



第60回 日本生化学会北海道支部例会

日本生化学会北海道支部・日本生物物理学会北海道支部

合同シンポジウム

プログラム・抄録集

令和5年7月15日（土）

北海道大学薬学研究院 臨床薬学講義室



【交通案内】

- JRご利用の場合
札幌駅下車、徒歩7分で
「正門」到着
- 地下鉄南北線・東豊線
ご利用の場合
さっぽろ駅下車、徒歩10分で
「正門」到着
- 地下鉄南北線ご利用の場合
北12条駅下車、徒歩4分で
「北13条門」到着
- 北18条駅下車、徒歩7分で
「北18条門」到着

薬学部

0 100 200 300 m
 ◎ 学部と同一建物内の大学館は多数を省略している
 ○ () は建物の名称を示す

【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接続（D-sub 15ピン）とHDMI接続が利用できます。
- ・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。

【ポスター発表者の方へ】

- ・ポスター会場は第二講義室です。メイン会場（臨床薬学講義室）の隣の部屋です。
- ・ポスターボードは縦177.5 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時半～10時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。
- ・ポスターセッションは12:10-13:10（奇数番号：12:10-12:40、偶数番号：12:40-13:10）の予定です。ポスター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が終了しましたら、ポスターの撤去をお願いします。

日本生化学会北海道支部例会プログラム

9:30 開場

10:00 開会の辞（前仲勝実）

【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 12 分 質疑応答 3 分）

（座長：塚本 卓、喜多 俊介）

10:10-10:25 新規に調整した高純度な癌幹細胞様細胞を用いた分化・腫瘍形成機構の検討

☆太田 悠介(北海道大学・薬学研究院・生体分子機能学研究室)

10:25-10:40 バイオマテリアル製剤化に向けた HLA-G 蛋白質の機能解析

☆竹高 育生(北海道大学・生命科学院・生体分子機能学研究室)

10:40-10:55 破骨細胞の形成および機能制御における p53 誘導性ホスファターゼ PPM1D の機能

☆本下 壮太郎(北海道大学・大学院総合化学院・生物化学研究室)

10:55-11:10 tRNA セレン修飾酵素 SelU の反応機構の研究

☆碓井 拓哉(北海道大学・生命科学院・構造生物化学研究室)

11:10-11:25 抗菌ペプチド LL-37 とそのオルソログの構造特性解析及びそのためのカルモジュリン融合タグによる可溶性画分での組換え大量発現

☆柴垣 光希(北海道大学・生命科学院ソフトマター専攻・蛋白質科学研究室)

11:25- 昼食

【ポスター発表】

12:10-13:10 (奇数番号:12:10-12:40、偶数番号:12:40-13:10)

- P01 ☆下柿元 咲瑛(北海道大学・薬学部・生体分子機能学研究室)
- P02 ☆入船 佑太(北海道大学・大学院総合化学院・生物化学研究室)
- P03 友池 史明(北海学園大学・工学部・生命工学科)
- P04 ☆上野 康大(北海道大学・大学院総合化学院・生物化学研究室)
- P05 ☆河原 生知(北海道大学大学院薬学研究院・衛生化学研究室)
- P06 奥山 文矢(北海道大学・大学院薬学研究院・衛生化学研究室)
- P07 ☆庾庭馳(北海道大学・大学院薬学研究院・衛生化学研究室)
- P08 ☆梁井 史織(北海道大学・大学院生命科学院・創薬科学研究教育センター)
- P09 ☆武川 祐一郎(北海道大学・理学部・構造生物化学研究室)
- P10 ☆南 未来(北海道大学・大学院生命科学院・構造生物化学研究室)
- P11 ☆武井 梓穂(北海道大学・大学院生命科学院・構造生物化学研究室)

【総会】

13:10-13:30 議長:田村 正人

【第60回記念講演】(発表 35 分 質疑応答 5 分)

(座長:田村 正人)

- 13:30-14:10 非炎症のワクチン免疫増強剤の開発
瀬谷 司(青森山田学園ねぶた健康研究所、北海道大学医学研究科)
- 14:10-14:25 休憩

【一般講演】(発表 20 分 質疑応答 5 分)

(座長:相馬 仁)

- 14:25-14:50 p53 誘導性ホスファターゼ PPM1D を介した好中球サブセット分化制御機構の解明
鎌田 瑠泉(北海道大学・大学院理学研究院・化学部門・生物化学研究室)
- 14:50-15:15 浮遊植物と表層共存細菌との相利共生相互作用
森川 正章(北海道大学・大学院地球環境科学研究院)
- 15:15-15:40 休憩

【特別講演】（発表 35 分 質疑応答 5 分）

（座長：前仲 勝実）

15:40-16:20 The role of posttranslational modifications and zinc ions in regulating SUMO-SIM interactions associated with formation of PML-nuclear bodies

James G. Omichinski (Department of Biochemistry and Molecular Medicine University of Montréal, Montréal)

16:20-16:35 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）

16:35-16:40 支部若手奨励賞授賞式

16:40-17:05 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・薬学研究院・生体分子機能学研究室）

【総説講演】（発表 20 分 質疑応答 5 分）

（座長：高橋 素子）

17:05-17:30 脂肪滴の核内での生成機序と意義

大崎 雄樹（札幌医科大学・医学部・解剖学第一講座）

（座長：鈴木 利治）

17:30-18:00 アルツハイマー病の有効な治療法開発に向けて

羽田 沙緒里（産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門）

18:00-18:10 表彰・閉会の辞（前仲勝実）

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

[一般講演]

新規に調整した高純度な癌幹細胞様細胞を用いた分化・腫瘍形成機構の検討

氏名：○太田 悠介¹、竹内 若菜²、梁井 史織²、黒田 京佑²、野村 尚生^{1,2}、前仲 勝実^{1,2}

所属：¹北海道大学・大学院薬学研究院・創薬科学研究教育センター

²北海道大学・大学院生命科学院

【要旨】

癌組織中にはごく少数の癌幹細胞が存在し、細胞ストレス耐性や抗癌剤に対して治療抵抗性を示すことが知られている。また、癌幹細胞は上皮間葉転換（EMT）の間葉型を示すことが報告されており、再発・転移の原因と考えられている。これまで行われてきた癌幹細胞研究では、元の癌細胞が混在していることが多く、真に癌幹細胞の性状を解析しているか明らかではない。そこで、これまで当研究室では大腸癌、乳癌、悪性黒色腫細胞株を対象に、今まで報告のなかった方法により市販癌細胞株から、抗癌剤セレクションや iPS 細胞を用いた転写因子導入などを行うことなく、癌幹細胞様細胞（CSC）の調製を行い、株化に成功している。調製した細胞は薬剤排泄能が高く、Wnt signaling を介して EMT の進行度を制御することで EMT・癌幹細胞マーカーを遺伝子・タンパク質レベルで発現増加させることを明らかにした。また、Single cell RNA-seq（scRNA-seq）解析により、この CSC は元の細胞株にもごく微量存在することを示し、さらに異種移植モデル試験から CSC は元の細胞株よりも腫瘍増殖能や転移能が高いことがわかっている。この CSC は株化から数年、継代培養をしても特性が維持されているため、CSC から癌細胞の分化には外部刺激が必要であると考えられる。

本研究では、CSC から癌細胞への分化及び、初期の腫瘍形成メカニズムを解明することを目指した。CSC に刺激が入ることで癌細胞に分化が誘導されることを検討するため、CSC 調製段階での知見から市販癌細胞の培養上清を添加した培地で CSC を培養し、薬剤排泄能及び EMT・癌幹細胞マーカーの発現解析を施行した。次に、*in vivo* において CSC の癌細胞への分化について検討するため、異種移植モデル試験を施行し、形成した腫瘍を取り出し分化能解析として移植前のタンパク質発現フェノタイプとの比較検討を行った。その結果、培養上清の添加により CSC は、元の癌細胞に類似した細胞形態に変化がみられた。また、上皮系マーカーの発現が増加した一方、癌幹細胞マーカーの発現が减弱し、元の癌細胞と発現パターンが類似していた。*in vitro* と同様に細胞形態の変化、上皮系マーカー発現増加、間葉系マーカーと癌幹細胞マーカーの発現減少がみられた。さらに、元の細胞株由来と類似した細胞形態に変化しており、CSC は生体内においても癌細胞に分化誘導されることがわかった。以上の結果から、CSC は周囲微小環境から外部刺激を受けると癌細胞に分化誘導され、腫瘍を形成することが示唆された（図 1）。

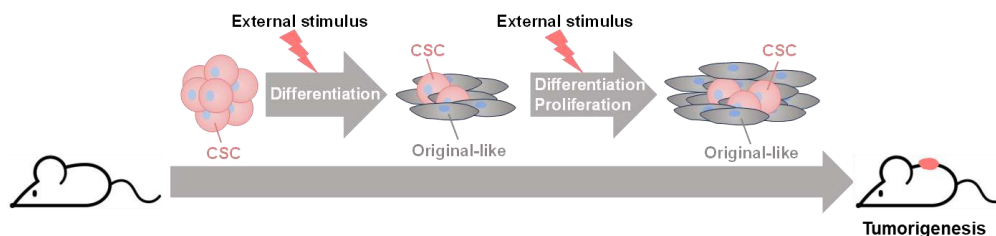


図 1. CSC は癌細胞に分化誘導され、初期腫瘍形成する模式図

CSC は周囲微小環境から外部刺激を受けると癌細胞に分化誘導され、腫瘍を形成することが示唆された。

[一般講演][ポスター講演]

