

[035]九州大学生体防御医学研究所年報 : 2020年

<https://hdl.handle.net/2324/6617898>

出版情報 : 九州大学生体防御医学研究所年報. 35, pp.1-, 2021. Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University

バージョン :

権利関係 :



分 子 機 能 制 御 学 部 門

Department of Molecular and Structural Biology

エピゲノム制御学分野

Division of Epigenomics and Development

教 授：佐々木 裕之

Professor : Hiroyuki Sasaki, M.D., Ph.D.

令和2年度は、新型コロナウイルス感染拡大による緊急事態宣言で幕を開けたが、主幹教授・佐々木裕之、准教授・鶴木元香、助教・石内崇士、特任講師・藤英博の体制で研究・教育を行った。佐々木は副学長（9月まで）、高等研究院長、エピゲノミクス分野教授を、また藤はエピゲノミクス分野特任講師を兼務した。以上に加え、学術研究員1名、博士課程学生5名、修士課程学生1名、生命科学科4年生1名、テクニカルスタッフ2名、技術補佐員2名、事務補佐員2名の計18名で研究・教育を実施した。

多くの講義・会議・学会が中止またはオンライン開催となり、九州大学でも教育研究が大きく変容した。研究室への出入りや滞在時間が制限され、マウスの頭数も減少せざるを得ないなど大きな制約があるなか、恒常性維持や生体防御に重要なエピジェネティクス及びエピゲノムの制御機構の解明を目指して研究を実施した。とくに生殖細胞におけるゲノムインプリンティングや発生・分化能のリプログラミング、エピジェネティクスによるゲノム安定性維持機構などについて精力的に研究を行った。

研究の実施にあたっては、科学研究費補助金・特別推進研究、新学術領域研究(2件)、基盤研究(C)、萌芽研究、各種助成金・寄附金を活用した。また、佐々木は日本医療研究開発機構(AMED)の革新的先端研究開発支援事業「健康・医療の向上に向けた早期ライフステージにおける生命現象の解明」のプログラムスーパーバイザー(研究開発総括)として、AMED-CREST 課題9件、PRIME 課題20件の研究を統括・推進した。また、科学技術振興機構(JST)の創発的研究支援事業のアドバイザーとして、全国の若手研究者の育成と研究課題の評価を行った。

最後に、今年度は博士課程学生1名(阿部周策)、修士課程学生1名(三木佑果)、生命科学科4年生1名(浜崎祥生)が学位を取得した。博士課程学生1名(木部加奈子)が単位取得の上退学するが、論文の再投稿の準備中であり、受理後に学位を申請する予定である。博士課程学生2名は就職が決まっており、修士課程学生と生命科学科学生は他学へ進学する。

A. 生殖細胞系列における DNA メチル化とゲノム刷り込みの制御機構

精子や卵子の形成過程でクロマチンに付加されるエピジェネティック修飾(DNAメチル化やヒストンの各種修飾)は、受精後の胚の発生能制御の重要な制御因子である。その影響を受ける発生関連遺伝子の一部は刷り込み遺伝子と呼ばれ、受精後において精子(父親)由来と卵子(母親)由来のいずれか一方のアレルだけ発現する。哺乳類の生殖

細胞のエピジェネティックな修飾過程に異常があると、そのような遺伝子の発現に障害が生じ、不妊・流産・奇形・発達遅延・成長障害の原因となる。我々はマウス卵子における主要な de novo メチル化酵素である DNMT3A の ADD ドメインに機能抑制型のアミノ酸置換を有するマウスを作成し、この変異の DNA メチル化への影響を調べた。ADD ドメインはヒストン H3K36me2/me3 を認識し、この修飾の蓄積したゲノム領域のメチル化に寄与すると考えられてきた。驚くべきことに、変異卵子において H3K36me2/me3 修飾領域の DNA メチル化は低下せず、この修飾がない領域のメチル化が上昇していた。また、変異卵子に由来する仔は小人症の表現型を示すが、生存可能であった(再投稿準備中)。以上の結果は、DNMT3A の ADD ドメインが H3K36me2/me3 修飾のない領域の異所性のメチル化を抑制する機能を有することを示す。

B. 初期胚における DNA メチル化の伝達とリプログラミングの機構

従来の研究では、受精後の初期胚では DNA メチル化の消去(リプログラミング)または維持が行われるだけで、新たなメチル化は生じないと考えられていた。しかし最近の研究により、一部の精子由来ゲノム領域はマウスの受精後、2細胞期までに新規メチル化されることがわかった。我々は University of British Columbia の Lorincz らとの共同研究により、この de novo メチル化を触媒するメチル化酵素が卵子に蓄積された母性 DNMT3A であることを示した (Richard Albert et al. *Nat. Commun.* 2020)。また、芸術工学研究院の丸山らと共に、マウス卵子及び初期胚(胚盤胞など)の DNA メチル化データをベースにして、DNA 配列からメチル化伝達または消去を予測するアルゴリズムの開発に取り組んだ。今年度は入力データを増幅する拡張法を開発し、双方向回帰型ユニットニューラルネットワークによる分類器の構築に成功した(投稿準備中)。この研究は、環境要因により生じたエピゲノム変化が子孫へ伝達するという、エピジェネティック伝達の研究に役立つものと思われる。

C. マウスの受精前後におけるヒストン H3.3 の分布と動態の解析

細胞の分化能や遺伝子の発現は、哺乳類の受精前後の発生過程において大きく変化する。ヒストンバリエーションの制御がこれらにどのように関与するかを調べるため、転写活性化やクロマチン脱凝縮に関わるヒストン H3.3 のゲノム上の分布を、マウスの受精卵及び初期胚において解析した。その結果、受精卵はこれまでに報告のない H3.3 の分布様式(非典型パターン)を有すること、さらにその分布様式はその後の発生過程において多くの細胞で見られる分布様式(典型パターン)へと変化する、その変化には DNA 複製に依存したヒストン H3.1/H3.2 のクロマチンへの挿入が重要であることを明らかにした (Ishiuchi et al. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2021)。

