

第 6 1 回 日本生化学会近畿支部例会

要旨集

日時：2014 年 5 月 17 日（土）

9 時 00 分～

会場：京都産業大学

京都府京都市北区上賀茂本山

御案内

1. 会場は京都産業大学です。詳しくは下記の交通アクセスをご参照ください。
2. 受付は神山ホールロビーにて 8 時 30 より開始します。会場では受付にてお渡しした名札に所属・氏名を記入の上、御着用ください。名札はお帰りの際に受付にお返しください。
3. ご参加の方々には優秀発表賞の投票を行っていただきます。受付で受け取られた投票用紙に記入の上、16 時 00 分までに受付の投票箱にお入れください。優秀発表賞は懇親会で発表し、表彰します。
4. 発表者の方へ：全ての発表を口頭とポスターの両方で行います。
 - a. 口頭発表は以下の通りに行います。
 - i) 講演 10 分、討論 3 分の計 13 分です。
 - ii) 発表者持ち込みのパソコンとミニ D-sub 15 ピン（オスーオス）ケーブルによって接続した液晶プロジェクターからスクリーンに投影します。Mac を使用する場合はミニ D-sub 15 ピン（オス）に接続するためのアダプタが必要です。
 - iii) 発表前の休憩時間中に必ず事前の試写を各会場にてお願いいたします。
 - iv) 発表者は、前の発表者が討論に入るまでにパソコンを起動しておいてください。プロジェクターのケーブルとの接続は会場の担当者が指示します。
 - v) プレゼンテーションに使用するソフトは自由ですが、トラブルの際に会場で対応可能なソフトは Microsoft 社の PowerPoint のみになります。
 - vi) 持ち込みのパソコンにトラブルが生じた場合のため、USB メモリにデータを保存したものををお持ちください。ファイルを会場備え付けのパソコン（Windows XP－Office2003）に移して投影します。PowerPoint2007、2013 等をお使いの場合は、念のため 2003 の形式でも保存しておいてください。
 - b. ポスター発表は神山ホールロビーにて以下の通りに行います。
 - i) ポスターを貼る部分の大きさは横 1189 mm × 縦 841 mm（A0 横）です。ご自身の演題番号のパネルにポスターを貼り付けてください。貼付に必要なテープと発表者リボンを受付でお渡しします。
 - ii) ポスター掲示は 13 時 00 分までにお済ませください。また、ポスターは 15 時 30 分までは掲示し、撤去は 16 時 30 分までに行ってください。
5. 12 時 10 分から 13 時 00 分まで、14 号館 1 階セミナー室（14113）において近畿支部評議員会を開催します。当日、受付に案内を掲示しますので、評議員の方は御確認の上、お集まりください。
6. 昼食は並楽館 3 階『LIBRE』、神山ホール 4 階『ふるさと』などを御利用ください。
7. 懇親会を 18 時 30 分より神山ホール 4 階『ふるさと』で行います。奮って御参加ください。会費は 4,000 円（学生無料）です。当日受付もあります。
8. 大学の建物内は全面禁煙ですので、御協力をお願いします。

第 61 回 日本生化学会近畿支部例会 プログラム

日時： 2014 年 5 月 17 日（土）9 時 00 分より

場所： 京都産業大学神山ホール、図書館ホール、他
〒603-8555 京都市北区上賀茂本山

HP アドレス： http://www.cc.kyoto-su.ac.jp/~mse/seolab_hp/2014reikai/home.html

参加費： 無料 懇親会費 4,000 円（学生無料）

【プログラム概要】

08:30 - 例会受付

09:00 - 09:10 開会の挨拶

09:10 - 09:55 山科郁男先生追悼講演（神山ホール/メインホール）

川寄敏祐教授（立命館大学 総合科学技術研究機構）

『山科郁男先生のご業績を偲んで-糖質化学から糖鎖生物学へ-』

10:00 - 12:00 一般講演

A 会場：神山ホール 3 階 第 1 セミナー室 A1-01 ~ A-09

B 会場：神山ホール 3 階 第 2 セミナー室 B1-01 ~ B-09

C 会場：図書館ホール C1-01 ~ C-09

D 会場：15 号館 1 階セミナー室(15102) D1-01 ~ D-09

12:00 - 13:10 昼食（**12:10 - 13:00** 14 号館 1 階会議室(14113) にて近畿支部評議員会）

13:10 - 14:41 一般講演

A 会場：神山ホール 3 階 第 1 セミナー室 A2-10 ~ A-16

B 会場：神山ホール 3 階 第 2 セミナー室 B2-10 ~ B-16

C 会場：図書館ホール C2-10 ~ C-16

D 会場：15 号館 1 階セミナー室(15102) D2-10 ~ D-15

14:41 - 15:30 ポスター発表 神山ホールロビー

15:30 - 17:30 シンポジウム（神山ホール/メインホール）

『生化学の実用化と社会への還元』

15:30 - 16:10 高島 成二（大阪大学 医学研究科・医化学）

「ATP 代謝の能動的制御」

16:10 - 16:50 酒井 敏行（京都府立医科大学 大学院医学研究科・分子標的癌予防医学）

「RB 再活性化スクリーニングによる trametinib の発見」

16:50 - 17:30 曾我 朋義（慶應義塾大学 先端生命科学研究所）

「メタボロミクスによるがんの代謝研究」

17:30 - 18:30 特別講演（神山ホール/メインホール）

吉川 正明（生命開発研究所）

『タンパク質に潜在する生理活性ペプチドの多様性とその利用』

18:30 - 20:00 懇親会（神山ホール 4 階ふるさと）

交通アクセス

【JR 京都駅、阪急烏丸駅から】

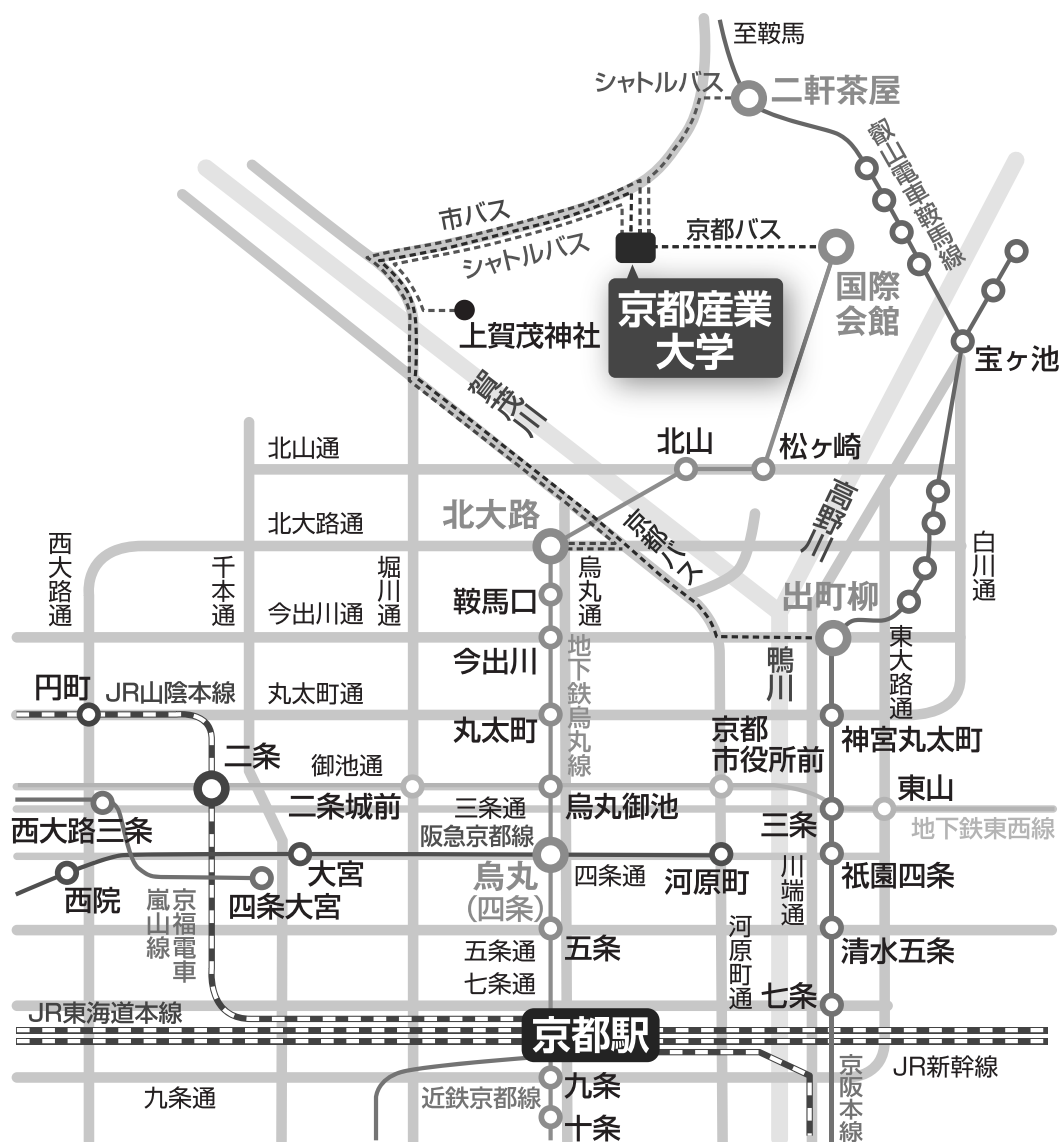
地下鉄で「国際会館駅」下車→京都バス（40 系統）で京都産業大学前下車

地下鉄で「北大路駅」下車→市バス（北 3 号系統）または京都バスで京都産大前下車

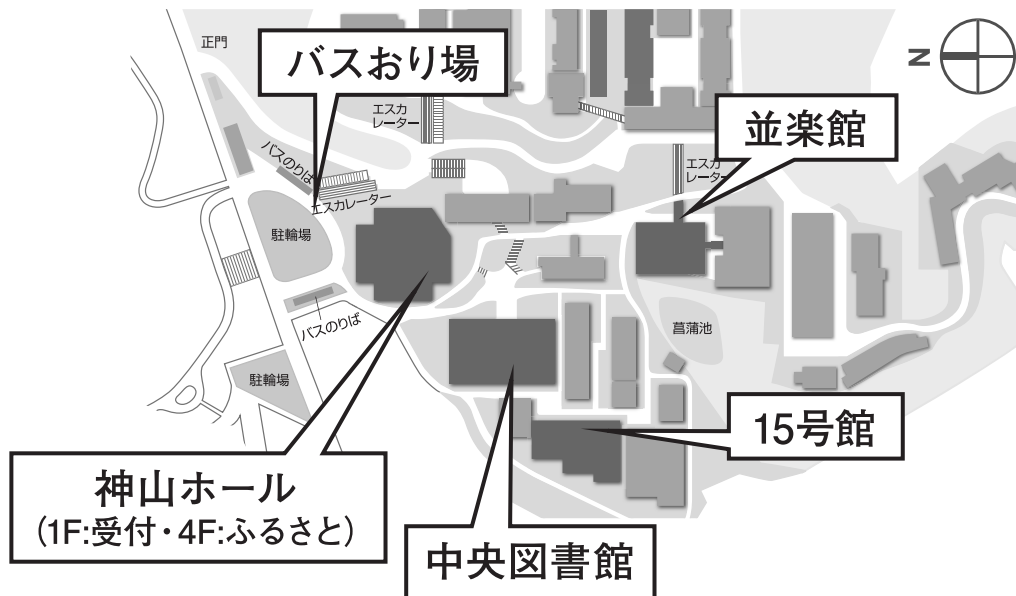
【京阪出町柳から】

叡山電鉄（鞍馬線）で二軒茶屋駅下車→徒歩 10 分

京都バス（広河原 32・静原・城山 34・市原 35・京都産業大学 急行 36）で京都産業大学前下車

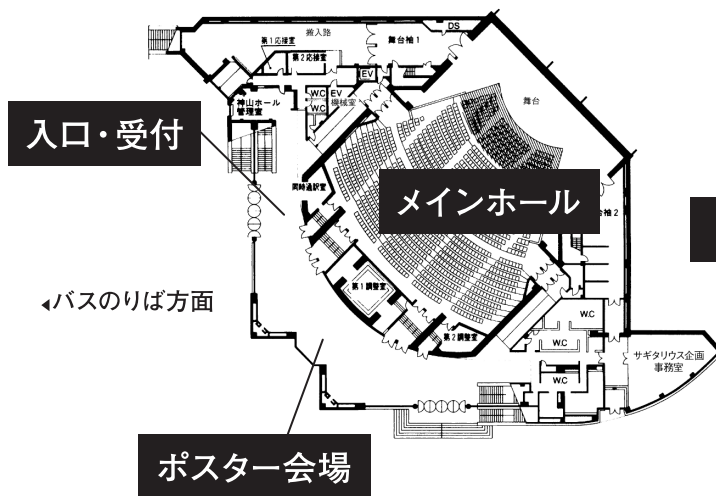


会場案内

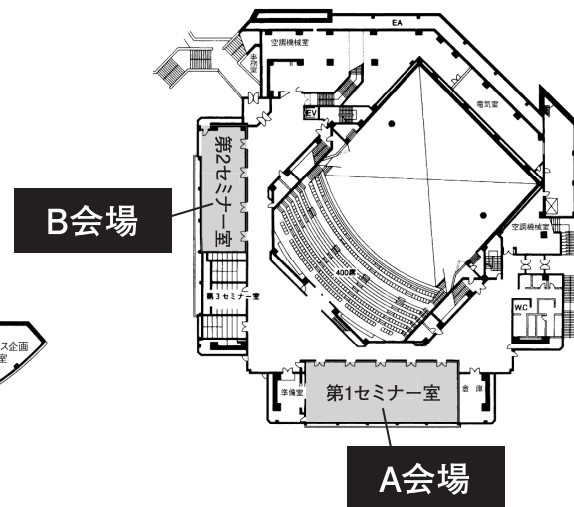


フロアマップ

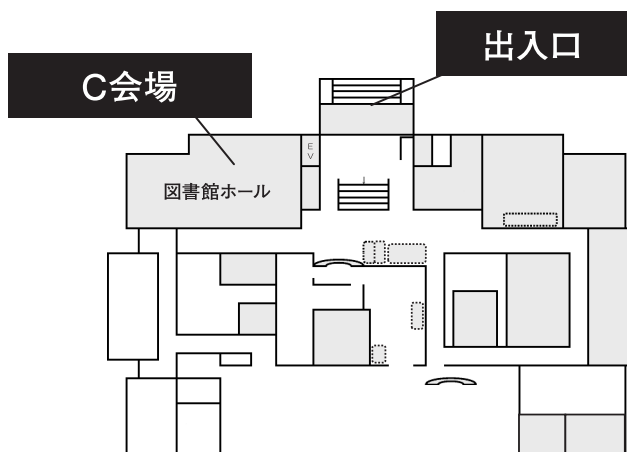
神山ホール1F



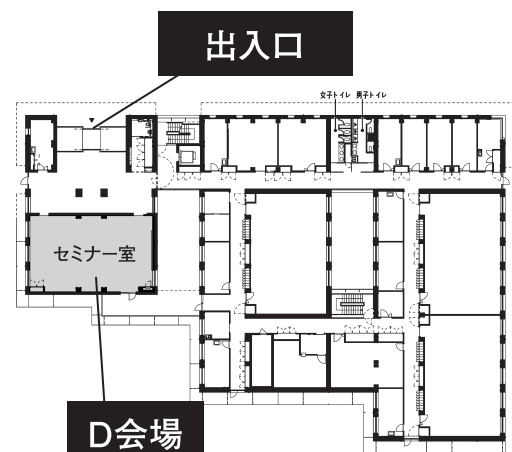
神山ホール3F



中央図書館



15号館



開会の挨拶					
山科郁男先生追悼講演 (神山ホール-メインホール)					
一般講演					
セッション	A会場(神山ホール第1会議室)	B会場(神山ホール第2会議室)	C会場(図書館ホール)	D会場(15号館セミナー室)	
	酵素・タンパク質・構造 1	がん・疾患 1	シグナル伝達 転写制御 1	細胞生物学・バイオテクノロジー 1	
1 10:00~10:13	がん抑制因子NAP-22のミリスチル化によるタンパク質間相互作用の制御 ○本田 忠誠, 菊池 佑一, 中村 正彦, 松原 守 京都学園大・バイオ環境・分子生物	The roles of estrogen on canine mammary gland tumors: Clinical diagnosis and treatment ○Waraphan Tonitil^{1,2}, Shimizu Akiol¹, and Misuzu Seol¹ 1Department of Biotechnology, Division of Engineering, Kyoto Sangyo University, 2Department of Preclinic and Applied Animal Science, Mahidol University, Thailand	初代培養肝細胞における一酸化窒素誘導に対するグアヤク脂成分の効果 ○中野 由希^{1,2}, 亀岡 寛史¹, 那須 正彰², 松尾 洋孝², 加納 麻奈¹, 吉開 会美¹, 西澤 幹雄¹, 池谷 幸信² 1立命館大・生命科学・医化, 2立命館大・薬・生薬	Low cytoplasmic pH reduces ER-Golgi trafficking and induces disassembly of the Golgi apparatus ○Jeerawat Soonthornsit¹, Nobuhiro Nakamura¹ 1Fael Life Sci, Kyoto Sangyo University	
2 10:13~10:26	カルモジュリン由来ペプチドヘドリックス-ループ-ヘリックスペプチド(HLH3, HLH4)の相互作用様式の解明 ○奥 彰彦, 武内 敏秀, 能代 大輔, 今西 未来, 二本 史朗 京都大学化学研究所	Increased expression of the ladybird homocobx 1 cause scoliosis in zebrafish mimicking human adolescent idiopathic scoliosis and congenital scoliosis ○郭 龍¹, 山下 寛¹, 黄 郁代³, 滝本 晶¹, 安達 泰治⁴, 開 祐司¹, 池川 志郎³, 宿南 知佐^{1,2} 1京都大・再生医科学研究所・生体分子設計学, 2広島大・院医歯薬保・生体分子機能学, 3理化研・統合生命医科学研究センター・骨関節疾患研究チーム, 4京都大・再生医科学研究所・チノ再生医工学研究センター・バイオメカニクス研究領域	植物病原菌Burkholderia plantariiにおけるファイトキシントロポロン生産制御ネットワーク 吉岡 誠訓¹, ○三輪 瞬平¹, 紀平 絵梨¹, 仲曾根 薫², 五十嵐 雅之³, 波多野 和樹³, 吉川 博文^{4,5}, 兼崎 友⁵, 江口 陽子¹, 内海 龍太郎¹ 1近大院農バイオ, 2近大工, 3微化研, 4東京農大応生化バイオ, 5東京農大ゲノム解析セ	YidCによるタンパク質膜組込機構 ○千葉 志信¹, 熊崎 薫², 塚崎 智也³, 濡木 理², 伊藤 維昭¹ 1京産大・総合生命, 2東大・院理・生物, 3奈良先端・院バイオ	
3 10:26~10:39	金属還元細菌 Geobacter sulfurreducensのマルチヘムセレンタンパク質および関連タンパク質群の解析 ○鳥本 奈々¹, 谷 泰史^{1,2}, 杉山 慧¹, 斎藤 茂樹^{1,2}, 田島 寛隆^{1,2}, 三原 久明¹ 1立命館大・生命科学・生物工, 2立命館大・R-GIRO	がん幹細胞のヒアルロン酸依存的増幅における上皮下間葉移行シグナルの解析 ○望月 信利¹, チャンミー シーラウット², オントン パーワレツ³, 板野直樹^{1,2,3} 1京産大・総合生命, 2京産大・先端研, 3京産大院・工	アオジソに含まれる一酸化窒素産生を抑制する成分に関する研究 ○難波 真由里^{1,2}, 長谷川 千紘², 松尾 洋孝², 吉開 会美¹, 西澤 幹雄¹, 池谷 幸信² 1立命館大・生命科学・医化, 2立命館大・薬・生薬	酸性pHにおけるStreptococcus mutans F型H+-ATPaseのH+輸送 ○佐々木 由香¹, 吉岡 拓哉¹, 前田 正知², 岩本(木原) 昌子¹ 1長浜バイオ大・バイオサイエンス, 2岩手医科大・薬	

4	10:39~10:52	魚類TRPA1の機能解析 ○織田 麻衣1, 黒木 麻湖1, 久保 義弘2, 齋藤 修1 1長浜バイオ大・院・動物分子生物学, 2生 理研・神経機能素子	VEGF-Aはその受容体NRP1の細胞内領域 とGPC1/Syとの複合体形成を促進し RhoAの活性化を介してがん細胞の増殖と 浸潤を誘導する ○吉田 亜佑美1, 清水 昭男2,3, 門之園 哲哉4, 近藤 科江4, Michael Klagsbrun2, 瀬 尾 美鈴1,3 1京産大・院工・生物工学, 2Vascular Biology Program, Children's Hospital Boston, Harvard Medical School, 3京産大・ 総合生命・生命システム, 4東工大・生命理 工学	Study of a cellular signaling network stimulated with leucine transported by a cancer-type amino acid transporter LAT1. ○Pornpam Kongprach1, Pattama Wiriwasernkul1, Noriyoshi Isozumil, Printip Wongthail1, Suguru Okudal1, Kenjiro Tadagakil1, Ryuichi Ohgakil1, Shushi Nagamoril1, Yoshikatsu Kanail 1 Biosystem Pharmacology, Department of Pharmacology, Graduate School of Medicine, Osaka University	各種乳酸菌の糖脂質の構造的特徴と 抗原性 ○南 領将, 谷河 みなみ, 柊田 尚也, 伊藤 伶芳, 田中 京子, 青木 大輔, 岩森 正男 近畿大・理工・生命・慶應大・医・産婦
5	10:52~11:05	卵白アルブミン分泌シグナルペプチド によるコラーゲンゲルの物性制御 ○成田 侑祐里1, 半田 明弘2, 田中 直毅1 1京工繊大院, 2キュービー(株)技術研	Anosmin-1が血管内皮細胞に及ぼす 生理作用とその受容体の解明 ○近藤 真菜美1, 清水 昭男2, 浅野 弘嗣2, 瀬尾 美鈴1,2 1京産大大学院・生命科学, 2京産大・総合 生命・生命システム	甘草の成分による一酸化窒素産生誘導の 抑制 ○種本 龍之亮1,2, 吉開 会美1, 松尾 洋孝 2, 池谷 幸信2, 西澤 幹雄1 1立命館大・生命科学・医化, 2立命館大・ 薬・生薬	抗体結合型核酸ドラッグの開発と 機能評価 山吉 麻子1, ○岸本 祐典1, 田村 理恵2, 村松 千愛2, 小堀 哲生1, 芦原 英司2, 村上 章1 1京工繊大院工芸科学・2京産大生命薬科 学
6	11:05~11:18	ゴルジマトリックスタンパク質GMI30の 構造解析 ○石田 竜一1, 中村 暢宏1 1京産大・総合生命・生命システム	もやもや病関連タンパク質mysterinによる zebrafishの発生制御 ○小谷 友理1, 森戸 大介1, 山崎 悟2, 山田 健太3, 高島 成二4, 平田 晋三3, 永田 和宏1 1京都産大・総合生命, 2国立循環器病 センター, 3国立遺伝研, 4大阪大・院生命 機能	初代培養肝細胞における一酸化窒素誘導 に対する防風およびその成分の効果 ○下倉 敏裕1, 神野 拓也1,2, 吉開 会美1, 池谷 幸信2, 西澤 幹雄1 1立命館大・生命科学・医化, 2立命館大・ 薬・生薬	5'末端塩基非依存的TALEタンパク質の 創製 ○辻 将吾, 今西 未来, 二木 史朗 京大・化研
7	11:18~11:31	大腸菌コネクターSafAによるセンサー PhoOの構造変化 ○吉谷 亘平, 江口 陽子, 石井 英治, 内海 龍太郎 近畿大院・農・バイオ	RAGE, receptor of advanced glycation endoproducts, negatively regulates chondrocytes differentiation. ○高倉 祐希, 岩井 敬祐, 西村 春香, 中澤 世莉子, 田邊 甫樹, 藤田 隆司 1立命館大・薬・分子薬効毒理学	脂肪肝形成に対する経口性IVA型 ホスホリバーゼA2阻害剤の抑制効果 ○金井 志帆, 倉井 悠貴, 古庄 由佳, 西川 瑞稀, 石原 慶一, 秋葉 聡 京都薬大	HEXIMI タンパク質に対して特異的 結合能を示す RNAモチーフの探索と 新規転写阻害剤としての応用 山吉 麻子, ○吉本 航大, 岸本 恭介, 小堀 哲生, 村上 章 京工繊大院工芸科学

8	11:31~11:44	モヤモヤ病タンパク質ミスレリンの構造と機能 ○森戸 大介 ¹ , 西川 幸希 ² , 山崎 悟 ³ , 寶関 淳 ⁴ , 北村 朗 ⁵ , 小谷 友理 ¹ , 金城 政孝 ⁵ , 高島 成二 ⁶ , 藤吉 好則 ² , 永田 和宏 ² 1京産大・総合生命, 2名大・CeSPI, 3国立循環器病セ, 4京大・院農, 5北大・院先端生命, 6阪大・院医	細胞凝集塊を誘導するコラーゲンの骨再生促進能の評価 ○國井 沙織 ¹ , 山本 衛 ² , 伊藤 浩行 ² , 平岡 陽介 ³ , 森本 康一 ¹ 1近畿大・生物理工・遺伝子工, 2近畿大・生物理工・医用工, 2新田セラチン(株)	B細胞抗原受容体シグナル伝達におけるスフィンゴ糖脂質CD77の機能解析 ○湯浅 大史 ^{1,2} , 濱野 久美子 ^{1,2} , 関 亮祐 ¹ , 岡 昌吾 ¹ , 竹松 弘 ¹ 1京大・院医, 2京大・院生命	RISC 機能の制御を目指したペプチドコンジュゲート核酸の開発 山吉 麻子, ○榮森 奈緒, 有吉 純平, 小堀 哲生, 村上 章 京工繊大院工芸科学
9	11:44~11:57	バクテリア蛋白質における翻訳後修飾部位の立体構造的解析 ○増井 良治 ¹ , Kwang Kim ¹ , 高畑 良雄 ¹ , 岡西 広樹 ¹ , 井上 真男 ¹ , 飯尾 洋太 ¹ , 中川 紀子 ¹ , 田良 敬 ^{2,3,4} , 倉光 成紀 ¹ 1阪大・院理, 2お茶の水女子大・人間文化創成科学, 3お茶の水女子大・生命情報科学研究センター, 4国立遺伝学研究所	SMN is essential for the HDAC6 mediated tubulin-deacetylation in fibroblasts ○Dian Kesumapramudya Nurputra ¹ , Hiroyuki Morita ² , Hisahide Nishio ¹ , Yumi Tohyama ² 1神大・院医・疫学, 2姫路獨協・薬・生化	コンドロイチン硫酸受容体を介した神経細胞の極性形成過程の制御機構の解析 ○志田 美春 ¹ , 友廣 彩夏 ¹ , 三上 雅久 ¹ , 田村 純一 ² , 北川 裕之 ¹ 1神戸薬大・生化, 2鳥取大・地域	抗原を担持させたペプチドナノファイバーの細胞取り込みにおけるサイズ効果 ○和久 友則, 川端 一史, 功刀 滋, 田中 直毅 京工繊大院・工芸科学
屋休憩・評議員会 (14号館14113会議室: 12:10-13:00)					
セッション	12:00~13:10	A会場(神山ホール第1会議室)	B会場(神山ホール第2会議室)	C会場(図書館ホール)	D会場(15号館セミナー室)
		酵素・タンパク質・構造 2	がん・疾患 2	シグナル伝達・転写制御 2	細胞生物学・バイオテクノロジー 2
10	13:10~13:23	ウエルシュ菌毒素 Ia による actin の ADP/リボシル化機構 ○鶴村 俊治, 津守 耶良, 秋 浩, 津下 英明 京産・総合生命	MUC1によるuPAの発現誘導及び悪性化機構 ○森 勇伍 ¹ , 秋田 薫 ¹ , 八代 正和 ² , 澤田 鉄二 ² , 平山 弘 ² , 中田 博 ¹ 1京産大・総合生命・生命システム, 2大阪市大・院医・腫瘍外科	ゼブラフィッシュ Chn1 遺伝子の軟骨特異的な発現を制御するシスエレメントの同定 ○山下 寛 ¹ , 宿南 知佐 ^{1, 2} , 開 祐司 ¹ 1京都大・再生医学研究所・生体分子設計学, 2広島大・院医歯薬保・生体分子機能学	Enzymatic properties and subcellular localization of 1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase responsible for synthesis of EPA-containing phospholipids in <i>Shewanella livingstonensis</i> Ac10. OCHO Hyun-Nam, KAWAMOTO Jun, KURIHARA Tatsuo Institute for Chemical Research, Kyoto University

11	13:23~13:36	Dye-decolorizing peroxidaseの触媒サイクルと基質結合部位 ○吉田 徹1, 津下 英明1, 久堀 徹2, 菅野 靖史3 1京産大・総合生命, 2東工大・資源研, 3日本女子大・理学	膜結合型ムチンMUC1とシアル酸結合レクチン Siglec-9 の結合は MUC1 とβ-cateninの相互作用および細胞増殖を促進する 谷田 周平1, ○秋田 薫1, 石田 有希子1, 森 勇伍1, 戸田 宗豊1, 井上 瑞江1, 太田 麻利子1, 八代 正和2, 澤田 鉄二2, 平川 弘2, 中田 博1 1京産大・総合生命・生命システム, 2大阪市大・院医・腫瘍外科	糖尿病性神経因性疼痛における脊髄後角の一酸化窒素産生と治療薬の効果 ○大野 華奈1, 安永 俊之2, 芦高 恵美子1,3 1大阪工大・院工・生体医工, 2大阪工大・工・生体医工, 3大阪工大・工・生命工学	好中球様に分化したヒト白血病細胞株 HL 60におけるピメンチンの機能の検討 ○山口 博文1, 森田 寛之1, 綾部 圭一郎1, 岡本 秀一郎2, 通山 由美1 1姫路獨協大・薬・生化, 2川崎医大・検査診断
12	13:36~13:49	リポフラビン光増感剤とする反応溶液中に生成される種々の脂質由来ラジカルの検出及び同定 ○西濱 菜緒, 岩橋 秀夫 和医大・院医・生体分子解析学	ナルディライジンによるアロディニア発症に關与するシグナル伝達機構の解明 ○川端 健太1, 西村 勇武2, 寺内 祥子3, 南 敏明4, 伊藤 誠二5, 芦高 恵美子1,2,3 1大阪工大・院工・生体医工, 2大阪工大・工・生体医工, 3大阪工大・工・生命工学 4大阪医大・麻酔, 5関西医大・医化学	ノセブチンによるアロディニア発症に關与するシグナル伝達機構の解明 ○川端 健太1, 西村 勇武2, 寺内 祥子3, 南 敏明4, 伊藤 誠二5, 芦高 恵美子1,2,3 1大阪工大・院工・生体医工, 2大阪工大・工・生体医工, 3大阪工大・工・生命工学 4大阪医大・麻酔, 5関西医大・医化学	膜ベータ細胞の還元剤によるERストレスとインスリン生成に対する影響 ○田畑 翔太郎1, 池崎 みどり1, 井内 陽子1, 松井 仁淑1, 井原 義人1 1和歌山県医大・医・生化
13	13:49~14:02	サーモライジンの安定性における315位のアミノ酸残基の役割 ○兒島 憲二, 中田 博己, 井上 國世 京大院・農・食生科	ナルディライジンはPGC-1αを制御することで体温恒常性維持機構と適応熱産生を調節する ○西城 さやか1, 平岡 義範1, 松岡 龍彦1, 大野 美紀子1, 西 清人1, 西 英一郎1 1京大・院医・循内	出生前後のマウス網膜を用いた遺伝子の発現解析のための相対定量PCR法の確立 ○足立 博子1, 富永 洋之1, 丸山 悠子2, 米田 一仁2, 丸山 和一3, 中野 正和1, 木下 茂2, 田代 啓1 1京府医大・院医・ゲノム医科学, 2視覚機能再生外科学, 3東北大・院医・眼科学	ヒト因子由来再構成型タンパク質合成システムの開発と応用 ○町田 幸大, 今高 寛晃 兵庫県立大・院工
14	14:02~14:15	抗体を用いた膜タンパク質の結晶化 ○名倉 淑子1, 小笠原 諭2, 田辺 幹雄3, 野村 紀通1, 岩田 昶1 1京都大・院医, 2東北大・院医, 3マルティン・ルター大・HALOmem	腎尿濃縮調節におけるMoesinの役割の解明 ○川口 高徳1, 波多野 亮1, 田村 淳2, 月田 早智子2, 浅野 真司1 1立命館大・薬, 2阪大・院生命機能	Homogeneous Fluorescence Assay による選択的スプラッシングの解析 村上 章, ○中嶋 廣介, 川合 雅幸, 古山 紘太, 山吉 麻子, 小堀 哲生 京工繊大学院工芸科学	Transport mechanisms of 4-boronophenylalanine as a 10B carrier of boron neutron capture therapy for cancers ○Printip Wongthail, Kohei Hagiwara1, Yurika Miyoshi2, Pattama Wiriyasermkul1, Pornparn Kongprachal1, Isozumi Noriyoshi1, Ryuichi Ohgaki1, Kenjiro Tadagaki1, Kenji Hamase2, Shushi Nagamori1, Yoshikatsu Kanai1 1Division of Bio-system Pharmacology, Department of Pharmacology, Graduate School of Medicine, Osaka University, 2Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University

