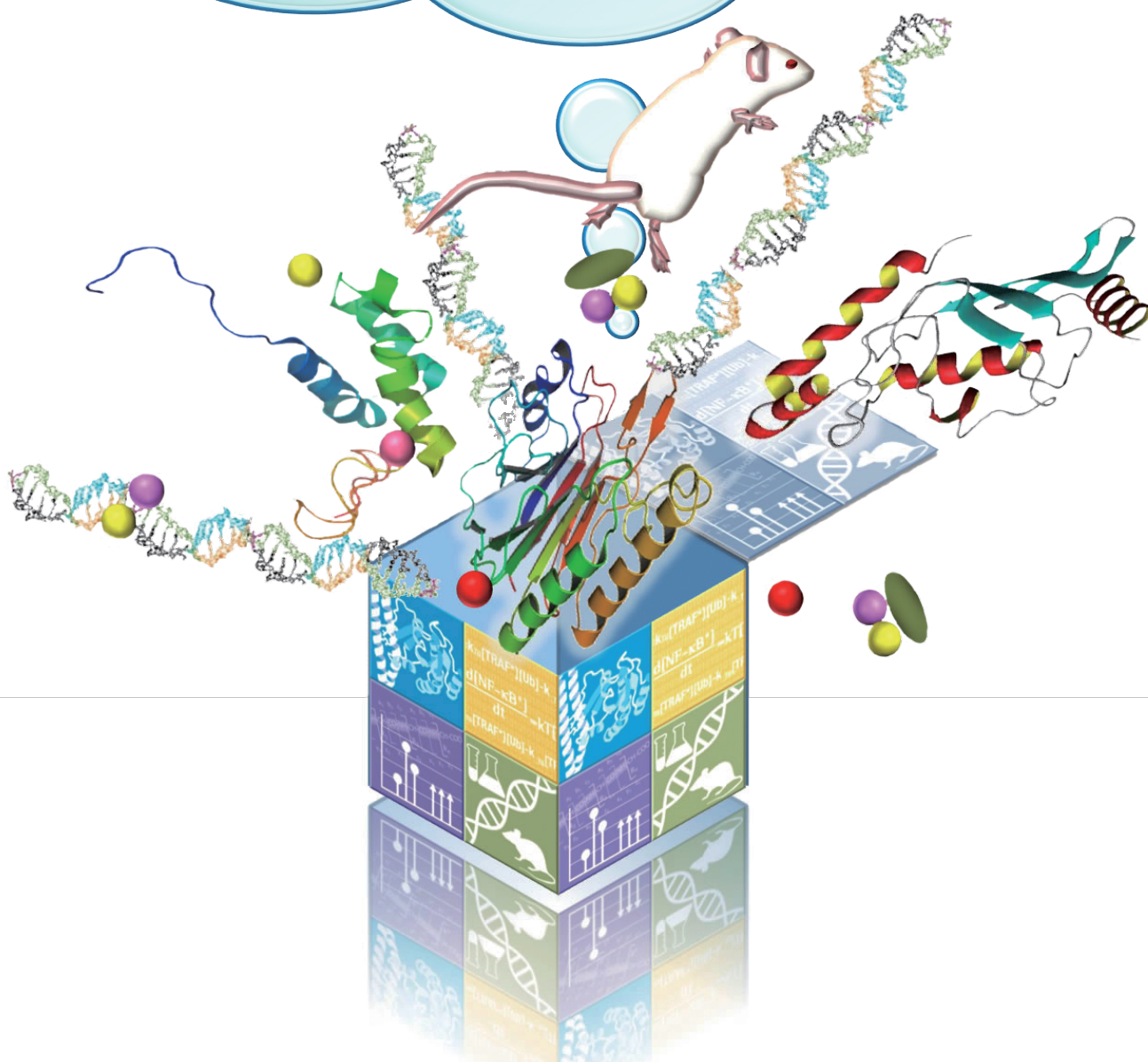


中高校生・専門外の皆さんへの研究成果報告

細胞の営みと病気との関係を
明らかにしようとした
研究グループの5年間



科研費
KAKENHI

平成22年度～平成26年度 文部科学省 科学研究費補助金 新学術領域研究(研究領域提案型)

「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)



表紙絵デザイン：都竹順子

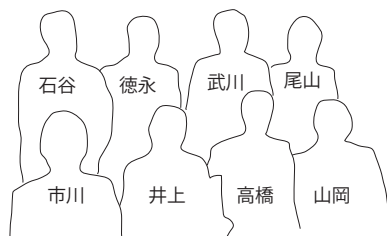
東京大学医科学研究所、山本雅研究室にて長年研究に携わる傍ら、「新細胞工学実験プロトコール」（細胞工学別冊）をはじめとした雑誌、専門書のイラスト、シンポジウム等のポスターを手掛けてきた。現在、東京大学医科学研究所プロジェクトコーディネーター室に所属。

「修飾シグナル病」研究グループ

領域代表	井上純一郎	東京大学・医科学研究所・教授
	徳永 文稔	群馬大学・生体調節研究所・教授
	山岡 昇司	東京医科歯科大学大学院 医歯学総合研究科・教授
領域副代表	武川 睦寛	東京大学・医科学研究所・教授
	高橋 雅英	名古屋大学大学院 医学系研究科・教授
	石谷隆一郎	東京大学大学院 理学系研究科・准教授
	市川 一寿	東京大学・医科学研究所・特任教授
	尾山 大明	東京大学・医科学研究所・准教授



2016.1.23 東京大学医科学研究所 BHGセミナー室にて
井上が手に持つ本は、研究グループの成果をまとめた英文書籍

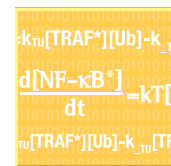
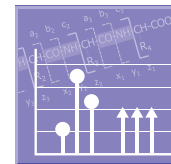


中高生、専門外の皆さん

この冊子は、国からの研究費をもとに病気が発症する仕組みを分子レベルで明らかにすることを目指した研究グループの5年間の成果を専門的な知識のない方にも理解していただくことを目的に作られました。

この研究グループは、分野の違う研究者の集まりです。核酸、タンパク質といった分子の動きを考える分子生物学（緑のロゴ）、タンパク質の3D構造を解く構造生物学（青のロゴ）、その重さからタンパク質の正体を明かす質量分析学（紫のロゴ）、分子の動きを数式で考える生物物理学や数理学（黄のロゴ）、細胞の挙動を見つめる細胞生物学（緑のロゴ）、病気の原因や治療法を考える医科学（緑のロゴ）等を専門とする学者が参加しています。冒頭で「専門外の皆さんへ」と呼びかけながら、実はグループの中はお互いに専門外と言って良い状況なのです。ただ、同じ専門の人同士が考えても同じように考えてしまい、なかなか新しいことが出てきません。異なる思考過程の人たちが突拍子も無いことを言い出すことによって意外な突破口が見えてくるのです。これを**異分野連携**と言います。ですので私たちの研究グループのマークは4色のロゴ（異分野）を合わせたものになっているのです（下図）。

細胞の中では、いろいろな情報が飛び交っています。この事を「細胞内シグナル伝達」と言います。詳しくは4ページから始まる私（井上）の報告の初めの部分を読んでください。正常な「細胞内シグナル伝達」は健康であるために必須です。それが何らかの原因で乱れると病気になります。「細胞内シグナル伝達」を正常にコントロールするにはタンパク質にマークをつける「翻訳後修飾」というイベントが非常に重要です。というわけで私たちのグループは「**修飾シグナル病**」という名前になっています。



研究グループ「修飾シグナル病」のロゴマーク

目次

研究成果説明① 細胞は指令に忠実！だから健康！	4
井上純一郎 東京大学 医科学研究所 分子発癌分野	
研究成果説明② タンパク質の目印が様々な病気と関係することを世界で初めて発見！	8
徳永文稔 群馬大学 生体調節研究所 分子細胞制御分野	
研究成果説明③ がん細胞は自己の生存を維持する仕組みを持っている	10
山岡昇司 東京医科歯科大学大学院 医歯学総合研究科 ウイルス制御学	
研究成果説明④ 細胞の情報（シグナル）伝達の理解から疾患の克服へ	12
武川睦寛 東京大学 医科学研究所 分子シグナル制御分野	
研究成果説明⑤ 細胞の動きを制御するタンパク質「ガーディン」の発見	16
高橋雅英 名古屋大学大学院 医学系研究科 分子病理学	
研究成果説明⑥ タンパク質が織り成す細胞内情報伝達ネットワークの全貌に迫る ～プロテオミクスが解き明かす生命システムの複雑な仕組み～	18
尾山大明 東京大学 医科学研究所 疾患プロテオミクスラボラトリー	
研究成果説明⑦ タンパク質の形から生命の謎を解く	20
石谷隆一郎 東京大学 理学系研究科 生物化学専攻	
研究成果説明⑧ コンピュータシミュレーションを使って細胞の秘密を解き明かす	22
市川一寿 東京大学 医科学研究所 腫瘍数理分野	
付録 専門研究者のため研究成果報告	27



細胞は指令に忠実！だから健康！

細胞の中で指令が伝達されている。

人はたった一つの受精卵から卵割を繰り返し10か月余りの後誕生しますが、新生児の細胞数は約3兆です。成人ではさらに増えて60兆に達します。3兆というのは巨大な数ですが²⁴²が約4兆であることを考えると妊娠期間に平均して週に一度分裂する程度の速さと考えられます。ただ、ここで大事なことは受精卵がただ42回分裂しても単なる細胞のかたまりになるだけで人という生命体にはなりません。分裂しながら手足を作ったり、脳を作ったり、胃を作ったり、骨格を作ったりしなければなりません。そのためには細胞は単に増えること（増殖）に加えて、新たな機能を持つ別の細胞に変化したり（分化）、機能すべき位置に移動したり（運動）、自ら消滅したり（細胞死あるいはアポトーシス）する必要があります（図1）。このような作業を計画的に実行するために細胞はその細胞の外から来る指令（増殖、分化等を細胞に促す命令）を受容体というセンサーで感知し、その指令を細胞内へ伝達させます。さらに細胞内でその指令が複数のシグナル伝達因子（主にタンパク質）間をリレー式に伝わっていき、最終的には転写因子（特定の遺伝子の mRNA の発現を誘導したり逆に抑制したりするタンパク質）の機能をコントロールすることで遺伝子の発現パターンを変化させます。こうして細胞は細胞外から来た指令を実行します（図2）。

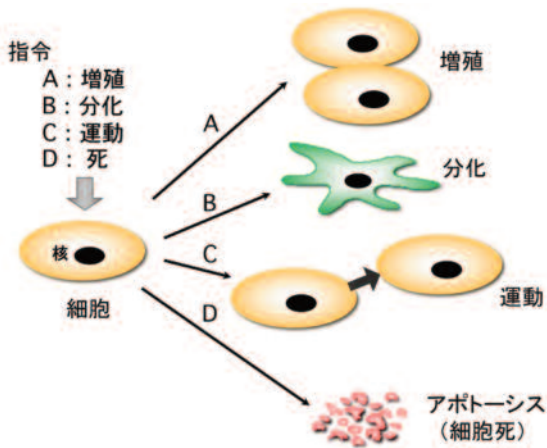


図1 細胞にA増殖、B分化、C運動、D細胞死の各指令が与えられた時の細胞の対応の仕方

このような細胞の中での指令の伝達を「細胞内シグナル伝達」と呼んでいます。正常な細胞内シグナル伝達は、上記のような胎児の形作りに必須であるとともに生後においても細菌やウイルス感染で誘起される炎症免疫反応、脳神経機能、損傷治癒等において必須な役割を果たします。

エヌ・エフ・カップター・ビー (NF-κB) って何？

私が研究対象としているタンパク質は、核内で遺伝子の発現に関わる転写因子でエヌ・エフ・カップター・ビー (NF-κB) と言います。NF は Nuclear Factor の略で核内で働くタンパク質という意味です。κ は抗体（免疫グロブリン）の構成タンパク質である κ 軽鎖、B は抗体を作る B 細胞を意味します。総合すると「B 細胞が抗体の κ 軽鎖遺伝子を発現誘導する際に機能する転写因子」という意味です。これは30年ほど前に NF-κB が発見された当初の命名です。その後の研究で NF-κB はほぼすべての細胞に存在し、抗体遺伝子以外にも細胞の増殖、分化に関わる遺伝子や細胞死を制御する遺伝子の発現に関わっていることがわかっています。さらにこれまでの研究で NF-κB が休止状態から活性化する仕組みが明らかになってきました。タンパク質の中には、常に機能を発揮する必要がないものや、常に機能を発揮すると細胞や体に害があるものがあります。NF-κB は後者にあたり

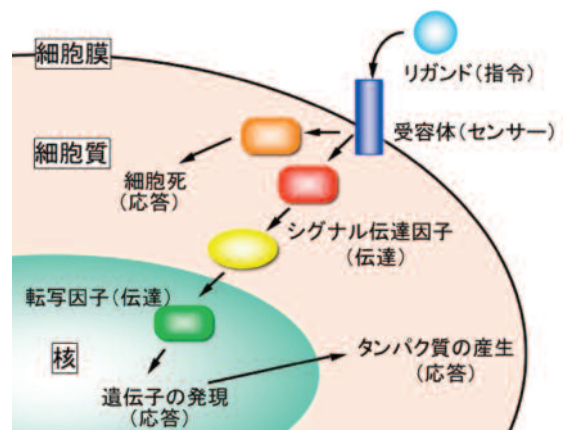


図2 指令が細胞に感知されその指令が細胞内へ伝達される（細胞内シグナル伝達）様子



東京大学 医科学研究所
分子発癌分野

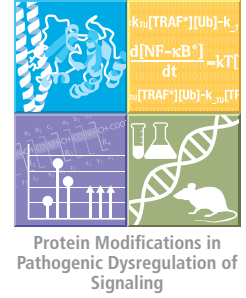
井上純一郎

1955年 東京都生まれ

出身高校：千葉県立千葉高等学校

趣味：音楽（古いロック）、フットサル、飼犬（雑種♀）と遊ぶこと

研究室 HP: <http://www.traf6.com>



ます。ですので、NF- κ Bは本来核に行って転写を誘起するものですが、普段はI κ B α （アイ・カップー・ビー・アルファ、Inhibitor of NF- κ B α , NF- κ Bの阻害タンパク質 α ）と呼ばれる別のタンパク質に妨害されて核に移れず細胞質に留まっています（図3）。すなわち、普段は機能を発揮できない状態になっています。皆さんの体のほとんどの細胞ではこの状態になっています。細菌感染等で細胞の外からNF- κ B活性化を命令する指令が来てそれを受容体（センサー）が感知する（図3①）とその指令が受容体の近くの細胞質のタンパク質に伝達されます。その数段階の指令伝達の結果、I κ B α の中のセリンというアミノ酸の側鎖の水酸基（-OH）にリン酸が付加されます（図3②）。次にこのリン酸の付加が原因でI κ B α のリジンというアミノ酸の側鎖のアミノ基（-NH₂）にユビキチンという76アミノ酸から成るペプチドが鎖状に多数付加されます（図3③）。このようにタンパク質の翻訳が完了した後にリン酸やユビキチンのような分子が付加することを「翻訳後修飾」と言い、リン酸が付加することをリン酸化、ユビキチンが付加することをユビ

キチン化と言います。重要なことに、このような翻訳後修飾はタンパク質の機能を変化させたりタンパク質のその後の運命が決めるのです。例えばI κ B α の場合、ユビキチン化されるとプロテアソームというタンパク質分解を担うタンパク質複合体に基質として認識され急速に分解されて消失します（図3④）。その結果、NF- κ BはI κ B α による縛りから解放され核に移行することになります（図3⑤）。核に移行したNF- κ Bは自身が標的とする遺伝子の発現を誘導し（NF- κ BはGGGACTTCCまたはそれに類似のDNA配列に結合します。したがってこの配列を発現制御配列に持つ遺伝子はNF- κ Bによって発現誘導されます。（図3⑥）、細胞は増殖したり分化したりして炎症免疫反応等の高次な生命現象を引き起こします。ユビキチン化は「ユビキチンが多数鎖状につながって付加されること」と書きましたが、実は鎖のつながり方に幾つかの型があり、型によってユビキチン化されたタンパク質の運命や機能が異なってきます。例えば、プロテアソームによって分解されるためにはK48型鎖がタンパク質に付加される必要がありま

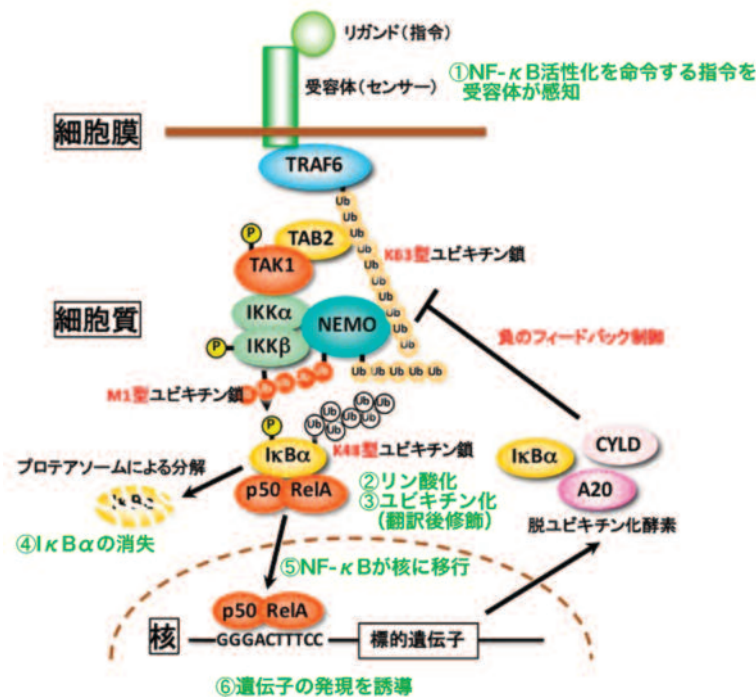


図3 NF- κ B活性化シグナルが細胞内伝達される様子。NF- κ Bはp50とRelAの2量体として描かれている。

す。一方、NF- κ B 活性化においては K63 型や M1 型と言った鎖も活躍します。I κ B α が K48 型ユビキチン化されるためには I κ B のリン酸化が必要であることを述べましたが、そのリン酸化を起こすのが I κ B キナーゼ (IKK) と呼ばれるタンパク質リン酸化酵素複合体で IKK α , IKK β , NEMO という 3 種類のタンパク質で構成されます。IKK は通常不活性化状態ですが細胞外からの指令があると活性化されます。この IKK の活性化は指令依存的に合成される K63 型や M1 型ユビキチン鎖が足場となって IKK を含む複数のタンパク質を集わせることで起こります。すなわち NF- κ B を活性化する細胞内シグナル伝達は少なくとも 3 種類の鎖型のユビキチンの連携で稼働していることとなります (図 3)。

NF- κ B は”健康”に必須、でも”がん”でも活躍する。

正常細胞では、前述のように NF- κ B は常時働いて欲しくないので、指令が来ない限り活性がなく細胞質に係留されています。指令が来ると活性化されるのですが、その活性化の強さや長さはいろいろな仕組みで適度に制限されていますし、正常細胞では指令が無くなれば元の状態 (活性がなく NF- κ B が細胞質に係留された状態) に戻ります (図 4: 正常な活性化)。どうやら、がん細胞ではこのような NF- κ B のコントロールが破綻してしまっていて、指令がないのに NF- κ B が活性化してしまい、そのためにがん細胞ができた、またできたがん細胞がさらに悪性化すると考えられています (図 4: 恒常的活性化)。また、NF- κ B が標的とする遺伝子の中には、NF- κ B の活性化に重要な役割を果たす K63 型や M1 型のユビキチン鎖を分解して NF- κ B 活性化を抑えるタンパク質 (脱ユビキチン化酵素) を作るものがあります。このようにあるものが活性化したことでそれを抑える物質作ってその活

性を抑えて制限することを「負のフィードバック制御」(図 3) と言いますが、これが何かの原因で機能しなくなると活性化の程度が亢進するとともに持続時間も延長されます。このような状態を過剰な活性化と言いますが、過剰な NF- κ B の活性化は過剰な炎症反応を誘起し、がんを含むいろいろな病気の原因と成ります (図 4: 活性持続性の延長または最大活性の増大)。今までの説明で NF- κ B の活性化メカニズムの詳細を明らかにすること、そしてその制御の破綻がどのように疾患に結びつくのかを解き明かすことが如何に重要かを分かっていただけでしょうか? まだまだわからないことがたくさんあるのです。このような現状を鑑み私たちは研究をしています。

5年間の研究で見つけたこと。

そこで私たちの研究グループは文部科学省に「翻訳後修飾による NF- κ B 活性化シグナルの制御機構と疾患発症との関連」という題名で 5 年間の研究計画を申請し、厳しい審査の結果採択され研究費 (科学研究費補助金: 「科研費」と略して呼びます) をいただきました。その研究費を使用して以下に記す成果を上げることができました。これらはいずれも、がんやその他の疾患に関する原因解明を加えて治療薬や治療方法の開発に貢献すると考えています。

1. ヒト白血病ウイルスは世界的に見ると日本国内に感染者が多く、しかも感染した一部の人に重篤な白血病を発症させます。このウイルスによる白血病発症にはウイルスが作る Tax と Hbz という二つのタンパク質が関与すると考えられています。そのうちの Tax はウイルスが感染した細胞の NF- κ B を恒常的に活性化することで細胞に永久に生きて増える能力を与えると考えられています。私たちは試験管内で Tax による NF- κ B 活性化を再

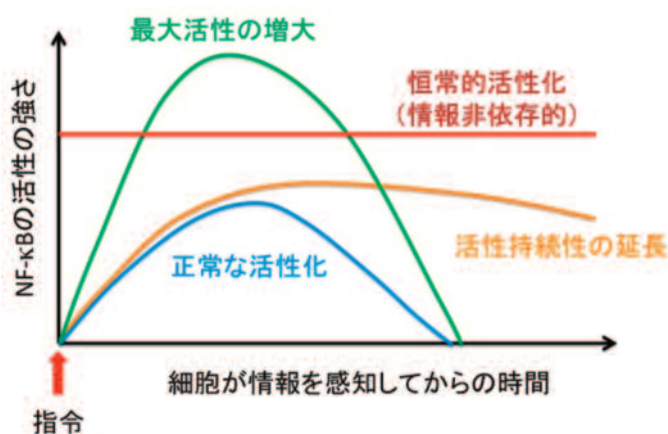


図4 正常なNF- κ B活性化シグナルと疾患発症につながる異常なNF- κ B活性化シグナル

現することに成功し Tax が細胞のタンパク質を利用して複数の鎖型のユビキチンを作ることによって NF- κ B を活性化することを明らかにしました。

2. 活性化 IKK 複合体を細胞から取り出しその複合体構成タンパク質を質量分析器で解析することで p47 というタンパク質を見つけました。p47 が NF- κ B 活性化指令により K63 型や M1 型ユビキチン鎖が付加した NEMO に結合し NEMO をリソゾームに運搬し分解させることで NF- κ B の活性化を負に制御することを明らかにしました。
3. がん幹細胞は腫瘍の中に少数存在する抗がん剤治療に抵抗性の細胞です。予後が悪く再発性の高い悪性の乳がんにおいて、このがん幹細胞が NF- κ B によって維持されていることを明らかにしました。さらにその理由を研究したところ、がん幹細胞の周囲のがん幹細胞以外のがん細胞（非がん幹細胞）の中の NF- κ B が NOTCH というセンサーの指令である JAG1 を発現誘導しその JAG1

がすぐ隣にいるがん幹細胞の NOTCH に指令を与えることであることを明らかにしました。

4. NF- κ B の活性化には古典的経路と非古典的経路の2種類がありお互いに協調して機能しています。ユビキチン編集（修飾）酵素である A20 が古典的 NF- κ B 経路により発現誘導され古典的経路を負に制御することはすでに報告されていましたが、私たちは発現誘導された A20 が cIAP に結合することで非古典的経路の活性化を誘導することを明らかにしました。
5. 悪性の乳がんにおける NF- κ B の恒常的活性化ががんの悪性を招く原因を明らかにするために NF- κ B が発現誘導する標的遺伝子（図3）を NF- κ B を人為的に抑制することで多数見つけました。その中の一つである Tropomodulin 1 (TMOD1) は、 β -Catenin という転写因子を安定化することで MMP13 というがんの組織浸潤性を高める遺伝子の発現を促進することを明らかにしました。

