



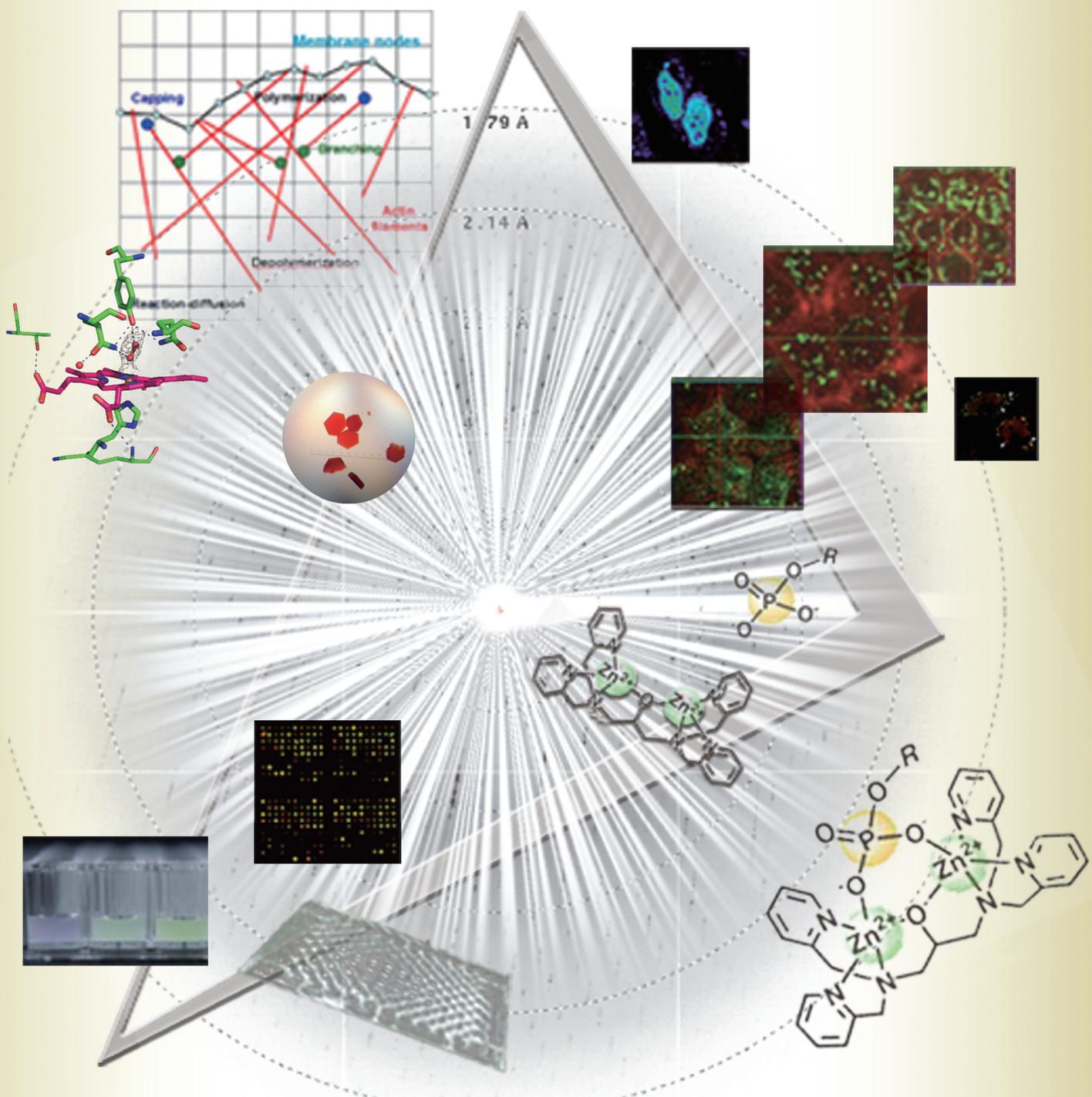
文部科学省・科学研究費補助金・新学術領域研究

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 Newsletter vol. 2

領域代表者

井上純一郎



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

(略称：修飾シグナル病)

「修飾シグナル病」からの Newsletter 第 2 号です！

2010 年度からスタートした文科省科研費・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」(略称：修飾シグナル病)も今年度から公募研究 30 班の先生方にも参加していただき賑やかになりました。そこで、Newsletter 第 2 弾では、領域の新しい拡がりのお披露目という観点から“研究紹介”と題して 14 名の公募班員の先生に、既に領域 HP に掲載されている研究内容では紹介し切れなかった研究室のトピックス、自慢話、人物紹介、ユニークな話題等を自由な形式でご紹介して頂きました。また、“最先端技術紹介”ではオリジナリティーの高い解析技術をお持ちの先生方 3 名に現在までの成果を踏まえてその内容を分かりやすくご紹介頂きました。前号の Newsletter は、総括班員による研究紹介という形に留まっていたましたが、今回は編集担当の尾山大明先生に企画を工夫していただいたお陰で、読み易くしかも興味深いものにまとまったと自負しております。どうかお楽しみください。さらに巻末には、当領域の一般国民に向けたアウトリーチ活動として名古屋大学環境医学研究所主催、当領域共催で開催された市民公開講座「癌の新たな治療戦略」と北海道大学「未来の科学者養成講座事業」と当領域が高校生や一般向けに開催した勉強会「ドリームチームが挑む“がん研究”最前線」の様子を武川研の久保田裕二先生と公募班員の有賀早苗先生にそれぞれ紹介して頂きました。最後にご多忙にも関わらずご執筆いただいた先生方、勉強会の企画にご尽力いただいた有賀先生に深く感謝いたします。

修飾シグナル病 領域代表 井上純一郎

2012 年 1 月 4 日

研究紹介

研究室のトピックス、自慢話、人物紹介、ユニークな話題などをご紹介します



Keap1 — Nrf2 システムと Akt シグナルの相互作用と肝疾患

田口 恵子 p3
東北大学大学院医学系研究科医化学分野



慢性炎症病態を制御するシグナル依存性 エピゲノム制御メカニズムの解析

沢津橋 俊 p3
群馬大学生体調節研究所核内情報制御分野



TRIM ファミリーによる基質蛋白修飾を介した癌と感染症での発症制御システムの解明

浦野 友彦 p4
東京大学 22 世紀医療センター抗加齢医学講座



蛋白質分解制御による新たなシグナル伝達機構の解明

大竹 史明 p4
東京大学分子細胞生物学研究所



プライミングリン酸化反応の制御機構とその破綻による病態解明

吉田 清嗣 p5
東京医科歯科大学難治疾患研究所



炎症シグナルによる ErbB チロシンキナーゼの Ser/Thr リン酸化とがん悪性化

櫻井 宏明 p5
富山大学大学院医学薬学研究部 (薬学) がん細胞生物学研究室



要布教活動、ポリグルタミン酸化修飾

～ポリグルタミン?納豆のネバネバ?いえ“ポリグルタミン酸化”です～
池上 浩司 p6
浜松医科大学解剖学講座 (細胞生物学分野)



避けた結果

奥村 文彦 p6
名古屋大学大学院理学研究科



体温の人為的調節とその疾患治療への応用を目指して

西 英一郎 p7
京都大学大学院医学研究科循環器内科



魚屋さん

石谷 太 p7
九州大学生体防御医学研究所細胞統御システム分野



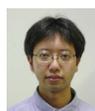
核 (染色体) と中心体サイクルの同期

後藤 英仁 p8
愛知県がんセンター研究所



OGFOD1 による翻訳開始因子キナーゼの水酸化

五十嵐 城太郎 p8
福島県立医科大学医学部自然科学講座 (生物学)



