

2013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22日（金）13：00～17：30

場所：北海道大学大学院理学研究院5号館大講堂

2013 年度合同シンポジウム『生命現象の分子レベルでの解明』

日時：2013 年 11 月 22 日（金） 13:00～17:30

場所：北海道大学理学部 5 号館大講堂（5-203 室）

13:00 開会の辞

金城 政孝（生物物理学会北海道支部長、北海道大学・大学院先端生命科学研究院）

13:05 - 13:45

演者：小谷 友也（北海道大学・大学院理学研究院・生物科学部門）

演題：「遺伝子機能を時空間特異的に制御する翻訳機構」

座長：佐々 貴之（北海道大学・大学院薬学研究院）

13:45 - 14:25

演者：多留 偉功（北海道大学・大学院薬学研究院・創薬科学部門）

演題：「神経シナプス形成機構への遺伝学的アプローチ」

座長：佐々 貴之（北海道大学・大学院薬学研究院）

14:25 - 15:05

演者：斉藤 貴士（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）

演題：「ミトコンドリアへのタンパク質輸送におけるプレ配列認識機構」

座長：田中 良和（北海道大学・大学院先端生命科学研究院）

15:05 - 15:25

休憩

15:25 - 16:05

演者：加藤 公児（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）

演題：「スルメイカ由来巨大ヘモシアニンの構造生物学」

座長：尾瀬 農之（北海道大学・大学院薬学研究院）

16:05 - 16:45

演者：内田 毅（北海道大学・大学院理学研究院・化学部門）

演題：「病原菌の鉄獲得機構 -コレラ菌のヘム分解酵素を中心に-」

座長：今川 敏明（北海道大学・大学院理学研究院）

16:45 - 17:25

演者：谷水 直樹（札幌医科大学・医学部附属フロンティア医学研究所・組織再生学部門）

演題：「肝臓の上皮細胞の分化可塑性および組織形成を制御する分子メカニズムの解析」

座長：今川 敏明（北海道大学・大学院理学研究院）

17:25 閉会の辞

田中 一馬（生化学会北海道支部長、北海道大学・遺伝子病制御研究所）

17:30 - 19:00 懇親会

理学部 7 号館 7-220 室

（会費 一般 1,000 円、学生 500 円）

生化学会北海道支部、生物物理学会北海道支部、北海道分子生物学研究会 共催

世話人：高橋 正行（生化学会）、田中 良和（生物物理学会）、米田 宏（分子生物学研究会）

遺伝子機能を時空間特異的に制御する翻訳機構

小谷友也

北海道大学 大学院理学研究院 生物科学分野

私たちが持つ遺伝子は、必要な時期に正確なタイミングで蛋白質となり、生命現象を進行させる。近年まで、こうした遺伝子発現の制御は転写レベルで行われていると考えられてきた。しかし、多くの生物の初期胚において、あるいは神経系組織において、部位・時期特異的な遺伝子産物の発現は mRNA の翻訳レベルで制御されていることが明らかとなってきた。しかしながら、翻訳の分子機構を解析する技術は転写のそれと比べ大きく遅れをとっており、生命現象における翻訳の役割およびメカニズムの解明は未だに困難である。

卵母細胞は成長の過程で mRNA を大量に蓄積するが、それらの大部分は翻訳を抑制されており、すぐには蛋白質に翻訳されない。これら卵に蓄積された mRNA は、卵が成熟する過程や受精後の発生過程において正確なタイミングで翻訳され、受精や個体形成において重要な役割を果たす。しかし、卵母細胞に蓄積された mRNA が正確なタイミングで翻訳されるメカニズムはよく分かっていない。その理由の一つは、mRNA の翻訳がいつ、どの部位で起こるかを検出できないことにある。我々は、部位・時期特異的な翻訳を解析するために、トランスジェニック・ゼブラフィッシュを作製し、卵母細胞に蓄積された mRNA の翻訳をリアルタイムで検出する新規技術を確立した(1)。翻訳の検出は、数アミノ酸からなる TC タグ配列と新規蛍光色素 ReAsH が特異的に結合し、蛍光を発することを利用した。この技術によって、初めて時期特異的な翻訳が起こる瞬間を捉えることが可能となった。

