

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

構造生物学分野

Division of Structural Biology

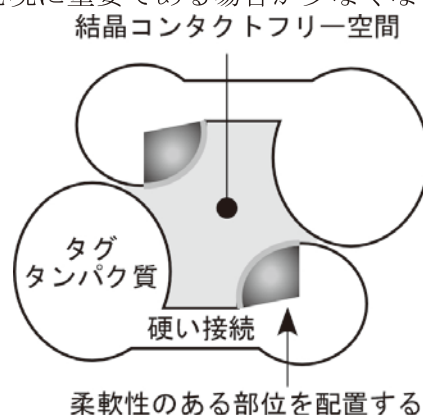
教授：神田 大輔

Professor : Daisuke Kohda, Ph.D.

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

A. 結晶コンタクト効果フリー空間を利用するタンパク質結晶構造解析技術の開発

タンパク質の結晶の中では分子同士が接触して3次元の結晶格子を作っている。結晶構造が溶液中の構造と同一と見なして良いことは、結晶構造とNMR構造が一致するという多くの事例から証明されている。しかし、タンパク質の中には、その一部の構造がとりわけ柔らかく創られていて、その形の変化が機能発現に重要である場合が少なくない。そうした柔軟な部分は結晶中では分子同士の接触（結晶コンタクト）により容易に変形して、正しい形（溶液中の平衡状態）ではなくなってしまう可能性がある。変形までしなくても、運動が制限されて偏った形に固定されてしまう。では、今までになぜ「柔構造の変形・固定問題」は看過されてきたのだろうか？ 多くの場合、柔らかく動的な部分の電子密度が薄くなったり見えなくなったりしてしまうので、価値がない情報として無視されてきたと想像される。しかし、結晶コンタクト効果によって変形した構造が得られて、意図せずに誤った解釈をしてしまう可能性が常に存在する。柔らかく動的な部分の構造変化はタンパク質の機能と密接に関連していることが少なくないことを考えると、「柔動構造



図A.1 対象タンパク質をタグタンパク質に硬い接続を用いて融合させることで、2つのタンパク質の間に隙間空間を創り、そこに対象タンパク質の一部分を意図的に配置する。

の「変形・固定問題」を真剣にとらえ、実験的に解決する手段を考案することは重要である。そのために、結晶コンタクト効果フリーな“隙間”を結晶格子中につくることを目指している（図 A.1）。3つの技術要素は、①タグタンパク質との融合タンパク質を用いる、②タグタンパク質と対象タンパク質を一本の長いヘリックスを用いて硬く接続する。さらに親和力の弱いリガンドの場合は、③占有率を保障するために共有結合を用いて、リガンドを対象タンパク質にテザリングする。である。

具体的な課題として、Tom20 タンパク質に結合した状態のプレ配列ペプチドの大きな運動性を定量的に解析することを設定した。タグタンパク質としてマルトース結合タンパク質 (MBP) を用いる。MBP の C 末端部分はヘリックス構造をとっていて、Tom20 の N 末端ヘリックスと直接つなげることで一続きのヘリックスとなるようにデザインした。2つのヘリックスの間に挿入するアミノ酸残基数を変えることで、Tom20 と MBP の相対配置を変化させ、プレ配列がクリスタルコンタクトの影響を受けない隙間に位置するように調節できる。プレ配列は分子間ジスルフィド結合を用いて Tom20 にテザリングする。

モデルビルディングを行い挿入する残基数を 4 とした。ラット ALDH 由来のプレ配列を用いて MBP-Tom20-SS-pALDH 複合体を作製し、結晶を得て構造解析を行った。モデルバイアスを避けるために、分子置換の際にはプレ配列に対応するモデルは置かなかつた。差フーリエ電子密度マップをつくると、結合サイト付近にプレ配列ペプチド由来と思われる棒状の電子密度を得ることができることを昨年度に報告した。今年度はさらに明瞭な電子密度を得るための X 線回折測定とデータ処理の条件を検討した。電子密度の可視化にはフーリエ変換の際にローパスフィルターを用いることが必要であった（図 A.2）。また、理由は今のところ不明であるが、電子密度の可視化には長波長の X 線（1.6 Å、通常は 0.9~1.0 Å を用いる）を用いた回折測定が有効であった。理化学研究所・杉田研究室と共同研究として分子動力学計算を行い、計算結果からシミュレーションした電子密度が実験から得られた電子密度と良く一致することを示した（論文 2）。

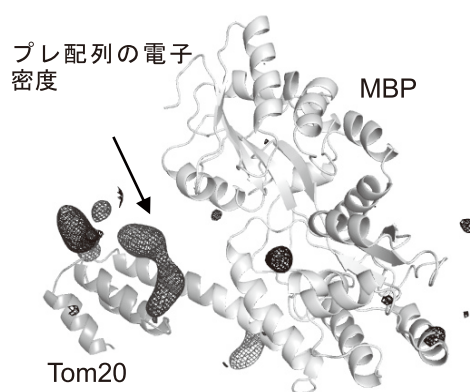


図 A.2 Tom20 に結合した状態のプレ配列の電子密度を Fo-Fc 差オミット電子密度マップとして表示した。MBP-Tom20 の構造を重ねて表示した。

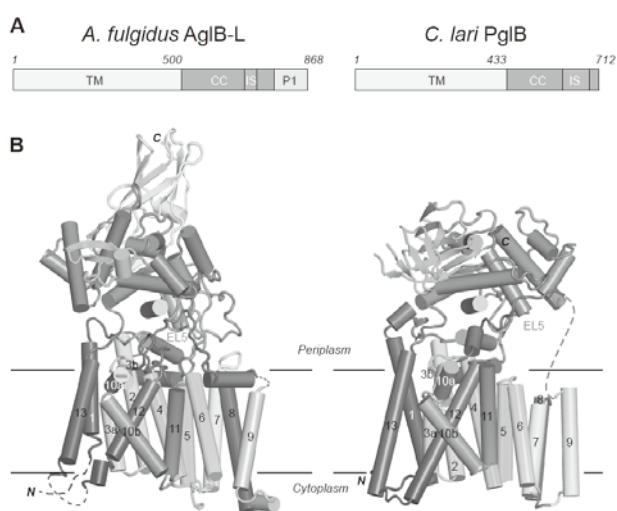
B. オリゴ糖転移酵素の構造生物学

タンパク質のアスパラギン残基への糖鎖付加（N 型糖鎖付加）は翻訳後修飾の代表である。コンセンサス配列 Asn-X-Thr/Ser 中の Asn 残基への糖鎖の転移反応はオリゴ糖転移酵素と呼ばれる膜タンパク質酵素が触媒している。N 型糖鎖修飾は真核生物だけではなく、古細菌にも広く存在する。また、真正細菌の一部にも存在する。OST 酵素の触媒サブユニットは STT3/Ag1B/Pg1B（真核/古細菌/真正細菌）と呼ばれるタンパク質である。オリゴ糖転移酵素は膜タンパク質であり、一次構造として N 末端側の 13 本の膜貫通ヘリックスからなる膜貫通領域と、C 末端側の可溶性ドメインからなっている。酵素活性に必須なアミノ酸残基は一次構造上散在しているため、酵素活性発現には膜タンパ

ク質全長が必要である。古細菌のオリゴ糖転移酵素は触媒サブユニットのみからなるシングルポリペプチド酵素であり、大腸菌の膜フラクションに活性のある形で発現することができる。まず、C末端可溶性ドメインの立体構造の決定を行い（論文4）、ついでその立体構造を分子置換のサーチモデルとして用いて、膜タンパク質としての全長の立体構造決定を行った（論文5）。

超好熱古細菌 *Archaeoglobus fulgidus* 由来の3つのオリゴ糖転移酵素のパラログのうち、AglB-L（全長868残基）を、C末端にヒスタグをつけた形で、大腸菌を用いて発現した。膜フラクションを界面活性剤であるDDM (n-dodecyl- β -D-maltopyranoside) を用いて可溶化後、Ni セファロース、スロンビンによるタグ除去、ゲルろ過を用いて精製した。ゲルろ過においてDDMをOG (noctyl- β -D-glucopyranoside) およびLDAO (lauryldimethylamine-oxide) に置換した。OGおよびLDAOサンプルから、空間群C2

（分解能2.5Å）と空間群P4₃2₁2（分解能3.4Å）の2つの結晶が得られた。C末端可溶性ドメインの立体構造を分子置換のサーチモデルとして用いて構造決定を行った（図B.1左）。N末端膜貫通領域には複数の保存された酸性残基があり、2価金属イオンに配位した構造をとって酵素活性中心を形成していること、C末端可溶性ドメインにはコンセンサス配列のセリン・スレオニンの側鎖を結合するポケットがあることがわかった。C2結晶の構造には2価金属イオンの近くに、結晶化溶液に含まれていた硫酸イオンが結合していた。これは反応プロダクトであるドリコールリン酸のリン酸基をミミックしていると考えている。また、2つの膜貫通ヘリックスをつなぐ長いループ（EL5と呼ぶ）はディスオーダーして電子密度が観測できなかった。一方、P4₃2₁2結晶の構造は、基質が結合していないアポフォームであり、EL5ループの電子密度が観測できた。他グループから報告されている真正細菌 *Campylobacter lari* のPglB (AglBのオースログ) の全長結晶構造（図B.1右）と合わせて考察することで、EL5のダイナミックな構造変化を中心とした、糖転移反応サイクルのモデルを提案した（論文5）。



図B.1 古細菌 *Archaeoglobus fulgidus* のAglB-Lの結晶構造（左）と、他グループより以前に決定されている真正細菌 *Campylobacter lari* のPglBの結晶構造（右）(Nature 474:350-355 (2011))

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

エンドサイトーシスは真核細胞が外部から物質を細胞内に取り込む基本生命現象の一つであり、クラスリン依存性エンドサイトーシスやカベオラ依存性エンドサイトーシスなどを含む。一方、細胞内膜輸送は、脂質二重膜で構成されたオルガネラと呼ばれる種々

の細胞内小器官間での、小胞を介した物質輸送システムである。このうちクラスリン依存性エンドサイトーシスに関して、そのクラスリン集積ステップに関与すると考えられるタンパク質である SGIP1 の μ homology domain (μ HD) の結晶構造決定に成功した。また生化学的手法により、 μ HD が他のエンドサイトーシス関連タンパク質である Eps15 の二つ並んだ DPF モチーフに結合することを解明した。さらに二つの DPF モチーフを含む Eps15 フラグメントと SGIP1 の μ HD の複合体の結晶構造を決定し、SGIP1 による Eps15 認識機構を解明した。またクラスリン被覆小胞からの被覆タンパク質の解離を担うと考えられる synaptojanin 2 タンパク質について、酵素活性を担う約 1000 残基のフラグメントの大量発現精製に成功し、結晶化や生化学的解析を進めている。さらに種々の細胞内膜輸送経路において様々な積み荷タンパク質の局在を決定する acidic cluster モチーフを特異的に認識する PACS2 タンパク質の結晶化やその acidic cluster モチーフとの相互作用解析に取り組んでいる。

D. 葉緑体タンパク質の構造機能解析

植物の葉緑体は、植物体に光が当たると、その刺激に応答して葉緑体の局在が変化する。葉緑体は弱い光を受けた場合、光への集積反応が見られ、逆に強い光を受けた場合、その光ダメージを避けるための回避反応が起こる。*Arabidopsis thaliana* の葉緑体の動態に関与する CHUP1 タンパク質の結晶構造解析を行っている。CHUP1 の C 末端ドメインについて、これまでに構造決定したものよりも長いフラグメントやそのアクチンとの複合体の結晶化スクリーニングを行い、このフラグメント単独の構造決定に成功した。結晶構造では、このフラグメントで長くした箇所は二量体化に関与しており、実際このフラグメントは二量体化してアクチンと相互作用することが判明した。さらにアクチンとの複合体の共結晶を得ている。

*九州大学・理学研究院 和田正三特任教授との共同研究

E. 超分子複合体の電子顕微鏡による単粒子解析

電子顕微鏡による単粒子解析法は試料の結晶化等を必要とせず、X 線や NMR では解析困難な超分子複合体を生理的条件下で立体構造解析できる。我々は DNA の複製、修復、組換え等に働く超分子複合体を中心に解析を進めている。これらのタンパク質は DNA との共結晶が得難い。Hjm ヘリケース-PCNA-DNA 複合体については、分解能を向上させたことにより、これまで全く見えていなかった DNA のほぼ全長を可視化することに成功した。DNA ライゲース-FEN-PCNA-DNA の 4 者複合体について、複合体の精製を確認、単粒子解析の結果、初期立体構造を構築することができた。PCNA 上に異なる複製因子を 2 つ結合させた状態を可視化させた最初の解析例である。ヌクレオソームとクロマチンリモデリング因子 FACT との複合体については、先ずその参照データとなるヌクレオソーム単体の構造解析が進展し、DNA 2 重鎖を明確に可視化でき、FACT 複合体についても構造解析を継続している。

F. 電子顕微鏡トモグラフィ法による観察

当研究所には汎用型 (Tecnai T20 FEI 社, 200 kV) とそれに比べてより厚い試料の観

察が可能となる電子顕微鏡 Polara (300 kV) があり, とともに電子顕微鏡トモグラフィー法による画像記録が極めて効率よく行える. 昨年に引続きトモグラフィーによる, 好熱性古細菌 *Thermoplasma acidophilum* の形態解析を行った. この細胞は大きさが約 0.5 μm 程度で古細菌のなかでも比較的小さいことから, 高加速電圧の電子線を用いることで細胞全体の観察を行える可能性があり, 電子顕微鏡トモグラフィー測定の良い試料であることがわかった. 固定・染色した *Thermoplasma acidophilum* の樹脂包埋切片の観察及び傾斜像シリーズのデータ収集を行い, 立体構造の再構成を行っている.

