

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20580098

研究課題名(和文) 新規酵素群グリセロホスホジエステルホスホジエステラーゼを分子標的とする基盤研究

研究課題名(英文) Physiological functions of novel mammalian glycerophosphodiester phosphodiesterases

研究代表者

矢中 規之 (YANAKA NORIYUKI)

広島大学・大学院生物圏科学研究科・准教授

研究者番号：70346526

研究成果の概要(和文)：

本研究では、新規な GDE5 を単離し、骨格筋細胞の分化に関与することが明らかにした。GDE5 mRNA は心筋や骨格筋組織において強く発現しており、マウス筋芽細胞株 C2C12 細胞で GDE5 をノックダウンした場合には、筋細胞分化、および筋管形成が著しく促進し、さらに、GDE5 の骨格筋特異的過剰発現マウスは速筋型筋重量の低下を呈し、GDE5 は骨格筋の細胞分化に深く関与することが示唆された。GDE5 は GroPCho を特異的に分解し、細胞内の GroPCho 濃度の調節に関与する可能性を示し、骨格筋細胞の分化過程における細胞内の GroPCho の役割を示唆した。

研究成果の概要(英文)：

This study isolated a novel GP-PDE, GDE5, and showed that GDE5 selectively hydrolyzes glycerophosphocholine (GroPCho). We show that that decreasing GDE5 abundance promoted myoblastic differentiation. Furthermore, transgenic mice specifically expressing GDE5 in skeletal muscle showed less skeletal muscle mass, especially type II fiber-rich muscle. These results indicate that GDE5 negatively regulates skeletal muscle development, providing novel insight into the biological significance of mammalian GP-PDE functions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：glycerophosphodiester phosphodiesterase, glycerophosphocholine, glycerophosphoinositol, differentiation, skeletal muscle, atrophy

1. 研究開始当初の背景

ホスファチジルコリンやホスファチジルイ

ノシトールなどのグリセロリン脂質の分解経路は、微生物においてはリンや炭素源などの再利用系として重要な役割を果たしていることが知られている。その場合、グリセロリン脂質はホスホリパーゼ類の作用によって二つのアシル基が切断され、その反応によって生じたグリセロホスホジエステルは、グリセロホスホジエステル ホスホジエステラーゼによって、さらに、グリセロール-3-リン酸とアルコールへと分解される。そのため、微生物の GDE はグリセロホスホコリン (GroPCho)、グリセロホスホエタノールアミン、グリセロホスホセリン、およびグリセロホスホイノシトール (GroPIIns) といった、グリセロホスホジエステル類を幅広く認識して加水分解する性質はグリセロリン脂質全体を資化する生理的な意味からも理解されやすい。一方、GDE は哺乳動物においても同定され、現在では GDE1 から GDE7 までの 7 種類のファミリーが存在することが明らかにされている。興味深いことに、動物由来の GDE の酵素活性については、GDE1 が GroPIIns を選択的に分解することが示され、微生物などの GDE の性質とは大きく異なって、グリセロホスホジエステル類に対して極めて高い基質特異性を有することが示されつつある。

動物由来の GDE の生体内での役割については、その分解の基質となるグリセロホスホジエステル、すなわち GroPCho、あるいは GroPIIns の細胞内濃度を規定する酵素として想定されている。つまり、GroPCho、あるいは GroPIIns の細胞内での生理作用が極めて重要であり、新たな細胞内シグナル伝達物質として、近年注目されている。

2. 研究の目的

動物細胞、あるいは動物における GDE 遺伝子の過剰発現やノックダウンによってグリ

セロホスホジエステル類の細胞内濃度を変動させることに着眼し、その表現型を詳細に解析することによって、水溶性シグナル伝達物質としての GroPIIns、あるいは GroPCho の生理機能、またその分解酵素である GDE の生理的意義を解明することを目的とする。

