

第43回  
日本生化学会北海道支部例会  
プログラム・抄録集  
ミニシンポジウム「生命科学から再生医療へ」  
(北海道医師会認定生涯教育講座)

日時:2006年11月3日(金)午前8時55分より

場所:北海道大学学術交流会館小講堂

事務局

---

北海道大学大学院医学研究科環境医学分野  
第43回日本生化学会北海道支部会例会係  
電話:011-706-5066[ダイレクトイン]  
FAX:011-706-7819  
E-mail: aoda@med.hokudai.ac.jp

## 第 43 回 日本生化学会北海道支部例会のお知らせ

日時:2006 年 11 月 3 日(金)午前8時55分より

場所:北海道大学学術交流会館小講堂

交通・アクセス 次頁をご参照ください.

発表形式: 一般講演 (質疑応答含め 15 分: 講演 12 分+質疑応答 3 分)

総説講演 (質疑応答含め 25 分: 講演 20 分+質疑応答 5 分)

特別講演;シンポジウム;特別演題

(質疑応答含め 30 分: 講演 25 分+質疑応答 5 分)

本年はご講演を多数頂き, 例年より特別講演のお時間が短くなっております.

講演者の皆様へ

係りより連絡申し上げたとおりです. 事前提出ご協力有り難うございます.

本年は皆様のご協力を頂き, 非常にご講演数が豊富です.

持ち時間の厳守をお願い致します.

ミニシンポジウムに参加される, 北海道医師会会員の方へ

受付(無料)の名簿にお名前の他に医籍登録番号をご記入下さい.

ミニシンポジウムは北海道医師会の承認を得て, 北海道医師会認定生涯講座の一環として行うものです. (3単位)

懇親会

休日と重なり予定しておりません.

## 北海道大学学術交流会館



〒060-0808

札幌市北区北8条西5丁目

TEL: 011-706-2141(会館事務室)

最寄駅 JR 札幌駅北口 徒歩7分  
(北大正門から入るとすぐ左手に見えます)

---



◇主要交通手段◇

1. JR 新千歳空港駅 → JR 札幌駅

快速エアポート 36分

2. JR 札幌駅 → 北海道大学学術交流会館

徒歩 7分

# 第43回 日本生化学会北海道支部例会プログラム

[午前の部]

8:55-9:00 開会の辞 例会長 藤田 博美 (北大院・医・環境医学)

座長: 若尾 宏 (北大院・医・環境医学)

一般講演1 低分子量二重特異性ホスファターゼによるSTAT3シグナル伝達系の制御

9:00-9:15 ○関根 勇一,辻 暁司,池田 収,松田 正(北大・薬・衛生化学)

一般講演2 新規アダプター分子 STAP-2 と EB ウイルス産物 LMP1 の機能的相互作用の解析

9:15-9:30 ○池田収,関根勇一,松田正(北大院・薬・衛生化学)

一般講演3 CaNBP75によるカルシニューリンの調節機構の解析

9:30-9:45 ○日野浩嗣<sup>1</sup>,山下祐理子<sup>2</sup>,中富晶子<sup>3</sup> (1 北大院・理・化学専攻, 2 北大・理・化学科, 3 北大院・先端生命科学・先端生命科学・先端細胞機能科学)

一般講演4 Development of Analytical Method to Detect Rare 3-O-Sulfated Glucuronic Acid-containing Disaccharides in Various Chondroitin Sulfate Preparations

9:45-10:00 ○Duriya Fongmoon<sup>1, 2, 3</sup>, Ajaya Kumar Shetty<sup>1, 2</sup>, Basappa<sup>1, 2</sup>, Shuhei Yamada<sup>1, 2</sup>, Kazuyuki Sugahara<sup>1, 2</sup> (1 Dept of Biochem, Kobe Pharma Univ, 2 Grad Sch of Life Sci, Hokkaido Univ, 3 Dept of Biochem, Faculty of Med, Chiang Mai Univ, Thailand)

座長: 矢澤 道生 (北大院・理)

一般講演5 コンドロイチン硫酸Eは単純ヘルペスウイルスのglycoprotein Cに直接結合し,抗ウイルス活性を発揮する

10:00-10:15 ○山田修平<sup>1,2</sup>,内藤聡美<sup>2</sup>,宇山 徹<sup>2</sup>,北川裕之<sup>2</sup>,Kicki Bergefall<sup>3</sup>,Edward Trybala<sup>3</sup>, Maria Johansson<sup>3</sup>,Tomas Bergström<sup>3</sup>,菅原一幸<sup>1,2</sup> (1北大, 2神戸薬大, 3ヨーテボリ大)

一般講演6 ユビキチン-プロテアソームシステムにおける BAG6 の機能

10:15-10:30 ○南 亮介,川原 裕之,横沢 英良(北大院・薬・生化)

一般講演7 貝類筋収縮 Ca 制御

10:30-10:45 ○矢沢洋一 (北海道教育大・旭川・健康福祉)

10:45-10:55 休憩

座長：石森 浩一郎（北大院・理）

**一般講演8 共鳴ラマン分光法が明らかにしたヘムシャペロンタンパク質の作用機構**

10:55-11:10 ○内田毅（北大院・理）

**総説講演1 Investigation of Heme Transport Proteins from Bacterial Pathogens**

11:10-11:35 ○Kenton R. Rodgers（Dept of Chem, Biochem, and Mol Biol, North Dakota State Univ）

座長：谷口隆信（旭医大・生化）

**特別講演1 乳腺上皮細胞の形態形成における間質脂肪細胞の役割**

11:35-12:05 ○木村和弘（北大院・獣医・生化）

12:05-12:55 休憩

[午後の部]

12:55-13:10 総会（矢澤 道生 支部会長）

座長：牛首文隆（旭医大・薬理）

**特別講演2 インドメサシンによる動脈管閉塞に対するEP4アゴニスト,エンドセリンアンタゴニストの阻害効果**

13:10-13:40 梶野浩樹,藤枝憲（旭川医大・小児）,○谷口隆信（旭川医大・生化・細胞制御科学分野）,牛首文隆（旭川医大・薬理）,村松郁延（福井大医・薬理）

**総説講演2 細菌のエイコサペンタエン酸およびドコサヘキサエン酸合成酵素遺伝子群**

13:40-14:05 ○森田直樹<sup>1</sup>・折笠善丈<sup>2</sup>・西田孝伸<sup>2</sup>・奥山英登志<sup>2</sup>（<sup>1</sup>産総研,<sup>2</sup>北大院・地球環境）

座長：藤田 博美（北大院・医・環境医学）

**特別演題1 魚類耳石に含まれるタンパク質の網羅的同定の試み**

14:05-14:35 ○当瀬秀和<sup>1,2</sup>・都木靖彰<sup>2</sup>・長澤寛道<sup>1</sup>（<sup>1</sup>東大院・農・応用生命化学,<sup>2</sup>北大院・水産・海洋応用生命）