MESSAGE



研究者という仕事に興味がある人へ

自分の将来像として「研究者になりたい」と明確に言える人はおそらくそんなに多くないと思うので何となく「研究者という仕事に興味がある」人に私なりのメッセージを送りたいと思います。私が研究者として仕事をしているここ30年だけでも生命科学の進歩には目覚ましいものがあります。次々と生命の神秘が明らかになっていく、そのドキドキ感はすごいものでした。その興奮を外から味わうだけでなく、自分がその興奮を多少でも作れる機会もありました。そうなってくると仕事という感覚はほとんどないですね。毎日好きなことをしているので不適切な表現だが、楽しいことをして収入を得ている感覚です。ただ、少し時が経ち自分の研究室を持つような立場になると実験の現場（実験台）から離れて研究費を稼ぎながら実験台で実験をする人に研究を委ねる、いわゆるマネジメントが主な仕事になってきます。私はこのマネジメントが苦手ですが、ここでもその才能を発揮して優れた人材の育成に成功する方を多く見かけます。羨ましい限りですが、それは別として、研究が楽しく創造的であり、やりがいのある仕事であることを理解していただけたと思います。もう一つ強調しておきたいのは私の時代と違ってこれから多様な分野の学問が連携していく必要があるということです。数学、物理、化学、情報学さらに文系の学問までが生物学や医学と壁を乗り越えて融合していく必要があります。これはまさに私たちの研究グループが目指したものです。私のような固定した学問領域が頭に沁み込んでいる生物者には、物理や数学といった分野の先生の話は時に外国語のように聞こえてしまうことがあります。また、逆に物理や数学の研究者には私の話が日本語に聞こえないことがあるのだと思います。でも、これからの学問がさらに発展するためにはそれではダメで異分野の研究者が頭に同じ絵を描きながら語り合える必要があるのです。それには若い柔軟な脳が必要です。ですので是非「研究者という仕事に興味がある」若い人が異分野に連携を意識しながら、研究の楽しさを味わって欲しいというのが私からのメッセージであり「切なる願い」なのです。



タンパク質の目印が様々な病気と関係することを世界で初めて発見！

10月に入るとノーベル賞の発表週間となり、このところ毎年のように「日本人受賞！」という明るいニュースが聞かれるようになってきました。私たちにとっても、「今年こそはあの先生が...」と、知り合いの先生の受賞を心待ちにする特別なウィークとなっています。2015年には梶田隆章博士にノーベル物理学賞が、大村智博士にノーベル医学生理学賞が授与されたことは記憶に新しいことでしょう。大村博士は、オンコセルカ症に対する特効薬イベルメクチンを微生物から見出し、アフリカの人々を数億人規模で寄生虫病による失明から救いました。実は、あまり報道されませんでした。大村博士が見出された抗生物質はこれに止まらず、重要なツールとして生命科学研究に利用されている数多くの化合物を見出されています。例えば、プロテアソーム阻害剤のラクタシスチン、プロテインキナーゼ阻害剤のスタウロスポリン、脂肪酸生合成阻害剤のセルレニンなどが代表的なものです。これらのうち、ラクタシスチンについて紹介します。

ラクタシスチンは、まず神経細胞の突起伸長を導く抗生物質として1991年に大村博士らによって放線菌から同定され、その後の研究からプロテアソーム

ムという酵素を阻害することが明らかになりました。プロテアソームは、ユビキチンという分子が数珠状に連結した目印（翻訳後修飾）を認識して、そのタンパク質を選択的に分解する酵素です（図1a）。プロテアソームは細胞内の新陳代謝を司る重要な酵素で、この酵素活性が正常に働かない場合は不良タンパク質が細胞内に蓄積することで神経変性疾患などの病気となり、一方、プロテアソーム活性が強すぎる場合も、がん化を抑制するタンパク質を分解してしまうことで、がんなどの病気を引き起こします。したがって、適切なユビキチン修飾とそれに引き続くプロテアソームによるタンパク質分解は、人体の健康維持のために必須と言えます。

不良タンパク質を識別して選択的にユビキチン修飾するメカニズムは、アブラム・ハーシュコ（Avram Hershko）やアーロン・チカノバー（Aaron Ciechanover）らのイスラエルの研究者らによって発見され、そのユニークな分子反応機構と生理的な重要性から2004年にノーベル化学賞を受賞しました。また、プロテアソームは田中啓二博士（東京都医学総合研究所・所長）らが発見した重要なタンパク質分解酵素です。ラクタシスチンは、複雑な構造であるため治療薬とし

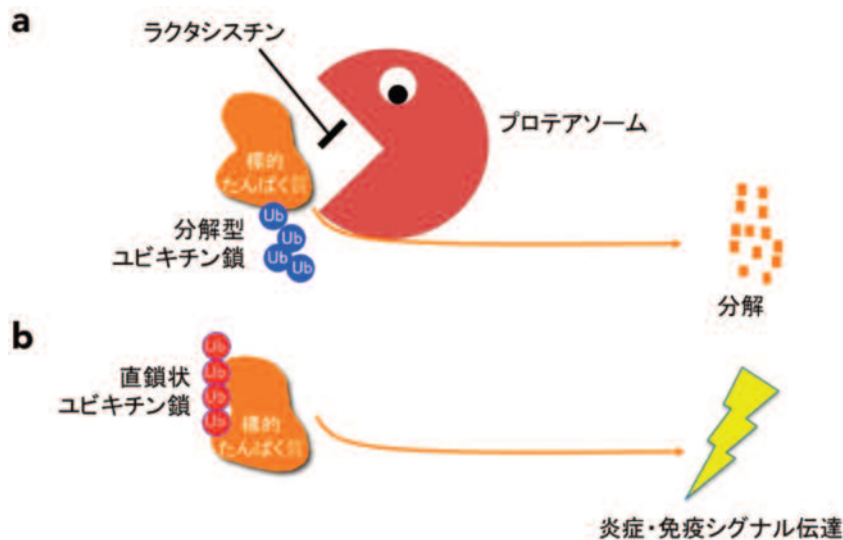


図1：ユビキチン修飾による細胞機能変換
 (a)標的タンパク質にユビキチンが結合すると選択的にプロテアソーム分解を受ける。
 (b)ユビキチンが直鎖状に連結した場合は、タンパク質分解ではなく、炎症・免疫に関与する。

群馬大学 生体調節研究所
分子細胞制御分野

徳永文稔

1962年 奄美大島生まれ

出身高校：鹿児島県立錦江湾高等学校

趣味：男声合唱、オペラ、将棋

研究室 HP：<http://molcellbiol.imcr.gunma-u.ac.jp/>



では発展しませんでした。生命科学の研究ツールとして大変貴重なものとして利用されています。現在、ラクタシスチンと構造は異なりますが、プロテアソーム活性阻害剤として開発されたボルテゾミブ（ベルケイド）という薬は、多発性骨髄腫や悪性リンパ腫などのがんに対して極めて有効であることが明らかになり、世界中で最も販売されている薬の一つになっています。

大変興味深いことに、その後の研究からユビキチンは単にタンパク質分解だけでなく、細胞内シグナル伝達、DNA 修復、細胞内物質輸送など様々な生理機能調節に関わることが明らかになってきました。これは、ユビキチンが数珠状に連結する際に、様々な様式を取ることができることに起因します。つまり、あるタイプのユビキチン鎖はプロテアソーム分解の標識となりますが、別のタイプのユビキチン鎖は全く分解の標識とはならず、DNA 修復やシグナル伝達など全く異なる役割を果たすことが分かったのです。これまで見出されていたユビキチン鎖は、7通りの分岐鎖状ユビキチン鎖という、いわばジグザグな鎖でしたが、今回の研



究で私たちは、「直鎖状ユビキチン鎖」という全く新しい真っ直ぐなタイプのユビキチン鎖を作る酵素を見出し、この直鎖状ユビキチン鎖が炎症応答や免疫制御に重要な NF- κ B (エヌ・エフ・カップパー・ビー) というシグナル伝達を制御することを発見しました (図 1b)。さらに、この酵素の構成因子が遺伝的になくなったマウスでは、重篤な皮膚炎を発症すること

を明らかにしました。また、いったん作られた直鎖状ユビキチン鎖を分解して、シグナルを ON から OFF へ制御する酵素 (脱ユビキチン化酵素) についても 2 種類同定し、その作用メカニズムを詳しく解明しました。これら

の研究から、細胞内の炎症・免疫シグナル伝達について新しい仕組みがわかり、その異常は、B 細胞リンパ腫などのがん、関節リウマチなど自己免疫疾患、筋萎縮性側索硬化症などの神経変性疾患、糖尿病など生活習慣病に関わることが示されました。今後、炎症や免疫応答の仕組みについて基礎医学的に研究を深めるとともに、この制御機構を標的とすることでがんなど各種疾患治療に有効な薬剤シーズの同定へと繋げていきたいと考えています。

MESSAGE



研究者を目指す若者へのメッセージ

さて、2015年のノーベル医学生理学賞を受賞した大村博士は、人の役に立つことを目指し、微生物からいろいろの有効成分を抽出して、その薬効を精力的に調べました。その翌日に、ノーベル物理学賞を受賞した梶田博士はニュートリノに質量があり、振動しているということを見出され、基礎研究の重要性を説かれていました。両博士とも地道な努力がすばらしい発見となり、今回の受賞に繋がったと思います。しかし実際には、これらの成果が結実するまでに20~30年という月日が必要でした。現在の状況を鑑みますと、これから20~30年後にも同じように日本人のノーベル賞受賞という明るいニュースが毎年聞かれるか疑問に思うことがあります。爆発的に成長する隣国に学術分野でもあっとい間に追い抜かれ、後塵を拝することがないか懸念しています。我が国において、今後とも学術領域での「未知への挑戦」を志す若者が続くことを期待しています。



がん細胞は自己の生存を維持する仕組みを持っている

人の病気の有効な治療法を開発する上で、病気のしくみを知ることはたいへん重要です。治療がむずかしいがんや、長い間続く発熱や痛みを伴う炎症を特徴とする病気の治療をするにあたって、症状を緩和するだけでなくできるかぎりその病気の原因を取り除くような治療ができないかという考えから、私たちは治療の標的になるような病気特有の異常を見つけ出すことを目標に研究をしています。

病気の原因を細胞レベルで考えると、遺伝子とタンパク質の問題にたどり着くことがしばしばです(図1)。それは、タンパク質が遺伝子情報をもとに作られ、そのタンパク質同士のネットワークが正常な細胞の活動を支えているからです。ネットワークでは情報のやり取りはもちろん、相互作用によって物が作られたり運ばれたりあるいは分解されたりします。ある病気でのタンパク質の異常は、発現量や構造上の異常かもしれませんし、タンパク質分子上に後から加えられる目印(翻訳後修飾)の違いが原因であるかもしれません。がんを例にとると、細胞膜から核さらには遺伝子へと情報を伝えるシグナル伝達経路上のタンパク質が遺伝子配列の変異の結果発がん性を持つようになったり、ふだん発がんを抑えているタンパク質が変異の結果その機能を失ったりそのタンパク質の発現が失われたりすることで発がんすることもあります。また、炎症という現象はけがをした際や病原体に感染したときに起こるからだの反応で、発熱や痛みを伴います。慢性炎症性疾患は、このような外的な原因がなくなっても炎症が治まらないような病気で、炎症をコン

トロールする遺伝子の発現やタンパク質に問題が生じていると考えられています。自己免疫疾患(膠原病)やアレルギー、最近ではがん、肥満や動脈硬化症も慢性炎症と関連があると報告されています。

私たちはウイルスが起こす血液細胞のがんである成人T細胞白血病(ATL)の研究をとおして、1)細胞の核の中で遺伝子の発現調節をするNF-κB(エヌエフカッパービー)と呼ばれるタンパク質が異常に活性化していて遺伝子の発現に異常が生じていること、2)それががん細胞の生存と増殖に必要であること、3)その原因が細胞膜からNF-κBへと情報を伝えるシグナル伝達経路上にあるNIKというタンパク質の過剰発現であること、4)その現象は血液細胞のがんに限らず肺がんや卵巣がんなどウイルスが関係していないと考えられるがんでも起こること、などを明らかにしました。NF-κBが活性化するとがん細胞の増殖が促進されたり、抗がん剤が効かなくなったり、浸潤や転移といった生命を脅かす現象が起こりやすくなることがわかっています。NF-κBを活性化する原因となっているNIKはマウスが生まれてくる過程で免疫機能の発達に重要な役割を果たしていることが報告されているので、ヒトでもNIKをがんの治療標的にすると問題が起こる可能性があります。そこで次に、活性化したNF-κBのために異常に多く作られていてがん細胞を助けているタンパク質を見つけ出し、それを治療の標的とすることはできないかという研究をしました。

この研究では、タンパク質に小さな目印(翻訳後修飾)を付けたたり外したりする役割を持つA20というタンパク質に注目しました。A20は、もともと仕組みはわかっていないものの細胞を死にくくすることが知られていて、前述のATL白血病細胞の中ではNF-κB活性化のために異常にたくさんのA20が作られています。がん細胞は、当たり前の事のように(1)増える(2)悪性化する、という特徴を持っています。ただそれだけでは不十分で、さらに(3)死

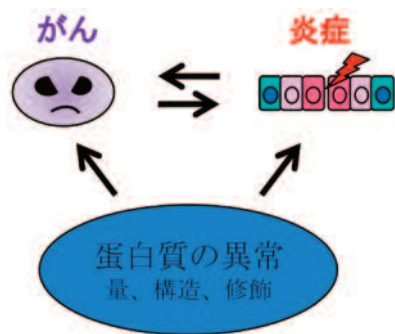
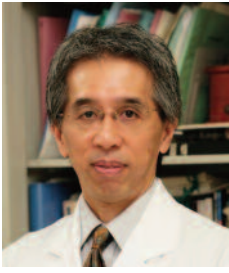


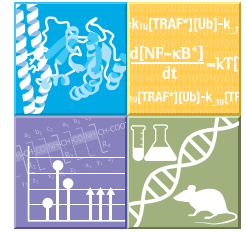
図1: 蛋白質(タンパク質)の異常と病気



東京医科歯科大学大学院 医歯学総合研究科
ウイルス制御学

山岡昇司

1955年 愛媛県生まれ
出身高校：私立愛光高等学校
趣味：スキューバダイビング、オートバイ、料理
研究室 HP: <http://molv.org/>



Protein Modifications in Pathogenic Dysregulation of Signaling

にくい、という特徴を備えていて初めてがん細胞たりうるのです。細胞が本来居るべき場所ではない所に居る時、条件の整っていない環境で増えようとする時、遺伝子に大きな異常が起きた時、細胞では死のプログラムが発動されるようセットされています。ところががん細胞は、その死のプログラムのスイッチを切るために、細胞の死を誘導するシグナルをさまざまな方法で遮断しており、ATL 白血病細胞での A20 の異常発現はその遮断方法の一つと考えられるのです (図2)。なぜなら、研究の結果、白血病細胞で高発現している A20 が細胞死を起こすタンパク質に結合してシグナルを出さないようにしていることや、A20 の発現を下げるだけで細胞に自殺のスイッチが入り増殖が止まることなどが明らかになったからです。

がん細胞の増殖を抑える治療法の飛躍的な進歩にもかかわらず、がんによる死亡者数は増え続けています。これまでのがん治療であまり標的として注目されていなかった「がん細胞がどのようにして生き延びるのか」というしくみが解明されることで、治療が難しいとされている多くのがんに対して有効な治療法の開発に貢献できるのではないかと期待されます。

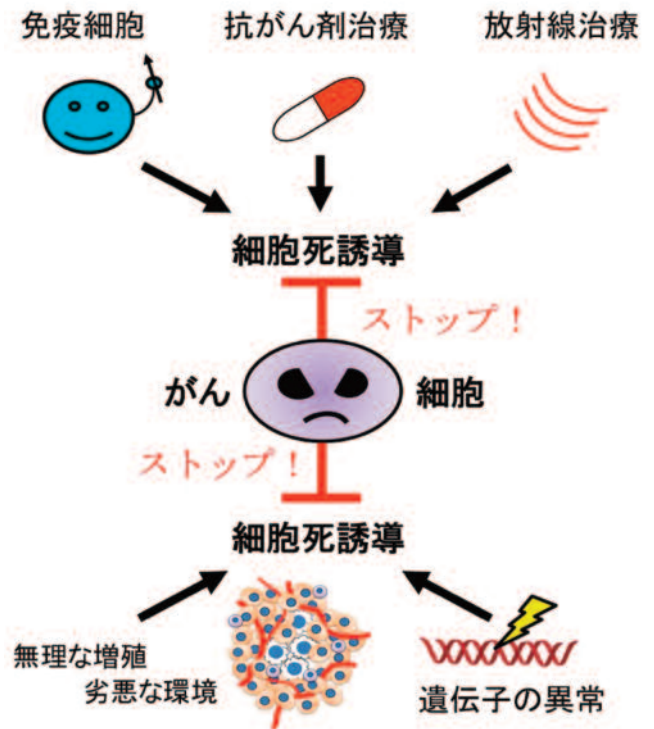


図2：細胞死シグナルをブロックして生存を図るがん細胞

MESSAGE



研究者を目指す若者へのメッセージ

人類の長い歴史を振り返ってみると、ヒトは優れた脳を持ったおかげで文明を発達させ、豊かな食糧を手に入れ感染症など多くの病気を克服して、長生きできるようになりました。その一方で、加齢に伴う病気は大きな社会問題となりつつあります。その代表的なものが人の生死にかかわる「がん」という病気で、毎年患者さんは増え続けています。皆さんの身近な人の中にもがんにかかった方がいらっしゃるのではないのでしょうか。がんは遺伝子の病気と言われて久しいのですが、たったひとつの遺伝子の異常でがんができるわけではありません。遺伝子はタンパク質を作るための暗号です。さまざまなタンパク質がネットワークを構成して細胞を生かし、細胞が集まって臓器を作り、生命を支えています。がんの研究も遺伝子、タンパク質、細胞、臓器、個体のあらゆる段階で進められていて、生命の根源を問う研究であるとも言えます。人類はまだ細胞ひとつ作ることもできませんが、生命という未知の大海を解き明かすための羅針盤は手に入れつつあります。将来を担う若い君たちが生命科学に関心を持って、柔軟な発想をもとに新たな航路を開いてくれることを期待しています。



細胞の情報(シグナル)伝達の理解から疾患の克服へ

「シグナル伝達」システムの代表「MAPキナーゼ経路」

細胞は外界からの様々な刺激を感知して、細胞内にシグナルを伝え、特定の遺伝子の発現量を調節することで外部環境の変化に適応しています。例えば、増殖因子が細胞表面にある受容体に結合すると、受容体から発せられたシグナルは、細胞質を通して核に伝えられ、細胞増殖に必要な遺伝子の発現が誘導されます。この場合、細胞表面からの情報が細胞内を通して核にまで伝わる過程が**シグナル伝達**です。シグナル伝達においては、情報を伝えるべき相手(分子)を選び、正しいタイミングで適切な強さのシグナルを伝える必要があります。このようなシグナル伝達の制御は、「リン酸化」などに代表されるタンパク質の翻訳後修飾によって担われています。

細胞内の情報伝達を担う仕組みの一つとして、**MAPキナーゼ(MAPK)経路**と呼ばれるシグナル伝達経路があります(図1)。MAPK経路は、MAPK、MAPKK、およびMAPKKKという3種類のタンパク質リン酸化酵素(タンパク質をリン酸化する作用を持つ酵素を、総称してキナーゼと呼びます)によ

て構成されるシグナル伝達システムです。増殖因子や、細胞外環境の様々な変化(温度、浸透圧、紫外線や放射線照射など)によって生じたシグナルは、このMAPキナーゼ経路をMAPKKK-MAPKK-MAPKの順に伝わって行き、最終的に様々な遺伝子の発現量を変化させたり、別のタンパク質の機能を変化させたりします。このことによって細胞の増殖、分化、死などが適切に制御されています。この様にMAPキナーゼ経路は、細胞内情報伝達の根幹をなすシステムであり、細胞の運命を決定づける働きをしています。これまでにMAPキナーゼ経路の情報伝達には、翻訳後修飾の一種であるタンパク質のリン酸化が重要であることが明らかにされてきました。即ち、MAPKKKがMAPKKをリン酸化して活性化し、さらに活性化されたMAPKKがMAPKをリン酸化して活性化するのです。また、活性化されたMAPKは、その一部が核内に移行して様々な転写因子をリン酸化し、その転写能を変化させて多彩な遺伝子の発現を調節します。即ち、リン酸化は、蛋白質の機能を制御するスイッチとして働いています。

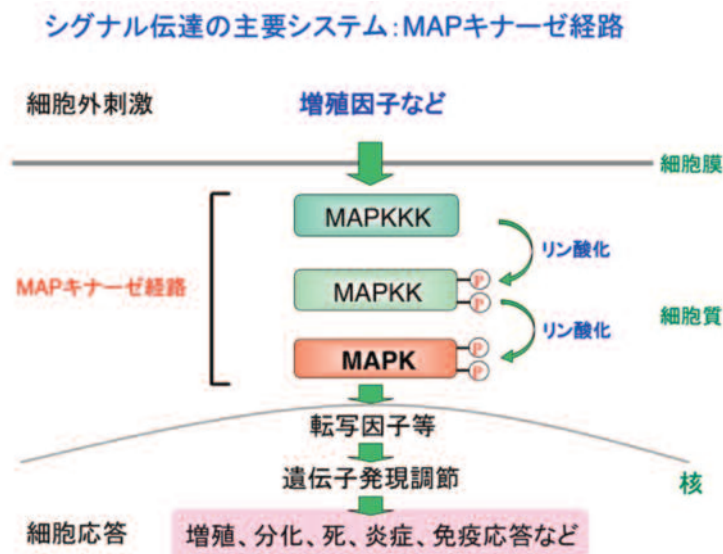


図1：MAPキナーゼ経路は3種類のリン酸化酵素で構成されている



東京大学 医科学研究所
分子シグナル制御分野

武川睦寛

1964年 東京都生まれ、札幌育ち
出身高校：北海道立札幌南高等学校
趣味：音楽鑑賞、ギター演奏

研究室 HP: <http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/dcsmm/DCSMM/Top.html>



ヒトMAPキナーゼ経路と疾患

MAPキナーゼ経路は、酵母からヒトに至るすべての真核細胞に共通して存在するシグナル伝達システムですが、ヒトの細胞内には、機能の異なる少なくとも3種類のMAPキナーゼ経路(ERK経路、p38経路、JNK経路)が存在することが知られています(図2)。

• **ERK経路**：主に増殖因子によって活性化され、細胞増殖や分化を制御しています。ERK経路を活性化する機能を持つ増殖因子受容体や、Rasなどの分子は癌遺伝子であることが知られており、これらの遺伝子の変異によってERK経路が異常に活性化すると細胞が癌化することが知られています。

• **p38およびJNK経路**：ストレス応答MAPキナーゼ経路とも呼ばれています。紫外線や放射線、オキシダント、熱ショック、高浸透圧など、様々な環境ストレス刺激によって活性化されて、ストレスを被った細胞に死を誘導します。また、ウイルスなどの病原体の感染によっても強く活性化されて、炎症や免疫応答の調節に中心的な役割を果たしています。

これら複数のMAPキナーゼ経路が正しく制御されることで、人体は健康な状態でいられますが、MAPキナーゼ経路に何らかの異常が起こってしまうと、癌、アレルギー・自己免疫疾患、糖尿病や神経変性疾患などの病気になってしまうことが知られています。従って、MAPキナーゼ経路の活性を調節する薬剤は、癌や関節リウマチなどに対する新たな治療薬となる可能性があり、実際に多くの製薬企業によってMAPキナーゼ経路をターゲットとした薬剤(活性阻害薬など)が開発され、現在、臨床試験が行われています。本学術領域研究において、私達は、MAPキナーゼ経路の活性制御メカニズムと生理機能、および疾病との関連を、特に翻訳後修飾の観点から分子レベルで解き明かし、難病の治療に役立てることを最終的な目標として、研究を行って来ました。その結果、MAPキナーゼ経路の活性制御にSUMO化などの新たな翻訳後修飾が関与することを見出すと共に、この経路の制御に関わる複数の新規分子を同定することに成功しました。さらに、MAPキナーゼ経路の制御異常と疾病(癌や神経変性疾患など)との関わりを明らかにしました。

