

2011 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

北海道分子生物学研究会

日 時：2011 年 11 月 11 日（金）13:00～17:30

場 所：北海道大学 理学部 5 号館 大講堂(5-203)

プログラム 場 所：北海道大学 理学部 5号館 大講堂(5-203)

日 時：2011年11月11日(金) 13:00~17:30

13:00~13:05 開会の辞

有賀 寛芳 (北海道分子生物研究会, 北海道大学 大学院薬学研究院)

13:05~13:45

○演者：**今井 亮三** (農研機構北海道農業研究センター, 北海道大学 大学院農学院)

演題：「植物におけるトレハロースの生物機能」

座長：佐分利 亘 (北海道大学 大学院農学研究院 生物化学研究室)

13:45~14:25

○演者：**奥山 正幸** (北海道大学 大学院農学研究院 分子酵素学研究室)

演題：「糖質加水分解酵素の機能と構造」

座長：森 春英 (北海道大学 大学院農学研究院 分子酵素学研究室)

14:25~15:05

○演者：**小野寺 智洋** (北海道大学 大学院医学研究科 整形外科学講座)

演題：「軟骨損傷の病態解明と軟骨再生」

座長：福井 彰雅 (北海道大学 大学院先端生命科学研究院 先端融合科学研究部門)

15:05~15:25 休憩

15:25~16:05

○演者：**伊東 大輔** (北海道大学 大学院工学研究院 応用物理学部門)

演題：「培養ニューラルネットワークの時空間ダイナミクス」

座長：古澤 和也 (北海道大学 大学院先端生命科学研究院 先端融合科学研究部門)

16:05~16:45

○演者：**大場 雄介** (北海道大学 医学研究科 病態医科学分野)

演題：「Regulation and function of Ras-family GTPases—tiny, but mighty molecular switches」

座長：尾瀬 豊之 (北海道大学 大学院薬学研究院)

16:45~17:25

○演者：**前仲 勝美** (北海道大学 薬学研究院 生体分子機能学研究室)

演題：「胎盤に発現する HLA-G 蛋白質の免疫制御機構と創薬への応用の可能性」

座長：南保 明日香 (北海道大学 大学院薬学研究院)

17:25~17:30 閉会の辞

出村 誠 (日本生物物理学会北海道支部, 北海道大学 大学院先端生命科学研究院)

シンポジウム終了後（17:30～19:00）、演者の先生を囲んで懇親会を予定しています。
奮ってご参加下さい。

会場： 理学部 5-201 号室、会費： 一般 1000 円、学生 500 円

●世話人

米田 宏（北大院薬学研究院）、水谷 武臣（北大院生命科学院）、森 春英（北大院農学研究
院）

植物におけるトレハロースの生物機能

今井 亮三

農研機構・北海道農業研究センター／北大 大学院農学院 北海道農業生産基盤学分野

トレハロースはグルコースが $\alpha, \alpha-1,1$ 結合した二糖であり、天然二糖としてはショ糖について存在量が多いと言われている。トレハロースは細菌、真菌、無脊椎動物等、生物界に広く見出される。昆虫では血糖として利用されており、エネルギー代謝の中心で恒常的に機能しているが、多くの生物においては、外界から過酷なストレスを受けたときに細胞内に蓄積する。トレハロースはその特異的な物性により、乾燥による生体膜間の接触や相転移を抑制する機能、熱や活性酸素によるタンパク質の変性を防ぐ機能などをもつ。最近の研究から、植物においては、このどちらにも当てはまらない新しい機能をもつことが明らかになってきた。本講演では、植物におけるトレハロースの生物機能に関して最新の知見を紹介したい。

