

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

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

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

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

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

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

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

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

D02

網膜視細胞の成熟における転写因子 Mef2d の機能と視細胞変性

○上野明希子, 大森義裕, 北村民樹, 茶屋太郎, 古川貴久

大阪大学 蛋白質研究所 分子発生学研究室

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

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

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

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

D03

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

脊髄性筋萎縮症 (SMA) のヒト神経細胞モデル作製と表現型の解析

○島亜衣¹, 森田寛之², 西尾久英¹, 通山由美²,

¹神大・院医・疫学, ²姫路獨協・薬・生化

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

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

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

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

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

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

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

【目的】

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

【方法】

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

【結果】

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

【考察】

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

【文献】

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

D10

新規アミロイド構造プローブとしてのヨウ素染色の有用性評価
及び染色メカニズムの解析○平松貴人¹, Ha Seongmin¹, 増田裕輝¹, 安田充², 尾崎幸洋², 茶谷絵理¹
¹神戸大・院理・化, ²関西学院大・院理工

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

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

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

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

【文献】1. Virchow, R. (1854) *Virchows Arch.* 6, 268–271

2. Burzynski, R., Prasad, P. N., Murthy, N. S. (1986) *J. Polym. Sci. Polym. Phys. ED.* 24, 133-141

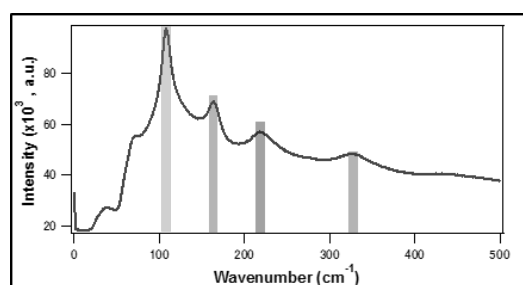


図 1. ヨウ素染色した線維の共鳴ラマンスペクトル(514.5 nm 励起)

D11

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

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

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

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

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

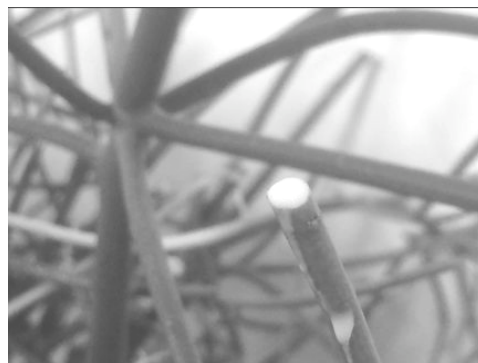
- 【文献】 1. Muller D., Roessner A., Rocken C. (2000) *Virchows Arch.* **437**, 521-527
2. Gomez R., Lhomme M., Merono T., et al. (2014) *Atherosclerosis* **237**, 652-660

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

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

【目的】

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



【方法】

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

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

【結果と考察】

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

【目的】 オウヒ（桜皮）はバラ科（Rosaceae）のヤマザクラ（*Prunus jamasakura* Siebold ex Koidzumi）またはカスミザクラ（*P. verecunda* Koehne）の樹皮である。薬効として鎮咳去痰、解熱、排膿、解毒があげられる。主要成分は naringenin や sakuranetin, genkwanin などがある。漢方処方の十味敗毒湯に含まれており、主に皮膚炎症に用いられる。これまでに、オウヒ水抽出物がアトピー性皮膚炎モデルマウスにおいて転写因子 NF- κ B の活性化や炎症性サイトカインの腫瘍壊死因子 α などの発現を抑制し皮膚炎を回復させることが報告されているが、オウヒのどのような成分が抗炎症作用に重要であるかほとんど明らかではない。本研究ではラット初代培養肝細胞において炎症メディエーターである一酸化窒素（NO）の産生誘導に対するオウヒ抽出物とその成分の効果を検討し、NO 産生抑制の分子メカニズムを解明することを目的とした。

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

【結果】

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

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

D14

フェリチンドメインを持つ新規な植物タンパク質の機能解析

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

¹京工繊大院・応用生物学, ²京都市産技研, ³京都府大・環境情報科学

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

D16

潰瘍性大腸炎モデルマウスに対する青黛の効果とその有効成分の探索

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

¹立命館大・院生命科学・生医, ²立命館大・薬・薬

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

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

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

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

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

D17

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

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

¹ 大阪大・院医・生体システム薬理学, ² 天津中医薬大・院中薬・薬理

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

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

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

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

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

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

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

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

D19

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

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

¹近畿大・院農・バイオ,²広島大,³微化研,⁴近畿大・生物理工

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

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

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

D20

5,10,15,20-テトラフェニル-21H,23H-ポルフィン塩化鉄(III),
ヨードシルベンゼン,エタノール反応溶液中に生成する
酸素中心エタノールラジカル○西崎大祐, 岩橋秀夫
和医大・院医・生体分子解析学

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

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

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

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

D21

 α -リノレン酸、 γ -リノレン酸およびそれらの混合溶液と鉄イオンとの反応によるラジカル生成の比較○松井 有史^{1,2} , 岩橋 秀夫¹¹和医大・医学研究科・生体分子解析学, ²和歌山国際厚生学院

