

A01

IFN- γ -producing B cells induce the formation of gastric lymphoid follicles after *Helicobacter suis* infection

○山本幸司, 東健
神戸大・院医・消化器

【目的】*Helicobacter (H.) suis* is a Gram-negative bacterium that colonizes the stomachs of various animals including humans and can induce gastric mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma in 100% of C57BL/6J mice. Recently, we found that the formation of gastric lymphoid follicles was strongly induced in the stomachs of *H. suis*-infected C57BL/6J mice with the high expression level of interferon (IFN)- γ ¹⁾. In this study, the direct relationship between the up-regulation of IFN- γ and the formation of gastric lymphoid follicles after *H. suis* infection was investigated.

【方法】 Wild-type (WT) mice, IFN- γ knockout (KO) mice and T cell receptor β and δ double knockout (TCR $\beta\delta$ DKO) mice were infected with *H. suis* to detect the formation of gastric lymphoid follicles. IFN- γ -producing cells in *H. suis*-infected stomach were disclosed by adoptive cell transfer.

【結果】 At 6 months after *H. suis* infection, the formation of gastric lymphoid follicles consisting of B cells, CD4⁺ T cells, dendritic cells (DC), and follicular dendritic cells (FDC) were induced in WT mice but not in IFN- γ KO mice²⁾. The gastric lymphoid follicles formation was also observed in TCR $\beta\delta$ DKO mice as same as that in WT mice²⁾. The formation of lymphoid follicles and the up-regulation of IFN- γ were restored only in the stomachs of the IFN- γ KO mice that received WT B cell transfers but not DC and FDC transfers at 3 months after infection²⁾.

【考察】 IFN- γ -producing B cells evoked the gastric lymphoid follicles formation independent of T cell help, suggesting that they are crucial for the development of gastric MALT lymphoma after *Helicobacter* infection.

- 【文献】 1. Mimura T, et al., IFN- γ plays an essential role in the pathogenesis of gastric lymphoid follicles formation caused by *Helicobacter suis* infection. *FEMS Immunol Med Microbiol.* Oct;63(1):25-34. 2011.
2. Yang L, **Yamamoto K (equally contributed)**, et al., Interferon- γ -producing B cells induce the formation of gastric lymphoid follicles after *Helicobacter suis* infection. *Mucosal Immunol*, Mar;8(2):279-95. 2015.

A02

スキルス胃癌細胞に対する特異抗体が認識する抗原、
gp200 の精製について

○松山千容¹、大谷水景¹、玉木理衣^{1,2}、住吉大地¹、森愛弥¹、川上智也¹、
小池敦資¹、藤森功¹、柳原五吉^{1,3}、天野富美夫¹

¹大阪薬大・生体防御学、²神戸医療センター中央市民病院、

³国立がん研究センター東病院

【目的】スキルス胃癌は、胃癌の中でも早期診断が難しく、有効な治療法が確立されていない極めて悪性度の高い癌である。当研究室には、スキルス胃癌細胞株 HSC-39 細胞の膜分画を抗原としてウサギに免疫して得た、抗スキルス胃癌ポリクローナル抗体がある。この抗体は分子量約 200 kDa 付近の糖タンパク質を認識し、調べたスキルス胃癌細胞株は全て陽性だが、分化型腺癌には反応しないという特徴をもつ。しかし、この gp200 抗原分子の同定はできていない。従来の研究から、gp200 抗原は HSC-39 細胞の表面及び内膜系に分布し、また、HSC-39 等の細胞の培養上清中に遊離することが示された。本研究では、HSC-39 細胞培養上清中の抗原 gp200 が Exosome と思われる膜小胞の分画に存在することを示唆する知見を得たので報告する。

【方法】HSC-39 細胞を 0.1 % TX-100 含有 Lysis buffer を用いて抽出し、細胞抽出液とした。また、Exosome 分画は、細胞の培養上清を 0.45 μ m フィルターでろ過した後、 $\times 100,000g$ 、60 分間の超遠心によって分離し、沈殿に回収した。また、Microsome 分画は、HSC-39 細胞を Dounce 型ホモジナイザーで破碎し、核を除いた遠心上清を $\times 100,000g$ 、60 分間の超遠心によって分離をして得た沈殿とした。なお、膜からの gp200 抗原の可溶化には、0.1 %TX-100 を用いた。それぞれの分画の一定量を SDS-PAGE/Western blotting 法で解析し、gp200 抗原を検出した。さらに、Exosome 分画からの gp200 抗原の精製のために、同分画の凍結融解を繰り返し試みた。なお、SDS-PAGE したタンパク質の検出は CBB 染色法によって行った。

【結果】細胞抽出液と比較すると、Exosome 分画及び Microsome 分画により多くの gp200 抗原が分布した。しかし、CBB 染色法では gp200 抗原の位置にタンパク質が検出できなかった。このことから、用いた抗 gp200 抗体が非常に高感度に微量の糖鎖抗原を認識することが示唆された。一方、Microsome 分画を 0.1 %TX-100 で抽出したサンプルを抗 gp200 抗体で免疫沈降すると gp200 抗原が回収された。また、Exosome 分画の回収の際、 $\times 100,000g$ 超遠心による上清には gp200 抗原が検出されず、Exosome 分画に多くの gp200 抗原を回収されることが分かった。さらに、Exosome 分画を 0.1 %TX-100 で抽出し、 $\times 100,000g$ 超遠心で分画すると、gp200 は上清に回収されたことから、Exosome 膜内に gp200 が分布し TX-100 で溶出されることが示唆された。

【考察】HSC-39 細胞の培養上清中に、スキルス胃癌に特異的な抗原 gp200 が遊離され、その一部が Exosome と思われる分画に回収されることが示された。また、この Exosome 分画を 0.1 %TX-100 処理すると膜面分から上清に遊離されたことから、gp200 抗原は Exosome の膜内に埋まった状態で存在する可能性がある。今後は、抗 gp200 抗体を用いて Exosome 分画中の gp200 抗原の回収及び、それに続く精製を検討することにする。

A03

ヒトスキルス胃癌細胞株、HSC-39 細胞由来の 5-フルオロウラシル
及びシスプラチン耐性変異株の樹立について

○ 奥中真白¹, 玉木理衣^{1,2}, 小池敦資¹, 森重雄太¹, 藤森功¹, 柳原五吉^{1,3},
天野富美夫¹

¹大阪薬大・生体防御学, ²神戸医療センター中央市民病院,

³国立がん研究センター東病院

【目的】スキルス胃癌は早期発見が難しく、浸潤転移も早いため予後不良な癌である。標準的な化学療法として、フッ化ピリミジン系の薬剤とシスプラチン (CDDP) の併用療法が行なわれているが、奏効率は低い。その原因の一つとして、スキルス胃癌細胞の化学療法剤に対する耐性獲得があげられる。そこで、この薬剤耐性機構を解明し、有効性の高い治療法への改良を目的とし、本研究では、ヒトスキルス胃癌細胞 HSC-39 細胞から 5-フルオロウラシル (5-FU) 及び CDDP 耐性変異株の樹立を試みた。

【方法】HSC-39 細胞に変異導入剤であるエチルメタンサルホン酸 (EMS) を加え、2 日間培養した。細胞を洗浄した後、10 μ M の 5-FU または CDDP を含む培地で 2 日間培養し、続く 2 日間は薬剤を含まない通常培地で培養した。この操作を繰り返すことにより、薬剤存在下でも増殖する細胞を耐性変異株として得た。なお、耐性の評価には WST-1 アッセイならびに FACS 解析を用いた。

【結果】作製した耐性株における 5-FU 及び CDDP の感受性を調べた結果、1 回の EMS 処理で得られた耐性株は、5-FU に対して、50%および 10%までの阻害濃度を示す IC₅₀ が 5.3 倍、IC₁₀ が 5.0 倍以上、それぞれ野生株と比較して上昇した。また CDDP に対しては、IC₅₀ が 5.1 倍、IC₁₀ が 5.0 倍、それぞれ上昇した。さらに FACS 解析の結果、野生株では抗癌剤の添加により細胞周期が S 期の減少、G2/M 期に入る前で止まる傾向を示したが、耐性株では S 期の減少割合が少なかったものの細胞周期が完全には停止せず、細胞障害を起こしにくいことが分かった。

【考察】以上の結果より、作製した変異株は、野生株と比べて薬剤に対する感受性が低下し、約 5 倍程度の薬剤耐性を獲得していることが示唆された。今後、1 回の EMS 処理で得られた耐性株に対して 2 回目の EMS 処理を行ってより強い耐性株を選択するなど、より高濃度の薬剤に耐性を示す変異株の樹立を継続するとともに、耐性獲得機構の解明を目指す。

A04

ヒトスキルス胃癌細胞株、HSC-39細胞を用いた、
コラーゲンが薬剤耐性に及ぼす影響

○中代里美¹，玉木理衣²，柳原五吉³，小池敦資¹，天野富美夫¹
¹大阪薬大・生体防御，²神戸医療センター・中央市民病院，
³国立がん研究センター・東病院

【目的】我が国における主要ながんである胃癌は、近年の診断・治療法の改良により、部位別死亡割合が低下してきた。しかし、その中で、スキルス胃癌に関しては依然として予後不良で、5年生存率は現在約15%程度である。スキルス胃癌は低分化型の進行がんで、原発巣から腹膜播種、ならびにリンパ節を介した他の臓器への転移が早く、早期発見しにくい。そこで、浸潤転移の過程でのcollagen Type I, type IVとの相互作用を介し、スキルス胃癌細胞が薬剤感受性を変化させる可能性を検討した。

【方法】ヒトスキルス胃癌細胞株、HSC-39細胞¹⁾を10%FBS含有DMEMに懸濁して 2×10^5 cells/5 mL/dishとなるように対照及びcollagen Type I, type IVをコートした60 mmのシャーレにそれぞれ播き、37°Cで4日間、培養した。細胞を回収後、新鮮な培地を用い、 1×10^3 cells/0.1 mL/wellとなるように抗がん剤を含む培地に播いた。なお、対照及びcollagen Type I, type IVのシャーレで前培養した細胞は、それぞれ対応するcollagenをコートしたあるいは対照の96穴プレートに播いた。抗がん剤はスキルス胃癌の治療で使用される5-FUおよびCDDPを0, 0.1-100 μ Mを添加して、37°Cで4日間、培養した後、WST-1を加え、その還元能を測定した。

【結果】HSC-39細胞をシャーレで4日間培養後、対照群とcollagenコート群の間に顕著な細胞数の差は見られなかった。また、抗がん剤添加4日後、抗がん剤の高濃度領域では影響は見られなかったが、1 μ M以下の低濃度領域では、collagenをコートした場合には対照に比べて細胞の生残性が高かった。

【考察】以上の結果から、HSC-39細胞は細胞外基質によって化学療法剤に対する感受性が影響を受け、特に微量の抗がん剤に対する抵抗性を示すようになることが示唆される。この結果はまた、体内局所でcollagenと相互作用する可能性があるスキルス胃癌の化学療法においては、がん細胞が抵抗性を示して生残し、再増殖する可能性をも示唆する。したがって、この相互作用を抑制することは、スキルス胃癌の治療成績の向上につながる事が期待される。

【文献】 1. Yanagihara, K., Seyama, T., Tsumuraya, M., Kamada, N., Yokoro, K. (1991) *Cancer Res.* 56, 381-386

抗がん剤抵抗性に及ぼす Hsp105 α の核局在化の関与

○齊藤洋平, 山根鉄平, 島田雅史, 加藤圭穂, 久家貴寿, 中山祐治
京都薬大・生化学

【目的】 Hsp105 は、大腸がんや肺がんをはじめとする多くのがん組織で高発現が報告されている熱ショックタンパク質であり、がんの免疫療法におけるターゲットあるいは腫瘍マーカーとして注目されている。我々は、抗がん剤に対する細胞応答において Hsp105 の関与の解明を目指しており、本研究では、Hsp105 の細胞内局在について解析した。

【結果】 HeLa 細胞を種々の濃度 (0.1-5 $\mu\text{g/ml}$) のアドリアマイシン (ADR) で 24 時間処理すると、高濃度 (2 $\mu\text{g/ml}$ 以上) ではアポトーシス様の細胞死が観察され、この細胞死は Hsp105 ノックダウンにより増加した。Hsp105 には構成的に細胞質に発現する Hsp105 α とそのスプライシングバリエーションであり 42 $^{\circ}\text{C}$ 加温時において特異的に核に発現する Hsp105 β が存在する。ADR 処理により Hsp105 α の核内発現の増加が観察されたが、Hsp105 β の発現は観察されず、Hsp105 α の遺伝子導入においても核局在が観察された。また、核移行シグナル (NLS) 変異体では ADR 処理においても核局在が減少し、核外移行シグナル (NES) 変異体では ADR で処理しないにも関わらず核局在した。さらに、ADR 処理により核外輸送タンパク質である CRM1 の発現が低下した。

【考察】 ADR 処理により Hsp105 α が核局在し、その核局在には NLS が必須であることを明らかにした。また、ADR により CRM1 の発現が低下し、核外排出が減少した結果、Hsp105 α が核内に蓄積することが示唆された。これまで我々は、核に発現する Hsp105 β が Hsp70 の発現を増加させることを見出し、その発現調節メカニズムを明らかにしてきた^{1,4)}。ADR 処理により核に蓄積した Hsp105 α が、Hsp70 の発現を介して ADR 抵抗性に寄与することを予想しており、現在、Hsp105 α による Hsp70 発現誘導の可能性について検討している。

- 【文献】
1. Saito Y, Yamagishi N, Hatayama T, *J. Biochem.*, 145, 185-191, 2009.
 2. Yamagishi N, Fujii H, Saito Y, Hatayama T, *FEBS J.*, 276, 5870-5880, 2009.
 3. Saito Y, Yukawa A, Matozaki M, Mikami H, Yamagami T, Kuga T, Yamagishi N, Hatayama T, Nakayama Y, *Exp. Cell Res.*, 327, 163-170, 2014.
 4. Saito Y, Nakagawa T, Kakihana A, Nakamura Y, Nabika T, Kasai M, Takamori M, Yamagishi N, Kuga T, Hatayama T, Nakayama Y, *J. Cell. Biochem.*, in press.

A06

ヒト肺がん由来 A549 細胞を用いた 耐性度の異なる CDDP 耐性細胞の樹立とその特性

○和田諭可子¹, 堀部紗世¹, 中原諒子¹, 平沼朋子¹, 河内正二², 力武良行¹
¹神薬大・医療薬学, ²神薬大・臨床教育センター

【目的】がんの薬物療法は、新薬の開発が進み画期的な進歩をとげているにもかかわらず、依然としてがんを根治させることは困難である。その原因の一つに抗がん剤に対する耐性がある。したがって、がん治療成績の向上のためには、がん細胞が抗がん剤に対する耐性を獲得する機構を解明し、抗がん剤に対する耐性を克服できる薬を開発することが求められている。白金製剤であるシスプラチン (CDDP) は、肺がん、大腸がんや子宮頸がんなど様々な悪性腫瘍に対する化学療法として広く使用されている。CDDP に対しても耐性が生じるが、決定的な耐性獲得機構は依然として不明であり、CDDP 耐性克服薬は開発されていない。私どもは、これまで CDDP に対する耐性細胞を作製して解析してきたが、新たに、従来よりも耐性度の高い耐性細胞を樹立し、その生物学的特性について検討した。

【方法】ヒト肺がん由来 A549 細胞に、CDDP を持続的に接触させて段階的に濃度を上げて耐性度の異なる CDDP 耐性細胞 (ACR4 および ACR20 細胞) を樹立した。CDDP の殺細胞効果は WST8 アッセイで測定し、50%細胞増殖阻害濃度 (IC₅₀ 値) を算出した。細胞増殖能は、細胞播種直後から 7 日後まで培養した細胞をクリスタルバイオレットで染色して測定した。各細胞の細胞周期は血清不含有培地で 30 時間培養して同調化後、血清を添加してその 18 時間および 24 時間後の細胞周期を測定した。遊走能および浸潤能は Boyden chamber アッセイで評価した。上皮および間葉系マーカータンパク質および多分化能マーカータンパク質の発現はウエスタンブロットで評価した。

【結果】ACR4 および ACR20 細胞における CDDP に対する感受性は A549 細胞と比較してそれぞれ約 6 倍および約 18 倍低下した。A549 細胞、ACR4 および ACR20 細胞の doubling time はそれぞれ 18.6 時間、24.4 時間および 28.4 時間であった。また、血清添加後の S 期の進行は、A549、ACR4、ACR20 細胞の順で低下していた。さらに、遊走能および浸潤能は、A549 細胞、ACR4 細胞、ACR20 細胞の順に低下した。上皮系マーカータンパク質である E-cadherin の発現はいずれの細胞においても同程度であった。一方、間質系マーカータンパク質の N-cadherin の発現は、A549 細胞では観察されたが、ACR4 および ACR20 細胞では観察されなかった。さらに、多分化能マーカーである SOX2 の発現は、ACR4 細胞では A549 細胞と比較して増加していたのに対し、ACR20 細胞では減少していた。

【考察】ACR4 および ACR20 細胞で観察された細胞増殖の遅延は、細胞周期の進行の遅延が原因であると考えられた。CDDP に対する耐性度が高くなるにつれて遊走能および浸潤能が低下し、N-cadherin の発現が減少したことから、上皮間葉転換は亢進していないことが示された。また、CDDP に対する耐性度に応じて SOX2 の発現パターンが異なることが示された。このことより、SOX2 の発現変化と N-cadherin の発現減少が CDDP に対する耐性獲得に関与していることが示唆された。

A07

血清除去による Mac-2 binding protein の発現誘導と その生物学的機能の解析

○深谷莉紗子, 前川友裕, 高松真二, 鎌田佳宏, 三善英知
大阪大学大学院・医学系研究科・機能診断科学

【目的】

Mac-2bp (90K / LGALS3BP) は分泌型糖タンパク質であり、血中 Galectin-3 のリガンドであることが知られている⁽¹⁾。膵癌をはじめとする様々な癌で血中濃度が上昇することが知られている。その発現調節機構や生物学的機能に関しては未だ不明な点が多い。多くの癌細胞は乏しい血管新生により栄養飢餓・低酸素状態に陥っており、我々はこれらの環境下における Mac-2bp の発現調節機構および生物学的機能について検討することとした。

【方法】

細胞・・・Pan02 (マウス膵がん細胞株)、Liv SV40(WT) (不死化マウス肝細胞株)、BNL-CL2 (マウス肝細胞株)

① 栄養飢餓・低酸素環境下における Mac-2bp 発現量変化の検討

ほぼ confluent となった細胞を栄養飢餓状態で培養し、24 時間後に細胞から total RNA を回収し Real-time RT-PCR 法により Mac-2bp mRNA 量を測定した。また、細胞および上清からタンパク質を回収し濃縮した上で ELISA 法にて Mac-2bp 発現量を測定した。低酸素状態についても、Mac-2bp mRNA 発現量を同様に測定した。

② Mac-2bp とアポトーシスとの関連性の検討

ほぼ confluent の Pan02 を栄養飢餓状態もしくは低酸素状態にし、同時に Mac-2bp を豊富に含む Conditioned Medium(CM) を medium に添加した。6, 24, 48 時間後に細胞を回収し、アネキシン V [BioLegend San Diego, CA] および 7-AAD [BD Bioscience] で染色し、フローサイトメーター (BD FACS Calibur) によりアポトーシス細胞の割合を測定した。

【結果】

① 栄養飢餓状態では Pan02、Liv SV40 ともに Mac-2bp mRNA 発現量は上昇し、タンパク発現はすべての細胞で上昇が確認された。低酸素状態では Mac-2bp mRNA 発現量は Pan02 は上昇し、Liv SV40(WT)、BNL-CL2 では低下した。

② 栄養飢餓状態、低酸素状態ともに、Pan02 のアポトーシス細胞の割合は、CM を添加することにより減少していた。

【考察】

がんでは細胞の増殖スピードに血管新生が追い付かず、その結果栄養や酸素が欠乏する。一般的にがん細胞はこのような環境に適応しアポトーシスを回避するために、タンパク質の合成を活性化することが知られている。本研究の実験結果より、栄養飢餓・低酸素状態に晒されると、がん細胞において Mac-2bp 発現誘導が起こり細胞のアポトーシスを抑制する可能性が示唆された。

【結語】

血清除去によって誘導される Mac-2bp はアポトーシスを抑制する可能性がある。

A08

RSK による EphA2 のリン酸化とグリオブラストーマ細胞の増殖制御

○濱岡 裕穂¹, 根岸 学^{1,2}, 加藤 裕教^{1,2}

¹京都大・院薬・神経機能制御学, ²京都大・院生命・生体システム学

【目的】チロシンキナーゼ型受容体ファミリーに属する EphA2 は、膜結合型リガンドである ephrinA1 によって細胞内のチロシンキナーゼが活性化され、発生過程における上皮細胞の位置決定などに重要な役割を果たしている。一方、様々な上皮組織由来のがん細胞において EphA2 の過剰発現が見られ、EGF などの growth factor の刺激によって EphA2 の 897 番目のセリン (S897) がリン酸化を受けることが報告されており、S897 のリン酸化とがん細胞の浸潤性との関連が指摘されている。今回我々は、EphA2 の S897 のリン酸化とがん細胞の増殖への影響について、EphA2 の発現が高いとされるグリオブラストーマ細胞を用いて検討を行った。

【方法】グリオブラストーマ細胞へのプラスミドの導入は、polyethyleneimine MAX を用いて行った。グリオブラストーマ細胞の増殖は、MTT アッセイ及び bromodeoxyuridine (BrdU) の核内への取り込みによって検討した。EphA2 の S897 のリン酸化は、anti-S897 phospho-EphA2 抗体を用いてウェスタンブロッティングにより検出した。

【結果】EphA2 は、リガンドである ephrinA1 を長時間処理すると細胞内へ取り込まれて分解され、発現が抑えられる。このときグリオブラストーマ U-251 細胞の増殖を調べたところ、ephrinA1 の長時間処理により、EGF 刺激によるグリオブラストーマ U-251 細胞の増殖が抑制された。この結果は EphA2 の shRNA を用いたノックダウンによっても確認された。グリオブラストーマ U251 細胞において、EGF 刺激により EphA2 の S897 のリン酸化が見られるが、このリン酸化は MEK の inhibitor で抑制されることを我々は見出した。このことから、EphA2 の S897 のリン酸化が MAP キナーゼカスケードの下流で起こっている可能性が考えられた。次に、ERK の下流で働く RSK の inhibitor を用いたところ、EGF による EphA2 の S897 のリン酸化は抑制された。さらに、RSK2 を過剰発現させると、EphA2 の S897 のリン酸化が起こることがわかった。これらのことから、U251 細胞では EphA2 の S897 のリン酸化は、ERK の下流で働く RSK により引き起こされることが示唆された。そこで、EGF 刺激によるグリオブラストーマ U-251 細胞の増殖における RSK の関与について調べたところ、RSK の阻害剤や shRNA によるノックダウンによって増殖が抑制され、逆に RSK2 の過剰発現によって促進された。また RSK2 の過剰発現による増殖促進は、RSK によりリン酸化を受けない EphA2-S897A 変異体の発現により抑制された。

【考察】以上の結果から、U251 細胞において EGF 刺激により MAP キナーゼカスケードが活性化され、その下流で働く RSK により EphA2 の S897 のリン酸化が起こり、U251 細胞の増殖が促進することが示唆された。

優秀発表賞候補者演題

A09

VEGF-A/NRP1 シグナルの障害はがん細胞の増殖と転移を抑制する

○ 山根銀平¹, 吉田亜佑美², 清水昭男³, 門之園哲哉⁴, 近藤科江⁴,
Michael Klagsbrun⁵, 瀬尾美鈴^{1,5}

¹京産大・総合生命・生命システム, ²国循・分子病態, ³滋賀医大・分子病態,
⁴東工大・生命理工学, ⁵Children's Hospital Boston, Harvard Medical School

【目的】がん細胞は、血管内皮増殖因子(VEGF-A)を分泌し、自身の発現する VEGF-A 受容体ニューロピリン 1(NRP-1)に結合することで細胞増殖と転移を促進する¹⁾。新しい抗がん剤開発のために、VEGF-A 結合によって活性化される NRP-1 の下流シグナル伝達経路を阻害し、その効果を検証した。我々は、抗腫瘍効果を示す新しい戦略としてがん細胞が発現する NRP-1 の細胞内領域から伝達されるシグナルを抑制しようとした。

【方法】悪性ヒト皮膚がん細胞株 DJM-1、前立腺がん株 PC3M、Glioblastoma の U87MG 細胞を *in vitro* 評価で用いた。VEGF-A、NRP1、GIPC1 および Syx のタンパク質発現抑制には siRNA を用いた。がん細胞の増殖、生存能（コロニー形成能）は soft agar assay を用い、浸潤能は transwell assay system を用いた。VEGF-A/NRP1 シグナルの解析は共免疫沈降法およびウェスタンブロットを用いた。GIPC1/Syx 間の結合を阻害するターゲットペプチドには HIV ウイルス由来の TAT (Trans-Activator of Transcription Protein) 配列を結合させ、膜透過型となるよう設計した。*in vivo* において U87MG 細胞をヌードマウスの右肩皮下に腫瘍を形成した。腫瘍形成後、ターゲットペプチドおよびスクランブルペプチドを 2 日に 1 回、腹腔内投与(240 μ g/mouse)し、ターゲットペプチドの抗腫瘍効果およびリンパ節転移に対する抑制作用を評価した。

【結果】VEGF-A または NRP-1 の発現を siRNA でノックダウンしたところ DJM-1、PC3M および U87MG 細胞の増殖と浸潤を抑制した。VEGF-A が NRP-1 に結合すると NRP-1 の細胞内領域に結合する足場タンパク質 GIPC1 と Syx の複合体形成が促進された。GIPC1 と Syx の発現を siRNA でノックダウンすると DJM-1、PC3M および U87MG 細胞の増殖と浸潤を抑制した。GIPC1 と Syx の結合を阻害するターゲットペプチドはこれらのがん細胞の増殖と浸潤を抑制した。In vivo 評価においてターゲットペプチドはスクランブルペプチドと比較して腫瘍成長を約 50%抑制した。また、リンパ節への転移を評価したところ、透過性ペプチドは近位のリンパ節転移を抑制しなかったが、遠位のリンパ節転移をスクランブルペプチドと比較して約 70%抑制した。

【考察】GIPC1/Syx 複合体形成を阻害するペプチドは *in vitro* および *in vivo* モデルでがん細胞の増殖、浸潤能を抑制した。したがって、NRP1 の下流シグナル伝達分子はがん治療標的として期待できる。

【文献】

1. Yoshida A, Shimizu A, Asano H, Kadonosono T, Kondoh SK, Geretti E, Mammoto A, Klagsbrun M, Seo MK. (2015) Biol. Open. 4, 1063-1076

A10

脂質型 CA19-9 の膜輸送に関わる 新規キャリア候補タンパク質 CABIN の機能解析

○赤松佑香, 浅澤瞳美, 峰平朋美, 澤登温子, 小泉百花,
魚住尚史, 高松真二, 鎌田佳宏, 三善英知
大阪大学大学院医学系研究科 機能診断科学講座

【目的】膵癌の腫瘍マーカーとして広く用いられている CA19-9 (Carbohydrate Antigen 19-9, Sialyl Lewis A) は、偽陽性を示すことが臨床上的の問題である。CA19-9 のキャリア分子として、古くから糖タンパク質型と糖脂質型の存在が知られており、糖タンパク質型としては MUC4 などの高分子ムチンが挙げられる。一方で、糖脂質型の CA19-9 の解明は未だ進んでいない。我々は先行研究において、ヒト胆汁中でカゼインに結合する脂質膜複合体を精製・解析し、この複合体が脂質型 CA19-9 の新規キャリア候補であり、また膵癌患者血清中で特異的に検出されることを発見した。CABIN (CAsein Binding domain integral protein with golgIN motif, KIAA0650) は、LC-MS による解析から、この脂質膜複合体に含まれるタンパク質として同定された。我々は、CA19-9 の膜輸送に関わる新規キャリア候補である CABIN に注目し、細胞に CABIN を導入することで蓄積される顆粒の機能解析を行った。

【方法】1. 8 種類の膵癌細胞株 (Panc1/PK45/PSN-1/PCI-6/Miapaca2/KMP4/Capan1/BxPC3) の Whole Cell Lysate を用いた Western blot を行い、CABIN の発現量を調べた。
2. CABIN の N 末端を含む 6 種類の pEGFP フュージョン蛋白質発現ベクター (NCAB-GFP) を作製し、Lipofectamine 法によって HEK293T に導入し、細胞内での発現を共焦点顕微鏡で観察した。
3. CABIN の N 末端を認識する抗 NCAB-2J マウスモノクローナル抗体を作製し、その有用性を検討した。
4. 高分子ムチンである MUC4 抗体を用いた Western blot と抗 CA19-9 抗体を用いた ELISA を行い、NCAB-GFP 導入有無による糖タンパク質と糖脂質上の CA19-9 を定量した。また、NCAB-GFP を膵癌細胞に導入した後、経時的に顆粒が蓄積する様子を細胞免疫染色法にて検討した。
5. 細胞内に蓄積した顆粒を抗 NCAB-2J 抗体カラムを用いて精製し、その顆粒に含まれるタンパク質を質量分析法で同定した。

【結果】1. ヒト胎児腎細胞株 HEK293T と比較し、膵癌細胞株では CABIN が多く発現していた。
2. CABIN の N 末端側には、細胞質に顆粒を蓄積させる生物学的機能があることがわかった。
3. NCAB-GFP を導入することで蓄積する顆粒と抗 NCAB-2J 抗体は細胞内で共局在した。
4. NCAB-GFP を膵癌細胞株に導入することで経時的に細胞質に蓄積する顆粒には、CA19-9 が含まれていた。
5. 精製してきた顆粒に含まれる Rab family タンパクとして、Rab7a や Rab11b が同定された。

【結論】 CABIN の N 末端側を細胞に導入することで蓄積する顆粒は、CA19-9 を含む特定の膜輸送に関わる細胞内小器官である可能性が示唆された。

A11

エクソソームの細胞内取り込み能と

レシピエント細胞のカベオリン-1 発現との関連

○田中一也¹, 堀部紗世¹, 清田実希¹, 松尾杏奈¹, 河内正二², 力武良行¹
¹神薬大・医療薬学, ²神薬大・臨床教育センター

【目的】エクソソームは、さまざまな種類の細胞から分泌され、生体内の体液中に存在する直径 30~100 nm の膜小胞である。エクソソームは、分泌する細胞（ドナー細胞）由来の miRNA、mRNA、タンパク質等の細胞機能を制御する分子を内包して、エクソソームを受容する細胞（レシピエント細胞）にその情報を伝達する。エクソソームは、がんや神経変性疾患の進行に関与し、エクソソームの取り込み阻害は、がんや神経変性疾患の進行の抑制につながる可能性がある。しかし、エクソソームがどのようなメカニズムで細胞内に移行し、ドナー細胞の情報を伝達するかは不明である。本研究では、エクソソームの細胞内移行メカニズムを明らかにするために、レシピエント細胞に依存したエクソソームの取り込み能と取り込みに関与する分子の発現について検討した。

【方法】ヒト肺がん由来 A549 細胞、ヒト大腸がん由来 HCT116 および COLO205 細胞を用いた。エクソソームは各細胞の培養上清から Total Exosome Isolation (Invitrogen)、ExoQuick-TCTM (System Biosciences) あるいは超遠心を用いて精製した。エクソソーム中のエクソソームマーカータンパク質である CD63、CD9、CD81 および HSP70 の発現をウェスタンブロットにより確認した。エクソソームの取り込み能は、DiO 標識したエクソソームを各細胞に 3 時間取り込ませて蛍光顕微鏡で観察し、ImageJ (NIH) で解析した。さらに、各細胞におけるエンドサイトーシス関連分子であるクラスリンおよびカベオリン-1 の発現は、ウェスタンブロットにより検出した。

【結果】各細胞の培養上清から超遠心で精製したエクソソームでは、CD63、CD9、CD81 および HSP70 が検出された。他の細胞と比べて、CD63 と CD9 は COLO205 細胞に、HSP70 は A549 細胞に最も多く存在した。CD81 は、いずれの細胞にも同程度に存在した。また、ドナー細胞とレシピエント細胞が同じ細胞の時には、DiO 標識したエクソソームは、細胞内に取り込まれた。ドナー細胞とレシピエント細胞が異なる細胞の時には、DiO 標識した各細胞由来のエクソソームの取り込みは、HCT116、A549、COLO205 細胞の順に減少した。さらに、クラスリンの発現は、COLO205 細胞と比較して A549 および HCT116 細胞では減少した。一方、カベオリン-1 の発現は、COLO205 細胞ではほとんど認められず、A549 細胞と比較して HCT116 細胞でより多く発現していた。

【考察】エクソソームのマーカータンパク質は、ドナー細胞によって発現パターンが異なることが示された。また、エクソソームの細胞内取り込み能は、ドナー細胞によって規定されるのではなく、レシピエント細胞によって規定されており、さらにレシピエント細胞におけるカベオリン-1 の発現と相関していることが示唆された。

A12

低温菌 *Shewanella livingstonensis* Ac10 の菌体外膜小胞の特性と エイコサペンタエン酸が小胞形成に与える影響の解析

○横山文秋¹, 川本純¹, 今井友也², 小川拓哉¹, 栗原達夫¹

¹京都大学化学研究所, ²京都大学生存圏研究所

【目的】 これまでにグラム陰性細菌、グラム陽性細菌の多くで、膜小胞 (MV) の分泌が確認されている。MV は細菌の生存に重要な影響を与えることが示唆されており、MV の生理的役割の解析が進められている。その対象の多くが病原性細菌であり、非病原性細菌についての研究報告例は比較的少ない。本研究では、南極海水由来の低温菌 *Shewanella livingstonensis* Ac10 が生産する MV の特性を解析した。本菌は、低温条件下で高度不飽和脂肪酸であるエイコサペンタエン酸 (EPA) を生産し、EPA の欠損は低温での細胞分裂や増殖に支障をきたすことから、本菌の低温環境適応に重要な分子であることがわかっている。本菌が生産する MV の形態および生化学的特性を明らかにするとともに、MV 形成と EPA 産生との関連について解析した。

【方法】 4 °C で定常期まで培養した *S. livingstonensis* Ac10 の培養上清から MV を回収した。透過電子顕微鏡、極低温透過型電子顕微鏡、動的光散乱 (DLS) 法により MV の形態を観察し、平均半径を算出した。MV を SDS-PAGE に供し、検出されたタンパク質バンドをペプチドマスフィンガープリンティングによって同定した。MV を構成するリン脂質画分を Bligh-Dyer 法により抽出し、メチルエステル化した後に、GC-MS に供することで脂肪酸組成を解析した。MV 生産量は、脂溶性蛍光分子 FM4-64 の蛍光強度によって算出した。EPA の有無が MV 生産におよぼす影響を解析するために、*S. livingstonensis* Ac10 の EPA 欠損株が生産する MV についても同様に解析した。

【結果】 電子顕微鏡観察と DLS 解析から、*S. livingstonensis* Ac10 が生産する MV の多くは平均直径約 100 nm で一重膜によって構成されていることが示された。また、二重膜を有しているものや MV が連結している構造のものなど、多様な構造を有する MV の存在が明らかとなった。本菌の MV のタンパク質組成は、菌体とは異なっており、2 つの外膜タンパク質 (FlgL、Omp176) および 2 つの内膜タンパク質 (LysR、機能未知タンパク質) が MV に濃縮されていることがわかった。GC-MS による脂肪酸組成解析の結果から、野生株の MV では細胞で最も豊富に含まれるパルミトレイン酸の含量が 5 % 以下と低く、逆にパルミチン酸は細胞よりも多く、約 25 % を占めていた。EPA は細胞中の全脂肪酸の 2 % 程度であるのに対して、MV では全脂肪酸の約 13% が EPA で占められていた。EPA の欠損は MV 生産量を 5 倍増加させ、野生株と比較して MV に内包される Omp176 が増加することがわかった。

【考察】 *S. livingstonensis* Ac10 は、低温環境下で直径約 100 nm で一重膜構造を有する MV を生産することが示された。一方で、多様な構造を有する MV も確認された。本菌の MV には外膜タンパク質以外に内膜タンパク質と推定される膜タンパク質が含まれていたことから、本菌は外膜・内膜成分を MV に輸送する仕組みを有していることが示唆された。一般に、グラム陰性細菌の MV は主に飽和脂肪酸で構成されることが報告されている。しかし本菌の MV は EPA 含量が細胞よりも高かった。EPA の欠損は本菌の MV のタンパク質組成や生産量に影響したことから、本菌の MV 生産に EPA が関与していることが示唆された。

A13

Free glycosylphosphatidylinositols are abnormally accumulated on the cell surface of GPI transamidase defective mammalian cells

○Yicheng Wang, Tetsuya Hirata, Yusuke Maeda, Yoshiko Murakami,
Taroh Kinoshita

WPI iFReC and Research Institute for Microbial Diseases,
Osaka University, Osaka, Japan

[Objective] Glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchoring is a ubiquitous post-translational modification of many proteins expressed on the surface of eukaryotic cells¹). After GPIs are attached to proteins by transamidase (GPIT), inositol-linked acyl chain of GPI-anchored protein (GPI-AP) is removed by PGAP1 and the second mannose (Man)-linked ethanolamine phosphate (EtNP) is removed by PGAP5 before exit from the endoplasmic reticulum (ER). Fatty acid chains of GPI-APs are remodeled by PGAP3 and PGAP2 in the Golgi¹). Non-protein linked GPIs or free GPIs expressed on mammalian cell surface was reported over two decades ago²), while the details of mammalian free GPIs are still remaining vague for lack of probes. When the ER-localized GPIT is defective, proteins to be GPI-anchored are degraded whereas a fate of GPIs is unclear. We aim to clarify the latter.

[Methods] Free GPIs were analyzed by fluorescence-activated cell sorting (FACS) method and Western blotting using T5 monoclonal antibody (mAb). Some protein-linked GPIs have *N*-acetylgalactosamine (GalNAc) side-branch attached to the first Man. The GalNAc may be elongated by galactose and sialic acid¹). T5 mAb is known to bind to Man-linked GalNAc of GPI-anchor but loses its affinity if galactose is attached.

[Results] T5 mAb stained wild-type Chinese hamster ovary (CHO) cells only weakly due to galactose capping whereas it strongly stained CHO-Lec8 cells defective in UDP-galactose transporter, hence GalNAc is not capped (Hirata's unpublished observation). Here, we present that CHO cells defective in GPIT subunits lose the cell surface GPI-APs, instead, abnormally accumulate free GPIs modified with GalNAc as the side branch. Western blotting with T5 mAb also demonstrated the accumulation of free GPIs in PIGT-defective cells. The free GPIs were completely lost when GPIT defective cells were treated with PI-PLC, which specifically cleaves GPI-anchors, indicating that almost all free GPIs modified by GalNAc in PIGT-defective cells were on the cell surface. Since inositol-acylated GPIs are resistant to PI-PLC, this result also indicates that inositol-linked acyl chain present in GPI precursor was removed by PGAP1 in the ER. The second Man-linked EtNP of free GPI was removed by PGAP5, because PIGS & PGAP5-deficient cells were negative for staining with T5 mAb. Unlike GPI-APs, some of free GPIs in GPIT defective cells were found in detergent soluble membrane fraction. The structural analysis of free GPIs by Mass spectrometry is needed.

