

腸管上皮細胞におけるヘパラン硫酸の
硫酸化構造と機能に関する研究

2013年

岐阜大学大学院連合農学研究科

生物資源科学

(岐阜大学)

西田 光貴

目次

第1章 緒論.....	1
第2章 マウス線維芽細胞表面へパラン硫酸糖鎖のアドレナリンに対する 応答機構解明.....	8
第1節 緒言	8
第2節 実験材料および実験方法.....	8
2-1 実験材料.....	8
2-2 HS の精製.....	9
2-3 HS 量の測定	11
2-4 DNA 量の測定	13
2-5 HS の二糖組成分析	14
2-6 6-OSTs の mRNA 発現量測定	16
2-7 アドレナリン受容体阻害剤による 6-OST-1 発現の阻害実験 ...	21
2-8 シグナル伝達阻害剤を用いた 6-OST-1 の阻害実験.....	23
2-9 ウェスタンブロッティング	24
2-10 Phostag ウェスタンブロッティング	30
2-11 ERK1/2 阻害剤を用いた HS 構造変化の阻害実験.....	32
2-12 表面プラズモン共鳴を用いた HS と NGF の相互作用測定 ..	33
2-13 NGF が 6-OST-1 発現に与える影響	34
第3節 結果	36
3-1 L-M 細胞表面 HS の硫酸化構造にアドレナリンが与える影響	36
3-2 L-M 細胞表面の HS 量にアドレナリンが与える影響.....	40
3-3 6-OST-1 発現にアドレナリンが与える影響	43
3-4 Sulf1/2 発現にアドレナリンが与える影響.....	46
3-5 L-M 細胞に発現するアドレナリン受容体の種類特定	48
3-6 6-OST-1 発現を制御するシグナル伝達機構の分析.....	50
3-7 アドレナリンによる HS 構造変化が NGF との相互作用に与える 影響	53

第4節 考察	55
第5節 要約	62
第3章 分化 Cacao-2 細胞表面 HS にペクチン添加が与える影響	64
第1節 緒言	64
第2節 実験材料および実験方法	66
2-1 実験材料	66
2-2 複合培養系による <i>in vitro</i> 小腸上皮モデルの構築	69
2-3 HS 6-O-endosulfatases および HS 硫酸基転移酵素の mRNA 発現解析	70
2-4 分化 caco-2 細胞におけるインテグリン, フィブロネクチン, ペクチンの局在性の観察	71
2-5 ペクチンが分化 Caco-2 細胞の HSulf-2 発現を誘導する機構の解明	76
2-6 $\alpha 5$ インテグリンの発現分析 (western blotting)	78
2-7 ペクチンが Wnt タンパク質の mRNA 発現に与える影響	80
2-8 Wnt タンパク質が IEC-6 細胞の細胞増殖に与える影響	81
2-9 Wnt タンパク質の発現解析 (western blotting)	82
第3節 結果	87
3-1 複合培養系において, ペクチン添加した分化 Caco-2 細胞が IEC-6 細胞に与える影響	87
3-2 HSulf-1/2 発現にペクチンが与える影響	89
3-3 6-OST-1/2 と 2-OST-1 発現にペクチンが与える影響	91
3-4 $\alpha 5$ インテグリンの局在にペクチンが与える影響	93
3-5 フィブロネクチンの局在にペクチンが与える影響	99
3-6 分化 Caco-2 細胞におけるペクチンの局在解析	105
3-7 ペクチンが HSulf-2 発現を誘導する機構の解明	108
3-8 ペクチンによる HSulf-2 発現に ERK 阻害剤が与える影響 ..	110
3-9 Wnt タンパク質が IEC-6 細胞の細胞増殖に与える影響	112

3-10	ペクチンが Wnt タンパク質と IL-8 発現に与える影響	114
3-11	分化 Caco-2 細胞のバソラテラル培地における Wnt タンパク質の発現解析	116
第4節	考察	118
第4章	総括	131
第5章	謝辞	135
第6章	参考文献	136

第 1 章 緒論

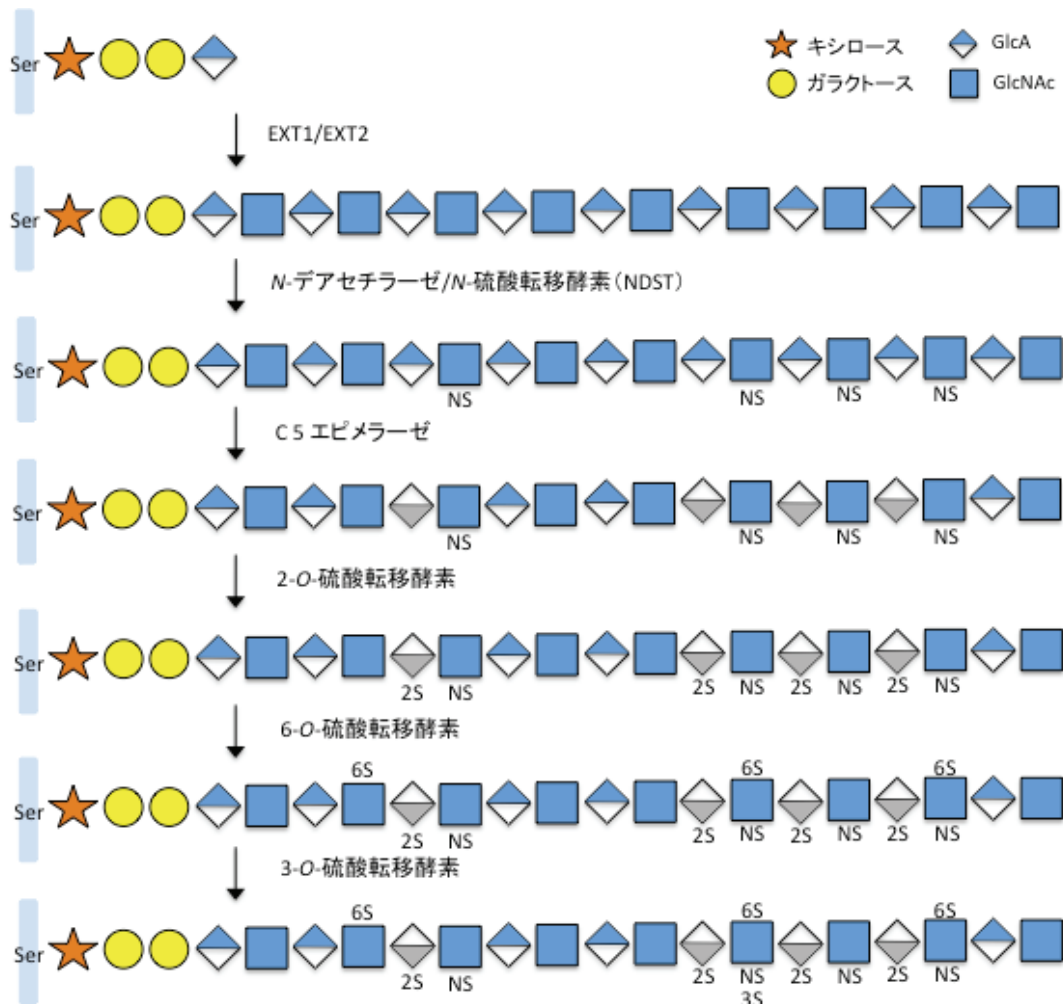
ヘパラン硫酸 (HS) は、硫酸化された直鎖状の多糖であり、グリコサミノグリカン (GAG) の 1 種として、プロテオグリカンのコアタンパク質に共有結合して、全ての哺乳類の細胞表面と細胞外マトリクスに普遍的に存在する。HS は、*N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc) とグルクロン酸 (GlcA) もしくはイズロン酸 (IdoA) の 2 糖単位が 50~100 回程度繰り返し重合化した構造をとる。GAG には、ヘパラン硫酸の他に、ヘパリン、コンドロイチン硫酸 (CS)、デルマタン硫酸 (DS) に分類される。GAG には、他にもケラタン硫酸やヒアルロン酸が含まれるが、以降ではそれらを除外して言及する。CS は、*N*-アセチルガラクトサミン (GalNAc) と GlcA の 2 糖が繰り返した構造から成り、DS は GalNAc と IdoA の 2 糖繰り返し構造から成る。

HS の生合成はゴルジ体で行われる。キシロース転移酵素が UDP-キシロース (Xyl) から Xyl をコアタンパク質の特定のセリン残基に転移すると、ガラクトース転移酵素-I と-II により、ガラクトース (Gal) 2 残基がキシロースに付加する。さらに、グルクロン酸転移酵素が GlcA を Gal に付加する。このような反応を経て、GAG とコアタンパク質の結合領域に共通な 4 糖構造が形成される (古川ら, 2008)。次いで、GlcNAc 転移酵素-I により GlcNAc が転移されると、ヘパラン硫酸合成酵素 (EXT) 1 と EXT2 が順次 GlcA と GlcNAc を交互に転移し、HS の 2 糖繰り返し構造が形成される (古川ら, 2008)。EXT1 や EXT2 のノックアウトマウスは胎生致死となることが報告されており (Yamada S, et al., 2004)、また脳特異的に EXT1 をノックアウトすると脳の小型化や小脳の奇形が観察されたことから (Inatani M, et al., 2003)、HS が発生や器官形成など生物の成長に重要な役割を担うことが示唆されている。

HS の 2 糖繰り返し構造が形成されると、多様な HS 硫酸基転移酵素により 2 糖の特定の位置が硫酸化される。まず初めに、*N*-デアセチラーゼ/*N*-硫酸基転移酵素 (NDST) により、GlcNAc の *N* アセチル基が脱アセチル化され、同時に *N* 硫酸化を受け、GlcNS が形成される。次いで、C 5 エピメラーゼが GlcNS に隣接する GlcA を IdoA へ変換する。その後、HS 2-*O*-硫酸基転移酵素 (2-OST-1) が GlcA/IdoA の C 2 位を硫酸化する。次いで、HS 6-*O*-硫酸基転移酵素 (6-OSTs) が GlcNAc の C 6 位を硫酸化して、稀に HS 3-*O*-硫酸基転移酵素 (3-OSTs) が GlcNAc の C 3 位を硫酸化する (Varki A, et al. 2008)。これらの酵素は、2-OST-1 と C 5 エピメラーゼを除いて、基質特異性と発現パターンの異なるアイソフォームが複数存在する (Esko J D,

et al., 2001)。例えば、マウスは 6-OSTs の 3 つのアイソフォームである 6-OST-1, 6-OST-2, 6-OST-3 を発現することが知られている (Habuchi H, et al., 1995; Habuchi H, et al., 1998; Habuchi H, et al., 2000; Habuchi H, et al., 2003)。硫酸基転移酵素は、ノックアウト手法を用いることにより、様々な生理機能に必須の役割を担うことが解明された。例えば、NDST-1 をノックアウトするとマウスの目の形成が阻害され (Pan Y, et al., 2006), 6-OST-1/6-OST-2 がヘパリン結合性増殖因子のシグナル伝達に重要な役割を果たすことが明らかとなった (Sugaya N, et al., 2008)。これらの硫酸基転移酵素は、HS の分子全体に対して不規則にはたらくため、HS は非常に複雑な硫酸化構造をもつようになる。

HS 生合成機構の模式図を以下に示す。



ゴルジ体内での硫酸化が完了すると、HS は細胞表面へ輸送される。細胞表面の HS は、HS 6-O-エンドスルファターゼ (Sulfs) により、IdoA (2S) – GlcNS (6S) ま

たは IdoA – GlcNS (6S) 2 糖の 6-硫酸が脱硫酸化される (Dhoot G K, et al., 2001)。近年では, Sulfs による HS の脱硫酸化も, HS の硫酸化構造形成を担うと考えられている。このような複数の酵素の働きにより, HS は膨大な構造多様性を持つようになる。

これまで述べてきたように, HS は, 構成する二糖の組成や鎖長, 硫酸化構造などが異なる膨大な種類が存在することになるが, それらは細胞種や成長段階に特異的であることが知られている (David G, et al., 1992; Ledin J, et al., 2004)。しかしながら, なぜ HS は複雑な硫酸化構造をもつ必要があるのでしょうか? 近年の研究により, HS は様々な生理活性タンパク質に対する受容体または共受容体として機能することにより, 細胞増殖や分化, 腫瘍の転移, 栄養分の代謝, 抗凝固活性等の多様な生理機能の調節に関与することが明らかにされた (Bishop J R, et al., 2007)。多くの生理活性物質は, 様々な硫酸基転移酵素/脱硫酸化酵素により形成される HS の硫酸化構造 (硫酸化パターン) を識別して結合すると考えられている (Habuchi H, et al., 2004)。例えば, 線維芽細胞増殖因子 (FGF) ファミリーは, 23 種類発見されているが, それぞれの FGF が異なる硫酸化パターンを認識して HS と相互作用する (Ishihara M, 1993)。また, 血液の抗凝固活性を示すアンチトロンビンⅢも HS やヘパリンの特定の硫酸化パターンを認識して結合する (Atha D H, et al., 1985; Atha D H, et al., 1987)。従って, HS の機能を解明するためには, HS の硫酸化構造に注目する必要があると言える。HS の硫酸化構造は, 様々な生理活性物質と結合するための暗号とも考えられ, HS の硫酸化構造と機能の相関を解明することは”heparanome”と呼ばれて注目を集めている (Turnbull J, et al., 2001; Lamanna W C, et al., 2007)。HS は硫酸化構造が複雑な上に, 細胞表面 HS の半減期が約 4 時間であることから (Yanagishita M, 1992), 細胞を取り巻く環境の変化に俊敏に応答して硫酸化構造を変化させることが推察できる。このように HS の硫酸化構造は注目されるものの, タンパク質が DNA の塩基配列を鋳型にして合成されるのとは異なり, 複数の硫酸化酵素/脱硫酸化酵素が鋳型情報に基づくことなく HS の硫酸化構造を形成するため, それらの酵素がどのような細胞内情報伝達経路を経て HS の硫酸化構造を形成するかは未だに解明されていない。

生体を構成する組織における HS の機能に目を移すと, HS の生合成をノックアウトする手法により, これまでのところ, 脳 (Inatani M, et al., 2003; Yamada S, et al., 2004) や肺 (Thompson S M, et al., 2010), 目 (Sugaya N, et al., 2008), 心臓 (Strunz C

M, et al., 2011) などにおける HS の機能の解明がなされてきたが、小腸における HS の研究は進んでいない。小腸上皮においては、HS は主に基底膜側に発現して、上皮細胞からのタンパク質の流失を防ぐ防護策として機能すると考えられていた (Bode L, et al., 2008)。しかしながら、小腸特異的に HS をノックアウトすることにより、小腸の正常な発達に HS が重要な役割を担うことが近年報告され (Perreault N, et al., 2001; Yamamoto S, et al., 2013)、小腸における HS の機能解明に注目が集まっている。特に、それらの報告は HS をノックアウトすることで HS の機能を推察したが、HS の微細な硫酸化構造については議論されていないため、小腸に発現する HS の硫酸化構造と機能についての解明が望まれている。

小腸上皮は、絨毛と陰窩（クリプト）に区分される。陰窩の底部に存在する小腸幹細胞から分裂した細胞は、2 日から 7 日間をかけて陰窩から絨毛の先端に向けて移動し、絨毛の先端で剥離するサイクルを繰り返す (Crosnier C, et al., 2006)。陰窩の底部にはパネート細胞が存在し、その上に小腸幹細胞が存在する (Reya T, et al., 2005)。パネート細胞は抗菌物質を分泌し、小腸の自然免疫に関与する。陰窩の残りの部分は、小腸幹細胞から分裂した増殖細胞が占めている。増殖細胞は絨毛に沿って先端に移動するにしたがって吸収上皮細胞や杯細胞へと分化し、その結果として絨毛が形成される (Crosnier C, et al., 2006)。つまり、絨毛の細胞は増殖しないが、陰窩では細胞増殖が活発に起きていると言える。

陰窩から絨毛に発現する細胞の動向は、主に Wnt (ウィント) タンパク質により制御されている (Reya T, et al., 2005)。Wnt タンパク質は、ショウジョウバエ (*Drosophila*) の体節形成に重要な役割を果たす Wingless 遺伝子 (Wg) が、マウスのガン原遺伝子 (Int-1) と同一であることが発見され (Rijsewijk F, et al., 1987)、Wnt と命名された。Wnt タンパク質は、脂質修飾された分泌型の糖タンパク質であり、ショウジョウバエから哺乳類まで広い生物種で保存されている。Wnt タンパク質は、哺乳類では 19 種類が同定され、生体の発生過程において細胞分化や組織形成に重要な役割を果たすことが知られている (van Amerongen R, et al., 2009)。マウス小腸においては、Wnt3a が陰窩底部に存在するパネート細胞の周囲に高発現し、パネート細胞の成熟を促すとともに、パネート細胞の上に存在する増殖性細胞の増殖を亢進すると考えられている (Gregorieff A, et al., 2005)。また Wnt11 も陰窩の細胞増殖を刺激する候補として注目を集めている (Ouko L, et al., 2004)。一方で、Wnt2b や Wnt4, Wnt5a, Wnt5b は主に絨毛に発現しており、上皮細胞の分化を促進することで絨毛の形成に関与すると考えられている (Gregorieff A, et al., 2005)。Wnt

タンパク質は細胞表面の HS と結合し (Ai X, et al., 2003), 小腸の陰窩に発現する HS が Wnt3a による陰窩の恒常性維持に関与することが示唆されたが (Yamamoto S, et al., 2013), 小腸に発現する Wnt の生理機能に HS が関与する詳細なメカニズムは解明されていない。

ところで、水溶性食物繊維であるペクチンが小腸絨毛の形態変化を引き起こしたとの報告がある。Tasman-Jones らは、ペクチンを含まない食餌を 12 週間与えたラットと 10%ペクチンを添加した食餌を同期間与えたラットの空腸および回腸の絨毛の形態を調べると、ペクチン無添加群ではそれらの絨毛が規則的な薄い葉状であるのに対して、ペクチン添加群の空腸絨毛は不規則で隆起を形成し、回腸絨毛は木の葉形で規則的であることを報告している (Tasman-Jones C, et al., 1982)。また、McCullough らは、通常ラットならびに無菌ラットに対し、成分栄養剤に食物繊維混合物を 30%添加して与えた場合、腸内細菌の有無にかかわらず小腸での杯細胞の増加と小腸及び近位結腸において陰窩の分化増殖が認められ、さらに無菌ラットの腸にて腸内分泌細胞数が低下した (McCullough J S, et al., 1998)。ニワトリにおいても、ペクチン摂取による小腸上皮の形態変化が報告された (Langhout D J, et al., 1999)。これらの研究は、ペクチンが小腸に直接作用して、陰窩の細胞増殖を亢進した結果、絨毛の増殖が促進された可能性を示すと考えた。しかしながら、ペクチンなどの食物繊維は、主に大腸に存在する腸内細菌の発酵作用を受けて生理作用を発揮すると考えられているため (Brown L, et al., 1999), ペクチンが小腸上皮へ作用する機構は解明されていない。

ペクチンは、果物や野菜類などの植物細胞壁に多量に存在する多糖類である。ペクチンは、植物組織中の構成成分や中間層の主成分として、組織や細胞間に接着力と安定性をもたらしている (Lunn J, et al., 2007)。ペクチンは直鎖状および分岐状の構造から構成される。ペクチンの主要な構造は、 α -D-ガラクトuron酸分子が α -1, 4-グリコシド結合した鎖状構造のホモガラクトuron (HG) であり、ペクチンの約65%に相当する (Mohnen D, 2008)。また、ペクチンの約10%はラムノガラクトuron-N-II (RG-II) で組成され、20-35%はラムノガラクトuron-N-I (RG-I) から成る (Leclerc L, et al., 2013)。RG-IIは少なくとも七つの1, 4-結合した α -D-GalA残基から成るHG主鎖で構成されており、四つの構造的に異なるオリゴ糖側鎖が主鎖に結合した構造を持つ (Ridley B L, et al., 2001)。RG-Iは α -D-GalA-1, 2- α -L-Rha-1, 4-という二糖の繰り返しから成る主鎖を持つ (Mohnen D, 2008)。ペクチンは、HG, RG-I

及びRG-IIが主鎖を介して繋がった構造をとると考えられている (Mohnen D, 2008)。ペクチンの側鎖には、アラビノース、キシロース、ガラクトース、フコース、マンノースおよびグルコースといった中性糖が存在する (印南ら, 1995)。ペクチンは、側鎖が密に分布した毛状領域 (hairy region) と側鎖分布の少ない平滑領域 (smooth region) から成る (真部, 2001)。天然に存在するペクチンは、ガラクツロン酸のカルボキシ基が部分的にメチルエステル化されている。エステル化度はメトキシル基 (OCH_3) の含有量によって表され、メトキシル基が7% (エステル化度=42.9%) 以上のものは高メトキシペクチン (HMP: high methoxy pectin), 7%以下のものは低メトキシペクチン (LMP: low methoxy pectin) と呼ばれる。メトキシ含量はペクチンの溶解性、粘性、ゲル化能、酵素に対する分解性などに大きな影響を与える (辻ら, 2004)。

ペクチンの摂取は、消化管の機能へ各種の生理効果を及ぼす。ペクチンの生理効果は、1) 消化管との物理的・化学的相互作用を介しての消化管機能の調節, 2) 他の食物成分との相互作用, 3) 消化管腔内の内部環境 (pH, 腸内細菌の量・質など) の調節, 4) ペクチンが腸内細菌の作用を受けて生成される短鎖脂肪酸のはたらきを介して示される (辻ら, 2004)。ペクチンは腸内細菌によって90~100%分解されるため、消化管上部においては前者二つの作用により生理効果を示し、消化管下部においては後者二つの作用により生理効果を示す (辻ら, 2004)。このような生理効果により、ペクチンはコレステロール低下などの効能を持つ他に、食物アレルギーの抑制作用や抗腫瘍活性、下痢や胃腸の炎症に対する効果も示す (Terpstra A H, et al., 1998; Tazawa K, et al., 1999; Lee J C, et al., 2004; Olano-Martin E, et al., 2002; Ohkami H, et al., 1995; 宮崎, 1990)。

本研究では、果物のプルーンから精製したペクチンを使用した。具体的には、三基商事 (株) より提供されたプルーンエキスをエタノールを供して、アルコール不溶性画分 (AIS) を抽出した。AISにはタンパク質が約50%含まれるため、AISを HCO_3^- 型のDEAE-celluloseカラムを用いた陰イオン交換クロマトグラフィーに供して、 NaHCO_3 を用いて溶出するすると、0.3 M NaHCO_3 溶出画分 (F3) が主画分となる (水川, 2006)。F3は中性糖を約20%含み、側鎖が密に分布するhairy領域であることが推測されている (中村, 2009)。そこで本研究では、F3をプルーン由来ペクチンとして利用した。以下にて特記しない限り、ペクチンとはプルーン由来F3画分を示す。

当研究室では、ペクチンが小腸絨毛の形態変化を誘導する機構を解明するために、*in vitro* ヒト小腸上皮モデルであるCaco-2細胞にペクチンが与える影響を研究してきた。その結果、分化Caco-2細胞にペクチンを添加すると、頂端（アピカル）側へのタンパク質分泌量が増加することや（中村，2009），細胞内の代謝が変化すること（中村，2009；石川，2011），細胞外マトリクス構成タンパク質であるフィブロネクチンのmRNA発現量の亢進を発見した（本田，2011）。また，ペクチンはフィブロネクチンのIII₁C領域（FNIII₁C）と結合することと，フィブロネクチンは分化Caco-2細胞のアピカル側に発現することが見出された（本田，2011）。さらに，分化Caco-2細胞表面HSの構造がペクチン添加により変化することも示唆されている（村田，2011）。これらの知見から，ペクチンは細胞外マトリクスのフィブロネクチンと結合することにより分化Caco-2細胞に刺激を与え，細胞表面HSに影響を及ぼすとの仮説を立てた。そこで本研究は，分化Caco-2細胞表面のHSへペクチンが与える影響を解明することにより，腸管上皮細胞におけるHSの機能を解明することを目的とした。

そのためには，細胞表面HSがペクチンの刺激に対してどのように反応するかを解明する必要があるが，細胞外の刺激に対するHSの応答様式は未解明である。これまでに，HSの硫酸化構造を識別して結合するFGF-1とFGF-2の神経細胞表面HSに対する結合性が，脳の発達時期に応じて変化したとの報告があることから

（Nurcombe V, et al., 1993），細胞表面HSは細胞外の刺激に応答して硫酸化構造を変化させるのではないかと考えた。さらに，当研究室では，マウス線維芽細胞表面HSの硫酸化構造がアドレナリン刺激により変化することを示唆する結果を得たことから（西田，2005；永見，2009），本研究では，まず初めに，マウス線維芽細胞を実験モデルにして，細胞表面HSの細胞外刺激への応答機構の解明に取り組んだ。その知見を基にして，分化Caco-2細胞表面HSの機能を解明するために，分化Caco-2細胞表面HSへペクチンが与える影響を分析した。

第2章 マウス線維芽細胞表面ヘパラン硫酸糖鎖のアドレナリンに対する応答機構解明

第1節 緒言

細胞表面 HS は、細胞外環境の変化に応答して硫酸化構造を変化させることが示唆されたが (Nurcombe V, et al., 1993), これまでのところ明確な証明はなされていない。当研究室では、L-M 細胞表面の HS 構造がアドレナリン刺激により変化することを示唆する知見を得ている (西田, 2005; 永見, 2009)。一般的な細胞培養には血清を必要とするが、血清中の成長因子は細胞表面 HS へ影響を及ぼすことが考えられる。しかしながら、L-M 細胞は培養に血清を必要としないため (Higuchi K, 1970), 培地に投与する物質が HS に与える影響を明確に評価できる。そこで本章では、アドレナリンに L-M 細胞表面 HS に与える影響を分析して、細胞表面 HS が細胞外からの刺激に応答する機構を解明することを目的とした。

第2節 実験材料および実験方法

2-1 実験材料

(1) マウス線維芽細胞

Mus musculus (mouse) の皮下結合組織由来線維芽細胞を株化培養した L-M 細胞を American Type Culture Collection (ATCC) より購入した。

(2) 培地

超純水 180 mL にバクトペプトン (BD) 20 mg を加えてオートクレーブし、10% バクトペプトンを調製した。Medium 199 (Life Technologies) 195 mL に 10% バクトペプトン 5 mL を混合して、L-M 細胞培養用の培地とした。

(3) TE buffer, pH 8.0

1 M Tris-HCl, pH 8.0 500 μ L と 0.5 M EDTA, pH 8.0 100 μ L を混合して、超純水で 50 mL に定容した。

試薬は、特に記述のない限り和光純薬工業より購入したものを使用した。

2-2 HS の精製

2-2-1. 試薬の調製

(1) 50 mM アドレナリン溶液

酒石酸水素 L-アドレナリン（ナカライテスク）を滅菌水に溶解して、50 mM のストックを -20°C にて保存した。粉末状のアドレナリンは 4°C にて1年間冷蔵保存すると劣化したため、必要量を凍結保存し、凍結融解を繰り返さないようにした。

(2) アドレナリン含有培地

50 mM アドレナリン溶液を培地で希釈して、0.01, 0.05, 0.10, 0.20 mM アドレナリン含有培地を調製した。

(3) PBS

KH_2PO_4 1 g, NaCl 40 g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 14.5 g, KCl 1 g を超純水に溶解し、500 mL に定容して10×PBSを調製した。これを10倍希釈することで、1×PBSを調製した。

(4) フェノール・クロロホルム溶液

フェノールとクロロホルムを1:1で混合し、 4°C にて保存した。

(5) 3 M 酢酸ナトリウム

酢酸ナトリウム（無水）49.2 g を超純水に溶解し、200 mL に定容してオートクレーブした。

2-2-2. 細胞培養

L-M 細胞を 10.5×10^5 cell/10 mL となるように 75 cm^2 フラスコに播種して、 37°C 、5% CO_2 条件下で3日間培養した。

2-2-3. 細胞表面からの GAG 回収

37°C に保温したPBSで細胞を洗浄して、アドレナリン含有培地 10 mL を添加し、 37°C 、5% CO_2 条件下で3時間または6時間培養した。また、コントロールとして、通常培地を10 mL 添加して同様の方法で培養した。

75cm² フラスコを氷上に置き、10 分間氷冷した。冷 PBS による細胞の洗浄を 2 回繰り返した。Trypsin/EDTA（ナカライテスク）2 mL を添加して、室温で 30 分間静置した。次いで、37℃で 10 分間インキュベートして、10 分間氷冷した。セルスクレイパーで剥離させた細胞懸濁液を 1.5 mL チューブに 1 mL ずつ回収し、フラスコ内に残存する細胞を回収するために冷 PBS 0.5 mL を加えて、先のチューブに 0.25 mL ずつ回収した。次に、遠心分離（4℃, 1500×g, 10 分）を行い、上清を回収した。沈殿は、DNA 量の測定に使用した。この方法は Showrak N W らの方法を参考にした（Shworak N W, et al., 1996）。

2-2-4. フェノール・クロロホルム抽出

2-2-3で回収した上清からタンパク質等を取り除くために、フェノール・クロロホルム抽出を行った。タンパク質を構成するアミノ酸には親水性、疎水性の両種のものが存在するが、水溶液中のタンパク質分子ではアミノ酸の疎水基を分子の内側に、親水基を水に接する外側に向けて安定化している。ここにタンパク質変性作用を持つフェノールを作用させると、立体構造が壊れて疎水基がフェノールにトラップされ、親水基が水層に留まろうとする。その結果、変性したタンパク質分子は遠心分離によって水層とフェノール層の界面に中間層として分離されることとなる。そこで、1.5 mL チューブにサンプル溶液を 750 μ L 以下になるよう分注し、サンプル溶液と等量のフェノール・クロロホルム溶液を加えてボルテックスミキサーで攪拌した。遠心分離(室温, 2000×g, 10分)を行い、タンパク質とフェノール層を回収しないように上層のみを慎重に回収した。その後、フェノール層の入ったチューブに滅菌水 200 μ L を加えて再びボルテックスミキサーで攪拌し、遠心分離（室温, 2000×g, 10分）を行い、上層を回収した。

2-2-5. アルコール沈殿

GAGは極性を持つ分子であり、水に溶解する。その溶液に対し、極性が小さくGAGを溶解させないアルコールを加えることで、すでに溶けていたGAGが析出する。しかしGAGは硫酸に由来する負の電荷を持つため互いに反発しあい沈殿ができてにくい。そこで、酢酸ナトリウムなどを加えて電荷を中和した後にアルコールを加えることでGAGが析出し、これを遠心分離することで沈殿が得られる。回収したサンプル溶液に対して、終濃度0.2 M以上となるように3 M 酢酸ナトリウム溶液を加えた。サンプル溶液+酢酸ナトリウム溶液量に対して、

-20℃で保存した2-プロパノールを等量加え、チューブを上下反転させて攪拌した。これを遠心分離（4℃，15000×g，60分）し、沈殿が浮いてくる前に素早く上清を除去した。

2-2-6. コンドロイチン硫酸（CS）の分解

回収した GAG に含まれる CS を分解することにより，HS の精製を行った。コンドロイチナーゼ ABC（*Proteus vulgaris*, EC 4.2.2.4，生化学工業）は，コンドロイチン硫酸，デルマトン硫酸，ヒアルロン酸の N-アセチルヘキソサミニド結合を脱離反的に切断し，非還元末端に△4-ヘキスロン酸残基を持つ二糖を生成する。ケラタン硫酸，ヘパリン，HS には作用しないため，効率的に GAG 内のコンドロイチン硫酸糖鎖を分解できる。HS と共存するコンドロイチン硫酸（CS）糖鎖を分解するため，2-2-5 で回収した上清を用いて，Table 1 のように調製した。

Table 1 CS 分解の反応組成

1.0 M Tris-HCl, pH 8.0		7.9	μL
3.0 M 酢酸Na		2.6	μL
0.1% BSA		20.0	μL
滅菌水		108.5	μL
40 mU/μL Chondroitinase ABC		1.0	μL
GAG溶液		100.0	μL

37℃で一晩反応させ，その後 2-2-4 と 2-2-5 の方法に従い，フェノール・クロロホルム抽出，プロパノール沈殿を行い，酵素タンパク質と分解した CS を除去した。

2-3 HS 量の測定

HSを含むGAGの定量には，HPLCやカルバゾール硫酸法，アルシアンブルー法が用いられる。HPLCを用いると塩やDNA混入の影響を受けずにGAGを定量することができ，カルバゾール硫酸法は塩の影響を受けること，アルシアンブルー法では硫酸化GAGのみを定量できることが報告されている（Frazier, et al.,

2008)。そこで本研究では、硫酸化GAGであるHSを定量するためにアルシアンブルー法を採用した。

アルシアンブルーはフタロシアニン色素の一種で、銅原子を含む疎水性のコアを持つ4価のカチオンであり、スルホムチンやシアロムチン、酸性ムコ多糖類を特異的に染める組織染色法として導入された。他の染色方法と比較して簡便で染色時間も短い。色素が結合した部位は青藍色に鮮やかに染色される。GAGに関しては、全てのカルボキシル基を中和するに足る低pHにおいて、アルシアンブルーは硫酸化GAGと特異的に結合する。アルシアンブルー法は、Zhangらの手順を参考にした (Zhang, et al., 2001)。

2-3-1. 試薬の調製

(1) 8 M グアニジン塩酸

グアニジン塩酸 76.4 gを加熱して超純水に溶解し、100 mLに定容した。

(2) Dyeストック

Alcian Blue 8GX (Fluka) 約1 gを量り取り、18 M硫酸 20 μ Lと8 Mグアニジン塩酸 1 mLを加え、超純水で20 mLに定容した。それを50 mL遠心チューブに入れて遠心分離 (室温, 3000 \times rpm, 1分) して、上清を回収した。超純水で100倍にした際に、600 nmの吸光度が1.4以下であることを確認した。

(3) Reagent 1

10% TritonX-100 750 μ Lに18 M硫酸 20 μ Lを添加して、超純水で9.22 mLに定容した。

(4) Reagent A

8 Mグアニジン塩酸とReagent 1を1 : 1で混合した。

(5) Working dye

Dyeストック 250 μ Lに10% TritonX-100 125 μ Lと18 M硫酸 5 μ Lを添加して、超純水で4.62 mLに定容した。

2-3-2. アルシアンブルー法

1.5 mLチューブにサンプル10 μ LとReagentA 10 μ Lを加えて、よく混合した。そこにWorking dyeをサンプル溶液に100 μ L加えて混合し、室温で30分間静置した。遠心分離（室温，800 \times g，30分）して、沈殿が浮き上がる前に素早く上清を除去した。沈殿を8 Mグアニジン塩酸110 μ Lに溶解して、そのうち100 μ Lを使用してマイクロプレートリーダーで620 nmにおける吸光度を測定した。また、ヘパリンナトリウム（関東化学）を超純水にて0~100 μ g/mLに調製し、検量線の標準溶液として使用してHS量を算出した。

2-4 DNA 量の測定

2-4-1. 試薬の調製

(1) DNA 抽出バッファー (SDS-)

150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl(pH 8.0), 10 mM EDTA となるように調製した。

(2) Proteinase K

凍結乾燥粉末（ナカライテスク）を 20 mg/mL となるように滅菌水に溶解させ、これをストック溶液とし、-20 $^{\circ}$ Cで保存した。

2-4-2. DNA 量測定法

2-2-3 で回収した細胞懸濁液を-20 $^{\circ}$ Cから取り出し、解凍した。冷 PBS 500 mLを加えて懸濁させ、遠心分離（4 $^{\circ}$ C，5000 \times g，10分）を行い、細胞を沈殿させた。上清を除去し、沈殿した細胞に対してDNA抽出バッファー（SDS-）1 mLを加えて細胞を懸濁させた。そして、10% SDS を 10 μ L と 10 mg/mL リボヌクレアーゼ A（ナカライテスク）を 1 μ L 加え、37 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートした。次に、20 mg/mL Proteinase K を 5 μ L 加えて、ゆっくり上下反転して緩やかに混合し、50 $^{\circ}$ Cで一晩インキュベートした。等容の PCI（フェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール）（ナカライテスク）を加えて、30秒間ボルテックスした。その後、遠心分離（室温，2000 \times g，10分間）を行い、先端を切断して口径を大きくしたチップを用いて上層を回収し、新しいチューブに移した。下層に対して TE buffer, pH 8.0 を 200 μ L 加えて混合し、遠心分離（室温，2000 \times g，10分間）して得られた上清を先に回収した上清と混合した。上清 600 μ L に対して、3 M 酢酸ナトリウム 60 μ L，冷 2-プロパノール 660 μ L を加えて混合し、-20 $^{\circ}$ Cに1時間静置した。遠心分離（4 $^{\circ}$ C，16000 \times g，10分間）して得

られた沈殿に 70% エタノール 100 μ L を加えた。それを混合した後に、遠心分離 (4°C, 16000 \times g, 10 分間) を行い、上清を除去してからキムワイプ上にチューブを逆さまにして置き、自然乾燥させた。TE buffer, pH 8.0 を 300 μ L 加えてボルテックスし、4°Cで一晩放置した。260 nm および 280 nm における吸光度を測定し、OD 比 (A_{260}/A_{280}) から DNA の純度を測定した。また DNA は $1 A_{260} = 50 \mu\text{g/mL}$ という特徴を持つことにより、得られた吸光度から DNA 濃度を測定し、DNA 量を算出した。

2-5 HS の二糖組成分析

2-5-1. 二糖スタンダード

以下に示す二糖スタンダードを生化学工業より入手して、HPLC のスタンダードとして使用した。

Δ Di-0S : 2-acetoamido-2-deoxy-4-*O*-(4-deoxy- α -L-threo-hex-enopyranosyluronic acid)-D-glucose

Δ Di-NS : 2-deoxy-2-sulfamino-4-*O*-(4-deoxy- α -L-threo-hex-4-enopyranosyluronic acid)-D-glucose

Δ Di-6S : 2-acetoamido-2-deoxy-4-*O*-(4-deoxy- α -L-threo-hex-4-enopyranosyluronic acid)-6-*O*-sulfo-D-glucose

Δ Di-diS1 : 2-deoxy-2-sulfamino-(4-deoxy- α -L-threo-hex-4-enopyranosyluronic acid)-6-*O*-sulfo-D-glucose

Δ Di-diS2 :
2-deoxy-2-sulfamino-(4-deoxy-2-*O*-sulfo- α -L-threo-hex-4-enopyranosyluronic acid)-D-glucose

Δ Di-triS :
2-deoxy-2-sulfamino-(4-deoxy-2-*O*-sulfo- α -L-threo-hex-4-enopyranosyluronic acid)-6-*O*-sulfo-D-glucose

2-5-2. HS 分解酵素による HS の分解

2.2-6 で得られた精製 HS に 3 種類のヘパラン硫酸分解酵素 [ヘパリナーゼ (*Flavobacterium heparinum*, EC 4.2.2.7, 生化学工業), ヘパリチナーゼ I (*F. heparinum*, EC 4.2.2.8, 生化学工業), ヘパリチナーゼ II (*F. heparinum*, no number

assigned, 生化学工業)]を用いて, HS を二糖単位に分解した。酵素反応を行うためサンプルを Table 2 のように調製した。

Table 2 Composition of enzyme reaction solution

HS溶液		150.0	μL
1.0 M NaOAc, pH 7.0		10.0	μL
0.1 M CaOAc		10.0	μL
1 mU/mL heparinase		0.4	μL
1 mU/mL heparitinase I		0.4	μL
1 mU/mL heparitinase II		0.4	μL
超純水		48.8	μL

37℃で一晩反応させて, 2-2-4 の方法に従いフェノール・クロロホルム抽出を行った。得られた上清を遠心濃縮機(CC-105, TOMY)にて乾固させて, 16 mM リン酸二水素ナトリウム溶液 30 μL に溶解させた。

2-5-3. HPLC

脱気した超純水を流速 1.0 mL/min にて流路 D に約 1 時間流した。次いで, 脱気した 16 mM リン酸二水素ナトリウム溶液を流速 1.0 mL/min にて流路 D に約 1 時間流した。その後, 脱気した 538 mM リン酸二水素ナトリウム溶液をポンプに流して, ポンプが機能することを確認した。16 mM リン酸二水素ナトリウム溶液を流速 1.0 mL/min にて流路に流してポンプ内の 538 mM リン酸二水素ナトリウム溶液を流出させた。100 μL シリンジにとった超純水にてサンプル注入口を洗浄した。HS 二糖スタンダードまたはサンプルを 10 μL シリンジにとり, アミノプロピルカラム (YMC-Pack PA-G, ワイエムシー) を備えた HPLC によって分析した。HS の二糖組成分析は, UV 検出器として JASCO UV-2075 Plus (JASCO) を備えた JASCO PU-2089 Plus (JASCO) を使用して Table 3 に示したプログラムで行った。なお, クロマトグラムの記録およびピーク面積の算出には, クロマトグラム用データ処理ソフトウェアである Chromato-PRO (ランタイムインスツルメンツ) を用いた。なお, この方法は, Yoshida らの方法を参考にした (Yoshida K, et al., 1989)。

Table 3 HPLC condition

Column	YMC-Pack PA-G (250 mm × 4.6 mm)
UV sensor	UV-2074 Plus
送液ポンプ	PU-2089 Plus
解析ソフトウェア	ChromatoPRO
サンプル量	10 μ L
カラム温度	30°C
流速	1.0 mL/min
検出波長	232 nm
測定時間	45 min
溶媒	16 mM NaH ₂ PO ₄ , 538 mM NaH ₂ PO ₄

2-6 6-OSTs の mRNA 発現量測定

2-6-1. 試薬の調製

(1) DEPC 水

ドラフト内で、超純水 400 mL に DEPC (ナカライ) 400 μ L を加え、十分に混合させた。これを 37°C で 1 時間インキュベートし、一晩静置した。さらにオートクレーブを 2 回行った。

(2) 70%エタノール

99%エタノールに DEPC 水を加えて、70%に希釈した。

(3) 3M 酢酸ナトリウム

酢酸ナトリウムを超純水に溶解させ、0.1%の DEPC を加えて、2 回オートクレーブした。

(4) 1×TAE

Tris 121 g, 酢酸 28.55 mL, EDTA・2Na 3.715 g を超純水に溶解して、500 mL に定容した。これをオートクレーブして、50×TAE を調製した。これを超純水で 50 倍希釈して 1×TAE を調製した。

2-6-2. 細胞培養

L-M 細胞を 6 穴プレートに 1.6×10^5 個播種して、培地を 3 mL となるように

加え、37℃、5%CO₂条件下で3日間培養した。その後、アドレナリン含有培地に交換して、一定時間培養した。

2-6-3. RNA 精製

RNA 精製の工程は、クリーンベンチ内で行なった。クリーンベンチ内は、あらかじめ UV ランプを 30 分程度照射し、RNase Quit（ナカライテスク）とエタノールでよく拭いた。

アドレナリンを添加して一定時間培養したら、6 穴プレートを氷上に置き、10 分間静置した。その後、培地を除去し、1×PBS 1 mL を加えて洗浄した。PBS での洗浄は 2 回行った。PBS を取り除いた後、RNAiso Plus（タカラバイオ）を 1 つの well に対して 1.2 mL 加えた。20 回程度ピペッティングした後に 1.5 mL チューブに移して、室温で 5 分間静置した。クリーンベンチ内でクロロホルム 0.24 mL を加えて、乳白状になるまでよく振り混ぜ、遠心分離（4℃、12000×g、10 分）を行った。上層を回収して新しいチューブに移し、等量の 2-プロパノールを加えてよく混合した。室温で 10 分間静置した後に、遠心分離（4℃、12000×g、10 分）を行なった。上清を取り除き、70%冷エタノール 1 mL を加えて洗浄し、遠心分離（4℃、12000×g、10 分）を行った。上清を除去したチューブを逆さまにして、キムワイプの上に立てて室温で乾燥させた。その後に RNA を DEPC 水 43.5 μL に溶解させた。そこから 1.0 μL を別の 1.5 mL チューブに取り出し、電気泳動に用いる DNA 除去操作前のサンプルとした。残りの RNA 溶液 42.5 μL に対して、Table 4 のように調製して、37℃で 30 分間インキュベートした。

Table 4 Composition of DNase reaction

Total RNA	42.5	μL
10 × DNase I buffer	5.0	μL
DNase I (5 U/mL)	2.0	μL
RNase Inhibitor	0.5	μL

DEPC 水 350 mL と PCI 400 mL を加えて混合し、遠心分離（室温、12000×g、5 分）を行った。上清 400 μL を新しいチューブに回収し、クロロホルム 400 μL を加えて混合し、遠心分離（4℃、12000×g、10 分）を行った。上清 350 mL を新しいチューブに回収した後、3 M 酢酸ナトリウム 35 μL、2-プロパノール

385 μL 加えて、 -20°C で 1 時間以上静置した。その後、遠心分離 (4°C , $12000 \times g$, 10 分) を行い、上清を取り除いた。冷 70%エタノールを加えて洗浄し、遠心分離 (4°C , $12000 \times g$, 10 分) を行った。上清を除去した沈殿に DEPC 水を 20 μL 程度加えて溶解した。

2-6-4. RNA の純度測定

2-6-3 で精製した RNA 1.0 μL を用いて、260 nm および 280 nm における吸光度を測定した。その OD 比 (A_{260}/A_{280}) から、RNA の純度を測定した。

2-6-5. RNA の濃度測定

精製した RNA 1.0 μL を用いて 260 nm における吸光度を測定した。RNA は $A_{260}=40 \mu\text{g/mL}$ という特徴を持つことより、得られた吸光度から RNA 濃度を測定した。

2-6-6. RNA の電気泳動

まず、1.5%アガロースゲルを調製した。アガロース (関東化学) 0.6 g を三角フラスコに入れ、 $1 \times \text{TAE}$ 40 mL を加えた。三角フラスコの口の部分にラップをかけ、小さな穴を 2~3 箇所開けて電子レンジで加熱した。突沸する前に電子レンジを止めて、三角フラスコをよくかき混ぜてから、アガロースを完全に溶解させた。この溶液を適度に冷まして、0.44 mg/mL エチジウムブロマイド (ナカライテスク) を 1 滴加えて混合した。

