

日本生化学会 東北支部
第 76 回 例会・シンポジウム
講演要旨集

主催：日本生化学会

共催：公立大学法人福島県立医科大学

会期：平成 22 年 5 月 8 日（土）

会場：コラッセふくしま 4 階 多目的ホール

日本生化学会東北支部 第76回例会・シンポジウム

日時:平成22年5月8日(土)

会場:コラッセふくしま 4階 多目的ホール
(福島市三河南町1-20)

- 一般演題を講演される方へ
 1. 講演30分前までに受付を済ませてください。
 2. 一般講演時間は8分、討論時間は4分です。時間の厳守をお願いします。
 3. プロジェクターは4ポートの切替器を介して接続します。休憩時間に接続・確認をお願いします。

- 受付開始: 8:30-

- 評議員・幹事合同会議 : 12:10-12:50
コラッセふくしま4階 小会議室402

- 懇親会: 18:20-
Ki-ichigo(きいちご) コラッセふくしま12階
懇親会参加費: 一般(3000円)、大学院生・学部生(無料)

9:00-10:00 一般演題(1) 細胞応答・シグナル伝達

座長: 本間美和子(福島医大・医・生体物質)

1. **Siglec-7 を介した U937 細胞の細胞死に必要な細胞外領域の同定**

○奈良清光¹、菅野真由美¹、三ツ木元章²、山地俊之³、山口芳樹⁴、和栗聡⁵、橋本康弘¹

(¹福島医大・医・生化学、²理研・糖鎖機能、³国立感染研、⁴理研・糖鎖構造、⁵福島医大・医・解剖組織)

2. **レプチンは骨の FGF23 合成を促進して腎でのビタミン D の活性化を抑制する**

○前田豊信、辻潔美、松沼礼子、川根徹也、堀内登(奥羽大・歯・口腔生化学)

3. **ERK5 を介した NGF による PC12 細胞の分化誘導メカニズムについて**

○小原祐太郎^{1,2}、山内新¹、根本互¹、竹原伸¹、高橋麻穂²、Philip J.S. Stork²、中畑則道¹

(¹東北大院・薬・細胞情報薬学、²オレゴンヘルスサイエンス大・ポーラム研)

4. **PP2C とは JNK により負の制御を受ける**

○小林孝安、栗野健二郎、菅野新一郎、永浦裕子、田村真理(東北大・加齢研・遺伝子情報)

5. **上皮細胞における転写因子 Nrf2 の活性化**

○田口恵子¹、鈴木隆史¹、本橋ほづみ²、山本雅之¹(東北大院・医・¹医化学、²RI センター)

10:05-11:05 一般演題(2) シグナル伝達

座長: 小林孝安(東北大・加齢研・遺伝子情報)

6. **含セレン蛋白質と Nrf2 による2段階生体防御機構**

○鈴木隆史¹、川谷幸恵¹、大越明¹、Vincent Kelly²、山本雅之¹(¹東北大院・医・医化学、²トリニティ大・生化学)

7. **新規抗菌ペプチド *Drosophila* Listericin の同定**

○後藤彰、矢野環、寺島潤、倉田祥一郎(東北大院・生命科学・生態適応、薬・生命機能)

8. **ショウジョウバエ自然免疫を制御するシャペロン様遺伝子 *CG8863* の機能解析**

○熊田幸平、高柿武志、後藤彰、大島吉輝、倉田祥一郎(東北大院・薬・生命機能)

9. **ショウジョウバエ PGRP-LE の細胞内寄生細菌に対するオートファジー誘導における構造活性相関解析**

○白田陽一、塩川裕子、矢野環、大島吉輝、倉田祥一郎(東北大院・薬・生命機能)

10. **精神遅滞モデルマウスのスパイン形態異常とそのメカニズム**

○塩田倫史¹、別府秀幸²、北島勲²、福永浩司¹(¹東北大院・薬・薬理、²富山大院・医・臨床分子病態検査)

11:10-12:10 一般演題(3) 発現調節・発生分化

座長: 初沢清隆(福島医大・医・細胞科学)

11. **血球分化に果たす GATA1 カルボキシル末端領域の機能解析**

○金子寛^{1,2}、川谷幸恵¹、清水律子²、山本雅之¹(東北大院・医・¹医化学、²病態検査)

12. **エピジェネティックな制御に関わる WGE タンパク質の挙動解析**

○小澤奈央、矢野環、古橋寛史、倉田祥一郎(東北大院・薬・生命機能)

13. Orphan GPCR、*Lgr4* が上皮系組織の分化制御に果たす機能の解析

○毛利泰彰¹、大山一徳¹、赤松篤¹、加藤成樹^{1,2}、奥山隆平³、西森克彦¹(¹東北大院・農・分子生物学、²福島医大・医・生体機能、³東北大院・医・皮膚科)

14. SOD1 欠損による内因性酸化ストレスは胚発生過程に依存して 2 細胞期発生停止もしくは細胞死を引き起こす

○角田智志¹、木村直子²、阿部宏之³、井内良仁¹、戸津川清²、藤井順逸¹(山形大院・¹医・生化学、²農・動物機能調節学、³理工・物質化学工学)

15. 弘前ヘアレスラット胸腺における Th2 細胞の分化抑制と形質細胞の分化亢進

○山田俊幸¹、七島直樹^{1,2}、清水武史¹、三浦卓也¹、山名大輔¹、土田成紀¹(¹弘前大院・医・ゲノム生化学、²保健・生体機能)

12:10-13:00 お昼休み

評議員・幹事合同会議 (12:10-12:50)

13:00-13:48 一般演題(4) 細胞機能・酵素

座長: 矢野環(東北大院・薬・生命機能)

16. 促進拡散型糖輸送タンパク質(Glut1、Glut3)の細胞膜局在性の検討

○佐京智子、奈良場博昭、北川隆之(岩手医大・薬・細胞病態生物)

17. 肺線維症におけるリゾホスファチジン酸産生酵素オートタキシンの機能解析

○奥平真一^{1,3}、久保裕司²、Hei Mei²、五十嵐浩二⁴、新井洋由^{3,5}、青木淳賢^{1,6}(東北大院・¹薬・分子細胞生化学、²医・先進感染医学、³東大院・薬・衛生化学、⁴(株)東ソー、⁵CREST・JST、⁶PREST・JST)

18. ペプチドを用いたミトコンドリアカルパインの特異的阻害～網膜色素変性症の治療へ向けて～

○尾崎拓¹、山下哲郎²、石黒誠一¹(¹弘前大・農学生命・分子生命工学、²岩手大・農・応用生物化学)

19. シアリダーゼ Neu4 による神経接着分子 NCAM ポリアシル酸の制御

○高橋耕太、塩崎一弘、山口壹範、宮城妙子(宮城県立がんセンター・生化学)

13:50-14:38 一般演題(5) 酵素・その他

座長: 守屋孝洋(東北大院・薬・細胞情報薬学)

20. ヘム調節インヒビター(HRI)のヘム・リン酸化による反応制御機構

○五十嵐城太郎、佐々木健彦、清水透(東北大・多元研・バイオ系プロセス制御)

21. 大腸菌のバイオフィーム形成に関わる酸素センサー酵素の性質

○北西健一、田中敦成、五十嵐城太郎、清水透(東北大・多元研・バイオ系プロセス制御)

22. 昆虫細胞-バキュロウイルス発現系におけるアスパルティックプロテアーゼについて

○小野洋輝¹、後藤猛¹、菊地賢一¹、葦澤悟²、高橋砂織³(¹秋田大・工学資源・環境応用化学、²国際農林業研究センター、³秋田県総合食品研究センター)

23. 昆虫培養細胞由来無細胞系の効率化と膜タンパク質の膜組込み効率の評価

○相澤圭師¹、佐藤陽子¹、吉村昌一郎¹、江連徹²、安藤英治²、伊東昌章³、魚住信之¹(¹東北大・エ・バイオ工学、²島津製作所・ライフサイエンス研、³沖縄高専・生物資源工学)

14:40-15:28 一般演題(6) その他

座長: 奈良清光(福島医大・医・生化学)

24. 脳神経機能研究のための高頻度逆行性輸送ベクターの開発

○高住賢司、倉持真人、加藤成樹、小林憲太、小林和人(福島医大・医・生体機能)

25. 発現ベクターpIRESHyg2 依存的に誘導される nonsense-mediated mRNA decay の遺伝子発現に対する影響

○色摩弥生¹、胡慧媛^{1,2}、松岡功^{1,3}、七島勉^{4,5}、木村純子¹(¹福島医大・医・薬理、²中国医大・薬物中毒、³高崎健康福祉大、⁴福島医大・医・循環器・血液、⁵福島環境医学研)

26. 疼痛の発生機序に関わるガングリオシド

○渡辺俊¹、丹野孝一²、只野武²、東秀好^{1,3}(東北薬大・¹分子生体膜研・生体膜情報、²薬理、³CREST・JST)

27. 細胞外基質からのインテグリンを介したシグナルによる MUC5AC ムチンの産生制御

○岩下淳、本郷香織、阿部達也(秋田県立大・生物資源・応用生物科学科)

15:50-16:10 生化学会東北支部優秀論文賞受賞者講演

座長: 中畑則道(東北大院・薬・細胞情報薬学)

スフィンゴ糖脂質合成酵素の細胞内トラフィック制御機構

上村聡志(東北薬大・分子生体膜研・機能病態分子)

16:10-16:40 生化学会東北支部奨励賞受賞者講演

座長: 清水透(東北大・多元研・バイオ系プロセス制御)

遺伝子改変マウスを用いた活性酸素の傷害性と有効性に関する研究

井内良仁(山形大院・医・生命環境・生化学分子生物学)

16:40-17:25 シンポジウム(1)

座長: 橋本康弘(福島医大・医・生化学)

細胞の形作りー細胞膜と細胞骨格を結ぶ一群の蛋白質

竹縄忠臣(神戸大院・医・脂質生化学)

17:25-18:10 シンポジウム(2)

座長: 小林和人(福島医大・医・生体機能)

シグナル伝達、mRNA 代謝、そしてエネルギー代謝

山本雅(東京大・医科研・癌細胞シグナル分野)

18:20-

懇親会: Ki-ichigo(きいちご) コラッセふくしま 12 階

シンポジウム(1)