卵に蓄積された mRNA の翻訳機構の実体を明らかにするため、マウスとゼブラフィッシュ卵母細胞の mRNA を最新の技術を用い高感度で検出した。その結果、翻訳を抑制された *cyclin B1* mRNA が卵細胞質において多数の顆粒を形成することを見いだした。興味深いことに、これら RNA 顆粒は mRNA が翻訳されるタイミングで消失した。さらに我々は *cyclin B1* RNA 顆粒の形成が、アクチン繊維と Pumilio1 蛋白質に依存することを明らかにした。人為的に RNA 顆粒を拡散すると *cyclin B1* mRNA の翻訳のタイミングが大幅に早まり、反対に RNA 顆粒を安定化すると *cyclin B1* mRNA の翻訳が阻害された。以上の結果から、卵に蓄積された mRNA は顆粒の形成と消失によって蛋白質合成のタイミングを調節していることが明らかとなった(2)。これらの研究成果は、正確なタイミングで遺伝子の発現を制御する新規分子機構を解明したもので、多くの研究者から注目を集めており(J. Cell Biol. Highlight in “In This Issue”, vol.202, 2013; Nature Reviews Mol. Cell Biol. “Research Highlight”, vol.14, 2013)、今後、初期胚や神経系組織等で見られる部位・時期特異的な翻訳機構の役割およびメカニズム解明に進展することが期待される。

【参考文献】

1. *Yasuda, K., *Kotani, T., Ota, R., Yamashita, M. Transgenic zebrafish reveals novel mechanisms of translational control of *cyclin B1* mRNA in oocytes. *Dev. Biol.* 348:p76-86, 2010. (*co-first author)
2. Kotani, T., Yasuda, K., Ota, R., Yamashita, M. Cyclin B1 mRNA translation is temporally controlled through formation and disassembly of RNA granules. *J. Cell Biol.* 202:p1041-1055, 2013.

神経シナプス形成機構への遺伝学的アプローチ

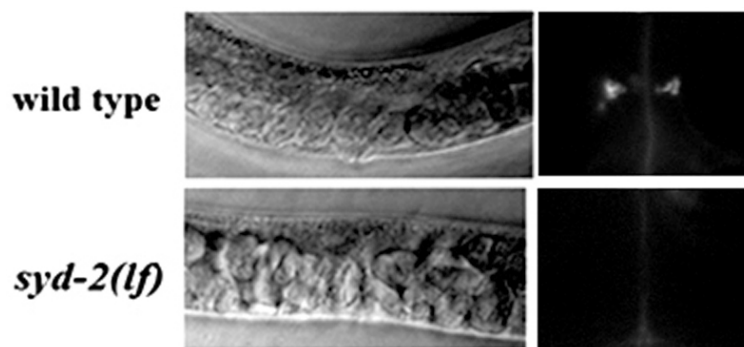
多留 偉功

北海道大学 大学院薬学研究院 神経科学研究室

脳では、神経細胞が“シナプス”と呼ばれる細胞間接着構造を介して互いに結びつき、複雑かつ精緻な回路網を形成している。シナプスは神経細胞間の情報伝達とその調節を担う、神経機能のいわば基本素子である。プレシナプス(シナプス前部)では、神経活動に伴う電位依存性カルシウムチャネルの開口に応じて、シナプス小胞からポストシナプス(シナプス後部)に向けて神経伝達物質が放出される。数十年来の生化学的解析から、プレシナプスの構造的・機能的な核として、多様なアダプター蛋白質群(Cytomatrix at the Active Zone; CAZ)の相互作用ネットワークが存在することが明らかになってきた。一方、プレシナプスの形成機構に関して、無脊椎モデル動物を用いた遺伝学的研究を中心に、分子レベルの探索が90年代以降盛んになった。現在、これら二つの潮流が融合することで、広く種を越えて保存されたプレシナプスの形成機構の理解が進展しつつある。

