

[0021]九州大学生体防御医学研究所年報 : 2006年

<https://doi.org/10.15017/15429>

出版情報 : 九州大学生体防御医学研究所年報. 21, 2007-05. Medical Institute of Bioregulation,
Kyushu University

バージョン :

権利関係 :



細胞統御システム分野

Division of Cell Regulation Systems

細胞統御システム分野は、特任准教授である石谷太の平成 18 年 11 月の着任とともに発足した。当分野では、個体の形成と維持に関わるシグナル伝達経路の機能と制御の解明を目指して研究を行っている。「一つの細胞から私たちの体が形成される過程（個体の形成）」や「成体における恒常性の維持や感染防御（個体の維持）」は、適切な遺伝子が適切な時空間において発現し、その遺伝子産物が適切に機能することによって達成される。このような遺伝子機能の時空間的制御のコントロールは、細胞内あるいは細胞間のシグナル伝達経路によってなされる。このシグナル伝達経路の破綻は、器官の形成不全などの遺伝子疾患や癌などの疾病の発症を引き起こす。シグナル伝達経路の機能と制御の解明は、将来的な新たな疾病の治療法や創薬の開発において非常に重要であると考えられている。当分野では「遺伝学的解析及び細胞生物学的解析に適した脊椎動物モデルであるゼブラフィッシュを用いた細胞レベル・個体レベルの研究」と「Co-IP や ChIP assay, in vitro kinase assay などの生化学的研究」そして「DNA マイクロアレイやプロテオミクスなどの網羅的研究手法」を組み合わせ、体の形成や維持、感染防御に関わるシグナル伝達経路群の機能と制御の解明を目指している。特に以下のテーマに注目して研究を進めている。

- (A) シグナル伝達経路の活性を制御するプロテインキナーゼ NLK の機能と制御の解明
- (B) 幹細胞の増殖と細胞の癌化に関わるシグナル伝達経路である Wnt シグナル伝達経路の機能と制御の解明
- (C) 個体の形成と維持に関わるシグナル伝達経路の生個体における可視化

A. シグナル伝達経路の活性を制御するプロテインキナーゼ NLK の機能と制御の解明

Nemo-like kinase (NLK) は MAPK に類似したキナーゼである。ヒト NLK は酵素ドメイン（キナーゼドメイン）においてヒト MAPK1 と 47% の相同性を有し、アミノ末端側にヒスチジンに富んだ (His-rich) 領域を持つ。私たちはこれまでに、NLK が様々な細胞内シグナル経路の転写因子をリン酸化してその活性を変化させることにより、シグナル伝達をファインチューンする機能をもつことを明らかにしてきた。例えば NLK は、TCF/LEF (Wnt シグナルの転写因子) をリン酸化することによりその DNA 結合能を低下させて Wnt シグナル活性を変化させたり、c-Myb (原がん遺伝子産物) をリン酸化することによりそのタンパク質安定性を低下させたり、転写因子 STAT3 をリン酸化して IL-6 や Activin のシグナルを促進したりする。しかし、これらのリン酸化の個体における生理学的意義はあまり明らかになっていない。

私たちは現在、NLK の制御と分子・細胞・個体レベルにおける機能の全貌解明を目指し、「NLK の新規基質の探索」「個体形成における NLK の機能の解明」に取り組んでいる。

a. NLK の新規基質の探索

NLK と相互作用し、かつリン酸化されることを指標として、NLK の新たな基質を探索した。まず、ヒト腎臓細胞株 293 細胞に発現させて得た Flag タグ付きの NLK (NLK-WT) 及びキナーゼ不活性型 NLK (NLK-KN) を、大量の 293 細胞から調製した細胞抽出液と混合し、抗 Flag 抗体で IP し、NLK と NLK-KN の両方に結合するタンパク質群を精製した。続いて IP 産物を in vitro kinase assay し、NLK によってリン酸化を受けるが、NLK-KN によってはリン酸化を受けないタンパク質を選別した。この様にして NLK の新たな基質候補を探索し、現在までに 4 種類の新規 NLK 基質を発見した。今後はまず、同定した基質をクローニングし、NLK が実際にこれに結合しリン酸化するかを確認したい。そして、実際に個体レベルで新規基質が NLK と共に機能しているかを検討するために、ゼブラフィッシュ胚において新規基質及び NLK の機能欠損/機能獲得の表現型の解析と比較を行ってきたい。

