

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19570131

研究課題名 (和文) 新規ユビキチン類似タンパク質 MNSF $\beta$ によるアポトーシス調節機構の  
解明研究課題名 (英文) Ubiquitin-like MNSF $\beta$  regulates apoptosis

研究代表者

中村 守彦 (NAKAMURA MORIHIKO)

島根大学・産学連携センター・教授

研究者番号：20155865

研究成果の概要：

ユビキチン類似タンパク質 MNSF $\beta$ が細胞内でアポトーシス促進因子 Bcl-G と共有結合し、フラボノール的一种、ケルセチン (quercetin)がこの複合体形成を調節することを明らかにした。ケルセチンはアポトーシス誘導を制御することで知られるが、その機序に MNSF $\beta$ /Bcl-G 複合体形成が関与していると考えられ、実際に siRNA によるノックダウン実験でこれを証明した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：ユビキチン、アポトーシス、Bcl-G

## 1. 研究開始当初の背景

我々は、サイトカインの一種として単離精製した MNSF $\beta$ を cDNA クローニングして、その構造がユビキチンと類似したタンパク質であることを明らかにしていた。さらに、ユビキチン化と同様に標的タンパク質と共有 (イソペプチド) 結合することも確認していた。加えて、標的タンパク質の 1 つが pro-apoptotic タンパク質 Bcl-G であることを証明していた。ユビキチン類似タンパク質の報告はこれまでに幾つかあるが、その機能が明らかにされているものは MNSF $\beta$  や

SUMO などごく限られている。

## 2. 研究の目的

Bcl-G はその構造からアポトーシスの促進に関与していると考えられ、さらに MNSF $\beta$  と複合体を形成することから、MNSF $\beta$  がアポトーシス制御に関わっているものと推察し、その実証を主たる目的とする。細胞の活性化時における MNSF $\beta$ /Bcl-G 発現の増減を観察し、MNSF $\beta$  のタンパク質発現が直接、アポトーシス誘導に関与することを証明する。

### 3. 研究の方法

(1) MNSFβによるアポトーシス制御機構を解明するために、マウスマクロファージ細胞株 Raw264.7 を使用した。ケルセチン (quercetin) は、アポトーシス誘導を制御するフラボノールとして広く知られている。そこで、quercetin の Raw264.7 における作用機構において、MNSFβ/Bcl-G が直接関与するかを検討した。最初に、Raw264.7 細胞の培養系に quercetin (100 μM) を添加し、MNSFβ/Bcl-G 発現の経時的な変化を抗 MNSFβ抗体によるウエスタンブロット法で確かめた。

(2) LPS 誘導 TNFα産生に対する quercetin の抑制作用に及ぼす MNSFβ siRNA の効果を調べた。培養液中の TNFα産生量はサンドイッチ ELISA 法により測定した。

(3) 一酸化窒素 (nitric oxide, NO) ドナー GSNO (*S*-Nitrosoglutathione) (0.5, 1 mM) によるアポトーシス誘導に与える MNSFβ siRNA の効果を検討した。

### 4. 研究成果

(1) Quercetin の作用と MNSFβ/Bcl-G 発現の関係を明らかにする目的で、Raw264.7 細胞を quercetin で刺激し、経時的に cell lysate を調製して抗 MNSFβ抗体によりウエスタンブロットを施行した。その結果を図 1 に示す。Quercetin で細胞を刺激すると、約 30 分後に 33.5kDa MNSFβ/Bcl-G 複合体の発現が低減し、その後、徐々に未刺激状態のそれまで回復した。興味深いことに、110kDa MNSFβ複合体 (標的タンパク質は未同定) は逆に一旦、上昇してから徐々に元の発現量に戻った。

以上の結果は、quercetin が MNSFβ/Bcl-G 形成に影響を及ぼすことを示している。これまでに明らかにしたように、MNSFβ/Bcl-G は複合体となって初めて MAP カスケードの ERK 活性を抑制することから、quercetin によるアポトーシス制御機構においても、恐らく MNSFβ/Bcl-G が未知の情報伝達分子 (例えばリン酸化に関与したタンパク質) に作用している可能性が考えられる。