CYLD による K63 結合型および直鎖型ポリユビキチン鎖選択的切断の構造的基盤

佐藤 裕介 p9
東京大学放射光連携研究機構生命科学部門 構造生物学研究室



研究の経緯と抱負について

行縄 直人 p9
京都大学大学院情報学研究科システム科学専攻

最先端技術紹介

オリジナリティーが非常に高い各先生方の解析技術をこれまでの成果を踏まえて分かりやすくご紹介します



病態モデル細胞を用いたシグナル伝達破綻メカニズムの解明

加納 ふみ p10
東京大学大学院総合文化研究科



Phos-tag 技術を用いたリン酸化タンパク質解析法

木下 英司 p11
広島大学大学院医歯薬学総合研究科 医薬分子機能科学研究室



無細胞蛋白質アレイを用いた E3 リガーゼ探索技術

澤崎 達也 p12
愛媛大学無細胞生命科学工学研究センター

アウトリーチ活動

名古屋大学環境医学研究所 市民公開講座 2011 「癌の新たな治療戦略」

久保田 裕二 p14
名古屋大学環境医学研究所分子シグナル制御分野

サイエンス・カフェ札幌 special 「ドリーム・チームが挑む“がん研究”最前線」

有賀 早苗 p16
北海道大学大学院農学研究院環境分子生物科学研究室

2011 年アウトリーチ活動一覧 p17

研究紹介

研究室のトピックス、自慢話、人物紹介、ユニークな話題などをご紹介します



Keap1 – Nrf2 システムと Akt シグナルの相互作用と肝疾患 田口 恵子

東北大学大学院医学系研究科医化学分野

私たちの研究室は、遺伝子の発現を制御する転写因子である GATA ファミリーと CNC ファミリーに着目して、個体発生、細胞分化、生体恒常性維持などに関連する様々な生命現象を解明することを大きな目標にしています。山本雅之教授を筆頭に、総勢 50 人のビッグラボです。筑波大学より東北大学へ研究室丸ごと移籍して早 5 年。すっかり仙台の地に根付いて、楽天イーグルス（野球）とベガルタ仙台（サッカー）観戦は毎年恒例の研究室行事となっています。本年 3 月には未曾有の大震災に見舞われ、直後は研究ができる生活環境ではありませんでした。医師である大学院生は方々の臨床現場へ駆け出され、研究室に残った者は、

細胞タンクの液体窒素補充や、マウスの飼育環境維持に努めるのが精一杯でした。しかし、その甲斐あって最小限の犠牲におさめ、早期に研究に復帰することができました。大雨が降ると雨漏りする

建物以外は以前と変わらない環境で、研究できる楽しさを感じつつ、50 人が右へ左へ、研究室内の交通網は日々混線していますが、新しい発見を求めて邁進しています。



慢性炎症病態を制御するシグナル依存性エピゲノム制御メカニズムの解析 沢津橋 俊

群馬大学生体調節研究所核内情報制御分野

グルココルチコイドレセプター (GR) は、「糖代謝恒常性」と「炎症」を制御する核内受容体の一つである。そのリガンドであるグルココルチコイドは血糖値維持に働くホルモンであると同時に、強力な抗炎症薬としての薬理作用を有している。このようなエネルギー代謝と炎症の両者を司る細胞内シグナルは、様々なシグナル経路でクロストークする可能性が考えられ、核内におけるクロストークはエピゲノム制御を介することが予想さ

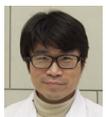
れるが、その分子メカニズムは未だ不明である。現在、生化学的手法によるタンパク質精製から LC-MS/MS 解析を用いて、この核内シグナルクロストークに関与する GR の翻訳後修飾パターンの同定とエピゲノム制御因子複合体の探索を試みている。

我々の研究室は 2010 年に新設された分野である。これ以前には東京大学分子生物学研究所・加藤茂明教授の下、ショウジョウバエを利用した分子遺伝学的ス

クリーニングから新規ヒストンシャペロンを同定し、さらに生化学的に複合体を精製することによって、リン酸化依存的な活性制御機構を見つけることができた。この経験を生かし、本研究課題ではタンパク質精製からメカニズムの鍵となる因子をみつけ、さらにマウスを利用した in vivo 解析へ研究を展開させていきたい。



研究紹介



TRIMファミリーによる基質蛋白修飾を介した癌と感染症での発症制御システムの解明 浦野 友彦

東京大学 22 世紀医療センター抗加齢医学講座

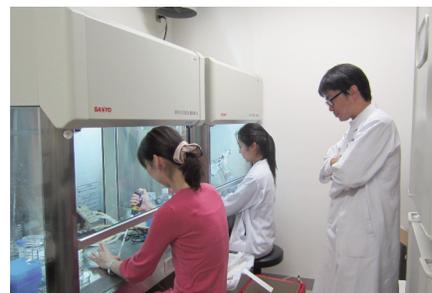
当研究室は 2006 年に医学部で最初に開設された抗加齢(= アンチエイジング)医学講座であります。当講座は東大病院老年病科を親講座とする寄附講座であり、私も内科医師として東大病院老年病科で外来診療を行っております。

当講座では加齢に伴い減少する性ホルモンであるエストロゲンならびにアンドロゲンの作用機構に重点をおき研究を行っています。特に核内受容体であるエストロゲン受容体ならびにアンドロゲン受容体が発現を直接制御するホルモン標的遺伝子の同定とその機能解析を行っております。本領域での私の研究課題である TRIM ファミリーの研究も最初はエストロゲン応答遺伝子である Efp(TRIM25)の機能解析を行っている中から着想し、

発展した研究であります。現在、当講座では、老化、老年病、癌(乳癌、前立腺癌、子宮癌)との関連で、核内受容体応答遺伝子の系統的機能解析を行っております。

また加齢に伴い多く発症することで知られる疾患、特に老年病の中では、骨関節疾患(ロコモティブシンドローム)をモデルとして、その発症ならびに予防における分子機構に関する研究も行っております。さらにヒトゲノム解析の成果に基づく遺伝解析にも力を入れており、骨粗鬆症発症や変形性関節症に関与する遺伝的素因に関して研究を行い、骨関節疾患の病態診断、予後の推定、予防と治療法の選択に応用することを目指しております。以上のような研究から臨床と基礎

の基盤のもとに抗加齢医学という新しい分野の学問を確立するために努力しております。抗加齢医学が対象とする疾患は多岐にわたることから、現在我々の研究室では老年病科のみならず、産婦人科、泌尿器科といった他科の大学院生への指導も行い、日夜、抗加齢医学の新しい知見を解明すべく精進しております。



蛋白質分解制御による新たなシグナル伝達機構の解明 大竹 史明

東京大学分子細胞生物学研究所

生物の環境応答、中でも環境化学物質に対する応答機構は、まだまだ未解明の部分の多い領域です。環境中に存在する、人的活動由来あるいは自然発生した有害化合物は、生物に様々な毒性作用を発揮します。そのため生物は、環境物質に応答する機構を進化させてきました。その代表例の一つが「ダイオキシン受容体(AhR)」で、AhRは有害化合物に応答して、身体の防衛の司令塔となる転写因子です。私はその巧みな環境応答機構と、生理的な合目的性、そしてダイオキシン類のような生命が想定しなかった物質に対する「異常な応答」としての毒性、に興味を持ち研究を進めています。その中で、ユビキチン修飾系の重要性が明らかとなってきました。すなわち、AhRの作用の一端はユビキチン系を介していることが明らかとなりました。ユビキチン

修飾系の研究は、より幅広い意味での、環境応答機構解明につながるのではないかと期待しています。

研究室は、毎週のソフトボール練習、

年3回のソフトボール大会、頻繁に開かれる飲み会があり、ラボメンバーは、いろんな意味でアクティブな研究生活をしています。



(写真は試合後のBチーム集合写真)