**特別演題2 「水産科学における生殖系列キメラの応用 – 借腹生産」**

14:45-15:05 ○山羽 悦郎・斎藤大樹・後藤理恵・荒井克俊〔北大・北方生物圏フィールド科学セ・水産院〕

15:05-15:15 休憩

座長：筒井裕之(北大院・医・循環器)，本望 修（札医大・医・脳外）

15:15-17:15 ミニシンポジウム「生命科学から再生医療へ」（北海道医師会認定生涯教育講座）

**演題1 骨髄幹細胞による神経再生医療へ向けて**

○本望 修,宝金清博（札医大・医・脳外）

**演題2 クローン胚からの単一リンパ球の誘導とその応用**

○若尾 宏,小田 淳,藤田 博美（北大院・医・環境医学）

**演題3 末期肝疾患に対する肝細胞治療—細胞ソースとしての不死化ヒト肝細胞株の作製**

○敦賀陽介<sup>1)</sup>,清野透<sup>2)</sup>,松下通明<sup>1)</sup>,葛西弘規<sup>1)</sup>,高橋徹<sup>1)</sup>,松本秀一朗<sup>1)</sup>,蒲池浩文<sup>1)</sup>,

藤堂省<sup>1)</sup>(1)北大院・医・消・一般外, 2)国立がんセ研・ウイルス)

**演題4 ミトコンドリア酸化ストレス制御による心血管病の新たな治療戦略**

○筒井裕之,絹川真太郎(北大院・医・循環器)

座長：加納英雄(札医大・医・生化二)

**特別講演3 プロスタノイドの循環器疾患病態形成における役割**

17:15-17:45 ○牛首文隆(旭医大・薬理)

**総説講演3 ジアシルグリセロールキナーゼが制御する多彩な生理病理機能—発生, 脳神経系, 免疫系, 細胞骨格系, アポトーシス, 発癌, 糖尿病における役割—**

17:45-18:10 ○坂根郁夫, 今井伸一, 甲斐正広, 安田智, 加納英雄(札医大・医・生化二)

座長：三輪 総一（北大院・医・薬理）

**一般講演9 MD-2認識とリポ多糖シグナル伝達におけるToll様受容体4 N末端側Cys29及びCys40の重要性**

18:10-18:25 ○西谷千明 1),光澤博昭 1),清水健之 1),佐野仁美 1),松嶋範男 2),黒木由夫 1)

(1 札医大・医・生合一, 2 札医大・保健・物理)

**一般講演10 Toll-like receptor (TLR) のLeucine rich Repeat (LRR)**

18:25-18:40 ○松嶋範男1,田中剛範2,Enhkbayar Purejav3,三上智子4,多賀昌江5,山田恵子1,

黒木由夫6（1札医大・保健・物理, 2理研・ゲノムセ, 3モンゴル大・生物, 4札幌市立高看, 5札幌市大・看護・看護, 6札医大・医・生合一）

**一般講演11 TLRとTIRアダプターとの特異的相互作用の分子メカニズム**

18:40-18:55 ○西屋 禎,梶田絵美,三輪聡一（北大院・医・薬理）

## 抄録集

座長： 若尾 宏（北大院・医・環境医学）

### 一般講演1 低分子量二重特異性ホスファターゼによるSTAT3シグナル伝達系の制御

○関根 勇一,辻 暁司,池田 収,松田 正(北大・薬・衛生化学)

生体システムの恒常性を維持するためには液性の調節因子であるサイトカインの存在が不可欠であり,サイトカインは主にJak/STATシグナル伝達系と呼ばれるシグナル系を利用しその機能を発現する.この系の破綻は白血病や免疫疾患として発症することが知られている.IL-6ファミリーサイトカインの主なシグナル伝達分子であるSTAT3の活性化は細胞癌化と深く関与しており,ミエローマや種々の癌細胞において恒常的な活性型STAT3の存在が報告されている.このSTAT3の活性制御の一つとして脱リン酸化反応が知られている.本研究では低分子量二重特異性ホスファターゼ2(LMW-DSP2)によるSTAT3活性化制御機構の解析を行った.精巣細胞及び肝細胞株においてサイトカイン刺激により,LMW-DSP2 mRNAの誘導が観察された.そこで,STAT3を介するサイトカインシグナル伝達系へのLMW-DSP2の作用をレポーター遺伝子アッセイにより検討した.するとLMW-DSP2容量依存的にSTAT3転写活性が減少することが観察された.さらにLMW-DSP2発現により,刺激によるSTAT3のリン酸化の減弱や,標的遺伝子SOCS3のmRNA誘導の減少も観察された.また,siRNAにより内因性LMW-DSP2をノックダウンすると,刺激によるSTAT3リン酸化の増強や,SOCS3 mRNA発現の上昇が観察された.以上の結果より,LMW-DSP2はSTAT3を脱リン酸化することによりその転写活性を制御していることが明らかとなった.

### 一般講演2 新規アダプター分子 STAP-2 と EB ウイルス産物 LMP1 の機能的相互作用の解析

○池田収,関根勇一,松田正(北大院・薬・衛生化学)

新規アダプター分子 Signal Transducing Adaptor Protein-2 (STAP-2)は,その分子内にPH,SH2-like,Pro-rich 領域を有し,サイトカインシグナル伝達を制御する分子であることが明らかとなっている.また最近,STAP-2 は自然免疫応答として知られるグラム陰性菌由来 LPS による,TLR4 を介したNF- $\kappa$ B シグナル伝達系の調節に関与することも明らかとなっている.

Epstein-Barr ウイルス(EBV)はそのウイルス産物である潜在性膜蛋白質 LMP1 を介してNF- $\kappa$ B シグナル伝達系を恒常的に活性化することによりB細胞の癌化に関与することが知られている.本研究ではLMP1 とSTAP-2 の機能的相互作用の解析を行った.ヒトバーキットBリンパ腫細胞株 Ramos のTet-onシステムを用いたLMP1 発現誘導系において,LMP1 発現により内因性STAP-2 mRNA が顕著に誘導された.そこで,STAP-2 のLMP1 への作用をNF- $\kappa$ B の活性化を指標に解析すると,興味深いことに,LMP1 によるNF- $\kappa$ B 転写活性化がSTAP-2 の発現により抑制され,LMP1 によって誘導される内因性IL-6の産生もSTAP-2 発現により抑制されることが明らかとなった.これらの結果から,STAP-2 はEBV産物LMP1 を抑制する内因性抗ウイルス因子として作用することが示唆された.



