

[0027]九州大学生体防御医学研究所年報 : 2012

<https://doi.org/10.15017/26861>

---

出版情報 : 九州大学生体防御医学研究所年報. 27, 2013. 九州大学生体防御医学研究所  
バージョン :  
権利関係 :

生体多階層システム研究センター  
Multi-scale Research Center for Medical Science

## プロテオミクス分野

### Division of Proteomics

准教授：松本 雅記

Associate Professor : Masaki Matsumoto, Ph.D.

プロテオミクス分野では、タンパク質の総体であるプロテオームを解析するための技術開発とその応用を目指すと共に、多くの研究者に対して最先端技術の提供を行っている。基本技術としては精密質量分析によるショットガン・プロテオミクス、ターゲット・プロテオミクス、ペプチドマスマフィンガープリンティング等を用い、さらに ICAT, iTRAQ, SILAC, mTRAQ 等の安定同位体標識を用いた定量情報付加による高度のプロテオミクス技術を擁している。さらに従来個別解析であった MRM 技術を改変して大規模データ取得を目指す次世代プロテオミクス技術の開発を行っている。現在、13 台の質量分析計を有し、幅広いプロテオミクス技術への要請に対応が可能となっている。

プロテオミクス分野は、分野所属の松本雅記准教授とテクニカルスタッフ 1 名（崎山明恵）に加え、技術室所属の技官 1 名（木庭絵美子）とテクニカルスタッフ 1 名（小田瑞穂）、および研究所所属のテクニカルスタッフ 1 名（高見知代）で実際の研究開発及びサービス業務を進めている（2013 年 3 月 31 日現在）。

#### A. 酵素-基質関係解明に向けた総合的なアプローチ

ユビキチン介在性のタンパク質分解機構は、さまざまなシグナル伝達因子や細胞周期制御因子などの量的制御を司っており、広範な生命現象への関与が示されている。ヒトゲノム情報の解読により、基質特異性を決定する酵素であるユビキチンリガーゼ (E3) が 600 種類以上存在することが示されたが、個々の E3 が標的とする基質分子はほとんど未同定のままであり、この酵素-基質関係の網羅的解明はユビキチン化が如何にして生命現象を制御するかを知る上で極めて本質的である。

SCF 型ユビキチンリガーゼにおいては F-box タンパク質が基質特異性を担っており、分解される基質分子に特異的に結合する。現在、約 70 種類の F-box タンパク質が知られているが、その大部分は対応する基質分子が同定されていない。われわれは F-box タンパク質の基質分子を、酵素-基質の結合を指標としてプロテオミクス技術を用いて網羅的に同定する方法、DiPIUS 法 (Differential Proteomics-based Identification of Ubiquitylation Substrates) を開発した。結合を指標としたスクリーニングでは、F-box タンパク質と基質が結合すると基質は速やかに分解されてしまうという問題があったが、われわれは F-box ドメインへ変異を導入することにより、基質とは結合するが基質は分解されない状況を作り上げた。野生型と F-box 変異型の免疫沈降産物を定量的プロテオーム解析法である SILAC (Stable Isotope Labeling by Amino acids in Cell culture) 法を用いて比較することにより、容易に基質候補分子の同定が可能となった。

われわれは DiPIUS 法を用いて F-box タンパク質である Skp2, Fbxw7  $\alpha$ , Fbx15 の既知の基質である p27, c-Myc, IRP2 をそれぞれ同定することができた。また mHepa 細胞 (Hepatocyte cell line),

C2C12 細胞 (myoblast cell line), Neuro2A 細胞 (neuroblastoma) 等様々な細胞を用いて DiPIUS 法による Skp2, Fbxw7  $\alpha$  の網羅的な基質同定をおこなった結果, それぞれの F-box タンパク質は細胞特異的に分解する基質が異なることがわかった. さらにわれわれは本解析で複数の新規基質候補を同定しており, 現在これらが真の基質であるかを検証すると共に, 新規基質の分解による生理学的な役割の解明を進めている.

DiPIUS 法はユビキチン化が分解のシグナルとなる全てのユビキチンリガーゼに应用可能である. 現在, VHL (Cu12-box 型) のような他の複合体型ユビキチンリガーゼに加えて, Mdm2 等の単量体型ユビキチンリガーゼへの应用を進めており, 既知の基質である HIF- $\alpha$  や p53 をそれぞれ同定した他, 複数の新規基質候補を同定できた. 本方法のさらなる应用によって, 多様な生体機能分子の量的・質的制御メカニズムの解明が飛躍的に促進されることが期待できる.

## B. ユビキチンプロテオームの網羅的解析技術の確立

遺伝子情報に基づき合成されたタンパク質は, その多くが特定の翻訳後修飾を受けることでさまざまな機能を発揮する. このタンパク質の修飾反応を調べることは, 細胞機能全体を理解するうえで必要不可欠である. このタンパク質の翻訳後修飾の解析には, 質量分析計 (mass spectrometry; MS) が大きな威力を発揮する. 近年の質量分析計の高精度・高感度化および検索エンジンなど周辺技術向上により, 多種多様なタンパク質の翻訳後修飾部位を正確かつ効率よく検出できるようになった. 最も多くの修飾部位が同定されている翻訳後修飾はリン酸化である. 一方, ユビキチン化ではユビキチン化ペプチドの回収法の開発が遅れているため, これまでに開発されたいくつかの方法によって修飾部位の同定が試みられてきたものの, 同定されたユビキチン化部位は数百箇所程度にとどまっている.

われわれは変異型ユビキチンを用いて二段階精製と二段階酵素消化を組み合わせることにより, ユビキチン化修飾部位を効率よく検出する新方法を開発した. 本同定法を用いて, HEK293T 細胞内のユビキチン化部位の網羅的解析を行い, 1,392 箇所のユビキチン化部位を同定することができた. ユビキチン化タンパク質としては, 794 個であった. 今回, 同定されたユビキチン化タンパク質やその修飾部位を調べると, 既知の報告通りのユビキチン化部位が検出できた. また, これまでのユビキチン化タンパク質の網羅的解析では同定することができなかった, ユビキチン化依存的に分解される不安定なタンパク質である p53, HIF-1 $\alpha$ , Geminin, p27<sup>Kip1</sup> などのユビキチン化部位も同定することができた. 加えて, ユビキチンの 7 箇所のリジン残基と, 直鎖状ポリユビキチン鎖形成時に使用される N 末端のユビキチン化も検出することができた. 本ユビキチン化部位の網羅的解析により得られたユビキチン化部位情報から, ユビキチン化修飾が, 標的タンパク質の 1 次および 2 次構造に対し, 選択性を持つかどうか調べるために, バイオインフォマティクスによる解析を行った. 得られた 1,392 箇所のユビキチン化リジン残基の前後 10 アミノ酸をデータベースから抽出し, データベースからランダムに抽出した 10,000 箇所のリジン残基の前後 10 アミノ酸を WebLogo 上で比較した. その結果, 1 次構造におけるユビキチン化修飾のコンセンサス配列を見出すことはできなかった. 2 次構造については, Protein Data Bank に登録されていた 151 個のユビキチン化タンパク質の立体構造情報を抽出し,  $\alpha$ -helix,  $\beta$ -sheet, Turn 構造とそれ以外の 4 つに分類した. 抽出したユビキチン化タンパク質内の 290 箇所のユビキチン化リジン残基と, 2,463 箇所すべてのリジン残基の 2 次構造領域を比較しても, 有意差は認められ

なかった。われわれの結果から、ユビキチン化修飾は特定の1次および2次構造を認識していないと推測された。さらに、Gene Ontology (GO) slim からユビキチン化タンパク質情報を抽出して、各機能分類を行った。アノテーションが付いていたユビキチン化タンパク質と、GO slim に登録されている全タンパク質を比較したところ、ユビキチン化タンパク質の細胞内局在では、細胞質に局在する割合が、他の場所に比べ若干高いことが判明した。

p27<sup>Kip1</sup>は細胞増殖に関してブレーキとして作用するサイクリン依存的キナーゼ (CDK) 阻害分子の一つであり、細胞増殖およびガンの悪性度との関係において重要な細胞周期制御因子である。今回、われわれの網羅的解析から、この分子のユビキチン化部位 (K165) を同定することができた。そこで、本法により同定されたユビキチン化部位の生物学的意義を調べるために、このリジン残基をアルギニン残基に置換した変異体 (K165R) p27<sup>Kip1</sup>を作製して、ユビキチン化能や分解速度変化を野生型p27<sup>Kip1</sup>と比較した。K165R変異体では、野生型p27<sup>Kip1</sup>に比べ、*in vivo*および*in vitro*でのユビキチン化能が低下していた。さらに、タンパク質合成阻害剤であるシクロヘキシミド存在下での変異型と野生型 p27<sup>Kip1</sup>の半減期を調べると、p27<sup>Kip1</sup>のK165R変異により細胞内での分解速度の遅延が認められた。以上より、本同定法によって得られたp27<sup>Kip1</sup>の165番目のリジン残基は、ユビキチン化依存的分解のために主要なリジン残基であることが証明された。

## 業績目録

### 原著論文

1. Hoshi, H., Hao, W., Fujita, Y., Funayama, A., Miyauchi, Y., Hashimoto, K., Miyamoto, K., Iwasaki, R., Sato, Y., Kobayashi, T., Miyamoto, H., Yoshida, S., Mori, T., Kanagawa, H., Katsuyama, E., Fujie, A., Kitagawa, K., Nakayama, K. I., Kawamoto, T., Sano, M., Fukuda, K., Ohsawa, I., Ohta, S., Morioka, H., Matsumoto, M., Chiba, K., Toyama, Y., Miyamoto, T. 2012.  
Aldehyde-stress resulting from Aldh2 mutation promotes osteoporosis due to impaired osteoblastogenesis.  
J. Bone Miner. Res., 27, 2015-2023.
2. Yumimoto, K., Matsumoto, M., Oyamada, K., Moroishi, T., Nakayama, K. I. 2012.  
Comprehensive identification of substrates for F-box proteins by differential proteomics analysis.  
J. Proteome Res., in press.
3. Liu, N., Matsumoto, M., Kitagawa, K., Kotake, Y., Suzuki, S., Shirasawa, S., Nakayama, K. I., Nakanishi, M., Niida, H., Kitagawa, M. 2012.  
Chk1 phosphorylates the tumour suppressor Mig-6, regulating the activation of EGF signalling.  
EMBO J., 31, 2365-2377.
4. Narumi, R., Murakami, T., Kuga, T., Adachi, J., Shiromizu, T., Muraoka, S., Kume, H., Kodera, Y., Matsumoto, M., Nakayama, K., Miyamoto, Y., Ishitobi, M., Inaji, H., Kato, K., Tomonaga, T. 2012.  
A strategy for large-scale phosphoproteomics and SRM-based validation of human breast cancer tissue samples.  
J. Proteome Res., 11, 5311-5322.
5. Hirano, A., Yumimoto, K., Tsunematsu, R., Matsumoto, M., Oyama, M., Kozuka-Hata, H., Nakagawa, T., Lanjakomsiripan, D., Nakayama, K. I., Fukada, Y. 2013.

FBXL21 regulates oscillation of the circadian clock through ubiquitination and stabilization of cryptochromes.  
Cell, 152, 1106-1118.

## 総説

1. 中津海洋一, 松本雅記, 中山敬一. 2012.  
mTOR ターゲットのリン酸化プロテオミクス.  
細胞工学, 31, 1360-1367.
2. 松本雅記, 中山敬一. 2013.  
次世代定量プロテオミクスによる細胞周期研究.  
実験医学 (増刊) 「ヒトと医学のステージへ拡大する細胞周期 2013」 (中山敬一 編, 羊土社, 東京)  
336-342.

## 学会発表

1. 幡野敦, 松本雅記, 中山敬一. (2012, 7/26).  
定量的リン酸化プロテオミクスによる Calcineurin の網羅的基質探索.  
第10回日本プロテオーム学会, 東京.
2. 松本雅記. (2012, 7/26).  
定量プロテオミクスのための試料調製 (教育講演)  
第10回日本プロテオーム学会, 東京.
3. 中山敬一, 松本雅記, 押川清孝, 松崎芙美子. (2012, 7/26).  
ヒトプロテオーム絶対定量プロジェクト: 網羅的ターゲットプロテオミクスの開発と応用. (シンポジウム)  
第10回日本プロテオーム学会, 東京.
4. 松本雅記, 松崎芙美子, 高見知代, 小山田浩二, 中山敬一. (2012, 11/24).  
情報基盤プロテオミクスによるヒトプロテオームの絶対定量.  
第5回定量生物学の会年会, 東京.
5. 渡邊心也, 杉本のぞみ, 松本雅記, 中山敬一, 藤田雅俊. (2012, 12/11).  
プロテオミクスアプローチを用いた新規 GRWD1 結合タンパク質の網羅的同定による GRWD1 の機能解明.  
第35回日本分子生物学会年会, 福岡.
6. 中津海洋一, 松本雅記, 小山田浩二, 中山敬一. (2012, 12/13).  
mTOR と転写をつなぐ新規分子 FOXX1 の発見とがん進展における促進作用. (ワークショップ)  
第35回日本分子生物学会年会, 福岡.
7. 足達俊吾, 穂本真佐江, 田中利好, 日置雄策, 村上裕, 菅裕明, 松本雅記, 中山敬一, 堀本勝久, 家村俊一郎, 夏目徹. (2012, 12/13).  
質量分析計による RNA 制御因子の同定法の開発とその応用. (ワークショップ)  
第35回日本分子生物学会年会, 福岡.

8. 平野有沙, 恒松良佑, 松本雅記, 尾山大明, 秦裕子, ランジャコーンシリパンダーリン, 中山敬一, 深田吉孝. (2012, 12/14).  
F-box タンパク質によるユビキチン化を介したCRY タンパク質の安定性制御. (ワークショップ)  
第35回日本分子生物学会年会, 福岡.
9. Matsumoto, M., Matsuzaki, F., Oshikawa, K., Oyamada, K., Goshima, N., Natsume, T., Nakayama, K. I. (2012, 12/15).  
Accurate and absolute quantification of human proteome by large-scale targeted proteomics. (シンポジウム)  
第85回日本生化学会大会, 福岡.
10. Kuroda, S., Yugi, K., Kubota, H., Soga, T., Matsumoto, M., Nakayama, K. I. (2012, 12/15).  
Unbiased identification of global network for signaling and metabolism from trans-omic data. (シンポジウム)  
第85回日本生化学会大会, 福岡.
11. 平野有沙, 恒松良佑, 松本雅記, 尾山大明, 秦裕子, ランジャコーンシリパンダーリン, 中山敬一, 深田吉孝. (2012, 12/16).  
時計タンパク質CRYの安定化を担う新規ユビキチンリガーゼの同定. (口頭発表)  
第85回日本生化学会大会, 福岡.

## 構造生物学分野

Division of Structural Biology

教授：神田 大輔

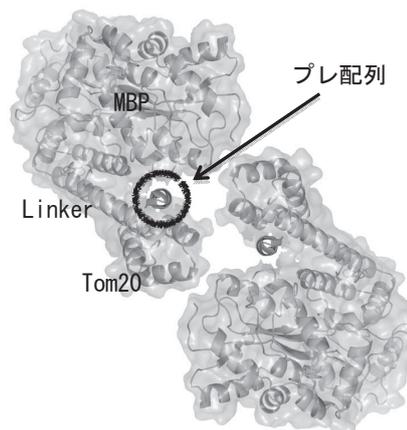
Professor : Daisuke Kohda, Ph.D.

