

日本生化学会 東北支部

第77回 例会・シンポジウム

講演要旨集

主催：日本生化学会

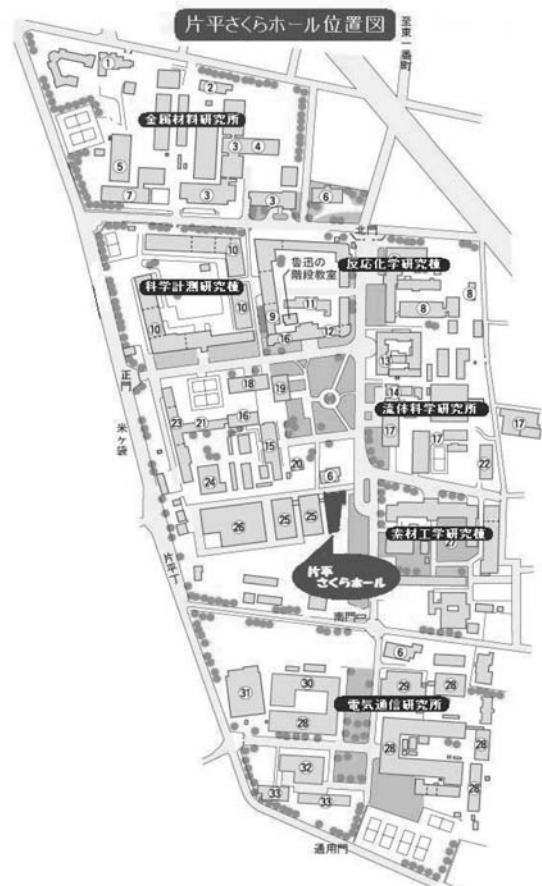
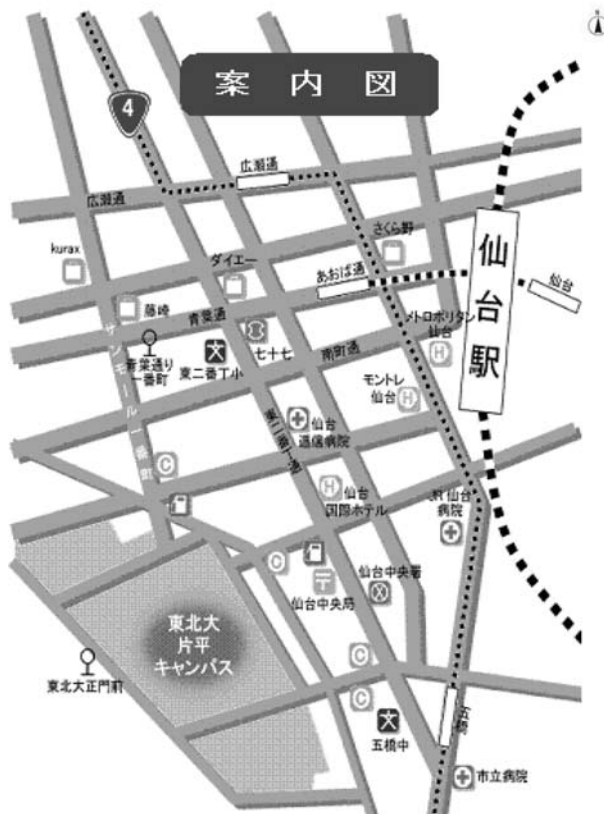
会期：平成23年7月23日（土）

会場：東北大学さくらホール

- 一般演題を講演される方へ
 - 1. 講演 30 分前までに受付を済ませてください。一般口頭発表の講演時間は 8 分、討論時間は 4 分です。時間の厳守をお願いします。発表は原則として各自のコンピューターをご使用ください。Mac コンピューターをお使いの方は接続用のコネクタを忘れずに持ってきて頂くようお願い致します。また、スクリーンセ이버、省エネルギー設定、パスワードの設定は前もって解除して頂きますようお願い致します。
 - 2. 一般ポスター発表の講演時間は 5 分、討論時間は 2 分です。時間の厳守をお願いします。発表は 13:00 に P-1, P-6, P-11 から開始してください。ポスターボードの寸法は、幅 1200mm, 高さ 1820mm です。ポスター設置は 10:00~12:00 の間、休憩時間を利用して行って下さい。ポスター発表終了後、15:00 までに各自でポスターを撤去して下さい。
- 座長の先生は、担当セッションの 30 分前（朝のセッションの場合は 10 分前）までに会場受付にお越し下さい。
- 受付開始：8:30～（受付：東北大学さくらホール 2 階）
- 評議員・幹事合同会議：12:00~13:00（昼食を用意いたします。）
（東北大学 材料物性棟 1 号館 1 階 大会議室）
- 懇親会 17:50～（東北大学さくらホール 1 階）
- 懇親会参加費：一般（3,000 円）、大学院生・学部生（無料）
- 会場ではネームプレートを付けて下さい。

■東北大学片平キャンパスへのアクセス■

- ・徒歩
JR仙台駅より約20分
- ・仙台市営バス
仙台駅前西口バスプール12番乗り場より
『動物公園経由長町ターミナル行』乗車 『東北大正門前』下車
- ・宮城交通バス
仙台駅前西口バスプール12番乗り場より
『霊屋橋 八木山動物公園経由 地下鉄長町駅たいはつくる行』乗車
『東北大正門前』下車
- ・地下鉄
地下鉄仙台駅より富沢方面行乗車 『五橋駅』下車
北2番の出入口より地上へ
- ・タクシー
『東北大学片平地区』と指示
JR仙台駅より約5分



9 : 0 0 ~ 9 : 4 8 一般演題 1 糖鎖・脂質

座長：顧 建国（東北薬大・分子生体膜研・細胞制御学）

O-1. リゾホスファチジン酸産生酵素オートタキシンの結晶構造解析

○奥平真一¹、西増弘志²、濱弘太郎¹、三原恵美子³、堂前直⁴、井上飛鳥¹、石谷隆一郎²、高木淳一³、濡木理²、青木淳賢^{1, 5}（¹東北大院・薬・分子細胞生化学、²東大院・理・生物化学、³大阪大・蛋白研、⁴理研、⁵東北大・医・代謝疾患医学センター）

O-2. インテグリンに付加された糖鎖の意義について

○伊左治知弥、陸瑩瑩、福田友彦、顧建国（東北薬大・分子生体膜研・細胞制御学）

O-3. 蝸牛聴毛の変性によるガングリオシド GM3 合成酵素欠損マウスの聴覚障害

○吉川弥里^{1,2}、郷慎司¹、岩崎克典²、井ノ口仁一¹（¹東北薬大・分子生体膜研・機能病態分子、²福岡大・薬・臨床疾患薬理）

O-4. 表面プラズモン共鳴によるサポニンおよび脂肪酸のレニン活性阻害ー結合相関解析

○後藤猛¹、鎌田淑恵²、小野洋輝²、菊地賢一¹、高橋砂織³（¹秋田大院・工学資源、²秋田大・工学資源、³秋田県総食研セ）

9 : 4 8 ~ 1 0 : 3 6 一般演題 2 細胞応答・シグナル伝達

座長：青木 淳賢（東北大院・薬・分子細胞生化学）

O-5. ペルオキシレドキシンによるレドックスシグナルの感知と代謝制御

○久下周佐^{1,2}、橘剛²、色川隼人¹、小笠原綾子¹、渡部俊彦¹、岩井健太^{1,2}（¹東北薬大・微生物学、²東北大院・薬・生体防御）

O-6. Peroxiredoxin 4 による細胞機能のレドックス調節の解明

○倉橋敏裕¹、栗田ちひろ²、金野祐¹、大槻倫之¹、角田智志¹、張紅旭¹、伊藤純一¹、井内良仁³、高尾敏文²、藤井順逸¹（¹山形大院・医・生化学・分子生物学、²大阪大・蛋白研、³山口大・農・生物機能科学）

O-7. Nrf2 依存的なヒト HO-1 遺伝子発現活性化機構の解析

○丸山敦史、伊東健（弘前大院・医・分子生体防御）

O-8. 膵β細胞における Keap1-Nrf2 システムの役割

○宇留野晃¹、柳下陽子¹、菅原明²、山本雅之¹（¹東北大院・医・医化学、²東北大院・医・病態検査）

10:36～10:46 休憩

10:46～11:22 一般演題3 発生と分化

座長：西森 克彦（東北大院・農・分子生物）

O-9. 神経発達におけるペプチドホルモンセクレチンの役割

○西島維知子（東北大学院・医・環境遺伝医学総合研究センター 情報遺伝学）

O-10. 腎臓発生における LGR4 の機能解析

○大山一徳、毛利泰彰、赤松篤、西森克彦（東北大院・農・分子生物）

O-11. 弘前ヘアレスラット胸腺でのヘルパーT細胞の分化抑制は CD4 陽性 T細胞と樹状細胞のそれぞれに発現する Ly49 ファミリー遺伝子の欠失による

○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）

11:22～11:58 一般演題4 染色体と遺伝子発現調節

座長：稲田 利文（東北大院・薬・遺伝子薬学）

O-12. 染色体整列に働く新規分子 CAMP の機能について

○伊藤剛、田中耕三（東北大・加齢研・分子腫瘍学）

O-13. S-アデノシルメチオニン合成酵素 MATII によるエピゲノム制御と転写調節

○解良洋平^{1,2}、加藤恭丈¹、太田嶺人¹、山本照子²、五十嵐和彦¹（¹東北大院・医・生物化学、²東北大院・歯・顎口腔矯正学）

O-14. mRNA 品質管理システムにおけるナンセンス mRNA 分解の分子機構

○鹿島勲^{1,3}, Stefanie Jonas¹, Uma Jayachandran², Gretel Buchwald², Elena Conti², Andrei N. Lupas¹ and Elisa Izaurralde¹ (¹Max Planck Institute for Developmental Biology, ²Max Planck Institute for Biochemistry, ³東北大院・薬・遺伝子薬学)

12:00~13:00 昼食

評議員・幹事合同会議 (12:00~13:00)

13:00~13:40 ポスター発表

座長：清水 透 (東北大・多元研・バイオ系プロセス制御)

P-1. ペルオキシレドキシニンによる過酸化水素の感知と酸化ストレス応答 (リン酸化 eIF2 α レベル) の制御

○岩井健太^{1,2}、柴田美奈子²、間さやか²、久下周佐^{1,2} (¹東北薬大・微生物学、²東北大院・薬・生体防御)

P-2. Sigma-1 受容体の新規スプライシングバリエーションの同定とその機能

○石川潔、塩田倫史、福永浩司 (東北大院・薬・薬理学)

P-3. リゾホスファチジン酸は体毛形成に関与する

○井上飛鳥¹、有馬直明¹、新井洋由²、青木淳賢^{1,3} (¹東北大院・薬・分子細胞生化学、²東京大院・薬・衛生化学、³東北大院・医・代謝疾患コアセンター)

P-4. LPA による血管透過性亢進作用メカニズムの解明

○近藤朋恵¹、可野邦行¹、奥平真一¹、Jerold Chun²、青木淳賢^{1,3} (¹東北大院・薬・分子細胞生化学、²スクリプス研究所、³東北大・医・代謝疾患コアセンター)

P-5. 新規 Autotaxin スプライシングアイソフォーム ATX δ の性状解析

○橋本崇史¹、奥平真一¹、五十嵐浩二²、矢富裕³、青木淳賢^{1,4} (¹東北大学院・薬・分子細胞生化学、²東ソー株式会社・バイオサイエンス事業部・開発部、³東京大学医学部附属病院・検査部、⁴東北大・医・代謝疾患医学コアセンター)

座長：福田 光則（東北大院・生命研・膜輸送解析）

P-6. ラット小脳顆粒細胞における合成カンナビノイド CP55940 の LPS 誘発性サイトカイン mRNA 発現抑制機構の解析

○千葉俊樹、上野沙奈恵、小原祐太郎、中畑則道（東北大院・薬・細胞情報薬学）

P-7. 一次繊毛形成における Rabin8 のリン酸化とその機能

○天貝佑太¹、千葉秀平¹、菅野新一郎²、安井明²、福田光則³、水野健作¹（¹東北大院・生命研・情報伝達分子解析、²東北大・加齢研・加齢プロテオーム解析、³東北大院・生命研・膜輸送解析）

P-8. 核内受容体 CAR によるケトン体合成酵素 HMGCS2 の発現制御機構

○大塚祐多、吉成浩一、山添康（東北大院・薬・薬物動態学）

P-9. 乳腺発達における LGR4 の機能解析

○霜田貴宏、大山一徳、毛利泰彰、西森克彦（東北大院・農・分子生物学）

P-10. 子宮内膜の脱落膜化における Lgr4 の機能解析

○曾根瑞季¹、毛利泰彰¹、大山一徳¹、加藤成樹¹、那波明宏²、西森克彦¹（東北大院・農・応生科、²名大医・産婦人科）

座長：北川 隆之（岩手医科大・薬・細胞病態生物学）

P-11. NMD (ナンセンス変異依存 mRNA 分解)における異常タンパク質分解機構の解析

○黒羽一誠、稲田利文（東北大院・薬・遺伝子薬学）

P-12. Dom34:Hbs1 複合体による NGD(No-Go Decay)標的 mRNA 分解機構の解析

○坪井達久、黒羽一誠、牧野志保、鹿島勲、稲田利文（東北大院・薬・遺伝子薬学）

P-13. 栄養ヘムによる遺伝子制御の実験系構築

○羽田浩士¹、白木琢磨²、渡部美紀¹、五十嵐和彦¹（¹東北大院・医・生物化学、²近畿大・生物理工学・食品安全工学）

P-14. 転写因子 BACH1 による巨核球の多倍化制御メカニズムの解明

○李婕¹、白木琢磨²、五十嵐和彦¹ (¹東北大院・医・生物化学、²近畿大・生物理工学・食品安全工学)

P-15. Tail-anchor 型膜タンパク質の小胞体標的化機構の解析

○相澤圭師¹、佐藤陽子¹、江連徹²、安藤英治²、Gunnar von Heijne³、魚住信之¹
(¹東北大院・工・バイオ工学、²島津製作所・バイオ臨床 BU、³Dept of Biochem. and Biophys., Stockholm Univ.)

