日本生化学会東北支部 第 81 回例会・シンポジウム

要旨集

会期:平成27年5月9日(土)

会場:東北大学 さくらホール

(仙台市青葉区片平2-1-1)

主催:日本生化学会

日本生化学会東北支部 第81回例会・シンポジウム

会期:平成27年5月9日(土)

会場:東北大学 片平さくらホール (仙台青葉区片平2-1-1)

○受付開始:8:00~

○一般演題を口演される方へ

- 1) 口演30分前までに受付を済ませてください。
- 2) 一般口演は12分、討論時間は3分です。時間の厳守をお願いします。
- 3) ロ頭発表は、パワーポイントを用いてお願いいたします。 事務局で準備したWindowsまたはMacをお使いください。 USBメモリーによる、データのコピー及び試写に関しては、 午前の部は8:15までに、午後の部は12:45までに、お済ませください。 (恐縮ですが、持ち込みのパソコンでの発表は、ご遠慮ください)

○ポスター発表をされる方へ

- 1) ポスターボードの寸法は、幅1130mm 高さ1660mmです。
- 2) ポスターは、発表日の朝に掲示を行ってください。(8:00~)
- 3) ポスターは、学会終了後に撤去をお願いします。

発表時間は、1時間と限られていますので、30分ずつのコアタイム (発表者が発表する時間帯)を設けています。

ポスター番号が奇数のポスターは、コアタイムA (11:00-11:30)です。 ポスター番号が偶数のポスターは、コアタイムB (11:30-12:00)です。

○評議会 12:10~12:50 レストラン萩

○懇親会 18:30~ レストラン萩

懇親会参加費:一般(4,000円)、大学院生·学部生(無料)

プログラム

8:25-8:30 開会の辞

8:30-9:45 一般口演 (0-1~0-5)

座長:鈴木教郎(東北大院・医・新医学領域創生)

- 0-1) 小タンパク質 MOZART1 による線虫γ-チューブリン複合体の制御機構
- ○春田奈美、杉本亜砂子

(東北大院・生命科学)

- 0-2) 細胞増殖抑制時の一次繊毛形成における TTBK2 キナーゼの機能解析
- ○永井友朗、小田聡明、千葉秀平、水野健作 (東北大院・生命科学)
- 0-3) 効率的な染色体整列における Kid 及び CENP-E の役割
- ○家村顕自、田中耕三 (東北大・加齢研・分子腫瘍学)
- **0-4)** FUS は GluA1 mRNA 安定性の調節を介してシナプス機能及び FTLD 様行動を制御する
 ○宇田川剛 ^{1,5}、藤岡祐介 ¹、田中基樹 ²、本田大祐 ¹、横井聡 ¹、衣斐大祐 ³、永井拓 ³、山田清
 文 ³、渡辺宏久 ¹、勝野雅央 ¹、大野欽司 ⁴、稲田利文 ⁵、曽我部正博 ²、岡戸晴生 ⁶、石垣診佑 ¹、
 祖父江元 ¹

(¹名古屋大院・医・神経内科学、²メカノバイオロジー・ラボ、³医療薬学・医学部付属病院薬剤部、⁴神経遺伝情報学、⁵東北大院・薬・遺伝子制御薬学、⁶東京都医学総合研・分子神経生理研究部門)

- 0-5) 脳内ヒスタミンのクリアランス機構について
- 〇吉川雄朗¹、長沼史登¹、三浦大和¹、矢内敦^{1,2}、堀米愛¹、中村正帆¹、望月貴年²、谷内一彦¹

(1東北大院・医・機能薬理、2ハーバード大・神経科学)

9:45-11:00 一般口演 (0-6~0-10)

座長:松沢厚(東北大院・薬・衛生化学)

0-6) Fas 感受性を調節するキナーゼ群の探索

○野口拓也、土田芽衣、平田祐介、松沢厚 (東北大院・薬・衛生化学)

0-7) 造血幹細胞における KEAP1-NRF2 制御系の機能解析

○村上昌平¹、山本雅之²、本橋ほづみ¹ (¹東北大・加齢研・遺伝子発現制御、²東北大院・医・医化学)

0-8) ガングリオシド GM3 合成酵素の細胞内トラフィック機構の解析

○ 宍戸史¹, 上村聡志², 樫村まどか¹, 井ノ口仁一¹ (¹東北薬科大・分子生体膜研・機能病態分子, ²青山学院・理工)

0-9) NRF2 protects sickle cell disease model mice from inflammation and organ damage

ONadine Keleku–Lukwete^{1,4}、鈴木未来子 ²、大槻晃史 ¹、土田恒平 ¹、片山紗乙莉 ¹、林真貴子 ¹、森口尚 ¹、田邉修 ³、今泉益栄 ⁴、山本雅之 ^{1,3}

(東北大・医・医化学 1 、RI センター 2 、東北大・東北メディカル・メガバンク機構・ゲノム 多型機能解析分野 3 、宮城県立こども病院血液腫瘍科 4)

0-10) 親電子性シグナル制御破綻による有機水銀毒性発現機構

〇笠松真吾 1,2 、居原 秀 2 、津々木博康 2,3 、石崎健勝 2 、井田智章 1 、藤井重元 1 、澤 智裕 3 、熊谷嘉人 4 、赤池孝章 1

(1東北大院・医・環境保健医学、2大阪府立大・院・理学・生物科学、3熊本大・院・生命科学・医学系微生物学、4筑波大・医学医療系・環境生物学)

11:00-12:00 ポスターセッション

P-1) 微生物由来 Dipeptidyl aminopeptidase IV の結晶構造解析

○六本木沙織¹、館岡千佳¹、鈴木義之³、藤本真友¹、森澤さおり¹、飯塚一平¹、小笠原渉³、田中信忠²、阪本泰光¹、野中孝昌¹

(1岩手医大、2昭和大、3長岡技大・生物)

P-2) フラビウイルス増殖における VCP/p97 の役割

○新井亜利紗¹、小林万希子²、有本大²、田端佳介²、森田英嗣^{1,2} (¹弘前大・農学生命・細胞分子生物、²大阪大・微生物病研究所・ウイルス研究グループ)

- P-3) 新規アンギオテンシン変換酵素 2 測定用蛍光消光基質の開発とその応用
- ○高橋砂織¹、熊谷久美子²、畠恵司¹、宮脇舞³、横田早希³、後藤猛³、韮澤悟⁴、杉山俊博⁵ (¹秋田県総食研、²ペプチド研、³秋田大院・工資、⁴国際農研、⁵秋田大院・医)
- P-4) バキュロウイルス感染昆虫細胞によるヒト型 ACE2 の細胞内外生産挙動及びその特性 解析
- ○横田早希¹、宮脇舞¹、後藤猛¹, 韮澤悟²、高橋砂織³ (¹秋田大院・工資、²国際農研、³秋田県総食研)
- P-5) Rad53 結合タンパク質、Mdt1p の欠損がタンパク質輸送変異 sec12-4 を抑圧するメカニズムについて
- ○関亦明子¹、関亦正幸²、佐藤菜津美¹、早坂勇人¹、中野明彦³,⁴ (¹山形大・医・ 看護、²福島県立医大・医、³東大院・理・生物科学、⁴理研・生細胞超解像 イメージング研究チーム)
- P-6) マウス顎下腺上皮組織の体外培養における増殖因子の効果
- ○早坂勇人¹、関亦明子¹、野川宏幸²、関亦正幸³(¹山形大・医・看護、²千葉大院・理、³福島県立医大・医)
- P-7) ヒト REG I α, マウス Reg I, Reg II タンパク質のレクチン活性の検討
- 〇山内貴裕 ¹、Nausheen Jamal ¹、佐藤舞 ¹、篠村航世 ¹、毛塚雄一郎 ²、野中孝昌 ²、大橋一晶 ¹、那谷耕司 ¹
 - (1岩手医大・薬・臨床医化学講座、2構造生物薬学講座)
- P-8) クロルプロマジン感受性に関わるトランスポーター遺伝子 *SMF2*および *NRAMP2*の解析 ○岡沼宇宙、畠山和也、秋本尚哉、伊藤文香、長谷川千夏、那谷耕司、大橋一晶 (岩手医大・薬・臨床医化学)
- P-9) 妊娠時マウス膵臓ランゲルハンス島 β 細胞増殖におけるヘパラン硫酸プロテオグリカンの関与
- ○木下光¹、高橋巖¹、手賀史¹、加藤晴菜¹、松崎南美²、山田修平²、那谷耕司¹ (¹岩手医大・薬・臨床医化学、²名城大・薬・病態生化学)
- P-10) 膵特異的に発現する PDI ファミリータンパク質 (PDIp) の生理的な基質の同定
- ○藤本拓志、斎藤美知子、都留秋雄、河野憲二、稲葉謙次、門倉広 (東北大・多元研、奈良先端大・バイオ)

- P-11) Rho-GEF So1o によるアクチン繊維と中間径フィラメントの制御とメカノセンシング における機能
- ○藤原佐知子、安彦日和、大橋一正、増子寿弥、水野健作 (東北大院・生命科学・情報伝達分子解析)
- P-12) Rab35・centaurin-β2/ACAP2 複合体形成の構造基盤と神経突起伸長及び細胞質分裂 への関与
- ○衛藤貫、福田光則 (東北大院・生命・膜輸送機構解析)
- P-13) Varp の新規結合分子の探索とメラノサイトのデンドライト形成への関与
- ○丸橋総史郎、大林典彦、福田光則 (東北大院・生命・膜輸送機構解析)
- P-14) シグマ1受容体の ALS 関連遺伝子変異はミトコンドリア障害を誘導する
- ○篠田康晴、田頭秀章、福永浩司 (東北大院・薬・薬理)
- P-15) 精神的ストレスにおけるドパミン D2 受容体の機能解析
- ○杉本航、塩田倫史、福永浩司 (東北大院・薬・薬理学分野)
- P-16) ショウジョウバエの器官改変系における生殖系列遺伝子の機能解析
- ○石井雄基、寺西達貴、Nguyen Thanh Quang、倉田祥一朗 (東北大院・薬・生命機能解析学分野)
- P-17) 機械的刺激に応答した自然免疫関連遺伝子群の発現誘導機構の解明
- ○見目裕之¹、堀亜紀¹、倉石貴透^{1,2}、倉田祥一朗¹ (¹東北大院・薬・生命機能解析学、² JST・さきがけ)
- P-18) DNA ウイルス感染により誘導されるアポトーシス関連因子の同定
- ○石澤勇輝、麻生高裕、石川裕規、倉石貴透、倉田祥一朗 (東北大院・薬・生命機能解析学)

P-19) mRNA 品質管理因子 Upf 複合体によるタンパク質分解促進機構の解析

○安藤功穣、黒羽一誠、稲田利文 (東北大院・薬・遺伝子制御)

P-20) デュアルレポーター系による NMD 阻害剤・リードスルー剤の同時スクリーニング

○山﨑玲奈、渡邉七恵、稲田利文

(東北大院・薬・遺伝子制御薬学)

P-21) 無細胞蛋白質合成法を用いた IL8 受容体の PET イメージング

○吉川雄朗¹、原田龍一²、古本祥三³、渋谷勝彦¹、岩田錬³、谷内一彦¹ (¹東北大院・医・機能薬理、²東北大・加齢研・ニューロイメージング、³東北大・CYRIC)

P-22) ミトコンドリアにおける分子シャペロン ERp57 結合タンパク質の探索

○工藤翔太¹、宮崎雅雄¹、山下哲郎¹、尾崎拓²

(1岩手大・農、2弘前大院・医・子どものこころの発達研究センター)

P-23) タンパク質ポリチオール化制御機構の解明

〇ヒシヤム ビン アブドル ハミル ¹、井田智章 ¹、笠松真吾 ¹、魏 范研 ²、松永哲郎 ¹、赤司壮 一郎 ¹、ジョン ミンギョン ¹、藤井重元 ¹、居原 秀 ³、澤 智裕 ⁴、富澤一仁 ²、本橋ほづみ 5 、赤池孝章 ¹

(¹ 東北大院 ・医・環境保健医学、² 熊本大院・生命・分子生理、³ 大阪府大院・理・生物科学、⁴ 熊本大院・生命・医学系微生物学分野、⁵ 東北大・加齢研・遺伝子発現制御)

P-24) システインパースルフィドの新しい検出システムの構築

○ジョン ミンギョン¹、井田智章¹、笠松真吾¹、松永哲郎¹、土屋幸弘²、渡邊泰男²、藤井重元¹、赤池孝章¹

(1東北大院・医・環境保健医学、2昭和薬科大・薬理学)

P-25) タンパク質ポリチオール化による親電子シグナル制御

○ 赤司壮一郎¹、笠松真吾¹、ジョン ミンギョン¹、松永哲郎¹、井田智章¹、藤井重元¹、本橋ほづみ²、澤 智裕³、熊谷嘉人⁴、赤池孝章¹

(¹東北大院・医・環境保健医学、²東北大・加齢研・遺伝子発現制御、³熊本大院・生命科学・ 医学系微生物学、⁴筑波大・医・環境生物学)

- P-26) Human ADH5 polymorphisms affect susceptibility to electrophilic stresses
- ○Md. Morshedul Alam¹, Shingo Kasamatsu², Maki Goto¹, Hiroshi Kitamura¹, Tomoaki Ida², Takaaki Akaike² and Hozumi Motohashi¹

(¹Dept Gene Expression Regulation, IDAC, Tohoku Univ, ²Depart of Environmental Health Sciences and Molecular Toxicology, Tohoku Univ Grad School of Med)

P-27) NRF2 活性化による音響外傷からの内耳保護効果の解明

○本蔵陽平^{1,2}、村上昌平¹、川瀬哲明²、香取幸夫²、本橋ほづみ¹ (¹東北大・加齢研・遺伝子発現制御、²東北大院・医・耳鼻咽喉頭頸部外科)

P-28) Nrf2 は Pten 欠失に起因する肝臓がん発症に寄与する

○一戸理沙、田口恵子、山本雅之 (東北大院・医・医化学)

P-29) ストレス応答における NRF2、KEAP1、CUL3 の細胞内分子挙動の解析

○磯達朗、鈴木隆史、山本雅之 (東北大院・医・医化学)

P-30) EVII 遺伝子高発現白血病における白血病発症機構

○ 片山紗乙莉^{1,2}、鈴木未来子³、呉繁夫²、山本雅之¹
 (東北大院・医・¹医化学、²小児病態、³RI センター)

P-31) NRF2 活性化変異を伴う肺がんモデルマウスの確立

○土田恒平¹、鈴木未来子²、大槻晃史¹、守田匡伸¹、山本雅之¹ (東北大院・医・¹医化学、²RI センター)

P-32) ヒト IL6 遺伝子モニターマウスを用いた in vivo イメージングによる炎症状態解析 システムの開発とその利用

○林真貴子¹, 高井淳¹, 于磊¹, 本橋ほづみ², 森口尚¹, 山本雅之¹ (¹東北大院・医・医化学、²東北大・加齢研・遺伝子発現制御)

P-33) 抗酸化剤応答配列 5'末端領域が NRF2-sMaf による生体防御遺伝子誘導に重要

○大槻晃史¹、鈴木未来子²、勝岡史城⁴、土田恒平¹、守田匡伸¹、清水律子³、山本雅之¹,⁴ (東北大院・医・医化学¹、RI センター²、分子血液³、東北大・東北メディカルメガバンク機 構⁴)

- P-34) GATA2 participates in inflammatory cytokine production from renal collecting duct cells during renal ischemia-repurfusion injury
- OLei Yu, Takashi Moriguchi, and Masayuki Yamamoto
 (Dept of Medical Biochemistry, Tohoku Univ Grad School of Med)

P-35) GATA 因子阻害を起点とした異所性エリスロポエチン発現誘導剤の開発

○金子寛¹、山本雅之²、清水律子¹ (¹東北大院・医・分子血液、²医化学)

P-36) GATA1 変異に起因した TMD/DS-AMkL の発症メカニズムの解析

○石原大嗣^{1,2}、長谷川敦史¹、山本雅之¹、清水律子² (¹東北大院・医・医化学、²分子血液)

P-37) マウス子宮内膜間質細胞増殖におけるリゾホスファチジン酸(LPA)シグナルの解析

○瀬川結花¹、可野邦行¹、藍川志津¹、青木淳賢¹,²(¹東北大院・薬・分子細胞生化学、²JST・CREST)

P-38) CRISPR/Cas9 system を利用した Gα遺伝子多重欠損細胞の作製

○石田覚¹、井上飛鳥¹¹²、新上雄司¹、青木淳賢¹³(¹東北大院・薬・分子細胞生化学、² JST・さきがけ、³ JST・CREST)

P-39) TGF α 切断アッセイによる GPCR リガンド探索

○岸貴之¹、井上飛鳥¹¹²、石黒純¹、青木淳賢¹¹³(¹東北大院・薬、² JST・さきがけ、³ JST・CREST)

P-40) 非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)モデルマウスにおける FGF19 投与の効果

○三浦雄貴¹、五十嵐洋平¹、平田祐介¹、野口拓也¹、松沢厚¹ (¹東北大院・薬・衛生化学)

P-41) RING 型ユビキチンリガーゼ TRIM48 による ASK1 活性化制御機構の解明

○森下徹、平田祐介、野口拓也、松沢厚 (¹東北大院・薬・衛生化学)

P-42) ノックアウトマウスを用いたプロテインホスファターゼ PPM1L の新規機能解明

藤田宏介¹、篠田康晴¹、永浦裕子¹、草野理恵¹、渡邊利雄²、松居靖久³、阪上洋行⁴、佐藤 達也⁵、舟橋淳一¹、大西素子⁶、田村眞理¹、〇小林孝安¹

(¹東北大・加齢研・プロジェクト研究推進分野、²奈良女子大・自然科学系・生物科学領域、³東北大・加齢研・附属医用細胞資源センター、⁴北里大・医・解剖、⁵東北大・学際フロンティア研、6中部大・応用生物 応用生物化学)

P-43) 妊娠高血圧腎症における DNA メチル化の関与

○内田多恵子、佐藤恵美子、津國由佳子、伏間智史、三枝大輔、佐藤博、高橋信行 (東北大院・薬・臨床薬学)

P-44) 妊娠高血圧腎症におけるカルニチン代謝の役割

○津國由佳子、佐藤恵美子、内田多恵子、伏間智史、三枝大輔、佐藤博、高橋信行 (東北大院・薬・臨床薬学)

P-45) エンドパーオキサイド構造を有する tetraoxane 化合物の遺伝子変異酵母とがん細胞に対する生物活性

〇ウスフバヤル ナランドラム 1 、上杉祥太 2 、髙野侑恵 1 、土屋英子 3 、佐々木麻乃 4 、嶋田和明 4 、木村賢一 1,2

(1岩手大院・農、2岩手大院・連合農、3広島大院・先端物質、4岩手大・工)

P-46) Ca²⁺シグナル伝達に関わる遺伝子変異酵母に作用する物質の RBL-2H3 細胞への効果

○大川佑介¹、小林 幹¹、東尾浩典²、塩野義人³、上杉祥太⁴、木村賢一¹,⁴ (¹岩手大院・農、²岩手医大・教養教育セ、³山形大・農、⁴岩手大院・連合農)

P-47) GSK3 阻害剤のヒト腫瘍細胞に対する増殖抑制効果の検討

○佐京智子、及川亜美、大久保美希、奈良場博昭、北川隆之 (岩手医大・薬・細胞病態生物学)

P-48) 膵癌細胞から放出される細胞外小胞エキソソームは血管新生を亢進させる

○千葉満¹、久保田栞²、佐藤このみ²、酒井彩花²、川村稚尋²、門前暁¹ (¹弘前大院・保健・医療生命科学領域 ²弘前大・医・保健学科検査技術科学専攻)

P-49) 間質細胞による胃がん細胞の浸潤抑制に働くがん細胞排除システムの解明

○伊藤剛、田中正光

(秋田大院・医・分子生化学)

P-50) 頭頸部がん幹細胞における CD271 の役割の解明

○望月麻衣¹、今井隆之³、松浦一登³、小鎌直子¹、玉井恵一²、本橋ほづみ⁵、菅村和夫⁴、田中伸幸¹

(宮城県がん・¹ がん先進治療開発研究部、² がん幹細胞研究部、³ 頭頸部外科、⁴ 発がん制御研究部、⁵ 東北大・加齢研・遺伝子発現制御分野)

P-51) 胆道癌がん幹細胞に発現する BEX2 の役割

〇玉井恵一 1 、中村真央 3 、小鎌直子 2 、渋谷莉恵 1 、望月麻衣 2 、山口壹範 3 、菅村和夫 3 、佐藤賢一 1 、田中伸幸 2

(宮城県がんセ研・1がん幹細胞、2がん先進治療、3発がん制御)

P-52) UVB 照射により、Ppp6c 欠損では、高頻度に皮膚扁平上皮癌が発生する

〇 加藤浩之 1,2 、田沼延公 1,2 、黒沢是之 1,2 、林克剛 1,2 、小河穂波 3 、野村美有樹 1 、渡邊 利雄 3 、島礼 1,2

(¹宮城がんセ・研・がん薬物療法、²東北大院・医・がん分子制御、³奈良女子大院・人間文化)

P-53) セクレトグラニン III が生体のインスリン生合成と分泌で果たす役割

○前田佳紀¹、工藤咲希¹、暮地本宙己²、村田知里³、鳥居征司³、渡部剛²、穂坂正博¹ (¹秋田県立大・生物資源科学、²旭川医大・解剖学、³群馬大・生体調節研究所)

P-54) 脳下垂体内分泌細胞の低酸素環境におけるホルモン分泌の解析

○佐藤瑛理¹、前田佳紀¹、暮地本宙己²、渡部剛²、穂坂正博¹ (¹秋田県立大・生物資源科学、²旭川医大・解剖学)

13:00-14:00 一般口演 (0-11~0-14)

座長: 那谷耕司(岩手医大・薬・臨床医化学)

0-11) ワールブルグ効果が腫瘍にもたらすもの

野村美有樹¹、坂本良美¹、盛田麻美¹、田中遼太¹、佐藤卓¹、渡邊利雄²、曽我朋義³、島礼¹、〇田沼延公¹

(1宮城がんセ・研・がん薬物療法、2奈良女大院・人間文化、3慶応大・先端生命)

0-12) 薬剤性急性肝障害に対するアスコルビン酸の肝臓保護作用

○倉橋敏裕¹、鍋島篤典²、齋藤由佳¹、李在勇¹、本間拓二郎¹、山田壮亮²、中山敏幸²、宮田哲³、藤井順逸¹

(¹山形大院・医・生化学分子生物学、 ²産業医大・第二病理学、 ³地域医療機能推進機構大 阪病院・内科)

0-13) 後天性自己免疫性出血病 FXIII/13 の原因となる自己抗体のエピトープ解析

○尾崎司、惣宇利正善、一瀬白帝

(山形大・医・分子病態学)

- 0-14) 水晶体の退縮と網膜の剥離を伴う劣性遺伝性小眼球ラット(Hirosaki Small Eye Rat; HiSER)の樹立とその原因遺伝子の解明
- ○山田俊幸¹、七島直樹^{1、2}、清水武史¹、土田成紀¹ (¹弘前大院・医・ゲノム生化学、²弘前大院・保健・生体機能)

14:00-14:10 授賞式

14:10-14:46 日本生化学会東北支部 優秀論文賞受賞講演

座長:藤井順逸(山形大院・医・生命環境医科学)

講演(1)New Zealand Black マウスが自然発症する自己免疫性溶血性貧血に対する赤血球酸 化ストレスの関与

金野祐(山形大院・医・生命環境医科学)

講演(2) 転写因子 NRF1 による細胞内チオール量及び脂質代謝経路の調節

辻田忠志(東北大院・医・医化学分野)

14:46-15:00 休憩

15:00-15:46 日本生化学会東北支部 奨励賞受賞講演

座長:福永浩司(東北大院・薬・薬理学)

講演(1) Gata1 と Gata2遺伝子ダイナミクスのネットワーク制御を基盤とした赤血球分化の 分子機構

森口尚(東北大院・医・医化学分野)

講演(2) ドパミン神経関連疾患における脂肪酸結合蛋白質 FABP3 の役割

塩田倫史(東北大院・薬・薬理学分野)

15:46-16:00 休憩

16:00-18:00 シンポジウム「思いもしなかった、がん研究の新展開」

特別講演(1)16:00-17:00

座長:本橋ほづみ(東北大・加齢研・遺伝子発現制御)

がん幹細胞を撲滅する:細胞周期研究から生まれた逆転の発想

中山敬一(九州大学教授)

