

第54回日本生化学会北海道支部例会

日本生化学会北海道支部・日本生物物理学会北海道支部合同シンポジウム

プログラム・抄録集

平成29年7月7日（金）

北海道大学医学部学友会館フラテホール



日本生化学会北海道支部

第54回日本生化学会北海道支部例会のお知らせ

日時：2017年7月7日（金）9:10～18:00

場所：北海道大学医学部学友会館フラテホール

※ タクシーの場合は正門からお入りください。自家用車でのお越しはお断りしております。

※ 最寄りの駅はJR札幌駅もしくは地下鉄南北線北12条駅または北18条駅となります。



医学部学友会館フラテホール

発表について

1) 口頭発表は全て電子プレゼンテーションとなります。必ず自身のノートパソコンをご持参ください。講演中は自身で操作を行っていただきます。液晶プロジェクターとパソコンとの接続は、D-sub15ピンとなります。一部のノートパソコンで、付属のコネクターが必要な場合がありますので、その場合はご持参ください。発表中はスクリーンセーバーや省電力モードにならないよう設定ください。

一般講演：講演12分、質疑応答3分

総説講演：講演17分、質疑応答3分

支部若手奨励賞受賞講演：講演25分、質疑応答5分

合同シンポジウム：講演25分、質疑応答5分

特別講演：講演30分、質疑応答5分

2) ポスター発表のボードサイズは縦200 cm×横90 cmです。ボードに演題番号が貼ってありますので、午前中にご掲示ください。発表時間は12:45~13:35です。ポスターは15:00までに撤去してください。

懇親会

閉会后、北大生協北部食堂（北大構内）にて懇親会を行います。会費は一般2,000円、学生500円の予定です。当日受付でお支払いください。当日参加の方は、受付までお知らせ下さい。

問い合わせ先

〒060-0815 札幌市北区北15条西7丁目

北海道大学遺伝子病制御研究所大学院医学院分子神経免疫学教室内

日本生化学会北海道支部 第54回支部例会係

TEL: 011-706-5120

FAX: 011-706-7542

E-mail: kamimura@igm.hokudai.ac.jp

第54回日本生化学会北海道支部例会

日本生化学会北海道支部・日本生物物理学会北海道支部合同シンポジウム プログラム

日時：平成29年7月7日（金）9:10～18:00

場所：北海道大学 医学部学友会館フラテホール

9:10～9:15 開会の辞

日本生化学会北海道支部第54回例会長

村上正晃（北海道大学・遺伝子病制御研究所・大学院医学院・分子神経免疫学教室）

優秀講演賞対象講演 O-1からO-9

9:15～10:15 [一般講演 セッション1]

座長：田村正人（北海道大学・大学院歯学研究院・口腔分子生化学教室）

O-1

ヒト免疫不全ウイルス2型Nefタンパク質のX線結晶構造解析

○平尾憲吾¹、黒木喜美子²、Sophie Andrews³、尾瀬農之^{2,4}、Sarah Rowland-Jones³、前仲勝実²

¹北海道大学・大学院生命科学院・生体分子機能学研究室、²北海道大学・大学院薬学研究院・生体分子機能学研究室、³University of Oxford・Nuffield Department of Medicine、⁴北海道大学・大学院先端生命科学研究院・X線構造生物研究室

O-2

遅発性AD(LOAD)に関連するApoE4-X11L制御下流遺伝子の同定

○豊田めぐみ¹、道川誠²、中矢正¹、鈴木利治¹

¹北海道大学・大学院薬学研究院・神経科学研究室、²名古屋市立大学・大学院医学研究科・病態生化学研究室

O-3

RNA polymerase II CTD Ser7は転写を減速させてArgonauteのRNAへのtargetingを促進する

○梶谷卓也¹、加藤太陽²、木村宏³、大川恭之⁴、Damien Hermand⁵、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島根大学・大学院医学系研究科、³東京工業大学・大学院生命理工学研究科、⁴九州大学・生体防御医学研究所、⁵ナミュール大学・ナミュールアドバンスドリサーチカレッジ

O-4

癌抑制タンパク質p53ファミリー多量体形成ドメインの進化過程における構造と安定性

○中川夏美、工藤風樹、北川郁人、和田隼弥、鎌田瑠泉、今川敏明、坂口和靖

北海道大学・大学院理学研究院・化学部門・生物化学研究室

10:15～11:00 [一般講演 セッション2]

座長：畠山鎮次（北海道大学・大学院医学研究院・生理系部門・生化学分野・医化学教室）

O-5

シェーグレン・ラルソン症候群の神経症状発症メカニズムの解明

○野尻光希¹、金武司¹、佐々貴之^{1,2}、木原章雄^{1,2}

¹北海道大学・大学院生命科学院・生化学研究室、²北海道大学・大学院薬学研究院・生化学研究室

O-6

*P. acnes*誘導性炎症応答とTyk2の新規機能

○平島洸基¹、室本竜太¹、松田正¹

¹北海道大学・大学院薬学研究院・衛生化学研究室

O-7

関節リウマチモデルにおいて左右対称性病変は病変間を結ぶ感覚神経回路によって導かれる

○大木拓究人¹、上村大輔¹、原田誠也²、河野史倫³、太田光俊¹、樋口光太郎¹、Mohamed Sobhy Hassan Elfeky¹、西川直樹¹、田中勇希¹、中川育磨¹、有馬康伸¹、村上正晃¹

¹北海道大学・遺伝子病制御研究所・大学院医学院分子神経免疫学、²大阪大学大学院医学系研究科・生命機能研究科・免疫発生学、³松本大学大学院健康科学研究科宇宙医学・生理学

11:00~11:45 [一般講演 セッション3]

座長：田中一馬（北海道大学・遺伝子病制御研究所・疾患制御部門・分子間情報分野、大学院生命科学院・生命システム科学コース・細胞高次機能科学分野・分子間情報研究室）

O-8

多価不飽和脂肪酸含有スフィンゴ脂質の組織分布及び生合成経路の解明

○枝川茉生¹、澤井恵¹、大野祐介^{1,2}、木原章雄^{1,2}

¹北海道大学・薬学部・生化学研究室、²北海道大学・大学院薬学研究院・生化学研究室

O-9

フィトスフィンゴシン代謝に関わるα酸化酵素の生化学的解析

○毛利圭佑¹、関直哉²、小原隆²、宮本政宗²、北村拓也²、木原章雄^{1,2,3}

¹北海道大学・薬学部・生化学研究室、²北海道大学・大学院生命科学院・生化学研究室、³北海道大学・大学院薬学研究院・生化学研究室

O-10

コレステロールの細胞膜二層間動態と膜変形機構におけるフィードバック制御機構

○岸本拓磨¹、小林俊秀²

¹北海道大学遺伝子病制御研究所・分子間情報分野、²フランス国立科学研究センター

11:45~12:00 総会

議長：日本生化学会北海道支部長 鈴木利治（北海道大学・大学院薬学研究院・神経科学研究室）

12:45~13:35 [ポスター発表]

13:35~13:40 [支部若手奨励賞授賞式]

13:40~14:10 [支部若手奨励賞受賞講演]

座長：前仲勝実（北海道大学・大学院薬学研究院・生体分子機能学研究室）

Y-1

Kinesin-1リン酸化によるAPP輸送制御機構

千葉杏子^{1,2}、○白木柚葉¹、蘇武佑里子¹、金城政孝³、鈴木利治¹

¹北海道大学・大学院薬学研究院・神経科学研究室、²UC DAVIS, College of Biological Sciences、
³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

14:10~14:30 [総説講演]

座長：鈴木利治（北海道大学・大学院薬学研究院・神経科学研究室）

R-1

視床下部の血糖値感知ニューロンにおけるミトコンドリアの形態変化と全身の糖代謝調節

○戸田知得¹

¹北海道大学・大学院獣医学研究院・生化学教室

14:30~16:30 [日本生化学会北海道支部・日本生物物理学会北海道支部 合同シンポジウム]
「生命現象解明への新しい試み」

座長：尾瀬農之（北海道大学・大学院薬学研究院・生体分子機能学研究室）

上村大輔（北海道大学・遺伝子病制御研究所・大学院医学院・分子神経免疫学教室）

JS-1

胸腺における正の選択を介したT細胞の機能的教育

○高田健介^{1,2}

¹北海道大学・大学院獣医学研究院・動物分子医学教室、²前所属：徳島大学・先端酵素学研究所・免疫系発生学分野

JS-2

正常上皮細胞はがん変異細胞にWarburg効果様の代謝の変化をひき起こし上皮層から排除する

○昆俊亮¹、石橋公二郎¹、藤田恭之¹

¹北海道大学・遺伝子病制御研究所・分子腫瘍分野

JS-3

計算科学的手法によるウイルスタンパク質の解析

○五十嵐学¹

¹北海道大学・人獣共通感染症リサーチセンター・国際疫学部門

JS-4

好熱性バクテリアのレチナールタンパク質：発見と物性解析のこれまでとこれから

○塚本卓^{1,2}

¹北海道大学・大学院先端生命科学研究院・生物情報解析科学研究室、²北海道大学・国際連携研究教育局・ソフトマターグローバルテーション

16:30~16:40 休憩

16:40~17:50 [特別講演]

座長：村上正晃（北海道大学・遺伝子病制御研究所・大学院医学院・分子神経免疫学教室）

S-1

ビスフェノール類の代謝から見てきた薬物抱合の役割

○岩野英知、藤木純平、横田博、井上博紀

酪農学園大学・獣医学群・獣医学類・生体機能学分野・獣医生化学ユニット

S-2

腸管 3 型自然リンパ球の生体内機能解明に向けた新規モデルマウスの開発

○澤新一郎¹

¹北海道大学・遺伝子病制御研究所・感染病態分野

17:50～17:55 優秀講演賞、ポスター賞発表

17:55～18:00 閉会の辞

日本生化学会北海道支部第54回例会長

村上正晃（北海道大学・遺伝子病制御研究所・大学院医学院・分子神経免疫学教室）

18:10～ 懇親会（北海道大学生協北部食堂）

12:45~13:35 [ポスター発表] ポスター賞対象演題 P-1からP-10

P-1

ケモカイン依存性T細胞遊走反応におけるSTAP-2の役割

○土屋琢也¹、齋藤浩大¹、柏倉淳一¹、松田正¹

¹北海道大学・大学院生命科学院・衛生化学研究室

P-2

変異の蓄積によるがんの排除から浸潤への移り変わり

○田中伸也¹、昆俊亮¹、藤田恭之¹

¹北海道大学・遺伝子病制御研究所・分子腫瘍分野

P-3

鉄代謝制御タンパク質IRP2のヘム依存的翻訳制御機構の解析

○小倉多喜¹、渡部祐太¹、武田有紀子²、内田毅^{1,3}、岩井一宏²、石森浩一郎^{1,3}

¹北大・総化、²京大・院医、³北大・院理

P-4

ヒト白血球抗原(HLA)-G2のLILRB2を介したヒト末梢単球由来樹状細胞への免疫抑制的効果

○高橋愛実¹、黒木喜美子¹、贅田美江²、前仲勝実¹

¹北海道大学・大学院薬学研究院・生体分子機能学研究室、²日本バイオセラピー研究所

P-5

表皮角化細胞におけるIL-17誘導性I κ B- ζ 発現機構の解明

○大垣内優衣、多和佳佑、室本竜太、松田正

北海道大学・大学院生命科学院・衛生化学研究室

P-6

上皮細胞の炎症様応答によるがん変異細胞の排除制御

○佐藤奈波^{1,2}、八子優太^{1,2}、藤田恭之^{1,2}

¹北海道大学 遺伝子病制御研究所 分子腫瘍分野、²北海道大学大学院総合化学院 生物化学コース 分子医化学講座 分子腫瘍分野

P-7

活性型NK細胞受容体に結合するHLA-Cw12拘束性HIV-1由来ペプチドの探索

○山下諒也¹ 渡邊洋介¹ 黒木喜美子¹ 前仲勝実¹ 滝口雅文² 小柳円³

¹北大・薬・生体分子機能学研究室、²熊大・エイズ学研究センター、³日本獣医生命科学大学・応用生命科学部・動物科学科

P-8

神経細胞におけるAPLP2順行性輸送の解析

○加藤俊¹、千葉杏子^{1*}、金城政孝²、羽田沙緒里¹、鈴木利治¹

¹北海道大学・大学院薬学研究院・神経科学研究室、²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、*UC DAVIS, College of Biological Sciences

P-9

Mahjongによる接触阻害の制御機構の解明

○江上陸^{1,2}、藤田恭之^{1,2}

¹北海道大学・遺伝子病制御研究所・分子腫瘍分野、²北海道大学・総合化学院・生物化学コース・分子医化学講座

P-10

Ser/ThrホスファターゼPPM1D機能のC末端領域を介した制御機構解明

○ 愉彦樺¹、清田雄平¹、鎌田瑠泉^{1,2}、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・生物化学研究室、²北海道大学・大学院理学院・化学部門・生物化学研究室

P-11

The specific regions of architectural NEAT1 lncRNA induce the formation of the phase-separated paraspeckle nuclear body

○ 山崎智弘¹、萬年太郎¹、Sylvie Souquere²、木立尚孝³、Archa H. Fox⁴、中川真一⁵、Gerard Pierron²、廣瀬哲郎¹

¹北海道大学・遺伝子病制御研究所・RNA生体機能分野、²Centre National de la Recherche Scientifique, Institut Gustav Roussy、³東京大学大学院・新領域創成・メディカル情報生命・生命ネットワーク解析分野、⁴Centre for Medical Research, University of Western Australia、⁵北海道大学・薬学研究院・RNA生物化学研究室

P-12

NTP1はBCRおよびCK2 α との相互作用を介してNF κ B経路依存的な活性化により炎症回路を正に制御する

○ 田中 勇希¹、Lavannya Sabharwal¹、熱海 徹¹、Jing-Jing Jiang¹、樋口 はるか¹、中川 育磨¹、太田 光俊¹、藤田 宗純¹、大河原 桃子¹、有馬 康伸¹、上村 大輔¹、村上 正晃¹

¹北海道大学・遺伝子病制御研究所・大学院医学院・分子神経免疫学教室

P-13

骨髄空間の発生に寄与する細胞の同定

○ 住谷瑛理子¹、澤新一郎¹

¹北海道大学・遺伝子病制御研究所・感染病態分野

P-14

炎症回路制御遺伝子 Rbm10 は DNA メチル化酵素 Dnmt3b の活性を調節することにより、標的遺伝子の転写を制御する

○ 上村大輔¹、大木拓究人¹、有馬康伸¹、熱海徹¹、Jiang Jing-Jing¹、村上正晃¹

¹北海道大学・遺伝子病制御研究所・大学院医学院・分子神経免疫学教室

P-15

Sat III lncRNAを足場とする核内ストレス体の構成変化とそのストレス回復期における役割

○ 二宮賢介¹、足達俊吾²、夏目徹²、廣瀬哲郎¹

¹北大遺制研、²産総研MolProf

P-16

血管伸張は、VEGF濃度に依存して異なる二つの経路で調節される

○ 田村-辻潔美¹、田村正人¹

¹北海道大学・大学院歯学研究院・口腔分子生化学教室

P-17

STAP2 promotes prostate cancer growth by enhancing EGFR stabilization

○ 鍛代悠一¹、岩上昌史¹、松田正¹

¹北海道大学・大学院薬学研究院・衛生化学研究室

P-18

核内構造体形成のアーキテクチャル長鎖ncRNAの共通特性としての難抽出性

○中條岳志¹、山崎智弘¹、川口哲哉¹、黒坂哲²、内匠透²、中川真一³、廣瀬哲郎¹

¹北海道大学・遺伝子病制御研究所・RNA生体機能分野、²理化学研究所・脳科学総合研究センター・精神生物学研究チーム、³北海道大学・大学院薬学研究院・RNA生物学研究室

P-19

反応性関節炎のマウスモデルにおける血清成分を介した関節炎症

○有馬康伸¹、上村大輔¹、大木拓究人¹、Mohamed Elfeky¹、西川直樹¹、樋口光太郎¹、Abhishek Kumar Singh^{1,2}、Sandeep Kumar^{1,2}、Ramnath Misra²、村上正晃¹

¹北海道大学・遺伝子病制御研究所・大学院医学院・分子神経免疫学教室、²Clinical Immunology, Sanjay Gandhi Postgraduate Institute of Medical Sciences, India

