

[0025]九州大学生体防御医学研究所年報 : 2010

<https://doi.org/10.15017/26853>

出版情報 : 九州大学生体防御医学研究所年報. 25, 2011. 九州大学生体防御医学研究所
バージョン :
権利関係 :



次世代研究スーパースター養成プログラム

The Kyushu University Research Superstar Program (SSP)

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では、「多細胞生物体が如何に個として構築され、維持されるのか?」、そのメカニズムの解明を目指して研究を行っている。多細胞生物における細胞は、お互いにシグナルを送受信し、自身のなすべき役割（形態変化、分化、増殖、生死、移動など）を認識し、それを実行する。細胞間でやり取りされるシグナルの実体は、サイトカインなどの細胞外分泌蛋白質や膜表面に存在するリガンド蛋白質分子群である。これら細胞外シグナル分子は、受け手の細胞においてそれぞれに異なる細胞内シグナル伝達経路を活性化し、それぞれに異なる細胞応答を誘導する。私たち人間のからだは 60 兆個もの細胞が集まり、それらがシグナルを送受信することで細胞社会を形成し、個として成り立っている。言い方を変えれば、このようなシグナルの送受信（シグナル伝達）の厳密な制御が、私たちのからだの構築と維持を担っている。実際、シグナル伝達の制御が破綻すると、癌や二型糖尿病、精神疾患など、様々な疾病が引き起こされることが知られている。このようなことから、シグナル伝達の制御機構を明らかにすることは、多細胞生物のからだの構築と維持のメカニズムの解明、疾病発症のメカニズム解明、将来的な組織再生医療や疾病治療技術開発につながると考えることができる。

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「生化学的研究」そして「網羅的研究手法」を組み合わせ、シグナル伝達（化学反応カスケード）のナノ／マイクロレベルからマクロレベルまでの統合的理解を目指している。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

当分野のメンバーは、今秋よりテクニカルスタッフとして甲斐草が産休から復帰し、また、技術補佐員である前川邦子が結婚退職し、計 7 名の体制となった。

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

私たちは、「シグナル伝達と“多細胞集合体である組織”の構築と維持の関係」の本

質に迫るため、複数のシグナル伝達経路の活動を制御する能力をもつ分子である “Nemo-like kinase (NLK)” に注目して研究を行っている。NLK は種を越えて保存されている MAP キナーゼに類似したリン酸化酵素である。私たちはこれまでに、NLK が様々なシグナル伝達経路の転写制御因子をリン酸化してその活性を変化させ、シグナル伝達強度の加減調節を行うことを明らかにしている。例えば NLK は、(1)Lef1 (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 シグナル活性を減弱させたり (Nature 1999; MCB 2003)、(2) 転写因子 c-Myb をリン酸化することによりその安定性を低下させたり (G&D 2004 共同研究)、(3) 転写因子 STAT3 をリン酸化してその活性を促進したり (PNAS 2005 共同研究)、(4) 転写制御因子 Notch1 をリン酸化してその活性を抑制したりする (Nature Cell Biology 2010)。しかしながら、NLK の活性制御機構はほとんどわかっていない。私たちは今回、NLK のホモ二量体形成が NLK の活性化と NLK の核局在に必須であることを発見した。私たちはまず、生化学的解析により、NLK がホモダイマーを形成し、intermolecular manner で自身の Thr-286 をリン酸化することを見いだした。さらに、この自己リン酸化が NLK の活性化に必須であることを発見した。また、線虫 *C. elegans* における NLK のホモログ lit-1 の機能欠損変異に相当する部位である Cys-425 に変異を導入した NLK はホモダイマーを形成できないだけでなく、酵素活性も核への局在活性も失っていた。これに対して、既知の NLK 活性化因子である神経成長因子 NGF によって細胞を刺激すると、細胞内在性の NLK がダイマー形成し、Thr-286 の自己リン酸化を行なうことがわかった。加えて、NLK のダイマー形成と自己リン酸化が NGF 刺激によって誘導される PC12 細胞の神経突起伸長に必須であることがわかった。これらの結果から、NLK のダイマー形成が NLK の機能的活性化の「最初のカギ」となることが示唆された (Molecular Biology of the Cell 2011)。このように全く未解明であった NLK の活性制御メカニズムの中核部分を解明することに成功した。

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、Wnt シグナルが活性化した細胞では、細胞質内で β カテニンが安定化し、その結果として β カテニンが核内に移行して転写

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ている。更に最近、 β カテニンの安定性の制御に関わる新たな分子を発見している。

a. 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 12 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ている。

b. HIPK2 による β カテニンの安定化

私たちはこれまでに、ショウジョウバエにおいてプロテインキナーゼ HIPK2 が β カテニンの安定性を促進し、Wnt シグナルを促進することを明らかにしている (Development, 2009)。現在、「HIPK2 が大腸がん細胞における Wnt シグナルの過剰亢進に関与しているか」、「脊椎動物個体における HIPK2- β カテニン経路の生理学的役割」、そして「HIPK2 が β カテニンを安定化する詳細な分子メカニズム」の三点の解明を目指して研究を進めている。

