



第 61 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

2024 年 7 月 20 日

於 北海道大学獣医学研究院・講堂

第 61 回 日本生化学会北海道支部例会

日時：2024 年（令和 6 年）7 月 20 日（土）9：30～17：00

会場：北海道大学大学院獣医学研究院・講義棟

（17：30 から同会場で懇親会を開催します）

●会場案内

- ・できるだけ公共交通機関を利用してご来場ください。
- ・会場周辺には昼食をとる施設・店舗がありません。恐れ入りますが、昼食は皆様各自でご用意くださいますようお願いいたします。少し離れますが、大学内 2 カ所のコンビニ（下図）は当日利用可能です。



◆参加者の皆様へ

【口頭発表者の皆様】

- ・プレゼンテーションは発表者ご自身の PC をプロジェクターに接続し、操作もご自身で行っていただきます。
- ・発表者は、発表用のファイルを立ち上げた状態で待機し、前の発表終了後速やかにご自身で接続を行ってください。
- ・PC からプロジェクターへの接続は、HDMI、もしくは RGB (D-sub 15 ピン) です。
- ・発表時間はプログラムに記載のとおりです。遅滞生じぬようご配慮ください。

特別講演：講演 30 分、質疑応答 5 分

合同シンポジウム：口演 16 分、質疑応答 4 分

一般講演：口演 12 分、質疑応答 3 分

- ・発表終了時間の 2 分前に 1 回、終了時間に 2 回、質疑応答終了時間に 3 回、それぞれベルでお知らせします。
- ・一般講演では応募者に対して優秀講演賞の審査が行われます。

【ポスター発表の皆様】

- ・ポスター会場は講義棟ホワイエ（ロビー）を予定しております。
- ・ポスターボードのサイズは、縦 180 cm × 横 90 cm です。
- ・個々のポスター演題に番号を付してあります。ポスターは、その番号のポスターボードに掲示してください。当日、受付をお済ませの後、11：00 までに掲示してください。

ポスター発表終了後も掲示、議論等を行っていただけます。ただし、懇親会会場準備の都合上、遅くとも 17：00 には撤収してくださいますようお願いいたします。

- ・ポスターセッションでは実際のポスター発表に先立って、講演会場（講堂）において、パワーポイント 1 ページを使い 1 分間でダイジェストをお話していただきます（フラッシュトーク、11：30～11：50）。

パワーポイント原稿は、前もってメール添付で届けていただきます（発表者の皆さん宛の連絡にてお知らせしております）。

- ・ポスターセッションの時間帯（12：30～13：50）には各自ポスター前で発表／説明を行ってください。特に、奇数番号／偶数番号ごとに指定する時間帯には必ずポスター付近で説明可能なよう対応をお願いします。応募者に対しては優秀ポスター賞の審査を行います。

【若手優秀講演賞・優秀ポスター審査員の皆様】

- ・当日、受付で審査表をお渡しします。
- ・一般講演、ポスター発表、それぞれ全ての応募演題についての審査をお願いいたします。ただし、ご自身の関係する演題は審査対象としないください。
- ・審査表は 14：00 までに受付にご提出願います。

【座長の皆様】

- ・講演時間は上述のとおりです。円滑な進行にご協力くださいますようお願いいたします。

プログラム・タイムテーブル

9:00	開 場
9:30	開 会・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・
	＜第 61 回例会長 稲葉 睦（北大・獣医）＞
9:35～10:20	● 一般講演 1 (口演 12 分、質疑応答 3 分：* は優秀講演賞応募演題)・・・・・・・・
	＜座長：阿部 一啓（北大・理）＞
9:35～9:50	O-1 赤血球膜安定性に関わるスペクトリン膜骨格と脂質二重層-膜骨格間連結との相互作用 宮園 耕介 ¹ 、富張 瑞樹 ¹ 、新敷 信人 ^{1,2} 、大塚 弥生 ¹ 、木崎 皓太 ¹ 、森下 啓太郎 ¹ 、Narla Mohandas ³ 、高桑 雄一 ² 、○稲葉 睦 ¹ 、 ¹ 北大・獣医学研究院・動物分子医学、 ² 東京女子医大・医・生化学、 ³ New York Blood Center, Red Cell Physiology Lab.
9:50～10:05	*O-2 酸性セラミダーゼ ASAH1 による表皮セラミドの恒常性維持 ○信本 和奏 ¹ 、永沼 達郎 ^{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
10:05～10:20	*O-3 新規 Triazapentalene 誘導体の多重染色による Deep Learning を用いた細胞識別 ○黒須 大樹 ¹ 、宇野 早映 ¹ 、Adele Omichinski ² 、山森 葉月 ² 、高見 亮佑 ¹ 、崎谷 愛未 ¹ 、池内 和忠 ³ 、鎌田 瑠泉 ^{1,2} 、谷野 圭持 ³ 、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・大学院理学研究院・化学部門・生物化学研究室、 ³ 北海道大学・大学院理学研究院・化学部門・有機化学第二研究室
10:20～10:30	休 憩・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・
10:30～11:30	● 一般講演 2 (口演 12 分、質疑応答 3 分：* は優秀講演賞応募演題)・・・・・・・・
	＜座長：坂口 和靖（北大・理）＞
10:30～10:45	*O-4 ウミホタルルシフェラーゼとその天然基質の鏡像異性体による発光反応 ○蟹江 秀星 ¹ 、呉 純 ² 、木平 清人 ³ 、安野 理恵 ⁴ 、三谷 恭雄 ² 、近江谷 克裕 ² ¹ 産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門、 ² 産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門、 ³ 宇宙航空研究開発機構・有人宇宙技術部門、 ⁴ 産業技術総合研究所・細胞分子工学研究部門
10:45～11:00	*O-5 授乳期のビタミン A 欠乏が子のベージュ脂肪細胞の出現と血管新生に与える影響 ○加藤 美羅 ¹ 、塚田 杏樹 ¹ 、二川 瑛実 ¹ 、稲波 修 ² 、木村 和弘 ¹ 、岡松 優子 ¹ ¹ 北海道大学・大学院獣医学研究院・生化学教室、 ² 北海道大学・大学院獣医学研究院・放射線学教室

＜座長：岡松 優子（北大・獣医）＞

11:00～11:15 O-6

マウス移植腫瘍における酸化還元状態とグルコース代謝の関連性

○稲波 修¹、加藤 千博¹、赤羽 英夫²、藤井 博匡³、江本 美穂⁴、水野 雄貴⁵、
久下 裕司⁵、永根 大幹⁶、山下 匡⁶、安井 博宣¹

¹北海道大学・大学院獣医学研究院・放射線学教室、²静岡大学・大学院総合科学技術研究科・工学専攻、³北海道医療大学・先端研究推進センター、⁴北海道医療大学・医療技術学部・臨床検査学科、⁵北海道大学アイソトープ総合センター、⁶麻布大学・獣医学部・生化学研究室

11:15～11:30 O-7

健康の生化学の現存在によるメタ存在論的検討

○臼杵 靖剛

北海道大学・先端生命科学研究院・次世代物質生命科学研究センター

11:30～11:50 ● ポスター発表 ＜フラッシュトーク、各演題1分＞・・・・・・・・・・・・・・・・

＜進行：森下 啓太郎（北大・獣医）＞

・ポスター番号順(P-1～P16)に1分間でダイジェストを紹介

11:50 昼食休憩・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・

12:30～13:50 ●ポスター発表（*は優秀ポスター賞応募演題）・・・・・・・・・・・・・・・・

・12:30～ *P-1

奇数番号演題

抗腫瘍免疫活性化を目指した抗HLA-G抗体の結合親和性・特異性解析

○栗城 佑妃¹、森 遥史¹、下柿元 咲瑛¹、引地 和馬¹、赤岩 愛記¹、荒瀬 尚²、古川 敦^{1,3}、前田 直良^{4,5}、黒木 喜美子¹、前仲 勝実^{1,4,6,7,8}

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・免疫学フロンティア研究センター・免疫化学研究室、³金沢大学・医薬保健学域薬学類・衛生化学研究室、⁴北海道大学・薬学部・創薬科学研究教育センター、⁵北海道医療大学・薬学部、⁶北海道大学・人獣共通感染症国際共同研究所、⁷北海道大学・創成研究機構・ワクチン研究開発拠点、⁸九州大学・大学院薬学研究院

*P-2

分泌受容体LILRA3の二量体形成化と新規リガンドHLA-G2分子認識機構の解析

○今井 慎介¹、渡邊 紘士¹、黒木 喜美子¹、前仲 勝実^{1,2,3,4,5}

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北海道大学・薬学部・創薬科学研究教育センター、³北海道大学・人獣共通感染症国際共同研究所、⁴北海道大学・創成研究機構・ワクチン研究開発拠点、⁵九州大学・大学院薬学研究院

*P-3

カイコ由来ピテロジェニンの構造基盤

○沼田 浩輝、喜多 俊介、佐々木 実奈、安楽 佑樹、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

*P-4

Coiled-coilアナログによる大腸菌の定常期における増殖促進効果

○立井 龍太郎¹、上野 康大¹、布川 優奈¹、鎌田 瑠泉^{1,2}、中川 夏美^{1,2}、坂口 和靖^{1,2}

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

P-5

抗腫瘍免疫賦活化を目指した免疫チェックポイント受容体機能阻害候補抗体の解析

○西内 智活¹、古関 亮太¹、赤岩 愛記¹、伊藤 啓²、中村 康司²、黒木 喜美子¹、前仲 勝実^{1,3,4,5,6}

¹北海道大学・薬学部薬科学科・生体分子機能学研究室、²カイオムバイオサイエンス株式会社、³北海道大学・薬学部・創薬科学研究教育センター、⁴北海道大学・人獣共通感染症国際共同研究所、⁵北海道大学・創成研究機構・ワクチン研究開発拠点、⁶九州大学・大学院薬学研究院

***P-6**

骨髄系細胞の分化における Ser/Thr ホスファターゼ PPM1D 阻害の効果

○仲野 聡一郎¹、工藤 風樹¹、塚本 敏生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・生物化学研究室、²北海道大学・大学院理学研究院・化学部門・生物化学研究室

***P-7**

カルモジュリン融合組換えを用いたケモカイン CCL5 の大量発現系の構築

○前田 皓丞¹、柴垣 光希²、石原 誠一郎³、芳賀 永³、相沢 智康^{2,4}

¹北海道大学・理学部生物科学科高分子機能学専修、²北海道大学・大学院生命科学院・蛋白質科学研究室、³北海道大学・大学院先端生命科学研究院・細胞ダイナミクス科学研究室、⁴北海道大学・大学院先端生命科学研究院・蛋白質科学研究室

***P-8**

Molecular insights into phospholipid recognition by P4-ATPase flippase

○銭 宇恒^{1,2,4}、Chai C. Gopalasingam³、Christoph Gerle³、阿部 一啓⁴

¹名古屋大学大学院・創薬科学研究科・構造生理学研究室、²名古屋大学・細胞生理学研究所、³SPRING8、⁴北海道大学大学院・総合化学院・分子生命化学研究室

***P-9**

BECs より産生される GM-CSF は末梢由来 MHC2^{hi} 食細胞の CNS での生存を促進し痛覚依存性の神経炎症の再燃を引き起こす

○李 承峰¹、村上 薫²、松山 詩菜¹、長谷部 理絵^{1,2}、山崎 剛士^{1,2}、田中 勇希^{1,3}、北條 慎太郎^{1,3}、田中 宏樹¹、村上 正晃^{1,2,3}

¹北海道大学 遺伝子病制御研究所・大学院医学院 分子神経免疫学分野、²生理学研究所 分子神経免疫学部門、³QST 量子免疫学チーム

***P-10**

授乳期母マウスの抗生剤摂取が子のベージュ脂肪細胞と腸内環境に与える影響

○塚田 杏樹、加藤 美羅、二川 瑛実、土生 優妃、高橋 菜摘、木村 和弘、岡松 優子
北海道大学・大学院獣医学院・生化学研究室

***P-11**

ウリ科植物の抵抗性を抑制するエフェクタータンパク質と標的因子の相互作用機構の解明

○廣川 量¹、碓井 拓哉¹、小川 スティター²、大木 進野³、高野 義孝²、尾瀬 農之^{1,4}

¹北海道大学大学院・生命科学院・構造生物化学研究室、²京都大学大学院・農学研究科・農学部、³北陸先端科学技術大学院大学・ナノマテリアルテクノロジーセンター、⁴北海道大学・大学院先端生命科学研究院

P-12

Distance Score Analysis による cis 型ペプチド結合の検出の自動化

篠原 浩大¹、岡田 哲二²、○友池 史明¹

¹北海学園大学・工学部・生命工学科、²学習院大学・理学部・生命科学科

*P-13

筋芽細胞における Ninjurin1 の発現制御機構の解析

○藤井 大樹、渡邊 佳孝、大軒 悟、渡辺 裕伍、中島 恵一、矢澤 隆志、川辺 淳一

旭川医科大学・医学部・生化学講座

*P-14

ヒト抗菌ペプチド LL-37 はマウス及びラットのオルソログとは異なる多量体化特性を有する

○柴垣 光希¹、クリスナント ジェレミア オクタビアン¹、テフェラ デサレニ アベジエ¹、月岡 耕太郎¹、上田 和佳¹、加納 康平¹、谷 昊¹、平井 芙実¹、熊木 康裕¹、久米田 博之¹、相沢 智康^{1,2}

¹北海道大学・大学院生命科学院ソフトマター専攻・蛋白質科学研究室、²北海道大学・大学院先端生命科学研究院・蛋白質科学研究室

*P-15

狂犬病ウイルス P タンパク質が、STAT 二量体選択性を伴って免疫系を阻害する機構の解明

○武川 祐一郎¹、飯塚 祐太²、南 未来¹、稲葉 理美^{1,2}、尾瀬 農之^{1,2}

¹北海道大学・大学院生命科学院・構造生物化学研究室、²北海道大学・理学部・構造生物化学研究室

*P-16

Structural analysis of molecular activation mechanism of scramblase Xkr4

○Panpan Zhang¹, Masahiro Maruoka³, and Jun Suzuki^{2,3}, Kazuhiro Abe¹

¹Faculty of Science, Department of Chemistry, Hokkaido University, ²Institute for Integrated Cell-Material Sciences (WPI-iCeMS), Kyoto University, ³Graduate School of Biostudies, Kyoto University,

13:50~14:00 休 憩

14:00~ ● 日本生化学会・日本生物物理学会 北海道支部合同シンポジウム

15:20 (口演 16 分、質疑応答 4 分)