### 一般講演3 CaNBP75によるカルシニューリンの調節機構の解析

○日野浩嗣<sup>1</sup>, 山下祐理子<sup>2</sup>, 中富晶子<sup>3</sup> (1 北大院・理・化学専攻, 2 北大・理・化学科, 3 北大院・先端生命科学・先端生命科学・先端細胞機能科学)

カルシニューリン(以下, CaN)は, 精巣で多く発現しており, 精子形成に関与すると考えられているが, その具体的機能は不明である. 我々はホタテガイ精巣から, CaN結合タンパク質CaNBP75(以下, BP75)を発見した. BP75のC末端側は, ヒトのRanBP3と高い相同性を示した. RanBP3は低分子量Gタンパク質Ranに結合するタンパク質であり, BP75もRanを結合すると推察した. 本報告では, 精巣でのCaNの調節機構について考察する. まず, BP75のRan結合能をファーウエスタン法にて検討した. メンブレン上のBP75を, ヒトRanを発現させた大腸菌の抽出液とインキュベーションし, 抗Ran抗体を用いて検出した. その結果, BP75はヒトRanと結合することが明らかになった. そこで, ホタテガイ精巣トータルRNAからRanのcDNAクローニングを行った. cDNA塩基配列から推定したホタテガイRanの一次構造は, ヒトRanと84.2%同一であったことから, ホタテガイRanもヒトRanと同様にBP75と結合すると考えた. 次に, CaN, BP75, Ranの精子形成過程での発現時期を調べるため, ホタテガイ精巣の1年周期での成熟に合わせて試料を採取し, ノーザン法にて解析した. その結果, これらのタンパク質の発現量は, 精巣の成熟に伴って増減し, いずれも精子形成期に極大に達することがわかった. これは, CaN, BP75, Ranが精子形成の同時期に働くことを示唆する. 以上の結果より, CaN, BP75, Ranが三元複合体を形成することでCaNの機能を調節し, 精子形成に関与するというモデルを考えている.

### 一般講演4 Development of Analytical Method to Detect Rare 3-O-Sulfated Glucuronic Acid-containing Disaccharides in Various Chondroitin Sulfate Preparations

○Duriya Fongmoon<sup>1, 2, 3</sup>, Ajaya Kumar Shetty<sup>1, 2</sup>, Basappa<sup>1, 2</sup>, Shuhei Yamada<sup>1, 2</sup>, Kazuyuki Sugahara<sup>1, 2</sup> (1 Dept of Biochem, Kobe Pharma Univ, 2 Grad Sch of Life Sci, Hokkaido Univ, 3 Dept of Biochem, Faculty of Med, Chiang Mai Univ, Thailand)

3-O-Sulfated glucuronic acid [GlcA(3S)]-containing disaccharides in chondroitin sulfate (CS), which may be biologically active, cannot be detected by the conventional anion-exchange HPLC due to its unusual degradation upon digestion with chondroitinase ABC (CSase ABC) as reported by our group. We herein developed a method to detect GlcA(3S) in CS, by monitoring probable intermediates by ESI-MS after CSase ABC digestion of GlcA(3S)-rich CS-E (from squid cartilage) and CS-K (from king crab cartilage) preparations. An authentic tetrasaccharide [ $\Delta$ HexAa1-3GalNAc(4S) $\beta$ 1-4GlcA(3S) $\beta$ 1-3GalNAc(4S)] ( $\Delta$ A-K) isolated from CS-E was digested with CSase ABC, labelled with 2-aminobenzamide (2-AB) followed by anion-exchange HPLC. The HPLC profile showed a peak eluting shortly after  $\Delta$ O [ $\Delta$ HexAa1-3GalNAc] in addition to DA [ $\Delta$ HexAa1-3GalNAc(4S)]. The ESI-MS in negative ion mode for this peak showed a predominant signal at the m/z 420, corresponding to the molecular mass of monosulfated GalNAc labelled with 2-AB. It can be assumed that this product resulted from the degradation of K-unit. By applying this method, two additional products, which are putative GalNAc(6S) and GalNAc(4S,6S) derived from L [ $\Delta$ HexA(3S)a1-3GalNAc(6S)] and M [ $\Delta$ HexA(3S)a1-3GalNAc(4S,6S)] units, respectively, were detected by ESI-MS in a CSase ABC digest of CS-E oligosaccharide fraction resistant to CSases AC-I and AC-II. This method allowed us to identify M-unit in addition to K-unit in CS-K for the first time, which indicated that this method enables us to detect and quantify the amounts of GlcA(3S)-containing disaccharides in CS from other sources including mammalian tissues.

座長： 矢澤 道生（北大院・理）

### 一般講演5 コンドロイチン硫酸Eは単純ヘルペスウィルスのglycoprotein Cに直接結合し、抗ウイルス活性を発揮する

○山田修平<sup>1,2</sup>,内藤聡美<sup>2</sup>,宇山 徹<sup>2</sup>,北川裕之<sup>2</sup>,Kicki Bergefall<sup>3</sup>,Edward Trybala<sup>3</sup>, Maria Johansson<sup>3</sup>,Tomas Bergström<sup>3</sup>,菅原一幸<sup>1,2</sup>（1北大,2神戸薬大,3ヨーテボリ大）

ヘパラン硫酸(HS)やコンドロイチン硫酸(CS)などの細胞表面に存在するグリコサミノグリカン(GAG)は、ヒトや動物を宿主とするウイルスの感染初期の受容体となっている。したがって、この相互作用はGAG様分子を用いた抗ウイルス薬開発のための研究対象になると考えられ、様々なタイプのCSについて単純ヘルペスウイルス(HSV)感染阻害能を調べることは重要である。今回、イカ軟骨由来のCS-Eに強い抗ウイルス活性が見出された。CS-EのIC<sub>50</sub>値は抗ウイルス活性がよく知られているヘパリンの値を上回るものであった。さらに、HS鎖を持たずCS鎖のみを発現しているマウス繊維芽細胞株gro2Cにおいて、CS-Eは非常に高い抗HSV活性を示した。この活性は、CS特異的分解酵素であるコンドロイチナーゼABCで消化すると消失した。また、CS-EはHSVの接着タンパク質であるglycoprotein C (gC)のgro2C細胞への結合を阻害した。さらに、CS-EとgCとの濃度依存的な直接の相互作用が証明された。gCとの結合に必要なCS-Eの最小サイズを同定するため、種々の大きさのCS-Eオリゴ糖を用いて結合実験及び阻害実験を行なったところ、八糖以上において活性が見られた。このようにCS-Eの抗ウイルス活性の機構を解明することにより、ヒトでのHSV感染阻害薬の開発に繋がることが期待される。

文 献

Bergefall et al. (2005) J. Biol. Chem. 280 (37) 32193-32199.