[Conclusion] Overall, our current findings indicate that free GPIs in GPIT defective mammalian cells are exported to the plasma membrane and accumulated on the cell surface. On the way, free GPIs are structurally remodeled and modified by GalNAc-side branch like GPI-APs. Functional significance of the cell surface free GPIs in mammalian cells needs to be clarified.

[References] 1. Kinoshita, T., Fujita, M. (2016) *J. Lipid. Res.* 57, 6-24
2. van't Hof, W., Rodriguez-Boulant, E., Menon, A. K. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 24150-24155

A14

**PGAP6 is involved in shedding of GPI-anchored protein, CRIPTO,
which regulates Nodal signaling.**

○Gun-Hee Lee¹, Morihisa Fujita², Yoshiko Murakami¹, Noriyuki Kanzawa¹,
Yusuke Maeda¹, Taroh Kinoshita¹

¹WPI Immunology Frontier Research Center and Research Institute for Microbial Diseases,
Osaka University, ²School of Biotechnology, Jiangnan University

(Objective) Shedding of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins (GPI-APs) from the cell surface by GPI cleaving enzymes has two potential biological effects: removal of inhibitory GPI-APs and function of released proteins at remote sites¹⁾. The latter example has not been demonstrated. We aim to identify a new GPI cleaving enzyme.

(Methods) As a candidate GPI cleaving enzyme, we chose PGAP6, a member of a putative transmembrane hydrolase superfamily, to which PGAP3 belongs. The released GPI-APs were analyzed by TritonX-114 partitioning, mass spectrometry and hydrophobic chromatography. The activity of released CRIPTO as a Nodal co-receptor was determined using HEK293T cells expressing a Nodal-responsive luciferase reporter, ALK4 and FAST2.

(Results) Overexpression of PGAP6 decreased the surface expression of some GPI-APs. Especially, CRIPTO was highly sensitive whereas its close homologue CRYPTIC was resistant. In human embryonic carcinoma NTERA2 cells, PGAP6 and CRIPTO were expressed endogenously, and CRIPTO was secreted continuously, which was almost completely inhibited by knockdown of PGAP6. The CRIPTO released by PGAP6 was active as a Nodal co-receptor. Cell-autonomous CRIPTO activity was reduced when PGAP6 was expressed. A model GPI-AP secreted from PGAP6-expressing cells was a product of phospholipase D cleavage whereas one still associated with the cells had lyso-GPI. From PGAP6-expressing cells, CRIPTO bearing lyso-GPI was secreted and then cleaved by phospholipase D.

(Discussion) We conclude that PGAP6 is a GPI-specific phospholipase A2 that selectively secretes CRIPTO. PGAP6 likely recognizes both GPI moiety and protein structure of CRIPTO. CRIPTO released by PGAP6 may act non-cell-autonomously in Nodal signaling during embryogenesis.

(Reference) (1) Fujita M and Kinoshita T (2012) *Biochem. Biophys. Acta* 1821(8):1050-1058.

「観るだけでわかるタンパク質間相互作用解析法」の開発と
 繊毛内タンパク質輸送複合体 IFT-B の構築様式の解明

○加藤洋平, 寺田将也, 中山和久
 京大・院薬・生体情報

【目的】細胞内のタンパク質には単独で働くものと、複数のタンパク質が組み合わさって働くものがある。多数のタンパク質から構成されるマルチサブユニット複合体は、単独のタンパク質では成しえない複雑な機能を担っている。タンパク質間相互作用の解析には酵母2ハイブリッド法、GST プルダウン法、共免疫沈降法などが用いられているが、これらは主に1対1のタンパク質間相互作用を調べるのに適した方法であり、複数のタンパク質が関与する複雑なタンパク質間相互作用を調べることは困難である。そこで本研究では、マルチサブユニット複合体における複雑なタンパク質間相互作用を解明するための新たなアッセイ法を開発することと、その手法を用いて繊毛内タンパク質輸送複合体 IFT-B の構築様式を解明することを目的とした。

【方法】観るだけでわかるタンパク質間相互作用解析法 (Visible immunoprecipitation (VIP)アッセイ) の開発¹⁾。GFP 融合 IFT-X と RFP 融合 IFT-Y を細胞に発現させ、GST 融合型抗 GFP-Nanobody (Nanobody はアルパカ由来の単鎖抗体) とグルタチオンビーズで免疫沈降し、ビーズを蛍光顕微鏡で観察した。GFP 融合 IFT-X に RFP 融合 IFT-Y が結合する場合にはビーズが赤く光り、結合しない場合には光らないため、ビーズを顕微鏡で観るだけでタンパク質間相互作用の検出が可能である (図1)。

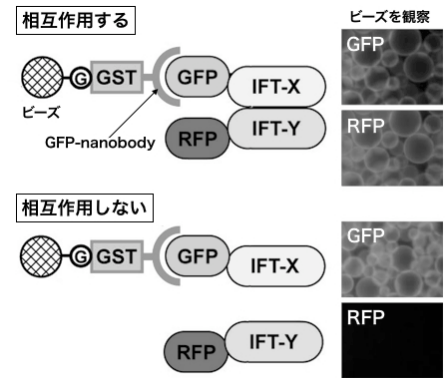


図.1 VIPアッセイの原理

【結果と考察】まず、IFT-B 複合体を構成する既知の 14 サブユニット、および 2 つの候補タンパク質 (Cluap1 と TTC26) の合計 16 種類の GFP および RFP 融合発現ベクターを構築した。次に、全サブユニット間の総当たり (16 × 16 = 256 通り) の VIP アッセイによる網羅的なタンパク質間相互作用解析を行った。さらに複数のサブユニットを組み合わせ、1:2 や 2:2 のタンパク質間相互作用も解析した。これらの結果から、IFT-B 複合体は 10 サブユニットのコアサブ複合体、および 6 サブユニットのペリフェラルサブ複合体から成るといふ全体の構築様式が判明した。また、これまでにサブユニットかどうかもわからなかった Cluap1 は IFT20 と IFT80 に結合し、TTC26 は IFT46 と結合し、それぞれペリフェラルサブ複合体とコアサブ複合体の構成サブユニットであることが判明した²⁾。

VIP アッセイは単純な 1 対 1 の相互作用から複雑な多対多の相互作用まで、多様な解析に用いることができるため、IFT-B 複合体だけでなく様々なタンパク質複合体の構築様式を解明するために応用可能である。

- 【文献】
1. Katoh, Y., Nozaki, S., Hartanto, D., Miyano, R., and Nakayama, K. (2015). Architectures of multisubunit complexes revealed by a visible immunoprecipitation assay using fluorescent fusion proteins. *J. Cell Sci.* **128**, 2351–2362.
 2. Katoh, Y., Terada, M., Nishijima, Y., Takei, R., Nozaki, S., Hamada, H., and Nakayama, K. (2016). Overall architecture of the intraflagellar transport (IFT)-B complex containing Cluap1/IFT38 as an essential component of the IFT-B peripheral subcomplex. *J. Biol. Chem.* in press.

優秀発表賞候補者演題

A16

KIF17 と IFT 複合体の相互作用様式の解明と繊毛内輸送における役割

○ 船橋輝記, 加藤洋平, 中山和久
京大・院薬・生体情報

【目的】動物のほぼ全ての細胞に存在する繊毛は、様々な外部シグナルを受容するセンサーとして機能する。繊毛の形成不全や機能異常は、繊毛病と総称される多様な遺伝性疾患を引き起こす。繊毛に局在するタンパク質の繊毛内への輸送、および繊毛内での輸送を担うタンパク質複合体として IFT-B 複合体と IFT-A 複合体がある。IFT-B 複合体はキネシンと共役して繊毛内の順行輸送を、IFT-A 複合体はダイニンと共役して逆行輸送を媒介する。しかし、キネシンやダイニンが IFT 複合体とどのように相互作用してタンパク質輸送を調節するのかは不明である。私たちはキネシンと相互作用するサブユニットを同定して、IFT 複合体による繊毛形成や繊毛内タンパク質輸送の分子基盤を明らかにするために、IFT-B 複合体に結合すると言われているキネシンのうちで KIF17 に着目した。

【方法・結果】私たちの研究室では、従来の方法では困難であった多数のサブユニットからなる複合体の構築様式でも簡単に調べることのできる VIP (visible immunoprecipitation) アッセイを開発し、16 サブユニットからなる IFT-B 複合体の構築様式の全容を解明している¹⁾。まず、VIP アッセイを用いて IFT-B のどのサブユニットが KIF17 と相互作用するのに必要なかを網羅的に調べた。その結果、KIF17 は IFT-B 複合体のどのサブユニットとも 1:1 では相互作用せず、IFT46 と IFT56 のヘテロ二量体に結合することが分かった。さらに、この結合には KIF17 の C 末端領域が必要であることが分かった。この領域には KIF17 が拡散障壁を越えて細胞質から繊毛内へと移行するために必要なシグナル配列が存在するが、IFT 複合体はこのシグナル配列とは別の領域に結合した。また、IFT-B 複合体と相互作用できない変異型 KIF17 (KIF17(R1000A,R1003A)) を作製して、その細胞内局在を調べたところ、野生型 KIF17 は繊毛の先端に蓄積するのに対して、KIF17(R1000A,R1003A)は一次繊毛に局在しなくなった。

CRISPR/Cas9 システムを用いて IFT56 ノックアウト(KO)細胞を作製したが、繊毛は野生型細胞と同様に形成され、IFT-B 複合体自体や繊毛内に局在する KIF17 以外のタンパク質の局在には変化が見られなかった。

【考察】今回の私たちの研究によって、KIF17 の C 末端領域が IFT46 と IFT56 のヘテロ二量体と結合することが明らかになった。さらに KIF17 が繊毛内へと輸送されるには、C 末端領域のシグナル配列に加えて、IFT-B 複合体との相互作用が必要であることが分かった。また、KIF17 は繊毛形成および IFT 複合体や他の多くのタンパク質の順行輸送には関与しないと考えられる。

今後は、IFT56 KO 細胞や KIF17 KO 細胞において、繊毛に局在する様々なタンパク質の局在を調べ、KIF17 と IFT 複合体の相互作用が繊毛内タンパク質輸送において果たす役割について詳細に解析をする予定である。

【文献】 1. Katoh, Y., Terada, M., Nishijima, Y., Takei, R., Nozaki, S., Hamada, H., Nakayama, K. (2016) *J. Biol. Chem.*, in press

A17

Rab11a は小腸において apical 膜タンパク質の局在を制御する

○前田 知美^{1,2}, 傍嶋 智明^{1,2}, 吉村 信一郎¹, 國井 政孝¹, 森脇 健太¹,
北野 真郷^{1,2}, 岩城 彩乃^{1,2}, 三善 英知², 原田 彰宏¹

¹ 阪大・院医・細胞生物, ² 阪大・院医・機能診断科学

【目的】小腸吸収上皮細胞は極性細胞として知られており、頂端面 (apical) と側底面 (basolateral) という組成や機能の異なる 2 つの膜領域を持つ。この細胞極性の破綻は様々な疾患を引き起こす原因となるが、その疾患の 1 つに微絨毛萎縮症と呼ばれる難治性疾患がある。微絨毛萎縮症の原因遺伝子はアクチンモータータンパク質 MyosinVb であり、細胞極性の破綻に加えて微絨毛の萎縮や微絨毛封入体と呼ばれる構造物が見られることでも知られている。Rab ファミリーは主に細胞内小胞輸送に機能するが、これに属する Rab8 や Rab11 は上述の MyosinVb に結合する分子として知られている。先行研究において、Rab8 ノックアウト (KO) マウスの小腸では apical タンパク質の局在異常や微絨毛の萎縮、微絨毛封入体が見られ、Rab8 KO マウスが微絨毛萎縮症様の表現型を示す事が報告されている。また、Rab11 は Rab8 と同様にリサイクリングエンドソーム (RE) と呼ばれる細胞内小器官に局在して RE を介した様々な輸送経路に機能することで知られるが、その一方で Rab11 が間接的に Rab8 の活性化にも関与することから、Rab11 が Rab8 や MyosinVb と機能的に相互作用して上皮細胞の極性形成を担う可能性がある。これまで Rab11 の上皮細胞極性への関与については培養細胞による知見のみであり、実際の生体内での知見は得られていない。そこで本研究では Rab11 ファミリーの 1 つである Rab11a の腸上皮特異的 KO マウスを作製し、生体内での Rab11 の上皮細胞極性への関与について検討した。

【方法】腸上皮特異的 Rab11a KO (Rab11a IKO) マウス (Villin-Cre; Rab11a^{flox/flox}) を作製し、出生・発育への影響や、腸上皮細胞における apical または basolateral タンパク質の分布およびタンパク発現量についての検討、電子顕微鏡による観察を行った。また、Rab8a KO マウスや微絨毛萎縮症患者の小腸を用いて Rab11 および Rab8 の局在についても検討した。

【結果】Rab11a IKO マウスでは明らかな発育不全および栄養飢餓 (血中ケトン体の上昇) と生存率の減少が見られた。IKO マウスの上皮細胞では apical タンパク質において basolateral 膜への局在化とリソソームへの蓄積が確認され、発現量に関する検討では IKO マウスにおいて apical タンパク質の発現量の減少と糖鎖修飾の変化 (分子量の増加) が確認された。一方で basolateral タンパク質については apical タンパク質のような局在変化および発現量減少は見られなかった。また、電子顕微鏡による観察から IKO マウスにおいて微絨毛の萎縮と微絨毛封入体を確認された。更に Rab8a KO マウスおよび微絨毛萎縮症患者の小腸上皮細胞における Rab11a や、Rab11a IKO マウスの上皮細胞での Rab8a は、コントロールに比してその局在が変化した。

【考察】Rab11a IKO マウスが微絨毛萎縮症様の表現型を示すことが明らかとなり、腸上皮細胞において Rab11a は apical タンパク質の局在および微絨毛の形成に重要であることが示唆された。Rab11a IKO マウスと Rab8 KO マウスでは apical タンパク質にのみ局在異常が見られ basolateral タンパク質には局在異常が見られないが、その一方で MyosinVb の変異により発症する微絨毛萎縮症では apical と basolateral のタンパク質のどちらにおいても局在異常が生じる。このことから MyosinVb/Rab11a/Rab8 依存性 apical 輸送と MyosinVb 依存性 Rab11a/Rab8 非依存性 basolateral 輸送が存在し、basolateral 輸送については別の Rab タンパク質が Rab11a/Rab8 の様に機能している可能性が考えられる。また、Rab8 KO マウスには見られず Rab11a IKO マウスにのみ見られた表現型として糖鎖修飾異常が確認された。この結果は Rab11 が局在している RE の新たな生物学的な意義解明につながるかもしれない。すなわち、本来糖鎖修飾の行われるトランスゴルジでの小胞輸送に Rab11 が関与する、あるいは RE 内で何らかの糖鎖修飾が行われるという可能性である。

プロテオグリカンの糖鎖修飾の転写を調節する
新規ゴルジ体ストレス応答経路の解析

谷口麻衣, 小森亮太, 奥田知穂, 田中隆也, 中川幸大, 濱田響,
佐々木桂奈江, 若林貞夫, 吉田秀郎
兵庫県大・院・生命理学

【目的】ゴルジ体ストレス応答とはゴルジ体の量を需要に応じて調節する機構である。これまでに、ゴルジ体ストレス時に転写因子 TFE3 が細胞質で脱リン酸化されて核に移行し、ゴルジ体の構造維持タンパク質や N 型糖鎖修飾に関わる酵素などの遺伝子の転写を誘導することを明らかにした (TFE3 経路)¹⁾。しかし、ゴルジ体の機能はさらに多岐にわたっているため、TFE3 経路以外のゴルジ体ストレス応答経路の存在が示唆される。プロテオグリカンは、グリコサミノグリカンが結合した糖タンパク質であり、皮膚の保湿や関節の潤滑だけでなく、細胞におけるシグナル伝達や神経の軸索再生など生体にとって極めて重要な役割を果たしていることが知られている。そこで、ゴルジ体における O 型糖鎖修飾の一つであるプロテオグリカンの糖鎖修飾酵素の発現を制御するゴルジ体ストレス応答経路 (ゴルジ体ストレス応答プロテオグリカン経路) を同定することを目的とする。

【方法】プロテオグリカンの糖鎖修飾を阻害することにより、プロテオグリカンの糖鎖修飾酵素の発現が上昇すると予想される。そこで、プロテオグリカンの糖鎖修飾阻害剤である xyloside で細胞を処理し、マイクロアレイ解析を行った。さらに、マイクロアレイで発現上昇が見られた遺伝子について、qRT-PCR を用いて発現上昇および TFE3 依存性について調べた。さらにこれらの遺伝子のプロモーター領域をルシフェラーゼ遺伝子につないで、転写制御配列の解析を行った。

【結果】xyloside で処理した細胞のマイクロアレイ解析を行った結果、コンドロイチン硫酸 (CSGALNACT2, CHST7) やヘパラン硫酸の糖鎖修飾酵素 (NDST2, GLCE, HS6ST1, HS3ST1) の発現が上昇することを明らかにした。またこれらの標的遺伝子の発現上昇は TFE3 に依存しないことを qRT-PCR を用いて明らかにした。さらにこれらの標的遺伝子のプロモーター領域をルシフェラーゼ遺伝子につないで細胞に導入し、xyloside で処理することにより、転写が誘導されることを明らかにした。さらにこれらのプロモーター領域の欠失変異体および点変異体の解析から、コンセンサス配列 (GGGCGG 様配列) を同定した。

【考察】以上の結果から、プロテオグリカンの糖鎖修飾酵素の発現を制御するゴルジ体ストレス応答経路は、TFE3 経路とは別の新規のゴルジ体ストレス応答経路であることが示唆された。

【文献】1. Taniguchi, M., Nadanaka, S., Tanakura, S., Sawaguchi, S., Midori, S., Kawai, Y., Yamaguchi, S., Shimada, Y., Nakamura, Y., Matsumura, Y., Fujita, N., Araki, N., Yamamoto, M., Oku, M., Wakabayashi, S., Kitagawa, H., Yoshida, H. (2015) *Cell. Struct. Funct.* 40, 13-30

A19

細胞外マトリクス **mindin** の分泌経路における **C-mannosyl** 化の作用
○上田佳奈¹, 井内陽子², 持田沙織³, 村田顕優³, 松井仁淑², 南方志帆²,
田尻道子⁴, 和田芳直⁴, 井原義人²
¹和歌山県医大・医・学部6年, ²和歌山県医大・医・生化, ³和歌山県医大・
医・大学院準備課程, ⁴大阪府立母子医療セ

【目的】細胞外マトリクス **mindin** は、monocyte、macrophage などの免疫細胞をはじめ、種々の組織で発現し、感染症や代謝性疾患などの制御に関与する分泌タンパク質である。F-spondin domain、thrombospondin type-1 repeat (TSR) の2つの機能ドメインからなるこのタンパク質は、TSRのW-X-X-WモチーフのはじめのTrpにmannoseがC-C結合によって付加(C-mannosyl化)しており、他の糖修飾をもたない。これまでに10種以上のTSR superfamilyのタンパク質のW-X-X-WモチーフについてこのC-mannosyl化が報告されているが、この糖修飾の機能についての情報は限定的である。そこで、**mindin** におけるC-mannosyl化の生理的意義の検討を行った。

【方法】マウス **mindin** のcDNAを肺total RNAより調製し、mycおよびHis-tagを融合した**mindin-wild type (WT)** 発現用プラスミドを作製した。C-mannosyl化を受けるTrpをPheへ変異導入し、非C-mannosyl化**mindin (mindin-mutF)** として実験に用いた。**Mindin** の分泌や細胞内局在、分子間相互作用、ケミカルシャペロンやproteasome阻害剤の作用などについて、Western blotting法、シヨ糖密度勾配遠心法、免疫蛍光法、免疫沈降法などを用いて検討した。野生型**mindin** のC-mannosyl化の確認には質量分析法を用いた。

【結果】COS7細胞に**mindin-WT** 発現プラスミドを導入すると、時間依存的に細胞外液の**mindin** が増加した。COS7細胞の細胞外液よりHis-tagを用いて精製した**mindin-WT** をトリプシン消化後にMALDI-TOF-MS、nanoESI-IT-MSによって分析したところ、W-X-X-WモチーフにおいてC-mannosyl化修飾を受けていた。一方、**mindin-mutF** は、WTと比較して細胞外液への分泌量が低く、細胞内への貯留が確認された。**Mindin-WT** が小胞体およびGolgi体に存在するのに対し、**mindin-mutF** は小胞体への局在が増加していることが免疫蛍光法により観察された。この結果はシヨ糖密度勾配遠心法によっても確認された。そこで、小胞体シャペロンの発現や**mindin** との相互作用を検討したところ、**mindin-mutF** の小胞体シャペロンとの相互作用の増加が観察された。一方ケミカルシャペロン処理によって**mindin-WT**、**-mutF** 両方の分泌が改善された。

【考察】以上の結果から、**mindin** のTSRにおけるC-mannosyl化は、このタンパク質のfoldingを促進する一方、小胞体シャペロンとの相互作用を抑制しGolgi体への移行を促すことが示唆された。

- 【文献】 1. Ihara, Y., Inai, Y., Ikezaki, M. (2011) *Trends Glycosci. Glyc.* 23, 1-13
2. Furmanek, A., Hofsteenge, J. (2000) *Acta Biochim. Pol.* 47, 781-9
3. Li, Y., et al. (2009) *EMBO J.* 28, 286-97

A20

カルレティキュリンはヒト絨毛細胞株 (HTR8/SVneo) において 細胞浸潤能に関与する

○山本円¹, 池崎みどり², 岩橋尚幸¹, 南條佐輝子¹, 井篁一彦¹, 井原義人²
¹和歌山県医大・医・産婦, ²和歌山県医大・医・生化

【目的】胎盤は母体と胎児を結び、児の生命を維持する非常に重要な臓器である。妊娠初期における胎盤形成の過程において絨毛外栄養膜細胞 (extravillous trophoblast, EVT) の浸潤が非常に重要な役割を果たす。EVT は母体の脱落膜内から子宮筋層の浅層に浸潤し、子宮壁の血管構造がEVTにより置換されることにより絨毛間腔へと流入する母体血液量が確保される。妊娠初期のEVTの浸潤が不十分であると胎盤形成不全となり妊娠高血圧症候群や胎児発育不全などの疾患をきたすと言われている¹⁾。EVTの浸潤機構のメカニズムはまだ不明な部分も多く、その解明は胎盤形成の生理的意義のみならず妊娠高血圧症候群などの疾患の病態解明にもつながる可能性がある。近年、妊娠とともに血中濃度が増加し、妊娠高血圧症候群に関与する分子としてカルレティキュリン (CRT) が報告された²⁾。しかし胎盤におけるその機能や生理的意義については未だ明らかでなく、今回 CRT の EVT 浸潤に果たす役割について検討した。

【方法】まずヒト胎盤組織とヒト不死化 EVT 株 HTR8/SVneo 細胞、絨毛癌細胞株 Bewo, Jar, JEG3 における CRT の発現の有無を Western blotting にて確認した。次に HTR8/SVneo 細胞にヒト CRT-shRNA 発現ベクターを導入し、CRT 低発現細胞株を作製した。CRT の発現抑制による細胞増殖能、浸潤能、および細胞外基質への接着能の変化について検討した。

【結果】ヒト胎盤組織、および4つの細胞株で CRT の発現を認めた。HTR8/SVneo 細胞において CRT 発現抑制は細胞浸潤能およびフィブロネクチンへの接着能を低下させた。これらの機序を解明するため、フィブロネクチンレセプターであるインテグリン (Itg) $\alpha 5\beta 1$ に着目し Itg の発現を評価した。CRT 低発現細胞において Itg $\alpha 5\beta 1$ のヘテロダイマーは形成していたものの、免疫蛍光染色では Itg $\beta 1$ の細胞膜への偏在が観察された。Western blotting では Itg $\beta 1$ がやや高分子化しており、Lectin blotting では DSA 結合 Itg $\beta 1$ が多く認められたことから、Itg $\beta 1$ の糖鎖修飾に変化があると考えられた。

【考察】ヒト胎盤組織において CRT の発現が認められた。HTR8/SVneo 細胞において CRT 発現抑制は浸潤能およびフィブロネクチンへの接着能を低下させた。CRT 発現抑制により Itg $\beta 1$ が Golgi 体を経て細胞膜表面で偏在していることから、細胞内での Itg $\beta 1$ の turn over が変化し、その機能に影響を及ぼしているものと考えられた。CRT は糖鎖を認識する分子シャペロンであり、糖鎖をもつ Itg $\beta 1$ の生合成や Itg 複合体の組み立てなどへの関与を介して EVT 細胞の基質接着能および浸潤能を調節している可能性が示唆された。

- 【文献】 1. Gerretsen, G., Huisjes, H.J., Elema, J.D. (1981) *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 88, 876-881.
2. Gu, V.Y., Wong, M.H., Stevenson, J.L., Crawford, K.E., Brennecke, S.P., Gude, N.M. (2008) *Mol. Hum. Reprod.* 14, 309-315

A21

メダカを用いた小胞体ストレス由来のアポトーシスの解析、 及びアポトーシス可視化メダカの作製

○陳炳碩, 石川時郎, 岡田徹也, 森和俊
京大・院理・生物物理

【目的】様々な生理的・病的な原因により小胞体のタンパク質品質管理能力が損なわれ、折りたたみに失敗したタンパク質が蓄積すると小胞体ストレスが発生する。細胞はこれに対し小胞体ストレス応答と呼ばれる機構を発動させ、小胞体恒常性の回復を試みるが、小胞体ストレスが解消出来ず恒常性が回復しない場合、アポトーシスを誘導する。これまでの小胞体ストレスに起因するアポトーシス誘導機構の解析は薬物により惹起したストレスを用いて行われて来た。しかし、この実験系では通常ではあり得ないレベルの強い小胞体ストレスが引き起こされ、様々な経路が応答してしまうため、小胞体ストレスに起因するアポトーシスの分子機構は明らかになっていない。

この問題を解決するため、本研究ではメダカを用いた個体レベルの実験系に着目し、生理的な小胞体ストレス由来のアポトーシスの解析を行うこととした。また、病的な小胞体ストレスを誘導させるため着目した Meigo 遺伝子の遺伝子破壊メダカ作製を行い、その解析を行うこととした。Meigo 遺伝子は小胞体膜に存在する8回膜貫通タンパク質をコードし、ショウジョウバエを用いた先行研究ではその欠損による小胞体ストレスの増加が確認されている¹⁾。また、生理的・病的な小胞体ストレス由来のアポトーシスの解析のため、FRET を利用した SCAT プローブを導入し、アポトーシスの可視化を試みた。

【方法】TALEN を用いて Meigo 遺伝子破壊メダカの作製を行い、遺伝子破壊系統の表現型の解析を行った。また、小胞体ストレス応答のマーカー遺伝子である BiP プロモーターの下流に EGFP を付加した系統を用いて Meigo 遺伝子破壊メダカの BiP の発現量を解析した²⁾。そして、小胞体ストレス応答因子の mRNA 発現量を qRT-PCR で調べた。次に、SCAT プローブを HCT116 細胞に導入し、小胞体ストレスによるアポトーシスの可視化を解析し、また、メダカ胚にも導入を行い、SCAT プローブ発現メダカの作製を行った。

【結果】Meigo 遺伝子破壊メダカは発生初期段階で心臓に異常が起き、全て致死となることが分かった。また、Meigo 遺伝子破壊メダカ胚では発生の進行と共に野生型と比べ BiP の発現量が明らかに増加していくことが観察された。そして、小胞体ストレス応答因子の mRNA 発現量も Meigo 遺伝子破壊メダカ胚では野生型に比べ増加していることがわかった。次に、SCAT プローブを細胞に導入した結果、小胞体ストレスに起因するアポトーシスの誘導による FRET 効果の変化が観察された。さらに、SACT プローブをメダカ胚に導入した結果、そのプローブの発現による蛍光が観察され、SCAT プローブ発現メダカの作製に成功した。

【考察】以上の結果から、Meigo 遺伝子破壊メダカ胚は発生段階で病的な小胞体ストレスが誘導され、それに起因するアポトーシスが誘導されると考えられる。特に、心臓で異常な表現型が生じることから、心臓の解析により小胞体ストレスに起因するアポトーシスの解析が可能になると期待される。また、SCAT プローブによるアポトーシスの可視化に成功したため、今後 SCAT プローブを導入したメダカを用いてメダカの発生段階で生じる生理的小胞体ストレスに起因するアポトーシスの解析を行う。さらに、Meigo 遺伝子破壊メダカとの解析を行い、病的な小胞体ストレスに起因するアポトーシスの解析も行う予定である。

- 【文献】 1. S. Sekine et al., (2013) *Nature neuroscience*. 16 (6), 683-91
2. T. Ishikawa et al., (2013) *Molecular biology of the cell*. 24 (9), 1387-95

遺伝学および化学的手法を用いた線虫精細胞の活性化機構の解析

○田島達也¹, 中村匠吾¹, 太田拳斗¹, 荒崎彩音¹

中西加純¹, 小川風太², 表 雅章², 西村 仁¹

¹ 撰南大・院理工・生命科学, ² 撰南大・院薬・医療薬学

【目的】線虫 (*C. elegans*) は *in vitro* で精細胞を精子へと活性化できるので、精子形成の研究に適したモデル生物である。線虫における精子形成では *spe-8* クラス遺伝子依存的または非依存的経路が活性化され、偽足（哺乳類精子のべん毛に相当）の伸長および細胞内の膜オルガネラ (MO, 哺乳類精子の先体に相当) と細胞膜の融合が起こる (図 1)。微生物由来の Pronase (Pron) および Proteinase K (ProK) は *in vitro* における精細胞活性化因子であるが (図 1), いずれも *spe-8* クラス遺伝子依存的経路を活性化する。

Calreticulin (CALR) および Calnexin (CANX) は互いに paralog の関係にある分子シャペロンとして知られている。線虫の場合, CALR 遺伝子 (*crt-1*) および CANX 遺伝子 (*cnx-1*) が生殖に関与していることが示唆されているが, それらの精子形成への関与は全く不明である。一方, *in vitro* で精子形成を再現できる線虫の利点を生かすため, 我々は化合物ライブラリーをスクリーニングして, 精細胞の活性化を阻害する化合物 (DDI-1) を得た。

本研究では, *crt-1* および *cnx-1* 変異体の表現型解析に加え, DDI-1 と DDI-1 改変体による阻害機構を調べ, 線虫の精子形成を多角的に解析した。

【方法】オス線虫より精細胞を SM (sperm medium, 精子培地) 中に放出させた後, Pron または ProK を加えて精子形成を惹起させた。その際, SM 中に FM1-43 を加えておき, 精子形成に伴って起きる細胞膜の変化 (偽足の伸長および MO との融合) を蛍光顕微鏡下で観察した。化合物の効果を調べる実験系では, 化合物を予め精細胞とプレインキュベーションした後, Pron または ProK を加えて精細胞が活性化するかどうかを調べた。

【結果および考察】*crt-1* または *cnx-1* が変異している精細胞は, いずれも Pron および ProK 処理で精子へと活性化した。一方, *crt-1* と *cnx-1* の二重変異体の場合, ProK では精細胞が活性化されたものの, Pron では活性化されなかった。これらの結果は, (1) *spe-8* クラス遺伝子依存的経路は, 少なくとも 2 つ以上のサブ経路 (Pron 経路と ProK 経路) に分類される, (2) 精子形成における *crt-1* と *cnx-1* の機能は互いに重複しており, かつ Pron 経路に限定される, ことを示唆している。

次に, DDI-1 存在下で野性型 (WT) 精細胞を Pron および ProK で活性化させると, 細胞膜と MO の融合は観察されたが, 偽足は伸長しなかった。DDI-1 の改変体 (DDI-1C) の場合, Pron による活性化を DDI-1 と同様のパターンで阻害したが, ProK による阻害効果は低下し, Pron 経路に対する特異性が高くなった。

本研究により (図 1), *spe-8* クラス遺伝子依存的経路におけるサブ経路の存在が初めて示唆された。さらに, CRT-1 や CNX-1 タンパク質および DDI-1 と DDI-1C の標的分子を調べることで, サブ経路を含めた精細胞活性化経路の全体像解明に近づくと思われた。

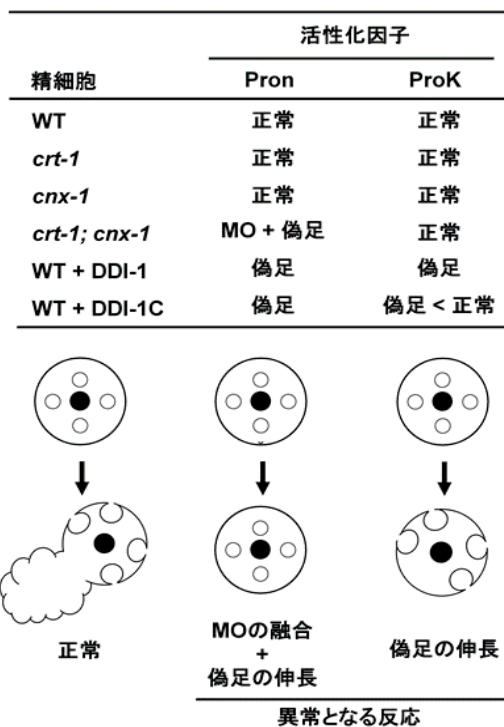


図1. 本研究のまとめ

B01

高硫酸化コンドロイチン硫酸による神経細胞の極性形成制御機構の解析

○志田美春, 三上雅久, 北川裕之

神戸薬大・生化

【目的】

コンドロイチン硫酸 (CS) は、中枢神経系の細胞外マトリックスに豊富に存在する直鎖状の硫酸化多糖の一つである¹⁾。中枢神経系においてCSは、成体では損傷後の軸索再生を阻害する一方で、発生期では神経突起伸長制御による神経回路網の形成に重要な役割を果たしていることが知られている。CSがこうした一見矛盾した機能をもつ理由の一つとして、CSの硫酸化修飾による多様な構造異性体の存在が挙げられる。実際、高硫酸化CSであるCS-DまたはCS-E基質上で海馬神経細胞を培養すると、それぞれ顕著に異なる形態の神経突起の形成が促進される。CS-Dは比較的短い複数本の神経突起の形成を促進する一方で、CS-Eは軸索様の長い神経突起の形成を促進する。また興味深いことに、これらの形態は神経細胞の極性形成過程における未熟な神経突起から軸索または樹状突起への運命が決定される特定の段階での神経突起の形態と酷似している。これらのことから、高硫酸化CSの硫酸化構造により神経細胞の極性形成過程が厳密に制御されている可能性が示唆される。これまでに我々は、GPIアンカー型細胞接着分子であるContactin-1 (CNTN-1)が、CS-EのCS受容体として機能し、非受容体型チロシンキナーゼであるFynの活性化を介して、神経突起伸長を促進することを明らかにしている²⁾。一方、CS-Dの認識機構については未解明のままであった。そこで本研究では、新規のCS受容体分子としてCNTN-1の類縁分子に着目し、CS-Dの認識機構、およびCS-DとCS-Eの識別機構の解明を試みた。

【方法】

CS受容体候補分子のCS受容体としての妥当性を検討するために、マウス胎仔由来海馬神経細胞において、CNTN-1あるいはCS受容体候補分子の機能を攪乱し、CS-DおよびCS-E基質上における神経突起の形態を観察した。また、CS-DとCS-Eによる神経突起伸長とCS受容体を介したシグナル伝達経路の活性化との関連性を明らかにするために、CNTN-1欠損株であるNeuro2a (N2a)細胞などを用い、CS-DおよびCS-E基質上におけるシグナル伝達経路の活性化の程度をWestern blotting法により解析した。

【結果・考察】

CNTN-1あるいはCS受容体候補分子の機能攪乱により、高硫酸化CS基質上における神経突起の形態に顕著な変化が認められた。また、CS-DおよびCS-E基質上におけるシグナル伝達経路の解析から、CS-DおよびCS-Eの認識には少なくとも複数のCS受容体が関与する可能性を見出した。以上のことから、CS-DおよびCS-Eの認識にはそれぞれ複数のCS受容体による複合体が関与しており、CS-DおよびCS-Eの硫酸化構造の識別はそれらCS受容体複合体の分子構成の相違による可能性が示唆された。

【文献】

1. Mikami T., and Kitagawa H. (2013) *Biochim. Biophys. Acta*, 1830, 4719-4733.
2. Mikami T., Yasunaga D., and Kitagawa H. (2009) *J. Biol. Chem.*, 284, 4494-4499.

B02

OTX2 蛋白質の PV 陽性細胞近傍への局在を決定する
コンドロイチン硫酸の構造は何か？

○ 大橋和佳, 野村綾香, 加藤由佳, 宮田真路, 山本和樹, 平岡秀一,
北川裕之
神戸薬科大・生化学

【目的】視覚の神経可塑性は幼少期に変化し、成長に伴って臨界期が終焉すると視力が固定される。臨界期終焉後の弱視の根本治療は困難であり、年齢に依存しない治療法を実現するため、視覚の神経可塑性の制御メカニズムを理解することが強く望まれている。

光刺激により網膜で産生される OTX2 蛋白質は、視床を介して大脳視覚野に運ばれ、PV 陽性細胞の近傍に蓄積し、細胞内へ取り込まれる。続いて PV 陽性細胞が成熟し、視覚の神経可塑性が変化する。PV 陽性細胞の周囲には、aggrecan (ACAN)をはじめとするコンドロイチン硫酸(CS)プロテオグリカンや、ヒアルロン酸等が集積した細胞外基質 (Perineuronal net: PNN) がある。コンドロイチン 6-O-硫酸基転移酵素 (C6ST1、図) の transgenic マウスでは、CSC の増加により、ACAN の分解が促進される¹。さらに PNN の機能が低下し、OTX2

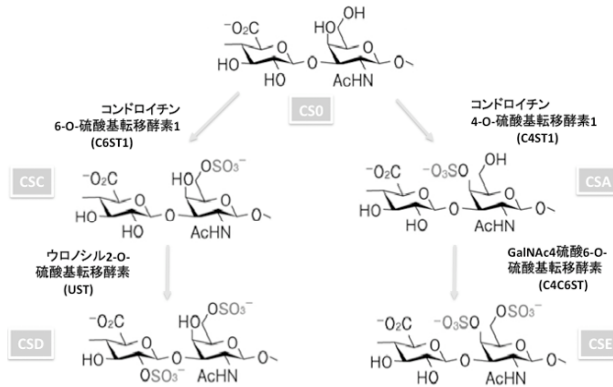


図 コンドロイチン硫酸の構造異性体

の蓄積量が減少、神経可塑性の臨界期が終焉しない²。一方、*in vitro* の解析から、OTX2 は CSD や CSE に結合するとされている³。以上の知見から、『OTX2 は、ACAN に付加された CSD や CSE に結合し PV 陽性細胞近傍に蓄積され、細胞内へ取り込まれる』との仮説が成立する。本研究では、この仮説の検証を次の様に行った。

【方法】硫酸基転移酵素 C6ST1 および C46ST1 は、各々 CSC と CSD、CSE 合成を触媒する (図)。PV 陽性細胞周辺部への OTX2 の蓄積に対し、CSD や CSE が必要か否かを検証するため、両遺伝子の欠損により CSC、CSD、CSE を欠損するマウス(C6ST1・C46ST1KO マウス)を作製した。このマウスの大脳視覚野における OTX2 の局在を免疫組織化学的に分析した。また、大脳皮質から 4M HCl guanidium によりプロテオグリカンを抽出、CsCl 密度勾配遠心法により ACAN を精製した。精製 ACAN と OTX2 との結合をゲルシフト法とエライザ法で解析した。

【結果】C6ST1・C46ST1KO マウスは、顕著な異常を示さず成長・繁殖した。大脳視覚野標本を WFA レクチン、抗 ACAN 抗体および抗 OTX2 抗体を用いて免疫染色したところ、期待に反して野生型と KO マウス間で OTX2 の局在に違いは見られなかった。ゲルシフト法やエライザ法により、OTX2 と ACAN との結合を分析したところ、C6ST1・C46ST1KO マウス由来の ACAN においても、野生型と同様、OTX2 に対する結合が観察された。以上の実験結果から、OTX2 の PV 陽性細胞近傍における蓄積には、ACAN に付加されている CS 鎖に、CSC, CSD, CSE の構造は不可欠ではないと結論した。

【考察】視覚野における OTX2 の局在を決定する CS の構造は、CSO もしくは CSA、その双方のいずれかで構成されていると考えられる。今後、人工的に合成した CS 鎖に対する OTX2 の親和性を測定し、OTX2 の結合する CS の糖鎖構造を明らかにしたい。

- 【文献】 1. Miyata S, Kitagawa H. *Neural Plasticity*. (2016) 2016:1305801.
2. Miyata S, et al. *Nature Neurosciences*. (2012) 15:414-422
3. Despras G, et al. *Chemistry*. (2013) 19:531-540.

