

2012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：11月16日(金) 13:00~17:30

場所：北海道大学工学部B-1棟2階オープンホール

北海道大学 札幌キャンパス



最寄り駅：
地下鉄南北線 北12条駅より徒歩7分、
JR札幌駅より徒歩20分

プログラム

13:00 開会の辞

鈴木 裕 (生化学会北海道支部、旭川医科大学医学部)

13:05-13:45

「シグナル伝達タンパク質のリン酸化を介した動的制御機構の解明へ向けたアプローチ」 …… P 1

小橋川敬博 (北海道大学 大学院先端生命科学研究院 構造生物学研究室)

座長：森川正章

13:45-14:25

「蛍光相互相関解析による細胞内外来 DNA 動態の可視化」 …… P 2

佐々木 章 (北海道大学 大学院先端生命科学研究院 細胞機能科学研究室)

座長：尾瀬農之

14:25-15:05

「細胞死をともなう植物の免疫システム」 …… P 3

初谷紀幸 (北海道大学 連携研究センター)

座長：藤田知道

15:05-15:25

休憩

15:25-16:05

「原始的な脊椎動物ヤツメウナギから免疫系の進化を探る」 …… P 4

須藤洋一、笠原正典 (北海道大学 大学院医学研究科 病理学講座 分子病理学分野)

座長：田中一馬

16:05-16:45

「パーキンソン病と細胞癌化を結ぶ DJ-1」 …… P 5

加藤いづみ (北海道大学 大学院薬学研究院 創薬科学研究教育センター)

座長：尾瀬農之

16:45-17:25

「低分子量 G 蛋白質 Arf6 による細胞運動・極性制御と癌の浸潤・転移」 …… P 6

橋本 茂 (北海道大学 大学院医学研究科 生化学講座 分子生物学分野)

座長：藤田知道

17:25 閉会の辞

有賀寛芳 (北海道分子生物学研究会、北海道大学大学院薬学研究院)

17:30-19:00 懇親会

会場：工学部食堂 (会費 一般 1,000 円、学生 500 円)

シグナル伝達タンパク質のリン酸化を介した動的制御機構の解明へ に向けたアプローチ

小橋川 敬博

北海道大学 大学院先端生命科学院 構造生物学研究室

細胞の増殖、分化、形態形成などは全ての多細胞生物が成り立つための基本過程である。それらの過程は細胞外からシグナルを細胞表面の受容体が認識し、それを細胞内シグナル伝達因子に伝え、適正に処理されることによりなされる。その過程においてリン酸化及び脱リン酸化を介したタンパク質分子内および分子間相互作用の動的変化が重要な役割を担う。その解明は細胞内シグナル伝達の制御機構を知る上で有用な知見をもたらす。X線やNMRに代表される構造生物学的手法はその解明において有効な手段である¹。しかしながら、現状では、リン酸化に伴う動的変化をX線やNMRにより解析すること容易ではない。その一つ目の要因は構造解析に要するmgオーダーのリン酸化タンパク質を調製する汎用的な手法が存在しないことにある。二つ目は上記のような課題を明らかにする上ではリン酸部位周辺の配列からなるモデルペプチドを用いた研究では不十分であり、複数のドメインからなる、より大きな構造フレームワークでの解析が必要となるからである。マルチドメインタンパク質はその動的性質のために一般には結晶化が難しく、仮に結晶化に成功しても結晶中でのパッキングの影響により、溶液中とは異なったドメイン配置をとる場合がある。NMRの場合は溶液中での構造情報を取得できるという点で優位性があるが、NMR固有の問題である分子量限界(～30kDa程度)や、マルチドメインタンパク質の動的性質によりドメイン間の相互作用領域の信号が消失する場合があります。解析が難しい対象ではあるが、適切な安定同位体標識手法と測定法を組み合わせることにより構造情報を取得することが可能となる。

本講演ではリン酸化に伴う動的な構造変化を介したシグナル制御機構の解明へ向けたアプローチについて、Cblタンパク質N末端領域(47kDa)のNMRによる解析結果を例に紹介する^{2,3,4}。

