

日本生化学会 東北支部 第 82 回例会・シンポジウム

会期：平成 28 年 5 月 21 日（土）、22 日（日）

会場：弘前大学医学部 基礎大講堂、コミュニケーションセンター1 階会議室

○受付開始；5 月 21 日（土）12:00～

○一般演題を講演される方へ

1. 講演 30 分前までに受付をお済ませください。
2. 一般講演時間は 10 分、討論時間は 2 分です。時間の厳守をお願いします。
3. プロジェクターは VGA 端子を介して接続します。休憩時間に接続・確認をお願いします。

○ポスター発表をされる方へ

ポスター会場はコミュニケーションセンター1 階会議室です。ポスターは 21（土）12:00 から設置できます。ポスター発表は自由討論です。ポスターの撤去は懇親会終了後各自をお願いします。撤去できない場合はこちらで撤去し、翌日受付でお渡しします。

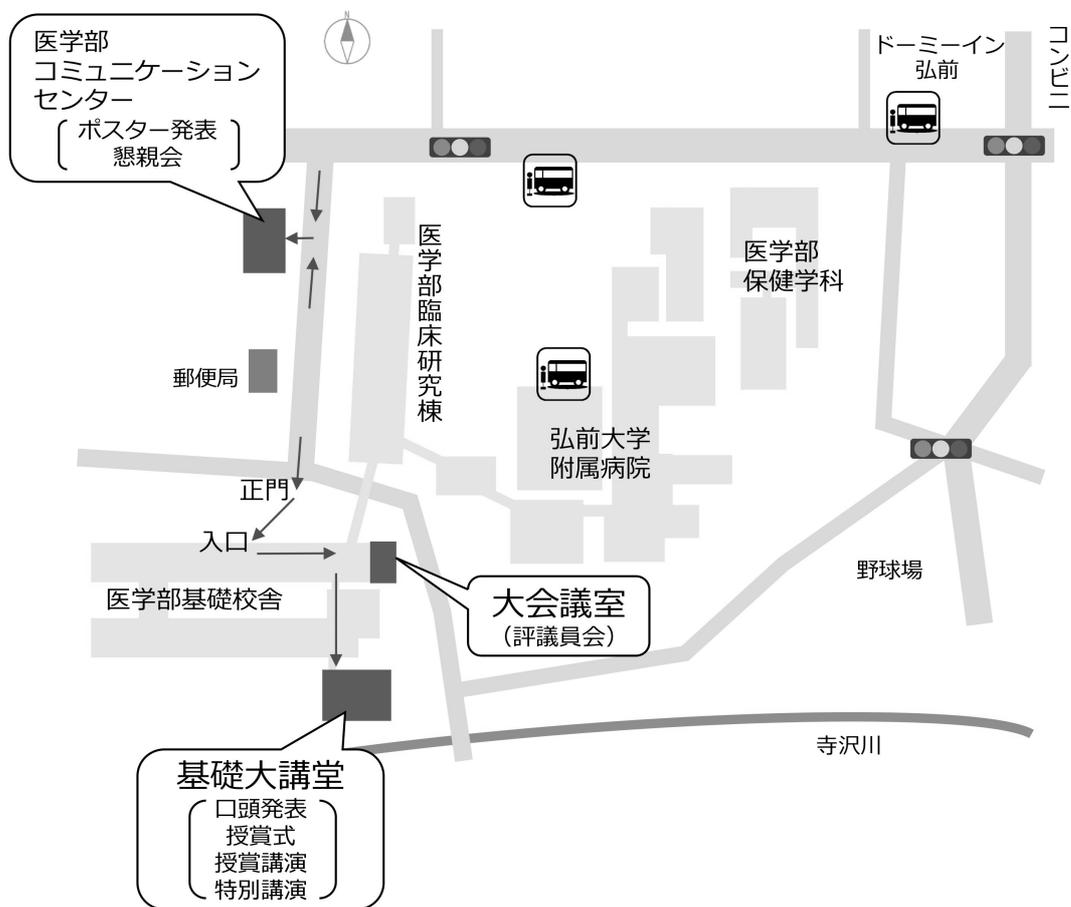
○座長の先生は、担当セッションの 10 分前までに会場にお越し下さい。

○懇親会: 19:00 -

コミュニケーションセンター1 階会議室

懇親会費：一般（4,000 円）、大学院生・学部生（無料）

会場案内



JR 弘前駅から

徒歩の場合 (約 35 分)

タクシーを利用する場合 (約 10 分)

バスを利用する場合 (約 20 分)

- ・JR 弘前駅前 (中央口) 【6 番のりば】「駒越線」に乗車、【大学病院前】で下車
- ・JR 弘前駅前 (中央口) 【8 番のりば】「金属団地・桜ヶ丘線」に乗車、【本町】で

下車

※土手町循環 100 円バスのご利用が便利です。

弘南鉄道

中央弘前駅で下車し、徒歩の場合 (約 7 分)

プログラム

2016年5月21日(土)

13:00 - 13:05 開会の辞 場所：基礎大講堂

13:05 - 14:30 一般演題(1)、(2) 場所：基礎大講堂

一般演題(1)

座長：森口尚 (東北医科薬科大学・医学部・医化学教室)

O-1. 複合遺伝子欠失レスキュー法による転写因子 Nrf2 の新規機能探索

○鈴木隆史¹、関詩織¹、平本圭一郎¹、長沼絵里子¹、高橋信行²、佐藤博²、
山本雅之¹

¹東北大院・医・医化学、²東北大院・薬・臨床薬学

O-2. バンコマイシンによる IL-1 β 分泌機構の解析

○西舘亜紀子、平田祐介、野口拓也、松沢厚

東北大・院薬・衛生化学

O-3. マクロファージにおけるトランス脂肪酸特異的な作用機構の解明

○高橋未来、平田祐介、工藤勇氣、野口拓也、松沢厚

東北大・院薬・衛生化学

O-4. ヒドロキシクロロキンによる乳酸脱水素酵素の活性阻害と抗腫瘍効果の解析

○後藤樹史¹、菅原琴美²、浅沼研³、小林五十鈴⁴、鶴生川久美⁴、郭永梅⁴、
高橋直人⁴、涌井秀樹¹、布村涉^{1,5}

¹秋大院・生命、²秋大院・医修、³秋大・RIセ、⁴秋大院・血内、

⁵秋大院・理工研セ

一般演題(2)

座長：坪井滋 (鷹揚郷腎研究所・癌免疫細胞生物学研究部)

O-5. N-glycosylation on integrin $\alpha 5$ serve as an on/off switch to regulate EGFR signaling

○杭慶雷、伊左治知弥、侯思聡、福田友彦、顧建国

東北医科薬科大・分子生体膜研・細胞制御

O-6. サケ由来コンドロイチン硫酸プロテオグリカンの血管新生への影響

○小林孝^{1,2}、柿崎育子¹、野坂大喜²、中村敏也²

¹弘前大院・医・糖鎖工学講座、²弘前大院・保・生体検査科学領域

O-7. Wnt/ β -catenin シグナルを介した細胞核内 F-アクチンによる転写制御機構

○山崎祥他¹、山本浩志¹、十川久美子²、徳永万喜洋²、原田昌彦¹

¹東北大・院・農、²東工大・院・生命理工

14:30 - 14:40 休憩

14:40 - 15:40 ポスター発表 場所：コミュニケーションセンター1階会議室

15:40 - 15:50 休憩

15:50 - 16:00 東北支部 各賞授賞式、授賞講演 場所：基礎大講堂

16:00 - 16:50 東北支部 各賞授賞講演 場所：基礎大講堂

優秀論文賞講演

座長：中島修（山形大学医学部・メディカルサイエンス推進研究所・遺伝子実験センター）

1. コラーゲンとの結合特異性に関与するコンドロイチン硫酸クラスター

○多田羅洋太^{1,2}、柿崎育子^{1,2}、須藤晋一郎^{1,2}、石岡陽菜^{1,2}、根岸美香^{1,2}、
遠藤正彦²

¹弘前大学大学院医学研究科・附属高度先進医学研究センター・糖鎖工学講座、

²弘前大学大学院医学研究科・糖鎖医化学講座

2. 酸化ストレス応答における Nrf2-sMaf ヘテロ二量体によるシス配列認識の重要性

○大槻晃史^{1,2}、鈴木未来子³、勝岡史城⁶、守田匡伸^{2,4}、清水律子⁵、
山本雅之^{2,6}

東北医科薬科大学医学部 医化学教室¹、東北大学大学院医学系研究科

医化学分野²、RI センター³、環境保健医学分野⁴、分子血液学分野⁵、

東北メディカル・メガバンク機構⁶

奨励賞講演

座長：那谷耕司（岩手医科大学・薬学部）

**1. 活性化 B 細胞の多様化と形質細胞分化を調節する Bach2 遺伝子ネットワークの
解明**

武藤哲彦

東北大学大学院医学系研究科・生物化学分野

2. インテグリンの N-型糖鎖修飾の重要性和糖鎖による機能制御

伊左治知弥

東北医科薬科大学・分子生体膜研究所・細胞制御学

16:50 - 17:00 休憩

17:00 - 18:00 特別講演 (1) 場所：基礎大講堂

座長：今泉忠淳（弘前大学大学院・医学研究科・脳血管病態学）

細胞老化の誘導メカニズムとその生体内における役割

大谷直子

東京理科大学・理工学部・応用生物科学科

18:00 - 19:00 特別講演 (2) 場所：基礎大講堂

座長：姫野依太（弘前大学・農学生命科学部）

tRNA 修飾と生命現象

富澤一仁

熊本大学大学院・生命科学研究部（医学系）

19:00 - 懇親会 場所：コミュニケーションセンター 1 階会議室

2016 年 5 月 22 日（日）

8:30 - 10:30 一般演題 (3)、(4) 場所：基礎大講堂

一般演題 (3)

座長：松沢厚（東北大学大学院・薬学研究科・衛生化学分野）

O-8. SOD1 欠損による酸化ストレスはシトクロム P450 活性を抑制することで薬剤誘発性肝障害を軽減する

○本間拓二郎¹、白土貴也¹、李在勇¹、倉橋敏裕^{1,2}、藤井順逸¹

¹山形大学大学院生化学分子生物学講座、²(現)京都府立医科大学細胞再生医学教室

O-9. フラビウイルス粒子形成に關与する ESCRT 因子群

新井亜利紗¹、田端桂介²、荒川将志¹、有本大²、斉藤一伸³、大森弘子³、奈良篤樹⁴、○森田英嗣¹

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

³大阪大・微生物病研究所・中央実験室、⁴長浜バイオ大・バイオサイエンス

O-10. 治療抵抗性を伴う悪性がんを標的とした NRF2 阻害剤の開発

○土田恒平¹、鈴木未来子²、林真貴子¹、辻田忠志³、山本雅之¹

¹東北大学大学院 医学系研究科 医化学分野、²東北大学大学院 医学系研究科 ラジオアイソトープセンター、³佐賀大学農学部 生命機能科学科 生化学分野

O-11. 致死的自己免疫疾患に対して NRF2 の恒常的活性化がもたらす抗炎症作用の解析

○鈴木琢磨^{1,2}、村上昌平¹、山本雅之³、張替秀郎²、本橋ほづみ¹

¹東北大学・加齢研・遺伝子発現制御分野、²東北大学・医・血液免疫病学分野、

³東北大学・医・医化学分野

O-12. オートファジー活性化を生かしたレビー小体病治療への応用

○丹治邦和¹、三木康生¹、猪瀬（丸山）敦史²、三村純正²、松宮朋穂³、

森文秋¹、今泉忠淳³、伊東健²、若林孝一¹

¹弘前大学・医・脳神経病理学講座、²分子生体防御学講座、³脳血管病態学講座

一般演題 (4)

座長：穂坂正博（秋田県立大学・生物資源科学部・応用生物科学科）

O-13. Furry は LATS2 を介して YAP を制御する

○入江和樹、永井友朗、水野健作

東北大学・院・生命科学

O-14. 生体内での 5-アミノレブリン酸欠乏は、耐糖能異常・インスリン抵抗性の原因となるグリコーゲン合成異常を惹起する

齊藤真一¹、中野博¹、野原豪和¹、白澤信行¹、岡野聡¹、山本雅之²、

高橋究³、田中徹³、中島元夫³、○中島修¹

¹山形大学・医・メディカルサイエンス推進研究所、²東北大学・医・医化学、

³SBI ファーマ株式会社

O-15. ミトコンドリアに存在する分子シャペロン ERp57 の機能解析

○工藤翔太¹、尾崎 拓²、宮崎雅雄¹、山下哲郎¹

¹岩手大学大学院 農学研究科 応用生物化学専攻、

²岩手大学 理工学部 化学生命理工学科 生命コース

O-16. 細菌リボソームの生合成

○後藤史門、武藤昱、姫野俵太

弘前大学・農学生命

O-17. Methionine adenosyltransferase (MAT) IIα のセントロメア領域における機能

○蝦名真行¹、加藤恭丈¹、島弘季¹、池田真教²、田中耕三²、五十嵐和彦¹

¹東北大学・医・生物化学分野、²東北大学・加齢医学研究所・腫瘍学研究分野

10:30 - 10:40 休憩

10:40 - 11:40 一般演題 (5) 場所：基礎大講堂

座長：本橋ほづみ (東北大学加齢医学研究所・遺伝子発現制御分野)

O-18. 腎集合管細胞での転写因子 GATA2 欠失により得られる急性腎障害予防効果のメカニズム解明

于磊¹、○森口尚^{1,3}、清水律子²、山本雅之¹

¹東北大院・医・医化学、²分子血液学、³東北医薬大・医・医化学

O-19. 3 番染色体逆位を伴う急性骨髄性白血病における GATA2 遺伝子ヘテロ欠失の寄与

○片山紗乙莉^{1,2}、鈴木未来子³、呉繁夫²、山本雅之¹

東北大学大学院 医学系研究科 ¹医化学分野、²小児病態学分野、

³ラジオアイソトープセンター

O-20. フォンウィルブランド因子高分子多量体解析の標準化・定量化の試み

○堀内久徳¹、坂爪公¹、斎藤健貴¹、樋口(江浦)由佳²、小亀浩市²、早川正樹³、松本雅則³

¹東北大・加齢研・基礎加齢、²国循研セ・分子病態、³奈良医大・輸血部

O-21. 中心体キナーゼ Aurora A が触媒する分裂期中期における動原体分子のリン酸化の役割

○家村顕自、田中耕三

東北大学加齢医学研究所 分子腫瘍学研究分野

O-22. 骨髄間葉系幹細胞による形質細胞の維持機構解析

○萱場敦子¹、伊藤亜里¹、高井俊行¹

¹東北大・加齢研・遺伝子導入研究分野

11:40 - 11:50 閉会の辞 場所：基礎大講堂

12:00 - 12:50 評議員会 場所：基礎大会議室

特別講演 1

細胞老化の誘導メカニズムとその生体内における役割

大谷 直子

東京理科大学 理工学部 応用生物科学科

「細胞老化」とは正常細胞に DNA ダメージなど発癌の危険性のあるストレスが加わった場合に発動される、不可逆的増殖停止であり、細胞老化はアポトーシスとならぶ重要な発癌防御機構として知られている。しかし、アポトーシスとは異なり、細胞老化をおこしても細胞が死滅せず長期間生存し続けることから、細胞老化は、初期には癌抑制機構として働くが、長期的には生体になんらかの慢性的な影響を及ぼす可能性があると考えられる。最近、細胞老化をおこすと、様々な炎症性サイトカインやプロテアーゼ等が大量に分泌されることが明らかになった。この細胞老化にともなう炎症性サイトカイン分泌現象は **senescence-associated secretory phenotype(SASP)** と呼ばれており、慢性炎症や慢性炎症を素地とする発がんの原因のひとつである可能性が示唆されている。しかし、細胞老化における炎症性サイトカインの分泌維持機構や、生体内において細胞老化による炎症性サイトカイン分泌が引き起こす病態については、十分には明らかになっていない。