抄 録 集

ヒト免疫不全ウイルス 2 型 Nef タンパク質の X 線結晶構造解析

氏名：○平尾憲吾¹、黒木喜美子²、Sophie Andrews³、尾瀬農之^{2,4}、Sarah Rowland-Jones³、
前仲勝実²

所属：¹北海道大学・大学院生命科学院・生体分子機能学研究室、

²北海道大学・大学院薬学研究院・生体分子機能学研究室、

³University of Oxford・Nuffield Department of Medicine、

⁴北海道大学・大学院先端生命科学研究院・X 線構造生物学的研究室

【要旨】

ヒト免疫不全ウイルス 1 型 (HIV-1) は、後天性免疫不全症候群 (AIDS) の主な原因ウイルスであり、現在も世界中で流行している。一方で、HIV-2 は感染力が弱く、感染者は西アフリカを主とした一部地域に局限して存在しており、HIV-1 感染者に比べて AIDS を発症する割合が低い。実際に、多くの HIV-2 感染者は、低レベルのウイルス量、健常者と同程度の CD4 陽性細胞数を保っているが、これらは HIV-1 感染者の約 1% でしか見られない症状であり、この違いの原因解明が望まれている。私たちは、霊長類レンチウイルスに共通の多機能アクセサリータンパク質のひとつである Nef が、ウイルス感染性および複製能を高める重要な病原性因子であることから、上記で述べた HIV-1 と HIV-2 の違いに寄与する可能性があると考えた。これまでに、HIV-1 と HIV-2 Nef タンパク質間の機能の違いとして、HIV-2 Nef が TCR-CD3 複合体の発現を抑制するのに対して HIV-1 Nef はその能力を欠損していることや、HIV-2 Nef が HIV-1 Nef に比べ CD28 の発現をより抑制することなどが報告されている (1, 2)。そこで本研究は、これまでに全く構造情報のない HIV-2 Nef の立体構造を解明し、既存の HIV-1 Nef 構造と比較することによって、両タンパク質の機能差異を理解することを目的とした。方法としては、大腸菌を用いて HIV-2 Nef コア領域を N 末端に His タグを付加したリコンビナントタンパク質として発現させ、アフィニティクロマトグラフィー法、続いて His タグを除去した後、ゲル濾過クロマトグラフィー法を用いて最終精製し、結晶化を試みた。その結果、HIV-2 Nef の結晶構造を 2.07 Å 分解能で決定し、HIV-2 Nef コア構造は HIV-1 Nef と非常に類似していること、しかし、その C 末端側に HIV-1 には存在しない付加的二次構造を有することを明らかにした。本発表では HIV-2 Nef の構造と今回新たに発見された C 末端側の構造について議論したい。

【参考文献】

- 1) Münch J, et al. (2005) J. Virol., 79, 10547-10560.
- 2) Schindler M, et al. (2006) Cell., 125, 1055-1067.

遅発性 AD(LOAD)に関連する ApoE4-X11L 制御下流遺伝子の同定

氏名：○豊田めぐみ¹、道川誠²、中矢正¹、鈴木利治¹

所属：¹北海道大学・大学院薬学研究院・神経科学研究室、

²名古屋市立大学・大学院医学研究科・病態生化学研究室

【要旨】

ApoEε4(ApoE4)対立遺伝子は孤発性/遅発性アルツハイマー病(SAD/LOAD)の危険因子として疫学的に同定されて来た。しかし、*ApoE4* キャリアで AD の発症年齢が下がる分子機構は、様々な仮説が提唱されている段階であり実証されていない。近年、LOAD 患者において *ApoE4* が制御する遺伝子の同定が試みられ、20 遺伝子が *ApoE4* バックグラウンドによって影響を受ける主要制御因子候補として見出された。そのうちの 1 つが *APBA2*(X11-like (X11L))遺伝子であった(1)。X11L は、本研究室で APP と相互作用するタンパク質として同定され、脳特異的に発現する X11L が *in vivo* で APP 細胞内輸送及び代謝を制御 することを明らかとしてきた (2-5)。さらに、ヒト型 APP-Tg マウスにおける脳 Aβ産生および沈着が、X11L-KO により増強された(6)ことを報告した。これらの成果は、X11L が AD 発症に関与する因子であることを示唆している。

我々は、*ApoE4* バックグラウンドで X11L が発現制御に関わる遺伝子群、かつ AD 発症に関与する遺伝子を探索する目的で、WT, X11L-KO, ヒト *ApoE4*(h*ApoE4*)-KI, h*ApoE4*-KI/X11L-KO マウスの脳を用いた RNA-seq による包括的な遺伝子発現解析を行った。発現が *ApoE4* および X11L によって調節される遺伝子群を同定し、それらの遺伝子に関する GO 解析を行ったところ、同定された遺伝子は細胞内タンパク輸送に関与するタンパク質の遺伝子であることを明らかとした。また、公的に利用可能なヒトデータを用いて、*ApoE3* および *ApoE4* キャリアとの遺伝子発現差異分析を行い、マウス脳による解析・同定された遺伝子群と共通する遺伝子を見いだした。

これらは、*ApoE4* と X11L によって調節される一連の遺伝子が存在し、その機能が AD 発症と密接に関連していることを示唆している。我々は、得られたデータのさらなる解析を行い、*ApoE4* および X11L 制御遺伝子が AD 発症に関連する分子機構の解明を行っており、その一端を発表する。

【参考文献】

- 1) Rhinn (2013) Nature, 500, 45-50.
- 2) Tomita (1999) J. Biol. Chem., 274, 2243-2254.
- 3) Motodate (2016) Brain Res., 1646, 227-234.
- 4) Sano (2006) J. Biol. Chem., 281, 37853-37860.
- 5) Saito (2008) J. Biol. Chem., 283, 35763-35771.
- 6) Kondo (2010) Mol. Neurodegener. 5, 35

RNA polymerase II CTD Ser7 は転写を減速させて Argonaute の RNA への targeting を促進する

氏名：○梶谷卓也¹、加藤太陽²、木村宏³、大川恭之⁴、Damien Hermand⁵、村上洋太¹

所属：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島根大学・大学院医学系研究科

³東京工業大学・大学院生命理工学研究科

⁴九州大学・生体防御医学研究所

⁵ナミュール大学・ナミュールアドバンスドリサーチカレッジ

【要旨】

<背景>

分裂酵母から哺乳類まで、多くの生物で small RNA がヘテロクロマチン形成に重要であることが知られているが、RNAi 因子と small RNA の供給源あるいは Argonaute の標的としての RNA polymerase II(RNAPII)との機能的相互作用については理解が進んでいない。一方、RNAPII C 末端ドメイン(CTD)のリン酸化は転写と共役したヒストン修飾や RNA processing に関与することから、我々は CTD と RNAi およびヘテロクロマチンの関係に着目した。

<結果>

我々は CTD とヘテロクロマチンの関連を調べるために、分裂酵母において Ser2,5,7 のアラニン置換変異株(S2A,S5A,S7A)を作成した。その結果、S7A ではセントロメア由来 siRNA と H3K9 メチル化が顕著に減少した。興味深いことに、S7A では、CTD Ser2 リン酸化の亢進、転写伸長因子の増加に代表される転写の過剰活性化が生じることを見出した。そこで転写活性化を抑制する CTD-S2AS7A 二重変異を導入すると、siRNA と H3K9 メチル化は回復した。S2AS7A 変異と同様に、転写終結因子 CPSF の変異体でも同様の回復が観察された。加えて、人工的ヘテロクロマチン形成システムにおいて転写ユニットの 3' UTR を欠損させると S7A の機能欠損を回復できることが分かった。RNAi 経路の詳細な解析から、S7A ではヘテロクロマチン形成に必要な Argonaute 複合体の ncRNA への結合が減少し、siRNA の二次的増幅が阻害された結果、H3K9 メチル化が減少すると分かった。

<考察>

以上の結果から、(1)Ser7 は転写速度を減速させるブレーキの機能を持つこと、(2)転写終結が転写速度を制御すること、(3)転写速度がヘテロクロマチン形成に重要であることが示唆された。Ser7 による転写速度の低下は Argonaute による RNA への効率的ターゲティングを可能にする仕組みだと考えられる。本発表では、CTD による転写速度制御と small RNA を介したヒストン修飾制御の分子機構について議論したい。

癌抑制タンパク質 p53 ファミリー多量体形成ドメインの進化過程における構造と安定性

氏名：○中川夏美、工藤風樹、北川郁人、和田隼弥、鎌田瑠泉、今川敏明、坂口和靖
所属：北海道大学・大学院理学院・化学部門・生物化学研究室

【要旨】

癌抑制タンパク質 p53 ファミリーにおいて、四量体形成ドメインを介した四量体化は機能発現のために必須である[1]。p53 は細胞ストレスに対するゲノムの完全性維持に最も重要なタンパク質であり、p63 および p73 は発生や分化に関わる転写因子である。p53/p63/p73 スーパーファミリーの共通祖先となるタンパク質の発現は、無脊椎動物のイソギンチャクにおいて初めて見られる。p53 は初期脊椎動物であるヤツメウナギより見られ、魚類から哺乳類に至るまで発現している。ヒト p53 四量体形成ドメインは Fig.1 に示す構造を有し、単量体と四量体の平衡状態にある[2]。我々は、ヒト p53 四量体形成ドメイン中の各種変異が多量体構造の多様な不安定化を誘導することを見出している[3]。ゼブラフィッシュ p53 は、C 端部にヒト p63, p73 に類似した第 2 ヘリックスを有する。

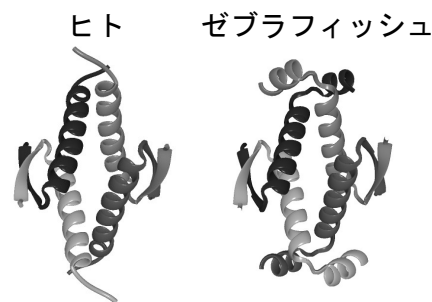


Fig. 1 ヒトおよびゼブラフィッシュ p53 の四量体構造

今回、癌抑制タンパク質 p53 ファミリーにおける多量体形成ドメインの構造および機能の進化過程について報告する。まず、脊椎動物の p53, p63 および p73 の全長アミノ酸配列より系統樹解析を実施した。その結果、p63, p73 は配列の相違度を示す Evolutionary Distance が小さく成熟したタンパク質である一方、p53 はより積極的に進化してきたことが示された。p53 においては、DNA 結合ドメインより多量体形成ドメインを変化させる方向を選択してきたことが示された。さらに、構造と機能の進化過程を明らかにするため、CD スペクトルによる p53 四量体形成ドメインペプチドの構造安定性解析および細胞内レポーターアッセイ系による転写活性解析を実施した。これらの結果より、初期魚類において第 2 ヘリックスが多量体構造安定化と転写活性上昇に大きく寄与することを見出した。まず、ヤツメウナギ p53 の構造安定性と転写活性は低く、ゼブラフィッシュなどの初期魚類が安定性を獲得した。その後、新魚類が第 2 ヘリックスを損失したことによる不安定化を経て、哺乳類への進化の過程で第 1 ヘリックスの伸長により高い構造安定性および転写活性を再獲得したことが明らかとなった。ヒト p63 と p73 とはヘテロ四量体を形成し互いの機能を阻害するが、p53 は p63 や p73 とはヘテロ四量体形成しないことが知られている。以上より、進化過程における第 2 ヘリックスの損失によって p53 が固有の機能を獲得したことが考えられた。

水中から陸上への生活環境変化において、脊椎動物は紫外線の急激な上昇などの遺伝毒性ストレスにさらされ、ゲノムの完全性維持に大きな問題を生じる。本研究により、進化過程において p53 が、環境変化に応じた多量体構造安定性の獲得および多量体構造の進化を介した機能の適応化が示唆された。

【参考文献】

- 1) Kamada R., Toguchi Y., Nomura T., Imagawa T., and Sakaguchi K. (2016) Biopolymers, 106, 598-612.
- 2) Clore G.M., Ernst J., Clubb R., Omichinski J.G., Kennedy W.M.P., Sakaguchi K., Appella E., and Gronenborn A.M. (1995) Nat. Struct. Biol., 2, 321-333.
- 3) Kamada R., Nomura T., Anderson C.W., and Sakaguchi K. (2011) J. Biol. Chem., 286, 252-258.

シェーグレン・ラルソン症候群の神経症状発症メカニズムの解明

氏名：○野尻光希¹，金武司¹，佐々貴之^{1,2}，木原章雄^{1,2}

所属：¹北海道大学・大学院生命科学院・生化学研究室

²北海道大学・大学院薬学研究院・生化学研究室

【要旨】

常染色体劣性遺伝疾患であるシェーグレン・ラルソン症候群（SLS）は、魚鱗鮮，痙性対麻痺，精神遅滞，羞明などの症状を伴う神経皮膚疾患である。SLS の原因遺伝子 *ALDH3A2* は脂肪族アルデヒド脱水素酵素をコードしている。*ALDH3A2* は様々な脂質代謝経路由来の脂肪族アルデヒド（主に長鎖脂肪族アルデヒド）の代謝に関与するが，これまでに当研究室では *ALDH3A2* がスフィンゴ脂質／スフィンゴシンの分解経路で産生される長鎖アルデヒド（ヘキサデセナールなど）の代謝に関与することを明らかにしている¹⁾。アルデヒドは一般的に反応性が高く，*ALDH3A2* 遺伝子変異によって蓄積した長鎖アルデヒドが生体機能に重要な何らかのタンパク質と反応して機能低下を引き起こし，SLS を発症させていると考えられている。しかし，具体的な長鎖アルデヒドのターゲットタンパク質を含め，SLS 発症の分子メカニズムは解明されておらず，本研究ではその解明を目指して解析を行った。

当研究室ではこれまでに *Aldh3a2* KO マウスの皮膚の解析を行い，ケラチノサイトの増殖，酸化ストレスの亢進などを明らかにしてきた²⁾。本研究では，SLS のもう 1 つの症状である神経症状に焦点を当てて研究を行った。*Aldh3a2* KO マウスの行動解析を行った結果，*Aldh3a2* KO マウスは運動機能異常や光に対する不安様行動などの SLS 様症状を示した。続いて *Aldh3a2* KO マウスの脳脂質を LC-MS/MS を用いて定量した結果，スフィンゴ脂質の一種であるガラクトシルセラミドとサルファチドの 2 位水酸化体が減少していた。これらの脂質はミエリンに多く存在（約 25%）し，ミエリンの形成・維持に重要である。これらの脂質の 2 位水酸化には脂肪酸 2 位水酸化酵素 FA2H が関与することから，*Aldh3a2* KO マウスでは FA2H 活性が低下していると予測された。実際，我々は *in vitro* 活性測定により，FA2H 活性が *ALDH3A2* 活性と相関していることを見出した。スフィンゴシンを培地中に添加した後，細胞から FA2H を精製して質量分析を行った結果，His335，His336 残基がアルデヒド修飾を受けていることが明らかとなった。His335，His336 残基は FA2H の活性に重要なヒスチジンボックス中に存在していることから，これらのヒスチジン残基に対するアルデヒド修飾が FA2H 活性低下の大きな要因になっていることが明らかとなった。スフィンゴシン分解経路において生じるヘキサデセナールは α ， β 不飽和アルデヒドであり，一般のアルデヒドよりも反応性が高い。実際，*Aldh3a2* KO 細胞において，ヘキサデセナールは飽和アルデヒドよりも強い細胞毒性を示した。質量分析の結果は，ヘキサデセナールが FA2H とシッフ塩基ではなく， α ， β 二重結合によるマイケル付加反応によって結合したことを示していた。

FA2H は遺伝性痙性対麻痺（SPG35）の原因遺伝子であり，SPG35 は SLS と類似した神経症状を示す。したがって，SLS の神経症状発症は，*ALDH3A2* 遺伝子変異によって蓄積した長鎖アルデヒドの修飾を受けて FA2H 活性が低下し，ミエリンの形成・維持に重要な 2 位水酸化脂質が減少することが原因であると考えられる。また，FA2H の基質（長鎖脂肪酸）は長鎖アルデヒドとよく似た構造を有していることから，*ALDH3A2* 遺伝子変異によって蓄積した長鎖アルデヒドは FA2H の基質ポケットに容易に入り込んで近傍のヒスチジン残基を攻撃すると考えられる。

【参考文献】

- 1) Nakahara K. *et al.* (2012) *Mol. Cell*, 46, 461-471.
- 2) Naganuma T. *et al.* (2016) *J. Biol. Chem.*, 291, 11676-11688.