発現量が逆相関している 110kDa MNSFβ複合体中の標的タンパク質については解明中である。また、70kDa 複合体については、その標的が T 細胞受容体α鎖であることを証明しているが、quercetin 添加後の変動は 33.5kDa MNSFβ/Bcl-G のそれと同様であった。44kDa MNSFβ複合体 (標的タンパク質は未同定) は全く影響を受けなかった。さらに、種々のフラボノールについて検討したところ、quercetin に加えてルテオリン (luteolin) が MNSFβ/Bcl-G の複合体形成に

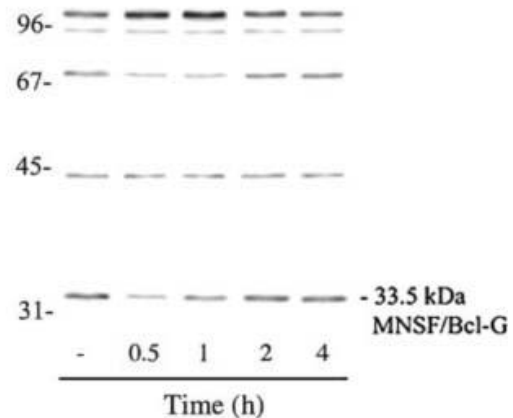


図1 Quercetin 刺激による MNSFβ/Bcl-G 発現の変動

影響を与えたが、その他のフラボノールに効果は認められなかった (図 2)。従って、ここで観察した現象はフラボノールに特有のものではなく、quercetin (lane 2) と luteolin (lane 3) に共通する構造が寄与しているものと考えられる。

(2) 次に、MNSFβ siRNA を活用して MNSFβ タンパク質発現量を低減させて、LPS 誘導 TNFα産生に対する quercetin の抑制作用に及ぼす効果を検討した。図 3 に示すように、50 μM quercetin は LPS (100 ng/ml) で刺激を受けた Raw264.7 細胞の TNFα産生を強く抑制した。これに対して、MNSFβ siRNA 処理した Raw264.7 細胞では、その抑制作用が有意に緩和された。この結果は、上記(1)の結果とも合わせて quercetin の抑制作用機序に MNSFβ が関与していることを強く示唆する。

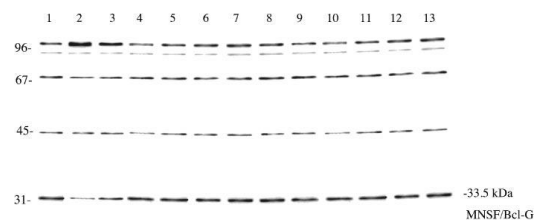


図2 種々のフラボノール刺激による MNSFβ/Bcl-G 発現の変動

尚、MNSFβ siRNA の効果は高濃度 (100 μM) quercetin による TNFα産生の抑制効果をも部分的に緩和した。一方、先に報告した通り、MNSFβ siRNA 処理した細胞はコントロールに比べて、LPS 誘導 TNFα産生量が著しく増大することを確認している。これらの結果は、i) Bcl-G が proapoptotic タンパク質であること、ii) quercetin がアポトーシス制御

機能を有することを鑑みれば MNSFβ /Bcl-G 複合体形成がアポトーシス調節に関与することが推察された。

(3) 以上の結果を受けて実際に MNSFβ がアポトーシス誘導において制御機能を持つかを検証した。NO ドナーの GSNO により Raw264.7 細胞を刺激してアポトーシスを誘導した。アポトーシスの程度は DNA ラダーの形成度により評価した。図 4 に示すように、GSNO 濃度依存的にアポトーシスが誘導されることが確認された。一方、MNSFβ siRNA 処理した Raw264.7 細胞では、このアポトーシス誘導が一部抑制された。この結果は、確かに MNSFβ が GSNO によるアポトーシス誘導過程で機能していることを物語っている。さらに、MNSFβ siRNA によるアポトーシスの抑制には p53 および caspase3 の活性制御が関与することも明らかにした。以上の結果は、MNSFβ が少なくとも GSNO によるアポトーシス誘導において、これを増強する作用を有するものと推察される。加えて、

