

2006年度合同シンポジウム

生命現象の分子レベルでの解明

要旨集

共催：日本生化学会北海道支部

日本生物物理学会北海道支部

北海道分子生物研究会

日時：12月15日（金） 13：00～17：30

場所：北海道大学大学院理学研究科5号館大講義室

プログラム

場所：北海道大学大学院理学研究科 5号館 大講義室

日時：12月15日（金）13時より

13:00~13:05 開会の辞

矢沢 道生（日本生化学会北海道支部長、北大院 理学院）

13:05~13:45

演者：今 重之（北大 遺伝子病制御研究所）

演題：「オステオポンチンを標的とした疾患治療」

座長：藤室 雅弘（北大院 薬学研究院）

13:45~14:25

演者：田中 伸哉（北大院 医学研究科）

演題：「癌化に関与するアダプター分子のシグナル伝達メカニズム」

座長：藤室 雅弘（北大院 薬学研究院）

14:25~15:05

演者：宮内 正二（北大院 薬学研究院）

演題：「輸送担体機能解析の paradigm としての光駆動性クロライドポンプ」

座長：相沢 智康（北大院 理学院）

15:05~15:25 休憩

15:25~16:05

演者：岩佐 達郎（室工大 材料物性工学）

演題：「イモリ嗅上皮に発現する“リガンド結合”タンパク質」

座長：相沢 智康（北大院 理学院）

16:05~16:45

演者：皆川 純（北大 低温科学研究所）

演題：「ステート遷移の実態と実体-光合成系のリモデリング」

座長：山本 隆晴（北大 遺伝子病制御研究所）

16:45~17:25

演者：小布施 力史（北大院 先端生命）

演題：「プロテオミクス技術を用いたヒト細胞における染色体の維持・伝達機構の解明」

座長：山本 隆晴（北大 遺伝子病制御研究所）

17:25~17:30 閉会の辞

有賀 寛芳（北海道分子生物研究会会長、北大院 薬学研究院）

シンポジウム終了後(17:45~19:00)、演者の先生を囲んで懇親会を予定していますので、奮ってご参加ください。

会場：理学研究科5号館2-01号室 会費：一般1000円、学生500円

オステオポンチンを標的とした疾患治療

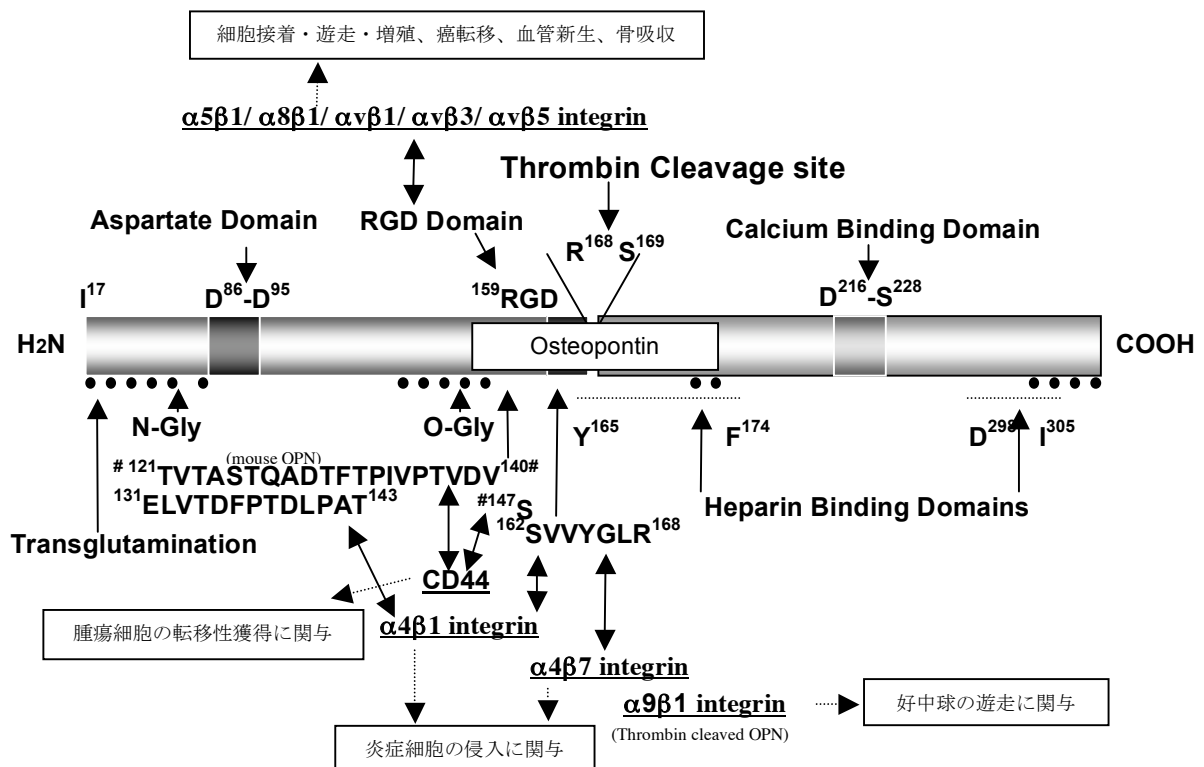
今 重之 (北海道大学 遺伝子病制御研究所 分子免疫分野)

