

平成 21 年 3 月 24 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007 年度～2008 年度
 課題番号：19590078
 研究課題名 (和文) 細胞外分泌型アデノシンデアミナーゼの脊椎動物における生理機能の解析
 研究課題名 (英文) The role of extracellular adenosine deaminase (ADGF/CECR1) in the vertebrate development
 研究代表者
 本間 光一 (HONMA KOICHI)
 帝京大学・薬学部・教授
 研究者番号：90251438

研究成果の概要：

細胞外に分泌されるアデノシンデアミナーゼ(ADA)を、昆虫細胞由来の増殖因子として発見し、昆虫の胚発生での重要性を示しました。現在では、この酵素がヒトを含む多くの動物種で保存されていることがわかり、新しい遺伝子(ADGF/CECR1)ファミリーとして認知されています。さらに、脊椎動物における機能を解析し、ADGF/CECR1 が体節形成に関わる重要な遺伝子であることを示しました。この遺伝子のユニークな特徴は、細胞外アデノシン量を低下させることにより、アデノシン受容体を經由した細胞内シグナル伝達を変化させることです。一連の解析を通じて、アデノシンの細胞外代謝の生理的意義を示しました。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,555,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：①アデノシンデアミナーゼ ②ADGF ③CECR1 ④IDGF ⑤ニワトリ
 ⑥アフリカツメガエル

1. 研究開始当初の背景

アデノシンデアミナーゼ (ADA) は、アデノシンおよびデオキシアデノシンを、それぞれイノシンおよびデオキシイノシンへ脱アミノさせるプリン・サルベージ経路の触媒酵素として知られる。細胞内においてこの酵素が欠損すると、原発性免疫不全症となり、初めての遺伝子治療が試みられたことでも知られる。一方、細胞外にもあるレベルでアデノシンが存在し、神経シナプス伝達や血管新生を調節する。これまで

ADA は、細胞外にも存在することが示唆されていたが、酵素学的性状は細胞内 ADA とは異なり、その構造も明らかではなかった。代表者らは、昆虫胚細胞の増殖に必須な細胞増殖因子として、IDGF(Insect-derived growth factor)と命名した蛋白を精製し、その cDNA を単離した結果、IDGF はアミノ末端側に分泌シグナル配列と機能未知のユニークドメインを、カルボキシル末端側に ADA 活性部位もつ新規な細胞増殖因子であることを明らかにした(*J. Biol. Chem.*,

271, 13770-13775(1996), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **350**, 334-338 (2006)). これは、脊椎動物・無脊椎動物を問わず、初めての細胞外 ADA の構造決定となった。また IDGF の細胞増殖活性の発現には ADA 活性の発現が必要であることを、部位特異的突然変異誘発法により明らかにした (*J. Biol. Chem.*, **276**, 43761-43766(2001)). さらに IDGF のファミリー遺伝子として ADA 活性ドメインを細胞外側にもつ膜貫通型の MSI を発見し、昆虫の精子形成に関与する遺伝子であることを明らかにした (*J. Biol. Chem.*, **275**, 36934-36941(2000)). その後、これらの発見が契機となり、IDGF ファミリーは昆虫のみならず無脊椎動物に広く存在し、さらにヒトを含む多くの脊椎動物にも存在することが明らかとなった。またヒト血清中などこれまで細胞外で検出されてきた ADA 活性の実体も、IDGF ファミリーであることがわかった。現在では、その名称も ADGF/CECR1 ファミリー (ADGF:adenosine deaminase-related growth factor, CECR1:cat eye syndrome critical region candidate 1)として統一されつつある (Maier ら、*J. Mol. Evol.*, **61**, 776-794(2005)). 細胞外 ADA の生理機能は、無脊椎動物においては、胚発生、精子形成、免疫細胞の分化に重要であることが代表者らを含む研究で明らかになってきたが、脊椎動物における生理機能はほとんどわかっていない。最近、ヒトの多臓器不全を引き起こす遺伝病(Cat eye syndrome)の原因候補遺伝子として IDGF ファミリーである CECR1 が同定され、CECR1 の遺伝子重複がこの疾患の原因ではないかと考えられている (Riazi ら、*Genomics*, **64**, 277-285(2000), Footz ら、*Genome Res.*, **11**, 1053-1070(2001)). このような背景のもと、細胞外 ADA の脊椎動物における生理機能が明らかになれば、細胞外 ADA の新たな生物学的役割が提示される可能性があり、またアデノシンの細胞外代謝の生理的な重要性が示されると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、細胞外分泌型ADA(ADGF/CECR1)の脊椎動物における生理機能を明らかにすることを目的とする。まず、脊椎動物由来の細胞外分泌型ADAの酵素学的性状を明らかにする。