トレハロース生合成の最も普遍的な経路は、トレハロース-6-リン酸合成酵素 (TPS) 及びトレハロース-6-リン酸脱リン酸化酵素 (TPP) による2段階反応であり、植物においてもこの経路が使われている。ところが、植物におけるトレハロース生合成は次の2点から特異である。1) 細胞内のトレハロース存在量が極微量である。2) ゲノム中に存在するトレハロース生合成遺伝子 (TPS, TPP) のコピー数が各々10程度と極めて多い (微生物や動物では1または2コピー)。つまり、トレハロース蓄積量が保護物質として働くためには不十分であり、また、複雑な遺伝子構成から時間、空間的に厳密な発現制御機構の存在が推測される。実際に最近の研究から、植物におけるトレハロースの独自の機能が明らかになってきた。

シロイヌナズナの TPS 遺伝子の1つ *AtTPS1* のノックアウト株は、種子胚の発生が魚雷型ステージで停止する。このとき、発生のプログラム自体は正常であるが、発生後期の貯蔵物質蓄積過程が阻害されていた。トウモロコシの *ramosa3 (ra3)* 変異体は、花序の分枝パターンに異常が見られるが、その原因遺伝子は TPP をコードする。花序分化の初期に、側生分裂組織基部で特異的に発現される RA3 (TPP) 活性の低下が、Tre-6P の過剰蓄積を誘起し、発生シグナルに異常が生じたと推定されている。

我々は、イネの *OsTPP1* 遺伝子が、短時間の低温処理に対して最も顕著に誘導される遺伝子であることを見出したことから、イネのトレハロース生合成とその機能に興味をもった。イネの全トレハロース生合成遺伝子 (18種) とトレハラーゼ遺伝子 (1種) について、発生ステージ、器官別発現とストレス応答をリアルタイム PCR 調べた。各遺伝子が、組織特異的、ストレス特異的に発現する全体像が明らかとなった。*OsTPP1* を過剰発現する形質転換体では、トレハロース蓄積量が増大し、低温耐性が向上した。これらの結果から、トレハロース代謝が低温ストレス耐性に関わることが示唆された。

トレハロースのシグナル分子としての機能を明らかにするために、イネ 22K オリゴ DNA マイクロアレイを用いて、トレハロース早期応答性遺伝子の網羅的スクリーニングを行った。意外なことに、トレハロース誘導性遺伝子の大部分が感染防御応答に関与していた。その中には、キチナーゼ、グルカナーゼといったいわゆる PR タンパク質群、ファイトアレキシン合成遺伝子、およびそれらの発現を調節する WRKY, ERF, JAMYB といった転写因子群が含まれていた。実際、トレハロース処理によりいもち病抵抗性が獲得されることが判った。外部から与えられたトレハロースはイネの自然免疫機構全体を活性化させていると考えられた。

糖質加水分解酵素の機能と構造

奥山 正幸

北海道大学 大学院農学研究院 応用分子生物学分野 分子酵素学研究室

糖質は生体の重要な構成物質のひとつである。デンプンやグリコーゲンはエネルギー源として、セルロースやキチンは植物、昆虫などの骨格を支える構造体として古くからよく知られている。近年では糖タンパク質、糖脂質の糖鎖が細胞間の相互認識や細胞機能の制御因子として働いていることも知られている。

糖質をつなぐグリコシド結合は生体物質の中で最も安定な結合のひとつとして知られており、DNA のリン酸エステル結合より 100 倍、タンパク質のペプチド結合より 1,000 倍安定であるといわれる。グリコシド結合を加水分解する糖質加水分解酵素は、この安定なグリコシド結合の加水分解反応を自発的な反応と比較して 10^{17} 倍以上加速するといわれる。すなわち糖質加水分解酵素は最も秀でた触媒能を有する酵素のひとつであるといえる。

糖質加水分解酵素はアミノ酸配列の類似性をもとに糖質加水分解酵素ファミリー (glycoside hydrolase family, GH family) に分類されている。類似したアミノ酸配列を有するタンパク質は類似した機能、構造を有しているという前提から、GH family は機能や構造が類似した酵素の一群であるといえる。よって同一 GH family に含まれる酵素は同一の触媒機構により加水分解を触媒していると考えるのが一般的である。しかし私たちは、ひとつの GH family に異なる触媒機構を有する酵素が混在することを明らかとした。つまりよく類似したアミノ酸配列を有していても異なる触媒機構を有する酵素が存在するということを見出した。