ヒトMAPキナーゼ経路と疾患

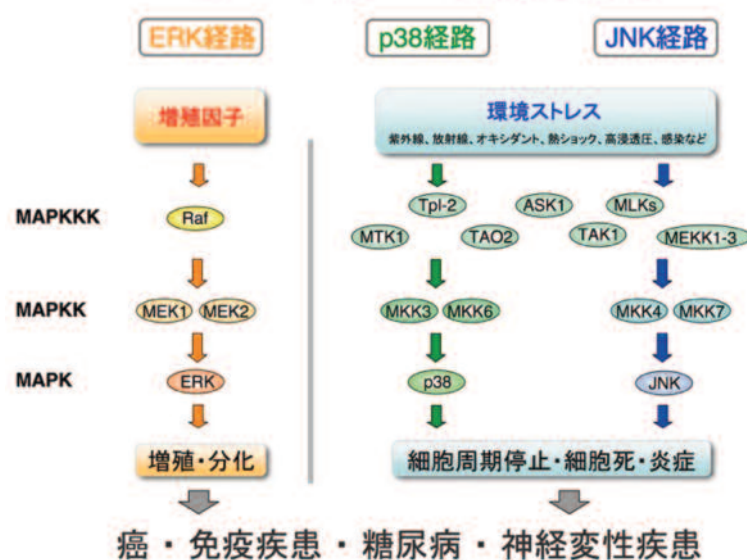


図2：3種類のヒトMAPキナーゼ経路

1) SUMO化によるERK経路の活性制御と 癌におけるその破綻

上述のように、ERKはリン酸化されることでキナーゼ活性が“ON”になりますが、このリン酸化を担うキナーゼが“MEK”です。本研究で私達は、MEKが、SUMOと呼ばれる小さなタンパク質に結合するとキナーゼ活性がoffになり、細胞増殖と癌化が抑制されることを見出しました。さらに、癌細胞では、変異したRasというタンパク質がMEKからSUMOを取り去ることで、MEKのキナーゼ活性を亢進させて、ERK経路を強力に活性化し、癌化を促進していることを見出しました (*Nat. Cell Biol.*, 2011)。

2) ERKによってリン酸化される新規タンパク質 MCRIP1の同定と、癌転移促進機構の解明

上述の様に、ERKの異常な活性化は、細胞を癌化させたり、癌の浸潤や転移を導くことが知られています。このメカニズムを解明するため、私達は、ERKによってリン酸化されるタンパク質の網羅的同定を行い、これまでに全く報告の無い新たな分子(MCRIP1と命名)を発見することに成功しました。更に、MCRIP1の生理機能の解析を行い、MCRIP1が、癌抑制遺伝子として知られるE-カドヘリンの発現制御に重要な役割を果たしていることを見出しました(図3)。E-カドヘリンは、皮膚や粘膜(腸管や気管などの表面)を構成する細胞(上皮細胞)に発現している分子であり、細胞同士を強固に繋ぎ止めることで細胞を動かない様にしてしている分子です。刺激の無い状態で、MCRIP1はE-カドヘリンの発現を維持する機能を持っていますが、増殖因子などによってERKが活性化

すると、MCRIP1がリン酸化されてその機能を失い、E-カドヘリンの発現が消失することを見出しました。さらに、癌細胞内で強く活性化したERKが、MCRIP1を強くリン酸化することで、E-カドヘリンの合成が停止し、その結果、癌細胞が自由に移動できるようになり、周囲の組織に浸潤したり、遠隔転移したりすることを突き止めました (*Mol. Cell*, 2015)。

3) ストレス応答MAPK (p38/JNK) 経路による 中心体複製制御

細胞は分裂する際に、遺伝情報を次世代へと正確に伝達するため、自身の染色体を2つの娘細胞に均等に分配しています。このプロセスには“中心体”という小さな細胞内構造物が関与することが知られています。中心体は通常、分裂期の細胞内に2つ存在していますが、その数が異常に増加すると染色体が均等に分配されず、癌化の引き金になることが明らかになっています。興味深い事に、癌細胞では、紫外線や放射線などの様々なストレス刺激に反応して、中心体の数が異常に増加することが報告されており、また中心体数の異常が染色体の異常を招いて癌が更に悪性化し、患者の寿命を縮めてしまうことも示されています。一方、正常な細胞では中心体数は厳密に制御されており、ストレス環境下でも中心体数の異常は起こりませんが、そのメカニズムに関してはこれまでほとんど分かっていませんでした。本研究で私達は、様々なストレス刺激に反応して活性化される2つの細胞内シグナル伝達経路、即ちストレス応答MAPキナーゼ(p38およびJNK)経路とp53経路が、協調して中心体複製の鍵分子であるPLK4の活

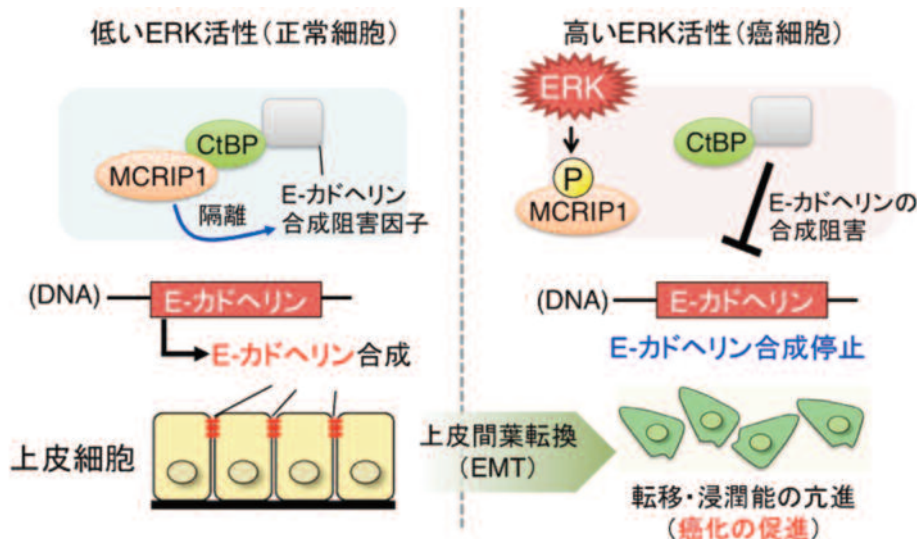


図3：ERKおよびMCRIP1によるがん転移の促進

性を調節しており、ストレス環境下で中心体数が異常に増加するのを防ぎ、発癌を抑制していることを見出しました(図4)。また、様々な癌細胞において、p53とストレス応答MAPキナーゼ経路が共に失活しており、その結果、中心体数が異常に増加して癌の悪性化が導かれていることを示しました(*Nat. Commun.*, 2013)。

4) ストレス顆粒 (SG) の形成機構と疾患における形成異常の解明

細胞は生存を脅かす様々なストレス(異常タンパク質の蓄積、低酸素、ウイルス感染、熱ショックなど)を感知すると、その状況から回復する時間を確保するため、「ストレス顆粒(SG)」と呼ばれる構造体を形成して、タンパク質の合成を一時的に停止します。今回、私たちはストレス刺激に応答して形成されるSGのふるまいを数式で表現(数理モデル化)し、SG形成のメカニズムを詳細に解析しました。その結果、TIA1というタンパク質の集合と、その細胞内輸送がSG形成の基本原理であることを見出しました(*PLoS Comp. Biol.* 2015)。また、SGの形成異常と疾患との関連についても研究を行い、TIA1が活性酸素によって酸化されるとSG形成が妨げられることを発見し、さ

らにこのことが、神経変性疾患(アルツハイマー病など)で認められる神経細胞死の一因となることを見出しました(*Nat. Commun.*, 2016)。

5) 細胞内でMAPキナーゼ(ERK、p38、JNK)活性を可視化する手法の開発、および炎症応答に重要なp38活性化リズムの発見

細胞増殖を担うERK、そしてストレス応答を担うp38及びJNKは、外部刺激に応答して活性化され、様々なタンパク質をリン酸化することで、多彩な細胞機能を制御しています。しかしながらこれまで、各MAPキナーゼ分子が、細胞内のどの場所で、また、どのようなタイミングで活性化されているのか、その詳細な挙動を追うことは困難でした。私達は、これらのMAPキナーゼ分子の活性化を、生きた細胞内で可視化し追跡できる、画期的な観察システムを開発しました(*Sci. Signal.*, 2012)。またこのシステムを用いて、実際にp38の活性化を観察したところ、炎症反応の際に起こるp38の活性化は規則的に“振動”しており、活性化と不活性化が周期的に繰り返されていることを見出しました。さらにこの振動現象が、炎症や免疫応答を増強する合図になっていることを明らかにしました(*Nat. Commun.*, 2015)。

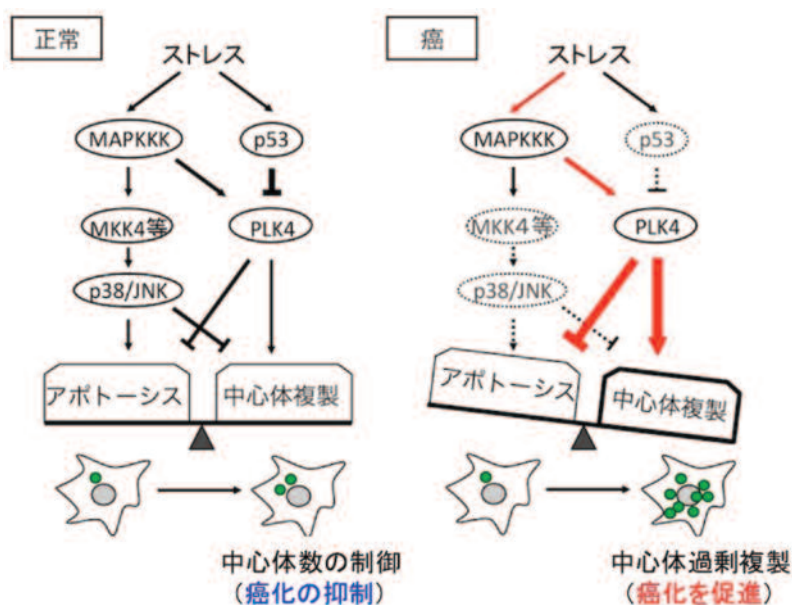


図4: MKK4とp53による中心体数の調節とその異常による細胞の癌化

研究者を目指す若者へのメッセージ

MAPキナーゼ経路は、生命活動の根幹を担う情報伝達経路であり、その異常が癌、アレルギー・自己免疫疾患、糖尿病や神経変性疾患などの病気の原因となることが示されています。現状では、これらの疾患の多くが不治の病ですが、MAPキナーゼ経路を始めとする細胞内シグナル伝達機構の基礎研究を通して、これら難治性疾患の発症メカニズムを分子レベルで解き明かし、新たな治療法や予防法の開発に発展させていきたいと考えています。



細胞の動きを制御するタンパク質「ガーディン」の発見

ヒトの体は数十兆個の細胞から構成されていると考えられています。その1つ1つの細胞が特有の機能を有しており、神経系や血管系、あるいは心臓、肝臓、腎臓といった臓器を作ることにより、体の正常な営みに重要な役割を果たしています。ヒトの体が正常につくりだされるためには、発生の過程で個々の細胞がその役割を果たす部位に正常に動いていかなければなりません。

では細胞の動きに異常がおきると私たちの体にどのような異変が生じるのでしょうか。一番よく知られていることは、がん細胞の「転移」という現象だと思えます。がん細胞が恐ろしいのは、非常に高い運動能力を獲得し、体の中を動き回ることができることにあります。がんの治療を考える上で、がん細胞の運動能力を抑えられる薬剤を作ることができれば、がんの転移を抑えられることとなります。そのためには、がん細胞が運動能力を獲得するメカニズムを解明するということが重要になります。

私たちの研究室では「なぜがん細胞の運動能力が高まるか」というテーマで研究を進めています。その研究の中から2005年にがん細胞の転移に重要な役割を果たす「ガーディン (Girdin)」と名付けた新しい

タンパク質を発見しました(図1、図2)。ガーディンはアクチン線維と呼ばれる細胞の動きに関与するタンパク質(細胞骨格とも呼ばれる)と結合することにより、がん細胞の運動能力を制御していることがわかりました。ガーディンは単独では機能を発揮することができず、アクチン線維の他に多くのタンパク質と協力して細胞の運動を調節しています(図2)。

私たちの研究によりガーディンをがん細胞からなくすと、がん細胞はほとんど動けなくなりました。肺への転移能力が非常に高いヒトの乳がん細胞をマウスの皮下に接種すると肺に高率に転移します。このがん細胞からガーディンをなくすと、肺への転移能力が著しく低下することもわかりました。また脳腫瘍においては、ガーディンが多く存在すると脳腫瘍細胞の悪性度を高め(図3)、脳内に腫瘍細胞が広がりやすくしていることを明らかにしました。さらに興味深いことに、ガーディンは「脳腫瘍幹細胞」と呼ばれる腫瘍細胞の親玉の生存や維持にも重要であることがわかってきました。現在、ガーディンを標的にしたがん治療法の開発ができないか検討を進めているところです。



図1：2005年9月6日読売新聞掲載記事

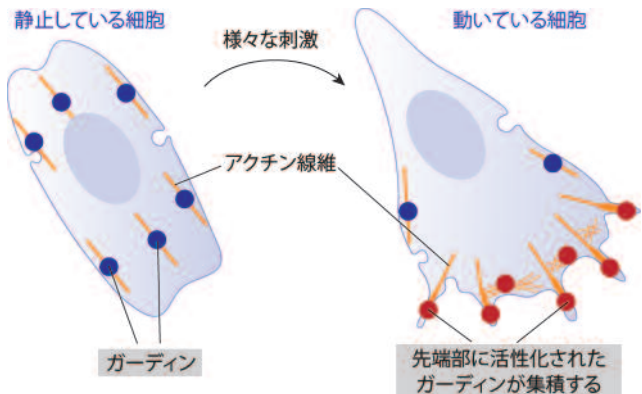


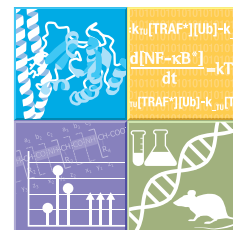
図2：ガーディンによるがん細胞の運動の調節のしくみ。ガーディン(青丸)は細胞骨格であるアクチン線維(橙色)と協力して細胞の形や動きを調節する。ガーディンが細胞の中で活性化されると(赤丸)、細胞の先端部に集積して前方方向への運動を促進することが解明されている。



名古屋大学大学院 医学系研究科
分子病理学

高橋雅英

1954年岐阜県生まれ
出身高校：私立東海高校
趣味：妻と二人で映画鑑賞、観劇
研究室 HP: <http://www.med.nagoya-u.ac.jp/patho2/>



Protein Modifications in
Pathogenic Dysregulation of
Signaling

また、ガーディンは神経や血管の形成にも重要な役割をはたしていることが明らかになってきました。神経細胞は成人の脳では新たに生まれないと以前は考えられていました。近年の研究により、成人の脳においても海馬や脳室周囲では神経細胞が生まれていることが示され、注目されています。私たちはこれらの新たに生まれた神経細胞が脳内の適切な位置に移動する際にガーディンが重要な役割を果たしていることを明らかにしました。海馬は記憶の形成に重要な脳の構造ですが、マウスを用いた実験により、ガーディンが正常に機能しないと海馬神経細胞の形態に異常が生じ、記憶障害を引き起こすことを証明しました。

海馬ではガーディンが DISC1 (Disrupted-In-Schizophrenia 1) と呼ばれるタンパク質とも協力して神経細胞の適切な位置の決定に関わっていることがわかってきました。DISC1 は統合失調症やうつ病などの精神疾患の発症に関わるタンパク質であり、ガーデ

インの異常が精神疾患と関連がある可能性も指摘されています。さらに、海馬の機能異常はてんかん発作と関連することがよく知られていますが、ガーディンの機能異常を有するマウスでは海馬を構成する神経細胞の配列に乱れが生じ、高率にてんかん発作が生じることも分かりました。したがって、私たちのグループが作製したガーディンの機能障害を有するマウスは精神疾患やてんかんのモデル動物として有用であり、新たな治療薬開発に活用できると考えています。

一方、目の網膜の血管は糖尿病性網膜症や未熟児網膜症などで異常な増殖を示し、失明など重篤な障害を引き起こします。ガーディンは網膜などにおける血管の形成、特に病的な血管の形成に関わっています。ガーディンの機能を低下させる薬を開発することにより、網膜症などの血管に異常を生じる病気の治療にも貢献したいと思っています。

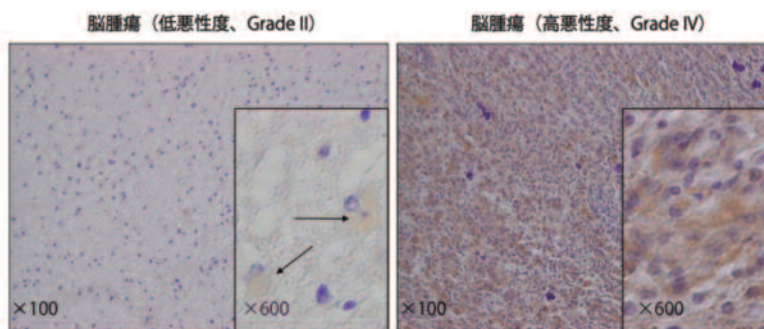


図3：悪性度の高い脳腫瘍においてガーディンが検出される。
ガーディンは悪性度の高い脳腫瘍（右、Grade IV）で存在する（茶色に染まる）が、悪性度の低い脳腫瘍（左、Grade II）では存在しない。
100倍(×100)および600倍(×600)の顕微鏡写真。

MESSAGE



研究者を目指す若者へのメッセージ

病気の発症にはさまざまな分子、要因が関わり、病気の生じるメカニズムの解明は容易ではありません。しかし、多くの研究者がそれぞれのアイデアに基づき試行錯誤を繰り返しながら研究することにより、意外なところから新しい治療法の開発につながる画期的な発見が生み出されることも歴史的な事実です。これからも若い人たちがサイエンスの世界に大きな関心を持ち、国際的に活躍する有能な人材が日本から勇躍して行ってほしいと思います。そのために私たちも魅力的な研究ができるよう、さらに努力を積み重ねていきます。



タンパク質が織り成す細胞内情報伝達ネットワークの全貌に迫る

～プロテオミクスが解き明かす生命システムの複雑な仕組み～

皆さんはタンパク質という生体物質の名前を学校の授業のみならず、日常の色々な場面で耳にしたことがあると思います。タンパク質は生体の重要な構成成分のひとつで、がん、脳疾患、感染症といった病気の多くは、タンパク質の働きの異常が原因となって引き起こされます。人間の体はおよそ60兆個の細胞からできていると言われていますが、その細胞一つ一つの中に数万から数十万種類にも及ぶタンパク質が存在し、生命活動を支えています。そのタンパク質の一揃いのセットのことをプロテオームと呼び、遺伝子の全体像であるゲノムの解読に続き、プロテオームの解析（プロテオミクス）が急速に進められるようになってきています。

プロテオミクスは新しい学問分野ですので、初めて耳にした人も多いのではないかと思います。ここでは最先端のプロテオミクス研究の現場でどのようなことが行われているのか、実際の様子を簡単にご紹介したいと思います。

プロテオミクスの研究は、主にタンパク質サンプルの調製（ウェット）とコンピューターによる解析（ドライ）という2つの過程から成り立っています。

ウェットの過程では、まず様々な試薬を用いて細胞から調べたいタンパク質を取り出します。病気に関係するタンパク質は非常に微量であることが多いため、実験をする人や実験器具に付着しているわずかな汚れやほこりが混入しないよう、実験作業は慎重に行われます（図1）。分離したタンパク質は、測定を行いやすいように分解酵素によって短い断片（ペプチド）にし、質量分析計と呼ばれる装置を用いて測定します（図2）。

最先端の質量分析計には、サンプルの導入部にナノLC（Nano-liquid chromatography）と呼ばれる超微量分離装置が設置されており、一つのサンプルから数千～数万種類のペプチドを検出することができます。ドライの過程では、得られた膨大な測定データを基に、どのようなタンパク質がサンプル中に存在しているか、ソフトウェアを用いて一網打尽に解析します。近年の測定・解析技術の飛躍的な進歩によって、今までの分析法では解析が困難であった多くの微量タンパク質の存在が分かるようになってきました。



図1：プロテオミクス研究では実験者や実験器具に付着しているわずかな汚れやほこりが混入しないよう細心の注意を払う。



図2：ペプチドの構造を解明する最先端の質量分析装置



東京大学 医科学研究所
疾患プロテオミクスラボラトリー

尾山大明

1974年 千葉県生まれ
出身高校：私立開成高等学校
趣味：乗馬、野球観戦、金魚の世話
研究室 HP: <http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/mpl/top.html>



このような新しい先端分析技術が生命科学・医学の分野でどのような発見に貢献しているのでしょうか？私たちの研究グループが行った実際の研究例を以下でご紹介したいと思います。

タンパク質が実際に細胞の中で機能を果たす時は、多くの場合複数のタンパク質が結合した状態（複合体と呼びます）で存在していますが、様々な生命現象ごとに全く異なる構成をしています。そこで、調べたいタンパク質を捕まえることができる抗体と呼ばれる物質を用いて、微量のタンパク質複合体を集めて測定用に精製します。私たちはこの研究グループでの活動において、がん化に関わることが知られている I κ B キナーゼ (IKK) 複合体を構成する重要なタンパク質として p47 という名前のタンパク質を新たに発見することができました。

タンパク質は細胞の核にある DNA からメッセージ RNA として転写された配列情報をもとに合成されます（この過程を翻訳と呼びます）が、ほとんどのタンパク質はこのままでは「未成熟」な状態で、一人前になるために言えば仕事用の「部品」を装着して実際に機能を果たします。この部品を装着する過

程を翻訳後修飾と呼んでいます。

翻訳後修飾には、リン酸化をはじめとしてユビキチン化、グリコシル化などの様々な種類の「部品」があることが知られていて、細胞の増殖や分化、アポトーシスなど様々な生命現象において重要な役割を果たすことが知られています。私たちの研究では、生物の睡眠・覚醒リズムに関与することが知られている CRY タンパク質がユビキチン化修飾を受け、体内時計の調節に関わることを見出すことに成功しました。



施設見学に訪れてくれた中高校生に研究紹介をする筆者。最先端の分析装置を前に様々な質問が飛び交います。

MESSAGE



研究者を目指す若者へのメッセージ

私たちがこの研究グループで進めてきた高感度・高精度なプロテオミクス解析システムの確立によって、今まで遅々として進まなかった生体内の微量タンパク質やその翻訳後修飾に関する精密な解析を網羅的に行うことができるようになりました。細胞内の無数のタンパク質が織り成す様々な生命現象を複雑なシステムとして理解し、その破綻によって生じる様々な病気に対する治療法の開発を理論的に進める時代がそこまで迫っています。新しい学問分野の発展には、柔軟な着想を持つ若い皆さんの力が必要不可欠です。先端技術を駆使したこれからの新しい生命科学・医学の進展に向けて、次の世代を担う皆さんの参加を心から期待しています。



タンパク質の形から 生命の謎を解く

我々人間の体は細胞からできており、細胞はさまざまな成分からできています。なかでも、タンパク質と酵素は多くの生命現象において重要な役割を果たしています。細胞の中で働くタンパク質は何万種類も存在しますが、タンパク質は、20種類のアミノ酸が数珠状につながったもので、どのアミノ酸がどのような順番でつながられてタンパク質が作られるかは、生命の設計図であるゲノムによって決まっています。そしてタンパク質は、最終的には、その並びに応じて複雑に折り畳まり、それぞれに独自の形をとりますが、この独自の形（立体構造）は、タンパク質や酵素が働く（機能を発揮する）うえで非常に重要です。そのため、細胞の活動の鍵となるタンパク質の構造と機能を解明することは、生命のしくみを理解する上で非常に重要となっています。

