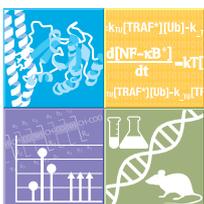


文部科学省・科学研究費補助金・新学術領域研究「修飾シグナル病」

第一回公開シンポジウム 「修飾シグナル病」学術領域の創出

抄録集・プログラム



2011年1月29日 土 13:30~17:20

東京大学医科学研究所 1号館1F講堂

領域代表者 井上純一郎

文部科学省・科学研究費補助金・新学術領域研究
翻訳後修飾によるシグナル伝達制御の分子基盤と疾患発症におけるその破綻

「修飾シグナル病」第一回公開シンポジウム

「修飾シグナル病」 学術領域の創出

2011年1月29日（土）東京大学医科学研究所 講堂

13:30-13:45 領域代表の挨拶

井上純一郎（東京大学）

13:45-15:15

座長：徳永 文稔（大阪大学）、山岡 昇司（東京医科歯科大学）

徳永 文稔	大阪大学大学院 医学系研究科 医化学 新規直鎖状ポリユビキチン鎖形成を介したNF- κ B シグナル制御	2
井上純一郎	東京大学医科学研究所・分子発癌分野 ユビキチン化によるNF- κ Bの活性制御と疾患	4
市川 一寿	東京大学医科学研究所腫瘍数理分野 タンパク複合体シミュレーションの基礎とTRAF6複合体におけるNF- κ B活性化	6

15:15-15:30 休憩

15:30-17:20

座長：武川 睦寛（名古屋大学）、高橋 雅英（名古屋大学）

黒田 真也	東京大学大学院理学系研究科生物化学専攻 【特別講演1】AktとERK経路のシステム生物学	8
青木 淳賢	東北大学薬学研究科分子細胞生化学 【特別講演2】生理活性リゾリン脂質と病態機能	10
石谷隆一郎	東京大学大学院 理学系研究科 生物化学専攻 ドミナントネガティブHLH型転写制御因子HHMの構造と機能	12

17:30- ポスター発表による研究交流会（医科研生協（白金ホール））

ポスター演題一覧	14
----------	----

新規直鎖状ポリユビキチン鎖形成を介したNF- κ Bシグナル制御

徳永 文稔

大阪大学大学院 医学系研究科 医化学

ユビキチン修飾系は、時空間特異的にユビキチンリガーゼが識別した標的タンパク質にユビキチンを付加する翻訳後修飾系で、タンパク質分解、エンドサイトーシス、DNA修復、シグナル伝達など多彩な生理機能制御に関与する。NF- κ B経路は、炎症、免疫制御、抗アポトーシスにおいて中心的な役割を果たすシグナル伝達経路で、リン酸化とともに多様なポリユビキチン化修飾が重要な制御機能を司ることが知られる。

我々はHOIL-1LとHOIPからなるユビキチンリガーゼ複合体が、ユビキチンのLys側鎖ではなく、N末端 α -NH₂基を介した全く新しい直鎖状ポリユビキチン鎖を形成することを見いだした。さらに、HOIL-1L/HOIP複合体は、TNF- α 刺激依存的にI κ Bキナーゼの制御サブユニットであるNEMOを直鎖状ポリユビキチン化することでNF- κ B活性化を導くことを示した。HOIL-1Lのノックアウトマウス由来細胞ではTNF- α 刺激に伴うNF- κ B活性化が減弱するなど、直鎖状ポリユビキチン化が生理的なNF- κ B制御に関わることを遺伝学的にも示してきた。

最近我々は、HOIL-1L欠損細胞においてもHOIPが完全には消失しないことからHOIPの新規結合タンパク質の検討を進め、HOIL-1Lと有意な相同性をもつSharpinが、HOIL-1L/HOIPとともに約600 kDaの三者複合体を形成することを同定した。Sharpin/HOIL-1L/HOIP複合体は、生理的な直鎖状ポリユビキチン鎖形成リガーゼ複合体（LUBAC）として機能し、炎症性サイトカイン刺激依存的にNEMOを直鎖状ポリユビキチン化することでNF- κ Bの活性化を導く。さらに、cpdmマウスと呼ばれるSharpinの自然変異マウスが報告されており、NEMOの機能不全型遺伝病であるEDA-IDに類似した慢性皮膚炎やパリエル板欠損など免疫系異常の症状を呈する。その発症機序は不明であったが、cpdmマウス由来細胞ではSharpinの欠損によりLUBACの他のコンポーネントであるHOIL-1LやHOIPの発現が低下することで、TNF- α やCD40刺激に伴う古典的NF- κ B経路活性化が特異的に減弱することを明らかにした。すなわち、直鎖状ポリユビキチン化はその異常が種々の疾患と関連するNF- κ B活性化に必須な翻訳後修飾であることが明らかとなった。

【関連文献】

1. Tokunaga, F. *et al.* **Nature Cell Biol.** 11, 123-132 (2009).
2. Iwai, K. and Tokunaga, F. **EMBO Rep.** 10, 706-713 (2009).
3. Kirisako, T. *et al.* **EMBO J.** 25, 4877-4887 (2006).