バイオマテリアル製剤化に向けた HLA-G 蛋白質の機能解析

氏名：○竹高育生¹、黒木喜美子¹、Pablo Adrian Guillen Poza¹、渡邊紘士¹、下柿元咲瑛¹、佐々木信²、荒瀬尚³、荏原充宏²、前仲勝実¹

所属：¹北海道大学・生命科学院・生体分子機能学研究室

²国立研究開発法人物質・材料研究機構

³大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・免疫化学教室

【要旨】

HLA-G は、胎盤や胸腺に加え、腫瘍細胞などに発現し、免疫細胞に発現する抑制型受容体である LILRB1 と LILRB2 に結合する。その結果、免疫細胞の機能を抑制することが知られている。私達はこれまでに、HLA-G 蛋白質溶液をアトピー性皮膚炎モデルマウスをはじめとする複数の炎症性疾患モデルマウスに投与することで、多様な抗炎症効果を示すことを報告してきた(図1)。本研究では、HLA-G をタンパク質製剤として応用する一つの方法として、バイオマテリアル化に向けた HLA-G 蛋白質の機能評価を行った。

初めに HLA-G1 と受容体 LILRB2 を組換え蛋白質として調製し、マテリアルへの固定化方法としてアミンカップリング法が適しているか、表面プラズモン共鳴法による結合活性評価を行った。その結果、アミンカップリング法により固定化した HLA-G1 は受容体結合能を保持していることが明らかとなった。そこで、バイオマテリアルシートへの固定化を実施し、細胞アッセイによる機能評価を開始した。引き続き、バイオマテリアルへ固定化した HLA-G 蛋白質の機能解析を実施したうえで、生体内応用に適したバイオマテリアルシートの選別・検討および、製剤化に向け基礎データの収集を目指している。

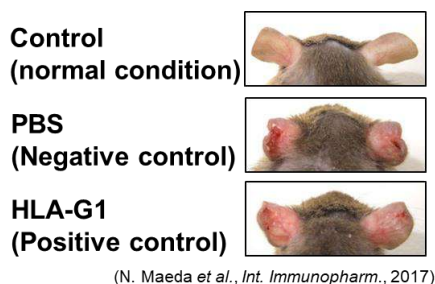


図1：炎症性腸疾患モデルマウスへの HLA-G1 の効果

【参考文献】

- 1) N. Maeda *et al.*, *Int Immunopharm.*, 2017.
- 2) K. Kuroki *et al.*, *Human Immunol.*, 2013.
- 3) D. Bortolotti *et al.*, *World J. Methodol.*, 2014

[一般講演]

破骨細胞の形成および機能制御における p53 誘導性ホスファターゼ PPM1D の機能

氏名：○本下壮太郎¹、牛尾早百合¹、谷野圭持²、坂口和靖^{1,3}、鎌田瑠泉^{1,3}

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・有機化学第二研究室

³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】

骨の量と質を適切に維持するためには骨の代謝が不可欠である。生体の骨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により代謝される。骨リモデリングのバランスの破綻は骨粗しょう症、大理石骨病、骨パジェット病などの骨疾患の原因となる。また、がんの骨転移や自己免疫疾患の進行に破骨細胞の関与が報告されている。これらの疾患の新規治療法開発のためにも破骨細胞の形成および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 は哺乳細胞の DNA 損傷応答において p53 によって誘導されるホスファターゼとして同定された。PPM1D は細胞分化や免疫応答など様々な生体機能に関与することが知られている [1]。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。

本発表では破骨細胞の形成および機能制御における PPM1D の新規機能について報告する (Fig. 1)。まず、マウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 細胞を破骨細胞分化誘導因子 RANKL の添加により破骨細胞へと分化誘導する過程において、当研究室で開発された PPM1D 特異的阻害剤 SL-176 [2] により PPM1D を阻害した。その結果、得られた破骨細胞の面積が SL-176 の濃度依存的に著しく増加することを見出した。また、PPM1D 特異的阻害剤 SL-176 を用いた結果と一致

して、siRNA を用いた PPM1D knockdown 後に分化誘導して得られた破骨細胞においても面積の著しい増加が見られた。さらに、SL-176 を用いて PPM1D を阻害した破骨細胞の骨吸収活性を解析した。非常に興味深いことに SL-176 添加による PPM1D の阻害によって、破骨細胞が底面のリン酸カルシウムを分解し得られる骨吸収窩の面積が大きく減少することが明らかとなった。また、SL-176 の分化初期の添加では、大きな効果を及ぼさない一方で、SL-176 の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 PPM1D の機能が破骨細胞形成過程の時期に依存していることが示唆された。さらに、ゲノムワイドな遺伝子発現量解析により、PPM1D の阻害は破骨細胞の形成および機能に関連する遺伝子の発現に効果を及ぼすことを明らかにした。

以上の結果より、PPM1D が破骨細胞の形成および機能を制御していることが示唆された。今後、破骨細胞の形成および機能における PPM1D の基質の同定および PPM1D を阻害した破骨細胞が骨芽細胞の分化および機能に及ぼす効果の解明により、PPM1D を標的とする骨疾患の新規治療法への展開や骨リモデリングの詳細な分子機構解明が期待される。

【参考文献】

- 1) R. Kamada, F. Kudoh, S. Ito, I. Tani, J. I. B. Janairo, J. G. Omichinski, and K. Sakaguchi. (2020) *Pharmacol. Ther.*, **215**, 107622.
- 2) S. Ogasawara, Y. Kiyota, Y. Chuman, A. Kowata, F. Yoshimura, K. Tanino, R. Kamada, and K. Sakaguchi. (2015) *Bioorg. Med. Chem.*, **23**, 6246–6249.

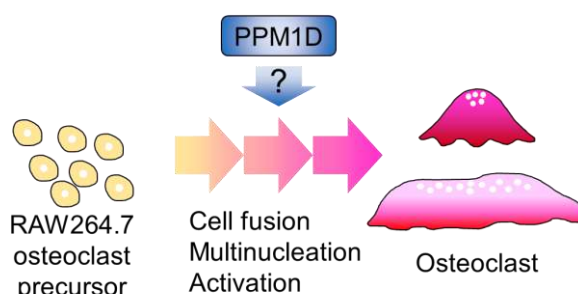


Fig. 1 破骨細胞の形成および機能制御における PPM1D の機能

[一般講演]

tRNA セレン修飾酵素 SelU の反応機構の研究

氏名：○碓井拓哉¹、大江花¹、石川結女¹、中村彰良²、尾瀬農之^{1,3}、姚関^{1,3}

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国立研究開発法人産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門

³北海道大学・大学院先端生命科学研究院・構造生物化学研究室

【要旨】

セレンは、多くの生物種にとって必須であると同時に深刻な毒性をもたらす。他の微量元素と比較して摂取適量域が非常に狭いため、ヒトの健康を考える上でも詳細な研究が欠かせない。運搬 RNA (tRNA) アンチコドン 1 位の 2-セレノウリジン修飾 (R5Se2U) は、唯一同定されているセレノ核酸であり、翻訳の過程において mRNA のコドンと tRNA のアンチコドン間の U-G ゆらぎ塩基対の効率的な形成を促進するため、蛋白質の翻訳効率に寄与すると考えられている⁽¹⁾。

2-セレノウリジン合成酵素 (SelU) は、真正細菌において広く保存されている酵素であり⁽²⁾、二つの反応ステップで基質である tRNA^{Glu}、tRNA^{Gln}、tRNA^{Lys} のアンチコドン 1 位のウリジンにセレンを導入する(図 1)⁽³⁾。まず、SelU は基質 tRNA の 2-チオウリジン (R5S2U) にゲラニルピロリン酸 (GePP) からゲラニル基を付加し、2-ゲラニルチオウリジン (R5ges2U) を合成する。次に、SelU は R5ges2U のゲラニルチオ基をセレン原子に置換し、R5Se2U を生成する。SelU は、この二段階の反応に対応する二つのドメイン、すなわち N 末端のローダネーゼ様ドメインと P ループを含む C 末端のドメインで構成されている。しかし、SelU がどのように全く性質の異なる二段階の反応を触媒するのか、その仕組みは未だ解明されていない。

我々は SelU-tRNA^{Gln} 複合体の結晶化に成功し、3.1 Å 分解能で構造を明らかにした。得られた構造中の tRNA アンチコドン 1 位のウリジンはゲラニル化されており、反応中間体状態であった。本発表では、構造から考えられる反応機構について報告し、議論する。

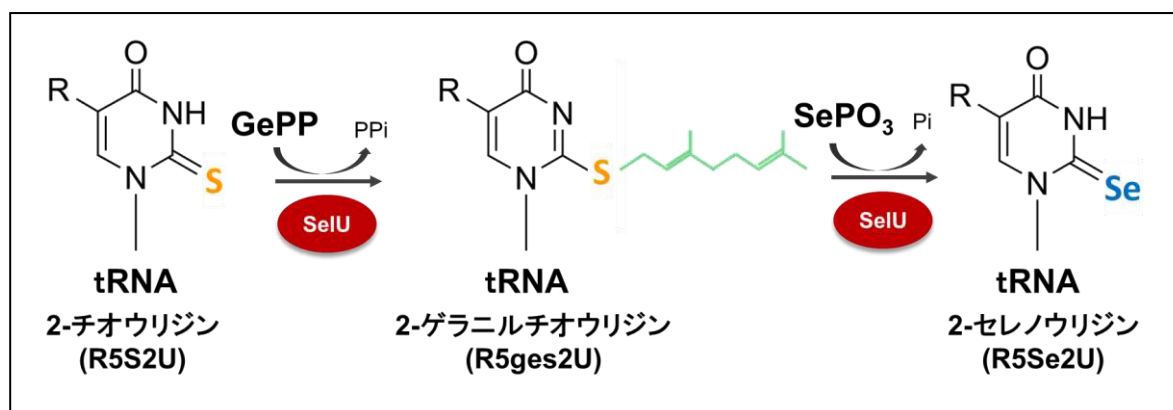


図 1. SelU による tRNA セレン修飾反応

【参考文献】

- 1) Wittwer A J., Ching W M., (1989) *Biofactor.*, 2, 27-34.
- 2) Wolfe M D., Ahmed F., and Larson T J. (2004) *J. Biochem.*, 279, 1801-1809.
- 3) Szczupak P., Sierant M., and Nawrot B. (2022) *Cells.*, 11, 1552.

