

2007年度合同シンポジウム

生命現象の分子レベルでの解明

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：11月28日（水） 13：00～17：30

場所：北海道大学大学院理学研究科5号館大講義室

プログラム

場所：北海道大学大学院理学研究科 5号館 大講義室

日時：11月28日（水）13時より

13:00~13:05 開会の辞

石森 浩一郎（日本生物物理学会副会長、北大院・理学研究院）

13:05~13:45

演者：山本 融（北大院・薬学研究院）

演題：「神経回路網形成の分子機構を探る-あたらしい軸索ガイド因子の解析から」

座長：北浦 廣剛（北大院・薬学研究院）

13:45~14:25

演者：遠藤 俊徳（北大院・情報科学研究科）

演題：「ゲノム解析から各種オーム情報解析への展開」

座長：北浦 廣剛（北大院・薬学研究院）

14:25~15:05

演者：南川 典昭（北大院・薬学研究院）

演題：「4'-チオ核酸の核酸医薬品創製研究への展開」

座長：姚 関（北大院・先端生命科学研究院）

15:05~15:25 休憩

15:25~16:05

演者：内藤 哲（北大院・先端生命科学研究院）

演題：「新生ペプチドによる翻訳停止と共役した mRNA 分解制御
- 植物におけるメチオニン生合成のフィードバック制御 -」

座長：姚 関（北大院・先端生命科学研究院）

16:05~16:45

演者：神田 輝（北大・遺伝子病制御研究所）

演題：「染色体の細胞生物学からウイルス学へ」

座長：押海 裕之（北大院・医学研究科）

16:45~17:25

演者：高岡 晃教（北大・遺伝子病制御研究所）

演題：「I型インターフェロンを誘導する細胞内DNA認識機構」

座長：押海 裕之（北大院・医学研究科）

17:25~17:30 閉会の辞

松本 健一（北大院、北大院・先端生命科学研究院）

シンポジウム終了後（17:45~19:00）、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：理学研究科5号館3-01号室 会費：一般1000円、学生500円

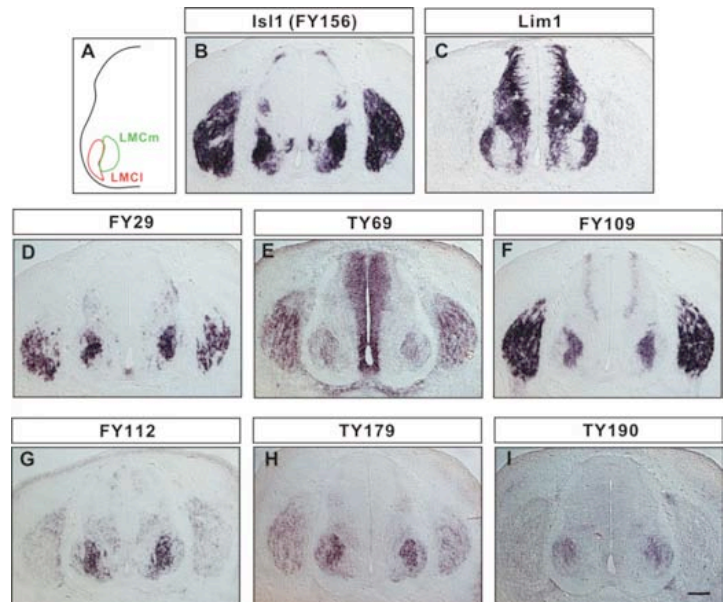
神経回路網形成の分子機構を探る—あたらしい軸索ガイド因子の解析から

山本 融 (北海道大学大学院・薬学研究院)