電気泳動装置を準備し、コームを設置した泳動槽にアガロースゲルを流し込み、ゲルが固まるまで静置した。ゲルが固まったら、コームを垂直に抜き取った。 $1 \times \text{TAE}$ を泳動槽に流し込み、液の高さがゲルよりも 1~2 mm 上になるまで注いだ。2-6-3 で回収した DNA 除去前の RNA 又は精製 RNA の各 1.0 μL に $6 \times \text{Loading Buffer}$ (タカラバイオ) 1 μL と混合し、ゲルにアプライした。電気泳動は、定電圧 100 V, 30 分の条件で行なった。30 分後、イメージアナライザー LAS-3000 UV mini (富士フイルム) と Multi Gauge ソフトウェア (富士フイルム) により画像解析を行なった。

2-6-7. cDNA 合成

1.5 mL チューブに Table 5 に示した通りに反応溶液を調製した。cDNA 合成に使用する Total RNA 量は 1 μg としたため、DEPC 水と total RNA の合計量が

4.5 μL となるようにした。

Table 5 Reaction composition of cDNA synthesis

Oligo(dT)15 (10 pmol/ μL , TAKARA)		1.0 μL
5 \times RT buffer (TOYOBO)		4.0 μL
dNTPs (2.5 mM, TAKARA)		8.0 μL
Rever Tra Ace (100 U/mL, TAKARA)		1.0 μL
RNase Inhibitor (40 U/mL)		0.5 μL
DEPC水/Total RNA		4.5 μL

これを 42°C で 30 分間インキュベートし、99°C で 5 分間インキュベートして自然冷却させてから、-20°C で保存した。

2-6-8. RT-PCR

RT-PCR に使用したプライマーの塩基配列を Table 6 に示す。

Table 6 Sequences of primers for RT-PCR

GAPDH	5'Primer	5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'
GAPDH	3'Primer	5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'
6-OST-1	5'Primer	5'-CGCCCAGAAAGTTCTACTACATC-3'
6-OST-1	3'Primer	5'-GGTTGTTAGCCAGGTTATAGGG-3'
6-OST-2	5'Primer	5'-ACCTCTTTCTGCAAAGGTATCAG-3'
6-OST-2	3'Primer	5'-GTTCTGATTTGGGTAGGATTTG-3'
6-OST-3	5'Primer	5'-GGACATGCAGCTTTATGAGTATG-3'
6-OST-3	3'Primer	5'-GCTGTTGTAGTCCTCAGTGACAG-3'

サーマルサイクラーは iCycler (Bio-Rad) を使用した。PCR 反応チューブは、0.2 ml THIN-WALL TUBES (MJResearch) を使用した。

2-6-9. PCR 産物の電気泳動

まず、アガロースを 1 \times TAE に加えて加熱溶解し、エチジウムブロマイドを加えて 2.0%アガロースゲルを作製した。これを泳動槽に入れて、TAE を浸した。次に、PCR 産物 15 μL に、6 \times Loading Dye 3 μL を加えて混合した後、ゲルに 18 μL アプライした。分子量マーカーとして Low MW DNA Ladder (New England Biolabs) を 5 μL アプライして、100 V で 30 分間電気泳動を行った。

その後、イメージアナライザーLAS-3000 UV mini(富士フィルム)と Multi Gauge ソフトウェア(富士フィルム)により画像解析を行った。

2-6-10. real time RT-PCR

機器は、リアルタイム定量 PCR ABI Step One Plus (Applied Biosystems) を使用した。リアルタイム RT-PCR 用のマイクロチューブは、Fast Reaction Tube With Cap (Applied Biosystems) を使用した。測定には、FAST SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) または THUNDERBIRD qPCR Mix (Toyobo) を使用した。

リアルタイム RT-PCR の Run method については、Table 7 のように設定し、サイクル数は 40 cycles とした。また、蛍光データ回収ポイントは、extend 時とした。データ解析ソフトは、StepOne Software v2.2.2 を使用した。

遺伝子の発現量の結果は、比較 C_T 法 ($\Delta\Delta C_T$ 法) による相対定量で算出した。 $\Delta\Delta C_T$ 法とは、基準としたサンプルとの C_T 値(Threshold Cycle)の差から相対値を求める相対定量法である。ターゲットの値を内在性コントロールの値で補正を行い、さらに基準にするサンプルとの相対値を算出する。この比較 C_T 法を用いて相対定量を行なうためには、PCR 増幅効率がほぼ 100%であるという条件を満たしている必要がある。そのためには、RT-PCR により、目的の遺伝子が単一に増幅していることを確かめておく必要がある。この条件を満たしていれば、 $\Delta\Delta C_T$ 法は、mRNA の発現レベルをサンプル間で比較する場合に適した定量法である。 $\Delta\Delta C_T$ 法では、以下の計算により相対値の算出を行った。

C_T 値と初期量及びその C_T での PCR 産物量の間には、 C_T での PCR 産物量 = 初期量 $\times 2^{C_T}$ という関係式が成り立つ。まず、 ΔC_T 値=ターゲットの C_T 値-内在性コントロールの C_T 値という計算により、ターゲットの C_T 値を内在性コントロールの C_T 値で補正した。次に $\Delta\Delta C_T$ 値=ターゲットの ΔC_T 値-キャリブレーター(基準にするサンプル)の ΔC_T 値という計算により、基準にするサンプル(キャリブレーター)との ΔC_T 値の差を算出した。そして、相対値= $2^{-\Delta\Delta C_T}$ という計算式から相対値を求めた。 C_T 値は Threshold が 0.2 となるサイクル数とした。なお、Table 7 の anneal 温度は、2-6-8 にて条件検討した結果の最適温度を各遺伝子について適用した。6-OST-1 と GAPDH の anneal 温度は 62℃とした。

Table 7 Reaction condition of real-time RT-PCR

		temperature	time
Holding Stage		98 °C	30 sec
Cycling Stage	hot start	98 °C	20 sec
	denature	98 °C	10 sec
	anneal	62 °C	15 sec
	extend	72 °C	20 sec
Melting Curve Stage	step1	95 °C	15 sec
	step2	60 °C	60 sec
	↓	+ 0.3 °C	
	step3	95 °C	15 sec

2-7 アドレナリン受容体阻害剤による 6-OST-1 発現の阻害実験

2-7-1. 実験材料

アドレナリン受容体阻害剤として、以下の 4 種を用いた。

(1) Nicergoline (α 1, 2 アドレナリン受容体阻害剤, Sigma-Aldrich)

Nicergoline 4.84 mg を DMSO 200 μ L に溶解させて、0.22 μ m フィルターで濾過をして、50 mM のストックを調製した。

(2) Propranolol hydrochloride (β 1, 2 アドレナリン受容体阻害剤, 東京化成工業)

Propranolol hydrochloride 14.79 mg を滅菌水 1 mL に溶解し、0.22 μ m フィルターで濾過をして、50 mM のストックを調製した。

(3) ICI 118,551 hydrochloride (β 2 アドレナリン受容体阻害剤, Santa Cruz Biotechnology)

ICI 118,551 hydrochloride (以下, ICI 118,551 と省略) 4.43 mg を滅菌水 1412 μ L に溶解させて、0.22 μ m フィルターで濾過をして、10 mM のストックを調製した。

(4) L-748,337 (β 3 アドレナリン受容体阻害剤, Tocris Bioscience)

L-748,337 3.89 mg を DMSO 781.7 μ L に溶解させて、0.22 μ m フィルターで濾

過をして、10 mM のストックを調製した。

2-7-2. 細胞培養

L-M 細胞を 6 穴プレートに 1.6×10^5 個播種して、培地を 3 mL となるように加え、37°C、5% CO₂ 条件下で、3 日間培養した。各アドレナリン受容体阻害剤を添加して、2 時間培養した後に、0.20 mM アドレナリン含有培地または通常培地に交換して 1.5 時間培養した。

2-7-3. RNA の精製

第 2 章，第 2 節，2-6-3 と同様に実施した。

2-7-4. RNA の純度測定

第 2 章，第 2 節，2-6-4 と同様に実施した。

2-7-5. RNA の濃度測定

第 2 章，第 2 節，2-6-5 と同様に実施した。

2-7-6. RNA の電気泳動

第 2 章，第 2 節，2-6-6 と同様に実施した。

2-7-7. cDNA 合成

第 2 章，第 2 節，2-6-7 と同様に実施した。

2-7-8. RT-PCR

第 2 章，第 2 節，2-6-8 と同様に実施した。

2-7-9. PCR 産物の電気泳動

第 2 章，第 2 節，2-6-9 と同様に実施した。

2-7-10. real time RT-PCR

第 2 章，第 2 節，2-6-10 と同様に実施した。

2-8 シグナル伝達阻害剤を用いた 6-OST-1 の阻害実験

2-8-1. 実験材料

シグナル伝達経路の阻害剤として，以下の 2 種を用いた。

(1) PP2 (c-Src 阻害剤, Calbiochem)

PP2 5 mg を DMSO 1655 μL に溶解させて，0.22 μm フィルターで濾過をして，10 mM のストックを調製した。

(2) FR180204 (ERK1/2 阻害剤, Calbiochem)

FR180204 1 mg を DMSO 305.5 μL に溶解し，0.22 μm フィルターで濾過をして，10 mM のストックを調製した。

2-8-2. 細胞培養

L-M 細胞を 6 穴プレートに 1.6×10^5 個播種して，培地を 3 mL となるように加え，37°C，5% CO_2 条件下で 3 日間培養した。PP2 または FR180204 を添加して，2 時間培養した後に，0.20 mM アドレナリン含有培地または通常培地に交換して 1.5 時間培養した。

2-8-3. RNA の精製

第 2 章，第 2 節，2-6-3 と同様に実施した。

2-8-4. RNA の純度測定

第 2 章，第 2 節，2-6-4 と同様に実施した。

2-8-5. RNA の濃度測定

第 2 章，第 2 節，2-6-5 と同様に実施した。

2-8-6. RNA の電気泳動

第 2 章，第 2 節，2-6-6 と同様に実施した。

2-8-7. cDNA 合成

第 2 章，第 2 節，2-6-7 と同様に実施した。

2-8-8. RT-PCR

第2章，第2節，2-6-8と同様に実施した。

2-8-9. PCR産物の電気泳動

第2章，第2節，2-6-9と同様に実施した。

2-8-10. real time RT-PCR

第2章，第2節，2-6-10と同様に実施した

2-9 ウェスタンブロッティング

2-9-1. 細胞培養

L-M細胞を75 cm² フラスコに 10.5×10^5 個播種して，培地を10 mL となるように加えた。37℃，5% CO₂ 条件下で，3日間培養した。

2-9-2. 試薬の調製

(1) 細胞溶解バッファー

1 M Tris-HCl (pH 7.4) 2 mL と 0.5 M EDTA 0.2 mL を滅菌水で100 mL に定容して，オートクレーブした。

(2) SDS 化サンプルバッファー (×2)

40 mM Tris-HCl (pH 6.8) 2.5 mL と 10% SDS 1.0 mL，グリセロール（ナカライテスク）2.0 mL，EDTA-2Na・2H₂O（ナカライテスク）18.6 mg，ブロモフェノールブルー約1.0 mg，超純水4.0 mL を混合して，室温で保存した。使用直前に，SDS 化サンプルバッファーと 2-メルカプトエタノール（sigma）を19：1の割合で混合した。

2-9-3. タンパク質回収

フラスコを氷上で10分静置した後，培地を全量除去して冷PBSでの洗浄操作を2回行った。その後，プロテアーゼインヒビターカクテル（ナカライテスク）を加えた細胞溶解バッファー1 mL をフラスコに添加し，セルスクレイパーで細胞を掻きとり，1.5 mL マイクロチューブに回収した。それを氷上に置

き、超音波破碎機 (TAITEC, UltraS Homoginizer, VP-55) を用いてホモジナイズした。ホモジナイズは、5 秒間の超音波処理後に 30 秒間静置する操作を 5 回繰り返した。超音波処理したサンプルを遠心 (4°C, 800×g, 10 分) し、上清を回収した。これをさらに遠心 (4°C, 20000×g, 60 分) して、沈殿を回収した。沈殿を細胞溶解バッファーに懸濁して、膜タンパク質溶液とした。細胞膜タンパク質を回収する方法は、Chernogubova らの方法を参考にした (Chernogubova E, et al., 2005)。

2-9-4. BCA 法によるタンパク質濃度測定

BCA (bicinchonic acid) 法は、アルカリ性の溶液において、ペプチド結合および特定アミノ酸残基 (Cys, Cys-Cys, Trp, Tyr) によって 2 価銅イオン (Cu^{2+}) が還元されて生じる 1 価銅イオン (Cu^+) と二分子の BCA が反応して、562 nm に最大吸光度を有する複合体を形成することに基づく (Smith P K, et al., 1985; Wiechelman K J, et al., 1988)。実際の測定には、BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いた。付属マニュアルに従い、濃度既知の牛血清アルブミン (BSA) より作成した検量線との比較により、サンプルのタンパク質濃度を求めた。具体的には、標準溶液またはサンプルの 25 μL に、Protein Assay Reagent A 液と B 液を 50:1 で混合した Working Reagent 200 μL を加えて、37°C で 30 分間加温した。その後、540 nm の吸光度を測定した。

2-9-5. サンプルの SDS 化

SDS 化サンプルバッファーと膜タンパク質溶液を等量混合して、ボルテックスミキサーで攪拌後に、沸騰浴中で 5 分間加熱処理した。

2-9-6. ポリアクリルアミドゲルの作成

本実験では、試料の分離を目的とした分離ゲルの上に試料の濃縮を目的とした濃縮ゲルを重層したスラブゲルを使用した。分離ゲルおよび濃縮ゲルのアクリルアミド濃度は、それぞれ 10%と 4%に設定した。

(1) 試薬の調製

A 溶液 : 30%アクリルアミド溶液

アクリルアミド (モノマー, ナカライテスク) 29.2 g と *N, N'*-メチレンビスアクリルアミド (ナカライテスク) 0.8 g を超純水に溶解して 100 mL に定容し

た。濾過後，使用まで 4℃にて遮光保存した。

B 溶液（分離ゲル緩衝液）：1.5 M Tris-HCl バッファー（pH 8.8）

Tris (hydroxymethyl) aminomethane（以下 Tris と呼ぶ，ナカライテスク）18.15 g を超純水に溶解し，HCl で pH 8.8 に調整後，100 mL に定容した。濾過後，使用まで 4℃にて保存した。

C 溶液（濃縮ゲル緩衝液）：0.5 M Tris-HCl バッファー（pH 6.8）

Tris 6.06 g を超純水に溶解し，HCl で pH 6.8 に調整後，100 mL に定容した。濾過後，使用まで 4℃にて保存した。

D 溶液：10%過硫酸アンモニウム溶液

過硫酸アンモニウム（ナカライテスク）100 mg を超純水 1 mL に溶解した。用事調製とした。

10% SDS

Sodium Dodecyl Sulfate（SDS，BIO-RAD）5 g を超純水 5 mL に溶解した。

水飽和イソブタノール

2-Methyl-propanol に適量の超純水を加えて常温で保存した。使用直前によく混合して，分離した上清を使用した。

（2）分離ゲルの作成（2 枚）

ゲルの作成に用いる試薬を全て室温に戻し，用いる器具を全てメタノールで拭いた。ガラス板の大小を重ねてゲルカセットに固定し，ガラス板の間に蒸留水を注ぎ，10 分静置しても水漏れがないことを確認し，注いだ蒸留水を捨てた。A 溶液 4.0 mL，B 溶液 3.0 mL，10% SDS 0.12 mL，超純水 4.9 mL を 50 mL 遠心チューブに注ぎ，減圧下で 15 分間脱気した。次いで，D 溶液 60 μ L と TEMED（ナカライテスク）6 μ L を加えて混合した。それを，ガラス板の中央から流し込み，その上部に水飽和イソブタノール約 100 μ L を静かに重層して，1 時間ほど静置してアクリルアミドを重合化させた。

（3）濃縮ゲルの作成（2 枚）

A 溶液 0.4 mL, C 溶液 1.0 mL, 10% SDS 0.04 mL, 超純水 2.6 mL を 50 mL 遠心チューブに注ぎ, 減圧下で 15 分間脱気した。次いで, D 溶液 20 μ L と TEMED (ナカライテスク) 4 μ L を加えて混合した。それを, 水飽和イソブタノールを超純水で除去した分離ゲルの上に重層して, サンプルコームを差し込んだ。ゲルの形成を確認後にサンプルコームを抜き取り, 使用まで超純水中で保存した。

2-9-7. 電気泳動

(1) 試薬の調製

泳動バッファー

グリシン (BIO-RAD) 14.4 g, Tris 3 g, SDS (BIO-RAD) 1 g を 1 L の超純水に溶解し, よく混合した。

(2) 電気泳動

泳動バッファーを満たした泳動槽 (ミニプロティアン 3, BIO-RAD) にスラブゲルを設置して, ウェル内を洗浄した後に, SDS 化サンプルを適量アプライした。なお, 分子量マーカーには, Precision Plus Protein Standards (BIO-RAD) を使用した。その後, 室温, 20 mA 定流の条件にて, 泳動先端 (プロモフェノールブルー) がゲル下端付近に到来するまで泳動を行った。

2-9-8. ウェスタンブロット

(1) 試薬の調製

転写バッファー

グリシン (Sigma) 14.4 g, Tris 3.6 g を超純水に溶解させて, メタノール 40 mL を加えた後に超純水で 800 mL に定容した。使用まで 4°C にて保存した。なお, 条件検討の結果, 本実験のメタノール濃度は 10% とした。

20% Tween 20

Tween 20 (BIO-RAD) 20 g を超純水に溶解後, 100 mL に定容した。

TBST ($\times 10$)

Tris 6.057 g と NaCl 45 g を超純水に溶解後, HCl で pH 7.4 に調整した。そこに 20% Tween 20 を 25 mL 加えて 500 mL に定容した。これをストック液とし

て、4℃で冷蔵保存した。

1% BSA/TBST (ブロッキングバッファー)

BSA (Roche) 0.3 g を TBST 30 mL に溶解させて、フィルター (Pore Size 0.22 μm) で濾過を行った。

0.2% BSA/TBST (抗体希釈バッファー)

BSA (Roche) 0.02 g を TBST 10 mL に溶解させて、フィルター (Pore Size 0.22 μm) で濾過を行った。

CBB 染色液

CBB 0.5 g, メタノール 225 mL, 酢酸 50 mL を超純水で 500 mL に定容した。

CBB 脱色液

メタノール 225 mL, 酢酸 35 mL を超純水で 500 mL に定容した。

(2) 膜転写

電気泳動にて分離した試料タンパク質の膜への転写は、ウェット式ミニトランスブロットセル (BIO-RAD) 付属のマニュアルに従い行った。

まずは、タッパーに PVDF 膜 (MILLIPORE) を入れて、メタノールに浸して活性化させた。超純水で洗浄後に転写バッファーに浸して、10 分以上振盪させた。また、スポンジ 2 枚とろ紙 2 枚を 1 個のタッパーに入れて、転写バッファーに浸して、10 分以上振盪させた。

電気泳動後に、ガラス板のショートプレートを外して濃縮ゲルを削り取り、泳動バッファーを入れたタッパーに分離ゲルを浸した。これを 10 分以上振盪させた。

メタノールで拭いたバットに転写バッファーを入れて、ゲルホルダーの黒を下にして、スポンジ、ろ紙、ゲル、PVDF 膜、ろ紙、スポンジの順に重ね、ブロットローラーを用いて空気を抜いた。ゲルホルダーで固定して、トランスブロットセルに設置した。また、冷却槽に氷を詰めて、トランスブロットセルに設置した。スターラー上にスターラーバーを入れたトランスブロットセルを置き、バットの転写バッファーを注ぎ入れて、室温、200 mA 定流にて 1 時間通電した。

ゲルホルダーの白を下にして、スポンジとろ紙を丁寧にはがし、鉛筆でゲルの位置がわかるように印をつけ、転写面がわかるように転写面に「上」と表記した。分子量マーカーのレーンは切り離して乾燥させた。また、転写後のポリアクリルアミドゲルを CBB 染色液に浸して、10 分間浸漬した。その後、CBB 脱色液に浸して一晩浸漬して、転写効率を確認した。

(3) 転写タンパク質の検出

目的タンパク質の検出は、タンパク質免疫検出装置 SNAP id (MILLIPORE) の説明書に従った。すなわち、SNAP i.d 装置を水平な卓上に置き、バキュームチューブ端の結合部分を装置本体の後ろにあるクイックディスコネクトフイッテングに差し込んだ。チューブのもう一方の端は、吸引源に接続した。次いで、ブロットホルダーの蓋を開けて、内側の白い表面が灰色になるまで超純水で濡らした。PVDF 膜のタンパク質を転写した面が白い表面と接するようにブロットホルダーの中央に置き、ブロットティングメンブレンをのせてブロットホルダーで気泡を取り除いた。ブロットホルダーのふたを閉めて、SNAP i.d.装置にブロットホルダーを設置した。ブロッキングバッファを 30 mL 流してすぐに吸引した。その後ブロットホルダーが完全に空になったら、抗体希釈バッファで 300 倍に希釈した抗 β 3 アドレナリン受容体抗体 (M20, Santa Cruz Biotechnology) 1 mL を添加して、15 分間反応させた。その後吸引して、ブロットホルダーが完全に空になったら吸引を ON のまま 1×TBST 30 mL で 3 回洗浄した。吸引を OFF にし、抗体希釈バッファで 2000 倍に希釈した HRP-conjugated rabbit anti-goat IgG heavy and light chain secondary antibody (Bethyl Laboratories) 1 mL を添加し、15 分反応させた。その後吸引し、ブロットホルダーが完全に空になったら吸引を ON のまま TBST 30 mL で 3 回洗浄した。

ブロットホルダーを装置から取り出し、PVDF 膜を取り出し、二辺を展開したビニール袋の上におき、シーラーを用いて PVDF 膜が筒状になるようにビニール袋を接着した。膜全体に ImmobilonTM Western Chemiluminescent HRP Substrate (Merck Millipore) がいきわたる量を添加し、イメージアナライザー LAS-3000 UV mini (富士フイルム) と Multi Gauge ソフトウェア (富士フイルム) により画像解析を行った。その後、泳動マーカーを画像化させて、Photoshop にて合成して、目的タンパク質の分子量を確認した。

2-10 Phostag ウェスタンブロッティング

2-10-1. 細胞培養

L-M 細胞を 6 well プレートに 1.6×10^5 個播種して、培地を 3 mL となるように加え、37°C, 5% CO₂ 条件下で 3 日間培養した。0.20 mM アドレナリン含有培地に交換して、0 (コントロール), 5, 10, 20, 30, 40, 60 分間培養した。

2-10-2. サンプル調製

(1) タンパク質回収

第 2 章, 第 2 節, 2-9-3 と同様に実施した。

(2) BCA 法によるタンパク質濃度測定

第 2 章, 第 2 節, 2-9-4 と同様に実施した。

(3) サンプルの SDS 化

第 2 章, 第 2 節, 2-9-5 と同様に実施した。

2-10-3. Phostag 含有ポリアクリルアミドゲルの作成

本実験では, Kinoshita らの方法に基づき, Phostag 含有ポリアクリルアミドゲルを作成した (Kinoshita E, et al., 2011)。分離ゲルおよび濃縮ゲルのアクリルアミド濃度は, それぞれ 12% と 4% に設定した。

(1) 試薬の調製

A 溶液 : 30% アクリルアミド溶液

第 2 章, 第 2 節, 2-9-6 (1) と同様に調製した。

D 溶液 : 10% 過硫酸アンモニウム溶液

第 2 章, 第 2 節, 2-9-6 (1) と同様に調製した。

2 M Bis Tris-HCl (pH 6.8)

Bis Tris (同仁堂) 41.85 g を超純水に溶解させて, HCl で pH を 6.8 に調整した。これを超純水にて 100 mL に定容した。

10 mM $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$

$\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ 148.74 mg を超純水に溶解させて，50 mL に定容した。

5.0 mM Phostag

Phostag (和光) 2.0 mg を特級メタノール 20 μL に溶解させた。そこに超純水 640 μL を加えて混合した。これをアルミホイルで遮光して，4°Cで保存した。

水飽和イソブタノール

第2章，第2節，2-9-6 (1)と同様に調製した。

(2) 分離ゲルの作成 (1 枚)

ゲルの作成に用いる試薬を全て室温に戻し，用いる器具を全てメタノールで拭いた。ガラス板の大きさを重ねてゲルカセットに固定し，ガラス板の間に蒸留水を注ぎ，10 分静置しても水漏れがないことを確認し，注いだ蒸留水を捨てた。A 溶液 2.4 mL，2M Bis Tris-HCl (pH 6.8) 1.07 mL，超純水 2.45 mL を 50 mL 遠心チューブに注ぎ，減圧下で 15 分間脱気した。次いで，5.0 mM Phostag 24 μL と 10 mM $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ 24 μL を加えて混合した。そこに D 溶液 30 μL と TEMED (ナカライテスク) 3 μL を加えて混合した。それを，ガラス板の中央から流し込み，その上部に水飽和イソブタノール約 100 μL を静かに重層して，1 時間ほど静置してアクリルアミドを重合化させた。

(3) 濃縮ゲルの作成 (1 枚)

A 溶液 0.33 mL，2 M Bis Tris-HCl (pH 6.8) 0.45 mL，超純水 1.71 mL を 50 mL 遠心チューブに注ぎ，減圧下で 15 分間脱気した。次いで，D 溶液 12.5 μL と TEMED (ナカライテスク) 2.5 μL を加えて混合した。それを，水飽和イソブタノールを超純水で除去した分離ゲルの上に重層して，サンプルコームを差し込んだ。ゲルの形成を確認後にサンプルコームを抜き取り，使用まで超純水中で保存した。なお，Phostag ゲルは長期保存ができないので，Phostag ゲルは作成した当日または次の日に使用した。

2-10-4. 電気泳動

(1) 試薬の調製

泳動バッファー

Tris 6.06 g, SDS 0.5 g, MOPS (ナカライテスク) 10.46 g, 亜硫酸水素 Na 0.26 g を超純水に溶解して、500 mL に定容した。

(2) 電気泳動

第2章, 第2節, 2-9-7と同様に実施した。なお, 2-9-7と異なり, 分子量マーカーはアプライせず, さらに SDS 化サンプルをアプライしないウェルにはサンプルバッファーをアプライした。

2-10-5. ウェスタンブロット

(1) 試薬の調製

Zn 除去バッファー

グリシン 3.6 g と Tris 0.76 g を超純水に溶解させて、500 mM EDTA 4 mL とメタノール 10 mL を加えた後に、200 mL に定容した。

その他の試薬は、第2章, 第2節, 2-9-8と同様に調製した

(2) 膜転写

電気泳動後に、Zn 除去バッファーにゲルを浸して、10 分間振盪した。この操作を3回繰り返した。その後は、第2章, 第2節, 2-9-8 (2)と同様に実施した。

(3) 転写タンパク質の検出

第2章, 第2節, 2-9-8 (3)と同様に実施した。なお, 一次抗体として抗 ERK1/2 抗体 (137F5, Cell Signaling Technology), 二次抗体として ECL peroxidase-labelled anti-rabbit IgG secondary antibody (GE Healthcare) を使用して, それぞれ 300 倍と 3000 倍に希釈した。

2-11 ERK1/2 阻害剤を用いた HS 構造変化の阻害実験

2-11-1. 実験材料

FR180204 (ERK1/2 阻害剤, Calbiochem)

2-11-2. 細胞培養

L-M 細胞を 75cm² フラスコに 10.5×10^5 個播種して、培地を 10 mL となるように加えた。37°C, 5% CO₂ 条件下で、3 日間培養した。20 μ M FR180204 を添加して 2 時間培養した後に、0.20 mM アドレナリン含有培地または通常培地に交換して 3 時間培養した。

2-11-3. HS の精製

第 2 章, 第 2 節, 2-2 と同様に実施した。

2-11-4. HS の二糖組成分析

第 2 章, 第 2 節, 2-5 と同様に実施した。

2-12 表面プラズモン共鳴を用いた HS と NGF の相互作用測定

Surface Plasmon Resonance (SPR) を利用した分子間相互作用解析システムとして BIAcore J (GEHealthcare) を用いた。BIAcore システムはリガンドとアナライトの相互作用をリアルタイムに測定できる。

溶媒とセンサーチップは室温に戻してから使用した。結合実験の際は室温を一定にし、BIAcore の温度は 25°C に設定した。ランニング緩衝液は HBS-EP buffer (GE Healthcare) を用いた。結合量の測定はアナライトのインジェクトが終了してから 10 秒後とした。また、再生溶液は必要に応じて 1 M NaCl/HBS-EP buffer, 2 M NaCl/HBS-EP buffer を用いた。再生溶液の添加は 1 回に 1 分として、結合したアナライトが十分に除去されたと確認できるまで繰り返し再生溶液を添加した。結果は Resonance Unit (RU) として表示され、測定後のデータ解析は BIAevaluation ソフトウェア (GE Healthcare) により行った。

2-12-1. 細胞培養

L-M 細胞を 75cm² フラスコに 10.5×10^5 個播種して、培地を 10 mL となるように加えた。37°C, 5% CO₂ 条件下で、3 日間培養した。0.20 mM アドレナリン含有培地または通常培地に交換して 6 時間培養した。

2-12-2. HS の精製

第 2 章，第 2 節，2-2 と同様に実施した。なお，アドレナリンで刺激した細胞から精製した HS を aHS として，アドレナリンで刺激しない細胞から回収した HS を cHS とした。

2-12-3. HS と NGF の相互作用測定

センサーチップは，当研究室において 2009 年に作成された抗 NGF 抗体固定化チップを使用した。抗 NGF 抗体 (sc-549; Santa Cruz Biotechnology) 固定化チップに対して 0.77 μ M NGF (mNGF 2.5 S; Alomone Labs)，0.77 μ M NGF と 0.77 μ M cHS の混合物，または 0.77 μ M NGF と 0.77 μ M aHS の混合物を添加した際のセンサーグラムを比較した。なお，HS のモル濃度は，HS の分子量を 20,000 と仮定して算出した。

2-13 NGF が 6-OST-1 発現に与える影響

2-13-1 細胞培養

L-M 細胞を 6 well プレートに 1.6×10^5 個播種して，培地を 3 mL となるように加え，37°C，5% CO₂ 条件下で 3 日間培養した。0 (コントロール)，20，100，200，または 400 pM NGF 含有培地に交換して，1.5 時間培養した。

2-13-2. RNA の精製

第 2 章，第 2 節，2-6-3 と同様に実施した。

2-13-3. RNA の純度測定

第 2 章，第 2 節，2-6-4 と同様に実施した。

2-13-4. RNA の濃度測定

第 2 章，第 2 節，2-6-5 と同様に実施した。

2-13-5. RNA の電気泳動

第 2 章，第 2 節，2-6-6 と同様に実施した。

2-13-6. cDNA 合成

第 2 章，第 2 節，2-6-7 と同様に実施した。

2-13-7. RT-PCR

第 2 章，第 2 節，2-6-8 と同様に実施した。

2-13-8. PCR 産物の電気泳動

第 2 章，第 2 節，2-6-9 と同様に実施した。

2-13-9. real time RT-PCR

第 2 章，第 2 節，2-6-10 と同様に実施した

第3節 結果

3-1 L-M 細胞表面 HS の硫酸化構造にアドレナリンが与える影響

当研究室のこれまでの研究により、L-M 細胞にアドレナリンを与えた 24 時間後に、細胞表面 HS の硫酸化構造が変化することが示唆された（西田，2005；永見，2009）。そこで、L-M 細胞表面 HS の硫酸化構造にアドレナリンが与える影響を明確にするために、アドレナリンを与えた 6 時間後の細胞表面 HS の構造を、アドレナリンを与えないコントロールと比較した。HS 定量の際に回収した HS を酵素で二糖単位に分解し、糖類の分離に多用されるカラムを装着した HPLC を用いて二糖の割合を分析した。HPLC で分離した各二糖は、二糖のスタンダードの溶出時間と比較することにより同定した（Fig. 2-1）。その結果、アドレナリンを与えると、細胞表面 HS の硫酸化構造が変化することが明らかとなった。つまり、アドレナリンによって、HS の二糖組成は、6 位硫酸化二糖(Δ Di-6S)の割合が 15%から 30%へ増加し、一方で非硫酸化二糖(Δ Di-0S)の割合が 55%から 35%へ減少することを発見した（Fig. 2-2）。また、0.01 mM のアドレナリンは、硫酸化構造を変化させないことも明らかとなった。

また、アドレナリンを添加した 3 時間後の L-M 細胞から HS を精製して、二糖組成分析を行った（Fig. 2-3）。その結果、アドレナリンを添加しないコントロールの HS は、主に非硫酸化二糖（ Δ Di-0S，約 45%）と 6 位硫酸化二糖(Δ Di-6S，約 27%)で構成されていた。N 位硫酸化二糖（ Δ Di-NS）と N 位と C 6 位硫酸化二糖（ Δ Di-diS1）の割合は低かった。0.05 mM のアドレナリンを添加しても、二糖組成は変化しなかったが、0.10 mM と 0.20 mM のアドレナリンを添加すると、 Δ Di-0S の割合がそれぞれ約 37%と 29%に減少した。さらに、 Δ Di-6S の割合は、0.10 mM と 0.20 mM のアドレナリンを添加により、約 31%と 35%に増加した。0.10 mM と 0.20 mM のアドレナリンを添加しても、その他の二糖の割合は変化しなかった。

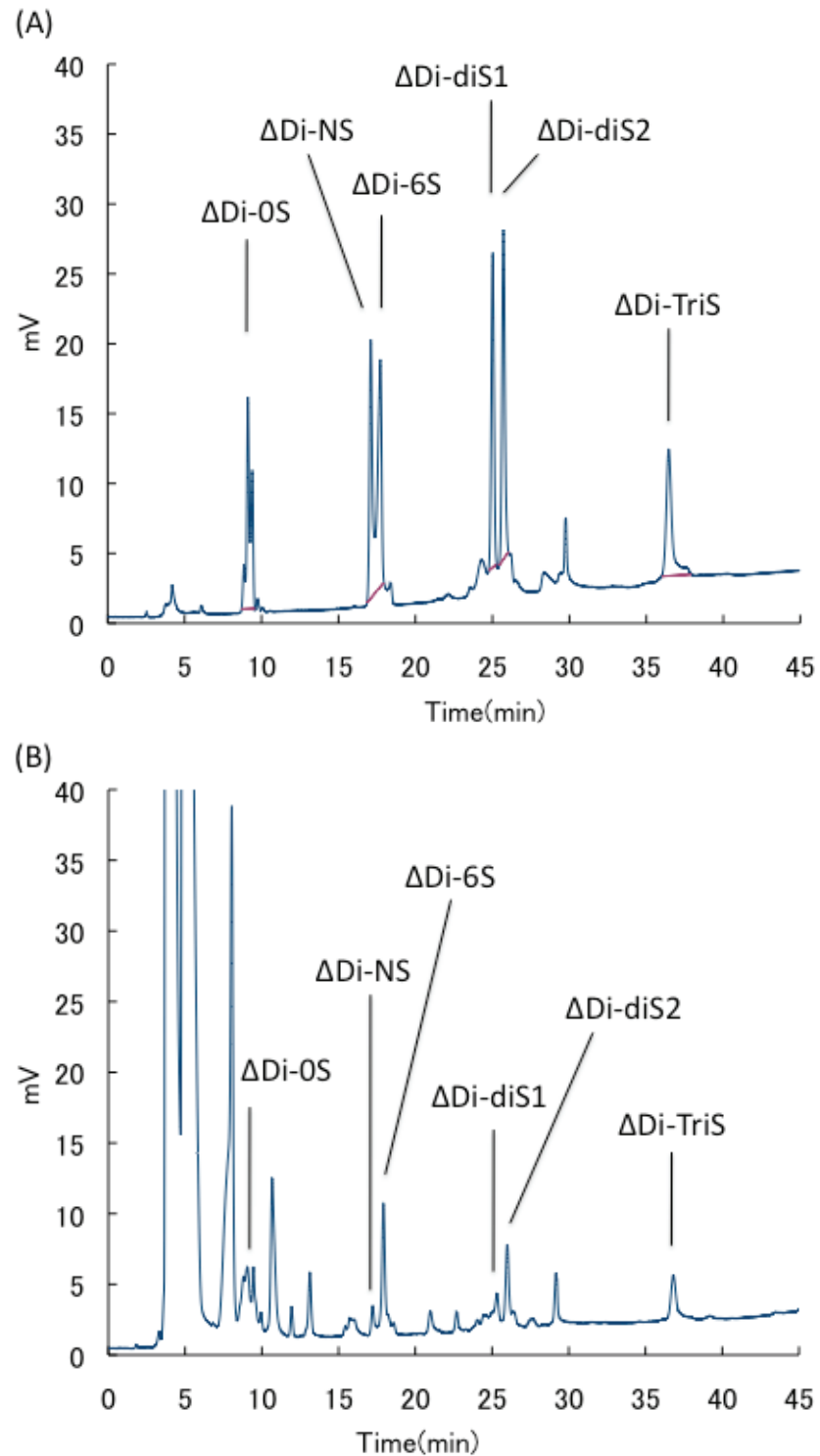


Fig. 2-1 二糖単位に分解した HS の HPLC 分析

HS 二糖スタンダード (A) または 0.10 mM アドレナリン添加 6 時間後の HS (B) を YMC-Pack NH₂PA カラムに供して、16 mM から 538 mM リン酸二水素ナトリウムを用いたグラジエント溶出を行った。

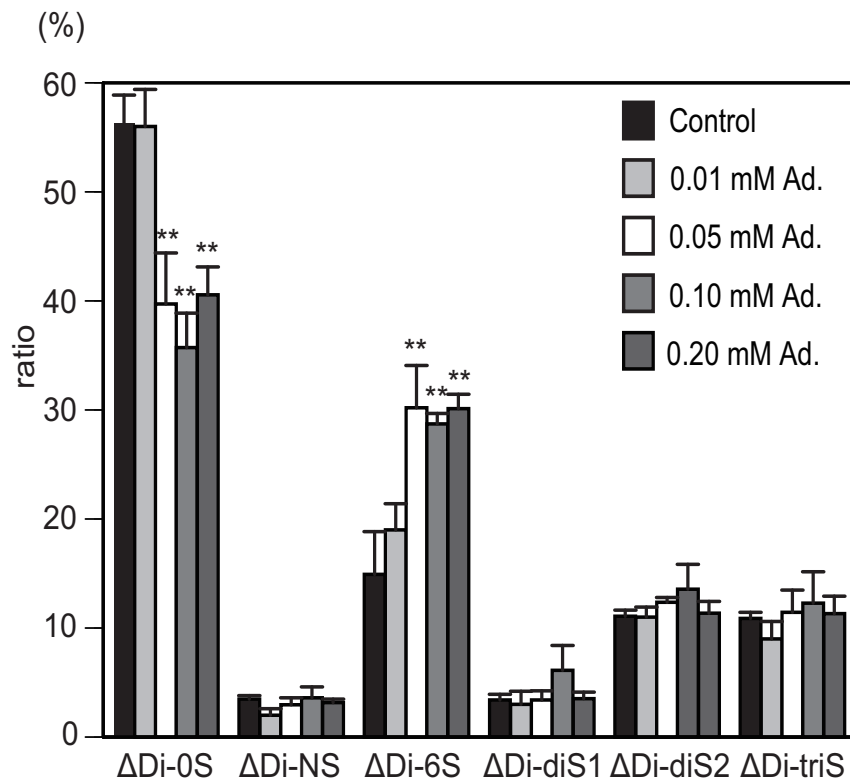


Fig. 2-2 アドレナリン添加 6 時間後の L-M 細胞表面 HS の二糖組成

アドレナリン含有培地またはコントロール培地を L-M 細胞に添加して, 6 時間培養した。その後, 細胞表面 HS を回収して, HS 分解酵素によって二糖単位に分解してから, HPLC を用いて各二糖の割合を算出した。得られた値 (%) はアークサイン変換を行い, Tukey 法を用いて統計分析を行った。*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$ 図中の 0.01 mM Ad.等は, 添加したアドレナリンの濃度を示す。

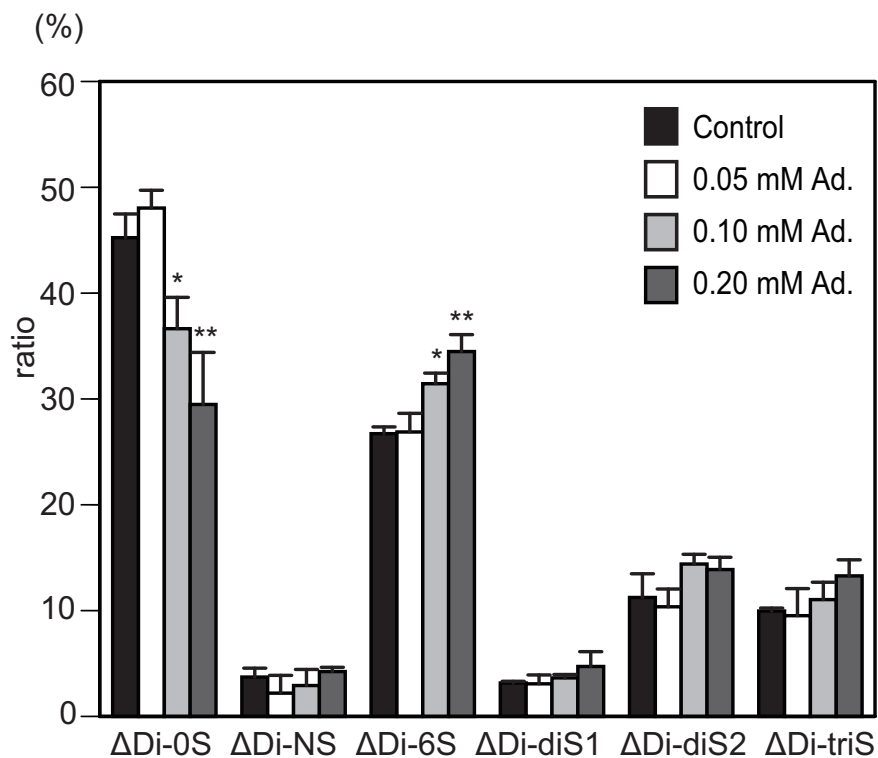


Fig. 2-3 アドレナリン添加 3 時間後の L-M 細胞表面 HS の二糖組成

アドレナリン含有培地またはコントロール培地をL-M細胞に添加して、6時間培養した。その後、細胞表面HSを回収して、HS分解酵素によって二糖単位に分解してから、HPLCを用いて各二糖の割合を算出した。得られた値(%)はアークサイン変換を行い、Tukey法を用いて統計分析を行った。*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$ 図中の0.01 mM Ad.等は、添加したアドレナリンの濃度を示す。

3-2 L-M 細胞表面の HS 量にアドレナリンが与える影響

アドレナリンが L-M 細胞表面の HS 量に与える影響を調べるために、アドレナリンを与えた 6 時間後の細胞表面 HS 量を、アドレナリンを与えないコントロールと比較した。L-M 細胞からトリプシン処理によって切り離した細胞表面の糖鎖を精製することにより HS を回収し、HS などの硫酸化糖鎖を特異的に染色する色素(Alcian Blue)で染色することにより、HS 量を定量した。同時に HS を回収した細胞の DNA 量も定量し、DNA 量から換算される細胞数で HS 量を補正した。その結果、細胞表面 HS 量は、アドレナリン投与の有無によらず、 25.1 ± 9.7 pg/cell であり、アドレナリンを与えても変化しないことが明らかとなった (Fig. 2-4)。また、アドレナリンを添加した 3 時間後の細胞表面 HS 量を同様の方法により分析すると、アドレナリン投与の有無によらず 21.2 ± 2.1 pg/cell であり、アドレナリンを与えても変化しないことが明らかとなった (Fig. 2-5)。

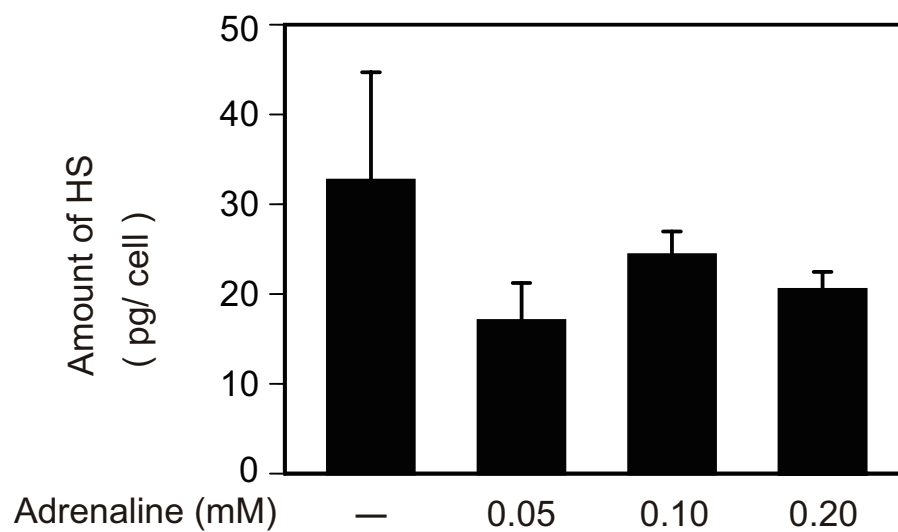


Fig. 2-4 アドレナリン添加 6 時間後の L-M 細胞表面 HS 量

アドレナリン含有培地またはコントロール培地をL-M細胞に添加して、6時間培養した。その後、細胞表面HSを回収して、HS量をAlcian Blue染色により算出した。また、HSを回収した細胞からDNAを抽出して、DNA量から細胞数を算出することで、細胞当りのHS量を換算した。Tukey法を用いて統計分析を行った。

