

一般講演1 イネ胚乳の核内倍化時期におけるサイクリンおよび CDK インヒビターの 発現部位の解析

○水谷 征法、堤 賢一、斎藤 靖史
(岩手大・農・寒冷バイオ・細胞遺伝応答)

細胞周期研究は植物においてもなされているが動物における研究に比べ、まだまだ不明な点が多い。我々はイネにおける CDK inhibitor (CKI)に興味を持ち、5種類のイネ CKI 遺伝子を同定した。この中の1つ、ESOCKIは開花後10日目のイネにおいて、穂特異的な発現を示す。そこで、種子形成過程における ESOCKI の機能を詳細に調べるため、受精直前から受精後14日目の穂における ESOCKI の発現を qRT-PCR 法によって調べた。その結果、ESOCKIは受精後2日目の穂において特に強く発現していた。*in situ* ハイブリダイゼーション法を用いて受精後2,3日目イネの穂における発現解析をおこなった結果、ESOCKIは胚乳の表層部で発現していることが分かった。胚乳の形態形成は核期、細胞期を経て分化し受精後25日目ころにほぼ完成する。受精後1日目は胚乳原核が分裂し胚乳核ができる。その後、受精後2日目頃まで細胞分裂を伴わない DNA 複製が活発に行われ、核内倍化によって増殖した核は、胚乳の表層部に並ぶ。受精後3日目頃から、胚乳表層部に並んだ多核は細胞分裂を行い、単核を持つ細胞となった後、通常の細胞分裂によって増殖し、受精後約10日で細胞分裂は停止することが知られている。よって、ESOCKIは胚乳形成初期において細胞質分裂を抑制し、核内倍化機構に関与している可能性が考えられた。

受精後2日と3日目の胚乳を形態的に比べると大きな違いがみられた。受精後3日目の胚乳の内部にはM期染色体が観られたが、受精後2日目ではM期染色体はみられなかった。受精後3日目の胚乳で ESOCKIは胚乳の表層部で発現しており胚乳の内部での発現はみられない。これらのことから、受精後3日目の胚乳表層部では ESOCKIにより細胞分裂が停止しているが、内部に向かっては細胞分裂が繰り返され胚乳内部の充実が行われている可能性が考えられた。

一般講演2 低温条件下における RNAi ノックダウン効果の検証

○久米 浩平¹, 小松 晃², 若狭 暁³, 堤 賢一¹, 斎藤 靖史¹
(¹岩手大・農・寒冷バイオ・細胞遺伝応答, ²農研機構・作物研, ³東農大・農)

RNAi は、遺伝子発現制御に重要な役割を果たしている一方、遺伝子機能解析のためのノックダウン法として利用されている。しかし、低温においては *transgene silencing* によるノックダウン効果が消失することを、Szittyra らが報告している (2003, EMBO, 22, 633.)。

そこで、RNAi ノックダウン法がどのような温度で機能するのか検証した。モデルとして、*OAS1* 遺伝子を標的とした RNAi ベクターを導入したイネカルスを用い、これを低温処理した後、*OAS1* 発現抑制効果が維持されるかどうかについて調べた結果、低温条件下においても *OAS1* の発現は抑制されたままであった。従って、イネにおいて低温で発現する遺伝子に対しても本研究で使用した遺伝子ノックダウン法は有効に機能することがわかった。

本ノックダウン法が低温でも機能したのは、Szittyra らにより低温でも機能することが報告された miRNA と同様に、ヘアピン型 RNA から small RNA が生成されるためであると考えられた。すなわち、siRNA 前駆体がヘアピン型の場合は低温非感受性であり、相補鎖合成過程を必要とする場合は低温感受性であると推測された。

そこで次に、相補鎖合成過程を経て生成される内在性 siRNA による発現抑制が低温で解除されるかどうかについて解析した。シロイヌナズナを 4°C にて処理し、*trans-acting(ta)* siRNA ターゲット遺伝子を RT-PCR を用いて解析した結果、低温処理により発現上昇する傾向がみられた。

また、内在性 siRNA を介して転写レベルでのジーンサイレンシングを受ける、セントロメア近傍領域に存在する TSI 反復配列が、同じく 4°C 処理したシロイヌナズナにおいて発現していることがわかった。これらのことから、植物は siRNA による遺伝子発現抑制系を利用して、低温による遺伝子発現制御を行っている可能性が考えられた。

一般講演3 ダイオキシン受容体非依存性アポトーシスにおける Ca²⁺/Calmodulin の関与

○小林大介 1、Sohel Ahmed 2、石田真人 2、五日市健夫 2、菊池英明 1,2
(1 岩手大・大学院連合農学研究科、2 弘前大・農学生命科学部)

TCDD (2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin) は毒性の強いダイオキシンのひとつであり、その毒性として催奇形性や発ガン性、免疫毒性が知られている。TCDDの毒性はAryl hydrocarbon receptor (AhR)依存的に誘導されることが多く知られているが、AhR非依存的な毒性はほとんど知られていない。我々は以前の研究から、TCDDがヒト小児白血病細胞であるL-MAT細胞においてアポトーシスを誘導し、それはAhR非依存的なシグナルによって引き起こされていることを報告した。一方でMaConkeyらが、ラット胸腺細胞へのTCDD投与によってアポトーシスが誘導される際に細胞内カルシウムが上昇することを報告しており、細胞内カルシウムがアポトーシスシグナルに関与している可能性が考えられた。