<座長：喜多 俊介（北大・薬）、長谷川 喜弘（札幌医大・医）>

14:00~14:20 S-1

ヘムから鉄を引き抜く色素分解酵素

○内田 毅¹、梅津 彩加²、吉村 遥香²、石森 浩一郎¹

¹北海道大学・大学院理学研究院・化学部門・構造化学研究室、²北海道大学・大学院総合化学院・総合化学専攻：構造化学研究室

14:20~14:40 S-2

核内脂肪滴の生成機序と生理的意義の解明

○和田 亘弘、大崎 雄樹

札幌医科大学・医学部・解剖学第一講座

- 14:40~15:00 **S-3**
 ブタの血清に含まれる α -グルコシダーゼの cDNA クローニングと機能構造解析
 ○田上 貴祥、渡邊 憲、枇杷 千尋、奥山 正幸
 北海道大学・大学院農学研究院・分子酵素学研究室
- 15:00~15:20 **S-4**
 新規輸送体ファミリーSbmA の立体構造と基質取り込み機構の解明
 ○稲葉 (井上) 理美^{1,2}, Dmitry Ghilarov^{3,4}, Konstantinos Beis^{1,2}
¹Department of Life Sciences, Imperial College London, ²Research Complex at Harwell, Rutherford Appleton Laboratory, ³John Innes Centre, ⁴Malopolska Centre of Biotechnology, Jagiellonian University
- 15:20~15:25 休 憩
- 15:25~
 15:40 ● 日本生化学会北海道支部総会
 <議長：高橋 素子 (札医大・医、北海道支部長)>
- 15:40~16:50 ● 特別講演 (講演 30 分、質疑応答 5 分)
 <座長：木原 章雄 (北大・薬)>
- 15:40~16:15 多様な免疫抑制タンパク質 HLA-G の機能制御に向けて
 黒木 喜美子、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
 <座長：坂口 和靖 (北大・理)>
- 16:15~16:50 能動輸送体 P-type ATPase の分子生命化学
 阿部 一啓
 北海道大学・大学院理学研究院・化学部門・分子生命化学研究室
- 16:50~17:00 ● 優秀講演賞・優秀ポスター賞受賞者の発表・表彰
 閉 会
 <第 61 回例会長 稲葉 睦 (北大・獣医)>
- 17:30~19:00 ● 懇親会 (於会議室)

特 別 講 演

要 旨

[特別講演]

多様な免疫抑制タンパク質 HLA-G の機能制御に向けて

氏名：○黒木喜美子¹、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

【要旨】

ヒト白血球抗原 (HLA) -G は胎盤、胸腺、制御性 T 細胞などで発現し、免疫細胞上の抑制性受容体 Leukocyte immunoglobulin-like receptor B (LILRB) を介して免疫抑制を誘導する非古典的 HLA クラス I のひとつである。妊娠時の胎盤では、HLA-G が母体側の免疫反応を抑制することで、胎児は排除されずに無事に出産へと至る。一方、腫瘍細胞の免疫逃避にも寄与していることから、近年、HLA-G と LILRB は抗腫瘍薬開発の標的となっている。

私たちは、HLA-G がスプライシングアイソフォームやホモ二量体形成、構成成分の解離などにより多様な分子形態で存在し、異なる受容体特異性・親和性を獲得することに着目して分子認識機構を明らかにしてきた。主要アイソフォーム HLA-G1 は、受容体を架橋できる分子配向でホモ二量体を形成し、単量体に比べシグナル伝達能がおよそ 100 倍程度強くなった^{1,2)}。また、ホモ二量体としてのみ存在する HLA-G2 アイソフォームは、受容体を架橋することにより強い結合親和性を獲得すると同時に、受容体特異性が HLA-G1 とは異なることを明らかにした³⁾。また、複数の自己免疫疾患モデルマウスにおいて、HLA-G2 は HLA-G1 よりも低用量で症状抑制効果を示した^{4,5)}ことから、バイオ医薬品としての可能性がより期待される。

以上より、私達は多様な HLA-G 分子種と受容体との相互作用を制御することによって、過剰免疫抑制および免疫抑制解除の両方向の制御法確立を目指している。その基盤となる分子機構について紹介したい。

【参考文献】

- 1) Shiroishi M, Kuroki K et al., (2006) J. Bio. Chem., 281(15), 10439-10447.
- 2) Kuroki K et al., (2019) J. Immunol., 203(12), 3386-3394.
- 3) Kuroki K et al., (2017) J. Immunol., 198(9), 3399-3403.
- 4) Takahashi A, Kuroki K et al., (2016) Hum Immunol, 77(9), 754-759.
- 5) Watanabe H, Kuroki K et al., (2020) Hum Immunol, 81(4), 186-190.

[特別講演]

能動輸送体 P-type ATPase の分子生命化学

氏名：○阿部一啓¹

所属：¹北海道大学・大学院理学研究院・化学部門・分子生命化学研究室

【要旨】

生命の根幹の1つと言える細胞膜を隔てた様々な物質の非対称分布は、P-type ATPase family を始めとした能動輸送体によって作り出される。本講演では、ATP を駆動力としてカチオンや脂質を能動輸送する P-type ATPase の中でも、演者がこれまで研究対象としてきた胃プロトンポンプを中心に、その作動メカニズムの解明から創薬へ向けた取り組みについて紹介する。

胃プロトンポンプ H^+, K^+ -ATPase は、ATP の加水分解と共役した H^+/K^+ の対向輸送によって食物消化時の胃内腔は pH 1 もの強酸性環境に保つ。これは消化にとって重要であり、またこの分子が胃酸抑制剤の標的分子となる理由である。これまでに我々は X 線結晶構造解析や Cryo-EM による単粒子解析と機能解析を組み合わせることによって、胃プロトンポンプが pH 1 の溶液に対して H^+ を排出するメカニズム¹⁾、輸送化学量論についての考察^{2,3)}、最近ではプロトンポンプを改変することでナトリウムポンプを創り出すことにも成功し⁴⁾、プロトンポンプとその近縁のカチオンポンプに対するメカニズムの理解を深めてきた。

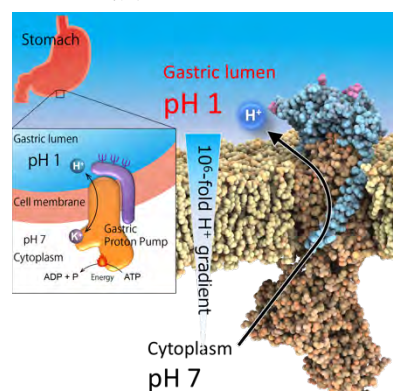


図1 胃プロトンポンプ

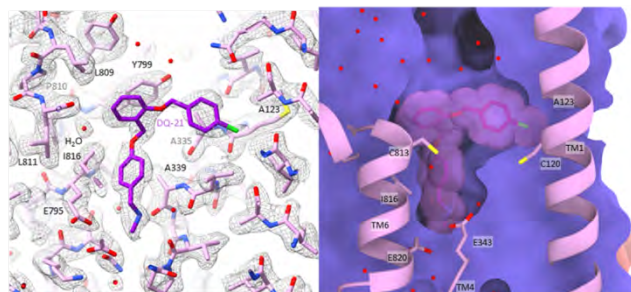


図2 AIによってデザインされた de novo 阻害剤

胃プロトンポンプを標的とした胃酸抑制剤は、胃潰瘍や逆流性食道炎の治療、胃がんの主原因とされるピロリ菌の除菌時の胃酸抑制を目的として用いられる。その世界市場規模は2兆円とも言われ、巨大なマーケットを持つ薬剤である。我が国でも、これまでに複数の薬剤が上市され治療に用いられているが、これらはすべてフェノタイプスクリーニングによって開発されたものであり、その

結合構造は未知であった。我々は胃酸抑制剤の結合構造解析に初めて成功して以来¹⁾、これまで7つの異なる薬剤/阻害剤の結合構造を明らかにしてきた⁵⁾。これら結合構造の情報に基づき、AIを利用することで阻害剤のデザインへと応用した⁶⁾。実際に化学合成した阻害剤の構造解析によって改良を施し、結合親和性の向上に成功した。この枠組みは、プロトンポンプだけではなく、薬剤結合構造既知の多くのタンパク質への応用が期待される。

【参考文献】

- 1) Abe K., et al. (2018) Nature, 556, 214-218.
- 2) Yamamoto et al. (2019) eLife, 8, e47701.
- 3) Abe et al. A. (2021) Nat. Commun., 12, 5709.
- 4) Young et al. (2022) Nat. Commun., 13, 5207.
- 5) Tanaka et al. (2022) J. Med. Chem., 65, 7843.
- 6) Abe et al. (2023) Commun. Biol. 6, 956.

日本生化学会・日本生物物理学会
北海道支部合同シンポジウム
(S-1～S-4)
要 旨

ヘムから鉄を引き抜く色素分解酵素

氏名：○内田 毅¹、梅津 彩加²、吉村 遥香²、石森 浩一郎¹

所属： ¹北海道大学・大学院理学研究院・化学部門・構造化学研究室、

²北海道大学・大学院総合化学院・総合化学専攻：構造化学研究室

【要旨】病原菌を含む細菌は、増殖する際、鉄を必要とする。赤血球中のヘモグロビンからヘムを取り出し、細菌内に取り込み、それをヘム分解酵素がヘムを分解することで、鉄を取り出すことが知られている。代表的な病原菌の一つであるコレラ菌では HutZ というタンパク質が酸化的にヘムを開環し、鉄を分解することを明らかにしてきた¹。今回、コレラ菌に存在し、アントラキノ系色素を分解する色素分解酵素 (*VcDyP*) がヘムを分解せず、酸素非依存的に鉄を取り出す (図1) ことを見出したので、報告する。

VcDyP は大腸菌により発現し、HisTrap カラムとゲル濾過カラムを用いて精製した。精製した *VcDyP* は赤色をしており、色素が含まれていた。蛍光スペクトルと質量分析、液体クロマトグラフィーを用いた解析からこの色素はヘムから鉄が抜けたプロトポルフィリン IX (PPIX) であることがわかった。このことから、大腸菌内で発現した *VcDyP* が菌内のヘムから鉄を引き抜く反応を行なっていることが示唆された。

そこで、この反応を試験管内で再現するため、ヘムと再構成した *VcDyP* を種々の反応条件において、PPIX の生成を観測した。ヘムから PPIX の生成は PPIX 特有の 620 nm 付近の蛍光の増加により判断した。その結果、嫌気条件下で還元剤であるジチオナイトを加えると、624 nm の蛍光強度が増加し、PPIX が生成した (図2)。同じ条件でヘムや代表的なヘム含有タンパク質であるミオグロビンを反応させても、蛍光強度が増加しなかったことから、この反応は *VcDyP* に特有の反応であることが示された。また、アスコルビン酸を還元剤として使用した場合、蛍光はほとんど増加しなかった。これは、アスコルビン酸は系中に微量に混入した酸素を除去できず、鉄抜き反応が阻害されたためと考えられた。

反応に関与するアミノ酸残基を同定するために、ヘムの結合部位周辺に存在するアミノ酸残基の変異体を作成し、反応を観測した。ヘムの配位子である His213、His213 と水素結合を形成する Asp272 を変異すると活性が消失したことから、これらの残基が反応に関与することがわかった。また、反応機構を推測するため、pH 依存性を調べた結果、低い pH では反応の立ち上がりが速いが、すぐに増加しなくなり、阻害が起こっていることが示された。一方、蛍光強度の増加量は中性付近で最も大きい一方、pH 6 以下または pH 10 以上ではほとんど増加しなかった。このことから、ヒスチジンのような側鎖の pK_a が中性付近のアミノ酸残基が反応に関与していることが示唆された。

以上のことから、*VcDyP* が還元反応によりヘムを鉄と PPIX に分解するタンパク質であることがわかった。コレラ菌においては、HutZ も獲得したヘムから鉄を取り出す働きをしているが、HutZ によるヘムの分解反応は酸素を必要とするのに対し、*VcDyP* では酸素が反応を阻害することから、環境の酸素の濃度により、鉄を取り出す酵素を使い分けている可能性が示された。

【参考文献】

1) 内田毅 (2019) 生化学, 91, 404-408.

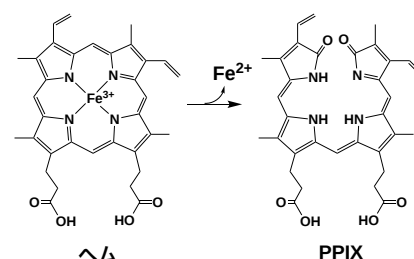


図1 ヘムから鉄イオンの引き抜き反応

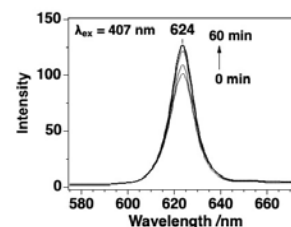


図2 蛍光スペクトルによる PPIX の生成の観測

核内脂肪滴の生成機序と生理的意義の解明

氏名：○和田亘弘、大崎雄樹

所属： 札幌医科大学・医学部・解剖学第一講座

【要旨】

中性脂質をリン脂質一重層と多様なタンパク質が覆う脂肪滴は、通常は小胞体から形成される細胞質オルガネラであり、様々な生理機能や疾患に関与する。脂肪滴は核内にも形成され（１）、これまでに２つの形成機序が判明している。肝由来細胞では小胞体内腔で合成された VLDL 前駆体顆粒が、内核膜陥入構造を通して核内に逆流して形成される（２）。非肝細胞では内核膜に脂質合成酵素群が局在し、内核膜から直接中性脂質合成と脂肪滴形成が行われる（３）。

肝細胞の核内脂肪滴形成において内核膜陥入構造の形成が重要であると考え、我々は現在、小胞体および核膜の形態維持に関与し、遺伝性ジストニア原因遺伝子である Torsin ファミリーに注目している。Torsin ファミリーは AAA-ATPase であり、Torsin 分子は２種類の小ファクターとの結合状態に依存して小胞体膜または内核膜への局在変化を起こすことが報告されている。

ヒト肝癌由来細胞である Huh7 細胞においてそれぞれのファミリー分子の発現抑制を行ったところ、Torsin1B 分子の発現抑制によって内核膜陥入構造、核内脂肪滴が増加することを新たに見出した。現在、肝細胞における VLDL 分泌機構との関連や、核内脂肪滴形成機構において Torsin ファミリーと協調して機能する分子を探索中である。

【参考文献】

- 1) Ohsaki et al., J Cell Biol 212:29-38, 2016
- 2) Soltysik, Ohsaki et al., (2019) Nat Commun., 10, 473.
- 3) Soltysik et al., (2021) J Cell Biol., 220, e202005026.