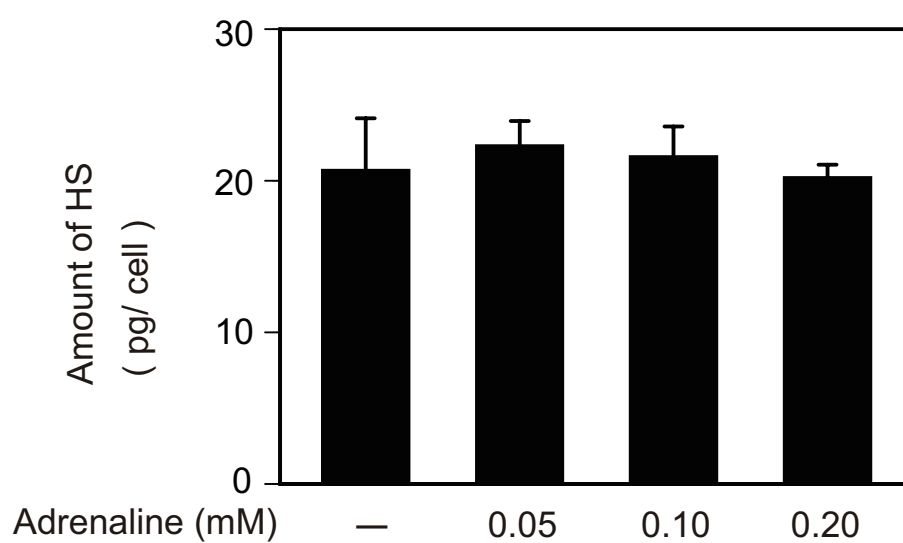


Fig. 2-5 アドレナリン添加 3 時間後の L-M 細胞表面 HS 量

アドレナリン含有培地またはコントロール培地を L-M 細胞に添加して, 3 時間培養した。その後, 細胞表面 HS を回収して, HS 量を Alcian Blue 染色により算出した。また, HS を回収した細胞から DNA を抽出して, DNA 量から細胞数を算出することで, 細胞当りの HS 量を換算した。Tukey 法を用いて統計分析を行った。

3-3 6-OST-1 発現にアドレナリンが与える影響

アドレナリン刺激によって細胞表面 HS の 6 位硫酸基二糖の割合の増加を確認したことから (Fig. 2-3), HS を構成する二糖の GlcNAc の C 6 位に硫酸基を転移する酵素 (6-OSTs) の遺伝子発現へアドレナリンが与える影響を調べた。L-M 細胞などのマウスは, 6-OSTs について, 6-OST-1, 2, 3 と 6-OST-2 の splice variant である 6-OST-2S を持つことが知られている。L-M 細胞におけるこれらの発現を調べたところ, 6-OST-1 が高発現しており, 6-OST-2 と 3 は発現していないことを発見した (Fig. 2-6, A)。そこで, アドレナリンが 6-OST-1 の遺伝子発現に与える影響を分析した。

一定時間アドレナリンを与えた L-M 細胞から total RNA を回収して cDNA を合成し, 6-OST-1 の mRNA 発現量を real time PCR で調べた。各時間における 6-OST-1 の発現量は, GAPDH を内部標準遺伝子として補正した。その結果, 0.2 mM アドレナリンを与えた 90 分後に, 6-OST-1 の mRNA 発現量が 1.5 ± 0.3 倍に増加することが明らかとなった (Fig. 2-6, B)。

L-M 細胞にアドレナリンを添加すると, 神経成長因子 (NGF) の分泌量が増加することが報告されている (Furukawa S, et al., 1986)。さらに, NGF がラット副腎髄質褐色細胞腫 (PC12) 細胞表面 HS の硫酸化構造を変化させることが報告されていることから (Margolis R K, et al., 1987), L-M 細胞表面 HS も分泌された NGF により構造が変化した可能性が示唆される。そこで, NGF が L-M 細胞表面 HS に与える影響を調べるために, NGF を添加した 1.5 時間後の 6-OST-1 の mRNA 発現量を real time RT-PCR により分析した。その結果, 20 pM から 400 pM の NGF を添加したが, 6-OST-1 の mRNA 発現量は変化しなかった (Fig. 2-7)。

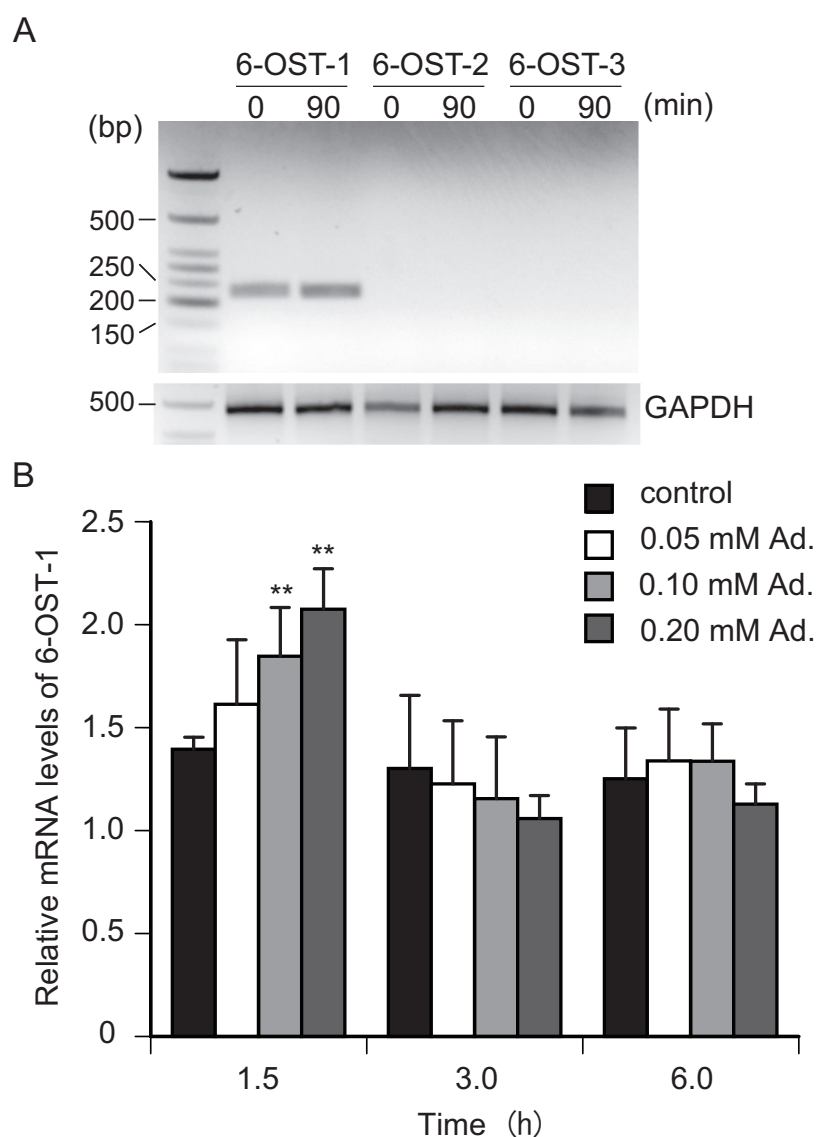


Fig. 2-6 6-OSTs の mRNA 発現量にアドレナリンが与える影響

(A) 0.20 mM アドレナリンを添加した 90 分後の L-M 細胞から total RNA を回収して、6-OST-1, 6-OST-2, 6-OST-3 の mRNA 発現を RT-PCR により確認した。また、ローディングコントロールとして、GAPDH の PCR 産物を泳動した。図中左側の数値は分子量スタンダードの分子量を示す。(B) アドレナリン添加 1.5 h, 3.0 h, 6.0 h 後における 6-OST-1 の mRNA 発現量を real time RT-PCR により測定した。アドレナリン非添加時 (0 h) における 6-OST-1 の発現量を 1.0 とした場合の相対値を示す。Tukey 法を用いて統計分析を行った。*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$

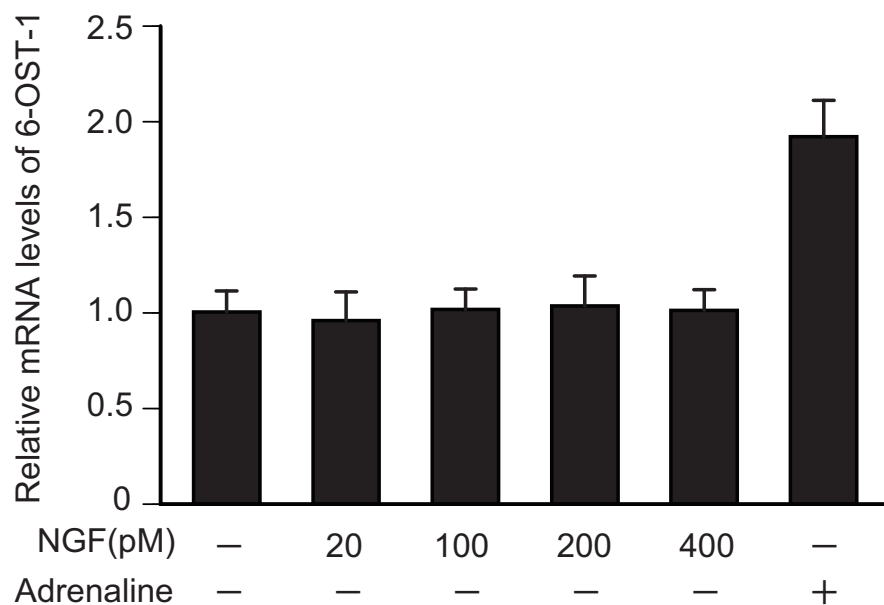


Fig. 2-7 NGF が 6-OST-1 の mRNA 発現に与える影響

20, 100, 200, 400 pM の NGF を培地に添加した 90 分後の 6-OST-1 の mRNA 発現量を real time RT-PCR により測定した。”Adrenaline”は, 0.20 mM アドレナリンを添加した 90 分後の 6-OST-1 の mRNA 発現量を示す。Tukey 法を用いて統計分析を行った。

3-4 Sulf1/2 発現にアドレナリンが与える影響

HS 6-*O*-endosulfatases (Sulfs) は、細胞表面 HS の特定の硫酸化構造から C 6 位の硫酸基を脱硫酸化することが知られている。これらの酵素の発現量が変化すると、 Δ Di-6S の割合が変化する可能性があるため、アドレナリンが Sulfs の発現に与える影響を調べた。L-M 細胞に Sulf-1/2 が発現するかを RT-PCR により調べると、Sulf1/2 とともに発現することが明らかとなった。そこで、アドレナリンを添加した 1.5 時間後の Sulf1/2 の発現量を real time RT-PCR により分析すると、アドレナリンを添加しても Sulf-1/2 の発現量は変化しないことが明らかとなった (Fig. 2-8)。

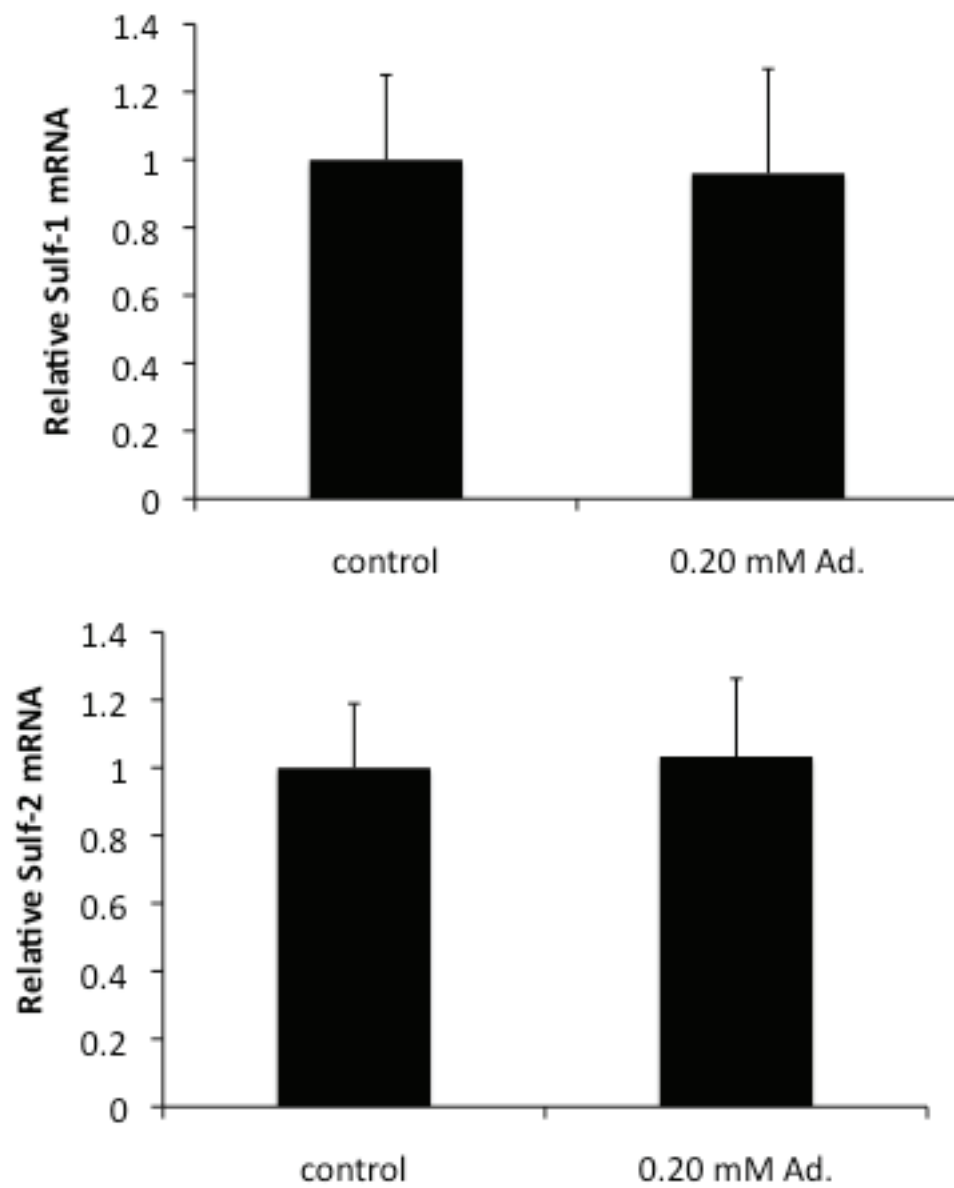


Fig. 2-8 アドレナリンが Sulf-1/2 発現に与える影響

0.20 mM アドレナリン添加 1.5 h 後における Sulf-1 と Sulf-2 の mRNA 発現量を real time RT-PCR により測定した。

3-5 L-M 細胞に発現するアドレナリン受容体の種類特定

アドレナリンが 6-OST-1 の mRNA 発現量に影響を与えたことから (Fig. 2-6, B), L-M 細胞はアドレナリンの刺激を細胞内に伝達していると推測された。アドレナリンを認識する受容体としてはアドレナリン受容体が考えられるが、これまでのところ L-M 細胞にアドレナリン受容体は存在しないことが報告されている (Furukawa S, et al., 1986; Schroeder F, et al., 1981)。しかし、アドレナリン受容体が本当に存在しないのか確認するために、0.20 mM アドレナリンを与えた 90 分後に 6-OST-1 の mRNA 発現量が有意に増加することに注目して、各アドレナリン受容体阻害剤が与える影響を調べることにより、発現するアドレナリン受容体の特定を行った。

アドレナリン受容体には、 α 1, 2 と β 1, 2, 3 受容体が存在することが知られる。そこで各種アドレナリン受容体阻害剤 (Nicergoline : α 1, 2 受容体非選択的阻害剤, Propranolol : β 1, 2 受容体非選択的阻害剤, ICI 118,551 : β 2 受容体選択的阻害剤, L 748,337 : β 3 受容体選択的阻害剤) を培地に投与して 2 時間培養した後、0.20 mM アドレナリンを与えた 90 分後の細胞から total RNA を回収し、6-OST-1 の mRNA 発現量を real time RT-PCR により解析した (Fig. 2-9, A, B)。その結果、 β 3 受容体選択的阻害剤を与えた場合のみ、0.20 mM アドレナリンによる 6-OST-1 の mRNA 発現増加を完全に抑制したことから (Fig. 2-9, B), L-M 細胞では β 3 アドレナリン受容体がアドレナリンを結合して、6-OST-1 の発現を制御していることが示唆された。また、L-M 細胞から膜タンパク質を回収して、 β 3 アドレナリン受容体抗体を用いたウェスタンブロッティングを行った。その結果、目的となる 47 kDa 付近にバンドが検出されたことから、L-M 細胞に β 3 アドレナリン受容体が発現することが示唆された (Fig. 2-9, C)。また、結果は図示しなかったが、以下に示すプライマー (Fw: 5'-TGTTGGTTCTGGAGGACTGA-3', Rv: 5'-TCACAGCAGAAAGGTCCAAG-3') を用いた RT-PCR の結果、 β 2 アドレナリン受容体の mRNA が L-M 細胞で発現することを確認した。しかしながら、膜タンパク質精製キット (DUALXtract total Membrane Protein Extraction Kit, Dualsystems Biotech) を用いて L-M 細胞から膜タンパク質を回収して、 β 2 アドレナリン受容体抗体 (ab 61778, abcam) により β 2 アドレナリン受容体の発現を調べたが、検出することはできなかった。

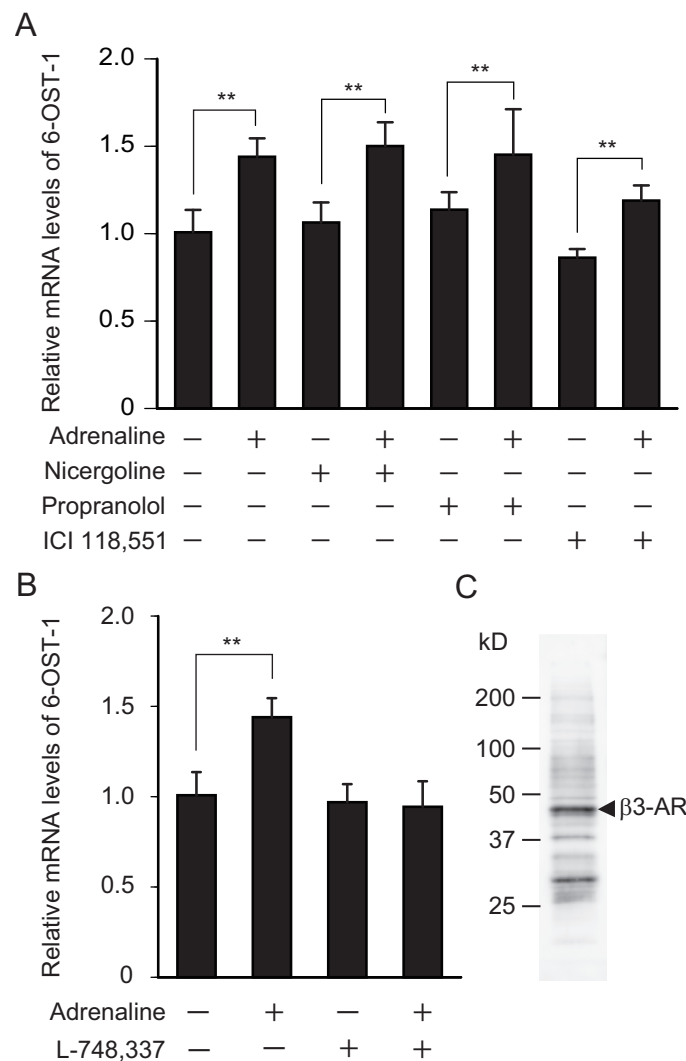


Fig. 2-9 アドレナリン受容体阻害剤が 6-OST-1 発現に与える影響

(A) Nicergoline ($\alpha 1, 2$ アドレナリン受容体阻害剤) または Propranolol ($\beta 1, 2$ アドレナリン受容体阻害剤), ICI 118,551 ($\beta 2$ アドレナリン受容体阻害剤) を培地に添加して 2 時間培養して, 0.20 mM アドレナリン含有培地に交換した 1.5 h 後の 6-OST-1 発現量を real time RT-PCR により測定した。(B) L-748,337 ($\beta 3$ アドレナリン受容体阻害剤) を培地に添加して 2 時間培養して, 0.20 mM アドレナリン含有培地に交換した 1.5 h 後の 6-OST-1 発現量を real time RT-PCR により測定した。(C) L-M 細胞から膜タンパク質を回収して, 抗 $\beta 3$ アドレナリン受容体抗体を用いたウェスタンブロッティングを行った。 $\beta 3AR$ は $\beta 3$ アドレナリン受容体を示し, 図中左側の数値は分子量マーカーの分子量を示す。Tukey 法を用いて統計分析を行った。
**: $P < 0.01$

3-6 6-OST-1 発現を制御するシグナル伝達機構の分析

$\beta 3$ アドレナリン受容体は主に脂肪細胞に存在して、脂肪酸の代謝に関与することが知られている (Robidoux J, et al., 2006)。マウスの脂肪細胞において、脂肪酸の代謝が行われる際は、 $\beta 3$ アドレナリン受容体に c-Src が結合して、細胞外シグナル調節キナーゼである ERK1/2 が活性化されることが知られている (Soeder K J, et al., 1999)。そこで、L-M 細胞が 6-OST-1 の発現を調節するシグナル伝達経路に Src と ERK1/2 が関与しているかを検証した。

PP2 (Src 阻害剤) または FR180204 (ERK1/2 阻害剤) を培地に加えて 2 時間培養し、その後 0.2 mM アドレナリンを与えた 90 分後の細胞から total RNA を回収して、6-OST-1 発現に与える影響を調べた。その結果、PP2 と FR180204 とともに、0.20 mM アドレナリンによる 6-OST-1 の発現量増加を完全に抑制したことから (Fig. 2-10, A, B)、アドレナリンによって誘導される 6-OST-1 の発現は、Src と ERK1/2 が関与していることが示唆された。また、アドレナリン添加によって ERK1/2 が活性化されるかを調べるために、Phostag ウェスタンブロッティングを行った。その結果、ERK1/2 の多くは非リン酸化状態 (np-ERK1/np-ERK2) で存在したが、アドレナリンを添加するとリン酸化 ERK1/2 が観察された (Fig. 2-10, C)。ERK1/2 が 2 箇所リン酸化された pTpY-ERK1/2 は、アドレナリン添加 5 分後にピークを迎え、60 分後にかけて徐々に減少した。また、1 箇所リン酸化された pT/pY-ERK1/2 はアドレナリン添加 5 分後のみに観察された。

通常 ERK1/2 は細胞質に存在するが、リン酸化を受けて活性化された ERK1/2 は核内に移行して、転写因子と相互作用することにより転写の制御を行うことが知られている。そこで、アドレナリンが誘導する 6-OST-1 の発現が ERK1/2 によって制御されているならば、ERK1/2 は細胞表面 HS の硫酸化構造も制御していると考えられる。そこで、ERK1/2 阻害剤を与えた細胞にアドレナリンを与えると、アドレナリンが誘導する HS の構造変化が抑制されるのかを検証した。その結果、FR180204 (ERK1/2 阻害剤) を与えた細胞に 0.20 mM アドレナリンを与えた 3 時間後の細胞表面 HS の二糖組成は、ERK1/2 阻害剤とアドレナリンを与えないコントロールの HS の二糖組成とほぼ同じであった (Fig. 2-11)。この結果から、アドレナリンが誘導する 6-OST-1 の発現は ERK1/2 が制御していることが確認された。

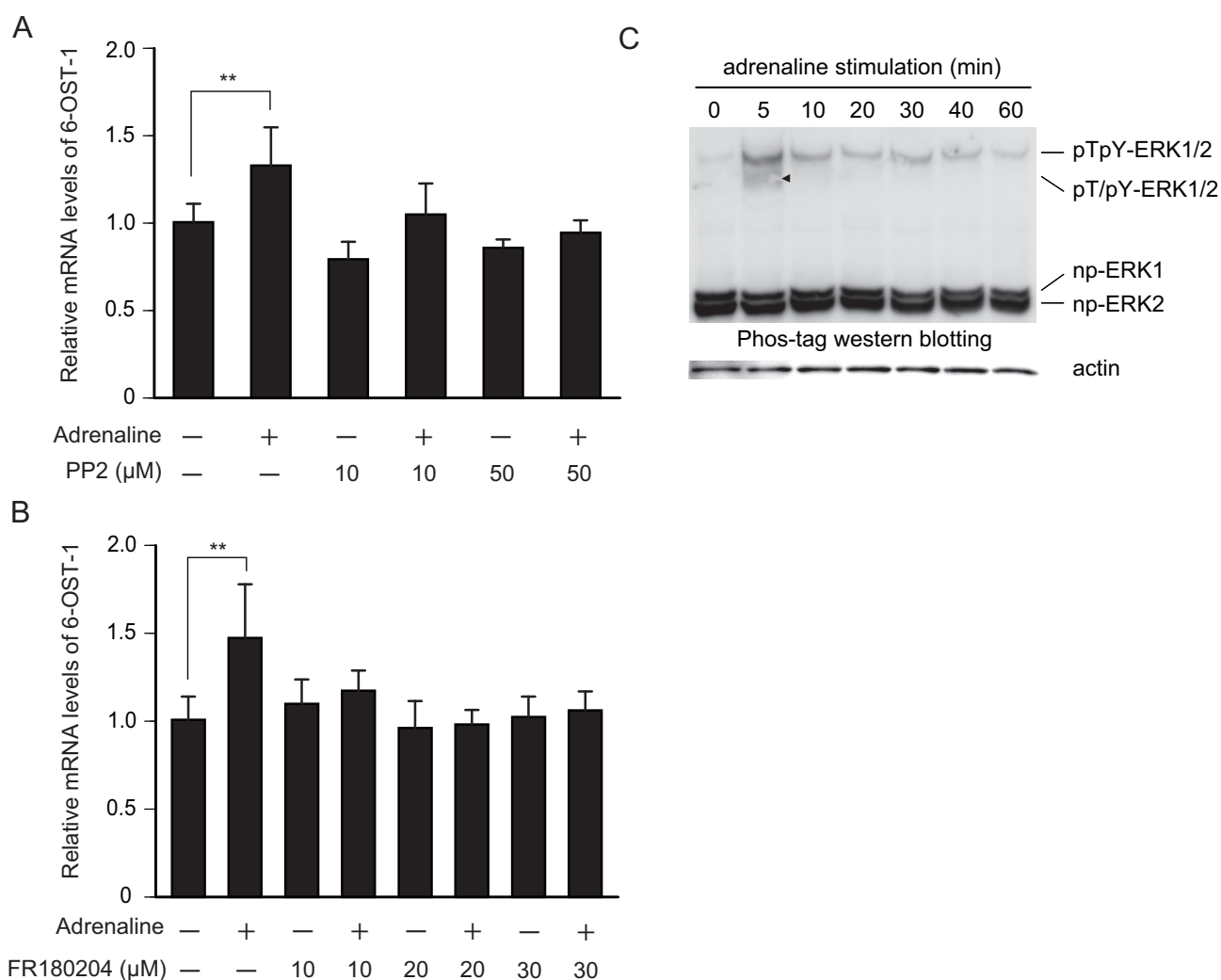


Fig. 2-10 6-OST-1 発現を制御するシグナル伝達経路の検討

(A) PP2 (c-Src 阻害剤) を培地に添加して 2 時間培養して、0.20 mM アドレナリン含有培地に交換した 1.5 h 後の 6-OST-1 発現量を real time RT-PCR により測定した。(B) FR180204 (ERK1/2 阻害剤) を培地に添加して 2 時間培養して、0.20 mM アドレナリン含有培地に交換した 1.5 h 後の 6-OST-1 発現量を real time RT-PCR により測定した。(C) 0.20 mM アドレナリンを 0, 5, 10, 20, 30, 40 分添加した L-M 細胞からタンパク質を回収し、抗 ERK1/2 抗体を用いた Phostag ウェスタンブロッティングによりリン酸化 ERK1/2 を検出した。ローディングコントロールとして、ウェスタンブロッティングにより β -アクチンの検出を行った。Tukey 法を用いて統計分析を行った。 **: $P < 0.01$

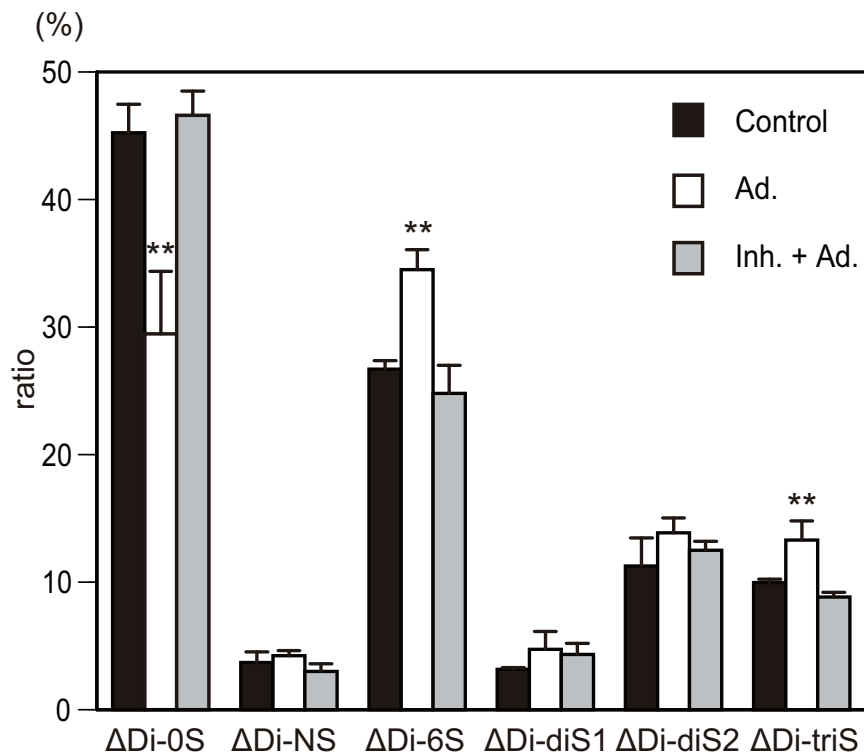


Fig. 2-11 アドレナリンによる HS の構造変化に ERK1/2 阻害剤が与える影響

FR180204 (ERK1/2阻害剤) を培地に添加して2時間培養し、0.20 mMアドレナリン含有培地またはコントロール培地をに交換して3時間培養した。その後、細胞表面HSを回収して、HS分解酵素によって二糖単位に分解してから、HPLCを用いて各二糖の割合を算出した。得られた値 (%) はアークサイン変換を行い、Tukey法を用いて統計分析を行った。 **: $P < 0.01$

図中の”Ad.”は0.20 mMアドレナリンを添加した場合を示し、”Inh. + Ad.”はFR180204で前培養した後に0.20 mMアドレナリンを添加した場合を示す。

3-7 アドレナリンによる HS 構造変化が NGF との相互作用に与える影響

L-M 細胞は NGF を分泌するが、アドレナリンを添加すると NGF の分泌量が増えることが報告されているため (Furukawa S, et al., 1986), アドレナリンによる HS の構造変化が NGF との相互作用に与える影響を調べた。まず、抗 NGF 抗体固定化センサーチップに NGF を供し、NGF の結合を確認したことにより、2009 年に作成されたチップが機能することを確認した (Fig. 2-12, A)。次に、NGF と HS を混合して抗 NGF 抗体結合チップに供して、NGF 単独場合と比較することにより、NGF と HS の相互作用の検出を試みた。そこで、cHS と NGF の等濃度混合物を添加すると、添加 10 分後の RU 値が NGF 単独の場合と比較して有意に減少した (Fig. 2-12, B)。さらに、aHS と NGF の等濃度混合物を添加すると、添加 10 分後の RU 値が NGF 単独の場合と比較して有意に減少した上、cHS と NGF の等濃度混合物を添加した場合と比較しても有意に減少することを見出した (Fig. 2-12, B)。

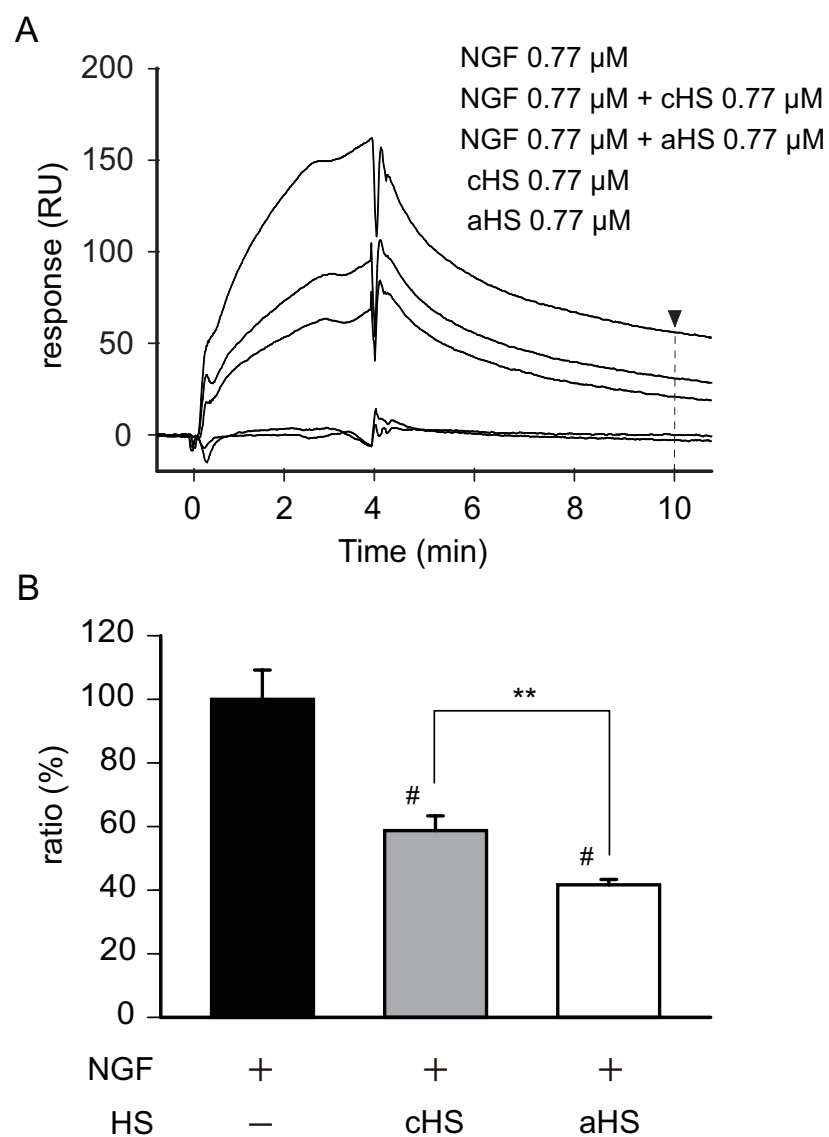


Fig. 2-12 L-M 細胞表面 HS と NGF の相互作用測定

(A) コントロール培地または 0.20 mM アドレナリンを添加した 6 時間後の L-M 細胞から HS を回収した (それぞれ cHS, aHS)。HS の分子量を 20,000 と仮定して濃度を計算し、NGF と混合した各 HS を抗 NGF 抗体固定化センサーチップにアプライして、NGF 単独の結果と比較した。(B) A において、サンプル添加 10 分後 (矢尻) の RU 値を相対評価した。Tukey 法を用いて統計分析を行った。#: $P < 0.01$ vs NGF 単独, **, $P < 0.01$

第4節 考察

本章では、細胞表面 HS が細胞外からの刺激に応答する機構を解明するために、アドレナリンの刺激により NGF 分泌量を増加する L-M 細胞をモデルにして、L-M 細胞表面 HS にアドレナリンが与える影響について検討した。

L-M 細胞表面 HS の硫酸化構造にアドレナリンが与える影響を調べると、アドレナリンの添加時間を 6 時間とした場合、0.05 mM, 0.10 mM, 0.20 mM のすべての濃度において、6 位硫酸化二糖の割合が同程度に増加した。一方で、非硫酸化二糖の割合は有意に減少した。これらの結果により、L-M 細胞表面 HS は、アドレナリンの刺激に応答して硫酸化構造を変化させることが示唆された。しかしながら、6 位硫酸化二糖の増加がアドレナリン濃度に依存しなかったことから、アドレナリン添加 6 時間後には 0.05 mM などの弱い刺激であっても、6 時間後にはアドレナリンの刺激による構造への影響が十分に反映されるからではないかと考えた。また、0.01 mM のアドレナリンは、HS の硫酸化構造を変化させなかったことから、L-M 細胞表面の HS 構造を変化させるためには、0.05 mM 以上の濃度のアドレナリンが必要になることが示唆された。そこで、アドレナリン添加 3 時間後の L-M 細胞表面 HS 構造にアドレナリンが与える影響を調べると、0.05 mM アドレナリンは影響を与えなかったが、6 位硫酸化二糖はアドレナリンの濃度依存的に増加した。また、0.10 mM と 0.20 mM アドレナリン添加によって非硫酸化二糖の割合が減少したことから、L-M 細胞表面 HS は、アドレナリンの刺激に応答して非硫酸化二糖の C 6 位に硫酸が付加された結果、6 位硫酸化二糖が増加したと示唆された。

アドレナリンによる L-M 細胞表面 HS の構造変化を別の方法により確認するために、当研究室の小堺により、HS の特定の硫酸化構造を識別して結合する線維芽細胞増殖因子 (FGF) と HS の結合量が SPR 法により測定された。その結果、0.20 mM アドレナリンで刺激した 6 時間後の細胞から回収した HS (aHS) と FGF-1 の解離定数 (151 ± 9 nM) は、アドレナリンで刺激しない L-M 細胞から回収した HS (cHS) との解離定数 (104 ± 4 nM) より有意に減少することが明らかになった。これにより、L-M 細胞表面 HS の硫酸化構造が変化したことが確認された。また、1 mol の cHS に結合した FGF-1, 2, 10 の結合量が、0.21, 2.2, 2.3 mol であったことから、アドレナリンで刺激しない場合の L-M 細胞表面 HS は、FGF-2 や FGF-10 に結合しやすい硫酸化構造を有していることが示唆され

た。さらに、FGF-1, 2, 10 と aHS の結合量を cHS と比較すると、結合量がそれぞれ約 85%, 62%, 45% に減少することが報告された。FGF-1 は、IdoA2S-GlcNS6S-IdoA2S を含む特定の 8 糖を認識することが報告されており (Kreuger J, et al., 1999; Kreuger J, et al., 2001), FGF-2 は N 硫酸化グルコサミンに隣り合うイズロン酸の C 2 位の硫酸化に加えて 5 糖以上の鎖長を認識することが知られる (Jemth P, et al., 2002; Ashikari-Hada S, et al., 2004)。FGF-10 は、3 つの HexA2S-GlcNS6S をもつ 8 糖に結合する (Ashikari-Hada S, et al., 2004)。しかしながら、FGF-1 と HS の相互作用が HS の硫酸基の数に依存しなかったとの報告があることから (Kreuger J, et al., 1999), FGF と HS の結合は硫酸基の数ではなく、HS の硫酸化構造 (パターン) に依存すると考えられる。従って、0.20 mM という高濃度のアドレナリンを添加したことにより、6 位硫酸化二糖が増加した結果、L-M 細胞表面 HS の硫酸化パターンが崩れたため、FGF の結合量が減少したのではないかと考えた。

アドレナリン添加 3 時間後に HS 構造が変化したが、これは HS の代謝時間を調べた研究と一致する。すなわち、新たに合成された HS がゴルジ体から細胞表面に輸送されるまでに約 12 分要する (Yanagishita M, 1992)。そして、HS が細胞表面に到達すると、約 4 時間後に切断されて細胞外マトリックスに分泌されるか、エンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれる (Yanagishita M, 1992)。HS の代謝 (半減期) が約 4 時間で起きることを考えると、アドレナリン添加 3 時間後に HS の構造変化が生じたことは妥当であると考えられる。

アドレナリンにより 6 位硫酸化二糖が増加したことから、GlcNAc の C 6 位に硫酸基を転移する 6-*O*-sulfotransferases (6-OSTs) の関与が示唆された。RT-PCR を用いて mRNA の発現を分析すると、L-M 細胞には 6-OST のアイソフォーム (6-OST-1, 6-OST-2, 6-OST-3) のうち、6-OST-1 のみが発現することが明らかとなった。そこで、アドレナリンが 6-OST-1 の mRNA 発現に与える影響を調べると、アドレナリン添加 1.5 時間後にアドレナリンの濃度依存的に 6-OST-1 発現が増加した。アドレナリン添加 3 時間後と 6 時間後の 6-OST-1 発現は変化しなかったことから、アドレナリンの刺激は添加 1.5 時間程度持続することが推定された。また、アドレナリンを添加しないコントロールの 1.5 時間後の 6-OST-1 の発現が増加したのは、培地交換によって細胞内の代謝が影響されたとの報告があることから (Caldwell J, et al., 1991), 培地交換によると考

えた。また、Sulf-1/2 は細胞表面において Δ Di-diS1 や Δ Di-TriS の GlcNAc C 6 位の硫酸基を脱硫酸化するため、6 位硫酸化二糖の形成に関与すると考えられることからアドレナリン添加 1.5 時間後の Sulf-1/2 発現を調べたが、変化しなかった。従い、アドレナリンによる 6S 構造の増加は、6S を脱硫酸化する Sulf 発現の抑制ではなく、6-OST-1 の発現亢進によると考えた。

Margolis らの報告によると、PC12 細胞に NGF を添加すると細胞表面 HS の硫酸化構造が変化した (Margolis R K, et al., 1987)。L-M 細胞もアドレナリンの刺激により NGF の分泌量が増加するため、分泌された NGF によって L-M 細胞表面 HS の構造が変化した可能性が挙げられた。3 日間培養した 3T3 マウス線維芽細胞は培地 1 mL 中に 0.49 ng の NGF を分泌することが報告されており (Oger J, et al., 1974), 当研究室でも L-M 細胞が培地 1 mL 中に約 0.45 ng の NGF を分泌することを確認した。さらに、L-M 細胞に 0.20 mM アドレナリンを添加すると、NGF 分泌量が最大で 20 倍に増加したとの報告があることから (Furukawa S, et al., 1986), 通常状態 (約 20 pM) から最大値 (400 pM) までの NGF を L-M 細胞に添加して、1.5 時間後の 6-OST-1 発現に与える影響を調べた。その結果、いずれの濃度の NGF も 6-OST-1 発現に影響しなかった。また、本研究において、アドレナリンを添加した 1.5 時間後に 6-OST-1 発現がアドレナリンの濃度依存的に誘導され、3 時間後に 6 位硫酸化二糖が増加したことから、アドレナリン添加 4 時間後に NGF の分泌量増加が見られたこと (Furukawa S, et al., 1986) と合わせて考えると、L-M 細胞表面 HS の構造変化は、アドレナリン刺激により分泌された NGF ではなく、添加したアドレナリンによると結論付けた。これらの結果より、L-M 細胞に発現する 6-OST-1 はアドレナリンによって誘導されることが明らかとなった。0.20 mM アドレナリンは生理的な濃度より高濃度であるが、HS 生合成酵素の発現を誘導する刺激はこれまでに報告されていないことから、アドレナリンによって 6-OST-1 の発現が誘導されることと 6 位硫酸化二糖が増加するとの発見は、HS の硫酸化構造が形成される仕組みを解明するための大きな一歩となる。そこで、この現象を実験モデルにして 6-OST-1 の発現を制御するシグナル伝達経路の特定を行った。

6-OST-1 発現がアドレナリンにより誘導されたことから、アドレナリン受容体がアドレナリンによる 6-OST-1 発現の制御に関与することが推定された。ア

ドレナリン受容体は、 $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$ に大別される (Molinoff P B, 1984)。これまでのところ、L-M 細胞にはアドレナリン受容体を発現しないことが報告されてきたが (Schroeder F, et al., 1981; Furukawa S, et al., 1986), 本研究では L-M 細胞が $\beta 3$ アドレナリン受容体を持つことを発見した (Fig. 2-9 C)。 $\beta 3$ アドレナリン受容体の遺伝子は肥満遺伝子とも呼ばれ、遺伝子変異により肥満を導くことが知られ、 $\beta 3$ アドレナリン受容体は主に脂肪細胞に発現することが知られる (Li H, et al., 2010)。L-M 細胞は L-929 細胞から樹立されたが、L-929 細胞の由来となった L 細胞は皮下脂肪組織から樹立されたことを考えると、L-M 細胞が脂肪細胞に発現する $\beta 3$ アドレナリン受容体を持つことは妥当であると言える。

$\beta 3$ アドレナリン受容体を介したシグナル伝達経路は脂肪細胞において研究が進んでいる (Robidoux J, et al., 2006)。 $\beta 3$ アドレナリン受容体は、ヘテロ三量体の G タンパク質である Gs と Gi に結合している (Soeder K J, et al., 1999)。Gi は、cAMP と PKA 経路に関与して、Gs は c-Src と ERK1/2 経路を制御する (Soeder K J, et al., 1999)。古川らが L-M 細胞には cAMP と PKA 経路が存在しないことを報告していることから (Furukawa S, et al., 1986), アドレナリンによる 6-OST-1 発現の誘導に、Src と ERK1/2 が関与するかを調べた。そのために、Src の阻害剤である PP2 と ERK1/2 の阻害剤である FR180204 を使用した。その結果、PP2 と FR180204 がともにアドレナリンによる 6-OST-1 の発現誘導を抑制したことから、アドレナリンで刺激した 6-OST-1 は Src-ERK1/2 経路で制御されることが示唆された。アドレナリンで刺激しない状態で PP2 または FR180204 を作用させても 6-OST-1 の発現は変化しなかったことから、細胞が恒常的に発現する 6-OST-1 は Src-ERK1/2 以外の経路で制御されることも示唆された。また、アドレナリンによって ERK1/2 がリン酸化されることも確認した。ERK1/2 は、Mitogen-activated protein kinase kinase (MEK) によって ERK1 の Thr-202 と Tyr-204, ERK2 の Thr-183 と Tyr-185 がリン酸化されることにより活性化する (Crews C M, et al., 1992; Seger R, et al., 1992)。さらに、FR180204 を反応させた L-M 細胞にアドレナリンを添加しても HS の硫酸化構造が変化しなかったことから、アドレナリンによって刺激される 6-OST-1 は ERK1/2 によって制御されることを確認した。6-OST-1 を強制発現させると 6 位硫酸化二糖の割合が増加したとの報告があるように (Do A T, et al., 2006), 本研究の結果、アドレナリンは 6-OST-1 の発現を誘導して、その結果 6 位硫酸化二糖の割合が

