



日本生化学会北海道支部支部例会 第 50 回記念大会

プログラム・抄録集

日 時:平成 25 年 7 月 26 日(金) 9:10～17:15

場 所:北海道大学大学院医学研究科 学友会館フラテ

世話人:北海道大学大学院医学研究科生化学講座医化学分野

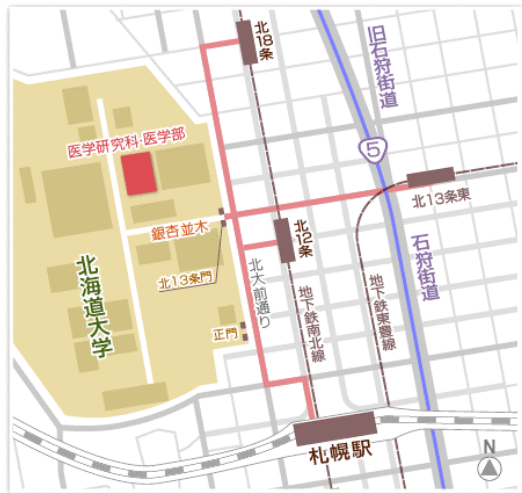
共 催:文部科学省科学研究費補助金 新学術領域研究

「高精細アプローチで迫る転写サイクルの統一的理解」

抄録プログラム

日時：平成25年7月26日（金） 午前9時10分より

場所：北海道大学医学部 学友会館フラテ（フラテホール）（札幌市北区北15西7）



※フラテホールは上右図、学友会館フラテ（医学部管理等）にあります。

※構内は禁煙です。

発表について

- 1) 口頭発表の際に使用する機材は**PC（Win/Mac）**のみとし、液晶プロジェクターで投影します。
- 2) 例会事務局では**PC（Win: power point 2010）**を用意しますので、**USB** でデータをお持ちになって下さい。Macの場合はご自分の**PC**をお持ちください。**Mac**の場合は接続用のコネクタをお忘れなく。
- 3) ポスター発表のボードサイズは縦**180cm x 横90cm** です。ボードに演題番号が貼ってありますので**9:00~10:00** の間に掲示ください。発表時間帯は**12:40~13:40** となっております。なおポスターの撤去は**18:20** までをお願いします。

問い合わせ先

〒060 - 0818 札幌市北区北18 条西9 丁目
北海道大学大学院医学研究科 生化学講座医化学分野
日本生化学会北海道支部 支部例会第50回記念大会係

TEL : 011 - 706 - 5047

FAX : 011 - 706 - 5169

E-mail : ikagaku@med.hokudai.ac.jp

*閉会后、フラテ会館大研修室にて懇親会を予定しております。会費は一般**2,000**円、学生**500**円の予定です。受け付けの際に、懇親会への参加の有無をお知らせください。

日本生化学会北海道支部 支部例会第 50 回記念大会 プログラム

日時:平成 25 年 7 月 26 日(金) 9:10~17:15
場所:北海道大学大学院医学研究科 学友会館フラテ

9:10-9:15 開会の辞

日本生化学会北海道支部例会 第 50 回記念大会長
畠山 鎮次 (北海道大学・大学院医学研究科・生化学講座)

9:15-10:00 「記念講演 I」(講演 40 分、討論 5 分)

座長 鈴木 裕 (旭川医科大学・医学部・生化学講座)

「私が見てきた生化学・分子生物学の興隆と発展」

大塚 栄子 (産業技術総合研究所)

10:00-10:25 「総説講演」(講演 20 分、討論 5 分)

座長 木村 和弘 (北海道大学・大学院獣医学研究科・形態機能学講座)

コンドロイチン硫酸/デルマトン硫酸の生合成に関わる酵素の変異による骨・皮膚疾患の糖鎖生物学的研究

○水本秀二¹, 中島正宏², Thomas Müller³, 三宅紀子⁴, Indrajit Suresh⁵, 古川諒¹, 小松由枝¹, 松本直通⁴, Andreas R Janecek³, 池川志郎², 菅原一幸¹

¹北海道大学大学院・先端生命科学研究院、²理化学研究所・骨関節疾患研究チーム、³Department of Pediatrics I, Innsbruck Medical University, Austria、⁴横浜市立大学・医学研究科・遺伝学、⁵Jagadguru Sri Shivarathreeshwara Univ. Hospital, India

10:30-11:00 「一般講演 セッション I」

座長 坂口 和靖 (北海道大学大学院・総合化学院・総合化学専攻・生物化学研究室)

O-01

サーファクタント蛋白質 A および D の EGF シグナル制御を介した抗腫瘍作用

長谷川 喜弘^{1,2}, 高橋 素子¹, 有木 茂¹, 高宮 里奈¹, 上原 康昭^{1,2}, 橋本 次郎^{1,3}, 高橋 弘毅², 黒木 由夫¹

¹札幌医大・医・医化学、²札幌医大・医・呼吸器・アレルギー内科、³札幌医大・医・泌尿器科

O-02

がん関連糖鎖シアリル Tn 糖鎖抗原発現によるインテグリンを介したがん微小環境制御機構

○高宮里奈^{1, 2}、大坪和明²、高松真二²、高橋素子¹、黒木由夫¹、谷口直之²

1 札幌医大・医・医化学、2 理研・グローバルクラスター・疾患糖鎖

11:00-11:30 「特別企画講演」(指定演題:講演 25 分、討論 5 分)

座長 田中 一馬 (北海道大学・遺伝子病制御研究所・分子間情報分野)

「一枚の写真から;レオノール・ミハエリスの札幌」

藤田 博美 (北海道大学・大学院医学研究科・予防医学講座)

11:30-11:35 総会

議長 日本生化学会北海道支部長 鈴木 裕 (旭川医科大学・医学部・生化学講座)

11:40-12:30 ランチョンセミナー

ヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ株式会社

13:00-14:00 「ポスター発表」

14:00-14:45 「記念講演Ⅱ」(講演 40 分、討論 5 分)

座長 畠山 鎮次 (北海道大学・大学院医学研究科・生化学講座)

「Structure and function of transcriptional regulatory complexes」

Joan Conaway (ストワーズ研究所)

14:45-15:20 「特別講演Ⅰ」(指定演題:講演 30 分、討論 5 分)

座長 黒木 由夫 (札幌医科大学・医学部・生化学第一講座)

「がんエピゲノム研究による病態解明と臨床応用」

鈴木 拓 (札幌医科大学・医学部・分子生物学講座)

15:20-15:40 コーヒーブレイク

15:40-16:15 「特別講演Ⅱ」(指定演題:講演 30 分、討論 5 分)

座長 高岡 晃教 (北海道大学・遺伝子病制御研究所・分子生体防御分野)

「細胞機能とシグナル伝達の蛍光イメージング」

大場 雄介 (北海道大学・大学院医学研究科・生理学講座)

16:15-17:15 「一般講演 セッションⅡ」

座長 前仲 勝実 (北海道大学・薬学研究院・生体分子機能学研究室)

O-03

Cuprizone 誘発性脱髄モデルからみた再ミエリン化におけるミクログリアの役割

○田中達英、村上公一、板東良雄、吉田成孝

旭川医大・医・解剖・機能形態学

O-04

7q23 にコードされた PPM1D ホスファターゼ過剰発現による染色体不安定化

○中馬吉郎^{1,2}、藤田章弘¹、小笠原紗里²、小境夕紀¹、今川敏明^{1,2}、坂口和靖^{1,2}

¹北海道大学大学院・総合化学院・総合化学専攻・生物化学研究室、

²北海道大学大学院・理学研究院・化学部門・生物化学研究室”

O-05

糖尿病および高血糖状態の治療薬としてのグルカゴンアナログ探査

○浅田ゆかり、ThanThan Sint、西塔竜弥、落岩和樹、桑山秀人

帯広畜産大学・畜産学研究科・畜産生命科学研究部門

O-06

Phosphorylations of RNAPII-CTD trigger two distinct pathways for Centromeric Silencing