特別講演 (2) 17:00-18:00

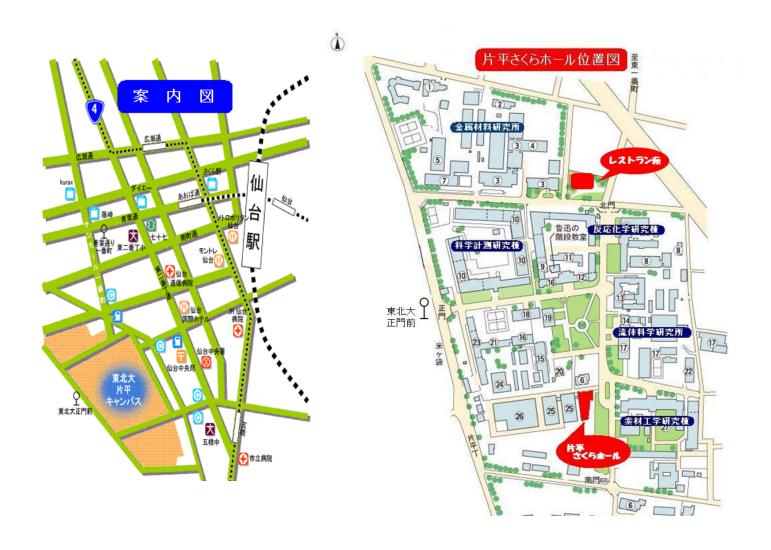
座長:山本雅之(東北大院・医・医化学)

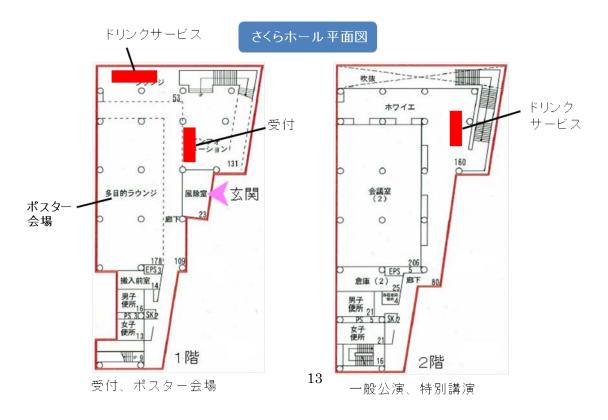
宿主の代謝システムを利用するがんのあざとい生存戦略

末松 誠 (慶応義塾大学客員教授)

18:05~18:10 閉会の辞

18:30~ 懇親会(レストラン萩)





仙台駅からのアクセス

仙台市営バス

仙台駅前の りば	行き先	下車停留所(所要時間)
9番のりば	宮教大・青葉台行 青葉通経由動物公園循環	■青葉通一番町 下車(約5分) のち徒歩(約10分)
11 番のりば	霊屋橋・動物公園経由緑ヶ丘三丁目行 霊屋橋・動物公園・日赤病院経由八木山南団地行	東北大正門前 下車(約10分)
12番のりば	霊屋橋・動物公園・西の平経由 長町南駅・長町(営)行	東北大正門前 下車(約10分)

仙台市営地下鉄

路線	行き先	下車駅(所要時間)
南北線	富沢行	□ 五橋駅 下車(約1分)のち徒歩(約10分)

徒歩

仙台駅西口より(約15分)

タクシー

仙台駅西口タクシープールより(約 10 分) ※所要時間は交通状況等により異なります。

特別講演(1)

がん幹細胞を撲滅する:細胞周期研究から生まれた逆転の発想

中山敬一

九州大学 生体防御医学研究所 • 分子医科学分野

抗がん剤の歴史は古く、そのルーツは約 100 年前に第一次世界大戦で使用された毒ガスに遡る。しかし抗がん剤だけでは、ほとんどのがんは根治できない。例外的に大成功を収めているイマチニブ(慢性骨髄性白血病の特効薬)ですら、がんを完全に根絶しているわけではない(投薬を止めれば高率に再発する)。従来の抗がん剤では、がん細胞は殺せても、がん"幹"細胞を殺すことができないのだ。その理由は、がん細胞は増殖期にいるが、がん幹細胞は静止期(G0期)という特殊なフェーズに留まっているため、増殖期を標的とする従来の抗がん剤は原理的に無効なのである。

われわれは、がん幹細胞には長期にわたって静止期(G0期)を維持する機構があると推定し、この静止期維持機構にユビキチンリガーゼ Fbxw7 による c-Myc のユビキチン依存性分解が大きなキーファクターとなっていることを突きとめた。 白血病モデルマウスにおいて Fbxw7 を条件的に欠損させると c-Myc が蓄積して一過性の増殖の後に白血病幹細胞の枯渇が起こる。 Fbxw7 の欠損と同時に抗がん剤投与を行うことによって、一過性の増殖なしに白血病の完全寛解に成功した。 つまり Fbxw7 の抑制によってがん幹細胞を静止期から追い出し、増殖を始めたところを従来の抗がん剤で叩くという「静止期追出し療法」が現実的にがん治療にとって有効であることを証明した。

しかし、Fbxw7の欠損は予期せぬ副作用を持つことが判明した。Fbxw7ノックアウトマウスではがん細胞の転移が異常に亢進していた。このがん転移促進効果は骨髄中の間葉系幹細胞におけるFbxw7欠損がケモカインCCL2産生を異常に亢進させることによって生じることを突き止めた。そこでCCL2の作用を阻害する既存薬プロパゲルマニウム(B型肝炎治療薬)をマウスに投与すると、がん転移は劇的に抑制されることを発見した。ヒトがん患者においてもマウスと同様に血中Fbxw7の低下と予後の悪化が正の相関を示すことがわかった。これらマウスおよびヒトの研究結果から、がん周囲環境におけるFbxw7はがん転移を抑制する重要な役割を持つことが明らかとなった。

特別講演(2)

宿主の代謝システムを利用するがんのあざとい生存戦略

○末松誠、山本雄広、大村光代、久保亜紀子、加部泰明 慶應義塾大学医学部医化学教室、JST ERATO 末松ガスバイオロジープロジェクト

極小分子であるガス分子は金属中心を有する補欠分子を持つタンパク質に結合し構 造を変えることによって細胞や個体の機能を制御することができる。機能未知のガス分 子受容体の探索に、我々は金属含有補欠分子を抱合したアフィニティナノビーズを用意 し、先に釣れてくるタンパク質を絞り込んで、そのリストの中からガス受容体を探索す る方法を見出した。一方、金属中心を有するタンパク質は「酵素」であるものが多い事 に着目すると、「ガス分子の添加(または生成抑制)」を摂動として代謝物のフットプリ ントを検出し、標的分子となる酵素の絞り込みをすることもできる。またアンモニアの ような脂溶性の高いガス分子は、大気圧下のイオン化で中性脂質と一緒にイオン化され る事を利用して、質量分析イメージング法で組織切片中のアンモニアの局在を画像化す る方法を開発し、担がん組織を使った質量分析でガス分子の分布の可視化を試みた。 これらの方法によって我々はストレス誘導性のガス分子である CO の受容体として、 PGRMC1 や cystathionine β-synthase (CBS)、などを見出した。前者はヘム結合タンパク 質としてへム依存性に2量体を形成することにより EGFR に結合し、がん細胞の増殖シグ ナルを増強するが、COが作用すると単量体となり増殖シグナルは抑制される。またCBS は CO により酵素活性が抑制される。CBS 阻害は再メチル化回路の制御に関与し、がん細 胞に発現するメチル化した PFKFB3 を脱メチル化させることによってブドウ糖の代謝を ペントースリン酸回路ヘシフトさせ、NADPH の供給に寄与し、酸化ストレス耐性を獲得 する。また NOG マウスにヒト由来大腸がん細胞株を移植した肝転移モデルにおける解析 では、転移巣における glutaminolysis で生じたアンモニアが肝臓実質の中性脂質に溶け こむことで腫瘍周囲の肝臓組織に集積し、宿主の尿素回路による分解を受けることを明 らかにし、がん細胞自らの毒性回避機構として利用していることが明らかになった。こ れらの知見の集積には低分子代謝物の局在を顕微鏡レベルの分解能で解析できる Imaging MS や表面増強ラマンイメージング技術が大きな役割を果たした。講演ではがん 細胞の代謝システムにおけるあざとい生存戦略機構を報告する。

(関連文献)

- 1. Morikawa T, et al. **PNAS** 2012, 109(4), 1293-1298
- 2. Yamamoto T, et al, Nat Commun 2014, 5, 3480. doi:10.1038/ncomms4480.

優秀論文賞受賞講演(1)

New Zealand Black マウスが自然発症する自己免疫性溶血性貧血に対する赤血球酸化ストレスの関与

○金野祐、大槻 倫之、倉橋 敏裕、岐部紀子、角田智志、井内良仁、藤井順逸 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 (現所属:神戸大学大学院 医学研究科 生化学・分子生物学講座 シグナル統合学分野)

自己免疫性溶血性貧血(Autoimmune hemolytic anemia; AIHA)は、赤血球に対する自己抗体が産生されることで生じる溶血性貧血であるが、発症の原因は未だに解明されていない。本研究室ではこれまでに、抗酸化酵素スーパーオキシドジスムターゼ1(SOD1)のノックアウトマウスが AIHA に類似した表現型を示すことを報告したが、この知見は、酸化ストレスが AIHA 発症の原因の一つとなっている可能性を示唆していたため、本研究では、AIHA を自然発症する病態モデルの New Zealand Black (NZB)マウスを用いて、全身性の SOD1 ノックアウトマウス(KO)、GATA1 プロモーターにより赤血球特異的にヒトSOD1を発現するトランスジェニックマウス(Tg)、両マウスの交配により得られるノックアウト;トランスジェニックマウス(KO;Tg)を作出し、野生型を含めた4系統のNZBマウスの赤血球酸化ストレスと AIHA の発症、増悪との関係について解析した。

マウス尾静脈より単離した赤血球を主なサンプルとして、血球数と抗赤血球自己抗体の測定から AIHA の症状の経時的な変化を解析した。さらに赤血球酸化障害の評価として、酸化ヘモグロビンのメトヘモグロビン、赤血球膜及び血漿中の脂質過酸化物、抗酸化酵素ペルオキシレドキシンの過酸化体、酸化ストレスによる酸化分解を受けやすいグルタチオンペルオキシダーゼ(GPX)のタンパク含量、赤血球内の主要な抗酸化酵素である SOD、カタラーゼ、GPX の酵素活性等を測定した。

解析の結果、KOマウスは赤血球の酸化傷害が亢進しており、AIHAを発症する野生型よりも早期に赤血球自己抗体が産生され、より深刻な貧血を伴って死亡していくのに対し、Tg および KO;Tg マウスでは有意に生存率が改善し、赤血球の酸化傷害を抑えると同時にAIHA の発症も抑制された。

以上より、免疫抑制剤や輸血、脾臓摘出といった従来の治療法に加え、赤血球酸化ストレスを軽減させることで AIHA の発症や増悪を緩和できる可能性が示唆された。

優秀論文賞受賞講演(2)

転写因子 NRF1 による細胞内チオール量及び脂質代謝経路の調節

辻田忠志

東北大学 大学院医学系研究科 医化学分野

NRF1 は NF-E2 p45、NRF2、NRF3、BACH1、BACH2 とともに CNC-bZip ファミリーに属する転写因子であり、小 MAF 因子群とヘテロ二量体を形成し、抗酸化応答(ARE)配列に結合することで転写を制御している。これらの CNC 因子を全身で欠失したマウスの中で、NRF1を欠失したマウスは唯一胎生致死の表現形を示す。他の CNC 因子も同様に ARE 配列を認識し、同じような標的遺伝子を制御すると考えられているが、なぜ NRF1 欠失マウスの表現型だけが他の CNC 因子と大きく異なることは長い間明確ではなかった。そこで、NRF1の条件付き欠失マウスと 3 メチルコランスレンによって肝特異的に Cre 組み換え酵素を誘導できるマウス (*CYP1A1-Cre*)を掛けあわせ、NRF1を成獣肝で安定した欠失を可能とし、解析に供した。

本 NRF1 欠失マウスは著明な非アルコール性脂肪肝(NAFLD)を安定して形成した。NAFLD は酸化ストレスの亢進が関与すると示唆されていたため、肝臓のグルタチオン(GSH)含量を測定したところ、予想に反して、GSH が著明に蓄積していることを見いだした。その原因はシスチンの取り込み過剰にあり、シスチン一グルタミントランスポーターxCT 遺伝子の発現亢進にあることを突き止めた。一方、NAFLD の主症状である脂質の異常蓄積の原因解明には脂質メタボロミクス解析を適用し、NRF1 欠失肝においてトリグリセリド由来の脂肪酸が多く蓄積する事実を見出し、脂肪酸を多く含むカイロミクロンや VLDLの取込みに関与する Apoer2、VIdIrや LdIr受容体の遺伝子発現が亢進することを明確にした。以上の結果から、NRF1 はシスチンや脂質の過剰な取り込みを抑制する役割を持つことが明らかとなった。このように、通常 NRF1 は不必要な転写を抑制制御しており、酸化ストレス条件下では、蓄積した NRF2 に ARE 領域を明け渡すことで転写活性化されるという、2段階の転写調節機構があることを提唱した。今後も、最近新規に見出した NRF1 特異的な活性誘導剤を活用して、NRF1 と NRF2 による転写調節機構の解明に挑んでいきたい。

奨励賞受賞講演(1)

Gata1 と Gata2遺伝子ダイナミクスのネットワーク制御を基盤とした 赤血球分化の分子機構

森口尚

東北大学 大学院医学系研究科 医化学分野

GATA1とGATA2は造血に必須の転写因子である。赤血球分化過程では、GATA2優位か らGATA1優位へと発現レベルが変化し、GATA因子スイッチングが起こる。我々は、BAC (大腸菌人工染色体) レポータートランスジェニックマウスと、染色体上でのシスエレ メントターゲッティングマウスを基盤としたシス制御領域解析手法により、GATA因子ス イッチングの分子メカニズムとその生理的意義の解明に取り組んできた。赤血球分化過 程でのGata1遺伝子発現レベル増加には、Gata1遺伝子制御領域内の複数のGATA配列への、 GATA2結合からGATA1結合へのスイッチングを介した転写活性化が重要であることを 明らかにした。一方、造血幹細胞ではGatal遺伝子発現は低レベルに抑制されている。こ の抑制メカニズムには、Gatal遺伝子上流制御領域へのDNAメチル基転移酵素のリクルー トによる、Gatal遺伝子座のDNAメチル化維持機構が重要であることを明らかにした。造 血幹細胞でのGatal遺伝子発現抑制機構を阻害すると、GATA1過剰発現により造血幹細胞 の赤血球系列への分化が誘導され、造血系の恒常性が障害された。ヒトGATA1遺伝子上 流および下流隣接領域にはインスレーター配列が存在し、CTCF (CCCTC-binding factor) の結合が検出された。このインスレーター配列は、ヒトGATAI遺伝子座の高次クロマチ ン構造を維持し、貧血誘導時のGATAI遺伝子発現を活性化させるために重要な役割を担 うことを明らかにした。GATA1およびGATA2の発現量低下や、その遺伝子変異を伴う血 液疾患が報告されているが、その発症メカニズムは未解明である。本研究で明らかにし てきたGata1およびGata2遺伝子制御領域の多型や変異が、これらヒト血液疾患の病態と リンクし、そのメカニズム解明につながる可能性があると考えている。

奨励賞受賞講演(2)

ドパミン神経関連疾患における脂肪酸結合蛋白質 FABP3 の役割

塩田倫史

東北大学 大学院薬学研究科 薬理学分野

長鎖不飽和脂肪酸は高次脳機能の調節に関与することが示唆されている。例えば n-3 系長鎖不飽和脂肪酸であるドコサヘキサエン酸、エイコサペンタエン酸は統合失調症の 情動異常や認知機能低下を改善すること、 n-6 系長鎖不飽和脂肪酸であるアラキドン酸 はアルツハイマー病等の老化に伴う記憶学習の低下を改善することが報告されている。 これらの長鎖不飽和脂肪酸の細胞内輸送には脂肪酸結合蛋白質である fatty acid binding proteins (FABPs) が必要である。FABP 分子ファミリーの中で、脂肪酸結合タンパク質 3 (Fatty acid binding protein 3; FABP3/H-FABP) のみが成熟神経細胞に発現する。 私達はドパ ミン D2 受容体のアイソフォームである D2L 受容体細胞内第 3 ループの 29 アミノ酸 残基に FABP3 が特異的に結合し、 D2L 受容体の機能を制御していることを明らかに した (J Neurosci. 2010)。具体的には、皮質-線条体のグルタミン酸神経終末と線条体アセ チルコリン神経に発現する D2L 受容体には FABP3 が結合しており、D2L 受容体の機 能を高めていることを証明した。また、 FABP3 はパーキンソン病の原因であるシヌク レイノパチーの発症に関与することを明らかにした (J Biol Chem. 2014)。パーキンソン病 は黒質ドパミン神経細胞の変性を伴う錐体外路障害を呈する疾患であり、その病態発症 には α シヌクレインの不飽和脂肪酸との結合による多量体形成が関与すると考えられて いる。私達は、FABP3 がαシヌクレインの多量体形成を促進することを明らかにした。 FABP3 はパーキンソン病を含むレビー小体病患者の血清において高発現しており、バイ オマーカーとして注目されている。さらに、ヒト及びげっ歯類においてアラキドン酸の 過剰な摂取はパーキンソン病のリスクを増大させることが示唆されている。本研究によ り、黒質ドパミン神経細胞における α シヌクレイン凝集体形成の一因として FABP3 と の複合体形成増加が関与することが明らかになった。

小タンパク質 MOZART1 による線虫 γ-・チューブリン複合体の制御機構

○春田奈美、杉本亜砂子

東北大院 • 生命科学研究科

 γ -tubulin は、中心体をはじめとする微小管形成中心(MTOC)に集積し、微小管の形成を促進する。 γ -tubulin は、 γ -tubulin と GCP2, GCP3 で構成される γ TuSC (γ -tubulin small complex)と、複数の TuSC と他の構成因子からなる γ TuRC (γ -tubulin ring complex)と呼ばれる環状の複合体を形成する。 γ -tubulin 複合体 (γ TuC)は、微小管のマイナス末端に結合し微小管形成の鋳型となるが、微小管形成能の制御機構は明らかではない。我々は、これまで線虫 C. elegans の γ TuC の解析を通じて新規の構成因子を同定し、線虫の γ TuC が他の生物と比較して特殊な進化をしていることを示してきた。

MOZART1 は、 γ TuC に含まれる小タンパク質(<100 a.a.)で、出芽酵母を除く真核生物に広く保存されている。ヒト細胞では、MOZART1 ノックダウンの表現型は、 γ -tubulin ノックダウンと同様の紡錘体形成異常を示す。線虫のゲノムにも相同性は低いがMOZART1 のオルソログと考えられる未解析遺伝子(以下 *Ce-MOZART1* と呼ぶ)が保存されている。そこで本研究では、この遺伝子産物の機能を解析し、線虫 γ TuC における役割を調べた。

線虫初期胚を用いたライブイメージングにより、GFP-Ce-MOZART1 は、 γ -tubulin、 γ TuC 構成因子 GIP-1(GCP3 オルソログ)とともに、細胞周期を通じて中心体に局在していることが示された。GFP-Ce-MOZART1 の局在はこれらのタンパク質に依存していた。一方、Ce-MOZART1 を RNAi でノックダウンすると、 γ -tubulin および GIP-1 の中心体における局在は著しく減少し、紡錘体の形成異常を示した。また、酵母ツーハイブリット法により、MOZART1 の分裂酵母やシロイヌナズナのオルソログと同様に、Ce-MOZART1は GIP-1の N 末端と強く結合することが示された。GIP-1の N 末端領域は、 GIP-1と GIP-2(GCP2 オルソログ)間の相互作用に影響をおよぼすことから、Ce-MOZART1は GIP-1の N 末端領域に結合して γ TuC の複合体形成を制御する可能性が高い。これらの結果から、Ce-MOZART1は線虫の γ TuC においても必須の構成因子であり、 γ TuC の形成と中心体への局在化に重要な役割を果たしていることが示唆された。

細胞増殖抑制時の一次繊毛形成における TTBK2 キナーゼの機能解析

○永井友朗、小田聡明、千葉秀平、水野健作

東北大・院・生命科学

一次繊毛はほとんどの動物細胞の表面に形成される、微小管を軸糸とした突起構造であ り、細胞外の化学的・機械的刺激を受容するアンテナとしての機能を有する。一次繊毛 の正常な形成と機能は個体の発生や恒常性の維持に重要な役割を担っており、その異常 は多発性嚢胞腎・糖尿病・網膜色素変性症・内臓逆位・多指症などの症状を示す繊毛病 と呼ばれる疾患を引き起こす。一般的に一次繊毛の形成は、細胞休止期に起こり分裂期 では抑制されていることから、細胞増殖と相反する関係にある事が知られているが、細 胞増殖抑制時依存的な一次繊毛形成の機構は不明である。中心体タンパク質である CP110 は、分裂期には中心体遠位末端に局在し一次繊毛形成を阻害しているが、細胞増 殖抑制時には母中心小体から解離するため、CP110 の母中心小体からの解離は一次繊毛 形成に必須の初期過程であると考えられている。カゼインキナーゼ1ファミリーに属す るセリン/スレオニンキナーゼである Tau tubulin kinase-2 (TTBK2)は、細胞増殖抑制 期依存的に母中心小体にリクルートされ、CP110 の解離や一次繊毛形成に必須の役割を 担っているが、TTBK2 の母中心小体局在化機構や一次繊毛形成促進の分子機構は不明で ある。本研究で、私たちは一次繊毛形成時における TTBK2 の機能解析を行った。まず TTBK2 の母中心小体への局在化機構を解析し、母中心小体タンパク質である Cep164 が TTBK2 のリクルートに必須であることを明らかにした。TTBK2におけるCep164結合領域として、 C 末端側のプロリンリッチ領域を同定し、この領域を除いた TTBK2 変異体では中心体へ の局在が損なわれることを見出した。また、TTBK2 のノックダウンによる CP110 解離の 阻害や一次繊毛形成の阻害効果が、この変異体の発現で回復しないことを見出した。以 上の結果から、Cep164 を介した TTBK2 の母中心小体への局在は、CP110 の解離と一次繊 毛形成に必須であることを解明した。さらに、一次繊毛形成時における TTBK2 のリン酸 化基質として Cep164 と CP110 結合タンパク質の Cep97 を同定し、特に TTBK2 による Cep164 のリン酸化は Dishevelled との結合を阻害することを見出した。

効率的な染色体整列における Kid 及び CENP-E の役割

○家村顕自、田中耕三

東北大・加齢研・分子腫瘍学研究分野

S 期で複製された染色体を分裂期において娘細胞に均等分配することは、細胞の恒常性を維持する上で必須の機構である。染色体を均等分配するためには全ての染色体が紡錘体の赤道面に移動し整列する必要がある。これまで、染色体の赤道面への移動は染色体中央部の動原体が微小管末端と結合(末端結合)し、微小管の重合・脱重合によって行われるモデルが考えられていた。しかし近年、動原体はまず微小管側面に結合(側面結合)し、分裂期の進行とともに微小管側面を沿って赤道面へ移動した後に末端結合に変換されることが示された。一方で、この微小管側面に沿った染色体の移動における分子機構は不明である。そこで我々は、側面結合染色体の移動を担う分子基盤を解明するため、既に染色体の移動への関与が既知なモーター分子 Kinesin-7/CENP-E と、染色体腕部に局在するモーター分子 Kinesin-10/Kid に着目し側面結合染色体の移動への関与を検証した。

側面結合染色体の赤道面への移動を模倣するため、末端結合形成に必須な分子 Hecl を発現抑制し、染色体動態を詳細に観察した。Hecl と Kid を共発現抑制すると、側面結合染色体の赤道面への移動が抑制され、Hecl と CENP-E を共発現抑制すると、大部分の側面結合染色体が赤道面に集合した。これらの結果から、Kid が側面結合染色体の赤道面への移動に関与し、CENP-E は側面結合染色体の赤道面への移動を抑制することが示唆された。次に、分裂期において微小管脱重合を担う分子を Hecl 及び Kid もくしは CENP-E と共発現抑制し、紡錘体微小管を安定化したところ、CENP-E は微小管の安定性に依存して側面結合染色体の赤道面への移動に寄与する可能性が示唆された。

以上の結果を踏まえ我々は、Kid が分裂期初期に側面結合染色体を赤道面へ運搬し、 分裂期進行に伴い微小管が安定化すると CENP-E が染色体の赤道面への移動に寄与する という染色体整列における 2 種類のモーター分子の協調的な制御機構を新たに提唱した い。

FUS は GluA1 mRNA 安定性の調節を介してシナプス機能及び FTLD 様行動を制御する

〇宇田川剛^{1,5}、藤岡祐介¹、田中基樹²、本田大祐¹、横井聡¹、衣斐大祐³、永井拓³、山田清文³、渡辺宏久¹、勝野雅央¹、大野欽司⁴、稲田利文⁵、曽我部正博²、岡戸晴生⁶、石垣診佑¹、祖父江元¹