【謝辞】 C6ST1KO マウス、GalNAc6ST1KO マウスを提供してくださいました名古屋大学医学部教授門松健治先生、愛知医科大学教授羽瀨脩躬先生に感謝申し上げます。

B03

コンドロイチン硫酸鎖の発現量調節を介した
骨格筋分化促進メカニズムの解析○山田敦子, 松浦伸明, 今村香奈実, 吉川泰樹, 三上雅久, 北川裕之
神戸薬大・生化

【目的】骨格筋の分化や再生過程では、筋芽細胞が互いに融合して多核の融合細胞(筋管や筋線維)が形成されるという劇的なイベントを経る。このイベントは、筋の発生や損傷筋の再生に必要不可欠であり、このメカニズムを解明することは、骨格筋分化の全容を解明する上で重要な課題となっている。これまでに我々は、コンドロイチン硫酸(CS)の一過的な発現低下が、骨格筋分化とその再生過程に必要なことを見出した。興味深いことに、細菌由来のCS分解酵素であるコンドロイチナーゼABC(ChABC)を筋肉内へ直接投与すると、筋損傷モデルや筋ジストロフィーモデルマウスである*mdx*マウスにおいて、それぞれ筋再生の促進や一過的な病態の緩解が観察された¹⁾。これらのことから、筋組織内のCS鎖発現を一過的に減少させる手段は、骨格筋自身の持つ再生能力を賦活化し、筋萎縮の進行遅延や改善を図る新たな治療戦略として、その応用が期待されている。しかしながら、CS鎖の発現レベルの低下がどのような分子メカニズムを介して、骨格筋分化・再生の促進に寄与しているのかは未だよくわかっていない。そこで我々は、CS鎖の発現低下により惹起される骨格筋分化・再生プログラムに焦点を当て、その分子基盤の解明を試みた。

【方法】CS鎖は特定のコアタンパク質に結合したプロテオグリカン(CSPG)として存在している。そのため、骨格筋分化・再生過程におけるCS鎖の作用機序の足がかりを得るため、C2C12細胞の筋分化誘導系を利用して、「細胞融合・多核化が活発に起こる筋管形成期に、CS鎖修飾の程度が低下するコアタンパク質」の同定を試みた。さらに、選定したコアタンパク質の天然型(CS鎖修飾型)ならびにCS鎖非修飾型の組換え体を作成・精製し、当該コアタンパク質におけるCS鎖の発現量の差異が、C2C12細胞の骨格筋分化誘導能に影響を及ぼすかを調べた。

【結果・考察】C2C12細胞の骨格筋分化過程で発現が認められるCSPG分子種について、それぞれのコアタンパク質に対する抗体を用いたウエスタンブロッティングにより、筋管形成期にCS鎖修飾の程度が低下する性質を示すコアタンパク質が存在することを見出した。そこで、当該コアタンパク質のCS鎖修飾型及びCS鎖非修飾型の組換えタンパク質を作製し、それらの骨格筋分化誘導能を調べたところ、C2C12細胞の多核化率(Fusion index)は、当該コアタンパク質のCS鎖修飾型添加群よりも、非修飾型組換え体の添加群で有意に高いことが分かった。さらに、骨格筋分化・再生過程の促進に重要なホスファチジルイノシトール3-キナーゼ/Akt(PI3K/Akt)経路における当該タンパク質の影響をそれぞれ調べたところ、Aktのリン酸化レベルの上昇は、CS鎖修飾型添加群よりも、非修飾型添加群で有意に高かった。これらのことから、少なくとも、時期特異的なCSPGコアタンパク質上のCS鎖の発現低下が、多核化を伴う骨格筋分化の進行に寄与すると考えられた。

【文献】

1. Mikami, T., et al. (2012) J. Biol. Chem. 287, 38531-38542.

B04

糖ヌクレオチド輸送体 *Slc35d1* は腸管ホメオスタシスに必要である○平岡秀一¹, 杉野太亮¹, 三上知佳¹, 西山美紀¹, 古関明彦², 北川裕之¹
¹神戸薬科大・生化学, ²理研 IMS・免疫器官形成

【目的】糖ヌクレオチド輸送体 *Slc35d1* は、コンドロイチン硫酸 (CS)、ヘパラン硫酸合成の基質である UDP-GalNAc, UDP-GlcNAc, および UDP-グルクロン酸を細胞質から小胞体・ゴルジ体内腔へ輸送する。*Slc35d1* は骨軟骨異形成症の原因遺伝子であり、この遺伝子が欠損すると、胎児成長板軟骨のコンドロイチン硫酸 (CS) 生合成が著しく低下し、骨格形成が顕著に阻害される¹。*Slc35d1* は、腸管等、他の組織にも発現するが、*Slc35d1* ノックアウトマウスは胸郭低形成による新生児致死性を示すため¹、軟骨以外の組織における機能は明らかにされていなかった。本研究では、この点を明確化するため、誘導的遺伝子破壊系を導入、骨格形成が成熟した成体マウスの *Slc35d1* を欠損させ、組織の異常を分析した。

【方法】タモキシフェン (TXF) により Cre をユビキタスに活性化出来る *ROSA-CreERT* allele を *Slc35d1* 遺伝子の *flox-allele* へ導入したマウス (*Slc35d1-iKO*) を作製した。このマウスに TXF を投与し、遺伝子破壊を誘導した。TXF 投与から経時的に小腸組織を採取し、組織化学的、生化学的および分子生物学的分析を行った。また、小腸の腸陰窩を採取し、上皮細胞で構成される organoid を誘導した。TXF 投与により遺伝子を破壊、分析を行った。

【結果】TXF を投与後、*Slc35d1-iKO* マウスは、下痢を発症、20%以上の体重減少を伴い、8~10 日後に死亡した。解剖所見では腸管に顕著な異常があり、腸管は水溶性の内容物で満たされていた。小腸標本を分析したところ、TXF 投与から 5 日後に絨毛構造に異常が現れ始め、8 日後には絨毛が顕著に縮退していた。TXF 投与から 5 日後の小腸組織を二糖分析で解析したところ、対照マウスのものに比べ CS 含量が 30%程度減少していた。

腸管内の炎症により絨毛構造が縮退することが知られているので、*Slc35d1* 欠損により炎症が発生したか否か、解析した。TXF 投与後の小腸に炎症サイトカインの *Tnf α* や *IL6* の遺伝子発現上昇が認められ、炎症が発生したことが判明した。この現象が、腸管上皮組織の異常により発生するか否かを検討するため、小腸の上皮組織の細胞のみで形成される organoid を誘導・培養した。TXF を投与すると、4 日後に organoid 構成細胞の増殖の低下や細胞死が確認された。

【考察】実験結果から、*Slc35d1* は腸管ホメオスタシスに必要であると結論した。*Slc35d1* 遺伝子欠損から個体死に至るまでの病理機序を次の様に推定した。

ステージ I : *Slc35d1* の欠損により、糖鎖の合成が低下、特に CS 合成が低下する。

ステージ II : 糖鎖合成の低下により、腸管上皮組織の細胞増殖低下と炎症発生が誘導される。炎症により下痢が発生、さらに、絨毛形態の縮退がおこる。

ステージ III : 腸管ホメオスタシスが破綻し、腸管の消化吸収能が低下、栄養障害により、個体死に至る。

Slc35d1 欠損による糖鎖合成の低下が、どのように腸管上皮細胞の増殖低下や炎症発生に結びついたのであろうか？ 腸管上皮幹細胞の増殖・分化には、モルフォゲンを介した分化シグナルの伝達が必要であり、また、上皮細胞の生存には接着因子シグナルの伝達が必要とされる。*Slc35d1* の欠損による糖鎖の減少が、この様なシグナル伝達プロセスの異常を誘導、腸管上皮組織が損傷し、その結果炎症が発生したのかもしれない。腸管上皮細胞の増殖・分化や細胞生存の制御について、糖鎖機能の視点から行われた研究例は少なく、腸管疾患の原因究明や治療法開発に必用な情報は不足している。*Slc35d1-iKO* マウスは、この様な問題の解決につながる新しい疾患モデルであり、このマウスの解析は、種々の腸管疾患の発症機序の理解や治療法の開発に、有用な情報を提供するであろうと期待される。

【文献】 1. Hiraoka S et al. *Nature medicine*. (2007) 13:1363-1367

B05

Chondroitinase ABC Prevented Chondroitin Sulfate *N*-Acetylgalactosaminyl-transferase 2 (ChGn-2) Effect on Macrophage Oxidized-Low Density Lipoprotein Uptake in Atherosclerosis Progression○Imam Manggalya Adhikara¹, Keiko Yagi², Kyoko Shinohara², Hirotohi Fujita², Naoki Yokoyama², Yoko Suzuki¹, Koji Ikeda², Ken-ichi Hirata¹, and Noriaki Emoto²¹*Division of Cardiovascular Medicine, Department of Internal Medicine, Kobe University Graduate School of Medicine, Kobe, Japan;* ²*Clinical Pharmacy, Kobe Pharmaceutical University, Kobe, Japan***Abstract**

Background: The “Response-to-Retention Hypothesis” demonstrated that proteoglycans (PGs) have an important role in early atherosclerosis development. PGs determine low-density lipoprotein (LDL) binding in the intima of vessels by modification of the length and sulfation pattern of glycosaminoglycan (GAG). ChGn-2 is one of the enzymes responsible for PGs construction and GAGs elongation. ChGn-2^{-/-} LDLr^{-/-} mice showed less atherosclerotic plaque as compared to ChGn-2^{+/+} LDLr^{-/-} mice. However, the role of ChGn-2 on the macrophage cellular LDL uptake has not been investigated. Hence, we elucidate the role of ChGn-2 on macrophage foam cell formation.

Methods: RAW 264.7 murine macrophage cell line was transfected with ChGn-2 and treated with oxidized-LDL (ox-LDL). ChGn-2^{-/-} mice peritoneal macrophage were isolated and cultured. Foam cell formation was detected by Oil red O staining. GAGs were measured by Alcian Blue staining and DMMB (Dimethylmethylene blue) assay. Gene expression related to ox-LDL uptake and lipid metabolism were measured by real time PCR.

Results: Foam cell formation enhanced significantly in ChGn-2 overexpressed cells as compared to control ($p \leq 0.05$) and addition of Chondroitinase ABC which is known to catalyzes the eliminative degradation of polysaccharides in GAG diminished ox-LDL uptake. Overexpression of ChGn-2 and ox-LDL addition up-regulated CD36 mRNA expression. ChGn-2^{-/-} mice peritoneal macrophage showed decreased foam cell formation.

Conclusion: Overexpression of ChGn-2 enhanced foam cell formation and increased GAGs on macrophage which altered ox-LDL uptake via CD36. These results demonstrated that ChGn-2 is a novel therapeutic target for atherosclerosis.

B06

炎症性腸疾患の発症に関わるコアフコースの役割について

○上田優衣¹, 藤井宏修¹, 新崎信一郎², 飯島英樹², 鎌田佳宏¹, 辻井正彦²,
竹原徹郎², 三善英知¹

大阪大学院医学系研究科,¹ 機能診断科学講座,² 消化器内科学講座

【目的】炎症性腸疾患（IBD；Inflammatory Bowel Disease）とは、クローン病と潰瘍性大腸炎に大別される、腸管に慢性・再発性に炎症を引き起こす原因不明の難病であり、免疫学的な異常が主要な原因である。これまで IBD と糖鎖に関する報告がいくつかあり、我々の研究室においても、IgG の糖鎖構造が B 細胞とマクロファージの相互作用を介して腸炎に影響を及ぼすことを明らかにした。近年フコースが免疫や IBD の発症に関連するという報告があり、我々は α -1, 6 フコース（コアフコース）が免疫細胞・T 細胞の活性化に関与していることを明らかとしてきた。これまで α -1, 6 フコース転移酵素（Fut8）ノックアウトマウスでは腸炎モデルマウスの病態進展が軽微になることを確認している。今回、Fut8 欠損（KO）マウス、あるいは野生型（WT）マウス由来骨髄移植モデルマウスを作製し、免疫細胞のコアフコースが腸炎に及ぼす影響に関して検討することを目的とした。

【方法】WT マウスに 10 Gy の放射線照射後、Fut8 WT / KO マウスより採取した骨髄細胞をそれぞれ尾静脈注射して骨髄移植マウスを作製した。T 細胞を介した腸炎モデルとして知られている TNBS（2,4,6-トリニトロベンゼンスルホン酸）腸炎を誘導し、腸炎の度合いを比較検討した。また、WT、Fut8 KO マウスの脾臓より CD4 陽性 T 細胞を分離し、抗 CD3 ϵ /28 抗体刺激によるサイトカイン産生、MAPK シグナルの変化について検討した。

【結果】Fut8 KO マウス由来の骨髄を移植したマウスでは WT マウス由来の骨髄を移植したマウス に比べ体重減少率が低く、組織学的にも腸の炎症所見が軽微であった。また腸管における炎症性サイトカインの遺伝子発現が有意に低下していた。Fut8 KO マウス由来の CD4 陽性 T 細胞は、抗 CD3 ϵ /28 抗体刺激時の Th1 型・Th2 型サイトカイン産生が有意に低下しており、さらに p38、JNK のリン酸化が Fut8 KO マウス由来 CD4 陽性 T 細胞で低下していることがわかった。

【考察】今回の検討により T 細胞のコアフコースを欠損させることで、炎症を抑制できる可能性が示唆された。コアフコースをターゲットとした糖鎖治療法の可能性が示唆された。

B07

糖転移酵素 Fut8 の肝細胞脂質代謝に及ぼす影響について

○ 藤好杏奈, 鎌田佳宏, 山本晃子, 戎谷友佑, 藤井宏修, 高松真二,
三善英知

大阪大学大学院医学系研究科 機能診断科学

【目的】近年の糖鎖生物学融合研究の急速な進歩により、糖鎖が様々な疾患発症や病態に関与していることが明らかになってきた。我々は単糖の一つであるフコースが N 型糖鎖に付着するフコシル化という糖鎖修飾について永年研究を行ってきた。フコシル化の中でも N 型糖鎖の根元の N-アセチルグルコサミンにフコースを付けるコアフコシル化は慢性肝疾患進展とともに亢進し、肝発癌にも関与していることがわかっている。今回、コアフコシル化を担う糖転移酵素である Fut8 の肝細胞脂質代謝に及ぼす影響について検討を行った。

【方法】マウス肝細胞（野生型マウス、Fut8 KO マウス由来）に SV-40 ラージ T 抗原遺伝子を導入して作製した不死化肝細胞を用いた（WT 肝細胞、KO 肝細胞）。定常状態での比較に加え、パルミチン酸添加前後で細胞内中性脂肪、コレステロール含有量を定量し、脂質代謝関連遺伝子発現をリアルタイム RT-PCR、Western blot 法にて比較検討した（Srebp1、Acc、Fas、Scd1、ApoB、Srebp2、Ldlr、Hmgcr）。

【結果】WT 肝細胞に比べ、Fut8 KO 肝細胞では中性脂肪、コレステロールの細胞内含有量が有意に低下していた。パルミチン酸添加後、WT 肝細胞では細胞内中性脂肪量は濃度依存性に有意に上昇していたが、KO 肝細胞ではほとんど上昇を認めなかった。脂質関連遺伝子 Srebp1、Acc、Fas、ApoB、Srebp2、Ldlr、Hmgcr 発現は KO 肝細胞で有意に高値を示した。興味深いことに LDL 受容体のタンパク発現は KO 肝細胞で劇的に低下していた。

【考察】以上の結果から、Fut8 KO 肝細胞では細胞内中性脂肪、コレステロールが WT 肝細胞に比べ低下しており、そのため中性脂肪、コレステロール代謝関連遺伝子発現が二次的に上昇しているのではないかと考えられる。現在このメカニズムについて Fut8 KO マウスを用いた *in vivo* の検討を含め、さらなる検討を行っている。

【結語】糖転移酵素 Fut8 は、肝細胞脂質代謝に影響を及ぼすことが示唆された。

脳における *N*-グリコシルノイラミン酸の発現は生体にとって負に働く

○ 内藤裕子^{1,4}, Leela Davies¹, 竹松弘^{1,5}, Hsun-Hua Chou¹,
Pam Tangvoranuntakul¹, Charles Heyser², Aaron Carlin¹, Andrea Verhagen¹,
Pascal Gagneux^{1,3}, Ajit Varki^{1,3}

¹カリフォルニア大学サンディエゴ校 (UCSD)・医, ²Neuroscience Behavioral Testing Core, UCSD, ³Glycobiology Research and Training Center, UCSD, ⁴神薬大・生化, ⁵京大・院医

【目的】細胞の表面は糖鎖で覆われており、細胞間あるいは同一細胞上での分子間認識の際、最初に出会う分子が糖鎖である。これら糖鎖の末端に位置するシアル酸は、その存在位置および様々な分子修飾による構造多様性から、分子間認識の決定基となる。哺乳動物細胞においては、シアル酸は、主に *N*-アセチルノイラミン酸 (Neu5Ac) と *N*-グリコシルノイラミン酸 (Neu5Gc) の2つの分子種として存在する。Neu5Ac と Neu5Gc の存在比は、Neu5Gc の生合成を担う酵素、CMP-Neu5Ac 水酸化酵素 (Cmah) の発現量により制御されており、一般的には動物種および臓器により大きく異なるが、脳・神経系だけは、これまでに調べられたどの動物種においても例外なく Neu5Gc を欠損しておらず、また Cmah の mRNA も検出されていない¹⁾。脳における Neu5Gc の発現が動物種を超えて保存されていることは、脳・神経系における Neu5Gc の発現が個体発生や脳の発達・機能に対し負に働く可能性を示唆する。そこで、脳・神経系における Neu5Gc 発現抑制の生理的意義を解明するため、脳に Neu5Gc を強制発現させたマウスを作製し、その表現型の解析を行った。

【方法】Cre-loxP システムを利用して、Cre リコンビナーゼ存在下で Cmah の発現が誘導されるマウスを作製し、これを脳特異的なプロモーター下で Cre リコンビナーゼを発現する Nestin-Cre マウスと掛け合わせることで、脳特異的に Neu5Gc を強発現するトランスジェニックマウス (以下、Cmah Tg マウス) を作製した。Neu5Gc 発現の脳機能への影響を明らかにするため、雄の Cmah Tg マウスおよびコントロールとして Nestin-Cre マウスを用い、オープンフィールド試験、バーンズ迷路試験、新奇物体認識試験等の行動実験を行った。また、病原体に対する抵抗性を調べるため、志賀毒素産生性大腸菌由来の毒素を Cmah Tg マウスおよびコントロールマウスに経鼻投与し、毒素投与後の生存率を比較した。

【結果】Cmah Tg マウスはメンデルの法則に従った比率で生まれ、特に目立った発達異常は認められなかった。しかし、脳機能に着目して様々な行動実験を行ったところ、Cmah Tg マウスは、コントロールマウスに比べて自発運動の低下を示した。また、空間記憶を調べるバーンズ迷路試験では異常は見られなかったが、新奇物体認識試験において物体認識能力の低下を示した。

シアル酸は、病原体による細胞認識においても重要な役割を果たしている。そこで、脳特異的な Neu5Gc の欠損が病原体からの脳の保護に寄与している可能性を考え、Neu5Gc に特異性を示すことが知られている細菌由来毒素をモデルとして用いて抵抗性を調べたところ、Cmah Tg マウスでは、コントロールマウスに比べ、毒素投与後の生存率が低下した。

【考察】以上の結果から、脳における Neu5Gc の発現は、脳機能のみならず、病原体に対する抵抗性など様々な側面から生体にとって負に働くことが明らかとなり、脳・神経系での Neu5Gc 欠失が、生体の生存に有利となることが示唆された。

【文献】 1. Davies, L.R.L., Varki, A. (2015) *Top. Curr. Chem.* 366, 31–54

【目的】 Ewing sarcoma protein (EWS)は、転写、スプライシング、マイクロ RNA 生合成、RNA 核外輸送と代謝、翻訳など、多面的に遺伝子発現調節に関与することが示唆されており、そのマルチ機能は翻訳後修飾によって制御されていると考えられる。我々は、最近の研究において、細胞分化に伴って EWS の O 結合型 N-アセチルグルコサミン(O-GlcNAc)修飾の動態が変化することを見出している^{1,2)}。本研究では、クリックケミストリーを用いて EWS に起こる O-GlcNAc 修飾の化学量論を検討した。

【方法】 培養細胞ライセート中の糖タンパク質の非還元末端 GlcNAc 残基に対し、以下の2段階反応によりポリエチレングリコール (PEG) タグ標識を行った。

Step 1: UDP-アジドガラクトース (UDP-GalNAz) を供与糖ヌクレオチドとした変異型 β -1,4-galactosyltransferase (Y289L)反応により GalNAz 化した。

Step 2: Huisgen's azide-alkyne 環化付加反応により分子量 5 kDa の PEG-アルキン を GalNAz に付加した。

その後、SDS-PAGE により PEG タグ標識数の異なる EWS を分離後、ウェスタンブロッティングによりグリコシル化の異なる EWS 分子種の化学量論的解析を行った。

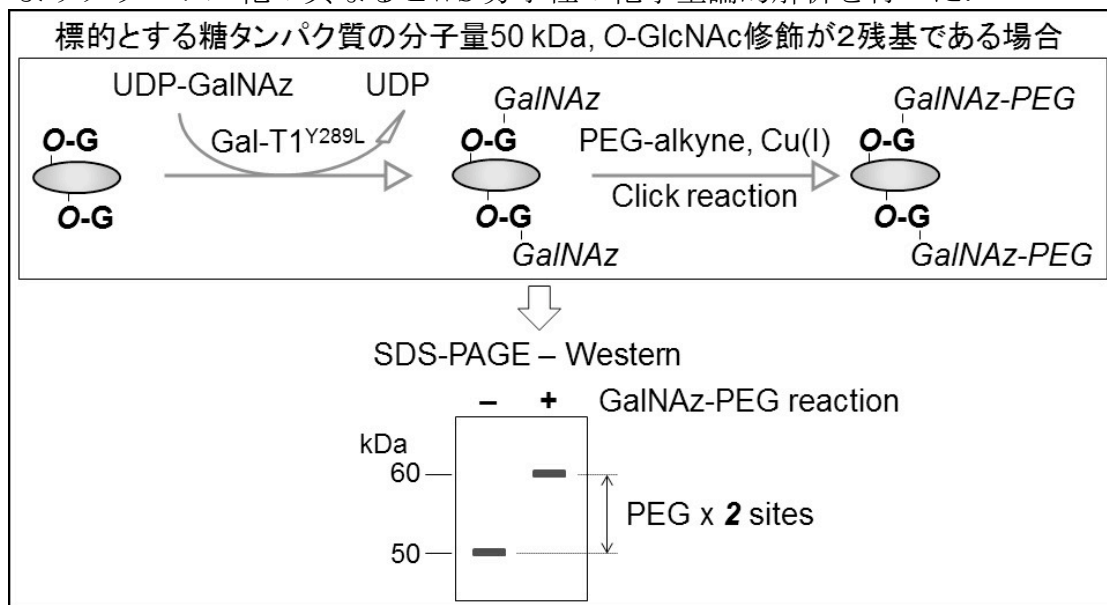


図 1. PEG タグ標識による O-GlcNAc 修飾サイト数同定の原理

【結果および考察】 神経系の細胞に注目して解析し、以下の結果を得た。(a) マウス胚性腫瘍細胞株 P19 の神経分化誘導に伴う神経細胞の出現に伴い、EWS のグリコシル化分子種が増加した。(b) 神経芽腫細胞株 Neuro-2a, SH-SY5Y、およびグリア芽腫細胞株 A172 を用いた解析から、EWS のグリコシル化は動的に制御されていた。(c) CD1 マウス脳抽出液において、EWS の大半がグリコシル化分子種として検出された。これらの結果から、神経組織において、EWS は高頻度にグリコシル化されており、1 分子の EWS につき 2-3 サイトの O-GlcNAc 修飾を有する分子種が大半を占めることが明らかになった。

- 【文献】 1. Li, Q., Kamemura, K. (2014) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 450, 588–592.
2. Koyama, T., Kamemura, K. (2015) *Exp. Cell Res.* 338, 194-202.

大腸癌細胞株 LoVo 細胞において AMPK の *O*-GlcNAc 修飾は腫瘍増殖を促進させる○石村恵美^{1,2}, 中川孝俊¹, 朝日通雄¹¹大阪医科大学医学部薬理学, ²愛仁会尼崎だいもつ病院

【目的】近年、糖尿病と癌罹患リスクとの関連が注目されており、主に II 型糖尿病は大腸癌、肝臓癌、膵臓癌、子宮内膜癌、乳癌等のリスク増加に関連している¹⁾。*O*-結合型 N-アセチルグルコサミン (*O*-GlcNAc) は細胞活動に必須の糖鎖で、種々のタンパク質のセリン/スレオニン 残基に付加されており²⁾、その量は *O*-GlcNAc 転移酵素 (OGT) 及び *O*-GlcNAc 離脱酵素 (OGA) によって制御されている。高血糖は細胞内蛋白質の *O*-GlcNAc 修飾を促進し、悪性腫瘍や神経変性疾患の増悪に影響を及ぼし³⁾、*O*-GlcNAc 修飾は乳癌、大腸癌、肺癌の増殖に重要な因子であるという報告も認められるが⁴⁾、その詳細は明らかでない。AMP-activated protein kinase (AMPK) は細胞のエネルギー恒常性の最上位の調節因子として重要な役割を担っているが、腫瘍細胞においてその活性化は増殖抑制効果を示すと考えられており⁵⁾、治療ターゲットとして有望視されている。今回、我々は、ヒト大腸癌細胞株 LoVo 細胞を用い、*O*-GlcNAc 修飾と細胞増殖の関連について AMPK の関与を中心に検討した。各種薬剤 (Thiamet G (TMG), OGA 阻害薬、AMPK 阻害薬 BML-275, AMPK アクティベータ (AICAR)) の影響を Cell counting kit 8 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) により測定した。タンパク質 *O*-GlcNAc 化、AMPK リン酸化等のタンパク質発現解析は Western blotting 法により検討した。

【In vivo】Balb/c-nu/nu (ヌードマウス) の LoVo 細胞皮下移植モデルにおける *O*-GlcNAc 修飾の影響を検討するため、TMG 腹腔内投与群、PBS 投与群の腫瘍サイズを定期的に測定し、比較検討した。腫瘍組織におけるタンパク質の発現解析は Western blotting 法により行った。

【結果】

1. LoVo 細胞の増殖は TMG 濃度依存的に増加した。
2. TMG による増殖亢進は AICAR により抑制される一方、BML-275 は LoVo 細胞増殖を促進した。
3. TMG により濃度依存的に AMPK のリン酸化は抑制される一方、*O*-GlcNAc 修飾は増加した。
4. TMG 処理細胞では mTOR 経路が活性化した。
5. LoVo 細胞は、TMG 腹腔内投与ヌードマウスにおいて、より大きな腫瘍を形成した。
6. TMG 処理ヌードマウスでは AMPK の *O*-GlcNAc 修飾と mTOR 経路活性が亢進していた。

【考察】LoVo 細胞において、*O*-GlcNAc 修飾を亢進させると AMPK の活性は抑制され、腫瘍増殖は亢進した。同時に、AMPK の *O*-GlcNAc 修飾の亢進も確認された。これまで癌細胞において AMPK の *O*-GlcNAc 修飾は確認されておらず、今回の結果は、II 型糖尿病患者において高血糖が大腸癌発症のリスクファクターとなる一つの要因として AMPK の *O*-GlcNAc が関与している可能性が示唆された。*O*-GlcNAc 修飾の制御が今後の治療のターゲットの一つとして新たな展開をもたらすものと期待される。

- 【文献】
1. Kasuga, M., Ueki, K., Tajima, N., et al (2013) *Cancer Sci.*; 104: 965-976
 2. Zachara N. E., Hart G. W. (2004) *Biochem. Biophys. Acta.*; 1673: 13-28
 3. Hanover J. A. (2001) *FASEB J.*; 15: 1865-187
 4. Wenyi, M., Yuchao, G., et al (2011) *Biochem. Biophys. Acta.*; 1812: 514-519
 5. Shackelford DB, Shaw RJ. (2009) *Nat Rev Cancer*; 9: 563-575

優秀発表賞候補者演題

B11

リゾスフィンゴ糖脂質サイコシンは、分裂溝における PIP_2 の産生を抑制することでエンドマイトーシスを誘導する

○渡邊寛¹, 小林俊秀², 岡昌吾¹, 竹松弘¹

¹京大・院医, ²理化学研究所

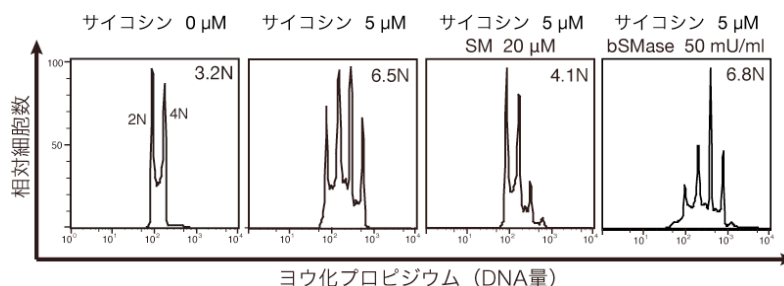
【目的】スフィンゴ糖脂質(GSL)は細胞膜を構成する脂質の1種であり、糖鎖の結合様式から様々な分子種が存在する。これらの多くは2本の炭化水素鎖をもつが、リゾ体と呼ばれる1本鎖のGSLの存在も知られている。サイコシンはガラクトシルセラミドのリゾ体であり、グロボイド細胞ロイコジストロフィー症という疾患に特徴的なGSLである。この疾患では、患者の脳白質において巨大な多倍体細胞が観察される。これまでサイコシンが細胞周期の中でM期のみを阻害し、多倍体化を誘導することが知られている¹が、これに関わる分子機構は解明されていない。近年、糖鎖ではなくコリンが付加されたスフィンゴ脂質、スフィンゴミエリン(SM)のクラスターが、M期において分裂溝の外膜に集積することで、その内膜で PIP_2 が産生されることが報告された²。また、私たちの行った探索結果から、サイコシンの正の制御因子としてGSLが候補に挙げられた。さらに、SMクラスターの形成はGSLによって阻害されることが知られている³。以上の知見から、本研究ではサイコシンの作用機序におけるSMおよびそのクラスターの関与の解明を試みた。

【方法】まず、Namalwa細胞の培地中にSMおよびスフィンゴミ分解酵素(bSMase)を添加することで、サイコシンによる多倍体化におけるSMの影響を確認した。次に、GSLの1種であるサイコシンによって、SMクラスターの形成が阻害されるか、その特異的なプローブであるLyseninを用いて検討した。GFPが融合したLyseninをリコンビナントタンパク質として調整し、細胞分裂期のNamalwa細胞を染色し、フローサイトメトリーおよび蛍光顕微鏡で観察した。さらに、GFPを融合させたPLC δ 1のPHドメインをNamalwa細胞に発現させ、蛍光顕微鏡で観察することで、 PIP_2 の産生に対するサイコシンの影響を評価した。

【結果】サイコシンによる多倍体細胞形成は細胞のSMレベルにより阻害的に制御されていることが明らかとなった(図1)。フローサイトメトリーや顕微鏡観察の結果から、細胞膜表面のSMクラスター量は、サイコシンによって低下し、分裂溝に集積するPLC δ 1-PH-GFPのシグナルも減弱した。サイコシン以外にも多倍体化を誘導するリゾスフィンゴ脂質が存在し、PLC δ 1-PH-GFPのシグナルの減弱はサイコシンと同様に多倍体化を誘導するリゾ脂質を処理した細胞でのみ観察された。

図1. サイコシンによる多倍体化の誘導に対するSMの影響の検討

細胞のDNA量をフローサイトメーターで測定し、多倍体化を評価した。通常の細胞を2Nとし、各ヒストグラムの右上に表記された数値は核相の平均値を示している。



【考察】本研究の結果から、サイコシンは細胞膜表面のSMクラスターの量を減少させ、その結果分裂溝における PIP_2 の合成を抑制することで多倍体化を誘導する、ということが明らかとなった。サイコシンが生体由来の分子であるということをもまえると、これらの知見は生体が分裂を失敗させる機構を持つ可能性を示す。

- 【文献】
1. Kanazawa, T. et al. (2000) *J. Cell. Biol.* 149, 4, 943-950
 2. Abe, M. et al. (2012) *Mol. Cell. Biol.* 32, 8, 1396-1407
 3. Makino, A. et al. (2015) *FASEB J.* 29, 477-493

B12

ヘキソサミン合成経路による上皮-間葉転換制御機構

○東出実歩, 望月信利, チャンミー シーラウト, 板野直樹

京産大・総合生命

【目的】ヒアルロン酸は腫瘍微小環境を形成する主要な細胞マトリックス成分であり、様々な癌腫においてその産生増加と癌進展との関連が報告されている。私達の研究室では、乳癌細胞におけるヒアルロン酸の過剰な産生が、癌細胞に上皮-間葉転換 (EMT) を誘導して癌幹細胞性の獲得に働くこと、また細胞内ヘキソサミン合成経路 (HBP) の代謝流束を加速することを明らかにしてきた。HBP の最終産物である UDP-*N*-アセチルグルコサミン (UDP-GlcNAc) は、タンパク質の *O*-GlcNAc 修飾を介して、細胞内シグナル伝達や転写調節に働くことが知られている。*O*-GlcNAc 修飾は、タンパク質のセリン・スレオニン残基に GlcNAc を付加する *O*-GlcNAc 転移酵素 (OGT) と脱 GlcNAc 反応を触媒する *O*-GlcNAcase (OGA) のバランスによって制御されている。本研究では、HBP の律速酵素である GFAT の活性阻害剤や OGT・OGA 活性阻害剤を用いた薬理的検討により、ヒアルロン酸過剰産生によって誘導される EMT に HBP とタンパク質 *O*-GlcNAc 修飾が関与する可能性を検討した。

【方法】ヒアルロン酸過剰産生乳癌発症モデルマウスと対照マウスに発生した乳癌組織より初代培養癌細胞を樹立した。上皮性細胞マーカー分子の E-cadherin について、その発現を免疫染色法により検討し、細胞の EMT を評価した。また、初代培養癌細胞から全 RNA を精製し、EMT 関連分子である Twist や Snail の遺伝子発現をリアルタイム定量 RT-PCR 法により検討した。そして、HBP を亢進するグルコサミンや GFAT や OGT、そして OGA に対する各種阻害剤を用いて、細胞における EMT とがん幹細胞の増幅に及ぼす影響について、上記方法により解析した。

【結果と考察】免疫染色法の結果、ヒアルロン酸過剰産生乳癌細胞では、対照乳癌細胞に比べて E-cadherin の発現が減少していることを明らかにした。HBP や OGT 阻害剤でヒアルロン酸過剰産生乳癌細胞を処理すると、未処理の細胞に比べて細胞間に局在する E-cadherin が増加した。

以上の結果から、ヒアルロン酸過剰産生乳癌細胞においては、HBP とその下流で制御される *O*-GlcNAc 修飾が、ヒアルロン酸依存的な EMT の誘導とに関与していることが示唆された。

異なる細胞内局在を示す2つのトランスアルドラーゼが
糖代謝全体に影響を及ぼす

○盛山 哲嗣¹, 田中 秀², 中山 泰宗³, 福本昌宏², 辻村賢二², 山田幸司¹,
馬場 健史³, 米田 悦啓^{4,5}, 福崎 英一郎³, 岡 正啓^{1,5}

¹ (国研) 医薬健康研・細胞核輸送 D, ² 阪大院・生命機能・細胞内移動学, ³ 阪大院・工学・
生物工学・生物資源工学領域, ⁴ (国研) 医薬健康研, ⁵ 阪大院・薬学・NIBIOHN

【目的】我々の研究目的は、代謝酵素であるトランスアルドラーゼの細胞内局在の
制御機構の解明と糖代謝への影響を解析することにある。

ペントースリン酸経路は、解糖系より分岐した経路であり、脂肪酸などの生成に必要な
NADPH や、核酸の生合成に不可欠となるリボース 5'-リン酸の生成などに関わる生体に重
要な代謝経路である。TISdb データベース (TISdb; <http://tisdb.human.cornell.edu/>)によると、
トランスアルドラーゼは潜在的に翻訳開始点を、10アミノ酸下流にもう一つ持っている
とされるが、細胞内で2種類のトランスアルドラーゼの発現や機能の違いについてはわかって
いない。

この疑問を解き明かすため、本研究では、以下の方法により、2種類のトランスアルド
ラーゼアイソフォームの発現と機能の解明及び糖代謝への影響について明らかにした。

【方法】トランスアルドラーゼが持つ2つの翻訳開始点が発現するのかを調べるために、
トランスアルドラーゼの2つの翻訳開始点の変異型発現ベクターを作製し、発現を確認し
た。また2種類のトランスアルドラーゼが核内輸送因子 importin α によって、核内へ輸送さ
れるのかを解析するために、Pull-down assay と *in vitro* transport assay を行った。糖代謝への
影響について解析するため、まず CRISPR/Cas9 システムを用いて、NIH/3T3 細胞のトラン
スアルドラーゼ欠損細胞を作製した。そして、その細胞株に、レトロウイルス発現システ
ムを用いて、2種類のトランスアルドラーゼを発現する細胞株を作製した。それらの細胞
株について、メタボローム解析を行い、代謝産物を網羅的に解析した。