プライミングリン酸化反応の制御機構とその破綻による病態解明

吉田 清嗣

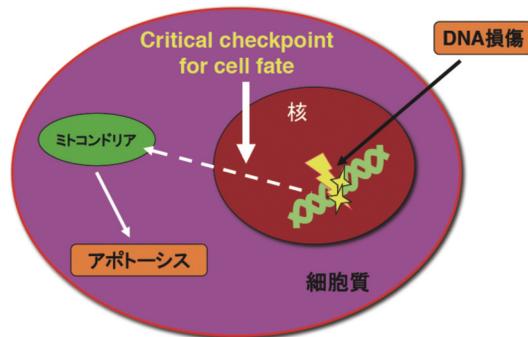
東京医科歯科大学難治疾患研究所



生命は地球上に誕生してから 36 億年以上の間、放射線、化学物質、酸素など多種多様な外来環境要因すなわち“ストレス”に曝されながら、細胞を単位とする自律的環境を守ってきました。この自律的環境を作り維持する営み、すなわちストレス応答反応そのものが“生きている”ことであり、生命の基本的な活動と考えられます。癌をはじめとする多くの疾患で、この機構の破綻が端緒となり発症することが知られていることから、このような生命基盤の動作原理とその破綻による病態解明を大きなテーマとして研究を展開しています。具体的には様々なストレスが細胞にどのような影響を与えるかを明らかにすることを目的として、主にその細胞死（アポトーシス）誘導における細胞内情報伝達機構の解明に焦点

をあて、特に DNA 損傷に応答するリン酸化酵素の機能解析を中心とした研究を進めてきました。アポトーシスの理解においては、細胞の中でめまぐるしくやり取りされている情報が、どのような仕組みで整理整頓されて伝えられているのかを掴むことが鍵だと考えています。近年、

リン酸化応答を軸とした細胞核から発信される様々な情報が細胞の運命を決めているらしいことがわかってきました。今後はその仕組みを明らかにしていきたいと考えています。またこの情報伝達異常が導く病態への理解を深めることで新たな治療法の開発を目指しています。



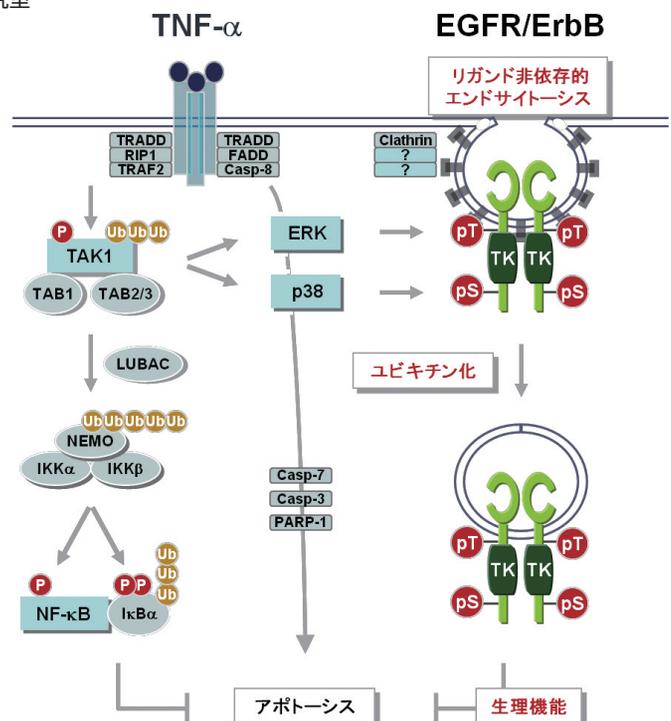
炎症シグナルによる ErbB チロシンキナーゼの Ser/Thr リン酸化とがん悪性化

櫻井 宏明

富山大学大学院医学薬学研究所 (薬学) がん細胞生物学研究室



1995 年、TAK1 は TGF- β -activated kinase 1 として同定されたが、その頃、著者は製薬企業の研究所で糸球体腎炎の病態形成における NF- κ B の役割を解析していた。糸球体硬化が病態形成に重要であることや TGF- β が免疫抑制に働くという報告から、「TAK1 は NF- κ B 活性化を抑制するに違いない」と考え、HeLa 細胞に NF- κ B-inducing kinase (NIK) とともに発現させた。ところが、期待とは全く逆に、TAK1 を活性化させるだけで NF- κ B が強く活性化したのである。まだ I κ B kinase (IKK) がクローニングされる前のことである。こうして発見した現象が、炎症性サイトカイン、抗原受容体、Toll 様受容体、さらには核内の DNA 切断からのシグナルにも関与していることが次々と報告されてきた。その後、著者は TNF- α -activated kinase としての TAK1 の機能解析を進めており、本領域においては EGFR/ErbB 受容体チロシンキナーゼへ流れる新しい翻訳後修飾シグナルの解明に向けて取り組み、がん悪性化との関連性について探ってみたいと考えている。



TAK1 は NF- κ B と EGFR の二つの抗アポトーシスシグナルを制御する

研究紹介



要布教活動、ポリグルタミン酸化修飾

～ ポリグルタミン？納豆のネバネバ？いえ“ポリグルタミン酸化”です～

池上 浩司

浜松医科大学解剖学講座（細胞生物学分野）

本年度より『修飾シグナル病』に参加させていただいている浜松医科大学の池上浩司です。タンパク質翻訳後修飾をテーマに研究を行って来て、こんなにドンピシャな領域に出会えるとは夢にも思いませんでした。領域を立ち上げて下さった井上代表に感謝せずにはおられません。

さて、私たちの研究チームは少し変わった修飾“ポリグルタミン酸化”を題材に研究を展開しています。学会などで発表すると「神経変性疾患のポリグルタミン病と関係があるのですか」とか「納豆のネバネバとは関係があるのですか」などと良く聞かれます。そういう時は申し訳なく「すみません、全く関係ありません・・・」と答えるとともに、自分の宣伝がまだまだ足りないことを反省します。本領域のサポートを受けて、学界や一般市民へのアピールを通してポリグル

タミン酸化修飾、ひいては最近提唱しようと思っている“ポリグルタミン酸病”を世間に広められれば幸いです。

最後にチームの話少々。メインで実験をしているのはベトナムから学位を取りにやって来たハンさんです。また、看護学科の卒研生2名も3ヶ月と

短い間ではありますが、研究に参加してくれています。上司の瀬藤教授が非常に理解ある方で、研究チームを認めてくれたおかげで研究を自由に進めることができます。恵まれた環境と領域のサポートの元、これからも研究を益々発展させていきたいと考えています。



チーム「ポリグルタミン酸化（ポリE）」



避けた結果

奥村 文彦

名古屋大学大学院理学研究科

高校時代は基本的に化学しか興味がなかったのですが、就職なども考えて薬学部に進みました。無事、薬剤師にはなれたものの、病院実習で感じた違和感と実験の面白さから、とりあえずそのまま修士に進学し、就職を先延ばしにしようと考えました。ある教授から国立大学とか受けへんのか？と聞かれ、それならばと指導教授の勧めで九大を受け進学することになりました。あろうことが研究テーマも調べず、指導教授の勧めで研究室を選びました。無事に修士課程を修了したものの、やはりバイトでしていた調剤薬局の仕事内容に違和感を覚え、現実逃避をするかのように博士課程に進もうと思いました。先輩の勧めで、九大の生体防御医学研究所に行ってみるかということになり、やはり研究テーマも調べずホームページの雰囲気だけで、研究室を決め進学



することになりました。当然のごとく予想以上にしんどかったですが無事博士課程も修了し、さあどうするかと考えた結果ここまできたら行っとくか、ということでアメリカに留学しユビキチン様分子ISG15に出会いました。やはり英語の壁は分厚かったです、ボスが中国人で言

