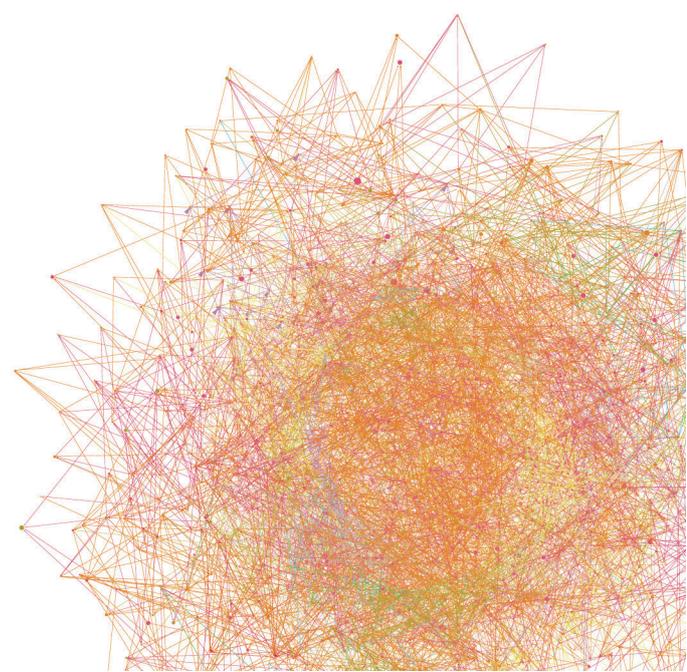
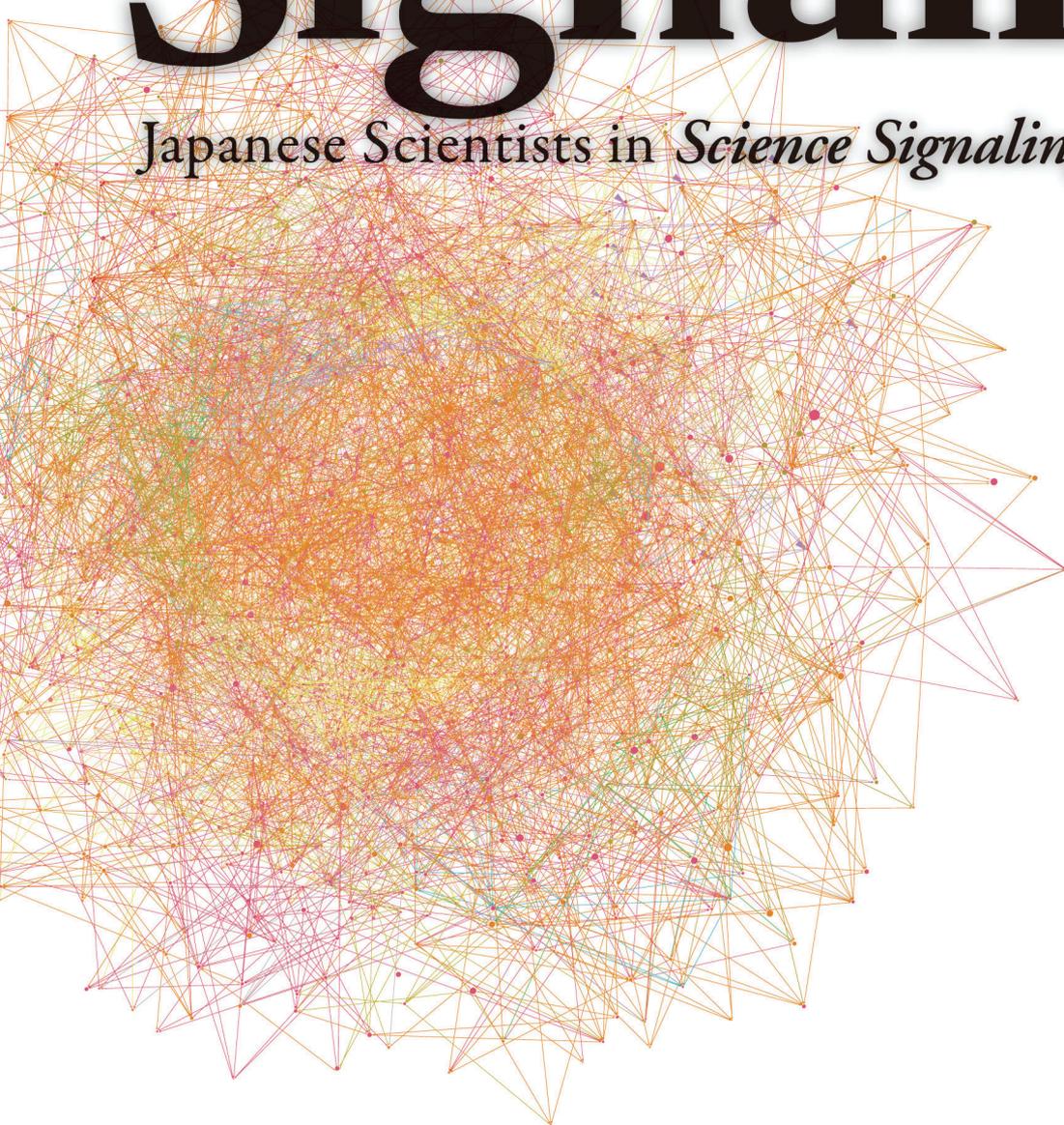


2019 Issue

Science Signaling

Japanese Scientists in *Science Signaling* 2018

シグナリングに載った
日本人研究者



COSMO BIO CO., LTD.
Inspiration for Life Science

Science Signaling
AAAS

このJapanese Scientists in *Science Signaling* 2018では、2018年の1年間にシグナリングに論文が掲載された日本人研究者・グループを紹介しています。誌面の都合上、または著者本人のご意向により、すべての日本人著者を紹介しているわけではありませんが、その旨ご了承ください。

所属名、共著者名、本文から図表の選定まで、すべて著者の皆様からご提供いただいたものです。特に、掲載論文については、日本語で分かりやすくご解説いただいておりますので、シグナリングに掲載された図表とは異なるものを使用している場合があります。また、記載の所属先やメールアドレス、URLなど一切の情報は、2019年1月時点のものになります。

内容については細心の注意を払っていますが、情報の正確性、専門性について発行者はいかなる責任を負うものではありません。正確な情報は、必ず原文にてご確認ください。

発行元

American Association for the Advancement of Science (AAAS)
1200 New York Avenue, NW
Washington, DC 20005
USA

協賛

コスモ・バイオ株式会社
〒135-0016 東京都江東区東陽 2-2-20 東陽駅前ビル
TEL: 03-5632-9610 FAX: 03-5632-9619
<http://www.cosmobio.co.jp>

企画・翻訳・編集

株式会社アスカコーポレーション (Science Japan Customer Service Office)
〒541-0046 大阪市中央区平野町 1 丁目 8-13 平野町八千代ビル
TEL: 06-6202-6272 FAX: 06-6202-6271
<http://www.asca-co.com>

表紙デザイン

株式会社大伸社 東京本社
〒151-0051 東京都渋谷区千駄ヶ谷 2-9-9
TEL: 03-3405-0603 FAX: 03-3405-0653
<http://www.daishinsha.co.jp/>

発行日

2019年3月

© 2019 American Association for the Advancement of Science (AAAS). All Rights Reserved.

Science Signaling

Japanese Scientists in *Science Signaling* 2018

シグナリングに載った日本人研究者

ご挨拶

米国科学振興協会 (AAAS) の公式刊行物である *Science Signaling* は、世界的な科学学術誌 *Science* の姉妹誌として、Cell Signaling (シグナル伝達) に関する先進的な研究成果を毎週発信しています。同誌は1996年にSignal Transduction Knowledge Environment (STKE) として創刊され、今に至るまで飛躍的な発展を遂げている生物学の基盤を支えてきました。

この「シグナリングに載った日本人研究者」は、「サイエンス誌に載った日本人研究者」の姉妹冊子として2015年に刊行され、通算5号目を数えます。本冊子には、2018年に *Science Signaling* で発表された16件の研究を紹介しています。昨年8件と比較すると、2018年は多くの日本人がこの分野で活躍したことがわかります。本誌には、アブストラクトの翻訳に加え、それぞれの論文の著者の方々より寄稿いただいた、研究の論点をわかりやすく記した解説文を掲載しています。

シグナル伝達の研究は、単なる生物学の一領域という位置づけを超えて、生体制御機構のあらゆる側面に関わる重要な知見をもたらしています。今回取り上げた研究も、免疫学や細胞運命など、細胞制御を通じてシグナル伝達がかかわる広範な生命機能をコントロールするカギとなっていることを改めて示しています。同時に、どの研究もがんや心疾患を含む新規治療法の開発や、臨床応用に向けての大きな一歩につながる知見であることは疑いありません。本誌が、生命科学研究に携わる多くの方にとってインスピレーションの基盤となることを祈念しています。

最後に、本誌の制作にあたり、ご多忙の中、ご協力いただきました日本人研究者の皆様にご心より御礼申し上げます。そして、多大なるご支援を賜りましたコスモ・バイオ株式会社様に深く感謝を申し上げます。

2019年3月
編集チーム一同

Japanese Scientists in *Science Signaling* 2018

シグナリングに載った日本人研究者

Science Signaling 投稿について 4

1月9日号
Research Article
ホスファターゼPP2AcのCa²⁺依存的脱メチル化はグルコース欠乏による細胞死を解糖系の枯渇とは無関係に促進する 6
Ca²⁺-dependent demethylation of phosphatase PP2Ac promotes glucose deprivation-induced cell death independently of inhibiting glycolysis
Associate Professor, Cancer & Stem Cell Biology Program, Duke-NUS Medical School **板鼻 康至**
Assistant Professor, Cancer & Stem Cell Biology Program, Duke-NUS Medical School **板鼻 陽子**

2月6日号
Research Article
CCR4-NOT脱アデニル化酵素複合体はAtg7依存性細胞死と心機能を制御する 8
The CCR4-NOT deadenylase complex controls Atg7-dependent cell death and heart function
秋田大学大学院医学系研究科 分子機能学・代謝機能学講座 助教 **山口 智和**
秋田大学大学院医学系研究科 分子機能学・代謝機能学講座 教授 **久場 敬司**

3月27日号
Research Article
SMAD2およびSMAD3によるコファクターの選択は多様な疎水性パッチの組み合わせによって決定される 10
Hydrophobic patches on SMAD2 and SMAD3 determine selective binding to cofactors
東京大学大学院 農学生命科学研究科応用生命化学専攻 特任准教授 **宮園 健一**
東京大学大学院 農学生命科学研究科応用生命化学専攻 特任教授 **田之倉 優**

4月10日号
Research Article
酸素を感知するFixL-FixJ二成分シグナル伝達系の全体像 12
Architecture of the complete oxygen-sensing FixL-FixJ two-component signal transduction system
兵庫県立大学大学院 生命理学研究科・細胞制御学II研究室 博士前期課程2年(現 東洋紡株式会社 フィルム技術総括部) **佐伯 茜子**
兵庫県立大学大学院 生命理学研究科・細胞制御学II研究室 助教 **澤井 仁美**