P-16. クロマチン機能構造形成におけるヒストンバリエント H2A.Z アイソフォームの機能解析

○日下部将之¹、松田涼¹、北村大志¹、堀哲也²、深川竜郎²、原田昌彦¹
(¹東北大・院農・分子生物、²国立遺伝研・分子遺伝)

13 : 40 ~ 14 : 16 一般演題5 癌

座長：宮城 妙子（東北薬大・がん糖鎖制御）

O-15. 細胞表面の O-glycan を利用した癌細胞の新しい免疫逃避機構

○坪井滋^{1,2}、須藤美穂子¹、畠山真吾²、羽瀧友則³、堀川洋平³、橋本安弘¹、米山高弘²、盛和行²、山谷金光¹、斎藤久夫¹、舟生富寿¹、大山力² (¹(財)鷹揚郷腎研究所(おうようきょうじんけんきゅうしょ)・生化学、²弘前大・院・医学・泌尿器科学、³秋田大・院・医学・腎泌尿器科学)

O-16. 形質膜シアリダーゼ(NEU3)とがん幹細胞性

○高橋耕太^{1,3}、山口壹範²、和田正²、秦敬子¹、森谷節子¹、山本晃司^{1,3}、宮城妙子¹ (¹東北薬大・がん糖鎖制御、²宮城がんセ・研、³東北大院・医)

O-17. 腫瘍性 HeLa 融合細胞における GLUT 遺伝子の発現制御機構の解析

渡辺勝、安部望、押切勇樹、佐京智子、○北川隆之（岩手医科大・薬・細胞病態生物学）

14:16~14:52 一般演題6 リン酸化・脱リン酸化酵素

座長：本間 好（福島医大・医・生体物質）

O-18. N-ミリスチル化は PP2C α および PP2C β の機能発揮に必須である

○小林孝安、千田透子、安藤正勝、松木佑、柘悠太郎、高橋祐輝、神藤祐亮、永浦裕子、田村眞理（東北大・加齢研・遺伝子情報）

O-19. T 細胞の遊走における SDF-1 刺激依存的な Slingshot-1 のリン酸化制御

○川村友理子、佐々木一貴、大橋一正、水野健作（東北大院・生命研・情報伝達分子解析）

O-20. ミトコンドリア c-Src による細胞死制御メカニズム

○小椋正人、八巻淳子、本間美和子、本間好（福島医大・医・生体物質）

14:52~15:00 生化学会東北支部奨励賞・優秀論文賞 表彰式

15:00~15:40 生化学会東北支部優秀論文賞受賞者講演

座長：杉山 俊博（秋田大・医・分子機能学）

強力な細胞傷害活性を有する二量体化二重特異性 diabody (hEx3 tetrabody) の精密機能解析

浅野 竜太郎（東北大院・工・バイオ工学）

脂肪酸結合蛋白質によるドパミン D2 受容体の機能制御

塩田 倫史（東北大院・薬・薬理学）

15:40~16:10 生化学会東北支部奨励賞受賞者講演

座長：土田 成紀（弘前大院・医・分子遺伝情報科学）

転写因子による転写調節とエピゲノム制御の共役機構

加藤 恭丈（東北大院・医・生物化学）

16:10～16:55 シンポジウム (1)

座長：田村 眞理 (東北大・加齢研・遺伝子情報)

チロシンホスファターゼの機能と病態

的崎 尚 (神戸大院・医・シグナル統合学)

16:55～17:40 シンポジウム (2)

座長：福永 浩司 (東北大院・薬・薬理学)

細胞のシグナル伝達系に介在するG蛋白質：Giの発見からG蛋白質が果たす役割の拡大に向けて

堅田 利明 (東大院・薬・生理化学)

17:50～ 懇親会：東北大学さくらホール1階

シンポジウム (1)

チロシンホスファターゼの機能と病態

的崎 尚

(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)

タンパク質のチロシンリン酸化はリン酸化を触媒するチロシンキナーゼと、逆に、これを脱リン酸化するチロシンホスファターゼ (PTP) により調節を受けており、この両者のプラスとマイナスの作用の精密なバランスにより多様な細胞機能が発現されると考えられています。また、このバランスの破綻が、がんや糖尿病、免疫異常など様々な疾患の原因となることが示されています。PTP は、構造上の特徴から細胞質型と受容体型の2つに分類されますが、私共は、胃がんの細胞株より Shp2 という細胞質型の PTP を同定し、Shp2 が増殖因子による低分子量 G 蛋白質 Ras の活性化に必須の因子であるということを見出しました。現在では、Noonan 症候群という小児遺伝性疾患や白血病で Ras を恒常的に活性化するような Shp2 の遺伝子変異が同定され、Shp2 の異常と疾患との関連が明らかにされています。また、私共は、受容体型 PTP のサブクラスである R3 受容体型 PTP ファミリー (SAP-1、PTP-RO、VE-PTP など) に関する研究を行っています。これらの PTP は構造的な類似性に加えて、SAP-1 は消化管粘膜上皮細胞の微絨毛に、PTP-RO は腎系球体の podocyte や嗅球の神経細胞に、VE-PTP は血管内皮細胞に限局して発現するなど、特定の細胞に発現する共通性があります。現在、この R3 受容体型 PTP の生体機能制御における役割や病態との関連を研究中であり、本講演では、これらの最近の成果をご紹介します。

文献

Matozaki, T. et al. Protein tyrosine phosphatase SHP-2: A proto-oncogene product that promotes Ras activation. *Cancer Sci. (Review)*, 100, 1786-1793, 2009.

Matozaki, T. et al. Expression, localization and biological function of the R3 subtype of receptor-type protein tyrosine phosphatases in mammals. *Cell Signal. (Review)*, 22, 1811-1817, 2010.

シンポジウム (2)

細胞のシグナル伝達系に介在するG蛋白質： Giの発見からG蛋白質が果たす役割の拡大に向けて

堅田 利明

(東京大学 大学院薬学系研究科 生理化学教室)

細胞における諸種のシグナル伝達経路において、「G蛋白質はGTP結合型GDP結合型のコンホメーション転換（Gサイクル）により分子スイッチとして機能する」という基本的な概念が既に確立して久しい。蛋白質の生合成を制御する翻訳因子、細胞膜受容体刺激のシグナルを細胞内に仲介する三量体G蛋白質、さらに、細胞の増殖・分化、細胞運動や物質輸送・分泌に介在する低分子量G蛋白質など、多くのG蛋白質ファミリーが同定されてきた。本講演では、私自身が実験に着手した初期のGi研究に関わる体験談をお話しすると共に、最近解析を進めている新奇なG蛋白質についての話題を提供したい。G蛋白質と出会う機会に恵まれたのは、北大薬学部4年次の卒業研究である。宇井理生先生が主宰した当時の薬効学教室では、ラットに様々な「侵襲」を与えてエピネフリン負荷後の代謝応答を解析していた。私に与えられた侵襲は「百日咳ワクチン投与」であり、エピネフリンの血糖上昇作用が劇的に消失した。ワクチン中の因子（百日咳毒素）がインスリン分泌応答を過剰に亢進させたためであった。毒素の作用機序に興味をもち、個体から臓器、細胞、さらに蛋白質精製へと実験系を移し、毒素がNADを基質として細胞膜の41 kDa蛋白質（Giの α サブユニット）をADPリボシル化することを見出した。百日咳毒素によってGiがADPリボシル化されると、受容体と共役する機能が失われる。その後GiはcAMPの抑制系だけでなく、ホスホリパーゼ、イオンチャネル、脂質PI-3キナーゼなど、他の多くのシグナル伝達系にも介在することが解明され、三量体G蛋白質の生理的役割が拡大していった。他方、低分子量G蛋白質は、一次構造の類似性からRas、Rho/Rac/CDC42、Rab、Arf/Arl、Ranなどと略記されるサブファミリーに分類される。ゲノムプロジェクトの進展からヒトで150種以上の低分子量G蛋白質の存在が推定され、既存のサブファミリーには属さない機能未知のアティピカルG蛋白質も数多く存在している。本講演の後半では、従来の刺激依存性GDP-GTP交換によるコンホメーション転換型とは異なる「GTP結合待機型」、及び既知のGドメインに加えて別の機能領域も有する「マルチ・ドメイン型」という新奇なG蛋白質ファミリーの話題を提供し、G蛋白質の作動様式の差異を含めた視点から、G蛋白質の生理的役割を再評価したい。

奨励賞

転写因子による転写調節とエピゲノム制御の共役機構

加藤 恭丈

(東北大院・医・生物化学)

哺乳類には 500 を越える転写因子があるとされる。私達は、がん関連転写因子 MafK に注目して、転写因子による遺伝子発現制御の分子機構を解明することを目指してきた。MafK はパートナー分子とヘテロ二量体を形成し、Maf 認識配列 (MARE) に結合して、標的遺伝子の転写を制御する。この制御系は、赤血球分化、B リンパ球分化、酸化ストレス応答、鉄代謝制御など、様々な生命現象に関わる。例えば、鉄代謝関連遺伝子のヘムオキシゲナーゼ-1 (HO-1) やフェリチン、フェロポーチンの転写は、MafK-Bach1 のヘテロ二量体により抑制化され、ヘムや酸化ストレスの刺激にともなって、MafK-Nrf2 のヘテロ二量体により活性化される。B リンパ球分化の過程では、MafK は主に転写抑制因子として機能し、Blimp-1 遺伝子などの発現を抑制することにより、液性免疫の量と質を制御する。私達は、成熟 B リンパ球株から MafK 複合体を精製し、MafK が Bach2 とヘテロ二量体を形成し、Blimp-1 遺伝子の転写を抑制する分子機構を明らかにした。さらに、MafK 複合体から S-アデノシルメチオニン (SAM) 合成酵素 MATII を同定した。MATII は、メチオニンと ATP を基質とする SAM 生合成を触媒する。SAM は、既知の核内メチル基転移酵素のメチル基供与体であり、ヒストンや DNA がメチル化されエピゲノムを構築する際に必須の低分子である。私達は、MATII の複合体精製および質量分析もおこない、MATII が MafK や Bach1、Bach2 以外の転写因子や、Swi/Snf や NuRD、ポリコーム複合体などのクロマチン制御因子、G9a や Ehmt1、ALL1 などのメチル化酵素と複合体を形成することを示し、SAMIT 複合体 (SAM-integrating transcription regulation module) と名付けた。そして、MATII および SAMIT が MafK のコリプレッサーとして HO-1 遺伝子など標的遺伝子の転写を抑制すること、この抑制には MATII の SAM 合成活性が必要であることも明らかにした。さらに、SAMIT 複合体が SAM 合成とヒストン H1 および H3 のメチル化修飾という二段階反応を効率良く触媒することを見いだした。これらのことから、私達は、SAM 合成とエピゲノム制御が転写因子により共役する可能性を提唱する。

優秀論文賞

強力な細胞傷害活性を有する 二量体化二重特異性 diabody (hEx3 tetrabody)の精密機能解析

浅野 竜太郎

(東北大院・工・バイオ工学)

これまで上皮増殖因子受容体(EGFR)とリンパ球表面抗原 CD3 を同時に認識し、両者を架橋することで特異的な抗腫瘍効果を発揮するヒト型化 diabody 型二重特異性抗体 hEx3 を開発し、がん治療抗体としての有用性を報告してきた。この hEx3 調製液中には多量体化した分子が少量含まれるが、これらの分子が非常に強い細胞傷害活性を有することが明らかになったため、さらにその詳細な機能解析を進めた。

動的光散乱法(DLS)により粒子径、および静的光散乱法(SLS)により分子量を測定した結果、多量体化した hEx3 は、hEx3 が二量体化した分子であることが示唆され、ゲル濾過クロマトグラフィーの結果ともよく一致していた。さらに等温滴定型熱量測定(ITC)により両標的抗原に対する結合比が 1:2 であることが示されたため、二価性の二重特異性能を有し、その取り得る形態として円形構造、即ち一本鎖抗体(scFv)の四量体である tetrabody 様の形態であることが予想された。表面プラズモン共鳴法(SPR)により、二価性となったことに起因する親和性の向上が観察され、このことが細胞傷害活性の向上をもたらしたと考えられる。生理的条件下や長期保存下における安定性も確認され、また四量体化による分子量の向上は、低分子抗体の問題点の 1 つである体内動態の改善も見込まれることから、hEx3 tetrabody は魅力的な次世代型がん治療抗体医薬であるといえる。

Asano R, Ikoma K, Sone Y, Kawaguchi H, Taki S, Hayashi H, Nakanishi T, Umetsu M, Katayose Y, Unno M, Kudo T, Kumagai I. (2010) Highly enhanced cytotoxicity of a dimeric bispecific diabody, the hEx3 tetrabody. **J Biol Chem.** 285:20844-20849.

優秀論文賞

脂肪酸結合蛋白質によるドパミン D2 受容体の機能制御

塩田 倫史

(東北大院・薬・薬理学)

長鎖不飽和脂肪酸は生体エネルギー源として利用される以外に、細胞膜の成分であるリン脂質の合成に必須である。ドコサヘキサエン酸 (docosahexaenoic acid; DHA)、エイコサペンタエン酸 (eicosapentaenoic acid; EPA)、アラキドン酸のような脂肪酸は不溶性であるため、細胞内での脂肪酸の移動には、これらと結合する脂肪酸結合蛋白質 (fatty acid binding proteins; FABPs) が必要である。FABP 分子ファミリーは、これまで哺乳類では 12 種の分子種が同定されている。脳では脳型、表皮型、心臓型 FABPs が発現しており、脳型は神経幹細胞とグリア細胞に、表皮型は未成熟な神経細胞とグリア細胞に発現するのに対し、心臓型は成熟神経細胞に発現する。私達は、心臓型 FABP (heart-type FABP; H-FABP/FABP3) がドパミン D2 受容体 (long 型) の細胞内第 3 ループに結合することを見出した (Takeuchi and Fukunaga, 2003)。さらに、H-FABP 遺伝子欠損マウスでドパミン D2 受容体の機能低下が見られることを見出した (Shioda et al., 2010)。統合失調症における陽性症状の発現や情動、認知機能の障害にはドパミン神経系の異常が関与することが知られている。また、長鎖不飽和脂肪酸の投与により統合失調症等の精神疾患が改善されることが報告されている。しかしながら、長鎖不飽和脂肪酸がどのようにして認知機能と情動行動に関与するのか不明である。今回の私達の研究により、H-FABP とドパミン D2 受容体の相互作用が部分的に長鎖不飽和脂肪酸のドパミン神経機能調節に関与することが示唆された。

Takeuchi, Y. and Fukunaga, K. (2003) Differential subcellular localization of two dopamine D2 receptor isoforms in transfected NG108-15 cells. **J. Neurochem.** 85:1064-1074.

Shioda, N., Yamamoto, Y., Watanabe, M., Binas, B., Owada, Y. and Fukunaga, K. (2010) Heart-type fatty acid binding protein regulates dopamine D2 receptor function in mouse brain. **J Neurosci.** 30:3146-3155.

O-1.