○梶谷卓也^{1,2}、Damien Hermand³、木村宏⁴、村上洋太¹

¹北海道大学大学院・理学研究院・化学部門・生物有機化学研究室、²京都大学大学院・医学研究科、³ナミュール大学、⁴大阪大学大学院・生命機能研究科

閉会の辞 日本生化学会北海道支部例会 第50回記念大会長 畠山 鎮次

17:30 懇親会

13:00-14:00 「ポスター発表」

P-01

癌抑制タンパク質 p53 の変異型-正常型間で形成されるヘテロ四量体の転写活性化能

○戸口 侑¹、今川敏明^{1,2}、坂口和靖^{1,2}

¹北大院・総化・総化、²北大院理・化学

P-02

生細胞に対する新規な低分子プローブの開発

田野 史¹・中馬吉郎^{1,2}・大澤 歩¹・今川敏明^{1,2}・難波康祐^{1,2}・谷野圭持^{1,2}・坂口和靖^{1,2}

¹北大院総化・総化、²北大院理・化学

P-03

エピゲノム変異にともなう個体形質の「ゆらぎ」とその制御メカニズムの解明

○反田真登¹、島田篤^{2,3}、平内孝紘¹、近重裕次⁴、高畑信也³、村上洋太³

¹北大院総合化学、²CSH Lab、³北大院理・化学、⁴情報通信研究機構

P-04

ヒト PPM1 ファミリーホスファターゼのペプチド基質に対するリン酸化 Ser/Thr 選択性

○白幡祐貴子¹、中馬吉郎^{1,2}、清田雄平¹、岩室良²、坂口和靖^{1,2}

¹北海道大学大学院・総合化学院・総合化学専攻・生物化学研究室、²北海道大学大学院・理学研究院・化学部門・生物化学研究室

P-05

細胞膜モデル「ナノディスク」を用いたハロロドプシンの分光学的解析

○鈴木研士郎¹・山本愛弓¹・塚本卓²・小橋川敬博³・内田毅^{1,4}・稲垣冬彦³・出村誠²・石森浩一郎^{1,4}

¹北大院総化・生化、²北大院生命・生命融合、³北大院先端生命、⁴北大院理・化学

P-06

C 型レクチン様受容体 Mincle の糖脂質認識機構

○古川敦^{1,2}、上敷領淳³、岡部由紀¹、神田涼⁴、豊永憲司⁵、森大輝⁵、三宅 靖延⁵、山崎晶⁵、尾瀬豊之¹、前仲勝実^{1,2}

¹北大・院・薬、²CREST、³福山大・薬、⁴北大・院・生命、⁵九大・生医

P-07

緑膿菌由来 MurD Ligase の発現・精製および結晶化

○笈川あずさ¹、北辻千展¹、福原秀雄¹、喜多俊介¹、小椋賢治²、稲垣冬彦²、尾瀬農之¹、前仲勝実¹

¹ 北大院・薬、² 北大院・先端生命

P-08

ATDC はヒストン H2A.X のリン酸化とヒストン H4 のアセチル化を介して DNA 二本鎖切断修復を制御する

○ 梶田 安志¹、高橋 秀尚¹、松本雅記²、中山敬一²、Ronald C. Conaway³、Joan W. Conaway³、畠山 鎮次¹

¹ 北海道大学大学院医学研究科 生化学講座 医化学分野、² 九州大学 生体防御医学研究所 分子医科学分野、³ Stowers Institute for Medical Research

P-09

Tripartite motif protein 39 (TRIM39)の機能解析

○ 鈴木 正宣^{1,2}、渡部 昌¹、中丸 裕爾²、福田 諭²、畠山 鎮次¹

¹ 北海道大学 大学院医学研究科 医学専攻 生化学講座 医化学分野

² 北海道大学大学院医学研究科 耳鼻咽喉科・頭頸部外科

P-10

Involvement of linear polyubiquitylation in PPAR γ transcriptional activity

○ Masashi Watanabe, Shigetsugu Hatakeyama

Department of Biochemistry, Hokkaido University Graduate School of Medicine

記念講演 要旨

特別講演 要旨

〔記念講演〕

私が見てきた生化学・分子生物学の興隆と発展

○大塚 榮子

北海道大学名誉教授 産業技術総合研究所名誉フェロー

【要旨】

生化学会北海道支部が設立されたのが50年前であることを知り感慨深い。医学部薬学科の1期生として学年進行で作られた大学院博士課程を終了した年であり、4月に米国 Wisconsin 大学酵素研究所 Khorana 研究室に留学した。今年は Watson と Crick が DNA 二重らせん構造を発見して60年である。21世紀になって明らかにされた最大の出来事はゲノム解析に続く non-codingRNA の役割ではないかと思う。50年前は遺伝暗号が解読されつつあり、Khorana 研では合成核酸がそれに使われようとしていて、運良くその研究に参加することができた。

遺伝暗号決定

1963年頃には、タンパクのアミノ酸配列は RNA の塩基3個によって決まるということが推定されていた。Nirenberg は ribooligomer と対応する tRNA と ribosome との複合体形成を利用し、Khorana らは64種の合成 ribotrimer 用い¹⁾、1965年遺伝暗号表を完成させた。Holley はアラニン tRNA の配列決定し、anti-codon に相補的配列が存在することを証明し、1968年には遺伝暗号解明の業績で Holley, Khorana, Nirenberg がノーベル生理・医学賞を受賞した。

核酸合成法の進歩と遺伝子合成

1967年東京で開催された国際生化学会で Khorana は次のテーマである遺伝子合成の構想を発表した。合成断片を DNA ligase によって結合し、77塩基対からなるアラニン tRNA 遺伝子を合成したが、生物学的活性は tyrosine suppressor tRNA 遺伝子で証明した²⁾。その後合成法の進歩もあり、インターフェロン遺伝子などが合成され、日本でも阪大池原研でヒト成長ホルモン遺伝子合成が行われた³⁾。北大では国立がんセンター西村研との共同で ras 遺伝子合成を行い⁴⁾、大腸菌中の大量発現によって Kim らとの X 線構造解析が可能になった。同様の方法で修復酵素 T4 エンドヌクレアーゼ V の合成と発現を行い、チミンダイマーを含む基質との複合体の構造解析を蛋白工学研森川らとを行い、この酵素による基質認識と反応機構をはじめて明らかにした⁵⁾。

RNA ワールドの展開

RNA の結合酵素も発見され、合成断片を結合することが可能となり、阪大ではホルミルメチオニン tRNA 合成が発表された⁶⁾。触媒活性のあるリボザイムは1989年に早くもノーベル賞の対象となったが、北大でも切断活性の特性を生かして、変異のある ras 遺伝子の発現を制御するリボザイムの研究⁷⁾や活性に必須な構造の解析などを行った⁸⁾。

その後、RNA 干渉の発見や、次世代シーケンサーによるゲノムの解析などから、タンパクをコードしない DNA のほとんどが non-coding RNA として遺伝子発現に重要な役割を果たしていることがわかり、高等生物の発生、分化や疾病との関わりが明らかにされつつある。

【引用文献】

- 1) Soll D. et al. (1965) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 54, 1378-1381.
- 2) Khorana H.G. (1979) Science, 203, 614-625.
- 3) Ikehara M. et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 5956-5960.
- 4) Miura K. et al. (1986) Jpn. J. Can. Res. 77, 45-51.
- 5) Vassilyev D.G. et al. (1995) Cell, 83, 773-782.
- 6) Ohtsuka E. et al. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 5493-5497.
- 7) Koizumi M. et al. (1989) Nucleic Acids Res. 17, 130-142.
- 8) Komatsu Y. et al. (1994) J. Am. Chem. Soc. 116, 3692-3696.

がんエピゲノム研究による病態解明と臨床応用

○鈴木 拓

札幌医科大学・医学部・分子生物学講座

【要旨】

DNA メチル化に代表されるエピジェネティクス異常は、ほぼあらゆるがんに見られる現象であり、CpG アイランドにおける局所的な高メチル化と、ゲノム全体の低メチル化の二面性がある。遺伝子プロモーター領域の CpG アイランド高メチル化は、遺伝子サイレンシングのメカニズムとして重要であり、メチル化の標的は古典的ながん抑制遺伝子のみならず、細胞周期・増殖シグナル・アポトーシス・浸潤・転移などがんに関わるあらゆるプロセスに関わる遺伝子、さらにはノンコーディング RNA 遺伝子など多岐にわたる。がん化は遺伝子変異・増幅・欠失などのジェネティックな変化と、エピジェネティックな変化の両者が蓄積することで進展すると考えられているが、特に多数の CpG アイランドメチル化を示す一群を CpG アイランドメチル化形質(CpG island methylator phenotype, CIMP)と呼ぶ。CIMP 陽性がんはまず大腸がんにおいて報告され、その後、様々ながんにおいてその存在が認められている。さらに近年では、血液腫瘍や脳腫瘍において TET ファミリーや IDH ファミリーの遺伝子変異がメチル化異常の原因である可能性が示され、注目されている。本講演では主に大腸における CIMP がんに関して、分子生物学的および臨床病理学的な相関について我々の最近の知見を紹介したい^{1,2)}。

また DNA メチル化は生検検体や、血液・尿・洗浄液などの微量検体からも安定して検出可能であり、バイオマーカーとしての応用が期待されている。我々はこれまで、機能性ノンコーディング RNA であるマイクロ RNA をコードする遺伝子もまた、がんにおいて CpG アイランドメチル化によりサイレンシングされることを報告した³⁾。その中でも miR-34b/c 遺伝子は、大腸がん、胃がんをはじめ様々ながんにおいてメチル化が報告されており、重要ながん抑制遺伝子であると考えられている⁴⁾。我々は miR-34b/c 遺伝子のメチル化が、大腸がん浸潤予測や、胃がんリスクマーカーとなりうることを提示した⁵⁾。また、膀胱がんにおいてエピジェネティックにサイレンシングされるマイクロ RNA 遺伝子を同定し、尿中から検出される DNA メチル化が膀胱がん診断マーカーなりうることを報告している⁶⁾。本講演では、これら最近の取り組みについて紹介する。

【参考文献】

- 1) Yamamoto E., Suzuki H., et al. Molecular dissection of premalignant colorectal lesions reveals early onset of the CpG island methylator phenotype. (2013) *Am. J. Pathol.*, 181, 1847-1861.
- 2) Sawada T., Yamamoto E., Suzuki H., et al. Association between genomic alterations and metastatic behavior of colorectal cancer identified by array-based comparative genomic hybridization. (2013) *Genes Chromosomes Cancer*, 140-149.
- 3) Suzuki H., et al. Genome-wide profiling of chromatin signatures reveals epigenetic regulation of microRNA genes in colorectal cancer. (2011) *Cancer Res.*, 71, 5646-5658.
- 4) Toyota M., Suzuki H., et al. Epigenetic silencing of microRNA-34b/c and B-cell translocation gene 4 is associated with CpG island methylation in colorectal cancer. (2008) *Cancer Res.*, 68, 4123-4132.
- 5) Suzuki H., et al. Methylation-associated silencing of microRNA-34b/c in gastric cancer and its involvement in an epigenetic field defect. (2010) *Carcinogenesis*, 31, 2066-2073.
- 6) Shimizu T., Suzuki H., et al. Methylation of a panel of microRNA genes is a novel biomarker for detection of bladder cancer. (2013) *Eur. Urol.*, 63, 1091-1100.