【結果】様々な哺乳類細胞株において、2種類のトラン
スアルドラーゼのタンパク質発現を確認した。NIH/3T3
細胞もまた2種類とも発現しており、細胞内の局在を調
べると、主に核内に局在していた。また、野生型と2つ
の翻訳開始点の変異型を強制発現して western blot 法に
より調べると、野生型では2つのバンドが確認できるの
に対して、変異型ではどちらかの1つのバンドしか確認
できなかった。さらに、importin α の認識する核局在化
シグナルが、トランスアルドラーゼ蛋白質のN末端にあり、
下流の翻訳開始点から発現するトランスアルドラー

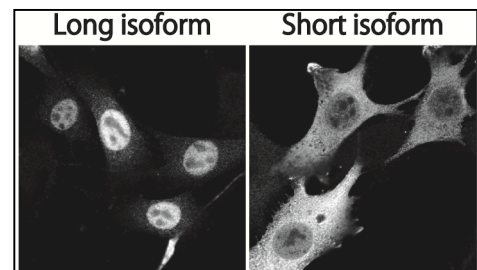


図 トランスアルドラーゼの細胞内局在
2つのトランスアルドラーゼが
異なる細胞内局在を示す

ゼは importin α に認識されずに細胞質にとどまることが明らかになった。興味深いことに、
2種類のトランスアルドラーゼは、ペントースリン酸経路の代謝酵素としての働きはほぼ
変わらないが、解糖系やクエン酸回路など他の代謝経路に影響を及ぼすことが確認された。

【考察】以上のことから、我々は、細胞内では異なる翻訳開始点を持つ2種類のトランス
アルドラーゼが存在しており、その違いであるN末端の10アミノ酸残基が核局在に必須
であること、さらにはトランスアルドラーゼの細胞内の局在が、他の代謝経路に影響を及
ぼすことを明らかにした。このことは、生体内では、2種類のトランスアルドラーゼの発
現を調整することにより、核と細胞質の存在比を変化させて、代謝全体を調整している可
能性を示唆している。

B14

細胞質型ホスホリパーゼ A₂ の分解機構の解明

○櫻本翔子, 辻田彩夏, 天野富美夫, 藤森功
大阪薬科大・院薬・生体防御

【目的】脂質メディエーターであるプロスタグランジン (prostaglandin: PG) の生合成は刺激に応じて、速やかに開始され、極めて短い時間うちに終結する。このような効率の良い PG 生合成の開始から終結に至る過程には、PG 産生に関与する酵素群における厳密な制御機構が存在するとされる。その制御機構の一部として、PG 合成酵素群の分解に着目し、ヒト巨核芽細胞において、PG 産生の律速酵素であるシクロオキシゲナーゼ-1 (cyclooxygenase-1: COX-1) や PGD₂ 合成酵素は細胞内カルシウムレベル上昇後、速やかにユビキチン-プロテアソーム系によって分解されることを明らかにした¹⁾。しかしながら、PG 産生における初発酵素である細胞質型ホスホリパーゼ A₂ (cytosolic phospholipase A₂: cPLA₂) の細胞内カルシウムレベル上昇後の分解についてはわかっていない。本研究では、細胞内カルシウムレベル上昇後の cPLA₂ の分解機構について検討した。

【方法】cPLA₂ の分解機構を調べるために、まず cPLA₂ の発現系を構築した。C 末端側に FLAG タグを付けた FLAG-cPLA₂ の発現ベクターを作製し、ヒト胎児腎細胞由来 293 細胞にエレクトロポレーション法を用いて導入した。ベクター導入して 24 時間後にタンパク合成阻害剤であるシクロヘキシミド存在下、カルシウムイオノフォアである A23187 を添加した。抗 FLAG 抗体を用いたウェスタンブロット法により、細胞内カルシウムレベル上昇後の cPLA₂ の安定性を検討した。さらに、FLAG-cPLA₂ 及び HA-ubiquitin 発現ベクターを 293 細胞にて共発現させ、プロテアソーム阻害剤である MG-132 存在下、A23187 添加 3 時間後に、抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降し、抗 HA 抗体を用いたウェスタンブロット法により、ユビキチン-プロテアソーム系による分解について検討した。

【結果】今回作製した C 末端側に FLAG タグを付けた cPLA₂ が 293 細胞において発現していることがウェスタンブロット法により確認された。293 細胞において、FLAG-cPLA₂ は細胞内で安定に存在するが、細胞内カルシウムレベルが上昇すると、短時間のうちに分解されることがわかった。さらに、FLAG-cPLA₂ と HA-ubiquitin の共発現系において、細胞内カルシウムレベルを上昇させると、A23187 添加 3 時間後という極めて短い時間のうちに高分子側領域において、ポリユビキチン化特有のスミア状の FLAG-cPLA₂ のシグナルが検出された。

【考察】細胞内カルシウムレベルに応じて、cPLA₂ がユビキチン-プロテアソーム系により、短時間のうちに分解されることから、PGD₂ の生合成に関わる cPLA₂、COX-1 及び PGD₂ 合成酵素は、PGD₂ 産生の終結後、極めて短時間のうちにいずれもユビキチン-プロテアソーム系により分解されることが示された。つまり、PGD₂ の産生制御において、合成から分解まで組織的に効率良く行われていることが示唆された。

【文献】 1. Yazaki, M., Kashiwagi, K., Aritake, K., Urade, Y., and Fujimori, K. (2012) Mol. Biol. Cell. 23(): 12-21

メタノール資化酵母および昆虫細胞における
ヒト *Lysoplasmalogenase* の発現

○國澤卓磨, 河合優太, 竹中重雄, 小森雅之
阪府大・生環・獣医・分生

【目的】 プラスマローゲンはリン脂質の一種であり, 多くのアシルグリセロールと異なりグリセロール骨格の *sn-1* 位にビニルエーテル結合をもつ. *sn-2* 位には多価不飽和脂肪酸が, *sn-3* 位にはエタノールアミンやコリンなどが結合している. プラスマローゲンはビニルエーテル結合の存在によって, 他のリン脂質とは異なった性質を持ち, 生体膜の構成要素となるだけでなく, 抗酸化作用を示すことや, 小胞体のストレス反応や NK 細胞の活性化, 精子形成に関与しているといわれている. プラスマローゲンの分解系に関与する酵素として, 近年, *Lysoplasmalogenase* (以下 LPase) が同定された¹⁾. LPase は *sn-2* 位が脱アシル化されたリゾプラスマローゲンのビニルエーテル結合を特異的に認識して加水分解する. しかしながら, LPase による基質認識の分子機構についてはほとんど分かっていない.

本研究ではヒト LPase の構造機能相関について解析するために, まず C 末に FLAG タグを付加したヒト LPase をメタノール資化酵母, さらに昆虫細胞を用いて発現する系を確立することを目的とした.

【方法】 既に単離済みのヒト LPase の全長 cDNA を用いて PCR 法によって, その C 末に FLAG タグを付加した LPase cDNA を単離し, T-vector にクローニングした. 得られた cDNA 断片のシーケンス解析を確認するとともに, この cDNA 断片を酵母の過剰発現ベクターである pHIPX4 に組み込み, メタノール資化酵母 *Hansenula polymorpha* の野生株(*leu-*)を形質転換した. 得られた組換え体酵母の無細胞抽出液を SDS-PAGE 後, 抗 FLAG 抗体を用いて, ウェスタンブロット分析を行った. さらに, 同 cDNA 断片をベクター pFastBac1 に組み込み, 昆虫細胞(Sf21 細胞)を用いて, 組換え体バキュロウイルスを作製・増幅した. この組換え体バキュロウイルスを感染させた Sf21 細胞より無細胞抽出液を調製し, 同様にウェスタンブロット分析により発現を確認した. また, 抗体作製のために大腸菌 DH5 α において MBP-LPase 融合タンパク質を誘導発現させた.

【結果および考察】 組み換え体酵母および組み換え体バキュロウイルス感染 Sf21 細胞から調整した無細胞抽出液に, FLAG タグ付加ヒト LPase に相当する約 19kDa のバンドが確認できた. また, 酵母で発現させた FLAG タグ付加ヒト LPase は細胞分画法によりミクロソーム画分に回収された. さらに, GFP 融合ヒト LPase を酵母で発現させ, その蛍光により細胞内局在についても検討しているので併せて報告する. 現在, これらの酵母および Sf21 細胞のミクロソーム画分を用いて LPase 活性を測定しているところである.

【文献】 1. Wu L-C, Pfeiffer DR, Calhoon EA, Madiari F, Guido M, Liu S, Jurkowitz MS. (2011) *J. Biol. Chem.* 286, 24916-24930

電位依存性ホスファターゼ VSP と PTEN に共通する
膜との相互作用部位の重要性○川鍋陽, 米澤智子, 岡村康司
阪大・院医・統合生理

【目的】 癌抑制遺伝子として有名な *PTEN* は、発現するタンパク質がホスファチジルイノシトール-3,4,5-三リン酸(PIP_3)を脱リン酸化することは知られているが、その酵素反応メカニズムなどはよくわかっていない。一方、電位依存性ホスファターゼ(VSP)はホヤの遺伝子から発見され、現在では哺乳類を含めさまざまな生物に広く分布していることがわかっている。VSP は電位を感知するセンサー部位に続いて *PTEN* と高い相同性をもつ領域(酵素ドメイン)を有し、ホスファチジルイノシトール-4,5-二リン酸 $PI(4,5)P_2$ の脱リン酸化を膜電位により制御する¹。

近年、*PTEN* の計算科学的解析²から、酵素ドメイン前半部分の残基(*PTEN*:V45,Y46)が細胞膜と相互作用していることが推測された。*PTEN* の脱リン酸化活性は膜との相互作用によって制御されていることが示されているので、この領域も重要な役割を担っていると考えられる。そこでこのメカニズムを明らかにすべく、CiVSP と比較しつつ、変異体による解析を行った。

【方法】 ヒト由来の *PTEN* (h*PTEN*) は大腸菌により発現後、精製、濃縮して使用した。POPS: PIP_3 =9:1 のリポソームと h*PTEN* を懸濁し、37°C でインキュベートした後にマラカイトグリーンアッセイにより遊離リン酸を定量し、脱リン酸化活性を評価した。

ホヤ由来の VSP (CiVSP) と変異体の脱リン酸化酵素活性の評価は、アフリカツメガエルの卵母細胞に CiVSP と GIRK チャネル、 $G\beta$ 、 $G\gamma$ を共発現させて行った。GIRK チャネルは細胞膜上に存在する $PI(4,5)P_2$ により活性化され K^+ イオンを透過する。脱分極で活性化した CiVSP により膜上の $PI(4,5)P_2$ が減少すると、それに伴い GIRK 電流も減少するので、これを指標として CiVSP の活性を評価した。

【結果】 膜と相互作用すると推測される部位の h*PTEN* 変異体を解析すると脱リン酸化活性は $WT > V45Q > Y46Q$ の順に低下した。興味深いことに、対応する部位の CiVSP 変異体においても活性が同様の傾向で低下する ($WT > L284Q(V45) > F285Q(Y46)$) ことがわかった。また、癌患者から発見された h*PTEN* の活性が失われる変異、Asn 挿入変異体(Y46 の後)および N48K、に相当する CiVSP 変異体でも脱リン酸化活性がないことが判明した。

【考察】 以上の変異体解析の結果から、推測された膜相互作用部位は *PTEN* における脱リン酸化酵素活性に重要な役割を担っていると示唆された。この部位が酵素反応のどのステップの制御に関わっているのかは今後の課題であるが、*PTEN* の結晶構造から類推するに、反応中心と膜の間に位置することから、基質である PIP_3 や PIP_2 を固定するはたらきを担っているのではないかと考えられる。

また、*PTEN* および VSP の酵素ドメインの結晶構造を比較すると、両者は非常に似通っており、その酵素反応メカニズムに共通性があると考えられていたが、これまで両者を比較することは難しかった。変異体による活性低下効果の傾向が VSP と *PTEN* でよく類似していることから、メカニズムの共通性は高く、VSP を解析した結果が *PTEN* の理解にも有用であることが示された。

- 【文献】 1. Murata, Y., Iwasaki, H., Sasaki, M., Inaba, K., Okamura, Y. (2005) *Nature* 435, 1239–1243
2. Shenoy, S. S., Nanda, H., Losche, M., (2012) *J. Struct. Biol.* 180, 394-408

B17

造血型プロスタグランジン D 合成酵素と補酵素・基質の分子認識機構と反応機構の解明

○浅田恵佑¹, 大野木友大¹, 丸野孝浩², 小林祐次²,
有竹浩介³, 裏出良博³, 日高雄二¹ 島本茂¹

¹近大・院理工, ²阪大・院工, ³筑波大・国際統合睡眠医科学研究機構

【目的】

造血型プロスタグランジン D 合成酵素(H-PGDS)は、プロスタグランジン H₂ (PGH₂)からプロスタグランジン D₂ (PGD₂)への異性化反応を触媒する酵素であり、この酵素反応の際に還元型グルタチオン(GSH)を補酵素として絶対的に要求する¹⁾。近年、筋ジストロフィーのように筋壊死を特徴とする疾患を発症した患者の壊死筋周辺で H-PGDS が誘起され、筋壊死を二次的に拡大すると報告されている²⁾。そのため、H-PGDS の阻害剤開発が進んでおり、筋ジストロフィーなどの治療薬開発に繋がると期待されている。これまでの研究から、H-PGDS の GSH 結合部位は明らかとなっているが、H-PGDS と GSH の化学量論および結合親和性などの詳細は明らかになっていない。また、基質である PGH₂ の結合に関しては、結合部位を含めほとんど明らかとなっていない¹⁾。本研究では、H-PGDS と GSH, GSH 類似化合物および基質安定誘導体との等温滴定型熱測定(ITC)による相互作用解析を行うことで、H-PGDS の詳細な分子認識機構を調べることを目的としている。

【方法】

H-PGDS 発現プラスミドを用いて大腸菌 BL21(DE3)を形質転換し、培養した。さらに集菌した菌体を破砕し、陰イオン交換クロマトグラフィー、GST アフィニティークロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィーで精製した。得られた H-PGDS と補酵素 GSH, GSH 類似化合物および基質安定誘導体を用いて、ITC による相互作用解析を行った。基質 PGH₂ は、水溶液中で数分以内に分解されるため、代替物として基質安定誘導体を用いた。

【結果と考察】

H-PGDS と GSH の ITC 測定の結果、滴下による反応熱が検出され、H-PGDS と GSH は解離定数 K_d 値が 327 μ M で特異的に結合することが分かった。一方で、H-PGDS と GSH 類似化合物である Arg-Cys-Gly (RCG)および L- α -glutamyl-L-cysteinylglycine (α -GSH)の ITC 測定では、滴下による反応熱は検出されず、H-PGDS と RCG, α -GSH はいずれも結合しないことが分かった。また、H-PGDS と基質安定誘導体 U-46619 の ITC 測定結果、滴下による反応熱が検出されず、GSH 非存在下では H-PGDS と U-46619 は結合しないことが分かった。次に、H-PGDS に GSH を結合させた状態で U-46619 との ITC 測定を行うと、滴下による反応熱が検出され、GSH 存在下では H-PGDS と U-46619 は結合することが分かった。

以上の GSH と GSH 類似化合物の ITC 測定の比較から、H-PGDS が GSH のアミノ基の位置を厳密に認識している可能性が示された。また、基質安定誘導体を用いた ITC 測定の結果より、GSH 非存在下の H-PGDS は apo 型では基質を認識せず、補酵素である GSH が結合することで PGH₂ の結合が可能になると考えられる。

- 【文献】 1. Kanaoka, Y., Ago, H., Inagaki, E., Nanayama, T., Miyano, M., Kikuno, R., Fujii, Y., Eguchi, N., Toh, H., Urade, Y. and Hayaishi, O., *Cell*, **90** (1997) 1085-1095.
2. Okinaga, T., Mohri, I., Fujimura, H., Imai, K., Ono, J., Urade, Y. and Taniike, M., *Acta Neuropathol.*, **104** (2002) 377-384.

分子進化解析を利用した B 群レンサ球菌のシアル酸分解酵素が
病原性に果たす役割の解明

○山口 雅也, 広瀬 雄二郎, 中田 匡宣, 後藤 花奈, 住友 倫子, 川端 重忠
阪大・院歯・口腔細菌

【目的】B 群レンサ球菌 (GBS) は、新生児の細菌性髄膜炎の原因菌として知られている。GBS は、主要な病原因子としてシアル酸で修飾された多糖莢膜を持つ一方で、肺炎球菌のシアル酸分解酵素 NanA と相同性の高い NonA を有する。肺炎球菌において、NanA は宿主の中枢神経系への侵入因子として働くことが報告されている¹⁾。本研究では GBS における NonA について、分子進化解析による重要性の予測と機能解析を行った。

【方法】肺炎球菌の *nanA* 遺伝子のオルソログを BLAST によって検索した。得られた遺伝子群について、遺伝子配列整列ソフト MAFFT によって多重配列整列を行った。得られた多重配列整列から、ベイズ法による分子系統樹の作成を行った。さらに、分子進化解析ソフトウェア HyPhy を用いて、統計的に有意な割合でサイレント変異が存在するコドンとミスセンス変異が存在するコドンを検出した。次に、GBS A909 株を親株として、*nonA* 欠失株、および *nonA* 欠失株に肺炎球菌の NanA を導入した株を作製した。これらの菌株について、蛍光基質を用いたシアル酸分解能の測定、ならびに蛍光標識ガラクトース結合レクチンを用いた莢膜シアル酸分解能の比較を行った。さらに、ヒト脳血管内皮細胞への侵入能、およびヒト血中での生存能を比較した。また、マウスに各菌株を経静脈感染させた後に、血中と脳内の菌数を算定した。

【結果】得られた分子系統樹から、レンサ球菌における *nanA* 遺伝子オルソログは、肺炎球菌を含む mitis 群レンサ球菌を主とするグループと、*Streptococcus iniae* と GBS からなるグループに大別されることが示された。また、分子進化解析から、肺炎球菌の *nanA* 遺伝子においては約 14% のコドンにサイレント変異が蓄積されていたのに対し、GBS の *nonA* 遺伝子では約 2% のコドンにのみサイレント変異が認められた。したがって、肺炎球菌の *nanA* 遺伝子と比較して、GBS の *nonA* 遺伝子における遺伝子変異の制約は弱いことが示唆された。次に、GBS 野生株と遺伝子変異株の表現型の比較を行った。GBS 野生株と *nonA* 欠失株はシアル酸分解活性を示さなかった。また、ヒト脳血管内皮細胞への侵入能、およびヒト血中での生存能の比較において、*nonA* 欠失株と野生株の間に有意な差は認められなかった。一方、NanA 発現 *nonA* 欠失株は高いシアル酸分解活性を呈し、自身の莢膜シアル酸を分解した。さらに、野生株および *nonA* 欠失株と比較して有意に高いヒト脳血管内皮細胞への侵入率を示した。その一方で、NanA 発現 *nonA* 欠失株のヒトおよびマウス血中での生存能は、両株と比較して有意に低下した。また、マウス脳内の菌数に有意な差は認められなかった。

【考察】これらの結果から、NonA は進化の過程でシアル酸分解能を失い、GBS のヒト脳血管内皮細胞への侵入ならびに血中生存能に寄与しないことが示された。また、活性型シアル酸分解酵素を GBS に発現させた場合、自身のシアル酸莢膜が分解され、GBS の生存にとって不利に働くことが示唆された。NonA がシアル酸分解能を失うことで、GBS は莢膜をシアル酸で修飾するという新たな生存戦略を選択した可能性が示された。

【文献】 1. Uchiyama, S., Carlin, A.F., Khosravi, A., Weiman, S., Banerjee, A., Quach, D., Hightower, G., Mitchell, T.J., Doran, K.S., Nizet, V. (2009) *J. Exp. Med.* 206, 1845–1852

B19

高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 由来の
新奇的な DNA 結合タンパク質 (TkaP) の構造・機能的解析
○高尾和也¹, 飯尾洋太², 井上真男², 藤井裕己³, 倉光成紀², 増井良治¹
¹大阪市大・院理,²阪大・院理,³阪大・院生命機能

【目的】 主要な翻訳後修飾の一つであるリン酸化は、細胞内情報伝達経路において転写制御に関わることが多い。様々な protein kinase や protein phosphatase による Ser, Thr, Tyr への可逆的なリン酸化は、真核生物だけでなく原核生物においても存在している。高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 由来の機能未知 DNA 結合タンパク質 TkaP についても、リン酸化プロテオーム解析により Ser のリン酸化が同定されている¹⁾。興味深いことに、リン酸化によって TkaP の DNA 結合能が阻害されることも明らかになった。しかし、TkaP は既知の DNA 結合タンパク質とは有意な配列相同性を持っておらず、具体的な分子機能については分かっていない。そこで本研究では、TkaP の DNA 結合様式を構造的側面から解析した。

【方法】 TkaP (77 残基) の C 末端領域を除く N 末端領域 (51 残基) のみでの部分的配列類似性の結果に基づいて、CopG (PDB ID, 1B01) をテンプレートとして、SWISS-MODEL を用いたホモロジーモデリングによる立体構造予測を行った。予測結果から DNA 結合に関わると予想される残基やリン酸化部位である残基に変異を導入した。さらに、C 末端領域を欠失させた変異体も構築した。野生型および変異体 TkaP は大腸菌で発現させ、3 種類のクロマトグラフィーにより精製した。会合状態はゲルろ過およびホルムアルデヒドを用いた架橋実験によって解析した。DNA 結合能は、60 bp の DNA を用いたゲルシフト法により解析した。

【結果】 立体構造予測の結果から、TkaP の N 末端領域は ribbon-helix-helix (RHH) 様のモチーフを持ち、二つの二量体から成る四量体として DNA に結合することが予測された。そこで TkaP の精製標品を用いて、まず会合状態について検討した。変性剤の添加やタンパク質濃度を下げることにより、ゲルろ過における見かけの分子量は三量体から四量体に相当する大きさまで解離した。ホルムアルデヒドを用いた架橋実験では、反応時間に伴って二量体、四量体、六量体に相当するバンドの形成が観察された。また、C 末端欠失変異体もゲルろ過では三量体から四量体の大きさを示した。次に、DNA 結合に関わる残基について検討した。予測構造ではリン酸化部位 Ser36 は DNA 近傍に位置し、リン酸化を模倣した酸性残基に置換したところ、野生型に比べて著しく DNA 結合能が低下した。さらに、DNA 近傍に位置する β -sheet 内の Arg8 と Gln10 のうち、Q10A 変異体では DNA 結合能が著しく低下した。また、C 末端欠失変異体は、野生型とほぼ同様の強さで DNA に結合した。

【考察】 RHH superfamily の転写因子の多くは二量体を形成し、N 末端の β ストランドと 2 つの α ヘリックス間のループによって DNA を認識する。架橋実験によって TkaP は二量体を構成単位とすることが示唆され、ゲルろ過では低いタンパク質濃度域で四量体付近まで解離した。また、 β ストランドとループ領域に存在する残基に変異を導入したところ、一部の残基で DNA 結合能が著しく低下した。これらの結果から、TkaP のモデリング結果を強く支持しており、TkaP は RHH 型タンパク質に似た DNA 結合様式をもつ新奇的なタンパク質であると推定された。

【文献】

1. Takahata, Y., Inoue, M., Kim, K., Iio, Y., Miyamoto, M., Masui, R., Ishihama, Y., Kuramitsu, S. (2012) *Proteomics* **12**, 1414-1430

B20

高度好熱菌 Protein kinase TpkD の構造安定性に対するリガンドの効果

○藤野友輔¹, 宮川武朗², 井上真男³, 藤井裕己², 倉光成紀³, 増井良治¹

¹大阪市大・院理, ²阪大・院生命機能, ³阪大・院理

【目的】タンパク質立体構造の安定性の維持は、フォールディングと密接につながっているだけでなく、その機能発現にも深く関わっている。特に耐熱性タンパク質の高温での熱安定性については、多くの構造的な因子の寄与が報告されている。高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 は至適生育温度が約 75°C であり、そのタンパク質のほとんどは高い耐熱性を示す。ところが、protein kinase の一つである TpkD は、50°C 付近で変性してしまう。しかし興味深いことに、ATP や ADP の存在下では熱安定性が約 30°C も上昇する。リガンドによってこれほど安定性が上昇する例は少ないが、生育温度の点からは生理的に重要な意味を持つと考えられる。そこで本研究では、ATP が TpkD に及ぼすこの特徴的な構造安定化機構を解明することを目的とした。

【方法】His タグを付加したリコンビナントタンパク質として大腸菌で TpkD を大量発現させ、アフィニティークロマトグラフィーによって精製した後、TEV プロテアーゼによってタグを除去した。得られた精製標品を用いて、まず ATP 添加に伴う遠紫外 CD スペクトルおよび蛍光スペクトルの変化を測定した。さらに、ゲル濾過を用いて TpkD の会合状態に対する ATP の影響を調べた。次に、変性剤（尿素）変性に対する ATP の効果を蛍光スペクトルと CD スペクトルによって検討した。ATP 以外のアデニンヌクレオチドについても同様の実験を行った。また、ホモロジーモデリングによる TpkD の立体構造予測を行い、TpkD の ATP 結合部位を予測した。

【結果】TpkD の尿素濃度過程を Trp 残基に由来する蛍光スペクトルで追跡したところ、尿素濃度に依存して蛍光強度が大きく変化した。また、この尿素変性は可逆であった。変性曲線から求めた ATP 非存在下での変性中点濃度 (C_m) は約 5.0 M だったが、ATP 存在下では約 6.5 M に上昇した。二次構造含量を反映する CD スペクトルでも、ATP の有無により C_m は約 5.0 M から約 6.0 M に上昇した。これらの結果から、ATP は尿素変性に対しても安定化効果をもたらすことが分かった。次に、ATP の添加による TpkD の構造変化を検討した。まず蛍光スペクトルでは、ATP 濃度の増加にともなって蛍光強度が増加した。一方、ATP 添加による遠紫外 CD スペクトルの有意な変化は見られなかった。ゲル濾過においても、ATP の有無による見かけの分子量の変化は観察されなかった。

【考察】今回の結果から、ATP は熱変性だけでなく、変性剤変性に対しても TpkD の構造安定性を高める効果があることが分かった。また、ATP 添加による変化は、CD スペクトルよりも蛍光スペクトルにおいてより顕著であった。さらに、TpkD のモデル構造における Trp 残基 (3 残基) は、基質である ATP の結合部位からは離れていた。これらのことから、TpkD に対する ATP の構造安定化は主に三次構造の変化によるものと考えられた。一般に細菌における ATP の細胞内濃度は mM レベルと報告されている。ATP 濃度に対する蛍光強度の変化が ATP 結合を反映していると仮定すると、TpkD に対する ATP の解離定数は μM レベルと求められた。このことから、高度好熱菌の生育温度では ATP が結合することによって TpkD が安定化されている可能性が強く示唆される。

Staphylococcus aureus の温度刺激による抵抗性の変化

○川井真好¹, 通山由美²

¹姫路獨協大・薬・衛生・微生物, ²姫路獨協大・薬・生化

【目的】 *Staphylococcus aureus* は常在菌であるが, しばしば日和見感染を引き起こす. しかしながら, *S. aureus* が易感染化するメカニズムは詳細にはわかっていない. *S. aureus* は, 様々な刺激によりその性状を変化させて, 外界からのストレスを和らげる. その一例として抗酸化活性を有するカロテノイド色素を産生することにより, 酸化ストレスに抵抗していることが報告されている¹⁾. 我々は, 身近に起こり得る温度刺激に着目し, 培養温度の異なる *S. aureus* の性状を検討した. また, 易感染化との関連を検討するため, 活性酸素種の産生を通して生体防御能を発揮する好中球に注目し, 好中球の生体防御機構, 食作用や Neutrophil extracellular traps (NETs) に対する *S. aureus* の抵抗性を検討したので報告する.

【方法】 好中球モデルとして, ヒト白血病細胞株 HL60 細胞を all-trans retinoic acid (ATRA) 処理により好中球様に分化して用いた. さらに, ヒト好中球を用いた. 菌株は, *S. aureus* ATCC12600, N315 を用いた. 好中球に対する *S. aureus* の抵抗性は, Soybean-Casein-Digest (SCD) 寒天培地を用いた生菌数測定により生残率を求めた. 薬剤感受性は 2 倍寒天希釈法および 2 倍液体希釈法により測定した.

【結果】 *S. aureus* ATCC12600 の培養温度を変えると, 産生する黄色色素量が変化した. すなわち, 色素産生量は温度依存であることが明らかとなった. そこで, 30~43°C で培養した *S. aureus* の薬剤抵抗性に変化が見られた. 続いて, 好中球モデル HL60 細胞に対する抵抗性を検討したところ, 黄色の色素産生量の多い高温培養株が好中球への抵抗性を有していることがわかった. 次に, HL60 細胞による食作用と NETs 形成のどちらに対して, 抵抗性を示しているのか区別するため, 人工的な NETs 形成誘導試薬, PMA で好中球を刺激後, *S. aureus* を加えて生残率を解析した. 黄色色素産生量の多い高温培養株は, 色素産生量の低い低温培養株より残存性が高かった. さらに, ヒト好中球についても高温培養株が高い生残性を示した.

【考察】 高温培養した *S. aureus* は, 薬剤などに弱い抵抗性を示し, 外界からのストレスにも抵抗性を示すとともに好中球による生体防御作用の一つである NETs 形成に対する抵抗性に寄与していることが示唆された. 今後, このメカニズムについて詳細に解析する予定である.

【文献】 1. Cluditz, A., Resch, A., Wieland, K., Peschel, A., Gotz, F. (2006) *Infect. Immun.* 74, 4950-4953

B22

メッシュ状金属薄膜を用いたエアロゾルの分離・検出と生化学的分析

○山本晃毅¹, 白井恵美¹, 井上有香¹, Ernest Wandera², 一瀬休生²,
神波誠治³, 近藤孝志³, 長谷川慎¹

¹長浜バイオ大学・院・バイオサイエンス,

²長崎大学熱帯医学研究所ケニア拠点, ³(株)村田製作所

【目的】エアロゾルは、土壌や水圏に由来するもの、工業排気や燃料消費などの人間の活動に由来するもの、カビや花粉といった生物に由来するものが挙げられる。人体に取り込まれやすいPM2.5相当のエアロゾルをメッシュ状金属薄膜に捕捉し、付着細菌の同定により感染伝播調査の手法を確立することを本研究は目的としている。本発表では捕捉されたエアロゾルの元素組成の調査、16S rDNAを用いた空気中の細菌叢解析の結果について報告する。

【方法】半導体作製技術を利用して作製された金属薄膜(メタルメッシュデバイス(MMD))は、規則正しい周期構造を持つため、粒子の大きさによる精密な“ふるいわけ”が可能であり、金属表面特有の光学特性を利用してIR透過スペクトルから付着物の検出・定量が可能である。孔径4.2 μ m、1.8 μ mのMMDを用いてエアロゾル吸引を16時間行った。さらに、2時間おきに電子天秤を用いて重量を測定し、同時に赤外分光光度計(FT-IR)を用いてスペクトルの変化を計測した。フィルター上に残留した粒子を光学・電子顕微鏡により観察し、波長分散型X線分析装置(WDX)により、エアロゾルの元素分析を行った。さらに、細菌中に保存される16S rDNAをPCR法により増幅し、シーケンシング解析を行った。

【結果】MMD表面の誘電率の変化により、IR透過スペクトルにシフトが生じた。このシフト差および透過率の変化はエアロゾル重量変化と相関関係があることが示された。フィルター表面上に残留したエアロゾルの捕集場所および分級の違いにより元素組成、細菌叢組成について解析することができた。

【考察】捕捉されたエアロゾル質量とシフト差に相関関係が示された。エアロゾルの元素組成、細菌叢組成は、生活環境および土壌の違いを反映しているものと考えられる。今後、空気中に存在する細菌の動態調査および病原性細菌の分離・検出を目指す。

優秀発表賞候補者演題

C01

カルマン症候群原因遺伝子産物 Anosmin-1 は Netrin-1 と相互作用し 嗅神経の伸長を促進する

○和田千菜津¹, 清水昭男^{1,2}, 浅野弘嗣¹, 石井泰雄¹, 木田朱音¹, 安木実悠¹, 徳村脩人¹, 小野勝彦³, 村上志津子⁴, 佐藤直子⁵, 瀬尾美鈴¹

¹京産大・総合生命・生命システム, ²滋賀医大・分子病態生化学, ³京都府立医・神経発生生物, ⁴順天堂大医・神経生物, ⁵東大医・小児

【目的】カルマン症候群(KS)は、低ゴナドトロピン性性腺機能低下、嗅覚低下・消失、二次性徴の欠如を伴う先天性疾患である¹⁾。原因遺伝子 KAL1 にコードされる Anosmin-1(Anos1)は分子量 100kDa の分泌型糖タンパク質である。その機能喪失型変異体は、正常な嗅球の発生を誘導できず KS が引き起こされると考えられている。発生過程において、嗅神経が嗅上皮から伸長して嗅球へ、嗅球から嗅策が視床下部へ向けて投射され、性腺刺激ホルモン産生神経細胞がそれらの軸索上を移動して嗅上皮から視床下部へと定着する。また、Netrin-1(NTN1)はノックアウトマウスの解析から嗅索ニューロンを誘引する分子であると報告されている。当研究室において Anos1 と NTN1 が直接結合することを見いだした。本研究では、KAL1 を有するニワトリ胚を用い、中枢神経系での Anos1 と NTN1 タンパク質の共局在の有無を検証した。また、Anos1 と NTN1 が結合し、相互作用することで嗅神経の誘引作用にどのような影響を及ぼすかを検証した。

【方法】E4～E12 のニワトリ胚を用い、中枢神経系での Anos1 と NTN1 タンパク質の局在を免疫組織染色法により検証した。嗅神経の誘引作用の検証は共培養系を用いた。ニワトリ胚から採取した嗅上皮 (E3～E4) の近傍に Anos1 または NTN1 タンパク質を強制発現させた HEK293T 細胞塊(コントロール: HEK, Anos1: Anos1-HEK, NTN1: NTN1-HEK) を 25%とマトリゲルと 60%コラーゲン中で共培養し、神経マーカーである Tuj-1 抗体を用いた免疫染色法により嗅神経の誘引作用を検証した。

【結果】ニワトリ胚を用いた Anos1 と NTN1 タンパク質の免疫組織染色において、E8～E12 の嗅球で Anos1 および NTN1 タンパク質が共局在していることが認められた。共培養系を用いた嗅神経の投射実験において、Anos1-HEK または NTN1-HEK 単独の神経突起誘引作用は HEK と比較して高かった。また、Anos1/NTN1-HEK の神経突起誘引作用は Anos1-HEK または NTN1-HEK 単独と比較して高く、Anos1 および NTN1 の相互作用により、相乗的な神経突起誘引作用が認められた。

【考察】以上より、発生期の脳において Anos1 および NTN1 の分子間相互作用により、軸索ガイダンスを制御している可能性が示唆された。また、共培養実験の結果から、Anos1 と NTN1 は、嗅上皮から嗅球への嗅神経の伸長を促進・誘引していることが示唆された。

【文献】

1. Sato N, et al. (2004) *J Clin Endocrinol Metab.* 89, 1079-1088

Anosmin-1 の血管内皮細胞に対する生理活性の検証と
そのシグナル伝達経路の解析

○松島章子¹, 清水昭男^{2,3}, 浅野弘嗣², 近藤真菜美¹, 瀬尾美鈴^{1,2}
¹京産大・院・生命科学, ²京産大・総合生命・生命システム,
³滋賀医大・分子病態生化学

【目的】先天性疾患 Kallmann 症候群は嗅球形成不全の病態を伴う疾患である。嗅球の形成不全は、嗅上皮から終脳への嗅神経軸索伸長が正常に誘導されないことに起因すると考えられている。これまでに Kallmann 症候群の原因遺伝子複数同定されており、それらの遺伝子産物はその生理活性として神経軸索伸長または軸索ガイダンスを引き起こす。またそれらのうちの多くの分子は、血管内皮細胞に対しても生理活性を有していることが報告されている。これは神経発生時において、軸索ガイダンス分子の受容体は血管内皮細胞にも発現し、軸索と同様のシグナルを受け取って並列して伸長することに起因する¹。そこで私たちは、Kallmann 症候群の嗅球形成不全の病態は、血管が正常に形成されないことが原因で引き起こされるのではないかという仮説を立て、報告されている原因遺伝子がコードするタンパク質の中で血管内皮細胞に対する生理活性が検証、または報告されていない分子を検索した。その結果、該当した分子は KAL1 遺伝子産物 Anosmin-1 であった。Anosmin-1 は終脳より分泌されて、嗅上皮から嗅神経を誘引し嗅球を形成させる誘因性軸索ガイダンス分子であることが報告されている。しかし、今までに血管内皮細胞に生理活性は報告されていない。そこで私たちは本研究において、Anosmin-1 が血管内皮細胞に対して生理活性を有しているかどうかを検証し、血管内皮細胞における受容体同定とそのシグナル伝達経路の解析を行った。

【方法】実験には HUVEC (ヒト臍帯静脈内皮細胞) および bEnd3 細胞 (マウス微小血管内皮細胞) といった 2 種類の血管内皮細胞を用いた。血管内皮細胞における Anosmin-1 による増殖能を proliferation assay、遊走能を Transwell migration assay、管腔形成能を 2D tube formation assay を用いて、血管内皮増殖因子 VEGF-A の活性と比較した。血管形成において主要なシグナル伝達経路である Ras-ERK1/2 経路、PI3K-Akt 経路、PLC-PKC 経路が Anosmin-1 によって活性化されるか、また VEGF-A の血管内皮細胞における主要な受容体である VEGFR2 がリン酸化されるかを Western Blotting 法によって解析した。Anosmin-1 による管腔形成が PLC γ 1 のノックダウンによって抑えられるかを 2D tube formation assay を用いて検証した。生体組織の血管において Anosmin-1 が血管形成を促進するかを、胎生 12 日目 (E12) のニワトリ胚の大動脈弓を用いて検証した。

【結果】Anosmin-1 は HUVEC においては遊走、増殖、および管腔形成を促進し、bEnd3 細胞においては遊走、管腔形成を促進した。また、Anosmin-1 刺激によって HUVEC、bEnd3 細胞どちらの細胞においてもホスホリパーゼ C γ 1 (PLC γ 1) 及びその下流に位置するプロテインキナーゼ C 基質 (PKC substrate) のリン酸化が引き起こされた。血管内皮細胞の PLC γ 1 を siRNA でノックダウンすると Anosmin-1 によって誘導される管腔形成は抑制された。Anosmin-1 は刺激後 5min において、VEGFR2 のリン酸化を引き起こした。Anosmin-1 によって引き起こされる VEGFR2 のリン酸化は VEGF-A 刺激で引き起こされるものと比べて弱かった。Anosmin-1 はニワトリ胚 E12 の大動脈弓の血管形成を促進した。

【考察】本来 Anosmin-1 が嗅球内の血管形成を誘導しているが、変異により Anosmin-1 が血管形成を誘導できなくなることにより嗅球形成不全を引き起こす可能性が示唆された。

