

第62回 日本生化学会近畿支部例会

要旨集

日時：2015年5月16日（土）

9:10～18:10

会場：立命館大学びわこ・くさつキャンパス
滋賀県草津市

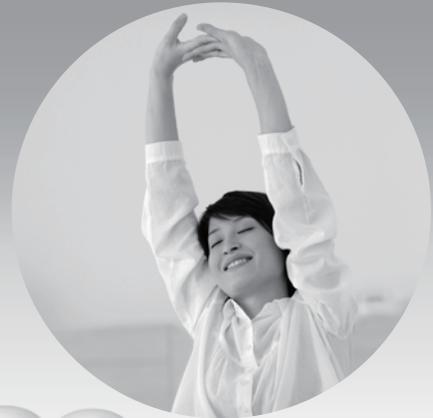
“休息の質”を見直して、朝からシャキッと！
いいサイクルで、いい毎日

今日を愛する。
LION

グッスミン 酵母のちから

休息に不満を
感じている中高年の方へ

- 朝は嫌い。昼もなんだかおっくう。
- 1日中元気でいたい。
- 家事や仕事がかどらない
- 若い頃のように休めない



※食生活は、主食、主菜、副菜を基本に、食事のバランスを。

**年齢を重ねたカラダにこそ！
大切なのは「休息の質」。**

健康で充実した毎日のために大切な休息。「たくさん休息しても満足できない」と感じたら、原因は「質の低下」にあるかもしれません。年齢に負けない毎日のために、休息の質を見直してみませんか？

**世界初！長年の研究から
「清酒酵母*」の新たな役割を発見！**

休息の質を支える自然由来の成分を探し求め、80種の食品素材に着目して研究。大学や専門機関の協力のもと、特定の「清酒酵母」が秘めた新たな働きを世界で初めて発見しました。

*アルコールは含まれておりません。

食品由来成分「清酒酵母」とは？

研究の末にたどり着いたのは、歴史ある酒蔵で発見された生命力の強い希少な清酒酵母です。食品にも使われる酵母由来なので、毎日の休息習慣にやさしく取り入れていただけます。

〈清酒酵母〉電子顕微鏡写真



**「質の高い休息」で毎日いきいき。
心もカラダも健康サイクルに！**

「質の高い休息」が健やかなサイクルを育むことに着目し、ライオンは長年研究を行ってきました。今、このサイクルに多くの研究者が注目。休息の重要性が見直されています。



厚生労働省が推進する「健康日本21*」では、食生活の管理や適度な運動などとともに「休養(質の高い休息)」を推奨しています。

*21世紀における国民健康づくり運動

いいサイクルで、いい毎日
グッスミン 酵母のちから

■内容量 124粒入り(約31日分)

■主要成分(4粒あたり) 清酒酵母粉末 500mg

お問い合わせ・お申し込みはこちらまで。

0120-056-208

通話料無料

受付時間 9:00~20:00
年中無休

<http://www.lionshop.jp/>

LION ウェルネスダイレクト

ライオン株式会社 通販事業部 〒130-8544 東京都墨田区横網 1-2-22

日本生化学会 近畿支部例会

開催日

2015年5月16日 (土)
9:10~18:10 (8:30 開場・受付開始)

開催場所

立命館大学びわこ・くさつキャンパス (BKC)
エポック立命21、ラルカディア

例会長

西澤 幹雄 (立命館大学 生命科学部 生命医科学科)

一般発表(口頭)

一般発表(ポスター)・高校生ポスター発表

ポスター前自由討論

ランチョンセミナー 宇留島 隼人 (国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所)
主催: 株式会社アミノアップ化学

シンポジウム 生化学から先端生命科学へのゲートウェイ

協賛: 関西実験動物研究会、立命館大学動物実験委員会

伊藤 誠二

(関西医科大学 医化学講座)

森 和俊

(京都大学大学院理学研究科 生物科学専攻 生物物理学教室ゲノム情報分野)

長田 重一

(大阪大学免疫学フロンティア研究センター 免疫・生化学部門)

喜多 正和

(京都府立医科大学大学院医学研究科 実験動物センター)

平成27年度日本生化学会近畿支部奨励賞
授賞式・受賞記念講演

波多野 亮 (立命館大学薬学部)

ホームページ: <http://aqis-conf.org/2015reikai-jbskinki/>

連絡先: 立命館大学 生命科学部 生命医科学科
医化学研究室内

日本生化学会近畿支部 例会事務局

〒525-8577 滋賀県草津市野路東1-1-1

E-mail: jbsk2014@gst.ritsumei.ac.jp



ご挨拶

この度、第 62 回日本生化学会近畿支部例会が 2015 年 5 月 16 日（土）に立命館大学びわこ・くさつキャンパスにおいて開催するはこびとなりました。ひさしぶりに滋賀の地で例会が開かれることとなります。

日本生化学会近畿支部が毎年開催している近畿支部例会では、支部会員の研究・教育成果の発信や情報交換の場を提供するとともに、将来の日本を担う若手研究者・学生の育成につなげようとしています。この例会では、医学、薬学、理学、農学、生命科学などさまざまなバックグラウンドの研究者が一つのキャンパスに集まります。また、全国レベルの学会とは異なり、学部生、大学院生、ポストドクトラルフェローなど若手研究者が多数発表し、活発に議論を行える環境であることが大きな特徴です。

注目される最新の研究については、シンポジウムとして紹介しています。今回は「生化学から先端生命科学へのゲートウェイ」と題して、昨年 9 月にラスカー賞を受賞された森和俊先生（京都大学大学院理学研究科）、長田重一先生（大阪大学免疫学フロンティア研究センター）、伊藤誠二先生（関西医科大学）のご講演を予定しております。そして、本シンポジウムに協賛していただいた関西実験動物研究会から喜多正和先生（京都府立医科大学動物センター）にご講演いただきます。

さらに、新しい試みとして高校生による研究発表や、企業主催のランチオンセミナーも予定しております。また、近畿支部の若手研究者の活動を盛り上げるため、本年度から創設された「日本生化学会近畿支部奨励賞」を受賞された波多野亮先生（立命館大学薬学部）に受賞記念講演をしていただきます。

本例会は学生と若手研究者の発表を促進するため、参加費や登録料はいっさい無料です。若い力がみなぎるアクティブな例会で、おおいに研究について語り合い、議論しあっていただきたいと思っております。

関係者一同、皆様の参加を心よりお待ちしております。

第 62 回日本生化学会近畿支部例会

例会長 西澤 幹雄

（立命館大学 生命科学部生命医科学科 医化学研究室 教授）

第 62 回 日本生化学会近畿支部例会 プログラム

開催日： 平成 27 年（2015 年）5 月 16 日（土）9:10～18:10
開催場所： 立命館大学びわこ・くさつキャンパス（滋賀県草津市）
エポック立命 21・ラルカディア
ホームページ： <http://aqis-conf.org/2015reikai-jbskinki/>
参加費： 無料 懇親会参加費： 4000 円（学生無料）

タイムスケジュール

- 08:30 –** 受付開始（エポック立命 21 1階エントランス）
- 09:10 – 09:15** 開会の辞（例会長、西澤幹雄）（ラルカディア 1階 R101）
- 09:15 – 09:55** シンポジウム講演 1：伊藤 誠二
「成熟した疼痛研究からの新しい展開」（ラルカディア 1階 R101）
- 10:05 – 11:55** 一般発表（口頭発表）：11 題／会場
A, B, C, D, L 会場（エポック立命 21・ラルカディア；会場図をご参照ください）
- 12:05 – 12:35** ランチョンセミナー（アミノアップ化学主催）：宇留島 隼人
「日本の伝統食品であるシソの新たな可能性～大腸炎治療効果のエビデンス獲得に向けた研究～」（ラルカディア 1階 R101）
- 12:40 – 13:10** ポスター前で自由討論（エポック立命 21 1階ホール）
- 13:10 – 14:10** 一般発表（口頭発表）：6 題／会場
A, B, C, D, E 会場（エポック立命 21・ラルカディア；会場図をご参照ください）
- 14:20 – 15:25** 一般発表（ポスター発表）と高校生のポスター発表（エポック立命 21 ホール）
- 15:40 – 16:20** シンポジウム講演 2：森 和俊
「小胞体ストレス応答によるタンパク質品質管理」（ラルカディア 1階 R101）
- 16:20 – 17:00** シンポジウム講演 3：長田 重一
「細胞死と"eat me"シグナル」（ラルカディア 1階 R101）
- 17:00 – 17:40** シンポジウム講演 4：喜多 正和
「動物実験と生化学の深い関係：社会に貢献する動物実験」
（ラルカディア 1階 R101）
- 17:40 – 18:10** 平成 27 年度日本生化学会近畿支部奨励賞の授賞式と受賞記念講演
波多野 亮「上皮膜輸送機能制御における細胞骨格系アダプター蛋白質エズリンの役割」（ラルカディア 1階 R101）
- 18:30 – 20:00** 懇親会（優秀発表賞の発表と表彰を含む）（ユニオンスクエア）
- 12:00 まで** ポスター掲示（エポック立命 21 1階ホール）
- 17:00 まで** ポスター撤去（エポック立命 21 1階ホール）
- *12:05 – 13:05** 近畿支部評議員会をエポック立命 21 3階 K304 にて開催します。

参加者へのご案内

会場

立命館大学びわこ・くさつキャンパス（BKC）です。詳しくは後に書いてある交通アクセスをご参照ください。大学内は全面禁煙ですので、御協力をお願いします。

受付

1. 8:30 よりエポック立命 21 の 1 階エントランスにて開始します。
2. 受付時に名前・所属等を確認し、例会に関する案内などの資料をお渡しいたします。
3. 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。
4. 学部生・大学院生の筆頭著者の方には、昼食時に弁当（無料）をお渡しします。受付にて確認し、名札にシールを貼ってもらってください。

高校生のポスター発表

1. ポスター発表のみを行います。エポック立命 21 ホール（1 階）がポスター会場です。
2. ポスターを貼るパネルの大きさは幅 900 mm × 高さ 2100 mm（A0 サイズまたは模造紙が収まるサイズ）です。貼付に必要なピン等と付き添いの先生用のリボンをポスター会場受付でお渡しします。
3. ポスターは 12:00 までに掲示して下さい。パネルに演題番号（H1～H12）が貼ってありますので、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。
4. 発表者の人はポスターの前に立って簡単に研究内容を説明し、質問に答えてください。ランチョンセミナー後にも、ポスター前で自由に討論できる時間を設けてあります。
5. ポスター発表が終わった後、17:00 までに撤去して下さい。

一般講演の発表者の方へ

すべての発表を会場での口頭発表とポスター発表の両方で行う予定でしたが、演題数が 103 題となったため、会場を 1 つ追加しました。それでも全員が会場での口頭発表をすることは困難な状態となりました。編集会議で相談した結果、やむを得ず、一部演題（演題番号が 18 番以降）をポスター発表のみとしました。せっかく演題申込をしていただきましたが、このような結果となり、大変申し訳なく、ここに深くお詫び申し上げます。なお、演題番号は演題表（会場案内の後のページ）でご確認ください。演題番号は会場のアルファベットと番号からなっています（例 A7 = A 会場の 7 番）。

口頭発表

1. **演題番号が 1～17 の発表者**は、それぞれの会場にて口頭発表を行ってください。なお、会場はエポック立命 21・ラルカディアに分かれています。演題表（会場案内の後のページ）と会場図（交通アクセスの後のページ）でご確認ください。
2. 講演 8 分、討論 2 分（演者交代の時間を含む）の計 10 分です。
3. 各自パソコンをお持ちください。

4. 発表者のパソコンとミニ 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をお持ちください。
5. 発表 20 分前までに必ず事前の試写を各会場でお願いいたします。なお、試写をする場所については各会場の入り口に掲示します。
6. 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。画面のスリープ機能はオフに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。
7. 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に対応可能なソフトは Microsoft 社の PowerPoint のみになります。
8. 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。

一般講演のポスター発表

1. エポック立命 21 ホール（1 階）がポスター会場です。
2. 一般講演のすべての演題についてポスター発表を行います。
3. ポスターを貼るパネルの大きさは幅 900 mm × 高さ 2100 mm（A0 が収まるサイズ）です。貼付に必要なピン等と発表者用リボンをポスター会場受付でお渡しします。
3. ポスターは 12:00 までに掲示して下さい。パネルに演題番号が貼ってありますので、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。
5. 発表者の人はポスターの前に立って説明し、質問に答えてください。
6. ポスター発表が終わった後、17:00 までに撤去してください。
7. 一般発表のポスターは終日掲示し、その内容を評価して、投票により「優秀発表賞」（5 名程度）を決定します。対象は学生（学部生と大学院生）の筆頭著者とします。なおポスターの見栄えではなく、内容を評価して決定します。懇親会において表彰します。

ランチョンセミナーと昼食について

1. 高校生と付き添いの先生および学部生・大学院生の筆頭著者の方（名札にシールが貼ってある人）は、ランチョンセミナー会場入り口にて弁当（無料）と飲料（無料）をお受け取りください。
2. ランチョンセミナーを聴かれる方は、ランチョンセミナー会場入り口にて弁当（無料）と飲料（無料）をお受け取りください。
3. ランチョンセミナーをお聴きにならない方は、ランチョンセミナー会場入り口にて弁当を買うか、あるいはユニオンスクエアの生協食堂などをご利用ください。

近畿支部評議員会

12:05 から約 1 時間、エポック立命 21 の 3 階 K304 において近畿支部評議員会を開催します。当日、受付で案内をお渡ししますので、評議員の方はお集まりください。

懇親会

18:30 よりユニオンスクエアにて懇親会を行います。奮って御参加ください。会費は 4,000 円です。学生は無料です。当日受付もあります。

交通アクセス

交通アクセス

京都、大阪方面からは JR 琵琶湖線の「野洲行き」または「米原方面行き」電車に乗り、南草津（最寄り駅）で下ります。「湖西線経由」の電車に乗らないようご注意ください。新快速で京都から 17 分で着きます。

南草津駅（東口）前から近江鉄道バスに乗り、「立命館大学」で降ります（約 15 分）。「立命館大学正門前」で降りないようご注意ください。当日朝のシンポジウム講演 1（S1）に間に合うよう臨時バスも出ます。

南草津駅（東口）出発の近江鉄道バス時刻表

http://www.busqr.com/jikoku/01/stop/iku/167_13_2.html

タクシーならば南草津駅（東口）前から約 10 分です。近江タクシー（077-563-0106）

学生以外の方は車で入校されても構いませんが、駐車場の台数に限りがございますので、当日はなるべく公共交通機関をお使いください。車で来られる場合には正門を入れてすぐ左の受付で入校許可を取ってください。

なお、立命館大学のホームページもご覧ください。「立命館大学」で検索。

（アクセス）http://www.ritsumei.jp/accessmap/index_j.html

（キャンパスマップ）http://www.ritsumei.jp/campusmap/index_j.html

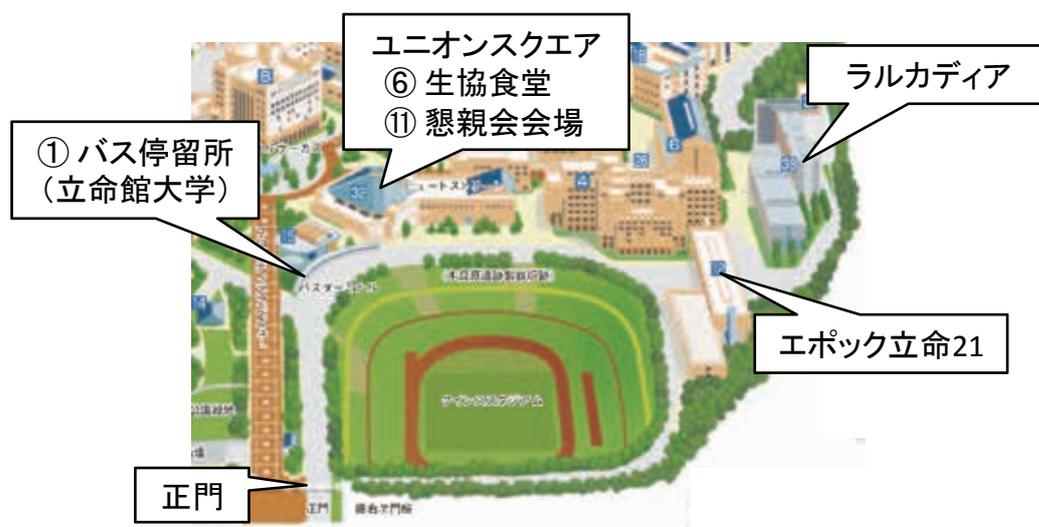
（建物案内）http://www.ritsumei.jp/campusmap/map_bkc_j.html

会場案内

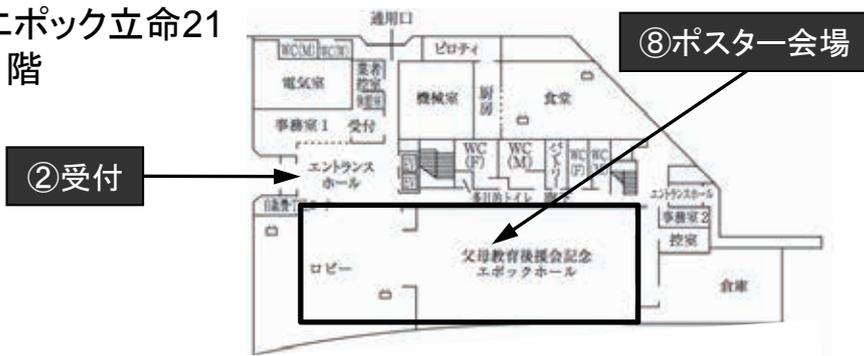
会場案内

- ①バス停留所「立命館大学」：スタジアム横。ユニオンスクエア前。
- ②受付：エポック立命 21 エントランス（1階）
- ③一般講演（口頭発表）：
 - A会場：エポック立命 21 3階 K309
 - B会場：エポック立命 21 3階 K310
 - C会場：ラルカディア 2階 R201
 - D会場：ラルカディア 2階 R202
 - E会場：ラルカディア 1階 R102
- ④シンポジウム会場：ラルカディア 1階 R101（ホール）
- ⑤ランチョンセミナー：ラルカディア 1階 R101（ホール）
- ⑥生協食堂：ユニオンスクエア
- ⑦近畿支部評議員会：エポック立命 21 3階 K304
- ⑧ポスター発表（一般講演、高校生発表）会場：エポック立命 21 1階 エポックホール
- ⑨シンポジウム講師控え室：ラルカディア 3階 R301
- ⑩本部、スタッフ控え室：エポック立命 21 3階 K306
- ⑪懇親会会場：ユニオンスクエア

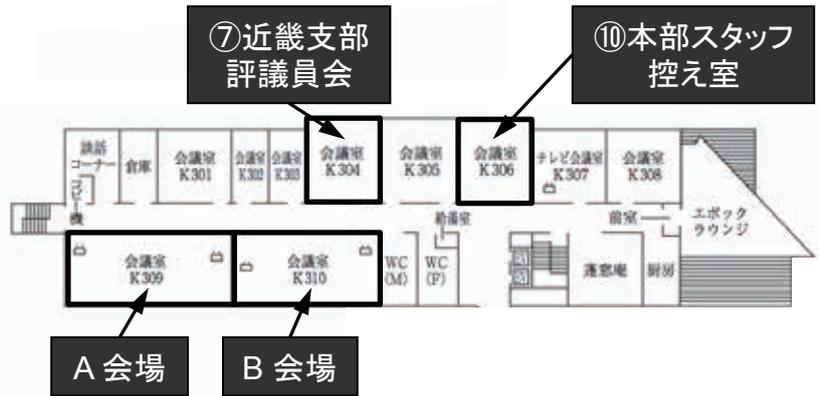
会場図（キャンパス全体）



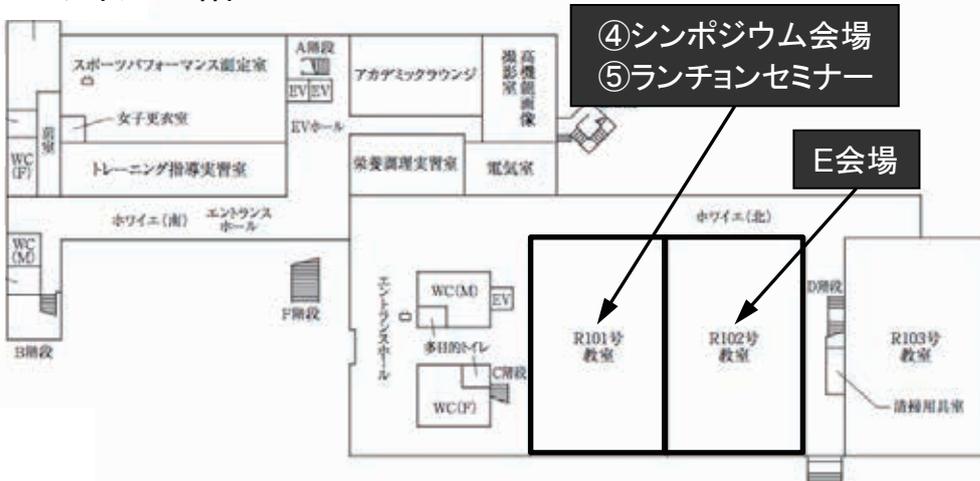
エポック立命21
1階



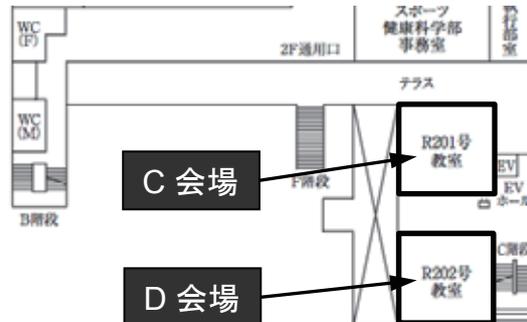
エポック立命21
3階



ラルカディア 1階



ラルカディア
2階



ラルカディア 3階
R301
⑨ シンポジウム講師
控え室

演題表

	9:10~9:15	開会の挨拶:西澤 幹雄 (ラルカディア1階R101)				
S1	9:15~9:55	シンポジウム:伊藤 誠二 (ラルカディア1階R101)				
	10:05~11:55	一般講演 (演題番号は会場のアルファベットと番号からなっています。筆頭著者名を記載しています。)				
	セッション	A会場	B会場	C会場	D会場	E会場
		エボック立命21 3階K309	エボック立命21 3階K310	ラルカディア 2階R201	ラルカディア 2階R202	ラルカディア 1階R102
1	10:05~10:15	A1:松本 直樹	B1:稲荷 尚吾	C1:大矢 知佳	D1:山崎 正幸	E1:栗田 宗一
2	10:15~10:25	A2:佐藤 真希	B2:澤野 俊憲	C2:小原 惇	D2:岩井 良祐	E2:小野寺 章
3	10:25~10:35	A3:位田 康熙	B3:藤井 愛理	C3:中尾 広美	D3:田中 誠	E3:平松 貴人
4	10:35~10:45	A4:田原 愛華	B4:岩佐 晃輔	C4:山田 敦子	D4:橋田 泰彦	E4:茶谷 絵理
5	10:45~10:55	A5:川井 真好	B5:中尾 友香梨	C5:松島 章子	D5:山崎 聖司	E5:若本 拓朗
6	10:55~11:05	A6:三輪 瞬平	B6:松村 美紀	C6:齋藤 僚	D6:清水 莉子	E6:赤坂 一之
7	11:05~11:15	A7:大山 克明	B7:若井 恵里	C7:高井 雅聡	D7:加藤 洋平	E7:森川 ありさ
8	11:15~11:25	A8:藤井 裕己	B8:森口 剛介	C8:吉田 亜佑美	D8:山本 晃毅	E8:谷口 甲介
9	11:25~11:35	A9:山口 大志	B9:松岡 悦子	C9:堀部 智久	D9:横川 貴太	E9:田中 正和
10	11:35~11:45	A10:加藤 志郎	B10:大野 華奈	C10:芦野 佳那子	D10:辻 将吾	E10:英山 明慶
11	11:45~11:55	A11:西 海斗	B11:馬屋原 慈理	C11:Kongpracha P.	D11:石田 莉葉子	E11:東本 菜月
L	12:05~12:35	ランチョンセミナー(アミノアップ化学主催):宇留島 隼人 (ラルカディア1階R101)				
	12:40~13:10	ポスター前で自由討論 (エボック立命21 1階ホール)				
		近畿支部評議員会 (12:05~13:05、エボック立命21 3階K304)				
	13:10~14:10	一般講演 (演題番号は会場のアルファベットと番号からなっています。筆頭著者名を記載しています。)				
	セッション	A会場	B会場	C会場	D会場	E会場
		エボック立命21 3階K309	エボック立命21 3階K310	ラルカディア 2階R201	ラルカディア 2階R202	ラルカディア 1階R102
12	13:10~13:20	A12:大野 絹代	B12:上田 佳奈	C12:山下 紘季	D12:山口 賀章	E12:内藤 朋樹
13	13:20~13:30	A13:吉田 沙織	B13:福井 健人	C13:牛田 吉泰	D13:池田 亜弥	E13:土谷 正樹
14	13:30~13:40	A14:柴田 理志	B14:藤井 正興	C14:田島 達也	D14:浅野 弘嗣	E14:徳永 智久
15	13:40~13:50	A15:河野 貴子	B15:梅川 碧里	C15:中西 加純	D15:坂本 凌	E15:豊竹 洋佑
16	13:50~14:00	A16:矢澤 一生	B16:志田 美春	C16:早川 結実子	D16:小西 諒	E16:木村 優花
17	14:00~14:10	A17:森田 寛之	B17:本田 葵	C17:和久 友則	D17:植山 萌恵	E17:片岡 三和
	12:00まで	ポスター掲示 (エボック立命21 1階ホール)				
		ポスター発表 (エボック立命21 1階ホール)				
	14:20~15:25	一般講演のポスター発表			高校生のポスター発表	
		A1~A17;B1~B17;C1~C17;D1~D17;E1~E17			H1~H12	
		A18:田村 峻佑	B18:奥山 哲矢	C18:成川 智貴	立命館慶祥高等学校	
		A19:浅井 智広	B19:内田 弘子	C19:早川 千尋	京都府立桃山高等学校	
		A20:西田 亮	B20:平 宗一郎	C20:野津 遼祐	大阪府立天王寺高等学校	
		A21:川口 高德	B21:横川 拓海	C21:近藤 真菜美	大阪府立園芸高等学校	
		A22:井上 恭	D18:吉田 徳之	C22:小野 伯容	奈良県立青翔高等学校	
		A23:松田 諒子	E18:井田 智恵利	C23:六嶋 千春	兵庫県立神戸高等学校	
	17:00まで	ポスター撤去				
S2	15:40~16:20	シンポジウム:森 和俊 (ラルカディア1階R101)				
S3	16:20~17:00	シンポジウム:長田 重一 (ラルカディア1階R101)				
S4	17:00~17:40	シンポジウム:喜多 正和 (ラルカディア1階R101)				
P	17:40~18:10	平成27年度日本生化学会近畿支部奨励賞の授賞式と受賞記念講演:波多野 亮 (ラルカディア1階R101)				
	18:30~20:00	懇親会 (優秀発表賞の発表と表彰を含む)(ユニオンスクエア)				

座長については後日、ホームページでご連絡します。

演題表

開会の挨拶：西澤 幹雄（ラルカディア1階R101）						
シンポジウム：伊藤 誠二（ラルカディア1階R101）						
一般講演（演題番号は会場のアルファベットと番号からなっています。筆頭著者とタイトルを記載しています）						
	セッション	A会場	B会場	C会場	D会場	E会場
9:10~9:15						
S1	9:15~9:55					
	10:05~11:55					
1	10:05~10:15	A1: 松本 直樹(立命館大学)ら、植物細胞壁ペクチンの生合成に関与するガラクトース転移酵素の生化学的解析	B1: 稲荷 尚吾(同志社大学)ら、血漿セレン含有タンパク質 Selenoprotein P1による膵臓β細胞障害のメカニズム解析	C1: 大矢 知佳(立命館大学)ら、表面マーカーSca1とCD34による体細胞初期化成功群と不成功群の解析	D1: 山崎 正幸(龍谷大学)ら、食物アレルギーの問題の解決に電磁波照射は利用できるか？	E1: 栗田 宗一(滋賀医科大学)ら、Zn-α2-glycoproteinの血清中濃度と血圧の相関およびその分子機構
2	10:15~10:25	A2: 佐藤 真希(立命館大学)ら、シロイヌナズナPHOT2のLOVドメインの光サイクルが生理反応へ及ぼす影響の解析	B2: 澤野 俊憲(大阪大学)ら、脳梗塞時のミクログリア機能に対するSema4D作用の解析	C2: 小原 惇(立命館大学)ら、Gata6, Oct4, Sox2を用いたマウス胎児線維芽細胞からの多能性の誘導	D2: 岩井 良祐(立命館大学)ら、レプリカ交換分子動力学法によるプロトン化状態の変化に伴うポリグタルミン酸のヘリックス-コイル転移の研究	E2: 小野寺 章(神戸学院大学)ら、酸化亜鉛ナノ粒子はレニン-アンジオテンジンを活性化し高血圧を惹起する
3	10:25~10:35	A3: 位田 康熙(立命館大学)ら、黄金色薬が持つオートファゴソームの光受容能およびDNA結合能の解析	B3: 藤井 愛理(立命館大学)ら、オウレンの初代培養肝細胞における一酸化窒素誘導に対する効果	C3: 中尾 広美(立命館大学)ら、新規ヒトIPS/ES細胞マーカー抗体の工ビトープの同定と結合特異性の解析	D3: 田中 誠(長浜バイオ大学)ら、新規プロテアソーム阻害剤ダイフェン-Fの構造活性性相関研究	E3: 平松 貴人(神戸大学)ら、ヨウ素染色を用いたアミロイド線維構造多形の識別
4	10:35~10:45	A4: 田原 愛華(大阪工業大学)ら、ヨーグルト酒からのGABA高生産菌の分離とGABA生産条件の検討	B4: 岩佐 晃輔(立命館大学)ら、初代培養肝細胞における一酸化窒素誘導に対するチロフェン誘導の効果	C4: 山田 敦子(神戸薬科大学)ら、コンドロイチン硫酸鎖による骨格筋分化・再生過程の制御メカニズムの解析	D4: 橋田 泰彦(京都大学)ら、カーボナノチューブを自己組織化的に被覆するペプチド分散剤の設計	E4: 茶谷 絵理(神戸大学)ら、インスリンB鎖におけるアミロイド線維前駆中間体の捕捉と構造特徴の解析
5	10:45~10:55	A5: 川井 真好(姫路獨協大学)ら、Staphylococcus aureusの好中球に対する抵抗性の変化	B5: 中尾 友香梨(大阪薬科大学)ら、バイカレインによる脂肪細胞の分化抑制機構の解明	C5: 松島 章子(京都産業大学)ら、Anosmin-1の血管形成におけるシグナル伝達経路の解析	D5: 山崎 聖司(大阪大学)ら、細菌異物排出ポンプの阻害剤結合様式と阻害メカニズムの解明	E5: 若本 拓朗(立命館大学)ら、高圧力NMR法によるユビキチンの局所変性状態の立体構造解析
6	10:55~11:05	A6: 三輪 瞬平(近畿大学)ら、イネ苗立枯細菌病菌Burkholderia plantariiにおける三成分制御系TroK, TroR1, TroR2によるトロポロン合成制御システム	B6: 松村 美紀(大阪薬科大学)ら、甲状腺ホルモンによる脂肪滴蓄積促進機構の解明	C6: 齋藤 僚(立命館大学)ら、神経分化過程における小胞体関連分解構成因子SEL1Lの役割	D6: 清水 莉子(近畿大学)ら、細菌ヒスチジンキナーゼのH-boxを標的とする新規抗生物質、waldiomycin	E6: 赤坂 一之(京都府立大学)ら、“原子”から“いのち”へー蛋白質のパラドックスを紐解く
7	11:05~11:15	A7: 大山 京明(立命館大学)ら、シアノバクテリア生物時計再構成系におけるKaiCの二状態変化とATPase活性	B7: 若井 恵里(大阪薬科大学)ら、脂肪細胞におけるプロスタグランジンD2受容体の機能解析	C7: 高井 雅隆(大阪医科大学)ら、卵巣明細胞腺癌におけるPP2Aを介したPI3K経路とRas pathway経路のクロストーク	D7: 加藤 洋平(京都大学)ら、Visible immunoprecipitation (VIP) アッセイによるマルチサブユニット複合体の構築様式の解明	E7: 森川 ありさ(神戸学院大学)ら、銀ナノ粒子による細胞毒性はミトコンドリアからのROS産生に関連する
8	11:15~11:25	A8: 藤井 裕己(大阪大学)ら、バクテリア由来アキア型ヌクレアーゼ、ヘリカーゼ様酵素の機能解析	B8: 森口 剛介(大阪工業大学)ら、活性化した褐色脂肪細胞において抗リン酸化NFκB抗体が認識するタンパク質について	C8: 吉田 亜佑美(京都産業大学)ら、VEGF-A/NRP1シグナルの阻害はがん細胞の増殖と転移を抑制する	D8: 山本 晃毅(長浜バイオ大学)ら、周期構造金属薄層膜を用いた細胞分離と赤外線透過性による検出	E8: 谷口 甲介(神戸学院大学)ら、非晶質ナノシリカはPI3Kシグナルを介した血管の弛緩反応を惹起する

9	11:25~11:35	A9: 山口 大志(近畿大学)ら、イオン液体耐性プロテアーゼの特性とイオン液体耐性細菌のゲノム解説 A10: 加藤 志郎(関西大学)ら、D-アミノ酸高生産乳酸菌のドラフトゲノム解析 A11: 西 海斗(京都府立大学)ら、好熱菌 <i>Methiobacterium ruber</i> H328株が生ずるケラチン分解性プロテアーゼに関する研究	B9: 松岡 悦子(大阪工業大学)ら、糖尿病神経因性疼痛に伴う脊髄におけるミトコンドリアの機能解析 B10: 大野 華奈(大阪工業大学)ら、糖尿病性神経因性疼痛に伴う脊髄後角の一酸化窒素産生制御 B11: 馬屋原 慈理(立命館大学)ら、フコキサンチンによる肥満細胞形成阻害効果	C9: 堀部 智久(京都大学)ら、P5活性化阻害剤のスクリーニングおよび癌細胞からのMIGAの分泌に及ぼす影響 C10: 芦野 佳那子(立命館大学)ら、Hippo経路を制御するTRIM/RBCCタンパク質TRIM3の機能解析 C11: Kongracha P.(大阪大学)ら、Inhibition of the LAT1-mediated leucine transport affects multiple cellular processes in pancreatic cancer cells.	D9: 横川 貴太(京都大学)ら、MMLV逆転写酵素のRNase Hドメインの性状解析 D10: 辻 将吾(京都大学)ら、TALEタンパク質の分子進化 D11: 石田 莉葉子(和歌山県立医科大学)ら、ES1マスマスベクトルを用いた非ワトソン-クリック型塩基対の検出について	E9: 田中 正和(関西医科大学)ら、生体内におけるポリADPリボシル化反応と細胞増殖との関連について E10: 英山 明慶(大阪大学)ら、タンパク質N末端アセチル化を介した選択的ミトコンドリア分解の制御 E11: 東本 菜月(和歌山県立医科大学)ら、ラット線維芽細胞におけるTGF- β シグナルのHsc70による制御について
L	12:05~12:35	ランチオンセミナー(アミノアップ化学主催): 宇留島 隼人 (ラルカディア1階R101)				
	12:40~13:10	ポスター前で自由討論 (エポック立命21 1階ホール)				
	13:10~14:10	一般講演 (演題番号、筆頭著者、タイトルを記載しています)				
	セッション	A会場	B会場	C会場	D会場	E会場
12	13:10~13:20	エポック立命21 3階K309 A12: 大野 絹代(奈良女子大学)ら、クラスリン集合タンパク質CALM欠損が及ぼすメラニン産生への影響 A13: 吉田 沙織(立命館大学)ら、胃腸上皮の構築と発進におけるエズリンノックダウンの影響 A14: 柴田 理志(大阪大学)ら、ARHGEF10はRab8の局在に関与する A15: 河野 貴子(立命館大学)ら、血管透過性制御におけるミオシン軽鎖のリン酸化制御システムの解析	エポック立命21 3階K310 B12: 上田 佳奈(和歌山県立医科大学)ら、Mindin thrombospondin type-1 repeat ドメインにおけるC-mannosyl化による分泌促進 B13: 福井 健人(京都大学)ら、酵母Pkc1の構成的活性化変異体の過剰発現が細胞死とキチン含量に及ぼす影響 B14: 藤井 正興(立命館大学)ら、進化トレース法を用いたO-GlcNAc転移酵素の進化解析 B15: 梅川 碧里(立命館大学)ら、出芽酵母 α -マンノシダーゼAMS1の活性制御機構の解析	ラルカディア 2階R201 C12: 山下 敏季(立命館大学)ら、トランスオミクスによる線虫Caenorhabditis elegansにおけるMEX-1 C13: 牛田 吉泰(立命館大学)ら、線虫 <i>Caenorhabditis elegans</i> におけるセラムドキナーゼ関連遺伝子T10B11.2の遺伝子発現および表現型解析 C14: 田島 達也(摂南大学)ら、線虫(<i>C. elegans</i>)のオス特異的な受精必須遺伝子spe-45の機能解析 C15: 中西 加純(摂南大学)ら、線虫(<i>C. elegans</i>)を用いた精細胞活性化因子の同定	ラルカディア 2階R202 D12: 山口 賀章(京都大学)ら、概日リズムの頑強性を担う視交叉上核バソプレジニン神経結合 D13: 池田 亜弥(神戸薬科大学)ら、ヘパリン硫酸の合成異常が神経発生と行動に与える影響についての解析 D14: 浅野 弘嗣(京都産業大学)ら、カルマン症候群原因遺伝子産物Anosmin-1はNetrin-1と結合する D15: 坂本 凌(立命館大学)ら、microRNA-1270に拮抗するインターフェロン α competing endogenous RNAネットワーク	ラルカディア 1階R102 E12: 内藤 朋樹(京都大学)ら、リン脂質フリッパーゼATP10AのPCフリッパー活性及び細胞膜ダイナミクスへの関与 E13: 土谷 正樹(京都大学)ら、骨格筋線維形成におけるリン脂質フリッパーゼの役割 E14: 徳永 智久(京都大学)ら、エイコサペンタエン酸の新規生理機能解析に應用できる ω -末端修飾型脂肪酸ナログ体の効率的な合成法の確立 E15: 豊竹 洋佑(京都大学)ら、 <i>Shewanella livingstonensis</i> Ac10における細胞膜リン脂質多様性に関与するPIsC4の基質特異性の解析
13	13:20~13:30					
14	13:30~13:40					
15	13:40~13:50					
16	13:50~14:00	A16: 矢澤 一生(大阪大学)ら、心筋特異的な膜タンパク質の同定 解析 B16: 志田 美春(神戸薬科大学)ら、コンドロイチン硫酸鎖の発現制御による初期軟骨分化過程の制御機構の解析 C16: 早川 結実子(長浜バイオ大学)ら、ヘリコクタン-ピロリの産生毒素VacAに対するペプチドアダプターとの探索と評価 D16: 小西 諒(京都工芸繊維大学)ら、核糖トラップのRISCに対する結合親和性評価法の開発 E16: 木村 優花(滋賀大学)ら、節足動物における中性糖脂質の共通性 - クロスズメバチ <i>Vespa flaviceps</i> 幼虫を用いて				

17	14:00~14:10	A17: 森田 寛之(姫路獨協大学)ら、Kinesin family member 20A(KIF20A)の多核化と細胞分裂への関与 B17: 本田 葵(奈良先端科学技術大学院大学)ら、糖脂質硫酸基転移酵素遺伝子の導入によるヒト子宮内膜癌細胞の表現形質の変化 C17: 和久 友則(京都工芸繊維大学)ら、異方性形態を有するペプチドナノキャリアによる細胞内抗原ペプチド呈示の役割	D17: 植山 萌恵(立命館大学)ら、eMycにより発現制御されるmiR17-92のiPS細胞誘導過程における役割に関する研究	E17: 片岡 三和(立命館大学)ら、Neurospora crassaにおけるセラミド代謝酵素遺伝子ホモログの生理的役割		
	12:00までに掲示	ポスター発表 (エポック立命21 1階ホール)				
		一般講演のポスター発表				
	14:20~15:25	A1~A17	B1~B17	C1~C17	D1~D17	E1~E17
		A18: 田村 峻佑(立命館大学)ら、植物細胞壁ペクチン由来ラムノガラクトロナン(LRG-1)オリゴ糖の調製とRG-1生合成酵素の活性測定法の構築 A19: 浅井 智広(立命館大学)ら、水モダイマー-光合成反応中心複合体の人工的ヘテロダイマー化 A20: 西田 亮(立命館大学)ら、大腸菌一遺伝子欠失株Keioコレクションを用いたリルル酸還元関連遺伝子の網羅的解析 A21: 川口 高徳(立命館大学)ら、腎尿管での電解質再吸収におけるアクチン結合タンパク質モエシンの生理的役割の解明 A22: 井上 恭(立命館大学)ら、GPR120の脂肪細胞分化に対する影響の解析 A23: 松田 諒子(立命館大学)ら、植物細胞壁生合成に必要なUDP-アピオースの調製法の開発	B18: 奥山 哲矢(立命館大学)ら、ソウジュツによる初代培養肝細胞の一酸化窒素誘導の効果 B19: 内田 弘子(立命館大学)ら、養シャクヤクとポタンビによる初代培養肝細胞の一酸化窒素誘導に対する効果 B20: 平宗一郎(立命館大学)ら、フコキサンチンによるアトピー性皮膚炎予防効果 B21: 横川 拓海(京都大学)ら、神経細胞においてp38 MAPKおよびcAMPシグナルはPGC-1 familyの発現を制御する C18: 成川 智貴(立命館大学)ら、初期化因子によるiPS細胞および心筋細胞の誘導過程における転写因子Foxd1の果たす役割 C19: 早川 千尋(立命館大学)ら、ストレス応答シグナルが多能性の獲得と維持に果たす役割に関する研究 C20: 野津 遼祐(立命館大学)ら、G-CSFシグナルを伝達する人工受容体の作製とこれを安定発現する多能性幹細胞株の樹立 C21: 近藤 真菜美(京都産業大学)ら、神経軸索ガイダンス分子Anosmin-1が血管内皮細胞におよぼす生理作用の解析 C22: 小野 伯容(立命館大学)ら、線虫Caenorhabditis elegansにおける抗微生物ペプチド遺伝子cnc-2発現経路のモデル構築 C23: 六嶋 千春(立命館大学)ら、線虫Caenorhabditis elegansの初期胚発生においてスフィンゴシンキナーゼsphk-1とスフィンゴシンリリン酸分解酵素53C3.13は必須遺伝子である	D18: 吉田 徳之(立命館大学)ら、乳癌培養細胞並びに組織におけるEphA2アンチセンスRNAの発現	E18: 井田 智恵利(名古屋女子大学)ら、ELISAをベースとしたポリ(ADP-リボース)測定法の確立と培養細胞からのポリ(ADP-リボース)抽出法の検討	
		高校生のポスター発表				
		H1: 越智匠海, 佐藤直, 菅原麻由, 無葉緑植物ギンリョウソウと外生菌根菌の共生関係—外生菌根菌を介した地下部ネットワークの解明— H2: 西井瑞季, 東畑和真, 橋亮蔵, サリドマイドは植物の生長にどのような影響を及ぼすか H3: 田端慶貴, 平瀬詩織, 原田勇輝, 田中美穂, パナナの皮のキリン化現象について H4: 池田楓, 岡本侑里香, 水谷彩乃, 安田悠真, 山之内志穂, 乳がん細胞の上皮間葉転換(EMT)における線維芽細胞増殖因子(FGF1)及び形質転換増殖因子(TGF-β1)の役割				
		立命館慶祥高等学校	立命館慶祥高等学校	立命館慶祥高等学校	立命館慶祥高等学校	立命館慶祥高等学校
		京都府立桃山高等学校	京都府立桃山高等学校	京都府立桃山高等学校	京都府立桃山高等学校	京都府立桃山高等学校
		大阪府立天王寺高等学校	大阪府立天王寺高等学校	大阪府立天王寺高等学校	大阪府立天王寺高等学校	大阪府立天王寺高等学校

14:20～15:25	大阪府立園芸高等学校	H5: 桑野峻, 國藤侃志, 石田祐輔, 高橋鳳翔, 野生乳酸菌のプロバイオテックス性に関する研究 H8: 植田友也, 大田董月, 小田彩乃, 古川菜々美, 輪紋病発生に関与する環境要因の解析	H6: 松口果歩, 松口莉歩, フザリウム属のカビを利用した海藻からの還元糖の生成とアルコール生産の可能性 H9: 平重輝, 西島拓海, 伊藤黎弥, 吉岡友裕, 生田依子, タンパク質以外の不凍物質	H7: 橋本英和, 山地潤心, 「池田ミカシ」の系譜に関する研究 - 異掌からのDNA抽出とRAPD分析による系統分析の可能性 - H10: 野口輝, 井西司, 若狭航季, 浅井雄飛, 二種の溶液を混ぜた混合溶液での再結晶	H11: 辻侖衣, 柴田規迪, 杉村侑亮, 橋爪沙良, 武内翼穂子, イ木の有効活用～食べるだけじゃもったいない!
	奈良県立青翔高等学校				
	兵庫県立神戸高等学校	H12: 赤坂貴浩, 河合真央, 合田元英, 齊藤良典, 里井俊太, 地衣類から新抗生物質を見つける			
	17:00まで	ポスター撤去			
S2	15:40～16:20	シンポジウム: 森 和俊 (ラルカディア1階R101)			
S3	16:20～17:00	シンポジウム: 長田 重一 (ラルカディア1階R101)			
S4	17:00～17:40	シンポジウム: 喜多 正和 (ラルカディア1階R101)			
P	17:40～18:10	平成27年度日本生化学会近畿支部奨励賞の授賞式と受賞記念講演: 波多野 亮 (ラルカディア1階R101)			
	18:30～20:00	懇親会 (優秀発表賞の発表と表彰を含む)(ユニオンスクエア)			

座長については後日、ホームページでご連絡します。

シンポジウム

「生化学から先端生命科学へのゲートウェイ」

伊藤 誠二

森 和俊

長田 重一

喜多 正和

協賛

関西実験動物研究会

立命館大学 動物実験委員会

成熟した疼痛研究からの新しい展開

伊藤 誠二

関西医科大学・医化学講座

疼痛は病院を訪れる患者の最も多い主訴であり、成人の4～5人に1人は慢性的な痛みを抱えている。なかでも、神経損傷に伴う神経障害性疼痛は痛覚伝達の最初の中継地である脊髄後角での神経回路網の再構築や抑制性介在ニューロンの細胞死など器質的変化のため難治性と考えられてきた。1980年代に遺伝子クローニング技術が確立し、電位依存性Na⁺チャネル、グルタミン酸受容体、プロスタグランジン受容体など情報伝達に関係する遺伝子が相次いでクローニングされ、遺伝子ファミリーを形成することがわかった。我々は、さまざまな遺伝子欠損マウスに神経障害性疼痛モデルを作製し、どの遺伝子が慢性疼痛に関与するか解析を行った。一連の実験結果、グルタミン酸NMDA受容体NR2Bサブユニットの1472番目のチロシン残基のリン酸化とその下流にあるCa²⁺カスケードが重要であること、神経障害性疼痛は、脊髄後角の器質的変化ではなく機能的変化により生じていることを明らかにした。実際、何年も持続した神経障害性疼痛患者の痛みが神経再生で治療されたことは難治性疼痛が非可逆的な器質的変化で持続されているのではなく、可逆的な機能的変化で持続していることを支持するものである。現在、様々な生体因子の遺伝子改変マウスが作製され、疼痛行動に及ぼす報告がデータベース化されているが、神経障害性疼痛が難治性であるのは、その原因が除去されないことにあると考えられる。このように成熟しつつある痛みの研究は、感覚受容における神経伝達・神経可塑的变化を分子から動物行動の個体まで体系的に解析できるすぐれた実験系でもある。痛みの研究を通じて、遺伝子ファミリーの中のある遺伝子に埋め込まれた精巧な仕組みや機能が解明できたことを報告する。我々が確立した坐骨神経再生モデルを用いた末梢神経再生機構の解析と二光子励起顕微鏡を用いる脊髄後角のイメージングの新しい取組もあわせて紹介する。

小胞体ストレス応答によるタンパク質品質管理

森 和俊

京都大学 大学院理学研究科 生物科学専攻
生物物理学教室 ゲノム情報分野

新規に合成された分泌タンパク質や膜タンパク質の高次構造形成が行なわれる小胞体は、これらのタンパク質が正しい立体構造をとっているかどうか峻別する能力を有し、タンパク質の品質を管理するオルガネラとして知られている。正しく折り畳まれたタンパク質はゴルジ装置以降の分泌過程に進むことが許され、折り畳まれていないタンパク質は小胞体に留められる。小胞体内には高次構造形成を介助・促進する分子シャペロンやフォールディング酵素（小胞体シャペロン）が多種多様に存在し、通常、新生タンパク質は効率よく折り畳まれている。一方、折り畳みに失敗したタンパク質は細胞質に引き出され、ユビキチン・プロテアソーム系により分解される。この廃棄システムは小胞体関連分解機構 Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation (ERAD) と呼ばれている。このように、折り畳みと分解という2つの相反する仕組みによって小胞体におけるタンパク質品質管理は成立している。

しかしながら、いわゆる小胞体ストレスと総括されている状況下で、小胞体内に高次構造の異常なタンパク質が蓄積すると小胞体ストレス応答（英語では Unfolded Protein Response; UPR）が活性化される。UPRは、小胞体ストレスを感知し小胞体膜を貫いたシグナル伝達を行うことができる小胞体膜貫通型タンパク質によって媒介され、哺乳動物では、IRE1、PERK、ATF6 というユビキタスに発現している3つのタンパク質が重要な役割を果たしている。これら3つの経路の活性化により、新規合成タンパク質がそれ以上小胞体内に送り込まれないように翻訳を抑制する小胞体の負荷軽減、小胞体シャペロンの転写誘導による折り畳み容量の増強、ERAD 因子の転写誘導による分解システムの活性化の3つの対応がなされ、小胞体の恒常性は維持される。それでもなお小胞体ストレスが持続する場合は、細胞がアポトーシスを起こし排除される。多細胞生物では、小胞体ストレスによってある一定数以上の細胞が死滅し、組織としての機能を果たすことができなくなることが、糖尿病を初めとして様々な疾患の原因となる。

本講演では、最先端の研究成果を交えながら、小胞体ストレス応答の分子機構、進化、生理的意義ならびに疾患への関与についてお話ししたい。

細胞死と"eat me"シグナル

長田 重一

大阪大学 免疫学フロンティア研究センター (IFReC)

免疫・生化学部門

真核細胞の細胞膜を構成するリン脂質は外膜と内膜の間で非対称的に分布している。すなわち、フォスファチジルセリン(PtdSer) やフォスファチジリエタノールアミン(PtdEtn)は内膜に、フォスファチジルコリンやスフィンゴリエリンは主に外膜に存在する。この細胞膜の非対称性は生命現象の種々の局面で崩壊する。例えば、細胞がアポトーシス(細胞死)を起こすと PtdSer は細胞表面に暴露され、マクロファージに対する“eat me”シグナルとして作用する。一方、血小板が活性化されると PtdSer を暴露し、暴露された PtdSer が血液凝固因子を活性化、血液凝固反応を進行させる。細胞膜の非対称性の維持には PtdSer や PtdEtn を外膜から内膜に転移させる酵素フリッパーゼ、崩壊には内膜と外膜の間でリン脂質をスクランブルさせる酵素スクランブラーゼの存在が仮定されていたがその実体は長い間不明であった。私達は、8個の膜貫通領域を持つ TMEM16F が Ca^{2+} によって活性化されるスクランブラーゼ、6個の膜貫通領域を持つ Xkr8 がカスパーゼによって活性化されるスクランブラーゼとして同定した。そして、血友病の症状を示すヒト患者 (Scott Syndrome) が TMEM16F 遺伝子に変異をもつことから、TMEM16F は活性化された血小板で PtdSer を暴露させる分子と結論した。一方、私達は、P4-タイプ ATPase である ATP11C が細胞膜で作用するフリッパーゼであることを見いだした。この酵素は CDC50A と呼ばれるシャペロン様タンパク質により、細胞膜に運ばれ、ATP 依存的に PtdSer や PtdEtn を外膜から内膜へ転移させる。この分子の中央にはカスパーゼによって認識される配列が3カ所存在し、アポトーシス時に切断・失活した。すなわち、アポトーシス時の PtdSer の暴露にはスクランブラーゼ (Xkr8) の活性化とともに、フリッパーゼの失活を必要条件とした。一方、フリッパーゼを完全に失った細胞は生きながら PtdSer を構成的に暴露、マクロファージはその“生きた”細胞を貪食した。以上、細胞膜の非対称性を制御する酵素とアポトーシスにおけるこれら酵素の動態に関して紹介する。

- 【文献】
1. Segawa, K., Kurata, S., Yanagihashi, Y., Brummelkamp, T. R., Matsuda, F., and Nagata, S. (2014) *Science* **344**, 1164-1168
 2. Suzuki, J., Denning, D. P., Imanishi, E., Horvitz, H. R., and Nagata, S. (2013) *Science* **341**, 403-406
 3. Suzuki, J., Umeda, M., Sims, P. J., and Nagata, S. (2010) *Nature* **468**, 834-838
 4. Nagata, S., Hanayama, R., and Kawane, K. (2010) *Cell* **140**, 619-630

動物実験と生化学の深い関係：社会に貢献する動物実験

喜多 正和

京都府立医科大学 大学院医学研究科 実験動物センター

「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」（環境省）において、「動物を科学上の利用に供することは、生命科学の進展、医療技術等の開発等のために必要不可欠なものである。」と明記されており、「医療イノベーション5か年戦略」においても「革新的医薬品・医療機器の開発等において動物を用いた試験実施は、極めて重要であり、医療イノベーション推進のためには、研究内容を熟知する研究開発機関の自主的管理の下、これを動物愛護の観点と科学技術の進歩の観点の調和を図りながら、引き続き、適切に実施することが必要である。」とされている。このように、動物実験は、基礎から応用に至る学術研究の進展や創薬等のイノベーションの推進に必要不可欠であり、人類の健康やライフサイエンス研究の進展に多大な寄与をしていることは明らかである。

一方、1973年に制定された「動物の保護及び管理に関する法律」（動物愛護管理法）は、その後、環境省の所管のもとに見直され、最新の改正版が2013年9月1日から施行されている。今回の改正においては、大学等の動物実験施設の届出制又は登録制等の規制導入は見送られ、いままで通りの自主管理体制を継続することになった。しかしながら、動物実験に関する項目が環境省の動物愛護管理法の中にある限りは、5年毎の見直し対象項目になることは避けられず、今後とも研究機関等における自主管理（機関管理）体制の向上が必須であることは明白である。

このような状況を踏まえ、国動協及び公私動協の幹事会は、文部科学省の指導の下に、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」（平成18年文部科学省告示71号）第6第3項に定められた情報公開を更に推進するために、それぞれの協議会の会員校に対して、情報公開を積極的に実施するよう要請している。さらに、全国医学部長病院長会議に新設された動物実験検討委員会において、同様の内容が検討され、全国医学部長病院長会議 動物実験検討委員会委員長、国立大学法人動物実験施設協議会会長および公私立大学動物実験施設協議会会長の連名で平成25年12月12日付け「動物実験に関する情報公開の実施について」という文章が全国の医学部を有する会員大学へ通知されている。また、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」第6第2項において、基本指針への適合性に関する自己点検・評価を実施すること、及び当該研究機関以外の者による検証を実施することに努めることが明記されているにも関わらず、相互検証プログラムによる外部検証を受けている大学は必ずしも大多数ではなく、現状では残念ながら自主管理（機関管理）が着実に実施されているとは言い難い。なお、昨年1月に相互検証プログラムの問題点や課題を検討するため、相互検証プログラムに対する公開評価会を開催し、現在、関係者からの意見に基づき第2期プログラムを準備中である。

近年、「厚生労働省が所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」が平成27年2月20日に一部改正され、日本実験動物協会が平成27年に情報公開の指針を新たに作成するとともに実験動物福祉規程を改正するなど、厚生労働省および農林水産省管轄の研究所および企業などにおいても、情報公開や外部検証への取り組みが推進されている。また、日本生化学会の行動規範には、「動物実験においては、代替・削減・苦痛軽減の原則を遵守し、真摯な態度で行う。」と明記されており、動物実験における法令遵守が重要と考えられる。本講演では、これらの最新の情報を取り入れながら、動物愛護管理法の改正における今後の問題点ならびに動物実験をとりまく現状と社会の動向について解説したい。

一般講演

A1

植物細胞壁ペクチンの生合成に関与するガラクトース転移酵素の生化学的解析

○松本直樹, 上原洋平, 田村峻佑, 石水毅
立命館大・生命

【目的】植物細胞壁成分のペクチンは12種類の単糖から構成されている多糖であり、その構造は非常に複雑である。また、ペクチンの生合成には約50種類の糖転移酵素が関与していると考えられている。しかし、これらの酵素遺伝子はほとんど同定されていない。そこで、酵素遺伝子の同定のためには、酵素の活性測定法を構築する必要がある。ペクチン構成成分の一つであるラムノガラクトuronan Iは、主鎖にガラクトuron酸とラムノースの二糖繰り返し構造をもつ。この主鎖のラムノース残基にガラクトースを構成単位とするガラクトンが側鎖として結合している。ラムノース残基にガラクトースを転移させるガラクトース転移酵素(図1)は未だ同定されていない。本研究では、このガラクトース転移酵素の活性測定法を構築し、生化学的性質を解析した。

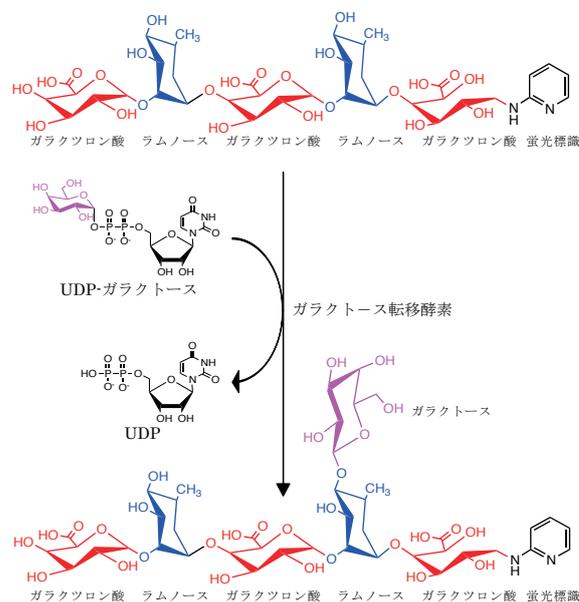


図1. ラムノガラクトuronan Iの生合成に関与するガラクトース転移酵素の活性測定

【方法】ドナー基質のUDP-ガラクトースは市販品を用いた。アクセプター基質の蛍光標識ラムノガラクトuronanオリゴ糖は、市販のラムノガラクトuronan IをTFAまたは加水分解酵素(ドリセラゼ、 β -ガラクトシダーゼ)により加水分解し、生成した各オリゴ糖を2-アミノピリジンにより蛍光標識した。蛍光標識ラムノガラクトuronanオリゴ糖の精製および酵素反応生成物と基質の分離には陰イオン交換HPLCを用いた。酵素源として植物(アズキ上胚軸、タバコBY-2細胞)の粗抽出物を用いた。生成物の構造解析にはESI-MSを用いた。

【結果・考察】植物粗抽出物を酵素源にして、ラムノガラクトuronanオリゴ糖とUDP-ガラクトースを反応させると、HPLC上で新たな生成物が観察された。この生成物は、ESI-MSにより解析すると、ラムノガラクトuronanオリゴ糖にガラクトースが転移した化合物であることがわかった。すなわち、この生成物を定量解析することで、ペクチン合成に関連するガラクトース転移酵素の活性を測定できる。本酵素によるガラクトース転移反応は、反応時間ならびに酵素量に依存して、定量的に進行した。いくつかの植物の器官について、酵素活性を調べたところ、活性の大きさに差があることがわかった。アズキ上胚軸由来の酵素において、本酵素の至適温度は 30°C 、至適pHは7.0であった。金属イオン依存性を調べたところ、コバルトイオン存在下で最も高い活性を示した。他に、基質特異性や界面活性剤依存性などについても報告する。

本研究で、植物細胞壁ペクチンの生合成に関与するガラクトース転移酵素の活性測定法をはじめ構築できた。この方法を利用して、本酵素の遺伝子同定に向けた研究が展開できる。

A2

シロイヌナズナ PHOT2 の LOV ドメインの光サイクルが生理反応へ及ぼす影響の解析

○佐藤真希, 谷口晴香, 新田拓也, 高橋文雄, 笠原賢洋

立命館大・院・生命

【目的】 青色光は植物の生育にとって重要な情報であり、光屈性、葉緑体光定位運動、気孔開口などの生理反応に関わっている。その青色光を認識する受容タンパク質としてフォトトロピン(PHOT)が存在する。フォトトロピンは、N末端側に青色光を受容する2つのLOVドメイン(LOV1、LOV2)を持ち、C末端側に Ser/Thr キナーゼドメインを持つ。また、2つのLOVドメインはそれぞれ発色団であるFMNを結合しており、FMNは青色光照射によってシステイン残基と一時的に共有結合(Cys-adduct)を形成する。これが形成されることによりLOVドメインが光活性化状態になり、Ser/Thrキナーゼ部位を活性化し自己リン酸化が起こり、前述の生理反応に至る。Cys-adductは自発的に解離し、暗所でLOVドメインは基底状態に戻るため、光活性化状態でなくなる。これをLOVドメインの光サイクルと呼ぶ¹⁾。Cys-adductの持続時間はPHOTの感度や生理反応に影響していると推測されている²⁾。本研究では、光活性化状態がより持続する変異LOVドメインを持つPHOTを発現するシロイヌナズナ組換え体(PHOT2V株)の葉緑体光定位運動を調べ、光活性化状態の持続が生理反応にどのように影響するかを検討した。

【方法】 シロイヌナズナ PHOT2 の LOV2 へ種々の変異を導入し、大腸菌で発現させ、精製タンパク質を用いて光サイクルを解析した。その後、アミノ酸を2ヶ所(V392IとV439R)置換したPHOT2を発現するシロイヌナズナ組換え体(PHOT2V株)を作製した。野生株の葉とPHOT2V株の葉に青色光を照射し、葉緑体光定位運動の逃避運動を観察・比較した。

【結果】 大腸菌で発現させたPHOT2LOV2タンパク質はいずれもCys-adductを形成し、光サイクルを示した。特に、V392IとV439Rのアミノ酸置換を導入すると、Cys-adduct解離速度が約20倍遅くなった。次に、これらのアミノ酸置換を持つPHOT2を発現するシロイヌナズナ組換え体(PHOT2V株)の葉緑体光定位運動を観察した。野生株はビーム照射部位から出るとすぐに逃避運動が止まるのに対して、PHOT2V株はビーム照射部位から出てもしばらく逃避し続けることがわかった。これを定量した結果、野生株は約10 μm逃避運動をしたが、PHOT2V株は約22 μmまで逃避運動をした。それに加え、PHOT2V株は青色光照射から暗状態に戻した直後の10分間(41-50分)以外の時間で移動速度が野生株より速くなることもわかった。40分後暗状態に戻した後も、野生株は約10-15分間で元の位置付近に戻ったのに対して、PHOT2V株では葉緑体の戻りは遅く、30分経っても元の位置には戻らなかった。

【考察】 PHOT2V株と野生株には葉緑体光定位運動の移動距離と速さに違いが出ることが分かった。このことにより、PHOT2V株はLOVドメインの光活性化状態の持続により野生株より光の感度がよくなったのではないかと考えられる。

【文献】

1. Chritie, J. M., et al. (2015) *Plant Cell Physiol.* 56, 401-413
2. Kasahara, M., et al. (2002) *Plant Physiol.* 129, 762-773

A3

黄金色藻が持つオーレオクロムの光受容能および DNA 結合能の解析

○位田康熙¹, 池田美恵², 笠原賢洋¹, 高橋文雄¹

¹立命館大・院・生命,²順天堂大学・医

【目的】植物にとって光は光合成のエネルギー源や、環境の変化に対応するための環境因子としての役割を持つ。受け取った光刺激をシグナルに変換するのが光受容体であり、緑色植物では青色光受容体としてフォトトロピンが良く知られている。近年、黄色植物（藻類）の一種である黄緑色藻フシナシミドロ(*Vaucheria*)から、フォトトロピンとは異なる青色光受容体としてオーレオクロムが発見された¹⁾。オーレオクロムは中央部に転写因子に見られる bZIP ドメインと C 末端側に青色光を受容する LOV ドメインをそれぞれ一つ持ち、珪藻や褐藻などからも発見された²⁾ことから黄色植物に特有の青色光受容体であることが示唆された。オーレオクロムに関する研究は主にフシナシミドロで行われており、他の藻類に関しては遺伝子の存在の確認に留まっている。そこで本研究では黄金色藻が持つオーレオクロムの機能、特に光受容能と DNA への結合活性を調べることを目的とした



図1 オーレオクロム全長

【方法】本研究では黄金色藻 (*Ochromonas danica*) 由来のオーレオクロム全長 (以下 OdAUREO) および LOV ドメインだけ (以下 OdAUREO-LOV) を用いて、大腸菌 (*Rosetta2* 株) によるタンパク質発現系の構築を行った。その後、分光解析やゲルシフトアッセイを行って青色光に対する光サイクルや DNA 結合能の光依存性を調べた。

【結果】発現させた OdAUREO および OdAUREO-LOV の吸収スペクトルを測定したところ、450nm に吸収極大を持ち、375nm に第二のピークを持つスペクトルが得られた。青色光の照射によって 450nm の吸収は減少し、LOV ドメインと FMN が Cys-adduct を形成したことが確認できた。また青色光照射後、暗所に置くことで吸収スペクトルは自発的に元に戻ったことから、発現させた OdAUREO および OdAUREO-LOV の光サイクルも確認できた。Cys-adduct の半減期はそれぞれ 33.8 分、25.0 分であった。

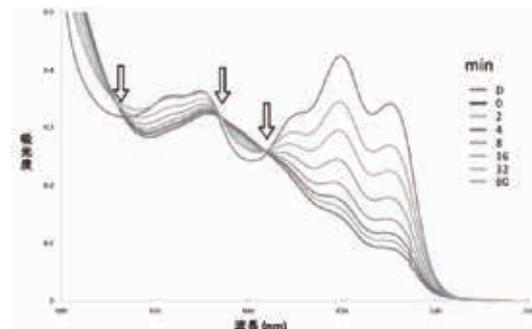


図2 OdAUREO の吸収スペクトル
矢印は不動点を表す

フシナシミドロのオーレオクロムの DNA 結合配列 (TGACGT) を用いてゲルシフトアッセイを行ったところ OdAUREO のみが、DNA と結合した。また OdAUREO と DNA の結合は、青色光によって活性化され、塩基を置換することで結合能は低下した。

【考察】以上の結果から、黄金色藻のオーレオクロムもフシナシミドロ同様に、青色光で活性化される転写因子としての働きを持つことが考えられる。黄金色藻の青色光反応としては、細胞の形態変化が報告されており、オーレオクロムがこれらの光形態形成を制御している可能性が示唆された。

- 【文献】
1. Takahashi, F., Yamagata, D., Ishikawa, M., Fukamatsu, Y., Ogura, Y., Kasahara, M., Kiyosue, T., Kikuyama, M., Wada, M., Kataoka, H. (2007) *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104, 19625-19630.
 2. Ishikawa, M., Takahashi, F., Nozaki, H., Nagasato, C., Motomura, T., Kataoka, H. (2009) *Planta*. 230, 543-552.