第60回記念講演

要旨

【記念講演】

非炎症のワクチン免疫増強剤の開発

氏名： 瀬谷 司^{1,2}

所属：青森山田学園 ねぶた健康研究所¹, 北海道大学医学研究科²

要旨

ワクチンは抗原とアジュバントからなる。本項では副反応を最小限に絞った免疫増強アジュバントを創製し、炎症を伴わない免疫増強剤（アジュバント）を確立する。ワクチンは炎症を副作用として容認しているが、コロナワクチンの副反応が社会問題に発展しているのは周知の通りである。がんワクチンも炎症を伴うとがん増殖を促進するので認可されたアジュバントはない。非炎症のアジュバントが確立されれば広い疾患適用が見込まれ、医療の改善に貢献する。免疫増強とは抗原提示樹状細胞の活性化剤を意味し、これは炎症（サイトカインによる発熱・頭痛など）と独立して誘導しうることも証明できる。炎症なしに免疫を増強させる方法が確立されれば予防・治療の必要な高齢者を含め、多くの人々に福音をもたらす。

炎症はインターフェロン・サイトカインの応答に代表される。申請者らはこれらを誘起しない核酸アジュバント（ARNAX）をデザインし、抗原提示樹状細胞の Toll-like receptor (TLR)3 だけを活性化することに成功した。TLR3 はヒト抗原提示樹状細胞に高発現する。一般に現行の TLR3 刺激剤 polyI:C はがん免疫に最適とされながら認可されていない。その理由は polyI:C は細胞質にあまねく存在する RIG-I/MDA5 の MAVS 経路を活性化し、強い副作用を惹起するためである。ARNAX は初めて MAVS 経路の炎症なしに抗原提示を促進する TLR3 アジュバントとして 2015 年に基礎データが公表された。

その後長鎖 RNA アジュバント（ARNAX）の化学合成・量産化に成功し、GLP 試験で全身性の炎症性サイトカインを誘導しない TLR3 特異的アジュバントであることを非臨床試験として証明した。ウイルスワクチンの優れたアジュバントとして公表された。シーズを臨床試験に向けて育てながらサイエンスに貢献する課題を模索している。

参考文献

1. Matsumoto, M., K. Funami, M. Tanabe, H. Oshiumi, M. Shingai, Y. Seto, A. Yamamoto, and T. Seya. *J. Immunol.* 171: 3154-3162, 2003.
2. Oshiumi, H., M. Matsumoto, K. Funami, T. Akazawa, and T. Seya. *Nature Immunol.* 4: 161-167, 2003.
3. Matsumoto, M., M. Tatematsu, F. Nishikawa, M. Azuma, N. Ishii, A. Morii-Sakai, H. Shime, and T. Seya. *Nat Commun.* 6: e6280, 2015.
4. Takeda, Y., K. Kataoka, J. Yamagishi, S. Ogawa, T. Seya, and M. Matsumoto. *Cell Rep.* 19(9):1874-1887, 2017.
5. Iwata-Yoshikawa, N., N. Nagata, H. Takaki, M. Matsumoto, T. Suzuki, H. Hasegawa, T. Seya. *ImmunoHorizons.* 6(4): 275-282, 2022.

一般講演

要旨

[一般講演]

p53 誘導性ホスファターゼ PPM1D を介した好中球サブセット分化制御機構の解明

氏名：○鎌田瑠泉¹、工藤風樹¹、児玉達哉¹、蔵翔磨¹、谷野圭持²、坂口和靖¹

所属：¹北海道大学・大学院理学研究院・化学部門・生物化学研究室

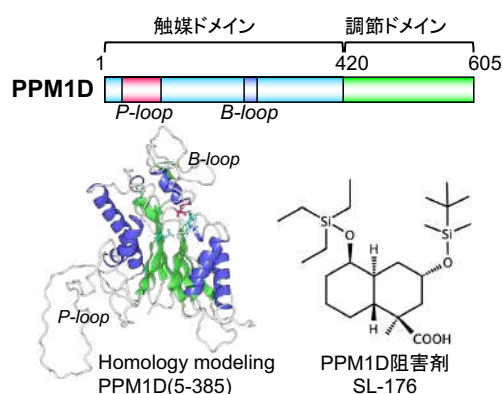
²北海道大学・大学院理学研究院・化学部門・有機化学第二研究室

【要旨】

好中球は感染の最初期の自然免疫応答を担う細胞であり、白血球の中で最も多くの割合を占めている。好中球には腫瘍形成促進と形成抑制の相反する効果が報告されており、機能の異なる多種多様な好中球サブセットに大きな注目が集まっている。免疫細胞が関与する疾患の原因解明および新規治療法開発のためにも好中球サブセット分化および腫瘍免疫応答の分子制御機構の解明が必須である。本研究は、好中球サブタイプの分化および免疫応答の分子制御機構を解明することを目的としている。

本研究は、好中球サブタイプの分化および免疫応答の分子制御機構を解明することを目的としている。我々は、癌抑制タンパク質 p53 誘導性 Ser/Thr ホスファターゼ PPM1D が好中球の分化を負に制御しており、PPM1D 阻害剤 SL-176 により好中球への分化が促進されることを見出している。さらに、PPM1D を阻害した際に分化誘導して得られる好中球が、正常好中球と比較して、貪食能の低下、炎症性サイトカイン産生量および ROS 産生能の上昇・抗菌ペプチド産生能の低下が見られることを明らかにした。さらには、大変興味深いことに PPM1D 阻害により誘導される好中球は、T 細胞の増殖を強力に抑制することが見出された。これらの結果より、PPM1D 阻害が正常好中球とは機能の異なる好中球サブセットの分化を誘導することが明らかとなった。

さらに、SL-176 の存在下および非存在下でトランスクリプトーム解析を実施し、PPM1D 阻害好中球サブセットにおいて、多くの遺伝子のスプライシングが変化していることが示された。スプライシングに変化が見られた遺伝子の中で、好中球の自然免疫反応に関わる膜タンパク質 CEACAM3 (CD66d) が異なるスプライシングパターンを示すことを見いだした。PPM1D 阻害により増加するスプライスバリエント CEACAM3-ΔTM は、C 末端領域の Transmembrane domain (TM) が特有の配列に置換されており、細胞外へ分泌されることが明らかとなった。



【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., Uno S., Kimura N., Yoshimura F., Tanino K., Sakaguchi K. (2022) *Int. J. Mol. Sci.*, 23, 12046.
- 3) Kamada R., Kimura N., Yoshimura F., Tanino K., Sakaguchi K. (2022) *PLoS One*, 14, e0212682.
- 4) Kamada R., Kudoh F., Yoshimura F., Tanino K., Sakaguchi K. (2017) *J. Biochem.*, 162, 303-308.