b. 個体形成における NLK の機能の解明

NLK は他の MAPK 同様に種を越えて保存されており、これまでに *C. elegans*, *Drosophila*, *Xenopus*, ゼブラフィッシュ (*Danio rerio*)、哺乳動物などにおいて各々 1 つずつの NLK 遺伝子がクローニングされている。私たちは最近、ゼブラフィッシュから新たにもう一つの NLK をクローニングし、これを NIK2 と名付け、以前にクローニングされたものを NIK1 とした。すでに報告されているゼブラフィッシュ NIK1 は *Xenopus* NLK とアミノ酸配列相同性が高いが、NIK2 は哺乳類 NLK に相同性が高かった。また、NIK1 が胚発生初期から継続的に胚全体に渡って発現するのに対し、NIK2 は初期のパターン形成の時期には発現せず、分化/成熟期の脳や神経系に発現する。興味深いことに、哺乳動物 NLK はゼブラフィッシュ NIK2 同様に脳組織に強く発現することが分かっているが、NLK の脳神経系における機能は不明である。そこで、現在私たちはゼブラフィッシュ NIK2 の脳神経発生における機能解析を行っている。NIK2 に対するモルフォリノアンチセンスオリゴヌクレオチド (MO) をゼブラフィッシュ受精卵に注入し、NIK2 機能阻害胚の脳神経発生過程を解析した。NIK2 機能阻害胚では、感覚神経の形成や中脳の発生に異常が認められた。これらのことから、NLK が脊椎動物の感覚神経の形成や中脳の形成において重要な働きを担っていることが明らかになった。しかし、NLK がどのような分子メカニズムでこれらの現象を制御するのかは未知である。現在、PC12 細胞などのモデルニューロンを用いて、NLK がどのような分子メカニズムで脳神経形成を制御するのかを詳細に調べている。

B. 幹細胞の増殖と細胞の癌化に関わるシグナル伝達経路である Wnt シグナル伝達経路の機能と制御の解明

Wnt シグナル伝達系は、「体の形成」、「幹細胞の増殖」、「癌の発症」に関わる重要なシグナル伝達経路である。Wnt シグナルの機能と制御の解明は、将来的な新たな医療技術の開発や創薬につながるかと期待されており、世界的に最もホットな研究課題の一つである。Wnt シグナル伝達系は、細胞が細胞間情報伝達分子 Wnt を受容することにより活性化する。Wnt シグナルが活性化した細

胞では、転写因子 Tcf/Lef が標的遺伝子の転写を誘導する。私たちはこれまで、「Tcf/Lef の分子レベルでの制御」に注目して研究を行い、「Tcf/Lef がリン酸化されること」と「Tcf/Lef がユビキチン-プロテアソーム系によって破壊されること」を世界で初めて発見した。

a. Tcf/Lef のユビキチン-プロテアソーム系による破壊

私たちはこれまでに、「Tcf/Lef ファミリーの転写因子 Lef1 がユビキチン-プロテアソーム系によって分解されていること」、「シグナルタンパク質 Nrarp が Lef1 の分解を阻害し、Lef1 を安定化すること」、そして「Nrarp による Lef1 分解の回避が神経堤細胞の発生に関わること」を見出している。この発見は、Wnt シグナルの新たな制御機構の発見であり、非常に興味深い。しかし、Lef1 の分解の制御機構は分子・個体いずれのレベルにおいても未だに理解が不十分であり、Lef1 にユビキチンを付与するユビキチンリガーゼさえも不明である。現在、私たちは、Lef1 タンパク質の安定性の制御とその意義を分子・細胞・個体の各レベルにおいて解明することを目標とし、研究を進めている。