リゾホスファチジン酸産生酵素オートタキシンの結晶構造解析

○奥平真一¹、西増弘志²、濱弘太郎¹、三原恵美子³、堂前直⁴、井上飛鳥¹、
石谷隆一郎²、高木淳一³、濡木理²、青木淳賢^{1,5}

(¹東北大院・薬・分子細胞生化学、²東大院・理・生物化学、³大阪大・蛋白
研、⁴理研、⁵東北大・医・代謝疾患医学センター)

オートタキシン (ATX) は分子量 100 kDa の分泌性の酵素であり、そのリゾホスホリパーゼ D 活性によりリゾホスファチジルコリン (LPC) を加水分解して脂質メディエーターであるリゾホスファチジン酸 (LPA) を産生する。LPA は特異的な G タンパク質共役型受容体に作用してさまざまな細胞応答を引き起こす。これまでに ATX は LPA 産生を介して血管形成やリンパ球のホーミングなど多岐にわたる生命現象に関与することがわかっている。また ATX はがんや線維症、神経因性疼痛などの様々な疾患とも関連が言われており、創薬ターゲットとして注目されている。ATX は構造的には細胞外核酸代謝酵素である Nucleotide Pyrophosphatase Phosphodiesterase (NPP) ファミリーに属するが核酸に対する加水分解活性は非常に弱い。また LPC においても、より鎖長が短く、また不飽和度の高い脂肪酸鎖を有する LPC に対する活性が強いという特徴を有している。これまで哺乳類の NPP ファミリー分子の構造は全く解明されていなかったが、今回我々は、マウス ATX の X 線結晶構造を決定することに成功した。その結果、1) ソマトメジン B 様ドメインとヌクレアーゼ様ドメインは触媒活性ドメインを挟むように存在し、この3つのドメインが密接に相互作用することで触媒活性ドメインの安定化に貢献していること、2) ATX の触媒活性ドメインに存在する基質結合領域には、他のすべての NPP ファミリー分子には存在するループ構造が欠失しており、この欠失によりリゾリン脂質を収納できる大きな基質ポケットが形成されること、3) 触媒活性ドメインの疎水性の基質ポケットは鎖長と飽和度の異なるリゾホスファチジン酸の脂肪酸を様々な形で收容すること、が明らかになった。これらの結果から ATX の基質特異性に対して構造的な解釈が与えられた。さらに、4) LPA が収まる疎水性ポケットからソマトメジン様ドメインと触媒活性ドメインの間を通り、基質の入り口とは逆方向に延びる疎水性チャンネルの存在が明らかとなり、LPA はこのチャンネルを通して LPA 受容体へと受け渡されるというモデルが提唱された。決定された高分解能の結晶構造は ATX をターゲットとした新規創薬開発の基盤となることが期待される。

O-2.

インテグリンに付加された糖鎖の意義について

○伊左治知弥、陸瑩瑩、福田友彦、顧建国
(東北薬大・分子生体膜研・細胞制御学)

インテグリンは、多細胞生物に存在する $\alpha\beta$ 二量体からなる細胞外マトリクス
の受容体である。インテグリンは細胞外の情報を増殖、分化、生存などのシグ
ナルに解読して細胞内へと伝えている。糖タンパク質の中でも N-結合同型糖鎖の
付加部位を多く持ち、分子量の 3 分の 1 以上は糖鎖から構成される。我々はこ
れまでに糖鎖リモデリングの手法を用い、インテグリンの N-結合同型糖鎖を糖転
移酵素、N-acetylglucosaminyltransferase (GnT)-III、GnT-V などリモデリングす
ると細胞接着・移動活性が変化することを報告してきた。このメカニズムを間
葉系インテグリンの代表インテグリンの $\alpha5\beta1$ をモデルに糖鎖欠損インテグリン
遺伝子をインテグリン欠損細胞に導入し、解析した。その結果、 $\alpha5$ 鎖の β -propeller
ドメインおよび $\beta1$ 鎖の I-like ドメインに付加される糖鎖は細胞接着や細胞移動
といったインテグリンの機能発現に必須であり、特に $\alpha5$ 鎖の site4 の糖鎖構造は
接着活性の制御に重要であることが分かった。

さらに、上皮細胞系の代表インテグリンで基底膜ラミニンと特異的に結合す
る $\alpha3\beta1$ の機能糖鎖部位を解析した。 $\alpha3$ 鎖の N-結合同型糖鎖付加部分のうち、Thigh
ドメイン上の 1 箇所に変異を導入すると完全に二量体形成が抑制され、細胞表
面に発現できなくなることがわかった。一方、興味深いことに、Calf1,2 ドメイ
ン上の変異体(CalfMut)は細胞表面の発現量は WT と同等であったが、Akt・Erk
のリン酸化は低下し、細胞増殖が有意に抑制された。一方、内在性の $\alpha3$ 鎖をノ
ックダウン(KD)すると細胞増殖は低下することから、 $\alpha3$ 鎖は細胞増殖に寄与す
ることが分かった。KD 細胞に WT 鎖を再導入すると細胞増殖は回復したが、
CalfMut の再導入ではノックダウン細胞より増殖能が低下した。更に、CalfMut
を導入した細胞は明らかに $\beta1$ 鎖の活性化レベルが低下したが、 $\beta1$ 鎖の活性化抗
体を共存させると活性化レベルと増殖能が回復した。

以上より、 $\alpha5$ 鎖と $\alpha3$ 鎖 の糖鎖の機能は大きく異なり、同じ α 鎖でも独自の機
能を持っていることが示唆された。特に、Calf1,2 ドメイン上の糖鎖はインテグ
リンの活性化や Akt・Erk のリン酸化を介して細胞増殖に関与することが分かっ
た。今後、どのようにインテグリン上の N-結合同型糖鎖がシグナル伝達に関わっ
ているかを増殖因子受容体や糖脂質との分子複合体を詳細に解析することで明
らかにする。

O-3.

蝸牛聴毛の変性によるガングリオシド GM3 合成酵素欠損マウスの聴覚障害

○吉川弥里^{1,2}、郷慎司¹、岩崎克典²、井ノ口仁一¹

(¹東北薬大・分子生体膜研・機能病態分子、²福岡大・薬・臨床疾患薬理)

シアル酸を含むスフィンゴ糖脂質であるガングリオシドは、主として細胞膜情報伝達の要である細胞膜マイクロドメイン (lipid raft) に存在し、細胞の様々な機能を制御していることが明らかになりつつある。

我々はガングリオ系ガングリオシド生合成経路の最上流に位置する GM3 合成酵素 (GM3S) の欠損マウスを用いて、行動学的に検討した結果、音に対する驚愕反応の消失が認められた。そこで、聴覚試験を行った結果、GM3S KO マウスは完全に聴覚機能が障害されていることが判明した。GM3S KO マウスの聴覚は、音が聞こえ始める生後 14 日目には減弱しており、その数日後には完全に消失することが判明した。蝸牛コルチ器は聴覚の感覚受容細胞である有毛細胞および支持細胞で構成されている。有毛細胞には外有毛細胞および内有毛細胞の 2 種類が存在し、外有毛細胞は伸縮して音の振動の強弱を調節し、内有毛細胞のモジュレーターとして働く細胞であり、内有毛細胞は音の信号を中枢へと伝達する主要な細胞である。有毛細胞の頭部に位置する聴毛は音の振動である機械刺激を電気信号に変換する重要な部位である。GM3S KO マウスの聴覚障害の原因を形態学的に検討すると、生後 8 日目には外有毛細胞の脱落および聴毛の変性が、生後 12 日目には内有毛細胞の聴毛の変性が認められた。したがって、GM3S KO マウスの聴覚の消失は内有毛細胞の聴毛の変性に起因することが示唆される。

野生型マウスの蝸牛には、GM3、GM1、GD1a 等のガングリオシドが発現し、4 週齢で聴覚機能に異常のない GM2/GD2 合成酵素 (GM2S) の欠損マウスの蝸牛には GM3 および GD3 が発現していた。一方、GM3S KO マウスの蝸牛には o-シリースの GM1b や GD1α 等のガングリオシドが発現していた。また、Whole-mount を用いた免疫組織染色の結果、野生型マウスの聴毛に GM3 および GM1 の発現が認められた。これらの結果より、ガングリオシドは聴毛の機能および形態の維持に重要であることが示唆された。

O-4.

表面プラズモン共鳴によるサポニンおよび脂肪酸の レニン活性阻害－結合相関解析

○後藤猛¹、鎌田淑恵²、小野洋輝²、菊地賢一¹、高橋砂織³
(¹秋田大院・工学資源, ²秋田大・工学資源, ³秋田県総食研セ)

【緒言】

レニンは血圧上昇を誘起するレニン－アンギオテンシン系の活性起点として重要である。高血圧治療薬の開発を目的としてレニン阻害物質の探索が行われ、豆類や穀類の抽出物からサポニンや脂肪酸がレニン阻害物質として同定された。その中で Soyasaponin I については血圧降下作用も確かめられている。さらなるレニン阻害物質の発見が期待されるが、レニン活性阻害試験には蛍光基質を利用するため、試料中の蛍光性不純物が広範かつ正確なスクリーニングの障害となっていた。そこで本研究では、表面プラズモン共鳴(SPR)によるレニン阻害物質探索の可能性を探るため、サポニンおよび脂肪酸のレニン阻害と結合との相関を調べた。

【実験方法】

ヒトプレプロレニン cDNA 導入組換えバキュロウイルスを Sf-9 昆虫細胞に感染させてヒトレニンを高発現させ、これを Pepstatin-aminoethyl Sepharose と MonoQ HR5/5 により単一に精製した。SPR 分析には Biacore 2000 を使用し、アミンカップリング法によりレニンをセンサーチップに固定化させた。DMSO 含有 HBS 緩衝液に溶解したサポニンおよび脂肪酸を通液し、SPR 応答を比較した。

【結果と考察】

センサーチップへのレニン固定化に及ぼす pH の影響を調べ、レニンの等電点以下の pH 4.0 で高い固定化量が得られた。そこで、このレニン固定化チップを用い、種々のサポニンおよび脂肪酸の SPR を調べた。その結果、レニン阻害活性を有するサポニン (Soyasaponin I & II, Chikusetsusaponin IV, Glycyrrhizin, MGGA) および脂肪酸 (cis-Vaccenic acid, Oleic acid, Linoleic acid, Linolenic acid, Arachidonic acid, EPA, DHA) は全て大きな SPR 応答を示した。これに対し、レニン阻害活性の無いサポニン (Ginsenoside Rb₁, Saikosaponin c, Glycyrrhetic acid) と脂肪酸 (Palmitic acid, Stearic acid) は、ほとんど SPR 応答を示さなかった。これより、SPR はレニン阻害物質探索の一次スクリーニングに利用できることが分かった。一方、レニン阻害活性が無い Saikosaponin b₂ も例外的に SPR 応答を示し、レニンに対する異なる結合性が示唆された。さらに、各サポニンの SPR に対する濃度依存性を調べ、結合定数 (K_A) を求めた。

O-5.

ペルオキシレドキシニンによるレドックスシグナルの感知と代謝制御

○久下周佐^{1,2}、橘剛²、色川隼人¹、小笠原綾子¹、渡部俊彦¹、岩井健太^{1,2}
(¹東北薬大・微生物学、²東北大院・薬・生体防御)

過酸化水素は、細胞に酸化ストレスを与えるだけでなく多彩な生理活性を示すことからシグナル分子として機能すると考えられている。しかしながら過酸化水素をシグナルとして感知・伝達する機構は知られていない。我々は、ペルオキシレドキシニンが活性酸素種(過酸化水素)の受容体として機能し、そのシグナルを他の分子に受け渡す、即ちジスルフィド結合形成を誘導することで他の分子(ターゲット分子)を制御するというモデルを提唱し、出芽酵母において主要なペルオキシレドキシニン *Tsa1* のターゲット分子として解糖系律速段階の反応を触媒するピルビン酸キナーゼ(Pyk1)を同定した。Pyk1 はホスホエノールピルビン酸(PEP)と ADP からピルビン酸と ATP を産生する不可逆的な反応を触媒する。一方、グルコースが枯渇し糖新生を行う時には異なった反応経路によりオキサロ酢酸を介して ATP を消費して PEP を合成する。したがって糖新生時に Pyk1 を抑制しなければ PEP を消費してピルビン酸を合成するという無駄なサイクルが回転することになる。Pyk1 はフルクトース 1,6-ビスリン酸(FBP)によるアロステリックに活性化するが、Pyk1 抑制機構は明らかにされていない。実際、糖枯渇時にも Pyk1 蛋白質は残存することから Pyk1 活性は積極的に抑制制御される必要がある。我々は Pyk1 の特定のシステイン残基が酸化されると Pyk1 活性が抑制されることを初めて明らかにした。また、細胞内においても Pyk1 が同様に制御されるかを検討するために、有機酸を中心とした陰イオン代謝物質の糖枯渇時の変動を CE-MS 法を用いて網羅的に解析した (Human Metabolome Technologies 社の協力による)。その結果、Pyk1 のシステイン残基変異体を持つ酵母細胞は野生株と比べて TCA サイクルおよびグリオキシル酸回路の代謝物質のイソクエン酸、コハク酸、フマル酸、リンゴ酸が糖枯渇時に顕著に増加することが明らかになった。これらの結果は、Pyk1 のシステイン残基の酸化還元(レドックス)反応が糖代謝の流路を制御する可能性を示唆している。

O-6.

Peroxiredoxin 4 による細胞機能のレドックス調節の解明

○倉橋敏裕¹、栗田ちひろ²、金野祐¹、大槻倫之¹、角田智志¹、張紅旭¹、
伊藤純一¹、井内良仁³、高尾敏文²、藤井順逸¹
(¹山形大院・医・生化学・分子生物学、²大阪大・蛋白研、
³山口大・農・生物機能科学)

Peroxiredoxin (Prx)は、thioredoxin 依存性に過酸化水素を消去する抗酸化酵素で、哺乳動物には6種類の遺伝子があり、細胞局在などが異なるタンパク質をコードする。ペルオキシダーゼ活性を介して過酸化水素の関与する細胞内リン酸化シグナル伝達のレドックス調節を行う他に、分子シャペロンとしての機能も知られており、多様な役割を担っている。Prx4はN末に疎水性アミノ酸からなるシグナル配列を有して合成され、一部は分泌されるものの、大部分は小胞体に留まる。全身で発現が認められるが、精巣では性成熟に伴って高分子型 Prx4 が発現するようになることから、精子形成への関与が示唆されている。

Prx4 遺伝子欠損マウスを作製しその表現型を解析した結果、細胞死の増加・精子数の減少といった精巣機能の異常が認められた。その後、全身に発現する Prx4 の他に、異なる第1エクソンから転写されるためにシグナル配列をもたない分子が精巣では生じ、それが高分子型 Prx4 に対応する事が分かった。Prx4 はこのように分子種ならびに細胞局在に依存して異なる生理機能を有すると考えられる。Bリンパ球をエンドトキシン刺激すると Prx4 が選択的に誘導され、Prx4 欠損形質細胞では高分子型 IgM の異常な重合が起こるが、これは小胞体内で Prx4 が Protein Disulfide Isomerase (PDI)と協調して新生タンパク質の disulfide 結合の形成に関わるためと考えられる。その一方で、Prx4 はN末端に分泌シグナル配列を有するにもかかわらず、分泌シグナル配列を欠く少なからぬ量の Prx4 が細胞質に存在することから、小胞体内に一旦輸送された後に細胞質に逆輸送されると考えられる。細胞質に逆輸送された Prx4 の役割の一つに、G-CSF 受容体のリン酸化を抑制することで、G-CSF 刺激による細胞内シグナルの終結に働くことが明らかになっている。Prx4 のもつその他の機能を解明する目的で、pull-down 解析により Prx4 と結合する分子の検索を行ったところ、小胞体に局在し PDI 活性を有する複数の分子を同定した。Prx4 と PDI の相互作用とその役割の解明を目指して研究を進めている。

O-7.