### 一般演題6 ユビキチン-プロテアソームシステムにおける BAG6 の機能

○南 亮介,川原 裕之,横沢 英良(北大院・薬・生化)

ユビキチンプロテアソームシステム(UPS)は、多様な生命現象を制御するタンパク質分解機構である。UPS は大きく2段階に分けて考えることができる。標的となる基質タンパク質のポリユビキチン化と、分解マシーンである26Sプロテアソームによるポリユビキチン鎖の認識、分解である。しかし近年、上記の中間の段階、すなわちポリユビキチン化されたタンパク質を26Sプロテアソームへリクルートするという機能を持ったタンパク質の存在が明らかになりつつある。

BAG6はN末端にユビキチンと相溶性の高い領域、ユビキチン様ドメイン(UBL)を持つ2型ユビキチン様タンパク質であり、C末端にはBAGドメインを持つ。我々はBAG6が、ポリユビキチン化タンパク質と相互作用することを初めて見出した。この相互作用は、細胞をプロテアソーム阻害剤であるMG132で処理した際に顕著に観察された。また、一度MG132処理を施した後、薬剤を除去するとこの相互作用は消失した。このことより、BAG6と相互作用したユビキチン化タンパク質は、その後分解されることが示唆される。さらに我々は、MG132処理した細胞においてBAG6が界面活性剤不溶性画分に移行すること、不溶性の凝集体であるアグリソームに局在することを見出した。

本発表では、これらの知見を含めBAG6がリクルートタンパク質である可能性について報告したい。

## 一般講演7 貝類筋収縮 Ca 制御

矢沢洋一（北海道教育大学旭川校健康福祉）

[序] 貝類の筋肉(主として貝柱筋)タンパク質の生化学的な検討や Ca 収縮制御機構については数多くの報告があるがそのほとんどがホタテガイの貝柱筋(横紋筋と平滑筋)を研究材料として行われてきた。しかし、ホタテガイ貝柱筋で得られた研究結果が、それ以外の多くの貝類にあてはまるかどうかについてはほとんどわかっていないのが現状である。今回の報告では、21種類の貝類より32種類の天然アクトミオシン(natural actomyosin =NAM)を調製した上、さらにミオシン、アクチン等を単離して、それらの生化学的性質および Ca 制御について検討を試みた。その結果、以下に示す幾つの興味ある知見を得る事ができたので報告する。

[結果] 1. 貝類筋肉ミオシンはいずれもミオシン分子量 22 万(220kDa)の H 鎖(HC)と~1.7 万(17kDa)の軽鎖(LC)から成っていた。 2. ミオシン調製後、0℃での安定性をMg-ATPase活性で調べた所、ホタテ貝柱横紋筋や平滑筋およびアワビ平滑筋は、1日で半分以下に低下した。また、多くの貝類ミオシンは3~7日間でその活性は半減した。一方、カキ貝柱斜紋筋ミオシンは30日以上安定であった。これは哺乳類平滑筋ミオシン(兎)のミオシンよりも安定であるという特異的な安定性を示した。

3. 貝類筋肉(貝柱筋および牽引筋)の天然アクトミオシンのMg-ATPase活性のCa制御は以下の3種類に分類することが出来た。

- ① ミオシンによるCa制御(8種類) そのうち、貝柱平滑筋不透明部によるものは調べた6種類のすべてがここに分類された。
- ② ミオシン側とアクチン側による2重制御
  - a. アクチン側タンパク質によるミオシンのCa感受性の上昇作用(22種類)
  - b. トロポミオシンによるミオシンATPaseのCa感受性低下効果(2種類)

座長：石森 浩一郎（北大院・理）

## 一般講演8 共鳴ラマン分光法が明らかにしたヘムシャペロンタンパク質の作用機構

### ○内田毅(北大・院理)

電子伝達蛋白質であるチトクロムcは補酵素としてヘムcを有し、CXXCHという共通のアミノ酸配列中の二つのシステインがヘムのビニル基とチオエーテル結合を形成している。このチオエーテル結合を形成するため、大腸菌などのグラム陰性菌ではCcm (cytochrome c maturation) と呼ばれる蛋白質群(CcmA~CcmH)による精巧な仕組みが存在する。これらの蛋白質の中でもCcmEが特に重要な蛋白質であり、遊離のヘムと結合し、それをアポチトクロムcに引き渡し、共有結合を形成させることからヘムシャペロンと呼ばれている。本研究では、CcmEのヘムの配位構造を明らかにし、シャペロン分子として機能するメカニズムについて検討した。

CcmEを単独で発現させるとヘムを含まないアポタンパク質として発現し、ヘムと再構成させることができる(b-type CcmE)。一方、他のCcmタンパク質と共発現するとヘムを共有結合により含んで発現する(holo CcmE)。CcmEがヘムをチトクロムcに渡すにはこの共有結合が必要なことから、生体中ではアポCcmEがヘムと結合し、b-type CcmEとなり、これがholo CcmEに変換し、シャペロンとして機能すると考えら

る。共鳴ラマンスペクトルからb-type CcmE,holo CcmEとも酸化型で5配位であることから、ヘムにタンパク質由来のアミノ酸残基が一つ配位していることがわかった.holo CcmEではチロシンを配位子として持つヘムタンパク質に特有のFe-O(Tyr) 伸縮振動が観測され、このバンドがTyr134の変異体で消失したことから、Tyr134がヘムの配位子であることがわかった。しかし、これらのバンドはb-type CcmEでは観測されず、His130の変異体でスペクトルが変化した。以上のことからCcmEはヘムをHis130で結合するが、その後Tyr134と交換するような構造変化が起こり、ヘムをシトクロムcに引き渡すことがわかった。

### 総説講演1 Investigation of Heme Transport Proteins from Bacterial Pathogens

○Kenton R. Rodgers (Det of Chemistry, Biochem, and Mol Biol, North Dakota State University)

Many bacterial pathogens require heme as their source of iron in establishing infection in mammalian hosts. Cytotoxicity of free heme imposes mandates thermodynamically stable complexation of heme by biomacromolecules. At the same time, facile mechanisms for transferring heme among the proteins that comprise the uptake and transport machinery must be accessible. The interplay between protein structure and heme coordination chemistry that makes it possible to strike this delicate balance is being investigated by spectroscopic and biochemical means. Recent results from these investigations will be presented and their mechanistic implications discussed.

