

3) Naka, Y., Watanabe, K., Sagor, G.H.M., Niitsu, M., Pillai, M.A., Kusano, T. and Takahashi, Y. Plant Physiol. Biochem. (in press).

4) Yamaguchi, K., Takahashi, Y., Berberich, T., Imai, A., Miyazaki, A., Takahashi, T. and Kusano, T. FEBS Lett. 580: 6783–6788 (2006).

コレステロール代謝酵素 *Neverland* の脊索動物における機能の解明

筑波大学大学院 生命環境科学研究科

「次代を担う若手大学人育成イニシアティブ」 丹羽隆介

【背景と目的】

多細胞生物においてコレステロールは、脂質やステロイドの原料として必須であり、その代謝調節が適切に行われることは極めて重要である。そして、体内のコレステロール代謝の異常は、ヒトにおいては様々な疾患をもたらす。例えば、コレステロールの過剰摂取は、肥満や動脈硬化などの生活習慣病の発症に大きな影響を及ぼす。よって、生体内におけるコレステロール動態制御機構の解明は、基礎と応用の両面から重要な課題である。

我々のグループは、昆虫ステロイドホルモンであるエクジソンの生合成に関わる新規遺伝子 *neverland* (*nvd*) の解析の過程で、この分子がコレステロール代謝に関与することを明らかにした (図1)¹⁾。 *nvd* は、Rieske ドメインと呼ばれる電子伝達を担うモチーフを持つ酵素をコードしている (図2)。現在までに我々は、昆虫の Nvd タンパク質がエクジソン生合成過程におけるコレステロールの7,8位の脱水素化 (図1, 丸点線) を担い、7-デヒドロコレステロール (7dC) の生成に必須の役割を果たすことを明らかにした (投稿準備中)。

nvd は、コレステロール代謝の進化を考える上で、保存性と多様性の両面から興味深い遺伝子ファミリーである。*nvd* は昆虫のみならず、エクジソンを持たない線虫類、棘皮動物から鳥類までの後口動物にも高度に保存されている¹⁾。また、アメリカのグループによって、*C. elegans* の *nvd* も、コレステロール代謝を通じたステロイドホルモン産生と個体発生に必須であることが示されている²⁾。すなわち、*nvd* はエクジソン合成に留まらず、動物界を越えてコレステロール代謝制御に関わり、その代謝経路は発生過程に必須な機能を持つことが強く示唆される。一方で、現在までに利用可能な哺乳類ゲノム情報からは、*nvd* は見つからない。このことは、同じ動物界においてもコレステロール代謝制御には分子レベルの多様性が存在し、哺乳類においては *nvd* は何らかの理由によって失われたことを示唆する。しかしながら、*nvd* の脊索・脊椎動物での生体内機能および進化的特徴の意義は、現在のところ全く明