Cblはチロシンキナーゼシグナルの抑制因子として機能するユビキチンリガーゼ(E3)である。成長因子受容体、免疫受容体、非受容体型チロシンキナーゼ等を標的とする。そのため、Cblタンパク質の機能不全変異はがんや自己免疫疾患に関わる。CblはY363のリン酸化により活性化されるが、自己阻害機構およびリン酸化による活性化機構の詳細は明らかにはなっていない。我々はアミノ酸選択ラベル、ドメイン選択ラベル、NMR、X線小角散乱の組み合わせにより、自己阻害状態および活性化状態の構造を解析し、Cblタンパク質の活性制御機構の詳細を明らかにした。

¹Kobashigawa *et al.*, *Nat Struct Mol Biol.*, **14**, 503-510 (2007)

²Kobashigawa *et al.*, *J Biotechnol.*, **131**, 458-465 (2007)

³Kobashigawa *et al.*, *J Biomol NMR.*, **43**, 145-150 (2009)

⁴Kobashigawa *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **108**, 20579-20584 (2011)

蛍光相互相関解析による細胞内外来 DNA 動態の可視化

佐々木章

北海道大学 大学院先端生命科学研究院 細胞機能科学研究室

外来遺伝子を体内に導入し、タンパク質を発現させたり目的遺伝子をノックダウンしたりする遺伝子治療はパーキンソン病など難治性疾患の治療法の一つとして期待されている。遺伝子治療の実用化において、遺伝子導入効率の向上は極めて重要な課題である。これまで遺伝子導入の効率化に対しては細胞膜を効率よく突破させる機構の開発が重要な貢献をしてきたが、現時点では実用化に耐える程の遺伝子発現効率は実現されていない。この原因の一つは、外来遺伝子の導入から核に入り発現に至る経路やメカニズムの解明が欠落し、ブラックボックスのままである点にある。本来、外来遺伝子の発現は厳重に防御されるべきであり、細胞が持つバリアー機構が重要な役割を果たしていることが考えられる。このような防御機構を含め、外来遺伝子発現システムの全体像を理解するには細胞内に導入された外来 DNA の運命を知ることが不可欠である。本講演では、生細胞内における外来遺伝子の拡散・分解などの運命を定量的に明らかにする方法として蛍光相互相関解析と実際の応用例を紹介したい。

蛍光相関分光法 (Fluorescence correlation spectroscopy: FCS) および蛍光相互相関分光法 (Fluorescence cross-correlation spectroscopy: FCCS) はフェムトリットル (10^{-15} L) オーダーの微小な測定領域における蛍光分子の大きさや数、さらには分子間相互作用を単一分子レベルで解析する手法で、近年細胞内での分子間相互作用解析への利用が進んでいる。我々は FCS、FCCS を利用して、細胞質に導入された外来 DNA がヌクレアーゼによって分解される様子、つまりは外来遺伝子に対する細胞の防御機構が実際に働く様子を定量的にモニターすることに成功、これが発現効率低下の要因の一つであることを明らかにした^[1]。さらに、発展形として外来 DNA 拡散速度や分解過程を時空間的にマッピングするために、画像ベースの相関解析法である Raster-scan image correlation spectroscopy (RICS) と、その拡張法の Cross-correlation RICS (ccRICS) を用いた。ccRICS は「相互相関」情報を画像ベースで取得可能であり、外来 DNA の分解、細胞内での拡散速度を時空間的に解析可能である。我々は、RICS ならびに ccRICS の定量解析法の確立と、両末端を蛍光標識した直鎖状 DNA をプローブとして、溶液中・細胞内における DNA 分解反応の検出を行った。本研究は外来遺伝子に対する生体の防御機構の解明という生物学的な意義はもちろん、遺伝子デリバリー分野において細胞生物学的なバックボーンを与えるものであり、新規遺伝子導入ベクターの論理的設計が可能となることが期待される。