G. 技術支援活動

九州大学共同利用施設である核磁気共鳴装置 (3 台) と, 生体防御医学研究所技術室の X 線結晶回折装置およびクライオ電子顕微鏡 (FEI Polara) のユーザー管理を行っている. 九州大学における構造生物学の拠点形成を目指している. 九州大学 (医・理) の X 線結晶構造解析, 大分大学の NMR 解析, 九州大学 (生医・薬・農・理) および九州工業大学, 大阪大学, 京都大学, 長浜バイオ大学, 愛知教育大学, 東京工業大学, 東京大学等の電子顕微鏡解析を支援した.

最新の構造生物学技術の普及を図る活動を続けている. 今年度は, 第 7 回構造生物学に関する先端技術講演会「生体分子の動的状態を捉える新測定技術」(後援: 卓越した大学院拠点形成支援) を平成 25 年 9 月 4 日に九州大学馬出キャンパス総合研究棟で開催した. 外部から 4 人の研究者を招待して講演会を行った.



図G.1 講師の集合写真.
左から西田 (東大), 朽尾 (京大), 神田, 塚崎 (奈良先端), 杉田 (理研)

業績目録

原著論文

1. Inoue M, Yasuda K, Uemura H, Yasaka N, Schnauffer A, Yano M, Kido H, Kohda D, Doi H, Fukuma T, Tsuji A, Horikoshi N
Trypanosoma brucei 14-3-3I and II proteins predominantly form a heterodimer structure that acts as a potent cell cycle regulator in vivo.

- J Biochem* **153**: 431-439 (2013)
2. Komuro Y, Miyashita N, Mori T, Muneyuki E, Saitoh T, Kohda D, Sugita Y
Energetics of the presequence-binding poses in mitochondrial protein import through Tom20.
J Phys Chem B **117**: 2864-2871 (2013)
 3. Nyirenda J, Matsumoto S, Saitoh T, Maita N, Noda NN, Inagaki F, Kohda D
Crystallographic and NMR evidence for flexibility in oligosaccharyltransferases and its catalytic significance.
Structure **21**: 32-41 (2013)
 4. Matsumoto S, Shimada A, Kohda D
Crystal structure of the C-terminal globular domain of the third paralog of the *Archaeoglobus fulgidus* oligosaccharyltransferases.
BMC Struct Biol **13**: 11 (9 pages) (2013)
 5. Matsumoto S, Shimada A, Nyirenda J, Igura M, Kawano Y, Kohda D
Crystal structures of an archaeal oligosaccharyltransferase provide insights into the catalytic cycle of N-linked protein glycosylation.
Proc Natl Acad Sci USA **110**: 17868-17873 (2013)
 6. Fujinami D, Matsumoto M, Noguchi T, Sonomoto K, Kohda D
Structural elucidation of an asparagine-linked oligosaccharide from the hyperthermophilic archaeon, *Pyrococcus furiosus*.
Carbohydr Res **387C**: 30-36 (2014)
 7. Iwamoto C, Takenaka K, Urata S, Yamauchi T, Shima T, Kuriyama T, Daitoku S, Saito Y, Miyamoto T, Iwasaki H, Kitabayashi I, Itoh K, Kishimoto J, Kohda D, Matozaki T, Akashi K
The BALB/c-specific polymorphic SIRPA enhances its affinity for human CD47, inhibiting phagocytosis against human cells to promote xenogeneic engraftment.
Exp Hematol **42**: 163-171 (2014)
 8. Takeuchi K, Nishino T, Mayanagi K, Horikoshi N, Osakabe A, Tachiwana H, Hori T, Kurumizaka H, Fukagawa T
The centromeric nucleosome-like CENP-T-W-S-X complex induces positive supercoils into DNA.
Nucleic Acids Res **42**: 1644-1655 (2014)

総説

1. 神田大輔, 2013.
N型糖鎖生合成の主役：オリゴ糖転移酵素の構造生物学
実験医学 2013年6月増刊号「第三の生命鎖 研究の最前線 糖鎖の機能・作動原理と疾患」
第31巻 第10号, 146-152

学会発表

1. 松本俊介 (2013, 5/18)
オリゴ糖転移酵素の結晶構造とダイナミクス (シンポジウム講演)

- 平成 25 年度日本生化学九州支部例会・シンポジウム「タンパク質構造の動きと機能発現」,
佐賀
2. 松岡礼, 神田大輔 (2013, 6/14)
蛋白質結晶中に創り出した隙間を利用して分子の動きを観るための新しい X 線結晶解析
第 13 回日本蛋白質科学会年会, 鳥取
 3. Kouta Mayanagi (June 23, 2013)
Molecular architecture and switching mechanism of DNA replication fork complex (poster)
Gordon Research Conference, Three Dimensional Electron Microscopy, Colby-Sawyer College,
USA
 4. Hiromi Ogino, Sonoko Ishino, Kouta Mayanagi, Takuji Oyama, Tsuyoshi Shirai, Kosuke Morikawa,
Gyri Teien Haugland, Nils-Kåre Birkeland, Daisuke Kohda, Yoshizumi Ishino (Sep 8-13, 2013)
Activation mechanism of the replicative helicase in the thermophilic archaeon, *Thermoplasma
acidophilum* (poster)
Thermophiles 2013, Regensburg, Germany
 5. Kouta Mayanagi, Shinichi Kiyonari, Hirokazu Nishida, Sonoko Ishino, Mihoko Saito, Daisuke
Kohda, Yoshizumi Ishino, Tsuyoshi Shirai, Kosuke Morikawa (July 30, 2013)
Electron microscopic analysis of molecular architecture and switching mechanism of DNA
replication fork complex (poster)
ICSG2013-SLS, Sapporo
 6. 松本 俊介, 嶋田 睦, ジェイムス ニレンダ, 井倉 真由美, 河野 能顕, 神田 大輔 (2013,
9/11)
古細菌型オリゴ糖転移酵素による N 型糖鎖修飾の構造基盤の解明
第 86 回日本生化学会大会, 横浜
 7. 藤浪大輔, ジェイムス ニレンダ, 神田大輔 (2013, 9/12)
超好熱性古細菌由来 N 結合型糖鎖の化学構造決定
第 86 回日本生化学会大会, 横浜
 8. Kouta Mayanagi (Oct 4, 2013)
Electron microscopic structure analysis of protein-DNA complexes (oral)
The 3rd International conference on New Frontier of the Research on RecA-family recombinases
and their accessory proteins, Nantes, France
 9. 尾木野弘実, 石野園子, 真柳浩太, 大山拓次, 白井剛, 森川耿右, Gyri Teien Haugland, Nils-Kåre
Birkeland, 神田大輔, 石野良純 (2013, 10/26)
好熱性アーキア *Thermoplasma acidophilum* における複製ヘリカーゼ活性化機構の分岐進化
第 14 回極限環境生物学会, 川崎
 10. Daisuke Kohda (2013, 10/29)
Intentional creation of crystal-contact free space for monitoring large amplitude motions of ligands
in protein crystals (workshop, “transient macromolecular complexes involved in multilevel
biological phenomena”)
第 51 回日本生物物理学会, 京都

11. 藤浪大輔, 神田大輔 (2013, 11/14)
超好熱性古細菌由来のオリゴ糖転移酵素の基質となるオリゴ糖鎖の化学構造決定と相互作用解析
第 52 回 NMR 討論会, 金沢
12. 真柳浩太 (2013, 11/16)
DNA 複製に関与する超分子複合体の単粒子解析 (招待講演)
日本顕微鏡学会第 57 回シンポジウム, 名古屋
13. 神田大輔 (2013, 12/3)
スペクトロスコーピーとしての NMR の実力を理解するためのイントロダクション (ワークショップ「原理まで遡って再確認する核磁気共鳴法の実力」)
第 36 回日本分子生物学会, 神戸
14. Rei Matsuoka and Daisuke Kohda (2013, 12/3)
Intentional crystal-contact-free space to observe the large amplitude motions of ligands by X-ray crystallography
第 36 回日本分子生物学会年会, 兵庫
15. Hiromi Ogino, Sonoko Ishino, Kouta Mayanagi, Takuji Oyama, Tsuyoshi Shirai, Kosuke Morikawa, Gyri Teien Haugland, Nils-Kåre Birkeland, Daisuke Kohda, Yoshizumi Ishino (2013, 12/4)
Divergently evolved activation mechanism of the replicative helicase in the thermophilic archaeon, *Thermoplasma acidophilum*
第 36 回日本分子生物学会年会, 神戸
16. 松岡礼, 神田大輔 (2013, 12/5)
蛋白質結晶中に創り出した隙間を利用して分子の動きを観るための新しい X 線結晶解析 SPring-8 萌芽的研究課題ワークショップ, 東京
17. Shunsuke Matsumoto, Atsushi Shimada, Takahiro Yamasaki, Daisuke Kohda (Jan 12-17, 2014)
Crystal structures of an archaeal oligosaccharyltransferase provide insights into the catalytic cycle of N-linked protein glycosylation (poster)
27th International Carbohydrate Symposium, Bangalore, India
18. Daisuke Kohda (Feb 7, 2014)
Intentional creation of crystal-contact free space for analyzing large amplitude motions in protein crystals (oral)
International Symposium between Kyushu U. Post Global COE and School of Biomedical Sciences, Monash U., Melbourne, Australia
19. Atsuko Yamaguchi, Daisuke Kohda, Atsushi Shimada (Feb 7, 2014)
Structural basis for the recognition of tandem DPF motifs by the SGIP1 μ homology domain (poster)
International Symposium between Kyushu U. Post Global COE and School of Biomedical Sciences, Monash U., Melbourne, Australia
20. Daisuke Fujinami, Masaki Matsumoto, Daisuke Kohda (Feb 7, 2014)
Structural elucidation of N-linked oligosaccharides of hyperthermophilic archaea (oral)

International Symposium between Kyushu U. Post Global COE and School of Biomedical Sciences,
Monash U., Melbourne, Australia

21. Rei Matsuoka, Daisuke Kohda (Feb 7, 2014)

Intentional crystal-contact-free space to observe the large amplitude motions of ligands by X-ray
crystallography (poster)

International Symposium between Kyushu U. Post Global COE and School of Biomedical Sciences,
Monash U., Melbourne, Australia

22. 真柳浩太 (2014, 2/7)

DNA 複製フォーク複合体の分子構築及び切換え機構の研究 (招待講演)

阪大蛋白研セミナー, 大阪

情報生物学分野

Division of Bioinformatics

教授：須山 幹太

Professor : Mikita Suyama Ph.D.

