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

C02

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 PLCγ1 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 Cγ1（PLCγ1）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 PLCγ1 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。

C04

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ΔGPC6 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ΔGPC6 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 smoothened (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

C05

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デム構造を見出した。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デム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.

C06

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，[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・MHCⅡ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βKlotho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からT細胞を採取し、成熟T細胞(TCRβhi/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 μM 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. AI-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。

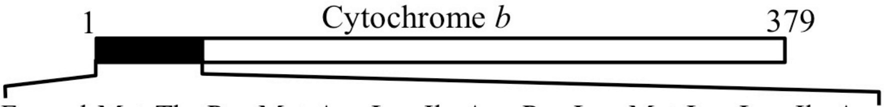
【文献】 1. Seiji T. et al. (2007) J Clin Invest. Oct;117(10):2812-24

C09

新規好中球活性化ペプチド、マイトクリプタイド-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, 木曽良明, 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、マイトクリプタイド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、マイトクリプタイド-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貪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細胞における貪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

一般演題

C10

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], 巻 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 $CaCl_2$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℃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IC_{50}あるいはIC_{80}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能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

C11

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 $3.3 \pm 0.29 \times 10^5 um^2$ vs R037 投与群 $2.3 \pm 0.15 \times 10^5 um^2$; 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 GSK3β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。

C13

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 Pang[1], 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 AT_1 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 IIIΔC1）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 IIIΔC1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 Tsuji[1], Dhite Bayu Nugroho[1,2], Koji Ikeda[1], Ken-Ichi Hirata[2], Noriaki Emoto[1]
[1]Kobe Pharmaceutical University・Clinical Pharmacy, [2]Kobe 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 Ikeda[1], Ken-Ichi Hirata[2], Noriaki Emoto[1]
[1]Kobe Pharmaceutical University・Clinical Pharmacy,
[2]Kobe 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 facor-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.

C16

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 μM）、リソソーム機能阻害剤としてクロロキン（50 μM）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 μM）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 Ikeda[1], Ken-Ichi Hirata[2], Noriaki Emoto[1]
[1]Kobe Pharmaceutical University・Clinical Pharmacy,
[2]Kobe 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.

C18

A *Drosophila* model for screening anti-obesity agents

○Tran Thanh Men[1], Masamitsu Yamaguchi[2], and Kaeko Kamei[1]
[1]*Dept. Biomol. Eng.*, [2]*Dept. 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

優秀発表賞候補者演題

C19

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 濃度の間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シングに関与する.

【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).

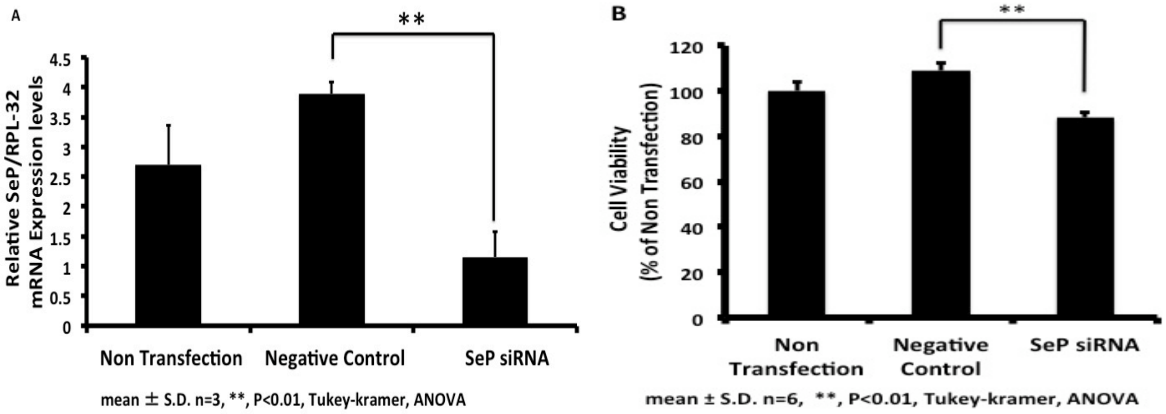


図 1 A：siRNA による MIN6 細胞内 SeP mRNA 発現の変化(real time PCR 法)
B：siRNA による MIN6 細胞の生細胞数の変化(WST-8 法)

【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関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 DGKα 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、DGKαが *in vivo* においても DN 改善に寄与するのか否かを DGKα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 DGKα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、DGKαKO 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、DGKα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 DGKα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

C21

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が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ることから、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)

C22

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，[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に上昇した。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.