



第 59 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

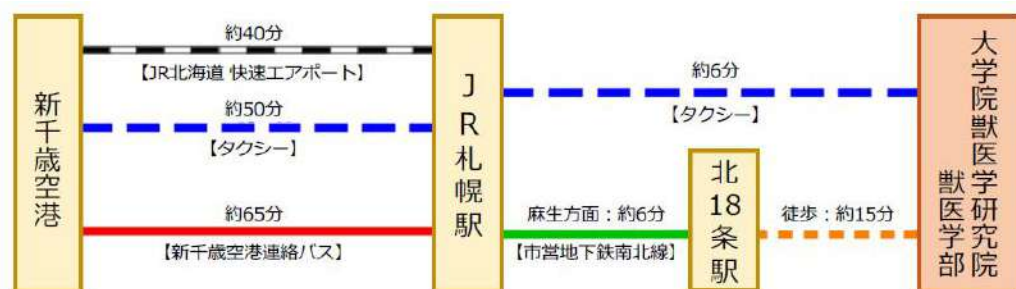
合同シンポジウム

プログラム&要旨集

2022 年 7 月 9 日 (土)

北海道大学 獣医学部 講堂

会場アクセス：来客用の駐車スペースはありません。公共の交通機関をご利用ください。



【ご参加の方へ】

- ・会場近くにはコンビニエンスストアや購買がありません。
昼食は各自でご持参の上、お越しください。

【口頭発表者の方へ】

- ・発表は全て電子プレゼンテーションとなります。発表者自身の PC をプロジェクターに接続して行って頂きます。講演中は自身で操作を行っていただきます。
- ・PC は発表用ファイルを立ち上げた状態で、ご自身でコネクターに接続してください。
- ・会場では RGB 端子 (D-sub15 ピン) が利用できます。
これ以外の端子については各自で変換コネクターをご用意ください。
- ・発表時間はプログラムに記載しています。ノートパソコンへの接続時間を含みます。
- ・プレゼン終了時間の 2 分前に1鈴、終了時に2鈴、質疑応答終了時間に3鈴を鳴らします。
プログラム進行がタイトですので、ご協力をお願いします。

【ポスター発表者の方へ】

- ・ポスターボードは縦 180 cm x 横 90 cm です。こちらに掲示できるサイズでお願いします。
- ・ポスターは、各自のポスター番号が書かれているボードに貼り出してください。
- ・可能であれば、当日の朝 9 時～9 時半の間にポスターの掲示をお願いします。
- ・遅くともポスターセッション開始の 30 分前までには掲示をお願いします。発表の時間になりましたら、各自ポスターの前にてご発表をお願いします。応募者には優秀演題審査があります。
- ・ポスターセッションは12:30-13:20 の予定です。18:10-18:40 まではフリーディスカッション時間ですので掲示しておいてください。19 時にはボードの撤収作業を行います。

プログラム

- 9:05 開場
9:30 開会の辞（山口 良文）

【日本生化学会・日本生物物理学会 北海道支部会シンポジウム】

（発表 20 分 質疑応答 5 分）

（座長：曾根 正光、喜多 俊介）

- 9:30-9:55 **大気中で失活する tRNA 硫黄修飾酵素が 2-チオウリジン合成を触媒する反応機構**
☆石坂 優人（北海道大学・大学院生命科学院・構造生物化学研究室）
- 9:55-10:20 **PML body による遺伝子転写制御メカニズムの研究**
栗原 美寿々（北海道大学・薬学研究院・RNA 生物化学研究室）
- 10:20-10:45 **哺乳類オートファジーにおける小胞体-隔離膜コンタクトサイトの解析**
小笠原 裕太（北海道大学・遺伝子病制御研究所・生命分子機構分野）
- 10:45-11:10 **Wnt 受容体調節の破綻が多段階発がん過程で果たす複雑な役割**
築山 忠維（北海道大学・大学院医学研究院・医化学教室）

【一般講演①】（発表 12 分 質疑応答 3 分）

（座長：鈴木 利治）

- 11:10-11:25 **Ser/Thr ホスファターゼ PPM1D の白色脂肪細胞およびサブタイプ分化における機能**
☆宇野 早映¹、木村 望¹、坂口 和靖^{1,2}、鎌田 瑠泉^{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・大学院理学院・化学部門・生物化学研究室）
- 11:25-11:40 **褐色脂肪組織の形成・増生時にビメンチンのチロシン残基がリン酸化される**
☆鈴木 美羅¹、玉越 雪乃¹、坪田 あゆみ¹、小林 純子²、岡松 優子¹、
木村 和弘¹
（¹北海道大学・大学院獣医学院・生化学教室、
²北海道大学・医学部・組織細胞学）

11:40-11:55 **STAP-2 による B 細胞受容体依存性活性化反応の制御**
☆河原 生知¹、織谷 健司²、柏倉 淳一³、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、
²国際医療福祉大学、³北海道科学大学・薬学部・生命科学分野)

11:55-12:10 **Co-expression assembly of plant chromatins**
☆Petra Banko¹、Kei-ichi Okimune¹、Takasuka Taichi¹
(¹北海道大学・大学院農学院・ゲノム生化学研究室)

12:10- 昼食

【ポスター発表】

12:30-13:20 **P01 ☆黒須 大樹**
(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)
P02 ☆及川 ゆい
(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)
P03 ☆本下 壮太郎
(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)
P04 ☆石本 太我
(北海道大学・獣医学部・生化学教室)
P05 小路 遥
(北海道大学・大学院薬学研究院・衛生化学研究室)
P06 ☆Nabila Mutassim Murad Abdu
(北海道大学・薬学研究院・生体分子機能学研究室)
P07 ☆茂手木 広一
(北海道大学・大学院薬学研究院・認知症先進予防・解析学)
P08 中島 恵一
(旭川医科大学・医学部・生化学講座)
P09 ☆中藺 彬
(北海道大学大学院医学研究院・生化学分野・医化学教室)
P10 ☆木村 将吾
(北海道大学・大学院医学研究院・生化学分野・医化学教室)
P11 ☆大木 のどか
(北海道大学・大学院医学研究院・生化学分野・医化学教室)

13:20-13:30 **総会**（議長:田村 正人）

【一般講演②】（発表 12 分 質疑応答 3 分）

（座長:相馬 仁）

13:30-13:45 **幹細胞を用いたブタ 11-ケトテストステロン産生機構の解析**

○矢澤 隆志¹、川辺 淳一¹

（¹旭川医科大学・生化学講座）

13:45-14:00 **新規アルツハイマー病バイオマーカー候補タンパク質**

Milk fat globule-EGF factor 8 (MFG-E8) のアミロイド性

○大橋 美帆子¹、濱野 宏美²、小海 康夫¹、相馬 仁²

（¹札幌医科大学・医学部・フロンティア医学研究所病態情報学部門、

²札幌医科大学・医療人育成センター・教育開発研究部門）

14:00-14:15 **自己免疫疾患関連遺伝子 C8orf13 による病態誘導機構**

☆北條 慎太郎¹、下山 修平^{1,2}、田中 勇希¹、渥美 達也²、

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・分子神経免疫学分野、

²北海道大学医学院・医学研究院・免疫・代謝内科学教室）

14:15-14:30 **ナノマテリアルによる大腸菌二成分制御系を介する感染調節**

○白土 明子^{1,2}、永長 一茂³

（¹札幌医科大学・医療人育成センター、²大学院医学研究科、

³弘前大学・地域戦略研究所

【特別講演】（発表 25 分 質疑応答 5 分）

（座長:村上 正晃）

14:30-15:00 **液-液相分離によるオートファジー制御**

野田 展生

（北海道大学・遺伝子病制御研究所・生命分子機構分野）

15:00-15:15 **休憩**

【日本生化学会会長 特別招待講演】（発表 40 分 質疑応答 5 分）

（座長：山口 良文）

15:15-16:00 **細胞がストレスを感じる仕組みと疾患
～分子クラウディングと LLPS による浸透圧センシング～**
一條 秀憲
（東京大学大学院薬学系研究科・細胞情報学教室、日本生化学会会長）

16:00-16:15 休憩

【支部若手奨励賞授賞式・受賞講演】（発表 20 分 質疑応答 5 分）

（座長：田村 正人）

16:15-16:20 支部若手奨励賞授賞式

16:20-16:45 **脂質抗原提示分子 CD1 の抗原認識機構**
喜多 俊介
（北海道大学・大学院薬学研究院・生体分子機能学研究室）

16:45-17:10 **血糖値の恒常性を維持する脳内メカニズムに関する研究**
戸田 知得
（北海道大学・大学院獣医学研究院・生化学研究室）

【総説講演】（発表 20 分 質疑応答 5 分）

（座長：坂口 和靖）

17:10-17:35 **細胞内カルボキシル化修飾による抗ストレス応答制御**
岡崎 朋彦
（北海道大学・遺伝子病制御研究所・大学院生命科学院・分子細胞生物研究室）

17:35-18:00 **新たな T 細胞活性化機構の発見と病態制御**
○柏倉 淳一¹、松田 正²
（¹北海道科学大学・薬学部・生命科学分野、
²北海道大学・大学院薬学研究院・衛生化学研究室）

18: 00-18:10 表彰・閉会の辞（山口 良文）

18:10-18:40 フリーディスカッション

（19:00 会場撤収）

日本生化学会・日本生物物理学会
北海道支部会シンポジウム
要旨

[招待講演]

大気中で失活する tRNA 硫黄修飾酵素が 2-チオウリジン合成を触媒する反応機構

氏名：○石坂優人¹、陳明皓¹、奈良井峻¹、田中良和^{1,2}、堀谷正樹^{3,4}、姚閔¹

所属：¹北海道大学・大学院生命科学院・構造生物化学研究室

²東北大学・大学院生命科学研究科・応用生命分子解析分野

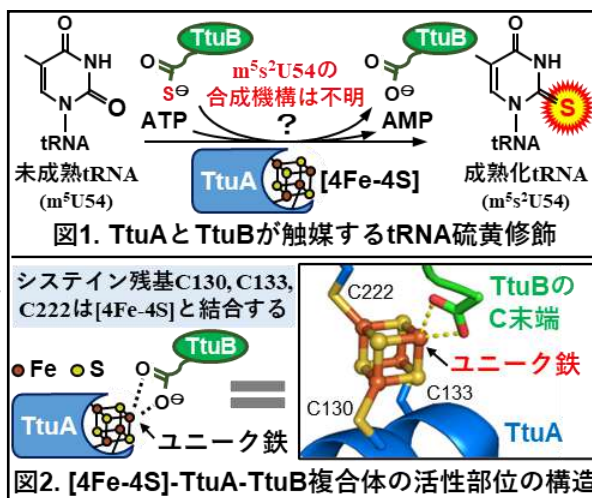
³佐賀大学・農学部・分子生命科学分野 ⁴鹿児島大学・大学院連合農学研究科

【要旨】

生体内で転写された直後の tRNA はリボソームにアミノ酸を運べないため、修飾という酵素反応を経て、成熟化する必要がある。現在までに tRNA の修飾は 100 種類以上も発見されており、中でも硫黄修飾は全生物で起こるため、普遍的かつ重要な生命現象として研究されてきた。近年では、tRNA 硫黄修飾の異常がミトコンドリア病やガンなどにも関わるという報告もある¹⁾。

本研究で着目している tRNA54 位の硫黄修飾 (5-メチル-2-チオウリジン修飾, m^5s^2U54) は、好熱菌が高温環境で生きるために必須の修飾で、2-チオウリジン合成酵素 TtuA と硫黄ドナー蛋白質 TtuB により触媒される (図 1)。我々は近年、TtuA の酵素活性には [4Fe-4S] 型の鉄硫黄クラスターが必要であることを明らかにした²⁾。興味深いことに、鉄硫黄クラスターを構成する 4 つの鉄のうち 3 つが TtuA のシステイン残基に結合する一方、残り 1 つの露出した鉄 (ユニーク鉄) は、TtuB の C 末端と結合していた (図 2)。この TtuA-TtuB 複合体の構造に基づき、ユニーク鉄が TtuB から硫黄を受け取るという反応機構が示唆された。

しかしながら、[4Fe-4S] は容易にユニーク鉄を失って [3Fe-4S] へと酸化崩壊するため、[3Fe-4S]-TtuA が酵素活性を持つ可能性も残っていた。また、TtuA ホモログ酵素の Ncs6 は、TtuB ホモログの硫黄ドナー蛋白質 Urm1 とともに tRNA34 位の硫黄修飾 (mcm^5s^2U34) を触媒する。鉄硫黄クラスターは酵素活性に必須の因子だが、Ncs6 には [4Fe-4S] 型の結晶構造だけでなく、ユニーク鉄を失った [3Fe-4S] を持つという分光学的な報告もある³⁾。故に、真の鉄硫黄クラスター構造に基づいた tRNA 硫黄修飾の詳細な反応機構は明らかでない。



そこで本研究では、無酸素環境下で酸化還元を制御し、TtuA に結合している鉄硫黄クラスター構造と TtuA の酵素活性を経時的に解析することで、活性型の鉄硫黄クラスターを明らかにした。さらに、tRNA 硫黄修飾における硫黄の追跡と変異体解析により、tRNA 活性化の後に硫黄転移が起こることを発見し、それらの過程を担う TtuA の重要残基を見出した。以上の結果をまとめ、我々は TtuA ファミリーにおける tRNA 硫黄修飾の反応機構を提唱した⁴⁾。

【参考文献】

- 1) Suzuki T., (2021) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 22, 375–392.
- 2) Chen M., et al., (2017) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 114, 4954–4959.
- 3) Bimai O., et al., (2020) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 65, 69–78.
- 4) Chen M., Ishizaka M., et al., (2020) *Commun. Biol.* 3, 168.

