

2 0 0 5 年度合同シンポジウム

生命現象解明への先端的アプローチ
— 遺伝子から生物個体まで —

要旨集

共催：日本生化学会北海道支部

日本生物物理学会北海道支部

北海道分子生物研究会

日時：12月 2日 (金) 13:00～17:30

場所：北海道大学大学院理学研究科 5号館 大講義室

—プログラム—

場所:北海道大学大学院理学研究科 5号館 大講堂

日時:12月 2日 13時から

13:00~13:05 開会の辞

河野 敬一 (日本生物物理学会北海道支部長、北大院 理学研究科)

13:05~13:45

演者:東野 史裕 (北大院 歯学研究科 口腔病態学講座)

演題:「mRNA の輸送・安定化による細胞のがん化」

座長: 松岡 一郎(北大院 薬学研究科・創成科学共同研究機構)

13:45~14:25

演者:鎌田 このみ・田中 一馬 (北大 遺伝子病制御研究所 疾患制御部門 分子間情報分野)

演題:「細胞における膜リン脂質の非対称性の役割」

座長: 松岡 一郎(北大院 薬学研究科・創成科学共同研究機構)

14:25~15:05

演者:長谷川 靖 (室蘭工業大学工学部 応用科学専攻)

演題:「水産系廃棄物ホタテガイ貝殻に含まれる生物活性 -ホタテガイ貝殻の新たな利用法を
探る」

座長: 津田 栄(産総研(連携院))

15:05~15:25 休憩

15:25~16:05

演者:扇谷 悟 (産業技術総合研究所 ゲノムファクトリー研究部門)

演題:「ゲノム情報を利用した酵母低温誘導発現系の開発」

座長: 出村 誠(北大院 生物科学研究科)

16:05~16:45

演者:今井 亮三 (農業・生物系特定産業技術研究機構 北海道農業研究センター)

演題:「植物の越冬適応の分子生物学」

座長: 星野 保(産総研(連携院))

16:45~17:25

演者:及川 英秋 (北大院 理学研究科 化学専攻)

演題:「生物活性天然物の酵素的合成研究」

座長: 門出 健次(北大院 理学研究科)

17:25~17:30 閉会の辞

津田 栄(産総研(連携院))

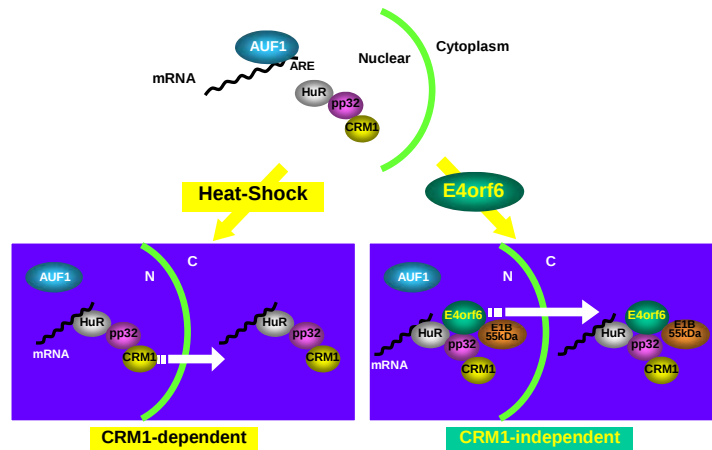
シンポジウム終了後、演者の先生を囲んで懇親会を予定しています。奮ってご参加ください。懇親会の会場は理学研究科5号館 2-01 号室、17:45~19:00(会費:一般 1000 円、学生 500 円)

mRNA の輸送・安定化による細胞のがん化

東野 史裕（北大院 歯学研究科 口腔病態学講座）

ポストゲノム時代を向え RNA やタンパクの解析が急速に進んでいるが、それらの研究とがん研究とが融合しているとは言いがたい。最近ある特定の mRNA にはそれらの運命を左右するようなシグナルが存在することが明らかになった。AU-rich element (ARE) は c-fos、c-myc などの oncogene や IL-3 の様な cytokine など細胞の増殖に関わる遺伝子の mRNA の 3'側に存在する AU-rich な領域で、ARE を持つ mRNA は合成後すぐに分解されるというサイクルを繰り返している。

そしてその分解には ARE がターゲットになっていることがわかっており、ARE に AUF1 などのタンパクが結合して分解が促進されることが見出されている。また逆に細胞に heat shock や血清などの刺激が加わると、ARE には Drosophila の ELAV (embryonic lethal abnormal vision) ファミリーに属するタンパク HuR が pp32 というタンパクと核外輸送タンパク CRM1 を伴って ARE に結合し、ARE-mRNA を細胞質側に輸送し安定化することが知られている。(図参照)。