細胞外マトリックスの一種であるオステオポンチン(OPN)は、分子量約41 kDaの分泌型糖タンパク質である。OPNは、 $\alpha v \beta 3$ 等のRGDインテグリンや $\alpha 4$ や $\alpha 9$ インテグリンと結合することにより、癌転移、リウマチや多発性硬化症等の慢性炎症性疾患、自己免疫疾患など多くの難治性疾患病態の発症に関与していることが明らかとなっている。

我々は、マウス OPN 上の細胞接着領域を認識する抗体を作製し、本抗体が関節リウマチや肝炎を抑制することを見出した。関節リウマチにおいては、OPNは炎症細胞の局所への遊走や破骨細胞活性化を行うことにより増悪化へ、肝炎発症においては、OPNはNKT細胞を活性化させサイトカイン、ケモカイン産生を亢進させることにより増悪化へ関与していることを見出した。

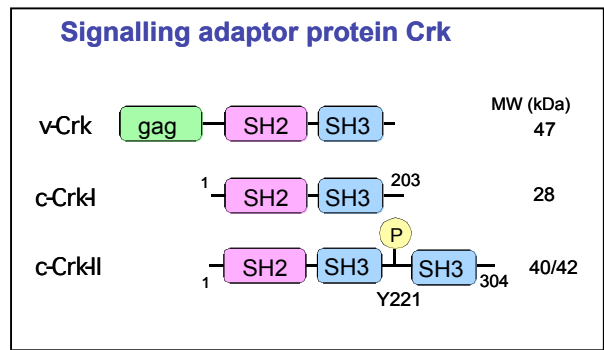
我々はさらにヒト OPN に対する中和抗体を作製しており、北海道大学発の抗体医薬として現在臨床応用化開発を行っている最中である。

抗体以外の OPN 機能抑制法として siRNA に着目し、OPN siRNA を利用して癌浸潤試験と肝炎抑制実験を行った。OPN siRNA は癌浸潤と肝炎を有意に抑制することが分かった。また、肝臓における OPN の発現抑制割合と ALT を指標とした肝炎抑制度に有意な相関を得ることができた。OPN siRNA を新規核酸医薬として発展させたいと考えている。



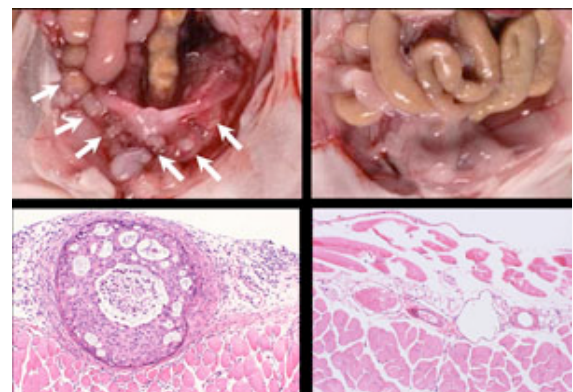
癌化に關与するアダプター分子のシグナル伝達メカニズム
 田中 伸哉（北海道大学大学院医学研究科 分子細胞病理学）