[1] Sasaki A. and Kinjo M. 「Monitoring intracellular degradation of exogenous DNA using diffusion properties.」 *J. Control. Release* 143(1):104-111 (2010)

細胞死をともなう植物の免疫システム

初谷紀幸

北海道大学 連携研究センター

植物に病気を引き起こす病原体はカビ、細菌、ウイルスなど十萬種を超えるが、1つの植物種に感染して加害することのできる病原体の数は平均して十數種程度である。言い換えれば、植物は大多数の病原体の攻撃を回避するための免疫システムを備えていることになる。植物は動物でみられるような免疫を専門とする細胞を持たないため、個々の細胞が病原体の認識から排除までの一連のプロセスを担当している。植物の代表的な免疫システムとして過敏細胞死があげられる。過敏細胞死は感染を受けた細胞が積極的に細胞死を起こすことにより、病原体を細胞内に封じ込め、感染が拡大するのを防ぐための植物独自のシステムである。過敏細胞死を中心に植物免疫について紹介したい。

過敏細胞死は偶発的な死と違い、植物自身に予めプログラムされた細胞死（プログラム細胞死）である。プログラム細胞死は植物、動物を問わず個体の生命を維持する上で重要な役割を果たしている。動物のプログラム細胞死（アポトーシス）では、Caspaseが実行因子としてよく知られている。一方、植物の細胞死の過程でもCaspaseに似た酵素活性が検出されている。しかしながら、イネやシロイヌナズナの全ゲノム配列が解読されると、植物には動物のCaspaseのホモログ遺伝子は存在しないことが明らかとなった。このような状況の中、私達は植物細胞の液胞に局在する液胞プロセシング酵素（vacuolar processing enzyme; VPE）が植物のCaspase-1活性の実体であることを突き止め、ウイルス感染で誘導される過敏細胞死を制御する鍵酵素であることを明らかにした。VPEはもともと液胞内の機能タンパク質の活性化に関わる酵素として同定されたもので、活性中心や基質認識部位の構造がCaspaseと類似している。VPEが制御する過敏細胞死は液胞膜の崩壊を導くことにより、素早く感染細胞を殺すことが特徴であることも分かってきた。

一方、細菌の感染で誘導される過敏細胞死は、ウイルスの感染で誘導される過敏細胞死とは異なったメカニズムで起こることが分かってきた。私達は、細菌に感染した植物の細胞が、液胞膜と原形質膜という全く異質な膜同士の融合を引き起こすことを見出した。すなわち、細胞の内側にある液胞と外部をつなぐ孔をつくることにより、液胞内部の抗菌性物質を外部に放出して細菌を攻撃すると同時に、自らの細胞も死に至らしめるというメカニズムを明らかにした。この膜融合がプロテアソームを介した選択的分解により制御されることも分かってきた。免疫細胞を持たない植物はコストをかけずに外敵から身を守るために全ての細胞が備え持っている液胞を利用しているという概念が生まれてきた。

原始的な脊椎動物ヤツメウナギから免疫系の進化を探る

須藤洋一、笠原正典

北海道大学 大学院医学研究科 病理学講座 分子病理学分野

我々の生活する環境は多くの微生物に満ちている。これらの小さな生命にとって、人間や動物の体内は、増殖するための条件が揃った好環境だが、実際には、こうした微生物が無制限に体内で増殖することは少ない。それは、我々の体内に存在する免疫系が、これらの侵入者を排除し、体内の環境を一定に保っているからである。体内を巡回し、異物を認識、排除する役割を担っているのが、リンパ球を始めとする免疫細胞である。リンパ球はその表面に異物を認識する抗原受容体を持っており、これと適合する物質を異物と認識し、除去する。抗原受容体には大きく分けて3種類があり、これにより、リンパ球も3種類に大別することが出来る。1つは分泌型の抗原受容体、すなわち抗体を分泌するB細胞であり、あとの2つは非分泌型（膜結合型）の抗原受容体を持つabT細胞及びgdT細胞である。抗原受容体は、リンパ球ごとに、異物と結合する部分の構造が異なっている。この多様性により、仮に体内にどのような病原体が侵入しても、いずれかのリンパ球が反応できるような体制になっている。