***P. acnes* 誘導性炎症応答と Tyk2 の新規機能**

氏名：○平島洸基¹、室本竜太¹、松田正¹

所属：¹北海道大学・大学院薬学研究院・衛生化学研究室

【要旨】

Tyrosine kinase 2 (Tyk2)は JAK ファミリーに属する非受容体型チロシンキナーゼで、IL-12 シグナル伝達系に必須で、T 細胞や NK 細胞による II 型 IFN (IFN- γ)産生を担う。また、Tyk2 は生体内においてマクロファージ由来の I 型 (IFN- α , IFN- β)および II 型 IFN 双方の産生を介し Th1 型免疫反応や抗ウイルス応答に役割をもつ。*Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) は皮膚常在性のグラム陽性菌であり、マウス腹腔への *P. acnes* 加熱死菌投与を行うと、急性腹腔内炎症や、慢性炎症である脾腫および肝肉芽腫形成が誘導される。肝肉芽腫形成においては *P. acnes* による IFN- γ 産生が関与することが報告されており、Tyk2 欠損マウスでは IFN- γ 産生低下によりこれらの炎症応答が抑制される。しかし腹腔内炎症のように IFN 産生以前の早期急性炎症では、IFN 非依存的な Tyk2 の役割が存在すると考えられる。

本研究では、マウスへの *P. acnes* 加熱死菌投与により誘導される急性腹腔内炎症における Tyk2 の関与を検討し、*P. acnes* 誘導性の炎症応答における Tyk2 の IFN 非依存的な新たな役割を見出すことを目的とした。

P. acnes 加熱死菌腹腔内投与後早期 (12 時間後) に誘導される腹腔への好中球浸潤においては、Tyk2 欠損による抑制が見られた。一方、野生型マウスに抗 I 型 IFN 受容体サブユニット 1 (IFNAR1) 抗体および抗 IFN- γ 抗体を同時投与することで生体内の I 型および II 型 IFN 応答を阻害し *P. acnes* 投与による炎症反応への影響を調べた。その結果コントロール Ig 投与マウスと比較して腹腔好中球浸潤は抑制されなかったことから、Tyk2 欠損による影響との乖離がみられた。腹腔常在性細胞数およびその組成を調べたところ Tyk2 欠損マウスでは野生型マウスに比べて、T 細胞、B 細胞数は減少したがマクロファージ数は変動しなかった。また、Tyk2 欠損マウスでは腹腔内炎症誘導時、炎症抑制性サイトカイン IL-10 量が野生型マウスに比べ増加していた。さらに、Tyk2 欠損マウスに抗 IL-10 中和抗体を投与することで、*P. acnes* 投与時の腹腔好中球浸潤は野生型マウスと同程度まで回復した。

以上の結果から、Tyk2 は IFN 関与が低い早期急性腹腔内炎症において促進的に寄与することが新たに示された。また Tyk2 欠損マウスにおける腹腔内炎症抑制機序として腹腔内 IL-10 量が関与することが示された。

関節リウマチモデルにおいて左右対称性病変は病変間を結ぶ感覚神経回路によって導かれる

氏名：○大木拓究人¹、上村大輔¹、原田誠也²、河野史倫³、太田光俊¹、樋口光太郎¹、Mohamed Sobhy Hassan Elfeky¹、西川直樹¹、田中勇希¹、中川育磨¹、有馬康伸¹、村上正晃¹

所属：

¹北海道大学・遺伝子病制御研究所・大学院医学院分子神経免疫学

²大阪大学大学院医学系研究科・生命機能研究科・免疫発生学

³松本大学大学院健康科学研究科宇宙医学・生理学

【要旨】

関節リウマチにおける左右対称性の関節炎は、かつては診断項目に存在し臨床的に頻度の高い特異的な所見である。その原因の一つとして、神経系が関連することが示唆されているが、現在のところ原因となる神経回路、そして分子については明らかとされていない。以前、我々は多発性硬化症モデルマウスにおいて、重力や痛み刺激に伴う局所的な神経刺激が感覚-交感神経経路の活性化を誘導し、神経伝達物質を介して過剰な局所炎症を引き起こすことを報告している。この過剰な炎症には、**NF- κ B** および **STAT** が関与する炎症回路と名付けたケモカイン過剰産生機構が関与する。今回、関節リウマチの左右対称性病変においても類似の機構が存在することを見出したため報告する。

炎症回路が増強しており、**IL-17**、**IL-6** の踵関節内投与により関節リウマチ様病変を早期に誘導できる **F759** マウスを用い解析を行なった。踵関節に接続する感覚神経の片側のみの遮断が、両側の関節リウマチ様病変を有意に抑制すること、また片側のみの感覚神経の活性化が、その反対側の関節病変をより悪化させることが判明した。また、**IL-17**、**IL-6** 投与側とは反対の関節において、感覚神経から放出される神経伝達物質が炎症を増強することが判明した。これらの結果は、両踵関節間の感覚神経を介した神経回路が左右対称性の病態形成に強く関与することを示している。神経トレーサー**HSV2** を用いて両踵関節間の神経回路を探索し、下部胸椎の介在ニューロンによって左右の関節の炎症強度が調節されていることを見出した。

左右対称性の病態は、関節リウマチ以外の疾患である交感性眼炎、乾癬、また糸球体腎炎においても生じることがあり、今回同定したものに類似した神経回路が存在する可能性がある。さらには、病態に強く関与する神経回路の局所的な遮断、もしくはそれらの神経回路における伝達物質を阻害するような新しい治療戦略につながる可能性があると考えている。

多価不飽和脂肪酸含有スフィンゴ脂質の組織分布及び生合成経路の解明

氏名：○枝川茉生¹，澤井恵¹，大野祐介^{1,2}，木原章雄^{1,2}

所属：¹北海道大学・薬学部・生化学研究室

²北海道大学・大学院薬学研究院・生化学研究室

【要旨】

スフィンゴ脂質は真核生物の細胞膜を構成する主要な脂質の1つで、皮膚バリア形成、神経機能、糖代謝の調節など様々な機能をもつ。スフィンゴ脂質骨格であるセラミドは脂肪酸と長鎖塩基で構成されている。スフィンゴ脂質を構成する脂肪酸の殆どは飽和脂肪酸であり、炭素数 24 (C24) の極長鎖脂肪酸を多く含むことを特徴とする。スフィンゴ脂質はコレステロールと共に細胞膜で脂質マイクロドメインを形成しているが、折れ曲がりのない飽和で長い脂肪酸は強固なマイクロドメイン形成に重要である。また、スフィンゴ脂質には一価不飽和脂肪酸である C24:1 も存在し、マイクロドメイン形成において調節的な役割を果たすと考えられる。一方、スフィンゴ脂質にはこれまで精巢を除き、多価不飽和脂肪酸 (PUFA) を含むという報告はない。しかし、本研究において我々は PUFA を含むスフィンゴ脂質を見出し、その生合成経路を解明したので報告する。

マウス組織及びヒト細胞の脂質抽出液を LC-MS/MS を用いて解析し、PUFA スフィンゴ脂質が存在していることを見出した。PUFA スフィンゴ脂質の中では C24:2 を含有したものが最も多く存在した。組織間分布としては、C24:2 セラミドは肺・脾臓・小腸・腎臓で多く、最も多い脾臓では C24:0 の約 45% であった。

セラミド合成酵素 CERS は長鎖塩基とアシル CoA からセラミドを合成する。哺乳類には 6 種類のアイソザイム (CERS1-6) が存在しており、この中で CERS2 は C22-26 アシル CoA に対して高い活性を示す。我々は PUFA 含有スフィンゴ脂質産生への CERS2 の役割を調べるために、CERS2 遺伝子をノックアウトしたヒト白血球細胞株 HAP1 細胞を作製してセラミド組成を解析した。その結果、C22-26 脂肪酸を持つ PUFA セラミドが大きく減少していた。

C18 以上の脂肪酸は小胞体膜上で、脂肪酸伸長サイクルにより合成される。1 段階目の縮合反応を担う脂肪酸伸長酵素 ELOVL には、7 種類のアイソザイム (ELOVL1-7) が存在する。この中で、ELOVL1 は飽和、一価不飽和の C24-26 CoA の合成に関与する¹⁾。Elov11 ノックアウトマウスの肺・脾臓・肝臓・小腸のセラミドについて解析したところ、C24:2 脂肪酸をもつセラミドが野生型マウスと比べて大きく減少していた。

以上の結果から、様々な組織に PUFA スフィンゴ脂質が存在し、その合成には CERS2, ELOVL1 が関与していることが明らかとなった。PUFA 中のシス二重結合は細胞膜上で大きく折れ曲がり、脂質マイクロドメイン形成を弱める作用があると予測されるため、PUFA スフィンゴ脂質は脂質マイクロドメイン形成において調節的な役割を持つと考えられる。

【参考文献】

- 1) Ohno Y., Suto S., Yamanaka M., Mizutani Y., Mitsutake S., Igarashi Y., Sassa T., and Kihara A. (2010) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 107, 18439-18444.

フィトスフィンゴシン代謝に関わる α 酸化酵素の生化学的解析

氏名：○毛利圭佑¹，関直哉²，小原隆²，宮本政宗²，北村拓也²，木原章雄^{1,2,3}

所属：¹北海道大学・薬学部・生化学研究室

²北海道大学・大学院生命科学院・生化学研究室

³北海道大学・大学院薬学研究院・生化学研究室

【要旨】

スフィンゴ脂質は疎水性骨格であるセラミドと極性基からなる脂質分子であり、神経機能、免疫機能、皮膚バリアの形成など様々な生理機能を担う。セラミドを構成する長鎖塩基としてスフィンゴシン、ジヒドロスフィンゴシン、フィトスフィンゴシン (PHS) などが知られている。PHS は 4 位に水酸基を持つため、他の長鎖塩基と異なった分解経路によって代謝される。この過程では分解中間体である 2-ヒドロキシ (2-OH) 脂肪酸が α 酸化と呼ばれる炭素数 1 の減少を伴う酸化によって奇数鎖脂肪酸へと変換され、その後主にグリセロ脂質へ代謝される。これまで、 α 酸化酵素は不明であったが、最近当研究室では酵母 Mpo1、哺乳類 HAC1/2 を同定した^{1),2)}。本研究では Mpo1 と HAC1/2 の基質特異性の解明を含む生化学的な解析を行ったので報告する。

MPO1 を欠損した酵母株 (*mpo1 Δ*) を [³H]2-OH パルミチン酸をラベルしたところ、野生株中で見られるようなペンタデカン酸/グリセロ脂質への代謝が損なわれていた。*mpo1 Δ* 株より脂質を抽出し、ホスファチジルコリン (PC) 量を LC-MS/MS で定量したところ、野生型に比べて奇数鎖脂肪酸を含む PC が大幅に減少していた。2-OH パルミチン酸を培地に添加すると野生型では奇数鎖 PC 量が 2-3 倍に増加したが、*mpo1 Δ* 株では僅かに増加したのみであった。同様に *mpo1 Δ* 株より抽出した脂質からセラミド量を測定したところ、C25 セラミドが野生型に比べて大きく減少していた。これらのことから、2-OH 長鎖、極長鎖脂肪酸の両方の α 酸化に Mpo1 が関与することが明らかになった。次に、Mpo1 が α 酸化経路においてどのような機能を果たしているのかを調べるため、精製 Mpo1 を用いて活性測定を行った。その結果、Mpo1 は鉄イオン依存的に 2-OH パルミチン酸を 1 段階の反応でペンタデカン酸へ変換した。保存性の高いアミノ酸残基をアラニンへ置換した変異 Mpo1 の活性を [³H]2-OH パルミチン酸ラベルによって調べた結果、19, 28, 115 番目のヒスチジン残基変異体ではいずれも活性が失われていた。これらのことから、Mpo1 は活性中心において 3 つのヒスチジン残基が鉄イオンに配位したオキシゲナーゼであることが示唆された。

哺乳類 α 酸化酵素 HAC1/2 の基質特異性の違いを明らかにするため、*mpo1 Δ* 株中で HAC1/2 を異所的に発現させて脂質を抽出し、LC-MS/MS で定量した。奇数鎖脂肪酸を含む PC 量は HAC1/2 どちらでも増加したが、HAC2 でより大きい増加が見られた。また、C25 セラミド量を定量すると、HAC2 を発現させた株でのみ有意に増加していた。これらのことから、HAC1, 2 共に 2-OH 長鎖アシル CoA に対して活性を示すが、HAC2 のみが 2-OH 極長鎖アシル CoA に対しては活性を示すことが明らかとなった。

【参考文献】

- 1) Kondo N. *et al.* (2014) Nat. Commun., 5, 5338.
- 2) Kitamura T. *et al.* (2017) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 114, E2616-E2623.

コレステロールの細胞膜二層間動態と膜変形機構におけるフィードバック制御機構

氏名：○岸本拓磨¹、小林俊秀²

所属：¹北海道大学遺伝子病制御研究所・分子間情報分野

²フランス国立科学研究センター

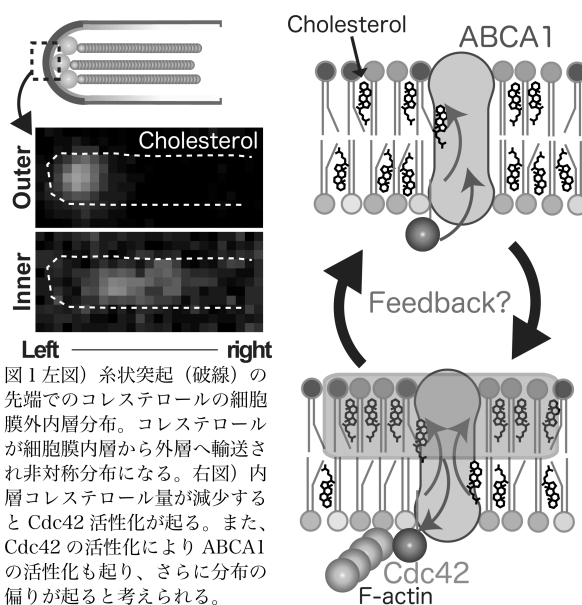
【要旨】

細胞膜の現象は、脂質とアクチン細胞骨格のダイナミックな相互作用により制御される。そのため、その機構の振舞いを解明する事は細胞膜現象の解明に重要である。しかし、①生細胞で脂質とアクチン細胞骨格の動態がどう相関するか、②細胞膜外層に多いコレステロールとスフィンゴ脂質が秩序液体層様ドメイン（ラフト）を形成し細胞骨格制御機構となると提唱されるが、生細胞でそれが観察されるか、③外層のラフト脂質がどのように内層側のアクチン細胞骨格を制御するか、と云う点は未解明である。

我々は、これらの疑問に取り組むため、細胞膜の脂質をより正確に可視化する全反射顕微鏡を用いた脂質プローブ観察実験系を構築した。そして、この実験系を用いて HeLa 細胞の細胞伸展をモデルとした脂質の動態を調査した。細胞膜外層のコレステロール（ラフト脂質の一つ）の含有量が高いドメインを perfringolysin 0 の膜結合ドメイン 4（D4）にて可視化した。その結果、D4 で染色されるコレステロールドメイン（D4-ドメイン）と細胞膜外層の別のラフト脂質 sphingomyelin は、細胞伸展するにつれ徐々に分離し別々の局在を示した。D4-ドメインは糸状突起の先端に局在し、伸展とともに突起全体に拡散した。この突起先端の細胞膜外層 D4-ドメインの裏側に当たる内層側ではコレステロールの局在量が減少していた（図 1 左図）。さらに、脂質環境依存性プローブ di-4-ANEPPDHQ を用いた実験によって、D4-ドメインがラフト様の秩序液体層を示す領域である事を明らかにした。

細胞膜二層間における D4-ドメインの動態がどのように制御されるかを調査した結果、コレステロールの輸送に関わる ABC トランスポーターの ABCA1 とアクチン細胞骨格関連低分子量 G タンパク質 Cdc42 により制御される事が明らかになった。一方、Cdc42 はコレステロール量が減少する事により活性が変化する事が明らかとなった。これらの結果から、1) 糸状仮足の先端にて CDC42 による制御を受け ABCA1 が活性化、コレステロールドメイン（細胞膜外層）を形成する。2) それにより膜物性が変化し、CDC42 がポジティブフィードバックを受けさらなる活性化が起る。このようなコレステロールの細胞膜外層-内層の輸送が Cdc42 その下流因子（N-WASP 等のアクチン細胞骨格関連タンパク質）が活性化され、アクチン細胞骨格を制御していると予測された。このような脂質分布と Cdc42 の両者にフィードバック制御機構がある可能性が示唆された（図 1 右図）。

