

2010年度合同シンポジウム

多彩な視点から迫る

いのち  
生命をつなぐメカニズム

要旨集

共 催： 日本生化学会北海道支部  
日本生物物理学会北海道支部  
北海道分子生物研究会

日 時： 2010年11月19日(金) 13:00~17:30

場 所： 北海道大学 工学部B1棟2階 オープンホール

**プログラム** 場 所：北海道大学 工学部B1棟2階 オープンホール

日 時：2009年11月19日(金) 13時より

13:00~13:05 開会の辞 松田 正 (北大院 薬学研究院)

13:05~13:45

演 者：**尾瀬 農之** (北海道大学・大学院薬学研究院・生体分子機能学研究室)

演 題：「ウイルス感染の構造生物学」

座長：坂井 直樹 (北海道大学・先端生命科学研究院・自然免疫研究室)

13:45~14:25

演 者：**櫻沢 繁** (公立ほこだて未来大学・システム情報科学部・複雑系知能学科)

演 題：「インビトロ運動再構成系における3D運動からみたアクチン-HMM相互作用」

座長：水谷 武臣 (北大院 先端生命科学研究院 細胞ダイナミクス科学研究室)

14:25~15:05

演 者：**大橋 俊朗** (北海道大学・大学院工学研究院・人間機械システムデザイン部門)

演 題：「細胞の構造原理と力学応答現象」

座長：芳賀 永 (北大院 先端生命科学研究院 細胞ダイナミクス科学研究室)

————— 15:05~15:25 休憩 —————

15:25~16:05

演 者：**藤田 恭之** (北海道大学・遺伝子病制御研究所・分子腫瘍分野)

演 題：「正常上皮細胞と変異細胞の相互作用—新規の癌治療を目指して—」

座長：芳賀 永 (北大院 先端生命科学研究院 細胞ダイナミクス科学研究室)

16:05~16:45

演 者：**北村 朗** (北海道大学・大学院先端生命科学研究院・細胞機能科学研究室)

演 題：「蛍光分光イメージングを用いた神経変性疾患解明へのアプローチ」

座長：松田 知己 (北海道大学・電子科学研究所・ナノシステム生理学)

16:45~17:25

演 者：**黒岩 麻里** (北海道大学・生命科学院・動物染色体研究室)

演 題：「Y染色体の進化—消失か？存続か？—」

座長：大場 雄介 (北海道大学・大学院医学研究科・病態医科学分野)

シンポジウム終了後 (17:30~19:00)、演者の先生を囲んで懇親会を予定していますので、奮ってご参加ください。

会場：**北大生協工学部食堂**; 会費：一般1000円、学生500円

## ウイルス感染の構造生物学（細胞侵入に関わる蛋白質の解析）

尾瀬農之・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）

脂質二重層より構成される“envelope”を持つウイルスの感染が成立するためには、宿主細胞膜との膜融合過程を経なければならない。膜融合はエネルギー的には有利な反応ではあるが、遷移状態へと至るエネルギー障壁を乗り越える必要がある。活性化エネルギーを下げるための膜融合剤(fusogen)として、ウイルスの場合にはコンフォメーション変化を伴う融合蛋白質が利用される。構造生物学によりウイルス感染のための膜融合現象を可視化する試みは、1981年のインフルエンザヘマグルチニン(HA)の結晶構造解析（SkehelとWileyら）という先導的研究により扉が開かれた。さらにSkehelとWileyは、エンドソームの成熟に伴うpH変化を巧妙に利用したHAの構造変化を捉え、膜融合メカニズムを説明することが可能となった。ウイルスfusogenとなる蛋白質は、そのトポロジーよりクラスI-IIIに分類することができ、それぞれのクラスにおいて詳細な膜融合のモデルが提唱されている。

