

【目的】フラボドキシン (FldA) は、フラビンモノヌクレオチド (FMN) を結合したフラボ蛋白質である。FldA は生理学的に重要な化合物の生合成経路における酸化・還元反応において、電子受容体として機能する細菌の生存にとって必須のホロ酵素である。ヘリコバクター・ピロリ (HP) において FldA は、アセチル CoA の生合成に関与する脱水素酵素 (PFOR) の電子受容体として機能することが報告されている。しかしながら、この FldA そのものがどのように代謝されるのかについては他菌種同様、HP においても全く解明されていない。そこで本研究は、FldA の代謝経路の解明を目的とした。

【材料と方法】HP の NCTC 11638 株を本実験に用いた。0.2% ジメチル- β -サイクロデキストリン加 PPLO 培地を用いて微好気環境下で HP の培養を行った。適当な緩衝液中で超音波処理を行い、得られた HP 細胞融解液を陰イオン交換クロマトグラフィーに供し holo-FldA の精製を行った。精製した holo-FldA をトリクロロ酢酸 (TCA) で処理し apo-FldA 標品を調製した。Apo-FldA と FMN の結合試験は、市販の FMN の存在下で apo-FldA を 25°C、2 時間放置し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (Native-PAGE) 後のクーマシーブリリアントブルー (CBB) 染色によって行った。HP 菌体を PBS で一回洗浄し、さらに PBS 中で一夜放置して得られた PBS 上清を適当な緩衝液で置換し陽イオン交換クロマトグラフィーに供し FMN 解離活性の精製を行った。精製した FMN 解離活性の純度検定は、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) 後の銀染色によって行った。FMN 解離活性の検出は、精製 holo-FldA を活性画分の存在下で 37°C、一夜放置し、Native-PAGE 後の CBB 染色によって行った。FMN 解離活性の同定は、ペプチドマスフィンガープリンティング (PMF) による質量分析によって得られたペプチドマススペクトルをマスショットサーチによってアルゴリズム的に解析することで行った。FMN およびリボフラビンの検出は MALDI-TOF MASS による質量分析によって行った。

【結果】微好気培養における HP の形態学的

な変化に伴う菌体蛋白質像の変化を Native-PAGE 後の CBB 染色によって解析した結果、FldA の質的变化が観察された。即ち、FMN を結合したホロ酵素 (holo-FldA) が減少・消失し、FMN を解離したアポ酵素 (apo-FldA) が増加・蓄積した。Apo-FldA は FMN と互いの親和性によって結合し holo-FldA に変換されたが、holo-FldA からの FMN の解離は自然には惹起されず、何らかの因子 (FMN 解離活性) の関与が必要であった。FMN 解離活性の認められた画分を SDS-PAGE 後の銀染色によって解析した結果、分子量およそ 28 kDa の蛋白質バンドのみが検出された。精製した FMN 解離活性を同定した結果、本活性の本体である 28 kDa 蛋白質は、クラス C 酸性ホスファターゼ (HppA) であることが判明した。HppA の存在下で、holo-FldA は apo-FldA に変換され、その反応液中において FMN の代わりにリボフラビンが検出された。

【考察】以上の結果から HP における FldA の代謝経路が明らかとなった。即ち、(1)リボフラビンのリン酸化によって生じる FMN は、FldA 蛋白質 (apo-FldA) と互いの親和性によって結合し holo-FldA に変換される。(2) Holo-FldA は、アセチル CoA の生合成を触媒することによって還元された PFOR から電子を受け取る電子転移酵素として機能する。(3)その後、holo-FldA に結合している FMN は、HppA のリン酸モノエステラーゼ活性による加水分解を受け、リボフラビンを次々と生じる。(4) FMN の加水分解によって生じたりボフラビンは、FldA 蛋白質との親和性の低下によって holo-FldA から解離し、その結果 apo-FldA が菌体内に蓄積する。本研究は、FldA におけるホロ酵素からアポ酵素への変換に HppA の酵素活性が要求されることを解明した初めての報告である。