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

平成 25 年度は須山幹太（教授）、佐藤哲也（助教）、吉原美奈子（テクニカルスタッフ）、吉村香（事務補佐員）の 4 名の体制でスタートし、11 月に齋藤大助（学術研究員）が加わった。

A. 選択的スプライシング制御機構の解析

選択的スプライシングは、トランスクリプトームに多様性をもたらす機構として知られており、エクソン選択のパターンから、エクソンスキップやイントロン保持、排他的スプライシングなどの複数のタイプに分類される。なかでも排他的スプライシングでは、複数ある排他エクソンの中から常にどれか 1 つのエクソンだけを選ぶという厳格な制御がなされており、その機構の解明は大変興味深い。これまで、ショウジョウバエの *dscam* 遺伝子において、特異的な RNA の二次構造形成が排他エクソンの選択に関与していることが示されていたが、脊椎動物ではそのようなメカニズムの存在は知られていなかった。そこで、RNA の二次構造形成による排他的スプライシング機構が左右相称動物 (bilateria) に普遍的に存在するものかどうかを調べるため、ヒトの転写産物の網羅的比較解析を行った。まず、この比較解析から 118 の排他的スプライシング座位を見出した。次に、これらの座位についてイントロンの二次構造形成能を調べたところ、*dynamin1* 遺伝子において、排他的スプライシング機構と合致する二次構造を同定した。この二次構造を形成する配列は他の哺乳類の対応するゲノム配列においても保存していることから、進化的な選択圧、すなわち機能的な働きを担っていることが示唆された。さらにこの配列はスプライス制御因子である FOX1, 2 の結合モチーフを含んでいることから、FOX1, 2 の結合と RNA の二次構造形成が競合することでエクソン選択の排他性を保証している、というモデルの提唱に至った (Suyama, 2013)。FOX2 については CLIP-seq のデータが公開されており、そのデータからもこのタンパク質と *dynamin1* の転写産物との結合が示されており、今回提唱したモデルのさらなる傍証となっている。

B. ラット腎臓における 8-オキソグアニンのゲノムワイドな分布の解析

8-オキソグアニン(8-oxoG)は、もっとも存在頻度の高い DNA 損傷の一つで、活性酸素による酸化損傷により生成することが知られている。ゲノム中のグアニン 10^5 - 10^6 個あたり一つの割合で存在すると言われている。これまで染色体スケールでの解析がなされているが、より解像度の高い解析は行われていなかった。そこで、名古屋大学医学研究科の豊國伸哉教授との共同研究で、ラット腎臓における ChIP-on-chip による 8-oxoG のゲノムワイドな分布の解析を行った。その結果、8-oxoG は遺伝子の少ない、所謂“gene desert”に多く見られることが明らかになった。このことは、転写される部位で能動的に修復される可能性を示しているため、遺伝子の発現強度と 8-oxoG の存在割合との相関の解析を行った。その結果、相関は認められず、転写と共役した修復が関与している可能性は少ないと結論付けた。次に、8-oxoG のゲノムワイドな分布を説明するための因子として、染色体の核内構造に着目した。なぜなら、染色体上で遺伝子の密度が高いところは核の内部存在し、遺伝子が少ないところは核膜周辺に存在することが知られているからである。染色体は、間期の核内において固有のほどけ方をしている。この「ほどけ方」はクロモソームテリトリーと呼ばれ、個々の染色体に特異的な蛍光を用いた FISH 法により明らかにされてきた。さらに、近年のハイスループット解析の進展に伴い、染色体が核膜近傍のラミナと相互作用する部位（ラミナ会合部位；lamina-associated domains; LADs）が同定されるようになった。そこで、8-oxoG と LADs との対応を調べたところ、強い正の相関が認められた。このことは、LADs において 8-oxoG が生成しやすいことを示している。その解釈として、(1) LADs は核膜近傍に存在するので、外部からの酸化損傷にさらされやすいため 8-oxoG が生成しやすい、あるいは (2) LADs はヘテロクロマチンを形成しやすいため、コンパクトな構造をとっており、OGG1 などの修復酵素の接近が阻害されているために 8-oxoG の修復がされにくく、そのために 8-oxoG が多く存在する、という二通りが考えられる。

C. 遺伝子発現情報を利用したヒストン修飾領域の同定法の開発

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

ストン修飾のサンプルにおいて、既存のプログラムでは解析困難であった ChIP-Seq データからも、特徴的なピーク領域の検出に成功している。今後は、計算機的にリード配列を生成することで、データ中のノイズに対して本方法がどれくらい有効であるか、といった検証を行う予定である。

D. ゲノムアライメント探索プログラムの開発

次世代シーケンサーをはじめとした技術の進歩にともない、新規生物種のゲノム配列決定が急速に進んでいる。すでに 100 種以上の脊椎動物のゲノム配列が明らかとなり、そのゲノムアライメントが公開されている。このようなゲノムアライメントは、その中に遺伝子発現制御配列などが強く保存した形で見られるため、それらの同定の上で非常に有用なものである。しかし、アライメントデータは、計算機の内部では特殊なフォーマットで書かれているためそのままでは人が見て解釈するのは難しく、さらに、そのファイルサイズも膨大なため、注目するゲノム部位におけるアライメントを得るのは容易ではない。そこで、これらの問題を解決するためのゲノムアライメント探索プログラムの開発を行った。このプログラムにより、アライメントデータを高速アクセスが可能なフォーマットへ書き換え、得られたアライメントを目で見て解釈しやすいように加工して出力することが可能になった。現在、一般の研究者の利用に供するため、ウェブサーバの開発を進めている。さらに、今後はこのプログラムを活用して、脊椎動物ゲノムに関する分子進化的解析が進むことが期待される。

E. 共同研究

次世代シーケンサーの普及に伴い、実験系研究者の間でも大規模なデータ解析に対する需要が急増している。本研究室は、生体防御医学研究所内や学内の研究室との連携をはじめ、理化学研究所免疫アレルギー科学総合研究センター、山口大学、基礎生物学研究所、東北大学などの研究室と、主にデータ解析の上での共同研究を行っている。また、国際ヒトエピゲノムコンソーシアム (IHEC) に参加している生体防御医学研究所の佐々木裕之教授が率いるチームの一員として、東北大学、国立成育医療センターとの共同研究でヒトの生殖・発生に関わる細胞のエピゲノム解析を進めている。その中では特にデータの取りまとめとその解析を担当している。

具体的な共同研究として、エクソーム解析による疾患原因変異の探索を複数の研究室と共同で進めているので、それについて述べる。エクソーム解析は哺乳類ゲノムの約 1% に相当するエクソン領域だけを濃縮することで、遺伝的変異が表現型に強く影響しそうな遺伝子領域のみを効率的に、かつ、全ゲノム配列決定に比べて十分な深度で、配列決定を行うものである。近年、遺伝的疾患の原因変異の同定において、目覚ましい進展をもたらしている。そこで得られるデータは膨大で、その中から原因変異を同定するには、様々なバイオインフォマティクス関連ツールの応用が必要である。そこで、一連のデータ解析を効率的に行うためのパイプラインの整備を行った。このパイプラインにより、エクソーム解析の元データから得られる数十万におよぶ変異データから、効率的に疾患原因と考えられる変異への絞り込むことが可能となった。今後は、前節で開発

したゲノムアライメント探索プログラムの活用をはじめ, たとえば RNA-seq からの遺伝子発現や転写産物構造も加味した解析により, さらに効率的な原因変異の絞り込みを目指す。

業績目録

原著論文

1. M. Suyama. 2013.
Mechanistic insights into mutually exclusive splicing in dynamin 1.
Bioinformatics 29, 2084-2087.
2. Y. Miyake, K. Toyonaga, D. Mori, S. Kakuta, Y. Hoshino, A. Oyamada, H. Yamada, K. Ono, M. Suyama, Y. Iwakura, Y. Yoshikai, S. Yamasaki. 2013.
C-type lectin MCL is an FcRγ-coupled receptor that mediates the adjuvanticity of mycobacterial cord factor.
Immunity 38, 1050-1062.
3. M. Villacorte, K. Suzuki, A. Hirasawa, Y. Ohkawa, M. Suyama, T. Maruyama, D. Aoki, Y. Ogino, S. Miyagawa, T. Terabayashi, Y. Tomooka, N. Nakagata, G. Yamada. 2013.
β-Catenin signaling regulates Foxa2 expression during endometrial hyperplasia formation.
Oncogene 32, 3477-3482.
4. Y. Takahashi, G. Sawada, T. Sato, J. Kurashige, K. Mima, T. Matsumura, R. Uchi, H. Ueo, M. Ishibashi, Y. Takano, S. Akiyoshi, H. Eguchi, T. Sudo, K. Sugimachi, J. Tanaka, S.E. Kudo, Y. Doki, M. Mori, K. Mimori. 2013.
Microarray analysis reveals that high mobility group A1 is involved in colorectal cancer metastasis.
Oncol. Rep. 30, 1488-1496.
5. T. Yokobori, H. Iinuma, T. Shimamura, S. Imoto, K. Sugimachi, H. Ishii, M. Iwatsuki, D. Ota, M. Ohkuma, T. Iwaya, N. Nishida, R. Kogo, T. Sudo, F. Tanaka, K. Shibata, H. Toh, T. Sato, G.F. Barnard, T. Fukagawa, S. Yamamoto, H. Nakanishi, S. Sasaki, S. Miyano, T. Watanabe, H. Kuwano, K. Mimori, K. Pantel, M. Mori. 2013
Plastin3 is a novel marker for circulating tumor cells undergoing the epithelial-mesenchymal transition and is associated with colorectal cancer prognosis.
Cancer Res. 73, 2059-2069.
6. Y. Takatsuno, K. Mimori, K. Yamamoto, T. Sato, A. Niida, H. Inoue, S. Imoto, S. Kawano, R. Yamaguchi, H. Toh, H. Iinuma, S. Ishimaru, H. Ishii, S. Suzuki, S. Tokudome, M. Watanabe, J.I. Tanaka, S.E. Kudo, H. Mochizuki, M. Kusunoki, K. Yamada, Y. Shimada, Y. Moriya, S. Miyano, K. Sugihara, M. Mori. 2013.
The rs6983267 SNP Is Associated with MYC Transcription Efficiency, Which Promotes Progression and Worsens Prognosis of Colorectal Cancer.

Ann. Surg. Oncol. 20, 1395-1402

7. S. Yamaguchi, T. Marumoto, T. Nii, H. Kawano, J. Liao, Y. Nagai, M. Okada, A. Takahashi, H. Inoue, E. Sasaki, H. Fujii, S. Okano, H. Ebise, T. Sato, M. Suyama, H. Okano, Y. Miura, K. Tani. 2014.

Characterization of common marmoset dysgerminoma like tumor induced by the lentiviral expression of reprogramming factors.

Cancer Sci. (in press).

学会発表

1. 佐藤哲也, 大川恭行, 須山幹太 (2013, 5/31).
遺伝子発現情報を利用したヒストン修飾領域同定法.
第7回日本エピジェネティクス研究会年会, 奈良.
2. 須山幹太 (2013, 9/7).
ゲノム情報解析にもとづく性差構築機構の解明.
新学術領域研究「性差構築の分子基盤」第5回領域会議, 佐賀.
3. 馬場崇, 大竹博之, 佐藤哲也, 宮林香奈子, 宍戸祐里菜, 嶋雄一, 大川恭行, 須山幹太, 諸橋憲一郎 (2013, 11/16).
Ad4BP/SF-1 レギュロンによる統括的なステロイドホルモン産生制御.
第21回日本ステロイドホルモン学会学術集会, 大阪.
4. 大竹博之, 馬場崇, 佐藤哲也, 嶋雄一, 宮林香奈子, 木村宏, 大川恭行, 須山幹太, 諸橋憲一郎 (2013, 11/16).
成獣ライディッシュ細胞における新規 Ad4BP/SF-1 標的遺伝子の同定.
第21回日本ステロイドホルモン学会学術集会, 大阪.
5. 松葉慎太郎, 和田俊樹, 武田和也, 佐藤哲也, 須山幹太, 高井俊行, 中村晃 (2013, 11, 30).
好塩基球・好酸球における SLPI の制御機構の解明.
第63回日本アレルギー学会秋季学術大会, 東京.
6. 栗根理恵, 佐藤哲也, 大川恭行, 須山幹太, 井上喜博 (2013, 12/4).
ショウジョウバエ血球細胞の腫瘍化をおこす *mxo* 突然変異の原因遺伝子産物の標的遺伝子群同定と転写制御.
第36回日本分子生物学会年会, 神戸.
7. 佐藤哲也, 大川恭行, 須山幹太 (2013, 12/5).
RNA-seq データを利用したヒストン修飾領域同定法.
第36回日本分子生物学会年会, 神戸.
8. 馬場崇, 大竹博之, 佐藤哲也, 宮林香奈子, 嶋雄一, 八木美佳子, 康東天, 大川恭行, 須山幹太, 諸橋憲一郎 (2013, 12/5).
Ad4BP/SF-1 レギュロンによる統括的な細胞内代謝制御.
第36回日本分子生物学会年会, 神戸.
9. 福井由宇子, 馬場崇, 大竹博之, 佐藤哲也, 大川恭行, 須山幹太, 諸橋憲一郎, 深見真紀 (2013, 12/3).