D. ヒストン H3.3 のアミノ酸置換が軟骨前駆細胞分化に与える影響

近年、ヒストン遺伝子の点変異が、がんを含む種々のヒト疾患において同定されている。そのうち、ヒストン H3.3 の 36 番目のリジンがメチオニンへと置換する点変異 (H3.3K36M) は、ヒト軟骨芽細胞腫の 9 割以上で見られる。そこで、マウスにおいてこの点変異を組織特異的に誘導できるマウスを作製し、その表現型の解析を行った。その結果、ヒストン H3.3K36M はヒストンメチル化酵素 NSD1, NSD2 の活性を阻害してヒストン H3K36me2 を減少させること、さらにその結果として、ヒストン H3K27me3 の再分布及び軟骨前駆細胞の分化異常を引き起こすことを明らかにした (Abe et al. **Epigenetics** 2020)。

E. エピジェネティクス異常に基づくヒト疾患の解明

ICF 症候群は免疫不全, セントロメア不安定性, 顔貌異常を主徴とする劣性遺伝病で、DNA メチル化酵素 DNMT3B (1 型 ICF 症候群), 転写制御因子 ZBTB24 (2 型), クロマチン再構成因子複合体を構成する CDCA7 (3 型) 及び HELLS/LSH (4 型) のいずれかの遺伝子の変異で生じる。我々は、1 型～4 型 ICF 症候群に共通して見られる表現型として、DNA 二重鎖切断の修復異常を報告したが、これだけではすべての型に共通なペリセントロメア領域の低メチル化を説明できなかった。そこで新規 DNA 合成鎖上に集積するタンパク質の網羅的解析を行なったところ、維持 DNA メチル化に関与する DNMT1/UHRF1 複合体及び R ループの解消及び形成阻止に働くタンパク質 (DDX21 と FACT 複合体) が減少していることを見出した。また、低メチル化状態になったペリセントロメア領域から転写が起これ、それが R ループを形成して、DNA 損傷を引き起こしていることも見出した (Unoki et al. **Sci. Rep.** 2020)。これらの結果より、1) CDCA7/HELLS 複合体が DNMT1/UHRF1 複合体の新規 DNA 合成鎖上へのアクセスと維持 DNA メチル化を促進すること、2) ICF 患者ではこの破綻によりペリセントロメア領域の低メチル化が起これ、それが異常な転写と R ループ形成を介して DNA 損傷を引き起こすことが示唆された。なお、横浜市立大学有田らとの共同研究により、UHRF1 の 298 番目のセリンのリン酸化は構造変化を引き起こし、UHRF1 の TTD ドメインのリガンドとの結合特性が、変化することも見出した (Kori et al. **J. Mol. Biol.** 2020)。

F. その他

研究所内ゲノミクス分野柴田らとの共同研究において、家族性痙性麻痺 28 型 (SPG28) の動物モデルを開発するため、原因遺伝子である DDHD1 (ホスホリパーゼ A1 をコードする) のノックアウトマウスを作成した。表現型解析を行った結果、運動神経系の障害、リソホスファチジルイノシトールの減少、神経活動や細胞間コミュニケーション関連の遺伝子の発現異常を認めた。以上により、このマウスが SPG28 の病態解明に有用であると結論づけた (Morikawa et al. **Biosci. Rep.** 2021)。

業績目録

原著論文

1. Kori S.*, Jimenji T.*, Ekimoto T.*, Sato M., Kusano F., Oda T., Unoki M., Ikeguchi M. & Arita K.
(*These authors equally contributed to the work.) (2020, Jun)
Serine 298 phosphorylation in linker 2 of UHRF1 regulates ligand-binding property of its tandem Tudor domain.
J Mol Biol. 432:4061-4075.
2. Unoki M., Sharif J., Saito Y., Velasco G., Francastel C., Koseki H. & Sasaki H. (2020, Oct)
CDCA7 and HELLS suppress DNA:RNA hybrid-associated DNA damage at pericentromeric repeats.
Sci Rep. 10:17865.
3. Richard Albert J., Au Yeung W.K., Toriyama K., Kobayashi H., Hirasawa R., Brind'Amour J., Bogutz A., Sasaki H. & Lorincz M. (2020, Oct)
Maternal DNMT3A-dependent de novo methylation of the paternal genome inhibits gene expression in the early embryo.
Nat Commun. 11:5417.
4. Abe S., Nagatomo H., Sasaki H. & Ishiuchi T. (2020, Nov)
A histone H3.3K36M mutation in mice causes an imbalance of histone modifications and defects in chondrocyte differentiation.
Epigenetics. *in press*.
5. Ishiuchi T., Abe S., Inoue K., Au Yeung W.K., Miki Y., Ogura A. & Sasaki H. (2021, Jan)
Reprogramming of the histone H3.3 landscape in the early mouse embryo.
Nat Struct Mol Biol. 28:38-49.
6. Morikawa T., Ohishi H., Kosaka K., Shimojo T., Nagano A., Taniguchi I., Fujioka R., Moriyama K., Unoki M., Takahashi M., Nakao M., Izumi Y., Bamba T., Sasaki H., Miura S. & Shibata H. (2021, Feb)
Ddhd1 knockout mouse as a model of locomotive and physiological abnormality in familial spastic paraplegia.
Biosci Rep. 41:BSR20204171.

総説

1. 鵜木 元香. (2020, Jul)
クロマチンリモデリングと染色体安定性-ICF 症候群の分子病態研究から見えてきたこと-.
月刊「細胞」7月号, Topics from special edition 52 (8), 43-47.

著書

1. 鵜木 元香, 佐々木 裕之. (2020, Sep)
もっとよくわかる！エピジェネティクス.
実験医学別冊, 羊土社.