A4

ヨーグルト酒からの GABA 高生産菌の分離と GABA 生産条件の検討

○田原愛華, 大森勇門, 大島敏久

大阪工業大院・工・生体医工

【目的】乳酸菌は動植物と共生して自然界に広く存在し、古来より人間の生活に深く関わりあってきた。多様な発酵食品の製造に関係しており、それらに様々な風味や栄養価を与えている。また、乳酸菌は種々の生理活性物質を生産することが知られているが、その一つに γ -アミノ酪酸 (GABA) がある。GABA は抑制性の神経伝達物質として機能しており、また経口摂取により、血圧降下作用やストレス低減作用を示すことが報告されている¹⁾。これらの機能を食品に付加させることを目的とした GABA 含有食品の開発が進められており、その展開が注目されている。本研究では日本酒とヨーグルトをブレンドしたヨーグルト酒を中心に酒類の GABA 濃度を分析し、GABA 高生産能を有する乳酸菌の分離と酒類の GABA 生産機構の解明を主目的とした。

【方法】ヨーグルト酒といくつかの酒類について、超高速液体クロマトグラフィー (UPLC) による GABA の定量分析を行った。また、加熱処理されていないヨーグルト酒からは、乳酸菌を培養・分離し、分離菌の 16S rDNA 塩基配列解析による同定を行った。その分離菌の GYP 液体培地における GABA 生産能の経時的变化を分析した。次に、GABA 生産能が高い菌株を用いてヨーグルトを作製後、市販の日本酒と混合してヨーグルト酒を作製して GABA の生成量の経時的变化を分析した。

【結果】まず、市販の 25 種類の異なる日本酒、焼酎、ヨーグルト酒の GABA 分析を行った。その結果、ヨーグルト酒が高濃度の GABA を含むことが明らかになった。しかし製品によっては、GABA を含まないものもあった。これらの GABA が乳酸菌により生産されるものと考え、次に GABA 含有量が高いヨーグルト酒から GABA 高生産と低生産乳酸菌を分離した。両分離菌は 16S rDNA 塩基配列解析から、*Streptococcus thermophilus* と同定できた。次に、その分離した 2 つの乳酸菌の GABA 生産能を GYP 培地と自作ヨーグルト酒を用いて分析した。その結果、培地へ L-Glu を添加した場合、GABA 高生産菌では、その添加濃度に比例して GABA 生産が認められ、その後の GABA 濃度の減少は殆どないことが分かった。一方、低生産菌では、そのような生産性の増大は見られなかった。

【考察】九州産の焼酎をベースとしたヨーグルト酒では GABA 濃度は極めて低かった。これは焼酎が蒸留酒であり遊離アミノ酸を含有していないことが原因であると考えられる。また、日本酒とそれをベースとしたヨーグルト酒の分析から、ヨーグルト酒の製造過程で GABA 濃度が増加し、それに伴い L-Glu 濃度が減少すること、さらにヨーグルト酒から分離した GABA 高生産と低生産の 2 種の乳酸菌による GABA 生産性の分析から、ベースとなる酒類中の L-Glu がヨーグルト中の乳酸菌 (グルタミン酸脱炭酸酵素) の作用により、GABA に変換されることが明かになった。このことから、GABA 高含有ヨーグルト酒を製造する基本的戦略が示唆された。

【文献】 1. Stanton, H. C.: *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*, 143, 195–204 (1963).

Staphylococcus aureus の好中球に対する抵抗性の変化○川井真好¹, 通山由美²¹姫路獨協大・薬・衛生・微生物, ²姫路獨協大・薬・生化

【目的】 *Staphylococcus aureus* は常在菌であるが, しばしば日和見感染を引き起こす. しかしながら, *S. aureus* が易感染化するメカニズムは詳細にはわかっていない. *S. aureus* は, 抗酸化活性を有するカロテノイド色素, スタフィロキサンチンを産生することにより, 酸化ストレスを和らげていることが報告されている¹⁾. そこで, 我々は活性酸素種の産生を通して生体防御能を発揮する好中球に注目し, 好中球の生体防御機構, 食作用や Neutrophil extracellular traps (NETs) に対して *S. aureus* が抵抗性を示すかどうか検討したので報告する.

【方法】 好中球モデルとして, ヒト白血病細胞株 HL60 細胞を all-trans retinoic acid (ATRA) 処理により好中球様に分化して用いた. 菌株は, *S. aureus* ATCC12600 を用いた. 好中球に対する *S. aureus* の抵抗性は, Soybean-Casein-Digest (SCD) 寒天培地を用いた生菌数測定により生残率を求めた.

【結果】 *S. aureus* ATCC12600 を温度を変えて培養することにより, 産生する黄色色素量が変化した. すなわち, 色素産生量は温度依存であることが明らかとなった. そこで, 30~43°C で培養し, 色素産生量の異なる *S. aureus* について好中球に対する抵抗性を検討したところ, 黄色の色素産生量の多い高温培養株が好中球への抵抗性を有していることがわかった. 次に, 好中球による食作用と NETs 形成のどちらに対して, 抵抗性を示しているのかを区別するため, 人工的な NETs 形成誘導試薬, PMA で好中球を刺激後, *S. aureus* を加えて生残率を解析した. 黄色色素産生量の多い高温培養株は, 色素産生量の低い低温培養株より残存性が高かった.

【考察】 *S. aureus* の産生する黄色色素は, 好中球による生体防御作用の一つである NETs 形成に対する抵抗性に寄与していることが示唆された. 今後, 色素成分を同定し, 分子メカニズムについて解析する.

【文献】 1. Cluditz, A., Resch, A., Wieland, K., Peschel, A., Gotz, F. (2006) *Infect. Immun.* 74, 4950–4953

A6

イネ苗立枯細菌病菌 *Burkholderia plantarii* における三成分制御系 TroK, TroR1, TroR2 によるトロポロン合成制御システム

○三輪 瞬平¹、吉岡 誠訓¹、紀平 絵梨¹、仲宗根 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、二成分情報伝達(TCS)に関与する、ヒスチジンキナーゼ(*TroK*)、レスポンスレギュレーター (*TroR1*, *TroR2*)を明らかにしてきた。本研究において、通常の TCS と異なり (*TroK*, *TroR1*, *TroR2*)の三成分からなるトロポロン合成制御システムの解明を目的にした。

【方法】

TroK の自己リン酸化活性、リン酸化 *TroK* から *TroR1*, *TroR2* へのリン酸転移を確認するために、それぞれの遺伝子を発現ベクターpET21aにクローニング後、大腸菌 Rosetta-gami において、発現後、histag アフィニティーカラム Ni-NTA を用いて精製した。精製後、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP を用いた自己リン酸化及び、リン酸基転移実験を行った。培地中に分泌生産されるトロポロンを評価するために、培養ろ液の吸光波長 320nm を ND-1000 Nano-Drop を用いて測定した。*TroK* の自己リン酸化部位の His ならびに *TroR1*, *TroR2* のリン酸基転移部位の Asp を、相同解析により推定した H253, D52, D46 をアラニン置換した変異株を用いて、トロポロン生産やリン酸化実験、リン酸基転移実験を行った。最後に、これらの変異株から、RNA を採取し、次世代シーケンサー（イルミナ社）を用いて、RNAseq 解析を行った。

【結果と考察】

精製された *TroK*、*TroR1*、*TroR2* ならびに *TroKH253A*、*TroR1D52A*、*TroR2D46A* 変異体を用いた自己リン酸化、リン酸基転移実験の結果、*TroK* のヒスチジンキナーゼ活性、*TroKH253-P* から *TroR1D52*、*TroR2 D46* へのリン酸基転移の活性が確認され、3成分制御系であることが確認された。*TroK/TroR1/TroR2* 欠損株における相補実験の結果 *TroK/TroR1/TroR2* すべての遺伝子が相補された場合のみトロポロン産生が回復し、*TroK/TroR1/TroR2*、三種類の遺伝子がトロポロン産生に必要であることが示された。*TroK* のリン酸化部位である H253、*TroR1*、*TroR2* のリン酸化部位である D52、D46 をアラニンに変異したプラスミドを用い、相補実験を行った。*TroKH253-A*、*TroR1D52-A*、*TroR2D46-A* 変異プラスミドは、各変異株のトロポロン産生を回復させることはできなかった。最後に、RNAseq 解析実験の結果、*TroK-TroR1*、*TroK-TroR2* 制御下のトロポロン合成に関与する遺伝子群が存在することが明らかになった。これらの結果から *B. plantarii* において、トロポロン合成には、*TroK*, *TroR1*, *TroR2* の3遺伝子が必須で、*TroKH253*→*TroR1D52*、*TroKH253*→*TroR2D46* への三成分が関与する His-Asp リン酸化リレーによるトロポロン合成制御システムの存在が明らかにされた。

A7

シアノバクテリア生物時計再構成系における KaiC の二状態変化と ATPase 活性

○大山克明, 中村香織, 浅井智広, 寺内一姫
立命館大・生命科学

【目的】シアノバクテリアは生物時計を内在する最も単純な生物である。その生物時計は3つの時計タンパク質 KaiA, KaiB, KaiC によって構成される。時計の中心である KaiC は、ATP 依存的に六量体を形成し¹⁾²⁾, 自己リン酸化能と自己脱リン酸化能を示す。KaiA は KaiC の自己リン酸化活性を促進し、一方、KaiB は KaiA の反応を阻害する。精製した3つの Kai タンパク質と ATP を混合することによる *in vitro* での生物時計の再構成系により³⁾, KaiC の ATPase 活性も 24 時間周期で変動することが明らかになった⁴⁾。さらに、KaiC のリン酸化状態による六量体構造の揺らぎの変化も示唆されている⁵⁾。Kai タンパク質による概日振動生成には KaiC の構造と状態の変化が重要であると考えられているが、その詳細な分子機構についての知見は乏しい。本研究では KaiC の構造状態に着目しリン酸化状態変異型 KaiC を解析することでその相関解明を目指した。

【方法】シアノバクテリア *Synechococcus elongatus* PCC7942 由来の KaiA, KaiB, KaiC を大腸菌において大量発現させ、精製した。KaiC の2つのリン酸化部位 (S431, T432) をアスパラギン酸, グルタミン酸, アラニンに置換した8種類の変異型 KaiC (KaiC-AA, KaiC-AT, KaiC-AE, KaiC-SE, KaiC-DE, KaiC-DT, KaiC-DA, KaiC-SA) を作製し、精製した。生物時計再構成条件下において各タンパク質を反応させ Blue Native PAGE (BN-PAGE) で KaiC の動態を解析し、HPLC で ATPase 活性を評価した。

【結果】KaiC には BN-PAGE で分離可能な2種類の構造変化が確認され、それぞれの見かけの分子量から単量体と六量体と推察された。一方、ゲル濾過クロマトグラフィーでは、KaiC は常に六量体の位置に溶出された。私たちは BN-PAGE の際に添加する CBB が六量体から単量体への解離を促すことでゲル濾過クロマトグラフィーとの挙動の違いが生じるのではないかと考え、Native PAGE で CBB の影響を解析した。その結果、CBB 非存在下では六量体を示し、CBB 存在下でのみ六量体と単量体に分離されることが確認された。次に、CBB 存在下で8種の変異型 KaiC を Native PAGE に供したところ、高リン酸化状態を模倣した KaiC-DE と KaiC-DT でのみ六量体から単量体に解離した。さらに、8種の変異型 KaiC の ATPase 活性を測定したところ、野生型と比べて高リン酸化模倣型 KaiC の活性は低く、低リン酸化模倣型では高いことが明らかとなった。

【考察】リン酸化状態が高くなると六量体構造は緩くなり ATPase 活性が低くなることから、KaiC のリン酸化状態と構造変化、ATPase 活性は密接に関係していると考えられる。これらの結果に基づき Kai タンパク質による概日振動生成機構を考察する。

- 【文献】
1. Mori, *et al.* (2002) *PNAS* **99**, 17203-17208
 2. Pattanayek, *et al.* (2004) *Mol Cell* **15**, 375-388
 3. Nakajima, *et al.* (2005) *Science* **308**, 414-415
 4. Terauchi, *et al.* (2007) *PNAS* **104**, 16377-16381
 5. Murayama, *et al.* (2011) *EMBO J* **30**, 68-78

A8

バクテリア由来アーキア型ヌクレアーゼ・ヘリカーゼ様酵素の機能解析

○藤井裕己¹、井上真男²、福井健二³、金光²、倉光成紀^{1,2}、上田昌宏^{1,2}、増井良治⁴

¹ 阪大・院生命機能、² 阪大・院理、³ 大医大、⁴ 大阪市大・院理

【目的】 DNA 二重鎖切断 (DSB) は重篤な傷害の一つである。DNA 修復系の一つである相同組換え修復系は DSB を解消する修復経路であり、そのメカニズムはこれまで真核生物やバクテリアを中心に研究されてきた。さらに近年ではアーキアにおける相同組換え修復系についても研究が進められてきており、新奇のヌクレアーゼ NurA とヘリカーゼ HerA が、DSB 部位に 3' 突出末端を形成することが示唆されている。しかし両酵素の遺伝子 *nurA*, *herA* の欠損が致死性を示すことから、その細胞機能の詳細については明らかになっていない。また NurA, HerA はアーキアに広く保存されている酵素として知られているが、そのアミノ酸配列を詳細に解析したところ、一部のバクテリアにも保存されていることがわかった。本研究では NurA, HerA を備えたバクテリアを用いることで両酵素の細胞機能を解明することを目的としている。

【方法】 NurA, HerA を備えているバクテリアとして、好熱性真正細菌 *Thermus thermophilus* HB8 (TtHB8) を用いた。TtHB8 の *nurA*, *herA* について遺伝子破壊株を作製し、増殖速度の比較や、コロニーカウントによる通常培養条件下での生存率、紫外線感受性、自然突然変異率、形質転換効率の測定を行った。また、大腸菌を用いて TtHB8 由来 NurA, HerA (TtNurA, TtHerA) を大量発現・精製し、各酵素の分子機能を解析した。

【結果】 各遺伝子破壊株において、紫外線照射に対する顕著な耐性の獲得がみられた。この表現型は、一般的な DNA 修復酵素の遺伝子破壊株で観察される表現型とは逆である。通常培養条件下での生存率や増殖速度、自然突然変異率、形質転換効率に大きな変化は見られなかった。またアーキア由来 NurA (ArNurA) は一本鎖 DNA に対するエキソヌクレアーゼ活性とエンドヌクレアーゼ活性、二本鎖 DNA に対するエキソヌクレアーゼ活性を持つものに対して、TtNurA はさらに二本鎖 DNA に対するニッキング活性を示した。一方、TtHerA は一本鎖 DNA 特異的な結合能と ATPase 活性を示したが、アーキア由来 HerA (ArHerA) の様なヘリカーゼ活性は示さなかった。また ArNurA, ArHerA と同様、TtNurA, TtHerA は強い物理的相互作用を示した。

【考察】 ArNurA, ArHerA は、その活性から相同組換え修復系への関与が示唆されているが、TtNurA, TtHerA は、その遺伝子破壊株が紫外線照射に対する顕著な耐性を示すことから、ヌクレオチド除去修復系、あるいはヌクレオチド除去修復系から相同組換え修復系へのバイパス経路に関与し、さらに DNA に傷害を加えない条件下では、野生株遺伝子破壊株の間で増殖速度や生存率に差が見られないことから、DNA 傷害の修復ではなく、修復を抑制・制御する anti-recombination 様の系の一つとして関与しているのではないかと考えられる。今後は NurA, HerA の各分子機能が細胞内でどのように関与しているかを解析するため、分子機能欠損変異体を作製し、表現型への影響を観察することを予定している。

A9

イオン液体耐性プロテアーゼの特性とイオン液体耐性細菌のゲノム解読

○山口大志¹, 倉田淳志², 岸本憲明²

¹近畿大・院農・応用生命化学専攻, ²近畿大・農・応用生命化学科

【目的】イオン液体はアニオンとカチオンから構成され、常温常圧で液体の塩である。不揮発性や難燃性を示すため安全性が高い。アニオンとカチオンの組み合わせを変化させることで、親水性や疎水性を示すイオン液体を調製可能である。親水性イオン液体は、セルロースやケラチンなどの難水溶性バイオマスを溶解できるため、バイオマス利用技術に応用されつつある。イオン液体は溶媒として有用性が高いが、高濃度の親水性イオン液体中では酵素が変性して失活する。親水性イオン液体や疎水性イオン液体存在下では、*Escherichia coli* や *Bacillus subtilis* の生育は阻害された。そのため高濃度の親水性イオン液体中で利用できる酵素や微生物の開発が期待されている。

本研究では、親水性及び疎水性イオン液体存在下で生育する細菌を探索して、イオン液体耐性細菌の生産する酵素の諸性質の検討を目的とした。

【方法】親水性イオン液体 1-Butyl-3-methylimidazolium chloride ([BMIM][Cl])を用いて、81種類の海水や土壌、塩分を含む食品サンプルを単離源として、10% [BMIM][Cl]存在下で生育する微生物を探索した。得られた微生物が生産する酵素を用いて、イオン液体耐性を検討した。さらに得られた微生物のドラフトゲノムを解読して、イオン液体耐性酵素のクローニングを試みた。

【結果】親水性イオン液体[BMIM][Cl]存在下で生育する微生物を探索したところ、京都味噌から *Bacillus amyloliquefaciens* CMW1 を見いだした。CMW1 株は、10% [BMIM][Cl]存在下で良好に生育し、培養液上清中においてプロテアーゼ活性を検出できた。硫酸アンモニウム沈殿と各種カラムクロマトグラフィーを用いて、培養液上清から本酵素を電気泳動的に均一になるまで精製した。

精製酵素を用いて、諸性質の検討を行った。PMSF によって酵素は失活したことから、本酵素はセリンプロテアーゼに分類された。本酵素反応の最適 pH は 8.0~9.0 であった。最適反応温度は 55°C であり、CaCl₂ の添加により 65°C となった。本酵素は、pH 4.0~12.5 で安定であった。10% [BMIM][Cl] 存在下では本酵素反応は 45% の活性を示した。[BMIM][Cl] と NaCl を用いて酵素安定性を検討したところ、80% [BMIM][Cl]存在下、23%NaCl 存在下で安定であった。有機溶媒耐性を検討したところ、50% (v/v) 各種有機溶媒中で活性を示した。さらに本菌株のゲノム配列の解読を試みたところ、スキヤフォールド 19 本を得られ、ゲノムサイズは 3.9 Mbp であった。本酵素の N 末端アミノ酸配列を用いてゲノム配列を検索したところ、本酵素遺伝子 (1149 bp) を見いだした。

【考察】イオン液体耐性プロテアーゼは、アルカリ耐性、耐塩性、有機溶媒耐性を示した。イオン液体の構造には、電荷を帯びた極性部分、疎水性を示す部分を見いだすことができる。そのため、イオン液体に耐性を示す本酵素は、アルカリ耐性や耐塩性、有機溶媒にも耐性を示したと考えられた。

【文献】 1. Kurata, A., Hirose, Y., Misawa, N., Hurunaka, K., & Kishimoto, N. (2014) Genome announcements, 2(5), e01051-14.

A10

植物細胞壁ペクチンの生合成に関与するガラクトース転移酵素の生化学的解析

D-アミノ酸高生産乳酸菌のドラフトゲノム解析

○加藤志郎¹, 高橋俊成², 老川典夫^{1,3}

¹ 関大・先端機構, ² 菊正宗酒造, ³ 関大・化学生命工

【目的】われわれはこれまでに、日本酒をはじめとする発酵食品の製造工程と D-アミノ酸含量の相関解析を行い、発酵工程に存在する乳酸菌が製品中の D-アミノ酸含量増加に大きく寄与することを報告してきた。また、乳酸菌における D-アミノ酸生産の解析を行う中で、菌株間において D-アミノ酸生産量に有意な差異があることを見出し、他菌株と比較して D-アミノ酸生産能の高い株の単離に成功した。本研究では乳酸菌による D-アミノ酸高生産機構のゲノム解析を通じた解明を目標として、次世代シーケンサーを用いて D-アミノ酸高生産乳酸菌の全ゲノム配列の解読を進めている。

【方法】本研究で対象とする乳酸菌は、乳酸桿菌 *Lactobacillus sakei* および乳酸球菌 *Leuconostoc mesenteroides* の 2 菌種であり、それぞれ酒造会社の酒蔵より単離した乳酸菌群から選抜した D-アミノ酸高生産株 (*L. sakei* LK-145 株および *L. mesenteroides* LK-151 株) を以降の解析に供した。これらの乳酸菌を MRS 液体培地で培養し、得られた菌体から抽出・精製したゲノム DNA を次世代シーケンサーでの解析に供した。次世代シーケンサーは Roche 社製の GS junior 454 を使い、遺伝子のアノテーションには遺伝研の MiGAP を利用した。

【結果】*L. sakei* LK-145 株および *L. mesenteroides* LK-151 株のドラフトゲノム配列を構築した結果、推定ゲノムサイズはそれぞれ 1.95 Mbp および 2.07 Mbp であり、GC 含量は 40% および 37.5%、推定遺伝子数は 1949 および 2070 であった。両株はまた、それぞれ少なくとも 3 つずつの異なるプラスミドを保持することも明らかとなった。*L. sakei* LK-145 株ゲノム上には推定のアラニンラセマーゼ、アスパラギン酸ラセマーゼおよびグルタミン酸ラセマーゼ遺伝子が、*L. mesenteroides* LK-151 株ゲノム上にはアラニンラセマーゼ、リシンラセマーゼ、ヒスチジンラセマーゼおよびグルタミン酸ラセマーゼ遺伝子がそれぞれ保存されており、これらの遺伝子差物がそれぞれの乳酸菌の D-アミノ酸産生を担うものと考えられた。

【考察】*L. sakei* LK-145 株および *L. mesenteroides* LK-151 株の推定ゲノムサイズ、GC 含量および遺伝子数はそれぞれゲノム解読が為された既報の株と比較して同程度の数値であることから、本研究で構築したドラフト配列はゲノムのほぼ全域をカバーしているものと考えられた。上記のラセマーゼ遺伝子および対応する L-アミノ酸代謝関連遺伝子の保存性は既報の株と一致しており、当該乳酸菌における D-アミノ酸の高生産は既知の D-および L-アミノ酸代謝関連酵素遺伝子の有無ではなく、これらの遺伝子の転写に関わる遺伝子配列の相違やその他の既知および未知遺伝子の有無による D-アミノ酸代謝フラックス等に起因するのではないかと考えられる。

【謝辞】本研究は「文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業（平成 25 年～平成 29 年）」により実施している研究である。

A11

好熱菌 *Meiothermus ruber* H328 株が産生するケラチン分解性プロテアーゼに関する研究

○西海斗¹、俣野明日香¹、清水歩¹、増村威宏¹、川崎一則²、茂里康²、渡部邦彦¹

¹京都府大院生命環境・応用生命、²産総研・健康工学

[目的] 好熱性細菌 *Meiothermus ruber* H328 株は、ケラチン分解性プロテアーゼを分泌しトリ羽毛を強力に分解する。このケラチン分解性プロテアーゼは巨大分子複合体を形成し¹⁾、プロテオームとゲノムデータを用いた構成タンパク質の同定解析から、機能未知タンパク質 Protein A (MrH_0843)と、その 4 bp 下流に位置するセリンプロテアーゼ Protein B (MrH_0844)の存在が明らかとなっている²⁾。一方で、H328 株は細胞外に膜小胞を産生しており、これら 2 つのタンパク質が膜小胞上にも存在することが確認されている³⁾。本研究では、Protein A と Protein B のオペロン形成の有無、そしてそれらの遺伝子破壊株を用いて、ケラチン分解機構と巨大分子複合体および膜小胞の関係性の解明を目的に行った。

[方法] Protein A、B のオペロン形成の有無は、対数増殖期中期の H328 株細胞から RNA を抽出し、逆転写酵素による cDNA 合成後、これを鋳型に PCR を行い解析した。1 ステップの相同組換えによる *protein A* および *B* 遺伝子の破壊は、両遺伝子上流および下流領域各 1 kb、そしてカナマイシン (Km)耐性遺伝子を含む 2 つのプラスミドを構築して実施した。また、野生株および得られた二つの破壊株の調製サンプルに対して、活性の調査、そして Western blotting 解析により 2 つのタンパク質の存在の確認を行った。

[結果・考察]RT-PCR の結果、Protein A、B の 2 つの遺伝子をカバーする約 4 kbp の位置にバンド増幅が見られ、2 つの遺伝子がオペロンを形成することが判り、さらにその上流に位置する遺伝子はオペロン形成しないことが確認された。次に、組換え実験により得られたコロニーを用いた PCR 解析により *protein A* および *protein B* 遺伝子の破壊が確認された。野生株、 Δ *protein A* 株、および Δ *protein B* 株の培養上清を用いてケラチン分解活性の比較を行ったところ、両遺伝子破壊株は野生株に比べて~30%まで活性が低下した。これらの結果からこれら 2 つの遺伝子がケラチン分解に大きく関与することが示された。次にこれら 3 つの株の培養上清に対して、抗 Protein A or B 抗体を用いて Western blotting 解析を行った。その結果、野生株については Protein A および B のバンドが検出されたが、両遺伝子破壊株については、Protein A、B ともにバンドは検出されなかった。この結果からこれら 2 つの遺伝子が Protein A と B の発現に必要であることが示唆された。次に 3 つの株の培養液から、無細胞抽出液および細胞残渣サンプルを調製し、Western blotting 解析を行った。その結果、野生株では両サンプルについてバンドが検出されたが、両遺伝子破壊株ではバンドが検出されなかった。このことから野生株において Protein A および B は、培養上清だけでなく、ペリプラズム、そして細胞表層あるいは膜に埋め込まれた形で存在していることが示唆された。

[文献] 1) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98:2973–2980 (2014); 2) *Genome Announc.* 1: e00176–13 (2013); 3) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 78:1623-1625 (2014)

A12

クラスリン集合タンパク質 CALM 欠損が及ぼすメラニン産生への影響

○大野絹代*¹, 増田成美*¹, 小河穂波¹, 住吉麻実¹,
早川夏姫¹, 稲垣綾華¹, 大塚瑞希¹, 中尾知美¹,

鈴木麻衣¹, 田中宏和², 森田詠子³, 酒井良明³, 渡邊利雄¹

¹奈良女子大・院人間文化, ²近畿大・医学部, ³(株)プロテックス・ジャパン

【目的】我々はクラスリン集合タンパク質 CALM の欠損マウスを作製し、(1) CALM の欠損はトランスフェリンの取り込みを低下させ、マウスに貧血を引き起こすこと、(2) CALM はアルツハイマー症で見られるアミロイド斑の成分であるアミロイドベーターの産生に必要なこと、(3) CALM 欠損マウスは B6 の純系背景では誕生直後に死亡することを見出してきている^{1,2)}。CALM 欠損胚では胚の目の色が薄いことから、小胞輸送時の被覆のクラスリンを集合させる CALM のメラニン産生への関与が推定された。「CALM の欠損によるメラニン産生への影響」の有無の解明が本研究の目的である。

【方法】CALM 欠損マウスの 18.5 日胚と、誕生後すぐのマウス(P0)を集め、目の色を検討した。CALM 欠損マウスは誕生後すぐに死亡するため、個体から単離した細胞 (メラノサイト) レベルでの解析の代わりに、メラニンを産生している B16C2M メラノーマ細胞に shRNA を発現させ、CALM タンパク質の発現を低下させた株を取得し、細胞の色、メラニン産生量を、それぞれ目視、吸光度の測定にて解析した。

【結果】CALM 欠損マウスの 18.5 日胚と、誕生後すぐのマウス(P0)を集め、目の色を検討したところ、いずれの場合でも CALM 欠損体では目の色が薄かった。東北大学加齢医学研究所の医用細胞資源センターから譲渡された B16C2M メラノーマ細胞に CALM 特異的な HuSH™ shRNA Plasmid Panels (29-mer) for Picalm-Mouse (ORIGENE)を導入した。コントロールとしてスクランブル配列のものを導入した。ウェスタン法で CALM タンパク質の発現量が検出限界以下のものを選んだ。コントロール細胞は黒い沈殿となるが、CALM 発現低下 B16C2M 細胞は白っぽい沈殿となった。吸光度によるメラニン量の測定から、CALM 発現低下 B16C2M 細胞でのメラニン合成量の低下が見られた。

【考察】以上の結果は、CALM 欠損マウスの目の色素細胞でのメラニン産生の低下が起こっている可能性を示している。加えて、B16C2M メラノーマ細胞でのメラニン産生に CALM が必要な可能性を示している。今後、CALM 欠損マウスでのメラニン量の低下、B16C2M メラノーマ細胞での CALM 発現量低下効果の特異性の実態の解明を行っていく。加えて、他の輸送関連因子の欠損によるメラニン産生の低下には、メラニン合成酵素 (Tymp1 など) の存在量の低下の関与が報告されているので、CALM 欠損の場合にも同様のことが見られるのかを検討する。

- 【文献】 1. Suzuki M, Tanaka H, Tanimura A, Tanabe K, Oe N, Rai S, Kon S, Fukumoto M, Takei K, Abe T, Matsumura I, Kanakura Y, and Watanabe T. (2012) The mouse clathrin assembly protein PICALM is required for erythroid maturation and transferrin internalization. *PLoS ONE* 7(2): e31854.
2. Kanatsu K, Morohashi Y, Suzuki M, Watanabe T, Tomita T, and Iwatsubo T. (2014) Decreased CALM expression reduces Aβ42 to total Aβ ratio through clathrin-mediated endocytosis of γ-secretase. *Nature Communications*, DOI: 10.1038/ncomms4386.

A13

胃腺上皮の構築と発達におけるエズリンノックダウンの影響

○吉田沙織¹, 波多野亮¹, 向所賢一², 杉原洋行², 浅野真司¹

¹立命館大・薬・分子生理学, ²滋賀医大・医・分子診断病理学

【目的】胃は食物の一次消化と強酸性条件下での殺菌を行う器官であり、生体防御の最前線に位置する。胃粘膜は調節的に胃酸と消化酵素を分泌すると共に、強酸から組織を防御するバリア機能をもつ。アクチン結合タンパク質であるエズリンは、主に消化管の刷子縁膜に集積し、細胞膜上のタンパク質と細胞骨格とをクロスリンクして、微絨毛の形成や膜融合など細胞の構造変化に関わる。胃体部においてエズリンは胃酸分泌を行う壁細胞に発現し、胃酸分泌プロトンポンプを含む細胞内の細管小胞と分泌膜との融合に関わる。そのため、遺伝的にエズリンの発現を阻害したノックダウンマウスでは、この膜融合が行えず胃酸分泌障害を起こすことが報告されている¹⁾。一方、胃粘膜において壁細胞は細胞分化に関わる因子を分泌して組織構築に関わることも報告されている²⁾。本研究ではエズリンの壁細胞における働きに加え、胃粘膜の構築と発達における機能について検討を行った。

【方法】ノックダウンマウスは、エズリン遺伝子のイントロン部分に変異カセットを導入することで作製し¹⁾、胃におけるエズリンの発現は野生型と比較して5%以下に低下した。胃粘膜の構造や胃腺を構成する細胞を確認するために、組織化学染色や免疫抗体染色を行った。Real-time PCRを用いて細胞マーカーのmRNA発現量の比較を行った。ラジオイムノアッセイ法を用いて血清ガストリン値を測定した。また、壁細胞内の微細構造を観察するために、電子顕微鏡像について検討した。

【結果】ノックダウンマウスでは顕著な成長遅延が見られるにも関わらず、胃の肥大化が観察された。また、血清中のガストリン値の上昇と対応した胃腺上部の腺窩上皮の過形成（細胞増殖）が観察された。さらに、幹細胞が存在する頸部においてKi67で染色される増殖細胞の増加が観察され、胃腺内の細胞数が有意に増加していた。また、胃腺を構成する細胞の割合を野生型と比較したところ、壁細胞や主細胞（ペプシノゲン分泌細胞）の減少と副細胞（粘液分泌細胞）の増加が見られた。壁細胞内の微細構造の観察では、ミトコンドリアや細管小胞の減少とあわせて、壁細胞内に空胞や多重膜に囲まれた小胞が観察された。

【考察】ノックダウンマウスでは胃酸分泌障害に伴い、血清中のガストリン値が上昇し、腺窩上皮の過形成が起こっていると考えられた。このことは、プロトンポンプ阻害剤の長期投与による胃酸分泌阻害を行ったラットでの報告と一致する³⁾。エズリンの欠損または胃酸分泌の阻害に伴う、壁細胞内の細管小胞の減少や空胞が観察されたことは、胃酸分泌プロトンポンプ ($H^+/K^+ ATPase \alpha$) 欠損マウスの報告と一致する⁴⁾。これらの結果に加え、新たに胃腺を構成する壁細胞や主細胞の減少と副細胞の増加が観察されたことは、壁細胞の減少または変性にともない、副細胞から主細胞への分化が阻害された可能性が考えられた。以上の結果から、エズリンは壁細胞の酸分泌に関わるだけでなく、胃粘膜を構成する細胞の分化・増殖にも影響することが確認された。

- 【文献】 1. Tamura et al., (2005) *J. Cell. Biol.* 169, 21–28
2. Goldenring JR., Nomura S. (2006) *Am. J. Physiol.* 291, G999–1004
3. Kakei et al., (1995) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 214, 861–868
4. Spicer et al., (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 21555–21565

A14

ARHGEF10 は Rab8 の局在に関する

○柴田 理志¹, 辻 智波¹, 河内 翼¹, 大岡 嘉治², 稲垣 忍¹

1. 阪大・医・保健・神経生物, 2. 徳島文理・薬・生体防御

【目的】細胞が移動するためには進行方向に形成された先端端での細胞骨格の再構成や膜成分の輸送が必要である。これらの細胞機能には様々な低分子量G蛋白質が関与しており、細胞骨格であるアクチン繊維は Rho ファミリーに、膜成分の輸送は Rab ファミリーにより制御されている。Rab ファミリーは 60 種類以上ありそれぞれの Rab が様々なオルガネラ膜に局在し膜成分の輸送や融合などで機能している。ARHGEF10 は Rho ファミリーの活性化因子であることが解っているがその機能はほとんど明らかにされていない。我々は ARHGEF10 の細胞内局在や ARHGEF10 欠失細胞の解析を行うことで ARHGEF10 の機能を明らかにすることを目的としている。

【方法】ARHGEF10 の特異抗体を作成し HeLa 細胞における ARHGEF10 の局在を蛍光免疫染色により明らかにした。更に、ARHGEF10 のノックダウンを行い、ARHGEF10 欠失細胞の機能を蛍光免疫染色や migration assay、invasion assay により調べた。

【結果】HeLa 細胞を ARHGEF10 の特異抗体を用いて蛍光免疫染色したところ細胞膜付近に粒状に局在していた。この局在は微小管の脱重合剤で処理することで核付近に集積することが解った。この結果から ARHGEF10 の局在は微小管により制御されていることが考えられた。オルガネラ間や細胞膜—オルガネラ間の膜成分の輸送の多くは微小管を介して行われている¹⁾。この様な輸送には Rab ファミリーが関与していることから ARHGEF10 の局在を様々な Rab と比較した結果、Rab6 と Rab8 が陽性である小胞に局在していることが明らかとなった。この小胞はゴルジ装置から細胞膜へと輸送される分泌タンパク質や膜タンパク質を含む小胞であることが報告されている。Rab6 は小胞のゴルジ装置からの分裂や細胞膜までの輸送で、Rab8 は Rab6 依存的に小胞に局在し細胞膜への融合で機能していることが知られている²⁾。Rab6 をノックダウンした細胞では ARHGEF10 が Rab8 と同様に小胞に局在できなくなっていた。また、ARHGEF10 をノックダウンした HeLa 細胞で Rab6 と Rab8 の局在を調べたところ、Rab6 の局在には異常は認められなかったが Rab8 が小胞に局在できなくなっていることが解った。更に、ARHGEF10 欠失細胞の機能を調べると、Rab8 のノックダウンと同様に浸潤活性の低下が認められた。

【考察】以上の結果から ARHGEF10 はゴルジ装置から細胞膜へと輸送される小胞に局在していることが解った。また、Rab6 は ARHGEF10 を介して Rab8 の小胞への局在を制御していることを示唆するものであった。浸潤中の細胞では Rab8 がゴルジ装置で作られた細胞外基質などを分解する酵素を含む小胞を先端端の細胞膜へと輸送することで、効率的な浸潤を可能にしていると考えられている³⁾。ARHGEF10 欠失細胞で認められた浸潤活性の低下は Rab8 がこれらの小胞に局在できなくなり、細胞外基質の分解などに異常が生じたことが原因だと考えられ、ARHGEF10 が Rab8 を介して細胞浸潤活性を制御していることを示唆するものであった。

【文献】

1. Horgan, Conor P. McCaffrey, Mary W. (2011) *Biochem Soc Trans.* 2011 Oct;39(5):1202-6.
2. Grigoriev I. et al. *Curr Biol.* 2011 Jun 7;21(11):967-74.
3. Bravo-Cordero JJ et al. *EMBO J.* 2007 Mar 21;26(6):1499-510.

A15

血管透過性制御におけるミオシン軽鎖のリン酸化制御システムの解析

○河野貴子¹, 太田茜¹, 槇峰希和子¹, 山川侑季乃¹, 鈴木健二^{1,2}

¹立命館大・薬・薬, ²立命館大・薬・創薬

【目的】血管は全身の組織に酸素や栄養を供給する重要な器官である。血管内皮細胞は血管内腔に一層のシート状の構造を形成し、血液成分と組織間の選択的な物質交換を制御している。また、炎症の際には、血管透過性が一時的に亢進し、炎症細胞が血管外へ遊走する。血管透過性の厳密な制御は生体の恒常性維持において不可欠である。

細胞骨格であるアクトミオシンの収縮は血管透過性を亢進させることが知られており、アクトミオシンの収縮はミオシン軽鎖(MLC)のリン酸化により誘導される。MLCのリン酸化は Rho-kinase をはじめとするキナーゼとミオシン脱リン酸化酵素のバランスによって制御されており、血管透過性制御において重要であると考えられる。本研究では、MLCのリン酸化を制御するシグナルネットワーク全体のバランスを司るメカニズムを明らかにすることを目的に MLC のリン酸化のシステムの制御原理の解析を行った。

【方法】システムの制御原理の解析のために、MLC のリン酸化制御シグナル伝達経路について微分方程式で表現した数理モデルを構築した。構築した数理モデルを用いて、コンピュータシミュレーション及び数理解析を行った。さらに、数理モデルから予測された新規シグナル伝達経路について、実験により同定を行った。

【結果】数理解析から、以下の結果を得た。

- ① MLC のリン酸化制御システムには、新規シグナル伝達経路として、ミオシン脱リン酸化酵素の自己活性化フィードバックシグナル伝達経路が存在する¹⁾。
- ② ミオシン脱リン酸化酵素の自己活性化によって、Rho/Rho-kinase による MLC のリン酸化は双安定性と呼ばれるスイッチのような特徴的な挙動を示す¹⁾。

さらに、数理解析結果から予測されたミオシン脱リン酸化酵素の自己活性化フィードバックシグナル伝達経路の存在を示唆する実験結果を得た。

【考察】以上の結果は、ミオシン脱リン酸化酵素による自己活性化制御シグナル伝達経路がフィードバックループの役割を果たし、双安定性を誘導することを示している。双安定性は物理学や制御工学の分野では良く知られる性質であり、上流シグナルが閾値を超えると、下流シグナルの状態が不可逆的に切り替わるスイッチのような役割を果たす。実際、上流シグナルである Rho の活性が一過的でも、MLC のリン酸化が持続することが報告されており²⁾、この結果は、MLC のリン酸化が双安定性を示すことと良く一致する。

- 【文献】
1. Kaneko-Kawano, T., Takasu, F., Naoki, H., Sakumura, Y., Ishii, S., Ueba, T., Eiyama, A., Okada, A., Kawano, Y., Suzuki K. (2012)
PLoS One. 7(6), e39269
 2. Maeda, A., Ozaki, Y., Sivakumaran, S., Akiyama, T., Urakubo, H., Usami, A., Sato, M., Kaibuchi, K., Kuroda, S. (2006)
Genes Cells. 11(9), 1071-1083

A16

心筋特異的な膜タンパク質の同定

○矢澤一生, 矢白木翔平, 新谷泰範, 高島成二
大阪大学・生命機能研究科

【目的】AMPKはATPの加水分解産物であるAMPによって活性化されるリン酸化酵素で、エネルギー代謝を制御している。ATPが消費されAMPが増加した低エネルギー状態ではAMPKはATPの消費を抑制する。近年AMPKはエネルギー代謝の他に細胞の分化や増殖にも関連があることが報告されている。我々は心筋においてAMPKは細胞接着部位である介在板に局在していることを見出した。心筋で最もATPを消費するアクチンとミオシンの収縮がおこるサルコメアではない部位に局在がみられたことは、心筋におけるAMPKの役割がエネルギー代謝以外にあるのではないかと予想された。そこで本研究では心筋におけるAMPKの新規基質を同定することを目的とした。

【方法】AMPKの基質のスクリーニングを行った。まずマウスの心臓をホモジナイズ塩析後、密度勾配超遠心により介在板分画を抽出した。この分画を用いてAMPKリン酸化部位のコンセンサスシーケンス抗体による免疫沈降を行った。その後質量分析を行いAMPKの基質を同定した。同定した基質のひとつについてマウスの各組織でRT-PCRし、心臓と骨格筋における特異的な発現を検討した。またこの分子に対するペプチド抗体を作成しラット心筋細胞、マウス心臓凍結切片のそれぞれで免疫染色を行った。HEK293T細胞で発現、精製したリコンビナントタンパクをPNGase F処理することで糖鎖修飾の有無を検討した。

【結果】介在板分画の免疫沈降および質量分析の結果16kDaの分子Xが同定された。マウスの各組織でのRT-PCRの結果から分子Xは心筋と骨格筋で特異的に発現していることが確認された。ラットの培養心筋細胞を用いた免疫染色では分子Xの細胞間接着部位への局在がみられ、マウスの心臓凍結切片を用いた免疫染色では介在板への局在が確認された。N末端にFLAGを付加したリコンビナントタンパクをPNGase F処理をすると分子量シフトがみられ、糖鎖修飾を受けていることが示唆された。

【考察】AMPKの新規基質として同定された分子Xは心筋と骨格筋に特異的に発現し、細胞間接着部位に局在している膜タンパクであることが明らかとなった。またPNGase F処理による検討からLSMEM2は糖鎖修飾を受けていることが確認された。今後結合するタンパク質の探索、ノックアウトマウスの作成によって機能解析を進めていく予定である。

A17

Kinesin family member 20A(KIF20A)の多核化と細胞分裂への関与

○森田寛之¹, 福井彩乃¹, 小山可奈子¹, 有馬太陽¹, 通山由美¹,
¹姫路獨協・薬学・生化

【目的】

キネシンスーパーファミリータンパク質 (KIFs) は、高度に保存されたモータータンパク質のドメインを共有し、微小管に沿ってプラス端へ動く。さらに KIFs は細胞分裂時の紡錘体形成や染色体分離、小胞と細胞小器官の細胞内輸送など様々な細胞機能に関与している。なかでも KIF20A は、細胞分裂の後期では中央部紡錘体に、終期では中央体と分裂溝に蓄積し、細胞質分裂に関与することが報告されている^{1,2}。そこで我々は、KIF20A ノックダウン細胞を作成し、KIF20A の細胞分裂時の機能について経時的に検討した。

【方法】

ヒト白血病細胞株 HL60 をマクロファージ様または好中球様に分化し、KIF20A の発現量の変化をウェスタンブロットティングで解析した。次に HL60 に KIF20A-shRNA および control-shRNA を導入し、KIF20A ノックダウン細胞型 HL60 と control-sh 細胞を樹立した。メイグリユンワルド・ギムザ染色および蛍光色素染色により、細胞分裂におけるクロマチンの動態を解析した。

【結果】

HL60 をマクロファージ様または好中球様に分化すると急激に KIF20A の発現量が減少し、KIF20A が細胞増殖、即ち細胞分裂に関わることが示唆された。蛍光色素染色法で解析すると、control-sh 細胞は中期にて双極紡錘体形成と染色体整列が確認された。一方 KIF20A ノックダウン細胞では3つ以上の紡錘体様の構造と染色体不整列が認められ、細胞分裂が途中で停止した細胞も多く見られた。その結果として、1細胞あたり2核以上存在する細胞の割合が control-sh 細胞の10%以下に対し、KIF20A ノックダウン細胞は60%以上であった。

【考察】

KIF20A ノックダウン細胞では3つ以上の紡錘体様の構造があることから、中期における紡錘体形成に関与していることが示唆された。染色体不整列による細胞分裂異常も認められ、細胞質分裂に加え有糸分裂にも関与していると考えられる。

【文献】

1. Keisuke Taniuchi, Mutsuo Furihata, Toshiji Saibara (2014). KIF20A-Mediated RNA Granule Transport System Promotes the Invasiveness of Pancreatic Cancer Cells. *NEOPLASIA* 16(12) 1082-1093.
2. Yu Zhang, Jun Liu, Xu Peng, Cheng-cheng Zhu, Jun Han, Jia Luo, Rong Rui. (2014) KIF20A Regulates Porcine Oocyte Maturation and Early Embryo Development. *PLoS ONE* 9(7):e102898.