1900年初頭にロックフェラー大学においてレトロウイルス由来のニワトリの肉腫が同定され、それから代表的な癌遺伝子産物 Src が発見されるに至った。1927年には10番目のトリ肉腫(CT10: chicken tumor No.10)が分離保存されており、1988年にそこから新たな癌遺伝子が同定され CRK(CT10 regulated kinase)と名づけられた。CRKはSH2/SH3領域からなるアダプター分子であり、チロシンキナーゼから低分子量G蛋白を結ぶシグナルを伝達することが明らかとなっている。CRKはc-CRK-Iとc-CRK-IIが存在するが(右図)、SH2領域にてp130Casやpaxillinなどの細胞接着斑の構成分子と結合し、SH3領域にてC3GやDock180などのGEF(guanine nucleotide exchange factor)と結合し、Rap/R-RasやRacの活性を制御して、細胞増殖や接着、運動などを調節すると考えられている。



CRKとヒト癌との関連については、我々は、肺癌細胞にて悪性度とCRKの発現の増加が相関する事を示したが、その後浸潤性の強い肺癌や悪性脳腫瘍でCRKの発現が増加していることが報告されてきている。そこで、CRKのヒト癌における役割を明らかにするために、癌腫(卵巣癌)、肉腫(滑膜肉腫)、脳腫瘍(膠芽腫)細胞を用いて、恒常的にCRKに対するsiRNAを発現するベクターを使用しCRKノックダウン細胞を樹立した。CRKノックダウン細胞は野生型の細胞に比較して増殖能、浸潤能ともに著明に低下しており、in vivoにおいても造腫瘍能の低下がみられた(右図)。このことからCRKのシグナル伝達系は、がん治療の標的となり得ることが示された。

ノックダウン癌細胞の腹腔内投与



WT cells

CRK-KO cells

CRKの分子標的治療薬を開発する準備段階として、CRKの立体構造をNMRを用いた解析にて、CRK-I、CRK-IIおよびリン酸化状態のp-CRK-IIに関して明らかにした(構造は、北大薬学部稲垣冬彦教授、および小橋川博士により明らかにされたものである)。

本シンポジウムではCRKのシグナル伝達メカニズムや癌との関連を概説した上で、構造解析の結果判明したCRK分子の特徴などについて話を進めたい。

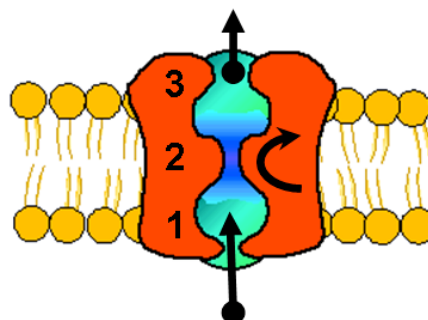
輸送担体機能解析の paradigm としての光駆動性クロライドポンプ 宮内 正二（北海道大学大学院薬学研究院）

細胞膜には外部刺激や情報の受容，物質の輸送，エネルギーの産生等を担っている様々な膜タンパクが存在する．これら膜タンパクが細胞の機能発現に重要であることは広く知られている．ヒトでは全ゲノムの約 25% を膜タンパクが占めており，これらは機能の面から受容体，酵素，輸送担体等に分類されている．輸送担体は，イオンや低分子化合物の細胞膜透過を促進する役割を担っており，アミノ酸などの栄養物の供給，生体にとって重要な生理活性物質の時間的・空間的な恒常性の維持に深く関与する．遺伝的要因や環境的要因による輸送担体の機能障害により疾病・障害が引き起こされるケースが数多く報告されており，輸送担体の重要性がクローズアップされている．

しかし，膜タンパク質の研究は，可溶性のタンパク質の研究に比べ，その実験の困難さから物理化学的な研究が遅れている．詳細な解析を物理化学的に行うためには，膜輸送タンパクの場合，精製タンパクを脂質 2 分子膜からなる閉じた小胞に再構成させる事が必要である．さらに，小胞を分離し，輸送された物質濃度の時間変化，および輸送担体中間体を時間高分解且つ高感度に測定する必要がある．