以上、本研究によりコレステロールの細胞膜二層間動態変化が、細胞骨格を介した膜変形を制御する知見が得られた。



Kinesin-1 リン酸化による APP 輸送制御機構

千葉杏子^{1, 2}、○白木柚葉¹、蘇武佑里子¹、金城政孝³、鈴木利治¹

¹北海道大学・大学院薬学研究院・神経科学研究室

²UC DAVIS, College of Biological Sciences

³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

【要旨】

長大な突起を有する神経細胞において適切な細胞内輸送は細胞の機能発現に不可欠である。しかしながら、モータータンパク質が働く上でどのような制御機構が働いているかは未だ明かではない。我々はモーター制御機構としてアダプタータンパク質とモーターの相互作用に着目した。特に主要な順行輸送モータータンパク質である kinesin-1 および kinesin-1 アダプタータンパク質である JNK-interacting protein 1 (JIP1)について解析を行った。

JIP1 は β -amyloid precursor protein (APP) などのカーゴと kinesin-1 の結合を介在するタンパク質である (図 1)。JIP1 は kinesin-1 の活性化機能があることが知られていたが、実際の輸送過程でどのような役割を果たすのかは明かではなかった(1)。我々は JIP1 が APP カーゴ輸送の「質」に果たす役割を検証するため JIP1 遺伝子欠損マウスから調製した初代培養神経細胞に APP-EGFP を発現させ、全反射顕微鏡により軸索中の EGFP 小胞の輸送を解析した。その結果、JIP1 欠損神経細胞においては野生型に比べ順行性輸送の速度および頻度に低下が見られた。また、様々な JIP1 変異体を用いた回復実験の結果、JIP1 の kinesin-1 への結合が APP 輸送の速度・頻度の維持に必要であることが明らかになった。

JIP1 は kinesin-1 のキネシン軽鎖 (KLC)と相互作用するがその結合様式は詳細には解析されていなかった。我々は JIP1 および KLC1 の部位欠損変異体を系統立てて作製することで JIP1 と KLC1 の結合は従来から報告されていた C 末端同士の結合(conventional interaction)に加え、N 末端同士の結合 (novel interaction)も含めた複雑な結合様式をとることを見出した。JIP1 の N 末端、C 末端それぞれが APP 輸送に対して異なる機能を果たしており、N 末端の結合は輸送頻度維持、C 末端の結合は輸送の高速化を担う事を明らかとした(2)。

これら APP 輸送における JIP1 の機能が制御される仕組みを明らかにするため、JIP1 と KLC の結合制御機構を解析した。ホスファターゼ阻害剤や LC-MS/MS を用いた解析から KLC1 のリン酸化が JIP1 の C 末端との結合を減弱させることが明らかとなった。リン酸化特異抗体を用いた解析により、マウス脳においてリン酸化 KLC1 が存在し、kinesin-1 複合体として機能することが示された。さらに加齢により KLC1 リン酸化レベルは変化する事を見だし、加齢個体の神経細胞では、軸索輸送の質的变化が生じている可能性が示唆された (3)。これらの結果は、アダプタータンパク質 JIP1 が kinesin-1 の機能を調節する modulator として働いており、生体内では、加齢に伴いその機能制御が変化することで神経機能の低下に関わる可能性を示唆している。

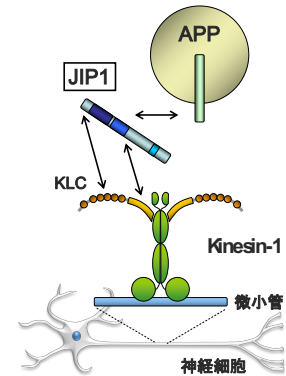


図1 JIP1と Kinesin-1, APPの相互作用

【参考文献】

- (1) Blasius et al., J. Cell Biol. (2007) 176, 11-17.
- (2) Chiba et al., Mol. Biol. Cell (2014) 25, 3569-3580.
- (3) Chiba et al., (2017) submitted for publication.

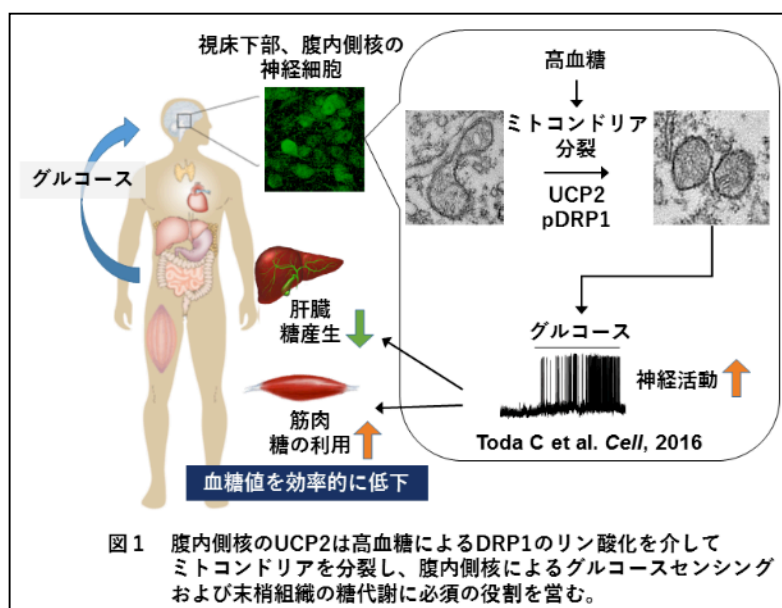
視床下部の血糖値感知ニューロンにおけるミトコンドリアの形態変化と全身の糖代謝調節

氏名：○戸田知得¹

所属：¹北海道大学・大学院獣医学研究院・生化学教室

【要旨】

脳は摂食・飲水・末梢組織のエネルギー代謝など、生物の生命維持に関わる重要な器官である。特に視床下部は全身のエネルギー蓄積量を検知するエネルギーセンサーとして働き、体内のエネルギー蓄積状況に応じて摂食量やエネルギー消費量を調節することで、体内エネルギーの恒常性を維持する。視床下部にはグルコース感受性神経が存在し、血糖値の維持に必須の役割を果たす。ミトコンドリア脱共役タンパク質 2 (uncoupling protein 2: UCP2) はミトコンドリア内膜に存在し、電子伝達系で作られたプロトンの濃度勾配を解消することで ATP の産生や活性酸素の生成を低下する。UCP2 は視床下部の中で腹内側核に顕著な発現が認められる。しかし、その役割は良く分かっていなかった。我々は、腹内側核の UCP2 が高血糖時にグルコース興奮性神経の活動増加および肝臓・骨格筋のインスリン感受性を亢進することで全身レベルの糖代謝に必須の役割を営むことを明らかにした。また近年、ミトコンドリアはダイナミックに分裂・結合を繰り返していることが明らかとなり、ミトコンドリアの形態変化が新たな細胞機能の調節因子として注目されている。我々は腹内側核の UCP2 が高血糖時にミトコンドリアの形態を小さくし、神経細胞の活動に影響を及ぼすことを明らかにした (図 1)。本講演では、ミトコンドリアの形態変化、神経活動、そして全身の糖代謝に焦点を当て、新しいデータを紹介します。



【参考文献】

- 1) Toda C, Santoro A, Kim JD, Diano S. (2017) *Annual Review of Physiology*, 79:209-236.
- 2) Toda C, Kim JD, Impellizzeri D, Cuzzocrea S, Liu ZW, Diano S. (2016) *Cell*. 64:872-883.
- 3) Toda C, Diano S. (2014) *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 28:757-764.

胸腺における正の選択を介した T 細胞の機能的教育

氏名：○高田健介^{1, 2}

所属：¹北海道大学・大学院獣医学研究院・動物分子医学教室

²前所属：徳島大学・先端酵素学研究所・免疫系発生学分野

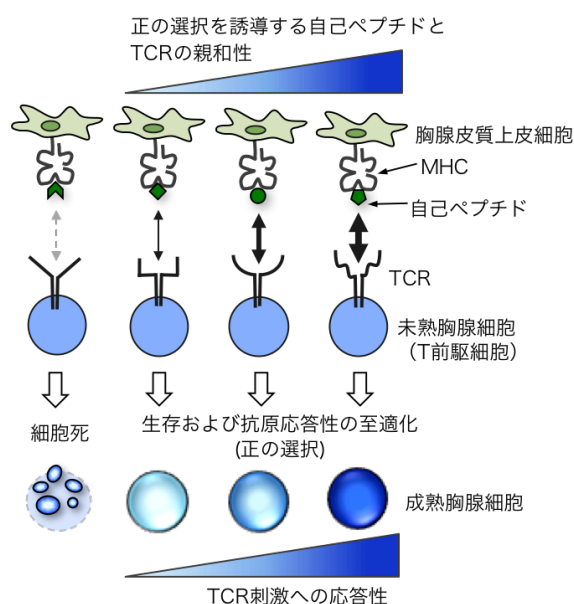
【要旨】

胸腺では、T 前駆細胞が発現する抗原受容体 (TCR) と抗原提示細胞上の自己ペプチドとの親和性に依存して、一部の T 前駆細胞のみが成熟を許される。正の選択は、胸腺皮質上皮細胞 (cTEC) 上の自己ペプチド-MHC 複合体に低い親和性をもつ T 前駆細胞を選択的に分化誘導する過程であり、生体に有用な TCR レパトアを形成する機構と考えられている。しかし、正の選択の生理的意義については未だ十分に解明されていない。

ユビキチン・プロテアソーム系は、MHC クラス I 会合ペプチドの産生に関与する。胸腺プロテアソームは cTEC に特異的に発現され、他のプロテアソームとは異なる基質特異性を示す。胸腺プロテアソーム欠損マウスでは CD8T 細胞の正の選択に異常が生じ TCR レパトアが変容することから、胸腺プロテアソーム依存的に産生される cTEC 固有の自己ペプチドが正の選択に重要な役割を果たすことが示唆されている。

本研究では、胸腺プロテアソーム欠損下で分化した CD8T 細胞の解析を通して、正の選択が T 細胞の機能に与える影響を検討した。胸腺プロテアソーム欠損下では TCR との親和性がより低い自己ペプチドによって正の選択が誘導され、抗原応答に顕著な異常が認められた。さらに、胎児胸腺培養によって、正の選択を引き起こす自己ペプチドの TCR 親和性が CD8T 細胞の抗原応答性に直接影響することが示された。これらの知見から、成熟 T 細胞の機能を分化段階で規定することで獲得免疫系の形成に寄与するという正の選択の新たな役割が明らかとなった。

【図 1】 正の選択を介した CD8T 細胞の機能的教育：胸腺皮質上皮細胞 (cTEC) によって提示された自己ペプチドと T 細胞抗原受容体 (TCR) の親和性が成熟 CD8T 細胞の抗原応答性を規定する。



【参考文献】

- 1) Kondo K., Takada K., and Takahama Y. (2017) Curr. Opin. Immunol., 46, 53-57.
- 2) Takada K., Kondo K., and Takahama Y. (2017) J. Immunol., 198, 2215-2222.
- 3) Takada K., Van Laethem F., Xing Y., Akane K., Suzuki H., Murata S., Tanaka K., Jameson, S.C., Singer A., and Takahama Y. (2015) Nat. Immunol., 16, 1069-1076.

正常上皮細胞はがん変異細胞に Warburg 効果様の代謝の変化をひき起こし上皮層から排除する

氏名：○昆俊亮¹、石橋公二郎¹、藤田恭之¹

所属：¹北海道大学・遺伝子病制御研究所・分子腫瘍分野

【要旨】

最近の研究成果より、正常上皮細胞層に少数のがん変異細胞が生じたとき、正常細胞と変異細胞間で互いに生存を争う「細胞競合」現象が起こり、その結果、変異細胞は上皮細胞層から管腔側へ排除されることが明らかとなってきた。このように、正常上皮細胞は隣接する変異細胞を認識し、積極的に排除する機能 (EDAC: Epithelial Defense Against Cancer) を有していることが分かってきたが、がん変異細胞を上皮層より排除する分子機構についてはほとんど分かっていない。

本研究では、この動的かつ抗腫瘍的現象を調節する代謝機構を解明することを目的とした。まず、培養細胞系にてミトコンドリアの活性を評価したところ、正常細胞に囲まれた Ras 変異細胞ではミトコンドリア内膜の膜電位が顕著に低下していることを見出した。さらには、正常細胞と混合培養下の Ras 変異細胞では、グルコースの取り込みと lactate dehydrogenase A (LDHA) の発現が亢進しており、乳酸産生量が Ras 変異細胞単独培養時に比べて増加していた。これらの結果より、正常細胞と共存した Ras 変異細胞は、ミトコンドリア活性が低下し、相対的に好氣的解糖系が亢進しており、すなわちワールブルグ効果様代謝様式にシフトすることが示唆された。そこで、この細胞非自律的な代謝変化を引き起こす分子機構を解明するため、代謝関連酵素の発現量を検討した結果、ピルビン酸をアセチル CoA に変換する pyruvate dehydrogenase (PDH) の活性を阻害する pyruvate dehydrogenase kinase 4 (PDK4) が有意に発現増加していることを突き止めた。PDK4 を欠損した Ras 変異細胞株を樹立し、正常細胞と共培養したところ、ミトコンドリア機能が回復し、さらには管腔側への逸脱が顕著に抑制された。この事象を生体内で検証すべく、腸管上皮細胞にモザイク状に Ras 変異を誘導できる新規マウスモデルを開発した。このマウスを解析した結果、正常細胞に囲まれた Ras 変異細胞のミトコンドリア活性の低下を認め、変異細胞のほとんどが管腔側へ排除されていた。さらには、腸管上皮特異的に PDK4 をノックダウンすると、Ras 変異細胞の管腔側への排除が有意に抑制された。これらの結果より、上皮細胞層に少数のがん変異細胞が出現するがんの初期段階では、正常細胞の作用により変異細胞はワールブルグ効果様代謝変化がおこり、上皮層より排除されることが示された。

【参考文献】

- 1) Kon S *et al.*, (2017) Nat. Cell Biol., 19, 530-541.

計算科学的手法によるウイルスタンパク質の解析

氏名：○五十嵐 学¹

所属：¹北海道大学・人獣共通感染症リサーチセンター・国際疫学部門

【要旨】

近年、インフルエンザ、ジカ熱、エボラウイルス病など、新興・再興感染症が世界各地で発生している。これらの感染症のほとんどは、野生動物と共存していた微生物がヒトに感染することで起こる人獣共通感染症である。人獣共通感染症のコントロールには、自然界における病原微生物の生態や伝播経路の解明から、ワクチン・薬剤の開発まで、包括的に研究することが必要である。我々は、分子シミュレーションやバイオインフォマティクス等の手法を用いて、病原体や宿主の遺伝子・蛋白質を解析し、計算科学的視点から病原体制御に資する知見を得ることを目指している。また蛋白質の立体構造情報を基盤に、ワクチンや治療・診断薬の開発に向けた基礎研究も進めている。本発表では、特にインフルエンザウイルスの表面糖蛋白質と抗体の分子間相互作用解析に関する成績を中心に、最近の研究成果を概説する。

【参考文献】

- 1) Igarashi M. (2015) YAKUGAKU ZASSHI., 135(9), 1015-1021.
- 2) Motohashi Y*, Igarashi M*, Okamatsu M, Noshi T, Sakoda Y, Yamamoto N, Ito K, Yoshida R, Kida H. (2013) Virol J., 10, 108.
- 3) Takano R*, Kiso M*, Igarashi M*, Le QM, Sekijima M, Ito K, Takada A, Kawaoka Y (2013) J. Infect. Dis., 207(1), 89-97.
- 4) Igarashi M, Ito K, Yoshida R, Tomabechi D, Kida H Takada A. (2010) PloS One., 5(1), e8553.