TCDD誘導性アポトーシスと細胞内カルシウムとの関連を調べるため、細胞内カルシウム蛍光指示薬であるFluo3-AMを用いて細胞内カルシウム濃度変化を検討した結果、L-MAT細胞においても、TCDD投与による細胞内カルシウム上昇が観察された。L-MAT細胞を細胞内カルシウムキレーターであるBAPTA-AMで前処理すると、TCDD誘導性アポトーシスの抑制が観察されたが、細胞外カルシウムキレーターであるEGTAでは抑制されなかった。また、カルシウムセンサータンパク質として知られているCalmodulin (CaM)のアンタゴニストであるW-7においてもTCDD誘導性アポトーシスの抑制が観察された。さらに、W-7はミトコンドリアからのシトクロムCの放出を抑制した。

以上のことから、L-MAT細胞におけるAhR非依存性のTCDD誘導性アポトーシスでは、細胞内カルシウムの関与が示唆された。さらに細胞内カルシウム変化は細胞外からのカルシウム流入によるものではなく、オルガネラからの放出によるものと考えられた。細胞内カルシウムはCaMを活性化し、そのシグナルがミトコンドリアからのシトクロムC放出を引き起こしていることがわかった。

一般講演4 マウス神経細胞 HT22 の翻訳抑制経路における細胞死の解析

○新澤未穂 1,2、山下哲郎 1、平 秀晴 1
(1 岩手大・農学部、2 東大院・新領域創成科学)

[背景] アルツハイマー病などの神経変性疾患は、神経細胞死の異常が引き起こす病態であり、神経変性疾患の発症メカニズムを解明するために、細胞死シグナル経路を明らかにする必要がある。またアルツハイマー病などの神経変性疾患とタンパク質のアンフォールディングによる小胞体ストレスを介した細胞死経路との関連性も報告されている。マウス海馬由来神経細胞 HT22 で観察されるグルタミン酸誘導性の神経細胞死は、初期の小胞体ストレスと後期の酸化ストレスによる 2 つの経路を経ると推定されている。これまでは酸化ストレス経路に焦点を当てて研究が進められてきたが、HT22 の小胞体ストレス応答による細胞死に至る経路は未だに明らかにされていない。本研究では、小胞体ストレスセンサー分子等の発現や活性化を指標とし、グルタミン酸による神経細胞死の初期経路を解析した。

[実験・結果] 小胞体ストレス抑制薬剤である 4-Phenylbutyrate がグルタミン酸処理による HT22 の細胞死を抑制したことから、小胞体ストレスが関与していることが示唆された。グルタミン酸処理により翻訳抑制経路が制御されている可能性に着目し、小胞体ストレス応答に関与する PERK (PKR-like ER kinase) によるタンパク質合成開始因子 eIF2 α (eukaryotic initiation factor) のリン酸化経路について、ウエスタンブロットにより解析した。HT22 神経細胞死の誘導初期に認められる eIF2 α のリン酸化は、PERK よりも PKR (double-strand RNA-activated protein kinase) が関与していることが明らかになった。PKR は主に細胞質に局在し機能することから、異常タンパク質の細胞質内での蓄積の可能性が示唆された。HT22 細胞内の異常タンパク質の蓄積を解析するため、ポリグルタミンを付加した遺伝子 114Q-EGFP を発現させ、凝集体形成と PKR の関与を解析した。HT22 に発現させた 114Q-EGFP の凝集体形成は、小胞体ストレス抑制薬剤 4-Phenylbutyrate 処理により抑制されたことが明らかになった。今後凝集体形成と PKR の活性化機構について解析して行く予定である。

一般講演5 Wnt-PCP 経路による神経突起退縮を制御する RhoA-GEF の同定

○辻拓史、太田裕作、大橋一正、水野健作
(東北大・院・生命科学)

Wnt シグナル経路は、細胞の極性化や運動、分化、組織の発生、神経突起の退縮など、多くの細胞機能の制御において重要なシグナル伝達経路である。Wnt シグナル経路の中の planar cell polarity (PCP) (non-canonical) 経路においては、Wnt によって Dishevelled (Dvl)が活性化すると足場タンパク質である Daam1 を介して RhoA が活性化することが知られているが、Daam1 には RhoA を直接活性化する領域が存在せず、RhoA-guanine nucleotide exchange factors (RhoA-GEFs) が関与しているのではないかと考えられている。しかし、実際にどの RhoA-GEF が Wnt-PCP 経路に関与しているのかは未解明であった。神経繊維芽細胞腫である N1E-115 細胞は、Wnt-3a で処理すると RhoA が活性化され神経突起が退縮し、また、Dvl を発現させると RhoA の活性化によって神経突起の退縮が起こることが報告されている。本研究では、N1E-115 細胞中で発現している 12 種の RhoA-GEF に対する shRNA を作成し、shRNA による網羅的な発現抑制を行うことで、Dvl による神経突起退縮への影響を調べた。その結果、N1E-115 細胞中で発現が確認された 12 種類の RhoA-GEF の中で、3 種の RhoA-GEF をそれぞれ発現抑制すると、Dvl の発現による神経突起退縮の阻害がみられた。また、これら 3 種の RhoA-GEF のうち、2 種の RhoA-GEF の発現抑制時には Dvl による RhoA の活性化も抑制された。さらに、これら 2 種の RhoA-GEF を発現抑制した N1E-115 細胞を、血清または Wnt-3a を含む CM (conditioned medium) で刺激したところ、血清刺激では神経突起が退縮したのに対して Wnt-3a CM 刺激では、神経突起の退縮が起こらなかった。以上の結果から、これら 2 種の RhoA-GEF は Wnt-PCP 経路における RhoA の活性化に関わっていることが示唆された。