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。

現在、Wnt シグナル、Notch シグナル、NF κ B シグナル、ヘッジホッグシグナルの可視化を進めている。これらのシグナルは全て発生だけでなく疾病の発症に関わっており、この可視化システムは「発生及び疾病の発症のメカニズムの解明」だけでなく「ドラッグスクリーニング」などの応用研究にも利用できる可能性がある。

業績目録

原著論文

1. Ishitani S, Inaba K, Matsumoto K, Ishitani T. Homo-dimerization of Nemo-like kinase is essential for activation and nuclear localization. 2011. Molecular Biology of the Cell. 22. 266-277.
2. Yamamoto M, Morita R, Mizoguchi T, Matsuo H, Isoda M, Ishitani T, Chitnis AB, Matsumoto K, Crump JG, Hozumi K, Yonemura S, Kawakami K, Itoh M. Mib-Jag1-Notch signalling regulates patterning and structural roles of the notochord by controlling cell-fate decisions. 2010. Development. 137. 2527-2537
3. Sugiyama K, Nishide K, Matsuo H, Okigawa S, Okano M, Ishitani T, Matsumoto K, Itoh M. Delta1 family members are involved in filopodial actin formation and neuronal cell migration independent of Notch signaling. 2010. Biochem Biophys Res Commun. 398. 118-124

総説

1. 石谷太, 松本邦弘, 伊藤素行. 2010.
Nemo-like kinase は Notch 転写複合体の形成を阻害し、神経細胞形成を促進する
実験医学, 28, 1417-1420
2. 石谷太, 石谷閑. 2010.
転写因子 TCF/LEF の修飾による Wnt シグナル制御
医学のあゆみ, 233, 971-978

学会発表

1. 石谷 太、石谷 閑、平尾 智子、鈴木 真帆、磯田 美帆、北川 元生、松本 邦弘、伊藤 素行
Nemo-like kinase は Notch 転写複合体の形成を阻害することにより Notch シグナルを抑制する
第 6 2 回日本細胞生物学会年会、大阪国際会議場
2010 年 5 月 19 日
2. Tohru Ishitani, Tomoko Hirao, Maho Suzuki, Miho Isoda, Shizuka Ishitani, Motoo Kitagawa, Kunihiro Matsumoto, & Motoyuki Itoh,
Nemo-like kinase promotes neurogenesis by interfering with formation of Notch transcription complex.
9th International Zebrafish Development and Genetics Conference, Wisconsin, USA
2010 年 6 月 17 日
3. Satoshi Ota, Shizuka Ishitani, Nobuyuki Shimizu, Kunihiro Matsumoto, Motoyuki Itoh, Tohru Ishitani,
Nemo-like kinase positively regulates Wnt signaling via phosphorylating Lef1 in developing midbrain tectum.
第 43 回日本発生生物学会大会 京都国際会議場
2010 年 6 月 20 日
4. Tohru Ishitani, Tomoko Hirao, Maho Suzuki, Miho Isoda, Shizuka Ishitani, Motoo Kitagawa, Kunihiro Matsumoto, & Motoyuki Itoh,
Nemo-like kinase promotes neurogenesis by interfering with formation of Notch transcription complex.
第 43 回日本発生生物学会大会 京都国際会議場
2010 年 6 月 22 日
5. 太田 聡、石谷 閑、清水 誠之、松本邦弘、伊藤素行、石谷 太
神経細胞における Wnt- β カテニン経路の活性化には、NLK による転写因子 Lef1 のリン酸化が必須である
第 16 回小型魚類研究会、埼玉
2010 年 9 月 18 日
6. 清水 誠之、太田 聡、石谷 太
ゼブラフィッシュにおける Wnt シグナルの活動の時空間的動態の可視化
第 16 回小型魚類研究会、埼玉
2010 年 9 月 18 日

7. 清水 誠之、太田 聡、石谷 太

ゼブラフィッシュ生個体における Wnt シグナルの活動の時空間的動態の可視化

BMB2010 神戸ポートピアホテル

2010 年 12 月 7 日

8. 太田 聡、石谷 閑、清水 誠之、松本邦弘、伊藤素行、石谷 太

NLK による Lef1 のリン酸化は、神経前駆細胞における Wnt/ β -catenin シグナルの伝達に必須である。

BMB2010 神戸ポートピアホテル

2010 年 12 月 7 日

9. Satoshi Ota, Shizuka Ishitani, Nobuyuki Shimizu, Kunihiro Matsumoto, Motoyuki Itoh, Tohru Ishitani,

Lef1 phosphorylation by NLK is essential for the Lef1-mediated Wnt/ β -catenin signaling in Neural progenitor cells.