Cbx2/M33 ノックアウトマウス成長期における長管骨形成異常.

第36回日本分子生物学会年会, 神戸.

10. 宮林香奈子, 嶋雄一, 佐藤哲也, 馬場崇, 大竹博之, 大川恭行, 須山幹太, 諸橋憲一郎 (2013, 12/8).

胎仔型ライディッヒ細胞における遺伝子発現プロファイルの経時的变化.

第17回日本生殖内分泌学会学術集会, 東京.

11. 佐藤哲也, 大川恭行, 須山幹太 (2014, 1/31).

RNA-seq データを利用したヒストン修飾領域同定法.

CREST 「エピゲノム研究に基づく診断・治療へ向けた新技術の創出」研究領域・第3回領域会議, 福岡.

システムコホート学分野

Division of System Cohort

准 教 授 : 山 西 芳 裕

Associate Professor : Yoshihiro Yamanishi, Ph.D.

システムコホート学分野では、生命科学において重要な様々な分子（遺伝子、タンパク質、低分子化合物、薬物など）を解析するためのバイオインフォマティクスや、生命システムをネットワークとして理解するシステム生物学の研究を行っている。特に、ゲノム、トランスクリプトーム、プロテオーム、メタボローム、フェノームなどの異質なオミックスデータを統合解析し、様々な分子間相互作用ネットワーク（タンパク質間相互作用、代謝パスウェイ、タンパク質リガンド相互作用、薬物・標的タンパク質間相互作用など）を解析および予測する統計手法を開発している。また医療や創薬への応用では、ケモゲノミクスや薬理ゲノミクスに基づく薬物の標的分子や副作用の大規模予測、既存薬の適用拡大を目指すドラッグリポジショニングを行っている。

システムコホート学分野はテニュアトラック制度で 2011 年 3 月に発足した研究室であり、情報生物学分野と連携して研究活動を行っている。2013 年度は、山西芳裕（准教授）、岩田浩明（学術研究員）の 2 名で研究活動を開始し、10 月に澤田隆介（学術研究員）が加わった。

A. 分子間相互作用ネットワークの予測アルゴリズムの開発

生命のはたらきとは、多数の様々な分子が複雑に相互作用したネットワークのシステムとして実現されるものである。しかしながら、遺伝子制御ネットワーク、代謝パスウェイ、タンパク質間相互作用などの分子間相互作用ネットワークはほとんどが未知であるため、それらを網羅的に予測することは挑戦的な課題である。これまで我々のグループでは、遺伝子やタンパク質に関する様々なオミックスデータからタンパク質間の機能的な相互作用ネットワークを予測する統計手法の開発を行ってきた。

本年度は、代謝パスウェイに焦点を絞り、メタボロームスケールの多数の化合物のセットから酵素反応ネットワークを自動生成する方法を開発した。まず、化合物の化学構造をフィンガープリントと呼ばれるデータ構造（部分構造を持つかどうかを 1 または 0 で表すバイナリベクトル）に変換し、フィンガープリント間の差分によって化合物ペアの化学構造の違いを表現した。これに基づき、任意の 2 つの化合物（化合物ペア）が酵素反応で互いに交換されうるかを教師付き分類器によって予測した。予測精度は、PubChem など既存のフィンガープリントでも好成績を得た。更に、より複雑な化学構造を捉えるため、KCF-S (KEGG Chemical Function and Substructure) という新しい化合物の記述子を提案し、それを酵素反応ネットワーク予測に応用することを提案した。既存のフィンガープリントに比べて、予測精度が大幅に向上することを示した。

B. 薬物の標的タンパク質の予測

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

a. ケモゲノミクスの手法

本研究では、薬物の化学構造情報とタンパク質の配列情報の融合解析を行う「ケモゲノミクス」の枠組みで、薬物・標的タンパク質間相互作用ネットワークを予測するための手法を開発した。薬物の化学部分構造、標的タンパク質の配列情報、薬物と標的タンパク質相互作用ネットワークの間の相関を検証し、相互作用に重要と考えられる薬物の化学部分構造とタンパク質の機能ドメインのセットを抽出した。更に、薬の部分構造とタンパク質の機能ドメインの組み合わせに基づいて、薬とタンパク質の間の潜在的な相互作用を予測する手法を開発した。提案手法を、酵素、イオンチャネル、G蛋白質共役型受容体、核内受容体など様々なタンパク質から構成される相互作用ネットワークに適用し、その有効性を示した。また薬物に限らず膨大な数の化合物にも適用可能にするため、提案手法のアルゴリズムを改良し、任意の化合物を多数のタンパク質に対して同時スクリーニングできるように発展させた。

b. 薬理ゲノミクスの手法

本研究では、薬物の薬理作用情報とタンパク質の配列情報の融合解析を行う「薬理ゲノミクス」の枠組みで、薬物・標的タンパク質間相互作用ネットワークを予測するための手法を開発した。薬物の副作用プロファイルとタンパク質の配列プロファイルから薬物・標的タンパク質間相互作用ネットワークを予測する統計手法を提案し、クロスバリデーション実験でその有効性を示した。薬物の分子は本来目標とした標的タンパク質にのみ結合するとは限らず、本来目標としていない複数のタンパク質に結合し、予想外の薬理作用を起こすことがある。副作用プロファイルの利用は、そのような本来目標としていないオフターゲットのタンパク質を予測するのに特に有効であることを示した。化学構造に基づくケモゲノミクスの手法との比較を行い、化学構造に依存しない標的タンパク質の予測ができることを示した。

C. ドラッグリポジショニング

新しい薬を完成させるためには膨大な資金と時間が必要であるが、近年のハイスループットスクリーニングやコンビナトリアルケミストリーなどの技術の進歩にもかかわ

らず、年々認可される新薬が減少しているのが現状である。このような新薬開発の行き詰まりを打開する方法として、既存薬の新しい効能を発見し、その既存薬を別の疾患治療薬として開発する研究、「ドラッグリポジショニング (Drug repositioning)」が注目されている。既存薬はすでにヒトでの安全性や体内動態が確認されており、化合物製造法などの情報を利用できるという特長がある。そのため開発工程を大幅に削減でき、承認されるまでの期間が短く、また低コストで新薬の開発が可能となる。

本研究では、薬物に関するケミカル情報や薬理作用情報、疾患に関するフェノタイプ情報やパスウェイ情報などの網羅的データを有効活用し、潜在的な薬物の効能を予測するためのインシリコ手法の開発を行った。薬物の効能は薬物と疾患の関連として捉えることができるが、薬物と疾患は必ずしも1対1には対応していない。つまり、1つの薬物が複数の疾患に効くこともあれば、1つの疾患に対して複数の薬物が開発されることもある。ここでは、ドラッグリポジショニングの問題を多数の薬物群と多数の疾患群の間の関連ネットワークの予測問題に帰着させ、そのアルゴリズムを開発した。提案手法を、日本や欧米で承認されている全ての薬物(約七千個)に適用し、潜在的な効能の大規模予測を行った。例えば、糖尿病の薬が乳がん、骨粗しょう症の薬が小細胞肺がん、眼科用の薬が急性骨髄性白血病に、血小板凝集抑制薬がアルツハイマー病に効くとそれぞれ予測され、それらの妥当性は近年の文献や臨床報告で確認できた。現在は、文献で確認できなかった薬物と疾患の組み合わせの妥当性を検証している。また新しい効能に関連している標的タンパク質や標的パスウェイの同定を行っている。

業績目録

原著論文

1. Kotera, M.*, Tabei, Y.*, Yamanishi, Y.*, Tokimatsu, T., and Goto, S. (* Joint first author) 2013.
Supervised de novo reconstruction of metabolic pathways from metabolome-scale compound sets.
Bioinformatics, 29: i135-i144.
2. Kotera, M.*, Tabei, Y.*, Yamanishi, Y.*, Moriya, Y., Tokimatsu, T., Kanehisa, M., and Goto, S. (* Joint first author) 2013.
KCF-S: KEGG Chemical Function and Substructure for improved interpretability and prediction in chemical bioinformatics,
BMC Systems Biology, 7(Suppl 6):S2.
3. Tabei, Y. and Yamanishi, Y. 2013.
Scalable prediction of compound-protein interactions using minwise hashing,
BMC Systems Biology, 7(Suppl 6):S3.
4. Iwata, H., Mizutani, S., Tabei, Y., Kotera, M., Goto, S., and Yamanishi, Y. 2013.
Inferring protein domains associated with drug side effects based on drug-target interaction network,
BMC Systems Biology, 7(Suppl 6):S18.

総説

1. Yamanishi, Y. 2013.
Inferring chemogenomic features from drug-target interaction networks,
Molecular Informatics, 32: 991–999.
2. 山西芳裕. 2013
薬物・標的タンパク質間相互作用ネットワークの予測,
日本化学会情報化学部会誌, 31(2): 26-29.
3. 山西芳裕. 2013
創薬科学におけるバイオインフォマティクス,
日本化学会情報化学部会誌, 31(2): 25.

予稿集

1. Tabei, Y., Kishimoto, A., Kotera, M., and Yamanishi, Y. 2013.
Succinct Interval Splitting Tree for Scalable Similarity Search of Compound-Protein Pairs with Property Constraints,
Proceedings of the 19th ACM SIGKDD Conference on Knowledge Discovery and Data Mining (KDD2013), pp.176-184, ACM New York, NY, USA.

学会発表（口頭のみ）

国際学会

1. Kotera, M., Tabei, Y., Yamanishi, Y., Tokimatsu, T., and Goto, S. (2013, 7/19-23).
Supervised de novo reconstruction of metabolic pathways from metabolome-scale compound sets.
The 21st International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology & 12th European Conference on Computational Biology (ISMB/ECCB2013), Berlin, Germany.
2. Tabei, Y., Kishimoto, A., Kotera, M., and Yamanishi, Y. (2013, 8/11-14).
Succinct Interval Splitting Tree for Scalable Similarity Search of Compound-Protein Pairs with Property Constraints.
The 19th ACM SIGKDD Conference on Knowledge Discovery and Data Mining (KDD2013), Chicago, USA.
3. Kotera, M., Tabei, Y., Yamanishi, Y., Moriya, Y., Tokimatsu, T., Kanehisa, M., and Goto, S. (2013, 12/16-18).
KCF-S: KEGG Chemical Function and Substructure for improved interpretability and prediction in chemical bioinformatics.
The 24th International Conference on Genome Informatics (GIW2013), Singapore, Singapore.
4. Tabei, Y. and Yamanishi, Y. (2013, 12/16-18).
Scalable prediction of compound-protein interactions using minwise hashing.
The 24th International Conference on Genome Informatics (GIW2013), Singapore, Singapore.

5. Iwata, H., Mizutani, S., Tabei, Y., Kotera, M., Goto, S., and Yamanishi, Y. (2013, 12/16-18).
Inferring protein domains associated with drug side effects based on drug-target interaction network.
The 24th International Conference on Genome Informatics (GIW2013), Singapore, Singapore.
6. Yamanishi, Y. (2014, 1/23-24).
Predicting drug-target interaction networks from the integration of chemical, genomic, and pharmacological spaces.
International Symposium on Tumor Biology in Kanazawa & Academic Drug Discovery Symposium,
Kanazawa, Japan.