15	14:15~14:28	アンジオテンシンタイプ2受容体とその特異的抗体を用いた共結晶化 ○浅田 秀基¹, 白石 充典², 岩成 宏子³, 植村 智子¹, 辻本 浩一¹, 新井 修³, 島村 達郎¹, 稲上 正⁴, 浜窪 隆雄³, 小林 祐也¹, 岩田 想¹ ¹京都大学大学院 医学研究科 分子細胞情報学²九州大学大学院 薬学研究院 蛋白質創薬学分野³東京大学 先端科学技術研究センター 計量生物医学⁴米国バーンビルト大学医学部生化学教室	Hsp47欠損は肝星細胞で小胞体ストレス依存的なアポトーシスを引き起こす ○川崎 邦人^{1,2}, 潮田 亮¹, 伊藤 進也^{1,2}, 池田 一雄³, 真砂 有作^{1,2}, 永田 和宏¹ ¹京産大・総生・生シ,²京大・院理・生物,³阪市大・医・解剖	Splicing transitions of the anchoring protein ENH during striated muscle development ○Jumpei Ito¹, Shun'ichi Kuroda¹, Koichi Takimoto², Andrés D. Maturana¹ ¹ Grad. Sch. Bioagri. Sci., Nagoya Univ.² Dep. Bioeng., Nagaoka Univ. of Tech.	光分解性保護基を導入した架橋性核酸の細胞内活性評価 小堀 哲生, ○中田 有紀, 杉原 悠太, 山吉 麻子, 村上 章 京工繊大院工芸科学
16	14:28~14:41	トレオニン合成酵素の触媒反応前半部分の反応機構解析 ○町田 康博¹, 村川 武志², 庄司 光男³, 林 秀行¹ ¹大阪医大・医・化,²大阪医大・医・生, ³筑波大・数物系	O-linked N-Acetyl Glucosamine (O-GlcNAc)は睡眠時無呼吸症候群で観察される間欠的低酸素下でオートファジーを亢進し、且つ酸化ストレスを抑制する。 ○中川 孝俊¹, 佐々木 泉响², 渡辺 明², 古川 裕一², 野村 篤生², 上橋 和佳², 加藤 隆児², 井尻 好雄², 林 哲也², 朝日 通雄¹ ¹大医大・医・薬理学,²大薬大・循環病態治療学	M視物質遺伝子のL型エキソン2はM視物質の発現量を減少させる ○上山 久雄¹, 村木 早苗², 田邊 詔子³, 山出 新一², 扇田 久和¹ ¹滋賀医大・生化学・分子生物学,²滋賀医大・眼科,³視覚研究所	
	14:41~15:30	ポスター発表 (神山ホール-ロビー)			
	15:30~17:30	シンポジウム (神山ホール-メインホール)			
	17:30~18:30	特別講演 (神山ホール-メインホール)			
	18:30~20:00	懇親会 (神山ホール4階-ラウンジふさと)			

座長リスト

特別講演

二木 史朗（京都大学 化学研究所）

山科郁男先生追悼講演

中田 博（京都産業大学 総合生命科学部）

シンポジウム

中村 暢宏（京都産業大学 総合生命科学部）

板野 直樹（京都産業大学 総合生命科学部）

津下 英明（京都産業大学 総合生命科学部）

一般講演

A 会場

午前 増井 良治（大阪大学 大学院理学研究科）

松原 守（京都学園大学 バイオ環境学部）

午後 林 秀行（大阪医科大学 化学教室）

鶴村 俊治（京都産業大学 総合生命科学部）

B 会場

午前 岡 正啓（独立行政法人 医薬基盤研究所）

開 祐司（京都大学 再生医科学研究所）

午後 浅野 真司（立命館大学 薬学部）

秋田 薫（京都産業大学 総合生命科学部）

C 会場

午前 芦高 恵美子（大阪工業大学 大学院工学研究科）

扇田 久和（滋賀医科大学 分子病態生化学）

午後 西澤 幹雄（立命館大学 生命科学部）

今西 未来（京都大学 化学研究所）

D 会場

午前 村上 章（京都工芸繊維大学 大学院工芸科学研究科）

千葉 志信（京都産業大学 総合生命科学部）

午後 北川 裕之（神戸薬科大学 生化学研究室）

通山 由美（姫路獨協大学 薬学部）

特別講演要旨

タンパク質に潜在する生理活性ペプチド –それらの意外な存在様式と多様性

吉川 正明

(財)生産開発科学研究所、京都大学名誉教授

特定の前駆体タンパク質のみから派生すると考えられていた生理活性ペプチドが、通常のタンパク質からも派生することが最初に見出されたのは、牛乳 β -カゼインに由来するオピオイドペプチド β -casomorphin の発見まで遡る(Brantl et al. 1979)。同年、小麦グルテン消化物がオピオイド活性を示すことが報告され、我々は3種類のオピオイドペプチドを単離構造決定した。これを機に、我々は食品をはじめとする各種タンパク質の消化物を探索の対象として選び、広範なアッセイ系を駆使することにより、動物のみならず植物タンパク質中にも、動物に作用する多様な生理活性ペプチド配列が潜在することを見出してきた。これらペプチドの一般的特性としては、内因性ペプチドと共通の多様なレセプターを介して作用し、作用は内因性ペプチドよりも小さいにも関わらず、経口投与で有効なものがある点である。動物由来のものについては合目的性が期待されるが、藻類から高等植物に至るまで、すべての植物に共通に含まれる Rubisco や、穀類、豆類等の貯蔵タンパク質中にも同様なペプチドが潜在し、これらに対するレセプターが動物に出現する遙か以前から存在してきたという事実は、合目的性とは関りなく、ある確率で生理活性配列が偶然にも存在し得ることを示唆している(天然ライブラリー仮説)。これらの中には、各種生活習慣病の予防に有効なものも見られる。以下では、これらペプチドに関する新しい構造-活性相関、強力誘導体の設計ならびに遺伝子変作物での生産、さらには、当初は予想しなかった成果として、内因性生理活性ペプチドにも共通する新しい生理作用、および情報伝達経路の発見について述べる。

表 1. 天然タンパク質から派生する生理活性ペプチド

Peptides	Precursors	Receptors	Post-receptor transduction
systems			
オピオイドペプチド			
YFPFGPI	(β -casomorphin)	β -casein	μ
YPFVE	(h β -casomorphin)	h β -casein	μ
YPFVV	(soymorphin)	β -conglycinin β	μ
YGGWL	(gluten exorphin A)	gluten	δ
GYYP	(gluten exorphin B)	gluten	δ
YPIISL	(gluten exorphin C)	gluten	δ
YPLDLF	(rubiscolin)	Rubisco	δ
回腸収縮ペプチド			
HIRL	(β -lactotensin)	β -lactoglobulin	NTS2-R
GYPMYPLPR	(oryzatensin)	rice albumin	C3a-R
YIPQYVLSR	(casoxin C)	κ -casein	C3a-R
AFKAWAVAR	(albutensin A)	HSA	C3a-R/C5a-R
FKDCHLAR	(lactomedin-1)	h lactoferrin	C5a-R
CFQWQR	(lactomedin-2)	h lactoferrin	OT-R
動脈弛緩ペプチド			
YVPFPPF	(casoxin D)	h α sl-casein	B ₁ -R
FRADHPFL	(ovokinin)	OVA	B ₁ -R
RADHPF	(ovokinin(2-7))	OVA	?
RPLKPW	(novokinin)	ovokinin deriv.	AT ₂
RIY	(parakinin)	rapeseed napin	ACE, ?
MRW	(rubimetide)	Rubisco	ACE, FPR2
ファゴサイトシス促進ペプチド			
MITLAIPVKNKGR	(soymetide)	β -conglycinin α'	FPR1
ACE 阻害ペプチド(多数)			
LRPVA	(lactopril)	lactoferrin	ACE

山科郁男先生追悼講演要旨

山科郁男先生のご業績を偲んで-糖質化学から糖鎖生物学へ-

川寄 敏祐

立命館大学

山科郁男先生が本年1月27日にご逝去されました。ご生前のご功績を偲び、謹んで哀悼の意を表します。

さて、山科郁男先生は、昭和38(1963)年7月、37歳の若さで金沢大学理学部より京都大学薬学部生物薬品化学講座（のちに 生物化学講座と改称）に、鈴木友二先生の後任として着任されました。その後の26年間京都大学薬学部において、1989年同大学を退職された後の7年間京都産業大学工学部において、日本を代表する糖鎖研究者として華々しいご活躍が続けられました。少しご経歴をさかのぼりますと、山科郁男先生は、昭和 23年3月東京大学理学部化学科（左右田徳郎研究室）をご卒業後、東京大学大学院、同助手、名古屋大学大学院を経て昭和28年7月にはスウェーデン、カロリンスカ研究所に留学、昭和 32 年に帰国し金沢大学理学部助教授に就任、やがて教授に昇進されています。カロリンスカ研究所では、山科先生は当時、世界の生化学の指導的立場にあった多くのスウェーデン学派の碩学と親交を結ばれ、生化学の本流であるタンパク質化学・酵素化学の研鑽をつまれ、後に自動ペプチドシーケンサーとして完成されていったEdman法による、フィブリノーゲン-フィブリン変換の機構、さらには酵素エンテロキナーゼによるトリプシノーゲンからトリプシンへの変換の機構の解明などの画期的成果をあげておられます。先生は、このとき十二指腸分泌液より精製した酵素エンテロキナーゼが45%に及ぶ糖含量を持つことに興味を持たれ、糖タンパク質の研究に進まれたと最近執筆された総説に述べておられます（1）。先生は糖タンパク質の概念すら確立してない黎明期から数十年間に渡る糖質研究を通し、終始、先見性に富んだ鋭い洞察力と厳密な実証主義を見事に一体化した研究を展開され、多くの偉大な業績を残されました。これらの研究は、先述の著書のなかで、(1) The basic structures of glycoproteins、(2) Characterization of membrane glycoproteins、(3) Sugar-directed and cancer-associated monoclonal antibodies としてまとめられています。いずれも、新しい時代を切り開く先端的な研究であり、ライフサイエンス全体に強いインパクトを与えました。これらのご業績に対し、昭和 63年には「細胞膜糖タンパク質の生化学的研究」により内藤記念科学振興賞を受賞されておられます。また、歴史の浅い薬学の生物系領域に本格的な生化学の研究・教育の伝統を築き上げられ、多くの優れた門下生を輩出されました。さらに、この間、日本生化学会会長、日本生化学会会頭、Journal of Biochemistry編集委員長、アジア・オセアニア・生化学分子生物学会連合(FAOBMB)の機関誌、Journal of Biochemistry、Molecular Biology and Biophysics (JBMBB)初代編集長、日本学術会議会員などの要職を務められ、わが国の基礎生命科学の発展に多大の貢献をなされました。

本講演では、糖質化学から糖鎖生物学へと時代をリードされた山科郁男先生の偉大なご業績を偲ぶと共に、その大樹の上に芽吹き、育っている門下生の研究成果についてもご紹介したいと思います。

(1) Ikuo Yamashina, The trail of my studies on glycoproteins from enterokinase to tumor markers, Proc.Jpn.Acad.Ser. B 86:578-587 (2010)

シンポジウム要旨

『生化学の実用化と社会への還元』

ATP 代謝の能動的制御

高島 成二

大阪大学医学研究科・医化学

我々の生体の恒常性維持には大量のエネルギーを必要とし、それは主に食物に含まれる自由エネルギーを、ATP に変換することによって効率的に行われている。ATP は解糖系およびミトコンドリアにおける酸化リン酸化によって大部分が産生される。体内における ATP の要求性は量的にも、時間的にもさまざまに変化するため複雑で巧妙な ATP 産生の調整系が存在することが予測される。

解糖系に関しては、代謝経路に関与する酵素が経路の途中で産生される基質によりフィードバック調節されているが、ミトコンドリアの酸化リン酸化の制御はより複雑で特徴的である。酸化リン酸化経路は解糖系のような直線的な酵素反応ではなく、水素から酸素へと流れる電子伝達のエネルギーをまずミトコンドリア内膜を挟んだプロトン勾配に変換する。次に、作成されたプロトン勾配により得られる位置エネルギーは、プロトンが内膜を通過する際に ATP 合成酵素ナノモーターの回転力に変換され ATP が産生される。電子伝達を含めたこれらの過程には実に 100 以上ものタンパク質が関与し、ATP の不足を感知した際には、電子伝達を素早く、もれなく上昇させる堅牢なシステムを構築している。

生体内で唯一酸素を消費するこのシステムは、嫌気性細菌より好気的細菌に進化した個体の寄生により誕生したとされているミトコンドリアの機能を進化的に考慮するうえでも大変興味深い。すなわち、細菌の電子伝達系に比べて、ミトコンドリアの電子伝達系ははるかに多くのタンパク質から構成されている。これらの新たに進化の過程で追加されたミトコンドリア酸化リン酸化タンパク質は、電子伝達系の堅牢性を維持し、電子が酸素に受け渡される過程が不完全に行われることを防ぐために構成されたと考えられる。それゆえにその機能を直接動的に制御する分子の存在は否定されてきた。しかし酵母のような下等生物からさらに脊椎動物のような閉鎖血管系を有する複雑な臓器複合体を形成する生物に進化する過程で、さらに酸化リン酸化の機能を制御する分子が誕生したことは十分想定される。そしてそれらはおそらく、高次機能を持つ臓器が低酸素等にさらされやすいという構造的特徴に起因する可能性が高い。

我々は、このミトコンドリアにおける堅牢な酸化リン酸化システムを動的に制御する分子を同定した。このクローニングには、ATP の産生を正確に評価するシステムの確立が必須であり、その過程において ATP 産生速度および ATP 利用度を生体内で測定することの重要性を見出した。そして本因子が、ATP 産生効率を上昇させ、臓器をエネルギー代謝不全から保護するために重要な働きをする脊椎動物特有の分子であることを見出した。

本講演では、新しい ATP イメージング法を使用した分子クローニング手法の紹介と、同定された分子の機能解析を通じて、ATP 産生増強剤の臨床応用も視野にいた最近の研究成果を紹介したい。

RB 再活性化スクリーニングによる trametinib の発見

酒井 敏行

京都府立医科大学大学院医学研究科分子標的癌予防医学

がん抑制遺伝子 RB は多くの悪性腫瘍で、特にタンパク質レベルで失活している。この点に着目し、RB に焦点を絞ったがんの予防、診断、治療に関するトランスレーショナルリサーチを行ってきた。その中で、「RB 再活性化スクリーニング」という独自の分子標的薬のスクリーニング系を考案し、製薬会社と共同で分子標的薬を見出してきた。

RB を活性化する CDK 阻害因子 p15 の発現を上昇させる薬剤スクリーニングを、JT 医薬総合研究所に提案し実行した結果、新規 MEK 阻害剤 trametinib を見出した。trametinib は、進行性 BRAF 変異メラノーマ患者を対象に、昨年5月に米国 FDA より認可された。さらに今年に入り、trametinib と BRAF 阻害剤 dabrafenib の同疾患に対する併用も米国 FDA により認可された。その結果、旧来の抗がん剤では、進行性 BRAF 変異メラノーマ患者に対する奏効率は約 5%であったのに対し、trametinib と dabrafenib を併用することにより奏効率は 76%にまで向上し、かつ完全奏効も 9%の患者に見られた。

これらの成果により、trametinib は British Pharmacological Society から、Drug Discovery of the Year に選ばれた。今回は、私の RB 再活性化スクリーニングから trametinib の発見に至った経緯に関して紹介したい。

メタボロミクスによるがんの代謝研究

曾我 朋義

慶應義塾大学先端生命科学研究所

近年、がんが特異的に示す代謝を標的とした抗がん剤が注目されており、がんの代謝を解明しようとする研究が精力的に行われている。

演者らは、キャピラリー電気泳動-質量分析計（CE-MS）を開発し、細胞内に数千種類存在する低分子代謝産物（メタボローム）の一斉分析を世界に先駆けて実現した[1,2]。現在この方法論を用いて、がんの代謝の全容解明を目指している。これまでに、CE-MS メタボロミクス法を各種のがん患者から採取した正常およびがん組織に応用し、がんで特異的に亢進している代謝経路を明らかにした[3]。また、Oxford 大との共同研究によって、がん抑制遺伝子であるフマル酸ヒドラターゼの変異によって蓄積したフマル酸が転写因子 NRF2 を安定化させて酸化ストレス防御遺伝子群を発現させたり[4]、クエン酸回路の酵素であるアコニターゼを阻害したり[5]、代謝産物に結合して尿素回路を阻害していること[6]などを見出した。本講演では、がんの代謝研究の基礎からメタボロミクスで得られた最新の知見を紹介したい。

参考文献*

1. Soga T. et al. J.Proteome Res. 2, 488-494, 2003.
2. Soga T. et al. J.Biol. Chem. 281, 16768-16776, 2006.
3. Hirayama A. et al. Cancer Res. 69, 4918-4925, 2009.
4. Adam J. et al. Cancer Cell 20, 524-537, 2011.
5. Ternette N. et al. Cell Rep. 3, 689-700, 2013.
6. Adam J. et al. Cell Rep. 3, 1440-1448, 2013.

一般講演要旨

A-1

がん抑制因子 NAP-22 のミリスチル化によるタンパク質間相互作用の制御

○本田 忠誠, 菊池 佑一, 中村 正彦, 松原 守
京都学園大・バイオ環境・分子生物

【目的】タンパク質のミリスチル化は重要なタンパク質脂質修飾の一つであり、がん遺伝子産物、ウイルスタンパク質、シグナル伝達系のタンパク質に多く見られ、これらの機能発現に必須である。これまでミリスチル化は主にタンパク質と細胞膜との結合に重要であることが知られているが、タンパク質間相互作用における役割についてはほとんど解明されていなかった。我々は、タンパク質間相互作用にミリスチル化が関わる例として神経突起形成に必要であり、最近ではがん抑制因子としても働いている NAP-22 とその標的タンパク質であるカルモジュリンとの相互作用を明らかにした。両者の複合体の X 線結晶構造解析から NAP-22 のミリスチル基を含む N 末端ドメインが、カルモジュリンの N 末端ドメインと C 末端ドメインによって形成される疎水性のトンネル構造の中央を貫通していることが分かった¹⁾。カルモジュリン以外にも NAP-22 とミリスチル化依存的に結合するタンパク質が存在すれば、ミリスチル化のタンパク質間相互作用における普遍性が増すものと考えられる。本研究では、タンパク質間相互作用におけるミリスチル化の生理的な役割を明らかにするために、NAP-22 とミリスチル化依存的に結合するタンパク質の解析を行った。

【方法】ミリスチル化された NAP-22 とミリスチル化されていない NAP-22 を大腸菌で発現（ミリスチル化 NAP-22 はミリスチル化転移酵素である NMT と共発現させる）、精製した後、それぞれを Affi-gel 15 に固定化させた。それぞれの NAP-22 を固定化したゲルとラット脳可溶性画分をインキュベートし、結合タンパク質画分を SDS-PAGE で分離し両者を比較した。ミリスチル化された NAP-22 だけに結合するタンパク質のバンドを切り出しトリプシン消化後、nano LC/MS/MS 解析し MASCOT サーチによりタンパク質の同定を行った。

【結果】ミリスチル化された NAP-22 およびミリスチル化されていない NAP-22 の両者ともに大腸菌で効率よく精製することができた。ミリスチル化された NAP-22 だけに結合するタンパク質の同定を行った結果、十数種類のタンパク質が見つかった。これらの中の一部には DDX5, HMGB1 など核内で働くタンパク質が存在した。現在、これらのタンパク質が NAP-22 とミリスチル化依存的に直接結合するかどうか、更には細胞内での局在や生理機能について検討中である。

【考察】カルモジュリン以外に NAP-22 とミリスチル化依存的に結合するタンパク質が見つかったことは、ミリスチル化がタンパク質間相互作用に深く関わっていることを示唆するものである。一方、最近になり NAP-22 のヒトホモログである BASP1 が核内に局在し、がん遺伝子である Myc や WT1 を抑えるがん抑制因子として働くことが報告されている²⁾。ミリスチル化依存的に NAP-22 と結合するタンパク質の中に核内の重要なタンパク質が発見されたことは、NAP-22 とこれらのタンパク質がミリスチル化によるタンパク質間相互作用を介して機能制御している可能性が考えられる。

【文献】

1. Matsubara, M., Nakatsu, T., Kato, H., Taniguchi, H. (2004) *EMBO J.* 23, 712–718
2. Toska, E., Campbell, H., Shandilya, J., Goodfellow, S., Shore, P., Medler, K., Roberts, S. (2012) *Cell Reports* 2, 1–8

A-2

カルモジュリン由来ペプチドヘリックスループ-ヘリックスペプチド(HLH3, HLH4)の 相互作用様式の解明

○奥 彰彦、武内 敏秀、能代 大輔、今西 未来、二木 史朗
京都大学化学研究所

【目的】カルモジュリンは、カルシウム結合タンパク質として細胞内における様々な生命活動に関わっている。カルモジュリンが持つ4つのヘリックスループ-ヘリックス領域がそれぞれカルシウムイオンと結合することで、構造変化が誘起され、細胞内の特定のタンパク質と結合できるようになることが知られている。最近の研究から、このカルモジュリンのN末端から3番目と4番目に対応するヘリックスループ-ヘリックスペプチド(HLH3、HLH4)同士が相互作用することが示唆されているが¹、その詳細については不明な点が多い。そこで本研究では、HLH3 と HLH4 の相互作用様式に関して情報を得ることを目的に実験を行った。

【方法】ペプチドの調製は Fmoc 式固相合成法により行った。HLH3 と HLH4 のカルシウムイオン応答性と会合能を調べるために、疎水性プローブである ANS (8-anilino-1-naphthalenesulfonic acid)を用いて蛍光の変化を測定した。また、HLH3 の C 末端側にシステインを導入したペプチド(HLH3-GC)、ならびに、HLH4 の N 末端と C 末端側にシステインを導入した CG-HLH4 と Ac-HLH4-GC をそれぞれ調製した。レドックスバッファー中でのジスルフィド架橋の優先性を検討することにより、両者の会合時における HLH3 の C 末端と HLH4 の N 末端あるいは C 末端とのトポロジーに関して情報を得た。

【結果】カルシウムイオンの存在下、HLH3 と HLH4 を混合すると ANS の蛍光強度の増大が観測された。一方、それぞれのペプチド単独の場合やカルシウムイオン非存在下では、蛍光強度に変化はなかった。このことから、カルシウムイオン存在下においてのみ HLH3 と HLH4 は疎水的相互作用を介してヘテロダイマーを形成することが示唆された。また、エネルギー的により安定な架橋構造を得ることが期待されるレドックスバッファー中では、HLH3-GC と CG-HLH4 との架橋体と、HLH3-GC と Ac-HLH4-GC との架橋体がほぼ同量生成した。HLH3 と HLH4 とのヘテロダイマー形成において準安定な会合状態が複数あるのかどうかに関しては今後さらに検討していきたい。また、HLH3 と HLH4 のアフィニティタグとしての可能性に関しても今後検討していきたい。

【文献】

1. Shuman, C.F., Jiji, R., Kerfeldt, K.S., Linse, S. (2006) *J. Mol. Biol.* 358, 870-881

金属還元細菌 *Geobacter sulfurreducens* のマルチヘムセレンタンパク質
および関連タンパク質群の解析

○ 寫本 奈々¹, 谷 泰史^{1,2}, 杉山 慧¹, 斎藤 茂樹^{1,2}, 田島 寛隆^{1,2}, 三原 久明¹

¹立命館大・生命科学・生物工, ²立命館大・R-GIRO

【目的】グラム陰性絶対嫌気性金属還元細菌 *Geobacter sulfurreducens* が有する 111 種の *c* 型シトクロム (Cyt *c*) 様タンパク質と 9 種のセレンタンパク質は、嫌氣的エネルギー代謝における電子伝達および金属還元に重要であると考えられている。我々はこれまでに、サブユニットあたり 5 つのヘム結合モチーフと 1 つのセレノシステイン残基をもつ、*Geobacter* 属に特有な Cyt *c* 様タンパク質 multiheme-containing selenoprotein (MHSEP) が本菌のペリプラズム間隙に局在することならびに、硫黄やモリブデン酸イオンにより発現誘導されることを見出してきた。*mhsep* 遺伝子 (*gsu2937_36*) は 10 個の ORF から成るオペロン様の遺伝子クラスター (*gsu2940-2930*) を形成しており、本クラスター内の ORF には電子伝達に関与する Cyt *c* や Cyt *b* のホモログやポリリン様タンパク質がコードされている。また、本クラスターの上流には LysR 型転写調節因子の遺伝子が存在する。そこで、本遺伝子クラスター上の 10 個の遺伝子がオペロンを形成し、LysR 型転写調節因子によって発現制御される可能性が考えられる。本研究では、*gsu2940-2930* の遺伝子群がオペロンを形成しているかを調べるとともに、MHSEP および本クラスター内遺伝子にコードされる他のタンパク質の細胞内局在解析を行った。

【方法】*mhsep* 遺伝子を含む 10 個の ORF からなる遺伝子クラスターがオペロンを形成するかを調べるために、硫黄により MHSEP 発現を誘導した *G. sulfurreducens* から total RNA を抽出し、RT-PCR 解析を行った。また、本オペロンの上流配列について転写開始点が存在する領域を RT-PCR 解析によって決定した。次に、タンパク質のシグナルペプチドを予測する PSORT 解析により、本クラスター内の各遺伝子にコードされるタンパク質の細胞内局在を予測した。さらに、細胞分画法によって菌体のタンパク質を細胞質画分、ペリプラズム画分、内膜画分、外膜画分に分画し、ウエスタンブロット法により細胞内局在を解析した。

【結果】RT-PCR 解析によって、*gsu2940-2930* がオペロンを形成していることが示唆された。また、*gsu2940* の上流 -98 塩基から -258 塩基の間の領域に転写開始点が存在することが推定された。PSORT 解析によってポリリン様タンパク質の GSU2939 は外膜、Cyt *c* 様タンパク質の MHSEP、GSU2935 および GSU2934 はペリプラズム間隙に局在すると予想された。実際に、細胞分画法とウエスタンブロット解析によって、GSU2939 は主に外膜に、MHSEP、GSU2935 および GSU2934 は主にペリプラズム間隙に局在することが示唆された。

【考察】本研究により、*gsu2940-2930* オペロンの上流にコードされる LysR 型転写調節因子が *gsu2940* の上流 -98 塩基から -289 塩基の近傍に結合する可能性が示唆された。また、PSORT による予測と細胞内局在解析の結果は一致していた。MHSEP と GSU2939、GSU2935 および GSU2934 はペリプラズム間隙で相互に作用していることも考えられるので、これらのタンパク質の相互作用解析が今後の研究課題である。

魚類 TRPA1 の機能解析

織田麻衣¹, 黒木麻湖¹, 久保義弘², 齊藤修¹¹長浜バイオ大・院・動物分子生物学, ²生理研・神経機能素子

【目的】TRPA1 は、6 回膜貫通領域を持つ陽イオンチャネルであり、N 末端に 16 個のアンキリンリピートを持ち、主に感覚神経に発現している¹⁾。哺乳類では、pH、低温(<17℃)、化学物質(マスタードオイルの辛味成分 AITC、コーヒーの苦味成分 *caffeine*、緑茶カテキンの渋味成分 EGCG、活性酸素種の H₂O₂)など様々な刺激によって活性化される。一方で、TRPA1 は同じ哺乳類でもヒトとマウスで *caffeine* に対する応答に違いがあることが知られ、温度については、鳥類以下の動物は高温で活性化されることが報告されている。これらのことから、様々な動物の多機能センサー TRPA1 は、食性や環境適応などの生存戦略によって機能変化してきたのではないかと考えられる。また、魚類の TRPA1 については、ゼブラフィッシュに 2 種類(zTRPA1a, zTRPA1b)、フグに 1 種類(fTRPA1)が存在する。zTRPA1 については、幼生の発現解析で a は迷走神経、b は三叉神経に発現していることから、成体で a は内臓、b は皮膚に発現していると考えられている²⁾が、魚類の TRPA1 について詳しい機能解析は行われていない。そこで、本研究では 3 種の魚類 TRPA1 の化学物質と温度(高温)に対する応答性について機能解析を行った。

【方法】マウス、ゼブラフィッシュ、フグの TRPA1 を HEK293T 細胞に発現させ、Ca²⁺ imaging により、各化学物質(AITC, *caffeine*, EGCG, H₂O₂)への応答を解析した。また、アフリカツメガエルの卵母細胞に各生物種の TRPA1 の cRNA をインジェクションし、二本刺し膜電位固定法により温度(高温)に対する応答について解析を行った。

【結果】化学物質については、zTRPA1a は AITC、*caffeine*、EGCG、H₂O₂ の 4 種の化学物質に応答した。一方、zTRPA1b と fTRPA1 は、*caffeine* に zTRPA1a と同程度の応答性を示したが、AITC と H₂O₂ には応答性が低く、さらに EGCG には全く応答しなかった。また温度感受性については、zTRPA1b と fTRPA1 が明らかな高温応答性を示したが、zTRPA1a は微弱であった。次に、zTRPA1 の化学物質と温度の感受性部位を探索するために、zTRPA1b の N 末端を持った zTRPA1a のキメラ(BA キメラ)を作成し、化学物質と温度に対する応答性を解析した。結果、BA キメラは、*caffeine* 以外の化学物質への応答性を失い、ある程度 of 高温応答性を獲得する傾向を示した。

【考察】以上の結果から、ゼブラフィッシュの 2 種の TRPA1 は、zTRPA1a が化学物質、b が温度に感受性が高く、それらは機能分担していると考えられること、一方フグの一種類しか存在しない fTRPA1 は zTRPA1a と b の中間的な性質を持つことが明らかになった。また、2 種の zTRPA1 の機能分担の多くが N 末端のアンキリンリピートに依存するものと考えられた。

【文献】

- 1) 沼田 朋大ら (2009) 生化学 64, 962-983.
- 2) Prober DA. et al. (2008) J. Neurosci. 28, 10102-10110

卵白アルブミン分泌シグナルペプチドによるコラーゲンゲルの物性制御

○成田佑祐里¹, 半田明弘², 田中直毅¹¹京工繊大院, ²キューピー (株) 技術研

【目的】OVAは分泌タンパク質であり、9-21の配列は細胞膜との相互作用に関与すると考えられている^[1]。OVAをpH4.0でペプシン処理することでN末端1-22残基を切断したpOVAを生成した。このpOVAは加熱により強度が弱いゲルを形成することが明らかとなっている。またOVA(1-22)の領域は、線維の凝集を促進させ凝集形態の変化を引き起こす働きがあり、この領域に対応する両親媒性ペプチドであるpN1-22(¹acetyl-GSIGAA SMEFCFDVFKELKVHH²²)はOVAおよびコラーゲンのゲル化を促進させる^[2]。本研究ではpN1-22のコラーゲンのゲルネットワークに対する影響を調査することでゲル物性の精密制御を目指す。



Figure 1. 3D structure of OVA.