4th Strategic Conference of Zebrafish Investigators, Asilomar Conference Center, USA

2011 年 1 月 31 日

蛋白質化学分野

Division of Protein Chemistry

当研究室では、細胞におけるタンパク質品質管理システムの作用機序を構造生物学、生化学、細胞生物学的アプローチにより深く理解することを目指している。中でも、蛋白質の立体構造形成において重要な役割をもつ蛋白質ジスルフィド結合の形成及び開裂に関わるレドックス因子について、分子レベルから細胞レベルまで詳細かつ網羅的な研究を展開している。特に、ほ乳類細胞の小胞体においてジスルフィド結合の形成に関わる経路 (Ero1-PDI)、および小胞体においてミスフォールド蛋白質のジスルフィド結合を還元し小胞体関連分解を促進する経路 (ERdj5-EDEM1-BiP) に焦点をあて、分子構造に立脚した研究を進めている。最近我々は、ヒト細胞の小胞体においてジスルフィド結合を創りだす因子 Ero1 α と小胞体関連分解を促進するジスルフィド還元酵素 ERdj5 の結晶構造を決定し、構造情報に基づく系統的な機能解析と合わせ、ジスルフィド結合の形成・開裂を介した小胞体品質管理の分子機構を解明するに至った。Ero1 α に関する研究成果は EMBO Journal 誌に、ERdj5 に関する研究成果は Molecular Cell 誌にそれぞれ掲載した。

平成22年12月にテクニカルスタッフである飯田裕果が退職した。一方、平成23年度4月より学術研究員として佐藤吉美が加わり、また増井 翔史が博士課程に進学する。本年度は、学術研究員3名、博士課程学生1名、テクニカルスタッフ1名の体制で研究を開始する予定である。

A. ヒト由来ジスルフィド結合形成因子 Ero1 α の構造と機能制御メカニズム (原著論文4に対応)

蛋白質ジスルフィド結合は、インスリンや免疫グロブリンなどの生合成において必須の化学結合であり、ヒト細胞における蛋白質ジスルフィド結合形成システムを分子構造レベルで理解することは細胞生物学的にも医学的にも極めて重要である。真核細胞においてジスルフィド結合の形成は主として小胞体内で進行し、その中心的役割を担うのがEro1 α -PDI酸化経路である。Ero1 α -PDIシステムは、これまで本研究室にて徹底的に研究を進めた大腸菌のDsbB-DsbAジスルフィド結合形成システムの真核細胞における機能ホモログである。

我々は、ヒト細胞にてジスルフィド結合を創りだすフラビン酵素Ero1 α の結晶構造を2.3 Å分解能で決定することに成功した。Ero1 α は補酵素であるFAD分子をfour-helix bundleの基本骨格中に有しており、その近傍にはFADとの結合に関わる幾つかの芳香族アミノ酸が存在する。このEro1 α の活性中心の構造を決定することにより、Ero1 α 中でFAD分子とCys391-Cys394ペアが共役してジスルフィド結合を創りだす化学スキームが原子レベルで明らかとなった。

重要なこととして、Ero1 α はジスルフィド結合を創るに伴い活性酸素種の源である過酸化水素を産出し、Ero1 α がオーバーワークすることにより酸化ストレスを誘起することが知られている。したがってEro1 α は、小胞体内のレドックス環境を鋭敏にセンスし、自身の活性を制御する巧妙な機構を有する。このフィードバック制御はEro1 α 中に存在する四つのシステイン (Cys94, Cys99, Cys104, Cys131) の間のジスルフィド結合形成パターンに依存することが報告されている。すなわち、高活性状態ではCys94-Cys99間で、不活性状態ではCys94-Cys131間で（おそらくCys99-Cys104間も）それぞれジスルフィド結合は形成される。しかしながら、このジスルフィド結合の組換えによる活性制御の分子機構の詳細は不明であった。そこで我々はEro1 α の高活性状態および不活性状態両方の結晶構造を解き、比較検討を行った。その結果、機能制御に関わる四つのシステインは全て一つのループ領域に集中して存在し、Ero1 α の全体構造はこれら二つの状態で大きな差異はなかった。しかしながら、二つの状態間の決定的な差はこれらシステインを含むループのflexibilityの違いにあった。一次構造上近接するCys94-Cys99間でジスルフィド結合が架かる高活性状態の場合、このループ領域の電子密度は全く観察されず、可動性が極めて高いことが示唆された。これに対し、Cys94-Cys131間のlong rangeのジスルフィド結合が架かる不活性状態の場合、このループ領域の電子密度がはっきりと現れ、高活性状態に比べ、よりrigidになっていることが示唆された。実はこのループ領域は、Ero1 α の活性制御に関わるだけでなく、PDIから直接電子を受け取り、FADを含む活性中心へ電子を伝達する機能も兼ねている。したがって、ジスルフィド結合の組換えによるループ領域の可動性の制御はEro1 α 分子内の電子移動反応の制御に直結し、この機構によりEro1 α のPDI酸化活性が厳密にコントロールされていることが明らかとなった。

B. Ero1 α -PDI 相互作用様式の解明 (原著論文 1 に対応)

ヒト細胞の小胞体内には約 20 種類もの PDI ファミリー蛋白質が存在し、それらは類似の構造をもつにもかかわらず、Ero1 α はPDIのみを効率的に酸化することが知られている。そこで我々は、ドッキングシミュレーション及び系統的な生化学実験により Ero1 α -PDI 間の特異的な相互作用機構を解明することを試みた。その結果、Ero1 α の突出した β ヘアピンループとPDI b' ドメイン上に存在する疎水性ポケットが両蛋白質間の特異的な相互作用に重要であることが示唆された。PDI b' ドメイン中には基質の結合に関わるとされる疎水性ポケットが存在するが、このPDIの疎水性ポケットはEro1 α との結合においても重要であった。さらに、PDIのEro1 α に対する親和性はPDIの活性部位(CxxCモチーフ)の酸化還元状態により制御されていることが示された。すなわち、Ero1 α がPDIを酸化するとEro1 α はPDIから解離し、次に新生ポリペプチド鎖がPDIの疎水性ポケットに結合することで基質にジスルフィド結合が導入されるという段階的反応モ

