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撹乱し、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撹乱により、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.

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?

〇 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

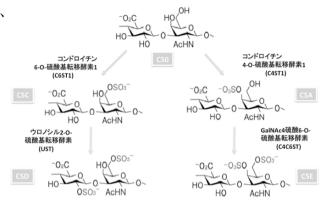


図 コンドロイチン硫酸の構造異性体

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、 \mathbb{C} 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渕脩躬先生に感謝申し上げます。

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

〇山田敦子, 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であることを見出した。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出・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.

糖ヌクレオチド輸送体 S1c35d1 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

【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 S1c35d1 遺伝子の f1ox-allele へ導入したマウス(S1c35d1-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、S1c35d1-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、S1c35d1 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 $Tnf \alpha$ 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、S1c35d1 は腸管ホメオスタシスに必要であると結論した。S1c35d1 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。

S1c35d1 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。S1c35d1 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。S1c35d1-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

Chondroitinase ABC Prevented Chondroitin Sulfate N-Acetylgalactosaminyltransferase 2 (ChGn-2) Effect on Macrophage Oxidized-Low Density Lipoprotein Uptake in Atherosclerosis Progression

OImam Manggalya Adhikara¹, Keiko Yagi², Kyoko Shinohara², Hirotoshi Fujita², Naoki Yokoyama², Yoko Suzuki¹, Koji Ikeda², Ken-ichi Hirata¹, and Noriaki Emoto²

Division of Cardiovascular Medicine, Department of Internal Medicine, Kobe University Graduate School of Medicine, Kobe, Japan; ²Clinical Pharmacy, Kobe Pharmaceutical University, Kobe, Japan

Abstract

<u>Background:</u> 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 ($p \le 0.05$) 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.

<u>Conclusion:</u> 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.

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。

糖転移酵素 Fut8 の肝細胞脂質代謝に及ぼす影響について

〇藤好杏奈,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-グリコリ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-グリコリルノイラミン酸(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

グリコシル化 EWS の化学量論的解析

長浜バイオ大・院バイオサイエンス・細胞制御

【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、ウエ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.

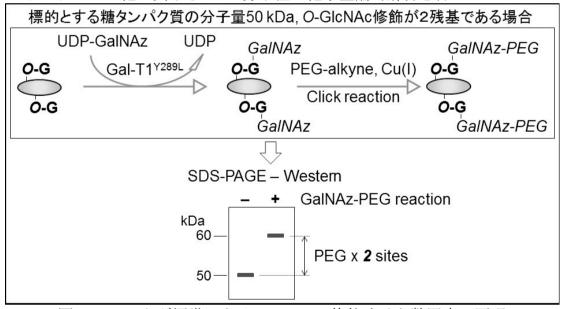


図 1. PEG タグ標識による O-GlcNAc 修飾サイト数同定の原理

【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 ¹ ¹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-GleNAc)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-GleNAc 転移酵素(OGT)及び O-GleNAc 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-GleNAc 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-GleNAc 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-GleNAc 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-GleNAc 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1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

リゾスフィンゴ糖脂質サイコシンは、分裂溝における PIP2 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

> ○渡邉寛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

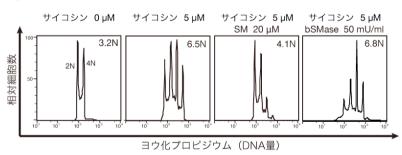
【目的】スフィンゴ糖脂質(GSL)は細胞膜を構成する脂質の1種であり、糖鎖の結合様式から様々な分子種が存在する。これらの多くは2本の炭化水素鎖をもつが、リゾ体と呼ばれる1本鎖のGSLの存在も知られている。サイコシンはガラクトシルセラミドのリゾ体であり、グロボイド細胞ロイコジストロフィー症という疾患に特徴的なGSLである。この疾患では、患者の脳白質において巨大な多倍体細胞が観察される。これまでサイコシンが細胞周期の中でM期のみを阻害し、多倍体化を誘導することが知られている『が、これに関わる分子機構は解明されていない。近年、糖鎖ではなくコリンが付加されたスフィンゴ脂質、スフィンゴミエリン(SM)のクラスターが、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』。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が候補に挙がった。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。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 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、PIP2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 PLCδ1-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、PLCδ1-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 PIP₂ 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ふまえると、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 29, 477-493

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 シーラウット,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、また細胞内へ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-GleNAc) は、タンパク質の O-GleNAc 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-GleNAc 修飾は、タンパク質のセリン・スレオニン残基に GleNAc を付加する O-GleNAc 転移酵素(OGT)と脱 GleNAc 反応を触媒する O-GleNAcase(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学的検討により、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-GleNAc 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

〇盛山 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) 医薬健栄研・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) 医薬健栄研, ⁵ 阪大院・薬学・NIBIOHN

【目的】<u>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</u>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 ε 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

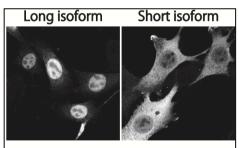


図 トランスアルドラーゼの細胞内局在 2つのトランスアルドラーゼが 異なる細胞内局在を示す

ぜは 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。

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 A_2 (cytosolic phospholipase A_2 :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】 $cPLA_2$ の分解機構を調べるために、まず $cPLA_2$ の発現系を構築した。C 末端側に FLAG タグを付けた FLAG- $cPLA_2$ 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 $cPLA_2$ の安定性を検討した。さらに、FLAG- $cPLA_2$ 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 $CPLA_2$ 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、 $CPLA_2$ 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、 $CPLA_2$ と $CPLA_2$ と $CPLA_2$ と $CPLA_3$ と $CPLA_4$ と $CPLA_4$ と $CPLA_5$ を $CPLA_5$ で $CPLA_5$ 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、 $cPLA_2$ 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、 PGD_2 の生合成に関わる $cPLA_2$ 、COX-1 及び PGD_2 合成酵素は、 PGD_2 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、 PGD_2 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 断片のシークエ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,ウエ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,同様にウエ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, Madiai 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 (hPTEN) は大腸菌により発現後、精製、濃縮して使用した。 POPS:PIP₃=9:1 のリポソームと hPTEN を懸濁し、37^{\circ}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 hPTEN 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 hPTEN 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 PIP₃や PIP₂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

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,日髙雄二¹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 H_2 (PG H_2)からプロスタグランジン D_2 (PG D_2)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 PGH_2 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 PGH_2 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

高度好熱菌 Thermus thermophilus HB8 由来の 新奇な 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 「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) のみでの部分的は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 β -sheet β -sheet

【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

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 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℃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℃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℃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(Cm)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Cm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 μ M 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

○川井眞好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 11 . 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~o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, $30\sim43^\circ$ Cで培養した S.~aureus~o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~ e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

優秀発表當候補者演題

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 Wandera ², 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 $4.2\mu m$ 、 $1.8\mu m$ 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、シークエ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。