

生物機能開発研究所

2019年度大学院生特別研究補佐員・研究成果報告

課 題：骨代謝に対するマルトビオン酸の作用の解析

担 当：西尾 彩花

指導教授：大西 素子

骨は破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成のバランスによって強度が維持されている。閉経後のエストロゲン分泌の減少などにより、このバランスが骨吸収に傾くと骨密度が低下し、骨粗鬆症が引き起こされる。我々はこれまでに、マルトビオン酸(MB)およびそのCa塩(MBCa)が骨粗鬆症モデル卵巣摘出マウスに見られる大腿骨の骨重量と骨中Ca量の減少を抑制すること、さらにこれらの化合物が骨吸収を担う破骨細胞の分化を抑制することを明らかにした。そこで本研究ではまず、ヒトの骨代謝に対するMBCaの作用を検証するため、40歳以上の女性を対象としたMBCa含有粉飴または同量のカルシウムを含むマルトース含有粉飴を用いたランダム化プラセボ対象二重盲検クロスオーバー比較試験を行った。4週間の試験前後に被験者の尿を採取し、尿中の骨吸収マーカーであるI型コラーゲン架橋N-テロペプチド(NTx)およびdeoxypyridinoline(DPD)の量を測定した結果、摂取前後の骨吸収マーカーの変化量について、プラセボ群では上昇したのに対し、MBCa群では両方の骨吸収マーカーとも有意な減少がみられた。以上の結果から、MBCaはヒトにおいても骨吸収を抑制することが明らかとなった。そこで次にMBおよびMBCaの作用機序を調べるため、破骨細胞分化因子RANKLによって活性化されるシグナル伝達経路に対する影響を調べた。その結果、MBおよびMBCaはp38のリン酸化レベルには影響しなかったが、 $I\kappa B$ のリン酸化レベルを抑制した。さらに破骨細胞分化に必須の転写因子NFATc1の発現も抑制する事がわかった。以上よりMBは破骨細胞分化シグナルを抑制、破骨細胞分化を阻害することによって、閉経後の過剰な骨吸収を抑制する可能性が示唆された。この研究成果は、Food Sci Nutr. 8: 1030-1037. (2020)に掲載された。

課 題：糸状菌 *Aspergillus terreus* におけるイタコン酸生合成に関する研究

担 当：柿崎 徹也

指導教授：金政 真

イタコン酸は二価の水溶性有機酸であり、重合によって線状高分子を形成できる特性がある。イタコン酸は安全性が高いことから、合成樹脂など工業製品の原料や添加剤など、様々な分野で利用されている。イタコン酸は米国エネルギー省によりバイオマス由来で有望とされている基礎化学物質12種のうち1種として挙げられている。イタコン酸の工業生産では主に *A. terreus* が使用されてきた。本菌におけるイタコン酸生産は培地中の金属イオンや培養pHなどに影響されることが解明されてきた。しかし、本菌を含め生物におけるイタコン酸の生物学的意義は不明である。そこで本研究では野生株とイタコン酸高生産変異株のゲノムを次世代シーケンサーにて比較した。その結果、多数の変異のうち、変異の影響により機能を失った可能性があると考えられた遺伝子が10個ほど発見された。この中でNADPH依存型リンゴ酸デヒドロゲナーゼの変異に着目し、詳細に分析中である。

一方, NADH 依存型リンゴ酸デヒドロゲナーゼの活性を調べたところ活性に大きな挙動の違いが見られなかった。

---

課 題 : Evolution of mutualism between xystodesmid host millipedes and parasitic nematodes

ババヤスデ科宿主と寄生性線虫の共生進化

担 当 : 長江 星八

指導教授 : 長谷川 浩一

Millipede (class Diplopoda) is believed as the first animal to inhabit terrestrial environment during the Silurian period (ca 420 mya). As millipede is often infected with parasitic nematodes, it's good model system to examine the evolution of host/parasite relations. We previously described the two nematode species, *Rhigonema naylae* and *Travassosinema claudiae* parasites of the Xystodesmidae millipedes *Parafontaria tonominea* species complex (Orange) and *P. laminata* in Aichi Prefecture. These nematodes were isolated together from both millipede species with high prevalences. Next, we collected *P. tonominea* species complex (Gray) and *P. longa* in Gifu Prefecture, and *Riukiaria cornuta* and *R. semicircularis* in Kumamoto Prefecture. *P. tonominea* species complex (Gray) and *P. longa* were also co-infected with *R. naylae* and *T. claudiae* with high prevalences, and *R. cornuta* and *R. semicircularis* were co-infected with unknown *Rhigonema* sp., *T. claudiae*, and unknown *Thelastoma* sp. with high prevalence. The suborder Rhigonematomorpha is phylogenetically close to the Ascaridomorpha that includes the roundworm parasitic nematode in human. The family Travassosinematidae belongs to the Oxyuridomorpha is very close to the cockroach parasitic nematodes family Thelastomatidae. Our results show the two nematodes with evolutionally different origin are commonly sharing Xystodesmidae millipedes as their host.