今回我々は、全身性の発癌モデルマウスを用いて、肥満により肝がんの発症が著しく増加することを見出した。肥満は様々ながんの発症率を高めることが統計学的にも明らかになっているが、肥満によるがん促進のメカニズムは十分には明らかになっていない。その機構の一つとして我々は細胞老化とそれともなう **SASP** 現象に着目した。肝がん腫瘍部においては、肝臓における筋線維芽細胞である肝星細胞において細胞老化と **SASP** が生じており、**SASP** による炎症性サイトカイン分泌が肝がんの進展に関与している可能性が示唆された。本学会では、この肥満誘導性肝がんモデルを用いて、がん微小環境における細胞老化・**SASP** の誘導機構とその生体内における役割について、最近の知見を含めて報告する。

参考文献

Shin Yoshimoto S, Loo TM, Atarashi K, Kanda H, Sato S, Oyadomari S, Iwakura Y, Oshima K, Morita H, Hattori M, Honda K, Ishikawa Y, Hara E & **Ohtani N**. Obesity-induced gut microbial metabolite promotes liver cancer *via* senescence secretome. **Nature** 499, 97-101, (2013)

特別講演 2

tRNA 修飾と生命現象

富澤一仁

熊本大学大学院 生命科学研究部 (医学系)

タンパク質翻訳に必須の転移 RNA (tRNA) は、古くから細菌や酵母では様々な化学修飾を受けていることが知られていた。一方、疾患との関連性が明確でなかったことや、同化学修飾は生命現象に普遍的であり細菌や枯草菌での機能が明らかになれば十分と考えられたりしたため、ヒトにおける tRNA 修飾研究は遅れていた。

Cyclin-dependent kinase 5 regulatory subunit-associated protein 1-like 1 (Cdkal1)は、最も再現性の高い 2 型糖尿病関連遺伝子の一つである。従来 Cdkal1 の生理機能は不明であったが、我々はリジンに対応する tRNA のアンチコドン近傍の 37 位のアデノシンをチオメチル化する酵素であることを突き止めた。チオメチル化修飾により、リジン翻訳時の誤翻訳を防止していた。プロインスリンにおいて、リジンはプロセッシング部位に位置している。そのため、誤翻訳により他のアミノ酸に置換されるとプロセッシングが障害され、切断されない異常なインスリンが産生される。実際に、膵 B 細胞特異的 Cdkal1 欠損マウスでは、プロインスリンのリジン量が低下していた。また同マウスは、インスリン分泌低下、耐糖能低下、非肥満および非インスリン抵抗性などの表現型を呈した。さらに Cdkal1 遺伝子にリスクアレルを保有するヒトでは、リジンに対応する tRNA のチオメチル化修飾が有意に低下していることが明らかになった。

またミトコンドリア tRNA のチオメチル化修飾酵素が欠損したマウスは、ミトコンドリア脳筋症の症状を呈することが明らかになった。さらに、ミトコンドリア脳筋症患者では、ミトコンドリア DNA の変異率とミトコンドリア tRNA のチオメチル化修飾率が逆相関するが明らかになった。このように、tRNA 修飾異常が代謝疾患発症に関与することが明らかになり、tRNA 修飾を標的としたバイオマーカー開発や創薬が期待される。本講演では、tRNA 修飾の生理的意義、同修飾異常による代謝疾患発症機構、ならびにバイオマーカー開発や創薬研究に関する最新の知見について紹介したい。

奨励賞 1

活性化 B 細胞の多様化と形質細胞分化を調節する Bach2 遺伝子ネットワークの解明

武藤 哲彦

東北大学大学院医学系研究科 生物化学分野

生体内に侵入した抗原により活性化された B リンパ球 (B 細胞) は胚中心応答を経て抗原に特異的な抗体を分泌する形質細胞 (Plasma cell; PC) へ最終分化を遂げる。胚中心 B 細胞の分化段階では、抗体遺伝子に対して体細胞超変異 (Somatic hypermutation; SHM) とクラススイッチ DNA 組換え (Class switch recombination; CSR) という二種類の変異が B 細胞特異的酵素 AID によって導入される。CSR の実行は一部の B 細胞でランダムに生じると考えられてきたが、転写因子 Bach2 のノックアウトマウスの解析から、転写因子により緻密に調節されていることを見いだした。この発見を契機に B 細胞の活性化応答を制御する Bach2 を中心とした遺伝子ネットワークの解明を試みた。

Bach2 の直接標的遺伝子のひとつが PC 分化のマスター転写因子 Blimp-1 をコードする *Prdm1* 遺伝子であることを突き止めた。その意義は、抗原で B 細胞が刺激されると Bach2 が働く細胞では *Prdm1* 遺伝子の発現誘導が遅れるため、PC 分化が一時停止し、その間に CSR を実行することにある。一方、Bach2 の活性が低下した B 細胞では発現誘導された Blimp-1 が PC 分化を促進する。

さらに、*Prdm1* 遺伝子に対するエピジェネティックな遺伝子発現調節機構および細胞分化の一時停止が解除されて PC 分化を再開する機序を明らかにしてきた。Bach2 は、ヒストン脱アセチル化酵素 HDAC3 と複合体を形成し、*Prdm1* 遺伝子座にリクルートしてヒストンのアセチル化修飾を除くことで遺伝子発現を抑制し、結果として PC 分化を制止することを明らかにした。B 細胞の活性化は B 細胞受容体 (B cell receptor; BCR) シグナルおよび T 細胞との相互作用で調節される。このとき Bach2 は、BCR で活性化される PI3K シグナル経路の下流でリン酸化修飾を受けること、Bach2 の核外への排出を促すことを見出した。PI3K シグナル経路は胚中心応答を抑制するという知見を部分的に説明する制御系と考えられる。これらの結果から、Bach2 は細胞外シグナルにより遺伝子ネットワークを適切に切り替え、CSR や PC 分化の調節をおこなう重要な因子である。

奨励賞 2

インテグリンの N-型糖鎖修飾の重要性と糖鎖による機能制御

伊左治知弥

東北医科薬科大学・分子生体膜研究所・細胞制御学

インテグリンは $\alpha\beta$ ヘテロ二量体の膜タンパク質で細胞接着・移動に重要である。近年の研究により、N-型糖鎖付加がインテグリンを含めた様々な受容体の機能制御に重要であることが明らかになりつつある。しかし、特定の糖鎖が細胞の機能調節に寄与しているのか不明であった。我々は、モデル分子として $\alpha 5\beta 1$ インテグリンの特定の糖鎖付加部位をスクリーニングし、特定の位置の糖鎖は細胞接着に重要なことを明らかにした (Isaji T., et. al., JBC, 2006、Isaji T., et. al., JBC, 2009)。さらに特定部位の糖鎖について検討を行うと、糖転移酵素は特定の糖鎖を修飾すること (Sato Y., Isaji T. et. al. JBC,2009)、また、膜近傍の細胞接着に関わらない糖鎖はマイクロドメインにおける局在や上皮成長因子受容体との複合体の形成を調節することがわかった(Hang Q., Isaji T. et. al. JBC,2015)。

また、我々はがん細胞で生じる異常な糖鎖変化の分子メカニズムについても注目している。がんの予後と相関する遺伝子である Golgi phosphoprotein 3 がインテグリン $\alpha 5\beta 1$ と $\alpha 3\beta 1$ のシアリル化された糖鎖を増加させ、がん細胞の転移・浸潤に促進的に働く分子機構を明らかにした (Isaji, et. al., JBC. 2014)。さらに、がんの転移・浸潤の過程に必要な上皮間葉移行 (EMT) において、 $\alpha 2,6$ シアル酸転移酵素の発現が誘導され、インテグリンの機能を促進することが分かった (Lu, J., Isaji T. et. al., JBC. 2014)。がん遺伝子や細胞接着によって糖鎖が調節されることが、がんの悪性度に重要であることを示唆している。

以上のインテグリンの N-型糖鎖に注目した研究から、①特定の糖鎖やその構造は細胞接着の制御や細胞のシグナルに重要であること②がん遺伝子や細胞接着によって細胞の糖鎖が調節されていることを明らかにした。今後、研究を更に発展させ、糖鎖により細胞表面の複合体を制御することで、がん転移の抑制方法の開発を目指してゆきたい。

優秀論文賞 1

コラーゲンとの結合特異性に関するコンドロイチン硫酸クラスター

○多田羅 洋太^{1,2}、柿崎 育子^{1,2}、須藤 晋一郎^{1,2}、石岡 陽菜^{1,2}、
根岸 美香^{1,2}、遠藤 正彦²

¹弘前大学大学院医学研究科・附属高度先進医学研究センター・糖鎖工学講座、

²弘前大学大学院医学研究科・糖鎖医化学講座

サケ鼻軟骨由来エピフィカン (EPY) は、コンドロイチン 4-硫酸と 6-硫酸を多く共有結合したグリコサミノグリカン (GAG) ドメインを持つが、このドメインの役割は知られていない。この研究ではまず、コラーゲンと EPY との結合を表面プラズモン共鳴法により解析した。EPY のコンドロイチン硫酸は単鎖ではコラーゲンに結合しないが、複数の糖鎖が一本のコアペプチドに結合したクラスターの状態では結合することが示された。I、III、VII、VIII、X 型コラーゲンは EPY と高い親和性で結合したが、II、IV、V、VI 型は結合が弱いか全く結合しなかった。EPY との結合が弱かったタイプのコラーゲンは、リシン残基の修飾が多い傾向が見られたことから、EPY との結合にリシン残基が関与すると仮定した。そこでコラーゲンのリシン残基を化学修飾し、コンドロイチン硫酸クラスターとの結合親和性を解析した。この結果、リシン残基の化学修飾により結合親和性は低下した。以上の結果から、コラーゲンのリシン残基は EPY との結合に関与し、リシン残基の修飾により EPY に結合するコラーゲンの特異性が決まると考えられる。コンドロイチン硫酸クラスターは糖鎖間の結合にも関与し、自己会合による糖鎖の複合体を形成することが示された。この糖鎖間の相互作用により細胞外マトリックスの間隙が充填されると推定される。また、エピフィカンのコンドロイチン硫酸はコラーゲンの線維形成を促進することが示唆された。

【受賞論文】

Tatara Y, Kakizaki I, Suto S, Ishioka H, Negishi M, Endo M. (2015) Chondroitin sulfate cluster of epiphykan from salmon nasal cartilage defines binding specificity to collagens. *Glycobiology* 25, 557-569

優秀論文賞 2

酸化ストレス応答における Nrf2-sMaf ヘテロ二量体によるシス配列認識の重要性

○大槻晃史^{1,2}、鈴木未来子³、勝岡史城⁶、守田匡伸^{2,4}、清水律子⁵、山本雅之^{2,6}

東北医科薬科大学医学部 医化学教室¹、東北大学大学院医学系研究科 医化学分野²、RI センター³、環境保健医学分野⁴、分子血液学分野⁵、東北メディカル・メガバンク機構⁶

CNC 群転写因子 Nrf2 と小 Maf 因子 (sMaf) からなるヘテロ二量体は、生体の酸化ストレス応答の中心的な役割を担っている。Nrf2-sMaf ヘテロ二量体は、抗酸化剤応答配列 (ARE) もしくは CNC-小 Maf 結合配列 (CsMBE) と呼ばれる DNA 配列を認識する。一方で、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) と呼ばれる配列を認識する。両者はよく似た配列であるが、モチーフ 5' 端の塩基がわずかに異なっている。過去の報告から、Nrf2 による ARE/CsMBE 認識には、502 番目に位置するアラニン (A) が重要であり、これをチロシン (Y) に置換すると MARE に対して親和性を示すことが知られていた。本研究では、両モチーフ間のわずかな違いが持つ生理的意義を明らかにするため、Nrf2^{A502Y} 変異を導入したノックインマウスを樹立し、検討を行った。Nrf2 および Nrf2^{A502Y} の結合部位を ChIP シークエンス法にて網羅的に解析し、Nrf2^{A502Y} の配列指向性が野生型 Nrf2 の結合部位である ARE/CsMBE から MARE へと転換していることをゲノムワイドに確認した。また、Nrf2^{A502Y} マウスでは、グルタチオン合成や過酸化水素の消去といった酸化ストレス応答に関わる Nrf2 標的遺伝子の発現が著しく減弱していた。それに伴い、Nrf2^{A502Y} 変異マウスはアセトアミノフェンによる急性肝障害に対して脆弱であった。これらの一連の解析によって、ARE/CsMBE と MARE はそれぞれ別の役割をもっており、Nrf2-sMaf 二量体が ARE/CsMBE 配列を認識することが酸化ストレス応答に重要な機構であることが明らかとなった。

【受賞論文】

Otsuki A, Suzuki M, Katsuoka F, Tsuchida K, Suda H, Morita M, Shimizu R, Yamamoto M. (2015) Unique cistrome defined as CsMBE is strictly required for Nrf2-sMaf heterodimer function in cytoprotection, *Free Radical Biology and Medicine*. 91, 45-57

口頭発表

O-1

複合遺伝子欠失レスキュー法による転写因子 Nrf2 の新規機能探索

○鈴木 隆史¹、関 詩織¹、平本 圭一郎¹、長沼 絵里子¹、高橋 信行²、佐藤 博²、
山本 雅之¹

¹東北大院・医・医化学、²東北大院・薬・臨床薬学

転写因子 Nrf2 は環境ストレスに応答して活性化する。Nrf2 は Keap1 欠失によって活性化するが、Keap1 欠失マウスは食道扁平上皮過角化による摂餌障害を起こし生後3週間ほどで致死となるため、成獣における表現型解析が進まなかった。そこで、本研究では扁平上皮特異的 Nrf2 欠失によって Keap1 全身欠失マウスの致死性を回避し、それによって Nrf2 活性化が成獣に及ぼす影響を明らかにし、Nrf2 の新たな生理機能の発見を目指した。扁平上皮特異的 Nrf2 欠失と全身 Keap1 欠失の複合マウス (NEKO マウス) を作製した結果、食道過角化が改善され致死性が回避された。しかし、本 NEKO マウスの表現型解析を行ったところ、尿崩症のような低張多尿を呈した。そこで、尿細管特異的な Keap1 欠失マウスを作成して、現象をコンファームしたところ、NEKO マウスと同様に尿崩症を発症することがわかった。この Keap1 欠失による尿崩症発症は、成獣期ではなく胎児期から Keap1 を欠失した場合にのみ発症することがわかった。以上の結果は、胎児期・授乳期における環境ストレスが Nrf2 を活性化し腎性尿崩症を引き起こすという新規の疾患発症メカニズムの存在を示す。また、本研究の複合遺伝子欠失レスキュー法により作製された NEKO マウスは、新しい Nrf2 の生理機能の探索に有用であることを実証された。