我々は、線虫 *C.elegans* を実験モデルとして、プレシナプス形成の分子機構の解明に取り組んできた。線虫ではCAZの一つであるアダプター蛋白質 SYD-2/Liprin- α が、プレシナプス形成のマスター制御因子として機能する。SYD-2は多量体形成および結合分子 ELKSとの相互作用を介して高次蛋白質複合体を形成し、それに基づいて他の CAZ 蛋白質群の集積および AZ 構造体の重合を制御する、というモデルを提唱している(Dai et al. *Nature Neurosci.* 9, 1479 (2006), Taru and Jin *J. Neuroscience* 31, 16261 (2011), Kittelmann et al. *J. Cell Biol. in press*)。さらに成熟プレシナプスに必須である電位依存性カルシウムチャネルの集積・局在が、二つの CAZ 蛋白質 RIM と RBP によって協調的に制御される可能性を、多重変異体解析によって見出した(未発表)。

本シンポジウムではシナプス形成の分子機構解明に向けた遺伝学的アプローチの例としてこれらの知見を紹介し、議論を深めたい。



線虫 *C.elegans* を用いたプレシナプス形成分子機構の解析例
遺伝学的解析に長けた線虫 *C.elegans* では、GFP 標識したプレシナプス局在蛋白質を特定の神経細胞に発現するトランスジェニック系統を用いて、プレシナプス構造の可視化と生体内観察が容易である(右上)。SYD-2 の機能欠損変異体では、プレシナプス形成不全が観察され(右下)、産卵行動など様々な生理機能に異常が認められる(左下)。

ミトコンドリアへのタンパク質輸送におけるプレ配列認識機構

齊藤貴士

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

ミトコンドリアには独自のゲノム DNA が含まれているが、このミトコンドリアゲノムにコードされているタンパク質はごく少数であり、ミトコンドリアを構成するタンパク質の大部分は核のゲノム DNA にコードされている。これらのミトコンドリアタンパク質は細胞質にあるリボソームでプレ配列が付加された前駆体蛋白質として合成された後、ミトコンドリアの外膜及び内膜に存在する膜透過装置（タンパク質からなる超分子複合体でそれぞれ Tom 及び Tim 複合体と呼ばれる）によってミトコンドリア・マトリクスへと輸送される。このうちプレ配列を最初に認識する受容体が Tom20 タンパク質である。プレ配列は 15 から 70 残基程度の長さであるがその種類は多種類存在し、Tom20 が認識するプレ配列のアミノ酸 6 残基からなるコンセンサス配列こそ推定されているものの共通のアミノ酸配列は見いだせない。これまで NMR スペクトルにより Tom20 と aldehyde dehydrogenase (ALDH) プレ配列ペプチドとの複合体構造が報告されており、プレ配列が複合体形成時に両親媒性のヘリックス構造をとることが知られていた。しかしこの Tom20 とプレ配列との相互作用は Kd が μ M オーダーと比較的弱い相互作用であるため NMR スペクトルや X 線結晶構造解析による構造を基盤としたさらなる解析が困難であった。そこでこの弱い相互作用を克服するために (1) Tom20 とプレ配列の間を適度な長さのリンカーと分子間 SS 結合でつなげる安定化手法 (2) プレ配列内に D 型システインと L 型システインを導入し、分子内 SS 結合を形成することでエントロピーの効果により複合体を安定化する手法 を採用した。これらの手法によって Tom20 : プレ配列複合体の X 線結晶構造解析と NMR 緩和解析による分子運動性の解析に成功した。この結果から Tom20 が複数のコンフォメーションを利用してプレ配列を認識している動的認識モデルを提唱した。このモデルは Tom20 が約 1000 種類にも及ぶプレ配列を認識し、ミトコンドリアタンパク質をミトコンドリア内へと導くために獲得した認識機構であると考えている。

スルメイカ由来巨大ヘモシアニンの構造生物学

加藤公児

北海道大学 大学院先端生命科学 X線構造生物学研究室

酸素の運搬は生命活動に必要なエネルギーを獲得するための最も重要な生体機構である。ヒトをはじめとした脊椎動物はヘモグロビン (Hb) を用いて酸素を運搬するが、イカやタコ、貝などの軟体生物ではヘモシアニン (Hc) というタイプ3銅含有蛋白質が酸素を運搬する。Hbは活性中心にヘムを持つのに対し、Hcは2つの銅イオンを持っており、その酸素分子の運搬機構はHbのそれとは異なっていると考えられる。Hbの機能は広く研究されてきたのに対し、Hcの解析は著しく遅れている。これは、ヘモシアニンが4MDaにも及ぶ巨大蛋白質会合体である事に起因する。軟体動物由来ヘモシアニンは、約50kDaの機能ドメインが8つ連続してつながった約400kDaのサブユニットが10個円状に会合した巨大分子である。また、その高い免疫原性を利用して、ハプテンのキャリアー蛋白質や、ワクチン投与の際の免疫活性化剤として用いられている。このように、Hcはバイオ・医工学的に広く応用されている分子であるが、これまでの構造学的研究は電子顕微鏡による解析が主で、結晶構造は一部のドメインのみが決定されているだけであった。そこで本研究では、Hcの全体構造をX線結晶構造解析により原子分解能で決定することで、その酸素運搬メカニズムの解明を目指している。