【方法】OVAとp-OVAのゲルの強度を動的粘弾性測定を周波数変化により評価した。さらに、OVA、pOVA、ADH、ルシフェラーゼ、リゾチームの凝集について320 nmにおける濁度測定により評価した。またpN1-22とその断片であるpN9-22、pN10-16の3種類のペプチドを使用し、コラーゲンに対する影響を調査した。レオメーターを用いた粘弾性測定では粘弾性の経時変化を45分間測定した。また全反射蛍光顕微鏡(TIRF)観察を行い、5-iodo acetamide fluoresceine (5-IAF)により蛍光ラベル化したpN1-22を用いてコラーゲンゲルを作製し、励起光488 nmで観察した。コラーゲンゲルはコラーゲン(cellmatrix Type I-A) 3.0 mg/mLに対し、ペプチドを0.1 mMとなるよう100 mMリン酸緩衝液(pH7.5)中で混合し25°Cで1時間インキュベートすることで作製した。また同様のゲルを用いて動的光散乱(DLS)測定を行い拡散係数の値を比較した。さらにゲルの粘弾性の熱変化測定を行った。DLS測定と同様のゲルを作製した後、0.5 °C/minで50°Cまで加熱しながら粘弾性を測定した。

【結果】pOVAのゲル強度はOVAに比べて極めて低いことが明らかとなった。それぞれの蛋白質の濁度測定より、pN1-22は凝集を促進する働きがあることが明らかとなった。またコラーゲンにペプチドを添加したサンプルにおいてはpN1-22のみがペプチド濃度の増加に伴い濁度が上昇し続けた。このことよりpN1-22はコラーゲン線維の形成に対して顕著な影響を及ぼすことが明らかとなった。またペプチド添加によるコラーゲンのゲル化速度の変化調査する目的で弾性経時変化測定を行ったところ、pN1-22の添加により弾性の急激な上昇が見られたことから、pN1-22はゲル化速度を促進させる働きがあると考えられる。さらにコラーゲンゲル中におけるペプチドの挙動を観察するために行ったTIRF観察では、蛍光ラベル化したpN1-22が線維状に見られることが確認され、またペプチド添加によるゲルの網目構造変化を調べるために行ったDLS測定の結果、pN9-22、pN10-16に比べてpN1-22添加ゲルの拡散係数の上昇が顕著に見られた。

【考察】pN1-22は変性蛋白質の会合を促進し、蛋白質の凝集促進とゲルの強度を向上させる効果があると考えられる。またpN1-22はコラーゲン線維に対して相互作用を示し、ゲルネットワークに変化を与えることが示唆された。さらにゲルの熱安定性評価よりペプチド添加はゲルの熱安定性に影響を及ぼさず、ペプチドはコラーゲン分子の三重らせん構造に対しては関与していないことが示唆された。

【文献】

[1] Tabe, L. et al., J. Mol. Biol. 180, 645-666 (1984)

[2] Kawachi, Y. et al., J. Agric. Food Chem.. 61, 8868-8675 (2013)

ゴルジマトリックスタンパク質 GM130 の構造解析

○石田竜一¹, 中村暢宏¹¹京産大・総合生命・生命システム

【目的】ゴルジ体は、分泌タンパク質や膜タンパク質の修飾、仕分け、配送を行う重ゴルジ体は、分泌タンパク質や膜タンパク質の修飾、仕分け、配送を行う重要な細胞小器官である。ゴルジ体の構造は細胞周期や細胞運動、細胞極性の変化に伴ってダイナミックに制御されているが、その分子機構には不明の点が多く残されている。GM130 は、ゴルジ体のシス槽 (小胞体側) の膜表面に局在するタンパク質であり、ゴルジ体のダイナミクスの制御に大きな役割を果たしていると考えられている。また、GM130 は様々な因子群と複合体を形成する事で、ゴルジ体の構造維持やゴルジ体を介した小胞輸送の調節に関与している。例えば GRASP65 との結合はゴルジ層板の維持に、p115 や syntaxin5 との結合は小胞輸送の調節に、small GTPase、Rab1b はこれら複合体の制御に重要である。そこで、GM130 とこれら因子群が形成する複合体の構造や、会合-解離の制御機構を詳細に解析し、ゴルジ体ダイナミクスとの関係性を解明することを目的とし実験を行った。

【方法、結果】精製した GM130 を Blue Native PAGE によって解析したところ、SDS-PAGE の約 4 倍の分子量であることが明らかとなった。4 種類の異なるタグを融合させた GM130 を共発現させて精製したところ、複合体から 4 種類全てのタグが検出されたことから、GM130 が四量体を形成する事が確認された。次に様々な GM130 フラグメントを構築し共沈降実験と BN-PAGE 解析を行った結果、N 末端部位と C 末端部位は結合しないこと、また、N 末端部位は 2 または 4 量体、C 末端部位は 4 量体を形成することが明らかとなった。GM130 をネガティブ染色によって透過型顕微鏡で観察したところ、紐状の分子や片側が分岐した分子など様々な形態が観察された。次に、GM130 の N 末端及び C 末端の位置を特定するために、N 末端を金粒子で標識した GM130 を透過型電子顕微鏡解析にて観察したところ、金粒子は紐状の構造物の片側に、また分岐したその両末端に観察された。次に C 末端を特定するために、GM130 の C 末端に結合する GRASP65 を金粒子で標識しその複合体を観察した。その結果 GRASP65 は紐状分子の片側、または分岐構造の逆側の末端で観察された。

【考察】本研究では生化学的解析により GM130 が四量体を形成する事、また電子顕微鏡解析によりその構造を明らかにした。電子顕微鏡解析の結果から、GM130 が非常にフレキシブルな構造を有しており、多様な構造を形成する事が明らかとなった。また GM130 は N 末端側は分岐して開いたような構造、閉じて一本の紐状構造物となった構造をとる事が明らかとなった。これは GM130 の C 末端側の断片が四量体で検出されたのに対し、N 末端側の断片は四量体、または二量体の位置で検出された BN-PAGE の結果と一致している。これらの結果から、GM130 の N 末端側の構造変化が GM130 の機能の重要な役割を果たしている可能性が考えられる。

A-7

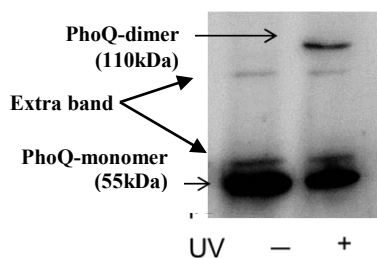
大腸菌コネクターSafA によるセンサーPhoQ の構造変化

○吉谷 亘平, 江口 陽子, 石井 英治, 内海 龍太郎

近畿大院・農・バイオ

【目的】我々は、大腸菌ゲノムに見出された 65aa からなる orphan 遺伝子、b1500 が 2 成分情報伝達機構 (TCS) EvgS (ヒスチジンキナーゼ, HK) / EvgA (レスポンスレギュレーター, RR) と PhoQ (HK) / PhoP (RR) 間を結ぶコネクター機能を有することを見出し、B1500 を SafA (Sensor Associating Factor A) と命名し、その機能解析を行ってきた (1)。SafA は EvgS/EvgA によって発現制御されており、発現された SafA が細胞膜にトランスロケーションされ、HK である PhoQ のセンサードメイン (SD) に作用することで PhoQ の自己リン酸化活性を向上させ、PhoQ/PhoP の情報伝達を活性化させる (2,3)。本研究では、*in vivo* 光架橋法を用い、大腸菌細胞内において、実際に SafA が PhoQ-SD 構造に与える影響を明らかにした。

【方法】PhoQ は、菌体内でダイマーを形成していることから SafA が作用した際、PhoQ-SD のダイマー境界面のヘリックスが一定の構造変化を生じることが予想された。本研究では、部位特異的 *in vivo* 光架橋法(4)を用い PhoQ-SD ダイマー境界面のヘリックスを構成する各アミノ酸(Asp45-Leu62)が架橋することで生じた PhoQ ダイマーバンドの形成率に及ぼす SafA の効果を評価した。すなわち、培地中に含ませた非天然アミノ (pBPA:p-benzoyl-phenylalanine) を、aminoacyl tRNA synthetase -tRNA_{CUA}により PhoQ の SD 内の各アミノ酸を部位特異的変異した終止コドン TAG に翻訳させることで pBPA 置換変異体を作製し、UV を照射後、



SDS-PAGE を行い、抗 PhoQ 抗体を用いて、pBPA と 3Å 以内の距離にあるアミノ酸が架橋形成したダイマーPhoQ の形成率 (図) を評価した。また、PhoQ ダイマー境界面を形成する各アミノ酸 (Asp45-Leu62) の pBPA 置換変異体において、SafA による PhoQ/PhoP 系の活性化が正常であることを確認するために、PhoQ/PhoP 制御下遺伝子 (*mgtA*) の発現量を β -galactosidase 活性を指標にしたレポーターアッセイをおこなった。

【結果】レポーターアッセイの結果、pBPA 置換 PhoQ は野生型 PhoQ と同等に SafA によって活性化されることが確認された。これらの pBPA 置換 PhoQ を保持した大腸菌において、SafA 発現下で培養した大腸菌液を用いて、UV 照射して、*in vivo* 光架橋反応を行った結果、架橋形成されたダイマーPhoQ の形成は、Lys46, Thr48, Phe49, Leu58 置換体において、抑制されたが、Leu52, Gly55 置換体において促進された。一方、PhoQ の Asp45, Thr47, Arg50, Leu51, Leu62 置換体では、SafA を発現しても、2 量体 PhoQ の形成に変化は見られなかった。

【考察】SafA を発現することにより、PhoQ の Lys46, Thr48, Phe49, Leu58 は、3Å 以上の距離に離れ、Leu52, Gly55 は、より架橋を形成しやすくなる構造変化が生じていることが示された。これらの結果は、大腸菌細胞内での、SafA による PhoQ/PhoP 系の活性化が、PhoQ の SD ダイマー境界面の構造変化に強く寄与していることを示唆した。

【文献】

1. Eguchi, Y *et al.*, *PNAS*. **104** 18712 (2007)
2. Eguchi, Y *et al.*, *Mol Microbiol*. **85**, 299 (2012)
3. Ishii, E. *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **77**, 814 (2013),
4. Mori, H. *et al.*, *PNAS*. **103** 16159 (2006)

モヤモヤ病タンパク質ミステリンの構造と機能

○森戸大介¹, 西川幸希², 山崎悟³, 寶関淳⁴, 北村朗⁵, 小谷友理¹, 金城政孝⁵,
高島成二⁶, 藤吉好則², 永田和宏²

¹京産大・総合生命, ²名大・CeSPI, ³国立循環器病セ, ⁴京大・院農, ⁵北大・院先端生命,
⁶阪大・院医

【目的】モヤモヤ病は我が国に多い脳血管疾患であり、脳底部の内頸動脈分岐部の進行性の狭窄・閉塞を特徴とする。2011年、我々は初めてのモヤモヤ病感受性遺伝子としてミステリンをクローニングした。ミステリンは新規の遺伝子であり、構造・機能ともに不明であったため、構造および生理・疾患機能の解明を目的として研究を行った。

【方法】ヒト HEK293 細胞に発現させたミステリンを、C末端に融合した FLAG エピトープタグを用いて精製し、生化学的手法および電子顕微鏡法により、酵素活性・構造等を検討した。

【結果】ミステリンに含まれる2つの予想AAA+ATPアーゼドメインにはいずれもATPアーゼ活性が認められた。精製ミステリンは他のAAA+ATPアーゼと同様、リング状のオリゴマーを形成していた。ミステリンは591 kDaの巨大タンパク質であり、そのためリング状オリゴマーは予想分子量3.5 MDaという巨大なものであった。蛍光相関分光法および生化学的解析により、このリング状オリゴマーは、ATP結合・加水分解サイクルと共役した集合と解離を繰り返していることが明らかとなった。

【考察】以上の結果から、ミステリンは新規のタンデムAAA+ATPアーゼであり、巨大なリング状オリゴマーをすることが分かった。さらにミステリンオリゴマーはATP結合・加水分解サイクルと共役して集合・解離していた。ミステリンは細胞内において他のAAA+ATPアーゼと同じく、何らかの物理的現象に寄与することが示唆された。

【文献】

1. Liu W, Morito D, Takashima S, Mineharu Y, Kobayashi H, Hitomi T, Hashikata H, Matsuura N, Yamazaki S, Toyoda A, Kikuta K, Takagi Y, Harada KH, Fujiyama A, Herzig R., Krischek B., Zou L., Kim JE, Kitakaze M., Miyamoto S., Nagata K., Hashimoto N., Koizumi A. (2011) *PLoS One*.
2. Morito D, Nishikawa K., Hoseki J., Kitamura A., Kotani Y., Kiso K., Kinjo M., Fujiyoshi Y., Nagata K. (2014) *Sci Rep*.

バクテリア蛋白質における翻訳後修飾部位の立体構造的解析

○増井良治¹, Kwang Kim¹, 高畑良雄¹, 岡西広樹¹, 井上真男¹, 飯尾洋太¹, 中川紀子¹,
由良 敬^{2,3,4}, 倉光成紀¹

¹阪大・院理, ²お茶の水女子大・人間文化創成科学,

³お茶の水女子大・生命情報学教育研究センター, ⁴国立遺伝学研究所

【目的】リン酸化とアセチル化に代表されるタンパク質の翻訳後修飾は、非常に多くの細胞活動を制御していることが知られている。近年、翻訳後修飾は真核生物だけでなくバクテリアにも広く存在することが明らかにされつつある。しかし、ヒストンなどごく一部のタンパク質を除いては、最近のプロテオームワイドな解析で発見された多くの翻訳後修飾の機能解析はなされていない。我々は高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 をモデル生物として、質量分析法を用いたリン酸化プロテオーム解析およびアセチル化プロテオーム解析を行い、多くのリン酸化部位とアセチル化部位を同定した^{1,2}。さらに、近縁株の *T. thermophilus* HB27 についてもリン酸化プロテオーム解析の結果が Wu らによって報告された³。本研究では、翻訳後修飾部位を立体構造上にマッピングすることにより、同定された翻訳後修飾が各タンパク質の機能や構造にもたらす影響の推定を試みた。

【方法】同定された翻訳後修飾部位を立体構造上にマッピングするため、修飾されていた *T. thermophilus* タンパク質あるいはそのホモログの立体構造データを Protein Data Bank から取得した。その際、使用する構造の基準は以下の順序とした：(i) *T. thermophilus* 由来タンパク質のリガンド結合型; (ii) ホモログのリガンド結合型; (iii) *T. thermophilus* 由来タンパク質のリガンド非結合型; (iv) ホモログのリガンド非結合型。構造未知のタンパク質については、Phyre2 server を用いてモデル構造を予測した。修飾残基側鎖の溶媒接触表面積 (ASA) は、<http://cib.cf.ocha.ac.jp/bitool/ASA/> のプログラムを用いて計算した。

【結果】*T. thermophilus* で同定されたリン酸化タンパク質 (78 個) のリン酸化部位 (Ser, Thr, Tyr) を立体構造上にマッピングしたところ、56% がリガンドから 8 Å 以内に位置しており、60% が 10% 以下の ASA を示した。この結果は、リン酸化部位の半数以上が分子表面ではなく、外部から接触しにくい場所に存在することを示している。また、リン酸化部位が flexible な領域により多く存在する傾向も見られた。一方、アセチル化部位 (Lys) はリガンド近くに多い傾向を示さなかったが、10% はタンパク質機能に直接影響を与えうる位置にあった。また、10% 以下の ASA を示す部位は 9% であり、規則的二次構造上により多く存在した。

【考察】タンパク質の (脱)リン酸化/や (脱)アセチル化は、それぞれ特異的な (脱)修飾酵素によって触媒されている。今回の解析により、アセチル化される Lys がそれら酵素と反応しやすい分子表面に多く見られたのに対し、リン酸化部位の半数以上は反応しにくい位置にあることが分かった⁴。さらに、*E. coli* のリン酸化部位の約 30% についても同様の傾向が見られた。この結果は、protein kinase/phosphatase と反応する際に、基質となるタンパク質のコンフォメーション変化を必要とする場合があることを示唆している。また、このような解析は、翻訳後修飾が構造や機能に与える影響を予測するのに役立つと考えられる。

【文献】

1. Takahata, Y., Inoue, M., Kim, K., Iio, Y., Miyamoto, M., Masui, R., Ishihama, Y., Kuramitsu, S. (2012) *Proteomics* **12**, 1414–1430
2. Okanishi, H., Kim, K., Masui, R., Kuramitsu, S. (2013) *J. Proteome Res.* **12**, 3952–3968
3. Wu, W. L., Liao, J. H., Lin, G. H., Lin, M. H., Chang, Y. C., Liang, S. Y., Yang, F. L., Khoo, K. H., Wu, S. H. (2013) *Mol. Cell. Proteomics* **12**, 2701–2713
4. Masui, R., Takahata, Y., Inoue, M., Iio, Y., Okanishi, H., Kim, K., Nakagawa, N., Yura, K., Kuramitsu, S. (2014) *J. Struct. Funct. Genomics* (in press)

ウェルシュ菌毒素 Ia による actin の ADP リボシル化機構

○鶴村俊治, 津守耶良, 秋浩, 津下英明

京産・総合生命

【目的】Iaはウェルシュ菌が分泌するモノ ADP リボシル化毒素であり、 NAD^+ から nicotinamide を除去し ADP リボースをアクチン Arg177 に特異的に付加 (ADP リボシル化) する。ADP リボシル化の反応機構の解明するために、毒素と基質タンパク質複合体の構造の解明が重要である。津下らが 2008 年に NAD^+ のアナログである β TAD と Ia、actin の複合体を明らかにしているが¹、本来の基質である NAD^+ 結合および ADP リボシル化の複合体構造は明らかにはなっておらず、これら ADP リボシル化前後の構造の解明することを目的とした。

【方法】Ia、actin と基質である NAD^+ を混合し結晶化を試みたが、おそらく結晶が生成される前に ADP リボシル化反応が進み、反応後酵素 Ia と基質タンパク質 actin が解離するため、複合体の結晶を得ることができなかった。そこで Ia と actin を混合し、さらに結晶化溶液と混合し放置することで NAD^+ の結合していない apo-Ia-actin 複合体 (apo 複合体) 結晶を作製し、この結晶を異なる手順で NAD^+ 溶液と氷晶防止剤であるエチレングリコールに浸漬することで NAD^+ 結合型 Ia-actin (NAD^+ 結合型複合体) 結晶と Ia-ADP リボシル化 (ADPR) -actin 複合体 (ADPR 化複合体) 結晶を作り分けた。これらの結晶を用いて X 線回折実験を行い、得られたデータを解析し構造を決定した。

【結果】 NAD^+ 結合型複合体は、apo 複合体結晶を NAD^+ -エチレングリコール混合溶液に浸漬することで、同時に入れたエチレングリコールが ADP リボシル化反応を阻害し、 NAD^+ の結合が見られた。一方、ADPR 化複合体は、apo 複合体結晶を NAD^+ 溶液へ浸漬・反応後、続いてエチレングリコール溶液に浸漬することで Ia 結合した状態での ADP リボシル化アクチンが見られた。

【考察】本来解離するはずの酵素と基質タンパク質が apo 複合体結晶中において、周囲に他の複合体分子が存在することで反応後も解離せず、ADP リボシル化反応を安定に捕捉することができたと考える。

これら ADP リボシル化反応の前後の構造が示唆する反応機構は、津下らが以前に提唱した strain-alleviation (緊張と緩和) モデル¹を裏付ける結果であり、オキシカルベニウムカチオンの 2 つの中間体を経てアクチン Arg177 への ADP リボシル化の修飾反応が起きると考えられる²。この反応機構は、RhoA を標的とする C3 毒素やヒトのポリ ADP リボシル化酵素などでも共通するものであると考えている。

【文献】

1. Tsuge H, Nagahama M, Oda M, Iwamoto S, Utsunomiya H, Marquez VE, Katunuma N, Nishizawa M, Sakurai J. (2008) Proc Natl Acad Sci U S A. 27;105(21)
2. Tsurumura T, Tsumori Y, Qiu H, Oda M, Sakurai J, Nagahama M, Tsuge H. (2013) Proc Natl Acad Sci U S A. 12;110(11):4267-72

Dye-decolorizing peroxidase の触媒サイクルと基質結合部位

○吉田徹¹, 津下英明¹, 久堀徹², 菅野靖史³¹京産大・総合生命, ²東工大・資源研, ³日本女子大・理学

【目的】 真菌 *Bjerkandera adusta* Dec1 株が分泌する酵素 Dye-decolorizing peroxidase (DyP) は、過酸化水素依存的に基質を酸化する（つまりペルオキシダーゼの定義に従う）ことからペルオキシダーゼと名付けられている。しかし、そのアミノ酸配列や立体構造は従来知られてきたペルオキシダーゼとは異なっており、DyP の反応機構の詳細は明らかになっていない。そこで本研究では、DyP と従来のペルオキシダーゼの反応機構における相違点を明らかにすることを目的とし、触媒サイクルと基質結合部位の解明を目指した。

【方法】 触媒サイクルを解明するために、DyP と過酸化水素の反応をストップフロー分光光度計を用いて追跡した。ストップフロー分光光度計は、島根大学澤嘉弘教授に貸して頂いた。基質結合部位は、基質複合体結晶より明らかにした。基質複合体結晶は、native DyP の結晶を基質を含む結晶化溶液に浸漬することで得た¹⁾。

【結果】 まず触媒サイクルについて結果を述べる。DyP は 1 等量の過酸化水素と反応し、中間体 (DyP* と呼ぶ) に変化することが明らかとなった。この反応は素反応であり、その反応速度定数は $7.0 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$ であった。また DyP* は、406, 533, 559, 618, 645 nm に吸収極大を示した。DyP* は 2 等量の基質と反応し反応前の状態へと戻ったが、この反応は素反応ではなかった。続いて基質結合部位について結果を述べる。2 種類の基質 (ascorbic acid, 2,6-dimethoxyphenol) について基質複合体結晶を得ることに成功した。これらの基質は、ヘムの 6-プロピオン酸の近傍に結合していた。さらに、基質とヘムの遠位部位は、分子内を占める水分子と Arg329 を介した水素結合ネットワークによってつながっていた。

【考察】 DyP の触媒サイクルは、まず 1 等量の過酸化水素と反応し、その後 2 等量の基質と反応することによって完了した。この触媒サイクルは他のペルオキシダーゼと同じであったが、DyP* の紫外可視吸収スペクトルは、他のペルオキシダーゼが 1 等量の過酸化水素と反応することで生じる中間体 (compound I) とは異なっていた。このことは、DyP* の電子状態が compound I とは異なる可能性を示唆している。そこで今後 ESR により DyP* の電子状態を決定する必要がある。また、基質結合部位は、ascorbate peroxidase に対する ascorbic acid の結合部位とよく似ていた。このことは、ascorbic acid に対する反応機構が DyP と ascorbate peroxidase で似ている可能性を示唆している。つまり、ヘムの 6-プロピオン酸が ascorbic acid から DyP への電子伝達に重要である可能性が高い。

【文献】

1. Yoshida, T., Tsuge, H., Hisabori, T., Sugano, Y., (2012) *FEBS Lett.* 586, 4351–4356

A-12

リボフラビンを光増感剤とする反応溶液中に生成される
種々の脂質由来ラジカルの検出及び同定

○西濱菜緒、岩橋秀夫

和医大・院医・生体分子解析学

【目的】 リボフラビンを光増感剤とする反応溶液中に生成される種々の脂質由来ラジカルを HPLC-ESR-MS 法を用いて検出及び同定することにより、リボフラビン光増感反応によりどのような構造の脂質由来ラジカルが生成するのか、さらに、その生成機構について検討する。

【方法】 標準反応溶液として、4.2 mM *cis*-11-Octadecenoic acid (あるいは *cis*-6-Octadecenoic acid、あるいは *cis*-9-Octadecenoic acid)、25 μ M フラビンモノヌクレオチド(FMN)、10 mM コール酸、30 mM リン酸緩衝液を含む重水溶液を用いた。この標準反応溶液に波長 436 nm の可視光線 (7.8 J/cm²) を照射し、0.1 M α -(4-Pyridyl-1-oxide)-*N*-*tert*-butylnitorone (4-POBN)、1 mM 硫酸アンモニウム鉄 [FeSO₄(NH₄)₂SO₄] を加え、1 分間反応させた後、ESR、HPLC-ESR、HPLC-ESR-MS 分析を行った。

【結果】 *cis*-11-Octadecenoic acid を含む標準反応溶液の ESR 分析を行うと、顕著な ESR シグナルが得られた。この標準反応溶液への光照射を行わなかった場合あるいは 1 mM 硫酸アンモニウム鉄[FeSO₄(NH₄)₂SO₄]を加えなかった場合、ESR シグナル高は減少した。このことより、この反応には光及び二価鉄イオンが関与していることが分かった。また、軽水中でこの反応を行なうと ESR シグナル高は減少した。重水中では一重項酸素の寿命が長くなることから、この反応に一重項酸素が関与していると考えられる。4.2 mM *cis*-11-Octadecenoic acid (あるいは *cis*-6-Octadecenoic acid、あるいは *cis*-9-Octadecenoic acid) を含む標準反応溶液の HPLC-ESR 分析を行うと、保持時間が 44.9 min (*cis*-11-Octadecenoic acid)、31.1min (*cis*-6-Octadecenoic acid)、39.6 min (*cis*-9-Octadecenoic acid) のところに顕著なピークが観測された。それぞれのピークの HPLC-ESR-MS 分析を行うと、*m/z* 366 及び *m/z* 279 (*cis*-11-Octadecenoic acid)、*m/z* 296 及び *m/z* 209 (*cis*-6-Octadecenoic acid)、*m/z* 338 及び *m/z* 251 (*cis*-9-Octadecenoic acid)のイオンが検出された。

【考察】 HPLC-ESR-MS 分析の結果から、*cis*-6-Octadecenoic acid を含む標準反応溶液中に 4-Carboxybutyl radical、*cis*-9-Octadecenoic acid を含む標準反応溶液中に 7-Carboxyheptyl radical、*cis*-11-Octadecenoic acid を含む標準反応溶液中に 9-Carboxynonyl radical が生成されたことが分かった。リボフラビン光増感反応によって生じた一重項酸素と *cis*-6-Octadecenoic acid あるいは *cis*-9-Octadecenoic acid あるいは *cis*-11-Octadecenoic acid との反応によりそれぞれ対応する過酸化脂質が生じ、この過酸化脂質と二価鉄イオンとの反応により、4-Carboxybutyl radical、7-Carboxyheptyl radical、9-Carboxynonyl radical がそれぞれ生じたと考えられる。

【文献】

1. Mori, H., Iwahashi, H. (2011) Clin. Biochem. Nutr. 49, 141-146

A-13

サーモライシンの安定性における 315 位のアミノ酸残基の役割

○児島憲二, 中田博己, 井上國世

京大院・農・食生科

【目的】サーモライシン (TLN) は, *Bacillus thermoproteolyticus* 由来の好熱性・好塩性の中性メタロプロテアーゼである. 316 アミノ酸残基から成り, β 構造が豊富な N 末端ドメインと α 構造が豊富な C 末端ドメインから構成される. これまでに, N 末端ドメインおよび活性部位近傍への変異導入により熱安定性の向上を報告した¹⁾. 本研究では, TLN のさらなる安定化を目標として, C 末端領域が TLN の安定性に与える効果について検討した.

【方法】組換え型 TLN (rTLN) は, TLN のプロ配列と成熟型配列を独立して挿入した発現プラスミドを用い, 大腸菌 JM109 株を宿主として生産した. 組換え大腸菌を 37°C で 48 時間培養し, その培養上清 (CS) 中のカゼイン加水分解活性 (PU/ml-CS) を測定した. CS を疎水性相互作用クロマトグラフィー, アフィニティクロマトグラフィーに供して rTLN を精製し, 精製した rTLN のカゼイン加水分解活性 (PU/mg) を測定した. CS と精製 rTLN のカゼイン加水分解活性を比較して, CS 中の rTLN の発現量 (mg/ml-CS) を求めた. 円偏光二色計により 2.5 μ M rTLN 溶液の 222 nm における楕円率 (q_{222}) の温度変化を, 0.5°C/min で 60°C から 100°C まで昇温して測定し, q_{222} の全変化量の半分になる温度を見かけの融解温度 $T_{m,app}$ として熱安定性の指標とした.

【結果】TLN の C 末端からアミノ酸残基を 1 残基ずつ欠失させた rTLN を作製したところ, C 末端から 2 番目の Val315 を欠失させると発現しなくなった. 次に, 部位特異的変異導入により Val315 を Gly, Ala, Leu, Ile, Phe, Tyr, Trp, Ser, Thr, Gln, Asp, Glu, Lys, Arg に置換した rTLN (V315 変異体) を作製した. 精製後の V315 変異体のカゼイン加水分解活性は野生型 TLN (WT) の 50–100% であった. すべての V315 変異体の $T_{m,app}$ は WT の $T_{m,app}$ (88.8°C) に比べて低下した. Leu や Ile に置換した変異体では, 発現量および $T_{m,app}$ は WT とほぼ同等であった (クラス 1). Ala, Phe, Thr への置換では, 発現量は 70–80% に減少し, $T_{m,app}$ は 2.2–3.5°C 低下した (クラス 2). Gln, Ser, Tyr への置換では, 発現量は 20–40%, $T_{m,app}$ は 4.0–8.0°C 低下した (クラス 3). Asp, Glu, Lys, Arg, Gly, Trp への置換では, 発現量は 10% 以下に, $T_{m,app}$ は 8.0–12.1°C 減少した (クラス 4). 各変異体の CS における発現量を 315 位アミノ酸残基のハイドロパシーインデックス (HPI) に対してプロットしたところ, 正の相関 ($r=0.90$) が見られ, HPI が 1 ユニット増大すると相対発現量 (WT の発現量を 100% とした時の rTLN の発現量の相対値) が 12% 増大した. 変異体の $T_{m,app}$ と HPI の間にも正の相関 ($r=0.84$) があり, HPI が 1 ユニット増大すると $T_{m,app}$ が 1.1°C 増大した. CS における変異体発現量と $T_{m,app}$ の間にも正の相関 ($r=0.94$) があり, $T_{m,app}$ が 1.0°C 低下すると相対発現量が 11% 減少した²⁾.

【考察】大腸菌における rTLN の発現量はその安定性に大きく影響される. TLN の立体構造において, Lys316 は他のアミノ酸残基と相互作用しておらず, Lys316 欠失は TLN の安定性に影響を与えないと考えられる. 一方, Val315 は周辺の Tyr217, Ile236, Phe281, Ser282, Arg285, Phe310, Val313 と疎水性クラスターを形成しており, 315 位のアミノ酸残基が本クラスターの形成に重要な役割を果たしていると考えられる.

【文献】

1. Kusano, M., Yasukawa, K., Inouye, K. (2010) *J. Biotechnol.* 147, 7–16
2. Kojima, K., Nakata, H., Inouye, K. (2014) *Biochim. Biophys. Acta* 1844, 330–338

A-14

抗体を用いた膜タンパク質の結晶化

○名倉淑子¹, 小笠原諭², 田辺幹雄³, 野村紀通¹, 岩田想¹

¹京都大・院医, ²東北大・院医, ³マルティン=ルター大・HALOmem

【目的】膜タンパク質はその役割から多くの疾患に関わり、細胞外で作用、制御することも可能な事から薬剤の標的になっている。膜タンパク質の結晶構造解析を行う場合、界面活性剤などを用いた可溶化が必要であり、それに伴い膜タンパク質が不安定になり容易に失活するケースも多い。また、疎水性領域がほぼ界面活性剤ミセルで覆われた膜タンパク質は、膜外領域を介した結晶格子が形成されにくく、結晶形成を困難にしている。これらの問題点を改善するために、我々は膜タンパク質にモノクローナル抗体を結合させ、この複合体を用いた結晶化を行っている。結晶化に適した抗体作製の手法を確立することを目的とし、様々な標的膜タンパク質についてこの手法を応用してきた。結晶化に適した抗体とはどのようなものか、また結晶化に適した抗体を作製するにはどのような手法が有用であるかを報告する。

【方法】精製膜タンパク質をリン脂質と再構成させたプロテオリポソームを用い、マウスに免疫した。マウス脾臓細胞からハイブリドーマを作製し、プロテオリポソーム ELISA、変性タンパク質 ELISA、表面プラズモン共鳴(SPR)、蛍光ゲルろ過(FSEC)によるスクリーニングを行い、高親和性かつ立体構造認識抗体産生株を樹立した。ハイブリドーマより得られた抗体を酵素処理で Fab 化し、標的膜タンパク質との複合体を形成させ、結晶化実験を行った。

【結果】ハイブリドーマのスクリーニングでは、プロテオリポソーム ELISA 陽性で変性タンパク質 ELISA 陰性のものを取捨選択した。プロテオリポソーム ELISA は、立体構造を保持した状態の標的膜タンパク質に結合するものを示しており、変性 ELISA はフレキシブルな領域のアミノ酸一次構造に結合するものを示している。これらの手法によって立体構造を認識し、その構造の安定化に寄与するような抗体を得た。さらに、SPR や FSEC にて標的膜タンパク質と複合体形成するような高親和性なものに絞り込むことができた。得られた抗体が標的膜タンパク質の熱安定性の向上に寄与していることを CPM アッセイにて確認した。抗体との複合体を形成させた場合、標的膜タンパク質単独の場合と比較して、変性中点 T_m が 10~15℃ 程度上昇することが分かった。これまでいくつかの膜タンパク質結晶化実験において、抗体との複合体で結晶が得られており、結晶の空間群に変化をもたらしたり、劇的に反射を向上させたようなケースもあった。

【考察】抗体を結晶化に用いる利点は、抗体の結合により膜タンパク質が特定の立体構造に保たれ安定化することと親水性領域の拡大によって結晶化が促進されることである。これらの条件を満たす抗体の作製法が確立しつつある。抗体と標的膜タンパク質との共結晶化は、適用範囲が特定の膜タンパク質に限定されないため普遍性が高く、様々な標的への応用が期待される。さらに特定の構造状態を狙った抗体作製も現実には手が届くところまで来ており、膜タンパク質の機能を立体構造情報に基づいて理解する有用なツールとなり得る。

アンジオテンシンタイプ2受容体とその特異的抗体を用いた共結晶化

○ 浅田秀基¹、白石充典²、岩成宏子³、植村智子¹、辻本浩一¹、新井修³、
島村達郎¹、稲上正⁴、浜窪隆雄³、小林拓也¹、岩田想¹

¹京都大学大学院 医学研究科 分子細胞情報学、²九州大学大学院 薬学研究院 蛋白質
創薬学分野、³東京大学 先端科学技術研究センター 計量生物医学、
⁴米国バンダービルト大学医学部生化学教室

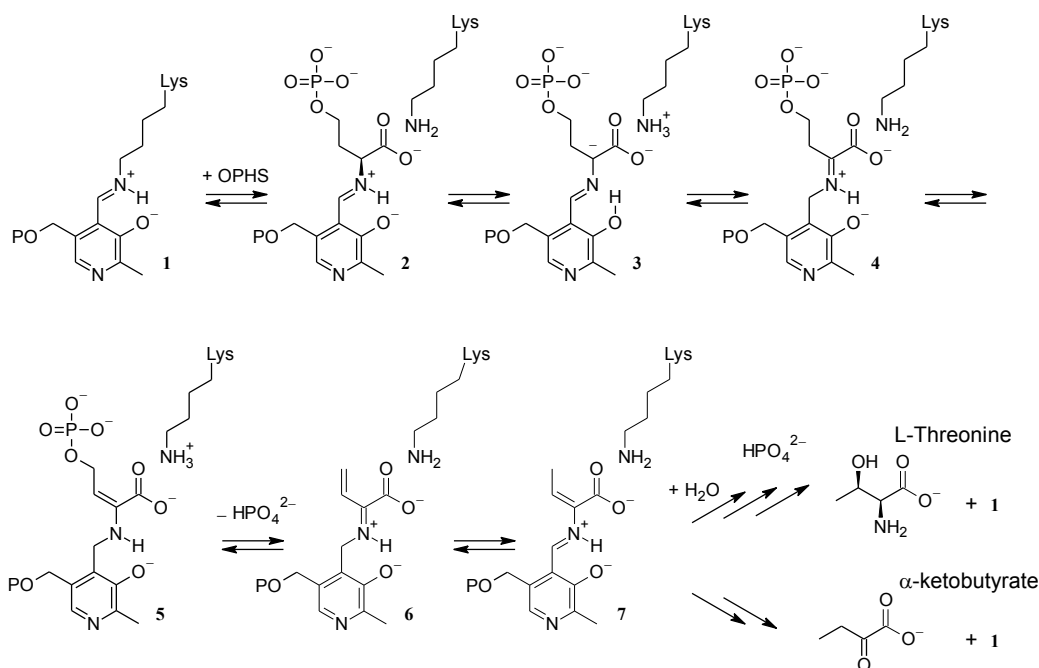
【要旨】アンジオテンシン受容体(AT)は、血圧を調節する重要な G タンパク質共役受容体(GPCR)であり、1 型(AT1)と 2 型(AT2)があることが知られている。また、AT を介した血圧調節はこれらのリガンドであるアンジオテンシン(Ang)により行われている。近年、AT2 が血圧調節のみならず、血管保護作用においても重要な役割を担っている可能性が報告されている。