アミノ酸配列が類似したこれらの酵素は立体構造もよく類似している。触媒ドメインは TIM barrel fold をとる。いずれの酵素も barrel を形成する β -strand の C 末端に触媒に重要なアミノ酸残基が保存されている。しかし、2 つある触媒基のカルボキシ基うちの 1 つが保存されておらず、一方の酵素では β -strand 4 の C 末端に、もう一方の酵素では β -strand 3 と 5 の C 末端に位置している (図 1)。同じカルボキシ基でも異なる場所に位置することで触媒機能が異なり、これが触媒機構の相違につながっている。同一 family に属する類似したアミノ酸配列、立体構造を有する酵素でも、触媒残基のような必須のアミノ酸残基が局所的に置換されている場合があり、単純な相同性検索では機能を完全には推定できないという例である。

これらの話題を中心に、糖質加水分解酵素の機能と構造について紹介したい。

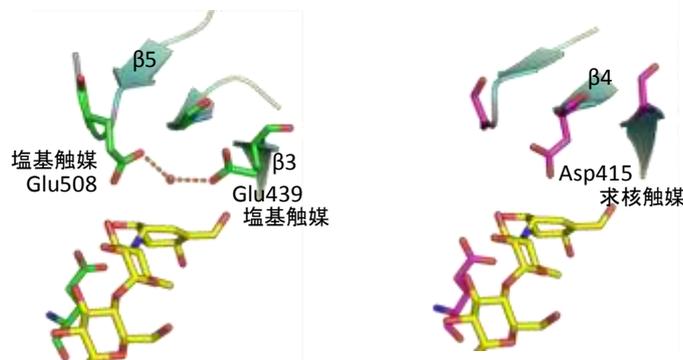


図 1, 同一 Family において異なる触媒機構を有する 2 つの酵素の活性中心

軟骨損傷の病態解明と軟骨再生

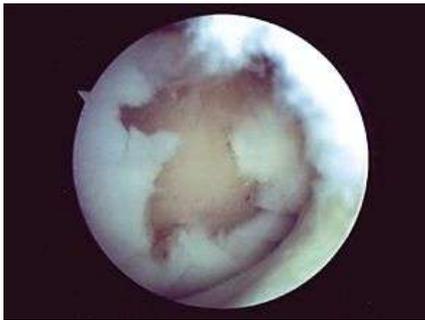
小野寺智洋

北海道大学 大学院医学研究科 整形外科学分野

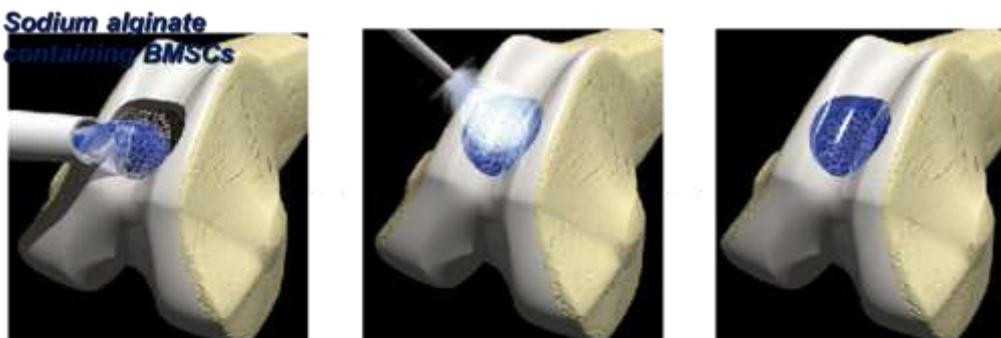
軟骨損傷を起因とする変形性関節症は、高齢者に見られる極めて一般的な疾患であるが、その病態生理の全貌は明らかにされてはいない。また、現状において、その治療法も未だに確立したものとは言えない。自然修復能力の極めて低い軟骨損傷に対する軟骨再生治療は、理想的治療法の一つであるが、これまで報告されてきたその臨床成績は、従来の治療法を凌駕するものではない。その原因の一つに現在臨床の場で行われているスタンダードな手技では手術侵襲が大きく、臨床成績向上のためには、手術手技の低侵襲化が不可欠と考えられる。そこで我々は、細胞膜上に存在し、細胞の表現型を担う糖脂質に着目し、そのコンディショナル KO マウスを用いることにより、軟骨損傷の病態解明を試みてきた。また、軟骨損傷の病態解明を進める一方、組織親和性の高い硬化性高純度低エンドトキシゲル(高純度ゲル)を開発し、関節鏡視下細胞移植が可能となるシステムを開発し、その臨床応用を目指している。