座長: 谷口隆信(旭医大・生化)

### 特別講演1 乳腺上皮細胞の形態形成における間質脂肪細胞の役割

○ 木村和弘 (北大院・獣医・生化)

乳腺は性成熟や妊娠、泌乳の過程に伴い、乳腺上皮による導管や腺房が形成され、乳成分の合成分泌を行う。乳腺組織はその後退縮し、妊娠により再形成されるが、これらの過程で間質部分に存在する脂肪細胞も消長を繰り返す。一方、脂肪細胞は余剰なエネルギーを蓄積するだけでなく様々な生理活性因子を分泌することが知られる。そこで、乳腺上皮細胞の形態形成に間質脂肪細胞が及ぼす作用を明らかにすることを目的として、以下の実験を行った。ウシ乳腺組織より乳腺上皮細胞および線維芽細胞様の間質細胞を分離し、間質細胞は常法により脂肪細胞に分化させた。上皮細胞はコラーゲンゲル中で培養し、間質細胞培養上清の形態形成能を評価した。脂肪細胞分化前の培養上清を上皮細胞に作用させても形態形成は誘導されなかったが、脂肪細胞の培養上清は上皮による導管および腺房様の構造物の形成を促進した。この作用は肝細胞増殖因子 HGF に対する抗体やアンタゴニストで抑制された。また脂肪細胞への分化にともない HGF 遺伝子の発現と分泌が増大し、組換え HGF は上皮細胞による構造物を形成させた。興味深いことに脂肪細胞における HGF の発現には種差が存在し、マウス由来の 3T3-L1 細胞では分化前の培養上清は形態形成を誘導し、分化後の培養上清は形態形成を誘導しなかった。さらに HGF による形態形成の促進は代表的な脂肪細胞分泌因子レプチンで抑制された。つまり間質脂肪細胞から分泌される因子はその栄養状態によって変化し、複雑に乳腺上皮細胞の形態形成を調節することで乳腺組織の構築に関与することが示唆された。

座長: 牛首文隆(旭医大・薬理)

### 特別講演2 インドメサシンによる動脈管閉塞に対する EP4 アゴニスト、エンドセリンアンタゴニストの阻害効果

梶野浩樹,藤枝憲(旭川医大・小児),○谷口隆信(旭川医大・生化・細胞制御科学分野),牛首文隆(旭

川医大・薬理),村松郁延(福井大医・薬理)

動脈管(Ductus Arteriosus, DA)は胎児期において血液を右心系から全身循環へ、機能していない肺を通さずに、シャントしている血管です。DA は生後肺呼吸肺循環の確立に伴って急速に閉塞し、この閉塞は胎児循環から成体循環への切り替えにおいて重要な意義を持っています。DA の開通状態は弛緩因子と収縮因子によって調節されており、生理的な弛緩系はプロスタグランジン E2(PGE2) /EP4 であり、収縮系はエンドセリン(ET) /ETA であることが明らかにされつつあります。一方、インドメサシンは強い子宮収縮抑制作用を持ち流産の治療に用いられていますが、同時に子宮内で胎児の DA 閉塞を生じ肺高血圧症や DA 開存症を引き起こすことが知られています。今回我々はインドメサシンによる DA 閉塞に対し EP4 アゴニストと ET アンタゴニストの効果を検討しました。ラット新生仔から摘出した動脈管の酸素による収縮に対して、EP4 アゴニスト及び ET アンタゴニストは阻害効果を示しました。妊娠 21 日目の母ラットにインドメサシンを投与すると in utero で DA 閉塞が生じますが、EP4 アゴニスト及び ET アンタゴニストの前投与によってこの DA 閉塞は抑制されました。以上の結果より、インドメサシンによる in utero の DA 収縮はエンドセリン系を介して起こっており、DA の弛緩因子である PGE2 系の相対的低下によると考えられました。今回の結果から EP4 アゴニストやエンドセリンアンタゴニストをインドメサシンと併用することにより、動脈管閉塞を起こさずに子宮収縮抑制効果を期待できることが示唆されました。

## 総説講演2 細菌のエイコサペンタエン酸およびドコサヘキサエン酸合成酵素遺伝子群

○森田直樹<sup>1</sup>・折笠善丈<sup>2</sup>・西田孝伸<sup>2</sup>・奥山英登志<sup>2</sup>(<sup>1</sup>産総研,<sup>2</sup>北大院・地球環境)

エイコサペンタエン酸(EPA)やドコサヘキサエン酸(DHA)を膜脂質成分として有する細菌が主に低温環境の海水(深海及び極地方)や海産魚類の腸内から多数単離されている。これら細菌の微生物生態学的研究は盛んに行われているが、EPAやDHAの生合成機構や機能に関する研究は進んでいるとは言いがたい。1996年にYazawaは海産魚の腸内細菌からEPA合成に関わる酵素の遺伝子群(EPA遺伝子クラスター)を単離した。EPA遺伝子クラスターを構成するのは5つの必須遺伝子(pfaA-E)で、この遺伝子群を発現した大腸菌は高レベル(~30%)のEPAを生成する。一方、1999年にTanakaらは深海に由来するDHA生産細菌からEPA遺伝子クラスターに類似のpfaA-Dを含む遺伝子群(DHA遺伝子クラスター)を単離した。最近Orikasaらによって同じ細菌からpfaEが得られ、両者を共発現することで大腸菌での遺伝子組み換えDHA生産に成功した。EPA及びDHA遺伝子クラスターを構成するpfaA-Eの予想アミノ酸配列は、酸素に依存する脂肪酸不飽和化酵素に見られるモチーフを持たず、脂肪酸合成酵素やポリケチド合成酵素のものと高い相同性を示した。したがって、細菌においてEPAやDHAはポリケチド合成様式でde novo合成されるとみてよい。本講演では、細菌のEPA及びDHA遺伝子クラスターの構造とアミノ酸配列から予想される個々の遺伝子のドメイン構造について概観し、その生合成機構を考察する。また、EPAを合成する遺伝子組み換え大腸菌を用いて明らかにされつつある多価不飽和脂肪酸の機能について述べる。

座長：藤田 博美(北大院・医・環境医学)

### 特別演題1 魚類耳石に含まれるタンパク質の網羅的同定の試み

○当瀬秀和<sup>1,2</sup>・都木靖彰<sup>2</sup>・長澤寛道<sup>1</sup>(<sup>1</sup> 東大院・農・応用生命化学, <sup>2</sup> 北大院・水産・海洋応用生命)