活スルメイカの血リンパから調製したヘモシアニンを用いて結晶化スクリーニングを行ったところ、複数の条件で結晶が得られた。得られた結晶を溶解し、電子顕微鏡で観察し、10量体構造を維持しているものについて結晶化条件を最適化した。X線回折実験は放射光 Photon Factory BL17Aで行い、3.5Åの分解能のデータを収集することに成功した。収集したデータから自己回転関数を計算し、得られた結晶が確かに10量体を維持していることが確認された。初期位相はクライオ電子顕微鏡解析により構築されたトコブシ由来ヘモシアニンの10量体をサーチモデルとした分子置換法により決定した。現在、非結晶学的対称を用いた電子密度マップの平均化を利用した位相改良とモデルの構築、その構造の精密化を行っている。本会ではその構造解析の現状と解析途中ではあるが、その構造から分かってきたことについて紹介する。

病原菌の鉄獲得機構 -コレラ菌のヘム分解酵素を中心に-

内田 毅

北海道大学 大学院理学研究院 化学部門

生物を構成する主要な成分は蛋白質やDNA、脂質、糖等であり、我々が注目する金属元素は、すべてを合わせても体重の1%にも満たない極微量な存在にすぎない。しかし、そんな微量にしか存在しない金属イオンであるが、生命の維持において重要な役割を担っている。例えば、生物は呼吸によりエネルギーを生産するが、呼吸を担う呼吸鎖はヘム(図1)または鉄-硫黄クラスターを補酵素として有する蛋白質により構成されていることから、金属元素は生命維持に必須の要素である。そのため、このような金属元素の生体内での働きを明らかにすることは生命現象の理解に必須の研究と言える。

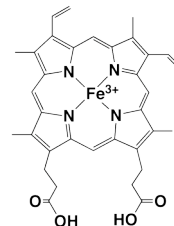


図1:ヘムの構造

微生物における鉄の取り込みにはシデロホアと呼ばれるキレート分子を菌体外に放出し、無機鉄を回収する方法とヘムから回収する方法がある。ヒトが保有する鉄の約70%が赤血球中のヘモグロビン中にヘムとして存在することから、ヒトに感染する病原菌ではヘムが主要な鉄源と考えられる。そこで、病原菌の一つであるコレラ菌に関し、ヘムからの鉄の獲得機構に注目し、ゲノム配列の解析によりヘムの取り込みから利用・制御に関わる蛋白質のネットワークを提案することができた。現在、それらの蛋白質の構造と機能を分子レベルで明らかにする研究を推進している。

コレラ菌におけるヘムの取り込みはHutA, HutR, HasRと呼ばれる膜蛋白質がヘモグロビンと結合し、ヘムだけを細菌内部に取り込み、HutBがヘムを内膜蛋白質であるHutCDに輸送し、細菌内部へ取り込まれ、HutZがヘムを分解することで行われる。ヘムから鉄を取り出すヘム分解酵素はヒトから微生物まで広い生物範囲で存在することが知られ、コレラ菌ではHutZがこの機能を担っていることを我々は明らかにしてきたが¹⁾(図2)、さらにVC2145という蛋白質がヘムを分解せず鉄のみを取り出すことも発見した。極めて安定な錯体であるヘムから鉄を取り出すことは錯体化学的には極めて困難であるが、VC2145は常温、中性で還元剤のみにより引き抜くことがわかった。さらに、取り出された鉄はCyaYという鉄輸送蛋白質により鉄を利用するフェロキラーターゼ(FC)という蛋白質に運搬され、ヘムの合成に使われる。また、細胞内部の鉄量やヘム量に応じ、それらの取り込み制御するFurやLysRなどの転写因子に関する研究を行っている。