増加したと考えられた。

本研究では、ERK1/2 阻害剤である FR180204 を用いることで、アドレナリンによる HS の硫酸化構造変化を阻害することに成功した (Fig. 2-11)。この結果は、硫酸基転移酵素である 6-OST-1 の発現を抑制することにより、HS の硫酸化構造を人工的に制御したとも考えられる。細胞はガン化すると HS の硫酸化構造が変化することが知られるため (Molist A, et al., 1998), HS の硫酸化構造を人工的に制御することができれば、ガン化の進行を抑制する新たな治療法の開発に寄与する可能性がある。HS の硫酸化構造は細胞のガン化のみならず、多種多様な生理機能に関与するため (Bishop J R, et al., 2007), 本研究成果を起点として、HS の硫酸化構造を人工的に制御することにより HS が関与する生理機能の解明が進むことが期待される。

本研究では、HS 生合成に関与する複数の酵素のうち、6-OST-1 の発現を制御するシグナル伝達経路を初めて特定したが、6-OST-1 発現経路を完全に解明するためには、6-OST-1 の転写因子を特定する必要がある。これまでのところ、HS の生合成に関与する硫酸基転移酵素の転写因子は一つも特定されていないが、転写因子 AP-2 と Runx2 がシンデカンやグリピカンの合成に関与することが示唆されている (Brucato S, et al., 2002; Jackson R A, et al., 2007; Haupt L M, et al., 2009; Teplyuk N M, et al., 2009; Araujo A P, et al., 2010)。そこで、6-OST-1 の転写因子の候補を探すために、6-OST-1 のプロモーター領域に存在する転写因子結合部位を探索した。まず、National Center for Biotechnology Information (NCBI) から mouse 6-OST-1 の reference sequence 情報 (NM_015818.2) を入手した。次に、non-coding region と転写開始位置、転写因子結合因子の情報を含むデータベースである Mammalian Promoter/Enhanced Database (PEDB) に reference sequence 情報を入力して、プロモーター領域の塩基配列情報を入手した。次に、JASPAR database にプロモーター情報を入力して、6-OST-1 のプロモーター領域に結合する転写因子の候補を得た。その結果、AP-1 (c-Fos, c-Jun) や NF-kappaB, Sox17, Klf4 などが 10 以上の高いスコアを示した。本研究では、6-OST-1 の転写因子を特定することはできなかったが、これらの結果を基にして転写因子を特定することが期待される。

本研究では、細胞表面 HS を回収するために、トリプシンを細胞に添加して

グリコサミノグリカンを遊離させ、CS を分解することで HS を精製した。HS などの GAG が結合するコアタンパク質から GAG を遊離させるためには、NaOH 等を用いた β -elimination を行う方法が一般的であるが、 β -elimination を行ったうえで L-M 細胞の HS を定量した永見の結果（永見, 2009）と β -elimination を行わない場合で差がないことから、本実験では β -elimination は行っていない。また、トリプシンで遊離したグリコサミノグリカンにフェノール・クロロホルム処理を行ったが、トリプシンで切断して残存したペプチドが大きい場合、当該処理によって有機層に移動する可能性を否定できない。従って、 β -elimination 処理を行ったうえで、陰イオン交換カラムで HS を精製する方法を採用することを検討する必要がある。

L-M 細胞はアドレナリン刺激により NGF の分泌量を増加させるため、アドレナリンによる HS の構造変化は NGF との相互作用に影響が生じるのではないかと考えた。そこで、NGF 抗体を結合させたセンサーチップに対して、アドレナリンで刺激した L-M 細胞から回収した HS (aHS) と NGF の混合物の相互作用を、刺激しない細胞から回収した HS (cHS) と NGF の混合物との相互作用と比較することで、HS の構造変化が NGF との相互作用に与える影響を分析した。その結果、cHS と NGF の相互作用が示唆された。NGF の C 末端にはヘパリン結合ドメインが存在するが、ヘパリンと NGF はほとんど結合しないことが報告されている（Sakiyama-Elbert S E, et al., 2002）。また、HS と NGF の結合は報告されていないため、本研究が最初の報告となるだろう。さらに、aHS と NGF の結合力が cHS より強くなることが示唆されたことから、アドレナリンによる HS の構造変化は、アドレナリンにより分泌された NGF との相互作用に影響することが示唆された。アドレナリンによる HS の構造変化が NGF の分泌に与える影響を観察するためには、トランスウェルのインサートに L-M 細胞を播種して、アウターウェルに PC12 細胞を播種した複合培養系を構築し、L-M 細胞にアドレナリンを投与した際の PC12 細胞の神経突起伸長を調べるのが有効な手段となるだろう。

線維芽細胞は Interleukin-1 β (IL-1 β) を分泌すること（Struyf S, et al., 1998）、アドレナリンをラット骨格筋細胞に与えると IL-1 β と IL-6 の分泌量が亢進すること（Frost R A, et al., 2004）の報告があり、さらに IL-1 β がヘパリンと結合することが報告されていることから（Ramsden L, et al., 1992）、アドレナリンによ

る L-M 細胞の硫酸化構造変化が IL-1 β との相互作用に影響する可能性があると考えた。そこで、市販の HS (heparan sulfate fast-moving fraction sodium salt from porcine intestinal mucosa, Sigma) を固定化したセンサーチップを作成して、mouse IL-1 β (#5024, Cell Signaling technology) との相互作用を Biacore により分析したが、結合を確認することはできなかった (data not shown)。L-M 細胞から回収した HS と IL-1 β の相互作用を調べる必要があるだろう。また、今後は、HS の構造変化がもたらす生理的な意義を分析するために、アドレナリンによって HS が構造変化した L-M 細胞に FGF などの増殖因子が与える影響を調べる必要があるだろう。

本章では、アドレナリンの刺激により NGF を分泌する L-M 細胞をモデルにして、高濃度のアドレナリンを材料にして、細胞表面 HS の硫酸化構造が細胞外の刺激に応答して変化する機構を解明した。細胞表面 HS が細胞外刺激に応答して硫酸化構造を変化させるという事象をさらに解明するために、今後は、ヒト由来の細胞と生理的な濃度の生理活性物質を用いた実験を行う必要があるだろう。

第5節 要約

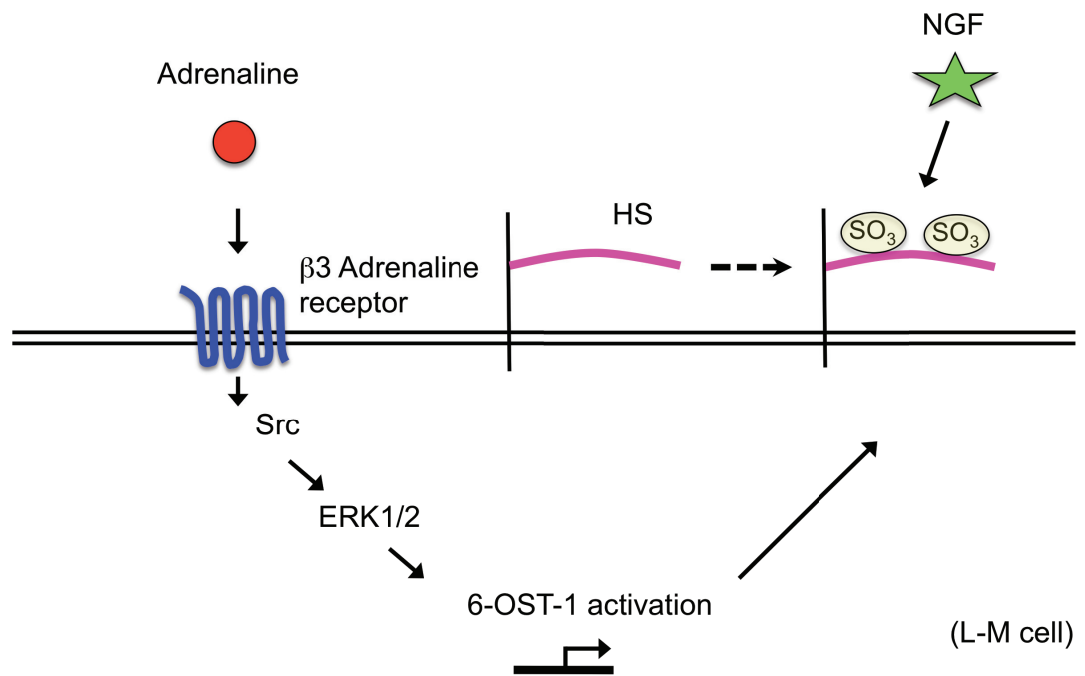
細胞表面 HS が細胞外の刺激に対して構造変化する応答機構を調べるために、アドレナリンにより NGF の分泌量を増加させる L-M 細胞をモデルにして、L-M 細胞表面 HS にアドレナリンが与える影響を分析した。

L-M 細胞表面の HS は、アドレナリンの刺激に応答して硫酸化構造を変化させることが明らかとなった。特に、HS を構成する二糖のうち、アドレナリンの刺激により 6 位硫酸化二糖が増加した。また、HS の特定の硫酸化構造を識別して結合する FGF と HS の結合量がアドレナリン刺激による構造変化により変化したことから、アドレナリンによる HS の構造変化を確認した。一方で、HS 量は変化しなかった。

L-M 細胞には、HS の 6 位硫酸基転移酵素 (6-OSTs) のうち、6-OST-1 のみが発現しており、6-OST-1 の mRNA 発現量はアドレナリン添加の 1.5 時間後に増加した。さらに、アドレナリンは L-M 細胞に発現する $\beta 3$ アドレナリン受容体を介して細胞内に刺激を伝達し、6-OST-1 の mRNA 発現は細胞内シグナル伝達分子の Src と ERK1/2 によって制御されていることが明らかとなった。また、アドレナリン刺激により NGF との結合力が増加することが示唆された。

以上より、L-M 細胞表面 HS は、アドレナリン刺激により $\beta 3$ アドレナリン受容体、Src、ERK1/2 を介して 6-OST-1 の mRNA 発現を亢進し、6 位硫酸化二糖の割合を増加させることが明らかとなった。

第2章の結論の模式図を以下に示す。



第3章 分化 Caco-2 細胞表面 HS にペクチン添加が与える影響

第1節 緒言

第2章において、L-M 細胞にアドレナリンを投与した場合の細胞表面 HS の硫酸化構造をコントロールと比較することにより、L-M 細胞は細胞外の刺激に対して細胞表面 HS 糖鎖の硫酸化構造を変化させるという応答をすることが示唆された。さらに、アドレナリン刺激により誘導された 6-OST-1 発現が Src-ERK1/2 経路により制御されることを解明したことから、細胞外からの刺激を受けて硫酸基転移酵素の発現を調節することにより、細胞表面 HS は硫酸化構造を変化させることが明らかとなった。

第1章でも述べたが、ペクチンを摂取すると小腸絨毛の形態が変化することが報告されている (Tasman-Jones C, et al., 1982; McCulloch J S, et al., 1998; Langhout D J, et al., 1999)。その分子メカニズムは解明されていないが、これまでに当研究室では、小腸上皮のモデル細胞である分化 Caco-2 細胞にペクチンを投与すると、腸端 (アピカル) 側へのタンパク質分泌量が増加することや (中村, 2009)、細胞内代謝産物の動態が変化すること (中村, 2009; 石川, 2011)、細胞外マトリックスの構成タンパク質であるフィブロネクチンの転写量が亢進すること (本田, 2011) を見出した。これらの結果は、ペクチンが分化 Caco-2 細胞へ生理作用を及ぼすことを示唆する。そこで、細胞表面 HS は様々な生理機能の調節に関与することが知られることから (Bishop J R, et al., 2007)、ペクチンが分化 Caco-2 細胞を刺激するならば、分化 Caco-2 細胞表面 HS が影響を受ける可能性があると考えた。そこで本章では、第2章の結果に基づき、分化 Caco-2 細胞表面 HS の硫酸化構造にペクチンが与える影響を解明することを通して、腸管上皮細胞表面 HS の機能について考察することを目的とした。

ペクチン摂取により小腸絨毛が形態変化するためには、絨毛と陰窩に区分される小腸上皮において、絨毛の上皮細胞は分化細胞から成るために増殖しないことから、陰窩の細胞が増殖するためであると推測できる。そこで、分化 Caco-2 細胞と陰窩のモデル細胞 (IEC-6 細胞) を複合培養して、ペクチンを分化 Caco-2 細胞へ添加するとの IEC-6 細胞が増殖するかを分析した。次いで、分化 Caco-2 細胞表面がペクチンに応答する機構を解明するために、第2章の結果に基づき、細胞表面 HS の硫酸化構造を形成する硫酸基転移酵素と脱硫酸化酵素の発現に

ペクチンが及ぼす影響を分析した。ペクチンが脱硫酸化酵素の発現を亢進し、またペクチンはフィブロネクチンと結合することから（本田，2011），ペクチンが脱硫酸化酵素の発現を誘導する機構について、フィブロネクチンとそのレセプターである $\alpha 5 \beta 1$ インテグリンに注目して検討した。また、ペクチン刺激により分化 Caco-2 細胞から分泌され、IEC-6 細胞を増殖させた物質の特定を試みた。本章では、これらの実験を通して、分化 Caco-2 細胞がペクチンと相互作用して陰窩細胞を増殖させる際に、分化 Caco-2 表面 HS が果たす機能について検討した。

第2節 実験材料および実験方法

2-1 実験材料

2-1-1. 株化細胞

(1) Caco-2 細胞 ; ATCC (Manassas, USA) より購入し, 液体窒素で保存していたヒト結腸ガン由来培養細胞 (Caco-2) を使用した。

(2) IEC-6 細胞 ; ATCC (Manassas, USA) より購入し, 液体窒素で保存していたラット小腸上皮細胞 (IEC-6) を使用した。

2-1-2. 試薬の調製

(1) DMEM

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Autocleavable Tissue Culture Medium Powdered, 炭酸水素ナトリウム・L-Glutamine 不含, Nissui ② 日水製薬) 粉末 1.99 g を量り取り、超純水 209.5 mL を加えて攪拌した。その後培地瓶に入れて、121℃で20分間オートクレーブした。

(2) 8% NaHCO₃ 溶液

NaHCO₃ 16 g を超純水 200 mL に溶解後、培地瓶に入れて 121℃, 20 分間オートクレーブした。

(3) L - グルタミン溶液

L - グルタミン (GIBCO) 3 g を超純水 100 mL に溶解し、濾過滅菌した。その後、15 mL 遠心チューブに分注して-20℃で保存した。

(4) 非必須アミノ酸溶液

100×Minimal essential medium non-essential amino acids (MEM NEAA, Gibco) を 15 mL 遠心チューブに分注して、-20℃で保存した。

(5) ペニシリン・ストレプトマイシン溶液

Penicillin-Streptomycin Mixed Solution (Penicillin 10000 units/mL, Streptomycin 10000 µg/mL, ナカライ) を溶解して、15 mL 遠心チューブに分注して、-20℃

で保存した。

(6) ウシ胎児血清 (Fetal Bovine Serum)

-30℃で保存したウシ胎児血清 (FBS) を 37℃で溶解した。攪拌後に 56℃で 30 分間インキュベートして、非動化した。50 mL 遠心チューブに分注し、-20℃で保存した。

DMEM 84 mLに8% NaHCO₃ 2.4 mL, L-グルタミン溶液 2 mL, ペニシリン・ストレプトマイシン溶液 0.8 mL, 非必須アミノ酸溶液 1.0 mL, ウシ胎児血清 10 mLを加えて混合し、使用まで4℃で保存した。

(7) 無血清培地

上記の培地組成のうち、FBSに相当する量を超純水に交換して調製した。しかしながら、FBSに相当する10%分を純水に交換すると、浸透圧などが変化することが推察されるため、無血清培地を正確に調製する必要がある。Caco-2細胞の場合、FBS相当量を以下に示す混合物に置換した無血清培地は10% FBS含有培地と比較して、細胞分化等へ影響を受けないことが報告されている (Ferruzza S et al. 2013)。

10 mg/L insulin, 5.5 mg/L transferrin, 6.7 µg/L sodium selenite (終濃度)

(8) トリパンブルー溶液

トリパンブルー 0.5 gをPBS(-) 100 mLに溶解し、攪拌後にろ紙でろ過した。

2-1-3. ペクチン溶液の調製

当研究室において2011年にブルーんAISから精製し、-20℃で保存していたF3画分 (村田, 2011) を、本研究ではペクチンとして使用した。F3画分を10 mg/mLとなるように20 mM NaClを加えて、70℃に設定したヒートブロックにて16時間加熱した。上清を取り出し、溶解したペクチン濃度をフェノール硫酸法により測定した。また、20 mM NaClを用いて1 mg/mLの濃度に調整したF3溶液を十分に攪拌して、超純水で段階希釈することにより検量線用のサンプルとした。

試験管にサンプル 100 µLと5% フェノール 100 µLを入れて、溶液に直接接触するように濃硫酸 500 µLを加え、室温で30分間静置した。490 nmの吸光度を測定して、検量線からペクチン濃度を測定した。

2-1-3. 細胞の融解方法

凍結保存しておいたセラムチューブを 37℃の温湯中に入れて、すばやく融解させた。培地9 mLを入れた遠心チューブに細胞液をすべて移してピペティングした。遠心分離（室温，1000×rpm，2分）した後に上清を吸引除去し，培地を1 mL加えて懸濁した。培地9 mLを入れたシャーレに細胞懸濁液を注ぎ入れ，37℃，5% CO₂条件下で培養した。細胞がコンフルエントになるまでは毎日培地交換を行った。

2-1-4. 継代培養

顕微鏡での観察により細胞がコンフルエントであることを確認したら，培地を除去して，37℃に保温したPBSでの洗浄を2回行った。PBSを除去して，トリプシン（TrypLE Express, Life Technologies）2 mLを加え，37℃，5% CO₂条件下で10分間培養した。細胞が剥離したことを確認してから，培地4 mLを加えて，ピペティングにより細胞を懸濁させた。それを15 mL遠心チューブに移して，遠心分離（室温，1000×rpm，5分）した。上清を吸引除去して，培地を6 mL程度加えて懸濁した。懸濁液 50 μLをマイクロチューブに取り，トリパンプルー溶液50 μL加えて懸濁し，Neubauer 型血球計算盤を用いて細胞数を計算した。計算盤の4箇所の計測値を平均し， 6×10^5 cells/dish（5日継代）， 7×10^5 cells/dish（4日継代）， 12×10^5 cells/dish（3日継代）となるように細胞懸濁液を10 cm²シャーレに播種した。シャーレに培地10 mLを加えて前後左右に静かに細胞を攪拌し，37℃，5% CO₂条件下で培養した。継代の2日後または3日後に培地交換を行った。

2-1-5. 凍結保存

コンフルエントに達した細胞を2-1-4に示したようにシャーレから剥離させて，遠心分離によりトリプシンを除去後，Neubauer型血球計算盤を用いて細胞数を計算した。再び遠心分離を行い，上清を吸引除去した。その後， 3×10^6 cells/mLとなるように10% DMSO（Dimethyl Sulfoxide, SIGMA）含有培地を加えて懸濁し，セラムチューブに1 mLずつ分注した。氷中で5分，-30℃で1時間，-80℃で12時間凍結し，その後液体窒素中で保存した。

2-2 複合培養系による *in vitro* 小腸上皮モデルの構築

2-2-1. 細胞培養

ATCC より購入したラット小腸上皮由来細胞 (IEC-6) とヒト結腸癌由来株化細胞 (Caco-2 細胞) を使用した。IEC-6 細胞を Caco-2 細胞用の培地に懸濁させた。

24 well プレートに Cell Culture Insert (Millicell, 0.45 μm pore size, 12 mm diameter, 0.6 cm^2 effective growth area) を設置して、アウターウェルに培地を 600 μL 入れた。インサートには、Caco-2 細胞を 1.0×10^5 cells/mL 播種し、培地量が 400 μL となるように培地を加え、20 日以上培養した。培地交換は 2 日に 1 回行った。Caco-2 細胞の培養日数が 20 日を超えたところで、Caco-2 細胞用の培地に懸濁した IEC-6 細胞を別の 24 well プレートに 2.0×10^4 cell 播種して、600 μL となるように培地を加えて、37°C, 5% CO_2 条件下にて 24 時間培養した。その後、IEC-6 細胞の培地を 37°C に保温した PBS で洗浄して、無血清培地 600 μL に交換した。また、トランスウェルで培養した Caco-2 細胞のアウターウェルの培地を取り除き、アウターウェルの周りを無血清培地で洗浄した。それを IEC-6 細胞を培養した 24 well プレートに移動させることで、分化 Caco-2 細胞と IEC-6 細胞を複合培養した *in vitro* 小腸上皮モデルを構築した。

2-2-2. 細胞増殖評価

分化 Caco-2 細胞にペクチンを投与して 24 時間培養した後に、アウターウェルの IEC-6 細胞の細胞増殖を評価するために、WST-8 法を用いた。この方法は、ミトコンドリアの脱水素酵素の代謝活性を測定することにより、間接的に生細胞数を測定する方法である。生細胞が呼吸活動をする際に、脱水素酵素の働きで、乳酸、コハク酸が、ピルビン酸、フマル酸となり、その際に NAD^+ が NADH となる。NADH が 1-Methoxy PMS を介して水溶性テトラゾリウム塩 (WST-8) を橙色のホルマザンに還元する。ホルマザン色素の量は生細胞数に比例するため、ホルマザンの吸光度を 450 nm で測定することにより、生細胞数を測定することができる。

(1) WST-8 試験

第 3 章、第 2 節、2-1-3 の方法により調製したペクチン溶液を無血清培地で希釈して、0.05, 0.10 mg/mL ペクチン含有培地を調製した。

インナーウェルの培地を取り除き、無血清培地で洗浄した後に、0.05 mg/mL, 0.10 mg/mL ペクチン含有培地、またはコントロールとして無血清培地 400 μ L に交換した。また、ポジティブコントロールとして、トランスウェルを設置しないウェルに培養した IEC-6 細胞に対して、10%血清を含む Caco-2 細胞用培地を添加した。これを 37°C, 5% CO₂ 条件下にて 24 時間培養した。

トランスウェルを取り除き、IEC-6 細胞の培地を除去した。無血清培地で洗浄して、5% WST-8 含有無血清培 600 μ L を添加して、37°C, 5% CO₂ 条件下で 2 時間インキュベートした。マイクロプレートリーダーで well を 9 分割して 450 nm における吸光度を測定した。

2-3 HS 6-*O*-endosulfatases および HS 硫酸基転移酵素の mRNA 発現解析

2-3-1. 細胞培養

Caco-2細胞を12 wellプレートに 0.4×10^5 cell/mLとなるように播種して、培地を1 mL加えた。これを37°C, 5% CO₂条件下にて培養した。培地交換を3日に1回行い、20日以上培養したものを使用した。

分化Caco-2細胞の各wellを37°Cに保温したPBSで洗浄して、第3章、第2節、2-1-3の方法に基づき調製した0.1 mg/mLペクチン培地を添加し、37°C, 5% CO₂ 条件下にて1時間培養した。その後、37°Cに保温したPBSで洗浄して、通常の培地を添加して、37°C, 5% CO₂条件下にて3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24時間培養した。

2-3-2. RNAの精製

第2章、第2節、2-6-3と同様に実施した。

2-3-3. RNAの純度測定

第2章、第2節、2-6-4と同様に実施した。

2-3-4. RNAの濃度測定

第2章、第2節、2-6-5と同様に実施した。

2-3-5. RNAの電気泳動

第2章、第2節、2-6-6と同様に実施した。

2-3-6. cDNA合成

第2章，第2節，2-6-7と同様に実施した。

2-3-7. RT-PCR

使用したプライマーの塩基配列をTable 8に示す。

Table 8 Primer sequences for PCR

HSulf-1	5'Primer	5'-CCATGCTCACTGGGAAGTACGTG-3'
HSulf-1	3'Primer	5'-CTTCTCCTTGATGCCGTTGCGA-3'
HSulf-2	5'Primer	5'-AGTGGGTCGGCCTACTTAAGAAGTC-3'
HSulf-2	3'Primer	5'-ATAGATCGTCTCCATGGAGTCA-3'
6-OST-1	5'Primer	5'-CGCCCAGAAAGTTCTACTACATC-3'
6-OST-1	3'Primer	5'-GGTTGTTAGCCAGGTTATAGGG-3'
6-OST-2	5'Primer	5'-ACCTCTTTCTGCAAAGGTATCAG-3'
6-OST-2	3'Primer	5'-GTTCTGATTTGGGTTAGGATTTG-3'
6-OST-3	5'Primer	5'-GGACATGCAGCTTTATGAGTATG-3'
6-OST-3	3'Primer	5'-GCTGTTGTAGTCCTCAGTGACAG-3'
2-OST-1	5'Primer	5'-TTTTCCTGGCTAAACGTTGG-3'
2-OST-1	3'Primer	5'-TGAAGGCAGAAGAGGCAAAT-3'

なお，GAPDHは第2章，第2節，2-6-8と同一のものを使用した。

2-3-8. PCR産物の電気泳動

第2章，第2節，2-6-9と同様に実施した。

2-3-9. real time RT-PCR

第2章，第2節，2-6-10と同様に実施した。なお，HSulf-2，6-OST-1，6-OST-2，2-OST-1のanneal温度は，それぞれ58℃，62℃，62℃，58℃とした。

2-4 分化 caco-2 細胞におけるインテグリン，フィブロネクチン，ペクチンの局在性の観察

2-4-1. 試薬の調製

(1) 50 mM リン酸 buffer, 0.15 M NaCl, pH 7.0

リン酸二水素ナトリウム二水和物 3.12 g またはリン酸水素二ナトリウム十二水和物 7.17 g を超純水に溶解して、100 mL に定容した。リン酸二水素ナトリウム水溶液 39 mL とリン酸水素二ナトリウム水溶液 61 mL を混合して、超純水で 200 mL に定容して、0.1 M リン酸 buffer, pH 7.0 を調整した。そこから 50 mL を取り出し、2.5 M NaCl 6 mL を加えて、超純水で 100 mL に定容した。オートクレーブして保存した。

2-4-2. ペクチンのアミノ化

当研究室では、プルーンから精製したペクチンがフィブロネクチンと結合することを SPR 法により見出した (本田, 2011)。そこで、分化 Caco-2 細胞においてペクチンとフィブロネクチンの結合を共焦点顕微鏡により観察できるかを検討した。そのためにペクチンを蛍光標識する準備を行った。

まずは、ペクチンの還元末端を還元するために、第3章、第2節、2-1-3の方法に基づき調製したペクチン溶液を超純水で 200 $\mu\text{g/mL}$ に希釈して、その 1 mL に 2 M NH_4Cl 8 μL と NaBH_3CN 0.8 mg を加えて、70°C のヒートブロックで 2 日間インキュベートした。その後、 NaBH_3CN を 1.0 mg 程度加えて、70°C で 2 日間インキュベートした。自然冷却後に 0.45 μm のフィルターを用いて濾過をした。

次いで、ゲル濾過によりアミノ化ペクチンの脱塩を行った。スタンドに固定した HiTrap Desalting カラム (GE Healthcare) に第3章、第2節、2-4-1 (1) にて調製した buffer (以下、リン酸 buffer) を 25 mL 流してカラムを平衡化した。次いで、アミノ化ペクチンを 1 mL シリンジに入れて、カラムにアプライした。リン酸 buffer を 0.5 mL 添加して、溶出液 0.5 mL を回収した (溶出液①)。次いで、リン酸 buffer 2.0 mL を添加して、溶出液 2.0 mL をアミノ化ペクチン含有画分として回収した (溶出液②)。さらにリン酸 buffer 2.0 mL を添加して溶出液を 1.0 mL ずつ回収した (溶出液③, ④)。リン酸 buffer を 10 mL 添加してカラムを洗浄し、20% エタノール 10 mL を添加して、4°C でカラムを保存した。

2-4-3. カルバゾール硫酸法によるアミノ化ペクチン量の測定

第3章、第2節、2-4-2 で回収した溶出液①, ②, ③, ④ の各 100 μL を試験管に入れた。同時に、検量線用のサンプルとして、20, 40, 60, 80, 100 $\mu\text{g/mL}$ のガラクトロン酸溶液 100 μL を試験管に入れた。カルバゾール 0.125 g をエタノ

ール 100 mLに溶解して調製したカルバゾール試薬 21 μ Lを添加して、濃硫酸 500 μ Lを加えて沸騰浴中で20分間加熱した。その際、ビー玉を試験管の上に乗せた。試験管を流水で冷却してから、540 nmの吸光度を測定し、検量線からアミノ化ペクチン濃度を算出した。

2-4-4. アミノ化ペクチンのビオチン化と精製

(1) アミノ化ペクチンのビオチン化

第3章、第2節、2-4-3の結果から、溶出液①と②にペクチンが含まれていたため、①と②を合わせた 2.5 mL を遠心濃縮して、約 1.0 mL に濃縮した。

アミノ化ペクチンを Sulfo-NHS-LC-Biotin (Thermo Scientific) と反応させることでビオチン化した。そこで、Sulfo-NHS-LC-Biotin 2.2 mg を超純水 400 μ L に溶解して 10 mM Sulfo-NHS-LC-Biotin 溶液を調製し、その 1.0 μ L をアミノ化ペクチン溶液に加えて、室温で 30 分間静置し、その後 4°Cで一晩静置してビオチン化を行った。

(2) アミノ化ペクチンの精製

未反応のビオチンを取り除くため、まずはアミノ化ペクチン溶液を遠心濃縮により約 0.2 mL に濃縮した。それを Mini Dialysis Kit, 1 kDa Cut-off (GE Healthcare) を用いて、超純水に対して透析を行った。スターラーで超純水を攪拌し、定期的に外液を交換しながら、3 日間透析を行った。さらに、Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter Devices (Ultracel 3K, Millipore) を用いてビオチンの除去を行った。すなわち、Amicon Ultra-4 に超純水 1.5 mL を添加し、遠心分離（室温、2000 \times g, 60 分）して洗浄した。次いでビオチン化ペクチン約 250 μ L に超純水 250 μ L を加えて Amicon Ultra-4 に添加し、遠心分離（室温、2000 \times g, 32 分）して 160 μ L に濃縮した。

2-4-5. 免疫組織化学染色法

(1) 試薬の調製

25 mM ホウ酸buffer, pH 8.3 :

無水ホウ酸 0.5 gを超純水に溶解し、HClでpHを8.3に調製した。それを超純水で100 mLに定容し、オートクレーブした。

Poly-L-Lys (PLL) 溶液：

超純水で調製した5 mg/mL Poly-L-Lys 0.1 mLを25 mMホウ酸buffer, pH 8.3 50 mLと混合して、濾過滅菌した。

10% PFA：

パラホルムアルデヒド（和光）5 gをビーカーに量り取り，超純水40 mLを加えてドラフト内で1時間ほど攪拌した。その後，加熱しながら更に1時間ほど攪拌した。1 N NaOHを添加して，パラホルムアルデヒドを完全に溶解させた。それを超純水で50 mLに定容した。最後に，pH試験紙を用いて，pHが7~8であることを確認した。

8% PFA：

10% PFA 8 mLに超純水 1 mLと10×PBS 1 mLを混合した。

4% PFA：

10% PFA 4 mLに超純水 5 mLと10×PBS 1 mLを混合した。

0.1% TritonX-100：

10% TritonX-100 20 μ Lと超純水1.6 mL，10×PBS 0.2 mLを混合した

2% BSA：

10% BSA 1 mLに超純水 3.5 mLと10×PBS 0.5 mLを混合した。

DAPI：

4',6'-ジアミジノ-2-フェニルインドール二塩酸塩（DAPI, Sigma）2 μ Lと1×PBS 1998 μ Lを混合した。

(2) 免疫染色

Lab-Tek II chamber slide system / 8 well Glass slide（Nunc）のチャンバー毎にPLL溶液200 μ Lを添加し，37°Cで一晩インキュベーションした。その後，PLL溶液を除去して，超純水でチャンバー内を5回洗浄した。Caco-2細胞を 0.08×10^5

cells/mL播種して、培地を400 μ L加えた。37°C, 5% CO₂条件下で培養を行い、3日に1回培地を交換した。Caco-2細胞を分化させるために、3日毎に培地交換を行い、約28日間培養を継続した。

ペクチンの局在を調べるために、分化したCaco-2細胞を無血清培地で洗浄し、無血清培地に溶解させたビオチン化ペクチンを400 μ L添加して、37°C, 5% CO₂条件下で1時間培養した。また、フィブロネクチンと α 5インテグリンの局在にペクチンが与える影響を調べるために、分化Caco-2細胞を無血清培地で洗浄し、無血清培地で調製したペクチン (0.1 mg/mL) を400 μ L添加して、37°C, 5% CO₂条件下で24時間培養した。

培養終了後に、Caco-2細胞の免疫染色を行った。ペクチンの局在を調べた際は、ペクチンとフィブロネクチンの結合力が弱いことを想定して、培地は取り除かずに、8% PFA 400 μ Lを丁寧に添加して、室温で30分間静置した。また、フィブロネクチンと α 5インテグリンの局在にペクチンが与える影響を調べた際には、培地を除去してから1×PBSで3回洗浄し、4% PFA 500 μ L添加して、室温で30分間静置し、細胞を固定化した。

次いで、PFAを取り除き、1×PBS 500 μ L で3回洗浄した。そこに、0.1% TritonX-100を400 μ L添加して、37°Cで15分間インキュベートして、浸透処理を行った。浸透処理しないwellには0.1% TritonX-100の代わりに等量のPBSを添加した。その後、2% BSA 500 μ L 添加して、室温で2時間静置して、ブロッッキングを行った。その後、2% BSA を取り除き、2% BSA で200倍希釈した anti-fibronectin antibody (ab23750, abcam)またはanti-integrin alpha 5 antibody (EPR 7854, abcam) 300 μ L を一次抗体として添加し、室温で3時間または4°Cで一晩静置した。なお、これ以降の操作は暗室にて行った。

一次抗体を取り除き、1×PBSで5回洗浄した。次いで、ペクチンの局在を調べた際は、Fluorescein Streptavidin (Vector Laboratories, 500 μ g/mL) とZO-1, mouse monoclonal antibody-Alexa Fluor 594 (Invitrogen) の混合物をPBSで50倍希釈して、二次抗体として200 μ L添加した。また、フィブロネクチンと α 5インテグリンの局在にペクチンが与える影響を調べた際には、Alexa Fluor 488, goat, anti-rabbit IgG (abcam) とZO-1, mouse monoclonal antibody-Alexa Fluor 594をそれぞれPBSで200倍と50倍希釈した混合物を200 μ L添加した。二次抗体は室温で2時間反応させた。細胞核を染色した際は、二次抗体の反応後に、1×PBSで5回洗浄し、DAPIを200 μ L添加して、室温で10分静置した。

最後に、1×PBSで5回洗浄し、チャンバースライドの枠組みを付属の機械を用いて取り外した。蛍光退色防止剤として Perma Fluor Aqueous mounting medium (Thermo Scientific) を1 wellにつき1滴添加し、空気が入らないように注意してカバーガラスを被せた。室温で1時間静置した後に、カバーガラスとチャンバースライドの隙間にマニキュアを塗り、室温で30分静置して封入した。使用するまでは、アルミホイルで巻いて遮光して、4℃で保存した。

2-4-6. 蛍光顕微鏡観察

顕微鏡デジタルカメラ OLYMPUS DP71 (オリンパス株式会社) を装着した蛍光顕微鏡 OLYMPUS BX51 (オリンパス株式会社) を使用して、第3章、第2節、2-4-5 (2) で作製した試料の蛍光顕微鏡写真を撮影した。

2-4-5. 共焦点レーザースキャン顕微鏡

共焦点レーザースキャン顕微鏡は、決められた領域を均一に照明する光学顕微鏡と異なり、対物レンズの焦点位置と共役な位置にピンホールを配置することで、対象物の1点に集光することができる。光源には特定波長の直進性に優れたレーザー光を使用して、強い光を1点に集中させるので、コントラストが向上する。焦点以外からの光はピンホールでカットさせるために、焦点位置のみの情報が得られ、焦点位置を少しずつ変えて連続的に撮影した画像を再構成することで、3次元画像を取得することができる。

共焦点レーザースキャン顕微鏡は LSM 710 (Carl Zeiss) を使用して撮影を行い、ZEN 2009 (Carl Zeiss) を用いて解析を行った。

2-5 ペクチンが分化 Caco-2 細胞の HSulf-2 発現を誘導する機構の解明

2-5-1. 実験材料

(1) FNIII₁C 溶液

フィブロネクチン first type III モジュールの C 末端 3 分の 2 フラグメント FNIII₁C (Sigma) 0.5 mg を PBS 0.5 mL に溶解し、4℃で保存した。

(2) 0.1 N 酢酸

無水酢酸 10 μL に超純水 1016 μL 加えて混合した。

(3) RGD 溶液

RGD ペプチド (Sigma) 5 mg を 0.1 N 酢酸 250 μ L に溶解し、 -20°C で保存した。

2-5-2. 細胞培養

Caco-2細胞を12 wellプレートに 0.4×10^5 cell/mLとなるように播種して、培地を1 mL加えた。これを 37°C , 5% CO_2 条件下にて培養した。培地交換を3日に1回行い、20日以上培養したものを使用した。

ブルーネペクチンの F3 画分の分子量は約 19 万であるので (本田, 2011), 0.1 mg/mL のペクチンのモル濃度は約 $0.526 \mu\text{M}$ となる。ペクチンと FNIII₁C が 1 : 1 で結合すると仮定すると, FNIII₁C がペクチンの 2 倍存在したらペクチンが分化 Caco-2 細胞へ与える刺激を阻害しうると考えた。そこで, FNIII₁C の終濃度は $1.05 \mu\text{M}$ とした。また, RGD ペプチドの終濃度も $1.05 \mu\text{M}$ とした。

分化 Caco-2 細胞の各 well を 37°C に保温した $1 \times \text{PBS}$ で洗浄して, $1.05 \mu\text{M}$ FNIII₁C または RGD と混合した 0.1 mg/mL ペクチン溶液を添加し, 37°C , 5% CO_2 条件下にて 1 時間培養した。その後, 37°C に保温した $1 \times \text{PBS}$ で洗浄して, 通常の培地を添加して, 37°C , 5% CO_2 条件下にて 6 時間培養した。

2-5-3. RNAの精製

第2章, 第2節, 2-6-3と同様に実施した。

2-5-4. RNAの純度測定

第2章, 第2節, 2-6-4と同様に実施した。

2-5-5. RNAの濃度測定

第2章, 第2節, 2-6-5と同様に実施した。

2-5-6. RNAの電気泳動

第2章, 第2節, 2-6-6と同様に実施した。

2-5-7. cDNA合成

第2章, 第2節, 2-6-7と同様に実施した。

2-5-8. RT-PCR

第3章，第2節，2-3-7と同様のプライマーを使用した。

2-5-9. PCR産物の電気泳動

第2章，第2節，2-6-9と同様に実施した。

2-5-10. real time RT-PCR

第3章，第2節，2-3-9と同様に実施した。

2-6 $\alpha 5$ インテグリンの発現分析 (western blotting)

2-6-1. 細胞培養

Caco-2 細胞をシャーレに 6.0×10^5 個播種して，培地を 10 mL となるように加え，37°C，5% CO₂ 条件下で 3 日間培養した。3 日に 1 回培地交換を行い，20 日以上培養して分化させた。

2-6-2. タンパク質回収

第2章，第2節，2-9-2 (2)と同様に実施した。

2-6-3. BCA 法によるタンパク質濃度測定

第2章，第2節，2-9-2 (3)と同様に実施した。

2-6-4. サンプルの SDS 化

第2章，第2節，2-9-2 (4)と同様に実施した。

2-6-5. ポリアクリルアミドゲルの作成

分離ゲルおよび濃縮ゲルのアクリルアミド濃度は，それぞれ 12%と 4%に設定した。

(1) 試薬の調製

A 溶液：30%アクリルアミド溶液

第2章，第2節，2-9-6 (1)と同様に調製した。

B 溶液（分離ゲル緩衝液）：1.5 M Tris-HCl バッファー（pH, 8.8）

第 2 章，第 2 節，2-9-6 (1)と同様に調製した。

C 溶液（濃縮ゲル緩衝液）：0.5 M Tris-HCl バッファー（pH, 6.8）

第 2 章，第 2 節，2-9-6 (1)と同様に調製した。

D 溶液：10% 過硫酸アンモニウム溶液

第 2 章，第 2 節，2-9-6 (1)と同様に調製した。

10% SDS

第 2 章，第 2 節，2-9-6 (1)と同様に調製した。

水飽和イソブタノール

第 2 章，第 2 節，2-9-6 (1)と同様に調製した。

(2) 分離ゲルの作成（2 枚）

第 2 章，第 2 節，2-9-6 (2)と同様に作成した。

(3) 濃縮ゲルの作成（2 枚）

第 2 章，第 2 節，2-9-6 (3)と同様に作成した。

2-6-6. 電気泳動

(1) 試薬の調製

泳動バッファー

第 2 章，第 2 節，2-9-7 (1)と同様に作成した。

(2) 電気泳動

第 2 章，第 2 節，2-9-7 (2)と同様に作成した。

2-6-7. ウェスタンブロット

(1) 試薬の調製

第 2 章，第 2 節，2-9-8 (1)と同様に調製した。

(2) 膜転写

第2章, 第2節, 2-9-8 (2) と同様に調製した。

(3) 転写タンパク質の検出

転写後の PVDF 膜を 1% BSA/TBST に浸して, 室温で 2 時間または 4℃で一晩静置し, ブロッキングを行った。TBST にブロッキング後の PVDF 膜を浸して 10 分間振盪した。抗体希釈 buffer (0.2% BSA/TBST) で 500 倍希釈した anti-integrin alpha 5 antibody (abcam) を PVDF 膜に添加して, 室温で 2 時間または 4℃で 4 時間静置した。その後, PVDF 膜を TBST に浸して 10 分間振盪した。抗体希釈 buffer で 10,000 倍希釈した HRP-conjugated rabbit anti-goat IgG heavy and light chain secondary antibody (Bethyl Laboratories) を PVDF 膜に添加して, 室温で 1 時間または 4℃で 4 時間静置した。そして, PVDF 膜を TBST に浸して 10 分間振盪した。目的物質の検出は, 第2章, 第2節, 2-9-8 (3)と同様に行った。

2-7 ペクチンが Wnt タンパク質の mRNA 発現に与える影響

2-7-1. 細胞培養

Caco-2細胞を12 wellプレートに 0.4×10^5 cell/mLとなるように播種して, 培地を1 mL加えた。これを37℃, 5% CO₂条件下にて培養した。培地交換を3日に1回行い, 20日以上培養したものを使用した。

分化 Caco-2 細胞の各 well を 37℃に保温した 1×PBS で洗浄して, 0.1 mg/mL ペクチン溶液を添加し, 37℃, 5% CO₂ 条件下にて 1 時間培養した。その後, 37℃に保温した 1×PBS で洗浄して, 通常の培地を添加して, 37℃, 5% CO₂ 条件下にて 3, 6, 9, 12 時間培養した。

2-7-2. RNAの精製

第2章, 第2節, 2-6-3と同様に実施した。

2-7-3. RNAの純度測定

第2章, 第2節, 2-6-4と同様に実施した。

2-7-4. RNAの濃度測定

第2章，第2節，2-6-5と同様に実施した。

2-7-5. RNAの電気泳動

第2章，第2節，2-6-6と同様に実施した。

2-7-6. cDNA合成

第2章，第2節，2-6-7と同様に実施した。

2-7-7. RT-PCR

RT-PCRに使用したプライマーの塩基配列をTable 9に示した。

Table 9 Primer sequences for RT-PCR

Wnt3a	5'Primer	5'-CAGGAACTACGTGGAGATCATG-3'
Wnt3a	3'Primer	5'-CCATCCCACCAAACCTCGATGTC-3'
Wnt5a	5'Primer	5'-AACCGGAACCATTTTTTTTC-3'
Wnt5a	3'Primer	5'-TCTTGTATTACCTTTTCAAAGATCC-3'
Wnt11	5'Primer	5'-GTAAGTGCCATGGGGTGTCT-3'
Wnt11	3'Primer	5'-GCTTCCAAGTGAAGGCAAAG-3'

2-7-8. PCR産物の電気泳動

第2章，第2節，2-6-9と同様に実施した。

2-7-9. real time RT-PCR

第2章，第2節，2-6-10と同様に実施した。なお，Wnt3a，Wnt5a，Wnt11のanneal温度は，それぞれ58℃，58℃，62℃とした。

2-8 Wntタンパク質がIEC-6細胞の細胞増殖に与える影響

2-8-1. 実験材料

Wnt3a：Recombinant Human Wnt-3a, CF（R&D Systems）

100 µg/mL となるように1×PBSに溶解し，-20℃で保存した。

Wnt5a：Recombinant Human Wnt-5a, CF（R&D Systems）

100 µg/mL となるように1×PBSに溶解し，-20℃で保存した。

Wnt11 : Recombinant Human Wnt-11, CF (R&D Systems)

100 µg/mL となるように PBS に溶解し, -20℃で保存した。

2-8-2. 細胞培養

IEC-6細胞を96 wellプレートに 0.2×10^4 cell/mLとなるように播種して, Caco-2細胞用の10% FBS含有培地を100 µL加えた。これを37℃, 5% CO₂条件下にて24時間培養した。次いで, 無血清培地にて各wellを洗浄した。無血清培地で希釈したサンプルを各wellに100 µL添加して, 37℃, 5% CO₂条件下にて24時間培養した。

2-8-3. 細胞増殖試験

第3章, 第2節, 2-2-2 (1) と同様に実施した。

2-9 Wnt タンパク質の発現解析 (western blotting)

2-9-1. 試薬の調製

(1) 20% CHAPS

CHAPS (ナカライテスク) 2 g を計量し, PBS (-) 10 mL に溶解して, フィルター濾過した。

(2) PBS/ 1% CHAPS

10×PBS 10 mL, 20% CHAPS 5 mL, 超純水 85 mL を混合した。

(3) PBS/ 1% CHAPS/ 1 M NaCl

10×PBS 10 mL, 20% CHAPS 5 mL, NaCl 5.84 g を超純水と混合し, 100 mL に定容した。

(4) SDS 化サンプルバッファー (×2)