細胞の形作り－細胞膜と細胞骨格を結ぶ一群の蛋白質

竹縄忠臣（神戸大学大学院 医学系研究科）

細胞や細胞膜の形がどのようにしてできるのかは長い間、生物学上の重大関心事の一つであった。我々は長年ホスホイノシタイド結合蛋白質の探索を行って来たが、あるグループにホスホイノシタイド結合活性のみならず膜の形を変える作用があることを見いだした。これらの蛋白質は膜変形作用活性を持つBAR, EFC/F-BAR や IMD/I-BAR ドメインを有し、細胞膜をエンドサイトーシス時に見られるような内向きの膜陥入構造にしたり、フィロポジアやラメリポジアのような外向きの膜突起構造にしたりする作用を持ち、様々な膜構造を作り出した。更にはこれらの蛋白質は膜のホスホイノシタイドに結合するのみならずアクチンの重合マシンである N-WASP/WAVE 蛋白質に結合して、膜変形を起こすための駆動力を発生させた。

ホスホイノシタイドがセカンドメッセンジャー産生やPHドメインなどの様々な結合蛋白質を介して蛋白質の機能を修飾していることはよく知られている。それに加えて、近年細胞や膜の形態形成にも重要な役割を果たしている事が明らかになって来た。これら膜変形作用を有する一連のホスホイノシタイド結合蛋白質についてお話ししたい。

シンポジウム(2)

シグナル伝達、mRNA 代謝、そしてエネルギー代謝

山本雅（東京大学医科学研究所 癌細胞シグナル分野）

遺伝子発現は様々な仕組みで制御されている。転写制御研究について多くの知見が蓄積しており、また翻訳開始制御に関しても様々に研究がなされてきた。そのような中、近年外来情報に依存した遺伝子発現制御の一つとして mRNA の安定性制御が注目されている。mRNA の安定性が 3' UTR 中の AU-rich element (ARE) により制御されているという報告がなされるとともに、多くの ARE 結合蛋白質が見出され解析されている。また miRNA や AGO 蛋白質と mRNA の 3' UTR の相互作用による遺伝子発現制御についても研究が進展している。

一方我々は EGF 受容体等受容体型チロシンキナーゼを介する細胞内シグナル伝達系を解析してきた。その過程で、EGF 刺激依存的に活性化される Erk1/2 MAP キナーゼ標的蛋白質として Tob を見出した。Tob は細胞増殖抑制活性をもつ蛋白質である。さらに我々は Tob 会合蛋白質とし CCR4-NOT 蛋白質複合体 (2 MDa) を見出した。CCR4-NOT 複合体は、哺乳動物では CNOT1~CNOT3, CNOT6, CNOT6L, CNOT7~10 の 9 個のサブユニットからなり、核内受容体と会合し転写制御に関わることが示されている。一方で、近年 CCR4-NOT 複合体は deadenylase 活性をもつことが明らかにされた。

我々は deadenylase 活性に注目して CCR4-NOT 複合体の生体における機能や、deadenylase の作用機構に関する研究を進めている。そのために、すべてのサブユニットについてそれぞれを改変したマウスを作成してきた。本講演では、特に CNOT3 改変マウスについて以下のことが明らかとなったので紹介したい。

1. CNOT3 ホモ欠損マウスは胚性致死である。
2. CNOT3 ヘテロ欠損マウスは瘠せ形質を示す。
3. CNOT3 ヘテロ欠損マウスでは糖代謝や脂肪酸代謝が亢進している。
4. CNOT3 が糖代謝や脂肪酸代謝に関わる mRNA の 3' UTR に作用して、それら mRNA を不安定化している。

さらに、肝臓での CNOT3 蛋白質の発現が飢餓時で減少しまた摂食時に亢進するなど、栄養状態によって大きく変動することをみいだした。そして、飢餓時に CNOT3 の発現が抑制されると同時に、脂肪酸代謝に関わる mRNA の発現が上昇することを見出した。つまり飢餓時には CNOT3 が減少し、貯えられていた脂肪の分解を促進するものと考えられる。現在 CNOT3 が特定の mRNA の発現制御に如何に関わるかについて、標的候補 mRNA の 3' UTR を介する分解制御の分子機構を明らかにするための研究を進めている。

これまでに、mRNA 転写因子や mRNA 翻訳因子遺伝子を改変したマウスでエネルギー代謝が亢進していることが示されてきたが、今回の我々が得た知見は mRNA の安定性制御因子 (deadenylase) もまたエネルギー代謝に関わることを強く示唆するものである。

奨励賞

遺伝子改変マウスを用いた活性酸素の傷害性と有効性に関する研究

井内良仁（山形大学大学院医学系研究科 生命環境医科学専攻 生化学・分子生物学講座）

活性酸素は、呼吸などの生命活動に伴って産生される他に、紫外線や喫煙、食品添加物などによる外界からの刺激を受けることで大量に発生する。過剰な活性酸素は生体を傷害し老化や疾患の原因となる一方で、生体は活性酸素を自ら産生し、それを厳密に制御することで、生体防御や細胞増殖・分化の調節のための細胞内シグナルと利用している事がわかってきた。

抗酸化酵素スーパーオキシドディスムターゼ 1 (SOD1) は、生体内で最初に生じる活性酸素であるスーパーオキシドを消去する事で、老化や疾患防止に働く。SOD1 遺伝子欠損 (SOD1 KO) マウスの解析を行った結果、赤血球内の活性酸素の増加と共に赤血球寿命の短縮が起こり、貧血症状を呈することを明らかにした。同時に、通常は生じない、赤血球に対する自己抗体が加齢と共に血液中に増加し、自己免疫疾患様病態を呈することがわかった。こうした病態は、SOD1 KO マウスの赤血球のみに SOD1 を発現するトランスジェニックマウスを作製する事で改善したため、免疫システムの異常によるものではなく、赤血球の酸化ストレスに起因する事が明らかになった。自己免疫性溶血性貧血を自然発症する NZB マウスにおいても、赤血球の酸化ストレスと自己抗体産生の関連を示す結果を得ており、こうした自己免疫疾患の発症に酸化ストレスが関与する可能性が示唆された。

一方、新規抗酸化酵素のペルオキシレドキシシン (Prx) ファミリーについては、その過酸化水素消去活性に加えて、細胞増殖刺激時に生じる活性酸素シグナルの制御因子としての役割が注目されている。Prx ファミリーのうち、Prx4 はサイトカイン受容体と相互作用して細胞シグナルを抑制的に制御している事が共同研究により明らかになった。さらに、Prx4 の生理機能を解明するために作製した遺伝子欠損マウスでは、精子形成過程で精母細胞が細胞死を起こすために精巣の萎縮と精子数の減少が見られた。このことは Prx4 が精子への分化に関わるシグナル制御に関与する可能性を示唆する。

優秀論文賞

スフィンゴ糖脂質合成酵素の細胞内トラフィック制御機構

上村聡志（東北薬科大学 分子生体膜研究所）

スフィンゴ糖脂質は細胞膜外層に存在し、コレステロールやスフィンゴミエリンと共に、脂質マイクロドメインを構成している。脂質マイクロドメインには、様々な増殖因子受容体やシグナル伝達分子が集積することから、シグナル伝達の中継地点として機能すると考えられている。これまでに我々は、シアル酸を含むスフィンゴ糖脂質、ガングリオシドに注目し、その中でも、動物細胞に広く発現しているガングリオシド GM3 の機能解析を中心に研究を行ってきた。その結果、GM3 が肥満モデル動物の脂肪細胞で著しく増加し、その増加した GM3 はインスリン受容体をカベオラと呼ばれる細胞膜のくぼみ構造から解離させることによって、インスリンシグナルを減弱させることを明らかにしてきた¹。他の研究グループからも、GM3 量を減少させる GlcCer 合成阻害剤の投与によって、肥満モデル動物のインスリン抵抗性を改善させることが報告され、現在では 2 型糖尿病治療薬の標的として、GM3 は注目を集めている。このように、細胞膜の GM3 量が病態と密接に関係することから、ゴルジ体における GM3 生合成の制御機構を理解することは、極めて重要であると考えている。

最近、我々は GM3 合成酵素 (SAT-I) に細胞質領域の長さが異なる 3 種類のアイソフォーム (M1-SAT-I, M2-SAT-I, M3-SAT-I) が存在することを見出した²。これらのアイソフォームは、SAT-I が複数の mRNA バリエーションを持つことと、複数のメチオニンが開始コドンと認識される、leaky scanning というシステムによって産生される。興味深いことに、M2-SAT-I と M3-SAT-I はゴルジ体に局在しているが、M1-SAT-I は細胞質領域に小胞体への逆行輸送シグナル (R-based motif) を持つため、その大部分は小胞体へ局在し、*in vivo* における GM3 合成活性が低かった。また、M3-SAT-I は M2-SAT-I よりも細胞内寿命が長く、ゴルジ体滞留時間が長いことが判明した。つまり、GM3 生合成量は、各アイソフォームの量的バランスによって決められていることが示唆される。

【参考文献】

1. Kabayama K. *et al.*, (2007) *Proc. Natl. Sci. USA.* 104, 13678-13683
2. Uemura S *et al.*, (2009) *Mol. Biol. Cell* 20, 3088-3100

1

Siglec-7 を介した U937 細胞の細胞死に必要な細胞外領域の同定

奈良清光¹、菅野真由美¹、三ツ木元章²、山地俊之³、山口芳樹⁴、和栗聡⁵、橋本康弘¹

(¹ 福島医大・生化学、² 理研・糖鎖機能、³ 国立感染研、⁴ 理研・糖鎖構造、⁵ 福島医大・解剖組織)

【目的】 Siglec-7 は、NK 細胞と単球に発現し、免疫機能を抑制する抑制性受容体の 1 つである。Siglec-7 のリガンドは、ジシアリル構造をもつ癌関連抗原が知られている。当研究室では、Siglec-7 の細胞内情報伝達を明らかにする目的で、Siglec-7 を発現する U937 細胞を解析していたところ、抗体刺激により Siglec-7 発現 U937 が細胞死を起こすことを見出した。そこでこの現象のメカニズムの解明を目的として、本細胞死に必要な Siglec-7 の領域の同定を行なった。

【方法】 細胞死に関与する Siglec-7 の領域を同定するため、近縁の分子であり細胞死を起こさないシグレック 9 と相同部位の入れ換えを行い、各種変異体を作製した。それぞれの変異体 DNA を、U937 細胞にトランスフェクションして、薬剤選択シクロン化して、安定発現株を樹立した。Siglec-7 の発現は、抗 Siglec-7 抗体を用いた FACS 解析により確認した。また、電子顕微鏡を用いて細胞死を起こした細胞の微細構造を観察するとともに、アポトーシスであるかの検討も行った。