細胞機能とシグナル伝達の蛍光イメージング

○大場雄介

北海道大学・大学院医学研究科・細胞生理学分野

【要旨】

下村脩博士によって、*Aequorea victoria* の発光器官から緑色蛍光タンパク質 GFP (green fluorescent protein) が発見され、1992 年にその cDNA が単離されて以来、生細胞イメージングは生物学研究の必須ツールになっている。GFP は cDNA の細胞導入のみで、生理的環境下での目的タンパク質の局在や局在変化を可視化し、種々のカラーバリエーションが入手可能な現在では複数のタンパク質の挙動の同時観察も可能である。

GFP はタンパク質の局在や動態のみならずタンパク質の質的変化、つまりタンパク質間相互作用・構造変化等の時間的・空間的な変化の解析も可能にする。我々はフェルスター共鳴エネルギー移動 (FRET, Förster resonance energy transfer) や蛍光蛋白質再構成法 (BiFC, bimolecular fluorescence complementation) 等の技術を用いて、低分子量 G 蛋白質 Ras が生きた細胞内の「いつ、どこで、どの様な」振る舞いをするかを明らかにしてきた (1,2)。また、細胞内の Ras 活性化が活性化因子により時間的な制御を、不活性化因子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)。これら技術におけるキーである「定量解析に資する顕微鏡画像の取得」を正しく行えば、イメージングは従来の実験系に比べ非常に高感度かつ低ノイズの解析手法となりうる。実際我々は、このアドバンテージを生かした新しい診断技術を開発し、実臨床における GFP の新たな活躍の場を模索するプロジェクトを遂行中である (3)。

また、BiFC 法を用いた Ras と標的分子の複合体の細胞内局在を追跡し、Ras と phosphoinositide 3-kinase (PI3K) の複合体が特異的かつ増殖因子刺激依存的に細胞膜からエンドゾームへ移行することを見出し、エンドゾーム上での PI3K 活性化には Ras が必要であることを発見した (2)。さらに、この Ras による PI3K のエンドゾーム移行と活性化がクラスリン非依存性エンドサイトーシスによる物質取り込みと、インフルエンザなどエンドサイトーシスを介して感染するウイルスの宿主細胞への侵入を制御することを見出した (4)。そこで、インフルエンザウイルスによる Ras 活性化の分子メカニズムを探索したところ、感染直後に生じる複数回に渡るカルシウム濃度の上昇を FRET- Ca^{2+} センサーである Cameleon を用いて捉えることができた。さらに Ca^{2+} は、Ras-PI3K 経路を介したクラスリン依存性エンドサイトーシスの制御以外にも、RhoA を介したクラスリン依存性エンドサイトーシスを介するウイルス粒子の取込制御にも関与することが明らかになった。一方、予想に反して優勢劣性型 RhoA の発現はウイルス感染依存的 Ca^{2+} 濃度上昇を消失させたことから、RhoA は Ca^{2+} の下流のみならず上流でも機能していると考えられた。以上より、インフルエンザウイルス感染をモデルに、 Ca^{2+} を中心としたエンドサイトーシスを制御する一連のシグナルネットワークを同定した。当日はこれら具体的な実験例を提示しながらイメージング手法の持つ可能性と今後のについても議論したい。

【参考文献】

- 1) Y. Ohba, K. Kurokawa and M. Matsuda. (2003) EMBO J., 22, 859-869.
- 2) K. Tsutsumi, Y. Fujioka, M. Tsuda, H. Kawaguchi and Y. Ohba. (2009) Cell. Signal., 21, 1672-1679.
- 3) T. Mizutani, T. Kondo, S. Darmanin, M. Tsuda, S. Tanaka, M. Tobiume, M. Asaka and Y. Ohba. (2010) Clin. Cancer Res. 16, 3964-3975.
- 4) Y. Fujioka, M. Tsuda, T. Hattori, J. Sasaki, T. Sasaki, T. Miyazaki and Y. Ohba. (2011) PLoS One, 6, e16324.

総説講演 要旨

一般講演 要旨

コンドロイチン硫酸/デルマタン硫酸の生合成に関わる酵素の変異による骨・皮膚疾患の糖鎖生物学的研究

○水本秀二¹, 中島正宏², Thomas Müller³, 三宅紀子⁴, Indrajit Suresh⁵, 古川諒¹, 小松由枝¹, 松本直通⁴, Andreas R. Janecke³, 池川志郎², 菅原一幸¹

¹北海道大学大学院・先端生命科学研究院、²理化学研究所・骨関節疾患研究チーム、³Department of Pediatrics I, Innsbruck Medical University, Austria、⁴横浜市立大学・医学研究科・遺伝学、⁵Jagadguru Sri Shivarathreeshwara Univ. Hospital, India

【要旨】

コンドロイチン硫酸/デルマタン硫酸(CS/DS)は、特定のコアタンパク質のセリン残基に共有結合した直鎖状の多糖鎖で、プロテオグリカンの形で動物細胞表面や細胞外マトリックスに普遍的に存在する。最近我々や他のグループの研究から、CS/DSの生合成に関わる糖転移酵素や硫酸基転移酵素の変異がヒトの遺伝性の骨・皮膚疾患を引き起こすことが明らかになってきた¹⁾。以前我々は、CS/DSの合成に関わる酵素(コンドロイチン 6-O-硫酸基転移酵素-1、デルマタン 4-O-硫酸基転移酵素-1、グルクロン酸転移酵素-I)をコードする遺伝子変異によって、それぞれ脊椎骨端異形成症(オマーン型)、エーラス・ダンロス症候群(古庄型)、ラーセン症候群を発症することを見出した²⁻⁶⁾。

今回、関節弛緩を伴う脊椎骨端骨幹端異形成症 I 型 (SEMD-JL1) が CS/DS とコアタンパク質とを橋渡しする四糖結合領域(グルクロン酸-ガラクトース-ガラクトース-キシロース)の 2 番目のガラクトース残基の生合成に関わるガラクトース転移酵素-II をコードする *B3GALT6* の変異によって発症することを見出した⁷⁾。SEMD-JL1 は、脊柱の変形や関節の脱臼など、重度の骨格異常を起こす遺伝性難治疾患である。全エクソーム解析の手法を基盤として、計 7 家系の患者の遺伝子変異を検索したところ、患者はすべて *B3GALT6* 遺伝子の複合ヘテロ接合性変異を持っていることがわかった。変異型の組換えタンパク質(S65G, P67L, D156N, R232C, C300S)を発現させ、ガラクトース転移活性を測定したところ、野生型のタンパク質の酵素活性と比較して、これらの変異タンパク質では有意にその活性低下が観察された⁷⁾。さらに、特徴的な顔貌、皮膚過伸展、筋緊張の低下を特徴とするエーラス・ダンロス症候群(早老型)の病像と SEMD-JL1 が重複していることから、本患者の *B3GALT6* 遺伝子を解析した結果、SEMD-JL1 と同様に *B3GALT6* 遺伝子の複合ヘテロ接合性変異を見出した⁷⁾。また、DS の生合成に関わる DS エピメラーゼ(DSE)の変異によって、エーラス・ダンロス症候群(musculocontractural type)が発症することも見出した⁸⁾。野生型の DSE と比較して変異型の DSE (S268L)は、顕著に酵素活性が低下していた。さらに患者由来の皮膚の線維芽細胞では DS の合成量も低下していた。

以上の研究から、*B3GALT6* と DSE の機能低下による GAG の合成不全が骨、皮膚、筋など結合組織を広くに犯す一群の疾患を引き起こすことがわかった。今後、*B3GALT6* と DSE の生体内での機能のさらなる解析を通じて、これらの疾患の発症の分子メカニズムの解明、新たな治療法の開発を目指していきたい。

【参考文献】

- 1) Mizumoto *et al.* (2013) *J Biol Chem*, **288**, 10953-10961; 2) Thiele *et al.* (2004) *Proc Natl Acad Sci USA*, **101**, 10155-10160; 3) van Rooij, Mizumoto *et al.* (2008) *Am J Med Genet*, **146**, 2376-2384; 4) Tuysuz, Mizumoto *et al.* (2009) *Clin Genet*, **75**, 375-383; 5) Miyake, Kosho, Mizumoto *et al.* (2010) *Hum Mutat*, **31**, 966-974; 6) Baasanjav, Al-Gazali, Hashiguchi, Mizumoto *et al.* (2011) *Am J Hum Genet*, **89**, 15-27; 7) Nakajima, Mizumoto *et al.* (2013) *Am J Hum Genet*, published online (doi: 10.1016/j.ajhg.2013.04.003); 8) Müller, Mizumoto *et al.* (2013) *Hum Mol Genet*, published online (doi:10.1093/hmg/ddt227).