[一般講演]

浮遊植物と表層共存細菌との相利共生相互作用

氏名：○森川正章

所属： 北海道大学・大学院地球環境科学研究院

【要旨】浮遊植物の一種である Lemnaceae 科（通称、Duckweed、ウキクサ）は、1cm に満たない個体サイズであるが、有用植物バイオマス資源として注目されている。私たちは、北海道大学植物園に自生するウキクサの成長を加速する細菌 *Acinetobacter calcoaceticus* P23 を 2010 年に発見した¹⁾。P23 はフェノール分解活性および炭化水素分解活性も有するため、効率的バイオマス生産と共に省エネ水質浄化に好都合である。P23 の成長促進機構を解明するために、従来報告されている植物ホルモン類などの生産活性を調べたところほぼ全てが陰性であった²⁾。P23 はウキクサ表層に付着してバイオフィルムを形成する際に特定の細胞外多糖を生産する。この細菌にとって付着に必要な接着剤ともいえる細胞外多糖がウキクサの成長因子として機能していることが分かった³⁾。さらに植物側の応答を調べた結果からは、P23 は 2 つの作用を有していることが分かってきた。そのひとつは、無菌ウキクサのストレスを緩和させる作用であり、もうひとつが光合成や細胞の増殖に必要な遺伝子群の発現誘導作用である。つまり、「成長をマイナスからゼロへ、そしてゼロからプラスに」転じているらしい。別種のウキクサ成長促進細菌 *Bacillus altitudinis* B10 では P23 とは異なり細胞外多糖はほとんど生産しない。その代わりに細胞外へいくつかの加水分解酵素を分泌生産しており、そのうちのカルボキシペプチダーゼがウキクサの成長因子として働いていることが示唆された。まだその触媒活性については未確認であるが、酵素として機能しているとすればウキクサの表層タンパク質を部分分解することが成長の刺激となっている可能性がある。B10 をウキクサに過剰量共存させると逆に成長阻害が起こることも観察されているので、B10 の場合は「成長刺激は過ぎたるは及ばざるがごとし」なのであろう。一方、*Ensifer* sp. SP4⁵⁾ では、有機体窒素代謝産物を提供してウキクサの光合成活性を上昇させる。浮遊植物と表層共存細菌との相利共生作用にもちいられる戦術は陸上植物とは大きく異なっているようである。

地球上の生物炭素量のうち植物が 82% で最大であるが、それに次ぐのが細菌 14% と菌類やプランクトン 3% である。動物は 0.3% に過ぎない。すべての生物は細菌群と共存し、ホロビオントとして生きている。今後、ホロゲノム解析による包括的な生物情報学研究と、上述のような個別の細菌の特性と植物の応答に関する地道な研究から得られる知見が両輪となって、より深く生物の多様性と生命の本質を理解できる日の到来を期待する。



【参考文献】

- 1) Yamaga F., Washio K., and Morikawa M. (2010) Environ. Sci. Technol. 44(16), 6470-6474
- 2) Utami D, Kawahata A, Sugawara M, Jog R, Miwa K, and Morikawa M. (2018) Front. Chem. 6, 251
- 3) 特許第 6800484 号(WO 2017002929)
- 4) Toyama T, Mori K, Tanaka Y, Ike M, Morikawa M (2022) Mol. Plant-Micro. Interact. 35(1), 28-38.

特別講演

要旨

[特別講演]

The role of posttranslational modifications and zinc ions in regulating SUMO-SIM interactions associated with formation of PML-nuclear bodies

氏名 : ○James G. Omichinski¹, Mathieu Lussier-Price¹, Haytham M. Wahba¹, Xavier H. Mascle¹, Laurent Cappadocia¹, Veronique Bourdeau¹, Sebastian Igelmann¹, Kazuyasu Sakaguchi² and Gerardo Ferbeyre¹

所属 : ¹Department of Biochemistry and Molecular Medicine University of Montréal, Montréal, QC Canada and ²Department of Chemistry, Faculty of Science, Hokkaido University, Sapporo, Japan

【要旨】

Proteins that contain intrinsically disorder regions (IDRs) often have the ability to undergo phase separation, which is an important defense mechanism for sequestering key cellular factors in response to stress. The inherent flexibility of IDRs allows proteins that contain them to transiently associate with multiple partners, and these interactions are often regulated by post-translational modifications. One important example of an IDR-containing protein is the tumor suppressor promyelocytic leukemia (PML) protein. In response to select stress signals, the PML protein undergoes phase separation to form membrane-less nuclear bodies (PML-NBs), which sequester key factors that regulate many nuclear processes including autophagy, DNA-damage repair, apoptosis, senescence and the antiviral response. It is now estimated that over 200 proteins transit in and out of PML-NBs and often this occurs through their participation in interactions mediated by SUMO (Small Ubiquitin-like Modifier) proteins. Like ubiquitin, SUMO proteins (SUMO1-5) function either as a protein post-translational modification or through non-covalent interactions with proteins containing SUMO-interacting motifs (SIMs). Since PML is both SUMOylated and contains a SIM, it has the capacity to recruit other proteins to PML-NBs that are either SUMOylated or contain a SIM. Over the last several years, we have been performing functional and structural studies to define the mechanisms that govern key SUMO-SIM interactions that regulate the formation of PML-NBs at the atomic level. More precisely, we have examined how post-translation modification of SUMO proteins and SIMs help to control SUMO-SIM interactions of key proteins required for PML-NB formation including PML itself. In addition, we have examined the role of zinc ions in enhancing the interaction of the SIM of PML with SUMO1 as well as the role that cellular zinc ion levels play in PML-NB formation. Our results demonstrate that there is a SUMO-SIM code that is regulated by acetylation of SUMO proteins and phosphorylation of SIMs, and that SUMO1 contains a paralog specific auto-inhibitory domain at its N-terminal region, which is specifically regulated by zinc ion levels in cells. Taken together the results provide important insights into how formation of PML-NBs through phase separation is regulated by both posttranslational modifications and the availability of metal cofactors in response to cell stress.

REFERENCES:

- 1) Cappadocia L *et al*, *Structure* (2015) 23:126-38
- 2) Mascle X *et al*. (2020) *Structure* 28:157-168
- 3) Lussier-Price M *et al*. (2020) *Structure* 28:573-585
- 4) Lussier-Price M *et al*. (2022) *Nucl Acids Res* 50:8331-8348

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.

総説講演

要旨

[総説講演]

脂肪滴の核内での生成機序と意義

氏名：○大崎雄樹¹

所属：¹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と疾患に関与する。脂肪滴は核内にも形成され、2つの生成機序が判明した。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(1)。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(2)。

一方核内脂肪滴の意義としては、肝由来細胞では小胞体ストレスに応じたリン脂質合成に関与すること(1)、グリオーマでは癌促進因子の発現調節に関与すること(3)をこれまでに報告した。さらに実際の人肝疾患患者の肝生検試料においても、核質内に浮遊する脂肪滴および核膜変形に伴う細胞質脂肪滴の核内陥入が高頻度に観察されているが(4)、特定の疾患背景と核内脂肪滴形成との相関は現在解析中である。

従来の核内構造体は核酸とタンパク質から成る非膜性構造であるが、その中で、リン脂質一重層とはいえ膜表層を供給する核内脂肪滴の存在は、新たな生理現象のプラットフォームになり得る。本演題では、判明してきた核内脂肪滴の形成・動体に関与し得る分子機序候補と、可能性のある生理機能についてご紹介したい。

【参考文献】

- 1) Soltysik, Ohsaki et al., (2019) Nat Commun., 10, 473.
- 2) Soltysik et al., (2021) J Cell Biol., 220, e202005026.
- 3) Umaru et al., (2023) FEBS J., 290, 1798-1821.
- 4) Imai, Ohsaki et al., (2023) Sci Rep., 13, 6861.

[総説講演]

アルツハイマー病の有効な治療法開発に向けて

氏名：○羽田沙緒里¹、齋藤遥²、鈴木利治²

所属：¹産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門

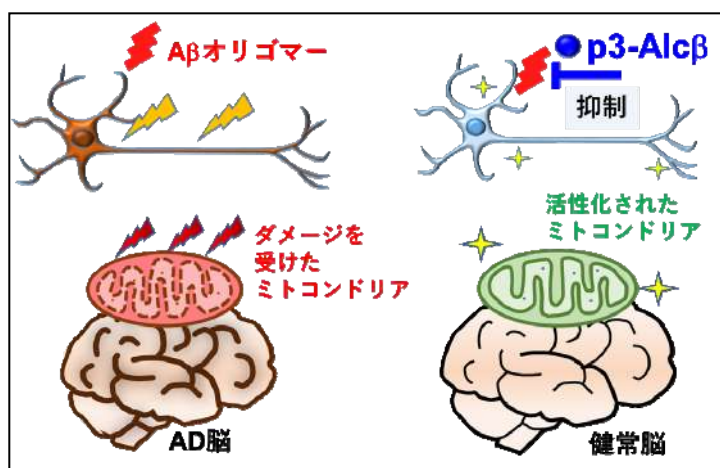
²北海道大学・大学院薬学研究院・認知症先進予防解析学分野

【要旨】

日本を含む先進諸国では、急速な高齢化による認知症患者の増加が社会問題となっている。認知症患者の最大疾患であるアルツハイマー病（AD）では、認知症を発症する20年以上前から、脳内でアミロイド前駆体タンパク質（APP）から切り出されたアミロイドβペプチド（Aβ）の凝集体が沈着して老人斑と呼ばれるADに特徴的構造体が蓄積し始める。老人斑となる前の可溶性Aβオリゴマー（多量体）が神経細胞のシナプスを傷害し、神経毒性を現すことがAD発症の引き金となる知見が蓄積していることから、Aβをターゲットとした治療法の開発が進められてきた。しかし、形成される多様なAβオリゴマーが様々な標的タンパク質（神経伝達物質受容体など）を介して神経毒性を発現することや、AD発症・悪化のメカニズムには個人差があることなどの複雑性が、有効な治療法の開発を困難にしている。現在開発が進んでいる治療薬の多くは、特定のタイプのAβオリゴマーや凝集体に対して高い結合親和性を示す抗体医薬であるため、その多様性に対応できる予防・治療法の開発が切望されている。

Alcadein β (Alcβ)は神経細胞に特異的に発現する膜タンパク質で、Aβの前駆体膜タンパク質であるAPPを切断する酵素により同じ代謝様式で切断されることによって、p3-Alcβという37-40アミノ酸のペプチドを産生する。p3-AlcβはAβとは異なり非凝集性のペプチドで、脳神経細胞から脳脊髄液中に分泌される。これまでにp3-Alcβは、加齢やAD発症に伴ってその量が減少することが明らかとなった¹⁾。

p3-Alcβの神経細胞に対する生理活性を解析したところ、p3-Alcβには神経細胞のミトコンドリアの活性化とAβ傷害性に対して保護的な作用があることがわかった²⁾。本研究により、p3-Alcβがこれまでに開発されてきたAD治療薬とは異なるメカニズムでADに有効であることが示唆された³⁾。p3-Alcβを用いることで、ADに有効な新規治療法の開発に結び付く可能性がある。



【参考文献】

- 1) Hata et al., (2019) *Alzheimers Dement (N Y)*. 5, 740-750.
- 2) Hata et al., (2023) *EMBO Mol Med*. 15, e17052.
- 3) Gandy (2023) *Trends Mol Med*. 29, 487-488.