【結果】 Siglec-7 による細胞死は、驚くべきことに、これまで重要だと考えられていた細胞内の ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif) と呼ばれる領域を欠失した変異体でも起こった。すなわち、今回見出した現象は今まで Siglec-7 では知られていないメカニズムで起こっていることが示唆された。さらに、細胞外の C2-2 と呼ばれるドメインが重要であり、中でも、中程の 4 つのアミノ酸残基が細胞死を起こすのに必須であった。電子顕微鏡による観察では、核の凝集などアポトーシス様の像を示さなかったが粗面小胞体の泡沫化という興味深い現象が見られた。また、本細胞死は典型的なアポトーシスではないことが示唆された。

【考察】 C2-2 領域を介した細胞死は、(1) 本領域に何らかのタンパク質が結合し、細胞内へシグナルを伝えている、(2) 本領域が何らかの構造的変化を起こす為に重要である等が考えられる。この細胞死の分子メカニズムを解明し、細胞死を制御する抗体や薬剤を開発することにより、NK 細胞の活性化を行い、癌免疫療法などへの寄与を行ないたいと考えている。

2

レプチンは骨の FGF23 合成を促進して腎でのビタミン D の活性化を抑制する

前田豊信、辻潔美、松沼礼子、川根徹也、堀内登

(奥羽大学・歯・口腔機能分子生物学講座・口腔生化学)

レプチンは主として脂肪細胞から分泌されるホルモンで、摂食抑制やエネルギー代謝に関与している。レプチン遺伝子に point mutation をもつ *ob/ob* マウスはレプチンを欠損していて、高度の肥満を呈する。私たちは *ob/ob* マウスを用いて、long form のレプチン受容体 (ObRb) を介し、腎臓の 1α -水酸化酵素発現を抑制することを見出した。レプチンは $1, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の合成を抑制し、血清カルシウム濃度を低下させることを私たちは明らかにした (Endocrinology, 2004)。しかし、レプチンは直接的ではなく間接的に腎近位尿細管細胞の 1α -水酸化酵素発現抑制に作用することがわかった (Arch. Biochem. Biophys. 2007)。本研究では、*ob/ob* マウスを用いて、レプチンによる腎の 1α -水酸化酵素発現抑制に、骨細胞から分泌されるリン酸利尿因子の FGF23 が関与するかについて検討した。

雄 *ob/ob* マウスにレプチン (4 mg/kg b. w.)、または、FGF23 (5 μ g/injection) を 12 時間ごとに 1 日 2 回、2 日間腹腔内投与した。骨と腎を取り出し mRNA 発現量を調べた。また、ラットの初代骨芽細胞培養を行い、レプチンの FGF23 発現への作用を検討した。

マウスにおける FGF23 mRNA 発現は骨で最も高かった。*ob/ob* マウスにレプチンを投与すると、血清カルシウムおよび $1, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 濃度は有意に低下したが、逆に FGF23 濃度は有意に上昇した。レプチン投与により、骨での FGF23 mRNA 発現は上昇し、腎の 1α -水酸化酵素発現は抑制された。ObRb mRNA を発現している初代培養骨芽細胞にレプチンを添加すると、STAT3 のリン酸化が亢進した。レプチンは FGF23 mRNA 発現を亢進させ、培地中への FGF23 分泌量を上昇させた。さらに、*ob/ob* マウスに FGF23 を投与すると、腎の 1α -水酸化酵素 mRNA 発現は抑制された。

以上の結果から、*ob/ob* マウスにおいて、レプチン投与による腎臓での 1α -水酸化酵素発現の抑制作用の少なくとも一部は、骨細胞や骨芽細胞での FGF23 合成促進を介していることが示された。

3

ERK5 を介した NGF による PC12 細胞の分化誘導メカニズムについて

小原祐太郎^{1, 2}、山内新¹、根本互¹、竹原伸¹、高橋麻穂²、Philip J. S. Stork²、中畑則道¹
(¹ 東北大院・薬・細胞情報薬学分野、² オレゴンヘルスサイエンス大・ボーラム研究所)

私たちはこれまでの研究で、神経成長因子 (NGF) は extracellular signal-regulated kinase (ERK) 5 の活性化を介して、ラット副腎髄質褐色細胞腫 (PC12) の神経突起伸展を引き起こすことを報告した (*J Biol Chem* 284, 23564-73, 2009; *Mol Pharmacol* 77, 10-6, 2010)。本研究では、カテコールアミン合成酵素であるチロシンヒドロキシラーゼの発現に関する ERK5 の役割について検討した。NGF 刺激によりチロシンヒドロキシラーゼ遺伝子の発現が促進されたが、新規 ERK5 シグナル阻害薬 BIX02189 は有意にその発現を抑制した。さらに、チロシンヒドロキシラーゼタンパク質の発現レベルについて検討した。ERK5 および MEK5 のドミナントネガティブ変異体の過剰発現により、また、ERK1/2 シグナル阻害薬である U0126 を用いて ERK5 と ERK1/2 の両方の酵素活性を抑制したところ、チロシンヒドロキシラーゼタンパク質の発現レベルは大きく低下した。さらに、NGF はチロシンヒドロキシラーゼタンパク質の安定性を上昇させたが、ERK5 のドミナントネガティブ変異体や BIX02189 により、チロシンヒドロキシラーゼの安定性は低下した。NGF はチロシンヒドロキシラーゼのセリン 31 残基をリン酸化して、タンパク質を安定化することがすでに示されている。そこで、このリン酸化部位について検討したところ、ERK5 のドミナントネガティブ変異体の過剰発現や BIX02189 によりチロシンヒドロキシラーゼのセリン 31 残基のリン酸化は全く抑制されない一方、U0126 によりほぼ完全に抑制された。すなわち、ERK5 はセリン 31 残基のリン酸化以外のメカニズムで、チロシンヒドロキシラーゼを安定化していることが明らかになった。以上の結果より、NGF は ERK5 の活性化を介してチロシンヒドロキシラーゼの遺伝子発現を促進し、さらに、チロシンヒドロキシラーゼタンパク質の安定性を上昇することによって、発現量を増加させることが明らかになった。最後に、ERK5 依存的に発現が誘導されてくる遺伝子群をマイクロアレイ法により網羅的に検討したところ、NGF は 482 遺伝子の発現を促進した。それらの遺伝子の中で、279 遺伝子 (57.9%) が ERK5 かつ ERK1/2 依存的に誘導され、57 遺伝子 (11.8%) が ERK5 のみに依存的だった。現在、これらの ERK5 依存的に発現誘導される遺伝子群の役割について、詳細に検討している。

4

PP2C ζ は JNK により負の制御を受ける

小林孝安、栗野健二郎、菅野新一郎、永浦裕子、田村眞理
(東北大学 加齢医学研究所 遺伝子情報)

プロテインホスファターゼ 2C (PP2C) は、真核生物の主要なセリン・スレオニンホスファターゼファミリーの一つで、哺乳動物では 14 種類の PP2C 遺伝子が確認されている。ストレス応答シグナル伝達路 (SAPK 経路) は MKKK、MKK および SAPK (JNK 及び p38) による三段階の連続したリン酸化反応からなるカスケードで、活性化された SAPK が転写因子を始めとするさまざまなタンパク質のリン酸化を介して、多様な細胞応答を引き起こす。このシグナル経路が適切に作動するには、各段階におけるリン酸化による活性化とプロテインホスファターゼによる負の制御のバランスが必須であるが、PP2C ファミリーのメンバーは、負の制御因子として重要な役割を担っていることが明らかとされている。

PP2C ファミリーのメンバーである PP2C ζ (zeta) は、JNK や p38 によってリン酸化されうるセリン・プロリン (SP) / スレオニン・プロリン (TP) 配列が複数集中した特徴的な領域を有している。このことより、JNK や p38 の基質となる可能性を考え、まず *in vitro* においてリン酸化を受けるかを検討したところ、PP2C ζ が JNK の良い基質となることが明らかとなった。リン酸化部位は、質量分析および変異体を用いた実験により Ser⁹² と Thr²⁰⁵ と同定された。これらの部位は、培養細胞での強制発現系においても、ストレス依存的に JNK によってリン酸化された。続いて、これらのリン酸化が PP2C ζ の機能に与える影響を検討した結果、Ser⁹² のリン酸化がホスファターゼ活性の抑制を引き起こすことが明らかとなった。PP2C ファミリーの多くが転写制御という比較的 long term の制御を受けていることが分かっているが、本研究は PP2C が翻訳後修飾という short term の制御を受ける初めての例を示したものである。

5

上皮細胞における転写因子 Nrf2 の活性化

田口恵子¹、鈴木隆史¹、本橋ほづみ²、山本雅之¹

(¹東北大院・医・医化学、²東北大・RI センター、)

転写因子 Nrf2 は親電子性物質や活性酸素種がもたらす酸化ストレスに対する生体防御システムとして重要な役割を果たしている。Nrf2 の活性は Keap1 によって負に制御されている。すなわち、Cullin3 型ユビキチン E3 リガーゼのアダプターである Keap1 によって細胞質に局在した Nrf2 は、ユビキチン-プロテアソーム系によって速やかに分解される。しかし、内因性および外因性刺激によって Keap1 と Nrf2 の結合が破綻すると、Nrf2 はタンパク質分解から免れて核へ移行し、抗酸化剤/親電子性物質応答配列 (ARE/EpRE) に結合して下流遺伝子群の転写を誘導する。Nrf2 の標的遺伝子には数多くの抗酸化あるいは解毒代謝酵素が知られている。本研究では、Keratin 5 (K5)-Cre マウスを用いてケラチノサイト特異的 *Keap1* 欠損マウスを作製し、上皮系組織における Nrf2 の発現と表現型について解析した。

K5 は皮膚、食道、前胃、舌などの扁平上皮細胞の基底層に発現している。上皮基底細胞特異的 *Keap1* 欠損マウス (*Keap1*^{flox/flox}:K5-Cre) では、K5 が発現する組織において Nrf2 の核蓄積および Nrf2 標的遺伝子である *Nqo1* や *Gpx2* の発現上昇がみられた。また、*Keap1*^{flox/flox}:K5-Cre は生後に成長遅延がみられ、授乳期に全例死亡した。これは、*Keap1* 遺伝子欠損マウスの表現型とよく似ていた。すなわち、今回の *Keap1*^{flox/flox}:K5-Cre マウスの解析から、*Keap1* 遺伝子欠損マウスの死因は、食道および前胃における異常な角化亢進であることが強く示唆される。

