

(様式 1-2)

提出日：2020 年 4 月 14 日

2019 年度 大阪大学蛋白質研究所 拠点事業

(2) 研究成果の概要

課題名		ジペプチダーゼ CNBP2 による酸化ストレスを起因とする 新規細胞死・フェロトーシスからの保護機構の解明	
研究代表者	氏名	藤井 順逸	
	所属機関名・部局名	山形大学大学院・医学系研究科	
	職名	教授	
事業名 (該当の事業名の右欄に○)		○	共同研究員
			超高磁場NMR 共同利用研究課題
			クライオ電子顕微鏡共同利用研究課題
			客員フェロー
蛋白研受入担当教員名		奥村 宜明	
培養細胞の培地からシステイン(Cys)を除く、もしくは細胞のもつシスチン輸送体 xCT を阻害すると鉄依存性の細胞死・フェロトーシスが起る。これまでに xCT 欠損マウスと野生型マウスよりマクロファージを単離してプロテオミクス解析を行ない、xCT 欠損マクロファージには Cys-Gly ジペプチドを特異的に切断すると報告されているジペプチダーゼ CNBP2 が高発現していることを見出している。CNBP2 活性の高い細胞は細胞外 GSH に由来する Cys-Gly を効率よく分解し、Cys をグルタチオン合成に供給することでフェロトーシスから細胞を保護している可能性が考えられる。本研究では(I)培養細胞を用いた CNBP2 の機能解析と、(II) CRISPR/Cas9 系を用いたゲノム編集により CNBP2 欠損マウスを作製し、CNBP2 の生理機能を明らかにすることを目的とした。 (I)LC-MS を用いて Cys-Gly 分解活性を測定したところ、野生型に比べて xCT 欠損マクロファージの方が活性が高く、CNBP2 が実際に Cys-Gly 分解を担うことを確かめた。また、CNBP2 と、近いファミリー遺伝子である CNBP1 を過剰発現させた細胞の活性を比較したところ、CNBP1 発現細胞では活性の増加をほとんど認めず、Cys-Gly 分解は CNBP2 に特異的な機能と考えられた。Hepa1-6 細胞をシスチン欠乏培地で培養するとフェロトーシスによって死滅したが、培地に Cys-Gly を添加すると細胞内グルタチオンが増加して生存率が改善し、CNBP2 の阻害剤である bestatin はその効果を打消した。この結果は、Cys-Gly が細胞に取込まれた後に CNBP2 で分解・再利用されていることを示している。またグルタチオンの添加によっても改善が認められたので、細胞膜に発現している γ-グルタミルトランスフェラーゼ(GGT)が γ-グルタミル基を切除し、CNBP2 を介して生成した Cys-Gly を利用していることが分かった。 (II) CNBP2 の生理機能を解明するために、CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集により CNBP2 欠損マウスを作製した。まだ解析をはじめたばかりではあるが、少なくともこれまでのところ、個体の成長や繁殖能力に CNBP2 の欠損による影響を認めていない。今後は糖尿病やグルタチオンを消費する刺激を加えた病態モデルで、CNBP2 欠損による影響が認められるか否か検討を行う。 さらに、CNBP2 には乳酸基をアミノ酸に付加するアミノ酸乳酸化活性があることが報告されていることから、マウス肝臓と血漿中の乳酸化アミノ酸を測定したところ、CNBP2 欠損細胞では含有量が低下していた。乳酸は、健常人では運動により増加するが、癌組織は糖代謝が活発なため乳酸を大量に生成することが知られている。乳酸化アミノ酸が腫瘍マーカーとなることが期待されるため、産科婦人科学講座との共同で、婦人科領域の癌患者血液中の乳酸化アミノ酸の測定を予定している。			