[シンポジウム]

PML body による遺伝子転写制御メカニズムの研究

氏名：○栗原美寿々

所属：北海道大学・大学院薬学研究院・中川真一研究室

【要旨】

PML body は核内に局在する球状の構造体で、その構成因子に多くのクロマチン関連因子が含まれていることから、遺伝子転写制御の場としても働くと考えられている。しかしながら、PML body がどういったクロマチン領域と相互作用し、どの遺伝子の転写を制御しているのかはほとんど明らかにされていない。解析が進まない最大の要因の一つとして、PML body とクロマチンの相互作用を解析する技術に限られることが挙げられる。そこで我々は、PML body と相互作用するゲノム領域を網羅的に同定することが出来る新規技術「ALaP(APEX mediated Chromatin Labeling and Purification)法」を開発した。これまでに我々は、ALaP 法を次世代シーケンス解析と組み合わせることで、PML body と相互作用するゲノム領域を同定した。その結果、PML body は Y 染色体のタンドムクラスタ配列である YS300 と相互作用し、近傍の遺伝子群の転写を活性化することを見出した。さらにそのメカニズムとして、PML body は YS300 との相互作用を介して、DNA メチル化酵素 DNMT3A を近傍空間から排除することで、隣接する遺伝子群の転写を活性化していることを明らかにした(図 1)。

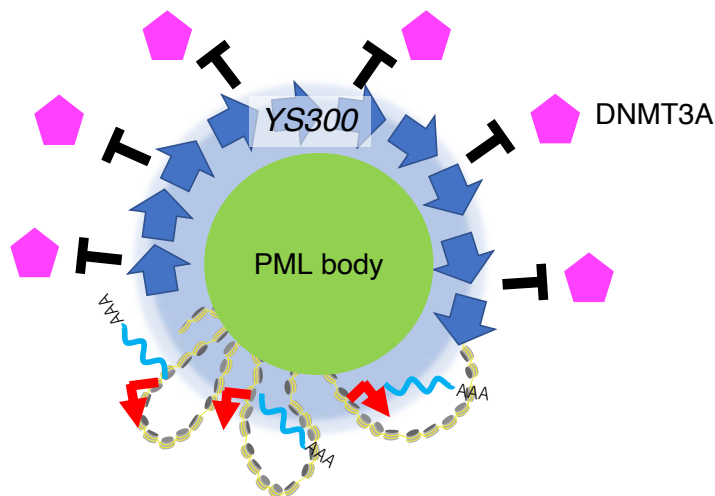


図 1 PML body による遺伝子転写制御モデル

【参考文献】

1. Kurihara M., Kato K., Sanbo C., Ohkawa Y., Fuchigami T and Miyanari Y. Genomic profiling by ALaP-Seq reveals transcriptional regulation by PML bodies through DNMT3A exclusion. Molecular Cell 78:493-505 (2020)

[一般講演]

哺乳類オートファジーにおける小胞体-隔離膜コンタクトサイトの解析

氏名：○小笠原裕太¹、的場一晃²、濱祐太郎^{1,2}、野田展生^{1,2}

所属：¹北海道大学・遺伝子病制御研究所・生命分子機構分野

²公益財団法人・微生物化学研究会・構造生物学研究部

【要旨】

真核生物が持つ主要な分解系オートファジーは、主にアミノ酸などが欠乏する飢餓条件において誘導され、細胞質の一部を分解することで栄養素を供給する。オートファジー誘導時には、オートファジー関連タンパク質 Atg が階層的にリクルートされることにより、隔離膜、オートファゴソームが形成される。出芽酵母では PAS と呼ばれる液胞上の液滴構造に Atg が集積することが報告されているが[1]、哺乳類では酵母における PAS のような構造は報告されていない。哺乳類細胞オートファジーの起源については、隔離膜が ER の延長構造の一部から形成される点や、ER-隔離膜コンタクト部位においてオメガソームと呼ばれる特殊な構造が形成されることが報告されている[2, 3]。またオメガソームマーカーである DFCP1 の形成部位において Kennedy pathway を介して形成される de novo phosphatidyl choline が蓄積していることも明らかになっている[4]。脂質の輸送は Atg の中で唯一の脂質輸送体である Atg2 が担っていると考えられているが[5]、どのような機構で隔離膜への有意な脂質輸送が起きているかは不明である。本研究ではオートファジー誘導条件下におけるオメガソームの構造を経時的に解析することで、オメガソーム近傍での隔離膜の発達、隔離膜末端へと収縮していくオメガソーム構造の形態変化を見出した。またこの時 DFCP1 と ATG2A (哺乳類の Atg2 ホモログ) の共局在を確認しておりオメガソームから ATG2A を介した脂質輸送を示唆するデータが得られている。哺乳類細胞には Atg2 のホモログとして ATG2A/B が存在しており、両者をノックアウトすることでオートファジーが欠損することが報告されている[6]。実際に ATG2A/B ダブルノックアウト細胞では細胞質に異常な構造のオートファジー関連構造が観察される。ATG2 の機能欠損によってオートファジープロセスがどの段階で停止しているか詳細を明らかにするために、各種 Atg の挙動を解析したところオートファジーマーカータンパク質である LC3 が高度に液滴化していることが明らかとなった。これはオートファジーの形成過程においてオートファジー関連構造が液滴化していることを示唆しており、実際に野生型の MEF 細胞において FRAP assay を行ったところオメガソーム上で GFP-LC3 と mCherry-DFCP1 の蛍光の復帰を確認できた(図 1)。これらデータは哺乳類細胞において形成されるオメガソームが出芽酵母における PAS と同様の機能を持つことを示唆しているかもしれない。

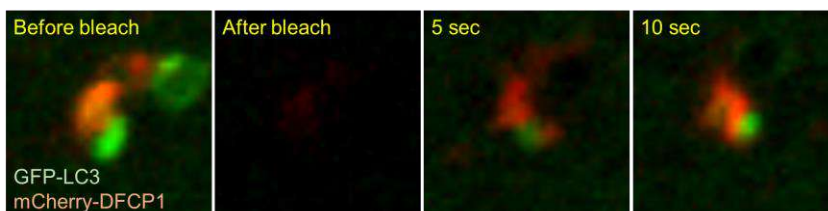


図 1. オメガソーム上での非常に速い分子流動の観察

【参考文献】

- 1) Fujioka, Yuko, et al. (2020) Nature., 578, 301-305.
- 2) Hayashi-Nishino, Mitsuko, et al. (2009) Nature cell biology., 11, 1433-1437.
- 3) Axe, Elizabeth L., et al. (2008) The Journal of cell biology., 182, 685-701.
- 4) Ogasawara, Yuta, et al. (2020) Nature communications., 11, 1-12.
- 5) Osawa, Takuo, et al. (2019) Nature Structural & Molecular Biology., 26, 281-288.
- 6) Tamura, Norito, et al. (2017) FEBS letters., 591, 3819-3830.

[シンポジウム]

Wnt 受容体調節の破綻が多段階発がん過程で果たす複雑な役割

氏名： ○築山忠維¹、松本雅記²、高橋秀尚³、石谷太⁴、中山敬一⁵、大場雄介⁶、Bon-Kyoung Koo⁷、
畠山鎮次¹

所属： ¹北海道大学・大学院医学研究院・医化学教室

²新潟大学・大学院医歯学総合研究科・オミクス生物学分野

³横浜市立大学・大学院医学研究科・分子生物学分野

⁴大阪大学・大阪大学微生物病研究所・生体統御分野

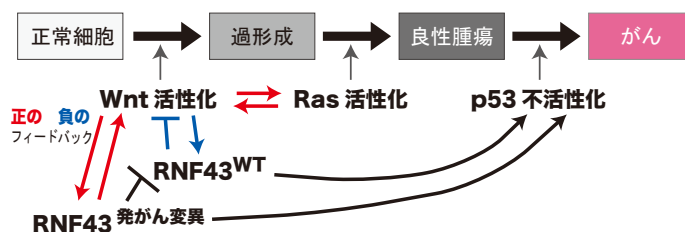
⁵九州大学・生体防御医学研究所・分子医科学分野

⁶北海道大学・大学院医学研究院・細胞生理学教室

⁷Institute of Molecular Biotechnology, Austria

【要旨】

古くから研究されている多段階発がんモデルでは、がんは Wnt シグナル伝達、Ras を介したシグナル伝達、および p53 経路の段階的な調節不全によって段階的に進行します。その中で Wnt シグナルは発がんの開始に重要な役割を果たします。Wnt シグナルの微調整は正常な個体においては幹細胞の分化/増殖を調節し、消化管などの活発な代謝を伴う組織の恒常性を維持するために重要な役割を果たしています。我々はこれまでに、ユビキチンリガーゼ RNF43 が Wnt 受容体の分解を誘導することにより、Wnt シグナルの負のフィードバック回路に関与することでがん抑制遺伝子として機能することを報告してきました。この RNF43 の機能は、細胞内局在依存性のリン酸化により双方向性に制御されています。大腸がんにおいて観察される遺伝子変異は RNF43 タンパク質の細胞内局在を変化させ、その結果リン酸化が失われることにより癌遺伝子への機能転換が起こります。また我々は以前より、RNF43 が p53 経路を抑制することも報告していました。しかし RNF43 のリン酸化は Wnt シグナル調節に決定的な影響力を持つのに対して、p53 経路を抑制する機能には影響しませんでした。つまり RNF43 の遺伝子変異により異常活性化した Wnt シグナルの標的遺伝子としてさらなる発現誘導を受けた変異 RNF43 は、より強力に p53 シグナルを抑制する可能性があります。そこでマウスモデルによる検討を行ったところ、RNF43 変異だけでは細胞を腫瘍化できませんでしたが、ここに p53 を不活性化する変異を加えることなく Ras 活性化変異を一つ追加するだけで腫瘍化が可能になりました。我々の結果は、RNF43 変異が Wnt シグナル伝達の活性化と同時に p53 経路を抑制するため、多段階発がんの 3 段階の達成に 2 つの遺伝子の変異だけで十分であることを示唆しています。



図；多段階発がんにおける複雑なネットワーク

【参考文献】

- 1) Tsukiyama T et al. (2021) BioEssays, 43(4), 2000297.
- 2) Tsukiyama T et al. (2020) Nat Commun., 11, 4586.
- 3) Tsukiyama T et al. (2015) Mol Cell Biol., 35(11), 2007-2023.
- 4) Shinada K et al. (2011) BBRC 404(1), 143-147.

特別講演・特別招待講演
要旨

[特別講演]

液-液相分離によるオートファジー制御

氏名：○野田展生¹

所属：¹北海道大学・遺伝子病制御研究所・生命分子機構分野

【要旨】

オートファジーは真核細胞に保存された基本的な分解システムで、細胞質のあらゆる成分（タンパク質、核酸、脂質、オルガネラなど）をリソソームに輸送することで分解を行う。栄養飢餓などでオートファジーが誘導されると、オートファジー関連（Atg）タンパク質群が集合してプレオートファゴソーム構造体（PAS）を形成し、PAS からオートファゴソーム形成が進行する。PAS の存在は 2001 年に報告されたが、それがどのような実体でどのような分子機能を担うのか、長らく謎に包まれてきた。我々は PAS の構築に働く Atg1 複合体の構造機能解析を行い、平行して出芽酵母を用いた細胞生物学的解析を行うことで、PAS の実体は Atg1 複合体が液-液相分離して形成された液滴であることを突き止めた。そしてオートファジーの始動は Atg1 複合体の液-液相分離で規定されること、液-液相分離は Atg1 複合体の構成因子である天然変性タンパク質 Atg13 のリン酸化状態で制御されることを明らかにした（図 1）¹⁾。

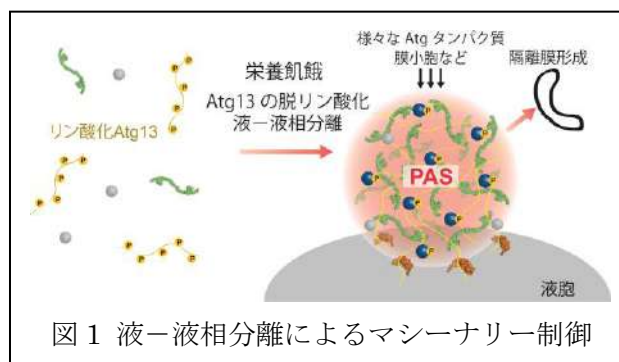


図 1 液-液相分離によるマシナリー制御

オートファジーは特定の基質を選択的に分解することが知られており、それは選択的オートファジーと呼ばれる。液-液相分離は特定のタンパク質を濃縮することが可能であることから、タンパク質の選択的オートファジーにおいても重要な役割を担うことが示唆されてきた。我々は最も古くから見出されてきた酵母における液胞酵素 Ape1 の選択的オートファジーが、実は液-液相分離で形成された Ape1 液滴を基質としていることを見出した。Ape1 の相分離を阻害する変異や固体状に凝集化させる変異は選択的オートファジーを阻害したことから、“液滴”であることが効率的な選択的オートファジーに重要であることが明らかとなった（図 2）²⁾。すなわち液-液相分離はマシナリーと分解基質の両方を“液滴状態”にすることで、オートファジーを駆動していることが明らかとなった^{3,4)}。

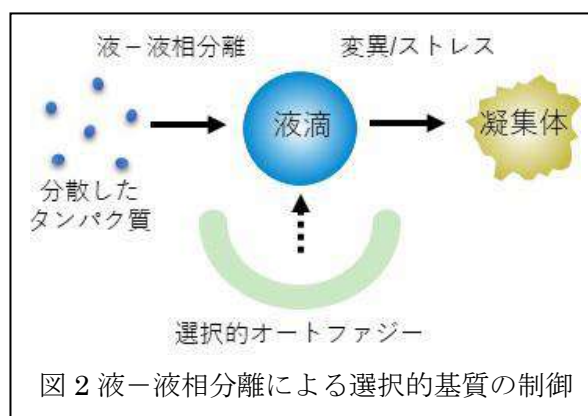


図 2 液-液相分離による選択的基質の制御

【参考文献】

- 1) Fujioka, Y., Alam, J. M., Noshiro, D., Mouri, K., Ando, T., Okada, Y., May, A. I., Knorr, R. L., Suzuki, K., Ohsumi, Y. and Noda, N. N. (2020) Nature, 578, 301-305.
- 2) Yamasaki, A., Alam, J. M., Noshiro, D., Hirata, E., Fujioka, Y., Suzuki, K., Ohsumi, Y. and Noda, N. N. (2020) Mol. Cell, 77, 1163-1175.
- 3) Noda, N. N., Wang, Z. and Zhang, H. (2020) J. Cell Biol., 219, e202004062.
- 4) Fujioka, Y. and Noda, N. N. (2021) Curr. Opin. Cell Biol., 69, 23-29.