ところで、最近、食道や皮膚の扁平上皮がん細胞において *Nrf2* 遺伝子における体性変異が存在し、それによる Nrf2 の活性化が報告されている。上皮細胞における Nrf2 の活性化は、がん細胞の増殖や分化に寄与している可能性が考えられるので、今回の結果と合わせて議論したい。

6

含セレン蛋白質と Nrf2 による 2 段階生体防御機構

鈴木隆史¹、川谷幸恵¹、Vincent Kelly²、山本雅之¹
(¹東北大院・医・医化学、²トリニティ大学・生化学)

含セレン蛋白質は、多くの場合、生体の抗酸化機能・レドックス恒常性維持に重要な貢献を果たしているが、セレンをセレノシステインの形で蛋白質に取り込むためには、セレノシステイン tRNA (tRNA^{Sec}) 分子の機能が必須である。本研究では、含セレン蛋白質欠失が生体の抗酸化機能に与える影響を調べるために、tRNA^{Sec} 遺伝子 (*Trsp*) の条件付き欠失マウスを作製した。*Trsp* はセレノシステインに対する唯一の tRNA であり、単一コピーで存在する。肝臓やマクロファージにおいて特異的な *Trsp* 遺伝子欠失は、酸化ストレスレベルの亢進を惹起し、転写因子 Nrf2 による抗酸化酵素群や第 2 相解毒酵素群の誘導を招来した。また、肝臓における *Nrf2* と *Trsp* 両遺伝子の 2 重欠失は抗酸化機能の重篤な障害を引き起こし、肝細胞のアポトーシスとマウス死亡率の著明な亢進を招いた。これらの結果は、含セレン蛋白質による第 1 線の酸化ストレス防御が破綻した際には、Nrf2 による第 2 線防御が代償的に機能して、酸化ストレス応答と個体の生存を助けることを示している。本研究を通して、生体内では 2 段階の抗酸化応答系が有機的に関連しながら機能していること、両者の機能貢献が個体生存に必須であることが理解された。

新規抗菌ペプチド *Drosophila* Listericin の同定

後藤彰、矢野環、寺島潤、倉田祥一郎

(東北大院・生命科学研究科)

自然免疫は、感染の第一線で活躍する哺乳類から昆虫まで普遍的に保存された免疫系の一つである。当研究室で最初に同定されたペプチドグリカン認識タンパク質 PGRP-LE は、自然免疫シグナル伝達経路の一つである Imd 経路およびメラニン合成経路の活性化などにも関与する多機能性分子である。近年、この PGRP-LE が細胞内寄生細菌に対する認識分子として機能する可能性が示唆された。本研究では、DNA マイクロアレイ法による遺伝子網羅的発現解析を用いて、細胞内寄生細菌であるリステリア菌に対する新規宿主防御因子の同定を目的とした。ショウジョウバエ・マクロファージ様細胞である S2 株および PGRP-LE 発現 S2 株を用いて DNA マイクロアレイを行ない、PGRP-LE 依存的かつ野性型リステリア菌の感染特異的に発現誘導される新規遺伝子 Listericin を同定した。Listericin は 121 アミノ酸からなるグリシン豊富領域を有する分泌タンパク質である。過剰発現および RNAi 法による解析により、Listericin は、PGRP-LE および JAK-STAT 経路の両方によって協調的に発現制御されることが明らかとなった。また、Listericin 安定発現培養細胞を用いた解析により、Listericin は 49 番目のアルギニン残基部位で限定分解された型で細胞外へ分泌されること、またその分泌型 Listericin を含む培養上清は、グラム陰性菌およびリステリア菌に対して抗菌様活性があることを示した。さらに、*In vivo* における解析も行ったところ、Listericin 過剰発現個体は、リステリア菌感染に対して抵抗性を示した。コロニー形成法による解析から、Listericin 過剰発現個体は、体液中でのリステリア菌およびグラム陰性菌の増殖を抑制することができることも明らかとした。

以上の結果から、Listericin は、自然免疫経路を制御する新規抗菌ペプチド様活性を有する遺伝子である可能性が示された。

ショウジョウバエ自然免疫を制御するシャペロン様遺伝子 *CG8863* の機能解析

熊田幸平、高柿武志、後藤彰、大島吉輝、倉田祥一郎
(東北大学・薬学研究科・生命機能解析学分野)

自然免疫は生物に侵入してきた病原体に対し最前線で機能する生体防御機構である。これまでに、モデル生物であるショウジョウバエを用いた解析から自然免疫制御因子 Toll が同定されており、これを契機に哺乳類において Toll 様受容体 (TLR) が同定された。多くの自然免疫制御因子群は昆虫類から哺乳類に至るまで高度に保存されており、さらに、ショウジョウバエはヒトと共通する自然免疫機構を有していることから、この自然免疫機構の解明は、感染症治療に新しい視点を提供するものと期待できる。

我々はこれまでに、ショウジョウバエを用いたゲノムワイドな機能獲得型スクリーニングを行い、過剰発現により恒常的な抗菌ペプチドの発現を誘導するシャペロン様遺伝子 *CG8863* を同定した。*CG8863* はそのアミノ酸配列から大腸菌コシャペロンの 1 つである DnaJ 様の機能を有することが示唆されている。DnaJ はシャペロンである DnaK の ATPase 活性を刺激し、DnaK の機能を補助することで正常なタンパク質のフォールディングを促進する因子であり、*CG8863* も同様の機能を有すると予想されるが、これまでにコシャペロンが自然免疫の活性化に関与するという報告はなされていない。そこで本研究では、RNAi 法により *CG8863* の機能を抑制した個体を作成し、*CG8863* の自然免疫への関与を検討した。その結果、貪食などの細胞性免疫を担当する血球細胞で *CG8863* の RNAi を行うことによって、自然免疫応答の一つであるメラニン化が誘導された。このメラニン化の誘導は、血球細胞における *CG8863* の機能低下により体液中に侵入してきた細菌に対する排除機構が破綻し、そのために二次的に誘導された免疫応答である可能性が考えられた。そこで、抗生物質処理を施し体内の細菌を排除したところ、*CG8863* の RNAi によるメラニン化の誘導は抑制されず、むしろ増強された。このことから、血球細胞における *CG8863* の RNAi により誘導されたメラニン化は、体液中の細菌に対する二次的な免疫応答ではなく、コシャペロンの機能低下に伴い、未知の自然免疫機構によって誘導された免疫応答である可能性が示唆された。

ショウジョウバエ PGRP-LE の細胞内寄生細菌に対するオートファジー誘導における構造活性相関解析

白田陽一、塩川裕子、矢野環、大島吉輝、倉田祥一郎
(東北大院・薬)

自然免疫は、哺乳類を含むほぼ全ての多細胞生物に広く保存された感染防御機構であり、有限の因子のみで体内に侵入した多様な病原体を認識し、病原体に対応した免疫応答を活性化する。ショウジョウバエでは、Peptidoglycan Recognition Protein (PGRP) ファミリー分子群が病原体認識分子として機能し、体液中において侵入した病原体を認識して、抗菌ペプチド産生を誘導することにより病原体の排除を行う。我々がこれまでに同定した PGRP-LE は、ショウジョウバエ体液中において DAP 型ペプチドグリカンをもつ細菌を認識し、宿主細胞内シグナル伝達経路である imd 経路の活性化により抗菌ペプチド産生を誘導する。抗菌ペプチドは体液中で増殖する細菌に対しては重要な防御機構であるが、細胞内寄生細菌はこの機構から逃れ、宿主細胞内に侵入し増殖する。この様な細胞内寄生細菌に対する防御機構として、近年、オートファジーが重要な役割を果たしていることが明らかとなってきている。我々はこれまでに、PGRP-LE が体液中のみならず細胞内においても認識分子として機能し、既知の自然免疫経路である Toll 経路や imd 経路に依存しない経路により細菌特異的なオートファジーを誘導することを明らかにした。しかし、この哺乳類にも保存された自然免疫応答である細菌特異的なオートファジー誘導において、その認識分子依存的な誘導機構は未だ多くが不明である。

我々は、認識分子依存的なオートファジー誘導の分子機構を解明するために、PGRP-LE における自然免疫活性化に必要なアミノ酸領域を検討した。内在性の PGRP-LE を発現していない細胞であるショウジョウバエ胚由来培養細胞 S2 細胞を用い、様々な欠損を有する PGRP-LE を発現させ、細胞内寄生細菌であるリステリア菌の感染を行うことにより、オートファジー誘導と抗菌ペプチド産生誘導に必要なアミノ酸領域の検討を行った。その結果、オートファジー誘導のみに必要な領域 (90 番目～93 番目のアミノ酸)、抗菌ペプチド産生誘導のみに必要な領域 (98 番目～101 番目のアミノ酸)、また、両方の誘導に必要な領域 (102 番目～105 番目のアミノ酸) を同定した。この結果は、オートファジー誘導と抗菌ペプチド産生誘導という PGRP-LE 依存的な 2 つの自然免疫応答の活性化が異なる機構に依っていることを示唆している。今回行った構造活性相関解析は、未同定の自然免疫経路である、細菌感染における選択的オートファジー誘導の分子機構解明に新たな手がかりを与えるものである。

精神遅滞モデルマウスのスパイン形態異常とそのメカニズム

塩田倫史¹、別府秀幸²、北島 勲²、福永浩司¹

(¹東北大院・薬・薬理、²富山大院・医・臨床分子病態検査)

【目的】 これまでの研究においてヒト精神遅滞ではスパインの形成異常がみられることが知られている(1)。例えば、遺伝性の精神遅滞である脆弱 X 症候群 (Fragile X syndrome) 樹状突起のスパインは細長く、密度が高い(2)。これらの現象は精神遅滞がスパイン形成異常の病気である可能性を示唆している。一方、私達はカルシウム・カルモデュリン依存性プロテインキナーゼII (CaM キナーゼII) の過剰な活性化によってラット脳スライス培養神経細胞のスパインが形態異常をひき起こすことを報告している(3)。X連鎖 α サラセミア・精神遅滞症候群 (ATRX syndrome) は精神遅滞を伴う発達遅滞を特徴とする疾患である。ATRX 蛋白質は他のクロマチン関連蛋白質と共にクロマチンリモデリングにおいて機能し、発達期の遺伝子発現抑制に働くと考えられている。本研究では ATRX exon2 変異精神遅滞モデルマウス (ATRX ^{Δ E2} マウス) を用いて、スパイン形態異常とその細胞内メカニズムについて検討した。

【結果及び考察】 ATRX 変異マウスは Y-maze test、 novel object recognition test において有意な認知機能の低下が見られた。また、ATRX 変異マウスは内側前頭前野において細長い形態をしたスパインが有意に増加していた。さらに、内側前頭前野の神経細胞において CaM キナーゼIIの活性が異常に上昇していた。また、スパインの形態に深く関与する GEF であり、CaM キナーゼIIの基質である Tiam1 と Kalirin-7 について検討した結果、それらのリン酸化が有意に上昇していること、その下流である PAK の活性も上昇することを確認した。これらの結果より、ATRX 変異マウスでは CaM キナーゼIIの過剰な活性上昇、続いて Rac1-GEF/PAK シグナルの亢進によりスパイン形態異常を起こすことが明らかとなった。

【引用文献】

- (1) Purpura DP. Dendritic spine "dysgenesis" and mental retardation. *Science*. (1974) 186:1126-1128.
- (2) Rudelli RD. Adult fragile X syndrome. Clinico-neuropathologic findings. *Acta Neuropathol*. (1985) 67:289-295.
- (3) Jourdain P, Fukunaga K, Muller D. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II contributes to activity-dependent filopodia growth and spine formation. *J Neurosci*. (2003) 23:10645-10649.