A18

植物細胞壁ペクチン由来ラムノガラクトツロナン I (RG-I) オリゴ糖の調製と RG-I 生合成酵素の活性測定法の構築

○田村峻佑¹, 上原洋平¹, 松本直樹¹, 溝口正², 民秋均², 石水毅¹

¹立命館大・生命, ²立命館大・薬

【目的】植物細胞壁の主成分であるペクチンは、植物の成長時に盛んに合成される。すなわち、ペクチン生合成は細胞成長と関連している。ペクチンは 12 種類の単糖、約 50 種類の糖鎖結合様式から構成され、その生合成には多くの酵素が関与している。しかし、ペクチンの構造が複雑なため、酵素の活性測定に必要な基質が容易に調製できず、これらの酵素のほとんどは同定されていない。

ペクチン主成分の一つであるラムノガラクトツロナン I (RG-I) の生合成に関わる酵素の活性測定法を構築するためには、 α 1-4 結合したガラクトツロン酸と α 1-2 結合したラムノースの二糖繰り返し構造の、RG-I 主鎖由来のオリゴ糖が基質として必要である。これを基質に用いると、RG-I を合成するガラクトツロン酸転移酵素やラムノース転移酵素など、5 種類の酵素の活性測定を行うことができる。当研究室ではこの基質の精製をしてきたが、得られる基質は 3 糖~6 糖 (表 1) と限定的であり、酵素解析を行うのに不十分な量であった。本研究では様々な長さの RG-I オリゴ糖を効率的に調製することを試みた。またこれらのオリゴ糖を用いて RG-I 生合成に関与する糖転移酵素の活性測定法の確立を試みた。

【方法・結果】市販の RG-I をドリセラーゼ、もしくは強酸によって加水分解した。生成した各オリゴ糖を 2-アミノピリジンで蛍光標識し、オリゴ糖を陰イオン交換 HPLC と逆相 HPLC により分離、精製した。さらにこれらのオリゴ糖について質量分析を用いて分子構造の同定を行い、3~10 糖 (表 1) の長さのオリゴ糖を、従来法の約 10~100 倍量得ることができた。3 糖、5 糖については NMR による構造解析も行った。今回得られた基質は、酵素活性を検出するのに必要な量があり、これらを基質に用いることで、RG-I の生合成に関与するガラクトツロン酸転移酵素、ラムノース転移酵素、ガラクトース転移酵素の活性測定法を構築できた。

ラムノガラクトツロナンオリゴ糖	従来法 (nmol)	改良法 (nmol)
 -PA	8	90
 -PA	7	760
 -PA	17	180
 -PA	16	750
 -PA	0	96
 -PA	0	280
 -PA	0	43
 -PA	0	57

 GalUA  Rha

表 1. RG-I 100 mg から得られたラムノ

【考察】今回構築した糖転移酵素の活性測定法を用いることで、RG-I 生合成に関与する酵素の遺伝子同定が可能となり、RG-I 生合成分子機構の解明に寄与できる。

A19

ホモダイマー光合成反応中心複合体の人工的ヘテロダイマー化

○浅井智広^{1,4}, Kwang Kim¹, 近藤徹², 原田二郎³, 伊藤繁², 大岡宏造¹

¹阪大・院理, ²名大・院理, ³久留米大・医, ⁴現: 立命大・生命

【目的】植物やシアノバクテリアがもつ光化学系 (PS) I と II に代表される「光合成反応中心 (RC)」は、多数の光合成色素と膜タンパク質から成る超分子複合体である。RC は光合成の初期反応を駆動する機能をもち、クロロフィル色素の光電荷分離によって生じた高エネルギーの電子が、RC 内部に配置された電子伝達コファクターの上を次々と移動する。電子伝達コファクターはダイマー構造のコアタンパク質のダイマー会合面に存在し、偽 C₂ 対称な 2 本の電子伝達経路を形成しているが、実際には排他的あるいは優先的に決まった片方の経路を電子が移動する。この機能的な非対称性は、コアタンパク質がヘテロダイマーであるために、電子伝達コファクター周辺の局所的な物理化学的性質が 2 本の経路で異なっていることが原因と考えられているが、その原子レベルの構造要因を実験的に同定した例は現時点で存在しない。また現代の RC は、ホモダイマー構造のコアタンパク質をもつ共通の祖先分子から進化し、遺伝子重複によってヘテロダイマー化したと考えられている。一方で、緑色硫黄細菌やヘリオバクテリアなどの一部の光合成細菌では、光合成が誕生して以来、約 30 億年以上もコアタンパク質がヘテロダイマー化していない。これは、RC の機能進化にコアタンパク質のヘテロダイマー化が深く関わっていることを示している。この問題に取り組むため、RC コアタンパク質のダイマー構造と電子移動反応の非対称性の相関関係を実験的に検証可能な実験系の構築を目指した。

【方法】絶対嫌気性の光合成細菌である緑色硫黄細菌 *Chlorobaculum tepidum* は、現代においても祖先型と同じホモダイマー構造のコアタンパク質 (PscA₂) の RC をもち、ホモダイマー RC をもつ生物のうち唯一、遺伝子操作が可能な生物種である。この性質を利用し、私たちは「*pscA* 遺伝子の偽二倍体化」という *C. tepidum* のホモダイマー RC を人工的にヘテロダイマー化する方法を提案している¹⁾。これは、任意の変異を導入した変異型の *pscA* 遺伝子を DNA の相同組換えに必須な *recA* 遺伝子のコーディング領域に組み込み、*pscA* 遺伝子を二倍体化するという方法である。ゲノム上に安定に保持された野生型と変異型の 2 つの *pscA* 遺伝子から発現する 2 種類の PscA がランダムに会合することで、任意の部位特異的な変異でヘテロダイマー化した RC が発現する。変異型遺伝子として野生型遺伝子を用いたモデル実験を実践することで、「*pscA* 遺伝子の偽二倍体化」の戦略の有効性を検証した。

【結果】「*pscA* 遺伝子の偽二倍体化」によって発現する人工ヘテロダイマー RC の発現量を、LC/MS/MS 解析で定量的に調べた。変異型遺伝子として His タグ付きの *pscA* 遺伝子をもち、His タグのアフィニティークロマトグラフィーによって調製した RC 標品に含まれる野生型 PscA を定量した結果、細胞内に発現している全 RC のうち約 10% がヘテロダイマー型 RC であると見積もられた。本来の野生型 *pscA* 遺伝子に Strep タグを付加し、変異型遺伝子として His タグ付きの *pscA* 遺伝子を導入したところ、発現した人工的なヘテロダイマー RC が少量であっても His タグと Strep タグのタンデムアフィニティークロマトグラフィーによって簡便且つ高純度に精製できることがわかった。

【考察】以上の結果は、私たちが提案する「*pscA* 遺伝子の偽二倍体化」がホモダイマー RC を人工的にヘテロダイマー化する方法として有効であることを示している。一方、ヘテロダイマー RC は PscA のランダムな会合を仮定した場合の約 1/5 程度しか発現しておらず、ヘテロダイマー RC の大量発現には遺伝子重複だけでは不十分であることがわかった。これは、RC コアタンパク質を安定的にヘテロダイマー化するには、コアタンパク質のアセンブリや安定性に関わる別な進化的メカニズムが必要であることを示唆している。

【文献】 1. C. Azai et al. (2011) *Biochim. Biophys. Acta* 1807, 803–812

A20

大腸菌一遺伝子欠失株 Keio コレクションを用いたテルル酸還元関連遺伝子の網羅的解析
○西田亮¹, 安間友香理¹, 田島寛隆^{1,2}, 斎藤茂樹^{1,2}, 谷泰史^{1,2}, 戸部隆太¹, 三原久明¹
¹立命館大・生命・生工, ²立命館大・R-GIRO

【目的】硫黄やセレンの同族元素であるテルルは、太陽電池や電子部品材料として先端産業分野で利用されている。テルルは、水溶液中ではオキシアニオンのテルル酸、亜テルル酸として比較的安定に存在し、環境汚染要因となるため、テルルオキシアニオンを毒性の低い不溶性の元素状テルルに還元する微生物が注目されている。微生物における亜テルル酸還元に関しては、膜結合型硝酸還元酵素¹、細胞内チオレドキシソ・グルタチオン系²やキノンプール³の関与など、複数の例が報告されている。一方、テルル酸還元については大腸菌でモリブドプテリン含有酵素の関与⁴が示唆されるのみであり、その詳細なメカニズムはわかっていない。そこで、大腸菌の一遺伝子欠失株コレクションである Keio コレクション株を用いてテルル酸還元に関与する遺伝子を網羅的に探索し、テルル酸代謝経路の解析を行った。

【方法】テルル酸は還元されると黒色を呈する元素状テルルとなる。そこで、テルル酸含有固体培地上で元素状テルルによる黒色を呈さない表現型を指標として、テルル酸還元能欠失株を選出した。これらの株をテルル酸を含む TSB 培地で培養し、生成した元素状テルルを定量した。また、セレン酸、亜セレン酸に対する還元能の有無を調べた。テルル酸と各オキシアニオン（硫酸、硝酸、亜硝酸）を含む TSB 培地で野生株を培養し、オキシアニオンのテルル酸還元への影響を調べた。

【結果】大腸菌遺伝子欠失株コレクション (Keio コレクション) 全 3812 株より、8 株のテルル酸還元能欠失株 ($\Delta ynbA$, $\Delta ydaS$, $\Delta yjeB$, $\Delta yidH$, $\Delta moeA$, $\Delta paaG$, $\Delta pdxY$, $\Delta nsrR$) を選抜した。これらの遺伝子欠失株ではテルル酸に加え、セレン酸の還元能も低下していた。一方、亜セレン酸の還元能低下は見られなかった。NsrR は、リン酸エクスポーター活性をもつ YjbB⁵ の遺伝子の正の転写調節因子である⁶。NsrR は NO 感受性の鉄硫黄クラスターを有し⁷、亜硝酸添加 (NO 産生) 条件下では、NsrR による yjbB の転写促進は解除される。そこで、亜硝酸とその他のオキシアニオンが野生株のテルル酸還元能に影響を与えるかを調べた。その結果、亜硝酸、硝酸が含まれる TSB 培地においてテルル酸還元の遅延が観察された。また、亜硝酸、硝酸によるセレン酸還元の遅延も同様に見られた。

【考察】選抜した遺伝子欠失株 8 株ではテルル酸、セレン酸の還元能が低下していたことから、テルル酸とセレン酸の還元は共通の機構によるものであり、亜セレン酸還元とは独立していることが示唆された。亜硝酸、硝酸の添加によるテルル酸、セレン酸の還元阻害の一部は、細胞内に取り込まれた亜硝酸、硝酸から生成された NO による NsrR 不活化を介した yjeB 発現量低下による可能性が考えられた。

- 【文献】
1. Sabaty, M., et al., (2001) *Appl. Environ. Microbiol.*, 67, 5122-5126
 2. Rigobello, M. P., (2011) *Free Radic. Biol. Med.*, 50, 1620-1629
 3. Wang, X., (2011) *Bioresour. Technol.*, 102, 3268-3271
 4. Theisen, J., (2013) *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 3171-3175
 5. Motomura, K., et al., (2011) *FEMS Microbiol. Lett.*, 320, 25-32
 6. Filenko, N., et al., (2007) *J. Bacteriol.*, 189, 4410-4417
 7. Tucker, N. P., et al., (2008) *PLoS One*, 3, e3623

A21

腎尿細管での電解質再吸収におけるアクチン結合タンパク質モエシンの生理的役割の解明

○川口高德¹, 波多野亮¹, 田村淳², 月田早智子², 浅野真司¹

¹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る。現在汎用されている中で最も強い利尿作用を示すループ利尿薬の標的分子であることや、その機能異常が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などが知られており、臨床上的重要性も高い。近年、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アダプタータンパク質の 1 つであるモエシンが、*in vitro* の系において NKCC2 と相互作用することが報告された¹⁾。しかし、未だモエシンの腎臓における機能的役割に関する知見は得られていない。そこで、本研究ではモエシンノックアウト (MKO) マウス²⁾ を用いて、生体内におけるモエシンの欠損が腎臓での尿濃縮機能に与える影響について検討した。

【方法】MKO マウスの尿や血漿における電解質 (Na^+ , K^+ , Cl^-) 及びクレアチニンの濃度測定や血圧測定を行った。生理機能の変化を検討するため電解質の分画排泄率を算出、尾静脈からの FITC-イヌリン投与により糸球体ろ過量 (GFR) を解析した。また、腎組織における免疫組織染色や、細胞膜表面タンパク質のビオチン化修飾及び密度勾配遠心法などの手法で調製した膜分画、脂質ラフト画分における NKCC2 の発現を検討した。

【結果】雄の MKO 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、MKO マウスでは野生型マウスに比べて NKCC2 の脂質ラフトでの局在性が低下していることが確認された。

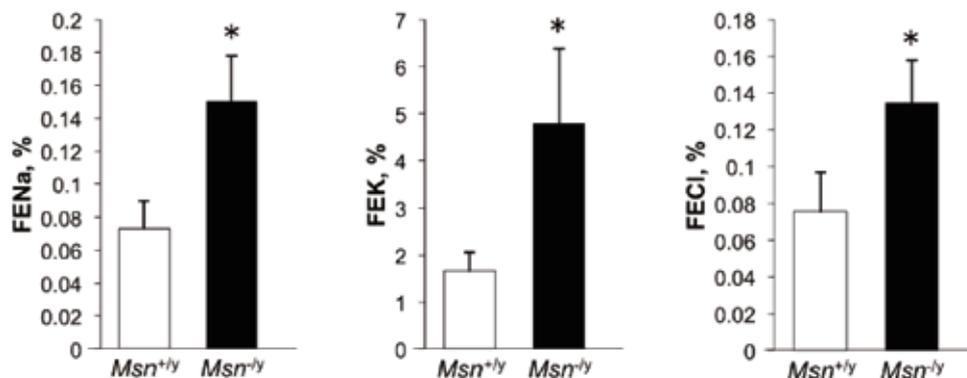


図 1. 野生型, モエシンノックアウトマウスにおける電解質の分画排泄率.

【考察】MKO マウスが電解質の尿中への喪失傾向を示しており、バーター症候群様の表現型を引き起こすことが示唆された。NKCC2 は脂質ラフトに集積し、TAL 管腔膜に発現する K^+ チャンネル (ROMK) と共役して効率的な電解質再吸収を行っていることが知られているが、MKO マウスでは NKCC2 の脂質ラフトでの局在性が低下していることが確認された。生体内ではモエシンが NKCC2 の脂質ラフトにおける局在制御を介して尿濃縮機能に関与していることが示唆された。

- 【文献】
1. Carmosino, M., Rizzo, F., Procino, G., Zolla, L., Timperio, A., Basco, D., Barbieri, C., Torretta, S., Svelto, M. (2012) *Biol. Cell*, **104**, 658-676
 2. Doi, Y., Itoh, M., Yonemura, S., Ishihara, S., Takano, H., Noda, T., Tsukita, S., *J. Biol. Chem.* **274**: 2315-2321

GPR120 の脂肪細胞分化に対する影響の解析

○井上 恭¹, 渡邊貴之², 前田奈美¹, 宮里文野¹, 河野貴子¹, 鈴木健二^{1,2,3}¹立命館大・薬・薬,²立命館大・生命科学・生命情報,³立命館大・薬・創薬

【目的】 今日大きな社会問題となっているメタボリックシンドロームは、肥満に伴うインスリン抵抗性（インスリン作用不全）が主要な原因である。脂肪細胞の肥大化と脂肪組織へのマクロファージの集積が慢性炎症とインスリン抵抗性をもたらし、これがメタボリックシンドロームの病態の基礎となると考えられている。最近、脂肪酸をはじめとした脂質分子が特異的な受容体や結合タンパク質を介して様々な細胞機能制御に関与をしていることが多くの研究から明らかになってきた。GPR120 は中・長鎖の脂肪酸によって活性化され、腸管細胞からのインクレチンの分泌とマクロファージにおける炎症応答の抑制に与り、個体のインスリン感受性やエネルギー代謝の調節に重要な役割を果たすと考えられている。2007年に Gotoh らは GPR120 が脂肪細胞分化の制御に関与することを報告した¹⁾ が、その詳細な分子メカニズムについては不明な点が残されている。本研究では GPR120 の細胞内第3ループと C 末端領域のセリン・スレオニン残基をアラニンに置換した変異体を作製し、受容体下流の細胞内情報伝達系の解析を行って、脂肪細胞分化に対する GPR120 の作用を分子レベルで明らかにすることを目的とする。

【方法】 マウス GPR120 の細胞内第3ループ及び C 末端領域のセリン・スレオニン残基をアラニンに置換した変異体を部位特異的変異導入法により作製した。野生型及び変異型 cDNA を RAW264.7 細胞や 3T3-L1 細胞に遺伝子導入し、安定発現株を樹立した。合成アゴニスト刺激による細胞内情報伝達系の活性化（ERK のリン酸化、細胞内カルシウム濃度変化）をそれぞれウェスタンブロッティングと蛍光試薬を用いた二波長測定法によって解析した。LPS 刺激により誘導されるサイトカイン産生量の変動は RT-PCR により測定した。インスリン・IBMX・デキサメサゾンによる脂肪細胞分化の評価は、Oil Red O 染色により行った。

【結果と考察】 HEK293 細胞を GPR120 のアゴニスト GW9508 で刺激して誘導される ERK のリン酸化は、細胞内第3ループのリン酸化部位を欠失した変異体では減少し、反対に C 末端領域のリン酸化部位を欠失した変異体では増加した。一方、リガンド刺激による細胞内カルシウム濃度の変動については変化がなかった。3T3-L1 細胞の脂肪細胞分化については GPR120 変異体発現細胞では野生型と比べて抑制されていた。RAW264.7 細胞における LPS 刺激によるサイトカイン産生は GW9508 処理で抑制されたが、セリン・スレオニン残基のアラニンへの変異はその抑制効果を阻害した。以上の結果は、3T3-L1 細胞の脂肪細胞分化に対して GPR120 下流でのアレスチン経路の関与を示唆している。

【文献】 1. Gotoh, C. *et al.* (2007). The regulation of adipogenesis through GPR120. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 354 (2), 591–597.

A23

植物細胞壁合成に必要な UDP-アピオースの調製法の開発

○松田諒子, 鈴木真未, 石水毅

立命館大・生命

【目的】植物細胞壁ペクチンには、ラムノガラクトツロナンⅡ(RG-Ⅱ)という構造単位が含まれる。RG-Ⅱの構成単糖のアピオース残基は、ホウ素原子とホウ酸ジエステル結合をすることでペクチンを架橋しており、ペクチンの構造形成に重要な役割を果たしている。RG-Ⅱは、その合成に約 20 種類の糖転移酵素が関与する。しかし、アピオース転移酵素をはじめ、ほとんどの酵素が未同定である。その理由の一つは、糖転移酵素の基質の調製が困難なことである。ペクチン合成に関与するアピオース転移酵素の基質 UDP-アピオースは、アルカリ条件下で 2 位の水酸基が隣接するリン原子を求核攻撃することで容易に分解されるため(図 1)¹⁾、これまでに単離されていない。本研究は、UDP-アピオースが溶液中で分解されにくい条件を探索し、UDP-アピオースの調製法を開発することを目的とした。

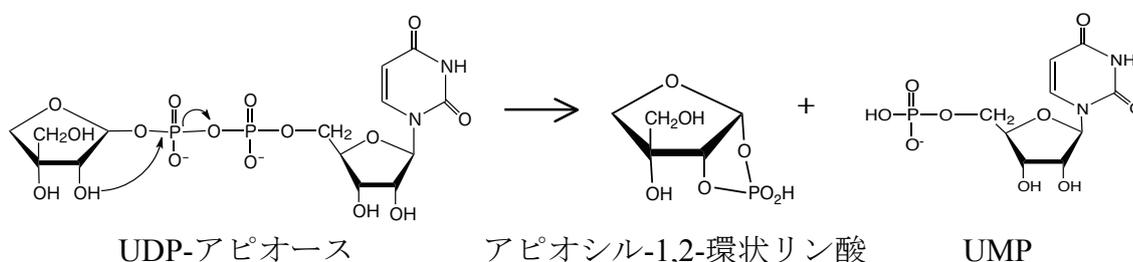


図 1. UDP-アピオースは溶液中で容易に分解される

【方法】大腸菌で発現させた UDP-アピオース/UDP-キシロース合成酵素と、その基質である UDP-グルクロン酸、補酵素 NAD^+ 、緩衝液を混合して 25°C で 19 時間反応させた。このとき、生成した UDP-アピオースの分解を防ぐために、正電荷を持つかさ高い緩衝剤として、*N,N*-ジメチルシクロヘキシルアミンを用いた。そして、反応生成物を逆相 HPLC で分析した。

【結果・考察】酵素反応生成物を逆相 HPLC で分析すると、UDP-アピオースと思われる新規生成物が生じた。この生成物をアルカリ ($\text{pH}9.0$) で処理すると、UMP が定量的に生じた(図 1)。また、生成物を 4M トリフルオロ酢酸で処理すると、アピオースが定量的に生成していた。以上より、新規生成物は UDP-アピオースであると考えられた。現在、この生成物のさらなる構造解析を進めている。本研究の達成によって、UDP-アピオースを基質とするアピオース転移酵素の同定を行うことができる。

【文献】 1. Kindel, P.K. & Watson, R.R. (1973) *Biochem. J.*, **133**, 227-241

B1

血漿セレン含有タンパク質 Selenoprotein P による膵臓β細胞障害のメカニズム解析

○稲荷尚吾¹, 高部稚子¹, 三田雄一郎¹, 御簾博文², 篁 俊成², 野口範子¹, 斎藤芳郎¹,
¹同志社大学・生命医科学・医生命システム, ²金沢大学・医薬保健研究域・包括的代謝学

【目的】 Selenoprotein P (SeP) は、血漿に存在するセレン含有タンパク質であり、細胞にセレンを供給する働きを担う。2型糖尿病患者において血漿 SeP 濃度が増加し、SeP 濃度と空腹時血糖値には相関性が認められている。マウスに SeP を投与するとインスリン抵抗性が増大することなどから、過剰の SeP は糖尿病を悪化させると考えられる。一方、2型糖尿病患者において、インスリン分泌能の低下や膵β細胞の減少に伴うインスリン分泌量の減少が知られている。最近の研究から、2型糖尿病患者におけるインスリン分泌能と血漿 SeP 濃度との間に負の相関が認められた。本研究では、マウス膵β細胞由来 MIN6 細胞を用い、2型糖尿病患者で増加した血漿 SeP 濃度に相当する SeP の添加効果および、その作用機序について以下の検討を行った。

【方法】 マウス膵β細胞由来培養細胞株の MIN6 細胞を使用した。SeP はヒト血漿から精製して用いた。生存率の測定には WST-8 および LDH assay を用いた。タンパク質の発現量は Western Blot 法にて評価した。

【結果と考察】 MIN6 細胞に可変量の SeP を添加し、72 時間培養した結果、濃度依存的な生細胞数の低下が認められた。健常人の血漿 SeP 濃度は 5 μg/ml であり、糖尿病態では約 10 μg/ml まで増加する。本研究で認めた MIN6 細胞死は、5 μg/ml 以上の濃度で認められた。SeP による MIN6 細胞死は、全カスパーゼ阻害剤 z-VAD-FMK によって有意に抑制された。さらに、SeP 処理により、アポトーシス実行因子 Caspase-3 の断片化による活性化も確認された。これより、過剰の SeP は、MIN6 細胞にアポトーシスを誘導すると考えられた。

SeP は、システインの硫黄がセレンに置き換わったセレノシステイン (Sec) の形でセレンを含む。MIN6 細胞死の誘導に SeP に含まれる Sec が関与するかについて、セレノシスチン (2分子の Sec が Se 間で共有結合した化合物) の添加効果を検討した。その結果、セレノシスチン濃度依存的に MIN6 細胞死誘導が引き起こされた。また、SeP 10 μg/ml に相当するセレノシスチンで細胞死が認められ、SeP による細胞死の誘導に Sec の供給が関与すると考えられた。

次に、細胞内に供給された Sec のセレンを脱離し、細胞内セレン含有タンパク質の合成に関わる Selenocystein lyase (Scly) の関与について、siRNA 法を用いて検討した。SeP およびセレノシスチンによる MIN6 細胞死は、Scly のノックダウンにより有意に抑制された。この結果から、SeP およびセレノシステインにより供給された Sec から切り出されたセレンがアポトーシスの誘導に関与すると考えられる。以上、本発表では SeP により誘導される MIN6 細胞死およびそのメカニズムについて述べる。

- 【文献】 1. Saito Y, Takahashi K (2002) *Eur J Biochem* **269**, 5746-5751
2. Misu H. et al. (2010) *Cell Metabolism* **12**, 483-495

脳梗塞時のミクログリア機能に対する Sema4D 作用の解析

○澤野俊憲¹, 渡邊文也¹, 石口満津子^{1,2}, 土江伸誉³, 古山達雄⁴, 稲垣忍¹
¹阪大・医(保)・神生, ²阪大・歯・口腔外, ³兵医療大・共教, ⁴香川県立保大・保医

【目的】 Sema4D は反発性軸索ガイダンス因子として同定された分泌型・膜貫通型タンパクであるが、免疫機能にも様々な影響を与えることが明らかにされている^{1,2}。脳梗塞は虚血のみならず、それに続いて生じる炎症によっても重度な傷害をもたらされる免疫学的なイベントである。これまでに脳内の免疫を司るミクログリアの活性化が培養条件下において Sema4D によって促進されることが明らかとなっているが、生体内におけるミクログリアへの Sema4D 作用は解明されていない³。そこで我々は脳梗塞時の脳内におけるミクログリアに対する Sema4D 作用を明らかにすることを目的とした。

【方法】 実験には CB-17/Icr-^{+/+} Jcl 野生型(WT)マウスと Sema4D 欠失型(Sema4D^{-/-})マウスを使用した。脳梗塞モデルマウスの作製は生後 6 週齢のマウスに対し中大脳動脈を電気焼灼することによって行った⁴。脳を取り出した後、免疫組織染色によって組織学的な解析を行った。脳内の一酸化窒素(NO)濃度は Griess 反応を用いて推定した。行動異常の評価は Open-field test によって行い、10 分間におけるマウスの移動数を計測した。

【結果】 Sema4D^{-/-}マウスでは WT マウスと比較して、脳梗塞作製後 3 日目(PO3)におけるミクログリアの Ameboid 形態への変化と、ミクログリアの一酸化窒素合成酵素(iNOS)の発現、脳内の NO 産生が抑制された。一方でミクログリアの BrdU 取り込みは PO3 において Sema4D の欠失により亢進した。Ameboid 形態のミクログリアと Ramified 形態のミクログリアを比較すると、iNOS の発現は Ameboid ミクログリアでより活発であり、BrdU の取り込みは Ramified ミクログリアにおいてより活発であった。Sema4D 欠失によるミクログリアの iNOS 発現の抑制と BrdU 取り込みの促進は主に Ameboid 形態のミクログリアではなく、Ramified 形態のミクログリアにおいて生じた。また、Sema4D^{-/-}マウスでは WT マウスと比較して、梗塞巣周囲における TUNEL 陽性細胞数が減少し、脳梗塞によって生じる移動行動の増加が抑制された。

【考察】 活性化し iNOS を発現したミクログリアは NO を産生することで傷害的な作用を示すことが知られている。Sema4D の欠失によってミクログリアにおける NO 産生が減少したが、これは iNOS 発現率の高い Ameboid ミクログリアの減少と Ramified ミクログリアにおける iNOS 発現の抑制によるものだと考えられる。一方で脳梗塞後のミクログリアの増殖は Sema4D の欠失によって促進された。これまでに脳梗塞後に増殖したミクログリアが IGF-1 の産生により保護的に作用することが示唆されている⁵。Sema4D^{-/-}マウスでは脳梗塞後の細胞死、行動異常が WT マウスと比較して軽度であることから、Sema4D は脳梗塞時の傷害的に作用するミクログリアの活性化に関与する因子であることが考えられる。

- 【文献】 1. Elhabazi, A., Delaire, S., Bensussan, A., Boumsell, G. (2001) *J. Immunol.* 166, 4341-4347
 2. Wang, X., Kumanogoh, A., Watanabe, C., Shi, W., Yoshida, K., Kikutani, H. (2001) *Blood.* 97, 3498-3504
 3. Okuno, T., Nakatsuji, Y., Moriya, M., Takamatsu, H., Nojima, S., Takegahara, N., Toyofuku, T., Nakagawa, Y., Kang, S., Friedel, R.H., Sakoda, S., Kikutani, H., Kumanogoh, A. (2010) *J. Immunol.* 184, 1499-1506
 4. Taguchi, A., Kasahara, Y., Nakagomi, T., Stern, D.M., Fukunaga, M., Ishikawa, M., Matsuyama, T. (2010) *J. Exp Stroke Transl Med.* 3, 28-33
 5. Lalancette-Hebert, M., Gowing, G., Simard, A., Weng, Y.C., Kriz, J. (2007) *J. Neurosci.* 27, 2596-2605

B3

オウレンの初代培養肝細胞における一酸化窒素誘導に対する効果

○藤井愛理¹, 奥山哲矢¹, 池谷幸信², 西澤幹雄¹
¹立命館大・生命・医化学, ²立命館大・薬・生薬

【目的】オウレン(黄連)は、キンポウゲ科オウレン属の常緑多年草であるオウレン(*Coptis japonica* Makino, *C. chinensis* Franchet, *C. deltoidea* C. Y. Cheng et Hsiao, *C. teeta* Wallich)の根をほとんど除いた根茎を乾燥させた生薬である。生薬のオウレンは、清熱燥湿と瀉火解毒の薬能を持つことから、皮膚搔痒症等に使う黄連解毒湯や口内炎等に使う半夏瀉心湯などの漢方処方に配剤される。薬効としては抗炎症、健胃、抗菌作用がある。オウレンの主要成分は四級アルカロイドの berberine であり、止瀉作用や抗炎症作用が知られている。しかし、berberine 以外にもオウレンの抗炎症作用を担う成分が含まれているのではと考え、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)の産生誘導の抑制作用を抗炎症作用の指標とし、オウレンの抗炎症成分を検討した。

【方法】オウレンをメタノールで還流抽出して得たメタノールエキスを水に溶解し、酢酸エチル、次いで *n*-ブタノールで分配抽出した。各抽出液をそれぞれ減圧濃縮し、酢酸エチル可溶部(A画分)、*n*-ブタノール可溶部(B画分)、水可溶部(C画分)を得た。これとは別に、メタノールエキスを1%硫酸水溶液に溶解し、ジエチルエーテルで分配抽出して得たジエチルエーテル抽出液を濃縮し、非アルカロイド画分とした。残った水層に炭酸ナトリウムを加え弱アルカリ性とし、再びジエチルエーテルで分配抽出して三級アルカロイド(3AL)画分を得た。さらに水層に水酸化ナトリウムを加え強アルカリ性とした後、クロロホルムで分配抽出し、四級アルカロイド(4AL)画分を得た。

Wistar ラットから初代培養肝細胞を調製し、37°C、5% CO₂の条件下で一晩培養した後、オウレンの各分画を IL-1 β (1 nM) と同時に添加して8時間培養した。培地中の NO 量を Griess 法により測定し、50%阻害濃度(IC₅₀)を求めた。細胞障害性は、培地中に放出された乳酸脱水素酵素の活性を測定することで確認した。薄層クロマトグラフィー(TLC)により、画分中の成分を解析した。

【結果】

1. オウレンのメタノールエキス 15.43 g (100%重量比)を粗分画したところ、A画分 1.10 g (7.1%)、B画分 5.71 g (37.0%)、およびC画分 8.62 g (55.9%) が得られた。
2. オウレンのメタノールエキス 17.90 g を非アルカロイドとアルカロイドに分画したところ、非アルカロイド画分 0.85 g (7.6%)、アルカロイド画分である 3AL 画分 0.12 g (1.1%) と 4AL 画分 10.22 g (91.3%) が得られた。
3. 上記のすべての画分が、IL-1 β による NO 産生誘導を抑制した。
4. C画分のみ、30 μ g/ml 以上の濃度で細胞障害性が見られた。
5. IC₅₀値は、A画分 50.3 μ g/ml、B画分 17.1 μ g/ml、C画分 16.3 μ g/ml であり、非アルカロイド画分 71.1 μ g/ml、3AL画分 18.5 μ g/ml、4AL画分 9.9 μ g/ml であった。
6. TLC分析から、BとC画分に、A画分より多くの berberine が含まれていることがわかった。また、非アルカロイド画分には berberine がほとんど含まれていなかった。

【考察】ラット初代培養肝細胞を用いた先行研究で、berberine は NO 産生を抑制することがわかっている。TLCの解析結果とあわせると、A、B、Cおよび4AL画分による NO 産生の抑制は berberine に由来することが示唆された。しかし、berberine をほとんど含まない非アルカロイド画分にも NO 産生抑制が見られたため、オウレンには berberine のようなアルカロイド成分以外にも NO 産生を抑制する成分が含まれていることが考えられた。

B4

初代培養肝細胞における一酸化窒素誘導に対するチョウトウコウの効果

○岩佐 晃輔¹, 奥山 哲矢¹, 池谷 幸信², 西澤 幹雄¹

¹立命館大・生命・医化学,²立命館大・薬・生薬

【目的】

釣藤鈎(チョウトウコウ)は、アカネ科カギカズラ *Uncaria rhynchophylla* Miquel、*U. sinensis* Haviland または *U. macrophylla* Wallich の通例とげを乾燥させた生薬であり、平肝清熱、平肝熄風の薬能を持つことから高血圧症や頭痛に使う釣藤散、高血圧症に伴う頭重・のぼせに使う七物降下湯などの漢方処方に配合されている。チョウトウコウは、降圧作用¹⁾や血管拡張作用²⁾が報告されているが、主要活性成分は未だ明らかになっていない。一酸化窒素(NO)により血管平滑筋が弛緩し血管が拡張することが知られている。NO産生は、初代培養肝細胞においてインターロイキン1 β (IL-1 β)の刺激により誘導される。本研究では、初代培養肝細胞を用いて、チョウトウコウ抽出エキスがNO産生誘導を促進するかどうか調べ、血管拡張作用を持つ成分が含まれている可能性を検討した。

【方法】

チョウトウコウ(*Uncaria rhynchophylla* Miquelのとげ)のメタノール抽出エキスを水に溶解し、酢酸エチル、次いで*n*-ブタノールで分配抽出した。各抽出液をそれぞれ減圧濃縮し、酢酸エチル可溶部(脂溶性画分、A画分)、*n*-ブタノール可溶部(両親媒性画分、B画分)、水可溶部(C画分)に粗分画した³⁾。さらに、B画分をDiaion HP-20(三菱化学)カラムクロマトグラフィに付し、疎水性によって4画分(Fr. B1~B4)に分画した。ラット初代培養肝細胞に、チョウトウコウの各画分とIL-1 β を同時に添加し、8時間培養した後、培地中のNO量を測定した。

【結果】

1. チョウトウコウのメタノール抽出エキス 7.26 g (100%重量比) から、A画分 4.30 g (59.2%)、B画分 0.88 g (12.1%)、C画分 2.08 g (28.7%) を得た。
2. A画分はIL-1 β によるNO産生誘導を有意に抑制したが、B画分はNO産生を有意に促進した。C画分はNO産生量に影響を与えなかった。設定した濃度範囲内では、いずれの画分にも細胞障害性は認められなかった。
3. B画分 225.5 mg を Diaion HP-20 カラムクロマトに付し、Fr. B1 47.1 mg (22.6%)、Fr. B2 135.5 mg (64.8%)、Fr. B3 12.9 mg (6.2%)、Fr. B4 13.4 mg (6.4%) を得た。
4. Fr. B2 は NO 産生誘導を有意に促進した。一方、Fr. B1 は NO 産生に影響を与えず、Fr. B3 と Fr. B4 は NO 産生を有意に抑制した。設定した濃度範囲内では、細胞障害性は認められなかった。

【考察】

チョウトウコウのB画分がNO産生の誘導促進を示したことから、肝細胞におけるNO産生誘導促進成分は両親媒性であることが示唆された。その中でもNO産生を有意に促進したFr. B2は、両親媒性の成分の中でも高極性である。このことからチョウトウコウの両親媒性で比較的高極性の成分がチョウトウコウによる血管拡張作用に関与している可能性が示唆された。

【文献】

1. Masumiya H, Saitoh T, Tanaka Y, Horie S, Aimi N, Takayama H, Tanaka H, Shigenobu K. *Life Sci.* **65**: 2333–2341 (1999).
2. Choi DY, Huh JE, Lee JD, Cho EM, Baek YH, Yang HR, Cho YJ, Kim KI, Kim DY, Park DS. *Biol Pharm Bull.* **28**: 2248–2252 (2005).
3. Ohno N, Yoshigai E, Okuyama T, Yamamoto Y, Okumura T, Sato K, Ikeya Y, Nishizawa M. *HOAJ Biology.* **1**: 2 (2012).

B5

バイカレインによる脂肪細胞の分化抑制機構の解明

○中尾 友香梨, 吉原 秀人, 天野 富美夫, 藤森 功
大阪薬大・薬・生体防御学

【目的】肥満は、糖尿病や高血圧症、脂質異常症やメタボリックシンドロームなど様々な生活習慣病の危険因子であり、生体内因子やホルモンの働きにより複雑に制御されている。近年、肥満人口の増加が問題となっており、その予防や解消は重大な課題である。本研究では、フラボノイドの1つであるバイカレイン (baicalein) に注目した。バイカレインは漢方にも用いられるコガネバナ (*Scutellaria baicalensis*) に多く含まれており、脂肪細胞分化抑制効果について報告がなされているが、作用機序については不明な点が多い。そこで、マウス前駆脂肪細胞 3T3-L1 細胞を用いて、バイカレインによる脂肪蓄積抑制機構の解明を目的に研究を行った。

【方法】マウス 3T3-L1 細胞を用いて、バイカレイン存在下で培養を行い、WST-8 アッセイによりバイカレインの細胞障害性を検討した。また、3T3-L1 細胞をバイカレイン存在下で成熟脂肪細胞へと分化誘導を行い、Oil Red O 染色や細胞内トリグリセリドレベルを測定し、脂肪滴蓄積量の変化を検討した。さらに、リアルタイム PCR 法により、脂肪細胞分化マーカーや脂肪酸合成系酵素、中性脂肪分解系酵素、グルコーストランスポーターの遺伝子発現レベルを測定した。

【結果】3T3-L1 細胞を用いて、0-100 μM のバイカレイン存在下で 6 日間培養を行い、WST-8 アッセイにより細胞障害性を検討したところ、0-50 μM では細胞生存率に有意な差は見られなかったが、100 μM では約 78%まで低下していた。また、3T3-L1 細胞を 50 μM バイカレイン存在下で 6 日間分化誘導したところ、バイカレインを非添加で分化誘導した場合と比較して、細胞内トリグリセリドレベルは有意に減少した。さらに、脂肪細胞分化マーカーである PPAR γ , aP2(Fabp4), C/EBP α , 脂肪酸合成系酵素である ACC, FAS, SCD, 中性脂肪分解系酵素である ATGL, HSL, MGL やグルコーストランスポーターである GLUT4 の遺伝子発現レベルは有意に低下していた。

【考察】バイカレインは脂肪酸合成系を抑制し、さらにグルコース取り込みを抑制することにより、脂肪細胞における脂肪滴蓄積を低下させることが示唆された。したがって、バイカレインは肥満を抑制し、多くの生活習慣病の発症予防や改善のために有用であると考えられた。

B6

甲状腺ホルモンによる脂肪滴蓄積促進機構の解明

○松村 美紀, 岸保 有里奈, 天野 富美夫, 藤森 功
(大阪薬科大・薬・生体防御学)

【目的】甲状腺ホルモンの一つであるトリヨードサイロニン (T₃) は白色脂肪細胞において脂肪滴蓄積を促進するが、その調節機構は未だ不明な点が多い。これまでの研究により、T₃ は脂肪細胞において脂肪酸合成系の遺伝子である **fatty acid synthase (FAS)** の遺伝子レベルでの発現を亢進させ、脂肪酸合成の促進により細胞内脂肪滴の蓄積を促進することが示唆された。本研究では、脂肪細胞において、T₃ が脂肪酸合成系遺伝子の発現を上昇させる調節機構について解析した。また、T₃ の中性脂肪分解経路への影響について中性脂肪分解酵素の遺伝子発現解析を行った。

【方法】マウス前駆脂肪細胞 3T3-L1 細胞を、T₃ を添加した培地で 6 日間脂肪細胞へと分化誘導し、Oil Red O 染色および細胞内トリグリセリド測定により脂肪滴蓄積量を調べた。次に、リアルタイム PCR およびウェスタンブロット解析により、FAS を始めとする脂肪酸合成酵素、HSL などの中性脂肪分解系酵素、T₃ 受容体である甲状腺ホルモン受容体 (TR) のサブタイプの発現を調べた。さらに、FAS 遺伝子の転写調節機構についても解析した。

【結果および考察】T₃ により FAS の発現は遺伝子およびタンパク質レベルで上昇することが分かった。さらに、脂肪細胞では、TR の 2 つのサブタイプのうち、TR α が発現していることが分かった。FAS のプロモーター領域を解析したところ、TR が結合するシス配列が存在しており、クロマチン免疫沈降法により TR は T₃ に依存して FAS プロモーターに結合することが分かった。つまり、T₃ は TR α を介して FAS の遺伝子発現を亢進させ、脂肪酸合成の促進により細胞内脂肪滴の蓄積を増加させることが示唆された。また、T₃ により HSL の発現レベルが低下しており、中性脂肪分解への関与も示唆された。

B7

脂肪細胞におけるプロスタグランジン D₂ 受容体の機能解析

○若井恵里¹, 天野富美夫¹, 裏出良博^{2,3}, 藤森 功^{1,3}

¹大阪薬科大・生体防御学, ²筑波大・IIS, ³大阪バイオサイエンス研

【目的】脂質メディエーターであるプロスタグランジン (PG) D₂ は, 脂肪滴の蓄積を促進することが分かっている. また, PGD₂ の代謝物は, 脂肪細胞分化において重要な役割を果たす PPAR γ を活性化し, 脂肪蓄積を促進する. しかし, PPAR γ を抑制しても脂肪蓄積を完全に抑制することができないことから, PGD₂ は PPAR γ とは異なる経路を介しても脂肪蓄積を促進していることが示唆される. さらに, 脂肪細胞における PGD₂ 受容体の役割については全く分かっていない. 本研究では, 脂肪細胞における PGD₂ 受容体を介した脂肪滴蓄積促進機構について検討した.

【方法】マウス前駆脂肪細胞株 3T3-L1 細胞を脂肪細胞へと 6 日間分化誘導し, 脂肪細胞における PGD₂ 受容体の発現レベルをリアルタイム PCR により調べた. また, PGD₂ 受容体アゴニスト, アンタゴニスト存在下で脂肪細胞へ分化誘導し, 細胞内トリグリセリドレベル, 遊離グリセロール量を定量し, さらに脂肪関連遺伝子の発現レベルを調べた.

DP2 受容体欠損マウスから mouse embryonic fibroblast (MEF) を作製し, 脂肪細胞へ分化させ, 細胞内トリグリセリドレベル, 遊離グリセロール量を測定し, さらに各種遺伝子の発現レベルを調べた.

【結果】脂肪細胞の分化過程において, PGD₂ 合成酵素の一つであるリポカリン型 PGD 合成酵素 (L-PGDS) の発現レベルが上昇し, さらに PGD₂ 産生量も増加した. また, L-PGDS siRNA 及び L-PGDS 阻害剤である AT-56 により PGD₂ 産生量は低下し, 脂肪細胞の分化が抑制された.

次に, 脂肪細胞において PGD₂ 受容体である DP1 と DP2 (CRTH2) 受容体の発現レベルをリアルタイム PCR により調べた結果, DP1 受容体はほとんど発現しておらず, DP2 受容体が高発現していた. DP2 受容体アゴニストである 15(R)-15-methyl-PGD₂ を脂肪細胞の培地中に添加して分化誘導を行ったところ, 遊離グリセロール量は濃度依存的に低下した. また, DP2 受容体アンタゴニストである CAY10595 を添加したところ, 脂肪滴の蓄積が抑制された. さらに, DP2 ノックアウトマウス由来 MEF を脂肪細胞へ分化誘導したところ, 細胞内トリグリセリドレベルは低下し, 遊離グリセロール量は増加した.

【考察】PGD₂ の代謝物が PPAR γ と結合して脂肪細胞の分化を促進するだけでなく, PGD₂ 自体が DP2 受容体を介して脂肪細胞の分化を亢進することが示唆された. さらに, 遊離グリセロール量の変化から, PGD₂ は DP2 受容体を介して脂肪分解を抑制していることが示唆された. 現在, DP2 受容体を介した脂肪分解メカニズムについて解析を行っている.

B8

活性化した褐色脂肪細胞において抗リン酸化 NFκB 抗体が認識するタンパク質について

○森口剛介, 井上智博, 松村潔
大阪工大・院・生体医工学

【目的】 マウスにおいて寒冷暴露や皮膚へのメントール（冷受容器の活性化剤）塗布は褐色脂肪細胞（Brown adipose tissue; BAT）を活性化し、熱産生を増加させる。この時、BAT において、抗リン酸化 nuclear factor kappa B p65 (ser276)（以下、抗 pNFκB 抗体）で認識されるタンパク質が核に集積する¹。この反応のメカニズムと生理学的意義を明らかにする研究を行っている。

【方法】 *in vivo* 実験：C57Bl6 マウス（雄、8 週齢）を 30°C で飼育し、その一部を 4°C に 1 時間暴露した。BAT を採取し、抗 pNFκB 抗体を用いた免疫組織化学法、ウェスタンブロット法で解析した。製造元の異なる複数の抗 pNFκB 抗体を用いた。

in vitro 実験：マウスおよびラットの BAT の初代培養をおこなった。isoproterenol (ISO; β 受容体アゴニスト)、phenylephrine (PHE; α 受容体アゴニスト)、forskolin (adenylate cyclase 活性化剤)、H89 (A kinase 阻害剤) に対する反応を、抗 pNFκB 抗体を用いた免疫組織化学法で検討した。また ISO に対する反応を抗 pNFκB 抗体を用いたウェスタンブロット法で検討した。

【結果】 *in vivo* 実験：マウスへの寒冷暴露（4°C 1 時間）により BAT 細胞の核に抗 pNFκB 抗体が認識するタンパク質が集積した（図 1）。対照群（30°C）ではこのような反応はほとんど見られなかった。異なる製造元の一次抗体で同様の結果が得られた。ウェスタンブロット法では 63kD と 100kD 付近に陽性反応が見られた。対照群と寒冷暴露群で比較すると、63kD のバンドはほぼ同等で、100kD のバンドは寒冷暴露で増強した。

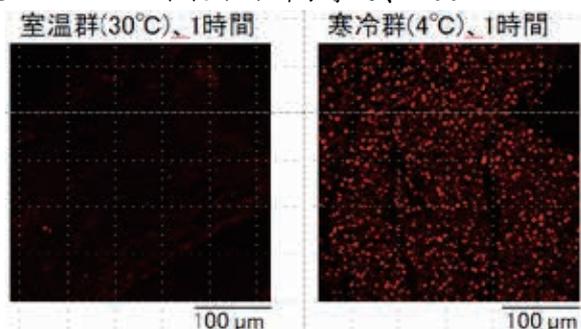


図 1 BAT における抗 pNFκB 抗体を用いた免疫組織化学

in vivo 実験：ISO (10^{-6} M) 10 分の刺激により、BAT 細胞の核に抗 pNFκB 抗体が認識するタンパク質が集積した。Forskolin 刺激でも同様の反応が見られた。ISO 刺激による反応は H89 により減弱した。PHE では反応が見られなかった。

初代培養 BAT 細胞をウェスタンブロット法で検討した結果、ISO 刺激により 100kD 付近のバンドが増強した。

【考察】 以上の結果は活性化した BAT 細胞において抗 pNFκB 抗体で認識されるタンパク質は、β 受容体⇒cAMP⇒A kinase の経路でリン酸化されることが明らかとなった。刺激により核に集積したタンパク質は当初想定されていた NFκB p65 ではなく、100kD の別のタンパク質である可能性が高い。

【文献】

1. Tajino et al. (2007) Application of menthol to the skin of whole trunk in mice induces autonomic and behavioral heat-gain responses. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2007 Nov;293(5):R2128-35

B9

糖尿病神経因性疼痛に伴う脊髄におけるミトコンドリアの機能解析

○松岡悦子¹, 大野華奈¹, 鍵本真人², 安永俊之³, 松井凌介³, 坂元秀幸³, 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・生命工学, ³大阪工大・工・生体医工

【目的】糖尿病性神経因性疼痛は高血糖による末梢神経系のポリオール代謝亢進, 終末糖化産物の産生, 酸化ストレスによる細胞障害などに起因することが知られている. 近年, 糖尿病に伴う感覚神経におけるミトコンドリア機能障害の関与が報告されているが, 中枢神経系における詳細は明らかではない. 本研究では, 糖尿病に伴う疼痛の中枢性感作に重要な脊髄後角におけるミトコンドリアの機能変化と, 損傷したミトコンドリアを分解するオートファジー関連分子について解析を行った.

【方法】5週齢雄 C57BL6 マウスにストレプトゾトシン (STZ, 200 μ g/g) を腹腔内投与し糖尿病モデルマウスを作製した. STZ 投与後週毎に, 体重測定, 機械刺激による疼痛評価 (von Frey 試験), マウスの尾静脈血をグルコースパイロットにて血糖値を測定した. 脊髄組織の ATP 測定はホタルルシフェラーゼ発光反応を利用した ATP 発光測定キット (TOYO INK) を用いた. 4%パラホルムアルデヒドで灌流固定したマウスから脊髄切片を作製した. 一酸化窒素 (NO) 測定には NADPH ジアホラーゼ活性を, 活性酸素種 (ROS) はジヒドロエチジウム (DHE) 染色法を用いた. また, ミトコンドリア陰イオンチャネルの VDAC, アポトーシス関連分子 cleaved caspase3, オートファジー関連分子の p62, LC3, LAMP2, Hsc70 抗体を用いて免疫染色を行い, 共焦点レーザー顕微鏡を用いて撮影し, 蛍光強度は ImageJ で定量した.

【結果】STZ 投与後 1-5 週間に体重減少と 5 週目では 2.8 倍の血糖値が上昇した. STZ 投与 1-5 週において機械刺激に対する疼痛閾値が低下し痛覚過敏反応が見られた. STZ 投与 1-5 週において脊髄組織の ATP 量に有意な変化はなく, 脊髄後角では VDAC の発現にも差はなかった. 脊髄後角では顕著な NADPH ジアホラーゼ活性が上昇したが, DHE 染色には有意な差はなかった. 脊髄後角での cleaved caspase3, p62, LC3, LAMP2 には変化なく, Hsc70 に僅かな上昇が見られた.

【考察】STZ 投与による糖尿病モデルマウスにおいて, 機械刺激による疼痛過敏反応や脊髄後角では顕著に NO 産生が上昇した. 一方, ミトコンドリアタンパク質の VDAC の発現, ATP 産生, ROS 産生, アポトーシス誘導, オートファジー関連分子の発現に対しては顕著な変化は見られなかった. 脊髄後角において, NO が糖尿病性神経因性疼痛の中枢性制御を担っていることが示唆された.

B10

糖尿病性神経因性疼痛に伴う脊髄後角の一酸化窒素産生制御

○大野華奈¹, 安永俊之², 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

【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、ポリオール代謝亢進やタンパク質糖化に加え、末梢神経の変性や脱落が関与すること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。私たちは、疼痛の中枢性制御を担う脊髄後角において糖尿病に伴い一酸化窒素 (NO) の産生が上昇することを明らかにした。本研究では、疼痛治療薬による脊髄後角の NO 産生に対する効果を解析した。

【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作製した。STZ 投与後週毎に von Frey 試験により機械刺激に対する疼痛反応を測定した。また、血糖値はグルコースパイロットを用いて測定した。STZ 投与後3週目のマウス脊髄切片を作製し、疼痛制御ペプチドのノシセプチンの受容体拮抗薬(JTC-801)を添加し NADPH ジアホラーゼ活性による NO 産生を測定した。NADPH ジアホラーゼ活性測定は、脊髄切片をニトロブルーテトゾリウムと NADPH 存在下に 37°C 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。さらに、STZ 投与後3週間目のマウスに JTC-801 とガバペンチン(電位依存性 Ca²⁺チャネル $\alpha 2 \delta$ 阻害剤)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。STZ 投与後 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。STZ 投与後 3 週目のマウス脊髄切片に JTC-801 (100 nM)を添加したところ、NADPH ジアホラーゼ活性は有意に抑制された。そこで、STZ 投与後 3 週目のマウスに JTC-801(10 µg/g)を経口投与したところ、投与後 1 時間に疼痛過敏反応と脊髄後角の NADPH ジアホラーゼ活性を抑制した。また、ガバペンチン(30 µg/g)は、2-3 時間に有意な疼痛抑制と 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。ノシセプチンの受容体拮抗薬 JTC-801 は、糖尿病に伴う脊髄後角の NO 産生を、*in situ* および *in vivo* において抑制し、疼痛過敏反応も抑制した。ノシセプチンが糖尿病神経因性疼痛の中枢性感作機構に関与していることが示唆された。

B11

フコキサンチンによる肥満細胞形成阻害効果

○馬屋原慈理¹, 松井濤¹, 田邊甫樹¹, 東泰孝², 藤田隆司¹
¹立命館大・薬・分子薬効毒性学, ²大阪府立大・獣医・応用薬理

【目的】

カロテノイドは肝臓や小腸粘膜上皮細胞でレチノール（ビタミンA）に代謝され、生理作用が生じる。ビタミンAは皮膚の恒常性の維持に重要であると考えられるが、ビタミンAの過剰摂取による慢性的な中毒症状として、嘔吐や下痢とともに皮膚障害を呈することも古くから知られている。一方外用でカロテノイドを使用した場合、代謝を経ないで作用する可能性がある。我々はカロテノイドの1つ、フコキサンチンが皮膚バリアタンパクである Filaggrin や Loricrin を誘導することに加え、肥満細胞形成を阻害することを見出してきた。今回、フコキサンチン(FX)が肥満細胞形成に抑制的に作用することを見出したので報告する。

【方法】

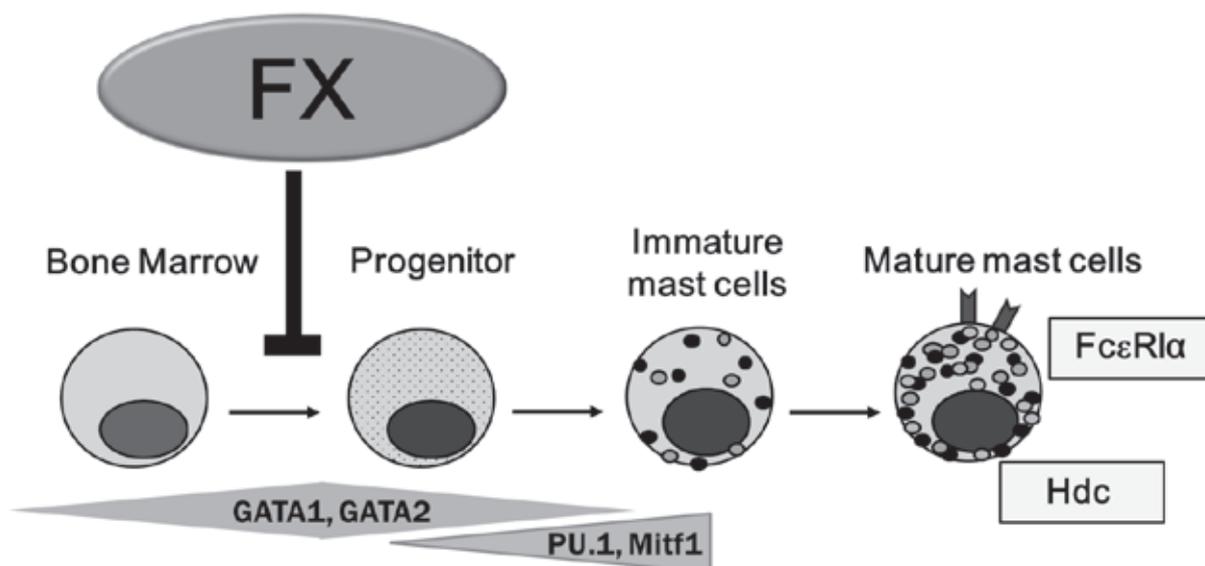
WHEI-3の培養液（IL-3含有）を用い、骨髄細胞を培養した。肥満細胞の分化マーカーはリアルタイムPCRにより評価し、顆粒形成は蛍光免疫化学的に評価した。

【結果】

FXは肥満細胞形成を阻害し、GATA活性に抑制的に作用した。また、GATA1, GATA2の発現抑制を示した。顆粒のマーカーであるトリプターゼの発現抑制もFX暴露により観察された。

【考察】

以上の結果から、FXが肥満細胞形成抑制効果を有し、皮膚のかゆみを抑える新たな成分として産業利用されることが期待される。



B12

Mindin thrombospondin type-1 repeat ドメインにおける C-mannosyl 化による分泌促進

○上田佳奈¹, 井内陽子², 持田沙織³, 村田顕優³, 松井仁淑², 田尻道子⁴, 和田芳直⁴,
井原義人²

¹和歌山県医大・医・学部5年, ²和歌山県医大・医・生化, ³和歌山県医大・医・大学院準備課程, ⁴大阪府立母子医療セ

【目的】糖付加修飾 C-mannosyl 化では、タンパク質の Trp-X-X-Trp モチーフ上のはじめの Trp のインドール環にマンノース 1 分子が直接 C-C 結合で結合する。この修飾の多くは機能モジュール thrombospondin type-1 repeat (TSR) 上で確認されており、補体タンパク質、細胞外マトリクス、神経ガイダンス分子などの分子表面に露出し、何らかの生理的機能を担うと考えられる。多くの TSR タンパク質が多数の機能性サブドメインと多種の糖修飾を含む分泌タンパク質であるのに対し、F-spondin ファミリーの分泌タンパク質 mindin は F-spondin ドメインと TSR ドメインのみからなり、唯一の糖修飾として C-mannosyl 化を含む。そこで mindin をモデルとして C-mannosyl 化がタンパク質分泌におよぼす影響を検討した。

【方法】マウス肺 total RNA 由来の mindin cDNA をクローニングし、myc および His-tag を融合した mindin-wild type (WT) 発現用プラスミドを作製した。さらに C-mannosyl 化修飾をうける Trp₂₈₂ を Phe あるいは Ala に変異させた (mutF あるいは mutA)、非 C-mannosyl 化 mindin 発現用プラスミドを作製した。COS7 をはじめとする複数の細胞株にこれらを導入し、mindin の細胞外への分泌、細胞内局在を Western Blotting、免疫蛍光染色、ショ糖密度勾配遠心法で検討した。また、野生型 mindin の C-mannosyl 化を質量分析法によって確認した。

【結果】Mindin-WT、-mutF、-mutA 発現プラスミドを COS7 細胞に導入した結果、mindin-WT が時間経過とともに細胞外液に蓄積された。細胞外液より His-tag を用いて mindin-WT を精製し、トリプシン消化後に MALDI-TOF-MS、nanoESI-IT-MS によって分析したところ、Trp₂₈₂ における C-mannosyl 化が確認された。一方、mindin-mutF、-mutA の分泌は mindin-WT の 40% に留まり、細胞内への貯留が認められた。このような非 C-mannosyl 化変異による mindin 分泌の低下は他の細胞株でも確認された。また変異 mindin は、chemical chaperone 処理により、分泌抑制の改善が認められた。

Mindin の細胞内分布を検討したところ、野生型 mindin が小胞体および Golgi 体に局在するのに対し、変異型の mindin は小胞体への分布が優位で、Golgi 体への移行が抑制されていた。

【考察】Mindin タンパク質内で比較的安定性の低い TSR ドメインは、その C-mannosyl 化により安定化と小胞体から Golgi 体への移行が促進され、分泌されると考えられた。C-mannosyl 化のない変異型も、chemical chaperone によってこの作用の一部が代償され、分泌量の低い変異型 mindin についても細胞外液からの大量精製が可能となった。今後、mindin がもつ細胞外基質、パターン認識分子、オプソニン化分子としての生理的作用について C-mannosyl 化が果たす機能の解明への利用が期待される。

【文献】 1. Ihara, Y., Inai, Y., Ikezaki, M. (2011) *Trends Glycosci. Glyc.* 23, 1-13
2. Furmanek, A., Hofsteenge, J. (2000) *Acta Biochim. Pol.* 47, 781-9

B13

酵母 *Pkc1* の構成的活性化変異体の過剰発現が細胞死とキチン含量に及ぼす影響

○福井健人、野村 亘、井上善晴
京大・院農・応生科

【目的】動物細胞は少なくとも 10 種類以上のプロテインキナーゼ C (PKC) アイソザイムを持つのに対し、出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) には PKC をコードする遺伝子は *PKC1* しか存在しない。*Pkc1* は C1 ならびに C2 ドメインを持つが、その活性にジアシルグリセロールや Ca^{2+} を必要とせず、*Pkc1* の活性化機構は未だよくわかっていない。出芽酵母において、*Pkc1* はアクチン細胞骨格の制御や、*Mpk1*-MAP キナーゼとともに cell wall integrity (CWI) 経路を形成し、熱ショックストレスなどの細胞壁ストレスに応答して、細胞壁の合成や維持に重要な役割を果たしている。本研究では、これらの役割以外の酵母 *Pkc1* の細胞内機能を探索することを目的として、*Pkc1* の構成的活性化変異体 (*Pkc1*^{R398P}) の過剰発現株の表現型の解析を行った。

【方法】*Pkc1*^{R398P} の過剰発現には *GALI* プロモーターを用いた。蛍光顕微鏡によるミトコンドリアの観察には mtGFP を、液胞の観察には FM4-64 を用いた。*Pkc1*^{R398P} の過剰発現が β -1,3-グルカン含量に及ぼす影響は、*Zymplyase* 処理による細胞のバーストによって評価した。また、*Calcoflour white* を用いて細胞壁のキチン分布を観察した。

【結果および考察】*Pkc1*^{R398P} の過剰発現により、熱ショックストレスがない状態でも *Mpk1* の基礎リン酸化レベルが上昇した。先行研究により、*Pkc1*^{R398P} の過剰発現によって細胞死が起こる¹⁾ことが報告されているが、*mpk1* Δ 株では *Pkc1*^{R398P} の過剰発現による細胞死は抑制された。また、*Mpk1* のキナーゼ活性を持たない変異体 (*Mpk1*^{K54R}) を持つ株でも *Pkc1*^{R398P} の過剰発現による細胞死が抑制されたことから、*Pkc1* の構成的活性化による細胞死には *Mpk1* のキナーゼ活性が必要であると考えられた。一方、*Pkc1*^{R398P} の過剰発現によってミトコンドリアの断片化や液胞のシュリンクといったオルガネラ形態の異常が観察されたが、これらの異常も *mpk1* Δ 株では抑制された。*Pkc1* は細胞壁合成に関与することから、*Pkc1*^{R398P} の過剰発現が細胞壁の主要な構成成分である β -1,3-グルカン含量に及ぼす影響を、細胞壁溶解酵素 *Zymolyase* に対する感受性を指標に検討した。その結果、*Pkc1*^{R398P} 過剰発現株を *Zymolyase* で処理すると、野生株と比較して細胞のバーストが抑制された。しかしながら、*mpk1* Δ 株で *Pkc1*^{R398P} を過剰発現させた場合も *Zymolyase* 耐性を示したことから、*Pkc1*^{R398P} の過剰発現による細胞死に β -1,3-グルカン含量の増加は関与しないと考えられた。次に、キチン合成に及ぼす *Pkc1*^{R398P} の過剰発現の影響を検討した。キチンは酵母細胞壁成分の 1~2%程度しかなく、bud neck や出芽痕に多く分布している。*Calcoflour white* を用いてキチン含量を観察した結果、*Pkc1*^{R398P} 過剰発現株では細胞壁全体が *Calcoflour white* によって強く染色されたが、その変化は *mpk1* Δ 株では観察されなかった。さらに、キチン合成酵素をコードする *CHS3* 欠損株では、*Pkc1*^{R398P} の過剰発現による細胞死が抑制された。*Mpk1* の下流で転写調節される機能未知遺伝子 *PRM5* とそのパラログである *YNL058C* の二重破壊株では、*Pkc1*^{R398P} の過剰発現による細胞死が抑制され、キチン含量の上昇も抑制された。これらのことから、機能未知タンパク質 *Prm5* と *Ynl058c* はキチン合成に関与するとともに、*Pkc1*^{R398P} の過剰発現による細胞死がキチン含量の上昇や分布の異常によって引き起こされる可能性が考えられた。

【文献】 1) Watanabe, Y., Irie, K., and Matumoto, K. (1995) *Mol. Cell. Biol.* 10, 5740-5749.