タンパク質の立体構造を決定し、他の分子との相互作用を詳細に解析することで、分子認識の問題や酵素活性発現メカニズムを構造生物学の手法を駆使して明らかにする。ターゲット選択にあたっては、単に生物学的機能の重要性だけでなく、分子機能が構造生物学的に興味ある課題を含んでいるかどうかを重視する。生物現象として、細胞内のタンパク質の行き先を指定する仕組み、タンパク質の糖鎖修飾、エンドサトーシス、DNA複製、修復、組み換えなど対象は多岐にわたっている。分子的な観点で見た場合、相互作用が弱くかつ特異性が広いケースに興味があり、これを「ゆるい分子認識 (promiscuous recognition)」と呼んでいる。研究手法として、X線結晶解析、核磁気共鳴解析、電子顕微鏡（単粒子解析と電子線トモグラフィ解析）を用いることで、ゆるい分子認識の構造的基盤の解明を目指している。同時に、新しい方法論の開発を進める必要があり、現在は「タンパク質結晶内に結晶コンタクト効果がないような空間を創る」技術の開発を進めている。

### A. 結晶コンタクト効果フリーなタンパク質結晶構造解析技術の開発

タンパク質の機能的な側面を捉えるには、タンパク質とリガンドの複合体の構造解析を行う必要がある。複合体の結晶構造が溶液中におけるリガンドとの相互作用を正しく反映していることは、多くの複合体の結晶構造解析から確立されている。しかし、リガンドがタンパク質に結合した状態において“大きな”運動性を持つ場合には、リガンドの構造は結晶コンタクトの影響を受けて、取りうる状態の1つに固定されていると考えられる。これを結晶スナップショットと呼ぶ。問題はスナップショットを多数集めても、リガンドの結合状態の運動性を正しく表現できないことにあり、これを「サンプリング問題」と呼ぶ。この問題を実験的に解決するために、リガンドの周囲に結晶コンタクト効果フリーな“隙間”を結晶格子中につくることを目指している（図 A. 1）。具体的な課題として、Tom20 タンパク質に結合した状態のプレ配列ペプチドの大きな運動性を定量的に解析することを設定する。

Tom20 蛋白質はミトコンドリア外膜に存在し、プレ配列受容体として機能している。プレ配列は 15 から 70 残基の長さの多様なアミノ酸配列であり、Tom20 との相互作用は弱い ( $K_d \sim$  数十  $\mu$ M)。我々は、Tom20 によるプレ配列認識には複



図A.1 Tom20をMBPに融合させることで、2つのタンパク質の間に隙間空間を創り、そこにプレ配列（Oで囲っている）を配置する。

数の結合状態が存在し、それぞれの状態はプレ配列の部分的な特徴を認識していて、それらの状態の間の動的平衡によりプレ配列全体の特徴が認識されるという「分子プラスチックモデル」を提唱している。プレ配列を結晶コンタクトフリー空間に配置することで、プレ配列の運動性を保持した状態で結晶解析を行い、結合状態におけるプレ配列の運動性の大きさ（振幅情報）に関する情報の取得を目指している。

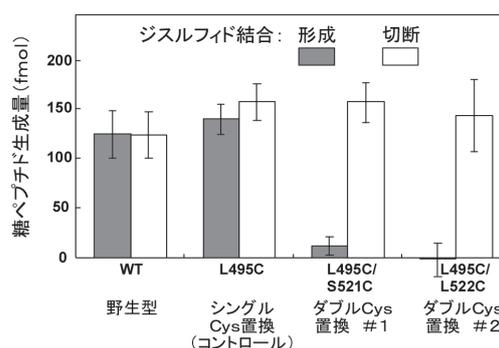
3つの技術要素は、①タグタンパク質との融合タンパク質を用いる、②タグタンパク質と対象タンパク質を一本の長いヘリックスを用いて硬く接続する、③占有率を保障するために分子間ジスルフィド結合を用いて、リガンドを対象タンパク質にテザリングする。である。タグタンパク質としてマルトース結合タンパク質(MBP)を用いる。MBPのC末端部分はヘリックス構造をとっていて、Tom20のN末端ヘリックスと直接つなげることで一続きのヘリックスとなるようにデザインした。2つのヘリックスの間に挿入するアミノ酸残基数を変えることで、Tom20とMBPの相対配置を変化させ、プレ配列がクリスタルコンタクトの影響を受けない隙間に位置するように調節できる。プレ配列をテザリングするのは占有率を100%にするためである。親和性の弱い相互作用では、リガンドの占有率がしばしば100%より小さくなり、結果の解釈を困難にすることが多い。

モデルビルディングから挿入配列の長さを選択し、4残基とした融合タンパク質MBP-Tom20の結晶構造を実際に得ることができた。設計通り2つのタンパク質は一本のヘリックスで接続されていて、挿入したリンカー部分もヘリックスを形成していた。さらに結晶格子の隙間にプレ配列の結合部位が向いており、隙間の体積も十分であった。次に、ラットALDH由来のプレ配列のC末端にシステイン残基を導入し、Tom20とジスルフィド結合を形成させ、MBP-Tom20-SS-pALDHの結晶を得て構造解析を行った。モデルバイアスを避けるために、分子置換の際にはプレ配列に相当するモデルは置かなかつた。差フーリエ電子密度マップをつくと、結合サイト付近にプレ配列ペプチド由来と思われる棒状の電子密度を得ることができた。この棒状の電子密度を定量的に解釈する方法論を開発することが今後の課題である。

## B. オリゴ糖転移酵素の構造生物学

タンパク質のアスパラギン残基への糖鎖付加

(N型糖鎖付加)は翻訳後修飾の代表である。コンセンサス配列 Asn-X-Thr/Ser 中の Asn 残基への糖鎖の転移反応はオリゴ糖転移酵素と呼ばれる膜タンパク質酵素が触媒している。N型糖鎖修飾は真核生物だけではなく、古細菌にも広く存在する。また、真正細菌の一部にも存在する。OST酵素の触媒サブユニットはSTT3/Ag1B/Pg1B(真核/古細菌/真正細菌)と呼ばれるタンパク質である。我々は昨年度にAg1BのC末端球状ドメインの結晶構造には大きな可塑性を示すセグメントがあり、また実際に溶液中ではこのセグメントは大きな内部運動を持つことをNMR緩和時間解析を用い



図B.1 古細菌 *Pyrococcus fuirusus* の Ag1B-L の C末端球状ドメイン内に人工的なジスルフィド結合を導入して、可動セグメントの動きを制限すると活性が完全に消失した。DTTを用いてジスルフィド結合を切断すると活性が完全に回復した。

て示した。今年度は古細菌のオリゴ糖転移酵素全長を大腸菌の膜分画に発現してアッセイする系を用いて、柔軟性を抑制するような人工的なジスルフィド結合を導入すると、酵素活性が完全に消失するが、還元してジスルフィド結合を切断すると完全に活性が回復することを示した(図 B. 1, 文献 5)。可動セグメントは糖鎖修飾コンセンサス配列である Asn-X-Ser/Thr 配列の+2の位置のセリンとスレオニン残基を認識するセリン・スレオニンポケットの形成に関与している。オリゴ糖転移酵素は新生ポリペプチド鎖を効率よくスキャンするために、C末端球状ドメイン内に存在する構造可塑性を巧みに利用している可能性が考えられる。すなわち、コンセンサス配列中のセリンとスレオニン残基を確実に捉え、糖転移が終了したら、すばやくポリペプチド鎖を離して次のコンセンサス配列が来るのに備えるために、セリン・スレオニンポケットの形成と破壊をすばやく行うようなメカニズムの存在が想定される。

### C. エンドサイトーシスおよび細胞内膜輸送に関与するタンパク質群の構造機能解析

エンドサイトーシスは、真核細胞が外部から物質を細胞内に取り込む基本生命現象の一つであり、クラスリン依存性エンドサイトーシスやカベオラ依存性エンドサイトーシスなどが含まれる。一方、細胞内膜輸送は、脂質二重膜で構成された、オルガネラと呼ばれる種々の細胞内小器官間での、小胞を介した物質輸送システムである。このうち、クラスリン依存性エンドサイトーシスに関し、クラスリン被覆小胞からの被覆タンパク質の解離を担うと考えられる synaptojanin 2 タンパク質について、5-phosphatase ドメインと SAC ドメイン(5-phosphatase とは異なる基質特異性の phosphatase 活性をもつ)を、それぞれ大腸菌での GST 融合タンパク質として大量発現することに成功した。これは、これら二つのドメインを含む発現の困難な約 1000 残基の領域に対応するフラグメントを、構造機能解析のために、個別に発現させた SAC ドメインと 5-phosphatase ドメインを SortaseA で酵素的に結合することで得る試みの一環である。また、エンドサイトーシス関連タンパク質である SGIP1 の  $\mu$  ホモロジドメインを構造機能解析のために大量発現精製することに成功した。さらに、種々の細胞内膜輸送経路において様々な積み荷タンパク質の局在を決定する acidic cluster モチーフを特異的に認識する PACS2 タンパク質の acidic cluster モチーフ結合ドメインを構造機能解析のために大量発現精製することに成功した。

### D. 葉緑体タンパク質の構造機能解析

植物の葉緑体は、植物体に光が当たると、その刺激にตอบสนองして葉緑体の局在が変化することが知られている。葉緑体は弱い光を受けた場合、光への集積反応が見られ、逆に強い光を受けた場合、その光ダメージを避けるための回避反応が起こる。*Arabidopsis thaliana* の葉緑体の動態に関与する CHUP1 タンパク質の結晶構造解析を行っている。CHUP1 の C 末端ドメインの結晶を得て構造決定を行った。その結果、アクチンを重合するタンパク質ドメインと共通する構造があることが判明した。この結果に基づき、さらに長いコンストラクトの結晶化とアクチンとの共結晶のスクリーニングを行っている。

\*九州大学・理学研究院 和田正三特任教授との共同研究

## E. 超分子複合体の電子顕微鏡による単粒子解析

電子顕微鏡による単粒子解析法は試料の結晶化等を必要とせず、X線やNMRでは解析困難な超分子複合体を、生理的条件下で立体構造解析できる。我々はDNAの複製、修復、組換え等に働く超分子複合体を中心に解析を進めている。これらのタンパク質はDNAとの共結晶が得難い。昨年に引き続きMCMと共に複合体を形成し複製の初期に関与するGINS複合体、ヌクレオソームとクロマチンリモデリング因子FACTとの複合体、tRNAの修飾を行うリボザイムであるRNasePの解析等を行い、FACT-ヌクレオソームについて初期立体構造の構築に成功した。また複製フォークにおいてDNA 2重鎖を巻き戻すヘリケース複合体の構成要素であるGINS-GAN複合体の構造解析を行っている。

## F. 電子顕微鏡トモグラフィ法による観察

電子顕微鏡Polaraは併設された汎用型(Tecnai T20 FEI社, 200 kV)に比べて高圧(300 kV)の加速電圧があり、より厚い試料の観察が可能となる。好熱性古細菌*Thermoplasma acidophilum*は細胞の大きさが約 $0.5\mu\text{m}$ であり、古細菌のなかでも比較的小さく、高加速電圧の電子線を用いることで細胞全体の観察を行える可能性があり、電子顕微鏡トモグラフィ測定の良い試料である。固定・染色した*Thermoplasma acidophilum*の樹脂包埋切片(厚さ 200, 400, 500 nm)の観察を行い、Polaraのトモグラフィ機構を用いて、加速電圧300 kVにて $\pm 70^\circ$ (傾斜間隔 $2^\circ$ 以下)の傾斜シリーズの撮影を行ってトモグラフィ像を得ることができた。

## G. 技術支援活動

九州大学共同利用施設である核磁気共鳴装置(3台)と、生体防御医学研究所技術室のX線結晶回折装置およびクライオ電子顕微鏡(FEI Polara)のユーザー管理を行っている。九州大学における構造生物学の拠点形成を目指している。極低温電顕Polaraについては昨年度まで問題になっていた建物の揺れに起因する電子顕微鏡本体の振動を大幅に抑制することに成功し、良質の画像データの取得が可能となった。

九州大学(医・理)および熊本大学のX線結晶構造解析、大分大学のNMR解析、九州大学(生医・薬・農・理)および九州工業大学、京都大学、東京工業大学、産総研、東京大学の電子顕微鏡解析を支援した。

最新の構造生物学技術の普及を図る活動を続けている。今年度は、CCP4の教育コースを平成24年10月29日から11月2日まで九州大学馬出キャンパス総合研究棟で開催した。CCP4(Collaborative Computational Project No. 4)はタンパク質などの生体高分子のX線結晶構造解析のためのソフトウェアで、世界で広く使われており、教育コースは日本国内で2年に1回開催されている。ヨーロッパからCCP4プログラムの開発をしている7人の講師(代表Charles Ballard)と日本から2人の講師が、一週間のスケジュールで午前中は講義、午後はコンピュータを用いた実習形式で集中的に行った。受講者は30人で、九州大学関係者の23人に加えて、北海道大学、富山大学、熊本大学、理化学研究所、中外製薬など日本全国から参加者があつ



た。

図G.1 CCP4講習会の記念写真。X線結晶解析の最新の解析手法を学ぶことができ、大変有意義であった。

## 業績目録

### 原著論文

1. Hanawa-Suetsugu, K., Kukimoto-Niino, M., Mishima-Tsumagari, C., Akasaka, R., Ohsawa, N., Sekine, S., Ito, T., Tochio, N., Koshiba, S., Kigawa, T., Terada, T., Shirouzu, M., Nishikimi, A., Uruno, T., Katakai, T., Kinashi, T., Kohda, D., Fukui, Y., Yokoyama, S. Structural basis for mutual relief of the Rac guanine nucleotide exchange factor DOCK2 and its partner ELMO1 from their autoinhibited forms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 3305-3310 (2012)
2. Islam, M. R., Nishie, M., Nagao, J., Zendo, T., Keller, S., Nakayama, J., Kohda, D., Sahl, H. G., Sonomoto, K. Ring A of nukacin ISK-1: a lipid II-binding motif for type-A(II) lantibiotic. *J Am Chem Soc* 134, 3687-3690 (2012)
3. Nishikimi, A., Uruno, T., Duan, X., Cao, Q., Okamura, Y., Saitoh, T., Saito, N., Sakaoka, S., Du, Y., Suenaga, A., Kukimoto-Niino, M., Miyano, K., Gotoh, K., Okabe, T., Sanematsu, F., Tanaka, Y., Sumimoto, H., Honma, T., Yokoyama, S., Nagano, T., Kohda, D., Kanai, M., Fukui, Y. Blockade of inflammatory responses by a small-molecule inhibitor of the Rac activator DOCK2. *Chem Biol* 19, 488-497 (2012)
4. Matsumoto, S., Igura, M., Nyirenda, J., Matsumoto, M., Yuzawa, S., Noda, N., Inagaki, F., Kohda, D. Crystal structure of the C-terminal globular domain of oligosaccharyltransferase from *Archaeoglobus fulgidus* at 1.75 Å resolution. *Biochemistry* 51, 4157-4166 (2012)
5. Nyirenda, J., Matsumoto, S., Saitoh, T., Maita, N., Noda, N., Inagaki, F., Kohda, D. Crystallographic and NMR evidence for flexibility in oligosaccharyltransferases and its catalytic significance. *Structure* 21, 32-41 (2013)
6. Komuro, Y., Miyashita, N., Mori, T., Muneyuki, E., Saitoh, T., Kohda, D., Sugita, Y. Energetics of the Presequence-Binding Poses in Mitochondrial Protein Import Through Tom20. *J. Phys. Chem. Part B*, in press (2013)
7. Inoue, M., Yasuda, K., Uemura, H., Yasaka, N., Schnauffer, A., Yano, M., Kido, H., Kohda, D., Doi, H., Fukuma, T., Tsuji, A., Horikoshi, N.

Trypanosoma brucei 14-3-3I and II proteins predominantly form a heterodimer structure that acts as a potent cell cycle regulator in vivo.