b. Tcf/Lef のリン酸化

私たちは NLK が Tcf/Lef をリン酸化することを 8 年前に同定したが、このリン酸化の生理学的意義は未だに十分に解析されていない。そこで、私は遺伝学的解析及び細胞生物学的解析に適したモデル動物であるゼブラフィッシュを用い、NLK による Tcf/Lef リン酸化の細胞レベル及び個体レベルの機能解析を行った。まず、ゼブラフィッシュより NLK ホモログ NIK1 及び NIK2、Tcf/Lef ホモログ Tcf4 及び Lef1 をクローニングした。続いてそれらが共に働く領域を探るべく、それぞれの発現パターンを解析した。その結果、NIK2 と Tcf4 と Lef1 が形成過程の中脳に重複して発現することがわかった。このことから、NIK2 による Tcf4/Lef1 のリン酸化が形成過程の中脳でおこり、このリン酸化が中脳の形成において何らかの役割を担う可能性が考えられる。そこで、モルフオリノアンチセンスオリゴヌクレオチド (MO) を用いてゼブラフィッシュ胚体内において NIK2 及び Tcf4/Lef1 の機能を特異的に阻害し、中脳の形成への影響を調べた。その結果、NIK2 機能阻害胚及び Tcf4/Lef1 機能阻害胚のいずれにおいても異常に矮小化した中脳が形成された。したがって、「NIK2 が Tcf4/Lef1 をリン酸化することにより Tcf4/LEF1 を正に制御し、正常な中脳の形成に関与する」可能性が示唆された。現在、「NIK2 が実際にゼブラフィッシュ胚体内で Tcf/Lef1 をリン酸化しているかどうか」と「NIK2 が Tcf/Lef1 を正に制御する分子機構」を調べている。

C. 個体の形成と維持に関わるシグナル伝達経路の生個体における可視化

癌・感染防御・脳神経系形成に関わるシグナル伝達経路が脊椎動物の卵から幼体に至る発生/成長過程において「いつ」「どこで」「どの程度の強さで」活性化して働いているかを解明することは、私たちの体の形成と維持の分子メカニズムを理解する上で非常に重要である。これを解明するためには、個体レベルにおけるシグナル伝達の可視化が非常に有効な手段であると考えられる。当分野では、ゼブラフィッシュを用いて「生きた脊椎動物個体におけるシグナル伝達経路の

時空間的動態の可視化」に取り組んでいる。ゼブラフィッシュは以下にあげるような優れた特性を持っており、脊椎動物におけるシグナル伝達の可視化に最も適したモデル動物である。ゼブラフィッシュの特性：(1)胚体が透明 / (2)体外で胚発生が起こること (ヒトやマウスなどの哺乳動物では、発生が母体内でおこなうことから、発生初期での重要な生物学的現象を経時的に観察することは技術的に困難) / (3)多産 / (4)ヒトと同様に脳神経系や消化器系などの器官をもち、それらがヒトのものと同様の発生機序を辿って形成され、そして維持されていること (ショウジョウバエや線虫といった無脊椎動物モデルにおいて形成される器官やその発生機序は我々脊椎動物のそれとは大きく異なるため、シグナル伝達経路の個体レベルにおける機能はヒトと大きく異なる)。今後、本研究により、「シグナル伝達経路がどのように機能することによって私たち脊椎動物の体が形成され、そして維持されるのか」を把握したい。そして、将来的にはこれを「各シグナル伝達経路の新規因子の探索と機能解析」や「病態とシグナル伝達の関連」を研究するための強力なツールとしたい。

業績目録

学会発表

1. 石谷太, 松本邦弘, Ajay Chitnis, 伊藤素行 (2006, 4/9).
Nrarp functions to modulate neural crest cell differentiation by regulating LEF1 protein stability.
2006 Keystone Symposia Wnt and b-catenin Signaling in Development and Disease,
アメリカ合衆国ユタ州
2. 石谷太, 松本邦弘, 伊藤素行(2006, 6/2).
脳神経発生における Nemo-like kinase (NLK)の機能解析
日本発生生物学会第 39 回大会, 広島
3. 伊藤素行, 石谷太, 松本 邦弘, Chitnis Ajay (2006, 6/3)
Nrarp は LEF1 蛋白質の安定化を通じて神経冠細胞の発生に関与する
日本発生生物学会第 39 回大会, 広島
4. 石谷 太, 松本邦弘, 伊藤素行 (2006, 6/16).
Regulation of the vertebrate axonal development by Nemo-like kinase
7th International Conference on Zebrafish Development and Genetics,
アメリカ合衆国ウィスコンシン州
5. 山本麻衣, 石谷太, 松本邦弘, 伊藤素行 (2006, 6/16).
Jagged-Notch Signaling is Involved in Zebrafish Notochord Development
7th International Conference on Zebrafish Development and Genetics,
アメリカ合衆国ウィスコンシン州
6. 石谷太, 平尾智子, 鈴木真帆, 磯田美帆, 松本邦弘, 伊藤素行