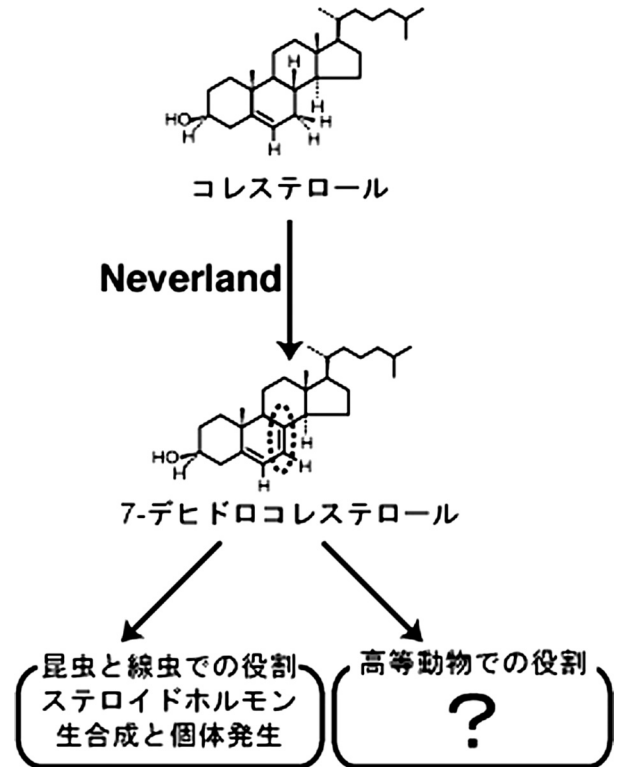


図1 *Neverland* の機能の模式図。

らかにされていない。

そこで本研究は、高等動物における *nvd* ファミリーの機能を探る第一歩として、脊索・脊椎動物の *nvd* ファミリーの遺伝子産物の生化学的性状の分析、発生過程における発現プロファイルの解析、および機能低下個体における表現型の検討を行った。このために、モデル生物として広く認知されているカタユウレイボヤ *Ciona intestinalis* とゼブラフィッシュ *Danio rerio* を利用した。

【結果】

1) カタユウレイボヤおよびゼブラフィッシュの Nvd は、コレステロール代謝活性を有する

公開されているゲノム情報を利用して、カタユウレイボヤから2つ、およびゼブラフィッシュから1つの *nvd* オークログを見出した。そこでまず、アノテーション情報を元にして個々の分子の open reading frame 領域を増幅するプライマーを作製し、初期胚由来の mRNA から合成した逆転写物を鋳型とし、個々の遺伝子をクローニングした。増幅産物については全塩基配列を決定し、カタユウレ

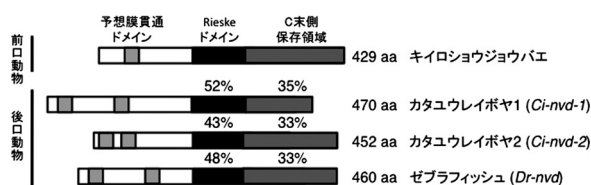


図2 Neverland の1次構造模式図。図中のパーセント表示は、ショウジョウバエ Nvd と各 Nvd の、ドメイン別のアミノ酸配列の相対率を示す。アミノ末端側に位置する膜貫通ドメインは、昆虫分子では1ヶ所予想されているが、カタユウレイボヤおよびゼブラフィッシュの分子では2ヶ所が予想されている。

イボヤの2つのオーソログはそれぞれ *Ci-nvd-1* と *Ci-nvd-2*、ゼブラフィッシュのオーソログは *Dr-nvd* と命名した。これら3種の予想タンパク質には、昆虫の Nvd タンパク質と同様に、膜貫通ドメイン、Rieske ドメイン、およびカルボキシル端側の保存領域が見出された (図2)。

次いで、同定したこの3種の Nvd に、コレステロールから7dC への変換活性があるかどうかを検討した。現在までに我々は、昆虫 Nvd のコレステロール代謝活性を検出するためのアッセイ系の確立に成功している (投稿準備中)。具体的には、ショウジョウバエ S2 培養細胞に *nvd* 遺伝子を過剰発現させ、その後に基質となるコレステロールを培地に加える。25℃ で6時間培養した後に培地ごと溶出し、生成物の7dC が産生されているかどうかを HPLC にて検出した。その結果、*Ci-Nvd-1*、*Ci-Nvd-2*、*Dr-Nvd* のいずれも、コレステロールから7dC への変換活性を有していた。すなわち、カタユウレイボヤおよびゼブラフィッシュの Nvd も、昆虫類と同様のコレステロール代謝活性を有することが示された。

2) カタユウレイボヤとゼブラフィッシュの *nvd* オーソログの発現パターン

カタユウレイボヤとゼブラフィッシュの初期胚を用いて、*in situ* hybridization 法により *nvd* オーソログの発現時期および発現部位を検証した。その結果、*nvd* はホヤでは幼生の一部の神経細胞で発現する一方、ゼブラフィッシュでは胚全体で発現していた。よって、*nvd* 相同遺伝子の発現パターンはカタユウレイボヤとゼブラフィッシュとで異なっていた。