我々はこのように生理的に重要な機能を果たす AT2 の構造解析を目指して、①AT2 の安定化変異体の作製、②発現・精製法の確立、③AT2 特異的抗体の作製、④AT2 単独及びその特異的抗体との複合体の結晶化を行った。安定化変異体は、N 末・C 末の欠損及び細胞内第 3 ループへの T4 リゾチーム(T4L)もしくはアポチトクローム b562 (BRIL)の挿入により行い、そのスクリーニングは GFP の蛍光を指標としたゲル濾過(FSEC)法により行った。野生型より安定化した変異体について Sf9 昆虫細胞を用いた大量生産を行った後、それぞれについて精製を行った。その結果、これまでに 3 種類の AT2-T4L 及び 1 種類の AT2-BRIL の精製に成功した。また、これらに平行して AT2 特異的構造認識抗体の作製を行った。抗体の作製は、マウスへの免疫から 1 次スクリーニングまでを東京大学の浜窪教授のグループが行い、それ以降のスクリーニングは京大で行った。その結果、12 種類の AT2 特異的構造認識抗体が得られた。得られた抗体はパパイン処理により Fab 化した後、AT2 と複合体を形成させた。これらのサンプルについて、蒸気拡散法及びキュービック液晶(LCP)法により結晶化を行った。現在のところ、AT2 単独ではいずれの結晶化においても結晶は得られていないが、AT2 と抗体の複合体のうち、3 種類の抗体との複合体において蒸気拡散法で結晶が得られ、1 種類の抗体との複合体において LCP 法で結晶が得られた。蒸気拡散法で得られた結晶について SPring-8 のマイクロフォーカスビームである BL32XU にて回折実験を行った結果、分解能が約 17Å であった。この結晶において結晶化条件の最適化を行ったが分解能の向上は認められなかった。一方、LCP 法により得られた結晶について SPring-8 での回折実験の結果、蛋白質の結晶である事を確認した。現在結晶化条件の最適化中である。

トレオニン合成酵素の触媒反応前半部分の反応機構解析

○町田康博¹, 村川武志², 庄司光男³, 林秀行¹¹大阪医大・医・化, ²大阪医大・医・生化, ³筑波大・数物系

【目的】ピリドキサル 5'-リン酸 (PLP) を補酵素とするトレオニン合成酵素 (ThrS) は PLP 依存性酵素に知られている反応中間体と素過程の全てを経由するという, PLP 依存性酵素の中で最も複雑な反応機構を有すると考えられる酵素である。これまでの研究により, PLP- α -アミノクロトン酸アルジミン中間体 (**7**) から主反応の L-トレオニン生成と副反応の α -ケト酪酸生成の 2 つの過程が分岐するが, **5** $\rightarrow$ **6** の段階で基質 O-ホスホ-L-ホモセリンから脱離したリン酸イオンがそのまま活性部位にとどまり, **7** からの主反応を特異的に進行させる触媒, すなわち「生成物支援触媒」として機能して反応特異性をつかさどっていることを見出した (文献 1, 2)。このように触媒反応の後半部分の反応機構は詳細に明らかになってきたが, 基質との反応から **7** に至る触媒反応の前半部分の反応機構は明らかでない。そこで **5** で反応が停止する基質アナログ 2-アミノ-5-ホスホノペンタン酸 (AP5) と ThrS の反応を遷移相で追跡し, **1**~**5** の過程の詳細な解析を試みた。



【方法と結果】AP5 と ThrS の反応をホットダイオードアレイを装備したストップフロー分光分析計で追跡したところ, カルボアニオン中間体 **3** を始めとする特徴的な中間体のスペクトルが出現し, 類似のスペクトルを示す **4** と **5** が現在分離できていないことを除いて, グローバル解析により各中間体のスペクトルと素過程の速度定数を決定することができた。

【考察】得られた各中間体のスペクトルとその出現の順序は上図の **1**~**5** の過程を支持しており, 残る不明な部分は **5**~**7** の過程に絞られた。また, ケチミン **4** の加水分解によるアミノ基転移が副反応として起こる可能性が予想されていたが, AP5 と ThrS をインキュベートして **4** を蓄積した状態を維持してもスペクトルに変化がなかったことは, ThrS がこの副反応を強く防ぐ機構を有していることを示している。

【文献】

1. Murakawa, T., Machida, Y., and Hayashi, H. (2011) *J. Biol. Chem.* 286, 2774–84.
2. Shoji, M., et al. (2014) *J. Am. Chem. Soc.* 136, 4525–33.

The roles of estrogen on canine mammary gland tumors: Clinical diagnosis and treatment

○ Waraphan Toniti^{1,2}, Shimizu Akio¹, and Misuzu Seo¹

¹Department of Biotechnology, Division of Engineering, Kyoto Sangyo University

²Department of Preclinic and Applied Animal Science, Mahidol University, Thailand

【Purpose of the study】 Mammary gland tumors are by far the most commonly found tumors in domestic dogs. Early detection, identification and classification of tumor are necessary and effective for the therapeutic plans of canine breast cancer to save the life. Subsequently, a most common treatment for canine breast cancer is surgery. After the surgery, chemotherapy is conventionally carried out. Beside chemotherapy, it seems necessary to treat another type of anticancer drugs to prevent metastasis and increase the overall survival of dogs with breast cancer. However, there is no treatment designed for canine breast cancer, like Bazedoxifene, an ER- α inhibitor for human being.

In human, estrogen has been implicated in breast cancer risk, because it has a role in stimulating growth of estrogen-responsive breast tumors which frequently express estrogen receptor (ER- α). ER- α is the most important target in human breast cancer over the past 30 years. However, it is not clear whether estrogen signaling contributes to canine breast cancer progression as well as human being because canine estrous cycle is different than one of human being.

Here, we would like to discuss about two subjects: (1) To confirm if ER expression is correlated with canine breast cancer cells like human breast cancer, we investigated the location and population of estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR) besides hematoxylin and eosin (H&E) of conventional histopathology staining. (2) In veterinary medicine for the canine therapeutic procedures, there is no evidence of canine ER- α specific treatment after breast cancer surgery. To confirm if human ER- α inhibitors including Selective Estrogen Receptor Modulator (SERMs), have abilities to bind to the canine ER- α with the similar affinity to human ER- α , 3D structure of the both ER- α s were generated and analyzed to compare the affinities of their ligands.

【Methods】 (i) Histopathology and Immunohistochemistry: The paraffin sections of the 50 canine primary mammary gland tumors were routinely stained with hematoxylin and eosin (H&E) and the primary antibodies against ER and PR using avidin-biotin-immunoperoxidase method. (ii) Homology modeling and Molecular docking: Human ER- α (3ERT) and canine ER- α (XP_533454.2) sequences were downloaded from protein data bank (PDB) and compared for similarity of the sequences. Then, the 3D structure of the ER- α were generated by Modeller and docked by 2,344 ligands and 15 SERMs. The estimated inhibition constants (Ki) of ligands on ER- α were calculated by Cheng-Prusoff equation.

【Results】 According to histopathological studies, the selected canine mammary gland tumors were classified as acinous adenoma with cartilage metaplasia (2%), tubular adenoma (6%), papillary tubular adenocarcinoma (12%) and solid carcinoma (80%). Nearly 40% of benign tumors were stained for ER or PR. Nearly 30% of malignant tumors were stained for ER or PR, showing no statistical difference of ER or PR expression between benign and malignant tumors.

The structure of both human and canine ER- α and its binding affinities to ligands were studied *in silico*. The comparison of human ER- α and canine ER- α using homology modeling and molecular docking showed 90% structural similarity. Ligand binding site of human ER- α was narrower than canine ER- α , however, most of the predicted pocket sites were very similar. The Ki of Bazedoxifene, as an example, for human ER- α was 52.50 pM compare to 689.49 pM for canine ER- α .

【Conclusion and Discussion】 According to the immunolocalizations of ER and PR in the tumors, the expression of ER and PR in mammary tumor cells still existed, showing that that mammary tumor cells differentiated from luminal-epithelium lineage origin might be able to response to estrogen signaling via the receptor for the proliferation and invasion to the adjacent tissues. This result indicates that it is worth targeting ER or PR for a therapeutic plan to dogs with mammary gland tumor by anti-estrogen drugs developed already for human being.

Any ER inhibitors including SERMs developed for human ER- α did show larger Ki values into the canine receptor compared to the one of human being by least 10 times, accounting that the inhibitors could bind to the canine receptor as lower affinities than the one of human being. This result indicates that, for canine, much higher doses of SERMs administration might be required than human patients with mammary gland tumors after surgery. We propose as a novel therapeutic plan to design the canine ER- α specific drug and strongly believe that it must be effective for canine mammary gland tumor therapy.

B-2

Increased expression of the ladybird homeobox 1 cause scoliosis in zebrafish mimicking human adolescent idiopathic scoliosis and congenital scoliosis

○郭龍¹, 山下 寛¹, 黄 郁代³, 滝本 晶¹, 安達 泰治⁴, 開 祐司¹,
池川 志郎³, 宿南 知佐^{1,2}

¹京都大・再生医科学研究所・生体分子設計学, ²広島大・院医歯薬保・生体分子機能学,

³理化研・統合生命医科学研究センター・骨関節疾患研究チーム, ⁴京都大・再生医科学研究所・ナノ再生医工学研究センター・バイオメカニクス研究領域

【目的】 Adolescent idiopathic scoliosis (AIS) is one of the most common spinal diseases in humans [1]. Strong genetic factor is implicated in its etiology and pathogenesis. The recent genome-wide association study has identified an AIS susceptibility locus near the *ladybird homeobox1* (*LBX1*) gene [2]; however, the role of *LBX1* in AIS remains unknown. Thus, the purpose of this research is to explore the role of *lbx1* in development of scoliosis.

【方法】 Zebrafish was used as a model animal in this research. Zebrafish homologues of *LBX1* (*lbx1a*, *lbx1b* and *lbx2*) were up-regulated by mRNA injection or Tol2 transposon-mediated transgenic expression. The changes at the molecular level were checked by whole-mount *in situ* hybridization. The axial skeleton was analyzed by alizarin red staining or μ CT.

【結果】 Transient ubiquitous and *lbx1b* enhancer-driven overexpressions of *lbx* resulted in scoliosis with the local notochord deformity and displaced dorsal melanophore stripes. The notochord deformity led to local vertebral malformation and eventually presented scoliosis mimicking congenital scoliosis (CS). A minority of the transgenic zebrafishes had no scoliosis at the larval stage, but later developed scoliosis similar to AIS. Moreover, *lbx1b* overexpression caused a decrease of *wnt5b*, a ligand of the non-canonical Wnt/PCP signaling pathway, leading to impairment of convergent extension (CE) movement. The defect of CE movement induced asymmetrical arrangement of somites, which is considered to be associated with the late-onset scoliosis.

【考察】 Our study presents the functional link between *LBX1* and scoliosis, and provides novel hypothesis in the pathogenesis of AIS: transient overexpression of *LBX1* at gastrula stage impairs the non-canonical Wnt/PCP signaling pathway, leading to the defect of CE movement which induces asymmetrical arrangement of somites; asymmetry of the spine developed from the asymmetrical somites could be too mild to be observed in childhood, and then progresses fast during adolescent growth spurt when mechanical stress and hormone/metabolism change dramatically.

【文献】

1. Ueno, M., Takaso, M., Nakazawa, T., Imura, T., Saito, W., Shintani, R., Uchida, K., Fukuda, M., Takahashi, K., Ohtori, S., et al. (2011). A 5-year epidemiological study on the prevalence rate of idiopathic scoliosis in Tokyo: school screening of more than 250,000 children. *Journal of Orthopaedic Science : official journal of the Japanese Orthopaedic Association* 16, 1-6.
2. Takahashi, Y., Kou, I., Takahashi, A., Johnson, T. a., Kono, K., Kawakami, N., Uno, K., Ito, M., Minami, S., Yanagida, H., et al. (2011). A genome-wide association study identifies common variants near *LBX1* associated with adolescent idiopathic scoliosis. *Nature genetics* 43, 1237-1240.

B-3

がん幹細胞のヒアルロン酸依存的増幅における上皮-間葉移行シグナルの解析
○望月信利¹, チャンミー シーラウット², オントン パーワレット³, 板野直樹^{1,2,3}
¹京産大・総合生命, ²京産大・先端研, ³京産大院・工

【目的】ヒアルロン酸は、組織の正常な形成と恒常性維持に重要な細胞外マトリックス成分であるが、その合成異常とがん進展との間には、密接な関係が成立することが報告されている。これまでに我々は、ヒアルロン酸合成酵素 2 遺伝子(Has2)を導入したコンディショナルトランスジェニック(Has2 cTg)マウスからなるヒアルロン酸過剰産生乳癌発症モデルを用いて、がん進展とヒアルロン酸との関係について解析してきた。その結果、Has2 cTg 乳癌モデルでは、乳癌の形成頻度や成長速度が対照マウスに比して増大していること、ヒアルロン酸産生の増加した乳癌細胞では、上皮間葉移行(Epithelial-Mesenchymal Transformation ; EMT)が誘導されていることを明らかにした。本研究では、ヒアルロン酸の増加が EMT を誘導してがん幹細胞(Cancer stem cell; CSC)の増幅に働くという仮説を立て、その可能性を検証した。また、CSC 増幅に働く EMT 関連シグナルとして、TGF- β や Snail のシグナル伝達経路の関与を検討した。

【方法】ヒアルロン酸過剰産生乳癌発症モデルマウスと対照マウスに発生した乳癌組織より初代培養癌細胞を樹立した。初代培養癌細胞中の CSC の割合は、乳癌幹細胞マーカー分子の CD24 と CD44 の発現を指標としてフローサイトメトリーにより解析した。上皮性細胞マーカー分子の E-cadherin について、その発現を免疫染色法により検討し、細胞の EMT を評価した。また、初代培養癌細胞から全 RNA を精製し、EMT 関連分子である TGF- β や Snail の遺伝子発現をリアルタイム定量 RT-PCR 法により検討した。そして、TGF- β receptor I 阻害剤 SB-431542 や Snail の阻害剤 GN-25 を用いて、TGF- β と Snail のシグナル伝達を阻害し、細胞における EMT とがん幹細胞の増幅に及ぼす影響について、上記方法により解析した。

【結果】フローサイトメトリー解析の結果、ヒアルロン酸過剰産生乳癌細胞では、対照乳癌細胞に比べて CD44^{high}/CD24^{low} ががん幹細胞の割合が増加していることを明らかにした。またヒアルロン酸過剰産生乳癌細胞における TGF- β や Snail の発現は、対照乳癌細胞に比べて有意に増加していた。TGF- β や Snail シグナルを阻害すると、未処理の細胞に比べて細胞間に局在する E-cadherin が増加し、CSC の割合が低下することが明らかとなった。

【考察】以上の結果より、EMT に関連した TGF- β シグナルやその下流で発現が制御される Snail 転写因子が、CSC のヒアルロン酸依存的な増幅に関与していることが示唆された。

B-4

VEGF-A はその受容体 NRP1 の細胞内領域と GIPC1、Syx との複合体形成を促進し RhoA の活性化を介してがん細胞の増殖と浸潤を誘導する

○吉田亜佑美¹, 清水昭男^{2,3}, 門之園哲哉⁴, 近藤科江⁴, Michael Klagsbrun², 瀬尾美鈴^{1,3}

¹京産大・院工・生物工学, ²Vascular Biology Program, Children's Hospital Boston, Harvard Medical School, ³京産大・総合生命・生命システム, ⁴東工大・生命理工学

【研究背景と意義】血管内皮増殖因子 (VEGF-A) は、腫瘍血管新生を誘導し、がん細胞の増殖、生存、転移を促進する。しかしながら、血管内皮細胞に発現する受容体 VEGFR2 と VEGF-A との結合を阻害し、腫瘍血管新生を抑える抗体医薬アバスタチンの臨床における抗腫瘍効果の奏功は多く報告されていない。我々のこれまでの研究から、VEGF-A はがん細胞上に発現する膜貫通型受容体である Neuropilin-1 (NRP1) に結合して、がん細胞自身の増殖、生存と浸潤を促進することを見いだした。アバスタチンの奏功率の低さは VEGF-A の血管内皮細胞上の VEGFR2 との結合を阻害するが、NRP1 への結合の干渉はできないことによると考えられる。我々は、抗 VEGF-A/NRP1 シグナルの戦略としてがん細胞が発現する NRP1 の細胞内領域から伝達されるシグナルを抑制しようとした。

【方法】悪性ヒト皮膚がん細胞株 DJM-1 細胞を用いた。VEGF-A、NRP1 のタンパク質発現抑制には siRNA を用いた。がん細胞における DN Syx の強制発現には lentivirus を用い、GIPC1/Syx 間の結合を阻害するペプチドには HIV ウイルス由来の TAT (Trans-Activator of Transcription Protein) 配列を結合させ、膜透過型となるよう設計し添加した。がん細胞の増殖、生存能 (=コロニー形成能) の評価には soft agar assay を用いた。がん細胞の浸潤能の評価には transwell を用いた。VEGF-A/NRP1 シグナルの解析はウェスタンブロットを用い、GIPC1/Syx 複合体形成の有無の評価には共免疫沈降法を、低分子量 G タンパク質である RhoA の活性化の評価には Cytoskeleton 社の Rhotekin-RBD-Protein GST Beads を用いてプルダウンした。

【結果】VEGF-A が NRP1 に結合することによって、NRP1 の細胞内領域と足場タンパク質である GIPC1 が結合し、続いて GIPC1 と RhoGEF である Syx が複合体を形成し、RhoA が活性化されることを示した。GIPC と Syx の発現を siRNA で抑えると、RhoA の活性化は起こらず、がん細胞の増殖が抑制された。次に、RhoGEF 活性を欠失させた変異型 Syx (Dominant negative Syx: DN Syx) を強制発現させることで VEGF-A/NRP1 シグナルが阻害されるかを検証したところ、DN Syx の強制発現は VEGF-A による低分子量 G タンパク質である RhoA の活性化を抑制し、コロニー形成能を 50% 抑制した。GIPC1 と Syx の複合体形成を阻害する膜透過型ペプチドを添加すると、DJM-1 細胞のコロニー形成能は 50%、浸潤能は 60% 抑制された。さらに、GIPC1/Syx の複合体形成は RhoA を活性化するが、ペプチドの添加により RhoA の活性化は抑制された。

【考察】DN Syx の強制発現により DJM-1 細胞のコロニー形成能が抑制されたことから、Syx は VEGF-A のシグナル伝達分子として必須であり、がん細胞の増殖を促進することが示唆された。GIPC1/Syx 複合体形成を阻害するペプチドが、がん細胞の増殖、浸潤能を抑制したことから、GIPC1/Syx 複合体形成は RhoA 活性化を誘導し、がん化させるための重要な因子であることを示した。VEGF-A シグナルを標的とした抗がん剤の設計において、NRP1 の細胞内領域とその下流のシグナル伝達分子を標的とすることの意義を提唱した。

Anosmin-1 が血管内皮細胞に及ぼす生理作用とその受容体の解明

○近藤真菜美¹、清水昭男²、浅野弘嗣²、瀬尾美鈴^{1,2}¹京産大大学院・生命科学、²京産大・総合生命・生命システム

【目的】カルマン症候群は、嗅覚低下・消失、低ゴナドトロピン性性腺機能低下を伴う先天性疾患で、Anosmin-1 をコードする *KALI* 遺伝子の変異により発症することが報告されている。*KALI* 遺伝子の変異により神経発生の異常が生じる結果、嗅神経の軸索伸長およびゴナドトロピン放出ホルモン(GnRH)産生神経細胞の視床下部への遊走の抑制が報告されている。しかし、カルマン症候群原因遺伝子産物の Anosmin-1 の分子メカニズムおよびシグナル伝達はまだ十分に解明されていない。

神経と血管は共通のリガンドと受容体を発現し、特に発生過程において神経細胞に近接する血管からのサポートが神経細胞の発生に重要であることが報告されている。仮説として私は、Anosmin-1 は血管内皮細胞に作用して血管形成を促進することにより、血管周辺にある嗅神経の発生をサポートしているということを考えた。そこで私は Anosmin-1 が血管内皮細胞におよぼす生理活性を検証する目的で実験を行った。

【方法】ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)とマウス大脳皮質微小血管内皮細胞(bEnd3)を用いて 3D tube formation assay を行い、Anosmin-1 の管腔形成能を検討した。

3D tube formation assay：血管内皮細胞をトリプシン処理後 EGM-2 complete medium 中に混和し、1 滴中に 500 個の細胞数になるように細胞非接着培養皿に 25 μ l ずつ播種後裏返し hanging drop 中で 10% CO₂ 条件下一晩インキュベートした。翌日形成された血管内皮細胞の細胞塊 (spheroid) を 24 穴プレート中に Cell matrix (collagen I -P 新田ゼラチン) とともに包埋した (3D 培養)。Matrix が固化後、Anosmin-1 が最終濃度 185、740、2960 ng/mL になるように添加し、10% CO₂ 条件下 16 時間インキュベートした。翌日 4% Paraformaldehyde で 1 時間固定後 0.2% Triton-X 100 による膜透過処理を行い Alexa Fluor 488 phalloidin で染色した。蛍光顕微鏡で観察し、細胞塊から伸長した突起(管)の数をカウントした。

【結果】血管内皮細胞に 2% FBS EBM-2(HUVEC)、10% FBS EBM-2(bEnd3)を negative control として用いたところ spheroid からの突起の伸長は見られなかった。血管内皮細胞に EGM-2 complete medium を positive control として用いたところ spheroid からの突起を伸長した (HUVEC : 4 本/spheroid、bEnd3:9.75 本/spheroid)。HUVEC(2% FBS EBM-2)に Anosmin-1 を最終濃度 185、740、2960 ng/mL になるように添加すると、Anosmin-1 は HUVEC の spheroid からの突起の伸長を誘導し、最大活性 185ng/mL を示した(1.75 本/spheroid)。bEnd3(10% FBS EBM-2)に Anosmin-1 を最終濃度 92.5、185、740、2960、11840 ng/mL になるように添加すると、Anosmin-1 は濃度依存的に(11840 ng/mL:6 本/spheroid)bEnd3 の spheroid からの突起を伸長した。

【考察】以上の結果から Anosmin-1 は HUVEC と bEnd3 の管形成能を促進する受容体を持っていることが示唆された。線維芽細胞増殖因子 (FGF) によって管腔形成を誘導される血管内皮細胞には FGFR1 が発現しており、FGFR1 が Anosmin-1 の受容体であるということが報告されている。しかし、Anosmin-1 が血管内皮細胞において FGFR1 の自己リン酸化を引き起こすかどうかは未だに解っていない。今後の研究において FGFR1 が Anosmin-1 の血管内皮細胞における受容体であるのかを明らかにしていきたい。そして、もしそうでないならば未知の Anosmin-1 に対する受容体を探索し同定したい。

B-6

もやもや病関連タンパク質 *mysterin* による *zebrafish* の発生制御

○小谷友理¹ 森戸大介¹, 山崎悟², 山田健太³, 高島成二⁴, 平田普三³, 永田和宏¹

¹京都産業大・総合生命, ²国立循環器病センター, ³国立遺伝研, ⁴大阪大・院生命機能

【目的】我々のグループは、原因不明の脳疾患であるもやもや病から、その発症に強く関わるタンパク質として、*mysterin*/RNF213 の同定・単離に成功した¹⁾。*Mysterin* は他に類を見ないタンパク質で、AAA+ATPase ドメインとユビキチンリガーゼドメインを持つほか、単量体の分子量が 591kDa と巨大であり、ユニークな性質を持つタンパク質であった²⁾。しかし、その機能は未だ分かっておらず、このような特殊なドメインを持ったタンパク質の機能がいかなるものか非常に興味深いため、また、*mysterin* の生体内における重要性を知るため、*zebrafish* を用いた *in vivo* の系で、*mysterin* の発現を喪失させ、引き起こされるフェノタイプの解析を目的とした実験を行った。

【方法】*Zebrafish* において、モルフォリノアンチセンスオリゴを用いた *mysterin* の発現抑制を行った。*Mysterin* の loss-of-function により引き起こされたフェノタイプを、明視野において観察し、さらに筋肉、神経、血管を組織染色によって観察した。

【結果】通常、*zebrafish* の孵化は、受精後三日目には完了するが、*mysterin* を発現抑制した胚は孵化効率が非常に低く 10%にも満たなかった。そこで、受精後一日目の胚を卵から強制的に孵化させ、運動能を観察したところ、*mysterin* のノックダウンによって著しい運動障害が見られた。そのパターンから、筋肉の機能異常や神経から筋肉への信号伝達異常の可能性が考えられたため、組織染色等を行った。驚くべきことに、顕著な筋肉繊維の乱れ、運動ニューロンの投射異常が見いだされた。以前、我々は、*mysterin* が血管ガイダンスへ強く寄与することを報告していたが、今回、新たに、筋肉、神経への寄与が明らかとなった。

【考察】以上から、もやもや病感受性タンパク質 *mysterin* は、血管ガイダンス制御の他、筋繊維形成、運動ニューロンの投射を制御していることが明らかとなった。今後は、*mysterin* の詳しい作用機構を知るため、Gal4-UAS システムを用いた組織特異的な強制発現系を導入し、*mysterin* の loss-of-function によるフェノタイプが cell-autonomous か non-cell-autonomous かを突き止めていく。また、*mysterin* の ATPase 活性は、分子形態を制御しているため、ユビキチンリガーゼドメインと合わせて *in vivo* における重要性を探索していく。

【文献】

1. Liu W, Morito D, Takashima S, Mineharu Y, Kobayashi H, Hitomi T, Hashikata H, Matsuura N, Yamazaki S, Toyoda A, Kikuta K, Takagi Y, Harada KH, Fujiyama A, Herzig R., Krischek B., Zou L., Kim JE, Kitakaze M., Miyamoto S., Nagata K., Hashimoto N., Koizumi A. (2011) *PLoS One*.
2. Morito D., Nishikawa K., Hoseki J., Kitamura A., Kotani Y., Kiso K., Kinjo M., Fujiyoshi Y., Nagata K. (2014) *Sci Rep*.

B-7

RAGE, receptor of advanced glycation endproducts, negatively regulates chondrocytes differentiation.

○高倉祐希 岩井敬祐 西村春香 中澤世莉子 田邊甫樹 藤田隆司

¹立命館大・薬・分子薬効毒性学

【Abstract】

RAGE, receptor for advanced glycation endproducts (AGE), has been characterized as an activator of osteoclastogenesis. However, whether RAGE directly regulates chondrocyte proliferation and differentiation is unclear. Here, we show that RAGE has an inhibitory role in chondrocyte differentiation. RAGE expression was observed in chondrocytes from the prehypertrophic to hypertrophic regions. In cultured cells, overexpression of *RAGE* or dominant-negative-*RAGE* (DN-*RAGE*) demonstrated that *RAGE* inhibited cartilaginous matrix production, while DN-*RAGE* promoted production. Additionally, *RAGE* regulated *Ihh* and *Col10a1* negatively but upregulated PTHrP receptor. *Ihh* promoter analysis and real-time PCR analysis suggested that downregulation of *Cdcs* was the key for *RAGE*-induced inhibition of chondrocyte differentiation. Overexpression of the NF- κ B inhibitor *I- κ B-SR* inhibited *RAGE*-induced NF- κ B activation, but did not influence inhibition of cartilaginous matrix production by *RAGE*. The inhibitory action of *RAGE* was restored by the Rho family GTPases inhibitor Toxin B. Furthermore, inhibitory action on *Ihh*, *Col10a1* and *Cdcs* was reproduced by constitutively active forms, *L63RhoA*, *L61Rac*, and *L61Cdc42*, but not by *I- κ B-SR*. *Cdx1* induced *Ihh* and *Col10a1* expressions and directly interacted with *Ihh* promoter. Retinoic acid (RA) partially rescued the inhibitory action of *RAGE*. These data combined suggests that RAGE negatively regulates chondrocyte differentiation at the prehypertrophic stage by modulating NF- κ B-independent and Rho family GTPases-dependent mechanisms.

B-8

細胞凝集塊を誘導するコラーゲンの骨再生促進能の評価

○國井沙織¹，山本 衛²，伊藤浩行²，平岡陽介³，森本康一¹

¹近畿大・生物理工・遺伝子工，²近畿大・生物理工・医用工，³新田ゼラチン（株）

【背景】コラーゲンは生体適合性が高く，再生医療分野で積極的に研究が進められている。しかし，動物実験においてコラーゲン単体の骨再生能は低いことが知られる¹⁾。我々は，新しくコラーゲンを開発し，新規コラーゲン（Col）上で培養したマウス骨芽前駆細胞（MC3T3-E1）とラット由来の初代骨髄間葉系幹細胞（rMSC）の骨芽細胞への分化促進能を評価した。さらに *in vivo* での Col の作用を調べるため，ラット骨欠損後の修復 15 日目の初期段階における仮骨形成を検証したので報告する。

【方法】酵素 X で処理した I 型コラーゲン（Col）を新たに調製した。この Col を培養皿に固定化し，MC3T3-E1 あるいは rMSC を骨芽細胞分化培地（株式会社プライマリーセル）で分化誘導し，アリザリンレッド S 染色で石灰化量を経時的に調べた。さらに，Col またはペプシン処理コラーゲン（P-Col）をそれぞれラット脛骨の外科的欠損部（φ 2.5 mm）に適当量埋植し，治癒段階の脛骨断面を HE 組織染色などで調べて Col の骨形成促進効果を評価した。

【結果と考察】我々が開発した Col で培養した MC3T3-E1 は細胞塊（スフェロイド）を形成したが，P-Col 上培養では MC3T3-E1 は単層で増殖していることが観察された。Col 上で培養した MC3T3-E1 および rMSC の骨芽細胞分化に伴う石灰化量は，無処理や P-Col 上での培養と比較して顕著に増加した。*In vivo* での実験結果から，Col を埋植した標本の骨再生能は P-Col より高いことが HE 染色により示された。また，ラット脛骨に埋植した Col は 15 日間でほとんど消失し，高い生体吸収性が確認された。以上の結果より，Col の石灰化と再生骨形成の亢進メカニズムは不明だが，Col は従来のコラーゲン材料と異なる機能を有することが明らかになった。本発表内容は，JST A-STEP ハイリスク挑戦タイプの研究支援で得られた成果である。

【文献】

1) Werntz, et al., *Orthop. Trans.* **10**, 1986.

B-9

SMN is essential for the HDAC6 mediated tubulin-deacetylation in fibroblasts

○Dian Kesumapramudya Nurputra¹, Hiroyuki Morita², Hisahide Nishio¹,
Yumi Tohyama²

¹ 神大・院医・疫学, ² 姫路獨協・薬・生化

Background: Spinal muscular atrophy (SMA) is a degenerative motor neuron disease caused by loss of the survival motor neuron (SMN) gene. The gene product, SMN, has been considered as one of cytoskeleton-dynamics regulator protein. On the other hand, a cytoplasmic class II-b, histone deacetylase-6 (HDAC6), has been reported to play some roles also in the development of neurodegenerative diseases through modification of α -tubulin deacetylation. In this study, we aim to clarify the effects of SMN on the deacetylation activity of HDAC6 in microtubule networks using SMA fibroblasts.

Method: Primary human fibroblasts derived from a healthy volunteer, SMA type 1 and type 3 patients were cultured and treated with HDACs inhibitors for 2 hours. After treatment, inhibitors were washed out and cells were incubated for further 2 hours. To confirm the result, series of SMN knockdown HeLa cell (SMN-KD HeLa) clones were established by transfecting *SMN-shRNA* containing vector. SMN-KD HeLa clones were treated in similar ways to fibroblasts. All cell lysates were subjected to immunoblotting using anti-acetylated α -tubulin (K40), anti- α -tubulin and anti-SMN antibodies.

Result: In fibroblasts derived from a healthy volunteer, 2h-treatment of TSA (class I and II HDAC inhibitor), tubastatin or CAY10603(HDAC6-specific inhibitor) greatly increased the acetylation at lysine 40 of α -tubulin while depletion of inhibitors reduced the acetylation to its basal level. In fibroblasts derived from SMA patients, treatment of inhibitors enhanced acetylation similarly but the deacetylation rate after removal of inhibitors was delayed as compared to healthy volunteer-derived cells. The experiment using SMN-KD HeLa clones showed a similar result with the result from fibroblasts.

Conclusion: These results suggest that SMN, an SMA causative gene product contributes to the deacetylation activity of HDAC6 that regulates the acetylation balance in microtubule networks and HDAC6 may be a potential therapeutic target of SMA.