国内学会

1. 岩田浩明, 山西芳裕 (2013, 6/27-28).
スパース統計モデルによる薬物-疾患ネットワークの予測.
第34回バイオ情報学研究会, 恩納村.
2. 山西芳裕 (2013, 9/4-5).
オミックスデータから薬物標的分子を網羅的に予測するためのバイオインフォマティクス.
第3回NGS現場の会, 神戸.
3. 山西芳裕 (2013, 9/8-11).
ゲノム情報, ケミカル情報, 薬理情報から薬物標的分子を予測する統計手法.
2013年度統計関連学会連合大会, 大阪.
4. 山西芳裕 (2013, 9/13).
ケモゲノミクスや薬理ゲノミクスの手法による薬物・標的タンパク質間相互作用ネットワークの予測.
第2回生命システム理論研究会, 東京.
5. 山西芳裕 (2013, 10/28-31).
異種オミックスデータの融合に基づく分子間相互作用ネットワークの予測.
第2回生命医薬情報学連合大会, 東京.
6. 山西芳裕 (2013, 11/7-8).
機械学習による薬物の標的分子や副作用の網羅的予測.
第41回構造活性相関シンポジウム, 西宮.
7. 岩田浩明, 吉原美奈子, 山西芳裕 (2013, 11/7-8).
ドラッグリポジショニングのためのイン・シリコ手法の開発.
第41回構造活性相関シンポジウム, 西宮.
8. 山西芳裕 (2014, 3/12-13).
薬物の潜在標的分子と新規効能のインシリコ予測.
共進化社会システム創成拠点フォーラム, 東京.
9. 山西芳裕 (2014, 3/20).
ドラッグ・リポジショニングのためのイン・シリコ手法.
千里ライフサイエンス振興財団専門実務セミナー「新規効能治療薬の創製～ドラッグ・リ
ポジショニングを用いて～」, 大阪.

防御分子構築学分野

Division of Molecular Design

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

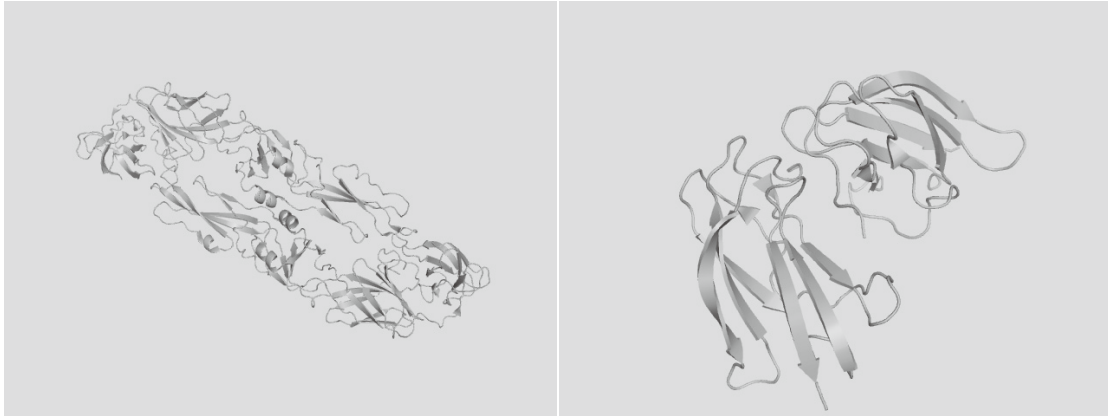
当部門では、バイオインフォマティクスを用いた研究を行なっている。研究対象は、主にタンパク質であり、その配列や立体構造などを用いて、それからの機能情報の抽出のための方法の開発と、その応用研究を行なっている。いずれのタイプの研究においても、進化的視点からの情報解析を実施している。

A. デングウイルスのエンベロープタンパク質の分子進化解析

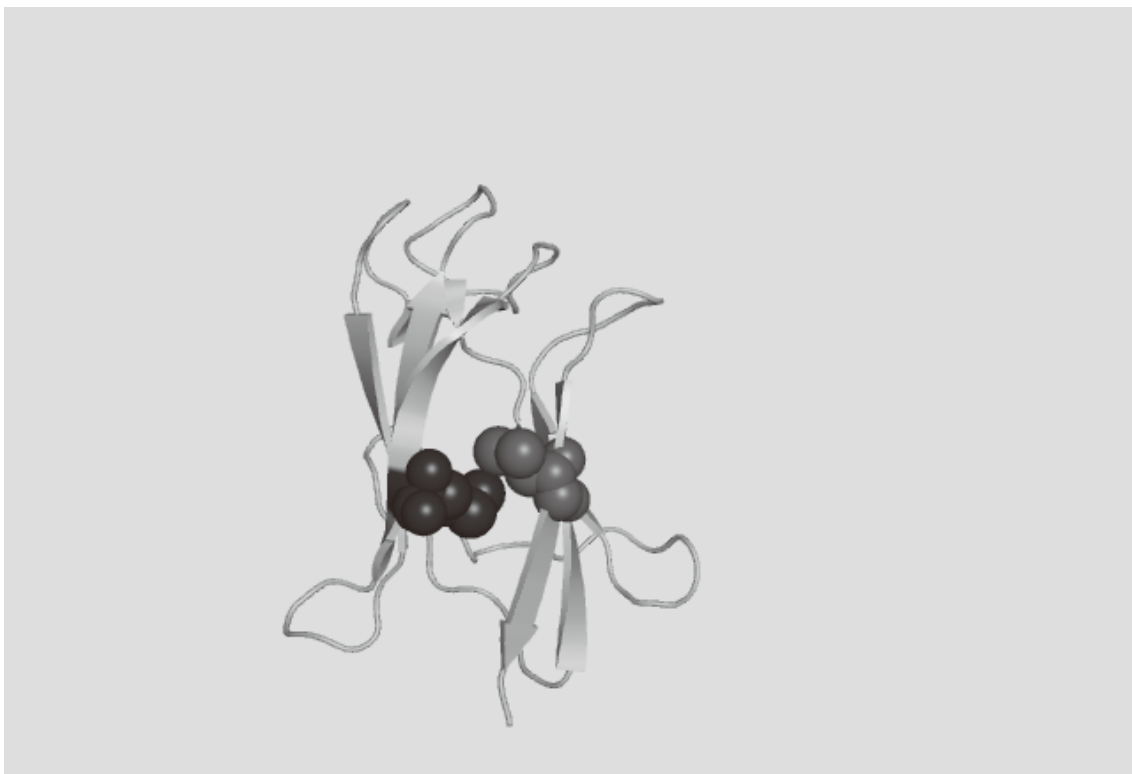
デングウイルス(dengue virus)は、南アジアや南東アジアにおいて見られる主要な感染症の原因であり、蚊によって媒介され、毎年5千万人から1億人程度の感染が報じられている。デングウイルス感染の症状は、デング熱とよばれる中程度のものから、デング出血熱とよばれる重度で生命を脅かすものまでである。デングウイルスはフラビウイルス科に属しており、一本鎖プラスRNAのゲノムを持つ。ウイルスRNAは、キャプシド、膜、エンベロープタンパク質によって被包されている。エンベロープタンパク質の立体構造は決定されており、3つのドメイン、ED1, ED2, ED3よりなることが知られている。宿主細胞の細胞膜上のヘパラン硫酸が、ウイルス受容体として働くと考えられているが、エンベロープタンパク質のED3ドメインがヘパラン硫酸と相互作用し、またED2ドメインのループの1つがウイルス粒子と細胞膜の融合に関与している。また、ED3にはデングウイルス特異的なエピトープが含まれており、このドメインが宿主の抗体との相互作用にも関わっている。これらのことから、エンベロープタンパク質がデングウイルスの感染において重要な役割を演じると考えられている(図1、(a), (b))。

デングウイルスからは、4つの異なる血清型(DEN1, DEN2, DEN3, DEN4)が同定されているが、これら4つの血清型の中のDEN3の配列一致度は70~89%と比較的高く、これらの三次構造は非常に類似するものと期待される。一方、それらの中のアミノ酸の違いは、それらの中の構造安定性に違いをもたらすと考えられるが、このような観点からの解析は十分には行われていなかった。東京農工大学工学部生命工学科の黒田裕准教授のグループは、このような観点から、デングウイルスの異なる血清型のED3について、熱力学的安定性の計測やX線結晶構造解析を行った。藤は、黒田准教授のグループのElahiの分子系統解析を指導し、ED3の進化的解析を実施した。

図 1



(a) エンベロープの構造 (PDB ID:1UZG) (b) ED3 の構造 (PDB ID:3WE1)



(c) ED3 ドメインの構造 (PDB ID:3WE1)。図中左および右の空間充填モデルはそれぞれ残基位置 310, 387 のアミノ酸を表す。

進化の過程において、その構造上の安定性に影響するアミノ酸置換は、それに近接するアミノ酸置換によって、その影響がキャンセルされ、安定性が維持されている場合がしばしば観察されている。このような変異は相補的変異 (compensatory mutation) と呼ば

れている。そこで、黒田らのグループで決定された DEN4 ED3 の立体構造と、4つの血清型の ED3 のアミノ酸配列を利用して、相補的変異が生じているサイトの候補を探索した。まず、構造上埋もれている疎水性のアミノ酸の中で、4つの血清型間で保存されていないものを選択すると10個のサイトが同定された。次にこの10個のサイトのそれぞれに対して空間的に近接している(α 炭素間距離で10Å以下)アミノ酸を同定し、16個のアミノ酸ペアを相補的変異が生じうる場所の候補とした。黒田らは、この16ペアのサイトに対して、その一方を4つの血清型のアミノ酸に変化させたモデル構造を構築し、そのロータマーについて構造的なぶつかりが生じうるかを検討した。強い衝突が観察されたのは、アミノ酸残基位置310/387, 335/367の2ペアのみであった。しかし、4つの血清型間での構造的な相補性が観察されるのは前者のみであった。ED3の構造が決定されているDEN3とDEN4では、310/387はそれぞれVal/IleとMet/Leuとなっており、size-switchタイプの相補的変化が起きているように見える。そこで、この二つのサイトに着目して解析が行われた(図1(c))。構造の決定されているDEN3およびDEN4のED3のアミノ酸残基位置310/387のアミノ酸を、実際の血清型に見られるアミノ酸に、一つずつ、あるいは二個を同時に変異させ、その融解温度が計測された。すると、DEN3のI387L, V310Mの融解温度が大きく低下し、熱力学的に不安定化していることがわかった。モデル構造の解析から、前者では疎水コアに小さな穴が形成されること、また後者では側鎖のぶつかりが大きいことが示唆され、これが安定性の低下の原因であると考えられた。

これらの結果を、実際の4つの血清型の進化の観点から解釈するため、分子系統解析を行った。この解析では、アミノ酸の代わりに、ED3の塩基配列を用いた。分子系統解析は、最尤法で行われ、トポロジーの信頼性はブートストラップ解析で確認された。この解析にはPhyML (<http://www.phylogeny.fr>)を使用した。また、系統樹の上の内部節に対応する祖先配列をASR (<http://www.datamonkty.org>)を用いて推定した。推定にあたって、PhyMLにより得られたトポロジーが仮定された。

図2に推定された最尤系統樹を示す。この系統樹は4タクソンについての無根系統樹として構築されている。そのため、この系統樹からはルートは決定できない。しかし、アミノ酸レベルで、アウトグループとして他のフラビウイルスの対応する配列を含めて分子系統解析を行ったところ、デングウイルスの血清型については同じトポロジーが得られ、そのルートは、この図のNODE0とNODE1の枝の上に推定されていた。この系統樹では、デングウイルスの血清型は大きくDEN4, DEN2のグループとDEN1, DEN3のグループに分かれている。この最尤系統樹のトポロジーのブートストラップ確率は97%であった。