現在未解明の難聴眩暈疾患が数多く存在するが、近年これら疾患の原因遺伝子の同定と表現型解析により、平衡石の形態形成異常が指摘されているものが幾つかある。しかし、平衡石の形態形成機構は不明で、平衡石形態異常疾患の直接要因は全くわかっていない。耳石は、内耳嚢状組織の内リンパ液内という無細胞環境で成長する炭酸カルシウムのバイオミネラルであり、この形態形成は無機物と有機物の相互作用によって起こる。内リンパ液は本結晶に対して過飽和であるが、タンパク質など有機物が形態形成を制御し基質として結晶に取り込まれる。つまり、耳石基質分子は、有機-有機、有機-無機相互作用を介して結晶の形態形成に関与する。我々は、耳石基質タンパクの相互作用およびそれら mRNA 発現を網羅的に調べるために、ニジマスを用いて耳石有機基質タンパク全ての同定を試みている。現段階で、イムノスクリーニング法およびタンデム質量分析を用いて 7 種のタンパク質を同定した。これらのうち、イムノスクリーニングで同定したタンパク質のうち 1 つは、核タンパク 64 kD、成熟体約 500 kD のプロテオグリカンであり、内耳感覚斑縁部の耳石基質産生細胞特異的に発現して耳石膜および耳石に取り込まれていることを確認した。この機能は現在解析中である。一方、内リンパ液特異的な酸性糖タンパク質を発見・精製し、このタンパク質が炭酸カルシウムの結晶形成を著しく抑制する活性を持つこと、結晶の形態形成に関与することを明らかにした。今後、これらの cDNA をゼブラフィッシュにおいてクローニングして発現と機能の解析を行う予定である。

### 特別演題2 「水産科学における生殖系列キメラの応用 – 借腹生産」

○山羽 悦郎・斎藤大樹・後藤理恵・荒井克俊〔北大・北方生物圏フィールド科学セ・水産院〕

植物では接木により、品種の特性を変えない苗の更新や、少数の台木から多数の品種の収穫が可能となっている。また、台木と穂木の組み合わせにより、結果作用の促進あるいは抑制、果実品質の向上、樹勢・樹形の調節、環境適応性の付与、病害虫に対する強耐性の付与などが可能である。このように遺伝的に異なる細胞を組み合わせさせた「キメラ個体」により生産効率の向上が図られている。

この考え方を魚類の種苗生産に応用したのが「借腹(仮親)生産」である。すなわち、種苗生産を目指す魚種(目的種)の配偶子(卵,精子)を、他の魚種(代理親種)に作らせる技術のことである。目的種の配偶子を組み込まれた個体は「生殖系列キメラ」と呼ばれている。この技術により、①少数の代理親種による多数の目的種の配偶子生産による多様性の保存および維持、②生殖期の短い代理親種による長い目的種の配偶子生産による種苗生産の短縮、③成熟体長の異なる魚種間での借腹生産による産卵数の確保や養殖空間の効率的な利用、④塩分耐性の異なる魚種間での借腹生産による異なる養殖環境の利用、⑤耐病性の異なる魚種間での借腹生産によるウイルスフリー化など様々な応用的な展開が期待できる。魚類での生殖系列キメラはいくつかの方法で誘導される。演者らは、初期胚で分化したひとつの始原生殖細胞(PGC)を不妊化した他種胚へ移植する方法(SPT法)で異種間の生殖系列キメラを誘導した。この方法で作られた、生殖系列キメラにおいて、種、属、または科の異なるPGC由来の精子が分化することが明らかになった。本講演では、魚類における借腹生産に関わる技術と問題点、そして研究の方向

性について言及する。

座長：筒井裕之(北大院・医・循環器)，本望 修 (札医大・医・脳外)

## ミニシンポジウム(北海道医師会認定生涯教育講座)

### 「生命科学から再生医療へ」

#### 演題1 骨髄幹細胞による神経再生医療へ向けて

○本望 修,宝金清博 (札医大・医・脳外)

「いったん損傷が生じた中枢神経系の再生は困難である。」という考えは現在も一般的に信じられているところが,近年の神経科学の進歩によって,脳神経の病気に対しても,再生医療という新しい治療が期待されるようになった。

神経再生医療におけるドナー細胞の確保は,必ずしも容易なことではない。期待される治療効果,副作用,感染症,免疫拒絶反応,倫理問題,細胞供給体制,社会事情,実現の可能性をトータルでバランスよく検討し最良の選択をすることが必要である。ドナー細胞として有力な候補は,ES細胞,胎児由来の神経幹細胞,成人由来の神経幹細胞,骨髄由来細胞が有力であるが,私達は,生着能,増殖能,分化能,分化制御技術の確立,遊走能,神経機能再建能,細胞確保の見込み,自家移植の可否,および実現性について検討した結果,骨髄由来の細胞,特に骨髄幹細胞が最も適切と判断し,実用化を目指している。

骨髄中に存在する細胞をドナー細胞として使用する場合,自分の細胞を使うことができるので,感染症,免疫拒絶反応,倫理面での諸問題がない。また,大きな利点として,脳神経の損傷した部位への直接移植のほか,静脈内投与でも治療効果が期待できる。静脈内に投与された骨髄幹細胞は,脳損傷の部位に到達して,死にかけている神経細胞を助けると同時に,自らも神経細胞になって治療効果を発揮する。

骨髄移植は,既に白血病の治療などで行われている治療であり,安全かつ非侵襲的に十分量のドナー細胞が確保できることが判明している。近い将来,若い時の自分自身の一部を“自己骨髄幹細胞バンク”などに蓄えておくことで,将来の病気に備える時代が来るかもしれない。

#### 演題2 クローン胚からの単一リンパ球の誘導とその応用

○若尾 宏,小田 淳,藤田 博美 (北大院・医・環境医学)

再生医療・細胞治療は将来の医療に重要な役割を果たすと信じられているが,その実現には多くのハードルが存在する。最大の問題はどのようにして自己組織由来の細胞から目的細胞を増殖・誘導するかである。現在,体性幹細胞から様々な細胞群が誘導できる。例えば骨髄幹細胞からは各種リンパ球,血液細胞などが分化誘導可能であるが,個体中の骨髄幹細胞の数は非常に限られており,再生医療・細胞治療に必要な十分量の分化細胞を得ることができない。この問題を克服するため胚性幹細胞であるES細胞の利用が検討されている。ES細胞は無限の増殖能を有するので必要な細胞の誘導方法が確立できれば,その細胞を数量の制限なく手にすることが可能となる。しかしながらこの方法では他人のES細胞を出発材料とすることから再生医療・細胞治療に用いたときには免疫拒絶反応が惹起される。この問題を回避すべく,核移植法を用いたカスタムメイドのES細胞,すなわちクローン胚を用いることが

提唱されている。

本講演ではマウスのクローン胚から単一の T リンパ球を誘導し、これらの T リンパ球が *in vitro*, *in vivo* で機能することを示す。クローン胚は NKT 細胞 (T 細胞と NK 細胞の両方の性質を兼ね備えたリンパ球) の核を核移植によって脱核未受精卵に挿入して作製した。このクローン胚を用いてフィーダー細胞上で分化誘導したところ、誘導されたリンパ球の 80% 以上が NKT 細胞であった。この細胞は外部刺激により IFN- $\gamma$ , IL-4 を産生した。またこの細胞の免疫強化能 (アジュバント効果) を *in vivo* で検討したところ、抗原特異的にアジュバント効果を発揮することが確認された。