MUC1 による uPA の発現誘導及び悪性化機構

○森 勇伍¹, 秋田 薫¹, 八代 正和², 澤田 鉄二², 平山 弘², 中田 博¹

¹京産大・総合生命・生命システム, ²大阪市大・院医・腫瘍外科

【目的】多くの上皮悪性腫瘍細胞で過剰発現している MUC1 は、膜結合型の糖タンパク質で腫瘍細胞の悪性化に関与していることが示唆されている。MUC1 は 1 本のポリペプチド鎖で合成された後、細胞内輸送過程において自己切断され、大半のエクトドメインを形成する N 末端ドメイン(=MUC1-ND)及び短い細胞外領域、膜貫通領域、細胞質内領域からなる C 末端ドメイン(=MUC1-CD)が非共有結合によってヘテロダイマーを形成し細胞膜へ輸送される。ヒト上皮悪性腫瘍細胞への MUC1 の強制発現に伴い、セリンプロテアーゼの一種であり、悪性腫瘍細胞の細胞浸潤能等に関与する分子である uPA の mRNA の増加が DNA microarray によって認められたことから、本研究では MUC1 の発現に伴う uPA の発現誘導機構及び悪性化機構への関与について検討した。

【方法】1) 各種ヒト上皮悪性腫瘍細胞株(HCT116, A549, SKOV3 細胞)を用いて、MUC1 強制発現細胞株及び MUC1 knockdown 細胞株を樹立し、それぞれの細胞における MUC1 と uPA の発現量の変化を SDS-PAGE 及び Western blotting を用いて検討した。2) ヒト胃癌、大腸癌、乳癌、膵臓癌患者組織切片を用いて、癌組織における MUC1 及び uPA の分布を調べた。3) MUC1 強制発現細胞を用いて、MUC1-CD と NF-kB p65 の相互作用を免疫沈降で検討すると共に、MUC1 発現の有無による NF-kB p65 の核移行の違いを検討した。4) MUC1 発現の有無による uPA promoter 上へリクルートされる NF-kB p65 の違いを Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) assay を用いて検討すると共に、uPA 遺伝子の転写への影響を Luciferase assay を用いて検討した。5) uPA の発現量変化に伴う癌悪性化機構への影響を、zymography による MMP-2/9 の活性及び invasion assay を用いた細胞浸潤能の測定により検討した。

【結果】1) 各種ヒト上皮悪性腫瘍細胞株において、MUC1 と uPA の発現に相関性が認められた。2) ヒト癌組織において、MUC1 と uPA は同一の発現パターンを示した。3) MUC1-CD と NF-kB p65 は複合体を形成することが示された。更に、MUC1 の発現によって NF-kB p65 の核移行の亢進が認められた。4) NF-kB p65 は MUC1-CD と複合体を形成することで、uPA promoter 上へよりリクルートされることが示された。加えて、MUC1 の発現によって uPA 遺伝子の転写活性も亢進することが示された。5) MUC1 発現細胞において、MMP-2/9 の活性が亢進して、同時に細胞浸潤能も亢進していることが示された。

【考察】過去の報告において、MUC1 が過剰発現している癌細胞及び癌組織では浸潤能が亢進していることが報告されていたが、その詳細な機構は未知なままであった。今回、本研究では MUC1 の発現に伴う細胞浸潤能の亢進における分子メカニズムとして、MUC1-CD/NF-kB p65 複合体が核移行し、uPA の promoter 上に結合することで uPA の転写を促進させ、uPA の発現量を増加させる結果、細胞浸潤能が亢進していることを明らかにした。以上のことから、上皮悪性腫瘍において MUC1 が過剰発現することで uPA の発現量を増加させ、細胞浸潤能が亢進する結果、腫瘍がより悪性化することが示唆される。

膜結合型ムチン MUC1 とシアル酸結合レクチン Siglec-9 の結合は

MUC1 と β -catenin の相互作用および細胞増殖を促進する

谷田 周平¹, ○秋田 薫¹, 石田 有希子¹, 森 勇伍¹, 戸田 宗豊¹, 井上 瑞江¹, 太田 麻利子¹, 八代 正和², 澤田 鉄二², 平川 弘², 中田 博¹

¹京産大・総合生命・生命システム, ²大阪市大・院医・腫瘍外科

【目的】MUC1 は多くの上皮性癌細胞において過剰発現する膜結合型のムチンであり、その発現レベルは予後不良と正の相関を示す。MUC1 の細胞外領域は N および O 型の多様な糖鎖により修飾されており、これらの糖鎖は Siglec や Galectin などの内在性レクチン分子のリガンドとして機能することが考えられる。Siglec はシアル酸含有糖鎖を認識する免疫グロブリンスーパーファミリーに属する細胞表面分子であり、マクロファージなどの免疫細胞に発現している。本研究では癌細胞を取り巻く微小環境に浸潤してきた免疫細胞表面上の Siglec と癌細胞表面上の MUC1 が相互作用する可能性、およびその生理的機能（癌細胞側）について検討した。

【方法】1). プルウダウンアッセイおよびプレートアッセイにより、MUC1 と Siglec の相互作用を調べた。2). ヒト膀胱癌、乳癌および大腸癌組織のパラフィン切片を用いて、癌組織における MUC1 発現細胞（癌細胞）と Siglec-9 発現細胞（免疫細胞）の分布／共局在を調べた。3). MUC1 強制発現細胞を用いて、MUC1 と繊維芽細胞増殖因子(FGF)受容体あるいは上皮成長因子(EGF)受容体との相互作用を免疫沈降にて調べた。4). 可溶型 Siglec-9 組み換えタンパク質存在／非存在下で培養した MUC1 強制発現細胞を用いて、MUC1 細胞質内領域にリクルートされる β -catenin 量を比較した。5). Siglec-9 強制発現／非発現細胞と共培養した MUC1 強制発現細胞を用いて、MUC1 細胞質内領域にリクルートされる β -catenin 量を比較した。6). 可溶型 Siglec-9 組み換えタンパク質存在／非存在下で培養した MUC1 強制発現細胞を用いて、 β -catenin の核移行および細胞増殖を比較した。

【結果】1). MUC1 は Siglec-9 と顕著に相互作用することが明らかになった。2). ヒト癌組織において MUC1 発現癌細胞は Siglec-9 発現細胞と共局在した。3). 今回使用した MUC1 強制発現細胞において、MUC1 と FGF 受容体-3 あるいは EGF 受容体の相互作用は認められなかった。4, 5). MUC1 強制発現細胞を可溶型 Siglec-9 組み換えタンパク質存在下で培養、あるいは Siglec-9 強制発現細胞と共培養することにより、MUC1 細胞質内領域にリクルートされる β -catenin 量が増加した。6). MUC1 への Siglec-9 の結合に伴い、核に移行する β -catenin 量が増加すると共に、細胞増殖が促進されることが明らかになった。

【考察】これまでの研究では、EGF あるいは FGF の刺激により活性化された Src キナーゼ、あるいは EGF 受容体のキナーゼドメインを介して MUC1 の細胞質内領域がリン酸化されると、 β -catenin との相互作用が増加することが報告されている。しかしながら、本研究ではそのような増殖因子受容体を介した経路とは独立して、MUC1 の細胞外領域に Siglec-9 が結合することによっても、MUC1 細胞質内領域への β -catenin のリクルートおよび β -catenin の核移行が増加し、結果として癌細胞の細胞増殖が促進されることを明らかにした。今回の結果は、MUC1 が様々な経路を介して癌の増殖／進展に関与していることを示唆している。

【文献】

1. S. Tanida, K. Akita, A. Ishida, Y. Mori, M. Toda, M. Inoue, M. Ohta, M. Yashiro, T. Sawada, K. Hirakawa, H. Nakada. Binding of the sialic acid binding lectin, Siglec-9, to the membrane mucin, MUC1, induces recruitment of beta-catenin and subsequent cell growth. *J. Biol. Chem.* 288(44): 31842-31852 (2013)

ナルディライジンは膵β細胞においてインスリン分泌を制御する
 ○西清人¹, 佐藤 雄一², 大野美紀子¹, 平岡義範¹, 西城さやか¹,
 稲垣 暢也², 西英一郎¹

¹京大・院医・循内, ²京大・院医・糖尿病内分泌栄養内

【目的】我々は、ナルディライジン(N-arginine dibasic convertase; NRDC)が細胞外ドメイン
 シェディングの活性化¹⁾、核内における遺伝子転写の調節²⁾、など様々な機能をもつタンパク
 であることを明らかにし、NRDC 欠損マウス (NRDC^{-/-}) の解析から、同分子が成長、軸
 索髄鞘形成¹⁾、体温調節²⁾、発ガン³⁾など種々の生命現象を制御することを示した。一方
 NRDC^{-/-}は「やせ」の表現型を呈し、同分子がエネルギー代謝においても重要な役割を持
 つことが示唆された。本研究では NRDC が糖代謝において果たす役割について検討した。

【方法・結果】糖負荷試験 (2g/kg 体重腹腔内投与) を施行し野生型マウスと比較したところ、NRDC^{-/-}は耐糖能異常を示し、糖負荷に対するインスリン分泌反応が著明に低下して
 いることがその原因と考えられた。そのため、膵組織を免疫染色 (抗インスリン抗体、抗
 グルカゴン抗体) および電子顕微鏡で観察したところ、NRDC^{-/-}の膵島、膵β細胞、イン
 スリン分泌顆粒に明らかな形態異常を認めなかった。次に、単離膵島を用いて糖負荷 (25mM
 グルコース)、KCl 負荷 (30mM KCl) に対するインスリン分泌反応を検討したところ、NRDC^{-/-}
 膵島は糖負荷に対してインスリン分泌反応を示さなかった。一方で、KCl を負荷した NRDC^{-/-}
 膵島はインスリン分泌反応を示しており、糖負荷に対するインスリン分泌反応が特異的に
 障害されていることがわかった。最後に、β細胞における NRDC の役割を *in vivo* で明らか
 にするために、β細胞特異的 NRDC 欠損マウスを樹立したところ、糖尿病の表現型を示し
 た。

【考察】NRDC 欠損マウスは軸索髄鞘形成不全などの表現型を示し、それらもインスリン
 分泌や糖代謝に影響を与えている可能性がある。しかし、本研究において単離膵島やβ細胞
 特異的 NRDC 欠損マウスを用いて解析することにより、膵β細胞における NRDC がイン
 スリン分泌に深く関わり、糖代謝を制御していることが明らかになったと考えられた。

【文献】

1. Ohno M, Hiraoka Y, Matsuoka T, Tomimoto H, Takao K, Miyakawa T, Oshima N, Kiyonari H, Kimura T, Kita T, Nishi E. (2009) Nat Neurosci. 12, 1506-1513.
2. Hiraoka Y, Matsuoka T, Ohno M, Nakamura K, Saijo S, Matsumura S, Nishi K, Sakamoto J, Chen PM, Inoue K, Fushiki T, Kita T, Kimura T, Nishi E. (2014) Nat Commun. 5, 3224.
3. Kanda K, Komekado H, Sawabu T, Ishizu S, Nakanishi Y, Nakatsuji M, Akitake-Kawano R, Ohno M, Hiraoka Y, Kawada M, Kawada K, Sakai Y, Matsumoto K, Kunichika M, Kimura T, Seno H, Nishi E, Chiba T. (2012) EMBO Mol Med. 5, 396-411.

ナルディライジンは PGC-1 α を制御することで体温恒常性維持機構と
適応熱産生を調節する

○西城さやか¹, 平岡義範¹, 松岡龍彦¹, 大野美紀子¹, 西清人¹, 西英一郎¹

¹京大・院医・循内

【目的】哺乳類の体温恒常性は厳密に維持されており、その核心温は中枢性セットポイントの設定、外気温の感知と末梢への指令、末梢性の熱産生および放散すなわち骨格筋におけるふるえ熱産生、褐色脂肪組織(BAT)における非ふるえ熱産生、末梢での血管収縮による熱放散抑制によって調節されている¹⁾。

一方、我々はナルディライジン(NRDc)が、細胞外ドメインシェディングの増強²⁾、核内での転写因子の活性化³⁾など様々な機能をもつタンパク質であることを示している。我々の作成したナルディライジン欠損マウスは多彩な表現型を示すが、低体温を呈したことから、今回、体温恒常性維持機構におけるナルディライジンの役割について検討した。

【結果】ナルディライジン欠損マウス(NRDc^{-/-})は、常温(24℃)において野生型と比較して1.5℃体温が低く、寒冷負荷(4℃)にて10℃台まで体温の低下を認めたことから、NRDcが体温恒常性維持に必須であることが明らかとなった⁴⁾。NRDc^{-/-}は低体温と低温不耐性を呈したにもかかわらず、常温において酸素消費量の増加とBATにおける熱産生の亢進を示していた。温度中性域(体温維持に基礎代謝以外のエネルギーを必要としない温度帯:30℃)における詳細な解析から、NRDc^{-/-}において、1)BAT熱産生が亢進していること、2)熱放散が亢進していること、3)中枢性体温セットポイントが低下していること、が明らかになった。一方BATの培養細胞系でNRDcはPGC-1 α の転写コアクチベーター活性を抑制することによってUCP1の発現を抑制していることが明らかとなった。

以上からNRDcは、中枢神経系(体温セットポイント設定)、末梢循環系あるいは皮膚(熱放散)、BAT(熱産生)での独立した機能を介して、体温恒常性を制御していることが明らかになった。

【文献】

1. Cannon, B. & Nedergaard, J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol. Rev.* **84**, 277-359 (2004).
2. Ohno M et al. Nardilysin regulates axonal maturation and myelination in the central and peripheral nervous system. *Nat Neurosci.* 2009
3. Li J1 et al. Identification and characterization of nardilysin as a novel dimethyl H3K4-binding protein involved in transcriptional regulation. *J Biol Chem.* 2012
4. Hiraoka Y et al. Critical roles of nardilysin in the maintenance of body temperature homeostasis. *Nat Commun.* 2014

腎尿濃縮調節における Moesin の役割の解明

○川口高德¹, 波多野亮¹, 田村淳², 月田早智子², 浅野真司¹¹立命館大・薬, ²阪大・院生命機能

【目的】 Na^+ 、 K^+ 、 2Cl^- 共輸送体 (NKCC2) は腎臓の太いヘンレの上行脚 (thick ascending limb: TAL) において電解質の再吸収を担うトランスポーターであり, NKCC2 の機能異常は電解質再吸収不全による Na^+ 、 K^+ 、 Cl^- の喪失を特徴とする I 型バーター症候群を引き起こすことが知られている. 上皮組織において膜タンパク質とアクチン細胞骨格とをクロスリンクする役割をもつタンパク質の 1 つであるモエシンは¹⁾, *in vitro* の系において NKCC2 と相互作用することが報告されている²⁾. そこで, 本研究ではモエシンノックアウトマウスを用いて, *in vivo* でモエシンの欠損が腎臓における尿濃縮機能に与える影響について検討した.

【方法】野生型及びモエシンノックアウトマウス (9-11 週齢) を代謝ケージに入れ, 採取した尿や血漿における電解質およびクレアチニンの濃度測定や血圧測定を行った. 更に, 生理機能の変化を検討するために, 各電解質の分画排泄率の算出や, 尾静脈からの FITC-イヌリン投与を行い, 2-コンパートメントモデルを用いた GFR の算出を行った. また, 腎髄質および腎皮質における種々のトランスポーターやその制御因子の発現を確認するため, ウェスタンブロッティング及び免疫組織染色を行った.

【結果】代謝ケージを用いた電解質・クレアチニンの動態解析より雄のモエシンノックアウトマウスにおいて Na^+ 、 K^+ 、 Cl^- それぞれの尿中への分画排泄の有意な亢進が認められ (図 1), GFR 及び血圧の有意な低下が確認された. また, ウェスタンブロッティングの結果から, 野生型マウスでリン酸化された活性型モエシンが多く分布する膜マイクロドメインにおいてモエシンノックアウトマウスでは NKCC2 の分布が減少していることが確認された.

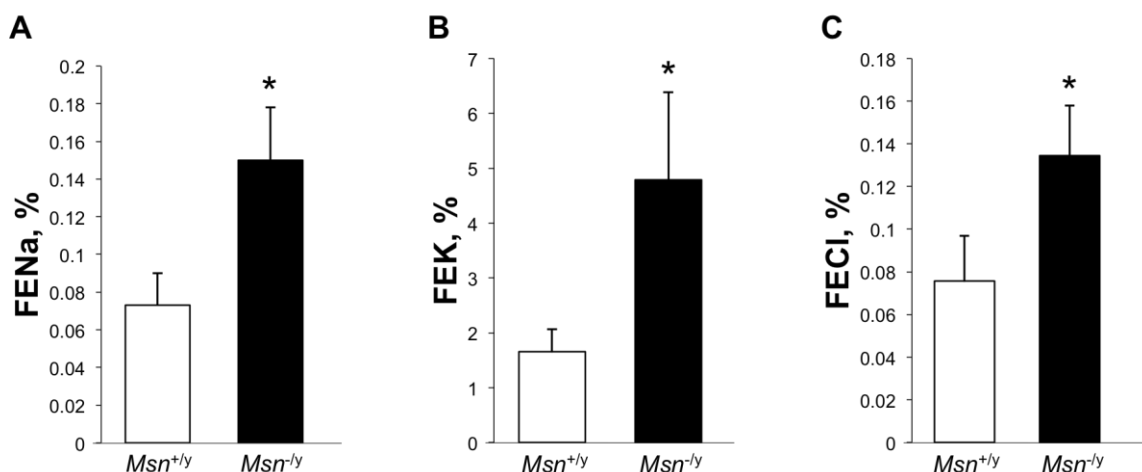


図 1. 野生型, モエシンノックアウトマウスにおける電解質の分画排泄率.
各電解質において有意な上昇が確認された ($Msn^{+/y}$, $n = 12$; $Msn^{-/y}$, $n = 13$; $p < 0.05$)

【考察】以上の結果より, モエシンノックアウトマウスでは NKCC2 の膜マイクロドメインでの局在異常を伴った電解質の再吸収力の低下を引き起こしていると考えられ, モエシンの欠損は, バーター症候群様の表現型を引き起こす可能性があることが示唆された.

【文献】

1. Tsukita, S., Yonemura, S. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**: 34507-34510
2. Carmosino, M., Rizzo, F., Procino, G., Zolla, L., Timperio, A., Basco, D., Barbieri, C., Torretta, S., Svelto, M. (2012) *Biol. Cell*, **104**, 658-676

B-15

Hsp47 欠損は肝星細胞で小胞体ストレス依存的なアポトーシスを引き起こす
○川崎 邦人^{1,2}, 潮田 亮¹, 伊藤 進也^{1,2}, 池田 一雄³, 真砂 有作^{1,2}, 永田 和宏¹
¹京産大・総生・生シ, ²京大・院理・生物, ³阪市大・医・解剖

【目的】慢性的な肝傷害は、コラーゲンを主成分とする細胞外基質の過剰な産生、沈着で特徴づけられる肝線維化を引き起こす。肝線維化における主要なコラーゲン産生細胞は肝星細胞である¹⁾。コラーゲン特異的分子シャペロン Hsp47 はコラーゲンの成熟に必須の分子シャペロンである²⁾。shRNA 等による Hsp47 の発現抑制によって肝線維化が抑えられることがすでに報告されているが、その際肝星細胞内で生じている変化について、詳細には明らかにされていない³⁾。本研究では、Hsp47 を欠損させた肝星細胞内でのコラーゲンの成熟、小胞体ストレス等の解析を目的とする。

【方法】Hsp47 floxed マウスから肝星細胞を単離し、培養下で活性化させる。Cre リコンビナーゼをアデノウィルスベクターを用いて活性型肝星細胞に導入することで、Hsp47 をノックアウトする。Hsp47 を欠損した活性型肝星細胞内の I 型プロコラーゲンや小胞体ストレス応答性タンパク質を免疫染色またはイムノブロットにより検出し、評価した。さらに、ミスフォールドしたコラーゲンの分解経路であるオートファジーの阻害剤を処理し、その際の小胞体ストレス応答性タンパク質の評価を行った。

【結果】Cre リコンビナーゼのウイルス導入から 12 日後、活性型肝星細胞の Hsp47 たんぱく質量は 20%以下になった。Hsp47 欠損の活性型肝星細胞における I 型プロコラーゲンは細胞内、特に小胞体に蓄積し、細胞外基質に含まれる I 型コラーゲン量が著しく減少することが示された。小胞体分子シャペロン BiP, Grp94 と小胞体ストレス応答性アポトーシス誘導転写因子 CHOP の誘導をイムノブロットにより観察したが、著しい上昇を認めることはできなかった。次に、オートファジー阻害剤を処理すると、Hsp47 欠損の活性型肝星細胞でより過剰な I 型プロコラーゲンの細胞内の蓄積が観察され、BiP や Grp94, CHOP の有意な上昇が観察された。

【考察】Hsp47 欠損により、ミスフォールドした I 型プロコラーゲンの小胞体内蓄積が引き起こされ、それにより小胞体ストレスが惹起され、アポトーシスが引き起こされることが示唆された。肝硬変の治療において、コラーゲンの分泌阻害にとどまらず、コラーゲン産生細胞を細胞死に導くことは大きな意義を持っている。したがって本研究の結果は、肝星細胞における Hsp47 が肝硬変治療の重要な標的の一つになりうることを示している。

【文献】

1. Friedman, SL. (2008) *Physiol. Rev.* 88, 125–172
2. Nagata, K. (1996) *TIBS.* 21, 23–26
3. Sato, Y., Murase, K., Kato, J., Kobune, M., Sato, T., Kawano, Y., Takimoto, R., Takada, K., Miyanishi, K., Matsunaga, T., Takayama, T., Niitsu, Y. (2008) *Nat. Biotechnol.* 26, 431–42

O-linked N-Acetyl Glucosamine (O-GlcNAc)は睡眠時無呼吸症候群で観察される
間欠的低酸素下でオートファジーを亢進し、且つ、酸化ストレスを抑制する。

○中川孝俊¹、佐々木泉帆²、渡辺明²、古川裕一²、野村篤生²、上橋和佳²、加藤隆児²、
井尻好雄²、林 哲也²、朝日通雄¹

¹大医大・医・薬理学、²大薬大・循環病態治療学

【目的】睡眠時無呼吸症候群（SAS）では低酸素・再酸素化が繰り返し起こる間欠的な虚血状態が引き起こされ、様々な心血管イベントの主要因となっている。これは糖尿病を合併する患者においてとりわけ影響が大きく治療上大きな問題となっている。一方、Serine/Threonine 残基への N-acetylglucosamine 修飾（O-GlcNAc 化）はリン酸化反応と拮抗する反応であり、細胞増殖、炎症反応等、様々なシグナル伝達に影響を及ぼすことが知られている。近年、虚血時にタンパク質の O-GlcNAc 化が亢進し、心機能に様々な影響を及ぼす事が報告されているが、その分子機序は未だ不明な点が多い。本研究の目的は低酸素/再酸素化時における O-GlcNAc 修飾タンパク質の心機能に及ぼす影響を糖尿病モデルマウス、O-GlcNAc 転移酵素遺伝子高発現マウス（OGTtg）及び培養細胞を用いてその分子機序を明らかにすることである。

【方法】in vivo study: db/db マウス（♂、8 週齢）及び OGTtg（♂、8-10 週齢）を間欠的低酸素状態下（5%酸素（1 分間）、21%酸素（5 分間）/サイクル）で 14 日間飼育し、これを SAS モデルとした。影響は組織染色法、及び、Western blot 法を用いた。

in vitro study: HEK293T 細胞を 2%酸素下で 4 時間培養した後、1 及び 2 時間 21%酸素下で培養した（低酸素/再酸素化モデル）。O-GlcNAc 化タンパク質の検出には Western blot 法を用いた。Densitometry 分析には Quantity One (Bio-Rad)を使用した。

【結果】in vivo study: 1) 間欠的低酸素処理は心筋変性と間質の線維化を促進した。これに伴い、2) 有意な O-GlcNAc 化タンパク質の増加が認められた (db/db マウス、OGTtg)、とりわけ 3) NFκB の O-GlcNAc 化の亢進が顕著であった。4) OGTtg において間欠的低酸化での左心室のリモデリングに亢進が認められた。5) 間欠的低酸素処理によりオートファジーが有意に亢進していた。一方でアポトーシスには抑制が見られた。(OGTtg)。

in vitro study: HEK293T 細胞においても、低酸素/再酸素化によって、1) 細胞内タンパク質の O-GlcNAc が有意に増加していた。2) O-GlcNAc 化を触媒する OGT の発現量を調べた所、有意な上昇が認められた。

【考察】分化した心筋細胞はいかなる状況下においても増殖することはないが、線維芽細胞は低酸素により増殖が促進され線維化すなわちリモデリングの促進につながる。本研究の結果より、O-GlcNAc 化タンパク質の増加は線維芽細胞の過増殖を制御している事が明らかとなり、その要因としてオートファジーとアポトーシスのバランス装置と機能している事が考えられた。このことは O-GlcNAc 化が、心筋のリモデリングを制御する治療標的と成り得る可能性が示唆された。

C-1

初代培養肝細胞における一酸化窒素誘導に対するグアヤク脂成分の効果
 ○中野由希^{1,2}, 亀岡寛史¹, 那須正彰², 松尾洋孝², 加納麻奈¹, 吉開会美¹,
 西澤幹雄¹, 池谷幸信²

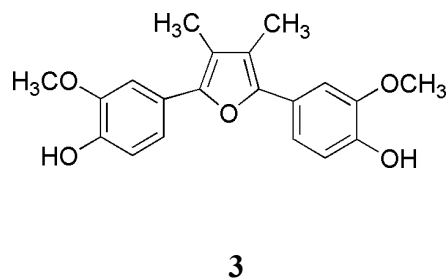
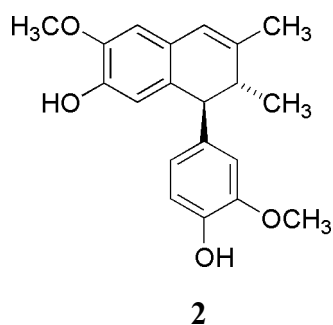
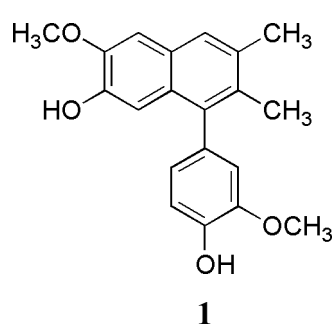
¹立命館大・生命科学・医化, ²立命館大・薬・生薬

【目的】グアヤク脂は、ユソウボク（癒瘡木 *Guaiacum officinale* L.）の樹幹から得られる樹脂であり、局所刺激薬、抗炎症薬、緩下薬として用いられてきた。¹⁾ これらの薬効のうち、抗炎症作用に着目すると、グアヤク脂には抗炎症活性成分が含まれることが予想された。炎症性サイトカインであるインターロイキン 1 β (IL-1 β) は肝細胞において、誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) を誘導し、炎症メディエーターである一酸化窒素 (NO) を産生する。本研究では、グアヤク脂の活性成分を分離同定し、これらが肝細胞における NO 産生誘導を抑制するかどうか検討した。

【方法】グアヤク脂（和光純薬）をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、12 画分に分けた。さらにこれらの画分を各種クロマトグラフィーに付し成分を単離した。単離した成分の構造は、NMR などの機器スペクトルデータの解析により決定した。

NO 産生抑制活性は、Wistar ラットから調製した初代培養肝細胞に、グアヤク脂の画分または成分と IL-1 β を同時添加し、8 時間培養後の NO 産生量を Griess 法により測定し、50% 阻害濃度 (IC₅₀) を求めた。また、細胞障害性確認のため培地中に放出された乳酸脱水素酵素 (LDH) 活性を測定した。iNOS タンパク質はウェスタンブロット法により解析した。

【結果】グアヤク脂の画分 (Fr. 3~12) は IL-1 β による NO 産生誘導を抑制した。活性分画の 1 つである Fr. 5 から単離した成分は、機器分析結果から dehydroguaiaretic acid (**1**) , (+)-*trans*-1,2-dihydrodehydroguaiaretic acid (**2**) , furoguaiacin (**3**) であると同定した。化合物 **1**, **2**, **3** は NO 産生誘導を濃度依存的に抑制し、IC₅₀ 値はそれぞれ 21, 38, 32 μ M であった。また、検討した濃度範囲では LDH 活性に有意な上昇は見られず、細胞障害性は観察されなかった。さらに化合物 **1** と **3** は、iNOS タンパク質の発現量を濃度依存的に減少させた。



【考察】本研究でグアヤク脂から単離された化合物は、いずれも isoeugenol 部分構造を持っていたことから、isoeugenol 部分構造が NO 産生抑制効果に関与していると考えられた。また、化合物 **1** と **3** は IL-1 β による iNOS タンパク質の誘導を抑制したので、iNOS 遺伝子の発現を主として転写レベルで抑制していることが示唆された。

【文献】

1. 三橋博 監修. “原色牧野和漢薬草大図鑑” 北隆館. 東京. p. 242 (1988).

植物病原菌 *Burkholderia plantarii* におけるファイトトキシン トロポロン生産制御ネットワーク

吉岡 誠訓¹、○三輪 瞬平¹、紀平 絵梨¹、仲曾根 薫²、五十嵐 雅之³、波多野 和樹³、
吉川 博文^{4,5}、兼崎 友⁵、江口 陽子¹、内海 龍太郎¹

¹近大院農バイオ、²近大工、³微化研、⁴東京農大応生化バイオ、⁵東京農大ゲノム解析セ

【目的】イネ苗立枯病は、イネ苗立枯細菌病菌 *Burkholderia plantarii* によって生産される植物毒素（ファイトトキシン）、トロポロンが主病原因子と考えられている。しかしながら、*B. plantarii* におけるトロポロン生産制御については、明らかにされていない。我々は、*B. plantarii* の全ゲノム解析情報をもとに、遺伝子破壊法を用いて、トロポロン生産制御に関する遺伝子として、2成分情報伝達(TCS)に関与する、ヒスチジンキナーゼ(*HK3*)、レスポンスレギュレーター (*RR1*, *RR2*)を明らかにしてきた。また、トロポロンはオートインデューサー様の作用を示し、培養液にトロポロンを添加することによって、トロポロンが誘導的に生産される。本研究において、TCS とトロポロンのオートインデューサー様機構によるトロポロンの生産制御ネットワークの分子機構の解明を目的にした。

【方法】トロポロン生産遺伝子群を明らかにするために、*HK3/RR1/RR2* 遺伝子破壊株とWTにおけるRNA-seqを行い、候補遺伝子の破壊株を作成して、実際にトロポロン生産量を測定し、TCS制御によるトロポロン生産に関与する遺伝子群を明らかにした。トロポロンのオートインデューサー様機構に関与する遺伝子を明らかにするために、各種遺伝子破壊株において、トロポロン添加によるトロポロン生産量を測定した。

【結果】RNA-seqの結果から *HK3/RR1/RR2* 遺伝子破壊株において、発現量が大きく低下した遺伝子群の中にトロポロン生合成に関わる(*paaD*, *caiA*, *aroG*)、トロポロンの排出輸送ポンプ(*emrK*)、取り込みトランスポーター(*cirA2*)、転写調節遺伝子 (QS2) に関与する遺伝子群が明らかになった。また、遺伝子破壊実験の結果、QS2 遺伝子破壊株において、トロポロンによるトロポロン生産誘導は観察されず、オートインデューサー様機構は抑制された。しかしながら、QS2 欠損株では *HK3/RR1/RR2* の発現量が上昇した。

【考察】本研究において、トロポロン生産に関与するマスター調節遺伝子として、QS2が見出された。QS2はクオラムセンシングの転写調節因子、LuxRと高い相同性を示し、トロポロンによるオートインデューサー様機構に主要な役割を果たしていることが示唆された。TCS, *HK3/RR1/RR2*の制御下に発現したQS2はトロポロンを感知することでトロポロン産生遺伝子の活性化と *HK3/RR1/RR2* の抑制を行うことが推定された。

アオジソに含まれる一酸化窒素産生を抑制する成分に関する研究

○難波真由里^{1,2}, 長谷川千紘², 松尾洋孝², 吉開会美¹, 西澤幹雄¹, 池谷幸信²

¹立命館大・生命科学・医化, ²立命館大・薬・生薬

【目的】シソの葉（蘇葉）は長年、民間薬や漢方処方を構成する生薬として使われており、花粉症などのアレルギーや炎症に効果があることが知られている。マウスへの経口投与の実験で、アオジソ *Perilla frutescens* Briton var. *crispa* f. *viridis* 水抽出物が抗炎症・抗アレルギー作用を示すことが報告されている。¹⁾ 私たちも、アオジソの水抽出物が炎症メディエーターである一酸化窒素（NO）の産生を抑制し、誘導型一酸化窒素合成酵素(iNOS) mRNA を濃度依存的に抑制することを報告した。²⁾ 本研究では、アオジソの抗炎症成分の抗炎症作用を解明すべく、アオジソの抽出エキスを分画精製して得た成分の NO 産生誘導に対する作用を検討した。

【方法】アオジソの乾燥葉（株式会社アミノアップ化学）を MeOH で還流抽出した。抽出液を濾過し、濾液を減圧濃縮して得た MeOH 抽出エキスを水に溶解し、EtOAc, 次いで *n*-BuOH で分配抽出した。EtOAc 抽出液, *n*-BuOH 抽出液および残った水相をそれぞれ減圧濃縮し、EtOAc 可溶部, *n*-BuOH 可溶部, 水可溶部を得た。NO 産生抑制活性が認められた *n*-BuOH 可溶部を各種クロマトグラフィーに付し成分を分離した。Wistar ラットから調製した初代培養肝細胞に、アオジソ成分と炎症性サイトカインの IL-1 β を同時添加し 8 時間培養後、培地中の NO 産生量を Griess 法で測定して、各成分の NO 産生誘導の阻害活性を調べた。

【結果】両親媒性画分である *n*-BuOH 可溶部から、青酸配糖体である prunasin (**1**)と(*R*)-2-(2-*O*- β -D-glucopyranosyl- β -D-glucopyranosyloxy)-phenylacetonitrile (**2**)の他、フラボノイド配糖体の apigenin-7-*O*- β -D-glucuronide (**3**)を分離した。化合物 **1** および **2** は IL-1 β で誘導された NO 産生を抑制する作用を示さなかったが、化合物 **3** は濃度依存的に NO 産生誘導を抑制した。このとき細胞障害性は認められなかった。EtOAc 可溶部から分離した apigenin と化合物 **3** を比較すると、アグリコンである apigeninの方が強い NO 産生誘導の抑制活性を示した。なお、化合物 **2** のアオジソからの分離は初めての例である。

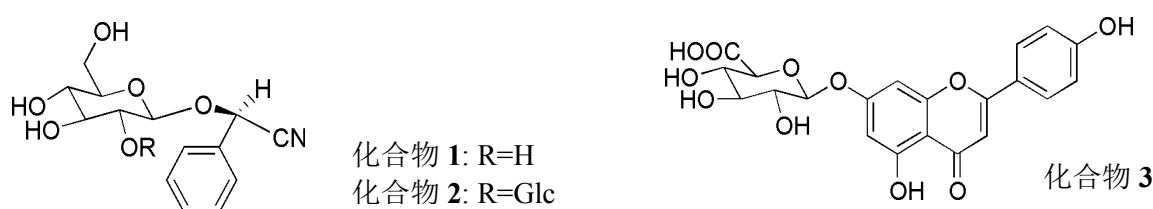


図 1. アオジソの *n*-BuOH 可溶部から分離した化合物

【考察】Apigenin の配糖体である apigenin-7-*O*- β -D-glucuronide(**3**)は、IL-1 β で誘発された NO 産生誘導を濃度依存的に抑制し、強い NO 産生抑制活性を示したことから、アオジソの抗炎症作用にはフラボノイドに加え、フラボノイド配糖体も関与することが示唆された。しかし、アグリコンである apigeninの方が apigenin 配糖体よりも強い NO 産生抑制活性を示した。肝細胞におけるグルクロン酸抱合の影響も考えられるが、今後検討する予定である。

【文献】

1. Yamazaki, M., et al. *Biosci. Biotech. Biochem.* **65**, 1673-1675 (2001).
2. 山本有香ら. 第 18 回肝細胞研究会. 東京 (2011).

C-4

Study of a cellular signaling network stimulated with leucine transported by a cancer-type amino acid transporter LAT1.