デルが提唱された。現在、Ero1 α -PDI 相互作用機構に関するさらなる知見を得るため、Ero1 α -PDI 複合体の結晶構造解析を進めている。

C. ERdj5が促進する糖蛋白質の小胞体関連分解経路の構造基盤（原著論文2に対応）

分泌蛋白質や膜蛋白質の合成の場である小胞体には、蛋白質の正しいフォールディングを促すシステムが存在する一方、ミスフォールドした蛋白質を適正に処理するシステムも存在する。このシステムは蛋白質品質管理機構と呼ばれ、細胞の恒常性を維持する上で不可欠である。この機構の一つである小胞体関連分解（ERAD）を促進する因子ERdj5は、酸化的な環境である小胞体においてジスルフィド結合還元酵素として働き、ミスフォールド蛋白質の誤ったジスルフィド結合を還元する注目すべき酵素である（Ushioda et al. *Science*, 2008）。ERdj5は、小胞体における代表的な分子シャペロンBiPと結合するJドメインを持ち、ミスフォールド蛋白質の糖鎖を特異的に認識するレクチン様蛋白質EDE1と協同的にはたらくことが示唆されている。そこで我々は、ERdj5の小胞体関連分解における機能発現メカニズムを解明する目的で、ERdj5全長の結晶構造解析に取り組み、一年半以上に渡る徹底的かつ網羅的なサンプル調整条件および結晶化条件の検討の結果、2.4 Å分解能でその構造を解くことに成功した。

その結果、ERdj5はJドメインと6つのチオレドキシン様ドメインから成ることが明らかとなった。これら6つのチオレドキシン様ドメインは同一平面上に並び、酸化還元活性部位である四つのCys-X-X-Cysモチーフは全てこの平面のJドメイン側に位置していた。興味深いことに、ERdj5の全体構造は、N末端から4番目と5番目のチオレドキシン様ドメイン間のリンカー領域を境に二つのクラスター（N末側クラスター、C末側クラスター）に分断されることが明らかとなった。得られた ERdj5 全長の構造情報を基に系統的な生化学実験及び細胞生物学実験を行ったところ、ミスフォールドタンパク質のジスルフィド結合を還元する主要な活性部位がC末側クラスターに存在することが判明した。さらに、C末側クラスターに存在する二つの Cys-X-X-Cys モチーフは共に還元力に富み、*in vitro*の精製系においてインシュリンに対する高い還元活性を有することも判明した。また、C末側クラスターはミスフォールドタンパク質の糖鎖構造を認識する因子EDE1との結合にも関与することが判明した。さらに、ミスフォールド蛋白質が最初にカルネキシンに認識され、次にEDE1に受け渡されたのちERdj5によって還元され、最終的にBiPに受け渡されるという詳細なERAD経路の分子メカニズムを明らかにした。現在は、EDE1-ERdj5及びBiP-ERdj5間の相互作用様式を解明するため、それら複合体の構造解析及び生化学的解析を進めている。

D. ERdj5によるBiP活性化の分子基盤

小胞体に存在する分子シャペロン BiP は小胞体関連分解(ERAD)において、ERdj5 によって還元された基質を受け取り、ディスロコンへ受け渡す役割を担っている。我々はERdj5 と BiP の相互作用機序およびERdj5 による BiP の ATPase 活性亢進の分子機構を明らかにするため、BiP 単独、およびERdj5 J-domain と BiP の複合体の結晶構造解析と生化学的研究に取り組んでいる。

BiP の結晶構造解析について、ATP 結合ドメインの単結晶を得ることができ、分解能 2.6Å でその構造を決定した。次に、BiP と ERdj5 J-domain 複合体の結晶構造解析を行うため、今回決定した BiP の結晶構造と当研究室ですでに構造が決定されている ERdj5 全長の結晶構造を用いてドッキングシミュレーションを行い、両蛋白質の結合様式を予測した。このシミュレーションの結果を基に、分子間のジスルフィド結合により安定化された BiP-ERdj5 J-domain 複合体の作製を試みた。その結果、ATP 存在下で両蛋白質を比較的効率よく分子間ジスルフィド結合によりリンクさせることに成功した。現在、大量調整に向けて条件の最適化を行い、結晶化を試みている。

次に、ERdj5 全長、J-domain、J-Trx1 領域による BiP の ATPase 活性亢進を定量的に測定した。その結果、J-domain>全長>J-Trx1 の順で BiP の ATPase 活性は上昇していた。ERdj5 全長よりも J-domain の活性亢進の効果が大きかったのは、全長の場合に比べ J-domain のみの方が BiP との立体障害が少なく、より高い親和性で結合するためであると考えられる。一方、J-Trx1 では ATPase 活性の亢進がほとんど見られなかったことは、Trx1 領域と BiP との間に大きな立体障害があることを示唆する。これらの考察はドッキングシミュレーションの結果ともよく一致しており、BiP と ERdj5 間の相互作用には、両蛋白質間の立体障害を軽減するため J-domain の構造上の柔軟性が重要であることが示唆された。