心血管系疾患における ST2 (IL-1レセプターファミリー) の発現とその機能に関する研究

循環器センター病院助手 新保 昌久

【目的】

Tominaga らによって線維芽細胞の増殖過程で誘導される遺伝子としてクローニングされた ST2 gene は、インターロイキン 1 レセプター (interleukin-1 receptor; IL-1R) ファミリーに属し、その遺伝子産物には分泌型 (soluble ST2)、膜貫通受容体型 (ST2L) が知られる。ST2 は、生体の様々な免疫応答 (T-cell response, macrophage-dependent inflammation 等) に関与していることが知られているが、機能の詳細は未だ明らかでない。心血管系においては、急性心筋梗塞、うっ血性心不全において血清分泌型 ST2 と予後の関連が報告されている。本研究は、炎症性サイトカインなどが病態に関与している心血管系疾患において、ST2 の発現が何らかの役割を演じているかを検討した。

【方法・結果および考案】

1) 培養細胞における ST2 の発現

これまでの研究で、ST2 が心筋細胞でも発現し、機械的伸展刺激や IL-1 などの刺激にて発現誘導されることを報告した。血管系の細胞における ST2 の発現を検討するため、ヒト大動脈血管内皮細胞 (hEC)、ヒト血管平滑筋細胞 (hSMC) に各種の刺激を行い、培養上清中の分泌型 ST2 濃度を ELISA にて検討した。

IL-1 β (10ng/mL)、phorbol ester (PMA 200 nM) で刺激した hEC において、培養上清中の分泌型 ST2 濃度は有意に上昇した。一方、TNF- α (20ng/mL) 刺激においては、hEC からの有意な ST2 分泌促進は見られなかった。また、hSMC においては、今回行った刺激において、分泌型 ST2 の有意な上昇は認められなかった。この結果から、心血管系疾患において、血管内皮細胞が ST2 のソースとなり得ることが示唆された。

2) 急性大動脈解離患者における ST2 の発現

大動脈疾患における ST2 の発現を検討するため、当院に入院した Stanford B 型の急性大動脈解離の症例 (n=6) より経時的に血液サンプルを採取し、血清 ST2 濃度を ELISA にて測定した。半数の症例において、発症 24 時間後の血清 ST2 濃度の上昇がみられた。今後、症例数を増やし、重症度 (解離の範囲など)、CRP など

他のマーカーとの相関について検討を進める予定である。

3) 急性心筋梗塞患者における ST2 の発現

これまでの研究で、急性心筋梗塞患者の血清 ST2 濃度が、発症約 12 時間から 24 時間をピークに一過性に上昇すること、ST2 レベルが 30 日後の死亡率および心不全発症の独立した予測因子であったことを報告したが、ST2 のソースは明らかではない。心筋細胞以外からの発現の可能性として、末梢の血球細胞が ST2 のソースとなり得るかを検討するため、末梢単核細胞を分離・培養し、培養上清中の ST2 濃度を ELISA にて測定した。当院の急性心筋梗塞患者においても、血清 ST2 濃度が一過性に上昇することが確認されたが、検討した培養上清サンプルにおいては、いずれも ST2 濃度は測定感度以下であり、末梢単核細胞が主要ソースである可能性は否定的であった。

【結語】

心血管系のさまざまな疾患において、ST2 の発現亢進が認められた。血管内皮細胞においても、炎症性サイトカインにより ST2 の発現誘導が見られ、病態への関与が示唆された。ST2 の特異的リガンドは不明であったが、最近 IL-33 と命名された新たなサイトカインがリガンドである可能性が報告され、ST2 の機能がさらに解明されることが期待される。今後も、心血管系疾患における ST2 の役割について解析を進めていきたい。

急性期離脱後に発症する超低出生体重児の重篤な循環不全の病態の解明

小児科病院助手 矢田ゆかり、高橋尚人、
本間洋子、尾仲達人、桃井真里子

【目的】 近年、急性期を過ぎた生後 1 ヶ月前後の超低出生体重児 (出生体重 1000 g 未満) に、突然、乏尿、浮腫、低血圧、低ナトリウム血症を伴う循環不全を認める症例 (いわゆる超低出生体重児の晩期循環不全) の報告が散見される。この循環不全の病態として、ストレスに対して充分量のステロイドが産生できない副腎機能低