[特別講演]

細胞がストレスを感じる仕組みと疾患 ～分子クラウディングとLLPSによる浸透圧センシング～

氏名: 〇一條 秀憲

所属: ¹東京大学大学院薬学系研究科・細胞情報学教室、日本生化学会会長

【要旨】

ストレス応答は細胞が持つ最も基本的な生命現象のひとつであり、その破綻は、がん、神経変性疾患、免疫疾患、代謝性疾患などをはじめとする多様な疾患の発症要因となります。本講演では、主に浸透圧ストレス応答に関する私たちの最新の知見をご紹介します。

細胞は、内外の浸透圧差によって強制的に体積を変化させられるストレス(=浸透圧ストレス)に常に曝されており、浸透圧変化を感知して適切に応答することで細胞体積を一定に保っています。これまでは、細胞外環境と接する細胞膜上の変化などを介して物理的実体のない浸透圧変化を感知するという考え方に基づいた研究が主流でした。私たちは、ASK3 というタンパク質を研究モデルに生化学的手法と計算機シミュレーションを用いて、細胞が液・液相分離という物理現象を引き金として浸透圧ストレスを細胞内部で感知していることを明らかにしました。

このような浸透圧ストレス応答の基礎研究を通じて、ストレスシグナル研究の一端をご紹介できればと思います。

支部若手奨励賞受賞講演
要旨

[一般講演]

脂質抗原提示分子 CD1 の抗原認識機構

氏名：○喜多 俊介¹⁾、日下 裕規¹⁾、秋田 穂¹⁾、井貫 晋輔²⁾、田 聡¹⁾、Md. Imran Hossain³⁾、花島 慎弥³⁾、田所 高志¹⁾、新山 真由美³⁾、杉山 成⁴⁾、相羽 俊彦^{2,3)}、尾瀬 農之⁵⁾、黒木 喜美子¹⁾、深瀬 浩一³⁾、村田 道雄³⁾、藤本 ゆかり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⁾ 大阪大学・大学院理学研究科化学専攻・生体分子化学研究室
³⁾ 慶應義塾大学・理工学部化学科・生体分子化学研究室
⁴⁾ 高知大学・理工学部・化学生命理工学科
⁵⁾ 北海道大学・大学院生命科学院・X線構造生物学的研究室

【要旨】

CD1d は非古典的主要組織適合遺伝子複合体クラス I の仲間であり、内在性及び外来性の脂質を認識する抗原提示分子である。CD1d はナチュラルキラーT (NKT)細胞の T 細胞受容体によって認識され、大量のサイトカインの産生を誘導する。NKT 細胞は Th1、Th2 および Th17 サイトカインといった多様なサイトカインを産生し、感染症やがん、自己免疫疾患などの多様な疾患に関与している。NKT 細胞のサイトカイン産生は CD1d によって提示される抗原情報に依存しているが、抗原の化学構造と産生されるサイトカインの選択性との関係は十分に明らかとなっていない。本発表では、糖脂質 α -GalCer のアシル鎖にアミド基を導入することでサイトカインの産性能向上が報告されたアミド型 α -GalCer における X 線結晶構造解析と熱安定性解析について報告する¹⁾。

CD1d 蛋白質は、カイコ-バキュロウイルス発現系を用いて調製した²⁾。カイコ体液より精製した CD1d はカイコの内在性脂質を結合していたため、化学合成したリガンドと置換する条件を検討し、酸性条件下でリガンドの置換が促進されることを見出した。これらの条件を用いて、ヒト CD1d およびマウス CD1d の調製を行い、CD1d とアミド型 α -GalCer 複合体の X 線結晶構造解析を行なった。マウス CD1d においては、抗原のアミド基と CD1d の Ser46 が水素結合ネットワークを形成していること、アシル鎖の長さによって Ser46 の向きが異なり、形成される水素結合ネットワークも異なることが明らかとなった。また、マウスとヒトでアミド基の位置や CD1d との相互作用に差があることを見出した。そこで各 CD1d と抗原複合体の示差走査熱量測定を行い、構造と熱安定性の相関を検証したところ、マウス CD1d では高い熱安定性を示すアシル鎖長が存在する一方、ヒト CD1d ではアシル鎖が長いほど熱安定性が高い傾向を示した。本研究によって明らかとなった、アシル鎖長による CD1d-抗原複合体の熱安定性変化や、抗原認識におけるヒトとマウスの種差をもとに、抗原デザインを合理的に進めることが期待される。

【参考文献】

- 1) Shinsuke Inuki, *et al.*, (2016) *ACS Chem. Biol.*, **11**, 3132-3139.
- 2) Hiroki Kusaka, *et al.*, (2020) *Protein expression and purification*, **172**, 105631–105631.

[シンポジウム]

血糖値の恒常性を維持する脳内メカニズムに関する研究

氏名：○戸田知得¹

所属：¹北海道大学・大学院獣医学研究院・生化学研究室

【要旨】

脳は末梢ホルモン、血中栄養素および上行性神経シグナルなどを介して体内に存在する利用可能な栄養素の量を感じ、食欲や末梢組織の代謝を調節することで体内エネルギー量の恒常性を維持する。視床下部は古くから食欲および血糖値の調節に重要であることが知られている。我々は、食後に満腹感および満足感をもたらす神経細胞の同定¹など、視床下部による全身エネルギー代謝の調節メカニズムについて研究を行ってきた。

本講演では我々が発見した視床下部の血糖値センサーについて紹介する^{2,3}。視床下部には血糖値の濃度変化を感じ取るグルコースセンシング神経があり、骨格筋の糖取り込みや肝臓からの糖産生を調節して血糖値を一定に保っている。肥満すると視床下部によるエネルギー感知システムの機能が低下して、血糖値の恒常性が維持できなくなる。しかし、そのメカニズムは十分に解明されていない。細胞膜リン脂質中には不飽和脂肪酸が存在し、様々な刺激によって遊離され、プロスタグランジン類の原料として利用される。しかし、血糖値の変化または肥満が視床下部のプロスタグランジン類を生成するか、また、視床下部のプロスタグランジン類が血糖値の調節に重要であるかは不明である。我々は、イメージング質量分析器などを用いて、視床下部における細胞膜リン脂質量の変化およびプロスタグランジン類の生成を測定した。その結果、血糖値の増加および肥満が視床下部におけるアラキドン酸含有リン脂質量を低下し、ある種のプロスタグランジン類の生成を増加した。視床下部のプロスタグランジン生成を阻害すると正常体重においては神経活動が低下して全身糖代謝が悪化した。一方、肥満マウスにおいては脳内炎症および全身糖代謝の悪化が改善した。したがって、視床下部のプロスタグランジン生成は正常体重では血糖値を低下させ、肥満マウスでは血糖値を増加するという逆の作用があることが示唆された²。

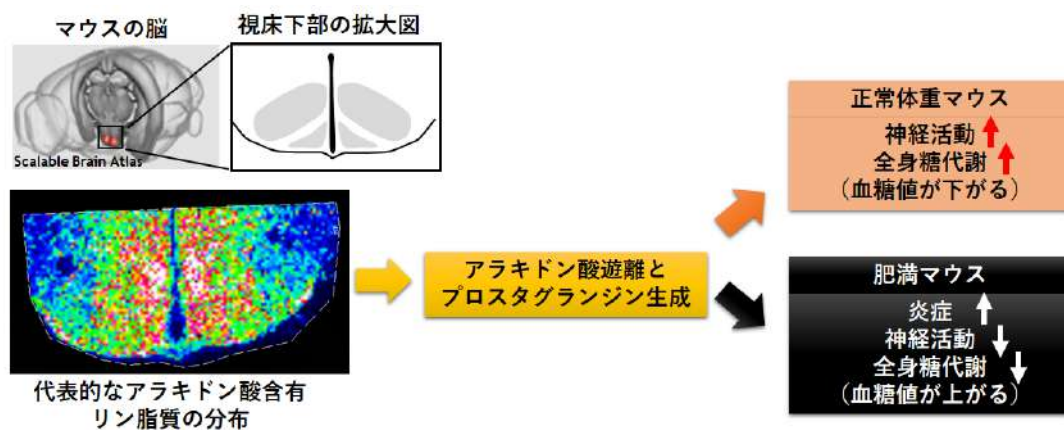


図1 視床下部のプロスタグランジン生成は正常体重では高血糖を低下させるために必要であるが、肥満マウスでは脳内炎症を引き起こし血糖値を増加する

【参考文献】

- 1) Imoto D, Toda C* et. al., (2021) Molecular Metabolism, 54, 101366.
- 2) Lee ML, Toda C* et. al., (2021) Nature Communications, 12, 2330.
- 3) Toda C, et. al., (2016) Cell, 64:872-883.

総説講演要旨

[総説講演]

発表タイトル:
細胞内カルボキシル化修飾による抗ストレス応答制御

氏名：○岡崎朋彦

所属： 北海道大学・遺伝子病制御研究所・大学院生命科学院・分子細胞生物研究室

【要旨】

タンパク質カルボキシル化修飾は、カルボキシラーゼ GGCX によってグルタミン酸残基とアスパラギン酸残基に起こる翻訳後修飾である。カルボキシル化修飾の基質はこれまで約 20 あまりの細胞外タンパク質が知られているのみであり、主に血液凝固や骨形成に関わることが報告されていた。一方で、GGCX により修飾を受ける細胞内タンパク質はこれまで報告されていなかった。我々はこれまでウイルス感染初期の防御機構である「I型 IFN 産生」と「アポトーシス誘導」の選択メカニズムの解明を進めており、この二つの応答を制御するミトコンドリア上の抗ウイルス応答分子 IPS-1 が意外にも GGCX によってカルボキシル化修飾を受け、それにより二つの応答を使い分けていることを見出した(Okazaki et al., unpublished)。これは、細胞内カルボキシル化がウイルス感染に対し「生きて IFN を産生し周囲に警告するか」または「ウイルスごと自殺するか」という細胞運命決定に関わる可能性を示している。

細胞内にもカルボキシル化基質が存在しうることが判明したことから、我々は他にも細胞内カルボキシル化基質が存在し様々な生命現象を担っている可能性を考え、現在その検証を進めている。興味深いことに、GGCX 欠損細胞に DNA 損傷刺激を加えた場合、野生型と比べて種々のストレス応答遺伝子の発現が変化し、DNA 損傷刺激に対する細胞の増殖抑制が軽減することを見出した。本発表においては、抗ストレス応答制御における細胞内カルボキシル化の重要性とその制御メカニズムについて議論したい。

[総説講演]

新たな T 細胞活性化機構の発見と病態制御

氏名：○柏倉淳一¹、松田正²

所属：¹北海道科学大学・薬学部・生命科学分野、

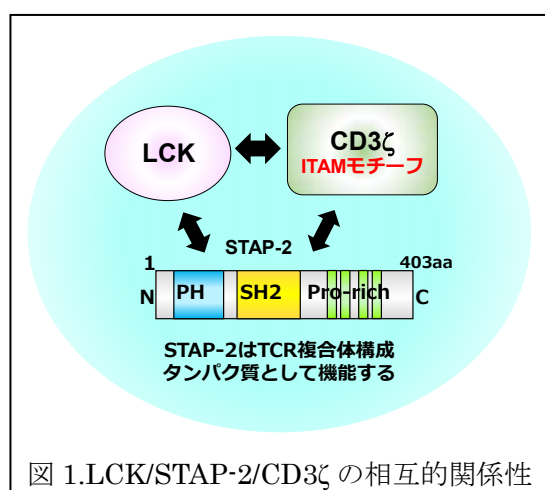
²北海道大学・大学院薬学研究院・衛生化学研究室

【要旨】

）我々の体内では常に新たに侵入した病原体の排除機構および免疫記憶の成立が起きている。特に免疫記憶に関わる獲得免疫応答は、一度、侵入した病原体を記憶しておき、再度の侵入時には、即座に反応し、それらを排除しようとする免疫応答である。その一例であるワクチンなどは、生体内に受動的に獲得免疫応答を成立させるため、感染症予防に重要であることが広く知られている。一方、獲得免疫応答に異常が生じると、自己に対する過剰な免疫応答が起こり、全身性エリテマトーデスや多発性硬化症などの自己免疫疾患を発症する。そのため、獲得免疫応答の詳細な解明は、効率的なワクチン開発のみならず、自己免疫疾患に対する新たな治療戦略を考える上でも必要不可欠である。