業績目録

原著論文

1. Masui, S., Vavassori, S., Fagioli, C., Sitia, R. and Inaba, K.* 2011
Molecular basis of cyclic and specific disulfide interchange between human Ero1 α and PDI
J. Biol. Chem. in press
2. Hagiwara, M.[†], Maegawa, K.[†], Suzuki, M.[†], Ushioda, R., Araki, K., Matsimoto, Y., Hoseki, J., Nagata, K.* and Inaba, K.* 2011 ([†]These authors equally contributed to this work.)
Structural basis of an ERAD pathway mediated by the ER-resident disulfide reductase ERdj5
Mol. Cell 41, 432-444
3. Ishitani, S., Inaba, K., Matsumoto, K. and Ishitani, T. 2011
Homo-dimerization of Nemo-like kinase is essential for activation and nuclear localization
Mol. Biol. Cell 22, 266-277

4. Inaba, K. *, Masui, S., Iida, H., Vavassori, S., Sitia, R. and Suzuki, M. 2010
Crystal structures of human Ero1 α reveal the mechanisms of regulated and targeted oxidation of PDI
EMBO J. 29, 3330-3343

総説

1. Inaba, K. 2011
Crystal structure of Ero1 α , a flavoenzyme responsible for protein disulfide generation in human cells
Spring 8 Research Frontier 2010 in press
2. 稲葉 謙次 2011
小胞体品質管理を支えるジスルフィド結合形成・開裂因子の構造基盤
生体機能関連化学ニュースレター Vol. 25, p3-6
3. Inaba, K. * 2010
Structural basis of protein disulfide bond generation in the cell.
Genes to Cells, 15, 935-943

学会発表

国際学会

1. Inaba, K. (2011, 2/10-14)
Crystal structures of Ero1 and ERdj5 reveal the mechanisms of ER quality control in mammalian cells (invited)
The 7th G-COE international symposium on Stem Cells and Regenerative Medicine, Singapore
2. Inaba, K. (2010, 10/ 31-11/3)
Structural basis of an ERAD pathway mediated by the ER-resident protein disulfide reductase ERdj5 (invited)
The 10th conference of the Asian Crystallographic Association, Busan, Korea
3. Inaba, K. (2010, 9/13-16)
Structural basis of regulated protein disulfide bond formation in human cells (invited)
The 3rd international symposium on protein community, Nara, Japan
4. Inaba, K. (2010, 5/9-14)
Crystal structures of mammalian human Ero1 α and ERdj5, the enzymes involved in ER quality control (invited)
Gordon Research Conference on thiol-based redox regulation & signaling, Lucca, Italy

国内学会

1. 稲葉 謙次 (2011, 3/9-10)
蛋白質ジスルフィド結合の形成および開裂に関わる細胞レドックスシステムの構造的基盤 (招待講演)
大阪大学蛋白質研究所セミナー、大阪
2. 増井 翔史, 鈴木 守, 飯田 裕果, Stefano Vavassori, Roberto Sitia, 稲葉 謙次 (2011, 3/9-10)
ヒト細胞中における蛋白質ジスルフィド結合形成システム Ero1-PDI の分子基盤 (ポスター)
大阪大学蛋白質研究所セミナー、大阪
3. 稲葉 謙次 (2010, 12/7-10)
Convergent evolution of the protein disulfide bond formation systems in the biological kingdoms (招待講演)
BMB2010、神戸
4. 増井 翔史, 飯田 裕果, 鈴木 守, Stefano Vavassori, Roberto Sitia, 稲葉 謙次 (2010, 12/7-10)
ヒト細胞におけるタンパク質ジスルフィド結合形成システム Ero1-PDI の分子基盤 (口頭&ポスター)
BMB2010、神戸
5. 稲葉 謙次 (2010, 12/3-5)
細胞内の蛋白質ジスルフィド結合形成装置の構造的基盤 (招待講演)
平成22年度日本結晶学会年会、大阪
6. 稲葉 謙次 (2010, 6/16-18)
小胞体品質管理にかかわるジスルフィド結合形成・開裂因子の分子基盤 (兼オーガナイザー)
第10回日本蛋白質科学会年会、札幌
7. 前川 憲一、萩原 誠智、鈴木 守、潮田 亮、新木 和孝、松本 悠史、實関 淳、永田 和宏、稲葉 謙次 (2010, 6/18)
小胞体内在性ジスルフィド結合還元酵素 ERdj5 を介した小胞体関連分解経路の構造的基盤 (ポスター)
第10回日本蛋白質科学会、札幌
8. 稲葉 謙次 (2010, 6/15)
細胞における蛋白質ジスルフィド結合形成の構造基盤 (招待講演)
日本生化学会北海道支部講演会、札幌

器官発生再生学分野

Division of Organogenesis and Regeneration

器官発生再生学分野では、哺乳動物の「発生」や「再生」、「疾患」について、幹細胞の性状理解と機能制御を中心に研究を展開している。特に、肝臓や腸、膵臓、食道などの一般的に内臓と呼ばれる消化器系器官の発生メカニズムや損傷後の再生メカニズム、幹細胞の機能破綻による疾患の発症メカニズムの解明に向け、遺伝子、細胞、組織、器官、個体レベルの実験を通じて多角的に研究を進めている。