Nemo-like kinase は Notch シグナルを阻害し、神経分化を制御する
第 12 回小型魚類研究会, 静岡

7. 石谷 太, 松本邦弘, 伊藤素行 (2006, 12/7).
脊椎動物脳神経発生における Nemo-like kinase の機能
日本分子生物学会 2006 フォーラム, 名古屋
8. 平尾智子, 石谷太, 鈴木真帆, 磯田美帆, 松本邦弘, 伊藤素行 (2006,12/8).
Nemo-like kinase は初期神経発生過程において Notch を負に制御する
日本分子生物学会 2006 フォーラム, 名古屋
9. 杉山和也, 石谷太, 西出賢次, 松本邦弘, 伊藤素行 (2006, 12/8)
細胞突起伸長における Delta1 の Notch 非依存的な役割
日本分子生物学会 2006 フォーラム, 名古屋
10. 高橋浩之, 石谷太, 松本邦弘, 伊藤素行(2006,12/8).
Nrap の Nodal シグナルにおける機能解析
日本分子生物学会 2006 フォーラム, 名古屋
11. 山本麻衣, 石谷太, 松本邦弘, 伊藤素行 (2006, 12/8)
Mind bomb (Mib) -Jagged-Notch シグナルは notochord の正常発生に必要である
日本分子生物学会 2006 フォーラム, 名古屋
12. 石谷太 (2007, 3/15).
ゼブラフィッシュを用いた NLK と転写因子 TCF/LEF の関係の検討
国立遺伝学研究所研究会「脊椎動物の器官形成とバイオイメージング」, 静岡

蛋白質化学分野

Division of Protein Chemistry

近接する二つのシステインが二電子酸化を受けることにより形成されるジスルフィド結合は、タンパク質の高次構造形成において重要な役割を担う構造安定化因子である。最近の研究によれば、ジスルフィド結合の形成・解離が酸化ストレス応答に関わる種々の転写因子や分子シャペロンの活性や細胞内局在を規定する因子としても重要な役割があることが判明している。細胞の中では、ジスルフィド結合が迅速かつ正確に進行するよう、ジスルフィド結合導入酵素・異性化酵素が存在する。大腸菌では、膜蛋白質 DsbB がユビキノンの酸化力を利用してジスルフィド結合を創りだし、ここで創られたジスルフィド結合は水溶性蛋白質 DsbA を介して多くの高次構造形成途上の蛋白質に受け渡される。我々はここ数年、この酸化システムに関する生化学的、遺伝学的、構造生物学的研究を遂行した。中でも最近、このシステムを構成する主要な三つの因子 DsbA-DsbB-ユビキノンの複合体の X 線結晶構造解析に成功し、Cell 誌に掲載するに至っている。その結果、この酸化システムの巧妙な分子機構の全貌を明らかにすることができた。

平成18年11月1日付けで九大生医研の SSP 学術研究員として採用され、実質的には平成19年1月より研究室のセットアップを行った。現在では、一連の細胞培養・タンパク質発現精製・生化学実験・構造生物学実験を遂行するための研究環境を整備するに至っている。既にテクニカルスタッフ2名と技能補佐員1名を雇用し、近日中にポスドクも1名加わる予定である。今後学生のリクルートも積極的に行い、研究室の規模を適度に拡大する予定である。

A. 蛋白質ジスルフィド結合が創り出される共通化学原理を解明（原著論文3）

大腸菌中では、フォールディング途上の蛋白質に効率よくジスルフィド結合を導入するため DsbA-DsbB-ユビキノン酸化システムが存在する。このシステムにおいて、膜酸化酵素 DsbB はユビキノン分子の強い酸化力をジスルフィド結合という形に変換し、ここで創り出されたジスルフィド結合は DsbA を介して多くの基質蛋白質に受け渡される。本研究では、DsbB とユビキノンは共役してジスルフィド結合を創り出す機構について、生化学的および理論化学的研究（京大院理林重彦助教授との共同研究）を展開し、DsbB のシステイン残基の一つがユビキノン分子と電荷移動錯体および付加生成物を過渡的に形成することで、ジスルフィド結合形成反応が速やかに進行することを示した。またこの過程において、DsbB ホモログ間で高度に保存されたアルギニン残基の正電荷が必須の役割を有していることも明らかとなった。