ブタの血清に含まれる α -グルコシダーゼの cDNA クローニングと機能構造解析

氏名：○田上貴祥、渡邊 憲、枇杷千尋、奥山正幸

所属： 北海道大学・大学院農学研究院・分子酵素学研究室

【要旨】

α -グルコシダーゼ（AGL）は糖質の非還元末端の α -グルコシド結合を加水分解して α -グルコースを遊離する糖質加水分解酵素であり、真正細菌や古細菌から高等生物に至るまで、ほぼ全ての生物種に分布している¹⁾。哺乳動物では基質特異性や局在性の異なる3種のAGLについて良く研究され、それぞれの遺伝子や生理機能が明らかとなっている。一方で、生理機能が未知のAGLも存在している。山本は、様々な哺乳動物の血清中のAGL活性について調査し、ブタの血清には他の哺乳動物の10~2万倍のAGL活性が含まれることを報告している²⁾。しかし当該AGLに関する研究は乏しく、その詳細は明らかとなっていなかった。本研究ではブタ血清AGLの酵素学的な性質を明らかにすることを目的とした。

ブタの血清から硫酸アンモニウム分画および3種のカラムクロマトグラフィーによって電気泳動的に単一な血清AGLを得た。N末端アミノ酸配列解析および分子量測定の結果、本酵素は哺乳動物の小腸刷子縁膜に局在し、2つのAGLドメインが連結した酵素であるマルターゼ-グルコアミラーゼ（MGAM）であると推定された。ブタの肝臓からMGAMのcDNAをクローニングし、*Pichia pastoris* を用いて組換え酵素を生産した。組換えMGAMと血清AGLは同等の酵素学的性質を示し、デンプン分解物であるマルトオリゴ糖に対して高い基質特異性を有していた。至適pHは6.2-6.5、pH安定域はpH3.1-9.9であった。これらの性質は既報のヒト小腸MGAMとも同等の性質であった。以上の結果から、ブタの血清AGLが小腸MGAMと相同なタンパク質であると結論づけた。

MGAMは哺乳動物において血糖を生産する酵素であり、ヒトにおいては食後過血糖抑制薬の標的酵素とされている。MGAMのN末端側AGLドメイン（NtMGAM）とC末端側AGLドメイン（CtMGAM）はそれぞれ結晶構造が明らかとなっていたが、MGAM全長の立体構造は明らかになっておらず、両ドメインによる協同効果などの何らかの相互作用は不明であった。本研究ではBINDSの支援を受けてクライオ電子顕微鏡単粒子解析を実施し、血清AGLと擬似五糖阻害剤との複合体構造を分解能2.77Åで決定した。両ドメインの基質結合部位はどちらも溶媒に露出しており、互いに影響せず独立して機能すると考えられた。血清AGLの熱安定性試験では2段階の熱失活が観察され、NtMGAMとCtMGAMがそれぞれ別個に熱変性していることを支持するものであった。また、本実験に用いた擬似五糖阻害剤は単独のNtMGAMおよびCtMGAMに対して拮抗阻害剤として働くが、両ドメインを有する血清AGLに対しては拮抗阻害の様式を示さなかった。この現象も「血清AGLのNtMGAMとCtMGAMが独立に拮抗阻害を受けると仮定した反応スキーム」で説明できることから、血清AGL（すなわちMGAM全長）においてNtMGAMとCtMGAMは互いに影響せず独立に機能を発現していると結論づけた。本研究成果は、MGAMに対する阻害剤分子の合理的な設計のための基盤となることが期待される。

【参考文献】

- 1) Tagami T. (2024) Biosci. Biotechnol. Biochem., zbae069.
- 2) Yamamoto T. (1978) J. Jap. Soc. Starch Sci., 25, 79-82.

新規輸送体ファミリーSbmA の立体構造と基質取り込み機構の解明

氏名： ○稲葉（井上） 理美^{1,2}, Dmitry Ghilarov^{3,4}, Konstantinos Beis^{1,2}

所属： ¹Department of Life Sciences, Imperial College London,

²Research Complex at Harwell, Rutherford Appleton Laboratory,

³John Innes Centre,

⁴Malopolska Centre of Biotechnology, Jagiellonian University

【要旨】

Bacterial species are under continuous warfare with each other for access to nutrients. Antimicrobial peptides, including microcin B17 and J25, hijack transporters of both the outer and inner membranes in Gram-negative bacteria. Once taken into the cell, they inhibit specific enzyme activities and lead to cell killing. The *Escherichia coli* inner membrane transporter, SbmA, is involved in the uptake of structurally unrelated antimicrobial peptides using proton chemical potentials, while the structure and detailed transport mechanism are still unknown. To establish the molecular mechanism of peptide transport and substrate promiscuity of SbmA, we determined cryo-EM structure of SbmA protein in a lipid bilayer mimetic environment, using proteins reconstituted in nanodiscs at 3.2 Å local resolution. The structure shows an outward-open conformation with a large cavity accommodating diverse substrates. SbmA is a homodimer consisting of eight transmembrane (TM) helices per protomer and composed of two TM0 domains. To prove the mechanism of proton uptakes during peptide transport, we established the pyranine fluorescence assays using the SbmA protein reconstituted in a liposome. The transport can only be initiated in the presence of both a proton gradient and the substrates. Given that the structural feature of SbmA is a previously unknown proton-driven secondary transporter fold, we proposed to define a new class of secondary transporters named SbmA-like peptide transporter (SLiPT transporter). We have also succeeded in capturing an alternative cryo-EM structure of SbmA and have revealed the conformational dynamics that facilitate transport cycles. Based on these results, we will discuss the detail transport mechanisms of the SLiPT transporter family.

【参考文献】

- 1) Ghilarov D*, Inaba-Inoue S*, Stepien P*, Qu F, Michalczyk E, Pakosz Z, Nomura N, Ogasawara S, Walker GC, Rebuffat S, Iwata S, Hedde JG, Beis K. (2021) *Sci Adv*, 7, eabj5363.
- 2) Travin DY, Jouan R, Vigouroux A, Inaba-Inoue S, Lachat J, Haq F, Timchenko T, Sutormin D, Dubiley S, Beis K, Moréra S, Severinov K, Mergaert P. (2023) *mBio*, 14, 1-21.
- 3) Inaba-Inoue S, Ghilarov D, Beis K et al, manuscript in preparation.

一 般 講 演

(O-1～O-7)

要 旨

* 若手優秀講演賞応募演題

赤血球膜安定性に関わるスペクトリン膜骨格と脂質二重層-膜骨格間連結との相互作用

宮園 耕介¹、富張 瑞樹¹、新敷 信人^{1,2}、大塚 弥生¹、木崎 皓太¹、森下 啓太郎¹、Narla Mohandas³、高桑 雄一²、○稲葉 睦¹、

¹北大・獣医学研究院・動物分子医学、²東京女子医大・医・生化学、³New York Blood Center・Red Cell Physiology Lab.

【要旨】

赤血球の変形能と物理的安定はともに膜タンパク質の機能に依存する。前者には脂質二重層を裏打ちするスペクトリン四量体-アクチン膜骨格の形成（横方向連結）とその弾性が重要である。後者は脂質二重層と膜骨格を連結するバンド3-アンキリンスペクトリン間結合（縦方向連結）、ならびにスペクトリン二量体間の結合による安定な四量体形成がその主体である。しかし、これら“横”と“縦”のタンパク質間作用は一般に独立したものと捉えられ、相互関係は明確になっていない。本研究では、以前に報告した牛バンド3欠損症の赤血球病態^{1,2)}を再検討して新たに α -スペクトリン遺伝子(*SPTAI*)多型を見出し、この多型に起因する赤血球膜の物性変化をもとに“縦”方向と“横”方向連結の関係を提唱する。

スペクトリンは $\alpha\beta$ 二量体が分節 $\alpha 0$ と $\beta 17$ (self-association site)とでhead-to-head結合した $(\alpha\beta)_2$ 四量体として存在する。バンド3欠損症原因変異をもたない牛167頭の解析から、*SPTAI*にはまずA、B、ABのアリルがあり、 $\alpha 1$ に位置する91番目のアミノ酸残基はすべてGlu(E)であった。さらに黒毛和種ではB配列をベースにE91がLys(K)に置換したBK91を加え、計4種のアリルが存在した。したがって、 α -スペクトリンの表現型はE91K置換に関してE/E、E/K、あるいはK/Kである。E/K、K/K型赤血球膜のスペクトリン含量はE/E型に比べ10–15%低値であった。E/K、K/K型赤血球は、その変形能はE/E型より高く、一方でズリ応力に対する物理的安定性は著しく低下していた。E91、あるいはK91をもつミニ・スペクトリン二量体($\alpha[0-1]-\beta[16-17]$)の四量体形成の割合はE/Eで87%、E/Kで69%、K/Kでは39%であった。これらの結果は、E91K置換が四量体形成を不安定化させ、膜骨格の物理的安定性を低下させることを示している。

アニオン輸送体阻害剤DIDSはバンド3に結合して $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 交換輸送とともにバンド3-アンキリン間結合を阻害する。赤血球浮遊液をメンブレンフィルター上で加圧すると濾液に膜骨格を含まない小胞が得られる。E/E、E/K赤血球にDIDSを作用させてからこの加圧を行うと、E/E赤血球から得られた小胞のタンパク質構成に変化はなかったが、E/K赤血球由来小胞にはスペクトリン、4.1Rなど膜骨格タンパク質の増加が認められた。これは、バンド3-アンキリンスペクトリン間結合が維持されれば、E91Kによる四量体形成低下はマスクされて一定の膜骨格構造が保たれるが、(E91Kをもつバンド3欠損症のように)それが失われると四量体形成低下の影響が顕在化することを示している。すなわち、バンド3-アンキリンスペクトリン間結合は、膜表面で $\alpha\beta$ 二量体の動きを制限し、head領域同士を近接して存在させることによって四量体形成を促進すると考えられる。

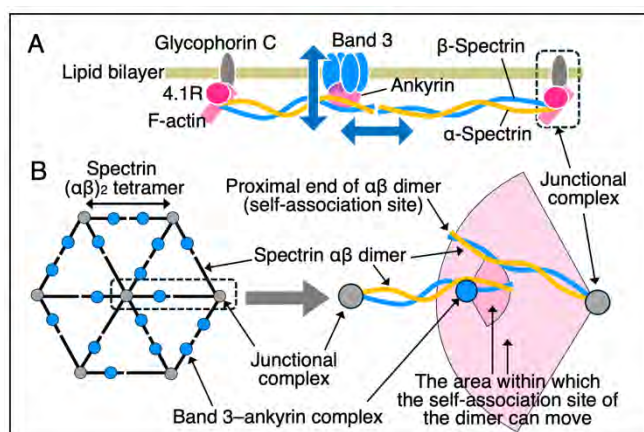


Fig. 1 Schematic illustrations for the horizontal and vertical linkages in red cell membrane organization (A) and a model for the functional role of the vertical link in strengthening spectrin tetramerization (B)

【参考文献】

- 1) Inaba, M., Yawata, A., Koshino, I., et al. (1996) *J. Clin. Invest.* **97**, 1804–1817.
- 2) Ito, D., Koshino, I., Arashiki, N., et al. (2006) *J. Cell Sci.* **119**, 3602–3112.

酸性セラミダーゼ *ASAHI* による表皮セラミドの恒常性維持

氏名：○信本和奏¹、永沼達郎^{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】

表皮の最外層を覆う角質層は、角化したケラチノサイトと、その細胞間を満たす脂質多層構造体（脂質ラメラ）で構成され、体外からの異物の侵入や体内からの水分蒸散を防ぐ透過性バリア機能を担っている。脂質ラメラの主成分であるセラミドは長鎖塩基と脂肪酸がアミド結合した構造をもち、その産生は透過性バリアの形成に不可欠である。一方、セラミドの分解については、表皮でセラミドがどれだけ分解されているかすら明らかになっておらず、その生理的意義は不明である。セラミドは、セラミド分解酵素セラミダーゼによって長鎖塩基と脂肪酸に分解される。ヒトのセラミダーゼには至適 pH の異なる 5 種類のアイソザイムが存在するが、分化後のヒト不死化ケラチノサイトにおいては酸性セラミダーゼ *ASAHI* が主要に発現している。そこで本研究では、表皮における *ASAHI* のセラミド分解と恒常性維持への寄与の解明を目指した。まず、*ASAHI* ノックアウト (KO) ヒト不死化ケラチノサイトを作製し、分化マーカーの発現量を測定したところ、明らかな分化異常は認められなかった。セラミドは水酸基あるいは二重結合の位置・数の異なる多様なセラミドクラスに分類され、さらに炭素鎖長が異なる多様な分子種が存在する。次に分化した *ASAHI* KO ケラチノサイト中の主要なセラミド (12 クラス、合計 156 分子種) を LC-MS/MS により測定した結果、*ASAHI* KO ケラチノサイトにおいて NS (8.8 倍)、NDS (7.9 倍)、NP (4.4 倍)、AS (4.0 倍)、ADS (4.5 倍)、OS (6.7 倍)、ODS (5.2 倍)、OP (6.4 倍)、EOS (4.8 倍) セラミドがコントロール細胞と比較して大きく増加した一方、NH (1.4 倍)、AP (0.73 倍)、AH (1.2 倍) セラミドはほとんど増加していなかった (図 1)。また、*ASAHI* KO ケラチノサイトにおいて増加したセラミドクラスのうち、EOS セラミド以外では、飽和脂肪酸に比べて一価不飽和脂肪酸をもつセラミド分子種がより顕著に増加していた (図 1)。以上の結果から表皮ケラチノサイトでは *ASAHI* により恒常的にセラミドが分解されていること、*ASAHI* は基質とするセラミドクラスや分子種に特異性をもつことが示唆された。