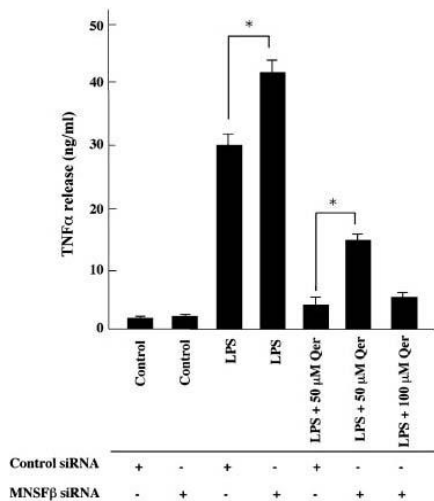


図 3 LPS 誘導 TNFα 産生に対する quercetin の抑制作用に及ぼす MNSFβ siRNA 効果

LPS と IFNγ で誘導されるアポトーシス誘導においても、MNSFβ siRNA は同様の効果を示すことから、MNSFβ はアポトーシス制御に深く関与しているものと結論した。

(4) 本研究を進める過程で、これまで未同定であった 62kDa MNSFβ 複合体における標的タンパク質を MALDI-TOF Ms により質量分析した。その結果、標的タンパク質が endophilin II であることを明らかにし、イソペプチド結合によって MNSFβ と会合していることを証明した。endophilin ファミリーにはタイプ I, II, III があり、神経細胞における

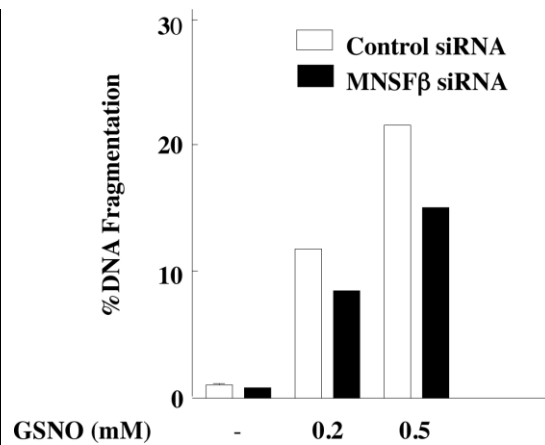


図 4 GSNO 誘導のアポトーシスに対する MNSFβ siRNA の抑制効果

endophilin I の機能解明が最も進んでいるが、endophilin II についてはこれまでに報告はほとんどない。endophilin I と同様にエンドサイトーシスに関与することが予想されたので、これを確かめた。Raw264.7 細胞は Alexa488 標識したザイモサン (β グルカン) を貪食するが (図 5)、endophilin II siRNA 処理した Raw264.7 細胞は未処理 (対照) に比べて著しく貪食能が増大した (約 1.9 倍)。そして予想通り、MNSFβ siRNA とダブルノックダウンした細胞では、さらに効果が増強された。即ち、MNSFβ は endophilin II と協調してマクロファージの貪食作用を調節していることが判明した。さらに、endophilin II 単独ではその効果は薄く、MNSFβ と複合体を形成して初めて貪食作用の促進効果が現れることが明らかになった。アポトーシス細胞がマクロファージ等に貪食される現象を鑑みれば、アポトーシスと貪食の両方に関わる MNSFβ の作用は極めて興味深い。

(5) MNSFβ のアポトーシス制御機構を明らかにする過程で、MNSFβ がファゴサイトーシスの調節に関与することを突き止めたが、その手法に蛍光剤として Alexa488 を使用した。2008 年度ノーベル化学賞に緑色蛍光タンパク質 (GFP) が授賞対象となったが、我々はバイオイメーキングに活用できる新しい蛍光剤として酸化亜鉛ナノ粒子を開発した。酸化亜鉛ナノ粒子には毒性がなく無機質であるが故に、レーザーを照射しても壊れることがないため長時間安定な蛍光を発する利点がある。そこで、このナノ粒子を蛍光剤としてザイモサンを標識して Alexa488 と同様の実験を施行した。Raw264.7 細胞に取り込まれた酸化亜鉛は長時間蛍光を放ち、かつ細胞は 24 時間以上全く影響を受けることなく健康に生きながらえた。この様子を世界で初めて動画記録に収めることに成功した。