5月1日号
Research Article
IKKαとLC3の相互作用がTLR9含有LAPosomeを介してI型インターフェロン産生を促進する 14
The interaction between IKKα and LC3 promotes type I interferon production through the TLR9-containing LAPosome
Postdoctoral fellow, Department of Immunobiology, Yale University School of Medicine **林 下致子**
Associate Research Scientist, Department of Immunobiology, Yale University School of Medicine **田浦 学**
Professor, Department of Immunobiology, Yale University School of Medicine
Howard Hughes Medical Institute Investigator, Yale University **岩崎 明子**

6月12日号
Research Resource
連動クロックシステムがヒト洞房結節ペースメーカー細胞の自動能を駆動する 16
A coupled-clock system drives the automaticity of human sinoatrial nodal pacemaker cells
Laboratory of Cardiovascular Science, Intramural Research Program, National Institute on Aging, National Institutes of Health
日本学術振興会海外特別研究員(NIH) **筒井 健太**
Chief, Laboratory of Cardiovascular Science, Intramural Research Program, National Institute on Aging, National Institutes of Health
Edward G. Lakatta

6月12日号
Research Resource
ヒト自己免疫疾患関連遺伝子 *Tagap* は胸腺細胞の皮質・髄質移行を制御する 18
Regulation of thymocyte trafficking by Tagap, a GAP domain protein linked to human autoimmunity
Research fellow, Immunobiology Section, Joslin Diabetes Center, Department of Medicine, Harvard Medical School **石川 優樹**

6月26日号
Research Article
甲状腺ホルモン受容体とERRαはミトコンドリアの分裂、分解、新生、機能を協調的に調節する 20
Thyroid hormone receptor and ERRα coordinately regulate mitochondrial fission, mitophagy, biogenesis, and function
Assistant professor, Laboratory of Hormonal Regulation, Cardiovascular and Metabolic Disorders Program, Duke-NUS Medical School **Brijesh K. Singh**
Research fellow, Laboratory of Hormonal Regulation, Cardiovascular and Metabolic Disorders Program, Duke-NUS Medical School
(現 国立大学法人 浜松医科大学 医学教育推進センター 特任講師) **大場 健司**
Professor, Laboratory of Hormonal Regulation, Cardiovascular and Metabolic Disorders Program, Duke-NUS Medical School **Paul M. Yen**

7月3日号
Research Article
ヒト、ニワトリ、ワニ、カエル、ゼブラフィッシュのミネラルコルチコイド受容体の進化: ステロイド特異性へのアロステリックな影響 22
Evolution of human, chicken, alligator, frog, and zebrafish mineralocorticoid receptors: Allosteric influence on steroid specificity
北海道大学 大学院理学研究院 教授 **勝 義直**
北海道大学 大学院生命科学院(現 熊本大学大学院 生命科学研究部 博士研究員) **岡 香織**

7月31日号
Research Article
コレステロール硫酸は眼の組織特異的免疫回避を仲介するDOCK2阻害因子である 24
Cholesterol sulfate is a DOCK2 inhibitor that mediates tissue-specific immune evasion in the eye
九州大学 生体防御医学研究所 免疫遺伝学分野 **櫻井 哲哉**
九州大学 生体防御医学研究所 免疫遺伝学分野 准教授/九州大学 免疫機構研究センター **宇留野 武人**
九州大学 生体防御医学研究所 免疫遺伝学分野 教授/九州大学 免疫機構研究センター長 **福井 宣規**

8月21日号
Research Article
ロイコトリエンB₄受容体1の段階的リン酸化がロイコトリエンB₄に対する細胞応答を規定する 26
Stepwise phosphorylation of leukotriene B₄ receptor 1 defines cellular responses to leukotriene B₄
東京大学大学院 医学系研究科 細胞情報学研究室(現 大阪大学大学院 医学系研究科 呼吸器・免疫内科学講座) **中西 由光**
岡山理科大学大学院 理学研究科 臨床生命科学専攻 細胞情報学研究室 教授 **中村 元直**

9月18日号
Research Article
Gタンパク質共役受容体に対するリガンド作用の1分子拡散動態に基づく評価 28
Single-molecule diffusion-based estimation of ligand effects on G protein-coupled receptors
理化学研究所 開拓研究本部 佐甲細胞情報研究室 研究員 **柳川 正隆**
理化学研究所 開拓研究本部 佐甲細胞情報研究室 主任研究員 **佐甲 靖志**

10月30日号
Research Article
RSK2は平滑筋ミオシンおよびNa⁺/H⁺交換輸送体を活性化することにより抵抗動脈の筋原性血管収縮に寄与する 30
RSK2 contributes to myogenic vasoconstriction of resistance arteries by activating smooth muscle myosin and the Na⁺/H⁺ exchanger
山陽小野田市立山口東京理科大学 薬学部 教授 **百 溪 江**
Research Scientist, Department of Molecular Physiology and Biological Physics, University of Virginia **Mykhaylo V. Artamonov**

11月6日号
Research Article
哺乳類の色素沈着はcAMPに依存してメラノソームのpHを調節する特有の機構によって制御される 32
Mammalian pigmentation is regulated by a distinct cAMP-dependent mechanism that controls melanosome pH
藤田医科大学 医療科学部化学教室 特任教授
藤田医科大学 保健学研究科保健学専攻(修士課程)臨床検査学領域
藤田医科大学 保健学研究科医療科学専攻(博士後期課程)生体情報検査科学分野 **若松 一雅**
藤田医科大学 名誉教授 **伊藤 祥輔**
Department of Dermatology, Weill Cornell Medical College **Jonathan H. Zippin**
Department of Dermatology, Weill Cornell Medical College **Dalee Zhou**

11月13日号
Research Article
フィラミンとDrp1の低酸素誘導性相互作用がミトコンドリア過剰分裂を伴う心筋老化を引き起こす 34
Hypoxia-induced interaction of filamin with Drp1 causes mitochondrial hyperfission-associated myocardial senescence
九州大学大学院 薬学研究院 創薬育薬研究施設統括室 講師 **西村 明幸**
自然科学研究機構 生理学研究所(生命創成探究センター)
心循環シグナル研究部門 教授
九州大学大学院 薬学研究院 創薬育薬研究施設統括室 教授 **西田 基宏**

11月13日号
Research Article
がん遺伝子産物ユビキチンリガーゼMDM2によるPERIOD2の分解と体内時計の制御 36
Distinct control of PERIOD2 degradation and circadian rhythms by the oncoprotein and ubiquitin ligase MDM2
Research Associate, Integrated Cellular Responses Laboratory, Department of Biological Sciences, Biocomplexity Institute, Virginia Tech
現 株式会社プロテックス 和光理研研究所 研究開発部 主任研究員 **後藤 徹哉**
Associate Professor, Integrated Cellular Responses Laboratory, Department of Biological Sciences, Biocomplexity Institute, Virginia Tech
Associate Professor, Department of Surgery, Virginia Tech Carilion School of Medicine
Associate Professor, Faculty of Health Sciences, Virginia Tech **Carla V. Finkielstein**

Science Signaling 投稿について

Science Signaling は、Cell Signaling (シグナル伝達) を対象とした最先端の研究成果を取り上げる週刊の科学専門誌です。広範な分野の研究に重要な影響を与えるシグナル伝達について、最新の知見を取りまとめ、利用可能なデータとして提供することが本誌の主要な目的です。

以下に、*Science Signaling* の Information for Authors (投稿規定) の簡易日本語版を掲載します。あくまでこの記事は抜粋版であり、すべての規定を網羅しているわけではないことをご了承ください。投稿前には、後述のウェブサイトで、最新の完全版を必ずご確認ください。

掲載される論文・記事の種類

Research Articles : シグナル伝達に関する画期的な研究成果を発表する原著論文。主なテーマは細胞内／細胞間／生体内のシグナル伝達および関連する生体制御機構。構成はアブストラクト、本文 (Introduction, Results, Discussion, Materials and Methods)。論文の理解、評価に不可欠ではない場合のみ Supplementary Material として別途添付可。

Research Resources : Research Article に投稿された論文の中から、新しい評価ツールや技術、データベース等を紹介する仮説駆動型の研究ではない記事。

Focus : *Science Signaling* で発表された論文に対するコメントリー。

<http://stke.sciencemag.org/content/instructions-authors-focuses>

Reviews : シグナル伝達研究の新たな展開についての総説。読者の理解を容易にするため、教科書レベルで解説した「注釈 (gloss)」を適宜付ける。

<http://stke.sciencemag.org/content/instructions-authors-reviews>

原稿の作成

参考文献および注記 : 引用する順に番号を付す (本文、参考文献の本文、図表説明文の順)。発表前の論文や私信は含めない。番号は重複しないようにし、組み合わせたり、注記に参考文献を含めたりしないこと。

図表 : すべて本文と同じファイルに含める。登場順に番号を付ける。論文の種類により規定が異なるので、それぞれの instructions for authors にて詳細を確認すること。

図説明文 (legend) : 本文と参考文献の間に記載。図中で使用する用語、略語、記号および単位は、本文と揃えること。図のタイトルを1行目として記載。

表 : 本文を補足するものとし、同じ内容を重複して記述しないこと。登場順に番号を付ける。表説明文 (legend) の1文目は、記述的な短いタイトルとする。各カラムには見出しを付け、測定単位を括弧内表示。同一カラム内で単位を変更しないこと。

Supporting Materials : 印刷媒体では提供できない、論文の内容を補完するための資料。サイズが大きなデータ、ビデオまたは音声ファイルなど。各資料について簡単な説明を記載する。

ポリシー

Science Signaling に掲載される論文の著者に対し、AAAS は研究における貢献、論文の内容に対する責任、利益相反などについて適切な情報の開示を求めています。投稿の際には、関連する書類の提出が必要です。

Science Signaling における研究成果の発表に関するポリシーは、*Science* に準ずるものとします。

Science: editorial policies

https://www.sciencemag.org/authors/science-journals-editorial-policies?_ga=2.202893268.450864058.1548105929-1251035054.1467977182

また出版倫理に関する事項については、Instructions for Authors のページを必ず投稿前にご確認ください。

投稿

Science Signaling では、オンラインで論文の投稿を受け付けています。ファイル形式等の詳細は論文・記事の種類ごとに定めています。

Science Signaling 投稿規定

Information for Authors (一般的な情報)

<http://stke.sciencemag.org/about/ifora>

Initial Submission Instructions (初回投稿原稿の作成)

http://stke.sciencemag.org/sites/default/files/ResearchArticle_Initial_0.pdf

Figure Preparation Instructions (図表に関する規定)

http://www.sciencemag.org/sites/default/files/Figure_prep_guide.pdf?_ga=1.19934392.123428658.4.1432097703

Science Journals Authorship and Conflict of Interest Form

<https://www.sciencemag.org/sites/default/files/2018%20author%20forms.pdf>

オンライン投稿システム

<https://cts.sciencemag.org>

論文投稿に関する問い合わせ先

E-mail: sciencesignalingeditors@aaas.org

<http://stke.sciencemag.org/feedback>

ホスファターゼPP2AcのCa²⁺依存的脱メチル化はグルコース欠乏による細胞死を解糖系の枯渇とは無関係に促進する

Ca²⁺-dependent demethylation of phosphatase PP2Ac promotes glucose deprivation-induced cell death independently of inhibiting glycolysis

Ha Yin Lee¹ Stefan Schuechner² 福田 正裕³ H. Shawn Je³ Egon Ogris² David M. Virshup^{1,4,5}

¹ Cancer & Stem Cell Biology Program, Duke-NUS Medical School, 8 College Road, 169857, Singapore.
² Department of Medical Biochemistry, Max F. Perutz Laboratories, Medical University of Vienna, Dr. Bohr-Gasse 9, 1030 Vienna, Austria.
³ Neuroscience & Behavioural Disorders Program, Duke-NUS Medical School, 8 College Road, 169857, Singapore.
⁴ Department of Biochemistry, National University of Singapore, 8 Medical Drive, 117596, Singapore.
⁵ Department of Pediatrics, Duke University School of Medicine, Durham, NC 27710, USA.