本シンポジウムにおいて発表するハロロドプシンは，レチナールを発色団とする膜タンパクであり，光で Cl⁻ を細胞の外から内へ輸送するクロライドポンプである．この膜タンパクは他の輸送タンパクにはない研究上の利点を持っている．それらは，**1)** タンパクのコンフォメーション変化が可視吸収の時間変化として追える，**2)** X 線構造解析がされていること，**3)** 大量発現系が構築されている事，**4)** 変異タンパクの作成が出来る事，**5)** アフリカツメガエル発現系を用いた電気生理学的手法による高感度，長時間分解のイオン輸送能の測定が可能である事等である．これら物理化学的利点を生かし，このトランスポーターの分子輸送機構の本質を明らかにすることができるのではと考えている．

これまでの研究から，輸送の基本的スキームは，右図に要約される．輸送担体は，**1**（基質取込み側の基質が移動出来るチャンネル，基質との親和力は強い）＋**2**（スイッチ）＋**3**（基質放出側のチャンネル，放出時には基質との親和力は弱い）の 3 つの要素から成り立っている．すなわち，チャンネルがどうなっているか，スイッチとは基質を取り込み側チャンネルから放出チャンネルへ移動させる事であるが，それはどのような分子的機構か，基質との親和力の変化はどのようにおこるのか等を理解する事が，輸送担体の分子輸送機構を知ることであると考えている．今回は，光駆動型クロライドポンプ，ハロロドプシンに関して得られた結果を報告し，これら輸送の基本的スキームの分子機構について議論したい．

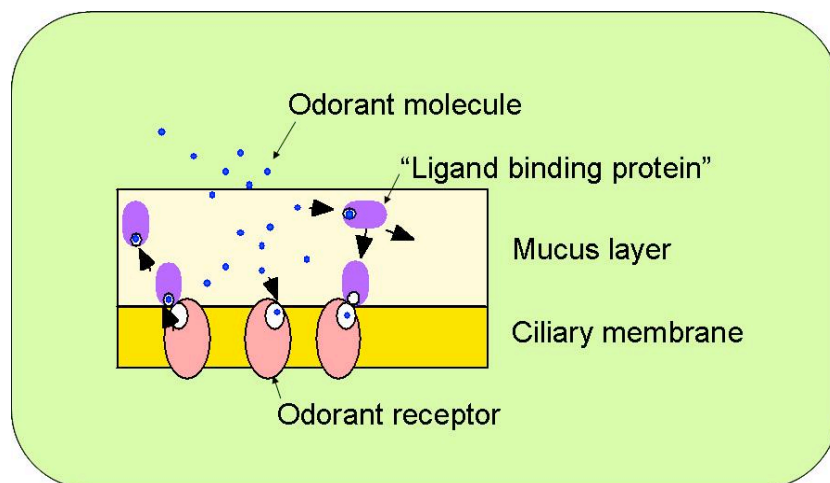


1: Substrate binding
2: Translocation (switching)
3: Substrate releasing

イモリ嗅上皮に発現する“リガンド結合”タンパク質 岩佐 達郎（室蘭工業大学・材料物性工学）

動物の嗅覚は味覚と並んで極めて基本的な感覚であり、外界の化学物質に対する感覚である。嗅覚受容体は G タンパク質共役受容体 (GPCR) に属しており、その中でも最も大きな遺伝子グループを形成している。嗅覚受容体に匂い分子が受容されることにより、G タンパク質 (Golf) を介した情報伝達系が活性化され、膜電位変化が発生することが明らかにされている。一般に匂い分子は揮発性の低分子であり、その多くのは脂溶性で水にはなじみにくい。しかし、嗅覚受容体タンパク質の存在する嗅細胞繊毛部位はボウマン腺から分泌される粘液に覆われている。そのため、外界から鼻腔に侵入した匂い分子は、嗅上皮を覆う嗅粘液表面に付着した後、“匂い分子結合タンパク質”により嗅繊毛まで運ばれ、受容体タンパク質に受容されると考えられている。嗅粘液中に大量に存在するリポカリンファミリーに属するタンパク質が“匂い結合タンパク質”として働いていると考えられている。リポカリンファミリータンパク質は分子量 20 k Da 程度の水溶性のタンパク質であり、8 本の β ストランドからなる β -バレル構造がよく保存されており、脂溶性低分子を結合する。このような匂い分子の運搬モデルは、匂い分子-匂い分子結合タンパク質-嗅覚受容体タンパク質間の分子間相互作用が適切に行われる必要があり、生体分子間相互作用の研究対象として興味深いと思われる。

