

**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 処理すると膜画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スルホン酸（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

ヒトスキルス胃がん細胞株、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がんは、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、スキルス胃がん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。スキルス胃がん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、スキルス胃がん細胞が薬剤感受性を変化させる可能性を検討した。

【方法】ヒトスキルス胃がん細胞株、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℃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がん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℃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がん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、スキルス胃がんの治療成績の向上につながることを期待される。

【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°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ェ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。

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、GPC1 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。GPC1/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(240μg/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。GPC1 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。GPC1 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】GPC1/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

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。

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℃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

**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)。

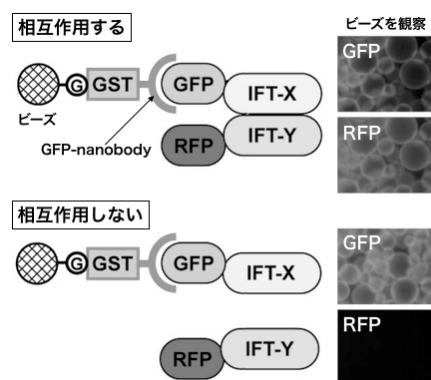


図 1 VIP アッセイの原理

【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 ($16 \times 16 = 256$ 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う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.

【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。さらにそ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、ショ糖密度勾配遠心法、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。この結果はショ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・病理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、病理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・病理的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、SCAT 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理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、病理的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

【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 存在下で野生型（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。

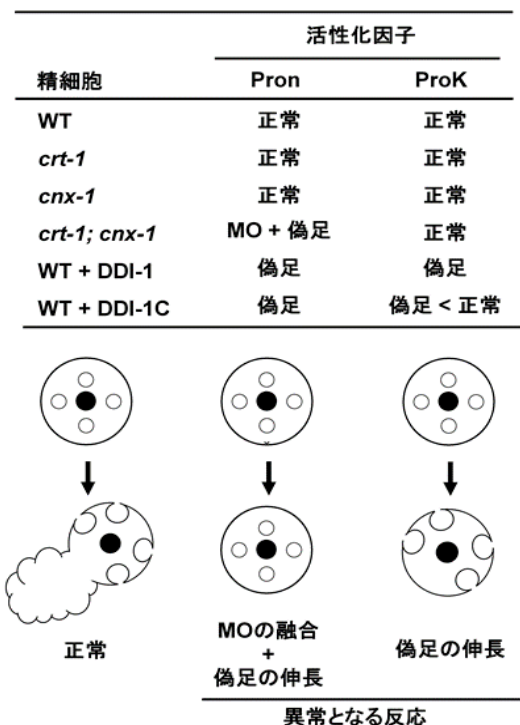


図1. 本研究のまとめ