本発表では、演者らの教室で行ってきたこれまでの研究成果と、今後の発展性について発表する。

【図1】軟骨損傷(関節鏡所見)



【図2】硬化性高純度低エンドトキシゲル(高純度ゲル)



•Novel injectable technique for cellular implantation

培養ニューラルネットワークの時空間ダイナミクス

伊東 大輔

北海道大学 大学院工学研究院 応用物理学部門 生物物理工学研究室

脳・神経系の情報処理は、空間的に広がりをもったニューロンのネットワーク中を電気信号であるスパイクが行き交う、時間と空間の極めて広いスケールで生じる時空間ダイナミクスを基盤としている。ばらばらの単体ニューロンがネットワークを形成し、発達・成熟に至る過程において、どのような分子が関わっているのだろうか？個々のスパイクは如何にネットワーク中を伝播していくのだろうか？このような基本的な問題を明らかにするため、我々の研究グループでは *in vitro* で再構築させた培養ニューラルネットワークを研究対象とし、時間と空間のマルチスケールに渡った現象の計測と制御を試みている。

時間情報の計測には、多電極アレイを用いている。多電極アレイによるスパイク多点計測法は、その非侵襲性と高い時間分解能からニューロダイナミクスの長期的な時間情報計測に非常に有効な手法である。一方、空間情報の計測には、部位特異的免疫蛍光イメージングを用いている(図1)。これらの手法によって得られた時間情報と空間情報とを組み合わせることにより、記憶・学習等の高次機能に深く関わる同期バースト発火に必要なネットワークの最小サイズを明らかにした(D. Ito, et al., *Neuroscience* 171(2010)50-61)。

次に、培養ニューラルネットワークの長期発達過程における電氣的活動とシナプス密度について時空間計測を行った。1カ月超の長期発達過程においてスパイクの多点計測を連続的に行ったところ、単発火から同期バーストへ移行するに伴い、発火率および同期バースト率は初期の増加後、やがて飽和に至った。ネットワークの接点であるシナプスを興奮性・抑制性をそれぞれ分離して免疫蛍光イメージングにより可視化し、長期発達過程におけるこれらの密度変化を計測したところ、同様に初期の上昇後、飽和傾向を示した。また、密度変化を発火率および同期バースト率変化と比較したところ、飽和に至る時期が一致しており、ネットワークの電氣的活動は興奮性・抑制性シナプス密度と強く関係していることを示唆している。本講演では、これらマルチスケールな時空間ニューロダイナミクスの計測から得られた知見について紹介する。

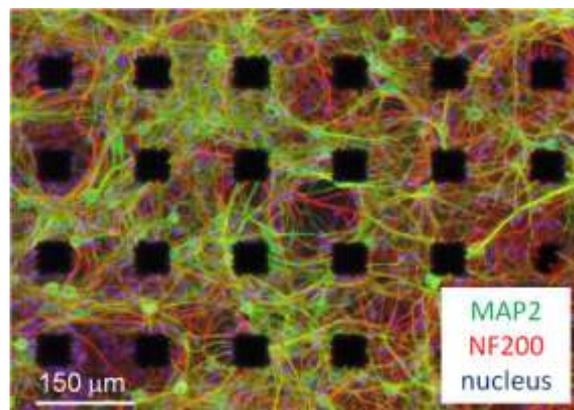


図1 多電極アレイ上培養ニューラルネットワークの免疫蛍光イメージング例

Regulation and function of Ras-family GTPases—tiny, but mighty molecular switches