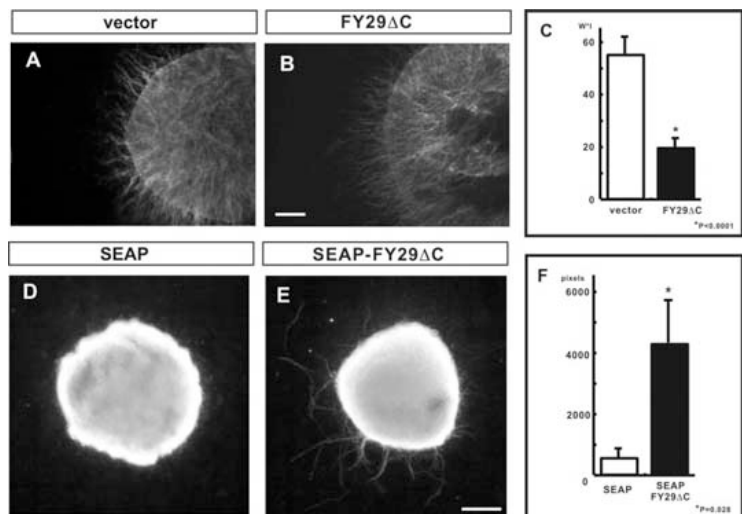
神経上皮から生まれ、ある特定の機能集団に分化するよう決定づけられた神経細胞は、分化・成熟の過程で、その軸索を、様々な choice point における経路選択を経て、標的となる細胞（群）へと伸ばしていきます。このとき、同じ細胞外環境にありながらも、ある神経群は、その他の神経群とは異なった経路を選択していきませんが、こうした選択を正しく行わせていくことを保証する分子機構については、まだ不明な点が数多く残っています。私たちは、同種の神経群の中でも、特定の機能単位に属する神経群にのみ選択的に発現している因子群の探索・解析を進めることにより、こうした経路選択・標的認識メカニズムを探っていこうと考え、四肢に投射する運動神経群を出発点に、その特定の機能単位・時期に選択的に発現する因子群の探索を進めました。

その結果、いくつかの新規・未解析の因子を単離・同定することに成功しましたが、興味深いことに、これら因子の一次構造は、すべて進化上高度に保存されていました。このことから、これら因子群は、これまでに知られていない、しかしながら、何らかの普遍的な役割を担っていることが考えられ、その機能解析を進めることにより、こうした分子メカニズムを明らかにしていく手がかりが得られるものと期待されます。

本シンポジウムでは、こうして単離したあたらしい軸索ガイド因子群の機能解析結果を紹介すると共に、これら因子群によって補完される軸索伸長・経路選択の制御機構について議論したいと思います。



LMCm 運動神経に選択的に発現する因子群



あたらしい軸索ガイド因子の軸索伸長誘導活性

ゲノム解析から各種オーム情報解析への展開 遠藤俊徳（北海道大学大学院情報科学研究科）

ゲノムプロジェクトは、実質的に 1995 年頃に始動し、DNA 構造発見からちょうど半世紀にあたる 2002 年に、ヒトゲノム解読の完了を宣言して一段落を見た。飛躍的に増加した配列データと効率化した配列決定プロセスは、新たな諸問題の提示と今後の様々な研究への可能性を生み出した。タンパク質をコードする翻訳領域の数を正確に予測することは、想像されていた以上に困難であり、ヒトの遺伝子数は何度も修正されることになった。それでも、これまでに知られている遺伝子に対して部分的な相同性すらみつからない配列が半数近くも存在した。しかも、これらの多くは転写物の存在が確認されているのである。オルタナティブスプライシングによる転写産物のバリエーションも予想を上回るもので、1 遺伝子あたり平均 3 種以上とも言われる。さらに、そこから得られるタンパク質に至っては、想像もつかないものになってしまった。配列情報の知識を増やす努力として、進化過程を重視した、各種モデル生物のゲノム配列決定が行われ、NCBI で 31 種の真核生物ゲノムデータ（ドラフト含む）が公開されるに至っている。一方で、多型データベース化という医療応用的側面を重視したプロジェクトも始まった。ヒトとチンパンジーの翻訳領域には 1%程度の差しか見られないという解析結果から、ヒトにおける個人差はそれより小さいと考えられるが、30 億塩基対のゲノムの 0.1%、つまり 1,000 塩基に 1 箇所として、300 万塩基の違いが存在することになる。この試算は、実情から遠くない数字のようである。この個人差を検出するため、これまで以上に高速かつ自動的な配列決定システムも開発され、健康診断の一部として個人単位のゲノム配列決定を行うということも現実味を増してきた。その一方で、塩基配列の情報だけでは、生命システムを理解するには不十分であることがますますはっきりしてきた。このため、転写物の全容を表すトランスクリプトーム、タンパク質の全体を表すプロテオーム、代謝物の全容を表すメタボローム、表現型の全容を表すフェノームといった、生命情報の流れに添った全体像の記載と理解が重要であると認識されるようになってきた。また、これら多数の因子の構造・機能の分類や、相互作用理解のための方法論として、バイオインフォマティクスやシステムバイオロジーといった分野が重視されるようになってきた。こういった生命科学研究の現状と課題の概要について述べる。また、こういった背景に基づいて、我々が行っている、ホヤプロテインデータベースの開発と構築、および機能未知遺伝子の機能予測についても述べたい。