J. Biochem., in press (2013)

## 学会発表

1. Shunsuke Matsumoto (2012, 5/29-30)  
Crystal structure of the C-terminal globular domain of oligosaccharyltransferase from *Archaeoglobus fulgidus* at 1.75 Å resolution  
Interact2012, Munich, Germany
2. 松本俊介, 嶋田睦, ニレンダジェイムス, 井倉真由美, 神田大輔 (2012, 6/20)  
古細菌 *Archaeoglobus fulgidus* 由来オリゴ糖転移酵素の結晶化と構造解析  
第12回日本蛋白質科学会年会, 名古屋
3. 藤浪大輔, ニレンダジェイムス, 神田大輔 (2012, 6/21)  
真核型オリゴ糖転移酵素の結晶化の試み  
第12回日本蛋白質科学会年会, 名古屋
4. ニレンダジェイムス, 松本俊介, 斉藤貴士, 神田大輔 (2012, 6/21)  
アスパラギン結合型糖鎖修飾を触媒するオリゴ糖転移酵素の分子運動性の解析  
第12回日本蛋白質科学会年会, 名古屋
5. 嶋田睦, 末次史郎, 松永笑子, 外山光俊, 寺田貴帆, 白水美香子, 竹縄忠臣, 山本雅貴, 横山茂之 (2012, 6/21)  
Cdc42によるCIP4のクラスリン被覆ピットへの局在機構の構造的基盤  
第12回日本蛋白質科学会年会, 名古屋
6. 松岡礼, 斉藤貴士, 松本俊介, 嶋田睦, 神田大輔 (2012, 6/22)  
Tom20に結合したプレ配列ペプチドのクリスタルコンタクトフリーな結晶構造解析  
第12回日本蛋白質科学会年会, 名古屋
7. 神田大輔 (2012, 7/19-21)  
大きな運動性に起因するサンプリング問題(結晶解析)と意味無し平均問題(NMR)の解決に向けた試み(チュートリアル)  
第13回若手NMR研究会, 北海道千歳市支笏湖
8. 神田大輔 (2012, 10/4-5)  
蛋白質結晶中に創り出した隙間を利用して分子の動きを観るための新しいX線結晶解析(口演)  
蛋白研セミナー, 大阪
9. 真柳 浩太 (2012, 10/3)  
単粒子解析による複製関連複合体の制御機構の研究  
遺伝研研究集会「遺伝情報の安定性を支える分子メカニズム」, 三島
10. 松岡 礼, 神田大輔 (2012, 10/25)  
蛋白質結晶中に創り出した隙間を利用して分子の動きを観るための新しいX線結晶解析  
平成24年度日本結晶学会年会, 仙台

11. Daisuke Kohda (2012, 11/29)  
Structural biology of the N-glycosylation reaction (oral, invited)  
The 20th Anniversary of the Mizutani Foundation for Glycosciences, Tokyo
  
12. 岩崎理紗, 田中卓, 嶋田睦, 神田大輔, 正井久雄 (2012, 12/12)  
微胞子 Cdc7-Dbf4 キナーゼ複合体の大量発現・精製・結晶化の試み  
第35回日本分子生物学会年会, 福岡
  
13. 嶋田睦, 末次史郎, 松永笑子, 外山光俊, 寺田貴帆, 白水美香子, 竹縄忠臣, 山本雅貴, 横山茂之 (2012, 12/14)  
Cdc42 による CIP4 ファミリータンパク質のクラスリン被覆ピットへの局在機構の構造的基盤 (ワークショップ)  
第35回日本分子生物学会年会, 福岡
  
14. 尾木野弘実, 石野園子, 真柳浩太, 大山拓次, 白井剛, 森川耿右, Gyri T. Haugland, Nils-Kare Birkland, 石野良純 (2012, 12/14)  
Thermoplasma acidophilum 由来 Cdc6/Orc1 とホモ4量体の GINS による MCM の相乗的活性化  
第35回日本分子生物学会年会, 福岡
  
15. Daisuke Kohda (2012, 12/14)  
Intentional creation of crystal-contact free space for monitoring large amplitude motions of proteins and ligands in protein crystals (symposium, oral)  
第85回日本生化学会年会, 福岡
  
16. 松本俊介, 嶋田睦, ニレンダジェイムス, 井倉真由美, 神田大輔 (2012, 12/15)  
古細菌型オリゴ糖転移酵素全長の結晶構造  
第85回日本生化学会年会, 福岡
  
17. 松岡礼, 神田大輔 (2012, 12/15)  
蛋白質結晶中に創り出した隙間を利用して分子の動きを観るための新しいX線結晶解析  
第85回日本生化学会年会, 福岡
  
18. 藤浪大輔, ニレンダジェイムス, 神田大輔 (2012, 12/15)  
真核型オリゴ糖転移酵素の結晶化の試み  
第85回日本生化学会年会, 福岡
  
19. James Nyirenda, Shunsuke Matsumoto, Takashi Saitoh, Nobuo Maita, Nobuo N. Noda, Fuyuhiko Inagaki, Daisuke Kohda (2012, 12/15)  
Flexibility in the C-terminal globular domain of archaeon oligosaccharyltransferase is essential for N-linked glycosylation.  
The 85th annual meeting of the Japanese Biochemical Society, Fukuoka
  
20. Shunsuke Matsumoto, Atsushi Shimada, James Nyirenda, Mayumi Igura, Daisuke Kohda (2013, 3/4-5)  
Crystal structure of an archaeal oligosaccharyltransferase, a membrane enzyme that catalyzes the transfer of sugar chains to asparagine residues of glycoproteins (oral)

- Post-GCOE Symposium & Retreat in Singapore with NUS and TLL, Singapore
21. Rei Matsuoka and Daisuke Kohda (2013, 3/4-5)  
Intentional crystal-contact free space to observe the large mobility of ligands in X-ray crystallography (oral)  
Post-GCOE Symposium & Retreat in Singapore with NUS and TLL, Singapore
  22. Shunsuke Matsumoto (2013, 3/3-8)  
Crystal structure of an archaeal oligosaccharyltransferase (selected as poster talk)  
Glycobiology Gordon Research Conference, CA, USA
  23. James Nyirenda (2013, 3/3-8)  
Flexibility in the C-terminal globular domain of oligosaccharyltransferase is essential for N-linked glycosylation  
Glycobiology Gordon Research Conference, CA, USA

## 情報生物学分野

Division of Bioinformatics

教授：須山 幹太

Professor : Mikita Suyama Ph.D.

情報生物学分野では、計算機を用いたバイオインフォマティクス解析、特に、ゲノム配列やエピゲノムについてのデータの比較解析から、遺伝子の発現制御機構やその分子進化について解明することを、研究の大きな柱としている。また、マイクロアレイや次世代シーケンサーといったハイスループットな技術革新に伴い、分子生物学全般においてバイオインフォマティクス解析、すなわち計算機を用いた大規模なデータ解析が必須となっている。このような現状においては、実験生物学者と情報生物学者の連携が重要であり、そのため当研究室では積極的に共同研究をおこなうとともに、データ解析技術の普及にも努めている。

情報生物学分野は平成 24 年 1 月に発足した比較的新しい研究室である。本年度は須山幹太（教授）、佐藤哲也（助教）、岩田浩明（学術研究員）、吉原美奈子（テクニカルスタッフ）、吉村香（事務補佐員）の 5 名の体制で研究を進めてきた。

### A. 選択的スプライシング制御機構の解析

選択的スプライシングは、トランスクリプトームに多様性をもたらす機構として知られており、エクソン選択のパターンから、エクソンスキップやイントロン保持、排他的スプライシングなどの複数のタイプに分類される。なかでも排他的スプライシングでは、複数ある排他エクソンの中から常にどれか 1 つのエクソンだけを選ぶという厳格な制御がなされており、その機構の解明は大変興味深い。これまで、次世代シーケンサーから得られたヒト組織での RNA-seq 解析の結果をスプライスジャンクションの検出に応用することで、まず排他的スプライシングの網羅的な同定をおこなってきた。特に興味深いメカニズムが推測できたものに *dynamin1* 遺伝子の排他的スプライシングがある。これまでの比較ゲノム解析から、*dynamin1* の排他的スプライシングでは、特徴的な pre-mRNA の二次構造形成とその形成を阻害するスプライシング制御因子タンパク質の結合が競合することで、排他性を保証していると推測した。配列パターンから、スプライス制御因子タンパク質として RNA 結合タンパク質である FOX1/FOX2 の関与が考えられた。FOX2 については CLIP-seq のデータが論文発表されており、そのデータからもこのタンパク質と *dynamin1* の転写産物との結合が示されている。

### B. 転写のリードスルーによる融合遺伝子生成機構の解析

EST 解析の進行に伴い、ゲノム配列上で近傍に位置する遺伝子と融合した形の転写産物の存在するが知られるようになった。これらのうちの多くのものは、染色体の転座やトランススプライシングなどではなく、転写時のリードスルーによる融合 (transcription-induced chimera) であると考えられている。次世代シーケンサー応用

した RNA-seq 解析の登場により、転写と共役した融合遺伝子を、全トランスクリプトームレベルで網羅的に調べることが可能になった。これまで、それらを検出するためのパイプラインを構築し、融合遺伝子の解析をおこない、隣接した複数の遺伝子にまたがるリード配列から融合遺伝子と考えられる事例を約300件見つけてきた。さらに、融合遺伝子の生成メカニズムの解明を目指し、様々なエピジェネティック・プロファイルや転写に関する配列モチーフとの比較・検討をおこなった。その結果、転写と共役した融合遺伝子の遺伝子間領域には、インシュレーターのコンプォネントの一つである CTCF の結合部位が有意に少ないこと、さらに、上流側遺伝子の転写終結点に存在する polyA 付加シグナルが有意に弱い上、上流側遺伝子の転写終結点下流のヌクレオソーム密度が有意に低いことを見出した。これらの結果から、こういった傾向が、転写のリードスルーを引き起こす機構に関与していると推測される。

### C. ChIP-Seq データを解析するための新規手法

ChIP-Seq 法は、クロマチン免疫沈降 (ChIP) 法で回収した DNA 断片をシーケンシングすることにより、タンパク質が結合するゲノム領域を決定する技術である。解析対象は、転写因子結合領域だけでなく、ヒストンメチル化などエピジェネティックな修飾領域まで多岐にわたる。ChIP-Seq データを解析するために、リードが集積しているゲノム領域 (ピーク) を検出するプログラムがよく使われている。これまでに様々なプログラムが開発されている中、転写因子の結合で見られるようなシャープな形状のピーク検出が得意な解析プログラムは比較的多く、ヒストン修飾領域のようにブロードな形状のピークを得意とするプログラムは僅かしかない。そこで我々は、ヒストン修飾のピーク領域を検出するための解析手法を開発している。ヒストン修飾の違いによって、ゲノム上の狭い範囲で変化が見られる場合もあれば、その変化が広範囲にわたる場合もある。我々の解析アプローチは、遺伝子発現情報を利用して、それぞれのヒストン修飾の情報を最大限に抽出できる最適なゲノム領域のサイズを見つけ出す、というものである。その後、そのサイズにゲノム領域を分割して、リードの集積を計算する。これまでに、ヒトのヒストン修飾のサンプルにおいて、既存のプログラムでは解析困難であった H3k27me3 の ChIP-Seq データから、特徴的なピーク領域の検出に成功している。今後は、様々なヒストン修飾に対して適用していく予定である。

### D. コドンアライメント作成プログラムの改良

アミノ酸配列アライメントにもとづいた核酸配列アライメント、すなわちコドンアライメント、を作成することは、同義置換・非同義置換の計測など、分子進化学的解析の基礎となる技術である。しかし、コドンアライメント作成のためのプログラムは少なく、しかも既存のものは汎用性に乏しかったため、新たなプログラムとして PAL2NAL を独自に開発し、ウェブサービスとして公開し (<http://www.bork.embl.de/pal2nal>)、世界中の多くの研究者に使用されるようになった。それに伴い年間の被引用数も増加し、2006年の論文発表から通算の被引用数は304件 (2012年2月25日現在)、また、2012年中の被引用数は75件であった。それと伴に、多数の問合せやコメントを受けており、そ

れらを参考に、より良いプログラムとなるよう継続して改良している。

## E. 共同研究

次世代シーケンサーの普及に伴い、実験系研究者の間でも大規模なデータ解析に対する需要が急増している。本研究室は、生体防御医学研究所内や学内の研究室との連携をはじめ、理化学研究所免疫アレルギー科学総合研究センター、山口大学、基礎生物学研究所、東北大学などの研究室と、主にデータ解析の上での共同研究をおこなっている。

たとえば、九州大学医学部小児科と理化学研究所免疫アレルギー科学総合研究センターと共同で、免疫不全症の患者とその家族について、エクソーム解析と RNA-seq によるトランスクリプトーム解析を併用した発症機構の解明を目指した研究を進めている。エクソーム解析は哺乳類ゲノムの約 1% に相当するエクソン領域だけを濃縮することで、遺伝的変異が表現型に強く影響しそうな遺伝子領域のみを効率的に、かつ、全ゲノム配列決定にくらべて十分な深度で、配列決定をおこなうものである。近年、遺伝的疾患の原因変異の同定において、目覚ましい進展をもたらしている。一方、この方法で同定される変異はエクソン領域とその近傍のスプライス部位程度に限られ、遺伝子発現制御領域の変異による疾患原因を特定することは困難である。そこで我々は、RNA-seq によるトランスクリプトーム解析を併用することで、まず、SNV を介したアレルの分離をおこない、その情報を元にアレル毎の発現を調べることで allelic imbalance などを特定し、アレル間の発現差をもたらすような発現制御領域の変異をも対象とした疾患原因ローカスの探索をおこなっている。

## 業績目録

### 原著論文

1. T. Yokobori, H. Iinuma, T. Shimamura, S. Imoto, K. Sugimachi, H. Ishii, M. Iwatsuki, D. Ota, M. Ohkuma, T. Iwaya, N. Nishida, R. Kogo, T. Sudo, F. Tanaka, K. Shibata, H. Toh, T. Sato, G.F. Barnard, T. Fukagawa, S. Yamamoto, H. Nakanishi, S. Sasaki, S. Miyano, T. Watanabe, H. Kuwano, K. Mimori, K. Pantel, M. Mori. 2013.  
Plastin3 is a novel marker for circulating tumor cells undergoing the epithelial-mesenchymal transition and is associated with colorectal cancer prognosis.  
Cancer Res. (in press).
2. M. Villacorte, K. Suzuki, A. Hirasawa, Y. Ohkawa, M. Suyama, T. Maruyama, D. Aoki, Y. Ogino, S. Miyagawa, T. Terabayashi, Y. Tomooka, N. Nakagata, G. Yamada. 2012.  
 $\beta$ -Catenin signaling regulates Foxa2 expression during endometrial hyperplasia formation.  
Oncogene. (in press).
3. Y. Takatsuno, K. Mimori, K. Yamamoto, T. Sato, A. Niida, H. Inoue, S. Imoto, S. Kawano, R. Yamaguchi, H. Toh, H. Iinuma, S. Ishimaru, H. Ishii, S. Suzuki, S. Tokudome, M. Watanabe, J.I. Tanaka, S.E. Kudo, H. Mochizuki, M. Kusunoki, K. Yamada, Y. Shimada, Y. Moriya, S. Miyano, K. Sugihara, M. Mori. 2012.

The rs6983267 SNP Is Associated with MYC Transcription Efficiency, Which Promotes Progression and Worsens Prognosis of Colorectal Cancer.

Ann. Surg. Oncol. (in press).

4. T. Yokobori, K. Mimori, M. Iwatsuki, H. Ishii, F. Tanaka, T. Sato, H. Toh, T. Sudo, T. Iwaya, Y. Tanaka, I. Onoyama, H. Kuwano, K.I. Nakayama, M. Mori. 2012.

Copy number loss of FBXW7 is related to gene expression and poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma.

Int. J. Oncol. 41, 253-259.

5. H. Iwata, O. Gotoh. 2012.

Benchmarking spliced alignment programs including Spaln2, an extended version of Spaln that incorporates additional species-specific features.

Nucleic Acids Res. 40, e161.

6. S. Ishimaru, K. Mimori, K. Yamamoto, H. Inoue, S. Imoto, S. Kawano, R. Yamaguchi, T. Sato, H. Toh, H. Iinuma, T. Maeda, H. Ishii, S. Suzuki, S. Tokudome, M. Watanabe, J. Tanaka, S.E. Kudo, K. Sugihara, K. Hase, H. Mochizuki, M. Kusunoki, K. Yamada, Y. Shimada, Y. Moriya, G.F. Barnard, S. Miyano, M. Mori. 2012.

Increased risk for CRC in diabetic patients with the nonrisk allele of SNPs at 8q24.

Ann. Surg. Oncol. 19, 2853-2858.

## 学会発表

1. Hiroaki Iwata, Tetsuya Sato, Mikita Suyama (2012, 10/30-11/2).

Difference in splicing mechanisms between alternative and constitutive exons.

Computational Biology Research Center Workshop 2012 (CBRC2012), 東京.

2. 岩田浩明, 佐藤哲也, 須山幹太 (2012, 9/24-26).

次世代シーケンサーデータを用いた転写のリードスルーの解析.

日本遺伝学会第84回大会, 福岡.

3. 岩田浩明, 須山幹太 (2012, 5/23-25).

NGSを用いたスプライシングメカニズム解析.

NGS現場の会第二回研究会, 大阪.

4. 佐藤哲也, 須山幹太 (2012, 12/11-14).

機能的な転写因子結合領域の特徴.

第35回日本分子生物学会年会, 福岡.

5. 馬場崇, 大竹博之, 佐藤哲也, 宮林香奈子, 宍戸祐里菜, 嶋雄一, 木村宏, 大川恭行, 須山幹太, 諸橋憲一郎 (2012, 12/11-14).

組織特異的転写因子 Ad4BP/SF-1 による解糖系遺伝子群の転写を介したグルコース代謝制御.

第35回日本分子生物学会年会, 福岡.

6. 大竹博之, 馬場崇, 佐藤哲也, 嶋雄一, 宮林加奈子, 木村宏, 大川恭行, 須山幹太, 諸橋憲一郎 (2012, 12/11-14).

成獣ライディッシュ細胞における新規 Ad4BP/SF-1 標的遺伝子の同定.