B14

進化トレース法を用いた *O*-GlcNAc 転移酵素の進化解析

○藤井正興¹, 小島寿夫¹, 伊藤将弘¹

¹立命館大・生命科学・生命情報

【目的】*O*-GlcNAc 転移酵素は *N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc) をタンパク質に付加する *O*-GlcNAc 修飾に関与する。ヒトにおいては、*O*-GlcNAc 転移酵素の失活は、癌や糖尿病などの疾患に関わる。後生動物や緑色植物において *O*-GlcNAc 転移酵素の活性が報告されているが、原核生物では *O*-GlcNAc 転移酵素に関する報告はない。本研究では、進化トレース法¹⁾に基づいた *O*-GlcNAc 転移酵素の解析を行い、予測される *O*-GlcNAc 転移酵素の活性部位を比較することで *O*-GlcNAc 転移酵素が機能を獲得するまでの過程を明らかにした。

【方法】ヒト *O*-GlcNAc 転移酵素をクエリ配列として PSI-BLAST による相同配列検索を行い、得られた配列から配列一致度が 20%以上の配列を選び、UPGMA 法を用いて分子系統樹を作成した。この際、分子系統樹に植物とバクテリアのグループが 2 つあることが確認されたため、進化速度が速いグループをそれぞれ削除したものをデータセットとした。そして、系統樹を配列一致度に基づいてグループに分類し、保存残基の同定を行った。同定された残基をタンパク質の立体構造に表示することで機能部位の予測を行った。マッピングで用いた *O*-GlcNAc 転移酵素の立体構造は、既に立体構造の決定しているヒト *Homo sapiens* (PDBID:4ZG5)と 4ZG5 を基にホモロジーモデリング法で求めた、シロイヌナズナ *Arabidopsis thaliana*, *Aureococcus anophagefferens*, および *Prochlorococcus marinus* である。

【結果】進化トレース解析の結果、生物種間において UDP-GlcNAc が結合する部位付近のアミノ酸は保存されていないことが確認された。そのため UDP-GlcNAc 結合部位の特徴として 3 つの相補性 (立体相補性, 静電相補性および疎水相補性) について解析を行ったところ、*H. sapiens* と *A. thaliana* の結合部位における特徴は類似した。また *A. anophagefferens* では、UDP-GlcNAc 結合部位の立体構造が *H. sapiens* に比べて開いており、*A. anophagefferens* だけが負の静電ポテンシャルにであることが確認された。

【考察】各立体構造において、3 つの相補性を比較した結果と、相同配列検索により *P. marinus* の *O*-GlcNAc 転移酵素類似体が確認された結果から、*O*-GlcNAc 転移酵素類似体は共通祖先から分岐進化をしたと推測された。さらに、*H. sapiens* と *A. thaliana* は異なる進化²⁾を経ているが、それぞれの *O*-GlcNAc 転移酵素は *O*-GlcNAc 修飾という共通の機能を有していることから、UDP-GlcNAc に対する結合部位の構造類似性を保存していると推測した。その一方で、*A. anophagefferens* の *O*-GlcNAc 転移酵素類似タンパク質の結合部位の静電ポテンシャルは負に帯電していたことから、UDP-GlcNAc とは結合しない可能性が高いこと示唆した。従って、*A. thaliana* の *O*-GlcNAc 転移酵素相同タンパク質は、*O*-GlcNAc 転移酵素とは異なる機能を獲得していることが推測した。

【文献】

1. Lichtarge, O., Bourne, HR., Cohen, FE. (1996) *J. Mol. Biol.* 257, 342-358
2. Cavalier-Smith, T. (2010) *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 365, 111-132

B15

出芽酵母 α -マンノシダーゼ AMS1 の活性制御機構の解析

○梅川碧里、槇島一樹、氏原将人、山本祥平、若山守
立命館大・生命

【目的】 *S.cerevisiae* の α -マンノシダーゼである AMS1 は、細胞質内で発現し、選択的オートファジーである Cytoplasm-to-vacuole targeting (Cvt)経路によって液胞へ輸送され、細胞内遊離糖鎖の分解を担う糖加水分解酵素である^{1), 2)}。 *S.cerevisiae* のいくつかの液胞内プロテアーゼなどの酵素は、窒素源飢餓により発現量が増加し、オートファジーによる細胞内へのアミノ酸供給に関わることが報告されているが、AMS1 の活性制御機構及び生理機能は明らかでない。本研究では AMS1 の活性制御機構の解明を試みた。

【方法】 *S.cerevisiae* の野生株、AMS1 の遺伝子欠損株 *ams1* 及び AMS1 の過剰発現株を用いて栄養条件下、糖質飢餓条件下及び窒素源飢餓条件下における *pNP- α -Mannopyranoside* に対する分解活性を測定することによって、AMS1 の細胞内活性を解析した。そして種々のオートファジー関連遺伝子及び栄養ストレス応答関連遺伝子の欠損株における AMS1 の活性誘導レベルを評価した。また、AMS1 のタンパク質発現レベルをウエスタンブロッティングにより解析した。

【結果と考察】 無細胞抽出画分の *pNP- α -Mannopyranoside* 分解活性の解析の結果、糖質飢餓及び窒素源飢餓によって AMS1 の活性が強く誘導されることが明らかとなった。本酵素の活性上昇は、オートファジー及び Cvt 経路に必須な ATG1 の欠損株においては著しく抑制されたが、AMS1 の液胞輸送の際のアダプタータンパク質である ATG19、ATG34 の両遺伝子欠損株においては野生株と同程度であったことから、AMS1 の活性上昇にオートファジー誘導は必要であるが、AMS1 の液胞輸送は必要でないことが示唆された。また、主な栄養ストレス応答因子 TORC1 の阻害剤である Rapamycin の添加によって、AMS1 の細胞内活性及びタンパク質発現量が著しく増加したことから、AMS1 の細胞内活性は TORC1 によってタンパク質の発現レベルで負に制御されていることが示唆された。

【文献】

1. Yoshihisa T and Anraku Y (1990) *J Biol Chem.* 265, 22418-25
2. Chantret I, *et al.* (2003) *Biochem J.* 373, 901-8

B16

コンドロイチン硫酸鎖の発現制御による初期軟骨分化過程の制御機構の解析

○志田美春¹, 橋本翔世¹, 三上雅久¹, 北川裕之¹
¹神戸薬大・生化

【目的】

コンドロイチン硫酸（CS）は、全身の組織の細胞表面や細胞外マトリックスに普遍的に存在する直鎖上の硫酸化糖鎖であり、とりわけ軟骨組織に多く存在する。また、いくつかの CS 生合成酵素の変異や欠損により、重篤な軟骨形成不全にいたることが明らかとなっていることから、CS 鎖が軟骨の機能維持だけでなく、分化制御においても重要な役割を果たしていることが示唆されている^{1,2)}。したがって、CS 鎖による軟骨分化の制御機構の解明は、難治性の軟骨疾患に対する治療法の確立につながることを期待できる。また、このメカニズムの解明には、軟骨分化が多段階過程を経ることから、CS 鎖により制御される分化段階の特定が必要課題である。

これまでに、軟骨の一連の分化過程を再現できる ATDC5 細胞を用いた CS 生合成酵素の発現変動の解析から、コンドロイチン 4-O-硫酸基転移酵素-1 (C4ST-1) およびコンドロイチン N-アセチルガラクトサミン転移酵素-1 (ChGn-1) が、軟骨分化マーカーであるアグリカンおよび II 型コラーゲンに同調した挙動を示すことを見出している。そこで本研究では、これらの CS 生合成酵素の発現を攪乱することにより、CS 鎖により制御される軟骨分化段階の同定および、その段階における CS 鎖の機能の解明を試みた。

【方法】

軟骨分化マーカーに同調した挙動を示す C4ST-1 および ChGn-1 を各々ノックダウン (KD) した ATDC5 細胞を樹立し、各 KD 細胞の軟骨分化段階における分化マーカーの発現変動を解析した。さらに、軟骨の分化過程を制御する骨形成サイトカインである bone morphogenetic protein (BMP) に着目し、細胞凝集過程以降における BMP シグナルの下流の分化イベントの解析を行った。また、CS 鎖と BMP との結合性を、BIACORE を用いて解析した。

【結果・考察】

C4ST-1 および ChGn-1 のいずれの KD においても軟骨分化段階の第一段階である細胞凝集過程以降の分化過程が抑制されることが分かった。さらに、各 KD により、細胞凝集過程以降の分化過程に関与する BMP シグナルの下流イベントが、抑制されることも見出した。また、BIACORE を用いた分子間相互作用により、CS 鎖が BMP と親和性を示すことが明らかとなった。

これらのことから、CS 鎖は BMP の Co-receptor あるいは reservoir として機能することで軟骨分化を制御しており、CS 鎖の発現が時期特異的に制御されることが、この制御において必要不可欠である可能性が示唆された。

【文献】

1. Thiele H., *et al.*, (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 101,10155-10160.
2. Watanabe Y., *et al.*, (2010) Biochem. J., 432, 47-55.

B17

糖脂質硫酸基転移酵素遺伝子の導入によるヒト子宮内膜癌細胞の表現形質の変化

○本田葵¹、田中京子²、青木大輔²、岩森正男³

(¹近大・理工 (現奈良先端大)、²慶應大・医・産婦、³近大・理工)

【目的】

ヒト子宮内膜癌は病的に低分化型と高分化型に分類される。高分化型癌は低転移性であり抗がん剤が効き易く、硫酸化糖脂質を含むという特徴を持っている(1)。高分化型形質と硫酸化糖脂質の関係を調べるために、硫酸化糖脂質を含まない子宮内膜癌細胞に糖脂質硫酸基転移酵素 (GST) 遺伝子を導入し癌細胞の性質の変化を調べた。

【方法】

ヒト子宮内膜癌細胞：硫酸化糖脂質を高発現する HEC-108 と全く発現していない SNG-II 細胞を用いた。両細胞は 10% FCS 含有 DMEM 培地を用い、5% CO₂ 下で培養した。

SNG-II-GST 細胞：HEC-108 細胞の全 RNA より cDNA を調製し、TA クローニングキットを用いて GST 遺伝子の ORF を得、発現ベクター pcDNA3.1/V5-His-TOPO に導入した。DNA 配列を確認後、pcDNA3.1-GST プラスミドをセルフエクト形質転換キットを用いて SNG-II 細胞に導入、G418 選別後、クローニングチャンバーを用いて 5 個のクローン細胞を分離した。各細胞の GST 活性を測定し、最も非活性の高い細胞を SNG-II-GST とした。

細胞の性質：SNG-II および SNG-II-GST について、トリプシン感受性、倍加時間、ヌードマウス皮下移植、抗がん剤感受性試験を行った。糖脂質組成は常法に従って分析した。

【結果と考察】

細胞生物学的特徴：SNG-II と SNG-II-GST の倍加時間は 24 hr、43 hr であり、SNG-II は敷石状に増殖するのに対し、SNG-II-GST は積み重なって増殖し、高頻度にドーム構造を形成した。ヌードマウス皮下への移植生着率は SNG-II が 12/15 であるのに対し、SNG-II-GST は 3/15 であった。移植組織の形態は SNG-II が低分化型、SNG-II-GST は腺構造を持ち高分化型形質を示した。

糖脂質組成：SNG-II の糖脂質組成は GlcCer, LacCer, Gb₃Cer, Gb₄Cer, GM3, GM2 であり、SNG-II-GST はこれらの糖脂質に加え、II³SO₃-LacCer と II³SO₃-Gg₃Cer を含んでいた。SNG-II-GST の両硫酸化糖脂質含有量は全糖脂質の 30%に達していたが、GST の活性増加は糖脂質全体の含有量に影響を与えず組成変化をもたらしていることが分かった。

抗がん剤感受性：抗がん剤パクリタキセルとシスプラチンの作用を MTT 法で測定したところ、両抗がん剤とも SNG-II に比べ、SNG-II-GST の方が感受性であることが分かった。両細胞の MDR1 遺伝子の発現量に大きな違いは見られないことから、硫酸化糖脂質がトランスporter活性を抑制し、感受性化している可能性がある。硫酸化糖脂質は正常内膜の分泌期に腺上皮管腔側に発現し、腺構造の形成や分泌作用に関わっていることが予想されている(2)。今回の実験を通じて、硫酸化糖脂質の発現が細胞の様々な性質を大きく変化させることから、糖脂質の代謝制御を通じて抗がん剤の治療効果を高める方策が生まれることが期待される。【文献】(1) Mikami M et al, *Oncol. Lett.* 1(2010) 113-117. (2) Kubushiro K et al, *Arch. Biochem. Biophys.* 268 (1989) 129-136.

ソウジュツによる初代培養肝細胞の一酸化窒素誘導の効果

○奥山 哲矢¹, 野口 奈央¹, 池谷 幸信², 西澤 幹雄¹¹立命館大・生命・医化学, ²薬・生薬学

【目的】 ソウジュツ(蒼朮)は、キク科オケラ属であるホソバオケラ *Atractylodes lancea*、*A. chinensis* またはそれらの雑種の根茎を乾燥させた生薬である。ソウジュツの薬能は祛風除湿、健脾益気などがあり、薬効は鎮痛、健胃、利尿、止汗が挙げられる。ソウジュツが含まれる漢方処方には、補中益気湯、抑肝散、六君子湯、加味逍遙散、柴苓湯などがある。主要成分は、セスキテルペノイドの β -eudesmol、hinesol、atractylodin などである。ソウジュツは、四塩化炭素を投与したマウスにおいて肝障害を抑制するとの報告があるが、炎症作用については報告されていない。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性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) の産生を促す。本研究では、初代培養肝細胞において IL-1 β によって誘導される NO 産生を指標とし、ソウジュツの NO 産生誘導に与える影響を調べ、活性を持つ成分について検討を行った。

【方法】 ソウジュツをメタノール抽出した後、減圧濃縮によってエキスを得た。このエキスを水に溶解後、酢酸エチルで抽出し、減圧濃縮を行って脂溶性画分 (A 画分) を得た。次に水層を *n*-ブタノール抽出したものを両親媒性画分 (B 画分)、残りの水層を水溶性画分 (C 画分) として凍結乾燥を行った。初代培養肝細胞はコラゲナーゼ灌流法によって Wistar ラットから調製し、一晚培養後、各画分または β -eudesmol (和光純薬、純度 98%) と IL-1 β を同時添加し、37°C、5% CO₂ の条件下で 8 時間培養した。培地中の NO 量を Griess 法で測定し、粗画分と成分の細胞障害性は、培地中に放出された乳酸脱水素酵素活性を測定して確認した。ウェスタンブロット法によって iNOS タンパク質量を測定した。

【結果】

1. ソウジュツ (84.60 g) をメタノール抽出してエキス 28.23 g (100%重量比) 得た。このエキスを分画し、A 画分 10.73 g (38.0%)、B 画分 3.94 g (14.0%)、C 画分 13.56 g (48.0%) を得た。
2. ソウジュツ A 画分および B 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。A 画分の方がより低濃度で NO 産生抑制効果を示した。C 画分では NO 産生誘導抑制効果はみられなかった。各画分の設定濃度範囲内では、細胞障害性は確認されなかった。
3. A および B 画分は、IL-1 β による iNOS タンパク質の発現誘導を濃度依存的に抑制した。
4. HPLC 解析の結果、A 画分に β -eudesmol が多く含まれていた。
5. β -Eudesmol は IL-1 β による NO 産生誘導を有意に抑制した。設定範囲内での細胞障害性は確認されなかったものの、抑制は軽度であった。

【考察】 ソウジュツの A および B 画分はともに IL-1 β による NO 産生誘導を抑制し、A 画分の方がより高い抑制活性を示した。両画分は iNOS タンパク質の発現も抑制したことから、転写レベルまたはそれ以降のレベルで NO 産生誘導を抑制していることが推測された。A 画分に含まれる β -eudesmol も NO 産生誘導を抑制したことから、 β -eudesmol がソウジュツの A 画分における NO 産生誘導の抑制に関係する成分の 1 つであることが示唆された。さらに β -eudesmol 以外にも、NO 産生誘導を抑制する成分が含まれることが示唆された。

B19

シャクヤクとボタンピによる初代培養肝細胞の一酸化窒素誘導に対する効果

○内田 弘子¹, 白井 葵¹, 藤井 愛理¹, 奥山 哲矢¹, 池谷 幸信², 西澤 幹雄¹
¹立命館大・生命・医化学, ²立命館大・薬・生薬

【目的】シャクヤク (*Paeonia lactiflora* Pallas) はボタン科の草本で、コルク皮を除いた根を生薬として用いる。薬能には補血、清熱涼血があり、当帰芍薬散などの漢方処方に配合され、薬効には抗炎症作用、鎮痛がある。主要成分である peoniflorin には抗炎症作用が報告されている。同じボタン科のボタン (*Paeonia suffruticosa* Andrews) は木本で、根皮を生薬のボタンピ (牡丹皮) として用いる。薬能には駆瘀血、清熱涼血があり、大黃牡丹皮湯などの漢方処方に配合され、薬効には抗炎症作用、抗アレルギー作用がある。主要成分には paeonol がある。炎症性サイトカインであるインターロイキン 1β (IL-1β) は、肝細胞において一酸化窒素合成酵素を誘導し、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、肝細胞における NO の産生誘導系を用いて、シャクヤクおよびボタンピが IL-1β による NO 産生誘導に与える影響を調べ、活性を持つ成分について検討した。

【方法】シャクヤクおよびボタンピ (調剤用) をメタノール抽出し、エキスを調製した。このエキスを水に溶解し、酢酸エチル、次いで *n*-ブタノールで分配抽出した。各抽出液をそれぞれ減圧濃縮し、酢酸エチル可溶部 (脂溶性画分、A 画分)、*n*-ブタノール可溶部 (両親媒性画分、B 画分)、水可溶部 (C 画分) に分けた。初代培養肝細胞はコラゲナーゼ灌流法により Wistar ラットから調製し、37°C、5% CO₂ の条件下で一晩培養後、各画分または peoniflorin (東京化成工業)、paeonol (東京化成工業) を IL-1β (1 nM) と同時添加し 8 時間培養した。培地中の NO 量を Griess 法で測定した。薬物の細胞障害性は、培地中に放出された乳酸脱水素酵素活性を測定し確認した、シャクヤクの各画分の構成成分は薄層クロマトグラフィー (TLC) で解析した。

【結果】シャクヤクのメタノール抽出エキス 517.1 g より、A 画分 43.9 g (8.5%)、B 画分 84.8 g (16.4%)、C 画分 320.6 g (75.1%) を得た。ボタンピのメタノール抽出エキス 23.6 g より、A 画分 5.15 g (23.0%)、B 画分 6.10 g (27.2%)、C 画分 11.2 g (49.8%) を得た。ともに画分の乾燥重量の総計を 100% とした。

シャクヤクの A、B 画分は、IL-1β による NO 産生誘導を濃度依存的に抑制し、C 画分は弱い NO 産生誘導抑制を示した。TLC 分析よりシャクヤクでは peoniflorin は主に B 画分に含まれていることがわかった。Paeoniflorin は IL-1β による弱い NO 産生誘導抑制がみられた。いずれも設定濃度範囲内での細胞障害性はみられなかった。

ボタンピの A、B 画分は IL-1β による NO 産生誘導を濃度依存的に抑制したが、C 画分は NO 産生誘導を有意には抑制しなかった。Paeonol では IL-1β による NO 産生誘導を濃度依存的に抑制した。いずれも設定濃度範囲内での細胞障害性はみられなかった。

【考察】シャクヤクおよびボタンピはともに A 画分が最も強く NO 産生を抑制したことから、双方ともに脂溶性成分が NO 産生誘導抑制に最も関与していることが示唆された。一方、paeoniflorin はシャクヤク B 画分に多く含まれていたことから、シャクヤク A 画分には paeoniflorin よりも強い NO 産生誘導抑制活性をもつ成分の存在が考えられた。Paeonol は NO 産生を抑制したため、これを主要成分とするボタンピの NO 産生誘導抑制に関与していることが考えられた。ボタンピでは B 画分も比較的高い抑制活性を示したことから、シャクヤクとは異なる活性成分が配合されていることが示唆された。

B20

フコキサンチンによるアトピー性皮膚炎予防効果

○平宗一郎¹, 松井滂¹, 田邊甫樹¹, 馬屋原慈理¹, 高倉祐希¹, 東泰孝², 藤田隆司¹
¹立命館大・薬・分子薬効毒性学, ²大阪府立大・獣医・応用薬理

【目的】

フコキサンチン(FX)は藻類から抽出できるカロテノイドの一種で、ビタミン A に類似した構造であり、体内でビタミン A に似た作用を示すと言われている。ビタミン A は皮膚への美容効果があると言われており、FX はその美容効果と肌の老化を防ぐ強力な抗酸化作用を併せ持っている。これまで私たちは FX が皮膚バリアタンパク質である Filaggrin(Flg)の発現を増加させ、皮膚の紫外線 (UVA) ダメージに対して保護・治療効果を有することを明らかにしてきた。アトピー性皮膚炎(AD)モデルマウスである Nc/Nga マウスを用いて、皮膚ダメージに対する FX の影響を調べた。

【方法】

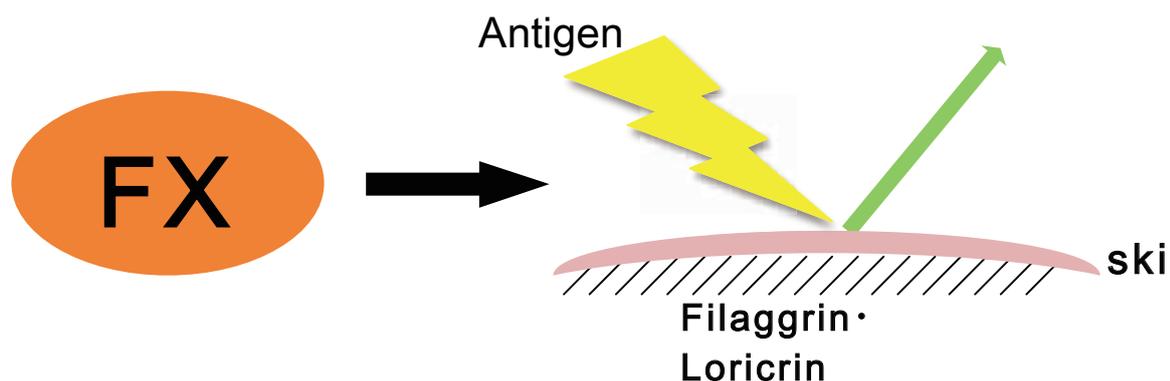
Nc/Nga マウスを用いて、外用塗布による FX の抗アレルギー効果を調べた。マウス背側を除毛し、0.1%含有 FX を塗布した群を、ワセリン塗布群を対象に試験した。塗布は、5週間毎日行った。マウスの行動学的変化は3週経過時にビデオ撮影により記録して搔痒行動をカウントし、5週経過時に安楽死させた後、皮膚及び血液、耳介リンパ節を摘出した。皮膚の免疫染色とウェスタンブロット、および血中の IgE 濃度と耳介リンパ節の浮腫、BrdU の取り込みを測定した。

【結果】

アレルギー症状の進行を示す耳介リンパ節の浮腫及び BrdU の取り込みは、ワセリン、FX 含有ワセリンを塗布した双方の群で有意差はなく、血中 IgE 濃度も双方とも正常値を大きく上回っていた。搔痒行動は FX 含有ワセリンを塗布した群で顕著に抑制された。また、FX 含有ワセリンを塗布した群では、皮膚バリアタンパク質である Flg、Loricrin(Lor)の発現が増加していた。

【考察】

FX により Flg、Lor の発現が増加して皮膚バリアが増強され、アレルギーの侵入を防ぐことができると考えられた。UVA ダメージ試験では、FX は Flg のみ誘導作用が見られたが、AD モデルマウスでは Lor の発現も誘導されていた。AD 症状をきたす皮膚において、バリアタンパク質の発現が高まり、外的因子の皮内侵入を抑制することで、皮膚のダメージを軽減、抑制することが出来ると考えられた。



B21

神経細胞において p38 MAPK および cAMP シグナルは PGC-1 family の発現を制御する

○横川拓海¹, 守村直子², 三品昌美², 藤田隆司³, 田中秀和⁴, 林達也¹, 橋本健志⁵
¹京都大・人環, ²立命館大・総研, ³立命館大・薬学, ⁴立命館大・生命科学, ⁵立命館大・
スポーツ健康科学

【目的】ミトコンドリアは脳の高次機能および健康の維持に必須の細胞内小器官である。そのため、神経細胞におけるミトコンドリア生合成の分子機序の解明は、神経変性疾患の治療法の確立だけでなく、脳の高次機能の分子機序の解明に対する重要な知見をもたらす可能性がある。先行研究は、神経成長因子群 NGF および BDNF が、神経細胞におけるミトコンドリア生合成を亢進させることを報告しており、その分子機序として、ミトコンドリア生合成の決定的因子である peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 (PGC-1) family である PGC-1 α のプロモーター領域への活性化型 CREB の結合が増加することを示唆している。一方、骨格筋細胞においては、筋収縮に伴い活性化する p38 MAPK/ATF2 経路が PGC-1 α の CRE 領域に対し機能的であるとの報告がなされている。以上より、本研究では、初代神経培養細胞における、PKA および p38 MAPK の薬理的な活性化が PGC-1 family の遺伝子発現に及ぼす影響を検討した。

【方法】胎生 18 日齢のラットの大脳皮質および海馬由来の神経細胞を調整した。培養 5-8 日目の神経細胞に対し、H-89 および SB 203580 で 60 分間の pretreatment した後、タンパク質のリン酸化状態の検討のため 90 分間、遺伝子発現の検討のため 16 時間、forskolin および anisomycin 刺激を実施した。その後、神経細胞を回収し、ウェスタンブロット法および real-time PCR による解析を実施した。

【結果】神経細胞への PKA 活性化剤である forskolin の刺激は、CREB 及びリン酸化を亢進した一方、ATF 2 のリン酸化を減少させた。PKA 阻害剤である H-89 は forskolin の CREB および ATF 2 のリン酸化状態への効果を抑制した。16 時間の forskolin 刺激は、PGC-1 α の遺伝子発現を抑制し、H-89 によりその効果は抑制され、PGC-1 β および PRC の遺伝子発現への効果は見られなかった。一方、神経細胞に対する p38 MAPK 活性化剤である anisomycin の刺激は、p38 MAPK および ATF2 のリン酸化を亢進させ、p38 MAPK 阻害剤である SB 203580 により、anisomycin の p38 MAPK および ATF2 への効果は抑制された。16 時間の anisomycin 刺激は、PGC-1 α , PGC-1 β , PRC の遺伝子発現を増加させ、SB 203580 によりその効果は減弱された。

【考察】神経細胞に対する forskolin 刺激は、CREB のリン酸化を増加させが、PGC-1 α の遺伝子発現を減少させたことから、先行研究とは異なり、PKA/CREB 経路は PGC-1 α の抑制因子として作用する可能性が示唆された。一方、Anisomycin 刺激は、p38 MAPK ならびに ATF2 のリン酸化および、PGC-1 family の遺伝子発現を増加させ、その効果が SB 203580 により減弱したことから、神経細胞においても、p38 MAPK/ATF2 経路が、PGC-1 family の遺伝子発現を増加させることが示唆された。以上より、神経細胞において、PKA/CREB 経路および p38 MAPK/ATF2 経路の相互作用により、PGC-1 family の遺伝子発現の制御がなされている可能性が示唆された。

C1

表面マーカーSca1 と CD34 による体細胞初期化成功群と不成功群の解析

○大矢知佳¹, 十河孝浩², 重野麻子¹, 馬場藍¹, 植山萌恵¹,
小原惇¹, 成川智貴¹, 野津遼祐¹, 早川千尋¹, 川村晃久¹

¹立命館大・院生命科学・生命医科, ²京都医療センター展開医療研究部

【目的】体細胞を初期化することで人工多能性幹(iPS)細胞を作製する技術は、再生医療の切り札として注目されている一方で、その実用化に向けて安全性の検証や初期化のメカニズム解析が求められている。しかし、初期化(=iPS細胞形成)に成功しiPS細胞が形成される効率が低いため詳細な解析が困難であることが問題になっている。

我々はこれまでの研究から、初期化過程の早期から発現する表面マーカーSca1,CD34を見出し¹⁾、これを指標に初期化過程で将来的にiPS細胞になる可能性の高い細胞に標的を絞った解析を行っている。本研究では、これまで初期化に関連すると報告された表面マーカーと比較したり、あるいは、Sca1,CD34をもとに細胞を分画することにより、iPS細胞形成過程の特徴を遺伝子レベルで解析する。

【方法】野生型C57BL/6マウスの胎生13.5~14.5日の胎児から線維芽細胞(mouse embryonic fibroblasts, MEFs)を採取して、iPS細胞を作製するための体細胞として用いた。MEFsにレトロウイルスを用いて初期化4因子(Oct4、Sox2、Klf4、cMyc; 4F)を発現させ²⁾、初期化誘導過程の早期から後期までを、2つの表面マーカーSca1とCD34に着目して解析を行った。誘導5,7,9,12日目に、セルソーターで細胞選別を行いRNAを採取したり、細胞培養を再開し、フローサイトメトリー、免疫染色、QPCRを用いた解析を施行した。

【結果】Nanog陽性iPS細胞コロニーは、誘導5日目におけるSca1/CD34二重陰性細胞群から主として出現すること、Sca1/CD34二重陽性細胞群からはほとんど出現しないことが判明した。Sca1/CD34二重陰性細胞群は、培養再開後、間葉上皮移行に関連する遺伝子の発現が上昇し、p53標的遺伝子の発現が低下した。さらにマイクロアレイによる網羅的な遺伝子発現解析により、クロマチン修飾やDNA代謝経路など種々のカテゴリーにおいて重要な遺伝子群の発現誘導が確認された。

【考察】初期化に成功する細胞の運命が誘導5日目頃の早期から決定されつつあることが判明した。初期化過程で出現する多様な細胞集団の中で、Sca1/CD34二重陰性細胞群は、早期に判定できる初期化成功候補集団として重要な細胞ソースとして考えられる。また、初期化成功群と失敗群の間で、明らかに遺伝子発現のパターンが異なっており、現在、代謝関連遺伝子とその制御因子である核内受容体に着目して解析を進めている。正常な体細胞と比べて、増殖の盛んな癌細胞や多能性幹細胞では代謝の仕組みが異なっていることが近年の研究から明らかになりつつあり、初期化過程で代謝制御の変化が初期化成功に重要であると考えられる。

【文献】 1. Kida YS*, Kawamura T*, et al. ERRs mediate a metabolic switch required for somatic cell reprogramming to pluripotency. (*Equal co-first) *Cell Stem Cell* Epub ahead of print
2. Kawamura T et al. Linking the p53 tumour suppressor pathway to somatic cell reprogramming. *Nature* 2009; 460: 1140-1144.

C2

Gata6、Oct4、Sox2 を用いたマウス胎児線維芽細胞からの多能性の誘導

○小原惇¹，重野麻子¹，植山萌恵¹，大矢知佳¹，成川智貴¹，
野津遼祐¹，早川千尋¹，馬場藍¹，十河孝浩²，川村晃久¹

¹立命館大・院生命科学・生命医科，²京都医療センター展開医療研究部

【目的】人工多能性幹(iPS)細胞は多能性幹細胞特異的遺伝子である Oct4、Sox2 と癌遺伝子 Klf4、cMyc を組み合わせて体細胞へ発現させることにより樹立される。悪性腫瘍発症の危険性を最小限にするため癌遺伝子を用いずに iPS 細胞を樹立する方法の開発は、臨床応用に向けた重要な課題である。Oct4、Sox2、Klf4 の3因子(3Fs)による iPS 誘導は可能であるが、Klf4 を除いた2因子のみによる誘導は難しく、がん抑制遺伝子 p53 のノックダウンを併用するなどの工夫を必要とする¹⁾。そこで癌遺伝子を用いない初期化因子の新たな組み合わせによる iPS 細胞誘導法の開発を試みた。

【方法】野生型 C57BL/6 マウスの胎生 13.5~14.5 日の胎仔から線維芽細胞(mouse embryonic fibroblasts, MEFs)を採取して、多能性を誘導するための体細胞として用いた。この MEFs に Oct4、Sox2 およびエピプラストステムセルマーカージェン²⁾の一つである Gata6 をレトロウイルスにより遺伝子導入し、iPS 細胞の誘導を行った。形成されたコロニーから iPS 細胞を樹立し、免疫染色、Q-PCR、AP 染色により未分化マーカージェンの発現を確認した。また、免疫染色、Q-PCR、テラトーマ形成実験により分化能を有しているか否かを確認した。

【結果】新たな初期化因子の候補である GATA6 と、そのファミリーのひとつ GATA4 が初期化効率に及ぼす影響を検証する目的で、Oct4/Sox2/Klf4 (3Fs)に GFP、GATA6、GATA4 のいずれかを組み合わせて iPS 細胞誘導を行った。その結果、3Fs と GATA4 を導入したところ Nanog 陽性コロニー数は低下したが、GATA6 はコロニー数に影響を及ぼさなかった。次に Oct4、Sox2 の2因子(2Fs)に加えて GATA6、GATA4 を導入したところ、2Fs+GATA6 を導入した MEFs からアルカリフォスファターゼ陽性のコロニーが誘導された。さらに 2Fs+GATA6 を用いて誘導した細胞は Nanog 陽性のナイーブ型コロニーとして維持され、アルカリフォスファターゼ陽性であることも確認された。この細胞株を用いて *in vitro* における分化誘導を行ったところ、免疫染色や Q-PCR 解析の結果、三胚葉マーカージェンが陽性であることが確認された。さらに、免疫不全マウスの皮下に細胞移植することでテラトーマが形成され、*in vivo* における多能性を有していることも確認された。

【考察】以上の結果から、GATA4 は 3Fs による iPS 細胞誘導効率を低下させるが GATA6 は影響を及ぼさないことが示唆された。また GATA6、Oct4、Sox2 によってマウス胎児線維芽細胞から誘導された細胞は自己増殖能および三胚葉への分化能を有することから多能性幹細胞であると考えられる。

- 【文献】 1. Kawamura T et al. *Nature* 2009; 460: 1140-1144.
2. Tesar PJ et al. *Nature* 2007; 448: 196-199.

C3

新規ヒト iPS/ES 細胞マーカー抗体のエピトープの同定と結合特異性の解析

○中尾広美¹, 松本尚悟¹, 豊田英尚², 川端健二³, 瀧 孝雄⁴, 川寄伸子¹, 川寄敏祐¹

¹立命館大・糖鎖工学研究センター,²立命館大・薬・生体分析化学,

³医薬基盤研・創薬基盤研究部,⁴新潟薬大

【目的】近年ヒト iPS/ES 細胞による再生医療はめざましい発展をとげ、すでに臨床治療が始められているが、これらの細胞の品質・規格をどのように確保するか、移植後にがん化するおそれのある未分化細胞の再生組織への混入の可能性をいかにして除くかなどの課題も指摘されている。我々が最近開発した2種の新規なヒト iPS/ES 細胞マーカー抗体 (R-10G および R-17F) は、これらの課題の解決に貢献できる可能性を有しており、研究の進展が期待されている¹⁾。このうち、R-17F は、大変興味あることに、ヒト iPS/ES 細胞に対して強い細胞傷害活性をもつことを明らかにしている。本研究ではこの R-17F により認識されるヒト iPS 細胞表面のエピトープ (抗原) の解析と R-17F 抗体の結合特異性の解析を行ったので、これらの結果について報告する。

【方法】R-17F のヒト iPS/ES 細胞への結合を蛍光免疫組織染色法により調べると、細胞表面全体が強く染色された。しかし、細胞の RIPA buffer 可溶化物を SDS-PAGE/Western blot で調べると陽性バンドはほとんど観察されなかった。この結果は、R-17F の抗原が細胞表面の脂質性分子であることを示唆している。そこで、ヒト iPS より抽出した全脂質を $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (65/25/4, v/v/v) を展開溶媒として TLC 分画したのち、PVDF 膜に blot し、R-17F による免疫染色を行うと、Rf 値約 0.1 の位置に1本の陽性バンドが観察された。この位置には通常脂質染色で検出されるバンドは観察されず、R-17F 抗原は微量成分と考えられた。分取用 TLC を行い、陽性バンドより脂質成分を抽出し、これを精製 R-17F 抗原とした。次に、この精製標品について、1) MALDI-TOF MS 分析、 MS^2 , MS^3 分析、2) 特異性既知の各種糖鎖認識抗体に対する反応性の解析、3) 抗原活性に及ぼすグリコシダーゼ消化の影響の解析を行い R-17F 抗原の構造を推定した。また、4) R-17F の糖鎖結合特異性を、neoglycolipid 化した13種の化学合成オリゴ糖鎖を用いた糖鎖マイクロアレイ法により解析した。

【結果】1) R-17F 抗原の MS 分析により得られたスペクトラムの全てのシグナルは Fuc-Hex-HexNAc-Hex-Hex-Cer およびその部分構造と推定された。 MS^2 , MS^3 分析の結果もこれを支持していた。2) フコース結合レクチン (AAL) および抗血液型 H1 (O) 抗原抗体と反応したが、抗-Lewis x 抗体、抗-Lewis a 抗体、抗 SSEA-3 抗体、抗 SSEA-4 抗体、抗血液型 H2 (O) 抗原抗体とは反応しなかった。3) 抗原活性は α 1-2 フコシダーゼ処理により消失した。4) R-17F は Fuc (α 1-2)Gal (β 1-3)GlcNAc (β 1-3)Gal (β 1-4)Glc に最も強く、ついで Fuc (α 1-2)Gal (β 1-3)GlcNAc (β 1-3)Gal に結合した。

【考察】以上の結果はヒト iPS 細胞表面の R-17F 抗原は Fuc (α 1-2)Gal (β 1-3)GlcNAc (β 1-3)Gal (β 1-4)Glc-Cer であり、R-17F 抗体のエピトープは Fuc (α 1-2)Gal (β 1-3)GlcNAc (β 1-3)Gal (β 1-4)であることを示している。本抗原糖鎖は Lacto-N-fucopentaose 1 (LNFP1) と呼ばれ、血液型 H1 (O) 抗原あるいは SSEA-5 としても知られている。

【文献】

1. Kawabe, K. et al., (2013) Glycobiology 23, 322-336

C4

コンドロイチン硫酸鎖による骨格筋分化・再生過程の制御メカニズムの解析

○山田敦子¹, 佐藤加菜¹, 松浦伸明¹, 三上雅久¹, 北川裕之¹

¹神戸薬大・生化

【目的】骨格筋は、多核の筋線維(筋細胞)から構成され、再生能力の高い器官であるが、筋ジストロフィーなどの筋原性疾患では、筋線維の再生が崩壊のスピードに追いつかず、次第に筋の萎縮が進行する。これら筋疾患の発症原因は遺伝性のものをはじめ多岐に渡ることから、根本的な治療法がないのが現状である。一方で、骨格筋の再生能力を効果的に促進させることができれば、筋萎縮の進行を遅延させることが可能となり、多くの筋疾患において症状の改善が十分期待できる。したがって、骨格筋の分化・再生過程の共通ステップである“筋芽細胞の細胞融合による多核の筋線維形成”の分子基盤を理解することは重要な課題であるが、未だ不明な点が多い。これまでに我々は、硫酸化グリコサミノグリカンの一つであるコンドロイチン硫酸 (CS) 鎖の発現が不十分な受精後間もない初期胚では、多核化を伴う細胞質分裂異常に陥ることを明らかにしている^{1,2)}。このことは、初期胚の細胞分裂が正常に進行する上で一定レベルの CS 鎖の発現が必要不可欠であることを意味するが、見方を変えれば、CS 鎖の発現レベルの低下が細胞融合を経る多核化過程に共通の作動原理である可能性を想起させた。そこで我々は、骨格筋分化・再生過程における CS 鎖の発現レベルの意義に着目した³⁾。

【方法】C2C12 細胞の骨格筋分化誘導系を利用し、細菌由来の CS 分解酵素であるコンドロイチナーゼ ABC (ChABC) によって、培養系に発現する CS 鎖を一過的に除去した場合や、内在性の CS 生合成・分解酵素遺伝子の発現を攪乱した場合において、多核の筋管形成の程度や細胞内シグナル系に与える影響を評価した。また、カルジオトキシン投与による筋損傷モデルや筋ジストロフィーモデルマウスである *mdx* マウスに ChABC を投与することで、筋再生や病態の改善に効果があるかどうかを検証した。

【結果・考察】C2C12 細胞の骨格筋分化過程における CS 鎖の発現レベルを経時的に分析したところ、分化誘導後の初期段階では増加するが、融合・多核化を伴う筋管形成期においては減少に転じることがわかった。この時期特異的な CS 鎖の減少は、CS 鎖の分解に関わる *HYAL1* の発現レベルとよく一致した。また、CS 鎖の発現レベルを強制的に減少させる実験系では、いずれも C2C12 細胞の筋分化が促進されたこと、さらに筋形成・再生過程に重要なホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ/Akt (PI3K/Akt) 経路が CS 鎖の減少に呼応して活性化されたことから、CS 鎖の発現レベルの低下は、骨格筋分化を進行させる上で細胞自律的に制御される重要なイベントであると考えられた。興味深いことに、ChABC を筋肉内へ直接投与すると、筋損傷モデルや *mdx* マウスにおいて、それぞれ筋再生の促進や一過的な病態の緩解が観察された。これらの結果は、CS 鎖の発現制御が、骨格筋分化過程の分子機構解明の一助となるだけでなく、筋疾患に対する新たな治療戦略になりうることを示唆する。

【文献】

1. Mizuguchi, S., *et al.* (2003) *Nature* 423, 443-448.
2. Izumikawa, T., *et al.* (2010) *J. Biol. Chem.* 285, 12190-12196.
3. Mikami, T., *et al.* (2012) *J. Biol. Chem.* 287, 38531-38542.

C5

Anosmin-1 の血管形成におけるシグナル伝達経路の解析

○松島章子¹, 清水昭男², 近藤真菜美¹, 浅野弘嗣², 瀬尾美鈴^{1,2}

¹京産大・院・生命科学, ²京産大・総合生命・生命システム

【目的】神経発生と血管形成は深く関わっており、神経発生時には血管からの酸素や栄養供給が重要であり、神経発生時の軸索ガイダンス分子とその受容体は血管形成にも深く関わっているということが知られている¹。Anosmin-1 は分子量約 100kDa の分泌タンパク質でヒト発生期において軸索ガイダンス分子として嗅感覚神経、鋤鼻神経、僧坊神経に誘引シグナルを伝達し、結果として嗅球の形成に貢献している。また、Anosmin-1 の神経における受容体は線維芽細胞増殖因子受容体 1 (FGFR1) であるという報告がある²。しかし、Anosmin-1 が血管内皮細胞におよぼす生理活性は報告されていない。本研究では、血管内皮細胞に対する Anosmin-1 の生理活性を検証し、血管内皮細胞における Anosmin-1 の受容体が FGFR1 であるかを解析した。

【方法】2種類の血管内皮細胞であるヒトの臍帯静脈由来血管内皮細胞 HUVEC とマウス的大脑皮質微小血管内皮細胞 bEnd3 を用いて、Anosmin-1 の管腔形成能を 3D sprout assay において検証した。また、FGFR 阻害剤 (AZD4547) や FGFR1 を過剰発現させた bEnd3 および HUVEC を用いた場合の Anosmin-1 の管腔形成促進作用を 3D sprout assay で、そして Anosmin-1 が FGFR1 の自己リン酸化を引き起こすかどうかを Western Blotting によって検討した。

【結果】3D sprout assay によって管腔形成能を検証したところ HUVEC、bEnd3 において Anosmin-1 は管腔形成を促進した。また FGFR1 のリガンドである FGF2 でも管腔形成を促進した。両方の血管内皮細胞に FGFR1 を過剰発現させると、FGF2 は管腔形成 (突起の数) を増加させたが、Anosmin-1 は管腔形成を増加させなかった。さらに、FGF2 刺激による管腔形成は FGFR 阻害剤によって抑制されたが、Anosmin-1 刺激による管腔形成は抑制されなかった。Anosmin-1 が FGFR1 の自己リン酸化を引き起こすかを Western Blotting によって検証したところ、両方の血管内皮細胞において Anosmin-1 は FGFR1 の自己リン酸化を引き起こさなかった。

【考察】以上の結果から、Anosmin-1 は血管内皮細胞において管腔形成を促進するが、Anosmin-1 の受容体が FGFR1 である可能性は低いと考えられた。当研究室の他の実験において、Anosmin-1 による管腔形成に PKC およびその上流の PLC γ の活性化が関与している可能性があることを示している。PLC γ は血管内皮細胞の増殖と管腔形成において重要であり、VEGFR2 では 1175 番目、FGFR1 では 766 番目のリン酸化チロシンに PLC γ の SH2 ドメインが結合することで活性化され PKC を含む下流へのシグナルを伝達する。しかし、今回の実験の結果から、FGFR1 が Anosmin-1 の受容体として PLC γ を活性化している可能性は低いと考えられる。今後の実験では血管内皮細胞における Anosmin-1 の受容体を同定するために、Anosmin-1 刺激した際 PLC γ に結合し PLC γ を活性化させる FGFR1 以外のチロシンキナーゼを探索していこうと考えている。

- 【文献】
1. Licht T, Eavri R, Goshen I, Shlomai Y, Mizrahi A, Keshet E. (2010) Development. 137,261-71
 2. Ayari B, Soussi-Yanicostas N. (2007) Dev Genes Evol. 217,169-175

C6

神経分化過程における小胞体関連分解構成因子 SEL1L の役割

○齋藤僚^{1,2}, 川田浩一², 山口大貴¹, 大熊康修², 藤田典久¹

¹立命館大・薬・情報薬理, ²千葉科学大・薬・薬理

【目的】小胞体は、多くの分泌型タンパク質や膜結合型タンパク質の合成・成熟の場として知られている。細胞内外からのストレスに対する小胞体を起点とした種々のストレス反応は「小胞体ストレス応答」と呼ばれ、細胞内環境の恒常性維持においても重要な役割を担う。これまでの研究で、我々は神経幹細胞時における小胞体ストレス負荷が、グリア細胞への分化を抑制し、神経細胞への分化を促進することを見出した¹⁾。一方、小胞体ストレス応答によって誘導される SEL1L (Suppressor Enhancer Lin12/Notch1 Like) は、小胞体関連分解 (Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation; ERAD) 機構の構成因子の一つであり、同機構においてはユビキチンリガーゼ HRD1 と複合体を形成し、ユビキチンが付加される基質タンパク質の認識を担う“Gatekeeper”としての役割を果たす。一方、SEL1L の相同分子種である線虫 SEL-1 は、Lin12/Notch の代謝回転を制御することで、Notch シグナル活性を抑制することが知られている。しかしながら、神経分化過程における SEL1L の生理機能については未だ不明な点が残されている。本研究では、マウス胚性腫瘍細胞 P19 による神経分化誘導モデルを用いて、SEL1L 発現抑制による神経分化への影響を検討した。

【方法】マウス胚性腫瘍細胞 P19 は多分化能を有する細胞であり、*all-trans* レチノイン酸への暴露により神経系細胞へと分化誘導を行うことが可能である。神経分化過程における SEL1L の生理機能を解析するため、胚細胞から神経系細胞への分化誘導時において RNA 干渉法による SEL1L の発現抑制を行った後、分化誘導 4 日目および 8 日目における各種遺伝子発現量とタンパク質量の解析を行った。

【結果】分化誘導 4 日目において、神経幹細胞マーカーである Nestin のタンパク質量を解析した結果、SEL1L の発現抑制に伴う有意な変化は認められなかった。また、Notch シグナル関連因子の解析を行った結果、SEL1L 発現抑制による Notch シグナルの活性化や、その下流の神経分化抑制因子である Hes1-mRNA および Hes5-mRNA の発現量に有意な変化は認められなかった。一方、神経分化促進因子である Math1-mRNA および Math3-mRNA の有意な減少が認められた。さらに、分化誘導 8 日目における各種神経系マーカータンパク質の発現量を解析した結果、SEL1L の発現抑制により幼若神経細胞マーカーである Doublecortin および Tuj-1 の有意な減少が認められた。また、分化誘導 8 日目においては、SEL1L の発現抑制による Notch3 の活性化が認められた。

【考察】以上の結果より、小胞体関連分解構成因子のひとつである SEL1L は、神経幹細胞から神経細胞への分化過程において Math1 および Math3 を介した神経分化誘導シグナルに関与する可能性が示唆された。また、SEL1L の発現抑制により、神経幹細胞の分化系譜が Notch3 の活性化を介したグリア細胞への分化に傾く可能性が示唆された。

【文献】1) Aberrant neuronal differentiation and inhibition of dendrite outgrowth resulting from endoplasmic reticulum stress. Kawada K, Iekumo T, Saito R, Kaneko M, Mimori S, Nomura Y, Okuma Y. *J Neurosci Res.* 92: 1122-33 (2014).

C7

卵巣明細胞腺癌における PP2A を介した PI3K 経路と Ras pathway 経路のクロストーク

○高井雅聡¹, 中川孝俊², 田辺晃子¹, 寺井義人¹, 大道正英¹, 朝日通雄²
¹大阪医科大学 医学部 ¹産婦人科学教室, ²薬理学教室

【目的】卵巣癌は婦人科癌の中で最も予後不良の悪性腫瘍として知られている¹⁾。卵巣癌は組織学的に漿液性、類内膜、粘液性、明細胞腺癌の4種類に大きく分類されるが、明細胞腺癌は白金製剤に耐性を示す事が多く、特に予後不良である。上皮系悪性腫瘍に対する分子標的薬の開発は進歩してきており、PI3K pathway と Ras pathway が上皮系悪性腫瘍における治療の標的になると考えられている。卵巣癌における PI3K pathway の活性と予後不良との関係があると報告もされている²⁾。そこで今回我々は、卵巣明細胞腺癌細胞株を用いて HIF-1 α の発現意義と機能解析を行った。

【方法】ヒト卵巣漿液性腺癌細胞株 A2780、A2780cp、CaOV3、SkOV3 とヒト卵巣明細胞腺癌細胞株 RMG-1 と、RMG-1 に Rapamycin (mTOR 阻害薬)を24時間添加した細胞を用いた。また、RMG-1 の Rapamycin 耐性株 (RMG-1RR) ならびに RMG-1 の HIF-1 α 恒常発現抑制株 (RMG-1HKD) を作製した。①HIF-1 α の発現について、②増殖能について、③タンパク発現について、④PP2A 活性について、⑤抗腫瘍効果について *in vitro* ならびに *in vivo* で実験を行った。

【結果】RMG-1 では HIF-1 α が恒常的に高発現していた。HIF-1 α を抑制した RMG-1HKD では細胞増殖能が亢進した。HIF-1 α を抑制することで PP2A の活性が抑制され、MEK ならびに ERK のリン酸化が亢進した。mTOR 阻害薬単剤を使用する場合よりも、MEK 阻害薬を併用することで、より効果的な抗腫瘍効果が得られた。

【考察】卵巣明細胞腺癌のように HIF-1 α が高発現している悪性腫瘍に対し mTOR 阻害薬単剤を使用する場合、同時に HIF-1 α を抑制することになり、結果的に Ras pathway が活性化されることになる。したがって、MEK 阻害薬を併用することで、より効果的な抗腫瘍効果が得られる可能性が示唆された。

【文献】 1. Edwards BK, et. al. *J Natl Cancer Inst.* 2005 ;97(19):1407-27.
2. Tanaka Y, et. al. *Cancer Biol Ther.* 2011 ;11(1):50-7.

VEGF-A/NRP1 シグナルの阻害はがん細胞の増殖と転移を抑制する

○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

【目的】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。VEGF-A を標的とした抗体医薬アバスチンは、VEGF-A と血管内皮細胞に発現する受容体 VEGFR2 との結合を阻害し、腫瘍血管新生を抑制することによる抗腫瘍効果が期待されたが、臨床においてその奏功は多く報告されていない。我々はこれまでの研究から、VEGF-A はがん細胞に発現する膜貫通型受容体である Neuropilin-1 (NRP1) に結合し、足場タンパク GIPC1 と RhoGEF である Syx の複合体形成を誘導することで RhoA を活性化し、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。アバスチンの奏効率の低さは 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、抗腫瘍効果を示す新しい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、前立腺がん株 PC3M、Glioblastoma の U87MG 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。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、浸潤能の評価には transwell assay system を用いた。VEGF-A/NRP1 シグナルの解析は共免疫沈降法およびウェスタンブロットを用いた。in vivo における NRP1 シグナルは、shRNA により NRP1 発現を安定的に抑制したがん細胞をマウスへ移植し、腫瘍体積、腫瘍内微小血管密度 (MVD) およびリンパ節への転移を評価した。

【結果】NRP1 の細胞内領域の末端の 3 つのアミノ酸 Ser-Glu-Ara (SEA) は、足場タンパク質である GIPC1 と相互作用することが報告されている¹。VEGF-A と NRP1 が結合すると、NRP1 と GIPC1 の結合量が増加した。続いて、NRP1/GIPC1 の結合量が増加すると GIPC1 と RhoGEF の Syx が複合体を形成し、GIPC1/Syx 複合体は Syx の RhoA を活性化した。GIPC1 と Syx の発現を siRNA で抑えると RhoA の活性化は起こらず、がん細胞の増殖と浸潤も抑制された。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、がん細胞のコロニー形成能は 20~40%、浸潤能は 20~50%に抑制された。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。マウスへの移植実験においては、shNRP1 を処理したがん細胞は腫瘍体積、MVD およびリンパ節への転移がコントロールに比べてそれぞれ 50%、25%に減少した。また、NRP1 の正常型、細胞内領域を欠損させた変異体 (Δ SEA) を、shNRP1 を処理したがん細胞に過剰発現させると正常型を発現させたものは腫瘍体積、MVD、リンパ節への転移が促進されたが、 Δ SEA を発現させた場合は促進されなかった。

【考察】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する。

【文献】 1. Ling, Wang., Debabrata, Mukhopadhyay, and Xiaolei Xu. (2006) *FASEB J* **20**, 1513-1515.

C9

P5 活性阻害剤のスクリーニングおよび癌細胞からの MICA の分泌に及ぼす影響

○堀部智久、鳥澤亜矢、川上浩司

京都大・院医・薬剤疫学

【目的】 Protein disulfide isomerase (PDI) P5 は、PDI ファミリータンパク質の一つであり、PDI と同様に細胞内の新生タンパク質の折りたたみに重要なジスルフィド結合の形成、還元、異性を触媒し、構造形成が誤ったタンパク質を特異的に認識してその構造形成を助けるシャペロンとしても機能する多機能性タンパク質であると考えられている。近年、P5 は、免疫細胞が癌細胞を認識し、細胞障害活性を発揮する際に重要な MHC class I chain-related gene A (MICA) と癌細胞表面で結合し、可溶性 MICA の分泌に重要な働きをすることが判明した¹⁾。可溶性 MICA の分泌により癌細胞の免疫細胞からの回避が促進されるメカニズムが明らかとなったことから¹⁾、P5 の人為的な制御は、新たな抗癌療法の標的としての可能性が期待される。

【方法】本研究では、京都大学 医学研究支援センターの構造および機能既知化合物ライブラリー（約 2000 化合物）を用いて、96well プレート上のインスリン比濁法²⁾により P5 のインスリン還元活性を阻害する化合物のスクリーニングを行った。一次スクリーニングで得られた化合物に対して、さらに二次、三次スクリーニングを行い、2つの候補化合物を同定した。これら同定した化合物による、P5 を含む PDI ファミリータンパク質の活性に及ぼす影響をインスリン比濁法²⁾により、癌細胞からの可溶性 MICA の分泌に及ぼす影響を ELISA を用いて、さらには、癌細胞に対する殺細胞効果を WST-8 assay により検討した。

【結果】化合物ライブラリーを用いたスクリーニングの結果、二つの候補化合物（anacardic acid および NSC74859）を同定した。興味深いことに、これら二つの候補化合物のうち、NSC74859 は、P5 を含む PDI ファミリータンパク質（PDI、P5、ERp57 およびチオレドキシン）の活性を阻害し、anacardic acid は、P5 の活性を特異的に阻害することが判明した。これら候補化合物の関連、類似骨格を有する化合物を用いて、活性阻害を調べたところ、P5 の活性阻害に重要と考えられる基本骨格が確認された。さらに、候補化合物の癌細胞からの可溶性 MICA の分泌に与える影響を調べたところ、anacardic acid は、可溶性 MICA の分泌のレベルを減少させることが確認された。さらに、これら同定された候補化合物はいずれも癌細胞に対して、殺細胞効果を有することが確認された。

【考察】以上の結果から、本研究のスクリーニングで同定された化合物は、P5 の活性阻害剤として機能し、癌細胞からの可溶性 MICA の分泌を減少させることができ、癌細胞表面の P5 を標的とした新たな抗癌標的療法の候補化合物として有用であると示唆される。

- 【文献】
1. Kaiser, BK., Yim, D., Chow, IT., Gonzalez, S., Dai, Z., Mann, HH., Strong, RK., Groh V., Spies, T. (2007) *Nature* 447, 482-486.
 2. Smith, AM., Chan, J., Oksenberg, D., Urfer, R., Wexler, DS., Ow, A., Gao, L., McAlorum, A., Huang, SG. (2004) *J Biomol Screen.* 9, 614-620.

C10

Hippo 経路を制御する TRIM/RBCC タンパク質 TRIM3 の機能解析

○芦野佳那子、道上康平、西良太郎、堀利行

立命館大学・生命科学研究科・生命科学専攻・生命医科学・病態細胞生物学研究室

Hippo 経路は、はじめショウジョウバエにおいてがん抑制リン酸化シグナル伝達系として発見された。Hippo 経路は哺乳類細胞においてもよく保存されており、これまでに、臓器サイズの制御に加え、細胞増殖、細胞の生死、細胞極性の決定や細胞分化とも密接にかかわることが示唆されている。Hippo 経路の機能不全はヒト癌症例で高頻度に認められていることから、この経路がヒトにおいてもがん抑制に重要な機能を担っていることは明らかである。Hippo 経路は細胞間接着をはじめとする多様な上流シグナルによって制御されていると考えられるが、我々はヒト細胞におけるこの経路の中核分子である LATS2 リン酸化キナーゼに注目し機能解析を行ってきた。これまでに LATS2 と相互作用する分子として TRIM/RBCC タンパク質である TRIM3 を同定し、TRIM3 が LATS2 の安定化を促進することにより Hippo 経路を正に制御することを見出したが、その詳細な分子機構は不明であった。その一方で最近、Li らにより他のユビキチン E3 リガーゼである DCAF1 が LATS2 のユビキチン化を増強することにより、LATS2 を分解または不活化させるという報告がなされた(Cancer Cell, 2014)。今回の発表では Hippo 経路を正に制御する TRIM3 が負の制御因子である DCAF1 の機能に対し、どのような影響を及ぼすのかを検討した結果について議論したい。

C11

Inhibition of the LAT1-mediated leucine transport affects multiple cellular processes in pancreatic cancer cells.