血球分化に果たす GATA1 カルボキシル末端領域の機能解析

金子寛^{1, 2}、川谷幸恵¹、清水律子²、山本雅之¹(¹ 東北大学・医学系・医化学、² 東北大学・医学系・病態検査学)

GATA1 は赤血球及び巨核球の分化に重要な遺伝子群の発現を包括的に制御する転写因子である。GATA1 には、転写活性化に重要なアミノ末端 (NT) 酸性領域と、DNA や共役因子との相互作用を担う 2 つの Zn フィンガー領域の 3 つの機能ドメインが存在し、それぞれが固有の機能を介して標的遺伝子の発現を調節している。近年、Zn フィンガー領域の変異による遺伝性血小板減少症家系が報告された。また、NT 領域の欠失がダウン症関連急性白血病発症に必発していることが明らかにされ、これらの機能ドメイン変異を基盤とした GATA1 の機能異常と疾患発症との関連が注目を浴びている。一方、GATA1 のカルボキシル末端 (CT) 領域については、同領域を欠失した GATA1 変異ゼブラフィッシュが重度の貧血により致死となることから、生体内における重要性が示唆されているものの、これまで詳しい解析はなされていない。そこで、CT 欠失変異体 GATA1- Δ C319 を作製し解析を行った。GATA1- Δ C319 は、野生型 GATA1 と同様の DNA 結合能とホモ二量体形成能を有していたが、転写活性化能は野生型の約 3 割に低下していた。これは、NT 領域を欠失した GATA1- Δ NT と同程度の活性低下であった。また、CT 領域と NT 領域の両方を欠失した GATA1- Δ NCT では、転写活性化能がほぼ消失した。さらに、GAL4 DNA 結合部位と融合させた融合蛋白質を作成し、それぞれの転写活性化能を検討したところ、CT 領域は NT 領域のほぼ 60% の転写活性化能を有していた。以上の結果から、CT は転写活性化能を有する第 4 の機能ドメインであることが明らかとなった。蛋白質一次構造上、グルタミン酸に富む酸性アミノ酸型転写活性化領域である NT 領域とは異なり、CT 領域はセリン/スレオニンやプロリンに富む転写活性化領域と考えられる。すなわち、GATA1 は、性質の異なる 2 つの転写活性化領域を用いて、標的遺伝子の転写制御を行い、造血系の恒常性維持に寄与している。

1 2

エピジェネティックな制御に関わる WGE タンパク質の挙動解析

小澤奈央、矢野環、古橋寛史、倉田祥一郎
(東北大院・薬)

分化した細胞から器官を構築するためには相同な細胞集団が機能的に統合される必要があるが、細胞分化の上位で器官特異性が決定される機構はあまり理解されていない。ショウジョウバエの複眼原基において、過剰発現により複眼から翅への器官改変を引き起こす遺伝子 *winged eye* (*wge*) は、様々な組織に発現し、エピジェネティックな遺伝子発現制御に関わると考えられている因子である。*wge* 変異体を用いた解析により、*wge* 遺伝子は発生過程に必須であるが、エピジェネティックな制御における *wge* の機能は、量あるいは状況に依存して変化することが示唆されている。したがって、過剰発現のみならず、内在性 WGE タンパク質の状況依存的な挙動や複合体形成の変化を調べることで、相同な細胞集団から器官の特異性が決定する分子機構における *wge* の機能解析が必要である。

本研究では、内在性 WGE タンパク質の機能解析を目的とし、WGE タンパク質においてクロマチンへの特異的な局在に必要であると考えられる BAH (bromo adjacent homology) ドメインを抗原として、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体を作製した。まず、抗原タンパク質を大腸菌で発現させ、非変性条件下で可溶性画分を回収し、アフィニティークラム、イオン交換カラムにより精製を行った。その結果、SDS-PAGE 上で単一のシグナルとして検出される精製度を得、これを抗原として、モノクローナル抗体、およびポリクローナル抗体を作製した。ウエスタンブロッティング、細胞免疫染色により、WGE タンパク質を認識するモノクローナル抗体を6株取得した。また、作製したポリクローナル抗体を用いて、ウエスタンブロッティングを行った結果、過剰発現のみならず、内在性 WGE タンパク質が検出できた。今回得られた抗 WGE 抗体は、内在性 WGE タンパク質のクロマチン上での挙動解析や、複合体を形成する因子の探索を初めて可能にすると考えられる。また、マウスモノクローナル抗体とウサギポリクローナル抗体を得たことで、組織の二重染色等における、より多彩な解析が可能となった。

1 3

Orphan GPCR、*Lgr4*が上皮系組織の分化制御に果たす機能の解析

毛利泰彰¹、大山一徳¹、赤松篤¹、加藤成樹^{1、2}、奥山隆平³、西森克彦¹

(¹東北大院・農学研究科、²福島医大・生体情報伝達研究所、³東北大院・医学系研究科)

近年様々な器官の発生・分化において死活的な機能を果たす事が明らかになっている。Lgr (Leucine-rich repeat containing G protein coupled-receptor)4 は薬剤開発の主要ターゲットでもある7回膜貫通GPCR型受容体に属す。Lgr類はTypeA、B、Cの3種に分類され、既知のFSHR、LHR、TSHRはTypeAに、ligandがRelaxinファミリーであると報告され生殖関連機能を有するLgr7、Lgr8はTypeCに属する。一方Lgr4はTypeBに属しこのsubfamilyは全てligand、シグナル伝達について詳細は不明なorphan-receptorである。

我々はLgr4の機能解析を目指し、flox型のLgr4 KOマウスを作製、解析を行ってきた。全身でLgr4を欠損したマウス(Lgr4^{-/-})は腎臓の矮小化や腎臓ネフロン密度の低下を示し新生児致死であり、また皮膚上皮角化細胞の遊走能低下に起因すると考えられた眼瞼の形成異常(EOB; Eye-Open at Birth)を示した。さらにKeratin5-Cre TGマウスの導入により得られた上皮組織特異的Lgr4 KOマウス(Lgr4^{K5 KO})は、致死性を回避しLgr4^{-/-}同様EOBを示した。一方成獣齢に達したLgr4^{K5 KO}は頭頂部の毛が脱落しており、Lgr4が新規の毛包関連遺伝子である事も初めて示した。さらにShhやLef1の免疫染色を行なったところ、染色される毛包原基の数が減少しており、Lgr4が毛包原基の発生に関わっている可能性が示された。さらに興味深い事に、毛包と同じく皮膚を起源とする外胚葉組織である乳腺の発達においてもLgr4^{K5 KO}で異常が確認されており、その事も報告する。

一方Lgr4^{-/-}マウスをC57Bl/6Jに10世代バッククロスしたところ、Lgr4^{-/-}マウスの生存率が大きく低下し、54匹の新生児マウスからLgr4^{-/-}マウスを得る事が出来なかった。胎児期での腎臓の形態観察を行ったところLgr4^{-/-}マウスの腎臓に多数の嚢胞が見られ、また尿管芽のブランチングに関連する遺伝子の発現にも異常が見られたので、その事も報告したい。

1 4

SOD1 欠損による内因性酸化ストレスは胚発生過程に依存して 2 細胞期発生停止もしくは細胞死を引き起こす

角田智志¹、木村直子²、阿部宏之³、井内良仁¹、戸津川清²、藤井順逸¹

(¹山形大院・医・生化学分子生物学、²山形大・農・動物機能調節学、³山形大院・理工・物質化学工学)

哺乳類卵母細胞を体外受精し培養下で初期発生させると、条件によっては一部の胚で細胞分裂が停止する。その原因の一つとして酸化ストレスの関与が考えられているが、その機構は未だ解明されていない。本研究では、内因性に生じる酸化ストレスの影響を調べるために、Superoxide dismutase 1 (SOD1)を欠損するマウス胚の初期発生について検討を行った。

野生型と SOD1 欠損マウスから採取した卵母細胞と野生型マウスの精子を、通常培養条件である 20%酸素または生体内酸素濃度に近い 1%酸素環境で体外受精させ、その後の胚発生の経過を観察した。その結果、野生型卵母細胞由来の胚はいずれの条件でも正常に発生したが、SOD1 欠損卵母細胞由来の胚は、20%酸素培養では全ての胚が 2 細胞期で発生を停止した。しかし、1%酸素培養下では SOD1 欠損マウス由来の胚も正常に発生したことから、20%酸素培養によって生じた活性酸素種が発生停止に関わると考えられる。胚の酸素消費量・ATP 含量・ミトコンドリアの膜電位を測定したが大きな違いはなく、ミトコンドリア傷害が主要な原因とは考えにくい。一方、Cdk 阻害分子である *p16^{Ink4b}* などが著しく発現誘導されていることから、蓄積した活性酸素種により細胞周期が抑制された可能性がある。また、1%酸素培養下で 4 細胞期に発生させた *SOD1* 欠損胚を 20%酸素培養に移したところ、細胞質が断片化し細胞死を起こした。このように、2 細胞期から 4 細胞期に発生する過程で、20%酸素培養によって内因性に生じる活性酸素種の作用対象は変化した。この時期にミトコンドリアの成熟が起る事から、4 細胞胚以降に見られる細胞死にはミトコンドリアが関与する可能性がある。

以上のように、マウス胚発生過程での酸化ストレスによる障害は 2 細胞期から 4 細胞期の間で大きく変化する。2 細胞発生停止には細胞周期の制御異常が、4 細胞期以降の細胞死にはミトコンドリア傷害が関わりとされる。