○Pornparn Kongprach¹, Pattama Wiriyasermkul¹, Noriyoshi Isozumi¹, Printip Wongthai¹, Suguru Okuda¹, Kenjiro Tadagaki¹, Ryuichi Ohgaki¹, Shushi Nagamori¹, Yoshikatsu Kanai¹

¹ Biosystem Pharmacology, Department of Pharmacology, Graduate School of Medicine, Osaka University

L-type amino acid transporter (LAT1) is a cancer-type transporter for large neutral amino acids. The expression of LAT1 is found in various human cancers. However, little is known regarding the clinical significance of LAT1 expression in cancers, such as pancreatic cancer even though the high expression of LAT1 protein is closely correlated with low survival rate of pancreatic patient. Leucine is one of LAT1 substrates and transported into cancer cells by LAT1. Leucine is not only building block for protein but also an important signaling molecule to regulate cell growth and cell proliferation by stimulating mTORC1 signaling pathway. Nonetheless, cellular mechanisms of the signaling pathway stimulated with leucine still largely remain elusive. Here we demonstrated that LAT1 was expressed in a pancreatic cancer cell line MIA PaCa-2 by Western blot and immunofluorescent microscopy. It was shown that leucine was transported into MIA PaCa-2 cells through LAT1 since the uptake was inhibited by an LAT1 inhibitor BCH. Stimulation of the cells with leucine resulted in phosphorylation of p70S6K, a downstream target of mTORC1, and BCH treatment impaired the activation of p70S6K indicating strongly that the activation of mTORC1 by leucine in MIA PaCa-2 cells required leucine transported by LAT1. Furthermore, comprehensive phosphoproteomics analysis revealed that the leucine transported by LAT1 regulated multiple pathways, such as cell survival or cell adhesion pathway as well as cell growth and proliferation. Altogether, our data indicated that LAT1 plays the important roles in regulating cell growth of MIA PaCa-2 pancreatic cancer cells by supplying leucine as a signaling molecule for mTORC1 pathway, suggesting LAT1 is a strong candidate as a therapeutic target for the treatment of pancreatic cancer.

Reference:

1. Kaira, K., Sunose, Y. (2012) *British Journal of Cancer*. 107, 632–638

甘草の成分による一酸化窒素産生誘導の抑制

○種本龍之亮^{1,2}, 吉開会美¹, 松尾洋孝², 池谷幸信², 西澤幹雄¹¹立命館大・生命科学・医化, ²立命館大・薬・生薬

【目的】甘草は、配合されている生薬の作用を緩和したり調和させる目的で、漢方処方の約7割に含まれている重要な生薬である。薬徴などの古典には、甘草の作用として鎮痙、鎮咳、抗炎症などの作用が記載されているが、¹⁾現代薬理学的な研究では抗炎症作用をはじめ広範な作用²⁻⁴⁾が報告されている。甘草の抗炎症成分の研究に関して glycyrrhizin や liquiritin がカラゲニン浮腫を抑制する、あるいは licochalcone A および B がロイコトリエン B4 や C4 の産生を抑制するなどの報告はあるが、²⁾glycyrrhizin 以外の成分の抗炎症活性についての報告は少ししかない。そこで、甘草の抗炎症成分を詳細に研究するため、肝細胞を用いて、炎症メディエーターである一酸化窒素 (NO) の産生誘導の抑制活性を指標に、甘草の抗炎症成分の探索を行った。

【方法】内蒙古産の甘草 (*Glycyrrhiza uralensis* Fisher の根およびストロン) の熱水抽出エキスを Diaion HP-20 カラムクロマトグラフィーに付し、水-MeOH 混合溶媒で溶出して6つの画分に分画した。各画分の NO 産生抑制活性を測定し、抑制作用が認められた 80% MeOH 溶出画分 (Gu-80ME) を各種カラムクロマトグラフィーに付し、化合物を単離した。Wistar ラットから調製した初代培養肝細胞に、甘草エキスまたは成分と IL-1 β を添加し、8 時間培養後の NO 産生量を Griess 法で測定した。

【結果】6つの甘草エキスの画分の内、低極性側の3画分 Gu-60ME, Gu-80ME, Gu-100ME に強い NO 産生抑制活性が認められた。最も収量の多かった Gu-80ME から、主成分である glycyrrhizin と isoliquiritigenin の他、3種のフラボノイドを単離した。これら成分について NO 産生抑制試験を行った結果、isoliquiritigenin, liquiritigenin, isoliquiritin に NO 産生抑制作用が見られたが、主成分である glycyrrhizin には NO 産生抑制作用がほとんど見られなかった。Glycyrrhizin は腸内細菌によって glycyrrhetic acid へと代謝されるので、⁵⁾glycyrrhetic acid についても調べたところ、NO 産生をほとんど抑制せず、細胞障害性を示した。

【考察】抗炎症作用の指標である NO 産生誘導の抑制においては、甘草の主成分である glycyrrhizin よりもむしろ、フラボノイド成分が深くかかわっていると考えられた。アグリコンと比較すると、フラボノイド配糖体の NO 産生抑制活性は弱かったが、これは配糖体になることで両親媒性になり、細胞膜を透過しにくくなるためと考えられた。

【文献】

1. 鳥居塚和生 編. “モノグラフ生薬の薬効・薬理”, 医歯薬出版, 東京. pp. 61–63 (2003).
2. Fu Y, Chen J, Li YJ, Zeng YF, Li P. *Food Chemistry* **141**, 1063–1071 (2013).
3. Shin YW, Bae EA, Lee B, Lee SH, Kim JA, Kim YS, Kim DH. *Planta Med.* **73**, 257–261 (2007).
4. 伊藤美千穂, 北山隆 監修. “生薬単”, NTS, 東京. pp. 142–143 (2012).
5. Taiko A, Teruaki A, Kyoichi K. *Chem Phar Bull.* **35**, 705–710 (1987).

初代培養肝細胞における一酸化窒素誘導に対する防風およびその成分の効果

○下倉 敏裕¹, 神野 拓也^{1,2}, 吉開 会美¹, 池谷幸信², 西澤 幹雄¹

¹立命館大・生命科学・医化, ²立命館大・薬・生薬

【目的】ボウフウ (*Saposhnikovia divaricata* Schischkin) は中国原産のセリ科に属する多年生草本であり、その根と根茎を生薬「防風」として使用する。主な薬効として解熱、鎮痛、抗菌などの作用がある。主成分にはクロモン類である ledebouriellol や hamaudol などがある。ボウフウの成分研究として、deltoin 等の数種の成分が RAW 264.7 細胞において炎症メディエーターである一酸化窒素 (NO) の産生を抑制するという報告¹⁾はあるが、クロモン類についての研究はほとんどない。炎症性サイトカインであるインターロイキン 1 β (IL-1 β) は、肝細胞において誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) を誘導して NO を産生する。本研究では、ラット初代培養肝細胞を用いて、IL-1 β による NO 産生誘導に対するボウフウ成分の抑制効果を検討し、主要成分の抗炎症作用の機序を明らかにすることを目的とした。

【方法】防風をメタノールで還流抽出後、水に溶解し、酢酸エチル抽出し、脂溶性画分 (A 画分) を得た。残った水層を *n*-ブタノールで分配抽出し、両親媒性画分 (B 画分) と水溶性画分 (C 画分) に粗分画した。A 画分から分離精製した成分を NMR によって同定した。コラゲナーゼ灌流法によって Wistar ラットから初代培養肝細胞を調製し、一晚培養後、ボウフウの各画分と IL-1 β を同時添加し、37°C で 8 時間培養した。培地中の NO 量を Griess 法で測定し 50% 阻害濃度 (IC₅₀) を求めた。細胞障害性は培地中の乳酸脱水素酵素活性を指標とした。iNOS タンパク質の発現量はウェスタンブロット法により解析した。

【結果】

1. ボウフウから得られたメタノール抽出物 237.1 g (100% 重量比) を粗分画して、A 画分 57.33 g (24.7%)、B 画分 23.60 g (10.2%)、C 画分 102.83 g (44.4%) を得た。
2. ボウフウの A 画分は IL-1 β による NO 産生誘導を濃度依存的に抑制したが、細胞障害性は認められず、IC₅₀ 値は 13.2 μ g/mL であった。B 画分は NO 産生誘導をある程度、抑制したが、IC₅₀ 値は求められなかった。一方、C 画分は、実験で用いた濃度の範囲では NO 産生誘導を抑制しなかった。
3. A 画分から ledebouriellol および hamaudol を分離して、NMR によって同定した。
4. Ledebouriellol と hamaudol は NO 産生誘導を濃度依存的に抑制した。細胞障害性は観察されず、IC₅₀ 値はそれぞれ 48 μ M と 213 μ M であった。
5. A 画分、ledebouriellol と hamaudol は iNOS タンパク質の誘導を濃度依存的に減少させた。

【考察】A 画分に含まれている ledebouriellol と hamaudol が NO 産生誘導を抑制したので、これらが A 画分の NO 産生誘導抑制作用に寄与していると考えられた。しかしこれらの成分の IC₅₀ 値と予想される含有量とから考えると、A 画分の抑制作用には他の成分も関与している可能性が示唆された。A 画分、ledebouriellol および hamaudol は、IL-1 β で誘導された iNOS タンパク質を減少させたことから、A 画分とこれらの成分は iNOS 遺伝子を主として転写レベルで抑制することによって、NO 産生を抑制していることが考えられた。

【文献】

1. Wang C. C., et al. *Cancer Letters* **145**, 151-157 (1999).

脂肪肝形成に対する経口性 IVA 型ホスホリパーゼ A₂ 阻害剤の抑制効果

○金井志帆, 倉井悠貴, 古庄由佳, 西川瑞稀, 石原慶一, 秋葉 聡

京都薬大

【目的】非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) は高脂肪食摂取により脂肪肝から線維化を発症する疾患で、食生活の欧米化に伴い我が国でも増加の一途をたどっている。NASH への進展では炎症反応が誘起されていることから、我々は、脂質性起炎物質の遊離・生成反応を担う IVA 型ホスホリパーゼ A₂ (IVA-PLA₂) を治療標的分子の候補として考えている。これまでに、本酵素の欠損マウスにおいて高脂肪食投与による脂肪肝形成と肝線維化の抑制、および、四塩化炭素 (CCl₄) 誘発性の肝線維化の抑制を見出しており、NASH の発症過程への本酵素の関与を示した^{1,2)}。本研究では IVA-PLA₂ 阻害剤の投与による、高脂肪食誘発性の脂肪肝の発症阻止および改善について検討した。

【方法】雄性の C57BL/6N マウスに高脂肪食 (HFD) を自由摂食で 16 週間与え脂肪肝を形成させた。対照として普通食 (ND) を同期間与えた。一方、IVA-PLA₂ 阻害剤である ASB14780 (アスピオファーマ (株) から供与) または対照としての投与媒体を期間中連日経口投与した。脂肪肝の指標として、肝組織中のトリグリセリド (TG) およびコレステロール (Chol) 量を測定した。また、肝組織を用いて脂肪肝形成に関連する分子の mRNA 発現量を RT-PCR 法にて測定した。

【結果】肝組織中の TG および Chol 量は ND 投与群に比し HFD 投与群で増加したが、ASB14780 の投与により有意に抑制された。また、10 週間 HFD を投与することで脂肪肝を形成させたマウスに、さらに 6 週間 HFD および ASB14780 を投与した群においても、HFD を 16 週間投与した群に比し TG 量には減少傾向が見られ、Chol 量は有意に減少した。さらに、脂肪肝形成関連分子として TG 合成に関与する SREBP1c および SCD-1 の mRNA 発現量を測定したところ、ND 投与群に比し HFD 投与群で増加していたが、ASB14780 の投与で有意に抑制された。

【考察】以上の結果より、HFD 投与により形成された脂肪肝は、高脂肪食摂取と同時期から ASB14780 を投与することで抑制されることが明らかとなった。これは、IVA-PLA₂ 欠損マウスでの結果と一致しており、脂肪肝の形成抑制に IVA-PLA₂ の阻害が有効であると考えられる。さらに、脂肪肝形成後に ASB14780 を投与した場合においても脂肪肝が改善したことから、IVA-PLA₂ の阻害が治療の面でも有効である可能性が新たに明らかとなった。したがって、本阻害剤は NASH の発症阻止を目指した薬物として有望であると考えられる。

【文献】

1. Ii H, Yokoyama N, Yoshida S, Tsutsumi K, Hatakeyama S, Sato T, Ishihara K, Akiba S. (2009) PLoS One, 4, e8089
2. Ishihara K, Miyazaki A, Nabe T, Fushimi H, Iriyama N, Kanai S, Sato T, Uozumi N, Shimizu T, Akiba S. (2012) FASEB J., 26, 4111-21

B 細胞抗原受容体シグナル伝達におけるスフィンゴ糖脂質 CD77 の機能解析

○湯浅大史^{1,2}, 濱野久美子^{1,2}, 関亮祐¹, 岡昌吾¹, 竹松弘¹¹京大・院医, ²京大・院生命

【目的】リンパ球 B 細胞は, T 細胞依存性抗原による刺激を受けて活性化され, 活発な増殖を繰り返すことで二次リンパ組織の濾胞内に胚中心という構造を構成する. 胚中心では高頻度体細胞突然変異による抗原との親和性増大, 自己抗原反応性 B 細胞のアポトーシスによる負の選択, 異なる機能を持つ抗体を産生するためのクラススイッチ組み換えなどの反応を経てメモリー B 細胞および抗体産生プラズマ細胞へと分化する. ヒトにおいて胚中心を構成する活性化 B 細胞は, スフィンゴ糖脂質 CD77 の発現の違いで CD77 陽性の細胞 (セントロブラスト), CD77 陰性の細胞 (セントロサイト) の 2 種類に分類される. しかし, CD77 発現変化の機能的な研究はあまり進展していない. 我々は, CD77 の発現が B 細胞抗原受容体 (BCR) シグナル伝達経路においてどのような機能性を持つかを明らかにするために実験を行った.

【方法】生体内から取り出した胚中心 B 細胞では糖鎖以外の変化を無視できず, CD77 の機能を解析することは困難である. 一方で, ヒト B lymphoma 培養細胞株である Namalwa 細胞は, 抗 IgM 抗体で刺激することで成熟 B 細胞と同様に BCR シグナル伝達を観察することができ, ヒトでの BCR シグナル伝達を研究する上で優れたモデルとなる. このため, 我々の研究室では Namalwa 細胞にコントロールウィルスを導入したセントロサイト様細胞, CD77 合成酵素 A4GALT を強制発現したセントロブラスト様細胞, 糖脂質発現を全体的に抑えたドミナントネガティブ体の糖鎖発現のみを変化させた 3 種の細胞を作製した. これらのモデル細胞を用いて, BCR を標的とした抗原刺激を加えた際の BCR シグナル伝達の応答を様々な下流因子のリン酸化の変化に注目して調べた.

【結果】CD19 は BCR シグナル伝達を正に制御する BCR 共受容体であり, リン酸化されることで PI3 キナーゼなどのシグナル因子をリクルートする. セントロブラスト様細胞 (CD77 陽性) では CD19 の細胞外ドメインの糖鎖付加が変化するとともに, 細胞内ドメインにおけるリン酸化が抑制された. 同様に, CD19 の下流でシグナル伝達に関わると考えられる Akt および Akt 基質のリン酸化の抑制も見られた. 一方で, その他のシグナル伝達経路においては CD77 発現の影響は見られなかった.

【考察】これより, CD77 は CD19 を介して BCR シグナル伝達のうち, Akt 経路を特異的な標的として負に制御していることが明らかになった. 現在, その特異性をさらに確認するため MAP キナーゼ経路の JNK 経路, p38 経路についても検討中である.

コンドロイチン硫酸受容体を介した神経細胞の極性形成過程の制御機構の解析

○志田 美春¹, 友廣 彩夏¹, 三上 雅久¹, 田村 純一², 北川 裕之¹

¹神戸薬大・生化, ²鳥取大・地域

【目的】コンドロイチン硫酸 (CS) は, コアタンパク質に共有結合したプロテオグリカン (CSPG) として中枢神経系の細胞外マトリックスに豊富に存在する硫酸化多糖の一つである. CS は, 損傷を受けた成体脳において軸索再生の阻害分子として振る舞う一方, 神経突起伸長の促進分子としての一面も併せ持つ. こうした一見矛盾した働きは CS の硫酸化構造の違いに起因すると考えられる. 実際, CS-E という高硫酸化 CS をコートした基質上で海馬神経細胞を培養すると, 軸索様の長い神経突起の伸長が促進されるが, CS-E とは異なる高硫酸化 CS である CS-D をコートした基質上で培養すると, 比較的短い神経突起が複数本観察されるに過ぎないという形態的な差異が見受けられる. このことから, 神経突起伸長が CS の硫酸化構造により厳密に制御されている可能性が示唆される. これまでに我々は, 細胞接着分子の一つである *contactin-1* (CNTN-1) が CS-E を認識する CS 受容体として機能し, CS-E による神経突起伸長が CS 受容体分子を介する細胞内シグナル伝達経路の活性化に起因することを明らかにした¹⁾.

興味深いことに, CS-D および CS-E 基質上で培養した海馬神経細胞の神経突起の形態は, 神経細胞の極性形成過程における未熟な神経突起から軸索または樹状突起への運命が決定される特定の段階での神経突起の形態と酷似している. このことから, 高硫酸化 CS が神経細胞の極性形成過程の調節にも関与する可能性が考えられた. そこで本研究では, 神経細胞の極性形成過程における高硫酸化 CS の機能について検討した.

【方法】マウス胎仔由来の海馬神経細胞に CS 受容体分子の shRNA 発現プラスミドおよび黄色蛍光タンパク質の発現プラスミドを導入し, CS-D および CS-E の割合を変化させた混合基質上で培養した. その後, 神経細胞のマーカーに対する抗体を用いて免疫染色を行い, 神経突起の長さを計測した.

【結果・考察】CS-D および CS-E の混合基質中の CS-D の割合を変化させることで, 神経細胞の極性形成過程が制御可能であることが分かった. また, この制御には CNTN-1 を含めた複数の CS 受容体分子を介した細胞内シグナル経路の関与が示唆された²⁾.

【文献】

1. Mikami T., Yasunaga D., and Kitagawa H.. (2009) *J. Biol. Chem.*, 284, 4494-4499.
2. Mikami T., and Kitagawa H. (2013) *Biochim. Biophys. Acta*, 1830, 4719-4733.

ゼブラフィッシュ *Chm1* 遺伝子の軟骨特異的な発現を制御するシスエレメントの同定

○山下 寛¹, 宿南 知佐^{1,2}, 開 祐司¹

¹京都大・再生医科学研究所・生体分子設計学, ²広島大・院医歯薬保・生体分子機能学

【目的】軟骨は間葉系では例外的に無血管な組織であるが、関節リウマチなどの血管新生病態のもとでは血管が侵入して組織が破壊される。つまり、軟骨の形成・機能維持には、組織の無血管性の維持が非常に重要である。我々は、軟骨マトリクス中に存在し、軟骨の無血管性を制御するタンパク質として、血管新生抑制因子Chondromodulin-I (ChM-I)を同定した¹⁾。ChM-Iは無血管軟骨に限局して発現し、血管侵入部位では消失するというユニークな発現パターンを示すが、その軟骨組織特異的な発現制御機構は良くわかっていない。本研究では、胚が透明で、顕微鏡による生体蛍光観察が容易なゼブラフィッシュを用いて、*in vivo*での軟骨特異的な*Chm1*遺伝子の転写制御機構の解明を目的としている。

【方法】*in vivo*での組織特異的な転写活性を、Tol2 トランスポゼースを用いて作成したトランスジェニックゼブラフィッシュ (Tg) において検討した。具体的には、プロモーターを含むと考えられるゼブラフィッシュ *Chm1* (*zChm1*) 遺伝子の翻訳開始点上流約 1,500 bp に *Gal4* 遺伝子を連結したプラスミドを作成した。これを Tol2 トランスポゼースの mRNA と共に、*Gal4* タンパク質の発現に応じて GFP を発現する(UAS-EGFP) Tg 胚にインジェクションし、幼魚の頭部の軟骨における GFP の蛍光を観察した。

【結果】ゼブラフィッシュ *Chm1* (*zChm1*) 遺伝子の翻訳開始点上流約 1,500 bp の領域は、*in situ* hybridization で観察される内在性 *zChm1* 発現パターンと同様に、脊索、ヒレ、耳胞および頭部の軟骨において GFP の発現を誘導した。そこで、翻訳開始点上流約 500 bp、300 bp、150 bp の領域について同様に *in vivo*での転写活性について検討したところ、300 bp の領域は、1,500 bp の領域と同等の GFP の発現を誘導したのに対し、150 bp の領域は脊索や耳胞における GFP の発現を誘導したが、頭部の軟骨における GFP の発現は誘導しなかった。そこで、翻訳開始点上流の領域を 300 bp から 150 bp まで段階的に欠失させたプラスミドを作成し詳細な検討を行ったところ、翻訳開始点上流 207 bp から 182 bp までの領域が、頭部の軟骨における EGFP の発現誘導に重要であることが明らかとなった。

次に、ゼブラフィッシュの頭部から抽出した核抽出物を用いた DNA プルダウン法により、翻訳開始点上流 207 bp から 182 bp の領域に結合する転写因子を検討した。共沈したタンパク質を質量分析により解析したところ、Regulation of nuclear pre-mRNA domain containing protein 1b (RPRD1b)が含まれていることが明らかとなった。そこで、HEK293T 細胞においてゼブラフィッシュ RPRD1b および翻訳開始点上流 300 bp の領域を用いたデュアルルシフェラーゼアッセイを行ったところ、RPRD1b の発現によって翻訳開始点上流 300 bp の領域の持つ転写活性の増強が確認できた。

【考察】以上の結果から、*zChm1* 遺伝子の翻訳開始点上流 207 bp から 182 bp の領域が、*in vivo*における軟骨特異的な転写制御を促進するシスエレメントを含むことが明らかとなり、このシスエレメントによる *zChm1* 遺伝子の転写制御に、RPRD1b が関与している可能性が示唆された。

【文献】

1. Yuji Hiraki, Hiroyuki Inoue, Ken-ichi Iyama, Akihito Kamizono, Masanori Ochiai, Chisa Shukunami, Sadayo Iijima, Fujio Suzuki and Jun Kondo (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 32419-32426.

糖尿病性神経因性疼痛における脊髄後角の一酸化窒素産生と治療薬の効果

○大野華奈¹, 安永俊之², 芦高恵美子^{1,3}¹大阪工大・院工・生体医工, ²大阪工大・工・生体医工, ³大阪工大・工・生命工学

【目的】糖尿病の合併症の1つである糖尿病性神経因性疼痛には、ポリオール代謝の亢進やタンパク質の糖化に加えて、末梢神経の変性や脱落が関与することが明らかにされているが、中枢神経系の制御についての詳細は明らかではない。脊髄では興奮神経伝達物質のグルタミン酸による一酸化窒素(NO)の産生が神経損傷や結縷による神経因性疼痛に関与することが報告されている。本研究では、糖尿病モデルマウスを作製し、脊髄切片のNADPH ジアホラーゼ活性によるNO産生を測定し、糖尿病性神経因性疼痛におけるNOの役割と治療薬の効果を解析した。

【方法】5週齢の雄マウスにストレプトゾトシン(STZ, 200 µg/g)を腹腔内投与することにより糖尿病モデルマウスを、カラゲニン(1%, 20 µl)を両脚に投与することにより炎症性疼痛モデルマウスを作製した。STZ投与後週毎に、カラゲニン投与後24時間に von Frey 試験により機械刺激に対する疼痛反応を測定した。STZ投与後3週目とカラゲニン投与後24時間の脊髄を摘出し、ニトロブルーテトラゾリウムとNADPH存在下37℃で反応させ、ニトロブルーテトラゾリウムフォルマザンの青色の発色を顕微鏡で観察し、Image Jにより定量した。また、脊髄のRNAを抽出し、cDNAを合成後、Real-time PCRにより神経型NO合成酵素(nNOS)と誘導型NO合成酵素(iNOS)の発現量の解析を行った。さらに、STZ投与後3週間目のマウスに、アミトリプチン(セロトニン再取り込み阻害剤)、ガバペンチン(電位依存性Ca²⁺チャネルα2δ阻害剤)、JTC-801(ノシセプチン拮抗薬)を経口投与し、疼痛反応とNADPH ジアホラーゼ活性を測定した。

【結果】STZ投与後1-3週間に機械刺激に対する疼痛過敏反応が見られた。3週目の脊髄後角ではNADPH ジアホラーゼ活性が上昇していた。一方、カラゲニン投与24時間後に疼痛反応が見られたが、NADPH ジアホラーゼ活性には変化はなかった。STZ投与によりnNOSやiNOSの発現変化は認められなかった。STZ投与後3週目のマウスにアミトリプチン(30 µg/g)とガバペンチン(30 µg/g)を経口投与したところ、各々1-2時間と2-3時間に有意な疼痛抑制が見られた。ガバペンチンは投与後3時間の脊髄後角のNADPH ジアホラーゼ活性も抑制させた。また、JTC-801(10 µg/g)は、投与後1時間に疼痛過敏反応とNADPH ジアホラーゼ活性を抑制した。

【考察】STZ投与による糖尿病モデルマウスでは、機械刺激による疼痛過敏反応や脊髄後角におけるNO産生が認められた。脊髄におけるNO産生上昇は、nNOSやiNOSの遺伝子発現ではなく活性制御によることが明らかになった。また、既知の治療薬アミトリプチンやガバペンチンに加え、JTC-801が疼痛反応と脊髄後角のNO産生を抑制したことにより糖尿病性神経因性疼痛の治療薬の候補として考えられる。

ノシセプチンによるアロディニア発症に関与するシグナル伝達機構の解明

○川端健太¹, 西村勇武², 寺内祥子³, 南敏明⁴, 伊藤誠二⁵, 芦高恵美子^{1,2,3}

¹大阪工大・院工・生体医工, ²大阪工大・工・生体医工, ³大阪工大・工・生命工学

⁴大阪医大・麻酔, ⁵関西医大・医化学

【目的】疼痛制御ペプチド・ノシセプチン/オーファニン FQ(N/OFQ)を髄腔内投与すると触覚刺激が疼痛となるアロディニアが誘発される。N/OFQはcAMPの抑制やマイトジェン活性化プロテインキナーゼ (MAPK) などのシグナル伝達を引き起こすことが知られている。しかしながら、N/OFQのアロディニア発症に関与するシグナル伝達機構は明らかにされていない。本研究では、脊髄におけるN/OFQによるアロディニア発症へのMAPKの関与を明らかにするため、MAPK阻害剤による疼痛反応の解析、脊髄切片を用いた *ex vivo* MAPK測定系の構築とシグナル伝達経路の解析を行った。

【方法】マウス髄腔内にMAPK阻害剤(0.5μg)を前投与し、15分後にN/OFQ(50 pg)を投与し50分間のアロディニア反応を評価した。また、マウス脊髄1 mm切片を作製し、N/OFQを添加した。阻害剤はN/OFQ添加の5分前に前処理を行った。4%パラホルムアルデヒドの添加により反応を停止し、40 μm切片を作製した。各種MAPKリン酸化抗体やグリア線維酸性タンパク質 (GFAP) 抗体で免疫組織染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡を用い撮影し、Image Jにより定量を行った。

【結果】N/OFQ (50 pg) の髄腔内投与によるアロディニア誘発は、MAPK阻害剤の中でJNK阻害剤 (SP600125, 0.5 μg) により抑制された。脊髄切片では、10 nM N/OFQにより10-15分にJNKのリン酸化の亢進が認められた。JNKのリン酸化は3-10 nM N/OFQで有意に上昇した。N/OFQによりERKやp38のリン酸化は見られなかった。N/OFQによるJNKリン酸化は、ホスホリパーゼC阻害剤 (U73122) によって抑制されたが、ホスファチジルイノシトール3キナーゼ阻害剤 (LY294002) では影響を受けなかった。また、N/OFQによるJNKリン酸化は脊髄後角のGFAP陽性細胞で見られた。

【考察】N/OFQの髄腔内投与によるアロディニアには、脊髄後角のアストログリア細胞におけるJNKの活性化が関与していることが明らかになった。さらに、N/OFQによるJNKのリン酸化にはホスホリパーゼCの経路が関与していることが示唆された。

出生前後のマウス網膜を用いた遺伝子発現解析のための相対定量PCR法確立

○足立博子¹, 富永洋之¹, 丸山悠子², 米田一仁², 丸山和一³,

中野正和¹, 木下茂², 田代啓¹

¹京府医大・院医・ゲノム医科学, ²視覚機能再生外科学, ³東北大・院医・眼科学

【目的】 マウスの網膜は生後14日頃に完成することから, 出生前後のマウス網膜では網膜の発生に関わる遺伝子の発現が劇的に変動していることが推察される. しかし, 多種類の細胞から構成されている網膜の発生に関連する遺伝子の発現変動を議論するためには, 精度の高い定量法を確立することが重要である. そこで本研究では, 網膜の発生に関連する遺伝子の発現変動を正確に捉えるための相対定量PCR法を確立することを目的とした.

【方法】 妊娠18日齢マウス (C57BL/6) の胎児 (E18) および生後0日齢 (P0) から生後4日齢 (P4) まで経時的に採取した網膜から, RNA STAT-60 (TEL-TEST) を用いてtotal RNAを抽出した. total RNAはNanoDrop 1000 (Thermo Scientific) およびAgilent 2100バイオアナライザ (Agilent Technologies) によって品質を検定した後, 500 ngを逆転写し (SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR, Invitrogen), cDNAを合成した. 検量線に用いたcDNAは, Stratagene mouse reference total RNA (Agilent Technologies) を鋳型とした. 定量PCRは, THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (東洋紡) を用いてMx3005P QPCR System (Agilent Technologies) によって実施した. 遺伝子発現量を補正するためのハウスキーピング (リファレンス) 遺伝子の評価は, 各タイムポイント間における測定値の安定性および既知の網膜視細胞分化に関連する遺伝子 (*Crx*および*Nrl*) の発現値を指標に評価した. また, 複数のアルゴリズム (BestKeeper, NormFinder, Genorm, The comparative delta-Ct method) を総合評価して最適なリファレンス遺伝子を選出する「ReffFinder」(<http://www.leonxie.com/referencegene.php>) を用いて客観的な評価も加えた.

【結果】 E18からP4のマウス網膜を用いて8種類のリファレンス遺伝子 (*Actb*, *Gapdh*, *Sdha*, *Rn18s*, *Tbp*, *Hprt*, *Rpl13a*, *Rplp0*) の測定値を検討した結果, *Sdha*のタイムポイント間における変動係数が最小 (0.39) であり, 最も発現が安定しているリファレンス遺伝子であることが示唆された. この結果は, E18からP4までのCt値に基づくReffFinderによる解析結果とも一致した. 一方, リファレンス遺伝子として汎用されている*Actb*は測定値の変動係数が最大 (0.45) であり, ReffFinderによる評価も最も低かった. これらのリファレンス遺伝子を用いて各タイムポイント間における*Crx*および*Nrl*の発現量を定量した結果, いずれのリファレンス遺伝子を用いても既に知られているタイムコースと同様の挙動を示した. しかし, *Sdha*で補正した場合, *Crx*および*Nrl*のE18-P4間での相対発現量はそれぞれ約3.4倍および約5.1倍上昇したのに対して, *Actb*で補正した場合はそれぞれ約5.4倍および約8.1倍上昇した.