O-2

バンコマイシンによる IL-1 β 分泌機構の解析

○西舘 亜紀子、平田 祐介、野口 拓也、松沢 厚

東北大・院薬・衛生化学

グリコペプチド系抗生物質であるバンコマイシンは、MRSA (メチシリン耐性黄色ブドウ球菌) などの耐性菌に対しても殺菌的に作用する数少ない抗菌薬である。一方で、バンコマイシンは腎毒性や聴力障害などの重篤な副作用を引き起こすことから、その投与にあたっては厳密なガイドラインが定められているが、副作用の発症機序はほとんど解明されていない。そこで、バンコマイシンによる副作用の発症機序を解明するために、バンコマイシンが誘導する細胞応答を解析した。マウス初代培養マクロファージおよびヒト単球性白血病細胞株 THP-1 細胞を用いて解析したところ、バンコマイシンが炎症性サイトカイン IL-1 β の分泌を促進することを見出した。しかし、バンコマイシンは、炎症誘導に主要な役割を果たす NF- κ B 経路や MAP キナーゼ経路をほとんど活性化しなかった。一方で、バンコマイシンは BiP や CHOP といった小胞体ストレスマーカーを発現誘導することが判明した。小胞体ストレスは NLRP3 インフラマソームを活性化して IL-1 β の分泌を促進するという報告があることから、バンコマイシンは小胞体ストレスを介して NLRP3 インフラマソームの活性化を惹起していることが示唆された。そこで、CRISPR/Cas9 法により NLRP3 インフラマソームの構成因子である NLRP3 および ASC のノックアウト細胞を作製し、バンコマイシンによる IL-1 β 分泌作用への影響を解析した。その結果、NLRP3 ノックアウト細胞においてはバンコマイシンによる IL-1 β 分泌が完全に抑制されたが、ASC ノックアウト細胞では部分的な抑制しか認められなかった。このことから、バンコマイシンは小胞体ストレスを介した NLRP3 インフラマソーム活性化作用を有するとともに、NLRP3 依存的かつ ASC 非依存的な未知の経路を介して IL-1 β 分泌を促進している可能性が示唆された。本大会においては、バンコマイシンによる IL-1 β の分泌促進機構に焦点を当て、その解析結果を報告したい。

O-3

マクロファージにおけるトランス脂肪酸特異的な作用機構の解明

○高橋 未来、平田 祐介、工藤 勇気、野口 拓也、松沢 厚

東北大・院薬・衛生化学

トランス脂肪酸は、炭素原子間にトランス型二重結合を有する脂肪酸の総称で、主に食品製造過程において人工的に産生される。疫学的な知見から、トランス脂肪酸は動脈硬化等の循環器系疾患や肥満・糖尿病等の生活習慣病のリスクファクターとなることが示唆されているが、細胞・分子レベルでの解析例が乏しく、トランス脂肪酸摂取に伴う疾患発症機序は不明である。そこで本研究では、トランス脂肪酸による疾患発症機構を解明するため、これらの疾患の発症と関わりが深いマクロファージに着目し、病原体由来成分 (PAMPs) や自己由来の起炎性因子 (DAMPs) によって誘導される免疫応答にトランス脂肪酸が及ぼす影響を比較検討し、トランス脂肪酸特異的な作用の同定およびその作用機序の解析を行った。マウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 細胞において、食品含有量が最も多いトランス脂肪酸であるエライジン酸、またはそのシス異性体であるオレイン酸を前処置し、代表的な PAMPs である LPS や DAMPs の一つである細胞外 ATP によって誘導される免疫応答への影響を解析した。その結果、エライジン酸の前処置は、LPS 誘導性の炎症関連遺伝子発現や食食には影響を与えない一方、細胞外 ATP 誘導性のアポトーシスを著しく亢進させることが判明した。しかし、このアポトーシス亢進作用はオレイン酸では認められなかった。また、リノエライジン酸やトランスバクセン酸など、他のトランス脂肪酸も ATP 誘導性アポトーシスを亢進させたが、それらのシス異性体では亢進が認められなかった。さらに、各種阻害剤やノックアウト細胞を用いた解析から、エライジン酸は、細胞外 ATP を認識する P2X₇ 受容体の下流で産生される活性酸素を介してストレス応答性 MAP キナーゼ p38 の活性化を増強することで、アポトーシスを亢進することが示唆された。本大会においては、細胞外 ATP 誘導性アポトーシスにおけるトランス脂肪酸特異的な作用機構について最新の研究成果をもとに報告したい。

O-4

ヒドロキシクロロキンによる乳酸脱水素酵素の活性阻害と抗腫瘍効果の解析

○後藤樹史¹、菅原琴美²、浅沼 研³、小林五十鈴⁴、鶴生川久美⁴、郭 永梅⁴、
高橋直人⁴、涌井秀樹¹、布村 渉^{1,5}

¹秋大院・生命、²秋大院・医修、³秋大・RIセ、⁴秋大院・血内、⁵秋大院・理工研セ

【動機】癌細胞はATP産生を嫌氣的解糖に依存しており、Warburg 効果として知られる [1]。嫌氣的解糖の最終段階を担う乳酸脱水素酵素 (LDH) には、5 種類のアイソザイム (M₄, M₃H, H₂M₂, H₃M, H₄) があり、ピルビン酸の還元と共役して NAD⁺を産生して解糖系に供給する。そのため、LDH の活性阻害による抗腫瘍効果が期待できる。我々は、自己免疫疾患治療薬として承認されているヒドロキシクロロキン (HCQ) の LDH 阻害効果を報告したがアイソザイム特性は明らかにしていない [2]。本研究では、HCQ の LDH アイソザイムの活性阻害特性を明らかにし、K562 の殺癌作用との関係を明らかにした。尚、阻害剤の対照として FX11 と STP を用い、CFU-E と比較検討した[3-5]。

【結果】K562 の主たるアイソザイムはそれぞれ M₃H と H₂M₂ だった (方法は前報に従った[6])。HCQ の LDH に対する阻害定数 K_i (mM) は M₄ (4.92 ± 1.01) , H₂M₂ (1.45 ± 0.23) , H₄ (2.86 ± 0.37) であった。HCQ は、STP 同様に K562 を死滅させ、CFU-E では一部の細胞の死滅を認めた。FX11 は K562 の増殖を濃度依存性に抑制したが、CFU-E の増殖を阻害しなかった。HCQ と FX11 は K562 の乳酸排出量を低下させた。【結論】HCQ は K562 の主たる LDH アイソザイムである H₂M₂ を阻害し、K562 を死滅させたことから、癌細胞の解糖系代謝阻害による殺癌効果が明らかになった。

【文献】 [1] Warburg O. *Science* (1956)**123**:309, [2] Nakagawa et al. *BBRC* (2016) DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.04.005, [3] Le A et al. (2010) *PNAS* **107**:2037, [4] Sada N et al. (2015) *Science* **347**:1362, [5] Kobayashi et al. (2016) *Exp. Hematol.* **44**:247, [6] Sugawara et al. (2016) *Fish. Sci.* DOI:10. 1007/ s12562-016-0972-1

O-5

N-glycosylation on integrin $\alpha 5$ serve as an on/off switch to regulate EGFR signaling

○杭慶雷、伊左治知弥、侯思聰、福田友彦、顧建国

東北医科薬科大・分子生体膜研・細胞制御

Integrin $\alpha 5\beta 1$ -mediated the cell-extracellular matrix (ECM) and the cell-cell interactions regulates a multitude of cellular responses. In addition to performing a structural role, integrin $\alpha 5\beta 1$ is known to bidirectionally relay signals across the cell membrane, particularly, the growth factor receptors (GFRs) signaling pathways. However, the effects of integrin $\alpha 5\beta 1$ on cell proliferation are controversial and the molecular mechanisms involved in the regulation between integrin $\alpha 5\beta 1$ and GFR remains largely unclear. Here we show that integrin $\alpha 5$ functions as a negative regulator of epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling through its *N*-glycosylation. Expression of wild-type (WT) integrin $\alpha 5$ suppresses the EGFR phosphorylation and internalization upon EGF stimulation. However, expression of the *N*-glycosylation mutant integrin $\alpha 5$, S3-5, which contains fewer *N*-glycans reversed the suppression of the EGFR-mediated signaling and cell proliferation. In a mechanistic manner, WT, but not S3-5 integrin $\alpha 5$ forms a complex with EGFR in the low-density lipid rafts, and the complex formation is disrupted upon EGF stimulation, suggesting that the *N*-glycosylation of integrin $\alpha 5$ suppresses the EGFR activation through promotion of the integrin $\alpha 5$ /EGFR complex formation. Furthermore, interestingly, consistent restoration of those *N*-glycans on the Calf-1,2 domain of integrin $\alpha 5$, particularly *N*-glycan on the potential *N*-glycosylation site 11, completely re-instated the inhibitory effects as well as the complex formation with EGFR. Taken together, these data are the first to demonstrate that the *N*-glycosylation on integrin $\alpha 5$ can serve as an on/off switch to regulate EGFR signaling, which is a novel molecular paradigm for the mechanism involved in EGFR activation and the cross-talk between integrins and GFRs.

O-6

サケ由来コンドロイチン硫酸プロテオグリカンの血管新生への影響

○小林 孝^{1,2}、柿崎育子¹、野坂大喜²、中村敏也²

¹弘前大院・医・糖鎖工学講座、²弘前大院・保・生体検査科学領域

プロテオグリカン (PG) は、コアタンパク質に1本以上のグリコサミノグリカン (GAG) 鎖が結合した複合糖質である。コンドロイチン硫酸プロテオグリカン (CSPG) は、GAG としてコンドロイチン硫酸 (CS) をもつ PG の総称であり、アグリカン・バーシカン・ニューロカンなどに代表される。CSPG は、細胞外マトリックスに広く分布しているが、特に軟骨組織に豊富に存在する。軟骨の CSPG (主にアグリカン) は、ヒアルロン酸やコラーゲンと複合体を形成し、軟骨の柔軟性に寄与している。また、CSPG は、細胞外マトリックスにおいて成長因子などと相互作用し、その機能の調節もおこなわれていることが知られている。軟骨組織には血管がないことから、軟骨由来の CSPG は、血管の形成については阻害的に働くと考えられている。しかしながら、CS は血管新生に対して阻害的にも促進的にも働くことが報告されており、血管形成に対する CSPG の機能はまだ明らかとなっていない。そこで我々は、サケ鼻軟骨由来の CSPG が血管新生に対してどのような影響を及ぼすのかを検証した。

サケ鼻軟骨の酢酸抽出物から DEAE イオン交換クロマトグラフィーによって PG 画分を調製した。この PG 画分は、アグリカンファミリーの CSPG がその大部分を占めているが、そのコアタンパク質は断片化していた。血管内皮細胞をサケ PG と培養した結果、1mg/ml で 48 時間培養した場合、若干の増殖阻害が認められた。また、フィブロネクチンコートディッシュをサケ PG で処理した場合、内皮細胞の接着が若干阻害された。次に、サケ PG の血管新生への影響を *in vitro* 血管新生モデルである管腔形成アッセイによって評価したところ、濃度依存的 (0~1 mg/ml) に管腔形成が著しく阻害された。この阻害作用は、PG のプロテアーゼ処理では消失せず、コンドロイチナーゼ処理で消失したことから、CS 鎖が重要であると考えられる。さらに、サケ PG で処理された内皮細胞では、マトリックスメタロプロテアーゼ-2 の発現の低下が認められた。これらの結果は、CSPG が、血管新生に対して抑制的に働くことを示唆している。

O-7

Wnt/ β -catenin シグナルを介した細胞核内 F-アクチンによる転写制御機構

○山崎祥他¹、山本浩志¹、十川久美子²、徳永万喜洋²、原田昌彦¹

¹東北大・院・農、²東工大・院・生命理工

近年、細胞核内に存在するアクチンが、細胞核の構造維持や転写制御に関与することが報告されている。細胞核に存在する単量体 globular (G)-アクチンは、クロマチンリモデリング複合体やヒストン修飾複合体の構成因子として、広くクロマチン構造変換に寄与する。一方で重合した filamentous (F)-アクチンは、限られた条件下で細胞核内に観察される。一例として、遺伝子の初期化の際に一過的に形成され、初期化因子 Oct4 の転写活性化に必要であることが報告されている(1)。我々は、核内 F-アクチンの遺伝子発現制御への関与とそのメカニズムを解明するため、核移行シグナル(NLS)を付加したアクチンを HeLa 細胞で発現させることで核内 F-アクチンを人為的に形成し、解析を行った。マイクロアレイによる網羅的な転写解析の結果、核内 F-アクチンの形成によって OCT4 を含む多様な転写因子の発現上昇が認められた(2)。次に、核内 F-アクチンによる転写活性化のメカニズムの一つとして、細胞内の主要なシグナル伝達因子である Wnt/ β -catenin 経路への関与を考え、その検証を行った。Wnt シグナルの mediator である β -catenin は、細胞質の F-アクチンに間接的に結合して安定化されることが知られている。我々は、核内に形成した F-アクチンと β -catenin が共局在することを観察した。さらに、核内に F-アクチンを形成した細胞では、 β -catenin および F-アクチンのクロマチンへの結合が増加していた(3)。これらの結果は、核内 F-アクチンが β -catenin の核局在とクロマチン結合に影響を与えることにより、Wnt/ β -catenin シグナルの標的遺伝子の発現制御に関与することを示している。

References:

1. K. Miyamoto, V. Pasque, J. Jullien and JB. Gurdon, *Genes Dev.*, 25, 946-58 (2011).
2. S. Yamazaki, K. Yamamoto, M. Tokunaga, K. Sakata-Sogawa and M. Harata, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 79: 242-246 (2015).
3. S. Yamazaki, K. Yamamoto, P. de Lanerolle, and M. Harata, *Histochem. Cell Biol.*, 145: 389-399 (2016).