ポスター発表

要旨

[ポスター] P1

免疫チェックポイント阻害可能な抗 HLA-G 抗体の機能評価

氏名：○下柿元咲瑛¹、黒木喜美子¹、引地和馬¹、赤岩愛記¹、古川敦^{1,2}、前田直良¹、荒瀬尚³、前仲勝実¹

所属：¹北海道大学・大学院薬学研究院・生体分子機能研究室、
²金沢大学・医薬保健学域薬学類・衛生化学研究室、
³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

【要旨】

HLA-G タンパク質は非古典的ヒト白血球抗原 (HLA) の一種で、胎盤、胸腺、一部の腫瘍細胞、制御性 T 細胞において特異的に発現している。いくつかのスプライシングアイソフォームがある中で、機能的タンパク質としては、 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ ドメインからなる HLA-G 重鎖、ペプチド、 $\beta 2$ ミクログロブリンを含むヘテロトライマーとして構成される HLA-G1 と、HLA-G 重鎖の $\alpha 2$ ドメインが欠損し、非共有結合的に $\beta 2$ ミクログロブリンフリーの重鎖ホモダイマーを形成している HLA-G2 がある。HLA-G の受容体としては、細胞内領域に抑制性シグナル伝達モチーフ (ITIM) を持つ免疫抑制性受容体 LILRB1 と LILRB2 が報告されている。LILRB1 は免疫細胞に広く発現するのに比べ、LILRB2 は単球、マクロファージ、樹状細胞などの抗原提示細胞に限って発現する。

本研究では、HLA-G が腫瘍組織周辺の免疫細胞上の LILRB1 や LILRB2 を介して免疫寛容を誘導し、腫瘍細胞の免疫逃避に関与していると示唆されているため、これらの相互作用を阻害し、腫瘍免疫反応を活性化できる抗体の開発を目的としている。具体的には、保有するラット抗 HLA-G 抗体ライブラリーの中から、表面プラズモン共鳴法を用いた分子間相互作用解析および細胞アッセイにより HLA-G と抑制性受容体 LILR との相互作用を阻害し、効果的に腫瘍免疫を活性化可能な抗体を評価し、候補抗体を選別した。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。

Ser/Thr ホスファターゼ PPM1D 特異的な阻害剤 SL-176 の新規アナログの がん細胞への効果

氏名：○入船佑太¹、小笠原紗里¹、谷野圭持²、鎌田瑠泉^{1,3}、坂口和靖^{1,3}

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・有機化学第二研究室、

³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】

Ser/Thr ホスファターゼ PPM1D は、がん抑制タンパク質 p53 誘導性ホスファターゼとして同定された。PPM1D は、p53 経路における種々のタンパク質を脱リン酸化することにより、p53 経路を負に制御している。多様ながんにおいて PPM1D の遺伝子変異や過剰発現が見られており、PPM1D の異常はがん患者の予後不良と関連していることが報告されている。このため、PPM1D はがん治療の標的として大きな注目を集めている。当研究室ではこれまでに、PPM1D を特異的かつ強力に阻害する PPM1D 阻害剤 SL-176 の開発に成功しており、PPM1D が様々な細胞の分化や機能を制御していることを見出している [1-3]。さらに、PPM1D を過剰発現しているがん細胞において、SL-176 が強力な増殖抑制効果を示し、神経芽腫や髄芽腫細胞の担がんマウスにおいても腫瘍のサイズを大きく減少させることを報告している [4]。

本研究では、より強力かつ特異的に PPM1D を阻害する化合物の開発を実施した。SL-176 は2つのシリル基、デカヒドロナフタレン骨格およびカルボキシ基を有しており、2つのシリル基はその阻害活性に必須である (Fig. 1)。近年、シリル基などケイ素を有する化合物が医薬品開発において注目され始めている。今回、SL-176 のカルボキシ基を種々の官能基に置換した SL アナログを用いて、PPM1D 阻害効果の解析を実施した。その結果、SL-176 と比較して、PPM1D を過剰発現しているヒト乳がん細胞やヒト肺がん細胞など種々のがん細胞の増殖をより強力に抑制する新規 SL アナログ SL-183 を見出した。興味深いことに、抗がん剤に抵抗性を示すヒト神経膠芽腫細胞において、得られた新規 SL アナログ SL-183 は極めて強力な細胞増殖抑制効果を示すことが明らかとなった。さらに、ヒト神経膠芽腫の抗がん剤であるテモゾロミドと SL-176 を共投与した結果、SL-176 がテモゾロミドの抗がん作用を増強することが見出された。本研究は、さらに強力な PPM1D 阻害剤の開発の上で重要であり、SL-176 をリード化合物とした抗がん剤開発につながることを期待される。

【参考文献】

- 1) Ogasawara S., Kiyota Y., Chuman Y., Kowata A., Yoshimura F., Tanino K., Kamada R., Sakaguchi K., (2015) *Bioorg. Med. Chem.*, 23, 6246-6249.
- 2) Kamada R., Uno S., Kimura N., Yoshimura F., Tanino K., Sakaguchi K., (2022) *Int. J. Mol. Sci.*, 23, 12046.
- 3) Kamada R., Kudoh F., Yoshimura F., Tanino K., Sakaguchi K., (2017) *J. Biochem.*, 162, 303-308.
- 4) Milosevic J., Treis D., Fransson S., Gallo-Oller G., Sveinbjörnsson B., Eissler N., Tanino K., Sakaguchi K., Martinsson T., Wickström M., Kogner P., Johnsen JI., (2021) *Cancers (Basel)*, 13, 6042.

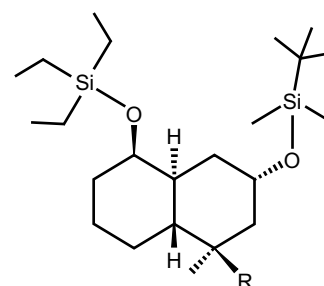


Fig. 1 : SL inhibitor の構造
(R = COOH; SL-176)

バクテリア由来ヒストン様タンパク質 HU を用いた DNA 高次構造体モデルの構築

氏名：○友池史明¹、荒矢夏美²、岡田哲二²（講演者の名前の前に○を付けてください。）

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】

DNA は細胞内で単純な紐状の分子として存在するのではなく、ヒストンをはじめとした他のタンパク質と相互作用することで、局所的に密度が異なる、いわば高次構造を形成していることが知られている。また、この高次構造が他のタンパク質との相互作用に影響することで遺伝子発現調節にも関わっていることが知られている。そのため、DNA がどのような高次構造をとれば、どのような機能を有するか、という構造機能相関について注目が集まっている。しかし、天然に存在する DNA の高次構造は、形成および調節にかかわる因子が多く、再現が難しいため、現状では構造機能相関を定量的に調べるのが難しい。そこで、シンプルな要素からなる DNA の高次構造作成法を確立すれば、様々な形の高次構造が用意でき、DNA の高次構造と機能の相関を調べる基盤となるのではないかと考えた。具体的には、調製が容易であり、DNA と混合するのみで複合体を形成するバクテリア由来のヒストン様タンパク質 HU にビオチンを提示させ、四量体で働くストレプトアビジンと混合することで高次構造体の形成を試みた。

ヒストン様タンパク質 HU の DNA 結合位置から遠い箇所に変異 PCR でシステインを導入した後、HU を大腸菌で発現させ、ヘパリン樹脂およびニッケル担体によるアフィニティークロマトグラフィーによって精製した。精製したシステイン導入 HU と Biotin-PEAC5-Maleimide を混合してシステイン残基と Maleimide を反応させて共有結合を形成させることで、ビオチン提示型 HU を調製した。ビオチン提示 HU の収率は、エルマン試薬と反応させて残留システイン量を定量化することで評価し、ほぼビオチン提示型 HU がほぼ 100% の収率で得られるよう条件を最適化した。高次構造体の評価は、アガロースゲル電気泳動での移動度を比較するとともに、制限酵素の反応収率を測定することで行った。

精製したシステイン導入型 HU と Biotin-PEAC5-Maleimide の反応条件を最適化することで、ほぼ 100% がビオチンを提示した HU 試料を調製した。調製したビオチン提示型 HU と DNA を混合したところ、野生型 HU と同程度の親和性を示したことから、ビオチン提示によって DNA 親和性が損なわれなかったことを確認した。次にビオチン提示 HU とプラスミド DNA を混合し、アガロース電気泳動で解析した。その結果、環状 DNA とビオチン提示 HU、ストレプトアビジンを混合したものは、ストレプトアビジンを加えていないものに比べて、ゲル中の移動度が下がっていた。このことから、ストレプトアビジンによって、よりゲル中を流れにくい高次構造が形成されたことが示唆された。また、環状 DNA の代わりに直鎖上 DNA を用いた場合は、移動度の変化がみられなかった。このことから、ストレプトアビジンによって形成される高次構造は、DNA の形状に依存することが示唆された。環状 DNA、ビオチン提示 HU、ストレプトアビジンを混合したものを制限酵素で処理したところ、切断産物量は、ストレプトアビジン非存在下で反応させたものより少なかった。このことから、高次構造を形成することで DNA と他のタンパク質の相互作用が阻害されたことが示唆された。