【考察】 経時的な遺伝子の発現変動量を正確に定量するためには, 各タイムポイントにおける測定値が安定しているリファレンス遺伝子によって遺伝子発現値を補正することが重要である. 本研究において選出された*Sdha*は, 各タイムポイント間における測定値の変動係数が他のリファレンス遺伝子に比べ小さいことが示されたことから, 出生前後の網膜における遺伝子発現解析におけるリファレンス遺伝子として最適であることが示唆された. 一方, タイムポイント間における変動の大きい*Actb*で補正した*Crx*および*Nrl*の定量PCRの結果は, 発現変動量がみかけ上大きく算出されてしまい, 過大評価している可能性がある. 今後は本研究によって確立された定量PCR法によって網膜における生理的な血管新生に関連する遺伝子の解析を実施していきたい.

【文献】

1. Jo Vandesompele et al. (2002) *Genome Biol.* 3(7), 0034.1-0034.11

Homogeneous Fluorescence Assay による選択的スプライシングの解析
 村上 章・○中嶋 康介・川合 雅幸・古山 紘太・山吉 麻子・小堀 哲生
 京工繊大学院工学科学

【目的】選択的スプライシングは生物の成熟 mRNA に多様性をもたらす、生命にとって極めて重要な機構であるが、同時にその異常は種々の疾患を引き起こす原因となる。ジストロフィン欠損に起因する DMD (デュシェンヌ型筋ジストロフィー) がその代表的な例である。この疾患では、選択的スプライシングによりジストロフィンをコードしないジストロフィン mRNA-variant (n-d-mRNA: exon20 欠損型($\Delta 20$), n:nonsense)が発現しており、DMD 発症に繋がっている。しかし、選択的スプライシングをアンチセンス制御することで、正常ジストロフィンに近い機能をもつタンパク質をコードするジストロフィン mRNA-variant (q-d-mRNA; exon19,20 欠損型($\Delta 19-20$), q:quasi)を発現させることが可能であることが報告されている¹。本研究では DMD におけるジストロフィンのスプライシング異常を検出する目的で Homogeneous Fluorescence Assay を用いた mRNA-variant の検出を試みた。

【方法】DMD 発症あるいはアンチセンス核酸制御の結果生じる exon-exon ジャンクションの一部を図 1 に示した。本研究では、検体 RNA 溶液に添加するのみで対象 RNA の存在を評価できる Homogeneous Fluorescence Assay を採用した。プローブには RNA と安定な二重鎖を形成した時にのみ蛍光を発する、RNA 選択的ピレン修飾型蛍光プローブ (OMU_{Py}2) を採用した²。モデル RNA として、図 1 の exon-exon ジャンクションを含む 2 種類のオリゴ RNA (ORN) ならびにそれらに相補的配列をもつ 2 種類の OMU_{Py}2 を合成した。対象 ORN と OMU_{Py}2 を等モル含む溶液 (PBS, 37°C) からの蛍光スペクトルからジャンクションの検出・同定を行った。

【結果】DMD のアンチセンス核酸制御の結果生じると考えられる exon-exon ジャンクションに相補的なプローブ

(q-d-OMU_{Py}2-1) は、図 1(1)の系では実質的に無蛍光性であったが、図 1(2)の系では顕著な蛍光が観測された。さらにこのプローブは、①標的 RNA の検出限界が約 30nM であること、②測定温度により識別能が変化し、50°Cにおいてその識別能が最大になるということが判明した。また exon-exon ジャンクション配列中に mismatch site を導入した q-d-OMU_{Py}2-2 は図 1(3)の系と図 1(4)の系の蛍光強度差が q-d-OMU_{Py}2-1 に比べ、より大きくなると判明した。

【考察】以上の結果から ①DMD 治療の効果を蛍光発光により評価、追跡が可能であること、②プローブの配列に変化を加えることで識別能を向上させることができるということ、③今回標的にした exon-exon ジャンクション以外を標的とした設計ができる可能性があることが判明した。

【文献】

1. Matsuo, M. (1996) *Brain Dev.* 18, 167-172.
2. Mahara, A. et al. (2002) *Angew. Chem. Int. Ed.* 41, 3648-3650

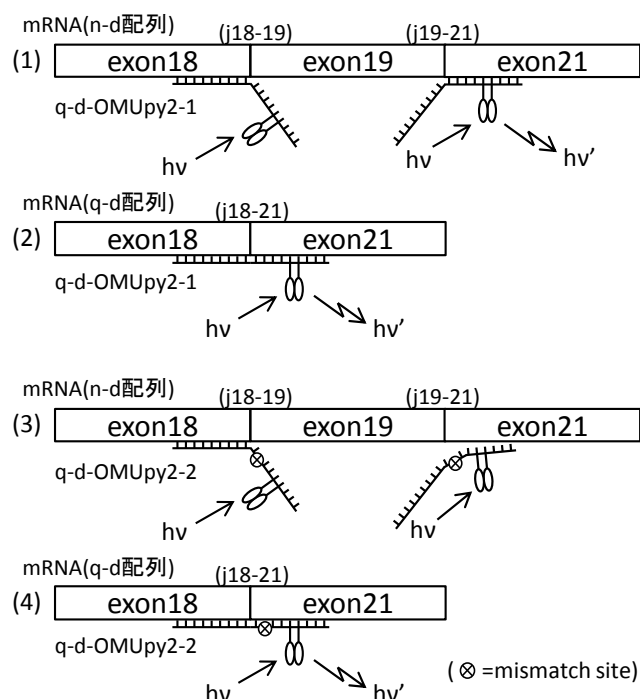


図 1 蛍光核酸プローブの設計

Splicing transitions of the anchoring protein ENH during striated muscle development

○Jumpei Ito¹, Shun'ichi Kuroda¹, Koichi Takimoto², Andrés D. Maturana¹

¹ Grad. Sch. Bioagri. Sci., Nagoya Univ. ² Dep. Bioeng., Nagaoka Univ. of Tech.

【Purpose】 ENH1 contains a PDZ domain and three LIM domains and acts as a scaffold to assemble cellular signaling molecules at specific sub-cellular localization. In addition, *enh* gene generates multiple splice variants lacking LIM domains. Others and we have shown that the three LIM-containing ENH variant predominates in neonatal cardiac tissue, whereas LIM-less ENHs are abundant in adult hearts, as well as skeletal muscles. Interestingly, LIM-containing ENH1 and LIM-less ENHs possesses opposite function in ventricular cardiomyocytes. ENH1 over-expression induces hypertrophy whereas the over-expressed LIM-less ENHs prevents a stimulated hypertrophy. Therefore, to find timing of ENH splicing transitions is important to understand mechanisms of cardiac hypertrophy. Here we examined the timing of splicing transitions of ENH gene products during postnatal heart development and C2C12 myoblast differentiation. In addition, we investigated the roles of ENH splicing variants in muscle differentiation using C2C12 cells.

【Methods】 We measured ENH splice variants during neonatal rat heart development and C2C12 myoblast differentiation by real-time qPCR analysis. In addition, we analyzed ENH splice transition in LIM-less ENHs by RT-PCR. Additionally, we established ENH variant-expressing C2C12 cells to investigate the function of each ENH splice variant during myoblast differentiation. We measured the mRNA level of marker genes such as MyoD and myogenin using stable ENH variant-expressing C2C12. Finally, we examined whether ENH splice variants effect myotube formation.

【Results】 RT-qPCR and RT-PCR showed that LIM-containing ENH1 mRNA gradually decreased during postnatal heart development and C2C12 myocyte differentiation. This phenomenon was observed until the end of experimental period, day 30 from birth for the heart ventricle and the 7-days of differentiation for C2C12 cells. In contrast, LIM-less ENHs mRNA continuously increased from the early period of the heart maturation up to 30 days and the C2C12 cells differentiation. Next, C2C12 cells stably expressing ENH1 exhibited significantly higher MyoD and myogenin mRNA levels before differentiation and after 5 days in low serum-differentiating medium than mock-transfected cells. On the other hand, cells stably expressing ENH3 or ENH4 were similar in marker genes mRNA levels to mock-transfected cells. On skeletal morphogenesis, ENH1 stably expressing cells showed myotube-like morphology with well-extended actin fibers following differentiation. However, ENH3 or ENH4 stable expressing cells did not show any myotube-like morphology following culture in the differentiation medium.

【Discussion】 We found ENH splice transition that shifts LIM-containing ENH1 to LIM-less ENHs occurred during striated muscles maturation. Moreover, cells stably expressing ENH1 showed higher mRNA levels of skeletal muscle specific genes and myotube-like morphorogy. These results suggest that ENH1 with multiple protein-protein interaction modules is essential for differentiation of striated muscles, whereas ectopic expression of LIM-less ENH disrupts normal muscle differentiation.

【Reference】

1. Ito J, Hashimoto T, Nakamura S, Aita Y, Yamazaki T, Schlegel W, Takimoto K, Maturana AD. (2012) *Biochem Biophys Res Commun.* 421, 232-238.
2. Ito J, Takita M, Takimoto K, Maturana AD. (2013) *Biochem Biophys Res Commun.* 435, 483-487.

M 視物質遺伝子の L 型エクソン 2 は M 視物質の発現量を減少させる

○上山久雄¹、村木早苗²、田邊詔子³、山出新一²、扇田久和¹

¹滋賀医大・生化学・分子生物学、²滋賀医大・眼科、³視覚研究所

【目的】網膜の L 錐体で働く L 視物質の遺伝子と、M 錐体で働く M 視物質の遺伝子は X 染色体上に L-M と並んで存在している（視物質遺伝子アレーと呼ぶ）。先天色覚異常の中の 1 型色覚（L 錐体が機能していない）では、この遺伝子アレーが M のみ、あるいは M-M となっている。M-M アレーにおける両 M 遺伝子産物の極大吸収波長（ $\lambda_{\max}$ ）に差がなければ 2 色覚、差があれば 3 色覚と予想される。われわれは既に 98 例の 1 型 3 色覚における M-M 遺伝子アレーを解析したが、その内 35 例は両 M 遺伝子の違いがエクソン 2 だけにあった（図 1）¹⁾。M 視物質においてはエクソン 2 によってコードされるアミノ酸配列は $\lambda_{\max}$ に影響しない²⁾ので、なぜこの 35 例が 3 色覚であるのかが不明であった。われわれは、両 M 視物質の発現量が極端に異なる 2 種の M 錐体（ $\lambda_{\max}$ は同じで分光感度がやや異なる）が存在するとすればこの臨床所見の説明がつくのではないかと考え、エクソン 2 の違いが M 視物質の発現量に影響するかどうか検討した。

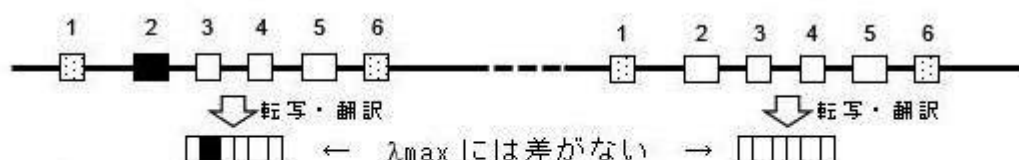


図 1 エクソン 2 だけが異なる M-M アレー。M 視物質においては、エクソン 2 によってコードされる配列は $\lambda_{\max}$ に影響しない。□は M 型、■は L 型のエクソンを示し、エクソン 1 と 6 は M 遺伝子と L 遺伝子で異なるので □ で示した。

【方法】L 型のエクソン 2 (Thr⁶⁵–Leu¹⁰⁰(CTA)–Ile¹¹¹–Ser¹¹⁶) と M 型のエクソン 2 (Ile⁶⁵–Leu¹⁰⁰(CTG)–Val¹¹¹–Tyr¹¹⁶) を持つ M 視物質の cDNA を作製し、pFLAG-CMV-5a 発現ベクターにクローニングした。HEK293 細胞にトランスフェクトし、2 日後に細胞タンパク質を集め抗 FLAG 抗体を用いたウェスタンブロットを行った。

【結果】L 型のエクソン 2 を持つものは M 型のエクソン 2 を持つものの約 20% の発現量しかなかった。L 型エクソン 2 の上記 4 か所をそれぞれ M 型に変えたところ、コドン 65 あるいはコドン 116 を変えたときのみ約 80% にまで発現量が回復した。M 型エクソン 2 のコドン 65 あるいはコドン 116 をそれぞれ L 型に変えたところ、いずれも約 60% の発現量に低下した。

【考察】M 視物質において、L 型のエクソン 2 によってコードされるアミノ酸配列により、その発現量が大きく低下することが判明した。さらに、コドン 65 とコドン 116 の違いが発現量の違いに同程度に関与していることも明らかになった。M-M アレーの両 M 遺伝子の違いがエクソン 2 だけであった 35 例において、両 M 視物質の発現量がかなり異なることが示唆された。

【文献】

1. Ueyama H. et al. (2004) Analysis of L-cone/M-cone visual pigment gene arrays in Japanese males with protan color-vision deficiency. *Vision Res.* 44: 2241-2252.
2. Merbs S.L., Nathans J, (1992) Absorption spectra of the hybrid pigments responsible for anomalous color vision. *Science.* 258: 464-466.

D-1

Low cytoplasmic pH reduces ER-Golgi trafficking and induces disassembly of the Golgi apparatus

○Jeerawat Soonthornsit, Nobuhiro Nakamura

¹FacI Life Sci, Kyoto Sangyo University

While the molecular mechanisms of the vesicular transport machinery has been well described during the last two decades, the mechanisms of the maintenance of the Golgi structure and its disassembly under various conditions remain largely unknown. In Low pH media, striking Golgi disassembly was induced resulting in significant separation of the *cis*- and *medial/trans*-Golgi markers. The “Golgi ribbon” structure was reformed and the Golgi markers come back together after returning to the normal pH. The *cis*-Golgi extensively disassembled while *medial/trans*-Golgi disassembled in lesser extent suggesting that low pH affected the vesicle tethering/fusion and/or vesicle formation at the *cis*-Golgi more strongly compared with *medial/trans*-Golgi. The anterograde transport monitored by VSV-G protein significantly delayed under the low pH treatment. Dynamic tubule-like structures were observed by live imaging analysis using GFP-GM130 as a marker under the low pH. This suggested the low pH treatment enhanced tubule formation from the Golgi apparatus inducing the Golgi disassembly. Because several phospholipase A₂ (PLA₂) were reported to be involved in the tubule formation from the Golgi apparatus, we predicted the involvement of PLA₂ for the low pH induced Golgi disassembly and analyzed the effects of PLA₂ inhibitors for this process. Interestingly, only two PLA₂ inhibitors, ONO and BEL, suppressed the Golgi disassembly in low pH treatment. These results suggested that PLA₂(s), most probably PAFAH1b, mediate the Golgi disassembly. On the other hand, over-expression of Rab1 also inhibited the Golgi disassembly. However, the delay of the anterograde transport was not recovered in Rab1 expressing cell. These results suggested that Rab1 counteracted for the tubule formation not facilitating the anterograde transport probably enhancing vesicle tethering and fusion.

YidC によるタンパク質膜組込機構

○千葉志信¹, 熊崎薫², 塚崎智也³, 濡木理², 伊藤維昭¹¹京産大・総合生命, ²東大・院理・生物, ³奈良先端・院バイオ

【目的】 Alb3/Oxa1/YidC ファミリータンパク質は、細菌からヒトまで保存された蛋白質膜組込装置である。新生蛋白質の膜組込や、膜内でのフォールディングなどを担う重要な膜蛋白質ファミリーである。本研究では、構造生物学と遺伝学を組み合わせ、YidC による蛋白質膜組込のメカニズムを解明することを目的とした。

【方法】枯草菌は蛋白質の膜組込装置 YidC のホモログを二つ持つ。恒常的に発現する SpoIIIJ (YidC1) の活性が低下すると、普段は発現していない YidC2 の合成が誘導される。*yidC2* の発現は、同一オペロン上の上流遺伝子にコードされた MifM が引き起こす「制御された翻訳アレスト」を介した機構で *cis* に制御を受ける^(1,2)。このことを利用し、*mifM* の下流に *yidC2-lacZ* 融合遺伝子を配置することで、SpoIIIJ の活性低下を LacZ 活性の上昇として検出可能なアッセイ系を構築できる。今回、*Bacillus halodurans* の YidC2 の結晶構造解析を行い、さらに、そこから得られた YidC の構造情報を元に、*yidC2-lacZ* の系を利用した SpoIIIJ のシステムティックな変異解析を行うことで、YidC によるタンパク質膜組込のメカニズムを解明することを試みた。

【結果】*B. halodurans* の YidC ホモログの結晶構造解析から、5 本の膜貫通領域が一つのコアを形成しており、その中央の膜貫通部分には、親水性残基に富んだ「溝」が形成されていることが明らかになった。この溝は、細胞質側と、脂質二重層の方向へと口を開けた構造をしている一方で、細胞外側からはアクセス出来ないような構造をしていた。以前、YidC がダイマーを形成することで、脂質二重層を貫通する孔を形成し、そのチャネルを通して基質が膜組込されるというモデル (dimeric insertion pore model) が提唱されていた⁽³⁾。しかしながら、今回の結果は、仮に YidC がダイマーを形成出来たとしても、孔は細胞外側まで貫通せず、このことから、insertion pore モデルは考えづらいという予想外のものであった。今回明らかになった親水性の溝の中央付近には、アルギニン残基が配置されており、それにより、この溝は塩基性を帯びている事が示唆された。さらに、枯草菌を用いた変異解析の結果から、このアルギニン残基が YidC による膜組込に必須である事、また、YidC の基質である MifM の膜貫通領域および細胞外領域にある酸性残基が、YidC によって膜に組み込まれるために必要であることが示唆された。

【考察】今回の解析から、YidC は、疎水的な脂質二重層の内部に親水的な溝を作り出し、その内部にポジティブチャージを配置すること、また、そのポジティブチャージで、基質膜蛋白質のネガティブチャージを引きつけることで蛋白質の膜組込を駆動していることが示唆された。今回の結果は、チャネルに依存しないような蛋白質膜組込の機構が存在することを示唆している⁽⁴⁾。

【文献】

1. Chiba S, Lamsa A, Pogliano K. (2009) *EMBO J.* 28, 3461-3475
2. Chiba S, Ito K. (2012) *Mol. Cell* 47, 863-872.
3. Kohler R, Boehringer D, Greber B, Bingel-Erlenmeyer R, Collinson I, Schaffitzel C, Ban N. (2009) *Mol. Cell* 34, 344-353.
4. Kumazaki, K., Chiba, S., Takemoto, M., Furukawa, A., Nishiyama, K., Sugano, Y., Mori, T., Dohmae, N., Hirata, K., Nakada-Nakura, Y., Maturana, A. D., Tanaka, Y., Mori, H., Sugita, Y., Arisaka, F., Ito, K., Ishitani, R., Tsukazaki, T., Nureki, O. (2014) *Nature* in press.

酸性 pH における *Streptococcus mutans* F 型 H⁺-ATPase の H⁺輸送○佐々木由香¹, 吉岡拓哉¹, 前田正知², 岩本(木原) 昌子¹¹長浜バイオ大・バイオサイエンス, ²岩手医科大・薬

【目的】*Streptococcus mutans* は、う歯の原因菌として知られている。我々は、その細胞膜に存在する F 型 H⁺-ATPase (FoF₁) の H⁺輸送路を形成する *c* サブユニットが、大腸菌の他のサブユニットと共に酵素複合体を形成し、ATP 合成酵素として機能することを既に報告した[1]。大腸菌の *c* サブユニットを持つ株は pH7.5 でも 5.5 でも生育したが、上記の株は中性より酸性でよく生育するようになっていた。また、昨年の本例会で報告したように、*S. mutans* 由来の全 8 サブユニットを、ATP 合成酵素を欠失した大腸菌に発現させた株では、膜画分の ATPase 活性および H⁺能動輸送の至適 pH は、大腸菌の 8 サブユニットを発現させた株より酸性側にシフトしていた。口腔内の酸性環境で生育する *S. mutans* の FoF₁ は、この細菌の耐酸性に関わると考えられているが、大腸菌などに分布する ATP 合成酵素との性状の違いは明らかではない。本研究では、*S. mutans* 由来の FoF₁ が発現した大腸菌膜画分を用いて、大腸菌酵素との比較を行った。

【方法】*S. mutans* および大腸菌のすべてのサブユニット遺伝子はオペロンを形成している。それらを持つプラスミドを大腸菌 DK8 株 (FoF₁ 欠失株) に導入した。H⁺輸送路を形成する Fo 部分および触媒部位を含む F₁ 部分のサブユニットが、*S. mutans* と大腸菌の異種の組み合わせとなるようプラスミドを構築し、同様に導入した。培養したそれぞれの株より反転膜小胞を調製し、細胞膜の ATPase 活性および H⁺能動輸送を pH5.0~8.0 の範囲で調べた。膜画分の呼吸鎖に共役した ATP 合成活性は、ルシフェリンの発光によって測定した。

【結果】*S. mutans* の FoF₁ を持つ膜画分は pH5.5~6.5 の酸性で H⁺ をよく能動輸送し、pH7.0~8.0 で輸送する大腸菌 FoF₁ とは異なっていた。反転膜小胞の内と外の pH を変えると、反転膜小胞の外側が酸性のとき H⁺ を能動輸送した。また、NADH, ADP, 無機リン酸を添加したところ、ATP の合成はほとんど起こらなかった。すなわち、*S. mutans* FoF₁ は、細胞の内部が酸性化したとき H⁺ 排出する酵素であると示唆された。ハイブリッド FoF₁ を用いた解析により、*S. mutans* 酵素由来の F₁ および Fo が、それぞれ、酸性における ATPase 活性と H⁺輸送に関与することが示唆された。イオン輸送路を含む Fo の *c* サブユニットに変異導入したところ、Ser17→Ala または Glu20→Ile の置換によって中性でも H⁺ を輸送するようになった。これらの残基は、H⁺輸送路の Glu-53 残基と立体構造の上で近傍と予想された。

【考察】*S. mutans* FoF₁ は、細胞内部が酸性に傾いたとき H⁺ を排出するのに適した酵素であることが示唆された [2]。 *c* サブユニットの Ser17 および Glu20 残基は、H⁺化／脱 H⁺化をくり返して H⁺輸送に関わると思われる Glu-53 残基の pK_a を低下させる可能性がある。

【文献】

1. Araki, M., Hoshi, K., Fujiwara, M., Sasaki, Y., Yonezawa, H., Senpuku, H., Iwamoto-Kihara, A., Maeda, M. (2013) *J. Bacteriol.*, **195**, 4873-4878.
2. Sasaki, Y., Nogami, E., Maeda, M., Nakanishi-Matsui, M., Iwamoto-Kihara, A. (2014) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **443**, 677-682.

D-4

各種乳酸菌の糖脂質の構造的特徴と抗原性

○南領将、谷河みなみ、枘田尚也、伊藤伶芳、田中京子、青木大輔、岩森正男
近畿大・理工・生命、慶應大・医・産婦

【目的】乳酸菌は糖を分解して乳酸菌を産生する細菌の総称であり、ヒト体内にも生息している他、発酵食品にも利用されている。一方、ヒトには強力な免疫システムが存在し、細菌とどのように関わりを持ちながら共生関係を築いているのかが大きな課題となっている。乳酸菌をはじめとするグラム陽性細菌の糖脂質は免疫認識に関わる抗原の1つとなっていることから、各細菌の糖脂質構造と免疫的性質について解析を進めた(1-3)。

【方法】

細菌：理化学研究所バイオリソースセンターより購入した細菌を用いた。抗細菌抗血清：LJ, LI, SE, SS 各 15 mg 菌体をフロント完全アジュバントとともにウサギに免疫して抗血清を作製した。

脂質分析：TLC、TLC 免疫染色、GCMS、FABMS、NMR による構造解析、完全メチル化法、糖分解酵素による糖鎖構造の解析は常法に従って行った。

【結果と考察】

細菌糖脂質：表 1 に示すグラム陽性細菌の 2 糖糖脂質は PG、CL に匹敵する濃度で含まれている。

表 1. 細菌 2 糖糖脂質の構造

2 糖糖脂質	略号	細菌
Gal α 1-2Glc α 1-3'DG	LacDH-DG	<i>Lactobacillus casei</i> , <i>L. johnsonii</i> , <i>L. intestinalis</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. rhamnosas</i> , <i>L. murinus</i>
Glc β 1-6Glc β 1-3'DG	StaDH-DG	<i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>S. aureus</i>
Glc α 1-2Glc α 1-3'DG	StrDH-DG	<i>Streptococcus salivarius</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Pediococcus pentosaceus</i> , <i>Tetragenococcus halophilus</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i>
Glc α 1-4Glc α 1-3'DG		<i>Lactococcus lactis</i>

また、*L. Johnsonii* (LJ)、*L. intestinalis*、*L. reuteri* には 3 糖 Gal α 1-6Gal α 1-2Glc α 1-3'DG (LacTH-DG)、4 糖 Gal α 1-6Gal α 1-6Gal α 1-2Glc α 1-3'DG (LacTetT-DG)が、*L. casei*、*L. murinus* には 3 糖 Glc β 1-6Gal α 1-2Glc α 1-3'DG、エステル化 3 糖 Glc β 1-6Gal α 1-2Glc(6-FA) α 1-3'DG が含まれていた。一方、脂肪酸組成の特徴として、*S. salivarius* は直鎖飽和、不飽和であるのに対し、*Lactobacillus*、*Enterococcus* 属細菌はシクロプロパン環、*S. epidermidis* はアンテイソ構造を有していた(2)。細菌糖脂質に対する抗体：各細菌をウサギに免疫して作製した抗血清は糖脂質と強く反応した。抗 LJ 抗血清は LacTH-DG、LacTetH-DG と強く反応し、抗 *Sta. epidermidis* 抗血清は StaDH-DG、LacDH-DG、StrDH-DG とは全く反応しない特異性を持っていた。約 7 割のヒト血清には LacTH-DG、LacTetH-D と反応する IgM がフォルスマン糖脂質に対する抗体価の 10~50%の力価で含まれていた。LJ はヒト腸内の主要乳酸菌であり、腸管内の細菌が体内に侵入するのを防御するために液性免疫応答していると推測した。一方、グラム陽性細菌細胞膜は厚い細胞壁に覆われていることから、細胞膜成分である糖脂質に対する免疫応答がどのような仕組みで行われているのかが今後の課題となる。

【文献】

1. Iwamori M et al, J. Biochem. 150(2011) 515-23.
2. Iwamori M et al, Glycoconj. J. 29(2012)199-2-9.
3. Iwamori M et al, Glycoconj. J. 30(2013)889-97.

抗体結合型核酸ドラッグの開発と機能評価

山吉麻子¹, ○岸本祐典¹, 田村理恵², 村松千愛², 小堀哲生¹, 芦原英司², 村上章¹¹京工繊大院工芸科学・²京薬大生命薬科学

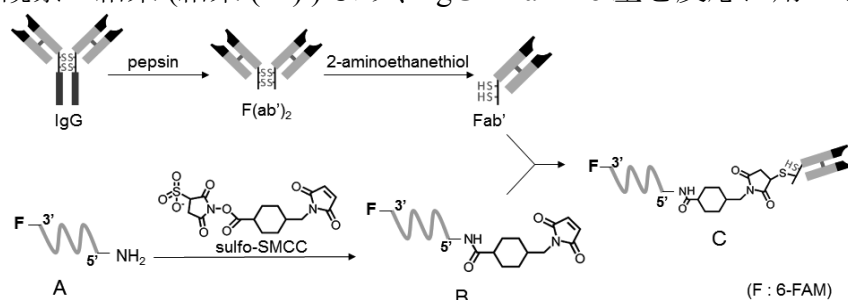
【目的】分子標的治療薬は従来の抗がん剤に比べて副作用が少ないことから、近年盛んに研究されている。なかでも siRNA (small interfering RNA) は、標的 mRNA に対する配列選択性が高く、特定の遺伝子発現のみを制御するため、新たな治療薬として有望視されている。現在、固形腫瘍に対して siRNA 製剤の全身性投与による前臨床試験は行われているが、造血管悪性腫瘍に対しては未だ行われていない。この原因として血球細胞への siRNA の細胞導入効率が未だ十分といえず、結果的に高濃度の核酸を必要とするために細胞毒性による副作用を免れないことが挙げられる。

本研究の目的は、siRNA にがん細胞選択的送達能を付与した新規薬物を開発することである。我々は、がん細胞のみに発現している表面抗原に注目し、その抗原を認識する抗体を薬物送達担体として利用することで、siRNA をがん細胞選択的に送達できるのではないかと考えた¹⁾。また、抗体をフラグメント化することで細胞内侵入性を向上させるとともに、薬物自身の抗原性を低下させようと試みた²⁾。

【方法】(I) IgG の amino 基を架橋反応に用いた場合、修飾 IgG が細胞侵入性を維持するかどうかを確認することを目的とし、anti-EGFR IgG に対し N-Hydroxysuccinimide- fluorescein (NHS-fluorescein) を 110 等量、及び 160 等量加え反応させた。続いて、得られた修飾 anti-EGFR IgG を MDA-MB-231 (EGFR positive) 細胞の培養上清に添加し、共焦点顕微鏡による観察を行った。(II) IgG のフラグメント化を目的とし、IgG を immobilized pepsin で処理することで F(ab')₂ を得た。この F(ab')₂ に対し、10 mM の 2-aminoethanethiol を作用させ hinge region の disulfide bond を還元し、Fab' を得た。Fab' の生成は非還元 SDS-PAGE により確認した。(III) 3' 末端に fluorescein、5' 末端に amino 基を導入した 21 量体のオリゴ DNA (化合物 A) に対し 160 等量の sulfo-SMCC を反応させることで、5' 末端に maleimide 基が修飾されたオリゴ DNA (化合物 B) の合成を行った。化合物 B 生成反応の追跡は逆相 HPLC により行った。

【結果】(I) IgG に対して、110 等量及び 160 等量の NHS-fluorescein を反応させた結果、IgG 1 分子あたりそれぞれ 3 個、8 個の fluorescein が修飾された IgG が得られた。共焦点顕微鏡による観察の結果、3 個の fluorescein が修飾された IgG は細胞内に fluorescein 由来の蛍光が観察されたものの、8 個の fluorescein が修飾された IgG では、細胞表面のみに fluorescein 由来の蛍光が観察された。(II) F(ab')₂、Fab' 生成確認のため非還元 SDS-PAGE を行った結果、分子量付近に各々のバンドが確認された。(III) 化合物 A と sulfo-SMCC を反応させ逆相 HPLC により分析した結果、より溶出時間の遅いピークが新たに現れた。

【考察】共焦点顕微鏡による観察の結果(結果 I))より、IgG の amino 基を反応に用いると、細胞侵入性が維持されない可能性が示唆された。今後、結果(III)で得られたピークが化合物 B であるかどうか同定を行い、Fab' と反応させることで抗体結合型オリゴ核酸の開発を行う予定である。



Scheme. synthesis of Fab'-DNA conjugate

【文献】

1. Bouchie, A., et al., (2013) *Nat. Biotechnol.*, 30, 1154-57
2. Sanz, L., et al., (2005) *Acta Pharmacologica Sinica*, 26, 641-648

D-6

5'末端塩基非依存的 TALE タンパク質の創製

○辻将吾, 今西未来、二木史朗

京大・化研

【目的】 Transcription activator-like effector (TALE) は植物病原菌 *Xanthomonas* 由来のタンパク質で配列特異的に DNA に結合する。TALE はデザインの容易さと結合特異性の高さから、ゲノムの部位特異的な編集技術などに広く応用されている。しかし、ほとんどの TALE は結合配列 5'末端塩基が T でなければならないという制限を有する。このためチミンを含まない DNA 領域には TALE を効率的に結合させることはできないという問題がある。そこで本研究では、この 5'-T の制限を受けない TALE を創製することを目指した。

【方法】 TALE-DNA 複合体の結晶構造から、TALE の N 末端に位置するリピート-1 と呼ばれる構造部分が 5'-T 認識へ関与していることが示唆されていた (図 1)¹。そこでまず、リピート-1 ループ構造の中でも、特に 5'-T 近傍に位置していた W232 の点置換体を作製し、その置換体の DNA 結合能をルシフェラーゼアッセイにより評価した。さらに、リピート-1 ループ部分に相当する 230 番目から 233 番目の 4 アミノ酸 (230KQWS233) をランダム化した。このランダム化ライブラリーの中から 5'-T 以外の配列に対して結合性を示す変異体を Bacterial one-hybrid screening²により選出した。得られた変異体の DNA 結合能をルシフェラーゼアッセイにより評価した。

【結果】 W232 点置換体においては 5'-T 配列への結合力が低下した。このことから W232 が 5'末塩基認識に重要な役割を担うことが示唆される。しかしながら、いずれの置換体においても、5'末がチミン以外である配列への結合性の上昇は見られなかった。一方で、リピート-1 ライブラリーのスクリーニングより得られた変異体 (AA230-233=SRGA) においては、5'-T 配列への結合性は少し低下したが、5'-T 以外の配列に対する結合性の大きな上昇がみられた (図 2)。すなわち、5'末塩基がいずれの塩基であっても効率的に結合する TALE が創製できたといえる³。

【考察】 本研究では、TALE リピート-1 中のヘアピンループ構造部分を改変することで、結合配列 5'末端塩基が T/A/G/C、いずれの場合でも十分な結合活性を示す TALE タンパク質を創製することに成功した。今回創製した TALE を用いれば、標的配列選択の自由度が大きく上昇するだけでなく、これまで標的にできなかった T を含まない配列に結合する TALE をデザインできることから、本研究成果は TALE を利用した遺伝子改変技術、遺伝子治療など多方面への応用が期待される。