1 5

弘前ヘアレスラット胸腺における Th2 細胞の分化抑制と形質細胞の分化亢進

山田俊幸¹、七島直樹^{1、2}、清水武史¹、三浦卓也¹、山名大輔¹、土田成紀¹

(¹弘前大院・医学研究科・ゲノム生化学、²弘前大院・保健学研究科生体機能)

弘前ヘアレスラット (Hirosaki hairless rat: HHR) は Sprague-Dawley rat (SDR) に由来し、毛のケラチン遺伝子を欠損した乏毛ラットである。これまでに HHR 脾臓では白脾髄数や抗体産生細胞数の減少が示されており、HHR 脾臓における B 細胞の分化障害が示唆されている。B 細胞は脾臓において T 細胞の支援のもとに抗体産生細胞へと分化する。そこで今回は HHR の T 細胞の機能不全を疑い、T 細胞の分化の場である胸腺について解析した。

HHR 胸腺の重量は SDR 胸腺の 1/5 程度であり、髄質の発達が不全であった。HHR 胸腺ではヘルパー T 細胞の表面マーカーである *CD4*、ヘルパー T 細胞のうち液性免疫の増強に関わる Th2 細胞の表面マーカーである *CCR4* や *ST2* などの発現が低下していた。また Th2 細胞への分化を促進する転写因子 *GATA3* や、Th2 細胞の分化を支持するストローマ細胞の表面マーカーである *CD11c* の発現量も低下しており、Th2 細胞の減少が HHR 脾臓における B 細胞の分化抑制の原因であると推察された。

次に HHR 胸腺における B 細胞の分化について検討した。成熟 B 細胞までのマーカーである CD20 に陽性の B 細胞は HHR、SDR とともに髄質に見られたが、HHR 胸腺の髄質にはそれらに加えてより分化の進んだ B 細胞に特異的に結合するレクチン (Peanut agglutinin: PNA) に濃染する細胞が散在していた。これらの細胞は核が偏在し細胞質が豊富な形質細胞の特徴を有していた。そこで HHR 胸腺での B 細胞の分化関連遺伝子の発現を検索したところ、形質細胞の分化誘導に重要な転写因子 *Oct-2*、*Oca-B* や、分化誘導時にストローマ細胞から放出されるケモカイン *CXCL13* とその受容体であり B 細胞表面に発現する *CXCR5* の発現が上昇していた。さらに免疫グロブリン (Ig) 遺伝子のクラススイッチを誘導する酵素である *AID* の発現も上昇しており、HHR 胸腺では形質細胞の分化が亢進している可能性が考えられた。また HHR 末梢血中では IgM 量は低下していたが IgG 量の低下は認められず、この可能性を支持する結果となった。

以上のことから、HHR 脾臓では Th2 細胞の減少により B 細胞の分化は抑制されているが、その補償として胸腺では正常では観察されない形質細胞の分化が亢進しているものと推察された。Th2 細胞の減少した胸腺において B 細胞の分化が促進している理由として、T follicular helper (Tfh) 細胞などのヘルパー T 細胞の関与が考えられ、現在その可能性を解析している。

16

促進拡散型糖輸送タンパク質 (Glut1、Glut3) の細胞膜局在性の検討

佐京智子、奈良場博昭、北川隆之

(岩手医科大・薬・細胞病態生物学講座)

動物細胞の促進拡散型糖輸送タンパク質 (Gluts) は、エネルギー供給において重要な役割を果たす12回膜貫通型糖タンパク質である。現在、同定されている十数種類のファミリー (Glut1~5, 7~14) は、その発現・輸送活性に臓器/細胞特異性があり、それぞれ異なる役割を担っていることが想定される。さらに、がんのような高エネルギー要求性への細胞環境変化に伴って、その発現が変化することも数多く報告されている。

我々は、非極性 HeLa 融合細胞を用いたがんのモデル細胞系において、腫瘍性の抑制された CGL1 細胞においては、Glut1 のみを発現しているのに対し、腫瘍性 CGL4 細胞では Glut1 に加えて Glut3 も共発現していることを見出した。さらに、Glut1 は、その一部がラフト膜に、Glut3 は流動膜にと異なる細胞膜ドメインに局在することを明らかにし、Glut1 のラフト膜局在性ドメインがN末側前半領域に存在することをすでに報告した (T. Sakyo et al., FEBS J., 2007)。

MDCK などの極性細胞においては、Glut1 は apical 膜へ、Glut3 は basolateral 膜に分布することがすでに知られていることから、同一細胞に共発現する Glut1 と Glut3 が異なる細胞膜に局在することにより機能分化している可能性を考えている。そこで我々は、非極性細胞における Glut のラフト膜分布と極性細胞における極性分布の関連について GFP 融合キメラタンパク質発現系を用いて検討したところ、Glut1 は、極性細胞においてもラフト膜に分布するが、極性分布とは異なる分子認識機構によって制御されていることが示唆された。

現在、その生理的意義や糖輸送機能と関連について、さらに検討中である。

肺線維症におけるリゾホスファチジン酸産生酵素オートタキシンの機能解析

奥平真一^{1, 3}、久保裕司²、Hei Mei²、五十嵐浩二⁴、新井洋由^{3, 5}、青木淳賢^{1, 6}

(¹東北大院・薬・分子細胞生化学、²東北大院・医・先進感染医学、³東大院・薬・衛生化学、⁴(株)東ソー、⁵CREST. JST、⁶PREST. JST)

肺線維症は肺間質における炎症とそれに伴う線維化を主徴とする疾患である。そのうち特発性肺線維症は原因不明の疾患であり、これまでに有効な治療法や、病態進行を反映する血中マーカーは確立されていない。オートタキシン (ATX) は生理活性脂質であるリゾホスファチジン酸 (LPA) を産生するリゾホスホリパーゼ D である。LPA は種々の細胞において炎症性サイトカインの発現を亢進させること、線維芽細胞の運動性を亢進させることから、炎症や組織修復に関わることが示唆されている。最近、LPA の受容体の一つである LPA₁ が肺線維症において重要な機能を持つことが示されており、LPA 受容体やその産生酵素が肺線維症の治療ターゲットとして着目されている。本研究において我々は LPA 産生酵素 ATX が肺線維症の進行に重要な役割を持つことを示す。特発性肺線維症患者における血清中や肺胞洗浄液中の ATX レベルは健常人に比べて有意に高かった。そこで本疾患における ATX の機能を明らかにする目的でマウス血中 ATX を除去する活性を有するモノクローナル抗体を確立し、ブレオマイシン誘導型肺線維症モデルにおいて投与したところ、肺の線維化は顕著に抑制された。さらに病態進行過程である肺胞中への炎症細胞の浸潤や肺における血管透過性の亢進は、抗 ATX 抗体投与により顕著に抑制された。本マウスモデルにおいても血中 ATX の上昇および肺胞洗浄液中の ATX の上昇が認められた。本研究により ATX-LPA が肺の線維化に重要な役割をもつことが強く示唆された。

18

ペプチドを用いたミトコンドリアカルパインの特異的阻害
～網膜色素変性症の治療へ向けて～

尾崎拓¹、山下哲郎²、石黒誠一¹

(¹弘前大・農学生命科学部・分子生命工学科、²岩手大・農学部・応用生物化学課程)

網膜色素変性症は、網膜に存在する視細胞または網膜色素上皮細胞が原発的に傷害される。夜盲や視野狭窄、視力低下といった症状が段階的に発症し、未だ有効な治療法がない難治性疾患である。

本疾患のモデル動物である RCS ラットの網膜を調べたところ、ミトコンドリアカルパインが網膜変性の初期段階で活性化し、アポトーシス誘導因子である AIF がミトコンドリアから遊離していることが分かった。さらにカルパイン阻害剤の眼内投与により、AIF の遊離と視細胞死は顕著に抑制された（～40%阻害）。しかし、網膜視細胞の機能を維持させることを考慮すると、細胞質カルパインに作用せずミトコンドリアカルパインのみを抑制することが、より効果的であると考えられた。

そこで、ミトコンドリアカルパインの活性を特異的に阻害するペプチドの同定を試みた。哺乳類で 14 種類存在するカルパインは、どれも類似のドメイン構造をとっており、N-末端から活性制御に重要なドメイン (I)、プロテアーゼ活性ドメイン (II)、プロテインキナーゼ C 等に存在する C2 ドメイン様のドメイン III、EF-ハンドモチーフが 5 回繰り返す PEF ドメイン (IV) の 4 つのドメインから成っている。以前の研究で、細胞質とミトコンドリアのカルパインでは、ドメイン III 領域が異なることが示唆された。よって、 μ -および m-カルパインのドメイン III 領域に相当するペプチドを N 末端側から 20 残基ずつ合成し、ミトコンドリアカルパイン活性を特異的に阻害するペプチドを探索した。

その結果、1 種の m-カルパインペプチドがミトコンドリアカルパインを特異的に阻害することが分かった。しかし、ペプチド処理によりミトコンドリア m-カルパイン分子およびその複合体（調節サブユニットまたはシャペロン分子）に変化が見られなかった。カルパイン活性阻害効果のあったペプチド領域には、ドメイン III で唯一 EF-ハンドが存在することから、合成ペプチドが EF-ハンドに直接結合し、Ca²⁺の結合を阻害することにより活性を阻害すると考えられた。

ミトコンドリアカルパインを特異的に阻害するペプチドを同定したことから、視細胞変性症を治療できる可能性が出てきた。

シアリダーゼ Neu4 による神経接着分子 NCAM ポリシアル酸の制御

高橋耕太、塩崎一弘、山口壹範、宮城妙子
(宮城県立がんセンター・生化学部)

シアリダーゼは、糖タンパク質や糖脂質の非還元末端のシアル酸を水解する酵素である。これまでに細胞内局在や酵素学的性質が異なる4種類 (Neu1、Neu2、Neu3、Neu4) が同定されている。われわれは先に、脳に高発現するNeu3、Neu4が脳の発生過程において異なった発現パターンを示し、神経突起形成にそれぞれ促進的に、抑制的に働いていることを見出した。本研究では特にNeu4に着目して機能解析を進めた。