O-8

SOD1 欠損による酸化ストレスはシトクロム P450 活性を抑制することで薬剤誘発性肝障害を軽減する

○本間拓二郎¹、白土貴也¹、李在勇¹、倉橋敏裕^{1,2}、藤井順逸¹

¹山形大学大学院生化学分子生物学講座、²(現)京都府立医科大学細胞再生医学教室

Superoxide dismutase 1 (SOD1)は、細胞質とミトコンドリア膜間腔に存在し、酸素が一電子還元を受けて最初に生じる活性酸素種のスーパーオキシドを消去する抗酸化酵素である。SOD1 を欠損したマウスの肝臓では酸化ストレスが増大する結果、小胞体ストレスを伴う軽度の肝障害が惹起され、脂質合成の亢進とリポタンパク質の分泌抑制が起こり脂肪肝となる。チオアセトアミド(TAA)は肝障害を誘導し肝線維化モデルを作製する際の薬剤として頻用され、その過程には酸化ストレスが関わると考えられている。本研究では、酸化ストレスと TAA 誘導性肝障害の関係を調べる目的で、SOD1 欠損マウスと野生型マウスに TAA を投与して検討を行った。

まず、10 週齢以上の野生型(C57BL/6)および SOD1 欠損雄マウスに、致死量の TAA (500 mg/kg)を投与した。その結果、野生型マウスは 36 時間以内に全て死亡したのに対し、SOD1 欠損マウスは全個体が観察期間 120 時間を通して生存した。野生型マウスに SOD1 阻害剤を前投与すると、非投与群に比べて致死量の TAA 投与による生存期間の延長が認められた。致死には至らない 200 mg/kg を腹腔内投与した場合の血漿中 ALT は、SOD1 欠損マウスでは野生型マウスと比較して低値であった。また、野生型マウスでは TAA 投与により肝臓の SOD1 のタンパク質量が減少したが、ほかの抗酸化酵素についてはいずれマウスでも変化はなかった。SOD1 欠損マウスでは非投与群においても CYP2E1 活性が低下しており、TAA 投与により肝薬物代謝酵素 CYP2E1 のタンパク質量は減少した。この時、脂肪滴表面の膜タンパクである PLIN2 の発現量がいずれにおいても増加したが、SOD1 欠損マウスでとくに顕著であった。

酸化ストレス状態である SOD1 欠損マウスが、野生型マウスに比べて TAA による肝障害に対して耐性であった。SOD1 欠損マウスでは CYP2E1 活性が低下しているため、TAA による肝障害が軽減された原因と考えられる。

O-9

フラビウイルス粒子形成に関与する ESCRT 因子群

新井亜利紗¹、田端桂介²、荒川将志¹、有本大²、斉藤一伸³、大森弘子³、奈良篤樹⁴、
○森田英嗣¹

¹弘前大・農学生命・分子生命、²大阪大・微生物病研究所・ウイルス研究グループ、
³大阪大・微生物病研究所・中央実験室、⁴長浜バイオ大・バイオサイエンス

フラビウイルスは感染後期過程に宿主細胞内膜系を大規模に再構築し、小胞体由来の複製オルガネラと呼ばれる構造体を形成する。我々はこれまでに、感染特異的に複製オルガネラにリクルートされる因子のプロテオミクス解析と siRNA ノックダウンスクリーニングによって、フラビウイルス複製に必要な種々の宿主因子を同定してきた。本研究では、スクリーニングによって同定された ESCRT 因子群について焦点を絞り、フラビウイルス増殖における役割について解析を行った。

単独または複数の siRNA の組み合わせによるノックダウンのスクリーニングを行い、ウイルスの増殖に必要な ESCRT サブユニットの同定と、各サブユニットの機能相補性について検討した。その結果、TSG101 単独でのノックダウン、CHMP4A/CHMP4B /CHMP4C 又は CHMP2A/CHMP2B/ CHMP3 を同時にノックダウンした細胞においてのみ、著しいウイルス増殖能の低下を確認した。これらの結果は、フラビウイルスの増殖において、一部の ESCRT 因子群が極めて重要な役割を担っていることを示唆している。また、免疫電子顕微鏡観察により、ESCRT 因子群が複製オルガネラ辺縁部に局在することを確認し、さらに、CLEM 解析より ESCRT をノックダウンした細胞の小胞体上に数多くの不完全なウイルス粒子様像が検出された。これらの結果は、ESCRT 機能の一端は小胞体近辺の複製オルガネラでみられるウイルス粒子形成にあることを示唆している。また、増殖が著しく抑えられたノックダウンの組み合わせに対して、各種変異体の入れ戻し実験を行い、ウイルスの増殖に必要な宿主因子間相互作用を調べたところ、TSG101-PTAP、CHMP2-CHMP4、CHMP-生体膜の相互作用の重要性は確認できたものの、TSG101-Ub、CHMP4-ALIX、CHMP2-VPS4、CHMP4-CCD21A の相互作用の重要性は確認できなかった。これまでにレトロウイルス粒子形成、MVB 形成、細胞質分裂など ESCRT が関与する様々な膜動態が報告されているが、フラビウイルスの粒子形成に必要な ESCRT 因子群はそれらとは異なったメカニズムにおいて機能している可能性が示された。

O-10

治療抵抗性を伴う悪性がんを標的とした NRF2 阻害剤の開発

○土田恒平¹、鈴木未来子²、林真貴子¹、辻田忠志³、山本雅之¹

¹東北大学大学院 医学系研究科 医化学分野、²東北大学大学院 医学系研究科 ラジオアイソトープセンター、³佐賀大学農学部 生命機能科学科 生化学分野

NRF2 は毒物や酸化ストレスに対する生体防御機構の中核を担う転写因子である。近年、肺がんをはじめとしたがん症例において、高頻度で NRF2 またはその抑制因子である KEAP1 の変異が認められることが報告されている。これらの変異は、NRF2 の恒常的な活性化をもたらす。NRF2 が誘導する一連の生体防御反応は、抗がん剤や放射線に対する治療抵抗性を付与するため、NRF2 活性化を伴うがんの予後は不良である。このような悪性度の高いがんを退縮させるためには、抗がん剤や放射線治療を行う際に、NRF2 を阻害することが有効であると考えられる。本研究では NRF2 阻害剤を同定するために、NRF2 が活性化している肺がん細胞株 A549 を用いて、NRF2 の転写活性化能の抑制を指標としたスクリーニングを行った。東北大学薬学研究科の低分子化合物ライブラリの 5,861 種類の化合物をスクリーニングし、NRF2 の活性を阻害する作用のある化合物 A を同定した。化合物 A は、アミノ酸飢餓反応を誘導することによって、NRF2 タンパク質の合成を阻害した。細胞内の NRF2 タンパク質を半量にするための化合物 A の濃度は約 30 nM であり、非常に低濃度で NRF2 阻害効果を示すことがわかった。次に、同定した NRF2 阻害剤の投与によって、抗がん剤耐性をもつ NRF2 活性化がん細胞の抗がん剤に対する感受性が増加するかを解析した。A549 細胞をヌードマウスの皮下に移植し、腫瘍を形成させた。このマウスに NRF2 阻害剤を投与したところ、腫瘍内の NRF2 タンパク質の減少が観察された。さらに、同モデルにおいて、溶媒投与、NRF2 阻害剤単独投与、抗がん剤シスプラチン単独投与、NRF2 阻害剤と抗がん剤の併用投与を 2 週間行った。抗がん剤単独投与の場合よりも、NRF2 阻害剤との併用投与の場合に著しい腫瘍退縮効果が認められた。これらの結果から、新規に同定した NRF2 阻害剤は、抗がん剤耐性をもつがん細胞において、抗がん剤の効果を増強させる Chemo-sensitizer として働くことが明らかになった。

O-11

致死的自己免疫疾患に対して NRF2 の恒常的活性化がもたらす抗炎症作用の解析

○鈴木 琢磨^{1,2}、村上 昌平¹、山本 雅之³、張替 秀郎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・血液免疫病学分野、

³東北大院・医・医化学分野

KEAP1-NRF2 制御系は酸化ストレスに対する生体防御に重要な役割を果たしている。転写因子 NRF2 は、定常状態においては KEAP1 により抑制されており、酸化ストレス下において活性化することで、抗酸化酵素や解毒酵素などの発現を誘導する。この制御系は感染症や自己免疫疾患による慢性炎症において生体防御に寄与することが知られているが、そのメカニズムは酸化ストレスに対する臓器保護作用だけでなく、炎症性シグナルの抑制にまで及ぶと考えられている。しかしながら、この炎症抑制作用についての詳細なメカニズムは明らかとされていない。そこで本研究では、自己免疫疾患モデルマウス (Scurfy, Sf) を用いて、NRF2 の活性化がもたらす炎症抑制作用について解析した。Sf マウスは、制御性 T 細胞の分化・機能獲得に必須である転写因子 FOXP3 の欠損により、制御性 T 細胞が産生されず、自己反応性 T 細胞の過剰な増殖による炎症から生後 2 週間程度で貧血を呈し、皮膚、肝臓、肺を中心とした全身性の臓器障害が進行することで、4 週間以内に死に至る。Sf マウスと *Keap1* ノックダウンマウス (*Keap1KD*) を交配させ、全身性に NRF2 を活性化させたマウス (Sf::*Keap1KD*) では、著明な生存期間の延長が観察され、また貧血の改善、皮膚、肝臓、肺における炎症細胞浸潤の減少も認められた。また、Sf::*Keap1KD* マウスのリンパ節 T 細胞では、活性化マーカーである CD25、CD44、CD69 陽性細胞や IFN- γ 、IL-4、IL-17A 陽性細胞が、Sf マウスと比較して減少していた。次に、この変化が T 細胞依存的なものかどうか検証するため、T 細胞特異的 *Keap1* 欠損マウス (Sf::*Keap1^{fl/fl}::Lck-Cre*) を作成し解析した。同マウスにおける T 細胞の活性化を調べたところ、Sf::*Keap1KD* マウスのような抑制効果は観察されなかった。以上より、全身性の NRF2 活性化は致死的な自己免疫反応であっても、炎症抑制効果を発揮するが、そのメカニズムは T 細胞の NRF2 活性化に依存したものではなく、他の免疫細胞や組織側の因子を介している可能性が示唆された。

O-12

オートファジー活性化を生かしたレビー小体病治療への応用

○丹治 邦和¹、三木 康生¹、猪瀬 (丸山) 敦史²、三村 純正²、松宮 朋穂³、森 文秋¹、今泉 忠淳³、伊東 健²、若林 孝一¹

¹弘前大院・医・脳神経病理学講座、²分子生体防御学講座、³脳血管病態学講座

α シヌクレイン (α -syn) は、家族性パーキンソン病の原因遺伝子の1つとして同定された。 α -syn は神経細胞シナプス末端において神経伝達物質の貯蔵および放出の調節に関与することが示唆されている。一方、レビー小体病 (パーキンソン病、レビー小体型認知症) では、 α -syn の異常蓄積が神経細胞の胞体および神経突起に認められ、さらにタンパク質分解酵素に耐性を示す異常 α -syn が、シナプス末端に多量に蓄積している。これらの知見から異常 α -syn の蓄積が神経細胞の機能不全を誘発し、レビー小体病の病因の一つであると考えられている。そこで我々は「異常蓄積を除去する」手法を模索した結果、神経細胞内の代謝を亢進する「オートファジーの活性化」が効果的であることを見出した。特に、培養細胞および正常マウスを用いた検討から天然二糖のトレハロース投与が効果的にオートファジーを活性化することを確認した。そこで、家族性の点突然変異 (A53T) を導入した α -syn トランスジェニックマウスをレビー小体病モデルマウスとしてさらに検討を行った。その結果、培養細胞および正常マウスの結果同様、トレハロースは効率的に脳内オートファジーを活性化した。しかし予想に反して、脳全体の異常 α -syn 量、局在に変化を認めなかったが、Triton X-100 に不溶性の α -syn 量の減少が認められた。このことから、オートファジーの活性化は、すでに凝集した分子に対して効果はなく、凝集前の分子を除去する可能性が示唆された。

O-13

Furry は LATS2 を介して YAP を制御する

○入江和樹、永井友朗、水野健作

東北大・院・生命科学

Hippo pathway は進化的に保存されたシグナル経路であり、細胞増殖や器官のサイズを制御する。細胞の接触阻害などの増殖抑制シグナルの下流で MST1/2 キナーゼが活性化されると、MST1/2 はアダプタータンパク質である SAV1 と結合し、LATS1/2 キナーゼと NDR1/2 キナーゼを活性化させる。LATS1/2 および NDR1/2 はともに転写共役因子である YAP/TAZ をリン酸化し、YAP/TAZ の細胞質係留や分解を促進して、YAP/TAZ の転写因子 TEAD との結合を阻害することで、細胞増殖を負に制御する。YAP の活性制御機構について多くの報告があるが、未解明な部分が多く残されている。Furry (Fry) は進化的に高度に保存された遺伝子であり、NDR と結合し活性化させることで、細胞の極性化や細胞周期の進行、神経突起の形成を制御する。当研究室では Fry が分裂期の紡錘体形成や染色体整列を制御することを明らかにした。しかしながら Hippo pathway における Fry の機能については不明であった。本研究において、私たちは Fry が YAP のリン酸化制御に関与することを明らかにした。まず、RPE 細胞において Fry を発現抑制した際の YAP の局在やリン酸化に対する影響を調べた。細胞を高密度で培養すると、YAP はリン酸化され、細胞質に局在する。しかし、Fry を siRNA によって発現抑制すると、YAP のリン酸化レベルがコントロール細胞に比べて著しく減弱し、YAP は核内への集積が観察された。これらの結果から、Fry は YAP のリン酸化を促進し、核内移行を負に制御していることが示唆された。また、Fry は YAP、LATS2、SAV1 と結合していることを見出した。また、Fry の発現抑制によって LATS2 の活性が減少したことから、Fry は LATS2 の活性化に寄与していることが示唆された。以上の結果から、Fry は Hippo pathway の構成因子と結合してその足場となることによって LATS2 の活性を促進し、そのことによって YAP のリン酸化と不活性化に関与していると考えられる。

O-14

生体内での5-アミノレブリン酸欠乏は、耐糖能異常・インスリン抵抗性の原因となるグリコーゲン合成異常を惹起する

斉藤真一¹、中野博¹、野原豪和¹、白澤信行¹、岡野聡¹、山本雅之²、高橋究³、
田中徹³、中島元夫³、○中島修¹

¹山形大・医・メディカルサイエンス推進研究所、²東北大院・医・医化学、
³SBI ファーマ株式会社

境界型糖尿病患者・二型糖尿病患者に対する、ヘム生合成前駆体である5-アミノレブリン酸(ALA)投与の複数のコホート研究により、ALA に糖尿病治療効果があることが報告された。我々は、非組織特異型ALA合成酵素遺伝子であるALAS1遺伝子破壊マウスにおける糖代謝を解析し、成体まで成長するALAS1遺伝子破壊マウスヘテロ接合体(HT)が、20週齢以降で、耐糖能異常(IGT)・インスリン抵抗性(IR)を示すことを見出した。HTのIGT/IRは、1週間のALA投与により正常レベルまで改善され、ALA依存性であった。電子顕微鏡解析から、HTの骨格筋でのグリコーゲン顆粒が凝集した異常な形態を示す一方、ALA投与されたHTではグリコーゲン顆粒の形態はほぼ正常になり、IGT/IRとグリコーゲン顆粒の形態異常が関連していた。HTの骨格筋では、インスリン依存性のde novoグリコーゲン合成、および、グリコーゲン合成を制御するグリコーゲンシンターゼ(GS)に対する、グルコース6-リン酸(G6P)によるアロステリックな活性化が障害されていた。以上の結果より、HTでは、G6Pによる、GSに対するアロステリック活性化が障害され、インスリンにより惹起されるde novoグリコーゲン合成が不全となるため、個体での血糖処理能が低下して、IGT/IRとなる可能性が示された。ALAS1ノックダウンC2C12筋芽細胞を用いて、HTと同様のグリコーゲン合成異常が認められた。ヘム生合成阻害剤スクシニルアセトン処理実験からALA合成失調は最終的にヘム合成失調を来し、これによりcell-autonomousにグリコーゲン合成異常が起こることが明らかとなった。本研究により、ヘムによる、グリコーゲン合成を介した糖代謝調節機構が存在し、その異常がIGT/IRをもたらすことが明らかとなった。一般に、二型糖尿病などに認められるグリコーゲン合成異常はインスリンシグナル異常の結果と考えられており、本研究により、グリコーゲン合成自体の異常が、IGT/IRをもたらすことが明らかとなった。