）T 細胞は胸腺で発生し、獲得免疫応答で中心的役割を担うリンパ球である。T 細胞が病原体やがん細胞を T 細胞受容体（以下 TCR）で認識すると、TCR シグナルカスケードが活性化し、獲得免疫応答の成立、それに伴う特異的病原体の排除が行われる。一方で、TCR シグナルの異常などにより、胸腺や末梢で自己反応性 T 細胞の除去が正常に行われないと、自己抗原に対して過剰の免疫応答が起こり、自己免疫疾患発症に繋がる。TCR シグナルカスケードは基質とリン酸化酵素の他、それらの足場タンパク質となるアダプター分子が必要である。アダプター分子の欠損や変異は、重大な TCR 依存性 T 細胞活性化異常を引き起こすことから¹⁾²⁾、近年、自己免疫疾患やアレルギー疾患の新規治療標的分子と成りつつある。

Signal-transducing adaptor protein-2 (STAP-2) は、STAP-1 とともに STAP ファミリーに属するアダプター分子である。我々はこれまでに STAP-2 が様々な免疫反応を調節する重要なアダプター分子であることや、がん細胞治療における新規標的分子と成る可能性を示してきた。特に T 細胞では、SDF-1 α 誘導性 T 細胞遊走、インテグリン依存性 T 細胞接着、Fas 介在性 T 細胞死などの調節に STAP-2 が必要であることを報告し³⁻⁵⁾、多くの T 細胞機能に対して STAP-2 が非常に重要な役割を担っている可能性が考えられる。本講演では、我々が最近明らかにした、STAP-2 の TCR 介在性 T 細胞活性化機序に対する機能的役割（図 1）、さらに T 細胞依存性自己免疫疾患の一つである多発性硬化症の病態形成における重要性⁶⁾について総説する。



【参考文献】

- 1) Zhang W, et al. (1998) Cell, 92, 83-92.
- 2) Wang, et al. (2008) J. Immunol., 180, 1565-1575.
- 3) Sekine Y, et al. (2009) J. Immunol., 183, 7966-7974.
- 4) Sekine Y, et al. (2007) J. Immunol., 179, 2397-2407.
- 5) Sekine Y, et al. (2012) J. Immunol., 188, 6194-6204.
- 6) Saitoh K, Kashiwakura J, et al. (2021) J. Immunol., In press.

一般講演要旨

[一般講演]

Ser/Thr ホスファターゼ PPM1D の白色脂肪細胞およびサブタイプ分化における機能

氏名：○宇野早映¹、木村望¹、坂口和靖^{1,2*}、鎌田瑠泉^{1,2*}

所属：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】

白色脂肪細胞は、単房性の大きな脂肪滴を有し、エネルギーの貯蔵と放出・ホルモンの分泌を行い全身のエネルギー恒常性を維持する。エネルギーの貯蔵を担う脂肪滴の過剰な形成は、白色脂肪細胞の肥大化を引き起こし肥満の原因となる。熱産生を行うベージュ脂肪細胞は、寒冷刺激などの刺激に応答して白色脂肪細胞から分化転換する。近年、脂肪細胞に機能の異なるサブタイプが報告されているが、その分化や機能発現機構は明らかとなっておらず、肥満治療法開発のためにも脂肪細胞サブタイプの分化やベージュ化の制御機構解明が強く求められている。p53 誘導性 Ser/Thr ホスファターゼ PPM1D は、免疫応答や精子形成などの生体内機能に関与する[1]。Ppm1d ノックアウトマウスにおいて体重の減少や脂肪蓄積の抑制が見られ、PPM1D の代謝への関与が示唆されている。我々は、脂肪細胞分化モデル細胞 3T3-L1 を用い、白色脂肪細胞への分化誘導時に PPM1D knockdown および当研究室で開発した PPM1D 特異的阻害剤 SL-176 により PPM1D を阻害した結果、脂肪細胞分化が著しく抑制されることを明らかにしている [2]。本発表では白色脂肪細胞およびサブタイプ分化における Ser/Thr ホスファターゼ PPM1D の新規機能について報告する。

まず、白色脂肪細胞分化における PPM1D の機能を解明するため、PPM1D の分化時期依存性解析を実施した。その結果、PPM1D は分化初期において脂肪細胞分化を制御する転写因子の PPAR γ と C/EBP α の発現誘導に関与する一方で、分化中期および後期において分化非依存的に脂肪滴形成を制御することが示された。さらに、成熟した白色脂肪細胞における PPM1D の阻害により、脂肪滴サイズの減少した多房性脂肪滴が形成されることが示された。Phosphatase assay および脂肪滴形成を制御するタンパク質である perilipin 1 の変異体を用いた解析により、PPM1D が perilipin 1 の Ser511 の脱リン酸化を介して脂肪滴形成を制御することを明らかとした。非常に興味深いことに、成熟白色脂肪細胞における PPM1D の阻害により、ミトコンドリア量が著しく増加することが明らかになった。一方で、ベージュ脂肪細胞分化マーカーの発現量には顕著な変化は見られず、ベージュ脂肪細胞の特徴を有する脂肪細胞サブタイプへの分化が示唆された。このサブタイプの脂肪分解活性を解析した結果、脂肪分解に耐性を示すことを明らかにした。

以上より、PPM1D は白色脂肪細胞分化に関与し、perilipin 1 Ser511 の脱リン酸化を介して脂肪滴形成を制御することが示された (図 1)。また、成熟白色脂肪細胞における PPM1D の阻害により、ベージュ脂肪細胞の特徴を有するサブタイプへの分化が示唆された。

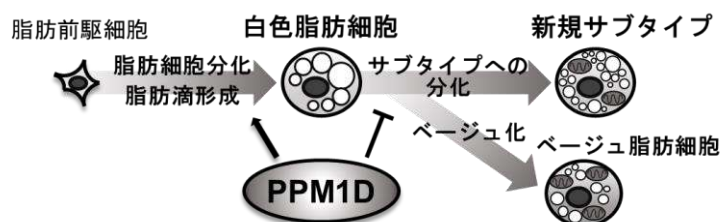


図 1 PPM1D の白色脂肪細胞およびサブタイプ分化における機能

【参考文献】

- 1) Kamada R., Kudoh F., Ito S., Tani I., Janairo J. I. B., Omichinski J. G., Sakaguchi K. (2020) *Pharmacol. Ther.*, **215**, 107622.
- 2) Kamada R., Kimura N., Yoshimura F., Tanino K., Sakaguchi K. (2019) *PLoS One*, **14**, e0212682.

[一般講演]

褐色脂肪組織の形成・増生時にビメンチンのチロシン残基がリン酸化される

氏名：○鈴木美羅¹、玉越雪乃¹、坪田あゆみ¹、小林純子²、岡松優子¹、木村和弘¹

所属：¹北海道大学・大学院獣医学院・生化学教室、

²北海道大学・医学部・組織細胞学

【要旨】

褐色脂肪組織は非震え熱産生に寄与し、新生仔や寒冷曝露時の体温維持に重要である。しかしハムスターでは出生直後に褐色脂肪組織はみられず、その後白色脂肪組織中で前駆細胞が増殖して褐色脂肪細胞へと分化する¹⁾。褐色脂肪組織の増生時、前駆細胞においてセリン/スレオニンキナーゼである PKA が活性化することが知られているが、チロシンリン酸化シグナルについては不明である。本研究では、ハムスターとマウスの褐色脂肪組織の形成・増生過程の前駆細胞において活性化チロシンリン酸化に関する経路を明らかにすることを目的とした。

シリアンハムスターの肩甲間脂肪組織は、7 日齢ではほとんどの領域を白色脂肪細胞が占めていたが、10 日齢では 20%程度の領域に前駆細胞が存在した。14 日齢ではほとんどの領域を褐色脂肪細胞が占めていた。抗リン酸化チロシン抗体を用いて褐色脂肪組織のウェスタンブロットを行うと、7 日齢で約 60kDa の明瞭なバンドが検出され、日齢とともに検出量が減少して 14 日齢以降では低レベルだった。同じサイズのリン酸化チロシンのバンドが、寒冷曝露 20 分後の C57BL/6J マウスの褐色脂肪組織においても検出された。前駆細胞の増殖制御に関わることが知られている、受容体型チロシンキナーゼの血小板由来増殖因子(PDGF)受容体の阻害剤投与により減少した。また、前駆褐色脂肪細胞株 HB2 を PDGF-BB で刺激するとリン酸化チロシン量が増加した。質量分析の結果、約 60kDa のバンドは中間径フィラメントであるビメンチンであることがわかった。

ハムスターの褐色脂肪組織形成時やマウスの寒冷曝露時にビメンチンのチロシン残基がリン酸化されることがわかった(図 1)。ビメンチンのセリン残基のリン酸化は、遊走、浸潤、シグナル伝達など多様な細胞機能に関与することが複数報告されている。一方、チロシン残基のリン酸化については不明な点が多い。今後、褐色脂肪組織におけるビメンチンのチロシンリン酸化の役割について検討する。

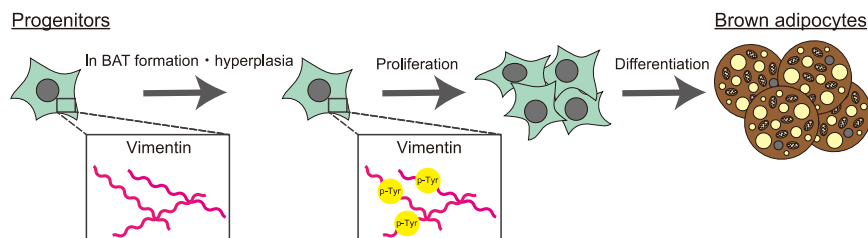


図 1. 褐色脂肪組織の形成・増生においてビメンチンのチロシン残基がリン酸化される

【参考文献】

- 1) Okamatsu-Ogura Y., Nio-Kobayashi J., Nagaya K., Tsubota A., and Kimura K. (2018) J Appl Physiol., 124(1):99-108.

[一般講演]

STAP-2 による B 細胞受容体依存性活性化反応の制御

氏名：○河原生知¹、織谷健司²、柏倉淳一³、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

² 国際医療福祉大学

³ 北海道科学大学・薬学部・生命科学分野

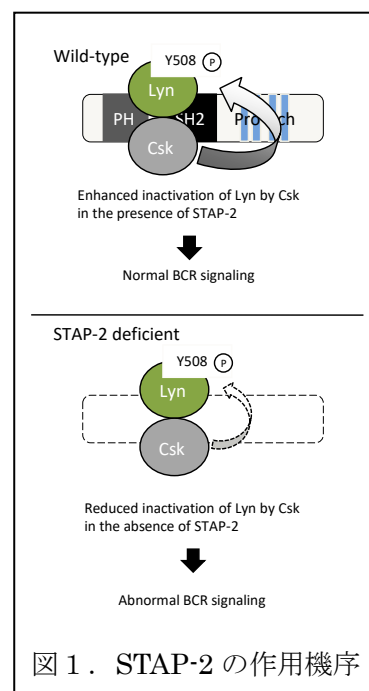
【要旨】

Signal-Transducing-Adaptor-protein-2 (STAP-2) は、様々な免疫細胞に発現し、細胞内シグナル伝達の調節にかかわるアダプタータンパク質である¹⁻³⁾。しかし、抗体産生細胞である B 細胞に対して STAP-2 がどのように働いているかは不明である。そこで、B 細胞受容体（以下 BCR）を介した B 細胞活性化、さらには生体内抗体産生機序における STAP-2 の機能的役割を解明することを目的として本研究を行った。

まず野生型 (WT) 及び STAP-2 欠損 (KO) マウス B 細胞を用いて、抗 IgM 抗体で BCR 刺激後のサイトカイン産生や下流シグナル分子の活性化を解析した。その結果 WT B 細胞と比較して、KO B 細胞では抗 IgM 刺激後の IL-6 および IL-10 産生の有意な増加が観察された。BCR シグナル分子の活性化状態の変化を解析したところ、WT B 細胞と比較して、KO B 細胞では Src ファミリーチロシンリン酸化酵素 Lyn や他の BCR 下流分子の活性化亢進が観察され、STAP-2 は B 細胞の BCR 依存性活性化反応を負に抑制していることが示唆された。次に HEK293T を用いた過剰発現系実験により STAP-2 による BCR 依存性 B 細胞活性化作用機序の解明を行ったところ、STAP-2 は Lyn および Lyn の活性化を抑制することが報告されている Csk と相互作用することが分かった。さらに、これら 3 分子を共発現して、STAP-2 による Csk 依存性 Lyn 活性化制御反応の増強を確かめたところ、STAP-2 を共発現させると、Csk による Lyn 活性化抑制の増強が観察された。