4'-チオ核酸の核酸医薬品創製研究への展開

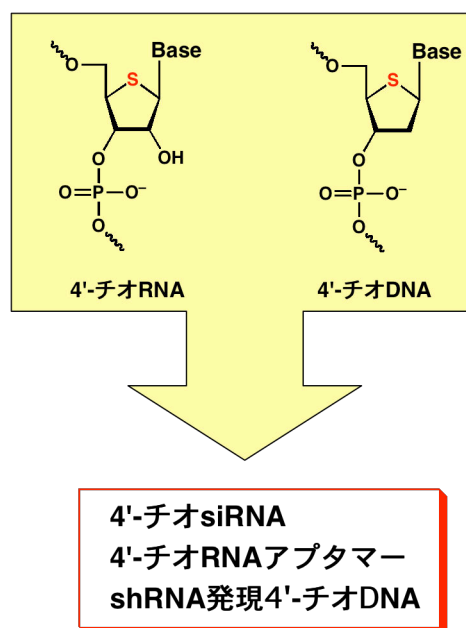
南川 典昭（北海道大学大学院薬学研究院）

近年、「機能性人工核酸」と呼ばれる化学修飾核酸が、新たなバイオ技術のツールとして、さらには次世代の医薬品として注目されている。既に欧米のベンチャー企業を中心として、この機能性人工核酸がアンチセンス法や siRNA による遺伝子発現抑制、また標的物質と特異的かつ強固に結合するアプタマー創製へと利用され、核酸医薬品の開発が精力的に行われている。しかし核酸分子への化学修飾は、核酸分解酵素（ヌクレアーゼ）に対する抵抗性や高次構造の熱的安定性を向上させるなどの機能を付与する一方で、天然型核酸との“生物学的等価性”を欠如させ、その結果、核酸医薬品創製に向けた様々なアプローチに対する多様性を消失させる可能性が高い。

本シンポジウムで発表する 4'-チオ核酸（4'-チオ RNA ならびに 4'-チオ DNA）は、ヌクレオシドのフラノース環酸素原子を硫黄原子に置換した、修飾様式としては非常にシンプルな化学修飾核酸である。周知のように硫黄原子は周期表上、酸素原子と同族元素であり、4'-チオ核酸が天然型核酸と“生物学的等価性”を示すことを期待した。その一方で、化学的性質や糖部 5 員環構造における結合距離や結合角度は異なっており、こういった相違によりヌクレアーゼ抵抗性や高次構造の熱的安定性などの機能が付与されることを期待した。