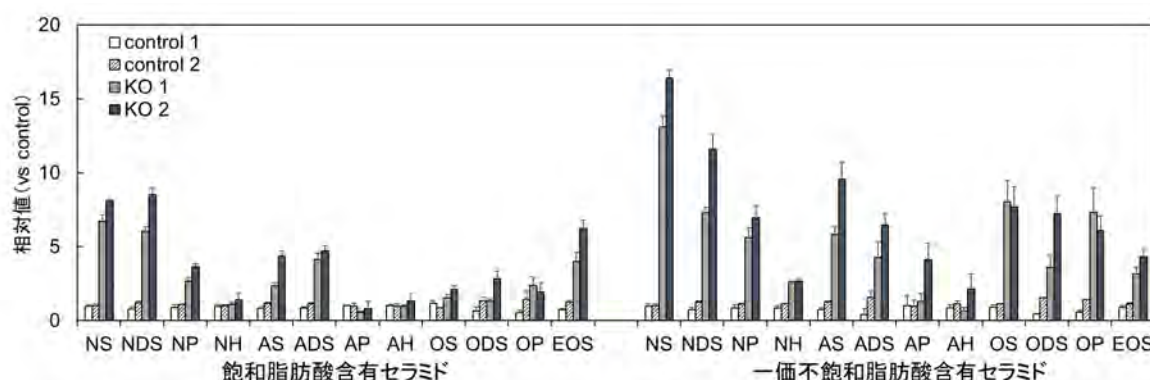


図 1 *ASAHI* KO ケラチノサイトにおけるセラミド量の変化

新規 Triazapentalene 誘導体の多重染色による Deep Learning を用いた細胞識別

氏名：○黒須 大樹¹、宇野 早映¹、Adele Omichinski²、山森 葉月²、高見 亮佑¹、崎谷 愛未¹、池内 和忠³、鎌田 瑠泉^{1,2}、谷野 圭持³、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

³北海道大学・大学院理学研究院・化学部門・有機化学第二研究室

【要旨】

シングルセルレベルでの細胞状態を迅速かつ簡便に識別することは、生命現象の解明において極めて重要である。我々は、低分子量でありながら高い量子収率を有し、置換基により蛍光特性の制御が可能な蛍光分子である 1,3a,6a-triazapentalene (TAP) 誘導体を開発し、細胞の各種オルガネラの形態を可視化できることを報告している [1,2]。深層学習は、従来の機械学習とは全く異なるアルゴリズムを有しており、対象の特徴量を絞ることなく解析が可能である。特に、畳み込みニューラルネットワーク (CNN) により構成された深層学習モデルは、抽象度の異なる多段階の情報抽出機構を有しており、これまで知ることのできなかった個々の細胞の情報抽出への応用が期待されている。しかしながら、シングルセルレベルで解析を行うモデルの構築には高精度なアノテーションが必要であるため、特に細胞の正確な境界の判別が難しい生細胞をターゲットとした深層学習モデルの構築は大きな課題である。

今回、新規 TAP 誘導体を用いた多重染色を、個々の細胞に関する教師データを作成することなく、Deep learning により生細胞の刺激応答を迅速に識別可能な手法について報告する。

まず、アミノブチル基を置換基として持つ新規 TAP 誘導体 ab-TAP-4PH をデザインし合成した。ab-TAP-4PH と、異なる染色パターンを示す TAP-2CY4E を用いて、野生型 p53 を有する細胞と p53 欠損細胞細胞を多重染色した。畳み込みニューラルネットワークで構築した新規モデルを作成し、取得した TAP 誘導体による多重染色画像を学習させた。画像の明るさ、コントラスト、彩度、色相をランダムに変化させるデータ拡張により、細胞以外の領域の学習への寄与を排除し、個々の細胞に注目させた学習を行った。さらに、学習における最適パラメータはベイズ最適化により探索することで、高い精度で多重染色した細胞画像の分類が可能なモデルの構築に成功した(図1)。最後に、高分解能を有するクラスアクティベーションマップ (CAM) を実装し、確立したモデルを介して画像内の個々の細胞の状態の識別および検出を行った。その結果、癌抑制タンパク質 p53 野生型細胞と欠損細胞を極めて高い精度で検出することに成功した。

以上、Deep learning を用いた新規 TAP 誘導体の多重染色画像の解析は、簡便かつ迅速にシングルセルレベルでの細胞識別に応用可能であり、疾患の超早期診断への展開が期待される。

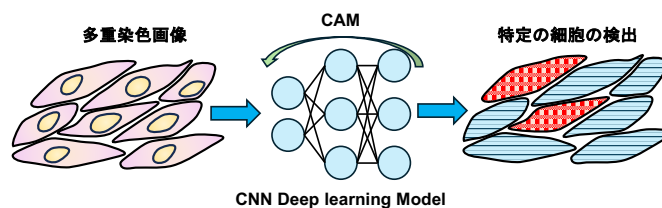


図1 多重染色画像の Deep Learning による解析

【参考文献】

- 1) Namba K., Osawa A., Nakayama A., Mera A., Tano F., Chuman Y., Sakuda E., Taketsugu T., Sakaguchi K., Kitamura N. and Tanino K. (2015), Chem. Sci., 6, 1083-1093.
- 2) Kamada R., Tano F., Kudoh F., Kimura N., Chuman Y., Osawa A., Namba K., Tanino K. and Sakaguchi K. (2016), PLoS One, 11, e0160625.

[一般講演]

ウミホタルルシフェラーゼとその天然基質の鏡像異性体による発光反応

氏名：○蟹江秀星¹、呉純²、木平清人³、安野理恵⁴、三谷恭雄²、近江谷克裕²

所属：¹産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門、

²産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門、

³宇宙航空研究開発機構・有人宇宙技術部門、

⁴産業技術総合研究所・細胞分子工学研究部門

【要旨】

ウミホタルルシフェラーゼ (CypLase) は、日本の沿岸に生息するウミホタルが保有する酵素であり、ウミホタルルシフェリン (CypL) と酸素分子の発光反応を触媒する (図1)¹。基質となるルシフェリンの化学構造に違いはあるものの、ウミホタルとは分類群の異なるホタルなどの生物に由来する天然のルシフェラーゼが触媒する発光反応と比較して、CypLase が触媒する CypL の発光反応は単位時間あたりの発光量に優れるという特徴がある²。しかしながら、未だに CypLase の立体構造は明らかになっておらず、キラリティを有する基質である CypL の認識や触媒機構も十分に理解されていないため、CypLase の応用研究やその利用が進んでいないという現状がある。そこで本研究では、CypLase の基質認識に焦点を当て、「CypLase が CypL のキラリティをどの程度厳密に認識して発光反応を触媒しているのか」という点を明らかにすることを目的とした³。

CypL は不斉炭素原子を1つ有する化学構造であるため、鏡像関係にある (R)-CypL と (S)-CypL の2種類が理論上存在するものの、(S)-CypL のみ天然での存在が報告されている。しかしながら、我々は天然基質でない (R)-CypL を CypLase の基質とした場合でも発光が認められ、その発光スペクトルは (S)-CypL を基質とした場合と有意な差がないことを明らかにした。ただし、最大発光強度については (S)-CypL が基質となる場合の10分の1程度であった。また、(R)-CypL に対する CypLase の K_m 値は (S)-CypL に対する K_m 値の3分の1程度であり、(R)-CypL のほうが (S)-CypL よりもむしろ CypLase との親和性が高いことを示唆する結果が得られた一方で、CypLase とラセミ体の CypL の反応をモニタリングすると (R)-CypL よりも (S)-CypL のほうがより速く消費されることを示す結果を得た。今回得られた結果は CypLase が基質のキラリティをそれほど厳密に認識することなく発光反応を触媒していること、さらに CypLase と基質の親和性の高さが必ずしも発光反応速度の向上とそれに伴う最大発光強度の増強につながるとは限らないことを示唆している。

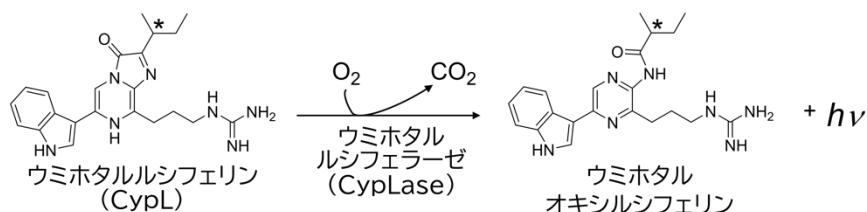


図1. 発光するウミホタル (左) と CypLase が触媒する CypL の発光反応スキーム (右)
図中のアスタリスクは不斉炭素原子を示す。

【参考文献】

- 1) Johnson, F. H., Shimomura, O. (1978) Methods Enzymol., 57, 331-364.
- 2) Shimomura, O., Yampolsky, I. V. (2019) Bioluminescence: Chemical Principles and Methods, 3rd ed.; World Scientific: Hackensack, NJ, USA.
- 3) Kanie, S., Wu, C., Kihira, K., Yasuno, R., Mitani, Y., Ohmiya, Y. (2024) Int. J. Mol. Sci., 25, 2699.

授乳期のビタミン A 欠乏が子のベージュ脂肪細胞の出現と血管新生に与える影響

氏名：○加藤美羅¹、塚田杏樹¹、二川瑛実¹、稲波修²、木村和弘¹、岡松優子¹

所属：¹北海道大学・大学院獣医学研究院・生化学教室

²北海道大学・大学院獣医学研究院・放射線学教室

【要旨】

寒冷などの交感神経性刺激によって白色脂肪組織中に脱共役タンパク質 1 (UCP1)を発現し熱を産生するベージュ脂肪細胞が出現する。マウスの白色脂肪組織では、生後早期にベージュ脂肪細胞が交感神経非依存的に一過性に出現するが¹⁾、詳細な機序は不明である。ビタミン A の活性代謝物であるレチノイン酸は血管新生を促進し UCP1 発現を増加させることが報告されているが^{2,3)}、生後早期のベージュ脂肪細胞の出現との関連は不明である。ビタミン A は胎盤や母乳を介して母から子へ移行することから、母体のビタミン A 欠乏が子のベージュ脂肪細胞の出現に及ぼす影響を解析した。

まず、6週齢の C57BL/6J 雌マウスにビタミン A 欠乏食を与え、2週間ごとにビタミン A 量を高速液体クロマトグラフ法で評価した。その結果、ビタミン A 欠乏食を6週間以上給餌すると肝臓および白色脂肪組織のビタミン A 量が減少した。次に、マウスに交配2週間前から離乳まで通常食またはビタミン A 欠乏食を与えて出産・哺育させ、子マウスのそけい部白色脂肪組織を RTqPCR 法およびウェスタンブロット法により解析した。通常食群において、そけい部白色脂肪組織の UCP1 遺伝子発現は日齢と共に増加し、15日齢にピークに達してその後減少した。また、UCP1 タンパク質発現は遺伝子発現に続いて20日齢にピークに達した。組織学的にも多房性脂肪滴をもつベージュ脂肪細胞が観察された。20日齢のビタミン A 欠乏食群では、肝臓および白色脂肪組織のビタミン A 量が減少し、ベージュ脂肪細胞の出現が有意に抑制された。さらに、乳子期前半(4-12日齢)または後半(12-20日齢)の子マウスにレチノイン酸受容体 (RAR) のアンタゴニストを投与した。いずれの期間の投与でもベージュ脂肪細胞の出現が著しく抑制された。しかし、組織学解析により血管新生を評価した結果、乳子期前半の RAR 阻害では血管新生の抑制されたが、乳子期後半の RAR 阻害では血管新生の抑制を伴わずにベージュ脂肪細胞の出現が抑制された。

授乳期のビタミン A は子のベージュ脂肪細胞の出現に必要であることが明らかになった。また、そこには血管新生に依存しない機序が存在することが示唆された(図1)。

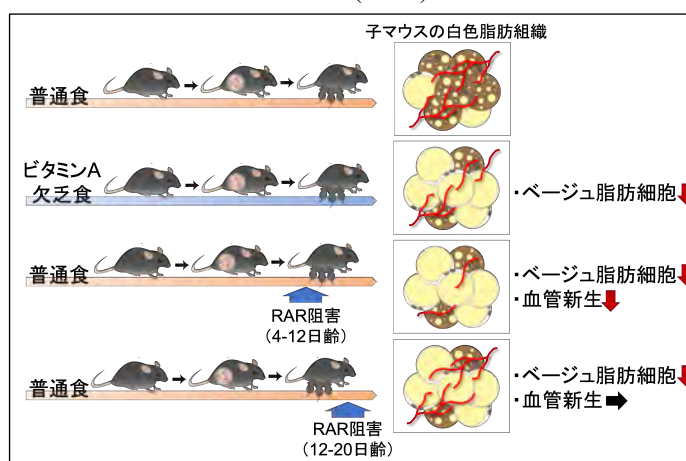


図1. 母体のビタミン A 欠乏や乳子期の RAR 阻害はベージュ脂肪細胞の出現を抑制する

【参考文献】

- 1) Tsukada A, Okamatsu-Ogura Y, Futagawa E, Habu Y, Takahashi N, Kato-Suzuki M, Kato Y, Ishizuka S, Sonoyama K, Kimura K. (2023) iScience. 28;26(7):107239.
- 2) Wang B, Fu X, Liang X, Deavila JM, Wang Z, Zhao L, Tian Q, Zhao J, Gomez NA, Trombetta SC, Zhu MJ, Du M. (2017) Cell Discov., 10;3:17036.
- 3) Seki T, Hosaka K, Lim S, Fischer C, Honek J, Yang Y, Andersson P, Nakamura M, Näslund E, Ylä-Herttuala S, Sun M, Iwamoto H, Li X, Liu Y, Samani NJ, Cao Y. (2016) Nat Commun. 5;7:12152.