このようなメカニズムは、病原体との長い生存競争を経て獲得されたものである。では、より原始的な免疫系は、一体どのような姿で出現し、どのような進化の道筋をたどって今に至るのだろうか。我々のグループでは、脊椎動物の中では最も原始的な体制を今に残す、無顎類と呼ばれる生物を用いて研究を行なっている。無顎類は、名前の通り顎が生じる前の体の構造を残す生物で、ヌタウナギ類とヤツメウナギ類の2群のみ現存している。2004年、米国のCooperらは、無顎類が我々のものとは構造的に全く異なる分子を抗原受容体として使用していることを示し、この分子をVariable lymphocyte receptor (VLR) と名付けた。VLRはleucine-rich repeat (LRR) ドメインが多数連続した構造を持ち、我々の抗体に匹敵するほど多様性が高い。我々はCooperらとの共同研究の中で、VLRには、我々の抗原受容体と同じように、複数の種類が存在することを示した。そのうちVLRAは膜結合型の抗原受容体であり、VLRBは分泌型の抗原受容体である。その後の解析で、Cooperらは、膜結合型のVLRAを発現するリンパ球は我々のT細胞と性質が似ており、分泌型のVLRBを発現するリンパ球はB細胞と性質が似ていることを明らかにした。

我々のグループはさらに、ヤツメウナギから第3のVLRを同定し、これをVLRCと名付けた。VLRCは、これまで発見されていたVLRと同様に高い多様性を持ち、VLRA、VLRBを発現する細胞とは異なる細胞集団に発現していた。ヤツメウナギの血液中から分泌型のVLRCが検出されなかったことなどから、VLRCは、VLRAのように、非分泌型の抗原受容体であると考えられている。この発見により、少なくともヤツメウナギ類は我々と同じように2種類の非分泌型の抗原受容体と1種類の分泌型の受容体を持つことが示唆された。

今回はこうしたVLR研究の経緯を概観しながら、今後の研究の展望などについてご紹介したい。

パーキンソン病と細胞癌化を結ぶ DJ-1

加藤いづみ

北海道大学 大学院薬学研究院 創薬科学研究教育センター

癌は様々なストレスにより遺伝子に突然変異が起こることによって発症、パーキンソン病は黒質のドーパミン作動性ニューロンが変性・脱落することにより発症する。両疾患はまったく異なる疾患である一方で近年、病態への酸化ストレスの関連の重要性を含むいくつかの共通項が報告されている。DJ-1は*ras*と協調的に働く癌遺伝子であり、家族性パーキンソン病原因遺伝子 *PARK7* と同一の遺伝子である。そのため、癌では DJ-1 の発現が上昇し、一方で DJ-1 の機能破綻はパーキンソン病などの疾患を引き起こすため、DJ-1 が異なる疾患へ共通して関与する機構の解明が期待されている。DJ-1 の特徴の一つは酸化ストレスにより、106 番システイン残基が容易に酸化されることである。実際に孤発性パーキンソン病患者の脳で過剰酸化型の DJ-1 が蓄積することなど、現象レベルでの酸化と DJ-1 の関係の重要性はいくつか報告されている。しかし、分子レベルへ踏み込んだ酸化型 DJ-1 の機能は不明である。もうひとつの特徴は DJ-1 が様々なタンパク質と結合してその機能を調節することである。しかし、どのようにその結合を使い分けているのか、また結合や機能調節への酸化型 DJ-1 の関与は不明であり、酸化ストレスに関与する疾患の機構解明のためにも、酸化ストレスに対応する DJ-1 の分子メカニズムの解明が望まれていた。