(1) 本研究では、GDE5 の筋細胞分化における生理的な役割を明らかにする。さらに、骨格筋特異的 GDE5 過剰発現マウス (GDE5Tg マウス) を用いて GDE5 の速筋型筋線維萎縮の発症における病態形成における役割を解明する。

(2) 極めて最近、ゲノム創薬的手法によって単離された GDE7 (未発表) の機能解析を行うとともに、消化管粘膜上皮細胞における GroPIIns の分解酵素を同定し、同酵素の特異的過剰発現マウスを作製することによって、粘膜上皮細胞における GroPIIns の機能性、さらに代謝系の全貌を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) GDE5 の筋細胞分化における生理的な役割を明らかにするために、マウス筋芽細胞株 C2C12 細胞などを用いて、機能解析を行う。また、GDE5Tg マウスの骨格筋異常の経時的解析を行う。現在、12 週齢の雄性、雌性マウスともに速筋型萎縮を確認しているが、若齢 (4 週齢)、および老齢 (16 ヶ月齢) マウスにおいて遺伝子発現、あるいは骨格筋の病理解析を行う。現在までの解析では、速筋型 (II 型) 骨格筋において、遅筋型 (I 型) 骨格筋への移行を示唆する実験結果も得られており、特に、遅筋型 (I 型) 骨格筋の遺伝子発現について解析を行う。筋萎縮解析に用いる研究材料の調製に関しては、連携研究者である亀井康富准教授 (東京医科歯科大学、難治研) と連携して行う。

消化管粘膜上皮細胞における GroPIns の分解酵素を同定する。 *in situ* hybridization 法 (ISH 法) などによって、消化管粘膜上皮細胞に発現する GDE 分子種を特定する。特定された GDE に着目し、特異的過剰発現マウスを作製するために、transthyretin もしくは, villin プロモーターを用いた発現コンストラクトを作製する。受精卵へのマイクロインジェクション, および F0 マウスの作製までは外注する。F0 マウスのゲノムチェック, および陽性個体の mRNA の発現をノーザンブロット法で確認し, 各系統における発現部位を詳細に解析する。

4. 研究成果

近年, 動物由来の glycerophosphodiester phosphodiesterase を形成するファミリーが同定され, 様々な生理作用を担うことが明らかになってきた。本研究では, 新規な GDE5 を単離し, 骨格筋細胞の分化に関与することが明らかにした。GDE5 mRNA は心筋や骨格筋組織において強く発現しているが, 除神経やプラスチック固定などの筋萎縮モデルマウスの骨格筋において発現量は減少した。マウス筋芽細胞株 C2C12 細胞で GDE5 をノックダウンした場合には, 筋分化に関わる転写因子 MyoD や myogenin の発現誘導を伴って, 筋細胞分化は誘導され, さらに筋管形成が著しく促進した。また, マウス筋芽細胞株 C2C12 細胞やラット筋芽細胞株 L6 細胞において GDE5 を過剰発現させた際には, 筋細胞分化は著しく抑制され, GDE5 は筋細胞分化に対する負の調節因子であることが明らかとなった。さらに, GDE5 の骨格筋特異的過剰発現マウスは速筋型筋重量の低下を引き起こすことも明らかとなっていたが, 筋線維断面積が減少しており, また heat shock protein などのストレス応答因子の誘導が引き起こされている

ことが確認された。4 週齢の若齢マウスにおいても同様のストレス応答が認められた。以上の実験結果により, GDE5 は骨格筋の細胞分化に深く関わることを示唆された。一方, GDE5 は GroPCho を特異的に分解し, 細胞内の GroPCho 濃度の調節に関わる可能性を示した。骨格筋細胞の分化過程における細胞内の GroPCho の生理的な役割を示唆するものであるが, 細胞内の GroPCho は腎尿管上皮細胞などの高 Na や尿素などの高浸透圧ストレス下に誘導することが明らかにされており, 筋細胞内の浸透圧ストレスによって筋細胞分化が調節される可能性が考えられた。