私たちの研究室では、麻疹ウイルス、単純ヘルペスウイルスおよびインフルエンザウイルスの細胞侵入に関わる蛋白質に関して構造生物学的な研究を進めてきた。麻疹ウイルスの宿主侵入には、エンベロープ蛋白質であるhemagglutinin (H)蛋白質とfusion (F)蛋白質が関わっている。F蛋白質はクラスIに属する蛋白質であり、H蛋白質と宿主細胞上の受容体が結合することが引き金となってF蛋白質の構造変化が誘起され、膜融合に至ると考えられている。H蛋白質の受容体として、免疫系細胞に発現しているsignaling lymphocyte molecule (SLAM; CD150)が同定されているが、私たちはH蛋白質とSLAMとの複合体結晶構造解析に成功した。立体構造からは、受容体の認識、抗体による中和および膜融合に対する多くの知見が得られた。一方、単純ヘルペスウイルス1型(herpes simplex virus type 1; HSV-1)の感染に必要なエンベロープ蛋白質のひとつであるglycoprotein B(gB; クラスIII)は、ペア型レセプターを構成する抑制型PILR $\alpha$ を受容体として利用することが最近明らかになった。gBとPILR $\alpha$ 間の相互作用を具体的に検証するために、PILR $\alpha$ の細胞外領域を調製し、gBの一部を抽出したシアル酸結合ペプチドとの表面プラズモン共鳴による相互作用解析、及び複合体結晶構造解析に成功した。PILR $\alpha$ の立体構造はSialoadhesinをはじめとするSiglecファミリーと類似していることが明らかになった。Siglecファミリーはシアル酸特異的に結合するレクチンの一種で、全てのSiglecファミリーには、シアル酸認識に必須のArg(Essential R)が保存されている。複合体構造からはPILR $\alpha$ がgBの糖とペプチドを同時に認識しており、その認識には大きな構造変化が伴うことが明らかになった。これらの構造基盤より、PILR $\alpha$ を介した侵入機構を考察したい。さらに時間が許せば、インフルエンザHAのコンフォメーション変化阻害剤を探索する試みも紹介したい。

# インビトロ運動再構成系における 3D 運動からみた

## アクチン-HMM 相互作用

櫻沢 繁 (公立はこだて未来大学 システム情報科学部 複雑系知能学科)

アクトミオシン系の分子運動を直接観察する方法としてインビトロモティリティアッセイ系が知られている。一方、一分子観察に利用されるエバネッセント光はガラス表面から離れるに従って指数関数的に減衰する性質を使うことで、ガラス表面から蛍光標識までの距離をその蛍光強度から読み取ることが可能となる。我々はインビトロモティリティアッセイ系にエバネッセント照明顕鏡法を組み合わせることにより、ミオシン (HMM) と相互作用しながら運動するアクチンの様子をナノスケールかつ三次元で観測することに成功した。

スライドガラス上に一様に散布された HMM の上を、まだら状に蛍光標識したアクチン繊維が滑り運動する様子をエバネッセント顕微鏡で観察すると、細かく明滅しながら運動する様子がみられた。蛍光標識の蛍光強度を画像解析により求め、高さ方向の移動距離に変換したところ、アクチンは運動中のほとんどの間、HMM の届かない高さに存在し、時々 HMM の頭部の高さまで降下することがわかった (図 1)。また、ATP 非存在下では、ほぼ HMM の頭部の高さで留まり続けた。また、同一のアクチン繊維中にある複数の標識について、運動中に降下する位置を比較すると空間的相関が高かった。これらのことから、運動中にしばしばみられる HMM の頭部の高さへの降下は、アクチン繊維と HMM との相互作用を示しているものと考えられる。その降下の頻度は非常に疎らであることから、アクチン繊維と HMM との相互作用も疎らであると考えられる。これらのことから、アクチン繊維は ATP を分解した HMM からエネルギーを受け取り、そのエネルギーで能動的に動いている可能性が示唆される。