【略歴】

1990年九州大学大学院医学系研究科博士課程修了。姫路工業大学理学部助手、アルバート・アインシュタイン医科大学客員研究員、大阪市立大学大学院医学研究科助教授を経て2008年より現所属、准教授。

ユビキチン化によるNF- κ Bの活性制御と疾患

井上 純一郎

東京大学医科学研究所・分子発癌分野

転写因子NF- κ Bは、炎症免疫反応、骨代謝、発生等の重要かつ広範な生命現象において細胞の増殖、分化及びアポトーシスを厳密に制御することにより必要不可欠な役割を果たしている。しかもその制御異常が、免疫異常や癌等の極めて重篤な疾患の発症を誘導することから、NF- κ Bの活性制御機構を分子レベルで解明することは急務であると考えられる。

通常、NF- κ Bは抑制因子I κ Bと結合しており、そのため核移行シグナルが遮蔽され細胞質に繫留されている。即ち転写因子として不活化状態にある。サイトカインなどの細胞外刺激を受けると、I κ Bのリン酸化とそれを指標としたI κ BのLys48型ユビキチン鎖の付加が誘導され、プロテアソームによるI κ Bの分解が起こる。I κ Bから解放され活性化されたNF- κ Bは核移行し標的遺伝子を発現誘導する。そのリン酸化を触媒するのがI κ B kinase (IKK) 複合体であるが、その活性化には複合体のサブユニットであるNEMOの刺激依存的なLys63型あるいは直鎖型ユビキチン鎖の付加が必要であると考えられている。これらのユビキチン鎖は、NEMOの分解ではなく活性化したシグナル複合体形成の駆動力となるタンパク質間相互作用やタンパク質の構造変化を誘導すると考えられている。一方でNF- κ Bの活性化は、適正な強さに調整されており、かつ一過性である。ところが多くの癌細胞ではNF- κ Bが恒常的に活性化されており、そのことによる標的遺伝子の持続的な発現が、癌の悪性化の一因と考えられている。正常細胞では、この適切な活性化を成立させるために脱リン酸化酵素や脱ユビキチン化酵素による負の制御機構が存在しているが、その全貌は明らかでない。また、これらの負の制御機構の異常と疾患発症との関連が近年示唆されている。

そこで、我々は、新たなNF- κ Bの活性制御因子の同定を目指し、細胞からIKK複合体を精製後、質量分析計にてその構成因子を詳細に解析した。その結果、新たなNF- κ Bの負の制御因子と推定されるユビキチン鎖結合タンパク質p47を同定した。本シンポジウムでは、p47によるNF- κ Bの新たな制御機構について紹介したい。

【関連文献】

1. Yamazaki, K. et al. *Sci. Signal.* 2 ra66 (2009).
2. Akiyama T. et al. *Immunity* 29, 423-437 (2008).
3. Gohda, J. et al. *EMBO J.* 24, 790-799 (2005).
4. Akiyama, T. *Science* 308, 248-251 (2005).

【略歴】

1984年東京大学大学院薬学系研究科博士課程修了、癌研究会癌研究所研究員、米国ソーク研究所ポスドク、東京大学医科学研究所助教授、慶応義塾大学理工学部教授、2002年より現職、東京大学医科学研究所教授

タンパク複合体シミュレーションの基礎と TRAF6 複合体における NF- κ B 活性化

市川 一寿

東京大学医科学研究所腫瘍数理分野

タンパク質をはじめとする生体物質は、細胞内において複雑な制御ネットワークを形成している。コンピュータシミュレーションによる制御ネットワークの動態解析はこれまでも多くなされて来たが、これらの研究のほとんどは多数のタンパク質の存在を暗黙的に仮定しており、濃度という連続量が制御ネットワークを表す量として用いられてきた。しかし細胞局所では反応に関わるタンパク質が数分子しかない場合がある。さらに G-actin 分子のように多数存在する場合であっても、その反応の結果生成されるのが F-actin という濃度で扱うことが不適切な場合もある。このような場合はもはや濃度を変数とする微分方程式によるシミュレーションは不適切なものとなる。タンパク複合体でも少数のタンパク質が集合体を形成しており、ここでもやはり微分方程式を用いた従来手法は適さない。これに代わる新たな手法として Stochastic Simulation（以下 SS）が注目されている。SS では分子一個一個の座標や動き、および分子の状態を管理し、偶然的衝突によって確率的に反応を生じさせる。我々は分子数無限大の極限において従来型微分方程式シミュレーションに収束する新たな SS 手法を開発し¹⁾、これを用いて TRAF6、MEKK3、TAK1 の複合体形成と NF- κ B 活性化のシミュレーションを行った。