好熱性バクテリアのレチナールタンパク質:発見と物性解析のこれまでとこれから

氏名: ○塚本卓^{1,2}

所属: ¹北海道大学・大学院先端生命科学研究院・生物情報解析科学研究室、

²北海道大学・国際連携研究教育局・ソフトマターグローバルテーション

【要旨】

光受容体タンパク質のうち、レチナール（アルデヒド型ビタミン A）を発色団にもつものを総称してレチナールタンパク質とよびます。レチナールタンパク質は、動物から微生物まで多くの生物に備わっており、例えば動物では視覚や色覚、微生物ではエネルギー産生や光走性の情報伝達を担っています。ゲノム解析技術の発展によって、地球上のさまざまな環境から、レチナールタンパク質をコードする遺伝子をもつ生物が数多く発見されています。このおかげで、Na⁺ポンプ、SO₄²⁻ポンプ、Cl⁻ポンプ、Cl⁻チャンネル、キナーゼといった、光によって駆動されるさまざまな機能を持つレチナールタンパク質の物性が明らかになりました。さらに、光によって細胞活動の活性と抑制を制御する光遺伝学のツール分子としての利用が進んだことで、レチナールタンパク質は今、とても注目されているタンパク質のひとつだと言えます。

こうした中、2013 年、私たちは初めて高度好熱菌からレチナールタンパク質を発見し、サーモフィリックロドプシン (TR) と名付けました。レチナールは高温で分解しやすい性質をもつため、高度好熱菌のような高温環境にすむ生物には、レチナールタンパク質は存在しないと考えられていました。物性を調べたところ、TR は 530 nm の緑色光を最もよく吸収し、細胞外向きに H⁺をポンプする機能を持つことがわかりました。さまざまな分光法を用いて、TR の H⁺ポンプ機能を実現する光化学反応や多量体形成能を明らかにしました。何より、TR は既知のレチナールタンパク質をはるかに上回る熱安定性を持つことがわかりました。TR の高い熱安定性を実現する構造的要因を探るために立体構造解析を行ったところ、TR の構造は多くの疎水性相互作用によって安定化されていることがわかりました。熱以外の刺激に対する安定性も広く調査し、TR の構造の頑丈さは材料として応用できる可能性があることを示しました。また、2017 年に私たちは別の好熱菌 *Rubrobacter xylophilus* からレチナールタンパク質 (RxR) を発見しました。同様に熱安定性を調べたところ、TR の 10 倍以上も熱に安定であることがわかりました。現在、この RxR は、世界で最も安定なレチナールタンパク質として報告されています。

これまでの研究から、好熱菌もレチナールタンパク質を持っていることがわかりました。では、どのように好熱菌内でレチナールを作り出しているのでしょうか？どのようにレチナールをタンパク質に届けているのでしょうか？これを明らかにするため、好熱菌由来のレチナール合成酵素に着目し、現在、この酵素の物性解析を行っています。これにより、好熱菌内でレチナールタンパク質がどのように成熟していくのかを明らかにすることができると考えています。

【参考文献】

- 1) Honda N., Tsukamoto T., and Sudo Y. (2017) *Chem. Phys. Lett.* 682, 6-14.
- 2) Kanehara K., Yoshizawa S., Tsukamoto T., and Sudo Y. (2017) *Sci. Rep.* 7, 44427.
- 3) Tsukamoto T., Mizutani K., Hasegawa T., et al. (2016) *J. Biol. Chem.* 291, 12223-12232.
- 4) 塚本卓, 須藤雄気. (2015) *生物物理* 55, 92-94.
- 5) Tsukamoto T., Demura M., and Sudo Y. (2014) *J. Phys. Chem. B* 118, 12383-12394.
- 6) Tsukamoto T., Inoue K., Kandori H., and Sudo Y. (2013) *J. Biol. Chem.* 288, 21581-21592.

ビスフェノール類の代謝から見てきた薬物抱合の役割

氏名：○岩野英知、藤木純平、横田博、井上博紀

所属： 酪農学園大学・獣医学類・獣医生化学ユニット

【要旨】

我々の身の回りには多くの化学物質があふれており、日常的に多くの化学物質に接触している。生体は、それら多くの化学物質を無毒化し、排除する効率的なシステムを備えている。たとえば、内分泌攪乱化学物質であるビスフェノール A (BPA) は、そのエストロゲン作用で大きく騒がれたが、現在では成熟した健康な大人であれば、大きな影響はないということが明らかとなった。それは、BPA が薬物代謝の第 II 相酵素 UDP-glucuronosyltransferase (UGT) により効率的に代謝され、排泄されるからである (文献 1))。一方で、妊娠中に BPA を暴露すると、たとえ低容量であっても次世代に悪影響を及ぼすとの報告がある。この低容量 BPA による胎児影響には、以下の 3 つのファクターが関与している、と我々は考えている。①妊娠中の母-仔間の体内動態②胎児における代謝システム (グルクロン酸抱合と脱抱合) ③胎児でのエストロジェニックな作用以外の攪乱

以上の仮説をもとに、これまでに我々は以下の点を明らかにしてきた。①BPA の代謝物 (BPA-グルクロン酸抱合体) が胎盤を通過する可能性があること (図 1、文献 2)) ②胎児側に移行した BPA 代謝物が BPA に再変換されうること (図 1、文献 2)) ③胎児期のビスフェノール類に対する UGT 活性はとても低いこと (図 1、文献 3) ④薬物抱合のタイプによっては、胎盤通過が異なる可能性があること (検証中) ⑤ビスフェノール類 (BPA、BPF) の妊娠中の暴露は、生まれた仔の成熟後に対して不安行動を増強すること (図 2、文献 4))。本発表では、これらの研究を踏まえながら、薬物抱合の役割、特に胎盤通過についての結果を中心に報告する。これまで薬物抱合反応は、薬物を排泄されるためのシステムであり、抱合体そのものの生体内での役割、影響については見いだせていなかった。生体内物質の抱合体には、排泄だけでなく運搬体としての意義があり、生体外からの化学物質も同様の過程をとる場合もあると考えている。今後、抱合体そのものの役割を詳細に検討するべきと考えている。

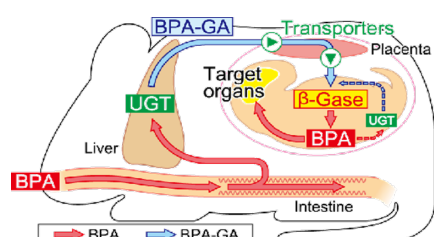


図1. Pharmacokinetics of BPA in pregnant rat
(Nishikawa et al. *Environ Health Perspect.* 2010 118:1196-203)

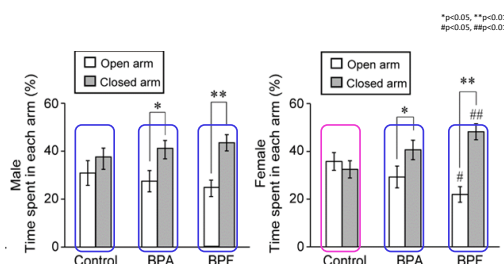


図2 高架式十字迷路試験 (各アームの滞在時間)

【参考文献】

- 1) Yokota H., Iwano H., et al. (1999) *Biochem J.* 340: 405-409.
- 2) Nishikawa, M., Iwano, H., et al. (2010) *Environ. Health Perspect.* 118, 1196-1203.
- 3) Yabusaki R., Iwano H., et al. (2015) *J Vet Med Sci.* 77:1479-1484.
- 4) Ohtani N., Iwano H., et al. (2017) *J. Vet. Med. Sci.* 79:432-439.

[特別講演 S-2]

腸管3型自然リンパ球の生体内機能解明に向けた新規モデルマウスの開発

氏名：○澤 新一郎¹

所属：¹北海道大学・遺伝子病制御研究所・感染病態分野

【要旨】

消化管粘膜は多細胞生物の内外界を隔てる界面領域であり、病原性微生物に対する生体防御機構と、食餌抗原や常在細菌に対する免疫寛容機構が備わっている。腸管粘膜固有層にはパイエル板や孤立リンパ濾胞と呼ばれるリンパ組織が形成され、抗原特異的な IgA 産生を中心とする液性免疫応答が盛んに行われている。

腸管内には制御性 T 細胞のほか、炎症性サイトカイン IL-17 や IL-22 を産生するヘルパー T 細胞 (Th17 細胞) も数多く存在している。クローン病や潰瘍性大腸炎等の炎症性腸疾患における Th17 細胞の役割が注目されており、Th17 細胞分化のマスター制御因子、ROR γ t の阻害剤や IL-23 中和抗体が炎症性腸疾患の有効な治療薬として期待されている。

近年、マウスやヒトの粘膜固有層にサイトカイン産生能が極めて高く、抗原受容体を持たないリンパ球が同定され、自然リンパ球 (Innate Lymphoid Cell=ILC) と命名された¹。ILC のうち、転写因子 ROR γ t を発現し、IL-17 や IL-22 を産生する細胞群は ILC3 と呼ばれ、腸管リンパ組織の形成や腸管上皮細胞の生存や維持、抗菌ペプチド産生誘導を介した生体防御に必須の役割を果たすことが明らかになっている²。しかし、ILC3 が炎症性腸疾患に果たす役割については不明な点が多く、解明すべき課題として残されている。

実際、ILC3 と Th17 細胞には分化誘導因子やエフェクター分子に重複が多く、ILC3 のみを特異的に欠失可能なマウスモデルはこれまで存在しない。我々は、生体内における ILC3 特異的な機能を明らかにするため、ILC3 のみを特異的に欠失可能なマウスモデルの樹立を試みてきた。本発表では、①網羅的遺伝子発現解析に基づいた ILC3 特異的 Cre 発現マウス、②ILC3 特異的にジフテリア毒素受容体 (DTR) を発現するマウス、を紹介する。これらのマウスモデルを用い、炎症性腸疾患の病態や腸内細菌叢の形成メカニズムについて新たな知見が得られると考えている。

【参考文献】

1. H. Spits, D. Artis, M. Colonna et al (2013) Nat Rev Immunol. 13(2), 145-149
2. S. Sawa, M. Lochner, N. Satoh-Takayama et al, (2011) Nat Immunol. 12(4): 320-326

ケモカイン依存性 T 細胞遊走反応における STAP-2 の役割

氏名：○土屋琢也¹、齋藤浩大¹、柏倉淳一¹、松田正¹

所属：¹北海道大学・大学院生命科学院・衛生化学研究室

【要旨】

炎症局所への免疫細胞の遊走はケモカインなどの走化性因子によって担われる。SDF-1 α (Stromal cell-derived factor-1 α) は腫瘍の浸潤や転移および白血球の遊走に重要なケモカインの1つであり、SDF-1 α によって誘導されるケモカインシグナル伝達の詳細な解析はがんや自己免疫疾患に対する新規治療薬開発に繋がることが期待されている。我々はこれまで免疫応答をはじめとする種々のシグナル伝達系に関与する新規アダプター分子 STAP-2 (Signal Transducing Adaptor Protein-2) が SDF-1 α を介した T 細胞遊走反応を正に制御していることを報告している。しかしながら、その制御機構の詳細は不明であった。そこで本研究では T 細胞遊走反応における STAP-2 の詳細な作用機序の解析を行った。SDF-1 α 刺激した STAP-2 過剰発現 Jurkat 細胞ではケモカインシグナル伝達で重要な役割を担う細胞内チロシンキナーゼ Pyk2 (Proline-rich tyrosine kinase 2) のチロシンリン酸化反応の亢進が観察された。また、恒常的な Pyk2/STAP-2 相互作用が観察され、この相互作用が Pyk2 のリン酸化依存的に増加していることも明らかとした。STAP-2 と Pyk2 の共発現細胞を用いた検討より、Pyk2 が STAP-2 の 250 番目のチロシン(Y250)をリン酸化すること、STAP-2 Y250 のチロシンリン酸化が Pyk2 と STAP-2 との相互作用を調節していることを明らかとした。さらに STAP-2 過剰発現 Jurkat 細胞を用いた細胞遊走試験では、Pyk2 ノックダウン及び Pyk2 阻害剤処理により SDF-1 α による細胞遊走反応が有意に減弱したことから、STAP-2 依存性 T 細胞遊走反応増強機構には Pyk2 が関与することが明らかとなった。これらの結果から Pyk2 により STAP-2 の 250 番目のチロシンがリン酸化され Pyk2 と STAP-2 が相互作用することで、SDF-1 α 誘導性 T 細胞遊走を正に制御している可能性が示された。今後は STAP-2 Y250 リン酸化の T 細胞遊走活性における作用機序の詳細、並びにがん免疫応答への影響など生体内での Pyk2/STAP-2 axis の詳細な機能についても解析を進めていく予定である。

【参考文献】

- 1) Sekine Y., Ikeda O., and Matsuda T. (2009) J. Immunol., 183, 7966-7974.
- 2) Saitoh K., Tsuchiya T., and Matsuda T. (2017) BBRC., 488, 81-87.

変異の蓄積によるがんの排除から浸潤への移り変わり

氏名：○田中伸也¹、昆俊亮¹、藤田恭之¹

所属：¹北海道大学・遺伝子病制御研究所・分子腫瘍分野

【要旨】

正常な上皮細胞層に一つのがん関連遺伝子に変異した細胞が出現すると、変異細胞は細胞層から排除される事が近年明らかとなった。この現象は細胞競合と呼ばれ、生体内においてがん抑制機構を担っていると考えられている。ただし、実際のがんの発生・進展では、複数の遺伝子が多段階に変異を起こし、蓄積している。このような変異の蓄積が細胞競合のフェノタイプにどのような影響を与えるのかは分かっていない。そこで、多段階発がんのモデルとして知られる家族性大腸がんに着目した。家族性大腸がんでは、APC、Ras 遺伝子が逐次的に変異することが知られている。当研究室では、野生型マウスの小腸絨毛組織に Ras 変異をモザイク状に単独誘導した場合、ほとんどの Ras 変異細胞が管腔側へ排除される事が分かっている。さらに最近の研究によって、APC 変異型マウスに Ras 変異をモザイク状に逐次的に誘導した際に生じる APC/Ras 二重変異細胞は、野生型に誘導した Ras 変異細胞に比べて、基底膜側へ浸潤する割合が増加する事も分かってきた。しかし、この浸潤現象と細胞競合の関係性は明らかになっていない。

本研究では、この家族性大腸がんモデルマウスを模倣する細胞培養系を構築し、浸潤現象と細胞競合の関係性を明らかにしようと試みた。APC 変異による Wnt 活性化を模倣する β -catenin 変異を用い、 β -catenin/Ras 二重変異細胞が β -catenin 変異細胞に囲まれた場合、二重変異細胞が基底膜側へ高頻度に浸潤する事を見出した。そして、 β -catenin/Ras 二重変異細胞の単独培養時では、二重変異細胞が基底膜側へ浸潤しない事も分かり、観察されていた浸潤現象が細胞非自律的現象であると分かった。

さらに、Ras のみ変異を起こした Ras 単独変異細胞が β -catenin 変異細胞に囲まれた場合には、管腔側へ排除される事が分かった。 β -catenin/Ras 二重変異細胞は基底膜側へ浸潤する事から、これは Ras 変異から β -catenin/Ras 二重変異へと変異が蓄積する事で、細胞競合が担う役割をがんの排除から浸潤へと変化させる事を示唆している。

現在、これらの現象の詳しい分子メカニズムの解明に取り組んでいる。

【参考文献】

- 1) Hogan, C., Dupre'-Crochet, S., Norman, M., Kajita, M., Zimmermann, C., Pelling, A.E., Piddini, E., Baena-Lo'pez, L.A., Vincent, J. P., Hosoya, H., Itoh, Y., Pichaud, F. and Fujita, Y. (2009) *Nature Cell Biology*, 11 (4), 460-467.
- 2) Kon, S., Ishibashi, K., Katoh, H., Kitamoto, S., Shirai, T., Tanaka, S., Kajita, M., Ishikawa, S., Yamauchi, H., Yako, Y., Kamasaki, T., Matsumoto, T., Watanabe, H., Egami, R., Sasaki, A., Nishikawa, A., Kameda, I., Maruyama, T., Narumi, R., Morita, T., Sasaki, Y., Enoki, R., Honma, S., Imamura, H., Oshima, M., Soga, T., Miyazaki, J., Duchon, M. R., Nam, J.-M., Onodera, Y., Yoshioka, S., Kikuta, J., Ishii, M., Imajo, M., Nishida, E., Fujioka, Y., Ohba, Y., Sato, T., and Fujita, Y. (2017) *Nature Cell Biology*, 19(5):530-541.