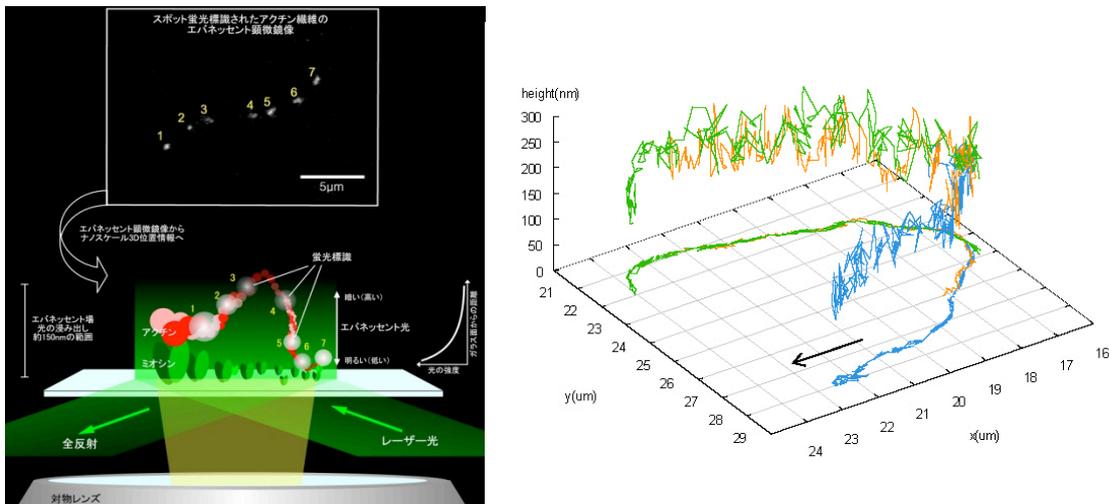


図 1. エバネッセント光を用いたアクチンの 3 次元運動の観察

## 細胞の構造原理と力学応答現象

大橋 俊朗（北海道大学 大学院工学研究院 人間機械システムデザイン部門）

血管内皮細胞は流れを負荷すると流れの方向に伸長・配向することが知られている。さらに、アクチンフィラメントの太い束であるストレスファイバを流れ方向に発達させる。これは内皮細胞の力学的適応現象であると考えられる。実際に流れ負荷前後で内皮細胞の形態および力学特性を原子間力顕微鏡で測定すると、流れ負荷後に内皮細胞は高さを減少させ弾性率を増加させることがわかった。細胞内応力分布を計算すると流れ負荷後は細胞内応力集中を緩和するようにリモデリングを行っていることが推察された。

接着細胞は焦点接着斑と細胞外マトリックスの結合によって接着している。このとき細胞は基質を細胞中心方向に引っ張る牽引力を発生している。したがって、細胞内の力学環境と細胞の機能に密接な関係があることを考えると、これらの力を測定することは細胞の生理・病理を理解する上で重要である。そこで、微細加工およびソフトリソグラフィ技術を用いてPDMSのマイクロピラー（直径  $3\ \mu\text{m}$ 、高さ  $10\ \mu\text{m}$ 、中心間距離  $8\ \mu\text{m}$ ）を有する細胞培養基質膜を作製し平滑筋細胞の牽引力を推定した。細胞培養後、マイクロピラーのたわみ量とマイクロピラーのバネ定数から牽引力を算出した結果、牽引力の平均値は約  $12\ \text{nN}$  であり細胞周辺部において牽引力は大きい傾向が見られた。また、別途行った顕微鏡下でのストレスファイバの引張試験より、ストレスファイバに発生している生理的張力は  $10\ \text{nN}$  程度のオーダーであり牽引力と同程度であった。すなわち、牽引力の発生源はストレスファイバの収縮力であることが理解できた。以上の研究から、細胞内部は特有の力学環境を有しており、外部の力学環境に適応するように内部の力学環境を変化させることが示唆された。

## 正常上皮細胞と変異細胞の相互作用—新規癌治療法の開発を目指して— 藤田恭之（北海道大学 遺伝子病制御研究所 分子腫瘍分野）

現在の癌治療研究の潮流は、癌細胞と正常細胞の細胞内シグナルの違いを明らかにし、その差異をターゲットにして癌細胞を特異的に攻撃するというものである。しかし、それらの研究で、癌は正常な細胞から起こり、正常な細胞に囲まれながら増えていくという「癌の社会性」についてはあまり顧みられることはなかった。癌細胞と周りの正常細胞はお互いの存在を認識できるのだろうか？また、両者は何か作用を及ぼし合うのだろうか？

