

2008 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：2008 年 11 月 21 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：2008 年 11 月 21 日（金）13：00 から

13:00～13:05 開会の辞

河野 敬一（北大院・理学研究院）

13:05～13:45

演者：高橋 正行（北大院・理学研究院）

演題：「細胞の形をつくる仕組み」

座長：矢沢 道生（北大院・先端生命科学研究院）

13:45～14:25

演者：高橋素子（札医大・医科学）

演題：「糖鎖修飾による増殖因子受容体の動態制御機構」

座長：矢沢 道生（北大院・先端生命科学研究院）

14:25～15:05

演者：高井 章（旭川医科大学 生理学講座）

演題：「M3型ムスカリン受容体の下流に接続する信号伝達機構の分子実体」

座長：相沢 智康（北大院・先端生命科学研究院）

15:05～15:25 休憩

15:25～16:05

演者：石森浩一郎（北大院・理学研究院）

演題：「自己酸化修飾能をもつ転写因子Irr：二段階酸素活性化と自己失活」

座長：相沢 智康（北大院・先端生命科学研究院）

16:05～16:45

演者：室本竜太（北大院・薬学研究院）

演題：「サイトカイン誘導性細胞増殖・生存の制御におけるDaxxの役割」

座長：有賀寛芳（北大院・薬学研究院）

16:45～17:25

演者：樋田京子（北大院・歯学研究科）

演題：「がん微小環境における腫瘍血管内皮細胞の異常性」

座長：有賀寛芳（北大院・薬学研究院）

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、奮って御参加下さい。

会場：理学研究科 2 号館 2-211 室 会費：一般 1000 円 学生 500 円

細胞のかたちを変え、そして維持する分子機構 —非筋細胞ミオシンIIの役割—  
高橋 正行（北海道大学大学院理学研究院）

私達の身体には筋肉のミオシンとは異なる非筋細胞ミオシンII(以後、単にミオシンII)と呼ばれるミオシンが存在し、様々な細胞の運動過程において重要な役割を担っている。ミオシンIIとアクチンを含む細胞骨格タンパク質が、必要な場所に必要な時に集合し細胞運動（細胞の形態変化）を可能にする。また、変化した細胞の形態を維持し続けるのも、アクチンとミオシンIIの重要な働きである。ミオシンIIが機能するためには、自己会合して双極性のフィラメントを形成することが必須である。脊椎動物には3種類のミオシンIIアイソフォーム（IIA, IIB, IIC）が存在するが、それらの機能の違いは良くわかっていない。ミオシンIIAとIIBに関しては、それぞれの重鎖のノックアウトマウスが胎生致死になることから、互いに補うことのできない機能を持っていることが予想される。細胞運動におけるミオシンIIの役割については、古くから多くの研究がなされてきたが、多くの場合、アイソフォームを区別することなく機能が議論されていた。我々はミオシンIIAとIIBの機能の差異に注目し研究を進めている過程で、繊維芽細胞が遊走する際にIIAとIIBが異なる局在を示すことを見出した。IIAは細胞の後方に加えて、前方のラメラと呼ばれる領域でアクチンファイバー構造と共局在するのに対し、IIBは後方の膜直下の限られた領域に局在することがわかった。また、調節軽鎖のSer19とThr18がリン酸化(二重リン酸化)されて高度に活性化しているミオシンIIが、ラメラに多く局在することを明らかにした。培養基質にまいた直後に見られる繊維芽細胞の形態変化に着目したところ、伸展段階が進み形態に極性が現れ始めた細胞では、周縁部において伸展を止めた部分にIIBが局在し、その部分で調節軽鎖の二重リン酸化がおきていないことを示唆する結果を得た。また、IIBのC末端305アミノ酸残基からなる尾部フラグメント(自己会合に必須な領域とアイソフォーム間で最も一次構造が異なる non-helical tail piece を含む)を細胞内に強制発現すると、IIB重鎖ノックアウトマウス由来の繊維芽細胞と同様の形態異常が起きることがわかった(図)。これらの結果から、現時点では、IIAは高度に活性化されて、細胞形態を変化させる方向に働き、IIBは細胞形態を維持する方向に働いているのではないかと考えている。本講演では、脳に特異的に発現するIIBのsplice variant の神経細胞の形態における役割についても議論したい。