以上の結果から、HU を修飾することで、DNA の高次構造体モデルが構築できたと考えられる。今後の計画として、小角散乱などの方法で粒子径を測定し、構造を評価する予定である。

Coiled-coil ペプチドの大腸菌増殖に対する促進効果

氏名：○上野康大¹、布川優奈¹、立井龍太郎²、中川夏美^{1,2}、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】

多量体形成は、生物が獲得した有力なストラテジーであり、標的分子に対する親和性および特異性の増強やアロステリック効果などにより、タンパク質機能の厳密な制御や拡張を実現している[1]。Coiled-coil (CC) は、複数の α -helix 鎖がコイル構造を形成する多量体化モチーフであり、応用性の高い多量体形成エレメントとして種々の生物活性ペプチドの多量体化に用いられてきた[2]。大腸菌は分子生物学におけるモデル生物であり、その生態に関する解析が行われている。*in vitro* における大腸菌の増殖は主としてその培地に依存しており、適切な栄養が豊富に存在するほど増殖が促進される。また、栄養が枯渇すると大腸菌の増殖速度が低下し、定常期となることが報告されている。

今回、CC ペプチドの大腸菌に対する興味深い生物活性について報告する。CC ペプチドとして、GCN-4 由来の並行 CC ペプチド CC(Mono), CC(Di), CC(Tri)を選択し、化学合成した (Fig. 1)。これら 3 種の CC について、大腸菌増殖に対する効果を最小栄養培地において解析した。非常に興味深いことに、すべての CC ペプチドが大腸菌増殖に対する促進能を有しており、さらに CC(Di)および CC(Tri)ペプチドは CC(Mono)ペプチドより強く増殖を促進することが明らかとなった。また、これら CC ペプチドに対し、当研究室で見出したマイルドな抗菌活性を有するペプチドを結合させたペプチドアナログを合成し、同様に大腸菌増殖に対する効果を解析した。その結果、単量体アナログは大腸菌の増殖を顕著に促進した一方、二量体アナログおよび三量体アナログはいずれも大腸菌増殖を顕著に抑制することが示された。以上より、CC ペプチドは大腸菌増殖を促進する一方、生物活性ペプチドを結合させたアナログは多量体状態に依存して活性を増強することが明らかとなった。今後は、CC ペプチド添加時における大腸菌形状変化の観察を実施する。また、抗生物質との共添加時における大腸菌増殖を解析する。

本研究により、CC ペプチドが大腸菌増殖に対する促進活性を有すること、その活性が多量体形成に依存することが示唆された。本現象の詳細を明らかとすることで、大腸菌増殖の機構解明につながるるとともに、生物活性ペプチドの機能制御において、CC を多量体形成エレメントかつ機能性ドメインとして選択することにより、多量体化生物活性ペプチドの活性のさらなる向上・最適化につながると期待される。

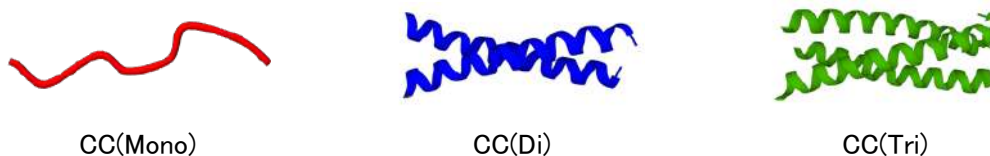


Fig. 1 各種 CC ペプチド

【参考文献】

- 1) Sakaguchi T., Janairo J. I. B., Lussier-Price M., Wada J., Omichinski J. G., and Sakaguchi K. (2017) Sci. Rep., 7, 1400.
- 2) Utterstrom J., Naeimipour S., Selegard R., and Aili D. (2021) Adv. Drug Deliv. Rev., 170, 26-43.

STAP-1 は B 細胞において CD40 シグナル伝達を制御する

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】

STAP-1(signal-transducing adaptor protein-1)はBRD1(BCR downstream signaling 1)としても知られ、B 細胞を始め種々の免疫系細胞に発現し、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¹⁻²⁾。B 細胞における STAP-1 の役割を再考すべく、野生型(WT)マウスおよび STAP-1 欠損(KO)マウスにおいて T 細胞依存性の抗体産生を誘導したところ、KO マウスにおいて抗体産生量及び、抗体を産生する直前の段階である胚中心 B 細胞数が有意に減少することが分かった。このことから、STAP-1 の胚中心 B 細胞形成への関与が示唆されたため、詳細なメカニズムを明らかにすることを目的とし本研究を行った。

まず初めに野生型(WT)及び STAP-1 欠損(KO)マウスにおいて、B 細胞の未成熟段階に差があるか、脾臓細胞を用いてフローサイトメトリー法によって検討を行った。その結果 WT と KO マウスにおいて有意な差は見られず、STAP-1 は B 細胞の成熟段階に関与することが示唆された。続いて、胚中心形成に必須なシグナルである CD40 シグナルに対して、STAP-1 の関与があるか確認した。尚、B 細胞表面における CD40 の発現に差は認められなかった。WT 及び STAP-1KO マウスの脾臓からナイーブ B 細胞を精製し、抗 CD40 抗体で刺激を行ったところ、CD40 シグナル下流伝達分子群である Akt、Erk、NF- κ B の活性化が减弱していることが分かった。以上の結果から、STAP-1 は B 細胞において CD40 シグナル伝達を制御していることが示唆された。

次に HEK293T 細胞を用いた過剰発現系により、STAP-1 による CD40 シグナル伝達制御の作用機序を解明した結果、STAP-1 は CD40 とその下流伝達分子である TRAF2 と相互作用することが明らかとなった。さらに CD40 と TRAF2 の結合が STAP-1 発現により増強されることが分かった。また、種々のヒト B 細胞株においても、STAP-1 と CD40、TRAF2 の相互作用が確認された。

最後に、抗体産生依存性疾患発症機構に対して STAP-1 が機能するか、WT 及び KO マウスにプリステン投与で全身性エリテマトーデス様症状を誘導することで検討した。その結果、KO マウスにおいて自己抗体産生や胚中心 B 細胞の有意な減少、及び腎障害の抑制が確認された。

以上のことから、STAP-1 は B 細胞において CD40 シグナル伝達を正に制御することで抗体産生を制御することが明らかとなり(図 1)、STAP-1 の人為的制御法を解明することは B 細胞過剰活性化を原因とする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) Kashiwakura J, Saitoh K, Ihara T, Sasaki Y, Kagohashi K, Enohara S, et al. (2020), PLoS ONE, 15:e0241440.
- 2) Toda J et al. (2020) Oncogene, 39:5601-5615.

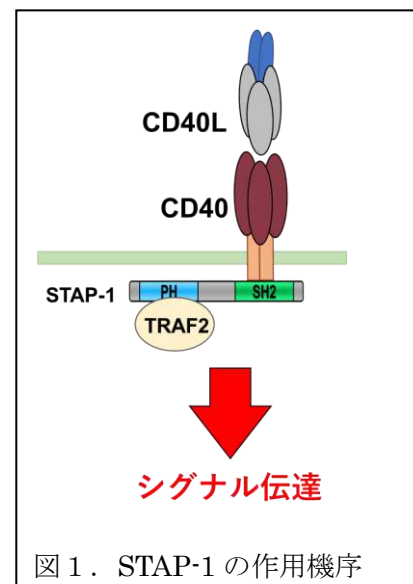


図 1. STAP-1 の作用機序

STAP-2 由来ペプチドによるがん細胞増殖・腫瘍形成阻害機構

氏名：○奥山文矢¹、前本大雅¹、鍛代悠一¹、織谷健司²、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・医学部・血液内科学

【要旨】細胞内シグナル伝達を制御するアダプタータンパク質の一つである Signal-transducing adaptor protein-2 (STAP-2) は、種々のがん遺伝子産物と相互作用し、がん細胞増殖や転移に関与することが知られている。特に、がんの増殖スイッチとなる上皮成長因子受容体 (EGFR) と直接結合し、その分解を抑制することにより、がん細胞増殖を促進する。そこで、STAP-2 と EGFR の結合領域を解析し、両者の結合を阻害するペプチドを検索し、がん細胞の細胞増殖や生体内腫瘍形成、EGFR のシグナル伝達における役割を検討した。

まず、グルタチオン-セファロースによる沈降反応により、N 末端 PH ドメインで EGFR と結合することを明らかにした。これにより、合成ペプチドを設計し、前立腺がん細胞株 DU145 の細胞増殖への影響を解析し、STAP-2 由来 2D5 ペプチド (2D5) を同定した。2D5 は EGFR 発現を示すヒト前立腺がん、肺がん、乳がんなど種々の上皮系がんに対して細胞増殖抑制活性を示した。また、2D5 はヒト前立腺がんにおいて EGF 刺激で誘導される EGFR, ERK, STAT3 のリン酸化並びに EGFR 下流遺伝子群の発現を抑制した。さらに、免疫不全ヌードマウスにおけるこれらがん細胞による腫瘍形成は 2D5 投与により抑制された。