第2章, 第2節, 2-9-2 (1)と同様に調製した。

2-9-2. 細胞培養

分化 Caco-2 細胞内の Wnt タンパク質発現を分析するために、6 well プレートで 20 日以上培養して分化させた Caco-2 細胞を使用した。また、培地中の Wnt タンパク質を検出するために、24 well プレートに Cell Culture Insert (BD, 1.0 μ m pore size, 10.5 mm diameter, 0.9 cm² effective growth area)を設置して、アウターウェルに培地を 800 μ L 入れた。インサートには、Caco-2 細胞を 1.0×10^5 cells/mL 播種し、培地量が 300 μ L となるように培地を加え、20 日以上培養した。培地交換は 2 日に 1 回行った。

2-9-3. サンプル調製

6 well プレートで分化させた Caco-2 細胞に対して、0.1 mg/mL ペクチン培地を添加して、37°C, 5% CO₂ 条件下にて 24 時間培養した。その後、第 2 章、第 2 節、2-10 (2) と同様に、whole lysate を調製した。

また、バソラテラル培地における Wnt の分泌を調べるために、アウターウェルを 37°C に保温した 1×PBS で洗浄して、無血清培地 800 μ L に交換した。次いで、インナーウェルを 1×PBS で洗浄して、無血清培地で調製した 0.1 mg/mL ペクチンを 300 μ L 添加し、37°C, 5% CO₂ 条件下にて 24 時間培養した。また、コントロールとして、無血清培地 300 μ L を添加して、同条件にて培養した。アウターウェルから培地を回収し、タンパク質の分解を防ぐために、プロテアーゼインヒビターカクテル（ナカライ）を添加し、また終濃度 1% となるように CHAPS を混合し、4°C にて保存した。なお、培地中の Wnt タンパク質を検出する方法は Stanford 大学の The Wnt homepage (<http://www.stanford.edu/group/nusselab/cgi-bin/wnt/>) のプロトコール等を参考にした (Willert K, et al., 2003)。まずは、Vivaspin 6 (10 kDa MWCO, GE healthcare) を用いて培地の濃縮を行った。Vivaspin 6 に超純水 1 mL を添加して、遠心分離（室温, 2000×g, 15 分）して、フィルターを洗浄した。この操作を 2 回行った。次に、コントロールおよびペクチンを添加したアウターウェルの培地を 5.0 mL ずつ Vivaspin 6 に添加して、遠心分離（4°C, 2150×g, 60 分）を繰り返して 0.1 mL に濃縮した。この操作を繰り返し、コントロールおよびペクチン添加培地をそれぞれ 12.4 mL から、0.2 mL に濃縮した。次に、濃縮培地中の CHAPS 濃度を 1% に調製するために、濃縮培地を Mini Dialysis Kit (1 kDa cut-off, GE healthcare) に入れて、1% CHAPS 含有 PBS を外液として、4°C にて 2 日間透析した。そして、Wnt タンパク質を精製するために、Wnt タンパク質がヘパリンに結合することに注目して、ヘパリンカラムを用いた精製に取り組んだ。

HiTrap Heparin HP Columns (1 mL, GE Healthcare) をスタンドに固定して、流速 1 mL/min にて PBS/ 1% CHAPS を 5 mL 流して洗浄した。次いで、コントロールまたはペクチン添加培地をカラムに流速 1 mL/min で流して、溶出液を回収した。溶出液は再びカラムに流し、この操作を 5 回繰り返した。最後の溶出液を溶出液①として回収した。次に、PBS/ 1% CHAPS を流速 1 mL/min で 2 mL 流した際の溶出液を回収した (溶出液②)。次に、PBS/ 1% CHAPS/ 1 M NaCl を流速 1 mL/min にて 4mL 流して、溶出液を 1 mL ずつ回収した (溶出液③, ④, ⑤)。

2-9-4. BCA 法によるタンパク質濃度測定

第 2 章, 第 2 節, 2-9-4 と同様の方法により、溶出液①～⑤のタンパク質濃度を測定した。

2-9-5. 再濃縮

溶出③～⑤のうちで、タンパク質の存在が確認できた③と④を混合して Vivaspin6 に入れ、遠心分離 (4°C, 2150×g, 60 分) を繰り返して 0.1 mL に濃縮した。

2-9-6. サンプルの SDS 化

濃縮液と等量の SDS 化サンプルバッファーと混合し、沸騰浴中で 5 分間加熱した。

2-9-7. ポリアクリルアミドゲルの作成

分離ゲルおよび濃縮ゲルのアクリルアミド濃度は、それぞれ 10% と 4% に設定した。

(1) 試薬の調製

A 溶液 : 30% アクリルアミド溶液

第 2 章, 第 2 節, 2-9-6 (1) と同様に調製した。

B 溶液 (分離ゲル緩衝液) : 1.5 M Tris-HCl バッファー (pH, 8.8)

第 2 章, 第 2 節, 2-9-6 (1) と同様に調製した。

C 溶液（濃縮ゲル緩衝液）：0.5 M Tris-HCl バッファー（pH, 6.8）

第 2 章，第 2 節，2-9-6 (1)と同様に調製した。

D 溶液：10%過硫酸アンモニウム溶液

第 2 章，第 2 節，2-9-6 (1)と同様に調製した。

10% SDS

第 2 章，第 2 節，2-9-6 (1)と同様に調製した。

水飽和イソブタノール

第 2 章，第 2 節，2-9-6 (1)と同様に調製した。

(2) 分離ゲルの作成（2 枚）

第 2 章，第 2 節，2-9-6 (2)と同様に作成した。

(3) 濃縮ゲルの作成（2 枚）

第 2 章，第 2 節，2-9-6 (3)と同様に作成した。

2-9-8. 電気泳動

(1) 試薬の調製

泳動バッファー

第 2 章，第 2 節，2-9-7 (1)と同様に作成した。

(2) 電気泳動

第 2 章，第 2 節，2-9-7 (2)と同様に作成した。

2-9-9. ウェスタンブロット

(1) 試薬の調製

第 2 章，第 2 節，2-9-8 (1)と同様に調製した。

(2) 膜転写

第 2 章，第 2 節，2-9-8 (2)と同様に調製した。

(3) 転写タンパク質の検出

第3章, 第2節, 2-6-8(3)と同様に行った。なお, 一次抗体には, anti-Wnt3a 抗体 (ab81614, abcam) と anti-Wnt11 抗体 (ab96730, abcam) を使用して, 二次抗体にはそれぞれ ECL mouse IgG, HRP-linked whole Ab (NA931, GE healthcare) と HRP-conjugated rabbit anti-goat IgG heavy and light chain secondary antibody を TBST で 10,000 倍希釈して使用した。

第3節 結果

3-1 複合培養系において、ペクチン添加した分化 Caco-2 細胞が IEC-6 細胞に与える影響

これまでにペクチン摂取による小腸絨毛の形態変化が報告されたが (Tasman-Jones C, et al., 1982; McCulloch J S, et al., 1998; Langhout D J, et al., 1999), 小腸絨毛は分化細胞から構成されて増殖することはないと考えられるため、これらの報告はペクチンが小腸上皮細胞と接触することにより陰窩における未分化細胞の増殖を刺激する可能性を示唆すると考えた。これを *in vitro* で証明しようと考えたが、これまでのところ、小腸上皮細胞を模した *in vitro* の培養系は報告されていない。そこで本研究では、小腸上皮細胞が絨毛と陰窩に大別されることに注目して、分化することで小腸上皮様の形態や性質を獲得し、絨毛のモデルとして多用される Caco-2 細胞をトランスウェルに播種し、20 日以上培養して分化させた。次いで、陰窩のモデルとして多用されるラット IEC-6 細胞をアウターウェルに播種して 24 時間培養し、分化 Caco-2 細胞とラット IEC-6 細胞から成る複合培養系を構築した。

ペクチンが分化 Caco-2 細胞を介して IEC-6 細胞へ与える影響を分析するために、構築した複合培養系にて、分化 Caco-2 細胞にペクチンを添加して 24 時間培養し、アウターウェルに播種した IEC-6 細胞の細胞増殖に与える影響を WST-8 法により測定した。その結果、分化 Caco-2 細胞へ添加したペクチンの濃度依存的に IEC-6 細胞が増加することを見出した (Fig. 3-1)。この結果より、ペクチンは分化 Caco-2 細胞に直接的に作用し、分化 Caco-2 細胞から分泌された物質によって IEC-6 細胞が増殖する可能性が示唆された。

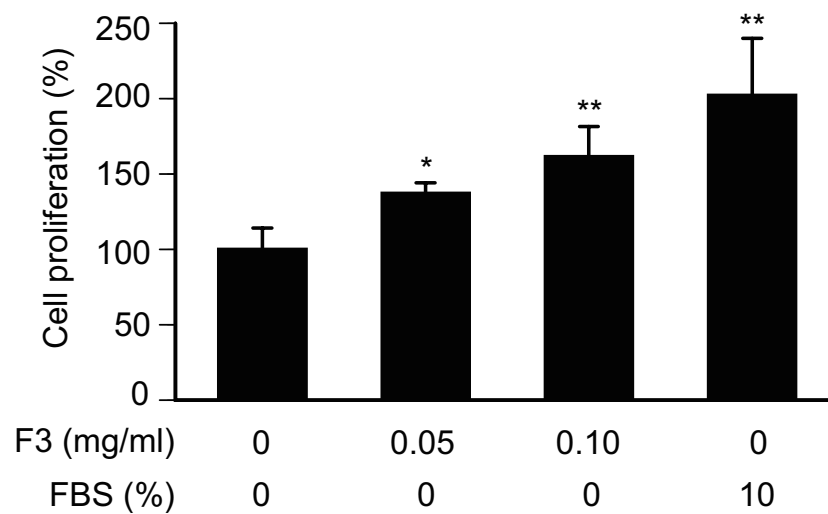


Fig. 3-1 分化 Caco-2 細胞へのペクチン添加が IEC-6 細胞の細胞増殖に与える影響

トランスウェルに Caco-2 細胞を播種して、20 日以上培養して分化させた。また、別のプレートに IEC-6 細胞を播種して、1 日培養して定着させた。分化 Caco-2 細胞を培養したトランスウェルを IEC-6 細胞のプレートに移動させて、小腸上皮を模倣した複合培養系を構築した。無血清培地を用いてペクチンを 0.05 mg/mL または 0.10 mg/mL に希釈して、ペクチン含有培地または無血清培地に交換して 24 時間培養した。その際、アウターウェルの培地も無血清培地に交換した。同時に、トランスウェルを設置しない IEC-6 細胞に対して 10% 血清 (FBS) 含有培地を添加し 24 時間培養した。IEC-6 細胞の細胞増殖を WST-8 法により測定した。Tukey 法を用いて統計分析を行った。*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$

3-2 HSulf-1/2 発現にペクチンが与える影響

Fig. 3-1 の結果から、ペクチンが分化 Caco-2 細胞へ直接的に作用することが示唆されたため、ペクチンが分化 Caco-2 細胞表面の HS 構造へ与える影響を調べた。その結果、ペクチン添加により、HS を構成する二糖単位の組成が変化すること、特に Δ Di-diS1 と Δ Di-triS の割合が現象した（未発表データ）。これまでに細胞表面において HS の特定の硫酸化構造（ Δ Di-diS1 と Δ Di-triS）を脱硫酸化する酵素（HS 6-*O*-endosulfatases）の存在が報告されていることから（Lamanna W C, et al., 2008; Frese M A, et al., 2009）、ペクチンがこれらの酵素発現に影響を与える可能性があると考えた。

そこで、HSulf-1/2 が分化 Caco-2 細胞に発現しているかを調べるために、分化 Caco-2 細胞から精製した total RNA を用いて cDNA を合成して、HSulf-1/2 の mRNA 発現を RT-PCR によって分析した。その結果、分化 Caco-2 細胞には HSulf-1/2 とともに発現することが明らかとなった（Fig. 3-2, A）。そこで、ペクチンが HSulf-1/2 発現に与える影響を調べるために、0.1 mg/mL ペクチンを分化 Caco-2 細胞に 1 時間接触させて、通常の培地に交換した後に一定時間培養して、total RNA を回収した。それを基にして、ペクチン 1 時間接触後の 3, 9, 18, 24 時間後の HSulf-1/2 発現を RT-PCR で分析すると、HSulf-1 の発現がペクチン刺激により著しく抑制されることを見出した（Fig. 3-2, A）。一方で、HSulf-2 の PCR 産物はペクチン接触の 3 時間後にコントロールより濃くなり、24 時間後にはコントロールと同程度になったことから、HSulf-2 発現はペクチンにより誘導されることが示唆された（Fig. 3-2, A）。そこで、ペクチンが HSulf-2 発現に与える影響を定量 PCR により解析した。その結果、ペクチン刺激の 3 時間後には HSulf-2 の mRNA 発現量がコントロールの約 3 倍に増加して、12 時間後まで有意に増加することを発見した（Fig. 3-2, B）。ペクチン刺激の 15 時間後から 24 時間後まではコントロールと比較して変化しなかった。これらの結果より、分化 Caco-2 細胞にペクチンを添加すると、HSulf-1 の発現は抑制され、HSulf-2 の発現は亢進することが示唆された。

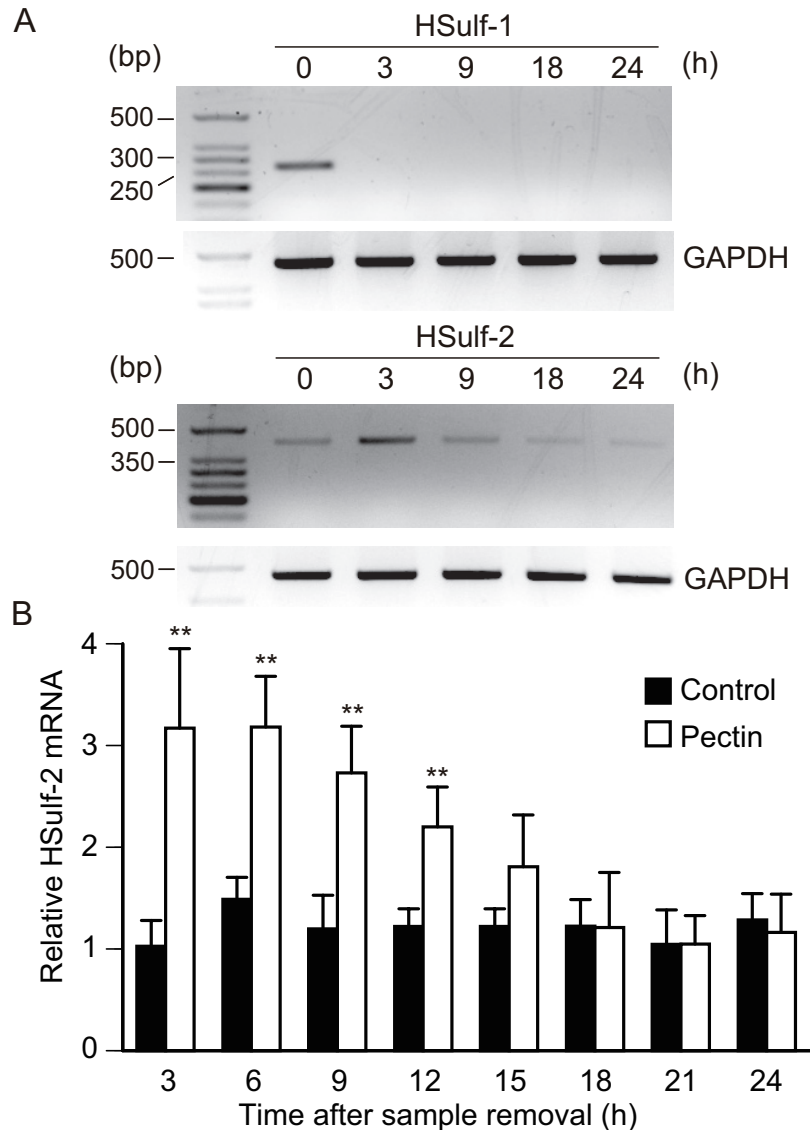


Fig. 3-2 分化 Caco-2 細胞の HSulf-1/2 発現にペクチンが与える影響

(A) 分化 Caco-2 に 0.1 mg/mL ペクチンを 1 時間添加して、通常の培地に交換して 3, 9, 18, 24 時間培養した後に、total RNA を回収した。HSulf-1 と HSulf-2 の発現量を RT-PCR で分析した。また、ローディングコントロールとして GAPDH の発現を分析した。図中左側の数値は、分子用マーカの分子量を示す。(B) 分化 Caco-2 に 0.1 mg/mL ペクチンを 1 時間添加して、通常の培地に交換して 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24 時間培養した後に、total RNA を回収した。HSulf-2 の発現量を real time RT-PCR で分析した。Tukey 法を用いて統計分析を行った。**: $P < 0.01$

3-3 6-OST-1/2 と 2-OST-1 発現にペクチンが与える影響

HS の硫酸化に関わる他の硫酸基転移酵素の発現にペクチンが与える影響を調べるために、まずは分化 Caco-2 細胞に各酵素が発現するのかを RT-PCR により調べた。6-OST-1, 2, 3 の発現を調べると、分化 Caco-2 細胞には 6-OST-1 と 6-OST-2 が発現することが判明した。また、分化 Caco-2 細胞には 2-OST-1 が発現することも発見した。そこで、6-OST-1, 2, 2-OST-1 の発現にペクチンが与える影響を定量 PCR により分析すると、6-OST-2 はペクチンで刺激しても変化しなかった (Fig. 3-3, B)。一方、6-OST-1 は、ペクチン刺激の 3 時間後に約 3 倍に発現量が増加して 12 時間後まで増加していた (Fig. 3-3, A)。2-OST-1 はペクチン刺激の 9, 12, 15 時間後に有意に減少することが明らかとなった (Fig. 3-3, C)。これらの結果より、ペクチンは分化 Caco-2 細胞に接触することで、6-OST-1, 6-OST-2, 2-OST-1 の発現を変化させることが示唆された。

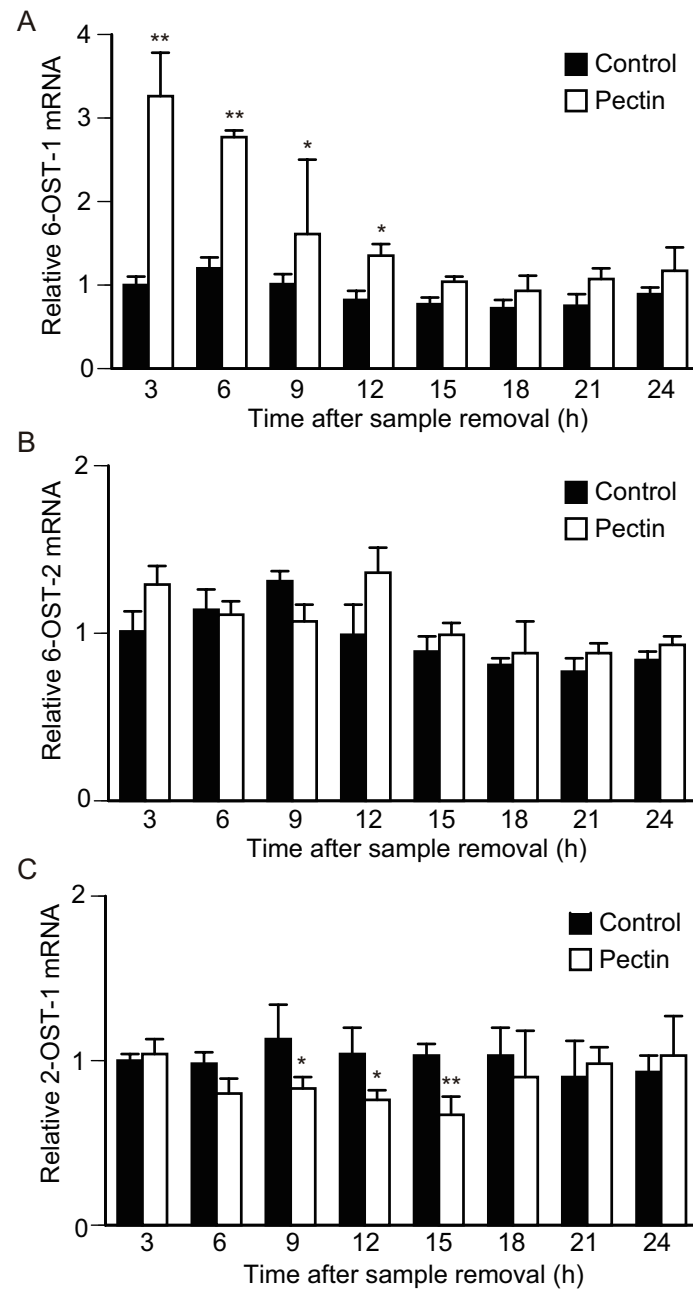


Fig. 3-3 分化 Caco-2 細胞の HS 硫酸基転移酵素発現にペクチンが与える影響

分化 Caco-2 に 0.1 mg/mL ペクチンを 1 時間添加して、通常の培地に交換して 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24 時間培養した後に、total RNA を回収した。(A) 6-OST-1, (B) 6-OST-2, (C) 2-OST-1 の mRNA 発現量を real time RT-PCR で分析した。Tukey 法を用いて統計分析を行った。*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$

3-4 $\alpha 5$ インテグリンの局在にペクチンが与える影響

ここまでで、ペクチンは分化 Caco-2 細胞における HS 硫酸基転移酵素や脱硫酸化酵素の遺伝子発現に影響を及ぼすことが示されたが、ペクチンはどのようにして分化 Caco-2 細胞へ刺激を与えたのであろうか？プルーンから精製したペクチンは細胞外マトリクス構成タンパク質であるフィブロネクチンと結合することが Biacore システムにより示されたため（本田，2011），分化 Caco-2 細胞においても細胞外マトリクスのフィブロネクチンが関与する可能性が挙げられた。フィブロネクチンは分泌タンパク質であるため，まずはそのレセプターである $\alpha 5$ インテグリンが分化 Caco-2 細胞のどこに発現するのかを調べた。そのために，Caco-2 細胞をチャンバースライド上で約 4 週間培養して分化させた。そして， $\alpha 5$ インテグリンは緑色，タイトジャンクションのマーカータンパク質である ZO-1 を赤色に染色した。

Fig. 3-4 に示したように，赤色で染色された ZO-1 が細胞と細胞の間に観察されたことから，今回の実験に使用した Caco-2 細胞はタイトジャンクションを完全に形成し，分化していることが見受けられた。また，赤色の ZO-1 と緑色の $\alpha 5$ インテグリンが共局在して黄色になった箇所が多く観察された。この結果より，分化 Caco-2 細胞において $\alpha 5$ インテグリンはタイトジャンクションの近傍に発現することが示唆された。

次に， $\alpha 5$ インテグリンが分化 Caco-2 細胞のアピカル側からバソラテラル側にかけて，どこに発現するかを調べるために，Z スタック画像を取得した。Z スタックを行うことで，Z 方面に焦点面をずらして連続的に断層画像を取得できる。そこで，分化 Caco-2 細胞のアピカルからバソラテラルにかけて 23 枚の連続画像を取得し，アピカル側から 5 枚目の画像と 10 枚目の画像を Fig. 3-5 と Fig. 3-6 に示した。Fig. 3-5 の(A)では，赤色で染色された ZO-1 の発現があまり見られないが，(B)に示したように緑色で染色された $\alpha 5$ インテグリンが細胞と細胞の間に確認することができた。このとき，(C)には共局在を示す黄色の染色は限られた箇所に散見された。一方で，Fig. 3-6 に示したアピカル側から 10 枚目の画像では，ZO-1 が明確に染色されていることから，Fig. 3-5 (A)はタイトジャンクションが形成される面のよりアピカル側の画像であることを確認した。さらに，Fig. 3-6 (B)では $\alpha 5$ インテグリンが Fig. 3-5 (B)よりも明確に検出され，Fig. 3-6 (C)では Fig. 3-5 (C)よりも多くの箇所が黄色に染色された。これらの結果から，分化 Caco-2 細胞において， $\alpha 5$ インテグリンはタイトジャン

クシオン付近からアピカル側にかけて連続的に発現することが示唆され、タイトジャンクションよりもアピカル側に発現することを確認した。

次いで、分化 Caco-2 細胞を 0.1 mg/mL ペクチンまたは通常培地で 24 時間培養して、ペクチンが $\alpha 5$ インテグリンの局在に与える影響を共焦点レーザースキャン顕微鏡を用いて分析した。 $\alpha 5$ インテグリンは緑色、タイトジャンクションのマーカータンパク質である ZO-1 は赤色、核を青色に染色した。Fig. 3-7 はペクチンで刺激しない場合の画像であり、Fig. 3-8 にペクチンで 24 時間刺激した場合の画像を示した。両画像ともに、細胞間を ZO-1 とインテグリンが明確に染色されており、多くの箇所で共局在して黄色になっていることから、ペクチンで刺激しても分化 Caco-2 細胞における $\alpha 5$ インテグリンの局在は変化しないことが示唆された。

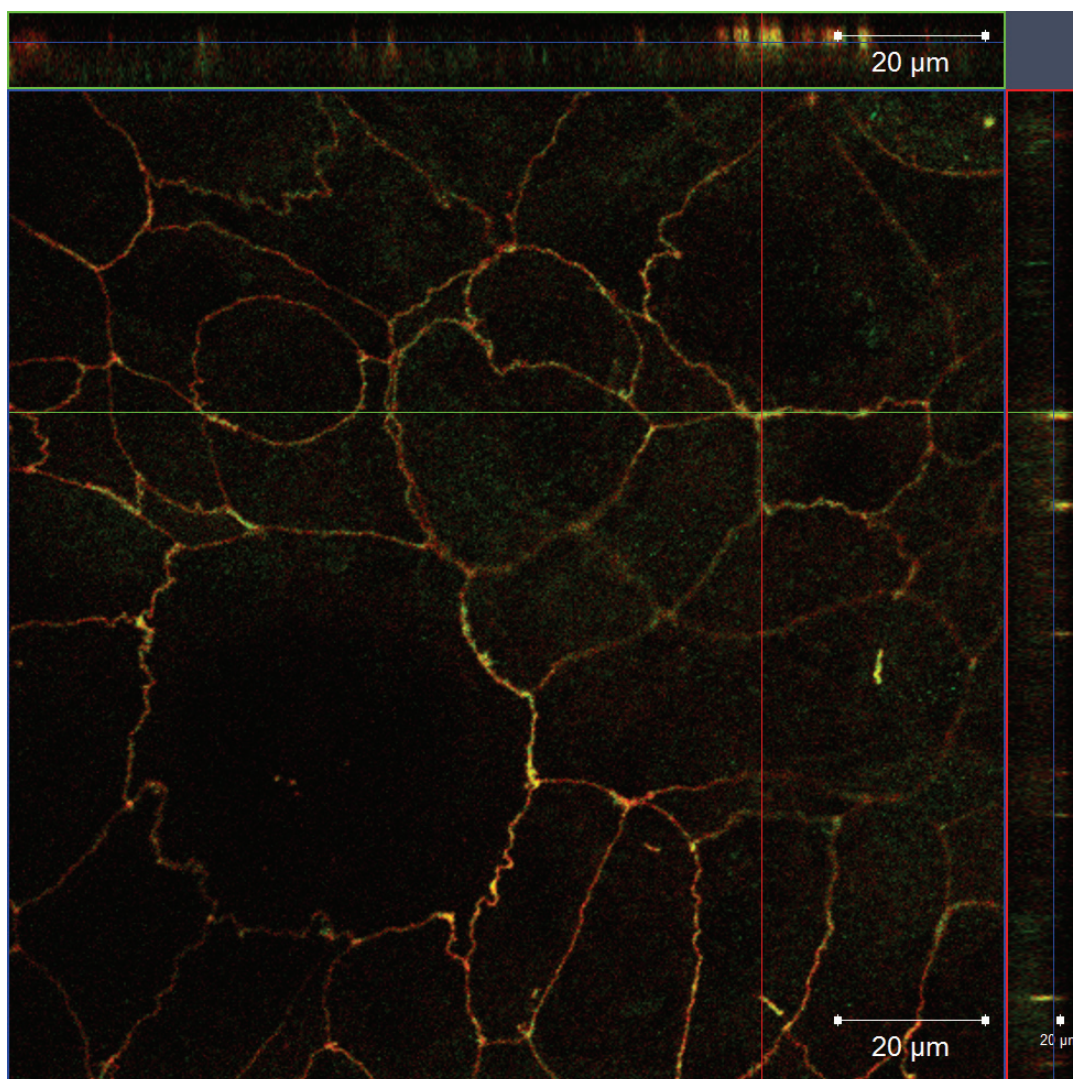


Fig. 3-4 浸透処理した分化 Caco-2 細胞における $\alpha 5$ インテグリンと ZO-1 の局在観察

チャンバースライド上で約 4 週間培養して分化させた Caco-2 細胞に対して、TritonX-100 による浸透処理を行い、抗 $\alpha 5$ インテグリン抗体と抗 ZO-1 抗体を用いて $\alpha 5$ インテグリンと ZO-1 を緑色、赤色に染色し、共焦点レーザースキャン顕微鏡を用いて観察した。接眼レンズは $\times 10$ 、対物レンズは $\times 63$ を使用した。

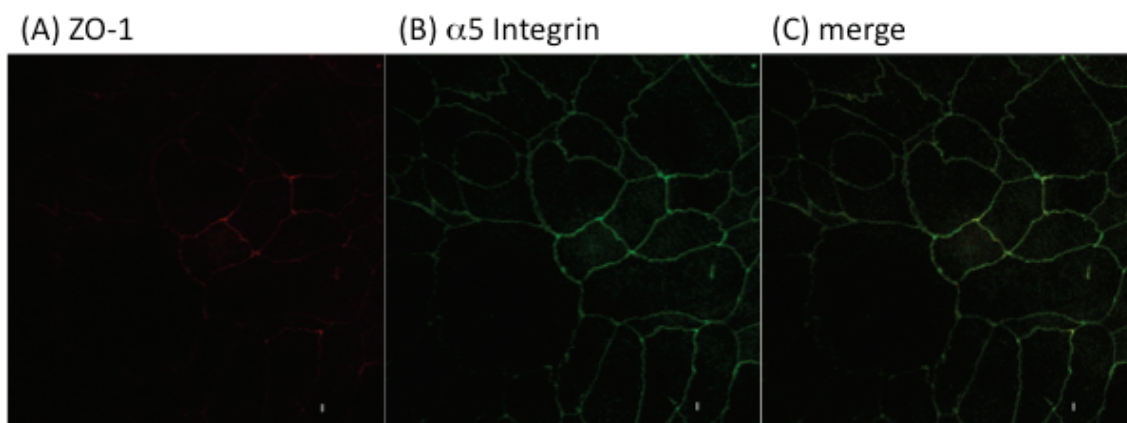


Fig. 3-5 浸透処理した分化 Caco-2 細胞における $\alpha 5$ インテグリンと ZO-1 の局在観察（アピカル側から 5 枚目）

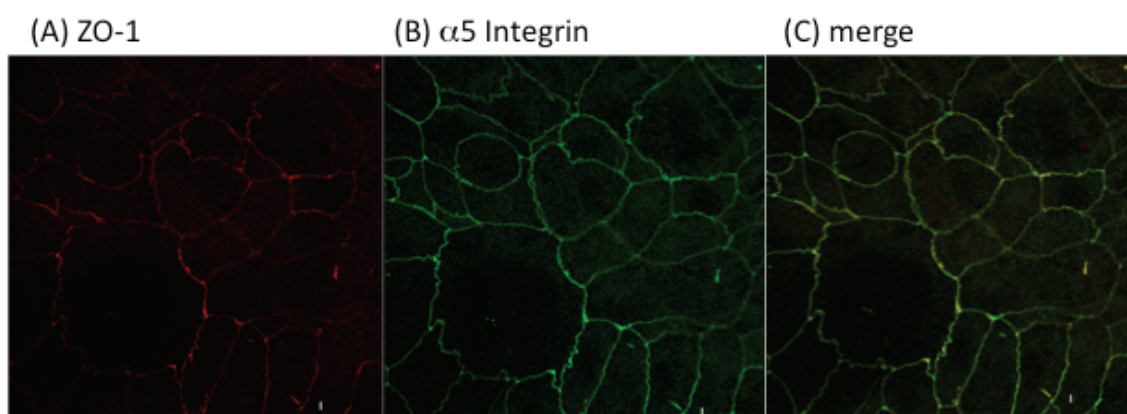


Fig. 3-6 浸透処理した分化 Caco-2 細胞における $\alpha 5$ インテグリンと ZO-1 の局在観察（アピカル側から 10 枚目）

チャンバースライド上で約 4 週間培養して分化させた Caco-2 細胞に対して、TritonX-100 による浸透処理を行い、抗 $\alpha 5$ インテグリン抗体と抗 ZO-1 抗体を用いて $\alpha 5$ インテグリンと ZO-1 を緑色、赤色に染色し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。接眼レンズは $\times 10$ 、対物レンズは $\times 63$ を使用した。Z スタック撮影により、23 層の画像を取得し、アピカル側から 5 枚目 (Fig. 3-5) と 10 枚目 (Fig. 3-6) の画像を示した。

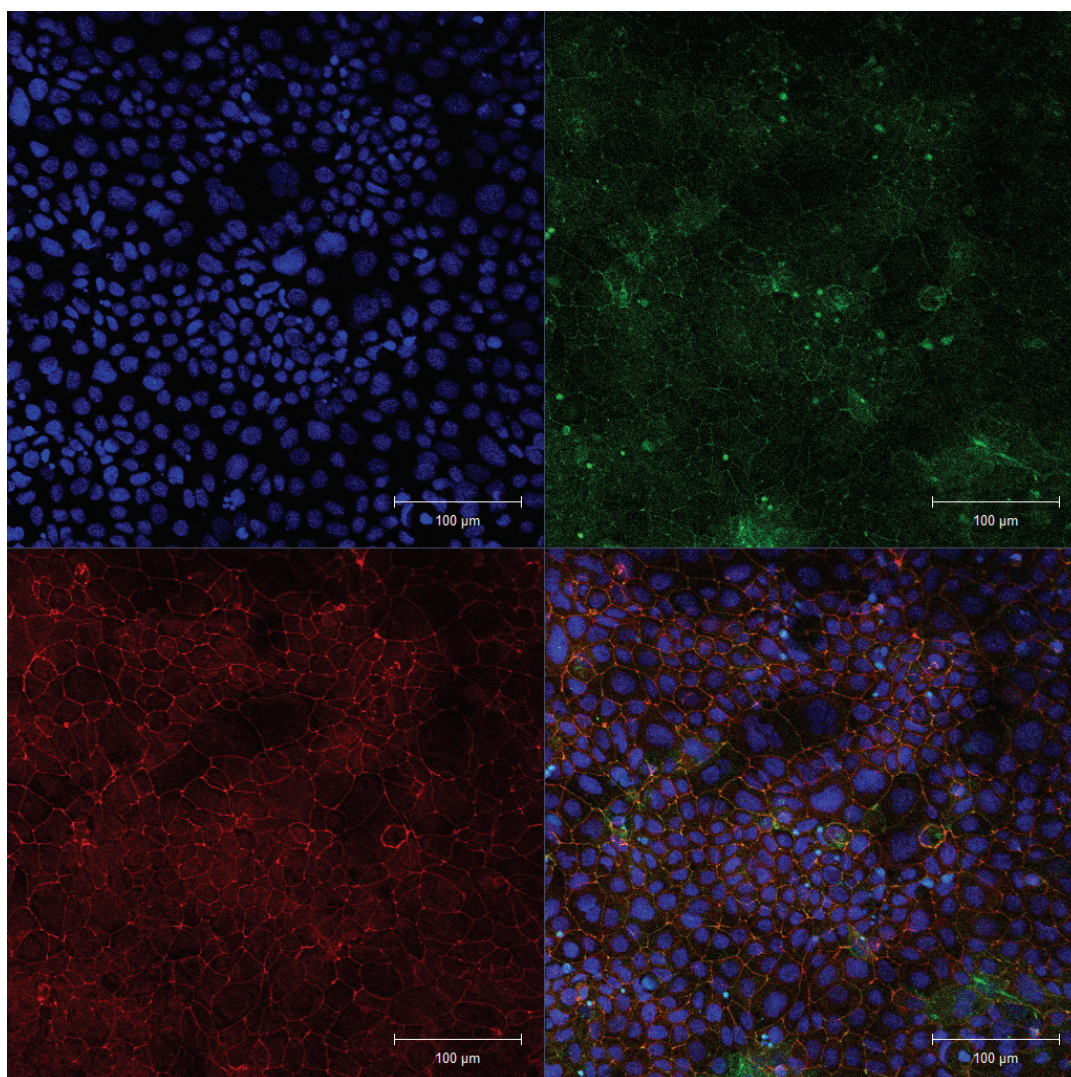


Fig. 3-7 浸透処理した分化 Caco-2 細胞における $\alpha 5$ インテグリンと ZO-1 の局在観察

チャンバースライド上で約 4 週間培養して分化させた Caco-2 細胞に対して、通常の培地にて 24 時間培養し、TritonX-100 による浸透処理を行い、DAPI と抗 $\alpha 5$ インテグリン抗体、抗 ZO-1 抗体を用いて核、 $\alpha 5$ インテグリン、ZO-1 を青色、緑色、赤色に染色し、共焦点レーザースキャン顕微鏡を用いて観察した。接眼レンズは $\times 10$ 、対物レンズは $\times 20$ を使用した。右下の画像は merge を示す。

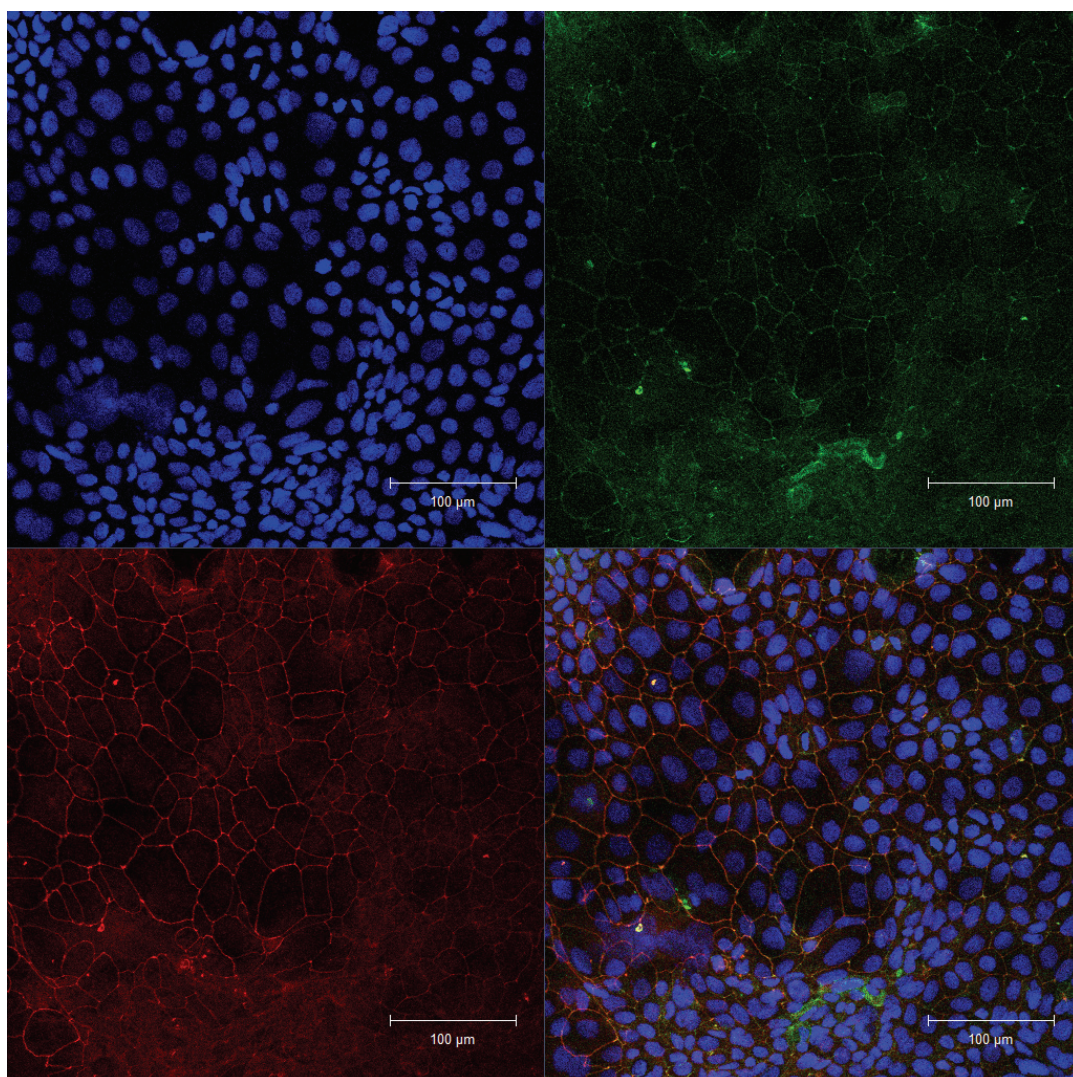


Fig. 3-8 ペクチン添加後に浸透処理した分化 Caco-2 細胞における $\alpha 5$ インテグリンと ZO-1 の局在観察

チャンバースライド上で約 4 週間培養して分化させた Caco-2 細胞に対して、0.1 mg/mL ペクチン含有培地にて 24 時間培養し、TritonX-100 による浸透処理を行い、DAPI と抗 $\alpha 5$ インテグリン抗体、抗 ZO-1 抗体を用いて核、 $\alpha 5$ インテグリン、ZO-1 を青色、緑色、赤色に染色し、共焦点レーザースキャン顕微鏡を用いて観察した。接眼レンズは $\times 10$ 、対物レンズは $\times 20$ を使用した。右下の画像は merge を示す。

3-5 フィブロネクチンの局在にペクチンが与える影響

当研究室のこれまでの研究から、細胞外マトリクスの構成タンパク質であるフィブロネクチンは、分化 Caco-2 細胞のアピカル側において一部のタイトジャンクションに発現することが示唆された（本田，2011）。そこで、分化 Caco-2 細胞のフィブロネクチンの発現がペクチン刺激によって影響されるかを調べるために、チャンバースライド上で約 4 週間培養して分化させた Caco-2 細胞を用いて、フィブロネクチンの発現を共焦点レーザー顕微鏡により観察した。なお、フィブロネクチンは緑色、ZO-1 は赤色、細胞核は青色に染色した。

そこで、まずは分化 Caco-2 細胞を TritonX-100 により浸透処理して、バソラテラル側におけるフィブロネクチンの局在を観察した。分化 Caco-2 細胞を通常培地で 24 時間培養した後に浸透処理した場合と、分化 Caco-2 細胞を 0.1 mg/mL ペクチンで 24 時間培養した後に浸透処理した場合の画像を Fig. 3-9 と Fig. 3-10 に示した。Fig. 3-9 と 3-10 では、フィブロネクチンがバソラテラル側に存在することを確認した。そして、フィブロネクチンがネットワーク状に広がる様子を観察することができた。しかしながら、Fig. 3-9 と Fig. 3-10 でフィブロネクチンが同様に観察されたことから、分化 Caco-2 細胞をペクチンで刺激してもバソラテラル側におけるフィブロネクチンの発現に影響を及ぼさなことが示唆された。

次に、TritonX-100 による浸透処理を行わないことで、アピカル側におけるフィブロネクチンの発現にペクチンが与える影響を調べた。分化 Caco-2 細胞を通常培地で 24 時間培養した場合と、分化 Caco-2 細胞を 0.1 mg/mL ペクチンで 24 時間培養した場合の画像を Fig. 3-11, 3-12, 3-13 に示した。Fig. 3-11 では、一部の ZO-1 とフィブロネクチンが近傍に局在することで黄色に染色された箇所を確認した。また、Fig. 3-12 と 3-13 でも Fig. 3-11 と同様に、黄色に染色された箇所を確認した。しかしながら Fig. 3-12 では、Fig. 3-11 と比べて多くのフィブロネクチンを観察できた。さらに、Fig. 3-13 から、一部のフィブロネクチンは赤で染色された ZO-1 よりアピカル側に存在することが確認できた。この結果より、分化 Caco-2 細胞をペクチンで刺激すると、アピカル側におけるフィブロネクチンの発現量が増加することが示唆された。