マウス移植腫瘍における酸化還元状態とグルコース代謝の関連性

氏名：○稲波 修¹、加藤千博¹、赤羽英夫²、藤井博匡³、江本美穂⁴、水野雄貴⁵、久下裕司⁵、
永根大幹⁶、山下匡⁶、安井博宣¹

所属： ¹北海道大学・大学院獣医学研究院・放射線学教室

²静岡大学・大学院総合科学技術研究科・工学専攻

³北海道医療大学・先端研究推進センター

⁴北海道医療大学・医療技術学部・臨床検査学科

⁵北海道大学アイソトープ総合センター

⁶麻布大学・獣医学部・生化学研究室

【要旨】電子スピン共鳴分光法（Electron Paramagnetic Resonance: EPR）を用いたイメージング（EPR imaging: EPRI）は不対電子を持つプローブの特性により組織中の酸素分圧、pH、レドックス状態などの情報を画像化する技術として実験動物を用いた研究で近年注目を集めている。一般的に市販の EPRI 装置は大型で重く容易に移動

できず、そのため他のイメージング技術との併用による比較・検討が困難であった。そこで共同演者の赤羽らはこの問題を克服するため、小型で分解と組み立てが可能な上に安価な可搬型 EPRI 装置を近年開発した（図 1）¹⁾。本装置を用いて既に藤井らによってアルツハイマーモデルマウスの脳組織の酸化還元状態（レドックス状態）の計測²⁾の報告があるものの、腫瘍組織での評価や他のイメージング技術との比較検討は行われていない。本研究ではヒト結腸がん HCT116 細胞を BALB/c Slc-nu/nu の後肢大腿に移植した腫瘍組織に対して 3-Carbamoyl-PROXYL (3CP) をレドックスプローブとして用いて同一個体における放射線照射前後の腫瘍内レドックス状態の断層像（レドックスマップ）の測定を行うと共に、放射線照射後のレドックスマップと [¹⁸F]FDG によるオートラジオグラフィー（ARG）の比較検討を行った。その結果、本装置を用いて得られた腫瘍のレドックスマップは腫瘍のグルタチオン濃度との相関があること、レドックスマップと ARG の比較では腫瘍の還元力が高い領域は糖代謝が活発であること（図 2）、放射線照射によってこの相関関係が喪失することが明らかとなった。今回開発した可搬型 EPRI 装置は、他の技術とのマルチモーダルイメージング技術と組み合わせることで、より詳細ながん治療応答機構の解明に繋がる可能性が示唆された。

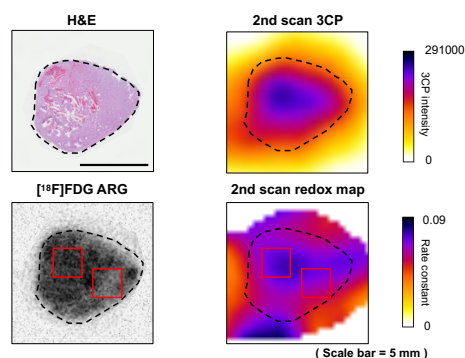
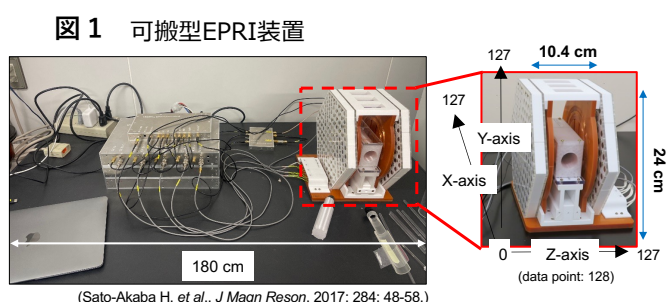


図 2 腫瘍組織の組織像、ARG ならびにレドックスマップの比較

【参考文献】

- 1) Hideo Sato-Akaba, Yuki Okada, Kentaro Tsuji, Miho C. Emoto, Hirotada G. Fujii, *Appl. Magn. Reson.* (2020) 52:1017-1029.
- 2) Miho C Emoto, Hideo Sato-Akaba, Naoya Hamaue, Katsuya Kawanishi, Hisashi Koshino, Shun Shimohama, Hirotada G Fujii, (2021) *Free Radic. Biol. Med.* 172: 9-18.

健康の生化学の現存在によるメタ存在論的検討

氏名：○臼杵靖剛¹

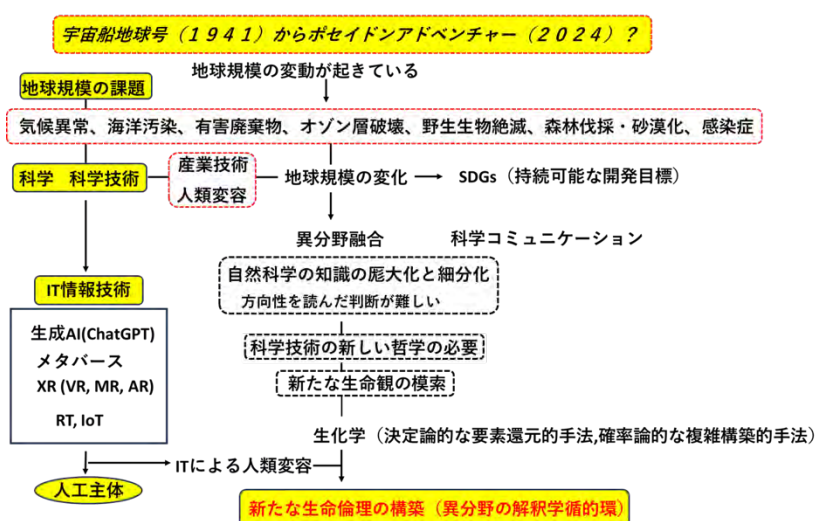
所属：¹北海道大学・先端生命科学研究院・次世代物質生命科学研究センター

【要旨】

我々は自然科学の知識の蓄積に付随して発展する科学技術が齎すビッグデータサイエンスの情報的大海の中で知識の膨大化と細分化により異分野融合、科学コミュニケーション、生命倫理、社会実装、地球環境という課題に直面する時代に生きている。ところが、科学技術が地球環境に影響を与え正負両面を考えなければならない科学技術の可否が問われる不確かさにも直面している（図1）。未来に思いを馳せると、やはり複雑で膨大な知識を要する課題の解決にはIT情報技術であるAI・VRの活用無くしてはあり得ないと思われる。しかしながらAI・VRの活用は人間の意識に直接働きかける技術であるので、我々は慎重であらねばならず自我を見失うことなく活用できる人間としての哲学の立ち位置の再確認が必要となると考えられる。万学の祖と讃えられたアリストテレスの天動説と生命自然発生説のドグマの呪縛の解放から今日の自然科学は誕生した。

アリストテレスの形相と質料の存在論はプラトン主義のイデア論の形而上学へのアンチテーゼであるので生物学は当初から存在論的な形而上学に基づいており、今日でも生命科学一般は存在論的である。そこで、私は生命科学の存在論から上記の困難な課題である生命倫理に旧来のアリストテレス的存在論でなくハイデガーの存在論によって取り組

図1 地球規模の課題からの生化学の生命倫理



むことがAI・VR化時代に適合していると考え。ハイデガーの「存在と時間」¹⁾の現存在（人間の基礎存在論に則り生命倫理へ至るメタ存在論が必要であると考え。そこで、本発表ではメタ存在論としての生化学の存在論への導入契機として健康の生化学に着目した。具体的には2つの現象1) 健康食品・サプリメントと世界内存在の契機である内存在の情態性との関わり、2) 健康寿命・生化学検査と時間性・日常性との関わりを存在論的に検討した記述を試みた。

【参考文献】

- 1) ハイデガー, M. 著、原佑訳・渡邊二郎訳(2012).『存在と時間』第6版 中公クラシック

ポスター発表 (P-1～P-16) 要 旨

* 若手優秀ポスター賞応募演題

抗腫瘍免疫活性化を目指した抗 HLA-G 抗体の結合親和性・特異性解析

氏名：○栗城佑妃¹、森遙史¹、下柿元咲瑛¹、引地和馬¹、赤岩愛記¹、荒瀬尚²、古川敦^{1,3}、前田直良^{4,5}、黒木喜美子¹、前仲勝実^{1,4,6,7,8}

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・免疫学フロンティア研究センター・免疫化学研究室

³金沢大学・医薬保健学域薬学類・衛生化学研究室

⁴北海道大学・薬学部・創薬科学研究教育センター

⁵北海道医療大学・薬学部

⁶北海道大学・人獣共通感染症国際共同研究所

⁷北海道大学・創成研究機構・ワクチン研究開発拠点

⁸九州大学・大学院薬学研究院

【要旨】

Human Leukocyte Antigen (HLA)-G は非古典的ヒト白血球抗原の一つで、一部の腫瘍細胞に発現し、腫瘍の免疫逃避に関与する免疫チェックポイント分子である。HLA-G には複数のスプライシングアイソフォームが存在するが、タンパク質機能が明らかになっているのは HLA-G1 と HLA-G2 である。また、HLA-G を認識する受容体である Leukocyte immunoglobulin-like receptor (LILR)-B1、LILRB2 は骨髄系細胞などの免疫細胞に発現する抑制性の受容体である。私たちは、腫瘍細胞が発現する HLA-G が周囲の免疫細胞上の LILRB を介して腫瘍免疫を逃避する機構に着目し、特に HLA-G2 アイソフォームが受容体との結合親和性が高く、HLA-G1 アイソフォームよりも強い抑制性シグナル伝達能を持つことを明らかにしてきた^{1,2)}。そこで、HLA-G1、HLA-G2 両方に結合し、抑制性受容体との相互作用を阻害可能な抗 HLA-G 抗体の作製、機能評価を進め、がん治療応用可能な新規抗 HLA-G 抗体医薬品の創出を目指してきた。しかし、HLA-G 受容体である LILRB1、LILRB2 はともに HLA クラス I の配列保存性の高い領域に結合し、その結果幅広い HLA クラス I を認識する。そのため、受容体との結合を阻害する抗 HLA-G 抗体は他の HLA クラス I にも結合する可能性が考えられた。

本研究では、昨年度本学会にて報告した LILRB1、LILRB2 との結合を阻害可能な新規抗 HLA-G 抗体について、その結合親和性と結合特異性について調べ、その結合特異性から抗 HLA-G 抗体の結合領域を予測した。今後 HLA-G との分子認識機構を明らかにし、創薬へとつながる基礎データを得る予定である。

【参考文献】

1) Kuroki K et al., (2017) J. Immunol., 198(9), 3399-3403.

2) Takahashi A, Kuroki K et al., (2016) Hum Immunol, 77(9), 754-759.

分泌受容体 LILRA3 の二量体形成化と新規リガンド HLA-G2 分子認識機構の解析

氏名：○今井慎介¹、渡邊紘士¹、黒木喜美子¹、前仲勝実^{1,2,3,4,5}

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北海道大学・薬学部・創薬科学研究教育センター

³北海道大学・人獣共通感染症国際共同研究所

⁴北海道大学・創成研究機構・ワクチン研究開発拠点

⁵九州大学・大学院薬学研究院

【要旨】

Leukocyte immunoglobulin-like receptor A3 (LILRA3) は、主に単球、マクロファージ、樹状細胞などの骨髄系細胞に発現する分泌型受容体である。LILRA3 のリガンドとしては、胎盤や腫瘍細胞で発現し、免疫抑制・自己寛容を誘導する非古典的 human leukocyte antigen (HLA) クラス I 分子の一種、HLA-G1 が知られている。HLA-G1 の受容体としては、免疫細胞上に発現する膜型抑制性受容体 LILRB1 および LILRB2 が存在し、LILRA3 はこれら膜型受容体と競合して HLA-G1 に結合することで、アンタゴニスト活性を示すことが予想されているが、実際の結合競合性や LILRA3 の機能については検討されていない。また、健常者由来単球ライセートにおいて LILRA3 は二量体として主に発現することが報告され、その場合、多価結合による avidity 効果により、HLA-G1 への結合親和性が向上すると予想されるが、LILRA3 組換え蛋白質を HEK293T 細胞で発現させると、主に単量体として得られるため、LILRA3 二量体の機能が明らかになっていなかった。

本研究では、LILRA3 二量体化の機能・構造解析に向けて、哺乳細胞発現系を用いた LILRA3 二量体調製法を確立した。また、HLA-G1 のドメイン欠損型アイソフォーム HLA-G2 と LILRA3 との結合実験を実施し、HLA-G1 に加え、HLA-G2 にも結合活性を有すること、既存の受容体と結合競合性を有することを明らかにした。現在、調製した LILRA3 二量体を用いて、HLA-G1、HLA-G2 との結合親和性が LILRA3 単量体と比べて期待通り増強するかについて表面プラズモン共鳴法を用いた解析を実施している。今後、LILRA3 単量体、二量体を用いた構造解析やシグナル解析を実施し、LILRA3 の生体内機能を明らかにする予定である。

[ポスター]

カイコ由来ビテロジェニンの構造基盤

氏名：○沼田浩輝、喜多俊介、佐々木実奈、安楽佑樹、前仲勝実

所属： 北海道大学・大学院薬学研究院・生体分子機能学研究室

【要旨】

ビテロジェニンとは卵黄タンパク質の前駆物質であり、卵生動物全般にみられる主要な脂質-タンパク複合体である。ビテロジェニンは大型脂質輸送タンパク質スーパーファミリーに属しており、主に脂質の輸送に深く関わっている。昆虫ではビテロジェニンは一般に成熟期の雌の個体に多く存在し、脂肪体で分泌され、血中を介して脂質を卵巣に輸送、蓄積され、卵の形成に必要な栄養を供給することが知られている1)。昆虫のビテロジェニンは、脂質やタンパク質の輸送を行なうだけではなく、真菌や細菌に対する生体防御に関与している多機能タンパク質であるが、構造と機能の関係については明らかになっていない2)。本発表では、カイコ蛹からビテロジェニンを精製し、クライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析に成功し、分解能 2.05 Å で構造決定したので報告する。

精製したカイコのビテロジェニンは重鎖(約 150 kDa)と軽鎖(約 40 kDa)から構成されており、ホモ二量体(重鎖 x2、軽鎖 x2)を形成していた。ビテロジェニンは他の大型脂質輸送タンパク質スーパーファミリーと比較して配列に関して相同性はあまり確認されなかったが、上流側の立体構造はとても類似していた。ビテロジェニンは内部が疎水性の中空構造をしており、内部には脂質と思われる密度が観察された。ビテロジェニンの二量体形成は、プロトマー同士で中空構造を塞ぐように結合しており、糖鎖の一部も利用して隙間を埋めていることが明らかとなった。以上の得られた構造から脂質を運搬できる機構について議論する。

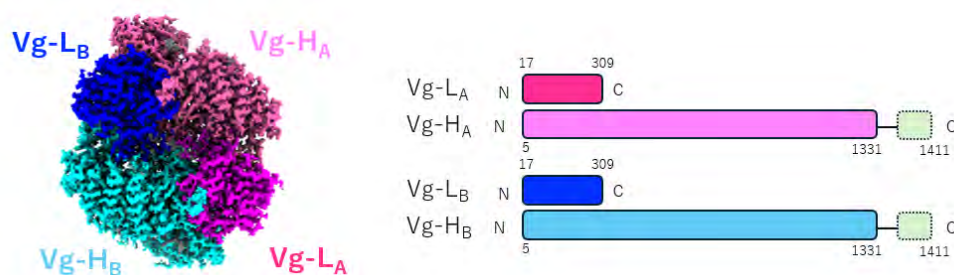


図 1 構造解析の結果 (左：モデル構造 右：各サブユニットの説明)

【参考文献】

- 1) Dalibor KODRÍK, Radmila ČAPKOVÁ FRYDRYCHOVÁ, Daniela HLÁVKOVÁ, Oxana SKOKOVÁ HABUŠTOVÁ, and Helena ŠTĚRBOVÁ (2023) *Physiol Res.* 72 475-487
- 2) Nitin Kumar Singh, Britto Cathrin Pakkianathan, Manish Kumar, Tulika Prasad, Mani Kannan, Simone König, and Muthukalingan Krishnan (2013) *PLOS ONE*.