Neu4 は胎生期で比較的低発現を示し、出生後 3-14 日で上昇した。また、マウス脳における mRNA の局在を *in situ* hybridization により観察すると、神経接着分子 NCAM が高発現する海馬に強いシグナルが認められた。NCAM はシアル酸が 8-200 残基縮重合 (α -2, 8-シアリル結合) したポリシアル酸 (PSA) によって修飾され、脳の発生に重要な役割を担っている。また、この PSA-NCAM の発現は出生後低下するが、この時期に Neu4 の発現は上昇している。そこで NCAM を修飾する PSA が Neu4 の内在性の基質になりうるか解析するため、神経線維芽細胞 Neuro2a に Neu4 遺伝子を導入したところ、PSA-NCAM の脱シアリル化が認められた。さらに、PSA-NCAM キメラタンパク質を作成し、これを基質として、Neu4 による PSA 変化を抗体によって調べると、その減少が検出された。以上の結果から、PSA-NCAM が Neu4 の内在性の基質であり、この Neu4 が脳の発生や神経の分化を制御している可能性が示唆された。

ヘム調節インヒビター (HRI) のヘム・リン酸化による反応制御機構

五十嵐城太郎、佐々木健彦、清水透

(東北大・多元物質科学研究所)

真核生物は 紫外線照射、アミノ酸不足、ウイルス感染などのストレス下で、タンパク質の合成を抑制する。赤血球前駆体の網状赤血球においては、ヘム濃度が減少すると、ヘム：グロビタンパク質を 1:1 に保つためにヘモグロビン合成を停止させる仕組みが備わっている。即ち、ヘム不足に陥ると、ヘム調節インヒビター (HRI) は自己リン酸化によって活性化し、翻訳開始因子 2α (eIF2 α) をリン酸化することによって、ヘモグロビンの合成を停止させる。私たちはこの HRI のヘム認識機構、及び活性化機構について明らかにしたので報告する。

1) 部位特異的変異体の解析により、HRI とヘムが結合する残基は N 末端ドメイン内の His119 もしくは His120、及びキナーゼドメイン内の Cys409 である。2) ヘムの存在下でのみ、N 末端ドメインとキナーゼドメインの間に相互作用が発生する [1]。3) 自己リン酸化によって、この相互作用は減少する。4) 質量分析法 (LC-MS/MS) により、少なくとも自己リン酸化部位が 33 カ所推定された。この中には Ser 及び Thr のみならず Tyr も含まれた。5) 同定された自己リン酸化部位に変異を導入し解析したところ、活性に重要なリン酸化部位は、Tyr193, Thr485, Thr490 である [2]。

以上の結果より、ヘムが結合した不活性型 HRI は、ヘムの解離によって、複数の部位において自己リン酸化が起こり、ドメイン間の相互作用が消失することで、活性型 HRI へと変換すると考えられる。

[1] Igarashi, J. *et al.* *J. Biol. Chem.* 283, 18782 (2008)

[2] Igarashi, J. *et al.* submitted

2 1

大腸菌のバイオフィーム形成に関わる酸素センサー酵素の性質

北西健一、田中敦成、五十嵐城太郎、清水透
(東北大・多元研)

cyclic-di-GMP は微生物の病原性、運動性、細胞間粘着作用、バイオフィームの合成など様々な生理機能の発現に重要な働きをする新規のセカンドメッセンジャーである。大腸菌の酸素センシングにおいて、ヘム制御酸素センサー酵素 *Ec* DOS は酸素濃度に応じて c-di-GMP を pGpG へと環開化反応を触媒する。一方、YddV は 2 分子の GTP から c-di-GMP の合成を触媒すると推定されている。*yddV* と *dos(yddU)* はオペロンを形成しており、同時に転写、翻訳されることが知られている。YddV は N 末端にグロビン様ヘム結合ドメイン、及び C 末端に GGDEF 配列を持つジグアニル酸シクラーゼドメインとからなる酵素である。しかし、YddV については現在まで精製した酵素の活性やその性質についての報告はない。本研究では、c-di-GMP の合成に関わる新規酸素センサー酵素 YddV の酸素センシングの分子機構を調べる目的で、大腸菌 K-12 株より、*yddV* 遺伝子をクローニングし、大量発現系を構築した。精製した酵素の酵素活性、酸素の酵素活性への影響、吸収スペクトル、酸素結合速度、自動酸化速度、及び共鳴ラマンスペクトルなどを測定し、酸素センシング、及びヘムによる反応制御の分子機構の解明を試みた。また、酸素の認識機構の解明のため、酸素結合部位であるヘム遠位に存在すると推定されるアミノ酸 Tyr43 と Gln60 の変異体を作製し、酸素結合や酸素化型の安定性におけるそれらアミノ酸の役割について考察した。その結果、Tyr43 と Gln60 は酸素の認識、及び酸素化型の安定性に重要な役割を果たすことが示唆された。故に、YddV は大腸菌において酸素センサーとして重要な機能を果たしていると推定された。酸素結合、及び酸化還元調節による YddV の活性制御メカニズムについて議論する。

22

昆虫細胞-バキュロウイルス発現系におけるアスパルテックプロテアーゼについて

小野洋輝¹、後藤猛¹、菊地賢一¹、菫澤悟²、高橋砂織³

(¹秋田大・工学資源、²国際農林業研究センター、³秋田県総合食品研究センター)

【緒言】

昆虫細胞-バキュロウイルス発現系は、外来遺伝子を導入したバキュロウイルスを昆虫細胞に感染させることにより目的タンパク質の高効率な生産を可能にする。しかし、昆虫細胞やバキュロウイルスの遺伝子にコードされている内在性プロテアーゼにより、目的タンパク質の収量の低下が懸念される。このため、効率的なタンパク質生産のために、これらの内在性プロテアーゼの種類や特性を把握しておくことが重要となる。本研究では内在性プロテアーゼの一つであり、ペプスタチンにより強く活性阻害を受けるプロテアーゼ (SAP) の特性解析を行ったので報告する。

【実験方法】

指数期の Sf-9 昆虫細胞懸濁液にヒトプレプロレニン cDNA 導入バキュロウイルスを感染多重度 (MOI) 1 pfu/cells で感染させ、28°C で攪拌培養を開始した。感染 6 日目の培養液を回収し、Pepstatin-aminohexyl Sepharose、DEAE-Sepharose FF、および Superdex-200 カラムクロマトグラフィーにより SAP の精製を行った。

SAP の活性値測定には蛍光自己消光基質 MOCac-Gly-Lys-Pro-Ile-Leu-Phe*Phe-Arg-Leu-Lys (Dnp)-D-Arg-NH₂ (*想定されるペプチド結合切断部位) を用い、37°C で反応後、蛍光強度 (励起波長 328 nm、測定波長 393 nm) を測定した。

【結果と考察】

SAP の細胞外活性は、感染培養の経過に伴ってゆるやかに上昇し、細胞が死滅する培養 6 日目に大きく増加した。そこで、感染 6 日目の培養液 200 ml から SAP の精製を試み、3 段階のクロマトグラフィーで約 29 μ g の精製 SAP を得た。精製 SAP の分子量はゲル濾過法により 37 kDa、また SDS-PAGE で 42 kDa と求められた。これより SAP は単量体で存在することが示された。SAP の N 末端 25 残基のアミノ酸配列を解析した結果、SAP はカイコやシヨウジョウバエ由来のカテプシン D と相同性が認められた。蛍光自己消光基質を用いた場合の SAP 活性の至適 pH は 3.0 であった。また、pH 3.0 における同基質に対する K_m 値は約 1 μ M と求められた。一方、SAP に対する各種プロテアーゼ阻害剤の影響を検討した結果、SAP はペプスタチンによってのみ著しく活性が阻害されたことから、アスパルテックプロテアーゼファミリーに属することが示された。また、ペプスタチンの SAP に対する K_i 値は 25 fM と求められた。

23

昆虫培養細胞由来無細胞系の効率化と膜タンパク質の膜組込み効率の評価

相澤圭師¹、佐藤陽子¹、吉村昌一郎¹、江連徹²、安藤英治²、伊東昌章³、魚住信之¹

(¹東北大・工・バイオ工学、²島津製作所・ライフサイエンス研、³沖縄工業高専・生物資源工学科)

無細胞タンパク質合成系は、1960年代にウサギ網状赤血球溶血液を用いた方法が最初に開発され、現在では哺乳類培養細胞系、小麦胚芽系、昆虫培養細胞系などが実用化されている。なかでも昆虫培養細胞由来の無細胞タンパク質合成系は生物の犠牲を経ることなく、ロット間の差のない安定したタンパク質合成量を見込むことができるといった優れた特徴をもつ(Transdirect)。一方、自動化や大量合成を行うためには「環状プラスミドの直鎖化・精製→mRNAの合成・精製→タンパク質合成」の各ステップを簡略化することが望まれている。本研究では、「環状プラスミドを用いた mRNA 合成→タンパク質の合成」とした簡略法を検討した(図1)。簡略法と従来法のタンパク質合成量を比較したところ、簡略法は従来法の50~100%の効率での合成が可能であり、十分な活性も維持していることが分かった。簡略法では、プラスミド直鎖化(制限酵素処理)を行わずに mRNA を合成して、mRNA の精製も省略する代わりに、EDTA 添加を行うこととした。これにより、精製にかかる遠心分離と溶解操作が省略できることから、分注装置などを利用した自動化への応用が期待できる。

一方、無細胞系を用いた「膜タンパク質」の合成には、タンパク質合成系に加えて精製小胞体膜の添加が必須であり、ウサギ由来または小麦胚芽由来のタンパク質合成系にイヌ膵臓由来の精製小胞体膜を添加する異種間の組合せがこれまでに使用されてきた。また、膜タンパク質は(i)タンパク質の翻訳と同時に小胞体膜へ組み込まれる「複数膜貫通型膜タンパク質」と(ii)タンパク質全長が細胞質で合成された後に小胞体へ組込まれる「C末端膜結合型膜タンパク質」の2種類があり、両タンパク質の膜組込みに関わる因子は異っている。本研究では、昆虫培養細胞由来のタンパク質合成系と精製小胞体膜を組み合わせた生体内に近い条件を用いて、「C末端膜結合型膜タンパク質」であるシナプトブレビンIIおよびタンパク質膜透過チャネルSec61の合成と膜への組込みを検討した。その結果、シナプトブレビンIIおよびSec61bはいずれも小胞体膜へ組込まれた。従来から用いられているイヌ膵臓由来の精製小胞体膜との比較においても、N型糖鎖修飾効率は昆虫培養細胞小胞体膜が若干高い効率であった。これらにより非生物の昆虫培養細胞由来のタンパク質合成系と精製小胞体膜のシステムの膜タンパク質合成の有効性が示された。