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

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

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

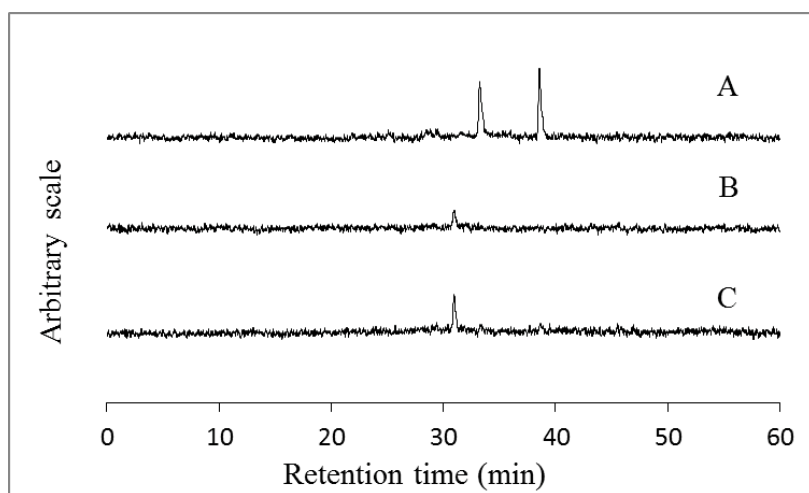


図 1. HPLC-ESR 測定結果.

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

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

D22

RNA 結合タンパク質 PUM-HD の認識塩基拡張

○篠田昂樹, 今西未来, 二木史朗

京大・化研

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

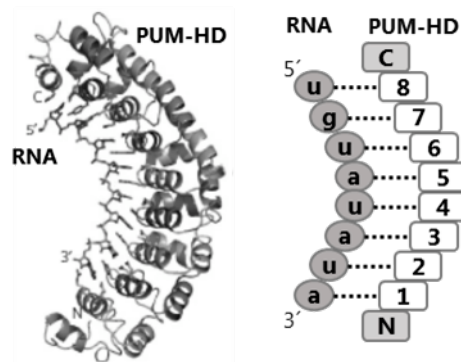


図 1. PUM-HD 結晶構造 (左)、結合様式 (右)。

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

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

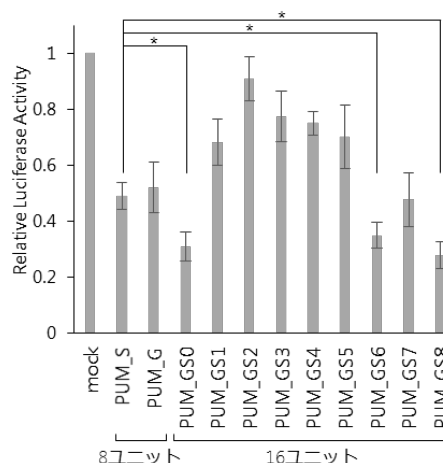


図 2. PUM-HD による発現抑制。

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

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

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

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

¹京大院農, ²沖縄高専, ³産総研

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

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

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

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

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

D24

医薬品創製を指向した新規ヘテロ環化合物群の合成

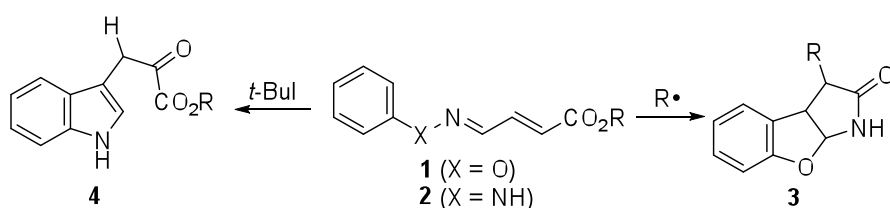
○上田昌史, 伊藤勇太, 杉田翔一, 武田紀彦, 宮田興子

神戸薬大・薬・薬品化学

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

【方法・結果】

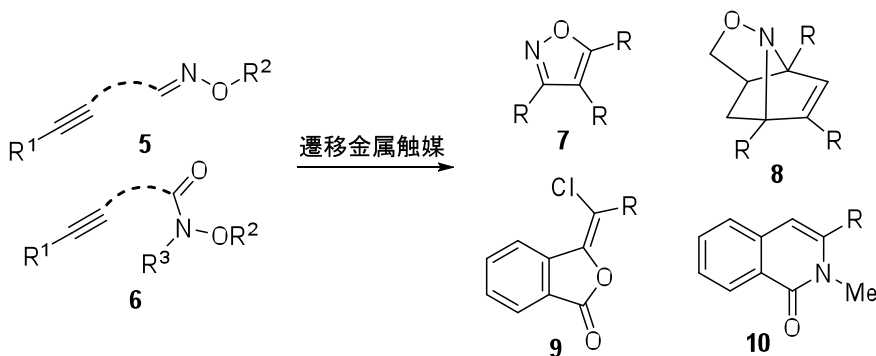
イミン窒素上にフェノキシ基およびフェニルアミノ基を有する共役イミンのドミノ型反応の開発研究を行った。はじめに、エステルと *O*-フェニルオキシエー



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

が生成する還元的 Fischer インドール合成の開発に成功した²⁾。

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



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

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

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