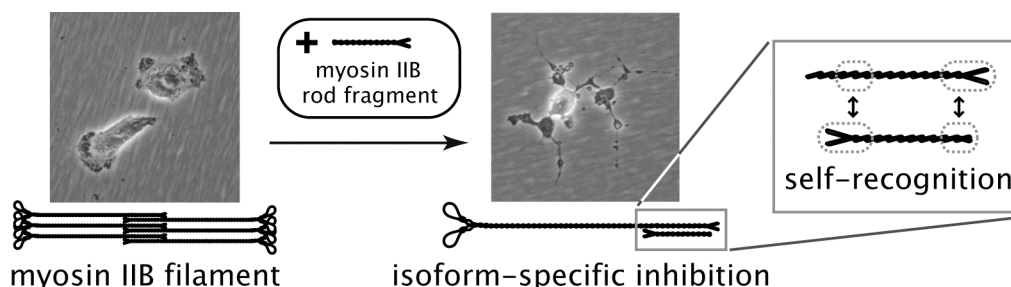
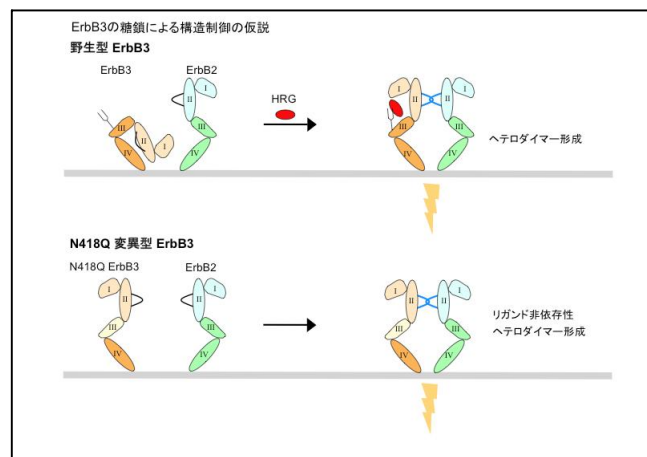


図 尾部フラグメント発現によるミオシン IIB のアイソフォーム特異的機能阻害

## N型糖鎖による増殖因子シグナルの制御

高橋素子（札幌医科大学医学部医化学講座）

糖鎖は、タンパク質の立体構造や可塑性、親水性を変化させることによって、タンパク質の細胞内輸送や分子間相互作用に影響すると考えられている。我々はこれまでに N 型糖鎖がシグナル受容体分子の二量体形成やエンドサイトーシス、ターンオーバー等を変化させ、シグナル伝達を制御している例を観察してきた。ErbB ファミリーは EGFR (= ErbB1)、ErbB2、ErbB3、ErbB4 の 4 つからなる増殖・分化、アポトーシスに深く関与する増殖因子受容体であるが、N 型糖鎖によって 1) ソーティングの制御、2) エンドサイトーシスの制御、3) 二量体形成の制御等を受けることが明らかになった。例えば、EGFR の N 型糖鎖に bisecting GlcNAc を導入すると、リガンド刺激によるエンドサイトーシスが増加する。この場合、受容体のエンドサイトーシスの増加は下流の Erk および PI3K シグナルを増強した。また、受容体の糖鎖欠損変異体を観察した結果、EGFR のドメイン III の Asn420 に付加する糖鎖と ErbB3 のドメイン III の Asn418 に付加する糖鎖はリガンド非依存性の二量体形成を防いでおり、リガンド応答性を保つ働きがあることが推測された。特に ErbB3 では、Asn418 付加糖鎖を欠損させると下流のシグナルが増強し、in vivo において腫瘍形成能が著しく増加することが明らかとなった。さらに ErbB3 の細胞外ドメインを精製し、リガンド結合性および立体構造を解析した。EGFR の Asn420 付加糖鎖の欠損変異体ではリガンド結合性を失うが、ErbB3 の Asn418 付加糖鎖の欠損変異体では、野生型と比較して結合速度、解離速度の変化は見られるもののリガンド結合性は保持されていることがわかった。NMR 解析では ErbB3 糖鎖欠損変異体のドメイン II と IV の接触部位の芳香族シグナルに変化はなく、糖鎖欠損変異体で観察される二量体形成はリガンド結合による二量体形成とは異なる機序によることが示唆された。今後、さらに ErbB 糖鎖欠損変異体の構造と機能の関係を解明したい。