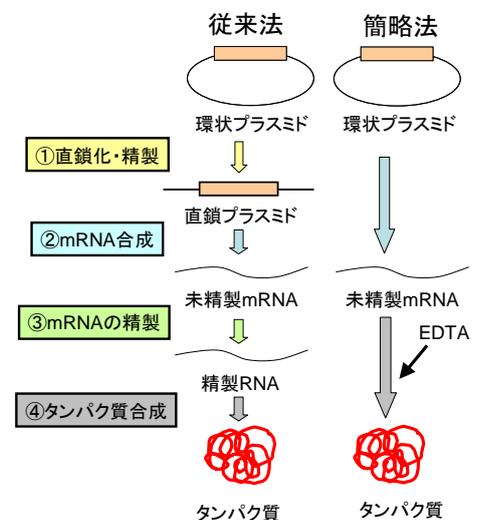


図1 従来法と簡略法によるタンパク質合成

24

脳神経機能研究のための高頻度逆行性輸送ベクターの開発

高住賢司、倉持真人、加藤成樹、小林憲太、小林和人
(福島医大・医・生体機能)

【背景・目的】

高次脳機能を媒介する脳内機構を明らかにするためには、神経回路を構成する特定ニューロンタイプや特定の神経路の役割を明らかにすることが重要である。私達の研究グループは脳機能解析へ応用可能な逆行性輸送を示すレンチウイルスベクターの開発を行ってきた。ベクターのエンベロープ糖タンパク質を変換することで、細胞導入の性質が変化することが知られている。本研究では神経終末より導入され、遠方の細胞体で遺伝子発現を誘導する高頻度な逆行性輸送ベクターを開発するため、糖タンパク質の改変をしたベクターを作製し、その特性の解析を行った。

【方法】

自己不活型のヒト免疫不全ウイルス1型 (HIV-1) ウイルスベクターを利用してエンベロープの糖タンパク質を狂犬病ウイルス由来の糖タンパク質 (RV-G) に変換したベクターを作製した。また、今回新たに RV-G と水泡性口内炎ウイルス由来の糖タンパク質 (VSV-G) を融合させた糖タンパク質 (FuG-C) を開発し、ベクターの作製に利用した。緑色蛍光タンパク質 (GFP) を導入遺伝子として、RV-G と FuG-C をそれぞれのエンベロープにした2種類のベクターの性能を比較した。種々の力価 (RNA タイター) のベクターをマウスの線条体内に注入し、4週間後に脳を摘出し、免疫染色法を用いて GFP の発現を解析した。注入部位である線条体と線条体へ入力のある領域、内側前頭前野、1次運動野、1次体性感覚野、視床束傍核、黒質緻密部について調べた。

【結果】

FuG-CベクターはRV-Gベクターと比較して逆行性輸送を介した遺伝子導入効率が高く、特に大脳皮質への導入効率が顕著に向上していることが明らかとなった。また、FuG-Cベクターはニューロンへの遺伝子導入の特異性が高いことも明らかとなった。

【考察】

今回開発した FuG-C ベクターを用いれば、げっ歯類だけではなく霊長類に対しても遺伝子導入を行うことが可能になる。特定の脳領域に入力する神経路に遺伝子を導入し、遺伝子産物に働きかける因子を導入することにより、神経細胞の機能を人為的に改変することができる。本ベクターは、脳機能研究において新規で有益なアプローチを提供する。

25

発現ベクターpIRESHyg2 依存的に誘導される nonsense-mediated mRNA decay の遺伝子発現に対する影響

色摩弥生¹、胡慧媛^{1, 2}、松岡功^{1, 3}、七島勉^{4, 5}、木村純子¹

(¹ 福島医大・薬理学講座、² 中国医科大・薬物中毒学講座、³ 高崎健康福祉大、⁴ 福島医大・循環器・血液学講座、⁵ 福島環境医学研究所)

【背景・目的】 Nonsense-mediated mRNA decay (NMD)は、有核細胞に備わる mRNA サーベイランス機構であり、premature termination codon (PTC)を持つ mRNA を分解する。その分解活性の大きさは mRNA の 3' UTR の長さに依存する。pIRESHyg2 は、遺伝子発現実験で頻用される bicistronic expression vector である。しかし pIRESHyg2 を介した遺伝子発現に NMD が関与することは知られていない。我々は、granulocyte-macrophage colony-stimulating factor 受容体 common beta 鎖 (βc)と 79 塩基からなる第 5 インترونが残存したために premature termination codon (PTC)を獲得したバリエーション「 $\beta c79$ 」(Shikama et al, J Leukocyte Biol, 2005)を、pIRESHyg2 を用いて安定発現させた場合、 $\beta c79$ mRNA の発現量が野生型 mRNA に比べて著しく低いことを見出し、この $\beta c79$ 低発現への NMD の関与を検討した。【方法】野生型 βc と $\beta c79$ の cDNA を、pIRESHyg2 または monocistronic vector pMT21 を用いて Ba/F3 細胞株に導入し、安定発現クローンを樹立した。Puromycin または Ufp1 に対する siRNA で NMD を阻害し、 βc と $\beta c79$ の転写産物量を real-time RT-PCR で解析した。【結果】pIRESHyg2 で導入された $\beta c79$ mRNA の発現量はいずれのクローンにおいても野生型 βc mRNA の 10%未満であり、mRNA の減衰は野生型に比べて有意に速かった ($p < 0.05$)。Puromycin は $\beta c79$ mRNA を時間及び用量依存的に増加させた。4.5 時間の puromycin 100 μ g/ml 処理で $\beta c79$ mRNA は約 40 倍増加したのに対し、野生型 mRNA の増加は 10 倍にとどまった ($p < 0.05$)。Upf1 ノックダウンによる $\beta c79$ mRNA の増加率も野生型 βc に比べて有意に大きかった ($p < 0.05$)。 $\beta c79$ の第 5 インترون 79 塩基を一塩基で置換しても NMD 阻害による増加率に変化はなかった。一方、pMT21 を用いて発現させた野生型 βc と $\beta c79$ はいずれも、puromycin 及び siRNA による NMD 阻害で有意な増加を示さず、NMD 誘導が pIRESHyg2 依存的であることが示唆された。【結論】pIRESHyg2 によって安定発現させた遺伝子の転写産物は PTC の有無に関わらず NMD により分解される。野生型よりも長い 3' UTR を持つバリエーションは、より大きな NMD の分解活性を誘導し、その発現量は著しく低下する。よって、pIRESHyg2 の使用は、ナンセンス変異体の十分な安定発現獲得には適さない。

26

疼痛の発生機序に関わるガングリオシド

渡辺俊¹、丹野孝一²、只野武²、東秀好^{1,3}

(¹東北薬科大・分子生体膜研究所生体膜情報、²東北薬科大・薬理学、³CREST・JST)

痛みは、危険を回避するための信号として作用し、個体の生存のための必須の機構である。しかしながら、組織の損傷を伴わない痛みや病態時に発生する痛み、慢性的な痛みなどは生活の質を著しく低下させてしまう。そのため、痛みのコントロールは医療および福祉の面からも非常に重要な問題であり、このような観点からも痛みの発生機構を解明し、制御することが求められてきている。組織が損傷すると、ブラジキニンやATPなどの多様な発痛物質が産生され、自由神経終末において細胞膜上の発痛物質に対する受容体が活性化されることで感覚神経が興奮し、中枢に信号を伝えることで痛みが発生する。ガングリオシドは細胞膜を構成する糖脂質であり、特に中枢神経系に豊富に存在することから神経機能に注目された研究が行われてきたが、末梢神経系の主要な生理的機能の一つである痛みの惹起と伝達におけるガングリオシドの機能は明らかにされていない。そこで、我々は発痛に対するガングリオシドの関与を検討した。まず、マウス足底に種々のガングリオシドを投与し、発痛作用と疼痛増強作用について疼痛関連行動である足なめ行動により評価した。その結果、ガングリオシドGT1bを足底に投与することで有意に足なめ行動が誘導され、他の疼痛刺激に対する反応も増強された。一方で、別種のガングリオシドGM1による効果はほとんど認められなかった。また、各種の阻害剤を用いてそのメカニズムを検討し、疼痛に関与する特定の受容体やその下流のシグナル伝達系が関与することが明らかとなった。

今回の知見によりガングリオシドが痛みを引き起こすためのシグナルを調節しうることが示され、ガングリオシドを介した疼痛の新たな制御機構が示唆された。また、鎮痛戦略としてほとんど注目されてこなかった物質であることから、ガングリオシドは新しいカテゴリーの鎮痛薬のターゲットとなる可能性がある。

細胞外基質からのインテグリンを介したシグナルによる MUC5AC ムチンの産生制御

岩下淳、本郷香織、阿部達也

(秋田県立大・生物資源科学部・応用生物科学科)

気道や腸管の表面を覆うムチン層は粘膜を形成し、外界からの刺激に対する生体防御に働く。しかし気道を覆うムチン層が過剰に産生されると気道を狭めて喘息の症状を悪化させるため、ムチン産生の制御は重要である。

ムチン産生の制御について多くの研究が行われているが、ムチン産生細胞と細胞外基質 (ECM) の接着による影響については詳細な解析が行われていない。我々は上皮を覆うムチン層の主成分である MUC5AC ムチンを産生する上皮細胞であるヒト肺癌細胞株 NCI-H292 を材料として用い、ECM が MUC5AC ムチンの産生に与える影響について解析した。

昨年の発表では ECM タンパク質である IV 型コラーゲンでコートしたプレート上で細胞を培養すると、MUC5AC の産生が減少することを報告した。今回我々は細胞—基質間接着の MUC5AC 産生への関与についてさらに調べるため、BSA などを用いて細胞—基質間の接着を阻害した場合の影響を観察した。その結果細胞と基質間の接着を阻害すると MUC5AC の発現が顕著に増加した。それに対し NCI-H292 細胞をマトリジェル上で培養した場合には、逆に MUC5AC が顕著に増加した。特にマトリジェルの主成分であるラミニン上で MUC5AC が顕著に増加した。

次に NCI-H292 細胞と ECM の接着に働くインテグリン分子を抗体を用いて阻害し、MUC5AC 産生制御に対するインテグリンの関与について調べた。その結果 IV 型コラーゲン上での MUC5AC 産生の減少はインテグリンの阻害によって回復した。しかしマトリジェル、ラミニン上での MUC5AC 産生の増加は阻害されず、逆にさらに増加した。またラミニン等による MUC5AC 産生の増加は EGF receptor を介していた。

これらの結果は細胞外基質からのシグナルがインテグリンや EGF receptor を介して NCI-H292 細胞に伝わり、MUC5AC の産生を調節することを示唆している。