【文献】 1. Licht T, Eavri R, Goshen I, Shlomai Y, Mizrahi A, Keshet E. (2010) Development. 137, 261-71

C03

Hippo シグナル伝達経路における MASK1 および MASK2 の機能解析

○中村圭佑, 出口幸大, 西良太郎, 堀利行

立命館大・生命・生医

【目的】Hippo シグナル伝達経路はショウジョウバエから哺乳類まで種を越えて保存され、細胞増殖やアポトーシスを制御するシグナル伝達経路である。また、Hippo 経路は臓器サイズを調節し、この経路の破綻は、がんの形成にも関与することが明らかにされている。我々はこれまでに、Yeast two hybrid(Y2H)法を用いて、Hippo 経路の中核分子である LATS2 と相互作用するタンパク質をスクリーニングし、MASK2(ANKRD17)を同定した。2013 年に、MASK2 とパラログである MASK1(ANKHD1)が、Hippo 経路の下流に位置する転写共役因子の YAP と相互作用し、その機能を増強することが報告されたが、その分子機構の詳細は不明である。そこで本研究では Hippo 経路における MASK タンパク質の機能解析を目的とし、Hippo 経路の中核因子の LATS2 や YAP、TEAD との関連を検討した。

【方法】HEK293T 細胞を用いた一過性発現系において共免疫沈降を行い、MASK2 と LATS2 の相互作用について確認した。また、MASK タンパク質の発現が YAP の標的遺伝子の転写および細胞増殖に与える影響をみるために MASK タンパク質をノックダウンした HEK293T 細胞を用いてリアルタイム PCR および細胞増殖試験を行った。加えて LATS2 の標的因子である YAP への関与として YAP のリン酸化に MASK タンパク質が影響するかどうかを一過性発現系において共免疫沈降を用いて解析した。最後に YAP-TEAD の相互作用に直接的もしくは VGLL4 などの因子を介して間接的に関与するかどうかについて HEK293T 細胞を用いた共免疫沈降を用いて検討した。

【結果】HEK293T 細胞を用いた共免疫沈降では MASK2 と LATS2 の相互作用が認められた。また、リアルタイム PCR を用いた YAP の標的遺伝子の転写への影響は MASK2 をノックダウンすることで転写が抑制されることが認められた。また、MASK2 のノックダウンにより細胞増殖が抑制された。しかし、MASK タンパク質による YAP のリン酸化については核内移行に重要とされているセリン 127 のリン酸化とチロシンのリン酸化に変化は認められなかった。YAP-TEAD の相互作用への影響についてはまだ確定的な結果がえられていない。

【考察】LATS2 と MASK2 の相互作用により MASK タンパク質の Hippo 経路への関与が示唆された。これまでの報告と一致して、MASK2 ノックダウンによって YAP の標的遺伝子の転写は抑制され、細胞増殖も抑制された。しかし LATS2 の標的因子である YAP のリン酸化は認められなかったため、MASK タンパク質はリン酸化以外で Hippo 経路に関与している可能性が示唆された。今後、MASK タンパク質による YAP-TEAD の相互作用への影響について検討していく必要があると考える。

常染色体劣性骨格異形成症の原因遺伝子である
Glypican-6 の hedgehog シグナル伝達における制御機構の解析○Tomomi Izumikawa, Mariana Capurro, Wen Shi, and Jorge Filmus
Biological Sciences, Sunnybrook Research Institute, and Department of Medical
Biophysics, University of Toronto

【目的】 Glypican(GPC)は、グリコシルフォスファチジルイノシトールアンカーを介して細胞膜に結合している膜結合型プロテオグリカンで、細胞表面上にグリコサミノグリカン鎖であるヘパラン硫酸(HS)鎖を局在させることで、細胞外環境と細胞、あるいは細胞同士の相互作用を制御する機能をもつ。ヒトでは6種類のGPCが存在し、HS鎖を介して、形態形成因子であるhedgehog(Hh)、WntやBMP と相互作用し、それらのシグナル伝達を制御することが明らかにされている。近年、常染色体劣性骨格異形成症の原因遺伝子として、GPC6が同定された¹⁾。さらに、GPC6は、マウスの骨端軟骨の増殖軟骨細胞層で強く発現することが報告された¹⁾。しかし、GPC6がどのように骨の形成に関与しているかは、不明であった。そこで、所属研究室において、GPC6ノックアウト(KO)マウスを作成、解析した結果、GPC6KOマウスはヒトと同様に骨格形成異常がみられ、出生後致死となった。また、これまで骨の形成に重要なHhであるIhhのKOマウスとGPC6KOマウスの表現型が類似していたことから、GPC6がHhシグナル伝達を制御していると予想し、その制御機構の解明を試みた。

【方法】 GPC6 の Hh シグナル伝達活性は、NIH3T3 細胞に転写因子 Gli 結合領域を有するレポータープラスミドと GPC6 を導入し、Shh を加え、Gli による転写活性をルシフェラーゼ活性で評価した。所属研究室では、これまで他の GPC において、Hh シグナルを促進させるためには、Hh の受容体 Patched (Ptc) との結合および Hh シグナル伝達において必須の役割を果たす一次繊毛への局在が必須であることを報告した²⁾。そこで、pull-down 法を用いて、GPC6 と Ptc の相互作用解析を試みた。さらに、GPC6 の一次繊毛への局在について調べた。

【結果】 ルシフェラーゼ活性測定の結果、GPC6 は発現量依存的に Hh シグナルの活性を促進した。さらに、pull-down 法を用いた解析により、GPC6 は Ptc と結合することが明らかとなった。また、HS 鎖を欠損させた Δ GPC6 では、Hh シグナル活性は促進されず、Ptc との結合も見られなかった。一次繊毛における GPC6 の局在を調べた結果、これまでの報告とは異なり、GPC6 は一次繊毛に局在しなかった。そこで、一次繊毛への局在化には、リガンドである Shh が必要だと予想し、Shh を添加後に GPC6 の細胞膜上での局在を調べた結果、GPC6 は一次繊毛へと局在が変化した。しかし、HS 鎖を欠損させた Δ GPC6 では、Shh を添加しても一次繊毛への移動は観察されなかった。さらに、GPC6 の存在下においては、Shh を添加後、Hh 経路の調節を担う 2 つの受容体 Ptc と smoothed (Smo)の一次繊毛での局在が変化することが明らかとなった。

【考察】 以上の結果より、GPC6 は Hh と結合し、一次繊毛へと移動することで受容体である Ptc と Smo の局在を変化させ Hh 経路の調節を担っていると考えられる。さらに、Ptc との結合および一次繊毛へと移動には、HS 鎖が重要な機能を担っていることが示唆された。GPC6 は、他の GPC とは異なる機構で Hh のシグナル伝達を制御することで、骨の形成に重要な機能を担うことが示唆された。

- 【文献】 1. Campos-Xavier, A. B., et al. (2009) *Am. J. Hum. Genet.*, **84**, 760-770
2. Li, F., et al. (2011) *J. Cell Biol.*, **192**, 691-704

新規糖鎖ユニット“リビトールリン酸”の同定と
筋ジストロフィーへの関与

○金川基¹, 小林千浩¹, 田尻道子², 萬谷博³, 久我敦¹,
山口芳樹⁴, 和田芳直², 遠藤玉夫³, 戸田達史¹

¹神戸大・院医・分子脳/神経内科, ²大阪母子セ・代謝,
³東京健康長寿医療セ・老化機構, ⁴理研グローバル・糖鎖構造生物

【目的】ジストログリカン (DG) は、基底膜成分のラミニンやシナプス分子の膜受容体で、リガンドとの結合には *O*-マンノース (*O*-Man) 型の糖鎖修飾が必要である。*O*-Man 型糖鎖の末端には、キシロース (Xyl) とグルクロン酸 (GlcA) からなるリピート構造があり、直接のリガンド結合部位として機能している。また、*O*-Man 型糖鎖の異常は、ジストログリカン異常症 (DG 異常症) と総称される筋ジストロフィーの原因になることが知られている。しかし、ジストログリカンの糖鎖構造の全容や、DG 異常症原因遺伝子 *fukutin*, *fukutin-related protein (FKRP)*, *isoprenoid synthase domain containing (ISPD)* などの機能は不明だった。本研究では、DG 異常症の発症機序の理解と治療法への道筋を拓くことを目的に、ジストログリカン糖鎖構造と DG 異常症の原因遺伝子機能の解明を行った。

【方法】ジストログリカンの糖鎖修飾部位や発現細胞の培養条件を検討し、Xyl/GlcA リピートが生理的に修飾された組換え体を作製した。この組換え体由来の糖鎖構造を質量分析法や NMR 法で解析し、得られた構造をもとに、ISPD、フクチン、FKRP の機能を検討した。

【結果】リガンド結合糖鎖の Xyl/GlcA リピートが生理的に修飾された組換え体の作製にはじめて成功し、*O*-Man 型糖鎖の中にリビトールリン酸が二つ連なったタンDEM構造を見出した。リビトールリン酸はキシリトール系の糖アルコールリン酸で、バクテリアや植物での存在が確認されているものの、哺乳類で糖鎖ユニットとして機能していることは知られていない。バクテリアでは CDP-リビトールを糖供与体にして、リビトールリン酸が糖鎖に組み込まれる。DG 異常症の原因遺伝子として近年同定された ISPD はバクテリアの CDP-リビトール合成酵素と類似性を示しており、実際にリビトール5リン酸と CTP から CDP-リビトールを合成する活性をもっていた。また、フクチンと FKRP は CDP-リビトールを糖供与体にして、リビトールリン酸を DG 糖鎖に順に組み込むリビトールリン酸転移酵素であることも明らかになった。更に、ISPD、フクチン、FKRP の変異による DG 異常症患者のモデル細胞として、ゲノム編集法で各遺伝子を欠損させた細胞を樹立し、リビトールリン酸タンDEMの形成不全が発症原因であることを突き止めた。興味深いことに、ISPD 欠損型疾患モデル細胞に CDP-リビトールを投与すると、糖鎖異常が解消された。このことは DG 異常症に対する CDP-リビトール補充療法の有効性を示唆している。

【考察】本研究により、リビトールリン酸が哺乳類の糖鎖ユニットとして機能していることが明らかになり、その生合成異常が筋ジストロフィーの原因になることがあきらかになった。DG 異常症の発症メカニズムが解明されたことで、今後、治療薬としての CDP-リビトールの開発に拍車がかかると期待される。

【文献】 Kanagawa et al. *Cell Rep.* 2016, 14, 2209–2223.

FGF21 は胸腺細胞の成熟化を促進する

○中山喜明¹, 増田有紀¹, 伊藤信行², 小西守周¹

¹神薬大・薬・微生物, ²京大・院医・MIC

【目的】 Fibroblast growth factor (FGF)は、様々な細胞に対し、増殖活性や分化誘導など多彩な作用を示す多機能性細胞間シグナル因子である。このうち FGF21 は、主に肝臓から内分泌される糖脂質代謝調節因子であることが数多く明らかにされてきた^(1,2)。一方で我々は FGF21 の同定当初より、FGF21 が肝臓に次いで一次免疫器官である胸腺にも発現することを報告している⁽³⁾が、これまでに免疫系における FGF21 の機能に関する知見は得られていなかった。そこで本研究では、胸腺における Fgf21 の機能に着目し、特に、獲得免疫において中心的な役割を果たす T 細胞の胸腺内成熟過程における FGF21 の機能解析を行った。

【方法】 本研究では、Fgf21 による胸腺細胞の分化・成熟作用を検討するため、生後 1 週齢と 4 週齢の野生型(WT)マウスと Fgf21 遺伝子欠損(KO)マウスから胸腺細胞および脾臓細胞を採取し、各種 T 細胞分化マーカー抗体を用いた免疫染色の後に、フローサイトメトリーによる細胞分取・解析を行った。また、Fgf21 による胸腺細胞の成熟過程への直接作用を検討するため、胎生 15 日マウスからの胎児胸腺器官培養実験と、生後 8 週齢マウスからの胸腺細胞初代培養実験を行った。

【結果】 初めに、胸腺組織における Fgf21 や Fgf 受容体の発現細胞の同定を行った。Fgf21 は EpCAM 陽性 CD45 陰性の胸腺上皮細胞(TEC)に強い発現がみられ、その中でも特に UEA1・MHC II 両陽性の成熟髄質 TEC に最も強く発現がみられた。一方で Fgf 受容体や共受容体である β Klotho は TEC に強く発現が確認され、未熟胸腺細胞の一部にも、弱く発現が認められた。

次に、胸腺細胞に対する Fgf21 の生理的機能を解析するため、WT マウスと KO マウスの胸腺と脾臓から T 細胞を採取し、成熟 T 細胞(TCR β hi/CD69-)の分布を比較したところ、KO マウスでは WT マウスに比べ、胸腺と脾臓における成熟 T 細胞の分布が減少していた。Fgf21 が胸腺細胞の成熟促進作用を有する可能性が示唆されたことから、この可能性を検証するため、器官培養胎児胸腺に FGF21 タンパク質を添加したところ、タンパク質添加群では、非添加群と比較して、成熟 T 細胞の分布が増加していた。さらに、胸腺細胞初代培養系において FGF21 タンパク質を添加すると、未熟胸腺細胞の活性化マーカーである CD69 陽性細胞の分布の増加が確認された。

【考察】 以上の結果から、胸腺における T 細胞の成熟過程において、Fgf21 は成熟髄質 TEC より分泌され、未熟胸腺細胞に作用し、成熟 T 細胞への分化・成熟過程を促進することが示唆された。

- 【文献】
1. Itoh, N., Nakayama, Y., Konishi, M. (2016) *Front. Cell Dev. Biol.* 4:30.
 2. Hotta, Y., Nakamura, H., Konishi, M., Murata, Y., Takagi, H., Matsumura, S., Inoue, K., Fushiki, T., Itoh, N. (2009) *Endocrinology* Oct;150(10):4625-33.
 3. Nishimura, T., Nakatake, Y., Konishi, M., Itoh, N. (2000) *Biochim. Biophys. Acta.* 21;1492(1):203-6.

C07

筋肉の増加減退に関わる RhoA の機能解析と相互作用分子の探索

○櫛谷晃帆¹, 上田修司¹, 加藤良毅¹, 桐村悠佑¹, 石政碧¹,
吉野健一^{2,3}, 竹内敦子⁴, 山之上稔¹, 白井康仁¹

¹神戸大・院農・動物資源, ²神戸大・バイオシグナル, ³神戸大・院医,
⁴神戸薬大

【目的】低分子量 G 蛋白質である RhoA は骨格筋の発達に不可欠であることが報告されている。また、骨格筋量を制御する因子としてインスリン様成長因子が挙げられ、先行研究によって C2C12 筋細胞株に IGF-1 を処理すると筋管の肥大と RhoA の発現量増加、活性化が促進されることが明らかになっているが、IGF-1 による筋肥大化における RhoA の調節機構は十分に解明されていない。そこで本研究では、IGF-1 による RhoA の発現量と活性調節機構について検討した。更に、骨格筋肥大における RhoA の機能を解明するため RhoA 相互作用分子の探索を行った。

【方法】マウス筋芽細胞株である C2C12 細胞を 2%HS/DMEM 培地で分化誘導させ、PI3K または mTOR 阻害剤で前処理後、IGF-1 (100 ng/ml) を培地に添加し 24 時間培養後、細胞を回収した。RhoA の発現量はウエスタンブロッティングによって測定、活性化 RhoA は GST 融合 mDia-RBD を用いたプルダウンアッセイによって測定した。RhoA の相互作用分子の探索は BirA 酵素標識法を用いた¹⁾。大腸菌由来のビオチンリガーゼである BirA を RhoA (WT) もしくは常時活性型変異体である RhoA (G14V) に融合し、これらを 293T 細胞に遺伝子導入し、24 時間後に無血清培地に交換するとともにビオチンを 50 μ M となるよう添加し 24 時間培養した。細胞ライセート中のビオチン化タンパク質は、ビオチン-ストレプトアビジン結合を利用し、Tamavidin 2-REV ビーズを加え 6 時間転倒混和させることで精製した。精製したタンパク質は質量分析 (LC-ESI-MS/MS) もしくはウエスタンブロッティングに供し、RhoA と相互作用する分子を解析した。

【結果】IGF-1 添加による PI3K、mTOR の活性化を、リン酸化抗体を用いて検出し、次に RhoA の発現増加と活性化を確認した。この RhoA の活性化は PI3K 阻害剤で抑制されなかったが、RhoA の発現増加は PI3K と mTOR 阻害剤によって抑制された。また、作製した BirA-RhoA を用いて RhoA 相互作用分子を探索したところ、BirA-RhoA (WT)、BirA-RhoA 常時活性型変異体 (G14V) を過剰発現させた細胞で、それぞれ 33 種類、22 種類の分子の同定に成功した。更に RhoA 関連候補分子の emPAI 値を比較したところ、Ste20-like protein kinase (SLK) において顕著な値が示され、質量分析によって SLK のビオチン化を確認した。

【考察】以上の結果から、PI3K と mTOR が IGF-1 による RhoA の発現量増加に寄与しており、PI3K は RhoA の活性化に寄与していないことが示唆された。また、BirA 酵素標識法を用いた RhoA 相互作用分子の探索において、RhoA と相互作用し、その調節に関わる候補分子として SLK を同定した。SLK は MAPK を制御するリン酸化酵素でありノックダウンすると平滑筋細胞の分化に障害が生じることなどが報告されているが²⁾、骨格筋における RhoA や IGF-1 との関係性は不明な点が多いため、現在骨格筋肥大における SLK の機能を検討している。

- 【文献】 1. Kyle J. Roux et al. (2012) The Journal of Cell Biology, Vol. 196 No.6 801-810
2. Khalid N. Al-Zahrani et al. (2013) Cell Adhesion & Migration, 7:1, 1-10

C08

心臓特異的ミオシン軽鎖キナーゼ (cMLCK) 賦活剤の開発

○宇山侑希¹, 塚本蔵¹, 菅裕明², 高島成二¹

¹大阪大学・生命機能研究科 ²東京大学・理学系研究科

【目的】

生活習慣病の増加や平均寿命の延長に伴い、我が国では重症心不全患者が急速に増加し、心機能低下による ADL の著しい低下は医学的問題のみならず社会問題となっている。しかし、従来の強心薬は生命予後を悪化するため、その使用は強心薬の持続点滴が必要な治療抵抗性重症心不全患者に限られている。重症心不全患者の心機能を改善し、ADL および生命予後の改善をもたらす新しいタイプの強心薬を開発することは、医学的のみならず社会的にも大変意義深い。我々のグループは2007年に心臓特異的ミオシン軽鎖キナーゼ(cMLCK)を世界に先駆けてクローニングした¹。現在、cMLCKによるミオシン軽鎖のリン酸化により心筋収縮性を増強することを利用した、副作用の少ない強心薬の開発に向けて、cMLCK 活性制御剤のスクリーニングと開発を行っている。

【方法】

Sf21 細胞を用いて cMLCK、平滑筋特異的ミオシン軽鎖キナーゼ (smMLCK)、および骨格筋特異的ミオシン軽鎖キナーゼ (skMLCK) の大量精製を行った。また、大腸菌を用いて心室筋特異的ミオシン軽鎖 (MLC2v) および Calmodulin の精製も行った。RaPID system を用いて、精製した cMLCK を bait として cMLCK に特異的に結合する特殊環状ペプチドの同定・合成を行った。さらに cMLCK 活性測定は、Phos-tag PAGE と ADP-Glo Kinase Assay の 2 種類の方法で評価し、同定された環状ペプチドの cMLCK 活性に与える効果を評価した。

【結果】

精製した蛋白質を使った cMLCK 活性測定では Phos-tag PAGE を用いることで cMLCK 濃度依存にリン酸化された MLC2v が検出された。一方、ADP-Glo Kinase Assay では cMLCK の活性を定量化することが可能となった。RaPID system では、cMLCK 特異的に結合する 8 種類の特殊環状ペプチドの同定に成功した。この 8 種類のペプチドの cMLCK 活性に対する効果を調べたところ、1 種類のペプチドが cMLCK の活性を阻害ことがわかった。興味深いことに、このペプチドは cMLCK の isoform である smMLCK と skMLCK には活性阻害効果を示さなかった。

【考察】

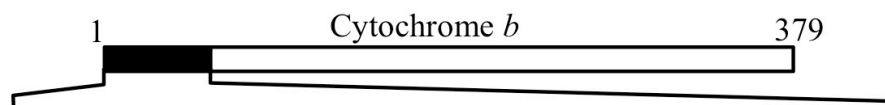
cMLCK 特異的に活性を阻害する環状ペプチドを得ることができた。このペプチドと cMLCK の共結晶を行うことで cMLCK の活性調節の機序の解明に繋がる可能性が考えられた。

【文献】 1. Seiji T. et al. (2007) J Clin Invest. Oct;117(10):2812-24

新規好中球活性化ペプチド、マイトクリプタイト-2の
構造活性相関の検討

○西野弘大, 丸谷飛之, 堤光己, 服部竜弥, 木曾良明, 向井秀仁
長浜バイオ大学大学院 バイオサイエンス研究科 ペプチド科学研究室

【目的】最近、我々は、新規好中球活性化ペプチド、マイトクリプタイトを健康なブタの心臓から単離・同定した^{1,2)}。これらのうち、マイトクリプタイト-2 (MCT-2)はミトコンドリア DNA にコードされたタンパク質、cytochrome *b* の N 末端由来ホルミルペプチドである。また、MCT-2 は好中球に発現している G タンパク質共役型受容体である formyl-peptide receptor-like 1 (FPRL1) のみに特異的に結合し活性化することで、好中球の遊走および食食を惹起することが示されている³⁾。しかし、MCT-2 の生理機能や病態との関わりには未だ不明な点が多い。それらを明らかにするためには、MCT-2 に対する拮抗阻害薬が有用な解析ツールになると期待される。そこで本研究では、MCT-2 に対する拮抗阻害薬の創製を目的とし、MCT-2 の構造活性相関を行い、MCT-2 の受容体である FPRL1 のリガンド認識機構の解析を行った。



Mitocryptide-2: Formyl-Met-Thr-Pro-Met-Arg-Lys-Ile-Asn-Pro-Leu-Met-Lys-Leu-Ile-Asn (15 残基)

【方法】本研究で用いた MCT-2 およびその誘導体は、Fmoc 固相法を用いて化学合成した。合成した MCT-2 およびその誘導体の活性は、好中球様に分化した HL-60 細胞における食食活性の指標である β -ヘキソサミニダーゼ分泌量を定量することで評価した。

【結果】我々はすでに先行研究により、MCT-2 の N-formyl 基が受容体の活性化に必須であること、またその formyl 基を含む 1 位から 4 位の配列が受容体の活性化に必要な最小構造であることを明らかにしている⁴⁾。そこで本研究では、最小活性単位である 1 位から 4 位アミノ酸残基の側鎖構造が受容体の活性化ならびに受容体との親和性に与える影響について検討した。その結果、1 位 Met の側鎖が受容体の活性化および親和性に寄与していること、また 4 位 Met の側鎖が受容体の活性化には影響を与えないものの、受容体との親和性に寄与することが示された。

【考察】先行研究および本研究により、MCT-2 の N-formyl 基、ならびに 1 位 Met の側鎖が受容体の活性化に寄与していることが示された。今後、その部分を修飾することで、MCT-2 に対する拮抗阻害薬を設計・創製していく予定である。

- 【文献】
1. Mukai, H., Hokari, Y., Seki, T., Takao, T., Kubota, M., Matsuo, Y., Tsukagoshi, H., Kato, M., Kimura, H., Shimonishi, Y., Kiso, Y., Nishi, Y., Wakamatsu, K., and Munekata, E. (2008) *J. Biol. Chem.* 283, 30596-30605
 2. Mukai, H., Seki, T., Nakano, H., Hokari, Y., Takao, T., Kawanami, M., Tsukagoshi, H., Kimura, H., Kiso, Y., Shimonishi, Y., Nishi, Y., and Munekata, E. (2009) *J. Immunol.* 182, 5072-5080
 3. Seki, T., Fukamizu, A., Kiso, Y., and Mukai, H. (2011) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 404, 482-487
 4. Marutani, T., Hattori, T., Koike, Y., Harada, A., Kiso, Y., and Mukai, H. (2015) In *Peptides 2014, Proceeding of the 33rd European Peptide Symposium*; Naydenova, E., Pajpanova, T., and Danalev, D. (Eds.) European Peptide Society, Sofia, 2015, 6-8

表面プラズモン共鳴法を用いた薬剤の薬効メカニズム解明
及び毒性予測評価に関する研究

○木内 啓貴^{1,2}, 有本 博一³, 西口 賢三¹, 松山 恵吾¹, 岡 雅子¹, 卷 秀樹¹,
北川 裕之², 上森 浩¹

¹塩野義製薬株式会社, ²神戸薬科大・院薬・生化, ³東北大・院生命科学・分子生命科学

【目的】「抗原と抗体」、「酵素と基質」、「糖鎖とレクチン」など、様々な分子が相互作用する生体分子として挙げられる。これらの分子は、特定の分子と特異的に、結合、解離することで機能を発揮する。分子間相互作用を分子レベルで解析することは、生体反応の機能を詳しく解明するための一つの手段となる。Biacoreは、表面プラズモン共鳴(Surface Plasmon Resonance, SPR)を測定原理として用い、生体分子間の相互作用を標識なしでリアルタイムにモニターすることができる装置である。固定化したリガンドとアナライトが結合すると、センサーチップ上の質量が上昇し、ごくわずかな質量変化をも検出することができる。

我々はSPRを用いて、薬効メカニズム解明の一環として、抗菌薬と化学合成した。

D-Ala-D-Ala や D-Ala-D-Lac などを含む lipid II 末端ジペプチドとの親和性評価系¹⁾, また、モデル脂質膜類(グラム陽性菌, グラム陰性菌及び哺乳動物細胞膜)との親和性評価系を構築した^{2,3)}。さらに、毒性評価研究の一環として、薬剤による甲状腺ホルモン(T4)のサイロキシン結合タンパク(transthyretin (TTR) / thyroxine binding globulin (TBG))との結合に対する競合阻害能を評価する分析法を構築した⁴⁾。

【方法】ランニング緩衝液は5% DMSO 及び0.05% Surfactant P20 を含んだPBS(抗菌薬とlipid II 末端ジペプチドとの親和性評価), 5% DMSO を含んだ2×PBS(抗菌薬とモデル脂質膜との親和性評価), 50 mg/L CaCl₂ を含んだ0.5×PBS(daptomycin とモデル脂質膜との親和性評価)及び100 mM NaCl を含んだ10 mM リン酸緩衝液(T4 競合阻害評価)を用いた。流速30 µL/min で100秒間(50 µL)注入した。注入後、ランニング緩衝液を30 µL/min で700秒間送液した。すべての測定は、測定温度25°Cで実施した。センサーチップ表面から解離せずに残存したアナライトをすべて取り除くために流速30 µL/min で50 mM NaOH あるいは10 mM HClを注入した。

【結果】薬効メカニズム解明の一環として、抗菌化合物のLipid II 末端ジペプチド

(D-Ala-D-Ala, D-Ala-D-Lac) 及び、脂質膜(哺乳動物細胞膜, グラム陽性菌膜, グラム陰性菌膜モデル)に対する親和性が評価できた。また、Daptomycin の脂質膜に対する特異性及び選択性が評価できる測定法を構築した。さらに、毒性評価研究の一環として、薬剤によるT4とサイロキシン結合タンパク(TTR:ラット, TBG:ヒト)との結合阻害評価系が構築できた。

【考察】抗菌薬におけるlipid II 末端ジペプチド及び、脂質膜に対する親和性と薬理活性の結果から化合物の結合選択性を評価することができ、抗菌化合物が有する薬効メカニズムに基づき親和性を示していることが確認できた。また、T4とTTRあるいはTBGに対する薬物の競合阻害能をIC₅₀あるいはIC₈₀として算出し、薬物の競合阻害能の強弱が予測でき、既報の論文から得られた薬物の阻害活性結果とほぼ同等であることがわかった。本SPR評価系は他の薬剤の結合特異性・選択性、薬効メカニズムや毒性予測に関わる評価などにも幅広く応用できることが期待される。

- 【文献】
1. Kinouchi H, Arimoto H, Nishiguchi K, Oka M, Maki H, Kitagawa H, Kamimori H. (2014) *Anal. Biochem.* 452, 67-75
 2. Kinouchi H, Arimoto H, Nishiguchi K, Oka M, Maki H, Kitagawa H, Kamimori H. (2014) *Biol. Pharm. Bull.* 37, 1383-1389
 3. Kinouchi H, Onishi M, Kamimori H. (2013) *Anal. Sci.* 29, 297-301
 4. Kinouchi H, Matsuyama K, Kitagawa H, kamimori H. (2016) *Anal. Biochem.* 492, 43-48

乳酸菌 (*Pediococcus acidilactici* R037) は免疫寛容樹状細胞を誘導し 動脈硬化を抑制する

○溝口泰司, 笠原和之, 山下智也, 佐々木直人, 江本拓央, 松本卓也,
林友鴻, 吉田尚史, 平田健一
神戸大学医学部循環器内科学分野

【目的】プロバイオティクスは制御性 T 細胞や免疫寛容樹状細胞の誘導を介して末梢組織における免疫寛容を誘導し、その結果様々な自己免疫疾患を改善させる可能性が示唆されている。その一方でプロバイオティクスが慢性炎症疾患である動脈硬化を免疫修飾により直接抑制したという報告はこれまでにない。そこでプロバイオティクスによる免疫修飾が動脈硬化に与える影響を R037 およびアポリポ蛋白 E 遺伝子欠損マウス (*ApoE*^{-/-} mice) を用いて検証した。

【方法】6 週齢の *ApoE*^{-/-} mice に *Pediococcus acidilactici* (R037) を 3 週間あるいは 12 週間の強制経口投与を行なった。9 週齢にて R037 投与による免疫変化を、18 週齢において大動脈基部における動脈硬化面積ならびに血漿コレステロールレベルを評価した。

【結果】血漿コレステロールレベルに影響を与えることなく、R037 投与群で大動脈基部における動脈硬化形成は有意に抑制された (コントロール群 $3.3 \pm 0.29 \times 10^5 \text{um}^2$ vs R037 投与群 $2.3 \pm 0.15 \times 10^5 \text{um}^2$; $P=0.005$; $n=15-17$)。R037 投与による免疫学的変化としては、R037 投与群において IFN- γ 産生性ヘルパー T 細胞 (Th1 細胞) の有意な減少および抗 CD3 抗体刺激によるリンパ球からの IFN- γ などの炎症性サイトカインの分泌の有意な減少が認められた。さらに ex-vivo の実験において、R037 投与群の脾臓から回収した樹状細胞はコントロール群に比べて CD4⁺ T 細胞からの炎症性サイトカインの産生や CD4⁺ T 細胞の増殖を有意に抑制し、R037 投与群の樹状細胞は免疫寛容性の作用を有することが示された。R037 投与群のマウスでは樹状細胞表面に co-inhibitory molecule として知られる Programmed cell death ligand-1 (PD-L1) の発現が有意に亢進しており、これが樹状細胞による免疫寛容のメカニズムに関与していることが示唆された。また R037 投与群の樹状細胞では IFN- β の発現が上昇しており、in-vitro の実験において IFN- β は樹状細胞の PD-L1 の発現を有意に上昇させた。この結果より R037 は樹状細胞による IFN- β の発現を刺激することで樹状細胞表面に PD-L1 を高発現させる可能性が考えられた。

【考察】IFN- γ などの炎症性サイトカインは動脈硬化促進的に働くことはよく知られており¹⁾、Th1 細胞の減少およびリンパ球による炎症性サイトカインの減少が R037 投与による動脈硬化抑制のメカニズムであると考えられた。また PD-L1 はその受容体である T 細胞上の Programmed cell death-1 (PD-1) との相互作用によりそのリンパ球からの炎症性サイトカインの産生および Th1 細胞を減少させることがすでに報告されており²⁾、R037 投与によって認められた免疫変化は PDL-1 を高発現した樹状細胞が関与している可能性が示唆された。以上のように R037 投与により免疫抑制性の樹状細胞を介して動脈硬化形成が抑制される可能性が示された。プロバイオティクスの投与は、免疫系の修飾により直接免疫反応や炎症に介入することで動脈硬化を抑制するという新たな動脈硬化予防法となりうると思われる。

- 【文献】
1. Gupta S, Pablo AM, Jiang XC, Wang N, Tall AR, Schindler C. *J. Clin. Invest.* 1997;99:2752-2761.
 2. Latchman YE, Liang SC, Wu Y, Chernova T, Sobel RA, Klemm M, Kuchroo VK, Freeman GJ, Sharpe AH. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101:10691-10696.

C12

低酸素は血管内皮細胞の Axin-1 発現を誘導し、Wnt/ β -catenin シグナルを

抑制することで肺微小血管の傷害を増悪させる

○中尾 宥介, 池田 宏二, 八木 敬子, 江本 憲昭
神薬大・院薬・臨床薬学

【目的】肺高血圧症は肺動脈圧が進行性に上昇し、やがて右心不全を合併して死に至る非常に予後不良な疾患群である。低酸素暴露は様々な原因による肺高血圧症の病態を修飾し、病状を悪化させる。一方、Wnt/ β -catenin シグナルは血管内皮細胞のアポトーシスを抑制し、様々なストレス傷害から肺微小血管を保護すると考えられ、そのシグナルの異常な変化が肺高血圧症の発症・進展に関わることが示唆されている。本研究の目的は肺高血圧症の発症・進展における Wnt/ β -catenin シグナルの役割を明らかとすることである。

【方法】私達は慢性的低酸素暴露により肺高血圧症モデルマウスを作成し、肺における Wnt シグナル関連遺伝子の発現を検討した。また、マウス (C166) およびヒト血管内皮細胞 (HUVEC) を塩化コバルトで処理して低酸素状態を擬似的に再現し、Wnt/ β -catenin シグナル関連遺伝子の発現を検討した。

【結果】慢性的低酸素暴露による肺高血圧症モデルマウスの肺では Wnt7b、Frizzled、LRP-5/6 および β -catenin 発現が有意に低下しており、Wnt/ β -catenin シグナルの全般的な低下が示唆された。次に血管内皮細胞の C166 および HUVEC を塩化コバルトで処理して Hypoxia-inducible factor (HIF)-1 を活性化し、Wnt/ β -catenin シグナル関連遺伝子の発現を検討したところ、HIF-1 活性化により Axin-1 の発現が有意に上昇することがわかった。Axin は GSK3 β と協調して β -catenin の分解を誘導する分子である。塩化コバルトで処理した血管内皮細胞では実際に β -catenin の蛋白分解が亢進しており、 β -catenin の蛋白発現が低下することがわかった。更に、血管内皮細胞に Axin-1 を過剰発現させると β -catenin が減少し、その結果、血管内皮アポトーシスが亢進し、遊走能が低下することがわかった。

【考察】以上の結果から低酸素刺激は Axin-1 の発現を誘導して血管内皮細胞の Wnt/ β -catenin シグナルを抑制することがわかった。低酸素による Wnt/ β -catenin シグナルの減弱は、肺微小血管内皮細胞のストレス傷害を加速させ、その結果、肺高血圧症を進展させる可能性が示唆された。

Dipeptidyl peptidase III によるアンジオテンシン II 分解の生化学的解析と
高血圧マウスモデルにおける降圧作用の検討○清水昭男¹, Xiaoling Pang¹, 栗田宗一¹, 竹内圭介¹, 石田哲生², 扇田久和¹
¹滋賀医大 生化分子生物 分子病態, ²琉球大学 理 海洋自然科学 化

【目的】慢性高血圧症は治療すべき危険因子の一つである。アンジオテンシン II (Ang II) は AT₁ 受容体を介して末梢血管平滑筋を収縮させると共に、副腎皮質ホルモンのアルドステロン分泌を誘導し腎臓での水再吸収を促進して、血圧を上昇させる。過剰な Ang II は慢性高血圧症を引き起こし、心臓や腎臓に障害が生じる。今日、Ang II をターゲットとした降圧薬が数多く開発され使用されているものの、これら既存の降圧薬を用いても降圧効果が十分に得られない患者が多数存在する。Dipeptidyl peptidase III (DPP III) は、分子量約 80kDa の亜鉛依存性アミノペプチダーゼで、アミノ酸残基数 3~10 のポリペプチドの N 末端を切断し、2 アミノ酸残基を放出する。DPP III の基質の一つとして Ang II が報告されているが、DPP III と Ang II の詳細な解析はなされていない。本研究は In vitro において DPP III が Ang II を加水分解する際の生化学的特性を解析し、さらに高血圧マウスモデルを用いた In vivo においてその降圧作用を実証することを目的とした。慢性高血圧症に起因する心臓と腎臓障害に対する保護効果も検討した。

【方法】DPP III を組換えタンパク質として大腸菌を用いて産生精製した。DPP III の Ang II 分解活性の生化学的特性を、逆相 HPLC/MS を用いて解析した。野生型 DPP III の酵素活性解析に加えて、様々な長さの N 末または C 末欠損変異体 DPP III を作製し、各変異体の酵素活性を測定した。In vivo 実験では、Ang II (400 ng/min/kg) またはノルアドレナリン (4 µg/min/kg) を定速で放出する浸透圧ポンプをマウス背部皮下に埋め込み、高血圧マウスモデルを作製した。この状態で、マウスの尾静脈から野生型または変異体 DPP III (200 µg/個体) あるいはカンデサルタン (30 µg/個体) を投与した。血中の Ang II 濃度は ELISA で測定した。心肥大は心超音波測定により、心線維化は Masson's 染色法で解析した。尿中アルブミンは CBB 染色法により可視化し定量化した。

【結果】逆相 HPLC/MS を用いた解析により、野生型 DPP III の酵素活性は、 K_m 3.7×10^{-6} M、 V_{max} 3.3×10^{-9} M \cdot s⁻¹ であった。次に、DPP III の様々な N 末または C 末欠損変異体の酵素活性を測定したところ、C 末端を 12 残基欠損させた DPP III (DPP III Δ C1) は、野生型と同様の酵素活性を維持したが、これ以上 C 末端を欠失させた変異体や、N 末端側を欠失させた変異体は、酵素活性を有しなかった。In vivo において、Ang II 放出ポンプの埋め込みにより収縮期血圧は平均 111±6 mmHg から平均 152±19 mmHg へと上昇した。この高血圧マウスに野生型 DPP III を静注すると、1 時間後に収縮期血圧は平均 97±10 mmHg、3 時間後に平均 109±15 mmHg まで有意に低下した。一方、心拍数の変化はなかった。血中の Ang II 濃度は DPP III の投与前 136.8 pg/ml から投与後 15 pg/ml へと減少した。DPP III Δ C1 投与においても同様に、高血圧マウスの血圧を低下させた。ところで、ノルアドレナリン放出による高血圧マウスでは、DPP III による降圧効果は見られなかった。Ang II 放出ポンプの埋め込み後より 1 日おきに野生型 DPP III またはカンデサルタンを尾静脈より投与したところ、心臓線維化、心肥大および尿中アルブミン量は非投与群に比べて劇的に減少した。

【考察】DPP III が Ang II を分解する酵素学的特性を明らかにすると共に、Ang II 過剰高血圧マウスで、DPP III が降圧作用および心臓や腎臓の臓器保護効果を有することを示した。

C14

**Angiogenic Adipokine Neuregulin-4 Ameliorates Adipocyte Dysfunction
by Regulating Adipose Tissue Angiogenesis**

○ Masahiro Tsuji¹, Dhite Bayu Nugroho^{1,2}, Koji Ikeda¹, Ken-Ichi Hirata²,
Noriaki Emoto¹

¹Kobe Pharmaceutical University · Clinical Pharmacy, ²Kobe University Graduate School of
Medicine · CV medicine

【Objective】 Adipose tissue angiogenesis is an important factor in the maintenance of adipocyte homeostasis, impairment of which causes systemic metabolic disorders. Although adipocytes produce various angiogenic factors, little is known about the interactive communications between endothelial cells (EC) and mature adipocytes in the regulation of adipose tissue homeostasis. The objective of this study is to elucidate a potential cross-talk between EC and mature adipocytes, and to reveal a novel mechanism regulating adipose tissue angiogenesis and homeostasis.