私の研究室では、新たに確立した培養細胞系を用い、正常上皮細胞と様々なタイプの変異細胞との境界で起こる現象を解析してきた。非常に面白いことに、癌遺伝子 Src 変異細胞や Ras 変異細胞が正常細胞に囲まれると、変異細胞内の様々なシグナル伝達が活性化され、正常上皮細胞層からはじき出されるように管腔側（体内への浸潤とは逆方向）へと排出されることが観察された (Hogan et al., *Nature Cell Biology*, 2009; Kajita et al., *Journal of Cell Science*, 2010)。またある種の癌抑制遺伝子変異細胞は正常細胞に囲まれるとアポトーシスを起こし体外へと失われていくことも明らかとなった (Tamori et al., *PLoS Biology*, 2010)。これらの現象は変異細胞のみを培養した時には見られないことから、周囲の正常細胞の存在が、変異細胞のシグナル伝達や性状に大きな影響を与えていることを示している。これらの我々の研究は非常に新規なものであり、現在多くの研究者たちの注目を集めている (*Nature*, Research Highlight, 2010, vol 463; *Nature Review in Cancer*, Research Highlight, 2010, vol 10 など)。

今回の講演では、これらの最近の知見を紹介すると共に、これらの研究における今後の課題は何か、またどのように新規の癌治療法や癌検出方法の開発につながっていく可能性があるのかについて論述する。

## 蛍光分光イメージングを用いた神経変性疾患解明へのアプローチ

北村 朗 (北海道大学 大学院先端生命科学研究院 細胞機能科学研究室)

SOD1 (Superoxide dismutase 1)は、常染色体優性遺伝する筋萎縮性側索硬化症(familial ALS; fALS)の原因遺伝子の一つとして知られている。変異型 SOD1 を発現する細胞内では、タンパク質の異常凝集が見られるが、その詳細は未解明のままである。そこで、タンパク質の凝集体形成機構と細胞毒性の関係を解析するためのモデルタンパク質として、この変異 SOD1 に着目した。

G85R 変異型 SOD1 を発現する HeLa 細胞に Proteasome 阻害剤である MG-132 を処理させると、Aggresome と呼ばれる、変性したタンパク質を含む封入体構造が細胞内の中心体近傍に形成される。一度形成させた Aggresome は、Proteasome の活性回復と共に消失するが、変異型 SOD1 も Aggresome と共に消失することを Time-lapse 蛍光顕微鏡観察によって示した。

この Aggresome 形成・消失過程において、変異型 SOD1 タンパク質がどのような会合状態を形成しているかを詳細に解析するため、Fluorescence Correlation Spectroscopy (FCS), Förster Resonance Energy Transfer (FRET), Monomeric photoactivatable green fluorescent protein (mPAGFP)などの蛍光分光イメージングの手法・材料を用いて解析を行った。

SOD1-G85R-mPAGFP は、Cytosol と Aggresome の間をゆっくり交換反応しており、Proteasome の活性が維持されている時よりも阻害されているときほうが、交換反応が遅いことが判明した。このことは、Aggresome への変性タンパク質を局在させる輸送機構が Proteasome 活性に依存していることを示している。

次に、微小な観察領域中を蛍光分子が動く速度を測定することで、分子の大きさを定量的に求めることができる手法である FCS を用いて、変異型 SOD1 はオリゴマーを介して凝集し、さらに Proteasome の活性が回復するとともにこれらのオリゴマーは消失することを明らかにした。

