

学術交流・研究推進プロジェクト 成果報告書

研究代表者 所属 生体機能解析学研究室
職・氏名 准教授・坂口 実

研究テーマ：グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼの核内移行メカニズムの解析

研究期間：

2022 年 4 月 1 日 ～ 2024 年 3 月 31 日

研究担当者：

<本学>

研究代表者 坂口 実（大阪医科薬科大学・薬学部・准教授）

研究分担者 田中 智（大阪医科薬科大学・薬学部・助教）

<共同研究機関>

研究代表者 (大学・ 学部・)

研究分担者 (病院・ 薬剤部・)

研究目的：

我々は、エンド型オリゴペプチダーゼであるプロリルオリゴペプチダーゼ（POP）と結合する細胞内タンパク質として GAPDH を同定した。神経芽腫由来の NB-1 細胞を使用した検討で、POP の阻害薬（SUAM-14746）によって、S 期進行が遅延し、GAPDH の核移行が抑制されることを見出している。このことは、S 期における GAPDH の核移行およびヒストン H2B 発現に POP が関与していることを示唆している。GAPDH が核内移行する際には、様々な転写後修飾や核移行タンパク質との相互作用が知られているが、S 期における核移行メカニズムはほとんど解明されていない。

本研究は、S 期の GAPDH の核移行メカニズムにおける POP の関与を証明することを目的として、POP ノックアウト細胞を作成し、GAPDH の核移行における POP との相互作用を蛍光免疫染色や Proximity ligation assay（PLA）によって解析した。

研究内容および研究成果：

POP と GAPDH の相互作用の解析

- オリゴペプチダーゼである POP による GAPDH の分解の可能性：両タンパク質について大腸菌による活性型の組換え体を調製し、POP が GAPDH を基質として認識して限定的な分解が認められるか否かについて、Blue Native PAGE およびゲルろ過法で検討したが、POP による GAPDH の分解や両タンパク質による複合体は検出されなかった。
- NB-1 細胞を使用して POP ノックアウト（KO）細胞を作製した。野生型 NB-1 細胞と POP-KO 細胞をヒドロキシウレアによって G1-S 期境界に同調後、S 期進行を BrdU-PI 法によるフローサイトメトリーで解析した結果、野生型と比較して POP-KO 細胞の S 期進行は緩慢に進行し S 期の延長が認められた。野生型 NB-1 細胞の S 期進入後 4 時間目をピークとして、細胞質における POP と GAPDH の結合を示す強い PLA シグナルが検出されたが、POP-KO 細胞では、PLA シ

グナルは検出されなかった。また、POP-KO 細胞の S 期進行に SUAM-14746 は何も影響を及ぼさなかった。

以上の結果により、NB-1 細胞の S 期進行における GAPDH の核内移行に POP との相互作用が関与していることを明らかにすることができた。

成果発表：

＜原著論文＞

- ・ Biochem. Biophys. Res. Commun. を投稿先として、原稿作成中
- ・

＜学会発表＞

- ・「S 期の GAPDH の核内移行におけるプロリルオリゴペプチダーゼの役割」石黒日向、山口雄矢、今海斗、澤田茜、天野祐美、田中智、坂口実、第 72 回 日本薬学会関西支部総会・大会（摂南大学）2022 年 10 月 8 日
- ・「神経芽腫細胞の S 期におけるプロリルオリゴペプチダーゼとの相互作用を介した GAPDH の核内移行」堂本若葉、石黒日向、山口雄矢、今海斗、澤田茜、天野祐美、田中智、坂口実、日本薬学会 第 143 年会（札幌）2023 年 3 月 28 日
- ・「S 期の GAPDH の核内移行におけるプロリルオリゴペプチダーゼとの相互作用」三井久実、石黒日向、山口雄矢、今海斗、澤田茜、天野祐美、田中智、坂口実、日本薬学会 第 144 年会（横浜）2024 年 3 月 30 日

＜その他＞

- ・該当なし
- ・