我々は以前よりアデノウイルスの初期遺伝子産物 E4orf6 の研究を行っている。E4orf6 は宿主細胞やウイルスの mRNA の輸送を制御してウイルスの増殖を調節し、かつ発がん活性も明らかにされたウイルスがん遺伝子産物でもある。我々は E4orf6 のもつ発がん機能を解析する目的で、がん細胞中で E4orf6 に結合するタンパクを質量分析法で解析したところ pp32 が同定された。そこで ARE-mRNA の輸送に対する E4orf6 の効果を調べたところ、E4orf6 は ARE-mRNA を核外輸送することがわかった。しかも E4orf6 は pp32 との結合を介して、本来なら CRM1 依存的に輸送される ARE-mRNA を CRM1 非依存的に、強制的、恒常的に核外輸送することも見出した (図参照 ; Higashino et al., Journal of Cell Biology, 170, 15, 2005)。

その後 E4orf6 の mutant を用いた解析よりこの核外輸送には E4orf6 の細胞がん化に必須の領域 (oncodomain) が必要である事もわかり、このことは E4orf6 が ARE-mRNA を核外輸送し細胞をがん化していることを示している。さらに最近 E4orf6 は ARE-mRNA の安定化にも重要な役割を果たしていることも明らかになったので、本発表ではこれらの研究の経緯について述べたい。

細胞における膜リン脂質の非対称性の役割

鎌田 このみ、田中 一馬（北海道大学遺伝子病制御研究所分子間情報分野）

全ての細胞において、膜の脂質二重層の表裏ではリン脂質の組成が異なることが知られており、膜リン脂質の非対称性と呼ばれている。しかし、その生理的役割や制御メカニズムについては不明な点が多い。これまでに膜リン脂質の非対称性として、細胞形質膜では、phosphatidylethanolamine や phosphatidylserine といったアミノリン脂質が細胞質側の層に、phosphatidylcholine や sphingomyelin は細胞外側の層に多く分布していることがわかっている。このようなリン脂質の非対称性は、リン脂質分子を選択的に二層間転移させるトランスロケースにより維持されていると考えられている。

私たちは、出芽酵母をモデル細胞として研究を行っており、最近、細胞極性を制御する新規膜蛋白質として Cdc50 を同定した。Cdc50 は、相同性の高いタンパク質が広く真核生物に存在する。また、出芽酵母には Cdc50 と相同性の高いタンパク質がさらに2つ（Lem3 と Crf1）存在し、これらを Cdc50 ファミリーと呼んでいる。これら3つのタンパク質は、それぞれ単独の欠損では細胞に大きなダメージを与えないが、3つ全てを欠損した細胞は致死となることから、Cdc50 ファミリーは細胞の普遍的な生命活動において機能するのではないかと期待した。その後の解析から、私たちは Cdc50 がアミノリン脂質トランスロケースと考えられている P-Type ATPase である Drs2 と複合体を形成して機能することを明らかにした。また、Lem3 は別のトランスロケースである Dnf1/2 と、Crf1 は Dnf3 とそれぞれ複合体を形成することも見出し、Cdc50 ファミリーがアミノリン脂質トランスロケースの非触媒サブユニットであることを明らかにした。私たち及び他のグループの解析から、Cdc50-Drs2 複合体は主にエンドソームやゴルジ体膜に局在し、Lem3-Dnf1/2 は細胞形質膜に局在してこれらの膜のリン脂質の二層間転移を制御していると考えられる。しかし、Cdc50 ファミリーそれぞれの単独の欠損では細胞に大きなダメージを与えないことから、トランスロケース複合体はお互いに機能を相補しあっていると考えられる。トランスロケース複合体の、すなわち膜リン脂質の非対称制御の、細胞の生育に必須な機能を探るために、Cdc50 ファミリーの高温感受性変異株を作成して詳細な解析を行った。その結果、Cdc50 ファミリー変異株では、エンドサイトーシスのリサイクリング過程に異常が生じていることが明らかとなった。また、Cdc50-Drs2 複合体は、リサイクリング過程において、Rab family 低分子量 GTPase である Ypt31/32 及びそのエフェクター分子である Rcy1 と関連して機能していることもわかってきた。すなわち、膜リン脂質の非対称性は、Rab GTPase の下流で制御され、膜輸送において重要な役割を果たしていると考えられる。一方、細胞形質膜に主に局在する Lem3 の単独破壊株は、細胞の生育速度は野生型細胞と変わらないが、野生型より長い細胞形態をとる。この形態異常を詳細に解析したところ、Lem3-Dnf1/2 により調節されるリン脂質の動きが、恐らく Rho family 低分子量 GTPase である Cdc42 を介して細胞の極性成長を制御していることが明らかとなってきた。すなわち、膜リン脂質の非対称性が細胞の極性形成にも関与していることが示唆された。