左から板鼻 康至、板鼻 陽子

板鼻 康至 Koji Itahana
Associate Professor, Cancer & Stem Cell Biology Program, Duke-NUS Medical School
板鼻 陽子 Yoko Itahana
Assistant Professor, Cancer & Stem Cell Biology Program, Duke-NUS Medical School



板鼻 康至 E-mail: koji.itahana@duke-nus.edu.sg
 所在地: 8 College Road, Singapore 169857
 U R L: <https://www.duke-nus.edu.sg/cscb/content/koji-itahana>
 板鼻 陽子 E-mail: yoko.itahana@duke-nus.edu.sg
 所在地: 8 College Road, Singapore 169857
 U R L: <https://www.duke-nus.edu.sg/cscb/content/koji-itahana>

Abstract

がん細胞は、グルコース代謝を増強させ、好気性解糖をサポートする。しかしながら、ある部分のがん細胞のみがグルコースの枯渇に対して強い感受性を示し、この選択的感受性の基となる機構は不明である。われわれは、グルコースの欠乏が、キナーゼRIPK1依存的にがん細胞の細胞死経路を促進することを示した。グルコースの枯渇は、急速な細胞膜脱分極と、L型カルシウムチャネルCav1.3 (CACNA1D)を介した細胞外カルシウムの細胞内への流入を引き起こし、キナーゼCAMK1を活性化させた。CAMK1およびデメチラーゼPPME1は、カルシウム流入に引き続くホスファターゼPP2Aの触媒サブユニット(PP2Ac)の脱メチル化および不活性化とRIPK1のリン酸化に必要であった。細胞膜脱分極、PP2Ac脱メチル化、および細胞死は、グルコースにより、また予想外にもその非代謝性類似体2-デオキシ-D-グルコース(2-DG)、すなわち解糖阻害剤により妨げられた。これらの知見は、これまでに知られていなかったグルコースの機能を明らかにした。われわれの結果は、グルコースが解糖におけるその役割とは無関係に作用し、細胞膜脱分極により誘導される細胞死を保護するシグナル分子として働くことができるということ、また、このがん細胞死経路の構成要素が、がんに対する潜在的な治療標的となることを示唆している。

Figure and Note

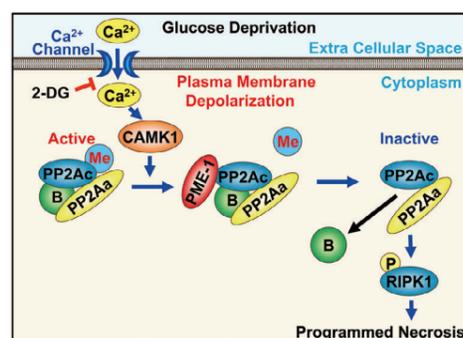


図1: グルコース欠乏によって誘導される細胞死シグナル経路
 グルコースの枯渇により、細胞膜上にあるカルシウムチャネルが開き、細胞内にカルシウムが流入する。それにより、CAMK1の活性化、PP2Ac脱メチル化、RIPK1のリン酸化が促進され、最終的にRIPK1依存的に細胞死が誘導される。

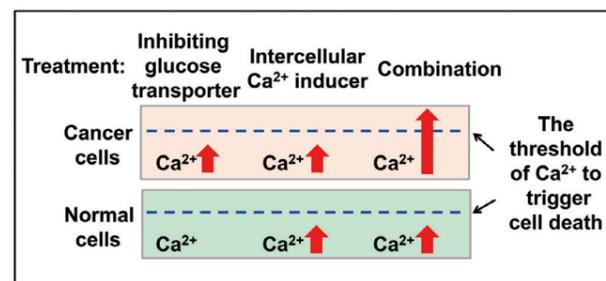


図2: 新規併用治療法の探索
 グルコーストランスポーター阻害剤とカルシウム誘導剤を併用することによって、がん細胞内のカルシウム濃度を許容限界以上に上昇させ、RIPK1依存的に細胞死をがん細胞選択的に誘導する。

グルコース欠乏で誘導されるCa²⁺-PP2A-RIPK1経路を介した細胞死

急速に分裂するがん細胞は正常細胞と比較し、より多くのグルコースを必要としていることが知られています。この依存性を利用し、グルコースのトランスポーターなどを阻害することによって、細胞内のグルコース濃度を減少させ、がん細胞を特異的に死滅させる治療法が試されていますが、現在のところ満足できるような成果は得られていません。すべてのがん細胞がグルコース依存性を持っているわけではないことに加え、グルコース依存性を持っているがんに対しても、グルコースの枯渇は細胞増殖を抑える効果はあるものの死滅に至らないケースが多いことが原因として考えられます。がん細胞がグルコースの枯渇によって死に至る経路にはまだまだ不明な点が多く残されています。したがって、そのメカニズムを明確にすることが、がん細胞を特異的に除去する有効な治療法の開発につながるのではないかと考えました。

グルコースはがん細胞の主なエネルギー源の1つであると長い間、信じられてきました。しかしわれわれは、あるがん細胞において、エネルギーを提供するには十分でない極少量のグルコースががん細胞の生存を維持するために作用していることを明らかにしました。これは、エネルギーを提供することに加え、グルコースが細胞死を防ぐシグナル分子として機能していることを示唆しています。グルコースが枯渇することによってカルシウムイオンがCav1.3 (CACNA1D)を通じて細胞内へ流入し、それによってCAMK1の活性化、PPME1介在によるPP2Acの脱メチル化および不活性化、さらにRIPK1のリン酸化が生じることが観察されました。最終的に、RIPK1はアポトーシス、ネクローシス、オートファジーとは異なる経路を介して、プログラムされた細胞死を引き起こすことがわかりました。グルコース枯渇によって引き起こされる前述の一連の現象は、グルコースの非代謝性類似体2-デオキシ-D-グルコース(2-DG)、すなわち解糖阻害剤によって妨げられることを見出しました。このことから、解糖系でのエネルギー源としてだけでなく、グルコース(あるいはグルコース類似体)が今までに知られていなかった形で細胞を死から保護するシグナル分子として働いていることが示されました。

さらに興味深いことに、正常細胞やグルコースに非依存性のがん細胞では培地からグルコースを除いても、細胞内のグルコースを一定量に保つことができるのに対し、グルコース依存性のがん細胞は、その能力を失っていることがわかりました。これらの結果は、このユニークな特性がグルコース依存性を示すがん細胞のがん治療の標的になり得る可能性を示唆しています。実際、細胞培養系において、グルコーストランスポーターの阻害剤とカルシウムの誘導剤を併用することにより、正常細胞に影響を与えることなく、グルコース依存性のがん細胞の細胞内のカルシウムレベルを許容限界以上に上昇させ、細胞死をがん細胞特異的に誘導できることがわかりました。

これらの知見をもとに、今後は、グルコーストランスポーターの阻害剤とカルシウムの誘導剤の併用が実際に生体レベルで効果があるかどうか調べていきます。また、がん患者から直接抽出したがん細胞をグルコースが枯渇した培地で短期培養した場合のPP2Acの脱メチル化、RIPK1のリン酸化、細胞死などを調べ、それらが治療方法を選択するうえでのマーカーとして使用できる可能性のあるかを検討していきます。

Duke-NUS Medical School, Cancer & Stem Cell Biology Program, Laboratory of Tumor Suppression

シンガポールにあるDuke-NUS Medical Schoolは米国のDuke大学とシンガポール国立大学が共同してつくった、アジアでは珍しい医学系大学院大学です。どの学部出身者でも4年で医師の免許を取ることができ、幅広い分野からの人材の育成を目指しています。Duke-NUSは特に研究に力を入れており、5つの分野にわたるMD、Ph.D.、MD/Ph.D.コースがあります。われわれは、がん幹細胞を研究する部門に属し、p53などのがん抑制遺伝子やがん代謝に特化した研究を行っています。日本からの研究者は大歓迎ですので、海外でのがん研究に興味のある方は是非われわれの研究室にコンタクトしてみてください。



CCR4-NOT 脱アデニル化酵素複合体は Atg7 依存性細胞死と心機能を制御する

The CCR4-NOT deadenylase complex controls Atg7-dependent cell death and heart function

鈴木 享¹ 佐藤 輝紀² 高橋 明格³ 渡邊 博之² 門脇 歩美¹ 夏井 美幸¹ 稲垣 秀晃⁴ 荒川 聡子⁵ 中岡 慎治^{6,7}
 小泉 幸央¹ 関 信輔⁴ 足達 俊吾⁸ 深尾 亜喜良⁹ 藤原 俊伸⁹ 夏目 徹⁸ 木村 彰方¹⁰ 小松 雅明¹¹
 清水 重臣⁵ 伊藤 宏² 鈴木 穂¹² Josef M. Penninger¹³ 山本 雅³ 今井 由美子⁷

¹ 秋田大学大学院医学系研究科 分子機能学・代謝機能学講座
² 秋田大学大学院医学系研究科 循環器内科学講座
³ 沖縄科学技術大学院大学
⁴ 秋田大学 バイオサイエンス教育・研究サポートセンター
⁵ 東京医科大学 難治疾患研究所 病態細胞生物学
⁶ 東京大学 生産技術研究所
⁷ 国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所 感染病態制御プロジェクト
⁸ 国立研究開発法人 産業技術総合研究所 創薬分子プロファイリング研究センター
⁹ 近畿大学薬学部 医療薬学科 生化学研究室
¹⁰ 東京医科大学 難治疾患研究所 分子病態分野
¹¹ 新潟大学 医学総合研究科 分子細胞医学専攻 遺伝子制御
¹² 東京大学大学院 新領域創成科学研究科 メディカル情報生命専攻 生命システム観測分野
¹³ Institute of Molecular Biotechnology of the Austrian Academy of Sciences, Campus Vienna BioCenter, Vienna 1030, Austria.