脊椎動物由来の細胞外分泌型ADAの酵素学的性状が、これまで系統的に調べられたことはない。カエル、ヒトのADGF/CECR1cDNAをそれぞれ単離し、リコンビナント蛋白を作成し、それらの酵素学的性状を脊椎動物間で比較するとともに、無脊椎動物由来のADGF/CECR1蛋白(IDGFおよびMSI)とも比較して、分子進化的考察を行う。まず、カエルにおいて2種類のア

イソフォームが存在することから、ADA活性と細胞増殖活性の比活性において2種類の酵素で差が見られるかどうか、ADA活性の発現は昆虫で明らかにしたように細胞増殖活性の発現に必須であるか、また2種類の遺伝子の発現時期、組織、細胞に差が見られるかどうかを調べることによって、個体発生での役割分担を明らかに出来る可能性がある。このような構造と機能に関する比較解析が、ニワトリ、ヒトの細胞外分泌型ADAや無脊椎動物の細胞外分泌型ADAを含めて行われた例はなく、本研究によって計画が達成されれば興味深い。つぎに、脊椎動物由来の細胞外分泌型ADAの個体発生での生理機能を解析する。

細胞外分泌型ADAの遺伝子発現と胚発生での機能解析

まず、発生時の遺伝子発現を *In situ* hybridizationとRT-PCRによって明らかにする。特に胚発生時での遺伝子発現変化について、その発現組織と時期について解析し、発生過程での細胞外分泌型ADAの機能を考察する。次に胚発生における脊椎動物由来の細胞外分泌型ADAの必要性を示すためにモルフォリノオリゴ(カエル)を利用し、個体レベルで特異的に細胞外分泌型ADAの遺伝子発現を抑制して、発生異常の有無を調べる。そして、さまざまな体節分化マーカー遺伝子の発現が影響されたのかどうかを調べることで、細胞外分泌型ADAの形態形成時での役割を推察する。

細胞外分泌型ADAの胚発生における作用メカニズムの解析

モルフォリノオリゴによる形態異常は、細胞外分泌型ADAの遺伝子発現が抑制された結果、細胞外でアデノシンからイノシンへの変換が抑制され、細胞外アデノシン量が亢進されたために引き起こされた可能性がある。そこで、形態異常個体の体液中のアデノシン量を測定し、この可能性を検証する。またアデノシン受容体には、A1,A2a,A2b,A3の4種類が知られている。形態異常がこれらの受容体を介したシグナリングに影響を及ぼした結果生じたのか、否かを知ることによって、細胞外でのアデノシン量の適切な調節が個体発生に重要であることを示していく。以上のような組織レベル、細胞レベル、分子レベルでの解析を通じて、細胞外分泌型ADAの生理的役割を具体的に示す。

3. 研究の方法

本研究計画では、細胞外分泌型ADA(ADGF/CECR1)の脊椎動物における生理機能を明らかにすることを目的としている。実験モデル生物

としては、カエル(*Xenopus laevis*)に注目し、細胞外分泌型ADAの機能を示していく。

脊椎動物由来細胞外分泌型ADA(ADGF/CECR1)ファミリーのADA活性と細胞増殖活性

脊椎動物由来の細胞外分泌型ADAの酵素学的性状がこれまで系統的に調べられたことはない。カエル、ヒトの細胞外分泌型ADA(ADGF/CECR1)cDNAをそれぞれ単離し、まずリコンビナント蛋白を作成する。ADA活性を有するリコンビナント蛋白を作成する必要があるが、カエル由来の2種類のADGF/CECR1cDNAに関しては、大腸菌を用いる方法とA6細胞を用いる方法で、活性のあるリコンビナント蛋白を作成することに成功している。従って、ヒト由来のリコンビナント蛋白に関しても、ゲノムプロジェクトの情報から同定されているcDNA配列をもとにして、カエルの場合と同様の方法により作成する。次にADA活性について、アデノシン、デオキシアデノシン、AMP、ADP、ATPを用いて基質特異性の解析を行うとともに、アデノシンを基質とした場合の*K_m*、*V_{max}*、*k_{cat}*を求める。さらにDCFやEHNAなど既知の細胞内ADA阻害剤を用いた阻害特異性を調べる。昆虫由来(センチクバエ、ショウジョウバエ)のリコンビナント蛋白は大腸菌を用いて作成済みである(*J. Biol. Chem.*, **276**, 43761-43766(2001)、*J. Biol. Chem.*, **275**, 36934-36941(2000))。このような解析を通じて、脊椎動物間、及び脊椎・無脊椎動物間で、酵素特性に違いがあるか否かという問題に関して有用な情報が得られるものと思われる。