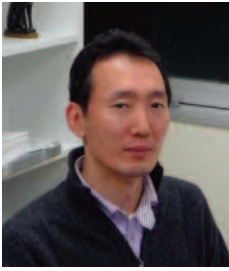
特に、細胞の中のタンパク質は単独で働いているわけではなく、さまざまなタンパク質が相互に結合したり、離れたりとすることで、様々な命令(シグナル)を伝え合うことで機能を発揮しています。また最近、タンパク質には、「目印」のようなもの（翻訳後修飾）がつけられ、この目印が、この命令の伝わり方などのタンパク質の機能が大きく変化させ、タンパク質が生命を支えていくうえで非常に重要であることが分かってきました（図1）。また、この目印には非常に多くの種類があり、さらに、目印は適当につけられているわけではなく、必要な時に、必要な場所にだけに、規則正しくつけられていることや、このような目印は必要に応じて取り除かれることも分かってきました。

一方、多くの病気は細胞の活動の不調に由来しています。特に、先に説明した細胞の命令（シグナル）とタンパク質の目印（翻訳後修飾）に関係するものには、その働きの異常が、ガンなどの病気の原因となっている場合が多いことが分かってきました。例えば、目印をつける役割を持つ酵素が暴走し、不必要に目印をつけるようになってしまった場合や、目印を取り除く役割を持つ酵素が機能できなくなってしまった場合などに細胞のがん化が引き起こされることが知られています。これらのタンパク質の異常を正常にするような薬を作れば、病気の治療を行うことができるかもしれません。そのため、これらのタンパク質の構造と機能を調べることは、生命を理解するだけでなく、病気の治療などに役立てることができると期待されています。

このような命令の伝達する役割を持つタンパク質の形（立体構造）を詳しく調べれば、どのようにして命令がタンパク質の間で伝えられるのか、という謎が解けます。また、これらの謎を解き明かすには、タンパク質同士が相互に結合して、命令を伝えている瞬間をとらえることが必要です。したがって、本研究では、上述の目印がどのように命令の伝達に影響するのか、さらには、どのようにして目印自体がつけられているのかに注目して、タンパク質の立体構造を調べる研究を行いました。特に、著者らのグループではこのような目印（翻訳後修飾）の一種である「ユビキチン」というタンパク質に着目して研究を行いました。このユビキチン修飾を取り除く役割を持つ酵素（脱ユビキチン化酵素）の一つとして A20 という



図1：タンパク質の合成と翻訳後修飾



東京大学大学院 理学系研究科
生物化学専攻

石谷隆一郎

1974年 兵庫県生まれ
出身高校：香川県立丸亀高等学校
趣味：料理, パン作り
研究室 HP: <http://www.nurekilab.net>



酵素が知られていますが、この A20 がユビキチン修飾を取り除くだけではなく、直鎖状ポリユビキチンという特殊なタイプのユビキチンに結合することを明らかにしました。また、A20 が直鎖状ポリユビキチンに結合することで、細胞内のシグナル伝達のうち、NF- κ B (エヌエフカッパービー) と呼ばれる免疫反応に関わるシグナルを抑える役割を持つことを明らかにしました (図 2)。

さらに、A20 がどのようにして直鎖状ポリユビキチンに結合するかを解明するために、A20 と直鎖状ポリユビキチンが結合した状態の分子の立体構造を調べる研究を行いました。一部の B 細胞リンパ腫の

患者さんの細胞では、この A20 に変異が起こり、病気の原因となっている可能性が指摘されています。A20 の変異が起こっている箇所は、A20 とユビキチンが結合する際に、要となる部分に位置していることが、分子の立体構造を調べた結果から明らかになりました (図 3)。すなわち、一部の B 細胞リンパ腫の患者さんの細胞では、変異により A20 のこの要の部分壊されてユビキチンに結合できなくなり、最終的に免疫反応に関わるシグナルを抑えられなくなっている可能性があることが明らかになってきました。このような結果は、最終的に B 細胞リンパ腫の治療法の開発へとつながるものです。

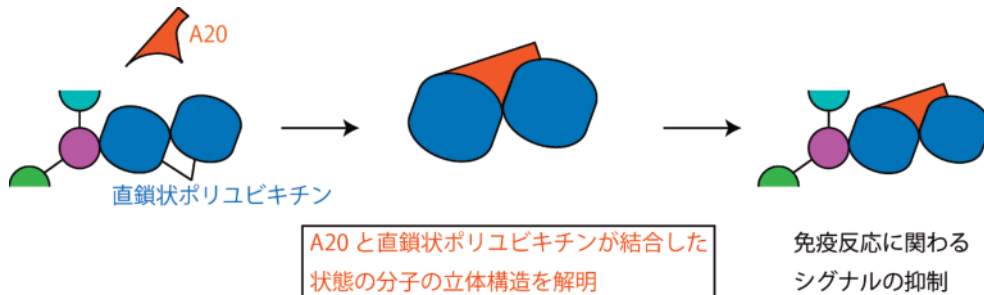


図 2 : A20 と直鎖状ポリユビキチンの結合による免疫反応に関わるシグナル抑制のメカニズム

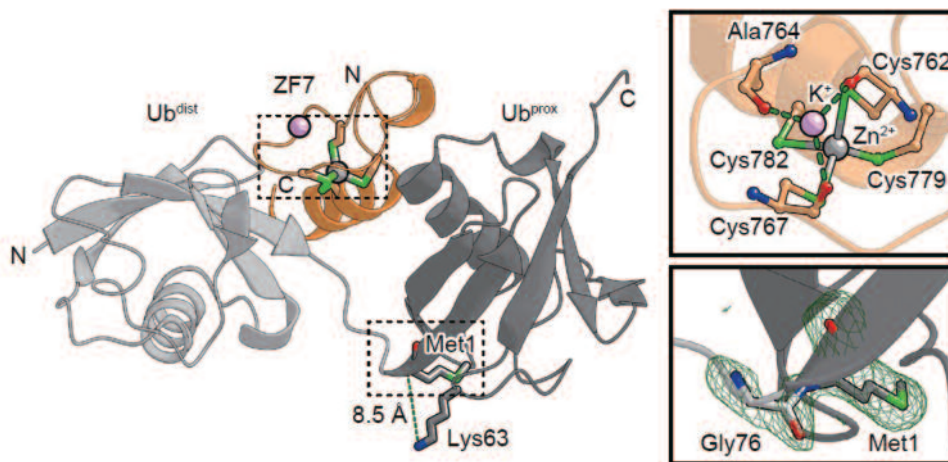


図 3 : A20 と直鎖状ポリユビキチンが結合した状態の分子の立体構造

MESSAGE

研究者という仕事に興味がある人へ

重要な研究題材の解明には大きな困難が伴うことが多いですが、自分が興味をもった題材はへこたれずにつきつめてもらいたいと思います。



コンピュータシミュレーションを使って細胞の秘密を解き明かす

細胞の研究でシミュレーションを使うということはあまり耳にしないかも知れません。でも地球温暖化のシミュレーションや新型インフルエンザの感染拡大のシミュレーションならばテレビなどで見たことがある方も多いのではないのでしょうか。大昔の天気予報は「夕焼けならば明日は晴れる」、のように経験の積み重ねで判断していました。それが観測技術の進歩と共に詳細なデータが集められるようになり、各地で観測したデータを使うことによって、精度が向上した天気予報を出すことができるようになりました。今ではこれが更に発展して、空気や水蒸気の動きをコンピュータで計算することによって天気予報が出されています。これを時間軸で大雑把にまとめれば、経験（夕焼け）→観測（風向・気圧・降雨量などのデータ）→シミュレーション、という流れが見えてきます。

私は細胞についても同じ流れがあると考えています。昔は経験的に薬草を使って傷や病気の治療を行っていました。しかしその後の実験観測技術の進歩によって分析が行われ、効能のある成分がわかり、どの成分をどれくらい与えれば効くのかといったデータが蓄積されました。さらにそれが細胞にどのような影響を与えるのかといったデータが蓄積され、現

在では細胞の中でどのタンパク質とどのタンパク質が相互作用をしているのか、その相互作用が薬の投与によってどのように変化するのかといった膨大なデータが蓄積されつつあります。ところがヒトの場合タンパク質は10万種もあるといわれており、たとえ全てのタンパク質の相互作用ネットワークが完成したとしてもその全体像を記憶できる人はいないでしょう。全体像が把握できなければ、この薬を投与したらどれくらい効くのか、副作用はないのかといったことを知ることは不可能であることは容易に想像できます。ここにコンピュータシミュレーションの出番があります。実験で得られたタンパク相互作用のネットワークをコンピュータの中に入れます。そこに薬剤を仮想的に投与して何が起こるのかということコンピュータで計算することによって予想することができるでしょう（効能予報とでも言えます）。がんやインフルエンザなどは細胞が異常を来たすことに原因があるので、この細胞を正常に戻す方法がシミュレーションで予測できれば治療に結びつきます。このように細胞シミュレーションが完成すれば副作用がなく、かつ効果的な治療を選択することができるようになりますと期待できます。このような期待もあって最近の分子細胞生物学の研究ではシミュレーションの導入が進み、今では実験とシミュレーシ

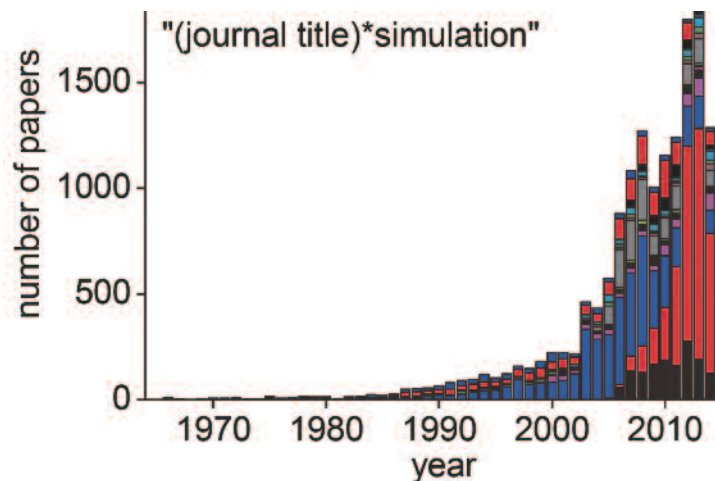


図1：分子細胞生物学関連のシミュレーション論文数



東京大学 医科学研究所
腫瘍数理分野

市川一寿

1950年 東京都生まれ

出身高校：東京都立新宿高等学校

趣味：音楽（全ジャンル）、近代史

HP: <http://tc-simulations.com/homepage/>



ンの共同研究が年間 2,000 本の論文が出されています（図 1）。シミュレーション関連専門誌に掲載されたシミュレーション単独の論文を含めると、これをはるかに上回る数（おそらく 10,000 本以上）になると思われます。

しかし、細胞シミュレーションの完成までは、まだまだ遠い道のりです。とにかく膨大な種類のタンパク質のネットワークですから、相互作用の種類がどれくらいになるのかの想像もつきません。これに対処する一つの方法は相互作用ネットワークを部分に分割してビルディングブロックとし、それを組み合わせて全体の構築に向かってゆく、というやり方です。これまでのタンパク質相互作用シミュレーションの全てが、全体の一部を切り出した部分のシミュレーションです。しかしこれでも生命科学へ貢献することができ、数値シミュレーションによっておぼろげな考えを確認して知識を確実なものにしたり、観測された現象に対して可能性あるメカニズムを与えたり、あるいはまだ観測されていない現象を予言したり、といったことがなされてきました。これらの研究はもちろん細胞シミュレーションの究極的目標に向かったものですが、それと同時にたくさんある可能性の中から方向を絞り込むことができるので実験を行うときの目安にな

り、実験研究と共同して生命科学を進めることができるといった効用もあります。

この研究グループで私たちは、シミュレーションによって細胞生物学の研究を行ってきました。研究は、1) 遺伝子発現プロファイルを制御する転写因子 NF-κB タンパク質がどのようなメカニズムでコントロールされるのか、2) がん浸潤の初期において根本的に重要なメカニズムは何で、どうすれば浸潤（ひいては転移）を防ぐことができるのか、3) 外部からの様々なストレスを受ける細胞の運命を決定する「ストレス顆粒 (SG)」の形成はどのように制御されるのか、などを対象にしました。私たちのシミュレーション研究の特徴は、細胞を点としてではなく、3次元に広がる実体として扱うことにあり（4D シミュレーション）、これによって今まで明らかにされなかった多くのことを明らかにし、予言を行い、それを実験で検証することができました（図 2）。

少し詳しく 1) ~3) の研究を紹介しましょう。まず 1) ですが、NF-κB は細胞外部から継続的な刺激を受けると細胞質から核へ、核から細胞質へと存在場所を繰り返して変え、核の NF-κB 量を観測すると振動することが分かっています。この振動パターン（周波数や継続性）は、遺伝子の発現プロファイルを決定

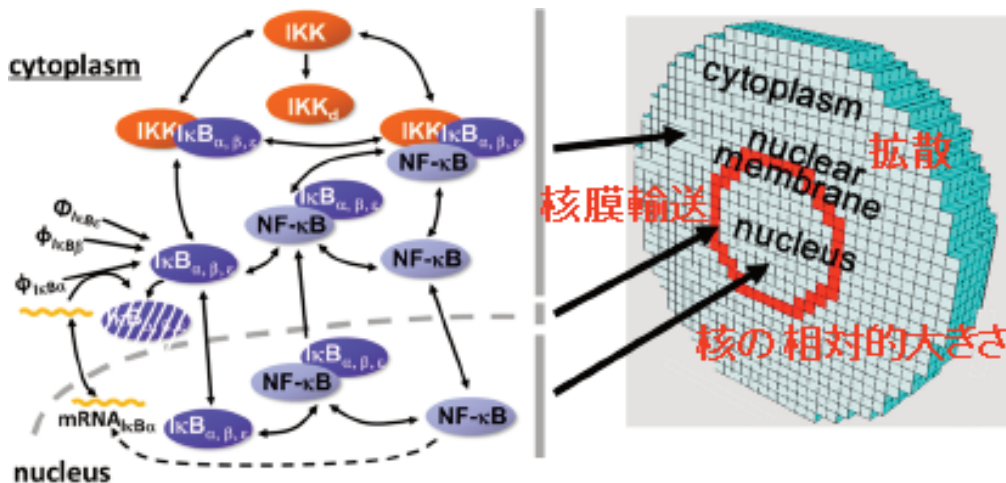


図2-1) NF-κBの新規制御メカニズムの発見：4Dシミュレーションのモデル及び、明らかになった新たなメカニズムと予言（赤字）。

する重要な要因であると考えられています。これまでではパスウェイの中の反応速度定数やタンパク質の濃度などを変化させて、どのパラメータがどのように振動パターンを変化させるのかが調べられていましたが、私たちは空間的に広がりのある球形細胞でシミュレーションを行い、タンパク質の拡散係数、細胞に対する核の相対的大きさ、核膜を通してのタンパク質や mRNA の移動のしやすさなど、空間的なパラメータが振動パターンを強力に制御することを発見しました。このような結果は通常やられているパスウェイシミュレーション（空間的広がりを考えていないので、実際の細胞で起こっている物質の移動や偏りをシミュレーションできません）では決して得ることができず、4D シミュレーションだからこそ明らかにすることができました（図 2-1）。

2) はがんの浸潤に関する研究で、浸潤や転移を抑えれば 90%以上の患者さんが延命するといわれています。浸潤の最初の段階は、MT1-MMP というタンパク質が細胞表面に高濃度に発現して周囲のコラーゲンなどの細胞外タンパク質を分解し、細胞が移動できるスペースを作ることです。そこでまず空間を考えないパスウェイシミュレーションを行ったところ、実験結果と一致する結果を得ました。しかし空間

を考えた 4D シミュレーションを行ったら、実験結果とは全く一致しない結果となりました。これは非常に奇妙なことで、実際により近いシミュレーションを行ったら、むしろ観測とは大きく異なる結果になってしまったわけです。これはなにか本質的なメカニズムが欠落していると考えてシミュレーションでいろいろ調べた結果、MT1-MMP が繰り返して発現しなければならないことが分かりました。しかもその発現頻度を予言することができ、それが我々および他の研究グループによって証明されました。このように、予想外の重要なメカニズムが明らかになった結果、あらたな浸潤抑制の治療ターゲットを提案することができました（図 2-2）。

3) は SG の形成シミュレーションです。SG は熱や薬物などのストレスが細胞に加わると細胞内に形成されますが、その数は数十個です。これだけ数が少ないとタンパク質のように濃度で扱うことができず、一つ一つを区別した粒子シミュレーション（これは必然的に確率的シミュレーションになります）が必要になります。タンパク質も一つ一つを区別した粒子として扱ったシミュレーションを行いました。メカニズムは最小限のものです。それでも実験と非常に良く合致する結果を得たばかりでなく、SG の大き

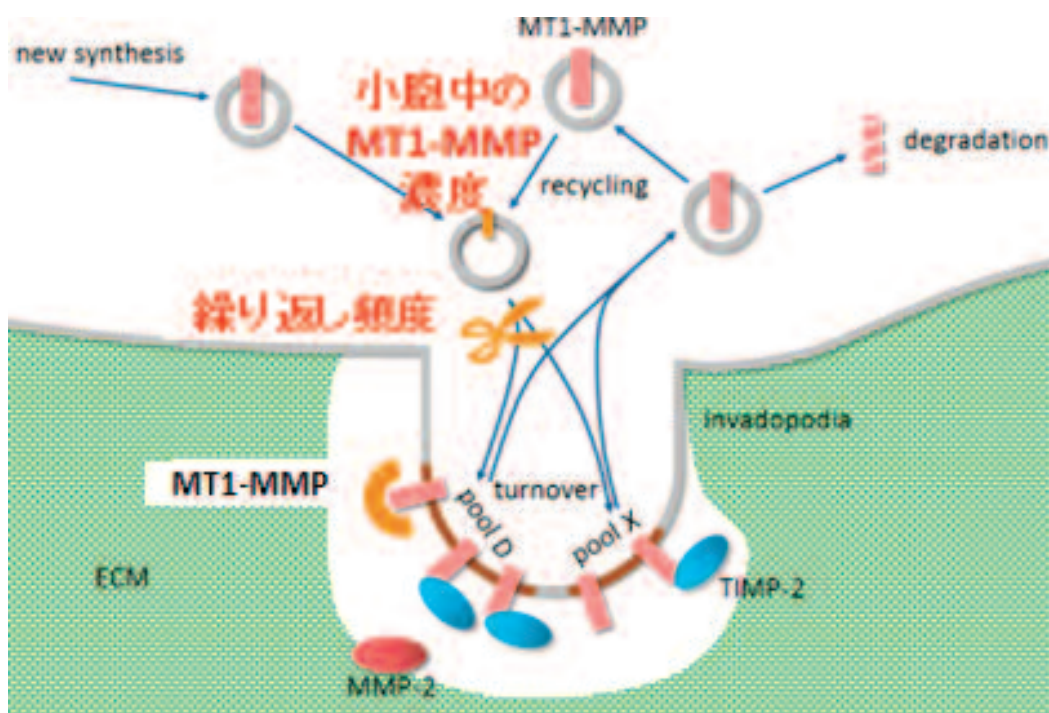


図2-2) がん浸潤抑制の新規メカニズムの発見

さの分布に関しての予言を行うことができ、それを実験的に確認することができました。このように複雑に見えた現象も、実は僅かなメカニズムが本質であることを明らかにすることができました(図2-3)。

すでに述べてはいますが、ここで改めてシミュレーションの役割について考えたいと思います。役割はいくつかありますが、その中で最も重要なものは「予言」です。なぜこれが重要かと言うと、シミュレーションではあらゆるパラメータを変化させてその影響を調べることができるという、有利な点を備えているからです。実験ではそうは行きません。そのタンパク質の濃度を半分にしたらどうなるかを調べた

いと思っても適当な方法がなかったり、たとえあったとしても本当に半分になっているかどうかを調べるのが非常に難しい場合がほとんどです。これに対してシミュレーションでは、コンピュータに与える数値を半分にするだけで済みます。この強みを生かせばシミュレーションではあらゆる影響を調べることができます。それによって、「こうなるはず、こうであるはず」という予言が生まれます。するとそれ的に絞った実験手段を考えることができ、実験的に検証することができます。このようにシミュレーションが実験と協力することによって、実験だけの場合に比べてはるかに効率的に研究を進めることができるのです。

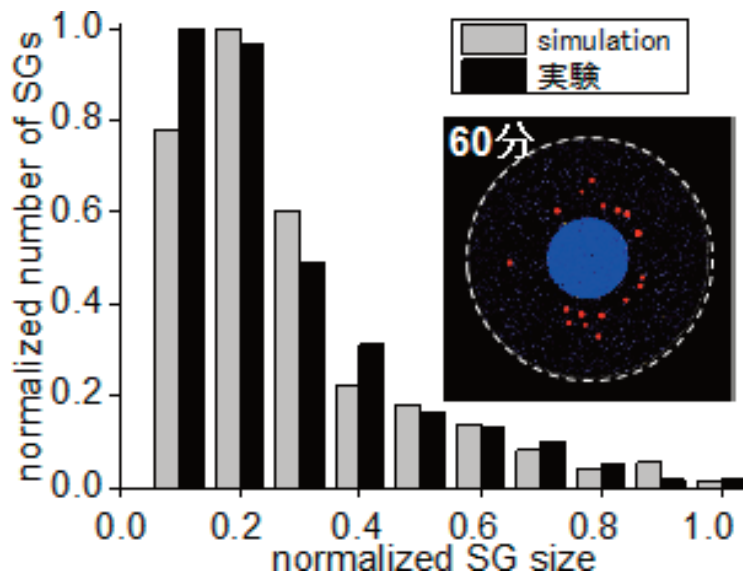


図2-3) SG形成を制御する統合的メカニズムの発見
SG形成の粒子シミュレーションでは、統合的メカニズムを明らかにした。

MESSAGE



研究者を目指す若者へのメッセージ

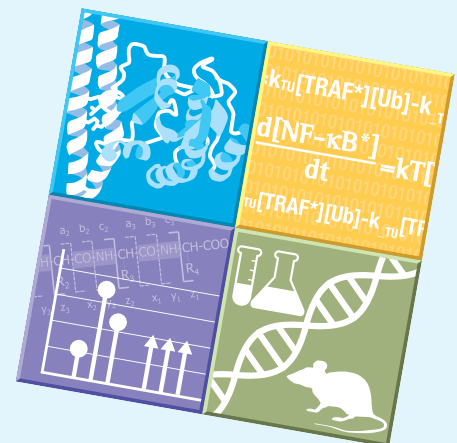
細胞シミュレーションは、実験では発見しにくかったり考えにくかったりする現象とメカニズムを、発見・予言する強力な方法論です。また、複雑極まりない細胞のメカニズムを実験だけで明らかにすることには大きな困難が伴います。シミュレーションはこの困難を取り除く方法論でもあります。もちろんシミュレーションで得られた結果は実験で検証されなければなりません。今後は実験とシミュレーションの垣根が取り払われ、手を携えて研究を進めることになると予想しています。本領域の研究はまさしくその先駆けですが、今後ますますこのような研究スタイルの重要性が増すに違いありません。一方、シミュレーションは方法論として、まだまだ研究すべき点が多く残っているのも事実です。今後若い人たちが細胞シミュレーションに参入し、実験研究と共同して研究を進めることを願って止みません。

専門研究者のため研究成果報告

翻訳後修飾による NF- κ B 活性化シグナルの制御機構と疾患発症との関連.....	28
井上純一郎 東京大学 医科学研究所 分子発癌分野	
直鎖状ポリユビキチン化修飾による新たな NF- κ B 活性化機構と病態との関連.....	31
徳永文稔 群馬大学 生体調節研究所 分子細胞制御分野	
持続的 NF- κ B 活性化メカニズムの解明と疾患.....	33
山岡昇司 東京医科歯科大学大学院 医歯学総合研究科 ウイルス制御学	
SUMO 化及び O-GlcNAc 化による MAP キナーゼ経路の活性制御機構と疾患.....	35
武川陸寛 東京大学 医科学研究所 分子シグナル制御分野	
Akt キナーゼによるアクチン結合蛋白 Girdin のリン酸化修飾と疾患.....	38
高橋雅英 名古屋大学大学院 医学系研究科 分子病理学	
翻訳後修飾やシグナル複合体の微量構成因子に関する高感度・高精度測定系の確立.....	42
尾山大明 東京大学 医科学研究所 疾患プロテオミクスラボラトリー	
蛋白質の翻訳後修飾と細胞内シグナル伝達に関連した因子の構造基盤.....	44
石谷隆一郎 東京大学 理学系研究科 生物化学専攻	
翻訳後修飾によるシグナル伝達制御とその破綻に起因する疾患の数理モデル.....	46
市川一寿 東京大学 医科学研究所 腫瘍数理分野	