O-15

ミトコンドリアに存在する分子シャペロン ERp57 の機能解析

○工藤翔太¹、尾崎 拓²、宮崎雅雄¹、山下哲郎¹

¹岩手大学大学院 農学研究科 応用生物化学専攻、

²岩手大学 理工学部 化学生命理工学科 生命コース

【目的】 ERp57 は E.C5.3.4.1 に属する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り、小胞体ならびに核、細胞質、細胞膜に存在し多くの機能を担っている。近年我々は、ERp57 がミトコンドリアにも存在し AIF 依存性のアポトーシスを間接的に制御していることを明らかにした。そこで本研究では、ERp57 の新たな生理機能を明らかにすることを目的として、ERp57 の新規結合因子の同定とその機能解析を行った。

【方法】 抗 ERp57 抗体カラムにラット肝臓ミトコンドリア膜間腔画分を添加し、タンパク質を抗体カラムに吸着させた後、Glycine-HCl により吸着タンパク質を溶出した。次に SDS-PAGE による分離、ゲル内トリプシン消化、nano LC-MS/MS (Advance UHPLC system, LTQ Orbitrap XL mass spectrometer) および MASCOT データベース検索を行い、標的タンパク質を同定した。続いて、同定されたタンパク質と ERp57 との免疫沈降解析を行った。さらに、培養細胞 HEK293 を用いた ERp57 ノックダウンによる標的タンパク質の量的変化を調べた。

【結果】 プロテオミクス解析では、硫化水素 H₂S の産生酵素である Cystathionine γ -lyase (CSE) や脂肪酸 β 酸化関連酵素である Acyl-CoA dehydrogenase (ACAD) が候補タンパク質として同定された。免疫沈降解析では、CSE と ACAD は各々 ERp57 と複合体を形成していることが示唆された。また、ERp57 のノックダウン処理をした HEK293 において、Ca²⁺ イオノフォア A23187 刺激による CSE のミトコンドリアへの移行量が減少した。

【結論】 ERp57 は、ミトコンドリアにおいてエネルギー生産や酸化ストレス応答関連酵素の活性調節を担っている可能性が見い出された。

O-16

細菌リボソームの生合成

○後藤 史門、武藤 昱、姫野 俵太

弘前大・農学生命

分子複合体は生体内でどのように正確かつ効率良く組み上げられているのだろうか。50 を超える構成要素から成りいくつもの活性部位を備える精緻な分子機械であるリボソームは、この問題を扱うにあたって最も魅力的な対象のひとつといえる。高効率な細菌リボソームの生合成の実現に寄与する **trans** 因子の存在が早くから予言されており、実際にその候補はこれまでに数十挙げられている。しかしながら細菌リボソームの生合成因子の候補のうちリボソーム生合成のいかなる過程でどのように機能するのか、具体的に示された例は皆無であった。

RbfA および **GTPase RsgA** はこのような細菌リボソーム生合成因子の候補であり、間接的な証拠から **30S** サブユニットの生合成に関与するとされてきた。我々は大腸菌 **GTPase RsgA** の遺伝子欠失株の解析から出発し、**RbfA** との遺伝学的関係を発見した。また **30S** サブユニット前駆体を高純度に精製する方法を開発し、これによって可能になった生化学的解析によって、大腸菌リボソーム生合成の後期に **RbfA** が **30S** サブユニットから解離する過程が存在すること、**RbfA** が適切に解離しなければリボソーム生合成がとどこおること、そして **GTPase RsgA** の役割はこの **RbfA** の解離を促進するというものであることを明らかにした。これらを通じて明らかにした、細菌リボソーム生合成の一端を報告したい。

O-17

Methionine adenosyltransferase (MAT) II α のセントロメア領域における機能

○蝦名 真行¹、加藤 恭丈¹、島 弘季¹、池田 真教²、田中 耕三²、五十嵐 和彦¹

¹東北大学・医・生物化学分野、²東北大学・加齢医学研究所・腫瘍学研究分野

MATII α はメチオニンとATPから*S*-adenosyl methionine (SAM) を合成する代謝酵素である。SAMはヒストンやDNAのメチル基供与体として利用される。核に局在するMATII α はSETDB1をはじめとするヒストンメチル基転移酵素と複合体を形成し、遺伝子調節領域に局在することによって、転写調節とエピゲノム制御を共役すると考えられている。また、機能不明なMATIIサブユニットであるMATII β はMATII α の核局在量を制御することもわかってきた。しかしながら、そのエピゲノム制御が核局在MATII α に依存する染色体領域は、完全に解明されたわけではない。加えて、MATII α の細胞内局在とSAMレベルに相関性があるかどうかは未解明のままである。

セントロメア領域は染色体の中心付近に位置し、染色体分離の際には動原体形成の場として機能する。セントロメア領域は、繰り返し配列であるSatellite DNAを含み、ヒストンは転写抑制性のヒストンH3の9番目リジンのトリメチル化(H3K9me3)に富む。セントロメア領域のH3K9me3レベルの低下はセントロメア領域からの転写産物(Satellite RNA)の蓄積と染色体の分離異常を伴うことが知られている。

我々は、MATII α がセントロメア領域に局在することを見出した。また、MATII α や β のノックダウンは、セントロメア領域からのSatellite RNAの蓄積やH3K9me3レベルの低下、染色体の分離異常を引き起こすことを確認した。さらに、セントロメア領域におけるSETDB1の局在は核局在MATII α に依存することも見出した。一方で、核抽出液中のSAM量は核内MATII α 量に依存しないことも明らかとなった。一連の解析結果をふまえ、我々は、セントロメア領域におけるエピゲノム制御がMATII α を介した局所的なSAM供給により維持されている可能性(SAM地産地消モデル)を紹介したい。

O-18

腎集合管細胞での転写因子 GATA2 欠失により得られる急性腎障害予防効果のメカニズム解明

于 磊¹、○森口 尚^{1,3}、清水律子²、山本雅之¹

¹東北大院・医・医化学、²分子血液学、³東北医薬大・医・医化学

GATA2 は血球分化に深く関わる Zn フィンガー型転写因子である。我々は最近 GATA2 が腎尿路系発生に必須の因子であることを報告したが、成体マウス腎臓内での組織発現分布や生理機能は未解明であった。*Gata2* 遺伝子座に GFP を挿入したマウスを用いて発現分布を解析したところ、GATA2 は腎集合管特異的に発現することを見いだした。GATA2 欠損マウスは致命的な造血障害に陥るため、腎尿細管上皮細胞特異的に GATA2 を欠失するマウス (*Gata2* CKO マウス) を作出し、成体腎臓での GATA2 機能解析を行った。*Gata2* CKO マウスは正常に生育し、腎臓に組織学的な異常を認めなかった。興味深いことに、*Gata2* CKO マウスの腎集合管細胞を用いた発現アレー解析では、炎症性サイトカイン群の定常状態での発現低下を認めた。腎内で産生される炎症性サイトカインは、急性腎障害時の組織障害を増悪させ、慢性腎臓病への移行に関わる。そこで、我々は *Gata2* CKO マウスの、虚血再灌流(IR; Ischemia Reperfusion)による急性腎障害に対する感受性を検討した。その結果、*Gata2* CKO マウスでは IR 誘導時の腎臓での炎症性サイトカイン遺伝子の発現誘導レベルが有意に減弱しており、炎症細胞浸潤と腎障害の程度が軽微であった。腎集合管由来の mIMCD 細胞株に対して GATA 因子機能阻害活性を持つ低分子化合物を添加すると、LPS(リポ多糖)刺激時の炎症性サイトカイン誘導のレベルが顕著に抑制された。さらに、野生型マウスの IR 腎障害誘導時に本化合物を前投与すると、腎障害の程度が有意に軽快した。以上の結果から、腎集合管細胞は IR 腎障害誘導時の炎症性サイトカインの主要な産生細胞であり、GATA2 は炎症性サイトカイン遺伝子発現誘導において重要な機能を担っていると考えられた。腎集合管細胞での GATA2 機能を阻害することにより、IR 腎障害に伴う炎症を軽減し、慢性腎臓病への移行を効果的に予防できることが期待される。

O-19

3 番染色体逆位を伴う急性骨髄性白血病における *GATA2* 遺伝子ヘテロ欠失の寄与

○片山紗乙莉^{1,2}、鈴木未来子³、呉繁夫²、山本雅之¹

東北大学大学院 医学系研究科 ¹医化学分野、²小児病態学分野、
³ラジオアイソトープセンター

3 番染色体長腕 q21 (3q21) と q26 (3q26) との間の転座や逆位を伴う急性骨髄性白血病 (AML) は、*EVI1* 遺伝子の高発現を伴い、予後が不良であることが知られている。以前、我々はこの 3 番染色体逆位を再現した大腸菌人工染色体 (BAC) クローンを導入したトランスジェニックマウス (3q21q26 マウス) を作製し、3q21 側に存在する *GATA2* 遺伝子のエンハンサーが 3q26 側に存在する *EVI1* 遺伝子に近接し、その発現を活性化することが白血病発症の原因となっていることを明らかにした。しかしながら、ヒト患者においては、3 番染色体の転座・逆位によって *EVI1* 遺伝子が高発現する一方で、片方のアリの *GATA2* 遺伝子はエンハンサーを失うため、*GATA2* 遺伝子のヘテロ欠失が同時に起こっている。*GATA2* 遺伝子ヘテロ欠失はそれ自体が骨髄異形成症候群や AML の原因となることが知られており、3 番染色体転座・逆位を伴う AML においても、*GATA2* 遺伝子ヘテロ欠失が白血病発症に寄与していることが考えられた。そこで、本研究では 3q21q26 マウスと *Gata2* 遺伝子ヘテロ欠失マウス (*Gata2*^{+/-}マウス) とを交配することにより、3 番染色体長腕転座・逆位を伴う AML における *GATA2* 遺伝子ヘテロ欠失の寄与を検討した。3q21q26:*Gata2*^{+/-}マウスは、3q21q26:*Gata2*^{+/+}マウスと比べて早期に白血病を発症した。白血病を発症した 3q21q26:*Gata2*^{+/+}マウスの骨髄には、B220 陽性の芽球と Gr1 陽性の骨髄単球系へ分化・成熟傾向を示す白血病細胞が混在して認められた。B220 陽性芽球を培養すると、Gr1 陽性細胞が出現したことから、3q21q26:*Gata2*^{+/+}マウスでは、B220 陽性芽球が Gr1 陽性細胞への分化能を有していることが明らかになった。一方で、白血病の 3q21q26:*Gata2*^{+/-}マウスの骨髄は B220 陽性芽球で占められており、骨髄単球系へ分化・成熟傾向を示す白血病細胞はわずかであった。このことから、*Gata2* 遺伝子ヘテロ欠失によって骨髄単球系への分化が障害されることで、白血病発症が促進されていることが示唆された。

O-20

フォンウィルブランド因子高分子多量体解析の標準化・定量化の試み

○堀内 久徳¹、坂爪 公¹、斎藤 健貴¹、樋口(江浦) 由佳²、小亀 浩市²、早川 正樹³、松本 雅則³

¹東北大・加齢研・基礎加齢、²国循研セ・分子病態、³奈良医大・輸血部、

フォンウィルブランド因子 (VWF) は、血管内皮細胞・骨髄巨核球から分泌される止血に重要なタンパク質である。超巨大 VWF 多量体 (unusually large VWF multimers: UL-VWFM) として産生される VWF はその特異的切断酵素 ADAMTS13 により不応力依存的に切断されて、血液中ではサブユニット 2 個 (50 万ダルトン) ~80 個 (2000 万ダルトン) の多量体として存在する。生体内で過度に強い不応力が生じる大動脈弁狭窄症や、ポンプ内で高度の不応力が生じる補助人工心臓装着例では、VWF の切断が亢進し、高分子量領域の VWF 多量体が欠損 (減少) することがある。一方、止血機能には VWF の高分子量領域の多量体が重要であるので、高分子量領域の VWF 多量体が欠損 (減少) は出血性疾患である後天性フォンウィルブランド症候群となる。我々の大動脈弁狭窄症の解析より、我が国では数万人が本疾患に罹患していると推測される (Tamura et al, *J Atherosclerosis Thrombosis*, 2015)。さらに、人工心臓装着時の合併症として、感染、血栓症とともに出血は頻度の高い重大合併症である (Sakatsume et al, *J Artificial Organs*, 2016) が、後天性フォンウィルブランド症候群は出血の主因として注目を集めている。

さて、この診断には VWF 多量体解析が必要であるが、超高分子量を検出する特殊なウェスタンブロットであり、世界的にも各研究室が独自の方法で行い、また、ほとんど定量的に評価されて来なかった。そこで、我が国で VWF 多量体解析を日常的に行ってきた 3 施設で解析法を標準化し、定量法を構築し、ほぼ完成した。ここでは、その方法について発表したい。なお、本定量化法の完成後には、この方法を用いて種々の循環器疾患症例を解析し、疾患毎に後天性フォンウィルブランド症候群発症頻度や、それが原因となっておこる出血イベントの頻度等、その実態を多施設共同前向き臨床研究 (The acquired von Willebrand syndrome co-existing with cardiovascular diseases Study (The AVeC Study) によって明らかにして行く計画である。

O-21

中心体キナーゼ Aurora A が触媒する分裂期中期における動原体分子のリン酸化の役割

○家村 顕自、田中 耕三

東北大学加齢医学研究所 分子腫瘍学研究分野

多くのがん細胞で染色体の異数化がみられるように、染色体の数を一定に保つことは細胞の恒常性を維持する上で必須の機構である。染色体の数を一定に保つためには、複製された染色体が分裂期において娘細胞に均等に分配されなければならない。この染色体均等分配は、分裂期中期において全ての染色体の動原体がそれぞれの紡錘体極から伸びる微小管と正しく結合し、赤道面で二極紡錘体結合を確立することによってなされる。動原体-微小管結合は分裂期の進行に際してしばしば誤った結合を引き起こすが、この誤った結合は動原体に局在する Aurora B キナーゼによる動原体分子のリン酸化によって修正される。