## M<sub>3</sub>型ムスカリン受容体の下流に接続する信号伝達機構の分子実体

高井章、宮津基、安井文智

旭川医大・生理・自律機能分野

一般に M<sub>3</sub> 型ムスカリン受容体(M<sub>3</sub>R)の刺激によって起こる生体反応は、G<sub>q/11</sub> 蛋白(G<sub>q/11</sub>)に共役した信号伝達経路を介して現れるが、その下流に接続する系の本体については必ずしも明確でない場合が多い。視覚遠近調節を司る毛様体筋はほぼ純粋に副交感神経支配の平滑筋であり、しかもその収縮は専ら伝達物質アセチルコリンによる M<sub>3</sub>R への刺激の増減に基づいて制御されている。われわれは、この恰好のモデル系を用い、M<sub>3</sub>R から収縮蛋白系に至る信号の流れとそれを担う分子を探求してきた。今回は、これまで主にウシ毛様体筋を用いて行ってきた研究の成果として得られた次のような知見について紹介する[1-3]。

1. 毛様体筋は、M<sub>3</sub>R 刺激に伴い平滑筋としてはきわめて速やかに収縮し(初期相)、その後刺激の続く限り一定の張力を保持し続ける(持続相)という特性があり、それが迅速で安定な焦点調節を可能にしている。収縮初期相は細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>)の急速な上昇に伴って起るが、これは G<sub>q/11</sub> 経路で phospholipase Cβが活性化されることに伴い産生される IP<sub>3</sub> が筋小胞体(SR)からの遊離を起すことによることがほぼ確定している[1,3]。毛様体筋 SR にはそのほか、[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇により開く ryanodine 感受性の Ca<sup>2+</sup>放出経路も存在する(未発表知見)。
2. 収縮持続相は細胞外からの持続的な Ca<sup>2+</sup>流入を必要とするが、毛様体筋細胞膜には膜電位依存性 Ca<sup>2+</sup>はほとんど発現しておらず、主な流入経路として機能するのは単位コンダクタンスの大きく異なる 2 種類の非選択性陽イオンチャネル(NSCCL と NSCCS と呼んでいる)である[1,2]。毛様体筋細胞膜には少なくとも 4 種類の TRPC チャネル蛋白(TRPC1, 3, 4 & 6)が発現していることを確認しているが、そのいくつかは NSCCL または NSCCS の本体または構成要素である可能性がある[1]。M<sub>3</sub>R 刺激が NSCCS を開口させるのも G<sub>q/11</sub> を介する信号を介してであり、その際 SR における Ca<sup>2+</sup>枯渇によって活性化されるいわゆる SOC 機構が関与することを強く示唆するデータを得ている(未発表知見)。SOC 機構との関連で注目されている STIM-1 が毛様体筋 SR 膜に多く存在することを観察している(未発表知見)。
3. 毛様体筋において M<sub>3</sub>R/G<sub>q/11</sub> からの信号は、遊離と流入に伴う [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇を引き起すのと並行して、RhoA/Rho-kinase 系を介して収縮蛋白系の Ca<sup>2+</sup>感受性を高める現象(いわゆる Ca sensitization)を起すことを強く示唆するデータを得ている[3]。

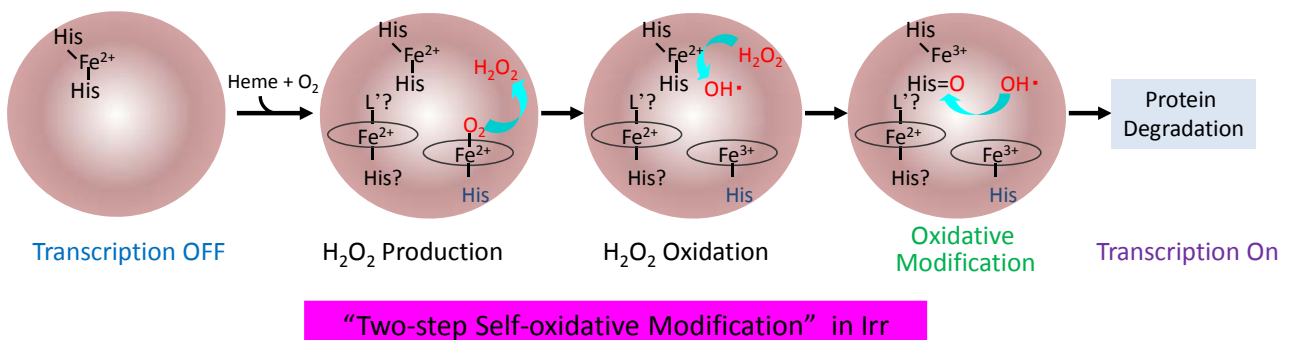
### 参考文献

1. TAKAI Y, SUGAWARA R, OHINATA H & TAKAI A (2004). Two types of non-selective cation channel opened by muscarinic stimulation with carbachol in bovine ciliary muscle cells. *J Physiol* **559**, 899-922.
2. SUGAWARA R, TAKAI Y, MIYAZU M, OHINATA H, YOSHIDA A & TAKAI A (2006). Agonist and antagonist sensitivity of non-selective cation channel currents evoked by muscarinic receptor stimulation in bovine ciliary muscle cells. *Auton Autacoid Pharmacol* **26**, 285-292.
3. YASUI F, MIYAZU M, YOSHIDA A, NARUSE K & TAKAI (2008). Examination of signalling pathways involved in muscarinic responses in bovine ciliary muscle using YM-254890, an inhibitor of the G<sub>q/11</sub> protein. *Br J Pharmacol* **154**, 890-900.