学会発表（口頭発表）

1. Ryo Shimizu, Wan Kin Au Yeung, Hidehiro Toh, Hiroyuki Sasaki, Osamu Maruyama. (2020, 9/1-3)
Predicting Discriminative Motifs for DNA Methylation in Mammalian Development.
2020年日本バイオインフォマティクス学会年会・第9回生命医薬情報学連合大会 (IIBMP2020), オンライン.
2. Takashi Ishiuchi. (2020, 9/14-16)
Dynamics of the histone H3.3 landscape in the early mouse embryo.
第93回日本生化学会, 横浜, オンライン.
3. 安川 武宏, 松田 盛, 稲富 鉄平, 都 由羅, 阿部 周策, 石内 崇士, 中田 和人, 一柳 健司, 佐々木 裕之, 康 東天. (2020, 9/14-16)
多様な RNA-DNA ハイブリッド形成に支えられている哺乳動物ミトコンドリア DNA の複製メカニズム.
第93回日本生化学会, オンライン.
4. 鵜木 元香. (2020, 9/16-18)
クロマチンリモデリングと染色体安定性-ICF 症候群の分子病態研究から見てきたこと.
日本遺伝学会第92回大会.
5. 佐々木 裕之. (2020, 10/2-4) 特別講演
ヒトエピゲノム研究の現状と医学応用 (Perspectives of the Human Epigenome Research and Its Application to Medical Sciences).
第31回日本緑内障学会, オンライン.
6. Motoko Unoki, Hiroyuki Sasaki. (2020, 11/18-21)
CDCA7 and HELLS suppress DNA:RNA hybrid-associated DNA damage at pericentromeric repeats.
日本人類遺伝学会第65回大会, オンライン.
7. 鵜木 元香. (2020, 11/26) 招待講演
CDCA7 と HELLS はペリセントロメア反復配列の DNA:RNA ハイブリッドに起因する DNA 損傷を抑制する.
日本環境変異原学第49回大会, 沼津.
8. Takashi Ishiuchi. (2020, 12/2-4)
Reprogramming of the histone H3.3 landscape in the early mouse embryo.
第43回日本分子生物学会年会, オンライン.
9. Hiroyuki Sasaki. (2020, 12/2-4) 招待講演

Genomic imprinting as a model to study epigenetic inheritance and reprogramming.

第 43 回日本分子生物学会年会, オンライン.

10. 佐々木 裕之. (2020, 12/19) 特別講演
ヒトエピゲノム研究の現状と医学応用 (Perspectives of the Human Epigenome Research and Its Application to Medical Sciences).
SPC (Science Pioneers Consortium) 2020, 東京.
11. 石内 崇士. (2020, 12/21-23)
全能性エピゲノムのデコーディングとデザイン.
『配偶子インテグリティの構築』『全能性プログラム』2020 年度合同公開新シンポジウム,
オンライン.
12. 鵜木 元香. (2021, 1/18-19)
CDCA7 と HELLS はペリセントロメア反復配列の DNA:RNA ハイブリッドに起因する DNA
損傷を抑制する.
第 38 回染色体ワークショップ・第 19 回核ダイナミクス研究会, オンライン.
13. 鵜木 元香. (2021, 2/5) 招待講演
クロマチンリモデリングと染色体安定性.
大阪大学蛋白質研究所セミナー, オンライン.
14. Hiroyuki Sasaki. (2021, 2/15-17) 特別講演
DNA methylation in development and disease.
Genome Concept Centennial Symposium, オンライン.
15. 石内 崇士. (2021, 3/30-31) 奨励賞受賞講演
哺乳類の初期発生の基盤となるエピゲノム制御機構.
第 14 回エピジェネティクス研究会年会, オンライン.

学会発表（ポスター発表 16 件）

内訳省略.

免疫ゲノム生物学分野

Division of Immunology and Genome Biology

教 授：馬場 義裕

Professor : Yoshihiro Baba, Ph. D.

免疫は感染症やがんから身を守る生体防御システムとして重要であることは広く知られている。一方で、免疫が自身を攻撃したり、過剰に反応したりすることで、自己免疫疾患やアレルギー、炎症の発症や増悪化にも深く関わる。しかし、この多様な免疫制御の仕組みや分子基盤は不明な点が多く、解決すべき課題が山積している。免疫ゲノム生物学分野では、液性免疫の要である B 細胞を中心に、ゲノム・分子・細胞・個体レベルで免疫細胞の分化および機能を明らかにし、難治疾患の発症原因や病態の理解に取り組んでいる。

令和 2 年度は、馬場義裕（教授）、田中伸弥（准教授）、畑野晋也（助教）に加えて、テクニカルスタッフ 2 名、博士課程大学院生 6 名、修士課程大学院生 3 名の計 14 名により、研究および教育活動を行なった。また、馬場は発生工学実験室長を兼任し、技術専門職員 1 名、テクニカルスタッフ 2 名、技能補佐員 20 名で動物飼育管理および遺伝子組換えマウス作製業務サービスを進めている。

令和 2 年度は革新的先端研究開発支援事業（AMED-PRIME）、科研費などの補助金による支援を受けた。

A. B 細胞分化機序の解明

B 細胞はプラズマ細胞へと最終分化し、抗体を分泌することにより感染防御の役目を果たす。そこに至るまでに、B 細胞は胚中心 B 細胞となって抗体の親和性亢進やクオリティーを変化させる。また、B 細胞は記憶 B 細胞へと分化し、免疫記憶の役割を担う。一方、B 細胞は自分自身を攻撃する抗体（自己抗体）を産生することもあり、自己免疫疾患の増悪因子にもなる。このように、適切な B 細胞分化が生体防御において重要であり、その仕組みを明らかにすることは疾患制御や医学応用への発展に貢献すると考えられる。私たちは、B 細胞の分化を支える細胞内因子（遺伝子発現、シグナル伝達、エピジェネティクス制御、BCR レパトア）や環境因子（場所、時間、老化、細胞間相互作用）を明らかにすることで、正常と異常な B 細胞分化を理解することを目指している。

今年度は、胚中心 B 細胞の分化機序を明らかにすることを試みた。胚中心は抗体、B 細胞レセプター（B cell receptor: BCR）の親和性を上昇させる場である。リンパ組織の胚中心では、B 細胞が抗原刺激を受けて活性化し、抗体の親和性を高めていくことから、胚中心の形成は抗体が効率良く病原体を排除するために必須のプロセスであ

る。胚中心 B 細胞が活性化されるには、まず、BCR を介して濾胞性樹状細胞上に存在する抗原を認識し、BCR シグナルを受ける必要があるが、その意義は不明であった。われわれは、Ca²⁺レポーターマウスと抗原特異的 BCR を有するトランスジェニックマウスを利用し、2 光子顕微鏡を用いて、胚中心 B 細胞の *in vivo* イメージングを行うことにより、胚中心 B 細胞が濾胞性樹状細胞と相互作用する時に、細胞内 Ca²⁺濃度が上昇することを見出した（未発表）。我々は、これまでに、小胞体 Ca²⁺センサーである STIM1 と STIM2 を欠損させると BCR 依存的 Ca²⁺流入のみを阻害することができることを報告している（*Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 2008; *Immunity*, 2011）ことから、B 細胞特異的 STIM1/2 二重欠損マウスを利用することで、胚中心 B 細胞形成における Ca²⁺流入の重要性を検証したところ、Ca²⁺シグナルの消失が胚中心 B 細胞を減少させることを突き止めた（未発表）。現在、これら現象を支える分子機序の解明に取り組んでいる。