中高校生、専門外の皆さんへ

ここから先は専門研究者向けに書いた成果報告文です。読まなくても全く構いません。ただ、もし興味があるなら読んでみてください。内容的には生物系大学院の修士学生になればおおよそ理解できるレベルです。読んでみて疑問点があればその部分を書いた先生にメール等で質問すると良いと思います。冊子前半の皆さん向けの説明文には著者の先生方の研究室の URL が記載されています。そのサイトに行けばメールアドレスがわかるはずです。



翻訳後修飾によるNF- κ B活性化シグナルの制御機構と疾患発症との関連

井上純一郎 東京大学 医科学研究所 分子発癌分野

研究成果のポイント

1. ヒト白血病ウイルスの発がんタンパク質 Tax による NF- κ B 活性化機構を無細胞系で解析し細胞性因子に依存した K63 型ユビキチン鎖の形成が Tax による NF- κ B 活性化に必須であることを明らかにした。
2. 活性化 IKK 複合体に結合するタンパク質として p47 を質量分析により同定し、p47 が NF- κ B 活性化刺激依存的に K63 型あるいは直鎖状ユビキチン化した NEMO をリソゾームに運搬し分解させることで NF- κ B 活性化を負に制御することを明らかにした。
3. 悪性の Triple Negative 乳がんである Basal 型乳がんにおいて、がん幹細胞が NF- κ B によって維持されていることを示し、非がん幹細胞における NF- κ B が NOTCH リガンドである JAG1 を発現誘導しその JAG1 が juxtacrine にがん幹細胞を刺激することがその分子機構であることを明らかにした。
4. ユビキチン編集酵素である A20 は古典的 NF- κ B 経路により発現誘導され古典的経路を負に制御するが、同時に cIAP に結合することで非古典的経路の活性化を誘導することを明らかにした。
5. 悪性の Triple Negative 乳がんにおける NF- κ B の恒常的活性化の標的遺伝子として Tropomodulin 1 (TMOD1) を同定し、TMOD1 が β -Catenin を安定化することで MMP13 を発現誘導しがんの浸潤性を高め *in vivo* でのがんの増殖を促進することを見出した。

主な研究成果の説明

1) ユビキチン鎖を介してNF- κ Bを負に制御するp47タンパク質の同定

(Shibata, Y. *et al. Nat. Commun.* 3:1061 (2012))

NF- κ Bの異常に高い活性化や持続的な活性化が、慢性炎症やがん悪性化など種々の疾患の原因と考えられていることから、NF- κ B活性化シグナルの詳細な制御機構の解明は必須である。特に負の制御はその異常がNF- κ Bの過剰な活性化を誘導するにも関わらずその解明が遅れている。我々は、NF- κ Bの活性化に必須なI κ Bキナーゼ (IKK) 複合体に結合する分子をグループ内の質量分析を担当する尾山と連携して探索し、NF- κ B活性化シグナル依存的にIKK複合体に結合するタンパク質を数種同定した。中でもp47と呼ばれるタンパク質はユビキチン鎖と相互作用するUBAドメインを持つことから興味深い候補因子として解析を進めた。p47の過剰発現はTNF α 刺激で誘導されるNF- κ B活性化を抑制した。逆にp47のノックダウンはTNF α 刺激によるNF- κ B活性化を増強し、IL-8等のNF- κ B標的遺伝子の発現を促

進した。すなわちp47はNF- κ Bの負の制御因子である。IKK複合体の構成因子で、その活性化に必須であるNEMO (NF- κ B essential modulator) は刺激依存的にK63型あるいは直鎖状ユビキチン鎖で翻訳後修飾されるが、p47はUBAドメインを介してユビキチン化NEMOに結合した。リコンビナントのp47とユビキチン鎖の結合を解析したところ、p47はK63型や直鎖型ユビキチン鎖に特異的に結合し、K48型ユビキチン鎖への結合はかなり弱かった。興味あることにNEMOとp47の共発現はNEMOの分解を誘導し、しかもこの分解はプロテアソーム阻害剤では抑制されず、リソゾーム阻害剤で抑制された。また、免疫染色実験では、刺激依存的にNEMOの一部がリソゾームのマーカーであるLamp1と共局在した。以上の実験結果からp47は刺激依存的にユビキチン化されたNEMOをライソゾームに運搬しNEMOのリソゾームでの分解を誘導することでNF- κ Bの活性化を負に制御する分子であると考えられた (図1)。

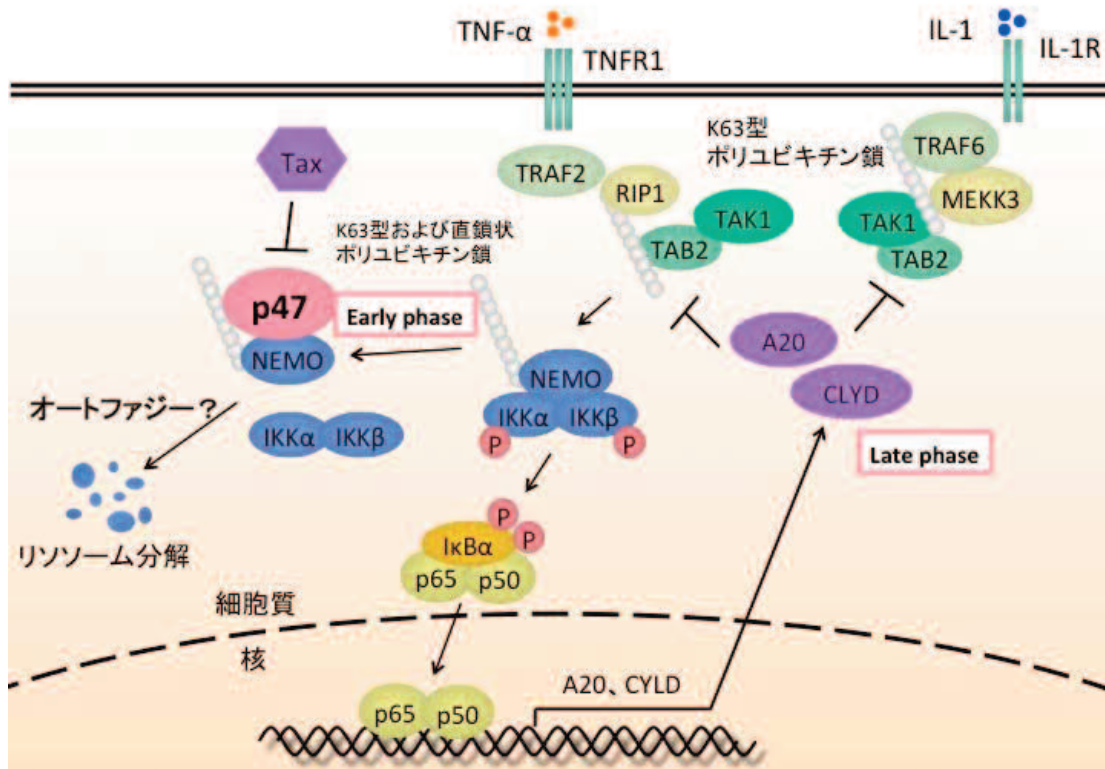


図1：p47によるNF-κB活性化制御機構

2) 乳がんのがん幹細胞の維持における NF-κB の役割説明

(Yamamoto, M. *et al. Nat. Commun.* 4:2299 (2013))

乳がんには、ホルモン療法や抗 ERBB2 抗体 (Herceptin) による治療が有効である病型 (サブタイプ) の他にこれらの治療が無効で予後の悪いトリプルネガティブ (TN) 型乳がんがある。我々は、これまでにこの TN 型乳がんにおいて、他の乳がんに比べて高いレベルの恒常的 NF-κB 活性化が観察されることおよびこの NF-κB 活性化ががん細胞の増殖等を促進していることを報告した (*Cancer Sci.* 2009)。恒常的な NF-κB 活性化が活性化シグナルで鍵となる役割を果たすユビキチン化の異常によることが想定されるため、恒常的 NF-κB 活性化と悪性乳がんとの関連を追求した。まず、恒常的 NF-κB 活性化が腫瘍形成に重要ながん幹細胞の維持にも重要な役割を持つのではと考え、TN 型乳がん細胞株についてがん幹細胞の割合と、恒常的 NF-κB 活性化の強さとの相関を調べたところ、TN 型乳がんの大半を占める Basal 型乳がんにおいて恒常的 NF-κB 活性化の程度とがん幹細胞の割合が正の相関を示すことが分かった。さらに重要な事に、がん幹細胞の割合は NF-κB 活性化を抑制すると減少し、逆に NF-κB 活性化を強めると増加することを見出した。また、共培養実験からがん幹細胞自体の NF-κB 活性化が重要なのではなく、周囲の非幹細胞のがん細胞の NF-κB 活性化が重要であ

ることが明らかとなった。乳がん細胞株の mRNA 発現マイクロアレイの結果及び他の実験結果からがん幹細胞の自己複製に重要と報告されている Notch シグナルのリガンドの 1 つである JAG1 が NF-κB 活性化により非がん幹細胞で発現誘導され、発現した JAG1 ががん幹細胞の Notch を刺激することで幹細胞の自己複製が促進されていることを見出した (図 2)。乳がん幹細胞は薬剤耐性や転移にも関与すると考えられているため、今回見出した乳がん細胞における NF-κB 活性化を介したがん幹細胞の維持機構は発がんだけでなく治療を考える上でも重要だと考えられる。

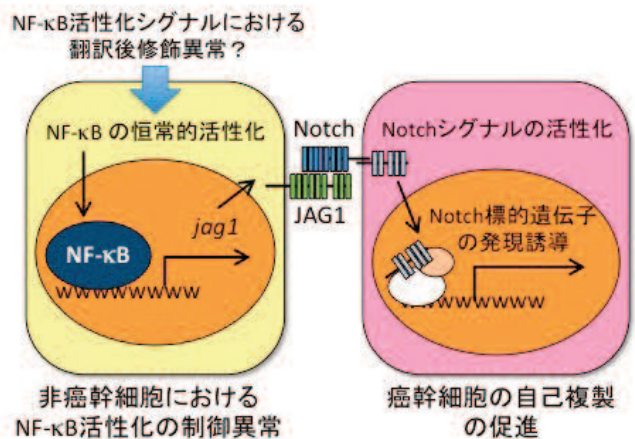


図2：NF-κB 活性化による乳がん・がん幹細胞の維持機構

3) ユビキチン編集酵素A20による非古典的経路の活性化の発見とその分子機構解明

(Yamaguchi, N. *et al. Sci. Rep.* 3, 2568 (2013))

非古典的経路の活性化はNF- κ Bを活性化する受容体の中でも一部の受容体でのみでしか誘導されないが、リンパ器官の形成、B細胞分化や骨代謝制御に必須であり非常に重要なシグナル経路である。しかしながら、古典的経路に比べて刺激後遅延して活性化される点を含めその活性化機構に不明な点が多い。我々はユビキチン編集酵素A20の機能解析の過程でcIAPおよびTRAF2をA20結合タンパク質として同定した。cIAPとTRAF2がいずれも非古典的経路の活性化を担うことからA20の非古典的経路における役割を解析した。非古典的経路の活性化において最初に起こる重要なプロセスはcIAP1/2, TRAF2, TRAF3で構成されるNIKユビキチン連結酵素複合体で誘導されるNIK (NF- κ B-inducing kinase) のプロテアソーム依存的な分解を止めることである。今回我々は古典的経路によって発現誘導されたA20が自身の7番目のZn fingerを介してcIAP1に結合することでNIKユビキチン連結酵素複合体中のTRAF2とTRAF3との結合を阻止しその活性を不活化することでNIKの蓄積を誘導し非古典的経路の活性化をもたらすことを明らかにした。A20が古典的経路で発現誘導された後に古典的経路を抑制するとともに非古典的経路の活性化をすることから、A20が古典的経路から非古典的経路への切替えスイッチの役割を担っているとするモデルを提唱した (図3)。

発表論文リスト

1. Shibata, Y., Oyama, M., Kozuka-Hata, H., Han, X., Tanaka, Y., Gohda, J. and Inoue, J. p47 negatively regulates IKK activation by inducing the lysosomal degradation of polyubiquitinated NEMO. *Nat. Commun.* 3:1061 doi:10.1038/ncomms2068 (2012).
2. Yamamoto, M., Taguchi, Y., Ito-Kureha, T., Semba, K., Yamaguchi, N. and Inoue, J. NF- κ B non-cell-autonomously regulates cancer stem cell populations in the basal-like breast cancer subtype. *Nat. Commun.* 4:2299 doi: 10.1038/ncomms3299 (2013).
3. Yamaguchi, N., Oyama, M., Kozuka-Hata, H. and Inoue, J. Involvement of A20 in the molecular switch that activates the non-canonical NF- κ B pathway. *Sci. Rep.* 3, 2568; DOI:10.1038/srep02568 (2013).
4. Sato, Y., Goto, E., Shibata, Y., Kubota, Y., Yamagata, A., Goto-Ito, S., Kubota, K., Inoue, J., Takekawa, M., Tokunaga, F. and Fukai, S. Structures of CYLD USP with Met1- or Lys63-linked diubiquitin reveal mechanisms for dual specificity. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 22, 222-229 (2015).
5. Ito-Kureha, T., Koshikawa, N., Yamamoto, M., Semba, K., Yamaguchi, N., Yamamoto, T., Seiki, M. and Inoue, J. Tropomodulin 1 expression driven by NF- κ B enhances breast cancer growth. *Cancer Res.* 75, 62-72 (2015).

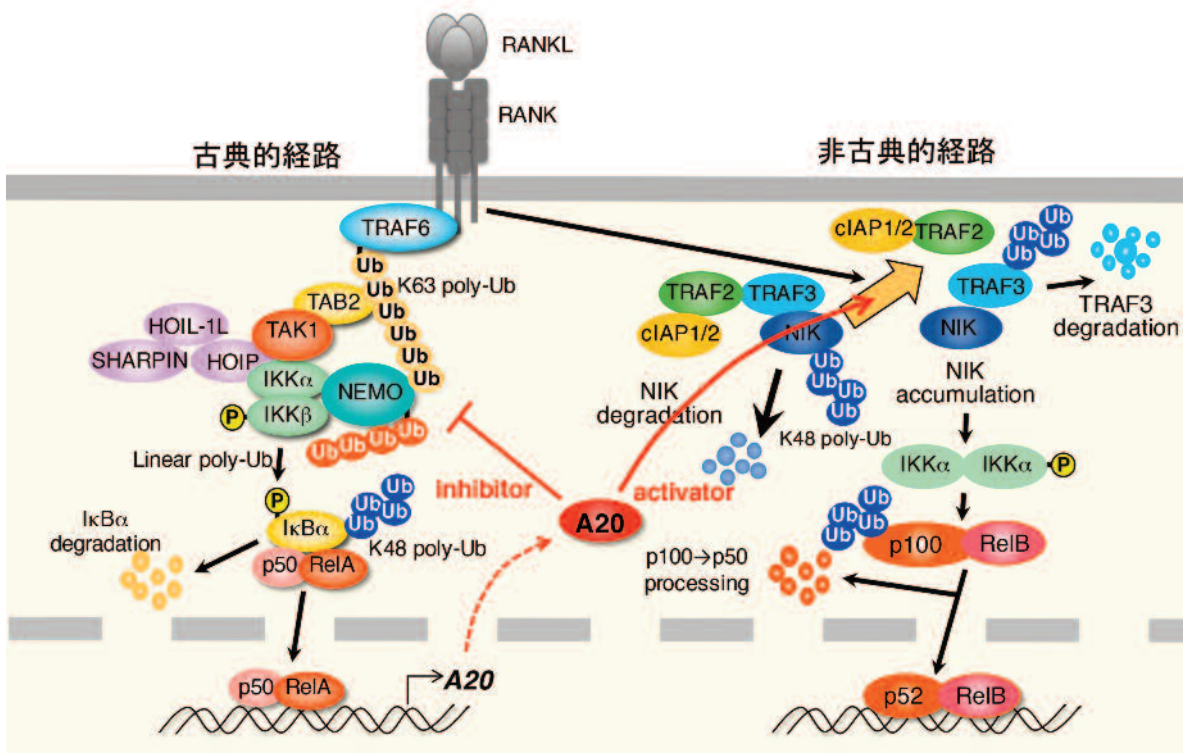


図3: ユビキチン編集酵素A20による非古典的NF- κ B経路の活性化

直鎖状ポリユビキチン化修飾による 新たなNF- κ B活性化機構と病態との関連

徳永文稔

群馬大学 生体調節研究所 分子細胞制御分野

研究成果のポイント

1. 新規直鎖状ユビキチン鎖を生成するユビキチンリガーゼ(LUBAC)の構成サブユニットとして SHARPIN を同定し、SHARPIN 欠損マウスでは NF- κ B 制御が不全になり、皮膚炎を呈することを明らかにした。
2. 領域内共同研究から、LUBAC を制御する脱ユビキチン化酵素 (CYLD と A20) が異なる生理機能で NF- κ B 活性制御に関わることを明らかにした。

主な研究成果の説明

まず、我々はRING型ユビキチンリガーゼのHOIL-1を発見し (Yamanaka K. *et al.*, *Nature Cell Biol.*, 2003)、HOIL-1のスプライシングアイソフォームであるHOIL-1Lとその結合タンパク質 (HOIP) が高分子量複合体 (LUBAC) を形成することで、ユビキチンのN末端 α -アミノ基を介する「直鎖状ポリユビキチン鎖」を生成することを見いだした (Kirisako T. *et al.*, *EMBO J.*, 2006)。当時、ポリユビキチン鎖は、ユビキチン分子内に存在する7つのLys残基のいずれかを介してイソペプチド結合で連結されるといわれていたが、LUBACはペプチド結合で連結された直鎖状ユビキチン鎖という全く新しいタイプのユビキチン鎖を形成した。さらに我々は、LUBACがIkBキナーゼ (IKK) の制御サブユニットであるNEMO (NF- κ B essential modulator) を直鎖状ポリユビキ

チン化することでNF- κ B経路を特異的に活性化することを世界に先駆けて報告した (図1a, b) (Tokunaga F. *et al.*, *Nature Cell Biol.*, 2009)。これは直鎖状ポリユビキチン化修飾がNF- κ B経路活性化に関わることを示す新たな知見となった。

そこで本研究で我々は、LUBACによるタンパク質の直鎖状ユビキチン化修飾とその生理機能および破綻がもたらす病態との関連の解明を目指した。まず、我々は、LUBACの構成サブユニットとして、HOIL-1LとHOIPに加えて新たにSHARPINを同定した。Sharpin遺伝子の自然突然変異マウス (*cpdm*マウス) は、重篤な慢性皮膚炎やパリエル板の欠損など二次リンパ器官の形成不全を呈するが、我々はその原因がLUBAC欠損によってNF- κ B活性制御が不全になることによると示した (図1c) (論文リスト1, 2)。さら

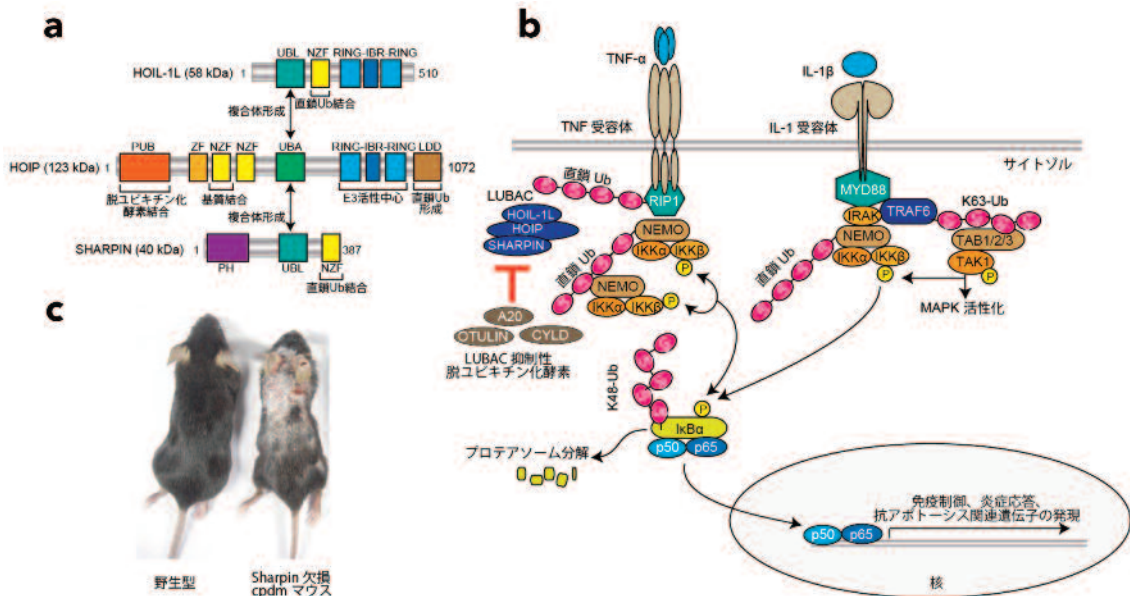


図1: LUBACによる直鎖状ユビキチン鎖生成を介したNF- κ B制御とSHARPIN欠損によって引き起こされる皮膚炎
(a) LUBACを構成するHOIL-1L、HOIP、SHARPINサブユニットのドメイン構造。
(b) LUBACは、NEMOやRIP1に直鎖状ユビキチン鎖付加し、IKKを活性化させる。
(c) Sharpinの自然変異マウス(*cpdm*マウス)にみられる慢性増殖性皮膚炎

に、LUBACはインターフェロン産生経路を抑制することでNF- κ B活性を特異的に亢進するのみならず (Inn K. *et al.*, *Mol. Cell*, 2011)、癌転移にも重要であった (Tomonaga M. *et al.*, *Int. J. Oncol.*, 2012)。興味深いことに、LUBAC複合体形成には、HOIL-1Lのユビキチン様 (UBL) ドメインとHOIPのユビキチン結合 (UBA) ドメイン間の新規会合様式が関わっていた (Yagi H. *et al.*, *EMBO Rep.*, 2012)。また、NF- κ B経路では、NEMOに2分子ユビキチンが直鎖状に付加されることで十分な活性化を現すことを見出した (Kensche T. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2012)。

さらに我々は、直鎖状ユビキチン鎖生成を介したNF- κ B活性化に拮抗する脱ユビキチン化酵素の解析を行った。その結果、CYLDとA20がLUBAC活性を抑制し、CYLDはユビキチン鎖分解によって阻害効果を発揮するが、A20は分解ではなく、7番目のZnフィンガードメインを介して直鎖状ユビキチンに特異的に結合することで、TNF受容体からNF- κ B活性化因子を解離させ、NF- κ B活性を抑制することを見出した (図2) (論文リスト3)。本研究では、石谷班と共同研究で、A20-ZF7と直鎖状ユビキチン鎖との共結晶構造解析を行い、詳細な直鎖状ユビキチン認識機構も解明した。一方、佐藤班、井上班、武川班との共同研究として脱ユビキチン化酵素CYLDによる直鎖状ユビキチンとK63ユビキチンを分解する分子メカニズム及びNF- κ BやMAPK活性など生理機能制御との関連を明らかにした (論文リスト4)。また最近、山岡班とともにA20の細胞死における役割も解明した (論文リスト5)。さらに石谷班とは、自然免疫応答において重要なヒトcGASの構造と生理機能相関に関しても報告した (Kato K. *et al.*,

PLoS One, 2013)。

この様に本領域研究から、直鎖状ユビキチン化という新たな翻訳後修飾の付加と除去及び結合を介して炎症・免疫制御に重要なNF- κ B経路が微細に調節されていることが明確になった。