鉄代謝制御タンパク質 IRP2 のヘム依存的翻訳制御機構の解析

氏名：○小倉多喜¹、渡部祐太¹、武田有紀子²、内田毅^{1,3}、岩井一宏²、石森浩一郎^{1,3}

所属：¹北大・総化、²京大・院医、³北大・院理

【要旨】

鉄ポルフィリン錯体であるヘムは、タンパク質の活性中心として必須である一方、生体内シグナル分子としての役割も注目されており、その結合により機能を制御されるさまざまなタンパク質が報告されている。その一つとして、細胞内鉄濃度に依存して鉄代謝系タンパク質の翻訳制御を行う IRP2 (Iron Regulatory Protein 2) が存在する。IRP2 は、細胞内へ鉄を取り込む Transferrin Receptor や細胞内で鉄を貯蔵する Ferritin などの mRNA 上の認識配列 IRE (Iron Responsive Element) に結合するが、細胞内鉄濃度が上昇するとヘムを結合することにより IRE から解離し、その翻訳制御を行うと想定されている⁽¹⁾。しかし、この IRE からのヘム依存的な解離は *in vitro* で示されているものの、細胞内では未だ確認されていない。

そこで本研究では、細胞内におけるヘム依存的な IRE からの IRP2 の解離を確認することを目的とし、その手法としては、細胞内での IRP2 の IRE との結合・解離を追跡可能な *in vivo* レポーター遺伝子アッセイ法の確立を試みた。本研究での *in vivo* レポーター遺伝子としては、基質 ONPG を分解して呈色反応を示す β -ガラクトシターゼを発現する *lacZ* 遺伝子を用い、その上流に IRP2 の結合部位である IRE を挿入したプラスミドを構築した (Fig.1a, 1b)。このプラスミドにおいて、IRP2 が IRE に結合すると、その下流の *lacZ* 遺伝子の翻訳が阻害され、その結果、 β -ガラクトシターゼの発現量が減少し、呈色強度も低下する。したがって、呈色強度の変化から IRP2-IRE の結合・解離を追跡できると期待される (Fig.1c)。

このレポーター遺伝子アッセイ系を用いて、細胞内においても IRE からの IRP2 の解離がヘムの結合に起因することを確認するため、細胞内において野生型 IRP2 を発現させた場合と、ヘム結合部位を変異させることでヘムを結合できない 3 種の変異型 IRP2 (C201A, H204A, C201AH204A) を発現させた場合の

β -ガラクトシターゼ活性を比較した。その結果、Fig.2 に示すように、野生型 IRP2 (WT) では細胞内のヘムにより IRP2 が IRE から解離し、 β -ガラクトシターゼ活性が観測されたものの、変異型 IRP2 (C201A, H204A, C201AH204A) の場合にはその活性が低く、細胞内にヘムが存在してもヘム結合部位変異型 IRP2 は IRE と結合したまま (Fig.1c 枠内上段) であることが明らかになった。つまり、変異型 IRP2 にはヘムが結合できないため、IRE からの解離が誘起されなかったと考えられる。以上の結果は、細胞内においても IRP2 へのヘム結合が IRE からの解離を誘起することを示しており、細胞内鉄制御タンパク質 IRP2 の機能制御においては、ヘムが細胞内鉄濃度のシグナル伝達分子として機能していることを強く示唆している。

【参考文献】

1) Iwai, K., et al., *EMBO J*, 1995, **14**, 5350-5357.

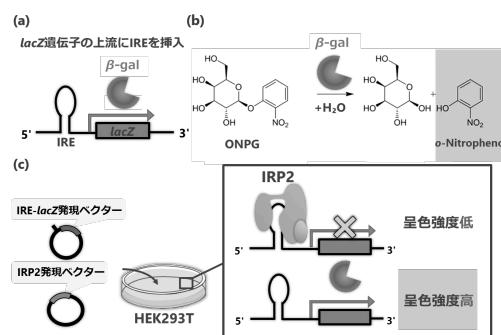


Fig.1 遺伝子レポーターアッセイの模式図

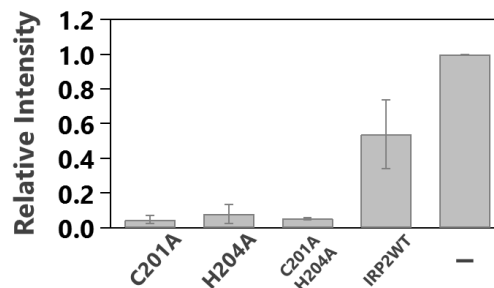


Fig.2 変異型 IRP2 における β -ガラクトシターゼ活性値の比較

ヒト白血球抗原 (HLA) -G2 の LILRB2 を介したヒト末梢単球由来樹状細胞への免疫抑制的効果

氏名： ○高橋愛実¹、黒木喜美子¹、贅田美江²、前仲勝実¹

所属： ¹北海道大学・大学院薬学研究院・生体分子機能学研究室

²日本バイオセラピー研究所

【要旨】

非古典的なヒト白血球抗原 (HLA) クラス I 分子の一つである HLA-G は、妊娠やがん、臓器移植、自己免疫疾患と関連があると言われ、ヒトの免疫抑制・免疫寛容に関係する分子として知られてきました。古典的な HLA クラス I 分子が重鎖 ($\alpha 1$ - $\alpha 2$ - $\alpha 3$ ドメイン)、 $\beta 2$ ミクログロブリンと呼ばれる軽鎖、内在性抗原ペプチドで構成されるのに対して、スプライシングアイソフォームである HLA-G2 は、ドメイン構造を 1 つ欠いた重鎖のみ ($\alpha 1$ - $\alpha 3$ ドメイン) で構成されます。これまでに私たちは、リコンビナント HLA-G2 蛋白質がヒト免疫抑制性受容体 leukocyte immunoglobulin-like receptor (LILR) B2 だけではなく、マウスオルソログである受容体 paired immunoglobulin-like receptor (PIR)-B と結合することを示し、さらに、リコンビナント HLA-G2 蛋白質がコラーゲン誘導関節炎マウスで免疫抑制効果を示すことを明らかにしました⁽¹⁾。今回は、HLA-G2 のヒト免疫細胞における作用機序解明を目的としました。まず、リコンビナント HLA-G2 蛋白質を調製し、ヒト末梢血中 LILRB2 発現細胞である単球の樹状細胞への分化過程における HLA-G2 の作用を、細胞表面分子の発現量を測定することで観察しました。その結果、HLA-G2 は単球由来の樹状細胞に対して、免疫抑制的な影響を与える可能性が示唆されました。現在は、引き続き詳細な作用メカニズムを解明すべく解析を進めています。

【参考文献】

- 1) Takahashi A, Kuroki K, Okabe Y, Kasai Y, Matsumoto N, Yamada C, Takai T, Ose T, Kon S, Matsuda T, Maenaka K. (2016) Hum. Immunol. 77 (9): 754-759.

表皮角化細胞における IL-17 誘導性 I κ B- ζ 発現機構の解明

氏名：○大垣内優衣、多和佳佑、室本竜太、松田正

所属： 北海道大学・大学院生命科学院・衛生化学研究室

【要旨】

表皮角化細胞は免疫細胞が産生する炎症性サイトカイン IL-17 によって活性化され、抗菌ペプチド産生等を通じて表皮バリアにおける感染防御を担う一方その過剰な活性化は乾癬など炎症性皮膚疾患の病態形成に関与する。当研究室では表皮角化細胞において IL-17 が NF- κ B の転写コアクチベータである I κ B- ζ の発現を誘導し、乾癬の病態形成に関与することを見出した。しかしながら IL-17 による I κ B- ζ 発現誘導機序の詳細は未だ不明であるため、本研究ではこの機序の解明を目的とし、I κ B- ζ の転写活性化および 3' 側非翻訳領域 (3' UTR) を介した mRNA 安定化について検討を行った。

I κ B- ζ の転写活性の評価のため、ヒト表皮角化細胞において Jak ファミリーキナーゼ Tyrosine kinase 2 (Tyk2) またはその標的である STAT3 を siRNA を用いてノックダウンしたところ、いずれにおいても I κ B- ζ mRNA の発現は有意に抑制された。また、I κ B- ζ のプロモーターの活性化を評価する Luc レポーターアッセイでは、Tyk2 過剰発現でコントロールと比べ優位な活性増強が観察され、さらなる IL-17 刺激では活性増強は観察されなかった。興味深いことに STAT3 のチロシンリン酸化は IL-17 刺激の有無にかかわらず観察され、刺激での変動は認められなかった。

次に、I κ B- ζ mRNA 3' UTR を介した mRNA 安定化を評価しうる Luc レポーターを用いて IL-17 感受性を検討したところ、IL-17 刺激により mRNA の安定化応答が認められたが、Tyk2 過剰発現によってさらなる増強は観察されなかった。また、ヒト表皮角化細胞株において RNA 分解酵素 Regnase-1 を siRNA を用いてノックダウンしたところ内在性 I κ B- ζ mRNA 量が増加した。

以上のことから、Tyk2-STAT3 シグナル伝達経路は表皮角化細胞内で恒常的な活性化状態にあり、I κ B- ζ mRNA の転写を誘導する。一方、IL-17 は RNA 分解酵素である Regnase-1 による I κ B- ζ mRNA 分解阻害を誘導することが示唆された。

【参考文献】

- 1) Muromoto R., T Hirao, K Tawa, K Hirashima, S Kon, Y Kitai, T Matsuda. (2016) Int Immunol., 28(9):443.

上皮細胞の炎症様応答によるがん変異細胞の排除制御

氏名：○佐藤奈波^{1,2}、八子優太^{1,2}、藤田恭之^{1,2}

所属：¹北海道大学 遺伝子病制御研究所 分子腫瘍分野

²北海道大学大学院総合化学院 生物化学コース 分子医化学講座 分子腫瘍分野

【要旨】

当研究室では、正常上皮層に少数の変異細胞が生じると、正常細胞と変異細胞間で生存を争う「細胞競合」が起こり、変異細胞が排除されるという現象を明らかにしてきた。更に、変異細胞の排除が隣接する正常細胞によって積極的に行われることを示し、この現象を EDAC(Epithelial defense against cancer)と名づけている。

一方、正常上皮層には細胞の排除を抑制し恒常性を維持しようとする機構が備わっていることも考えられ、この機構が変異細胞の排除を妨げる働きをする可能性もある。そこで、正常細胞が多く Ras 変異細胞と隣接する条件で、特異的に発現変化する分子を同定するため、正常細胞側のマイクロアレイ解析を行った。この結果、変異細胞と共培養した正常細胞において、単独培養した正常細胞よりも遺伝子発現が上昇する分子として COX-2 を同定した。更に、COX-2 によって生産されるプロスタグランジン E₂ は Ras 変異細胞の排除を抑制することが明らかになった。また、COX-2 阻害剤である非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) を混合培養条件下に添加すると、Ras 変異細胞の排除が有意に促進した。このことは、正常細胞側での COX-2 の上昇に伴うプロスタグランジンの生産が EDAC とは逆のメカニズムに寄与し、上皮層からの変異細胞の排除を阻害していることを示唆している (図 1)。今後は、COX-2 の上流で機能する発現調節因子の探索、および COX-2 の下流で Ras 変異細胞の排除を阻害するプロスタグランジンの作用機序の解明を目指し、研究を進めていく。

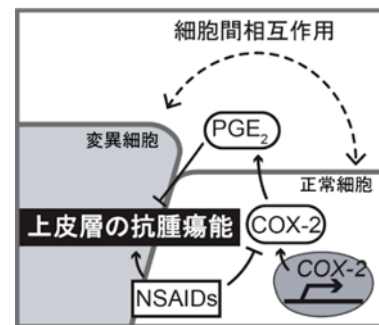


図1 モデル図

活性型 NK 細胞受容体に結合する HLA-Cw12 拘束性 HIV-1 由来ペプチドの探索

Screening of HLA-Cw12-restricted HIV-1-derived peptides that bind to activating NK cell receptors

○山下諒也¹ 渡邊洋介¹ 黒木喜美子¹ 前仲勝実¹ 滝口雅文² 小柳円³

¹北大・薬・生体分子機能学研究室、²熊大・エイズ学研究センター、

³日本獣医生命科学大学・応用生命科学部・動物科学科

ヒト免疫不全ウイルス(HIV)は、後天性免疫不全症候群(AIDS)の原因ウイルスであり、さまざまな機構により宿主免疫反応から逃避を行なうことによって、高い感染力を獲得している。アクセサリータンパク質のひとつである Nef は宿主免疫反応から逃れるため、抗原提示機能を持つ Human leukocyte antigen(HLA)-A および HLA-B の発現量を低下させるが、HLA-C の発現量は低下させない。そのため、ウイルス感染時に HLA-C はウイルス由来のペプチドを提示し、細胞性免疫を誘導すると考えられている。また、HLA-C は NK 細胞に発現しているペア型受容体の killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR)のリガンドとして知られており、HIV 感染時の自然免疫反応においても重要であると予想される。

本研究の目的は、日本人集団で頻度の高い HLA-Cw12 を対象に、NK 細胞を活性化させる HIV ペプチドワクチンの設計に向けて、活性型 KIR と優位に結合する HLA-Cw12 拘束性 HIV 由来ペプチドの配列を同定することである。実際に細胞内プロセッシングや修飾を経たペプチドを同定するため、HEK293T 細胞を用いて HLA-Cw12 を分泌発現させた。その際 HIV 由来ペプチドを提示させるため、HIV-1 遺伝子産物を共発現させた。その後アフィニティークロマトグラフィーで精製を行い、液体クロマトグラフィー質量分析法(LC-MS/MS)によるペプチド配列の同定を試みている。現在、HLA-Cw12 拘束性ペプチドを単離・測定する条件を決定するため、大腸菌巻き戻し法により調製した HLA-Cw12 を用いて、MALDI-TOF-MS によるペプチドの単離・配列確認に成功している。

神経細胞における APLP2 順行性輸送の解析

氏名： ○1 加藤俊、1*千葉杏子、2 金城政孝、1 羽田沙緒里、1 鈴木利治

所属： 1 北海道大学・大学院薬学研究院・神経科学研究室、

2 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

*UC DAVIS, College of Biological Sciences

【要旨】

Amyloid precursor-like protein 2 (APLP2)は、amyloid β -peptide precursor (APP) ファミリーの分子である。APP はアルツハイマー病(AD)の発症に関わる amyloid- β ($A\beta$) ペプチドの前駆体であり、神経細胞における主な機能は kinesin-1 のカーゴである。

Kinesin-1 はそれぞれ 2 分子の kinesin heavy chain (KHC) および kinesin light chain (KLC) から成るヘテロ 4 量体であり、KHC は微小管に結合するモータードメインを含み、KLC はカーゴと結合する TPR モチーフを含む。神経細胞では主に KLC1 と KLC2 の 2 種の遺伝子が発現している。これまで、我々は、APP は kinesin-1 が微小管上を移動する速度の約 2 倍となる「増強された高速輸送」を受けること、KLC1 および KLC2 のどちらで構成された kinesin-1 でも輸送されること、アダプタータンパク JIP1b を介した KLC1 との相互作用は、「増強された高速輸送」に必要である事を報告してきた。一方、APLP2 は APP と同様な速度で輸送されるが、KLC1 との結合には JIP1 は介在しておらず、KLC2 とは直接結合することを見いだした。そこで、kinesin-1 による APLP2 と APP 輸送のメカニズムの相違を解析した。分化させたマウス神経芽腫細胞(CAD cell)に APLP2-EGFP および APP-EGFP を発現させ、神経突起における順行輸送を TIRF 顕微鏡で解析した。APP 同様に増強された高速輸送を受ける APLP2 の輸送機構を解明する目的で、KLC1 と KLC2 の発現をそれぞれ knock down し輸送解析を行った。APLP2 は、KLC1 を knock down した細胞では control と比較して低速に、KLC2 を knock down した細胞では高速に順行輸送を受けた。この結果は、APLP2 は APP と同様に KLC1 で構成された kinesin-1 により「増強された高速輸送」を受けているが、APP と異なり KLC1 との結合には JIP1 以外の因子が関わっている可能性を示唆した。