B. 免疫応答を抑制する B 細胞の全容解明

B 細胞は自己免疫疾患、炎症、アレルギーの原因となったり病態を悪化させたりすることが知られているが、それとは逆に、免疫反応を抑制する B 細胞として“制御性 B 細胞”の存在が明らかにされ注目されている。特に、抗炎症性サイトカイン IL-10 を産生する制御性 B 細胞は、さまざまな疾患モデルマウスを用いた研究から、炎症や自己免疫疾患、さらには、感染免疫や腫瘍免疫などに対する抑制能がずっと示され、その制御の対象は多様であることが示されている。さらに、IL-10 以外の機序により免疫を抑制する制御性 B 細胞の存在も示唆されており、この研究領域は発展しつつある。私たちの研究室では、これまでに、生体内における IL-10 産生制御性 B 細胞として CD138⁺CD44^{hi} プラズマブラストを同定し、多発性硬化症のマウスモデルである自己免疫性脳脊髄炎に対する抑制作用を示した（*Immunity*, 2014）。さらに、プラズマブラストの IL-10 産生には、TLR および BCR 刺激で活性化される IRF4 や NFAT が必要であることを明らかにした。現在、IL-10 産生プラズマブラスト特異的な遺伝子発現や分化の分子機序の解明を目指して研究を進めている。同時に、IL-10 以外の新規抑制作用を持った B 細胞の同定を試みており、今年度は、そのひとつの候補遺伝子の B 細胞特異的ノックアウトマウスを樹立し、機能解析を進めている。

C. カルシウムシグナルと免疫応答

B 細胞が抗原と出会い、活性化・分化するためには、BCR による抗原認識が必須となり、その情報はシグナル伝達として細胞内に伝わる。私たちは、この BCR シグナル伝達の分子メカニズムやその生理的な意義について研究を進めている。これまでに、STIM1 に結合するタンパク質を複数同定しているが、そのなかのひとつの新規分子（こ

ここでは、STBP1 : STIM1 binding protein1 と呼ぶ) の機能解析を行った。STBP1 を欠損させた B 細胞株を樹立・解析したところ、STBP1 が欠失すると B 細胞が致死となることが判明した。生体での役割を検証するため、STBP1 のコンディショナルマウス (BK0) の作製を試みた。B 細胞特異的ノックアウトマウスを作成するためには、B 細胞 Cre マウスと flox マウスを交配して作成するが、現在、使える B 細胞特異的 Cre マウスは特異性と効率において不十分な点があったため、それらの弱点を克服した新規の B 細胞特異的 Cre マウス (CD19-iCre) を作成した (*Sci Rep*, 2012)。STBP1flox マウスの樹立にも成功しており、現在、CD19-iCre と STBP1flox マウスの交配により、BK0 マウスを作成し、現在、解析を進めている。

D. 自己免疫疾患を制御する B 細胞の研究

エピジェネティクス制御が B 細胞機能に与える影響を検証する目的で、DNA 脱メチル化を制御する Tet 分子の B 細胞特異的ノックアウトマウスを作製し、B 細胞分化を調べると、異常な B 細胞集団の増加と、自己免疫病態を自然に発症することを突き止めた (*Nat Immunol*, 2012)。また、ヒト自己免疫疾患の発症リスクを増大させる SNPs が存在する遺伝子が、自己免疫疾患発症に直接関与する可能性を検証するため、候補分子のひとつの遺伝子改変マウスを解析中である。

E. ヒト B 細胞免疫学の研究

B 細胞の分化や性状はマウスとヒトで異なることが多いため、ヒト B 細胞研究は重要だと考えている。特に、ヒト制御性 B 細胞の実体や病態への関与については未解決な課題が多い。われわれは、この疑問にも取り組んでおり、ヒトプラズマブラストが IL-10 を産生することを見出している (*Immunity*, 2014)。そこで、将来の医学応用を視野に入れ、*in vitro* でヒト IL-10 産生制御性 B 細胞を選択的かつ効率よく培養する方法の樹立を試みており、現時点で IL-10 産生 B 細胞を大幅に増幅することに成功している。現在、より効率的な培養法を改良中である。

F. 発生工学技術支援

総合研究棟 9F と生医研別館 3F の動物飼育室の運営を担当しており、SPF 動物の飼育、健康管理を行なっている。凍結精子および凍結受精卵の作製や CRISPR/Cas9 ゲノム編集を用いたノックアウトマウス作製に加えて、Cas9 タンパク質および gRNA をエレクトロポレーションによって受精卵に導入する方法の支援業務も問題なく進行中である。

業績目録

原著論文

1. Yasuda T., Saito Y., Ono C., Kawata K., Baba A., Baba Y. (2021, Mar)
Generation and characterization of CD19-iCre mice as a tool for efficient and specific conditional gene targeting in B cells.
Sci Rep. 11(1):5524.
2. Tanaka S., Ise W., Inoue T., Ito A., Ono C., Shima Y., Sakakibara S., Nakayama M., Fujii K., Miura I., Sharif J., Koseki H., Pandelakis K., Raman I., Li Q.-Z., Kubo M., Fujiki K., Nakato R., Shirahige K., Araki H., Miura F., Ito T., Kawakami E., Baba Y., Kurosaki T. (2020, Aug)
Tet2 and Tet3 in B cells are required to repress CD86 and prevent autoimmunity.
Nat Immunol. 21(8), 950-961.
3. Sakaguchi T., Okumura R., Ono C., Okuzaki D., Kawai T., Okochi Y., Tanimura N., Murakami M., Kayama H., Umemoto E., Kioka H., Ohtani T., Sakata Y., Miyake K., Okamura Y., Baba Y., Takeda K. (2020, Jun)
TRPM5 Negatively Regulates Calcium-Dependent Responses in Lipopolysaccharide-Stimulated B Lymphocytes.
Cell Rep. 31(10):107755.
4. Monin L., Ushakov D.S., Arnesen H., Bah N., Jandke A., Muñoz-Ruiz M., Carvalho J., Joseph S., Almeida B.C., Green M.J., Nye E., Hatano S., Yoshikai Y., Curtis M., Carlsen H., Steinhoff U., Boysen P., Hayday A. (2020, May)
 $\gamma\delta$ T cells compose a developmentally regulated intrauterine population and protect against vaginal candidiasis.
Mucosal Immunol. 13(6), 969-981.
5. Tanaka S., Baba Y. (2020, Apr)
B Cell Receptor Signaling.
Adv Exp Med Biol. 1254:23-36.