我々はアカハライモリ嗅上皮 cDNA ライブラリーを作製し、ランダムにクローンの遺伝子配列を決定し、“リガンド結合”に関与すると考えられるタンパク質に高い相同性を示す 3 種類の遺伝子を得た。これらの遺伝子はそれぞれ Olfactory specific protein(OSP)、Lipocalin、PLBP (Possible Ligand Binding Protein) に高い相同性を示したので、以下、イモリの学名にちなみ各々 Cp-OSP, Cp-Lip, Cp-PLBP と名づけた。推定されるアミノ酸配列より分子系統樹を作成したところ、Cp-OSP, Cp-Lip は共にリポカリン・スーパーファミリーに属することが分かった。これらの“リガンド結合”タンパク質のノーザンブロット、*in situ* ハイブリダイゼーションによる発現特異性の解析、大腸菌でのタンパク質発現、精製タンパク質での機能解析等の結果について報告し、これらのタンパク質の考えられる生理的働きについて議論したい。



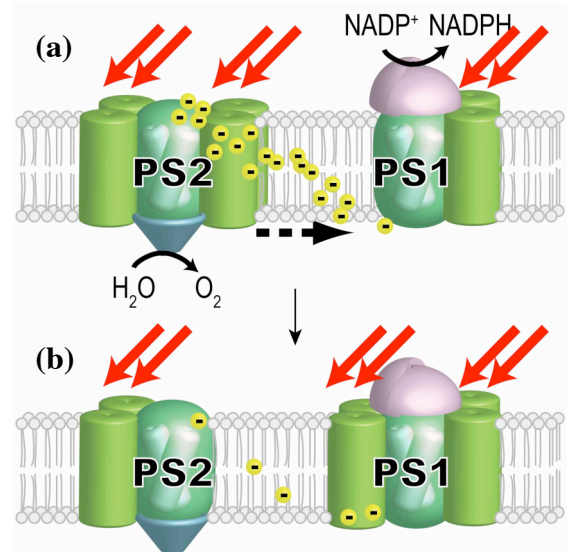
ステート遷移の実態と実体 -光合成系のリモデリング-

皆川 純 (北海道大学・低温科学研究所)

光合成反応では、電荷分離を行う2つの光化学系が直列に繋がって機能し、光エネルギーが化学エネルギーへと変換される。一連の反応が効率よく行われるためには、2つの光化学系がバランス良く励起されなければならない。しかし、光化学系2にはクロロフィルbが多く含まれる一方、光化学系1にはクロロフィルaが多く含まれるなど、二つの光化学系には違いがある。またそれぞれのモル比も環境に応じて変動するため、二つの光化学系の励起のバランスは失われがちである。アンバランスな状態が長期にわたる場合は、それぞれの遺伝子発現が調節され、光化学系1と系2の存在量そのものが最適化されるが、これは天候が急変した場合などには間に合わない。そのような場合に、二つの光化学系が光を集める能力のみを瞬時に最適化し、励起のバランスを取る現象がステート遷移(state transition)である。この現象は精力的に研究されてきたものの、いまだ謎も多く残されている。その最たるものが、LHCと呼ばれる集光アンテナタンパク質が実際に2つの光化学系間を移動してバランスをとるのか？ 移動するならば数十あるうちのどのLHC分子が移動するのか？ という疑問であった。

私たちは、ステート遷移の能力が特に発達している単細胞の緑藻(クラミドモナス)を研究材料に用い、ステート遷移の実態を捉える研究を進めてきた。光化学系2が過剰に励起された場合、光化学系2の集光能力を小さく、逆に光化学系1の集光能力を大きくすることによりバランスが取られる(ステート1→2、右図)。最近、光化学系1の集光能力が大きくなった状態(ステート2)の細胞から光化学系1超複合体を単離することに成功した(右図(b)の右側の複合体に相当する)。その分子量1Mdaほどの巨大タンパク質複合体には、光化学系1自身の集光アンテナのほかに、ステート1では光化学系2の集光アンテナを構成していた3つのLHCII分子が含まれていた。予想外なことに、この3つの色素結合タンパク質は、これまで光化学系2固有の成分でありステート遷移には関与しないと考えられてきた“単量体LHCII分子”であった。