- 第 35 回日本分子生物学会年会, 福岡.
7. 梅河内隆成, 臼井一馬, 佐藤哲也, 須山幹太, 大川恭行, 山口政光, 吉田英樹 (2012, 12/11-14). mRNA 新規小胞体標的化機構の分子メカニズムの解明.  
第 35 回日本分子生物学会年会, 福岡.
  8. 嶋路耕平, 小西貴大, 田中伸太郎, 木村宏, 大川恭行, 佐藤哲也, 須山幹太, 吉田英樹, 山口政光 (2012, 12/11-14). ショウジョウバエヒストンメチル基転移酵素 dG9a は複眼形態形成過程において EGFR 経路の制御に關与する.  
第 35 回日本分子生物学会年会, 福岡.
  9. 藤原俊介, 堀井健志, 平塚賢, 大川恭行, 佐藤哲也, 須山幹太, 吉田英樹, 山口政光 (2012, 12/11-14). ショウジョウバエ転写因子 DREF を中心とした転写制御ネットワーク: DREF の標的としての Hippo 経路関連遺伝子の同定.  
第 35 回日本分子生物学会年会, 福岡.
  10. Hiroaki Iwata, Mikita Suyama (2012, 12/11-14). Deviation from co-transcriptional splicing in the regions involved in alternative splicing.  
第 35 回日本分子生物学会年会, 福岡.
  11. 馬場崇, 大竹博之, 佐藤哲也, 宮林香奈子, 宍戸祐里菜, 嶋雄一, 木村宏, 大川恭行, 須山幹太, 諸橋憲一郎 (2012, 10/15-18). 組織特異的転写因子 Ad4BP/SF-1 による解糖系遺伝子群の転写を介したグルコース代謝制御. 新学術領域研究「性差構築の分子基盤」第 4 回領域会議, 和歌山.
  12. 宮林香奈子, 嶋雄一, 佐藤哲也, 大竹博之, 馬場崇, 大川恭行, 須山幹太, 諸橋憲一郎 (2012, 10/15-18). 胎仔型ライディッヒ細胞における遺伝子発現プロファイルの経時的变化の解析および成獣型ライディッヒ細胞との比較.  
新学術領域研究「性差構築の分子基盤」第 4 回領域会議, 和歌山.
  13. 大竹博之, 馬場崇, 佐藤哲也, 嶋雄一, 宮林加奈子, 木村宏, 大川恭行, 須山幹太, 諸橋憲一郎 (2012, 10/15-18). 成獣ライディッヒ細胞における新規 Ad4BP/SF-1 標的遺伝子の同定.  
新学術領域研究「性差構築の分子基盤」第 4 回領域会議, 和歌山.
  14. 岩田浩明, 佐藤哲也, 須山幹太 (2012, 10/15-17). RNA-seq 発現解析データに見られる性差.  
新学術領域「性差構築の分子基盤」第 4 回領域会議, 和歌山.
  15. 須山幹太 (2012, 10/15-18). ゲノム情報解析にもとづく性差構築機構の解明.  
新学術領域研究「性差構築の分子基盤」第 4 回領域会議, 和歌山.
  16. 須山幹太 (2012, 10/3). 比較ゲノム解析・ChIP-seq 解析によるモチーフ同定の実際.  
JSBi・第 3 回アグリバイオインフォマティクス研究会「モチーフ解析の最前線」, 東京.

17. Mikita Suyama (2012, 10/19-21).  
Mechanistic analysis of transcription by using RNA-seq data.  
Frontiers in Bioinformatics, Girona, Spain.

## システムコホート学分野

Division of System Cohort

准教授：山西 芳裕

Associate Professor : Yoshihiro Yamanishi, Ph.D.

システムコホート学分野では、生命科学において重要な様々な分子（遺伝子、タンパク質、低分子化合物、薬物など）を解析するためのバイオインフォマティクスや、生命システムをネットワークとして理解するシステム生物学の研究を行っている。特に、ゲノム、トランスクリプトーム、プロテオーム、メタボローム、フェノームなどの異質なオミックスデータを統合解析し、様々な分子間相互作用ネットワーク（遺伝子制御ネットワーク、タンパク質間相互作用、代謝パスウェイ、薬物・標的タンパク質間相互作用など）を解析および予測する統計手法を開発している。また分子間相互作用ネットワーク解析を通じて、医療や創薬などの産業への応用を目指している。例えば、ケモゲノミクスや薬理ゲノミクスにおける情報技術を開発し、薬物の標的分子や副作用の予測を行っている。

システムコホート学分野はテニュアトラック制度で平成 24 年 3 月に発足したばかりの新しい研究室であり、情報生物学分野と連携して研究活動を行っている。次年度は、学術研究員が 1 名着任し、研究活動に参加する予定である。

### A. 生体分子間相互作用ネットワークの予測

生命のはたらきとは、多数の遺伝子やタンパク質などの生体分子が複雑に相互作用したネットワークのシステムとして実現されるものである。しかしながら、遺伝子制御ネットワーク、代謝パスウェイ、タンパク質間相互作用などの生体分子ネットワークはほとんどが未知であるため、それらを網羅的に予測することは挑戦的な課題である。近年、遺伝子やタンパク質に関して網羅的に得られるようになったゲノム関連データ（塩基配列、進化系統樹、遺伝子発現パターン、タンパク質発現パターンなど）から生体分子ネットワークをコンピュータ上で推定する手法の開発が期待されている。本研究では、遺伝子やタンパク質に関する様々なオミックスデータから遺伝子間・タンパク質間の機能的な相互作用ネットワークを網羅的に予測する統計手法を開発した。遺伝子やタンパク質に関する異質なデータを融合し、教師付き学習の枠組みでネットワーク推定を行う点が特長である。実際の適用例として、出芽酵母のタンパク質間相互作用ネットワークを、マイクロアレイ遺伝子発現情報、タンパク質の細胞内局在情報、系統プロファイルから予測し、その有効性を示した。また代謝パスウェイの予測への応用においては、未知の酵素反応に関わる酵素遺伝子の候補を同定する方法を開発した。そして、これらの提案手法を実装した予測システム GENIES (GEnE Network Inference Engine based on Supervised analysis) を構築した。この予測システムはウェブ上で利用可能である (<http://www.genome.jp/tools/genies/>)。

## B. 薬物・標的タンパク質間相互作用ネットワークの解析と予測

大半の薬物は標的とするタンパク質などの生体分子との相互作用を介して、薬効や副作用という形で人体に影響を及ぼす。そのため、薬物・標的タンパク質間の相互作用の網羅的同定は、医薬品の開発過程において最重要課題である。ポストゲノム研究では、ゲノム、トランスクリプトーム、プロテオームなどの遺伝子やタンパク質に関する大量のオミックスデータが得られるようになってきた。同時にハイスループットスクリーニングなどの技術の発展によって、膨大な数の化合物や薬物に関するケミカル情報や生理活性情報も蓄積されている。我々は、これらの様々なオミックスデータを有効活用し、複数の生体分子を同時に標的とする多重標的薬の特徴とその薬効・副作用を分子間相互作用ネットワークの観点から理解することを目指している。

### a. ケモゲノミクスの手法

本研究では、薬物の化学構造情報とタンパク質の配列情報の融合解析を行う「ケモゲノミクス」の枠組みで、薬物・標的タンパク質間相互作用ネットワークを予測するための手法を開発した。薬の化学部分構造、標的タンパク質の機能ドメイン情報、薬と標的タンパク質相互作用ネットワークの間の相関を検証し、相互作用に重要と考えられる薬の化学部分構造とタンパク質の機能ドメインのセットを抽出した。更に、薬の部分構造とタンパク質の機能ドメインの組み合わせに基づいて、薬とタンパク質の間の潜在的な相互作用を予測する手法を開発した。提案手法を、酵素、イオンチャネル、G蛋白質共役型受容体、核内受容体など様々なタンパク質から構成される相互作用ネットワークに適用し、進化的に異なるファミリー間で共有されるリガンド部分構造やファミリー特異的なリガンド部分構造を検出した。更に網羅的な予測を行い、薬とタンパク質の間における潜在的な相互作用を予測した。

### b. 薬理ゲノミクスの手法

本研究では、薬物の薬理作用情報とタンパク質の配列情報の融合解析を行う「薬理ゲノミクス」の枠組みで、薬物・標的タンパク質間相互作用ネットワークを予測するための手法を開発した。米国FDA（食品医薬局）で公開されている数百万人の患者に対する市販後調査報告書をテキストマイニングし、薬物間の薬理作用類似性を評価した。また化学構造類似性と比較し、標的タンパク質のパターンとの相関解析を行った。そして薬物の薬理作用類似性とタンパク質の配列類似性から薬物・標的タンパク質間相互作用ネットワークを予測する統計手法を提案し、クロスバリデーション実験でその有効性を示した。薬の分子は本来目標とした標的タンパク質にのみ結合するとは限らず、本来目標としていない複数のタンパク質に結合し、予想外の薬理作用を起こすことがある。提案手法は、そのような本来目標としていないオフターゲット分子の予測に、特に有効であることを示した。提案手法を適用することで、薬の候補化合物の未知の創薬ターゲットや、既存薬の未知のオフターゲットタンパク質を網羅的に予測し、いくつかに対しては文献情報で妥当性を確認した。

### C. 薬剤の副作用のネットワーク解析と予測

多くの薬剤は特定のタンパク質を標的とし、細胞内のタンパク質ネットワーク、あるいは分子経路全体の制御を誘導する小化合物である。薬剤の投与は、期待通りの治療効果をもたらす一方、望ましくない副作用を引き起こすこともある。副作用は軽少なものから重篤なものまであり、医薬品開発において重要な懸案であるにも関わらず、その分子作用機構はほとんど未同定のままである。本研究では、薬剤-標的タンパク質の相互作用という分子レベルでの情報と、薬剤とその副作用という表現型レベルでの情報という、異なるレベルでの情報を関連づける方法を提案した。スパーズ正準相関解析という統計的手法を適用し、薬剤-標的タンパク質相互作用データと、薬剤-副作用データの間に関連のあるタンパク質と副作用のセットを抽出した。抽出された相関セットの生物学的妥当性は、Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) と Gene Ontology (GO) データベースを用いた Pathway Enrichment 解析で評価した。その結果、同じ分子経路で働くタンパク質は、分子機能が異なっても同じ相関セットにクラスタリングされた。すなわち、ある相関セットにクラスタリングされたタンパク質の薬剤による機能制御は、同じ分子経路の活性、不活性化を通じて、同じような副作用を引き起こすのではないかと解釈することが出来る。今回提案した手法は、副作用の分子作用機序への議論を可能にするとともに、薬剤候補化合物に対して標的タンパク質プロファイルから潜在的な副作用を予測するのに有用である。また薬剤の化学構造情報も取り入れた予測モデルを構築することで、副作用の予測精度が向上することを示した。

### D. オースログ遺伝子クラスターの同定

シーケンス技術の向上によってゲノム配列の決定は急速に進んでおり、増加する新規遺伝子に対して効率的に機能アノテーションを行うことが重要となっている。遺伝子の配列類似性に基づいた分類によりオースログクラスタを作成することで、機能推定を行うことができるが、これまでに提案されているオースログクラスタ作成手法では膨大な計算が必要であり、生物種を限定せざるを得なかった。本研究では、真核生物、真正細菌、古細菌を含む 2112 種の幅広い生物種において、タンパク質をコードする 835 万遺伝子について、配列類似性に基づき、遺伝子ネットワークにおける準クリーク探索の結果と系統関係に従ってオースログ関係を評価することで、117 万クラスタからなるオースログクラスタ、KEGG OC を作成した。そのため、KEGG OC には既存のオースログデータベースと比較して次のような 3 つの特徴がある。1) 生物種数が多く、系統関係を反映した階層構造を持っている。2) 手作業による分類を含まない完全に自動化された計算により、定期的に更新を行うことが可能となっている。3) 全遺伝子が KEGG データベースと関連付けられているため、KEGG パスウェイや BRITe 機能階層分類をシームレスに利用可能である。KEGG OC は、KEGG の web サイトで公開されている OC Viewer を用いて閲覧・利用が可能である (<http://www.genome.jp/tools/oc/>)。

## 業績目録

### 原著論文

1. Kotera, M., Yamanishi, Y., Moriya, Y., Kanehisa, M., and Goto, S. 2012.  
GENIES: gene network inference engine based on supervised analysis.  
Nucleic Acids Research, 40: W162-W167.
2. Tabei, Y., Pauwels, E., Stoven, V., Takemoto, K., and Yamanishi, Y. 2012.  
Identification of chemogenomic features from drug-target interaction networks using interpretable classifiers,  
Bioinformatics, 28: i487-i494.
3. Mizutani, S., Pauwels, E., Stoven, V., Goto, S., and Yamanishi, Y. 2012.  
Relating drug-protein interaction network with drug side-effects,  
Bioinformatics, 28: i522-i528.
4. Takarabe, M., Kotera, M., Nishimura, Y., Goto, S., and Yamanishi, Y. 2012.  
Drug target prediction using adverse event report systems: a pharmacogenomic approach,  
Bioinformatics, 28: i611-i618.
5. Nakajima, N., Tamura, T., Yamanishi, Y., Horimoto, K. and Akutsu, T. 2012.  
Network completion using dynamic programming and least-squares fitting,  
The Scientific World Journal, 957620 (8 pages).
6. Yamanishi, Y., Pauwels, E., and Kotera, M. 2012.  
Drug side-effect prediction based on the integration of chemical and biological spaces,  
Journal of Chemical Information and Modeling, 52(12): 3284-3292.
7. Nakaya, A., Katayama, T., Itoh, M., Hiranuka, K., Kawashima, S., Moriya, Y., Okuda, S., Tanaka, M., Tokimatsu, T., Yamanishi, Y., Yoshizawa, A., Kanehisa, M., and Goto, S. 2013.  
KEGG OC: A large-scale automatic construction of taxonomy-based ortholog clusters.  
Nucleic Acids Research, 41: D353-D357.

### 著書

1. Yamanishi, Y. 2012.  
Chemogenomic approaches to infer drug-target interaction networks.  
Data Mining for Systems Biology, Methods in Molecular Biology Series (DeLisi, C., Kanehisa, M. and Mamitsuka, H., eds.), Springer, 97-113.

### 学会発表

#### 国際学会

1. Yamanishi, Y. (2012, 8/6-7).  
Machine learning methods to analyze and infer drug-target interaction networks.  
2012 Sapporo Workshop on Machine Learning and Applications to Biology (MLAB2012), Sapporo,

Japan.

2. Takarabe, M., Kotera, M., Nishimura, Y., Goto, S., and Yamanishi, Y. (2012, 9/8-12).  
Drug target prediction using adverse event report systems: a pharmacogenomic approach.  
The 11th European Conference on Computational Biology (ECCB2012), Basel, Switzerland.
3. Mizutani, S., Pauwels, E., Stoven, V., Goto, S., and Yamanishi, Y. (2012, 9/8-12).  
Relating drug-protein interaction network with drug side-effects.  
The 11th European Conference on Computational Biology (ECCB2012), Basel, Switzerland.
4. Tabei, Y., Pauwels, E., Stoven, V., Takemoto, K., and Yamanishi, Y. (2012, 9/8-12).  
Identification of chemogenomic features from drug-target interaction networks using interpretable classifiers.  
The 11th European Conference on Computational Biology (ECCB2012), Basel, Switzerland.
5. Takarabe, M., Kotera, M., Nishimura, Y., Goto, S., and Yamanishi, Y. (2012, 10/14-17).  
Prediction of drug-target interaction network using adverse event report systems.  
Joint Conference on Informatics in Biology, Medicine and Pharmacology, Tokyo, Japan.
6. Yamanishi, Y., Pauwels, E., Saigo, H., and Stoven, V. (2012, 10/14-17).  
Inferring chemogenomic features from drug-target interaction network using sparse canonical correspondence analysis.  
Joint Conference on Informatics in Biology, Medicine and Pharmacology, Tokyo, Japan.
7. Kotera, M., Yamanishi, Y., Moriya, Y., Kanehisa, M., and Goto, S. (2012, 10/14-17).  
GENIES: gene network inference engine in GenomeNet.  
Joint Conference on Informatics in Biology, Medicine and Pharmacology, Tokyo, Japan.
8. Yamanishi, Y., Pauwels, E., Saigo, H., and Stoven, V. (2012, 12/11-15).  
Extracting chemogenomic features from drug-target interaction network using sparse canonical correspondence analysis.  
The 23rd Genome Informatics Workshop (GIW2012), Tainan, Taiwan.
9. Kotera, M., Yamanishi, Y., Moriya, Y., Kanehisa, M., and Goto, S. (2012, 12/11-15).  
GENIES: A web-based application for supervised gene network inference engine.  
The 23rd Genome Informatics Workshop (GIW2012), Tainan, Taiwan.
10. Takarabe, M., Kotera, M., Nishimura, Y., Goto, S., and Yamanishi, Y. (2013, 1/3-7).  
Prediction of drug-target interaction network using FDA adverse event report system.  
Pacific Symposium on Biocomputing 2013 (PSB2013), Hawaii, US.