学会発表

1. 馬場 義裕. (2020, 10/22)
B細胞の免疫応答制御機構.
第16回皮膚免疫疾患研究会, web開催.
2. 田中 伸弥. (2020, 11/6)
Role of Ten-eleven translocation (Tet) in B cell self-tolerance.

The 15th International Symposium of the Institute Network for Biomedical Sciences, The 6th IMCR Symposium on Endocrine and Metabolism, web 開催.

3. 馬場 義裕. (2020, 12/19)

B 細胞による自己免疫疾患制御.

免疫と神経疾患オンラインセミナー, web 開催.

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論点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、エンドサイトーシス、DNA複製、修復、組み換えなど対象は多岐にわたっている。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（主に単粒子解析）を用いることで、タンパク質の分子認識の構造的基盤の解明を目指している。特に、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）」と呼び、集約的な研究を進めている。

A. 蛋白質内部に存在する大振幅運動の空間分布を可視化する測定法の開発

蛋白質分子は安定な一定の立体構造を持つと教科書に書かれている。しかし実際は生命活動に必要な分子機能を発揮するために、蛋白質分子は進化的に柔軟かくデザインされていて、大きな振幅（ $>3 \text{ \AA}$ ）を持つ内部運動が存在する。この大振幅内部運動の周波数分布は核磁気共鳴法を用いて（ある程度）解析できるが、振幅の空間分布を実験的に解析するための良い手法が存在しない。そこで、X線小角散乱（small angle X-ray scattering, SAXS）を使って生体高分子の動的な構造情報を得るための測定技術を開発した（図 A.1）。通常の解析では、散乱データから全ての原子の間の距離分布関数（pair distribution function）を得ることができるが、これを運動性の解釈に用いることは困難である。そこで、重原子を2つ導入して重原子間の距離分布を決定する方法を提案した（図 A.1D）。

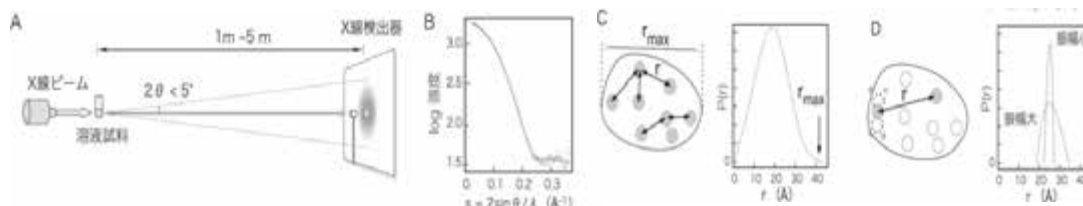


図 A.1 X線小角散乱の(A)測定スキーム、(B)散乱曲線、(C)通常の解析、(D)シングルペア SAXS 法。特定の原子対の情報のみを抽出することで、蛋白質分子の構造ゆらぎの空間分布を可視化する。

モデル化合物として、ポリエチレングリコール（PEG）鎖の両端に2つのヨウ素原子を導入した化合物を合成した（図 A.2）。ヨウ素以外の軽原子の影響は、ヨウ素原子を1個あるいは0個とした化合物の SAXS データを別に測定し、データの加減算 $S = S_{I-I} - 2 \cdot S_{I-H} + S_{H-H}$ を行うことで消去した。得られた結果の妥当性を検証するために、分子メカニカルモデルを使って距離分布関数をシミュレーションで求め、実験結果と計算結果がよく一致することを示した（図 A.3）（原著論文 1）。

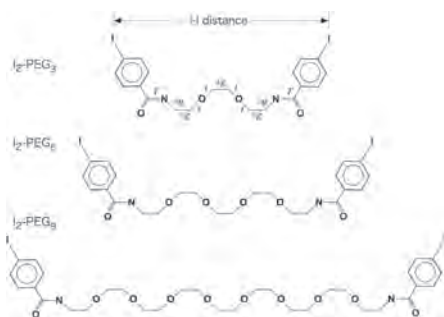


図 A.2 合成したモデル化合物の化学構造. PEG ユニットの数を変えることで、ヨウ素原子間の距離分布を変化させた。図の化合物に加えて、ヨウ素原子が1つあるいは0個の化合物も合成した。

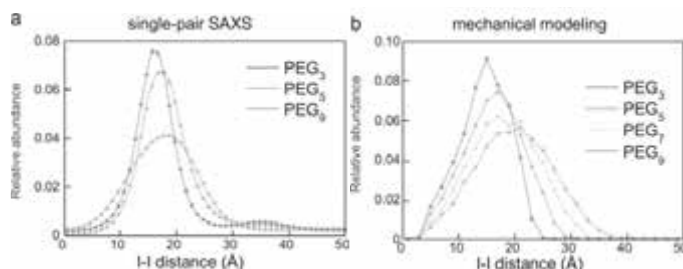


図 A.3 シングルペア SAXS 法で求めたヨウ素原子間の距離分布 (a, DMSO 中) とメカニカルモデルでシミュレーションしたヨウ素原子間の距離分布 (b)。

B. オリゴ糖転移酵素の生物学

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。真核生物のオリゴ糖転移酵素は多数の膜タンパク質からなる多量体酵素であり、出芽酵母のオリゴ糖転移酵素は8つのサブユニットからなる。多量体型の酵素を組み換え体として調製することは困難であり、アミノ酸変異体の活性評価は酵母菌体の生き死に実験が主であった。しかし、活性の評価を定量的に行うことが重要と考え、アフィニティタグを導入して酵母菌体から調製する方法を確立した。これにより活性が低下するようなアミノ酸変異を持った酵母オリゴ糖転移酵素複合体を調製できるようになった。精製した変異酵素を用いて、ペプチド基質へのN型糖鎖転移活性と糖鎖供与体（Lipid-Linked