サーファクタント蛋白質 A および D の EGF シグナル制御を介した抗腫瘍作用

○長谷川喜弘^{1,2}、高橋素子¹、有木茂¹、高宮里奈¹、上原康昭^{1,2}、橋本次郎^{1,3}、高橋弘毅²、黒木由夫¹

¹札幌医科大学・医学部・医化学講座、²呼吸器・アレルギー内科学講座、³泌尿器科学講座

【要旨】

サーファクタント蛋白質 A (SP-A) および D (SP-D) は C 型レクチンのコレクチンサブグループに属し、肺胞 II 型細胞で合成され、肺胞腔中に分泌される。特定の病原微生物と結合したり、マクロファージと相互作用を有することが知られており、自然免疫において重要な役割を果たしている。受容体型チロシンキナーゼのひとつである上皮成長因子受容体 (EGFR) は、様々ながん細胞に過剰発現しており、現在がん治療の標的分子のひとつとなっている。本研究では SP-A と SP-D が EGF シグナルを制御し抗腫瘍作用をもたらす可能性について検討した。

A549 肺腺がん細胞と EGFR を強制発現させた CHOK1 細胞を用いて、SP-A、SP-D 存在下で EGF 刺激を行った所、EGFR リン酸化、Erk リン酸化、Akt リン酸化が抑制された。transwell double chamber を用いた検討では SP-A、SP-D 存在下では EGF 刺激による細胞遊走・浸潤が抑制された。WST-1 assay による解析では SP-A、SP-D により細胞増殖が抑制された。¹²⁵I-EGF を用いた検討により SP-D が EGF-EGFR 結合、特に high-affinity の結合を阻害することが明らかになった。EGFR の細胞外ドメイン(soluble EGFR = sEGFR) の安定発現細胞(Flp-In CHO 細胞)を確立し、培養上清に分泌された sEGFR をカラムクロマトグラフィーで精製した。ELISA、表面プラズモン共鳴センサーによる検討で sEGFR と SP-D が結合することが明らかになった。この結合は Ca^{2+} 依存性であり、mannose 添加によって阻害され、N-glycopeptidase F を用いて糖鎖を切断した sEGFR には SP-D は結合しなかった。

以上の結果から、SP-A および SP-D は A549 細胞と EGFR 過剰発現 CHOK1 細胞の EGFR のリン酸化を抑制することにより細胞内シグナルを抑制し、増殖・遊走・浸潤を阻害すると考えられた。特に SP-D は Ca^{2+} 依存性に EGFR の糖鎖に結合し、EGF-EGFR 結合を阻害すると考えられた。

がん関連糖鎖シアリル Tn 糖鎖抗原発現によるインテグリンを介したがん微小環境制御機構

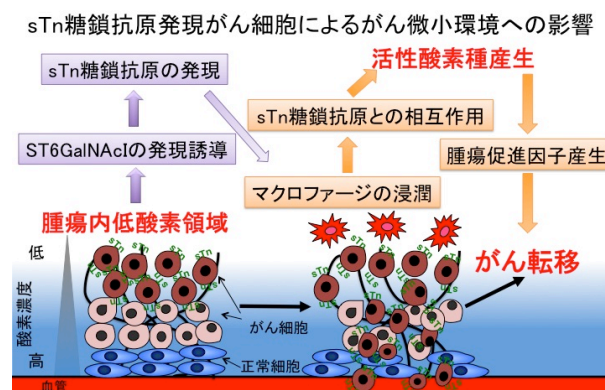
○高宮里奈^{1,2}、大坪和明²、高松真二²、安形高志²、高橋素子¹、黒木由夫¹、谷口直之²

¹札幌医科大学・医学部・医化学講座

²理化学研究所・グローバル研究クラスター・疾患糖鎖研究チーム

【要旨】

がん細胞の低酸素応答はがんの悪性度と密接に関係していることが報告されているが、その詳細な分子機構や意義はほとんど解明されていない。また、シアリルTn (sTn)糖鎖抗原はがん患者の予後の不良と相関する腫瘍マーカーとして臨床の現場で用いられているが、その生物学的機能は不明であった。これまでに我々は、腫瘍内部の低酸素環境が、がん特異的な糖鎖シアリルTn (sTn)抗原の合成酵素であるST6GalNAc-I (ST6)の発現を誘導することを見出し、sTn糖鎖抗原の $\alpha 2 \beta 1$ インテグリン上への発現がコラーゲン依存性のがん細胞の浸潤を上昇させ、がん細胞の血行性転移の直接的な原因となることを明らかにしてきた(Ohtsubo K, et al., 投稿準備中)。今回我々は、sTn糖鎖抗原がマクロファージを中心としたがん微小環境に関与するか検討を行った。マウスを用いたがん細胞皮下移植実験において、腫瘍内部のsTn糖鎖抗原発現領域には、特異的にマクロファージの浸潤が認められた。そこで、ST6高発現肺がん細胞株(H157(ST6))と単球細胞株(THP-1)の共培養を行なったところ、THP-1からの活性酸素種産生を介した腫瘍形成因子(IL-8、TNF- α)の産生やMMP-9 活性亢進、さらに単球の分化亢進が認められた。次に、がん細胞と単球との細胞間相互作用に細胞間の接着の亢進が関与しているか、H157(ST6)上でTHP-1をローリングさせ解析を行なった。すると、H157(ST6)上での白血球のローリング速度の優位な低下が認められたが、ST6高発現 $\alpha 2$ インテグリン欠損株(H157(ST6/ $\alpha 2$ Integrin(-)))では認められなかった。この知見から、sTn糖鎖抗原の $\alpha 2 \beta 1$ インテグリン上への発現が、単球との相互作用に関与していると考え、H157(ST6/ $\alpha 2$ Integrin(-))-THP-1細胞の共培養実験を行なった。細胞間接着の低下と同様に、H157(ST6)との共培養で認められたTHP-1からの腫瘍促進因子の産生やMMP-9 活性亢進は、H157(ST6/ $\alpha 2$ Integrin(-))との共培養では優位に低下していた。以上の結果より、 $\alpha 2 \beta 1$ インテグリン上へのsTn糖鎖抗原の発現は、がん細胞自身の特性に関与するだけでなく、腫瘍組織に浸潤した単球やマクロファージに腫瘍随伴マクロファージ様の変化をもたらし、腫瘍形成に関わる因子群を産生させ、がん微小環境の形成・改変に影響を与えている可能性が示唆された。



Cuprizone 誘発性脱髄モデルからみた再ミエリン化におけるミクログリアの役割

○田中達英、村上公一、板東良雄、吉田成孝
旭川医大・医・解剖・機能形態学

【要旨】

神経細胞を取り巻くミエリンの崩壊は重篤な神経障害を引き起こす。しかしながら、脱髄やミエリン再生の調節機構は未だ不明な点が多い。我々は化学脱髄モデルを用いてミエリン再生機序の解明を目指している。cuprizone 含有飼料を4週間マウスに与えると脳梁に脱髄を誘導することができ、ミエリン構成因子である MBP や CNPase、成熟オリゴデンドロサイトのマーカーである CC1 の発現が顕著に減少した。一方、脳梁におけるミクログリアは脱髄とともに徐々に集積し、炎症性サイトカインや神経栄養因子発現量が上昇する。そこで、ミクログリアのミエリン再生における役割を検討するため、cuprizone を4週間投与し、脳梁で脱髄を惹起させた後、通常飼料に戻してミエリン再生を誘導する段階でミクログリアの活性化を阻害する minocycline を投与した。その結果、脱髄によって減少した CC1、MBP、CNPase の発現はミエリン再生過程において回復するが、minocycline 投与群ではこれらの発現上昇が抑えられた。また、minocycline 投与群では毛様体神経栄養因子(CNTF)発現量が著しく減少した。更に、オリゴデンドロサイトの cell-line, CG-4 および初代培養細胞を用いた *in vitro* の実験で、CNTF が直接オリゴデンドロサイトの分化を誘導することを明らかにした。これらのことより、minocycline によって脱髄後のミクログリアにおける CNTF の発現が抑えられることで再ミエリン化が抑制されることが示唆された。

【参考文献】

- 1) Tanaka T., Murakami K., Bando Y. and Yoshida S. (2013) J. Neurochem., in press.

17q23 にコードされた PPM1D ホスファターゼ過剰発現による染色体不安定化

○中馬吉郎^{1,2}、藤田章弘¹、小笠原紗里²、小境夕紀¹、今川敏明^{1,2}、坂口和靖^{1,2}

¹北海道大学大学院・総合化学院・総合化学専攻・生物化学研究室、

²北海道大学大学院・理学研究院・化学部門・生物化学研究室

【要旨】

多様な悪性腫瘍で頻繁に観察される染色体不安定化は、染色体の欠損、転座、異数性などに代表される染色体構造の異常である。p53 依存的に誘導される Ser/Thr ホスファターゼ PPM1D は、乳癌を含む多くの癌において遺伝子増幅および過剰発現が見られ、PPM1D を過剰発現している乳癌由来 MCF7 細胞では、染色体不安定化が見られることが知られている¹⁻³⁾。一方、2 本鎖 DNA を切断・結合することによりクロマチンのトポロジーを制御する TOP2A の機能不全が、染色体不安定性に関与することが報告されている。我々は、PPM1D 過剰発現細胞で見られる細胞癌化の分子機構の解明を実施しており、今回 PPM1D 過剰発現による TOP2A 活性制御を介した染色体不安定化機構について報告する。

まず、PPM1D の過剰発現およびノックダウンによる染色体安定性への効果を解析し、PPM1D 過剰発現が染色体の不安定化を引き起こすことを明らかにした（図 1）。次に、PPM1D が細胞内において TOP2A と相互作用することを示した。興味深いことに、過剰発現した PPM1D は染色体分離異常の際に見られる DNA bridge 上に存在し、TOP2A と共局在していた。さらに、PPM1D 過剰発現細胞では、内在性 TOP2A 活性の低下が見られたことから、PPM1D 過剰発現による TOP2A 機能阻害により染色体分離が阻害されていることが示唆された。一方、PPM1D 過剰発現細胞では TOP2A レベルの増加が見られ、その増加には PPM1D の酵素活性が必須であった。このように PPM1D 過剰発現細胞では TOP2A の増加と活性阻害が見られたことから TOP2A のリン酸化レベルを解析したところ、PPM1D の過剰発現により低リン酸化状態の TOP2A 量が顕著に増加していることが示された。これらの結果より PPM1D 過剰発現により低リン酸化 TOP2A 増加に伴う TOP2A 不活性化が生じ、最終的に染色体分離異常を引き起こすモデルを提唱した。



図 1. PPM1D 過剰発現による DNA bridge 形成

【参考文献】

- 1) Fiscella, M., Zhang, H., Fan, S., Sakaguchi, K., Shen, S., Mercer, W. E., Vande, Woude, G. F., O Connor, P. M., and Appella, E. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 94, 6048-6053.
- 2) Chuman, Y, Kurihashi, W, Mizukami, Y, Nashimoto, T, Yagi, H, Sakaguchi, K. (2009) J. Biochem., 145, 1-12.
- 3) Klein CA, Schmidt-Kittler O, Schardt JA, Pantel K, Speicher MR, Riethmüller G.. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96, 4494-4499.