### 演題3 末期肝疾患に対する肝細胞治療—細胞ソースとしての不死化ヒト肝細胞株の作製

○敦賀陽介<sup>1)</sup>, 清野透<sup>2)</sup>, 松下通明<sup>1)</sup>, 葛西弘規<sup>1)</sup>, 高橋徹<sup>1)</sup>, 松本秀一朗<sup>1)</sup>, 蒲池浩文<sup>1)</sup>,

藤堂省<sup>1)</sup> (1) 北大院・医・消・一般外, 2) 国立がん研・ウイルス)

背景: 末期肝疾患に対する治療として肝臓移植が普及し成果を上げているが、臓器不足の問題は深刻化する一方である。肝臓移植に代わる治療法としてハイブリッド型人工肝臓や肝細胞移植が研究され、一部臨床にも応用され始めている。しかしこれらの治療法においても肝細胞が必要とされ、細胞ソースの確保が臨床応用に向けた課題のひとつとなっている。我々は、細胞ソースの一つとして不死化ヒト肝細胞に注目し、遺伝子導入により継代可能で、分化した肝細胞機能を維持した不死化ヒト肝細胞株の作製をめざしている。

目的: ヒトパピローマウイルス 16 (HPV16) E6, E7 及び hTERT 遺伝子導入により、不死化ヒト肝細胞株を作成する。

方法: レンチウイルスベクターを用いてヒト初代肝細胞に E6, E7, hTERT 遺伝子を導入。アルブミン合成能、肝細胞特異的遺伝子の発現、腫瘍原性の有無について評価した。

結果: 遺伝子導入肝細胞は 100PD 以上継代可能であった。アルブミン産生を確認した。RT-PCR では、Albumin, CK-18, HNF-4 を発現、AFP の発現はみられなかった。SCID マウス皮下移植での腫瘍形成はみられなかった。

結語: HPV16 E6, E7 及び hTERT 遺伝子導入により、成熟肝細胞機能を有する不死化ヒト肝細胞株を樹立した。

### 演題4 ミトコンドリア酸化ストレス制御による心血管病の新たな治療戦略

○筒井裕之, 絹川真太郎 (北大院・医・循環器)

#### 心血管病の連鎖における心筋リモデリングとは

心血管病は、「血管障害 (動脈硬化)」から、心筋梗塞を引き起こし、最終的には「心筋障害 (心不全)」にいたる一連の連鎖として捉えられる。ミトコンドリア機能不全は、エネルギー産生低下、酸化ストレス、アポトーシスを引き起こし、心血管病の発症・進展に密接に関与する共通の分子基盤と考えられる。

#### 心筋リモデリングとミトコンドリア酸化ストレス

心筋に傷害が加わると心筋細胞ミトコンドリアにおける活性酸素の産生が亢進する。ミトコンドリアで産生された活性酸素は、ミトコンドリア DNA (mtDNA) 傷害を引き起こす。mtDNA の傷害は、電子伝達系複合体サブユニットの mRNA の低下、さらに電子伝達の機能不全をもたらす。ミトコンドリアにおける電子伝達の障害は、活性酸素のさらなる産生をもたらすため、悪循環を形成し酸化ストレスをさらに亢進させる。ミトコンドリア酸化ストレスは、心筋収縮機能を低下させ、心筋細胞死をもたらす。



### ミトコンドリア酸化ストレス制御による心不全治療の開発

ミトコンドリア由来の酸化ストレスを制御することは、心不全の予防・治療に有用であると期待される。ミトコンドリア酸化ストレスを制御する第1の方法は、ミトコンドリアで発生した活性酸素をグルタチオンペルオキシダーゼやペルオキシレドキシニン-3により局所的に消去することである。第2の方法として、mtDNAが活性酸素に対して傷害を受けにくくすることが考えられる。ミトコンドリア転写因子A (TFAM)は mtDNAを酸化ストレス損傷から保護する働きを有しており、TFAMの誘導や活性化は新たな心不全治療となる可能性がある。

座長： 加納英雄(札医大・医・生化二)

### 特別講演3 プロスタノイドの循環器疾患病態形成における役割

○牛首文隆(旭医大・薬理)

プロスタノイドは、プロスタグランジン (PG) とトロンボキサン (TX) より成る生理活性脂質であり、その作用は各々に特異的な受容体を介して発揮される。現在、PGD2, PGE2, PGF2 $\alpha$ , PGI2, TXA2 の受容体として各々 DP, EP, FP, IP, TP が知られており、EP には EP1~EP4 の4種類のサブタイプが存在する。一方、これら多種類の受容体は、心臓、血管、腎臓や血小板など循環器系の臓器・組織に広く発現分布している。また、循環器系で認められる様々な疾患や病態に伴い、プロスタノイド産生が亢進することが知られており、その循環器系での作用が注目されてきた。しかし、これらプロスタノイドの作用が生理的・病態生理的にどの程度重要な役割を果たすのかに関し、今だ不明な点が多く残されている。今回、各プロスタノイド受容体欠損マウスを用いた解析から明らかとなってきた、心筋梗塞、圧負荷心肥大や炎症性頻脈など循環器系疾患での病態形成におけるプロスタノイドの役割について紹介したい。

### 総説講演3 ジアシルグリセロールキナーゼが制御する多彩な生理病理機能—発生、脳神経系、免疫系、細胞骨格系、アポトーシス、発癌、糖尿病における役割—

○坂根郁夫, 今井伸一, 甲斐正広, 安田智, 加納英雄(札医大・医・生化二)

ジアシルグリセロール (DAG) キナーゼ (DGK) は DAG をリン酸化してホスファチジン酸 (PA) を産生する酵素であり、DAG と PA は 共にセカンドメッセンジャーとして注目されている。DGK は 10 種のアイソフォーム (選択的スプライス産物を加えると少なくとも 17 種) から成る分子ファミリーであり、各 DGK アイソフォームは 2 又は 3 個の亜鉛フィンガー (C1 ドメイン) と触媒ドメインからなる共通領域に加えて、EF ハンド、pleckstrin homology ドメイン、sterile  $\alpha$  motif ドメイン、アンキリンリピート等のそれぞれに特徴的な機能ドメインを持つ。最近、各 DGK アイソフォームのノックアウトマウス、siRNA や dominant negative 変異体を用いた研究により、各分子が予想以上に広範で多彩な生理機能や病理現象 (発生、脳神経系、免疫系、細胞骨格系、アポトーシス、発癌、糖尿病等) の制御に関与していることが判明した。更に、各 DGK 分子は、プロテインキナーゼ C, Ras guanyl nucleotide-releasing protein, ホスファチジルイノシトール 4-リン酸 5-キナーゼ、 $\beta$ 2-chimaerin, mammalian target of rapamycin 等と複合体を形成し、DAG の消費又は PA の産生を通じてそれらの活性を制御することにより、それぞれに時・空間的に隔絶した特異的な機能を担っていることが明らかになってきている。本総説講演では、我々が主に研究している DGK $\alpha$  (腫瘍壊死因子- $\alpha$ によって誘導されるアポトーシスを抑制)、DGK $\gamma$  (Rac1 の活性を抑制し葉状仮足形成を制御) と DGK $\delta$  (上皮増殖因子受容体のシグナル伝達を正に制御し、発生のキーエン