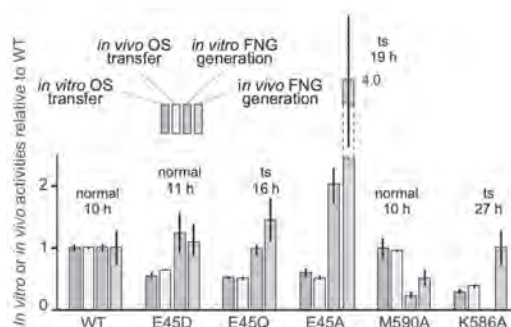


図 B.1 酵母 OST 酵素の活性サブユニットにアミノ酸変異を導入して、オリゴ糖転移活性（OS transfer）と遊離 N 型糖鎖生成活性（FNG generation）を試験管内アッセイで測定した。また、同じ変異をもつ OST 酵素を酵母菌体内で発現させて、標的蛋白質の糖鎖付加の程度と菌体に蓄積した遊離 N 型糖鎖の量を測定した。

Oligosaccharide, LLO) の加水分解による遊離 N 型糖鎖生成反応のアッセイを行った (図 B.1). また, 平行して, 菌体内に変異酵素を発現させて *in vivo* でも 2 つの活性について解析を行った (図 B.1) .

興味深いことに, ペプチド基質の認識に関わるアミノ酸残基に変異を導入した場合に, 糖鎖転移活性に比べて加水分解活性が上昇するような変異体 (E45D, E45Q, E45A), 逆に加水分解活性が抑制されている変異体 (M590A, K586A) を得ることができた. これは糖鎖転移活性と遊離 N 型糖鎖生成活性を分離することができること, そしてアミノ酸のわずか一残基の変異で一見無駄な糖鎖供与体 LLO の加水分解を抑制できることを意味している. したがって, 遊離 N 型糖鎖生成活性は進化の過程で保存されており, 遊離 N 型糖鎖の存在は細胞・生物にとって何らかの有用な役割を果たしていることを推測させる. 実際に試験管内では K586A 変異体は遊離 N 型糖鎖をほとんど発生しないにもかかわらず, 細胞内には WT と同程度の量が蓄積している (図 B.1). これは酵母の生育速度を減少させる (10 h→27 h) ことで, わずかに残った遊離 N 型糖鎖生成活性あるいは非酵素的な遊離 N 型糖鎖生成を使って, 細胞内の遊離 N 型糖鎖を確保した結果と考ええると, 遊離 N 型糖鎖の細胞における未知な生理機能の存在を示唆している (原著論文 4).

C. ランチオニンペプチドの NMR 解析

ヒト表皮常在グラム陽性菌 *Staphylococcus warneri* ISK-1 が産生するペプチド Nukacin ISK-1 (27 残基) は Lipid II と相互作用して抗菌活性を発揮する抗菌ランチペプチドである. ランチペプチドは配列内に翻訳後修飾により生じた不飽和アミノ酸 (Dhb) とモノスルフィド結合 (A-S-A, Abu-S-A) を有する (図 C.1). ^1H - ^{15}N HSQC スペクトル測定から Nukacin は溶液中で二つの状態の平衡にあることがわかっており. 2 つの状態を状態 A と状態 B と呼ぶことにする.

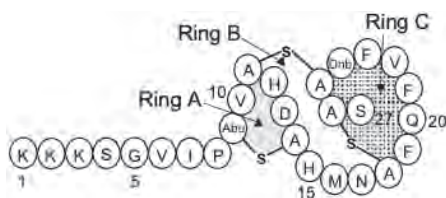


図 C.1 Nukacin の一次構造

2 つの状態の平衡定数を HSQC スペクトル (図 C.2 左) の強度比から, また交換速度 ($k_{A \rightarrow B}$ と $k_{B \rightarrow A}$ の 2 つ) を EXSY 法で解析した. 常識に反して, 平衡定数の値および交換速度が残基毎に大きく異なっていた. 一般的に蛋白質の構造平衡および構造変化には高い共同性 (cooperativity) が存在すると信じられている. そのため, NMR を使ってアミノ酸残基毎に平衡定数や交換速度定数を決定しても単一の値でグローバルフッティングを行うのが常である. 次に, 残基毎の平衡定数と交換速度の分布の間の関係を調べた. 平衡定数と交換速度定数の両対数プロットを行うと良い直線関係があることを見いだした (図 C.2 右). 横軸と縦軸のそれぞれは二状態の自由エネルギー差 ΔG_{B-A}

と、遷移状態と各状態の自由エネルギー差 $\Delta G_{\ddagger-A}$ および $\Delta G_{\ddagger-B}$ に対応するので、直線関係は残基毎の自由エネルギー直線関係と言い換えることができる。その物理化学的起源について考察を進めた。

一つのアイデアとして、構造変換がスムーズに進むための物理化学的要請を反映しており、郷モデル (Go model) におけるコンシステンシー原理の初めての実験的サポートとなっている可能性がある。今回の発見はフォールディングできるポリペプチド鎖である蛋白質には、共同性 (cooperativity) の他に、 $\log k$ vs $\log K$ プロットの直線性から定義される協調性 (consistency) があるという新しい概念をもたらす。

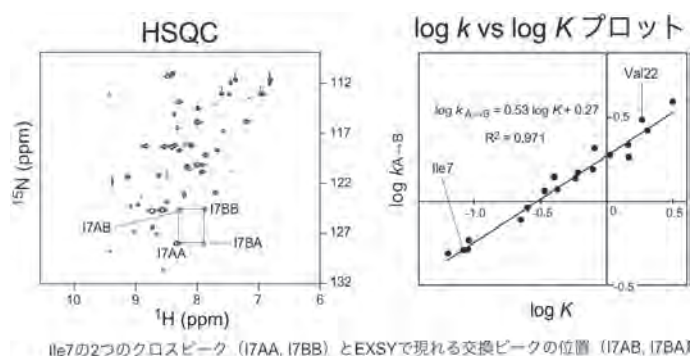


図 C.2 生理活性ペプチド Nukacin は溶液中で2状態 (A と B) をとる。NMR を使って残基毎に平衡定数と速度定数を決定して、 $\log k_{A \rightarrow B}$ vs $\log K$ のプロットをつくると直線関係がある (右図)。なお、 $K = k_{A \rightarrow B} / k_{B \rightarrow A}$ の関係から $\log k_{B \rightarrow A}$ vs $\log K$ も直線となる。直線の傾き ($0 \leq \rho \leq 1$) は反応座標における遷移状態の位置を表す。