【Method】 We searched for genes that is highly expressed in adipose tissue, and the expression of which is regulated by EC using microarray analysis.

【Results】 We identified one interesting gene which encodes neuregulin-4 (Nrg4), a latest member of neuregulin family that are part of the EGF family proteins. Nrg4 is highly and preferentially expressed in mature adipocytes, while its receptor is expressed in EC but not in adipocyte. Nrg4 enhanced endothelial angiogenic functions and angiogenesis but its expression in adipocytes was negatively regulated by EC and/or blood vessels, constituting a negative-feedback loop for adipose Nrg4. Genetic loss of Nrg4 caused overweight and impaired metabolic homeostasis even while consuming normal chow, whereas targeted activation of Nrg4 (aP2-Nrg4-Tg) in adipocytes enhanced insulin sensitivity and protected mice from obesity-related metabolic disorders. Mechanistically, Nrg4 modulated energy expenditure, adipose tissue inflammation and adipokine expression by regulating adipose tissue angiogenesis.

【Conclusions】 Here, we show that Nrg4 is a paracrine-acting adipokine that regulates adipose tissue angiogenesis through a signaling crosstalk between EC and mature adipocytes. These data provided new insight in the interactive communication between EC and mature adipocytes in the regulation of adipose tissue angiogenesis, and shed light on Nrg4 as a therapeutic target for the treatment of metabolic disorders associated with obesity.

C15

Vascular senescence-messaging secretome disrupts metabolic function of adipocytes; A novel mechanism in metabolic disorders associated with aging

○Agian Jeffilano Barinda^{1,2}, Koji Ikeda¹, Ken-Ichi Hirata², Noriaki Emoto¹

¹Kobe Pharmaceutical University • Clinical Pharmacy,

²Kobe University Graduate School of Medicine • CV medicine

【Objective】 Aging often causes dysfunction of organs including adipose tissue and blood vessels, which is strongly associated with age-related diseases such as diabetes and cardiovascular disease. Senescent cells secrete several cytokines and inflammatory factors, which can impair functions of surrounding healthy cells, concurrently termed as senescence associated secretory phenotype (SASP). Adipose tissue contains very well developed vascular networks; however potential role of vascular aging on age-related adipose tissue dysfunction remains unexplored. The objective of this study is to reveal an effect of vascular cells-mediated SASP on adipose tissue functions and homeostasis.

【Method】 We introduced conditioned medium (CM) derived from replicative-senescent human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) or human coronary artery smooth muscle cell (HCASMC) into 3T3-L1 mature adipocytes.

【Results】 Introduction of CM from both senescent HUVEC and HCASMC induced premature senescence of adipocytes represented by SA- β Gal activity and increased expression of senescence-associated genes such as p16, p19, and p21 potentially through excessive oxidative stress. Furthermore, vascular cells-mediated SASP dramatically reduced the expression of insulin receptor substrate-1 (IRS-1), and thus blunted insulin signaling in adipocytes. Moreover, vascular cells-mediated SASP substantially reduced adiponectin production in adipocytes. Treatment with β -NMN, an intermediate in the biosynthesis of NAD that activates SIRT1, largely abolished the effects of SASP on metabolic functions of adipocytes, resulting in the preserved insulin signaling. In contrast, CM from aged vascular cells showed minimal effects on the expression of metabolic genes in myotubes, suggesting the higher susceptibility of adipocytes to vascular cells-mediated SASP. We then generated mice in which vascular cells are specifically senescent using a dominant negative form of telomeric repeat-binding factor-2 under a control of Tie-promoter (Tie2-TRF2-DN-Tg). These mice are viable and fertile, and their metabolic phenotypes are now under investigation.

【Conclusions】 Together, we revealed that senescent vascular cells impair metabolic functions of adipocytes through SASP for the first time. This novel mechanism provides valuable information for the treatment of age-related metabolic disorders that is a major risk factor for cardiovascular diseases in elderly population.

エイコサペンタエン酸 (EPA) が

血清中性脂肪を低下させる分子メカニズムの解明：

Carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) の分解機構の解明

○中川勉^{1,2}, 崎山晴彦³, 山本和宏², 藤原範子³, 鈴木敬一郎³, 平井みどり^{1,2}

¹神大・院医・薬物動態学, ²神大病院・薬, ³兵医大・生化

【目的】多価不飽和脂肪酸であるエイコサペンタエン酸 (EPA) は、血清中性脂肪低下作用を有しており、医薬品として承認、販売されている他に、特定保健用食品 (トクホ) としても数多くの商品が販売されており、容易に入手し摂取することができる。しかしながら、EPA が血清中性脂肪を低下させる詳細な分子メカニズムは明らかになっていない。Carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) は脂肪酸の合成を担う転写因子である。ChREBP を欠損/阻害したレプチン欠損マウスにおいて血清中性脂肪が低下することが報告されていることから、我々は ChREBP 活性の阻害が EPA による血清中性脂肪低下作用のメカニズムの 1 つであると考えた。そこで本研究では、EPA による血清中性脂肪低下作用の分子メカニズムを解明するため、EPA が ChREBP の活性におよぼす影響とそのメカニズムについて検討を行った。

【方法】ヒト胎児腎細胞 (HEK293A) に FLAG タグを付加した ChREBP をリポフェクション法により一過性に発現させ、各種脂肪酸を培養液中に添加した。ChREBP の活性は、ルシフェラーゼアッセイにより脂肪酸合成酵素 (FAS) 遺伝子のプロモーター活性を測定することにより行った。ChREBP の細胞内タンパク量は、抗 FLAG 抗体を用いたウェスタンブロット法により測定した。プロテアソーム阻害剤として MG-132 (10 μ M)、リソソーム機能阻害剤としてクロロキン (50 μ M) と塩化アンモニウム (20 mM)、オートファジー誘導剤としてレスベラトロール (50 μ M) を用いた。

【結果】各種脂肪酸が ChREBP の活性に与える影響について検討した結果、一価不飽和脂肪酸であるオレイン酸や多価不飽和脂肪酸であるリノール酸、EPA が ChREBP の活性を減少させることが明らかとなった。また、各種脂肪酸が ChREBP の細胞内タンパク量に与える影響について検討した結果、オレイン酸やリノール酸は ChREBP の細胞内タンパク量にほとんど影響を与えなかったのに対して、EPA は ChREBP の細胞内タンパク量を減少させることが明らかとなり、ChREBP の分解を亢進している可能性が示唆された。次に ChREBP の分解機構を明らかにするため、各種阻害剤処理により ChREBP の細胞内タンパク量の変化を検討した。その結果、MG-132 処理では ChREBP の細胞内タンパク量に変化が見られなかったのに対して、クロロキンや塩化アンモニウム処理では ChREBP の細胞内タンパク量が増加することが明らかとなった。また、レスベラトロール処理により ChREBP の細胞内タンパク量は減少することが明らかとなった。さらに EPA 単独処理で見られた細胞内タンパク量と転写活性の減少が、クロロキンを同時に処理することにより消失することが明らかとなった。

【考察】本研究結果から、HEK293A 細胞において ChREBP の主要な分解経路は、ユビキチン・プロテアソーム経路ではなく、オートファジー・リソソーム経路であることが明らかとなった。また、オレイン酸やリノール酸が ChREBP の核移行を阻害することにより ChREBP の活性を抑制するのに対して¹⁾、EPA は ChREBP の分解を促進することにより活性を抑制していることが示唆された。

【文献】1. Nakagawa T., Ge Q., Powlosky R., Wynn R. M., Veech R. L., Uyeda K. (2013) *J. Biol. Chem.* 288, 28358-28367.

C17

**Fam13a regulates lipolysis by modulating ATGL expression
in mature adipocytes to preserve metabolic homeostasis**

○Donytra Arby Wardhana^{1,2}, Koji Ikeda¹, Ken-Ichi Hirata², Noriaki Emoto¹

¹Kobe Pharmaceutical University • Clinical Pharmacy,

²Kobe University Graduate School of Medicine • CV medicine

【Objective】 Adipocytes play a critical role in the nutritional adaptation by storing excess energies as triacylglycerol and releasing them by breaking down lipids into glycerol and fatty acids. Dysregulated lipolysis is strongly associated with obesity-related metabolic disorders, but its underlying molecular mechanisms remain to be explored. The objective of this study is to reveal a novel mechanism regulating adipose tissue functions including lipolysis.

【Method】 We searched for genes that is highly expressed in adipose tissue, and the expression of which is differentially regulated during obesity.

【Results】 We found that family with sequence similarity 13, member A (Fam13a), a well preserved gene among species with unknown function, is highly expressed in mature adipocytes, and its expression was substantially reduced during obesity. Targeted deletion of Fam13a did not affect the adiposity in mice fed a high fat-diet (HFD). Nevertheless, Fam13a^{-/-} mice fed a HFD showed enhanced adipose tissue inflammation, exacerbated insulin resistance and impaired glucose tolerance comparing to those in HFD-fed WT mice. We identified that loss of Fam13a led to enhanced lipolysis by activating the ATGL expression in WAT, accompanied by increased serum nonesterified fatty acids. In contrast, targeted activation of Fam13a in adipocyte showed better insulin sensitivity even in mice consuming normal chow, which is associated with reduction in lipolysis due to decrease of ATGL in WAT.

【Conclusions】 Here we report a novel factor regulates lipolysis and thus preserves metabolic homeostasis. These results revealed a crucial role of Fam13a in the regulation of lipolysis during obesity, and establish Fam13a as a novel pharmacotherapeutic target to treat obesity-related metabolic disorders.

A *Drosophila* model for screening anti-obesity agents

○Tran Thanh Men¹, Masamitsu Yamaguchi², and Kaeko Kamei¹
¹Dept. Biomol. Eng., ²Dept. Applied Biol., Kyoto Inst. Technol.

[Purpose] Although triacylglycerol is essential for normal physiology, its excessive accumulation causes obesity in adipose tissue and is associated with organ dysfunction in non-adipose tissue (1). The brummer (*bmm*) gene in *Drosophila melanogaster* is known to be homologous with human adipocyte triglyceride lipase, which is related to the regulation of lipid storage (2). Here, we focused on the *Drosophila* model to develop therapeutics for preventing obesity.

[Methods] Transgenic flies was established by introducing a fusion gene of *bmm* promoter and Green Fluorescent Protein (GFP) gene. Then, this *Drosophila* model was used for checking the effects of chemical compounds and vegetable powders on *bmm* promoter activity.

[Results] The third instar larvae of *Drosophila* showed the GFP signal in all tissues observed and specifically in the salivary gland nucleus. To confirm the relationship between *bmm* expression and obesity, the effect of oral administration of glucose diets on *bmm* promoter activity was analyzed. The *Drosophila* flies administered with high-glucose diets showed higher lipid contents, indicating the obesity phenotype. This model showed the good opposite correlation between obesity and the intensity of GFP signal in salivary gland nucleus. The results showed HDAC inhibitors might be remarkable candidates for further obesity-therapy studies.

[Discussion] In the past few years, GFP has been broadly used as a marker in fat storage studies in *C. elegans*. For instance, GFP was used as an indicator for RNAi screening to identify uncharacterized fat storage regulatory genes in *C. elegans* (3). In the present study, the transgenic *Drosophila* fly carrying the fused genes of the *bmm* promoter and *GFP* showed fluorescence in all examined tissues, including salivary gland nuclei.

The transgenic *bmm*-expressing *Drosophila* model established in this study has many advantages. First, the easy detection of the GFP signal due to the large size of the salivary gland nucleus enables the efficient screening for anti-obesity candidate drugs. Second, fixing and staining of salivary gland tissue are not needed. Third, the GFP intensity in the salivary gland nucleus can be quantified easily by the MetaMorph software.

[Conclusion] These results demonstrated that the transgenic *Drosophila* model established in this study is useful for screening anti-obesity agents.

[References]

- (1) Hotamisligil, G.S. (2006). *Nature*. **444**, 860-867
- (2) Gronke, S., Mildner, A., Fellert, S., Tennagels, N., Petry, S., Muller, G., Jackle, H., and Kuhnlein, R.P. (2005). *Cell metabolism*. **1**, 323-330
- (3) Liu, Z., Li, X., Ge, Q., Ding, M., and Huang, X. (2014). *Journal of genetics and genomics = Yi chuan xue bao*. **41**, 305-313

膵β細胞モデル MIN6 におけるセレノプロテイン P 発現の意義

○中尾昌平, 三田雄一郎, 野口範子, 斎藤芳郎
同志社大学・院・生命医・システム生命科学

【目的】セレノプロテイン P (SeP)は、翻訳されうる 21 番目のアミノ酸と呼ばれるセレノシステイン(Sec, システインの硫黄がセレンに置き換わったアミノ酸)を多く保有し、グルタチオンペルオキシダーゼ様の過酸化脂質還元活性やセレン供給活性など多様な機能を有するタンパク質である。SeP は主に肝臓で産生され血中に分泌される。最近、我々の研究から、2 型糖尿病患者におけるインスリン分泌能と血漿中の SeP 濃度の中に負の相関が認められた。さらに、糖尿病態を反映した濃度の SeP をマウス膵β細胞由来 MIN6 細胞に添加すると、細胞死やインスリン分泌能低下が誘導されることが見出された(稲荷ら, BMB2015 にて発表)。一方、遺伝子発現解析から、MIN6 細胞が SeP を発現していることが示唆された。そこで本研究では、MIN6 細胞における SeP 発現の意義について明らかにするために以下の解析を行った。

【方法】各タンパク質の発現解析は Western Blot 法を用いた。mRNA の発現解析には Real Time PCR 法を用いた。MIN6 細胞の生存率の測定には WST-8 assay およびトリパンブルー染色を用いた。siRNA 法により SeP mRNA 発現を低下させた MIN6 細胞を作製した。MIN6 細胞が発現・分泌するインスリン、GPx1 および Sep15 のタンパク質発現を解析した。GPx1 は、SeP からのセレン供給により生合成されるセレン含有タンパク質であり抗酸化作用を有する。Sep15 は、小胞体においてタンパク質のプロセッシングに参与する。

【結果】MIN6 細胞に SeP siRNA をトランスフェクトすることで、有意に SeP mRNA の発現が抑制された(図 1 A)。SeP 発現を低下させた MIN6 細胞では、インスリンの発現が低下した。また Sep15 及び GPx1 のタンパク質発現が減少した。さらに、顕微鏡下観察及びトリパンブルーを用いた生細胞の計測から、MIN6 細胞の生存低下が示唆されたので、WST-8 assay を行った。その結果、SeP siRNA 処理により有意に生細胞数の低下がみられた(図 1 B)。

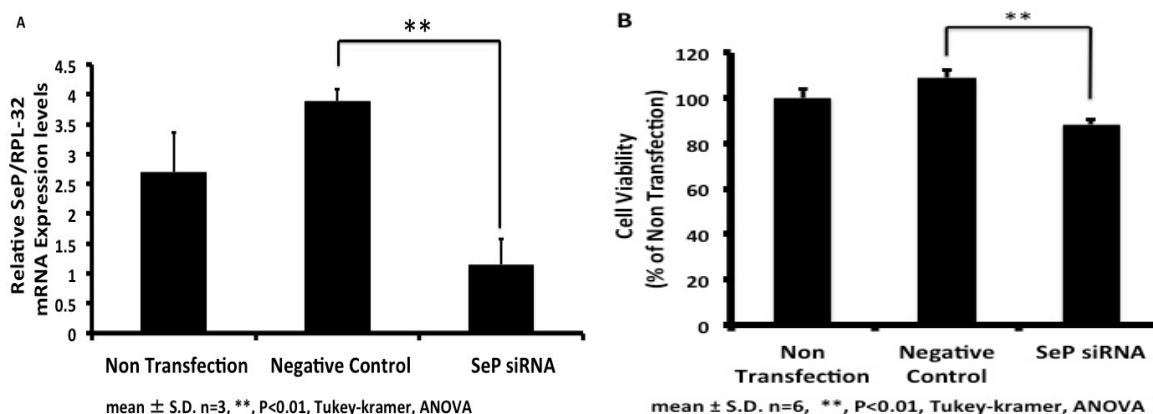


図 1 A : siRNA による MIN6 細胞内 SeP mRNA 発現の変化(real time PCR 法)

B : siRNA による MIN6 細胞の生細胞数の変化(WST-8 法)

【考察】以上の結果から、MIN6 細胞の SeP 発現量を低下させた結果、インスリン、GPx1 及び Sep15 の発現が低下し、また細胞障害が引き起こされると考えられた。Sep15 は小胞体に存在しフォールディングに参与するタンパク質であることから、インスリン前駆タンパクが正常に折り畳まれず、インスリンが正常に生成されなかった可能性が考えられる。GPx1 は抗酸化作用を有するので、GPx1 の減少による酸化ストレスによって、細胞障害が引き起こされたと思われる。以上より、MIN6 細胞において SeP 発現が細胞生存及び機能維持に重要であることが示唆された。

C20

ビタミン E による糖尿病性腎症改善機構の解明

○ 林大輝¹, 八木敬子², 上田修司¹, 山之上稔¹, 江本憲昭², 斎藤尚亮³,
白井康仁¹

¹神戸大・院農・動物資源, ²神戸薬大・臨床薬学, ³神戸大・バイオシグナル

【目的】糖尿病性腎症(DN)は糖尿病性血管合併症のひとつであり、血中高グルコースより産生されたジアシルグリセロール(DG)による PKC の活性亢進が発症・増悪の一因であることが知られる。DG キナーゼ(DGK)は DG をリン酸化しフォスファチジン酸(PA)に変換する酵素であることから、DGK は PKC の活性化を間接的に抑制することができる。実際、ビタミン E(VtE)の腹腔内投与が DGK の活性化を介した PKC の活性抑制により、DN を改善することが報告された¹⁾。これを受け我々は、VtE が 10 種類ある DGK 分子種の中でも DGK α を特異的に活性化させることを明らかにした²⁾。しかし、これは *in vitro* の実験であったため、DGK α が *in vivo* においても DN 改善に寄与するの否かを DGK α 欠損マウスを用いて検証した。ついで、VtE の経口投与による DN の改善効果についても検証した。

【方法】雄性 6 週齢の野生型(WT)及び DGK α を欠損(KO)させた C57BL/6 マウスにストレプトゾトシン(STZ)を 50 mg/kg で 5 日間連続投与し、糖尿病を発症させた。STZ 投与後よりマウスを、VtE を 40 mg/kg で腹腔内投与により隔日投与するものと、溶媒のみを隔日投与するものに分けた。STZ 投与後 1 週目から 6 週目まで毎週採尿・採血を行い、DN の指標である尿量、尿アルブミン量、クレアチニンクリアランス(Ccr)を測定した。6 週目においては実験に用いたマウスから腎臓を摘出し、腎重量を測定し、腎糸球体の形態を電子顕微鏡を用いて観察した。ついで、VtE の経口投与による DN 改善効果を検証するために、STZ 投与により糖尿病を発症させた WT マウスに、通常飼料あるいは、1%となるように VtE を含む飼料を与え、尿量及び尿アルブミン量、腎重量を測定した。なお、対照群としてそれぞれ STZ を投与していないものを用いた。

【結果】STZ を投与したマウスにおいて投与後血糖値の上昇が見られたため STZ の投与により糖尿病を発症したことを確認した。DN の主な症状として、尿中アルブミンの量の上昇、Ccr の変動、腎重量の増加が知られているが、WT マウスにおいて VtE を腹腔内投与した群ではそれらの改善が見られた。一方、DGK α KO マウスでは VtE の腹腔内投与による DN 改善効果が減弱あるいは消失した。さらに、VtE の経口摂取による DN 改善効果を検証したところ、VtE の経口投与によっても DN の症状である尿アルブミン量の上昇、腎重量の上昇が有意に抑制された。

【考察】以上の結果から、DGK α が実際に *in vivo* においても VtE による DN 改善に寄与していることが明らかとなった。さらに、糖尿病マウスにおける VtE の経口摂取も DN を改善することが明らかとなった。腎糸球体において DGK α は血管上皮細胞に発現していることから、VtE は腎糸球体血管上皮細胞に作用し DN 改善に寄与することが考えられ、現在その詳細なメカニズムについて検討を行っている。

- 【文献】 1. Koya D et al. (1996) J. Am. Soc. Nephrol. 8,426-435
2. R. Fukunaga-Takenaka, Y. Shirai, K. Yagi et al. Genes to Cell (2005) 10, 311-319

分泌性因子 *neudesin* の遺伝子欠損マウスでは
白色脂肪の褐色化が亢進した

○ 太田紘也^{1,2}, 齋藤優太¹, 中山喜明¹, 増田有紀¹, 木村郁夫³, 伊藤信行⁴,
小西守周¹

¹神戸薬大・微生物化学,²名大・環医研,³東京農工大院・農・応用生命,
⁴京大院・医・メディカルイノベーションセンター

【目的】肥満の増加は全世界的に重大な問題となっている。近年、白色脂肪組織(WAT)由来のレプチンを筆頭に、多くの分泌性因子がエネルギー代謝の調節を介して肥満の発症に関わることが明らかになった。*neudesin* は発表者らが同定した分泌性因子であり¹⁾、*neudesin* 遺伝子欠損(以下KO)マウスはエネルギー消費の亢進に起因する抗肥満の表現型を示した²⁾。さらにこのエネルギー消費の亢進には交感神経系の活性化に関わることも明らかにした²⁾。一方最近では交感神経の活性化によって、エネルギー消費の増大をもたらす褐色脂肪様の細胞が WAT に出現する現象(WAT の褐色化)が注目を集めている。そこで *neudesin* KO マウスの WAT 褐色化について解析した。

【方法】①: 交感神経活性の変化が *neudesin* 発現に与える影響を検討した。高脂肪食負荷により肥満させたマウス、寒冷曝露あるいはアドレナリン受容体アゴニスト(CL316,243: CL)投与したマウスの脂肪組織における *neudesin* 発現を定量 PCR 法で解析した。②: 12 週齢野生型および *neudesin* KO マウスの WAT の褐色化について検討した。ヘマトキシリン・エオシン染色による WAT の組織学的変化および免疫染色法と定量 PCR 法による熱産生・脂肪酸酸化関連因子の発現変化を解析した。

【結果】①: 肥満時には WAT で *neudesin* 発現が上昇した一方で、寒冷曝露や CL 投与を行った場合は WAT での *neudesin* 発現が低下した。一方で褐色脂肪(BAT)での *neudesin* 発現に変化は認められなかった。②: *neudesin* KO マウスの WAT では一部の脂肪細胞が本来褐色脂肪細胞に特徴的な油滴の多泡化を呈した。また褐色化マーカーの UCP1 発現が顕著に上昇することも判明した。さらに脂肪酸酸化関連因子の発現も軒並み上昇した。従って *neudesin* KO マウスの WAT では明らかな褐色化が認められることが判明した。

【考察】肥満時に WAT での *neudesin* 発現が上昇する一方で、寒冷曝露や CL 投与といった交感神経活性を高める刺激により WAT での *neudesin* 発現が低下することが判明した。肥満時の WAT における交感神経活性は低下していると言われていたことから、WAT の *neudesin* 発現は交感神経活性に逆相関する可能性がある。興味深いことに、これまでのところ WAT 以外の組織では交感神経活性の変化に伴う *neudesin* 発現の変化は観察されていないので、交感神経活性と *neudesin* の関係は WAT 特異的であることが示唆される。

交感神経刺激は WAT の褐色化を誘導することが知られている。実際 *neudesin* KO マウスの WAT では顕著な褐色化が認められた。さらに予備的な検討の結果であるが、我々は *neudesin* が血中に分泌されず局所的に作用する可能性が高いことや、*neudesin* が直接脂肪細胞に作用して脂肪細胞への交感神経刺激の入力を抑制する可能性を見出している。以上より、*neudesin* による交感神経活性制御メカニズムの一つとして、脂肪組織で産生された *neudesin* が直接脂肪細胞に作用して交感神経刺激の入力を抑制する可能性が考えられる。

- 【文献】 1. Kimura, I. *et al.* *J. Neurosci. Res.* **79**, 287–294 (2005)
2. Ohta, H. *et al.* *Sci. Rep.* **5**, 10049 (2015)

不飽和脂肪酸負荷より誘導される Fgf21 の脂質代謝調節機構の解析

○藤岡広大¹, 松家京介¹, 伊藤信行², 中山喜明¹, 小西守周¹

¹神薬大・薬・微生物, ²京大・院医・MIC

【目的】

Fibroblast growth factor 21 (Fgf21) は糖・脂質代謝の調節に関わる内分泌因子で、肝臓や白色脂肪、褐色脂肪等の組織から産生される。また、Fgf21 は肥満発症時における糖・脂質代謝異常を改善する薬理作用を持つため、代謝改善薬の候補因子として期待されている¹。我々の研究室では、6 日以上の高脂肪低糖質食負荷時に血中 Fgf21 濃度が著しく上昇することをこれまでに明らかにしている²。Fgf21 の効率的な産生誘導は代謝改善に寄与することが期待されることから、食用油及び脂肪酸の単回投与による Fgf21 の産生誘導機構の解析を行った。さらには、食用油を長期投与することで Fgf21 産生と糖・脂質代謝との関連性について検討した。

【方法】

① 3 時間絶食した 8 週齢 C57BL/6 雄性マウスに対し食用油、各種脂肪酸を経口投与した。投与後 4 時間で血中 Fgf21 濃度と各種組織における Fgf21 mRNA 量を測定した。
② 4 週齢雄性野生型マウス (WT) と Fgf21 ノックアウト (KO) マウスに対し、ラード含有高脂肪食群 (ラード群) と亜麻仁油含有高脂肪食群 (亜麻仁油群) に分け、20 週齢まで体重、血糖値、摂食量を測定した。20 週齢に達した後、各種臓器を摘出し組織重量を測定し、血中 Fgf21 濃度を測定した。肝臓、精巣上体脂肪 (eWAT) は定量的 RT-PCR により Fgf21 の発現量を検討した。また肝臓は組織切片を作成し観察を行った。

【結果】

食用油の単回経口投与実験では特に魚油や亜麻仁油投与群で、一方で脂肪酸投与実験では α リノレン酸投与群において強く上昇した。これら脂質投与により誘導される Fgf21 の生理的機能を検討するため、それぞれ亜麻仁油とラードを含む高脂肪食の長期投与を行ったところ、WT ではラード群と比較して亜麻仁油群で体重増加が見られた。そこで各組織重量を測定したところ、WT 亜麻仁油群では eWAT 重量が減少していたものの、肝臓重量が大きく増加していた。一方で KO ではこれら体重変化や肝臓・eWAT 重量の変化は見られなかった。肝臓切片の染色では特に亜麻仁油群で数多くの脂肪滴が観察された。

【考察】

本研究により、脂肪酸の中で特に ω -3 不飽和脂肪酸によって肝臓から Fgf21 の産生が強く誘導されることが示唆された。さらに亜麻仁油含有餌の長期投与の結果から、代謝改善薬の候補因子である Fgf21 は、内臓脂肪の減少を促進するものの、脂肪肝発症を誘発するリスクを有している可能性が示唆された。また、本研究の結果は、不飽和脂肪酸の過剰摂取による肝障害発症の新たな分子機構の一端を明らかにしており、これらの知見を基に、新たな肝障害治療法の確立に繋がることが期待される。

【文献】

1. Itoh, N., Nakayama, Y., Konishi, M. (2016) *Front. Cell Dev. Biol.* 4:30
2. Murata, Y., Nishio, K., Mochiyama, T., Konishi, M., Shimada, M., Ohta, H., Itoh, N. (2013) *PLoS ONE* 8(7): e69330.

ストレスによる脳白質オリゴデンドロサイト機能変化の分子機序

○宮田信吾¹, 清水尚子¹, 田中貴士¹, 遠山正彌^{1,2}

¹近大・東医・分子脳科学, ²大阪府立病院機構

【目的】うつ病などの精神疾患の発症には環境要因が大きく関与することが知られており、ストレス暴露による視床下部-下垂体-副腎軸 (HPA axis) の過剰刺激が、うつ病を引き起こす大きな原因として想定されているものの、その分子機序や脳の機能的変化はこれまでに明らかにされていない。

そこでまず我々は、うつ病の病態モデルとして慢性的なストレス負荷マウスの作製を試みた。このマウスでは、恒常的に血中のコルチコステロン量が増加しており、尾懸垂法などの行動解析による無気力感の増加や海馬歯状回における神経新生レベルの低下などの、うつ病態を示した¹⁾。

このモデルマウスを用いた検討から、これまでに我々は、慢性ストレス負荷により特異的に発現上昇を示す因子として Serum/glucocorticoid regulated kinase 1 (Sgk1) を同定し、その活性化機構を明らかにしてきた。この慢性ストレスによる SGK1 の活性化シグナルは神経細胞では観察されず、線維束オリゴデンドロサイト特異的であることを見出している¹⁾。さらに、このオリゴデンドロサイト特異的な SGK1 シグナルがどのような影響を及ぼすことによりストレスシグナルを伝えているのかについて検討したところ、慢性ストレス負荷によりオリゴデンドロサイト内での接着因子群の発現変化が誘導され、オリゴデンドロサイトの形態変化が引き起こされること、さらにはこの構造変化がうつ症状発現との関連性があることを見出した¹⁾。

そこで本研究では、線維束におけるこのオリゴデンドロサイトの構造変化が軸索機能に影響を与えうるのか否かについて、ランビエ絞輪の機能変化に注目して検討を行った。

【方法】慢性ストレス負荷マウスを作製し、ランビエ絞輪部の構造変化については、電子顕微鏡による微細構造の変化、更には免疫組織化学的解析や Western blotting、PCR といった関連因子の発現変化とオリゴデンドロサイト-軸索間の機能変化の有無を検討した。

【結果】慢性ストレス負荷マウスでは、ランビエ絞輪部の構造変化と機能変化が生じていることを見出した²⁾。我々はこれまでにオリゴデンドロサイトでの SGK1 による遺伝子発現調節の可能性について報告している³⁾が、これに関連してオリゴデンドロサイトにおける機能変化に活性化 SGK1 の細胞内局在変化と遺伝子発現調節変化が関連する可能性が示唆された²⁾。

【考察】以上の結果は、脳白質部におけるオリゴデンドロサイト(髄鞘)-軸索に密接な情報交換機構が存在していることを示しているだけでなく、オリゴデンドロサイトによる跳躍伝導速度の調節機構とうつ病などの気分障害発症機構の間に何らかの関連性が存在することが考えられた。

- 【文献】
1. Miyata, S., Koyama, Y., Takemoto, K., Yoshikawa, K., Ishikawa, T., Taniguchi, M., Inoue, K., Aoki, M., Hori, O., Katayama, T., Tohyama, M. (2011) *PLoS One*. 6(5), e19859
 2. Miyata, S., Taniguchi, M., Koyama, Y., Shimizu, S., Tanaka, T., Yasuno, F., Yamamoto, A., Iida, H., Kudo, T., Katayama, T., Tohyama, M. (2016) *Sci. Rep.* 6, 23084
 3. Miyata, S., Yoshikawa, K., Taniguchi, M., Ishikawa, T., Tanaka, T., Shimizu, S., Tohyama, M. (2015) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 464(1), 76-82

D02

網膜視細胞の成熟における転写因子 Mef2d の機能と視細胞変性

○上野明希子, 大森義裕, 北村民樹, 茶屋太郎, 古川貴久

大阪大学 蛋白質研究所 分子発生学研究室

【目的】網膜視細胞は外界からの光を受容しそのシグナルを電気信号に変換して伝達するという重要な機能を担っている。網膜視細胞の成熟は主に転写因子 Crx によって制御されており、Crx ノックアウト(KO)マウスでは生後 21 日齢において網膜視細胞の変性と視細胞外節の欠損が見られる。しかし、Crx KO マウスにおいて全ての視細胞関連遺伝子の発現が完全には消失しないことから、Crx 以外に網膜視細胞の成熟を制御する転写因子が存在すると考えられる。そこで我々は、網膜視細胞の成熟を制御する転写因子を同定し、その機能メカニズムを明らかにすることを目的として本研究を行った。

【方法】視細胞とその前駆細胞で発現が上昇している遺伝子をマイクロアレイ解析により選別し、転写因子 Mef2d を同定した。続いて Mef2d KO マウスを作製し、網膜電図 (ERG) による解析や網膜組織の蛍光免疫染色を行い Mef2d の網膜における機能を解析した。さらにマイクロアレイ解析により Mef2d KO マウスの網膜における遺伝子プロファイリングを行い、Mef2d の転写制御ネットワークを解析した。

【結果】Mef2d KO マウスでは生後 30 日齢以降に進行性の視細胞変性が見られ、生後 6 ヶ月齢では視細胞層の厚さが野生型の 1/4 程度にまで減少していた。また、ERG 解析では生後 30 日齢において視細胞と双極細胞の光刺激に対する応答性が大幅に減少し、視細胞・双極細胞・水平細胞間において異所的なシナプスが形成されていた。また、生後 14 日齢において視細胞の外節が短くなっていることが観察された。さらに、マイクロアレイ解析の結果 Mef2d KO マウスでは錐体アレスチン遺伝子 Arr3 や電位依存性カルシウムチャネルのサブユニット遺伝子 Cacna1s を含む視細胞や双極細胞の機能を制御する遺伝子群の発現が低下していた。これにより視細胞の変性や光に対する応答の異常が引き起こされたと考えられる。一方、ルシフェラーゼアッセイの結果から Mef2d が錐体アレスチンのプロモーター領域に結合し、転写因子 Crx と協働して相乗的にその転写を活性化することが明らかになった。

【考察】以上の結果から、Mef2d は錐体アレスチンをはじめとする視細胞または双極細胞の機能を制御する多くの遺伝子のプロモーターに結合し、Crx と協働してその転写を活性化することで網膜視細胞と双極細胞の成熟を制御していると考えられる。また、Mef2d は筋組織で転写因子 MyoD と協働して筋組織特異的な遺伝子の発現を制御することが報告されていたが、今回の結果から網膜視細胞ではパートナーを Crx に変えて網膜視細胞特異的な遺伝子の発現を制御していることが明らかとなった。これらのことから、網膜視細胞と筋組織におけるそれぞれの組織特異的な遺伝子の発現は Mef2d による共通の機構で制御されている可能性が示唆された。

優秀発表賞候補者演題

D03

Prdm13による網膜のアマクリン細胞サブタイプ分化の制御と 視覚応答感度調節

○久保峻, 杉田祐子, 小塚孝司, 古川貴久
大阪大学・蛋白質研究所・分子発生学研究室

【目的】アマクリン細胞は網膜における介在神経細胞として知られており、双極細胞から神経節細胞へと伝達される視覚情報の修飾や処理に関わっている。これまでの研究からアマクリン細胞は神経突起の分枝などの形態や投射位置から少なくとも異なる約30種のサブタイプの存在が知られている。しかし、各サブタイプの分化メカニズムや、視覚機能における役割は一部を除きほとんど不明である。本研究において我々は転写制御因子によるアマクリン細胞のサブタイプ分化メカニズム明らかにすることを目的とする。

【方法】マウス網膜を用いて、アマクリン細胞において特に強く発現している遺伝子をマイクロアレイ解析により抽出し、その中で転写抑制因子である *Prdm13* (PR domain-containing 13) を同定した。免疫組織学的手法を用いて *Prdm13* のマウス網膜における局在を明らかにした。網膜の発生における *Prdm13* の役割を明らかにするため、*Prdm13* を発生中のマウス網膜に過剰発現させ、網膜の組織学的解析を行った。また *Prdm13* 欠損マウスを作製し、*Prdm13* 欠損マウス網膜の組織学的解析を行った。さらに *Prdm13* 陽性細胞の光応答性や視覚機能での役割を明らかにするため、*Prdm13* 欠損マウスで網膜電図 (ERG) や視運動性眼球運動 (OKR) を測定した。

【結果】マイクロアレイ解析と組織学的解析により、*Prdm13* がアマクリン細胞で強く発現していることが明らかとなった。*Prdm13* は Calbindin や Calretinin 陽性細胞に発現しており、その中でもグリシン作動性や GABA 作動性アマクリン細胞で発現が認められた。*Prdm13* を過剰発現させた網膜ではグリシン作動性や GABA 作動性アマクリン細胞の分化が促進された。*Prdm13* 欠損マウス網膜ではアマクリン細胞の約3割が消失しており、Calbindin 陽性のグリシン作動性や GABA 作動性アマクリン細胞の細胞数が減少していることが観察された。その一方で他の神経伝達物質を放出するアマクリン細胞への影響は観察されなかった。さらに抗 Calbindin 抗体を用いた免疫染色によって観察される IPL (inner plexiform layer: 内網状層) のサブレイヤーのうち S2 層と S3 層の間の神経突起層が特異的に消失することも見出した。ERG による網膜光応答性の測定では *Prdm13* 欠損マウスは野生型マウスと比べて違いが認められなかった。しかし OKR では *Prdm13* 欠損マウスは野生型マウスに比べて時間周波数特性と空間周波数特性がともに上昇し、コントラスト感受性の増強も認められ、視覚刺激に対する応答感度が上昇していることが明らかとなった。

【考察】組織学的解析の結果から、*Prdm13* が特定のアマクリン細胞への分化を制御していると考えられる。また、*Prdm13* 欠損マウスを用いた生理学的解析から、*Prdm13* が発現するアマクリン細胞は視覚応答感度を抑制的に制御しており、適切な視覚応答感度の調節に重要であることが明らかになった。本研究によりアマクリン細胞の多様性を生み出す分子メカニズムと視覚機能制御機構の一端が明らかとなった。

ラット視交叉上核における時計遺伝子概日振動の
in vivo リアルタイム計測

○山口賀章^{1,2}, 岡田和樹¹, 水野貴暢¹, 程肇³, 重吉康史⁴, 小林正樹⁵, 岡村均^{1,2}
¹京都大・院薬・システムバイオ, ²科学技術振興機構, ³金沢大・理工・自然システム, ⁴近畿大・医・解剖, ⁵東北工業大・院工・電子工学