NF- κ B 活性化に至る途中で TRAF6 を中心とする複合体が形成されるが²⁻⁴⁾、その形成過程には不明な点も多い。例えば、複合体がどのような順番で形成されるのか、全てのサイトでのユビキチン化が必要なのか、またユビキチン鎖の長さはどのくらいか、などはいまだ不明である。これら全ての疑問に SS が答えられるわけではないが、複合体形成の順番を様々に変えることによって、形成複合体の数や安定性にどのような影響があるのかを調べ、可能な形成過程を絞り込むことができると考えられる。TRAF6 複合体の形成には IL-1 受容体の活性化から IRAK1 の活性化に至る経路が必要であるが、簡単化と問題の明確化のため、活性化された IRAK1 が初期状態で存在し、そこから複合体の形成が開始する状況を想定してシミュレーションを行った。その結果、過程の途中に安定性の高い状態が存在することにより、多くの、かつ安定的な TRAF6 複合体が形成されることを見出した。これは可能な NF- κ B 活性化経路の中で最も効率の良いものの一つであると考えられる。

【関連文献】

1. Ichikawa, K., et al., *Phys.Biol.*, **7**(2010), 046010.
2. Yamazaki, K., et al., *Sci.Signal.*, **2**(2009), ra66.
3. Chen, Z.J., *Nat.Cell Biol.*, **7**(2005), 758-765.
4. Wu, H., et al., *BioEssays*, **25**(2003), 1096-1105.

【略歴】

1974年 3月 早稲田大学理工学部卒業
1974年 4月 日本アイ・ビー・エム(株)入社 大和研究所課長
1991年 10月 富士ゼロックス(株)入社 脳情報科学研究室室長
2004年 9月 金沢工業大学教授
2009年 11月 大阪大学基礎工学研究科特任教授
2010年 11月 東京大学医科学研究所特任教授

【特別講演 1】 Akt と ERK 経路のシステム生物学

黒田 真也

東京大学大学院理学系研究科生物化学専攻

シグナル伝達経路は、細胞の増殖や分化などさまざまな生命現象を制御している。例えば、PC12 細胞を EGF または NGF で刺激すると、ERK はそれぞれ一過性または持続性に活性化して細胞を増殖または分化する。つまり、同じ分子であっても時間波形により異なる現象を制御できる。我々は、刺激の速度と強度をそれぞれ一過性と持続性の ERK 活性化が捉えていることを見出した¹⁾。つまり、前者が刺激パターンの微分回路、後者が積分回路と言える。現在は ERK 経路の下流を解析するためロボットを用いた自動化測定技術の開発に成功している²⁾。この技術を用いて ERK 経路がどのように時間波形を伝達しているかを解析している。その結果、ERK の下流である c-FOS, EGR1, c-JUN などの各 IEGs (immediate early genes) はそれぞれ異なる時間パターンをデコードできることが明らかとなった。このデコード特性により IEGs は上流の入力パターンから異なる出力パターンを生み出して、さまざまな生命現象を制御していると考えられる。

また、細胞の成長を制御する Akt 経路におけるシグナルの伝わり方を計測したところ、強い一過性のシグナルよりも弱い持続性のシグナルの方が下流に効率的に伝わる現象を発見した。この直感に反する現象は Akt 経路のローパスフィルタ（低周波通過フィルタ）特性によって生じていることが明らかになった。さらに、抗癌剤として用いられる EGFR 阻害剤のひとつである Lapatinib は EGFR のリン酸化は効率よく阻害するものの、Akt 経路の下流の S6 のリン酸化を逆に上昇させる場合があることをモデルから予測し、実験を行って確認した³⁾。

生命科学の分野では、分子や遺伝子が何かしらの機能を持つかの如く表現されている。しかし、分子それ自体は情報や機能そのものではなく単なる媒体で、分子の変動パターンが情報であるとみなすほうが生命現象の本質をはるかに明確に捉えることができる。