¹名古屋大院・医・神経内科学、²メカノバイオロジー・ラボ、³医療薬学・医学部付属病院薬剤部、⁴神経遺伝情報学、⁵東北大院・薬・遺伝子制御薬学分野、⁶東京都医学総合研・分子神経生理研究部門

目的: FUS は筋萎縮性側索硬化症(ALS)、及び前頭側頭葉変性症(FTLD)の原因となる RNA 結合タンパク質である。今回われわれは FUS の機能喪失がシナプスにおけるタンパク質発現、機能、形態、及び高次行動に及ぼす影響を解析し、FTLD の病態発現への寄与を調査した。

方法: shRNA を発現するレンチウィルスベクターの感染、AAV ベクターの定位注入により、 それぞれ培養神経細胞、マウス海馬における FUS のノックダウンを行い、生化学的、電 気生理学的、細胞生物学的解析、及び高次行動解析を行った。

結果・結語:培養神経細胞のFUS ノックダウンにおけるシナプス関連タンパク質の発現解析から、新規なFUS 標的として AMPA 受容体サブユニット GluA1 を同定した。さらに、FUS は GluA1 mRNA のポリ(A) 鎖の長さの調節を介して、mRNA の安定性を制御することを明らかにした。培養細胞における FUS の欠失は AMPA 受容体のシナプス表面発現、及びシナプス伝達の異常を引き起こし、マウス海馬における FUS ノックダウンはシナプス成熟、シナプス伝達の異常、及び、多動、脱抑制、社会性行動の異常といった FTLD 様の行動異常を示した。さらに、FUS ノックダウンにおけるシナプス成熟の異常、及び行動異常については GluA1 の発現による改善が観察された。これらの結果は FUS が GluA1 mRNA の安定性、ポストシナプス機能、FTLD 様行動の制御に重要な役割を担うことを示している。

脳内ヒスタミンのクリアランス機構について

〇吉川雄朗¹、長沼史登¹、三浦大和¹、矢内敦^{1,2}、堀米愛¹、中村正帆¹、望月貴年²、谷内一彦¹

1東北大院・医・機能薬理、2ハーバード大・神経科学

ヒスタミンはアレルギー反応や胃酸分泌に関わっているが、脳内では神経伝達物質とし て機能している。脳内ヒスタミンは睡眠や学習、ストレス応答など多彩な生理現象、更 にはうつ病やアルツハイマー病、てんかんといった多くの神経疾患との関連が明らかと なっている。しかしながら、これまでのヒスタミン神経系の研究はヒスタミン受容体や ヒスタミン合成酵素に着目したものがほとんどで、ヒスタミン代謝酵素やトランスポー ターに関する研究は限られていた。我々はまず in vitro の系でヒスタミンクリアランス について検討し、細胞外ヒスタミンが plasma membrane monoamine transporter (PMAT) あるいは organic cation transporter 3 (OCT3) によって細胞内へと輸送されること、 更には細胞内で histamine N-methyltransferase (HNMT) によって代謝されることを明 らかにした。次に PMAT と OCT3 に対して阻害作用を有する imipramine をマウスに投与し たところ、脳内遊離ヒスタミン量が増加したため、これらのトランスポーターが生体内 でヒスタミンの輸送機構として機能していると考えられた。また HNMT のノックアウトマ ウスを解析したところ、この KO マウスにおいて脳内ヒスタミン量が増加すること、睡眠 覚醒サイクルに異常が生じること、攻撃性が上昇することが明らかとなった。以上のこ とから、PMAT、OCT3、HNMTが協調してヒスタミン濃度を調節することが、脳内ヒスタミ ン系の維持に重要である可能性が考えられた。

Fas 感受性を調節するキナーゼ群の探索

○野口拓也、土田芽衣、平田祐介、松沢厚

東北大院・薬・衛生化学分野

Fas リガンドやTRAIL といったサイトカインはアポトーシス誘導能を有することから、これらの受容体を介するシグナル伝達経路は、癌治療における有望な標的経路として注目されている。しかしながら、多くの腫瘍細胞がFas リガンドやTRAIL に耐性を示すことから、有効な癌治療法開発のためには、これらに対する耐性機構を明らかにする必要がある。一方で、アポトーシスの誘導機構においては、アポトーシス実行因子の同定がなされたことにより、その全容が明らかにされつつあるが、個々のアポトーシス実行因子の活性化制御機構においては未だに不明な点が多く、アポトーシスの感受性がどのように決定されているか、その分子機構の解明には解析の余地が残されている。

そこで我々は、Fas リガンドが誘導するアポトーシスの感受性調節機構に関与する因子のスクリーニングを行うことにした。特に、カスパーゼ-8をはじめとしたアポトーシス誘導におけるリン酸化修飾を受けることが報告されているが、アポトーシス誘導におけるリン酸化修飾の役割はほとんど明らかにされていないことから、キナーゼによるアポトーシス調節機構に着目した。キナーゼ特異的な siRNA ライブラリーを用いて、ヒトに発現するキナーゼおよびそのサブユニット約 690 遺伝子を個別にノックダウンし、Fas リガンド存在下における細胞生存率を測定することで Fas リガンドに耐性を示すノックダウン細胞を探索した。その結果、8種類のキナーゼのノックダウン細胞が Fas リガンドに耐性を示すことが明らかになった。すなわち、この8種類のキナーゼは Fas リガンドによるアポトーシスの感受性を亢進させる機能を持つことが示唆された。現在、アポトーシス誘導におけるそれぞれのキナーゼの役割を解析しているが、本会では、その中でも比較的解析が進んでいるセリン・スレオニンキナーゼ LKB1/STK11 について議論したい。

0-7

造血幹細胞における KEAP1-NRF2 制御系の機能解析

○村上昌平1、山本雅之2、本橋ほづみ1

¹東北大・加齢研・遺伝子発現制御学分野、²東北大院・医・医化学分野

KEAP1-NRF2 制御系は、外因・内因性のストレスに応答する生体防御機構である。転写 因子 NRF2 は、通常条件下において KEAP1 依存的に分解されるが、ストレス曝露下にお いては安定化し、抗酸化酵素・解毒代謝系酵素の発現を誘導する。近年、同制御系の機 能はストレス応答にとどまらず、細胞の増殖・分化に寄与することが明らかになりつつ ある。一方、組織幹細胞はその多くが通常状態において静止期に維持されているが、組 織障害などのストレス曝露下においては、増殖・分化を促進することが知られている。 本研究では、幹細胞の増殖・分化制御における KEPA1-NRF2 制御系の機能を明らかにす るため、特に造血幹細胞に着目した。実験方法としては、Keap1^{FF}::Mx1-Cre および Keap1^{FF}::Vav1-Cre マウスを用いて、NRF2 の活性化が造血幹細胞に及ぼす影響を評価し た。まず、骨髄移植実験により造血幹細胞の骨髄再建能を検討したところ、Keap1 遺伝 子欠損マウス由来の造血幹細胞は再建能の低下を示し、2 次移植後にはほぼ完全に枯渇 した。Keap1::Nrf2 の 2 重欠失造血幹細胞は骨髄移植における骨髄再建能の低下を免れた ことから、NRF2 の恒常的な活性化が造血幹細胞の枯渇の原因であると示された。この 機序を明らかにするために細胞周期を検討したところ、Keap1 欠損造血幹細胞では GO 期に存在する細胞が減少しており、NRF2 の安定化により細胞周期エントリーが促進さ れていることがわかった。NRF2 誘導剤を投与して一過性に NRF2 を安定化させた場合 でも、造血幹細胞の細胞周期エントリーの促進が観察された。一方、Keap1 欠損造血幹 細胞において、細胞死および移植後のホーミング能力には変化が認められなかった。し たがって、Keap1 欠損造血幹細胞における骨髄再建能の低下は、NRF2 活性化による細胞 周期の亢進が原因であると考えられた。現在、その分子機構を明らかにすべく、造血幹 細胞における遺伝子発現変化を調べ、新規 NRF2 標的遺伝子の探索を試みている。本研 究から、NRF2は静止期に維持された造血幹細胞の活性化をもたらすと結論づけられる。 このことから、KEAP1-NRF2 制御系は細胞の環境変化を認識し、組織幹細胞の維持や増 殖・分化を制御するものと考えられる。

ガングリオシド GM3 合成酵素の細胞内トラフィック機構の解析

○宍戸史¹, 上村聡志², 樫村まどか¹, 井ノ口仁一¹

1東北薬科大・分子生体膜研・機能病態分子,2青山学院・理工

ガングリオシドはシアル酸を含有する糖脂質の総称で、主に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(ラフト)と呼ばれる微小領域を形成している.脂質マイクロドメインは、エンドサイトーシスやシグナル伝達の中継地点として機能し、細胞の接着、分化、増殖などに関与していると考えられている.我々が注目している St3gal5(GM3/GM4 synthase)は、ガングリオ系ガングリオシドの中で最初に生合成される糖脂質である GM3 を合成する酵素であり、ガングリオシドファミリー発現の律速酵素である.これまでの研究により、細胞膜のガングリオシドは生体恒常性の維持に重要であり、その発現異常は様々な病態と密接に関連していることがわかっている.よって、ゴルジ体における GM3 生合成の制御機構を理解する事は極めて重要である.

II 型の膜タンパク質である糖転移酵素の膜貫通領域近傍(細胞質側)に存在する [R/K](X)[R/K]配列は、Small GTPase の Sarl と相互作用する事により小胞体搬出シグナルとして機能すると報告されている。しかしながらこの検討は、内腔側を GFP に置換したキメラタンパク質を細胞に一過性に発現させる実験系でのみ行われており、全長の糖転移酵素において [R/K](X)[R/K]配列が小胞体搬出シグナルとして機能しているかは不明であった。本研究では、安定発現させた全長の St3gal5 において $^2R^3R(X)_5^9K(X)_3^{13}K$ 配列(ここでは R/K-based motif とする)が小胞体搬出に関わる新たなシグナル配列である事を明らかにするとともに、これらシグナル配列の変異体では、細胞内局在/トラフィックが異常になり、内腔側領域の N 型糖鎖の成熟と酵素の安定性が減少する事を見出した。本学会では、細胞質領域の R/K-based motif と内腔側領域の N 型糖鎖修飾の両方が小胞体搬出とゴルジ体繋留に重要であることを示し、GM3 の生合成制御機構について述べる.

NRF2 protects sickle cell disease model mice from inflammation and organ damages

○ Nadine Keleku-Lukwete^{1,4}、鈴木未来子²、大槻晃史¹、土田恒平¹、片山紗乙莉¹、 林真貴子¹、森口尚¹、田邉修³、今泉益栄⁴、山本雅之^{1,3}

¹ 東北大院・医・医化学分野、²RI センター、³ 東北大・東北メディカルメガバンク機構・ ゲノム多型機能解析分野、⁴宮城県立こども病院・血液腫瘍科

Sickle cell disease (SCD) is a heritable disorder caused by a missense point mutation in hemoglobin β chain, leading to the production of abnormal sickle-shaped red blood cells (RBCs). These sickle RBCs are prone to intravascular hemolysis, which causes inflammation and vaso-occlusion resulting in damages in multiple organs. NRF2 is a master regulator of antioxidant cell defense system. To examine contribution of NRF2 activation to SCD, we used SCD model mice bearing human mutated globin loci. Since NRF2 protein is negatively regulated by KEAP1 in normal conditions, the SCD mice were crossed with Keap1 hypomorphic knockdown (Keap1^{flox/-}) mice to generate SCD::Keap1^{flox/-} compound mutant mice, in which NRF2 was constitutively activated. Histological analyses of the liver, lung and kidney revealed that congestion, inflammation and necrosis were much lower in the SCD::Keap1^{flox/-} mice than simple SCD mice. Moreover, mRNA levels of inflammatory cytokines and adhesives molecules (IL-6, VCAM and P-selectin) that promotes vaso-occlusion were relieved in the aorta of SCD::Keap1^{flox/-} mice. While hemolysis rate of SCD::Keap1^{flox/-} mice did not change compared to the SCD mice, the plasma burden of heme was significantly reduced. These results indicate that NRF2 induction prevents organ damages and inflammation in SCD mice. This implies that NRF2 activation will be an important means to protect organs and improves conditions of SCD related to the oxidative stress.

親電子性シグナル制御破綻による有機水銀毒性発現機構

〇笠松真吾 1,2 、居原 秀 2 、津々木博康 2,3 、石崎健勝 2 、井田智章 1 、藤井重元 1 、澤 智裕 3 、熊谷嘉人 4 、赤池孝章 1

¹ 東北大院・医・環境保健医学分野、² 大阪府大院・理・生物科学専攻、³ 熊本大院・生命・ 医学系微生物学分野、⁴ 筑波大・医学医療系・環境生物学研究室

【目的】メチル水銀(MeHg)などの有機水銀化合物は自然界にユビキタスに存在する親電子性の有害物質であるが、有機水銀毒性発現の分子メカニズムについては未だ不明な点が数多く残っている。我々は最近、NO・活性酸素(reactive oxygen species, ROS)シグナルの親電子性2次シグナル分子である8-ニトログアノシン-3',5'-環状1リン酸(8-nitro-cGMP)が心筋において細胞老化シグナルとして機能すること、また、そのシグナル活性が活性イオウ分子によって負に制御されていることを報告した。そこで本研究では、活性イオウ分子に注目し、MeHgの毒性発現機構における8-nitro-cGMPの関与およびその下流シグナル機構について解析を行った。

【方法】Wister rat より調製した小脳顆粒神経(cerebellar granule neuron, CGN)細胞初代培養系を用いて、MeHg 処理による ROS と活性イオウ分子、8-nitro-cGMP 産生への影響を検討した。またその下流のシグナルの解析として、H-Ras/ERK シグナル経路の活性化をウエスタンブロット(WB)にて解析した。さらに、MeHg 中毒モデルラットの脳切片について、免疫染色を行い、*in vivo* での知見を得た。また、活性イオウ分子による8-nitro-cGMP および MeHg の代謝産物への MeHg の影響についても解析を行った。

【結果・考察】MeHg 処理により、CGN 細胞内で活性イオウ分子産生の減少および ROS、8-nitro-cGMP 産生の増加を確認した。WB 解析の結果、MeHg 処理により H-Ras/ERK の活性化が認められた。さらに MeHg 中毒モデルラット脳切片の免疫染色から、MeHg 投与により小脳プルキンエ細胞において 8-nitro-cGMP の増加が観察された。今回得られた結果から、MeHg は活性イオウ分子による親電子性シグナル制御機構を破綻させることで、H-Ras/ERK シグナル経路を介して神経毒性を示している可能性が示唆された。

ワールブルグ効果が腫瘍にもたらすもの

野村美有樹¹、坂本良美¹、盛田麻美¹、田中遼太¹、佐藤卓¹、渡邊利雄²、曽我朋義³、 島礼¹、○田沼延公¹

1宮城がんセ・研・がん薬物療法、2奈良女大・院・人間文化、3慶応大・先端生命

がんにおける代謝制御の重要性が明らかになってきた。なかでも、ワールブルグ効果と呼ばれる形質は、がん代謝の古典である。この現象は、誤解されることも多いが、もともと"酸素が十分に存在しても、好気呼吸が活性化しない"状態を指す。定説では、この形質が、がんに様々な代謝上の利点をもたらすとされるのだが、、実際はどうなのだろうか?

解糖系の最終ステップを触媒するピルビン酸キナーゼ M には、選択的スプライシングで生じる、酵素学的性質の異なる 2 つの isoform (Pkm1 と Pkm2) が存在する。これらPkm-isoform の発現切換え (Pkm スイッチ) は、解糖系から好気代謝へと向かうグルコース由来炭素源の流束決定において重要と考えられている。我々は、マウスでの遺伝子改変により、個体レベルで、Pkm スイッチを不能化することに成功した。それらマウスモデルの解析で得られた結果を中心に、がんにおけるワールブルグ効果の意義について考察したい。

薬剤性急性肝障害に対するアスコルビン酸の肝臓保護作用

○倉橋敏裕¹、鍋島篤典²、齋藤由佳¹、李在勇¹、本間拓二郎¹、山田壮亮²、中山敏幸²、 宮田哲³、藤井 順逸¹

¹ 山形大院・医・生化学分子生物学、² 産業医大・第二病理学、³ 地域医療機能推進機構大阪病院・内科

アセトアミノフェン(AAP)は、適量を摂取する限りは安全な解熱・鎮痛剤であるが、過剰摂取により急性肝炎を引き起こし、欧米では薬剤性急性肝障害の原因として最多を示す。AAP過剰摂取による肝障害では、グルタチオン(GSH)の枯渇やミトコンドリア傷害等による酸化ストレスの亢進が直接の原因と考えられている。GSHの枯渇を補い治療することを目的として、その前駆体となる N-acetylcysteine (NAC)の投与が行われるが、合成化合物であることから副作用の問題が残る。我々は抗酸化能を有するアスコルビン酸(AsA)が AAP による肝障害からの保護に働くことを見出したので、本研究では AsA による肝臓保護の機構について検討した。

ヒトをはじめとする霊長類はAsAを合成できないが、マウス等のげっ歯類はグルコースから合成できるため、AsA の作用を解析する実験には適さない。そこで AsA 合成能が野生型 (WT) マウスの約1割まで低下している AKRIA-KO マウスを用いて解析を行った。AAP (200 mg/kg) を腹腔内投与後、血漿 ALTを測定して肝障害の程度を推定し、肝臓の病理学的解析を行って障害を確認した。その結果、WT マウスに比べ、AKRIA-KO マウスでは激しい肝障害が認められた。この投与量では、WT マウスは回復したが、AKRIA-KO マウスの約3割は3日以内に死亡した。この AKRIA-KO マウスで認められた AAP の強い肝障害は、AsA(1.5 g/L)を飲水として投与することで緩和され、死亡したマウスも減少した。酸化障害マーカーである脂質過酸化物量を測定したところ、AAPを投与した AKRIA-KO マウスでは WT マウスに比べて増加し、AsA 投与により抑えられた。また、ヒトと同様に AsA 合成能を欠くモルモットを用いた検討でも、AsA 投与の有効性が確認できた。

AAP の作用で増加する活性酸素と、代謝産物である N-acetyl-p-benzoquinone imine (NAPQI)によるグルタチオンの枯渇が肝障害の原因とされている。今回 AsA が活性酸素を消去することで AAP の毒性を軽減するとの結果が得られ、急性肝障害の安全な治療薬となる可能性を示唆している。

0-13

後天性自己免疫性出血病 FXIII/13 の原因となる自己抗体のエピトープ解析

○尾崎司、惣宇利正善、一瀬白帝

山形大・医・分子病態学講座

後天性自己免疫性出血病 FXIII/13(AH13)は血液凝固第 XIII 因子(FXIII)に対する自己抗体が原因で出血症状を示す疾患である。FXIII は血液凝固の最終段階で凝固タンパク質フィブリンなどを架橋する酵素で、活性化ペプチド、β-サンドウィッチ、コア、バレル 1 および 2 ドメインから構成される酵素部位の A サブユニット(FXIII-A)とFXIII-Aの安定化に働くBサブユニット(FXIII-B)からなる。我々の研究室では現在までに42例のAH13症例を同定し、FXIII-Aを認識して活性化を阻害するAa型、活性化FXIIIを認識して活性を阻害するAb型、FXIII-Bを認識してクリアランスを促進するB型の3群に分類した。3 群の中では、AH13-Aa型が最も多く、86%を占める。さらに詳細な阻害機構の解明のために、AH13-Aa型14例の自己抗体が認識するエピトープの解析を行った。抗 FXIII-A自己抗体が結合する領域では、プロテアーゼによる rFXIII-A の切断が阻害され、生成するペプチド量が減少すると考えられた。そこで、エピトープを同定するために、健常人あるいは抗 FXIII-A自己抗体を含む AH13-Aa型の血漿検体と組換え FXIII-A(rFXIII-A)を反応後、Lys-Cあるいは Asp-Nで切断し、抗 FXIII-A自己抗体存在下で生成量が半分以下に減少する rFXIII-A由来のペプチド断片を探索した。ペプチドの同定、定量は液体クロマトグラフィー質量分析法(LC/MS)を用いて行った。

健常人血漿と反応させた後、Lys-C 処理した試料からは 19 ペプチド、Asp-N 処理した 試料からは 32 ペプチドを同定した(FXIII-A 全配列の 73.6%に相当)。このうち 36 ペプチドは、いずれかの検体(自己抗体)存在下で生成量が半分以下に減少した。これらのペプチドは複数の検体に共通しているものもあり、8 検体に共通するものが活性部位の His^{373} 、 Asp^{396} を含むコアドメイン由来のペプチドとバレル1の C 末端側のペプチドで、7 検体に共通するものがコアドメインの活性中心の Cys^{314} より 35 残基 N 末端側のペプチド とバレル1の N 末端側のペプチドで、ユニバーサルエピトープの存在が示唆された。

0 - 14

水晶体の退縮と網膜の剥離を伴う劣性遺伝性小眼球ラット(Hirosaki Small Eye Rat; HiSER)の樹立とその原因遺伝子の解明

○山田俊幸1、七島直樹1、2、清水武史1、土田成紀1

1弘前大院・医・ゲノム生化学、2弘前大院・保健・生体機能

我々の講座の Sprague-Dawley rats (SDR)の中に、白濁した小眼球をもつ個体が数匹出現 した。このラット同士、あるいは正常ラットとの交配実験から、この異常眼は常染色体劣性 遺伝することが判明し、 このラットを Hirosaki Small Eye Rat (HiSER)と名付けた。 HiSER 眼の白濁は加齢に伴い拡大し、組織学的には水晶体の退縮と網膜の剥離を認め、症状が進行 すると水晶体は消失し網膜は眼の中央に凝集した。Brown Norway rat との戻し交配個体に よる連鎖解析から、原因遺伝子は 10 番染色体に存在すると示唆された。またマイクロアレ イ解析では HiSER 眼において 10 番染色体上のβA3/A1-crystallin をコードする *Cryba1* 遺 伝子の発現が顕著に低下しており、これが原因遺伝子と推察された。そこで同遺伝子領域を genomic PCR により解析したところ、6 個のエクソンのうち第 4-第 6 エクソンを含む 3.6kb の領域が欠失していた。しかしながら、HiSER 眼においても第1-第3エクソンを含む転写 産物が存在したため、3'-RACE によりこの転写産物の下流部分の塩基配列を決定したところ、 第3エクソンの下流に Cryba1遺伝子の下流に位置する非コード領域に由来する約 $270 \mathrm{bp}$ の 塩基配列が融合していた。この塩基配列は DNA 上では2カ所に分かれて存在し、上流側の 配列はエクソンの境界を示す AG、GT 配列に囲まれ、下流側の配列も AG 配列に隣接して存 在し内部には poly A シグナル様の配列を持っていた。これらの理由から融合 mRNA が形成 されたものと考えられた。この転写産物は第1-第3エクソンに由来するアミノ酸の下流に7 アミノ酸(その直後にストップコドンが出現するため)を加えた新規融合タンパク質をコー ドしていた。免疫組織化学染色では、正常眼における正常βA3/A1-crystallin も HiSER 眼に おける融合タンパク質も共に水晶体と毛様体上皮に強く発現していたが、正常眼の毛様体内 に認められるα-smooth muscle actinの発現はHiSER眼にはほとんど認められず毛様体筋の 形成不全が推察された。以上の結果から、HiSER 眼の異常は Cryba1 遺伝子の部分欠失の結 果もたらされる正常タンパク質の消失あるいは融合タンパク質の発現によるものと考えられ た。