Mahjong による接触阻害の制御機構の解明

氏名：○江上陸^{1,2}、藤田恭之^{1,2}

所属：¹北海道大学・遺伝子病制御研究所・分子腫瘍分野

²北海道大学・総合化学院・生物化学コース・分子医化学講座

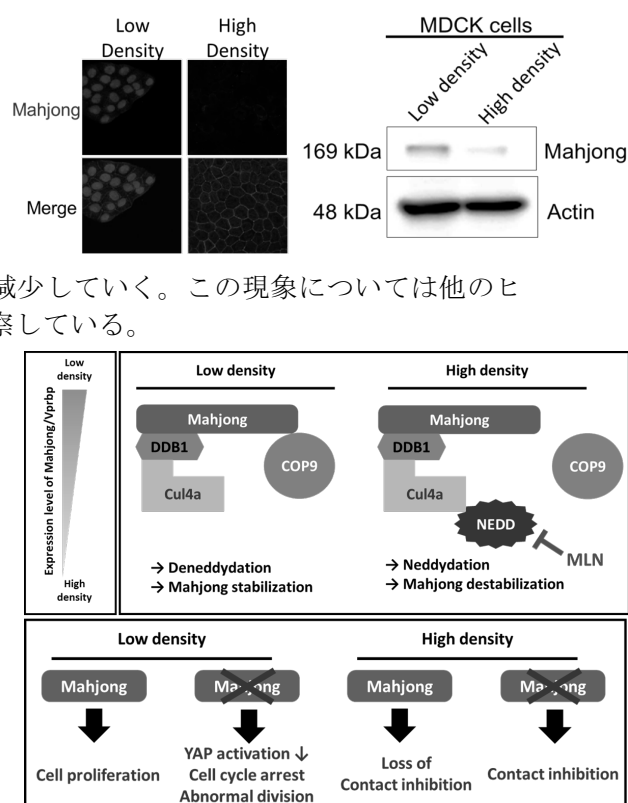
【要旨】

近年の研究から、正常上皮細胞層にがん変異を有する細胞が出現した際に、生じた変異細胞と隣接する正常細胞との間で互いに生存を争う細胞競合現象が起こり、変異細胞は上皮細胞層より排除されることが明らかになってきた。当研究室では、上皮細胞の頂端極性に関与する哺乳類 Lgl と相互作用し、細胞競合関連タンパク質として Mahjong を同定している。Mahjong は E3 ユビキチンリガーゼの基質認識を担うコンポーネントであり、対象基質のユビキチン化により細胞周期の制御やヒストン修飾に関与する報告がある。しかし、細胞競合のような細胞間コミュニケーションの伴う現象において、Mahjong がどのような機能を担っているのかは未だ不明な点も多い。

本研究では細胞間コミュニケーションの伴う現象において Mahjong がどのような役割を果たすのかについて検討したところ、Mahjong は細胞密度依存的に局在、ならびに発現量が変化することを見出している(上図)。低密度条件下で細胞を培養した際には、Mahjong は核全体に強く発現している一方、細胞密度を高くしていくにつれて、核における発現量が徐々に減少していく。この現象については他のヒト上皮細胞株を用いた実験においても同様の挙動を観察している。

また、細胞密度が高くなると正常な細胞には接触阻害機構が働き、細胞増殖能が低下することが知られている。代表的な接触阻害のシグナル経路としては Hippo-YAP 経路がよく知られているが、Mahjong 分子もこの経路において機能することが分かった。本研究では、Mahjong の発現量変化に伴った YAP の局在変化ならびにリン酸化状態の変化を観察しており、Mahjong は YAP を介した接触阻害の上流制御因子であることが示唆された。また、Mahjong 自身の細胞密度依存的な発現量変化を制御する新規上流因子として、COP9 signalosome が機能することも見出しており、図に示すようなモデルについて議論したい。

機械刺激に応答して発現量や活性が変化する分子の実態はあまり多く明らかにされておらず、Mahjong はその一つとしての機能が期待される。今後は機械刺激と Mahjong を介した接触阻害との関係を解明することから、接触阻害機構の本質の解明を目指す。



Ser/Thr ホスファターゼ PPM1D 機能の C 末端領域を介した制御機構解明

氏名：○愉彦樺¹、清田雄平¹、鎌田瑠泉^{1,2}、今川敏明^{1,2}、坂口和靖^{1,2}

所属：¹北海道大学・大学院総合化学院・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】

癌の早期発見において、発癌メカニズムの解明が重要な課題である。正常細胞において、紫外線や発癌物質などの遺伝毒性ストレスに応答して、癌抑制タンパク質 p53 が活性化される。Ser/Thr ホスファターゼ PPM1D は p53 依存的に発現誘導され、ネガティブフィードバック調節を介して p53 機能を抑制する[1,2]。PPM1D 機能亢進は、細胞癌化を含む様々な生命現象に関与することが知られている[3]。しかしながら、そのメカニズムには不明な点が多く、解明が強く求められる。PPM1D は 605 残基のアミノ酸を有し、他の PPM1 ファミリーメンバーには見られない PPM1D 特異的な領域であるプロリンリッチ領域 (P-loop)、塩基性アミノ酸リッチ領域 (B-loop)、多くの翻訳後修飾サイトを有する C 末端領域を持つ (図 1) [4]。

PPM1D の C 末端領域を欠失した短縮型変異体は野生型 PPM1D よりも高い細胞内発現量、安定性を示すことから、機能未知である PPM1D の C 末端領域に、タンパク質発現量を調節する機能調節領域が存在すると考えられた。

まず我々は、自己切断配列を含む 2 種類の蛍光タンパク質を用いて、生細胞内でのタンパク質発現量を定量的に解析可能な新規シングルセル解析系を構築した (図 2)。この解析系を用いて、PPM1D 特異的領域の置換変異体を新規解析系に導入し、細胞内タンパク質発現量解析した。その結果、興味深いことに野生型 PPM1D の C 末端に存在する脂質修飾モチーフの変異によって、発現量が大きく増加することが明らかとなった (図 3)。一方、PPM1D 特異的領域である B-loop の置換によって PPM1D 発現量が減少した。以上より、PPM1D タンパク質安定性制御には複数のメカニズムが存在することが示唆された。PPM1D 制御機構解明によって新たな抗癌剤開発、発癌メカニズムにおける新たな知見が期待される。

【参考文献】

- 1) M. Fiscella *et al.*, (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 94, 6048–53.
- 2) D. V Bulavin *et al.*, (2002) Nat. Genet., 31, 210–5.
- 3) Y. Kozakai, R. Kamada, J. Furuta, Y. Kiyota, Y. Chuman, and K. Sakaguchi, (2016) Sci. Rep., 6.
- 4) Y. Chuman, W. Kurihashi, Y. Mizukami, T. Nashimoto, H. Yagi, and K. Sakaguchi, (2009) J. Biochem., 145, 1–12.

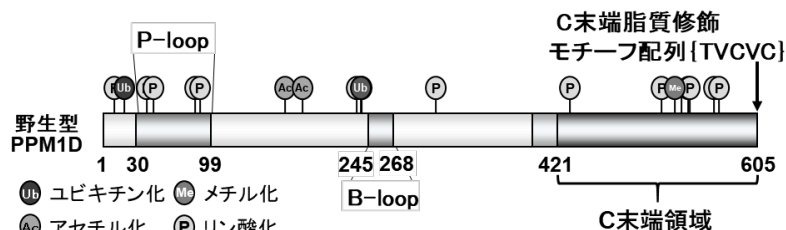


図 1 PPM1D 二次構造

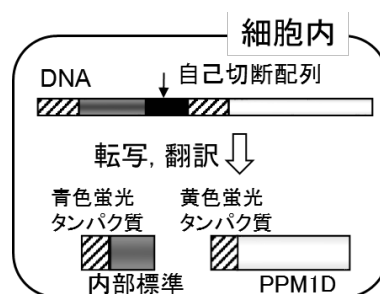


図 2 新規解析系

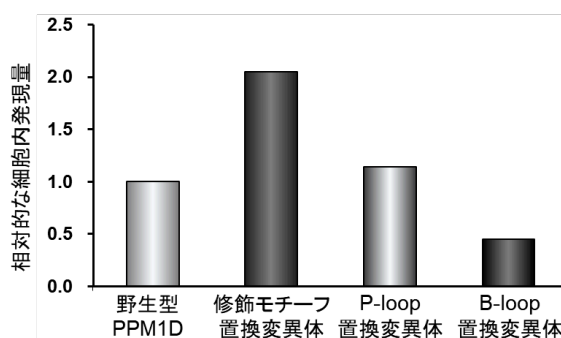


図 3 置換による PPM1D 発現量変化

The specific regions of architectural NEAT1 lncRNA induce the formation of the phase-separated paraspeckle nuclear body

氏名：○山崎智弘¹、萬年太郎¹、Sylvie Souquere²、木立尚孝³、Archa H. Fox⁴、中川真一⁵、Gerard Pierron²、廣瀬哲郎¹

所属：¹北海道大学・遺伝子病制御研究所・RNA 生体機能分野

²Centre National de la Recherche Scientifique, Institut Gustav Roussy

³東京大学大学院・新領域創成・メディカル情報生命・生命ネットワーク解析分野

⁴Centre for Medical Research, University of Western Australia

⁵北海道大学・薬学研究院・RNA 生物学的研究室

【要旨】

NEAT1 lncRNA は、核内構造体パラスペックルの構造骨格として機能する。パラスペックルは 40 種類ものタンパク質（パラスペックルタンパク質）が集まる巨大な構造体であり、遺伝子発現や個体発生・疾患に重要な役割を果たすことが明らかとなっている。しかし、この NEAT1 のどの RNA 配列・構造がこのような機能を支えているかは全く明らかとなっていない。

そこで、私たちは、ヒト一倍体細胞株を用い、CRISPR/Cas9 システムにより、NEAT1 の機能的配列の探索を行った。200 種類に及ぶ NEAT1 変異細胞株を樹立し、網羅的に機能 RNA 領域を探索した結果、パラスペックルの形成に必要な十分な領域の同定に成功した。さらに、パラスペックル形成に異常を呈する NEAT1 変異体に、MS2 タグにより特定のパラスペックルタンパク質を繫留させることで、パラスペックルの形成がレスキューされた。このことから、これらのパラスペックルタンパク質がこの変異体の欠失領域と結合することで構造体形成を誘導していることが示された。加えて、パラスペックルの構造構築に必須の NEAT1 領域は、*in vitro* で相分離を誘導すること、また、細胞内でも、パラスペックルは相分離しているという結果が得られた。さらに、別の RNA 領域は、パラスペックルが核スペックルと独立して存在するために必須であることを見出した。これは、細胞内構造体の独立性維持の分子機構の解明に繋がると期待できる。以上の結果、NEAT1 は、特定の RNA 領域を介して、特異的なパラスペックルタンパク質の局所濃度を上げることで相分離を誘導し、さらにパラスペックルを他の構造体とは独立して形成させているという構造体構築の分子機構が明らかとなった。

NTP1 は BCR および CK2 α との相互作用を介して NF κ B 経路依存的な活性化により炎症回路を正に制御する

氏名：○田中 勇希¹, Lavannya Sabharwal¹, 熱海 徹¹, Jing-Jing Jiang¹, 樋口 はるか¹, 中川 育磨¹, 太田 光俊¹, 藤田 宗純¹, 大河原 桃子¹, 有馬 康伸¹, 上村 大輔¹, 村上 正晃¹

所属：¹北海道大学・遺伝子病制御研究所・大学院医学院・分子神経免疫学教室

【要旨】

アルツハイマー病は記憶障害や認知機能の低下を伴う神経変性疾患の一つである。近年、アルツハイマー病の発症・増悪には炎症が寄与していることが報告されたが、その詳細な分子メカニズムは未だ不明である。これまでに我々は、NF κ B および STAT3 の同時活性化にて非免疫細胞で生じるケモカイン産生機構「炎症回路¹⁻⁶」を発見した。さらにゲノムワイドスクリーニングを行い、炎症回路の正の制御因子として 1000 以上の遺伝子を同定した³。本研究では、その中でもアルツハイマー病関連遺伝子として考えられている NF κ B regulating transmembrane protein 1 (NTP1) に着目して炎症回路の詳細な制御メカニズムを明らかにすることを目的としている。

はじめに、NTP1 が NF κ B および STAT3 のどちらを制御しているかを調べるために NTP1 ノックダウン細胞を用いて定量 PCR を行ったところ、NTP1 は NF κ B を正に制御していることが明らかとなった。クロマチン免疫沈降により、NTP1 ノックダウン細胞では p65 および p300 の NF κ B プロモーターへの recruitment が減弱することが分かった。さらに、その詳細な分子メカニズムを調べるために NTP1 の相互作用分子を免疫沈降法にて同定することとした。その結果 NTP1 は、p65 セリン 529 のリン酸化に関与する分子である BCR および CK2 α と相互作用することが明らかとなった。また、NTP1 ノックダウン細胞では p65 セリン 529、BCR および CK2 α のリン酸化の減弱を認めた。これらの結果から、NTP1 は BCR および CK2 α の足場タンパクとして働くことで NF κ B の活性化に寄与し、炎症回路を正に制御していることが示唆された。これらの結果から、NTP1 はアルツハイマー病のみならず、様々な炎症性疾患の治療標的となりうる可能性が考えられた。

【参考文献】

1. Ogura, H. et al. Interleukin-17 Promotes Autoimmunity by Triggering a Positive-Feedback Loop via Interleukin-6 Induction. *Immunity*. 29, 628-636 (2008).
2. Murakami, M. et al. Local microbleeding facilitates IL-6- and IL-17-dependent arthritis in the absence of tissue antigen recognition by activated T cells. *The Journal of experimental medicine* 208, 103-114, (2011).
3. Murakami, M. et al. Disease-association analysis of an inflammation-related feedback loop. *Cell reports* 3, 946-959, (2013).
4. Atsumi, T. et al. Inflammation amplifier, a new paradigm in cancer biology. *Cancer research* 74, 8-14 (2014).
5. Harada, M. et al. Temporal expression of growth factors triggered by epiregulin regulates inflammation development. *Journal of immunology* 194, 1039-1046, (2015).
6. Meng, J. et al. Breakpoint Cluster Region-Mediated Inflammation Is Dependent on Casein Kinase II. *Journal of immunology* 197, 3111-3119, (2016).

骨髓空間の発生に寄与する細胞の同定

氏名：○住谷瑛理子¹、澤新一郎¹

所属：¹北海道大学・遺伝子病制御研究所・感染病態分野

【要旨】

ヒトをはじめとする哺乳類では、骨髓中の造血幹細胞に由来する免疫担当細胞が病原体の排除に重要な役割を果たしている。そのため、造血幹細胞を支持する骨髓環境が正常に形成されることは、免疫機能を発揮する上で重要である。

マウスにおいて大腿骨を含む大部分の骨の骨髓形成は、胎生 14.5 日頃から始まることが知られている。まず将来骨が出来る場所に軟骨細胞から成る骨原基が形成され、その中央部分から間葉系の細胞や血管内皮細胞などが侵入する。これらの細胞の骨原基への侵入と軟骨吸収が進むことで原始骨髓が拡大し、さらに出生直前に胎仔肝臓から移動して来る造血幹細胞が定着することで造血機能を持った骨髓が形成されると考えられている。しかしながら、胎生期に起こる原始骨髓の発生において骨髓空間の形成と維持に関わる細胞やシグナル分子には不明な点が多い。本研究では、サイトカイン RANKL に着目し、発生過程において骨髓空間の形成に重要な役割を果たす細胞の同定を目指した。

RANKL は骨吸収を担う破骨細胞の分化に必須の因子であり、RANKL をコードする *Tnfsf11* 遺伝子を欠損したマウスは骨髓腔形成不全を示す大理石骨病となることが知られている。そこで原始骨髓の発生における RANKL の関与を明らかにするために、*Tnfsf11* 遺伝子欠損マウス胎仔の骨髓腔の形成過程を調べた。原始骨髓の発生が始まる胎生 14.5 日以降の大腿骨を経時的に採取し、組織学的な解析をおこなったところ、*Tnfsf11* 遺伝子欠損マウスでは胎生期において骨髓形成の異常が認められた。この結果は胎生期の原始骨髓の発生に RANKL が関与していることを示唆する。今後の研究において、原始骨髓形成期に RANKL を発現する細胞および RANKL の受容体である RANK を発現する細胞を同定し、それぞれの細胞が原始骨髓の形成に寄与することを示すことによって、骨髓空間の形成メカニズムの一端が明らかになることが期待される。

