

2009 年度合同シンポジウム
生命現象の分子レベルでの解明 (仮)

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： 2009 年 11 月 13 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：2009年11月13日(金) 13時より

13:00~13:05 開会の辞

有賀 寛芳 (北海道分子生物研究会会長、北大院 薬学研究院)

13:05~13:40

演 者：南保明日香 (北海道大学・大学院薬学研究院・衛生化学研究室)

演 題：「エボラウイルスの宿主細胞への侵入機構の解明」

座長：米田 宏 (北海道大学・大学院薬学研究院・分子生物学研究室)

13:40~14:15

演 者：佐々 貴之 (北海道大学・大学院薬学研究院・生化学研究室)

演 題：「大脳皮質の神経細胞移動と層形成における

クラス III ホスファチジルイノシトール 3-キナーゼの役割」

座長：米田 宏 (北海道大学・大学院薬学研究院・分子生物学研究室)

14:15~14:50

演 者：豊田 実 (札幌医科大学・大学院医学研究科・生化学講座)

演 題：「癌における DNA メチル化異常と RNA 干渉」

座長：樋田京子 (北海道大学・大学院歯学研究科・血管生物学教室)

————— 14:50~15:10 休憩 —————

15:10~15:45

演 者：牧野 雄一 (旭川医科大学・内科学講座 病態代謝内科学分野)

演 題：「低酸素応答性転写因子による生体機能調節機構」

座長：樋田京子 (北海道大学・大学院歯学研究科・血管生物学教室)

15:45~16:20

演 者：田中 良和 (北海道大学・創成研究機構・

北大基礎融合科学領域リーダー育成システム)

演 題：「黄色ブドウ球菌由来巨大蛋白質 Ebh の全体構造に関する考察」

座長：坂井直樹 (北海道大学・大学院先端生命科学研究院・自然免疫研究室)

16:20~16:55

演 者：永井 健治 (北海道大学・電子科学研究所・ナノシステム生理学)

演 題：「Toward understanding biological phenomena

by genetically-encoded molecular spies」

座長：坂井直樹 (北海道大学・大学院先端生命科学研究院・自然免疫研究室)

16:55~17:00 閉会の辞

藤田 博美 (日本生化学会前北海道支部長、北大院・医学研究科)

シンポジウム終了後 (17:00~19:00)、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3-01号室; 会費：一般1000円、学生500円

エボラウイルスの宿主細胞への侵入機構の解明

南保明日香 (北海道大学 大学院薬学研究院 衛生化学研究室)

エボラウイルスはフィロウイルス科に属するネガティブ 1 本鎖 RNA ウィルスである。エボラウイルス感染はエボラ出血熱という重篤な症状を惹起し、その致死率は極めて高く 90% に達することもある。しかしながら、現時点においてエボラウイルス感染に対する有効な予防、治療法は実用化されていない。

ウィルスの多くはその増殖の場となる宿主細胞に侵入する際に、様々なエンドサイトーシス経路を利用することが知られているが、エボラウイルスの侵入経路についてはほとんど理解されていないのが現状である。

従来、エボラウイルスは古典的なエンドサイトーシス経路として知られるカベオラまたはクラスリン依存的な経路を介して細胞に侵入すると考えられていた。しかしながら、エボラウイルス粒子は短径が 80~100 nm、長径が 1~2 μm のひも状の形態を有し、この粒子サイズはカベオラおよびクラスリン被覆ピットの内径と比較して非常に大きい。また、従来のエボラウイルス侵入に関する研究の多くは、シュードタイプウィルスの系を用いたものであり、実際のエボラウイルスの侵入経路を反映していない可能性があった。

これに対し、本研究においては、本来のエボラウイルス粒子の形態を保持するエボラウイルス様粒子を蛍光標識し、生きた細胞におけるエボラウイルス侵入の可視化システムを構築することでその侵入機構の解明を試みた。