我々の期待通り、4'-チオ核酸はヌクレアーゼに対して高い抵抗性を示すと共に熱的に安定な高次構造を形成することが明らかになった。このような性質は、4'-チオ核酸が機能性人工核酸として高い資質を有することを示すものであり、現在、核酸医薬品としての開発研究を進めている。その結果、1) 4'-チオ siRNA を用いた RNAi による効率的な遺伝子発現抑制法を確立し、2) 4'-チオリボヌクレオシド三リン酸体を用いた SELEX 法による 4'-チオ RNA アプタマーの獲得に成功した。さらに、3) 4'-チオ DNA を shRNA 発現ベクターとして利用した新しい遺伝子発現抑制法の可能性を見出すことが出来た。本講演では、これらの結果の詳細について紹介したい。

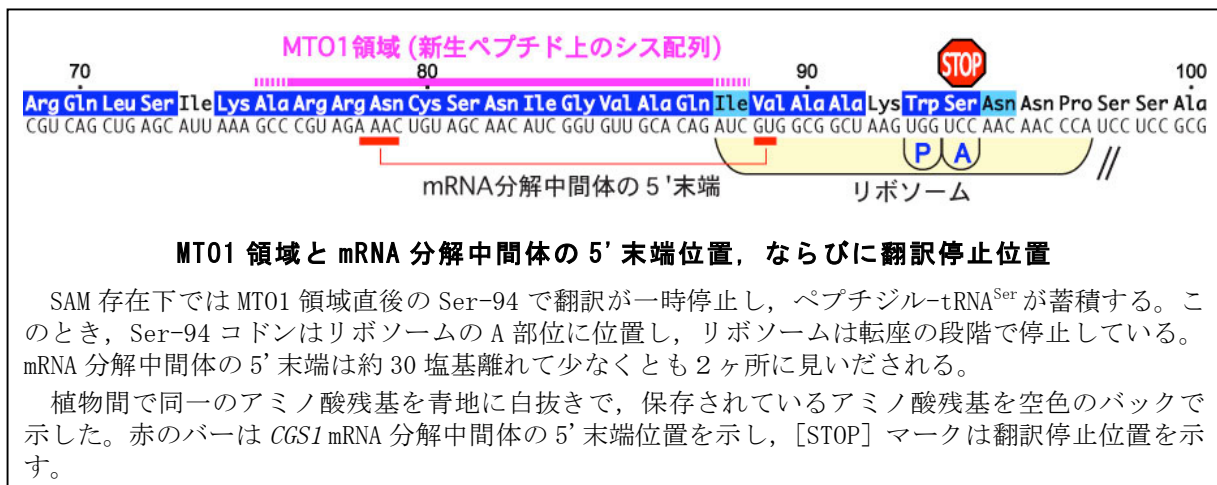
【参考文献】 1) Naka, *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, 122, 7233; 2) Hoshika, *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, **2004**, 32, 3815; 3) Inoue, *et al.*, *J. Org. Chem.*, **2005**, 70, 8597; 4) Kato, *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, **2005**, 33, 2942; 5) Hoshika, *et al.*, *FEBS Lett.*, **2005**, 579, 3115; 6) Inoue, *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, **2006**, 34, 3476; 7) Hoshika, *et al.*, *ChemBioChem*, **2007** in press; 8) Inoue, *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **2007** revised.



新生ペプチドによる翻訳停止と共役した mRNA 分解制御
 - 植物におけるメチオニン生合成のフィードバック制御 -
 内藤 哲 (北海道大学・大学院先端生命科学研究院)

植物におけるメチオニン生合成の鍵段階を触媒するシスタチオニン γ -シントラーゼ (CGS) はアロステリック酵素ではなく、メチオニン生合成の制御機構は 1980 年代以来の謎であった。我々は、遊離メチオニンを過剰に蓄積するシロイヌナズナ *mtol* 変異株を用いた解析により、CGS をコードする *CGS1* 遺伝子の発現がメチオニンの代謝産物である S-アデノシルメチオニン (SAM) に応答して、mRNA の分解段階でフィードバック制御されており、しかも、この制御に MT01 領域と名付けた CGS 自身がコードする十数アミノ酸の領域 (*mtol* 変異部位を含む) がシス配列として働くことを見いだした (*Science* 286: 1371-4, 1999; *JBC* 277: 36380-6, 2002; *PNAS* 100: 10225-30, 2003)。