糖尿病および高血糖状態の治療薬としてのグルカゴンアナログ探査

○浅田ゆかり、ThanThan Sint、西塔竜弥、落岩和樹、桑山秀人
帯広畜産大学・畜産学研究科・畜産生命科学研究部門

【要旨】

糖尿病治療に用いられる特効薬エキセナチド (Ex4) は、アメリカ毒トカゲの唾液毒から同定された 39 個のアミノ酸からなる GLP-1 受容体作動薬で、インスリンを分泌させる働きがある。糖代謝はグルカゴン関連ペプチドに深く関連しており、我々は、ウシを用いた研究においてグルカゴン (GcG) とオキシントモジュリン (Oxm) のインスリン分泌促進作用を見出し、GLP-1 と Ex4 がそれらの活性を阻害することを報告した¹⁻²⁾。そこで、今回は GcG と Ex4 の配列からなるキメラペプチドを合成し、高血糖状態の治療薬として使えるようなグルカゴンアナログを探索した。

図 1

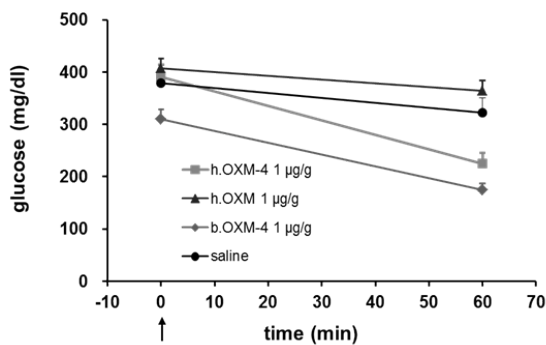


図 2

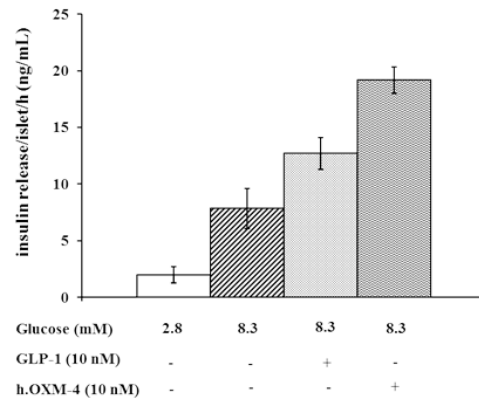


図 1 糖尿病モデルマウス db/db への投与と血糖値変化

図 2 キメラペプチドによるマウス膵島からのインスリン放出

GcG または Oxm の 2 残基を Ex4 と同一にした GcG4、Oxm4、GcG または GcG4 の C 末端に Ex4 の C 端 10 残基を延長した Gcd、Gcd4 をそれぞれ固相ペプチド合成した。これらをそれぞれ、ホルスタイン去勢牛 (3 ヶ月齢・8 頭) の頸静脈カテーテルから投与し (3-5 µg/kg)、120 分まで経時的に採血し、血漿中のインスリン濃度と血糖値を測定した。Gcd 投与では Gcg 投与の場合と類似のインスリン濃度変化が認められたが、Gcd4 投与では、2 分後にインスリン濃度が最大となり、GcG の場合とは逆に血糖値が減少し、Ex4 投与の場合と類似の効果が認められた。一方、Oxm4 投与では、Ex4 投与の場合と極めて類似した効果が認められた。これらの反芻動物における結果がヒト高血糖状態の処置に応用可能であることを確認するため、ウシにおいて薬効が高かった Oxm4 について、糖尿病モデルマウスへの腹腔内投与による血糖値の減少 (図 1) およびマウス膵島からのインスリン放出実験 (図 2) を実施した。その結果、Oxm4 は 2 型糖尿病治療薬として可能性が高いことが示唆された。

【参考文献】

- 1) ThanThan S., Asada Y., Saito T., Ochiiwa K., Zhao H, Yannaing S., and Kuwayama H. (2013) Domest. Anim. Endocrinol., 44, 70-80.
- 2) ThanThan S., Zhao H., Yannaing S., Kuwayama H. Diabetes 2012;61 (suppl 1): A689

Phosphorylations of RNAPII-CTD trigger two distinct pathways for Centromeric Silencing.

○梶谷卓也^{1,2}、Damien Hermand³、木村宏⁴、村上洋太¹

¹北海道大学大学院・理学研究院・化学部門・生物有機化学研究室

²京都大学大学院・医学研究科

³ナミュール大学

⁴大阪大学大学院・生命機能研究科

【要旨】

<研究背景>

ヘテロクロマチンは高度に凝集したクロマチン構造で、転写や組換えを抑制し、染色体分配、トランスポゾン抑制、テロメア保護などゲノムの安定性に重要である。分裂酵母において発見された RNAi 因子によるヘテロクロマチン形成と類似の転写抑制機構が高等真核生物においても報告されている。ヘテロクロマチンは RNA polymerase II (RNAPII) による転写を抑制する機能を持つが、一方で、分裂酵母では、RNAPII がセントロメア内で non-coding RNA (ncRNA) 転写を行う事が RNAi 因子によるヘテロクロマチン形成に必須であるという二面性を持つ。また、セントロメア由来 RNA は ncRNA として機能し、転写直後に核外輸送されることなく、mRNA とは異なった挙動を示す。過去の知見から、転写産物の ncRNA としての運命決定は転写と共役して起きると推察できるが、その分子機構は依然不明のままである。

<結果>

本研究では ncRNA の運命決定機構を解明するために、RNAPII のリン酸化に着目した。RNAPII の最大サブユニット Rpb1 は C 末端 (CTD) に YSPTSPS が 26 回繰り返す反復配列を持ち、転写と共役したリン酸化が起きることが知られている。CTD のリン酸化部位に Ala 変異を導入した S2A 株と S7A 株では遺伝子発現抑制の異常を示した。S7A 株では siRNA の合成能を失い、RNAi を介したヘテロクロマチン形成に異常が生じていた。詳細な解析から、S7 リン酸化はクロモドメインタンパク Chp1 と共調して新生 ncRNA をヘテロクロマチンに安定に保持 (on-chromatin retention) するために必要であると分かった。さらに Ser7 リン酸化と RNAi 因子がユークロマチン領域ではストレス応答遺伝子群の発現抑制に関与すること、この領域では双方向の転写が起きることを明らかにし、これまで分裂酵母ではヘテロクロマチン形成に特化していると思われていた RNAi の機能がユークロマチン上でも発現抑制に必要であることを示した。一方、S2A 株では、siRNA 合成能とヘテロクロマチン構造は正常であり、Ser2 リン酸化は RNAi-independent な RNA 分解経路による ncRNA の転写後抑制に必要であると推察される。

<結論>

上記の結果から、RNAPII-CTD の Ser2、Ser7 リン酸化は互いに独立した RNAi-dependent と RNAi-independent の 2 つの経路で遺伝子発現抑制を制御し、RNA の運命決定を仕分ける分子スイッチとして機能すると結論づけた。本研究は、遺伝子発現と RNA を介したクロマチン構造制御の研究において新奇の概念を提唱する報告である。

ポスター発表 要旨

癌抑制タンパク質 p53 の変異型-正常型間で形成されるヘテロ四量体の転写活性化能

○戸口 侑¹、今川敏明^{1,2}、坂口和靖^{1,2}

¹北海道大学大学院・総合化学院・総合化学専攻・生物化学研究室

²北海道大学大学院・理学研究院・化学部門・生物化学研究室

【要旨】

癌抑制タンパク質 p53 は 393 アミノ酸残基からなる転写調節因子であり、放射線や紫外線などの遺伝毒性ストレスに応答して活性化し、細胞周期停止やアポトーシスを誘導することで細胞癌化を抑制している¹⁾。悪性腫瘍において、p53 をコードする TP53 の遺伝子変異は最も高頻度にみられることが知られている。p53 の単量体と四量体は平衡状態にあり、p53 の四量体形成は機能発現に必須である。このため、p53 の生理的機能の正確な理解には、生理的なレベルの p53 発現量での解析が必要である。p53 の対立遺伝子が増変することによって変異型 p53 と正常型 p53 が共発現した場合、p53 は変異型-正常型間でヘテロ四量体を形成し、ドミナントネガティブ効果によって p53 の機能を抑制すると考えられている²⁾。しかしながら、このようなヘテロ多量体を形成するタンパク質の細胞内での構造や機能の解析は非常に困難であるため、実態は不明な点が多い(図)。我々は、p53 ヘテロ四量体に対する転写活性化能の解析により、p53 のヘテロ四量体形成を介した不活性化の閾値の解明や初期の段階における細胞癌化のメカニズムの解明を実施している。