水産系廃棄物ホタテガイ貝殻に含まれる生物活性 –ホタテガイ貝殻の新たな利用法を探る–

長谷川 靖（室蘭工業大学工学部 応用科学専攻）

生物が作り出す鉱物化は、バイオミネラリゼーションと呼ばれ骨、歯、貝殻、真珠、コッコリス（円石藻が作る殻）など多くの生物種において見られる現象である。骨、歯などがリン酸カルシウム結晶で構築されているのに対し、貝殻は炭酸カルシウム結晶で構築される。貝殻の組成は95%以上が炭酸カルシウム、残り数%がタンパク質、糖などの有機化合物、そして微量の金属イオンが含まれている。貝殻に含まれる炭酸カルシウム結晶は2種類の結晶構造（ホタテガイ貝殻などに見られるカルサイト構造、および真珠に代表されるアラゴナイト構造）からなり、種によって異なっている。炭酸カルシウムの結晶構造、そして様々な貝の形は含まれているタンパク質によって制御されているものと考えられている。ここ数年、貝殻に含まれるタンパク質が次々にクローニングされ、炭酸カルシウムの結晶化の制御が報告されてきているが、その詳細は明らかになっていない。

ホタテガイ貝殻は北海道で年間約30万トンが産業廃棄物として産出されており、その処理時におけるコストの増大や埋め立て処分時の悪臭等多くの問題を抱えている。産出された貝殻の一部は、高温で焼成された後、ホルムアルデヒドを消去する壁材、土壌改良剤、脱硫剤、抗菌剤などとして再利用されている。再利用の多くは、炭酸カルシウム、高温での焼成によって生じる酸化カルシウムに着目したものであるが、大部分はなお廃棄処理されているのが現状である。貝殻の粉碎、焼成などの過程はコストが高くつくという面から、安価な炭酸カルシウム原料と差別化できる付加価値の高い再利用が望まれている。

一方、貝殻と同じ機構で生み出される真珠は、装飾物としてのみならず古くから中国において漢方薬として利用されており、大変珍重されてきた。真珠に含まれる数%のコンキオリンと呼ばれるタンパク質画分には、皮膚細胞を活性化する能力があるといわれており、化粧品素材としても利用されている。しかし、細胞に対する作用、作用する成分、作用機構など科学的根拠はほとんど明らかにはなっていない。筆者らは、真珠と同じ機構によって構築されるホタテガイ貝殻を用い、有機成分が有する生理活性作用の探索を行ってきた。本講演では、ホタテガイ貝殻中に含まれる有用な生理活性作用、特に皮膚組織、脂肪組織への効果、そしてその利用可能性について紹介する。

ゲノム情報を利用した酵母低温誘導発現系の開発

扇谷 悟 (産業技術総合研究所 ゲノムファクトリー研究部門)

日本はヒト完全長 cDNA の大規模コレクションを有し、これらを発現させて機能を解析する研究を進めている。しかしながら、既存の蛋白質発現系は、いずれも万能ではないことがわかってきた。例えば大腸菌発現系では、多くのヒト cDNA は不溶性の封入体(inclusion body)を形成するか、あるいは発現しない。ポストゲノム時代になって膨大な数の cDNA が単離されている現在、様々な cDNA を発現させるためには、多様な発現系が必要であるということが、蛋白質研究における共通認識となっている。

出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) は現在ゲノム情報が最も良く整理されている真核生物であり、大腸菌などに比較すると細胞内環境や遺伝子の機能が類似していることから、ヒトなどの cDNA 発現に適していると考えられる。一方、蛋白質発現における温度効果に目を向けると、大腸菌発現系において従来経験的に、低温下(通常 25-30℃)で発現させることにより封入体を回避する手法が用いられてきた。そこで我々は、この低温の利点を生かすために、低温でも増殖可能な酵母を用い、さらに酵母のゲノム情報を利用して、ヒトなどの蛋白質の生産に適した発現系を構築した。