左から山口 智和、久場 敬司

山口 智和 Tomokazu Yamaguchi
 秋田大学大学院医学系研究科 分子機能学・代謝機能学講座 助教

久場 敬司 Keiji Kuba
 秋田大学大学院医学系研究科 分子機能学・代謝機能学講座 教授

Contact
 山口 智和 E-mail: yamaguchit@med.akita-u.ac.jp
 所在地: 010-8543 秋田県秋田市本道 1-1-1
 U R L: http://kuba-lab.com/
 久場 敬司 E-mail: kuba@med.akita-u.ac.jp
 所在地: 010-8543 秋田県秋田市本道 1-1-1
 U R L: http://kuba-lab.com/

Abstract

脱アデニル化と呼ばれる過程である、mRNA のポリアデニル化[poly(A)] 尾部の短縮および除去は、CCR4-NOT (carbon catabolite repression 4-negative on TATA-less) 複合体によって媒介される、mRNA 分解の重要な一段階である。われわれは、心臓における mRNA 脱アデニル化の調節を検討し、この複合体が細胞死を阻止するために必要であることを見出した。CCR4-NOT 複合体の構成成分である Cnot1 または Cnot3 の筋肉特異的な欠失により、オートファジー空胞の形成と心筋細胞死が引き起こされ、QT 延長を伴う致死的心不全が生じた。Cnot3 は、オートファジーの主要調節因子である Atg7 の mRNA の poly(A) に結合し、poly(A) を短縮させた。Cnot3 が欠損した心臓においては、Atg7 発現が転写後に増加した。Atg7 の遺伝子破壊により、Cnot1 または Cnot3 ノックアウトマウスの生存率が上昇し、心機能が部分的に回復したが、Atg5 の遺伝子破壊ではそのような改善は認められなかった。さらに、Cnot3 が欠損した心臓では、Atg7 が p53 と相互作用し、p53 の活性を調節して、心筋細胞の細胞死促進因子の遺伝子発現を誘導することが示され、心臓における脱アデニル化の欠損によって、Atg7 と p53 が異常に活性化され、細胞死が促進されることが示唆された。したがって、CCR4-NOT 複合体を介する mRNA 脱アデニル化は、Atg7 誘導性細胞死と心不全の防止に極めて重要であり、オートファジー遺伝子を標的化して正常な心臓恒常性を維持するうえで、mRNA 脱アデニル化が果たす役割が示唆される。

Figure and Note

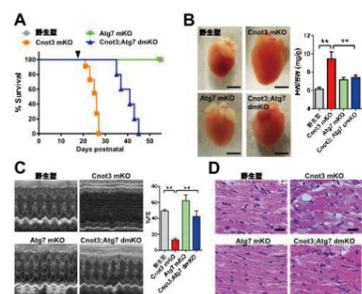


図1: Cnot3とAtg7の遺伝子欠損マウスにおける心不全病態
 心臓でのCnot3欠損は出生後の心不全死(A)、心重量の増加(B)、心収縮率の低下(C)、および空胞形成と心筋細胞死(D)を伴う心不全病態を示すが、Atg7遺伝子との二重欠損により心不全の進行が抑制された。

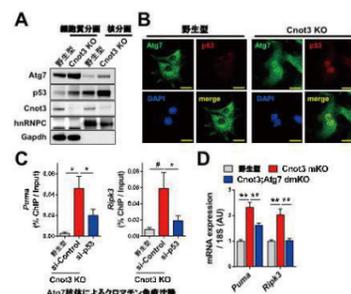


図2: Cnot3欠損によるAtg7の核内移行とp53の転写活性化制御
 Cnot3欠損細胞ではAtg7とp53の核内移行が誘導され(A, B)、p53の標的遺伝子であるPuma、Ripk3のプロモーターへの結合強化(C)、およびmRNA発現量の上昇(D)により細胞死が亢進した。

心機能調節における mRNA poly(A) 分解制御の生理的意義の解明

細胞内における遺伝子発現調節において mRNA 分解を介した mRNA の量的、質的な制御は重要なプロセスです。mRNA 分解の第一段階は、mRNA の poly(A) 鎖の短縮および除去、すなわち脱アデニル化と呼ばれる過程によって開始されますが、CCR4-NOT 複合体は複数のコアタンパク質、脱アデニル化酵素、および RNA 結合タンパク質との相互作用により脱アデニル化の中心的な役割を担うタンパク質複合体であることが知られております。私たちの研究室ではこれまでに、ショウジョウバエにおける大規模な in vivo RNAi 心不全スクリーニングにより CCR4-NOT 複合体を新たな心機能調節因子として見出していました(Kuba K. et al. *Cell* 2010)。しかしながら、心臓の機能調節において CCR4-NOT 複合体による RNA 分解の生理的意義、役割はよくわかっていませんでした。そこで、まず CCR4-NOT 複合体の主要な足場タンパク質である Cnot1 または Cnot3 の遺伝子発現を筋肉特異的に欠失させた遺伝子ノックアウトマウスを作製し、心臓の機能評価を行いました。その結果、Cnot1 または Cnot3 の欠失は心臓肥大、収縮力の低下、QT 延長、ならびに心筋細胞死を伴う致死的心不全を誘導することがわかりました。

CCR4-NOT 複合体の標的 mRNA の探索、遺伝子発現解析、ならびに poly(A) 鎖長の解析により、CCR4-NOT 複合体が脱アデニル化を介して複数のオートファジー関連タンパク質の遺伝子発現を調節していることがわかりました。その中でも主要なオートファジー調節因子である Atg7 をコードする mRNA に Cnot3 が強固に結合し、翻訳制御を行っていることを見出しました。実際に Cnot1 もしくは Cnot3 の欠損により生じた心不全病態は Atg7 の二重欠損により回復が見られ、心不全の病態が Atg7 の働きに強く依存している可能性が考えられました。Cnot3 を欠損した心筋細胞や線維芽細胞では、Atg7 ならびに転写因子 p53 の発現が著しく上昇し、Atg7 は p53 と結合し、p53 とともに核内に移行することを観察しました。さらに、Atg7 は p53 の標的遺伝子である Puma、Ripk3 などの細胞死関連因子の転写発現を誘導することで、細胞死を亢進させていることが明らかとなりました。

以上の結果から、心不全の病態では、通常オートファジーが細胞により効果をもたらす作用とはまったく異なるメカニズムで Atg7 が心不全を悪化させる可能性があり、CCR4-NOT 複合体は Atg7 mRNA の分解を促進させることで心不全の重篤化を防いでいることがわかりました。以上の発見は、オートファジータンパク質の活性や RNA 分解を標的とした、既存の循環器学にはない心不全の診断・治療法の開発に繋がることを期待されます。

RNA 制御の根源的な分子メカニズムの解明と疾患治療への応用を目指す

私たちの研究室では遺伝子改変マウスの作製と解析、生理学、薬理的な解析、試験管内での生化学的解析を中心に、分子から個体レベルまでの包括的な生命現象の理解とその破綻から生じる病態メカニズムの解明を目指し研究を行っています。特に心不全病態における CCR4-NOT 複合体の mRNA 脱アデニル化作用の機能的意義を明らかにすることで、心不全患者の新たな治療戦略を見出すことに貢献することを目指しています。



SMAD2およびSMAD3によるコファクターの選択は多様な疎水性パッチの組み合わせによって決定される

Hydrophobic patches on SMAD2 and SMAD3 determine selective binding to cofactors

森脇 沙帆¹ 伊藤 友子¹ 栗崎 晃^{2,3} 浅島 誠²

¹ 東京大学大学院農学生命科学研究科 ² 国立研究開発法人産業技術総合研究所 ³ 奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科



左から宮園 健一、田之倉 優

宮園 健一 Ken-ichi Miyazono
東京大学大学院 農学生命科学研究科応用生命化学専攻 特任准教授

田之倉 優 Masaru Tanokura
東京大学大学院 農学生命科学研究科応用生命化学専攻 特任教授

Contact 田之倉 優
E-mail : amtanok@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp
所在地 : 113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1 東京大学大学院農学生命科学研究科
URL : http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/Yojokun/

Abstract

サイトカインの一種であるトランスフォーミング増殖因子-β(TGF-β)は、細胞の増殖、免疫応答、細胞外マトリックス生産などの様々な生物学的過程を調節する多機能性因子である。そのため、TGF-βシグナル伝達系の機能不全は、がんや線維症などの様々な疾患を引き起こす。SMAD2およびSMAD3(SMAD2/3)は、細胞内におけるTGF-βシグナル伝達に関与する主要な転写因子であり、TGF-βの刺激に応じてSMAD4とヘテロ三量体を形成する。形成されたヘテロ三量体は、その機能を調節する別のタンパク質(コファクター)とさらなる複合体を形成する。SMAD2/3に結合するコファクターには、様々な転写因子や、転写のコアクチベーター、コリプレッサーなどが含まれており、これらのコファクターがSMAD2/3に対して特異的に結合することによって、TGF-βシグナル依存的な遺伝子発現の制御がなされている。本研究では、SMAD2/3が多様なコファクターと特異的に結合できる機構を構造学的な観点から明らかにした。SMAD2と転写コリプレッサー SKIの複合体、およびSMAD3と転写因子FOXH1の複合体のX線結晶構造解析の結果、SMAD2/3のMAD homology 2 (MH2)ドメイン分子表面上には、コファクターが結合する可能性のある疎水性パッチが複数存在することが明らかになった。各コファクターは、これらの疎水性パッチの一つないし複数を選択し、あるときは共同的に、またあるときは競合しながら、SMAD2/3に結合することによって、TGF-βシグナル依存的な多様な遺伝子発現を制御する。

Figure and Note

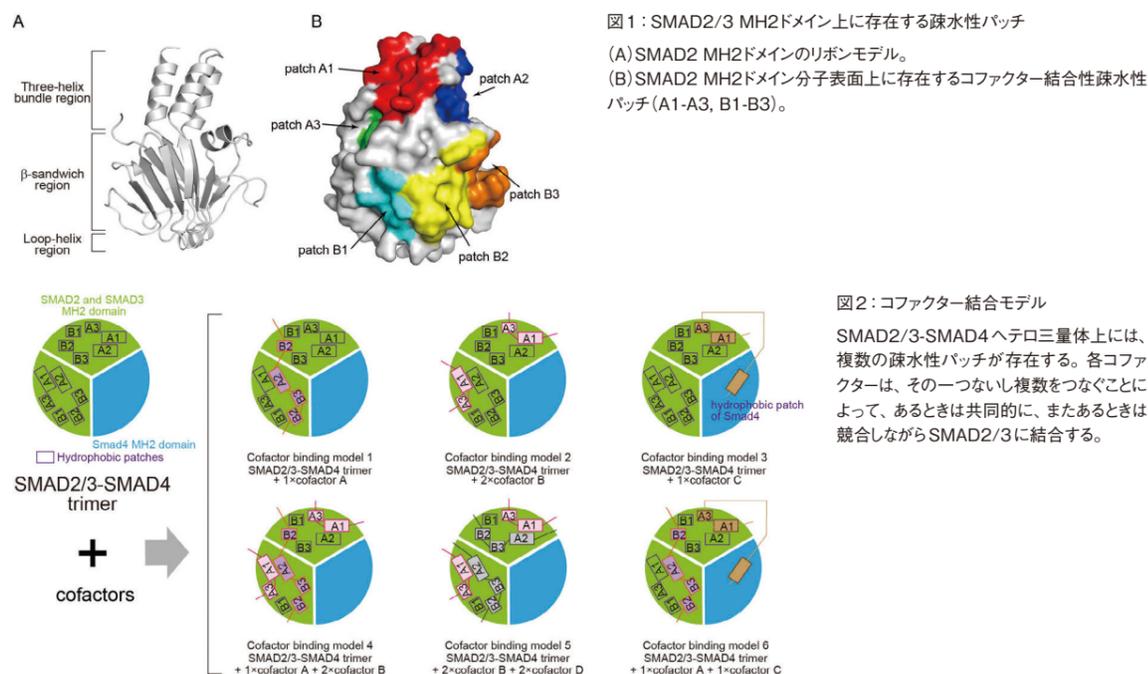


図1: SMAD2/3 MH2ドメイン上に存在する疎水性パッチ
(A) SMAD2 MH2ドメインのリボンモデル。
(B) SMAD2 MH2ドメイン分子表面上に存在するコファクター結合性疎水性パッチ(A1-A3, B1-B3)。