Nrf2 依存的なヒト HO-1 遺伝子発現活性化機構の解析

○丸山敦史、伊東健
(弘前大院・医・分子生体防御)

HO-1 遺伝子はヘムや重金属、活性酸素種、LPS などの環境ストレスに非常に鋭敏に応答し、顕著に発現増強する。ヒト HO-1 遺伝子では、転写開始点上流 4kb (E1)と 9kb (E2)にエンハンサー領域があり、それらの領域にはストレス応答に必要なエレメント StRE が存在する。両エンハンサー領域には AP-1 や C/EBP など多種の転写因子が結合するが、酸化ストレス応答において重要な結合分子は Nrf2 である。

Nrf2 は化学発がん、炎症性疾患、神経変性疾患など酸化ストレスが関与する疾患から生体を防御する転写因子である。Nrf2 は親電子性物質や活性酸素種などに応答して細胞核に移行し、抗酸化剤応答配列 ARE への結合を介して、標的遺伝子発現を活性化する。代表的な Nrf2 標的遺伝子としては HO-1, TXNRD1, NQO1 が挙げられるが、HO-1 遺伝子の発現は他の遺伝子に比べ迅速かつ顕著に増強する。そのため、HO-1 遺伝子特異的な発現活性化機構の存在が示唆される。そこで Nrf2 依存的な HO-1 遺伝子発現活性化機構を調べるために、テトラサイクリン(Tet) 誘導性に Nrf2 を過剰発現する細胞株を作製し、Nrf2 と RNA polymerase II (PolII)の挙動を詳細に検討した。その結果、下記の事項が明らかとなった。

1. Tet誘導的にNrf2が発現し、HO-1遺伝子のエンハンサーに結合する。
2. HO-1遺伝子のエンハンサーおよびプロモーターにはNrf2非依存的にPolIIが結合しており、Nrf2依存的かつ一過性にHO-1 E1エンハンサーへのPolIIの結合が増強する。
3. Nrf2依存的にHO-1遺伝子プロモーターへのPolII結合が増強する。
4. この際Nrf2はHO-1 遺伝子プロモーターに結合しない。

以上の結果から、Nrf2はエンハンサー結合を介して、PolIIのHO-1遺伝子プロモーターへの導入を増強することがわかった。

現在、Nrf2依存的なPolII導入増強の分子機構を調べるために、HO-1遺伝子プロモーターにおけるクロマチンリモデリング因子BRG1の挙動やヌクレオソームの位置変化について検討中である。

O-8.

膵β細胞における Keap1-Nrf2 システムの役割

○宇留野晃¹、柳下陽子¹、菅原明²、山本雅之¹
(¹東北大院・医・医化学、²東北大院・医・病態検査)

Nrf2はCNCファミリーに属する塩基性ロイシンジッパー型の転写因子である。Nrf2は、親電子性物質、活性酸素種、活性窒素種、重金属類などのストレスにより活性化され、多くの解毒酵素や抗酸化酵素を協調的に誘導し、ストレス防御に重要な役割を果たしている。Keap1はユビキチンリガーゼのアダプタータンパク質でありNrf2転写活性を抑制的に制御しているが、ストレスセンサー機能も併せ持つ。Keap1-Nrf2システムは生体の環境応答に重要な役割を果たしている。膵β細胞は膵ランゲルハンス島の主要な構成細胞であるが、生体で唯一のインスリン分泌細胞であることから、その障害は糖尿病発症に直結する。膵β細胞は抗酸化遺伝子の発現が低いことが知られており、酸化ストレス防御機構の解明は糖尿病の病態の理解に重要である。しかし、膵β細胞におけるKeap1-Nrf2システムの役割は知られていなかったことから、その解析を行った。

マウス単離膵ランゲルハンス島における*Keap1*および*Nrf2*遺伝子の発現を定量PCR法で検討したところ、両者の遺伝子の発現を認めた。親電子性物質であるジエチルマレイン酸、*tert*-ブチルヒドロキノン、15デオキシプロスタグランジンJ2、活性酸素種である過酸化水素水、一酸化窒素ドナーであるSIN-1、NOR3は、膵ランゲルハンス島におけるNrf2標的遺伝子群の発現を増加させた。*Nrf2*遺伝子ノックアウト(*Nrf2*^{-/-})マウスからの単離膵ランゲルハンス島は、Nrf2標的遺伝子である*Gstp1*、*Gpx2*、*Txnrd1*の発現低下を認め、*Ins1*、*Ins2*遺伝子の発現が低下していた。しかし、ブドウ糖負荷試験では*Nrf2*^{-/-}マウスは野生型マウスと比較して血漿インスリン濃度の有意な低下を認めなかった。このため、膵β細胞障害モデルとして、インスリンプロモーター制御下に*iNOS*遺伝子を発現するトランスジェニック(*iNOS-Tg*)マウスにおけるNrf2の役割を検討した。*iNOS-Tg*マウスと比較して、*iNOS-Tg::Nrf2*^{+/-}マウスでは膵ランゲルハンス島のインスリン染色陽性領域の縮小と、ブドウ糖負荷試験における血漿インスリン濃度の低下と血糖値の上昇を認めた。

本研究において、Keap1-Nrf2システムは膵β細胞におけるストレスに対する防御機構に重要な役割を果たしており、その破綻は糖尿病発症をきたすことが明らかとなった。

O-9.

神経発達におけるペプチドホルモンセクレチンの役割

○西島維知子

(東北大学院・医・環境遺伝医学総合研究センター 情報遺伝学)

哺乳類動物の脳は胎生期に発生・形成され、生後に著しく発達する。発達中の脳では様々な栄養因子や脳発達の制御因子が働き、脳神経の正しいネットワーク形成を制御している。ペプチドホルモンの一つであるセクレチンは消化促進ホルモンとして同定されたが、近年、脳においても機能していることが明らかになってきた。我々はセクレチンとセクレチンレセプターが発達期の脳に非常に多く存在することに着目し、遺伝子改変マウスを作製し、神経生物学・行動学解析を行っている。セクレチンとセクレチンレセプター遺伝子のノックアウトマウス成獣では自閉症に類似した症状（社会行動の異常と繰り返し行動を伴う記憶形成の異常）を示した。さらに記憶の形成に重要とされる脳の海馬 CA1 ニューロンで、シナプスの可塑性の低下と樹状突起棘（**dendritic spines**）の減少を発見した。神経細胞の樹状突起棘は脳発達により未熟型の形状から成熟型に変化するが、セクレチンレセプターノックアウトマウス海馬の樹状突起では成体においても多数の未熟型が依然として存在していた。また、幼少期のセクレチンとセクレチンレセプターノックアウトマウスにおいて、神経新生の場である海馬の歯状回の顆粒細胞下層（**subgranular zone: SGZ**）の神経前駆細胞（**DCX** 陽性神経前駆細胞）の生存率が低下し、細胞死が亢進していることを発見した。これらの結果は、セクレチンシグナルが神経発達期のシナプス形成と神経新生に重要な役割を果たしていることを示唆し、神経発達期の神経回路形成の不全が生涯を通して神経行動学的に影響を与えていることが推測される。

O-10.

腎臓発生における LGR4 の機能解析

○大山一徳、毛利泰彰、赤松篤、西森克彦
(東北大院・農・分子生物)

Lgr4(Leucine-Rich Repeat-Containing, G protein-Coupled Receptor4)はFSHR、LHR、TSHRらの受容体と近縁な遺伝子としてクローニングされたGPCRの一つである。発見当初はこれらの遺伝子と同様に生殖腺での機能が予測されたLGR4であるが、Lgr4遺伝子欠損マウスを用いた我々の解析により、さまざまな器官の発生・分化に関わる機能を持つこと遺伝子であることが明らかとなっている。

我々の作成した全身でLgr4を欠損させたLgr4 nullマウス(Lgr4^{-/-})は新生児致死を示した。このマウスの腎臓の形態観察を行ったところ、胎児期16.5日においてCystの形成に伴う腎臓の発生異常を示すことが明らかとなった。この発生異常の原因を明らかとするため、さらに詳細な解析を行ったところ、発生時期のLgr4^{-/-}マウスの腎臓では尿管芽のbranching関連遺伝子であるRet, Wnt11の発現低下が観察された。また尿管芽の分化状態に着目し解析を行い、LGR4がWnt β -catenin signalを介し尿管芽の細胞を未分化な状態に保ち、正常な尿管芽発達を維持していることが明らかとなった。これらの結果は、LGR4の腎臓発生における機能を詳細に示した初めての結果である。

O-11.

弘前ヘアレスラット胸腺でのヘルパーT細胞の分化抑制はCD4陽性T細胞と樹状細胞のそれぞれに発現するLy49ファミリー遺伝子の欠失による

○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)

弘前ヘアレスラット (HHR) はSDラット (SDR) に由来する乏毛ラットである。我々はこれまでに、HHR胸腺がSDR胸腺に比べて著しく小さいことや、胸腺内でのヘルパーT (Th) 細胞の分化が抑制されていることを報告してきた。また最近の解析からHHR胸腺では制御性T細胞 (Treg) の分化に重要な転写因子である*FoxP3* 遺伝子や*IL-2Rα* (*CD25*) 遺伝子の発現低下といった、Treg細胞の分化抑制を示すデータも得られている。Th細胞もTreg細胞も胸腺内のCD4⁺CD8⁻ (*CD4SP*) 細胞から分化するため、これら細胞の分化を阻む共通の機構が存在することも考えられる。実際にHHR胸腺ではCD4⁻CD8⁻ (DN)、CD4⁺CD8⁺ (DP)、*CD4SP*、CD4⁻CD8⁺ (*CD8SP*) 細胞の存在比率はSDR胸腺と差はないが、*CD4* 遺伝子の発現が低下し、*CD4* の発現の低い細胞が多数存在するという知見も得られている。

HHRは毛のケラチン遺伝子を欠損しているが、それがT細胞の分化抑制につながるのかは不明である。また胸腺におけるT細胞の分化にはT細胞と胸腺上皮細胞や樹状細胞といったストロマ細胞の相互作用が必須であるが、このどちらにも異常があるのかも不明である。そこで原因遺伝子を探るため、HHRとSDRの肝臓からDNAを抽出しCGHアレイ解析を行なった。その結果、HHRの第4染色体q42領域に2カ所の欠失領域が存在することが示された。このうち一方の欠失領域には*Ly49sil* 遺伝子に相同性を持つ*Klra17* 遺伝子が、他方には*Ly49s3*、*Ly49s4*、*Ly49i3*、*Ly49i4* の4遺伝子が存在していた。*Ly49* ファミリーはNK細胞表面に発現し、標的細胞のMHC class I分子を認識する役割があるが、T細胞や樹状細胞に発現するメンバーもある。そこでHHRで欠失している遺伝子が正常胸腺の細胞で発現しているかを検討するため、SDR胸腺より単離したDP、*CD4SP*、*CD8SP* 細胞ならびにOX62陽性の樹状細胞を用いたRT-PCR解析を行ったところ、*Klra17* 遺伝子は*CD4SP* 細胞で、*Ly49s3-i4* 遺伝子は樹状細胞で発現していることが示された。HHR胸腺においてはこれら遺伝子の発現は認められなかった。

これらの結果は、HHR胸腺の*CD4SP* 細胞と樹状細胞の両方で*Ly49* ファミリー一遺伝子の発現が失われたことがTh細胞やTreg細胞の分化抑制につながることを示唆している。今後はHHR胸腺およびSDR胸腺より単離した*CD4SP* 細胞と樹状細胞の共培養の系などを用いて、これらT細胞分化抑制における*Ly49* ファミリー遺伝子の役割を探ることが重要であると考えている。

O-12.

染色体整列に働く新規分子 CAMP の機能について

○伊藤剛、田中耕三

(東北大・加齢研・分子腫瘍学)

細胞分裂における染色体の正確な分配は、遺伝情報の安定な維持に必須である。近年、染色体分配の異常は染色体不安定性（細胞ごとに染色体数が異なる状態）をひきおこし、細胞のがん化と関連することが予想されている。正確な染色体分配に必要な条件として、全染色体が分裂中期に細胞中央部へと整列することがあげられる。染色体の整列にとって、染色体上のセントロメアに構築されるキネトコアと中心体から伸張する微小管が正常に結合することや微小管の適切なダイナミクスが重要であることがわかっている。これらは主にキネトコアや微小管に局在する分子により制御され、関与分子の欠損は染色体整列の異常を引き起こすことが報告されている。しかしながら、染色体整列に関するメカニズムはまだ不明であり、未知の分子が貢献している可能性がある。そこで、我々は染色体整列に働く新たな分子を同定し、その機能を詳細にすることで、整列に働くメカニズムの解明を目指した。

我々は染色体整列に関与する新規の分子を同定し、その機能を明らかにした。1) この新規分子をノックダウンした HeLa 細胞では染色体整列を維持できない、2) この分子は分裂期特異的にリン酸化されることより、CAMP (Chromosome alignment-maintaining phosphoprotein) と名付けた。CAMP は 828 のアミノ酸残基から成り、N,C 末端に Zing フィンガー、3 種類の特徴的な繰り返しのアミノ酸配列をもつ領域を含んでいた。我々はこれら繰り返し配列を WK, SPE, FPE 領域とした。この中でも FPE 領域はキネトコアや微小管に局在し、染色体整列にとって重要であることがわかった。CAMP ノックダウン細胞では染色体整列が異常となるが、このノックダウン細胞に Zn フィンガー、各々の領域を発現させた結果（レスキュー実験）、異常な整列は FPE 領域の発現により正常な状態へと回復した。さらに、我々は CAMP 内の 22 箇所（箇所）のリン酸化部位を特定した。レスキュー実験により、これらのなかでも FPE 領域における 3 箇所（箇所）のリン酸化が染色体整列にとって重要であることを明らかにした。

Go Itoh, Shin-ichiro Kanno, Kazuhiko SK Uchida, Shuhei Chiba, Shiro Sugino, Kana Watanabe, Kensaku Mizuno, Akira Yasui, Toru Hirota and Kozo Tanaka

CAMP (C13orf8, ZNF828) is a novel regulator of kinetochore-microtubule attachment

The EMBO Journal (2011) 30, 130–144

O-13.