【関連文献】

1. Sasagawa, S. *et al*, Prediction and validation of the distinct dynamics of transient and sustained ERK activation. *Nat. Cell Biol.*, 7 (4), 365-373, 2005
2. Ozaki, Y. *et al*, A quantitative image cytometry technique for time series or population analyses of signaling networks. *PLoS ONE*, 5(4), e9955, 2010
3. Fujita, K.A. *et al*, Decoupling of receptor and downstream signals in Akt pathway by its low-pass filter characteristics. *Science Signaling*, 3 (123), ra56, 2010

【略歴】

1991年 神戸大学医学部卒業
1995年 大阪大学医学研究科大学院修了
1995年 奈良先端科学技術大学院大学、助手
1999年 ATR川人動態脳プロジェクト推進委員兼任
2002年 東京大学大学院情報理工学系研究科コンピューター科学専攻、
生物情報科学学部教育特別プログラム、特任助教授
2006年 東京大学大学院理学系研究科生物化学専攻、教授
現在に至る

【特別講演2】 生理活性リゾリン脂質と病態機能

青木 淳賢

東北大学薬学研究科分子細胞生化学

リゾリン脂質はアシル基を1本有するリン脂質の総称である。リゾリン脂質はグリセロ骨格とスフィンゴ骨格に大別され、それぞれに結合する極性基とアシル基の種類の組み合わせにより多数の分子種が存在する。リゾリン脂質の物理化学的特徴は、親水基であるリン酸基と疎水性のアシル基を有することにある。この特徴により、細胞膜を構成するジアシルリン脂質（アシル基を2本有するリン脂質）に比べ疎水性が低下しており、容易に細胞膜から遊離して作用する。従来から、組織障害等の炎症反応が起こる際、生体膜のリン脂質が加水分解されリゾリン脂質が産生されることは知られていた。実際、いくつかのリゾリン脂質は培養細胞レベルや個体レベルで様々な薬理作用を引き起こすことが知られてきたが、生体内で実際にこれらリゾリン脂質が産生されて生理機能を発揮しているかどうかはほとんどわかっていなかった。脂質はペプチド性のシグナル分子とは異なりゲノムに直接コードされておらず、その機能解析が困難な研究対象である。しかし、この10年の間に産生酵素や受容体の候補が多数同定され、また、質量分析機による好感度脂質分析、遺伝子ノックアウト（KO）マウスやヒトの疾患患者などに関する知見が飛躍的に蓄積されたことで、リゾリン脂質が生体内で数々の生理的・病理的役割を担うことが明らかになってきた。

本発表では始めにリゾリン脂質の構造について説明し、次に受容体と産生酵素に関する知見を述べ、リゾリン脂質の中でも特に解析が進んでいるリゾホスファチジン酸（LPA）、リゾホスファチジルセリン（LPS）の最新の生理・病態機能に関する知見を紹介する。

【関連文献】

1. 第二世代の生理活性脂質としてのリゾリン脂質 井上飛鳥、青木淳賢 実験医学 2009年7月号
2. Autotaxin, an LPA producing enzyme with diverse functions., Nakanaga K, Hama K, Aoki J., J Biochem. 148:13-24 (2010)
3. Biological roles of lysophosphatidic acid signaling through its production by autotaxin., Okudaira S, Yukiura H, Aoki J., Biochimie. 92:698-706 (2010)
4. LPA3, a unique G protein-coupled receptor for lysophosphatidic acid., Hama K, Aoki J., Prog Lipid Res. 49:335-342 (2010)
5. Emerging lysophospholipid mediators, lysophosphatidylserine, lysophosphatidylthreonine, lysophosphatidylethanolamine and lysophosphatidylglycerol., Makide K, Kitamura H, Sato Y, Okutani M, Aoki J., Prostaglandins Other Lipid Mediat. 89:135-139 (2009)

ドミナントネガティブHLH型転写制御因子HHMの構造と機能

石谷 隆一郎

東京大学大学院 理学系研究科 生物化学専攻

HHM (Human homologue of murine maternal Id-like molecule)/GCIP(Grap2 cyclin D interacting protein)は361残基からなる、細胞増殖の制御にかかわる核内タンパク質である¹⁾。特に、HHMはCyclin D1と結合することから、Cyclin D1-Cdk4複合体の形成を阻害し、Rb経路を活性化して細胞周期のG1停止を引き起こす可能性が示唆されている。一方、HHMの一次構造はHelix-loop-helix (HLH)モチーフとLeuジッパーモチーフを有しているが、DNA結合に関わる塩基性領域を持たないため、Idタンパク質等に代表されるドミナントネガティブHLH (dnHLH)ファミリーに属すると考えられている。そしてさらに、HHMはOlig1等の組織特異的なクラスB-HLH転写因子と結合してOlig1-Smad-DNA複合体の形成を阻害し、TGF- β シグナルを抑制することが、近年の研究により明らかになった²⁾。