図2: コファクター結合モデル
SMAD2/3-SMAD4ヘテロ三量体上には、複数の疎水性パッチが存在する。各コファクターは、その一つないし複数をつなぐことによって、あるときは共同的に、またあるときは競合しながらSMAD2/3に結合する。

SMAD2/3が多様なコファクターと結合できる仕組みを解明

TGF-βは、多様な生命現象を制御する多機能性のサイトカインであり、その刺激により様々な遺伝子発現の制御が行われます。細胞外で作用するTGF-βのシグナルは、細胞内では主に転写因子SMAD2/3のリン酸化へと変換されます。リン酸化されたSMAD2/3はSMAD4とヘテロ複合体を形成し作用しますが、このとき、他のコファクターと多様な転写因子複合体を形成することが知られています。SMAD2/3に対しては、300近いコファクターが相互作用することがこれまでに知られていましたが、これらのコファクターには共通する「SMAD2/3結合モチーフ」に相当する領域が保存されておらず、なぜこれほど多くの多様なコファクターがSMAD2/3に対して特異的に結合できるのかは、明らかにされていませんでした。SMAD2/3の機能はコファクターによって様々に調節を受けるため、SMAD2/3がどのように各コファクターを認識しているかを明らかにすることができれば、TGF-βシグナルの多機能性の根幹に迫ることができると期待されます。

本研究では、SMAD2/3に結合するコファクターの多様性を構造学的な観点から明らかにしようと試みました。SMAD2/3とコファクターの間の相互作用様式を詳しく調べるために、転写コリプレッサー SKIが結合したSMAD2、および転写因子FOXH1が結合したSMAD3の構造をX線結晶構造解析法により決定しました。その結果、SMAD2/3とコファクターの結合様式は、同一の構造基盤で行われているわけではなく、SMAD2/3分子表面上に存在する複数の疎水性の小領域(疎水性パッチ)が、コファクターとの結合に関与することが明らかになりました。これまでに明らかにされてきたSMAD2/3-コファクター複合体の構造を精査すると、1. SMAD2/3 MH2ドメイン上にはコファクターが結合する可能性のある疎水性パッチが6カ所存在する、2. 各コファクターは、これらの疎水性パッチのうち一つないし複数を選択しそれらをつなぐことによりSMAD2/3に対し特異的に結合する、というモデル(SMAD cofactor code)が予想されました。このモデルをもとに考えると、これまであいまいであったSMAD2/3とコファクターの関係性(結合する分子数、共同的な結合、競合など)の多くを説明できるようになります。

これまでに報告されてきた様々な結合実験の結果を今回の解析結果に照らし合わせると、各疎水性パッチに結合するコファクターの群をある程度予測することができます。つまり、ある特定の疎水性パッチを阻害するような物質は、特定のコファクター群の相互作用のみを阻害することが期待されます。TGF-βシグナルの異常はがんや線維症といった重篤な疾病と関係します。本研究で明らかにしたSMAD cofactor codeをもとに、特定のコファクター群の作用のみを制御できる物質を開発できれば、新たなTGF-βシグナル制御剤となり、創薬分野での応用も期待されます。

生命現象の構造学的な理解からその制御へ

私たちの研究室は、2017年から東京大学大学院農学生命科学研究科に新しく開設された寄付講座です。超高齢化社会を迎えた我が国において、医・食・農にまたがる広い観点から、身体の健康維持や持続的社会的実現に求められる技術シーズの創出を目指しています。構造生物学研究を主要な技術としており、構造情報をもとにした生命現象の理解と、その制御に向けた研究を進めています。



酸素を感知する FixL-FixJ 二成分シグナル伝達系の全体像

Architecture of the complete oxygen-sensing FixL-FixJ two-component signal transduction system

Gareth S. A. Wright¹ 引間 孝明² 西園 陽子³ 久野 玉雄² 鎌屋 美咲³ 貫名 康平³ 西谷 秀男³ 中村 寛夫² 山本 雅貴²
Svetlana V. Antonyuk¹ S. Samar Hasnain¹ 城 宜嗣^{2,3}

¹ Molecular Biophysics Group, Institute of Integrative Biology, Faculty of Health and Life Sciences, University of Liverpool, Liverpool L69 7ZB, UK.
² 特定国立研究開発法人 理化学研究所 放射光科学研究センター
³ 兵庫県立大学大学院 生命理学研究科



佐伯 茜子 Akane Saeki
兵庫県立大学大学院 生命理学研究科・細胞制御学II研究室 博士前期課程2年
(現 東洋紡株式会社 フィルム技術総括部)

澤井 仁美 Hitomi Sawai
兵庫県立大学大学院 生命理学研究科・細胞制御学II研究室 助教

左から佐伯 茜子、澤井 仁美

Contact 澤井 仁美 E-mail : sawai@sci.u-hyogo.ac.jp
所在地 : 678-1297 兵庫県赤穂郡上郡町光都3-2-1
URL : http://www.sci.u-hyogo.ac.jp/life/regulation/index-j.html

Abstract

ダイズ根粒菌 (*Bradyrhizobium japonicum*) は、酸素センサータンパク質システム FixL と FixJ の働きにより、低酸素環境下で効率的に窒素固定を行うことができるため、窒素肥料をほとんど使うことなくダイズの高収量生産を可能にさせる。二成分シグナル伝達系 (TCS) を構成するヒスチジキナーゼ FixL は、分子状酸素 (O_2) のセンサーとして機能し、 O_2 を結合していないときに ATP を加水分解して自己リン酸化し、リン酸基をレスポンスレギュレーターである FixJ に転移する。リン酸化された FixJ は、転写因子として機能し、窒素固定酵素の遺伝子発現を促進する。本研究では、*B. japonicum* 由来 FixL および FixJ の全長タンパク質を調製し、X線小角散乱法・X線結晶構造解析・in silico モデリング法を用いて、各タンパク質の立体構造とそれらの複合体の構造を明らかにした。全長 FixL の活性型と不活性型の構造比較から、分子内シグナル伝達は、センサードメインとヒスチジキナーゼドメインを結ぶコイルドコイル領域の局所的変化によって制御されることが示唆された。さらに、FixJ は単量体状態だけでなく、リン酸基転移時に FixL と複合体を形成するときも、柔軟な構造をとることが見出された。本研究における構造特性解析は、TCS の制御メカニズムの理解にとどまらず分子進化論的な理解も導くであろう。

Figure and Note

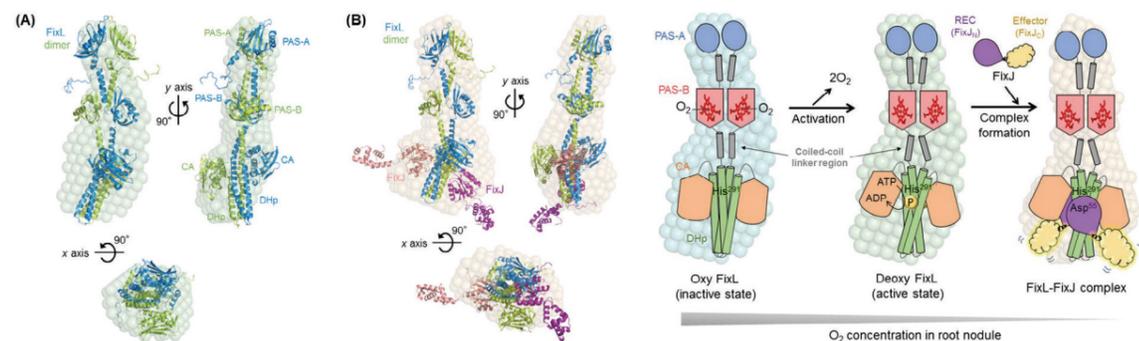


図1: 全長 FixL (A) ならびに全長 FixL と全長 FixJ の複合体 (B) の構造
FixL は青色と緑色のリボン図で示すようなホモダイマーを形成していた。FixJ はピンク色とマゼンタ色で示した。1 分子の FixL に対して 1 分子の FixJ が結合している。

図2: O_2 センシングシステム FixL/FixJ の分子機構の模式図
根粒菌内の O_2 濃度が低いときに FixL と FixJ は複合体化し、リン酸を FixL から FixJ に渡すことでシグナルを伝達する。

土壤中の O_2 濃度を感知するタンパク質システムの全体像

根粒菌は、大気中の窒素を植物が利用しやすいアンモニアに変換する反応 (窒素固定反応) を行う土壌細菌です。化学肥料に含まれるアンモニアは超高压高温下で工業的に生産されていますが、根粒菌は窒素固定により常温常圧下でアンモニアを作ることができます。根粒菌による窒素固定反応は O_2 があると進行しないため、根粒菌は周囲の O_2 濃度を感知して、 O_2 のない環境で効率よく窒素固定を行うシステムを有しています。このシステムにおいて、 O_2 センサーとして機能するタンパク質が FixL、FixL の酸素センシングに伴う情報を受けて窒素固定酵素の合成を制御するタンパク質が FixJ です。FixL/FixJ システムのような2種類のタンパク質からなるシグナル伝達システムは「二成分シグナル伝達系 (TCS)」と呼ばれています。これまでに、多くの研究者が TCS を研究してきたにもかかわらず、タンパク質全体の立体構造が解明されておらず「環境因子の感知をどのようにして伝達しているのか?」という機能制御機構については詳細に答えることは不可能でした。そこで私たちは、FixL/FixJ を研究対象として、これまで未解明であったタンパク質の全体構造を決定し、 O_2 の感知に伴うシグナル伝達の詳細な分子メカニズムを解明することを目指しました。