## 国内学会

1. 山西芳裕 (2012, 9/13-14).  
オミックスデータの融合に基づく分子間相互作用ネットワークの予測.  
CMRU 研究会「ネットワーク科学の数理と展開」, 仙台.
2. 山西芳裕 (2012, 11/7-9).  
医薬品の標的分子や副作用の予測における機械学習.  
第 15 回情報論的学習理論ワークショップ (IBIS2012), 東京.

3. 水谷紗弥佳, パウエルズ エドワード, ストーヴン ヴェロニク, 五斗 進, 山西芳裕 (2012, 12/11-14).  
薬剤標的タンパク質と副作用の関連分析のための統計手法.  
第 35 回日本分子生物学会年会, 福岡.
4. 守屋勇樹, 中谷明弘, 片山俊明, 伊藤真純, 平糠和志, 川島秀一, 奥田修二郎, 田中道廣, 時松敏明, 山西芳裕, 吉沢明康, 金久實, 五斗進 (2012, 12/11-14).  
KEGG OC: 系統関係に基づいた大規模オーソログクラスタの自動生成.  
第 35 回日本分子生物学会年会, 福岡.
5. 山西芳裕 (2013, 1/15).  
薬物の標的分子や副作用の予測におけるバイオインフォマティクス.  
化学研究所シンポジウム/JSBi 第 1 回生命システム理論研究会, 宇治.

## 蛋白質化学分野

Division of Protein Chemistry

准 教 授 : 稲葉 謙次

Associate Professor : Kenji Inaba, Ph.D.

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ジスルフィド結合の形成・異性化及び開裂に関わるレドックス因子について、分子構造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。近年の研究により、ヒト細胞の小胞体において、当初考えられていたよりもはるかに複雑なジスルフィド結合形成のためのネットワークが張り巡らされていることが明らかとなりつつある。当研究室では、各レドックス経路について構造情報に基づく生化学的および細胞生物学的研究を幅広く進めており、中でも、最近見つけたPDI酸化酵素 Peroxiredoxin-4 を起点としたジスルフィド結合導入経路の構造機能解析において大きな進展があった。さらに小胞体-ゴルジ体間のpH勾配を利用し、小胞体タンパク質や未成熟分泌タンパク質のゴルジ体から小胞体へのリテンションを担うPDIファミリータンパク質 ERp44 について系統的な生化学解析を行い、そのpH勾配に依存した機能発現制御機構をアミノ酸レベルで解明した。現在これら幾つかの成果に関する論文を投稿中である。

人事面では、平成24年度4月に、萩原 誠智 (学振特別研究員 PD)、小島 理恵子、奥村 正樹が博士研究員として、また井上 維がテクニカルスタッフとして当研究室に加わった。平成24年度3月に小島 理恵子が退職した一方、奥村 正樹が学振特別研究員 PD に採択された。平成25年度からは研究拠点を東北大学多元物質科学研究所に移し、上記研究課題を継続して進める予定である。

### A. 新規ジスルフィド結合形成因子 Prx4 を介した酸化経路の作用機序と生理的機能の解明

真核生物に特有な細胞内小器官である小胞体には種々のフォールディング酵素や分子シャペロンが存在し、新たに合成された膜タンパク質や分泌タンパク質の正しい立体構造形成が促進される。小胞体で合成されるタンパク質の多くはジスルフィド結合の導入を伴う酸化的フォールディングを受け、その基質には生物学的にも医学的にも重要な免疫グロブリン、インスリン、血液凝固因子などが知られている。これまで真核生物におけるタンパク質のジスルフィド結合の形成は

主として基質にジスルフィド結合を導入する protein disulfide isomerase (PDI) と PDI を再酸化する酵素 ER oxidoreductin 1 (Ero1) により行われると考えられてきた。しかしながら、哺乳動物細胞の小胞体には PDI ファミリーのタンパク質が 20 種類以上存在することが知られ、さらに 2010 年、Ero1 以外の PDI 酸化酵素が相次いで 4 種類報告された。これらの発見により、高等動物細胞の小胞体にはジスルフィド結合形成のための複数の酸化経路がネットワークを形成しているという新たな概念が確立されつつある。

我々は、過酸化水素の代謝に関わる代表的な酵素群 peroxiredoxin ファミリーの中で唯一小胞体局在性である peroxiredoxin-4 (Prx4) に着目して研究を行った。Prx4 は小胞体において高濃度に存在し、過酸化水素の酸化力を利用して PDI ファミリータンパク質を酸化すると考えられる。Prx4 を介したジスルフィド結合導入経路を同定するため生化学実験、細胞生物学実験を行ったところ、Ero1 が PDI を特異的に酸化する酵素であるのに対し、Prx4 は PDI ファミリータンパク質のうち ERp46 と P5 の酸化に特化した酵素であることが強く示唆された。また変性還元 RNase A のリフォールディング実験を行い、Prx4-PDI ファミリータンパク質を介した酸化的フォールディングの機構を詳細に解析した。その結果、PDI は基質に正しくジスルフィド結合を導入したのに対し、P5 あるいは ERp46 を介したジスルフィド結合導入は PDI を介した時よりも迅速に起こるものの、その多くは誤ったジスルフィド結合であった。つまり P5 と ERp46 は正しいジスルフィド結合を選択的に架ける能力において PDI よりも大きく劣ることが判明した。さらに興味深いことに、P5 と PDI、あるいは ERp46 と PDI 混在下で RNase A のリフォールディング実験を行ったところ、単なる足し合わせから予想されるよりも有意に速い活性回復が観測された。このことは、ERp46 あるいは P5 を介したジスルフィド結合導入と PDI によるジスルフィド結合の異性化が協同的に働くことにより、基質タンパク質の酸化的フォールディングが相乗的に加速され得ることを意味する。

次に、Prx4 による P5 および ERp46 酸化の分子機構を系統的に解析した。その結果、Prx4 が P5 や ERp46 をチオレドキシンドメイン (Trx) 単位で認識し、酸化することが明らかになった。Prx4 の C 末端領域が特にその分子間認識において重要であることを生化学的に突き止め、P5 の Trx と Prx4 の C 末端領域の複合体の結晶構造を 2.1 Å の分解能で決定することにも成功した。P5 と Prx4 の間には分子間ジスルフィド結合が形成されており、この結晶構造は Prx4 から P5 へとジスルフィド結合を受け渡す際の間状態の構造と解釈できる。

一方、Prx4 との親和性が高いもう一つの PDI ファミリータンパク質である ERp46 についても、構造解析において大きな進展があった。ERp46 は 3 つの Trx から成るが、このうち Trx1, Trx2 の X 線結晶構造をそれぞれ 2.5 Å, 0.95 Å の分解能で決定した。さらに、X 線小角散乱解析により ERp46 の全長構造を明らかにし、ERp46 がこれまで報告されている PDI ファミリータンパク質と

は異なるドメイン配置をもつことを明らかにした。また、これら Trx は Prx4 を起点として単独でも基質へのジスルフィド結合の導入を効率よく行うことを明らかにした。重要な点として、PDI の場合と異なり、ERp46 の 3 つの Trx は協調的に働くのではなく、独立的に機能していることが強く示唆された。

## B. PDI ファミリー蛋白質 (PDI, ERp46, ERp57, ERp72, P5) の酸化還元依存的な動的構造と機能

PDI ファミリー蛋白質の中で、PDI のみ酸化型・還元型両方の結晶構造が決定されている。その結果、構成単位であるチオレドキシンドメインの配向が酸化還元状態依存的に変化し、酸化型では還元型と比べ、より開いた open 構造をとっていることが明らかとなった。しかしながら、結晶構造は一般に静的な平均構造であり、クリスタルパッキングというバイアスがかかるため、溶液構造の特徴や 1 分子の動きにおいて十分な議論ができない。そこで、今回 1 分子観察として高速原子間力顕微鏡の測定を行い、酸化型 PDI が還元型 PDI よりも開閉の動きに富んだ性質をもつことを明らかにした。この PDI の開閉機構が本酵素の優れた異性化機能と関連性があるか、さらなる生化学解析を進めている。

また、Ero1 及び Prx4 を起点として、PDI ファミリー蛋白質、そして基質への一連のジスルフィドトランスファー(酸化的フォールディング)経路を明らかにするため、モデル基質として BPTI を採用し、HPLC や MALDI-TOF/MS を用いて詳細な解析を行った。その結果、ERp46 は基質へのジスルフィド導入が早いこと、PDI は基質のフォールディング中間体を認識し、迅速に天然構造への転移を促すこと(フォールディング中間体の寿命が短いこと)を明らかにした。また P5 はフォールディング中間体から天然構造への転移効率が低く、フォールディング中間体が多く蓄積した。現在 ERp46, P5 について全長の構造解析を進めており、構造的視点から PDI ファミリータンパク質の機能的性質の違いを深く考察したいと考えている。

## C. 小胞体-ゴルジ体間の pH 勾配に依存した ERp44 による Ero1 $\alpha$ の小胞体内リテンション機構の解明

真核細胞におけるジスルフィド結合の形成は主に小胞体内で進行し、Ero1-PDI酸化経路がその中心的役割を担う。ヒト組織においてユビキタスに発現している Ero1  $\alpha$  は小胞体で働く酸化酵素であるにもかかわらず、小胞体局在シグナル (KDEL配列) をもたない。そこで、KDEL配列を有する ERp44 とゴルジ体内で結合することで、Ero1  $\alpha$  は COP I 被覆ベシクルを介しゴルジ体から小胞体へと逆行輸送される。小胞体中で PDI酸化酵素として振る舞う Ero1  $\alpha$  がゴルジ体では ERp44 と強く結合し、一方小胞体では両者が解離するという親和性制御機構を解明するべく研究に取り組んでい

る。ERp44はPDIファミリータンパク質の1つであり、a-b-b' の3つのチオレドキシソ様ドメインと約45残基から成るC末端tail（以下C-tailと呼ぶ）によって構成される。注目すべきことに、aドメイン上には疎水性パッチが、b'ドメイン上には疎水性ポケットがそれぞれ存在するが、結晶構造上これらはC-tailによって覆われている。我々はin vitroでの生化学解析の結果、pH依存的なC-tailの開閉がERp44とEro1  $\alpha$  間の親和性を制御する（すなわち、pH6.5付近のゴルジ体ではC-tailが開きERp44とEro1  $\alpha$  が強く結合する。一方、pH7.2付近の小胞体ではC-tailが閉じるためERp44はEro1  $\alpha$  から解離する）ことを突き止めた。さらに系統的な変異体解析の結果、(i) aドメインとC-tailの間にシステインを中心とした水素結合ネットワークが存在しC-tailの閉じた状態を安定化すること、(ii) このシステインの水素化・脱水素化がpH依存的なC-tailの開閉を制御することを明らかにした。細胞を用いた実験結果と合わせ、小胞体-ゴルジ体間のpH勾配に依存したERp44によるEro1  $\alpha$  の小胞体内リテンション機構モデルを提唱するに至っている。現在は、ERp44-Ero1  $\alpha$  間の相互作用様式を詳細に解明するため、ERp44-Ero1  $\alpha$  複合体の結晶構造解析およびX線小角散乱法を用いた解析に取り組んでいる。

#### D. 小胞体膜上に存在する新規PDIファミリー蛋白質TMX5の機能解析

小胞体における新生タンパク質の品質管理は大きく分けて次の3つに分けることができる。①新生タンパク質の正しい立体構造形成、②構造異常タンパク質の分解、③最終的な機能を発揮する区画への分泌である。これらの機構が適切に働くことにより、新生タンパク質に対して厳密な品質管理が可能となる。このシステムにおいて、システインの酸化・還元・異性化反応（以降レドックスと呼ぶ）を司るチオレドキシソスーパーファミリータンパク質（PDIファミリータンパク質）が密接に関与することが知られている。PDIファミリー蛋白質がジスルフィド結合の形成・異性化を介し、上記①、②に深く関与することは知られているが、上記③においてPDIファミリータンパク質が関与する例はほとんど知られていない。唯一の例として、ERp44が誤って輸送経路に乗った小胞体タンパク質を小胞体にリテンションすることが知られている。

そこで我々は新たな研究テーマとして、小胞体膜に局在が予測される新規チオレドキシソ様タンパク質TMX5の機能解析を開始した。TMX5は小胞体局在と考えられているが、小胞体残留シグナルを有していない。TMX5の小胞体残留メカニズムを明らかにするために、TMX5と結合するタンパク質を網羅的に調べた。数多くの結合タンパク質の中から、p24ファミリー蛋白質に着目した。LC MS/MS解析の結果から、p24ファミリー蛋白質はp23、p24と2種類同定されている。またp24ファミリータンパク質は、COP I, COP II結合モチーフをもち、小胞体とゴルジ体間の基質の輸送に関与するタンパク質として知られている。TMX5、p23、p24を全てクローニングし、免疫沈降法により各タンパク質間の結合を調べたところ、各因子間の結合が確認された。また35S

メチオニン、システインを用いたパルスチェイス法により TMX5 と p23、p24 は安定的に結合すること、逆に p23、p24 をロックダウンすることで小胞体局在の TMX5 が減少することを免疫染色法により明らかにした。このことは TMX5 が p24 ファミリー蛋白質の輸送基質ではなく、TMX5-p24 複合体が生理的役割のある機能体として働くことを示唆する。TMX5 が ERp44 と同様、分泌タンパク質の輸送・品質管理に関わる PDI ファミリータンパク質であるという作業仮説を立て、現在は TMX5-p24 ファミリー蛋白質複合体の基質の同定および TMX5 による基質の輸送制御機構とその機能的意味を解明すべく研究を進めている。

## E. 小胞体コシャペロン ERdj3, ERdj4 の構造・機能解析

小胞体の代表的分子シャペロン BiP (Immunoglobulin-heavy chain binding protein) は、新生ポリペプチド鎖や構造異常タンパク質の疎水性部分に結合して凝集を抑制し正常なフォールディングを促進する。これに加え BiP は、構造異常タンパク質の蓄積などの小胞体ストレスを感知し、IRE1 や ATF6 などの小胞体ストレス応答因子を活性化するなど、小胞体タンパク質品質管理において中心的な役割を担っている。BiP の N 末端側には ATPase 活性を持つヌクレオチド結合ドメインと構造異常タンパク質と結合する基質結合ドメインが存在する。基質結合ドメインへの構造異常タンパク質の結合はヌクレオチド結合ドメインに ATP が結合しているときには弱く、ADP に加水分解されると強くなることが知られているが、BiP 単独の ATPase 活性は低く、細胞内で基質を結合するためには、ATPase 活性を亢進し基質をリクルートする能力を持つコシャペロンが必要とされる。ERdj3 及び ERdj4 は小胞体内に存在する BiP のコシャペロンで、共に小胞体ストレスによりその発現が誘導される。ERdj3 は主に膵臓と精巣で発現しており、BiP と協同してタンパク質の正しいフォールディングを促進すると考えられている。また、免疫グロブリンの重鎖と特異的に結合することも報告されている。一方、ERdj4 は主に肝臓や腎臓などの分泌タンパク質を多く生産する臓器において発現しており、過剰発現すると構造異常タンパク質の分解を促進することから、BiP と協同して小胞体関連分解に関与していると考えられている。

今回、我々は ERdj3 及び ERdj4 の機能と構造を明らかにするために、バキュロウイルス-昆虫細胞発現系を用いてそれらの大量発現及び精製を試みた。その結果、ERdj4 の発現は認められたが、アフィニティー精製には至らなかった。一方 ERdj3 については、効率よくアフィニティー精製することができ、幅広い結晶化スクリーニングにより ERdj3 の微結晶を得ることに成功した。放射光施設で X 線回折測定を行ったところ、構造決定に足る分解能の回折データは得られなかったため、現在更なる結晶化条件の検討に取り組んでいる。これと並行して、精製した ERdj3 を用い、BiP の ATPase 活性亢進効果や、免疫グロブリンのリフォールディング促進効果を定量的に解析している。