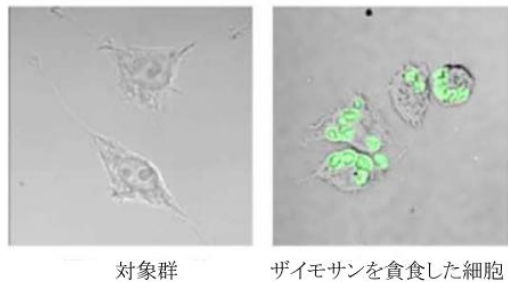


図5 マクロファージによるザイモサンの食食作用

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① O Senthilkumar, Shunsuke Shimozaki, K. Senthilkumar, Hideo Akiyoshi, Morihiko Nakamura, Moriyuki Sato and Yasuhisa Fujita, Bio-imaging of macrophage cell lines by nanoparticle ZnO-antibody conjugate, Physica. Status. Solidi., in the press, 2009 査読有
- ② Morihiko Nakamura, Satomi Omura, Quercetin regulates the inhibitory effect of monoclonal non-specific suppressor factor beta on tumor necrosis factor-alpha production in LPS-stimulated macrophages, Biosci. Biotechnol. Biochem., 72, 1915-1920, 2008. 査読有
- ③ O. Senthil Kumar, K. Yamauchi, Y. Hanada, M. Miyamoto, M. Nakamura and Y. Fujita ZnO based nanomaterials for light emitting devices and bio-imaging applications, Japan Nano, 1, 84-86, 2007, 査読有

[学会発表] (計 6 件)

- ① Shunsuke Shimosaki, Morihiko Nakamura, Ubiquitin-like protein MNSF $\beta$  regulates phagocytosis, 第 81 回 日本生化学会、12. 8. 2008, 神戸
- ② Morihiko Nakamura, Nanomedicine Research at Shimane University, The 2<sup>nd</sup> International Symposium on Nanomedicine, 11.7. 2008, Matsue.
- ③ 中村守彦、小村里美、Ubiquitin-like protein MNSF $\beta$  enhances LPS-induced apoptosis in macrophages、第 80 回 日本生化学会、2007. 12、横浜
- ④ 中村守彦、小村里美、Ubiquitin-like protein MNSF $\beta$  enhances nitric oxide-induced macrophage apoptosis、第 37 回日本免疫学会総会、2007. 11、東京
- ⑤ 中村守彦、酸化亜鉛を活用したナノメ

イシン「ナノテク医工学の臨床応用拠点」

第 1 回国内ワークショップ 2007. 9. 25  
出雲

- ⑥ Senthil Kumar Obuliraj, Kazuki Yamauchi, Shigekazu Morito, Takuya Ohba, Moriyuki Sato, Morihiko Nakamura, Yasuhisa Fujita, ZnO nanoparticles for bio-imaging Applications, 第 5 回 ナノ学会、2007. 5 筑波

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

- ① 名称：蛍光標識材料および蛍光標識剤  
発明者：佐藤守之、中村守彦  
権利者：島根大学長 (本田雄一)  
種類：特許  
番号：特願 2008-279248  
出願年月日：10. 30. 2008  
国内外の別：国内
- ② 名称：蛍光標識剤および蛍光標識方法  
発明者：藤田恭久、中村守彦  
権利者：島根大学長 (本田雄一)  
種類：特許  
番号：PCT/JP2007/73114  
出願年月日：11. 29. 2007  
国内外の別：国外

[その他]

ホームページ

<http://www.med.shimane-u.ac.jp/CMRC/index2.htm>

<http://www.proken.shimane-u.ac.jp/>

新聞報道

「新しい蛍光剤酸化亜鉛ナノ粒子」  
日経新聞 社会 32 面平成 20 年 11 月 20 日  
朝日新聞 社会 32 面 平成 20 年 11 月 19 日  
毎日新聞 全国版 2 面 平成 20 年 11 月 19 日  
共同通信 平成 20 年 11 月 19 日  
読売新聞 全国版 2 面 平成 20 年 11 月 16 日

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 守彦 (NAKAMURA MORIHIKO)  
島根大学・産学連携センター・教授  
研究者番号：20155865

(2) 研究協力者

下崎 俊介 (SHIMOSAKI SHUNSUKE)  
島根大学・プロジェクト研究推進機構・  
研究員

研究者番号：70432622