

様式3

群馬大学生体調節研究所内分泌・代謝学共同研究拠点共同研究報告書

平成 30 年 4 月 11 日

群馬大学生体調節研究所長 殿

所属機関名 立命館大学生命科学部生命医科学科
職 名 教授
研究代表者 白壁恭子

下記のとおり平成29年度の共同研究成果を報告します。

記

(課題番号:17020)

1. 共同研究課題名	炎症反応における亜鉛シグナルとシェディングの相互関係とその機能的意義の解明			
2. 共同研究目的	分子糖代謝制御学分野が有する亜鉛解析技術と、申請者が有するシェディング解析技術を融合させ、炎症反応を制御する新しい分子機構を解明する。			
3. 共同研究期間	平成 29 年 4 月 1 日 ~ 平成 30 年 3 月 31 日			
4. 共同研究組織				
氏 名	所属部局等	職名等	役割分担	
(研究代表者) 白壁恭子	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科臓器代謝ネットワーク講座	ジョイントリサーチ 講座准教授	研究の計画および遂行	
(分担研究者) 大村卓也	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科分子内分泌代謝学分野	大学院生	研究の遂行	
5. 群馬大学生体調節研究所の共同研究担当教員	分野名	分子糖代謝制御学	氏 名	福中彩子

※ 次の6, 7, 8の項目は、枠幅を自由に変更できます。但し、6, 7, 8の項目全体では1頁に収めて下さい。

6. 共同研究計画

マクロファージ細胞に蛍光亜鉛指示薬を添加してから、細菌成分 LPS (lipopolysaccharide) で刺激して経時観察することで、亜鉛濃度の変化をリアルタイムイメージングする。特に LPS 刺激によって亜鉛濃度が細胞全体で変化するのか、それとも局所的に変化するのかを明らかにすることで亜鉛シグナルの機能的意義を推測したい。次に、亜鉛トランスポーターのシェディングを担うプロテアーゼに対する阻害剤を添加したり、siRNA でプロテアーゼの発現を抑制したりすることで、LPS 刺激による亜鉛濃度の変化が見られなくなるか検討する。さらに、どの亜鉛トランスポーターが亜鉛濃度の変化に必要なのか明らかにするために、各亜鉛トランスポーターの発現を阻害する siRNA を用いて検討する。最後にプロテアーゼやトランスポーターの活性を阻害して亜鉛濃度の変化を抑えるとマクロファージによる炎症反応が減弱するか、炎症性サイトカインの放出量を ELISA 法で測定することで明らかにする。

以上の研究を群馬大学生体調節研究所が所有する、亜鉛イメージング用蛍光顕微鏡とプレートリーダーを用いて行う。

7. 共同研究の成果

これまでマクロファージ細胞に細菌成分を添加し炎症反応を惹起すると亜鉛トランスポーターがシェディングされることを明らかにしていたが、上皮細胞に発がん刺激を加えた場合にも亜鉛トランスポーターのシェディングが起こることを明らかにした。上皮細胞はマクロファージ細胞に比べ亜鉛トランスポーターを大量に発現することができるので、今年は上皮細胞を用いてシェディング切断配列を決定する研究を優先的に行った。シェディング切断部位を同定するためには、シェディングによって生じる2つの産物のうち C 末端側のタンパク質を大量に調整してその N 末端アミノ酸配列を決定する必要がある。これまで我々のグループはいくつかの一回膜貫通型タンパク質についてそのシェディング切断配列を同定してきたが、亜鉛トランスポーターのような複数回膜貫通型タンパク質の切断配列の同定にはいまだ成功していない。そこで亜鉛トランスポーターの C 末端側シェディング産物を大量調整するために、C 末端にタグを付加した亜鉛トランスポーター発現プラスミドを構築し、上皮細胞に大量に発現させたあと発がん刺激前後の細胞抽出液を調製してウエスタンブロットティングを行った。その結果、発がん刺激に応じて分子量 50 kDa のタンパク質の量が増大すること、シェディング酵素であるメタロプロテアーゼの阻害剤を添加するとその増大が消失することがわかった。これらの結果は 50 kDa タンパク質が亜鉛トランスポーターの C 末端側シェディング産物であることを強く示唆している。現在このタンパク質を大量に精製し、シェディング切断部位を同定することを試みている。亜鉛トランスポーターの細胞外領域には二量体形成に関わる配列が存在すると報告されている。この研究を続けて遂行することで、シェディングが亜鉛トランスポーターから二量体形成配列を切り離すことで単量体化し、その活性を劇的に変化させる可能性を検証することができると考えている。

8. 共同研究成果の学会発表・研究論文発表状況

(本研究所の担当教員の氏名の記載のある論文、又はこの共同研究に基づくとの記載のある論文等を記載して下さい。なお、論文の場合は、別刷りを1部提出してください。)

①本研究所の担当教員の氏名の記載のある論文

該当しません。

②この共同研究に基づくとの記載のある論文

該当しません。