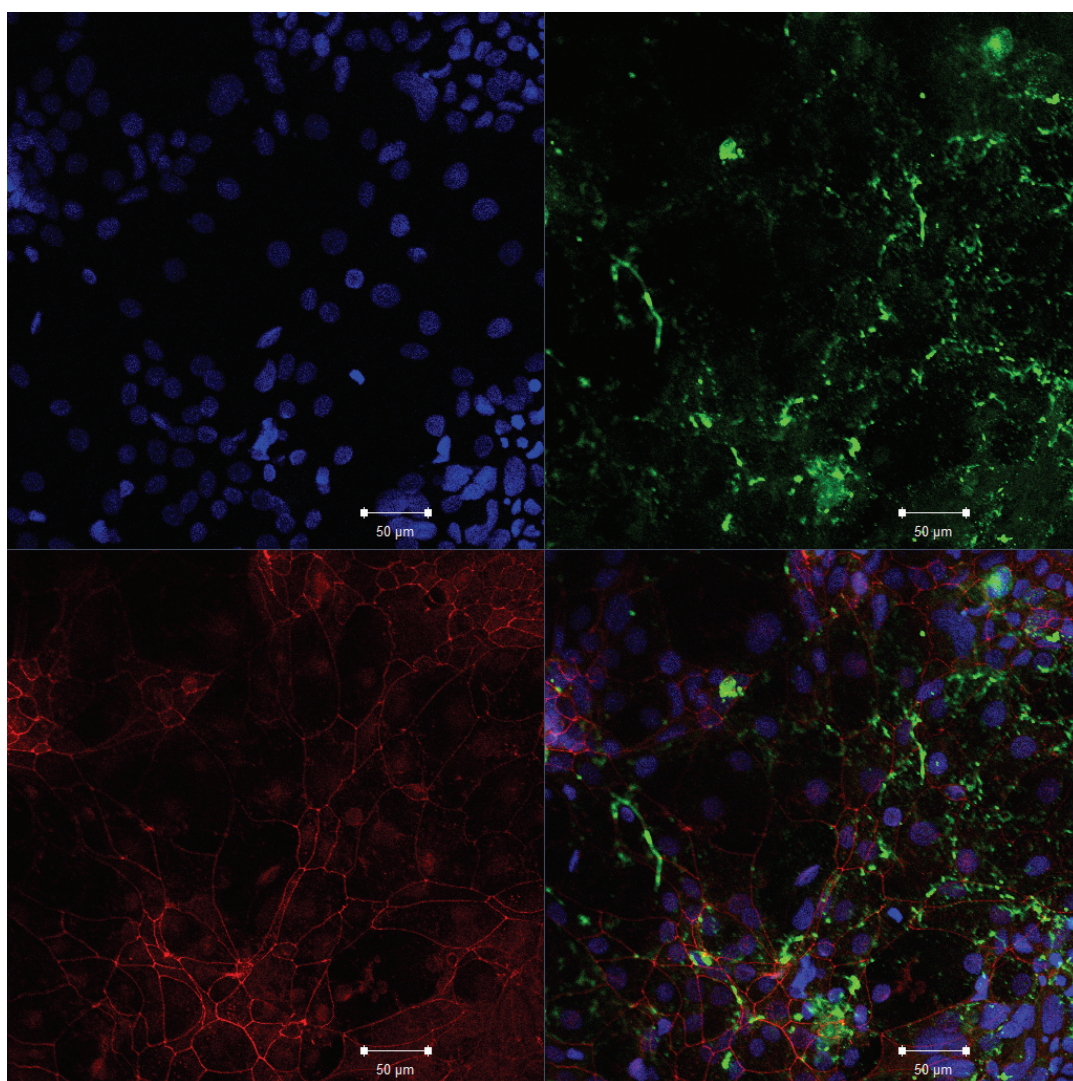


Fig. 3-9 浸透処理した分化 Caco-2 細胞におけるフィブロネクチンと ZO-1 の局在観察

チャンバースライド上で約 4 週間培養して分化させた Caco-2 細胞に対して、通常培地にて 24 時間培養し、TritonX-100 による浸透処理を行い、DAPI と抗フィブロネクチン抗体、抗 ZO-1 抗体を用いて核、フィブロネクチン、ZO-1 を青色、緑色、赤色に染色し、共焦点レーザースキャン顕微鏡を用いて観察した。接眼レンズは×10、対物レンズは×20 を使用した。右下の画像は merge を示す。

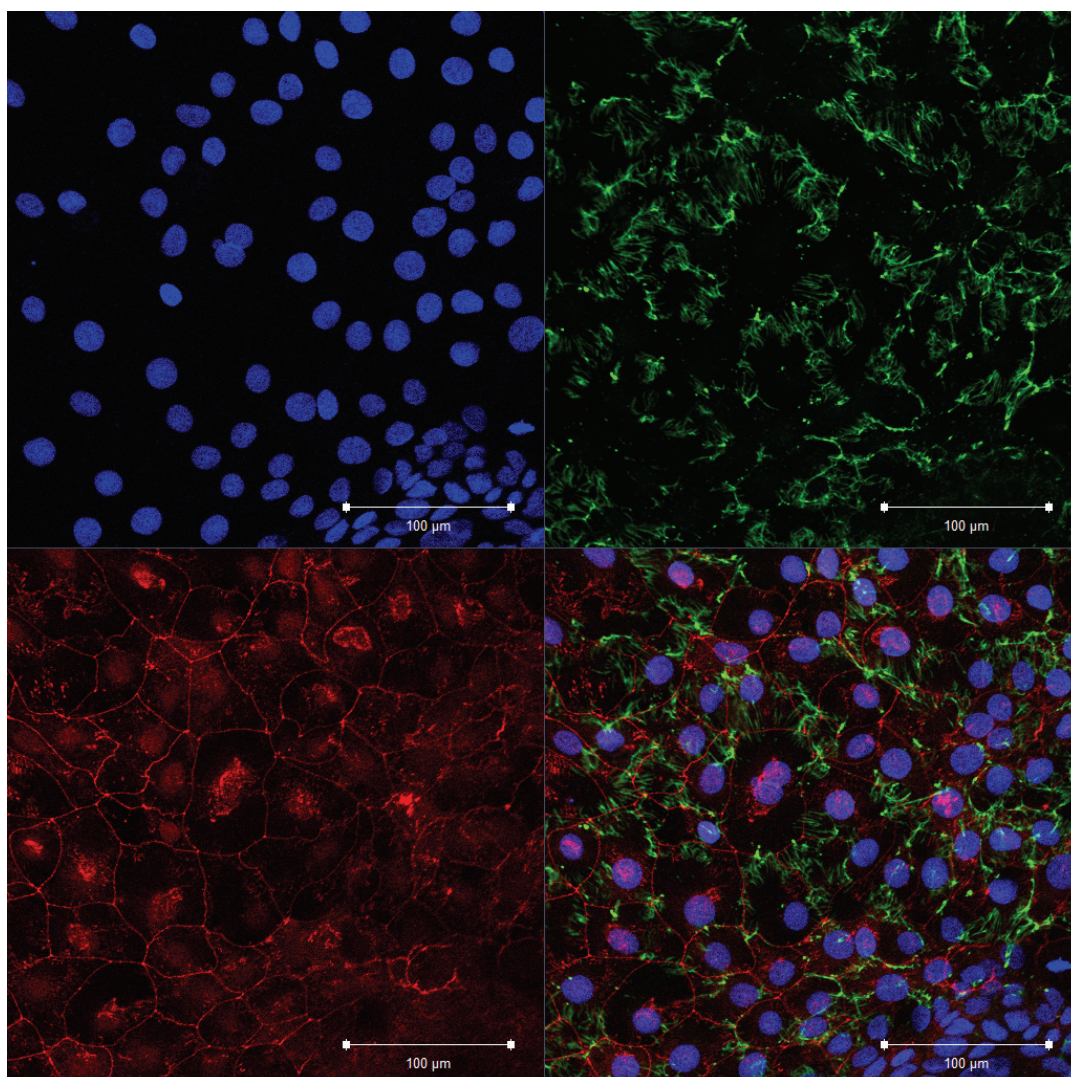


Fig. 3-10 ペクチン添加後に浸透処理した分化 Caco-2 細胞におけるフィブロネクチンと ZO-1 の局在観察

チャンバースライド上で約 4 週間培養して分化させた Caco-2 細胞に対して、0.1 mg/mL ペクチン含有培地にて 24 時間培養し、TritonX-100 による浸透処理を行い、DAPI と抗 $\alpha 5$ インテグリン抗体、抗 ZO-1 抗体を用いて核、 $\alpha 5$ インテグリン、ZO-1 を青色、緑色、赤色に染色し、共焦点レーザースキャン顕微鏡を用いて観察した。接眼レンズは $\times 10$ 、対物レンズは $\times 20$ を使用した。右下の画像は merge を示す。

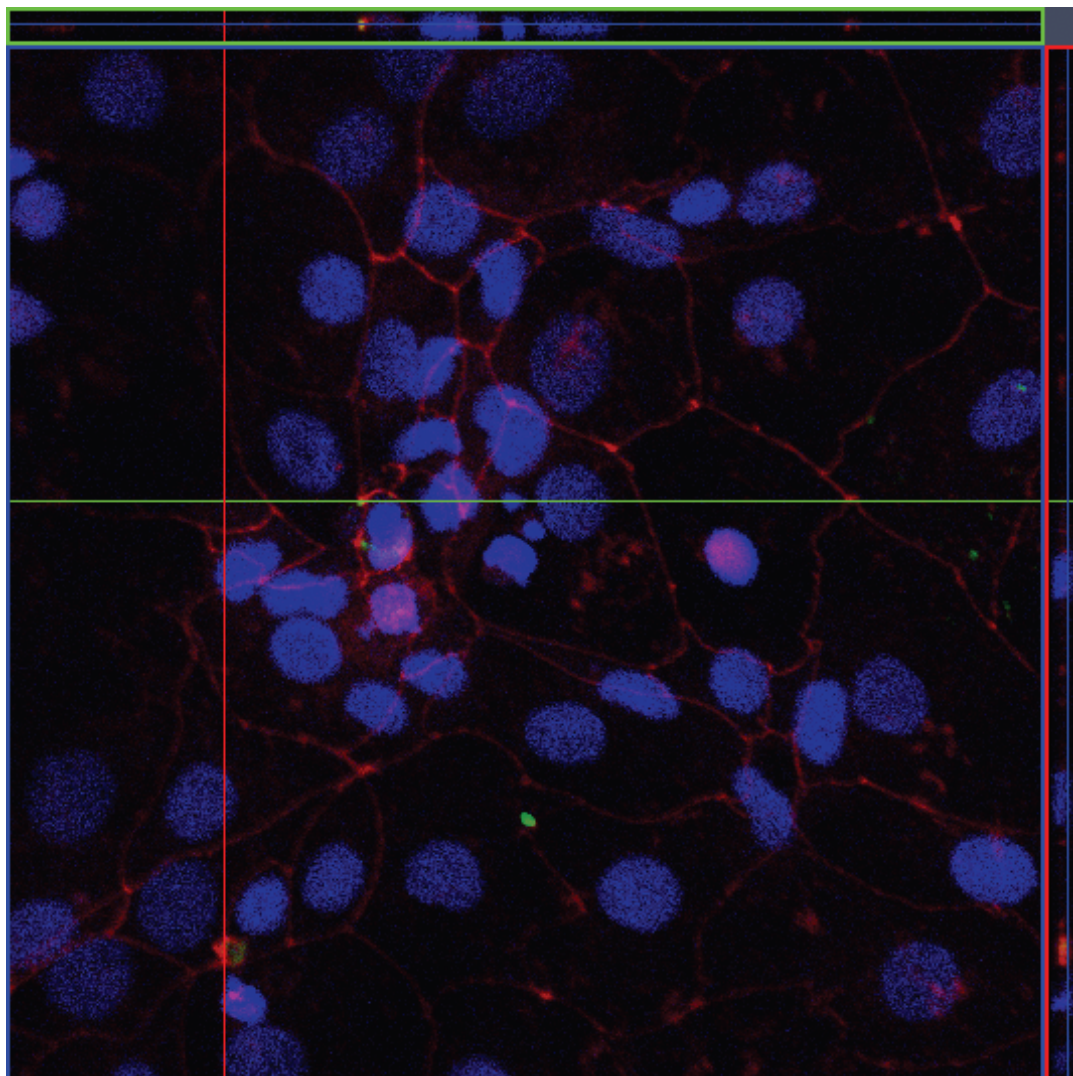


Fig. 3-11 浸透処理しない分化 Caco-2 細胞におけるフィブロネクチンと ZO-1 の局在観察

チャンバースライド上で約 4 週間培養して分化させた Caco-2 細胞に対して、通常培地にて 24 時間培養し、浸透処理は行なわず、DAPI と抗フィブロネクチン抗体、抗 ZO-1 抗体を用いて核、フィブロネクチン、ZO-1 を青色、緑色、赤色に染色し、共焦点レーザースキャン顕微鏡を用いて観察した。接眼レンズは×10、対物レンズは×20 を使用した。

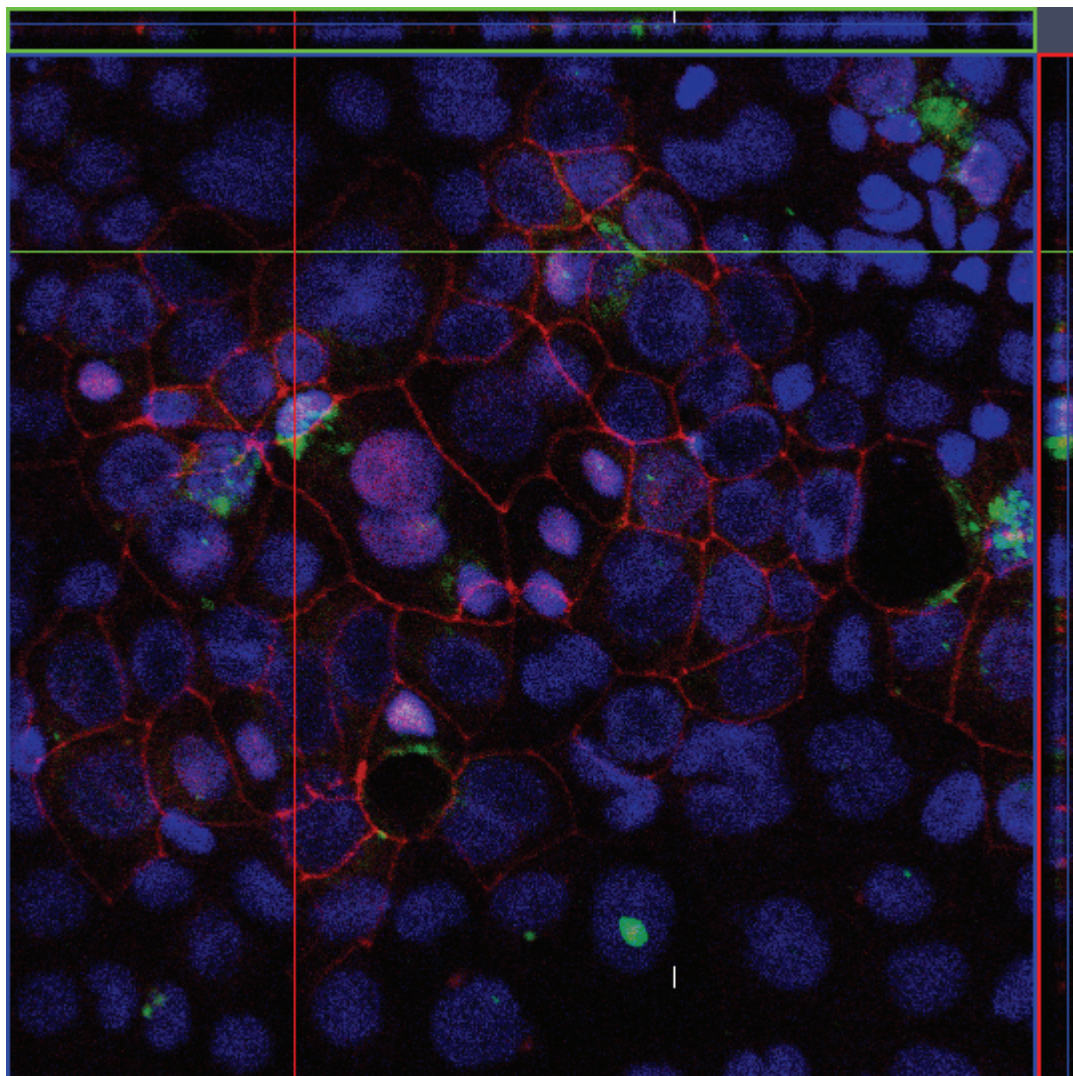


Fig. 3-12 ペクチン添加後に浸透処理しない分化 Caco-2 細胞におけるフィブロネクチンと ZO-1 の局在観察

チャンバースライド上で約 4 週間培養して分化させた Caco-2 細胞に対して、0.1 mg/mL ペクチン含有培地にて 24 時間培養し、浸透処理は行わず、DAPI と抗フィブロネクチン抗体、抗 ZO-1 抗体を用いて核、フィブロネクチン、ZO-1 を青色、緑色、赤色に染色し、共焦点レーザースキャン顕微鏡を用いて観察した。接眼レンズは×10、対物レンズは×20 を使用した。

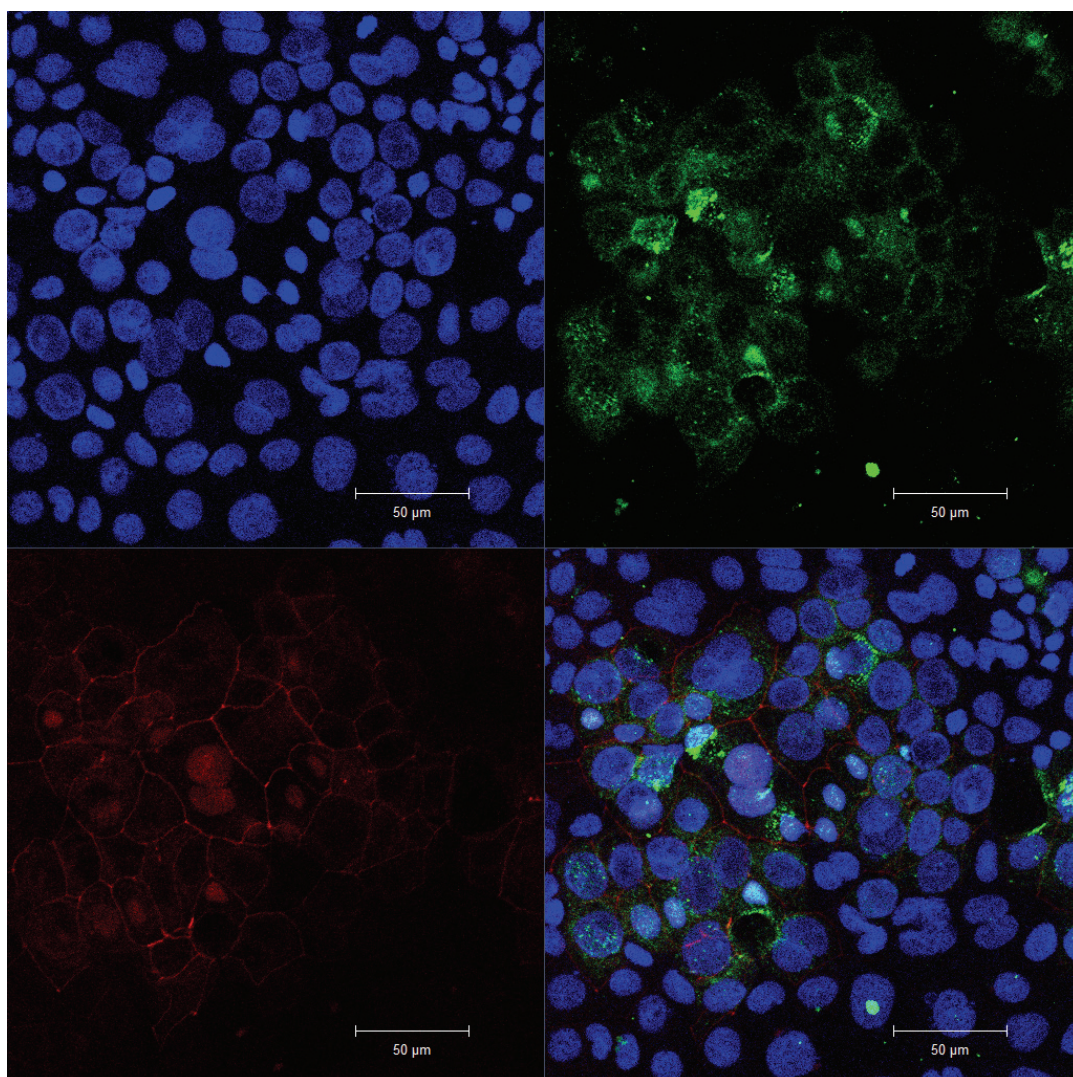


Fig. 3-13 ペクチン添加後に浸透処理しない分化 Caco-2 細胞におけるフィブロネクチンと ZO-1 の局在観察

Fig. 3-12 と同条件にて撮影した画像のうち、よりアピカル側の画像を示した。

3-6 分化 Caco-2 細胞におけるペクチンの局在解析

当研究室のこれまでの研究から、ブルーネから精製したペクチンはフィブロネクチンと結合することが Biacore を用いた実験により報告されている (本田, 2011)。第 3 章, 第 3 節, 3-4 と 3-5 の結果から, 分化 Caco-2 細胞において, $\alpha 5$ インテグリンはタイトジャンクションよりアピカル側に発現し, アピカル側にはフィブロネクチンが発現することを確認したことから, ペクチンがフィブロネクチンと $\alpha 5$ インテグリンを介して Caco-2 細胞に影響を与える可能性が示唆された。しかしながら, Caco-2 細胞におけるペクチンとフィブロネクチンの結合は確認されていない。そこで, 分化 Caco-2 におけるペクチンとフィブロネクチンの結合の検出を共焦点レーザー顕微鏡を用いて試みた。

第 3 章, 第 2 節, 2-4-1 と 2-4-2 に記したようにペクチンの還元末端をアミノ化し, ビオチンを結合させた。調製したビオチン化ペクチンは, ガラクツロン酸を標準液としたカルバゾール硫酸法により確認した。

ペクチンとフィブロネクチンの結合力は強くないことが予想されたため, チャンバースライド上の分化 Caco-2 細胞にビオチン化ペクチンを 1 時間接触させた後, 培地を取り除かずに, 8% PFA を丁寧に注ぎ入れて固定化を行った。そしてペクチンを緑色, ZO-1 を赤色に染色した。TritonX-100 による浸透処理を行わなかったものを Fig. 3-14 に示し, 浸透処理を行った場合を Fig. 3-15 に示した。その結果, Fig.3-14 ではペクチンを示す緑色の染色を確認することができなかった。Fig. 3-14 に薄く見られる緑色の点は, 共焦点レーザー顕微鏡を観察した際に明確に発色したものでなかったことから, バックグラウンドであると考えた。浸透処理を行った Fig. 3-15 でもペクチンの局在を観察することができなかった。

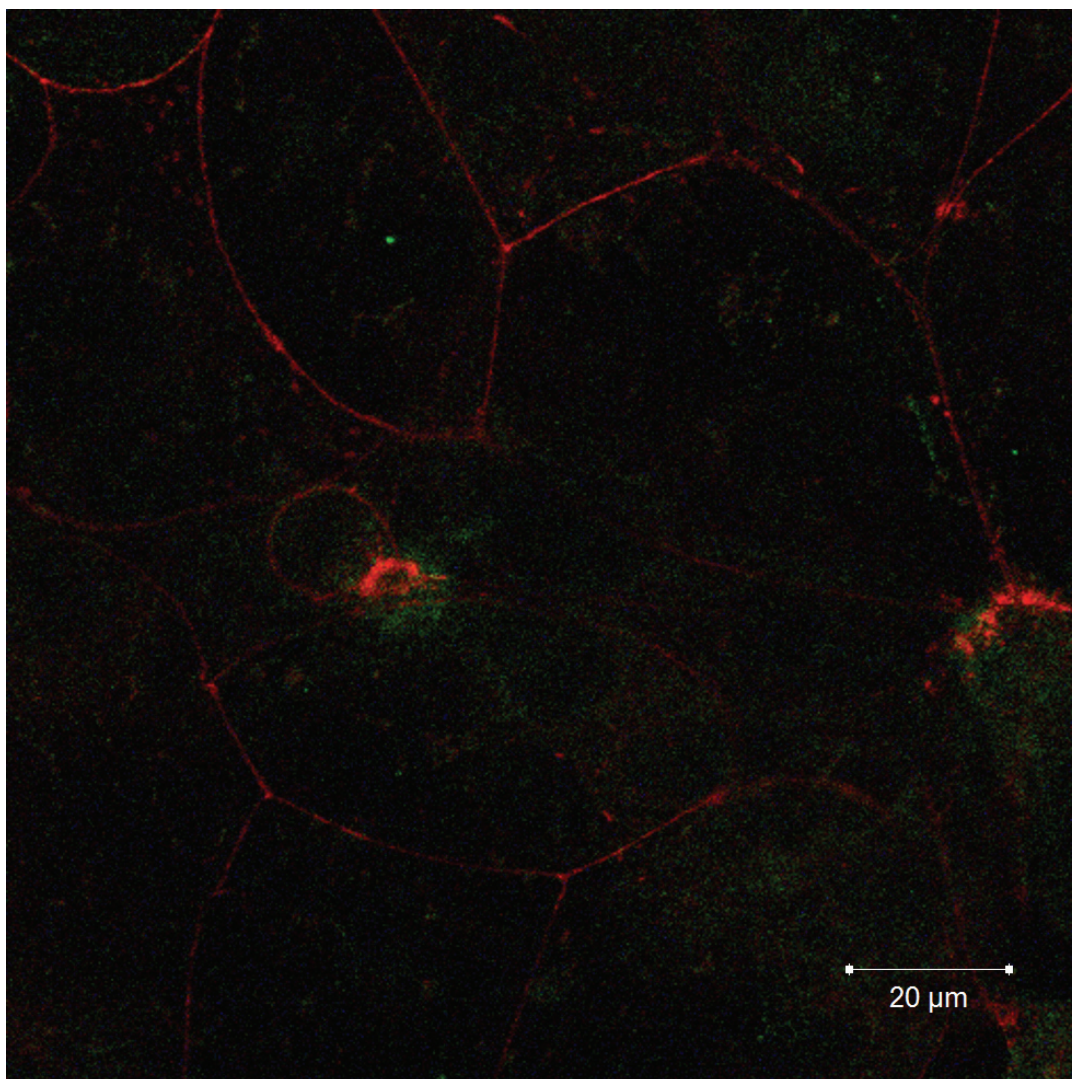


Fig. 3-14 浸透処理しない分化 Caco-2 細胞におけるペクチンと ZO-1 の局在観察

チャンバースライド上で約 4 週間培養して分化させた Caco-2 細胞に対して、ビオチン標識ペクチンを 1 時間添加し、浸透処理は行わず、蛍光標識ストレプトアビジンと抗 ZO-1 抗体を用いてフィブロネクチンと ZO-1 を緑色、赤色に染色し、共焦点レーザースキャン顕微鏡を用いて観察した。接眼レンズは×10、対物レンズは×63 を使用した。

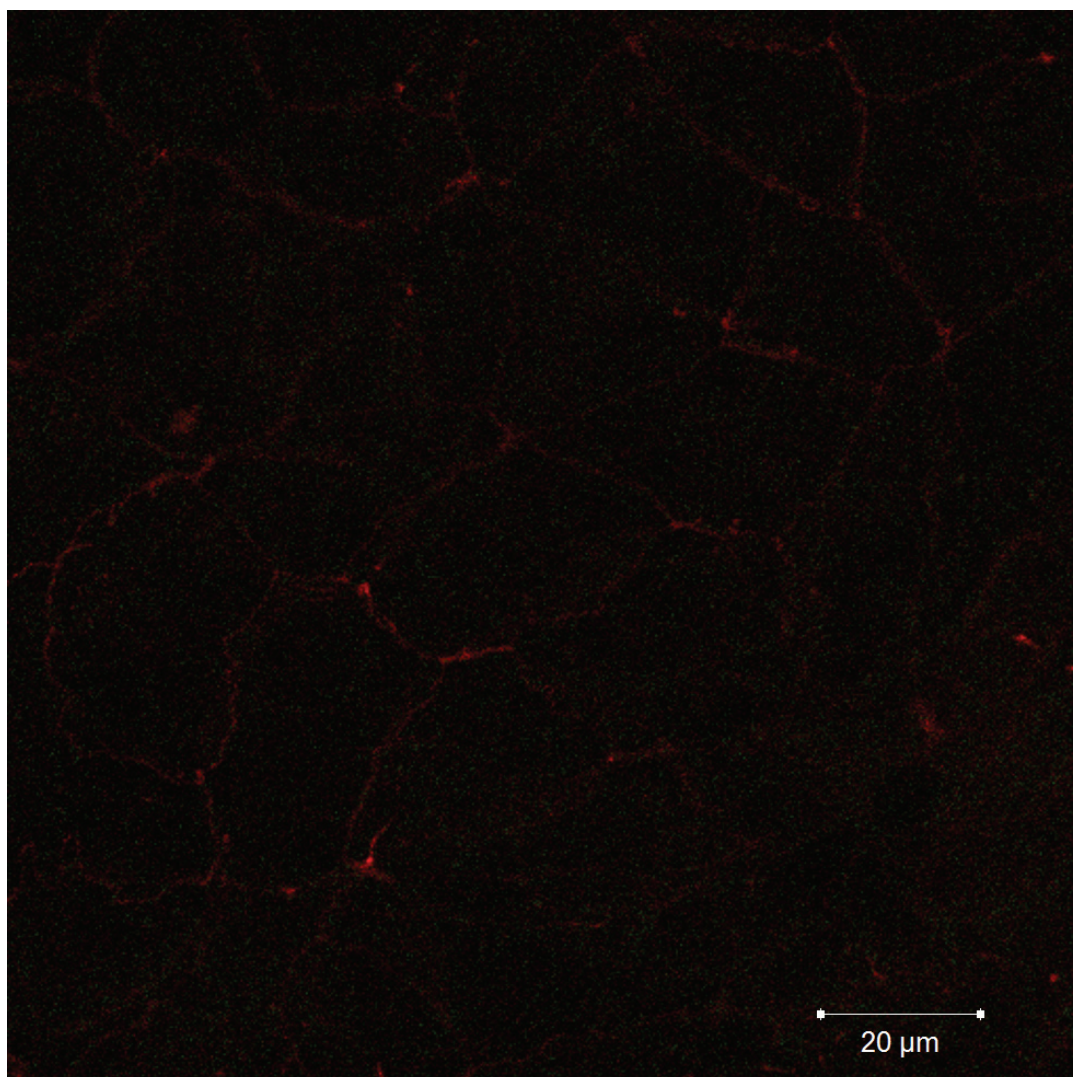


Fig. 3-15 ペクチン添加後に浸透処理した分化 Caco-2 細胞におけるペクチンと ZO-1 の局在観察

チャンバースライド上で約 4 週間培養して分化させた Caco-2 細胞に対して、ビオチン標識ペクチンを 1 時間添加し、TritonZ-100 による浸透処理を行い、蛍光標識ストレプトアビジンと抗 ZO-1 抗体を用いてフィブロネクチンと ZO-1 を緑色、赤色に染色し、共焦点レーザースキャン顕微鏡を用いて観察した。接眼レンズは×10、対物レンズは×63 を使用した。

3-7 ペクチンが HSulf-2 発現を誘導する機構の解明

第3章, 第3節, 3-2 に示したように, 分化 Caco-2 細胞にペクチンを添加すると HSulf-2 の発現が誘導されることを見出した。ペクチンが HSulf-2 発現を誘導する機構は解明されていないが, 第3章, 第3節, 3-4 と 3-5 の結果から, ペクチンはフィブロネクチンと $\alpha 5$ インテグリンを介して Caco-2 細胞の HSulf-2 発現に影響を与える可能性が示唆された。

当研究室の報告によると, フィブロネクチン III₁C フラグメント (FNIII₁C) とブルーンのペクチンが結合することから (本田, 2011), ペクチンと FNIII₁C を予め結合させれば, ペクチンは分化 Caco-2 細胞に発現するフィブロネクチンに結合できなくなると考えた。そこで, ペクチンと FNIII₁C の混合物を与えた 6 時間後の HSulf-2 発現をペクチンのみを添加した場合と比較すると, HSulf-2 発現が FNIII₁C により抑制された (Fig. 3-16 A)。この結果より, 分化 Caco-2 細胞においてペクチンはフィブロネクチンと結合することにより HSulf-2 発現を誘導することが示唆された。

また, フィブロネクチンは分泌タンパク質であるため, 単独で細胞表面に定着することはできない。フィブロネクチンは $\alpha 5 \beta 1$ インテグリンを介して細胞表面に結合することが知られている。そこで, $\alpha 5 \beta 1$ インテグリンとフィブロネクチンの結合を阻害すれば, ペクチンはフィブロネクチンと結合してもペクチンによる HSulf-2 発現誘導が阻害されるのではないかと考えた。フィブロネクチンは $\alpha 5 \beta 1$ インテグリンとフィブロネクチンの III₁₀ 領域に存在する RGD という配列を介して結合するため, $\alpha 5 \beta 1$ インテグリンへの結合阻害剤として RGD ペプチドを用いた。そこで, ペクチンと RGD ペプチドの混合物を与えた 6 時間後の HSulf-2 発現をペクチンのみを添加した場合と比較すると, HSulf-2 発現が RGD ペプチドにより抑制された (Fig. 3-16 B)。この結果より, ペクチンは $\alpha 5 \beta 1$ インテグリンを介して HSulf-2 発現を誘導することが示唆された。

分化 Caco-2 細胞における $\alpha 5$ インテグリンの発現をウェスタンブロッティングにより確認するために, 55 cm² シャーレに培養した分化 Caco-2 細胞のタンパク質を回収した。それを, 第3章, 第2節, 2-5-14 に記したように抗 $\alpha 5$ インテグリン抗体を用いて $\alpha 5$ インテグリンの検出を行った。その結果, 150 kDa と 19 kDa 付近にバンドが検出されたことから, 分化 Caco-2 細胞に $\alpha 5$ インテグリンが発現することを確認した (Fig. 3-16, C)。

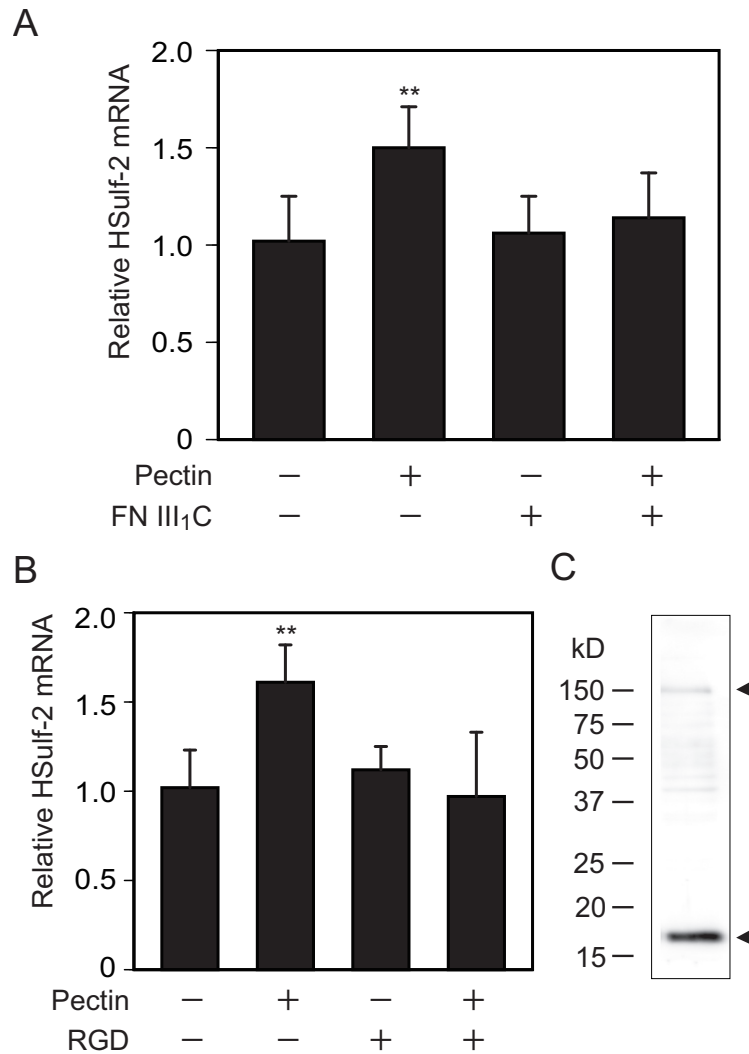


Fig. 3-16 ペクチンによる HSulf-2 発現誘導に FNIII₁C と RGD ペプチドが与える影響

(A) 分化 Caco-2 細胞に対して、0.1 mg/mL ペクチンまたはペクチンと FNIII₁C の混合物を 1 時間添加して、通常の培地に交換して 6 時間培養した。Total RNA を回収して、HSulf-2 の mRNA 発現量を Real Time RT-PCR により測定した。(B) 分化 Caco-2 細胞に対して、0.1 mg/mL ペクチンまたはペクチンと RGD ペプチドの混合物を 1 時間添加して、通常の培地に交換して 6 時間培養した。Total RNA を回収して、HSulf-2 の mRNA 発現量を Real Time RT-PCR により測定した。(C) 分化 Caco-2 細胞のタンパク質を回収して、抗 $\alpha 5$ インテグリン抗体を用いたウェスタンブロッティングを行った。図中左側の数値は、分子量マーカーの数値を示す。Tukey 法を用いて統計分析を行った。**: $P < 0.01$

3-8 ペクチンによる HSulf-2 発現に ERK 阻害剤が与える影響

第3章, 第3節, 3-7の結果から, ペクチンはフィブロネクチンと $\alpha 5$ インテグリンを介して分化 Caco-2 細胞の HSulf-2 発現を亢進することが示唆された。Caco-2 細胞において, $\alpha 5 \beta 1$ インテグリン下流のシグナルに ERK1/2 が関与することが報告されているため (Kuwada S K, et al., 2000; Kuwada S K, et al., 2005), ペクチン添加により ERK1/2 の活性化が起きるかを Phostag-western blotting により分析した。0.1 mg/mL ペクチンを分化 Caco-2 細胞と 0, 2, 5, 10, 30 分接触させて, 洗浄後に whole lysate を回収した。これを Phostag 分子を結合させたアクリルアミドゲルに供して, 膜転写後に抗 ERK1/2 抗体を用いてリン酸化 ERK1/2 の検出を行うと, ペクチン添加 2 分後にはリン酸化 ERK1/2 が検出され, 添加 5 分後をピークとして, 添加 30 分後まで維持されることが示唆された (Fig. 3-17 A)。次に, ERK1/2 活性化のピークである添加 5 分後に注目して, ERK1/2 のリン酸化の阻害剤 (PD98059) が与える影響を調べた。PD98059 を 2 時間前培養した分化 Caco-2 細胞にペクチンを添加すると, 5 分後のリン酸化 ERK1/2 が検出されなかったことから (Fig. 3-17 B), ペクチンは分化 Caco-2 細胞に接触して ERK1/2 をリン酸化することが確認された。最後に, ペクチンにより誘導される HSulf-2 の発現に ERK1/2 が関与するかを調べるために, ERK1/2 の阻害剤である FR180204 を 2 時間前培養した分化 Caco-2 細胞にペクチンを 1 時間添加して, 培地交換の 6 時間後の HSulf-2 発現を定量 PCR により分析した。その結果, ペクチンによる HSulf-2 発現上昇が FR180204 により抑制されたことから, ペクチンは ERK1/2 を介して HSulf-2 発現を制御する可能性が示唆された。

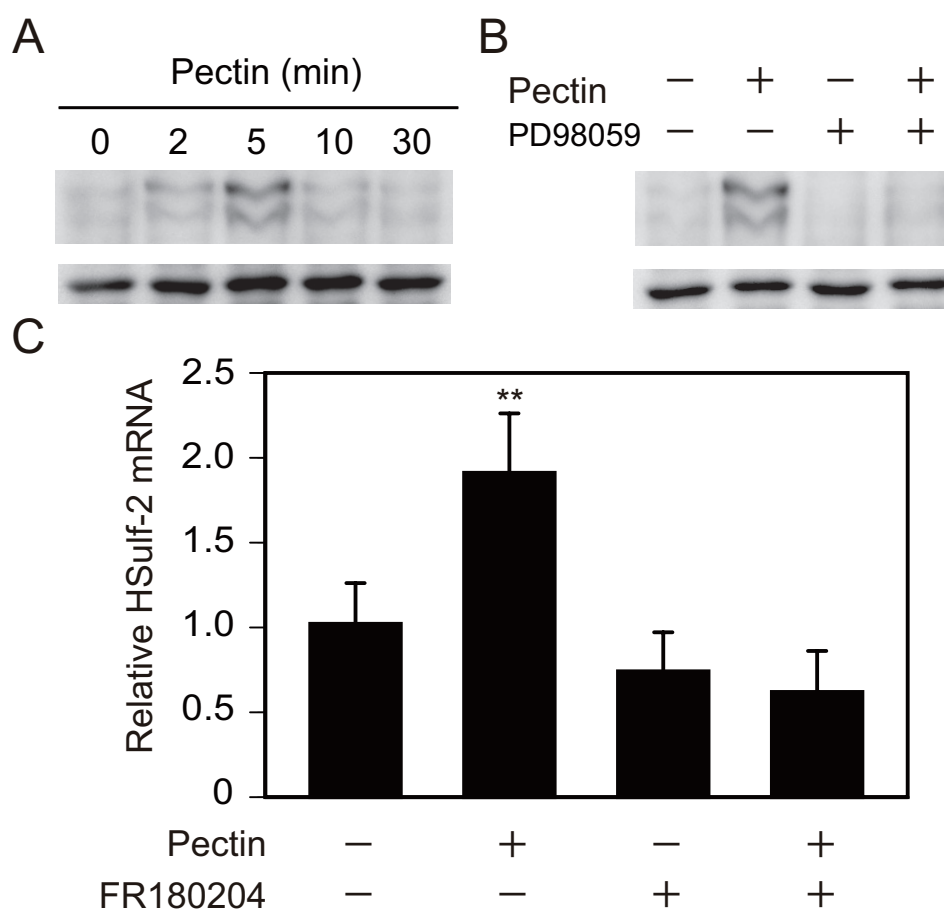


Fig. 3-17 ペクチンによる HSulf-2 発現誘導に ERK1/2 阻害剤が与える影響

(A) 0.1 mg/mL ペクチンを 0, 2, 5, 10, 30 分添加した分化 Caco-2 細胞からタンパク質を回収して、抗 ERK1/2 抗体を用いた Phostag ウェスタンブロッティングに供して、リン酸化 ERK1/2 の検出を行った。また、 β アクチンのバンドを示した。(B) PD98059 (MEK 阻害剤) を分化 Caco-2 細胞に添加して 1.5 時間培養した後、0.1 mg/mL ペクチンを 5 分添加した細胞からタンパク質を回収して、抗 ERK1/2 抗体を用いた Phostag ウェスタンブロッティングに供して、リン酸化 ERK1/2 の検出を行った。また、 β アクチンのバンドを示した。(C) FR180204 (ERK1/2 阻害剤) を分化 Caco-2 細胞に添加して 2 時間培養した後、0.1 mg/mL ペクチンを 1 時間添加し、通常培地にて 6 時間培養した。HSulf-2 の mRNA 発現量を Real Time RT-PCR により測定した。Tukey 法を用いて統計分析を行った。**: $P < 0.01$

3-9 Wnt タンパク質が IEC-6 細胞の細胞増殖に与える影響

第3章, 第3節, 3-1の結果から, ペクチンを分化 Caco-2 細胞に添加すると IEC-6 細胞の増殖を促進する物質がバソラテラル側へ分泌された可能性が推察できる。そこで, 小腸陰窩の形成に重要な役割を担う Wnt タンパク質に注目して, それらが IEC-6 細胞の細胞増殖に与える影響を解明するために, 第3章, 第2節, 2-7に記した方法に従って細胞増殖試験を行った。

その結果, Wnt3a と Wnt11 は, 濃度依存的に IEC-6 細胞の細胞増殖を促進した (Fig. 3-18, A, C) が, Wnt5a は IEC-6 細胞の増殖に寄与しないことが明らかとなった (Fig. 3-18, B)。これらの結果から, ペクチンが分化 Caco-2 細胞に接触した結果バソラテラル側に分泌され, IEC-6 の細胞増殖を誘導した増殖因子の候補として Wnt3a と Wnt11 が挙げられた。

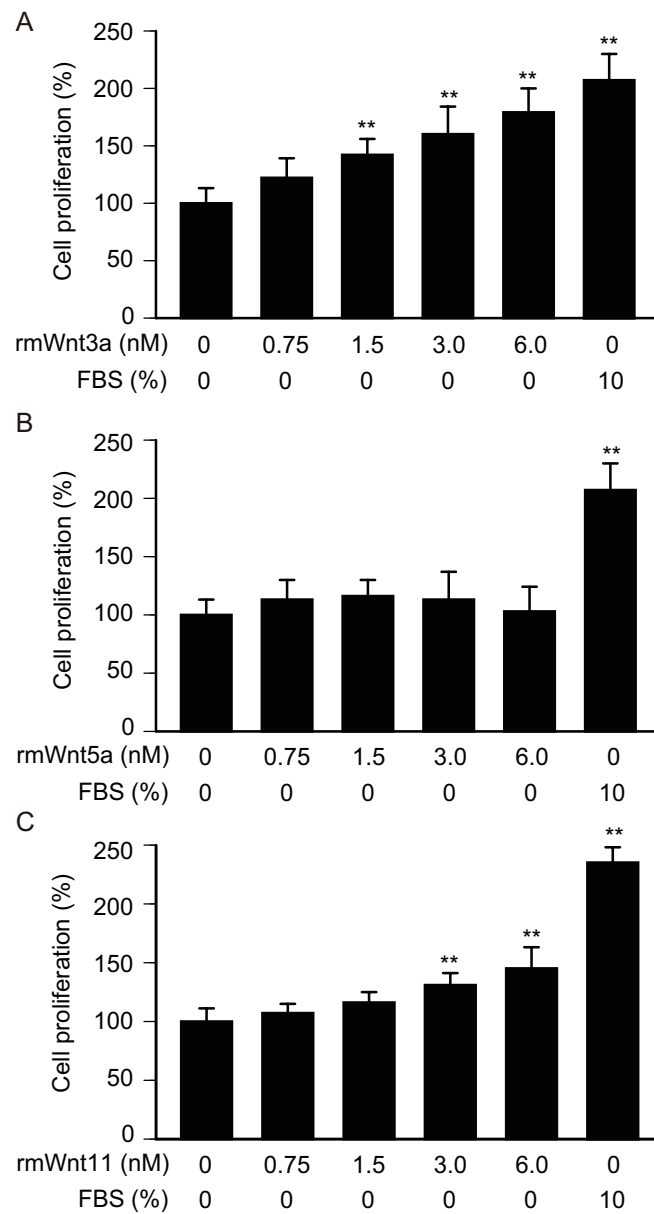


Fig. 3-18 Wnt3a, Wnt5a, Wnt11 が IEC-6 の細胞増殖に与える影響

96 well プレートに播種して 1 日培養した IEC-6 細胞に対して、(A) Wnt3a, (B)Wnt5a, (C) Wnt11 を添加して 1 日培養した。IEC-6 細胞の細胞増殖は WST-8 法により測定した。Tukey 法を用いて統計分析を行った。**: $P < 0.01$ vs control