本講演では DJ-1 の酸化修飾状態の違いがタンパク質との結合親和性を変化させ、そのタンパク質の機能を調節する機構を紹介する。DJ-1 は酸化ストレスにより、酸化型 DJ-1 へと変化し、癌抑制遺伝子産物 p53 へと結合する。このことにより転写因子である p53 のターゲット遺伝子発現が抑制され、酸化ストレス後の細胞死が抑制された。また、我々の研究から DJ-1 が抑制できるターゲットは p53 の標的 DNA への結合強度に応じて規定されていることが示唆された。本シンポジウムでは酸化ストレスに応じた DJ-1 の機能と共に創薬科学研究教育センターにおけるアカデミア発新薬創出に向けた取り組みを紹介したい。

低分子量 G 蛋白質 Arf6 による細胞運動・極性制御と癌の浸潤・転移

橋本 茂

北海道大学 大学院医学研究科 分子生物学分野

癌の最も大きな脅威はその浸潤・転移性の獲得にある。腫瘍組織において自己複製能と、腫瘍を構成する多様な分化系統の癌細胞を生み出す幹細胞様の形質を持った少数の癌化の起源となる細胞（癌幹細胞）が転移巣の形成や治療後の再発の主要因であると考えられている。一方、これまで浸潤・転移形質を示す癌細胞は、癌の進行の最終段階と考えられていたが、癌発症の初期段階から、既に、骨髄などへ転移が起こることが報告されている。従って、癌幹細胞の genetic/epigenetic な変異の蓄積だけでは短期間で起こる浸潤・転移を体系的に説明することは困難と考えられる。

上皮-間充織形質転換 (Epithelial-Mesenchymal Transition; EMT) は、上皮細胞において E-cadherin を介した細胞-細胞間接着の消失、integrin を介した細胞-基質間接着の活性化、apico-basal 極性の消失、細胞骨格の再構築などの変化によって一過性に間充織細胞に誘導されることにより、運動性や浸潤性を獲得する現象である。2008 年 Weinberg らのグループによって TGF β シグナル伝達を介した EMT によって乳癌幹細胞が誘導される可能性が例示された。しかしながら、乳癌幹細胞の起源及び、その浸潤・転移形質を実質的に担う分子装置について未だ不明な点が多い。

我々は、これまでに、低分子量 G 蛋白質 Arf6 が乳癌細胞の浸潤活性に根幹的役割を果たしていること、癌浸潤における Arf6 のエフェクターが AMAP1 であることを見出した (Hashimoto et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2004; Onodera et al. *EMBO J.* 2005; Hashimoto et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2006)。引き続いて、EGF レセプター経路の活性化に伴う乳癌細胞の浸潤形質獲得において Arf6 を活性化する GEF として、GEP100 を同定した。さらに、GEP100 が PH ドメインを介して、活性化 EGF レセプターのリン酸化チロシン部位に直接結合することで Arf6 を活性化し、乳癌細胞の浸潤形質を誘導する作用機序を明らかにした。また、病理学的解析から、GEP100 の発現がヒト浸潤性乳管癌の約 80% に観察されることを見出した (Morishige et al. *Nature Cell Biol.* 2008)。さらに、GEP100-Arf6-AMAP1 経路は、ErbB2/Her2/Neu によっても活性化され、肺腺癌のリンパ節転移と統計的に有意に相関し (Menju et al, *PLoS One* 2011)、また、VEGFR2 の活性化に伴う血管新生にも関与することを見出した (Hashimoto et al, *PLoS One* 2011)。最近、乳腺上皮細胞や乳癌細胞において TGF β 1 刺激や低酸素環境による EMT 誘導に伴う浸潤形質獲得に GEP100-Arf6-AMAP1 経路が関与することを見出している。

本講演では、Arf6 を中心とした分子装置による細胞運動性・極性制御とその破綻に伴う癌の浸潤・転移形質獲得のプロセスについて考察したい。

【世話人】

藤田知道（北海道大学大学院理学研究院）

尾瀬農之（北海道大学大学院薬学研究院）

森川正章（北海道大学大学院地球環境科学研究院）