発表論文リスト

1. Tokunaga, F., Nakagawa, T., Nakahara, M., Saeki, Y., Taniguchi, M., Sakata, S., Tanaka, K., Nakano, H., and Iwai, K.; SHARPIN is a component of the NF- κ B activating linear ubiquitin assembly complex. *Nature* 471, 633-636, (2011)
2. Ikeda, F., Deribe, Y.L., Skånland, S.S., Stieglitz, B., Grabbe, C., van Wijk, S., Franz-Wachtel, M., Goswami, P., Nagy, V., Terzic, J., Tokunaga, F., Androulidaki, A., Nakagawa, T., Pasparakis, M., Iwai, K., Sundberg, J.P., Schaefer, L., Macek, B., Rittinger, K., and Dikic I.; SHARPIN forms a linear ubiquitin ligase complex regulating NF- κ B activity and apoptosis. *Nature* 471, 637-641, (2011)
3. Tokunaga, F., Nishimasu, H., Ishitani, R., Goto, E., Noguchi, T., Mio, K., Kamei, K., Ma, A., Iwai, K., and Nureki, O.: Specific recognition of linear polyubiquitin by A20 zinc finger 7 is involved in NF- κ B regulation. *EMBO J.* 31, 3856-3870, (2012)
4. Sato Y., Goto E., Shibata Y., Kubota Y., Yamagata A., Goto-Ito S., Kubota K., Inoue J., Takekawa M., Tokunaga, F., and Fukai S.: Structures of CYLD USP with Met1- or Lys63-linked diubiquitin reveal mechanisms for dual specificity. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 22(3), 222-229, (2015)
5. Saitoh Y., Hamano A., Mochida K., Kakeya A., Uno M., Tsuruyama E., Ichikawa H., Tokunaga, F., Utsunomiya A., Watanabe T., and Yamaoka S.: A20 targets caspase-8 and FADD to protect HTLV-I infected cells. *Leukemia* in press

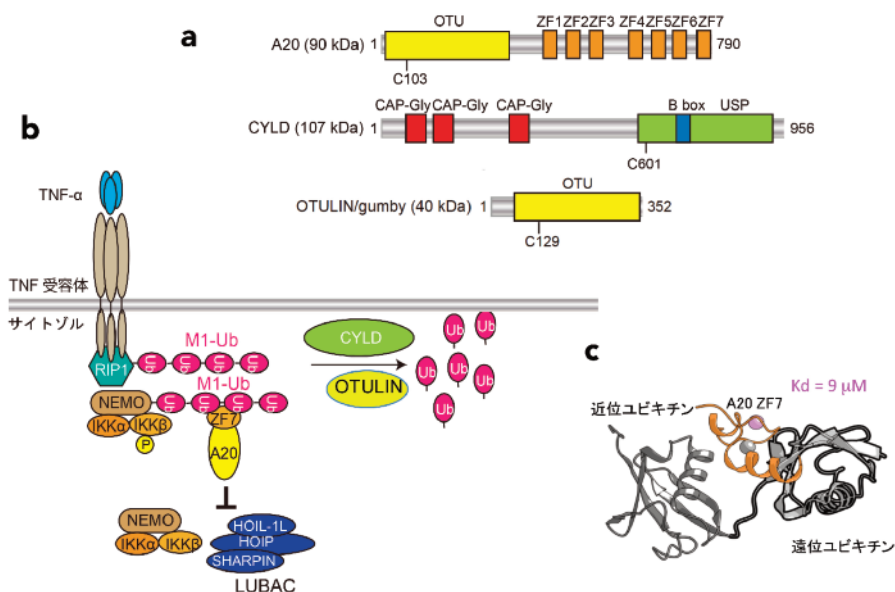


図2：直鎖状ユビキチン化によるNF- κ B活性化を制御する脱ユビキチン化酵素
 (a) LUBAC活性を抑制する脱ユビキチン化酵素(A20、CYLD、OTULIN)のドメイン構造。
 (b) CYLDとOTULINは直鎖状ユビキチン鎖を分解することでNF- κ B活性を抑制するが、A20は直鎖状ユビキチン鎖に結合することで阻害する。
 (c) A20-ZF7における直鎖状ユビキチン鎖結合。

持続的NF- κ B活性化メカニズムの解明と疾患

山岡昇司

東京医科歯科大学大学院 医歯学総合研究科 ウイルス制御学

研究成果のポイント

1. 成人T細胞白血病 (ATL) 細胞におけるリン酸化酵素 I κ B kinase (IKK) 複合体の活性阻害が細胞死を誘導することを明らかにした。
2. 卵巣癌細胞においてリン酸化酵素 NF- κ B inducing kinase (NIK) が過剰発現し、持続的 NF- κ B 活性化と悪性形質発現に寄与することを明らかにした。
3. ATL 細胞および HTLV-I 感染細胞株においてユビキチン化修飾酵素 A20 が高発現し、細胞の生存・増殖に不可欠であることとその作用メカニズムを明らかにした。

主な研究成果の説明

1) ATL細胞におけるIKK複合体活性による細胞死制御機構の解明

ATL細胞における転写因子NF- κ Bの恒常的活性化は腫瘍細胞の生存・増殖に不可欠であり、その原因は細胞質で阻害タンパク質I κ Bのリン酸化を制御するIKK複合体の脱制御にある。本研究は、IKKのATP結合部位に結合するよう分子設計されたIKK阻害剤IMD-0354が、ATL患者由来末梢血単核球でcaspase-3/7を活性化しその生存を抑制すること、ヒトT細胞白血病ウイルス (HTLV-I) 感染細胞株においても持続的NF- κ B活性化を抑制し細胞死を誘導することを明らかにした。同阻害剤がマウスの全身状態に悪影響を及ぼすことなくATL患者由来白血病細胞株の免疫不全マウスにおける増殖を抑制することも示した。以上の結果は、低分子量IKK阻害剤が恒常的NF- κ B 活性化を特徴とするATLの治療に貢献する可能性を示すものである (*Cancer Sci.*, 2012)。

2) 卵巣癌細胞における持続的NF- κ B活性化の分子機構と悪性形質発現との関連 (図1)

卵巣癌は腹腔内深部に位置するため進行癌として発見されることが多く、外科的根治手術が困難でしばしば化学療法にも抵抗性であるため予後が悪く、有効な治療法の開発が喫緊の課題である。本研究では、臨床検体および多数の卵巣癌細胞株における転写因子NF- κ Bの恒常的活性化を示し、その主要な原因がNIKのmRNAレベルでの高発現であることを明らかにした。卵巣癌細胞株でNIKの発現を抑制すると、NF- κ B依存性に発現する*Cyclin D1*、*MMP9*などの内因性遺伝子発現の低下、足場依存性および非依存性細胞増殖の低下、caspase-3/7の活性化とアポトーシスが誘導され、マウス移植モデルにおいてはその腫瘍形成能が低下した。以上の結果は、NIKの異常発現が卵巣癌における恒常的NF- κ B活性化の主要原因であり、NIKが有効な治療標的分子となりうることを示唆している (*PLoS One*, 2014)。

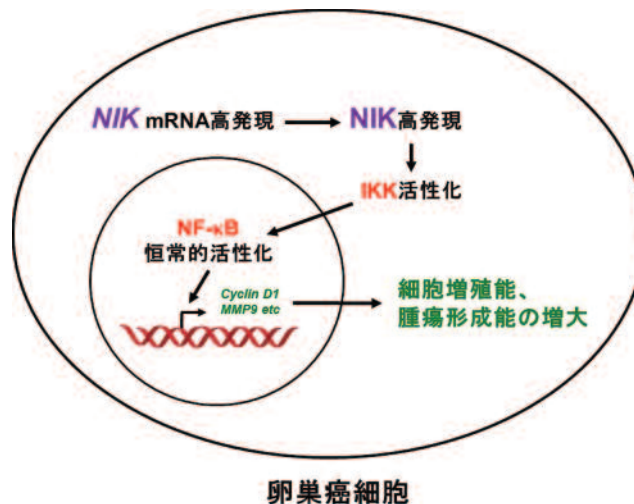


図1: NIK mRNA高発現によるNF- κ Bの恒常的活性化と腫瘍形成

3) ATL細胞およびHTLV-I感染細胞株における ユビキチン化修飾酵素A20による 細胞生存・増殖の制御機構解明

ATL細胞およびHTLV-I感染細胞株では、NF-κBの恒常的活性化によって標的遺伝子産物のひとつであるユビキチン化修飾酵素A20がmRNAレベルで高発現していること、A20の発現抑制がcaspase-8、caspase-3/7の活性化と細胞死を誘導し、マウス移植モデルでは造腫瘍能の低下を起こすことを明らかにした。Bリンパ腫細胞ではA20の欠失や変異がしばしば認められ、正常A20の発現回復によってNF-κB活性が低下し細胞死が誘導されるため、A20はこれまでNF-κB活性化を抑制する腫瘍抑制因子として位置づけられてきた。ところがATL細胞で高発現しているA20は変異がないにもかかわらずNF-κB活性化を抑制しておらず、Bリンパ腫細胞の場合とは逆に細胞生存を支えていることがわかった。これまでの領域での研究成果から、HTLV-I感染細胞ではA20によるNF-κB抑制を無力化するTaxあるいはNIKが高発現していることが、その原因と考えられる。A20の変異体を用いた解析は、細胞死抑制活性はその脱ユビキチン化酵素活性、E3 ligase活性、直鎖ユビキチン結合活性には依存せず、caspase-8、FADDとA20との結合が細胞死抑制に重要であることを示した。NF-κBの恒常的活性化がATL細胞の生存に必須であることは以前に明らかにしていた

が、治療の観点からは個体レベルでNF-κB活性全般を抑制することは副作用が大きすぎ、細胞死の抑制に本質的役割を果たしているNF-κB誘導性遺伝子産物を治療標的としなければならない。A20はNF-κB活性化に伴って発現誘導される代表的な遺伝子産物であり、A20がATL細胞の生存に必要な不可欠の役割を果たすことを明らかにしたことで、A20は重要な治療標的分子候補として位置づけられることとなった (*Leukemia* in press)。

発表論文リスト

1. Uota, S., Zahidunnabi Dewan, M., Saitoh, Y., Muto, S., Itai, A., Utsunomiya, A., Watanabe, T., Yamamoto, N. and Yamaoka, S. An IκB kinase 2 inhibitor IMD-0354 suppresses the survival of adult T-cell leukemia cells. *Cancer Sci.* 103, 100-106, 2012.
2. Uno M, Saitoh Y, Mochida K, Tsuruyama E, Kiyono T, Imoto I, Inazawa J, Yuasa Y, Kubota T, Yamaoka S. NF-κB Inducing Kinase, a Central Signaling Component of the Non-Canonical Pathway of NF-κB, Contributes to Ovarian Cancer Progression. *PLoS One*, 9(2):e88347, 2014.
3. Saitoh Y, Hamano A, Mochida K, Takeya A, Uno M, Ichikawa H, Tsuruyama E, Tokunaga F, Utsunomiya A, Watanabe T, Yamaoka, S. A20 targets caspase-8 and FADD to protect HTLV-I infected cells. *Leukemia*, in press.

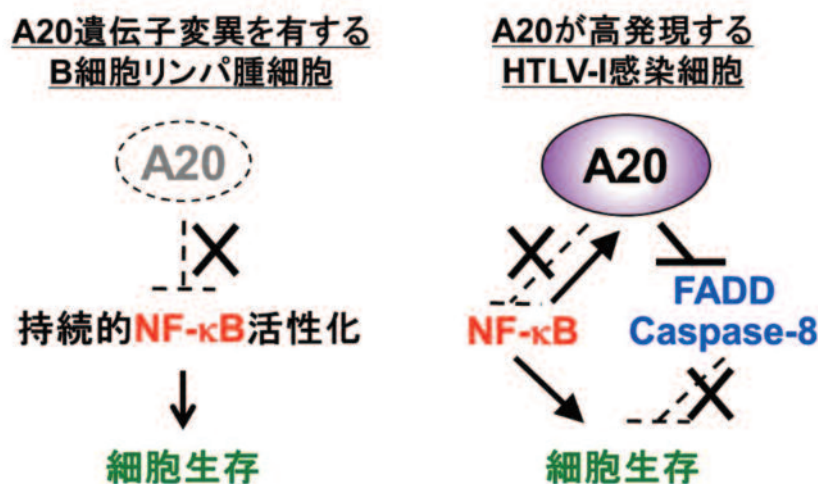


図2：A20による細胞生存・増殖の制御機構解明

SUMO化及びO-GlcNAc化による MAPキナーゼ経路の活性制御機構と疾患

武川睦寛 東京大学 医科学研究所 分子シグナル制御分野

研究成果のポイント

1. ERK 経路の MAPKK (MEK) が細胞内で SUMO 化されることを見出し、さらに MEK の SUMO 化が ERK 経路の過剰な活性化を防いで、発癌阻止に作用することを明らかにした。また、癌遺伝子 Ras が、RMEK の SUMO 化を阻害して ERK 経路を強く活性化し、発癌を導くことを示した。
2. ERK の新規基質分子 MCRIP1 を同定すると共に、ERK が MCRIP1 を介して、転写抑制共役因子 CtBP の機能を制御することで、癌抑制遺伝子 E-カドヘリンのジーン・サイレンシングが惹起されることを見出した。また、癌で認められる MCRIP1 のリン酸化異常が、癌細胞の上皮間葉転換を促進することを示した。
3. ストレス応答 MAPK 経路と p53 が協調して、PLK4 (中心体複製の鍵分子) の活性を制御しており、DNA 損傷等のストレス環境下で、中心体の複製停止と染色体安定性保持に重要な役割を果たしていることを見出した。さらに癌で認められる MKK4 (ストレス応答 MAPKK) と p53 の機能喪失変異によって、PLK4 の制御異常が惹起され、中心体の過剰複製と染色体異常が誘導されることを示した。
4. ストレス顆粒 (SG) の形成に、RNA 結合蛋白質 TIA1 の多量体化と細胞内輸送が重要であることを示した。また、活性酸素が TIA1 を酸化して、その機能を阻害し、SG の形成を著しく抑制する作用をもつことを見出した。さらに、このことが神経変性疾患の病態に関与することを示した。
5. 各 MAPK (ERK/p38/JNK) の活性化を生細胞内においてリアルタイムで可視化する 3 種類の FRET プロローブを開発した。また、このプロローブを用いて、サイトカイン (IL-1) 刺激による p38 の活性化が周期的に振動することを見出すと共に、この振動現象が炎症・免疫応答の効率的な誘導に重要であることを示した。

主な研究成果の説明

1) SUMO化によるERK経路の活性制御と 癌におけるその破綻

ERK経路の新たな活性調節機構としてMEKが細胞内でSUMO化されること、さらにSUMO化がMEK活性を阻害して、ERK経路の過剰な活性化を防ぎ、発癌阻止に作用することを見出した。また、癌遺伝子Rasが、MEKのSUMO化を抑制する作用を持つことを見出し、実際にRasに変異を有するヒト癌細胞においてMEKのSUMO化が消失していることを確認した。即ち、癌遺伝子Rasは、Rafを活性化すると同時に、SUMO化によるMEKの不活性化を阻止する、という二重の機構によってERK経路を強力に活性化し、発癌を導くことを示した。また、RasによるMEK-SUMO化阻害機構についても解析を行い、MAPKKKの一種であるMEKK1が、MEKのSUMO化を担うE3リガーゼとしても機能するこ

と、さらに癌遺伝子RasがMEKK1のE3リガーゼ活性を阻害することを明らかにした (*Nat. Cell Biol.*, 2011)。これらの成果は*Science Signaling*誌のEditor's choice欄で紹介されると共に、Faculty of 1000のmust read paperにも選ばれた。

2) 新規ERK基質分子MCRIP1による 上皮間葉転換 (EMT) の制御

ERKによってリン酸化される基質分子を、ヒトcDNA発現ライブラリーから網羅的に探索する新たなスクリーニング法を開発して、新規遺伝子 (MCRIP1と命名) を同定することに成功した。さらに、MCRIP1が、CtBP (転写抑制共役因子) と直接結合して、CtBPの転写抑制作用を解除する作用を持つこと、またその結果、CtBPの標的遺伝子であるE-カドヘリン (上皮マーカー分子) の発現が保

持されて上皮細胞としての性質が保たれていることを見出した(図1)。一方、ERKによってMCRIP1がリン酸化されると、CtBPがMCRIP1から解離してプロモーター上に結合出来る様になり、周囲のヒストン修飾を変化させて、E-カドヘリンの発現抑制とEMTを惹起することを明らかにした。また我々は、ERK経路が異常に活性化している多くの癌細胞において、MCRIP1が恒常的にリン酸化されており、その結果MCRIP1がCtBPと結合する能力を失ってEMTが起こり易い状態(即ち、癌細胞の浸潤・転移が起きやすい状態)になっていることを示した(*Mol. Cell*, 2015)。この成果は、「発癌シグナル(ERK経路)による、癌抑制遺伝子(E-カドヘリン)のジーン・サイレンシング」という新たな概念を提示するものであり、発表後すぐにFaculty of 1000のvery good paperに選出された。

3) ストレス応答MAPK (p38/JNK) 経路による中心体複製制御

DNA損傷などのストレス刺激に応じて活性化される、2つの細胞内シグナル伝達システム、即ちストレス応答MAPK経路とp53経路が、協調して中心体複製の鍵分子であるPolo-like kinase 4 (PLK4)の活性を調節しており、ストレス環境下で中心体の複

製を停止させて、染色体の安定性を保持する機能を持つことを見出した(図2)。さらに癌細胞で高率に観察されるp53およびMKK4(ストレス応答MAPKK)の遺伝子変異によって、中心体複製の調節機構が破綻し、ストレス刺激に応じて中心体の過剰複製と染色体の倍数体異常が惹起されることを示した(図3)。本研究により、MKK4がストレス環境下でp53と協調して機能し、中心体の過剰複製と染色体不安定性を防御する新たなタイプの癌抑制遺伝子であることが明らかとなった(*Nat. Commun.*, 2013)。

4) ストレス顆粒(SG)の形成機構と疾患における形成異常の解明

SGは、小胞体(ER)ストレスなどによって形成される細胞内構造体であり、ストレス応答MAPK経路を阻害して細胞死を抑制する。市川班と共同して、細胞のSG形成機構の解析に数理シミュレーションを導入し、RNA結合蛋白質TIA1の多量体化と細胞内輸送が、SG形成の基本原則であることを解明した(*PLoS Comp. Biol.*, 2015)。

また、SG形成異常と疾患との関連についても研究を推進し、活性酸素がTIA1の特定のCys残基を酸化して、その機能を阻害し、SGの形成を著しく抑

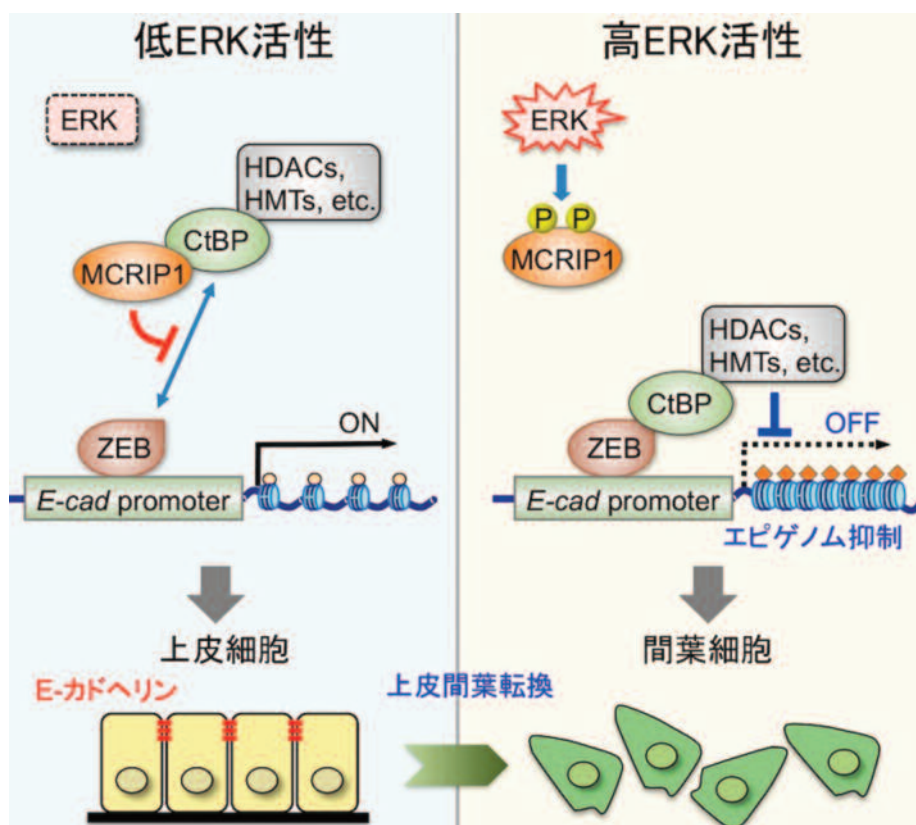


図1: ERKおよびMCRIP1による上皮間葉転換の制御

制する作用をもつことを新たに見出した。さらに、細胞内で小胞体ストレス（SG形成促進）と酸化ストレス（SG形成阻害）が同時に誘導される神経変性疾患のモデル細胞では、疾患原因蛋白質の変性によって小胞体ストレスが惹起されても、同時に発生する活性酸素の作用によってSG形成が著しく阻害されており、このことが神経細胞死を促進する一因となっていることを発見した（*Nat. Commun.*, 2016）。

5) MAPKシグナルを生細胞内で可視化する FRETプローブの開発と、p38活性の振動（オシレーション）現象の発見

代表的な3つのMAPK経路（ERK、p38、JNK）の活性化を生細胞内においてリアルタイムで可視化する3種類のFRETプローブを開発する事に成功した（*Sci. Signal.*, 2012）。また、このプローブを用いて、p38の活性化を単一細胞レベルで可視化する実験系を確立し、炎症性サイトカインによるp38活性が大きく振動（オシレーション）しており、活性化と不活性化が周期的に繰り返されていることを見出した。さらにこの分子機構として、p38依存的に発現誘導されるMKP-1を介したネガティブフィードバックループにより、振動現象が生じていることを

見出した。また、このp38活性の振動現象が、IL-6やCOX-2の遺伝子発現に寄与しており、免疫応答に重要であることを発見した（*Nat. Commun.*, 2015）。

発表論文リスト

1. Arimoto K, Saito H and *Takekawa, M. TIA1 oxidation inhibits stress granule assembly and sensitizes cells to stress-induced apoptosis. *Nat. Commun.* 7: 10252 doi:10.1038/ncomms10252 (2016).
2. Ichikawa K, Kubota Y, Nakamura T, Weng JS, Tomida T, Saito H and *Takekawa, M. MCRIP1, an ERK substrate, mediates ERK-induced gene silencing during epithelial-mesenchymal transition by regulating the co-repressor CtBP. *Mol. Cell* 58, 35-46 (2015).
3. Tomida T, Takekawa, M and *Saito H. Oscillation of p38 activity controls efficient pro-inflammatory gene expression. *Nat. Commun.* 6: 8350 doi:10.1038/ncomms9350 (2015).
4. Nakamura T, Saito H and *Takekawa, M. SAPK pathways and p53 cooperatively regulate PLK4 activity and centrosome integrity under stress. *Nat. Commun.* 4:1775 doi: 10.1038/ncomms2752 (2013).
5. Kubota Y, O'Grady P, Saito H and *Takekawa, M. Oncogenic Ras abrogates MEK SUMOylation that suppresses the ERK pathway and cell transformation. *Nat. Cell Biol.* 13, 282-291 (2011).