大場雄介

北海道大学 大学院医学研究科 分子細胞病理学

Ras は転写や細胞増殖・細胞の運動性獲得・細胞死制御など数多くの現象に関与する低分子量 GTP 結合タンパク質である。GTP/GDP 結合部位、下流の標的分子と相互作用するためのエフェクターループ、細胞膜局在に必要な C 末端側の脂質修飾部位からなる約 21 kDa の小さな分子で、この基本構造を有する 10 種類程度のタンパク質群とともに Ras ファミリーを形成する。一方で Ras は多くの癌で変異が認められるがん遺伝子でもある。

GTP 加水分解以外の酵素活性を有さない小さな Ras が細胞内の多彩な現象に関与する理由は、複数の制御因子群・標的分子群の存在で説明される。不活性化状態の Ras は GDP 結合型で、グアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) による GTP への交換で活性化されるが、EGF・PDGF・NGF 等事実上すべての増殖因子が Sos という GEF を介して Ras を活性化する。増殖因子受容体経路以外に細胞内カルシウムによっても Ras は活性化される。このようにして活性化された Ras は GTPase 活性化蛋白質 (GAP) の助けにより GTP を加水分解して不活性型 (GDP 型) となる。がんで見られる Ras の変異は、GAP あるいは内在性 GTPase 活性の喪失により、恒常的に活性化型 (GTP 結合型) になる変異で、Gly12 や Gln61 にミスセンス変異があることが多い。我々は細胞内の Ras 活性化が GEF により時間的な制御を、GAP により空間的な制御を受けていることを、蛍光バイオセンサーを用いて解明した(1)。また、がん細胞では Ras 活性化の亢進に加え、活性化している場の乱れが生じていることを明らかにした。

一方、Ras の下流には 10 以上の標的因子があり、主なものとしてセリンスレオニンキナーゼ Raf、脂質リン酸化酵素 PI3 キナーゼ (PI3K)、他の Ras ファミリータンパク質 Ral の GEF (RalGEF) の 3 つが知られている。これらの因子は Ras の機能を説明するために重要な因子であるが、Ras がそれらを如何に使い分けるかについては、上流因子の解析に比べ立ち遅れていた。最近我々は Ras と PI3K の複合体がエンドゾームに局在することを、蛍光バイオイメージングを用いた可視化に成功した(2)。エンドゾーム上で Ras と結合した PI3K は活性化しており、この結合による PI3K 活性化がエンドサイトーシス亢進やエンドゾームの成熟化、外来因子取込に重要であった(3)。更に、インフルエンザウイルスの宿主細胞への取込の制御似重要な、Ras—PI3K 相互作用を基点するシグナル伝達ネットワークの全貌が明らかになりつつある(未発表)。当日にはこれら最近の知見の紹介を加え、Ras にまつわる多彩な細胞機能についての理解を深めたい。

【参考文献】

1. Y. Ohba, K. Kurokawa, & M. Matsuda. Mechanism of the spatio-temporal regulation of Ras and Rap1. *EMBO J.* 22: 859, 2003.
2. K. Tsutsumi, Y. Fujioka, M. Tsuda, H. Kawaguchi & Y. Ohba. Visualization of Ras-PI3K interaction in the endosome using BiFC. *Cell. Signal.* 21: 1672, 2009.
3. Y. Fujioka, M. Tsuda, T. Hattori, J. Sasaki, T. Sasaki, T. Miyazaki & Y. Ohba. The Ras-PI3K signaling pathway is involved in clathrin-independent endocytosis and the internalization of influenza viruses. *PLoS One* 6: e16324, 2011.