○Pornparn Kongpracha, Pattama Wiriyasermkul, Noriyoshi Isozumi, Printip Wongthai, Kazuko Kaneda-Nakashima, Suguru Okuda, Ryuichi Ohgaki, Shushi Nagamori, Yoshikatsu Kanai
Bio-system Pharmacology, Department of Pharmacology,
Graduate School of Medicine, Osaka University

【Purpose of the study】 L-type amino acid transporter 1 (LAT1) is a major essential amino acid transporter in cancer cells. LAT1 is specifically upregulated in many types of cancers, such as pancreatic, lung and colorectal cancers, to support cell growth and proliferation. Leucine is one of the LAT1 substrates and mainly transported into cancer cells by LAT1. Leucine is not only a building block for proteins but also an important signaling molecule to regulate cell growth and proliferation by stimulating mTORC1 pathway. We previously showed that the inhibition of LAT1 suppressed the phosphorylation of downstream of mTORC1 *in vitro* and, furthermore, strongly arrested the growth of *Xenograft* tumor in animal models. However, the overall picture on cellular processes mobilized by leucine still remains elusive. In this study, by using comprehensive and quantitative phosphoproteomics, we aimed to reveal the cellular processes affected by the leucine transported through LAT1 in pancreatic cancer cell lines.

【Methods】 To reveal the alteration of phosphoproteomes induced by the LAT1-mediated leucine uptake, cells were cultured in the presence or the absence of leucine and/or LAT1 inhibitors. After collecting the cells, proteins were extracted and digested into peptides. Phosphorylated peptides were enriched by IMAC (immobilized metal affinity chromatography) method. The phosphopeptides were labeled with iTRAQ (isobaric tags for relative and absolute quantitation) reagents and then subjected to the analyses by LC-MS/MS (Q Exactive Thermo scientific with Advanced UHPLC). The amounts of phosphopeptides in each sample were quantitated and compared by Proteome Discoverer software. After constructing a list of proteins whose phosphorylation is altered by the LAT1-mediated leucine uptake, underlying IPA (ingenuity pathway analysis) software was used to depict the comprehensive network on the affected cellular processes.

【Results】 We found that LAT1 was expressed in all pancreatic cancer cell lines examined by using western blot, immunofluorescent staining and LC/MS. Leucine was transported into the cells through LAT1. Similar to other cancer cell lines, LAT1 inhibitors suppressed the phosphorylation of p70S6K, a downstream effector of mTORC1, in pancreatic cancer cells. In addition, comprehensive phosphoproteomics revealed that the leucine transported by LAT1 affected numerous signaling pathways and regulated multiple cellular processes such as cell death and survival, cellular assembly and organization, cell movement, gene expression, and cell cycle. Results obtained by wound healing assay supported that inhibition of LAT1 impairs cell migration by affecting cellular assembly and organization and cellular movement.

【Conclusion and Discussion】 LAT1 plays important roles to regulate multiple cellular processes in pancreatic cancer cells by supplying leucine as a signaling molecule. Our data suggest that inhibition of LAT1 not only arrests tumor cell growth but also suppresses multiple cellular functions related to cellular assembly and organization and cellular movement. Therefore, LAT1 is proposed to be an attractive molecular target for cancer therapeutics in the future.

Reference: Kanai Y., et al (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 23629-23632

C12

トランスオミクスによる線虫 *Caenorhabditis elegans* における MEX-1 翻訳調節候補遺伝子群の同定

○山下紘季¹, 白波瀬拓馬¹, 富田想美¹, 押目武弘¹, 小島寿夫¹,
早野俊哉², 伊藤将弘¹

¹立命館大・生命科学・生命情報, ²立命館大・生命科学・生命医科

【目的】線虫 *Caenorhabditis elegans* の細胞運命は、成虫期の生殖腺から mRNA が発現する母性由来遺伝子の産物（タンパク質）によって決定する。特に、細胞運命の決定に重要なシステムのひとつに遺伝子カスケードがあり、いくつかの母性由来遺伝子産物の翻訳因子が母性由来遺伝子や初期胚以降における多くの遺伝子の mRNA の 3'-UTR に結合することで行われる翻訳調節に関連している。遺伝子 *mex-1* は、遺伝子産物である MEX-1 は 2 つの CCCH タイプのジンクフィンガーモチーフを持つ RNA 結合タンパク質¹⁾として、細胞運命の決定に重要な母性由来遺伝子の翻訳調節に関与²⁾している。本研究では、翻訳調節機構の解明を目的とし、*C. elegans* の野生株 N2 と *mex-1 (or286)* における次世代シーケンサーを用いた比較定量トランスクリプトーム解析及び iTRAQ を用いた比較定量プロテオーム解析を統合したトランスオーム解析を進めることで、MEX-1 によって翻訳調節されている遺伝子群の特定を目指した。

【方法】*C. elegans* の野生株 N2 と *mex-1 (or286)* の胚発生期を試料として用いた。試料からタンパク質を抽出して、トリプシン消化を行った後、iTRAQ タグを用いて標識し、LC-MS/MS による測定後、自動ペプチド同定ソフトウェアである Protein Pilot を用いてタンパク質の同定および定量情報を獲得した。同様の試料より mRNA を抽出して cDNA への逆転写を行い、次世代シーケンサーにより Reference 配列との照合を行うことで mRNA の同定および発現情報を獲得した。

【結果】トランスオーム解析により mRNA とタンパク質双方の定量情報を得ることができた 1,564 種類の遺伝子を解析の対象とした。そのうち 175 種類は N2 と *mex-1 (or286)* の比較で mRNA の発現量に変化はなく、タンパク質発現量のみが変動した遺伝子であった。線虫の *in situ* ハイブリダイゼーションのデータベースである NEXTDB を参照すると、175 種類のうち 117 種類が母性由来遺伝子であった。加えて、WormBase にて表現型を調べた結果、76% (89 種類) が胚致死を示した。これらの結果から、MEX-1 が初期胚において重要な母性由来遺伝子群の翻訳調節に関与していることが示唆された。

【文献】

1. Susana G. and James R P, (1997), *Development.*, 124, 731-739
2. Marieke O., Scott M.R, Tugba G.O., Caroline S., David G. and Rueyling L., (2013), *Development.*, 140, 4614-4623

線虫 *Caenorhabditis elegans* における
 セラミドキナーゼ関連遺伝子 *T10B11.2* の遺伝子発現および表現型解析
 ○牛田吉泰, 六嶋千春, 山地美佳, 小島寿夫, 伊藤将弘
 立命館大・生命科学・生命情報

【目的】近年, スフィンゴ脂質は生体膜の構造維持だけでなく, 細胞内シグナル伝達分子として機能することがわかってきた. スフィンゴ脂質代謝の中心的脂質であるセラミドは, アポトーシス, 細胞増殖, 分化, インスリン抵抗性などを制御するシグナル伝達分子として注目されている¹⁻⁵⁾. しかし, セラミドをはじめスフィンゴ脂質代謝の構成分子の生成量は複雑かつ巧妙に調節されており, その調節機構および機能は未だ十分には解明されていない. セラミドの主要代謝産物の一つである, セラミド-1-リン酸 (C1P) の合成経路もその一つである. 現在判明している C1P の合成経路は, セラミドキナーゼによるセラミドのリン酸化経路のみである^{6,7)}. 線虫 *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) にはヒトセラミドキナーゼと相同なタンパク質 *T10B11.2* (51% similarity) が存在する. 本研究では, 定量 RT-PCR と $\Delta\Delta Ct$ 法を用いた野生株 N2 の 3 発生段階 (胚発生期, 幼虫第 1 期, 成虫期) における *T10B11.2* の mRNA 発現量解析および, 変異株 *T10B11.2* (*tm5727*) の表現型解析から, *T10B11.2* の機能解析を目指した.

【方法】mRNA 発現量解析は, N2 の各発生段階試料からそれぞれ total RNA を抽出し, 逆転写した後 RT-PCR により *T10B11.2* mRNA 発現量を測定. ハウスキーピング遺伝子である *act-1* (β -action) mRNA 発現量測定値により, *T10B11.2* mRNA 発現量を補正した. *T10B11.2* および *act-1* 特異的なプライマーは Primer3plus (<http://primer3plus.com/>) および WormBase BLAST (<http://www.wormbase.org>) を用いて設計した. 3 発生段階間の相対発現量比を $\Delta\Delta Ct$ 法により求めた. 表現型解析は, NGM 培地にて 20°C 飼育した *T10B11.2* (*tm5727*) の表現型観察を行い N2 と比較解析した.

【結果】mRNA 相対発現量解析より, 胚発生期における発現量が幼虫第 1 期および成虫期に比べ十分に高く, かつ幼虫第 1 期が最も低いことが分かった. さらに表現型解析では, 胚発生初期の卵割および割球形成の異常や成虫期の卵細胞の形態異常, 子宮内の卵の配列異常が観察された.

【考察】*C. elegans* の *in situ* ハイブリダイゼーションデータベース NEXTDB (<http://nematode.lab.nig.ac.jp/>) では, *T10B11.2* は成虫期の生殖腺から胚発生期初期にかけて mRNA 発現量が高いことが報告されており, 本研究で得られた発生段階別 mRNA 発現量と表現型の異常の局在はこれと一致する. これらの結果は, *T10B11.2* は卵形成および胚発生初期において重要な遺伝子であり, 成虫の生殖腺および胚発生期初期で特異的に機能している可能性が高いことを示唆する.

- 【文献】 1. Okazaki, T., Bielawska, A., Bell, R. M., Hannun, Y. A. (1990) *J Biol Chem.* 265(26), 15823-15831
 2. Mathias, S., Dressler, K. A., Kolesnick, R. N. (1991) *Proc Natl Acad Sci. USA* 88(22), 10009-10013.
 3. Hannun, Y. A. (1994) *J Biol Chem.* 269(5), 3125-3128.
 4. Deng, X., Tin, X., Allan, R., Lu, D. D., Maurer, C. W., Haimovitz-Friedman, A., Fuks, Z., Shaham, S., Kolesnick, R. (2008) *Sci.* 322(5898), 110-115.
 5. Gomez-Munoz, A. (1998) *Biochim Biophys Acta.* 1391(1), 92-109.
 6. Boath, A., Graf, C., Lidome, E., Ullrich, T., Nussbaumer, P., Bornancin, F. (2008) *J Biol Chem.* 283(13), 8517-8526.
 7. Gomez-Munoz, A., Duffy, P. A., Martin, A., O'Brien, L., Byun, H. S., Bittman, R., Brindley, D. N. (1995) *Mol Pharmacol.* 47(5), 833-839.

C14

線虫 (*C. elegans*) のオス特異的な受精必須遺伝子 *spe-45* の機能解析
○田島達也¹, 高山順², 大浪修一², Steven W L'Hernault³, 西村仁^{1,3}
¹ 摂南大・院理工・生命科学, ² 理研・QBiC, ³ エモリー大・生物

【背景・目的】線虫 (*Caenorhabditis elegans*) の雄性生殖細胞系列で機能する遺伝子は *spe* (sperm-defective) と呼ばれているが, その中で *spe-9* クラスは受精に関連する遺伝子群である. 最近, 当研究室で免疫グロブリン様膜タンパク質をコードしている新規 *spe* 遺伝子 (*spe-45*) を同定した. この遺伝子の欠失変異体は不妊だったが, 減数分裂による精細胞形成や精細胞から精子への活性化は正常だった. 一方, 野性型の雌雄同体が産生する自己精子は貯精嚢で起こる受精で消費されるのに対し, 変異体の自己精子の数はほとんど減少せず, 受精で消費されないように思われた. 従って, *spe-45* が変異すると受精が起こらない可能性が高く, この遺伝子は *spe-9* クラスであると思われた. しかし, 線虫では体外受精系がないことから, *spe-45* を含めた *spe-9* クラス遺伝子の変異精子が受精できないことを直接的に証明できていない. 本研究では, (1) ライブイメージング法による *spe-45* 変異精子の受精異常の観察, (2) 各種トランスジェニック線虫を用いた *spe-45* の機能解析, を行った.

【方法】まず, 核が mCherry でラベルされた精子を産生する野性型または *spe-45* 変異型のオスと細胞膜が GFP でラベルされた卵子を産生する雌雄同体を交配し, 雌雄同体の貯精嚢内で起こる受精の様子をライブイメージングで観察した. 次に, GFP 遺伝子の両端に *spe-45* の 5'-UTR (untranslated region, 非翻訳領域) と 3'-UTR を持つトランス遺伝子 (transgene, TG) を構築し, この TG を発現させた野性型のオス線虫を蛍光顕微鏡下で観察した. また, 細胞質ドメイン中に FLAG タグを持つ SPE-45 タンパク質 (SPE45-CTFLAG) の TG も構築し, CRISPR-Cas9 法を用いて *spe-45* 変異体のゲノムに挿入した. さらに, 得られたトランスジェニック線虫からタンパク質溶液を調製して抗 FLAG モノクローナル抗体による免疫沈降実験を行った.

【結果】ライブイメージング解析を行った結果, 野性型精子と受精した卵子の細胞膜において, GFP のシグナルが一部消失した. 一方, *spe-45* 変異型精子と受精した場合, GFP のシグナルはほとんど消失しなかった. 次に, GFP レポーター遺伝子を持つオス線虫を観察すると, 近位生殖巣の生殖細胞で GFP シグナルが検出された. また, SPE45-CTFLAG を *spe-45* 変異体で発現させた所, 変異体の不妊が約 77% レスキューされた. しかし, 免疫沈降実験では, 抗 FLAG モノクローナル抗体と特異的に結合するタンパク質は同定できなかった.

【考察】本研究より, *spe-45* 遺伝子は雄性生殖細胞系列で発現しており, 受精における配偶子間融合のステップに関係していることが示された. 現在, SPE45-CTFLAG TG を持つオス線虫が産生する精細胞を抗 FLAG モノクローナル抗体で免疫染色している. また, そのオス線虫に含まれる細胞を分画し, ウェスタンブロット解析で FLAG シグナル陽性の細胞画分を同定することも検討している.

【文献】

1. Nishimura, H., and L'Hernault, SW. (2010) *Dev. Dyn.* **239**, 1502-1514.
2. Nishimura, H., Tajima, T., Comstra, S., and L'Hernault, SW. (2014) In *Sexual Reproduction in Animals and Plants* (ed. by Sawada, H., Inoue, N., and Iwano, M.), pp199-213, SpringerOpen.

C15

線虫 (*C. elegans*) を用いた精細胞活性化因子の同定

○中西加純, 荒崎彩音, 田島達也, 西村仁
摂南大・院理工・生命科学

【背景・目的】減数分裂によって作られた精細胞が運動能を持つ精子へ活性化する際、その引き金となる精細胞活性化因子 (Spermatid-Activating Factor, SAF) の実体はほとんどの生物種で不明である。線虫 (*Caenorhabditis elegans*) では、オスと雌雄同体に性特異的な SAF が存在すると考えられている。オスの場合、SAF は TRY-5 (セリンプロテアーゼ) である可能性が高いが、雌雄同体の SAF は全く不明である。しかし、*in vitro* の SAF であるプロナーゼ (各種プロテアーゼの混合物) やプロテイナーゼ K (セリンプロテアーゼ) を使った研究より、雌雄同体の SAF もセリンプロテアーゼと予想される。本研究では、実体が不明な雌雄同体 SAF の同定を試みた。

【方法】線虫ゲノムには 10 個のセリンプロテアーゼ遺伝子 (*try-1*~*try-10*) が存在するが、上述のように *try-5* はオス SAF 遺伝子と考えられる。そこで、他の *try* 遺伝子と *try-5* の多重変異体を作製し、雌雄同体が不妊となる系統を探索した。

try-1 や *try-2*, *try-5* については既存の欠失変異体が存在するが、過去の研究より、*try-2* が SAF 遺伝子である可能性は低いと思われた。残りの *try* 遺伝子の場合、既存の変異体が存在しなかったため、CRISPR/Cas9 法 (ゲノム編集) あるいは feeding RNAi 法 (遺伝子ノックダウン) でそれぞれの遺伝子機能を調べた。

【結果】まず、CRISPR/Cas9 法で *try-3* 変異体を作製し、交配によって *try-1*; *try-3*; *try-5* 変異体を得た。しかし、この三重変異体の自家受精能は、ほぼ野性型と同じだった。また、feeding RNAi 法を使い、*try-5* 欠失変異体中で *try-4*, *try-8*, *try-9* または *try-10* を単独でノックダウンしても不妊傾向は見られなかった。しかし、*try-5* 変異体の *try-4*, *try-8*, *try-9* および *try-10* を同時にノックダウンすると、自家受精による F1 の数が減少した。

【考察】以上の結果より、(1) *try-1* または *try-3* が雌雄同体における唯一の SAF 遺伝子である可能性は低い、(2) *try-4*, *try-8*, *try-9* および *try-10* の中で、少なくとも 2 つの遺伝子が SAF と関係している可能性がある、ことが考えられた。今後は、CRISPR/Cas9 法で *try-4*, *try-6*, *try-7*, *try-8*, *try-9*, および *try-10* の変異体を作製し、SAF 遺伝子の候補となる *try* 遺伝子を絞り込む予定である。

- 【文献】
1. Nishimura, H., and L'Hernault, SW. (2010) *Dev. Dyn.* **239**, 1502-1514.
 2. Nishimura, H., Tajima, T., Comstra, S., and L'Hernault, SW. (2014) In *Sexual Reproduction in Animals and Plants* (ed. by Sawada, H., Inoue, N., and Iwano, M.), pp199-213, SpringerOpen.

C16

ヘリコバクター・ピロリの産生毒素 VacA に対するペプチドアプタマーの探索と評価

○早川結実子¹, 松野充宏¹, 田中誠¹, 武居修², 北村幸一郎³, 長谷川慎¹

¹長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・研究科, ²(株)ライフテック, ³ジェナシス(株)

【目的】近年、進化分子工学的手法により抗体と同等の分子認識能を有するアプタマーとよばれる人工分子が開発され、医薬応用が図られている。アプタマーは、RNA, DNA, ペプチドおよびその誘導体のランダム配列から探索される人工分子である。生産コストが低い、構造デザインや分子修飾の容易であるなどの利点を持つが、結合親和性を高める工夫が必要とされる。われわれは、cDNA ディスプレイ法によりヘリコバクター・ピロリの産生する細胞空砲化毒素 VacA に特異的に結合するペプチドアプタマーを得た^{1,2}。本研究の目的は、それらを構造改変により結合親和性の向上を図り、用途開発により有用性を明らかにすることである。

【方法】cDNA ディスプレイ法での探索により、VacA に対する親和性ペプチド候補を得た。48 種を化学合成し、SPR センサー及び FCS で相互作用解析を行った。そのうち最も結合力を示したペプチドについて、結合親和性を向上させる方法として、スキップフォールドへの導入や環状化といった手法を検討することとした。まず、ペプチドの両端にシステインを導入し環状化させた。分子間相互作用検出による評価手段として光親和性標識法を用いた。図 1 に示すペプチドアプタマー誘導体に対する競合結合を指標として、直鎖状ペプチドと環状ペプチドを比較することで結合親和性の向上の有無を検証した。

【結果】ペプチドアプタマーの光反応性誘導体(図 1)を作成し、VacA に対する親和性標識により結合特異性を検討した。VacA と結合した光反応性誘導体ペプチドを架橋させ、ペプチドのあらかじめ付加したビオチンを介して化学発光検出を行ったところ、VacA に対する特異的な結合が確認できた。さらに、両端にシステインを導入した環状化ペプチドに対する結合親和性の変化を検証したところ、環状ペプチドは同配列直鎖ペプチドより高い親和性を持つことが示唆された。

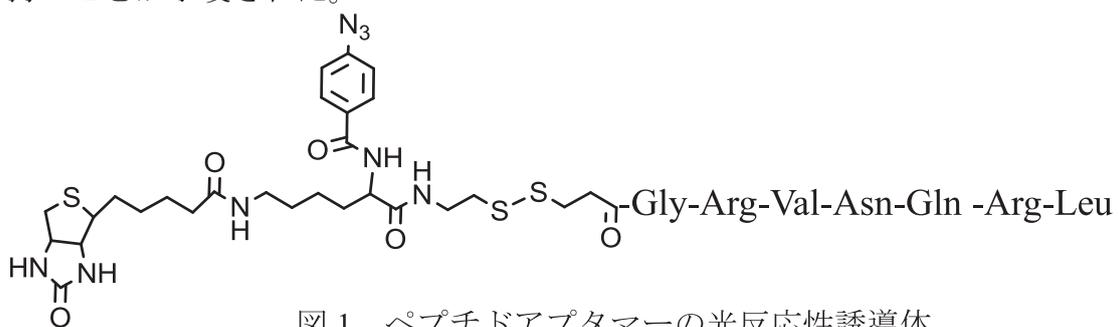


図 1 ペプチドアプタマーの光反応性誘導体

【考察】ペプチドの環状化は結合親和性を高めることがわかった。環状化が結合親和性を高める理由として、不定形な直鎖分子よりも、環状定形でターン構造を含む分子のほうが、標的蛋白質の結合ポケットに作用しやすいことが挙げられる。結合親和性の向上には、立体構造の制御が必要であると考えられる。

- 【文献】 1. 松野充宏 ヘルリコバクター・ピロリの産生する毒素 VacA に対するペプチドアプタマーの開発 ケミカルバイオロジー学会第 6 回年会
2. 特開 2012-242304

C17

異方性形態を有するペプチドナノキャリアによる細胞内抗原デリバリー

○和久友則, 笠井彩音, 功刀 滋, 田中直毅
京工繊大院

【目的】従来のがんの治療法と比較し、低負担、低副作用であることからペプチドワクチン療法が注目を集めている。高効率な免疫誘導には、がん細胞を特異的に攻撃する細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の活性化が必要である。CTL の活性化のためには、抗原提示によるシグナルに加えて、抗原提示細胞の活性化に伴って発現する副刺激分子やサイトカインによるシグナルが必要である。しかしながら抗原ペプチド単独では、細胞内移送性が低くまた抗原提示細胞を活性化する作用も有しないため、これらのシグナルを活性化することはできない。そのため、抗原送達能と抗原提示細胞活性化能 (アジュバント活性) の両方を併せ持つキャリアとそれによる抗原デリバリーシステムの開発が求められている。

これまでに我々は、 β シート配列 (FVIFLD; β) に抗原配列 (257 SIINFEKL 264 : OVA) と親水性配列 (oligo(ethylene glycol) $_{12}$; EG $_{12}$) を導入したペプチド (β -OVA-EG $_{12}$) の自己組織化を利用することで、抗原担持ナノファイバー (NFs) を作製し、その細胞取り込みと構造の解析を行ってきた。本研究では、キャリアとしての機能性の向上を目指し、ethylene glycol 鎖長の違いが細胞取り込み、毒性などに与える影響を評価した。

【方法】 β -OVA-EG $_{12}$ ペプチドを 5% dimethyl sulfoxide (DMSO) を含む phosphate buffered saline (PBS; NaCl 137 mM, KCl 27 mM, Na $_2$ HPO $_4$ 10 mM, KH $_2$ PO $_4$ 1.8 mM; pH 7.4) に溶解させ、60°C で 24 時間加熱を行った。得られた NFs 分散液をフィルター (孔径: 0.45 μ m) に通すことで、線維長を制御した。 β -OVA-EG $_6$ および β -OVA-EG $_{24}$ ペプチドに関しても同様の操作で NFs を調製した。

【結果および考察】 β -OVA-EG $_n$ NFs の作製

蛍光基を導入した β -OVA-EG $_n$ -FAM ペプチドと β -OVA-EG $_n$ ペプチド ($n=6, 12, 24$) を PBS 中 1:19 のモル比で混合し、60°C で 24 時間インキュベートすることで約数 μ m の長さを持つ蛍光ラベル化 β -OVA-EG $_n$ NFs を調製した。さらに、この NFs 分散液を孔径 0.45 μ m のフィルターで濾過することで、平均線維長がそれぞれ 230 \pm 50 nm ($n=6$)、260 \pm 70 nm ($n=12$)、230 \pm 70 nm ($n=24$) の NFs を作製した。

EG 鎖長が細胞取り込みおよび細胞毒性に与える影響

3 種類の β -OVA-EG $_n$ NFs ($n=6, 12, 24$) を用いて、EG 鎖長の違いが細胞取り込みに与える影響を評価した。無血清培地中で 3 種類の蛍光標識化 NFs (10 μ M, 20 μ M) と 2 時間共存させた JAWS II 細胞をフローサイトメーターにより解析した。その結果、FCM により得られた蛍光強度は、大きい順に β -OVA-EG $_6$ NFs > β -OVA-EG $_{12}$ NFs > β -OVA-EG $_{24}$ NFs であった。次に、共焦点顕微鏡観察を行ったところ、 β -OVA-EG $_{12}$ NFs と共存させた細胞においては、細胞内部からの蛍光シグナルが観察され、NFs の細胞内への取り込みが確認された。また、この蛍光シグナルは、 β -OVA-EG $_{24}$ NFs と共存させた細胞よりも強く、FCM 測定の結果と一致した。一方、 β -OVA-EG $_6$ NFs と共存させた細胞においては、細胞内部からの蛍光シグナルはわずかであり、細胞膜表面からの強い蛍光シグナルが観察された。このことより、 β -OVA-EG $_6$ NFs は細胞表面との相互作用は大きい、細胞内部への移行性は低いことが分かった。これは、EG 鎖長が短いために NFs の分散性が低くなり、細胞取り込みに不利なサイズの凝集体を形成したためと考えられる。

初期化 4 因子による iPS 細胞および心筋細胞の誘導過程における
転写因子 Foxd1 の果たす役割

○成川智貴¹, 植山萌恵¹, 大矢知佳¹, 早川千尋¹, 小原惇¹,
野津遼祐¹, 馬場 藍¹, 重野 麻子¹, 十河孝浩², 川村晃久¹

¹立命館大・院生命科学・生命医科, ²京都医療センター展開医療研究部

【目的】人工多能性幹細胞(iPS)細胞が作製され再生医療の実現が期待されている。しかし安全性、効率などが問題となっており、iPS 細胞が作製される過程(=初期化)のメカニズムの解明は重要課題といえる。iPS 細胞は、線維芽細胞などの体細胞に初期化 4 因子(Oct4/Sox2/Klf4/cMyc)を導入し作製されるが、その樹立効率は低く(数%未満)、この点が初期化のメカニズム解析を困難にしている。我々の研究室では、共同研究を通じて、初期化過程で、転写因子 Foxd1 の発現が一過性に上昇するが iPS 細胞形成に重要であること¹⁾、さらに、iPS 細胞が形成されるか否かを予測するための表面マーカーとして、CD34 と Sca1 を見いだした²⁾。CD34 と Sca1 の二重陰性群は、他細胞分画と比べて iPS 細胞の樹立効率が約 30%と非常に高くなっている。一方で、二重陽性群からは iPS 細胞が樹立されにくく、心筋細胞などの他の細胞腫が誘導される。しかし、各細胞分画における転写因子 Foxd1 が果たす役割については依然不明である。本研究では、fate mapping や表面マーカー解析などを駆使して、初期化 4 因子(Oct4, Sox2, Klf4, cMyc)により iPS 細胞や心筋細胞が誘導される過程で転写因子 Foxd1 の果たす役割について検証する。

【方法】Foxd1 の遺伝子座に Cre をノックインしたマウスと、CAG プロモーターに loxp-stop-loxp-EGFP-polyA を連結したカセットを発現するトランスジェニックマウスを交配したマウスの胎児から線維芽細胞を採取して実験に用いた。初期化誘導は、レトロウイルスを用いて 4 因子を遺伝子導入して行った。Foxd1 の発現履歴や表面マーカー解析には、フローサイトメトリーや蛍光顕微鏡を用いて行った。iPS 細胞誘導効率は、Nanog 陽性コロニー数を評価し、心筋細胞誘導効率は、蛍光免疫染色や自己拍動率で評価した。

【結果】iPS 細胞コロニーの 90%以上が Foxd1 の発現履歴をもつ GFP 陽性コロニーであった。GFP 陽性細胞の 60~70%程度が、CD34 と Sca1 の二重陰性群から出現し、逆に、二重陰性群の 80%程度が Foxd1 の発現履歴をもつ GFP 陽性細胞であった。初期化誘導過程中期から浮遊培養によるスフィア形成を介して心筋細胞を誘導したところ、Foxd1 発現履歴をもつ GFP 陽性細胞と、履歴のない GFP 陰性細胞が混在したスフィアが形成された。さらに、スフィアを接着培養することで自己拍動する心筋細胞が出現したが、その中には Foxd1 発現履歴をもつ GFP 陽性細胞と履歴のない GFP 陰性細胞が混在していた。

【考察】iPS 細胞コロニーの 90%以上が Foxd1 の発現履歴をもつ GFP 陽性コロニーであったことから、iPS 細胞樹立にとって Foxd1 の発現が重要である。しかし Foxd1 の発現が、必ずしも iPS 細胞樹立へ導く訳ではない。今後、表面マーカー CD34 と Sca1 と組合せる事で、より特異性の高い予測マーカーとなるかどうか検証していきたい。初期化過程から誘導される心筋細胞においても Foxd1 発現履歴があるものとないものが混在しており、誘導経路の違いや心筋特性の違いがあるかどうか解明していきたい。

- 【文献】 1. Koga M, Matsuda M, Kawamura T, et al. Foxd1 is a mediator and indicator of the cell reprogramming process. *Nature Commun.* 2014;5:3197. doi: 10.1038/ncomms4197.
2. Kida YS*, Kawamura T*, et al. ERRs mediate a metabolic switch required for somatic cell reprogramming to pluripotency. (*Equal co-first) *Cell Stem Cell* Epub ahead of print

C19

ストレス応答シグナルが多能性の獲得と維持に果たす役割に関する研究

○早川千尋¹, 馬場 藍¹, 重野麻子¹, 植山萌恵¹, 大矢知佳¹,
小原惇¹, 成川智貴¹, 野津遼祐¹, 十河考浩², 川村晃久¹

¹立命館大・院生命・生医, ²国立病院機構京都医療センター展開医療研究部

【目的】

多能性の誘導(=体細胞初期化あるいは iPS 細胞誘導)と多能性の維持(=未分化性の維持)において、ストレス応答シグナルの重要性が近年の研究により示唆されている。これまで当研究室では、線維芽細胞が初期化され多能性を獲得する過程において DNA 損傷や細胞老化などに関わるストレスシグナルが活性化されること、その下流の癌抑制遺伝子 p53-p21 経路が初期化を負に制御することを報告してきた。本研究では、ストレス応答に関与する MAPK のひとつである JNK(c-Jun N-terminal kinase)の活性を生細胞内で観察する目的で、蛍光共鳴エネルギー移動(Fluorescence resonance energy transfer: FRET)の実験系の立ち上げを行った。

【方法】

野生型 C57BL/6 マウスの胎生 13.5 日の胎児から線維芽細胞(mouse embryonic fibroblasts;MEFs)を採取し、これに 4 因子 Oct4、Sox2、Klf4、cMyc をレトロウイルスを用いて遺伝子導入し過去の報告に従って iPS 細胞を誘導した。誘導過程における各時相ごとに、細胞からタンパク質を抽出し、ウェスタンブロット法により JNK のリン酸化レベルを解析した。また初期化過程における、JNK シグナル活性の詳細を一細胞レベルで生きた状態で時空間的に解析する目的で、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)の原理に基づいたタンパク質キナーゼの活性を検出するバイオセンサーを用いたイメージングの実験系を構築した。FRET の測定は、MEFs に Lipofectamine2000 を用いて FRET biosensor を発現させ Time-laps Imaging により施行した。JNK シグナルを可視化する biosensor は、ドナーの蛍光タンパク質として ECFP、基質配列、リンカー、リン酸化結合ドメインである FHA1、アクセプターの蛍光分子として変異型 YFP(Ypet)を用いた 1 分子 FRET biosensor である¹⁾。

【結果】

4 因子 Oct4、Sox2、Klf4、cMyc を遺伝子導入したマウス線維芽細胞から初期化誘導過程における各時相で JNK のリン酸化レベルをウェスタンブロットにより検証したところ、早期から中期にかけて亢進し後期では減弱していた。また、多能性幹細胞では ES 細胞、iPS 細胞ともに、未分化の基底状態における JNK のリン酸化の程度は、線維芽細胞と比較し減弱していた。これらの結果は、多能性を獲得することでストレスシグナルに対する耐性を獲得する可能性を示唆するものである。

【考察】

構築した FRET イメージングを用いて、現在バイオセンサーの発現を長期に安定させ、細胞間のばらつきを軽減する目的で、これを全身に発現するトランスジェニックマウスから採取した線維芽細胞を用いた実験も施行している。今後、多能性の誘導や維持あるいは細胞分化におけるストレス応答の詳細を明らかにすることで、安全かつ効率的な再生医療実現のための iPS 細胞誘導法や分化培養系の開発に貢献したい。

【文献】 1. Komatsu N et al. *Mol Biol Cell*. 2011; 22: 4647-4656.

C20

G-CSF シグナルを伝達する人工受容体の作製とこれを安定発現する多能性幹細胞株の樹立

○野津遼祐¹, 植山萌恵¹, 大矢知佳¹, 小原惇¹, 成川智貴¹,
早川千尋¹, 十河孝浩², 河原正浩³, 長棟輝行³, 川村晃久¹

¹立命館大・生命・生医, ²国立病院機構・京都医療センター・展開医療研究部,

³東京大・院工・化学生命工学

【目的】

心筋梗塞後の重症心不全に対する治療には喪失した心筋細胞を再生する方法が必要で、胚性幹(ES)細胞や人工多能性幹(iPS)細胞などの多能性幹細胞から心筋細胞を分化誘導し、これを心臓へ移植する手法が期待されている。近年、ES細胞やiPS細胞は分化初期段階で顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)受容体を発現していること、これをG-CSF組換えタンパク質により刺激すると心筋細胞への分化誘導効率が上昇することが報告されている¹⁾。さらに、G-CSFシグナルの活性化はアポトーシス抑制に作用し心筋梗塞後の心機能を改善する効果があることも報告されている²⁾。しかし、G-CSFの全身投与は、組織の炎症を惹起し間質性肺炎や肺水腫などの副作用も懸念されている。さらにG-CSF組換えタンパク質は安価ではなく、大量の心筋細胞を体外で作製することは医療経済的に容易でない。本研究では、生理活性のない安価な代替リガンド分子によりG-CSFシグナル伝達を可能とする人工受容体を作製し、これにより多能性幹細胞や分化後の移植細胞へG-CSFシグナルを伝達させ、経済的かつ効率的に心筋細胞を作製し移植することを目指す。

【方法】

G-CSFは1回膜貫通型受容体のホモ二量体として機能することが知られているので、リガンド結合領域あるいは細胞外ドメインすべてを、抗フルオレセイン(FL)抗体のsingle chain Fv(ScFv)に置換した人工受容体(=キメラG-CSF受容体)を作製し、これを安定発現するマウスES/iPS細胞株を樹立した。複数個のFL分子と結合したウシ血清アルブミン(BSA-FL)を代替リガンドとして用いて、G-CSFシグナルに関して、STAT3とAktのリン酸化をWestern blotにより解析を行った。また、JAK/STAT経路の活性化を介して未分化性が維持できるか否か、アルカリフォスファターゼ染色を用いて解析した。

【結果】

キメラG-CSF受容体を導入したES/iPS細胞では、BSA-FLを代替リガンド分子として用いると濃度依存性にSTAT3のシグナルが活性化され、1 μ g/mLでLIF(白血球阻止因子)1000U/mlと同等のSTAT3のリン酸化が確認された。また、BSA-FLで刺激した場合、LIFを用いることなく未分化性がある程度維持されることも確認された。

【考察】

キメラG-CSF受容体を導入したES細胞に、代替リガンドであるBSA-FLで刺激することでSTAT3のリン酸化が確認されたが、このシグナル伝達が、JAKやgp130を介しているものか否かを検討する必要がある。また、G-CSFで刺激した場合と同様に下流の標的遺伝子が発現制御されているか否かをマイクロアレイや次世代シーケンサーにより解析していきたい。

- 【文献】 1. Shimoji K et al. *Cell Stem Cell*. 2010; 6: 227-237.
2. Takano H and Komuro I. *J Jpn Coron Assoc*. 2010; 16: 97-106.
3. Sogo T, et al. *Cytokine*, 2009;46:127-136.

C21

神経軸索ガイダンス分子 Anosmin-1 が血管内皮細胞におよぼす生理作用の解析

○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・総合生命科学

【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ある。カルマン症候群原因遺伝子産物 Anosmin-1 は分泌型タンパク質で、誘引性神経軸索ガイダンス分子である。KAL1 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および定着の抑制が報告されている。Anosmin-1 に変異をもつカルマン症候群患者において、嗅球の欠損と嗅上皮から伸長する嗅感覚神経と鋤鼻神経の欠失が見られ、ヒト生体内発生期において Anosmin-1 は軸索ガイダンス分子として嗅球形成に必須の誘引シグナルを伝達していると考えられている¹。

一方、マウスの嗅球の形成には血管形成が重要であることが報告されている²。血管内皮増殖因子 VEGF を阻害した knock in mouse の前脳で血管の欠損が見られ、嗅球の形成不全が引き起こされた。そこで本研究では、脳内で発現している神経軸索ガイダンス分子 Anosmin-1 も神経だけではなく直接、血管形成にも作用しているのではないかという仮説をたて、Anosmin-1 の血管内皮細胞におよぼす生理作用と活性化するシグナル伝達経路を解析した。

【方法】マウス大脳皮質微小血管内皮細胞(bEnd3)とヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)を用いて Anosmin-1 のおよぼす生理活性を解析した。細胞遊走能を Migration assay、細胞増殖能を Proliferation assay、管腔形成能を 2D tube formation assay 及び 3D tube formation assay を用いて検討した。ウエスタンブロット法を用いて Anosmin-1 刺激により活性化される細胞内シグナルを検討した。PKC、PKD、PLC 抑制剤を Anosmin-1 と同時添加することにより管腔形成能の検討を行った。

【結果】Anosmin-1 は両細胞の遊走を誘導した (HUVEC:1.8 倍、bEnd3 : 1.8 倍)。2D tube formation assay において、Anosmin-1 は管腔形成を誘導した(HUVEC :2.3 倍、bEnd3 : 5.3 倍)。3D tube formation assay においてそれぞれ 2% FBS EBM-2 (HUVEC)、10% FBS EBM-2 (bEnd3)を negative control として用いたところ、管腔形成 (spheroid からの突起の伸長)は見られなかったが、Anosmin-1 を添加すると両細胞の管腔形成を誘導した(HUVEC : 1.75 本/spheroid、bEnd3 : 5 本/spheroid)。ウエスタンブロットによる細胞内シグナルの検討を行ったところ、Anosmin-1 刺激により両細胞共通に活性化されたのは PKC であった。PKC substrate として Anosmin-1 刺激によりリン酸化されたタンパク質は、VEGF-A 刺激の場合と異なっていた。2D tube formation assay において PKC または PKD いずれかの抑制剤 (G06983、CRT0066101) の添加により Anosmin-1 による管腔形成は抑制された(bEnd3 : 52%)。PLC 阻害剤(U73122)により、PKC の活性化が抑制され、Anosmin-1 による管腔形成が抑制された (bEnd3 : 61%)

【考察】以上の結果から、HUVEC と bEnd3 は Anosmin-1 によって管形成能を促進する受容体を持ち、その受容体を介して Anosmin-1 が細胞内シグナルを活性化していることが示唆された。PKC、PKD の阻害剤、または PLC 阻害剤は、Anosmin-1 の血管内皮細胞の管腔形成を阻害したことにより、Anosmin-1 による管腔形成のシグナルは PLC-PKC 経路を介していることが示唆された。

- 【文献】 1. Soussi-Yanicostas N, et al., Cell 109:217-228 (2002)
2. Lichit T, et al., Development 137:261-271 (2010)

線虫 *Caenorhabditis elegans* における
抗微生物ペプチド遺伝子 *cnc-2* 発現経路のモデル構築

○小野伯容¹, 小島寿夫¹, 伊藤将弘¹

¹立命大院・生命科学・生命情報

【目的】 線虫 *Caenorhabditis elegans* は、体が透明で観察が容易であることや、全ゲノムが解読されていることから、病原体と宿主の相互作用（宿主—病原体相互作用）を解明するためのモデル生物である。また *C. elegans* は真菌の感染に対し、遺伝子 *cnc-2* がコードする抗微生物ペプチドを発現し、抵抗している¹⁾。したがって *cnc-2* 発現システムを解明することは、真菌に対する感染防御機構の理解に繋がる。その一方で、*cnc-2* 発現システムは、分子ネットワークを構成する各分子濃度の経時変化を測定することが実験的に困難である。本研究では Zugasti らの実験データ¹⁾に基づき、真菌 *Drechmeria coniospora* に感染された幼虫第4期の *C. elegans* を想定した *cnc-2* 発現経路の数理モデル構築とシミュレーションにより、*cnc-2* 発現経路の成因子濃度の経時変化の予測を行った。

【方法】 *C. elegans* は、真菌未感染時の1上皮細胞内の各分子濃度は明らかになっていない。そこで、論文²⁾および WormBase と PaxDB データベースから、分子濃度の初期値を決定した。また、*cnc-2* 発現システムを構成する分子は部分部分で同定されたものの集まりであり、全ての分子が同定されていない¹⁾。本研究では、SMA-3 のヒトのホモログ分子 R-Smad の分子ネットワークを参考に、新たに転写因子 SMA-3 の核内非リン酸化状態および脱リン酸化反応を考慮したモデルを構築した。本提案モデルの信頼性を確認するために、全速度定数の推定と *cnc-2* 発現シミュレーションを行った。

【結果】 まず、既報の分子ネットワークだけでモデルを構築し、シミュレーションを行った結果、*D. coniospora* の感染から12時間後の *cnc-2* 発現量の予測値は、12時間後以外の実験値と比較して差異は大きく示された。次に、本提案モデルでのシミュレーションでは、12時間後の *cnc-2* 発現量に差異は少なからず改善した。また、上述の2つのモデルを比較すると、8時間後と24時間後の *cnc-2* 発現量の差異は大きいですが、全実験値と全計算値の相対誤差は、本提案モデルの方が小さい。この結果は、本提案モデルが精度向上したことを示唆する。

【考察】 本提案モデルから、核内リン酸化 SMA-3 の脱リン酸化は、実際に分子ネットワークに含まれている可能性がある。その一方で、12時間後の *cnc-2* 発現量に対する実験値と計算値の差異を縮小するため、*cnc-2* 発現量に応答するフィードバック機構を考慮した新たなモデルを構築する予定である。

【文献】

1. Zugasti, O., Ewbank, J. J. (2009) *Nat. Immunol.* 10, 249-256
2. Kim, D. H., Grün, D., van Oudenaarden, A. (2013) *Nat. Genet.* 45, 1337-1344

C23

線虫 *Caenorhabditis elegans* の初期胚発生においてスフィンゴシンキナーゼ *sphk-1* とスフィンゴシン 1 リン酸分解酵素 *F53C3.13* は必須遺伝子である

○六嶋 千春, 山地 美佳, 牛田 吉泰, 小島 寿夫, 伊藤 将弘

立命館大・生命科学・生命情報

【目的】近年, スフィンゴ脂質代謝産物のセラミド, スフィンゴシンやスフィンゴシン-1-リン酸(S1P)などは, 細胞に関してその生存や増殖さらには運動などに関与する重要な脂質メディエーターである事がわかり注目されている. 特に, S1P は細胞増殖作用, 細胞運動, 態調節作用, 細胞分化などの多様な作用を及ぼす. しかし, それらの脂質メディエーターは多細胞生物のモデル生物である線虫 *Caenorhabditis elegans*(*C. elegans*)において解析されていない.

本研究では, スフィンゴ脂質代謝におけるスフィンゴシンから S1P への合成を触媒するスフィンゴシンキナーゼと S1P からスフィンゴシンへの分解を触媒する S1P ホスファターゼに着目し, 線虫 *C. elegans* におけるスフィンゴシンキナーゼ関連遺伝子ホモログ *sphk-1* と S1P ホスファターゼ関連遺伝子ホモログ *F53.C3.13* を対象として表現型と胚致死率の観察, 発生段階別の mRNA 更にはタンパク質の発現解析を進めた.

【方法】表現型解析では, NGM 培地にて 20°C で飼育した $\Delta sphk-1$ (*ok1097*) と $\Delta F53C3.13$ (*ok1861*) の観察を行い野生株 N2 と比較解析した. 胚致死率の観察は, 成虫の腹部を切断し, 卵を取り出し NGM プレートに散布した後, 2 日後に孵化した線虫を数え, (孵化した数 / 撒いた卵の数)を算出する事で行った. 発生段階別の mRNA 発現量解析では, N2 の 3 発生段階(胚発生期, 幼虫第一期, 成虫期)試料から RNA を抽出し, 逆転写した後 RT-PCR により *sphk-1*, *F53C3.13* とハウスキーピング遺伝子である *act-1* の mRNA 発現量を測定し, 3 発生段階間の相対発現量比を $\Delta\Delta Ct$ 法により求めた.

【結果】表現型解析では, 成虫期において卵の並びや産卵口で変異がみられた. 胚発生期においては, $\Delta sphk-1$ の 2 細胞期において卵割の異常が見られた. また胚致死率も両変異株において 40% を超える高い値を示した. mRNA 相対発現量解析では, *sphk-1* では胚発生期における発現量が一番高く, 次いで成虫期, そして幼虫第 1 期が最も低かった. *F53C3.13* では成虫期における発現量が一番高く, 次いで胚発生期, そして幼虫第 1 期が最も低かった. これらの結果から, 胚発生期と成虫期において *sphk-1* と *F53C3.13* は重要な母性由来遺伝子であることを示唆した.

D1

食物アレルギー問題の解決に電磁波照射は利用できるか？

○山崎正幸¹、三谷友彦²、岡崎史子¹、塩尻かおり³

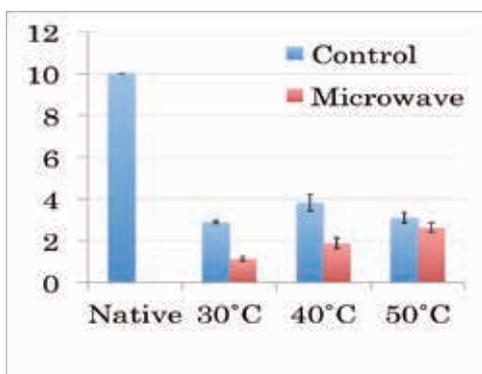
¹龍谷大・農・食品栄養, ²京都大・生存研, ³龍谷大・農・植物生命

【目的】鶏卵、牛乳、小麦、ソバ、ピーナッツなどに代表される食物アレルギーは、我々の「食」による精神的な充足を著しく妨げる現代の大問題であり、その原因は多くの場合、食品に含まれるタンパク質にあることがわかっている。その対策としてアレルゲンフリー食品の利用などが挙げられるが、遺伝子改変技術の導入など道徳的な問題を抱える。ここで我々は、アレルゲンタンパク質の性質を改変できる可能性として、生存圏にあふれるエネルギーの中から電磁波に着目した。電磁波は、食物を完全なかたちのまま深部まで均一的に処理できる特質を持ち、その照射はアレルゲンタンパク質の構造を変化させる可能性がある。また、電磁波を種子に照射すれば、生育後のアレルゲンタンパク質含有量などに影響を与える可能性がある。

【方法】卵白の主要アレルゲンタンパク質であるオボアルブミンを精製し、鶏卵中の状態を模したアルカリ溶液 (pH10.0) 中で保存した。その上で 2.45GHz 帯の電磁波を 24 時間照射し、オボアルブミンのアレルゲン性低下を観察した。さらに、その過程において見出した、低温アルカリ処理がアレルギー性の低下に与える影響を検討した。

ソバの種子を純水中に保存し、同じく 2.45GHz 帯の電磁波を 40 度、60 度、80 度で 5 分間照射した。それら種子において抽出された可溶性タンパク質量の変化、成長後の個体の変化、その葉を食した害虫の生育の変化を測定した。

【結果】



電磁波照射を行ったオボアルブミンについてアレルゲン性の低下を観察した (左図)。また低温アルカリ処理がアレルゲン性低下に大きな効果を示した。今後は他の波長帯を用いた電磁波照射が持つアレルゲン性低下の可能性に着目したい。ソバの種子に対する電磁波照射が与える影響では、その後の成長や葉を食する害虫の生育に関する予備的結果を得た。今後は葉の成分分析を行い、種子時の電磁波照射による生理的影響を検討する。

【考察】電磁波照射による食品や植物への影響を正しく検討するためには、被照射サンプルに応じた正しいデバイスの構築とそれに対する照射コントロールや正しい対照群の設定が必須である。今後も、電磁波照射が我々にもたらす未知の可能性として、食物アレルギー問題の解決に焦点を絞りたい。

なお、本研究は京都大学研究大学強化事業「融合チーム研究プログラム-SPIRITS-」及び京都大学生存圏研究所「生存圏萌芽研究」の支援のもと行われた。

D2

レプリカ交換分子動力学法によるプロトン化状態の変化に伴う ポリグルタミン酸のヘリックス-コイル転移の研究

○岩井良祐, 永井哲郎, 高橋卓也
立命館大学・院生命・生情

【目的】

タンパク質の構造形成, 機能の発現において溶媒の pH は重要である. 本研究では, 溶媒の pH によるポリグルタミン酸(PGA)の Helix-coil 転移を分子動力学(MD)シミュレーションによってどの程度再現できるかを調べることを目的とした.

【方法】

ソフトウェアAmberを用いて, 末端をACEとNMEでキャッピングした8, 16, 21, 30残基の中性条件(GLU)と酸性条件(GLH)の二状態に対応するPGAに対して, 陰溶媒(GBSA法)で, 4つの力場(ff03, ff99SP, ff99SB, ff14SB)で, 100 nsのレプリカ交換分子動力学(REMD)シミュレーション[1]を行った(16残基, 中性条件, ff03でのPGAについては2回シミュレーションを行い, 酸性条件, ff14SBでのPGAについては200 nsシミュレーションを行った.). その後, 10000 stepsに一度サンプリングした構造に対して, DSSP[2], 特定の二次構造に対応する二面角の範囲に含まれる残基数の割合, 末端間距離の解析を行った.

【結果】

DSSPの解析結果において, ff03, 酸性条件でのPGAでは残基数の増加に伴い, helix content(3_{10} -helix, α -helix, π -helixを合わせた割合)が増加し, 中性条件でのhelix contentは減少した. ff99SPでは, 残基数が増加するに連れて, 両方のpHの条件でのhelix contentは増加し, 酸性条件におけるPGAのhelix contentは中性条件のhelix contentに比べ高い値を示した. ff99SBでは, ff99SPのものとは対照的に, 両方のpHの条件で, 残基数の増加に従ってhelix contentは減少した. 加えて, 中性条件でのPGAの方が酸性条件でのPGAに比べ高いhelix contentを示した. ff14SBでは, 割合は異なるがff03と同様の傾向を示した. 16残基の中性条件におけるff03を用いたPGAと酸性条件でのff14SBのPGAでは他の条件の力場に比べ, helix contentの誤差の値が大きかった. また, 中性条件において, ff99SPとff14SBでは 3_{10} -helixの割合が他の力場に比べ多く観察された.

【考察】

DontenらのCD法によるhelix contentの測定結果[3]によれば, 残基数の増加に伴いより明瞭にHelix-coil転移を示すと考えられる. 加えて, 3_{10} -helixは形成されにくく[4], 陰溶媒では水分子が関与する水素結合を再現できないためhelix構造を過安定化させる[5]ことから, pHにおけるHelix-coil転移を再現する力場はff03であると考えられる.

【文献】

- [1]Y. Sugita and Y. Okamoto, Chem. Phys. Lett. **314**, 141-151, (1999).
- [2]W. Kabsch and C. Sander, Biopolymer, **22**, 2577 - 2637, (1983).
- [3]M. L. Donten, P. Hamm, Chem Phys **422**, 124-130, (2013).
- [4]D. J. Barlow, J. M. Thornton, J. Mol. Bio. **201**, 601-19, (1988).
- [5]A. E. Garcia and K. Y. Sanbonmatsu, PNAS **99**, 2782-2787, (2002)

D3

新規プロテアソーム阻害剤リダイフェン-Fの構造活性相関研究

○田中誠¹, 杉山茂仁¹, 早川結実子¹, 水澤彰人², 渡邊千尋², 太田のぞみ²,
椎名勇², 佐々木隆造¹, 水上民夫¹, 長谷川慎¹,
¹長浜バイオ大学バイオサイエンス学部, ²東京理科大学理学部応用化学科

【目的】我々は、抗エストロゲン剤として乳がん治療に用いられるタモキシフェンの誘導体からプロテアソーム阻害作用を持つ化合物群を見出した。本発表では、その中でも特に阻害活性の高いリダイフェン-F (以下 RID-F)の構造活性相関解析の結果を報告する¹⁾。

【方法】RID-Fは椎名らに開発された3成分連結反応により合成した。精製ヒト20Sプロテアソームに対する蛍光基質分解速度を測定する事により50%阻害濃度(IC₅₀)と阻害様式を求めた。培養細胞へ化合物を添加し、50%増殖阻害濃度(Cyt₅₀), ユビキチンタンパク質の蓄積, アポトーシス誘導を確認した。MOE (ver.2010.10)を用いてドッキングシミュレーションを行い基質結合部位と直接相互作用したモデルの構築をした。

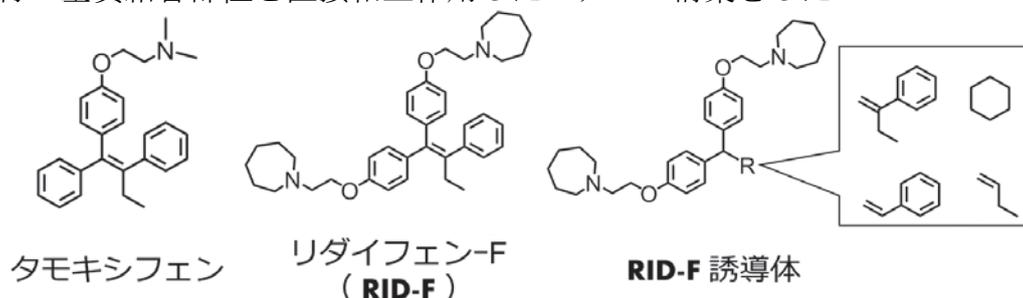


図 1.リダイフェン-F の構造および誘導体置換基導入位置(R)

【結果】RID-Fを中心炭素構造によって分類しIC₅₀およびCyt₅₀の比較を行なった。種々の誘導体の中でRID-Fが最も強い阻害を示した(CT-L:IC₅₀=0.65μM, PGPH:IC₅₀=0.44μM, HEK293:Cyt₅₀=4.1μM)。また、RID-Fのホモピペリジン環構造の一方を削った非対称性のRID-F誘導体は、いずれの阻害活性も大きく低下した。次に、酵素速度論解析によってRID-Fは、CT-L活性に対しては非拮抗阻害型、PGPH活性に対して拮抗阻害型を示した。また、標識阻害剤との競合実験においてもCT-L活性に対し競争的な阻害が確認された。HeLa細胞への化合物添加実験により、ユビキチンタンパク質の蓄積によるプロテアソームの阻害とアポトーシス誘導が確認された。これらデータを基礎にドッキングシミュレーションを行った結果、RID-Fではプロテアソームの基質結合部位に対して中心炭素構造またはホモピペリジン環がはまり込む形が示された。

【考察】種々のRID-F誘導体に対するプロテアソーム阻害効果の評価から、プロテアソーム阻害作用を発揮する新規構造を見出した。構造活性相関の結果、RID-Fには、ホモピペリジン環の存在と中心部構造の変換が、酵素阻害活性に大きく影響を与えることを示した。また結合シミュレーションより、RID-Fの分子構造中2か所の部位のいずれかがプロテアソームの触媒活性部位(基質結合部位)と相互作用する様式が示唆された。HeLa細胞への処理によって、RID-Fが最もアポトーシス誘導する活性が強いことが判った。

【文献】 1. Hasegawa, M., Yasuda, Y., Tanaka, M., Nakata, K., Umeda, E., Wang, Y., Watanabe, C., Uetake, S., Kunoh, T., Shionyu, M., Sasaki, R., Shiina, I., Mizukami, T. (2014) *Eur J Med Chem*, 71, 290-305.