図1は、私たちが明らかにした FixL ならびに FixL-FixJ 複合体の世界初の立体構造です。これらの立体構造から、 O_2 などの環境因子の感知に伴うシグナル伝達は、局所的に起こる小さな構造変化によって伝播されるということが示唆されました。さらに機能解析を行い、センサー部位とリン酸基結合部位の間で生じる構造変化によってシグナルが制御されることを提唱しました (図2)。さらに、FixL-FixJ 複合体では、FixL と FixJ のリン酸基結合部位が近づくようにして複合体を形成していました。この構造では、FixJ のリン酸基結合領域だけが FixL と相互作用しており、その他の領域は FixL と相互作用せず揺らいでいることがわかりました。リン酸基の授受によるシグナル伝達は、すべての TCS タンパク質に共通する機構であるため、本研究で解明された FixL-FixJ 間の相互作用は TCS タンパク質に共通する性質です。また TCS に属する他のタンパク質では、FixL-FixJ 複合体中の FixJ に観測された揺らいだ構造に相当する部分には多種多様な生理機能を担うタンパク質のパーツが融合しています。このことから、TCS タンパク質はこのパーツの部分を進化の過程で多様化することにより、様々な環境因子に対応できるようになったと考えられます。

ダイズ根粒菌の FixL/FixJ タンパク質は、宿主植物であるダイズの生育に不可欠な窒素栄養の供給に必須のシステムです。本研究で明らかにした FixL/FixJ タンパク質の立体構造に基づき、ダイズ根粒菌を改良することで悪環境でも効果を発揮できる菌株の開発が期待できます。また、FixL/FixJ システムが属する TCS は、微生物や高等植物が生きていくために欠かせない環境応答システムです。この情報伝達系は、ヒトを含む動物ではまったく見つかっていません。本研究グループが解明した立体構造の情報を用いることにより、TCS に特異的に作用し、その制御を停止する薬剤を作ることで、動物への影響のない新しいタイプの抗菌薬を開発できる可能性があります。

兵庫県立大学大学院生命理学研究科 細胞制御学II研究室

生体内に数多く存在する金属タンパク質・酵素は、生体の物質・エネルギー代謝、恒常性維持など多くの重要な生理反応に関与しています。私たちの研究室は、大型放射光施設 SPring-8 に近接しており、研究に集中できる環境です。X線結晶構造解析法・各種分子分光法による分子構造解析ならびに生化学的・細胞生物学的な機能解析法を駆使して「生体金属の役割を原子レベルで理解すること」を目標に研究を行っています。



IKK α とLC3の相互作用が TLR9含有LAPosomeを介して I型インターフェロン産生を促進する

The interaction between IKK α and LC3 promotes type I interferon production through the TLR9-containing LAPosome



左から林 下致子、田浦 学、岩崎 明子

林 下致子 *Kachiko Hayashi*
Postdoctoral fellow, Department of Immunobiology,
Yale University School of Medicine

田浦 学 *Manabu Taura*
Associate Research Scientist, Department of Immunobiology,
Yale University School of Medicine

岩崎 明子 *Akiko Iwasaki*
Professor, Department of Immunobiology, Yale University School of Medicine
Howard Hughes Medical Institute Investigator, Yale University

Contact

岩崎 明子
E-mail : akiko.iwasaki@yale.edu
所在地 : 300 Cedar Street 40 New Haven CT, USA
06519 203.785.7662
URL : https://medicine.yale.edu/lab/iwasaki/

Abstract

Toll様受容体9(TLR9)は、エンドソーム内のDNAを認識し、炎症性サイトカインとI型インターフェロン(IFN)の産生を誘導する別々のシグナル伝達経路を活性化する。IFN産生を誘導するがインターロイキン-12 p40(IL-12p40)の産生には関与しないTLR9シグナルの伝達には、微小管結合タンパク質1A/1B-軽鎖3(LC3)を表面にもつエンドソーム小胞における、シグナル伝達プラットフォームの構築が必要である。さらに、インターフェロン調節因子7(IRF7)の活性化とIFN合成には非古典的なオートファジーの一形態であるLC3関連ファゴサイトーシス(LAP)が不可欠であることも知られている。われわれは、CpGオリゴヌクレオチドによるTLR9の刺激後、オートファジータンパク質LC3とタンパク質リン酸化酵素IKK α が、TLR9を含有するエンドソームに誘導されることを示した。そのようなシグナル伝達プラットフォームとなるエンドソームへのIKK α とLC3の誘導には、古典的オートファゴソーム形成の促進因子(FIP200)は必要ではなく、ATG5を必要とし、LAP形成が関与する。加えて、LC3-IKK α 複合体はさらに、TRAF3とIRF7の両方と結合することが見出された。IKK α においてLC3相互作用領域(LIR)と推定される3カ所が同定され、変異導入実験から、このうち2カ所がLC3との直接結合に不可欠であることが示唆された。さらに、これら2カ所のLIR配列に変異を導入すると、IKK α の発現を再構成したIKK α 欠損樹状細胞においてI型IFN産生が回復しなかった。以上より、TLR9活性化によるI型IFN産生には、LAP形成とIKK α の動員が直接的に関連していることが示唆される。

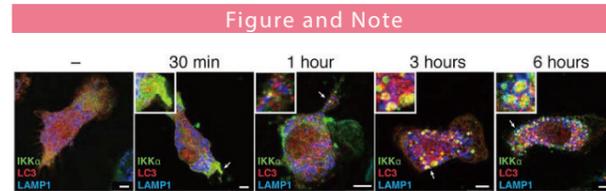


図1: TLR9刺激依存性なIKK α とLC3の共局在
TLR9刺激30分後からIKK α とLC3は、IRF7 endosome (LAMP1/2)を包み飾るように共局在する。

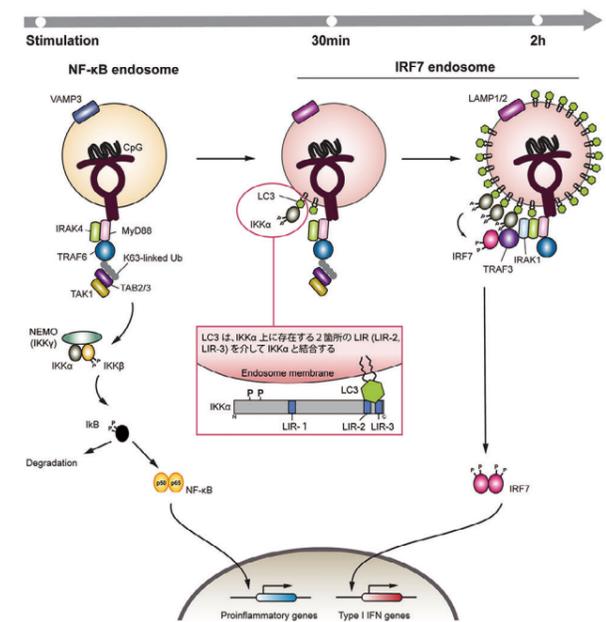


図2: TLR9シグナル下流におけるI型インターフェロンの誘導には、IKK α -LC3の結合を介したLAPosomeの誘導が必須である
TLR9リガンドの結合によりTLR9は二量体化し、炎症性サイトカインの発現を惹起するNF- κ B endosomeを経て、ATG5依存的にLC3を誘導することによりLAPosome (IRF7 endosome)を形成し、IKK α 上のLIRを介したLC3とIKK α の結合がIRF7活性化を介してI型IFNの発現を誘導する。

LC3はIKK α と結合し、IFN産生を誘導する

樹状細胞やマクロファージに主に発現するTLR9は、ファゴサイトーシスにより取り込んだ病原体由来のDNAをエンドソーム内で認識し、炎症性サイトカインやI型IFNの産生を誘導する自然免疫受容体の一つです。特にI型IFNの産生には、DNA取り込みの際に活性化されるオートファジー制御因子LC3がエンドソーム膜上に誘導され、IFN産生を誘導する転写因子IRF7特異的の活性化が必須です。このようなTLR9活性化時に誘導されるLC3は、オートファジーとは直接関係のないLC3関連ファゴサイトーシス(LAP)と呼ばれる非古典的オートファジーを制御し、ATG5/7を介してLAPosomeと呼ばれるendosomeを形成します。しかし、TLR9刺激によるLC3活性化およびLAPosome形成がどのようにIRF7を活性化しIFNの産生を特異的に誘導しているのかその詳細は不明でした。

そこで私たちは、IRF7活性化に必須のタンパク質リン酸化酵素IKK α に着目し、IKK α 欠損マクロファージにIKK α 、LC3、TLR9を過剰発現させ共焦点顕微鏡下にてこれらタンパク質の局在を観察しました。その結果、TLR9特異的に活性化するDOTAP-CpG刺激依存的にIKK α とLC3が初期エンドソームおよび後期エンドソーム上のTLR9と共局在することを発見しました。さらにIKK α のアミノ酸配列上にLIRを見出し、TLR9刺激依存的にIKK α とLC3が結合することを明らかにしました。またATG5欠損マクロファージではIFNの発現が顕著に抑制されたことから、TLR9刺激依存的なIKK α とLC3の結合およびエンドソーム上での共局在はLAPosomeを介することが示されました。さらにLC3は、TLR9下流でIRF7活性化を誘導するTRAF3、IRF7、IKK α の結合を増強することも確認されました。次に私たちは、IKK α 上に確認された3カ所のLIRにそれぞれ変異を導入したIKK α 変異体を作成しIKK α 欠損樹状細胞に過剰発現し検討を行いました。その結果、IKK α 上の2カ所のLIR変異によりTLR9刺激依存的なIKK α とLC3の共局在ならびにIFN産生が顕著に低下していました。さらに、LIRの変異はNF- κ Bシグナルにまったく影響しない一方で、IRF7活性化を特異的に低下させました。以上より、TLR9刺激依存的にLC3がIKK α に結合することによって、IKK α 、LC3、TRAF3、IRF7を構成因子に持つLAPosomeが形成され、IFN特異的産生を制御することが明らかになりました。

本研究は、LC3がIKK α に結合することにより直接的に自然免疫シグナルを制御しうることを示した点において画期的発見であると考えられます。IFNは病原体に対する生体防御のみならずがんや自己免疫疾患など多様な疾患に寄与し、TLR9リガンドはワクチンアジュバントとして注目されています。以上のことに鑑み、これまで完全には理解されていなかったTLR9のIFN特異的産生経路の詳細を示す本研究の見解は極めて有用であると考えられます。

Akiko's Lab, Department of Immunobiology, Yale School of Medicine

私たちが所属するYale大学医学部免疫生物学部門は、これまでTLRの発見などを通じて免疫学の理解に大きく貢献してきました。その原動力は、革新的かつ独創的で自由闊達な発想に基づく緻密で地道な研究の積み重ねです。また多様性を重視し、世界中から多くの若手研究者が集い、昼夜を問わず日々研究に邁進しています。私たちの研究室も、米国、日本、中国、韓国、インド、台湾、ブラジルと出身国を問わず男女共に、多種多様な研究バックグラウンドを持つ仲間たちと日々笑いの絶えない和気あいあとした雰囲気の中、サイエンスと英語という共通言語を武器に研究を行っています。これからの日本人若手研究者のチャレンジを大いに期待します。

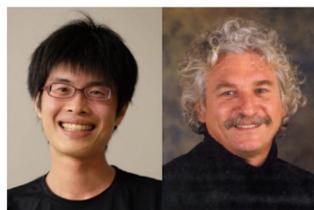


連動クロックシステムが ヒト洞房結節ペースメーカー細胞の自動能を駆動する

A coupled-clock system drives the automaticity of human sinoatrial nodal pacemaker cells

Oliver J. Monfredi^{1,2,3} Syevda G. Sirenko-Tagirova¹ Larissa A. Maltseva¹ Rostislav Bychkov¹ Mary S. Kim¹ Bruce D. Ziman¹ Kirill V. Tarasov¹ Yelena S. Tarasova¹ Jing Zhang¹ Mingyi Wang¹ Alexander V. Maltsev¹ Jaclyn A. Brennan⁴ Igor R. Efimov⁴ Michael D. Stern¹ Victor A. Maltsev¹

¹ Laboratory of Cardiovascular Science, Intramural Research Program, National Institute on Aging, NIH, Baltimore, MD 21224, USA.
² Institute of Cardiovascular Sciences, University of Manchester, Manchester M13 9NT, UK.
³ Department of Cardiovascular Electrophysiology, Johns Hopkins Hospital, 1800 Orleans Street, Baltimore, MD 21287, USA.
⁴ Department of Biomedical Engineering, George Washington University, Washington, DC 20052, USA.