## F. 小胞体関連分解 (ERAD) に関わる膜タンパク質 DNAJB12 の構造・機能解析

小胞体関連分解 (ERAD) は、小胞体から逆輸送された異常タンパク質を 26S プロテアソームによって分解するタンパク質品質管理機構として重要な経路である。近年、ERAD タンパク質の一つである小胞体膜タンパク質 DNAJB12 (DnaJ homolog subfamily B member 12) が選択的オートファジーにおける主要なアダプタータンパク質 p62 と相互作用することが示唆され、ERAD とオートファジーの関連性が注目されつつある。そこで我々は小胞体品質管理でのユビキチン-プロテアソームとオートファジー-リソソーム分解系の基質選別に DNAJB12 が重要であると考え、X 線結晶構造解析を用いて DNAJB12 の全長構造さらには p62 との共結晶構造を決定し、そのメカニズムを原子分子レベルで解明することを目的に研究を進めている。

DNAJB12 は一回膜貫通の II 型の膜タンパク質であり、小胞体膜を介して N 末端側の細胞質ドメイン (D1 ドメイン) と C 末端側の小胞体内腔ドメイン (D2 ドメイン) の 2 つの機能領域から成る。まずマウスの DNAJB12 の 2 つのドメインについて、大腸菌を用いた大量発現系を構築した。共に大量精製まで成功し、更に D2 ドメインについて 2 つの異なる結晶化条件で結晶を得た。SPring8 において、それぞれの結晶から 2.1 Å と 3.3 Å の回折データを収集することに成功し、構造リファインメントもほぼ完了している。D1 ドメインについては現在精力的に結晶化を行っているところである。全長の DNAJB12 についても、大腸菌の膜面分に発現していることを確認しており、精製・結晶化スクリーニングを経て微結晶を得ることに成功している。今後、全長の構造解析についても早急に進める。

## 業績目録

### 原著論文

1. Vavassori, S. †, Cortini, M. †, Masui, S. †, Sannino, S. †, Anelli, T., Caserta, I. R., Fagioli, C., Fornili, A., Mossuto, M. F., Degano, M, Inaba, K. and Sitia, R. (†These authors contributed equally to this work.) 2013  
A pH-Regulated Quality Control Cycle for Surveillance of Secretory Protein Assembly.  
Molecular Cell in press.
2. Okumura, M., Hashimoto, S., Nawata, M., Yutani, K., Hikima, T., Hamada, D., Hidaka, Y., Ito, L., Shiba, K., Hosokawa, K., Inoue, G, Maekawa, T., Imaoka, S., Inaba, K., and Yamaguchi, H. 2013  
Bisphenol A Induces a Conformational Change in Protein Disulfide Isomerase  
*Peptide Science* in press.

## 総説

1. Kojima, R., Okumura, M. and Inaba, K.\* 2013  
Structural basis of protein disulfide bond formation in the bacterial periplasm and mammalian ER.  
*eLS review*: in press
2. Sato, Y. and Inaba, K.\* 2012  
Disulfide bond formation network in the biological kingdoms  
*FEBS J.* 279, 2262-2271
3. 佐藤 吉美、稲葉 謙次 2012  
哺乳動物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  
生化学 Vol.84 No.9 p767-772
4. 前川 憲一、稲葉 謙次  
小胞体品質管理に関わるジスルフィド結合還元酵素 ERdj5 の構造と機能  
化学と生物 Vol. 50 p484-487

## 学会発表

### 国際学会

1. Kojima, R., Sato, Y., Okumura, M., Hagiwara, M., Masui, S., Maegawa, K., Suzuki, M. and Inaba, K. (2013, 3/4-5)  
Structural basis for selective disulfide transfer from Prx4 to PDI family proteins. (oral)  
Post-GCOE Symposium & Retreat in Singapore with NUS & TLLon Cell-fate Decision: Function and Dysfunction in Homeostasis, Singapore

### 国内学会

1. 稲葉 謙次 (2012, 5/23)  
SSP 時代を振り返って (招待講演)  
九州大学テニユアトラック制シンポジウム、福岡
2. 増井 翔史, Stefano Vavassori, Margherita Cortini, Roberto Sitia, 稲葉 謙次 (2012, 6/20-22)  
小胞体-ゴルジ体間の pH 勾配に依存した ERp44 による pH 依存的 Ero1a リテンション機構の解明 (ポスター)  
第12回蛋白質科学会年会 名古屋
3. 佐藤 吉美、稲葉 謙次 (2012, 6/20-22)  
高等動物細胞におけるタンパク質ジスルフィド結合形成ネットワークの分子基盤 (招待講演)

第12回日本蛋白質科学会年会 名古屋国際会議場

4. 増井 翔史, 飯田 裕果, 鈴木 守, Stefano Vavassori, Roberto Sitia, 稲葉 謙次 (2012, 7/14)  
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)  
生化学若い研究者の会 九州支部 (福岡)
5. 稲葉 謙次 (2012, 7/10)  
タンパク質品質管理に関わるジスルフィド結合形成・開裂システムの分子基盤 (招待講演)  
東北大学多元研セミナー、仙台
6. 稲葉 謙次 (2012, 9/14)  
タンパク質品質管理に関わるジスルフィド結合形成・開裂システム (招待講演)  
京都大学ウイルス研セミナー、京都
7. 稲葉 謙次 (2012, 11/2)  
タンパク質品質管理を支えるジスルフィド結合形成ネットワーク (招待講演)  
山形大学テニュアトラック制シンポジウム、福岡
8. 奥村正樹, 橋本翔子, 縄田万里奈, 油谷克英, 引間孝明, 浜田大三, 日高雄二, 伊藤廉, 志波公平,  
細川桂一, 井上岳, 前川拓摩, 今岡進, 稲葉謙次, 山口宏 (2012, 11/7-9)  
Bisphenol A Induces a Conformational Change In Protein Disulfide Isomerase (ポスター)  
第49回ペプチド討論会、鹿児島
9. 増井翔史, Stefano Vavassori, Margherita Cortini, Roberto Sitia, 稲葉謙次 (2012, 12/14-16)  
小胞体-ゴルジ体間の pH 勾配に依存した ERp44 による小胞体内リテンション機構の解明 (口頭&ポスター)  
第85回日本生化学会大会 福岡
10. 佐藤 吉美, 小島 理恵子, 増井 翔史, 前川 憲一, 鈴木 守, 稲葉 謙次 (2012, 12/14-16)  
高等動物細胞における新たなジスルフィド結合形成経路 - Prx4 と PDI ファミリータンパク質の巧みな関係プレー - (口頭&ポスター)  
第85回日本生化学会大会 福岡

## 防御分子構築学分野

### Division of Molecular Design

#### I. 客員教授：藤 博幸      Professor : Hiroyuki Toh, Ph.D.

当部門では、バイオインフォマティクスを用いた研究を行なっている。研究対象は、主にタンパク質であり、その配列や立体構造などを用いて、それからの機能情報の抽出のための方法の開発と、その応用研究を行なっている。いずれのタイプの研究においても、進化的視点からの情報解析を実施している。

#### A. ケモカイン受容体ファミリーの機能分化の情報解析

ケモカイン受容体は、ケモカインをリガンドとして、その刺激により白血球の遊走を引き起こす働きを持っており、炎症や免疫反応に深く関わる GPCR である。ケモカイン受容体には、機能の異なるホモログが 2 種類存在する。デコイ受容体は、ケモカインに対する結合能を有するが、シグナリング活性を持たない受容体である。デコイ受容体は、ケモカイン受容体同様、我々のゲノムにコードされており、ケモカイン受容体が発現している細胞あるいはその近傍で発現し、ケモカイン受容体と拮抗的にケモカインを奪い合うことが知られている。先に述べたように、ケモカイン受容体からのシグナルは、白血球の遊走を引き起こすが、それによって炎症が発生する。長い期間の炎症は、我々自身の身体にダメージを及ぼすことから、炎症をある段階で抑制する必要がある。デコイ受容体は、ケモカインには結合できるがシグナリング能を持たないことから、炎症の抑制因子として働くと考えられている。また、ヘルペス単純ウイルス、ポックスウイルス、サイトメガロウイルスなどの二本鎖 DNA ウイルスには、その進化の早い段階で、宿主からケモカイン受容体の遺伝子を自身のゲノムに取り込んだものがある。それらの中には、取り込んだケモカイン受容体遺伝子をウイルスゲノム内で遺伝子重複させて複数コピー所有するものもある。これらのウイルス性受容体は、ウイルスの感染後に標的細胞の上に発現する。このウイルス性受容体は構成的に活性化されており、リガンドが結合しなくてもシグナルを送ることができる。ウイルスは、このシグナルを利用して増殖すると考えられている。このように、リガンド結合能、シグナリング能の二つの活性の点において、ケモカイン受容体ファミリーは、大きく 3 つのグループに分類できる (図 1)。

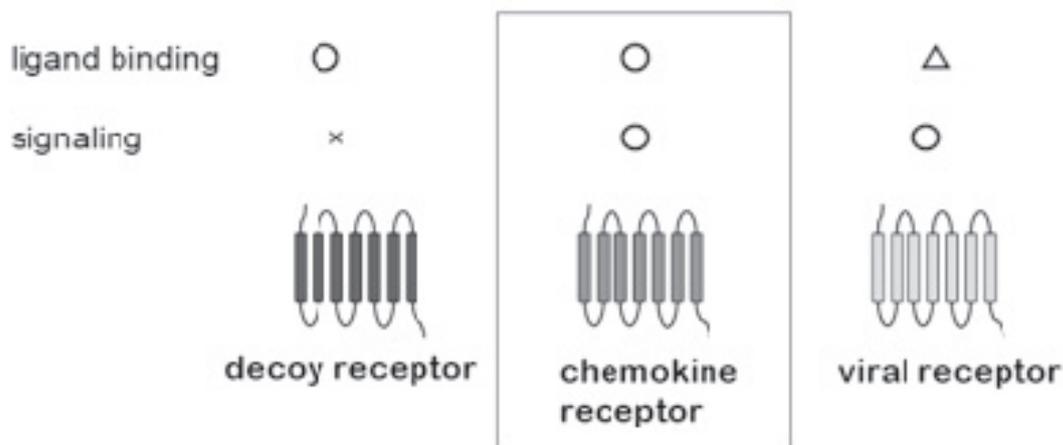


図1 ケモカイン受容体の機能分化

ウイルス性受容体は構成的に活性化されているが、リガンド結合によってシグナリング活性が増大するものもあるのでリガンド結合能を $\Delta$ とした。

この機能差を生みだしているアミノ酸サイトを同定できれば、広くは GPCR、狭くともケモカイン受容体における、リガンド結合からシグナリングにいたる機構を解明できると期待される。いずれも、機能差のある相同タンパク質のアミノ酸配列のマルチプルアラインメントを構築するところから解析がはじまる。次の得られたアラインメントを、機能差のあるグループに分類する。機能の違いは、それに関与するアミノ酸サイトに作用する機能的制約の違いを生む。この機能的制約の違いのあるサイトを同定する手法は大きく3つに分類される。第一の方法は、機能差のあるグループ間の各サイトでアミノ酸の保存の違いを評価する方法である。第二の方法は、機能差のあるグループ間で各サイトのアミノ酸組成の違いを評価する方法である。第三の方法は、機能差のあるグループ間の各サイトで進化速度の違いを評価する方法である。今回解析する系は、ウイルスの遺伝子とホストの遺伝子の比較を行うことから、進化速度に基づく方法は利用できない。また、保存度のみを用いると、アミノ酸組成が変化するという形での機能的制約の違いを検出できないが、保存度の違いは、アミノ酸組成の違いとしても捉えることができる。そこで今回は、アミノ酸組成の違いを評価することで、ケモカイン受容体の機能差に関連するサイトの同定を行った。

図2にケモカイン受容体ファミリーの無根分子系統樹を示す。

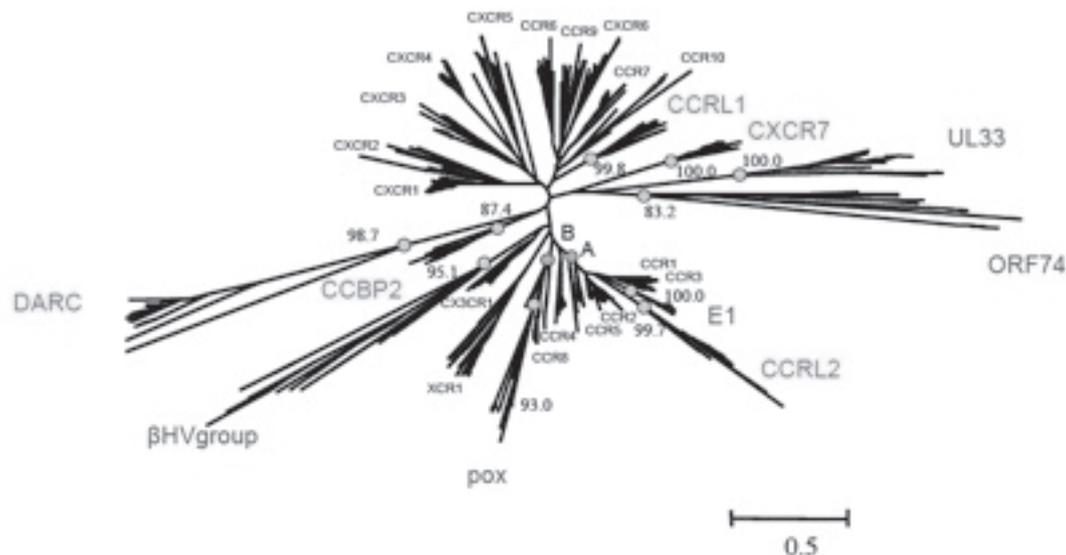


図2 ケモカイン受容体ファミリーの無根分子系統樹

黒字がケモカイン受容体、赤字がデコイ受容体、青字がウイルス性受容体のクラスタを表す。黄色の丸は、ブートストラップ確率が80%以上の節を表す。

図に示すように、デコイ受容体は、共通の祖先ケモカイン受容体から分岐進化したのではなく、異なるケモカイン受容体サブファミリーから独立に複数回出現したことがわかる。これは、同じデコイ受容体であっても、デコイ受容体の異なるサブファミリーの間では、デコイ受容体への機能の変換が異なる機構で生じた可能性があることを示す。同様に、ウイルス性受容体も、複数回独立に宿主からウイルスゲノムへの取り込みが起きたことがわかる。すなわち、ウイルス性受容体も、サブファミリーごとに構成的な活性化の機構は異なる可能性が考えられる。そこで、本解析では、ケモカイン受容体は一つのグループとして扱うが、デコイ受容体は CCRL1, CCRL2, CCBP2, CXCR7, DARC の5つのグループに分割し、その各グループとケモカイン受容体のグループを比較した。同様にウイルス性受容体も、UL33, ORF74, E1, βHV, pox の5つのグループに分類し、その各グループとケモカイン受容体のグループと比較した。

比較は次のように行った。ケモカイン受容体の全配列と、デコイあるいはウイルス性受容体のいずれかのグループとのマルチプルアラインメントを MAFFT で作成した。次に、このアラインメントの各グループについて、各サイトのアミノ酸組成を計算する。各サイトのアミノ酸組成の計算には、タクソノミックバイアスを除くための Henikoff-Henikoff のウェイトを導入、また PSI-BLAST で使用される方法でシュードカ

ントを導入した。ただし、シュードカウントのパタメータ  $\beta$  は 0.1 と小さな値に設定し、BLAST のパラメータ  $\lambda_u$  はニュートン-ラフソン法で推定した (図 3)。