D4

カーボンナノチューブを自己組織化的に被覆するペプチド分散剤の設計

○橋田泰彦¹, 梅山有和², 三原潤也², 今堀博^{1,2},
辻本将彦¹, 磯田正二¹, 高野幹夫¹, 橋田充^{1,3}

¹京大・iCeMS, ²京大院・工, ³京大院・薬

【目的】カーボンナノチューブ(CNT)はユニークな電気的特性や優れた機体的強度、高い熱伝導性などの特徴を有するナノ炭素材料であり、特に材料・エレクトロニクス分野での応用研究が進んでいる。生命科学分野においても、バイオセンサーやドラッグデリバリーのキャリア、光線温熱療法における光増感剤としての応用研究が行われているが¹⁾、CNTの生体応用においては、その高い疎水性のために水溶液中への分散が困難であるということが大きな問題となっており、その解決が望まれている。そこで本研究では、CNTの生体内応用を目指し、生体適合性の高いペプチドを用いてCNT分散剤を作成することを目的とした。

【方法】ペプチドは、 β -シート構造を形成することを基本コンセプトとして設計した。 β -シート構造を形成することが期待される数種類のペプチド配列に対して単層CNT(SWCNT)との複合体分子モデルを構築し、その構造の妥当性を評価した。分子モデルの構築は、TINKER 7.1ソフトウェアパッケージを用いた分子力学計算によって行った。ペプチドの合成はFmoc固相合成法によって行い、逆相HPLCによって精製した。CNT分散液の調製は、ペプチドを含む5 mlの重水中で1 mgのHiPCO SWCNT(Unidym社)を1時間超音波処理することにより行った。得られた分散液は40,000 rpmで超遠心し、バンドル化SWCNTを除去した。

【結果】設計した数種類のペプチドとSWCNTの複合体モデルを構築した結果、多くのペプチドがSWCNT表面に β -シート様の構造を形成することが出来たが、その中でもSGKWSGの6アミノ酸配列を4回繰り返す(SGKWSG)₄ペプチドが、ペプチド主鎖間の水素結合を最も多く形成し、非常に周期性の高い β -シート構造をとることが示された。そこでこのペプチドを実際に合成してSWCNTの分散に用いたところ、非常に安定性の良い分散液を得ることが出来た。この分散液は透析によって過剰なペプチドを除去してもSWCNTが凝集することは無く、1年以上の長期にわたって分散状態を維持した。この結果は、(SGKWSG)₄ペプチドがSWCNTと非常に強固な複合体を形成していることを示しており、このことはペプチド分子間に β -シート様の水素結合ネットワークを形成していることを示唆しているのではないかと考えられる。

一方で、分子モデリングにおいてあまり良い結果を得ることが出来なかったペプチドは、SWCNTの分散液を調製することは可能であったが、SWCNTに対する吸着量などの評価から β -シート構造を形成していないのではないかと考えられた。また、その分散液は水中では十分に安定であったが、塩や有機溶媒を含む緩衝液中では速やかに凝集を生じ、その安定性は(SGKWSG)₄ペプチドに劣ることが示唆された。

【考察】本研究では、作為的に β -シート構造様に水素結合を形成するようにペプチド分子を並べ、その構造を基盤として分子力学計算による最適化を行った。この手法では、実際にペプチドが水溶液中で形成する構造を予測することは難しいが、狙った構造を形成するためにどのペプチドがより適しているかという評価には十分実用的であると考えられる。現段階では、得られたSWCNTとペプチドの複合体がどのような構造をとっているのかを明らかに出来ておらず、さらなる構造解析が必要だろう。

【文献】 1. Liu Z, Tabakman S, Welsher K, Dai H. (2009) *Nano Res.* **2**, 85–120

D5

細菌異物排出ポンプの阻害剤結合様式と阻害メカニズムの解明
○山崎聖司^{1,2}, 中島良介³, 櫻井啓介³, 林克彦^{1,2}, 長田親広⁴,
星野一樹⁴, 小野寺宜郷⁴, 山口明人³, 西野邦彦^{1,2}
¹ 阪大・産研・生体分子制御, ² 阪大・院薬・細胞生物,
³ 阪大・産研・生体防御, ⁴ 第一三共製薬

【目的】近年、様々な抗菌薬に対して耐性を示す多剤耐性菌が出現し、臨床現場で深刻な問題となっている。その主原因として、菌体内から菌体外へ多様な化合物を排出できる、異物排出ポンプが特に注目されている。これまで異物排出ポンプの阻害剤開発には多くの努力が傾けられたが、未だに臨床的に有効な阻害剤は得られていない。大腸菌の排出ポンプ AcrB を阻害するピリドピリミジン誘導体 ABI-PP は、緑膿菌の排出ポンプ MexB の特異的阻害剤であるが、多剤耐性緑膿菌のもう 1 つの有力な原因である排出ポンプ MexY を全く阻害できず、多剤耐性緑膿菌感染症の治療薬にはならなかった。私たちは 2011 年に、薬剤は排出ポンプの基質輸送経路上の近位ポケットと遠位ポケットを順に通過して細胞外へ排出されるという蠕動機構を解明した(*Nature*, 2011)。本研究では、阻害剤 ABI-PP の結合様式を調べ、ABI-PP が MexY に効かない理由を解明することで、分子標的創薬による新規治療薬開発のための情報基盤の構築を目指した。

【方法】排出ポンプと化合物との共結晶構造情報をもとに、様々な変異型ポンプ発現株を構築し、各薬剤に対する感受性および排出活性測定等によって、阻害剤感受性に重要なアミノ酸を同定する。

【結果】AcrB・MexB と ABI-PP との共結晶解析の結果、遠位ポケット内部に阻害剤結合ピットの存在が示唆された。まず ABI-PP の阻害剤としての機能を調べたところ、基質薬剤とは異なり、AcrB によって全く排出されなかったことから、ABI-PP は阻害剤ピットに強く結合することで、排出ポンプの蠕動機構を抑制していることが示された。また、AcrB・MexB の阻害剤ピットにある Phe (F)が、MexY の同位置では Trp (W) に置き換わっており、その

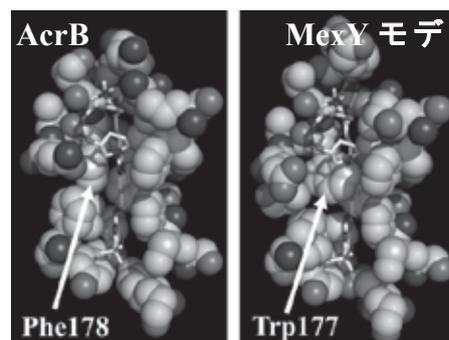


図 1. 阻害剤ピットの比較

大きな側鎖による立体障害で ABI-PP が結合できなくなっていると考えられた (図 1. 便宜上 MexY モデルには AcrB 結合型 ABI-PP を重ね合わせている)。解析の結果、AcrB_F178W 変異体は ABI-PP の阻害を受けなくなり、MexY_W177F 変異体は逆に阻害されるようになった。一方、MexB_F178W 変異体は、依然として ABI-PP の阻害を受けていたため、ABI-PP との共結晶を解析したところ、MexB の阻害剤ピットには余裕があり、Trp (W) に変異してもピット内に側鎖が突き出ないことが示唆された。そこで、ピット内部のスペースをわずかに増やした AcrB_F178W/V139A 変異体、MexY_I138A 変異体を構築して解析した結果、Trp (W) があるにも関わらず、ABI-PP の阻害を受けるようになることが明らかとなった。

【考察】以上より、阻害剤 ABI-PP に対する感受性は、阻害剤結合ピットにおけるごくわずかな立体障害によって決まることが示された。この立体障害を回避するような誘導体を分子設計することで、AcrB・MexB のみならず、MexY を含めた広域異物排出ポンプ阻害剤の開発が可能となった(*Nature*, 2013)。現在、当構造情報を利用した新規阻害剤の探索も進めており、実際に既存の阻害剤が効かない MexY にも効果がある新規化合物が複数得られ、製薬企業との共同開発を開始している。

D6

細菌ヒスチジンキナーゼの H-box を標的とする新規抗生物質、waldiomycin

○清水 莉子¹、江口 陽子¹、犬飼 洋一¹、枋尾 尚哉²、岡島 俊英³、新家 粧子¹、深溝 慶¹、
五十嵐 雅之⁴、木川 隆則⁵、内海 龍太郎¹

¹近大・院・農、²広大、³阪大・産研、⁴微化研、⁵理研

【目的】細菌の二成分情報伝達システム(two-component system: TCS)はヒスチジンキナーゼ(HK)と対となるレスポンスレギュレーター(RR)からなり、細菌の病原性、増殖、バイオフィーム形成等の遺伝子発現の制御も担っていて、新規抗菌剤の標的として有効である。HKは細胞外のセンサードメイン、細胞内2量体化(DHp)ドメインとATP結合(CA)ドメインを構成成分として共通に有し、DHpドメインは、2本のヘリックス(I, II)からなり、それらがサブユニットとなりホモ二量体(4ヘリックスバンドル構造)を形成している。本研究から見出した新規抗生物質、waldiomycin⁽¹⁾は細菌HKのDHpドメインと相互作用し、自己リン酸化活性を阻害することが知られている。本研究では立体構造が既知である大腸菌のHK EnvZ DHpドメインを用いて、waldiomycinによるEnvZ DHpドメインの内の標的部位を明らかにしようとした。

【方法】¹⁵N-EnvZ DHpを調製し、NMRによる¹H,¹⁵N-HSQCスペクトルを用いたwaldiomycin滴定実験を行い、waldiomycinとの相互作用の有無、また、相互作用領域を特定した。特定した相互作用領域を中心にアミノ酸残基のアラニン変異体を用いて、waldiomycinによる自己リン酸化阻害活性(IC₅₀)を測定した。IC₅₀測定においてwaldiomycinに耐性化を示した変異体を¹⁵N-EnvZ DHp変異体として調製し、waldiomycin滴定実験を行い、相互作用の変化を観測した。

【結果】¹⁵N-EnvZ DHpを用いてのwaldiomycin滴定実験を行った結果、ヘリックスI内の自己リン酸化ヒスチジン残基およびその近接領域であるH-boxと、ヘリックスIIのC末端に保存された疎水性アミノ酸を含むX-regionを中心に明らかなクロスピーク強度の減衰が見られ、相互作用が確認された。H-box、X-regionに位置するアミノ酸残基のアラニン変異体を用いて、waldiomycinによる自己リン酸化阻害活性(IC₅₀)を測定した結果、H-box内の変異体S242A、D244A、T247A、P248Aはwaldiomycinに顕著な耐性化を示した。これら4種の¹⁵N-EnvZ DHp変異体を用いて、waldiomycin滴定実験を行った結果、シグナル強度の減衰は観測されず、waldiomycin結合能が明らかに弱くなったと考えられた。これらの結果はDHpドメイン内に共通に保存されたH-box内のS242、D244、T247、P248はwaldiomycinの結合に重要なアミノ酸残基であることを示した。

【考察】waldiomycinはH-box、X-regionを含む他のクラスI HKに対して、自己リン酸化活性を阻害した。H-boxを保持しないクラスII HK CheAや、ヘリックスIIのC末端が短くX-regionを保持しないクラスII HK NtrBには自己リン酸化阻害を示さなかった。これらの結果はwaldiomycinがクラスI HKのDHpドメインのヘリックスIのH-boxとヘリックスIIのX-regionへの結合により、CAドメインのHK触媒作用を阻害するという我々のモデルを強く支持した。現在、HKのDHpドメインに作用するキナーゼ阻害剤はまだ報告されておらず、waldiomycinはDHpドメインのH-boxを標的とする最初のヒスチジンキナーゼ阻害剤であることが明らかとなった。

【文献】 1. Igarashi M., Watanabe T., Hashida T., Umekita M., Yanagida Y., Kino H., Kinoshita N., Sawa R., Nishimura Y., Utsumi R., Nomoto A. *J. Antibiot.* **66**,459-464 (2013).

D7

Visible immunoprecipitation (VIP) アッセイによるマルチサブユニット複合体の構築様式の 解明

○ 加藤洋平¹, 野崎梢平¹, 寺田将也¹, 中山和久¹
¹京大・院薬・生体情報

【目的】細胞内のタンパク質には単独で働くものと、複数のタンパク質が組み合わさって働くものがある。多数のタンパク質から構成されるマルチサブユニット複合体は、単独のタンパク質では成しえない複雑な機能を担っている。このような複合体は細胞や組織から生化学的な手法を用いて単離されることが多い。しかし、多数のサブユニットがどのように組み合わさって複合体を形成するのか、という点については天然の複合体だけでは解明することが難しい。また一方で、個々のタンパク質間相互作用の解析には酵母2ハイブリッド法、GST プルダウン法、共免疫沈降法などが用いられているが、これらの方法は主に1対1のタンパク質間相互作用を調べるのに適した方法であり、複数のタンパク質が関与する複雑なタンパク質間相互作用を調べることは困難である。そこで本研究では、マルチサブユニット複合体における複雑なタンパク質間相互作用を解明できる新たなアッセイ法を開発し、その手法を用いてマルチサブユニット複合体（具体的には BBSome 複合体、Exocyst 複合体、IFT 複合体）の構築様式を解明することを目的とした。

【方法】 Visible immunoprecipitation (VIP)アッセイ

アルパカ由来の単鎖抗体でGFPを認識する anti-GFP-Nanobody の cDNA を人工遺伝子合成し、pGEX6P1 ベクターにクローニングした。大腸菌で GST-anti-GFP-Nanobody を発現させ、グルタチオンセファロースビーズを用いて精製した。

GFP 融合遺伝子と RFP 融合遺伝子をコードしたプラスミドを HEK293T 細胞にポリエチレニミンを用いてトランスフェクションした。24 時間後に蛍光タンパク質の発現を顕微鏡で確認し、その後 cell lysate を調製した。次に lysate と GST-anti-GFP-Nanobody ビーズを用いて共免疫沈降を行った。最後に免疫沈降後のビーズを蛍光顕微鏡で観察することで、GFP/RFP 融合タンパク質間の相互作用の有無を調べた。

【結果】 VIP アッセイは蛍光タンパク質と単鎖抗体の Nanobody を組み合わせた共免疫沈降法をベースとしている。基本原理は一般的な共免疫沈降法とほぼ同じであるが、手間のかかるウェスタンブロットをするのではなく、ビーズ上の蛍光タンパク質のシグナルを顕微鏡で直接検出するという点が大きく異なっている。この工夫により簡単、迅速、安価にタンパク質間相互作用を調べることができるようになった。また、VIP アッセイでは1対1の相互作用だけでなく、4種類の蛍光タンパク質を使うことで一度に4サブユニット間の相互作用を解析することができた。さらに複数のサブユニットをまとめて細胞に発現させることで、これまで困難だった複数サブユニット間の相互作用、すなわち1対2、1対3、2対2のような複雑な相互作用の解析にも応用できることがわかった。

これまでに VIP アッセイを用いて、一次繊毛でのタンパク質輸送やメンブレントラフィックに関与する BBSome 複合体 (8 サブユニット)、Exocyst 複合体 (8 サブユニット)、IFT-B 複合体 (16 サブユニット) の構築様式を解明することができた。

【考察】 VIP アッセイはシンプルでありながら多目的に応用できる方法であり、今後さまざまな複合体の構築様式を解明するために役立つと考えている。

【文献】

D8

周期構造金属薄膜を用いた細胞分離と赤外線透過性による検出

○山本晃毅¹, 森康介¹, 白井恵美¹, 井上有香¹, 萬壽優², 渡邊順子²,
神波誠治², 近藤孝志², 長谷川慎¹

¹長浜バイオ大学バイオサイエンス学部・研究科, ²(株)村田製作所

【目的】本研究は、メッシュ状の繰り返し構造を持つ金属薄膜を用い、細胞など生体由来粒子の分離と赤外線透過特性を利用したセンシングの技術開発を目的としている。半導体作製技術を利用した精密微細加工により作製された金属薄膜（メタルメッシュデバイス (MMD)）は、その構造的な特徴から粒子の大きさによる既存法にない精密な“ふるいわけ”が可能である。この性能を生かして、細胞を大きさにより分離できれば、遠心分離によらない細胞回収が可能となり、細胞工学分野での幅広い応用が期待できる。

【方法】孔径 1.8 μm の MMD を用いて、大腸菌、HeLa 細胞の分画実験を行った。MMD を吸引ポンプのライン上にセットし、それぞれの細胞を吸引ろ過した。これにより、フィルター上に残留した細胞を光学・電子顕微鏡により観察した。さらに FT-IR を用いて赤外線透過性から表面残留物の定量を検討した。

【結果】MMD 表面の誘電率の変化により、赤外透過ピークのシフトが生じた。このシフト差および透過率の変化の定量性について検討した結果、細胞数 100 個レベルでの検出が可能であることが確認された。細胞をろ過した結果、孔径以下のサイズである大腸菌は通過し、直径約 15 μm の HeLa 細胞は MMD 表面に残留した。また、MMD 表面を金粒子で修飾することにより、赤外透過ピークによる定量性やふるい効果による細胞の分離効率が改善した。

【考察】細胞の吸引ろ過の結果より、マイクロメートルオーダーでの精密な分画できることが示された。今後、形状から細胞の違いを分別できるか検討を進める。

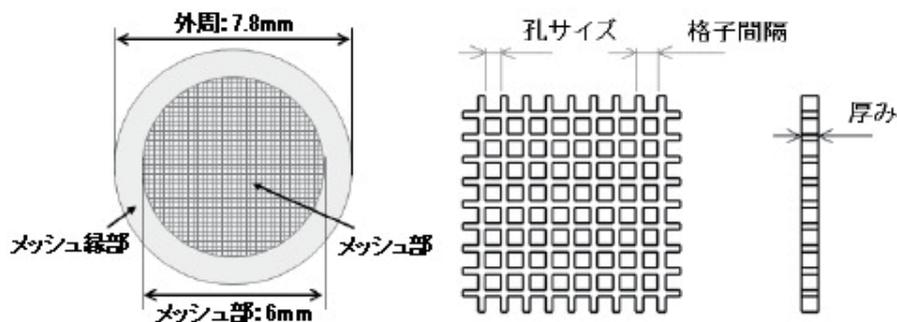


図1 メタルメッシュデバイスの外観

(<http://www.murata.com/ja-jp/about/newsroom/news/application/healthcare/2014/0902>)

MMLV 逆転写酵素の RNase H ドメインの性状解析

○横川貫太¹、西村耕作¹、深津浩佑²、久世郁実²、久好哲郎¹、
小西篤¹、三上文三¹、兒島憲二¹、保川清¹
¹京大院・農、²京大・農

【目的】モロニー Maus 白血病ウイルス (MMLV) 逆転写酵素 (RT) は分子量 75,000 のモノマーで、5 個のドメイン (Fingers、Palm、Thumb、Connection、RNase H) から成り、DNA ポリメラーゼ活性と RNase H 活性をもつ。両活性の活性部位はそれぞれ Palm および RNase H ドメインに存在する。MMLV RT は全体の立体構造が得られておらず、さらに RNase H ドメインはその性状について不明な点が多い。そこで本研究では、MMLV RT の RNase H ドメインを調製し、性状解析を行った。

【方法】①RNase H ドメイン (I498-L671) の調製：完全長のもの (WT) および基質結合部位を含む I593-L603 あるいは G595-T605 が欠失したもの (それぞれ $\Delta C1$ 、 $\Delta C2$) に、Strep-tag (WSHPQFEK) と (His)₁₀ をそれぞれ N および C 末端に付加させたものを大腸菌で発現させ、菌体から精製した。②蛍光基質を用いた RNase H 活性の測定：3'-fluorescein 修飾 18 塩基の RNA (5'-GAUCUGAGCCUGGGAGCU-3') と 5'-Dabcyl 修飾 18 塩基の DNA (5'-AGCTCCCAGGCTCAGATC-3') から成る RNA/DNA 二本鎖を基質として、37°C で 45 分間反応を行い、反応停止後、490 nm で励起したときの 515 nm の蛍光強度を解析した。

③放射性基質を用いた RNase H 活性の測定：5'末端が ³²P で標識された 25 塩基の RNA (5'-AUGUAUAGCCCUACCAGCAUCCTGG-3') と未標識 25 塩基の相補的 DNA から成る RNA/DNA 二本鎖を基質として 37°C で反応を行い、経時的にサンプルを採取し、反応停止後、変性ポリアクリルアミド電気泳動にかけ、切断された RNA 鎖のパターンを解析した。

【結果】①蛍光基質を用いた RNase H 活性の測定：WT は活性を示したが、 $\Delta C1$ と $\Delta C2$ は活性を示さなかった。蛍光増加量から、RNase H ドメイン単独の本活性は RT のそれよりも著しく低いことが示された。②放射性基質を用いた RNase H 活性の測定：WT、 $\Delta C1$ および $\Delta C2$ では鎖長が異なる 7-16 塩基のバンドが同程度の強度で検出された。これは、本基質に MMLV RT (全長) を作用させたとき、14-20 塩基のバンドが強く検出されたことと異なった。また $\Delta C1$ と $\Delta C2$ は活性を有したが、WT よりも著しく低かった。

【考察】単独発現させた RNase H 領域は DNA 合成活性の活性部位をもたないために、基質との親和性が低く、切断部位が不特定になったと考えられる¹⁾。現在、鎖長と配列が異なる放射性基質を用いて切断パターンの解析と速度論的解析を行っている。さらに、WT、 $\Delta C1$ 、 $\Delta C2$ の結晶化を試みている。

【文献】1. K. Nishimura, K. Yokokawa, T. Hisayoshi, K. Fukatsu, I. Kuze, A. Konishi, B. Mikami, K. Kojima, K. Yasukawa, *Protein Expr. Purif.* in press

D10

TALE タンパク質の分子進化
○辻将吾, 今西未来, 二木史朗
京都大・化研

【目的】任意の塩基配列に結合するようにデザイン可能な DNA 結合タンパク質は遺伝子転写制御や遺伝子改変など生命科学技術への応用が期待されている。近年、Transcription activator-like effector (TALE) と呼ばれる DNA 結合タンパク質が発見され、注目されている。TALE は 34 アミノ酸から成るユニットが繰り返される領域を含んでおり、繰り返しユニットひとつが標的 DNA の 1 塩基を認識する。各繰り返しユニットは 12、13 番目のアミノ酸以外は保存されており、この 2 アミノ酸（可変アミノ酸）の配列変化によって、各繰り返しユニットが、どの塩基に結合するかが決定される。異なるユニットを組み合わせるだけで任意の塩基配列に結合する TALE を容易に作製することが可能である¹⁾。しかし、TALE が標的 DNA に効率的に結合するためには、繰り返しユニットによって認識される塩基配列に加えて、5'末端側に T が必要であるという制限がある。また遺伝子転写制御に重要な働きをするといわれる 5 位メチル化を受けたシトシン(5mC)を選択的に認識するユニットは未だ存在しない。そこで本研究では、より自由に標的配列を選択することができる TALE タンパク質を獲得することを目指した。

【方法】TALE による 5'末端チミン認識には、リピート-1 と呼ばれる繰り返しユニット類似構造部分の関与が示唆されていた。そこで 5'-T の制限を解除するために、リピート-1 のループ構造部に相当する 230 番目から 233 番目の 4 アミノ酸 (KQWS) をランダム化したライブラリーを作製した。また 5mC 選択的認識ユニットを獲るため、繰り返しユニットの可変アミノ酸を含めた周辺部位をランダム化したライブラリーを作製した。これらのライブラリーから大腸菌を用いた Bacterial one-hybrid screening²⁾ によりセクションを行った。その結果得られた変異体タンパク質に関して、ルシフェラーゼレポーターアッセイやゲルシフトアッセイにより結合活性を個別に評価した。

【結果】リピート-1 のランダム化ライブラリーのセクションの結果、得られた全ての変異体において 231 番目のグルタミン残基がアルギニンに置換されていた。それらの変異体を用いてルシフェラーゼアッセイを行ったところ、5'-A/T/G から始まる標的配列への結合活性が 5'-T から始まる標的配列に対する活性と同程度まで上昇することが明らかとなった³⁾。またユニットランダム化ライブラリーからのセクションの結果、比較的小さなアミノ酸を多く含む変異体が多かった。変異体の結合活性をルシフェラーゼアッセイで評価したところ、既存の 5mC 結合性を示すユニットに比べて、5mC/C 結合比において大きな上昇が見られた (図 1)。

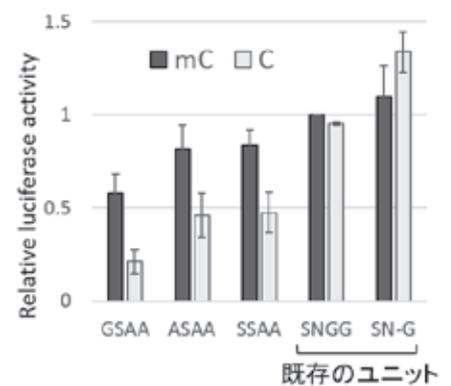


図 1. 得られた 5mC 選択的結合ユニットのルシフェラーゼ活性

- 【文献】 1. J. B. Adam *et al.*, *Science* 333, 1843-1846 (2011)
2. M. B. Noyes, *Meth. Mol. Biol.* 786, 79-95 (2012)
3. S. Tsuji, S. Futaki, M. Imanishi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 441, 262-265 (2013)

D11

ESI マススペクトルを用いた非ワトソン-クリック型塩基対の検出

○石田莉葉子、岩橋秀夫

和医大・院医・生体分子解析学

【目的】DNA の二重らせんを形成する際はワトソン・クリック型塩基対 A と T、G と C が形成されている。ところが、X線結晶解析やNMR法にてd(CCCC), d(CCCT), d(CCCAAT), d(TAACCC)の4重鎖及びd(G-A)₄, d(T-C)₄の3重鎖が形成され、前者にC:C、後者においてはHoogsteen型C:Gの非ワトソン-クリック型塩基対が見いだされた。その生成にはpHが影響すると報告されている。そこでESIマススペクトル法を用いて単量体レベルで非ワトソン-クリック型塩基対を検出し、その安定性を評価することを試みた。

【方法】1 mM Adenosine, Cytidine, Guanosine, Thymidine, Uridine, 5-Bromouridine と塩酸 0.1 mM ~ 4 mM を混合し、ESI マススペクトルを測定した。

【結果】1.0 mM の塩酸を添加したとき、Adenosine の場合は m/z 268 のイオンが検出され、これは単量体に相当する。二量体に相当する m/z 535 のイオンは、ほとんど検出されなかった。Cytidine の場合は単量体 (m/z 244) と二量体 (m/z 487) が検出され、単量体に対する二量体の相対存在比 0.28 であった。Guanosine の場合は単量体 (m/z 284)、二量体 (m/z 568) が検出され、単量体に対する二量体の相対存在比 0.19 であった。Thymidine の場合は単量体 (m/z 243)、二量体 (m/z 485) が検出され、単量体に対する二量体の相対存在比 0.87 となった。Uridine の場合は単量体 (m/z 245)、二量体 (m/z 489) が検出され、単量体に対する二量体の存在相対比 0.54 となった。5-Bromouridine の場合は (m/z 323・m/z 325)、二量体 (m/z 645・m/z 647・m/z 649) が検出され、単量体に対する二量体の相対比 0.49 となった。5-Bromouridine においては単量体に相当する2種類のイオン m/z 323・m/z 325 が検出された。これは臭素に ⁷⁹Br、⁸¹Br という同位体が存在するからである。二量体に相当する3種類のイオンとして m/z 645・m/z 647・m/z 649 が検出され、それらは二量体中に ⁷⁹Br と ⁷⁹Br、⁷⁹Br と ⁸¹Br、⁸¹Br と ⁸¹Br をそれぞれ含むイオンに相当する。

塩酸の濃度を変化させ、Adenosine, Cytidine, Guanosine, Thymidine の二量体イオンの強度を塩酸濃度に対してプロットすると、Adenosine では 0.5 mM、Cytidine では 0.5 mM、Guanosine では 1.0 mM、Thymidine では 2 mM で最大となった。

Thymidine, Uridine, 5-Bromouridine の二量体形成能を比較するために、それぞれの混合溶液 (T/U、T/BrU、U/BrU) の ESI マススペクトルを測定した (表 1)。

表 1 Thymidine (T), Uridine (U), 5-Bromouridine (BrU) の混合溶液の ESI マススペクトル

	T-T (%)	U-U (%)	BrU-BrU (%)	T-U (%)	T-BrU (%)	U-BrU (%)
T/U	60±17	9±6		30±11		
T/BrU	56±4		6±2		38±2	
U/BrU		37±7	28±14			40±9

表 1 の結果より、二量体形成能は、T-T > U-U > BrU-BrU であった。

【考察】Cytidine, Guanosine, Thymidine, Uridine, 5-Bromouridine で非ワトソン・クリック塩基対が検出された。塩基対の形成には加えた塩酸の濃度に依存した。このことより塩基へのプロトン付加が二量体形成に直接関与していることが推測される。Thymidine, Uridine, 5-Bromouridine の二量体形成能の違いは、5位の置換基の影響を受けているものと思われる。置換基の電気陰性度が大きくなるにつれて二量体形成能が低下していた。

D12

概日リズムの頑強性を担う視交叉上核バソプレッシン神経結合

○山口賀章, 岡村 均

京都大・院薬・システムバイオ

【目的】欧米へと海外渡航をすると、不眠や胃腸障害など、いわゆる時差ボケに悩まされる。これは、ジェット機旅行により環境の明暗リズムは瞬時に位相変動するが、自身の体内時計は直ちに渡航先の現地時間にリセットされないため、外界時計と体内時計の時刻位相が乖離してしまうからである。しかしながら、時差が生じる分子神経機構はほとんど解明されていなかった。そこで私は、概日リズムの中核である視交叉上核 (SCN) をターゲットとして分子スクリーニングを行い、バソプレッシン (AVP) の受容体である V1a と V1b を時差の分子候補として得た。

【方法】野生型マウスとして、C57Bl/6 マウスを用いた。V1aV1b ダブルノックアウト (V1aV1bDKO) マウスは、V1aKO マウスと V1bKO マウスを交配することで得た。マウスを時差環境におくために、12 時間明期/12 時間暗期の明暗環境位相を 8 時間前進させた。時差環境下における時計遺伝子の発現変動を定量的に解析するために、時差前は 1 日半、時差後は野生型マウスでは 10 日間、V1aV1bDKO マウスでは 6 日間にわたって、4 時間毎に各点 2 匹のマウスから SCN、肝臓、腎臓をサンプリングし、RT-PCR 法を用いて定量的に時計遺伝子の発現量を測定した。

【結果】明暗環境を 8 時間前進させた時差環境下では、野生型マウスは新しい明暗環境に再同調するのに 10 日程度を要したが、V1aV1bDKO マウスは瞬時に再同調した。しかしながら、V1aV1bDKO マウスは、恒暗条件下での概日行動リズムの周期や SCN における時計遺伝子の発現リズムおよび光パルス刺激に対する応答性は全て正常であった。すなわち、V1aV1bDKO マウスは通常の明暗飼育環境下では概日時計システムが正常なマウスであるが、時差環境下におかれた時のみ素早く再同調するという、極めてユニークな特徴を持ったマウスであることがわかった¹。

続いて、時差環境下における時計遺伝子 *Per2* の発現を長期間にわたって測定した。野生型マウスの SCN において、*Per2* は時差を起こす前は明瞭な日周リズムを示していたが、時差を起こした直後はそのリズム性が消失した。以後リズム性は日々少しずつ回復し、時差後 8 日目に時差前と同様の明瞭な日周リズムが観察された。一方で V1aV1bDKO マウスの SCN の *Per2* は時差後 3 日目と非常に早く回復した。同様の結果は、他の時計遺伝子である *Per1*、*Bmal1* および *Dbp* においても観察された。また、肝臓や腎臓といった末梢臓器においても時計遺伝子は 24 時間周期のリズムで発現振動するが、時差環境下において V1aV1bDKO マウスは、時差後野生型マウスよりも早く再同調した¹。

【考察】AVP は SCN の主要なペプチドであり、AVP 神経細胞群は V1a と V1b 受容体を介して SCN 内で局所神経ネットワークを形成する。SCN 切片培養を用いて数百個に及ぶ SCN 神経細胞の個々のリズムをリアルタイム計測したところ、正常マウスの SCN は外界からのリズム攪乱因子の存在下であっても各 SCN 神経細胞がオリジナルのリズム位相を維持できたが、V1aV1bDKO マウスの SCN では維持されなかった¹。よって、SCN の AVP 神経結合が概日リズムの頑強性に大きく寄与していると考えられる。このような強靱な体内時計により、満月や山火事といった異常な明暗環境下であっても、地球上の生命体は自身の時間を維持できるものと考えられる。しかしながら、ジェット機旅行が実用化された現代ではその堅牢性がかえって仇となり、時差の原因になっているようだ。

【文献】 1. Yamaguchi Y#, Suzuki T#, Mizoro Y, Kori H, Okada K, Chen Y, Fustin JM, Yamazaki F, Mizuguchi N, Zhang J, Dong X, Tsujimoto G, Okuno Y, Doi M, Okamura H. *Science* 342, 85-90, 2013. (#: co-first).

D13

ヘパラン硫酸の合成異常が神経発生と行動に与える影響についての解析
池田 亜弥, ○石野 敦重, 尾ノ井 孝一, 中村 侑, 灘中 里美, 北川 裕之
神戸薬大・薬・生化

【目的】ヘパラン硫酸 (HS) は、脳の発達過程で重要な機能を担い、その生合成は厳密に制御されている。これまでに、HS の主要な生合成酵素遺伝子、*EXT1*、を欠損させたノックアウトマウスが作製され、HS が合成されなかった場合には、著しい脳の形態形成異常を示すこと、神経細胞特異的な *EXT1* の欠損により自閉症に似た表現型を呈することが明らかになっている。しかし、*EXT1* の欠損による HS の合成不全は致死を招くため、*EXT1* 遺伝子がヒトの精神疾患と関連する可能性は低いと考えられる。今回、私たちは、HS の合成を下方制御する分子 *EXTL2* のノックアウトマウス¹⁾を用いて、HS の合成量が正常レベルよりも増加した場合、神経の発生過程にどのような異常が生じるのか、この異常が行動にどのような影響を与えるのかについて調べた。

【方法】免疫組織染色法により、野生型マウスとノックアウトマウスの大脳皮質に存在する神経細胞、および胎仔期の神経前駆細胞の数を種類ごとに調べた。また、神経前駆細胞の増殖や分化について、ブロモデオキシウリジン (BrdU) の取り込みと細胞周期関連核タンパク *Ki67* を指標に調べた。野生型および *EXTL2* ノックアウトマウスの行動は、オープンフィールド試験、高架式十字迷路試験、および明暗箱試験により評価した。

【結果】大脳皮質に存在する神経細胞について調べた結果、*EXTL2* ノックアウトマウスでは興奮性神経細胞数に変化はなかったが、抑制性神経細胞数が増加していることがわかった。抑制性神経細胞の増加の原因を調べた結果、胎生期における抑制性神経細胞前駆細胞の増殖が亢進していることが示された。次に、抑制性神経細胞と興奮性神経細胞の数のバランスの乱れがどのような行動異常を示すのかについて調べた。通常の飼育条件で活動量に有意な差は見られなかったが、オープンフィールド試験から、新奇環境下で多動の傾向を示すことがわかった。また、高架式十字迷路試験で壁のない走行路 (オープンアーム) への進入回数の増加、明暗箱試験で明箱における滞在時間の延長が認められた。

【考察】以上の結果は、*EXTL2* による HS 合成の制御が神経発生の過程で重要な役割を担うことを示している。また、この制御機構の破綻によって HS 合成が恒常的に増加した結果、神経前駆細胞の増殖が亢進し、大脳皮質における抑制性神経細胞数が野生型マウスよりも増加していることが示唆された。大脳皮質の神経細胞は、8 割が興奮性神経細胞、2 割が抑制性神経細胞で構成されており、これらのバランスが正常な高次脳機能の発現に重要である。今回の解析から、抑制性神経細胞が増加した *EXTL2* ノックアウトマウスは情動行動の異常を示すことがわかった。今後、*EXTL2* 遺伝子欠損が抑制性神経細胞前駆細胞を増加させる機構を詳細に解析するとともに、*EXTL2* 遺伝子欠損により生じる行動異常がどのような精神疾患に関連するのかを明らかにしていきたい。

【文献】

- 1) Nadanaka, S., Zhou, S., Kagiya, S., Shoji, N., Sugahara, K., Sugihara, K., Asano, M., and Kitagawa, H. (2013) *J. Biol. Chem.* 288, 9321-9333
- 2) Nadanaka, S., Kagiya, S., and Kitagawa, H. (2013) *Biochem. J.* 454, 133-145
- 3) Nadanaka, S. and Kitagawa, H. (2014) *Matrix Biol.* (2014) 35, 18-24

D14

カルマン症候群原因遺伝子産物 Anosmin-1 は Netrin-1 と結合する

○浅野 弘嗣¹、竹内 祥人¹、清水 昭男¹、佐藤 直子²、瀬尾 美鈴¹
¹京産大・総合生命科学・生命システム学科, ²東大・医・小児科

カルマン症候群(KS)は、低ゴナドトロピン性性腺機能低下、嗅覚低下・消失、二次性徴の欠如を伴う先天性疾患である。現在までに、Anosmin-1(Anos1)をコードする KAL-1 遺伝子を含む8つの原因遺伝子が同定されている。KS患者は、嗅神経の嗅球への軸索伸展、嗅球形成、およびゴナドトロピン放出ホルモン(GnRH)神経の嗅上皮から視床下部への移動に障害があることが報告されているがその分子メカニズムについては不明な点が多い。また Anos1 は細胞外分泌タンパク質であり、誘因性軸索ガイダンス分子と考えられているが、その作用機序はほとんど明らかにされていない。

Anos1 のタンパク質ホモロジー解析により、DCC および Neogenin の細胞外領域と約40%の相同性があることを見出した。DCC および Neogenin は、軸索ガイダンス分子 Netrin-1(NTN1) の受容体として知られ、ノックアウトマウスやモルフォリノを用いたゼブラフィッシュの解析から、NTN1 シグナルが GnRH 神経の細胞移動や嗅神経の嗅球への投射を制御する事が明らかにされている。本研究では、Anos1 が NTN1 の可溶性受容体として働いて、NTN1 シグナルを制御することにより、嗅球形成や GnRH 神経の移動を促進する可能性を検証する。

Anos1 と NTN1 が相互作用するかを検討するため、Anos1 および NTN1 を過剰発現させた HEK293T 細胞の細胞培養上清を用いて共免疫沈降を行った。その結果、NTN1 と Anos1 が直接結合した。Biacore を用いたタンパク質相互作用の解析から、Anos1 と NTN1 の結合は高親和性 (Kd: 5.23nM) であることが明らかになった。加えて、欠損型 Anos1 を用いた Biacore の解析から、4つの FNIII ドメインの中で2つ目の FNIII ドメインが NTN1 との結合に関与していることが示唆された。次に、Anos1 が NTN1 に結合することにより NTN1 の受容体への結合を制御するという仮説を立て、AP-binding assay により検証を行った。その結果、NTN1 受容体 DCC 及び UNC5B への NTN1 の結合を Anosmin-1 が阻害することが明らかになった。次に、Anos1 が NTN1 の生物学的活性を実際に制御しているかを検証するため、PC12 細胞を用いた成長円錐崩壊アッセイを行った。その結果、NTN1 単独添加により成長円錐の崩壊が誘導されたのに対し、Anos1 と NTN1 の同時添加により成長円錐の崩壊が阻害された。NTN1 による成長円錐崩壊の細胞内シグナルを検討した結果、アクチン重合の制御タンパク質 cofilin-1 の脱リン酸化が誘導され、Anos1 を同時添加することにより cofilin-1 の脱リン酸化が阻害された。これらの結果から、Anos1 は、NTN1 の可溶性受容体として働き、NTN1 シグナルを阻害することにより誘因性軸索ガイダンス作用を持つことが示唆された。先行研究の知見を合わせて考えると、Anos1 は NTN1 といった全く異なるガイダンスシグナルを制御することにより、嗅神経軸索の投射や GnRH 神経の移動を制御していることが示唆された。

D15

microRNA-1270 に拮抗するインターフェロン α competing endogenous RNA ネットワーク

○坂本凌、蔣時文、吉田徳之、木村富紀

立命館大学薬学部薬学科病原微生物学研究室

【目的】 我々はこれまでに、自然免疫の主たるエフェクターをコードするインターフェロン α 1 (IFN- α 1) 遺伝子の逆鎖から転写されるアンチセンス (AS) RNA が、同 mRNA を転写後性に安定化し、IFN- α タンパク質の発現を増大させることを報告した¹⁾。その作用メカニズムとして、IFN- α 1 mRNA の発現を負に制御する microRNA-1270 (miR-1270) が同 mRNA に結合するに際し、IFN- α 1 AS RNA が競合的に拮抗する可能性を考えた。しかし、IFN- α 1 AS RNA が競合的に拮抗阻害を果たすためには、同分子と miR-1270 の分子比が概ね 1:1 になることが必要と考えられる²⁾。しかしながら、これまでの研究から IFN- α 1 AS RNA を含め、アンチセンス RNA の発現は一般的に mRNA に比較し低レベルにとどまることが知られている¹⁾。そこで、IFN- α 1 AS RNA による同 mRNA 安定化の新たなメカニズムを知る目的で、miR-1270 に対するデコイ RNA として機能する可能性を検討した。その結果、IFN- α 1 AS RNA は他の miR-1270 標的分子と共にネットワークを形成し、miR-1270 を吸着する結果、IFN- α 1 mRNA 分解に拮抗することを見出したので報告する。

【方法】 IFN- α 1 AS RNA 並びに mRNA 及び miR-1270 の分子数を RT-qPCR により定量した。続いて、IFN- α 1 AS RNA 上に miR-1270 response element (MRE-1270) をマッピングし、ルシフェラーゼレポーターにより検証した。加えて、miR-1270 過剰発現及び miR-1270 の中和実験により、その標的である MRE-1270 を有する分子の同定を図った。

【結果と考察】 IFN- α 1 AS RNA 上には、MRE-1270 が 5 ヶ所に分布した。同 AS RNA 分子数が 1 μ g RNA 量あたり 1,558 \pm 82 であり、antimiR-1270 によりその発現は 3.6 倍に増大したことから、IFN- α 1 AS RNA が有する MRE-1270 は、1 μ g RNA あたり 100,100 \pm 9,696 分子存在する miR-1270 に対し、その約 30% に相当することが明らかになった。しかしながら IFN- α 1 AS RNA が competing endogenous RNA (ceRNA) として miR-1270 に拮抗するには、残余の 70% を充当する他の MRE 陽性分子の存在が必要と考えた。そこで MRE-1270 陽性分子のバイオインフォマティクス解析と antimiR-1270 導入による内因性 miR-1270 の中和実験を行ったところ、IFN- α ファミリーに属する IFN- α 8,10,14,17 mRNA に加え、IFN- α 7,8,10,14 AS RNA および CAPRIN1 を含む 5 種の mRNA 分子が、MRE-1270 を介して miR-1270 に拮抗することが明らかになった。以上の結果から、IFN- α 1 AS RNA をはじめとするこれらの AS RNA 並びに mRNA 群が、miR-1270 に対する ceRNA ネットワークを形成し miR-1270 に拮抗することで、IFN- α 1 mRNA の発現を制御する事が考えられた(図 1)³⁾。

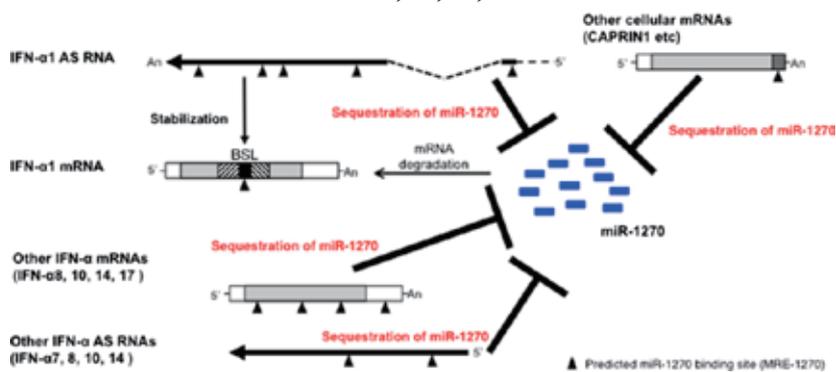


図 1 IFN- α ceRNA ネットワークモデル

- 【文献】 1. Kimura, T. *et al.* (2013) *Cellular and molecular life sciences*, 70: 1451-1467.
2. Tay, Y. *et al.* (2014) *Nature* 505: 344-352.
3. Kimura, T. Sakamoto, R. *et al.* (2015) *Cellular and molecular life sciences*, in press.

D16

核酸ドラッグの RISC に対する結合親和性評価法の開発

○小西諒¹, 松山洋平¹, 有吉純平¹, 小堀哲生¹, 村上章², 山吉麻子^{3,4}

¹京工繊大院工芸科学, ²京薬科大, ³京大白眉センター, ⁴京大院理学,

【目的】 microRNA (miRNA) は、ヒトの遺伝子発現の約 3 分の 1 以上を制御している non-coding RNA であり、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 の機能を阻害する代表的な手法としてアンチセンス法が挙げられる。現在、アンチセンス核酸 (ASO) の設計は、miRNA と ASO との熱力学的安定性 (二重鎖融解温度: T_m) を指標とするのが一般的である。しかし、miRNA と ASO の T_m と、細胞内における miRNA の機能阻害効果との間には必ずしも相関性が得られないことが報告されている¹⁾。そこで本研究では、miRNA が機能を発現するためには必ず RNA-induced silencing complex (RISC) と呼ばれる、リボヌクレオプロテインを形成する点に着目し、RISC と ASO の結合親和性 (解離定数: K_d) を算出する手法の開発を目的とした。RISC と ASO の K_d を求めることが出来れば、ASO を設計する上で有用な指標となることが期待される。

【方法】 ASO の標的として、Firefly luciferase mRNA を切断する miRNA (miR-Luc) を選択し、RISC を形成する miR-Luc のガイド鎖 RNA の 5' 末端に ³²P 標識を行った。次に *in vitro* RNAi system²⁾ を応用し、RISC と ASO との結合親和性を Native agarose gel 電気泳動により評価した。

【結果と考察】 Native agarose gel 電気泳動による分析の結果、ASO (2'-OMe 型) の濃度が上昇するに伴ってバンド①が消失し、バンド②へシフトすることが明らかとなった (Figure 1)。この結果より、バンド①は RISC であり、バンド②は RISC-ASO 複合体であることが示唆された。次にバンド①とバンド②の輝度を ASO の濃度に対してプロットし回帰分析を行ったが、適切な回帰曲線を得ることが出来ず、RISC と ASO との K_d を求めることが出来なかった。この原因として、ウェルに検出されるバンドが考えられる。このバンドは RISC が凝集化し、泳動されなかったものであると想定した。そのため、RISC と RISC-ASO 複合体を正確に分離出来なかったと考察した。RISC の凝集化を防ぐためにポリビニル硫酸を添加し、泳動パターンの検証を行った。発表ではその検証結果について報告する。

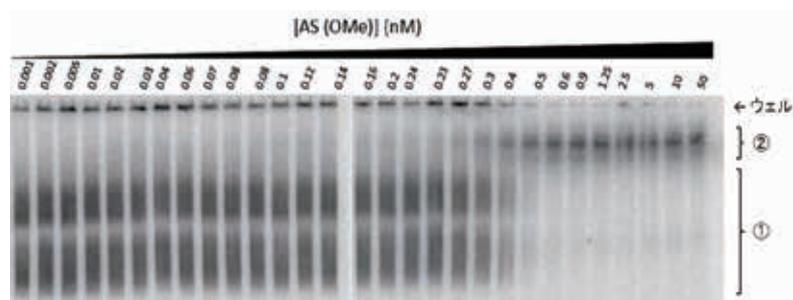


Figure 1. Native agarose gel 電気泳動による RISC-ASO 複合体の分析

【文献】

1. C. Esau, *et al.* (2006) *Nucleic Acids Res.*, 34, 2294-2304.
2. T. Kawamata, Y. Tomari, *et al.* (2009) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 16, 953-960.

D17

cMycにより発現制御される miR17-92 の iPS 細胞誘導過程における役割に関する研究

○植山 萌恵¹、重野 麻子¹、十河 孝浩²、馬場 藍¹、大矢 知佳¹、
小原 惇¹、成川 智貴¹、野津 遼祐¹、早川 千尋¹、川村 晃久¹

¹立命館大・生命科学・生命医科学, ²国立病院機構・京都医療センター

【目的】

人工多能性幹(iPS)細胞を用いた再生医療が期待されている一方で、その安全性を検証することが現在の課題の一つである。この問題を解決するために、依然として不明な点が多く存在する。特にiPS細胞が樹立する分子メカニズムについて詳細に解明する必要がある。我々は、これまで、iPS細胞への初期化過程で発現が変化する転写産物を網羅的に解析し、最近、非コードRNAであるmicroRNA17-92 cluster(miR17-92)の発現が初期化早期から亢進している可能性を見出した。また、これまでの報告から、miR17-92は下流の標的遺伝子として癌抑制遺伝子Ptenの発現を負に制御していることが示唆されている。さらに、PtenはAktを脱リン酸化することで、細胞増殖やがんを抑制することからiPS細胞形成を負に制御している可能性が強く示唆される。そこで本研究の目的は、iPS細胞誘導過程におけるmiR17-92の果たす役割について検討することである。

【方法】

野生型C57BL/6マウスの胎生13.5-14.5日の胎児から線維芽細胞(mouse embryonic fibroblasts,MEFs)を採取して、iPS細胞を作製するための体細胞として用いた。レトロウイルスを用いたiPS細胞の誘導は、過去の報告¹⁾に従って行った。RT-QPCR法により、誘導過程における遺伝子の発現をmRNAレベルで解析した。miR18a、19aの発現に関してはApplied Biosystems社のキットを用いたRT-QPCR法により定量解析を行った。またRT-QPCR法、蛍光免疫染色、胚様体形成における多分化能の確認実験及び奇形腫形成実験解析によりmiR17-92を用いて作製したiPS細胞株の特性解析を行った。

【結果】

初めに、初期化過程でmiR17-92の発現を定量する目的でRT-QPCRを行った。誘導過程早期(5日目)で、初期化4因子(Oct4/Sox2/Klf4/cMyc)によりmiR17-92の中でmiR18a、19aの発現が2-3倍程度まで上昇し、cMycがこの原因となっていることが判明した。さらにmiR17-92をウイルスにより強制発現させることで、iPS細胞の形成効率の上昇を認めた。またcMycを除いた3因子によるiPS細胞誘導においてもmiR17-92の強制発現によって、Nanog陽性のコロニー形成効率の上昇を認めた。miR17-92のプロモーター解析の結果では、誘導過程におけるcMycの結合部位が同定された。興味深いことに、miR17-92の発現が亢進している未分化ES細胞においては、初期化誘導過程とはcMycが結合する領域が異なる可能性が示唆された。

【考察】

以上の結果より、cMycによるmiR17-92の発現はiPS細胞形成に重要であるということが明らかになった。また、多能性の誘導と維持においてcMycがmiR17-92の発現に果たす役割が異なっている可能性が示唆された。

【文献】 1. Kawamura T et al. Linking the p53 tumour suppressor pathway to somatic cell reprogramming. *Nature* 2009; 460: 1140-1144.

D18

乳癌培養細胞並びに組織における EphA2 アンチセンス RNA の発現

○吉田徳之¹, 西澤幹雄², 杉江知治³, 奥村忠芳³, 木村富紀¹

¹立命館大・薬・病原微生物, ²立命館大・生命科学・医化学, ³関西医大・医・外科学

【目的】我々は転写後性の遺伝子発現制御メカニズムに注目し、宿主自然免疫の主エフェクターをコードする IFN- α 1 mRNA を対象にその発現制御研究を進め、IFN- α 1 遺伝子の逆鎖から転写される IFN- α 1 アンチセンス (AS) RNA が IFN- α 1 mRNA の発現を安定化させることを見出した¹⁾。近年 Eph ファミリーが悪性腫瘍において高発現することが報告され、癌の悪性化に関与するという報告がある²⁾。そこで、これまでの知見を生かし、EphA2 AS RNA による同 mRNA の発現調節機構を明らかにし、乳癌をモデルとする癌治療開発における新規創薬シーズ発掘へと発展させることを到達目標とした。その為にまず、EphA2 AS RNA を同定し、その発現解析を行ったので報告する。

【方法】EphA2 AS RNA を同定する目的で、乳癌培養細胞 MDA-MB-231 を用いたノーザンブロッティングを行った。さらに、同 AS RNA の 5'及び 3'端の決定とゲノム上における EphA2 mRNA に対する局在を決定する目的で、PCR マッピング、RACE 実験を行った。

EphA2 mRNA 及び同 AS RNA 発現を解析するために、3 種の乳癌培養細胞 (MCF10A, MCF-7, MDA-MB-231 ; MCF10A は乳腺上皮細胞、MCF-7 は分化型乳 (腺) 癌細胞、MDA-MB-231 は未分化型乳 (腺) 癌細胞)、又はヒト乳癌組織を用いて定量的 RT-PCR を行った。

【結果】ノーザンブロッティングの結果から、EphA2 mRNA が 5 kb 長なのに対し、同 AS RNA は 1.9 kb 長と推定された。この結果並びに、PCR マッピング、RACE の結果を合わせ、EphA2 AS RNA は同 mRNA 3'UTR 領域と重複し、第 17 エクソン領域に伸長することを明らかにした。

乳癌培養細胞、及びヒト検体において、EphA2 AS RNA 発現が高いと同 mRNA 発現も高いという強い正の相関関係があった。更に乳癌培養細胞においては、細胞の分化度に逆相関して EphA2 mRNA と同 AS RNA 発現が増大した。しかしながら予想に反して、ヒト検体においては、乳癌組織より正常組織において EphA2 mRNA と同 AS RNA 発現が高値であった。

【考察】EphA2 mRNA と同 AS RNA 発現には強い正の相関関係が認められ、EphA2 AS RNA は同 mRNA の発現制御に何らかの関与をすることが推測された。EphA2 AS RNA は同 mRNA 3'UTR 領域に対応して逆鎖方向で存在することから、iNOS AS RNA において報告されるように³⁾、この領域の ARE (AU-rich element) 部分で、HuR (human homolog R of embryonic lethal-abnormal visual protein)、PTB (polypyrimidine tract-binding protein) や hnRNP L (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L) と複合体を形成して、EphA2 mRNA の安定化調節に関与する可能性が考えられる。

ヒト検体において、正常組織より乳癌組織で EphA2 mRNA と同 AS RNA 発現が抑制された結果は、今までの報告と矛盾する。この結果を更に検証するために、EphA2 の下流因子 (JAK/STAT、Wnt/ β -cat 経路) を解析しており、この結果を合わせて報告する予定である。

- 【文献】
1. Kimura, T., Jiang, S., Nishizawa, M., Yoshigai, E., Hashimoto, I., Nishikawa, M., Okumura, T., Yamada, H. (2013) *Cell. Mol. Life Sci.* 70, 1451-1467
 2. Landen, CN., Kinch, MS., Sood, AK. (2005) *Expert. Opin. Ther. Targets.* 9, 1179-1187
 3. Matsui, K., Nishizawa, M., Ozaki, T., Kimura, T., Hashimoto, I., Yamada, M., Kaibori, M., Kamiyama, Y., Ito, S., Okumura, T. (2008) *Hepatology.* 47, 686-697

E1

Zn- α 2-glycoprotein の血清中濃度と血圧の相関およびその分子機構

○栗田宗一、竹内圭介、上山久雄、扇田久和
滋賀医大・分子病態生化学

【目的】 Zn- α 2-glycoprotein (ZAG) はヒト血漿 α 2 分画中に存在する分子量 41kDa のタンパク質で、がんなどの疾患との関連が報告されている¹⁾。ZAG は脂質代謝の制御にも関与すると考えられているが²⁾、血清中 ZAG 濃度と BMI や血圧などのメタボリックシンドロームの指標との相関については明らかにされていない。本研究では、定期健康診断受診者の血清中 ZAG 濃度を調べ、メタボリックシンドロームに関連する指標や生化学マーカーとの相関とその分子機構を検討するとともに、ZAG の発現制御機構の解析を行った。

【方法】 定期健康診断受診者 326 人 (男性 236 人、女性 90 人、17-79 歳) の血清中 ZAG 濃度を ELISA 法により定量し、健康診断の BMI、血圧、血糖値、LDL コレステロールなどの生化学マーカーとの相関を解析した。ZAG 濃度と正の相関が見られた血圧について、血圧上昇に関与する血管平滑筋の収縮を引き起こす RhoA の活性化を GST プルダウン法により解析した。ZAG は主に肝臓で産生されるため、培養肝細胞を用いたルシフェラーゼアッセイにより ZAG のプロモーター解析を行い、ゲルシフトアッセイでその領域に結合する転写因子を解析した。

【結果】 血清中の ZAG 濃度は平均 67.3 ± 21.1 $\mu\text{g/ml}$ であった。ZAG 濃度は、体重、BMI、血糖値、総コレステロール、LDL コレステロールとは相関しなかったのに対し、収縮期血圧および拡張期血圧と正に相関した。高血圧群 (81 人) では正常血圧群 (245 人) に比べて、ZAG 濃度が有意に高かった。ルシフェラーゼアッセイでは ZAG 遺伝子の -110 から -101 の領域に強いプロモーター活性が認められた。その領域を含む DNA 断片を用いたゲルシフトアッセイにおいて、培養細胞の核抽出液の添加によりバンドシフトが起こり、そこに転写因子 Sp1 の抗体をさらに添加するとスーパーシフトが確認された。実際に培養肝細胞において Sp1 をノックダウンすると、ZAG の発現が低下した。血管平滑筋細胞を ZAG で刺激すると、RhoA の活性化がみられた。

【考察】 受診者の高血圧と血清中 ZAG 濃度の高値の因果関係は不明ではあるが、培養細胞を用いた実験の結果から、血清中 ZAG 濃度の上昇は、血管平滑筋細胞において RhoA の活性化を引き起こし、それによって血管が収縮して血圧が上昇する可能性が示唆された。また、ZAG の発現上昇に Sp1 が関与することを示したが、そのさらに上流の因子や他の制御機構を含め、ZAG の発現を亢進させる分子機構のさらなる解析が必要である。

- 【文献】 1. Bürgi W, Schmid K. *J Biol Chem.* (1961) 236, 1066-1074.
2. Russell ST, Hirai K, Tisdale MJ. *Br J Cancer.* (2002) 86, 424-428.