3-10 ペクチンが Wnt タンパク質と IL-8 発現に与える影響

第3章, 第3節, 3-9 から Wnt3a と Wnt11 が IEC-6 の細胞増殖を導くことが示唆されたが, 分化 Caco-2 細胞にそれらは発現するのであろうか。そこで, 分化 Caco-2 細胞に Wnt タンパク質が発現するかを調べるために, Wnt3a, Wnt5a, Wnt11 に注目して, それらの mRNA が発現しているかを調べた。その結果, Wnt3a, Wnt5a, Wnt11 の mRNA が分化 Caco-2 細胞に発現していることを発見した (data not shown)。そこで, ペクチンが分化 Caco-2 細胞における各 Wnt タンパク質の mRNA 発現に与える影響を定量 PCR により調べた。Wnt3a はペクチンを 1 時間接触させた 3 時間後に約 3 倍に増加して, 9 時間後には約 1.5 倍に増加した (Fig. 3-18, A)。また, Wnt5a と Wnt11 は, ペクチン刺激の 3 時間後に約 3.5 倍と約 2 倍に増加した (Fig. 3-19, B, C)。これらの結果から, ペクチンを分化 Caco-2 細胞に添加すると, 今回注目した Wnt タンパク質の転写量が増加することが示唆された。

また, 分化 Caco-2 細胞に IL-8 が発現するかを RT-PCR により分析すると, 目的のサイズにバンドが検出されたことから, 分化 Caco-2 細胞に IL-8 が発現することを確認した。しかしながら, ペクチンは分化 Caco-2 細胞の IL-8 発現に影響を与えないことが定量 PCR により確認された (Fig. 3-19, D)。

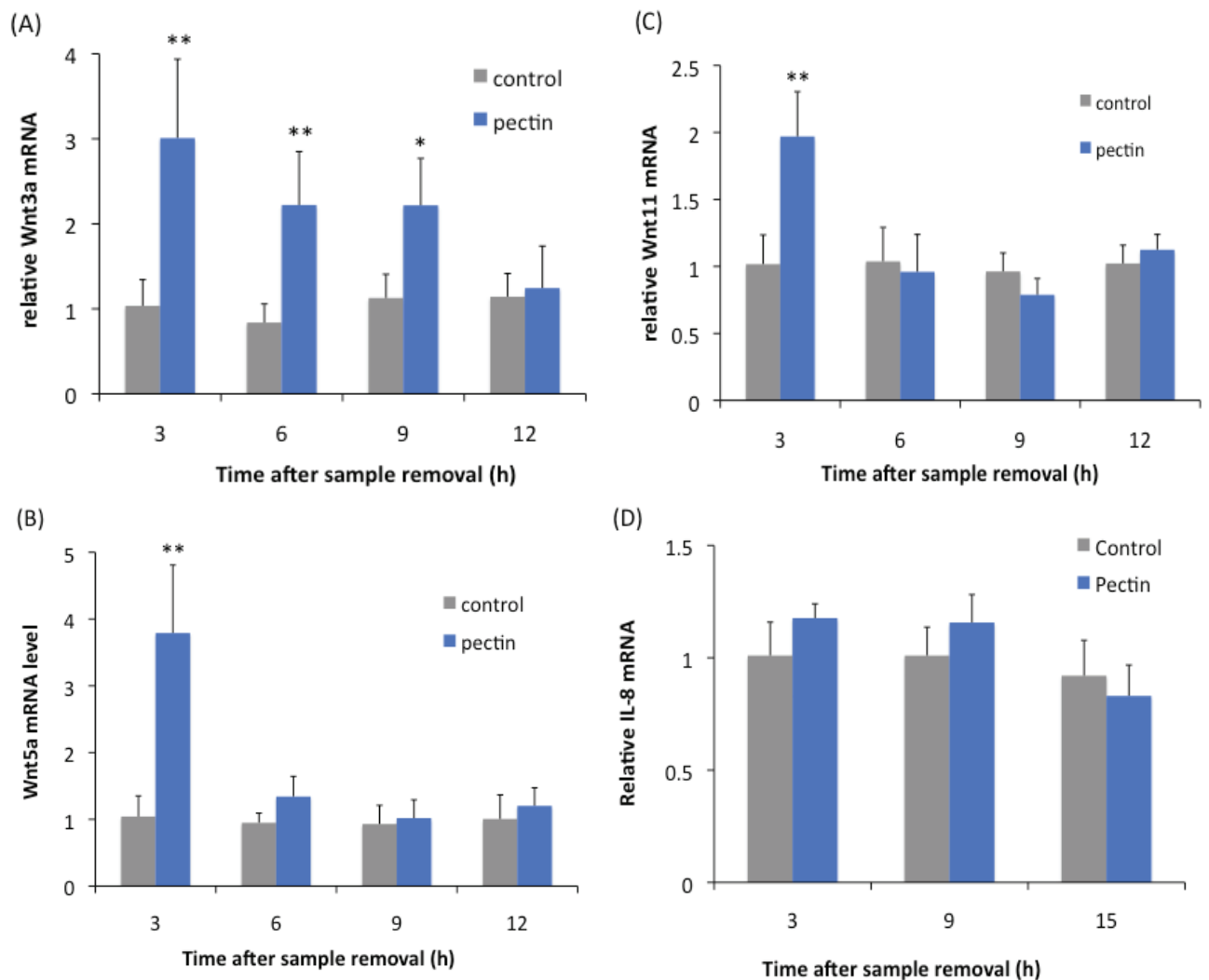


Fig. 3-19 ペクチンが Wnt タンパク質と IL-8 の mRNA 発現に与える影響

0.1 mg/mL ペクチンを 1h 添加してから、通常培地にて 3, 6, 9, 12, 15 時間培養した分化 Caco-2 細胞から total RNA を回収し、(A) Wnt3a, (B) Wnt5a, (C) Wnt11, (D) IL-8 の mRNA 発現量を Real Time RT-PCR により測定した。Tukey 法を用いて統計分析を行った。*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$

3-11 分化 Caco-2 細胞のバソラテラル培地における Wnt タンパク質の発現解析

第 3 章, 第 3 節, 3-10 の結果から, 分化 Caco-2 細胞をペクチンで刺激すると, Wnt タンパク質の mRNA 発現が亢進したため, バソラテラル側へ分泌される可能性が示唆された。そこで, ペクチンと 1 時間接触させた分化 Caco-2 細胞の whole lysate を回収し, Wnt タンパク質の発現量をコントロールと比較した。その結果, ペクチンを添加すると, 分化 Caco-2 細胞における Wnt3a の発現量が亢進した (Fig. 3-20 A)。一方で, ペクチン添加によらず, Wnt11 の発現は確認することができなかった。Wnt11 抗体の濃度を複数検討したが, レーン全体に亘り複数のバンドが検出され, ポジティブコントロールである組換え Wnt11 の近くに検出されたバンドが一番濃いバンドではなかったため, 今回の実験に使用した分化 Caco-2 細胞には, Wnt11 は発現しないと結論付けた。

また, 培地中における Wnt タンパク質の分泌量の変化を調べるために, トランスウェル上で分化させた Caco-2 細胞のバソラテラル培地を回収して, 第 3 章, 第 2 節, 2-8 に記した方法に従ってウェスタンブロッティングを行った。しかしながら, バソラテラル培地から Wnt3a と Wnt11 を検出することはできなかった (Fig. 3-20 B)。

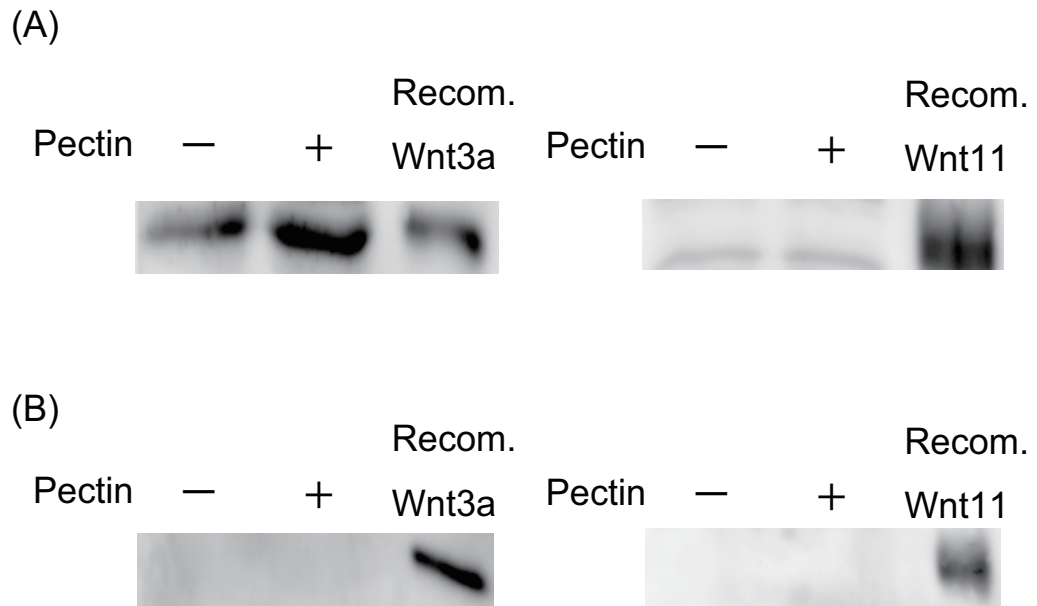


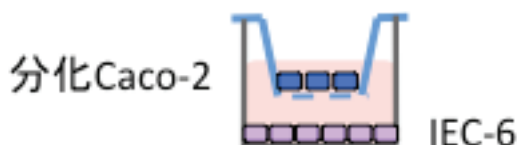
Fig. 3-20 whole lysate およびバソラテラル培地における Wnt3a と Wnt11 発現解析

(A) 分化 Caco-2 細胞に 0.1 mg/mL ペクチンまたは通常培地を 1 時間添加して、細胞を回収した。細胞を溶解させた whole lysate を用いて、抗 Wnt3a 抗体と抗 Wnt11 抗体を用いたウェスタンブロッティングにより、Wnt3a と Wnt11 の発現を分析した。一番右のレーンには、リコンビナント Wnt3a または Wnt11 のバンドを示す。(B) トランスウェル上で培養して分化させた Caco-2 細胞に 0.1 mg/mL ペクチンを添加し、24 時間後にバソラテラル側の培地を回収した。培地を濃縮後にヘパリンカラムに供し、再度濃縮後に抗 Wnt3a 抗体と抗 Wnt11 抗体を用いたウェスタンブロッティングを実施。一番右のレーンには、リコンビナント Wnt3a または Wnt11 のバンドを示す。

第4節 考察

本章では、腸管上皮細胞表面における HS の機能の解明に取り組んだ。近年になり、小腸の正常な発達に HS が重要な役割を担うことが報告されたが (Perreault N, et al., 2001; Yamamoto S, et al., 2013), それらの報告は HS をノックアウトすることで HS の機能を推察したため、HS の微細な硫酸化構造と機能については研究がなされていない。そこで本研究では、小腸上皮細胞に増殖作用をもたらすと考えられるペクチンを材料にして、ペクチンが小腸上皮様細胞表面の HS に与える影響を詳細に検討した。

これまでにペクチンを長期間摂取すると小腸絨毛の形態が変化することが報告されたが (Tasman-Jones C, et al., 1982; McCulloch J S, et al., 1998; Langhout D J, et al., 1999), 小腸上皮を構成する絨毛は増殖しないことが知られるため、これらの報告はペクチンが小腸の陰窩における細胞増殖を誘導したことを示唆すると考えた。これを *in vitro* で証明するためには、小腸上皮のモデルが必要となるが、小腸上皮モデルを確立したとの報告はない。そこで、小腸上皮が絨毛と陰窩に大別されることに注目して、小腸上皮の *in vitro* モデルを構築するために、トランスウェルに Caco-2 細胞を播種して分化させ、絨毛のモデルとした。一方、アウターウェルに陰窩のモデルとされる IEC-6 細胞を培養した。複数の培養方法を検討したところ、トランスウェルに Caco-2 細胞を播種して 20 日程培養して分化させて、Caco-2 細胞が分化するタイミングに合わせて IEC-6 細胞を別のプレートに培養して定着させ、その上に分化 Caco-2 細胞の定着したトランスウェルを移植する方法を採用した。これにより絨毛のモデルである分化 Caco-2 細胞と陰窩のモデルである IEC-6 細胞を複合培養した *in vitro* 小腸上皮モデルを構築した。



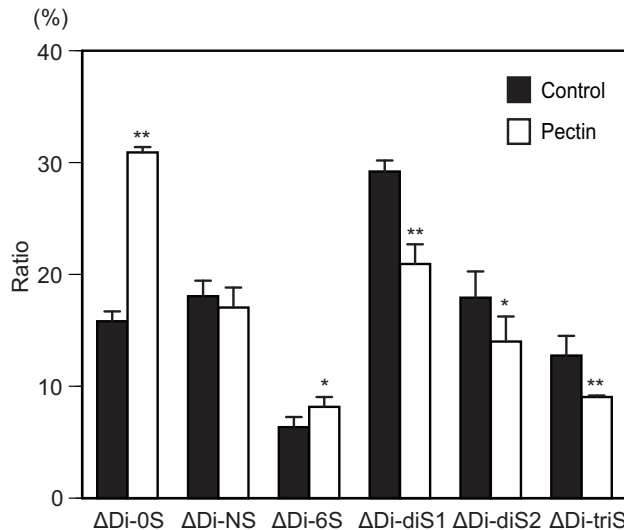
(構築した *in vitro* 小腸上皮モデルの模式図)

これまでに、異なる細胞を同じ容器内で培養する複合培養の実験が多数行われている。小腸上皮細胞の下層には、間葉細胞や免疫系細胞、神経細胞などの細胞が存在して、それらとの相互作用が生理機能に重要な役割を果たすことが

推定される。そこで、複合培養系はより生体に近い *in vitro* 培養系として注目されている。例えば、トランスウェルで Caco-2 細胞を分化させて、神経系細胞のモデルであるラット副腎髄質褐色細胞腫 (PC12 細胞) と複合培養すると、複合培養日数の増加に伴い PC12 細胞の突起伸長が確認されている (Satsu H, et al., 2001)。本研究では、分化 Caco-2 細胞にペクチンを添加して 24 時間培養すると、ペクチンの濃度依存的に IEC-6 細胞が増加することを発見した。ペクチンによる小腸絨毛の形態変化を、ペクチンが陰窩の細胞増殖を促進した結果誘発されたと考えれば、陰窩のモデル細胞として多用される IEC-6 細胞がペクチン刺激により増殖したことは、今回構築した複合培養系が小腸上皮の *in vitro* モデルとして活用できる可能性を示唆する。また、本研究では陰窩のモデルとしてラット由来の IEC-6 細胞を用いたが、Caco-2 細胞がヒト由来であり、ヒト由来の陰窩の株化細胞が報告されていることから (Beaulieu J F, et al., 2012), それらを用いることを検討する必要があると考える。

ペクチンによる IEC-6 の細胞増殖をさらに検討するために、構築した小腸上皮モデルを用いて、分化 Caco-2 細胞にペクチンを添加して 24 時間培養し、バソラテラル培地を回収した。IEC-6 細胞を回収したバソラテラル培地で 24 時間培養すると、IEC-6 は分化 Caco-2 細胞に添加したペクチンの濃度依存的に増殖したことから (未発表データ), ペクチンの添加により分化 Caco-2 細胞からバソラテラル側に分泌されたものにより IEC-6 細胞が増加したことを確認した。また、分化 Caco-2 細胞に添加したものと同濃度のペクチンを IEC-6 細胞に投与しても IEC-6 細胞は増加しなかったことから (未発表データ), ペクチンによる IEC-6 細胞の増殖は、トランスウェルを通過したペクチンによらないことも確認した。

ペクチンは分化 Caco-2 細胞を介して IEC-6 細胞を増殖させたことから、次に、ペクチンが分化 Caco-2 細胞の HS に与える影響を分析した。第 2 章の結果から、細胞表面 HS は細胞外の刺激に応答して硫酸化構造を変化させたため、分化 Caco-2 細胞表面の HS もペクチンの添加により硫酸化構造を変化させる可能性があると考えた。そこで、分化 Caco-2 細胞にペクチンを添加した 24 時間後に細胞表面 HS を回収し、HS の二糖組成を調べると、ペクチン添加により HS の硫酸化構造が変化したことが報告された (未発表データ)。本研究成果を考察する上での基礎となることから、以下に掲載する。



(ペクチン添加 24 時間後の分化 Caco-2 細胞表面 HS の二糖組成)

ペクチンを添加すると、分化 Caco-2 細胞表面 HS を構成する二糖のうち、 Δ Di-diS1 と Δ Di-triS の割合が有意に減少して、一方で Δ Di-0S の割合が増加した。つまり、ペクチン添加により分化 Caco-2 細胞表面 HS の硫酸化度が低下した。 Δ Di-diS1 と Δ Di-triS の減少に注目すると、細胞表面で HS を脱硫酸化する HSulfs は、HS の UA2S-GlcNS6S 二糖 (triS) と UA-GlcNS6S 二糖 (diS1) の GlcNAc C 6 位を脱硫酸化することが知られているため (Lamanna W C, et al., 2008; Frese M A, et al., 2009)、ペクチンによる分化 Caco-2 細胞の構造変化に HSulf が関与することが推測された。マウス小腸に Sulf-1 と Sulf-2 が発現するとの報告はあることから (Nagamine S, et al., 2012)、Caco-2 細胞における HSulf の発現については研究が乏しい。そこで本研究では分化 Caco-2 細胞における HSulf-1/2 の発現を RT-PCR および定量 PCR により調べた。その結果、分化 Caco-2 細胞には HSulf-1/2 が発現しているが、ペクチン刺激により HSulf-1 の発現は抑制され、HSulf-2 の発現は亢進することを発見した。HSulf-1 の発現がペクチン刺激により著しく抑制されるのは、HSulf-2 の発現を強調するためではないかと考えた。

Sulfs の発現をノックアウトすると、6-OSTs や 2-OST-1 の発現が抑制されたとの報告がある (Lamanna W C, et al., 2008)。本研究では、ペクチン刺激によって HSulf-1 発現が顕著に抑制されたことから、ペクチンは 6-OSTs や 2-OST-1 の発現に影響を及ぼす可能性があると考えた。HS 合成関連酵素は複数のアイソフォームを有しており、それらの発現パターンは組織や発達段階に依存することが知られている (Nogami K, et al., 2004)。そこで、6-OSTs の 3 つのアイソフォームのうちで分化 Caco-2 細胞に発現するものを RT-PCR により分析する

と、6-OST-1 と 6-OST-2 が発現することを発見した。さらに、ペクチン刺激により、6-OST-2 の発現は変化しなかったが、6-OST-1 は約 3 倍に増加して、徐々にコントロールレベルに収束した。ペクチン添加により Δ Di-6S が増加したが（未発表データ）、それは 6-OST-1 発現の増加に起因すると考えた。また、ペクチン刺激により 2-OST-1 の発現が減少した。ペクチン刺激により GlcNAc の N 位とウロン酸の C 2 位が硫酸化された Δ Di-diS2 の割合が減少したが（未発表データ）、 Δ Di-NS が変化していないことから、 Δ Di-diS2 の減少は 2-OST-1 発現の減少に起因すると考えた。また、NDSTs の発現は転写レベルではなく、リボソームで制御されることが知られるため（Grobe K, et al., 2002）、本研究では NDSTs の mRNA 発現に与える影響は分析しなかった。

Biacore を用いた相互作用解析によりプルーンのペクチンが細胞外マトリクス構成タンパク質であるフィブロネクチンと結合することが示されたため（本田, 2011）、ペクチンはフィブロネクチンを介して分化 Caco-2 細胞に刺激を伝達したと考えた。そこでフィブロネクチンの受容体である $\alpha 5 \beta 1$ インテグリンの発現を調べるために、本研究では $\alpha 5$ インテグリンに注目した。分化 Caco-2 細胞における $\alpha 5$ インテグリンの局在を共焦点顕微鏡により調べると、タイトジャンクションのマーカータンパク質である ZO-1 よりアピカル側に発現することを見出した。本研究では $\beta 1$ インテグリンの局在を調べられなかったが、上皮細胞の研究材料として Caco-2 細胞と同様に多用される分化 MDCK 細胞では $\beta 1$ インテグリンが ZO-1 よりアピカル側に局在することが共焦点顕微鏡により観察され（Tafazoli F, et al., 2000）、分化したヒト小腸様細胞株（Caco-2 BBE）でも細胞膜における $\alpha 5 \beta 1$ インテグリンの局在が観察されたことから（Krishnan M, et al., 2013）、上皮細胞モデルである分化 Caco-2 細胞でも $\beta 1$ インテグリンがアピカル側に発現することが推察できる。従い、分化 Caco-2 細胞のアピカル側には $\alpha 5 \beta 1$ インテグリンが発現し、アピカル側に分泌されたフィブロネクチンと結合する可能性が高いことが示された。

共焦点顕微鏡による観察から、分化 Caco-2 細胞にペクチンを添加しても、 $\alpha 5$ インテグリンの局在は変化しないことが示唆されたが、タンパク質レベルでの発現量への影響を調べる必要があるだろう。分化 Caco-2 BBE 細胞において、上皮細胞に特異的に発現する低分子量 GTP アーゼである Rab25 が $\alpha 5 \beta 1$ インテグリンの発現を制御することが報告されているため（Krishnan M, et al., 2013）、Rab25 への影響を分析することはペクチンの生理機能を解明する一助

となるだろう。

分化 Caco-2 細胞において、大多数 (92~93%) のフィブロネクチンはバソラテラル側に分泌されるが、一部 (7~8%) はアピカル側へ分泌されることが報告されている (Low S H, et al., 1994)。本研究でも共焦点顕微鏡による観察から、浸透処理をしない分化 Caco-2 細胞において、タイトジャンクションの一部にフィブロネクチンが発現すること、およびアピカル側にフィブロネクチンが発現することが観察された。当研究室の以前の結果 (本田, 2011) の再現性をとることができた。また、ペクチンを添加した 24 時間後の分化 Caco-2 細胞を浸透処理せずに観察すると、アピカル側におけるフィブロネクチンの発現が増加することが観察された。ペクチンを分化 Caco-2 細胞に投与するとフィブロネクチンの mRNA 発現量が増加したこと (本田, 2011)、アピカル側におけるフィブロネクチンの発現が亢進したと考えた。さらに、Z スタック画像を取得することにより、ペクチンを添加するとフィブロネクチンが ZO-1 よりアピカル側に局在する様子が観察された。この結果から、ペクチンの添加によりアピカル側に分泌されたフィブロネクチンは $\alpha 5 \beta 1$ インテグリンと結合する可能性があることが示唆された。なお、浸透処理を行わない状態でタイトジャンクションの裏打ちタンパク質である ZO-1 を観察できた。その理由は解明されていないが、同様の結果が報告されている (Natoli M, et al., 2011 ; 本田, 2011)。また、本研究では、共焦点顕微鏡による観察により、分化 Caco-2 細胞のアピカル側にフィブロネクチンと $\alpha 5$ インテグリンが発現することを観察したが、それぞれの抗体がともに Rabbit で作製されたものであるため、フィブロネクチンと $\alpha 5$ インテグリンの共局在を観察することはできなかった。どちらかの抗体を Rabbit 以外の生物種で作製されたものに変更することで、分化 Caco-2 細胞のアピカル側におけるそれらの共局在を調べることが望まれる。また、本研究では、ビオチン化ペクチンを作製し、蛍光標識ストレプトアビジンを用いることにより、分化 Caco-2 細胞のアピカル側におけるペクチンの検出を試みたが、観察には至らなかった。プルーンペクチンの F3 画分と FNIII₁C の解離呈す (K_D) は、 6.24×10^{-7} (M) であることが Biacore を用いて報告されたため (本田, 2011)、プルーンペクチンとフィブロネクチンの結合は *in vitro* では弱いものではないが、Caco-2 細胞のフィブロネクチンと結合した状態でペクチンを検出するためには、検出感度を高める方法を検討する必要があるだろう。

共焦点顕微鏡を用いた観察から、分化 Caco-2 細胞のアピカル側にはペクチンと接触できる位置にフィブロネクチンと $\alpha 5$ インテグリンが発現することが示唆された。フィブロネクチンは、一般的に、C 末端が SS 結合により共有結合した二量体として存在しており、細胞の接着や移動、増殖、分化などに影響する (Pankov R, et al., 2002)。フィブロネクチンは 3 種類の繰り返し構造 (タイプ I, タイプ II, タイプ III) で構成されており、それぞれ 12 個, 2 個, 15-17 個の領域を有する。それぞれのドメインは様々なタンパク質と結合することが知られるが、なかでもタイプ III の 10 番目領域は、RGD 配列を含み、そこが $\alpha 5 \beta 1$ インテグリンと結合することでフィブロネクチンは細胞表面に繫留する (Pankov R, et al., 2002)。本研究では、ペクチンによる HSulf-2 発現誘導が FNIII₁C により抑制されることを見出した。プルーン由来ペクチンが FNIII₁C と結合することは *in vitro* で確認されていることから (本田, 2011)、ペクチンと FNIII₁C が結合したことで、ペクチンが細胞表面のフィブロネクチンと結合できなくなったために HSulf-2 の発現が誘導されなかったと推測した。

Nagel らは、酵素処理したリンゴペクチンが Swiss 3T3 線維芽細胞と相互作用することと、それが $\alpha 5 \beta 1$ インテグリンにより仲介されることを報告した (Nagel M D, et al., 2008)。 $\alpha 5 \beta 1$ インテグリンはフィブロネクチンのレセプターとして機能し (Danen E H, et al., 1995)、さらに Swiss 3T3 線維芽細胞は細胞外マトリクスにフィブロネクチンを分泌することから (Verderio E, et al., 1998)、本研究においてもペクチンはフィブロネクチンと $\alpha 5 \beta 1$ インテグリンを介して HSulf-2 発現を誘導した可能性があると考えた。これは、RGD ペプチドによる阻害実験を行うと、RGD ペプチドはペクチンによる HSulf-2 発現上昇を抑制したことから確認された。すなわち、RGD ペプチドが分化 Caco-2 細胞表面の $\alpha 5 \beta 1$ インテグリンと結合したことにより、ペクチンと結合したフィブロネクチンがインテグリンと結合できなかったためではないかと考えた。これらの結果より、ペクチンは $\alpha 5 \beta 1$ インテグリンを介して分化 Caco-2 細胞を刺激することが示唆された。

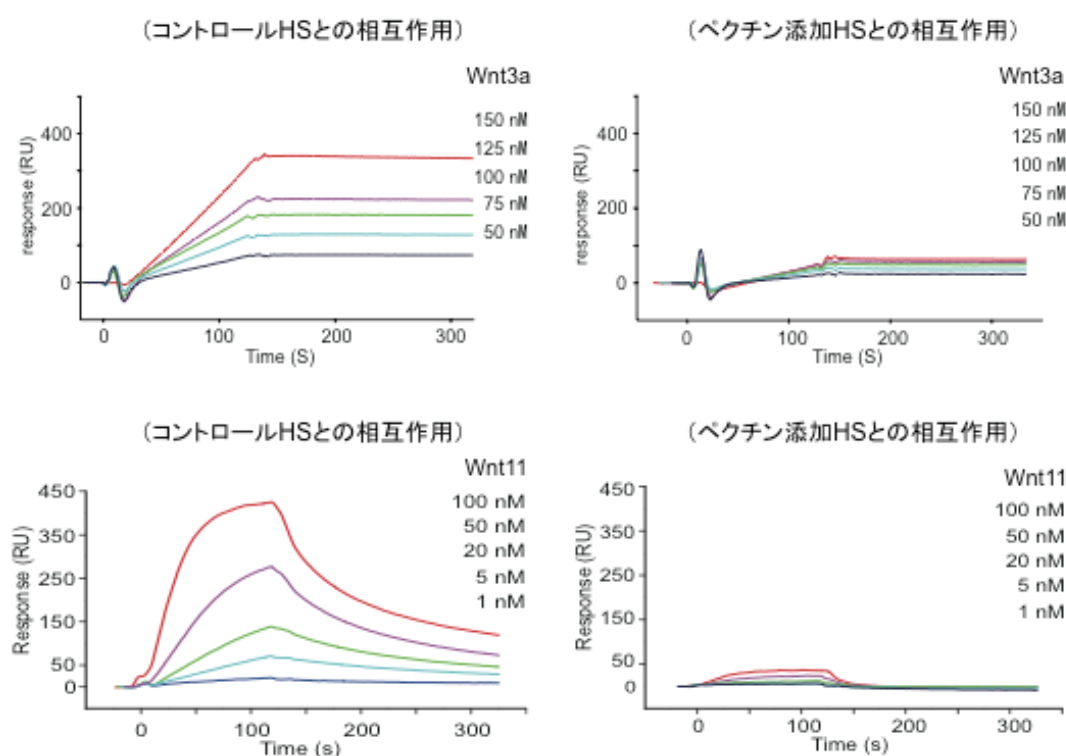
これまでに、クロバナロウゲ (*Comarum palustre* L.) 由来ペクチンのガラクトツロン酸残基が $\beta 1 / \beta 2$ インテグリンと結合したとの報告があることから (Popov S V, et al., 2005)、分化 Caco-2 細胞表面の $\beta 1 / \beta 2$ はペクチンとフィブロネクチンの結合をサポートする可能性があると考えた。プルーンペクチンのガラクトツロン酸残基と $\beta 1$ インテグリンの結合を Biacore により調べるのが有効な手段と

なるだろう。また、抗 $\alpha 5$ インテグリン抗体を用いたウェスタンブロッティングにより、分化 Caco-2 細胞に $\alpha 5$ インテグリンが発現することを確認した。Caco-2 細胞における $\alpha 5$ インテグリンの発現については論文によって主張が異なるが (Sanders M A, et al., 2000; Kuwada S K, et al., 2000; Zhang J, et al., 2003; Kuwada S K, et al., 2005), 共焦点レーザースキャン顕微鏡を用いた観察結果と合わせて考えると、今回使用した分化 Caco-2 細胞には $\alpha 5$ インテグリンが発現すると結論付けた。加えて、 $\beta 1$ インテグリンの発現が報告されていることから (Lévy P, et al., 2003), 分化 Caco-2 細胞に $\alpha 5\beta 1$ インテグリンが発現すると推測した。

インテグリンは細胞外マトリクス構成タンパク質が細胞に結合することを媒介して、多様な細胞内シグナル伝達経路を制御する (Aliaga J C, et al., 1999; Gilcrease M Z, 2007)。 $\alpha 5\beta 1$ インテグリンは少なくとも2つの経路により ERK1/2 を活性化する。一つは, Src-FAK に続く MAKP 経路であり (Schlaepfer D D, et al., 1997; Schlaepfer D D, et al., 1998), もう一つは, 細胞膜陥没構造の主要タンパク質であるカベオリンが Fyn と Shc を介する経路である (Wary K K, et al., 1996; Wary K K, et al., 1998)。Caco-2 細胞において, $\alpha 5\beta 1$ インテグリンはフィブロネクチン依存性の RGFR の活性化に関与し, それにより ERK1/2 の活性化が誘導されることが報告されている (Kuwada S K, et al., 2000; Kuwada S K, et al., 2005)。本研究では, ペクチンが ERK1/2 を活性化することを Phos-tag ウェスタンブロッティングにより確認した。さらに, ペクチンは ERK1/2 を介して HSulf-2 発現を誘導することを発見した

ここまでで, ペクチンは分化 Caco-2 細胞のアピカル側に発現するフィブロネクチンと $\alpha 5\beta 1$ インテグリンを介して細胞に刺激を伝達し, ERK1/2 経路を活性化することで HSulf-2 や 6-OST-1, 6-OST-2, 2-OST-1 の発現を変化させ, 細胞表面 HS の硫酸化構造を変化させることが推察された。分化 Caco-2 細胞表面の HS はなぜペクチンの刺激に応答して硫酸化構造を変化 (硫酸化度を減少) させたのであろうか? Ai らの研究によると, QSulf-1 が細胞表面 HS から GlcNAc C 6 位を脱硫酸化することで HS と Wnt タンパク質の結合が弱くなり, その結果 Wnt がそのレセプターへ輸送されることが報告された (Ai X, et al., 2003)。つまり, 細胞表面 HS は Sulf により硫酸化構造が変化 (硫酸化度が減少) することで Wnt の分泌を促進すると考えられている。本研究でも, ペクチン刺激に

より HSulf-2 の発現が誘導され、 Δ Di-diS1 と Δ Di-triS の割合が減少したことから、ペクチンによる HS の構造変化が Wnt タンパク質との相互作用に影響することが推察された。Wnt は小腸上皮の形成に深く関与するタンパク質であることから、ペクチンで刺激した分化 Caco-2 細胞表面の HS と Wnt タンパク質の結合力を Biacore で分析し、ペクチンで刺激しない場合と比較すると、HS と Wnt タンパク質との結合力が顕著に減少することを見出した（未発表データ）。本研究を考察する上で欠かせないことから、以下に掲載する。



（ペクチン添加した Caco-2 細胞の HS およびコントロール細胞の HS と Wnt3a, Wnt11 の相互作用解析結果）

上記結果から、ペクチンはフィブロネクチンと $\alpha 5 \beta 1$ インテグリンを介して HSulf-2 の発現を亢進することで、分化 Caco-2 細胞表面 HS の硫酸化構造を変化させ、それにより Wnt タンパク質との結合を調節する可能性が示唆された。つまり、分化 Caco-2 細胞表面の HS は、ペクチンの刺激により硫酸化構造を変化させることで Wnt3a や Wnt11 の分泌を促進する機能を有することが示唆された。本研究では細胞表面の HS に注目したが、HS と同じ GAG の一種であるコンドロイチン硫酸（CS）についても、CS の硫酸化度が減少することにより Wnt3a の分泌を促進するモデルが報告されている（Nadanaka S, et al., 2011）。従

って、分化 Caco-2 細胞においてもペクチンが CS の硫酸化構造へ与える影響を調べることは必要となるだろう。また、ペクチンによる HSulf-2 発現の亢進により HS の硫酸化度が減少したが、この現象を高分子化学の観点から考察すると、高分子の電荷が減少すると立体構造が収縮することが知られているため (Azzaroni O, et al., 2012)、硫酸化度が減少した HS も立体構造が変化することにより Wnt タンパク質との結合が減少した可能性が推察できる。これらの考察から、複合培養系の実験において、ペクチンで刺激した分化 Caco-2 細胞から分泌されて IEC-6 細胞を増殖させたものとして Wnt タンパク質の可能性が浮上した。

分化 Caco-2 細胞がペクチンの刺激により分泌して、IEC-6 細胞を増殖させた物質の候補である Wnt タンパク質について考察した。Wnt タンパク質が IEC-6 細胞に与える影響は複数報告されている。Wnt3a を強制発現させた L 細胞の培養上清が、IEC-6 細胞の損傷回復を早めたことから、IEC-6 細胞に対する増殖活性が示唆された (Liu L, et al., 2012)。また、Wnt5a は IEC-6 細胞の分化を促進した (Gon H, et al., 2013)。また、Wnt11 を発現させた L 細胞の培養上清が IEC-6 細胞を増殖させた (Ouko L, et al., 2004)。Wnt を強制発現させた細胞の培養上清が IEC-6 細胞へ与える影響は既に報告されたため、本研究では、Wnt タンパク質の組み替え体を直接 IEC-6 細胞に添加して細胞増殖への影響を評価した。その結果、Wnt3a と Wnt11 が濃度依存的に IEC-6 細胞を増殖させたが Wnt5a には IEC-6 細胞に対する増殖活性は認められなかった。さらに、分化 Caco-2 細胞へのペクチン刺激により、Wnt3a, Wnt5a, Wnt11 の mRNA 発現が亢進することを発見した。Wnt の組み替え体による増殖試験の結果と分化 Caco-2 細胞において Wnt5a はアピカル側のみに分泌されたとの報告 (Gross J C, et al., 2012) を合わせて考えると、ペクチン刺激によりアピカル側に分泌された Wnt5a は Caco-2 細胞の分化を促進させる可能性があると考えた。また、ペクチン刺激により、分化 Caco-2 細胞における Wnt3a 発現が亢進するが Wntt 発現は確認できなかったことから、ペクチン刺激によりバソラテラル側に分泌された Wnt3a が IEC-6 細胞の増殖に寄与することが示唆された。

上記推察に基づけば分化 Caco-2 細胞のバソラテラル培地には Wnt3a が存在するはずであるが、本研究で様々な検討を重ねたがバソラテラル培地中から Wnt3a を検出することはできなかった。今回の実験では無血清培地を用いて Wnt3a の検出を試みたが、無血清培地を用いると Wnt3a が凝集して不溶化する

ために、遠心分離により沈殿することが報告されている (Fuerer C, et al., 2010)。従って、ペクチン添加後のバソラテラル培地を遠心分離して、沈殿を再溶解させてウェスタンブロッティングを行ったが、Wnt3a の検出には至らなかった。また、Wnt3a の溶解性と活性を保持するためには、血清または血清中の HSPG が必要となることが報告されていることから (Fuerer C, et al., 2010)、Wnt3a を検出するためには血清を含む培地を用いる必要がある。また、培養上清から活性を保持したまま Wnt3a を精製した報告では (Willert K, et al., 2003)、Wnt3a を強制発現させた L 細胞を 4 日間培養した上清を 2 L 濃縮して回収していることから、今回はペクチン添加 24 時間後の培地を回収したが、より長時間の培養が必要であろう。また、Wnt3a を強制発現させた L 細胞の培養上清をショ糖密度勾配遠心法により分離すると、exosome 画分に検出されたことから (Gross J C, et al., 2012)、超遠心を用いた分離も検討すべきであろう。しかしながら、強制発現させた L 細胞における Wnt3a の大部分が細胞中に検出されたことから (Gross J C, et al., 2012)、遺伝子操作をしない条件で培地から Wnt を検出することは、より一層の工夫が必要となるだろう。

分化 Caco-2 細胞へのペクチン添加で IEC-6 細胞が増殖したが、バソラテラル培地から Wnt3a を検出できなかったことから、分化 Caco-2 細胞は Wnt 以外の生理活性物質も分泌することが示唆された。分化 Caco-2 細胞にペクチンを添加すると、細胞増殖因子であるポリアミン類の代謝の亢進が示唆されていることから (伊藤, 2012)、ポリアミン類の関与も検討する必要がある。また、小腸上皮の形成には、Wnt の他に、骨形成タンパク質 (Bone Morphogenic Protein, BMP) や Hedgehog タンパク質、Noggin (BMP のアンタゴニスト) 等が関与することが知られる (Crosnier C, et al., 2006)。特に BMP と Noggin は高硫酸化 HS に強く結合するが、Sulf の働きにより HS の硫酸化度が減少すると Noggin が解離し、BMP の分泌を促進するモデルが報告されている (Viviano B L, et al., 2004)。これは HS と Wnt の関係性と同様であるため、本研究においてもペクチンで刺激して HSulf-2 発現が亢進した HS と BMP/Noggin との関係を調べることは、腸管上皮細胞表面における HS の機能を調べるうえで一層の助けとなるだろう。

最後に、本研究の意義について考察する。本研究は小腸上皮のモデル細胞とされる Caco-2 細胞を用いて、小腸上皮へ増殖刺激を及ぼすと考えられるペクチンを材料に、細胞表面 HS の機能解明に取り組んだ。その結果、フィブロネ

クチンや $\alpha 5\beta 1$ インテグリンを介したペクチンの刺激により HSulf-2 の発現が亢進し、HS の硫酸化構造を変化させることにより Wnt3a の分泌を促進する機構が示唆された。陰窩の HS をロックアウトした実験から、陰窩の正常な細胞増殖に HS が欠かせないことが報告されたが (Yamamoto S, et al., 2013), 本研究は HS をロックアウトすることなく、HS の微細な硫酸化構造に注目することにより、HS が硫酸化構造を変化させることで Wnt の分泌を調節することを見出した。また、ペクチンにより分化 Caco-2 細胞における発現量の亢進する Wnt3a は、小腸幹細胞に隣接するパネート細胞に高発現し (Sato T, et al., 2011), さらに Wnt3a の添加により増殖した IEC-6 細胞は陰窩のモデルとされることから、ペクチン摂取による小腸絨毛の形態変化の分子メカニズムを解明するにあたり、細胞表面 HS が構造変化により Wnt の分泌を促進するという本研究成果は大きな貢献を果たすと期待できる。

要約

第3章では、まず分化 Caco-2 細胞と IEC-6 細胞を複合培養した *in vitro* 小腸上皮モデルを構築した。そして複合培養系において、分化 Caco-2 細胞にプルーレンから精製したペクチンを投与すると、ペクチンの濃度依存的に IEC-6 細胞が増加することを発見した。ペクチン添加により分化 Caco-2 細胞表面 HS の硫酸化構造が変化したことから、ペクチンが分化 Caco-2 細胞の HS 合成関連遺伝子に与える影響を調べると、ペクチンにより HSulf-1 の発現が顕著に抑制され、一方で HSulf-2 の発現が誘導された。また、ペクチン刺激により、6-OST-1 の発現が誘導され、2-OST-1 の発現は減少した。これらの結果より、ペクチンは分化 Caco-2 細胞表面 HS の硫酸化構造を変化させることが示唆された。

当研究室において、ペクチンはフィブロネクチンと結合することが *in vitro* で確認されたため、フィブロネクチンのレセプターである $\alpha 5$ インテグリンの分化 Caco-2 細胞における局在を共焦点電子顕微鏡により調べた。その結果、ペクチンの刺激によらず、 $\alpha 5$ インテグリンは分化 Caco-2 細胞のタイトジャンクションよりアピカル側に発現することを発見した。また、分化 Caco-2 細胞の基底膜側におけるフィブロネクチンの発現はペクチン刺激によらず広く発現するが、アピカル側にはペクチンで刺激するとより多くのフィブロネクチンの発現することを見出した。ペクチンを蛍光標識してアピカル側におけるペクチンの局在観察を試みたが、検出することはできなかった。

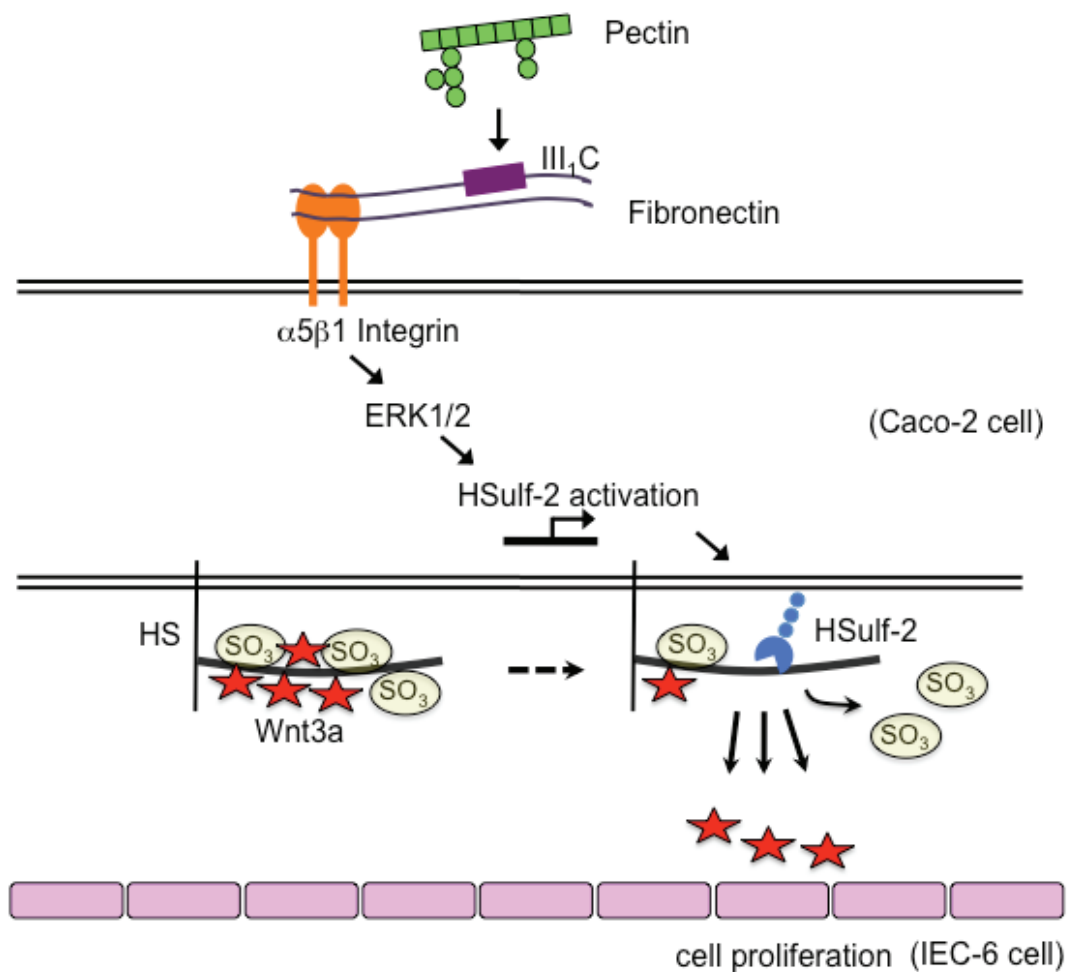
ペクチンが HSulf-2 発現を誘導する機構を解明するために、ペクチンが FNIII₁C と結合し、フィブロネクチンは RGD 配列を介してインテグリンと結合することに注目して、FNIII₁C または RGD ペプチドとペクチンを混合すると、HSulf-2 誘導が抑制された。またペクチンは分化 Caco-2 細胞の ERK1/2 を活性化し、ペクチン刺激による HSulf-2 発現上昇は ERK1/2 阻害剤により抑制された。これらの結果から、ペクチンはフィブロネクチンとインテグリン、ERK1/2 を介して HSulf-2 発現を誘導したことが示唆された。