この制御はコムギ胚芽抽出液の *in vitro* 翻訳系で再現される。*In vitro* 翻訳系を用いた解析により、SAM 存在下では MT01 領域を翻訳した直後に翻訳伸長の一時停止が起こり、これが引き金となって mRNA 分解が起こると考えられた (*Genes Dev* 19: 1799-810, 2005)。*CGS1* mRNA の分解に際しては 3' 側断片が分解中間体として生成されるが、その 5' 末端は、翻訳停止したリボソームによって保護されると考えられる領域に位置する。このことはリボソームと密接に関連した機能によって *CGS1* mRNA 分解が引き起こされることを示唆する。



新生ペプチドはリボソームの大サブユニットを貫く出口トンネルを通過して出てくるが、翻訳停止したリボソームにおいて MT01 領域の新生ペプチドは出口トンネル内に位置すると考えられる。SAM によって如何にして翻訳停止が誘導され、如何にして mRNA 分解が引き起こされるのか？ トンネルの闇の中から一筋の光明を見いだすべく、議論したい。

総説：実験医学 2007 年 1 月号 pp. 25-30.

<http://arabi4.agr.hokudai.ac.jp/Research/CGS1/CGS1.html>

染色体の細胞生物学からウイルス学へ

神田 輝 (北海道大学・遺伝子病制御研究所・附属ウイルスベクター開発センター)

細胞染色体 (クロマチン) の複製・分配は、遺伝情報を正確に継承していくために厳格にコントロールされている。すなわち複製は DNA 合成期に一回だけ起こり、その後分裂中期において姉妹染色体のセントロメアに左右両極から来た紡錘糸が正確に結合することで、複製した染色体は娘細胞へと均等に分配される。一方で、ヒト細胞の核内に潜伏感染するウイルスの中には環状プラスミド (エピゾーム) 状態で染色体とは独立した分子として複製し、かつ娘細胞へと分配されるものが存在する。ウイルスは、限られたサイズのゲノム上に数多くの遺伝子をコードしているため、当然セントロメア構造のようなものは持ち得ない。ではウイルスエピゾームの DNA は、どのようなメカニズムにより娘細胞の核へと安定して継承されていくのであろうか？

近年の研究により、いくつかの DNA ウイルスエピゾームが娘細胞へと継承されるメカニズムとして、宿主細胞染色体に付着して分配されるという共通の仕組みが存在することが明らかになってきた。このようなエピゾーム DNA の挙動は、chromosome tethering ないし chromosome hitchhiking と呼ばれる。私たちのグループは、ヒト B リンパ球指向性に潜伏感染するヘルペスウイルスの一種である EB ウイルスエピゾームの複製・分配のメカニズムに焦点を絞って解析を行っている。潜伏感染状態では、EB ウイルスエピゾームは、染色体と同調して細胞周期に一回だけ複製し、分裂細胞では chromosome tethering により娘細胞へと分配される。こうした複製と分配の両過程において唯一必要なウイルス蛋白質が EBNA1 蛋白質である。EBNA1 はウイルスゲノムの oriP と呼ばれる領域に存在する EBNA1 認識配列に結合するドメインと、細胞性染色体 (もしくは間期核クロマチン) と結合するドメインを有し、両者を橋渡しする分子である (図 1)。

私たちは、細胞生物学的手法を用いて、EB ウイルスエピゾーム、および EBNA1 蛋白質の核内局在を詳細に解析した。その結果、EB ウイルスエピゾームは、ただランダムに宿主染色体に付着するのではなく、複製した分子の多くが姉妹染色体上へと均等分配されるという興味深い現象を見出した (図 2)。この現象の意義、および今後の展開について議論したい。