S-アデノシルメチオニン合成酵素 MATII によるエピゲノム制御と転写調節

○解良洋平^{1,2}、加藤恭丈¹、太田嶺人¹、山本照子²、五十嵐和彦¹
(¹東北大院・医・生物化学、²東北大院・歯・顎口腔矯正学)

エピゲノム制御において、ヒストンメチル化修飾は根幹的な役割を担う。このヒストンメチル化反応のメチル基供与体は、S-アデノシルメチオニン (SAM) である。SAM はメチオニン代謝回路において、メチオニンと ATP を基質にして SAM 合成酵素 MAT (methionine adenosyltransferase) により合成される。そのアイソザイム MATII は、触媒サブユニット α と調節サブユニット β から構成される。私達は、酸化ストレス応答に関与する転写因子 MafK の複合体から MATII を同定し、MafK が MATII を局所的にクロマチンへ動員し、周辺のヒストンメチル化を促進して転写調節することを明らかにした。また、MATII が様々な転写因子やヒストンメチル化酵素 (MT) とモジュール (SAMIT; SAM-integrating transcription regulation module) を形成して、ヒストンメチル化に関わることを示した。そこで、私達は、ヒストン修飾における MATII の作用機構を解明するとともに、標的遺伝子を同定することを試みた。不死化したマウス胎児線維芽細胞 (iMEF) を用いて、MATII α の発現を減弱 (ノックダウン) させ、クロマチン分画におけるヒストン H3K9 および K4、K27 メチル化修飾を解析した。その結果、H3K9 および K4、K27 トリメチル化 (me₃) がコントロール細胞と比較して選択的に減弱していた。MATII α と共役する MT を同定するために、ビオチン化タグを融合した MATII α を発現させた iMEF を用いて、アビジン結合ビーズによるプルダウンを行い、Suv39h1 と SETDB1 が MATII と相互作用することを明らかにした。これらの MT は H3K9me₃ 化を引き起こすことから、MATII と共役してエピゲノムを制御することが示唆された。コントロールと MATII α ノックダウン iMEF を用いて、マイクロアレイ解析を行い、両細胞において 10 倍以上の発現差のあった遺伝子群から、遺伝子オンロジーで "Response to oxidative stress" に分類され、脂質代謝や炎症反応に関与する Cox2 (シクロオキシゲナーゼ 2) を同定した。MATII α や SETDB1 ノックダウンにより、Cox2 の発現量はそれぞれ約 5 倍および約 3 倍増加した。Cox2 の遺伝子制御領域に Maf 認識配列 (MARE) が存在することから、MafK が MATII および SETDB1 を動員し、その発現を抑制することが示唆された。

O-14.

mRNA 品質管理システムにおけるナンセンス mRNA 分解の分子機構

○鹿島勲^{1,3}, Stefanie Jonas¹, Uma Jayachandran², Gretel Buchwald², Elena Conti², Andrei N. Lupas¹ and Elisa Izaurralde¹

(¹Max Planck Institute for Developmental Biology, ²Max Planck Institute for Biochemistry, ³東北大院・薬・遺伝子薬学)

ナンセンスコドンを含む異常 mRNA を検出し分解する機構、Nonsense-mediated mRNA decay (NMD)は真核生物に普遍的に存在する mRNA 品質管理機構の一つである。NMD の第一の生理学的役割は、異常な位置に終止コドンを含む mRNA を排除することで、本来の遺伝子産物よりも短い異常タンパク質断片の蓄積を防ぐことにあると考えられている。これまでの解析から、終止コドンの下流にスプライシングによって生じる exon と exon のつなぎ目 (exon junction) が存在する場合、その mRNA はナンセンス mRNA として認識され急速に分解されることが知られている。Exon junction の 20-22nt 上流にはスプライシング依存的に EJC (Exon junction complex) と呼ばれるタンパク質複合体が結合していることが示されている。正常 mRNA の翻訳領域に結合している EJC はリボソームによる翻訳により mRNA 上から取り除かれる。一方、終止コドンの下流に存在する EJC はリボソームにより取り除かれることなく、翻訳終結にともない NMD 因子複合体によって認識される。まさにこの過程がナンセンスコドンの認識過程の分子機構である。

今回、ナンセンスコドン認識から mRNA 分解の機序、NMD 担当エンドヌクレアーゼ SMG6 と標的 mRNA の結合様式を明らかにするため、SMG6 の解析を試みた。驚くべきことに、SMG6 の N 末端側には、EJC と直接結合する新しいタンパク質モチーフ (EJC binding motif; EBM) が存在することを発見した。実際、試験管内で再構成した EJC と SMG6 は、EBM を介して直接結合する。さらに、EBM を介した SMG6 と EJC の結合は NMD に必要であった。以上の結果から SMG6 は EJC を介して標的 mRNA に結合することが明らかとなった。

O-15.

細胞表面の *O*-glycan を利用した癌細胞の新しい免疫逃避機構

○坪井滋^{1,2}、須藤美穂子¹、畠山真吾²、羽瀧友則³、堀川洋平³、橋本安弘¹、
米山高弘²、盛和行²、山谷金光¹、斎藤久夫¹、舟生富寿¹、大山力²
(¹ (財) 鷹揚郷腎研究所 (おうようきょうじんけんきゅうしょ)・生化学、
² 弘前大・院・医学・泌尿器科学、³ 秋田大・院・医学・腎泌尿器科学)

癌細胞表面の **Core2 *O*-glycan** と呼ばれる *O*-結合型糖鎖が、癌の転移に深く関わっていることが知られている。最近、われわれは、Core2 *O*-glycan の合成の key となる糖転移酵素、**Core2GnT (C2GnT)** が高発現した膀胱癌は、NK 細胞による免疫システムから逃避する能力を持ち、このために高頻度で転移し、患者の予後を不良にすることを見出した。われわれは、C2GnT を高発現する癌細胞が、どのようにして NK 細胞による免疫システムから逃避しているのか、その分子機構を明らかにすることを目的とした。

C2GnT を高発現する癌細胞は、C2GnT 発現の低い癌細胞に比べて、NK 細胞による細胞障害活性に対し強い抵抗性を示した。NK 細胞による癌細胞への攻撃は、主として、癌細胞表面に発現するリガンド分子 MHC Class I-related chain A (MICA) が、NK 細胞活性化型レセプター NKG2D に結合し、NK 細胞を活性化することで惹起される。C2GnT 高発現癌細胞の MICA の *O*-glycan を解析した結果、MICA 上の NKG2D 結合領域には core2 *O*-glycan が多数付加しており、それらが、Gal β 1-4GalNAc のユニットから成るポリラクトサミンによって修飾されていることがわかった。さらに、そのポリラクトサミンにはガレクチン-3 が結合し、MICA の NKG2D に対する親和性を弱めていることがわかった。ポリラクトサミンで修飾され、ガレクチン-3 を結合した MICA は、NKG2D を介して NK 細胞を活性化する効率が著しく低かった。C2GnT を高発現する癌細胞の表面からポリラクトサミンとガレクチン-3 を除去すると、NK 細胞の傷害活性に対する抵抗性が減少し、転移能が低下することが、*in vitro*、*in vivo* 両方の実験によって確認された。以上のことから、C2GnT を高発現する癌細胞は、NK レセプターリガンド分子上の *O*-glycan をポリラクトサミンとガレクチン-3 で修飾することによって NK 細胞の活性化を抑制し、NK 細胞による攻撃から逃避することができるようになり、その結果として高い転移性を示したと考えられる。本研究によって、C2GnT を高発現する癌が、細胞表面の *O*-glycan を利用した新しい免疫逃避機構によって、NK 細胞の免疫システムから逃避していることが明らかにされた。

形質膜シアリダーゼ(NEU3)とがん幹細胞性

○高橋耕太^{1,3}、山口壹範²、和田正²、
秦敬子¹、森谷節子¹、山本晃司^{1,3}、宮城妙子¹

(¹東北薬大・がん糖鎖制御、²宮城がんセ・研、³東北大院・医)

シアリダーゼは、糖タンパク質や糖脂質の非還元末端のシアル酸を水解する酵素である。これまでに細胞内局在や酵素学的性質が異なる 4 種類が同定されている。われわれはこれまでに、形質膜に局在するガングリオシド特異的ヒトシアリダーゼ NEU3 が、大腸がんを含む種々のがんで異常に亢進し、がん細胞の生存、浸潤、運動などの悪性形質を増強していることを明らかにしてきた。近年、がん研究において、自己複製能、薬剤耐性能および造腫瘍能を有するがん幹細胞の存在が報告され、その性状解析がなされているが、糖脂質代謝と造腫瘍性およびがん幹細胞性を関連づける報告はまだなされていない。本研究では、大腸がん HT29 細胞株を用いて、がんで異常に亢進している NEU3 ががん幹細胞性の維持に深く関わっている可能性を検証した。

われわれは、磁気ビーズ標識 CD133/1 抗体により濃縮される CD133^{high} 細胞集団、および無血清・非接着培養で形成されるスフェロイドにおいて NEU3 の発現が亢進していることを見出した。がん幹細胞性に対する NEU3 の影響を調べるため、NEU3 過剰発現およびテトラサイクリン誘導性発現抑制 HT29 細胞株を作製した。NEU3 の発現抑制によりスフェロイド形成能は抑制され、一方で過剰発現により促進した。また、NEU3 の発現抑制によりオキサリプラチン存在下あるいは軟寒天培地上でのコロニー形成能が抑制された。さらに、免疫不全マウス (nude マウス) における造腫瘍能は、NEU3 のノックダウンにより有意に抑制された。NEU3 の発現抑制によるシグナリングと遺伝子の発現変化を調べると、Akt を介する生存シグナルの抑制とともに、幹細胞性遺伝子である Nanog、Oct4 および Sox2 の発現抑制が認められた。これらの結果から、NEU3 ががん幹細胞の自己複製、薬剤耐性および造腫瘍能において調節的な役割を担っている可能性が示唆された。

腫瘍性 HeLa 融合細胞における GLUT 遺伝子の発現制御機構の解析

渡辺勝、安部望、押切勇樹、佐京智子、○北川隆之
(岩手医科大・薬・細胞病態生物学)

【目的】 がん細胞はグルコースを過剰に取り込んでおり、このグルコースの細胞内への取り込みは、グルコース輸送タンパク質（以下 GLUT）によって行われる。我々は以前、HeLa 細胞と正常線維芽細胞との融合細胞系(E.J. Stanbridge, UCI)を用い、腫瘍性に伴う GLUT 遺伝子の発現変化を明らかにした。腫瘍性 HeLa 融合細胞では GLUT1 および GLUT3 遺伝子の発現が検出されるが、非腫瘍性 HeLa 融合細胞では GLUT3 遺伝子の発現が抑制されていた。このことから、GLUT3 遺伝子の発現調節と腫瘍性との関連が示唆されるが、その分子機構は不明である。そこで本研究では、腫瘍性 HeLa 融合細胞において GLUT 遺伝子の発現を制御するシグナル伝達経路について解析した。**【結果及び考察】** HeLa 及び HeLa 融合細胞株を種々の抗がん剤で処理したところ、アドリアマイシン等の DNA 損傷を誘導する抗がん剤によって GLUT3 遺伝子の発現が特異的に抑制された。この発現抑制は、MEK 阻害剤である U0126 及び ERK の siRNA 処理によって阻害されたが、p53 には非依存性であった。一方、マウス胎児線維芽細胞 (MEF) において、GLUT3 遺伝子の発現に NF- κ B の関与が示されている。p65 に対する siRNA を用いた解析から、HeLa 融合細胞でも NF- κ B が GLUT3 遺伝子の発現を制御していることが明らかとなり、さらにシグナル経路を検討中である。次いで、GLUT3 遺伝子の発現とがん細胞の増殖との関連を検討した結果、GLUT3 遺伝子を過剰に発現した細胞では、アドリアマイシンに抵抗性を示し、siRNA により GLUT3 遺伝子をノックダウンした細胞では、アドリアマイシンに対する感受性が増加した。したがって、GLUT3 遺伝子の発現量は、抗がん剤の細胞毒性に影響することが示唆された。

O-18.

N-ミリスチル化は PP2C α および PP2C β の機能発揮に必須である

○小林孝安、千田透子、安藤正勝、松木佑、
枘悠太郎、高橋祐輝、神藤祐亮、永浦裕子、田村眞理
(東北大・加齢研・遺伝子情報)

プロテインホスファターゼ 2C(PP2C)は、真核生物の主要なセリン・スレオニンホスファターゼファミリーの一つで、哺乳動物では 14 種類の PP2C 遺伝子が確認されている。AMPK activated protein kinase (AMPK)は、細胞内のエネルギー不足を感知するキナーゼで、ATP 枯渇状態を克服するさまざまな細胞現象を引き起こす。その活性化には、LKB1 をはじめとする上流のキナーゼによる α サブユニットの Thr172 のリン酸化が必須である。同部位の脱リン酸化を担うプロテインホスファターゼに関しては、1990 年代初頭、PP2A の阻害剤であるオカダ酸を用いた研究などから、PP2C ファミリーのメンバーである PP2C α が担うことが報告されていた。その後、哺乳類の PP2C ファミリーが、14 種の分子種からなる大きなファミリーであることが判明したことから、今回我々は、AMPK の脱リン酸化を担うホスファターゼの再検討を試みた。LKB1 を欠く HeLa 細胞に、AMPK と LKB1 を過剰発現させると、AMPK のリン酸化が観察されるが、この系に 11 種の PP2C を共発現させ、Thr172 のリン酸化を検討した。その結果、これまで報告されていた PP2C α の他、PP2C β が AMPK α の Thr172 のリン酸化を顕著に減少させることが明らかになった。この共発現系で PP2C α と PP2C β の G2A 変異体を用いたところ AMPK の脱リン酸化が観察されなかった。PP2C α と PP2C β を発現した細胞を[3H]ミリスチン酸で標識したところ、両タンパクのミリスチル化が観察された。また PP2C α と PP2C β の細胞内局在は G2A 変異により影響を受けた。以上の結果は PP2C α と PP2C β と N-ミリスチル修飾がこれらの機能発現に必須であることを示唆している。

O-19.