一般講演6 遺伝性の **Hirosaki hairless rat** における塩基性ケラチン遺伝子群の欠失と融合遺伝子の発現

○七島直樹 1,2、秋田美季 1,3、山田俊幸 1、清水武史 1、中野 創 3、范 洋 1、土田成紀 1
(1 弘前大院・医・ゲノム生化、2 弘前大院・保健・生体機能、3 弘前大院・医・皮膚)

【目的】Hirosaki hairless rat (HHR) は Sprague-Dawley rat (SDR)より自然発生した乏毛を特徴とするラットである。HHR の表現型は常染色体劣性の遺伝形式をとることが知られていたがその原因遺伝子は不明であった。本研究では HHR の表現型を支配する原因遺伝子の同定を試みた。

【方法・結果】Brown Norway rat と HHR を交配した F₁に HHR を戻し交配して作製した N₂ に対しマイクロサテライトマーカーを用いて連鎖解析すると、原因遺伝子は第7染色体のマーカー *D7Rat173* (135.7Mb) とテロメアの間 (7q36) にマップされた。この領域には 80-kb におよぶ DNA の欠失が認められ、欠失領域には *Kb21*、*Kb23* および *Kb26* などの basic hair keratin 遺伝子群が含まれていた。また、欠失の break point は *Krt2-25* の第9エクソンと *Kb25* の第9エクソンの 95-bp 内であり、両遺伝子は融合し、欠失は相同組み換えによるものと示唆された。毛のケラチンを尿素で抽出し、SDS-PAGE および Mass で解析すると、SDR の 51-KDa の塩基性ケラチンは *Kb21*、*23*、*Krt2-25* が主だった。これらのケラチンは HHR で著しく減少し、*Kb21-26* 遺伝子欠失の結果が裏付けられた。また、SDR にはほとんど存在しない 56-KDa の塩基性ケラチンは HHR で増加しており、このケラチンは *Kb25* と *Krt2-25* の融合遺伝子産物であるが Mass の結果から *Kb25* そのものであることが明らかになった。毛胞の免疫染色の結果、*Kb25* は SDR では毛髄に、HHR では毛皮質に発現していた。*Kb21* は SDR の毛皮質でのみ発現していた。

【結語】相同組み換えによる塩基性ケラチン遺伝子群の欠失と融合遺伝子の発現が HHR の表現型の原因であることを明らかにした。

一般講演7 ヒト形質膜シアリダーゼ NEU3 遺伝子のプロモーター領域の解析

○山口壹範、小関弘恵知、塩崎桃、宮城妙子
(宮城がんセ・研・生化、CREST, JST)

ヒト NEU3 シアリダーゼはシアル酸を遊離させる糖鎖分解酵素で、膜結合性を示し、主にガングリオシドに作用する。これまでの我々の解析から、EGF 受容体やインスリン受容体等を介するシグナル伝達系の調節を通して、細胞の生存、分化、運動能、あるいはがんや糖尿病等の病態に関与していることが明らかになった。糖鎖分解酵素である NEU3 がシグナル伝達系の調節にどのように関わっているのか、意義と分子機構について現在研究を進めている。

一方、NEU3 機能の調節については、少なくともその一部が転写レベルで行われている事が示唆されている。NEU3 の発現は、脳、筋肉で比較的高く、消化管で低いことが示され、また、T 細胞の活性化や神経細胞の分化に伴って発現の上昇が観察された。さらに大腸がん、腎がん、前立腺がん等では腫瘍組織で NEU3 遺伝子の発現が著しく亢進していることが明らかとなった。このような NEU3 遺伝子の発現制御機構を解明することが、本酵素の生理機能の調節を理解する上で非常に重要であると考え、本研究ではこれまで不明であったゲノム遺伝子の構造を明らかにし、さらにプロモーター領域の同定を行った。

正常組織及び培養細胞由来の RNA を用いたオリゴキャップ法により、本遺伝子の転写が複数の転写開始点より始まっていること、それらが翻訳開始点より約 5.6 kb 及び 5.9 kb 上流の、2 つの領域に存在することが明らかになった。また、これら2つの領域の使用頻度に関して、脳とそれ以外の組織・細胞に違いがあること、同定された転写開始点の近傍には典型的な TATA 配列は存在しないことも示された。転写開始点近傍のプロモーター活性に関しては、ルシフェラーゼレポーターアッセイにより、転写開始点より上流約 1.5kb の領域が転写活性化能を示すことが明らかになった。マウス、ウシのゲノム配列との比較から、Sp1 ファミリーの推定結合配列が共通に存在することがわかった。EMSA、ChIP アッセイによる解析から、転写因子 Sp3 が本遺伝子の転写調節に働いている可能性が示された。

一般講演8 4-メチルウンベリフェロンの新たな機能とヒアルロン酸合成酵素 HAS2 の活性調節

○中村敏也¹、成田茂樹¹、太田真衣²、大屋絵理²、七島直樹¹、石川 孝¹
(¹弘前大院・保健学研究科・生体機能科学、²弘前大・医・保健・検査技術科学)

【目的】4-メチルウンベリフェロン(MU)はヒアルロン酸(HA)合成阻害作用を有することが知られているが、最近、いくつかのマトリックスメタロプロテアーゼの発現に影響を与えるなどの作用を有することも知られてきた。我々は MU の有するこの多機能性の原因について検討している中で、MU が細胞内タンパク質の *O*-結合型 β -*N*-アセチルグルコサミン化(*O*-GlcNAc化)を亢進させ、これが HA 合成酵素のひとつである HAS2 のリン酸化を抑制することにより酵素活性を低下させる可能性を示す結果を得たので報告する。