P-1

微生物由来 Dipeptidyl aminopeptidase IV の結晶構造解析

〇六本木沙織¹、館岡千佳¹、鈴木義之³、藤本真友¹、森澤さおり¹、飯塚一平¹、小笠原 渉³、田中信忠²、阪本泰光¹、野中孝昌¹

1 岩手医大、2 昭和大、3 長岡技大・生物

Dipeptidyl aminopeptidase IV(DPP4)は、ジペプチド単位でペプチドを分解する酵素であ る。我々は、Pseudoxanthomonas mexicana WO24 由来 DPP4 (PmDAP IV、微生物 DPP4)の apo 体 と阻害剤及びペプチドとの複合体の立体構造を決定した。P. mexicana W024 は病原菌ではな いが、PmDAP IV と多剤耐性菌として知られる Stenotrophomonas maltophilia 由来 DPP4 とア ミノ酸配列相同性は 74%と非常に高く、PmDPP4 の構造情報は、S. maltophilia 由来 DPP4 の 基質認識・結合機構解明に役立つと考えられる。*S. maltophiliaを*始めとする糖非発酵性細 菌において DPP4 は栄養源であるジペプチド生産に重要であることが知られており、微生物 DPP4 はコラーゲン(-(Gly-Pro-Hyp)n-)に多く含まれるプロリンやヒドロキシプロリンを特 異的に認識し分解する。一方、哺乳類由来 DPP4 は、微生物 DPP4 とは異なりプロリンのみを 認識することが知られている。 微生物 DPP4apo 体と哺乳類 DPP4 の構造比較解析では、微生物 DPP4 と哺乳類 DPP4 は立体構造や基質認識機構がほぼ同じであると考えられていたが、本研 究により初めて得られた微生物 DPP4 複合体の立体構造と哺乳類 DPP4 複合体構造の比較解析 研究は、微生物 DPP4 と哺乳類 DPP4 とでは、(1)プロリンやヒドロキシプロリンとの相互作用 に関与するアミノ酸残基が一部微生物と哺乳類で異なること、(2)微生物 DPP4 では、基質あ るいは阻害剤の結合により、哺乳類 DPP4 では見られない大きな構造変化が引き起こされるこ と、(3) 基質ペプチド N 末端の認識に重要なアルギニン残基が微生物 DPP4 と哺乳類 DPP4 で立 体構造上ほぼ等価な位置に保存されているものの、そのアルギニン残基が含まれる二次構造 は微生物 DPP4 ではαヘリックス、哺乳類 DPP4 ではループ構造であることを明らかにした。

本研究によって、これまでほぼ同じ立体構造や基質認識機構を持つと考えられていた微生物 DPP4 と哺乳類 DPP4 間の異なる点が明らかにされたことで、糖非発酵性病原菌のペプチド代謝系に重要な微生物 DPP4 のみに特異的な阻害剤の探索の可能性が示された。

フラビウイルス増殖における VCP/p97 の役割

○新井亜利紗¹、小林万希子²、有本大²、田端佳介²、森田英嗣¹,²

1弘前大・農学生命・細胞分子生物、2大阪大・微生物病研究所・ウイルス研究グループ

フラビウイルスは、感染後、宿主細胞内膜系を大規模に再構築し、ウイルスゲノム複製に特化した複製オルガネラと呼ばれる構造物を小胞体 (ER) 近傍に形成する。我々はこれまでに、デングウイルス (DENV) 又は日本脳炎ウイルス (JEV) 感染細胞より抽出した複製オルガネラに対して網羅的プロテオミクス解析を行い、感染特異的に複製オルガネラにリクルートされる宿主因子として VCP/p97 を同定した。VCP は、N 末端側のドメインを介して様々なコファクターと結合し、小胞体ストレス応答やゴルジ体やエンドソーム膜形成など多様なイベントに分子シャペロンとして関与することが報告されている。本研究では、VCP がどのようにフラビウイルスの増殖に関与するかを明らかにするために、VCP と種々のコファクターとの結合の重要性について解析した。

siRNAにより VCPをノックダウンした Huh7 細胞ではフラビウイルスの増殖は著しく抑制される。一方、標的配列に siRNA 抵抗性サイレンス変異を導入した VCP 発現ベクターを同時に遺伝子導入するとウイルス増殖能は回復する。本研究では、このシステムを用い、コファクターが結合する VCP-N 末端領域に導入した種々の変異がウイルス増殖能にどのような影響を与えるのか調べた。UFD1 と UBXD7 への結合能が欠損した R53A と、UBXD1 と UBXD7 への結合能が欠損した R53A と、UBXD1 と UBXD7 への結合能が欠損した I70A/L72A 変異を保持した VCP を入れ戻し細胞ではウイルス増殖能が回復するのに対し、p47 や p37 には結合するが、NPL4 や UBXD7 への結合能が欠損した V108A/K109A/Y110A 変異を持つ VCP/p97 を入れ戻し細胞では、ウイルス増殖能の回復は確認できなかった。この結果から、NPL4 もしくは UBXD7 がウイルス増殖における VCP の機能に重要である可能性が示された。また、これら変異体やコファクターの感染細胞内での局在についても解析し、VCP のフラビウイルス増殖における役割について論じる。

新規アンギオテンシン変換酵素2測定用蛍光消光基質の開発とその応用

〇高橋砂織¹、熊谷久美子²、畠恵司¹、宮脇舞³、横田早希³、後藤猛³、韮澤悟⁴、 杉山俊博⁵

¹秋田県総合食品研究センター、²株式会社ペプチド研究所、³秋田大院・工学資源、⁴国際農林水産業研究センター、⁵秋田大院・医

レニンは主に腎臓で生合成され様々な刺激で血中に分泌される。血中のレニンは肝臓で生合成されたアンギオテンシノーゲンに作用して 10 残基のアミノ酸から構成されるアンギオテンシン I(AI)を生成する。生じた AI は不活性ペプチドで、アンギオテンシン変換酵素(ACE)もしくはキマーゼにより C 末端 2 残基が切除され、アンギオテンシンII(AII)となり、血圧上昇を引き起こす。本研究では、ACE の相同遺伝子として見出され、多様な機能を持つアンギオテンシン変換酵素 2 (ACE2) に注目して、新規蛍光消光基質開発を目指すとともに、組換え型酵素の特性解析などに応用した。

ACE2 の作用物質探索や組換え型酵素特性解析には ACE2 特異的且つ高感度の基質開発が必須である。これまで、ACE2 の活性測定にはカスパーゼ用の基質である MCA-Tyr-Val-Ala-Asp-Pro-Lys (Dnp) や MCA-Ala-Pro-Lys (Dnp) などが用いられてきた。しかしながらこれらの基質は ACE2 の基質特異性を考慮した構造とはなっておらず、便宜的に用いられているにすぎない。そこで、本研究では最初に ACE2 の基質開発に取り組んだ。アンギオテンシン II の ACE2 切断部位を基に、各種 Nma-Xaa-Pro-Lys (Dnp)を合成し、ACE2による分解速度を LC-MS を用いて解析した。その結果、高感度蛍光消光基質 Nma-His-Pro-Lys (Dnp)の開発に成功した。次に、本基質を用いてバキュロウイルス・昆虫細胞発現系で発現した組換え型ヒト ACE2 の特性解析を行った。その結果、感染培養初期には膜結合型酵素が大部分を占めていたが、培養中期から後期にかけて培地中に酵素活性が見出された。この時、C 末端側に付加した His タグの分解が観察された。この事は、膜結合領域近傍がプロテアーゼによる加水分解に感受性が高い領域であることを示唆している。一方、開発した基質を用いて ACE2 阻害物質の探索を行った結果、大豆や山菜などに阻害物質の存在することを見出した。今後、本基質と組換え型 ACE2 を用いて詳細な反応動力学的解析や ACE2 阻害物質の構造機能相関解析などを進める予定である。

バキュロウイルス感染昆虫細胞によるヒト型 ACE2 の細胞内外生産挙動及び その特性解析

○横田早希¹、宮脇舞¹、後藤猛¹、菲澤悟²、高橋砂織³

¹秋田大院・工資、²国際農研、³秋田県総食研

【目的】哺乳動物における重要な血圧調節系にレニン - アンギオテンシン系が (RAS) ある。この系では,アンギオテンシン変換酵素(ACE)により不活性型のアンギオテンシン I (AII) が活性型のアンギオテンシン II (AII) に変換され,血圧上昇を引き起こす。さらに近年,AII を基質として RAS を負に調節して心血管等の機能を制御する ACE2 が見いだされた。本研究では,昆虫細胞発現系によるヒト型(h)ACE2 の効率的な生産を目的とし,細胞内外における生産挙動の解析および精製酵素の特性解析を行った。

【実験方法】C 末端に His タグを付加した hACE2 の cDNA を導入した組換えバキュロウイルス (vACE2) を Bac-to-Bac システムにより作製し、これを Sf9 昆虫細胞に MOI 0.1、1、10 pfu/cells で接種して、5 日間感染培養を行った。その後、培養液を培地画分と細胞画分に分け、 Western blotting によって hACE2 (98 kDa) の発現を確認した。また、hACE2 の活性は蛍光消光基質 Mca-Ala-Pro-Lys(Dnp)-OH (Anaspec 社製) または新たに開発した Nma-His-Pro-Lys(Dnp)-OH を用いて測定した。

【結果と考察】感染培養における hACE2 の生産挙動を, 抗 His タグ抗体を用いた Western blotting により調べた結果, 細胞画分では培養2日目以降でhACE2のバンドが検出され、活性も認められた。一方で培地画分ではバンドが検出されないものの, 培養後期には高い活性が見られた。そこで抗 ACE2 抗体を用いた Western blotting を行った結果, 3日目以降では培地画分にもバンドが検出された。このことから培養後期において hACE2 は, C 末端の His タグを含む部位が加水分解され、細胞外に漏出することが分かった。この細胞外漏出挙動はどの MOI 条件でも同様であり, His タグ融合 hACE2 の生産量にも大きな差は見られなかったため、hACE2 の生産には、ウイルス量が少なく、比較的培養時間の短い MOI 1 pfu/cell が適していると考えられる。さらに、Ni-アフィニティクロマトグラフィーにより高純度の hACE2 が得られ、最終的に培養量 500 ml 当たり約 1.7 mg のhACE2 が得られた。また、生産した精製 hACE2 の速度論的解析も行ったので、併せて報告する。

Rad53 結合タンパク質、Mdt1p の欠損がタンパク質輸送変異 *sec12-4* を抑圧する メカニズムについて

○関亦明子¹、関亦正幸²、佐藤菜津美¹、早坂勇人¹、中野明彦³,4

¹山形大・医・看護、²福島県立医大・医、³東大院・理・生物科学、⁴理研・生細胞超解像イメージング研究チーム

我々は、粗面小胞体で合成されたタンパク質の輸送に関与する最上流因子、Sec12pの制御機構を解明するため、sec12-4温度感受性変異の復帰変異として獲得されたHrr25p に結合する因子として、Mdt1p を同定した。MDT1 遺伝子の欠損が sec12-4 の制限温度での増殖とタンパク質輸送障害を抑圧することを確かめた。また、 $sec12-4\Delta mdt1$ 二重変異株では、sec12-4 の制限温度下で、有為な差はないものの、Sec12-4p 変異タンパク質が増加傾向であること、カルボキシペプチダーゼ Y (CPY) の小胞体型が蓄積することをこれまでに報告している。

Sato ら (2002) は、sec12-4が小胞体からの積み荷タンパク質の過剰発現によって抑圧されること、またこの抑圧は小胞体ストレス応答(UPR)遺伝子、IRE1の欠損によって無効になることを報告している。本研究においても、 $sec12-4\Delta mdt1$ 二重変異株で CPY のような積み荷タンパク質の増加が見られていることから、MDT1 欠損による sec12-4 の抑圧は UPR によるものではないかと推測し、 $sec12-4\Delta mdt1$ 二重変異株における UPR の強度を測定した。 $sec12-4\Delta mdt1$ 二重変異株では $sec12-4\Delta mdt1$ 二重変異株における UPR の強度を測定した。 $sec12-4\Delta mdt1$ 二重変異株では $sec12-4\Delta mdt1$ 公 ire1 三重変異株は制限温度で増殖できることがわかった。この結果により、MDT1 欠損による sec12-4 の抑圧は IRE1 経路を介していないと結論した。

RNA 結合モチーフを持つこと、 $sec12-4\Delta mdt1$ 二重変異株では、小胞体型 CPY の蓄積がみられることなどから、我々は MDT1 がタンパク質の合成、特に翻訳の調整に関わる可能性を考えている。MDT1 の欠損によって、sec12-4 変異の制限温度で起こるべき、タンパク質合成の停止が起こらなくなり、タンパク質の蓄積後に増殖できるようになったことが推測できる。このことは、 $sec12-4\Delta mdt1$ 二重変異株の増殖カーブが二層性であることを説明できる。我々は、MDT1 欠損による sec12-4 温度感受性が抑圧されるメカニズムを調べることによって、タンパク質輸送とタンパク質合成のクロストークシグナル経路を解明できるのではないかと考えている。

マウス顎下腺上皮組織の体外培養における増殖因子の効果

○早坂勇人¹、関亦明子¹、野川宏幸²、関亦正幸³

1山形大・医・看護、2千葉大院・理、3福島医大・医

がん治療において、放射線治療等により唾液腺は不可逆的に障害を受けることがある。しかし、移植等の侵襲的な治療は患者の負荷となるため、新しいケア開発が求められている。そのため我々は唾液分泌低下を予防あるいは軽減できる非侵襲的なケア開発を目的に、薬剤スクリーニングやその評価に利用できる培養分泌モデル構築を目指している。そこでまずマウス唾液腺の体外培養における培養条件の検討を行った。我々は顎下腺で発現している EGF family の transforming growth factor— α (TGF— α), Neuregrin1 (NRG1)と FGF family の fibroblast growth factor 10 (FGF10)の3つの増殖因子、及び増殖補助因子として lysophosphatidic acid (LPA)に着目し、これらの増殖因子の組み合わせによるマウス胎児顎下腺原基の上皮組織の成長を観察した。今回は顎下腺原基の小葉部分と導管部分の増殖の違いに注目した。

妊娠 13 日目のマウス胎児から摘出した顎下腺の間充組織を除去し上皮組織のみにした。増殖因子を加えた培地で上皮組織を培養し、培養初日を 0 日として 24 時間ごとに 3 日間形態的変化を観察した。3 つの増殖因子及び LPA はすべての組み合わせで培養を試みた。結果は NRG1 単独では小葉の増殖、TGF- α では小葉の分岐の増加、FGF10 では導管部分の伸長が観察された。これらの増殖因子にそれぞれ LPA を添加すると NRG1, TGF- α では小葉の分岐の増加が観察された。LPA を加えたことにより FGF10 では導管の伸長が抑えられた。次に 2 つの増殖因子を組み合わせた培地で組織を培養し観察した。NRG1+TGF- α では小葉の伸長と分岐の増加が、NRG1+FGF10, TGF- α +FGF10 では小葉の増殖と分岐の増加、導管部分の伸長が観察された。最後に 3 つすべての増殖因子を組み合わせた培地で組織を培養すると小葉の増殖と分岐の増加が観察された。これに LPA を添加すると組織全体がさらに大きく成長した。

唾液腺プロジェニター細胞が主に介在導管周辺に局在しているという報告もあることから、導管部の増殖が見られた NRG1+FGF10, TGF- α +FGF10 の組み合わせに焦点を当て、 唾液腺細胞の分化・増殖について幹細胞マーカーを用いて現在検討を行っている。

ヒト REG I α. マウス Reg I, Reg II タンパク質のレクチン活性の検討

〇山内貴裕 ¹、Nausheen Jama1¹、佐藤 舞 ¹、篠村航世 ¹、毛塚雄一郎 ²、野中孝昌 ²、大橋 一晶 ¹、那谷耕司 ¹

1 岩手医大・薬・臨床医化学講座、2構造生物薬学講座

膵β細胞の再生・増殖因子として発見された Reg (Regenerating gene) はファミリーを形成しており、そのタンパク質の一次構造の特徴から 4 つのサブタイプに分類されている。Reg タンパク質は構造上 C-type レクチンとしての特徴を有しており、 \mathbf{III} 型(ヒトHIP/PAP)は 'EPN' モチーフを介してペプチドグリカンと結合すること, 'EPN' モチーフが殺菌作用に重要であることが報告されている。一方, \mathbf{I} 型, \mathbf{II} 型の \mathbf{Reg} \mathbf{I} \mathbf{II} 型の \mathbf{Reg} \mathbf{II} \mathbf{II}

ヒトREG I α , マウス Reg I, Reg II タンパク質を大腸菌に発現させ、イオン交換クロマトグラフィを用いて精製した。これらのタンパク質を用いて、グラム陽性球菌の Staphylococcus aureus、グラム陽性桿菌の Lactobacillus caesi、Bacillus subtilis、グラム陰性桿菌の Escherichia coli に対する凝集活性を検討したところ、ヒトREG I α 、マウス Reg I, Reg II タンパク質は全ての菌種に対して凝集活性を示した。一方、殺菌活性については認められなかった。次にこれらのタンパク質による細菌凝集活性がオリゴ糖の添加により阻害されるか検討したところ、gentiobiose、gentiotriose、gentiotetraose などの混合物であるゲンチオリゴ糖の添加により、ヒトREG I α 、マウス Reg I, Reg II タンパク質による細菌の凝集が阻害された。

以上の結果から、ヒト REG I α 、マウス Reg I, Reg II タンパク質による細菌の凝集は糖結合活性によるものであり、これらの Reg ファミリータンパク質は Reg III タンパク質 と異なり 'EPN' モチーフを持たないにもかかわらず Reg III タンパク質と同様にレクチン活性を有している可能性が考えられる。

クロルプロマジン感受性に関わるトランスポーター遺伝子 SMF2 および NRAMP2 の解析

○岡沼宇宙、畠山和也、秋本尚哉、伊藤文香、長谷川千夏、那谷耕司、大橋一晶

岩手医大•薬•臨床医化学

クロルプロマジンは統合失調症などの精神疾患の治療に用いられる薬剤である。クロルプロマジンの作用機序についてはドパミン D₂受容体遮断をはじめとして様々な解析がなされているものの、その体内動態に関する分子機構については不明な点が多い。そこで、クロルプロマジンの輸送に関わる可能性のあるトランスポーターを同定する目的で、酵母の各種トランスポーター遺伝子の欠損株を用いてクロルプロマジンに対する感受性を調べた。

その結果、金属イオンのトランスポーターSmf2 の遺伝子欠損株がクロルプロマジンに対して耐性を示すことがわかった。Smf2 タンパク質は、Mn²+など2価の金属イオンを主に輸送することが報告されており、ヒトではホモログとして NRAMP2 が知られている。さらに、酵母には、Smf2 と同様の構造・機能を持つトランスポーターSmf1 および Smf3 が存在する。Smf1 は Smf2 と同様に Mn²+を主に輸送するが、Smf3 は主に Fe²+または Fe³+の輸送に関わると考えられている。そこで、SMF1 および SMF3 遺伝子の欠損株についてもクロルプロマジン感受性を調べた。その結果 SMF1 遺伝子欠損株ではクロルプロマジン耐性を示したが、SMF3 遺伝子欠損株はクロルプロマジン耐性とはならなかった。さらに、SMF2 遺伝子およびヒト NRAMP2 遺伝子をそれぞれ過剰発現させたところ、酵母はクロルプロマジンに対する感受性が高くなった。

以上の結果は Smf1、Smf2 タンパク質および NRAMP 2 タンパク質がクロルプロマジンン 感受性に関与することを示していると考えられる。また、これらの結果から、Smf1, Smf2 および NRAMP2 タンパク質がクロルプロマジンを細胞内に輸送する、または金属イオンの 取り込みがクロルプロマジン感受性を左右する可能性が考えられる。

妊娠時マウス膵臓ランゲルハンス島 β 細胞増殖におけるヘパラン硫酸プロテオグリカンの 関与

○木下光¹、高橋巖¹、手賀史¹、加藤晴菜¹、松崎南美²、山田修平²、那谷耕司¹

1岩手医大・薬・臨床医化学、2名城大・薬・病態生化学

へパラン硫酸(HS)は N-アセチルグルコサミンとグルクロン酸の二糖構造が直鎖状に連なった高分子多糖であり、コアタンパク質に結合した複合糖質(プロテオグリカン)の形で細胞膜表面や細胞外基質に存在する。 へパラン硫酸プロテオグリカン(HSPG)の機能の主体は糖鎖骨格上に修飾された硫酸基であり、複数の修飾酵素により施された硫酸化微細構造が細胞増殖や細胞分化などを制御している。生体内で唯一インスリンを分泌する器官である膵臓ランゲルハンス島(膵ラ島) β 細胞(膵 β 細胞)は増殖能に乏しいことが知られているが、妊娠時の母体では増殖することが報告されている。妊娠時には胎児への栄養供給を維持する必要から母体はインスリン抵抗性を示すものの、膵 β 細胞が増殖することで高血糖状態を回避している。我々はマウス膵 β 細胞の表面に存在する HS が、インスリン分泌や膵 β 細胞増殖に関与することを明らかにしてきたが、妊娠時の膵 β 細胞増殖に HS が関与しているかは不明であった。本研究では、妊娠時マウス膵 β 細胞増殖への HSPG の関与について検討を行った。

妊娠時マウス膵ラ島における HSPG の生合成に関与する遺伝子の発現を定量 PCR にて調べたところ、Epimeraseや N-アセチルグルコサミンの 6 位に硫酸基を転移する酵素 (Hs6st1; heparan sulfate 6-O-sulfotransferase isoform-1)、3 位に硫酸基を転移する酵素 (Hs3st3b1)、HS コアタンパク質の Perlecan の遺伝子発現が上昇していた。さらに妊娠時の膵ラ島における HS の二糖組成を HPLC にて分析した結果、6 位と 3 位に硫酸基が転移された二糖の割合が増加していた。従って、これらの硫酸化修飾による HS の構造変化が妊娠時の膵 β 細胞増殖に関与している可能性が考えられた。次に、マウス膵 β 細胞由来でインスリン応答性を有する MIN6 細胞を用いて、妊娠時マウス膵 ラ島で発現上昇が認められた Hs6st1と Perlecanを RNA 干渉法にてノックダウンしたところ、Hs6st1では細胞増殖能が低下したが、Perlecanではわずかに亢進した。このことから、HS の 6 位の硫酸化が膵 β 細胞増殖に必要であることが考えられた。一方、Perlecan はヒト血管内皮培養細胞において、細胞密度の上昇に伴い発現が上昇し、細胞増殖に対

して抑制的に作用することが報告されている。このことから、妊娠時マウス膵ラ島における Perlecan の発現上昇は、 β 細胞の増殖に対して抑制的に作用している可能性が考えられる。

膵特異的に発現する PDI ファミリータンパク質 (PDIp) の生理的な基質の同定

○藤本拓志、斎藤美知子、都留秋雄、河野憲二、稲葉謙次、門倉広

東北大・多元研、奈良先端大・バイオ

ジスルフィド結合の形成は多くの分泌タンパク質にとって立体構造形成上重要な反応ステップである。真核生物の小胞体では Protein disulfide isomerase (PDI)ファミリーに属するタンパク質がジスルフィド結合の形成・切断・異性化を触媒する。哺乳動物では約 20 種類の PDI ファミリータンパク質が知られている。しかし、個々の酵素の生体内における具体的な役割はあまり分かっていない。これは各酵素の生理的な基質が不明であることに起因する。本研究では膵特異的に発現する PDI ファミリータンパク質である PDIp の機能を理解するため、本酵素の基質の同定を目指している。

まず、PDIpに対する抗体を用いてマウスにおける組織分布を調べた。PDIpは膵臓、胃、小腸など消化に関わる器官に発現しており、特に膵臓で多かった。一般に PDI ファミリーに属する酵素は、基質にジスルフィド結合の形成、切断、異性化を行う際、一過的な反応中間体として分子間のジスルフィド結合で連結したジスルフィド結合複合体を形成する。本研究ではこのジスルフィド結合複合体を利用し、PDIpの基質を同定することにした。ジスルフィド結合複合体を安定化するため、マウスの組織をトリクロロ酢酸水溶液中で粉砕した後、N-エチルマレイミドで処理した。このように調製した膵臓サンプルではジスルフィド結合複合体とみられる強いバンドが複数検出された。哺乳動物の膵臓の特徴として多量の α -アミラーゼを生産することが挙げられる。そこで、 α -アミラーゼの抗体を使って調べたところ、PDIpが形成するジスルフィド結合複合体のいくつかは α -アミラーゼを含むことがわかった。したがって、PDIpはジスルフィド結合を介して α -アミラーゼと相互作用することが判明した。現在この相互作用の持つ生理的な意義を調べている。また、質量分析を利用してPDIpの基質候補タンパク質の網羅的な同定を進めている。