2010 年度においては、鈴木淳史 (SSP 学術研究員・特任准教授)、中野貴子 (非常勤研究員・医学)、姫野絵美 (学術研究員)、関谷明香 (テクニカルスタッフ)、松本 (旧姓：久保山) 宏美 (テクニカルスタッフ)、郡島英理子 (技能補佐員) に渕上惣一郎 (医科学修士 1 年) が加わり、また、兼行紋子 (テクニカルスタッフ) が 2010 年 3 月末で退職したため、総勢 7 名で研究を遂行した。

A. マウス胎仔肝幹細胞の分離・回収と機能解析

肝臓の発生は、心臓に近接した前腸内胚葉が心臓や間質組織からの刺激によって肝臓に特化することで始まる。肝臓を構成する細胞には肝上皮細胞 (肝細胞と胆管上皮細胞) や血液細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞など複数あるが、そのうちの肝細胞と胆管上皮細胞だけが前腸内胚葉由来であり、それらの起源は同一の細胞であると考えられている。この細胞は、数十年前から肝芽細胞 (hepatoblast) と呼ばれ、肝芽細胞こそ肝臓の幹細胞 (肝幹細胞) であると考えられてきた。ところが、肝芽細胞が肝幹細胞の性質を満たす細胞か否かを実験的に証明するには、従来の実験技術では不十分であった。それは、肝臓が肝上皮細胞以外にも多くの種類の細胞を含む複雑な構造体であるがために、数が少なく、形態的に他の細胞と見分けがつかない肝芽細胞だけを肝芽細胞以外の細胞から完全に切り離して解析することが難しかったためである。そこで我々は、肝芽細胞を他の細胞から選別する手法として、細胞表面抗原を抗体で染色した細胞を生きたまま回収可能な装置であるフローサイトメトリー (fluorescence activated cell sorting: FACS) を利用した。そして、回収された細胞の性状をクローナルな解析系 (1 つ 1 つの細胞を個別に解析する手法) にて調べ、結果として、高い増殖能、多分化能、自己複製能、肝組織再構築能といった肝幹細胞の特性をすべて満たし、マウス胎仔肝臓細胞の 10 万個にわずか 6 個しか存在しない肝芽細胞が $c\text{-Met}^+ \text{CD49f}^{+/low} c\text{-Kit}^- \text{CD45}^- \text{TER119}^-$ 細胞画分に極めて限定して含まれることを突き止め、その同定と特異的分離・回収に成功した

(Suzuki et al., 2000, 2002 ; 特許登録済み)。

このように、独自の手法を確立してマウス胎仔肝臓から肝芽細胞 (= 肝幹細胞) を分離できることから、肝発生において肝芽細胞の増殖や分化を司る分子メカニズムにアプローチすることが可能になった。実際に、これまで行った研究によって、肝芽細胞の自己複製や肝細胞分化は、肝細胞増殖因子 (HGF) やオンコスタチン M (OSM) などの液性因子、C/EBP α などの転写因子、コラーゲンやラミニンなどの細胞外マトリックスによって制御されていることが判明した (Suzuki et al., 2003a)。そこで次に、肝発生における T-box 転写因子の役割を解析した。T-box ファミリーに属する転写因子は、多くの器官や組織の発生において重要な役割を担っているが、肝発生における役割についてはこれまで不明であった。我々はまず、マウス胎仔肝臓における T-box 転写因子の発現を網羅的に調べてみた。すると、17 個ある T-box 転写因子の中で 7 個の T-box 転写因子の発現がマウス胎仔肝臓で確認された。次に、マウス胎仔肝臓の細胞をフローサイトメトリーにて画分化し、それぞれの細胞集団を分離・回収して 7 個の T-box 転写因子の発現について調べた。その結果、7 個の T-box 転写因子のうち *Tbx3* だけが c-Kit⁻ CD45⁻ Ter119⁻ 細胞画分の肝上皮細胞集団に発現が認められた。さらに、*Tbx3* は c-Met⁺ c-Kit⁻ CD45⁻ Ter119⁻ 細胞画分の肝芽細胞集団において極めて強く発現していた。そこで、肝発生における *Tbx3* の機能解析を行う目的で、*Tbx3*^{-/-}マウスの胎仔肝臓を用いて研究を行った。驚くことに、*Tbx3*^{-/-}マウスの胎仔肝臓はとても小さく、肝上皮細胞の増殖が強く抑制されていた。また、肝上皮細胞集団のうち、肝細胞の数は激減していたが、胆管上皮細胞の数は増加していた。これらの表現型が肝芽細胞の機能異常によるものか否かを調べるべく、フローサイトメトリーを用いて *Tbx3*^{-/-}マウスの胎仔肝臓から肝芽細胞を分離・回収し、*in vitro* における単一細胞培養法によってその増殖能と分化能を解析した。その結果、*Tbx3*^{-/-}肝芽細胞のコロニー形成能は著しく低下しており、また、肝細胞へはほとんど分化せず、胆管上皮細胞へ優位に分化した。続いて肝芽細胞における *Tbx3* の作用機序を調べた結果、*Tbx3* は *p19*^{luc} の発現を抑制することで肝芽細胞の増殖と肝細胞への分化を促進しており、逆に *Tbx3* による *p19*^{luc} の抑制が減少もしくは停止すると肝芽細胞は増殖を止め胆管上皮細胞に分化することが判明した。これらの結果から、*Tbx3* は *p19*^{luc} の抑制を介して肝芽細胞の増殖と分化を制御することにより、肝臓の発生を進める上で必須の役割を担っていることが明らかとなった (Suzuki et al., 2008a)。