【方法】MU 存在下および非存在下に培養したヒト皮膚線維芽細胞抽出液について、*O*-GlcNAc 抗体を用いたウェスタンブロットおよび免疫組織化学染色を行った。次に、プロテインキナーゼCの活性化剤である 12-*O*-テトラデカノイルホルボール-13-アセテート(TPA)およびMUをそれぞれ単独で、あるいは共に含む培地で線維芽細胞を培養し、それらの細胞抽出液を固定化金属アフィニティクロマトによりリン酸化および非リン酸化タンパク質画分に分画した。それぞれの画分について、HAS2 やリン酸化アミノ酸に対する抗体等でウェスタンブロットを行った。培地に分泌された HA 量はビオチン化 HA 結合タンパク質-HRP 標識ストレプトアビジン法により測定した。また、RT-PCR 法により HAS1、2 および 3 の遺伝子発現を調べた。

【結果】TPA はタンパク質の *O*-GlcNAc 化を抑制し、逆に MU はタンパク質のセリンおよびスレオニンのリン酸化を抑制する傾向が観察された。線維芽細胞の HA 合成量は TPA により顕著に増加したが、MU を共存させることにより TPA も MU も含まないコントロール細胞のレベルまで低下した。このとき HA 合成量と HAS2 のリン酸化との相関が観察されたが、HAS2 そのものの発現量には顕著な差が認められなかった。

【結論】MU は細胞内タンパク質のリン酸化抑制剤として働くことが知られた。また、リン酸化と *O*-GlcNAc 化の競合により HAS2 の HA 合成活性の調節される可能性が初めて示された。

一般講演9 酸化傷害から精子形成細胞を保護する抗酸化酵素ペルオキシレドキシシン 4

○1 井内良仁、1 岡田太、1 角田智志、1 岐部紀子、2 白澤信行、3 伊川正人、3 岡部勝、
4 池田義孝、1 藤井順逸

(1 山形大学大学院医学系研究科生体分子機能学、2 山形大学医学部情報構造統御学講座形態構造医学、3 大阪大学微生物病研究所附属遺伝情報実験センター遺伝子機能解析、4 佐賀大学医学部分子生命科学)

【背景】 ペルオキシレドキシシン (Prx) は近年見いだされた新規抗酸化酵素で、チオレドキシシン依存性に過酸化水素などを還元無毒化する活性に加えて、個々の分子に特徴的で多様な生理機能を有する。ほ乳類が持つ6種類のPrx遺伝子の中で、Prx4産物は唯一分泌シグナルを有し、ほとんどの臓器では分泌型として機能すると考えられる。しかし、性成熟期の精子形成細胞ではシグナル配列の切断が起きず分泌型から膜結合型へと変換し、小胞体膜に留まる。

【目的と方法】 各臓器におけるPrx4の役割を解明するために、loxPを組込んだターゲティングベクターを作製したが、まずは全身でPrx4を欠損する(Prx4 KO)マウスを作製し、その表現型の解析を行った。

【結果】 Prx4 KOマウスは正常に発育し通常の妊孕能を有していたが、Prx4 KO雄マウスの体重ならびに主要臓器をWTマウスと比較したところ、精巣のみが小さく発達異常が見られた。そして、Prx4 KOマウス精巣では脂質やタンパク質の酸化が亢進しており、TUNEL染色陽性を示す精母細胞の細胞死が増加していた。また、43℃、15分間の精巣へのマイルドな熱ストレスによって細胞死が著しく増加し、過酸化脂質に対する抗体ならびに酸化DNAに対する抗体でも強く染色された。さらに精巣上体中に未分化な精子形成細胞が認められ、成熟精子数も著しく少なかったが、得られた精子の受精能はほぼ正常であった。

【考察】 以上の結果は、Prx4 KOマウスの精子形成細胞は、通常の生理的条件下で生じるわずかな活性酸素によっても酸化的傷害を受ける事を示唆している。精子形成細胞は各種ストレスに対して感受性が高く脆弱であることから、膜結合型Prx4は、精子形成過程で小胞体中に生じる活性酸素を消去することで酸化ストレスを抑え、精子形成を助けている可能性が示唆された。

一般講演10 低酸素は肝癌由来細胞株におけるヘム合成系酵素の発現を抑制する

パトリック バルガス、○古山和道、金子桐子、柴原茂樹
(東北大学大学院医学系研究科分子生物学分野)

ヘムはヘモグロビンやチトクロームなどの補欠分子として機能する、ほとんど全ての生物の生存に必須の分子である。ほ乳類ではグリシンとスクシニル CoA から 8 段階の酵素反応を経て合成されるが、このうち第3および第4段階の反応はヒドロキシメチルピラン合成酵素 (HMBS)とウロポルフィリノーゲン III 合成酵素(UROS)がそれぞれ触媒する。どちらの酵素についても、赤芽球を含め全ての細胞で発現する mRNA(非特異的 mRNA)と赤芽球でのみ発現する赤芽球特異的 mRNA の、5'末端のみが異なる2種類の mRNA が単一の遺伝子から転写される。今回我々は、低酸素条件下(1% O₂)における HMBS と UROS の発現の変化につき、肝癌由来細胞株(HepG2、Hep3B)と赤白血病由来の赤芽球系細胞株(YN-1、K562)とを用いて検討を行なった。その結果、肝癌由来細胞株では低酸素条件下で両酵素の mRNA の発現が低下したが、赤芽球系細胞株ではいずれの酵素の mRNA の発現も低下しなかった。さらに同条件下での赤芽球系細胞株における両酵素の非特異的 mRNA と赤芽球特異的 mRNA の発現をリアルタイム PCR 法によりそれぞれ別個に検出したところ、いずれの mRNA の発現も低下していなかった。次に HepG2 細胞における HMBS と UROS mRNA の半減期を通常培養条件下と低酸素条件下で比較したところ、いずれの酵素も低酸素条件下で mRNA の半減期の短縮を認めなかった。最後に、低酸素条件下での遺伝子発現調節を司る転写因子である hypoxia inducible factor 1 (HIF-1)を非低酸素条件下で活性化させる事が知られる deferoxamine や CoCl₂を培養上清中に添加したところ、いずれの試薬も HepG2 細胞の HMBS と UROS mRNA の発現を低下させた。以上の結果から、1) 肝癌由来細胞株と赤芽球由来の細胞株では低酸素条件下における HMBS と UROS の発現調節は異なり、肝癌由来細胞株でのみ両酵素の発現が抑制されること、2) 肝癌由来細胞株における両酵素の低酸素条件下での mRNA の発現低下には HIF-1 の活性化が関与する可能性が高いこと、などが明らかになった。