【目的】ホルモン分泌や血圧変動など、私たちの多くの生理現象は、約 24 時間周期のリズムを示す。この概日リズムは、脳の視交叉上核 (Suprachiasmatic nucleus: SCN) と呼ばれる小さな神経核が、恒常的に時間情報を全身に発信することにより、形成されている。概日リズムの分子メカニズムは、時計遺伝子 *Per1* や *Per2* などによる転写・翻訳を介したネガティブフィードバックループ機構である。転写活性化因子である CLOCK と BMAL1 は、*Per1* や *Per2* 遺伝子のプロモーター上にある E (E')-box に作用し、*Per1* や *Per2* の転写を促進する。その後、タンパク質へと翻訳された PER1 と PER2 は、同じく抑制因子である CRY と共に、CLOCK と BMAL1 の転写活性化因子を阻害する。この結果、*Per1* と *Per2* の転写は減弱される。このようなサイクルを一日単位で繰り返すことで、*Per1* や *Per2* は、概日振動を示す。興味深いことに、これらの発現振動は、概日行動リズムにまで反映される。したがって、私たちは、無麻酔・無拘束下の動物の SCN から *Per1* と *Per2* の転写発現をリアルタイムでモニターすることを試みた。

【方法】*Per1* あるいは *Per2* のプロモーターでルシフェラーゼ (*luc*) を発現する 2 種類のトランスジェニックラット (*Per1-luc* ラットおよび *Per2-luc* ラット) を用いた。自由行動下のこれらのラット SCN に光ファイバーを挿入し、ルシフェラーゼの基質であるルシフェリンを浸透圧ポンプにより SCN に持続投与した。ラットが自由に行動できるように、光ファイバーをシーベルで連結した。また、生体発光の計測は、恒暗条件下で行った。

リアルタイム PCR に用いた SCN のサンプルは、レーザーマイクロダイセクション法を用いて、SCN のみを単離した。

【結果】*Per1-luc* ラットおよび *Per2-luc* ラットのどちらを用いた場合でも、長期間にわたって明瞭な概日リズムを示す生体発光を計測した。これらの発光リズムを解析したところ、振動の大きさは共におよそ 2 倍であり、周期長はどちらも 24 時間であった。しかし、振動のピーク時刻は異なっており、*Per1-luc* の発光ピークは主観的明期中頃に、*Per2-luc* の発光ピークはそれより 3 時間程度遅れていた。これらのピーク時間の違いは、SCN のサンプルを用いたリアルタイム PCR 法による定量によっても示された。

【考察】今後は、時差のような SCN の時間恒常性が破綻するような環境下で、*Per1* や *Per2* がどのように変動するかをモニターし、これらの再同調過程や行動リズムとの関連を解明したい。

【文献】 1. Yamaguchi, Y., Okada, K., Mizuno, T., Ota, T., Yamada, H., Doi, M., Kobayashi, M., Tei, H., Shigeyoshi, Y., Okamura, H. (2016) *J. Biol. Rhythms*. 31, 108–111

D05

アホロートル TRPA1 の機能解析
○織田 麻衣, 齊藤 修
長浜バイオ大・院・バイオサイエンス

【目的】TRPA1 チャンネルは、N 末端に 16 個のアンキリンリピートを持ち、主に感覚神経に発現し、侵害刺激センサーとして働く。げっ歯類の TRPA1 は、低温、機械刺激、種々の化学物質(ワサビに含まれる AITC、レドックス、ポリフェノール類、ブドウ由来の忌避剤 MA)などの刺激によって活性化される。一方、熱帯に生息する両生類のニシツメガエルの TRPA1 が同定され、その TRPA1 が MA には応答せず、40°C 以上の高温で活性化されることが示された。また、後にレドックス、ポリフェノールに応答性がないことが判明した。このように、TRPA1 の刺激応答性が動物種で異なることが複数報告され、おそらく動物種間での外界刺激を受容する感覚の種差は、TRPA1 などのセンサーの機能的な違いに起因し、各動物の環境適応や生存戦略に重要であると考えられる。本研究では、より水中生活に適応し、生涯外鰓を持ち幼生成熟する有尾両生類のアホロートルの TRPA1 がどのような性質を持つか注目した。この動物は、比較的低温のメキシコのソチミルコ湖に生息する。

【方法】アホロートル DRG より EST 情報をもとに、TRPA1 cDNA をクローニングした。次に、アホロートル TRPA1(axTRPA1)を HEK293T 細胞に発現させ、Ca²⁺ imaging により、各化学物質(AITC, H₂O₂, 酸化 EGCG, MA)への応答を解析した。また、カエル卵母細胞に発現させ、二本刺し膜電位固定法により化学物質と温度に対する応答について解析を行った。さらに、アホロートル幼生の行動解析を行った。

【結果】axTRPA1 は 1121 アミノ酸残基から成り、典型的な TRPA1 構造を持つことが明らかになった。他の動物種の TRPA1 と系統比較すると、脊椎動物 TRPA1 は哺乳類・鳥類・爬虫類、両生類、魚類の 3 系統に分かれる傾向があり、axTRPA1 はニシツメガエル TRPA1 に最も近いことが判明した。RT-PCR を用いた発現解析では、脳、肺、心臓、胃で mRNA が検出された。Ca²⁺ imaging 法と二本刺し膜電位固定法で化学物質に対する応答性を解析した結果、axTRPA1 の応答性はニシツメガエルと類似し、H₂O₂ と酸化 EGCG には応答性が検出されなかった。しかし、興味深いことに MA に対して axTRPA1 は 2.7 mM から応答性を示し、ニシツメガエルとは大きく異なることが判明した。そこで、アホロートルが化学物質 MA を実際に認識できるかどうか、アホロートル幼生の生体応答を解析した。飼育水に MA を添加したところ、4 mM でアホロートル幼生は速やかに遊泳が活発になり、添加後 30 秒間の活動度は対照の 5 倍に上昇した。また、axTRPA1 の温度応答性を二本刺し膜電位固定法で解析した結果、低温から 40°C 付近の高温まで有意な応答は検出されなかった。

【考察】axTRPA1 は、同じ両生類のニシツメガエルとは異なり MA 応答性を持ち、個体レベルでの侵害反応も検出された。爬虫類以下の動物の TRPA1 では MA 応答性が極めて低いことを考えると興味深い。アホロートルの食性や水中適応との関連性を調査する必要があるかもしれない。また、皮膚での axTRPA1 発現が検出されていないため、幼生がどこで MA を感知したのか、組織レベルの発現解析が重要である。ニシツメガエル TRPA1 は 40°C 以上の高温で活性化される。一方、最近、我々は魚類 TRPA1 が明確な温度閾値を持たず、徐々に高温活性化することを見出した¹。axTRPA1 がどちらの特性を示すか注目されたが、実際には顕著な温度応答性がないことが示唆された。安定した低温の生息環境が関連しているかもしれないが、他の侵害刺激センサーの温度解析が重要である。

【文献】 1. Oda M., Kurogi M., Kubo Y., Saitoh O., *Chemical Senses*, 2016;41(3):261-72

クラスリン非依存性エンドサイトーシス経路による
神経成熟の制御機構鹿内弥磨¹, 鍋島陽一², 柚崎通介¹, 〇川内健史^{1,2}¹慶応大・医・生理, ²先端医療センター研究所・医薬品開発研究グループ

【目的】多細胞生命体は、機能分担した多様な細胞集団で構成される。しかし、発生過程を遡ると、これらの細胞集団は、均一な前駆細胞（ひいては1個の受精卵）に由来する。我々は、個々の細胞の多様化が顕著である脳をモデルとして、均一な前駆細胞が、特定の役割を担う「組織の一員」へと機能成熟する過程に興味をもって研究を行っている。神経成熟の一部は、初代培養神経細胞でも観察することができる。培養皿にまいた神経細胞は、*in vivo*と同様に、複数の未成熟突起を形成し、そのうち1本が軸索へと変化する。これに対して、樹状突起の成熟は、*in vitro*と*in vivo*で形態的に異なる。*In vitro*では、軸索に選択されなかった残りの突起がそのまま樹状突起へと成熟するのに対して、発生期の大脳皮質においては、未成熟な突起は刈り込まれ、新たに先導突起という1本の太い突起が形成される。先導突起をもった神経細胞は、特定の脳領域まで移動した後に、先導突起を分岐させて樹状突起が形成される。このように、個体脳における樹状突起形成は、時空的に厳密に制御されているが、未成熟突起の刈り込みと先導突起伸長の分子メカニズムは、*in vitro*で再現することが困難であることから、未解明な点が多く残されている。

【方法】発生期の大脳皮質において、未成熟突起の刈り込みと先導突起の伸長を起こしている神経細胞にのみ発現する分子を探索した。さらに、簡便に個体への遺伝子導入を行える子宮内エレクトロポレーション法^{1,2}を用いて、得られた候補分子の発現抑制実験を行い、*in vivo*のみで観察される神経成熟過程にどのような影響がみられるかを解析した。

【結果】発生期の大脳皮質において、未成熟突起の刈り込みと先導突起の伸長は、中間帯と呼ばれる領域で起こることが知られている。我々は、中間帯に強く発現するが、神経前駆細胞が存在する脳室帯や成熟した神経細胞が含まれる皮質板にはほとんど発現しない分子として、非神経細胞ではカベオラ構造の主要な構成因子である Caveolin-1 を同定した。発生期の大脳皮質において、Caveolin-1 は、未成熟な神経細胞に強く発現しており、未成熟な突起と細胞体の両方に局在していた。また、神経細胞はカベオラ構造をもたないにもかかわらず、初代培養神経細胞において Caveolin-1 はクラスリン非依存性のエンドサイトーシス経路に関与することが分かった。次に、Caveolin-1 の *in vivo* ノックダウン実験を行ったところ、未成熟突起の刈り込みと先導突起の伸長が、どちらも抑制された。

【考察】Caveolin-1 は、クラスリン非依存性のエンドサイトーシスに関与したことから、Caveolin-1 は、未成熟突起の膜成分を細胞内に取り込むことにより、突起の刈り込みに寄与している可能性が考えられる。また、Caveolin-1 は、先導突起にはあまり発現していなかったことから、未成熟な突起から取り込んだ膜成分が、細胞内輸送経路を介して、先導突起へと運ばれることにより、結果として先導突起の伸長が促されると考えられる。これまでに我々は、主にクラスリン依存性のエンドサイトーシスに関与する Rab5 が、先導突起形成後の長距離移動に必須であることを報告していることを考え合わせると³、神経成熟は、異なる型のエンドサイトーシス経路が巧みに使い分けられることによって実行されていることが示唆される。

- 【文献】 1. Kawauchi, T., Chihama, K., Nabeshima, Y., Hoshino, M. (2003) *EMBO J.* 22, 4190–4201
2. Kawauchi, T., Chihama, K., Nabeshima, Y., Hoshino, M. (2006) *Nature Cell Biol.* 8, 17–26
3. Kawauchi, T., Sekine, K., Shikanai, M., Chihama, K., Tomita, K., Kubo, K., Nakajima, K., Nabeshima, Y., Hoshino, M. (2010) *Neuron* 67, 588–602

【目的】発生期における神経突起の形態形成は神経機能発揮の基盤である。神経突起の形成に最も重要なことの一つは、突起先端部の成長円錐での Rho ファミリー低分子量 G 蛋白質を介したアクチン細胞骨格の再構築であり、このことが神経突起の伸長速度や方向性を決定する。これまでの研究により、神経突起伸長における Rho ファミリーの下流シグナル伝達系は明らかになってきたが、細胞外シグナルがどのように Rho ファミリーを制御しているのか、その分子メカニズムには不明な点が多く残されている。本研究では、成長円錐での細胞骨格の再構築に細胞膜構成リン脂質の一つホスファチジルエタノールアミン (PE) の細胞膜脂質二重層を横切るフリップ・フロップ運動が関わっている可能性を考え、神経突起伸長における細胞膜の挙動による Rho ファミリー低分子量 G 蛋白質を介した細胞骨格系の調節機構の解明を目的とした。

【方法】海馬初代培養神経細胞を用いた生化学的・分子生物学的解析を主として、細胞膜を構成する PE の挙動による Rho ファミリーを介した細胞骨格系の調節機構の解析を行った。PE 結合プローブを用いて神経細胞における PE の細胞膜脂質二重層中での分布の観察、PE の挙動を制御した際の Rho ファミリーの活性解析、成長因子やガイダンス因子により刺激した神経細胞の PE の脂質二重層中での分布を PE 結合プローブを用いて観察、脂質二重層中でのリン脂質の分布を制御する分子の発現解析および遺伝子発現調節による神経突起伸長への関与の検討、Rho ファミリーの活性解析を行って、神経突起伸長におけるリン脂質の挙動と Rho ファミリーの機能的関連を検討した。

【結果】神経突起伸長時、PE の細胞膜脂質二重層中での分布を観察すると、成長円錐のアクチン細胞骨格が重合している局所で、通常、細胞膜内層に存在する PE が細胞膜外層に露出していることが分かった。さらに PE を細胞膜外層に固定すると、Rho ファミリー低分子量 G 蛋白質の活性を上昇させること、また成長円錐のアクチン細胞骨格の再構築を制御していることが明らかとなった。また、BDNF や Netrin1、細胞外 Ca^{2+} の流入といった細胞外シグナルによって PE の細胞膜外層への局在が促進されることが分かった。次に PE を細胞膜外層から内層へと輸送する分子であるフリッパーゼの探索を行ったところ、神経突起伸長時の成長円錐に発現し、神経突起の伸長を制御するフリッパーゼを見出した。さらにフリッパーゼの発現が Rho ファミリーの活性を制御していることを明らかにした。また、PE の膜内輸送活性が欠如したフリッパーゼ変異体の過剰発現が、神経突起の伸長を抑制することを明らかにした。

【考察】以上の結果より、神経突起伸長時、Netrin-1 や BDNF といった情報伝達因子は、細胞外からの Ca^{2+} の流入を介して成長円錐における PE の細胞膜外層への露出を誘導し、Rho ファミリーの活性調節を介して、アクチン細胞骨格の再構築を引き起こすことが考えられる。また、PE を細胞膜外層から内層へと輸送するフリッパーゼが神経突起伸長に重要であることから、PE の細胞膜内層と外層を行き来するフリップ・フロップのサイクルが神経突起伸長に重要であることが示唆された。

脊髄性筋萎縮症 (SMA) のヒト神経細胞モデル作製と表現型の解析

○島亜衣¹, 森田寛之², 西尾久英¹, 通山由美²,

¹神大・院医・疫学, ²姫路獨協・薬・生化

【目的】脊髄性筋萎縮症 (Spinal Muscular Atrophy; SMA) は、脊髄前角細胞の変性によって進行性の筋萎縮を呈する遺伝性疾患である。原因遺伝子 *Survival Motor Neuron 1 (SMN1)* がコードするタンパク質 SMN は全身で発現しており、核内低分子リボ核タンパク質 (snRNP) の形成やスプライシングに関与することが示唆されている¹⁾。しかし、*SMN1* の欠失・変異を有する SMA 患者において、運動神経と骨格筋特異的に重篤な症状が現れる理由については不明である。我々は、神経細胞特異的な SMN の機能を明らかにすることを目的に、ヒト神経芽腫細胞株で *SMN1* をノックダウンした SMA 神経モデルを作製し、表現型を解析した。

【方法】ヒト神経芽腫細胞 SK-N-BE(2)c に対し、レンチウイルスを介して *SMN1* およびそのホモログ *SMN2* の両方を標的とした shRNA を導入して、*SMN* ノックダウン細胞を作製した。野生型細胞およびクローン化した *SMN* ノックダウン細胞は、オールトランス型レチノイン酸 (ATRA) 5 μ M を用いて分化を誘導後、蛍光免疫染色法にて、神経突起様構造の形成を中心に表現型の観察を行った。

【結果】野生型ヒト神経芽腫細胞 SK-N-BE(2)c では、5 μ M ATRA 添加後 4 日間培養すると顕著な神経突起様構造の形成が認められた。一方、ウェスタンブロット法によって約 70% の SMN 発現低下を確認した *SMN* ノックダウン細胞 3 株では、ATRA 添加後も、野生型のような著しい神経突起様構造の伸長は認められなかった。ノックダウン効率の低い株では、細胞の一部が細長く伸びている様子が観察されたが、野生型と比べてその数は少なく、また突起が太く短いなどの特徴が見られた。SMN に対する蛍光免疫染色を行なったところ、野生型細胞では細胞核内の顆粒状構造が染まり、分化誘導前後で染色像に差は認めなかった。この構造は、*SMN* ノックダウン細胞では観察されなかった。野生型細胞を分化すると、神経突起様構造の伸長に伴って α チューブリン (K40) のアセチル化の亢進が確認されたが、*SMN* ノックダウン細胞ではほとんど認められなかった。

【考察】以上の結果から、SMN の発現が低下したヒト神経細胞では神経突起様構造の伸長が抑制されることが示された。これはゼブラフィッシュ²⁾ やマウス³⁾ などの SMA モデル動物で得られた結果と合致する。また、SMA 患者で運動神経の高度な変性・脱落を認める点とも矛盾しない。我々の作製したヒト SMA 神経細胞モデルは病態と合致する顕著な表現型を示しており、SMA の発症機構を解明するうえで有用なツールになると考える。今後は、SMN の発現低下がどのようにして神経突起の伸長阻害を引き起こすのかを明らかにするため、細胞骨格タンパク質やその制御因子を中心に、詳細な解析を進めていく。

- 【文献】
1. Nurputra DK, Lai PS, Harahap NI, Morikawa S, Yamamoto T, Nishimura N, Kubo Y, Takeuchi A, Saito T, Takeshima Y, Tohyama Y, Tay SK, Low PS, Saito K, Nishio H. (2013) *Ann. Hum. Genet.* 77:435-63
 2. McWhorter ML, Monani UR, Burghes AH, Beattie CE. (2003) *J. Cell Biol.* 162:919-31
 3. Cifuentes-Diaz C, Nicole S, Velasco ME, Borra-Cebrian C, Panozzo C, Frugier T, Millet G, Roblot N, Joshi V, Melki J. (2002) *Hum. Mol. Genet.* 11:1439-47

KIF20A (Kinesin family member 20A) の分化と細胞分裂への影響

○ 森田寛之, 有馬太陽, 佐々木彪曜, 松本隆太郎, 田畑裕幸, 通山由美
姫路獨協・薬学・生化

【目的】

KIF20A は、キネシンスーパーファミリータンパク質(KIFs)に属し、細胞質分裂に重要な役割を果たすことが報告されている。本研究では、KIF20A の細胞分裂における機能が、血球系細胞の分化・成熟、細胞増殖にどのように関わっているか、ヒト白血病細胞株, HL60 を用いて検討した。

【方法】

レンチウイルスを介して、ヒト白血病細胞株 HL60 に対して、*KIF20A*shRNA を導入した KIF20A ノックダウン細胞、および KIF20A 過剰発現型細胞を作成した。これらの細胞を用いて、メイグリュンワルド・ギムザ染色、蛍光色素染色により、細胞分裂におけるクロマチンの動態を解析するとともに、ヨウ化プロピジウム染色により細胞周期の解析を行った。

【結果】

ウェスタンブロッティングにてヒト白血病細胞株 HL60 を好中球様またはマクロファージ様に分化し KIF20A の発現量を解析したところ、好中球様またはマクロファージ様に分化した HL60 は、KIF20A の発現量が著しく減少した。KIF20A をノックダウンすると、G2/M 期の割合が増加し、多倍体化（4N をこえる）細胞の割合が増加した。また、KIF20A ノックダウン型 HL60 細胞では、紡錘体様構造が3つ以上存在する細胞や染色体不整列細胞の優位な増加が確認できた。さらに、KIF20A 過剰発現型 HL60 細胞では、好中球様分化刺激後も、細胞増殖が停止せず、細胞分化の遅延が認められた。

【考察】

KIF20A ノックダウン型 HL60 細胞では、紡錘体構造の異常が認められたことから KIF20A は、細胞質分裂に加え、紡錘体構造の形成に関与していると考えられる。さらに、KIF20A の発現量が好中球様またはマクロファージ様の分化誘導により著しく減少し、KIF20A の過剰発現により細胞分化の遅延が認められたことより、KIF20A は、細胞分化の制御に関与していることが示唆された。

【文献】

1. Keisuke Taniuchi, Mutsuo Furihata, Toshiji Saibara (2014). KIF20A-Mediated RNA Granule Transport System Promotes the Invasiveness of Pancreatic Cancer Cells. *NEOPLASIA* 16(12) 1082-1093.
2. Yu Zhang, Jun Liu, Xu Peng, Cheng-cheng Zhu, Jun Han, Jia Luo, Rong Rui. (2014) KIF20A Regulates Porcine Oocyte Maturation and Early Embryo Development. *PLoS ONE* 9(7):e102898.

D10

新規アミロイド構造プローブとしてのヨウ素染色の有用性評価
及び染色メカニズムの解析

○平松貴人¹, Ha Seongmin¹, 増田裕輝¹, 安田充², 尾崎幸洋², 茶谷絵理¹
¹神戸大・院理・化, ²関西学院大・院理工

【目的】今回我々はアミロイド線維の分子構造を解析可能な新規プローブの開発を目的として研究を行った。アミロイド線維はタンパク質の異常凝集体の一種で、パーキンソン病など多数の疾患の原因物質である。これらの疾患には現状では対症療法しか存在しないため、根治を目指した多数のアミロイド研究が行われてきた。その結果、近年ではアミロイド線維には同じタンパク質であっても構造多形と呼ばれる分子レベルでの微細な構造の違いが存在し、これが疾患の潜伏期間や症状に関与している可能性が提唱されている。したがってアミロイド病の分子メカニズムの解明には、線維構造の詳細な解明が必須である。しかし現状、線維構造を解析可能な手法は非常に限られており、有力な解析手段である固体 NMR 法についても時間やコストの面で非常に難易度が高く、未だ分子レベルでの構造多形に関する知見は少ない。そこで我々はこれらの課題を解決する為に、簡便かつ安価に構造多形を識別する手段が必要であると考え、ヨウ素分子をプローブとした新規手法の開発に取り組み、ヨウ素染色¹⁾の有用性評価及び染色メカニズムの解明を試みた。

【方法】ヒトインスリンをモデルタンパク質として用い、数種類の溶液条件で線維化させることで構造多形を誘導した。線維形成を赤外分光法及び原子間力顕微鏡で確認した後、各種線維溶液をヨウ素溶液と混合して染色し、その色調を紫外-可視吸光(UV-vis)測定で評価した。次に線維-ヨウ素分子間の結合を定量的に評価する為、ヨウ素滴定及びスペクトル分解を用いた UV-vis スペクトル解析を行った。更に共鳴ラマン分光法を用いて線維に結合したポリヨウ素分子種の同定を試みた。

【結果】調製したインスリンアミロイド線維の中には、ヨウ素染色により異なる色調を示すものがあり、可視領域の吸収スペクトル形状に明らかな違いが見られた。これはヨウ素染色が構造多形を識別可能であることを示している。更にヨウ素滴定及び UV-vis スペクトル解析の結果より、線維表面には複数の特異的なヨウ素結合サイトが存在することが確認された。次に分子種の同定を行う為、共鳴ラマン測定を行った。514.5 nm の励起波長を用いて得られたラマンスペクトルの一例を図 1 に示す。このスペクトル中には 107 cm⁻¹ と 160 cm⁻¹ 付近に鋭いピークが、210 cm⁻¹ 及び 320 cm⁻¹ 付近に弱いブロードなピークが確認できる。過去の文献²⁾より、107 cm⁻¹ は I₃ イオン、160 cm⁻¹ は I₂-I₃ 複合体であると帰属され、後者の 2 つの弱いピークについては前者のピークの倍音であると考えられた。これにより少なくとも 2 種類のポリヨウ素分子種が線維に結合することで呈色することが明らかとなった。

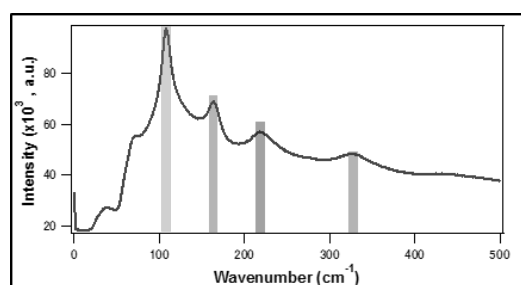


図 1. ヨウ素染色した線維の共鳴ラマンスペクトル(514.5 nm 励起)

【考察】以上の結果より、アミロイド線維のヨウ素染色は構造の異なる線維を識別するのに有用であると考えられる。この様な構造識別能はチオフラビン T など既存のアミロイドプローブには見られないものであり、本手法はアミロイド線維構造研究において非常に強力な手法になり得ると考えられる。

- 【文献】 1. Virchow, R. (1854) *Virchows Arch.* 6, 268–271
2. Burzynski, R., Prasad, P. N., Murthy, N. S. (1986) *J. Polym. Sci. Polym. Phys. ED.* 24, 133-141

D11

脂質存在下における血清アミロイド A の酵素消化と
それに及ぼす脂質組成の影響○中村友紀, 高瀬ひろか, 田中将史, 向高弘
神戸薬大・物化

【目的】血清アミロイド A (SAA) は 104 残基のアミノ酸から成り、炎症時に血液中に大量に分泌されるタンパク質である。AA アミロイドーシスは、SAA が凝集した線維が臓器に沈着することで、機能障害を引き起こす疾患である。線維は、プロテアーゼによって切断された SAA 分子の N 末端部分の 1-76 残基のポリペプチドで構成されていることから、SAA 線維の形成においてプロテアーゼの関与が示唆される。SAA は高密度リポタンパク質 (HDL) の構成成分として、血液中では主に脂質に結合した状態で存在しているにも関わらず、プロテアーゼによる SAA の酵素消化の研究は、これまで脂質非存在下でのみ行われてきた。そこで本研究では、炎症時の HDL を模倣した SAA-HDL 粒子を用いて、脂質存在下における SAA の酵素消化について検討を行った。さらに、HDL の脂質組成の変化が SAA の酵素消化に及ぼす影響について評価した。

【方法】SAA-HDL 粒子を再構成手法で作製し、その粒子径を動的光散乱法 (DLS) により測定した。また、円二色性 (CD) 測定によるタンパク質の二次構造の解析を行った。その後、matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) を用いて、SAA-HDL 粒子中の SAA の酵素消化を行った。各時間後の酵素反応液を SDS-PAGE で分離後、SAA 全長タンパク質の残存率を算出した。

【結果】HDL の主要な構成脂質であるホスファチジルコリン (PC) からなる SAA-HDL 粒子を再構成手法で作製した。中性条件下、作製した SAA-HDL (PC) の粒子径は生体内の HDL 粒子と同程度の大きさである 10 nm 前後であった。生体内温度である 37℃では、脂質非存在下の SAA はランダム構造であり、高次構造を形成していないのに対して、SAA-HDL (PC) 中の SAA は同温度条件下において α -ヘリックス構造を形成していた。さらに熱変性実験の結果、SAA-HDL (PC) 中の SAA は、脂質非存在下の SAA に比べて熱に対する高次構造の安定性が向上していることが分かった。同様の方法で、酸性リン脂質であるホスファチジン酸 (PA) を含む SAA-HDL (PC/PA) を作製した。粒子の大きさや粒子中の SAA の熱に対する構造安定性においては SAA-HDL (PC) と同様の結果が得られた。しかしながら、MMP-1 を用いた酵素消化では、脂質組成の異なる 2 種の SAA-HDL 間で SAA 全長タンパク質の残存率が異なり、SAA-HDL (PC/PA) 中の SAA は SAA-HDL (PC) 中のそれに比べて酵素消化されやすいことが示された。

【考察】MMPs は SAA 線維の臓器沈着部位から検出されており、SAA の線維形成に影響を及ぼすことが示唆される¹⁾。また、AA アミロイドーシス発症の原因疾患となる慢性炎症性疾患の罹患者の HDL の脂質組成は健常者の HDL の脂質組成とは異なることが報告されている²⁾。よって、今回得られた HDL を構成する脂質組成の変化がもたらした SAA の酵素消化への影響が、AA アミロイドーシス発症メカニズムと関連している可能性が考えられる。今後は、PA 以外の脂質を有する SAA-HDL 粒子を用いてさらなる検討を行うことにより、SAA の酵素消化に影響を及ぼす HDL の構成脂質の組成変化と疾患発症との関連性について明らかにする必要がある。

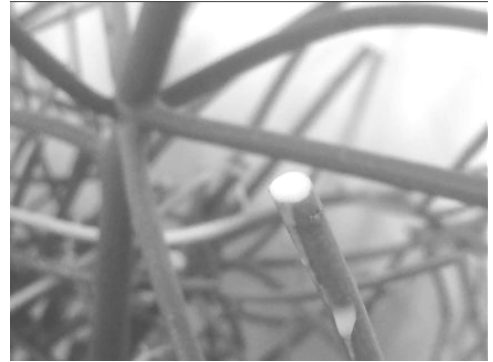
- 【文献】 1. Muller D., Roessner A., Rocken C. (2000) *Virchows Arch.* **437**, 521-527
2. Gomez R., Lhomme M., Merono T., et al. (2014) *Atherosclerosis* **237**, 652-660

ミドリサンゴの乳液のトランスクリプトームとプロテオーム解析 ○北島佐紀人¹, 三浦謙治², 青木航^{3,4}, 大和勝幸⁵, 平良東紀⁶, 村上隆太¹, 油屋駿介³

¹京工繊大・応用生物, ²筑波大・生命環境, ³京都大・農,
⁴京都バイオ計測センター, ⁵近畿大・生物理工, ⁶琉球大・農

【目的】

一部の植物は、乳管細胞と呼ばれる特殊な細胞を持つ。動物あるいは昆虫により植物が損傷すると乳管細胞が切断され、その細胞質基質（“乳液”あるいは“ラテックス”と呼ばれる）が体外に漏出する。乳液は、天然ゴムの原料としてよく知られるが、植物自身にとっては生体防御を担っていて、様々な抗菌・殺虫成分を大量に含む。その共通した生理機能にかかわらず、乳液のタンパク質成分は植物種間あるいは器官間で異なっている。例えば、クワの非木化部位の乳液には殺虫性キチナーゼ様タンパク質が大量に含まれる一方、木化部位では代わりに抗菌性キチナーゼが最も多く含まれる。イチジク属の乳液においてはシステインプロテアーゼが最も大量に含まれ、これが昆虫に対する防御を担う。より多くの植物の乳液成分を知ることは、植物の防御機能の多様性の理解を深め、さらには新たな防御システムの発見に繋がると期待される。本研究では、トウダイグサ科ミドリサンゴ (*Euphorbia tirucalli*) の防御機能の分子基盤を理解することを目的に、トランスクリプトームとプロテオーム解析を実施した。



【方法】

トランスクリプトーム解析: ミドリサンゴ乳液より得た RNA の illumina ショートリード、サンガー法による茎の EST データならびに NCBI に登録されていた mRNA 配列を混合して、MIRA4 および Trinity アセンブラを使用してハイブリッド *de novo* アッセンブリを実施し、得られたユニジーンを mRNA 配列データベースとした。Refseq およびアラビドプシスデータベース TAIR10 に対する blastx の結果にもとづいてアノテーションした。RPKM の算出には bowtie2 を用いた。

プロテオーム解析: 乳液タンパク質の Lys-C/トリプシン消化物を LC-Orbitrap システムを用いて同定した。量の多いタンパク質については、2D-PAGE による分離後 LC-MS により同定した。GO (Gene Ontology) 解析は、アラビドプシスホモログの GO に基づいて行った。

【結果と考察】

ミドリサンゴの乳液より抽出した可溶性タンパク質 (0.005 %, w/w) を含む人工飼料をモデル昆虫ショウジョウバエの 2 令幼虫に与えたところ、蛹化が遅延した。従って、昆虫に毒性のタンパク質がミドリサンゴ乳液に含まれると考えられた。乳液のトランスクリプトームにおいては、ゴムの重合に関わるとされる REF (rubber elongation factor) と機能不明の PLAT ドメインタンパク質の発現レベルが特に高かった。乳液プロテオームにおいては、比較対象とした茎のプロテオームに比べて、キチナーゼ、プロテアーゼ、ストレス応答、脂質代謝、酸性フォスファターゼ、ゴルジ体関連の GO タームが増加していた。2D-PAGE では乳液の主要タンパク質はキチナーゼ、パーオキシダーゼ、レクチンであった。以上より、外敵に対する主要なアタッカーはレクチンとキチナーゼで、他の防御関連遺伝子はこれらと協調して働くと推定された。

D13

オウヒの初代培養肝細胞における一酸化窒素誘導に対する効果

○山内優子¹, 奥山哲矢¹, 池谷幸信², 西澤幹雄¹

¹立命館大・生命・医化学, ²立命館大・薬・生薬

【目的】 オウヒ（桜皮）はバラ科（Rosaceae）のヤマザクラ（*Prunus jamasakura* Siebold ex Koidzumi）またはカスミザクラ（*P. verecunda* Koehne）の樹皮である。薬効として鎮咳去痰、解熱、排膿、解毒があげられる。主要成分は naringenin や sakuranetin, genkwanin などがある。漢方処方の方味敗毒湯に含まれており、主に皮膚炎症に用いられる。これまでに、オウヒ水抽出物がアトピー性皮膚炎モデルマウスにおいて転写因子 NF- κ B の活性化や炎症性サイトカインの腫瘍壊死因子 α などの発現を抑制し皮膚炎を回復させることが報告されているが、オウヒのどのような成分が抗炎症作用に重要であるかほとんど明らかではない。本研究ではラット初代培養肝細胞において炎症メディエーターである一酸化窒素 (NO) の産生誘導に対するオウヒ抽出物とその成分の効果を検討し、NO 産生抑制の分子メカニズムを解明することを目的とした。

【方法】 オウヒ（徳島県産 *P. jamasakura* 樹皮、栃本天海堂）のメタノール抽出エキスを水に溶解し、酢酸エチル、次いで *n*-ブタノールで分配抽出した。各分画液を減圧濃縮し、酢酸エチル可溶部（A 画分）、*n*-ブタノール可溶部（B 画分）、水可溶部（C 画分）を得た。各画分の成分を薄層クロマトグラフィー（TLC）で分析した。Wistar ラットから初代培養肝細胞を調製し一晩培養した後、オウヒの各画分、naringenin または sakuranetin をインターロイキン 1 β (IL-1 β) と同時添加し 8 時間培養した。Griess 法により培地中の NO 量を測定し 50% 阻害濃度 (IC₅₀) を求めた。細胞障害性は培地中の乳酸脱水素酵素活性を測定した。誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) の発現をウェスタンブロット法で解析した。また、iNOS mRNA の発現量は RT-PCR 法により測定した。

【結果】

1. メタノールエキス 6.91 g から A 画分 0.92 g, B 画分 2.18 g および C 画分 0.85 g を得た。
2. A 画分は IL-1 β による NO 産生誘導を濃度依存的に抑制したが、B 画分はほとんど抑制しなかった。一方、C 画分は弱い NO 産生促進傾向を示した。全ての画分で設定濃度範囲内では細胞障害性はなかった。A 画分の IC₅₀ 値は 48.5 \pm 12.5 μ g/ml であった。
3. TLC 分析により A 画分に naringenin および sakuranetin が含まれることがわかった。
4. Naringenin および sakuranetin は IL-1 β による NO 産生誘導を濃度依存的に抑制した。設定濃度範囲内での細胞障害性を示さず、IC₅₀ 値はそれぞれ 23.4 \pm 4.7 μ M および 34.7 \pm 4.4 μ M であった。
5. オウヒ A 画分、naringenin および sakuranetin は IL-1 β による iNOS タンパク質および iNOS mRNA の発現誘導を抑制した。

【考察】 オウヒの A 画分が NO 産生誘導を抑制したことから、オウヒの抗炎症作用は A 画分に含まれる脂溶性成分が関与することが考えられた。さらに、A 画分に含まれる naringenin および sakuranetin が NO 産生誘導を抑制したことから、これら 2 つの成分がオウヒによる抗炎症作用に関与していると示唆された。また naringenin および sakuranetin の NO 産生抑制は、iNOS mRNA の転写レベルの抑制によるものだと考えられた。

D14

フェリチンドメインを持つ新規な植物タンパク質の機能解析

○ 今村大樹¹, 飯伏 純平¹, 池永誠², 橘 洋一², 安藤 信幸², 大藪 泰²,
廣岡 青央², 椎名 隆³, 石崎 陽子³, 北島 佐紀人¹

¹京工繊大院・応用生物学, ²京都市産技研, ³京都府大・環境情報科学

【目的】漆は、ウルシノキ (*T. vernicifluum*) 樹液が固化したものであり、東アジア、東南アジアの伝統的な塗料として利用されてきた。漆の固化の初発反応は、樹液中に含まれる酵素ラッカーゼによるフェノール性化合物ウルシオール¹の酸化と重合であるが、固化反応の全容は未解明である。本研究の目的は、ウルシノキ樹液中のタンパク質群を同定し、それらがラッカーゼの酸化還元反応あるいはそれに続く重合と固化に関与する可能性を検討することにある。特にウルシノキ樹液のアセトン不溶性かつ水不溶性画分に見出された、フェリチンドメイン含有新規タンパク質 TvFeD に着目し、これが漆の固化反応に関与する可能性を検討するとともに、樹液を作らない植物におけるこのタンパク質のホモログの機能を明らかにすることを目的とした。

【方法】プロテオーム解析：市販のウルシノキ樹液(“生漆”)を実験材料とし、アセトン処理によりウルシオールを除去した後、残った画分を水溶性画分と不溶性画分に分離して、イオン交換クロマトグラフィーと SDS-PAGE によりタンパク質を分離した。主要バンドのマススペクトルを MALDI-TOF/MS により得て、mRNA-seq の *de novo* アッセムブリーにより構築した mRNA データベースに照合してタンパク質を同定した。

TvFeD の生化学的解析：TvFeD の N 末端側に His タグおよび Nus タグが融合した遺伝子を作製し、大腸菌中で組換えタンパク質を発現させてアフィニティー精製した。酵素としてカワラタケ属 (*Trametes sp*) ラッカーゼ、生漆由来のラッカーゼ、あるいは西洋ワサビペルオキシダーゼを用い、モデル基質のシリングアルダジンまたはグアヤコールを酸化する速度に対する組換えタンパク質の影響を解析した。

シロイヌナズナホモログの発現部位の解析：シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) における 2 つの TvFeD ホモログ AtFeD-1 あるいは AtFeD-2 遺伝子のプロモーター領域をレポーター遺伝子 GUS に連結してシロイヌナズナに遺伝子導入し、GUS 染色により発現部位を調べた。

【結果と考察】ウルシノキ樹液中には、ラッカーゼに加えて酸化還元反応に関わると思われる複数の機能未知タンパク質が多く蓄積していることが見出された。その一つ、フェリチンドメイン含有タンパク質(TvFeD)については、多くの植物にもホモログが存在していたが未だ機能は明らかでない。組換えタンパク質を得てラッカーゼ反応系に添加したところ、酵素による酸化物の蓄積を抑制した。Cys 残基変異型、フェリチンドメインを変異あるいは除去した変異型においても同様の結果を得た。さらに、TvFeD は、西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼによる基質酸化物の蓄積も抑制した。これらの結果より、TvFeD の機能はラッカーゼおよびペルオキシダーゼの酵素反応の制御であり、その機能ドメインは C 末端側の機能不明領域に存在すること、Cys 残基は酵素反応の抑制に関与しないことが示唆された。TvFeD ホモログの、植物における普遍的な役割を調べるためにシロイヌナズナを用いて分析したところ、シロイヌナズナのホモログ AtFeD-1 は子葉の先端と、根と胚軸の間の維管束で発現していた。一方、AtFeD-2 は維管束と、本葉上の未成熟なトライコームで発現していた。これらの結果より、シロイヌナズナの TvFeD ホモログがこれらの部位でラッカーゼあるいはペルオキシダーゼの機能を調節している可能性が考えられた。