その結果、エボラウイルス粒子はマクロピノサイトーシスによって宿主細胞に取り込まれること、またその取り込みはエボラウイルス粒子上の糖タンパク質(GP)依存的に生じることが明らかになった。さらに、取り込まれたウイルス粒子は 後期エンドソーム/リソソームへと輸送された後、膜融合が生じることが示された。以上の結果より、エボラウイルス粒子は GP 依存的に細胞膜上の何らかの分子に結合することによってマクロピノサイトーシスを積極的に誘導し、宿主細胞に効率よく取り込まれることが示唆された。本研究によって得られた成果から、将来的に、GP 特異的な侵入過程を標的とした抗エボラウイルス薬の開発および実用化に貢献する可能性が期待される。

大脳皮質の神経細胞移動と層形成における

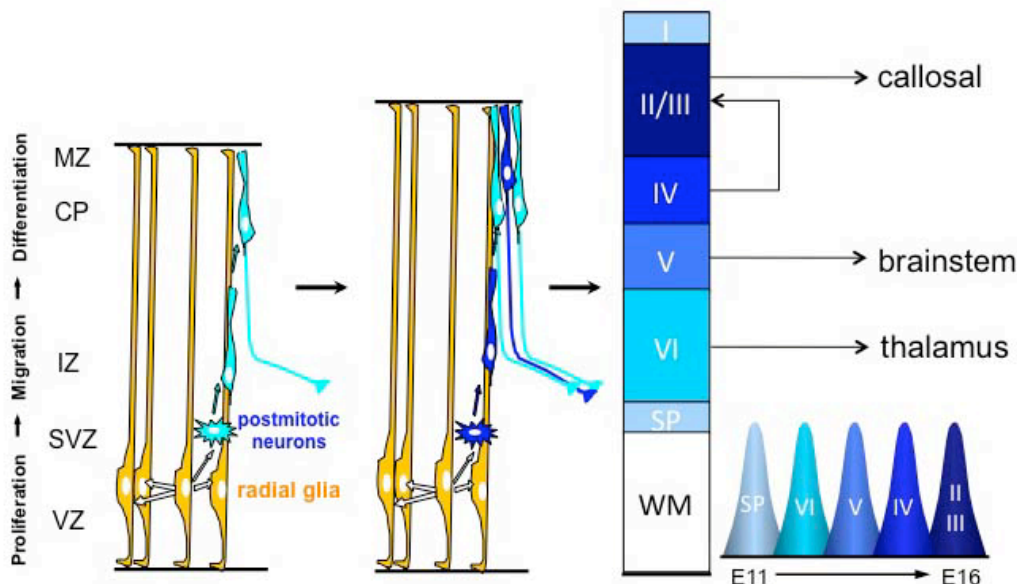
クラス III ホスファチジルイノシトール 3-キナーゼの役割

佐々 貴之 (北海道大学 大学院薬学研究院 生化学研究室)

哺乳類の大脳新皮質は6層から成り、各層の神経細胞は解剖学的および機能的に特徴的な性質を示す。ヒトにおいて、遺伝的要因あるいは外的要因により層形成が障害されると精神遅滞を伴うことが知られ、層構造の構築は脳がその高次機能を果たすための基盤となっている。この層構造は、発生過程において深層（脳室帯，VZ）で生まれた神経細胞が表層（皮質板，CP）へ移動することにより構築される（図1）。

ヒトの遺伝病およびモデル動物を用いた研究から、層構造の構築に必要な分子として Lis1, Dcx, Cdk5, Reelin などの主に細胞骨格の制御やシグナル伝達に関与する分子が同定されてきた。今回我々は、クラス III ホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ (Pik3c3) のノックアウトマウスにおいて、大脳皮質神経細胞の移動および層形成に異常を見いだした。Pik3c3 はホスファチジルイノシトール (PI) の3位水酸基をリン酸化する酵素であり、触媒生成物である PI(3)P はエンドソームにおいてエンドサイトーシス後の小胞輸送を制御すると考えられている。表現型の詳細および PI(3)P によって制御される可能性のある細胞表面レセプターの解析について紹介したい。

図1 大脳皮質発生の模式図



癌における DNA メチル化異常と RNA 干渉

豊田 実 (札幌医科大学医学部生化学講座)