最後に生体内抗体産生応答における STAP-2 の機能を明らかにする目的で、NP-Ficol1 免疫 WT および KO マウスの血中抗 NP-IgM 抗体価を ELISA 法で測定した。その結果、KO マウスでは WT マウスと比べ、抗 NP-IgM 抗体価が有意に上昇した。また、WT および KO マウスにブタクサ抗原を連続的に吸入させる花粉症マウスモデルを用いてブタクサ抗原特異的 IgE 産生の変化を検討したところ、KO においてブタクサ抗原特異的 IgE 抗体価の上昇、それに伴う症状増悪化が見られた。

以上の結果から、STAP-2 は B 細胞において Lyn と Csk の足場タンパク質として機能し、BCR 依存性 B 細胞活性化反応を調節する重要なアダプター分子であることが示唆された (図 1)。またこの研究により STAP-2 機能の人為的制御法を開発することにより、B 細胞の過剰活性化によるアレルギー性炎症や自己免疫疾患の新規治療薬開発につながると考えられる。



【参考文献】

- 1) Saitoh K, Kashiwakura J, et al. (2021) J. Immunol., In press
- 2) Sekine Y et al., (2006) J. Immunol., 176, 380-389
- 3) Sekine Y et al., (2014) J. Immunol., 192, 3488-3495

Co-expression assembly of plant chromatin

氏名：○Petra Banko¹、Kei-ichi Okimune¹、Takasuka Taichi¹

所属：¹北海道大学・大学院農学院・ゲノム生化学研究室

【要旨】

Chromatin plays a central role in the eukaryotic cell nuclei to protect DNA, regulate spatio-temporal gene expression, and inherent epigenetic functions from generation to generation. The building block of the chromatin is the nucleosome, which consists of an octameric protein complex made up of two copies of each H2A, H2B, H3 and H4 histones, wrapped around by ~147 bp of DNA. Most histones are deposited in a DNA replication-coupled manner. Changes in the chromatin structure, like the deposition of replication-independent histone variants, are thought to contribute to specialized chromatin functions in a tissue type-dependent gene regulation, cell division, DNA repair and heterochromatin formation. However, the mechanism of deposition and physiological function of these variants are not fully understood due to the limited *in vitro* approach. Here, we introduce a novel method for *in vitro* chromatin assembly for *Arabidopsis thaliana* chromatin. We utilize a cell-free protein expression system to assemble chromatin in one reaction on a circular plasmid template (1). 24 combinations of canonical histone and histone variants found in *A. thaliana* – H2A, H2A.X, H2A.W, H2A.Z, H3.1, H3.3, CENH3, H4, were evaluated chromatin assembly potential, and assessed by supercoiling and micrococcal nuclease assay (Figure 1). Seven combinations were efficiently assembled into chromatin with expected nucleosome repeat lengths. Additionally, we co-expressed a reported chromatin assembly factor, AtNap1, in the reaction of the 17 combinations, which did not form chromatin successfully, to test the currently not described histone variant assembly function of AtNap1. Two combinations were successfully assembled in an AtNap1-dependent manner. Overall, our method should provide a new tool for the creation of uniform chromatin on a defined DNA template and may also offer opportunity to directly evaluate the effect of a single factor or interacting protein on chromatin assembly in a physiologically relevant environment.

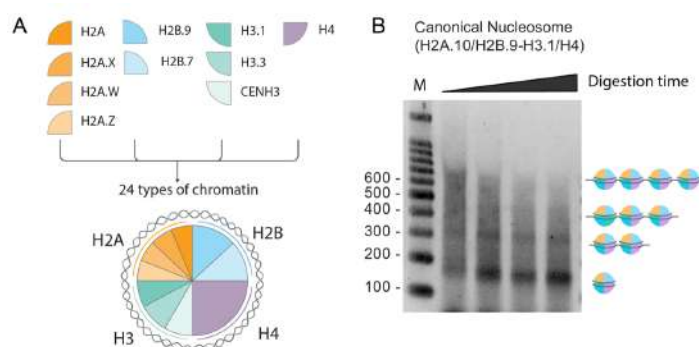


Fig1. A) Schematic representation of *Arabidopsis* histone variants and possible 24 combinations used in this study. B) Micrococcal nuclease assay of canonical chromatin. Digestion fragments are corresponding to mono-, di-, tri and tetra nucleosomes (2).

【参考文献】

- 1) Okimune K., Hataya, S., Matsumoto, K., Ushirogata, K., Banko, P., Takeda, S. and Takasuka T.E. (2021)
- 2) Banko P., Okimune K. and Takasuka T. (2022) Patent 2022-071114

[一般講演]

幹細胞を用いたブタ 11-ケトテストステロン産生機構の解析

氏名：○矢澤隆志、川辺淳一

所属： 旭川医科大学生化学講座

【要旨】

免私たちは、再生医療を目指して幹細胞からステロイドホルモン産生細胞を分化誘導する系を確立すると共に、分化した細胞を用いてホルモン産生のメカニズムを解析してきた。本研究では、臓器移植等に用いられるブタ由来の幹細胞において研究を行った。ブタの間葉系幹細胞由来のPSPA細胞に転写因子のSF-1/Ad4BPを発現させたところ、細胞は多くのステロイドホルモン産生酵素を発現し、テストステロンやエストラジオールといった性ステロイドを産生する細胞に分化した。また、分化した細胞は、HSD11B2を発現しており、11-ケトテストステロン(11-KT)を産生した。11-KTは、アンドロステンジオンやテストステロンからCYP11BやHSD11B2といった複数の酵素により合成されるアンドロゲンである。11-KTは、従来、硬骨魚類に特有のアンドロゲンであると考えられてきたが、近年はヒトでも副腎で産生され、血中に高濃度で存在していることが分かり注目されている。そこで、ブタにおける11-KTの存在を確かめるために、雌雄血中の各種アンドロゲンをLC-MS/MS法により測定した。すると、ブタ血中には比較的高濃度の11-KTが検出され、特に、メスの血中では、テストステロンの10倍以上の高濃度で11-KTが存在していた。一方、オス血中にはメスよりも有意に高い濃度の11-KTが存在していたが、テストステロンの40分の1程度の量であった。去勢によりオス血中のテストステロン濃度は著しく低下したのに対し、11-KTの低下は緩やかであったことから、11-KTは精巣において産生されているものの主に副腎皮質で産生されていることが示唆された。この仮説を支持するように、副腎にはCYP11BやHSD11B2が高いレベルで発現していた。11-KTは、ブタ・アンドロゲン受容体(AR)を強力に活性化し、血管内皮細胞における一酸化窒素合成酵素の発現を誘導した。以上の結果から、11-KTはブタの主要なアンドロゲンとして副腎で産生され、機能していることが示唆された²⁾。

【参考文献】

- 1) Imamichi Y, Yazawa T. (2016) J Clin Endocrinol Metab, 101,3582-3591.
- 2) Yazawa T, et al. (2021) J Steroid Biochem Mol Biol, 210:105847.

[一般講演]

新規アルツハイマー病バイオマーカー候補タンパク質 Milk fat globule-EGF factor 8 (MFG-E8) のアミロイド性

氏名：○大橋 美帆子¹、濱野 宏美²、小海 康夫¹、相馬 仁²

所属：¹札幌医科大学・医学部・フロンティア医学研究所病態情報学部門

²札幌医科大学・医療人育成センター・教育開発研究部門

【要旨】

アルツハイマー病 (AD) は、進行性の神経変性疾患で、認知症の半数以上を占める。AD のバイオマーカーとしてこれまで $A\beta$ ペプチドや Tau 等が注目されてきた。我々は、マウス初代神経培養モデル細胞を用いて、 $A\beta$ 刺激で神経細胞から分泌される Ca^{2+} 情報伝達に関わる 2 つのタンパク質 (Annexin A5、Milk Fat Globule-EGF factor 8 protein (MFG-E8)) を新規の AD バイオマーカー候補として検討している。Annexin A5 は既に血漿マーカーとしても有用であることを報告した。MFG-E8 は、アポトーシスの過程で細胞膜の表面に現れるホスファチジルセリン (PS) およびマクロファージ (M ϕ) 上のインテグリンに結合する部位を持ち、eat me signal として M ϕ のアポトーシス細胞貪食作用を促進するため、MFG-E8 は神経細胞障害に関わるマーカーとなることが期待される。既に我々は、AD モデルマウス (APP^{swe}/PSEN1^{dE9}) 用いた免疫組織学的解析で、 $A\beta$ プラーク出現早期から、プラークの中心に MFG-E8 が蓄積するという特徴的な像を認めた。

$A\beta$ はオリゴマー構造を経てアミロイドを形成し、プラークに集積する。レビー小体型認知症や他の神経変性疾患においても特有のタンパク質のアミロイド形成が認められ、アミロイド形成環境が共通すると考えられる。

プラーク中の MFG-E8 はアミロイド性を持つことが考えられ、本研究で検討した。アミロイド性を検出する方法として CongoRed のスペクトル変化による分光学的方法 (500nm 付近のピークのレッドシフト) が有用である。 $A\beta_{40}$ を用いた検討で、スペクトル変化がアミロイド形成と一致することは、電顕アミロイド繊維画像から確かめられた。リコンビナント MFG-E8 を調製するために大腸菌を用いると細胞内封入体に取り込まれ、精製に変性過程を必要とする (rMFG-E8_E)。一方、哺乳類培養細胞で発現したリコンビナント MFG-E8 (rMFG-E8_M) は細胞から分泌し、変性過程を経ずに精製可能で、ネーティブに近いと考えられる。rMFG-E8_M に CongoRed を加えて測定したスペクトルは、時間経過と共にピークのレッドシフトが観察された。更に、アミロイド繊維様の電顕画像が観察された。従って、MFG-E8 もアミロイド形成性の性質を持つことが考えられる。また、rMFG-E8_E に CongoRed を加えて測定したスペクトルは最初からレッドシフトしたスペクトルが観察された。rMFG-E8_E 発現後の変性・再生過程でアミロイド化が起こったと考えられる。

これらのことから MFG-E8 はアミロイド性を示すタンパク質であることが示され、その生理活性は現在のところ不明であるが、AD 病態との関連が期待される。

【参考文献】

- 1) Sohma H. International Conference on Biotechnology, biotechnology-biomarkers--systems-biology-2019-annexin-a5-and-mfge8-as-potential-plasma-biomarkers-for-alzheimers-diseas.pdf
- 2) Sohma H, Kokai Y. Plasma biomarkers in Alzheimer's disease. Update on Dementia. Moretti DV Ed. ISBN 978-953-51-2655-3, Print ISBN 978-953-51-2654-6, 556 pages, Publisher: InTech, (2016)

自己免疫疾患関連遺伝子 C8orf13 による病態誘導機構

氏名：○北條慎太郎¹、下山修平^{1,2}、田中勇希¹、渥美達也²、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・分子神経免疫学分野 1

²北海道大学医学院・医学研究院・免疫・代謝内科学教室

【要旨】

自己免疫疾患は、自身の組織や臓器に対する過剰な免疫応答によって引き起こされる慢性炎症性疾患である。我々は以前に、滑膜線維芽細胞などの非免疫細胞において STAT3 と NF- κ B が同時に活性化されることにより、NF- κ B の過剰な活性化が引き起こされ、その結果 IL-6 を含む炎症性サイトカイン、ケモカイン、および成長因子の産生が相乗的に増強される炎症増幅機構「IL-6 アンプ」を発見した。また、全ゲノムを対象にした IL-6 アンプ関連遺伝子の機能的スクリーニングを通して、ヒト疾患関連遺伝子データベースとの照合により、ヒトの様々な炎症性疾患に IL-6 アンプが関与していることを突き止めた。関節に慢性炎症をきたす自己免疫疾患である関節リウマチ (RA) において、機能が既に同定されている疾患感受性アレルの多くは IL-6 アンプに関与しているが、ゲノムワイド関連解析で同定された疾患感受性アレルの中には機能が明らかではない分子が多数存在している。その中でも、RA、全身性強皮症、全身性エリテマトーデスなどの疾患感受性アレルとして同定されている rs13277113 1-塩基多型 1(SNP) は、**T**→**A** 置換によって当該アレル近傍に存在する *C8orf13* の発現量を増加させることが報告されている。しかしながら、病態形成における当該分子の役割は不明であった。本研究では、IL-6 アンプ制御における *C8orf13* の機能解析を中心に、rs13277113 のリスクアレルがヒトの炎症病態に与える影響を調べた。まず、非免疫培養細胞株において *C8orf13* をノックダウンあるいは過剰発現させたところ、サイトカイン刺激依存的な IL-6 アンプ標的遺伝子の発現誘導や IL-6 および NF- κ B のプロモーター活性が、それぞれ有意に抑制あるいは促進された。さらに解析を詳細に進めた結果、(1) *C8orf13* は TNFR1 複合体内で Caspase-8 による RIP の切断と活性化を抑制し、NF- κ B シグナルを亢進させること、(2) サイトカイン誘導性関節炎モデルと皮膚炎モデルにおいて、*C8orf13* が炎症病態の形成に関与していること、(3) rs13277113 のリスクアレルを有する RA 患者の関節滑膜では、IL-6 アンプの活性化が亢進しており、IL-6 やケモカインの発現が増強していることがわかった。すなわち、*C8orf13* は非免疫細胞において IL-6 アンプの活性化を亢進し、自己免疫疾患の病態形成に寄与していることが明らかとなった。 1

【参考文献】

- 1) Murakami M., Harada M., and Kamimura D. et al., Disease-association analysis of an inflammation-related feedback loop. (2013) Cell Rep., 3(3):946-959.
- 2) Arima Y. et al., Regional neural activation defines a gateway for autoreactive T cells to cross the blood-brain barrier. (2012) Cell, 148(3):447-457.
- 3) Ogura H. and Murakami M. et al., Interleukin-17 promotes autoimmunity by triggering a positive-feedback loop via interleukin-6 induction. (2008) Immunity, 29(4):628-636