本講演では、これらの結果の詳細とそれに基づいたステート遷移の最新分子モデルについて論じる。また、LHCタンパク質スーパーファミリーの全容、ステート遷移超分子複合体におけるエネルギー移動の詳細についても、私たちの研究結果を中心に紹介したい。



ステート遷移による2つの光化学系の励起バランスの最適化(ステート1→2) 光化学系2(PS2)が過剰に励起されると、2つの光化学系間に還元力が溜まるが(a)、2つの光化学系の集光能力を調節することにより解消される(b)。破線矢印は集光アンテナの移動を示す。

Takahashi, H., Iwai, M., Takahashi, Y., Minagawa, J. (2006) Identification of the mobile light-harvesting complex II polypeptides for state transitions in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 103: 477-482.

プロテオミクス技術を用いたヒト細胞における染色体の維持・伝達機構の解明

- ヘテロクロマチン蛋白質は動原体複合体と相互作用して染色体の分配に寄与する -
小布施 力史 (北大院 先端生命 染色体機能ネットワーク研究室)

ここ数年の間に質量分析を用いたプロテオミクス解析が核膜孔や核小体、核膜などの細胞核の構造のみならず、中心体やキネトコア、複製フォークなど染色体の維持や伝達に関する複合体の構成因子のネットワーク解析に用いられ成果をあげている。なかでも染色体分配に関わる複合体はその構成成分の局在と機能阻害したときの表現型が明確であり、得られた結果を比較的容易に検証できることから、プロテオミクス解析のモデルケースとして出芽酵母からヒトまで広く推進されている。

Mis12 タンパク質は、セントロメアに局在し、染色体の均等分配に必須な機能を持つ遺伝子産物として分裂酵母において同定され、出芽酵母からヒトまで保存されている。われわれは、ヒトの Mis12 複合体の構成因子を明らかにするために、hMis12 複合体を精製し質量分析により同定した。その結果、9種類のタンパク質が hMis12 とともに特異的に同定された。そのうち2つは動原体タンパク質として知られている HEC1 と Zwint-1 であった。HEC1 および Zwint-1 はともに外部動原体プレートに局在すると考えられており、紡錘体微小管との相互作用に寄与していることが示唆されている。また、同定されたうちの4種類 (DC8、c20orf172、PMF1、AF15q14) は動原体タンパク質として新規のものであった。これらは、hMis12 と同様にセントロメアに局在し、正常な染色体分配に必要なことがわかった。さらに、意外なことに、ヘテロクロマチンの構成タンパク質である HP1 が hMis12 と相互作用していることが明らかとなった。これらことから、内部動原体プレートに局在する Mis12 は、いくつかのタンパク質とともに複合体を形成し、HP1 を介してより内側の構造であるヘテロクロマチンと、HEC1 および Zwint-1 を介して外部動原体プレートと直接結合することにより、クロマチンから紡錘体微小管へとつなぐ構造を形成していることが想像された。

さらに、HP1 が hMis12 複合体を介して染色体分配機能にどのように関わるかを解明するために、HP1 と hMis12 複合体の相互作用を詳細に解析した。酵母2ハイブリッド法を用いた解析から、HP1 のクロモシャドウドメインが hMis12 複合体の構成因子である DC8 と結合することを示した。DC8 は、クロモシャドウドメイン結合コンセンサス配列を持っており、2量体を形成した HP1 と直接結合することが示唆された。HP1 と結合できない DC8 変異タンパク質で内在性の DC8 を置き換えると、Mis12 複合体のセントロメア局在が減退し、染色体の分配異常が引き起こされた。また、HP1 と hMis12 複合体の相互作用は間期に強く、分裂期に減少していることが明らかとなった。以上の結果から、細胞周期依存的な HP1 と hMis12 複合体との相互作用は機能的な動原体の構築に必要なことが示唆された。

このように、いままで遺伝学を用いることができる酵母などのモデル生物で始めて可能であった細胞機能のネットワークの解析が、質量分析を用いたプロテオミクス技術と RNA 干渉法やイメージングなどの技術とを組み合わせることにより、ヒト細胞においても可能になりつつあることを、われわれの解析例をとおして紹介したい。