これらの結果から、STAP-2 由来ペプチド 2D5 は EGFR 依存的なシグナル阻害により、がん増殖を抑制することが示唆された (図 1)。ペプチド創薬における新規分子として、2D5 のさらなる最適化や化学修飾により、新規がん治療薬の開発が進むことが期待される。

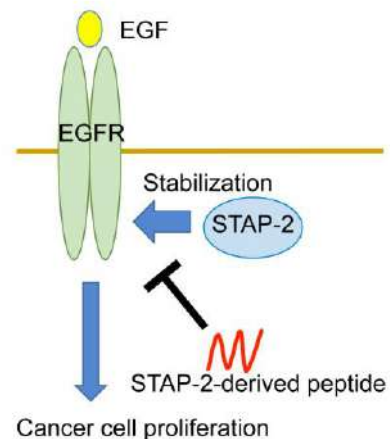


図1 STAP-2由来ペプチドによるがん細胞増殖阻害

【参考文献】

- 1) Ikeda O., Sekine Y., Yasui T., et al. (2008) Mol. Cell. Biol., 28, 5027-5042.
- 2) Ikeda O., Sekine Y., Mizushima A., et al. (2010) J. Biol. Chem., 285, 38093-38103.
- 3) Ikeda O., Mizushima A., Sekine Y., et al. (2011) Cancer Sci., 102, 756-761.
- 4) Sekine Y., Ikeda O., Mizushima A., et al. (2012) Oncogene, 31, 4384-4396.
- 5) Sekine Y., Togi S., Muromoto R., et al. (2015) J. Biol. Chem., 290, 17462-17473.
- 6) Kitai Y., Iwakami M., Saitoh K., et al. (2017) J. Biol. Chem. 292:19392-19399.
- 7) Matsuda T., and Oritani K. (2021) Biol. Pharm. Bull., 44, 1810-1818.

NEDD 化阻害は非免疫細胞における Regnase-1 切断を惹起する

氏名：○庾庭馳、小森雄喜、室本竜太、松田正

所属：北海道大学・大学院薬学研究院・衛生化学研究室

【要旨】

mRNA 分解酵素 Regnase-1 は炎症性サイトカイン等の mRNA を標的として分解することで免疫/炎症応答を負に調節する。一方、細胞活性化等に伴う Regnase-1 の一時的不活化は特定遺伝子を適時に発現させる機構として重要である。Regnase-1 の酵素活性はリン酸化やユビキチン化などの翻訳後修飾を直接受けることで調節されるが未解明点も多い。本研究では、ユビキチン様タンパク質 NEDD8 による翻訳後修飾である NEEDD 化が細胞内の Regnase-1 活性調節に関与する可能性を考え、その検証を目的とした。

Regnase-1 分解標的である $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ mRNA の 3'非翻訳領域をルシフェラーゼ遺伝子の下流に連結したレポーターによる Regnase-1 不活化 (mRNA 安定化) 発光計測系を用いサイトカイン IL-17 添加、NEEDD 化阻害剤 Pevonedistat (MLN4924)、NEDD8 siRNA、NEDD8 過剰発現等の影響を調べた。Regnase-1 タンパク質はウエスタンブロット法で解析した。Pevonedistat による Regnase-1 分子量変化への MALT1 阻害剤 Mepazine の影響を調べた。

IL-17 誘導性の Regnase-1 不活化 (mRNA 安定化) 反応は NEDD8 過剰発現により抑制され、NEEDD 化阻害剤 Pevonedistat 添加により増強された。NEDD8 を過剰発現時に Regnase-1 に直接の NEDD8 共有結合付加は認められなかった。興味深いことに Pevonedistat は Regnase-1 タンパクの低分子側への分子量変化を起こし、その変化はパラカスパーゼ MALT1 の阻害剤により抑制された (図 1)。MALT1 による切断部位 (R111) の点変異体である Regnase-1 R111A は Pevonedistat 処理下の分子量変化が消失した (図 2)。siRNA 導入による内在性 NEDD8 のノックダウン下にも Regnase-1 切断が認められた。免疫沈降実験から Pevonedistat 処理が MALT1-BCL10 複合体形成を促進することが示された。合成基質 Ac-LRSR-MCA を用いた蛍光測定実験から Pevonedistat 処理が MALT1 の酵素活性化を起こすことが示された。以上の結果から、細胞内で起こっている恒常的 NEDD 化反応が阻害されると MALT1 活性化を介して部位特異的 Regnase-1 切断が起こる、新規分子機構の存在が示唆された。

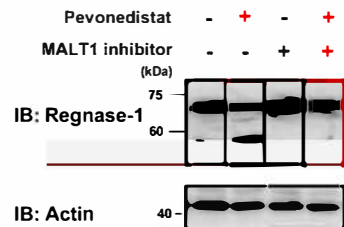


図1 MALT1阻害がPevonedistatによる Regnase-1切断に対する影響

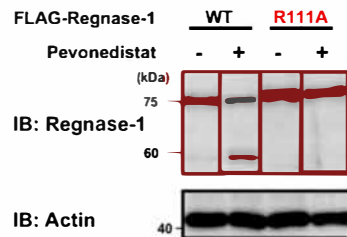


図2 Regnase-1 R111AはPevonedistat 処理により切断されない

癌細胞中での小胞体局在酵素による Wnt3a 成熟機構の解明

氏名：○梁井史織¹、太田悠介²、野村尚生^{1,2}、前仲勝実^{1,2}

所属：¹北海道大学・大学院生命科学院・創薬科学研究教育センター、

²北海道大学・大学院薬学研究院

【要旨】

癌幹細胞 (CSC) は癌の再発や転移の原因になり、高い薬剤排泄能など癌の悪性化に関連する様々な性質を有するため、CSC を標的とした創薬や治療を目指した CSC の性質解明が行われている。我々が着目するタンパク質 Endoplasmic reticulum oxidoreductin-1 alpha (ERO1 α) は小胞体に局在する酵素であり、癌細胞と CSC で過剰発現することが知られている。ERO1 α の主な機能は、酵素 Protein disulfide isomerase (PDI) を酸化型へと戻す酸化還元反応の触媒である。PDI は、自身が酸化型から還元型へと変化する過程で他のタンパク質へジスルフィド結合を受け渡し、タンパク質の折りたたみを促進する。よって、ERO1 α により PDI は持続的に他のタンパク質へのジスルフィド結合供給を行うことができる。CSC で重要な役割を果たすタンパク質の一つに Wnt がある。Wnt は細胞の分化や増殖に関与する分泌型のシグナル伝達タンパク質であり、癌細胞や CSC での過剰発現が報告されている。Wnt- β カテニン経路を駆動する Wnt3a は、11 か所ものジスルフィド結合の間に、分泌時に認識されるパルミトイル化部位と 2 か所の糖鎖修飾部位を有していることから、ジスルフィド結合形成が分泌の過程で重要になることが推測される。以上の点から、癌および CSC で過剰発現している ERO1 α が、PDI を介したタンパク質折りたたみを促進し、Wnt の折りたたみと翻訳後修飾から成る成熟過程に影響を及ぼすのではないかと考えた (図 1)。そこで、ERO1 α 発現量の異なる癌細胞株を作製し、Wnt 経路に関連する性質を評価した。Wnt 経路下流のアルデヒド脱水素酵素は、ERO1 α 発現量の減少に伴って活性が低下した。凍結融解または Whole cell lysate の抽出サンプルをウエスタンブロッティング法により評価すると、還元条件では Wnt3a の発現量に差異がなかったものの、非還元条件では、細胞質画分を抽出した凍結融解サンプルにおいて、ERO1 α 発現量の低下に伴って Wnt3a のバンド強度が減弱した。以上から、ERO1 α が Wnt3a の折りたたみに寄与し、活性型の Wnt 発現量に関与している可能性が示唆された。

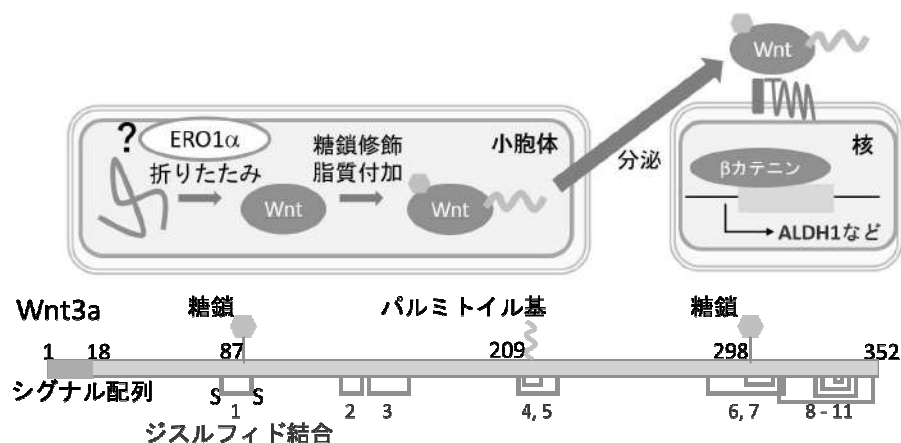


図 1 : Wnt の分泌過程と Wnt3a のジスルフィド結合・翻訳後修飾位置を示した模式図
ジスルフィド結合の間に修飾部位が存在することから、成熟過程の初めに生じる折りたたみが重要であると考え、タンパク質折りたたみを促進する ERO1 α -PDI 経路との関連に着目した。