一方、脊椎動物由来の細胞外分泌型ADAが、細胞増殖活性を示すか否かを調べる。ヒトの細胞外分泌型ADAに関しても、それぞれの動物種由来の各種培養細胞に対して細胞増殖活性が検出されるか否かを調べる。もし細胞増殖活性が検出されたならば、DCFを作用させてADA活性をブロックしたときに、増殖促進活性が影響されるか否かを調べることによって、脊椎動物由来ADAの細胞増殖活性の発現にADA活性の発現が必要なか否かが明らかとなる。

脊椎動物由来細胞外分泌型ADA(ADGF/CECR1)ファミリーの遺伝子発現(発現時期、発現組織)

脊椎動物由来の細胞外分泌型ADAの遺伝子発現を、胚個体全体を用いたWhole mount *in situ* hybridization法と、組織切片を用いた *In situ* hybridization法によって、発現時期と発現組織を同定する。さらに組織切片を用いた *In situ* hybridization法によって、遺伝子発現細胞種を

各種細胞マーカー遺伝子と対照することによって同定する。

脊椎動物由来細胞外分泌型ADA(ADGF/CECR1)ファミリーの個体発生への関与

これまでにカエルの2種類の細胞外分泌型ADAの遺伝子発現を同時に抑制するようにデザインしたモルフォリノオリゴを2細胞期の両細胞にインジェクションすると、体節が異常となり湾曲した胚となることを見出している。これは、細胞外分泌型ADAが体節形成に必要であることを示唆している。そこで、より詳細に発生異常を調べるために、細胞レベルで筋細胞の分化段階や数(割合)が変化していないかを、筋細胞の分化マーカー蛋白に対する抗体を用いた免疫染色法を行うことで調べる。また *In situ* hybridization法によって、筋分化に関わる各種遺伝子の発現(Myf5, MyoDなど)を、細胞外分泌型ADAの遺伝子発現と同時に調べることで、筋分化のどの分化段階で細胞外分泌型ADAの関与があるのかを同定していく。次に、モルフォリノオリゴを用いた発生阻害実験は、細胞外分泌型ADAによる、細胞外アデノシン量の調節が発生に重要であることを示唆している。そこで、発生異常個体の体液中のアデノシン量が実際に亢進しているかどうかをHPLC(高速液体カラムクロマトグラフィー)を用いた定量(Dolezalら、*PLoS Biol.* **3**, 1213-1224(2005))により調べる。また、DCFはカエルの細胞外分泌型ADAのADA活性を不可逆的に阻害するので、DCFをモルフォリノオリゴをインジェクションした胚の胞胚腔、または原腸胚腔に注入することによって、その後の神経胚における発生異常が阻害されるかどうかを調べる。方法は、古谷らの方法に準じる(*Develop. Growth Diff.* **37**, 337-346(1995))。さらに、細胞外分泌型ADAによる発生異常が、アデノシン受容体を介しているかどうかを調べるために、アデノシン受容体に対するアンタゴニスト(DPCPX, KF17837, Enprofylline, MRS1220等)を用いて、DCFの場合と同様の注入実験を行い、アデノシン受容体の関与の有無を検証する。

4. 研究成果

本研究では、細胞外分泌型ADA(ADGF/CECR1)の脊椎動物における生理機能を明らかにすることを研究目的としている。まず、脊椎動物由来の細胞外分泌型ADAの酵素学的性状を明らかにした。このためにカエル、ヒトのADGF/CECR1cDNAをそれぞれ単離し、リコンビナント蛋白を作成し、それらの酵素学的性状を脊椎動物間で比較するとともに、無脊椎動物由来のADGF/CECR1蛋白(IDGFおよびMSI)