E2

酸化亜鉛ナノ粒子はレニン-アンジオテンシン系を活性化し高血圧を惹起する

○小野寺 章^{1,2}, 屋山 勝俊¹, 河合 裕一¹

¹神院大・薬, ²神戸理研・CLST

【目的】

ナノマテリアルは、一次粒子の大きさが 100 nm 未満の材料を意味する。これまでにシリカ・銀・酸化亜鉛を原料とする多数のナノマテリアルが生産されており、一般消費者向けの製品への利用拡大が進んでいる。しかしながら、これらナノマテリアルが一定の曝露条件を満たすことで、マウス等に影響を与える研究成果が多数報告されている。本研究グループにおいても、銀ナノ粒子がミトコンドリア由来の酸化ストレスを増加させ細胞毒性を引き起こすこと^[1]、及びシリカナノ粒子が母体を経由して胎児の生育に影響すること^[2]を明らかとしてきた。

このような背景を踏まえ、経済開発協力機構では 14 種類の代表的ナノマテリアルを抽出し、安全性項目に関する情報収集を実施している。酸化亜鉛ナノ粒子もこの 14 種に含まれていたが、現在はこれら対象から外れている。本研究グループにおいても、過剰量の酸化亜鉛ナノ粒子を曝露させない限り、血液生化学検査などの一般毒性試験ではマウス個体への影響は観察できなかった。しかしながら、腹腔からの酸化亜鉛ナノ粒子の単回投与によって、マウスの血圧が上昇し、この高血圧状態が数日間続くことを見出した。そこで本研究は、ナノ酸化亜鉛による高血圧のメカニズムを明らかにすることを目的に、薬理学的研究手法による解析を実施し、新知見を得たので紹介する。

【方法】

酸化亜鉛ナノ粒子は、粒子径が 100 nm の素材を用いた (nZnO100、SIGMA-ALDRICH)。血圧動態の解析は、BALB/c 雄性マウスを用い、腹腔又は頸静脈から単回投与し、その 1、2、7 日後の心拍数と収縮期血圧を tail-cuff 法により測定した。次に、血管への影響を解明するため、Wistar 系雄性ラットの摘出胸部大動脈を用い、血管の弛緩収縮機能をマグヌス法により評価した。また、血漿中のレニン活性を RIA 法で測定し、血漿中のナノトリウム濃度を酵素的測定法 (Sodium Enzymatic Assay Kit, Diazyme laboratory) で測定した。

【結果・考察】

nZnO100 の腹腔もしくは頸静脈からの単回投与により、マウスの血圧が上昇した。この高血圧状態は、投与 2 日後まで持続し、7 日後には正常値に回復した。一方、これらマウスの心拍は正常であり、拍動の乱れもなかった。次に、高血圧の原因の一つである血管収縮への影響を解析した。しかしながら、nZnO100 は血管を収縮させず、弛緩反応も惹起しなかった。そこで、一般的な高血圧の原因であるレニン-アンジオテンシン系への影響を明らかにするため、血漿中のレニン活性及びナトリウム濃度を測定した。その結果、高血圧を示したマウスのみ、活性の上昇とナトリウム濃度の増加が測定された。

すなわち、nZnO100 はレニン活性を直接に亢進する、もしくはナトリウム排泄の低下を原因とする高血圧を惹起すると示唆された。

【文献】

1. A. Onodera, F. Nishiumi, K. Kakiguchi, A. Tanaka, N. Tanabe, A. Honma, K. Yayama, Y. Yoshioka, K. Nakahira, S. Yonemura, I. Yanagihara, Y. Tsutsumi, Y. Kawai. (2015) *Toxicology Reports*. 2, 574–579
2. K. Yamashita, Y. Yoshioka, K. Higashisaka, K. Mimura, Y. Morishita, M. Nozaki, T. Yoshida, T. Ogura, H. Nabeshi, K. Nagano, Y. Abe, H. Kamada, Y. Monobe, T. Imazawa, H. Aoshima, K. Shishido, Y. Kawai, T. Mayumi, S. Tsunoda, N. Itoh, T. Yoshikawa, I. Yanagihara, S. Saito, Y. Tsutsumi. (2011) *Nat. Nanotechnol.* 6, 321–328

E3

ヨウ素染色を用いたアミロイド線維構造多形の識別

○平松貴人¹, Ha Seongmin¹, 増田裕輝¹, 茶谷絵理¹,
¹神戸大・院理・化

【目的】アミロイド線維はタンパク質の異常凝集体であり、アルツハイマー病などアミロイドーシスと呼ばれる多数の疾患の原因物質である。アミロイド線維は cross- β 構造と呼ばれる共通構造を有しているが、その一方で階層的あるいは微視的な構造は異なっており、同じタンパク質でもしばしば構造多形を示すことが知られている。アミロイド線維の構造多形は疾病の症状や伝播性の分子基盤をなすことが提唱されており、アミロイドーシスの分子的メカニズムの解明のためにも線維構造の解析は必須である。しかし、線維構造を解析可能な手法は現状では非常に限られており、新たな手法の開発が望まれている。そこで我々は生体内に沈着したアミロイド線維を染色可能なヨウ素¹⁾に着目し、線維構造に対する新規プローブとしての有用性の評価を試みるとともに、線維—ヨウ素間の詳細な反応メカニズムを解明することを目的とした。

【方法】インスリンタンパク質を異なる3種類の条件(NaCl 添加、SDS 添加、添加物なし)で自発的に線維形成させてアミロイド線維の構造多形を誘導し、3種類の線維を得た。線維の形成をチオフラビン T 蛍光、原子間力顕微鏡及び赤外分光法により確認した後、これらを KI/I₂ 混合溶液でヨウ素染色し、それぞれの紫外可視吸収スペクトルを測定した。次に線維を超音波で破碎して線維断片を作製し、これと天然状態のインスリンを混合して線維構造伝播反応(シーディング反応)を行った。得られた線維をヨウ素染色し、そのスペクトル形状をシーディング反応前のものと比較することでシーディング反応のヨウ素染色への影響を評価した。最後に線維に対してヨウ素溶液を滴定し、ヨウ素濃度に対する吸収スペクトル変化の観察及び解析を行った。

【結果】ヨウ素染色した3種類の線維はそれぞれ異なる色調を示し、可視領域の吸収スペクトルの形状に違いが見られた(図1)。このスペクトル形状はシーディング反応の前後で完全に保存されたことから、ヨウ素染色により示される色調は多形を識別していることが示唆された。更に滴定実験により得られた吸収スペクトルの解析を行ったところ、線維の種類に応じて異なる吸収成分が存在すること、各吸収成分がヨウ素濃度に対して応答が異なることが明らかとなった。すなわち、線維には特異性の高いヨウ素結合部位が存在すること、更にその結合部位は線維の種類に応じて異なることを示している。

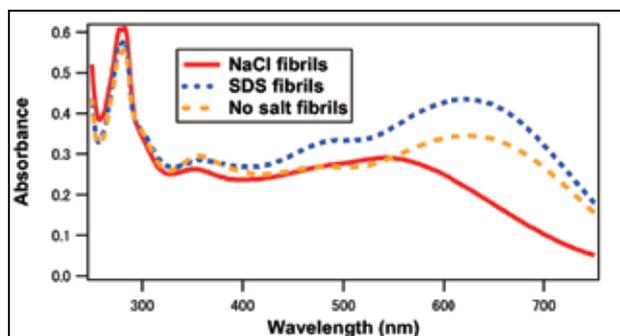


図1. ヨウ素染色した3種類の線維の紫外可視吸収スペクトル

【考察】以上の結果より、ヨウ素染色はアミロイド線維の構造多形を精度よく区別可能であることが明らかとなった。またこの様な構造識別能はチオフラビン T やコンゴレッドなど既存のアミロイドプローブには見られないものであり、ヨウ素染色は線維構造の研究において強力な手法になり得ると考えられる。

【文献】 1. Virchow et al. (1854) *Virchows Arch.* 6, 268

E4

インスリン B 鎖におけるアミロイド線維前駆中間体の捕捉と構造特徴の解析

○茶谷絵理¹、津原祥子¹、山本直樹¹、増田裕輝¹

¹神戸大・院理・化学

【目的】

アミロイド線維は、タンパク質のミスフォールディングによって形成される線維状の凝集体であり、アルツハイマー病など数多くの重篤な疾病に関与することが知られている。アミロイド線維は、基本的に線維核の形成とそれに続く成長の 2 相から成り、核形成反応の方が一般に遅く線維形成反応の律速段階となっている。しかし、一旦線維核が形成されると一気に伸長反応が進むため、核形成は線維形成反応全体のスピードをコントロールしている重要な段階である。しかしながら、その詳細な分子メカニズムについては不明な点が多い。

そこで本研究では、アミロイド線維形成反応の初期に見られるタンパク質集合体である線維前駆中間体を捕捉し観察を行うことで、線維核の形成機構を解明しようとした。

【方法と結果】

本実験では、インスリンを構成する A 鎖と B 鎖のうち、30 アミノ酸残基からなる B 鎖を単離し試料として用いた。B 鎖をいくつかの pH 条件で溶解させると、溶解直後からアミロイド線維構造に特異的に結合し蛍光を発するチオフラビン T (ThT) の高い蛍光強度が見られ、B 鎖の強いアミロイド性が示唆された。

続いて、pH1.6、5.0、8.6 の 3 種類の pH 条件を選択し線維形成反応の観察を行ったところ、いずれの pH 条件においても反応開始直後から ThT 蛍光強度が上昇した。このとき、一般的なアミロイド線維形成反応で典型的に見られる誘導期は確認されなかったことより、B 鎖は反応のごく初期から何らかのアミロイド様会合体が形成していることが考えられた。特に pH8.6 での経時的な蛍光強度の上昇パターンには段階性が見られ、中間体の捕捉が実現する可能性が示唆された。

さらに CD スペクトルを用いて pH8.6 での線維化反応の追跡を行った結果、反応開始直後にランダムコイル様のスペクトルからわずかに形状変化が見られ、その後変化が一旦停止し一定時間が経過したのちに再び急激にスペクトルが変化するという段階的な二次構造の発達の様子が観察された。

【考察】

以上の解析結果より、pH8.6 での B 鎖の線維化反応は少なくとも 2 段階で起こっており 1 段階目の反応終了時にわずかに構造化した線維前駆中間体が過渡的に蓄積していることが考えられた。このように線維前駆中間体の捕捉および構造解析は、アミロイド線維核が形成されるまでの過程でどのようなタンパク質分子の集合化が起きているのか、その実態を理解するのに有用であり、アミロイド核形成機構の詳細な解明につながると期待される。現在も解析を進めている最中であるが、最近、試料中に含まれる B 鎖のほぼ全量が集合化し線維前駆中間体になっていることが判明し、このことより今回捕捉した中間体は反応経路上の中間体として線維化に直接関わる可能性が示唆された。本発表では、得られた解析結果に基づき、線維前駆中間体を經由した線維形成スキームを提案・議論したいと考えている。

E5

高圧力 NMR 法によるユビキチンの局所変性状態の立体構造解析

○若本拓朗¹, 北沢創一郎², 矢木-内海真穂³, 加藤晃一³, Nicola J. Baxter⁴, Christian Roumestand⁵, Mike P. Williamson⁴, 北原亮⁶

¹立命大・生命科学研究科, ²立命大・理工学研究科, ³分子研, ⁴Dept. Mol. Biol. and Biotec., Univ. Sheffield, ⁵Centre de Biochimie Structurale, Univ. Montpellier, ⁶立命大・薬学部

【目的】近年、蛋白質の天然状態よりも高いギブズ自由エネルギーをもった状態(高エネルギー状態)と、分子認識や蛋白質の機能発現との関わりが注目されている。高エネルギー状態は存在率が低いため通常は分光学的に観測困難であるが、高圧力 NMR 法を用いる事により圧力下でその分布率を増加させ観測可能にできる⁽¹⁻³⁾。高圧力 NMR 法により、ユビキチンは 2 つの高エネルギー状態(準安定状態 N₂, 局所変性状態 I)を持つ事が明らかになっている⁽¹⁾。変異体 Q41N を用いた研究から、298 K・250 MPa 下で N₂ 状態の分布率が 97%にまで増加し、3 次元 NMR 測定に基づいた高精度な立体構造解析に成功している⁽²⁾。一方、I 状態は 33-42 残基のループ及びβシート領域が局所的に不安定な構造をとると考えられているが⁽³⁾、詳細な立体構造解析には至っていない。本研究では、高圧力 NMR 法を用い I 状態の立体構造の解明を目的としている。

【方法】変異体 Q41N を用いて低温 (278 K) ・酸性(pH4.0)条件下で、0.1-250 MPa までの範囲で高圧力 NMR 測定を行い、信号強度の変化から N(N₁+N₂)状態, I 状態, U 状態の各分布率を算出した。距離情報(NOE)と主鎖二面角情報(TALOS+)を基に CYANAversion3.96 を用いて立体構造解析を行い、¹⁵N スピン緩和法 (*R*₁, *R*₂, hNOE)により主鎖の運動性を調べた。

【結果】変異体 Q41N の場合、250 MPa (278 K, pH 4.0)では、N、I、U の分布率はそれぞれ 30%、50%、20%であった。¹⁵N スピン緩和測定から、I 状態では、33-42 残基でアンフォールド様の高い運動性を持ち、他の領域は N 状態と類似の運動性であることがわかった。まだ構造の最終的な精密化に至っていないものの、立体構造解析からは 33-42 残基以外の領域では N 状態と類似の 2 次構造を持つことが示唆された。

【考察】3 状態が混在している NMR 構造解析が非常に困難な系であるが、各部位から得られる NOE 信号 (距離情報) や主鎖二面角情報を丁寧に集めることにより、I 状態の立体構造解析が収斂しつつある。高エネルギー状態の原子座標解析は、近年のタンパク質構造研究で注目されている研究であるが、化学シフト情報を用いた構造モデリング法 (CS-ROSETTA 法)に止まっており、NOE を用いた精密構造解析に成功した例は、高圧力 NMR 法による我々の結果だけである^(1,2)。

- 【文献】 1. Kitahara, R., Yokoyama, S., Akasaka K. (2005) *J. Mol. Biol.* 347, 277-285
2. Kitazawa, S., Kameda, T., Kumo, A., Yagi, M., Baxter, N., Kato, K., Wiliamson, MP., Kitahara, R. (2014) *Biochemistry.* 53, 447-449
3. Kitahara, R., Akasaka, K (2003) *PNAS*, 100, 3167-3172

E6

“原子” から “いのち” へー蛋白質のパラドックスを紐解く

赤坂一之

京都府立大・生命環境科学

【目的】蛋白質はすべての生命に共通にその現象の最前線を受け持つ反面、化学的には単純な原子からなる分子に過ぎない。一方で単純な原子・分子で、一方で地球上のあらゆるいのちの現場を受け持つ事実は、一見して矛盾—“パラドックス”ともいえる。このパラドックスを紐解くことは生化学の基礎であり、同時に素粒子や原子分子よりなる宇宙の中で、どうして生命現象が可能かの間に答える鍵でもある。その鍵を、結晶中でのいわゆる“天然構造”の中に見出そうとする試みは、部分的にしか成功していない。高分解能高圧 NMR 法[1]によって蛋白質を眺めれば、このパラドックスの原点が見えてくる。

【方法】高分解能高圧 NMR 法[1]を ^{15}N , ^{13}C 核等で標識した蛋白質試料に適用する。

【結果】ニワトリリゾチームの加圧下での NMR スペクトル[2]を図 1 に示す。同じ蛋白質分子から、加圧下で図のような全く異なる 2 つのスペクトル群が得られる。水溶液中のフォールド状態では個性的な変化(A)、もう一方のウレア中では非個性的な変化(B)を示す。右のプロットはこれを裏打ちしている。

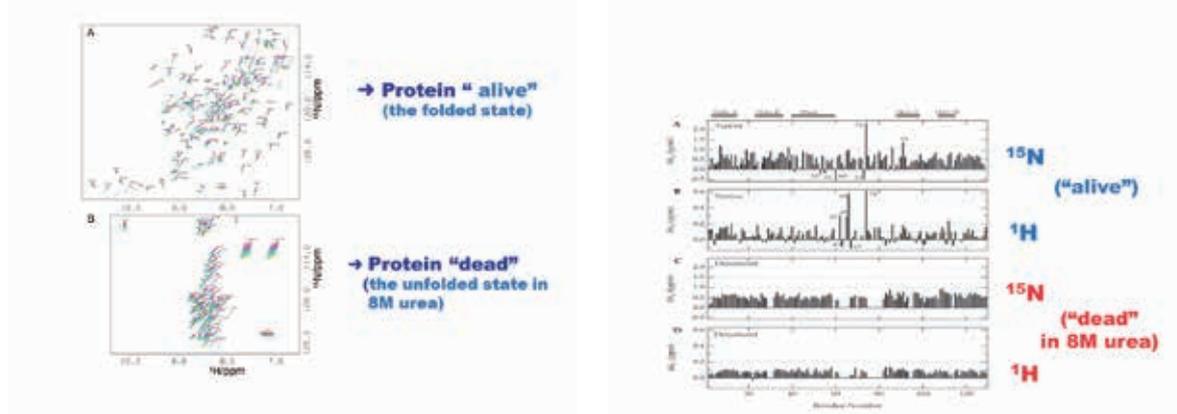


図 1. (左) ニワトリリゾチームの加圧下での NMR スペクトル($^1\text{H}/^{15}\text{N}$ HSQC)
(右) 信号のシフト変化の大きさを残基毎のプロットで示す。[2]

【考察】 この結果から、機能を有する蛋白質分子では、主鎖の N や H 原子が加圧下で独特のうごきをしていることが明白である。ウレア中ではそれが消失している。

加圧下での NMR スペクトル変化は、常圧下での揺らぎ（うごき）を拡大して示している [3]。本来ランダムな熱揺らぎは“生きたうごき”に変っている！さまざまな蛋白質での実験結果は、その動きはそれぞれの蛋白質に個性的で、それぞれの機能に特化したものであることを示している[4]。

私はこの結果をこうみる：生物は適当な温度と圧力等の環境下で環境に適応して生息できる。それは、蛋白質がランダムな熱揺らぎを、自ら“生きたうごき”—それぞれの蛋白質機能に結びつく“うごき”—に変えているからである。現存する蛋白質には、これを可能にする“隠れたデザイン”がある。このデザインは加圧によって顕在化することができる[4]。

ランダムな熱揺らぎを“生きたうごき”に変えることはどうして可能なのか？

1 つには、自然はこれを可能にする“分子技術”を使っている。

2 つには、自然はこれに適したアミノ酸配列を“進化の時間”の中で選びとってきた。

従って、蛋白質のパラドックスは、単に宇宙に内在する原子・分子に共通の原理に依るのではなく、数十億年の時間をかけて生物自身が関与して創りあげた特別な分子であることに由っている。

- 【文献】
1. Akasaka K, Yamada H. (2001) *Methods Enzymol.* 338:134-58.
 2. Kamatari YO, Yamada H, Akasaka K, Jones JA, Dobson CM, Smith LJ. (2001) *Eur J Biochem.* 268(6):1782-1793.
 3. Hirata I F, Akasaka K (2015) *Journal of Chemical Physics* 142(4):044110
 4. Akasaka K. (2006) *Chemical Reviews* 106(5):1814-35.

E7

銀ナノ粒子による細胞毒性はミトコンドリアからの ROS 産生に関連する
○森川 ありさ¹, 小野寺 章^{1,2}, 谷口 甲介¹, 屋山 勝俊¹, 河合 裕一¹
¹神院大・薬, ²神戸理研・CLST

【目的】

ナノマテリアル(NM)は、従来のサブミクロンサイズ以上の素材とは異なる新たな機能を有することから、次世代を担う素材として注目されている。一方で、NM 特有の毒性が懸念されており、安全性の確保が急務となっている。現在までに、NM の細胞毒性の1つに活性酸素種(ROS)による酸化的損傷が挙げられている。酸化的損傷は、抗がん剤や重金属ストレス、または炎症反応との関連が示されており、その発生源や作用機序は個々の事象により異なる。本研究では、NM による細胞毒性と酸化的損傷の関連を明らかにすることを目的に、2種類の NM を用い ROS の局在性について検討した^[1]。

【方法】

本研究は、粒子径 70 nm (nSP70)のナノシリカ、粒子径 1 nm のサブナノ銀 (snAg) を NM のモデル材料として用いた。これら NM の処置条件は、11.1~300 µg/mL の nSP70、もしくは 0.1~10 µg/mL の snAg を Balb/3T3 細胞へ 1 時間処置とした。細胞毒性は、WST-1 法で生細胞数を定量評価し、ROS の局在性は、ラジカル反応性蛍光プローブの DCFH-DA を用い、共焦点レーザー走査型顕微鏡 FV1000 (OLYMPUS) によりイメージングした。

【結果・考察】

nSP70 の細胞毒性は、300 µg/mL を最大とする濃度範囲では、生細胞数の低下は観察されなかった。一方、snAg の細胞毒性は、1 µg/mL の処置条件で生細胞数が 40% に低下し、5 µg/mL では 0% となった。また、0.1~0.5 µg/mL の濃度範囲では生細胞数の低下は観察されなかった。次に nSP70 による ROS の産生は、細胞質全体で DCF の蛍光が観察され、snAg ではミトコンドリアでの DCF の局在が確認された。以上より、ナノマテリアルの細胞毒性発現メカニズムは、ミトコンドリアからの ROS 産生と強く関連すると示唆された。

【文献】

1. A. Onodera, F. Nishiumi, K. Kakiguchi, A. Tanaka, N. Tanabe, A. Honma, K. Yayama, Y. Yoshioka, K. Nakahira, S. Yonemura, I. Yanagihara, Y. Tsutsumi, Y. Kawai. (2015) *Toxicology Reports*. 2, 574-579

E8

非晶質ナノシリカは PI3K シグナルを介した血管の弛緩反応を惹起する
○谷口 甲介¹, 小野寺 章^{1,2}, 森川 ありさ¹, 屋山 勝俊¹, 河合 裕一¹
¹神院大・薬, ²神戸理研・CLST

【目的】

先の研究で我々は、非晶質シリカが細胞内の遊離 Ca²⁺濃度を一過性に増加させる新たなナノバイオ反応を見出した。細胞内遊離 Ca²⁺濃度の増加は、Ca²⁺依存性のシグナルカスケードを活性化し、血管においては内皮細胞依存性の弛緩反応を惹起する。本研究では、ナノサイズの非晶質シリカが血管の弛緩反応を惹起するか否かを明らかとし、さらに、Ca²⁺チャネル、PI3K、COX 阻害剤を用い、非晶質ナノシリカによる血管弛緩反応のメカニズムを解析した。

【方法】

ナノサイズの非晶質シリカは、1次粒子径が 70 nm (nSP70)を用いた。マイクロサイズの非晶質シリカは、1次粒子径が 300 nm (nSP300)及び 1000 nm (mSP1000)の2種を用いた。血管の弛緩反応は、1 µM の phenylephrine(Phe)による収縮条件下でマグヌス法を用い評価した。マグヌス法で用いる血管は、11 週齢の Wistar 系雄性ラットの摘出胸部大動脈をリング標本として用いた。各粒子径の非晶質シリカは、終濃度を 100 µg/mL とし、陽性対照に 1 µM の Acetylcholine(Ach)を用いた。また、Ca²⁺チャネル阻害剤は Dantrolene(10 µM) (小胞体)、SKF96365(100 µM) (細胞膜)を用い、PI3K 阻害剤は Wortmannin(100 nM)、L-NAME(40 µM)、COX 阻害剤は Diclofenac(10 µM)を用いた。

【結果・考察】

Phe収縮条件下の血管は、ACh処置により弛緩し、その最大弛緩率は約 75%であった。nSP70 処置においても弛緩反応が観察され、その最大弛緩率は約 75%であった。一方、nSP300、mSP1000 処置では、微弱な弛緩反応が観察され、最大弛緩率はそれぞれ約 15%、約 10%であった。以上の結果により、ナノサイズの非晶質シリカが、ACh と同様に血管弛緩を惹起すると示唆された。そこで、各種阻害剤を用い nSP70 による血管弛緩反応のメカニズムを追究した。その結果、SKF96365、Wortmannin、L-NAME 処置により nSP70 による血管弛緩反応は抑制された。一方、Dantrolene、Diclofenac 処置では nSP70 による血管弛緩反応は抑制されなかった。これら結果より、血管への nSP70 処置は、血管内皮細胞の Ca²⁺チャネルの開口および PI3K を介した NO 産生を活性化し、血管弛緩を惹起すると示唆された。

【文献】

E9

生体内におけるポリ ADP リボシル化反応と細胞増殖との関連について

○ 田中正和¹, 虫明正敏², 高橋淳², 佐々木由香³, 石崎 (井田) 智恵利^{2,4},
益谷美都子³, 三輪正直²

¹関西医科大学・医・微生物学, ²長浜バイオ・院・バイオサイエンス,

³国立がんセンター・ゲノム安定性, ⁴名古屋女子短期大・生活

【目的】細胞内でのポリ ADP-リボシル化反応の役割については、塩基除去修復が知られてきたが、染色体の安定性や細胞増殖における関与等を含めて未だ多くの不明な点が残っている。我々は DNA 損傷が無い状態での生体内に微量に存在するポリ ADP リボース (PAR) 量の変化が細胞の増殖とどのような関係にあるのかについて、PARP 阻害剤を用いて解析を行った。

【方法】CHO-K1 細胞およびMEF細胞に対し、ポリ ADP リボシル化阻害剤(3AB, NU1025, AG14361) の効果について調べた。細胞増殖性についてはトリパンブルー細胞計測、細胞周期についてはフローサイトメーター(FCM)を用いて、中心体数は γ -tubulin 抗体を用いた免疫染色法にて、染色体数の計測はギムザ染色後による顕微鏡観察によって計測した。増殖シグナルの影響については、Immunoblot 法により検出を試みた。なお AKT 阻害剤は (10-NCP, API-2) を用い、PARP の活性測定は、NAD⁺を基質とした酵素活性法を用いて測定した。

【結果】全ての用いたポリ ADP リボシル化阻害剤では細胞死は認められなかったにも関わらず、細胞増殖は抑制された。しかし細胞周期のパターンの変化は認められなかった。故に細胞周期の進行が全体として遅延していることが判明した。この結果を踏まえ、細胞外からの増殖刺激による細胞増殖シグナル経路を検討したところ、ポリ ADP リボシル化阻害により AKT の強い脱リン酸化が認められた。さらに我々は AKT 阻害剤を用いて同様に検討したところ、細胞増殖性の低下ならびに中心体数の増加、異数染色体数の増加が認められた。その一方で AKT 阻害剤そのものには PARP 活性の阻害は認められなかった。以上の結果から、in vivo レベルでのポリ ADP リボシル化反応は AKT 経路を通して、細胞増殖を調整していることが示唆出来た。

【考察】現在、PARP 阻害剤は BRCA 変異を持つ遺伝性乳がんに対して合成致死性を誘導する新しい抗がん治療薬候補として、また虚血再還流障害の軽減作用など臨床応用が期待されている。今回の AKT による細胞増殖機構の調節とポリ ADP-リボシル化との間に何らかの関連があることを示唆する所見を得られた。今後はこの点について更に検討して行きたいと考えている。

E10

タンパク質 N 末端アセチル化を介した選択的ミトコンドリア分解の制御

○英山明慶, 岡本浩二

阪大・生命機能

【目的】 マイトファジーは細胞内において、ミトコンドリアを選択的に分解する機構であり、機能不全となったミトコンドリアを除去することで、その品質管理に貢献している。出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* では、呼吸増殖を長時間行った場合にマイトファジーが誘導される。この際、ミトコンドリア分解の分別マーク・タンパク質 Atg32 が発現し、ミトコンドリアの表層に局在することでマイトファジーが進行する。Atg32 を中心に、マイトファジーの分子メカニズムの解明が進められているが、その制御機構は未だ不明な点が多い。我々はマイトファジーのメカニズムの解明を目指し、その制御に関与する新規因子の候補として、NatA を同定した。NatA はタンパク質 N 末端アセチル基転移酵素であり、触媒サブユニット Ard1 とアダプターサブユニット Nat1 で構成される複合体である。NatA はリボソームと結合し、新生ポチペプチド鎖 N 末端の 2 番目のアミノ酸残基に対して、アセチル CoA からのアセチル基を転移させる。本研究では、タンパク質の N 末端アセチル化とミトコンドリア分解の関係性について解析を行った。

【方法】 Nat1 と Ard1 をそれぞれ欠損させた酵母細胞を用いて、ミトコンドリアの液胞(酵母のリソソーム)への取り込みを確認するため、蛍光顕微鏡による観察を行った。また、ジヒドロ葉酸レダクターゼ(DHFR)に赤色蛍光タンパク質 mCherry を付加した融合タンパク質を、ミトコンドリアのマトリックスに局在させた株を作成した。この細胞を使用し、ウェスタンブロッティングによって free の mCherry の蓄積が検出されれば、ミトコンドリアの分解度合を示すことになる。ここでは Nat1 と Ard1 の欠損細胞だけではなく、NatA の酵素活性が阻害されるように、Ard1 に変異を入れた細胞も用いて解析を行った。さらに、NatA がマイトファジーのどの段階に関与しているかを調べるために、ミトコンドリアが隔離膜で囲まれた構造体(マイトファゴソーム)の形成についても蛍光顕微鏡を用いて解析を行った。最後にマイトファジーの必須因子である Atg32 の発現量の変化についてもウェスタンブロッティングによる解析を行った。

【結果】 呼吸増殖において、NatA 欠損細胞ではミトコンドリアの液胞への取り込みがあまり確認できなかった。加えて、ミトコンドリアの分解を示す free の mCherry の蓄積も、野生型の細胞と比べ、NatA 欠損細胞と酵素活性を阻害した Ard1 の変異体では強く抑制された。さらに、ミトコンドリアが隔離膜で囲まれたマイトファゴソームに関しても、NatA 欠損細胞ではその形成の異常が確認できた。また、Atg32 の発現誘導も部分的に抑制された。一方、NatA の欠損細胞で Atg32 の発現量を上げた場合、ミトコンドリアの分解が一定の割合で回復することもわかった。

【考察】 以上の結果から、NatA がミトコンドリアの選択的分解の進行に極めて重要な因子であることが示唆された。酵素活性を無くした NatA でも、ミトコンドリアの分解が抑制されたことから、アセチル化作用がマイトファジーに重要であることは確からしいと考える。そして、NatA 欠損細胞でマイトファゴソーム形成に異常が見受けられたことから、この因子はマイトファジーの初期段階の制御に関与している可能性が高い。また、NatA は Atg32 の発現制御に関与していることも示唆された。つまり、少なくとも Atg32 は、NatA とマイトファジーの間を介する因子の一つであると考えられる。しかし、アセチル化を受けるタンパク質の数が非常に多いことから、NatA の基質でマイトファジーの制御に関与している因子が他にもある可能性が高く、今後は Atg32 以外に、アセチル化とマイトファジーを繋ぐ因子の更なる探索が必要である。

E11

ラット線維芽細胞における TGF- β シグナルの Hsc70 による制御について

○東本菜月¹, 池崎みどり², 松村考¹, 井原義人²

¹和歌山県医大・医・大学院準備課程, ²和歌山県医大・医・生化

【目的】TGF- β は細胞の増殖、分化、アポトーシス、遊走や細胞外マトリックス産生を含む様々な細胞プロセスを制御している。TGF- β は、様々な組織の線維化において重要な促進因子とされており、線維芽細胞の活性化を介して細胞外マトリックス蓄積を促すことが知られている。TGF- β シグナルは、転写因子である Smad2 や Smad3 が TGF- β I 型受容体、TGF- β II 型受容体によりリン酸化されて、核内に移行し標的遺伝子の転写を制御している。一方、熱ショックタンパク質は種々のストレスによる細胞障害の防御・修復に重要な役割を担う分子シャペロンであるが、非ストレス下においても機能していることが知られている。熱ショックタンパク質 Hsp70 ファミリーの 1 つである Hsc70 は、細胞質や核で構成的に発現しており、変性タンパク質のフォールディングだけではなく、エンドサイトーシスや細胞内膜輸送、シャペロン介在性オートファジーなどに関与することが報告されている。本研究では、ラット線維芽細胞 NRK 49F を用いて、Hsc70 の TGF- β シグナルに対する影響を明らかにすることを目的とした。

【方法】NRK 49F 細胞に Hsc70 siRNA を導入し Hsc70 発現を抑制後、TGF- β 処理を行った。TGF- β シグナルへの影響は、リン酸化 Smad2 とリン酸化 Smad3 レベルについてイムノブロット法、免疫蛍光染色法により評価した。また、細胞抽出 RNA を用いて TGF- β 誘導性の結合組織成長因子 (CTGF) 産生に対する影響をリアルタイム RT-PCR 法により解析した。次に、NRK 49F は Hsp70 発現が低いため、熱処理により発現誘導を行い、上記と同様の解析を行い、TGF- β シグナルへの影響を評価した。

【結果】siRNA による Hsc70 発現抑制により、TGF- β 依存性の Smad2 および Smad3 のリン酸化レベルの抑制が認められた。免疫蛍光染色法により、リン酸化 Smad2、Smad3 核内集積の阻害が観察された。また、Hsc70 発現抑制されることで、TGF- β 誘導性の CTGF 産生についても、低下していた。Hsc70 発現抑制により、Hsp70 発現の増加が認められたことから、TGF- β シグナルに対する Hsp70 の影響について評価を行った。熱処理により Hsp70 発現を誘導し、TGF- β 依存性の Smad2 および Smad3 のリン酸化レベルを解析した結果、変化は見られなかった。

【考察】ラット線維芽細胞において、Hsc70 発現抑制により TGF- β シグナルが阻害されることを見出した。この抑制効果は、Hsp70 発現増加によるものではないことが確認された。今後の研究において、Hsc70 と TGF- β シグナル制御分子との相互作用について解析を行い、Hsc70 の TGF- β シグナル制御機構の解明を目指したい。

E12

リン脂質フリッパーゼ ATP10A の PC フリップ活性及び細胞膜ダイナミクスへの関与
○内藤朋樹、高津宏之、宮野吏永、高田直人、中山和久、申惠媛
京大院・薬・生体情報

【目的】

生体膜は脂質二重層から成っており、その脂質組成は外葉と内葉とで非対称に保たれている。P4-ATPase ファミリーはリン脂質を外葉側から内葉側へと転移させる(フリップする)ことにより、この非対称性を創出・維持している酵素(フリッパーゼ)である。また、P4-ATPase が小胞体から出るためには CDC50 というシャペロン様の膜タンパクが必要である。近年の我々の研究により、多くの P4-ATPase が CDC50A と相互作用することで各オルガネラに局在できるようになることが分かった¹⁾。さらに数種類のヒト P4-ATPase についてリン脂質フリップ活性の基質特異性も明らかにした²⁾。しかしながら、P4-ATPase のうち ATP10A については、糖尿病や肥満といった病態との関与が示されているのみで、CDC50 との関連性や基質特異性などの酵素的特徴、生理的な機能は全く分かっていない。

今回我々は、ATP10A と CDC50 タンパク質との相互作用を明らかにすること及びリン脂質フリップ活性の基質を突き止めることを目的として研究を行った。また ATP10A の機能を探るため、細胞に過剰発現させた時の影響を調べた。

【方法】

免疫染色法による ATP10A の細胞内局在観察及び細胞の形態観察。

共免疫沈降法による ATP10A と CDC50A の相互作用の調査。

siRNA 法による ATP10A 及び CDC50A のノックダウン。

蛍光標識リン脂質を利用した P4-ATPase リン脂質フリップ活性の測定。

【結果】

単独発現させた ATP10A は小胞体に局在した。一方、CDC50A 共発現下では細胞膜に局在した。CDC50B との共発現では小胞体に局在したままであった。また ATP10A を免疫沈降すると、CDC50A が共沈降した。

ATP10A を発現させた細胞ではホスファチジルコリン(PC)の取り込みが顕著に増加した。さらに ATPase 活性のない変異体を用いた実験ではこの PC フリップ活性が見られなくなった。ホスファチジルセリン(PS)やホスファチジエタノールアミン(PE)に対する活性は見られなかった。

ATP10A を過剰発現させた細胞では、形態が変化し細胞の大きさが減少した。これらの細胞の細胞接着の様子を経時的に観察してみると、細胞接着の遅延及び Spreading の抑制が見られた。

【考察】

今回の結果では ATP10A は CDC50A 共発現時に細胞膜に局在し、また CDC50A と相互作用することが確認された。これらの結果から、ATP10A は CDC50A 依存的に局在変化を起こして機能すると考えられる。

リン脂質フリップ活性の測定により、ATP10A が PC 特異的なフリッパーゼであることが分かった。一般的に細胞膜では外葉に PC が多く保たれていることから、ATP10A はこの非対称性を維持するためというよりは、局所的に非対称性を崩すような機能があると考えられる。事実、ATP10A 発現細胞では細胞接着や Spreading が抑制されており、PC フリップの亢進による非対称性の崩壊が、細胞膜のダイナミクスに強く影響することが示唆される。

【文献】

1. Takatsu, H., Baba, K., Shima, T., Umino, H., Kato, U., Umeda, M., Nakayama, K., and Shin, H.W. (2011) *J. Biol. Chem.* 286, 38159-38167
2. Takatsu, H., Tanaka, G., Segawa, K., Suzuki, J., Nagata, S., Nakayama, K. and Shin, H.W. (2014) *J. Biol. Chem.* 289, 33543-33556

E13

骨格筋線維形成におけるリン脂質フリッパーゼの役割

○土谷正樹, 原雄二, 西岡諒太郎, 長尾耕治郎, 梅田真郷
京大・院工・合成・生物化学

【目的】骨格筋線維は単核の筋芽細胞が互いに融合することで形成される。筋芽細胞の融合において細胞膜突起・膜小胞の形成や膜半融合など膜構造の活発な編成が行われるが、細胞融合素過程の根幹である「膜融合前後の脂質分布の制御機構」は明らかではない。そこで、脂質膜外層から内層へのリン脂質輸送を促進し、多様な細胞機能に関与するリン脂質フリッパーゼに着目した。哺乳動物におけるフリッパーゼの主要ユニットとして14種類のP4型ATPaseが同定され、補助サブユニットの3種類のCDC50蛋白質と複合体を形成して機能すると考えられているが、詳細な細胞機能は明らかにされていない。本研究では骨格筋線維形成におけるリン脂質フリッパーゼP4型ATPase/CDC50の機能解明を目指した。

【方法】本研究ではマウス骨格筋由来筋芽細胞株C2C12をモデル系として解析を行った。まず、筋分化前後におけるP4型ATPase/CDC50の遺伝子発現変化を解析するため、C2C12細胞を増殖培地(20% FBS-DMEM)で培養後、分化培地(2% HS-DMEM)に交換して培養し、1日毎にTotal RNAを回収してRT-PCRを行った。次に、筋線維形成におけるリン脂質フリッパーゼの役割を検討するため、C2C12細胞へのCDC50Aに対するsiRNAの導入や、CRISPR/Cas9システムによるP4型ATPase遺伝子欠損株の樹立を行い、分化誘導した各細胞について筋分化マーカーであるミオシン重鎖に対する免疫染色を行い、形態を観察した。

【結果】C2C12細胞の筋分化前後における遺伝子発現解析の結果、P4型ATPaseについて14種類のうち7種類の発現を検出した。このうち5種類は分化誘導前または分化初期において最も強く発現し、分化が進むにつれ発現が減少した。一方、他2種類は分化の進行に伴い発現が上昇した。CDC50について3種類のうちCDC50Aのみの発現を検出し、分化前後で概ね同程度の発現を維持していた。そこで、C2C12細胞の筋管形成におけるCDC50Aの発現抑制効果を検討した(図)。コントロール細胞は横幅がほぼ均一な数個の核を含む筋管を形成したのに対し、CDC50A発現抑制細胞は、巨大なシート状の細胞形態を形成し、1つの細胞融合体の中に非常に多数の核を含有した。またコントロール細胞から生じた筋管は一定方向に並列し、横方向での細胞融合はほとんど観察されなかったのに対し、CDC50A発現抑制細胞は特定の方向性を示さず、ランダムな細胞融合が観察された。さらに、筋分化誘導により発現が増強されたP4型ATPase遺伝子欠損株はCDC50A発現抑制細胞と同様の異常な細胞融合形態が観察された。

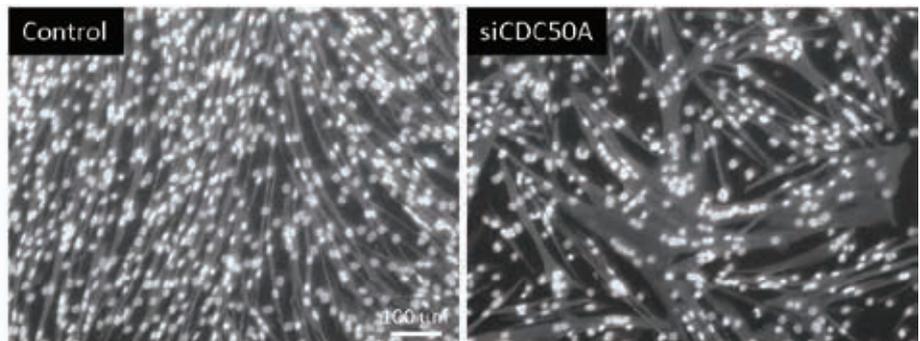


図. CDC50A発現抑制細胞の巨大な細胞融合形態. siRNAを導入して筋分化を誘導したC2C12細胞について、蛍光染色法にて核および筋分化マーカーであるミオシン重鎖の検出を行った。

【考察】以上の結果から、筋芽細胞の筋管形成において、上記のP4型ATPaseがCDC50Aと協同して細胞融合の制御および極性の形成に関与することが示唆された。現在、リン脂質フリッパーゼによる筋芽細胞における膜融合調節機構の全容解明を目指し、同分子により惹起されるシグナル経路の同定を行っている。

E14

エイコサペンタエン酸の新規生理機能解析に応用できる
 ω -末端修飾型脂肪酸アナログ体の効率的な合成法の確立

○徳永智久¹, 渡辺文太¹, 川本 純¹, 栗原達夫¹

¹京大・化研

【目的】エイコサペンタエン酸 (EPA) はシス型二重結合を 5 つ有する ω -3 系多価不飽和脂肪酸であり、抗炎症作用や抗腫瘍作用を有し、動脈硬化や高脂血症といった血管性疾患の予防など様々な効果を持つ生理活性物質として、近年、大きな注目を集めている。EPA は脂質メディエーターの前駆体として知られているとともに、リン脂質のアシル鎖として存在し、生体膜の生理機能発現に重要な役割を担っていると考えられている。南極海水より単離された低温適応細菌 *Shewanella livingstonensis* Ac10 は EPA 含有リン脂質を低温誘導的に生合成する。本菌において、細胞分裂部位に EPA 含有リン脂質が濃縮されたマイクロドメインが形成されることが明らかとなっており¹⁾、本菌において EPA が新たな生理機能を担う可能性が示唆されている。当研究室では、このような EPA の生理機能を解析するために EPA の可視化や EPA 修飾タンパク質の探索に応用可能な末端エチニル型 EPA が開発された。しかし、当初確立された合成法は、全 19 段階の多段階反応であり、収率が 0.0010% 以下と非常に非効率的な合成系であった。本研究では、従来法よりも効率的な末端エチニル型 EPA の合成法の確立に取り組み、さらに、その合成法を応用して EPA 重水素ラベル体の合成を行った。

【方法・結果】化合物 **1** および **2** を銅触媒によりカップリングし、TMS 基を除去して化合物 **3** を得た (図 1)。同様に化合物 **4** および **5** をカップリングした後、水酸基を臭素原子で置換して化合物 **6** を得た。次に、化合物 **3** および **6** をカップリングして化合物 **7** を得た。さらに化合物 **7** の非共役三重結合を P-2 ニッケルを用いて部分還元し、アセタールを加水分解して化合物 **8** とした。最後に、化合物 **8** および **9** を Wittig 反応により縮合した後、加水分解して目的化合物である末端エチニル型 EPA **10** を得た (全 12 段階、収率 4.5%)。また、化合物 **8** および化合物 **11** を Wittig 反応により縮合した後、加水分解することにより目的化合物である EPA 重水素ラベル体 **12** を合成した。

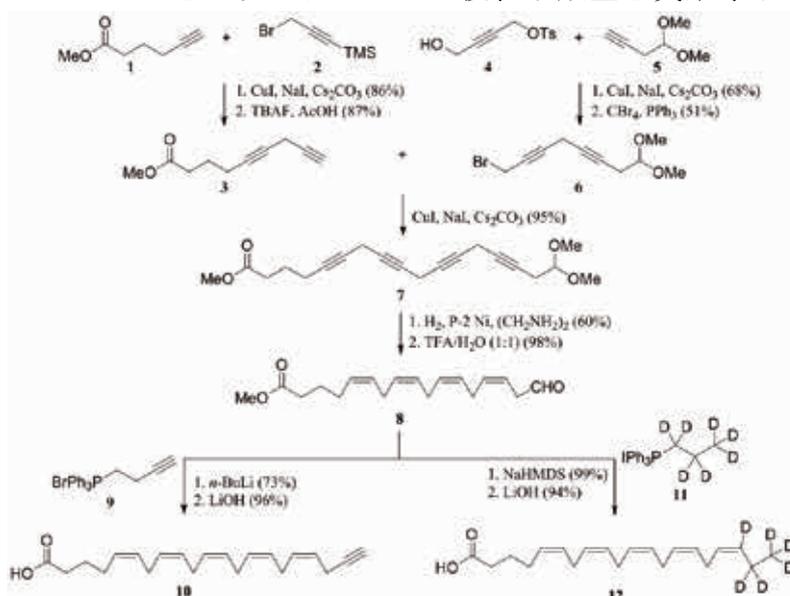


図 1 末端エチニル型 EPA および EPA 重水素ラベル体の合成法

【考察】末端エチニル型 EPA の合成において、従来法に比べて 7 段階減らすことができ、収率も約 4500 倍にすることができた。また、化合物 **9** や化合物 **11** のようなホスホニウム塩を用いることにより、化合物 **8** から末端エチニル型 EPA や EPA 重水素ラベル体をはじめ、炭素鎖長の異なる末端エチニル型 EPA アナログや天然型 EPA などの多様な ω 末端修飾型 EPA アナログの合成が可能である。

【文献】 1. Sato, S., Kawamoto, J., Sato, B. S., Watanabe, B., Hiratake, J., Esaki, N., Kurihara, T. *J. Biol. Chem.* **2012**, 287, 24113-24121

E15

Shewanella livingstonensis Ac10 における細胞膜リン脂質多様性に関与する PlsC4 の基質特異性の解析

○豊竹洋佑, 趙賢南, 川本純, 江崎信芳, 栗原達夫
京大・化研

【目的】1-アシル-*sn*-グリセロール-3-リン酸アシルトランスフェラーゼ (PlsC) は, 細胞膜リン脂質 *sn*-2 位にアシル鎖を導入する. 我々は, 低温菌 *Shewanella livingstonensis* Ac10 が 5 つの PlsC ホモログ (PlsC1~5) を有していることを見出しており¹⁾, 本菌では, それぞれの PlsC ホモログが異なる脂肪酸をリン脂質に導入していることが示唆される. 本研究では, これらの PlsC ホモログのうち, 分子鎖飽和脂肪酸を選択的にリン脂質に導入する PlsC4 を見出した.

【方法】相同組み換えにより *plsC4* 遺伝子破壊株を作製した. その細胞内全リン脂質を Bligh and Dyer 法で抽出して ESI-MS に供した. また, PlsC4 高発現ベクターを破壊株に導入することで *plsC4* 相補株を作製し, 破壊株と同様にその細胞内全リン脂質を抽出して ESI-MS に供した. 破壊株, 相補株それぞれについて, 抽出したリン脂質の *sn*-2 位のエステル結合をホスホリパーゼ (PLA2) を用いて加水分解し, ESI-MS に供した. また, 細胞内リン脂質由来の全脂肪酸をメチルエステル化し, その組成を GC-MS で解析した. 一方, 膜懸濁液を酵素液として調製し, 種々のアシル CoA を基質として用いたリゾホスファチジン酸へのアシル基転移を解析することで, PlsC4 のアシル鎖転移活性を評価した.

【結果】細胞内全リン脂質組成を ESI-MS で解析した結果, 破壊株では炭素数 13 の飽和脂肪酸含有リン脂質の生産量が野生株に比べて著しく低下していることを見出された. 一方, 相補株ではそれらのピークが回復した. PLA2 によるリン脂質の加水分解産物を ESI-MS に供した結果, 破壊株では炭素数 13 の飽和脂肪酸のピークが著しく低下し, 相補株では回復していることを見出された. よって, PlsC4 はリン脂質の *sn*-2 位に炭素数 13 の飽和脂肪酸を導入しているものと考えられた. 細胞内リン脂質由来の脂肪酸組成を GC-MS によって解析した結果, 破壊株では炭素数 13 の飽和脂肪酸のピークのみ低下し, 相補株では回復していることを見出された. さらに, 炭素数 13 の直鎖, *iso*, *anteiso*-form の 3 種類の異性体の溶出時間と比較すると, 本菌由来の炭素数 13 の飽和脂肪酸は, *iso*-form と溶出時間が一致した. このことから, PlsC4 は *iso*-form である 11-メチルラウリン酸の導入を触媒することが示された. また, *in vitro* で PlsC4-His のアシル鎖転移活性を調べた結果, 炭素数 12 から 14 までの飽和脂肪酸に対する活性を示したが, 炭素鎖長 16 以上の脂肪酸には活性を示さなかった.

【考察】以上の結果から, PlsC4 は鎖長の短い脂肪酸に対して基質特異性を有するアシル鎖転移酵素活性を有しており, *in vivo* においては 11-メチルラウリン酸含有リン脂質の生合成を担う PlsC であることがわかった.

【文献】1. Cho, H., - N., Kasai, W., Kawamoto, J., Esaski, N., Kurihara, T. *Trace Nutr. Res.* **29**, 92–99 (2012).

E16

節足動物における中性糖脂質の共通性 —クロスズメバチ *Vespula flaviceps* 幼虫を用いて—

○木村 優花, 秋山 裕香, 糸乗 前 (滋賀大・教育・化学)

itonori@edu.shiga-u.ac.jp

【目的】細胞膜の構成成分の一つであるスフィンゴ糖脂質は、多様な糖鎖構造を有しており生体内での重要な生理機能を果たしていると考えられている。当研究室では、主に下等動物のスフィンゴ糖脂質に着目し、それぞれの動物種における特徴的な構造を見出し、生物進化との関係を明らかにしようとしてきた。中でも節足動物においては、共通の Arthro 系列糖鎖(GlcNAc β 1-3Man β 1-4Glc β)を有する動物が各種報告されている。一方で、ハエ¹⁾以外では non-Arthro 系列の糖鎖構造を持つ動物も報告されてきている。

本研究で用いるクロスズメバチ(*Vespula flaviceps*)は、節足動物門昆虫綱ハチ目に属する。既に同種のセイヨウミツバチの中性糖脂質は、CMS (Glc β Cer), CDS (Man β 4Glc β Cer), CTS₁ (GlcNAc β 3Man β 4Glc β Cer)および CTS₂ (Man β 4Man β 4Glc β Cer)を持つと報告されている。CMS~CTS₁は節足動物に共通してみられる Arthro 系列糖鎖であるが、CTS₂は植物のコムギからの報告があるのみで動物からは初めて見出された糖脂質である²⁾。

本研究では、クロスズメバチのスフィンゴ脂質の構造解析を行うことで、同種のミツバチとの中性糖脂質の共通性および節足動物における中性糖脂質の共通性について検討する。

【方法】クロスズメバチ幼虫 2.0kg (約 19,000 固体), 乾燥重量 770.5g から, CHCl₃/MeOH 及び CHCl₃/MeOH/Water によって総脂質を抽出し, 弱アルカリ水解及び酸処理によって, 粗スフィンゴ脂質画分 (30.1g) を得た。順に DEAE-, QAE- Sephadex, Florisil カラムクロマトグラフィーに処し, 酸性・極性・中性・両性脂質の 4 画分に分画した。それぞれについて糖, アミノ基, リン酸の検出によって TLC 分析を行った。

中性糖脂質画分は, 高速液体クロマトグラフィーを用いた C/M/W 系濃度勾配溶出法による Iatrobeds カラムクロマトグラフィーに処し分画を行った。C/M/W 系及び PrOH 系の 2 種類の展開溶媒を用いて TLC 分析を行い, 精製度を確認した。また, それぞれの画分は, MALDI-TOF/MS により分子量を測定し, 単離精製した画分に対しては, ¹H-NMR による分析, GC を用いた構成糖分析, 長鎖塩基分析を行った。

【結果・考察】TLC 分析の結果から, 酸性脂質画分に糖とリン酸の発色が見られた。極性脂質画分では, 糖の発色はなく, アミノ基とリン酸の発色が確認できたことから, セラミドホスホエタノールアミン(CPEA)であると考えられる。さらに, 両性脂質画分には, スフィンゴミエリン(Sph)と考えられる発色が見られた。中性糖脂質は, キンバエ由来の中性糖脂質と比較して 1 糖から 6 糖の糖鎖を持つ糖脂質と考えられる発色が確認できた。

中性糖脂質画分を Iatrobeds カラムクロマトグラフィーにより精製し, 分子量測定した結果, CMS, CDS, CTS, CQS, CPS, CHS に相当するピークが検出された。CMS, CDS の画分に対しては構成糖分析も行ったところ, CMS の画分からは Glc のピークが, CDS の画分からは Glc, Man のピークが検出された。従って, これらは Arthro 系列糖鎖を持つ糖脂質の前駆体となることがわかった。しかし, CQS はフコースを含むピークが検出されていることから Arthro 系列糖鎖を持つ糖脂質の他に, セイヨウミツバチとは異なる non-Arthro 系列の糖脂質も存在していると考えられた。

- 【文献】 1) Itonori, S.; Sugita, M. (2005) *Trends in Glycoscience Glycotechnology*, **17**, 15-25
2) 西尾匡, 小島寿夫, 他 (2010) 立命館大学理工学研究所紀要, **69**, 99-108

E17

Neurospora crassa におけるセラミド代謝酵素遺伝子ホモログの生理的役割

○片岡三和¹、山下泰典¹、谷泰史^{1,2}、三原久明¹

¹立命館大・生命,²立命館大・R-GIRO

【目的】スフィンゴ糖脂質は真核生物の細胞膜の重要な構成成分であり、脂質ラフト構造の形成に関与し、細胞膜で起こる様々な生命現象において重要な役割を果たすと考えられている。糸状菌のスフィンゴ糖脂質としては、一般に、脂質部分がセラミド構造を有する中性スフィンゴ糖脂質と、脂質部分がフィトセラミド構造を有する酸性スフィンゴ糖脂質（イノシトールリン酸セラミド）の2種類が知られている。スフィンゴ糖脂質の基本骨格であるセラミドも細胞シグナル伝達物質として細胞膜で起こる様々な生命現象において重要な役割を果たすと考えられている。しかし、糸状菌におけるスフィンゴ糖脂質やセラミドの詳細な機能や生合成経路は未だ明らかになっていない。本研究では、*Neurospora crassa* のゲノムに存在するセラミド代謝酵素遺伝子ホモログ7種の欠損株を用いて、これら遺伝子ホモログの *N. crassa* における生理的役割を解明することを目的とした。

【方法】*N. crassa* に存在するセラミド代謝酵素遺伝子ホモログ7種に着目した。各遺伝子欠損株 (NCU00008、NCU00642、NCU02282、NCU02969、NCU04395、NCU06465、NCU08927) と野生株の表現型を比較した。また、Vogel 液体培地にて培養した各菌株からスフィンゴ糖脂質を抽出し、薄層クロマトグラフィー (TLC) 分析にて調べた。TLC 分析においては、オルシノール硫酸を糖検出試薬として用いた。さらに、Vogel 固体培地にて生育した各菌株を光学顕微鏡にて観察し、菌糸生長についても比較を行った。

【結果・考察】セラミド代謝酵素遺伝子ホモログ欠損株のうち3株 (NCU06465、NCU02969、NCU02282) は、Vogel 液体培地にて野生株と同様の生育を示し、薄層クロマトグラフィー分析の結果から、スフィンゴ糖脂質の組成と量についても野生株と大きな違いはないことが分かった。一方、残り4株 (NCU00008、NCU00642、NCU04395、NCU08927) においては、Vogel 液体培地を用いた液体培養において菌糸生長が観察されず、栄養細胞の TLC 分析から、スフィンゴ糖脂質が生成されていないことが示唆された。一方、固体培地上で高温培養したところ、これら4株の菌糸形成が観察された。固体培地から得られたこれら4株の菌糸体よりスフィンゴ糖脂質を抽出し、TLC 分析したところ、スフィンゴ糖脂質が存在していた。また、光学顕微鏡でこれら4株の菌糸を観察したところ、野生株と比較して、いずれの遺伝子欠損株も菌糸幅が小さいことを見いだした。以上より、NCU00008、NCU00642、NCU04395、NCU08927 において欠損されているセラミド代謝酵素遺伝子ホモログは、スフィンゴ糖脂質の生合成を介して菌糸形成に関与することが示唆された。

- 【文献】 1. Obeid, L. M., Okamoto, Y., Mao, C. (2002) *Biochim. Biophys. Acta* 1585: 163-171.
2. Costantino, V., Mangoni, A., Teta, R., Kra-Oz, G., Yarden, O. (2011) *J. Nat. Prod.* 74: 554-558.

E18

ELISA をベースとしたポリ (ADP-リボース) 測定法の確立と培養細胞からのポリ (ADP-リボース) 抽出法の検討

○井田智恵利^{1,2}, 山下幸子¹, 塚田匡輝¹, 江口貴之¹, 田中正和³, 緒方進⁴, 藤井 貴弘¹, 西義介¹, 池上晋¹, 三輪正直¹

¹長浜バイオ大・バイオサイエンス, ²名古屋女子大・短期・生活, ³関西医大・微生物, ⁴三重大学・生資・生物圏生命

【目的】タンパク質の翻訳後修飾反応の一つであるポリ ADP-リボシル化 (以下 PAR 化と略す) はポリ (ADP-リボース) ポリメラーゼ (以下 PARP と略す) により触媒され DNA 修復や転写制御、細胞増殖、細胞死など様々な細胞内機能に関与している¹⁾。生理的な条件下におけるポリ (ADP-リボース) (以下 PAR と略す) 量の変化を調べることで細胞内機能における PAR 化の役割の解明につながる。しかし、PAR の生理的な条件下での存在量は、極めて微量であり、PAR を抽出するための細胞破碎操作が人為的な PAR の合成や分解を引き起こすため、正確な PAR 量の測定は困難である。今回、培養細胞における PAR 量を測定するため ELISA をベースとした高感度な PAR 測定法の確立と培養細胞からの人為的な PAR の合成や分解を抑えた PAR 抽出法の検討を行った。

【方法】2 種類の PAR 抗体を用い、PAR を結合させ、酵素標識された二次抗体を用い、基質の発色をマイクロプレートリーダーにより測定するサンドイッチ ELISA 法の確立を行った。

HeLa 細胞から PAR を抽出する際、trichloroacetic acid (以下 TCA と略す) を用いて、細胞内の酵素類を失活させた後、細胞を破碎し PAR を抽出したサンプルと細胞からタンパク質を抽出する際によく用いられる RIPA buffer (50 mM Tris HCl, pH 7.6, 150 mM NaCl, 1 % Nonidet P40, 0.5 % sodium deoxy cholate, protease inhibitor cocktail, 0.1 % SDS) で抽出したサンプルの PAR 量を比較した。さらに、PARP 阻害剤を用い、細胞破碎時における PAR 量の変化が抽出操作の際に PARP が人為的に働いたものかを検討した。PAR 量の測定は、PAR 抗体を用いた Western blot 法と ELISA 法の 2 種類の方法で行った。

【結果】

今回の検討により、5 pg からの PAR を測定可能な感度の良い測定法を確立した。細胞から PAR を抽出する際、TCA で固定したサンプルに比べ、RIPA buffer で抽出したサンプルの PAR 量は 450 倍多くなった。PARP 阻害剤を加えた RIPA buffer で抽出した場合、RIPA buffer のみで抽出した場合より、PAR 検出量が大幅に減少した。しかし、TCA 固定したサンプルと比較するとまだ 50 倍多く検出された。この差異は、ELISA 法では検出できたが、PAR 抗体を用いた Western blot 法では検出できなかった。

【考察】PAR を直接測定する方法は限られており、従来の放射性同位元素 (RI) を使用する方法は施設面と実験者の健康面から、非 RI 測定法が求められている。本研究により確立した、ELISA 法を用い、細胞内の生理的な条件下での微量な PAR 量の測定に用いることが可能となった。さらに、今回の検討から、サンプル調整時には PARP を含む酵素類の迅速な失活を行うことが、*in vivo* での PAR 量を測定する上で重要であることが明らかとなった。

【文献】 1. Miwa, M., Masutani, M. PolyADP-ribosylation and cancer, (2007) *Cancer Sci.* 981528–1535

高校生発表

立命館慶祥高等学校

京都府立桃山高等学校

大阪府立天王寺高等学校

大阪府立園芸高等学校

奈良県立青翔高等学校

兵庫県立神戸高等学校

H-1

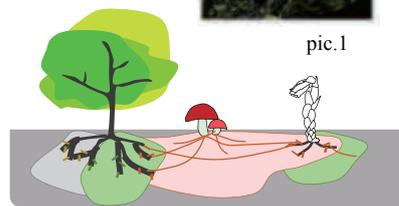
無葉緑植物ギンリョウソウと外生菌根菌の共生関係 —外生菌根菌を介した地下部ネットワークの解明—

立命館慶祥高等学校 自然科学部生物班

3年 越智匠海 2年 佐藤直, 菅原麻由



pic.1



【目的】

ECM(外生菌根菌)とは樹木の根の部分に付着する菌類であり(pic.2), ギンリョウソウ(pic.1)とは葉緑素を持たないため独自に光合成産物を生産できず, その根に存在する ECM を介して樹木から養分を受け取っている植物である. 社会一般ではこの関係は中立であるといわれているが私達の 2012 年の研究ではギンリョウソウが ECM に対して寄生, 2013 年の研究では両者は相利共生であるという考察に至った. そして最終目的を ECM ネットワーク全体の解明, また地球温暖化問題の解消を目的とし, 研究を行った.

pic.2



【方法】

北海道札幌市に位置する平岡公園でギンリョウソウを見つけ, その直下, 60cm 離れた地点, ギンリョウソウの影響を受けない control の土壌ブロックを採取し根と土に分け, それぞれの ECM の数をカウントし, その結果を多変量解析にかけた. また 2014 年は 2013 年 1 サイトしか行うことのできなかった細分調査を 5 サイト用いて行い, ECM 群集構造をより細かく把握した.

【結果】

類似性指数, 多様度指数からギンリョウソウと ECM には何かしらの関係があると考察し, DNA 解析により *t9* がギンリョウソウと直接的に関係を持つベニタケ属であると判明した. 出現頻度, 対応分析, 細分調査からベニタケ属はそもそも絶対数が少なく, ギンリョウソウの真下に現れる傾向があった.