[ポスター] P9

狂犬病ウイルス P タンパク質による STAT 特異的な阻害機構の解明に向けて

氏名： ○武川祐一郎¹、南未来²、杉山葵²、姚関^{2,3}、尾瀬農之^{2,3}

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

³北海道大学大学院先端生命科学研究院

【要旨】

狂犬病は狂犬病ウイルス(RV)によって引き起こされる人獣共通感染症である。治療法は存在せず、致死率は100%である。ワクチンによって予防できるが、発展途上国を中心に未だに年間約6万人の死者が発生しており、治療法や安価なワクチンの開発が強く望まれている^[1]。

RVは五種類のタンパク質から成り、その一つとしてPタンパク質が知られている。RVはPタンパク質C末端ドメイン(RVPCTD)を用いて宿主JAK-STAT経路を阻害し、免疫を回避する^[2]。

JAK-STAT経路はシグナル伝達経路の一種である。サイトカインが受容体に結合することで、JAKというチロシンキナーゼによって細胞質内のSTATの特異的なチロシンがリン酸化され、STAT二量体が形成される。STATは二量体を形成すると核内に移行し、標的遺伝子上流のプロモーターのある配列に結合することでその遺伝子の転写を促進する。

STATは、ヒトの場合はSTAT1から6まで存在し、二量体も複数存在する。RVPCTDはその中でもSTAT1/1二量体、1/2二量体、1/3二量体を阻害する(右図)^[3]。一方で、3/3二量体は阻害しないことも知られている^[3]。本研究は組換えタンパク質の発現および精製により、RVPCTDによるSTAT特異的な阻害機構の解明を目的とする。私は特に1/3二量体に着目している。



本発表では1/3二量体の精製に成功したことを報告する。STAT1および3を大腸菌内で共発現させて1/3二量体の過剰発現を行い、続けて液体クロマトグラフィーによって1/3二量体の精製を行った。この際、1/1二量体および3/3二量体も存在するが、二つの戦略によって1/3二量体の精製を可能にした。一つ目は、二つの異なるアフィニティータグの使用である。STAT1およびSTAT3に別種の精製タグを付けて発現させ、それぞれのタグについて二段階のアフィニティークロマトグラフィーを行うことで1/3二量体のみを取り出した。二つ目の戦略は、変異の導入による四量体の消失である。STATはN末端ドメイン同士による相互作用でも二量体を形成し、pYSTATは実際には四量体として存在する。しかし、1/3二量体とホモ二量体で四量体を形成すると、先ほどの戦略を用いても1/3二量体のみを精製することは不可能である。そこで、私は既知の構造解析に基づいてN末端ドメインに変異を入れて、四量体を形成できないSTAT1および3を用いた。なお、全長のSTATヘテロダイマーの精製はこれまで報告されておらず、今回の1/3ダイマーが世界で初めての精製例である。

今後は、①発現系および精製法の最適化、②1/3二量体の性質の評価(マスマスフォトメトリーやSEC-MALSによる分子量の決定、ウェスタンブロッティングによるリン酸化状態の決定など)、③FPによる相互作用解析、④クライオ電顕による複合体の構造解析を行う。本研究は、狂犬病の知見を深めるというだけでなく、機能不明な点も多いSTATヘテロ二量体の精製法の確立という意義も含まれる。

【参考文献】

- [1] WHO Expert Consultation on Rabies: second report. (2013)
- [2] Vidy A. et al., *J. Virol.*, **79**, 22, 14411–14420 (2005)
- [3] Harrison A. R. et al., *J. Virol.*, **94**, 22, e00856-20 (2020)

狂犬病ウイルスPタンパク質による STAT1 阻害機構の解明

氏名：○南未来¹、杉山葵¹、武川祐一郎¹、姚閔¹、廣瀬未果²、喜多俊介³、前仲勝実³、杉田征彦⁴、尾瀬農之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大阪大学・蛋白質研究所・電子線構造生物学研究室
³北海道大学・大学院薬学研究院・生体分子機能研究室
⁴京都大学・医生物学研究所・微細構造ウイルス学分野

【要旨】

狂犬病は狂犬病ウイルスによって引き起こされる人獣共通感染症であり、アジアやアフリカを中心に毎年 6 万人もの死者を出している。発症後の致死率はほぼ 100%であり、治療薬の開発が望まれている。ヒトはウイルスに感染すると、免疫経路である JAK-STAT 経路を活性化し、ウイルスを排除する。具体的にはウイルス感染細胞によって産生された IFN を他の細胞の受容体が認識し、受容体の下流に位置する JAK のリン酸化を通して、転写因子である複数種の STAT をリン酸化する。リン酸化された STAT(pYSTAT)はホモあるいはヘテロ二量体形成し、各 pYSTAT 二量体の種類に応じて多様な抗ウイルス遺伝子を発現する。一方、RABV の P 蛋白質の C 末端ドメイン(RVP CTD)は STAT と相互作用することで、3 つの pYSTAT 二量体(pYSTAT1, pYSTAT1/2, pYSTAT1/3)によって転写される抗ウイルス遺伝子の発現を阻害する¹⁾²⁾。しかし、RVP CTD がどのように STAT を識別し、阻害するのか詳細な阻害機構は不明である。

そこで本研究では、RVP CTD による STAT1 阻害機構を分子レベルで明らかにすることを目的とした。多くの先行研究では pYSTAT は二量体として説明されてきた。しかし、STAT は N 末端ドメイン同士が相互作用し、生体内で四量体を形成することを考慮する必要がある。本発表では STAT1 の四量体形成に着目して行った STAT1 と RVP CTD の相互作用解析、構造解析の結果について報告する。

【参考文献】

- 1)Vidy A. et al., J. Virol., 79, 22, 14411–14420 (2005)
- 2) Harrison A. R. et al., J. Virol., 94, 22, e00856-20 (2020)

[ポスター]

アダプター蛋白質介在に伴う、乳がん特異的キナーゼの活性亢進評価

氏名：○武井梓穂¹, 宇賀神魁¹, 中迫純希¹, 松尾友樹², 神田諒², 松田正², 前仲勝実²,
姚関^{1,3}, 尾瀬農之^{1,3}

所属：¹北海道大学 大学院 生命科学院 ²北海道大学 大学院 薬学研究院
³北海道大学 大学院 先端生命科学研究院

【要旨】

乳がんは日本人女性で最も罹患率の高い悪性腫瘍である。その罹患率、死亡率は年々増加傾向にあり、幅広く盛んな研究が求められている。本研究では特に、乳がん細胞の増殖プロセスに着目した。

乳がん特異的キナーゼ(Brk)は浸潤性乳管がん細胞にて過剰発現する非受容体型チロシンキナーゼである。Brkは細胞増殖を担う転写因子のSTAT3, STAT5をリン酸化することで、乳がん細胞の異常増殖に深く関与する¹⁾(図1 a)。

一方、アダプター蛋白質 STAP-2は、何らかの分子機構でBrkのSTATリン酸化活性を亢進するユニークな蛋白質であり、乳がん細胞の増悪化に重要である²⁾ことが細胞生物学実験によって示された(図1 b)。しかし、両者間の相互作用の詳細は不明である。そこで本研究は、STAP-2介在に伴うBrkのSTAT活性化亢進機構を分子レベルで解明し、乳がん増悪化の新たな分子機構を提唱することを研究目的としている。

本発表では以下4点についてポスター発表を行う。1. 組換え蛋白質の精製方法確立及び性状評価 2. STAP-2介在に伴うBrkのSTATリン酸化亢進の直接観測 3. Brk/STAP-2間の相互作用解析 4. Brk/STAP-2複合体の粒子径計測および負染色電顕による観察

まずBrk, STAP-2の組換え蛋白質の発現・精製系を構築した。SEC-MALSによる絶対分子量解析の結果、溶液中で両蛋白質は単量体で存在した。次に精製蛋白質を用い、STAP-2介在に伴うBrkのSTATリン酸化亢進の直接観測を行った。リン酸化チロシン抗体を用いたウェスタンブロットの結果、細胞を用いた先行研究の通り、STAT3, STAT5aに対するリン酸化亢進が示され、STAP-2介在に伴うSTATリン酸化亢進は、3者による直接の相互作用に起因することを明らかとした。SPR法によりBrk/STAP-2間の相互作用パラメータを算出することに成功し、両者は直接相互作用する複合体を形成することがわかった。Brk/STAP-2複合体の粒子径をDLSにて計測したところ、複合体は予想外にも1,000nmを超える巨大粒子を形成することがわかり、この粒子の直接観測に負染色電顕にて成功した。以上の結果から、Brk/STAP-2複合体が形成する巨大複合体が、リン酸化反応の反応場として機能している点について議論したい。

【参考文献】

- 1) Llor X et al. Clin Cancer Res 1999, 5:1767
- 2) Ikeda, O. et al., J Biol Chem, 2010; 285: 093– 103.

図1 本研究で着目する乳がん細胞増殖機構