とも比較して、分子進化的考察を行った。方法は、細胞外分泌型 ADA (ADGF/CECR1)cDNA をそれぞれ単離し、大腸菌を用いて活性のあるリコンビナント蛋白を作成した。次に ADA 活性について、アデノシン、デオキシアデノシン、AMP、ADP、ATP を用いて基質特異性の解析を行うとともに、アデノシンを基質とした場合の K_m , V_{max} , k_{cat} を求めた。さらに DCF や EHNA など既知の細胞内 ADA 阻害剤を用いた阻害特異性を調べた。その結果、脊椎動物間、及び脊椎・無脊椎動物間で、酵素特性に多くの共通性が見られることが明らかとなった。次に脊椎動物由来の細胞外分泌型 ADA が、細胞増殖活性を示すか否かを調べた。その結果、カエル由来の細胞外分泌型リコンビナント ADA は、昆虫胚由来の培養細胞 NIH-Sape-4 に対しても増殖促進活性を示すことを見出した。引き続き、カエル由来の各種培養細胞に関しても、増殖促進活性が検出されるかどうかを調べる。これらの結果は、脊椎動物由来 ADA と無脊椎動物由来 ADA が共通の作用メカニズムを有していることを示唆する重要な知見である。

カエルの細胞外分泌型 ADA に関しては、胚発生の神経胚から尾芽胚の時期に体節、前腎、眼、セメント腺、神経管、神経板に遺伝子発現があることを見出したので、ADGF/CECR1 のタンパクおよび遺伝子発現を抑制することによる胚発生異常の生化学的解析を行った。ADGF/CECR1 の個体発生における重要性を示すために、モルフォリノオリゴを利用し、個体レベルで特異的に ADGF/CECR1 のタンパクおよび遺伝子発現を抑制することに成功した。そして、形態形成に及ぼす影響を解析した。その結果、カエル胚発生時での ADGF/CECR1 のタンパク発現を、2細胞期の両細胞で特異的に抑制すると、その後形成される体節構造が異常になることを見出した。そしてこのような発現抑圧胚について、RT-PCR によって MyoD や Myf5 など、各種分化マーカー遺伝子を用いて分子レベルでの異常を検出したところ、これらの遺伝子発現が顕著に変動することを見出した。いくつかの体節のマーカー遺伝子の発現レベルを調べたところ、筋分化に重要な機能を果たすことが知られている Myf5 の発現が、正常発生胚と比べて 20 倍程度高まっていることがわかった。さらに、アデノシン、またはアデノシン受容体のアゴニストを原腸腔へ注入し、その後の胚発生を観察すると、モルフォリノオリゴを作用させた場合と同様な形態異常が起こることを見出した。以上の結果からこの形態異常は、アデノシン受容体を介したシグナリングに影響した結果であることが示唆される。また、アデノシン受容体の各サブタイプ間の機能分担と、アデノシンシグナリングの異常との因果関係を予測させる点からも興味深い知見である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① Iijima, R., Kunieda, T., Yamaguchi, S., Kamigaki, H., Fujii-Taira, I., Sekimizu, K., Kubo, T., Natori, S. and Homma, K. J.
The extracellular adenosine deaminase growth factor, ADGF/CECR1, plays a role in *Xenopus* embryogenesis via the adenosine/P1 receptor
***J. Biol. Chem.* 283, 2255-2264(2008)**
査読：有
- ② Yamaguchi, S., Fujii-Taira, I., Katagiri, S., Izawa, E., Fujimoto, Y., Takeuchi, H., Takano, T., Matsushima, T. and Homma, K. J.
Gene expression profile in cerebrum in the filial imprinting of domestic chick (*Gallus gallus domesticus*)
***Brain Res. Bull.* 76, 275-281(2008)**
査読：有
- ③ Yamaguchi, S., Fujii-Taira, I., Murakami, A., Hirose, N., Aoki, N., Izawa, E., Fujimoto, Y., Takano, T., Matsushima, T., and Homma, K. J.
Up-regulation of microtubule-associated protein 2 accompanying the filial imprinting of domestic chick (*Gallus gallus domesticus*)
***Brain Res. Bull.* 76, 282-288(2008)**
査読：有
- ④ Yamaguchi, S., Katagiri, S., Hirose, N., Fujimoto, Y., Mori, M., Fujii-Taira, I., Takano, T., Matsushima, T. and Homma, K. J.
In vivo gene transfer into newly-hatched chick brain by electroporation
***Neuroreport*, 18, 735-739 (2007)**
査読：有
- ⑤ Ohira, K., Funatsu, N., Homma, K. J., Sahara, Y., Hayashi, M., Kaneko, T. and Nakamura, S.
Truncated TrkB-T1 regulates the morphology of neocortical layer I astrocytes in adult rat brain slices
***Eur. J. Neurosci.*, 25, 406-416 (2007)**
査読：有
- ⑥ Fujimoto, Y., Itabe, H., Kinoshita, T., Homma, K. J., Onoduka, J., Mori, M., Yamaguchi, S., Makita, M., Higashi, Y., Yamashita, A. and

Takano, T.
Involvement of long chain acyl-CoA synthetase in local synthesis of neutral lipids in cytoplasmic lipid droplets in human hepatocyte HuH7.