消化管粘膜上皮細胞における GroPIns の分解酵素を同定することを目的として ISH 法によって検討を行った。7 種類の GDE について, 消化管において発現量の高い分子の同定を行った。その結果, GDE1, GDE4, GDE7 の 3 種類の mRNA の発現が見いだされ, さらに ISH 法により解析を行った結果, GDE1 が消化管粘膜上皮細胞において特異的に発現していた。消化管粘膜上皮細胞において特異的である, villin 遺伝子のプロモーターを用いて, GDE1 の発現コンストラクトを作製し, F0 マウスのゲノムチェック, および陽性個体の発現を確認した。現在のところ, 3 系統の過剰発現マウスの作製を完了しており, 今後, 詳細な形質の解析を行う予定である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

1. Okazaki Yuri, Ohshima Noriyasu, Yoshizawa Ikumi, Kamei Yasutomi, Mariggio Stefania, Okamoto Keiko, Maeda Masahiro, Nogusa Yoshihito, Fujioka Yuichiro, Izumi Takashi, Ogawa Yoshihiro, Shiro Yoshitsugu, Wada Masanobu, Kato Norihisa,

Corda Daniela, Yanaka Noriyuki, A novel glycerophosphodiester phosphodiesterase GDE5 controls skeletal muscle development via a non-enzymatic mechanism. *J. Biol. Chem.*, (査読有) 285, 2010, pp27652-27663

2. Kanzaki Keita, Kuratani Mai, Mishima Takaaki, Matsunaga Satoshi, Yanaka Noriyuki, Usui Sachio, Wada Masanobu, The effects of eccentric contraction on myofibrillar proteins in rat skeletal muscle. *Eur. J. Appl. Physiol.*, (査読有) 110, 2010, pp943-952

3. Dairaku Issei, Han Yunkyung, Yanaka Noriyuki, Kato Norihisa, Inhibitory effect of curcumin on IMP dehydrogenase, the target for anticancer and antiviral chemotherapy agents. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, (査読有) 4, 2010, pp185-187

4. 矢中規之, 本田絢子, 膜由来の新しいシグナル伝達物質グリセロホスホジエステルの生理的な役割, 化学と生物, (査読有), 48, 2010, pp812-814

5. Corda Daniela, Kudo Takahiro, Zizza Pasquale, Iurisci Cristiano, Kawai Eri, Kato Norihisa, Yanaka Noriyuki, Mariggio Stefania, The developmentally regulated osteoblast phosphodiesterase GDE3 is glycerophosphoinositol-specific and modulates cell growth. *J. Biol. Chem.*, (査読有) 284, 2009, pp24848-24856

6. Yanaka Noriyuki, Kaseda Yurika, Tanaka Anna, Nogusa Yoshihito, Sumiyoshi Naoki, Kato Norihisa, Generation of a zinc finger protein ZPR1 mutant that constitutively interacted with translation elongation factor 1alpha. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, (査読有) 73, 2009, pp2809-2811

7. Hirata Toshifumi, Fujii Misato, Akita Kazuhiro, Yanaka Noriyuki, Ogawa Kaori, Kuroyanagi Masanori, Hongo Daiki, Identification and physiological evaluation of the components from citrus fruits as potential drugs for anti-obesity and anticancer. *Bioorg. Med. Chem.*, (査読有) 17, 2009, pp25-28

[学会発表] (計 12 件)