Rho-GEF Soloによるアクチン繊維と中間径フィラメントの制御とメカノセンシングにおける機能

○藤原佐知子、安彦日和、大橋一正、増子寿弥、水野健作

東北大院・生命科学・情報伝達分子解析学分野

生体内の細胞は多様な機械的刺激(メカニカルストレス)を受けており、それらに応 答することで生体の生理的機能を維持することが知られている。メカニカルストレスは 主に細胞間接着あるいは細胞-基質間接着部位で受容され、化学的シグナルに変換された 結果、アクチンや中間径フィラメントなどの細胞骨格の再構築を引き起こす。低分子量 G蛋白質 Rho ファミリーはアクチン骨格の再構築において中心的なシグナル分子であり、 Rho ファミリー活性化因子(Rho グアニンヌクレオチド交換因子: Rho-GEF)により活性化 される。しかしながら、メカニカルストレスによる Rho シグナルの活性制御機構は未だ 不明である。血管内皮細胞は血管の伸縮を模した繰返し伸展刺激を受けると、伸展方向 とは垂直な向きに細胞の長軸とストレスファイバーの向きを配向させる性質がある。メ カニカルストレス応答に関与する Rho-GEF を探索するため、shRNA ライブラリーを用い て Db1 ファミリーに属する 63 種類の Rho-GEF をスクリーニングした。 その結果、 繰返し 伸展刺激による細胞配向に必要な Rho-GEF として、RhoA と RhoC の GEF である Solo を同 定した。Solo の発現抑制は、力負荷刺激依存的な RhoA の活性化を有意に抑制すること が明らかとなった。また、Solo の活性化の分子機構の解明を目的として Solo 結合蛋白 質を探索し、アクチンおよび中間径フィラメントを形成するケラチンを同定した。特に、 Solo はケラチン繊維に対して複数の結合部位を有することを見出した。 Solo を上皮細胞 に過剰発現させると、太いストレスファイバーと太いケラチン繊維の形成が促進した一 方で、Solo の発現抑制はストレスファイバーの消失とケラチン繊維の不規則な分布を引 き起こした。さらに、Soloの GEF ドメインの変異体や各種欠失変異体の発現や Soloの 発現抑制は引張刺激依存的なストレスファイバー形成を抑制した。以上の結果から、Solo はケラチン繊維と複数部位で相互作用することにより、メカニカルストレス依存的な RhoA の活性化に関与し、アクチン繊維とケラチン繊維の再構築に寄与することが示唆さ れた。

Rab35·centaurin-β2/ACAP2複合体形成の構造基盤と神経突起伸長及び細胞質分裂への関与

○衛藤貫、福田光則

東北大院・生命・膜輸送機構解析

低分子量 G タンパク質 Rab35 はメンブレントラフィックを制御する分子スイッチで、 神経突起伸長、細胞質分裂、ファゴサイトーシスなど様々な生命現象に関与する。Rab は GTP を結合した活性化状態の時にエフェクター分子をリクルートすることにより特定 の機能を発揮するため、Rab の機能を理解する上でエフェクター分子の同定は不可欠と 考えられる。Rab35 に関しても、活性化型 Rab35 に結合する分子の探索が活発に行われ、 7種類ものエフェクター候補分子がこれまでに報告されている。 しかし、 Rab35 が制御す る現象で、どのエフェクター候補分子が実際に機能しているのか、また Rab35 がそれぞ れのエフェクター候補分子をどのように認識仕分けているのかは全く解明されていない。 そこで本研究では、当研究室で独自に見出した Rab35 エフェクター候補分子・centaurinβ2 (ACAP2 とも呼ばれる Arf6 の不活性化因子) に着目し、種々の欠失変異体・点変異 体を作成することで両者の特異的結合に関わるアミノ酸残基の同定を試みた。その結果、 Rab35 のスイッチ II 領域に存在する 2 つの Thr 残基(Thr-76 及び Thr-81)が centaurinβ2 との特異的な結合に不可欠であることを見出した。興味深いことに、これらの Thr 残基は他の 6 種類の Rab35 エフェクター候補分子(MICAL-L1、fascin、OCRL など)との 結合には関与していなかった。また、centaurin-β2 のアンキリンリピート (ANKR) ド メインに存在する Rab35 の結合に必要な最小領域を決定し、その領域の中の 2 つの Asn 残基 (Asn-610 及び Asn-691) が Rab35 の特異的な認識に関与することも突き止めた。さ らに、centaurin- β 2 との結合のみを欠損した Rab35 変異体を用いることで、神経突起 伸長と細胞質分裂における Rab35・centaurin- β 2 複合体の重要性を細胞レベルで検証し た。その結果、いずれの現象においても Rab35・centaurin-β2 複合体の形成が必要であ ることが示唆された (J. Biol. Chem., in press)。今後、開発した Rab35 変異体を Rab35 が関与する様々な現象に応用することで、細胞内での Rab35 と centaurin-β2 の特異的 結合の重要性を明らかにしていく予定である。

Varp の新規結合分子の探索とメラノサイトのデンドライト形成への関与

○丸橋総史郎、大林典彦、福田光則

東北大院・生命・膜輸送機構解析学分野

メラノサイトはメラニン色素の産生に特化した細胞で、メラノソームと呼ばれる黒色 の特殊な細胞小器官を有している。メラノサイトはデンドライト(樹状突起)と呼ばれ る突起状構造を形成することで周辺の細胞(ケラチノサイトや毛母細胞)と接触し、メ ラノソームを受け渡すことで、肌や毛髪の暗色化を引き起こす。この暗色化過程を制御 する因子の一つとして、当研究室では Varp (VPS9-ankyrin-repeat protein) をこれま でに同定している。Varp は N 末端側に Rab21 を活性化する VPS9 ドメインを、C 末端側に アンキリンリピートドメイン(ANKR1 及び ANKR2 ドメイン)をタンデムに持つ。これま での解析で、Varp は ANKR1 ドメインを介して Rab32/38 を結合することによりメラニン 合成酵素を含む小胞の輸送を促進するだけでなく、VPS9 ドメインで Rab21 を活性化する ことにより cAMP 依存的なデンドライト形成に関与することが明らかになっている。一方、 ANKR2 ドメインは Rab40C を結合することにより Varp 分子の発現制御(プロテアソーム 分解)への関与が示唆されているものの(Biol. Open, 2015)、肌の暗色化における機能 に関しては不明な点が多い。そこで本研究では、ANKR2 ドメインのメラノサイトでの機 能を明らかにするため、酵母 two-hybrid スクリーニングにより新たな結合分子の探索を 行った。その結果、Varp の新規結合分子として RACK1 を同定することに成功した。興味 深いことに、RACK1 と Varp の結合は cAMP 濃度を上昇させる forskolin 刺激により増強 したことから、デンドライト形成への関与が推測された。そこでさらに、特異的な siRNA を用いて内在性の RACK1 をノックダウン(あるいは過剰発現)したところ、以下の知見 が得られた。①RACK1 ノックダウン細胞ではデンドライト形成が有意に抑制される。② RACK1 ノックダウン細胞では Varp のタンパク質量が減少する。 ③Rab40C による Varp の 分解を介したデンドライト形成の抑制は RACK1 の過剰発現により解除される。本発表で は、これらの結果をもとにデンドライト形成における Varp と RACK1 の結合意義について 議論する予定である。

シグマ1受容体の ALS 関連遺伝子変異はミトコンドリア障害を誘導する

○篠田康晴、田頭秀章、福永浩司

東北大院・薬・薬理学分野

【背景・目的】筋萎縮性側索硬化症(ALS)は、上位及び下位運動神経の一方あるいは双方の変性・脱落による進行性の神経変性疾患である。筋力低下・筋萎縮を主症状とし、重症化した場合、麻痺や呼吸機能低下を引き起こす。近年、ALS の病態として運動神経細胞におけるミトコンドリア機能障害や異常なタンパク質凝集体形成などが注目されている。一方、ある若年性 ALS 家系において、小胞体膜に局在するシャペロンタンパク質シグマ1受容体に遺伝子変異 (E102Q) が存在することが報告された (Al-Saif et al., Ann Neurol. 2011)。シグマ1受容体は、 Ca^{2+} チャネルの IP_3 受容体と結合しミトコンドリアへの Ca^{2+} 輸送を調節するタンパク質であるが、ALS 病態におけるシグマ1受容体変異体の役割についてはほとんど明らかとなっていない。そこで本研究では、シグマ1受容体変異体の神経細胞毒性について神経芽細胞種 Neuro2A 細胞を用いて検討した。

【方法】Neuro2A 細胞に野生型及び変異型シグマ1受容体を過剰発現した後、免疫染色 法及び免疫沈降法を用いて細胞内局在を検討した。また蛍光プローブを用いて、これら の細胞における Ca²⁺輸送、ミトコンドリア障害及びアポトーシスについて検討した。さ らに、生化学的手法を用いて ATP 産生及びプロテアソーム活性を評価した。

【結果・考察】免疫染色法及び免疫沈降法により、変異型シグマ1受容体は小胞体から解離し、細胞質において凝集体を形成することが明らかとなった。また、変異型シグマ1受容体は、小胞体からミトコンドリアへの Ca²+輸送を障害し、ミトコンドリア障害およびプロテアソーム活性の低下を引き起こし、アポトーシスを誘導した。さらに変異型シグマ1受容体は、ALS の病理学的特徴の一つである RNA 結合タンパク質 TDP-43 の細胞質への漏出を引き起こした。またこれらの結果は、病態と同様の小胞体ストレス条件下においてより顕著であった。以上の結果より、変異型シグマ1受容体は凝集体の形成を介し Ca²+輸送の障害を引き起こすことでミトコンドリア及びプロテアソームの機能低下を引き起こし、TDP-43 の細胞質への漏出やアポトーシスを誘導することが明らかとなった。

精神的ストレスにおけるドパミン D。受容体の機能解析

○杉本航、塩田倫史、福永浩司

東北大院・薬・薬理学分野

統合失調症や心的外傷後ストレス障害 (PTSD) などの精神疾患の発症には遺伝的要 因と環境要因の両方が関与し、遺伝子解析から、ドパミン D2 受容体は原因遺伝子の一 つであると考えられる。また、 D₂ 受容体には細胞内第 3 ループ 29 アミノ酸残基の有 無により、D。L 受容体と D。S 受容体のアイソフォームが存在する。 しかしながら、 D、L 受容体の異常と精神疾患との詳細な関与は不明である。本研究では、D₂L 受容体と精神 疾患発症との関与に着目した。方法として、精神疾患発症の環境要因となり得る精神的 ストレス (強制水泳ストレス負荷) を D₂ 受容体欠損マウス及び D₂L 受容体欠損マウス に負荷した。強制水泳ストレス負荷により、高架式十字路迷路試験、Open-field 試験 に おいて、D2 受容体欠損マウス、D2L 受容体欠損マウス共に野生型マウスと比較し不安 様行動の有意な増加が見られた。また、尾懸垂試験、強制水泳試験においても D2 受容 体欠損マウス、 D₂L 受容体欠損マウス共に野生型と比較してうつ様行動の有意な増加 が見られた。次に、ストレス負荷による脳内の遺伝子発現の変化を検討するため、スト レス負荷を与えたマウスの脳幹部位における DNA マイクロアレイ解析を行った。結果 として、D2 受容体欠損マウス及び D2L 受容体欠損マウスにおいてセロトニン神経系関 連遺伝子の有意な増加が見られた。そこで、ストレス負荷時におけるセロトニン遊離量 の変化を in vivo マイクロダイアリシスにより検討した。ストレス負荷により、D2L 受 容体欠損マウスのセロトニン遊離量は野生型マウスと比較し有意に増加することが確認 した。さらに、セロトニン受容体の1つである5-HT_{IA} 受容体作用薬である8-OH-DPAT の 投与により、ストレス負荷時の不安様行動は野生型マウスにおいて改善が認められたが、 D₂L 受容体欠損マウスではみられなかった。また、免疫染色法により縫線核セロトニン 神経細胞での D2 受容体の発現が確認できた。以上の結果は D2L 受容体欠損マウスにお けるストレス負荷に対する脆弱性には、セロトニン 5-HT_{IA} 受容体を介したセロトニン 放出の脱抑制が関与することを示唆している。

ショウジョウバエの器官改変系における生殖系列遺伝子の機能解析

〇石井雄基、寺西達貴、Nguyen Thanh Quang、倉田祥一朗

東北大院・薬・生命機能解析学分野

当研究室では、器官形成や細胞分化運命の転換のメカニズムを解明するために、ショウジョウバエの複眼に本来生じない翅が形成される器官改変系を用いた研究がなされている。これまでに、simjang 遺伝子を過剰発現すると複眼から翅への器官改変が促進されることがわかっており、その分子メカニズムの解析が行われてきた。その結果、興味深いことに、simjang 過剰発現によって、将来精子や卵子を形成する生殖細胞でのみ発現することが知られている生殖系列遺伝子が、本来ほとんど発現しない体細胞において異所的に発現することが明らかになった。しかし、当研究室で見出された simjang による器官改変の促進において、生殖系列遺伝子がどのような役割を果たしているのか全く解明されていない。よって本研究では、simjang 過剰発現による器官改変の促進における生殖系列遺伝子の機能解析を目的とした。

本研究の結果、simjang 過剰発現による器官改変の促進に、複数の生殖系列遺伝子の 異所的な発現上昇が必要であることが明らかになった。また、生殖系列遺伝子の異所的 な発現は複眼に翅が生じる頻度だけでなく、生じた翅の形態的な質にも影響を与えるこ とがわかった。さらに、複数の生殖系列遺伝子は単独で機能するのではなく、互いの発 現に影響を及ぼしあうことで器官改変の促進に関与している可能性が考えられた。

機械的刺激に応答した自然免疫関連遺伝子群の発現誘導機構の解明

○見目裕之¹、堀亜紀¹、倉石貴透¹,²、倉田祥一朗¹

¹東北大院・薬・生命機能解析学、² JST・さきがけ

[背景] 自然免疫応答は、多細胞生物に侵入してきた微生物などの病原体関連分子パターンを認識し、血球細胞による貪食や、抗菌ペプチド・サイトカインの産生を通して病原体を排除する、生物種を越えて保存された生体防御反応である.しかし近年、がん化や組織損傷などによっても自然免疫応答が惹起されることが報告されるなど、菌感染に依存しない自然免疫制御機構が存在することが示唆されている.このような内因性のリガンドによる自然免疫応答の異常な活性化は、慢性炎症やさまざまな疾患につながると考えられている.自己組織の損傷時には組織からダメージ関連分子パターンが放出され、それが自然免疫応答を惹起すると考えられているが、その詳細な分子機構は不明である.

[方法・結果] 今回我々はショウジョウバエ幼虫をモデル生物とした解析を行い,機械的刺激を与えることでショウジョウバエの免疫組織において抗菌ペプチド Drosomycin の発現が誘導されることを見いだした。また,このときの遺伝子発現量の変化をマイクロアレイ法によって網羅的に解析したところ,Defense response に関連する多くの遺伝子の発現量が上昇していることが明らかとなった。無菌的飼育を行った幼虫を用いた場合も,同様の方法で Drosomycin の発現量が上昇したことから,この現象は菌感染非依存的に生じることがわかった。次に,機械的刺激依存的な Drosomycin の発現に対する既知自然免疫関連経路の関与を検討した。Toll 経路,Imd 経路,JAK/STAT 経路,MAPK 経路などの構成因子の変異体やノックダウン個体を用いた解析の結果,機械的刺激に応答した Drosomycin の発現は一部 Toll 経路に依存するが,大部分は既知経路に非依存であることがわかった。

[考察] これらの結果から、機械的刺激によってショウジョウバエ幼虫で自然免疫応答が惹起されることが明らかとなり、この反応にはToll経路の他に新規経路が関与している可能性が示唆された. 現在 Ethyl methane sulfate (EMS) を用いた順遺伝学的スクリーニングを実施しており、機械的刺激依存的な自然免疫関連遺伝子群の発現誘導を担う原因遺伝子の同定を目指している.

DNA ウイルス感染により誘導されるアポトーシス関連因子の同定

○石澤勇輝、麻生高裕、石川裕規、倉石貴透、倉田祥一朗

東北大院・薬・生命機能解析学分野

ウイルスに対する宿主の防御反応として、インターフェロンによる抗ウイルス遺伝子 の発現誘導とプログラムされた細胞死として知られるアポトーシスによる感染細胞自体 の排除が知られている.アポトーシス関連遺伝子をノックアウトすると、インターフェ ロンによる転写活性化は正常であるにも関わらずウイルスに対する感受性が高くなるこ とが報告されており、アポトーシスによる抗ウイルス機構の生体防御における重要性が 示唆されている. しかしアポトーシスによる抗ウイルス機構については、RNA ウイルス 感染時のアポトーシス誘導分子メカニズムについては解析が進んでいるものの、DNA ウ イルス感染時における分子メカニズムはよくわかっていない. そこで私達はインターフェ ロンを有していないショウジョウバエをモデル生物とし、DNA ウイルス感染時のアポト ーシスに関与する因子を探索するゲノムワイド RNAi スクリーニングを培養細胞を用い て行った. スクリーニングで陽性と考えられた因子に対して, タンパク合成阻害や RNA ウイルス感染という2つの異なるアポトーシス誘導刺激を検討した結果、陽性因子はそ れらの刺激によるアポトーシスには関与しないことが示唆された. したがって DNA ウイ ルス感染時のアポトーシス誘導に特異的に働く因子が同定されたと考えられる.今後は それらの因子がどのように DNA ウイルス感染時のアポトーシスに寄与するのか、その分 子メカニズムを明らかにしていくと共に、ショウジョウバエ因子の哺乳類ホモログにつ いて,同様に DNA ウイルス感染時のアポトーシスに必要であるか解析を行う予定である.

mRNA 品質管理因子 Upf 複合体によるタンパク質分解促進機構の解析

○安藤功穣、黒羽一誠、稲田利文

東北大院・薬・遺伝子制御

Upf1, Upf2, Upf3 からなる Upf 複合体は、ナンセンス変異が生じた mRNA を急速に分解する NMD (Nonsense-mediated decay) 経路に必須である。我々はこれまで、Upf 複合体が標的 mRNA に加え、そこから翻訳された異常タンパク質の分解にも必要であることを明らかにしてきた。我々は、この新規品質管理機構 NMPD (Nonsense-mediated protein degradation) について、出芽酵母を用いた解析を行った。

異常タンパク質は分子シャペロン Hsp70 と特異的に相互作用していることから、分子 シャペロンの NMPD における関与を検討した。Hsp70 およびその ATP-ADP 交換因子である Sse1 の欠損株で解析したところ、異常タンパク質が顕著に安定化されることから、これ らが異常タンパク質の分解を促進することが明らかとなった。さらに、Sse1 の欠損株お よび Sse1 と Upf1 の二重欠損株における異常タンパク質の半減期の測定から、Sse1 によ る分解促進はUpf1を介したものであることが示された。Sse1の変異体解析の結果、Sse1 の ATPase 活性及び Hsp70 との相互作用が NMPD において重要であることが明らかとなっ た。Hsp70/Sse1 はタンパク質のフォールディングに関わる分子シャペロンであることか ら、短鎖型タンパク質の folding に異常が生じている可能性を考え、出芽酵母における unfold タンパク質モデルであるヒト VHL タンパク質(von-Hippel Lindeau 病の原因遺伝 子産物)が NMPD の基質となるか検証を行った。VHL タンパク質を酵母内で発現させると、 正しい folding をとることができないために迅速に分解されるが、コファクター (Elongin B/C 複合体)の共存下では正しく folding される。VHL タンパク質の下流に長い 3'-UTR を挿入し、NMD 因子を mRNA 上にリクルートさせることで、Upf 複合体による VHL タンパク質の分解促進が生じた。つまり、異常タンパク質の分解促進は NMD とタンパク 質の構造異常に依存して生じると考えられる。

これらの結果は、Upf 複合体を介した異常 mRNA の分解と、分子シャペロンによる異常 タンパク質の分解が翻訳時に Upf 複合体を介し共役して生じることを示唆している。

デュアルレポーター系による NMD 阻害剤・リードスル一剤の同時スクリーニング

○山﨑玲奈、渡邉七恵、稲田利文

東北大院・薬・遺伝子制御薬学

ナンセンス変異はアミノ酸をコードするコドンから終止コドンへの置換変異であり、ヒトの遺伝性疾患の主要な原因変異である。原因遺伝子が同定されているヒトの遺伝性疾患のうち、約 1/3 がナンセンス変異に起因するものであると推定されている (Hui-Ling *et al.*, *Pharmacol Ther* 2012)。

Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) は細胞が保持する mRNA 品質管理機構であり、ナンセンス変異をもつ mRNA が翻訳された際、正常な終止コドンの手前のコドン Premature termination codon (PTC)での異常な翻訳終結を認識して mRNA を迅速に分解する機構である。リードスルー剤は、PTC の読み飛ばしを引き起こし、完全長のタンパク質を合成させる薬剤である。既知のリードスルー剤としては Gentamicin、G418 等のアミノグリコシド系抗生物質があるが、腎障害や難聴などの副作用のため臨床応用は困難である。近年同定されたリードスルー剤 PTC124 は副作用が無く経口投与が可能なため、実用化が期待されている(Welch et al., Nature 2007)。2014 年 8 月に EU で、歩行可能な 5 歳以上の DMD 患者に対する治療薬として条件付承認された(Ryan, Drugs 2014)。しかし PTC124 は NMD を阻害しないため、NMD による mRNA 分解の影響を強く受ける異常mRNA には効果が期待出来ない。したがって PTC124 を用いた治療は極めて限定的である可能性が考えられる。

我々は、スプライシングに依存した機構で NMD を受けるデュアルレポーター系を構築し、NMD 阻害効率とリードスルー効率の同時評価を可能にした。蛍光タンパク質 RFP と GFP の間にヒト β -globin 由来の Exon2-Intron2-Exon3 (HBB) の配列を挿入して RFP と HBB の間に終止コドンを含む配列を挿入した RFP-X-HBB-GFP レポーターを構築し、HEK293 安定発現株を樹立した。同様にして、RFP を Renilla luciferase (Rluc) に、GFP を Firefly luciferase (Fluc) に置換した Rluc-X-HBB-Fluc レポーターも構築した。これらのレポーター系を用いて、NMD を受ける mRNA にも有効なリードスルー剤もしくは NMD 阻害剤の同定を目的にスクリーニングを行っている。

無細胞蛋白質合成法を用いた IL8 受容体の PET イメージング

○吉川雄朗¹、原田龍一²、古本祥三³、渋谷勝彦¹、岩田錬³、谷内一彦¹

¹東北大院・医・機能薬理、²東北大・加齢研・ニューロイメージング、³東北大・CYRIC

【目的】ポジトロン断層撮影法(positron emisstion tomography、PET)は癌や炎症性疾患・認知症といった幅広い疾患の診断や病態解明に用いられている。PET イメージングのためには放射性薬剤が必要となるが、この薬剤として抗体やリガンドなどの蛋白質が注目されている。我々は放射性蛋白質を合成するための方法として無細胞蛋白質合成法に着目している。この方法は蛋白質合成に必要なアミノ酸、転写因子や翻訳因子といった全ての因子を別々に調整した後に再構成するinvitro蛋白合成法である。今回我々はこの反応液中に含まれるプロリンを[¹⁸F]プロリンを置換した溶液を作製し、[¹⁸F]プロリンで標識されたinterleukin-8(IL8)の合成にすること、またこの[¹⁸F]IL8をPETイメージングとして用いることを目的として実験を行った。

【結果】まず、プロリンを除いた 19 種類のアミノ酸を含んだ無細胞蛋白質合成用の溶液中に、コールド体のフルオロプロリン([19F]プロリン)を加えて反応させ、Western blotにて[19F]IL-8 が問題なく合成できることを確認した。次に[19F]IL-8 が IL-8 受容体に結合できるかどうかを検討した結果、通常の IL-8 と[19F]IL-8 で受容体への結合能に差が無いことを確認した。更にポジトロン標識化合物である[18F]プロリンを用いて IL-8 の合成を試みたところ、時間依存的に[18F]IL-8 が合成できることが確認できた。また夾雑物を取り除くために[18F]IL-8 の精製について検討し、陽イオンスピンカラムを用いた精製法が短時間で純度の高い蛋白質を得るために適していることを確認した。放射化学純度は91%と算出されイメージングを行うのに十分であり、[18F]IL-8 が IL-8 受容体に対しても結合することも確認できた。そこで得られた[18F]IL-8 をマウスに投与して PET 撮像を行い、体内動態を確認したところ、尿路系以外への臓器への集積は認められなかった。最後に、IL8 受容体を安定発現させた CHO 細胞を nude マウスに移植し、このマウスを用いて PET 撮像を行ったところ、CHO 細胞が増殖した部位に[18F]IL-8 が集積していることが確認できた。以上のことから、無細胞蛋白質合成法を用いて PET イメージングが簡便に行えることが明らかとなった。

ミトコンドリアにおける分子シャペロン ERp57 結合タンパク質の探索

○工藤翔太¹、宮崎雅雄¹、山下哲郎¹、尾崎拓²

1岩手大・農、2弘前大院・医・子どものこころの発達研究センター

[研究目的]

ERp57 は主として小胞体に局在し、プロテインジスルフィドイソメラーゼ活性を有する分子シャペロンである。我々は、ERp57 はミトコンドリアにおいて内膜に存在するアポトーシス誘導因子(AIF)を切断する μ -カルパインの安定化に関与していることを明らかにしており、間接的にアポトーシスを制御していることが示された (*Biochem. Biophys. Acta* 1783, 1955–1963 (2008))。今回、ミトコンドリアにおける ERp57 の生理機能の全体像を明らかにする目的で、ERp57 と相互作用するミトコンドリアタンパク質の網羅的解析を行った。

[実験方法]