ペクチン刺激により分化 Caco-2 細胞から分泌されて IEC-6 細胞を増殖させた物質を特定するために、小腸上皮の形成に関与する Wnt タンパク質に注目すると、分化 Caco-2 細胞に発現する Wnt3a, Wnt5a, Wnt11 の mRNA 発現がペクチン刺激により増加した。Wnt3a, Wnt5a, Wnt11 を直接 IEC-6 細胞に添加すると、Wnt3a と Wnt11 は濃度依存的に細胞を増殖した。ペクチン添加により、分化 Caco-2 細胞中の Wnt3a 発現は亢進したが、Wnt11 は検出できなかった。また、

ペクチンを添加した分化 Caco-2 細胞のバソラテラル培地から, Wnt3a と Wnt11 を検出することはできなかった。

以上より, 分化 Caco-2 細胞表面の HS は, ペクチンの刺激をフィブロネクチンと $\alpha 5 \beta 1$ インテグリン, ERK1/2 を介して HSulf-2 発現を誘導することにより硫酸化構造を変化させ, Wnt3a との相互作用を低下させることにより Wnt3a の分泌を促進することを見出した。また Wnt3a により IEC-6 細胞が増加し, Wnt3a は陰窩の幹細胞に隣接するパネート細胞に高発現し, IEC-6 細胞は陰窩のモデルであることから, *in vivo* においてペクチンにより小腸絨毛の形態が変化する際にも, 細胞表面 HS が同様の機能を発揮する可能性が推察される。本研究は, 小腸上皮様細胞における HS の機能解明に大きく貢献する。

第 3 章の結論の模式図を以下に示す。



第4章 総括

HS は直鎖状の多糖であり，線虫から高等動物にいたるまで，細胞表面や細胞外マトリクスに普遍的に存在する。ゴルジ体で，GlcNAc とグルクロン酸またはイズロン酸から成る二糖の繰り返し構造が合成されると，多様な硫酸基転移酵素の働きによって硫酸化修飾を受ける。多数のアイソフォームを持つ硫酸基転移酵素が複数存在する上に，発現する部位や時期が一定ではないために，HS は非常に多様な硫酸化構造を持つことが構造上の大きな特徴である。ゴルジ体から細胞表面へ輸送された HS は，脱硫酸化酵素により更なる修飾を受ける。このような過程を経ることで，細胞表面 HS は膨大な構造多様性を有するようになる。さらに細胞表面の HS は細胞表面に輸送されてから数時間すると代謝することも知られている。これらの事実から，HS は細胞外の環境変化に応答して敏感に硫酸化構造を調節すると考えられるが，なぜ HS は複雑な硫酸化構造を持つのであろうか？それは，細胞表面 HS は特定の硫酸化構造により生体内の多様な生理活性物質結合することで，細胞増殖や分化，腫瘍転移，栄養素の代謝にいたるまで様々な生理機能の調節に関与するためである。HS の硫酸化構造を形成する HS 合成酵素や硫酸基転移酵素をノックアウトすると胎生致死を招き，種々の臓器の奇形が観察されたことから，HS 鎖のみならず，HS の硫酸化構造が生体の正常な発達に極めて重要な役割を担うと考えられている。これまでのところ，線維芽細胞増殖因子（FGF）と HS に関する研究が古くから行われたことから，細胞増殖における HS の機能については，硫酸化構造の観点から研究が進展している。

ところで，小腸上皮は，生体内でも細胞増殖が絶えず行われる組織である。小腸上皮は，絨毛と陰窩に区分され，陰窩の底部に存在する小腸幹細胞から分離した細胞が上部へ移動して，絨毛の先端で剥離するサイクルを繰り返す。HS が小腸上皮の基底膜側に存在することは古くから知られていたが，その働きは十分に解明されていなかった。しかしながら，近年になり，小腸上皮の正常な発達に HS が重要な役割を担うことが報告されたことから，小腸における HS の機能に注目が集まった。そこで本研究では，小腸上皮細胞表面 HS の機能を硫酸化構造に注目して解明することを目的とした。細胞表面 HS の硫酸化構造は細胞外の環境変化などの刺激に応答して変化することが示唆されているが，明確な証明はなされていない。そこで，まずは，当研究室において知見が蓄積したマウス線維芽細胞（L-M 細胞）をモデルにして，細胞外の刺激に対する

HS の応答機能の解明に取り組んだ。

マウス線維芽細胞（L-M 細胞）は，アドレナリンに応答して神経成長因子（NGF）の分泌量を増加させることが知られるため，アドレナリンによって細胞表面 HS の硫酸化構造が変化すると仮定し，この現象をモデルにして，細胞外の刺激に対する細胞表面 HS の応答機構を解明に取り組んだ。そこで，アドレナリンを添加した 3 時間後の細胞から HS を回収して，HS 分解酵素を用いて二糖単位に分解したのち，HPLC に供して二糖組成をコントロールの HS と比較した。その結果，アドレナリンの刺激により GlcNAc の C 6 位のみが硫酸化された二糖（6S）の割合が有意に増加することを発見した。GlcNAc の C 6 位は，6-*O*-sulfotransferases（6-OSTs）によって硫酸化されるため，6-OSTs のアイソフォームのうちで L-M 細胞に発現する 6-OST-1 に注目すると，アドレナリン添加の 1.5 時間後に mRNA 発現量がアドレナリンの濃度依存的に増加した。さらに，アドレナリンによる 6-OST-1 の発現上昇が，Src 阻害剤と ERK1/2 阻害剤によって抑制されたことから，6-OST-1 の発現が Src-ERK1/2 経路によって制御されることを発見した。さらに，L-M 細胞を ERK1/2 の阻害剤で前培養することにより，アドレナリンによる HS の構造変化を抑制することに成功した。以上より，L-M 細胞表面 HS は，アドレナリンの刺激によって 6-OST-1 の発現を Src-ERK1/2 経路によって誘導して，HS の硫酸化構造を変化させることが明らかとなった。これにより，細胞表面 HS は，硫酸化構造を変化させることで細胞外からの生理刺激に応答することを証明した。

次に，L-M 細胞の研究から得られた知見を踏まえて，腸管上皮細胞における HS の硫酸化構造と機能に関する研究を行った。これまでに，水溶性食物繊維であるペクチンをラットに与えると，小腸絨毛の形態が変化することが報告されているが，その分子メカニズムは解明されていない。細胞表面 HS は様々な生理機能に関与することから，ペクチンが小腸絨毛のへ生理作用を及ぼす際に細胞表面 HS も影響を受ける可能性があると考えた。そこでペクチンが小腸上皮様細胞表面の HS の硫酸化構造と機能に与える影響について考察した。まず初めに，小腸上皮を *in vitro* で再現するために，トランスウェルに小腸上皮のモデル細胞である Caco-2 細胞を播種し，約 20 日培養して分化させ，アウターウェルに陰窩のモデルとなる IEC-6 細胞を播種して，小腸上皮を模した複合培養系を構築した。プルーンから精製したペクチンを分化 Caco-2 細胞に添加す

ると、ペクチンの濃度依存的に IEC-6 細胞が増加した。これにより、ペクチンが分化 Caco-2 細胞に接触することにより細胞増殖因子等を分泌して、IEC-6 細胞の増殖が促進されたと推測された。また、当研究室において、分化 Caco-2 細胞にペクチンを添加すると細胞表面 HS の硫酸化構造が大きく変化することが報告された。特に、GlcNAc の N 位と C 6 位・ウロン酸の C 2 位が硫酸化された二糖 (Δ Di-TriS) が減少した。そこで、細胞表面で Δ Di-TriS を脱硫酸化する HS 6-O-endosulfatases (HSulfs) に注目すると、ペクチン添加により HSulf-1 の発現が抑制され、一方で HSulf-2 の発現が誘導された。これらの結果から、ペクチンによって HSulf-2 の発現が誘導され、それにより分化 Caco-2 細胞表面 HS の硫酸化構造が変化したことが示唆された。当研究室では、細胞外マトリクスの構成タンパク質であるフィブロネクチンの部分配列 (FNIII₁C) がプルーンペクチンと結合することを見出していた。そこで、チャンバースライド上に Caco-2 細胞を培養して分化させ、フィブロネクチンとその受容体である α 5 インテグリンの発現を免疫染色法により検討した。その結果、 α 5 インテグリンはペクチンの添加によらず細胞間に広く発現しており、細胞間の密着結合 (タイトジャンクション) よりアピカル側に発現することが示された。また、ペクチンを添加すると、アピカル側におけるフィブロネクチンの発現が上昇することが観察された。アピカル側におけるペクチンの局在の観察を試みたが、観察することはできなかった。共焦点顕微鏡による観察から、分化 Caco-2 細胞のアピカル側にはフィブロネクチンと α 5 インテグリンがペクチンと接触できる位置に発現することを確認したことから、ペクチンがフィブロネクチンや α 5 インテグリンを介して HSulf-2 の発現を誘導したかを調べた。その結果、ペクチンによる HSulf-2 の発現誘導が FNIII₁C と RGD ペプチドにより阻害されたことから、ペクチンはフィブロネクチンと α 5 β 1 インテグリンを介して HS の硫酸化構造を変化させることが示唆された。また、ペクチンにより分化 Caco-2 細胞の ERK1/2 がリン酸化され、ERK1/2 阻害剤がペクチン添加による HSulf-2 発現上昇を抑制したことから、ペクチンによる HSulf-2 発現亢進には ERK1/2 が関与することが示唆された。

ペクチンで刺激した分化 Caco-2 細胞から分泌されて IEC-6 細胞の増殖を促進した物質を特定するために、小腸上皮の発達に重要な役割を果たす Wnt タンパク質に注目した。そこで、IEC-6 細胞に Wnt3a, Wnt5a, Wnt11 の組み換え体を投与すると、Wnt3a と Wnt11 が濃度依存的に IEC-6 細胞を増殖させることを見出した。また、ペクチンを分化 Caco-2 細胞に投与すると、Wnt3a と Wnt11 の

mRNA 発現量が亢進し、Wnt3a については細胞内の発現量も亢進した。さらに、当研究室では、ペクチン刺激により硫酸化構造の変化した HS と Wnt-3a や Wnt-11 に対する結合力が、ペクチン刺激しない細胞の HS と比較して著しく減少することを発見したことから、分化 Caco-2 細胞表面の HS はペクチン添加による硫酸化構造変化により Wnt の分泌を促進することが推察された。

以上の結果より、L-M 細胞表面の HS は、アドレナリン刺激を $\beta 3$ アドレナリン受容体を介して細胞内へ伝達し、Src-ERK1/2 経路により 6-OST-1 の mRNA 発現を添加 1.5 時間後に亢進させた。その結果、アドレナリン添加 3 時間後には、6 位硫酸化二糖が増加することにより細胞表面 HS の硫酸化構造が変化し、アドレナリンにより分泌が促進される NGF との相互作用が強くなることが示唆された。次いで、この知見に基づき、分化 Caco-2 細胞表面 HS の硫酸化構造と機能について研究した。分化 Caco-2 細胞と陰窩のモデルとされる IEC-6 細胞を複合培養して、分化 Caco-2 細胞をペクチンで刺激すると、ペクチンの濃度依存的に IEC-6 細胞が増加した。分化 Caco-2 細胞とペクチンの相互作用が示唆されたことから、分化 Caco-2 細胞へペクチンを添加すると、細胞表面 HS を構成する二糖のうち、主に GlcNAc の N 位と C 6 位・ウロン酸の C 2 位が硫酸化された二糖 (Δ Di-TriS) が減少した。また、ペクチン添加により、 Δ Di-TriS の脱硫酸化を担う HSulf-2 発現が亢進した。ペクチンによる HSulf-2 発現上昇が FNIII₁C と RGD ペプチド、ERK1/2 阻害剤により抑制されたことから、分化 Caco-2 細胞において HSulf-2 はフィブロネクチンとインテグリンを介して細胞内へ刺激を伝達し、ERK1/2 が HSulf-2 の発現を制御することを見出した。また、ペクチン添加により分化 Caco-2 細胞の Wnt3a/Wnt11 の mRNA 発現量が亢進し、細胞内の Wnt3a 発現量も亢進した。分化 Caco-2 細胞において細胞表面 HS は主にバソラテラル側に発現し、ペクチン添加により Wnt3a や Wnt11 との相互作用が顕著に減少したことと、Wnt3a 添加により IEC-6 細胞が増加したことから、分化 Caco-2 細胞表面 HS はペクチン刺激により HSulf-2 の発現を亢進させることで Δ Di-TriS の割合を減少させ、Wnt3a の分泌を促進することで陰窩の細胞を増殖させる機構が示唆された。

第5章 謝辞

はじめに、博士課程へ進学する機会を与えてくださった矢部富雄准教授に感謝申し上げます。2006年に矢部先生の研究室を卒業してから、糖質化学とは無関係の分野で4年半を過ごしたため、研究を遂行するための知識と経験に乏しい状態でしたが、日夜を問わず矢部先生と議論する機会に恵まれたお陰で、研究を続けることができました。特に、1報目の論文については、投稿から受理に至まで約2年の歳月がかかり、何度もご迷惑をおかけしましたが、研究者として社会に巣立つにあたり、非常に貴重な経験を積むことができました。矢部先生が岐阜大学に赴任された年に学部4年生として本研究室への配属が叶い、途中で他大学への進学や社会人経験を挟みましたが、矢部先生の研究室でもう一度研究する機会に恵まれ、矢部先生のような研究者になることを目標に毎日研究に没頭することができました。博士課程の3年間ほど1つのこと（ヘパラン硫酸）について真剣に考えたことはありません。私の人生において、最も充実し、苦難を味わい、成長に貢献した3年間でした。矢部先生のご指導に、心から感謝申し上げます。

研究の進捗に対して終始懇切丁寧なご指導、ご教授を賜りました金丸義敬教授、森誠教授、石田秀治教授、岩本悟志准教授、北口公司助教に厚く御礼申し上げます。

また、試料を提供していただいた三基商事株式会社に感謝申し上げます。

そして、本研究の遂行にあたり終始御協力、御助言頂いた技術補助員の矢部律子氏、松岡拓磨氏、研究員の稲垣瑞穂氏、博士課程の Cairangzhuoma 氏に感謝いたします。また、本研究の考察に欠かすことの出来ないデータの提供を受けた修士課程2年の村田一馬氏、大島和也氏、修士課程1年の小堺健生氏に感謝申し上げます。英語論文の執筆にあたり、適切なご助言をいただいた博士課程の Sana Ben Othman 氏に感謝申し上げます。タンパク質測定の実験方法のご助言をいただいた修士課程2年の大野翔平氏に感謝申し上げます。また、研究室の行事を開催して、楽しい研究室生活を提供してくれた研究室の仲間に感謝申し上げます。

最後に、毎日研究に没頭する生活環境を提供してくれ、研究を毎日応援してくれた妻と家族に感謝いたします。

ありがとうございました。

西田 光貴

第 6 章 参考文献

- Ai, X., Do, A. T., Lozynska, O., Kusche-Gullberg, M., Lindahl, U. and Emerson, C. P. Jr. (2003). QSulf1 remodels the 6-O sulfation states of cell surface heparan sulfate proteoglycans to promote Wnt signaling. *J. Cell Biol.* 162, 341~351.
- Aliaga, J. C., Deschênes, C., Beaulieu, J. F., Calvo, E. L. and Rivard, N. (1999). Requirement of the MAP kinase cascade for cell cycle progression and differentiation of human intestinal cells. *Am. J. Physiol.* 277, G631~G641.
- Ashikari-Hada, S., Habuchi, H., Kariya, N., Itoh, N., Reddi, A. H. and Kimata, K. (2004). Characterization of growth factor-binding structures in heparin/heparan sulfate using an octasaccharide library. *J. Biol. Chem.* 279, 12346~12354.
- Atha, D. H., Lormeau, J. C., Petitou, M., Rosenberg, R. D. and Choay, J. (1985). Contribution of monosaccharide residues in heparin binding to antithrombin III. *Biochemistry* 24, 6723~6729.
- Atha, D. H., Lormeau, J. C., Petitou, M., Rosenberg, R. D. and Choay, J. (1987). Contribution of 3-O- and 6-O-sulfated glucosamine residues in the heparin-induced conformational change in antithrombin III. *Biochemistry* 26, 6454~6461.
- Araujo, A. P., Ribeiro, M.E., Ricci, R., Torquato, R. J., Toma, L. and Porcionatto, M. A. (2010). Glial cells modulate heparan sulfate proteoglycan (HSPG) expression by neuronal precursors during early postnatal cerebellar development. *Int. J. Dev. Neurosci.* 28, 611~620.
- Azzaroni, O. (2012). Polymer Brushes Here, There, and Everywhere: Recent Advances in Their Practical Applications and Emerging Opportunities in Multiple Research Fields. *J. Polym. Sci.* 50, 3225~3258.
- Beaulieu, J. F., and Ménard, D. (2012). Isolation, characterization, and culture of normal human intestinal crypt and villus cells. *Methods Mol. Biol.* 806, 157~173.
- Bishop, J. R., Schuksz, M. and Esko, J. D. (2007). Heparan sulphate proteoglycans fine-tune mammalian physiology. *Nature* 446, 1030~1037.

- Bode, L., Salvestrini, C., Park, P. W., Li, J. P., Esko, J. D., Yamaguchi, Y., Murch, S. and Freeze, H. H. (2008). Heparan sulfate and syndecan-1 are essential in maintaining murine and human intestinal epithelial barrier function. *J. Clin. Invest.* 118, 229~238.
- Brown, L., Rosner, B., Willett, W. W. and Sacks, F. M. (1999). Cholesterol-lowering effects of dietary fiber: a meta-analysis. *Am. J. Clin. Nutr.* 69, 30~42.
- Brucato, S., Bocquet, J. and Villers, C. (2002). Regulation of glypican-1, syndecan-1 and syndecan-4 mRNAs expression by follicle-stimulating hormone, cAMP increase and calcium influx during rat Sertoli cell development. *Eur. J. Biochem.* 269, 3461~3469.
- Caldwell, J., Palsson, B. O., Locey, B. and Emerson, S. G. (1991). Culture perfusion schedules influence the metabolic activity and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor production rates of human bone marrow stromal cells. *J. Cell Physiol.* 147, 344~353.
- Chernogubova, E., Hutchinson, D. S., Nedergaard, J. and Bengtsson, T. (2005). Alpha1- and beta1-adrenoceptor signaling fully compensates for beta3-adrenoceptor deficiency in brown adipocyte norepinephrine-stimulated glucose uptake. *Endocrinology* 146, 2271~2284.
- Crews, C. M., Alessandrini, A. and Erikson, R. L. (1992). The primary structure of MEK, a protein kinase that phosphorylates the ERK gene product. *Science* 258, 478~480.
- Crosnier, C., Stamatakis, D. and Lewis, J. (2006). Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control. *Nat. Rev. Genet.* 7, 349~359.
- Danen, E. H., Aota, S., van Kraats, A. A., Yamada, K. M., Ruiter, D. J. and van Muijen, G. N (1995). Requirement for the synergy site for cell adhesion to fibronectin depends on the activation state of integrin alpha 5 beta 1. *J. Biol. Chem.* 270, 21612~21618.
- David, G., Bai, X. M., Van der Schueren, B., Cassiman, J. J., and Van den Berghe, H. (1992). Developmental changes in heparan sulfate expression: in situ detection with mAbs. *J. Cell Biol.* 119, 961~975.
- Dhoot, G. K., Gustafsson, M. K., Ai, X., Sun, W., Standiford, D. M. and Emerson, C. P. Jr. (2001). Regulation of Wnt signaling and embryo patterning by an extracellular sulfatase. *Science* 293, 1663~1666.

- Do, A. T., Smeds, E., Spillmann, D. and Kusche-Gullberg, M. (2006). Overexpression of heparan sulfate 6-O-sulfotransferases in human embryonic kidney 293 cells results in increased N-acetylglucosaminyl 6-O-sulfation. *J. Biol. Chem.* 281, 5348~5356.
- Esko, J. D. and Lindahl, U. (2001). Molecular diversity of heparan sulfate. *J. Clin. Invest.* 108, 169~173.
- Ferruzza, S., Rossi, C., Sambuy, Y., and Scarino, M. L. (2013). Serum-reduced and serum-free media for differentiation of Caco-2 cells. *ALTEX.* 30, 159~168.
- Frazier, S. B., Roodhouse, K. A., Hourcade, D. E. and Zhang, L. (2008). The Quantification of Glycosaminoglycans: A Comparison of HPLC, Carbazole, and Alcian Blue Methods. *Open Glycosci.* 1, 31~39.
- Frese, M. A., Milz, F., Dick, M., Lamanna, W. C. and Dierks, T. (2009). Characterization of the human sulfatase Sulfl and its high affinity heparin/heparan sulfate interaction domain. *J. Biol. Chem.* 284, 28033~28044.
- Frost, R. A., Nystrom, G. J. and Lang, C. H. (2004). Epinephrine stimulates IL-6 expression in skeletal muscle and C2C12 myoblasts: role of c-Jun NH2-terminal kinase and histone deacetylase activity. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 286, E809~E817.
- 古川鋼一，遠藤玉夫，岡昌吾，本家孝一，加藤晃一（2008）：糖鎖情報の独自性と普遍性，共立出版
- Fuerer, C., Habib, S. J. and Nusse, R. (2010) A study on the interactions between heparan sulfate proteoglycans and Wnt proteins. *Dev. Dyn.* 239, 184~190.
- Furukawa, Y., Furukawa, S., Satoyoshi, E. and Hayashi, K. (1986). Catecholamines induce an increase in nerve growth factor content in the medium of mouse L-M cells. *J. Biol. Chem.* 261, 6039~6047.
- Gilcrease, M. Z. (2007). Integrin signaling in epithelial cells. *Cancer Lett.* 247, 1~25.
- Gon, H., Fumoto, K., Ku, Y., Matsumoto, S. and Kikuchi, A. (2013). Wnt5a signaling promotes apical and basolateral polarization of single epithelial cells. *Mol. Biol. Cell* 24, 3764~3774.

- Gregorieff, A., Pinto, D., Begthel, H., Destrée, O., Kielman, M. and Clevers, H. (2005). Expression pattern of Wnt signaling components in the adult intestine. *Gastroenterology* 129, 626~638.
- Grobe, K. and Esko, J. D. (2002). Regulated translation of heparan sulfate N-acetylglucosamine N-deacetylase/n-sulfotransferase isozymes by structured 5'-untranslated regions and internal ribosome entry sites. *J. Biol. Chem.* 277, 30699~30706.
- Gross, J. C., Chaudhary, V., Bartscherer, K. and Boutros, M. (2012). Active Wnt proteins are secreted on exosomes. *Nat. Cell Biol.* 14, 1036~1045.
- Habuchi, H., Habuchi, O. and Kimata, K. (1995). Purification and characterization of heparan sulfate 6-sulfotransferase from the culture medium of Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* 270, 4172~4179.
- Habuchi, H., Kobayashi, M. and Kimata, K. (1998). Molecular characterization and expression of heparan-sulfate 6-sulfotransferase. Complete cDNA cloning in human and partial cloning in Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* 273, 9208~9213.
- Habuchi, H., Tanaka, M., Habuchi, O., Yoshida, K., Suzuki, H., Ban, K. and Kimata, K. (2000). The occurrence of three isoforms of heparan sulfate 6-O-sulfotransferase having different specificities for hexuronic acid adjacent to the targeted N-sulfoglucosamine. *J. Biol. Chem.* 275, 2859~2868.
- Habuchi, H., Miyake, G., Nogami, K., Kuroiwa, A., Matsuda, Y., Kusche-Gullberg, M., Habuchi, O., Tanaka, M. and Kimata, K. (2003). Biosynthesis of heparan sulphate with diverse structures and functions: two alternatively spliced forms of human heparan sulphate 6-O-sulphotransferase-2 having different expression patterns and properties. *Biochem. J.* 371, 131~142.
- Habuchi, H., Habuchi, O. and Kimata, K. (2004). Sulfation pattern in glycosaminoglycan: does it have a code? *Glycoconj. J.* 21, 47~52.
- Haupt, L. M., Murali, S., Mun, F. K., Teplyuk, N., Mei, L. F., Stein, G. S., van Wijnen, A. J., Nurcombe, V. and Cool, S. M. (2009). The heparan sulfate proteoglycan (HSPG) glypican-3 mediates commitment of MC3T3-E1 cells toward osteogenesis. *J. Cell Physiol.* 220, 780~791.

- Higuchi, K. (1970). An improved chemically defined culture medium for strain L mouse cells based on growth responses to graded levels of nutrients including iron and zinc ions. *J. Cell Physiol.* 75, 65~72.
- 本田明里 (2011) : 腸管上皮細胞に対する多糖類の構造特異的相互作用の解明, 岐阜大学修士論文
- Inatani, M., Irie, F., Plump, A. S., Tessier-Lavigne, M. and Yamaguchi, Y. (2003). Mammalian brain morphogenesis and midline axon guidance require heparan sulfate. *Science* 302, 1044~1046.
- 印南敏, 桐山修八 (1995) : 食物繊維, 第一出版株式会社
- 石川愛美 (2011) : 腸管上皮細胞におけるブルーネペクチンのポリアミン代謝関連遺伝子への影響, 岐阜大学卒業論文
- Ishihara, M. (1993). Biosynthesis, structure, and biological activity of basic FGF binding domains of heparan sulfate. *Trend Glycosci. Glycotech.* 5, 343~354.
- 伊藤千弘 (2012) : 腸管上皮細胞におけるブルーネペクチンのポリアミン代謝への影響, 岐阜大学卒業論文
- Jackson, R. A., Murali, S., van Wijnen, A. J., Stein, G. S., Nurcombe, V. and Cool, S. M. (2007). Heparan sulfate regulates the anabolic activity of MC3T3-E1 preosteoblast cells by induction of Runx2. *J. Cell Physiol.* 210, 38~50.
- Jemth, P., Kreuger, J., Kusche-Gullberg, M., Sturiale, L., Giménez-Gallego, G. and Lindahl, U. (2002). Biosynthetic oligosaccharide libraries for identification of protein-binding heparan sulfate motifs. Exploring the structural diversity by screening for fibroblast growth factor (FGF)1 and FGF2 binding. *J. Biol. Chem.* 277, 30567~30573.
- Kinoshita, E. and Kinoshita, E. (2011). Improved Phos-tag SDS-PAGE under neutral pH conditions for advanced protein phosphorylation profiling. *Proteomics* 11, 319~323.
- Kreuger, J., Prydz, K., Pettersson, R. F., Lindahl, U. and Salmivirta, M. (1999). Characterization of fibroblast growth factor 1 binding heparan sulfate domain. *Glycobiology* 9, 723~729.

- Kreuger, J., Salmivirta, M., Sturiale, L., Giménez-Gallego, G. and Lindahl, U. (2001). Sequence analysis of heparan sulfate epitopes with graded affinities for fibroblast growth factors 1 and 2. *J. Biol. Chem.* 276, 30744~30752.
- Krishnan, M., Lapierre, L. A., Knowles, B. C. and Goldenring, J. R. (2013). Rab25 regulates integrin expression in polarized colonic epithelial cells. *Mol. Biol. Cell* 24, 818~831.
- Kuwada, S. K. and Li, X. (2000). Integrin alpha5/beta1 mediates fibronectin-dependent epithelial cell proliferation through epidermal growth factor receptor activation. *Mol. Biol. Cell* 11, 2485~2496.
- Kuwada, S. K., Kuang, J. and Li, X. (2005). Integrin alpha5/beta1 expression mediates HER-2 down-regulation in colon cancer cells. *J. Biol. Chem.* 280, 19027~19035.
- Lamanna, W. C., Kalus, I., Padva, M., Baldwin, R. J., Merry, C. L., and Dierks, T. (2007). The heparanome--the enigma of encoding and decoding heparan sulfate sulfation. *J. Biotechnol.* 129, 290~307.
- Lamanna, W. C., Frese, M. A., Balleininger, M. and Dierks, T. (2008). Sulf loss influences N-, 2-O-, and 6-O-sulfation of multiple heparan sulfate proteoglycans and modulates fibroblast growth factor signaling. *J. Biol. Chem.* 283, 27724~27735.
- Langhout, D. J., Schutte, J. B., Van Leeuwen, P., Wiebenga, J. and Tamminga, S. (1999). Effect of dietary high- and low-methylated citrus pectin on the activity of the ileal microflora and morphology of the small intestinal wall of broiler chicks. *Br. Poult. Sci.* 40, 340~347.
- Leclerc, L., Cutsem, P. V. and Michiels, C. (2013). Anti-cancer activities of pH- or heat-modified pectin. *Front. Pharmacol.* 4, 128.
- Ledin, J., Staatz, W., Li, J. P., Götte, M., Selleck, S., Kjellén, L., and Spillmann, D. (2004). Heparan sulfate structure in mice with genetically modified heparan sulfate production. *J. Biol. Chem.* 279, 42732~42741.
- Lévy, P., Robin, H., Bertrand, F., Kornprobst, M. and Capeau, J. (2003). Butyrate-treated colonic Caco-2 cells exhibit defective integrin-mediated signaling together with increased apoptosis and differentiation. *J. Cell Physiol.* 197, 336~347.

- Lee, J. C., Pak, S. C., Lee, S. H., Na, C. S., Lim, S. C., Song, C. H., Bai, Y. H. and Jang, C. H. (2004). Asian pear pectin administration during presensitization inhibits allergic response to ovalbumin in BALB/c mice. *J. Altern. Complement. Med.* 10, 527~534.
- Li, H., Fong, C., Chen, Y., Cai, G. and Yang, M. (2010). Beta-adrenergic signals regulate adipogenesis of mouse mesenchymal stem cells via cAMP/PKA pathway. *Mol. Cell Endocrinol.* 323, 201~207.
- Liu, L., Rao, J. N., Zou, T., Xiao, L., Smith, A., Zhuang, R., Turner, D. J. and Wang, J. Y. (2012). Activation of Wnt3a signaling stimulates intestinal epithelial repair by promoting c-Myc-regulated gene expression. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 302, C277~285.
- Low, S. H., Wong, S. H., Tang, B. L., Hong, and W. (1994). Effects of NH₄Cl and nocodazole on polarized fibronectin secretion vary amongst different epithelial cell types. *Mol. Membr. Biol.* 11, 45~54.
- Lunn, J. and Buttriss, J. L. (2007). Carbohydrates and dietary fibre. *Nutr. Bull.* 32, 21~64.
- McCullogh, J. S., Ratcliffe, B., Mandir, N., Carr, K. E. and Goodlad, R. A. (1998). Dietary fibre and intestinal microflora: effects on intestinal morphometry and crypt branching. *Gut.* 42, 799~806.
- 真部孝明 (2001) : ペクチン-その科学と食品のテクスチャー, 幸書房
- Margolis, R. K., Salton, S. R. and Margolis, R. U. (1987). Effects of nerve growth factor-induced differentiation on the heparan sulfate of PC12 pheochromocytoma cells and comparison with developing brain. *Arch. Biochem. Biophys.* 257, 107~114.
- 水川ひとみ (2006) : プルーンのペクチン性多糖について, 岐阜大学卒業論文
- 宮崎利夫 (1990) : 多糖の構造と生理活性, 朝倉書店
- Molinoff, P. B. (1984). Alpha- and beta-adrenergic receptor subtypes properties, distribution and regulation. *Drugs* 28, 1~15.
- Mohnen, D. (2008). Pectin structure and biosynthesis. *Curr. Opin. Plant Biol.* 11, 266~277.
- Molist, A., Romarís, M., Lindahl, U., Villena, J., Touab, M., and Bassols, A. (1998). Changes in glycosaminoglycan structure and composition of the main heparan

- sulphate proteoglycan from human colon carcinoma cells (perlecan) during cell differentiation. *Eur. J. Biochem.* 254, 371~377.
- 村田一馬 (2011) : 腸管上皮様細胞表面のヘパラン硫酸糖鎖構造に対するプルーンペクチンの影響, 岐阜大学卒業論文
- Nadanaka, S., Kinouchi, H., Taniguchi-Morita, K., Tamura, J., and Kitagawa, H. (2011). Down-regulation of chondroitin 4-O-sulfotransferase-1 by Wnt signaling triggers diffusion of Wnt-3a. *J. Biol. Chem.* 286, 4199~4208.
- 永見圭太郎 (2009) : 生理活性物質によるヘパラン硫酸糖鎖構造変化の解析, 岐阜大学修士論文
- Nagamine, S., Tamba, M., Ishimine, H., Araki, K., Shiomi, K., Okada, T., Ohto, T., Kunita, S., Takahashi, S., Wismans, R. G., van Kuppevelt, T. H., Masu, M. and Keino-Masu, K. (2012). Organ-specific sulfation patterns of heparan sulfate generated by extracellular sulfatases Sulf1 and Sulf2 in mice. *J. Biol. Chem.* 287, 9579~9590.
- Nagel, M. D., Verhoef, R., Schols, H., Morra, M., Knox, J. P., Cecccone, G., Della Volpe, C., Vigneron, P., Bussy, C., Gallet, M., Velzenberger, E., Vayssade, M., Cascardo, G., Cassinelli, C., Haeger, A., Gilliland, D., Liakos, I., Rodriguez-Valverde, M. and Siboni, S. (2008). Enzymatically-tailored pectins differentially influence the morphology, adhesion, cell cycle progression and survival of fibroblasts. *Biochim. Biophys. Acta* 1780, 995~1003.
- 中村綾 (2009) : ペクチンと腸管上皮細胞との相互作用の解析, 岐阜大学修士論文
- Natoli, M., Leoni, B. D., D'Agnano, I., D'Onofrio, M., Brandi, R., Arisi, I., Zucco, F. and Felsani, A. (2011). Cell growing density affects the structural and functional properties of Caco-2 differentiated monolayer. *J. Cell Physiol.* 226, 1531~1543.
- 西田光貴 (2005) : 生理活性物質評価のための新規アッセイ系の開発, 岐阜大学卒業論文
- Nogami, K., Suzuki, H., Habuchi, H., Ishiguro, N., Iwata, H. and Kimata, K. (2004). Distinctive expression patterns of heparan sulfate O-sulfotransferases and regional differences in heparan sulfate structure in chick limb buds. *J. Biol. Chem.* 279, 8219~8229.

- Nurcombe, V., Ford, M. D., Wildschut, J. A. and Bartlett, P. F. (1993). Developmental regulation of neural response to FGF-1 and FGF-2 by heparan sulfate proteoglycan. *Science* 260, 103~106.
- Oger, J., Arnason, B. G., Pantazis, N., Lehrich, J. and Young, M. (1974). Synthesis of nerve growth factor by L and 3T3 cells in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 71, 1554~1558.
- Ohkami, H., Tazawa, K., Yamashita, I., Shimizu, T., Murai, K., Kobashi, K. and Fujimaki, M. (1995). Effects of apple pectin on fecal bacterial enzymes in azoxymethane-induced rat colon carcinogenesis. *Jpn. J. Cancer Res.* 86, 523~529.
- Olano-Martin, E., Gibson, G. R. and Rastell, R. A. (2002). Comparison of the in vitro bifidogenic properties of pectins and pectic-oligosaccharides. *J. Appl. Microbiol.* 93, 505~511.
- Ouko, L., Ziegler, T. R., Gu, L. H., Eisenberg, L. M. and Yang, V. W. (2004). Wnt11 signaling promotes proliferation, transformation, and migration of IEC6 intestinal epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 279, 26707~26715.
- Pan, Y., Woodbury, A., Esko, J. D., Grobe, K. and Zhang, X. (2006). Heparan sulfate biosynthetic gene *Ndst1* is required for FGF signaling in early lens development. *Development* 133, 4933~4944.
- Pankov, R. and Yamada, K. M. (2002). Fibronectin at a glance. *J. Cell Sci.* 115, 3861~3863.
- Popov, S. V., Ovodova, R. G., Popova, G. Y., Nikitina, I. R. and Ovodov, Y. S. (2005). Adhesion of human neutrophils to fibronectin is inhibited by comaruman, pectin of marsh cinquefoil *Comarum palustre* L., and by its fragments. *Biochemistry (Mosc)* 70, 108~112.
- Perreault, N., Katz, J. P., Sackett, S. D. and Kaestner, K. H. (2001). Foxl1 controls the Wnt/beta-catenin pathway by modulating the expression of proteoglycans in the gut. *J. Biol. Chem.* 276, 43328~43333.
- Ramsden, L. and Rider, C. C. (1992). Selective and differential binding of interleukin (IL)-1 alpha, IL-1 beta, IL-2 and IL-6 to glycosaminoglycans. *Eur. J. Immunol.* 22, 3027~3031.

- Reya, T. and Clevers, H. (2005). Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* 434, 843~850.
- Ridley, B. L., O'Neill, M. A. and Mohnen, D. (2001). Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry* 57, 929~967.
- Rijsewijk, F., Schuermann, M., Wagenaar, E., Parren, P., Weigel, D. and Nusse, R. (1987). The *Drosophila* homolog of the mouse mammary oncogene *int-1* is identical to the segment polarity gene *wingless*. *Cell* 50, 649~657.
- Robidoux, J., Kumar, N., Daniel, K. W., Moukdar, F., Cyr, M., Medvedev, A. V. and Collins, S. (2006). Maximal beta3-adrenergic regulation of lipolysis involves Src and epidermal growth factor receptor-dependent ERK1/2 activation. *J. Biol. Chem.* 281, 37794~37802.
- Sakiyama-Elbert, S. E. and Hubbell, J. A. (2000). Controlled release of nerve growth factor from a heparin-containing fibrin-based cell ingrowth matrix. *J. Control Release* 69, 149~158.
- Sanders, M. A. and Basson, M. D. (2000). Collagen IV-dependent ERK activation in human Caco-2 intestinal epithelial cells requires focal adhesion kinase. *J. Biol. Chem.* 275, 38040~38047.
- Sato, T., van Es, J. H., Snippert, H. J., Stange, D. E., Vries, R. G., van den Born, M., Barker, N., Shroyer, N. F., van de Wetering, M., and Clevers, H. (2011). Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts. *Nature*. 469, 415~418.
- Satsu, H., Yokoyama, T., Ogawa, N., Fujiwara-Hatano, Y. and Shimizu, M. (2001). The changes in the neuronal PC12 and the intestinal epithelial Caco-2 cells during the coculture. The functional analysis using an in vitro coculture system. *Cytotechnology* 35, 73~79.
- Schlaepfer, D. D. and Hunter, T. (1997). Focal adhesion kinase overexpression enhances ras-dependent integrin signaling to ERK2/mitogen-activated protein kinase through interactions with and activation of c-Src. *J. Biol. Chem.* 272, 13189~13195.
- Schlaepfer, D. D., Jones, K. C. and Hunter, T. (1998). Multiple Grb2-mediated integrin-stimulated signaling pathways to ERK2/mitogen-activated protein kinase:

- summation of both c-Src- and focal adhesion kinase-initiated tyrosine phosphorylation events. *Mol. Cell Biol.* 18, 2571~2585.
- Schroeder, F., Fontaine, R. N., Feller, D. J. and Weston, K. G. (1981). Drug-induced surface membrane phospholipid composition in murine fibroblasts. *Biochim. Biophys. Acta* 643, 76~88.
- Seger, R., Ahn, N. G., Posada, J., Munar, E. S., Jense, A. M., Cooper, J. A., Cobb, M. H. and Kerbs, E. G. (1992). Purification and characterization of mitogen-activated protein kinase activator(s) from epidermal growth factor-stimulated A431 cells. *J. Biol. Chem.* 267, 14373~14381.
- Shworak, N. W., Fritze, L. M., Liu, J., Butler, L. D. and Rosenberg, R. D. (1996). Cell-free synthesis of anticoagulant heparan sulfate reveals a limiting converting activity that modifies an excess precursor pool. *J. Biol. Chem.* 271, 27063~27071.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. and Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150, 76~85.
- Soeder, K. J., Snedden, S. K., Cao, W., Della, R. G. J., Daniel, K. W., Luttrell, L. M. and Collins, S. (1999). The beta3-adrenergic receptor activates mitogen-activated protein kinase in adipocytes through a Gi-dependent mechanism. *J. Biol. Chem.* 274, 12017~12022.
- Sugaya, N., Habuchi, H., Nagai, N., Ashikari-Hada, S. and Kimata, K. (2008). 6-O-sulfation of heparan sulfate differentially regulates various fibroblast growth factor-dependent signalings in culture. *J. Biol. Chem.* 283, 10366~10376.
- Strunz, C. M., Matsuda, M., Salemi, V. M., Nogueira, A., Mansur, A. P., Cestari, I. N. and Marquezini, M. V. (2011). Changes in cardiac heparan sulfate proteoglycan expression and streptozotocin-induced diastolic dysfunction in rats. *Cardiovasc Diabetol* 10, 35~44.
- Struyf, S., Van Collie, E., Paemen, L., Put, W., Lenaerts, J. P., Proost, P., Opdenakker, G. and Van Damme, J. (1998). Synergistic induction of MCP-1 and -2 by IL-1beta and interferons in fibroblasts and epithelial cells. *J. Leukoc. Biol.* 63, 364~372.

- Tafazoli, F., Holmström, A., Forsberg, A. and Magnusson, K. E. (2000). Apically exposed, tight junction-associated beta1-integrins allow binding and YopE-mediated perturbation of epithelial barriers by wild-type *Yersinia* bacteria. *Infect. Immun.* 68, 5335~5343.
- Tasman-Jones, C., Owen, R. L. and Jones, A. L. (1982). Semipurified dietary fiber and small-bowel morphology in rats. *Dig. Dis. Sci.* 27, 519~524.
- Tazawa, K., Yatuzuka, K., Yatuzuka, M., Koike, J., Ohkami, H., Saito, T., Ohnishi, Y. and Saito, M. (1999). Dietary fiber inhibits the incidence of hepatic metastasis with the anti-oxidant activity and portal scavenging functions. *Hum. Cell* 12, 189~196.
- Tepluk, N. M., Haupt, L. M., Ling, L., Dombrowski, C., Mun, F. K., Nathan, S. S., Lian, J. B., Stein, J. L., Stein, G. S., Cool, S. M. and van Wijnen, A. J. (2009). The osteogenic transcription factor Runx2 regulates components of the fibroblast growth factor/proteoglycan signaling axis in osteoblasts. *J. Cell Biochem.* 107, 144~154.
- Terpstra, A. H., Lapre, J. A., de Vries, H. T. and Beynen, A. C. (1998). Dietary pectin with high viscosity lowers plasma and liver cholesterol concentration and plasma cholesteryl ester transfer protein activity in hamsters. *J. Nutr.* 128, 1944~1949.
- Thompson, S. M., Jesudason, E. C., Turnbull, J. E. and Fernig, D. G. (2010). Heparan sulfate in lung morphogenesis: The elephant in the room. *Birth Defects Res. C Embryo Today* 90, 32~44.
- Turnbull, J., Powell, A., and Guimond, S. (2001). Heparan sulfate: decoding a dynamic multifunctional cell regulator. *Trends Cell Biol.* 11, 75~82.
- 辻啓介, 森文平 (2004) : 食物繊維の科学, 朝倉書店
- van Amerongen, R. and Nusse, R. (2009). Towards an integrated view of Wnt signaling in development. *Development* 136, 3205~3214.
- Wiechelman, K. J., Braun, R. D. and Fitzpatrick, J. D. (1988). Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation. *Anal. Biochem.* 175, 231~237.
- Willert, K., Brown, J. D., Danenberg, E., Duncan, A. W., Weissman, I. L., Reya, T., Yates, J. R. 3rd. and Nusse, R. (2003). Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature* 423, 448-452.

- Yanagishita, M. (1992). Glycosylphosphatidylinositol-anchored and core protein-intercalated heparan sulfate proteoglycans in rat ovarian granulosa cells have distinct secretory, endocytotic, and intracellular degradative pathways. *J. Biol. Chem.* 267, 9505~9511.
- Yamada, S., Busse, M., Ueno, M., Kelly, O. G., Skarnes, W. C., Sugahara, K. and Kusche-Gullberg, M. (2004). Embryonic fibroblasts with a gene trap mutation in *Ext1* produce short heparan sulfate chains. *J. Biol. Chem.* 279, 32134~32141.
- Yamamoto, S., Nakase, H., Matsuura, M., Honzawa, Y., Matsumura, K., Uza, N., Yamaguchi, Y., Mizoguchi, E. and Chiba, T. (2013). Heparan sulfate on intestinal epithelial cells plays a critical role in intestinal crypt homeostasis via Wnt/ β -catenin signaling. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 305, G241~G249.
- Yoshida, K., Miyauchi, S., Kikuchi, H., Tawada, A. and Tokuyasu, A. (1989). Analysis of unsaturated disaccharides from glycosaminoglycuronan by high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* 177, 327~332.
- Varki, A., Cummings, R. D., Esko, J. D., Freeze, H. H. and Stanely, P. (2008). *Essentials of Glycobiology*. pp. 229~248. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- Verderio, E., Nicholas, B., Gross, S. and Griffin, M. (1998). Regulated expression of tissue transglutaminase in Swiss 3T3 fibroblasts: effects on the processing of fibronectin, cell attachment, and cell death. *Exp. Cell Res.* 239, 119~138.
- Viviano, B. L., Paine-Saunders, S., Gasiunas, N., Gallagher, J., and Saunders, S. (2004). Domain-specific modification of heparan sulfate by *Qsulf1* modulates the binding of the bone morphogenetic protein antagonist Noggin. *J. Biol. Chem.* 279, 5604~5611.
- Wary, K. K., Mainiero, F., Isakoff, S. J., Marcantonio, E. E. and Giancotti, F. G. (1996). The adaptor protein Shc couples a class of integrins to the control of cell cycle progression. *Cell* 87, 733~743.
- Wary, K. K., Mariotti, A., Zurzolo, C. and Giancotti, F. G. (1998). A requirement for caveolin-1 and associated kinase Fyn in integrin signaling and anchorage-dependent cell growth. *Cell* 94, 625~634.

Zhang, J., Li, W., Sanders, M. A., Sumpio, B. E., Panja, A. and Basson, M. D. (2003). Regulation of the intestinal epithelial response to cyclic strain by extracellular matrix proteins. *FASEB J.* 17, 926~928.

Zhang, L., Lawrence, R., Schwartz, J. J., Bai, X., Wei, G., Esko, J. D. and Rosenberg, R. D. (2001). The effect of precursor structures on the action of glucosaminyl 3-O-sulfotransferase-1 and the biosynthesis of anticoagulant heparan sulfate. *J. Biol. Chem.* 276, 28806~28813.