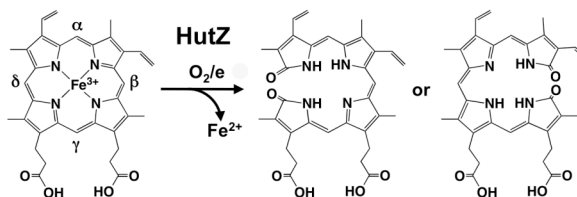


図2:HutZによるヘムの分解

以上のような細菌における鉄の獲得に関与する蛋白質に関する最近の研究成果について紹介する。

1) Uchida, T. et al., (2012) *Chem. Commun.*, **48**, 6741-6743

肝臓の上皮細胞の分化可塑性および組織形成を制御する分子メカニズムの解析

谷水 直樹

札幌医科大学医学部附属フロンティア医学研究所組織再生学部門

肝臓は、様々な代謝機能を担う重要な臓器である。薬剤などによる障害によって肝臓組織の一部が破壊されると、その旺盛な再生能力を発揮して組織を再生する。肝臓には、肝芽細胞（胎生肝幹細胞）を起源とする肝細胞および胆管上皮細胞という2種類の上皮細胞が存在している。一過性の障害に対しては、残存する肝細胞あるいは胆管上皮細胞が増殖・肥大化することにより組織を再生する。一方、慢性的な障害により上皮細胞の増殖能が失われると、肝幹細胞が活性化されて肝細胞や胆管上皮細胞を供給して肝再生が起こると考えられている。一方、上皮細胞の可塑性に基づく再生、すなわち肝細胞と胆管上皮細胞の間での **lineage** の変換が起こっている可能性も示されており、肝再生のみならず疾患の発生機序を解明するうえでも注目されている。

我々は、新生仔期から成体にかけての肝臓から、**EpCAM (epithelial cell adhesion molecule)** 陽性の胆管上皮細胞を分離し、肝細胞への分化転換能について検討した。その結果、新生仔期の細胞は肝細胞への分化する能力を備えているが、成体の細胞はそのような能力を喪失していることがわかった。胆管上皮細胞に特異的な転写因子の発現を比較したところ、**grainyhead like 2 (Grhl2)** の発現量が、新生仔に比べて成体の胆管上皮細胞で高いことが明らかになった。*In vitro* の肝細胞分化誘導系において、**Grhl2** を強制発現すると新生仔期の胆管上皮細胞から肝細胞への分化が抑制された。さらに、**Grhl2** は肝細胞分化に必須の転写因子である **HNF4 α** と **C/EBP α** の発現を抑制していた。以上の結果から、胆管の構造形成を担う転写因子である **Grhl2** は、胆管上皮細胞から肝細胞への分化転換を抑制し、胆管上皮細胞の **lineage** を安定化する役割も担っていると考えた^{1,2}。

マウスに **3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydro-collidine (DDC)** を含む餌を与えて慢性的な肝障害を誘導すると、肝幹細胞が活性化される。我々は、この障害モデルにおいて、肝細胞が部分的に胆管上皮細胞様の性質を示すことを見出した。すなわち、肝細胞の一部が胆管上皮細胞のマーカーである **Sox9** を発現する細胞 (**Sox9⁺ biphenotypic** 細胞) へと変化していた。**Sox9⁺ biphenotypic** 細胞の一部は、胆管上皮細胞あるいは肝細胞へと分化する能力を示した。以上の結果は、終末分化していると考えられる成熟肝細胞の一部が、慢性的な障害条件下においては分化の可塑性を示し、必要に応じて胆管上皮細胞および肝細胞分化することを示唆している。今後は、このような障害条件下での上皮細胞の分化転換の生理的意義を解明していきたいと考えている。

1. Senga, K., Tanimizu, N. et al. *Mol. Biol. Cell.* 2012, **23**, 2845-55.
2. Tanimizu, N. et al. *J. Cell Sci.* 2013 *in press*.



【世話人】

- 高橋 正行 (北海道大学 大学院理学研究院)
- 田中 良和 (北海道大学 大学院先端生命科学研究院)
- 米田 宏 (北海道大学 大学院薬学研究院)