Coiled-coilアナログによる大腸菌の定常期における増殖促進効果

氏名：○立井龍太郎¹、上野康大¹、布川優奈¹、鎌田瑠泉^{1,2}、中川夏美^{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】

大腸菌は分子生物学の最も重要なモデル生物であり、クローニング、タンパク質の発現・精製を含む生化学的研究に頻繁に用いられている。また工業的にも生分解性プラスチックの合成・分解などに利用されている。そのため、大腸菌の増殖を理解し制御することは非常に重要である。大腸菌の増殖過程は、誘導期、対数増殖期、定常期、死滅期からなる。これら4つの過程のうち、定常期では大腸菌の増殖と死滅が平衡状態になっており、見かけの菌体量が増減することなく一定になっている。Coiled-coil (CC) は、その配列と高次構造の研究が進んでおり、緻密なナノ構造を形成するための分子ツールとして幅広く使用されている。当研究室においても、D-LヘテロキラルCCヘテロダイマー形成 [1]、CCによる多量体化を介したバイオミネラリゼーション制御に関する研究を実施しており [2]、非常に興味深い結果を報告している。

今回、CCペプチドによる大腸菌の定常期における増殖促進効果について報告する。

本研究において、酵母由来のCCペプチドのMonomer(CC(Mono))、Dimer(CC(Di))、Trimer(CC(Tri))を用いた (Table 1)。これらCCペプチドを大腸菌に対し添加した結果、濃度依存的に大腸菌の定常期における増殖が促進された。興味深いことに、CC(Mono)は、CC(Di)およびCC(Tri)よりも高い活性を示すことが明らかとなった。さらに、コロニー形成アッセイによる大腸菌の生存菌体数の定量を行い、CC(Mono)を添加すると顕著に生存菌体数が増加していることが示された。CC(Mono)のCDスペクトルを25%TFE存在下において測定した結果、buffer中のスペクトルと比較して α -helix含量が顕著に増加することが示された。以上の結果より、CC(Mono)が大腸菌膜との相互作用によりコンフォメーション変化を引き起こすことが示唆された。CCペプチドを大腸菌へ添加してから36時間後の培地をSDS-PAGEにより解析した。CC(Tri)は培地に残存していた一方、CC(Di)は顕著に培地に残存する量が減少した。CC(Mono)は培地からほぼ消失し、添加した条件の培地において特異的なバンドを見出した。CC(Mono)添加条件下の対数増殖期にある大腸菌の形態を観察した結果、サイズの小さい大腸菌が多く観察された。

本研究により定常期における大腸菌の増殖促進メカニズムが解明され、大腸菌増殖の制御が可能となり、医薬品や工業製品の大量生産技術の展開が期待される。

Table 1 各 Coiled-coil ペプチドの配列

Peptides	Sequence
CC(Mono)	H-R MKQAEDK VEEALSK NYHAENE VARAKKL VGER-NH ₂
CC(Di)	H-R MKQLEDK VEELLSK NYHLENE VARLKKL VGER-NH ₂
CC(Tri)	H-A MKQLEDK VEELLSK NYHLENR VARLEKL VGER-NH ₂

【参考文献】

- 1) T. Sakaguchi, N. Nakagawa, K. Mine, J. I. B. Janairo, R. Kamada, J. G. Omichinski, and K. Sakaguchi. (2023) Biomimetics, 8, 606.
- 2) R. Kamada, N. Nakagawa, T. Oyama, and K. Sakaguchi. (2017) J. Pept. Sci., 23, 644-649.

抗腫瘍免疫賦活化を目指した免疫チェックポイント受容体機能阻害候補抗体の解析

氏名：○西内智活¹、古関亮太¹、赤岩愛記¹、伊藤啓²、中村康司²、黒木喜美子¹、前仲勝実^{1,3,4,5,6}

所属：¹北海道大学・薬学部薬科学科・生体分子機能学研究室、

²カイオムバイオサイエンス株式会社

³北海道大学・薬学部・創薬科学研究教育センター

⁴北海道大学・人獣共通感染症国際共同研究所

⁵北海道大学・創成研究機構・ワクチン研究開発拠点

⁶九州大学・大学院薬学研究院

【要旨】

LILRB2 (Leukocyte Immunoglobulin-like Receptor B2) は、ミエロイド系抗原提示細胞（単球、マクロファージ、樹状細胞）に発現し、ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif) を介して抑制シグナルを伝達する免疫抑制性受容体である。リガンドとして HLA (Human leukocyte antigen) クラス I を広く認識し、自己細胞に対する自己寛容を誘導する。一方で、腫瘍細胞が発現する HLA-G の免疫逃避・自己寛容獲得に寄与する免疫チェックポイント受容体のひとつとして知られている。

私たちは、 $\alpha 2$ ドメイン欠損型アイソフォーム HLA-G2 が、主要アイソフォーム HLA-G1 と比較して LILRB2 に高い親和性を示すこと¹⁾、ヒト末梢血単球細胞や単球由来樹状細胞において、LILRB2 を介して腫瘍関連免疫抑制性分子の発現増強を誘導することを明らかにした。そのため、HLA-G2 との結合を阻害することにより、抗腫瘍免疫賦活化を誘導可能な抗 LILRB2 抗体開発を目指した。精製 LILRB2 組換え蛋白質を抗原として抗 LILRB2 抗体ライブラリーを作製し、表面プラズモン共鳴法を用いた分子間相互作用解析、ヒト末梢血単球細胞を用いた LILRB2 を介するシグナル解析により、LILRB2 機能阻害抗体候補を選別した。さらに、抗体と LILRB2 の分子認識機構を明らかにするために、抗体断片と LILRB2 の複合体構造解析を進めており、さらなる抗体の最適化、高機能化を目指した情報を収集する予定である。

【参考文献】

- 1) Kuroki K et al., (2017) J. Immunol., 198(9), 3399-3403.

骨髓系細胞の分化における Ser/Thr ホスファターゼ PPM1D 阻害の効果

氏名：○仲野聡一郎¹、工藤風樹¹、塚本敏生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 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】

血液細胞は、造血幹細胞の細胞増殖および細胞分化により造られ、これら造血メカニズムの異常は様々な血液関連疾患を引き起こす[1]。急性骨髄性白血病（AML）は骨髓系前駆細胞における分化異常により生じ、重篤な免疫不全を引き起こすことから5年生存率は約25%と生存率が極めて低い疾患である。このため、血球分化の分子機構の解明および、血液関連疾患に対する新たな治療法の開発が強く求められている。Ser/Thr ホスファターゼ PPM1D は遺伝ストレス応答において p53 依存的に発現誘導される脱リン酸化酵素として同定され、免疫応答や細胞分化など様々な細胞内機能を制御することが知られている（図1）[2]。本研究は、骨髓系細胞である好中球および赤血球の分化における PPM1D ホスファターゼの機能を解明することを目的とする。

まず、AML における PPM1D の機能を明らかにするため、AML 患者の抹消血単核球である PBMC を用いたトランスクリプトーム公開データの再解析を実施した。その結果、FAB 分類 M0~M5 の AML 患者は健常者と比較し、PPM1D の発現量が有意に増加していることが明らかとなった。次に、好中球分化モデルとして HL-60 および赤血球分化モデルとして K562 の2種の白血病細胞株を選択した。HL-60 細胞を All-trans retinoic acid により分化誘導した結果、PPM1D の発現量が上昇することが示された。さらに、当研究室が開発した強力な PPM1D 阻害剤 SL-176 [3]を用いて PPM1D を阻害し、細胞分化に及ぼす効果を解析した。その結果、好中球分化において、SL-176 による PPM1D 阻害が、好中球分化を促進することを見出した。分化した好中球は、貪食能の低下および T 細胞の細胞増殖抑制能を示し、好中球分化における PPM1D 阻害が機能の異なる好中球サブセットへの分化を誘導することが明らかとなった。一方、赤血球分化における PPM1D 阻害は、ヘモグロビンタンパク質の発現量を増加させた。興味深いことに、ヘモグロビンの mRNA 発現量には影響を及ぼさず、タンパク質量制御に関与していることが明らかとなった。以上のことから、PPM1D が骨髓系細胞における、細胞分化および機能制御に関与していることが示唆された。

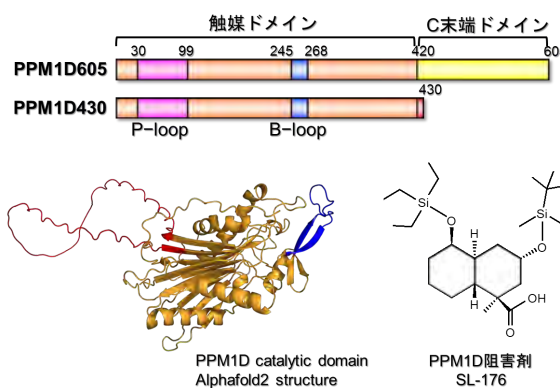


図1 Ser/Thr ホスファターゼ PPM1D と特異的阻害剤

【参考文献】

- 1) Seita J. and Weissman I. L. (2010) J. Thromb. Haemost., 2, 640–653.
- 2) Kamada R., Kudoh F., Ito S., Tani I., Janairo J. I. B., Omichinski J. G., and Sakaguchi K. (2020) Pharmacol. Ther., 215, 107622.
- 3) Kamada R., Kudoh F., Yoshimura F., Tanino K. and Sakaguchi K. (2017) J. Biochem., 162, 303-308.

カルモジュリン融合組換えを用いたケモカイン CCL5 の大量発現系の構築

氏名：○前田皓丞¹、柴垣光希²、石原誠一郎³、芳賀永³、相沢智康^{2,4}

所属：¹北海道大学・理学部生物科学科高分子機能学専修

²北海道大学・大学院生命科学院・蛋白質科学研究室

³北海道大学・大学院先端生命科学研究院・細胞ダイナミクス科学研究室

⁴北海道大学・大学院先端生命科学研究院・蛋白質科学研究室

【要旨】

ケモカイン CCL5 (RANTES) は主に T 細胞で産生され、G 蛋白質共役受容体および細胞表面に発現したグリコサミノグリカンと相互作用することにより、炎症による刺激に応答して免疫細胞を動員する機能を持つ¹⁾。乳がんや膵臓がんをはじめとするがん細胞においても、その増殖や細胞の動員といった複数の機能を持ち、転移にも関与することが報告されている²⁾。しかし、がんにおける CCL5 の機能は未知の点も多く、さらにその機能を明らかにすることで新たな治療戦略を提案することができる可能性がある。現在まで CCL5 の構造解析、および機能解析のため、大腸菌の組換え発現による研究例が報告されている。しかし CCL5 は不溶性の凝集体を形成しやすく、可溶性の CCL5 を効率良く得ることは困難である。この問題の改善のための、MBP との融合蛋白質発現系でも、沈殿形成を完全に防ぐことは困難なことが報告されている³⁾。

本研究においては CCL5 のさらなる可溶性と生産性の向上を目的とし、融合パートナー蛋白質としてカルモジュリンを用いた発現系⁴⁾の検討を行った。まず CCL5 の N 末端側にカルモジュリンおよび酵素エンテロキナーゼ切断配列の遺伝子を挿入した pET ベクターを構築し、大腸菌 BL21(DE3)を形質転換した(図 1)。次に発現誘導後、集菌した菌体を再懸濁し、超音波破碎した後遠心し、上清と沈殿を分画した。その結果、全 CCL5 のうち、90%が可溶性画分に存在し、可溶性の向上に成功した。また、アフィニティークロマトグラフィー、酵素エンテロキナーゼによる切断、および逆相クロマトグラフィーを行い、CCL5 の精製に成功した。さらに、NMR 法により、正しい立体構造の形成を確認することができた。

今後、本研究で構築した CCL5 の大量発現系を利用し、G 蛋白質共役型受容体やグリコサミノグリカンとの相互作用解析を進める予定である。

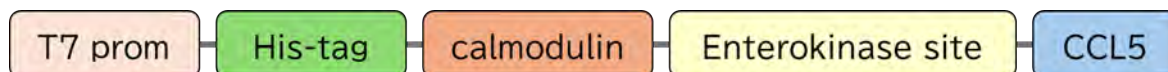


図 1. 本研究で構築した発現系の概要

【参考文献】

- 1) Miller MC., and Mayo KH. (2017) Int J Mol Sci., 18, 2088.
- 2) Aldinucci D., Borghese C., and Casagrande N. (2020) Cancers (Basel)., 12, 1765.
- 3) Cho HJ., Lee Y., Chang RS., Hahm MS., Kim MK., Kim YB., and Oh YK. (2008) Protein Expr Purif., 60, 37-45.
- 4) Ishida H., Nguyen L. T., Gopal R., Aizawa T., and Vogel H. J. (2016) J. Am. Chem. Soc., 138, 11318–11326.

Molecular insights into phospholipid recognition by P4-ATPase flippase

氏名：○錢 宇恒^{1 2 4}、Chai C. Gopalasingam³、Christoph Gerle³、阿部 一啓⁴

所属：¹名古屋大学大学院・創薬科学研究科・構造生理学研究室

²名古屋大学・細胞生理学研究センター

³SPRING8

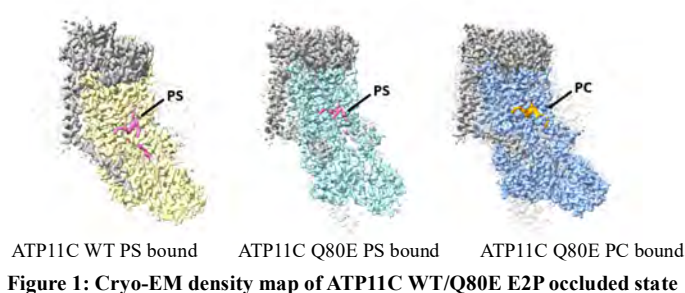
⁴北海道大学大学院・総合化学院・分子生命化学研究室

【要旨】

Biological cell membranes including plasma membrane (PM) is mainly composed of phospholipids. As a characteristic feature of the living cells, these phospholipids are distributed asymmetrically. This asymmetry is maintained by flippase (P4-ATPase), floppase and scramblase, and is critical for regulating multiple important cellular events including apoptosis.