[一般講演]

ナノマテリアルによる大腸菌二成分制御系を介する感染調節

氏名：○白土明子^{1, 2}, 永長一茂³

所属：¹札幌医科大学・医療人育成センター, ²大学院医学研究科

³弘前大学・地域戦略研究所

【要旨】

ナノマテリアルは皮膚の広い範囲に直接触れる日焼け止めや化粧品などに配合されており、その毒性評価は安全性に重要な要素である。近年、毒性が低いとされる細菌が、皮膚や傷に付着した際に皮膚炎や傷害、強い毒性を与える場合のあることが報告されるようになった。細菌には環境を感知する仕組みがあり、環境中の化学物質や宿主内の物質の認識により、遺伝子発現を変化させて環境変化に適応して生存生育する。皮膚表面には常在細菌を含め多くの細菌が存在しており、ナノマテリアルが細菌の生理状態を変化させることで、皮膚への炎症や傷害の状態に影響を与えている可能性が提唱されているが、直接の作用はまだ十分に調べられてはこなかった。本研究では、ナノマテリアルにより皮膚の常在細菌の遺伝子発現が変化して、細菌の宿主への傷害性に影響が生じると仮説を立て、これを、大腸菌をキイロショウジョウバエに注入する遺伝学感染モデルを用いて調べた。

細菌の遺伝子発現は、膜受容体タンパク質と転写調節タンパク質の組み合わせで構成される、二成分制御系とよばれる情報経路が制御している。まず、ショウジョウバエの腹に大腸菌を注入し、二成分制御系因子の活性レベルを調べたところ、ストレス応答遺伝子群を制御する二成分制御系に活性の高い種類が多かった。続いて、宿主内で活性の高まる二成分制御系について、ショウジョウバエを殺す性質への寄与を調べると、EnvZ と OmpR から成る経路が、体液成分により活性化して、膜タンパク質をコードする遺伝子である *ompC* の発現を促進すること、さらに、*ompC* は大腸菌のショウジョウバエの殺傷能に抑制的に働くことがわかった。そこで、日焼け止め成分として配合されるナノマテリアルについて、大腸菌の増殖を抑制しない濃度条件を用い、共培養時の *ompC* 転写プロモーター活性を調べたところ、ナノマテリアルの一種である ZnO により *ompC* 転写プロモーター活性が抑制されることがわかった。

以上より、宿主の体液成分は大腸菌 EnvZ-OmpR による *ompC* の発現を変化させて宿主傷害作用を抑制し、ナノマテリアル ZnO はこの経路を抑制して、宿主の傷害状態を高めている可能性がある。

ポスター発表要旨

PPM1D による前骨髄球性白血病タンパク質 PML の脱リン酸化を介した細胞老化制御

氏名：○黒須大樹¹、工藤風樹¹、飯倉一哉¹、鎌田瑠泉^{1,2}、坂口和靖^{1,2}

所属：¹北海道大学・大学院総合化学学院・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】

細胞老化は正常な細胞における永久的な増殖の停止であり、胎児の発育や腫瘍の抑制という有益な効果を持つ一方でアテローム性動脈硬化症やパーキンソン病をはじめとする老化関連疾患を引き起こすという有害な効果も持つ。

Ser/Thr ホスファターゼ PPM1D は癌抑制タンパク質 p53 により発現が誘導され、細胞周期や免疫応答、精子形成、代謝など多くの細胞機能に関与する [1]。ヒト PPM1D は 2 つのスプライスバリエントを有しており、605 アミノ酸残基からなる PPM1D605 が全身に発現する一方で、430 アミノ酸残基からなる PPM1D430 は精巣と白血球特異的に発現することが知られている (Fig. 1) [2]。

前骨髄球性白血病タンパク質 PML のスプライスバリエントである PML-IV は、過剰発現により正常線維芽細胞の細胞老化を引き起こすことが報告されている (Fig. 1)。PML body は PML の形成する核内構造体で、SUMO Interactive Motif を有するか、翻訳後修飾である SUMO 化がされたタンパク質をその内部へとリクルートすることができる。細胞老化の詳細な制御メカニズムの解明は、老化関連疾患の新たな治療法の開拓と細胞癌化メカニズムの解明につながることを期待される。

本発表では、PPM1D による PML-IV Ser480/Thr482 の脱リン酸化を介した細胞老化の制御について報告する。まず、HEK293T 細胞に PML-IV と PPM1D605 あるいは PPM1D430 を過剰発現させ、PML body および PPM1D605/430 の局在を解析した。その結果、PPM1D が PML body に強く局在化することを見出した。また、PPM1D430 が PPM1D605 に比べてより強く PML body に局在化するという非常に興味深い現象が観察された。さらに、PPM1D を免疫沈降し、抗 SUMO 抗体を用いて検出した結果、細胞内の PPM1D605/430 が恒常的に SUMO 化を受けていることを明らかにした。また、PPM1D の脱リン酸化モチーフである SQTQ 配列が PML-IV の 480 位から 483 位に見られることから (Fig. 1)、PML-IV の 474 位から 488 位のリン酸化ペプチドを合成して Phosphatase assay を実施した結果、PPM1D が PML-IV の Thr482 を脱リン酸化することを明らかにした。さらにこの残基の変異体を用いた解析から、PML-IV のリン酸化状態が PML body 形成に影響を及ぼすことが示唆された。

以上本研究により、PPM1D が脱リン酸化を介して PML-IV の過剰発現による細胞老化誘導を下方制御していることが示唆された。

【参考文献】

- 1) Kamada R, Kudoh F, Ito S., Tani I., Janairo J. I. B., Omichinski J. G., and Sakaguchi K. (2020) *Pharmacol. Ther.* **215**, 107622.
- 2) Y. Chuman, W. Kurihashi, Y. Mizukami, T. Nashimoto, H. Yagi, and K. Sakaguchi, (2009) *J. Biochem.*, **145**, 1–12

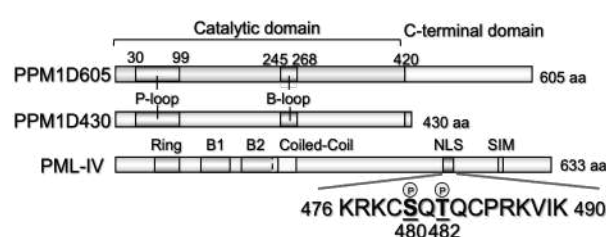


Fig.1 PPM1D および PML-IV のドメイン構造

[ポスター]

リボソームタンパク質の癌原遺伝子産物 PPM1D を介した核小体における機能

氏名：○及川ゆい¹、谷愛海¹、土井星陽¹、鎌田瑠泉^{1,2}、坂口和靖^{1,2}

所属：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】

核小体は、リボソームタンパク質 (RP)、核小体タンパク質、rRNA の液-液相分離によって構成される膜のない構造体であり、リボソーム生合成の場として知られている。RP は、リボソームの合成とタンパク質の翻訳に不可欠な役割を果たすことが知られているが、リボソームとは独立した機能も有することが明らかとなっている。核小体ストレスなどの刺激により、RP がリボソームから遊離し、RP が癌抑制や癌促進、免疫経路に関与することが知られている。しかしながら、核小体ストレス応答における RP の機能制御については未だ報告例が少なく、核小体ストレス応答における RP の役割には不明な点が多い。

Ser/Thr ホスファターゼ PPM1D は、癌抑制タンパク質 p53 依存的に発現が誘導される Ser/Thr ホスファターゼとして同定され、癌原遺伝子産物であることが知られている [1]。当研究室では PPM1D の過剰発現により、核小体タンパク質 Nucleophosmin のリン酸化異常が誘導され、リボソーム生合成の場である核小体数が上昇することを明らかにしている [2]。さらに、PPM1D 相互作用タンパク質として 6 種の Large subunit RP (RPLs) を同定している。

本発表では、6 種 RPLs のうち、uL4 と uL30 について、癌原遺伝子産物 PPM1D を介した核小体における機能について報告する。uL4 および uL30 の機能を解析するため、RPLs のノックダウンを実施した結果、核小体数が顕著に減少することが明らかになった。さらに興味深いことにノックダウン時に uL4 の局在が核小体から細胞質へ変化すること、uL30 のノックダウンにより核が肥大化することを見出した。また、RPLs のノックダウンにより PPM1D の発現量が減少することを明らかとした。PPM1D のノックダウンにより核小体数が減少するが、uL4 および uL30 のノックダウンは PPM1D よりも核小体数減少の効果が大きかった。この結果から、uL4 および uL30 が PPM1D を介してだけでなく、他の経路によっても核小体に関与することが示唆された。さらに、uL4 および uL30 のノックダウンにより G1, G2/M 期細胞周期停止が誘導されたことから、uL4 および uL30 は核小体ストレス応答により細胞癌化抑制に関与することが示唆された。また、RPLs のノックダウン時には p53 のタンパク質量の増加が観察された一方、p53 のリン酸化レベルの増加は見られなかった。以上より uL4 および uL30 は p53 非依存的な核小体ストレス応答に関与していることが示唆された。

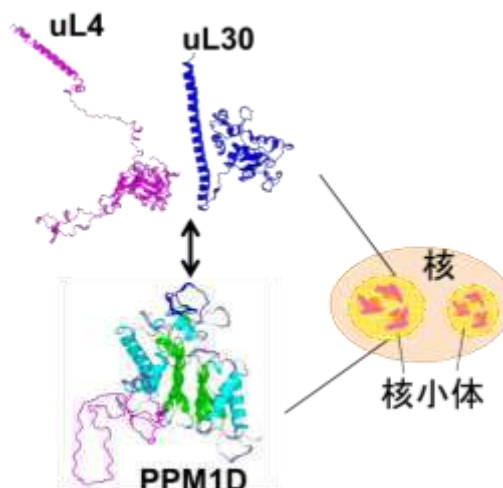


図 1 RP と PPM1D

【参考文献】

- 1) Kamada R., Kudoh F., Ito S., Tani., Janairo J. I. B., Omichinski J. G., and Sakaguchi K. (2020) *Pharmacol. Ther.*, **215**, 107622.
- 2) Kozakai Y., Kamada R., Furuta J., Kiyota Y., Chuman Y., and Sakaguchi K. (2016) *Sci. Rep.*, **6**, 33272.

[ポスター]

破骨細胞の分化および活性制御におけるp53誘導性ホスファターゼPPM1Dの機能解明

氏名: 本下壮太郎¹、牛尾早百合¹、鎌田瑠泉^{1,2}、坂口和靖^{1,2}

所属: 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】

生体内の骨量は破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成の骨リモデリングのバランスにより調節されている。骨リモデリングのバランス破綻は、骨粗鬆症、大理石骨病、骨パジェット病などの様々な骨疾患を引き起こす。これらの骨量異常疾患の新規治療法開発のためにも破骨細胞の分化および骨吸収機能の分子機構解明が強く望まれている。

Ser/ThrホスファターゼPPM1Dは、遺伝毒性ストレス応答におけるp53誘導性ホスファターゼとして同定された[1]。PPM1Dは免疫応答、代謝制御など様々な機能に関与することが知られている[2]。さらに、PPM1D knockoutマウスにおいて大腿骨、尺骨のサイズ減少が報告されていることから、PPM1Dが骨量の調節に関与することが示唆されている。

今回、破骨細胞分化および骨吸収活性におけるPPM1Dの新規機能について報告する。まず、マウスマクロファージ様細胞株RAW264.7細胞を分化誘導因子RANKLにより分化誘導し、PPM1D特異的阻害剤SL-176を用いてPPM1D阻害した結果、形成される破骨細胞の面積がSL-176の濃度依存的に大きく増加することを見出した。また、興味深いことに、SL-176の分化初期の添加では大きな効果を及ぼさないのに対して、分化後期の添加では形成する破骨細胞の面積を増加させた。この結果から、破骨細胞分化過程の時期によりPPM1Dの機能が異なることを明らかにした。

PPM1Dをknockdown後、分化誘導して形成した破骨細胞は、破骨細胞分化中期の阻害と同様に多核化しているものの、正常破骨細胞のように接着していない細胞が増加した。さらに、破骨細胞分化関連遺伝子のmRNA発現量解析により、PPM1Dの阻害によって、破骨細胞マスター転写因子*NFATc1*や破骨細胞融合関連遺伝子*DC-STAMP*、*OC-STAMP*の発現が抑制されることが示された。骨組織分解酵素*MMP9*はSL-176添加による大きな発現変化は見られなかった一方、他の骨組織分解酵素*TRAP*、*Cathepsin K*の発現は抑制された。次に、PPM1Dを阻害した破骨細胞の骨吸収活性をリン酸カルシウムでコーティングされたプレートを用いて解析した。その結果、SL-176添加により破骨細胞がリン酸カルシウムを分解し形成される骨吸収窩の形成に効果を及ぼした。

以上の結果より、PPM1Dが破骨細胞分化および骨吸収活性を正に制御し、破骨細胞の機能を制御していることが示唆された。今後、骨吸収におけるPPM1Dの機能制御機構を解明することで、PPM1Dを標的とする骨量異常疾患の新規治療法への展開が期待される。

【参考文献】

- 1) M. Fiscella, H. Zhang, S. Fan, K. Sakaguchi, S. Shen, W. E. Mercer, G. F. Vande Woude, P. M. O'Connor, and E. Appella. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **94**, 6048–6053.
- 2) R. Kamada, F. Kudoh, S. Ito, I. Tani, J. I. B. Janairo, J. G. Omichinski, and K. Sakaguchi. (2020) *Pharmacol. Ther.*, **215**, 107622.
- 3) S. Ogasawara, Y. Kiyota, Y. Chuman, A. Kowata, F. Yoshimura, K. Tanino, R. Kamada, and K. Sakaguchi. (2015) *Bioorganic Med. Chem.*, **23**, 6246–6249.



