

P3-11

アルツハイマー病患者におけるヒト脳ニューロン特異的な $\alpha 1$ -chimaerin の mRNA とタンパク質の発現加藤 智子¹, 小西 吉裕², 赤津 裕康³, 山本 孝之⁴, 遠山 育夫¹¹滋賀医大・分子神経科学研究センター, ²国立病院機構鳥取医療センター・臨床研究部, ³名市大・院医・地域医療教育学, ⁴医療法人さわらび会・福祉村病院

【背景と目的】われわれは以前, ヒト脳 cDNA ライブラリーの中から β -amyloid に親和性をもつタンパク質として $\alpha 1$ -chimaerin を見出した(日本認知症学会 2004)。 $\alpha 1$ -chimaerin は Rac1 GTPase activating protein のひとつであり, 脳の海馬や小脳などのニューロンに多く発現し, 樹状突起のスパインを制御している (P. Buttery et al. PNAS, 2006)。さらに, われわれはアルツハイマー病患者の脳において $\alpha 1$ -chimaerin の mRNA の発現が有意に減少している事を見出した (T. Kato et al. Neurosci Lett. 2015)。そこで, 今回, アルツハイマー病患者の脳組織を用いて, $\alpha 1$ -chimaerin のタンパク質の発現および局在を調べ, その病的意義を検討した。

【方法】まず, ウサギを $\alpha 1$ -chimaerin 特異的ペプチドおよび融合タンパク質で免疫し, ポリクローナル抗体を作製した。次に, 作製した特異抗体を用いてアルツハイマー病患者と対照例のヒト脳組織を用いて $\alpha 1$ -chimaerin タンパク質の局在と発現をウェスタンブロッティング法および免疫組織化学法で調べた。

【結果】ウサギで作製した抗 $\alpha 1$ -chimaerin 抗体は, ウェスタンブロッティング法でそれぞれの免疫源を認識し, 免疫組織化学法でアルツハイマー病患者と対照例のヒト脳組織のニューロンや神経原線維を染色した。

【考察】アルツハイマー病患者の脳において, $\alpha 1$ -chimaerin の mRNA はニューロンに局在し, 発現は減少していたが, $\alpha 1$ -chimaerin タンパク質はニューロンに局在するだけでなく神経原線維にも見られ, 本タンパク質がアルツハイマー病の病態と深く関わっている可能性が示唆された。

P4-01

脂溶性抗酸化物質による aPKC-Par 複合体の機能制御を介した創傷治癒促進効果

堀越 洋輔¹, 花木 武彦^{1,2}, 中曾 一裕¹, 池口 正英², 松浦 達也¹¹鳥取大・医・統合分子医化学, ²鳥取大・医・病態制御外科学

【目的】細胞の極性化は, 上皮シート構造の形成・維持や創傷治癒の過程において必要である。我々は, 四塩化炭素によって惹起される肝組織の極性異常が脂溶性抗酸化物質であるビタミン E (VE) 処理により抑制できる事を報告した。本研究では, 酸化ストレスが関与しない細胞の傷修復過程でおこる細胞の極性化に対する VE 作用について検討すると共に, その分子機構を解明することを目的とした。

【方法】培養ヒトケラチノサイト細胞を用いて wound healing assay を行い VE の作用について以下の点を検討した。①創傷治癒過程における細胞の極性化に対する作用, ②細胞極性の制御に働くプロテインキナーゼ C (aPKC) とその結合タンパク質である Par-3 の発現および局在に対する作用

【結果】傷修復過程で起こるゴルジ体の傷面への局在化(極性化)が VE で促進されるか検討した結果, VE によりゴルジ体の極性化が促進されることが分かった。また, 傷修復過程における aPKC と Par-3 の発現と局在について免疫組織化学的手法を用いて検討した。VE は aPKC と Par-3 の傷に面した細胞において形質膜への局在化を誘導することを見出した。さらに, 生化学的手法を用いて細胞膜画分を調整し, そこに含まれる aPKC, Par-3 の量をウェスタンブロッティングにより確認した。その結果, VE により細胞膜画分中に含まれる aPKC の量が増加することが明らかとなった。このような VE による作用はビタミン C では確認されなかった。また, VE を処理した細胞においては aPKC-Par-3 複合体の量が増加していることも明らかとなった。