語の苦勞をわかってもらえているのか、一生懸命理解してくれ助かりました。結局、薬剤師として働くことを避けてきて今に至っております。



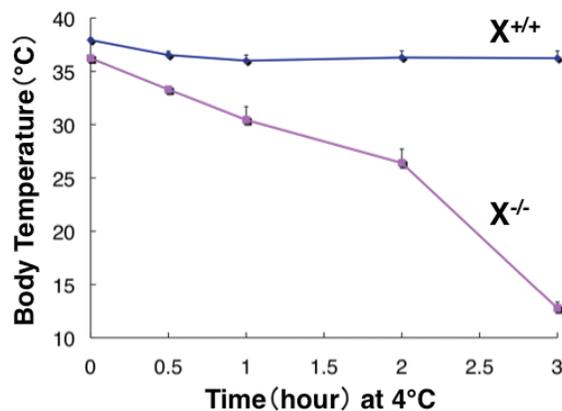
体温の人為的調節とその疾患治療への応用を目指して 西 英一郎

京都大学大学院医学研究科循環器内科

哺乳動物の体温（核心温）は、外気温によらずほぼ一定に保たれる。体温恒常性は美しくデザインされた調節系の代表といえるだろう。寒冷暴露下での体温維持は、ふるえ（筋収縮）による熱産生と、主に褐色脂肪組織における非ふるえ熱産生に依存する。一方、高温環境下の熱放散は皮膚血管反応と発汗が司る。しかしながら、体温恒常性の許容範囲を超える環境に置かれ、低体温症あるいは熱中症を発症した場合、ヒトは途端に命の危険にさらされる。一方、救急医療の場においては、致死的な脳障害あるいは心筋障害を来した患者に対して、体温を下げ、代謝（酸素需要）を抑制することが患者の生命予後改善につながる事が明らかになっている。しかしながら低体温療法を行うためには、体温恒常性を破綻させるために、筋弛緩薬投与、全身麻酔下の人工呼吸器およびクーラージャケットの装着など極めて非生理的な方法を必要と

する。もし比較的簡便に体温を下げることができ、その結果エネルギー消費量を抑制することができれば、虚血性疾患、悪性腫瘍などの全く新しい補助療法になる可能性はないだろうか。我々が作製した遺伝子改変マウスは、思いがけず常温

にて低体温を呈し、低温（4℃）に3時間おくことで、その体温は10℃台まで低下した（図）。将来「体温の人為的調節と、その疾患治療への応用」を可能にすべく、この表現型の分子機構解明に努めたい。



魚屋さん 石谷 太

九州大学生体防御医学研究所細胞統御システム分野

もしかしたらお気づきの方もいらっしゃるかもしれませんが、私は大学でも学会会場でも、許される限り「ヨコジマ」のシャツを着ています。これは私がヨコジマが好きだからでも、派手好きだからでもありません。実はこれは、一種の研究プレゼンなのです。私は運良く早期にPIになることができ、それは非常に喜ばしいことなのですが、反面、ポストドクからいきなりPIになってしまったために、分野が極めて近い先生方を除き、他研究機関の先生方とほとんど面識がありませんでした。やはり研究者として生きていくためには、多くの先生方に自分と自分の研究を認識して頂き、厳しいご意見を頂くことは非常に重要ですので、

どうやったら効率良くそういう状況にもっていけるのか、相当悩みました。私はあいにく魅力的とは言い難い風体ですし、強烈にキャッチーな研究をやっている訳でもありません。ではどうすれば??幸いにして私は、自分の主戦場であるシグナル伝達研究の分野ではレアな「魚（ゼブラフィッシュ）屋」でしたので、先生方に「魚やってるヤツ」で覚えて頂こうと考えました。その結果が、ゼブラ柄（ヨコジマ）のシャツなのです。我ながらナイスアイデアと思っていましたが、最近会ったドイツ人のゼブラフィッシュ研究者も連日ヨコジマの服を着ていました。皆考えることは一緒か。。。



実験中の石谷とゼブラフィッシュ。

研究紹介

核（染色体）と中心体サイクルの同期

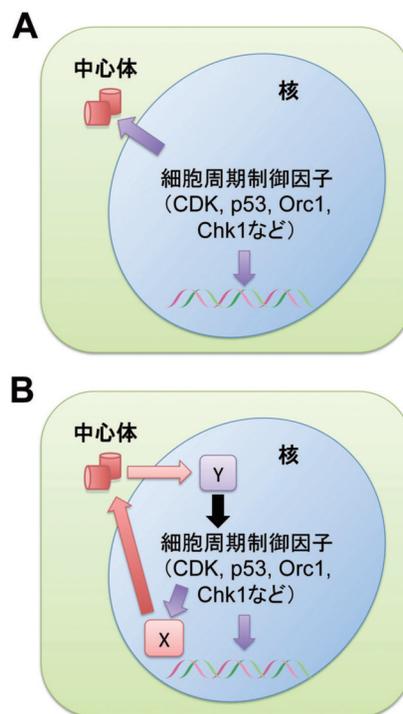


後藤 英仁

愛知県がんセンター研究所

私は、細胞周期に関わるリン酸化修飾の研究をずっと行ってきていますが、DNA（染色体）と中心体の複製サイクルがなぜ一致するのかという疑問がずっと心の中にあります。10 数年以上前から、核のサイクルを制御する分子群が中心体にも移行（または、存在）し、直接的に中心体サイクルを制御しているという考えが支配的であると思われます（図 A）。しかし、最近、このパラダイムだけでこの 2 つのサイクルが完全に同期することをすべて説明できないのではないかと考えています。それは、Chk1 が直接的に中心体サイクルも制御するというモデルを検証したところ、この論理の裏

付けとなっている Chk1 抗体が実は中心体で異なる分子を認識していること、強制的に Chk1 を中心体に移行させても細胞周期進行に大きく影響を与えないことなどが明らかになったからです。少なくとも、Chk1 が核内で発するシグナルは何らかの分子の介在を考えないと中心体には伝わらないのではないかと考えています（図 B）。しかし、図 B の X や Y といった分子群を証明できないと図 B のようなモデルはなかなか受け入れられないのかもしれませんが。今後の私の研究課題として、図 B の X や Y といった分子群の存在を証明していきたいと考えています。



OGFOD1 による翻訳開始因子キナーゼの水酸化

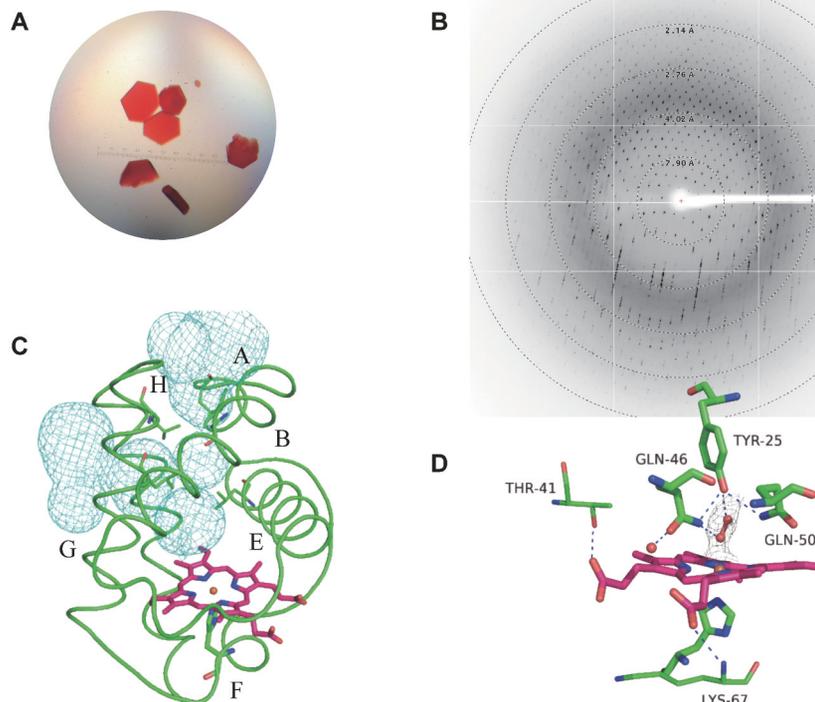
五十嵐 城太郎

福島県立医科大学医学部自然科学講座（生物学）

X 線結晶構造解析によるタンパク質の立体構造解析を志したのは、大学院生の頃。当時は、東北大学大学院理学研究科生物学専攻に所属し、原生生物 *Tetrahymena pyriformis* に見られる短縮型ヘモグロビンの機能解析を行っていました。ポスドクとして、カリフォルニア大学アーバイン校 Poulos Lab で初めて、一酸化窒素合成酵素（NOS）と阻害剤との複合体の構造解析を行いました（1）。帰国後、東北大学多元物質科学研究所において、短縮型ヘモグロビンの構造解析を行いました（図 1A, B）。全体構造（図 1C）より、短縮型ヘモグロビンには、タンパク質内部に大きな空洞があることがわかりました。また、結合した酸素分子は Tyr と Gln からの水素結合によって安定化されていました。（図 1D）。以上から、短縮型ヘモグロビンの機能は酸素運搬とは異なる機能を果たしている可能性が示唆されました（2）。