がんの発生と進展には、エピジェネティックな異常の蓄積が関与すると考えられる。特に、遺伝子プロモータ領域の DNA メチル化による遺伝子サイレンシングはがん抑制遺伝子の不活化に重要な役割を果たす。しかし、DNA の異常メチル化が起こる分子機構や異常メチル化によりサイレンシングされる遺伝子の全貌は明らかでない。癌における DNA メチル化異常と RNA 干渉に関して、DNA メチル化が RNA 干渉系に異常を起こす場合と、RNA 干渉系による DNA メチル化異常の誘発の両方向の経路が存在する。前者に関して我々は、大腸がん細胞株を用い、脱メチル化処理または DNMT1/3B ノックアウト細胞との microRNA の発現に関して比較を行い、大腸がんにおいて p53 の標的である miR-34b/c の CpG アイランドが異常メチル化していることを明らかにした。大腸がん臨床例における mir-34b/c の DNA メチル化を調べたところ、90%の症例でメチル化を認めた。さらに、microRNA microarray を用いて、DNMT1/3B をノックアウトした大腸がん細胞株において発現が誘導される microRNA を同定した。ChIP on ChIP あるいは、次世代シーケンサーを用いたヒストン H3K4 メチル化の ChIP-seq 解析により、DNA メチル化により発現が低下している microRNA の H3K4 メチル化は、DNMT ノックアウト細胞で回復を認め、H3K4 メチル化はこれまで解析が困難であった、microRNA の転写開始点同定のマーカーとして有用であると考えられた。

酵母や植物では RNA 干渉が、DNA メチル化やヒストン修飾などのエピジェネティックな変化に関与するが、がんのエピジェネティック異常における RNA 干渉の役割に関しては不明な点が多い。我々は、DICER のヘリカーゼドメインをノックアウトした大腸がん細胞株を用いて、遺伝子の発現パターンや DNA メチル化、ヒストンメチル化を親細胞と比較した。その結果、エピジェネティックにサイレンシングされた一連の遺伝子の発現が、DICER の欠如によって再活性化されることを見出した。この再活性化は局所的なプロモータの DNA 低メチル化あるいは、ヒストン H3K27 の低メチル化や H3K4 の高メチル化と関係しており、RNA 干渉が、がんにおける選択的なエピジェネティックマークの維持に必要であることが示唆された。

低酸素応答性転写因子による生体機能調節機構

牧野 雄一 (旭川医科大学 内科学講座 病態代謝内科学分野)

低酸素環境における生体応答あるいは低酸素シグナルによる生体機能の調節は実に多彩であり、その組織特異性、状況特異性などの多様性の分子機構については不明な点を多く残している。低酸素に対する生体適応の異常や破綻が多くの疾患・病態の成立に密接に関わることが明らかにされ、生体低酸素応答制御機構の本質的理解が生理学的のみならず臨床医学的にも要求されている。低酸素によって活性化される転写因子 Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1)の発見以降、生体低酸素応答制御の分子機構に関する研究は爆発的展開を見せている。HIF-1は、いずれも basic helix-loop-helix(bHLH)-PAS 型蛋白質ファミリーに属する HIF-1 α と β サブユニットからなるヘテロ二量体であり、各種解糖系酵素、グルコース輸送蛋白、血管内皮増殖因子(VEGF)、造血因子エリスロポイエチンなど、多くの遺伝子の発現を転写レベルで制御し、細胞から組織・個体にいたる全てのレベルの低酸素適応を制御する。HIF-1 機能制御には様々な因子が関与する事が示されているが、bHLH-PAS 型蛋白質 Inhibitory PAS domain protein (IPAS)は、HIF-1 複合体との直接結合を介して HIF-1 機能を抑制的に制御する。IPAS は、それ自身の発現が低酸素によって誘導されることから、低酸素シグナル伝達系におけるネガティブフィードバック制御を媒介すると考えられている。IPAS 発現制御機構、IPAS トランスジェニックマウスにおける疾患モデル解析などから、生体における低酸素応答性転写因子ネットワークの生体機能調節機能について論じてみたい。