筒井 健太 *Kenta Tsutsui*
 Laboratory of Cardiovascular Science, Intramural Research Program,
 National Institute on Aging, National Institutes of Health
 日本学術振興会海外特別研究員 (NIH)

Edward G. Lakatta
 Chief, Laboratory of Cardiovascular Science, Intramural Research Program,
 National Institute on Aging, National Institutes of Health

左から筒井 健太、Edward G. Lakatta

Contact 筒井 健太
 E-mail : knt22e@gmail.com
 所在地 : 251 Bayview Blvd Suite 100 Baltimore, MD 21224, USA
 U R L : https://researchmap.jp/tsutsui_kenta//
 Edward G. Lakatta
 E-mail : LakattaE@grc.nia.nih.gov
 所在地 : 251 Bayview Blvd Suite 100 Baltimore, MD 21224, USA
 U R L : https://www.nia.nih.gov/research/labs/lcs

Abstract

心臓の主要ペースメーカーである洞房結節 (SAN) は、自発的・周期的活動電位を生じて作業心筋を規則的かつ最適リズムで収縮させ、血液を全身に向けて駆出させる。新鮮なヒト心臓を用いた電気生理学的研究は技術的・倫理的に極めて困難なため、洞房結節ペースメーカー細胞 (SANC) の自動能を担う生理学的機構に関するこれまでの研究は、主に小動物の心臓を用いてなされてきた。われわれは、ドナー心から単離したヒトSANCを用いて、細胞質内の筋小胞体からの自発的周期的な局所 Ca^{2+} 放出 (Ca^{2+} クロック) が、起電性の細胞膜イオンチャネル群 (Mクロック) と連動して周期的活動電位を生じること、また、 Ca^{2+} -cAMP-プロテインキナーゼ A (PKA) シグナル伝達がクロック連関を調節することを示した。このクロック連関が解かれると、膜電位は脱分極して局所 Ca^{2+} 放出は乱れる。結果としてSANCは自発的活動電位を停止し、自動能を失う。 β -アドレナリン受容体 (β -AR) 刺激を介した細胞内cAMP濃度増加は小動物SANCでクロック連関の増強を介して活動電位発火頻度を増加させるが、一部の非拍動停止型ヒトSANCにおいては、この刺激は細胞内 Ca^{2+} 濃度を上昇させ、拡張期局所 Ca^{2+} 放出を同期することによりクロック連関を再開させ、自発的周期的活動電位を回復させた。 β -AR刺激を中止すると、クロックは再び連動しなくなり、SANCは非拍動停止状態に戻った。したがって、ヒトペースメーカー細胞の自動能は、 Ca^{2+} -cAMP-PKAシグナル伝達に誘導される連動クロックシステムによって駆動される。クロックの非連関状態が極度になると、自発的活動電位生成障害が生じたが、これは、クロックを再度連動させることにより回復した。これらの停止細胞の一部におけるクロック連関と活動電位発火は、 β -AR刺激誘導性の Ca^{2+} -cAMP-PKAシグナル伝達増強によって、回復させることが可能である。

Figure and Note

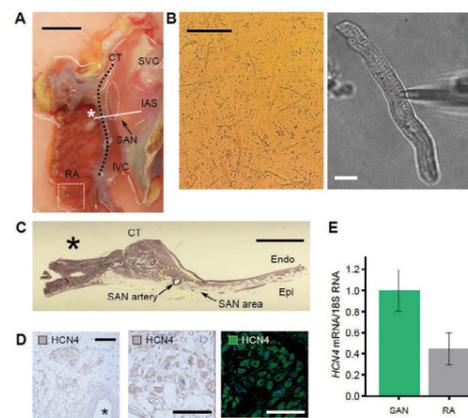


図1: ヒト心臓からの新鮮洞房結節細胞の単離
 (A) 26-65歳の心疾患を有さないドナー患者から単離された右心房後壁。白破線は洞房結節領域を示す。(B) 単離に成功したヒト洞房結節細胞。(C) 洞房結節領域 (パネルAの白破線) の横断面。洞房結節領域は洞房結節動脈を中心に分布。(D・E) 同部位の細胞が特異的マーカー・HCN4陽性であることが確認された。

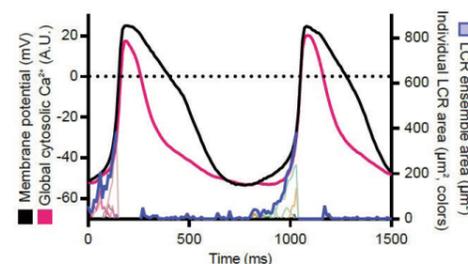


図2: 自発的活動電位と細胞内Caシグナルの同時計測
 ヒト洞房結節細胞におけるパッチクランプとカルシウムイメージングの同時測定。自発的活動電位 (黒) の立ち上がりに同期して、全細胞シグナル (マゼンタ) と局所Caシグナル (青) が増加する。

心拍の起源と、二つのクロック

心臓は、堅牢かつ柔軟にその心拍数を調節しながら一貫して温かい血液を全身に送り続けます。私たちの安静時心拍数は一見すると非常に安定してみえますが、心拍数は心臓・全身・外的環境の複雑な相互連関の結果、その都度動的に決定されるもので、生涯を通じて一度たりとも同じではありません。心拍数は臨床的に計測が容易で、(1) 平均安静時心拍数 (2) 心拍数のゆらぎ (3) 心拍の機能的予備能 (最大心拍数-安静時心拍数) といった情報に、幅広い領域で診断的価値があることが報告されています。これらを利用した新たな診断・治療技術の開発が期待されますが、心拍が生じる過程に関する理解がまだ不十分であることが障壁となっています。洞房結節細胞の自発的活動電位は心拍数を規定するきわめて重要な因子ですが、その機能や機序を詳細に検討するためには心臓を切除して洞房結節を酵素処理する必要があり、ヒトの新鮮な細胞を直接調べることは困難でした。特に、近年小動物の心臓を用いた検討によって示されてきた Ca^{2+} クロックやクロック連関がヒトSANCでみられるかについては、まったくわかっていませんでした。

今回私たちは、心疾患を有さないドナー心臓の洞房結節から新鮮なヒトSANCを多数単離することに成功しました。そうして得られたヒトSANCにパッチクランプとカルシウムイメージングを行うことで、活動電位発火のためには細胞膜上の電位・時間依存性イオンチャネル群 (Mクロック) と筋小胞体からの局所的 Ca^{2+} 放出 (Ca^{2+} クロック) が連関して協調的に機能することが重要であることを発見しました。クロック連関の強弱が心拍数の多少を規定している可能性は、小動物を用いた実験的検討にて以前より指摘されてきました (例: 連関の程度が強いほど心拍が速く、程度が弱いほど心拍が遅くなる)。今回の結果は、その仕組みが心拍数の異なるヒトでも共通であることがわかりました。さらに、活動電位発火を停止したSANCではこのクロック連関が失われており、 β 受容体刺激を通じてcAMP-PKAシグナリングを活性化することでクロックの連関が生まれて活動電位発火を再開することを明らかにしました。

ヒトSANCが小動物のSANCと同じ仕組みで自発的活動電位を発生していることが示唆されました。これまでに積み重ねられてきた、小動物を用いた実験的検討がヒトに当てはまる可能性を示し、勇気づけられるものだと考えます。今回の研究により、クロック連関が極端に低下した場合にSANCが活動電位発火を停止すること、クロック連関を向上することで発火を開始することがわかりました。私たちはこのクロック連関について詳細な検討を続けています。長期的には、加齢に伴う心拍制御異常、例えば洞機能不全 (依然として原因不明で、社会の高齢化とともに患者数の倍増が予測され、人工ペースメーカー植え込み術の原因として最大の疾患です) に対する、デバイスに頼らない新規細胞ペースメーカー治療の開発などに役立つと期待されます。

Human heart team

24/7 gang

Laboratory of Cardiovascular Science

私たちの研究室は、創始者であるEdward G. Lakattaの一貫した精力的な指導の下で、洞房結節の研究のみならず、正常なヒトの老化過程の実際を探るコホート研究 (Baltimore Longitudinal Study of Aging: BLSA)・動脈硬化・高血圧・心不全などを含む、幅広いテーマを扱っています。国際的な環境で、多様なアプローチで洞房結節の自動能の起源に迫るべく日々活発な実験・議論が行われています。

Oliver
 Mary
 Alex
 Magda
 Jing
 Dongmei

Victor
 Larissa
 Kenta
 Rostislav
 Bruce
 Syevda
 Mingyi
 Kirill
 Yelena
 Dan
 Chloe
 Michael
 Tony

ヒト自己免疫疾患関連遺伝子 *Tagap* は胸腺細胞の皮質・髄質移行を制御する

Regulation of thymocyte trafficking by *Tagap*, a GAP domain protein linked to human autoimmunity

Jonathan S. Duke-Cohan^{1,2} Akihiro Yoshizawa^{1,2,†} Young-Il Choi^{1,2,†} Chin-Nien Lee^{2,3,‡} Oreste Acuto⁴ Stephan Kissler^{2,3} Ellis L. Reinherz^{1,2}

¹ Laboratory of Immunobiology, Department of Medical Oncology, Dana-Farber Cancer Institute, Boston, MA 02215, USA. [†] 理化学研究所 生命医科学研究センター 自然免疫システム研究チーム
² Department of Medicine, Harvard Medical School, Boston, MA 02115, USA. [‡] Boston Children's Hospital, Enders Research Building BCH3097, 300 Longwood Avenue, Boston, MA 02115, USA.
³ Immunobiology Section, Joslin Diabetes Center, Boston, MA 02215, USA.