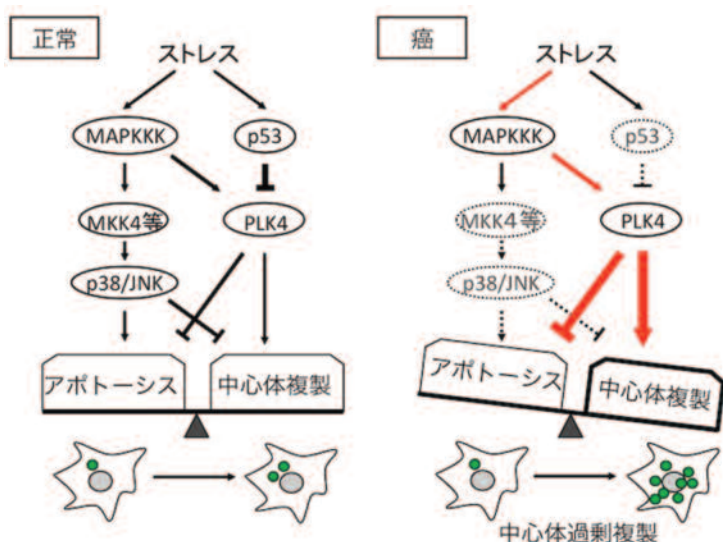


図2: ストレス応答MAPK経路およびp53による、中心体複製の制御(左)と癌におけるその破綻(右)

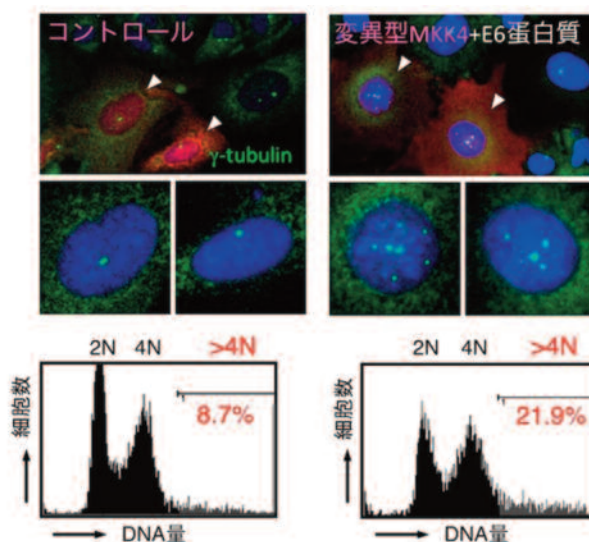


図3: MKK4およびp53の異常による、中心体の過剰複製(上)と染色体の異数化(下)

Aktキナーゼによるアクチン結合蛋白 Girdinのリン酸化修飾と疾患

高橋雅英 名古屋大学大学院 医学系研究科 分子病理学

研究成果のポイント

1. 脳室下帯から嗅球へ移動する神経前駆細胞の極性決定において、アクチン結合蛋白 Girdin が極性決定分子 Par-3 と結合することの重要性を明らかにした。Girdin ノックアウトマウスでは嗅球への神経前駆細胞の移動障害を生じ、嗅球の低形成を引き起こした。
2. グリオーマ細胞における Girdin の発現レベルが悪性度と関連し、Girdin がグリオーマ細胞の増殖・浸潤能を制御していることを示した。特に、Akt による Girdin のリン酸化はグリオーマ細胞の浸潤能に重要な役割を果たした。
3. Girdin の Akt リン酸化部位変異マウスを用いて、病的網膜血管新生とがん微小環境環境におけるがん関連線維芽細胞のがん組織周囲への遊走における Girdin リン酸化の意義を明らかにした。
4. Girdin がエンドサイトーシスに重要な役割を果たす dynamin と結合し、特定のカーゴ選択的なエンドサイトーシスに機能することを証明した。

主な研究成果の説明

1) 脳室下帯の神経前駆細胞移動における

Girdinの機能解析

Girdin のノックアウトマウスでは脳室下帯で発生する神経前駆細胞(神経芽細胞)が嗅球へ向かう移動の障害が観察され、嗅球の形成異常が生じることが明らかになった(Wang *et al.*, *J. Neurosci.*, 2011)(図1)。その移動経路である吻側移動経路(rostral migratory stream)における神経前駆細胞の形態を観察すると、必ずしも嗅球への方向性を示さず細胞極性に異常が生じていることが示唆された。そこで細胞の極性決定に重要な役割を果たすことが知られている Par-3 と Girdin との機能関連性について検討した。

まずHEK293細胞を用いて内在性Par-3とGirdinとの結合を免疫沈降法で検討した結果、細胞内での両者の結合を確認した。両分子の各ドメインの精製蛋白を用いた結合アッセイにより、両者の結合には、Par-3のC末端領域およびGirdinのC末端領域が必要な領域であることが判明した。Girdinの細胞極性における役割を明らかにするため、Girdinの発現をノックダウンした際の遊走細胞におけるゴルジ体の位置異常についてwound healing法により検討し

た。通常ゴルジ体は運動する細胞の核の運動方向側に局在するが、GirdinあるいはPar-3をノックダウンすると50%以上の細胞にゴルジ体の位置異常が認められ、Girdinが細胞極性にも関与していることが示唆された。Par-3に結合しないGirdin変異体の過剰発現によっても同様の極性異常が観察された。以上の結果により、Girdin/Par-3複合体が移動する細胞の極性決定に重要な役割を有していることを証明した(Ohara *et al.*, *PLoS One*, 2012)。

2) グリオーマ細胞におけるGirdinの発現と

増殖、浸潤制御

神経膠芽腫(グリオーマ)においてPI3K-Aktシグナル伝達系が活性化されていることが報告されている。摘出されたグリオーマからsphere形成能を指標に樹立された細胞株を用いて、腫瘍細胞の増殖、浸潤能と幹細胞マーカー遺伝子の発現におけるGirdinの役割を解析した。Girdinの発現をshort hairpin RNAによりノックダウンした細胞株を樹立し、マウス脳スライス上で浸潤能を検討したところ、Girdinをノックダウンしたグリオーマ細胞では浸潤能が著明に低下した。AktによるGirdinのリン酸化

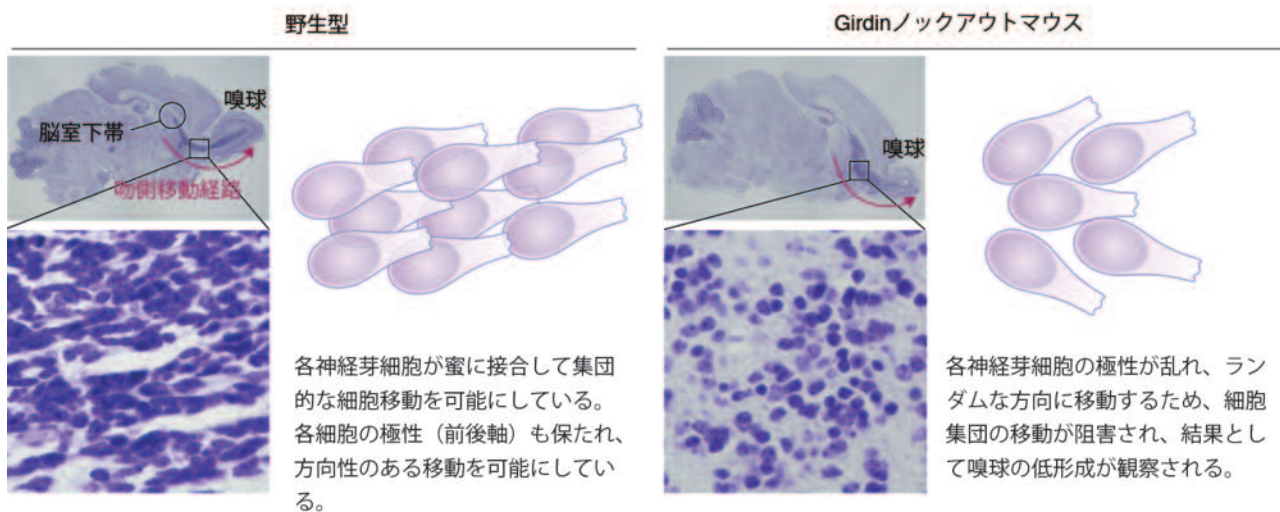


図1：Girdinは脳室下帯で産生される神経芽細胞の極性を維持した移動に重要である。神経芽細胞は嗅側移動経路に沿って嗅球まで移動し、介在ニューロンへ分化することが知られている。野生型（左）では極性を維持した細胞の集団移動が観察される。一方Girdinノックアウトマウスでは細胞の極性および接着に異常が生じ、個々の細胞がランダムに移動する結果、嗅球の低形成がみられることが明らかとなった。

が浸潤能に重要であった。またマウス脳内に移植したノックダウン細胞は生体内における腫瘍形成能が減弱し、長期生存が可能であった。さらにGirdinノックダウングリオーマ細胞では幹細胞マーカーであるCD133, nestin, Oct-4, Sox2などの遺伝子発現が減弱し、腫瘍幹細胞性の維持にGirdinが関わっていることが示唆された（Natsume *et al.*, *Oncogene*, 2012）。

3) GirdinのAktリン酸化部位変異マウスの作成と表現系解析

①酸素誘発網膜症モデルにおける病的血管新生におけるリン酸化Girdinの役割

新生仔期マウスを75%程度の高濃度酸素状況下に5日間曝露し、さらに通常環境下で5日間飼育した。その後経時的に網膜を摘出し、異常血管新生の程度を野生型とAktによるリン酸化部位セリン1416をアラニン置換したマウス（SAマウス）の両群で比較した。SAマウスでは異常血管新生の程度は有意に低下しており、GirdinのAktによるリン酸化が病的血管新生において重要な役割を果たしていることを明らかにした。さらにVEGFを網膜に過剰発現する

トランスジェニックマウスにおける病的血管新生についても、SAマウスと交配することにより、有意に低下することが判明した（Ito *et al.*, *Am. J. Pathol.*, 2013）。

②リン酸化Girdinの腫瘍微小環境における役割

腫瘍微小環境におけるリン酸化Girdinの意義を検討するため、がん細胞を野生型マウスとSAマウスの皮下に移植して、腫瘍増殖を比較した。SAマウスにおいて、腫瘍の増大が有意に抑制されており、腫瘍組織に存在するがん関連線維芽細胞（cancer-associated fibroblasts; CAF）の数も有意に少なかった。腫瘍血管量は両群で有意差が見られなかったことより、血管内皮細胞ではなく、CAF内におけるAktシグナルが腫瘍の進展に寄与していることが示唆された（図2）。SAマウスから得られた線維芽細胞やCAFとがん細胞をマウスへ共移植すると、野生型マウスからの線維芽細胞やCAFを用いた群と比較して、腫瘍の増大が抑えられ、がん関連線維芽細胞内におけるAkt-Girdinシグナルが腫瘍の進展に寄与していることを支持する結果となった（Yamamura *et al.*, *Cancer Res.*, 2015）。

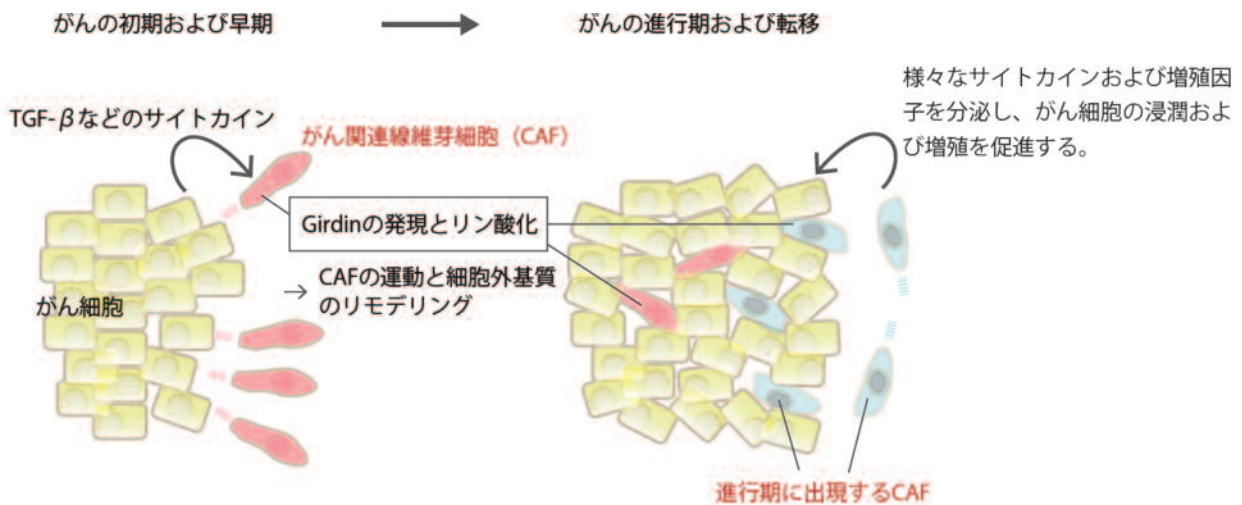


図2：がんの間質で増殖するがん関連線維芽細胞（CAF）における Girdin の発現と Akt によるリン酸化は、初期のがん進展に重要であることを腫瘍移植モデルで証明した。Girdin の Akt によるリン酸化は CAF の運動能に重要であり、それによる間質のリモデリングが腫瘍の進展を促進する。一方、CAF から分泌される様々な液性因子もがん細胞の増殖や運動能亢進に寄与する。

4) Girdinによる選択的エンドサイトーシスの制御機構

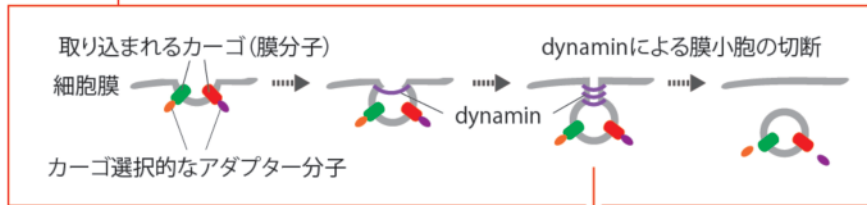
細胞がエンドサイトーシスにおいて膜分子（カーゴ）を取り込むためには、まず細胞膜が内側にくびれ、膜小胞として細胞膜と遊離する必要がある。膜小胞の遊離に重要な働きをする機械化学的分子として dynamin が知られているが、dynamin の新規結合分子として Girdin を同定した。生化学的解析により Girdin が dynamin と直接結合し、dynamin の GTPase 活性を上昇させることを明らかにした (Weng *et al.*, *EMBO J.*, 2014) (図3)。Girdin の dynamin に対する結合の責任ドメインは Girdin の N 末端ドメインであり、同ドメインを介した dynamin/Girdin 間の結合が膜小胞の切断に重要な働きをすることを明らかにした。

様々なカーゴのエンドサイトーシスを検証した結果、Girdin は E-cadherin の取り込みは制御するが、EGF 受容体やインテグリンの取り込みは制御しないことが判明した。この選択的エンドサイトーシスの機序については、以下のようなモデルが示唆された。Girdin は EGF 受容体と結合することが明らかにされている。実験結果より Girdin の N 末端ドメインが EGF 受容体と結合すると dynamin/Girdin の複合

体形成が競合的に阻害され、従って dynamin の活性が上昇せず、結果的に膜小胞の切断が抑制されることが判明した。これと同様の機構でインテグリンを含む膜小胞の切断も Girdin は制御することができない。一方、トランスフェリン受容体や E-cadherin のカーゴを含む膜小胞の場合、Girdin はこれらのカーゴと結合せず、従って dynamin/Girdin 複合体が形成されることで膜小胞の切断が促進された。以上の知見によって、Girdin が選択的エンドサイトーシスを制御する分子であることが判明した。

Girdin による選択的エンドサイトーシスの生物学的意義を検討するため、移動する神経芽細胞における N-cadherin の局在を免疫染色で検討した。その結果、N-cadherin の局在および発現レベルが Girdin ノックアウトマウスでは野生型マウスに比較して顕著に障害されていることが判明した。一方、神経芽細胞の接着に重要であるもう一つの接着分子 PSA-NCAM (Polysialic Acid Neural Cell Adhesion Molecule) には異常が観察されなかった。従って、Girdin は生体内においても cadherin の分子動態を選択的に制御している可能性が示唆された (Muramatsu *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2015)。

神経芽細胞・癌細胞・血管内皮細胞



膜分子がE-cadherinの場合



膜分子がEGF受容体の場合



図3 : Girdin は dynamin と結合することにより選択的エンドサイトーシスを制御する。膜分子 (カーゴ) が E-cadherin の場合、Girdin は dynamin に結合し、その GTPase 活性を促進させることで膜小胞の切断に寄与する。一方、カーゴが EGF 受容体の場合、Girdin は競合的阻害のために dynamin に結合することができず、結果として膜小胞を切断できない。本機構は神経芽細胞における N-cadherin の動態および発現に重要であることが示されている。

発表論文リスト

1. Wang, Y., Kaneko, N., Asai, N., Enomoto, A., Isotani-Sakakibara, M., Kato, T., Asai, M., Murakumo, Y., Ota, H., Hikita, T., Namba, T., Kuroda, K., Kaibuchi, K., Ming, G., Song, H., Sawamoto, K. and Takahashi, M. Girdin is an intrinsic regulator of neuroblast chain migration in the rostral migratory stream of the postnatal brain. *J. Neurosci.* 31, 8109-8122 (2011).
2. Natsume, A., Kato, T., Kinjo, S., Enomoto, A., Toda, H., Shimato, S., Ohka, F., Motomura, K., Kondo, Y., Miyata, T., Takahashi, M. and Wakabayashi, T. Girdin maintains the stemness of glioblastoma stem cells. *Oncogene* 31, 2715-2724 (2012).
3. Ohara, K., Enomoto, A., Kato, T., Hashimoto, T., Isotani-Sakakibara, M., Asai, N., Ishida-Takagishi, M., Weng, L., Nakayama, M., Watanabe, T., Kato, K., Kaibuchi, K., Murakumo, Y., Hirooka, Y., Goto, H. and Takahashi, M. Involvement of Girdin in the determination of cell polarity during cell migration. *PLoS One* 7 e36681 (2012).
4. Weng, L., Enomoto, A., Miyoshi, H., Takahashi, K., Asai, N., Morone, N., Jiang, P., An, J., Kato, T., Kuroda, K., Watanabe, T., Asai, M., Ishida-Takagishi, M., Murakumo, Y., Nakashima, H., Kaibuchi, K. and Takahashi, M. Regulation of cargo-selective endocytosis by dynamin 2 GTPase-activating protein girdin. *EMBO J.* 33, 2098-2112 (2014).
5. Yamamura, Y., Asai, N., Enomoto, A., Kato, T., Mii, S., Kondo, Y., Ushida, K., Niimi, K., Tsunoda, N., Nagino, M., Ichihara, S., Furukawa, K., Maeda, K., Murohara, T. and Takahashi, M. Akt-Girdin signaling in cancer-associated fibroblasts contributes to tumor progression. *Cancer Res.* 75, 813-823 (2015).
6. Muramatsu, A., Enomoto, A., Kato, T., Weng, L., Kuroda, K., Asai, N., Asai, M., Mii, S. and Takahashi, M. Potential involvement of kinesin-1 in the regulation of subcellular localization of Girdin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 463:999-1005 (2015).

翻訳後修飾やシグナル複合体の微量構成因子に関する高感度・高精度測定系の確立

尾山大明

東京大学 医科学研究所 疾患プロテオミクスラボラトリー

研究成果のポイント

1. リン酸化・ユビキチン化修飾部位に関する高精度な同定を行うプロテオーム解析基盤の確立
2. シグナル複合体の微量構成因子群に関する包括的な同定を行うプロテオーム解析基盤の確立

主な研究成果の説明

シグナル伝達系は細胞の運命決定を担う最も重要な生命制御システムの一つであり、リン酸化やユビキチン化をはじめとする翻訳後修飾の精細な制御に支えられた高次のタンパク質相互作用ネットワークによって、転写・翻訳をはじめとする基本的な生命活動の駆動力として機能を果たしている。この複雑な生命システムに関する作動原理の解明には、細胞内で発現しているタンパク質群に関する包括的な理解のみならず、それらの翻訳後修飾に関する詳細な動態解析が必須である。近年、超低流速液体クロマトグラフィーと高感度質量分析計を組み合わせたショットガンプロテオミクス解析技術の開発により、数千の因子に関する一斉同定及びそれらの定量が可能となっている。

当研究班では2010年に東京大学医科学研究所附属疾患プロテオミクスラボラトリーに新規導入された質量分析システム（Dina-LTQ-Orbitrap Velos ETD）を中核として領域内のプロテオーム解析を総合的に支援する分析基盤の構築を行い、領域内班員からの多様な解析依頼に対してサンプルの調

製から測定データの情報学的な解釈に至るまでの一連の流れを的確に行うための解析パイプラインを整備した。リン酸化・ユビキチン化をはじめとする翻訳後修飾やシグナル複合体の微量構成因子に関する包括的な同定・定量解析を可能とする高感度・高精度測定系を確立し、以下の研究成果をはじめとする多くの共同研究を推進した。

リン酸化については、膠芽腫患者組織から樹立したがん幹細胞に関してSILAC（Stable Isotope Labeling by Amino acids in Cell culture）法により細胞内の全タンパク質に安定同位体ラベルを導入し、当研究班で現在までに進めてきた細胞内シグナル伝達系に関する時系列プロテオーム解析技術（Oyama *et al.*, *Mol. Cell. Proteomics*, 8: 226-231, 2009; Oyama *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 286: 818-829, 2011）を基盤としてリン酸化修飾ダイナミクスの網羅的な高精度定量を行った。EGF刺激依存的定量リン酸化プロテオーム解析から2,282種類のリン酸化タンパク質に由来する6,073種類のリン酸化ペプチドを計測し、mTORあるいはERK/MAPKシグナルパスウ

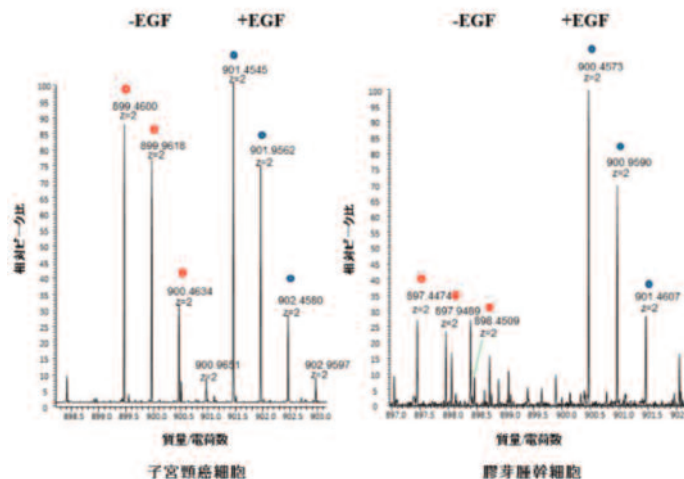


図1：supervillin-like (LOC645954)のRNA配列によりコードされた新規リン酸化ペプチド(GLApSPTAITPVASAIcGK)に関するEGF刺激依存的な活性変動を示すMSスペクトル

エイにおいて転写・翻訳制御に至るまでの主要リン酸化因子の多くを同定した (Kozuka-Hata *et al.*, *PLoS One*, 2012)。また、大変興味深いことに当研究グループで世界に先駆けて進めてきた大規模質量分析データとヒト全長cDNA配列情報からの新規タンパク質コード領域の情報科学的探索 (Oyama *et al.*, *Genome Res.*, 14: 2048-2052, 2004; Oyama *et al.*, *Mol. Cell. Proteomics*, 6: 1000-1006, 2007) により、従来非翻訳領域と考えられてきたRNA配列部位がコードする新規ペプチドのセリン残基がリン酸化修飾を受け、EGF刺激により活性制御を受けていることを新たに見出し、膠芽腫幹細胞において従来の想定を超えるシグナル制御因子の存在が示された (図1)。また、代表的な神経幹細胞マーカーであるネスチンに関して今まで報告されていなかった11か所のリン酸化部位を同定することに成功し (図2)、膠芽腫幹細胞特異的な情報伝達制御に関与する多様な新規リン酸化修飾の存在を示唆する結果が得られた。

さらにユビキチン化に関しては、東京大学理学系研究科の深田吉孝先生との領域内共同研究において体内時計の調節に関与するCRYタンパク質におけるユビキチン化修飾部位の同定に成功し、共同研究成果を報告した (Hirano *et al.*, *Cell*, 2013)。また、シグナル複合体に関する解析については、本計画班においてNF- κ B経路に関与することが知られているI κ Bキナーゼ (IKK) 複合体に結合するタンパク質としてp47を新たに見出したほか (Shibata *et al.*, *Nat. Commun.*, 2012)、ユビキチン編集酵素A20の相互作用因子としてユビキチンリガーゼcIAPを同定し、成果発表を行った (Yamaguchi *et al.*, *Sci. Rep.*, 2013)。

近年、ゲノミクスやプロテオミクスをはじめとする網羅的な生体分子計測技術と共に、そこから産生される大量の情報を統合して統計科学的に知識を抽出するバイオインフォマティクス技術や、数理モデルに基づく理論的な制御解析が生命現象の体系的な

理解に応用されるようになってきており、こうした方法論の革新がシグナル伝達研究を次の段階に押し進める原動力となりつつある (Kozuka-Hata *et al.*, *Front. Physiol.*, 2012)。細胞外からの刺激によるシグナル伝達系の活性化に関して、各種シグナル因子に関する包括的な活性変動情報を基盤とした数理モデルによる細胞制御理論に関する研究も可能となってきており (Tasaki *et al.*, *PLoS One*, 5: e13926, 2010)、プロテオームワイドな翻訳後修飾ダイナミクスデータに基づく統合的な生命制御システム解析に関する方法論の構築は、次世代のシグナル伝達研究の方向性に計り知れないインパクトを与えられられる。

発表論文リスト

1. Yamaguchi N, Oyama M, Kozuka-Hata H, and Inoue J. Involvement of A20 in the molecular switch that activates the non-canonical NF- κ B pathway. *Sci. Rep.* 3: 2568 (2013).
2. Hirano A, Yumimoto K, Tsunematsu R, Matsumoto M, Oyama M, Kozuka-Hata H, Nakagawa T, Lanjakornsiripan D, Nakayama KI, and Fukada Y. FBXL21 regulates oscillation of the circadian clock through ubiquitination and stabilization of cryptochromes. *Cell* 152, 1106-1118, (2013).
3. Shibata Y, Oyama M, Kozuka-Hata H, Han X, Tanaka Y, Gohda J, and Inoue J. p47 negatively regulates IKK activation by inducing the lysosomal degradation of polyubiquitinated NEMO. *Nat. Commun.* 3: 1061 (2012).
4. Kozuka-Hata H, Nasu-Nishimura Y, Koyama-Nasu R, Ao-Kondo H, Tsumoto K, Akiyama T, and Oyama M. Phosphoproteome of human glioblastoma initiating cells reveals novel signaling regulators encoded by the transcriptome. *PLoS One* 7: e43398 (2012).
5. Kozuka-Hata H, Tasaki S, and Oyama M. Phosphoproteomics-based systems analysis of signal transduction networks. *Front. Physiol.* 2: 113 (2012).