T細胞の遊走における SDF-1 刺激依存的な Slingshot-1 のリン酸化制御

○川村友理子、佐々木一貴、大橋一正、水野健作
(東北大院・生命研・情報伝達分子解析)

細胞が遊走する際、アクチン線維の脱重合・切断因子である Cofilin はラメリポディア形成などのアクチン骨格のダイナミックな再構築において重要な役割を果たしている。Cofilin は LIM キナーゼによって Ser-3 がリン酸化、不活性化され、Cofilin の特異的脱リン酸化酵素である Slingshot によって脱リン酸化再活性化する。私たちは、インスリンやケモカイン SDF-1 の刺激によって細胞内の Cofilin が LIM キナーゼによって一過的にリン酸化され、その後の急激な Cofilin の脱リン酸化には PI3K の下流で Slingshot-1 (SSH1) が活性化されることが必要であることを明らかにした。しかし、PI3K が SSH1 を活性化するメカニズムについては不明である。本研究では PI3K の下流で働く Akt の関与について検討した。まず、Akt による SSH1 のリン酸化を検討した結果、SSH1 の C 末端領域の三カ所を主にリン酸化することが明らかとなった。また、優勢不活性型 Akt の過剰発現によって、インスリン刺激による Cofilin の脱リン酸化が抑制された。さらに、SSH1 は、SDF-1 刺激による Jurkat T 細胞の走化性における極性形成に必要であることから、Jurkat 細胞の内在性の SSH1 を shRNA によって発現抑制し、Akt によるリン酸化部位を変異させた shRNA 耐性の SSH1 変異体を発現させる回復実験を行い、Akt によるリン酸化の機能を検討した。その結果、Akt による 3カ所のリン酸化部位を Ala に置換した SSH1(3A)変異体による回復実験では SDF-1 刺激による移動方向への極性が形成されず、Glu に変異させた SSH1L(3E)では野生型と同様に極性が形成されることが明らかとなった。これらの結果から、SDF-1 刺激による PI3K-Akt 経路を介した SSH1 のリン酸化は、細胞移動における極性形成において重要なことが明らかとなった。

O-20.

ミトコンドリア c-Src による細胞死制御メカニズム

○小椋正人、八巻淳子、本間美和子、本間好
(福島医大・医・生体物質)

非受容体型チロシンキナーゼである c-Src は、増殖、分化、生存といった細胞の根源的機能に関与する。我々は、現在までに c-Src がミトコンドリアにおいて機能的に発現すること、および、このキナーゼ活性が酸化リン酸化の制御を通して細胞内 ATP 量を調節することを明らかにしてきた。ミトコンドリアの機能異常は、神経変性疾患をはじめとする細胞死に深く関与する。本研究では、c-Src によるミトコンドリア機能制御が細胞死に与える影響を解析したので報告する。ミトコンドリア内 c-Src 特異的にチロシンリン酸化シグナルを抑制するミトコンドリア移行シグナル融合キナーゼ欠損 c-Src 変異体(MTS-KD-c-Src)を作製した。この変異体発現細胞による解析を行い、以下の結果を得た。①変異体発現 T98G 細胞において、細胞死の指標となる PI 陽性細胞数が顕著に増加した。②活性酸素種の産生量が著明に増加した。③大脳皮質由来初代培養神経細胞において、変異体発現により顕著な細胞死が観察された。これらの結果はミトコンドリア c-Src シグナルが細胞死の制御について重要な役割を果たしていることを示唆している。そこで、ミトコンドリア c-Src 基質を網羅的に解析したところ、4 種のタンパク質が同定された。現在、細胞死制御に関与する基質を検討中であるので合わせて報告する。

P-1.

ペルオキシレドキシニンによる過酸化水素の感知と酸化ストレス応答
(リン酸化 eIF2 α レベル) の制御

○岩井健太^{1,2}、柴田美奈子²、間さやか²、久下周佐^{1,2}
(¹東北薬大・微生物学、²東北大院・薬・生体防御)

過酸化水素は、細胞に酸化ストレスを与えるだけでなく多彩な生理活性を示すことからシグナル分子として機能すると考えられている。しかしながら過酸化水素をシグナルとして感知・伝達する機構は知られていない。これまでの報告は、過酸化水素が特定の蛋白質の特定のシステイン残基を酸化することでその活性を制御するという「直接酸化」機構が想定されている。一方、我々は、抗酸化酵素として知られている酵母のペルオキシレドキシニン (Prx) である Tsa1 や Ahp1 が酸化ストレスを感知し、そのシグナルを標的分子に伝達する言わば、過酸化物の受容体として機能し酸化ストレスシグナルを仲介する機能を持つことを明らかにしてきた。そこで、哺乳動物の Prx も同様に過酸化水素受容体として機能するか検討した。

哺乳動物の Ahp1 ホモログ Prdx5 にジスルフィド結合を介して結合する因子を検索したところ Bag1 が得られた。Bag1 は HSP70 のコシャペロンで eIF2 α のリン酸化の制御蛋白質の GADD34 と相互作用しその活性を制御する。また、GADD34 は、プロテインフォスファターゼ PP1 と結合し eIF2 α の脱リン酸化活性を誘導するが、Bag1 と結合することでその脱リン酸化活性を抑制することが報告されている。そこで、過酸化水素処理により Bag1 が酸化されるのか、それに伴う Bag1-GADD34 相互作用および eIF2 α のリン酸化の変動を解析した。その結果、過酸化水素が Bag1 のシステイン残基を酸化し GADD34 との結合を増強させること、Bag1-GADD34 の相互作用の増強は eIF2 α のリン酸化レベルを増強し抗酸化酵素などを発現誘導させる転写因子 ATF4 の翻訳を促進させることが明らかになった。これまで酸化ストレスによる eIF2 α のリン酸化レベルの上昇は eIF2 α のリン酸化酵素の増強と予想されていたが、本研究は「脱リン酸化の抑制という負の制御」によることを示唆している。また、哺乳動物においても Prx が過酸化物の受容体として働く可能性を示すものである。

P-2.

Sigma-1 受容体の新規スプライシングバリエーションの同定とその機能

○石川潔、塩田倫史、福永浩司

(東北大院・薬・薬理学)

【目的】 Sigma-1 受容体 (Sigma-1R) は細胞内において小胞体とミトコンドリアの近接部位の小胞体側に存在する 223 アミノ酸からなる分子シャペロンである。また、Sigma-1R の強力な作用薬として、選択的セロトニン再取り込み阻害剤として知られる抗うつ薬フルボキサミンや、アセチルコリンエステラーゼ阻害剤であるアルツハイマー病治療薬ドネペジルが存在し、Sigma-1R が脳機能に深く関与する可能性が示唆されている。これまでの研究において、Sigma-1R は小胞体のイノシトール 1,4,5-三リン酸受容体 (IP₃R) と相互作用することにより、IP₃R による小胞体からミトコンドリアへのカルシウムの放出を調節すること、活性酸素による酸化ストレスを負荷した培養神経細胞の樹状突起棘形態変化に関与すること等が報告されている。しかしながら、脳機能との関連性については未だ明らかとされていない。本研究では、私達がマウス脳からクローニングした Sigma-1R の新規スプライスバリエーションである sigma-1 receptor short isoform (Sigma-1SR) の発現とその機能について検討した。

【方法】 Sigma-1R, Sigma-1SR の cDNA をマウス神経芽腫細胞である Neuro-2a 細胞に過剰発現させ、安定発現細胞株を作製した。免疫ブロット法により、マウス脳における Sigma-1SR の発現を確認した。免疫染色法により Sigma-1SR の細胞内局在を同定した。また、免疫沈降法を用いて Sigma-1SR と Sigma-1R の相互作用について検討した。カルシウムイメージング法を用いて ATP 刺激による IP₃R 依存性のミトコンドリアにおけるカルシウム動態を測定した。**【結果・考察】** 免疫ブロットの結果より、マウス脳の大脳皮質、海馬、線条体において Sigma-1R の 30-40%の内在性 Sigma-1SR の発現が確認された。Neuro-2a 細胞における免疫染色により、Sigma-1SR は Sigma-1R と同様に小胞体とミトコンドリアの近接部位に局在するが、Sigma-1SR はゴルジ装置にも存在すること、免疫沈降により、Sigma-1R と Sigma-1SR は複合体を形成することが明らかとなった。カルシウムイメージングの結果より、Sigma-1R 発現細胞はコントロール細胞と比較してミトコンドリアへのカルシウム流入の上昇が見られた。一方、Sigma-1SR 発現細胞ではカルシウム流入抑制が見られ、Sigma-1R と Sigma-1SR の共発現細胞では Sigma-1SR 発現細胞のカルシウム流入抑制が改善された。これらの結果より、神経細胞において Sigma-1SR は Sigma-1R と複合体を形成し、Sigma-1R の機能である IP₃R を介したミトコンドリアへのカルシウム流入を抑制することが示唆された。

P-3.

リゾホスファチジン酸は体毛形成に関与する

○井上飛鳥¹、有馬直明¹、新井洋由²、青木淳賢^{1,3}
(¹東北大院・薬・分子細胞生化学、²東京大院・薬・衛生化学、
³東北大院・医・代謝疾患コアセンター)

哺乳類において、体毛は毛包と呼ばれる皮膚内の上皮系組織で形成される。毛包組織内において、種々の増殖因子や転写因子が協調的に作用することで正常な体毛形成が進行する。これまでに、先天性体毛形成異常のヒト患者の解析から、PA-PLA₁α(遺伝子シンボル名 LIPH)と P2Y₅(遺伝子シンボル名 P2RY5)の各遺伝子の変異が見つかっている。当研究室は以前、PA-PLA₁αが分泌型の酵素であり、*in vitro*で生理活性脂質のリゾホスファチジン酸(LPA)を産生する活性を有することを報告している。また、P2Y₅はGタンパク共役型受容体であり、脂質を認識するサブファミリーに属しているがそのリガンドは不明であった。PA-PLA₁α欠損患者とP2Y₅欠損患者が類似した体毛形成異常を示すことから、体毛形成過程においてPA-PLA₁αがLPAを産生しP2Y₅を活性化する機構が働くことが想定された。我々はこの仮説を検証するため、PA-PLA₁α遺伝子欠損マウスを作製し、そのメカニズムを解析した。作製したPA-PLA₁α遺伝子欠損マウスはヒト患者と同様の縮毛の体毛形成異常を示した。マウス毛包のLPA量を高感度LC-MS/MS法により定量したところ、PA-PLA₁α遺伝子欠損マウスではLPAがほぼ消失しており、PA-PLA₁αが生体内でLPA産生を担うことが初めて判明した。さらに、体毛形成におけるLPAの下流の分子機構を検討したところ、TGF-αの膜型前駆体からの切断が起こっていることを見出した。そこで、TGF-αの切断を指標にP2Y₅の系を組み立てたところ、P2Y₅がLPAにより活性化され膜型前駆体TGF-αの切断を引き起こすことがわかった。さらに、このP2Y₅の活性化はリコンビナントPA-PLA₁αでも引き起こされた。これまでの*in vitro*のデータを考慮すると、PA-PLA₁αが形質膜の脂質二重層の外膜に存在するホスファチジン酸のアシル基を切断し、産生されたLPAが膜上のP2Y₅受容体へ受け渡されていると想定される。以上より、毛包形成過程において、PA-PLA₁αによるLPA産生とP2Y₅の活性化およびTGF-αの切断が起こっており、この経路が正常な体毛形成に必須であることが明らかとなった。

LPA による血管透過性亢進作用メカニズムの解明

○近藤朋恵¹、可野邦行¹、奥平真一¹、Jerold Chun²、青木淳賢^{1,3}
(¹東北大院・薬・分子細胞生化学,²スクリプス研究所,
³東北大・医・代謝疾患コアセンター)

【背景・目的】リゾホスファチジン酸 (LPA) は、6 種類の LPA 受容体 (LPA₁₋₆) を介し機能を発揮する生理活性脂質であり、リゾホスホリパーゼ D 活性を有するオートタキシン (ATX) の作用により様々なリズリン脂質から産生される。これまでに LPA が血管透過性を亢進すること、その作用にヒスタミンが関与することが報告されているが、詳細なメカニズムは不明であった。本研究では LPA の血管透過性亢進作用に注目し、そのメカニズムの解明を目指した。

【方法・結果】血管透過性は、C57BL/6 マウスの吻側背部に血漿又は薬物を皮内投与した直後 Evans blue を静脈内投与し、30 分後に致死させ、剥離した皮膚をホルムアミド抽出し、色素漏出量を定量して評価した。単離後数時間加温した血漿をマウスに投与すると顕著な血管透過性が認められた。この時、加温血漿中には 10 μM 程度の LPA が検出された。抗 ATX モノクローナル抗体により ATX を除去した血漿を加温した場合 LPA 産生が確認されず、また、血管透過性亢進作用も認められなかった。よって加温血漿中で産生された LPA が血管透過性亢進作用を起こし得ることが分かった。

次にこの LPA による血管透過性亢進作用のメカニズムの解析を行った。抗ヒスタミン薬であるケトチフェンの投与やマスト細胞欠損マウスでは LPA の作用が有意に抑制されることが確認された。しかし、マスト細胞欠損マウスでは LPA 投与による血管透過性亢進作用が完全には消失しなかった。LPA_{1,3} 受容体アンタゴニストである Ki16425 の同時投与、LPA₁ KO マウスにおいても LPA の作用が抑制された。一方で、LPA₃ 受容体特異的アゴニストである T13 投与では血管透過性亢進作用が認められなかった。

【考察】LPA は炎症時に産生されることが知られているが、炎症時の血管透過性亢進における LPA の関与が想定された。LPA はマスト細胞に発現する LPA₁ を介してヒスタミンの放出を促し、寄与することが示唆された。しかし、マスト細胞欠損マウスへの LPA 投与では作用が完全には消失しないことから、マスト細胞を介さない別のメカニズムが存在する可能性が考えられる。

P-5.