今回我々は、分裂期中期において赤道面に整列した染色体の動原体分子が、Aurora B ではなく中心体に局在する Aurora A キナーゼによってリン酸化されることを見出した。このリン酸化は、正常二倍体細胞株 RPE-1 細胞で顕著にみられ、染色体の数が異常ながん細胞株 HeLa 細胞ではみられなかった。また、分裂期中期における染色体動態を観察したところ、RPE-1 細胞では染色体が極間で振幅運動を行う染色体オシレーション運動が引き起こされており、この染色体動態は Aurora A を阻害することで抑制された。染色体オシレーション運動は、微小管安定化処理や Aurora B の阻害による動原体-微小管結合の安定化によって抑制されることから、Aurora A は分裂期中期における動原体-微小管結合の安定性制御に寄与している可能性が示唆された。

本会ではこの結果に加え、Aurora A が触媒する動原体分子のリン酸化を様々な細胞株を用いて検証した結果を示し、分裂期中期での Aurora A による動原体-微小管結合制御機構の必要性について議論したい。

O-22

骨髄間葉系幹細胞による形質細胞の維持機構解析

○萱場敦子¹、伊藤亜里¹、高井俊行¹

¹東北大・加齢研・遺伝子導入研究分野

【背景】私達は一度感染症にかかれば二度かからない「免疫記憶」という能力を持っているが、その一方で自己組織を非自己と認識する誤った記憶をもってしまうことによる自己免疫疾患も存在する。この免疫記憶がどのように維持されているのかについては、まだ十分に解明されていない。免疫記憶を構成する細胞の一つに、骨髄に定着して数ヶ月から数年の間、病原体に対する中和抗体を産生し続ける骨髄形質細胞 (Plasma Cells: PC) があり、骨髄中の CXCL12 陽性ストローマ細胞の近傍で維持されることが報告されているが、詳しい維持機構に関しては不明な点が多い。PC は *in vitro* では数日しか維持できず、骨髄 PC の長期生存の詳細を明らかにする為には、*in vitro* での長期培養系の確立が重要であると考えられる。マウスに関して、現段階では樹状細胞との共培養によって 1 ヶ月培養した報告が最長である。我々は PC の新たな生存維持細胞として、骨髄に存在する間葉系幹細胞 (Mesenchymal Stem Cells: MSC) に着目した。MSC は未分化な細胞集団であり、脂肪細胞や軟骨細胞などへの分化能を有する。また、MSC はリンパ球系細胞に対して免疫制御機能を持つことが報告されているが、PC に対する影響はまだ明らかではない。近年、Sca-1 と PDGFR- α を用いてフローサイトメトリー法で MSC を単離する方法が樹立され、従来の長期培養で得られる MSC よりも純度が高く、生体内での性質に近いものが得られるようになった。【目的】本研究では、PC の生体内での維持機構の解明と長期培養系の確立を目的として、マウス骨髄から MSC と PC を採取して共培養を行った。【方法・結果】培養後の PC を回収して ELISpot 法で IgG 産生細胞を検出した結果、PC 単独培養と比較して、MSC と共培養したものでは抗体産生能を維持している PC 数が多い傾向が得られた。更に ELISA 法で解析したところ、共培養した上清中には、PC 単独培養と比べて PC の生存に必要な因子の一つである IL-6 濃度が有意に高く、MSC が IL-6 を分泌していることが分かった。【結論】これらの結果は、MSC が PC の生存維持に寄与する可能性を示唆するものであった。今後は、PC の維持に必要な MSC 由来の因子を同定することで MSC-PC 間のシグナル経路を明らかにする予定である。

ポスター発表

P-1

ミトコンドリアカルパインの新規活性制御因子の探索

○永島 昂¹、山下哲郎²、尾崎 拓¹

¹岩手大学 理工学部 化学生命理工学科 生命コース、

²岩手大学大学院 農学研究科 応用生物化学専攻

【目的】 カルパインは Ca^{2+} 依存的に活性化するシステインプロテアーゼである。細胞質に多く存在しているが、ミトコンドリアにも μ -カルパインや m -カルパイン、カルパイン 10 が局在している。カルパインの内在性阻害因子であるカルパスタチンは、細胞質では機能しているがミトコンドリアには存在しないと考えられている。よって細胞質とは異なる機構によりミトコンドリアカルパインの活性が制御されていることが示唆される。そこで、本研究ではミトコンドリア独自のカルパイン活性制御機構を解明することを目的として、新規活性制御因子の探索を行った。

【方法と結果】 ラット肝臓より単離したミトコンドリア膜間スペースを DEAE- Sepharose CL-6B カラムクロマトグラフィーによって分離した。次に、カルパイン活性の見られなかった各画分に膜間スペースを作用させカルパイン活性を測定したところ、後半の画分にカルパイン活性を上昇させる因子が含まれていることが分かった。続いて、その活性化因子が含まれる画分を細胞質とミトコンドリアのカルパインに各々作用させたところ、ミトコンドリア μ -カルパインの活性を約 7 倍、ミトコンドリア m -カルパインの活性を約 4 倍も上昇させることが分かった。一方、細胞質の μ -カルパインと m -カルパインの活性には変化が見られなかった。さらに、活性化因子が含まれる画分を SDS-PAGE に展開し、主なバンドを nano LC-MS/MS (Advance UHPLC system, LTQ Orbitrap XL mass spectrometer) 解析ならびに MASCOT データベース検索を行ったところ、幾つかの候補分子が同定された。

【結論】 ミトコンドリアカルパインの活性化因子の存在が確認できたことから、ミトコンドリアには細胞質とは異なった独自のカルパイン活性制御機構が存在している可能性が示唆された。

P-2

遺伝子 *Tspo* の発現調節メカニズムの解明

○下山修司¹、中村和彦^{1,2}、上野伸哉^{1,3}

¹弘前大院・医・子どものこころの発達研究センター、

²弘前大院・医・神経精神医学講座、³弘前大院・医・脳神経生理学講座

近年、精神疾患や脳神経疾患では脳内で炎症が起きていることが多数報告されており、炎症状態を可視化する方法として、PET 画像診断が広く用いられている。この際に用いられるプローブは複数の種類があるが、いずれも 18 kDa translocator protein TSPO を標的としたものである。TSPO は脳内では免疫担当細胞であるミクログリアに存在しており、炎症に伴って mRNA レベルで増加することがわかっているが、どのようなメカニズムで増加するかは明らかにされていない。

本研究では、マウスミクログリア細胞株 BV-2 を用いて、LPS によって擬似的炎症状態を引き起こした際の、遺伝子 *Tspo* の発現調節に関与するシスエレメント及び転写因子の探索を行なった。はじめに、遺伝子 *Tspo* の調節領域をクローニングしたのち、様々な長さのコンストラクトを作製し、ルシフェラーゼアッセイを行なった。その結果、転写因子複合体 AP-1 結合領域を含む部位を欠損させると、LPS による *Tspo* の発現誘導が著しく減少したことから、AP-1 の関与が示唆された。そこで、この領域に AP-1 が結合するかどうかを、AP-1 構成因子である c-fos 及び c-jun 抗体を用いた ChIP assay にて確認したところ、LPS 刺激によりいずれも結合量が増加していることがわかった。また、ヒト遺伝子 *TSPO* のプロモーター近傍には Sp1 結合領域が存在し、Sp3・Sp1 の置換による発現調節が報告されている。この付近はヒトとマウスで非常に高い相同性を示すことから、マウスにおいても Sp1 の関与が示唆された。そこで、同様に Sp1 の ChIP assay を行なったところ、LPS 刺激により結合量が増加することが明らかになった。

以上の結果より、遺伝子 *Tspo* の発現調節はエンハンサー領域では転写因子複合体 AP-1、プロモーター近傍では Sp1 によって正に制御されることが明らかになった。今後は脳内炎症モデルマウスを用いて、LPS 刺激以外ではどのように遺伝子 *Tspo* の発現調節がなされているかを明らかにし、炎症との関係を解明していく予定である。

P-3

非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）を光で探す

○栢森 藍佳¹、畠 恵司²、樋渡 一之²、佐々木 玲²、高橋 純一郎³、鳥居 征司⁴、吉原 利忠⁵、飛田 成史⁵、穂坂 正博¹

¹秋田県立大院・生物資源研究科、²秋田県総合食品研究センター、³株式会社スカイライト・バイオテック、⁴群馬大学・生体調節研究所、⁵群馬大学・理工学府

肝臓に30%以上の脂肪が蓄積した状態は脂肪肝と呼ばれ、その中でも飲酒との関係が認められない非アルコール性脂肪性肝炎（Nash: non-alcoholic steatohepatitis）は、欧米で肝硬変や肝がんの原因として重要視されており、メタボリック症候群が蔓延し始めた我が国でも、今後患者が増大することが危惧されている。従来の腹部エコー、CT、MRIなどの画像診断法でもNASHの罹病疑念を可視化できるが、詳細な診断には、肝臓に太く長い針を刺して組織の一部を採取し調べる侵襲性の高い肝生検が必須である。さらにNASHは自覚症状がほとんどないため、早期発見が困難であり、確定診断時に病状が進行していることが多い。このため、NASH病態を早期発見できる低侵襲性診断や、簡便かつ有効な薬剤探索・評価モデルの確立は、医療・創薬産業における喫緊の課題である。

我々の研究グループ（秋田県立大学、群馬大学）は、生体内の低酸素部位を検出するプローブとしてイリジウム錯体を用いる方法を考案した。イリジウム錯体のりん光は酸素消光を示し、通常の酸素分圧では発光せず、低酸素環境でのみで発光をする。イリジウム錯体（BTP）およびその改良体（BTPHSA：長波長改良体）は、生体での低酸素病態を可視化できる新規の分子イメージング法として期待されている。

最近、我々（秋田県立大学、秋田県総合食品研究センター、スカイライト）は一連の研究・開発過程で『NASH誘発モデルマウスの肝臓がBTPHSAで有意に標識されること』を見出した。そこで本研究では、マウスをモデルとして、イリジウム錯体によるNASH病態の生体イメージング法を確立し、イリジウム錯体がNASH病態の肝臓で発光するメカニズムを検証することを目的とした。本会では、NASHモデルマウス、単純性脂肪肝モデルマウスの肝臓におけるイリジウム錯体の発光を検証したので報告する。

P-4

カルノシン酸はアミロイドβの細胞内オリゴマー化抑制により神経細胞毒性を低減する

○吉田 秀見¹、丹治 邦和²、松宮 朋穂¹、早狩 亮¹、三村 純正³、伊東 健³、
今泉 忠淳¹

¹弘前大院・医・脳血管病態学講座、²弘前大院・医・脳神経病理学講座、³弘前大院・医・分子生体防御学講座

アルツハイマー病の成因はアミロイドβ (Aβ) ペプチドのオリゴマー形成・集積であるという Aβ オリゴマー仮説が有力視されている。Aβ は細胞膜を貫通しているアミロイド前駆体タンパク質 (APP) がβ 及びγ セクレターゼにより切断されて生成する。健常ではアミノ酸残基数 40 の Aβ40 が最も多く存在し、Aβ42 は全 Aβ の約 10%、Aβ43 は数%を占める。Aβ42 と Aβ43 は Aβ40 に比べて凝集性が高く、オリゴマー化して神経細胞の機能障害や死を招く。ローズマリーなどに含まれるカルノシン酸 (CA) は転写因子 Nrf2 の活性化等を介して神経保護作用を発揮することが知られている。私たちは培養 SH-SY5Y ヒト神経芽腫細胞を用いて、Aβ の細胞毒性に対する CA による抑制効果を検討した。Aβ42 及び Aβ43 のモノマーで細胞を処理 (10 μM, 24 h) するとアポトーシスが誘導された。すなわち、カスパーゼカスケード (caspase-3, -4, -8, -9) の活性化や切断型 poly-(ADP-ribose) polymerase (PARP)、成熟型 apoptosis-inducing factor (AIF) の増加とともに cell viability が低下した。同じ条件の Aβ40 モノマー処理細胞にはこのような変化は認められなかった。Aβ 処理の 1 時間前に加えた CA (10 μM) は、Aβ42 及び Aβ43 の細胞毒性を抑制した。また、細胞内に取り込まれたモノマーがオリゴマー化した Aβ42 及び Aβ43 は、前処理した CA により減少した。Aβ40 モノマー由来のオリゴマーは CA による前処理の有無にかかわらず細胞内に検出されなかった。以上から、CA は神経細胞内における Aβ42 及び Aβ43 のオリゴマー形成・蓄積を抑制することによりカスパーゼカスケードの活性化を抑制し、ひいてはアポトーシスの誘導を抑制すると考えられる。CA は Aβ が介在するアルツハイマー病などの疾患の予防に有用かもしれない。

P-5

tmRNA/SmpB による翻訳停滞リボソームの認識メカニズムの解明

○栗田大輔¹、姫野倭太¹

¹弘前大学・農学生命科学部

tmRNA は、tRNA と mRNA の両方の機能を持つキメラ分子 RNA である。通常の翻訳は、開始コドンから始まり終止コドンに達すると解離因子 (release factor ; RF) の働きによってポリペプチドがリボソームから解離することで終結する。もし何らかの原因で mRNA が途中で切断された場合、リボソームは終止コドンに到達できないため mRNA 上で停滞してしまう。このような状態のリボソームに対して、tmRNA はリボソームの入り口である A サイトに入り、できかけのペプチドを受け取る。次に tmRNA は mRNA として機能することで出来かけのタンパク質にタグペプチド (分解の目印になる) を付加し、自身の持つ終止コドンによって翻訳を終了させる。このように 2 分子の RNA から 1 分子のポリペプチドを作ることから、この機構はトランス・トランスレーションと呼ばれる。しかし、トランス・トランスレーションの詳細な分子メカニズムはわかっていない。

tmRNA は何らかの方法で停滞したリボソームを見分けていると考えられる。我々は tmRNA 結合タンパク質である SmpB に着目した。SmpB は tmRNA だけでなくリボソームにも結合することから、部位特異的ラジカルプロービング法を用いてリボソーム上の SmpB 結合部位を明らかにした。次に詳しい分子メカニズムを明らかにするために、精製した因子を用いて *in vitro* トランス・トランスレーション系の確立と各中間状態の活性評価系を立ち上げた。この系を用いて、様々な mRNA で停滞したリボソームを再現し各ステップに与える mRNA の影響を調べた。その結果、トランス・トランスレーション初期段階において tmRNA/SmpB がどのようにして標的となるリボソームを認識しているか、その分子メカニズムが明らかになった。

P-6

フラビウイルス増殖における VCP/p97 の役割

○荒川将志¹、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

¹弘前大・農学生命・分子生命、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、小胞体 (ER) 近傍に複製オルガネラと呼ばれる構造体を形成する。我々はこれまでにデングウイルス(DENV)また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の網羅的プロテオミクス解析により、複製オルガネラに特異的にリクルートされる宿主因子として VCP (Valosin-containing protein/p97)を同定した。VCP は、N 末端側のドメインを介してさまざまなコファクターとの結合し、小胞体ストレス応答やゴルジ体、エンドソームの膜形成など、細胞内の多様なイベントに分子シャペロンとして関与する。本研究では、VCP がどのように複製オルガネラにリクルートされるのか、その分子機構と、フラビウイルスの増殖における VCP とコファクターの役割を明らかにすることを目的として解析を行った。