As members of the mammalian P4-ATPases, ATP11A and ATP11C specifically translocate PS and PE in the plasma membrane, but do not for PC and SM. Previous structural and functional analysis of ATP11C revealed that proper interactions between phospholipid head group and its binding site located in the transmembrane (TM) region is crucial for phospholipids recognition [1]. Recently it has been reported that a mutant of ATP11A (Q84E), which is identified in a patient with developmental delays and neurological deterioration, caused phosphatidylcholine (PC) flipping. This aberrant flip results in increasing sphingomyelin in the exoplasmic leaflet in PM, changing cell characteristics including cell growth, cholesterol homeostasis, and sensitivity to sphingomyelinase [2]. However, why/how PC is recognized and translocated in this disease mutant is elusive.

In this presentation, we attempt to clarify the molecular mechanisms underlie altered transport substrate in the equivalent mutant in ATP11C, which also shows PC translocation activity *in vitro*, employing cryo-EM single-particle analysis. So far three cryo-EM structures (WT with PS, and Q80E with PS or PC) have been determined. We will discuss the distinct binding mode of substrate phospholipids, which might be a key to understand how flippases recognize and translocate their specific substrates in general.



【参考文献】

- [1] Nakanishi H, Irie K, Segawa K, et al. Crystal structure of a human plasma membrane phospholipid flippase. *Journal of Biological Chemistry*, 2020, 295(30): 10180-10194.
- [2] Segawa K, Kikuchi A, Noji T, et al. A sublethal ATP11A mutation associated with neurological deterioration causes aberrant phosphatidylcholine flipping in plasma membranes. *The Journal of Clinical Investigation*, 2021, 131(18), e148005.

[ポスター]

BECs より産生される GM-CSF は末梢由来 MHC2^{hi} 食細胞の CNS での生存を促進し痛覚依存性の神経炎症の再燃を引き起こす

氏名：○李承峰¹、村上薫²、松山詩菜¹、長谷部理絵^{1,2}、山崎剛士^{1,2}、田中勇希^{1,3}、
北條慎太郎^{1,3}、田中宏樹¹、村上正晃^{1,2,3}

所属：¹北海道大学 遺伝子病制御研究所・大学院医学院 分子神経免疫学分野

²生理学研究所分子神経免疫学部門

³QST 量子免疫学チーム

【要旨】我々は重力や痛み、ストレスなどの環境刺激などにより特定の感覚-交感神経回路が活性化し、ノルアドレナリンが局所的に放出され、特異的部位の血管内皮細胞 (BECs) に NF- κ B 過剰活性化機構である IL-6 アンブが誘導されてケモカイン産生が生じ、中枢神経系 (CNS) への血液中免疫細胞の侵入口 (ゲートウェイ) ができるゲートウェイ反射 (G 反射) を発見した (図 1)¹⁻⁶。この時、血中に存在する自己反応性 T 細胞が組織抗原と反応し、当該部位の血管透過性が上り組織特異的炎症病態が形成される。G 反射は多発性硬化症 (MS) モデルやぶどう膜炎モデル、関節リウマチにて証明されており、炎症性疾患の発症や再燃に作用する。

2015 年に我々は、MS のマウスモデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) の移入 EAE モデル (tEAE) を用いて、第 5 腰髄 (L5) に血中から集積する CD11b⁺MHC class II⁺細胞 (末梢由来 MHC II^{hi} 食細胞) が、寛解時にも CNS に長期間生存し、痛覚刺激依存性の G 反射を介して L5 腹側血管周囲に集積し、その部位から中枢炎症の再燃をもたらすことを発見した²。

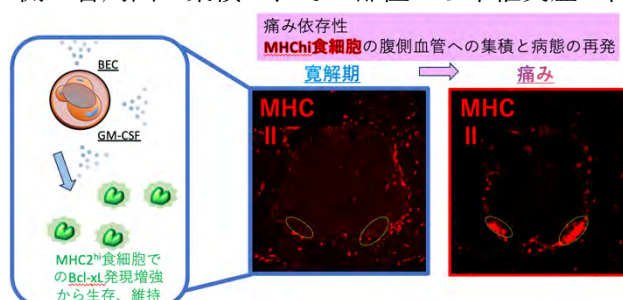


図 2: MHC II^{hi}食細胞の生存メカニズム

再燃も抑制された。これらの結果により、GM-CSF は末梢由来 MHC II^{hi} 食細胞の生存因子であることが判明した。また、CNS における GM-CSF の供給源は、BECs であり、MHC II^{hi} 食細胞が L5 において高い割合で BECs と共局在していた。以上結果より、BECs より産生される GM-CSF は CNS において末梢由来 MHC II^{hi} 食細胞の生存を促進し、痛覚刺激による tEAE 再燃に重要であった (図 2)⁷。本研究結果より、CNS での GM-CSF 抑制は MS のような再燃を伴う炎症性中枢神経系疾患における新規治療標的として活用できる可能性が示唆された。

【参考文献】

- 1) Arima Y et al., (2012) Cell., 148 (3), 447-457.
- 2) Arima Y., (2015) eLife., 4, e08733.
- 3) Arima Y et al., (2017) eLife., 6, e25517.
- 4) Murakami M et al., (2019) Immunity., 50 (4), 812-831
- 5) Hasebe R et al., (2022) J Exp Med., 219 (6), e20212019
- 6) Stofkova A et al., (2019) Sci rep., 9 (1), 2353
- 7) Matsuyama S et al., (2023) J Immunol., 211 (1), 34-42

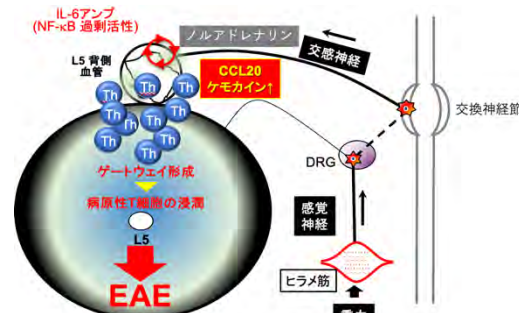


図 1: 重力によるゲートウェイ反射

本研究では、MS の再燃をもたらす末梢血から CNS に残存する末梢由来 MHC II^{hi} 食細胞が寛解期においてどのように長期生存し再燃に関与するかを検証した。これらの細胞にて表面抗原解析を実施した結果 GM-CSF 受容体を高発現し、さらに CNS に GM-CSF を投与するとこれらの細胞が増加し、Bcl-xL を高発現していた。一方で抗 GM-CSF 抗体投与では MHC II^{hi} 食細胞数が減少し、痛覚刺激による神経炎症の

授乳期母マウスの抗生剤摂取が子のベージュ脂肪細胞と腸内環境に与える影響

氏名：○塚田杏樹、加藤美羅、二川瑛実、土生優妃、高橋菜摘、木村和弘、岡松優子

所属： 北海道大学・大学院獣医学院・生化学研究室

【要旨】

哺乳類の脂肪組織は主にエネルギーの貯蔵を担う白色脂肪細胞と、エネルギーを消費して熱産生する褐色脂肪細胞から構成される。加えて、慢性的な交感神経性刺激により、白色脂肪組織中に熱産生を担う脱共役タンパク質 1 (UCP1) を発現するベージュ脂肪細胞が誘導される。乳子期のマウス白色脂肪組織では、交感神経系に依存せず¹⁾ ベージュ脂肪細胞が一時的に出現し離乳とともに消失する²⁾。私たちは、この乳子期のベージュ脂肪細胞誘導に腸内細菌が関わることを報告した³⁾。本研究では、乳子期マウスにおけるベージュ脂肪細胞の出現時期と腸内細菌叢形成との関わりについて検討した。

母マウスに授乳期の前半のみ（出産直後から 10 日目まで）もしくは後半のみ（産後 10 日目以降、子でベージュ脂肪細胞が出現する時期）に抗生剤を含む水を与えて、子の腸内細菌叢形成を阻害した。生後 20 日齢における白色脂肪組織の *Ucp1* 発現量は、抗生剤を与えなかった対照群の子に比べて後半投与群の子で抑制され、組織学的解析でも多房性脂肪滴を持つベージュ脂肪細胞の減少が確認された。メタゲノム解析により子の腸内細菌叢構成を調べると、対照群、抗生剤前半投与群、後半投与群でそれぞれ異なるクラスターに分かれた。腸内細菌代謝産物である短鎖脂肪酸の盲腸内容物中濃度は、対照群の子に比べて後半投与群の子で低下した。

ベージュ脂肪細胞が出現する乳子期後半に腸内細菌叢形成が阻害されると、ベージュ脂肪細胞の誘導が抑制されることが明らかになった。乳子期の腸内細菌がベージュ脂肪細胞を誘導するメカニズムとして腸内細菌由来の短鎖脂肪酸が関与する可能性が示唆された（図 1）。今後、短鎖脂肪酸受容体である GPR41 や GPR43 の欠損マウスを用いて、さらなるメカニズムを検討する。

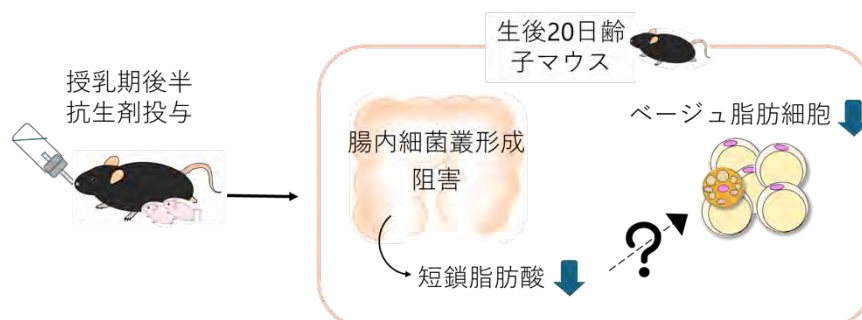


図 1. 授乳期母マウスの抗生剤摂取が子のベージュ脂肪細胞と腸内環境に与える影響

【参考文献】

- 1) Wu Y. et al. (2020) Proceedings of the National Academy of Sciences, 117, 6883-6889.
- 2) Xue B. et al. (2007) J Lipid Res, 48, 41-51.
- 3) Tsukada A. et al. (2023) iScience, 26(7), 107239.

[ポスター]

ウリ科植物の抵抗性を抑制するエフェクタータンパク質と標的因子の相互作用機構の解明

氏名：○廣川量¹、碓井拓哉¹、小川スティター²、大木進野³、高野義孝²、尾瀬農之^{1,4}

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、

²京都大学大学院・農学研究科・農学部

³北陸先端科学技術大学院大学・ナノマテリアルテクノロジーセンター

⁴北海道大学・大学院先端生命科学研究院

【要旨】

世界では約 16%の作物が病原体による感染症によって喪失しており、そのうちの 70%以上は、植物病原菌の糸状菌によって引き起こされている。一般的に植物は植物病原菌が有する PAMPs と総称される分子を認識することによって病原菌に対して抵抗性を発現する。一方で、植物病原菌は宿主特異性を示し、特定の宿主に感染する際にエフェクター分子を分泌することで植物の抵抗を抑制し感染を成功させる。そのため、エフェクター分子が植物病原菌の宿主特異性を決定していると考えられているが、それを遺伝的・分子的に証明した事例は非常に少ない。高野らは、ウリ類炭疽病菌のウリ科植物に対する宿主特異性に関与するエフェクター分子群（EPC1～EPC4）を同定した¹⁾。続いて、EPC3 の標的としてウリ科植物の小胞体局在シャペロン分子（CuBIP5）を同定したが、その抵抗性抑制機構は未だ明らかではない。

本研究は、ウリ類炭疽病菌がどのように宿主の抵抗性を阻害するのか、そのメカニズムを解明することを目的とした。分子レベルでの相互作用様式の理解のため、BIP5 及び EPC3 の発現精製を行い、蛋白質の単離に成功した。また相互作用解析において、BIP5 は大腸菌で発現した EPC3 とは相互作用しないが植物発現の EPC3 とは相互作用を示した。今回の発表では、相互作用解析の結果とそれを踏まえた考察について報告する。

【参考文献】

- 1) Inoue Y., Takano Y., *et al.*, (2023) *New Phytologist.*, 238(4):1578-1592.

Distance Score Analysis による cis 型ペプチド結合の検出の自動化

氏名： 篠原浩大¹、岡田哲二²、○友池史明¹

所属： ¹北海学園大学・工学部・生命工学科

²学習院大学・理学部・生命科学科

【要旨】

タンパク質のペプチド結合は、trans 型と cis 型では、trans 型のほうが安定であるにも関わらず、稀に cis 型のペプチド結合が観察される。cis 型のペプチド結合が形成される規則などについて、未だ知見が不十分である一方で、この cis 型のペプチド結合がタンパク質の構造と機能に影響を与える例も報告されている。そのため、cis 型のペプチド結合は稀にしか見られない構造であるが、その知見の蓄積することは、タンパク質の構造と機能の理解と予測のために必要不可欠である。しかし、Protein Data Bank (PDB) に登録されている構造情報から cis 型のペプチド結合を抽出することも難しい。その原因の一つは、PDB に登録されている膨大な構造情報の中には、実際は cis 型のペプチド結合を形成している箇所であっても、分解能や精密化の質によっては trans 型として登録されているものも存在しており、単純に構造情報から cis 型のペプチド結合を抽出するだけでなく、同じタンパク質の別の報告も参照する必要がある。そこで我々が提唱する Distance Score Analysis (DSA 解析)を応用することで、cis 型のペプチド結合を抽出する手法を自動化できないかと考えた。

我々が提唱する DSA 解析では、タンパク質の立体構造を高い再現性で比較することを目的として同一タンパク質の PDB に登録されている複数の構造情報について α 炭素間の距離を計測し、平均距離と標準偏差を求めている。これまでの DSA 解析の結果で隣り合うアミノ酸残基間の α 炭素の平均距離が trans 型と cis 型で異なることがわかっていった。そこで、この距離の違いを調べたところ、cis 型をとるペプチド結合では α 炭素間の平均距離は $3.3 \text{ \AA}$ 以下になることがわかった。また、平均距離は cis 型が報告されている比率に依存するため、この平均距離が短いほど cis 型のペプチド結合の可能性が高いと判断できることがわかった。この性質を利用し、BioPython のモジュールを利用して、同一 Uniprot ID の構造情報の取得と各ペプチド結合の α 炭素間距離の平均値を計算し、cis 型のペプチド結合を抽出するプログラムを作製した。このプログラムを用いて、ピルビン酸キナーゼと RNase U2 の構造が明らかになっているホモログに対して、cis 型のペプチド結合を抽出し、進化上の保存性を調べた。その結果、ピルビン酸キナーゼについては系統樹上、保存性は確認できなかった一方、RNase U2 では cis 型のペプチド結合が保存されていることが観察された。