新規 Autotaxin スプライシングアイソフォーム ATX δ の性状解析

○橋本崇史¹、奥平真一¹、五十嵐浩二²、矢富裕³、青木淳賢^{1,4} (¹東北大学院・薬・分子細胞生化学, ²東ソー株式会社・バイオサイエンス事業部・開発部, ³東京大学医学部附属病院・検査部, ⁴東北大・医・代謝疾患医学コアセンター)

【目的】 Autotaxin (ATX) はリゾホスファチジルコリン (LPC) をリゾホスファチジン酸 (LPA) に変換する活性を有しており、体液中における生理活性脂質 LPA の産生を担う酵素であると考えられている。データベース上には複数の ATX スプライシングアイソフォームが存在するが、そのうち exon19 の 3'末端の 12 塩基が欠損するものに関してはその性状は解析されていない。この 12 塩基の欠損は EST データベース中の ATX をコードすると考えられる mRNA の約 3 割を占めていた。そこで本研究ではこの 12 塩基の欠損を含む新たな ATX アイソフォームの同定とその性状解析を行った。

【方法・結果】 12 塩基欠損のスプライシングサイトを含めると、ATX には 8 つのスプライシングアイソフォームが存在する。RT-PCR とサブクローニングを行った結果、このうち 5 種類の存在が確認された。そのうち、exon12 と 21 を持たず 12 塩基が欠損するアイソフォームと、exon21 を持たず 12 塩基が欠損するアイソフォームは新規であり、それぞれ ATX δ 、ATX ϵ と命名した。熱安定性比較と EST データベース検索の結果から ATX δ は ATX β に次ぐ主要なアイソフォームであると考えられた。そこで ATX δ の性状解析を行った。ATX δ を HEK293 細胞に発現させたのち、抗 ATX 抗体を用いたウェスタンブロッティングと lysoPLD 活性測定により調べたところ、ATX β と比べて同程度の発現が見られた。両者を培養上清より部分精製したところ、ATX δ は ATX β と同等の比活性を有していた。両者は、基質特異性、2 価カチオン要求性、細胞遊走活性、熱安定性および依存性においてほぼ同等の性状を示した。各組織での ATX δ の mRNA 量を RT-PCR にて定量した結果、いずれの臓器においても、3 割程度の比率で存在することが分かった。

【考察】 8 つの ATX スプライシングアイソフォームのうち 5 種類の存在が確認され、2 種類は 12 塩基の欠損を持つ新規アイソフォームであった。その中でも、ATX δ は全体の約 3 割を占める主要なアイソフォームである。現在、ATX δ と ATX β との間に生化学的な差異は見いだせていないが、ATX δ のみを発現し ATX β を発現しない生物種も存在することから、ATX δ は ATX β と同等の機能を担うと考えられる。今後はその発現定量系の構築を行い、様々な病態における発現解析を通して、病態マーカーとして確立していきたいと考えている。

P-6.

ラット小脳顆粒細胞における合成カンナビノイド CP55940 の
LPS 誘発性サイトカイン mRNA 発現抑制機構の解析

○千葉俊樹、上野沙奈恵、小原祐太郎、中畑則道
(東北大院・薬・細胞情報薬学)

カンナビノイドとは大麻が含む多数の生理活性物質あるいはそれらの受容体と相互作用する物質の総称である。近年、カンナビノイドは食欲・記憶・痛覚・脳内報酬系に対する作用以外に炎症反応に対する寄与も報告されている。しかし、このカンナビノイドの作用はカンナビノイド (CB) 受容体依存的または非依存的に観察されることが報告されており、それらの詳細な細胞内シグナル伝達機構や作用点については未だ不明な点が多く残されている。また、これらの報告は主にグリア細胞や免疫細胞を用いた報告であり、初代培養神経細胞を用いた報告は乏しい。そこで本研究では、ラット小脳顆粒細胞 (CGC) の初代培養系を用いて、合成カンナビノイド受容体アゴニスト CP55940 によるリポポリサッカライド (LPS) 誘発性サイトカイン発現の調節メカニズムについて解析を行った。

CGC において CB₁ 受容体の mRNA 及びタンパク発現が認められたが、CB₂ 受容体の発現は認められなかった。CGC に LPS (1 μg/mL) を作用させると IL-1β、IL-6、TNF-α などの炎症性サイトカインの有意な mRNA 発現上昇が認められた。この際、合成カンナビノイド受容体アゴニストである CP55940 を作用させると濃度依存的な炎症性サイトカイン発現の抑制が認められた。興味深いことに、内因性カンナビノイドである 2-アラキドノイルグリセロールやアナンダミドは炎症性サイトカイン発現の抑制作用を示さなかった。また、CB₁/CB₂ 受容体アンタゴニストである NESS0327 (3 μM) では CP55940 による炎症性サイトカイン発現抑制作用の解除が認められなかった。CGC において、新規カンナビノイド受容体と考えられている GPR55 mRNA の発現が認められた。GPR55 は Gq 共役型受容体と考えられているが、CP55940 はイノシトールリン脂質代謝回転及び細胞内 Ca²⁺濃度上昇を示さなかった。さらに、GPR55 アンタゴニストと考えられているカンナビジオールによっても、CP55940 と同様に有意なサイトカイン発現抑制作用が認められた。以上の結果より、CGC において、合成 CB 受容体アゴニスト CP55940 は CB₁、CB₂ 受容体及び GPR55 を介さずに LPS 誘発性サイトカイン mRNA 発現を抑制する可能性が示唆された。

一次繊毛形成における Rabin8 のリン酸化とその機能

○天貝佑太¹、千葉秀平¹、菅野新一郎²、安井明²、福田光則³、水野健作¹ (¹ 東北大院・生命研・情報伝達分子解析、² 東北大・加齢研・加齢プロテオーム解析、³ 東北大院・生命研・膜輸送解析)

一次繊毛は微小管を軸とする細胞外突起構造体であり、各種受容体やイオンチャネルが高密度に分布した、細胞外シグナル受容のための“アンテナ”として機能する。近年、その構築異常や機能不全が嚢胞性腎疾患や肥満、失明、男性不妊等の複合的症候を有する疾患の原因となることが判明し、繊毛関連遺伝子群の同定とその機能解明は重要な研究課題となってきた。繊毛形成の際には、中心体方向への小胞輸送によって、繊毛を構成する膜と蛋白質が繊毛へ供給される。Rabin8 は細胞内物質輸送を制御する低分子量 G 蛋白質 Rab8 の活性化を介して、繊毛構築に必要な繊毛膜の供給や繊毛の機能発現に必要な繊毛関連因子の輸送を担う Rab8 特異的なグアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) である。しかし、一次繊毛形成時の Rabin8 の制御機構はほとんど不明である。私たちは Rabin8 が細胞内においてリン酸化されていることに着目し、繊毛形成における Rabin8 のリン酸化制御の実態を検証することを目的に解析を行った。ヒト網膜色素上皮細胞由来の hTERT-RPE 細胞は、血清飢餓によって一次繊毛を形成するが、Rabin8 発現抑制細胞では、一次繊毛形成は顕著に抑制された。この異常は、発現抑制効果を回避する Rabin8 の野生型 [Rabin8(WT)] の過剰発現により回復する一方で、セリン残基をリン酸化されないアラニン残基に置換した Rabin8(SA) 変異体の発現では回復しなかった。そこで、Rabin8 の Rab8 に対する GEF 活性を *in vitro* で測定したところ、野生型と Rabin8(SA) 及び Rabin8(SE) 変異体の活性には差が見られなかった。この結果から、リン酸化は GEF 活性自体には作用せず、繊毛構築過程での Rabin8 の細胞内局在を制御することが示唆された。そこで Rabin8(WT) 及び Rabin8(SA) 変異体について、それぞれの結合蛋白質の網羅的スクリーニングとマスマスペクトロメトリー解析を行なった。その結果、Rabin8(WT) の特異的な結合蛋白質として 14-3-3 を同定した。14-3-3 は結合基質のリン酸化特異的に結合し、その酵素活性や細胞内局在を変化させることが知られており、リン酸化と 14-3-3 の結合が繊毛形成過程での Rabin8 の細胞内局在を制御することが強く示唆された。

核内受容体 CAR によるケトン体合成酵素 HMGCS2 の発現制御機構

○大塚祐多、吉成浩一、山添康
(東北大院・薬・薬物動態学)

核内受容体 constitutive androstane receptor(CAR)は、薬物代謝酵素の誘導に関わる主要な因子として知られている。一方で、CAR は薬物動態の調節のみならず、糖代謝や脂質代謝といった内因性物質レベルの調節にも関与することが示されつつあるが、その全容は不明である。そこで本研究では、CAR のエネルギー代謝における新規機能の同定を試みた。

CAR 活性化薬投与に伴うマウス肝臓における脂質代謝関連遺伝子の発現変動を、DNA マイクロアレイにより網羅的に解析した。その結果、CAR 活性化に伴いインスリンシグナルや脂肪酸酸化、ならびにそれらに関与すると考えられる転写因子の発現レベルが低下することが示唆された。これらのうち、ケトン体合成の律速酵素である HMG-CoA synthase 2 をコードする *Hmgcs2* について、その CAR による発現調節機構をさらに解析した。マウス *Hmgcs2* の約-7kb までのプロモーター領域を含むレポーターコンストラクトを作製し、レポーターアッセイを行った。その結果、CAR の活性化は、構成的なレポーター活性に影響を与えなかったが、*Hmgcs2* の転写活性化作用を有する peroxisome proliferator activated-receptor α (PPAR α)の活性化薬 bezafibrate(BZF)の処置に伴うレポーター活性の上昇を完全に抑制した。同様の結果はヒト *HMGCS2* でも得られた。しかし、DNA 結合能を欠いた CAR 変異体ではそのような転写抑制作用は認められなかった。また、培養ヒト肝細胞において BZF 処置により増加した *HMGCS2* mRNA レベルは、CAR 活性化薬の併用により低値を示した。

これらの結果から、ヒトとマウスの肝臓において、CAR は PPAR α を介した *HMGCS2* 遺伝子の転写を負に制御することが示唆された。またその転写抑制には、CAR がこれら遺伝子のプロモーター領域に結合することが必要である可能性が示された。したがって、*HMGCS2* 遺伝子の発現は、正の調節因子である PPAR α と負の調節因子である CAR により協調的に調節されており、ケトン体レベルの恒常性は両核内受容体の転写活性のバランスによって保たれている可能性が考えられた。以上、本研究により、CAR の新規生理機能の一端を明らかにすることができた。

乳腺発達における LGR4 の機能解析

○霜田貴宏、大山一徳、毛利泰彰、西森克彦
(東北大院・農・分子生物学)

Lgr4(Leucine-Rich Repeat Containing G-protein Coupled Receptor4)はFSHR、LHR、TSHR らの受容体と近縁な遺伝子としてクローニングされた GPCR の一つである。発見当初はこれらの遺伝子と同様に生殖腺での機能が予測された Lgr4 であるが、Lgr4 遺伝子欠損マウスを用いた我々の解析により上皮組織の形成に広く関わる機能を持つことが明らかとなっている。

我々の作成した Lgr4 null マウス(Lgr4^{-/-})は胎生致死、もしくは新生児致死を示し、またこの Lgr4^{-/-}マウスは眼瞼の開いたまま生まれる'EOB'(Eye-open at birth)と呼ばれる特徴的な表現型が観察された。この表現型は上皮組織や上皮細胞における異常を強く示唆するものであるため、我々は上皮組織における LGR4 の機能について着目し解析を行った。

Lgr4^{-/-}マウスは致死を示すため生後マウスの解析が不可能であった。そこで我々は生後マウス上皮組織における Lgr4 機能を解析するため fx 型の Lgr4 KO マウスと Keratin5-Cre TG マウスを用い上皮組織特異的 Lgr4KO マウス(Lgr4^{K5 KO})を作製した。このマウスを用いて乳腺の形態観察を行ったところ、Lgr4^{K5 KO} マウスでは3週齢以降の乳腺において発達不全が確認された。また妊娠期乳腺においても乳腺の発達不全を示し、乳汁産生能が低下することが確認された。これらの結果から LGR4 は乳腺の発達やその機能に必須の役割を担うことが明らかとなった。

子宮内膜の脱落膜化における Lgr4 の機能解析

○曾根瑞季¹、毛利泰彰¹、大山一徳¹、加藤成樹¹、那波明宏²、西森克彦¹
(東北大院・農・応生科、²名大医・産婦人科)

Lgr4(Leucine-rich repeat containing G-protein coupled receptor)は、GPCR の一種で、リガンド未同定の orphan レセプターである。本研究室において作製された、全身で Lgr4 を欠損させたマウス(Lgr4^{-/-})では、腎臓発生不全による新生児致死や眼瞼、頭頂部毛包の発生異常などの表現型が確認され、Lgr4 が様々な器官、特に上皮組織において重要な機能を持つことが強く示唆された。しかし新生児致死を示す Lgr4^{-/-}では、出生後における表現型の解析が不可能であるため Keratin-5(K5) Cre TG マウスを導入し、上皮組織特異的 Lgr4 欠損マウス(Lgr4^{K5 KO})を作製したところ、歯やマイボーム腺、乳腺の発生不全、さらに雌の不妊という新たな表現型を示した。雌の不妊に焦点を当て、雌生殖器官における Lgr4 の発現を確認したところ、子宮で Lgr4 の発現と K5 Cre の活性化が確認されたため、子宮に着目し解析を行った。子宮においては、着床に備えて子宮内膜の細胞増殖(脱落膜化)が妊娠の維持に必須な機構であることが知られているが、Lgr4^{K5 KO} の子宮では脱落膜化が生じないことが突き止められた。そこで脱落膜化誘導直前の子宮を観察したところ、Lgr4^{K5 KO} の子宮は Lgr4^{K5 ctrl} よりも矮小化していたため、Lgr4^{K5 KO} の子宮の発生不全を疑った。同時期の形態観察を行ったところ、子宮における分泌腺の形成不全が見出された。分泌腺からのサイトカインは、着床および脱落膜化に必須であるという報告がある。サイトカインシグナルの下流に存在し、脱落膜化誘導に関与する Bmp シグナルの低下が Lgr4^{K5 KO} において観察されたことから、分泌腺の形成不全に伴う Bmp シグナルの異常が、Lgr4^{K5 KO} の子宮における脱落膜化誘導を阻害することが示唆された。

分泌腺は子宮内膜の luminal 細胞と stromal 細胞の相互作用により、luminal 細胞が分化し形成されることが知られているが、そのメカニズムに関しては未知の部分が多い。現在、分泌腺形成への関与が報告されている遺伝子について、qRT-PCR や免疫染色を行い、分泌腺形成メカニズムにおける Lgr4 の機能を解析中であり、これについても報告したい。

NMD (ナンセンス変異依存 mRNA 分解)における
異常タンパク質分解機構の解析

○黒羽一誠、稲田利文
(東北大院・薬・遺伝子薬学)

遺伝子情報を正確に発現するため、mRNA の品質はリボソームにより厳密に監視されており、翻訳終結の異常が引き金となって分解が促進される。ナンセンス変異を保持する異常 mRNA(PTC-mRNA)は、NMD(nonsense-mediated mRNA decay)と呼ばれる特異的分解系によって迅速に分解される。これまで我々は、NMD の必須因子である Upf1 が、プロテアソームより、PTC-mRNA 由来の異常翻訳産物(PTC 産物)の分解を促進することを見いだした。しかしながら、どのように Upf1 が PTC 産物の分解を促進しているのか、についてはほとんど明らかではない。