J Lipid Res. **48**, 1280-1292 (2007)

査読：有

[学会発表] (計 12 件)

- ①発表者：片桐幸子、広瀬直樹、山口真二、平郁子、藤本康之、高野達哉、松島俊也、本間光一

発表標題：RNAi によるニワトリヒナ脳での特異的遺伝子抑圧系の確立

学会名：日本薬学会 128 回大会

発表年月日：2008. 03

- ②発表者：本間 光一

発表標題：大脳領野への神経細胞選択的遺伝子導入法を利用した鳥類刻印付けの分子機構の解明

学会名：特定領域研究「統合脳」夏のワークショップ 合同班会議、統合シンポジウム、サテライトシンポジウム

発表年月日：2008. 08. 07.

発表場所：北海道厚生年金会館（ウエルシテイ札幌）

- ③発表者：片桐 幸子、山口 真二、平 郁子、本間 光一

発表標題：鳥類刻印付けの分子基盤の解明

学会名：日本薬学会 生物系薬学部会「フォーラム・バイオフォーラム 2008」

発表年月日：2008. 11. 29

発表場所：日本薬学会長井記念ホール

- ④発表者：本間 光一

発表標題：大脳領野への神経細胞選択的遺伝子導入法を利用した鳥類刻印付けの分子機構の解明

学会名：特定領域研究「統合脳」5 領域冬の公開シンポジウム、合同領域班会議

発表年月日：2008. 12. 14

発表場所：一ツ橋学術総合センター

- ⑤発表者：本間 光一、山口 真二

発表標題：鳥類の VSP

発表年月日：2008. 03

発表場所：自然科学研究機構生理学研究所

- ⑥発表者：片桐幸子、廣瀬直樹、山口真二、藤本康之、松島俊也、高野達哉、本間光一

発表標題：In vivo エレクトロポレーション法による鳥類生後脳における神経細胞選択的遺伝子導入

学会名：遺伝子・デリバリー研究会第 7 回シンポジウム

発表年月日：2007. 05

- ⑦発表者：Homma, K. J., Yamaguchi, S.

発表標題：Gene expression profiling associated with the filial imprinting of domestic chicks

学会名：IBRO satellite on 'Brain Mechanisms, Cognition and Behaviour in Birds.'

発表年月日：2007.07.21

発表場所：Heron Island, Queensland, Australia

- ⑧発表者：Yamaguchi, S., Homma, K. J.

発表標題：In vivo gene transfer into neuronal cells of newly-hatched chick brain

学会名：IBRO satellite on 'Brain Mechanisms, Cognition and Behaviour in Birds.'

発表年月日：2007.07.21

発表場所：Heron Island, Queensland, Australia

- ⑨発表者：廣瀬直樹、片桐幸子、山口真二、藤本康之、松島俊也、高野達哉、本間光一

発表標題：鳥類の大脳神経細胞選択的な in vivo 遺伝子導入法の確立

学会名：日本神経科学会 30 回大会

発表年月日：2007. 09

- ⑩発表者：山口真二、國枝武和、飯島亮子、神垣ひろこ、平郁子、久保武雄、名取俊二、本間光一

発表標題：細胞外アデノシンデアミナーゼのアフリカツメガエル胚発生での機能解析

学会名：日本生化学会 80 回大会

発表年月日：2007. 12

- ⑪発表者：藤本康之、板部洋之、木下哲昭、本間光一、山口真二、小野塚潤、山下純、前田正知、高野達哉

発表標題：脂肪滴アシル CoA 合成酵素

学会名：日本生化学会 80 回大会

発表年月日：2007. 12

⑫発表者：平郁子、山口真二、飯島亮子、名取俊二、本間光一

発表標題：ショウジョウバエ細胞膜型ステロイド結合蛋白によるエクダイソン情報伝達の調節

学会名：日本生化学会 80 回大会

発表年月日：2007. 12

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他] なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

本間 光一 (HONMA KOICHI)

帝京大学・薬学部・教授

研究者番号：90251438

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

山口 真二 (YAMAGUCHI SHINJI)

帝京大学・薬学部・助教

研究者番号：60398740