【文献】

1. A. N. Mal *et al.* (2012) *Science*, 335, 716-719
2. M. B. Noyes. (2012) *Meth. Mol. Biol.*, 786, 79-95
3. S. Tsuji, S. Futaki, M. Imanishi. (2013) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 441, 262-265

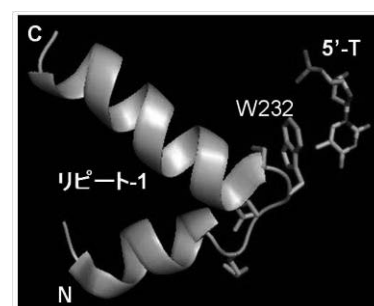


図 1: リピート-1 による 5'-T 認識

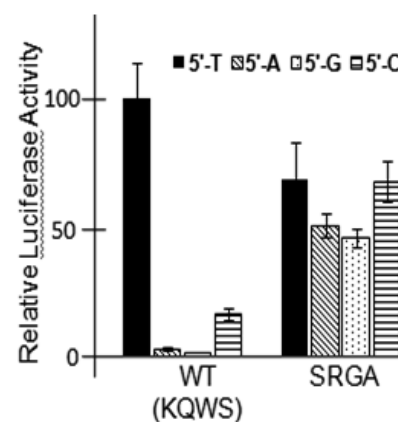


図 2: 変異体の 5'-T/A/G/C 配列に対するルシフェラーゼ活性

HEXIM1 タンパク質に対して特異的結合能を示す RNA モチーフの探索と
新規転写阻害剤としての応用
山吉麻子・○吉本航大・岸本恭介・小堀哲生・村上章
京工繊大院工芸科学

【目的】本研究では、細胞核内におけるプロウイルス遺伝子の転写を阻害することで、後天性免疫不全症候群 (AIDS) を引き起こすヒト免疫不全ウイルス (HIV) の感染から出芽に至るルートを遮断する新規抗 HIV 治療薬の開発を目指した。真核生物における転写機構では、DNA 鎖上に存在する RNA polymerase II に転写伸長因子である P-TEFb が結合することで転写が開始される。この転写機構において、HEXIM1 タンパク質は転写抑制因子として働くことが知られている。HEXIM1 は 7SK snRNA と結合することにより構造変化し、P-TEFb を捕捉することで転写を抑制する¹⁾。当研究室ではこれまで 7SK snRNA の構造と配列を模倣した機能性核酸 (7SK mimic) の開発を行ってきた。その結果 7SK mimic が HIV-LTR プロモーターに対する転写抑制能を有することが明らかとなった。一方で近年、*cad* mRNA が HEXIM1 に対し、7SK snRNA と比較して約 10 倍高い結合能を有することが発見された²⁾。この mRNA は全長 1017 塩基からなっており、そのうちの 9 塩基からなるバルジを含んだ構造 (HBS element) が HEXIM1 との結合に必要な RNA モチーフとして報告されている²⁾。そこで我々はこの構造を含むいくつかの RNA に着目し、7SK mimic よりもさらに高い転写抑制能を有する機能性核酸の創製を目指した。

【方法】C 末端に 6 個の His 残基 (His-tag) を有する HEXIM1 の発現を、大腸菌 BL21 (DE3) 株を用いて行った。培養した大腸菌を集菌し、超音波破碎処理を行った後、可溶性画分を Ni カラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーにより精製した。得られたタンパク質の同定は、抗 HEXIM1 抗体を用いたウエスタンブロッティングにより行った。次に、*cad* mRNA の配列のうち HBS element を含む配列を参考にして RNA (37 mer) を設計した (*cad* decoy)。設計した RNA は、固相ホスホロアミダイト法を用いて合成した。合成した RNA に対する HEXIM1 の結合能評価を、ゲルシフトアッセイにより行った。

【結果】精製したタンパク質をウエスタンブロッティングによって分析したところ、HEXIM1 と予測される分子量付近に抗 HEXIM1 抗体陽性のバンドが検出された。これより、HEXIM1 の発現および精製に成功したと判断した。次に固相ホスホロアミダイト法により合成した HBS element を含む RNA に $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ を用いて RI 修飾を施し、HEXIM1 への結合能評価を行ったところ、HEXIM1 の濃度が上昇するに伴って、RNA のバンドよりも泳動度が小さい位置に新たなバンドが確認された。このことから *cad* decoy が HEXIM1 に対する結合能を有すると考えた。

【考察】上記の実験結果から HBS element を有する *cad* decoy が HEXIM1 と結合することが明らかとなったので、*cad* decoy が転写を抑制する機能性核酸となり得ると判断した。今後は、*in vitro* 転写実験を行い、HIV-LTR プロモーターに対する転写抑制能を評価する。また転写抑制能が確認された場合、生細胞中での転写抑制能評価の実験も行う。さらに短鎖の RNA を設計するなどして、細胞内送達効率の向上も図りたいと考えている。

【文献】

1. Cho, W., Jang, M., Huang, K., Pise-Masison, C., Brady, J., (2010), *J. Virol.*, 84, 12801-12809
2. Fujimoto, Y., Nakamura, Y., Ohuchi, S. *Biochimie* (2012), 94, 1900-1909

RISC 機能の制御を目指したペプチドコンジュゲート核酸の開発

山吉麻子・○栄森奈緒・有吉純平・小堀哲生・村上章

京工繊大院工芸科学

【目的】 non-coding RNA の一種である microRNA (miRNA) は、ヒトの遺伝子発現の約三分の一を制御していること、特にその発現異常が癌などの疾患に関与していることから、核酸医薬の標的分子として非常に注目を浴びている。miRNA は単独では活性を持たず、様々なタンパク質と RISC を形成することで初めて機能を発揮する。RISC の中核となる Argonaute タンパク質には、PIWI-box と呼ばれる領域が存在し、miRNA の 5' 末端のリン酸基と PIWI-box 中の Lys 残基との静電的相互作用によって、miRNA が RISC 中に保持されることが報告されている¹⁾。そこで我々は、この相互作用を阻害し、RISC から miRNA を解離させることで、その機能を抑制することができると考えた。本研究では、miRNA と相補的な配列を持つ核酸に、miRNA と PIWI-box との相互作用を阻害するペプチド (RINDA) をコンジュゲートしたペプチドコンジュゲート核酸 (RINDA-as) を開発し、その RISC 機能抑制能を評価することを目的とした。

【方法】 RINDA を 2 種類設計した。一方は、カチオン性のアミノ酸である Lys の連続配列 (KKK) を持つ RINDA (K3) であり、PIWI-box 中の Lys 残基と競合することで miRNA と PIWI-box との相互作用を阻害することを目的としている。他方は、アニオン性のアミノ酸である Glu の連続配列 (EEE) を持つ RINDA (E3) であり、miRNA の 5' 末端のリン酸基と競合することで miRNA と PIWI-box との相互作用を阻害することを目的としている。固相担体 3'-Amino Modifier C7 CPG 500 を用いて、Fmoc 固相合成法により RINDA を合成した後、miRNA に相補的な配列を持つ 2'-OMe RNA をホスホロアミダイト法により伸長する方法で、2 種類の RINDA-as を合成した。これらの RINDA-as について、RISC から miRNA を解離する効果を定量化する方法 (unloading-assay) により評価した。この手法は、5' 末端を ³²P で標識した miRNA を持つ RISC を、磁気性を持つ固相担体上に担持させ、これに RINDA-as を加えて 37 °C で 30 min 反応した後、固相と液相を分画してそれぞれの放射活性を測定する方法である。RISC から miRNA が解離されなければ、³²P 標識された miRNA は固相に留まり、RISC から miRNA が解離されれば、³²P 標識された miRNA は液相に移る²⁾。固相と液相の放射活性の割合から、RISC からの miRNA の解離率 (miRNA 解離率) を評価した。

【結果】 unloading-assay を行った結果、RINDA(K3)-as の miRNA 解離率は 24%、RINDA(E3)-as では 36%、ペプチドを持たない Antisense oligonucleotide (ASO) では 24% となった。カチオン性のペプチドを有する RINDA(K3)-as は ASO と変わらない miRNA 解離率を示したのに対し、アニオン性のペプチドを持つ RINDA(E3)-as は ASO より約 12% miRNA 解離率が向上したことが見出された。

【考察】 以上の結果から、アニオン性のペプチドを持つ RINDA-as が、RISC から miRNA を解離する有効な分子であることが示された。現在、アニオン性のアミノ酸の連続配列をさらに伸長した RINDA-as を数種類合成し、RISC からの miRNA の解離能がどのように変化するか評価を行っている。発表では、これらの RINDA-as の合成、RISC 機能抑制能についても併せて報告する。

【文献】

1. Ma. J. B, *et al.* (2005) *Nature* 434, 666-670.
2. MacRae. L. J, *et al.* (2013) *Mol. Cell* 50, 344-355

抗原を担持させたペプチドナノファイバーの細胞取り込みにおけるサイズ効果

○和久友則, 川端一史, 功刀 滋, 田中直毅

京工繊大院・工学科学

【目的】薬物や抗原をターゲット細胞に効率的に送達するデリバリーシステムの構築を目的として、高分子ナノ粒子やリポソームなどの球状キャリアの開発が活発に進められてきた。近年、キャリアの形態は、①体内動態、②細胞による取り込み、③細胞内での局在などに影響を与えることが明らかとされ、球状のみならず異方性形態を持つナノ構造体が DDS キャリアとして注目されている。しかし、その報告例は限られており、形態とキャリア機能との相関に関する知見はまだ十分に蓄積されていない。本研究では、異方性キャリアとしてペプチドナノファイバー (NFs) に着目し、NFs の形態に基づく新規な DDS キャリア機能を探索するとともに、その得られた知見を基にした新規な抗原デリバリーシステムを開発することを目的とする。本発表では、線維長の異なる NFs を種々作製し、細胞による取り込みを検討した結果、線維長が NFs の細胞による取り込み効率および機構に影響を与えることを見出したので報告する。

【方法】①高いアスペクト比、②設計の自在性および③生体適合性を有する点に着目し、 β -シートペプチドの自己組織化により形成するペプチドナノファイバー (NFs) を異方性キャリアとして選択した。線維長の異なる NFs を種々作製し、細胞による取り込みを検討した。

【結果と考察】線維形成配列 (FVIFLD) に抗原配列 (SIINFEKL) と親水性鎖 (オリゴエチレングリコール) を導入したペプチド β -OVA-EG₁₂を PBS (pH7.4) 中、60°C で 24 時間加熱することで NFs を作製した。平均線維長の異なる 4 種類の β -OVA-EG₁₂ NFs (810、280、120、40 nm) を用いて、線維長の違いが細胞取り込みに与える影響を評価した。具体的には 4 種類の NFs を PBS 中で RAW264 細胞に取り込ませ、その取り込み量をフローサイトメーターにより評価した。さらに、無血清培地 (FBS (-)) および血清含有培地 (FBS (+)) 中での取り込み試験を行い、培地中の成分が β -OVA-EG₁₂ NFs の取り込みに与える影響について評価した。PBS、FBS (-) 中での取り込みは多い順に 280 nm = 120 nm > 40 nm > 810 nm であった。一方で、FBS (+) 中での細胞取り込みは線維長に因らず、PBS、FBS (-) 中での取り込み量と比較して小さい値を示した。FBS 中のタンパク質により NFs が凝集し、細胞取り込みに不利なサイズとなったために取り込みが抑制されたと考えられる。次に、線維長の異なる NFs (810、280、120、40 nm) の細胞取り込み経路を調べることを目的として、エンドサイトーシス阻害剤が細胞取り込みに与える影響について評価した。NaN₃ 溶液中で 30 分プレインキュベートした RAW264 細胞に、各線維長の NFs を終濃度 50 μ M で 30 分取り込ませ、洗浄後、共焦点レーザー顕微鏡によって観察した。エンドサイトーシス阻害条件下において、120、280、810 nm の NFs を取り込ませた場合、蛍光は主に細胞表面からのみ観察され、内部からの蛍光は観察されなかった。この結果より、120、280、810 nm の NFs は主にエンドサイトーシス経路で取り込まれていることが示された。一方、興味深いことに 40 nm の NFs はエンドサイトーシス阻害条件下においても確かに細胞内に取り込まれていることが認められた。以上の結果より、線維長の違いは NFs の細胞取り込み経路に大きく影響を与えることが示された。言い換えると、NFs の線維長によって、取り込み経路を合目的的に制御することが可能であることが示された。

【文献】

T. Waku et al., *Chem. Lett.*, **42** 1441-1443 (2013)

Enzymatic properties and subcellular localization of 1-acyl-*sn*-glycerol-3-phosphate acyltransferase responsible for synthesis of EPA-containing phospholipids in *Shewanella livingstonensis* Ac10

○CHO Hyun-Nam, KAWAMOTO Jun, KURIHARA Tatsuo

Institute for Chemical Research, Kyoto University

【Purpose】 *Shewanella livingstonensis* Ac10, a psychrotrophic bacterium isolated from Antarctic seawater, is a model organism for investigation of microbial cold-adaptation mechanisms. This bacterium produces eicosapentaenoic acid (EPA) as a fatty acyl chain of phospholipids at low temperatures, which plays a role in membrane organization and cell division¹⁾. EPA is exclusively found at the *sn*-2 position of phospholipids in *S. livingstonensis* Ac10. In the phospholipid *de novo* biosynthesis, 1-acyl-*sn*-glycerol-3-phosphate acyltransferase (PlsC) transfers an acyl group to the *sn*-2 position of 1-acyl-*sn*-glycerol-3-phosphate to synthesize phosphatidic acid. Thus, PlsC is supposed to be responsible for the synthesis of EPA-containing phospholipids. In this research, we studied catalytic function and subcellular localization of PlsC of *S. livingstonensis* Ac10 to elucidate mechanism of biosynthesis of EPA-containing phospholipids.

【Methods】 *S. livingstonensis* Ac10 has five genes coding for proteins homologous to *Escherichia coli* PlsC (named PlsC1 through PlsC5). Each of the *plsC* genes was disrupted, and we compared the lipid composition of the mutant and wild-type strains by ESI-MS. We performed functional expression assay for these putative PlsCs of *S. livingstonensis* Ac10 by using a temperature sensitive mutant of PlsC, *E. coli* JC201. Membrane fractions from these transformed *E. coli* JC201 were assayed for PlsC enzymatic activity. We also determined subcellular localization of PlsC1 and *E. coli* PlsC expressed in *plsC1*-disrupted strain (*DplsC1*) by immunofluorescence microscopy.

【Results】 The amount of phospholipids containing EPA was remarkably decreased only in *DplsC1*, suggesting that PlsC1 is responsible for incorporation of EPA into phospholipids. The *in vitro* enzyme assay showed that all the acyl-CoAs tested served as the substrate for PlsC1, indicating that this enzyme has a broad substrate specificity. We expressed PlsC1 and *E. coli* PlsC in *DplsC1* to compare the *in vivo* function of these two enzymes. Lack of EPA-containing phospholipids and defect in cell division observed in *DplsC1* were suppressed by expression of PlsC1. In contrast, when *E. coli* PlsC was expressed in *DplsC1*, the cells remained filamentous though EPA-containing phospholipids were produced. We determined subcellular localization of both PlsCs by immunofluorescence microscopy. PlsC1 was localized at the middle of the cells (Fig. 1a). On the other hand, this localization was not observed for *E. coli* PlsC in *DplsC1* (Fig. 1b).

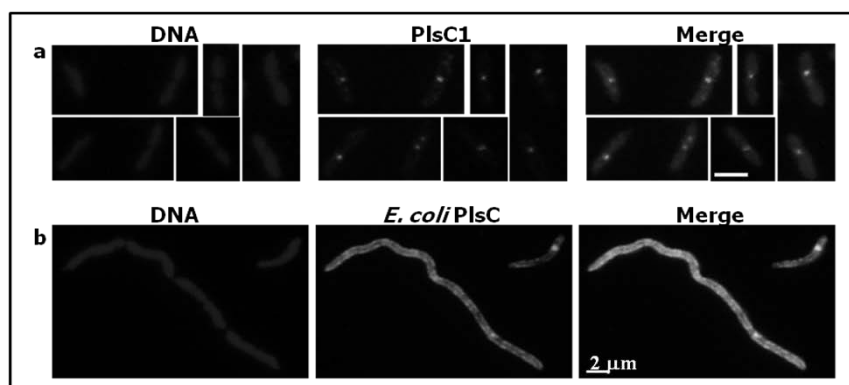


Fig. 1. Subcellular localization of PlsC1 (a) and *E. coli* PlsC (b) in *ΔplsC1* mutant strain of *S. livingstonensis* Ac10.

【Discussion】

EPA-producing bacterium, *S. livingstonensis* Ac10, has five putative 1-acyl-*sn*-glycerol-3-phosphate acyltransferases, PlsC1 through PlsC5. PlsC1, which has a broad acyl-CoA specificity, was shown to be responsible for the synthesis of EPA-containing phospholipids in this strain. PlsC1 was found to be localized at the middle of the cells of *S. livingstonensis* Ac10. EPA-containing phospholipids produced by PlsC1 at the middle of the cells were supposed to be required for the normal cell division of this strain at low temperatures.

1) Kawamoto, J., Kurihara, T., Yamamoto, K., Nagayasu, M., Tani, Y., Mihara, H., Hosokawa, M., Baba, T., Sato S. B., Esaki, N. (2009) *J. Bacteriol.* **191**, 632-640

好中球様に分化したヒト白血病細胞株 HL60 におけるビメンチンの機能の検討

○山口博文¹, 森田寛之¹, 綾部圭一郎¹, 岡本秀一郎², 通山由美¹

¹ 姫路獨協大・薬・生化, ² 川崎医大・検査診断

【目的】血液細胞に存在する中間径フィラメント、ビメンチンの好中球様分化における役割を明らかにする。

【方法】好中球におけるビメンチンの機能を明らかにするため、ヒト白血病細胞株 HL60 に *vimentin*-shRNA を導入して発現量を抑制したビメンチンノックダウン型 HL60 を樹立した。これら HL60 細胞を all-trans retinoic acid (ATRA) 処理により好中球様に、TPA + ビタミン D3 処理により単球・マクロファージ様に分化誘導し、1) 分化にともなう細胞および核の形態変化、分化マーカータンパク質の発現量の変化、2) 補体を介した食作用と食作用依存性の活性酸素種の生成について比較検討した（文献）。

【結果】ビメンチンの発現量は、好中球様に分化誘導すると経時的に低下し、蛍光免疫染色では限局した線維状構造として捉えられた。一方、単球・マクロファージ様に分化誘導すると発現量は増加し細胞全体に広汎に分布する傾向が見られた。すなわち、分化誘導の方向により、ビメンチンの発現と局在に大きな差異が認められた。好中球様分化におけるビメンチンの機能を明らかにするため、ATRA 処理後の細胞についてメイギムザ染色による形態解析をおこなった。好中球様に分化した際に認められる核の分葉は、HL60 細胞、control-shRNA を導入した HL60、ビメンチンノックダウン HL60 において同様に認められた。次に、補体依存性の食作用をおこなった。補体活性化成分 C3bi でオプソナイズされた zymosan（不活性化した *Saccharomyces cerevisiae*）は、好中球様に分化した HL60 により効率よく貪食された。フローサイトメーターを用いて、次亜塩素酸陽性細胞を定量解析したところ、HL60 細胞、control-shRNA を導入した HL60 では、ATRA 処理 4 日目以降の細胞において貪食の進展とともに次亜塩素酸陽性細胞の割合が微増したが、ビメンチンノックダウン細胞では、ATRA 処理 3 日で微増、4 日後には顕著な増加が認められた。これらの結果より、ビメンチンの発現量の減少が好中球様分化を促進し、好中球様分化にともなう食作用依存性の活性酸素の生成を亢進すること、ビメンチンが好中球様分化を制御している可能性が示唆された。

【考察】ヒト白血病細胞株 HL60 において、ビメンチンは単球・マクロファージ様分化と好中球様分化では異なる機能を果たしており、好中球様分化においては、むしろ発現量の減少が分化に促進的に機能している可能性が示唆された。

【文献】

Tatsumi Kawakami, Jinsong He, Hiroyuki Morita, Kunio Yokoyama, Hiroaki Kaji, Chisato Tanaka, Shin-ichiro Suemori, Kaoru Tohyama, Yumi Tohyama. Rab27a is essential for the formation of neutrophil extracellular traps (NETs) in neutrophil-like differentiated HL60 cells. PLOS ONE 2014. journal.pone.0084704

D-12

膵ベータ細胞の還元剤による ER ストレスとインスリン生合成に対する影響

○田畑翔太郎¹、池崎みどり¹、井内陽子¹、松井仁淑¹、井原義人¹

¹和歌山県医大・医・生化

【目的】2型糖尿病において膵ベータ細胞は高グルコース、高脂質、酸化ストレスなど様々なストレスにより障害を受け、インスリン産生、分泌機構の障害が起こることが知られる。インスリンはその構造にジスルフィド結合をもち、折りたたみにレドックス制御の存在が知られるが、膵ベータ細胞に対する還元ストレスが細胞やインスリン生合成にどう影響するかについては明らかではない。本研究では、マウス膵ベータ細胞株 MIN6 を用いて、還元剤ジチオスレイトール(DTT)による ER ストレスとインスリン産生に対する影響を明らかにすることを目的とした。

【方法】培養 MIN6 細胞に種々濃度(最終濃度 0-2 mM)の DTT を添加することで還元剤ストレス処理を行った。遺伝子転写物は細胞抽出 RNA をもとに RT-PCR により増幅しアガロースゲル電気泳動により解析した。細胞タンパク質の発現については、タンパク抽出サンプルを用いたイムノブロット解析や、免疫蛍光抗体法を用いたレーザー顕微鏡による形態学的解析により評価した。インスリン結合分子の解析については、インスリン免疫沈降複合体を単離しイムノブロット解析を行った。

【結果】MIN6 細胞においてプロインスリンのタンパク発現レベルが DTT 処理 2 時間により減少したが、インスリン遺伝子の転写レベルに顕著な影響はなかった。DTT 処理により XBP-1 mRNA のプロセシングの促進や、ER シャペロン分子の発現増加が観察された。また、DTT 処理によりインスリン免疫沈降複合体の中に種々の ER シャペロンが検出された。DTT による細胞内インスリンレベルの減少は、ラクタシスチン、MG-132、塩化アンモニウムの共存により抑制された。

【考察】還元剤ストレスにより膵ベータ細胞 MIN6 に ER ストレスの誘導されることが確認された。還元剤ストレスによる細胞内プロインスリンレベルの減少には、ER 関連分解やリソソーム分解系の活性化の関与が示唆された。

ヒト因子由来再構成型タンパク質合成システムの開発と応用

○町田幸大, 今高寛晃

兵庫県立大・院工

【目的】タンパク質合成の生化学的な解析を行うツールとして PUREsystem は広く利用され、特にタンパク質のフォールディングにおけるシャペロン群の役割について多大な成果を収めている。しかし、PUREsystem は大腸菌の翻訳関連因子で再構築されたシステムであるため真核細胞に関する研究には最適なシステムとは言えない。そして、ヒトの疾患関連因子のポストトランスレーショナル或いはコトランスレーショナルなフォールディングやプロセシングの作用機序を *in vitro* で詳細に解析するためのツールの開発は急務になってきている。そこで我々は、ヒトのタンパク質合成に必要な因子で再構築した「ヒト因子由来再構成型タンパク質合成システム」の開発とその評価を行った。

【方法】ヒト翻訳伸長因子複合体 (eEFs)、翻訳終結因子複合体 (eRFs)、40S・60S リボソーム、tRNAs、20 種類のアミノアシル tRNA 合成酵素 (ARSs) をネイティブ体或いはリコンビナント体として精製し、アミノ酸、ATP などのエネルギー源と共にエッペンドルフチューブ内で混合した。必要に応じてリコンビナント CCT¹⁾や PFD を加えた。そこに HCV-IRES 依存的にタンパク質を発現するプラスミドを T7 RNA ポリメラーゼと共に投入し、32 度、3 時間のインキュベーションを行った。ヒト β actin の解析の場合、合成後 β actin のフォールディングの度合いを Native-PAGE によるゲルシフトアッセイで観察し CCT や PFD の必要性を解析した。また、真核細胞特異的に生じることが明らかにされているウイルスタンパク質のプロセシングのメカニズムは産物のウエスタンブロットにより解析した。

【結果】ゲルシフトアッセイの結果、ヒト β actin を効率よくフォールディングさせるためにはシャペロニン CCT だけでは不十分で CCT と PFD の連携 (シャペロンの相互作用) が必須であることが明らかになった。また、ウエスタンブロットによるウイルスタンパク質のプロセシングの解析から、合成システムに添加されている翻訳関連因子のみで真核細胞内と同様のプロセシングが再現されることが明らかになった。

【考察】以上の結果は、我々が構築した「ヒト因子由来再構成型タンパク質合成システム」が真核細胞のポストトランスレーショナル或いはコトランスレーショナルなイベントを解析するための有効な研究ツールになることを示唆している。

【文献】

1. Machida, K., Kobayashi, T., Mikami, S., Masutani, M., Nishino, Y., Miyazawa, A., Imataka, H. (2012) *Protein Expr Purif.* 82, 61-69.

Transport mechanisms of 4-borono-phenylalanine as a ^{10}B carrier of
boron neutron capture therapy for cancers

○Printip Wongthai¹, Kohei Hagiwara¹, Yurika Miyoshi², Pattama Wiriyaermkul¹,
Pornparn Kongpracha¹, Isozumi Noriyoshi¹, Ryuichi Ohgaki¹, Kenjiro Tadagaki¹, Kenji Hamase²,
Shushi Nagamori¹, Yoshikatsu Kanai¹

¹Division of Bio-system Pharmacology, Department of Pharmacology, Graduate School of Medicine,
Osaka University, ²Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University

Small substances do not enter into cells spontaneously because of lipophilic properties of cell membrane. Transporters respond to transport essential substances for living, such as nutrients, into cells across the membranes. However, substrates of transporter are not only nutrients but also xenobiotics. Many of medical treatments are delivered and react on their target via the function of transporters. Boron neutron capture therapy (BNCT) is a powerful radiotherapy for brain, head and neck cancers. In BNCT, the reaction of ^{10}B incorporated into tumor cells and irradiated neutron emits alpha particle and recoiling lithium that destroy ^{10}B containing cells. Thus, the success of BNCT requires sufficient accumulation of ^{10}B in tumor cells. 4-borono-L-phenylalanine (L-BPA) has been represented as a ^{10}B carrier of BNCT in clinical trials. However, the efficacy is not satisfied perfectly and the mechanism of L-BPA transport into cancers is yet unclear. To understand the transport mechanisms of L-BPA in cancers, the varieties of cancer cell lines were examined for L-leucine uptake inhibition effect in the presence and absence of L-BPA. Furthermore, expressions of amino acid transporters were quantitated by LC-MS and Western blot analysis. The results showed that the inhibition effects L-BPA were well corresponded to the expression level of LAT1, a cancer cell type amino acid transporter. In efflux assays using stably transfected cells, L-BPA was transported by both LAT and LAT2, a normal cell type amino acid transporter. Moreover, transport of L-BPA was confirmed in *Xenopus* oocyte expression system by direct quantification of L-BPA using post-labeling HPLC method. Among the oocyte expressing of all system L amino acid transporters, only LAT1 and LAT2 showed the transportation of L-BPA while LAT3 and LAT4 did not show that effects. Therefore, increasing an affinity and/or specificity of L-BPA to LAT1, but not to LAT2, seems to be necessary to improve the efficacy of BNCT.

光分解性保護基を導入した架橋性核酸の細胞内活性評価
 小堀哲生・○中田有紀・杉原悠太・山吉麻子・村上章
 京工繊大院工芸科学

【目的】様々なバイオテクノロジー技術の発展に伴い、癌やその他の重篤な疾患に遺伝子の変異が深くかかわっていることが明らかとなってきた。アンチセンス法は、そのような特定の遺伝子の発現を選択的に制御できる方法として注目を集めている。しかしながら、現在汎用されているアンチセンス核酸には、標的結合能や選択性において改善すべき点が多く残されている。そこで、我々は次世代型アンチセンス核酸として、配列特異的に標的遺伝子と反応し、さらに活性部位に光分解性の保護基を導入することで光によりその活性を制御できる光応答型架橋性核酸の開発を行っている。これまでに、2-ニトロベンジルアセタール基で活性部位を保護した α -ハロアルデヒド誘導体(Photoresponsive α -haloaldehyde: PXA, X=Cl or Br)を合成し、PXAをオリゴ核酸の5'末端に導入した架橋性アンチセンス核酸(PXA-ODNとPXA-ORN)を合成、評価してきた¹⁾²⁾。

本研究では緑色蛍光タンパク質であるEGFPのmRNAを標的としたPXA-ORNを合成し、EGFP発現プラスミドであるpEGFPを導入したHeLa細胞内に導入することにより、PXA-ORNの細胞内における活性を評価した。

【方法】ホスホロアミダイト法を用いて、2'OMe型のPXA-ORNを合成した。配列はEGFPmRNAの開始コドンを含む配列と相補的なものとした。次に、96穴プレートに播種したHeLa細胞に対して、pEGFP、PXA-ORN、また内標とするためpDsRedをリポフェクション法を用いて導入した。導入6時間後に5分間のUV光照射(365 nm, 1.6 mW/cm²)を行った後、42時間後に蛍光像の撮影と蛍光測定を行い、EGFPの蛍光強度を評価した。

【結果と考察】蛍光像の撮影や蛍光測定の結果、EGFP由来の蛍光を観察することが出来た。しかし、PXA-ORNを27.5~110 nMの濃度範囲で評価した結果、UV光照射の有無にかかわらず、EGFPの蛍光強度に違いが現れないことが明らかとなった。これらの結果から、今回の導入条件ではPXA-ORNのHeLa細胞への導入効率は低いことが示唆された。したがって、導入条件の検討を行う必要があると考えられる。

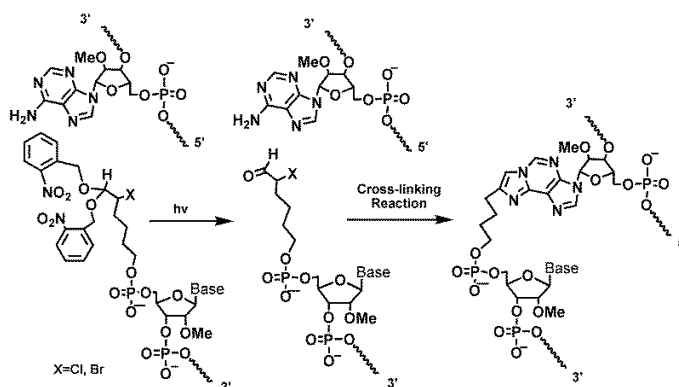


Figure Mechanism of the cross-linking reaction of PXA-ORNs

【文献】

1. Kobori, *et al. Bioorg. Med. Chem.*, **2012**, 20, 5071-5076.
2. A. Kobori, *et al. Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2013**, 23, 5825-5828.

京都産業大学図書館所蔵 貴重書特別展示会

図書館では、本学創設者 荒木俊馬総長が宇宙物理学・天文学の研究者であったことから、天文関係資料の収集に努めています。今回はそれらの中から、非常に貴重な学術資料であるコペルニクス著『天球の回転について』（初版）を展示いたします。

また、キャンパスが上賀茂神社に隣接することから収集に力を入れている、賀茂関係のコレクションから、5月に行われる行事に関する資料を展示いたします。

その他、部数を限定して出版されたため、あまり目に触れることがない自然科学分野の図書も出展いたします。

またとない機会ですので、ぜひご覧ください。

本学では、創立以来収集に努めてきた貴重資料を、社会貢献の一環として、本学図書館 Web サイト上の「貴重書電子展示室」により広く公開しておりますので、この機会にあわせてご覧いただければと存じます。

日 時：平成 26 年 5 月 17 日（土）10:00～15:30

場 所：京都産業大学図書館 1 階グループ視聴覚室 102

展示内容：以下の資料などを展示

天文関係

- ・コペルニクス著『天球の回転について』初版（1543 年）

(Nicolai Copernici Torinensis De revolutionibus orbium cœlestium, libri VI)

賀茂関係

- ・『洛中遊覧并加茂競馬絵巻』西川宇右衛門[画]
- ・『賀茂神事』伝土佐光起画

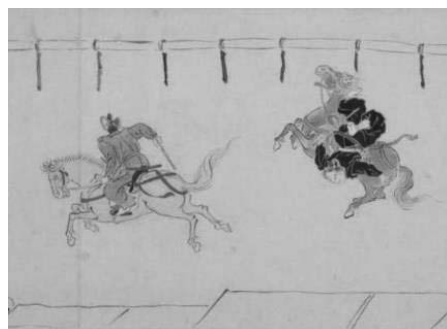
部数限定出版図書

- ・『レオナルド・ダ・ヴィンチ解剖手稿 ウィンザー城王室図書館エリザベス女王陛下所蔵』Leonardo da Vinci, Keele, Kenneth D. | 原典翻刻・注解, Pedretti, Carlo | 原典翻刻・注解. 岩波書店, 1982 年
- ・『Siebold's florilegium of Japanese plants = Florilegium plantarum Japonicarum sieboldii (シーボルト旧蔵日本植物図譜コレクション)』edited by Yojiro Kimura and Valerii I. Grubov. Limited ed. 丸善, 1993 年

以 上



『天球の回転について』より



『洛中遊覧并加茂競馬絵巻』より

「第61回日本生化学会近畿支部例会」を開催するにあたり、以下の企業に多大なご協力を頂きました。関係者一同、御礼申し上げます。

株式会社島津製作所

株式会社増田医科器械

和研薬株式会社

株式会社紀伊國屋書店

ライフテクノロジーズジャパン株式会社