一方、最近、HIF-1 が、生体内の代謝異常、炎症にはじまるシグナルにより、正常酸素環境下においても活性化されることが明らかにされ、HIF-1 が、低酸素環境への適応のみならず広く細胞機能制御において重要な役割を果たすことが示されている。我々は、糖尿病性血管障害をモデルにした解析により、高グルコース環境が、酸素分圧非依存性に細胞内の HIF-1 シグナルを作動させる事を明らかにしつつある。かかる誘導には、少なくともグルコース応答性転写因子による HIF-1 α 遺伝子プロモーターの制御が介在しており、さらにグルコース応答性転写因子の細胞内含量の違いが、グルコースに対する HIF-1 応答に細胞特異性を付与している可能性が示されている。すなわち、グルコース濃度は酸素分圧とは独立して HIF-1 シグナル制御に働く可能性があり、阻血（血流低下）組織と、酸素化障害等による純低酸素組織における HIF-1 シグナル制御の異同を考える上でも興味深い。環境変化への細胞応答における HIF-1 を介した多彩な遺伝情報発現調節機構について考案する。

黄色ブドウ球菌由来巨大蛋白質 Ebh の全体構造に関する考察

田中 良和 (北海道大学 創成研究機構)

【緒言】黄色ブドウ球菌は人をはじめとした哺乳類に常在する細菌であるが、疾病により免疫機能の低下した患者や乳幼児、老人に感染した場合は、各種の毒素、免疫攪乱物質などを産生し、毒素ショック症候群、敗血症、肺炎などの重篤な疾患を引き起こす。これに加え、黄色ブドウ球菌は種々の抗生物質に対する耐性を容易に獲得するという劣悪な性質があり、現在では人類の保有する全ての抗生物質に耐性を獲得してしまったことから、院内感染の原因菌として深刻な社会問題となっている。このような背景から、黄色ブドウ球菌に対する創薬の社会的意義は極めて深く、かつ急務であるが、有効な薬剤の獲得には至っていない。

近年、黄色ブドウ球菌の表面に存在する蛋白質が黄色ブドウ球菌に対するワクチンとして有用であるという報告がなされ、細胞表面蛋白質が注目されている。ゲノム解析の結果、黄色ブドウ球菌は 20 種類の細胞表層蛋白質を有していることがわかったが、その中でとりわけ分子量の大きな蛋白質として Ebh (extracellular matrix binding protein homologue) が見出された。Ebh は約 1.1 MDa の巨大蛋白質であり、機能ドメインとして 126 残基からなるコア配列を 52 回繰り返して有している。本研究では、X 線結晶構造解析、円偏光二色性、小角 X 線散乱、電子顕微鏡により Ebh の構造を解析した。

【結果と考察】2 つのドメインが連結した蛋白質の X 線結晶構造解析を行った結果、three-helix bundle 構造の各ドメインが縦方向に連続して結合した、約 120Å の棒状の構造であることが明らかになり (図 1)、ドメイン間には、ある程度のフレキシビリティが確認された。次に、1, 2, 4, 10 個のドメインが連結した蛋白質を調製し、各々の蛋白質について小角 X 線散乱による構造解析を行ったところ、いずれの分子も溶液中で棒状の分子として存在しており、またドメインの数が増えるにつれて分子長が長くなることが明らかになった。各蛋白質の円偏光二色性スペクトルは 208 nm と 222 nm に負の極大をもつ α -ヘリックスに特徴的なスペクトルで、更に各々のスペクトルが完全に一致したことから、各蛋白質は同一の構造を有していることが示された (図 2)。さらに、10 個のドメインが連結した蛋白質を電子顕微鏡で観測した結果、約 500 Å 程度の棒状の分子が観測された。これは、X 線結晶構造解析から予想された構造と極めて良く一致しており、以上の結果から、全長の Ebh がドメイン間でフレキシビリティをもった約 320 nm のひも状の分子であることが提案された。