新学術領域研究においては、OGFOD1 と呼ばれる非ヘム鉄酵素による翻訳後修飾（水酸化）の解析を行っております。継続して研究を行ってきた、一酸化窒素とヘムタンパク質との相互作用とは異なる領域、新天地（福島医大）にて、研究を進めて参ります。ご指導ご助言よろしくお願い致します。

研究室 HP-URL: http://www.fmu.ac.jp/cms/biol2000/index_html



参考文献：

1. Igarashi, J., Li, H., Jamal, J., Ji, H., Fang, J., Lawton, G., Silverman, R. B. and Poulos, T. L. "Crystal structures of constitutive nitric oxide synthases in complex with de novo designed inhibitors" *J. Med. Chem.* 52, 2060-2066 (2009)
2. Igarashi, J., Kobayashi, K. and Matsuoka, A. "A hydrogen-bonding network formed by the B10-E7-E11 residues of a truncated hemoglobin from *Tetrahymena pyriformis* is critical for stability of bound oxygen and nitric oxide detoxification." *J. Biol. Inorg. Chem.* 16, 599-609 (2011)



CYLD による K63 結合型および直鎖型ポリユビキチン鎖選択的切断の構造的基盤 佐藤 裕介

東京大学放射光連携研究機構生命科学部門構造生物学研究室

こんにちは、放射光連携研究機構の佐藤です。その名前からは何をやっている研究室か全く分からないと思いますが、主に X 線結晶解析法によるタンパク質の立体構造解析と、それを基にした生化学的な研究を行っています。今回は、あまり皆様に馴染みがないかもしれないシンクロトロン放射光施設でのデータ測定について簡単に触らせていただきます。

データ測定に使っているシンクロトロン放射光施設はつくばの Photon Factory と播磨の SPring-8 の 2 つあり、ここで手塩にかけて育てたタンパク質の

結晶に X 線をあてるという作業を徹夜で行います（写真は SPring-8 入り口）。なぜ徹夜なのかと思われるでしょうが、その理由として、シンクロトロン放射光施設は日本だけでなく世界中から利用希望が集まるため、一研究室に割り当てられるシフトは一ヶ月に一度あるかないかという点があげられます。したがって貴重な時間を無駄にしないために、眠い目をこすりながら、夜食用に買ったおやつを楽しみに実験を繰り返すのです。なかなか望みの結果が得られない時は疲労と眠気のあまり意識を失いそうになりますが、深夜に素晴らしい結果が得られた時

は徹夜のハイテンションと相まって、形容しがたい満足感を得ることができます。



研究の経緯と抱負について 行縄 直人

京都大学大学院情報学研究所システム科学専攻

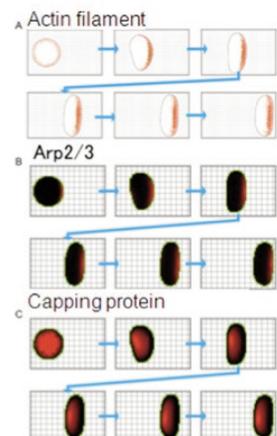
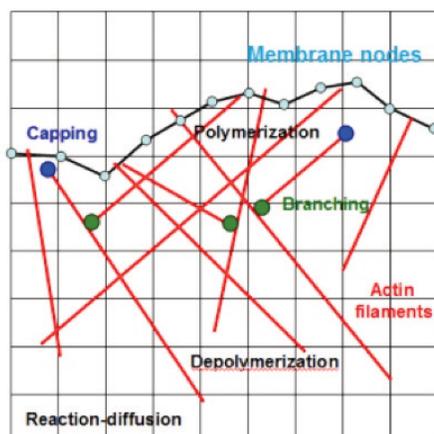
京都大学の行縄と申します。本新学術領域研究に公募課題をご採択いただきましたこと、遅ればせながら感謝申し上げます。本拙文では、現在の研究テーマに至った経緯を自己紹介も兼ね、駆け足ではありますが紹介させていただきます。

我々の本課題での取り組みを一言で述べると、癌や神経変性疾患などにつながる細胞の多様かつ動的な形態変化の要因について、細胞骨格分子の一つであるアクチンと、関連するシグナル伝達系の細胞内素過程を主な対象とし、統計的解析と計算機シミュレーションにより定量的に捉えるための道具作りと言えます。私は大学院生時代より、遺伝子発現プロファイルを中心とした定量データのための統計的解析研究に従事しており、詳細な分子動態と病態などの細胞の巨視的な状態とを結びつけるための手法を開発してきました。一方、2009 年度からは理化学研究所を中心拠点とした「次世代生命体統合シミュレーションソフトウェアの

研究開発」に従事し、次世代スーパーコンピュータ「京」での利用を想定した、神経細胞における形態変化のマルチフィジックスな生命現象を統合するシミュレーションを行うソフトウェアの開発を進めてきました（図）。本課題では、定量的生物学研究における以上の二つの異なる

アプローチを統合・拡張した手法の開発を目指しています。

この研究を通じ、他の班員の先生方のハイレベルな研究から学ばせていただきつつ、本研究領域の発展に少しでも貢献できるよう日々精進したいと考えております。



図：シミュレーションで扱う細胞内構成要素（左）と細胞移動のシミュレーション例（右）



病態モデル細胞を用いたシグナル伝達破綻メカニズムの解明

加納 ふみ 東京大学大学院総合文化研究科

セミインタクト細胞とは、連鎖球菌の酵素感受性毒素であるストレプトリシン O (Streptolysin O; SLO) などを形質膜に作用させることにより、形質膜を部分的に透過性にした細胞のことである(図1)。ここに(細胞を一個の試験管に見立てて)新たに外部より分画した細胞質成分と ATP 再生系などを添加し、細胞質に依存的な細胞内のイベントを再構成し、その中で生起する生命現象を生物物理学的、生化学的に解析できる。よって、セミインタクト正常細胞に病態モデルマウス組織より調製した病態細胞質を導入することにより、病態細胞内の環境をセミインタクト細胞内で再現し、病態特異的に現れるシグナル伝達過程の異常を検出できることになる。さらに導入する細胞質からの特定タンパク質の免疫除去や dominant negative タンパク質の添加などで、シグナル伝達異常に関わるタンパク質群を同定するための機能検定系となる。我々は今までに 20 種類を超える細胞アッセイ系を構築し、その成果を各種 journal にて発表しており(BBA 2011, JCS 2009, Genes to Cells 2005, 2005, MBC2004, 2000, JCB 2000 など)、

特に細胞周期依存的なオルガネラの形態変化や小胞輸送過程の解析に本セミインタクト細胞アッセイを応用してきた。例えば、細胞分裂期 (M 期) に同調させた細胞から調製した細胞質、M 期細胞質をセミインタクト細胞に添加し、細胞内環境を細胞分裂期のものに改変すると、分裂期特異的に生じるゴルジ体の分解、小胞体切断、染色体凝縮などがセミインタクト細胞内で再現される。この再構成系を利用し、各オルガネラ形態変化に関わるキナーゼの同定や、オルガネラ間を結ぶ小胞輸送過程とオルガネラ形態とのカップリングを明らかにした。近年、我々はこの方法を進化させ、セミインタクト細胞をリシーリング(再封入)して続けて培養・継代可能とするリシール細胞技術を開発した。この技術によりセミインタクト細胞では樹立できなかった細胞膜を介したシグナル伝達過程を構築することが可能となり、生きた「病態モデル細胞」として病態改善・進行に関わる様々な薬剤・タンパク質動態などの可視化解析・スクリーニングへの応用も視野に入っている。