今回、ヘテロ四量体形成による p53 の転写活性化能を解析するため、p53 量と p53 依存的転写活性化能を評価する新規システムを構築した。このシステムは、当研究室で開発した蛍光タンパク質によるレポーターシステム³⁾を基盤とし、より高感度に正常型および変異型 p53 量を定量可能である。変異型 p53 を青色蛍光タンパク質により、正常型 p53 を黄色蛍光タンパク質によって検出し、これら p53 タンパク質の四量体化を介した転写活性を赤色蛍光タンパク質により測定することで生細胞内での同時モニターが可能である。生細胞に変異型 p53 を一過的に導入し、さらに内在性レベルの正常型 p53 を誘導した結果、p53 の転写活性化能の低下が見られた。さらにこのデータに対し、正常型ホモ、変異型ホモおよび変異型-正常型ヘテロ四量体の形成量比を考慮した転写活性化能を解析するためのモデルでフィッティング解析した。その結果、非常に興味深いことに、正常型:変異型=3:1 のヘテロ四量体は実質的な転写活性化能を有することが示唆された。

本研究により、ヘテロ四量体 p53 タンパク質の不活性化の閾値や初期の細胞癌化のメカニズムについて新たな知見が得られることが期待される。

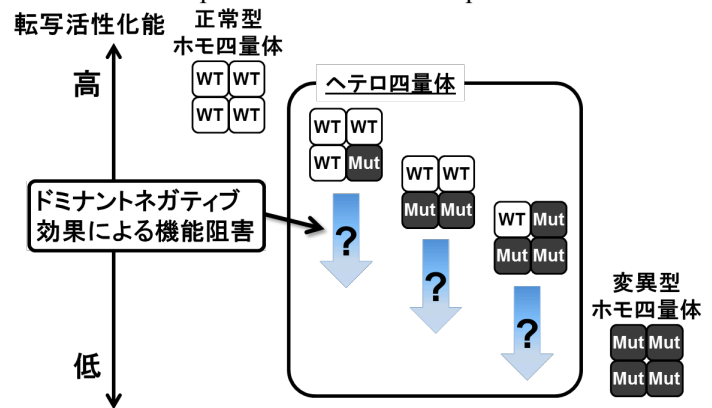


図 ヘテロ四量体化を介したドミナントネガティブ効果

【参考文献】

- 1) Zuckerman V., Wolyniec K., Sionov RV., Haupt S., Haupt Y. (2009) J. Pathol., 219, 3-15.
- 2) De Vries, A., Flores E., Miranda B., Hsieh H., Van Oostrom C., Sage J., and Jacks T. (2002). Proc. Natl. Acad. Sci., 99, 2948-2953.
- 4) Imagawa T., Terai T., Yamada Y., Kamada R., Sakaguchi K. (2009) Anal. Biochem., 387, 249-256

生細胞に対する新規な低分子蛍光プローブの開発

○田野 史¹・中馬吉郎^{1,2}・大澤 歩³・今川敏明^{1,2}・難波康祐^{3,4}・谷野圭持^{3,4}・坂口和靖^{1,2}

北海道大学大学院・総合化学院・総合化学専攻・¹生物化学研究室、³有機化学第二研究室

北海道大学大学院・理学院・化学部門・²生物化学研究室、⁴有機化学第二研究室

【要旨】

細胞における生体分子の局在化解析は、様々な疾患メカニズムの解明や生命現象の理解および創薬など幅広い分野において非常に重要であり、細胞内オルガネラを特異的に染色する蛍光化合物は極めて重要である。そのため、コンパクトな分子サイズで、多様な細胞内オルガネラを簡便かつ同時に染色可能な薬剤の開発が求められている。特に、細胞質全体を染色する化合物は、生細胞のダイナミックな挙動解析や他のオルガネラ標識剤との併用による細胞内局在化のより詳細な解析における極めて有効な標識試薬となる。新規蛍光化合物 1,3a,6a-triazapentalene (TAP) の誘導体はコンパクトな蛍光分子で、置換基によって蛍光波長を多様に変換することが可能である¹⁾。

本研究では、2-phenyltriazapentalene を共通構造とした TAP 誘導体による、新規な生細胞染色法の開発を実施した (Fig.1)。TAP 誘導体は細胞培養液への添加のみによって、生細胞の細胞質ならびに顆粒状のオルガネラを迅速に染色することが明らかとなった (Fig.2)。また、各誘導体の異なる置換基により、青色～赤色までの複数の蛍光色で細胞を染色することに成功した。さらに、TAP 誘導体の生細胞への毒性は非常に低く、生細胞の解析に極めて有用であることが示された。オルガネラを特定するため、既存のオルガネラ染色剤を用いて同時標識を行ったところ、TAP 誘導体が局在化している顆粒がリソソームである可能性が示された。また、細胞核染色剤である Hoechst33342 や Acridine Orange との併用により、細胞質と細胞核の染め分けにも成功した。詳細な解析に用いた A549 細胞のみならず、HeLa 細胞、HEK293 細胞など種々の細胞においても TAP 誘導体は同様の染色パターンを示した。TAP 誘導体のソルバトクロミズム効果を利用して、極性溶媒と非極性溶媒それぞれの観察条件で蛍光強度を比較した結果、TAP 誘導体は細胞内の疎水性環境下に局在化することが示唆された。以上の結果より、TAP 誘導体は、多様な細胞に対して使用可能であり、細胞質染色のための有効な蛍光プローブであることが示された。

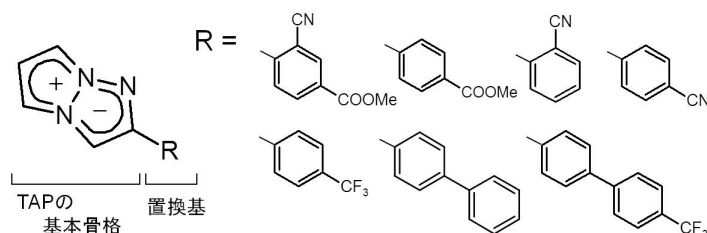


Fig.1 TAP 化合物の基本骨格と各誘導体の置換基の構造

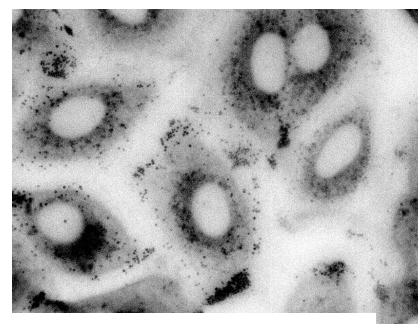
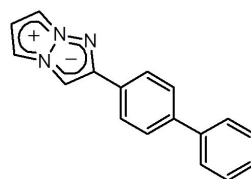


Fig.2 TAP-4PH による生細胞の染色

【参考文献】

- 1) Namba K., Osawa A., Ishizaka S., Kitamura N., and Tanino K. (2011) *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 11466-11469.

エピゲノム変異にともなう個体形質の「ゆらぎ」とその制御メカニズムの解明

○反田真登¹、島田篤^{2,3}、平内孝紘¹、近重裕次⁴、高畑信也³、村上洋太³

¹北海道大学大学院・総合化学院・総合化学専攻・生物有機化学研究室

²Cold Spring Harbor Laboratory

³北海道大学大学院・理学研究院・化学部門・生物有機化学研究室

⁴独立行政法人情報通信研究機構

【要旨】

生物の遺伝媒体は DNA の塩基配列に留まらず、DNA のメチル化やヒストンの化学修飾に加え、それらに依拠する高次クロマチン構造もまた次世代に伝播する。ゲノム DNA を主体としたこれらの包括的遺伝情報媒体はエピゲノムと呼ばれる。

真核生物の遺伝子発現はクロマチンの凝集・弛緩によって発生段階やストレスに応答して、ダイナミックな制御を受ける。特に、凝集したクロマチン構造をヘテロクロマチンといい、この領域の遺伝子は高度に抑制される。特に、ヒストン H3 の 9 番目のリジン残基のメチル化(H3K9me)は、ヒトから分裂酵母まで保存された普遍的ヘテロクロマチンマーカーのひとつである。

分裂酵母 Epe1 は脱メチル化触媒機能を持つ JmjC ドメインを保有しており、H3K9me の脱メチル化酵素と推測されているが、生化学的な活性証明に成功例がなく、生体内における機能は未だ明らかになっていない^{1),2)}。しかし、ヘテロクロマチン領域にリポーター遺伝子・*ade6* が挿入された細胞において *epe1* 遺伝子を欠損させると、赤白まだらのコロニーが出現することがわかった³⁾。白いコロニーはヘテロクロマチンによって、本来は抑制された状態にある *ade6* 遺伝子が発現していることを意味し、ヘテロクロマチンの崩壊を示す。一方、赤いコロニーは *ade6* が抑制されたままの状態であることを意味する。同一の生育環境下にもかかわらずクローン間で表現型がばらつく現象を「ゆらぎ」といい、Epe1 はその抑制因子と考えられる。

epe1 欠損によって出現した赤と白のコロニーをそれぞれ継代すると、赤いコロニーからは赤白まだら、白いコロニーからは安定的に白色のコロニー(*epe1*ΔWhite 株)が現れた。*epe1*ΔWhite 株に対してゲノムワイドなトランスクリプトーム解析を行うと、23kbp に及ぶ転写抑制的クラスター領域が出現した。この領域は *ade6* の上流で赤色代謝産物の合成を制御する遺伝子・*ade5* を含み、本来は脱抑制状態にある。そして、クロマチン免疫沈降(ChIP)法により、この領域は H3K9me が過度に蓄積し、異所的にヘテロクロマチン化されていたことが明らかになった。しかし、依然としてその根本的な発生原理は不明である。本会では、予期しないエピゲノムの不活性化と Epe1 によるその制御機構について議論したい。

【参考文献】

- 1) Ayoub N., Noma K., Isaac S., Kahan T., Grewal S.I., and Cohen A. (2003) Mol Cell Biol.
- 2) Zofall M., and Grewal S.I., (2006) Mol Cell.
- 3) Treweek S.C., Minc E., Antonelli R., Urano T., and Allshire RC. (2007), EMBO J.