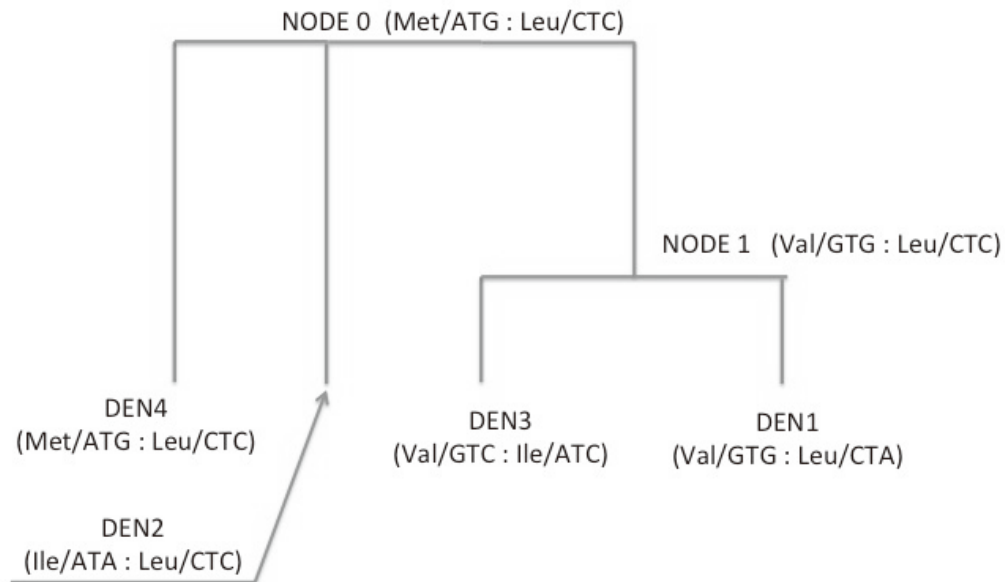


図2 デングウイルスの4つの血清型のED3についての塩基配列に基づく分子系統樹とアミノ酸サイト310、387の推定祖先コドン

このトポロジーに従って、2つの内部節 NODE 0 と NODE 1 に対応するアミノ酸サイト 310、387 のコドンの塩基配列の推定を行った。表 1 に、ASR による祖先塩基の推定結果とその支持率を示す。複数の祖先塩基が推定されたサイトもあったが、それらの支持率はきわめて低かったため、図 2 および表 1 では最も支持率の高かった塩基のみを示している。

310/387 の祖先アミノ酸が Met/Leu だとした時に、DEN3 の Val/Ile に至るパスは次の 2 種類が考えられる。

Path1: Met/Leu -----> Val/Leu -----> Val/Ile

Path2: Met/Leu -----> Met/Ile -----> Val/Ile

分子系統解析は、Path1 を支持しているが、これは黒田らの熱力学的な安定性の実験結果と合致する。DEN3 ED の 310/387 の融解温度は、DEN3 ED3 の変異体 Met/Leu に対して Val/Leu への変化では 4.8 ~ 4.9° 程度の融解温度の低下が生じるが、Met/Ile への変化による融解温度の低下は 9.1 ~ 11.1° と非常に大きい。Val/Leu から Val/Ile への変化では 5.5 ~ 5.9° 程度の融解温度の上昇が、また Met/Ile から Val/Ile への変化で

は 9.8 ~ 11.1° の上昇が観察されている。しかし、中間型での安定性の大きな低下から、Path2 ではなく Path1 が生じやすいと考えられ、これは祖先配列推定の結果と一致している。Bloom et al. (2006) や Tokuriki and Tawfik (2009) の論文の中で、球状タンパク質はその進化の過程で熱力学的安定性が維持されることが理論的に示唆されており、今回の解析結果はそのような仮説を支持する結果となっている。

Residue Position	NODE ID	Amino Acid at the NODE	Joint Decided Nucleotide	Marginal Nucleotide (Support)	Sample Nucleotide (Support)
310	0	Met	A	A (0.85)	A (0.88)
			T	T (0.99)	T (1.00)
			G	G (0.78)	G (0.89)
	1	Val	G	G (0.88)	G (0.92)
			T	T (0.99)	T (1.00)
			G	G (0.93)	G (1.00)
387	0	Leu	C	C (0.95)	C (1.00)
			T	T (0.99)	T (0.88)
			C	C (0.94)	C (0.98)
	1	Leu	C	C (0.92)	C (0.98)
			T	T (0.99)	T (1.00)
			C	C (0.85)	C (0.70)

表 1 ASR による内部節の塩基の推定結果。最も支持率の高いもののみを示す。

本解析でもう一つの重要な点は、デングウイルスの DEN3 と DEN4 の ED3 に見られた size switch タイプの変化が、correlated mutation あるいは coevolution の結果ではない点である。もし、310/387 のサイトへの突然変異に伴う熱力学的安定性の低下がウイルス生存に重要なファクターであれば、図 2 に示しているように一つずつ置換が生じるのではなく、二つのサイトで同期して相補的な変化が生じると考えられる。Path1 に示した NODE 1 の中間型 Val/Leu の安定性は低下しているが、その低下は 4.8 ~ 4.9° 程度であり、このくらいの不安定化は中立あるいはほぼ中立な変化として受け入れられたのであろう。その後、DEN3 に至る仮定での新たな変異の獲得で、安定性を回復しており、この段階で size-switch タイプのパッキングの再構成が生じたと考えられる。

DEN3 と DEN4 の ED3 のみを見ている限りは、compensatory mutation が起きたように見えるが、このことは correlated evolution の解析にあたって、現在の配列のみに基づく解析の危険性を示唆すると同時に、祖先配列推定を含む分子系統解析の重要性を示している。一方、分子系統解析では、全てのサイトが独立していると仮定した手法がほとんどであり、残基間相互作用が考慮されておらず、correlated evolution の解析にあたっての理論的な背景もまだ不完全であるといえよう。

本解析の結果は、Elahi et al (2013) で報告した。本報告中の図表は、この論文中小およびサプリメント中の図表を改編したものである。本年度は、これ以外に、東京電機大学の根本、九州大学の山西らとともに GPCR 相互作用予測手法の開発、大阪大学の大安、産総研の杉原とともに、ケモカイン受容体の機能差の解析、大阪大学の大安とともにレトロエレメント由来遺伝子の非コード領域の解析、また産総研の油谷とともに酵母の細胞周期に関する遺伝子ネットワーク予測などの研究を行った。

業績目録

原著論文

1. Yokobori T, Iinuma H, Shimamura T, Imoto S, Sugimachi K, Ishii H, Iwatsuki M, Ota D, Ohkuma M, Iwaya T, Nishida N, Kogo R, Sudo T, Tanaka F, Shibata K, Toh H, Sato T, Barnard GF, Fukagawa T, Yamamoto S, Nakanishi H, Sasaki S, Miyano S, Watanabe T, Kuwano H, Mimori K, Pantel K, Mori M
Plastin3 is a novel marker for circulating tumor cells undergoing the epithelial-mesenchymal transition and is associated with colorectal cancer prognosis
Cancer Res. 73, 2059-2069 (2013)
2. Elahi M, Islam MM, Noguchi K, Yohda M, Toh H, Kuroda Y.
Computational prediction and experimental characterization of a "size switch type repacking" during the evolution of dengue envelope protein domain III (ED3).
*Biochim Biophys Acta.*1844, 585-592 (2013)
3. Aburatani, S, Toh, H
Estimation of Physical Transcriptional Control in Yeast Cell Cycle by Structure Equation Modeling
In: Protein Purification and Analysis I, pp.103-121 iConcept Press (2013))

総説

1. 佐藤恵子、白木澤佳子、高木利久、藤博幸
我が国におけるバイオインフォマティクスを取り巻く現状
人材に関するアンケート調査結果 –
情報管理 56, 783-789 (2014)

学会発表

1. Aburatani, S., Toh, H. “Network Inference of AP pattern formation system in *D.melanogaster* by Structural Equation Modeling”, *The 2nd International Conference on Mathematical Modeling in Physical Sciences (IC-MSQUARE 2013)*, 1.Sep.-5.Sep., 2013, Prague, Czech Republic (2013)
2. 大安裕美、藤博幸
Evolutionary analysis of domesticated genes derived from LTR retroelements
第36回日本分子生物学会年会 (2013)

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

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

A. S-ニトロシル化修飾を介した細胞間シグナル伝達

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

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

B. 水素分子に対する生体反応の機序

生体に作用するガス状分子としては、呼吸に関係する酸素・二酸化炭素をはじめ、一酸化炭素・硫化水素・水素など多くの分子が知られるようになった。従来扱われてきた様な高濃度のガス状分子は、酸素も含めて生体障害性を示すことが多い。しかし実際の生体内では多くの場合、産生濃度は極めて低く制御されており、産生部位と作用部位が近接しているなどの物理的な機序を介することにより、生理機能の構築に深く関わっていることが知られてきた。

近年、ヒト生体内には産生酵素が存在しないものの、外部から取り込まれた水素分子がヒト組織内部において様々な生理作用・治療効果を示す報告がなされてきた。なかでも、九州大学薬学部（野田百美准教授）と生体防御医学研究所（中別府雄作教授）から報告された、パーキンソン病モデルマウスの脳組織におけるドーパミン産生神経の脱落が水素水の経口投与により改善されるという報告は、その後、ヒトパーキンソン病患者でも水素水投与が臨床症状を改善させる報告（順天堂大学）によって検証され、臨床展開も含めて幅広い社会的関心を集めた。しかし、マウス飲水中に含まれる水素濃度が従来用いられてきたものよりも10分の1以下と低濃度であり、脳内への水素の移行も確認出来ないなど、その作用機序の解明が期待されていた。

生体内におけるガス状分子は、標的分子と直接反応する事により効果を発揮すると考えられてきたため、水素分子に関しても標的組織（脳）における作用分子（水素）の存在が機序を明らかにするための前提とされていた。しかし、これまでの水素分子に関する研究成果を集約すると、飲水中に溶解させた場合に認められる効果（抗パーキンソン病）と、肺から気体として取り込まれた場合に効果が認められる病態（抗虚血再灌流障害）が独立していた。そこで、生体内での飲水の最初の貯留臓器である胃に着目し、水素分子が他のシグナル因子を惹起する事により、脳においてドーパミン産生神経の保護作用を発揮する仮説を検証することにした。

胃は消化器官であるが、同時にガストリン・グレリン・ソマトスタチンなどのホルモン産生臓器でもある。そこで、水素水を飲水させたマウスの胃における遺伝子発現を検討したところ、水素水飲水によりグレリン遺伝子が有意に上昇する事が明らかになった。また、胃における遺伝子発現量に相関して血中グレリン濃度も上昇し、水素水によるグレリン産生亢進作用が明らかになった。また、交感神経β受容体が水素水によるグレリン産生亢進に関与している事も薬理的に明らかになった。脳にはグレリン受容体が存在し、体循環に投与されたグレリンが抗パーキンソン病効果を示す事が既に報告されている。そこで、水素水飲水によるドーパミン神経脱落抑制効果が胃から産生されるグレリンによっていることを示すため、水素水投与時にグレリン受容体阻害薬やβ受容体遮断薬を併用したところ、水素水の飲水効果が消失した。これらの成果を総合し、水素水飲水は胃におけるグレリン産生を介して抗パーキンソン病効果を示すと考えられた。今後、ヒトにおける水素水飲水とグレリン産生亢進などが明らかにされていく事が期待される。

水素分子による生体作用に関しては現象の報告のみが先行していたため、水素分子の作用機序を科学的に明らかにする事が多方面から望まれていた。また、一般社会においても水素の効用が話題になる事もあるが、一方で非科学的な拡大解釈が行なわれている事も事実である。一般社会に対して科学的な理論・知識に基づく論拠を提供する事も医学的には極めて重要である。今回の研究成果が、社会への知の還元にもつながる事を期待している。

本研究は、九州大学ヌクレオチドプール研究センター（中別府雄作教授）病態制御研究部門（薬学研究院病態生理学分野：山藤芽美さん、野田百美准教授）の共同研究、生体防御医学研究所共同利用課題（千葉大学医学部薬理学）としても実施された。

業績目録

原著論文

1. Takamatsu S, Korekane H, Ohtsubo K, Oguri S, Park JY, Matsumoto A, Taniguchi N. 2013.
N-acetylglucosaminyltransferase (GnT) assays using fluorescent oligosaccharide acceptor substrates: GnT-III, IV, V, and IX (GnT-Vb).
Methods Mol Biol. 1022: 283-98.
2. Korekane H, Park JY, Matsumoto A, Nakajima K, Takamatsu S, Ohtsubo K, Miyamoto Y, Hanashima S, Kanekiyo K, Kitazume S, Yamaguchi Y, Matsuo I, Taniguchi N. 2013.
Identification of ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 3 (ENPP3) as a regulator of N-acetylglucosaminyltransferase GnT- IX (GnT-Vb).
J Biol Chem. 288(39): 27912-26
3. Matsumoto A, Yamafuji M, Tachibana T, Nakabeppu Y, Noda M, Nakaya H. 2013.
Oral 'hydrogen water' induces neuroprotective ghrelin secretion in mice.
Sci Rep. 2013 20;3:3273.
4. Sunagawa T, Shimizu T, Matsumoto A, Tagashira M, Kanda T, Shirasawa T, Nakaya H. 2014.
Cardiac electrophysiological alterations in heart/muscle-specific manganese-superoxide dismutase-deficient mice: prevention by a dietary antioxidant polyphenol.
BioMed Research International. in press.