興味深いことに、本研究で提唱したユビキノン分子に依存したジスルフィド結合創生機構は、真核生物でみられる FAD (flavin adenine dinucleotide) 分子に依存したそれと多くの類似点が存在する。FAD 分子に依存したジスルフィド結合形成解離過程においても、ジスルフィド酸化還元酵素中でシステイン残基と FAD との間で電荷移動錯体および付加生成物が過渡的に形成され、またその際、近傍に存在する NADP⁺ などの正電荷が重要な役割を担っている。真核細胞と原核細胞の

ジスルフィド結合創生システムが、それぞれ独立して進化したにもかかわらず、基本となる化学原理を共有していることは、その生物学および化学的合理性を示唆している。

B. DsbA-DsbB-ユビキノン三者複合体のX線結晶構造解析（原著論文 1）

細胞システムの機能発現メカニズムを深く理解する上で、そのシステムを構成する因子の構造情報を得ることは極めて重要である。そこで本研究では、大腸菌における蛋白質ジスルフィド結合形成システムを構成する三つの因子DsbA-DsbB-ユビキノンの複合体のX線結晶構造解析に果敢に挑んだ。DsbBが膜内在性酵素ということもあり、その結晶構造解析は困難を極めたが、徹底したサンプル調整法および結晶化条件の検討により、4年以上もの歳月をかけて、3.7Å分解能の結晶構造を解くに至った。その結果、この酸化システムに関する幾つもの重要な知見が得られた。第一に、DsbB上のユビキノン結合部位を同定し、DsbBとユビキノンが共同してジスルフィド結合を創り出すための化学スキームが分子レベルで解明された（下図参照）。第二に、DsbBからDsbAへジスルフィド結合をリ

レーする過程において、DsbBはDsbAとの会合に伴う巧妙な構造変化を引き起こし、両蛋白質間に存在する酸化還元電位のエネルギー障壁を巧みに克服していることが強く示唆された。さらに、大腸菌のペリプラズムには、ジスルフィド結合導入のための酸化経路に加え、ジスルフィド結合組換えのため

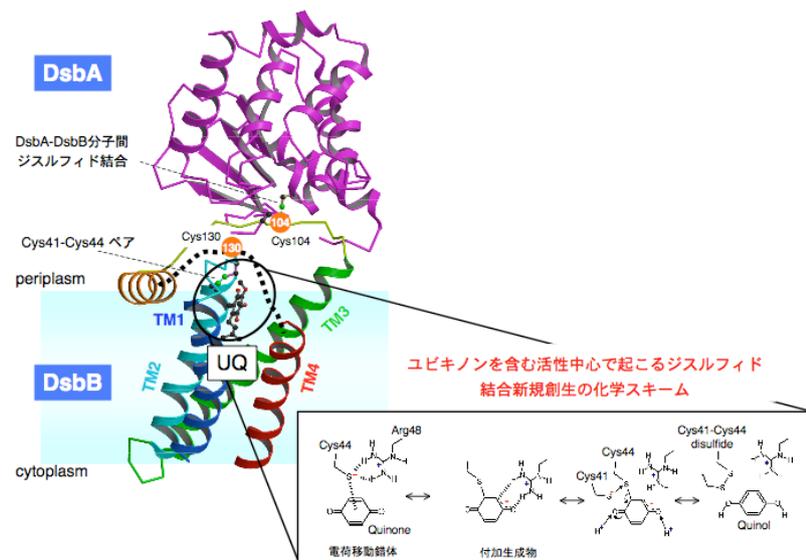


図 DsbA-DsbB複合体の結晶構造とジスルフィド結合創生の分子機構

の還元経路も存在するが、これら二つの経路の巧妙な分断機構も明らかとなった。以上構造解析により明らかとなった事柄は、我々が以前より生化学的および遺伝学的研究より提唱してきた分子メカニズムと合致し、我々の考えを強くサポートするものである。これらの研究成果により、細胞の中でジスルフィド結合がどのように創られ、蛋白質に導入されるのか、そのメカニズムの全貌が分子レベルで解明されたと言える。