以上のように、マウス胎仔肝臓からの肝芽細胞分離技術と分離した肝芽細胞のクローナルな解析系を組み合わせることで、肝芽細胞の性状解析を迅速かつ極めて正確に遂行できることが証明された。よって、今後もこれら独自の解析系を駆使し、引き続き肝芽細胞の性状解析を行っていく。

B. 肝再生メカニズムの解明と成体マウス肝幹細胞の分離・回収

アポロドーロスが著わしたギリシャ神話にも登場するように、肝臓は我々哺乳類で唯一の「再生する器官」であり、その再生の様子は小さい頃に見たトカゲ尾の再生を彷彿とさせるエレガントでダイナミックなものである。一般的な肝再生は、幹細胞や前駆細胞の増殖を伴わない成熟肝細胞の増殖再活性化による代償性肥大であるが、そのメカニズムには未だ謎の部分が多い。そこで我々は、肝細胞の増殖再活性化や再生終了時の増殖停止など、肝再生を司る重要なステップを制御する分子メカニズムを明らかにすべく研究を行っている。最近の研究では、肝再生シグナルに応じて肝細胞内で急速に分解される分子を発見し、その分解が肝細胞の増殖活性化のトリガーになっていることを見出した（論文投稿中）。また、九州大学生体防御医学研究所・分子医科学分野との共同研究によって、SCF 型ユビキチンリガーゼにおける基質タンパク質のレセプター分子である Fbxw7 が肝細胞の増殖や脂質代謝、肝幹細胞の分化を制御することも明らかにした（Onoyama et al., 2011）。Fbxw7 の欠損は肝臓に非アルコール性脂肪性肝炎（non-alcoholic steatohepatitis; NASH）に似た症状をもたらすことから、本研究は NASH の原因究明や治療法の開発にもつながる成果といえる。

一方、成熟肝細胞の増殖が阻害された特殊な状況では、幹細胞や前駆細胞の増殖が活性化して肝臓を再生すると考えられており、我々は肝臓の幹細胞システムの全体像を理解する目的で、これら成体マウス肝臓に存在する肝幹細胞の分離・回収とその機能解析も行っている。本研究では、まず、成体マウスに DDC という薬剤を投与することで幹細胞や前駆細胞の増殖を誘導し、マイクロアレイ解析によって DDC 投与時に発現上昇する遺伝子を網羅的に調べた。その結果、他の組織幹細胞でも発現が確認されている CD133 という細胞表面分子の発現が上昇していた。引き続き行った免疫染色により、CD133 が肝臓の門脈周囲に存在する小型細胞に発現していることが判明したため、抗 CD133 抗体を用いて、肝臓中から CD133⁺ CD45⁻ TER119⁻ 細胞を分離し、クローナルな解析系を用いて機能解析を行った。その結果、DDC 投与時の肝臓に含まれる CD133⁺ CD45⁻ TER119⁻ 細胞は、高い増殖能、多分化能、自己複製能という肝幹細胞の特性を有していた。また、分離した CD133⁺ CD45⁻ TER119⁻ 細胞を培養下で増やし、人の高チロシン血症のモデルマウスである FAH 欠損マウスに移植したところ、ドナー細胞は肝臓内に生着して増殖し、2 ヶ月後には肝臓の大部分を再構築していた。この実験では、非移植群がすべて死亡したのに対し、移植を受けた数十匹のマウスすべての生存が可能であった。このように、CD133⁺ CD45⁻ TER119⁻ 細胞は肝組織再構築能も兼ね備えた細胞であり、結論として、

マウス胎仔肝臓に続き、成体マウス肝臓からも肝幹細胞を分離することが可能になった (Suzuki et al., 2008b ; 特許出願済み)。また、これら特殊状況下で出現する肝幹細胞の形態的特徴は、人の肝炎や肝がんなどで観察される細胞に似ていることから、成体マウスの肝幹細胞研究は、肝炎や肝がんに対する肝幹細胞の役割を検証するための基盤科学になりうる。そこで、DDC を投与した p53 欠損マウスから CD133⁺ CD45⁻ TER119⁻ 細胞を分離し、CD133⁺ CD45⁻ TER119⁻ 細胞画分以外の細胞画分に含まれる細胞と腫瘍形成能について比較した。その結果、p53 を欠損した CD133⁺ CD45⁻ TER119⁻ 細胞のみが免疫不全マウスの皮下で腫瘍を形成し、腫瘍の内部には肝細胞がんと胆管上皮細胞がんの両者が混在していた (Suzuki et al., 2008b)。このことから、DDC 投与時に出現する CD133⁺ CD45⁻ TER119⁻ 細胞は、肝がんに含まれる「がん幹細胞」のもとになる細胞である可能性が高く、今後、肝がんのがん幹細胞についても研究を展開していく。