まずヒトERp57C末端合成ペプチドをAF-aminoToyopearlに固定化したペプチドカラムを作成し、これを用いて同ペプチドを抗原とする抗 ERp57 抗体を精製した。次に抗 ERp57 抗体もしくは非免疫ウサギ抗体を Protein G-Sheparose に固定化して抗体カラムを作成した。まず非免疫抗体カラムにラットミトコンドリア膜間腔画分を通し、その素通りを抗 ERp57 抗体カラムに吸着させ、抗原ペプチドを添加して溶出されるタンパク質をSDS-PAGE、ゲル内消化後、nano LC-MS/MS (ADVANCE UHPLC system, LTQ Orbitrap XL mass spectrometer)で得られたスペクトルから MASCOT データベースによりタンパク質を同定した。

[結果と考察]

抗 ERp57 抗体カラムに特異的に結合したタンパク質として Acy-CoA dehydrogenase や ketoacyl-CoA thiolase といった脂肪酸 β 酸化関連酵素や H_2S を生産する Cystathionine γ -lyase という酵素が高いスコアで同定された。このことから、ERp57 はミトコンドリアにおけるエネルギー生産や酸化ストレス応答に関わる酵素の安定化や活性の調節などの働きをもつ可能性が示唆された。

タンパク質ポリチオール化制御機構の解明

〇ヒシヤム ビン アブドル ハミル 1 、井田智章 1 、笠松真吾 1 、魏 范研 2 、松永哲郎 1 、赤司壮一郎 1 、ジョン ミンギョン 1 、藤井重元 1 、居原 秀 3 、澤 智裕 4 、富澤一仁 2 、本橋ほづみ 5 、赤池孝章 1

¹ 東北大院・医・環境保健医学分野、² 熊本大院・生命科学・分子生理学分野、³ 大阪府大院・理・生物科学専攻、⁴ 熊本大院・生命科学・医学系微生物学分野、⁵ 東北大・加齢研・遺伝子発現制御分野

【背景・目的】我々は最近、生体内でチオール基に過剰にイオウ原子が付加したシステインパースルフィド(CysSSH)をはじめとするポリスルフィドが生成し強力な抗酸化活性を示すことを明らかにし、さらに、タンパク質中のシステイン残基にもポリスルフィドが存在すること(タンパク質ポリチオール化)を見出した。しかし、タンパク質ポリチオール化の分子メカニズムは依然不明な点が多い。そこで本研究では、タンパク質ポリチオール化の検出方法を確立するとともに、タンパク質ポリチオール化の分子メカニズムについて、特にシステイニル tRNA 合成酵素(CysRS)に注目して解析を行った。

【方法】ポリエチレングリコールーマレイミドをチオール標識試薬に用いたタンパク質ポリチオール化検出方法(PEG-maleimide-based gel shift assay, PMSA)を開発し、組換えヒトGAPDHタンパク質およびヒト肺がんA549細胞内GAPDHタンパク質についてポリチオール化の解析を行った。また、組換えCysRSタンパク質の酵素生成物について質量分析(LC-MS/MS)による解析を行った。

【結果・考察】本研究で開発した PMSA の結果、組換え GAPDH タンパク質および A549 細胞内 GAPDH タンパク質どちらもポリチオール化されていることが分かった。また、A549 細胞内では GAPDH 以外にも様々なタンパク質がポリチオール化されていることが分かった。LC-MS/MS により CysSSH の tRNA への取込みを解析した結果、CysRS は Cys のみならず CysSSH を効率よく tRNA に転移して CysSSH-tRNA を生成することが明らかになった。これらのことから、タンパク質ポリチオール化は翻訳後におこる修飾ではなく、翻訳時に CysSSH 自体がタンパク質に組み込まれることに起因するタンパク質修飾である可能性が示唆された。

システインパースルフィドの新しい検出システムの構築

○ジョン ミンギョン¹、井田智章¹、笠松真吾¹、松永哲郎¹、土屋幸弘²、渡邊泰男²、藤井重元¹、赤池孝章¹

1東北大院・医・環境保健医学、2昭和薬科大・薬理学

【目的】活性イオウ分子は、システインパースルフィドをはじめとした、チオール基(R-SH)に過剰なイオウ原子が付加した化合物(R-(S)_n-SH)であり、生体内で高いレベルで生成されていることが分かってきた。また、活性イオウ分子は高い抗酸化活性を有し、その生理的機能が注目されている。しかし、システインパースルフィドは反応性が高く不安定であるため、定量的に検出することが難しく、さらに、その検出には質量分析装置等の特別な機器・技術が必要である。本研究では、チオール基反応試薬であるヨードアセトアミドフルオレセイン(IAF)を用いた high performance liquid chromatography(HPLC) 一蛍光検出法による、より簡便な新しいシステインパースルフィドの検出法の構築を目的とした。

【方法と結果】HPLC-蛍光検出法では、システインパースルフィドを IAF と反応させることで安定化させ、その反応生成物(IAF アダクト)を HPLC により分離したのち蛍光により検出をおこなった。まず、濃度既知の各種合成標品(IAF アダクト)を調製し、HPLC-蛍光検出法により分析をおこなった。その結果、本検出法により各種システインパースルフィド IAF アダクトを特異的・定量的に検出できることが示された。また、シスチンを基質とした組換えシスタチオニンγ-リアーゼによるシステインパースルフィド生成を本 HPLC-蛍光検出法を用いて解析した。その結果、質量分析装置を用いた解析と同様に試験管内でのシステインパースルフィドの生成を検出、定量することが可能であった。さらに、本検出法により細胞内活性イオウ分子の生成を解析した結果、システインパースルフィド関連化合物であるグルタチオンパースルフィドの生成が確認された。

【考察】システインパースルフィドの HPLC-蛍光検出システムは、従来の質量分析法等 に比べて、より簡便な検出システムであり、活性イオウ分子の生理機能の解明の有用な ツールとなることが期待される。

タンパク質ポリチオール化による親電子シグナル制御

○赤司壮一郎¹、笠松真吾¹、ジョン ミンギョン¹、松永哲郎¹、井田智章¹、藤井重元¹、本橋ほづみ²、澤智裕³、熊谷嘉人⁴、赤池孝章¹

¹ 東北大院・医・環境保健医学、² 東北大・加齢研・遺伝子発現制御、³ 熊本大院・生命科学・医学系微生物学、⁴ 筑波大・医・環境生物学

【背景・目的】活性酸素の生理的なシグナルを担う親電子物質である 8-ニトロ-cGMP について解析していくなかで、我々は 8-ニトロ-cGMP を代謝・制御する因子としてcystathionine γ -lyase などのイオウ代謝酵素から産生されるシステインパースルフィド (CysSSH) を同定した。さらに、過イオウ化したシステインである CysSSH は多くのタンパク質中に存在することがわかってきた。そこで CysSSH を有するタンパク質(ポリチオール化タンパク質)を介した親電子シグナル制御について、8-ニトロ-cGMP を用いて検討を行った。

【方法・結果・結論】ヒト組換え glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) および ヒト組換え ethylmalonic encephalopathy protein 1 (ETHE1) をモデルタンパク質として用いた。PEG maleimide-labeling gel shift assay (PMSA) および質量分析 (LC-MS/MS) による解析法を構築し、これら組換えタンパク質のポリチオール化を特異的に検出した。さらに、ポリチオール化タンパク質の反応性を検討するために、8-ニトローでGMP によるチオール基修飾であるタンパク質 Sーグアニル化を解析したところ、2-mercaptoethanol などの還元剤の処理により Sーグアニル化が減少した。すなわち、この Sーグアニル化は通常のアルキル化構造ではなく、チオール基に複数のイオウ原子を含むユニークな構造 (Sーポリチオール) を有していることが推察された。以上より、タンパク質ポリチオール化は、親電子シグナル伝達においてチオール基を保護し、タンパク質翻訳後修飾の可逆性を維持する機構であることが示唆された。

Human ADH5 polymorphisms affect susceptibility to electrophilic stresses

○Md. Morshedul Alam¹, Shingo Kasamatsu², Maki Goto¹, Hiroshi Kitamura¹, Tomoaki Ida², Takaaki Akaike² and Hozumi Motohashi¹

Alcohol dehydrogenase class 3 (also known as ADH5) is highly conserved from bacteria to human and considered as the most ancient member of alcohol dehydrogenase family. ADH5 is a glutathione-dependent bifunctional enzyme catalyzing oxidation of formaldehyde to formate (formaldehyde dehydrogenase (FDH) activity) and reduction of nitric oxide (NO) to hydroxylamine (nitrosoglutathione reductase (GSNOR) activity). While previous studies demonstrated essential roles of ADH5 in the termination of NO signaling, we have recently clarified an important contribution of ADH5 to the cytoprotection from oxidative stress and one carbon metabolism by analyzing phenotypes of Adh5-null mice. To investigate whether ADH5 is involved in the pathogenesis of various human diseases related to NO, oxidative stress and one carbon metabolism, we explored non-synonymous single nucleotide polymorphisms (nsSNPs) in human ADH5 gene and examined their effect on the enzymatic activity of ADH5. We found 23 nsSNPs in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database. Among them, we picked up three nsSNPs, which were expected to be pathogenic judging from the resultant amino acids in terms of their cooperation with a substrate, NAD(H), Zn²⁺ coordination and dimerization interface as well as their conservation status. Recombinant proteins of three ADH5 variants, K288E, R312C and V346E, were prepared, and their activities were measured in vitro together with artificial mutants of ADH5, R115D, C45S and C174S. R312C had a higher activity of GSNOR, whereas V346E had a lower activity of FDH than wild-type ADH5. Moreover, V346E was found unstable when it is expressed in cells. Since the nsSNP for V346E variant has been shown to associate with Takotsubo cardiomyopathy, our results suggest that functional defects of ADH5 might be one of the underlying causes of the pathological condition.

¹Department of Gene Expression Regulation, IDAC, Tohoku University

²Department of Environmental Health Sciences and Molecular Toxicology, Graduate School of Medicine, Tohoku University

NRF2 活性化による音響外傷からの内耳保護効果の解明

○本蔵陽平12、村上昌平1、川瀬哲明2、香取幸夫2、本橋ほづみ1

1東北大・加齢研・遺伝子発現制御分野、2東北大院・医・耳鼻咽喉頭頸部外科学分野

強大音に曝露されると内耳性聴覚障害が生じる。この発症機序は、虚血再還流による 酸化ストレスの増加がもたらす組織障害であると理解されている。すなわち、強大音に 曝露されている間は内耳の血流量が減少し、曝露後にその回復が起こることにより、活 性酸素種が発生し組織障害・細胞の機能低下をもたらすというものである。本研究では、 酸化ストレス防御において中心的役割を果たしている転写因子として NRF2 に着目した。 NRF2 は、酸化ストレスや外来異物の刺激により活性化され、それらに対する生体防御 機構を担う遺伝子群の発現を統括的に誘導する。これまでに、Nrf2 遺伝子欠損 $(Nrf2^{-/-})$ マウスを用いた解析から、同因子が様々な組織において酸化ストレス防御を担っている ことが報告されている。そこで、内耳の音響外傷からの保護においても NRF2 が重要な 役割を果たすものと予想し、Nrf2⁻⁻マウスを用いて強大音曝露実験を行い、NRF2の内耳 保護効果を検討した。まず、聴性脳幹反射(ABR:Auditory brain stem responses)と蝸牛の 有毛細胞の組織学的検討から、Nrf2^ナマウスは野生型マウスと比較して強大音曝露によ り内耳障害が生じ易いことが明らかになった。そこで、NRF2 誘導剤である CDDO-Im を 事前に投与したところ、強大音曝露での内耳障害が軽減された。この効果は、Nrf2--マ ウスでは認められなかったことから、NRF2 の活性化が音響外傷からの内耳保護に有効 であったと確認された。実際、CDDO-Im 投与により蝸牛組織で NRF2 の標的遺伝子の発 現が上昇しており、過酸化脂質である 4-hydroxynonenal の減少が認められた。以上の結 果から、NRF2 の活性化は、強大音曝露による内耳障害に対して保護効果を有すると結 論される。この結果は、騒音性難聴だけでなく加齢性難聴も含む、酸化ストレスに伴う 内耳障害の予防に NRF2 の活性化が有効であることを意味しており、これらの病態をも たらす分子メカニズムの解明の一助となることが期待される。

Nrf2 は Pten 欠失に起因する肝臓がん発症に寄与する

○一戸理沙、田口恵子、山本雅之

東北大院・医・医化学分野

肝臓がんのおおよそ半数では、がん抑制因子である Pten の発現が低下している。肝臓特 異的 Pten 欠失 (Pten-Alb) マウスは、脂肪肝炎を経て肝臓がんを発症するため、ヒトの 肝病態を模した格好のモデルとなる。Nrf2 は酸化ストレスや毒物に応答して活性化し、 抗酸化や解毒代謝に関連する遺伝子群の発現を統一的に誘導する転写因子である。Nrf2 は、Keap1 と β-TrCP という 2 つのユビキチンリガーゼアダプターを介してプロテアソー ムによる分解を受けるので、通常は低活性状態を維持している。しかし、多くのがん細 胞ではそのような Nrf2 分解機構が破綻しており、異常活性化した Nrf2 が抗がん剤耐性 の獲得や、がん細胞の増殖促進に働く。本研究では、Pten:Nrf2 二重欠失 ($Pten-Alb::Nrf2^{-/-}$) マウスを作製することによって、Pten-Albマウスの肝病態に対する Nrf2 の寄与を調べた。 Pten-Albマウスは既報の通り6ヶ月齢で脂肪肝炎を、12ヶ月齢では肝臓がんを発症した。 6ヶ月齢における肝トリグリセリドを測定したところ、Pten-Alb と Pten-Alb::Nrf2^{-/-}マウス 両者で有意な上昇がみられたが、一方、Pten-Alb と Pten-Alb::Nrf2⁻の間では大きな差は なかった。Pten-Alb::Nrf2^{-/-}マウスは Pten-Alb マウスと同様に 6 ヶ月齢において脂肪肝炎 を発症したが、12ヶ月齢において肝臓がんを発症しなかった。また、Pten-Alb マウスで は 6 ヶ月齢、12 ヶ月齢のいずれにおいても Nrf2 活性化がみられ、Nrf2 標的遺伝子であ る Ngo1 遺伝子および同タンパク質の発現上昇が確認できた。以上の結果より、Pten 欠 失による Nrf2 活性化は、脂肪肝炎から肝臓がんへの進展に対して重要な役割を果たすも のと結論された。一方、Nrf2 活性の有無に関わらず Pten-Alb マウスは 6 ヶ月齢で脂肪肝 炎を発症することから、Nrf2 は Pten 欠失による脂肪肝炎発症には関与しないものと考え られる。

ストレス応答における NRF2、KEAP1、CUL3 の細胞内分子挙動の解析

○磯達朗、鈴木隆史、山本雅之

東北大院・医・医化学分野

転写因子 NRF2 は酸化ストレスに応答し生体防御遺伝子群の発現を誘導する。KEAP1 は CUL3 と共に E3 ユビキチンライゲース複合体を形成して NRF2 の分解抑制を行うが、ス トレス感知に伴いユビキチン化反応は停止し、蓄積した NRF2 は生体防御遺伝子群を活 性化する。細胞内の NRF2 量は KEAP1-CUL3 複合体の制御下に決定されるが、これまで その絶対量は不明であった。本研究は、ストレス応答における細胞内の NRF2、KEAP1、 CUL3 の絶対量を明らかにして複合体形成の動的変化を評価し、ストレス応答における 分子挙動の詳細の解明を目指している。濃度既知のリコンビナントタンパク質を標準と したイムノブロット解析により、マウスマクロファージ細胞株(RAW264.7)におけるスト レス刺激時の NRF2、KEAP1、CUL3 分子の絶対量の変化を求めた結果、KEAP1 と CUL3 細胞質に存在し、それらの分子の数は1細胞あたり約20万個であって、その数と局在は ストレス刺激の有無で変化しなかった。一方、NRF2 は定常状態では約 5 万分子と低レ ベルに維持されているが、ストレス刺激によって 40 万個程まで蓄積して KEAP1 量を上 回った。細胞質における KEAP1 二量体は約 500 nM の濃度で存在し、そのうち 150 nM 程度が NRF2 を捕捉・分解し、残り大部分の KEAP1 は NRF2 と結合していない。 ストレ ス刺激を受け NRF2 分解が停止すると、細胞質における NRF2 濃度は KEAP1 二量体と同 程度まで上昇し、核における NRF2 は 2.7 µM 程に達した。また、精製タンパク質を用い た分析超遠心やプルダウンアッセイの結果、ストレス刺激は KEAP1-CUL3 相互作用に影 響を与えないことが明らかになった。以上より、KEAP1-CUL3 はストレス刺激によって 量、局在、相互作用を変化させることなく NRF2 分解を停止するものと考えられる。ま た、ストレス刺激により安定化した NRF2 タンパク質が細胞質における KEAP1 を飽和さ せ、その結果 KEAP1 による補足から免れた NRF2 が核に蓄積するものと考えられる。本 研究成果は、環境応答型転写因子の量的制御の分子メカニズム理解に寄与する重要知見 である。

EVI1 遺伝子高発現白血病における白血病発症機構

○片山紗乙莉 1,2、鈴木未来子 3、呉繁夫 2、山本雅之 1

東北大院・医・1医化学分野、2小児病態学分野、3RI センター

急性骨髄性白血病にみられる 3q21 と 3q26 との間の染色体転座や逆位は、予後不良の白 血病を惹起することが知られている。この白血病では 3q26 側に存在する EVII 遺伝子が 異常に発現することが白血病発症の原因となるが、しかし、その詳細なメカニズムに関 しては不明な点が多い。私たちはこの白血病発症機構を解明するために、大腸菌人工染 色体(BAC)クローンを用いて、ヒトの3q21と3q26との間の逆位を再現したトランス ジーンをもつマウス(3q21q26 マウス)を樹立した。3q21q26 マウスでは、造血幹・前駆 細胞特異的にヒト EVII 遺伝子が高発現しており、このマウスは 24 週齢以降に実際に白 血病を発症した。3q21q26 マウスの白血病細胞をフローサイトメトリーで解析したとこ ろ、B 細胞マーカーである B220 または骨髄球マーカーである Gr1 が陽性となる B220+/Gr1-細胞、B220+/Gr1+細胞、B220-/Gr1+細胞の3種類の白血病細胞が混在する混 合型白血病であることがわかった。これらの3分画において、未分化細胞のマーカーで ある c-Kit の発現を解析したところ、B220+/Gr1-分画が最も多く c-Kit 陽性細胞を含んで いた。そこで、これらの3つの分画をさらに c-Kit 発現の有無によって合計6分画に分け て解析したところ、B220+/Gr1-/c-Kit+分画が最も高いコロニー形成能を有していた。さ らに、この細胞分画から骨髄球系細胞(B220-/Gr1+細胞)への分化が認められた。また、 B220+/Gr1-/c-Kit+分画の細胞では、EVII 遺伝子の高発現も認められた。白血病発症前の 若年齢(12 週齢)のマウスを解析したところ、3q21q26 マウスでは野生型マウスと比べ て有意に B220+/Grl-/c-Kit+細胞が増加していたが、一方、分化した段階である B220+/CD19+細胞は減少していた。以上の結果から、白血病細胞分画のうち、 B220+/Gr1-/c-Kit+分画が最も未熟な細胞を含んでおり、この細胞から白血病細胞が発生 しているものと理解される。すなわち、この EVI 高発現白血病では明らかな症状を示す 以前よりB細胞の分化障害がおこっており、その結果として蓄積した前駆細胞が白血病 細胞の起源になっているものと結論される。

NRF2 活性化変異を伴う肺がんモデルマウスの確立

○土田恒平¹、鈴木未来子²、大槻晃史¹、守田匡伸¹、山本雅之¹

東北大院・医・¹医化学分野、²RI センター

NRF2 は酸化ストレスに対する生体応答の制御機構において中心的な役割を担う転写因 子であり、抗酸化・異物代謝遺伝子の転写を活性化することで様々な生体防御反応を誘 導する。一方、一部の非小細胞性肺がんでは NRF2 の活性化変異がみられ、予後不良因 子として知られている。培養細胞株を用いた解析から、NRF2 活性化変異はがん細胞に おいて細胞増殖亢進や治療耐性獲得を引き起こすことで、がん患者の予後を悪化させて いるものと考えられてきた。しかし、そのような NRF2 活性化変異をもつがん細胞の悪 性化機構について、個体レベルでの検証は行われていない。正常細胞では NRF2 が発が んに対して抑制的に働くために、既存の先天性 NRF2 活性化マウスは化学物質による発 がんに対して抵抗性を示す。即ち、同モデルではがん細胞の悪性化に関する NRF2 活性 化の影響解析は困難であった。そこで、本研究では発がんと同時に NRF2 を後天的に活 性化させるトランスジェニック(Tg)マウスモデルの樹立を試みた。トランスジーンに は、Nrf2 遺伝子を含む約 200kb のマウスゲノム配列をベースにした大腸菌人工染色体 (BAC) を用い、そこにがん検体で認められる NRF2 活性化変異 (NRF2^{T80R}) を導入し た。さらに、その上流に loxP 配列で挟み込まれたスプライス受容部位と転写終結配列を 挿入して、Cre 酵素による組換えに応じて NRF2^{T80R} を発現する構築を作製し、それを用 いて条件付き Nrf2^{T80R} BAC Tg マウスを樹立した。本マウスにおいては、Cre 誘導的に NRF2^{T80R}が発現し、その標的遺伝子の発現が上昇する。本マウスに肺がんを形成するた めに、条件付き活性化型 Kras 発現マウスと交配した後、Cre 誘導アデノウイルスの鼻腔 内投与によって肺特異的に活性化型 Kras および NRF2^{T80R} を発現させたところ、感染 8 週後にアデノーマ形成を認めた。これらの結果から、本マウスは発がん後のがん悪性化 において NRF2 の果たす役割を解析する上で非常に有効なマウスとなるものと期待され る。

ヒトIL6 遺伝子モニターマウスを用いた *in vivo*イメージングによる炎症状態解析システム の開発とその利用

○林真貴子¹、高井淳¹、于磊¹、本橋ほづみ²、森口尚¹、山本雅之¹

1東北大院・医・医化学分野、2東北大・加齢研・遺伝子発現制御学分野

インターロイキン 6 (IL6) は様々な慢性炎症性疾患の病態形成に深く関わる炎症性サ イトカインである。IL6 遺伝子の発現は様々な炎症性刺激により誘導され、免疫系細胞 以外に、線維芽細胞や神経細胞などからも産生される。我々は、非侵襲的に動物個体内 の炎症状態をモニターするために、ヒト IL6 遺伝子座を含む BAC (大腸菌人工染色体) DNA の制御下において、ルシフェラーゼレポーターを発現するトランスジェニックマウ ス(hIL6 モニターマウス)を樹立した。hIL6 モニターマウスでは、LPS(リポ多糖) 刺激による全身性の炎症が、Luc活性の in vivo イメージングにて観察された。また、本 マウスでは LPS 用量依存的な炎症の重症化を、Luc 活性の強さを指標に定量できた。 LPS 投与後に臓器を取り出し ex vivo イメージングを行った結果、脳、肺、胸腺を含む各臓器 において Luc 活性の誘導が観察され、マウス内在性 IL6 遺伝子の発現パターンと相関し ていた。次に、アトピー性皮膚炎モデルである活性化型ダイオキシン受容体(AhR-CA) 過剰発現マウスと hIL6 モニターマウスを交配し、Luc 活性を指標に皮膚炎症状の推移を 観察した。本複合変異マウスでは、皮膚炎の進行と相関して Luc 活性の増強が確認され た。デキサメサゾンを本複合変異マウスに途布したところ、炎症マーカーの改善と相関 した Luc 活性の減衰を確認し、薬剤の抗炎症効果をモニターすることができた。続いて、 hIL6 モニターマウスに、ヒト多発性硬化症のモデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) を適用した。中枢神経系での炎症を in vivo イメージングにて高感度に検出し、 炎症状態と神経症状重症度との相関が示された。以上より、hIL6 モニターマウスは動物 個体内での炎症状態、および薬剤の抗炎症効果の高感度なモニターリングを可能にし、 慢性炎症性疾患の病態メカニズムを解明する有用な実験ツールになることが期待される。

抗酸化剤応答配列 5'末端領域が NRF2-sMaf による生体防御遺伝子誘導に重要

〇大槻晃史 1 、鈴木未来子 2 、勝岡史城 4 、土田恒平 1 、守田匡伸 1 、清水律子 3 、山本雅 之 1,4

東北大院・医・¹医化学分野、²RI センター、³分子血液学分野、⁴東北大・東北メディカルメガバンク機構

CNC 群転写因子 NRF2 と小 Maf 群因子 (sMaf)からなる二量体は、生体防御機構の中 心的な役割を担っている。NRF2-sMaf 二量体は、抗酸化剤応答配列 (ARE; TGA[G/C]NNNGC) に結合し、様々な生体防御遺伝子の転写を活性化する。一方、Maf 群因子はそれ自身でホモ二量体を形成し、Maf 認識配列 (MARE; TGCTGA[G/C]TCAGCA) に結合する。ARE と MARE は、5'末端の塩基(下線部)が異なっており、この配列が NRF2-sMaf 二量体または Maf ホモ二量体の選択に重要であると示唆されていたが、その 詳細は明らかではなかった。NRF2と Maf 群因子の DNA 結合ドメインは類似しているが、 NRF2 の 502 番目に位置するアラニン (A502)に対応するアミノ酸が、Maf 群因子ではチ ロシン(Y)である点で異なっている。実際に、NRF2の A502 を Y に置換した変異体 (NRF2^{A502Y})とsMafのヘテロ二量体は、ARE認識能を喪失し、Maf群因子と同様にMARE に対して親和性を示す。そこで本研究では、NRF2^{A502Y}変異体を発現するノックインマウ スを作製し、野生型 NRF2 結合部位と NRF2^{A502Y} 結合部位とを比較することによって、 NRF2-sMaf 二量体と Maf ホモ二量体結合部位の特徴付けを行った。腹腔マクロファージ を用いたクロマチン免疫沈降(ChIP)シーケンスの結果、野生型 NRF2 が特異的に結合 している領域では、5'末端に A/G が高頻度に出現した。一方、NRF2A502Y の結合領域では Cが濃縮された。また、野生型 NRF2 および NRF2^{A502Y} の結合サイトは相互に排他的な分 布を示したことから、モチーフの 5'末端に位置する塩基が NRF2-sMaf ヘテロ二量体と Maf ホモ二量体を明確に区別し、NRF2-sMaf による酸化ストレス応答に重要な機能を担 っていることが明らかとなった。さらに、NRF2^{A502Y} マウスでは野生型マウスに比べて、 制御領域に ARE をもつ生体防御遺伝子群の発現誘導が著しく低下していた。これらのこ とから、シス配列の僅かな違い(ARE (A/G) vs. MARE (C)) に規定される転写因子結合 が生体防御反応に重要であることが実証された。

GATA2 participates in inflammatory cytokine production from renal collecting duct cells during renal ischemia-repurfusion injury

OLei Yu, Takashi Moriguchi, and Masayuki Yamamoto

Department of Medical Biochemistry, Tohoku University Graduate School of Medicine

Transcription factor GATA2 has been known to play pivotal roles in hematopoiesis and urogenital development. While GATA2 is highly expressed in collecting duct (CD) cells of adult kidney, physiological function of GATA2 in this lineage of cell is not fully understood. To delve into this issue, we generated renal tubular cell specific *Gata2* deletion (G2CKO) mice and examined gene expression signature in the CD cells. We found that a series of inflammatory cytokine genes were down-regulated in the GATA2-deficient CD cells. Given this result, we assumed that GATA2 is involved in pathophysiology of inflammatory renal diseases. To explore this possibility, we applied ischemia reperfusion injury (IRI) model to the G2CKO mice. Interestingly, the G2CKO mice exhibited resistance against IRI by virtue of the reduced expression of inflammatory cytokine genes. Over all, this study provides novel insight into proinflammatory function of GATA2 in acute renal disease.