FRET は、蛍光分子間の距離および立体配座を検出することができる手法であるが、一般的分子間 FRET は分子内 FRET よりも効率が低く、検出しにくいことが多い。これを解決するため、弱い FRET 効率を定量的に検出できる Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy (FLIM)を用いることにした。FLIM を用いて変異型 SOD1 タンパク質間の会合状態を解析したところ、Proteasome 活性が阻害されるとまず Cytosol で変異型 SOD1 タンパク質の会合が起こり、Aggresome へ移行することがわかった。次に、Proteasome 活性を回復させると、Cytosol における変異型 SOD1 分子間の FRET 効率が低下していったが、興味深いことに Aggresome 内部の変異型 SOD1 分子間の FRET 効率もおだやかに低下していくことがわかった。このことは、Aggresome に存在する SOD1 タンパク質がその場で分解されて消失するのではなく、脱凝集を伴いながら少しずつ脱離させる機構が細胞内に存在することを示唆するものである。

さらに驚くべきことに、変異型 SOD1 が凝集していく過程よりも脱凝集する過程において細胞死がより多く引き起こされることを見出した。以上のことから、変異型 SOD1 の凝集体は aggresome に隔離されることにより細胞死を回避させている可能性と、脱凝集過程に生成された産物が細胞機能に悪影響を与えて細胞毒性を増加させている可能性が考えられた。このことは、タンパク質凝集と神経細胞死の関係を結び付ける新たな知見であり、今後の fALS 治療戦略にも寄与する成果であると考えられる。

- [参考文献]
- Kitamura A. et al. Nat. Cell Biol. 8, 1163-1170 (2006)
  - Kitamura A. et al. FEBS J. 277, 1369-1379 (2010)
  - Hirayama S. et al. Mol. Biol. Cell 19, 899-911 (2008)

## Y染色体の進化—消失か？存続か？—

黒岩 麻里（北海道大学 大学院理学研究院 動物染色体研究室）

我々ヒトを含め、哺乳類はXX/XY型の性染色体をもつ。性染色体は元々一対の常染色体であったと考えられており、現在のY染色体にあたる側に決失が繰り返され、長い進化の年月を経てY染色体は矮小化していった。近年、ヒトの全ゲノム配列の解読がすすみ、X染色体上には約1,100個の機能遺伝子が連鎖している一方で、Y染色体には80個ほどの遺伝子しかなく、遺伝子の重複を除くとたったの30種類しか残されていないことがわかってきた。残された約30種類の遺伝子の多くは、精子形成や精巣発達などの男性に必須な機能を担うようになり、まさしく少数精鋭の男性のための遺伝子へと進化していった。しかし、Y染色体がこのまま矮小化の一途をたどるとすれば、およそ1400万年後にはY染色体がなくなるにより男性がいなくなり、ひいては人類が絶滅してしまうという説がある(Aitken & Graves, *Nature*, 2002; Graves, *Cell*, 2004)。私たちのY染色体は、このような進化の道をたどるのであるか？

私は、すでにY染色体を消失してしまった大変珍しい哺乳類、トゲネズミを用いて、Y染色体の進化研究を行っている。トゲネズミ属(*Tokudaia*)は三種から構成され、1972年より国の天然記念物に指定されている。沖縄島に生息するオキナワトゲネズミ(*Tokudaia muenninki*)は、一般的な哺乳類と同様にXX/XY型の性染色体をもつが、奄美大島のアマミトゲネズミ(*Tokudaia osimensis*)と徳之島のトクノシマトゲネズミ(*Tokudaia tokunoshimensis*)はY染色体をもたず、雌雄ともにX染色体1本のXO/XO型である。現在までに、トゲネズミ属三種の比較解析により、三種の共通祖先種においてY染色体の存続を左右する重大なイベントが生じたが、XO型トゲネズミでは雄性を維持しながらY染色体の消失が生じ、XY型トゲネズミでは常染色体との融合によりY染色体の存続を可能にしたことが明らかとなっている。つまり、Y染色体消失が直接的に雄性の消失にはつながらない可能性を示した。本講演では、Y染色体の消失あるいは存続により雄性の消失をうまく乗り切った進化メカニズムについてお話しする。