まず我々は低温に対する酵母の遺伝子発現応答を俯瞰するために、10℃低温暴露後の酵母の遺伝子発現変化について、酵母 cDNA マイクロアレイを用いて解析した。経時的かつ網羅的な解析の結果、新たに 250 種以上の低温誘導性遺伝子を同定することができた。さらに、遺伝子発現の経時変化のクラスター解析と MIPS データベースによる遺伝子産物の機能分類により、酵母の低温適応機構を解明した。この低温適応機構の経時的な変化を参考にして、蛋白質発現のための低温誘導性遺伝子のプロモーターを選抜し、低温下で効率的に蛋白質を生産する発現系をデザインした。低温誘導プロモーターの下流にレポーター遺伝子として Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP) cDNA を繋いでモデル発現系を構築したところ、EGFP が低温処理により経時的に生産された。さらに、ベクター、ホスト酵母菌株、低温誘導条件などの検討を行い、新規低温誘導発現系を構築した。本発現系は市販および既存の酵母発現系を凌駕する発現量を与えた。この要因としては、(1)低温によって誘導されるプロモーターを利用しているため、他の多くのプロモーター由来の mRNA が低温で減少するのに対して、目的タンパク質の mRNA は増加するため、結果として相対的含量が増加すること、(2)低温によって翻訳関連システムが誘導され、低温による翻訳機能の低下を抑えていること、(3)低温下での発現により正しい folding のタンパク質が生産されやすいこと、(4)低温によってプロテアーゼなどの分解系が抑制されること、(5) (膜タンパク質では)低温によって細胞膜の脂質組成が変わり、膜タンパク質の安定性が改善されること、などのメカニズムを推定している。

これまでに、従来の大腸菌発現系では不溶化する蛋白質の可溶性発現について成功している他、従来の酵母発現系では極めて少量しか発現しなかった蛋白質の生産量が数倍以上となった例がある。さらに数十例の発現実験を行っている。

また、本低温誘導発現系は、温度変化によって遺伝子発現を誘導するため、誘導のための化学物質の添加を必要としない。通常、酵母を対数増殖期初期から中期まで 30℃で培養し、温度を 10℃あるいは 4℃に低下させて遺伝子発現を誘導させる。我々は、濁度センサーと流路コントローラーを備えたジャーファーメンターを試作し、低温誘導の自動化システムについても開発した。

植物の越冬適応の分子生物学

今井 亮三 （農業・生物系特定産業技術研究機構 北海道農業研究センター）

私達の身の回りの多くの植物は温度と日長によって季節を知る。温度や日長から感じ取られる季節情報は植物にとって発芽や開花のタイミングを決定する重要な要因である。越冬性の植物は晩秋の（プラス温度域の）低温を感じ取り、到来する冬に向けての準備（耐凍性の獲得等）をする。この植物が行う”冬支度”をハードニング（winter/cold hardening）、或いは低温馴化（cold acclimation）という。北海道において栽培される冬（秋まき）コムギの場合、9月に播種したコムギは旺盛に生育し葉を展開していくが、気温の低下と共に生育を抑え、低温馴化のプロセスに入る。組織の水分量も減少させながら、耐凍性は徐々に獲得されていき、11月～12月にかけて最大となる。真冬には気温が -20°C 前後まで下がる場合もあるが、そのような気温変化にも対応できるようになる。多雪地帯においては、12月～3月は雪の下に埋もれることになる。この場合、植物を取りまく環境の温度は 0°C 近くで維持され、凍結は回避されるが、好冷性の植物病原菌の攻撃を受けるようになる。また、長期間暗黒下で光合成が行われない状態に置かれるので、エネルギー消費を抑えるような適応も必要である。低温馴化の過程では、耐凍性の獲得が最も顕著な変化であり、多くの研究がこの観点から進められている。しかし、低温馴化は耐病性の獲得、休眠の誘導、形態変化等多様な変化を伴う複合的な低温環境適応機構と捉えるべきである。本講演では、植物の低温馴化の分子機構に関して私達の研究成果を織り交ぜながら、最新の知見を紹介したい。

生物活性天然物の酵素的合成研究
及川 英秋（北大院 理学研究科 化学専攻）

天然には抗菌性、抗腫瘍性、免疫抑制活性など有用な生物活性を有する複雑な構造の化合物が多種存在するが、90年代以降これら天然物の中でもポリケタイドおよびポリペプチドと呼ばれる化合物群の生合成に関与する酵素遺伝子群が次々と明らかとなった。このうち脂肪酸合成酵素に類似し複数の触媒部位からなる基本単位が連なったポリケタイド合成酵素 (PKS) に関して研究が進み、基本単位を入れ換えた人工酵素を用いて部分構造が異なる化合物が合成できることが判ってきた。これは PKS 各触媒部位の基質特異性が低く、下流にある触媒部位は基質の構造が異なるにも関わらず変換反応を触媒することを意味し、かなり自由に天然物型化合物を合成できることになる。

一方ポリペプチド合成酵素 (NRPS) は PKS と同様な機構で生成物を与えることが知られているものの、これまで応用例は報告されていない。そこで我々は抗腫瘍性物質である echinomycin の生合成酵素を用いて、この問題に取り組んでいる。Echinomycin 生産菌である *Streptomyces lasaliensis* の全 DNA ライブラリーより echinomycin 生合成遺伝子クラスターを持つコスミドを取得した。最近 16 個すべての生合成遺伝子の発現を確認するとともに、大腸菌での echinomycin の生産を確認できたので、その詳細を紹介する。