GATA 因子阻害を起点とした異所性エリスロポエチン発現誘導剤の開発

○金子寬¹、山本雅之²、清水律子¹

1東北大院・医・分子血液学分野、2医化学分野

腎性貧血は慢性腎臓病の進行に伴って発症し、骨髄での赤血球造血を刺激するエリスロポエチン(EPO)の産生量低下に起因する。現在の主要な治療方策は遺伝子組換えヒトエリスロポエチン製剤の投与であるが、投与方法や薬価等に問題を抱えており、EPO遺伝子の発現を誘導する薬剤の開発が望まれる。低酸素誘導的なEPO遺伝子発現制御機構にはHIF転写因子群が関与するが、これまでにこれらを標的とした薬剤は実用化されていない。近年、本来の腎EPO産生細胞以外での異所性EPO発現の抑制機構に、GATA転写因子群が関与することが報告された。我々は、低分子化合物によるGATA因子阻害が異所性のEPO発現を誘導し、腎性貧血の治療に資するものと考え研究を進めている。これまでに、GATA因子活性を指標としたハイスループットスクリーニング系を用いて、低分子化合物ライブラリからレポーター活性を抑制する複数のヒット化合物を得た。さらに、これらヒット化合物で処理された培養細胞株やマウス個体内ではEPO発現が誘導されるが、HIF標的遺伝子であるGLUTIやHKIの発現は上昇しなかった。よって、これらヒット化合物は、通常酸素濃度下でHIF経路を介さず、異所性のEPO発現を誘導すると推察される。

GATA1 変異に起因した TMD/DS-AMkL の発症メカニズムの解析

○石原大嗣 1,2、長谷川敦史1、山本雅之1、清水律子2

1東北大院・医・医化学分野、2東北大院・医・分子血液学分野

一過性骨髄増殖症(TMD)はダウン症患児の約10%に認められ、新生児期に白血病様芽球が異常増殖する疾患である。TMDの多くは無治療で自然寛解するが、TMD既往を持つ患児の約20%が数年間の無症候期を経て急性巨核芽球白血病(DS-AMkL)を発症する。TMDおよびDS-AMkL 芽球では、赤血球・巨核球分化に関わる転写因子GATA1のアミノ末端側転写活性化(NT)ドメインの欠失変異(GATA1^{ΔNT})が高頻度に見つかっている。さらに、近年、TMD 芽球におけるGATA1^{ΔNT}発現量の多寡が白血病発症率に影響することも明らかにされた。このことから、GATA1の機能異常による標的遺伝子発現制御の破綻が、TMDおよびDS-AMkLの発症に関与することが示唆されているが、その詳細な分子メカニズムは明らかにされていない。

本研究では、遺伝子相補レスキュー法によって作出した GATA1 $^{\Delta NT}$ のみを発現するマウス(ΔNTR ; ヒト TMD および DS-AMkL の病態を再現する)の胎仔肝臓巨核球における遺伝子発現プロファイルを解析し、TMD 発症に関わる責任遺伝子の同定を試みた。また、GATA1 $^{\Delta NT}$ の発現量の異なる 2 系統の ΔNTR マウス(白血病発症系統と非発症系統)間での遺伝子発現プロファイルを比較することで、DS-AMkL 発症の有無を規定する特異的遺伝子の探索も行った。

 Δ NTR マウスでは細胞周期や白血病化、アポトーシスに関わる遺伝子の発現が変動し、その中には転写因子 E2F の標的遺伝子が多数含まれていた。GATA1 $^{\Delta NT}$ は Rb タンパク質 の結合部位を欠失しているため Rb との相互作用が減弱することが分かっている。このことから、Rb を介した E2F 標的遺伝子の発現バランスの不均衡が TMD 発症に関与していることが考えられる。また、GATA1 $^{\Delta NT}$ の発現量の多寡により Ras シグナルを制御する遺伝子や巨核球分化に関連する遺伝子発現の変動パターンが変動していた。この結果から、GATA1 $^{\Delta NT}$ の発現量低下による Ras シグナルや巨核球分化の制御破綻が、TMD から DS-AMkL への進展に寄与している可能性が示唆される。

マウス子宮内膜間質細胞増殖におけるリゾホスファチジン酸(LPA)シグナルの解析

○瀬川結花¹、可野邦行¹、藍川志津¹、青木淳賢¹,²

¹東北大院・薬・分子細胞生化学 、²CREST・JST

リゾホスファチジン酸(LPA)は6種のLPA受容体(LPA_{1~6})を介して多様な生命現象を 引き起こす生理活性脂質である。これまでに当研究室では、着床期の子宮において子宮 内膜上皮細胞に特異的に発現するLPA。が子宮内膜の肥厚(間質細胞の増殖)を惹起し、 着床に必須な役割を担っていることを明らかにした。この子宮内膜間質細胞の増殖に関 して、上皮細胞との相互作用及びLPAシグナルの寄与を検討するため、本研究では子宮 内膜細胞初代培養系を用いた。着床期(交尾後3.5日)のICR系雌マウスの子宮より、子 宮内膜上皮細胞、間質細胞をそれぞれ単離し、その共培養系又は間質単培養系を用いて 間質細胞の増殖を評価した。LPA_{1/3} antagonistであるKi16425を加えたところ、興味深 いことに共培養系だけなく単培養系のいずれにおいても間質細胞の顕著な増殖抑制が 濃度依存的に確認された。一方でLPA₁ antagonistであるAMO95や、最近我々が化合物ス クリーニングにより独自に見出したLPA₃特異的 antagonistでは、僅かな抑制傾向しか 認められなかった。次に単離した内膜細胞のLPA受容体発現レベルを調べたところ、単 離直後はin vivoと同様に上皮細胞において特異的なLPA。の発現が認められたものの、 培養開始後に急激に発現が減少することが分かった。一方でLPA」およびLPA。は間質細胞 において発現していることが明らかとなった。以上の結果から、現行のin vitroの系で は上皮細胞に発現しているLPA。による間質細胞の増殖作用を解析することは困難と考 えられた。一方で、今回我々は新たに間質細胞に発現しているLPA受容体もその増殖に 関与する可能性を見出した。Ki16425は弱いLPA。antagonist作用も示すことから、LPA。 およびLPA。がその候補として考えられる。今後は上皮細胞におけるLPA。発現が失われな いような実験系を模索すると共に、間質細胞のLPA受容体を介した増殖機構の生理的意 義を調べる必要がある。

CRISPR/Cas9 system を利用した Gα遺伝子多重欠損細胞の作製

○石田覚¹、井上飛鳥¹,²、新上雄司¹、青木淳賢¹,³

¹東北大院・薬・分子細胞生化学、²さきがけ・JST、³CREST・JST

はじめに HEK293 細胞における各 G α 遺伝子の mRNA の発現解析を行った。その結果、G α_s ファミリーでは GNAS(G α_s をコード、以下略)と GNAL(G α_{olf}) の 2 種類が、G $\alpha_{q/11}$ ファミリーでは GNAQ(G α_q) と GNAII(G α_{11}) の 2 種類が、G $\alpha_{12/13}$ ファミリーでは GNAI2(G α_{12}) と GNAI3(G α_{13}) の 2 種類が発現していることを確認した。発現を確認した 6 種類の G α 遺伝子を欠損させるため、それぞれに特異的なシングルガイド RNA(sgRNA)配列を複数作製した。次に、作製した中で高い変異導入効率を示した sgRNA を混合して HEK293 細胞に導入し、限界希釈法によりクローン化を行った。その結果、GNAS と GNAI の二重欠損細胞(G $_{g}$ 欠損細胞)、GNAI2と GNAI3の二重欠損細胞(G $_{12/13}$ 欠損細胞)を樹立できた。G α サブユニットの機能欠損は下流シグナルの検出により検討し、cAMP 産生 (G $_{s}$)、細胞内 Ca²⁺流入 (G $_{q/11}$)、TGF α 切断応答(G $_{q/11}$ 、G $_{12/13}$)が各変異細胞において消失していることを確認した。さらに、GNAQ/GNAII/GNAI2/GNAI3 四重変異細胞の作製にも成功し、本細胞では TGF α 切断応答が完全に消失することを確認した。

GPCR の詳細な機能解明には GPCR に共役する $G\alpha$ サブユニットの同定が必須であるが、これまで行われてきた阻害剤や siRNA による解析等では残存する G タンパク質の影響は否定できない。今回作製した各種 $G\alpha$ 欠損細胞を用いることで、各 $G\alpha$ ファミリーの下流シグナルや GPCR と $G\alpha$ サブユニットの共役の理解に大いに役立つものと期待される。

$TGF \alpha$ 切断アッセイによる GPCR リガンド探索

○岸貴之¹、井上飛鳥¹,²、石黒純¹、青木淳賢¹,³

¹東北大院・薬、²さきがけ・JST、³CREST・JST

[目的]GPCR は市販薬の約3割が作用する重要な創薬標的である。GPCR のリガンド同定は、 GPCR の機能解析において極めて重要であり、これまでに多くの GPCR リガンド探索がな されてきた。通常、GPCR のリガンド探索は、GPCR の活性化により誘導される Gαサブユ ニットの下流シグナルの測定によりなされる。4種類($G\alpha_s$ 、 $G\alpha_i$ 、 $G\alpha_{0/11}$ 、 $G\alpha_{12/13}$)に分類 される $G\alpha$ サブユニットのうち、 $G\alpha_{12/13}$ シグナルを効率的に精度よく評価することは難し い。多くの場合、オーファン GPCR の共役する Gαサブユニットは不明であり、全ての下 流シグナルを個々に検出することは効率が悪い。我々は近年、膜型 TGFαの細胞外ドメイ ンの切断を利用した、 $Goldsymbol{lpha}_{lpha/1}$ および $Goldsymbol{lpha}_{12/13}$ 共役型 GPCR の活性化を高感度・高精度に検出 する新規 GPCR 活性化検出系(TGFα切断アッセイと命名)を開発し、これまでに 3 つの $G\alpha_{12/13}$ 共役型 GPCR のリガンドを同定している。 $TGF\alpha$ 切断アッセイはキメラ $G\alpha$ を共発現 させることで、原理的にどのGαと共役するGPCRの活性化も検出可能であると考えられ、 事実、約 120 種類の GPCR のうち 9 割もの GPCR の活性化を検出している。従って、これ まで見落とされてきたリガンドを含め、新たな GPCR リガンドを同定することが可能と考 えられる。そこで、我々は TGFα切断アッセイを用いた GPCR リガンド探索を試みた。 「方法・結果]HEK293 細胞にアルカリホスファターゼ(AP)標識 TGFα(AP-TGFα)、GPCR、 $G\alpha$ サブユニット $(G\alpha_{q/s}, G\alpha_{q/i1}, G\alpha_{q/i3}, G\alpha_{q/o}, G\alpha_{q/z}, G\alpha_{q/12}, G\alpha_{q/13}$ および $G\alpha_{16}$ サブユニ ットを混合)をトランスフェクションした。翌日、化合物を播種した96ウェルプレート に細胞懸濁液を添加し、1時間培養した後、上清を回収した。AP-TGFα切断量は p-ニト ロフェニルリン酸を用いた酵素反応を行い、吸光度を測定することで算出した。また、 実際に評価系の有効性を確認するため、複数のリガンド既知 GPCR を用いて検討を行い、 リガンド-GPCR の組み合わせを本評価系で検出可能であることを確かめた。現在、約 9 万 5 千通りの組み合わせを目指したリガンド探索を進めており、これまでに評価を終え た約3万通りの組合せのうち1組のヒットを見出した。

非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) モデルマウスにおける FGF19 投与の効果

○三浦雄貴¹、五十嵐洋平¹、平田祐介¹、野口拓也¹、松沢厚¹

1東北大院・薬・衛生化学

Fibroblast growth factor (FGF) 15 および FGF19 (げっ歯動物: FGF15、ヒト: FGF19) は、FGF ファミリーの中で内分泌性 (ホルモン様) FGF として機能する。両者は小腸に高発現し、血流を介して肝臓に発現する FGF 受容体 (FGFR) に作用することで、胆汁酸合成・細胞増殖・糖代謝および脂質代謝など様々な生理機能を調節している。また、FGF15の発現レベルが低い farnesoid X receptor (Fxr) 欠損型マウスでは、脂肪肝や肝障害など非アルコール性脂肪性肝疾患 (nonalcoholic fatty liver disease: NAFLD) と類似した病態を示すことが知られている。NAFLD において、炎症や線維化を伴うより重篤な病態を示すものは非アルコール性脂肪性肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis: NASH)と呼ばれている。NASH は肝硬変を経て最終的には肝癌へと進行するため、早期の段階での治療や予防が必要とされる。しかしながら、NASH に有効な薬物療法は未だ確立されておらず、そのための分子基盤の確立が望まれている。

我々はこれまでに、Fxr 欠損マウスに FGF19 を投与することによって脂肪肝および肝障害の病態が改善することを明らかにしてきた。そこで本研究においては、NASH における FGF19 投与の効果を検討することにした。まず、メチオニン・コリン欠乏 (MCD) 飼料給餌により NASH モデルマウスを作製したところ、肝臓における脂肪の蓄積、炎症性サイトカインの発現および肝障害マーカーの上昇が認められたことから、MCD 飼料給餌マウスは NASH 様病態を示していることが確認された。一方で、FGF19 を投与した MCD 飼料給餌マウスにおいては、血中肝障害マーカーレベルならびに炎症および線維化マーカーの肝 mRNA レベルが有意に低下したことから、FGF19 の投与は NASH の病態改善作用を有することが示唆された。今後は、FGF19 による NASH 病態改善作用の分子機構を明らかにし、NASH の治療法・治療薬開発へ向けた分子基盤の確立を図りたいと考えている。

RING 型ユビキチンリガーゼ TRIM48 による ASK1 活性化制御機構の解明

○森下徹、平田祐介、野口拓也、松沢厚

東北大院・薬・衛生化学

細胞は常に酸化ストレスや紫外線といった様々なストレスにさらされており、生体の恒常性を維持するためには、これらのストレスを正確に感知して適切な応答を誘導することが必要とされる。我々は、ストレス応答の制御因子である Apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1)に注目して解析を行っている。ASK1 は MAPKKK ファミリーに属するセリン・スレオニンキナーゼであり、下流の MAPK である JNK および p38 経路の選択的な活性化を介して、アポトーシスやサイトカイン産生といった細胞応答を誘導する。これまでの報告から、ASK1 は様々な疾患の発症に関わっていることが示唆されており、ASK1 の活性化制御機構の解明は、疾患発症メカニズムの解明や治療法探索の上で重要であると考えられる。

我々は、ユビキチンリガーゼ特異的な siRNA ライブラリーを用いた RNAi スクリーニングを行い、ASK1 の活性化に関わる新規分子として、機能未知の RING 型ユビキチンリガーゼ Tripartite motif containing 48 (TRIM48)を同定した。また、TRIM48 の結合因子探索により、ASK1 活性化抑制因子として報告のあるアルギニンメチル化酵素 Protein methyl transferase 1 (PRMT1)を同定した。これらの結果から、TRIM48 は ASK1 抑制因子である PRMT1 の制御を介して ASK1 の活性化を調節していることが考えられた。そこで、我々は TRIM48 と PRMT1 の関係について検討を行い、TRIM48 と PRMT1 の共発現細胞では、TRIM48 のユビキチンリガーゼ活性依存的に PRMT1 の発現量が低下することを見出した。このことから、TRIM48 はユビキチン化修飾を介して PRMT1 の分解を促進することで ASK1 の活性を正に制御していることが示唆された。一方で、TRIM48 自身も細胞内でユビキチンプロテアソーム依存的な分解を受け、タンパク質レベルでの発現制御を受けていることを明らかにしている。今後は、TRIM48 の発現制御機構も明らかにし、TRIM48 による ASK1 活性化機構の生理的役割を明らかにしたいと考えている。

ノックアウトマウスを用いたプロテインホスファターゼ PPM1L の新規機能解明

藤田宏介¹、篠田康晴¹、永浦裕子¹、草野理恵¹、渡邊利雄²、松居靖久³、阪上洋行⁴、 佐藤達也⁵、舟橋淳一¹、大西素子⁶、田村眞理¹、○小林孝安¹

¹東北大・加齢研・プロジェクト研究推進分野、²奈良女子大・自然科学系 生物科学領域、 ³東北大・加齢研・附属医用細胞資源センター、⁴北里大・医・解剖学、東北大・学際フロンティア研究所、⁶中部大・応用生物学・応用生物化学科

Metal dependent protein phosphatase (PPM)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17種類のメンバーが同定されている。メンバーのひとつである PPMIL は、N 末端に膜貫通ドメインを有し、小胞体膜上で細胞質側に触媒ドメインを向けた形で存在している。また、SAPK 経路を構成する TAK1と ASK1 の脱リン酸化を担うこと、セラミド輸送を制御する CERT の脱リン酸化に関与していることが細胞レベルで明らかにされた。これまで、遺伝子欠損動物がなかったため個体レベルでの解析は遅れていたが、我々は最近 PPMIL 欠損マウスの作出に成功した。

PPMIL KO マウスを交配し、出生した仔を検証したところ、PPMIL 欠損に伴う表現系は 戻し交配を行うマウスの遺伝的背景により大きく異なることが分かった。すなわち CBA を遺伝的背景に持つ交配で生まれたヘテロ KO マウスからは成熟したホモ KO マウスが得られたのに対し、C57BL6 を遺伝的背景に持つヘテロ KO マウスの交配では、ホモ KO マウスは出生直後に死亡することが明らかになった。成熟したホモ KO マウスの行動を観察したところ、前脚や後脚を握りこむような行動の異常が認められた。WT および KO の新生児マウス脳の組織学的な解析を行った結果、側脳室の拡大や線条体尾状核被殻の縮小が観察された。認められた異常は大脳皮質に入出力する軸索線維の異常であると考えられ、大脳皮質の神経細胞もしくは大脳皮質へ投射する神経細胞の軸索形成不全あるいは発達異常が示唆された。

妊娠高血圧腎症における DNA メチル化の関与

○内田多恵子、佐藤恵美子、津國由佳子、伏間智史、三枝大輔、佐藤博、高橋信行

東北大院・薬・臨床薬学分野

妊娠高血圧腎症は高血圧・蛋白尿・胎児発育遅滞を特徴とし、早産・流産の原因となる疾患である。しかしながら現在、発症機構は不明な点が多く、胎盤除去以外の根本的な治療法は存在しない。妊娠高血圧腎症の発症機序の解明および治療法の開発は、必須の課題である。近年、LC-MSを用いたグローバルメタボロミクスにより生体内の代謝物の変化を捉えられることができるようになった。本研究では、妊娠高血圧腎症の発症機構を解明するため、妊娠高血圧腎症モデルマウスを対象とし、グローバルメタボロミクスを行った。

8週齢のメス C57BL/6 マウスにアデノウィルスを投与し、可溶型 VEGF 受容体 1(sFlt-1)を過剰発現させ、妊娠高血圧腎症モデルマウスを作製した(N=6)。対照群では sFlt-1 の代わりに green fluorescent protein (GFP)を過剰発現させた (N=6)。ウィルス 投与 2 週間後にサクリファイスをし、それぞれの群から血漿を得た。得られた血漿は、 高分解能・精密質量測定可能な Q-Exactive により測定を行った。データ解析には SIMCA -P を用いた。

グローバルメタボロミクスの結果、妊娠高血圧腎症モデルマウスではメチオニン回路 周辺の代謝物、胆汁酸が、有意に上昇していることが分かった。そこで、本研究ではメ チオニン回路の代謝物に着目し、ターゲットメタボロミクスを行った。その結果、妊娠 高血圧腎症モデルマウスでは、DNA メチル化の基質となる s-adenosyl-L-methionine (SAM)が有意に上昇していることが分かった。

近年、妊娠高血圧腎症では胎盤における DNA の異常なメチル化が関与していることが報告され始めている。本研究でも DNA メチル化の基質となる SAM が妊娠高血圧腎症で有意に上昇していたことから、妊娠高血圧腎症の発症に DNA メチル化が大きく関与していることが考えられる。今後、妊娠高血圧腎症モデルマウスの胎盤を用いて、DNA メチル化と発症機序について検討を行う予定である。

妊娠高血圧腎症におけるカルニチン代謝の役割

○津國由佳子、佐藤恵美子、内田多恵子、伏間智史、三枝大輔、佐藤博、高橋信行

東北大院・薬・臨床薬学分野

妊娠高血圧腎症(Preeclampsia: PE)は妊娠20週以降に発症し高血圧・蛋白尿を伴う病態であり、妊婦・胎児死亡の主な要因である。しかし、現在出産以外の有効な治療法はなく、確立された予測マーカーも存在しない。また、詳細な発症機序も未だ不明である。

本研究は global metabolomics により病態特異的な代謝物の変化を調べ、PE 病態や 治療効果の評価、発症機序解明への手がかりを得ることを目的としている。

8 週齢のメス C57BL/6J マウスに adenovirus を投与して可溶型 VEGF 受容体 1 (sFlt-1)を過剰発現させ PE モデルマウスを作成した。コントロール群では sFlt-1 の代わりに green fluorescent protein (GFP)を過剰発現させた。 高分解能・精密質量測定可能な Q-Exactive で血漿の global metabolome 測定を行った。また、解析は SIMCA による OPLS-DA、JMP による ANOVA を行った。

コントロール群と PE 群の代謝物を比較したところ、ミトコンドリアにおける脂肪酸酸化などに関わるアセチルカルニチンの濃度が PE 群において低値を示した。そこで、血漿中アセチルカルニチンレベルの変化に着目し、他のアシルカルニチンについて解析を行ったところ、いくつものアシルカルニチンが PE 病態において有意に変化していることが分かった。これらの結果で、PE モデル群でアシルカルニチンレベルに変化がみられたことから、カルニチン代謝の乱れによるミトコンドリア内のエネルギー代謝の異常が病態に関連している可能性があると考えられる。近年、PE において生じる低酸素状態と、カルニチントランスポーターやカルニチン代謝に関わる酵素の発現異常とを関連裏付ける報告もなされており、PE とカルニチントランスポーターおよび関連酵素の関係について検討する予定である。

エンドパーオキサイド構造を有する tetraoxane 化合物の遺伝子変異酵母とがん細胞に対する生物活性

○ ウスフバヤル ナランドラム¹、上杉祥太²、髙野侑恵¹、土屋英子³、佐々木麻乃⁴、 嶋田和明⁴、木村賢一¹,²

1岩手大院・農、2岩手大院・連合農、3広島大院・先端物質、4岩手大・工

エンドパーオキサイド化合物は、抗マラリア薬 dihydroartemisinin (DHA) 類に代表される優れた生物活性を示す。我々は、DNA 損傷チェックポイントに関わる遺伝子変異酵母 WCTR312A (cdc2-1 $rad9\Delta$) 株の生育回復活性 11 を指標とし、山菜のシドケ(モミジガサ)に含まれるエンドパーオキサイド化合物 20 の上の指標とし、山菜のシドケ(モミジガサ)に含まれるエンドパーオキサイド化合物 20 。EDBD は動物レベルで抗腫瘍効果を示し、ヒト急性前骨髄性白血病細胞 HL60 に対してアポトーシスよりも、主に脂質過酸化によるネクローシス様細胞死を誘導することを最近明らかにした。そこで本研究では、エンドパーオキサイド構造を有する合成化合物 3 -phenyl-1, 2 , 4 , 5 -tetraoxa-spiro 2 [5, 5] undecane (tetraoxane) の生物活性を、EDBD などと比較検討する事とした。

Tetraoxane、EDBD、並びに DHA の WCTR312A に対する生育回復活性を調べたところ、DHA には認められず、EDBD と同様に tetraoxane にも濃度依存的に生育回復活性が認められた。HL60 細胞に対する細胞毒性(MTT 法)はいずれも濃度依存的な細胞毒性を示し、それぞれの IC_{50} 値は 3.17、0.95、並びに $0.29\,\mu$ M であった。また、tetraoxane による細胞の形態は、DHA(アポトーシス)とは異なり、EDBD(ネクローシス)に類似していた。一般にエンドパーオキサイド構造は、 Fe^{2+} により開裂してラジカル中間体(活性本体)が生じるが、tetraoxane も最適条件が pH5 と $15\,$ mM 以上の $FeSO_4$ で完全に変換した。細胞毒性も $FeSO_4$ により増強され、一方で鉄キレーターである DFOM により抑制されたことから、 Fe^{2+} が活性に関与することが確認できた。さらに、細胞毒性がネクローシス阻害剤 IM-54、脂質過酸化阻害剤 ferrostatin-1、並びに脂溶性抗酸化剤 vitamin E で阻害されたことから、tetraoxane も EDBD と類似の脂質過酸化によるネクローシス作用が示唆された。

- 1) E. Tsuchiya, et al., Biosci. Biotechnol. Biochem., 74, 411-414 (2010).
- 2) K. Kimura, et al., Bioorg. Med. Chem., 20, 3887-3897(2012).