胎盤に発現する HLA-G 分子の免疫抑制の分子基盤とその生体への応用

前仲 勝実

北海道大学 大学院薬学研究院 生体分子機能学研究室

生体防御に関わる細胞表面抗原／受容体は多様な形態を有することで巧妙に機能制御を行っている。我々はこれらの分子基盤を明らかにするために、主に X 線結晶構造解析や相互作用解析(表面プラズモン共鳴や滴定型カロリメトリーなど)を中心に蛋白質科学的な手法を組み合わせて研究を進めている。本講演では、胎盤に特異的に発現する細胞表面抗原であるヒト HLA-G 分子(ヒト主要組織適合性複合体(MHC)クラス I のひとつ)の免疫抑制効果について、我々の最新の成果を紹介する。HLA-G は、ヒト免疫抑制性受容体群(Leukocyte Ig-like receptor(LILR/ILT/CD85)など)と結合することにより、強い免疫抑制効果を有し、母体の免疫寛容を誘導すると考えられている。我々は多様な形態を有する HLA-G と LILR 受容体に対する特異性やその分子機構を明らかにし、その分子基盤を利用した HLA-G の生物製剤としての応用への可能性について研究を進めている。

HLA-G は、他の MHC クラス I と同様にペプチドと $\beta 2$ ミクログロブリン($\beta 2m$)と会合して、ヘテロ3量体を形成する。さらに、HLA-G は $\beta 2m$ の欠損した形態としても細胞表面に発現する。これらの形態と LILR 受容体との相互作用解析を行った。その結果、抑制型受容体である LILRB1 と LILRB2 は $\beta 2m$ 欠損 HLA-G 分子を認識できるのに対して、LILRB1 は認識できず、LILRB1 と LILRB2 でリガンド特異性が異なることがわかった。結晶構造解析により決定した LILRB2-HLA-G 複合体の立体構造から、LILRB2 が LILRB1 より $\alpha 3$ ドメインをより強く認識するため、 $\beta 2m$ の欠損は結合にあまり影響しないと考えられた。

他方、HLA-G は他の MHC クラス I 分子と異なり、余分なシステイン残基を持ち、ジスルフィド結合を介したダイマーを形成する。私たちは HLA-G ダイマーが幅広い免疫系細胞の抑制性受容体 Leukocyte Ig-like receptor(LILR)B1、LILRB2 と強く結合することによりモノマーに比べより強力なシグナル伝達を行うことを明らかにした。さらに、HLA-G ダイマー蛋白質の免疫抑制効果を *in vivo* で評価し、抗炎症剤としての可能性を検討した。まず、HLA-G ダイマー蛋白質の大量調製を巻き戻し法を用いて行い、II 型コラーゲン誘導型関節リウマチモデルマウスに投与したところ、関節の腫れの抑制効果が認められた。体重減少、致死など明らかな副作用は認められなかった。また、その関節炎抑制効果は HLA-G モノマーに比べてダイマーの方がより強く、数倍以上低濃度で有効であった。次に、投与方法(投与回数、投与部位など)について検討したところ、左足局所への皮内投与で、関節炎抑制効果は少なくとも 2 か月間持続することが分かった。これにより投与量と副作用の著しい軽減が期待できた。今後、抑制効果の作用機序を明らかにし、蛋白質製剤としての可能性をさらに検討していく予定である。

参考文献

- 1) Shiroishi M, Kuroki K, Rasubala L, Tsumoto K, Kumagai I, Kurimoto E, Kato K, Kohda D, Maenaka K (2006). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103, 16412-17.
- 2) Shiroishi M, Kuroki K, Ose T, Rasubala L, Shiratori I, Arase H, Tsumoto K, Kumagai I, Kohda D, Maenaka K (2006). J. Biol. Chem. 281, 10439-10447.
- 3) Kuroki K, Maenaka K (2007). Eur. J. Immunol. 2007 Jul;37(7):1727-9.