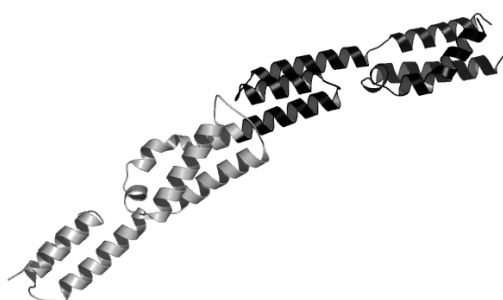


図 1. Ebh-R7-R8 の立体構造
(黒 : Ebh-R7, 灰色 : Ebh-R8)

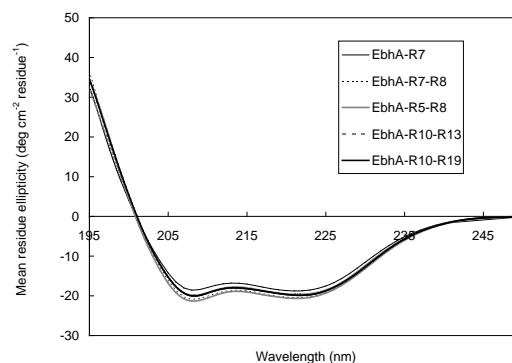


図 2. 各部分蛋白質の円偏光二色性スペクトル

Toward understanding biological phenomena by genetically-encoded molecular spies

Takeharu Nagai (Research Institute for Electronic Science, Hokkaido University)

tnagai@es.hokudai.ac.jp

Our primary goal is to better understand how biological molecules function in space and time. To this end, we are developing several techniques to visualize physiological events at molecular level in living cells. One approach is the use of the green fluorescent protein and its derivatives (FPs). To expand color palette of FPs, we invented a pH-insensitive ultramarine fluorescent protein, Sirius, with enhanced photostability and an emission peak at 424 nm, the shortest wavelength among fluorescent proteins reported to date (Figure). The pH-insensitivity of Sirius makes possible prolonged visualization of biological events in an acidic environment. Combination of FPs with fluorescence resonance energy transfer (FRET) technique allows us to develop functional indicators for visualization of localized molecular events in their natural environment. For example, we have developed an ultra-sensitive Ca^{2+} indicator by introducing some modification into Ca^{2+} sensing domain of YC3.60 (Nagai et al. 2004). Its small K_d value (20 nM) and large dynamic range (1450%) allows us to detect subtle changing in Ca^{2+} concentration even at 10–150 nM ranges without affecting cellular viability. In addition, we also developed “dual FRET” imaging methods by using two emission compatible FRET pairs, Sirius-CFP and Sapphire-dsRed, thereby we succeeded in simultaneous spatio-temporal visualization of two intracellular events. Furthermore, we applied the FRET technique to make a photoconvertible fluorescent protein, Phamret, which can be highlighted by UV stimulation inducing a change in fluorescence emission from cyan to green color. In this symposium, I will introduce not only several kinds of FP-based indicators mentioned above but also a technique for high-throughput gene construction that is useful for making high performance indicators.

- [1] H. Imamura et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* in press
- [2] W. Tomosugi et al. *Nature Methods* 6 (2009) 351.
- [3] T. Matsuda et al. *Nature Methods* 5 (2008) 339.
- [4] I. Kotera and T. Nagai. *J. Biotechnol.* 13 (2008) 1.
- [5] K. Takemoto et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104 (2007) 13367.
- [6] K. Okamoto et al.. *Nature Neurosci* 7 (2004) 1104
- [7] T. Nagai et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 (2004) 10554.
- [8] T. Nagai et al. *Nature Biotechnol.* 20 (2002) 87.

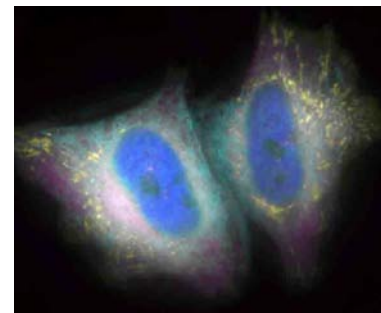


Figure. Multi-color imaging of HeLa cells labeled with Sirius-H2B, mseCFP-ER Venus-mitochondria, and mCherry-Tubulin