# 自己酸化修飾能をもつ転写因子 Irr : 二段階酸素活性化と自己失活

(北大・院理) 石森浩一郎

生体内では種々の蛋白質により生命機能が維持されているが、蛋白質の発現は無秩序に行われるわけではなく、転写因子とよばれる蛋白質により DNA から mRNA への転写が厳密に制御され、生物として秩序がとれた状態を維持している。転写因子は、特定の標的 DNA に結合することでその機能を発揮するが、一部の転写因子は、外部からのシグナル伝達物質の結合により標的 DNA に対する親和性が変化し、その結果、mRNA の転写が制御され、最終的に蛋白質の発現が調節される。つまり、このような転写因子は、細胞内シグナルに応答した蛋白質発現制御の受容体兼変換器の役割を果たしている。ここでの細胞内シグナルとしては、種々の小分子や蛋白質が報告されているが、近年、いままで蛋白質の活性中心として機能していると考えられてきた鉄ポルフィリン錯体であるヘムも、ある種の転写因子に対してのシグナル伝達物質であることが明らかになってきた。そのような転写因子の一つである Irr (Iron Response Regulator) は、ヘム合成の中間体の合成酵素である ALA 脱水酵素 (ALAD) の転写を細胞内の鉄イオン濃度に依存して制御し、鉄欠乏時にヘムの合成を抑制する機能を有している。すなわち、鉄欠乏時には Irr が標的 DNA に結合して ALAD の mRNA の転写を抑制するが、鉄濃度が十分高いとヘムが Irr に結合することで、Irr の自己酸化修飾反応が起こり、Irr は最終的には分解されてその転写抑制が解け、ヘム合成が進行すると考えられている。この Irr の自己酸化修飾による転写制御機構は、酸化活性を有するヘムをシグナル伝達分子として巧妙に利用した非常に興味深い例であるが、その自己酸化修飾の分子機構については明らかではない。そこで我々は、この Irr の自己酸化反応での酸化活性種の同定と、その産生の分子機構を明らかにするため、活性酸素種に特異的な阻害剤存在下での酸化修飾蛋白質の追跡と質量分析法を駆使して検討を行った。その結果、Irr に結合したヘムは、還元剤存在下、分子状酸素を活性化して過酸化水素を産生することが明らかになった。さらに、過酸化水素では酸化力が弱く、直接アミノ酸残基を酸化修飾できないことから、Irr による過酸化水素の更なる活性化機構が示唆された。系統的なアミノ酸置換体の酸化修飾の結果から、特定のヒスチジン残基の選択的修飾が示され、このようなヒスチジン残基の酸化修飾は、Irr と一次構造上の類似性があり、過酸化水素をシグナル伝達分子として転写機能が制御される PerR でも観測された。したがって、Irr においても PerR 同様に、その分子内に非ヘム鉄を含み、その鉄上での Fenton 反応により過酸化水素から HO ラジカルを生成し、その HO ラジカルがヒスチジン残基を酸化修飾することが考えられた。以上の結果は、Irr はヘムを結合することにより還元雰囲気下で分子状酸素から過酸化水素を産生し、この産生した過酸化水素を内在性の非ヘム鉄によりアミノ酸を直接酸化可能な OH ラジカルに変換することで、特定の部位のヒスチジン残基が酸化修飾されるという二段階酸素活性化による自己酸化機構を示している。さらにこの自己酸化機構により蛋白質構造の不安定化、DNA 結合能の自己失活が誘起され、最終的には蛋白質分解につながると考えられた (下図)。