一般講演11 ヘム制御真核生物翻訳開始因子2 α キナーゼ(HRI)のヘムによる反応制御機構

五十嵐城太郎、村瀬元彦、○清水透
(東北大・多元研)

真核生物は UV 照射、アミノ酸不足、ウイルス感染などのストレスに曝されると、蛋白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:グロビンを 1:1 に保つために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、ヘム制御真核生物翻訳開始因子2 α (eIF2 α)キナーゼ HRI は自己リン酸化によって活性化し、eIF2 α をリン酸化することによって、グロビン蛋白質の合成を停止させる。私たちはこの HRI のヘムセンシング機構について明らかにしたので報告する。HRI の様々な欠損変異体、及び部位特異的変異体の吸収スペクトルや EPR などの分光学的研究より、N 末端ドメインの His119/His120 と C 末端キナーゼドメインの Cys409 がヘムの軸配位子であることが示唆された。Cys409 は、ヘム制御酵素のヘムセンシング部位として特徴的な配列であると言われている CP (Cys-Pro) モチーフの1つであった。しかし、全長型 HRI の Cys409 を Ser へ変異しても、キナーゼ活性が影響を受けることはなかった。一方、単離されたキナーゼドメインや、His119/His120 を含まない N 末端欠損変異体では、Cys409 を Ser へ変異すると、ヘムによるキナーゼ活性の阻害効果が消失した。これらの結果より、ヘムセンシングは、ヘムの CPモチーフへの結合という単純な機構よりも、ヘムが CPモチーフに結合することで誘起される蛋白質構造の変化によって N 末端とキナーゼドメインとの相互作用が生じ、その結果酵素活性を抑制すると言う機構が示唆された。

Igarashi, J. *et al. J. Biol. Chem.* 279, 15752 (2004).

Miksanova, M. *et al. Biochemistry* 45, 9894 (2006).

Igarashi, J. *et al. J. Biol. Chem.* 283, in press (2008).

一般講演12 ラットの肝化学発癌のイニシエーション:胆管細胞の **disorganization** による
前がん前駆細胞の発生

○佐藤公彦、平向洋介、関根均
(弘前大学・院・保健・生体機能科学分野)

目的:イニシエーションの分子機構(最初のがん性変化、がんの原因)の解明は、がん研究の基本命題のひとつとなっている。ラットの肝化学発癌系において腫瘍マーカー酵素 GST-P(グルタチオン S-トランスフェラーゼ P型)と GGT(ガンマグルタミルトランスぺプチダーゼ)を用いるアプローチはそのためにも有用と思われる。Solt-Farber プロトコルにおいてラット肝に誘発する前がんフォーカスの前駆細胞と見なされる 2 種類のミニフォーカス、GST-P(+)/GGT(-)および GST-P(+)/GGT(+)型、が検出されたが、それらは細胆管に結合して発生増殖することが最も大きな特徴であった[1]。今回、ミニフォーカス(細胞)の由来と発生増殖機構を 3'-Me-DAB の投与プロトコルにおいて簡単に検討した。

方法:SD ラット(雄 6 週令)を用いた。誘発プロトコル:A) 3'-Me-DAB(0.05%)の単独投与(24 週まで)、B) 発がんプロモーター[D,L-エチオニン(ET, 0.25%)、17 α -エチニルエストラジオール(EE, 200ppm)]の単独投与(6 週)、C) 3'-Me-DAB(0.05%)の単独投与 8 週後、プロモーターを投与(2 週)。ラット肝臓は冷アセトンで固定した。Vibratome 切片(25mm)を GGT の活性染色と GST-P 免疫染色を組み合わせた高感度法によって染色し、ミニフォーカス、フォーカスを検出した。

結果:1)プロトコル A:ラットに 3'-Me-DAB を投与すると 20 週までに誘発するミニフォーカス、フォーカスは殆どが GST-P(+)/GGT(-)型で、GST-P(+)/GGT(+)型は少なかった。2) ラットに発がんプロモーター、ET および EE、を 2-6 週、単独投与すると胆管の過剰増生とそれに伴う GGT の強発現が認められた。3) ラットに 3'-Me-DAB を 8 週投与後、さらにプロモーター(ET および EE)を 2 週投与したところ GST-P(+)/GGT(+)型が主であった($p<0.001$)。

考察: 3'-Me-DAB を 8 週投与して GST-P(+)/GGT(-)型のミニフォーカスを誘発したラットに、更にプロモーターを 2 週投与すると GST-P(+)/GGT(+)型へと形質転換する事実が注目された。一方、正常ラット(control)にプロモーターを投与すると胆管は過剰増生し、胆管細胞は GGT(-)から GGT(+) へと転換する。しかし、肝実質細胞は GGT(-)のまま転換が見られなかった。したがって胆管に結合して発生増殖するミニフォーカスは、肝実質細胞ではなく、胆管細胞由来と考えられる。他のデータも考え合わせると、発がん剤の作用で胆管細胞が(細)胆管から漏出し nongenetic に disorganize(非組織化)されてミニフォーカスを生じるイニシエーションの分子細胞機構が推察された。[1] Satoh K. et al. Enzymatic detection of precursor cell populations of preneoplastic foci positive for γ -glutamyl- transpeptidase in rat liver. Int. J. Cancer, 115, 711-716, 2005.