著書

1. 松本明郎
酸化ストレス制御によるレドックスシグナルの維持 –とくに一酸化窒素(NO)によるシグナル伝達とその制御機構 医学のあゆみ 2013 Nov; 247(9): 770-5.

学会発表

1. 松本明郎, 清水健, 津々木博康, 野田公俊, 中谷晴昭 (2013, 6/28-6/29).
一酸化窒素(NO)による腸管出血性大腸菌(EHEC)の感染制御と重症化機序
第13回日本NO学会学術集会, 沖縄.
2. 松本紋子, 松本明郎, 谷口直之 (2013, 9/11-9/13).
筋萎縮性側索硬化症モデルマウスにおける Cu,Zn-superoxide dismutase の可溶性マルチマー形成と発症前後における構成オリゴマーの変化
第86回日本生化学会大会, 横浜.
3. 是金宏昭, Jong Yi Park, 松本明郎, 中嶋和紀, 高松真二, 大坪和明, 宮本泰豪, 谷口直之 (2013, 9/11-9/13).
エクトヌクレオチド ピロホスファターゼ/ホスホジエステラーゼ 3 (ENPP3)は糖転移酵素 GnT-IX (GnT-Vb)の制御因子である
第86回日本生化学会大会, 横浜.

4. 眞山義民, 松本明郎, 河野陽一, 中谷晴昭 (2013, 10/19).
フェニルアラニン過負荷による細胞障害性の発生機構
第 129 回日本薬理学会関東部会, 東京.
5. Sanayama, Y., Matsumoto, A., Kohno Y., Nakaya H. (2013, 11/27).
Establishment of phenylalanine sensitive cells revealed mTOR inhibition by excessive phenylalanine
The 55th Annual Meeting of The Japanese Society for Inherited Metabolic Diseases (JSIMD), 千葉.
6. 松本明郎 (2014, 1/17).
生理的低分子量物質の生体内作用
第 152 回 Basic Science Joint Meeting, 千葉.
7. 松本明郎 (2014, 1/21).
生理的低分子量物質の生体内作用
第 664 回生医研セミナー・ヌクレオチドプール研究センターセミナー, 博多.
8. 松本明郎 (2014, 2/1).
水素水による新たな生理作用の発現機序 —胃におけるグレリン産生の活性化—
第 4 回分子状水素医学シンポジウム, 東京.
9. 山藤芽実, 松本明郎, 立花知子, 中別府雄作, 野田百美, 中谷晴昭 (2014, 3/19-3/21).
水素水の飲用はグレリン産生を亢進し、MPTP 誘発性パーキンソン病モデルマウスにおいて
神経保護作用を発揮する
第 87 回日本薬理学会年会, 仙台.
10. 小島章光, 西田洋文, 松本明郎, 岩田和実, 白山武司, 矢部千尋, 中谷晴昭 (2014, 3/19-3/21).
低酸素時における洞徐脈に対する Nox1/NADPH オキシダーゼの保護作用
第 87 回日本薬理学会年会, 仙台.

防御システム再生学分野

Division of Regeneration Biology

客員教授：稲葉 謙次

Professor : Kenji Inaba, Ph.D.

当研究室では、細胞におけるタンパク質品質管理システムの作用機序を構造生物学、生化学、細胞生物学的アプローチにより深く理解することを目指している。中でも、タンパク質の立体構造形成において重要な役割をもつジスルフィド結合の形成・異性化及び開裂に関わるレドックス因子について、分子構造レベルから細胞レベルまで詳細かつ網羅的な研究を展開している。近年の研究により、ヒト細胞の小胞体において、当初考えられていたよりもはるかに複雑なジスルフィド結合形成のためのネットワークが張り巡らされていることが明らかとなりつつある。当研究室では、各レドックス経路について構造情報に基づく生化学的および細胞生物学的研究を幅広く進めており、中でも、最近見つかったPDI酸化酵素 Peroxiredoxin-4 を起点としたジスルフィド結合導入経路の構造機能解析において大きな進展があった。さらに小胞体-ゴルジ体間のpH勾配を利用し、小胞体タンパク質や未成熟分泌タンパク質のゴルジ体から小胞体へのリテンションを担うPDIファミリータンパク質 ERp44 について系統的な生化学解析を行い、そのpH勾配に依存した機能発現制御機構をアミノ酸レベルで解明した。これら成果について、複数の論文を発表するに至っている。

人事面では、平成25年度4月に稲葉が東北大学多元物質科学研究所に教授として異動した。4月と10月の二回にわたり引っ越し作業を行い、現在は研究室整備もほぼ完了し、新たな研究を展開している。

A. 新規ジスルフィド結合形成因子 Prx4 を起点とした酸化的フォールディング経路の構造と作用機序に関する研究

小胞体内で合成されるタンパク質の多くはジスルフィド結合の導入を伴う酸化的フォールディングを受けると考えられており、その基質には種々の細胞表層受容体、免疫グロブリン、血液凝固因子、インスリンなどが知られる。これまで真核生物におけるタンパク質のジスルフィド結合の形成は主として基質にジスルフィド結合を導入する protein disulfide isomerase (PDI) と PDI を再酸化する酵素 ER oxidoreductin 1 (Ero1) により行われると考えられてきた。しかし近年 Ero1 以外の PDI 酸化酵素が相次いで同定され、高等動物細胞の小胞体にはジスルフィド結合形成のための複数の酸化経路が複雑なネットワークを形成しているという新たな概念が確立さ

れつつある。

我々は新規に見つかった PDI 酸化酵素 peroxiredoxin-4 (Prx4) を介したジスルフィド結合導入経路の同定と機能的役割の解明を目的として研究を進めた。その結果、Ero1 は PDI を特異的に酸化するのに対し、Prx4 は PDI ファミリータンパク質のうち ERp46 と P5 の酸化に特化した酸化酵素であることを明らかにした。また PDI は基質に正しくジスルフィド結合を導入するのに対し、P5 あるいは ERp46 は PDI よりも高効率にジスルフィド結合を導入するものの、正しいジスルフィド結合を選択的に架ける能力には欠けることがわかった。これら異なる複数の酸化経路は独立して働くわけではなく、協同的かつ相乗的に酸化的フォールディングを促進することも明らかにした。その結果、図 1 に示す哺乳動物細胞の小胞体における酸化的フォールディングネットワークのモデルを提唱するに至っている。

さらに Prx4 による PDI ファミリータンパク質の認識機構についても生化学的解析を進め、本酵素が PDI ファミリータンパク質をチオレドキシンドメイン単位で認識することを明らかにした。さらに P5 のチオレドキシンドメインと Prx4 の活性部位システインを含む C 末端 tail 領域の複合体の結晶構造を 2.1 Å 分解能で解くことにも成功し、これにより Prx4 によるチオレドキシンドメイン認識の詳細な分子機構が解明された。

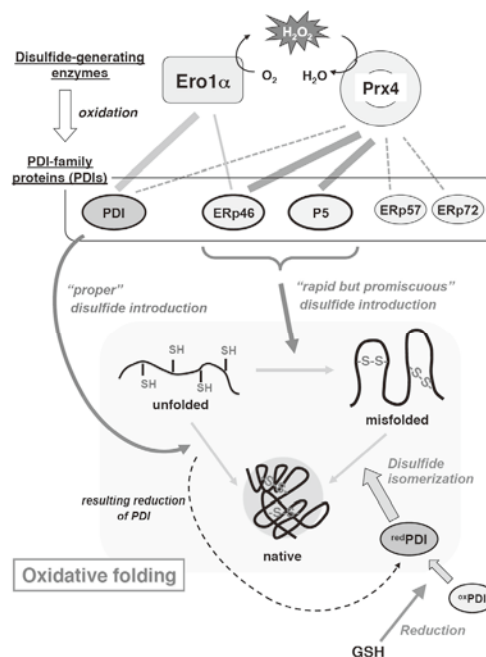


図 1 哺乳動物細胞の小胞体における酸化的フォールディングネットワーク

B. ERp46 と PDI の異なる構造と機能的役割に関する研究

哺乳動物細胞の小胞体には 20 種類以上の PDI ファミリータンパク質が存在するが、個々の因子の生理的機能はほとんど解明されていない。前節で述べたように、新たに見つかった PDI 酸化酵素 Prx4 は ERp46 に対して極めて高い酸化活性を有することを我々は明らかにした。そこで本研究では、ERp46 および Prx4-ERp46 複合体の構造機能解析を進め、Prx4 と ERp46 を介した基質へのジスルフィド導入経路の構造基盤を確立するに至った。ERp46 は 3 つのチオレドキシンドメイン (Trx) から成るが、このうち Trx1, Trx2 の X 線結晶構造をそれぞれ 2.5 Å, 0.95 Å の分解能で決定した。また、Trx2 と Prx4 の C 末端領域の複合体の結晶構造を 0.92 Å の分解能で決定し、その結合様式を明らかにするとともに、Prx4 が潜在的に幅広く PDI ファミリータンパク質の Trx を認識し酸化する機構を解明した。さらに、X 線小角散乱法により ERp46 の全長構造のモデリン

グを行った結果、ERp46 は他の PDI ファミリータンパク質にはみられない新規な「開いた V 字構造」をとっていることが明らかになった。さらに系統的な機能解析により、Prx4-ERp46 経路は酸化的フォールディング初期におけるジスルフィド結合導入のステップを促進するのに対し、Ero1-PDI 経路は酸化的フォールディング後期における中間状態から最終天然状態への移行ステップを促進することを見出した (図2)。ERp46 は開いた V 字構造上で活性部位を溶媒に露出させ、アンフォールドした基質にランダムかつ迅速にジスルフィド結合を導入するのに対し、PDI は U 字構造内部の疎水性ポケットにフォールディング中間状態を取り込み、互いに向き合った活性部位が協調的

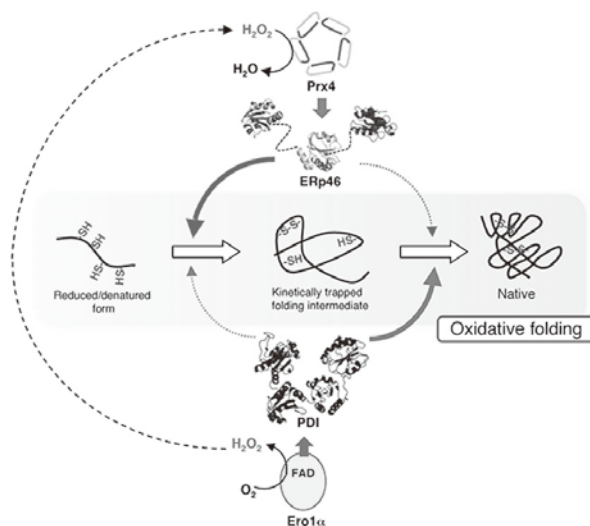


図2 ERp46 と PDI の酸化的フォールディングにおける異なる機能的役割

にはたらくことで効率よくジスルフィド結合の組換えを行うと考察している。本研究により、哺乳動物細胞の代表的な PDI ファミリータンパク質 ERp46 と PDI の異なる構造と機能的役割が明らかとなった。

C. 小胞体ーゴルジ体間に存在するpH勾配に依存した新たなタンパク質品質管理機構に関する研究

小胞体で正常な高次構造を獲得したタンパク質は分泌経路に沿ってゴルジ体へと輸送される。一方で、PDIやEro1αのような小胞体局在タンパク質も分泌経路に沿ってゴルジ体へと輸送されることがある。そのような場合でも、小胞体局在タンパク質の多くは小胞体局在配列(KDEL配列)をもつため、COP-I被覆小胞子によって逆行輸送を受け小胞体中にリテンションされる。興味深いことに、PDI酸化酵素であるEro1αは小胞体局在タンパク質であるにも関わらず、KDEL配列をもたない。過去の研究から、Ero1αはKDEL配列をもつERp44とゴルジ体において結合することにより、小胞体へ逆行輸送されることが報告されている。本研究では、小胞体中では酸化酵素としてPDIと特異的に結合するEro1αが何故ゴルジ体ではERp44と結合するのか、その親和性制御機構の解明に取り組んだ。