Ca2+シグナル伝達に関わる遺伝子変異酵母に作用する物質の RBL-2H3 細胞への効果

○大川佑介¹、小林 幹¹、東尾浩典²、塩野義人³、上杉祥太⁴、木村賢一¹,⁴

1岩手大院・農、2岩手医大・教養教育セ、3山形大・農、4岩手大院・連合農

出芽酵母($Saccharomyces\ cerevisiae$)の Ca^{2+} ングナル伝達阻害に関わる遺伝子変異酵母 YNS17($zds1\Delta\ erg3\Delta\ pdr1/3\Delta$)株の生育回復活性を用い、久慈産琥珀から単離した kujigamberol $^{1)}$ が、ラット好塩基性白血病細胞 RBL-2H3 における脱顆粒抑制活性、並びに細胞内 Ca^{2+} 流入抑制活性を有し、モルモットの鼻づまり試験で抗アレルギー効果を示すことを明らかにしてきた。そこで本研究では、同じ遺伝子変異酵母に活性を有した他の化合物が、RBL-2H3 細胞で脱顆粒抑制活性、並びに細胞内 Ca^{2+} 流入抑制活性を有するか否かの検討を行った。

 Ca^{2+} チャネルブロッカーである diltiazem、カルシニューリン阻害剤である FK506 と cyclosporin A、並びに GSK-3 β 阻害剤である GSK-3 β inhibitor I のうち、脱顆粒抑制 活性を有したのは FK506 と cyclosporin A のみであり、それらの細胞内 Ca^{2+} 流入抑制活性は脱顆粒抑制活性と比べ弱かった。我々が植物内生糸状菌から単離精製した新規の eremoxylarin B $^{2)}$ 、benzophomopsin A $^{3)}$ 、並びに anthracobic acid $^{4)}$ について同様に評価した結果、カルシニューリン阻害活性を有する eremoxylarin B が、動物試験で有効であった kujigamberol よりも強い脱顆粒抑制活性を示すと共に、FK506 とは異なり細胞内 Ca^{2+} 流入抑制活性も有していた。以上の結果から、eremoxylarin B はカルシニューリン阻害以外の活性も有し、動物試験でも有効である可能性が示唆された。

- 1) K. Kimura, et al., Fitoterapia, 83, 907-912 (2012)
- 2) Y. Ogasawara, et al., J. Antibiot., 61: 496-502 (2008)
- 3) Y. Shiono, et al., J. Antibiot., 62: 533-535 (2009)
- 4) 特許 4865339 号(2011)

GSK3 阻害剤のヒト腫瘍細胞に対する増殖抑制効果の検討

○佐京智子、及川亜美、大久保美希、奈良場博昭、北川隆之

岩手医大·薬·細胞病態生物学講座

多くのがん細胞で糖輸送の亢進ならびに促進拡散型糖輸送タンパク質(GLUTs)の過剰 発現が報告されている。

我々は、ヒト子宮頸がん由来 Hela 融合細胞 (CGL1, CGL4) において、腫瘍化に伴う GLUT3 発現変化を見出した 11 。そこで、腫瘍性 Hela 融合細胞を標的とした新規分子標的候補薬剤のスクリーニングを行ったところ、GSK3 阻害剤 (GSK3 inhibitor IX) が、腫瘍性 CGL4 細胞に対して強い細胞増殖阻害効果を示すととともに、GLUT3 タンパク質発現を抑制することを見出した 21 。 GSK3 inhibitor IXは、ヌードマウスにおける in vivo 腫瘍に対しても、コントロール群に比べて約 30 %程度の腫瘍増殖抑制効果を示し、抗腫瘍効果の高かった腫瘍組織においては、GLUT3 タンパク質発現も抑制された。また、腫瘍細胞における GLUT3 発現と GSK3 inhibitor IXの有効性について GLUT3 発現の異なる大腸がん細胞株を用いて検討したところ、GLUT3 過剰発現細胞では細胞増殖抑制効果と GLUT3 発現の抑制効果が確認された。

以上の結果より、GSK3 inhibitor IXが、GLUT3 発現抑制を介して腫瘍細胞増殖抑制効果を発揮する可能性が示唆された。しかしながら、GLUT3 発現の少ない大腸がん細胞でも増殖阻害を示すものもあり、異なる作用機序の存在も示唆された。

- 1) Suzuki. et al. (1999) Eur. J. Biochem, 262, 534-40
- 2) Watanabe, et al. (2012) Oncogenesis, 1, e21

膵癌細胞から放出される細胞外小胞エキソソームは血管新生を亢進させる

○千葉満1、久保田栞2、佐藤このみ2、酒井彩花2、川村稚尋2、門前暁1

1弘前大院・保健・医療生命科学領域、2弘前大・医・保健学科・検査技術科学専攻

【目的】膵癌は5年生存率が7%程度と極めて予後が不良であり、その難治性は高い浸潤・ 転移能による。癌細胞は多段階的な遺伝子変異の蓄積により高い浸潤・転移能を獲得すると 考えられるが、その他に細胞外因子による制御も癌細胞の浸潤・転移に重要な役割を担って いることが明らかになってきた。本研究では細胞外因子として膵癌細胞が放出するエキソソ ームという細胞外小胞 (Extracellular Vesicles; EVs) に着目して、癌微小環境を構成する 細胞のひとつである血管内皮細胞へのシグナル伝達経路、遺伝子発現、表現型への影響につ いて調べた。【方法】膵癌細胞株(PK-45H)が放出する EVs を培養上清から超遠心法により回 収し、ヒト血管内皮細胞(HUVEC)の培養上清へ添加した。EVs 存在下における HUVEC の細胞遊 走への影響を Wound healing assay により、管腔形成への影響を Tube Formation assay によ り調べた。また、EVs添加後の遺伝子発現変化をマイクロアレイ解析により、血管新生に関 わる分子のリン酸化状態をウエスタンブロット法により調べた。【結果・考察】PK-45H 由来 EVs を HUVEC の培養上清に添加すると、HUVEC の細胞遊走と管腔形成の亢進が認められた。ま た、HUVECのp38, cofilin, ERK1/2, Aktのリン酸化状態の亢進が確認された。遺伝子発現 解析の結果、血管新生に関連する遺伝子群の発現変化が確認された。これらの解析の結果、 膵癌細胞が放出する EVs は血管新生を亢進する機能をもち、膵癌の血行性遠隔転移の亢進に 関与することが示唆された。

連絡先: mchiba32@hirosaki-u. ac. jp

間質細胞による胃がん細胞の浸潤抑制に働くがん細胞排除システムの解明

○伊藤剛、田中正光

秋田大院·医·分子生化学

(概略) 間質細胞は胃がん細胞のアポトーシスを引き起こすことがわかった。このアポトーシスは両細胞間の接触を必要とする。この間質細胞によるデスタッチは間質細胞層へのがん浸潤の阻害に働いていた。

(導入) スキルス胃がん細胞は間質細胞層への高い浸潤能を示すことが知られている。近年、この浸潤にとって間質層の癌関連線維芽細胞(CAF Cancer Associated Fibroblast)が重要な役割を持つことがわかってきた。胃がん細胞と近接する線維芽細胞はある条件でCAFへと変化し、CAF はその周囲を浸潤にとって最適な環境へと作り変える。また、CAF はがん細胞自体の運動能を高める役割をも果たす。これらが相乗することで、がん浸潤の進行が飛躍的に促進されることがわかってきた。しかしながら、スキルス胃がんで生じる間質細胞と関連した癌浸潤機構は未だ不明瞭なところが多い。われわれは腹膜転移を好発する株である 44As3 細胞(スキルス胃がん細胞)とCAF を含む間質細胞を用いて、がん浸潤に関連する分子機構を調べている。

(研究結果) 通常線維芽細胞もしくは CAF と胃がん細胞を共培養した場合、これら間質細胞に接触したがん細胞では細胞死が引き起こされることを見つけた (デスタッチ)。がん細胞に H2B-GFP を安定発現させ、蛍光顕微鏡により観察した結果、DNA の断片化が認められた。 Cleaved caspase3 に対する免疫染色法により、この断片化はアポトーシス経路を介して生じることがわかった。

次に、がん浸潤とデスタッチの関係を検討した。方法として、アポトーシス阻害剤 ZVAD 添加後の、CAFと共培養したがん細胞の浸潤過程をゲル浸潤アッセイにより追跡・比較した(ZVAD 処理有:アポトーシス抑制)。興味深いことに、ZVAD 添加後、きわめて多くのがん細胞が間質細胞層を越えてゲル内へと浸潤していく様子が認められた。この浸潤の重篤化の原因として、CAF によるデスタッチが機能せず、がん浸潤を誘導する機構のみが働くためであると考えた。そこで、間質細胞層に向けてのがん浸潤過程を詳細に観察・解析した。結果、アッセイ開始後36時間にはおよそ4割のがん細胞は間質細胞層においてアポトーシスを起こし、浸潤が阻害されていることがわかった。その一方、ZVAD 存在下ではほぼ全ての細胞が生存しており、間質細胞層を越えてさらにゲル内へと浸潤しようとする様子が認められた。

CAF はがん浸潤を誘導する一面をもつが、同時にデスタッチによるがん細胞の排除という側面を併せ持っていた。これにより、がん浸潤が実は大幅に抑えられていた。CAF によるがん浸潤誘導とデスタッチとのバランスは浸潤範囲の決定にとって重要であることが示唆された。

頭頸部がん幹細胞における CD271 の役割の解明

○望月麻衣¹、今井隆之³、松浦一登³、小鎌直子¹、玉井恵一²、本橋ほづみ⁵、菅村和夫⁴、田中伸幸¹

宮城がんセ・研・¹がん先進治療開発研究部、²がん幹細胞研究部、³頭頸部外科、⁴発がん 制御研究部、⁵ 東北大・加齢医学研究所・遺伝子発現制御分野

背景:がん組織はヘテロな細胞集団から構成されており、近年悪性度に関わるがん幹細胞の存在が注目されている。頭頸部がん幹細胞については解析が不十分であったが、我々は CD271 ががん幹細胞マーカーであることを突き止めた。 (2013, Imai et al.) CD271 は神経細胞増殖因子 (NGF) の受容体であり、間葉系幹細胞においては静止期を維持する主要因子であることが知られているが、癌における CD271 の役割は未だ解明されていない。我々は今回、頭頸部癌における CD271 の機能解析を試みた。

方法: 頭頸部癌臨床検体を用いて、CD271 と増殖のマーカーKi67 を免疫染色し、In vivo における CD271 陽性細胞の増殖との関連を解析した。また、In vitro においては頭頸部癌細胞株 (HPCM2 他)を用い、siCD271 の導入によるがん細胞の特性の変動を、増殖試験・免疫不全マウスへの造腫瘍能試験・細胞周期・マイクロアレイ解析によって検討した。 結果: 正常基底膜および前癌病変である高度異形成においては、CD271 陽性細胞は Ki67 陰性であり、dormant な性質を有していた。逆に、悪性度の高い浸潤癌では、CD271 陽性細胞は Ki67 陽性となることが明らかになった。このことから我々は、CD271 陽性細胞は癌の進行に従って増殖能の高い幹細胞性を獲得すると考えた。これを詳しく解析するため、頭頸部癌細胞株において siRNA を用い CD271 をノックダウンしたところ、増殖の停

考察: 頭頸部癌において、CD271 は単なるがん幹細胞のマーカーではなく、それ自身ががん細胞の悪性度を左右する主要因子であることが示唆された。CD271 は、EGFR と同様に細胞表面に発現する受容体であることから、特異的抗体などによる抗体治療の標的としても有望であると考えられる。

止、造腫瘍能の低下、細胞周期の G1/S 停止が誘導された。さらに、マイクロアレイでの

網羅的解析においては CDKN1C を始めとした細胞周期関連タンパクの変動を認めた。

胆道癌がん幹細胞に発現する BEX2 の役割

〇玉井恵一¹、中村真央³、小鎌直子²、渋谷莉恵¹、望月麻衣²、山口壹範³、菅村和夫³、 佐藤賢一¹、田中伸幸²

宮城がんセ・研・1がん幹細胞、2がん先進治療、3発がん制御

【背景と目的】近年がん組織中には腫瘍組織を形成する元となるがん幹細胞が存在する ことが知られている。がん幹細胞は静止期・抗癌剤耐性・低プロテアソーム活性といっ た特徴をもち、癌再発の主因と想定される。今回我々は胆道癌におけるがん幹細胞同定 を試み、その分子機序を検討することとした。【方法】胆道癌細胞株を用いて他の癌幹 細胞マーカーとして知られる CD133/CD90 陽性細胞と陰性細胞の特性を比較して癌幹細 胞同定を行った。がん幹細胞の特性は、免疫不全マウス皮下の腫瘍形成能・ALDH アッセ イ・細胞周期で解析した。【結果】胆道癌細胞株において、CD133/CD90 陰性細胞は陽性 細胞に比べ免疫不全マウス皮下での腫瘍形成能が高かった。マイクロアレイによる網羅 的遺伝子解析では、高造腫瘍能を持つ細胞群で CD274 (PD-L1) の発現が低下していた。 肝外胆道癌 91 例を用いた免疫染色の結果、CD274 が低発現である症例は予後不良であっ た。細胞株を用いた検討では、 CD274 低発現細胞は、高い造腫瘍能に加え、高 ALDH 活 性・GO 期優位な細胞周期・低 ROS 産生能を示し、静止期がん幹細胞に酷似していると考 えられた (Cancer Science, 2014)。 さらに我々は、治療ターゲットとなる分子を同定 するために、CD274 低発現分画中に高発現している遺伝子をスクリーニングした。その 結果、マウスの胎生肝で高発現することが知られる、BEX2 (Brain Expressed X-linked gene 2) 遺伝子を同定した。BEX2 をノックダウンした胆道癌細胞では、造腫瘍能の低下 に加え、ALDH 活性の低下・GO 分画の減少をみとめ、CD274 高発現分画と同様の表現型を 得た。BEX2 タンパクはユビキチン化修飾を受け、プロテアソーム依存性に分解された。 【結論】BEX2 はがん幹細胞特性を示す CD274 低発現細胞群で高発現し、その発現を抑制 することによってその特性も消失した。BEX2 は、低プロテアソーム活性であるがん幹細 胞における分子メカニズムを解明する手がかりとなることが考えられた。

UVB 照射により、Ppp6c 欠損では、高頻度に皮膚扁平上皮癌が発生する。

○加藤浩之^{1,2}、田沼延公^{1,2}、黒沢是之^{1,2}、林克剛^{1,2}、小河穂波³、野村美有樹¹、渡 邊利雄³、島礼^{1,2}

¹宮城がんセ・研・がん薬物療法、²東北大院・医・がん分子制御、³奈良女子大院・人間文化

悪性黒色腫の全 exon シークエンスのデータから、プロテインホスファターゼ 6 型 (PP6)の触媒サブユニット (Pp6c)の遺伝子変異が高頻度に見出され、同ローカスにLOHを伴うことから、PP6 の loss of function が、ドライバー変異として働く可能性が示唆された (Cell 2012 Landscape of driver mutations in melanoma)。また最新の大規模ゲノム解析プロジェクトである TCGA (The Cancer Genome Atlas) によると、PP6 遺伝子変異は、悪性黒色腫のみならず複数のがんで存在することが示されている。

我々は、発がんプロモーターのオカダ酸が PP6 の阻害剤であることから、PP6 が、がん抑制遺伝子であるという仮説持っていた。そこで皮膚 2 段階 (DMBA/TPA) 発がん実験で検討した。その結果、皮膚で *Ppp6c* を欠損したマウスは、腫瘍の形成時期が大幅に早まること。さらには、DMBA 処理のみで皮膚腫瘍が生じることを明らかにした。この結果は PP6 機能不全が、腫瘍発生のプロモーション作用を持つことを意味した(文献1)。

しかし、DMBA/TPA 2 段階発がん実験では PP6 の機能不全が (1) 良性腫瘍だけでなく悪性腫瘍 (扁平上皮癌など) の発生を促進させるか (2) ヒトの発がんの原因となる環境変異源にたいしてはどうか、という疑問が残った。そこで、紫外線 UVB による皮膚発がん実験を企画した。

皮膚特異的に Ppp6c 欠損したマウスに対して、週3回の UVB 照射($2kJ/m^2$)を、40週間連続して行った。この結果、マウスにおいて、PP6 機能不全により、UVB による皮膚扁平上皮がんの発生頻度が顕著に増加することが明らかとなった。このメカニズムとしては、(1) Ppp6c 欠損ケラチノサイトにおいて、UVB に対して高い感受性を持ち高頻度にアポトーシスを起こすこと(2) PP6 の機能異常により、DSB の修復が不完全なままに、代償性細胞増殖が起こること、の2つが考えられた。

本実験により得られた情報は、ヒトにおいても、UV が原因となる皮膚がん発症の予防や治療の開発に生かされると期待できる。

文献 1) Hayashi K et al. Abrogation of protein phosphatase 6 promotes skin carcinogenesis induced by DMBA. Oncogene (in press) doi: 10.1038/onc.2014.398.

セクレトグラニン III が生体のインスリン生合成と分泌で果たす役割

○前田佳紀¹、工藤咲希¹、暮地本宙己²、村田知里³、鳥居征司³、渡部剛²、穂坂正博¹

¹秋田県立大・生物資源科学、²旭川医大・解剖学講座、³群馬大・生体調節研究所

内分泌細胞でペプチドホルモンは、粗面小胞体上で分子量の大きなホルモン前駆体として合成された後、ゴルジ装置を経て、トランスゴルジネットワーク(TGN)から分泌顆粒へと選別輸送される。その後、分泌顆粒内でホルモンは限定切断、末端アミノ酸の修飾を受け活性型ホルモンとして貯留され、細胞外からの刺激により放出されてターゲット細胞にシグナルを伝達する(調節性分泌経路)。内分泌細胞の分泌顆粒内には、ペプチドホルモンの他にグラニンタンパク質群(クロモグラニンA,B;セクレトグラニンII,III)、ホルモンを修飾して活性化するプロセッシング酵素群が局在している。また、顆粒膜上の細胞質側には、分泌制御タンパク質、イオンチャネル、ポンプなどが存在している。

我々の研究グループは、これまで『ペプチドホルモンが分泌顆粒へ輸送されるメカニズム』を解析し、TGN から分泌顆粒内へホルモンを運ぶ因子としてグラニンタンパク質のセクレトグラニン III(SgIII;471 個のアミノ酸からなる)を見出した。さらに生化学的、細胞学的解析を通して、1)SgIII がアミノ酸 23 番-186 番目のドメイン SgIII 23-186 で TGN 膜の高コレステロール組成ドメイン(コレステロール組成;40-45 mol%)に着床すること、2)SgIII 187-373 がペプチドホルモンとクロモグラニン A(CgA;分泌顆粒内に局在するグラニンタンパク質)の凝集体と結合すること(Endocrine J. 57, 275-286 review, 10) 3)マウス下垂体由来 AtT-20 細胞で SgIII の発現を減弱したところ、SgIII が POMC(プロオピオメラノコルチン;ACTH 前駆体)を顆粒へと輸送する(Traffic 14, 205-218, 13)、ことを明らかにした。

本会では、SgIII ノックアウトマウスの解析によって得られた結果(耐糖能、インスリン分泌、体重変化)を中心に SgIII がインスリン生合成と分泌で果たす役割について報告する。

脳下垂体内分泌細胞の低酸素環境におけるホルモン分泌の解析

○佐藤瑛理¹、前田佳紀¹、暮地本宙己²、渡部剛²、穂坂正博¹

¹秋田県立大・生物資源科学、²旭川医大・解剖学講座

ストレスに応答して生合成・分泌される下垂体前葉の副腎皮質刺激ホルモン(ACTH;adrenocorticotropic hormone)は生体における動的恒常性維持のための種々の適応反応開始点となり、重要な役割を果たしている。しかしながら、低酸素環境がホルモン分泌動態や細胞内分泌機構にもたらす影響に関しては、これまであまり検討されてこなかった。わずかに、分娩時の低酸素ストレスを模した高地飼育(酸素濃度 10%)の羊胎児でPOMC(proopiomelanocortin: ACTH 前駆体)のプロセッシングが、低地飼育(酸素濃度20%)の羊胎児と比較して亢進することを示した研究や(Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 288, 1178-1184, 05)、高地トレーニングで血中の成長ホルモンが増加することを示した研究(Int. J. Sports Physiol. Perform 4, 497-508, 10) など、個体レベルでの古典的な内分泌学的研究が散見されるのみで、低酸素環境がホルモン分泌に与える影響を分子細胞生物学的な観点から詳しく検討した研究は始まったばかりである。

本研究では、低酸素環境下でマウス脳下垂体由来 AtT-20 細胞をモデルとして、ホルモン分泌を亢進するメカニズムを分子・細胞レベルで解明し、ホルモン生合成・分泌制御と低酸素応答の関連性について明らかにすることを目的とした。本会では、マイルドな低酸素環境下(10%酸素濃度;24 時間)で AtT-20 細胞を培養し、常酸素環境下(20%酸素濃度;24 時間)で培養した細胞における ACTH の分泌と細胞内貯蔵量を中心に、タンパク質レベル、RNA レベルで比較検証したので報告する。

実行委員メンバー

世話人 島 礼

広報・ホームページ担当 鈴木 教郎

財務担当 千葉 祐香、寺尾 典子

プログラム担当 本橋 ほづみ、山口 壹範

会場担当 田沼 延公、野村 美有樹、辻田 忠志