3) *nvd* オーソログのゼブラフィッシュにおける遺伝子発現阻害により発生異常が生じる

後口動物における *nvd* の発生過程における機能を解明するために、ゼブラフィッシュを利用した機能阻害実験に着手した。すなわち、*Dr-nvd* のスプライシングを特異的に阻害するようなアンチセンスモルフォリノオリゴを作製し、それを発生初期のゼブラフィッシュ胚に顕微注入する

ことで *nvd* の機能を阻害した。まだ予備的結果を得ている段階であるが、モルフォリノ注入個体においては、初期胚における細胞の覆い被せ運動の異常、および頭部と尾部の形態形成異常が高頻度に観察された。同濃度のコントロールモルフォリノオリゴを注入した個体では、そのような表現型は見られなかった。

【考察】

本研究により、昆虫から系統的に大きく離れた原索動物および魚類においても、Nvd タンパク質が昆虫分子と同様のコレステロール変換活性を保持することが明らかとなった。このことから、Nvd のコレステロール代謝機能は進化的に高度に保存されていると考えられる。しかし一方、*nvd* の発現パターンは生物種によって異なることから、*nvd* の発生過程における役割は後口動物の種ごとに多様化している可能性がある。*Dr-nvd* 機能阻害時に頭部と尾部の形態形成の異常が認められたが、これはステロイドホルモン合成遺伝子の機能を低下させた際のゼブラフィッシュにおいても報告されている³⁾。このことから、ゼブラフィッシュにおいても *nvd* は生体内でステロイドホルモン産生に関与している可能性がある。一方で、コレステロールから7dC への変換について、後口動物における役割についての知見は現時点では一切ない。今後、*nvd* 機能低下個体の表現型を詳細に追究することで、高等動物におけるコレステロール代謝の新しいメカニズムに迫りたいと考えている。

【謝辞】

本研究を遂行するにあたり、研究奨励金を賜りました財団法人農芸化学研究奨励会に深く感謝申し上げます。また、カタユウレイボヤとゼブラフィッシュという私にとってまったく新しい研究対象を扱うに当たり、筑波大学大学院人間総合科学研究科の塩見健輔博士および筑波大学下田臨海実験センターの笹倉靖徳博士に本研究を全面的にサポートしていただきました。この場を借りて深く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) Yoshiyama, T., Namiki, T., Mita, K., Kataoka, H., and Niwa, R. (2006) Neverland is an evolutionally conserved Rieske-domain protein that is essential for ecdysone synthesis and insect growth. *Development* **133**: 2565–2574.
- 2) Rottiers, V., Motola, D.L., Gerisch, B., Cummins, C.L., Nishiwaki, K., Mangelsdorf, D.J., and Antebi, A. (2006) Hormonal Control of *C. elegans* Dauer Formation and Life Span by a Rieske-like Oxygenase. *Dev. Cell* **10**: 473–

ニトロチロシン硫酸化の機能解明

東海大学農学部・バイオサイエンス学科 安田 伸

【目的】

循環器系疾患および肝炎患者の血液および組織中に認められる過剰なニトロチロシンは、疾患リスクの予測因子または酸化/ニトロ化による機能障害マーカーとして広く知られている。近年、ニトロチロシンによる DNA 酸化傷害およびアポトーシス誘導作用やタンパク質レベルでの機能破綻作用などが報告されてきている。しかしながら、有害なニトロチロシンに対する生体防御機構については未だ明らかにされておらず、これまでのニトロチロシン研究は遊離体のみで議論されてきた経緯がある。