PDIファミリータンパク質の1つであるERp44は、a-b-b' の3つのチオレドキシシン様ドメインとC末端のtail (C-tail)から構成されており、aドメイン中のCys29の周りには疎水性パッチが存在する。またERp44の結晶構造中において、Cys29とC-tail上に存在するThr369との間に水素結合が

形成され、これによりC-tail領域は閉じた状態にある。その結果、基質との結合に関わると考えられるCys29と疎水性領域は覆われた状態となっている。

以上のERp44の構造的特徴と小胞体-ゴルジ体間に存在するpH勾配に着目し、系統的な構造生化学実験を行った。その結果、小胞体のpHに相当するpH7.2ではERp44のC-tailが閉じEro1 α とERp44が解離するのに対し、ゴルジ体のpHに相当するpH6.5ではERp44のC-tailが開きEro1 α とERp44が強く結合することが判明した。すなわち、pH依存的なERp44のC-tailの開閉がERp44-Ero1 α 間の親和性を制御することを明らかにした。細

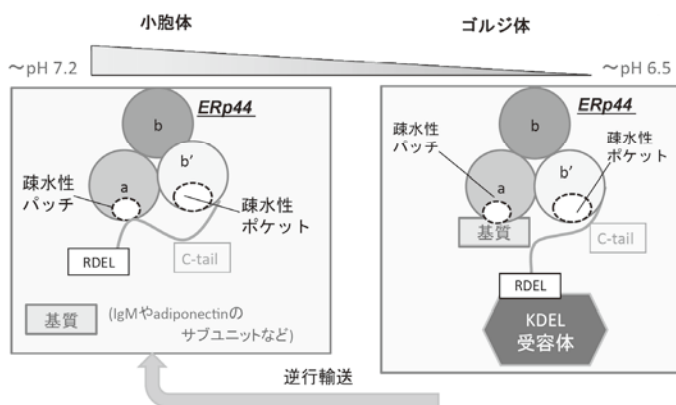


図3 ERp44のpH依存的な構造変化に基づく未成熟タンパク質のゴルジ体-小胞体逆行輸送機構

胞を用いた実験結果と併せ、以下に記すERp44を介した新たなタンパク質品質管理機構を提唱するに至った(図3)。

- (i) ゴルジ体の低pHにおいてERp44のCys29がプロトン化されることにより、C-tailが閉じた状態を安定化するのに必要な水素結合ネットワークが破壊される。
- (ii) その結果、C-tailが開き、ERp44がEro1 α や構造未成熟なタンパク質を捕獲し、さらにKDEL受容体とも結合する。
- (iii) COP-I被覆小胞により、基質を捕獲したERp44とKDEL受容体の複合体が小胞体へ逆行輸送される。
- (iv) 小胞体の中性pHでは、C-tailは閉じた状態に戻り、ERp44、基質、KDEL受容体は解離する。逆行輸送された基質は、小胞体において再度正しい立体構造形成(成熟化)が促される。

現在はERp44による構造未成熟な基質認識機構を調べるため、X線結晶構造解析やX線小角散乱法によるERp44-基質複合体の分子構造の決定に取り組んでいる。

D. 哺乳動物細胞小胞体に局在するERdj5の生理的基質候補タンパク質の網羅的解析に関する研究

ジスルフィド結合の形成は、多くの分泌タンパク質にとって立体構造形成上、重要な反応ステップである。上述のように、哺乳動物細胞のPDIファミリータンパク質の多くは分泌タンパク質にジスルフィド結合を導入する過程やジスルフィド結合を切断する過程に関わると予想される。し

かし、個々の酵素の生理的な役割についてはほとんど分かっていない。その最も大きな要因としては各酵素の生体内における基質が不明であることが挙げられる。本研究ではこれらの酵素の生体内における働きを理解するための第一歩として、PDI ファミリータンパク質の一つである ERdj5 のマウス個体組織中における基質を同定することにした。

PDI ファミリーに属する酵素が、ジスルフィド結合の形成、還元、異性化を行う際には、酵素と基質が分子間のジスルフィド結合で連結した中間体を形成することが知られる。ERdj5 の基質を同定するために、この性質を利用することにした。ただし、このような酵素・基質複合体は通常一過的にのみ形成する。よって、このような複合体を精製し基質を同定するためには、いかにこの複合体を安定化させるかが鍵になる。本研究では、トリクロロ酢酸と N-エチルマレイミドを利用することによってマウス個体の組織中で生成するこのような複合体を安定化することに成功した。ERdj5 に対する抗体を利用して調べたところ、ERdj5 はマウスの精巣上体で強く発現しており、この組織中で、上述の中間体と予想される複合体が多数検出された。そこで、これらの複合体を、ERdj5 に対する抗体を利用して精製後、質量分析法によって解析した。その結果、ERdj5 の基質の候補となるタンパク質を多数同定することに成功した。更に、これらのタンパク質の幾つかは分子間のジスルフィド結合を介して ERdj5 と相互作用していることも突き止めた。同定されたタンパク質から本酵素の生体内における機能を予測する上で極めて有用な知見が得られた。

業績目録

原著論文

1. Kojima, R.[†], Okumura, M.[†], Masui, S., Kanemura, S., Inoue, M., Saiki, M., Yamaguchi, H., Hikima, T., Suzuki, M., Akiyama, S. and Inaba, K.* ([†]*These authors contributed equally to this work.*) 2014
Radically different thioredoxin domain arrangement of ERp46, an efficient disulfide-bond introducer of the mammalian PDI family
Structure, 22, 431-443
2. Sato, Y.[†], Kojima, R.[†], Okumura, M.[†], Hagiwara, M.[†], Masui, S., Maegawa, K., Saiki, M., Horibe, T., Suzuki, M. and Inaba, K.* ([†]*These authors contributed equally to this work.*) 2013
Synergistic cooperation of PDI family member proteins in peroxiredoxin 4-driven oxidative protein folding
Scientific Reports 3, 2456 DOI: 10.1038
3. Walden, P. M., Halili, M. A., Archbold, J. K., Lindahl, F., Fairlie, D. P., Inaba, K.* and Martin, J. L.* (*co-corresponding authors) 2013
The α -proteobacteria *Wolbachia pipientis* protein disulfide machinery has a regulatory mechanism absent in γ -proteobacteria..

PLoS One 8 (11), e81440. Doi:10.1371

4. Vavassori, S.[†], Cortini, M.[†], Masui, S.[†], Sannino, S.[†], Anelli, T., Caserta, I. R., Fagioli, C., Fornili, A., Mossuto, M. F., Degano, M, Inaba, K. and Sitia, R.* ([†]*These authors contributed equally to this work.*) 2013
A pH-Regulated Quality Control Cycle for Surveillance of Secretory Protein Assembly.
Mol. Cell 50, 783-792
5. Kadokura, H.* , Saito, M., Tsuru, A., Hosoda, A., Iwawaki, T., Inaba, K. Kohno, K.* (*co-corresponding authors) 2013
Identification of the redox partners of ERdj5/JPDI, a PDI family member, from an animal tissue.”
Biochem. Biophys. Res. Comm. 440, 245-250
6. Okumura, M.*, Hashimoto, S., Nawata, M., Yutani, K., Hikima, T., Hamada, D., Hidaka, Y., Ito, L., Shiba, K., Hosokawa, K., Inoue, T., Maekawa, S., Imaoka, S., Inaba, K., and Yamaguchi, H. 2013
Bisphenol A induces a conformational change in protein disulfide isomerase
Peptide Science, 331-332

総説

1. Appenzeller-Herzog, C., Inaba, K., Delaunay-Moisan, A. 2014
Cell biology of cysteine-based molecular switches.
Int. J. Cell Biol. 2014, 157038-039
2. Kojima, R.[†], Okumura, M.[†], and Inaba, K.* ([†]*These authors contributed equally to this work.*) 2013
Structural basis of disulfide bond formation in the bacterial periplasm and ER.
Encyclopedia of Life Science、DOI: 10.1002
3. 奥村 正樹、稲葉 謙次 “2014
哺乳動物細胞の小胞体におけるジスルフィド結合形成ネットワークの構造基盤
実験医学 (羊土社)、印刷中
4. 増井 翔史、Roberto Sitia、稲葉 謙次 2013
分泌タンパク質の成熟化を監視する pH に依存的な新たなタンパク質品質管理機構の発見
ライフサイエンス新着論文レビュー2013 URL: <http://first.lifesciencedb.jp/archives/7229>

学会発表

国際学会

1. Inaba, K. (2014, 3/23-26)
Structural and mechanistic basis of protein disulfide bond formation network in mammalian cells
17th Biennial Meeting of Society for Free Radical Research International, Kyoto

2. Okumura, M., Kojima, R., Masui, S., Hikima, T., Yamaguchi, H., Suzuki, M., Akiyama, S., Inaba, K. (2013, 5/9-11)
Structural basis of the newly identified disulfide-introducing pathway composed of Prx4 and ERp46.. (poster)
NIH-Tohoku university-JSPS Symposium, Sendai,
3. Masui, S., Vavassori, S., Cortini, M., Sitia, R. and Inaba, K. (2013, 5/9-11)
ER retention of Ero1 α is regulated by the pH-dependent C-terminal tail movement of ERp44 (poster) NIH-Tohoku university-JSPS Symposium, Sendai,

国内学会

1. 稲葉 謙次 (2013, 12/3-6)
小胞体におけるタンパク質品質管理に関わるジスルフィド結合形成ネットワークの分子基盤 (招待講演)
第36回日本分子生物学会年会 ワークショップ「ER-Post ERにおける膜プロテオスタシスネットワーク研究の最前線」、神戸
2. 奥村 正樹、小島 理恵子、増井 翔史、鈴木 守、秋山 修志、稲葉 謙次 (2013, 12/3-6)
A radically different thioredoxin domain arrangement explains the efficient catalysis of disulfide-bond introduction by the PDI family member, ERp46” (ポスター)
第36回日本分子生物学会年会、神戸
3. 稲葉 謙次 (2013, 12/6)
細胞のタンパク質品質管理の仕組み (講演)
第13回多元物質科学研究所研究発表会、仙台
4. 稲葉 謙次 (2013, 12/18)
小胞体におけるタンパク質品質管理機構の分子構造基盤 (講演)
第660回九州大学生体防御医学研究所セミナー、福岡
5. 稲葉 謙次 (2013, 12/13)
細胞におけるタンパク質品質管理システムの構造基盤 (招待講演)
平成25年度日本生物物理学会東北支部会、仙台
6. 稲葉 謙次 (2013, 11/15)
哺乳動物細胞におけるタンパク質ジスルフィド結合形成ネットワークの分子基盤 (特別講演) 鳥取大学応用生物工学科セミナー、鳥取
7. 稲葉 謙次 (2013, 9/7)
哺乳動物細胞におけるジスルフィド結合形成ネットワークの分子基盤 (招待講演) 平成25年度日本薬学会東北支部会 第12回生物化学若手研究者セミナー「酸化ストレス応答機構—研究の新展開」、

仙台

8. 稲葉 謙次、佐藤 吉美、小島 理恵子、奥村 正樹、萩原 誠智 (2013, 6/19-21)
哺乳動物細胞におけるジスルフィド結合形成システムの構造と作用機序」(講演)
第65回日本細胞生物学会年会 シンポジウム「プロテオスタシス：細胞内タンパク質の恒常性」、名古屋
9. 奥村 正樹、小島 理恵子、増井 翔史、引間 孝明、山口 宏、鈴木 守、秋山 修志、稲葉 謙次 (2013, 6/12-14)
PDI酸化酵素 Prx4 と PDI ファミリータンパク質 ERp46 による新たなジスルフィド結合導入経路の構造基盤 (ポスター)
第13回日本蛋白質科学会年会、鳥取
10. 稲葉 謙次 (2013, 6/12-14)
哺乳動物細胞におけるジスルフィド結合形成ネットワークの構造と機能」(講演)
第13回日本蛋白質科学会年会 公募型シンポジウム、鳥取