ヒト PPM1 ファミリーホスファターゼのペプチド基質に対するリン酸化 Ser/Thr 選択性

○白幡祐貴子¹、中馬吉郎^{1,2}、清田雄平¹、岩室良²、坂口和靖^{1,2}

¹北海道大学大学院・総合化学院・総合化学専攻・生物化学研究室、

²北海道大学大学院・理学研究院・化学部門・生物化学研究室

【要旨】

PPM1 ファミリーは Mn^{2+}/Mg^{2+} 依存的 Ser/Thr ホスファターゼであり、ヒトでは 12 種類のアイソフォームが存在する。PPM1 ファミリーは様々なシグナル伝達経路に関与していることが知られており、その遺伝子異常による機能不全や亢進が、癌や低血圧症などの様々な疾患に関与することが報告されている。PPM1 ファミリーにおいて、活性中心近傍に存在する金属キレート部位やリン酸結合部位の配列は高度に保存されている。一方、我々は各アイソフォームの固有のインサート領域や触媒ドメイン外の領域を見出しており、これらの領域がタンパク質間の相互作用や基質認識に重要な役割を果たしていると考えられる。PPM1 遺伝子の異常によるシグナル伝達不全の機構解明には、各アイソフォームの標的タンパク質の同定やアイソフォーム特異的阻害剤の開発が必須であり、PPM1 ファミリーの基質配列特異性の解明が極めて重要である。そこで、本研究では「PPM1 ファミリーのペプチド基質に対するリン酸化 Ser/Thr 選択性の解明」を目的とした。

今回、生体内基質であるタンパク質由来の多様なリン酸化ペプチドを化学合成し、PPM1 ファミリー (PPM1A, PPM1B, PPM1D, PPM1E, PPM1F, PPM1G, PPM1H, PPM1K, PPM1L, ILKAP) に対する脱リン酸化活性を解析した。その結果、各アイソフォームが、脱リン酸化部位であるリン酸化 Ser およびリン酸化 Thr に対して異なる選択性を示すことが明らかとなった。速度論的解析を行ったところ、PPM1A および PPM1B は高いリン酸化 Thr 選択性を示す一方で、PPM1G や PPM1L のリン酸化 Thr 選択性は非常に低いことが明らかとなった。アライメント解析およびホモロジーモデリング解析より、高いリン酸化 Thr 選択性を示すアイソフォームは、活性中心近傍に特徴的な疎水性ポケットを有することが示唆された。そこで、この疎水性ポケットを充填するように置換した PPM1A 変異体を作製し、酵素活性測定解析を行った結果、変異体のリン酸化 Thr 選択性は減少した。以上より、この活性部位の疎水性ポケットがリン酸化 Ser/Thr 選択性に重要な役割を果たすことが強く示唆された (図 1)。

本研究で得られた結果は、各 PPM1 ホスファターゼに対する生体内基質の同定やアイソフォーム特異的な阻害剤の開発において重要な知見を与えることが期待される。

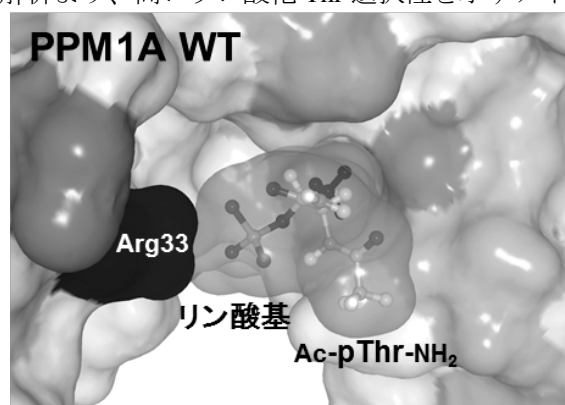


図 1 PPM1A の活性中心に存在する疎水性ポケット

【参考文献】

- 1) Chuman, Y., Kurihashi, W., Mizukami, Y., Nashimoto, T., Yagi, H., Sakaguchi, K. (2009) J. Biochem., 145, 1-12.
- 2) Lammers, T. and Lavi, S. (2010) Arthritis Res Ther., 12, R151.
- 3) Janairo, J.I., Iwamuro, R., Kaya, S., Yagi, H., Chuman, Y., Imagawa, T., Sakaguchi, K., (2012) Peptide Science 2011, 245-246.

細胞膜モデル「ナノディスク」を用いたハロロドプシンの分光学的解析

○鈴木研士郎¹・山本愛弓¹・塚本卓²・小橋川敬博³・内田毅^{1,4}・稲垣冬彦³・出村誠²・石森浩一郎^{1,4}

¹北海道大学大学院・総合化学院・生物化学コース・構造化学研究室、

²北海道大学大学院・生命科学院・生命融合科学コース・生物情報解析科学研究室

³北海道大学大学院・先端生命科学院・構造生物科学研究室

⁴北海道大学大学院・理学院・化学部門・構造化学研究室

【要旨】

高度好塩菌由来の膜結合タンパク質ハロロドプシン(HR)は、光照射による連続的な構造変化で Cl⁻の能動的膜間輸送を行う光駆動型 Cl⁻ポンプ機能を有し、その生理的機能に興味を持たれているばかりではなく、近年は光駆動型陽イオンポンプと共に神経細胞に発現させることによって、信号伝達の光制御への応用も期待されている。これまで膜結合タンパク質である HR の構造、機能解析は、界面活性剤存在下で可溶化して研究が進められていたが、細胞膜とは異なった界面活性剤を用いた実験のため、生体内での挙動とは異なっている可能性が指摘されている。一方、代表的な細胞膜モデルであるリポソームでは、生体内と同様な環境下での測定が期待されるが、詳細な構造、機能情報を与える分光学的測定においては、その巨大な分子サイズにより光散乱が起こるため、十分な測定が行われてはいない。

そこで近年、新たな細胞膜モデルとして、細胞膜と同様な脂質二重膜で、さらに分子サイズが小さいため光散乱が生じない「ナノディスク」が開発¹⁾され、膜結合タンパク質の新たな研究手法として注目されている。しかし、ナノディスクに使用する脂質の選択においては、脂質と再構成するタンパク質との相互作用に関する情報が十分検討されておらず、生体内環境を十分反映するナノディスクの作製法は確立されてはいない。そこで本研究では異なる脂質を用いて HR をナノディスクに再構成し、その構造や機能への影響を検討することで、細胞膜モデルとしてより生体内に近い環境を与えるナノディスクの開発とこのようなナノディスクを用いたナノディスク化 HR の構造、機能解析を試みた。

生体内と同じ環境に再構成されたナノディスク化 HR を作製するため、アシル鎖の長さや二重結合の数が異なる DMPC、POPC、DOPC を用いることで、HR の膜貫通部分と脂質疎水基との接触面積を変化させ、その機能や構造への影響を追跡した。それぞれの脂質でのナノディスク化条件を検討したところ、POPC ではナノディスク化タンパク質 MSP と HR の比が HR:MSP:POPC=0.5:1:30 の場合に効率的にナノディスク化 HR が得られ、DMPC では POPC よりも脂質比が 1/6、DOPC では脂質比が 1/15 の場合に最適条件となることが明らかになった。それぞれの脂質で再構成したナノディスク化 HR を用いて、吸光測定と CD から発色団周辺の構造を解析し、フラッシュフォトリシスによる光サイクル各中間体を観測したところ、従来の界面活性剤を用いた場合とは異なった結果が得られ、より生体内環境に近い条件での構造機能解析が可能となった。

【参考文献】

- 1) Bayburt T., Grinkova Y., and Sligar S., (2002) Nano Lett., Vol. 2, No. 8, 853-856

C 型レクチン様受容体 Mincle の糖脂質認識機構

○古川敦^{1,2}、上敷領淳³、岡部由紀¹、神田涼⁴、豊永憲司⁵、森大輝⁵、三宅 靖延⁵、山崎晶⁵、尾瀬豊之¹、前仲勝実^{1,2}

¹ 北大・院・薬 ² CREST ³ 福山大・薬 ⁴ 北大・院・生命 ⁵ 九大・生医

【要旨】

C 型レクチン様受容体(CLR)は免疫細胞表面に存在し、パターン認識型受容体として働くことが知られている。近年、これら CLR は“レクチン”という名前から想像する以上に多岐に渡る分子（核酸、タンパク質、糖脂質）に認識することが明らかになりつつある。その中で、マクロファージで発現する Mincle(Macrophage inducible C-type lectin)は結核菌細胞壁に存在する糖脂質 TDM (Trehalose 6,6-dimycolate)と直接結合し、マクロファージ活性化することが明らかになっている。TDM を構成するトレハロースやミコール酸単独ではその活性化が誘導されないことから、糖脂質を特異的に認識していると考えられているが、その分子認識機構は明らかになっていない。本研究では、Mincle と他の CLR の構造を比較し、その基質特異性を明らかにすることを目的とした。

Mincle の細胞外ドメインを大腸菌により封入体として作成し、巻き戻しにより組換え蛋白質を調製した。これを結晶化することに成功し、X 線構造解析により立体構造を決定した。その結果、Mincle は他の CLR に比べ糖鎖認識領域が広く露出しており、二糖である TDM を許容するスペースが存在していた。さらには、糖鎖認識近傍に疎水性残基を多く含むループが存在しており、このループが TDM の脂質部位の認識に関与している可能性が考えられた。現在、各種変異体作製を行い予想される糖鎖認識モデルの検証を進め、分子機構の解明を目指している。