図1 セミインタクト細胞アッセイとリシール細胞技術の概要



Phos-tag 技術を用いたリン酸化タンパク質解析法

木下 英司

広島大学大学院医歯薬学総合研究科医薬分子機能科学研究室

私たちの研究室では、世界中で使われ始めた『Phos-tag 技術』を開発しています。世界中のバイオ研究現場で使ってもらえるオリジナルな研究技術の開発と実用化を目指して研究を進めています。本稿では、この『Phos-tag 技術』についてご紹介したいと思います。

これまでに開発、実用化した主な『Phos-tag 技術』は3つに分類されます。いずれも、リン酸モノエステル結合分子としての Phos-tag に有能な機能性置換基を導入することによって、生命科学におけるリン酸化タンパク質解析法として利用されることを目的としました。

1) Phos-tag アクリルアミド (左図) を用いたリン酸基親和性電気泳動法:

Phos-tag アクリルアミドは、SDS-PAGE の分離ゲルに共重合させることで、電気泳動中のリン酸化タンパク質を特異的に捕捉する分子です。あるタンパク質においてリン酸化型は非リン酸化型よりも移動度の小さいバンドとして検出されます。また、同じリン酸基数でリン酸化部位が異なる場合も分離可能です。したがって、1つのタンパク質に複数存在するリン酸化フォームを分離し、リン酸化状態の全体像を定量的に検出することや、リン酸化状態の違いに基づくタンパク質の機能の差異に関する情報を得ることが可能となります。

2) Phos-tag アガロース (中央図) を用いたリン酸基親和性クロマトグラフィー法:

生体内のリン酸化タンパク質は、キナーゼ/フォスファターゼ反応によって刻一刻とリン酸化と脱リン酸化を繰り返し、個々のタンパク質においてそのリン酸化レベルは様々です。リン酸化解析では極微量のリン酸化タンパク質を分離、濃縮することは非常に有効となります。Phos-tag アガロースを用いることで、リン酸化ペプチド/タンパク質を効率良く分離、濃縮、精製することができます。

3) Phos-tag ビオチン (右図) を用いたリン酸基親和性ウェスタン解析法:

Phos-tag ビオチンは HRP-ストレプトアビジンとの複合体として用いることで、PVDF 膜上のリン酸化タンパク質を特異的に検出できる分子となります。Phos-tag はチロシン/セリン/スレオニンのいずれのリン酸基にもほぼ同じ親和性を持つので、抗リン酸化抗体に替わる網羅的リン酸化タンパク質解析ツールとして有効です。

Phos-tag 技術の本体をなす関連試薬は和光純薬工業 (株) から販売されております。オリジナルのプロトコール集も研究室ホームページ (<http://home.hiroshima-u.ac.jp/tkoike/>) より世界に向けて発信しております。是非、お試しください。

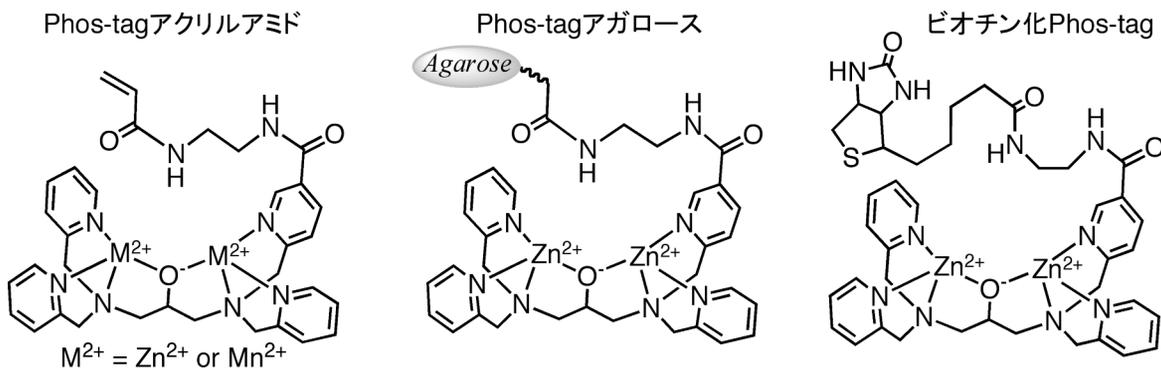


図 これまでに実用化している3つの Phos-tag 誘導体

最先端技術紹介



無細胞蛋白質アレイを用いた E3 リガーゼ探索技術

澤崎 達也

愛媛大学無細胞生命科学工学研究センター

タンパク質修飾の1つであるユビキチン化は、特異的な E3 リガーゼにより行われます。E3 リガーゼの蛋白質としての機能は、ユビキチン化する基質蛋白質と E2 を適度な距離に保つ“足場”を提供することにあります。そのため、目的蛋白質をユビキチン化する E3 リガーゼを見つけ出すためには、目的蛋白質と特異的に結合する E3 リガーゼを同定することが重要となります。細胞内では、ユビキチン化された蛋白質の分解は素早いことや、プロテアソーム阻害剤は毒性が高いことから、細胞生物学的に目的蛋白質と結合する E3 リガーゼを見つけることは難しいのが現状です。

蛋白質-蛋白質の相互作用を生化学的にかつ網羅的に検出する技術は、Biacore やプロテインチップなどがあります。しかし、Biacore の場合はスループット性が低く、プロテインチップのスループット性は十分ですが、蛋白質がチップ上で乾燥するため蛋白質が機能を失う場合が多いことや、ダイナミックレンジが小さいため結合能が高い相互作用因子しか検出できないなどの欠点があります。我々が開発してきた、コムギ無細胞蛋白質系と AlphaScreen システムの組み合わせは、上記の問題点を解決し、とても簡単に相互作用する蛋白質を同定することができる技術です (図1)。また、この系は *in vitro* でのユビキチン化反応もほとんど同じ手順で検出することができます (図2)。図2では、基質蛋白質にビオチン化、Flag タグがユビキチン (Ub) に付加されている点が図1と異なります。下記に、実験の手順を紹介します。蛋白質上のビオチン化タグや Flag タグの位置はどこでも良いのですが、PCR のプライマー設計の簡便さから、我々は N 末端に付加することが多いです。また、E3 リガーゼおよび目的蛋白質は、コムギ無細胞系で合成した溶液をそのまま使います。我々の研究室では、下記の混合反応を機械で行うため、数千種類のアッセイが一度に行えます。

結合反応及び検出 (図1 参照)

【用意するもの】

- ・ ビオチン化 E3 リガーゼ蛋白質：N 末端にビオチンが1分子付加された E3 リガーゼ
- ・ Flag ラベル目的蛋白質：N 末端に Flag タグを付加された蛋白質
- ・ AlphaScreen ビーズ
- ・ 抗 Flag 抗体
- ・ EnVision(PerkinElmer 社製検出用測定器)

【手順】

- 1) E3 リガーゼ蛋白質と、目的蛋白質合成をそれぞれ 1μL ずつと AlphaScreen ビーズ、抗 Flag 抗体を加え 25μL 系になるように調整し、25℃、1時間静置後、EnVision で測定。

ユビキチン化反応及び検出 (図2 参照)

【用意するもの】

- ・ ビオチン化目的蛋白質：N 末端にビオチンが1分子付加された蛋白質
- ・ E3 リガーゼ蛋白質
- ・ E1(ラビット)
- ・ E2(UbcH5c)
- ・ Flag-Ub(ユビキチン)
- ・ AlphaScreen ビーズ
- ・ 抗 Flag 抗体
- ・ EnVision(PerkinElmer 社製検出用測定器)

【手順】

- 1) ビオチン化目的蛋白質合成液と E3 リガーゼ蛋白質溶液をそれぞれ 1μL ずつ混合し、E1、E2、Flag-Ub を添加し、Hepes バッファーを加え計 15μL の系で、2時間、37℃で反応させる。
- 2) AlphaScreen ビーズ、抗 Flag 抗体を含んだ 10μL の溶液を加え1時間後、EnVision で測定。



ユビキチン化に関しては、E3の種類によっては一般的に使われている UbcH5c/UBE2D3 ではユビキチン化できない場合があります。その場合は、他のE2を試す必要があります。ユビキチン化検出系での大規模スクリーニングができない理由は、このE3リガーゼの種類によっては至適なE2が必要であることにあります。