本研究では、 α 炭素間の距離を計測する DSA 解析を応用することで、cis 型のペプチド結合を抽出した。この手法を BioPython モジュールを利用したプログラムを組むことで自動化した。自動化した結果、タンパク質の cis 型ペプチド結合がホモログ間で保存されているかを調べるのが容易になった。今後は、このプログラムを利用して、保存性の高い、すなわち重要な役割を果たしていると考えられる cis 型のペプチド結合を収集することで、cis 型のペプチド結合の形成メカニズムと機能を調べる予定である。

【参考文献】

- 1) Okada, T. and Tomoike, F. (2023) Heliyon 9, e18598

[ポスター]

筋芽細胞における Ninjurin1 の発現制御機構の解析

氏名：○藤井大樹、渡邊佳孝、大軒悟、渡辺裕伍、中島恵一、矢澤 隆志、川辺淳一

所属：旭川医科大学・医学部・生化学講座

【要旨】

目的：Ninjurin1 (nerve injury-induced protein 1) は神経傷害時に誘導される膜タンパク質として荒木らによって発見された(1)。我々は、ペリサイトと血管内皮細胞の接着および新生血管の成熟化を調節する因子として Ninjurin1 を同定し(2)、その後、ペリサイトのシュワン細胞への分化(3)や創傷治癒(4)に関与することを明らかにしてきた。近年、Ninjurin1 はマクロファージの plasma membrane rupture (5)や骨格筋分化(6)において重要な役割を果たすことが報告されている。Ninjurin1 は多様な機能を有するものの、その発現機構については殆ど解明されていない。本研究では、骨格筋分化における Ninjurin1 機能の解明を目的として、筋芽細胞における発現機構について解析した。

方法：マウス Ninjurin1 遺伝子(*Ninj1*)の上流配列(～2,600 bp)を PCR 法により単離し、塩基配列を確認後、pGL4.10 ベクターに挿入した。さらに、そのデリーション配列(1,500 bp、1,000 bp、500 bp、150 bp)を挿入したベクターを構築した。Dual-Luciferase Reporter Assay により筋芽細胞 C2C12 における転写活性を評価した。*Ninj1* mRNA 発現に及ぼすサイトカインや阻害剤の影響について RT-qPCR で評価した。

結果：筋芽細胞 C2C12 において TNF α により *Ninj1* の mRNA 発現が誘導された。マウス *Ninj1* 遺伝子の上流配列には、明確な TATA-box は認められないものの、GC-rich 領域や GT リピートなどの特徴的な配列が存在した。コントロールベクターと比較して、*Ninj1* の上流配列を含む pGL4.10 で有意なルシフェラーゼ活性の上昇が認められた。1,000 bp の上流配列が最も強い転写促進作用を示した。GC-rich 領域を欠損させると転写促進作用は、ほぼ認められなかった。*Ninj1* のプロモーターと考えられる領域には複数の SP1 結合配列が認められたことから、その一部を欠損させた結果、転写活性が有意に低下した。また、SP1 の阻害剤として知られている chromomycin A3 により *Ninj1* の mRNA 発現が減少することからも、*Ninj1* の発現は SP1 により制御される可能性が示唆された。

【参考文献】

- 1) Araki T and Milbrandt J. *Neuron*. 1996 17:353-361.
- 2) Matsuki M. et al. *Circ J*. 2015 79:1363-1371.
- 3) Tomita Y et al. *Biochem Biophys Res Commun*. 2019 519:462-468.
- 4) Matsuo R et al. *JID Innov*. 2022 2:100141.
- 5) Ramos S et al. *EMBO J*. 2024 43:1164-1186.
- 6) Kny M et al. *PLoS One* 2019 14:e0216987.

ヒト抗菌ペプチド LL-37 はマウス及びラットのオルソログとは異なる多量体化特性を有する

氏名：○柴垣光希¹, クリスナント ジェレミア オクタビアン¹, テフェラ デサレニ アベジェ¹, 月岡耕太郎¹, 上田和佳¹, 加納康平¹, 谷昊¹, 平井芙実¹, 熊木康裕¹, 久米田博之¹, 相沢智康^{1,2}

所属：¹北海道大学・大学院生命科学院ソフトマター専攻・蛋白質科学研究室、

²北海道大学・大学院先端生命科学研究院・蛋白質科学研究室

【要旨】

抗菌ペプチドは全生物が有する生体防御システムであると同時に、宿主免疫機能にも重要な役割を果たしており、神経系における炎症制御活性も注目されている¹。LL-37 はヒトが有する cathelicidin ファミリー抗菌ペプチドであり、上皮細胞、免疫細胞、神経系を含む全身の組織で発現している。LL-37 は FPR2, CXCR4, TLR4 などの受容体や、P2X7, TRPV2 などの膜チャネルなどを活性化することができる²。そのメカニズムは膜受容体を介したモデルで説明されるが、詳細な作用機序は不明である。

Cathelicidin ファミリー抗菌ペプチドはヒト、マウス、ラットにおいて保存されており、高い配列類似性を有し、3 種すべてが α -helix 構造をもつと報告されている。しかし、ヒト LL-37 は P2X7 受容体や FPR2 受容体に対する活性を持つのに対し、マウス及びラットのオルソログ (cathelin-related antimicrobial peptide, CRAMP) は活性を有しないことが報告されている^{3,4}。LL-37 の膜上での多量体化状態やダイナミクスは、受容体活性を左右すると考えられ、よく研究されてきた一方で、CRAMP の理解は進んでいない。我々は、CRAMP の物理化学的特性を明らかにし、LL-37 との比較を行うことで、構造活性相関のメカニズムを明らかにできると考えた。

本研究では、組換えを用いて LL-37 と CRAMP の調整を行った。これらのペプチドは凝集性が高いため、効率的な可溶性発現に適する calmodulin 融合発現系を用いた。得られた組換えペプチドを用いて、異なる pH 及び塩濃度条件下で CD により 2 次構造を測定し、加えて DLS により粒子径測定を行った。さらに、各条件での多量体化状態を化学架橋実験により観察した。その結果、ヒト LL-37 のみが pH 依存的な構造変化を示すことが分かった。またグルタルアルデヒドを用いた架橋実験により、ヒト LL-37 は中性ミセル上で多量体を形成しない一方で、CRAMP は多量体を形成することが示唆された。MD シミュレーションと AlphaFold3 による予測の結果、LL-37 は CRAMP と比較して分子内塩橋形成に有利な配列を有していることで α -helix 構造が安定化され、同時に分子間塩橋による 2 分子間相互作用が生じにくいことが示唆された。LL-37 は中性脂質上での非特異的な多量体化を低減するように進化したことで、マウスやラットの CRAMP にはない受容体刺激活性を獲得した可能性がある。

【参考文献】

- 1) Stuart, B. A. R., Franitza, A. L., & E, L. (2022). *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 16.
- 2) Verjans, E. T., Zels, S., Luyten, W., Landuyt, B., & Schoofs, L. (2016) *Peptides*, 85, 16–26.
- 3) Singh, D., Qi, R., Jordan, J. L., Mateo, L. S., & Kao, C. C. (2013) *JBC*, 288, 8258–8268.
- 4) Brandenburg, L. O., Jansen, S., Wruck, C. J., Lucius, R., & Pufe, T. (2010). *Molecular Immunology*, 47, 1905–1913.

[ポスター]

狂犬病ウイルス P タンパク質が, STAT 二量体選択性を伴って免疫系を阻害する機構の解明

氏名: ○武川祐一郎¹、飯塚祐太²、南未来¹、稲葉理美^{1,2}、尾瀬農之^{1,2}

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北海道大学・理学部・構造生物化学研究室

【要旨】

狂犬病ウイルスは、狂犬病を引き起こす。狂犬病の致死率は 100%であり、治療法は存在しない。世界では、未だに年間約 6 万人が狂犬病によって亡くなっている。狂犬病の強毒性には、ヒトのシグナル伝達蛋白質 STAT1 および STAT2 の機能の阻害が関与している。ウイルスの感染が認識されると、細胞質中の STAT1 および 2 の特異的なチロシンがリン酸化される。チロシンリン酸化 STAT は、STAT1/1 ホモ二量体および 1/2 ヘテロ二量体を形成し、核に移行して、標的遺伝子の転写活性化を介して免疫を誘導する。狂犬病ウイルスは、P 蛋白質 C 末端ドメイン (RVPCTD) を用いて、STAT 二量体の核移行を阻害し、免疫を破綻させる¹⁾。我々は、最近 1/1 ホモ二量体と RVPCTD の複合体構造を明らかにした。これによって、1/1 ホモ二量体と RVPCTD の関係性は、原子レベルでの議論が可能となった。一方で、1/2 ヘテロ二量体については、RVPCTD が 1/2 ヘテロ二量体を阻害するという報告から、ほとんど研究が進んでいない。本研究は、組換え蛋白質を用いて、1/2 ヘテロ二量体と RVPCTD の相互作用の分子基盤を明らかにすることを目指す。これにより、世界に先駆けて、STAT ヘテロ二量体とウイルス蛋白質の関係性を原子レベルで議論するという点から、ウイルス学に新たな視点を与えることが期待される。

我々は、チロシンリン酸化 STAT1 と STAT2 を共発現させることで、1/2 ヘテロ二量体の精製に成功した。この際、それぞれの STAT に異なるアフィニティータグを融合させ、対応する二段階アフィニティークロマトグラフィーを行った。また、得られた 1/2 ヘテロ二量体は RVPCTD と結合し、サイズ排除クロマトグラフィーカラムで分取可能であった。さらに、蛍光偏光解消法による定量的な相互作用解析も行った。その結果、1/2 ヘテロ二量体は、解離平衡定数およそ 7 nM で RVPCTD と相互作用することが分かった。興味深いことに、この解離平衡定数は、1/1 ホモ二量体と RVPCTD の相互作用の解離平衡定数 (およそ 200 nM) よりも、30 倍ほど小さかった。つまり、RVPCTD は、1/1 ホモ二量体よりもはるかに強く 1/2 ヘテロ二量体と相互作用することが明らかになった。ここから、RVPCTD は、STAT 二量体の機能に応じて、優先順位を付けて阻害している可能性について議論する。

【参考文献】

- 1) Brzózka, K., et al. (2006), *J. Virol.*, **80**, 2675-2683.

Structural analysis of molecular activation mechanism of scramblase Xkr4

○Panpan Zhang¹, Masahiro Maruoka³, and Jun Suzuki^{2,3}, Kazuhiro Abe¹

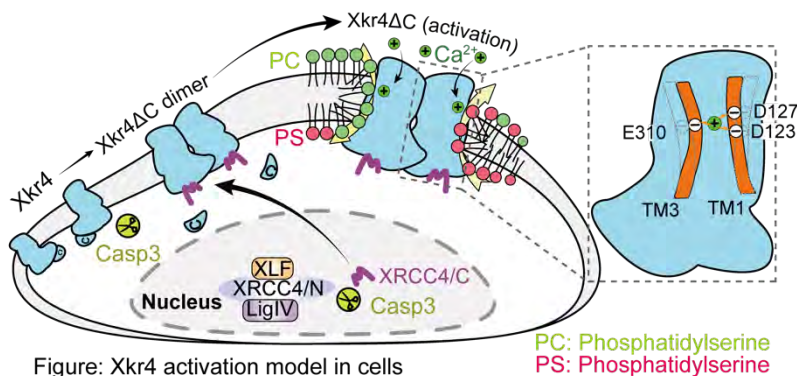
¹Faculty of Science, Department of Chemistry, Hokkaido University, Sapporo, 060-0810, Japan.

²Institute for Integrated Cell-Material Sciences (WPI-iCeMS), Kyoto University, Yoshida-Honmachi, Sakyo-ku, Kyoto, 606-8501, Japan

³Graduate School of Biostudies, Kyoto University, Konoe-cho, Yoshida, Sakyo-ku, Kyoto, 606-8501, Japan

Abstract

The “eat me signal”, Phosphatidylserine is exposed on the surface of dying cells by the phospholipids scrambling. We previously identified two family proteins of TMEM16 family and Xkr family¹⁻³ function as scramblers. In Xkr family, Xkr4, Xkr8, and Xkr9 are caspase cleavage-dependent scramblases, which caspases cleave at a conserved caspase cleavage site in the C-terminus during apoptosis³, and form a dimer after caspase cleavage. However, dimer formation is not sufficient to activate Xkr4. In our recent studies, we have identified a nuclear protein XRCC4 and extracellular Ca^{2+} are necessary for Xkr4 activation^{4,5}. The C-terminus fragment of XRCC4 was also cleaved by caspase3 during apoptosis, and was released into cytoplasm. The C-terminus fragment of XRCC4 directly binds to Xkr4 to provide a preactivated state of Xkr4 favoring the movement of Ca^{2+} into the transmembrane region. Ca^{2+} interacts with the residues D123 and D127 in transmembrane 1 and E310 in transmembrane 3 to bridge the two transmembrane which induces conformational changes to activate Xkr4 at the final step. Although the activation factors were identified, the details of how Xkr4 scrambles phospholipids by themselves remain unknown because purification of the activated formation of Xkr4 as a dimer formation is still the challenge in this field. Through condition optimization of purification, we successfully purified Xkr4 as a dimer formation. Using the purified Xkr4 dimer, we will perform liposome analysis and structural analysis to define the molecular details of the Xkr4 activation.



Reference

1. Suzuki, J., Fujii, T., Imao, T., Ishihara, K., Kuba, H., & Nagata, S. (2013) J Biol Chem., 19, 13305-13316.
2. Suzuki, J., Denning, D. P., Imanishi, E., Horvitz, H. R., & Nagata, S. (2013) Science., 341, 403-406.
3. Suzuki, J., Imanishi, E., & Nagata, S. (2014) J Biol Chem., 289, 30257-30267.
4. Maruoka, M., Zhang, P., Mori, H., Imanishi, E., Packwood, D. M., Harada, H. Kosako, H, Suzuki, J. (2021) Molecular Cell., 81(7), 1397-1410.
5. Zhang, P, Masahiro, M. Suzuki, R, Katani, H, Dou, H, Daniel M. P, Kosako, H, Tanaka, M, and Suzuki, J. (2023) Nat Common., 14.1: 5592.