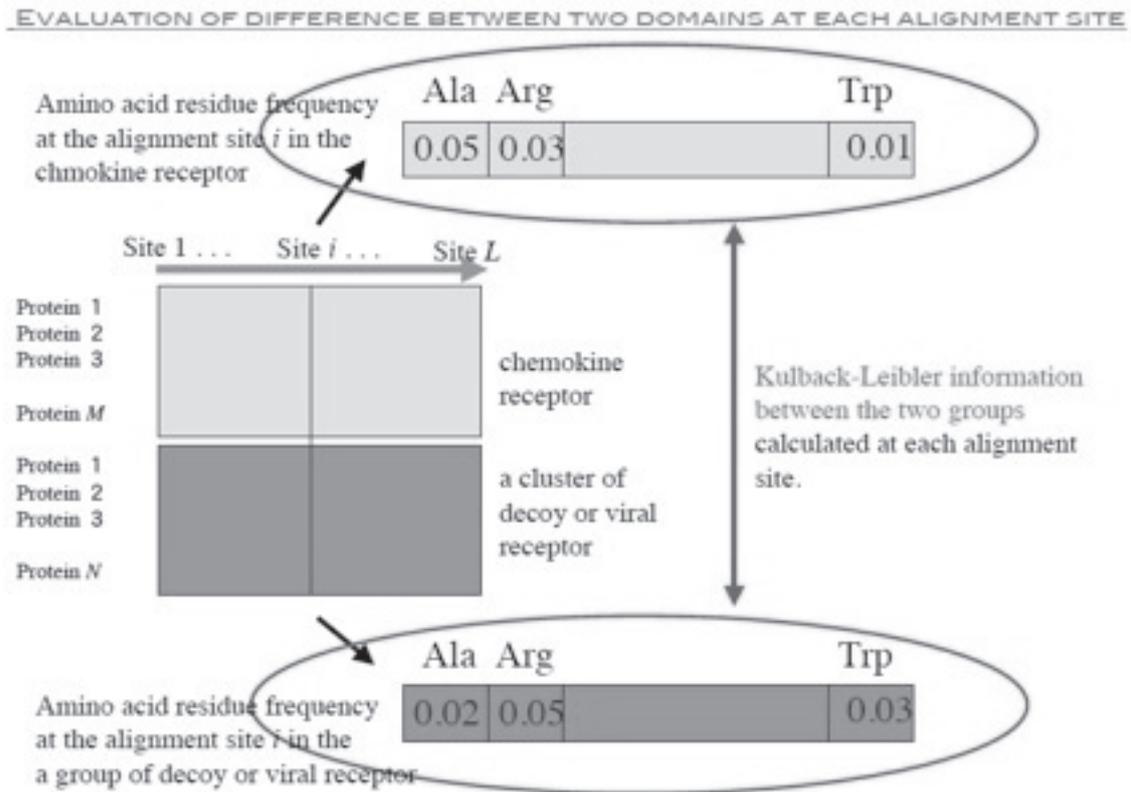


図 3 各サイトのアミノ酸組成の推定とそのグループ間での差の計算

サイトごとにアミノ酸組成の違いは、カルバック-ライブラー (KL) 情報量を対称性を持たせるように修正した次の式で評価した (Ichihara, Daiyasu and Toh, 2004)。

$$\sum_{i=1}^{20} p(i) \log \frac{p(i)}{q(i)} + \sum_{i=1}^{20} q(i) \log \frac{q(i)}{p(i)}$$

ここで  $p(i)$  は、そのサイトにおけるケモカイン受容体のアミノ酸  $i$  の頻度、 $q(i)$  はそのサイトにおける注目しているグループのアミノ酸  $i$  の頻度を表す。得られた KL 情報量のトップ 5% の大きな値を持つサイト、すなわちアミノ酸組成が大きく異なるサイトを、機能差に関連するサイトとして抽出した。図 5 は各比較ごとに得られたトップ 5% の KL 情報量を持つサイトを既知のケモカイン受容体 (CXCR4) の構造上にマッピングした結果である。Surface 表示は GPCR 及びケモカイン受容体特異的なモチーフを示す。空間充填モデルで表したアミノ酸が、KL 情報量によって検出されたサイトに対応する。

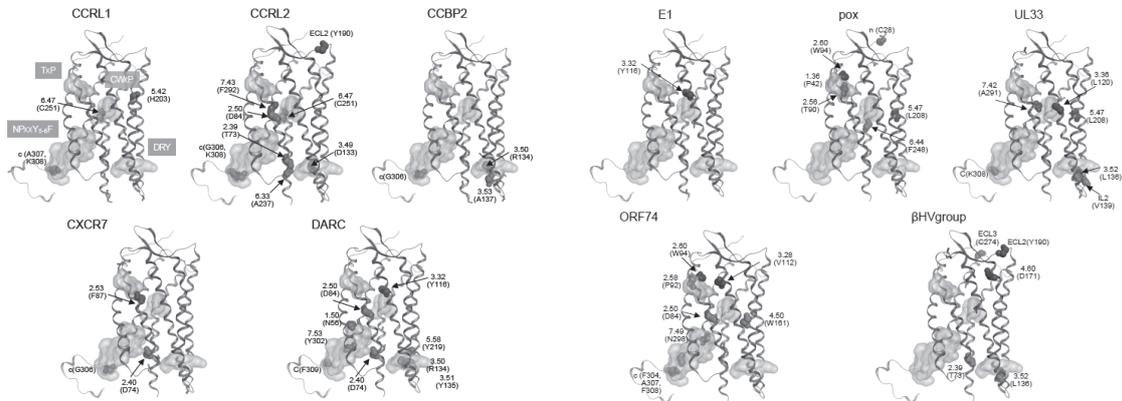


図4 立体構造上への検出サイトのマッピング

デコイ受容体では細胞質側に検出サイトが集中しているが、ウイルス受容体は細胞質側にも細胞外側にも検出サイトが分布していることがわかる。この点を定量的に評価するため、次のような統計検定を行った。まず、細胞外ループ(N末領域含む)と細胞外ループ(C末領域を外す。外部に突き出した状態のため)のそれぞれについて $\alpha$ 炭素について幾何重心を決定し、それをつないだ軸と、その重心の midpoint を求めた。midpoint から細胞外に向かう単位ベクトルを計算した。また、midpoint から各アミノ酸の $\alpha$ 炭素へのベクトルを求め、単位ベクトルとの内積を計算した。この内積は、軸上への各アミノ酸を射影した位置を表し、正の値はmidpoint に対して細胞外に、また負の値はmidpoint に対して細胞内に射影されたことを示す。図5は、ここで説明した変換の方法を図示したものである。図6に、デコイ受容体、ウイルス性受容体の各グループについての上記の処理を行った結果を示す。

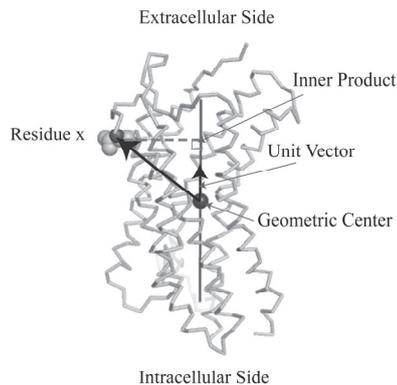


図5 統計検定のまたの三次元構造の一次元への変換。赤い線は、細胞内外のループの幾何重心をつないでおり、赤い丸はその midpoint を示す。

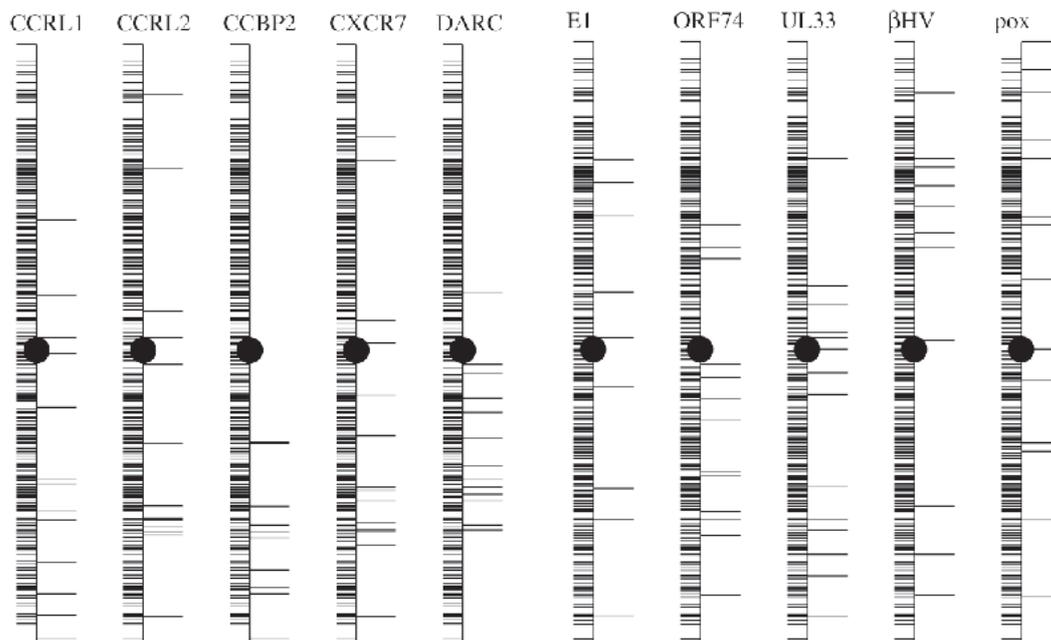


図6 図5で示した方法での三次元構造の1次元への変換

上の図中、垂直線が、細胞内ループの幾何重心と細胞外ループの幾何重心をつなぐ軸で、黒丸は中点を示す。上が細胞外、下が細胞内である。軸に対して右の水平線が、KL 情報量の大きなサイトに対応するアミノ酸を射影した位置を、左の水平線は、それ以外のアミノ酸を射影した位置を表す。

左の射影位置の平均値と、右の射影位置の平均値に差があるかを  $t$ -検定によって確認した（統計パッケージ R を使用）。デコイ受容体の場合、5つのグループ中、4つのグループで有意差が確認された。一方、ウイルス性受容体の場合、いずれのグループにおいても帰無仮説を棄却できなかった。

デコイ受容体についての解析結果は、予想されるものであった。デコイは、リガンドは結合できるが、シグナリング活性を持たないので、リガンド結合能の維持という意味では細胞外側の機能的制約は CKR とは違いがないと思われる。一方、細胞内側はシグナリング能を失っていることから、機能的制約が弱まっていると考えられる。実際、KL 情報量が大きなサイトとして検出されたものの中には DRY モチーフなどシグナリングに重要なモチーフ内のサイトが検出されており、デコイではそれらのサイトではモチーフが壊れるような形での変化が生じていた。例えば、DRY モチーフが壊れていた。一方、ウイルス性受容体は、まだ特徴付けがなされているものが少ないが、リガンド結合がない状態での構成的なシグナリング活性を示すものがしられている。そこで、当初、ウイ

ルス性受容体では、細胞外側に検出サイトが集中することを期待していた。実際、CASTp で同定したリガンド結合ポケット内で検出されるサイトの数は、デコイよりもウイルス性受容体の方が統計的に有意に多かった。ところが、ウイルス性受容体においても細胞質側に検出サイトが見いだされた。しかし、これらのサイトは、必ずしもデコイ受容体で検出されるものとは一致しなかった。例えば、DRYモチーフはウイルス性受容体では保存されており、そこからサイトは検出されなかった。これらのことから構造的なシグナリング活性を維持するためには、細胞質側にも変異を生じる必要があることが示唆される。また、ターゲットタンパク内の研究との関連では、ProC領域あるいはH8と呼ばれる、フロントタンパク質との相互作用してシグナリング活性制御に関係している領域について、デコイでもウイルスでもKL情報量の大きなサイトが検出されている場合があった。

本研究は、Daiyasu, H., Nemoto, W., Toh, H. Evolutionary analysis of functional divergence among chemokine receptors, decoy receptors and viral receptors. *Front Microbiol* **3**, 264 (2012)として発表された。また、CSCB2013の招待講演において、同内容を発表した。

## 業績目録

### 原著論文

1. Nemoto, W. Toh, H.  
Functional region prediction with a set of appropriate homologous sequences - an index for sequence selection by integrating structure and sequence information with spatial statistics  
*BMC Struct Biol* 12, 11 (2012) (highly accessed)
2. Yokobori T, Mimori K, Iwatsuki M, Ishii H, Tanaka F, Sato T, Toh H, Sudo T, Iwaya T, Tanaka Y, Onoyama I, Kuwano H, Nakayama KI, Mori M.  
Copy number loss of FBXW7 is related to gene expression and poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma.  
*Int J Oncol.* 41, 253-259 (2012)
3. Ishimaru S, Mimori K, Yamamoto K, Inoue H, Imoto S, Kawano S, Yamaguchi R, Sato T, Toh H, Iinuma H, Maeda T, Ishii H, Suzuki S, Tokudome S, Watanabe M, Tanaka JI, Kudo SE, Sugihara KI, Hase K, Mochizuki H, Kusunoki M, Yamada K, Shimada Y, Moriya Y, Barnard GF, Miyano S, Mori M

Increased Risk for CRC in Diabetic Patients with the Nonrisk Allele of SNPs at 8q24.

*Ann Surg Oncol*, 19, 2853-2858 (2012)

4. Daiyasu, H., Nemoto, W., Toh, H.  
Evolutionary analysis of functional divergence among chemokine receptors, decoy receptors and viral receptors.  
*Front Microbil* 3, 264 (2012).
5. Takatsuno Y, Mimori K, Yamamoto K, Sato T, Niida A, Inoue H, Imoto S, Kawano S, Yamaguchi R, Toh H, Inuma H, Ishimaru S, Ishii H, Suzuki S, Tokudome S, Watanabe M, Tanaka JI, Kudo SE, Mochizuki H, Kusunoki M, Yamada K, Shimada Y, Moriya Y, Miyano S, Sugihara K, Mori M.  
The rs6983267 SNP Is Associated with MYC Transcription Efficiency, Which Promotes Progression and Worsens Prognosis of Colorectal Cancer.  
*Ann Surg Oncol* (in press)

## 学会発表

1. 藤博幸、根本航、大安裕美  
ケモカイン受容体の機能部位の情報解析  
第12回日本蛋白質科学会年会 (2012)
2. 藤博幸  
プロテオミクスと他のオミクス研究をつなぐバイオインフォマティクス  
(教育セミナー：プロテオミクスのためのバイオインフォマティクス、  
オーガナイザー：馬見塚拓、藤博幸)  
日本プロテオーム学会 2012 年大会 (2012)
3. 根本航、山西芳裕、藤博幸  
バイオインフォマティクスによる創薬標的 GPCR どうしの相互作用ペア予測  
(教育セミナー：プロテオミクスのためのバイオインフォマティクス、  
オーガナイザー：馬見塚拓、藤博幸)  
日本プロテオーム学会 2012 年大会 (2012)
4. Toh, H, Nemoto, W., Daiyasu, H.  
Change of the functional constraints associated with  
the functional differentiation of the chemokine receptor family  
第35回日本分子生物学会年会 (2012)

5. Nemoto, W., Yamanishi, Y., Toh, H.  
Tissue-specific preferential coexpression of hetero dimeric GPCRs  
第 85 回日本生化学会大会 (2012)
6. Toh H  
Computational Analysis of Functional Divergence of Chemokine Receptors (Invited)  
Conference on Computational and Systems Biology (CCSB) 2013, Sanya, China (2013)

## II. 客員准教授：松本 明郎 Associate Professor : Akio Matsumoto, M.D. Ph.D.

当部門では、生体におけるガス状分子による生理機能の制御と、その破綻に基づく病態形成について、基礎的な研究を行っている。なかでも、一酸化窒素（NO）によるタンパク質翻訳後修飾（S-ニトロシル化）の形成と、シグナル伝達機構における生理的役割の発現・制御機構を分子レベルで解析することに主眼をおいている。

### A. S-ニトロシル化修飾を介した細胞間シグナル伝達

NOは、NO合成酵素（NOS）により産生され細胞内液に溶解するが、ガス状分子の特性から脂質にも溶解し、細胞膜を通り隣接細胞へ拡散する。またNOは不対電子を有するためタンパク質チオール基と可逆的に結合し、S-ニトロシル化（SNO化）反応を惹起する。SNO化反応はリン酸化修飾に類似した生理的機能をもち、シグナル伝達やその制御機構として機能する。さらにSNO化異常（過剰や不足）は、気管支喘息・肝がん・脳神経の発生や分化などと密接に関わっており、NO/SNO分解酵素の活性が病態生理的にも重要であることが示されてきた（Hess, Matsumoto et al. Nature Rev Mol Cell Biol 2005）。

NO分子は、拡散により細胞膜を通過し、細胞質へ入り込んだ後、様々なタンパク質とNOの配位反応（ニトロシル化反応）を生じ、タンパク質機能を調節する。例えば、NOは可溶性グアニル酸シクラーゼ（sGC）のヘムに配位（ニトロシル化）し活性化する。その結果、細胞内cGMP濃度が増大し、PKGを介したシグナルが増強される。一方、SNO化されたアミノ酸やタンパク質もシグナルを隣接した細胞へ伝えることが知られている。しかし、NO分子に比べて分子量が大きなSNO化タンパク質が細胞膜を自由に通過し、隣接した細胞へ直接侵入するとは考えにくい。実際、細胞内でのSNOプールを形成しているニトロソグルタチオン（GSNO）やSNO化タンパク質は、システインにNOを引き渡し（SNO交換反応:Transnitrosylation）、ニトロソシステイン（CysNO）を形成する。このCysNOが細胞膜に存在するアミノ酸トランスポーター（主にLAT）により細胞内へと導入され、細胞間でのSNOシグナル伝達が行なわれることが明らかになった。