Fig. 1 破骨細胞分化および活性制御におけるPPM1Dの機能

[ポスター]

冬眠動物シリアンハムスターの爪の伸びは深冬眠中に減少する

氏名: ○石本太我¹、小住英之²、夏賀健²、山口良文³

所属: ¹北海道大学 獣医学部

²北海道大学 大学院医学研究院 皮膚科学教室

³北海道大学 低温科学研究所 冬眠代謝生理発達分野

【要旨】

爪は各指の遠位端に存在し、爪母に位置する爪幹細胞が分化することで爪甲が形成される。爪は生涯伸び続け、手足の機能をサポートする役割を担う。しかし入院や寝たきりの状態では爪は異常な伸び方をし、歩行や爪の機能に悪影響を与える。一方で冬眠動物は長期間の休眠状態後にもかかわらず冬眠を終えると餌探しや繁殖のために活動を再開する。長期間の休眠後にもかかわらず活動を再開することから冬眠動物の爪には長期間の休眠に対してダメージを受けない仕組みが備わっていると私たちは考えた。しかし冬眠期の冬眠動物の爪の伸びについてはよくわかっていない。はたして冬眠中に冬眠動物の爪は伸びているのだろうか。

冬眠中の動物では、様々な臓器で細胞増殖が抑えられることがリスやハムスターの先行研究から知られている。しかし冬眠期の冬眠動物において幹細胞の動態を同一個体で経時的に評価した報告はない。そこで、冬眠動物の爪の伸びを測定することにより爪母に位置する爪幹細胞の活動を非侵襲性に同一個体で経時的に評価することができるのではないかと私たちは考え、以下の実験を行った。私たちは冬眠動物であるシリアンハムスターの爪を色素で標識することで、冬眠前後での爪の伸びを定量化した。温暖長日の夏環境で飼育した非冬眠期、寒冷短日の冬環境で長期間飼育し冬眠を発動した冬眠期、冬環境で数ヶ月冬眠を繰り返したのち自発的に冬眠を脱した後冬眠期の同一個体において、それぞれ爪の伸びを測定した。その結果、シリアンハムスターの爪の伸びは冬眠期には大きく減少するが、同じ個体の爪の伸びは後冬眠期には回復することが明らかとなった。さらに冬眠期の爪の伸びを、酸素消費量が低下する深冬眠状態と、酸素消費量が回復する中途覚醒状態それぞれで過ごした時間から推定した。その結果、爪の成長は深冬眠状態では停止する一方、中途覚醒時には非冬眠個体と同程度に爪が伸びている可能性が示唆された。

[ポスター]

Identification of RPL15 60S ribosomal protein as a novel topotecan target protein that correlates with DAMP secretion and antitumor immune activation

氏名：○小路 遥¹、山田駿介¹、鍛代悠一¹、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】

Damage-associated molecular patterns (DAMPs) contribute to antitumor immunity during cancer chemotherapy. We previously demonstrated that topotecan (TPT), a topoisomerase I inhibitor, induces DAMP secretion from cancer cells, which activates STING-mediated antitumor immune responses. However, how TPT induces DAMP secretion in cancer cells is yet to be elucidated. Here, we identified RPL15, a 60S ribosomal protein, as a novel TPT target and showed that TPT inhibited pre-ribosomal subunit formation via its binding to RPL15, resulting in the induction of DAMP-mediated antitumor immune activation independent of TOP1. TPT inhibits RPL15–RPL4 interactions and decreases RPL4 stability, which is recovered by CDK12 activity. RPL15 knockdown induced DAMP secretion and increased the CTL population but decreased the Treg population in a B16-F10 murine melanoma model, which sensitized B16-F10 tumors against PD-1 blockade. Our study identified a novel TPT target protein and showed that ribosomal stress is a trigger of DAMP secretion, which contributes to antitumor immunotherapy.

[ポスター]

Molecular basis for ANGPTL2 recognition of LILRB2 immune checkpoint receptor

氏名 : Nabila Abdu¹, Tsuyoshi Kadomatsu², Yuichi Oike², Kimiko Kuroki¹, Katsumi Maenaka¹

所属 : ¹Laboratory of Biomolecular Science, Faculty of Pharmaceutical Science, Hokkaido University.

² Department of Molecular Genetics, Graduate School of Medical Sciences, Kumamoto University.

【要旨】

Despite the extraordinary success of the known immune checkpoints; the programmed cell death 1 (PD1) and the CTLA-4 inhibitors, the treatment acquired resistance is continuously increasing. Leukocyte immunoglobulin-like receptor subtype B2 (LILRB2) and LILRB1 are members of immune checkpoint receptors, with four highly homologous extracellular immunoglobulin (Ig)-like domains and intracellular ITIM (Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif) expressed on the surface of the myeloid cells. These receptors induce immune tolerance against healthy self-cells through the recognition of major histocompatibility complex class 1 (MHC I) molecules and especially have a crucial role in cancer development through the interactions with the human leukocyte antigen-G (HLA-G) expressed by the tumor cells. We've demonstrated the complex structures and the molecular recognition mechanism these ligand-receptor molecular recognition (1,2)

Angiopoietin-like receptor 2 (ANGPTL2), has been recently reported to interact with LILRB2 to inhibit the differentiation of the hematopoietic stem cells, hence leading to a poor prognosis in leukemia. The overexpression of LILRB2 and ANGPTL2 is related to numerous solid tumors. The detailed information on the interaction of ANGPTL2 and LILRB2 is poorly understood and yet to be elaborated on.

In the present study, we found the recombinant protein of the first two Immunoglobulin-like domains of LILRB2 (LILRB2D1D2) showed the specific binding activity to the fibrinogen-like domain of ANGPTL2 (ANGPTL2-FLD) using the surface plasmon resonance. In order to determine the recognition mechanism between these two molecules, we performed the mutation analysis of LILRB2 and found the important residues for ANGPTL2 binding. To understand the structural properties, we are currently working on the crystallization of ANGPTL2-FLD/LILRB2 complex.

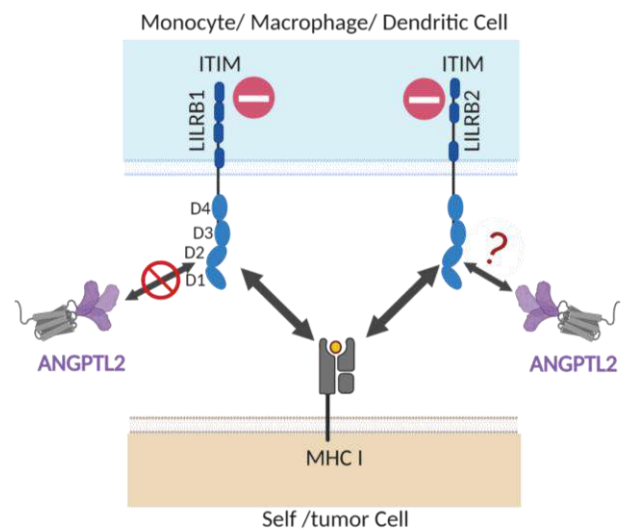


Figure 1: Ligand specificity of LILRBs

【参考文献】

- 1) Shiroishi M., Kuroki K., et al. (2006) PNAS, 103, 16412-16417.
- 2) Kuroki K., Matsubara H., et al. (2019) J. Immunol., 203, 3386-3394.

[ポスター]

膜タンパク質 Alcadin β の発現増加をもたらす化合物の探索

氏名：○茂手木広一、木下祥一、鈴木利治

所属： 北海道大学・大学院薬学研究院・認知症先進予防・解析学

【要旨】

Alcadein β /Alc β (Calsyntenin3/Clstn3) は、主として神経細胞に発現する I 型膜タンパク質 Alcadin のファミリー分子である。Alc β はアミロイド β (A β) 前駆体タンパク質 (APP) の切断酵素 α -secretase および γ -secretase による 2 段階の切断を受け、非凝集性ペプチドである p3-Alc β を産生する[1]。これまでの研究から p3-Alc β は A β が現す神経毒性を抑制する神経保護機能を示すことが明らかにされている。p3-Alc β は加齢に伴い減少することから、認知症の最大疾患であるアルツハイマー病 (AD) の進行を抑制する機能を持つと考えられている[2,3]。

本研究では、この p3-Alc β の産生を増加させることを目的として、前駆体 Alc β の発現を増加させる化合物の探索を行った (図 1)。ヒト Alc β /Clstn3 遺伝子の転写開始点上流 promoter 配列を Firefly Luciferase 遺伝子をもつベクターに組み込みヒト・マウス両方の培養細胞に発現させるレポーターアッセイ系を確立し、プロモーター活性を定量化することで化合物のスクリーニングを行った。Alc β のプロモーター活性を亢進させた化合物を単離し、細胞毒性等を検定後に、内在性 Alc β 遺伝子の発現が増大するのか解析した。

その結果、2 種の化合物が、細胞毒性を示さずに Alc β の転写活性を促進することがウェスタンブロッティング、RT-qPCR を用いた解析によって明らかになった[4]。また、細胞に作用させたところ、p3-Alc β の産生が増加する事が明らかになった、2 種の化合物をシードとした新規アルツハイマー病治療薬の開発が期待できる。

【参考文献】

1. Hata S, et. al. (2009) Alcadin cleavages by APP α - and γ -secretases generate small peptides p3-Alcs indicating Alzheimer disease-related γ -secretase dysfunction. *J. Biol. Chem.* 284, 36024-36033.
2. 特許第 6319912
3. Hata S, et. al. (2019) Decrease in p3-Alc β 37 and p3-Alc β 40, products of Alcadin β generated by γ -secretase cleavages, in aged monkeys and patients with Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement. TRCI* 5, 740-750
4. 特願 2022-035640

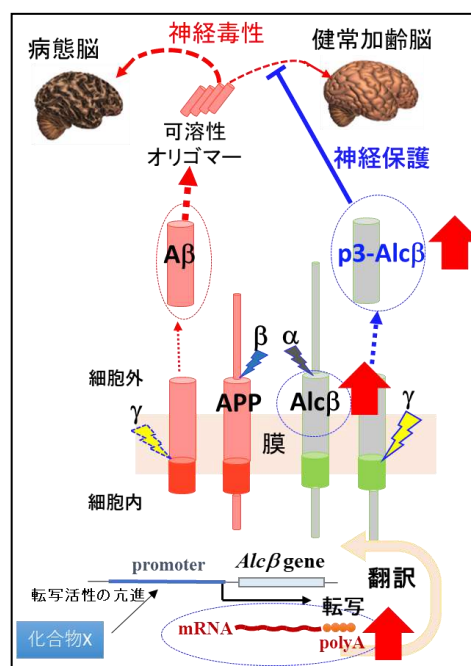


図 1 化合物 X の作用概要

[ポスター]

毛細血管を構成する周皮細胞は骨格筋の維持に寄与する

氏名：○中島恵一¹、竜川貴光²、鹿野耕平³、川辺淳一¹

所属：¹旭川医科大学・医学部・生化学講座

²旭川医科大学・医学部・外科学講座

³旭川医科大学・医学部・内科学講座

【要旨】

背景：骨格筋は本来、再生能が高い組織であるが、高齢化社会においては加齢により再生能が低下し、筋量が低下する病態、サルコペニアが注目されている。毛細血管の重要な構成細胞である周皮細胞（PCs）は、一部に多分化能を認め¹⁻³、骨格筋維持・再生に関与している可能性が示唆されているが、その機序など不明な点が多い。本研究ではPCsの生体内追跡及び特異的欠損マウスを用い、成体の骨格筋維持におけるPCsの役割を検証した。

方法：PCs特異的マーカーであるNG2を発現する細胞を蛍光タンパク質で標識することでPCsの生体内動態を追跡できるNG2CreERT/tdTomatoマウス(PCs追跡マウス)を用いて、tamoxifen(TM)処理後1年間の長期観察を行った。また、NG2CreERT/diphtheria toxin fragment A(DTA)マウス(PCs欠損マウス)を用いて、TM投与によりNG2陽性PCs特異的にDTAを発現させ同細胞のアポトーシスを誘導し、4か月間にわたり観察した。評価は体重および運動機能の変動、下腿筋の組織学的評価、遺伝子発現解析を行った。

結果：PCs追跡マウスでは、TM投与後3日で筋組織内微小血管のPCsが選択的に標識されたが、7日目以降に蛍光陽性のPCs由来筋線維が確認され、次第にその数が増加した。一か月後には腓腹筋内側やヒラメ筋、特にType1, 2aである遅筋線維のほとんどがPCs由来筋線維となった。蛍光陽性の筋線維は1年時点でも概ね維持されていた。筋線維PCs欠損マウスの長期観察モデルではTM投与後、早期では筋重量や筋断面積の低下は認めなかった。しかし、2か月時点から体重増加率及び運動機能の低下傾向を示し、4か月時点の下腿筋組織では下腿筋の中でも主に遅筋で構成されるヒラメ筋の萎縮が進行していた。また、筋線維タイプ別染色において、萎縮したヒラメ筋内に通常認めない速筋線維(Type2b)が出現しており、中間筋(Type2a)の減少を認めた。遺伝子発現において、PCs欠損群ではcontrol群に比べ筋再生マーカーであるMyf5の低下及びMyoD、Myogeninの増加を認め、PCsの遅筋特異的な骨格筋維持機構への関与が示唆された。

結論：微小血管に存在するPCsは、本来の役割である毛細血管の形成・成熟化に加えて、骨格筋、特に姿勢維持・代謝・呼吸など基本的生命活動に関する役割を担う遅筋の筋量維持に関与している可能性が示唆された。

【参考文献】

- 1) Kabara M. et al. (2014) Lab. Invest., 94, 1340-1354.
- 2) Yoshida Y. et al. (2020) Stem Cells Transl. Med., 9, 120-130.
- 3) Kano K. et al. (2020) Stem Cell Res., 47, 101914.