一般講演13 肝再生過程における Reg I の発現と局在性

○王静舒、馬莉、小代田宗一、杉山俊博
(秋田大・医・構造機能医学)

【目的】Reg (regenerating gene)は90%膵切除後にニコチンアミド投与したラットの再生ランゲルハンス島で特異的に発現する遺伝子として発見された膵β細胞再生増殖因子である。現在、Reg遺伝子は複数存在し、ヒト、マウスなど様々な動物種に発現していることからReg遺伝子ファミリーとして考えられるようになった。近年の研究でRegの発現が膵臓以外の消化器系の臓器でも確認され、細胞増殖活性や抗アポトーシス活性など、臓器損傷、炎症、細胞の再生と増殖、腫瘍に関与していることが明らかになってきた。本研究はラット肝再生モデルにおけるReg Iの発現に注目し、肝再生過程での発現と局在を詳細に調べて、再生過程におけるReg Iの機能を解明することを目的とした。

【方法】2-acethylaminofluorene(2AAF)/部分肝切除(PH)ラット肝臓組織および正常ラットの肝臓組織でのReg Iの発現と局在を調べた。mRNAの発現はRT-PCR法により測定した。組織免疫染色は、東北大学にて作製されたReg Iモノクローナル抗体を用いた。多重蛍光免疫染色法によりReg Iと肝臓および胆管系マーカーの発現部位を比較した。

【結果】RT-PCR分析の結果、2AAF/PH肝臓でのReg Iの発現は肝臓の再生に伴って著しく上昇していることがわかった。多重蛍光免疫染色の結果、細胆管の一部において術後3日目から12日目にかけてReg I陽性細胞の増加が認められ、AFP、CK19、OV6などと共染色された。さらに、Reg I陽性の細胆管細胞の多くはPCNA陽性であった。また、Reg Iは正常成体ラット肝臓においても、ごく少数のAFP陽性胆管系細胞に発現していることが分かった。Reg Iは肝臓の再生過程において細胆管に存在する幹細胞の増殖に関与している可能性が示唆された。

一般講演14 マウスコーキシンの発現における組織特異性の解析

○小林賢治、平 秀晴、山下哲郎
(岩手大・農・応用生物化学)

[背景]通常、哺乳動物において尿中にタンパク質が排泄されるという現象は、腎疾患のマーカーとして考えられている。しかし、宮崎らは、健常なイエネコ(*Felis catus*)の尿中に約70kDaのタンパク質が大量に存在することを発見した。このタンパク質の一次構造を決定したところ、カルボキシルエステラーゼと類似した配列を有するタンパク質であることが明らかになったため、このタンパク質を **cauxin(carboxylesterase-like urinary excreted protein)**と命名した。カルボキシルエステラーゼは様々な臓器に発現し、医薬品なども含め多くの化合物の加水分解を触媒しており、外来異物の代謝酵素として存在するものと考えられている。コーキシンはカルボキシルエステラーゼのサブファミリーである CES4 ファミリーを形成しており、イエネコにおいては近年の研究により尿中コーキシンの機能は解明されつつある。しかし、マウスやヒツジ等で発現が確認されている尿以外に存在するコーキシンの機能は不明である。そこで、動物組織に存在しているコーキシンの機能を解明するために、コーキシンの発現における組織特異性の解析を行った。

[実験・結果]8週齢の ICR マウスから摘出した各臓器を用いて RT-PCR を行ったところ、様々な臓器でマウスコーキシン mRNA の発現が確認され、このことからマウスコーキシンが各臓器において外来異物や薬物の代謝に関与している可能性が示唆された。さらに、オスの生殖器においてマウスコーキシン mRNA の発現が顕著であったため、マウスコーキシンがオスの生殖器特異的な機能を持つ可能性が示唆された。マウスコーキシン mRNA の発現が最も顕著であった精巣上体を用いて *in situ hybridization* を行ったところ、精巣上体管の上皮細胞からマウスコーキシンのシグナルが検出された。この結果と精巣上体の機能からマウスコーキシンが精子に何らかの影響を与え、生殖機能に関与しているという可能性が示唆された。今後はマウスコーキシン抗体を作製し、タンパク質レベルでの解析を行うと共に、作成中のマウスコーキシンノックアウトマウスの表現型の解析を行う予定である。

一般講演15 新規のプロテインホスファターゼ 2C ファミリーメンバーPP2C η -2 による
NF- κ B 経路の制御機構

逸見健明 1,2、永浦裕子 1、越後成志 2、田村眞理 1、○小林孝安 1
(東北大・加齢研・遺伝子情報 1、東北大院・歯・口腔外科 2)