感染細胞より VCP を精製し共精製される因子を質量分析によって解析したところ、ウイルス遺伝子にコードされている NS3 及び NS4b 領域のペプチドが多数同定された。酵母ツーハイブリッド法により NS4b のどの領域が VCP 複合体との結合に重要か検討したところ、TMD3 と TMD4 に挟まれた領域が VCP コファクターである Npl4 と直接相互作用している可能性が示された。また、免疫蛍光染色法により Npl4-VCP 複合体が小胞体近傍に形成されるコンパートメントにリクルートされることを見出した。さらに、VCP をノックダウンした細胞に、Npl4 結合不全 VCP 変異体を入れ戻した場合にのみ、ウイルス増殖が回復しなかった。また、Npl4 をノックダウンした細胞ではウイルス増殖能の低下が認められた。これらの結果は、コファクターの中でも Npl4 が VCP の機能の中心的な役割を果たし、また、ウイルス複製オルガネラ上の NS4b 分子との直接結合を介してウイルス増殖を制御していることを示唆している。また、ウイルス感染細胞に VCP 阻害剤を添加すると著しいストレス顆粒の蓄積が確認された。この現象は VCP ノックダウン細胞にも確認された。これらの結果は、VCP の宿主ストレス応答制御機構がウイルスの増殖に関与している可能性を示唆している。

P-7

膵島β細胞株の低酸素環境におけるホルモン修飾の解析

○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秋田県立大学 生物資源科学研究科、²旭川医科大学 解剖学講座

内分泌細胞で、ペプチドホルモンや多くの生理活性ペプチドは、まず分子量の大きな前駆体として粗面小胞体で合成され、トランスゴルジネットワーク(TGN)まで輸送される過程で、順次、シグナルペプチドの除去、S-S結合の形成、糖鎖付加などの修飾を受ける。その後、分泌顆粒に選択的に輸送されたホルモン前駆体(プロホルモン)は、さらに顆粒中でプロセッシング(塩基性アミノ酸対、末端アミノ酸での限定切断などの修飾)を受け、活性を持つ成熟型ホルモンとなり細胞外に放出される。通常、分子量の大きなプロホルモンは生理活性を欠き、プロセッシングなど翻訳後修飾を受け、はじめて活性のある成熟型ホルモンとなる。

生体内の酸素濃度は血液が酸素を輸送するため、その正確な測定は難しく現在でも不明な点が多く残されている。しかし近年、生体内の低酸素環境で発現が誘導される HIF などのタンパク質が見つかり、生体の低酸素が恒常性維持に果たす役割について注目されつつある。生体組織の酸素分圧は古典的な電極型酸素分圧測定装置で電極プローブを対象とする組織に刺し、酸素分圧を測定されてきた。膵島では、麻酔下のラットで同様の測定装置によりその内部と表面の酸素分圧が測定され、その酸素分圧は 36-45 mmHg と報告されている(Diabetes.47,1586,1998)。

本研究では、低酸素環境下でマウス膵島β細胞由来 MIN6 細胞をモデルとして、生理的な低酸素環境下におけるホルモン合成・分泌制御について明らかにすることを目的とした。本会では、生理的な低酸素環境下(10-20%酸素濃度、24時間培養)で MIN6 細胞を培養し、常酸素環境下で培養した細胞におけるホルモン分泌、細胞内貯蔵量、ホルモン修飾をタンパク質レベルで比較検証したので報告する。

P-8

Rhodobacter capsulatus 由来 *bd* キノール酸化酵素の解析

○坂元 君年¹、佐々木 智子¹、Fevzi Daldal²

¹弘前大・農生・分子生命、²ペンシルバニア大・生物

ミトコンドリアの起源は α プロテオバクテリアであると考えられていることを裏付けるように、細菌細胞膜上にある呼吸鎖電子伝達系にはミトコンドリア内膜の呼吸鎖電子伝達系で見られる呼吸鎖酵素複合体の祖先型とも言える酵素複合体が見られる。しかしながら、ミトコンドリアとの大きな相違点として、細菌は生育環境に応じてよりダイナミックに呼吸鎖酵素の構成を変化させていることが特徴的である。細菌にはミトコンドリアに存在しない呼吸鎖酵素を複数持つものが多く、同じ酵素活性を持ちながらも特性の違う酵素複合体を使い分けている例が多い。

ミトコンドリアでは脱水素酵素によって還元されたユビキノンに再酸化するのはユビキノール-シトクロム *c* 還元酵素（複合体 III）であり、さらにシトクロム *c* 酸化酵素（複合体 IV）によって、最終電子受容体である酸素へと電子が渡されるが、この二つ酵素によるキノールから酸素への電子伝達を一つの酵素で行う、キノール酸化酵素が細菌では複数種存在する。その中で、*bd* キノール酸化酵素は酸素への親和性が高く、低酸素状態で発現誘導されることが知られている。分子系統解析から、*bd* キノール酸化酵素は大きく二つのグループ、*bd*-I と *bd*-II に分けられる。*bd* キノール酸化酵素で最も良く研究されているのは大腸菌の酵素であり、これは *bd*-I に属するが、酢酸菌や *Pseudomonas* 属の持つ *bd*-II がシアンに極端に低い感受性を示すことから CIO (cyan insensitive oxidase) という名称が使用されている。

紅色光合成細菌 *Rhodobacter capsulatus* は *bd*-II タイプのキノール酸化酵素を保有しているが、これまで *Rhodobacter* 属の *bd* キノール酸化酵素はほとんど研究されていない。そこで、本研究では *R. capsulatus* 由来 *bd* キノール酸化酵素の特性を解析するために、この酵素の欠損株、過剰発現株を作製し、活性測定の方法確立を試みた。これによって、本酵素のシアンへの感受性が酢酸菌や *Pseudomonas* 属の CIO ほどは低くなく、大腸菌の酵素に近いことが分かった。

P-9

ストレス応答遺伝子 *HO-1* 発現への INO80 複合体の関与解析と人為的制御への試み

○秋山 祐亮¹、高橋 裕一朗¹、村上 寛和¹、Christian Heinis²、五十嵐 和彦³、
加藤 恭丈³、原田昌彦¹

¹東北大・院農・分子生物、²EPFL・LPPT, Lausanne、³東北大・院医・生物化学

真核細胞のゲノム DNA はクロマチンを形成して存在しており、このクロマチン構造が転写や DNA 損傷修復におけるエピジェネティック制御の分子基盤となっている。ATP 加水分解のエネルギーを用いてクロマチン構造を変換する ATP 依存的クロマチンリモデリング(ADCR)複合体は、クロマチン構造変換に中心的な役割を果たしている。多くの ADCR 複合体の構成因子として、アクチンと進化的・構造的に関連性を有するアクチン関連タンパク質(Arp)が含まれていることが知られている。転写や修復に重要な機能を果たす INO80 ADCR 複合体には、アクチンおよび Arp4, Arp5, Arp8 のアクチンファミリーが含まれている。我々は、細胞の酸化ストレス応答に重要な Heme oxygenase-1 遺伝子 (*HO-1*)の発現誘導における、INO80 複合体中のアクチンファミリーの役割を解析した。Arp5, Arp8 が INO80 複合体に特異的な構成因子であることから、ヒト Nalm-6 培養細胞株を用いて Arp5, Arp8 の遺伝子欠損細胞株を作製し、酸化ストレス条件下での遺伝子発現への影響を解析した。その結果、これらの遺伝子欠損細胞株において、*HO-1* の発現誘導の著しい低下が観察された。INO80 複合体機能におけるこれらのアクチンファミリー役割を解析した結果、Arp8 が INO80 複合体のクロマチン結合に必要であること、Arp5 が INO80 複合体の活性化に必要であることが示された。このようなアクチンファミリー機能の詳細な解析と、INO80 複合体機能の人為的制御を目的として、Arp5, Arp8 に結合する linear peptide, bicyclic peptide のスクリーニングを行った。bicyclic peptide は2つの環状構造をもつ低分子ペプチドで、この環構造により標的タンパク質に高い親和性で結合する。これらのペプチドが *in vitro* で INO80 複合体の安定性を低下させること、細胞に導入した peptide が *HO-1* の発現を抑制することが示された。この結果は、これらのペプチドを用いて INO80 複合体機能を人為的に制御できる可能性を示唆している。

P-10

小細胞肺がんにおける Pkm1 高発現と代謝特性

○盛田麻美^{1,2,4}、野村美有樹¹、坂本良美¹、滝崎浩³、井上維¹、島礼^{1,3}、
前門戸任^{2,4}、田沼延公^{1,3}

¹宮城県立がんセンター研究所がん薬物療法研究部、²宮城県立がんセンター呼吸器内科、³東北大学大学院医学系研究科がん分子制御学、⁴東北大学大学院医学系研究科呼吸器科腫瘍学

小細胞肺がん（SCLC）は転移しやすく、化学療法・放射線療法への感受性は比較的高いものの、そのほとんどが再発を来し、5年生存率は全体で10%未満という極めて予後不良のがんである。しかし SCLC における悪性形質のメカニズムには不明な点が多い。我々は、SCLC の代謝特性を治療標的として開発することを目標に研究をすすめている。

解糖系酵素ピルビン酸キナーゼ M には、単一遺伝子から選択的スプライシングによって生じる2つのアイソフォーム Pkm1 と Pkm2 が存在する。Pkm1 が構成的活性化型である一方、Pkm2 は条件的活性化型であり、両者の発現切り替えはがんの糖代謝特性を決定づけると考えられている。種々の癌種を含む細胞株パネルを用いた検討から、SCLC では Pkm1 発現が例外的に高いことを我々は見出した。機能解析では、SCLC の Pkm1 依存性が示唆されており、Pkm1 や、関連する代謝形質が SCLC における新規治療標的候補として浮上した。

P-11

上皮管腔組織形成における Solo の機能解析

○西村亮祐、大橋一正、藤原佐知子、水野健作

東北大院・生命・情報伝達分子解析分野

われわれヒトを含む生体は、様々な機械的な力を受けている。その際、組織を構成する細胞はこれらの機械的刺激のシグナルを細胞内の化学的なシグナルに変換して伝達し、様々な生理的応答（力覚応答）を行っている。上皮組織の形態形成においても、細胞外からのさまざまな機械的刺激によって細胞の形態や増殖、極性が制御されている。これらの力覚応答には低分子量G蛋白質Rhoファミリーによって制御されるアクチン骨格が深く関与することが明らかとなっているが、分子機構については不明な点が多く残されている。私たちは、これまでに実施したスクリーニングにより、張力刺激に応答するRhoグアニンヌクレオチド交換因子(Rho-GEF)としてSoloを同定した。Soloは、細胞間および細胞-基質間接着からの張力刺激に対する応答におけるRhoAの活性化に必要であること、単層上皮特異的な中間径フィラメントのケラチン8/18繊維に結合し、細胞内のケラチン8/18繊維ネットワークの形成と維持に関与することを明らかにした。本研究では、Soloのより生体内に近い環境における機能を明らかにするために、上皮形態形成のモデルの一つである、コラーゲンゲルを用いた三次元培養によるイヌ腎上皮MDCK細胞のHGF依存的な管腔形成モデルを用いて検討を行った。その結果、siRNAを用いたSoloの発現抑制により、管腔構造全体に対して内腔の占める割合が有意に増加し、また、管腔構造の長軸と短軸の比（細長さ）が有意に低下した。さらに、ケラチン8/18繊維ネットワークを構成するケラチン18の発現抑制を行った結果、Soloの発現抑制と同様の有意な形態変化が認められた。これらの影響は、管腔を構成する細胞の頂端側に働く張力の低下が原因である可能性が示唆されたため、アクトミオシン系の阻害剤であるY-27632とblebbistatinを添加して解析を行った結果、同様に管腔の内腔の肥大と伸長の抑制が認められた。以上の結果より、Soloとケラチン8/18繊維は、RhoAの活性化を介して、アクトミオシン依存的に発生する細胞間の収縮力を調節し、管腔全体の形状と内腔の大きさの制御に関与している可能性が示唆された。

P-12

フラビウイルスキャプシド蛋白質とリボソームの相互作用

○石村麻里奈、吉田永吉、天沼美里、後藤史門、石田幸太郎、牛田千里、姫野俵太、森田英嗣

弘前大学・農学生命・分子生命

フラビウイルスは蚊やダニ等の節足動物によって媒介されるプラス鎖の1本鎖RNAをゲノムに持つエンベロープウイルスであり、ウイルスゲノムの複製・翻訳及び粒子形成などの全ての複製過程は細胞質に形成される複製オルガネラと呼ばれる小胞体膜由来構造物にて行なわれる。しかしながら、ウイルス構造蛋白質のひとつであるキャプシド蛋白質は、感染初期より複製オルガネラだけでなく核内構造体にも局在しており、その意義・役割は未だ解明されていない。本研究では、キャプシド蛋白質が持つウイルスゲノムRNAへの結合能に着目し、どのような宿主側RNAがキャプシド蛋白質と結合するのか検索し、さらに、キャプシド蛋白質の核内構造体に局在する意義と役割を明らかにすることを目的として種々の解析を行った。

ウイルス感染細胞抽出液より、キャプシド蛋白質に対する抗体を用いて免疫沈降を行い、免疫沈降物中に含まれるlncRNAについてqPCRアレイを用いて網羅的に解析した。その結果、ウイルス感染の有無によって発現量の影響を受けず、且つキャプシド蛋白質と特異的に相互作用する可能性のあるlncRNAとして18SリボソームRNA(rRNA)を含む数種類のlncRNAが同定された。また、特異的RT-qPCRプライマーを用いて28S、5.8S、5S rRNAについて検討したところ、全てのrRNAがキャプシド蛋白質沈殿画分に検出された。また、感染細胞を0.5%NP-40溶液にて溶解したのち、細胞質画分をショ糖密度勾配遠心分離法によって分画したところ、80Sリボソームの画分にキャプシド蛋白質が検出された。また、キャプシド蛋白質とrRNAとの結合は、ウイルス感染の有無に関係なく、キャプシド蛋白質のみを発現させた場合においても確認された。しかしながら、この結合はキャプシド蛋白質の $\alpha 2$ 領域の疎水性アミノ酸残基をアラニンに置換した場合に解消されることが示された。また、この変異体は核小体への局在が確認されないことから、キャプシド蛋白質とリボソームとの結合はキャプシド蛋白質の核小体への局在と密接に関係していると考えられる。現在、感染細胞内における核小体ストレスの有無、及び感染細胞由来リボソームを用いてウイルスゲノム及び宿主mRNAへの翻訳能について解析を行っている。