【考察】

研究結果から, ベニタケ属はギンリョウソウに養水分を与える一方で, ギンリョウソウから何かしらの形で生存しやすい環境を作ってもらっていると考えられる. つまり両者は相利共生の関係にあると考えられる. 今研究は昨年度の結果をより確かなものとし, 社会一般での中立という考えを否定する一つの要因となった. 今後はシャーレ内で ECM の種間競争を行うことで, ベニタケ属の生存率や他の ECM との勢力関係を調べるとともに, 研究室内で三者の相互関係を再現し, 新たな実験系を組み立てることで ECM ネットワークの解明と, 自然環境に与える影響を調べる予定である.

【参考文献】

ブナ林の共生菌とその役割. (ブナ林をはぐくむ菌類. 金子繁, 佐橋憲生, 文一総合出版, 東京). 79-149
宝月岱造 (2004) Smith SE, Read DJ (1997) Mycorrhizal Symbiosis Second edition. 605 pp, Academic Press. London, UK. 佐橋憲生 (2004) 森の構成者としての菌類. (菌類の森. 東海大学出版会, 神奈川). 1-37

H-2

サリドマイドは植物の生長にどのような影響を及ぼすか

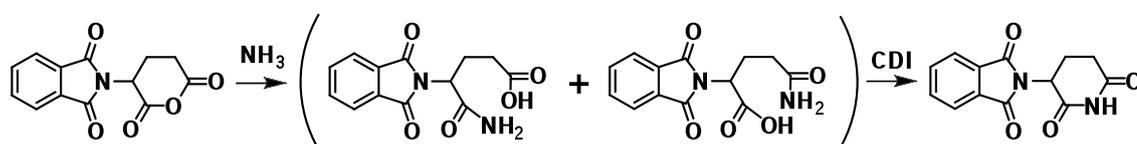
西井 瑞季, 東畑 和真, 高橋 亮蔵

指導教員 加藤 正宏

京都府立桃山高等学校

【目的】最近、サリドマイドの標的分子が「セレブロン」であることが判明した¹⁾。セレブロンは、442個のアミノ酸からなるタンパク質で、ユビキチンリガーゼの構成因子であり、植物からヒトまで進化的に保存されている²⁾。以上の知見から次のような仮説を立てた。すなわち、「サリドマイドは、植物体内のセレブロン（もしくはユビキチンリガーゼ複合体）に作用し、その生長に影響を与える」、という仮説である。そこで、この仮説の検証を目的として研究を行った。

【方法】(1) サリドマイドは、既報を参考にし、市販の原料から2ステップで合成する³⁾。

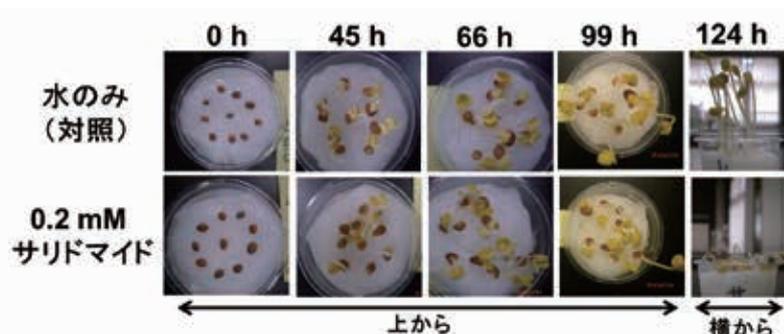


(2) カイワレダイコン種子の発芽と成長に対する影響

- ① サリドマイド水溶液を浸した脱脂綿上に種子10粒置く。
- ② 20℃、遮光下で静置する。

【結果】(1) 白色の結晶を得た。機器分析等の結果より、サリドマイドの合成に成功したと考えられる（総収率70%）。

(2) 発芽率や茎長に有意差は観察されなかった。しかし、茎の強度に影響を与えた（右写真）。



【考察】サリドマイド投与群は、明らかに茎が弱っていた。この原因は、仮説の通り「植物にも存在すると考えられているセレブロンに対する作用の影響」かもしれない。また、オーキシン受容体がユビキチンリガーゼ複合体を構成するタンパク質であることを考慮すると、サリドマイドは、オーキシン活性阻害剤として作用したかもしれない。

【文献】 1. Ito, T., Ando, H., Suzuki, T., Ogura, T., Hotta, K., Imamura, Y., Yamaguchi, Y., & Handa, H. (2010) *Science*. 327, 1345–1350.
2. 伊藤拓水, 半田宏. (2011) *生化学*. 第83巻, 第2号, 118–122.
3. Kumata, K., Takei, M., Ogawa, M., Yui, J., Hatori, A., Suzuki, K., and Zhang, M. (2010) *J. Label Compd. Radiopharm.*, 53, 53–57.

H-3

バナナの皮のキリン化現象について

田端 優貴、平瀬 詩織、原田 勇輝、田中 美穂
指導教員 加藤 正宏
京都府立桃山高等学校

【目的】バナナ果皮は、その成熟に伴い、褐色化する。この現象は、「皮中のドーパミンが酵素の作用等で重合し、ポリドーパミン（メラニン）が生成すること」が原因であると言われている（図1）。しかし、「なぜ“斑点状”に褐色化するのか」、この理由については、はっきりしていない。そこで、「“斑点状”に褐色化するメカニズムの解明」を主目的にしながら、バナナ果皮の褐色化に関する総合的な研究を行った。

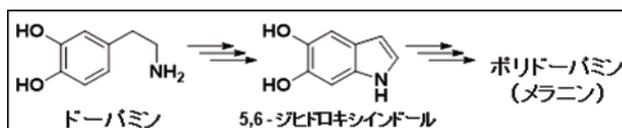


図1. ドーパミンの重合反応

今回、(1)バナナ果皮の褐色化現象の温度依存性、(2)バナナ果皮中のドーパミンの抽出、について研究結果を発表する。なお、バナナ果皮が斑点状に褐色化した状態がキリンの皮膚模様に似ているので、「果皮の斑点化現象」を「キリン化現象」と呼んでいる。

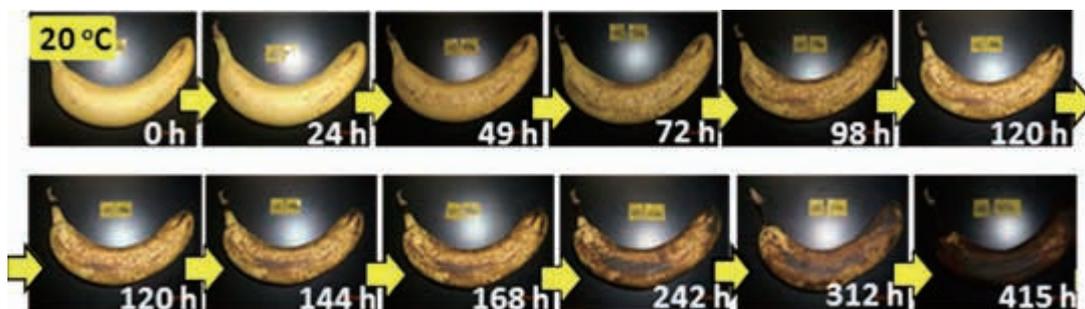
【方法】(1)バナナ果皮の褐色化現象の温度依存性

各温度 (-10 ~ 200 °C) の装置内にバナナ (甘熟王: Sumiflu) 3本を静置し、その変化を観察する。

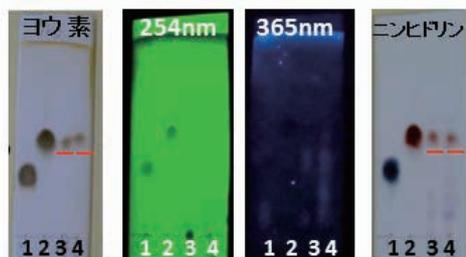
(2)バナナ果皮中のドーパミンの抽出

①果皮を抽出溶媒に浸漬し、ミキサーにかける。②ろ過後、TLCで分析する。

【結果】(1)20°C、30°C保存時のみ、典型的な斑点状の褐色化現象が観察された(図2)。



(2) 2 mol/L 塩酸およびメタノールにて、ドーパミンの抽出に成功した。



<展開溶媒>

n-ブタノール: 酢酸: 水 = 4: 1: 1

<サンプル>

1: L-ドーパミン 2: ドーパミン
3: 塩酸抽出液 4: メタノール抽出液

【考察】酵素が失活するような温度 (200 °C) でも、褐色化が観察された。高温下と低温下では、ドーパミンの重合メカニズムは異なっているかもしれない。また、ポリドーパミンの化学構造も異なっているかもしれない。

H-4

乳がん細胞の上皮間葉転換 (EMT) における線維芽細胞増殖因子 (FGF1) 及び形質転換増殖因子 (TGF- β 1) の役割

池田楓, 岡本侑里香, 水谷彩乃, 安田悠真, 山之内志穂

大阪府立天王寺高等学校

指導教員 河井 昇

目的

線維芽細胞増殖因子 (FGF 1) は、細胞の増殖・遊走・分化といった生理学的、病理学的に重要なプロセスに関与しており、EMT を抑制と促進の両方向に制御する。しかし、この FGF1 がどのような条件で抑制、あるいは促進するのかは未だはっきりと解明されていない。そこで、EMT の主要誘導因子である形質転換増殖因子 (TGF- β) が働くときには、FGF1 が EMT を抑制・促進のどちらの方向に制御するのかということをも明らかにすることを本研究の目的とした。

方法

MCF10A(ヒト正常乳腺上皮細胞株)を未処理、50 ng/ml FGF1 で刺激、5 ng/ml TGF- β 1 で刺激、50 ng/ml FGF と 5 ng/ml TGF- β 1 で刺激し cDNA を合成した。それぞれの cDNA を PCR 法を用いて遺伝子を増幅させた。増幅産物を 1.5%アガロースゲルを用いて電気泳動を行い、遺伝子の発現量の違いを測定した。

結果

E-cadherin は TGF- β の刺激で EMT が進行し発現量は低くなるはずだが増加した。FGF の刺激でも発現量が増加した。これは TGF で刺激した場合より多かった。TGF- β と FGF で刺激した場合は EMT が促進され発現量は低下した。N-cadherin は TGF- β の刺激で EMT が進行し、発現量は増加した。FGF で刺激した場合は低下し、TGF- β と FGF で刺激した場合は TGF のみの刺激と同様に発現量が増加した。Snail は TGF- β 、FGF のそれぞれ単独で刺激した場合には変化がなかった。TGF- β と FGF の刺激では発現量が低下した。Vimentin と Slug は TGF- β 単独、FGF 単独、TGF- β と FGF の両方で刺激、すべてで発現量の違いが見られなかった。SMA は TGF- β の刺激で EMT が促進され発現量は増加した。また、FGF の刺激でも EMT が促進され増加しているが、TGF- β で示された結果より低くなった。TGF- β と FGF の両方では TGF- β のみの場合よりも発現量は低下した。

考察

E-cadherin、SMA においては TGF- β または FGF のみで刺激すると EMT を抑制した。TGF- β +FGF だと EMT が促進され、転移しやすくなる。N-cadherin においては、TGF- β のみ、TGF- β +FGF の刺激だと EMT が抑制され、FGF のみの刺激では促進される。Snail においては、TGF- β +FGF においてのみ EMT が抑制されることから、Snail は E-cadherin を TGF- β +FGF で刺激した際の効果には関与していないと考えられる。Vimentin においては、転移に関与すると考えられていたが、今回の実験ではどの条件で刺激しても変化が見られなかったの、転移には関係ないと考えられる。

H-5

野生乳酸菌のプロバイオティクス性に関する研究 Search of the Wild Probiotic Lactic Acid Bacteria

桑野峻，國藤侃志，石田祐輔，高橋鳳翔

指導教員：山下 昭

大阪府立園芸高等学校 バイオサイエンス科 バイオ研究部

Abstract

We isolated the wild lactic acid bacteria from fig and grape fruits, and the tolerance of the bacteria to the simulated digestive juice was investigated. The bacteria isolated from the grape fruits were high tolerant to the juice. Then, they were thought to be the probiotics.

1. 目的

野生乳酸菌、既知のプロバイオティクス乳酸菌の人工消化液耐性試験を通して、野生乳酸菌のプロバイオティクスとしての可能性を検討する。

2. 方法

市販ヨーグルト（3種類 B、C、E）、市販乳酸菌飲料（2種類 A、C）、果実由来乳酸菌株前培養液（2種類 F、G）を試料とした。

人工胃液に試料を加え 37℃で 3 時間反応させ、BCP 寒天培地を用いて、反応前後の生菌数を測定し生菌率を求めた。人工胃液反応物を人工腸液に加え 37℃、24 時間嫌気下で反応させ、反応後の生菌数を測定し増殖率を求めた。

3. 結果

試料 G は試料 A、C、E と同等の耐性を示した。試料 B、D は耐性が低かった。

4. 考察

試料 G は試料 A、C、E と同様に胃酸で死滅せず、大腸に定着する可能性が高く、プロバイオティクスとしての適応性が認められる。今後は、プロバイオティクスとしての別の機能（抗菌性、コレステロール吸着性）について調べたい。

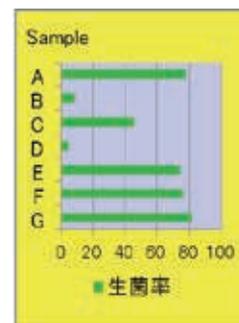
5. 参考文献

乳酸菌の人工消化液中での生残性. 瀧口隆一*, 鈴木豊. *雪印乳業(株)

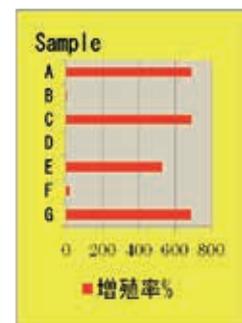
6. キーワード

プロバイオティクス, 乳酸菌, 消化液耐性, 人工消化液

人工胃液耐性試験



人工腸液耐性試験



H-6

フザリウム属のカビを利用した海藻からの還元糖の生成とアルコール生産の可能性

松口果歩, 松口莉歩

指導教員: 西村秀洋

大阪府立園芸高等学校 バイオサイエンス科 バイオ研究部

【目的】私達は、寒天を分解し生育するカビを土壌中から分離した。そのカビの形態と分類について調べたところ、フザリウム属の仲間であることが分かった。私達は、寒天を分解できるフザリウムが海藻を栄養源として利用できると考え、複数の海藻上で生育試験を試み成功した。そこで、大阪湾など内海で夏場に大量発生し、海洋汚染源になっているアオサをバイオ燃料にする技術を開発したいと考え、このカビの粗酵素液を用いた糖化実験とパン酵母を用いたアルコール発酵試験を行った。

【方法】

1. アオサの糖化実験

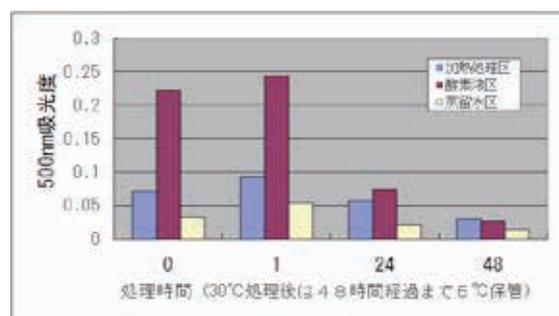
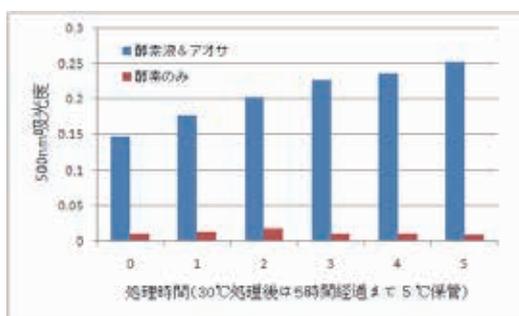
①アオサとフザリウムの粗酵素液を混合し、液中の還元糖量を48時間まで、ソモギーネルソン法によって計測した。②滅菌後、2週間、5、15、30℃で糖化実験を行った。

2. アルコール発酵試験

①フザリウム粗酵素液との反応によりアオサから得られた還元糖を含む液にパン酵母、を入れ、アインホルン管を用い、ガス発生の有無を確かめた。②サッポロビール社のアルコール0.00%の簡易測定法に従い、アルコール発生の有無を調べた。

【結果】

1. ①: 処理後5時間まで還元糖量が増加した(図左)。しかし、24時間後は還元糖が減少した(図右)。②: 2週間において還元糖量の減少はなく、反応温度に従い増加した。



2. ①: アインホルン管にはほんのわずかな気体の発生が認められた。②: アルコール発生は確認できなかった。

【考察】糖化実験では、フザリウムから得られる酵素により、アオサを分解し、還元糖が得られることを実証することができた。一方、アルコール発酵試験では、アオサから得られる還元糖を基質に、パン酵母はアルコールを生産することができなかった。このことは、アオサから得られる還元糖をパン酵母は資化できないことを示していると考えられる。

今後はアオサから得られる還元糖を資化できる酵母の探索に取り組みたい。またフザリウムから得られる酵素のアオサを糖化する反応の最適条件についても明らかにしたい。

【文献】

北村 進一・中屋 慎. 糖の定量法. 生物学 第90巻.

サッポロビール株式会社. アルコール0.00%の簡易測定法, 2013.

H-7

「池田ミカン」の系譜に関する研究 —果実からのDNA抽出とRAPD分析による系統分析の可能性—

橋本英和, 山地潤心

指導教員：西村秀洋

大阪府立園芸高等学校 バイオサイエンス科 バイオ研究部

【目的】大阪府立園芸高校のある池田市は、中熟系普通温州ミカンの主要系統「南柑4号」の母本となっている「池田ミカン」の起源地とされている。バイオ研究部では池田市が町おこしの資源として注目している「池田ミカン」の系譜に関する研究の計画を立て、その端緒として、DNA抽出とRAPD分析を試みた。

【材料】静岡試験場で保存されている「池田ミカン」株をつぎ木し、校内で栽培されている「池田みかん」2株（以下「静岡池田1」「静岡池田2」）と地元農家より提供された池田ミカンと思われる残存株をつぎ木した2株（以下「残存池田1」「残存池田2」）から得られた果実と葉を使用した。また、校内で生産実習用に栽培されている「早生温州ミカン（以下「早生温州」）」と「金柑」も実験に供試した。

【方法】○実験1：「静岡池田1」「早生温州」、「金柑」の未展開の小葉、十分に展開した大葉、果実を採取し、果実から外果皮、中果皮、砂じょうをそれぞれ切りだした。これらの各部位約50mgからキアゲン社（米国）のDNA抽出キットDNeasy plant mini Kitを使用し、DNA抽出液200 μ Lを得た。得られたDNA抽出液は2%アガロースゲル電気泳動を実施するとともに紫外可視分光光度計を用いた吸光度測定を行い、DNAの濃度を調べ、260/280比を調べた。○実験2：実験1で得られた各DNAサンプルの他、「残存池田」の葉および外果皮からのDNAサンプルを用い、濃度調整の後これをテンプレートとして、予備実験で選抜した3種類の12merランダムプライマー（A24, A27, A31）でPCRを行い、得られたDNAバンドから類似度（Dice）を算出した。

【結果】○実験1：DNA抽出液の電気泳動の結果、「池田ミカン」、「早生温州」、「金柑」のいずれも小葉、大葉、外果皮の順でDNA量が多かった。また吸光度測定の結果、濃度は低いがいずれの中果皮、砂じょうからもDNAが得られていることが確かめられ、吸光度の比（260/280）は、ほぼ1.8を越える値を示した。○実験2：3種類のプライマーで11本のDNAバンドが得られた。このうち、すべてのサンプルに共通して出現したバンドは1本のみであった。算出した類似度は、葉、外果皮を抽主組織としたサンプル間の値に比較して、同一株からであっても、内果皮や砂じょうの間では明らかに低い値にとどまった。葉および外果皮から抽出したサンプルによるDNAバンドの類似度を「静岡池田1・2」、「残存池田」、「早生温州」、「金柑」の間で比較すると「金柑」とその他の間では明らかに低くなったが、「静岡池田」「残存池田」「早生温州」間ではややばらつきはあるものの「池田ミカン」と「早生温州」に明らかな差異はなかった。

【考察】「池田ミカン」の系譜に関する今後の研究の留意点が明らかになった。

1. 分析用DNAを果実から得る場合は、外果皮から抽出することが必要である。
2. RAPD分析に適用できるプライマー数を十分に確保し「池田ミカン」と「早生温州」間で差異の検出がされることを検証する段階が必要である。

【文献】熊代克巳、平成6年、高等学校農業用「果樹」、p97、農文協 他

H-8

輪紋病発生に関与する環境要因の解析

植田友也, 太田堇月, 小田彩乃, 古川菜々美

指導教員：水本祐之

奈良県立青翔高等学校

【目的】 リンドウ子房輪紋ウイルス (Gentian ovary ring-spot virus; GoRV) はリンドウの子房に輪紋症状を引き起こす植物ウイルスとして、2014年に岩手県で発見された(1)。輪紋症状とは、植物の茎、葉、果実などに生じる同心円状の模様である(図1)。輪紋は植物ウイルスによる病害として広く知られている症状であるが、輪紋が生じるメカニズムについては明らかとなっていない。本研究では輪紋発生のメカニズムの解明を目指し、輪紋発生に対する温度と光の影響について解析した。

【方法】 GoRVをベンサミアータバコ(*Nicotiana benthamiana*)に接種すると、ウイルスを接種した葉に輪紋が生じる。そこで本研究で、栽培が容易なベンサミアータバコをモデル植物として用いた。ベンサミアータバコにGoRVが感染した植物葉の磨砕液、もしくは精製ウイルス粒子(20 µg/ml)を接種した。温度の影響を見るために、接種個体を26°Cに設定し蛍光灯(約1500 lx)の光を16時間あてた植物培養器、および野外の温室でそれぞれ7~10日間培養した。また、光の影響を見るために、GoRVを接種した植物を26°Cに設定し蛍光灯の光を16時間あてた培養器、および26°Cに設定し光をあてない培養器でそれぞれ培養した。培養後、輪紋の直径を計測するとともに、植物の状態を観察した。

【結果】

1. 2014年10月に実験をおこなった際、屋内と屋外で培養した植物に生じた輪紋の直径は4~28 mmであった。この時、屋外の昼の気温は18~26°Cであった(図1)。
2. 2014年12月に実験をおこなった際、屋内と屋外で培養した植物に生じた輪紋の直径は1~2 mmとであった。この時、屋外の昼の気温は10~18°Cであった(図1)。
3. 2015年3月に実験をおこなった際、屋内で蛍光灯の光をあてた植物に生じた輪紋の大きさは1.5~5.0 mmであった。一方、暗黒条件で培養した植物は枯死した(図2)。

【考察】 温度を26°Cに設定した植物培養器においても、10月と12月では輪紋の大きさが異なることから、輪紋の発生には温度以外の要因が関与している可能性がある。興味深いことに、GoRVを接種した植物を暗黒条件で培養したとき、植物はウイルス病により枯死した。このことは、輪紋病の発生は、光の影響を大きく受けることを示唆している。今

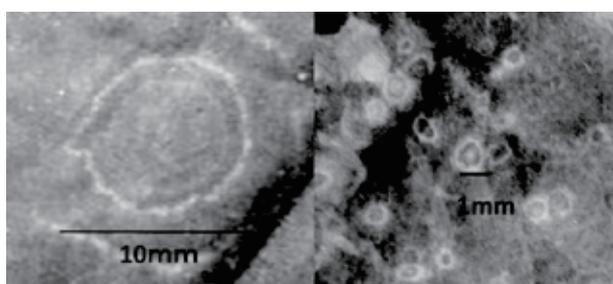


図1 (左)10月の屋内のタバコに生じた輪紋。(右)12月の屋内のタバコに生じた輪紋。



図2 (左)光をあてた条件で培養したウイルス接種植物。(右)暗黒条件で培養したウイルス接種植物。

後は輪紋発生における光の影響をさらに調べ、輪紋病を光で防除する技術の開発を目指す。

【文献】 1. Atsumi, G., Tomita, R., Yamashita, T., Sekine K. (2015) *J. Gen. Virol.* **96**, 431–439

H-9

タンパク質以外の不凍物質

平重輝¹, 西島拓海¹, 伊藤黎弥¹, 吉岡友裕¹, 生田依子²
¹奈良県立青翔高等学校2年生, ²奈良県立青翔高等学校教諭

【目的】タンパク質の不凍物質はよく研究されているが、熱・酸やアルカリなどによって失活し、働きを失うため、加熱する冷凍食品などには使用できない。そこで、タンパク質以外の不凍物質を探すことを目的とした。試料はタンパク質が少なく、糖を多く含むキノコのなかで、もっとも低温で生育するエノキタケを用いた。

【方法】

- ① 生のエノキタケに同量の水を加えてミキサーで粉碎し、一方は10℃、他方は100℃で6時間加熱した。それぞれろ液の糖度を測定した。
- ② 水酸化カリウム濃度が2%になるように加え、さらに100℃で2.5時間加熱した。
- ③ 水酸化カリウム濃度が20%になるように加え、さらに100℃で2.5時間加熱した。
- ④ 蒸留水と方法①の10℃と100℃のろ液同量を冷凍庫に入れ、どちらが先に凍結するか観察した。方法③のろ液と20%水酸化カリウムを同量、冷凍庫に入れ、どちらが先に凍結するか確認した。

【結果】方法①のろ液の糖度は10℃は4.8±0.5Brix%、100℃は5.5±1.3 Brix%であった。10℃と100℃のろ液は糖度は高いが、蒸留水と同時に凍結した(図1)。



20%水酸化カリウムだけの水溶液が凍結した時点で、20%水酸化カリウム+エノキタケの水溶液は凍結しなかった(図2)。

図1. 左から蒸留水・10℃水+エノキタケ・100℃+エノキタケ



図2. 左 20%KOH、右 20%KOH+エノキタケ

【考察】水と熱水で抽出した場合、糖度は高いが凍結した。この結果より、不凍効果を持つ物質は水と熱水では抽出できないと考えられる。また、20%水酸化カリウム水溶液でアルカリ抽出した場合、エノキタケの成分を含む水溶液は、エノキタケの成分を含まない20%水酸化カリウム水溶液が凍結した時点では凍結しなかった。この結果より、アルカリ抽出されたエノキタケの成分には不凍効果を持つ物質が含まれ、100℃で6時間加熱しても機能を失わないため、タンパク質以外の物質と考えられる。エノキタケにはキシロマンナンという多糖類が含まれており¹⁾、キシロマンナンには不凍効果がある²⁾と知られているため、本研究の不凍効果はキシロマンナンによると考えられる。

- 【文献】 1. F. R. Smiderte, E. R. Carbonero, C. G. Mellinger, G. L. Sasaki, P. A. Gorin, M. Iacomini (2006) *Phytochemistry* **67**, 2189-2196
2. 河原秀久.(2014) 不凍タンパク質に次ぐ新製品を開発 エノキタケ由来不凍多糖の量産化に世界で初めて成功 関西大学プレスリリース 配布資料

H-10

二種の溶液を混ぜた混合溶液での再結晶

野口 輝 井西 司 若狭 航季 浅井 雄飛

指導教員 辻田 弘仁

奈良県立青翔高等学校

- 【目的】 1, 混合溶液での結晶の様子を観察する。
2, 溶液ごとの結晶の特徴を観察する。

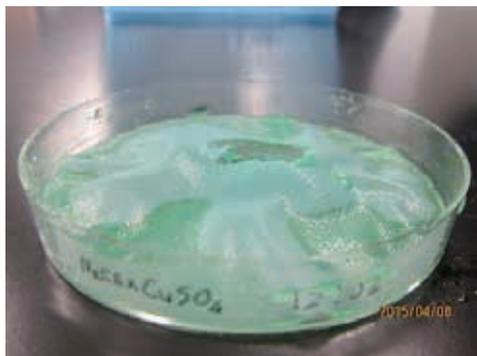
【方法】

- 1, 50 ml, 60°Cの水に飽和する(KNO_3 , NaNO_3 , Na_2SO_4 , CuSO_4 , $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$, NaCl)を用意した。
- 2, それらを2種類ずつの組み合わせで50 mlの水に入れたものを15種類作った。
- 3, それぞれを60°Cに加熱し、15°Cの恒温槽で静置した。

【結果】

- ② $\text{KNO}_3 \times \text{Na}_2\text{SO}_4$ ・・・針状の結晶が多く析出。
- ⑨ $\text{NaNO}_3 \times \text{NaCl}$ ・・・不定型な結晶となり、区別がつかない。
- ⑩ $\text{Na}_2\text{SO}_4 \times \text{CuSO}_4$ ・・・青い粒状の結晶を透明な結晶が取り囲んでいる。
- ⑭ $\text{CuSO}_4 \times \text{NaCl}$ ・・・緑色の膜状の結晶ができた。→画像
- ⑮ $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \times \text{NaCl}$ ・・・まとまった大きな結晶ができた。

etc...



【考察】

- $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$ のような複塩がすぐに出来るのかと思っていたがそうではなく、それぞれがそれぞれの形で結晶化しているのが多かった。
- ・ $\text{CuSO}_4 \times \text{NaCl}$ の場合のみ、 Cu^{2+} と Cl^- が配位結合を起こして $\text{Na}_2[\text{CuCl}_4]$ の結晶になっていたのかと思われる。
 - ・ KNO_3 を含んでいる結晶は底に KNO_3 以外の結晶ができ、その上に KNO_3 の柱状の結晶が生えるような形で成長していた。これは KNO_3 単体の結晶の時と酷似している。

- 【文献】 ・理科年表ポケット版平成14年度版
・数研出版高校理科用化学

H-11

イネの有効活用～食べるだけじゃもったいない！～

辻伶衣¹，柴田規迪¹，杉村侑亮¹，橋爪沙良¹，武内菜穂子²

¹青翔高校・S探究イネ研究班，²青翔高校・教員

【目的】本校はタイのプリンセスチュラボーンナコンシータンマラート校と姉妹校提携を結んでいる。タイでは近年の経済発展によりエネルギーの需要が高まり、安定供給のためにバイオエタノールの生産が盛んである。しかし、その材料はサトウキビやキャッサバであるため、食糧と燃料のバランスが問題となっている。この問題を解決するために、本校と姉妹校ではバイオエタノール生産について共同研究を行うことにした。

本校の周辺は水田が広がる豊かな稲作地域で毎年多くの米が生産されている。しかし、米を収穫した後のイネわらは廃棄するだけである。そこで、「米を食べるだけではもったいない！」と感じて、イネわらからバイオエタノールを作ることにした。昨年度は基礎的な実験データをとるために、バイオエタノール生産と食用の両方に適したイネの品種を探索し、イネわらの糖化や発酵について研究を行ったのでこれを報告する。

【方法】実験① 7品種のイネ（うるち米4種・もち米2種・酒米1種）を栽培し、草丈、分けつ数、葉齢、イネわらの質量、種子の数、種子の質量について計測を行った。**実験②** イネわらを乾燥させて粉末（最大径 250 μm 以下）にし、セルラーゼを含む酢酸緩衝液中で糖化した¹⁾。糖化を確認するため、糖化液の糖度を測定した。また、糖化液をシリカゲル薄層クロマトグラフィー（TLC）で展開して糖組成を調べた²⁾。

【結果】実験① 7品種のイネの各種パラメーターの計測により、草丈、イネわらの質量、種子の数、種子の質量の値が大かったのは、旭糯であった。**実験②** 旭糯とヒノヒカリのイネわらを糖化して糖度を比較したところ、顕著な違いは見られなかった。さらに、糖組成の分析から、糖化液にはグルコースが含まれていることが明らかになった。

【考察】本研究の目的に合うイネわらの質量と種子の質量の値がともに大きい品種は旭糯（もち米）であった。もち米はうるち米よりも草丈が大きくなるという特徴がある。植物の草丈が高くなるには細胞壁を強固にする必要があり、これにはリグニンという成分が重要な役割を担う。このことから、旭糯はリグニン成分が多い可能性が考えられた。リグニンは糖化を邪魔する物質であることから、旭糯とうるち米のヒノヒカリについて糖化を比較したところ、糖化に顕著な違いは見られなかった。リグニン量は少ないがセルロースやヘミセルロース密度が高いために細胞壁が強固になり倒れにくい品種も報告されている³⁾。今回用いた旭糯がリグニン量の少ない品種との報告は見つけられなかった。しかし、現段階では、もち米だから糖化に悪影響がでるという結果は得られていない。

ポスター発表では、その他さらに進めた実験の詳細を結果も合わせて考察したい。

- 【文献】**
1. 佐藤啓ら、市販セルラーゼによる微粉碎したスギとイネわらの糖化 (1998)
 2. 山崎光廣ら、TLC による糖質の分離挙動と食品試料への応用 (1988)
 3. T.Ookawa *et al.*, Increased lodging resistance in long-culm, low-lignin *gh2* rice for improved feed and bioenergy production. (2014) *Scientific Reports*

H-12

地衣類から新抗生物質を見つける

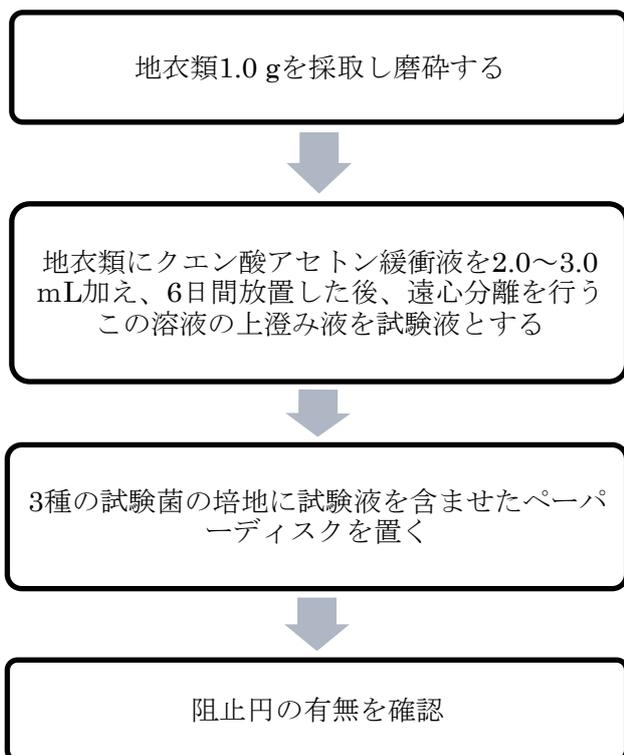
赤坂貴浩, 河合真央, 合田元英, 齊藤良典, 里井俊太

指導教員: 中澤克行

兵庫県立神戸高等学校 総合理学科

【目的】本研究の目的は、神戸高校周辺に生息する地衣類から新抗生物質を見つけることである

【方法】



【結果】

結果

地衣類の種類	<i>M.luteus</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>B.mycooides</i>
コフキジナリア	-	+(14.0mm) +(17.0mm) +(14.5mm)	+(14.0mm) +(13.0mm) +(18.5mm)
レプラゴケ のなかま	- +(18.4mm)	+(17.0mm) +(14.5mm) +(14.8mm)	++(22.0mm) ++(23.3mm) ++(20.1mm)
ロウソクゴケ	-	+(13.2mm)	+(17.3mm)
チョロキ ウメノキゴケ	-	-	-
コフキチョロキ ウメノキゴケ	-	-	-

抗生物質による阻止円の出方

抗生物質	試験菌		
	<i>M.luteus</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>B.mycooides</i>
マクロライド系	++	+	-
マクロライド系	+	-	-
テトラサイクリン系	-	+	++
テトラサイクリン系	-	-	+
ペニシリン系	++	+	-
ペニシリン系	+	-	-
アミノグリコシド系	-	++	+
アミノグリコシド系	-	+	-

【考察】

①のコフキジナリアでは、3回の実験ともに、阻止円が観測された。また阻止円の大きさにはばらつきがあるが、阻止円が観測された菌のパターンが3回とも同じであるため、この地衣類は抗生物質を持ち、既存の系統であればテトラサイクリン系、あるいはアミノグリコシド系であると考えられる。

②のレプラゴケのなかまでは阻止円が観測されたため、抗生物質が存在していると考えられるが、3回の実験のうち阻止円が観測された菌のパターンが一致してないため、再度確認する必要がある

③のロウソクゴケは3回中1回のみしか阻止円が観察されなかったため、再度確認する必要がある。

【文献】

- [1] 厚生省. 畜水産食品中の残留抗生物質簡易検査法 (改訂). 2003年
- [2] 吉村康. 原色日本地衣類図鑑. 保育社, 1974年
- [3] 井上哲男, 慶田雅洋. 報文 地衣類の抽出成分. ウスニン酸とその利用. 粧抜誌 第14巻第1号, 1980年

平成 27 年度日本生化学会
近畿支部奨励賞
受賞記念講演

波多野 亮

上皮膜輸送機能制御における細胞骨格系アダプター蛋白質エズリンの役割

波多野 亮

立命館大学薬学部 分子生理学

上皮組織は、様々な栄養物質を体内へと取り込むと同時に老廃物や生体異物を体外へと排出する事で生体内外の物質環境の恒常性維持に関わる重要な役割を果たしている。トランスポーターを介した様々な物質の上皮細胞膜輸送はこの恒常性維持において重要な役割を担っており、その発現及び膜局在制御機構の解明は生体内におけるトランスポーターの生理学的役割や疾患の発症機序の解明、標的薬物の開発などにおいて重要である。このような膜輸送体の機能や局在は足場タンパク質など様々なタンパク質との相互作用の上に成り立っており、それらの足場タンパク質の生理的な役割を明らかにすることが必要である。我々はそのような足場タンパク質の一種であるエズリンの生体内における機能について着目し、研究を進めている。エズリンはアクチン細胞骨格とトランスポーターなどの細胞膜タンパク質や足場タンパク質とを架橋する機能を有するタンパク質であり、ERM (**E**zrin-**R**adixin-**M**oesin)ファミリーに属している。遺伝子改変マウスを用いたこれまでの研究では、エズリンの欠損はより重篤な表現型を呈する事が示されている。エズリンは特に上皮細胞における発現が特徴的であり、胃、小腸・大腸、腎臓、肺などに存在する様々な上皮細胞において発現している。個体レベルでは、胃壁細胞や腸管の吸収上皮細胞におけるエズリンの役割についての研究が中心になされ、その他の臓器での個体レベルでの検討は十分になされていなかった。我々は、エズリンノックダウン(KD)マウスを用いて、他の臓器におけるエズリンの機能解析を進め、エズリンKDマウスの腎臓及び肝臓内胆管において機能的な異常が生じている事を新たに見出している。腎臓においては、エズリンは近位尿細管細胞の頂端膜側に局在しており、これまでもNa-リン酸共輸送体Npt2aや足場タンパク質であるNHERF1(Na⁺/H⁺-exchanger regulatory factor 1)の局在を制御しているものと考えられていた。エズリンKDマウスではこれらのタンパク質の頂端膜側における局在の異常と尿中へのリン酸排泄の亢進が見られることから、エズリンがNpt2aの細胞膜局在制御を介して生体内リン酸ホメオスタシスの調節に重要な役割を担っているものと考えられた。また、血液解析の結果、エズリンKDマウスにおいて重篤な肝機能障害が生じている事を見出した。エズリンは肝臓においては胆管細胞において特異的に発現している。胆管は肝細胞から毛細胆管中に分泌された胆汁の流動性を調節する重要な役割を担っており、この胆管細胞においてエズリンはClチャネルであるCFTR(Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator)などの頂端膜側における局在を制御する事で胆管細胞のイオン分泌、とりわけCFTRによるCl分泌を利用した二次的なHCO₃⁻の管腔内への分泌を制御する事で、細胞表面でのHCO₃⁻バリア形成亢進に重要な役割を果たしているものと考えられる。以上のように、これまでの研究成果から、エズリンが生体内において様々な上皮細胞の頂端膜側における膜輸送体タンパク質の局在制御を担う重要な分子であると考えられた。今後個々の上皮組織におけるエズリンの機能的・生理的役割を明らかにする事によって様々な疾患の発症機序の解明や治療法の開発に繋げていきたいと考えている。

【文献】

1. Hatano R *et al.* Knockdown of ezrin causes intrahepatic cholestasis by the dysregulation of bile fluidity in the bile duct epithelium. *Hepatology. in press*, 2015.
2. Hatano R *et al.* Ezrin, a membrane cytoskeletal cross-linker, is essential for the regulation of phosphate and calcium homeostasis. *Kidney Int.* 83(1): 41-49, 2013

ランチオンセミナー

宇留島 隼人

主催

株式会社アミノアップ化学

日本の伝統食品であるシソの新たな可能性 ～大腸炎治療効果のエビデンス獲得に向けた研究～

宇留島 隼人

国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所 免疫シグナルプロジェクト

私は鳥取大学農学部獣医学科を卒業後、臨床獣医として7年間勤務しました。ペット業界でもヒトと同様に様々なサプリメントが存在し、ペットの健康増進および治療を目的として使用されています。しかし、全てのサプリメントのエビデンスレベルが高いわけではなく玉石混濁で、飼い主さんに自信を持って勧められるサプリメントが少ないという状況でした。そこでサプリメントについてもっと勉強をしよう、研究をしようと思い大阪大学大学院医学研究科の生体機能補完医学寄附講座（現在は統合医療学寄附講座に名称変更）に入学しました。消化器外科医である伊藤壽記教授のご指導の下、腸管免疫に影響を与える食事成分を研究することとなり、良い素材がないかと探していたところアミノアップ化学社製のシソ葉熱水抽出物（シソエキス）を学会で知りました。

シソは東南アジア原産の一年草で、シソの葉は防腐効果を有し古来より刺身のツマとして利用されてきました。また、漢方においても健胃、鎮咳、鎮静、発汗、利尿などを目的として、シソの葉を成分の一つとして含む柴朴湯、半夏厚朴湯、香蘇散などが処方されています。シソエキスはこれまでにマクロファージからの TNF- α 産生を抑制することや抗アレルギー作用など様々な抗炎症作用が報告されています。クローン病や潰瘍性大腸炎などの炎症性腸疾患（IBD）は厚生労働省の特定疾患に指定されている再発・寛解を繰り返す原因不明の難病ですが、腸管粘膜免疫の破綻により、TNF- α 、IL-6 や IL-17A などの炎症性サイトカインが過剰に分泌されていることが病態の一つであると考えられています。そこでシソエキスの抗炎症作用に着目し、IBD マウスモデルである DSS 誘導腸炎モデルに対する PE の安全性、有効性、および PE 成分の免疫細胞におけるサイトカイン産生に対する影響についての研究を行うこととなりました。

シソエキスの投与によって DSS 誘導腸炎による体重減少が軽減され、腸管粘膜の抑制性 T 細胞が増加し、炎症からの回復が促進されることが確認できました。またシソエキスの主な成分であるルテオリン、アピゲニン、ロスマリン酸のリンパ球に対する影響を検討し、ロスマリン酸、アピゲニンがリンパ球からの炎症性サイトカイン産生を抑制すること、ロスマリン酸が抑制性 T 細胞の分化を促進することも確認しました。

今回のランチョンセミナーでは、その実験結果を中心に大学院での機能性食品研究について話させていただきます。

第 62 回 日本生化学会近畿支部例会
ランチオンセミナー発表

北海道生まれの
青ジソの葉から抽出。
「シソエキス」

www.aminoup.co.jp

写真: 北海道の契約シソ農場

 **Amino Up
Chemical**

人の健康を考える
株式会社アミノアップ化学
〒004-0839 札幌市清田区真栄363-32
TEL(011)889-2277 FAX(011)889-2288



北海道食品機能性表示制度
「ヘルシーDo」
北海道認定 を応援しています!

自然の恵みをテーマに、
人と健康にやさしい製品を
皆様のもとへ
お届けいたします。

www.aminoup.co.jp



**Amino Up
Chemical**

人の健康を考える

株式会社アミノアップ化学

〒004-0839 札幌市清田区真栄363-32
TEL(011)889-2277 FAX(011)889-2288



北海道認定

北海道食品機能性表示制度

「ヘルシーDo」

を応援しています!

ライチ由来
低分子化ポリフェノール
Oligonol®

酵素処理アスパラガス
熱水抽出物
ETAS®

じっくり育てた
自然のチカラ。

担子菌培養抽出物
AHCC®

www.aminoup.co.jp

 **Amino Up
Chemical**

人の健康を考える
株式会社アミノアップ化学
〒004-0839 札幌市清田区真栄363-32
TEL(011)889-2277 FAX(011)889-2288



北海道食品機能性表示制度
「ヘルシーDo」
北海道認定 を応援しています!



ヘルシーDoは
北海道のお墨付き。
「おいしい × ヘルシー」

www.aminoup.co.jp

 **Amino Up
Chemical**

人の健康を考える
株式会社アミノアップ化学
〒004-0839 札幌市清田区真栄363-32
TEL(011)889-2277 FAX(011)889-2288



北海道食品機能性表示制度
「ヘルシーDo」
北海道認定 を応援しています!

研究機器の検索サイト「研究機器オンライン」

リニューアル
和研薬の研究機器オンラインが、検索しやすくなって新登場！！

研究用途に
合わせた検索も
ラクラク！

② 研究機器オンライントップへ！



HPトップから
一目でラクラク
検索だワン！

① HP トップバナーから



予算申請の
金額に合わせた
検索もラクラク！

特長

- 予算申請に便利 → 指定範囲の金額で検索が可能に！
- 研究用途から機器検索 → 細胞解析・有機合成・タンパク質解析などのカテゴリー検索
- あのメーカーのあの機器を → フリーワード検索やメーカー別索引も可能！
- 製品情報の充実 → 各製品の仕様表が詳細になりました！

和研薬の **NEW** 研究機器オンラインは、
PC、スマートフォンやタブレット端末からアクセス！

URL <http://www.wakenyaku.co.jp/ctg/>



和研薬 研究機器 検索

理 化 学 器 械 ・ 医 用 器 材 ・ 実 験 動 物 飼 育 装 置
O A 機 器 ・ 事 務 用 品
I W A K I 特 約 店



株 式 会 社 南 出 理 化 商 会

代 表 者 南 出 政 男

〒545-0021 大阪市阿倍野区阪南町4丁目11-26

電話 (06) 6621-2947

FAX (06) 6627-1359

第62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。

株式会社アミノアップ化学



ライオン株式会社



タカラバイオ株式会社

ナカライテスク株式会社

株式会社廣川書店

株式会社ツムラ

小野薬品工業株式会社

株式会社南江堂

プラス薬局 若草本店（滋賀県草津市）

和研薬株式会社

株式会社南出理化商会

パスカル薬局（滋賀県草津市）

第62回日本生化学会近畿支部シンポジウムに協賛いただいた

関西実験動物研究会

立命館大学動物実験委員会

に感謝いたします。また、要旨集の写真を提供していただいた

滋賀県フォトライブラリー

立命館広報課

に感謝いたします。

ひとつの新薬が生まれるたび、
世界は少し幸福になる。



いまだ克服できていない病気や、
さまざまな患者さんの満たされない想い。
いま、必要とされている薬は、一様ではありません。
私たちは独自の研究開発を積み重ねながら、
世界のバイオ企業や研究機関とも積極的に手を結び、
これまでにない新薬の開発に全力で取り組んでいきます。
人々の幸福に少しでも力になれると信じて。

願いをこめた新薬を
世界のあなたに届けたい。
小野薬品



第 62 回日本生化学会近畿支部例会

例会長

西澤 幹雄 (立命館大学 生命科学部生命医科学科)

実行委員

浅野 真司 (立命館大学 薬学部薬学科)
三原 久明 (立命館大学 生命科学部生物工学科)
鈴木 健二 (立命館大学 薬学部薬学科)
藤田 隆司 (立命館大学 薬学部薬学科)
寺内 一姫 (立命館大学 生命科学部生命情報学科)

第 62 回日本生化学会近畿支部例会要旨集

2015 年 5 月 16 日発行

発行者： 第 62 回日本生化学会近畿支部例会長 西澤 幹雄
〒525-8577 滋賀県草津市野路東 1-1-1
立命館大学 生命科学部生命医科学科 医化学研究室内
日本生化学会 近畿支部 例会事務局
電話：077-561-2876 Fax：077-561-2876
E-mail：jbsk2014@gst.ritsumei.ac.jp

印刷・製本： 株式会社 北斗プリント社

レーニンジャーの生化学 [第6版] (上・下)

—生化学と分子生物学の基本原理解—

京都大学名誉教授 川崎 敏祐 監修
立命館大学総合科学技術研究機構上席研究員
京都大学大学院教授 中山 和久 編集

[上] B5判 1,000頁 9,504円
[下] B5判 940頁 9,504円

フルカラー 世界的に実績のある教科書の5年ぶりの改訂版。生化学・分子生物学領域の基礎から最先端までをカバーしており、初めて学ぶ学生のみさんから幅広い専門分野の研究者までをも対象としている。今回の大改訂によって、ポストゲノム時代を反映する網羅的オミックス解析や次世代シーケンシングに基づく病態生化学、遺伝子診断、システムバイオロジー、分子進化などに関連する項目が特に充実し、生化学だけでなく、分子生物学の教科書として見ても最新の内容になった。本書の伝統である確かな化学に立脚するとともに、用語や慣例の丁寧な説明、親しみやすい例示や明快なグラフィックスを随所に盛り込んだ解説が特徴である。

目次

Chapter 1 生化学の基礎

Part I 構造と触媒機能

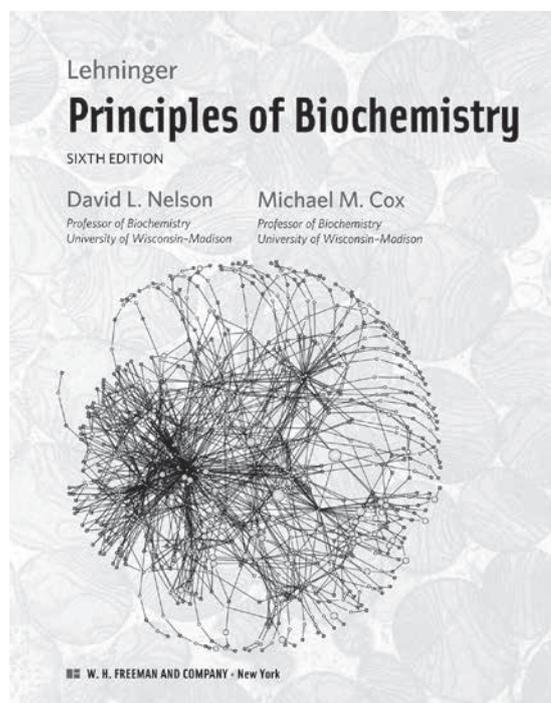
- Chapter 2 水
- Chapter 3 アミノ酸、ペプチドおよびタンパク質
- Chapter 4 タンパク質の三次元構造
- Chapter 5 タンパク質の機能
- Chapter 6 酵素
- Chapter 7 糖鎖と糖鎖生物学
- Chapter 8 ヌクレオチドと核酸
- Chapter 9 DNAを基盤とする情報技術
- Chapter 10 脂質
- Chapter 11 生体膜と輸送
- Chapter 12 バイオシグナリング

Part II 生体エネルギー論と代謝

- Chapter 13 生体エネルギー論と生化学反応のタイプ
- Chapter 14 解糖、糖新生およびペントースリン酸経路
- Chapter 15 代謝調節の原理
- Chapter 16 クエン酸回路
- Chapter 17 脂肪酸の異化
- Chapter 18 アミノ酸の酸化と尿素の生成
- Chapter 19 酸化的リン酸化と光リン酸化
- Chapter 20 植物と細菌における糖質の生合成
- Chapter 21 脂質の生合成
- Chapter 22 アミノ酸、ヌクレオチド
および関連分子の生合成
- Chapter 23 哺乳類の代謝のホルモンによる調節と統合

Part III 情報伝達

- Chapter 24 遺伝子と染色体
- Chapter 25 DNA代謝
- Chapter 26 RNA代謝
- Chapter 27 タンパク質代謝
- Chapter 28 遺伝子発現調節



廣川書店

Hirokawa Publishing Company

113-0033 東京都文京区本郷3丁目27番14号

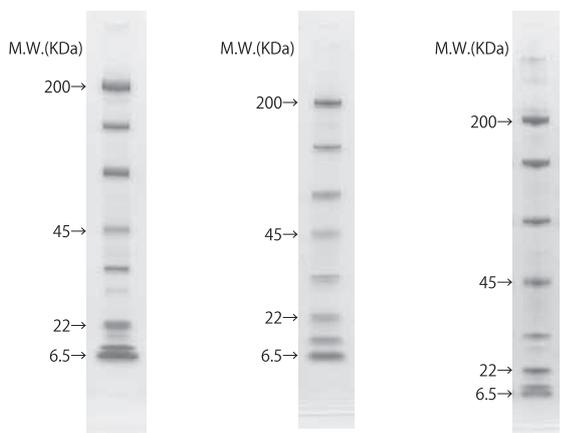
電話03(3815)3652 FAX03(3815)3650 <http://www.hirokawa-shoten.co.jp/>



Bullet PAGE One Precast Gel

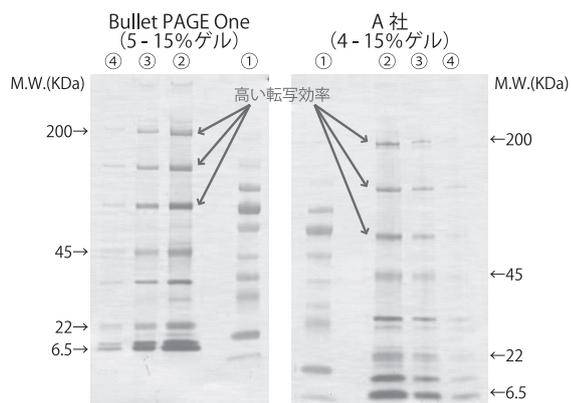
● 泳動時間 約10分 という驚きの速さを実現

Bullet PAGE One (5 - 15% ゲル) A 社 (4 - 15% ゲル) B 社 (4 - 12% ゲル)



泳動時間：11分 33分 50分

● ウェスタンブロッティングでの高い転写効率



転写後の PVDF メンブレンを CBB 染色

- バンドがシャープ
- 従来 SDS-PAGE 法 (Laemmli 法) の泳動緩衝液・試料緩衝液を使用可能
- マルチチャンネルピペットの使用が可能 (17 ウェルタイプのみ対応)

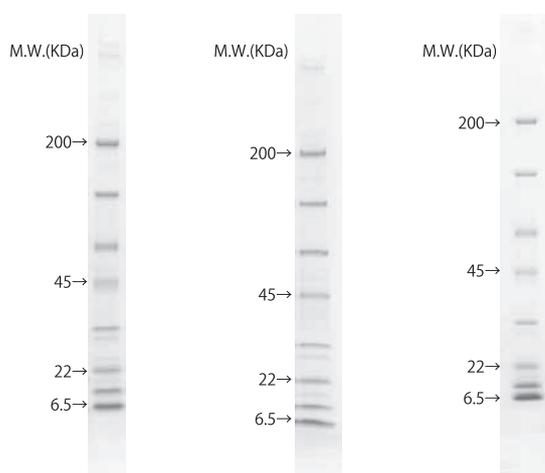
<製品仕様>

ゲルの種類：均一ゲル 2種類、グラジエントゲル 2種類
プレート：W100mm×H80mm×T3.2mm (ガラス製)
ゲルサイズ：W80mm×H60mm×T1.0mm
ウェル数：13ウェル、17ウェル

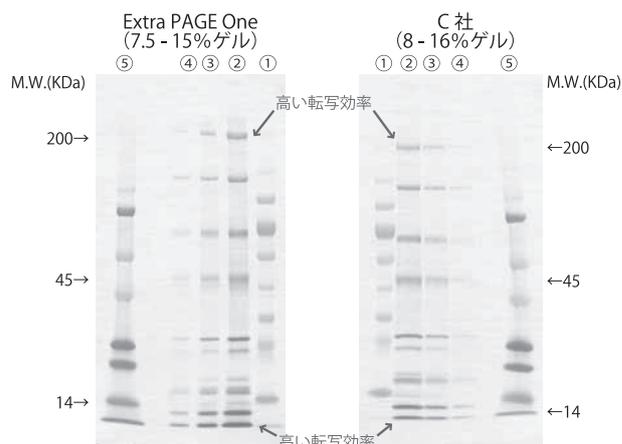
Extra PAGE One Precast Gel

● 高い分離能とコストパフォーマンス

Extra PAGE One (5 - 20% ゲル) C 社 (4 - 20% ゲル) D 社 (5 - 20% ゲル)



● ウェスタンブロッティングでの高い転写効率



転写後の PVDF メンブレンを CBB 染色

- バンドがシャープ
- 従来 SDS-PAGE 法 (Laemmli 法) の泳動緩衝液・試料緩衝液を使用可能
- マルチチャンネルピペットの使用が可能 (17 ウェルタイプのみ対応)

<製品仕様>

ゲルの種類：均一ゲル 4種類、グラジエントゲル 5種類
プレート：W100mm×H100mm×T3.2mm (ガラス製)
ゲルサイズ：W80mm×H80mm×T1.0mm
ウェル数：13ウェル、17ウェル

ゲノム編集を強力に支えるサポートツール

Guide-it™ シリーズ



ゲノム編集CRISPR/Cas9
実験フロー

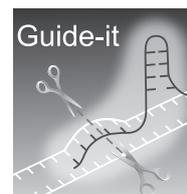
ターゲットの選択

PAM配列を含む任意のDNA配列を選択

ガイドRNAの設計

オンラインツールを使用

<https://chopchop.rc.fas.harvard.edu/>



*in vitro*で
ガイドRNAを合成し
有効性を試験

sgRNAを簡便に調製し、*in vitro*で切断効率を評価

Guide-it™ Complete sgRNA Screening System

(製品コード 631439)

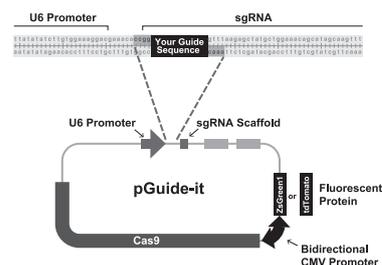
ガイドRNA、Cas9等
を細胞へ導入

sgRNAクローニング・発現システム

Cas9、蛍光タンパク質も同時に発現

**Guide-it™
CRISPR/Cas9 System
(Green) / (Red)**

(製品コード 632601/632602)



Cas9の発現を確認

組換えCas9タンパク質を高感度に検出

Guide-it™ Cas9 Polyclonal Antibody

(製品コード 632606)

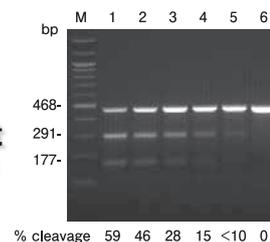
Indels変異の
モニター

ゲノム編集後の変異導入確認キット

高性能Guide-it™ Resolvaseを使用

Guide-it™ Mutation Detection Kit

(製品コード 631443)



Indels変異の
配列確認

ゲノム編集後の挿入、欠失等ゲノム配列の確認に
シーケンス用サンプル調製のためのオールインワンキット

Guide-it™ Indel Identification Kit

(製品コード 631444)

※詳しくは弊社ウェブサイトをご覧ください。 <http://www.takara-bio.co.jp>

Takara Clontech

タカラバイオ株式会社

東京支店 TEL 03-3271-8553 FAX 03-3271-7282
関西支店 TEL 077-565-6969 FAX 077-565-6995