細胞は環境ストレスに応じて、ストレス応答反応や細胞死の誘導などさまざまな応答反応を示すが、そこで重要な役割を担っているのが SAPK 経路と NF- κ B 経路である。一方、プロテインホスファターゼ 2C (PP2C)ファミリーは、真核生物のセリン・スレオニンホスファターゼの主要な 4 つのグループの一つで、哺乳類では少なくとも 13 種類の異なる遺伝子産物が存在する。近年、複数の PP2C ファミリーメンバーが SAPK 経路や NF- κ B 経路のシグナル経路の重要な制御因子であることが明らかにされてきた。我々はこれまでに、PP2C β と PP2C ϵ が SAPK 経路の負の制御因子として働くことを報告してきたが、今回さらに、新規の PP2C ファミリーメンバーである PP2C η -2 が、二つの経路のうち NF- κ B 経路を特異的に抑制することを見出した。PP2C η は、選択的スプライシングにより、核局在を示す PP2C η -1 と、細胞質に局在する PP2C η -2 が産生される。HEK293 細胞を IL-1 で処理すると、SAPK 経路と NF- κ B 経路の両者が活性化されるが、細胞に PP2C η -2 を過剰発現させると、IL-1 依存性の NF- κ B の活性化を抑制したが、JNK の下流に位置する AP-1 の活性化には影響を与えなかった。また、PP2C η -2 の強制発現は MAPKKK である TAK1 の強制発現による NF- κ B の活性化を抑制したが、TAK1 による JNK の活性化には無影響であった。さらに、NF- κ B 経路において TAK1 の下流に位置する IKK β の強制発現による NF- κ B の活性化が、PP2C η -2 の強制発現によって抑制された。最後に、IL-1 依存性の IKK β の Ser171 のリン酸化と I κ B β の分解の亢進、さらには IL-1 による IL-6 の発現誘導が、siRNA による内在性の PP2C η -2 のノックダウンによってさらに促進された。以上の結果から、内在性の PP2C η -2 が、IKK β を脱リン酸化することにより、IL-1 依存性の NF- κ B の活性化を選択的に抑制することが示された。さらに、PP2C η -2 mRNA の発現が IL-1 処理により抑制された。以上の結果より、PP2C η -2 は IL-1-NF- κ B 経路の選択的な抑制因子として機能するが、その発現が IL-1 シグナルによりフィードバック的に抑制されることが示唆された。今回の結果は、PP2C の各メンバーがストレス下流のシグナル経路のさまざまな局面で機能していることを示している

一般講演16 がん抑制蛋白質 p19ARF の Bach1 を介した新機能

○西澤弘成、土肥由裕、井倉毅、五十嵐和彦
(東北大学大学院医学系研究科・生物化学分野)

酸化ストレス応答は細胞老化に深く関わっていることが知られている。私達は酸化ストレス応答性の転写因子である Bach1 の機能について研究しており、Bach1 KO 線維芽細胞の解析により Bach1 が p53 の転写活性化能を抑制することで細胞老化を負に制御することを明らかにしている。Bach1 の細胞老化における役割をさらに明らかにするために Bach1 複合体を精製したところ、p53 に加えもう一つのがん抑制蛋白質である p19ARF(ヒトでは p14ARF) が Bach1 複合体に含まれていることが明らかになった。p19ARF は、p53 を分解する Mdm2 に結合し Mdm2 の働きを抑制することで、p53 を安定化させ細胞周期の停止やアポトーシスを誘導することがよく知られている。ところが興味深いことに、この Bach1 複合体中に Mdm2 は含まれていなかった。このことは、p19ARF が Mdm2 を介さずに p53 を制御する可能性を示唆している。そこでこの p19ARF の新たな機能を解明するために、p19ARF、Bach1、p53 の相互関係を免疫沈降法によって調べたところ、p19ARF と Bach1 の結合が p53 の量依存的に阻害されることが明らかになった。これは p53 が Bach1 との結合において p19ARF と競合していることを示している。すなわち p19ARF が Bach1 と結合することで、Bach1 が p53 およびエンハンサー上からはずれ、p53 の標的遺伝子の転写が活性化されると考えられる。今回は、Bach1 複合体におけるがん抑制蛋白質 p19ARF の Mdm2 を介さない新たな役割について紹介する。

一般講演17 マウスメラノーマ細胞の HDAC 阻害による神経様細胞への分化

○岩下 淳、桑島 明子、酒井 正史、阿部 達也
(秋田県立大学 生物資源科学部 応用生物科学科)

ヒストンデアセチラーゼ(HDAC)の阻害は様々な遺伝子の発現を変化させる。HDAC 阻害剤は癌細胞において細胞分裂の停止や分化などを誘導することから、制ガン剤としても用いられている。メラノーマ(悪性黒色腫)は色素細胞メラノサイトが癌化した細胞で、神経堤由来である。我々は以前ブチラート、及びトリコスタチン(TSA)によるHDAC阻害がマウスメラノーマ細胞 B16-BL6 の人工基底膜浸潤を抑制することを報告した。この浸潤抑制はB16-BL6細胞が運動性の低い状態へと分化したことによる可能性がある。

今回我々はブチラート、あるいは TSA による HDAC 阻害がメラノーマの分化に与える影響を調べた。B16-BL6細胞にブチラート、あるいは TSA を加え培養すると細胞は多数の樹状突起を伸ばし、突起の先端が相互に結合した神経細胞様の形態へと変化した。この樹状突起には、軸索伸長にも必要な α/β チューブリンの発現が観察されたがアクチンストレスファイバーはほとんど見られなかった。成熟した神経細胞に特異的なマーカーの一つに microtubule-associated protein 2 (MAP2)がある。HDAC 阻害剤で処理した B16-BL6細胞の樹状突起には MAP2 の高い発現が観察された。さらに神経発生と軸索の伸長に必須である NCAM の高い発現も見られた。

樹状突起の発達やマーカー遺伝子 MAP2 の高発現などの結果は、HDAC 阻害により、メラノーマが元の神経細胞様へと分化したことを示している。軸索構成成分として重要な NF-Lは変化しなかったことから、完全な神経細胞への分化には至っていないが、HDAC 阻害剤処理という簡便な方法でメラノーマ細胞を神経細胞様に分化させ得るという結果は、メラノーマの運動性、基底膜浸潤能が減少することを示唆し、転移抑制の観点から興味深い。