本研究では、HHMの結晶構造解析を行い³⁾、構造に基づいた機能解析を行うことで、HHMによる細胞増殖の制御機構を解明することを目指した。まず、HHM単独の結晶構造解析からは、HHMは2つのヘリックスバンドルがV字型に配向した新規の構造を取ることが明らかになった。HLHモチーフを持つ領域は、このV字構造の内側に埋め込まれるように存在しており、従来解明されているDNA結合複合体のHLHモチーフとは全く異なった構造を取っていた。以上より、HHMは、大きな構造変化を起こし、このHLH領域が露出することで、Olig1等のHLH転写因子と結合すると推測された。さらに、このHLH領域と2つのヘリックスバンドルの相互作用を破壊するような変異体を作成し、機能解析を行った。その結果、変異体HHMはターゲットに対する特異性が低下し、Olig1以外の本来結合しないような転写因子にまで結合するようになり、*in vivo*でも細胞分化に影響することが明らかになった。以上から、今回明らかになったHHM単独の構造はHHMと転写因子の非特異的な会合を防ぐ自己阻害状態であり、本来のターゲット転写因子が存在するときのみHLH領域が露出して、そのDNA転写活性を阻害するというモデルを提唱した。

【関連文献】

1. S. Terai, H. Aoki, K. Ashida and S. Thorgeirsson. Human homologue of Maid: a dominant inhibitory helix-loop-helix protein associated with liver-specific gene expression. *Hepatology* 32, 357-366 (2000).
2. H. Ikushima et al. An Id-like molecule, HHM, is a synexpression group-restricted regulator of TGF- β signaling. *EMBO J.* 27, 2955-2965 (2008).
3. A. Seto, H. Ikushima, T. Suzuki, Y. Sato, S. Fukai, K. Yuki, K. Miyazawa, K. Miyazono, R. Ishitani and O. Nureki. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of GCIP/HHM transcriptional regulator. *Acta Crystallogr F.* 65, 21-24 (2008).

【略歴】

2003年、東京大学 大学院理学系研究科 生物化学専攻 博士課程修了、東京工業大学 生命理工学研究科 助教、東京大学 医科学研究所 准教授を経て、2010年より東京大学大学院 理学系研究科 准教授

- 1 柴田 佑里 新規 NF- κ B 活性化抑制因子の同定と解析
- 2 田口 祐 A unique cytoplasmic domain in RANK induces long-term signaling required for osteoclastogenesis
- 3 尾山 大明 次世代型質量分析システムを用いた翻訳後修飾解析の新潮流
- 4 市川 研史、斎藤 春雄、武川 睦寛
ERK-MAP キナーゼの新規基質分子 MSP1 の同定と機能解析
- 5 久保田裕二、O'Grady Pauline、斎藤 春雄、武川 睦寛
Negative regulation of the ERK MAPK cascade and cell transformation by protein SUMOylation
- 6 富田太一郎、斎藤 春雄
MAPK リン酸化シグナルの可視化解析
- 7 西増 弘志 自然免疫応答に関連するアミノアシル tRNA 合成酵素の結晶構造
- 8 光山 倫央 悪性腫瘍の浸潤転移に関与するオートタキシンの分子動力学シミュレーション
- 9 加藤 一希 糖尿病及び靭帯骨化症に関与するヌクレオチド加水分解酵素、NPP1 の構造解析
- 10 小原 圭 アクチン結合タンパク質 Girdin と細胞極性制御分子 PAR-3 の相互作用
- 11 Liang Weng Actin binding protein Girdin regulates endocytosis through dynamin
- 12 齊藤 愛記 ユビキチン化修飾酵素 A20 は NF- κ B inducing kinase による NF- κ B 活性化を増強する
- 13 宇野 雅哉 卵巣癌細胞における NF- κ B inducing kinase の過剰発現と腫瘍形質への寄与
- 14 大迫 美穂 マクロファージ分化モデルにおける持続的 NF- κ B 活性化解析
- 15 Mariko Akita, Fuminori Tokunaga, and Kazuhiro Iwai
Role of ZF domains of HOIL-1L/HOIP in NF- κ B activation.
- 16 Tomoko Nakagawa, Masaki Nakahara, Shin-ichi Sakata, Fuminori Tokunaga, and Kazuhiro Iwai
Roles of linear polyubiquitination in non-canonical NF- κ B activation pathway.