業績目録

原著論文

1. Kenji Inaba, Satoshi Murakami, Mamoru Suzuki, Atsushi Nakagawa, Eiki Yamashita, Kengo Okada and Koreaki Ito. 2006
Crystal structure of the DsbB-DsbA complex reveals a disulfide bond generation mechanism
Cell 127, 789-801.
2. Kenji Inaba, Yoh-hei Takahashi, Koreaki Ito and Shigehiko Hayashi 2006
Critical role of a thiolate-quinone charge transfer complex and its adduct form in de novo disulfide bond generation by DsbB
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 103, 287-292.
3. Yoh-hei Takahashi, Kenji Inaba and Koreaki Ito 2006
Role of the cytosolic loop of DsbB in catalytic turnover of the ubiquinone-DsbB complex
Antioxidants & Redox Signaling 8, 743-752.

総説

1. 稲葉 謙次, 伊藤 維昭 2007
構造が明らかにした蛋白質ジスルフィド結合形成の仕組み
蛋白質核酸酵素 印刷中
2. 稲葉謙次 2007
タンパク質ジスルフィド結合の形成に関わる酵素群—構造が明らかにしたそのメカニズム
酵素工学ニュース 印刷中
3. 伊藤 維昭, 稲葉 謙次 2007
ジスルフィド結合の形成メカニズム
Medical Bio 4, 58-65
4. 稲葉 謙次 2006
細胞における蛋白質ジスルフィド結合創生の基本化学原理
日本生物物理学会会報誌 46, 257-262.

著書

1. 稲葉 謙次, 伊藤 維昭 2007
細胞内に張り巡らされた蛋白質ジスルフィドネットワーク
蛋白質の一生 集中マスター 77-85
2. 稲葉 謙次, 伊藤 維昭 2007
まだまだ見つかる PDI の新しい機能
蛋白質の一生 集中マスター 132-133

学会発表

国際学会

1. Kenji Inaba (2007, 3/15-16)
How are protein disulfide bonds generated in the cell? (invited lecture)
Milestone of life of proteins, Kyoto, Japan.
2. Kenji Inaba, Satoshi Murakami, Mamoru Suzuki, Atsushi Nakagawa, Eiki Yamashita, Kengo Okada and Koreaki Ito. (2006, 11/20-23)
Crystal Structure of DsbB-DsbA Complex Revealing a Cysteine Relocation Mechanism. (invited lecture)
Joint Conference of the Asian Crystallographic association and the Crystallographic Society of Japan, Tsukuba, Japan.
3. Inaba, K., Murakami, S., Suzuki, M., Nakagawa, A., Yamashita, E., Okada, K. and Ito, K. (2006, 9/17-19)
Crystal structure of the DsbB-DsbA complex revealing a cysteine relocation process for disulfide bond generation. (invited lecture)
Switzerland-Japan Symposium on Structural Biology 2006, Brunnen, Switzerland
4. Inaba K. and Ito K. (2006, Jul 29 – Aug 3)
Crystal Structure of DsbB-DsbA Complex Revealing a Cysteine Relocation Mechanism.
FASEB Meeting “Protein Folding in the Cell” Saxton River, USA.

国内学会

1. 稲葉 謙次 (2006, 12/14, 15)
細胞におけるタンパク質の立体構造形成の仕組み (招待発表)
さきがけライブ 2006, 東京
2. 稲葉 謙次, 村上 聡, 鈴木 守, 中川 敦史, 山下 栄樹, 岡田 健吾, 伊藤 維昭 (2006, 12/6-8)
大腸菌における蛋白質ジスルフィド結合創生マシーナリーの構造とメカニズム (招待講演)
日本分子生物学会フォーラム 2006, 名古屋
3. 稲葉謙次, 村上聡, 鈴木守, 中川敦史, 山下栄樹, 岡田健吾, 伊藤維昭 (2006, 7/25-26)
大腸菌におけるジスルフィド結合導入システムの構造的基盤
第33回生体分子科学討論会, 名古屋
4. 稲葉謙次, 高橋洋平, 林重彦, 伊藤維昭 (2006, 4/24-26)
細胞における蛋白質ジスルフィド結合創生の基本化学原理
第6回日本蛋白質科学会年会, 京都