### B. 細菌のNO耐性と病原性

マクロファージなどの貪食細胞は細菌を取り込んだ後、大量の活性酸素種やNOを産生することにより殺菌を行なう。一方、細菌も活性酸素種やNOの強力な代謝分解系を有して対抗する。身近な細菌感染症としてあげられる食中毒では、下痢や発熱などの症状を引き起こすのみで回復する病原性大腸菌感染と、重篤な溶血性尿毒症症候群（HUS）を引き起こすほどの強い病原性を示す場合に分かれることが知られている。とりわけ、O157などの腸管出血性大腸菌（EHEC）感染では、同じO抗原を有した流行株でも、その病原性は大きく異なることが知られているが、その分子機構については明

らかではなかった。

EHECの遺伝子解析より、多くの株はNORと呼ばれるNO還元酵素の活性中心付近に欠失を有し、NOR活性が殆ど消失していることが明らかとなった。しかし、一部の株は野生型のNOR遺伝子を有している。通常、細菌におけるNOの代謝はHMPと呼ばれるフラボヘモグロビンにより酵素的になされ、NORの寄与は少ないと考えられてきた。しかし、HMPは酸素を利用してNOを代謝するため、低～無酸素条件下ではNORのみがNO消去活性を示すことができる。さらに、腸管管腔内側の酸素分圧は、下部腸管に向かって大きく低下していくことが知られているため、下部腸管内部でマクロファージなどに貪食された細菌は、ほぼ無酸素の状況におかれることとなる。さらに、貪食細胞は殺菌のために活性酸素種を産生するが、その産生のためには酸素が必須である。これらの状況から、NOR活性が高い株はマクロファージなどによる殺菌に耐性を示し生存する可能性が高いと考えられた。実際、無酸素条件下ではNOR活性が大腸菌のNO耐性を規定していた。マクロファージによる貪食を受けてもNOR活性の正常な菌株は残存しやすいのに対して、NOR活性の低い株は貪食により容易に死滅した。さらに、HUSなどを引き起こす原因ともなる腸管毒素産生能についても、NOR活性と相関していることが示され、NOR活性が腸管出血性大腸菌感染症における病原性を規定する因子であることが示唆された。

さらに、これまでに流行したEHEC株の遺伝子情報をNORについて検索し、感染者のHUSなどによる死亡率と比較検討した。実際、これまで知られている高い死亡率を示した流行株は、ほぼ全てがNOR野生型であった。

EHEC感染治療において、重症化後の抗生物質を用いた治療法は毒素産生を盛んにし、病態を急激に悪化させることが知られているため禁忌とされている。しかし、感染早期の段階で悪性度を診断することが可能であれば、積極的な抗菌薬投与により、より効率的な治療を行なうことが可能となる。NOR遺伝子の変異に基づく検索が、EHEC感染症の治療方針を決める的確な手段となることが期待される。

現在、ガス状分子による生理機能の制御とその破綻に基づく病態形成との関連について、脳機能制御学分野（中別府雄作教授）、薬学研究院病態生理学分野（野田百美准教授）との共同研究を実施している。

## 業績目録

### 原著論文

1. Gao C, Maeno T, Ota F, Ueno M, Korekane H, Takamatsu S, Shirato K, Matsumoto A, Kobayashi S, Yoshida K, Kitazume S, Ohtsubo K, Betsuyaku T, Taniguchi N. 2012  
Sensitivity of heterozygous  $\alpha$  1, 6- fucosyltransferase knock out mice to cigarette smoke-induced

emphysema: implication of aberrant TGF- $\beta$  signaling and MMP gene expression.  
J Biol Chem 287(20): 16699-16708.

2. Shimizu T, Tsutsuki H, Matsumoto A, Nakaya H, Noda M. 2012  
The nitric oxide reductase of enterohemorrhagic Escherichia coli plays an important role for the survival within macrophages.  
Mol Microbiol 85(3): 492-512.
3. Korekane H, Hasegawa T, Matsumoto A, Kinoshita N, Miyoshi E, Taniguchi N. 2012  
Development of an antibody-lectin enzyme immunoassay for fucosylated  $\alpha$ -fetoprotein.  
Biochim Biophys Acta 1820(9): 1405-1411.

## 著書

1. 松本明郎  
一酸化窒素由来ストレスの制御とシグナル機構の維持  
実験医学増刊 活性酸素・ガス状分子による恒常性制御と疾患 2012 Oct; 30(17): 57-63.

## 学会発表

1. Akio Matsumoto, Hidemi Endo, Ayako Matsumoto, Haruaki Nakaya (2012, 6/17-6/18)  
Redox sensitive regulation of thioredoxin interacting protein (TxnIP) in mouse vascular smooth muscle cells.  
第8回新学術領域班会議, 沖縄.
2. Akio Matsumoto, Hidemi Endo, Ayako Matsumoto, Haruaki Nakaya (2012, 6/26-6/29)  
Redox sensitive regulation of thioredoxin interacting protein (TxnIP) in mouse vascular smooth muscle cells.  
The 33rd Naito Conference, 札幌.
3. Ayako Okado-Matsumoto, Akio Matsumoto, Naoyuki Taniguchi (2012, 6/26-6/29)  
Detection of enzymatically active oligomeric assemblies of Cu,Zn-superoxide dismutase in familial amyotrophic lateral sclerosis model mice.  
The 33rd Naito Conference, 札幌.
4. Akio Matsumoto, Hidemi Endo, Ayako Matsumoto, Haruaki Nakaya (2012, 6/29-6/30)  
Redox sensitive regulation of thioredoxin interacting protein (TxnIP) in mouse vascular smooth muscle cells.  
第12回日本NO学会学術集会, 神戸.
5. 松本明郎・遠藤愛実・立花知子・中谷晴昭 (2012, 7/14)  
NOによる Thioredoxin Interacting Protein の制御機構  
第126回日本薬理学会関東部会, 東京.
6. Akio Matsumoto, Hidemi Endo, Ayako Matsumoto, Haruaki Nakaya (2012, 7/22-7/26)  
Redox sensitive regulation of thioredoxin interacting protein (TxnIP) gene expressions in mouse vascular smooth muscle cells.  
7th International Conference on the Biology, Chemistry and Therapeutic Application of Nitric Oxide,

Edinburgh.

7. 西田洋文, 丸山浩央, 松本明郎, 中谷晴昭 (2012, 10/12-10/13)  
ミトコンドリア  $\text{Ca}^{2+}$ 活性化  $\text{K}^{+}$ チャンネル活性化を介した endocannabinoid の心筋保護作用  
第29回日本心電学会, 千葉.
8. 西田洋文, 丸山浩央, 松本明郎, 中谷晴昭 (2012, 10/12-10/13)  
Oxytocin の心筋保護機構における ATP 感受性  $\text{K}^{+}$ チャンネルの役割  
第29回日本心電学会, 千葉.
9. 松本明郎 (2012, 11/8)  
細胞間をつなぐ一酸化窒素シグナルの役割と制御 Transfer and restriction of nitric oxide as a  
bullet molecule from cell to cell  
第636回生医研セミナー(多階層生体防御システム研究拠点)ヌクレオチドプール研究センター  
セミナー, 博多.
10. 松本 紋子, 松本 明郎, 谷口 直之 (2012, 12/14-12/16)  
筋萎縮性側索硬化症モデルマウスの発症前後における Cu,Zn-superoxide dismutase の可溶性  
集合体の検出と生化学的解析  
第85回日本生化学会, 福岡.
11. 是金宏昭, Jong Yi Park, 松本明郎, 高松真二, 中嶋和紀, 大坪和明, 宮本泰豪, 谷口直之  
ENPP3 は糖転移酵素 GnT-IX の制御因子候補タンパク質である  
第85回日本生化学会, 福岡.
12. 松本明郎, 遠藤愛実, 立花知子, 中谷晴昭 (2012, 12/14-12/16)  
マウス大動脈における Thioredoxin Interacting Protein の制御機構  
第85回日本生化学会, 福岡.
13. 松本明郎 (2013, 2/8)  
一酸化窒素 (NO) による細胞間情報伝達機構  
第128回 Basic Science Joint Meeting (BSJM), 千葉.
14. 松本明郎 (2013, 2/9)  
ガス状分子によるシグナル伝達制御: NOによるS-ニトロシル化修飾  
第3回分子状水素医学シンポジウム, 東京.
15. 松本明郎, 清水健, 津々木博康, 中谷晴昭, 野田公俊 (2013, 3/21-3/23)  
一酸化窒素 (NO) による腸管出血性大腸菌の感染制御と重症化機序  
第86回日本薬理学会年会, 福岡.

## 防御システム再生学分野

Division of Regeneration Biology

客員教授：森 正樹

Professor : Masaki Mori, M.D., Ph.D., FACS

防御システム再生学分野では、(A) 癌幹細胞制御の研究、(B) 再生医学と癌研究の連携、(C) 発癌の早期病変の研究、を研究の3つの柱と位置づけ研究を推進している。外科学の基盤の上にたち、癌の診断と治療をより良くするための研究を行っている。遺伝子、蛋白質、細胞、組織、個体、集団レベルでの医科学叡智を総動員して癌の制圧を目指している。このような先端医科学を臨床外科学に展開することにより、質が高くコストに見合った医療を提供することに社会貢献できる。最近の数年間は癌幹細胞の可視化と創薬事業を重点的に進めている。

### A. 消化器癌の癌幹細胞制御の研究

造血器腫瘍の癌幹細胞は1994年に造血器幹細胞で最初に報告されてから我々の研究室では消化器癌幹細胞を世界に先駆けて報告した。本年度は、肝臓癌の癌幹細胞に特化させた研究を実施し、造血器とは異なる固形癌特有の分子病態を明らかにした。この知見は新たな治療法の開発に貢献できる。この目的に沿って消化器癌の癌幹細胞の分子生物学的特徴を明らかにした。

#### a. 2つのタイプの癌幹細胞：活性酸素応答から転移へ

治療抵抗性の観点から、静止期にある癌幹細胞と増殖期にある癌幹細胞を峻別できる細胞表面分子を同定した。この細胞表面分子を駆使することにより、これら2つのタイプの癌幹細胞を明らかにすることが可能となり、特に静止期にある癌幹細胞が従来には知られていなかった薬剤耐性機構に関わることが明らかとなった。この静止期にある癌幹細胞は、癌幹細胞が低酸素領域に存在して治療後に残存することを分子レベルから解明できる突破口となった。細胞内の活性酸素と解糖系の偏倚の解明に着手し、本年度は新しい情報伝達経路の解明を実施、活性酸素応答から転移へのメカニズムを明らかにして、特異的な阻害剤の開発に着手した。

#### b. 消化器癌細胞のリプログラミング

高度で簡便なiPS技術を駆使することにより、消化器癌細胞のリプログラミングを実施した。本事業の成果の一部として、消化器癌細胞は正常分化細胞に於けると同様に多分化能を再獲得して、分化誘導療法と抗癌剤への感受性を獲得できることを明らか

として、新時代を切り拓く新しい癌治療の先鞭をつけることに成功した（iPC 技術）。消化器癌細胞の中でも特に癌幹細胞に焦点を当ててリプログラミングを誘導する新技術の開発に着手した。

### **c. 癌幹細胞の可視化と創薬**

鋭敏な蛍光蛋白質を用いた癌幹細胞の可視化とそれによる核酸などの創薬事業を進めている。

## **B. 再生医学と癌研究の連携に向けて**

再生医学から癌研究へと研究を展開するとともに、癌細胞から誘導する我々独自の iPC 技術を正常細胞に応用することを試みた。現在開発中の複数の低分子化合物を使用することにより、癌化の可能性を高度に排除できる新しいリプログラミング技術の開発に向けて基盤を構築した。この研究のインパクトとして、従来の iPS 技術の弱点であった癌化問題の克服、正常と癌の相違の解明に向けて応用が可能と考えられる。細胞の起源の研究を開始した。さらに核酸創薬を基盤とした新しい技術の応用研究まで展開し臨床応用の基盤を構築した。

## **C. 発癌の超早期病変の究明**

発癌の超早期病変において、正常細胞が如何に生理的機能の作動原理から逸脱して癌化形質を獲得するかに関して、基盤研究を実施した。超早期段階には未分化関連遺伝子の発現が時空間的に異常を来していることを明らかにしたので、化学発癌実験において再現することで新しい創薬のための技術開発に向けて基盤を構築した。本年度は試験管内で培養した消化器組織に遺伝子発現トレーシングでの高感度イメージング分析を実施し、発癌過程の早期病変を可視化した。発癌早期病態の分子生物学的特徴を検討した。胚性幹細胞由来の遺伝子発現を動物モデルで解明し分子マーカーの開発を実施した。

## **業績目録**

### **原著論文**

1. Miyoshi N, Ishii H., Nagano H., Haraguchi N., Dyah LD., Kano Y., Nishikawa S., Tanemura H., Mimori K., Tanaka F., Saito T., Nishimura J., Takemasa I., Mizushima T., Ikeda M., Yamamoto H., Sekimoto M., Doki Y., Mori M. Reprogramming of Mouse and Human Cells to Pluripotency Using Mature MicroRNAs. *Cell Stem Cell* 8(6):633-638, 2011

2. Dyah LD, Ishii H., Kano Y., Nishikawa S., Haraguchi N., Sakai D., Satoh T., Doki Y., Mori M. Cancer stem cell theory in gastrointestinal malignancies: recent progress and challenges. *J Gastroenterol* 24(10):1145-1157,2011
3. Haraguchi N, Ishii H., Nagano H., Doki Y., Mori M. The future prospects and subject of the liver cancer stem cells study for the clinical application. *Gastroenterology*,2011 (in press)
4. Tanemura K, Ohmura Y., Deguchi T., Machida T., Tsukamoto R., Wada H., Kobayashi S., Marubashi S., Eguchi H., Ito T., Nagano H., Mori M., Doki Y. Rapamycin Causes Upregulation of Autophagy and Impairs Islets Function Both In Vitro and In Vivo. *Am J Transplant*, 12(1):102-104,2012
5. Dyah LD, Ishii H., Haraguchi N., Nishikawa S., Kano Y., Fukusumi T., Ohta K., Miyazaki S., Ozaki M., Sakai D., Satoh T., Nagano H., Doki Y., Mori M. Reprogramming of gastrointestinal cancer. *Cancer Sci* , 103(3):393-399, 2012
6. Ohkuma M., Haraguchi N., Ishii H., Mimori K., Tanaka F., Kim HM., Shimomura M., Hirose H., Yanaga K., Mori M. Absence of CD71 transferrin receptor characterizes human gastric adenocarcinoma stem cells. *Ann Surg. Oncol* , : 19(4):1357–1364 ,2012
7. Kim HM, Haraguchi N., Ishii H., Ohkuma M., Okano M., Mimori K., Eguchi H., Yamamoto H., Nagano H., Sekimoto M., Doki Y., Mori M. Increased CD13 Expression Reduces Reactive Oxygen Species, Promoting Survival of Liver Cancer Stem Cells via an Epithelial-Mesenchymal Transition-like Phenomenon. *Ann Surg Oncol*, 19:S539–S548 ,2012
8. Hoshino H, Nagano H., Haraguchi N., Nishikawa S., Tomokuni A., Kano Y., Fukusumi T., Saito T., Ozaki M., Sakai D., Satoh T., Eguchi H., Sekimoto M., Doki Y., Mori M., Ishii H : Hypoxia and TP53 Deficiency for induced pluripotent stem cell-like properties in gastrointestinal cancer. *Int J Oncol* 40(5):1423-1430 ,2012
9. Sugimura K., Miyata H., Tanaka K., Hamano R., Takahashi T., Kurokawa Y., Yamasaki M., Nakajima K., Takiguchi S., Mori M., Doki Y. Let-7 expression is significant determinant of response to chemotherapy through the regulation of IL-6/STAT3 pathway in esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*, 18(18) : 5144-5153, 2012
10. Yamada D., Kobayashi S., Yamamoto H., Tomimaru Y., Noda T., Uemura M., Wada H., Marubashi S., Eguchi H., Tanemura M., Doki Y., Mori M., Nagano H. Role of the hypoxia-related gene, JMJD1A, in hepatocellular carcinoma: clinical impact on recurrence after hepatic resection. *Ann Surg Oncol*, (3) : 355-364,2012
11. Yokobori T, Ishii H, Mimori K, Mori M., Plastin3 is a novel marker for circulating tumor cells undergoing the epithelial-mesenchymal transition and is associated with colorectal cancer prognosis. *Cancer Res*,2013 (in press)