Nukacin ISK-1 には非天然アミノ酸に由来するモノスルフィド結合が3つあり、2つの状態の立体構造も良く似ているため、自由エネルギー直線関係は特殊なケースに過ぎない可能性もある。そこで、単純タンパク質が変性状態から天然状態に巻き戻る際に同様の直線関係があることを検証するために、SH3 ドメインを使って NMR 実験を行った。その結果、SH3 ドメインのフォールディング状態とアンフォールディング状態の動的平衡においても共同性は完全ではなく、残基レベルの自由エネルギー直線関係 (協調性) が成立していることを見いだした。このことから、残基レベルの自由エネルギー直線関係は一般的なタンパク質のフォールディング過程にも成立していると考えている。問題点として NMR 測定には固有のバイアス (緩和時間 T_1 , T_2 などが残基毎と状態毎で異なる) が存在するため、これらの影響を補正した精密定量 NMR 実験と解析を今後進める。

D. エンドサイトーシス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生物が外部から物質を細胞内に取り込む仕組みであり、クラスリンと呼ばれるタンパク質に依存するクラスリン依存性エンドサイトーシスや、細菌等のより大きな基質を取り込む機構である貪食作用 (ファゴサイトーシス) を含む。今年度は構造生物学的知見に基づき設計した、クラスリン被覆ピットの動態に影響を与えると期待される新規ペプチドについて、神戸大学の研究者と共同研究を開始し、細胞生物学実験用プラスミドの調製と授受を行った。

また、これまでクラスリン依存性エンドサイトーシスやファゴサイトーシスに関与するタンパク質が脂質膜上で作る高次会合体を電子顕微鏡により観察する手法の確立を進めてきた。その過程で、脂質二重層中の膜タンパク質を電子顕微鏡により簡便に観察する手法の開発を行った。この手法では膜タンパク質の脂質二重層中での会合体も観察できるなど、既存の手法とは異なる優位性があり、産業応用の可能性もあることから特許出願を行った。今後はこの手法を用いて、細胞膜上での免疫反応やエンドサイトーシスなど、細胞膜で起こる種々の生物学的現象の構造的基盤を解明するとともに創薬を通じた医療応用も目指す。

E. 超分子複合体の電子顕微鏡による単粒子解析

革新的な発展を遂げた電子直接検出 (DED) カメラによって、電子顕微鏡単粒子解析法を用いて原子レベルの構造解析が可能となった。我々は結晶構造解析が困難な 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。

DNA ポリメラーゼ D (PolD) に関して、活性化因子及び DNA との複合体の構造解析を行い、ほぼ全長に相当する原子モデルを構築しプロテインデータバンクに登録した。この構造をもとに PolD の DNA 伸長モードと校正モードを切り換える機構を提唱した (図 D.1, 原著論文 3)。更に PolD-Primase 複合体の単粒子解析を行った。この複合体については、PolD の領域は上記の PolD-PCNA-DNA 複合体中とほぼ同様の構造が得られたものの、Primase 領域については PolD の DP1 に結合している部分のみ可視化され、

全体の立体構造は構築できなかった。一方、機能解析実験により Primase の PriS サブユニットは PolD の DP1 サブユニットに結合し、Primase の PriL サブユニットは PolD の DP2 サブユニットの C 末端に存在する柔軟な天然変性領域と結合していることが判明した。このことから、DP1 から突出している Primase の領域は PriS に相当し、天然変性領域を介して結合している PriL 領域は位置が定まらないために平均化の処理において不可視になると考えられる (原著論文 6)。

抗酸菌のリボソームの休眠因子 MDP1 は結核菌の薬剤抵抗性に関連する重要な蛋白である。本因子はその全長の半分程は α ヘリックス及び β ストランドからなるコアを

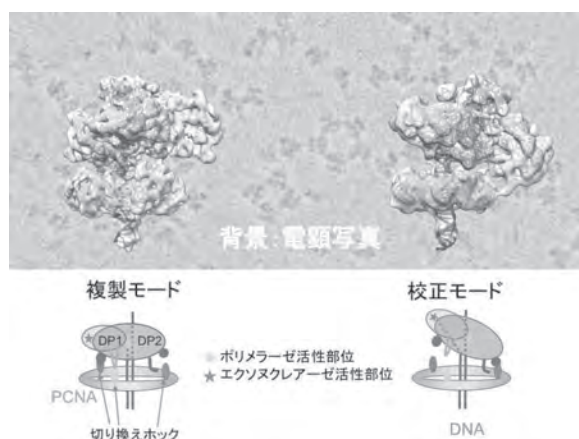


図 D.1 古細菌の DNA 複製装置のモード変換制御機構
急速凍結した複合体のクライオ電顕像 (上段背景) から溶液中に 2 タイプの立体構造 (上段左右) が存在していることが明らかになった。これらの構造を元に DNA の伸長と校正の 2 モード間の切り換えの制御機構 (下段) を提唱した。

形成するものの、残りは天然変性領域であり定まった構造をとらない。これまで、コア領域の結晶構造がダイマーの形で得られているが、実際の溶液中での形態はよく分かっていなかった。単粒子解析及び生化学的な実験を行い、溶液中では単量体として存在していることを明らかにした。

F. 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（2 台）と生体防御医学研究所技術支援室のクライオ電子顕微鏡 Polara（FEI 社）のユーザー管理を行っている。Polara は日本全国のクライオ電顕ネットワークにおける F1 サイトに登録されている (<https://www.cryoemnet.org/f1-em>)。F1 サイトは予備的なスクリーニングを担当する。