一方で硫酸抱合化は、生体内物質および生体外異物の体内変換そして排泄のための主要な代謝経路のひとつである。細胞質可溶性硫酸転移酵素 (cytosolic SULTs) は、硫酸基を標的化合物の水酸基またはアミノ基に転移する巨大なスーパーファミリーをもつ一連の酵素群であり、11 種類のヒト SULTs のうち SULT1A3 はドーパミンなどのモノアミン類のフェノール基を選択的に硫酸化することが知られる。これまでに申請者らは、ヒト肝腫瘍細胞 HepG2 およびヒト初代血管内皮細胞 HUVEC に活性型一酸化窒素 (peroxynitrite) 供与剤である 3-morpholinopropanesulfonamide (SIN-1) を処理すると、産生されたニトロチロシンが硫酸抱合化され、さらに細胞外へ効率良く排出されることを明らかにしてきた (Yasuda et al., 2007; Liu et al., 2007)。さらに、ニトロチロシン硫酸化には SULT1A3 が大きく貢献していることを報告している (Yasuda et al., 2007)。しかしながら、酸化ストレスやニトロ化ストレスに対する生体防御機構としての硫酸化の機能やその生理的意義については未だ詳細な検討がなされていない。

そこで本研究では、ニトロチロシンの遊離体および硫酸抱合体の生理機能性の違いを明らかにすることを目標とし、まずニトロチロシン硫酸体合成法の検討を行うこととした。さらに、細胞内 SULT1A3 によるニトロチロシン除去機構を調べるため、RNA 干渉法を用いて SULT1A3 発現レベルを低下させた細胞系の構築を試みることにした。

【方法】

1. ニトロチロシン硫酸体の合成

ニトロチロシン硫酸体は、adenosine 3'-phosphate

5'-phosphosulfate (PAPS) を硫酸供与体とし、ヒト SULT1A3 を用いて酵素的に合成を行った。ニトロチロシンの硫酸体を含む反応液を薄層セルロースプレート上にアプライし、薄層電気泳動 (TLE) および薄層クロマトグラフィー (TLC) によって 2 次元展開した。アセトン中に調製した 0.5% ニンヒドリン溶液を薄層プレートに噴霧し、ニトロチロシン遊離体および硫酸体スポットの検出を行った。得られたスポットが硫酸体であることを確認する際には、PAP^[35S] を用いて放射活性を示すスポットとして検出し、さらにアシルサルファターゼ (Type IV) を用いて加水分解反応後の硫酸体の検出を行った。

2. SULT1A3 発現レベルを低下させた細胞系の構築

HepG2 ヒト肝臓癌由来細胞株は 5% CO₂ および 37°C の温度に維持されたインキュベーター内において、10% FBS を含む MEM 培地中で培養された。異なる濃度に調整されたヒト SULT1A3 siRNA (sense: 5'-AAGAAAU-AAAGUCAAUUTT-3', antisense: 5'-AAUUGAGCUU-UAUUUUCUUTG-3') を LipofectAmine 2000 とともに HepG2 に導入し、さらに 3 日間培養を行った。その後得られた細胞粗抽出液を用いて、ニトロチロシンまたはドーパミンを基質とした際の各細胞抽出液の酵素活性を測定した。

【結果および考察】

1. ニトロチロシン硫酸体の合成法の検討

ニトロチロシンおよびニトロチロシン硫酸体の機能性の違いを検証することは、生体による硫酸抱合化の生理的意義を明らかにすることに繋がる。本研究では、まずニトロチロシン硫酸体の合成法について検討を行うこととした。遊離型のニトロチロシンをヒト SULT1A3 および PAPS とともにマイクロチューブ内で反応させた溶液を薄層プレート上にアプライし、これを TLE および TLC により 2 次元展開させた。その後 TLC プレートにニンヒドリン溶液を噴霧することにより、遊離型および硫酸体ニトロチロシンのスポットをそれぞれ可視化させた (data not shown)。これにより、薄層プレート上においてニトロチロシン硫酸体の分離検出が可能であることが明らかとなった。さらに、放射性標識した PAP^[35S] を用いて同様の酵素反応を行い、得られた反応溶液を 2 次元展開した。その結果、ニトロチロシン由来の ^[35S] 放射活性を有する硫酸体が検出され、前述のニトロチロシン硫酸体として認めら