C. 肝細胞分化関連遺伝子の導入による非肝細胞からの肝細胞作製技術

現在、様々な肝疾患に対して脳死肝移植・生体肝移植医療が確立されているが、ドナー臓器の不足や拒絶反応などの問題は依然解消されておらず、肝細胞移植などの効率が良い低侵襲治療への移行が望まれている。また、代謝中枢的役割を有する肝細胞を用いた薬剤反応性テスト（薬効・毒性）においては、個人に適した薬剤の選択が可能になるテーラーメイド医療の確立と発展を担う重要な技術革新のひとつと考えられている。このように、肝細胞は多くの面で利用価値の高い細胞であるが、患者の生体組織から直接採取できる細胞の数には限界があり、また肝細胞は生体外で増殖させることが困難なために、肝細胞を用いた医療応用へのステップは実験段階を脱することができないのが現状である。この高いハードルを越えるためには、肝細胞以外の細胞から肝細胞を新たに生み出すといった画期的な技術開発が必要と考えられる。そこで我々は、マウスおよびヒトの非肝細胞から肝細胞を直接作製することが可能な新技術を開発し、作製した肝細胞を肝再生医療や薬剤反応性テストに利用することを目指して研究を行っている。最近の研究では、マウスの皮膚由来繊維芽細胞に肝細胞分化誘導因子を導入することで、肝細胞に非常によく似た細胞を誘導することに成功している（論文投稿中；特許出願済み）。我々の発見は、細胞分化の可塑性を研究するよい研究対象を提供するとともに、肝細胞移植や人工肝臓、肝細胞を使った薬剤反応性テストなどへの応用が期待できる。

D. 腸幹細胞の性状解析と腫瘍形成メカニズムの解明

腸上皮組織は 3～4 日でターンオーバーしているため、常に幹細胞から腸上皮細胞が

供給され続けていることが分かる。このように、腸管には明確な幹細胞システムが存在するが、生体内では活発に増殖する腸幹細胞を生体外で培養しても増殖はせず、腸幹細胞を生体外で維持することは不可能であった。そこでまず、我々は腸幹細胞の増殖を活性化する分子を探索し、最終的に上皮成長因子 (EGF) を同定した。そして、培養液に EGF を添加することで、マウス胎仔、成体マウス、成人の腸幹細胞を生体外でそれぞれ培養・維持することに成功した (Suzuki et al., 2010)。現在では、腸幹細胞の機能制御メカニズムとその破綻がもたらす腫瘍形成メカニズムの解明を念頭に、腸幹細胞の培養実験系に遺伝子改変マウスを用いた *in vivo* の解析系を組み合わせる研究を行っている。

業績目録

原著論文

1. Suzuki, A., Sekiya, S., Gunshima, E., Fujii, S., Taniguchi, H. 2010.
EGF signaling activates proliferation and blocks apoptosis of mouse and human intestinal stem/progenitor cells in long-term monolayer cell culture.
Lab Invest 90, 1425-1436.
2. Onoyama, I., Suzuki, A., Matsumoto, A., Tomita, K., Katagiri, H., Oike, Y., Nakayama, K., Nakayama, K.I. 2011.
Fbxw7 regulates lipid metabolism and cell fate decisions in the mouse liver.
J Clin Invest 121, 342-354.

学会発表

1. Suzuki, A. (2010, 4/17)
Prospective isolation and clonal analysis of hepatic stem cells in adult mouse liver (Invited speaker)
The 3rd Pan Pacific Symposium on Stem Cells Research, Taichung, Taiwan
2. Yoshitake, S., Hikichi, T., Suzuki, A., Masui, S. (2010, 5/14)
Global expression analysis of somatic stem cells *in vitro* (ポスター)
第 8 回幹細胞シンポジウム、兵庫
3. 鈴木淳史、関谷明香、久保山宏美、郡島英理子 (2010, 6/18)
遺伝学的手法を用いた肝オーバル細胞の系譜解析 (一般口演)
第 17 回肝細胞研究会、秋田

4. Suzuki, A. (2010, 6/21)
Induction of functional hepatocytes from fibroblasts by defined factors (Invited Speaker)
43rd Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists jointly sponsored
by the Asia-Pacific Developmental Biology Network (JSDB-APDBN) meeting, Kyoto, Japan
5. 鈴木淳史 (2010, 6/26)
肝オーバル細胞の分離と系譜解析 (招待講演)
第20回日本サイトメトリー学会、東京
6. 鈴木淳史 (2010, 9/24)
肝オーバル細胞の分離と系譜解析 (一般口演)
第69回日本癌学会学術総会、大阪
7. Suzuki, A. (2010, 12/7)
Prospective isolation and clonal analysis of murine hepatic stem cells (Invited Speaker)
BIT's 3rd Annual World Congress Regenerative Medicine & Stem Cells, Shanghai, China
8. Suzuki, A. (2011, 2/12)
Prospective isolation and *in vivo* genetic lineage tracing of hepatic oval cells (Oral presentation)
The 7th Global COE International Symposium and 6th
Young Investigators Forum "Cancer Stem Cells Inflammation and Immunity", Singapore