【考察】以上の結果より, VE は創傷治癒の過程で起こる細胞の極性化を促し, 傷の修復を速めている事が示唆された。その分子機構として, 極性制御因子である aPKC, Par-3 の形質膜への局在化および複合体形成を促進していると考えられた。

P4-02

核内における脂肪滴形成メカニズム

大崎 雄樹, 程 晶磊, 川合 毅, 藤本 豊士

名古屋大・医・分子細胞学

脂肪滴 (LD) は中性脂質のコアを持ちリン脂質一重層に覆われたユビキタスなオルガネラであり, その表層は蛋白質の貯留や分解等の様々な生理機能の足場と成る事が示唆されている。LD は細胞質だけでなく核質内にも存在し, マウス肝初代培養細胞や肝癌由来細胞株など特定の細胞で頻りに検出された。肝癌由来培養細胞株 Huh7 の TEM 及び SEM による連続断面観察では, 核膜から核質に延びる膜構造(核膜延長構造)が存在し, 核質内 LD と近接していた。細胞質 LD に局在する主要分子である perilipin-2 は核質内 LD に検出されず, 一方核質内 LD は蛋白質修飾や転写調節の場である PML 小体と頻りに共局在し, 蛋白質の組成は核内外の LD で異なっていた。複数の PML isoform の中で PML-II が最も LD と共局在し, PML-II の発現量と核質内 LD 形成量は正の相関を示した。PML-II は内核膜 (INM) 直下にも局在し, この領域 (PML-II-patch) では INM 分子が排除されていた。PML-II の過剰発現あるいは INM 分子の発現抑制により核質内 LD 及び核膜延長構造が増加した。核膜延長構造には中性脂質合成酵素の一部が局在していた。細胞分裂阻害時にも新規合成された脂質エステルが核質内 LD に供給された。

これらの結果は肝由来細胞等では PML-II の働きにより形成される核膜延長構造から核質内で LD が生成され得る事を示唆し, 詳細な分子機構を検討中である。LD-PML 複合体の周囲にはユビキチン・SUMO1 が局在し, さらにリン酸化 p53 等が検出されたことから, LD-PML 複合体において機能的な蛋白質修飾が行なわれ得る事も示唆された。現在核質内 LD 周囲で起こる生理的事象についてさらに検討中である。

P4-03

インターフェロン- $\alpha 1$ アンチセンス RNA はネットワークを形成し miR-1270 に拮抗する

坂本 凌, 蔣 時文, 吉田 徳之, 木村 富紀

立命館大・薬・病原微生物学

我々は自然免疫応答の主たるエフェクターであるインターフェロン- $\alpha 1$ (IFN- $\alpha 1$) mRNA の核外輸送に注目し, Fluorescence in situ hybridization 法を用いて mRNA 上に輸送責任領域の特定を図った。その結果, IFN- $\alpha 1$ mRNA の CDS 領域が形成する stem loop (SL) 構造が, 輸送因子 CRM1 に認識されることがその核外輸送に必要であることを見出した。この研究過程で, SL 構造中に存在する Bulged-stem loop (BSL) 領域が IFN- $\alpha 1$ mRNA の安定的な発現に関連することが明らかになった。

その後の研究の結果, この IFN- $\alpha 1$ mRNA の安定的な発現は, 同遺伝子の逆鎖から転写される IFN- $\alpha 1$ アンチセンス (AS) RNA が mRNA 上の BSL 領域を認識することにより, 転写後に同分子の半減期を延長することで制御されていた。続いて, その安定化の分子メカニズムを検討したところ, IFN- $\alpha 1$ AS RNA は, 同 mRNA の発現を抑制する miR-1270 を吸着, 不活化する competing endogenous RNA (ceRNA) として機能し, miR-1270 の機能に拮抗することで IFN- $\alpha 1$ mRNA を安定化することが明らかになった。さらにこの分子メカニズムの詳細を検討したところ, IFN- $\alpha 1$ AS RNA は, miR-1270 の標的塩基配列を共有することで, 他の IFN- α ファミリーのメンバー mRNA 並びに AS RNA, 及び他の細胞由来の mRNA と協働して miR-1270 の作用を拮抗阻害する ceRNA ネットワークを形成し, 機能することを明らかにした。