ボウフウから単離された成分の分子構造と
一酸化窒素産生誘導の抑制活性の相関○奥山哲矢¹, 下倉敏裕¹, 神野拓也^{1,2}, 池谷幸信², 西澤幹雄¹¹立命館大・生命・医化学, ²立命館大・薬・生薬

【目的】セリ科多年草本であるボウフウ (*Saposhnikovia divaricata* Schischkin) およびハマボウフウ (*Glehnia littoralis* Fr. Schmidt ex Miquel) の根および根茎は、それぞれ生薬の防風、浜防風として古くから用いられてきた。どちらも湿疹などの皮膚疾患の漢方処方に使われるが、日本ではボウフウをハマボウフウに代用してきた経緯もあり、現在でも製薬メーカーが混同して漢方処方に使用している。ボウフウおよびハマボウフウの各成分とそれらの抗炎症作用について体系的に比較検討したところ、ボウフウでは主要成分であるクロモン誘導体が、ハマボウフウではクマリン誘導体が肝細胞における炎症メディエーターの一酸化窒素 (NO) 産生誘導の抑制活性をそれぞれ担っていることが示された¹⁾。今回、ボウフウから単離されたクロモン誘導体による NO 産生抑制の分子機序を検討するとともに、クロモン誘導体の分子構造と NO 産生の抑制活性との相関について検討した。

【方法】ボウフウ (乾燥した根および根茎、栃本天海堂) をメタノール抽出しエキスを得て、このエキスから成分を単離同定した。コラゲナーゼ灌流法により Wistar ラットから初代培養肝細胞を調製し一晚培養後、成分と炎症性サイトカインのインターロイキン1β (IL-1β) を同時添加した。8 時間の培養後、培地中の NO 量を Griess 法で測定し 50% 阻害濃度 (IC₅₀) を求めた。誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) などの遺伝子発現はウェスタンブロット法または定量的 RT-PCR 法で解析した。

【結果】ボウフウエキスからクロモン誘導体である ledebouriellol, hamaudol および 3'-*O*-angeloylhamaudol を単離同定した。これらの 3 成分は、初代培養肝細胞において IL-1β による NO 産生誘導を濃度依存的に抑制し、iNOS タンパク質の発現誘導を抑制することがわかった。NO 産生抑制の IC₅₀ 値は ledebouriellol が 49 μM、hamaudol が 213 μM、3'-*O*-angeloylhamaudol が 13 μM と算出された。

これらの 3 成分は dihydropyranocoumarin 骨格を有し、3'-*O*-angeloylhamaudol は hamaudol の hydroxyl 基に angelic acid が結合した angeloyl 基を持つ。また ledebouriellol でも同位置で angeloyl 基に置換されている。そこで、angelic acid を用いて NO 産生抑制試験を行ったが、angelic acid は NO 産生を抑制しなかった。NO 産生抑制活性が特に高かった 3'-*O*-angeloylhamaudol は iNOS mRNA の発現と、iNOS mRNA の安定性に関わる iNOS アンチセンス転写物の発現を抑制した。さらに、炎症性サイトカイン・ケモカインの mRNA 発現も抑制した。

【考察】ボウフウから単離された 3 つのクロモン誘導体には dihydropyranocoumarin 骨格の分子構造が共通しており、NO 産生誘導の抑制活性に重要であることが示唆された。抑制活性の高い 3'-*O*-angeloylhamaudol および ledebouriellol には angeloyl 基が共通するものの、angelic acid には NO 産生の抑制活性はなかった。このことから、親水性である hydroxyl 基が angeloyl 基へ置換されたことで疎水性が高まって細胞膜透過性が亢進するため、高い抑制活性を示すようになった可能性が考えられた。また 3'-*O*-angeloylhamaudol によって iNOS 遺伝子の発現が抑制されるために、炎症刺激による NO 産生の誘導が抑制されることが示唆された。

【文献】 1. Kamino T, *et al.* (2016) *J. Nat. Med.* 70, 253–259

D16

潰瘍性大腸炎モデルマウスに対する青黛の効果とその有効成分の探索

○ 小澤佳¹, 乾里帆¹, 山内優子¹, 高坂和芳¹, 奥山哲矢¹, 池谷幸信²,
西澤幹雄¹, 田中秀和¹

¹立命館大・院生命科学・生医, ²立命館大・薬・薬

【目的】潰瘍性大腸炎 (ulcerative colitis, UC) は血便、下痢、発熱、体重減少などを主徴とする炎症性腸疾患である。現在、治療薬として副腎皮質ステロイドや5-アミノサリチル酸などが用いられているものの、対処しきれない症例も存在する。近年、UC患者に対して漢方薬の一つである青黛 (セイタイ) が著明な改善効果を示すとの報告がなされている¹⁾。今回我々はUCモデルマウスに対する青黛の有効性の測定と、インターロイキン1 β (IL-1 β) によって誘導されるラット初代培養肝細胞の一酸化窒素 (NO) 産生誘導に対する青黛抽出物の効果を検討し、有効成分の探索を行った。

【方法】6週齢の♂マウス (C57BL/6J) に対して、1.0% Dextran Sodium Sulfate (DSS) を飲用水に混入して10日間経口投与することで、UCモデルマウスを作成した。青黛の有効性の測定に際しては、マウスをcontrol群、DSSを与える群、DSSと青黛を同時に与える群に分け、薬物投与開始から10日間、摂餌量、体重、糞便の硬さ、血便の程度について記録した。なお青黛は粉餌に混入することで投与した。マウスを薬物投与開始後10日目に安楽死させて大腸を摘出した。摘出した大腸を固定し、パラフィン包埋後5 μ m厚の切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い、粘膜と粘膜下層の欠損および炎症細胞の浸潤を評価した。青黛のメタノール抽出物およびその残渣もDSSと同時にマウスに与え、同様に薬物投与期間中の状態を記録し、投与後の腸切片の状態を観察した。また、Wistarラットから初代培養肝細胞を調製し、青黛抽出物とIL-1 β を同時に投与した。培地中に遊離するNO量をGriess法によって測定し、IC₅₀を求め抗炎症作用を測定した。

【結果】DSSのみを投与したマウスは、体重減少や下痢便、血便などのUC様症状が徐々に観察されるようになり、特に投与開始後5~7日で重症化した。DSSと青黛を同時投与したマウスでは薬物投与期間中、これらの症状はほとんど見られなかった。組織像も、DSSと青黛を同時に投与したマウスはDSSのみを投与したマウスに比べ、粘膜の欠損や炎症細胞の浸潤が抑制されている様子が観察された。DSSと青黛のメタノール抽出物およびその残渣を同時投与したマウスでもこれらの症状の抑制が観察されたが、青黛そのものを投与した場合と比べて効果は弱かった。抗炎症作用の測定では、青黛のDimethyl sulfoxide (DMSO) 抽出物はNO産生を抑制した (IC₅₀=63.7 μ g/mL [青黛重量相当、以下同])。また青黛メタノール抽出物のIC₅₀は4.2 μ g/mL、水抽出物のIC₅₀は6358.8 μ g/mLであり、メタノール可溶性分画に強いNO産生抑制活性が見られた。

【考察】青黛がUCマウスに対して効果を発揮することが確認された。また、青黛は高い抗炎症作用を示し、メタノール可溶性分画に強い活性があった。そのため青黛の有効性のある程度の部分は、メタノール可溶性成分の抗炎症作用によって発揮されていると考えられる。しかしながら、メタノール抽出物を投与したマウスでのUC様症状の抑制は限定的なものであり、またメタノール抽出残渣を投与したマウスでも限定的なUC様症状の抑制が観察されたため、メタノールで抽出されない成分にも腸炎の寛解に寄与する分子が含まれている可能性が示唆された。

【文献】 1. Suzuki, H., Kaneko, T., Mizokami, Y., Narasaki, T., Endo, S., Matsui, H., Yanaka, A., Hirayama, A., Hyodo, I. (2013) *World J Gastroenterol.* 19, 2718-2722

D17

Interaction of potential hepatotoxic ingredients of Traditional Chinese Medicine with liver drug transporters OATP1B1 and MDR1

○Lili Quan¹, Zijie Song², Yueqing Zhou², Ryuichi Ohgaki¹, Shushi Nagamori¹,
Xin He², Yoshikatsu Kanai¹

¹大阪大・院医・生体システム薬理学, ²天津中医薬大・院中薬・薬理

【Objective】 The clinical application of traditional Chinese medicine (TCM) has been widely spreading across the world. However, the adverse effects, especially drug-induced liver injury (DILI), are also attracting increasing concerns. Compounds with specific functional groups such as epoxide, furan and thiophene have a potential to be converted into electrophilic reactive metabolites (RMs) in hepatocytes, which would cause liver injury due to their hepatotoxicity by covalently binding to cellular proteins and DNAs at the nucleophilic sites. For the prediction and prevention of DILI, it is important to reveal the interaction of drugs with membrane transporters involved in drug disposition in hepatocytes. OATP1B1 (Organic Anion Transporter Protein B1) is expressed at the sinusoidal membrane of hepatocytes and involved in the uptake of various chemical compounds. MDR1/P-gp (p-glycoprotein)/ABCB1 (ATP Binding Cassette Protein B1) is expressed at the canalicular membrane of hepatocytes and plays an important role for drug disposition into bile. In this study, we constructed stable cell lines for OATP1B1 and MDR1, two major liver drug transporters, and examined their interaction with 20 potential hepatotoxic ingredients from hepatotoxic TCM such as *Psoralea corylifolia*, *Tripterygium wilfordii*, *Rheum rhabarbarum*, *Tetradium ruticarpum* and *Ginkgobiloba*.

【Method】 Human embryonic kidney 293 (HEK293) cell lines stably expressing human OATP1B1 and MDR1 were constructed by gene integration using Flp-In system (Invitrogen). Expression of the transporters was confirmed by western blot analysis using specific antibodies. The interaction of OATP1B1 with the test compounds was evaluated by their inhibitory effects on the uptake of [³H] estrone sulfate, a well-known OATP1B1 substrate. For the functional analysis of MDR1, calcein-AM efflux assay was performed. The inhibitory effects of the test compounds on the efflux of calcein-AM from MDR1 expressing cells were analyzed and normalized by comparison with that of verapamil, a well-known MDR1 substrate.

【Results】 HEK293 cell lines stably expressing human OATP1B1 and MDR1 were constructed successfully. From the initial screening of 20 potential hepatotoxic ingredients of TCM, we identified several compounds that interact with OATP1B1 and/or MDR1 as their possible substrates or inhibitors. Those included emodin, rhein, and rutaecarpine, the compounds previously reported to produce RMs that would exhibit hepatotoxicity. Some compounds that showed strong inhibitory effects on OATP1B1 and MDR1 were subjected to further analysis to determine IC₅₀ values.

【Discussion】 We identified novel interactions of ingredients of hepatotoxic TCM with hepatic transporters OATP1B1 and MDR1. If the compounds are the substrates of OATP1B1, they could exert their hepatotoxicity by being taken up into hepatocytes. If the compounds are the inhibitors of MDR1, they could enhance the hepatotoxicity of other compounds by suppressing their efflux via MDR1. These compounds may also affect the disposition of other drugs transported by these transporters. Our cell-based assay system will be applicable to further screening of the interaction of potential hepatotoxic ingredients with OATP1B1 and MDR1. Also, similar *in vitro* assay using stable cell lines for other hepatic transporters would be necessary to understand the overall mechanism of DILI from the aspect of the interaction of drugs with transporters and to obtain clues to the prediction and prevention of DILI.

D18

Toxin-Antitoxin の相互作用阻害剤のスクリーニングシステムの構築

○江川広紀¹, 山口良弘², 波多野和樹³, 五十嵐雅之³, 内海龍太郎¹

¹近畿大・院農・バイオ, ²大阪市大・複合先端研, ³微化研

【目的】原核生物には、生育や細胞死を制御する Toxin-Antitoxin (TA) systems が数多く存在し、様々なストレス環境下における生存に重要であることが明らかとなってきた¹⁾。TA systems は菌の生育には必須ではないが、ほぼ全ての原核生物に存在する。この TA systems は、ヒトでいうアポトーシスと似た様な役割を持っている。通常の生育下では、Toxin に Antitoxin が結合し、複合体を形成することで Toxin の毒性を抑制している。しかし、この Antitoxin は Toxin に比べ、不安定な物質であるため分解されやすく、ストレス等を受けることで分解される。そして、Antitoxin が分解されたことで Toxin が遊離し、毒性を示す。これにより、菌の細胞死または生育の停止を引き起こす。この TA systems はヒトには存在しないため、その阻害剤は抗生物質のように微生物に対して致死効果が期待される。本研究では、毒性が強く、細菌に広く保存されている MazE(Antitoxin)-MazF(Toxin)に着目し、安定的に MazE-MazF 複合体が大腸菌細胞内で発現させる条件を検討し、効率的に MazE-MazF 相互作用を阻害する化合物を探索できるスクリーニングシステムの構築を行った。

【方法】スクリーニングシステムの構築のためには、one ベクターシステムが用いられた。すなわち、大腸菌細胞内において MG1655 株の大腸菌ゲノムから *mazE* と *mazF* 遺伝子をオペロンとして単離し、pColdII ベクターにクローニングされた pCold II *mazE-mazF* を含む大腸菌 BL21(DE3)株が用いられた。そして、pCold II *mazE-mazF* を含む大腸菌 BL21(DE3)株の培養条件の検討と SDS-PAGE による MazE と MazF のタンパク質発現の確認を行った。スクリーニングには、各種土壌微生物培養液のエタノール抽出物が用いられた。そして、その蒸発乾固物の DMSO 懸濁液が MazE-MazF 発現大腸菌の増殖に及ぼす効果をベクターのみを含む大腸菌の吸光度 (OD₆₀₀) と比較測定することにより評価した。また、MazE-MazF 相互作用阻害を評価するために、pCold II *mazE-mazF* を含む大腸菌 BL21(DE3)株の培養液から、MazE-MazF 複合体抽出液を調製し、その調製液に候補サンプルを加えて SDS-PAGE を行い、MazE-MazF の相互作用阻害を評価した。

【結果と考察】pCold II *mazE-mazF* を含む大腸菌 BL21(DE3)株を 37°C で、IPTG を終濃度が 1.0 mM~2.0 mM になるように添加する条件下でタンパク質を発現させ、アフィニティークロマトグラフィーによりタンパク質の精製をし、SDS-PAGE で MazE (9.3 kDa) と MazF (12.1 kDa) のバンド確認ができた。このような MazE-MazF 複合体が発現している大腸菌液を 96 穴マイクロプレートに 200µl ずつ分注し、そこに DMSO で溶かした化合物を 1µl 添加して時間経過ごとに菌の OD₆₀₀ を計測した結果、216 サンプル中 1 サンプルがベクターのみを含む大腸菌と比較して顕著に増殖を阻害した。また、本候補サンプルが実際に MazE-MazF の相互作用に及ぼす効果は、現在検討中である。

【文献】1. Yamaguchi, Y., Inouye, M. (2012) Nat. Rev. Microbiol. 9, 779-790

D19

新規ヒスチジンキナーゼ阻害剤 waldiomycin の細菌細胞内での作用機構

○長尾勇希¹, 村井春香¹, 清水莉子¹, 植田修平¹, 木下英司², 五十嵐雅之³,
江口陽子^{1,4}, 内海龍太郎¹

¹近畿大・院農・バイオ,²広島大,³微化研,⁴近畿大・生物理工

【目的】細菌は様々な環境ストレスに適応するため、ヒスチジンキナーゼ (HK) とその HK と対をなすレスポンスレギュレーター (RR) からなる二成分制御系 (TCS) という情報伝達機構を保持している。当研究室で見出された新規抗生物質 waldiomycin は TCS の様々な HK を標的とし、自己リン酸化を阻害することが明らかとなっている。*in vitro* において、大腸菌 HK, EnvZ の細胞内領域の二量体化 (DHp) ドメインを用いて、作用機構研究を行った結果、各種 HK に共通に保存されている Hbox (リン酸化されるヒスチジン領域) 内のアミノ酸 S242、D244、T247、P248 のアラニン置換体が waldiomycin に対して顕著な耐性化を示し、waldiomycin が細菌 HK の Hbox に結合していることが明らかにされている。本研究では、waldiomycin が実際に、細菌細胞内で全長 EnvZ の Hbox に対して作用することを明らかにしようとした。また、大腸菌細胞内での waldiomycin の作用研究もおこなった。

【方法】Waldiomycin は大腸菌細胞内への取り込み能が低いので、細菌細胞内での waldiomycin の全長 EnvZ に対する自己リン酸化阻害を確認するため、EnvZ 過剰発現プラスミド pBsE-full (pHT10, His6-EnvZ1-450) を枯草菌に形質転換した株を用いた。pBS-full を含む枯草菌培養液 (waldiomycin 添加、無添加) を用いてサンプル調製後、リン酸化タンパク質と非リン酸化タンパク質を分離できる phos-tag SDS-PAGE を行った。その後、Penta His 抗体を用いて Western blotting 法により自己リン酸化 EnvZ を検出した後に、waldiomycin の全長 EnvZ に対する自己リン酸化阻害能を評価した。さらに、Hbox 内の変異体 S242A, T247A を用いて、waldiomycin に対する変異体 EnvZ 自己リン酸化活性に与える影響を調べた。大腸菌細胞内での waldiomycin の作用を調べるために、大腸菌外膜変異株 (*imp4213*) NR685 を用いて、最少生育阻止濃度 (MIC) や最少殺菌濃度 (MBC) を評価した。

【結果・考察】pBS-full を含む枯草菌において、waldiomycin による全長 EnvZ の自己リン酸化阻害能を検討した結果、waldiomycin 2 $\mu\text{g/ml}$ において、自己リン酸化阻害が観察されたが、S242A, T247A 変異体 EnvZ に対しては、2 $\mu\text{g/ml}$ においても観察されなかった。これらの結果から、枯草菌細胞内において、waldiomycin は全長 EnvZ の自己リン酸化を阻害すると考えられた。一方、EnvZ 変異体 S242A, T247A に対して、耐性化を示したことは、細菌細胞内においても、waldiomycin が全長 EnvZ の Hbox にも作用していることを示唆した。次に大腸菌 NR685 と枯草菌 168 に対する waldiomycin の MIC を測定した結果、6.25 $\mu\text{g/ml}$ 、1.56 $\mu\text{g/ml}$ を示した。NR685 と 168 に対する waldiomycin の MBC は、それぞれ、50 $\mu\text{g/ml}$ 以上と 3.13 $\mu\text{g/ml}$ であった。waldiomycin は大腸菌において菌を死滅させずに、増殖阻害を引き起こしている一方、枯草菌においては、殺菌的に作用していることを示した。これらの結果は、大腸菌においては、増殖必須な HK が存在しなくて、複数の HK に waldiomycin が作用していることを示唆した。

D20

5,10,15,20-テトラフェニル-21H,23H-ポルフィン塩化鉄(III),
ヨードシルベンゼン, エタノール反応溶液中に生成する
酸素中心エタノールラジカル

○西崎大祐, 岩橋秀夫
和医大・院医・生体分子解析学

【目的】種々の鉄ポルフィリン化合物と Iodosylbenzen (C_6H_5IO)との反応溶液中にヘム $Fe(IV)=O$ 中間体が生成するが、この反応溶液中にアルカンを添加するとアルカン水酸化反応が起こることが知られている¹⁻⁸⁾。その水酸化反応において、アルキルラジカル中間体の生成が推定されているが、このラジカル中間体を直接検出したという報告はまだない。今回、エタノールを基質として用いた時、エタノール由来の酸素中心ラジカルを N-tert-butyl- α -(4-pyridyl-1-oxide) nitron (4-POBN)ラジカルアダクトとして検出することができたので報告する。

【方法】コントロール反応溶液 (3mL) はエタノール (600 μ L), 4-POBN (17.5 mM), 5,10,15,20-Tetraphenyl-21H,23H-porphine iron(III) chloride (TPP) (0.5 mM), C_6H_5IO (60mg) を含む。 C_6H_5IO を加えて反応を開始し、10 分後 ESR スペクトルを測定した。4-POBN はスピントラップ剤として用いた。また、HPLC-ESR 法、HPLC-ESR-MS 法を駆使し、エタノール由来のラジカルである事を検討した。

【結果と考察】 C_6H_5IO を加えて反応を開始した 10 分後、顕著な ESR スペクトルが観測され、反応溶液中にフリーラジカルが生成していることが示唆された。この顕著な ESR スペクトルはエタノールを加えなかった時、あるいは TPP を加えなかった時、ESR シグナル強度はコントロール反応溶液のそれぞれ $11 \pm 1\%$ 、 $32 \pm 1\%$ まで減少した。また、 C_6H_5IO を加えなかった時は ESR シグナルを観測することはできなかった。このフリーラジカルを単離精製するために、HPLC-ESR 分析を行うと、保持時間 31.9 min にピークが得られ、また、化学構造を決定するために、HPLC-ESR-MS 分析を行った結果 m/z 240 のイオンが観測された。このことから標準反応溶液中に生成したフリーラジカルはエタノール由来のフリーラジカルであることが分かった。また、この生成したフリーラジカルが炭素中心であるか、酸素中心であるかを決定するために、エタノールの同位体を用い、HPLC-ESR-MS 分析した結果、 m/z 240 のイオンが m/z 245 へ移動した。この結果から、酸素中心のエタノール由来のフリーラジカルが生成しているとわかった。TPP と C_6H_5IO との混合溶液中には $Fe(IV)=O$ 中間体が生成することから、 $Fe(IV)=O$ 中間体とエタノールとの反応により酸素中心のエタノール由来ラジカルが生じているものと思われる。

- 【文献】
1. Nam, W., Lee, Y-M., Fukuzumi, S. (2014) *Acc. Chem. Res.* 47, 1146-1154
 2. Nam, W. (2007) *Acc. Chem. Res.* 40, 522-531
 3. Donald, W. A., Mckenzie, C. J., J O'Hair, R. A. (2011) *Angew. Chem. Int. Ed.* 50, 8379-8383
 4. Morimoto, Y., Lee, Y-M., Nam, W., Fukuzumi, S. (2013) *Chem. Commun.* 49, 2500-2502
 5. Ghosh, M., Nikhil, Y. L. K., Dhar, B. B., Gupta, S. S. (2015) *Inorg. Chem.* 54, 11792-11798
 6. Morimoto, Y., Park, J., Suenobu, T., Lee, Y-M., Nam W., Fukuzumi, S. (2012) *Inorg. Chem.* 51, 10025-10036
 7. Oh, N. Y., Suh, Y., Park, M. J., Seo, M. S., Kim J., Nam, W. (2005) *Angew. Chem. Int. Ed.* 44, 4235-4239
 8. Han, J. H., Yoo, S-K., Seo, J. S., Hong, S. J., Kim, S. K., Kim, C. (2005) *Dalton Trans.* 402-406

D21

α -リノレン酸, γ -リノレン酸およびそれらの混合溶液と鉄イオンとの反応によるラジカル生成の比較

○松井 有史^{1,2}, 岩橋 秀夫¹

¹和医大・医学研究科・生体分子解析学, ²和歌山国際厚生学院

【目的】我々は脂質から過酸化脂質を経由し過酸化脂質由来ラジカルの生成について調べている。今回, α -リノレン酸, γ -リノレン酸およびそれらの混合溶液と鉄イオンとの反応によるラジカル生成について比較検討をした。

【方法】反応液は, 脂肪酸 (0.61 mM α -リノレン酸, 0.61 mM γ -リノレン酸, あるいはそれらの混合溶液), 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4), 0.1 M α -4-pyridyl-1-oxide N-tert-butyl nitrone (4-POBN), 0.38 M アセトニトリル, 20 μ M FeCl₃を含む。4-POBN はスピントラップ剤である。 α -リノレン酸単独の場合, γ -リノレン酸単独の場合, それらを混合した場合を比較した。反応は, 30°C, 168 時間行った。反応後, 液体クロマトグラフ-電子スピン共鳴 (HPLC-ESR), 液体クロマトグラフ-電子スピン共鳴-マススペクトル (HPLC-ESR-MS) を測定した。

【結果】 α -リノレン酸反応液の HPLC-ESR 測定を行なうと, 保持時間 31.5 分及び 36.4 分に顕著なピークが得られた (図 1A)。このピークの HPLC-ESR-MS 分析を行うと, m/z 224 及び m/z 338 イオンが得られ, ethyl radical 及び 7-carboxyheptyl radical が生成していることが分かった。 γ -リノレン酸反応液の HPLC-ESR 測定を行なうと, 保持時間 30.9 分に顕著なピークが得られた (図 1B)。このピークの HPLC-ESR-MS 分析を行うと, m/z 296 イオンが得られた。この結果より 4-carboxybutyl radical が生成していることが分かった。混合すると 4-carboxybutyl radical のピーク高は γ -リノレン酸単独のときと比べて 193% 増加し, 7-carboxyheptyl radical および ethyl radical のピークはほぼ消失した。

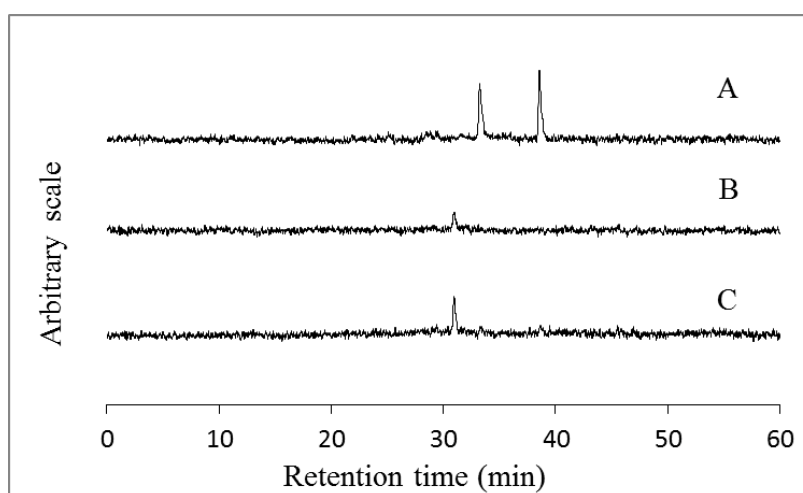


図 1. HPLC-ESR 測定結果.

A: α -リノレン酸 B: γ -リノレン酸 C: α -リノレン酸 + γ -リノレン酸

【考察】 α -リノレン酸単独の場合, γ -リノレン酸単独の場合, α -リノレン酸と γ -リノレン酸を混合した場合のラジカル生成について比較した。 α -リノレン酸と γ -リノレン酸を混合した場合, 単独の場合と比較して, γ -リノレン酸由来の 4-carboxybutyl radical の生成量が 2 倍近く増加し, α -リノレン酸由来の 7-carboxyheptyl radical および ethyl radical はほぼ消失した。このことより, α -リノレン酸と γ -リノレン酸が共存すると, γ -リノレン酸の方が一方的に酸化されることが分かった。

RNA 結合タンパク質 PUM-HD の認識塩基拡張

○篠田昂樹, 今西未来, 二木史朗

京大・化研

【目的】近年、遺伝子発現における転写後制御の重要性が明らかになってきており、発現制御等の新たな標的として特定の RNA を制御するツールの開発が行われている。Pumilio homology domain (PUM-HD)は真核生物の細胞分化や発生過程で mRNA の翻訳や安定性の制御に関与する Pumilio and FBF homology タンパク質ファミリーの RNA 結合ドメインである (図 1)。塩基認識が独立したユニットの繰り返し構造を持ち、各ユニットの特定の amino 酸を置換することで PUM-HD が認識する配列を自由に変更できることから、RNA を標的とするツールの基盤として有望である。しかし、その野生型は 8 塩基しか認識できないため、配列特異的に特定の遺伝子転写物だけを標的にするには、認識する RNA の長さが不十分であることが懸念される。そこで本研究では、ユニット増加によって PUM-HD の認識塩基の拡張に取り組んだ。

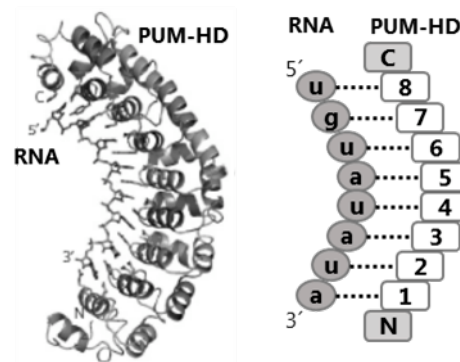


図 1. PUM-HD 結晶構造 (左)、結合様式 (右).

【方法】以前報告された伸長型 PUM-HD¹を参考に、2 種類の PUM-HD を組み合わせて、各ユニット間に 8 ユニットの挿入した 16 ユニットの PUM-HD 発現ベクターを構築した。5' 末端非翻訳領域に標的配列を導入したルシフェラーゼ遺伝子の発現抑制を指標として、PUM-HD の細胞内における RNA 結合能を評価した。さらに、ゲルシフトアッセイによって RNA との結合親和性を評価した。

【結果】レポーターアッセイの結果、16 ユニットの PUM-HD による発現抑制の強さは挿入位置によって異なることがわかった (図 2)。また、別の PUM-HD を組み合わせた 16 ユニットの PUM-HD でも検討した結果、特定の位置に挿入された 16 ユニットの PUM-HD がルシフェラーゼ活性を大きく抑制することがわかった。さらに、ゲルシフトアッセイによってこれらの結合親和性を解析した結果、8 塩基のみが一致する標的 RNA に比べて、16 塩基が一致する標的 RNA に対して高い親和性を持つことがわかった。ユニット数増加によって認識能が向上したといえる。

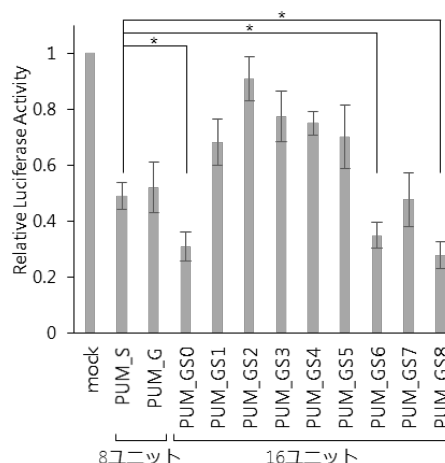


図 2. PUM-HD による発現抑制.

【考察】本研究では、PUM-HD の RNA 結合 8 ユニットの PUM-HD を別の PUM-HD のユニット間に導入することで 16 ユニットの PUM-HD を作製した。その結果、挿入位置がその塩基認識能に影響を及ぼすことが示唆された。また、特定の位置に 8 ユニットが導入された 16 ユニットの PUM-HD は 8 ユニットの PUM-HD に比べて、より長い RNA 配列を認識できることが示唆された。本結果は長い RNA 配列を標的とするツールのデザインに有用な知見を与えることが期待される。

【文献】 1. Filipovska, A., Razif, M., Nygard, K. & Rackham, O. (2011) *Nat. Chem. Biol.* 7, 425 - 427

MMLV 逆転写酵素の無細胞タンパク質合成系の構築と
マイクロアレイへの応用

○片野 裕太¹, 久好 哲郎¹, 久世 郁美¹, 岡野 啓志¹, 伊東 昌章², 西垣 功一³,
滝田 禎亮¹, 保川 清¹

¹京大院農, ²沖縄高専, ³産総研

【目的】逆転写酵素 (RT) は分子生物学的研究や臨床診断において必要不可欠な酵素である。今日、モロニーマウス白血病ウイルス (MMLV) RT が使用されているが、RNA の二次構造をなくし、反応効率を向上させるために耐熱化が求められている。近年、我々¹ および他のグループ² が大腸菌を宿主として、部位特異的変異導入により耐熱性が向上した MMLV RT を作製した。しかし、それらの耐熱性は PCR に使用されている耐熱型 DNA ポリメラーゼと比較すると著しく低い。無細胞タンパク質合成系は、大腸菌等の宿主を用いる発現系と比較して、目的タンパク質を迅速に合成・解析できる。そのため、ランダム変異導入と組み合わせることで効率的なスクリーニング系の構築が期待できる。本研究では MMLV RT を無細胞タンパク質合成系で発現させ、その性状を解析した。また、近年開発された 0.5 μ l のウェルを 1024 個有し、サンプル移送が可能なマイクロアレイ (Microarray with Manageable Volume, MMV)³ への応用についても検討した。

【方法】**1. MMLV RT の発現** : 昆虫無細胞合成系 (島津製作所) により、C 末端に Strep-tag (WSHPQFEK) を付加させた野生型 MMLV RT (WT) および耐熱型 MMLV RT E286R/E302K/L435R/D524A (MM4) を発現させ、アフィニティークロマトグラフィーにより部分精製した。**2. poly(rA)-p(dT)₁₅ への dTTP 取込み** : 37°C で反応を行い、継時的に反応液を採取し、poly(rA)-p(dT)₁₅ へ取り込まれた ³H 標識 dTTP を定量した。**3. cDNA 合成** : モデル RNA を用いて PCR チューブおよび MMV チップで cDNA 合成反応を 45°C で行った後、PCR を行い、増幅産物を電気泳動で解析した。**4. RNase H 活性** : 3'-fluorescein 修飾 18 塩基の RNA (5'-GAUCUGAGCCUGGGAGCU-3') と 5'-Dabcyl 修飾 18 塩基の DNA (5'-AGCTCCCAGGCTCAGATC-3') から成る RNA/DNA 二本鎖を基質として反応を 37°C で行った。

【結果】**1. dTTP 取込み活性** : T_{50} (10 分間の熱処理で活性が 50% に減少する温度) は WT では 45°C 以下であったが、MM4 では 52°C であった。**2. cDNA 合成活性** : PCR チューブおよび MMV チップのいずれにおいても、WT は 54°C 10 分間の熱処理で活性を失ったのに対し、MM4 は 60°C でも活性を有した。**3. RNase H 活性** : WT は RNase H 活性を有したが、RNase H 活性の触媒残基 D524 に変異を有する MM4 は活性がなかった。

【考察】無細胞タンパク質合成系で発現させた場合、大腸菌で発現させた場合と同様に、MM4 が WT よりも高い耐熱性を有した。MMLV RT の DNA 合成活性は Finger、Palm および Thumb ドメインが担う。さらなる耐熱化には、これらの領域にランダム変異を導入し、本合成系と移送式マイクロアレイを組み合わせることで発現およびスクリーニングを行う方法が有効であると考えられる。⁴

- 【文献】 1. K. Yasukawa *et al.* (2010) *J. Biotechnol.* **150**, 299-306
2. B. Arezi and H. Hogrefe (2009) *Nucleic Acids Res.* **37**, 473-481
3. H. Sharma *et al.* (2014) *BMC Biotechnol.* **14**:78
4. Y. Katano *et al.* (2016) *Biotechnol. Lett.* in press

D24

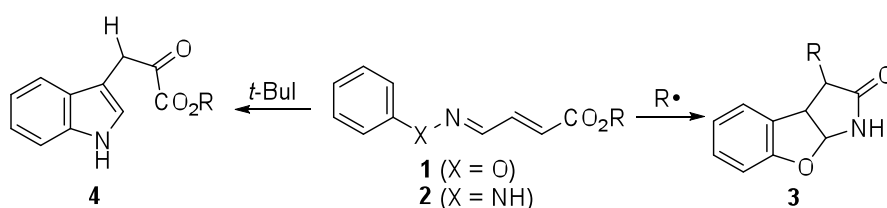
医薬品創製を指向した新規ヘテロ環化合物群の合成

○上田昌史, 伊藤勇太, 杉田翔一, 武田紀彦, 宮田興子
神戸薬大・薬・薬品化学

【目的】 これまでない様式の新規ヘテロ環骨格をもつ化合物の創製は、医薬品の開発の視野を広げ、新しい作用機序を有する新規医薬品の開発に繋がると期待される。そのため、誘導体合成を視野に入れた新規ヘテロ環骨格の創製が強く望まれている。また、次世代型有機合成として、複雑な構造を有する標的化合物の短期的かつ効率的供給を地球環境に配慮して実現する方法論の開発も重要な課題である。そこで、革新的医薬品の創製を目的とし、環境調和型多段階連続反応を基盤とする新規骨格を有する複素環化合物の効率的合成法を開発し、さらに生物活性物質の合成に展開する。

【方法・結果】

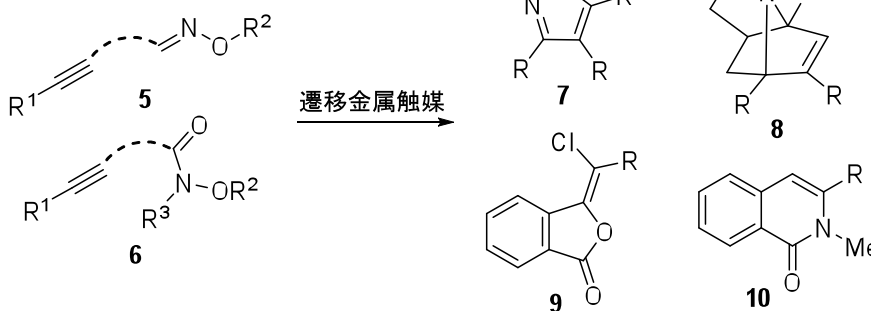
イミン窒素上にフェノキシ基およびフェニルアミノ基を有する共役イミンのドミノ型反応の開発研究を行った。はじめに、エステルと *O*-フェニルオキシエー



テルに共役したアルケン **1** のドミノ型ラジカル付加-転位反応を検討したところ、ベンゾフロ [2,3-*b*] ピロール **3** が収率良く得られることを見出した¹⁾。また、共役ヒドラゾンのドミノ型反応を検討した。共役ヒドラゾン **2** とヨウ化 *tert*-ブチルを反応させると、水素原子の導入されたインドール **4**

が生成する還元的 Fischer インドール合成の開発に成功した²⁾。

次に、窒素-酸素結合と三重結合をもつ化合物の遷移金属触媒によるドミノ型反応を検討した。アルコキシイミン **5** やアルコキシアミド **6** を遷移金属触媒で処理



したところ、様々な様式の環化反応が進行し、多種多様なヘテロ環化合物 **7-10** が合成できることを見出した³⁾。

【考察】 本反応で容易に合成できるヘテロ環骨格の一部は、これまで合成および生物活性に関する研究がほとんどないことから、新規医薬品のファーマコフォアとしての有用性にも期待できる。また、既知のヘテロ環骨格に関しても、興味深い生物活性を有する化合物の部分構造として含まれており、既存の医薬品の活性を凌駕する誘導体合成にもつながることが期待できる。

- 【文献】 1. Ueda, M., Ito, Y., Ichii, Y., Kakiuchi, M., Shono, H., Miyata, O. (2014) *Chem. Eur. J.*, 20, 6763-6770.
2. Ito, Y., Ueda, M., Takeda, N., Miyata, O. (2016) *Chem. Eur. J.*, 22: 2616-2619.
3. Sugita, S., Ueda, M., Doi, N., Takeda, N., Miyata, O. (2016) *Tetrahedron Lett.* 57, 1786-1789.