緑膿菌由来 MurD Ligase の発現・精製および結晶化

○笈川あずさ¹、北辻千展¹、福原秀雄¹、喜多俊介¹、小椋賢治²、稲垣冬彦²、尾瀬農之¹、前仲勝実¹

¹北海道大学大学院・薬学研究院・生体分子機能

²北海道大学大学院・先端生命科学研究院・構造生物学

【要旨】

細菌の細胞壁を形成するペプチドグリカン、N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) と、N-アセチルムラミン酸 (MurNAc) が β 1-4 結合したヘテログリカン鎖が MurNAc の乳酸残基でオリゴペプチド架橋された構造をもつ。このペプチド部分のアミノ酸配列は細菌の種類によって異なり、リボソームで合成されるのではなく、細胞質で ATP 依存的な 4 つの酵素 MurC、MurD、MurE、MurF が L-Ala、D-Glu、meso-DAP (グラム陽性菌では L-Lys)、D-Ala-D-Ala を順に UDP-MurNAc に付加する反応を触媒する。これらの酵素は基質アミノ酸を認識する特異性が高く、また細胞壁の合成阻害剤はヒトへの毒性が低いために、ペニシリンをはじめとする多くの抗菌薬が開発されてきた。

我々は UDP-MurNAc-L-Ala に D-Glu の付加反応をおこなう MurD を標的とする阻害剤を開発することを目指し、近年多剤耐性菌の発生が問題となっているグラム陰性好気性桿菌である緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 由来の MurD を組換えタンパク質として調製した。

pET-21d ヘサブクロニングし、大腸菌 B834(DE3)株を用いて可溶性画分に発現させた緑膿菌 MurD は、Ni アフィニティークロマトグラフィー後にタグ配列をプロテアーゼで除去し、ゲル濾過クロマトグラフィーにかけることで 80mg/L の収量で高純度に精製することができた。シッティングドロップ蒸気拡散法により結晶化スクリーニングを行なったところ、PEG3350 を沈殿剤とした条件で結晶が得られ、シンクロトロン放射光施設にて約 2.35 Å の反射を得た。緑膿菌 MurD 結晶の空間群は $P6_322$ 、格子定数は $a=b=138.328$ 、 $c=128.393$ Å であった。大腸菌の MurD をモデル構造とした分子置換法により構造を決定し、現在は構造精密化をおこなっている。

ATDC はヒストン H2A. X のリン酸化とヒストン H4 のアセチル化を介して DNA 二本鎖切断修復を制御する

○ 榊田 安志¹、高橋 秀尚¹、松本雅記²、中山敬一²、Ronald C. Conaway³、Joan W. Conaway³ 畠山 鎮次¹

¹北海道大学大学院医学研究科 生化学講座 医化学分野

²九州大学 生体防御医学研究所 分子医科学分野

³Stowers Institute for Medical Research, Kansas City, MO 64110, USA

【要旨】DNA の二本鎖切断 (double strand break, DSB) は電離放射線 (ionizing radiation, IR) や複製エラーによって引き起こされ、細胞の生命活動を脅かす最も危険な DNA 損傷である。DSB 損傷の一連の修復プロセスは、ATM (ataxia telangiectasia mutated) によるヒストン H2A. X のリン酸化によって開始される。その修復の過程で、TIP60 ヒストンアセチルトランスフェラーゼ複合体は DNA 損傷部位のヒストン H4 をアセチル化し、周辺のクロマチン構造を解くことで、修復因子の損傷部位へのアプローチを可能にし、損傷修復を促進する。ATM は、DSB 修復経路の最も上流で機能するタンパク質の 1 つであり、放射線高感受性疾患である毛細血管拡張性運動失調症 (ataxia telangiectasia, AT) の原因遺伝子である。ATDC (ataxia telangiectasia group D complementing gene) 遺伝子は、AT 細胞を用いた放射線感受性相補実験において、ATM の機能を相補する遺伝子の 1 つとして同定された。ATDC は、TRIM (tripartite motif) ファミリータンパク質の一つの TRIM29 であり、細胞のがん化に関与することが知られている。しかし、ATDC がどのようにして ATM の機能を相補するのかに関して、現在明らかにされていない。

今回我々は、生化学的解析及び細胞生物学的解析によって、DSB 修復経路における ATDC の役割を検討した。ATDC の細胞内局在を免疫染色法と細胞分画法を用いて調べたところ、ATDC は核内に局在し、クロマチン上に存在することが分かった。IR 照射による DSB の修復開始に必須の H2A. X のリン酸化と H4 のアセチル化が、ATDC のノックダウンによって抑制された。また、ATDC をノックダウンした細胞では、DSB 修復因子によって損傷部位に形成される foci の数が減少した。さらに、ATDC に結合するタンパク質を同定するために、FLAG-ATDC を安定に発現する HeLa S3 細胞の核抽出液を用いて、ATDC と結合するタンパク質の精製を行った。質量分析計を用いて解析したところ、ATDC は DSB 修復に機能する BASC 複合体 (BRCA1-associated genome surveillance complex)、TIP60 複合体や DNA-PK (DNA-dependent protein kinase) などのタンパク質と結合することが判明した。以上の結果から、ATDC は DSB 修復因子と複合体を形成し、H2A. X のリン酸化や H4 のアセチル化を介して、ゲノム安定性の維持に機能している可能性が示唆された。

Tripartite motif protein 39 (TRIM39)の機能解析

○鈴木 正宣^{1,2}、渡部 昌¹、中丸 裕爾²、福田 諭²、畠山 鎮次¹

¹北海道大学 大学院医学研究科 医学専攻 生化学講座 医化学分野

²北海道大学大学院医学研究科 耳鼻咽喉科・頭頸部外科

【要旨】

ユビキチンリガーゼは標的タンパク質に最終的にユビキチンを付加する上で重要な酵素サブユニットであり、ヒトゲノム中に数百以上（全ゲノム中の数%以上）は存在することが知られている。その活性中心の構造から、Homologous to the E6AP Carboxyl Terminus (HECT)型、Really Interesting New Gene (RING)型、U-box 型などのグループに細分化されている。RING ドメインを有するファミリータンパク質群として、TRIM ファミリータンパク質 (TRIM タンパク質) の存在が見出されている。このうち、TRIM39 の exon 内に存在する SNP はベーチェット病と相関があることが知られており、炎症免疫シグナルへの関与が示唆されていた。

我々は Dual luciferase assay を用いて TRIM39 の炎症免疫シグナルへの関与を検討した。その結果、TRIM39 は NF κ B、IFN- β シグナルを負に制御していることを見出した。次に、この TRIM39 による炎症免疫シグナル制御機構を明らかにするため、酵母 Two-Hybrid 法を用いて TRIM39 結合タンパク質を検索した。その結果、Cactus-interacting protein (以下、Cactin) を TRIM39 結合タンパク質として同定し、実際に細胞内での結合を確認した。バキュロウイルス・昆虫細胞系を用いて TRIM39 と Cactin のリコンビナントタンパク質を作製し、*in vitro* での両者の結合を確認した。Cactin は Inhibitor of kappa B-like protein(I κ BL)と結合し協調して NF κ B、IFN- β シグナルを抑制するという報告²⁾がある。そのため、TRIM39 は Cactin および I κ BL と協調して NF κ B、IFN- β シグナルを抑制することが推測される。

【参考文献】

- 1) Kurata R, Nakaoka H, Tajima A, Hosomichi K, Shiina T, Meguro A, Mizuki N, Ohono S, Inoue I, and Inoko H. (2010) Biochem. Biophys. Res. Commun., 289, 479-484.
- 2) Atzei P, Gargan S, Curran N, and Moynagh PN. (2010) J Biol Chem., 285, 36804-36817.

Involvement of linear polyubiquitylation in PPAR γ transcriptional activity

○Masashi Watanabe, Shigetsugu Hatakeyama

Department of Biochemistry, Hokkaido University Graduate School of Medicine

【要旨】

Peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) is a master regulator of adipogenesis, induces the expression of adipocyte-specific genes through the binding of PPAR γ -retinoid X receptor- α (RXR α) heterodimers to a PPAR-response element (PPRE), resulting in the adipocyte maturation and fat storage. The tripartite motif-containing protein (TRIM) family proteins are involved in a broad range of biological processes including transcriptional regulation. In this study, we comprehensively screened TRIM proteins using a luciferase reporter assay with PPRE driven luciferase construct (PPRE-Luc) and identified PPAR γ coactivator TRIM protein (PTRIM) as a novel positive regulator affecting PPAR γ -mediated transcription in the presence of synthetic PPAR γ ligand. The expression levels of *PTRIM* gene and protein were increased during 3T3-L1 adipocytes differentiation and knockdown of PTRIM in 3T3-L1 adipocytes decreased the mRNA levels of PPAR γ -target genes and intracellular triglyceride levels. The interaction between PTRIM and PPAR γ was verified to be in a ligand-independent manner. Furthermore, PTRIM induced *in vitro* and *in vivo* ubiquitylation of PPAR γ , especially with a linear polyubiquitin chain to PPAR γ . Surprisingly, deletion analysis of PTRIM revealed that deletion of amino-terminal RING domain induced ligand-independent activation and deletion of carboxy-terminal region suppressed PPAR γ activation. PPAR γ fused to an uncleavable linear polyubiquitin at the carboxy-terminus possessed normal DNA-binding activities but showed few transcriptional activity. The mechanism of PPAR γ regulation by carboxy-terminal region of PTRIM was remain to be elucidated, but these results suggesting that PTRIM acts as a potent dual regulator of PPAR γ for regulating adipocyte differentiation and maturation. Results of further studies on PTRIM may be useful for revealing of abnormalities in adipocyte differentiation or functions in metabolic syndromes characterizing by insulin-resistance. Therefore, PTRIM may be a potential therapeutic target for the treatment of insulin resistance and obesity.