P-13

酵母のクロルプロマジン感受性に関わる金属輸送体 NRAMP1, 2 の解析

○長崎茜、野地彩乃、那谷耕司、大橋一品

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様々な解析がなされているが、その体内動態の分子機構に関しては不明な点が多い。我々は、これまでに、酵母を用いてクロルプロマジン感受性に関与する遺伝子を調べ、金属イオントランスポーター Smf2 の遺伝子を欠損するとクロルプロマジンに耐性を示すことを明らかにしている。酵母 Smf2 タンパク質は、Mn²⁺ など 2 価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 NRAMP1 および NRAMP2 が知られている。NRAMP2 は、小腸など消化管を含む多くの組織に発現をしており、金属イオンの体内輸送に機能すると考えられている。一方、NRAMP1 は、主に白血球に発現し、異物の排除に関与することが知られている。

そこで、ヒトの金属輸送体 NRAMP1 および NRAMP2 についてクロルプロマジン感受性に関与するかを調べるため、酵母にそれぞれ、NRAMP1 および NRAMP2 遺伝子を過剰発現させた。その結果、これらの酵母は、いずれもクロルプロマジンに高感受性を示した。

また、金属輸送活性に重要なアミノ酸に変異を導入した NRAMP1 または NRAMP2 を、酵母に発現させた場合でも、同様にクロルプロマジンに高感受性を示した。一方、NRAMP1、NRAMP2 および Smf2 で保存された細胞質側の領域のうち 7 アミノ酸を欠失した NRAMP1 変異体を発現させた場合には、クロルプロマジンに対する感受性が通常よりもさらに上昇した。

以上の結果は NRAMP1 および NRAMP2 タンパク質がクロルプロマジ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、クロルプロマジン感受性に NRAMP1 および NRAMP2 の金属イオン輸送能は無関係であり、今回同定した機能未知の細胞質内の部位が、クロルプロマジン取込み量の調節などを介して感受性を左右している可能性が考えられる。

P-14

リボソームを介した浸透圧応答機構

樽澤武房、伊藤汐音、長谷要一、後藤史門、武藤あきら、○姫野俵太

弘前大・農学生命・分子生命科学科

我々は、リボソーム生合成因子 RsgA (Ribosome Small subunit-dependent GTPase A) を欠損した大腸菌が塩ストレスに対して高い耐性を示すことを発見した。欠損株で見られていたリボソームの異常のほとんどは塩ストレス後に改善されていた。同様の現象は、RsgA 以外の 30S サブユニットの成熟因子である RbfA や RimM の欠損株においても、あるいは 50S サブユニットの成熟因子である RrmJ の欠損株においても、また 30S サブユニットを構成する S6 タンパク質の欠損株においても見られた。以上より、リボソームの生合成に異常が起こると、共通して細胞が浸透圧耐性（塩耐性）を獲得することが明らかとなった。

次に、塩耐性に対するタンパク質合成阻害剤の効果を調べた。DNA 合成阻害剤や転写阻害剤はどれも効果がなかったが、翻訳阻害剤であるカスガマイシンあるいはクロラムフェニコールを加えると、塩ストレスによる細胞増殖停止からの回復は早くなった。したがって、リボソームの生合成に限らず、リボソームの機能（タンパク質合成）に異常があると細胞が塩耐性を獲得することが示唆された。

一方、セリンヒドロキサメートの添加によりアミノ酸飢餓を引き起こし、細胞内のシグナル伝達因子 ppGpp あるいは pppGpp の濃度を上昇させた場合でも、細胞は塩耐性を獲得した。リボソームの機能の異常による塩耐性獲得が (p)ppGpp の上昇によるものか否かを調べるため、(p)ppGpp 合成酵素の遺伝子である *relA* および *spoT* を欠損した細胞株 ((p)ppGpp 非産生株) を作製した。この細胞株においては、予想通りセリンヒドロキサメートの効果は見られなくなったが、依然としてリボソーム生合成因子あるいは翻訳阻害剤の効果は見られた。この結果は、リボソームの機能の異常による浸透圧耐性獲得機構と (p)ppGpp の上昇による浸透圧耐性獲得機構が独立に働いていることを示している。

P-15

精巣における 2-ヒドロキシグルタル酸の産生機構と生理的作用の検討

○百々美奈^{1,2}, 北村大志¹, 太田奈緒¹, 三枝大輔³, 小関健由², 本橋ほづみ¹

¹東北大学加齢医学研究所 遺伝子発現制御分野, ²東北大学大学院歯学系研究科 予防歯科学分野, ³東北大学東北メディカルメガバンク機構 ゲノム解析部門

2ヒドロキシグルタル酸 (2HG) は、脳腫瘍や白血病など、イソクエン酸脱水素酵素 IDH1/IDH2 に変異を有するがん細胞において特異的に産生されるオンコメタボライトとして知られている。2HG は、ヒストン脱メチル化酵素や DNA 脱メチル化過程を触媒する TET を競合的に阻害してエピゲノム制御を攪乱することにより細胞のがん化をもたらす。我々は、野生型マウスの様々な臓器における 2HG レベルを定量したところ、意外にも精巣において 2HG が極めて高いレベルで蓄積していることを発見した。2HG には光学異性体が存在し、IDH1/IDH2 変異体により産生されるのは D-2HG である。我々が見出した精巣由来の 2HG を分析したところ、L-2HG であることがわかった。過去の論文で、パキテン期以降の精母細胞特異的に発現する乳酸脱水素酵素 C (LDHC) が、 α -ケトグルタル酸 (α -KG) を還元して 2HG を産生する酵素活性をもつことが報告されていた。そこで、*Ldhc* ノックアウトマウスを作成したところ、予想どおり、精巣における 2HG レベルが他の組織と同レベルにまで減少した。これにより、精巣に蓄積している 2HG は LDHC により産生されるものであることがわかった。これまで、LDHC は他の乳酸脱水素酵素と同様にピルビン酸から乳酸への反応を触媒していると考えられてきたが、ピルビン酸や乳酸のレベルに違いはみられないことより、LDHC は 2HG 産生に特異的に貢献していることが明らかになった。次に、精巣における 2HG の役割を明らかにするために、*Ldhc* 欠損マウスの表現型解析を行った。*Ldhc* 欠損雄マウスを野生型雌マウスと交配させても産仔が得られず、*Ldhc* 欠損雄マウスは不妊であると考えられた。しかし興味深いことに、*Ldhc* 欠損雄マウスと交配させた野生型雌マウスでは、胎生 10.5-15.5 日あたりまでの胎児の生存が確認できており、産仔がえられないのは胎生致死が原因の一つである可能性が示唆されている。*Ldhc*^{+/+}マウス同士の交配ではメンデル則にしたがった遺伝子型の産仔が得られており、LDHC はマウスの生存には必要ないと考えられる。したがって、2HG 低下によるヒストンや DNA のメチル化異常により、*Ldhc* 欠損雄マウスの精子におけるエピゲノム異常が、次世代の発生障害をもたらすものと予想し、現在、精巣の RNA-seq 解析と精子の DNA メチル化解析を進めており、仮説の検証を試みつつある。

P-16

KEAP1 の体細胞変異は RAS シグナルと協調して腫瘍形成を促進させる

○北村大志、本橋ほづみ

東北大学 加齢医学研究所 遺伝子発現制御分野

KEAP1-NRF2 制御系は、酸化ストレスに対する生体防御において中心的な役割を担っている。非刺激時において KEAP1 は NRF2 をユビキチン化してその分解を促進しているが、細胞が酸化ストレスを受けると KEAP1 が失活し、その結果蓄積した NRF2 は生体防御遺伝子群を統括的に活性化して細胞にストレス抵抗性を付与する。一方、肺がんなどの固形腫瘍では、KEAP1 遺伝子変異により NRF2 が恒常的に活性化し、その増殖や治療抵抗性をもたらしている。RAS シグナルも NRF2 の活性化を通してがん細胞の増殖を促進すると報告されているが、KEAP1 変異と RAS シグナルの関係については不明な点が多い。そこで我々は、マウス胎児線維芽細胞から *Keap1* 変異を有し RAS 経路が活性化したがん細胞を作成し、その性質を調べた。まず、C57/BL6 に純系化した *Keap1*^{+/+} マウス同士の交配から得た野生型(WT)および *Keap1*^{-/-} MEF に SV40 T 抗原を導入して不死化した。次いで、これらの細胞に RAS の活性化型変異体である HRAS^{G12V} を導入して(WT RT-MEF, *Keap1* RT-MEF)、細胞増殖と腫瘍形成能を調べた。これらの細胞はディッシュ上での細胞増殖に大きな違いはなかったが、マウスの皮下に移植した時に、*Keap1* RT-MEF の腫瘍形成能が WT RT-MEF と比較して大幅に上昇していた。*Keap1* RT-MEF の腫瘍形成能が *Keap1* 欠損による NRF2 の蓄積に依存していることを確かめるために、この細胞に KEAP1 を導入したところ、NRF2 の蓄積量が WT RT-MEF のレベルまで低下し、腫瘍形成能が消失した。このような KEAP1 依存的な腫瘍形成性能を支える転写プロファイルを明らかにするために、マイクロアレイを行った結果、いくつかのサイトカイン遺伝子が *Keap1* RT-MEF において顕著に上昇していた。その中でも NRF2 と RAS シグナルの共通の標的遺伝子の可能性がある *Il-11* に着目した。CRISPR/CAS9 システムにより構築した *Il-11* 欠損 *Keap1* RT-MEF は腫瘍形成能が大幅に減少した。現在、NRF2 の活性化が RAS シグナルの活性化と共に、どのように *Il-11* の発現上昇に関与しているかを検討している。

P-17

線虫 CeR-2a 核小体 RNA の欠損によるリボソーム生合成異常

○小山 昂志¹、長島 哲治²、尾崎 大意³、牛田 千里^{1,2,3}

¹岩手連大・農・ゲノム工学講座、²弘前大・農生・分子生命、

³弘前大院・農生・分子生命

線虫 (*Caenorhabditis elegans*) MT16939 は IV 番染色体に 616 bp の欠失をもつ変異体である。この領域には ncRNA 遺伝子 *cer-2a* とタンパク質遺伝子 T26A8.2 の終止コドンと 3' UTR、さらには別のタンパク質遺伝子 T26A8.4 の 3' UTR の一部がコードされている。*cer-2a* と T26A8.4 は IV 番染色体上で同じ DNA 鎖にコードされており、前者の上流に後者が位置する。一方、T26A8.2 は *cer-2a* 下流の相補鎖にコードされている。*cer-2a* がコードする CeR-2a RNA は rRNA 前駆体のプロセッシングに関与することが示唆されており、脊椎動物の U8 snoRNA のホモログである可能性が高い (Hokii, *et al.*, 2010)。われわれはこれまでにこの変異体が特定の大サブユニット rRNA 前駆体を多く蓄積すること、精子形成異常を示すこと、初期胚発生異常を示すことを明らかにした。今回、この変異体のリボソームについてショ糖密度勾配遠心法を用いて解析し、rRNA 前駆体の蓄積がリボソームの生合成に影響を与えているか否か検討した。その結果、変異体では 40S サブユニットに対する 60S サブユニットの量的な割合が低下していること、その割合は変異体に *cer-2a* を戻すことで野生株と同程度に回復することがわかった。以上の結果は CeR-2a RNA が U8 snoRNA の線虫ホモログであることを強く支持する。今後、変異体に *cer-2a* を導入することで大サブユニット rRNA 前駆体のプロセッシングが野生株と同程度に回復するかどうか明らかにするとともに、変異体に見られる精子形成異常や初期胚発生異常と rRNA 前駆体のプロセッシングやリボソームの生合成に相関があるか否か検討する。

P-18

コラーゲン分解におけるコンドロイチン硫酸の新たな役割

○多田羅 洋太¹、須藤 晋一郎¹、伊東 健²

¹弘前大学大学院医学研究科・附属高度先進医学研究センター・糖鎖工学講座

²弘前大学大学院医学研究科・附属高度先進医学研究センター・分子生体防御学講座

骨粗鬆症の初期原因は過剰な破骨細胞の活性とされている。破骨細胞から放出されるプロトンにより酸性微小環境が作られ骨が脱灰される。酸性環境で活性化したカテプシン K によりコラーゲン線維は分解される。

本研究では骨吸収におけるコンドロイチン硫酸の役割を明らかにするために、酸性条件におけるグリコサミノグリカン (GAG) とコラーゲンとの結合と、カテプシン K によるコラーゲンの分解に与える GAG の影響について検討した。

表面プラズモン共鳴法による結合解析を行った結果、コンドロイチン硫酸やデルマトン硫酸といった硫酸化 GAG は pH 4.5 以下でコラーゲンに結合することが明らかとなった。また硫酸化 GAG は I 型から X 型のどのタイプのコラーゲンにも結合することが示された。

酸性条件下ではコラーゲン細線維は変性して溶解するが、コンドロイチン硫酸存在下ではコラーゲン細線維は溶解しなかった。この状態のコラーゲン細線維を走査型電子顕微鏡で観察した結果、コラーゲンの線維構造が保持されていた。コンドロイチン硫酸は酸性条件下でコラーゲン細線維に結合することにより、コラーゲン細線維の変性を抑えることが示唆された。

さらにカテプシン K によりコラーゲンを分解したところ、コンドロイチン硫酸を結合したコラーゲン細線維はカテプシン K に対して耐性を示した。以上の結果から、酸性条件下で変性し可溶化したコラーゲンをカテプシン K が分解する際に、コンドロイチン硫酸はコラーゲン細線維の酸変性を抑えカテプシン K による分解を抑制する働きを持つことが示唆された。

P-19

親電子性物質による ISR 活性化

○三村 純正¹、小坂 邦男²、丸山 敦史¹、伊東 健¹

¹弘前大院・医・分子生体防御学、²長瀬産業株式会社

カルノシン酸 (Carnosic acid, CA) はローズマリーなどに含まれるポリフェノールの一種であり、抗酸化作用や抗菌作用があることが知られている。これまでの解析から、ほ乳類細胞において CA が親電子性物質として働き、酸化ストレス応答性転写因子 Nrf2 (NF-E2 related factor 2) の誘導剤として機能することがわかっていた。

CA で処理した U373MG ヒトアストロサイトーマ細胞を用いたマイクロアレイ解析により、CA が別のストレス応答性転写因子である ATF4 (Activating transcription factor 4) の誘導剤としても働くことが明らかとなった。ATF4 はストレス誘導型の転写因子で、その下流遺伝子の発現誘導を介して、ER ストレスやアミノ酸飢餓応答に関わっている。CA は濃度依存的に ATF4 を誘導したが、ATF4 の誘導には Nrf2 を誘導するよりも高濃度の CA が必要であった。

一方、CA による ATF4 の誘導機構を探ったところ、CA は ISR (Integrated stress response) 経路の活性化を介して ATF4 を誘導していることがわかった。CA は翻訳因子 eIF2 α の 51 番目のセリン残基のリン酸化を活性化し、ATF4 の誘導とともに、全般的翻訳抑制を行うことが示された。また、ほ乳類細胞における 4 つの eIF2 α キナーゼのうち、HRI (Heme regulated inhibitor) が CA による eIF2 α のリン酸化、ATF4 の誘導に必要であることもわかった。

以上のことから、CA は HRI の活性化を介して ISR 経路を活性化すると考えられる。