汎用電顕 T20（FEI 社）と Polara の共同利用を支援した。電子顕微鏡、試料作製装置の維持管理、利用者の測定のサポートを始め、依頼サンプルの負染色試料の作成や凍結試料の作成、データ収集を行った。今年度は、九州工業大学のトモグラフィー観察の支援と、マックスプランク研究所、新潟大学、長浜バイオ大学、及び学内の依頼による観察を行った。

Polara については導入後 10 年以上が経過しているものの、装置自体の基本性能は十分である。九州大学における研究環境整備要求（令和元年度）で導入決定された Gatan 社の K3 カメラのセットアップを行った（図 F.1）。本新型カメラは 5760×4092 の画素の電子直接検出器を有し、前モデルの K2（3838×3710 画素）に比べて約 1.7 倍の領域の画像データが取得可能である。また K2 の撮影速度が 400 fps であったのに対し K3 は 1500 fps と大幅に高速化されており、画素数と合わせると 6 倍以上のスループットの向上が見込まれる。本カメラには画像の劣化を及ぼす非弾性散乱電子を除去するエネルギーフィルタである最新型モデル BioContinuum が搭載されている。

昨年度に引き続き自動撮影システム SerialEM の改善を行った。凍結試料の自動撮影シーケンスにおいて、視野から視野へ移る際のステージ移動、ステージ移動後の焦点合わせ、ステージ移動後のステージ安定化の待ち時間等が律速となる。高速自動撮影を可能にするために、一回のステージ移動後に電子ビームを振ることで、隣接する複数箇所の視野をステージを動かさずに連続的に自動撮影できる設定を行った。結果として以前の 10 分の 1 の時間でデータを収集することができる。

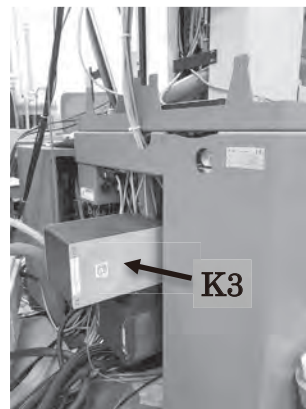


図 F.1 クライオ電顕 Polara に新規導入した最新型の電子直接検出カメラ K3 (Gatan)。Polara の背面より撮影。

業績目録

原著論文

1. Taguchi Y., Saio T., Kohda D. (2020, Jul)
Distance Distribution between Two Iodine Atoms Derived from Small-Angle X-ray Scattering Interferometry for Analyzing a Conformational Ensemble of Heavy Atom-Labeled Small Molecules.
J Phys Chem Lett. 11:5451-5456.
2. Fang Y., Akimoto M., Mayanagi K., Hatano A., Matsumoto M., Matsuda S., Yasukawa T., Kang D. (2020, Jul)
Chemical acetylation of mitochondrial transcription factor A occurs on specific lysine residues and affects its ability to change global DNA topology.
Mitochondrion. 53:99-108.
3. Mayanagi K., Oki K., Miyazaki N., Ishino S., Yamagami T., Morikawa K., Iwasaki K., Kohda D., Shirai T., Ishino Y. (2020, Oct)
Two conformations of DNA polymerase D-PCNA-DNA, an archaeal replisome complex, revealed by cryo-electron microscopy.
BMC Biol. 18:152.
4. Yamasaki T., Kohda D. (2020, Nov)
Uncoupling the hydrolysis of lipid-linked oligosaccharide from the oligosaccharyl transfer reaction by point mutations in yeast oligosaccharyltransferase.
J Biol Chem. 295:16072-16085.
5. Kawasaki Y., Ariyama H., Motomura H., Fujinami D., Noshiro D., Ando T., Kohda D. (2020, Nov)
Two-State Exchange Dynamics in Membrane-Embedded Oligosaccharyltransferase Observed in Real-Time by High-Speed AFM.
J Mol Biol. 432:5951-5965.
6. Oki K., Yamagami T., Nagata M., Mayanagi K., Shirai T., Adachi N., Numata T., Ishino S., Ishino Y. (2021)
DNA Polymerase D temporarily connects primase to the CMG-like helicase before interacting with proliferating cell nuclear antigen.
Nucleic Acids Res. *in press.*
7. Inoue N., Terabayashi T., Takiguchi-Kawashima Y., Fujinami D., Matsuoka S., Kawano M., Tanaka K., Tsumura H., Ishizaki T., Narahara H., Kohda D., Nishida Y., Hanada K. (2021)
Berberine and coptisine act against camptothecin-resistant topoisomerase I mutants.
Sci Rep. *in press.*

著書

1. 神田 大輔. (2020 年 6 月)
巻頭言「50%生物学」
生物物理 Vol.60 No.3, pp.145. 日本生物物理学会, 京都.
2. 神田 大輔. (2020 年 12 月)
16.3.4 タンパク質, 核酸の二次, 三次構造
化学便覧 基礎編 改訂 6 版, 丸善出版, 東京.

学会発表

1. 斯琴 巴拉, 田口 裕也, 韓 喜玲, 神田 大輔. (2020, 5/23)
蛋白質分子内部に存在する大振幅運動の空間分布を可視化する.
令和 2 年度日本生化学会九州支部例会, 福岡 (誌上開催).
2. 山崎 貴大, 神田 大輔. (2020, 5/23)
酵母オリゴ糖転移酵素の 2 つの触媒活性に関する相関解析.
令和 2 年度日本生化学会九州支部例会, 福岡 (誌上開催).
3. 林 成一郎, 藤浪 大輔, 神田 大輔. (2020, 5/23)
フォードブルなポリペプチド鎖の特性を熱力学・速度論の視点から NMR を用いてアミノ酸残基レベルで解析する.
令和 2 年度日本生化学会九州支部例会, 福岡 (誌上開催).
4. 林 成一郎, 藤浪 大輔, 神田 大輔. (2020, 7/28)
Residue-specific NMR analysis of a polypeptide chain revealed a new-type linear free energy relationship.
第 20 回日本蛋白質科学会年会, 札幌 (Zoom 開催).
5. Daisuke Kohda. (2021, 1/22)
Integrative structural biology approach to understand the molecular mechanism of Asn-glycosylation.
The 5th Symposium of the Inter-University Research Network for Trans-Omics Medicine, “The Future of Trans-Omics in the Age of COVID-19”, 東京 (Zoom 開催).