一般講演18 クロマチンリモデリング蛋白質 ATRX 変異マウスのスパイン形成異常とそのメカニズム

○塩田倫史 1、所 崇 2、別府秀幸 3、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、3 ハーバード大・心血管研)

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。例えば、遺伝性の精神遅滞である脆弱 X 症候群 (Fragile X syndrome) のスパインは細長く、密度が高いことが報告されている。これらの結果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。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。本研究では ATRX 変異精神遅滞モデルマウスを用いて、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。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。実験の結果、ATRX 変異マウスは内側前頭前野においてこれまでの精神遅滞症候群と同様に、細長い形態をしたスパインが有意に増加していた。私達は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することを見い出した。スパインの形態に深く関与する Rac1-guanine nucleotide exchange factors (GEFs) 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 p21-activated kinase (PAK) の活性も上昇することを確認した。私達の研究により、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。

一般講演19 ヒストンバリエント H2AZ アイソフォームの欠損細胞の作成と
クロマチン・染色体構築における機能解析

○松田涼 1、堀哲也 2、深川竜郎 2、原田昌彦 1
(1 東北大・院農・分子生物学、2 国立遺伝研)

真核生物の核内で、ゲノムはヒストン H2A、H2B、H3、H4 からなるヒストンオクタマーに巻き付いてヌクレオソームを形成している。これを基本単位としたクロマチン構造がエピジェネティック制御の分子基盤となり、転写・修復・複製・分配などのゲノム機能を制御している。クロマチン構造の構築および変換には、ATP 依存的クロマチンリモデリング複合体やヒストン修飾複合体が関わることは知られているが、最近ではさらにヒストンバリエントが重要な役割を果たすことも示されている。ヒストンバリエントは通常のヒストンと構造的類似性を有し、通常のヒストンと入れ替わってヌクレオソームに導入される。我々は出芽酵母からヒトまで高度に保存されている H2A のバリエントである H2AZ に注目し、その機能解析を行っている。出芽酵母では H2AZ は SWR1 クロマチンリモデリング複合体によってユークロマチンとヘテロクロマチンの境界に導入されることや、遺伝子プロモーターに導入されて転写制御やエピジェネティックメモリーに関与することが示唆されている。一方で、脊椎動物の H2AZ の機能については不明な点が多い。我々は脊椎動物の H2AZ を解析する過程で、従来 H2AZ として扱われていたタンパク質には二種類のアイソフォームが存在し、これらがニワトリからヒトまで保存されて存在していることを見出した。これらのアイソフォームを H2AZ と H2AF と名付けて区別し、ニワトリ DT40 細胞を用いてこれらの解析を行なった。H2AZ と H2AF は異なる染色体上の遺伝子にコードされ、両者とも発現していることを確認した。H2AZ と H2AF の機能を区別して解析するため、H2AF 遺伝子を破壊した細胞株を作成した。H2AF 欠損細胞は野生株に比べて増殖が遅く、G2/M 期での遅延が認められた。また、H2AF 欠損細胞では分裂期中期において染色体整列に異常を示す細胞が顕著に増加し、分裂期染色体の形態にも変化が観察された。このような表現形が H2AF に特異的な機能を反映したものであることを確認するため、H2AZ 欠損細胞の作成を進めている。

一般講演20 INO80 クロマチンリモデリング複合体は DNA 複製の再開に必要である

○尾間由佳子 1、島田健士 2、久郷和人 3、太田邦史 4, Susan M. Gasser², 原田昌彦 1
(1 東北大学・院農・分子生物、2 FMI, Basel、3 理研、4 東大・総合文化)

真核生物のゲノム DNA は、ヒストンなどのタンパク質と結合したクロマチンとして核内に存在しており、ゲノム機能はクロマチン構造の変換により制御を受けている。クロマチンリモデリング複合体はクロマチン構造変換の主要な機構であり、これまでに転写・DNA 損傷修復などへの関与が報告されている。その一方で、DNA 複製へのクロマチンリモデリング複合体の関与については、これまでほとんど不明であった。INO80 クロマチンリモデリング複合体は Ino80, Arp5、Arp8などを構成因子としており、酵母からヒトまで存在する。出芽酵母ゲノムにおける INO80 複合体の機能を解析する目的で、クロマチン免疫沈降(ChIP)と第3, 4,5番および6番右腕染色体をカバーした DNA タイピングアレイ(chip)を組み合わせた ChIP-chip 法による解析により、Ino80 および Arp5 のゲノム上の結合部位を同定した。その結果、非同調細胞において、遺伝子プロモーター領域に加え、複製起点の 28%に INO80 複合体が結合していることが示された。Ino80 と複製の関係を詳細に解析するために、細胞を alpha-factor により G1 期に同調させた後にヒドロキシウレア (HU) 存在下で培養し、複製起点の近傍で複製フォークを停止させたところ、複製起点の 86%に INO80 複合体の結合が観察された。これにより、停止した複製フォークにおいて INO80 複合体が何らかの役割を持つ可能性が示唆された。そこで、HUを培地から除いた後の複製再開を、FACS解析および二次元ゲル電気泳動により解析したところ、*ino80* 欠損株では複製フォークの進行に遅延が生じていることが明らかとなった。また、INO80 複合体の構成因子でありリモデリング活性に必要であることが知られている Arp8 を欠損させた場合でも、同様に複製フォークの進行の遅れが観察された。これらの結果から、INO80 クロマチンリモデリング複合体が、停止した複製フォーク進行の再開促進を介して、DNA 複製に関与することが示された。