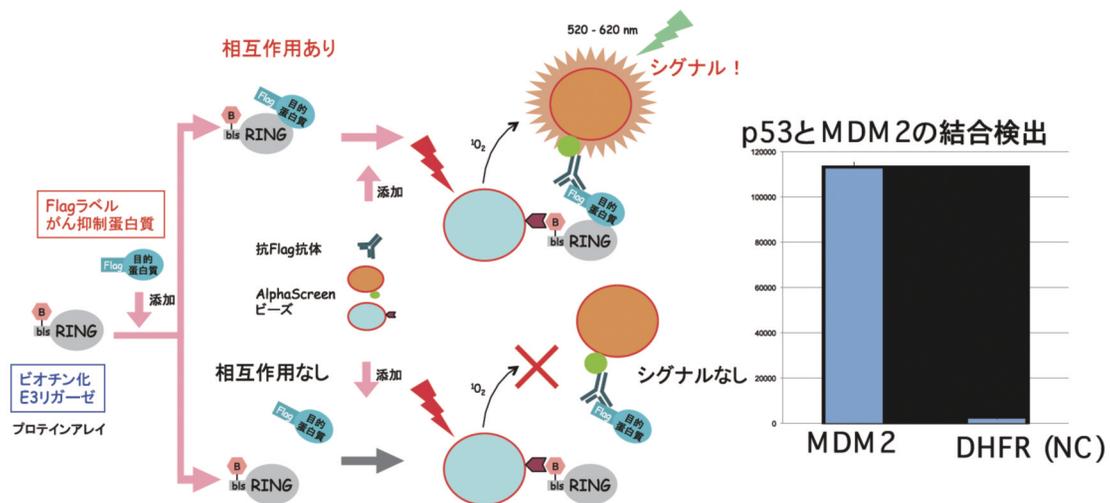


図1. AlphaScreen 法による相互作用検出実験

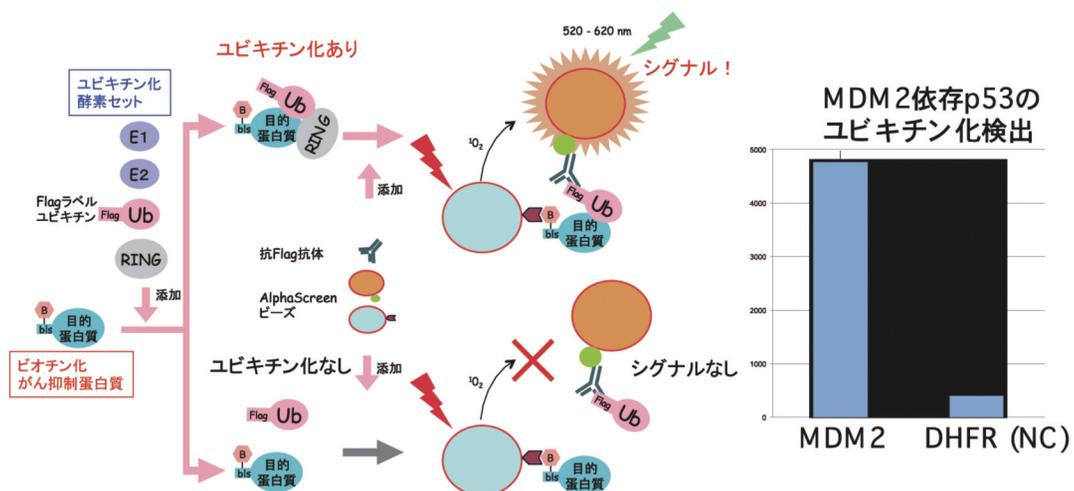


図2. AlphaScreen 法によるユビキチン化検出実験



Outreach Report

名古屋大学環境医学研究所 市民公開講座 2011

共催：文部科学省新学術領域研究「修飾シグナル病」

「癌の新たな治療戦略」

日時：平成 23 年 10 月 15 日（土） 13:00～16:30

場所：名古屋大学 野依記念学術交流館

久保田 裕二 名古屋大学環境医学研究所分子シグナル制御分野

本領域のアウトリーチ活動の一環として、平成 23 年 10 月 15 日、名古屋大学野依記念学術交流館にて、名古屋大学環境医学研究所「市民公開講座 2011」が開催されました。本講座は「癌の新たな治療戦略」と題し、様々な癌の発症機構、病態、診断、治療、予防などに関する情報を分かりやすく市民の皆様にご説明することで、がんに対する理解をより深めて頂くことを目的として行われました。

本講座では、がんの診断、治療、研究において第一線で活躍されている先生方にご講演して頂きました。癌の臨床医の立場から、秋田赤十字病院 消化器病センター部長 山野泰穂先生、名古屋大学医学部附属病院 化学療法部長 安藤雄一先生、聖マリアンナ医科大学 消化器・肝臓内科講師 渡邊嘉行先生がご講演され、医療現場における種々の癌の診断や治療の進歩について解説をされました。また、文部科学省「修飾シグナル病」研究班より領域代表の井上純一郎先生（東大医科研教授）、東京医科歯科大学教授の山岡昇司先生、また本

講座を企画した名古屋大学環境医学研究所教授の武川睦寛先生が参加され、癌の発症機構に関する研究の歴史や、シグナル伝達研究を基に発展してきた分子標的薬剤開発の現状を分かりやすく解説されました。

本講座では武川先生の司会進行のもと、まず名古屋大学環境医学研究所の村田善晴所長による開会の辞に続き、「修飾シグナル病」領域代表の井上教授からご挨拶と本研究班の概要をご説明頂きました。その後、各先生による講演発表が行われました。また本講座の最後に、講演をされた先生方を回答者としたパネルディスカッションの時間を設け、癌に対する市民の皆様のような疑問に対する質疑応答を行いました。



「大腸がん：早期発見のすすめ」

山野 泰穂 先生
(秋田赤十字病院 消化器病センター 部長)

山野先生は最新の大腸内視鏡検査による大腸がんの診断技術の進歩についてご講演されました。従来の技術では同定が困難であった初期段階の大腸がんの早期発見に、特殊ながん染色技術を用いる事が極めて有用であるという知見を、内視鏡カメラによる大腸がんの映像と共に分かりやすくお話しされました。



野依記念学術交流館
(名古屋大学東山キャンパス)



「がん化の仕組みと新しい治療薬」

武川 睦寛 先生
(名古屋大学 環境医学研究所 教授)

武川先生はがん遺伝子発見の歴史とその機能、そしてがん遺伝子が細胞をどのようにがん化させるのかを分子的な視点からご説明下さいました。また、基礎研究の成果を基にして、近年開発されてきた分子標的抗癌剤の効果とその作用機序について、最新の報告例を交えつつ詳細にお話しされました。



「ウイルスとがん」

山岡 昇司 先生
(東京医科歯科大学 歯医学総合研究科 教授)

山岡先生はヒトに感染してがんを誘発するウイルスについてご講演されました。がんウイルスの例として、特に子宮頸癌を導くヒトパピローマウイルス (HPV)、肝臓癌を導く肝炎ウイルス (B 型・C 型ウイルス) の感染機構と発癌機構をご説明になり、さらに感染対策としてのワクチン予防についてお話しをされました。



開会のご挨拶をされる村田所長（左）と井上領域長（右）。



「分子標的治療薬による新しいがん治療」

安藤 雄一 先生
(名古屋大学 医学部附属病院
化学療法部長)

安藤先生は分子標的治療薬による癌治療の実際、特にその治療効果と副作用について、名古屋大学附属病院でのケースを例としてご紹介されました。また、新たな分子標的治療薬の開発のための早期臨床試験(治験)のプロセスについて、詳細かつ分かりやすくご説明下さいました。



「胃がん治療の進歩と未来への挑戦」

渡邊 嘉行 先生
(聖マリアンナ医科大学
消化器・肝臓内科 講師)