サイトカイン誘導性細胞増殖・生存の制御における Daxx の役割  
室本竜太（北海道大学大学院薬学研究院）

Signal transducer and activator of transcription (STAT)は細胞質に局在しているタンパク質であるが、インターロイキン (IL) 等のサイトカイン刺激が加わるとリン酸化を受け、二量体を形成して核へと局在を移し、標的遺伝子の転写を促進するシグナル伝達性転写因子である。われわれは特に IL-6 受容体下流の STAT3 活性化とその免疫系細胞の増殖や分化における重要性に注目し研究を進めている。STAT3 はリンパ腫を含む様々なヒト腫瘍細胞株及び腫瘍組織において恒常的なリン酸化が観察されており、また、恒常的活性化型変異 STAT3 はそれ自身ががん遺伝子産物としても機能することが報告されている。最近の報告では STAT3 が骨髄中の免疫系 B 細胞の前駆細胞のアポトーシスを防ぎ、細胞の生存を維持する機能をもつことが示されており、腫瘍細胞以外に正常細胞の生存・増殖の制御にも重要であることが示唆されている。ゆえに細胞内における STAT3 の活性制御機構を明らかにすることは、STAT3 の活性制御異常に起因する様々な腫瘍や免疫疾患の治療薬開発への一助となると考えられる。

現在までにわれわれは STAT3 と細胞内で会合しその転写活性化機能を抑制するタンパクとして Fas death domain-associated protein (Daxx) が関与することを見出した。Daxx は主に細胞核に局在し、遺伝子転写を抑制する機能をもつことが知られている。そこでわれわれは Daxx による STAT3 機能の抑制が B 細胞のアポトーシス誘導 / 増殖抑制と関連すると考え、解析を進めている。

本講演では、IL-6 受容体及び STAT3 活性化に依存した細胞増殖シグナルの制御における Daxx の役割を検証した研究結果を報告する。マウスプロ B 細胞株を基に樹立され STAT3 活性化依存的に増殖する細胞株を用いた解析により、STAT3 に依存した細胞増殖は内因性 Daxx のノックダウンにより促進され、遺伝子導入による Daxx 過剰発現によって抑制されることが示された。一方で STAT5 活性に依存した細胞増殖は Daxx による影響が観察されなかった。これらの結果から、Daxx は STAT3 に依存した細胞増殖を特異的に抑制すると考えられる。今後さらなる解析によって STAT3 による細胞増殖の促進と Daxx による抑制の機序を明らかにし、これら分子間の関係性を正確に理解することができれば、STAT3 の制御異常に起因するリンパ腫等の疾患に対する新たな治療薬開発にも結びつけることができると考えられる。

## がん微小環境における腫瘍血管内皮細胞の異常性

○<sup>ひだきょうこ</sup>樋田京子<sup>1</sup>、樋田泰浩<sup>2</sup>、秋野文臣<sup>1,3</sup>、大賀則孝<sup>1,4</sup>、松田光平<sup>1,4</sup>、

黒須拓郎<sup>1,4</sup>、土屋邦彦<sup>1,3</sup>、村木 力<sup>1,4</sup>、進藤正信<sup>1</sup>

(北海道大・歯・口腔病理病態<sup>1</sup>、腫瘍外科<sup>2</sup>、腎泌尿器科<sup>3</sup>、口腔外科<sup>4</sup>)

腫瘍血管新生は腫瘍の進展と転移に重要である。従来、腫瘍内の血管は周囲の正常血管が進展してくることによって新生されるものと考えられていたため、腫瘍血管内皮細胞はHUVECなどの正常血管内皮細胞と異なるものと考えられていた。しかし、最近、腫瘍血管の携帯学的な違いに加え、腫瘍血管内皮細胞は周囲の正常血管内皮細胞とは異なる遺伝子発現をしていることが報告されている。さらに腫瘍の血管新生には骨髄由来の血管内皮前駆細胞が関与していることなども報告されている。

われわれはこれまで腫瘍血管内皮細胞を分離培養してその特異性について研究してきた。例えば腫瘍血管内皮は正常血管内皮に比較して増殖が早く遊走能も高いこと、bFGF、

EGFなどに対する反応性が高いことなどがわかった。また、マイクロアレイにより4種類の異なるがん組織由来から分離された腫瘍血管内皮に共通して10倍以上発現が亢進している遺伝子群が50ほどもあった。さらに驚くべきことに、腫瘍血管内皮細胞はaneuploidy

を持っていることがわかり、がん細胞のみならず血管内皮細胞さえも腫瘍微小環境において異常な性質を獲得していることが示唆された (Hida et al., Cancer Res. 2004)。血管内皮を標的とした血管新生阻害療法は重要ながんの治療法の一つであるが、真に理想的な血管新生阻害療法の開発のためには腫瘍血管のbiologyをより理解することが肝要と思われる。今回、我々の研究も含めこれまでの腫瘍血管内皮についての研究について若干の考察を加えて報告したい。