そこでまず我々は、PTC 産物のユビキチン化の有無について検証した。PTC 産物を発現する細胞に、Myc タグを付加したユビキチンを過剰発現させ、PTC 産物を免疫沈降後、抗 Myc 抗体を用いてユビキチン化産物の検出を試みた。その結果、PTC 産物は野生株においてユビキチン化を受けており、その修飾効率 *upf1* 欠損株でほとんど変化しなかった。これは、Upf1 が PTC 産物のユビキチン化を促進していないことを示している。

次に、PTC 産物のユビキチン化に作用する E3 酵素を同定するため、いくつかの E3 酵素変異株を用いて PTC 産物の安定性を検証した。結果、ノンストップ mRNA 由来の異常翻訳産物のユビキチン化に必要な因子(Ltn1)の欠損株において、PTC 産物が有意に安定化することを見いだした。しかしながら、*ltn1* 欠損株において PTC 産物のユビキチン化に変化はなく、Upf1 自身のユビキチン化が有意に減少することがわかった。さらに、ユビキチン化された PTC 産物が、*upf1* 欠損株で有意に安定化しなかったことから、Upf1 は Ltn1 による自身のユビキチン化を介して、ユビキチン化非依存的に PTC 産物の分解を促進している、と考えられる。

Dom34:Hbs1 複合体による NGD(No-Go Decay)標的 mRNA 分解機構の解析

○坪井達久、黒羽一誠、牧野志保、鹿島勲、稲田利文
(東北大院・薬・遺伝子薬学)

真核生物では、mRNA 品質管理機構による厳密な監視により、RNA レベルでの細胞内分子制御の正確性が保証されている。人工的な二次構造等によって翻訳伸長反応が阻害された場合、mRNA 分子内切断 (NGD: No Go Decay) を受けることが知られている¹。我々は、連続した塩基性アミノ酸配列が翻訳アレストを引き起こし、その配列近傍で mRNA が切断されることを明らかにした^{2,3}。

Dom34:Hbs1 複合体は mRNA の分子内切断 (NGD) を促進する因子であり¹、試験管内再構成系において翻訳伸長中のリボソームを各サブユニットに解離させる活性を持つ⁴。今回我々は、終止コドン非依存の翻訳終結反応における Dom34:Hbs1 複合体の機能を解析した。ハンマーヘッドリボザイム配列 (*Rz*) を *GFP* の下流に挿入し、ノンストップ mRNA (*GFP-Rz*) を発現させ、その翻訳産物を解析した⁵。その結果、Dom34 の欠損株において、*GFP-Rz* の翻訳産物がポリソーム画分に存在し、かつペプチジル tRNA として検出された。従って、Dom34:Hbs1 複合体がノンストップ mRNA の 3'末端で停止したリボソームの解離を促進することが強く示唆された。この結果は、ヒトの Dom34(Pelota):Hbs1 複合体が mRNA の 3'末端で停止したリボソームの解離を促進することを示した生化学的解析の結果⁶と一致している。mRNA 分子内切断により生じる 5'側の切断断片 (5'NGD 断片) は、終止コドンとポリ(A)鎖を持たないノンストップ mRNA である。従って、Dom34:Hbs1 複合体がノンストップ mRNA の 3'末端で停滞したリボソームを解離させることで、5'NGD 断片の分解を促進する可能性について検討した。その結果、Dom34:Hbs1 複合体は mRNA 分子内切断を促進するとともに、その 5'NGD 断片の分解を促進する結果を得た。以上の結果から我々は、Dom34:Hbs1 複合体が NGD において、①mRNA 分子内切断の促進、②5'側切断断片の末端で停滞したリボソームを解離させることでエキソソームによる分解を促進する、という 2つの機能を持つことを提案する。

¹Doma *et al*, *Nature* 2006; ²Dimitrova *et al*, *J. Biol. Chem.* 2009; ³Kuroha *et al*, *EMBO Rep.* 2010; ⁴Shoemaker *et al.*, *Science* 2010; ⁵Kobayashi *et al.*, *Proc. Natl. Acad. USA* 2010; ⁶Pisareva *et al.*, *EMBO J.* 2011

栄養ヘムによる遺伝子制御の実験系構築

○羽田浩士¹、白木琢磨²、渡部美紀¹、五十嵐和彦¹
(¹東北大院・医・生物化学、²近畿大・生物理工学・食品安全工学)

ヘム鉄は非ヘム鉄より吸収効率が良いという栄養学的な知見から、鉄分をヘムとして輸送する経路が存在すると考えられている。細胞内に取り込まれたヘムは、転写抑制因子 **Bach1** と直接結合して **Bach1** の細胞核から細胞質への移行を促し、ヘオキシゲナーゼ(**HO-1**)の転写抑制を解除し、**HO-1** によりヘムが鉄へと分解されると考えられる。栄養として取り込まれたヘム (栄養ヘム) は、ヘモペキシン(**Hx**)との複合体でエンドソームに運ばれるが、この **Hx** 由来のヘムが **Bach1** の調節に関わる可能性は、まだ検討されていない。我々は、**Hx** との複合体としてヘムを取り込ませることで、生体内におけるヘムの取り込みをミミック出来ると考えた。**Hx** は血清から抽出することが出来るが、血清から得た **Hx** にはヘムと結合したものと未結合なものが含まれるため、実験系のコントロールが困難である。そのため我々はリコンビナント **Hx** の発現系を構築した。**Hx** の産生効率を良くするために、**Hx** の分泌シグナルを、分泌効率の高いイムノグロブリン κ のシグナル配列に置き換えたコンストラクトを作成し、**HEK293** 細胞に発現させた。培養上清 30ml を回収し、イオン交換カラムクロマトグラフィで 60 μg のリコンビナント **Hx** を精製することが出来た。精製したリコンビナント **Hx** とヘムとの結合を、ネイティブ **PAGE** を用いて解析することで、複合体が形成されることを確認し、ゲル濾過法により未結合のヘムを除去した。現在、この複合体を作用させた時の **Bach1** の局在変化を検討中である。複合体由来のヘムがエンドソームから細胞質内に放出され、**Bach1** を調節することを確認した上で、**Hx** 由来ヘムの細胞内輸送に関わる因子を探索したい。

転写因子 BACH1 による巨核球の多倍化制御メカニズムの解明

○李婕¹、白木琢磨²、五十嵐和彦¹

(¹東北大院・医・生物化学、²近畿大・生物理工学・食品安全工学)

巨核球は、造血前駆細胞 MEP (Megakaryocyte erythroid progenitor) から分化する。その際、細胞は DNA 複製を繰り返し、細胞質分裂を生じないことで多倍体化する。一般に細胞分裂中期では、染色体はスピンドルタンパク質によって、細胞の赤道面に整列して均等に分配される。そして、細胞分裂終期に、細胞質分裂を経て、二倍体の娘細胞になる。しかし、巨核球の場合、スピンドルタンパク質が作用せず、多倍体の単核になると考えられている。転写抑制因子 BACH1 (BTB and CNC homology 1) が、巨核球の分化に関与することを、BACH1 過剰発現マウスの解析による、巨核球の形成不全などが生じることが報告されている。そこで、私達は、巨核球における細胞分裂中期の染色体の動態に注目し、BACH1 によるその制御と多倍体化のメカニズムを解明することを試みた。まず、細胞分裂関連因子の相互作用を網羅的にまとめたデータベースを検索し、スピンドルタンパク質 CHICA を BACH1 結合因子の候補として同定した。HEL (Human erythroleukemia) 細胞を用いて、BACH1 の発現を減弱 (ノックダウン) させて PMA (TPA) による分化誘導実験を行ってところ、コントロールと比較して分化誘導後の細胞増殖能が低下し、巨核化も抑制された。細胞分裂中期における染色体の赤道面への整列への関与を調べるために、BACH1 ノックダウン HeLa 細胞を用いて、モータータンパク質阻害剤 Monastrol 処理による染色体のリング形成を観察した。ヒストン H2B 融合 GFP タンパク質により染色体を可視化し、BACH1 ノックダウン HeLa 細胞ではコントロールと比較して、70%以上の細胞で染色体リングの形成不全が生じた。この細胞に、BACH1 タンパク質のさまざまな欠失変異体を発現させたところ、BACH1 の細胞質局在シグナル (CLS) を欠失する BACH1 では、染色体のリング形成がレスキューされなかった。BACH1 は CLS を介して Exportin1 (Crm1) により細胞核から細胞質へ輸送される。以上のことから、BACH1 が巨核球の分化に重要な役割を果たしていること、BACH1 は細胞分裂中期染色体整列に関わること、そしてこの作用には Exportin1 との相互作用が必須であることが示唆される。

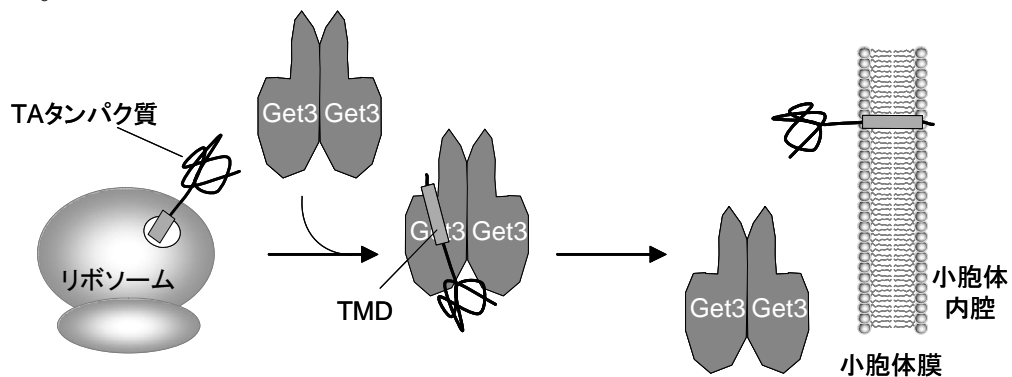
P-15.

Tail-anchor 型膜タンパク質の小胞体標的化機構の解析

○相澤圭師¹、佐藤陽子¹、江連徹²、安藤英治²、Gunnar von Heijne³、魚住信之¹
(¹東北大院・工・バイオ工学、²島津製作所・バイオ臨床 BU、
³Dept of Biochem. and Biophys., Stockholm Univ.)

【背景】 Tail-anchor 型膜タンパク質 (TA タンパク質) は、C 末端の膜貫通部位 (TMD) と N 末端側の細胞質ドメインからなる 1 回膜貫通型の膜タンパク質である。TA タンパク質は細胞質中のリボソームで全長が合成された後に細胞質中に一旦放出された後、標的化因子によって小胞体膜に輸送される機構が予想されている。これは膜タンパク質の大多数を占める複数膜貫通型膜タンパク質が、合成中にシグナル認識粒子 (SRP) によって認識され標的化される経路とは異なるものである。近年、酵母において Guided Entry of TA-protein 複合体 (GET 複合体) が TA タンパク質の標的化に関与していること明らかになった。GET 複合体の構成因子の一つである Get3 は、細胞質中において TA タンパク質の疎水性 TMD を認識し、Get3-TA タンパク質複合体を形成して小胞体膜へ標的化される (図 1)。また、Get3 の結晶構造解析により、疎水残基が集中してタンパク質表面に露出した領域周辺に電荷残基の集中が確認されており、これが Get3-TA タンパク質複合体形成に関与していると予想されているが、詳細な結合部位は明らかになっていない。本研究では TA タンパク質の電荷残基の置換実験により、Get3 との相互作用における電荷残基の役割の解明をめざした。

【実験方法・結果】 TA タンパク質であるヒト由来シナプトブレビン II の TMD 周辺のアミノ酸配列に連続した電荷残基導入を行い、*in vitro* 系を用いて小胞体膜への組込み解析を行った。TMD の N 末端側に正電荷を導入した場合、膜組込み効率は向上した。一方、負電荷を導入した場合には、膜組込み効率は大幅に低下した。また C 末端側に電荷を導入した場合、正電荷・負電荷のいずれにおいても膜組込み効率は低下した。以上より、Get3 立体構造上には負に帯電した領域が存在しており、ここに TMD の N 末端側領域が接するような位置で結合している可能性が示唆された。



P-16.

クロマチン機能構造形成における
ヒストンバリエント H2A.Z アイソフォームの機能解析

○日下部将之¹、松田涼¹、北村大志¹、堀哲也²、深川竜郎²、原田昌彦¹
(1 東北大・院農・分子生物、2 国立遺伝研・分子遺伝)

細胞核内にはヘテロクロマチン、ユークロマチンといった多様なクロマチン構造が存在しており、このクロマチンの不均一な構造がエピジェネティック制御の重要な分子基盤となっている。近年、クロマチン構造変換因子としてヒストンバリエントが注目されている。ヒストンH2Aのバリエントの一つであるH2A.Zは、遺伝子発現を制御するクロマチン構造の形成に関わると考えられているが、その他にも、核膜タンパク質の局在、クロマチン構造の境界、DNA損傷修復、さらに植物ではH2A.Zの存在がDNAメチル化に拮抗するなど、多様な機能が報告されている。我々は脊椎動物H2A.Zの解析の過程で、H2A.Zとして従来一つに扱われていたタンパク質に2種類のアイソフォーム(H2A.Z-1, H2A.Z-2)が存在し、両者がクロマチン中に存在することを見出した¹⁾。これらのアイソフォームの機能を区別して解析するため、ニワトリDT40細胞を用いてそれぞれのアイソフォーム遺伝子を破壊した細胞株を作製し、H2A.Z-1とH2A.Z-2の間に共通な機能と特異的な機能が存在することを明らかにした¹⁾。さらに、H2A.Zの両アイソフォームの遺伝子を破壊した細胞(H2A.Z DKO)を作成して解析を行っている。このH2A.Z DKOを用いて、脊椎動物においてもH2A.ZとDNAメチル化に拮抗関係があるかの検証を行った。ニワトリW性染色体にはXhoI-family反復配列が存在し、この配列中にDNA高メチル化領域と低メチル化領域が存在する²⁾。メチル化感受性制限酵素XhoIでの切断によってWTとH2A.Z DKOのXhoI-family配列のメチル化を比較したところ、H2A.Z DKOにおいて切断の減少が観察された。この結果はH2A.ZによってXhoI-family配列の低メチル化領域が維持されていることを示しており、脊椎動物においてもH2A.Zとメチル化に拮抗関係があることを示唆している。

References:

1. Matsuda et al., *Nucleic Acids Res.* 38: 4263-4273 (2010)
2. Kodama et al., *Chromosoma* 96: 18-25 (1987)