TRIM20 遺伝子変異によるインフラマソーム異常活性化の分子機構の解明

氏名：○中 蘭彬¹、近藤豪¹、渡部昌¹、畠山鎮次¹

所属：¹北海道大学大学院医学研究院 生化学分野 医化学教室

【要旨】

TRIM20 遺伝子は家族性地中海熱 (Familial Mediterranean Fever、以下 FMF) の原因遺伝子として同定され¹⁾、FMF では TRIM20 遺伝子の多様な変異が報告されている²⁾。これらの変異は TRIM20 が関与するインフラマソームの過剰な活性化につながると考えられるが、一部の変異例を除き、そのメカニズムのほとんどは不明である³⁾。そこで本研究では、TRIM20 変異によるインフラマソーム過剰活性化の分子機構について検討した。

TRIM20 に直接作用する因子を探索するために、TRIM20 を安定発現させた HEK293T 細胞を用いて免疫沈降法および質量分析法により解析したところ、結合分子としてタンパク質 N 末端メチオニン切断酵素である Methionine Aminopeptidase 1 (MetAP1) を同定した。TRIM20 遺伝子の変異体 7 種 (ΔPYD、ΔSPRY、S208T、S242R、S208T/S242R、M680I、M694V) を用いて結合部位を検証したところ、SPRY 領域において MetAP1 との結合を認めた。また、mCherry-ASC および FLAG-TRIM20 野生型および変異体を安定発現させた HeLa 細胞を用いて、ASC speck 形成を指標にインフラマソームの活性化を評価した。MetAP1 との結合能を失う変異体 3 種 (ΔSPRY、M680I、M694V) において 1 細胞あたりの ASC speck の有意な増加を認めた(図 1)。さらに TRIM20 野生型発現細胞において siRNA を用いて MetAP1 を発現抑制したところ、1 細胞あたりの ASC speck 形成の有意な増加を認めた(図 2)。

以上の結果から、MetAP1 が TRIM20 インフラマソームの活性化における負の制御因子である可能性が示唆された。今回 MetAP1 と機能的な関係性が示された TRIM20 変異は FMF 症例の多くを占めるため、将来的な創薬標的として期待される。

【参考文献】

- 1) The International FMF Consortium. (1997) Cell, 90, 797-807
- 2) Schnappauf O., Chae J., Daniel L. et al. (2019) Front. Immunol., 10, 1745
- 3) Moghaddas F., Llamas R., Nardo D. et al. (2017) Ann. Rheum Dis., 76(12), 2085-94.

図1. TRIM20変異によるASC speck 形成

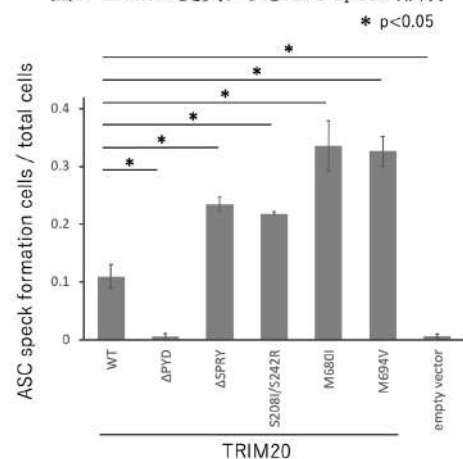
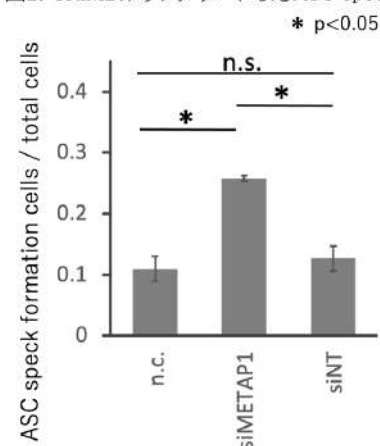


図2. TRIM20ノックダウンによるASC speck 形成



[ポスター]

ユビキチンリガーゼ TRIM27 の機能解析

氏名：○木村将吾¹，渡部昌¹，近藤 豪¹，畠山鎮次¹

所属：¹北海道大学 大学院医学研究院 生化学分野 医化学教室

【背景】TRIM タンパク質ファミリーは細胞内シグナル伝達，発生，自然免疫，発癌などのメカニズムについて多くの機能を有する。TRIM タンパク質ファミリーの1つである TRIM27 はアレルギー，抗ウイルス免疫応答，メラノーマなどの悪性腫瘍形成といったさまざまな病態への関与が報告されてきた¹⁻³。しかし，その分子レベルの発症メカニズムについては不明な点が多く，特に生理的な条件で TRIM27 がどのような機能をもつかについてはほとんど明らかになっていない。

【目的】TRIM27 の機能およびその分子メカニズムを解明する。

【方法】レトロウイルスベクターを用いて FLAG-TRIM27 過剰発現細胞を樹立し，抗 FLAG 抗体を用いた免疫沈降法により TRIM27 結合タンパク質を精製し，質量分析によって同定を行った。得られた結合タンパク質の結合と細胞内での局在をそれぞれウエスタンブロット法と蛍光免疫染色法によって解析した。蛍光免疫染色法は共焦点レーザー顕微鏡を使用して，細胞内および細胞表面における TRIM27 および関連タンパク質の局在を評価した。

【結果】FLAG-TRIM27 過剰発現 HEK293T 細胞を樹立し，抗 FLAG 抗体で免疫沈降後に質量分析を行ったところ BBS (Bardet-Biedl syndrome)1, BBS2, BBS4, BBS5, TTC8 (BBS8), BBS9 を結合分子候補として同定した。FLAG-TRIM27 過剰発現 HEK293T 細胞を用いて，抗 FLAG 抗体による免疫沈降とウエスタンブロット解析を行ったところ，BBS2, BBS4, BBS5, BBS7, BBS8 との特異的な結合を認めた。

また，VIP assay を行い，BBS4 と BBS18 (BBIP10)それぞれについての相互作用を認めた⁴。Bardet-Biedl 症候群は先天奇形（多指症，合指症），網膜色素変性，腎機能障害，肥満，精神発達遅滞，性腺機能低下などの症状をきたす遺伝性疾患である⁵。BBS 遺伝子は BBSome とよばれる複合体を形成し，キネシンによる順行輸送およびダイニンによる逆行性輸送により一次繊毛に沿って移動し，繊毛機能や細胞内・繊毛内の微小管に局在するタンパク質や小胞の輸送やヘッジホッグシグナル伝達経路に関与する。

一次繊毛における TRIM27 と BBSome の関係を明らかにするため，FLAG-Trim27 過剰発現 NIH3T3 細胞および mIMCD-3 細胞を樹立し蛍光免疫染色を行った。TRIM27 は一次繊毛と共局在は認めないものの一部では一次繊毛の近傍に局在しており，基底小体 (Basal body) の指標となる GFP-Nphp3(1-201:G2A) を一過性に発現し観察したところ，TRIM27 は Basal body との共局在を認めた。

また，マウス Trim27 に対する shRNA をコードするレンチウイルスベクターを用いて TRIM27 ノックダウン NIH3T3 細胞および mIMCD-3 細胞を樹立し，蛍光免疫染色にて一次繊毛の伸長作用を認めた。一次繊毛におけるソニックヘッジホッグシグナル伝達経路を評価するため，qPCR を用いて Gli1 および Ptch1 の mRNA 発現量を解析したところ，TRIM27 ノックダウン NIH3T3 細胞では SAG 投与時の Gli1, Ptch1 の低下を認めた。また，蛍光免疫染色にて Smoothened (Smo)の局在変化を解析したところ，TRIM27 ノックダウン NIH3T3 細胞では SAG 投与時に Smo と一次繊毛の共局在比率が低下し，DMSO 投与時では一部の一次繊毛への共局在を認めた。さらに qPCR にて DMSO 投与時に Gli1 の mRNA 上昇がみられた。

【結論】TRIM27 は，BBS4 を介して BBSome と特異的結合することが予想された。また一次繊毛でのソニックヘッジホッグシグナル伝達経路において，Smo の局在変化制御に関与し，Gli1, Ptch1 を上昇させることで発生や腫瘍形成に関与している可能性が示唆された。

【参考文献】

- 1) Srivastava S, Cai X, Li Z, Sun Y, Skolnik EY. Mol Cell Biol 2012; 32:3132-3139.
- 2) Zheng Q, Hou J, Zhou Y, Yang Y, Cao X. J Immunol 2016; 196:1317-1326.
- 3) Xia Y, Zhao J, Yang C. Cancer Med 2020; 9:8989-9005.
- 4) Yohei K, Kentaro N, Kazuhisa N. Bio Protoc. 2018 5; 8(5).
- 5) Elizabeth F, Philip L. Eur J Hum Genet. 2013;21(1):8-13.

[ポスター]

効率的な遺伝子発現制御を可能にする CRISPRi 法の開発

氏名：○大木 のどか¹、近藤 豪¹、畠山 鎮次¹

所属：¹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

【要旨】

CRISPR/Cas9 システムは、標的遺伝子配列を含むガイド RNA（以下 gRNA）によって Cas9 を特定の DNA 配列に誘導し、DNA 二重鎖切断を起こすゲノム編集を可能にした。しかし、本システムは、DNA 二重鎖切断による遺伝子発現の不可逆性や細胞毒性、細胞クローニングの困難性等により、実験デザインによっては使用が難しい場合がある。一方、本システムは DNA 切断酵素を不活性化した Cas9（以下 dCas9）を用いることで、DNA 切断以外の目的にも広く応用されている¹⁾。遺伝子発現をロックダウンする手法として開発された CRISPR interference (CRISPRi)²⁾では、転写開始点 (TSS) 付近に dCas9 を結合することで、RNA ポリメラーゼの働きを物理的に阻害し、標的遺伝子の転写を抑制する。その標的特異性の高さにより、RNA 干渉を利用したロックダウン手法に比べてオフターゲット効果が少なく、gRNA 配列を変更するだけで標的遺伝子の選択が可能であることから、利便性やコスト面などにおいても利点を有する。一方で、抑制効率の低さが課題とされており、これまでに dCas9 に転写抑制活性を持つ Krüppel-associated box (KRAB) ドメインの融合³⁾や抑制因子 MeCP2 の追加⁴⁾、より抑制活性の高い KRAB ドメインの探索や適応⁵⁾等の改良法が報告されている。しかし、これらの改良にもかかわらず遺伝子抑制が不十分なケースがあり、より強力な方法が求められていた。

そこで本研究では、さらなる遺伝子発現抑制効率の強化に向けて、転写制御因子 X を用いた CRISPRi 法の改良を検討した。抑制効率を最適化するため、dCas9 と融合した転写制御因子 X 変異体を 6 種類構築し、gRNA を安定発現させた細胞に導入した。リアルタイム PCR による標的遺伝子発現解析により抑制効率を評価し、最も抑制活性が高かった変異体 dCas9-X-mt3 を選択した。続いて、既存の dCas9-KRAB^{KOX1}-MeCP2⁴⁾および dCas9-KRAB^{ZIM3}⁵⁾と比較したところ、われわれが開発した dCas9-X-mt3 がより強力な遺伝子発現抑制を示すことが確認された。また、同一遺伝子における TSS から離れた部位を標的とした gRNA を用いた比較では、dCas9-X-mt3 による発現抑制効果が急速に失われる一方で、既存法は中程度の発現抑制を維持した。このことから dCas9-X-mt3 は標的遺伝子への特異性が高く、オフターゲット効果が少ないことが予測される。さらに、Tet-on システムを用いた可逆的な遺伝子発現制御を試みたところ、Doxycyclin (Dox) 添加により抑制された標的遺伝子発現が、Dox 除去により回復することが確認された。

以上の結果から、既存法よりも優れた CRISPRi 法を確立できたと言える。これにより、生存や増殖に必須の遺伝子も含めた柔軟な発現制御が可能となり、特定の遺伝子についての *in vitro* 解析はもとより、ゲノムワイドな遺伝子スクリーニングや *in vivo* への応用等への可能性が期待される。

【参考文献】

- 1) Gavin J. Knott and Jennifer A. Doudna, (2018) Science, 361, 866-869.
- 2) Lei S. Qi et al., (2013) Cell, 152, 1173-1183.
- 3) Luke A. Gilbert et al., (2013) Cell, 154, 442-451.
- 4) Nan Cher Yeo et al., (2018) Nat. Methods, 15, 611-616.
- 5) Nader Alerasool et al., (2020) Nat. Methods, 17, 1093-1096.