ザイムの一つとして機能)を中心に, DGK 研究の最近の進展について概説したい。

座長: 三輪 総一 (北大院・医・薬理)

#### 一般講演9 MD-2認識とリポ多糖シグナル伝達におけるToll様受容体4 N末端側Cys29及びCys40の重要性

○ 西谷千明 1),光澤博昭 1),清水健之 1),佐野仁美 1),松嶋範男 2),黒木由夫 1)

(1 札医大・医・生化学, 2 札医大・保健・物理)

Toll様受容体(TLR)4は,リポ多糖(LPS)のシグナル受容体であるが,TLR4を介するLPSシグナル伝達には,TLR4の細胞外領域に結合するMD-2の存在が必須である.本研究の目的は,MD-2との相互作用に関わるTLR4領域を同定することである.TLR4とTLR2の構造の相同性に着目し,TLR4/TLR2キメラ体を作成後,HEK293T細胞にMD-2と共発現させ,免疫沈降法を用いて,TLR蛋白とMD-2の結合性を調べた.TLR4Met1-Phe54とTLR2 Ala53-Ser784からなるTLR4/2aキメラ及び野生型TLR4は,MD-2と共沈したが,TLR2Met1-Phe52とTLR4 Pro568-Ile839からなるTLR2/4aキメラ及びTLR4Glu24-Pro34領域の欠損変異体であるTLR4 $\Delta$ E24-P34は,共沈を認めなかった.さらに,MD-2は,TLR4N末端側Glu24-Lys47領域に相当するTLR4合成ペプチドと結合した.また,CysをAlaに置換したTLR4変異体とMD-2との結合性を調べたところ,TLR4C88AはMD-2と共沈したが,TLR4C29A及びTLR4C40Aは共沈しなかった.さらに,TLR4C88Aは細胞表面に発現しLPSによるNF- $\kappa$ B活性化を惹起したが,TLR4C29A及びTLR4C40Aは細胞表面への発現及びLPS惹起NF- $\kappa$ B活性化を認めなかった.以上の結果は,TLR4N末端側Glu24-Lys47領域がMD-2結合部位で,Cys29及びCys40がMD-2認識並びにLPSシグナル伝達において重要であることを示している.

#### 一般講演10 Toll-like receptor (TLR) のLeucine rich Repeat (LRR)

○ 松嶋範男 1),田中剛範 2),Enhkbayar Purejav 3),三上智子 4),多賀昌江 5),山田恵子 1),黒木由夫 6)

(1 札医大・保健・物理, 2 理研・ゲノムセ, 3 モンゴル大・生物, 4 札幌市立高看, 5 札幌市大・看護・看護, 6 札医大・医・生化学)

ロイシンリッチリピート(LRR)は,ロイシンを主とした疎水性残基を規則的に含む20~30残基の配列が連続して繰り返すタンデムリピートである[1, 2].これまで22種類のLRR蛋白質の立体構造が原子座標レベルで解明され,すべて馬蹄型あるいは円弧状の形をしていることが明らかにされている.LRR蛋白質であるToll-like receptor (TLR)は,動物の自然免疫において中心的な役割を果たしている.TLRは膜蛋白質でありLRRを含むEctodomainが,バクテリアやウイルス由来の lipopolysaccharide, flagellin, dsRNA, CpG DNA などと直接相互作用することが知られている. 現在TLRsのアミノ酸配列がさまざまな生物種から多数決定され,脊椎動物のTLRsは6種類のファミリーに分離さ

れている。しかしながら、アミノ酸配列データベースに報告されているそれぞれのTLRSのLRRのリピート数は、生物種間においてかなり異なっている。本研究において、LRRを同定する新しい方法を提案し、TLRSのLRRの同定に適用した。その結果、哺乳動物のTLR1, TLR2, TLR6, TLR10はLRRが20回、TLR4は23回、TLR5は21回、TLR7, TLR8およびTLR9は27回繰り返していることを明らかにした。本研究の結果が、さまざまな実験研究を促進することを期待している。

1. Matsushima, N., et al. Leucine-rich repeats (LRRs): structure, function, evolution and interaction with ligands. *Drug Design Reviews* 2005, 2: 305–322.
2. Matsushima N, et al. Structural analysis of leucine-rich-repeat variants in proteins associated with human diseases. *Cell Mol Life Sci.* 2005, 62(23):2771–2791.

### 一般講演11 TLRとTIRアダプターとの特異的相互作用の分子メカニズム

○西屋 禎, 梶田絵美, 三輪聡一 (北大院・医・薬理)

Toll-like receptor (TLR) は、主に自然免疫細胞に発現し、細菌・カビ・ウイルスなどの病原体成分を認識し、感染防御に不可欠な免疫応答を誘導する。TLRは、現在ヒトにおいて約10種類同定されており、いずれもI型一回膜貫通受容体構造を有し、その一時構造は良く保存されている。TLRのシグナルは、細胞内に存在するToll-interleukin I receptor-resistance (TIR) アダプターによって細胞内に伝達される。TIRアダプターは現在4種類(MyD88, TIRAP/Mal, TRIF/TICAM1, TRAM/TICAM2)同定されており、それぞれ異なるシグナリングを活性化する。さらに、各TLRとTIRアダプターとの相互作用にも特異性が見られ、それが各TLRに独特な生理機能の発現に寄与していると考えられているが、その特異的相互作用の分子メカニズムに関しては不明な点が多い。今回我々は、MyD88とTRIFのTIRドメインを相互に置換したキメラアダプタータンパクを作製し、TLRとTIRアダプターとの相互作用におけるTIRドメインの重要性について検討した。その結果、TRIFのみを使用するTLR3のシグナルはTRIF(MyD88TIR)では伝達されなくなった。また、MyD88のみを使用するTLR5とTLR9のシグナルはMyD88(TRIFTIR)では伝達されなくなった。しかしながら、MyD88(TRIFTIR)はTLR3のシグナルを伝達することがわかった。以上の結果から、TLRとTIRアダプターとの相互作用の特異性はTIRドメインに起因することが示唆された。