---

課 題 : ジオスゲニンの筋細胞融合亢進作用の解析

担 当 : 坂東 春佳

指導教授 : 草野 由理

ジオスゲニン (Dio) はステロイドサポゲニンであり, その生理作用として骨格筋の肥大作用を見出している。またこの作用には Dio による筋芽細胞の細胞融合の亢進作用が関与することを, マウス骨格筋由来筋芽細胞株 C2C12 細胞を用いて報告している。本研究は, この作用機序の解明を目的としており, この研究課題においては Dio がリガンドとなりうる受容体の探索を試みた。これまでに, 予備実験ではあるが, エストロゲン受容体 (ER) の阻害剤を用いて, その関与を示唆する結果を得ている。まずその点から, 確認した。ICI182 780 存在下において, Dio の細胞融合活性は阻害され, ER の関与が示された。ER には核内受容体である ER $\alpha$  あるいは  $\beta$  の他に, G タンパク共役型 (GP) ER が知られている。これらのうちどの ER が Dio による作用に関与するのかという点について, 細胞融合に伴う F-アクチン構造の再構築を指標として検討した。まず, GPER の関与について, その阻害剤を用いて検討したところ, Dio により細胞内に誘導される F-アクチン構造の阻害作用はみられなかった。

また ER $\alpha$  アゴニスト存在下で C2C12 細胞を培養すると, F-アクチン構造への変化はみられなかった. 一方で, ER $\beta$  アゴニストを用いた場合, Dio を添加した場合と類似した F-アクチン構造が観察された. 以上のことから, Dio は, ER の中でも, ER $\beta$  を介し C2C12 細胞の細胞融合を促進する可能性が示唆された. 現在, ER $\beta$  アゴニストを用いた細胞融合活性への影響を検討している.

---

課 題：糸状菌 *Aspergillus terreus* 由来適合溶質エクトインの生合成に関する研究

担 当：村田 紋奈

指導教授：金政 真

エクトインは, 好塩細菌が産生する適合溶質として知られているが, 当研究室の先行研究にて網羅的に代謝物解析を行ったところ, 糸状菌 *A. terreus* がエクトインを生産することを発見した. これは真核微生物としては初めての知見であるが, その生産に関わる遺伝子およびその生合成経路については未だ解明されていない. そこで本研究では, 本菌のエクトイン合成について調べた. 本菌も細菌と同様の生合成経路にてエクトイン生産を行っていると仮定し, 好塩細菌においてエクトインの代謝に関連する物質について LC-MS/MS による分析を行った. その結果, エクトインの前々駆体であるヒドロキシエクトインを検出した. 次いで, RNA-Seq 解析により, 高塩環境に晒されたときに発現量が上昇する遺伝子を調べた. その結果, 高塩濃度のときに働くいくつかの遺伝子を確認した.

---

課 題：ABC 輸送体 ABCG2 遺伝子上に存在する一塩基多型の機能解析

担 当：山下 実穂

指導教授：中川 大

一塩基多型は, 当該遺伝子産物の機能や細胞内安定性に影響を及ぼし, 疾患の発症リスクを含めた体質の個人差を決定する要因の一つである. 我々は, ヒト ABC 輸送体 ABCG2 遺伝子上にアレル頻度 21%および 30%で存在する非同義一塩基多型 rs2231137 (34 G>A, V12M)および rs2231142 (421 C>A, Q141K)が, それぞれ ABCG2 に依存した薬剤耐性に影響を及ぼすことを明らかにしてきた (Tamura et al., *Cancer Sci.*, 231-239, 2007.). そこで, 本研究では, これらの一塩基多型が同一アレル上に存在する条件下において ABCG2 の機能を評価した. ABCG2 の野生型 (WT) および非同義一塩基多型バリエント (V12M/Q141K) をそれぞれ安定発現させた細胞を樹立し, MTT assay を実施して抗がん剤 SN-38 あるいは Mitoxantrone にたいする細胞の感受性を評価した. その結果, ABCG2 (WT) を発現する細胞と ABCG2 (V12M/Q141K) を発現する細胞との間で SN-38 感受性に有意な差は認められなかった. 一方, ABCG2 (V12M/Q141K) を発現する細胞が ABCG2 (V12M) を発現する細胞と比して有意に高い SN-38 感受性を示すことを見出した. また, ABCG2 (WT or V12M or Q141K) を発現する細胞と ABCG2 (V12M/Q141K) を発現する細胞との間で Mitoxantrone 感受性に有意な差が認められた. これらの結果から, 一塩基多型 (V12M or Q141K) が同一アレル上に存在する場合, それぞれの一塩基多型が独立したアレル上に存在する場合とは異なる機能を ABCG2 に与える可能性が示唆された.