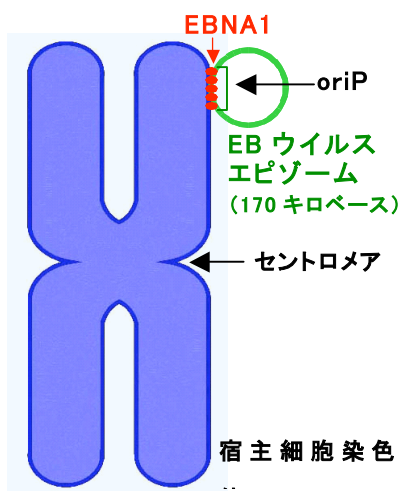


図 1. EBNA1 蛋白質を介した EB ウイルス エピゾームの chromosome tethering の模式図

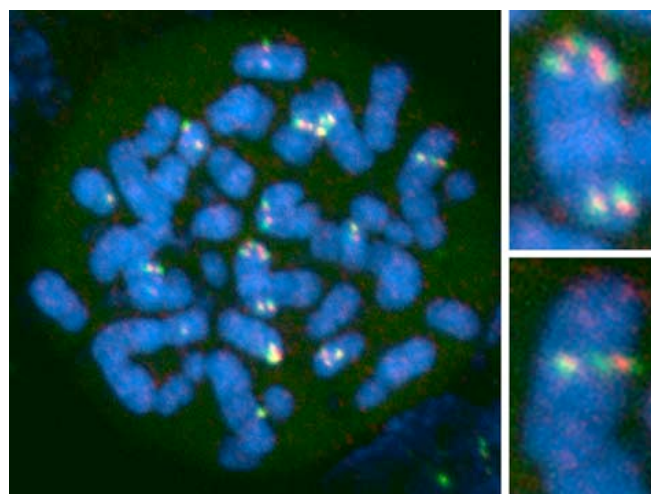


図 2. G2 期未成熟染色体凝縮標本の姉妹染色体上における EBNA1 蛋白質 (赤) および EB ウイルスゲノム (緑) の対称性局在

I 型インターフェロンを誘導する細胞内 DNA 認識機構

高岡 晃教（北海道大学 遺伝子病制御研究所 分子生体防御分野）

「生体はどのようにして体内に侵入した病原体を認識するのか？」--- 近年、自然免疫システムにおける微生物認識機構の研究が急速に進展し、Toll 様受容体をはじめとする微生物認識受容体の存在が明らかとなってきた。とくに微生物由来の核酸は、自然免疫での認識機構において重要な標的分子とされる。実際に、TLR3/TLR7/TLR8 や RIG-I/MDA5 はそれぞれ細胞外および細胞内の RNA を感知する受容体分子として自然免疫活性化におけるその重要性が示されている。一方で、DNA に対する認識受容体は、これまで TLR9 が細胞外の DNA を認識する分子であることが報告されているが、細胞内に存在する DNA を認識する分子はその存在を示唆する報告はあるものの、本体は明らかにされていなかった。最近、我々のグループは、インターフェロン (IFN) 誘導遺伝子の中から細胞質内 DNA 認識に関与することが予想される候補分子を同定した。我々が見出した分子は、細胞質内の DNA と会合することで、とくに IFN 調節因子 (IFN-regulatory factors; IRFs) の活性化を引き起こし、I 型 IFN 産生誘導につながる下流のシグナル経路を活性化することが明らかとなった (図)。今回見いだされたこの分子の新たな機能から DAI (DNA-dependent activator of IRFs) と呼称した。今後、ウイルス感染や細菌感染において活性化される自然免疫応答の誘導におけるこの DAI 分子の関連性について検討していきたいと考えている。

DAI 分子による細胞内 DNA 認識機構の予想図