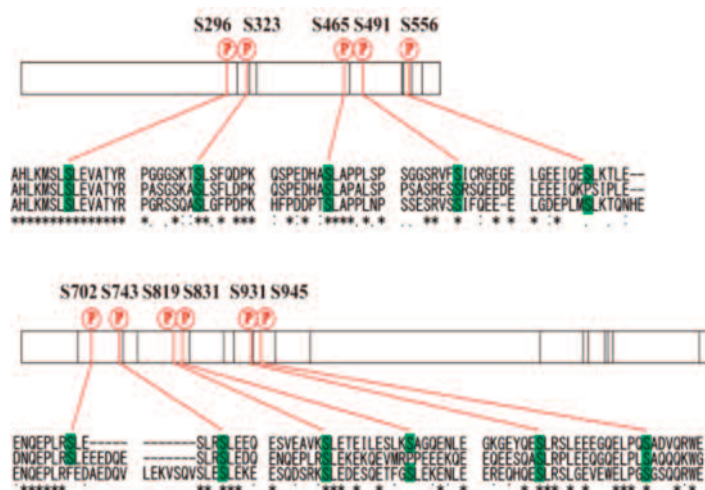


図2: 膠芽腫幹細胞から同定された神経幹細胞マーカー・ネスチンのリン酸化部位に関する種間アミノ酸配列比較解析

蛋白質の翻訳後修飾と細胞内シグナル伝達に関連した因子の構造基盤

石谷隆一郎 東京大学 理学系研究科 生物化学専攻

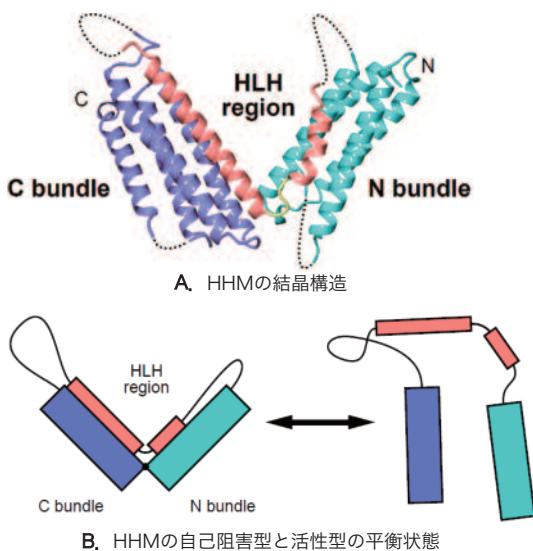
研究成果のポイント

1. 転写抑制因子 HHM の結晶構造を解明し、自己阻害型と活性型の構造変化メカニズムを提唱した。
2. A20/直鎖型ユビキチン複合体の結晶構造を解明し、A20 の変異による機能不全による B 細胞リンパ腫惹起のメカニズムを提唱した。
3. 骨形成シグナルに関わる Enpp1 の構造機能解析を行い、骨形成を制御するメカニズムの構造基盤を明らかにした。
4. cGAS/DncV の構造機能解析を行い、DncV と cGAS の基質・産物特性のメカニズムを解明した。
5. Klotho の結晶構造解析を行った。

主な研究成果の説明

1) 転写抑制因子HHMの構造機能解析

転写抑制因子HHMの結晶構造を解明した（図1A）。構造に基づいた生化学的・物理化学的解析を行った結果、HHMは溶液中で、自己阻害型のV字型構造（図1A）と、他の転写因子と相互作用することが可能な、ほどけた活性型との平衡状態であることを解明した（図1B）。結晶構造に基づいてV字型構造を壊すような変異体をデザインし、細胞内で機能解析を行ったところ、変異体は筋細胞の分化を著しく促進することが判明した。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、本来の基質が存在するときのみHLH領域が露出して活性型となるというモデルを提唱し、成果はEMBO Jに掲載された（研究業績3）。



2) A20/直鎖型ユビキチン複合体の構造機能解析

生化学的解析、および、細胞生物学的解析により、脱ユビキチン化酵素A20がC末端のzinc finger 7 (ZF7) を介して直鎖状ポリユビキチンに結合することでNF- κ B活性化を抑制することを明らかにした。A20 ZF7-直鎖状ユビキチン複合体のX線結晶構造を決定し、その直鎖状ジユビキチン認識機構を明らかにした（図1C）。構造情報に基づいて機能解析を行い、A20がZF7を介して直鎖状ポリユビキチンと結合しTNF受容体へと集積することでNF- κ B経路を制御するという新たな分子機構を明らかにした。さらに、本研究の結果から、A20 ZF7と直鎖状ポリユビキチンとのあいだの結合の不全はB細胞リンパ腫惹起と関連することが示され、成果はEMBO Jに掲載された（研究業績5）。

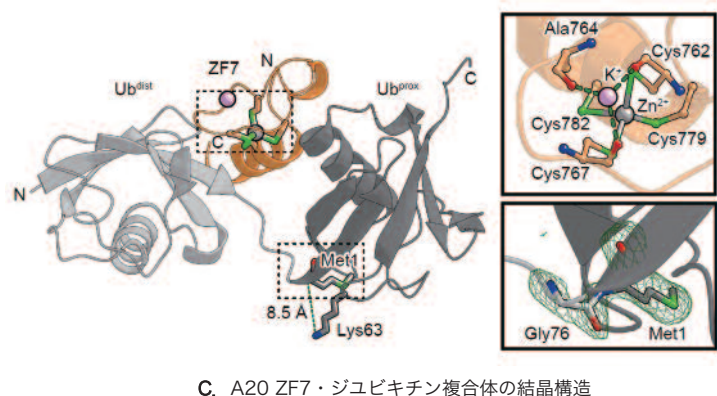


図1：HMMおよびA20/ジユビキチン複合体の結晶構造

3) 骨形成シグナルに関わるEnpp1の構造機能解析

Enpp1はピロリン酸を産生して骨形成を制御する細胞外酵素である。Enpp1の結晶構造を決定し(図2A), 構造に基づいた生化学的解析を行うことで, Enpp1が細胞外ATPを特異的に加水分解して骨形成を制御するメカニズムの構造基盤を明らかにした。ヒトEnpp1の遺伝性変異をEnpp1の構造にマッピングしたところ, 変異はEnpp1の構造を不安定化させ先天性の骨疾患を引き起こす可能性が示唆された。成果はPNASに掲載された(研究業績4)。

4) cGAS/DncVの構造機能解析

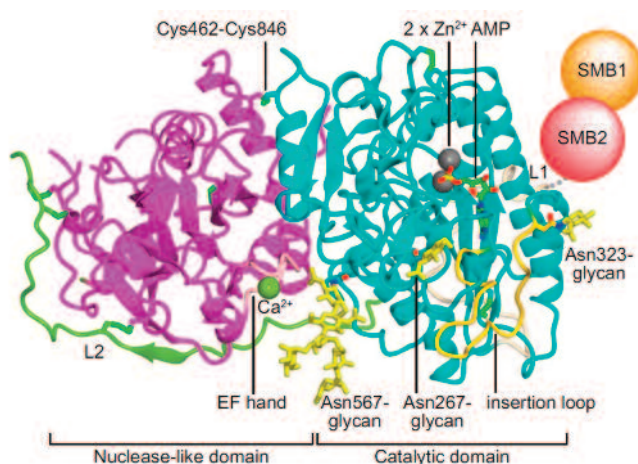
cGASはウイルス由来のDNAを認識することで活性化し, ATPとGTPからcyclic GMP-AMPを産生する酵素である。cyclic GMP-AMPはSTINGに結合し, 下流へとシグナルを伝えることでI型インターフェロンの産生を促す。このようにcGASはウイルス感染の初期に反応して, 宿主の免疫系を活性化する重要な酵素であるにも関わらず, どのようにcGASがウイルスDNAを認識しているかについては不明であった。そこで本研究ではX線結晶構造解析の手法を用いてcGASの立体構造を決定し, cGASによるDNA認識機構を原子分解能レベルで解明した(図2B)。さらに, 解明した構造に基づいた生化学的, 細胞生物学的解析を行うことで, cGASはジンクフィンガー, および, 正電荷の溝を介してウイルスDNAを認識し, cyclic GMP-AMPを産生することで免疫を活性化することが明らかとなった(研究業績2)。他に病原菌が有するcyclic GMP-AMP産生酵素DncVの立体構造解析も行い(図2C), ヒトcGASとの構造比較を行うことで, DncVとcGASの基質・産物特性のメカニズムを解明した(研究業績1)。

5) Klothoの結晶構造解析

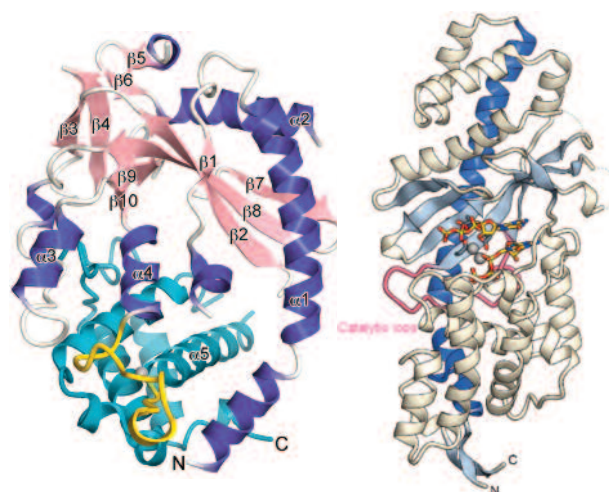
cHEK293S GnTI (-) 細胞を用いてヒト由来 α -Klothoを発現, 精製, 結晶化を行ったところ, 針状結晶を得ることに成功したが再現性が悪く, タンパク質自体も不安定であった。そこで, ニワトリ由来 α -KlothoをHEK293細胞を持ちいて大量発現させ, 精製, 結晶化を行ったところ2.3 Å分解能の結晶を得ることに成功し, 分子置換法により構造決定に成功した。 α -Klothoは2つの $(\alpha/\beta)_8$ パレル構造からなり, 基質結合部位と推定される領域には水分子のクラスターが存在した。MDシミュレーションにより, 糖鎖との結合時にはループ領域が構造変化をおこし, 結合ポケットが形成されると推測された。現在, 生化学データなどと合わせて論文投稿準備中である。

発表論文リスト

1. Kato, K., Ishii, R., Hirano, S., Ishitani, R. and *Nureki, O. Structural Basis for the Catalytic Mechanism of DncV, Bacterial Homolog of Cyclic GMP-AMP Synthase. *Structure* 23, 843-850 (2015)
2. Kato K, Ishii R, Goto E, Ishitani, R., *Tokunaga F, and *Nureki O. Structural and functional analyses of DNA-sensing and immune activation by human cGAS. *PLoS One* 8:e76983 (2013).
3. Ishii R, Isogaya K, Seto A, Koinuma D, Watanabe Y, Arisaka F, Yaguchi SI, Ikushima H, Dohmae N, Miyazono K, Miyazawa K, *Ishitani, R., and *Nureki O. Structure of a dominant-negative helix-loop-helix transcriptional regulator suggests mechanisms of autoinhibition. *EMBO J.* 31, 2541-2552 (2012).
4. Kato K, Nishimasu H, Okudaira S, Mihara E, Ishitani, R., *Takagi J, *Aoki J, and *Nureki O. Crystal structure of Enpp1, an extracellular glycoprotein involved in bone mineralization and insulin signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 16876-16881 (2012).
5. *Tokunaga F, Nishimasu H, Ishitani, R., Goto E, Noguchi T, Mio K, Kamei K, Ma A, Iwai K, and *Nureki O. Specific recognition of linear polyubiquitin by A20 zinc finger 7 is involved in NF- κ B regulation. *EMBO J.* 31, 3856-3870 (2012).



A. Enpp1の結晶構造



B. cGAS(左)とDncV(右)の結晶構造

図2: Enpp1およびcGAS/DncVの結晶構造

翻訳後修飾によるシグナル伝達制御とその破綻に起因する疾患の数理モデル

市川一寿 東京大学 医科学研究所 腫瘍数理分野

研究成果のポイント

1. NF- κ B の振動パターンが空間パラメータ (N/C 比、拡散定数、核膜輸送、I κ B の翻訳場所) によって変化すること、およびそのメカニズムを明らかにし、疾患等の関連について可能性を示した。
2. ストレス顆粒 (SG) 形成のモデルを構築して SG 形成の制御因子を明らかにし、かつ形成メカニズムに深く関わる SG サイズ分布のシミュレーションによる予言を実験によって検証した。

主な研究成果の説明

1) NF- κ B振動のダイナミクス

転写因子NF- κ Bは継続的なサイトカイン刺激によって細胞質-核間で局在を周期的に変化させ、振動することが知られている。NF- κ Bの振動パターンの違いは遺伝子発現プロファイルの違いを生むと考えられており、その制御因子の同定が重要である。NF- κ Bの振動現象は多くのシミュレーション研究者の関心を集め、これまでに60以上のシミュレーション研究報告が行われてきた (Ichikawa, K., *et al.*, *IET Syst.Biol.*, 2014)。ところが、細胞は3次元空間に広がる実体であるにもかかわらず、Terry, A.J. and Chaplain, M.A., *J. Theor. Biol.*, 2011の2次元空間を扱った研究を除き、これら60を超えるシミュレーション論文すべてが空間的広がりを無視し、すべてのシグナル伝達が一点に集中している (あるいはシグナル伝達が無限の速度で伝達して空間内のどこでもまったく同じ状況にある) ことを前提としたものであった。さらに、3次元空間としての細胞を扱った研究はなかった。しかし言うまでもなく細胞は3次元

空間に広がった実体であり、様々な空間パラメータ、すなわち核/細胞質体積比 (N/C比)、たんぱく質とmRNAの拡散定数、核膜輸送率、NF- κ Bによって転写制御されNF- κ Bの活性を抑制するI κ Bたんぱく質の翻訳場所、および核の形が核内NF- κ Bの振動パターンに影響する可能性を検討する必要性を痛感した。そこで時空間シミュレーションによって上記5つの空間パラメータがNF- κ Bの振動パターンに与える影響を調べた。

その結果、1) 核の形以外の4つの空間パラメータは振動パターンの制御因子であること、2) I κ BとmRNA_{I κ B}の拡散定数、mRNA_{I κ B}の核外への輸送率、I κ Bの転写と翻訳は振動継続性を、I κ Bの核内への輸送率は振動周波数を制御すること (図1)、3) 振動の継続には核内に流入したNF- κ B濃度が、その後初期濃度以下にリセットされることが必要なこと、4) I κ Bの拡散定数が大きいと核から離れた細胞質空間にNF- κ Bによって発現制御されたI κ Bが大量運ばれてそこが「溜池」として働き、核内NF- κ B

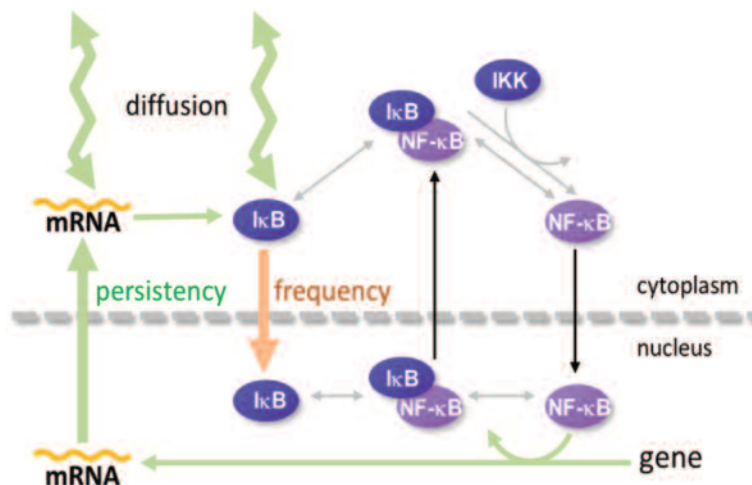


図1: NF- κ B振動の制御因子。緑色矢印は振動継続性の制御因子、橙色矢印は周波数の制御因子。

がリセットされること、5) mRNA_{IκB}の核内貯留量がmRNA_{IκB}の核外への輸送率によって変化することによってIκBの翻訳量も変化して核内NF-κBのリセットが制御されること、を明らかにした。

細胞が置かれている環境やストレスによってミトコンドリアや小胞体の密度と配置がダイナミックに変化することが報告されており、これは実効的拡散係数を変化させる。従って我々が明らかにした空間パラメータによるNF-κB振動パターンの変化は、細胞の置かれた環境によってNF-κB振動パターンが変化する可能性を強く示唆するものである。一方、老化やがん化によって核膜孔の機能やN/C比が変化することが知られている。従ってこれら疾患によってもNF-κB振動パターンが変化し、その結果遺伝子発現プロファイルが変化している可能性を示唆するものである。

2) ストレス顆粒形成のダイナミクス

さまざまな細胞ストレスによって非膜性のストレス顆粒 (SG) が細胞質に形成されるが、SG形成の有無は細胞運命の決定に重要であると考えられている。しかしTIA-1タンパク質の活性化と翻訳開始因子eIF2αのリン酸化によってSG形成が行われることが知られているものの、不明な点が多かった。そこで実験とシミュレーションの連携によってSG形成の制御因子を調べた。

まず武川班がヒ素刺激によるSG形成を観測し、その時空間ダイナミクスを調べた。次にシミュレーションを行うわけであるが、細胞質に形成されるSGは数十個である。すなわちSGは連続的なものではなく個別のものとしてとらえるべきものである。従って連続量である「濃度」を扱う決定論的シミュレーションは適用できず、粒子個々を扱う確率論的シミュレーションを行うことが必要となる。そこですでに我々が構築していた確率論的シミュレーション

の理論 (Ichikawa, *et al.*, 2010) を使い、実験データから得られたパラメータを使ってモデル構築とシミュレーションを行った。その結果、1) 形成されるSG個数の時間経過、SGサイズの時間経過、SGの空間分布についてシミュレーションが実験を良く再現し、2) SG個数が30分近辺をピークとして減少するのはSGの融合によるものであることを明らかにし、3) SGの空間分布を決定つけるのは微小管上のSG輸送であることを明らかにし、4) SGサイズがγ分布であることをシミュレーションが予言し、それを実験的に証明し、5) γ分布のメカニズムがSGの融合であることを発見した (図2)。

発表論文リスト

1. Ohshima, D. and Ichikawa, K. Regulation of nuclear NF-κB oscillation by nuclear transport: mechanisms determining persistency and frequency. *PLoS ONE* 10:e0127633 (2015) doi:10.1371/journal.pone.0127633.
2. Ohshima, D., Arimoto-Matsuzaki, K., Tomida, T., Takekawa, M., and Ichikawa, K. Spatio-temporal dynamics and mechanisms of stress granule assembly. *PLoS Comp. Biol.* 11:e1004326 (2015) doi:10.1371/journal.pcbi.1004326.
3. Ohshima, D. and Ichikawa, K. Regulation of nuclear NF-κB oscillation by a diffusion coefficient and its biological implications. *PLoS ONE* 9:e109895 (2014) doi:10.1371/journal.pone.0109895.
4. Ohshima, D., Sagara, H., and Ichikawa, K. Regulation of NF-κB Oscillation by Spatial Parameters in True Intracellular Space (TiCS). 2013 International Symposium on Computational Models for Life Sciences, AIP Conf. *Proc.* 1559, 5-11, (2013); doi: 10.1063/1.4824990.
5. Ohshima, D., Inoue, J., and Ichikawa, K. Roles of Spatial Parameters on the Oscillation of Nuclear NF-κB: Computer Simulations of a 3D Spherical Cell. *PLoS ONE* 7:e46911(2012).

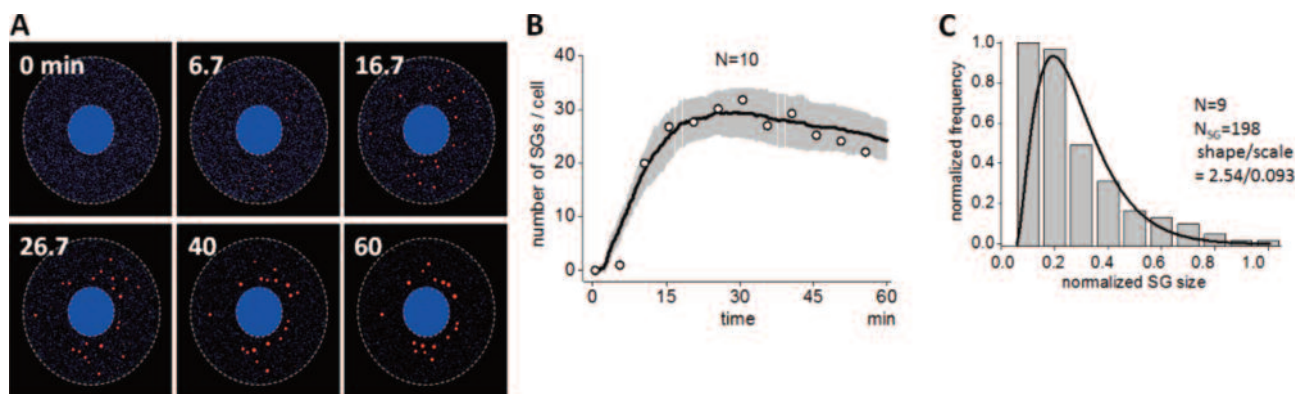


図2: (A)SG形成の確率論的シミュレーション (赤丸: SG)、
(B)SG個数の時間経過 (白丸: 実験、黒線: シミュレーション、灰色領域: シミュレーションのSD)、
(C)SGサイズ分布 (黒線: フィッティングカーブ)。

最後に一言

この5年間「修飾シグナル病」の領域代表として多くの経験を積みました。この冊子では、グループの立ち上げに携わった8名の研究者に関してのみ研究成果を掲載しましたが、この他に44名の研究者がグループに参加され多くの研究成果を発表されています。領域代表としてご参加いただいた先生方に深く感謝いたします。また各研究室の若手の方にもそのエネルギーでグループを盛り上げていただきありがとうございました。

そして、この成果報告を読んでくださった中高校生、専門外の皆さん。

私たちの他にも多くの研究者が多様な研究グループを立ち上げ国からの研究費（科研費と言います）をもとに世界的な研究成果を上げています。これらの成果は、単に学問上の意義ばかりでなく治療方法の開発や創薬につながり国民の福祉に大きく貢献するものです。是非、いろいろな機会を利用して研究と言うものの意義を理解していただくとともに、自分自身も研究者となることを考えていただきたいと思います。

「修飾シグナル病」領域代表

井上純一郎

東京大学医科学研究所

平成28年2月25日

新学術領域研究「修飾シグナル病」

中高校生・専門外の皆さんへの研究成果報告

～細胞の営みと病気との関係を明らかにしようとした研究グループの5年間～

発行日 平成28年3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
E-mail: <jun-i@ims.u-tokyo.ac.jp>
編集 井上純一郎