渡邊先生は胃の健診・診断による胃がんのリスクマネジメントの重要性についてご講演されました。特に、胃がんを早いステージで発見する最新の診断法として、従来廃棄されていた胃洗浄液を回収し、液内に含まれる腫瘍マーカーを遺伝子レベルで検査するという画期的な方法をご発表されました。

全講演の終了後、ご来場頂いた皆様のがんに対する疑問を解決するため、同会場内にてパネルディスカッションが行われました。会場からは、癌治療薬の現状に関する具体的な質問や、原癌遺伝子とシグナル伝達との関連に関する質問など、非常に多くの方から多彩なご質問を頂き、それら全てに対して講演を行われた先生方から詳細な回答が返されました。本講演会には、実際に御家族が癌と診断され、治療を受けておられる方なども多く出席されており、先生方とご参加頂いた皆様との間で非常に真剣かつ活発なディスカッションが行われました。

開催当日は小雨という悪天候にも関わらず、143名の一般市民の方にご来場頂きました。先生方の講演では、最新の医療機器や癌の診断法、分子標的薬剤による癌治療の進歩、発癌ウイルスに対する感染予防などについて詳細に論じられましたが、美しい写真や動画などを用いて丁寧にご説明して頂き、非常に分かりやすく感じられました。また、スライドの一枚一枚が強く惹き付けられる内容であり、がんの診断・治療に対する

研究開発の重要性を改めて認識することが出来ました。また、各講演の終了毎に行われた質疑応答や、本講座最後のパネルディスカッションでは、非常にたくさんの方々からご質問を頂き、大変活発な議論が行われました。今回の市民公開講座の全プログラムを通じ、ご参加頂いた皆様に癌治療の現状や癌研究の意義について、より深くご理解頂いたのではないかと考えております。雨の中、多くの市民の皆様にご参加頂きましたことを改めて厚く御礼申し上げます。



講演の様子



雨天にも関わらず、多くの方にご参加下さいました。



パネルディスカッションでは来場者から多くのご質問を頂き、活発な議論が行われました。



Outreach Report

北海道大学「未来の科学者養成講座事業」勉強会 文部科学省・新学術領域研究「修飾シグナル病」社会還元発表会 ドリームチーム、札幌へ出動！

日時：平成23年11月5日（土）13:30～15:30

場所：札幌駅前 紀伊国屋書店札幌本店 1F インナーガーデン

有賀 早苗 北海道大学大学院農学研究院環境分子生物科学研究室

本研究班ではホームページでも出前授業、出張講演のオファーをしていますが、去る11月5日には領域リーダーを含む総括班の3先生に遠く札幌までお出ましのいただき、中高生や一般市民向けに講演をしていただきました。班員の有賀が関わっているJST・未来の科学者養成講座事業の受講高校生のための勉強会を公開して一般中高生・市民と共有する企画を立て、本研究班との共催で、サイエンスカフェスペシャル「ドリームチームが挑む“がん研究”最前線」と題して実施しました。

会場となった紀伊国屋書店札幌本店入口のインナースペースは、人通りの多いJR札幌駅前の道に面したガラス張りの空間で、街路からも書店内からも様子を窺うことができ、ポスターやチラシなどで開催を知って足を運んだ人だけでなく、何をやっているんだろう、面白そうだな、と通りがかりに気軽に立ち寄ることもできる多目的スペースです。当日は早くから来場された方も何人もいらっしやって、13:30の開始時には用意した50席が埋まっていました。



トップバッターの井上純一郎先生からは「研究者って何？」というタイトルで、研究者の使命から日常まで、生き生きとご紹介いただきました。研究は面白いけれど、プロの研究者になって常に成果を求められ、研究費を得る苦労、得た研究費に対する責任を含め、時間とエネルギーを惜しみなく費やさなくてはならない大変さもあること、中高生には研究者への夢と覚悟を持ってもらえるように、また一般の方たちには、自分の興味のためだけでなくソーシャルウィッシュに込めるべく頑張っている研究者や次代の研究者を目指す若者たちを応援してほしいという、大変重要なメッセージを発信していただきました。

続いて登場していただいた武川隆寛先生には「がんを研究すると何がわかるの？」ということで、がん研究の歴史、分子レベルでのがんの理解から、治療に向けた研究展開まで、幅広くお話しいただきました。医師でもいらっしやる武川先生は、一般の人が抱いている臨床的な「がん」のイメージと基礎研究とを無理なく結び付けてお話しくださって、聴く



人たちに本領域の研究進展に対する大きな期待と希望を引き出したことと思います。武川先生は地元の名門・札幌南高等学校のご卒業ということもあり、聴衆はぐっと身近に感じて熱心に耳を傾けていました。

最後に市川一寿先生が「メンデルは数学者？」と題して、生命科学に数学が果たす役割・必要性についてお話しいただきました。実験や観察のデータをどう解釈するか、コンピュータシミュレーションの活用など、難しい内容を身近な例を交えて解説してくだり、未来の科学者を志す高校生たちが特に目を輝かせて聴き入っていました。

ドリームチームのクリーンアップの熱意のこもったわかりやすいご講演から、「分子細胞生物学、医科学、構造生物学、数理科学、プロテオミクス研究者の有機的な異分野連携が生み出すシナジーが領域推進の源」と領域リーダーが述べている本領域展開の重要性が札幌の中高生や一般の方たちにも伝わったのではないかと思います。講演終了後には、先生方にサインを求める女子学生もいたり、アンケート調査からも、今回のサイエンスカフェは大変好評でした。



Outreach Report

文部科学省・新学術領域研究「修飾シグナル病」

2011年アウトリーチ活動一覧

開催日	会場	参加者	説明者
6月3日(金)	名古屋大学環境医学研究所 分子シグナル制御分野研究室および実験室	一般の方3名	武川 睦寛
8月21日(日)	東京大学医科学研究所 分子発癌分野セミナー室及び研究室	明治学院東村山 高等学校3年生2名	井上純一郎
9月9日(金)	東京大学医科学研究所 分子発癌分野セミナー室及び研究室	群馬県立高崎高等学校 2年生10名	井上純一郎
10月15日(土)	名古屋大学 野依記念学術交流館	一般の方143名	井上純一郎 武川 睦寛 山岡 昇司
11月5日(土)	紀伊国屋書店札幌本店1F インナーガーデン	高校生10名程度 一般の方40名程度	井上純一郎 武川 睦寛 市川 一寿
11月9日(水) 11月30日(水)	NHK名古屋文化センター	一般の方約50名	高橋 雅英
11月30日(水)	明治学院東村山高等学校チャペル	高校生1年生250名程度	井上純一郎
12月22日(木)	岡山学芸館高等学校・清秀中学校	高校生・中学生25名	尾山 大明
12月24日(土)	東京大学 理学部1号館	小学生～大学生まで 40名程度	石井 亮平(特任助教) 加藤 英明(大学院生)

編集後記

本年度から新たに加わった公募班の先生方に「ざっくばらんに研究をご紹介下さい」とお願いしたところ、各先生方の個性溢れるユニークな原稿が多数寄せられました。本研究領域では特徴ある解析技術をお持ちの先生方が多く集まっていることもあり、それぞれ異なる“切り口”で自己紹介を頂けたことは、編集に携わる身として非常に新鮮に感じることができました。また、強固になった領域のネットワークを利用して、代表の井上純一郎先生を中心に名古屋、札幌と日本全国を駆け巡るアウトリーチ活動のパッションも十分にお伝えできたかと思えます。来年度は中間点に当たる3年目、飛躍の年とすべく領域活動にもますます力が入ってくると思われしますので、どうか変わらぬご支援の程を宜しくお願い致します。

(尾山 大明)

新学術領域研究「修飾シグナル病」ニュースレター

発行日 平成24年1月
発行 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
領域代表者 井上純一郎
東京大学医科学研究所 癌・細胞増殖部門 分子発癌分野
〒108-8639 東京都港区白金台4-6-1
TEL: 03-5449-5275 FAX: 03-5449-5421
E-mail: <info@shushoku-signal.com>
編集 尾山 大明