炎症回路制御遺伝子 Rbm10 は DNA メチル化酵素 Dnmt3b の活性を調節することにより、 標的遺伝子の転写を制御する

氏名：○上村大輔¹、大木拓究人¹、有馬康伸¹、熱海徹¹、Jiang Jing-Jing¹、村上正晃¹

所属：¹北海道大学・遺伝子病制御研究所・大学院医学院・分子神経免疫学教室

【要旨】

慢性炎症は、自己免疫疾患、癌などをはじめとする種々の疾患に関与していることが分かっており、そのメカニズムの解明の重要性が指摘されている。我々は非免疫細胞において、転写因子 NF- κ B (p65) を介したシグナル伝達系と転写因子 STAT を介したシグナル伝達系との共刺激により炎症性サイトカイン、ケモカインの産生が顕著に亢進することを見出し、それを炎症回路¹⁻⁶と命名した。我々は、以前に炎症回路制御遺伝子をスクリーニングによって同定しており³、その1つである選択的スプライシング関連遺伝子 Rbm10 に着目し、炎症回路における Rbm10 の作用機構の検討を行った。Rbm10 欠損細胞では IL-6/17 刺激による IL-6, cxcl5 の産生の顕著な減弱が認められた。一方、刺激依存的な転写因子である p65、STAT3 のリン酸化、核移行には影響がみられなかったことから、Rbm10 は核内の現象に関与していることが示唆された。Rbm10 欠損細胞においては p65 の会合、ヒストン H3K9 のアセチル化の減弱が認められたことからクロマチン構造が閉じていることが示唆された。DNA のメチル化は転写抑制に重要な機構であることは広く知られていることから DNA のメチル化に着目した検討を行ったところ、Cxcl1 プロモーター内の p65 結合配列付近の CpG 配列の DNA メチル化が顕著に亢進していることが明らかとなった。さらにメチル化 DNA 免疫沈降法シーケンス (MeDIP-Seq.) によるゲノムワイド解析による結果、複数の炎症回路制御遺伝子のプロモーター領域における DNA メチル化が亢進していることが分かった。*De novo* DNA メチル化酵素である Dnmt3b は選択的スプライシングにより、多数のアイソフォームを形成することが知られている。Rbm10 欠損細胞では Dnmt3b のスプライシングが減弱しており、DNA メチル化活性を有するアイソフォームの割合が増加しており、細胞内 DNA メチル化活性の増加が示唆された。さらに Dnmt3b は p65 と核内で複合体を形成することが分かったことから p65 により Dnmt3b が炎症回路制御遺伝子の p65 プロモーター近傍に引き寄せられることによって、p65 プロモーター部位特異的な転写抑制を行っていることが示唆された。

【参考文献】

1. Ogura, H. et al. Interleukin-17 Promotes Autoimmunity by Triggering a Positive-Feedback Loop via Interleukin-6 Induction. *Immunity*. 29, 628-636 (2008).
2. Murakami, M. et al. Local microbleeding facilitates IL-6- and IL-17-dependent arthritis in the absence of tissue antigen recognition by activated T cells. *The Journal of experimental medicine* 208, 103-114, (2011).
3. Murakami, M. et al. Disease-association analysis of an inflammation-related feedback loop. *Cell reports* 3, 946-959, (2013).
4. Atsumi, T. et al. Inflammation amplifier, a new paradigm in cancer biology. *Cancer research* 74, 8-14 (2014).
5. Harada, M. et al. Temporal expression of growth factors triggered by epiregulin regulates inflammation development. *Journal of immunology* 194, 1039-1046, (2015).
6. Meng, J. et al. Breakpoint Cluster Region-Mediated Inflammation Is Dependent on Casein Kinase II. *Journal of immunology* 197, 3111-3119, (2016).

Sat III lncRNA を足場とする核内ストレス体の構成変化とそのストレス回復期における役割

氏名：○二宮賢介¹、足達俊吾²、夏目徹²、廣瀬哲郎¹

所属：¹北大遺制研、²産総研 MolProf

【要旨】

ヒートショック下のヒト細胞で発現する Satellite III 領域由来の転写産物 Sat III lncRNA は、SR 蛋白質や HNRNP など主にスプライシング制御に関わる特定の RNA 結合蛋白質群を集約し、核内ストレス体 (Nuclear Stress Body、以下 nSB) と呼ばれる巨大な複合体を形成する architectural RNA である。しかし、その正確な役割は殆ど明らかにされていない。

私達は ChIRP (Chromatin Isolation by RNA Purification)-MS 法を用い、Sat III lncRNA に結合する蛋白質の大規模探索を行い、nSB 構成蛋白質の候補を多数取得した。興味深いことに、nSB の構成蛋白質の種類やリン酸化などの翻訳後修飾の状態は、ストレス条件下とストレス除去後の回復期でその時間経過に応じて、変化していくことが示唆された。

上記で同定された新規 nSB 蛋白質の一つである SR 蛋白質リン酸化酵素 CLK1 は、主に回復期に nSB にリクルートされる。一方で、CLK1 の基質の SR 蛋白質は、ヒートショックにより一過的に脱リン酸化され、回復期に迅速にリン酸化が回復することから、nSB では、ストレス除去に応じて CLK1 をリクルートすることで、その場に濃縮された SR 蛋白質の再リン酸化を効率よく行なっていることが予想された。検証の結果、実際に Sat III lncRNA が nSB に局在する SR 蛋白質の CLK1 依存的な再リン酸化を促進していることが明らかになった。さらに、複数の pre-mRNA のヒートショック依存的なスプライシング制御過程で、nSB がストレス除去後の正常化を促進していることが示唆された。以上の結果は、nSB が、ヒートショックにより一過的に引き起こされる SR 蛋白質の脱リン酸化とそれに伴う特異的 mRNA のスプライシング変化に対して、ストレス除去後の速やかな正常化を担っていることを示唆している

血管伸張は、VEGF 濃度に依存して異なる二つの経路で調節される

氏名：○田村-辻 潔美¹、田村 正人¹

所属：¹北海道大学・大学院歯学研究院・口腔分子生化学教室

【要旨】

近年、損傷組織の治療方法の一つとして、再生医療が注目を集めている。組織再生の成功には、既存組織と新生組織を結ぶ、新たな血管網の構築が必要不可欠である。血管は、血管内皮細胞の増殖、分化、伸長、内腔形成を経て構築される。VEGF（血管内皮細胞増殖因子）はこれらの血管形成過程に広く作用して血管新生を刺激する因子であり、血管再生治療への応用が試みられている。しかし、動物実験モデルを用いた研究によって、局所的な高濃度 VEGF は、血管腫を発生させる可能性があることが報告されている。そこで我々は、マウス ES 細胞由来の血管内皮細胞を用いた薬剤スクリーニングにより、低濃度 VEGF 環境において血管伸長を誘導できる化合物の検出を行い、その結果、PI3K、Akt シグナルの阻害剤（LY294002、Akt inhibitor VIII）、mTORC1 阻害剤（Everolimus、Rapamycin）の 4 種の阻害剤を得た¹⁾。

ES 細胞を OP9 ストローマ細胞上で培養することで、Flk⁺血管前駆細胞が出現する。この血管前駆細胞を FACS で分離採取し、培養することで、VE-cadherin⁺血管内皮細胞に分化誘導することができる¹⁻⁵⁾。この ES 細胞由来の血管内皮細胞は、低濃度 VEGF 環境では敷石状の細胞形態を保ち、円型のコロニーを形成する。一方、高濃度 VEGF 環境では細長い形態に変化し伸張型コロニーを形成するが、それとともに細胞増殖が刺激されるため過形成が起こる。PI3K-Akt、mTORC1 シグナルを阻害することで、低濃度 VEGF 環境においても細胞伸張が誘導されることが明らかになった。また高濃度 VEGF 環境では、PI3K-Akt、mTORC1 の阻害により、細胞伸張を維持したまま、過形成を抑制することができた。

Foxo1 は血管形成に重要な転写因子であり、Foxo1 を欠損した血管内皮細胞は高濃度 VEGF による伸張機能が消失している³⁻⁵⁾。Foxo1 欠損血管内皮細胞では、低濃度 VEGF での 4 種の阻害剤による伸張機能の誘導が見られなかった。よって、PI3K-Akt、mTORC1 シグナルは低濃度 VEGF において、Foxo1 を介した血管内皮細胞の伸張を負に制御していることが示唆された。一方、高濃度 VEGF 環境では mTORC1 を阻害した場合のみ、Foxo1 欠損血管内皮細胞の伸長機能が回復することが明らかになった。これらの結果によって、環境中の VEGF 濃度によって細胞伸張の調節における Foxo1 への依存性が変化することが示された。

本研究によって、血管伸張は、VEGF の濃度に依存して異なる 2 つの経路で調節されるという新たなメカニズムが示唆された。PI3K-Akt、mTORC1 シグナルの阻害は、低濃度 VEGF 環境では血管伸張を誘導し、また、高濃度 VEGF 環境では血管の過形成を抑制する。そのため、これらの阻害剤は、血管の伸長過程を調節する薬剤として、組織・血管の再生に有用であると考えられる。

【参考文献】

- 1) Tsuji-Tamura K., and Ogawa M. (2016) J. Cell Sci., 129, 1165-1178.
- 2) Tanzir A., Tsuji-Tamura K., and Ogawa M. (2016) Stem cells, 34, 2814-2824.
- 3) Tan KS., Tamura K., Lai MI., Veerakumarasivam A., Nakanishi Y., Ogawa M., and Sugiyama D. (2013) Stem Cell Rev., 9, 586-598.
- 4) Tsuji-Tamura K., Sakamoto H., and Ogawa M., (2011) Embryonic Stem Cells, 581-606.
- 5) Park SH., Sakamoto H., Tsuji-Tamura K., Furuyama T., and Ogawa M., (2009) BBRC, 390, 861-866.

[ポスター P-17]

STAP2 promotes prostate cancer growth by enhancing EGFR stabilization

氏名：○鍛代悠一¹、岩上昌史¹、松田正¹

所属：¹北海道大学・大学院薬学研究院・衛生化学研究室

【要旨】

Signal-transducing adaptor family member 2 (STAP2) is an adaptor protein that regulates various intracellular signaling pathways and promotes tumorigenesis in melanoma and breast cancer cells. However, the contribution of STAP2 to the behavior of other types of cancer cell is unclear. Here, we show that STAP2 promotes tumorigenesis of prostate cancer cells through upregulation of EGFR signaling. Tumor growth of a prostate cancer cell line, DU145, was strongly decreased by STAP2 knockdown. EGF-induced gene expression and phosphorylation of AKT, ERK, and STAT3 were significantly decreased in STAP2-knockdown DU145 cells. Mechanistically, we found that STAP2 interacted with EGFR and enhanced its stability by inhibiting c-CBL-mediated EGFR ubiquitination. Our results indicate that STAP2 promotes prostate cancer progression by facilitating EGFR activation.

核内構造体形成のアーキテクチュラル長鎖 ncRNA の共通特性としての難抽出性

氏名：○中條岳志¹、山崎智弘¹、川口哲哉¹、黒坂哲²、内匠透²、中川真一³、廣瀬哲郎¹

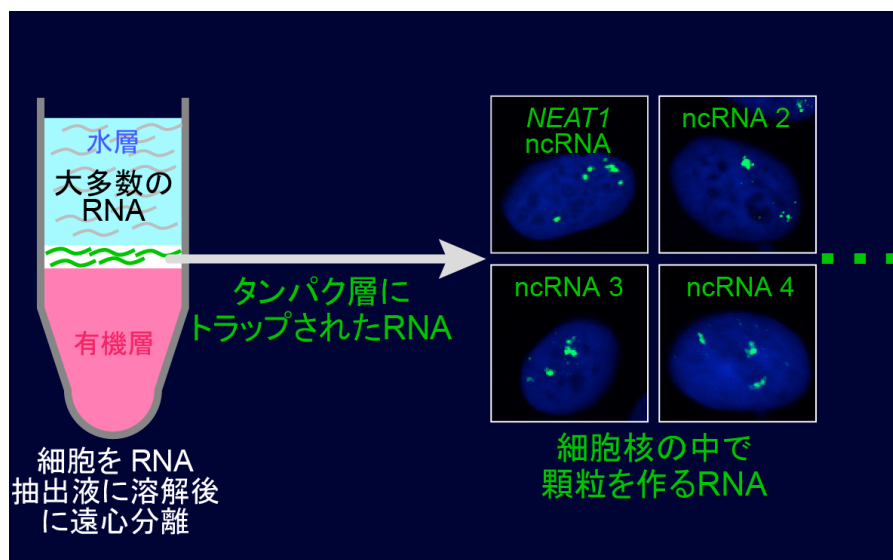
所属：¹北海道大学・遺伝子病制御研究所・RNA 生体機能分野、

²理化学研究所・脳科学総合研究センター・精神生物学研究チーム、

³北海道大学・大学院薬学研究院・RNA 生物学研究室

NEAT1_2 long noncoding RNA (lncRNA) is the molecular scaffold of mammalian paraspeckle nuclear bodies. Similarly, several other lncRNAs also play architectural roles in the formation of specific nuclear bodies; we proposed classifying these nuclear body-constructing RNAs as a distinct subclass of lncRNA called “architectural RNA (arcRNA)” (Chujo et al., BBA. 2016). Formation of known arcRNA-dependent nuclear bodies occurs under specific stresses and developmental stages, and is initiated by induced expression of the arcRNAs. Accordingly it is likely that as-yet-unknown arcRNA-dependent nuclear bodies remain to be identified in various cellular contexts.

Here, we report an improved RNA extraction method: extensive needle shearing or heating of cell lysate in RNA extraction reagent improved NEAT1_2 extraction by 20-fold (a property we term “semi-extractability”), whereas using a conventional method NEAT1_2 was trapped in the protein phase. The improved extraction method enabled us to estimate that approximately 50 NEAT1_2 molecules are present in a single paraspeckle. Another architectural lncRNA, IGS16, also exhibited similar semi-extractability. A comparison of RNA-seq data from needle-sheared and control samples revealed the existence of multiple semi-extractable RNAs, many of which were localized in subnuclear granule-like structures. The semi-extractability of NEAT1_2 correlated with its association with paraspeckle proteins and required the prion-like domain of the RNA-binding protein FUS. This observation suggests that tenacious RNA-protein and protein-protein interactions, which drive nuclear body formation, are responsible for semi-extractability. Our findings provide a foundation for the discovery of the architectural RNAs that constitute nuclear bodies (Chujo et al, EMBO Journal. 2017).



反応性関節炎のマウスモデルにおける血清成分を介した関節炎症

氏名: ○有馬康伸¹、上村大輔¹、大木拓究人¹、Mohamed Elfeky¹、西川直樹¹、樋口光太郎¹、Abhishek Kumar Singh^{1,2}、Sandeep Kumar^{1,2}、Ramnath Misra²、村上正晃¹

所属: ¹北海道大学・遺伝子病制御研究所・大学院医学院・分子神経免疫学教室、
²Clinical Immunology, Sanjay Gandhi Postgraduate Institute of Medical Sciences, India

【要旨】

我々は非免疫細胞において、転写因子 NF- κ B を介したシグナル伝達系と STAT を介したシグナル伝達系との共刺激により炎症性サイトカイン、ケモカインの産生が顕著に亢進することを見出し、それを慢性炎症誘導する分子機構として炎症回路と命名した¹⁻⁶。反応性関節炎(ReA)は、サルモネラ菌などの消化管感染によって引き起こされる無菌性の関節炎である。インドでは、サルモネラ菌が細菌性下痢の最も一般的な原因であり、この病原体は ReA 症例の約 1/3 を占める。しかし、ReA の良い診断マーカーや治療方法は確立できておらず、それは ReA の発症メカニズムを研究するための良い動物モデルが無いことがその一因である。本研究では、インドの臨床研究チームと合同で、ReA の新規診断マーカーおよび治療法を同定するために、炎症回路に基づいた ReA のマウスモデルを確立することを試みる。我々は、炎症回路が増強している F759 マウスを用い、サルモネラ菌の経口感染がそれ自体では明らかな関節炎を早期には誘導しない一方で、感染したマウスの血清成分を関節に投与することで顕著な関節炎を引き起こすことができることを見出した。また、この ReA モデルの関節および ReA 患者の血清中には炎症回路の標的因子が増加していた。これらの結果は、炎症回路と ReA の関連を示すものであり、またこの ReA モデルが ReA の病因を解明するのに有用である可能性を示している。

【参考文献】

1. Ogura, H. et al. Interleukin-17 Promotes Autoimmunity by Triggering a Positive-Feedback Loop via Interleukin-6 Induction. *Immunity*. 29, 628-636 (2008).
2. Murakami, M. et al. Local microbleeding facilitates IL-6- and IL-17-dependent arthritis in the absence of tissue antigen recognition by activated T cells. *The Journal of experimental medicine* 208, 103-114, (2011).
3. Murakami, M. et al. Disease-association analysis of an inflammation-related feedback loop. *Cell reports* 3, 946-959, (2013).
4. Atsumi, T. et al. Inflammation amplifier, a new paradigm in cancer biology. *Cancer research* 74, 8-14 (2014).
5. Harada, M. et al. Temporal expression of growth factors triggered by epiregulin regulates inflammation development. *Journal of immunology* 194, 1039-1046, (2015).
6. Meng, J. et al. Breakpoint Cluster Region-Mediated Inflammation Is Dependent on Casein Kinase II. *Journal of immunology* 197, 3111-3119, (2016).