1. 真田洋平, 矢中規之, 末廣春奈, 久本高央, 平田敦子, 西村 英紀, 加藤範久, Vitamin B6 の摂取が脂肪組織の遺伝子発現に及ぼす影響, 2011 年度日本農芸化学会大会, 2011 年 3 月 27 日, 京都
2. 岡本佳子, 中村啓司, 吉澤郁美, 吉田円, 栗崎知浩, 加藤範久, 矢中規之, リン脂質代謝酵素 GDE5 の発現抑制による筋芽細胞株 C2C12 細胞の筋分化誘導の機構解析, 2011 年度日本農芸化学会大会, 2011 年 3 月 26 日, 京都
3. 平田敦子, 真田洋平, 末廣春奈, 大畑智美, 矢中規之, 加藤範久, azoxymethane 誘発大腸腫瘍モデルマウスの初期病変に関わる新規標的因子の同定, および抗癌活性を有する vitamin B6 の予防効果に関する解析第 33 回日本分子生物学会年会 第 83 回日本生化学会大会合同大会, 2010 年 12 月 10 日, 神戸
4. 前田将宏, 吉澤郁美, 岡本佳子, 栗崎知浩, 加藤範久, 矢中規之, 新規リン脂質代謝酵素 GDE5 の C2C12 細胞の筋分化における役割, 2010 年度日本農芸化学会大会, 2010 年 3 月 29 日, 東京
5. 本田絢子, 工藤尊裕, 山下洋祐, 岩永敏彦, Stefania Mariggio, Daniela Corda, 加藤範久, 矢中規之, 消化管上皮細胞機能に関わる glycerophosphoinositol の分解酵素の探索, 2010 年度日本農芸化学会大会, 2010

年3月29日，東京

6. 大畑智美，矢中規之，平田敦子，真田洋平，末廣春奈，鳥家圭悟，加藤範久，ビタミンB6 摂取による大腸における遺伝子発現調節作用，2010 年度日本農芸化学会大会，2010年3月29日，東京

7. 吉澤郁美，岡本佳子，前田将宏，岡崎優利，大嶋紀安，和泉孝志，加藤範久，矢中規之，筋芽細胞分化中の新規グリセロホスホジエステルホスホジエステラーゼ GDE5 の機能的役割，第34回日本分子生物学会年会，2009年12月9日，横浜

8. 末廣春奈，鳥家圭悟，大畑智美，矢中規之，加藤範久，ビタミンB6 摂取により大腸で発現上昇する Laminin γ 2 の単離，および発現調節機構の解明，2009 年度日本農芸化学会大会，2009年3月29日，福岡

9. 江口優子，平田敦子，原口智彰，工藤尊裕，矢中規之，加藤範久，魚油摂取によってラットの大脳皮質で発現上昇する Alas2 遺伝子の単，2009 年度日本農芸化学会大会，2009年3月28日，福岡

10. 岡本佳子，吉澤郁美，大嶋紀安，亀井康富，岡崎優利，前田将宏，和泉孝志，加藤範久，和田正信，矢中規之，新規因子 GDE5 の筋芽細胞分化における役割，および骨格筋特異的 GDE5 過剰発現マウスの形質の解析，2009 年度日本農芸化学会大会，2009年3月28日，福岡

11. 工藤尊裕，Stefania Mariggio，本田絢子，河合衣里，加藤範久，Daniela Corda，矢中規之，細胞骨格調節因子 GDE3 による細胞球状化のメカニズムに関する解析，2009 年度日本農芸化学会大会，2009年3月28日，福岡

12. 具正愛，田中健太，矢中規之，加藤範久，消化管のビタミンB6 代謝の特性，2009 年度日本農芸化学会大会，2009年3月28日，福

岡

[その他]

ホームページ等

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/nutri/yanakaN.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

矢中 規之 (YANAKA NORIYUKI)

広島大学・大学院生物圏科学研究科・准教授

研究者番号：70346526

(2) 研究分担者

加藤 範久 (KATO NORIHISA)

広島大学・大学院生物圏科学研究科・教授

研究者番号：20144892

和田 正信 (WADA MASANOBU)

広島大学・大学院総合科学研究科・教授

研究者番号：80220961

(3) 連携研究者

亀井 康富 (KAMEI YASUTOMI)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教授

研究者番号：70300829