石川 優樹 *Yuki Ishikawa*
 Research fellow, Immunobiology Section, Joslin Diabetes Center, Department of Medicine, Harvard Medical School

Contact

E-mail : yuki.ishikawa@joslin.harvard.edu
 所在地 : One Joslin Place, Boston, MA, 02215, USA
 URL : https://www.joslin.org/_diabetes-research/kissler-lab.html

Abstract

グアノシントリホスファターゼ(GTPアーゼ)活性化タンパク質であるTAGAPをコードするヒトTAGAPの一塩基多型(SNP)は1型糖尿病(T1D)を含む複数の自己免疫疾患と関連することが知られている。本研究ではヒトT1DモデルマウスであるNODマウスを用いて、*Tagap*が胸腺細胞の皮質・髄質移行と引き続く髄質での自己反応性細胞の除去(負の選択)に不可欠な分子であることを明らかにした。

皮質において機能性T細胞受容体を持つ未熟な胸腺細胞が第一の選択(正の選択)を受けた後に胸腺髄質へ移行するためには、Sema3E/plexin-D1複合体形成によるβ₁インテグリンを中心とした細胞骨格の変化と胸腺細胞の皮質からの乖離が必要である。*Tagap*はplexin-D1の細胞質ドメインに直接作用し、RhoAを活性化、また、sema3Eとplexin-D1の結合に反応したCdc42を間接的に活性化することでSema3E/PlexinD1シグナルを媒介することをわれわれは明らかにした。RhoAとCdc42はいずれも胸腺細胞中の細胞骨格およびインテグリン動態の主要なメディエーターである。さらに*Tagap*ノックダウン(KD)NODマウス胸腺では、胸腺細胞の皮質・髄質移行が著明に阻害され、皮質内に異所性髄質構造が形成された。異所性髄質構造での負の選択は本来の髄質と比較して不完全であると予測される(Choi Y., et al. *Immunity*. 2008)。

本研究の結果から、TAGAPの変異は、胸腺細胞の皮質・髄質移行と引き続く髄質における負の選択に影響を及ぼすことにより、自己免疫疾患病態形成に関与することが示唆された。

Figure and Note

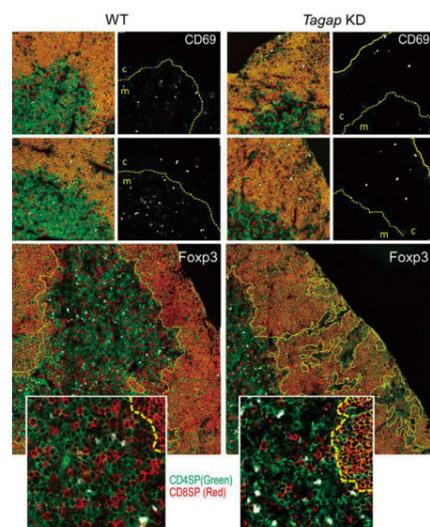


図1: *Tagap*-KDマウス胸腺皮質内における異所性髄質構造の形成と皮質領域における胸腺細胞の成熟
Tagap-KD胸腺では、野生型(WT)マウスと比較して不規則な皮質境界と、皮質内に成熟胸腺細胞を多く含む髄質様構造の形成を認める。また、*Tagap*-KD胸腺皮質には正の選択を受けた胸腺細胞(CD69+)が優位に多く認められる(上段図)。また、制御性T細胞(Treg)の成熟も異所性髄質構造内で起こっていることが示唆される(下段図)。

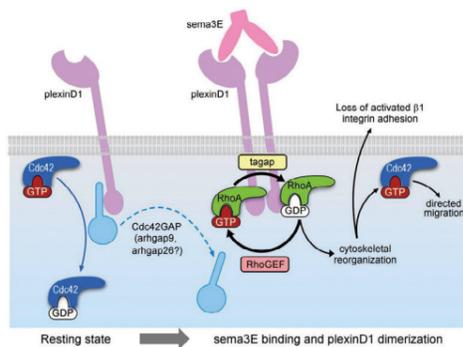


図2: 胸腺細胞内におけるTagap, Sema3E/PlexinD1シグナル伝達と機能調節モデル
*Tagap*はplexin-D1の細胞質ドメインに直接作用し、GTPアーゼであるRhoAを活性化する。また、sema3Eとplexin-D1の結合に反応したCdc42を間接的に活性化する。この結果、胸腺細胞内の細胞骨格変化と胸腺皮質細胞からの乖離、髄質由来化学遊走因子の濃度勾配に応じた皮質から髄質への移行が起こる。

I型糖尿病リスク遺伝子TAGAPの胸腺T細胞成熟における機能および病態形成機序に関する研究

本研究で解析した*Tagap*のヒトTAGAPにおける一塩基多型(SNP)がT1D、関節リウマチ、炎症性腸疾患など複数の自己免疫疾患関連遺伝子であることは以前から知られており、ゲノムワイド関連研究(GWAS)を中心にこれまで何度も報告されてきました。しかしその詳細な機能および病態形成への機序に関してはまったく不明のままです。私の所属するStephan Kisslerの研究室では、TAGAPの他にもGWASで同定された自己免疫疾患関連遺伝子の機能解析と病態形成への関与をI型糖尿病モデルマウスであるNODマウスを用いた系で明らかにすることをやってきました(Vaballero-Franceo C., et al. *Genes Immun*. 2016; Nowakowska DJ., et al. *J Immunol*. 2016; Schuster C., et al. *Immunity*. 2015.)。一方、共同研究者であるEllis Reinherzの研究室では、Sema3E/PlexinD1シグナルが胸腺細胞の皮質移行に必須であることを報告してきました。研究を継続していく中でSema3E/PlexinD1シグナルにおけるKey moleculeの一つとしてTagap(TAGAP)に着目しました。こうしてStephan Kissler研究室とEllis Reinherz研究室がコラボレートして本研究を進めていくことになりました。このように研究室間の垣根が低くコラボレーションが盛んであることは特筆に値する特徴であると考えます。

本研究の重要なポイントは、これまで複数の自己免疫疾患関連遺伝子として報告されながらも、生理的にも病態形成上もその機能が不明であったTAGAPの機能を詳細に解明したことにあると言えます。TAGAPの機能不全が胸腺における自己反応性T細胞の不十分な除去に繋がる可能性があるという点において、TAGAPが自己免疫疾患の病態形成に深く関与することが少なくとも胸腺レベルで説明できたということで画期的な研究であったと考えます。

自己反応性T細胞の除去のみならず、Tregの分化・成熟も髄質で起こるとされてきましたが、われわれの研究結果から、皮質異所性髄質でTregの成熟が起こっていた可能性があります(図1)。異所性髄質がどの程度本来の髄質同様の機能(負の選択、Tregの分化)を果たすのか、こうした異所性髄質で分化したT細胞の機能などが次に明らかにすべき点として挙げられます。また、TAGAPの発現は胸腺細胞のみならず、末梢成熟T細胞、B細胞、樹状細胞、NK細胞などにも強く認められることがわかっています。われわれは中枢免疫寛容におけるTAGAPの役割を示しましたが、末梢免疫機構における役割は詳細不明です。TAGAPが関連する自己免疫疾患において、中枢免疫寛容の破綻のみで病態形成が説明できるほど病態生理は単純なものではないと考えられます。今後は末梢における役割および中枢免疫寛容との関連性をより詳細に解明することで、TAGAPの病態形成における役割に基づいた臨床応用の方法が模索できるものと考えます。

Always Be Ambitious!!!

本稿執筆時、私が米国留学を開始して3年半が経過しました。学位取得後、基礎免疫学研究を継続し、専門であるリウマチ学における画期的な臨床応用の方法を見出すという志を抱いてやってきました。初めはコミュニケーションの問題を含めた環境の違いに左右されてなかなか思うように研究がはかどりませんでした。目的を持って日々やるべきことを継続することで、徐々に実力と自信が身につく、困難な状況においても突破口を見つけることができるようになりました。日本との大きな違いは自己主張がはっきりしているところで、そのせいかコミュニケーション能力が高いように思われ、Scientificな話題に限らず討論が盛んなように感じます。そうした討論の中で自身のアイデアを生み出すという習慣を日々学んでいる最中です。こうして留学生生活を過ごして来たのですが、常にベースにあるのはAmbitionです。日本人らしい大和魂と大志を持って多くの日本の若い研究者が海外留学を経験されることを切に期待して止みません。



甲状腺ホルモン受容体とERR α はミトコンドリアの分裂、分解、新生、機能を協調的に調節する

Thyroid hormone receptor and ERR α coordinately regulate mitochondrial fission, mitophagy, biogenesis, and function

Rohit A. Sinha^{1,2} Madhulika Tripathi¹ Arturo Mendoza³ Jann A. C. Sy¹ Sherwin Y. Xie¹ Jin Zhou¹ Jia Pei Ho¹ Ching-yi Chang⁴ Yajun Wu⁵ Vincent Giguère⁶ Boon-Huat Bay⁵ Jean-Marc Vanacker⁷ Sujoy Ghosh¹ Karine Gauthier⁷ Anthony N. Hollenberg³ Donald P. McDonnell⁴

¹ Laboratory of Hormonal Regulation, Cardiovascular and Metabolic Disorders Program, Duke-National University of Singapore (NUS) Medical School

⁴ Department of Pharmacology and Cancer Biology, Duke University School of Medicine

² Department of Endocrinology, Sanjay Gandhi Postgraduate Institute of Medical Sciences

⁵ Department of Anatomy, Yong Loo Lin School of Medicine, NUS

³ Division of Endocrinology, Diabetes, and Metabolism,

⁶ Goodman Cancer Research Centre, McGill University

Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard Medical School, Center for Life Sciences

⁷ Institut de Génomique Fonctionnelle de Lyon, Université de Lyon



左からBrijesh K. Singh, 大場 健司, Paul M. Yen

Brijesh K. Singh

Assistant professor, Laboratory of Hormonal Regulation, Cardiovascular and Metabolic Disorders Program, Duke-NUS Medical School

大場 健司 Kenji Ohba

Research fellow, Laboratory of Hormonal Regulation, Cardiovascular and Metabolic Disorders Program, Duke-NUS Medical School (現 国立大学法人 浜松医科大学 医学教育推進センター 特任講師)

Paul M. Yen

Professor, Laboratory of Hormonal Regulation, Cardiovascular and Metabolic Disorders Program, Duke-NUS Medical School

Contact

大場 健司
E-mail : ohbak@hama-med.ac.jp
所在地 : 431-3192 静岡県浜松市東区半田山1-20-1
URL : https://www.hama-med.ac.jp

Abstract

甲状腺ホルモン受容体 $\beta 1$ (thyroid hormone receptor $\beta 1$: TR $\beta 1$)とエストロゲン関連受容体 α (estrogen-related receptor α : ERR α)はいずれもミトコンドリアの活性において重要な役割を果たす。この両者の間に存在する相互作用について理解するために、私たちはトランスクリプトーム解析とクロマチン免疫沈降シーケンシング (ChIP-seq)を行い、TR $\beta 1$ とERR α の両者に制御される多くの遺伝子が、酸化リン酸化 (OXPHOS)、TCA回路、脂肪酸 β 酸化などのミトコンドリア代謝経路に関与することを見出した。甲状腺ホルモン (thyroid hormone: TH)は、TR $\beta 1$ 依存性に転写共役因子PPARGC1A (PGC1 α とも表記される)の誘導を介して、ERR α の発現および活性を増加させた。さらにERR α 依存性にミトコンドリアの新生、分裂、分解 (マイトファジー)を誘導した。またTHはERR α を介してULK1の発現も誘導し、DRP1に媒介されるミトコンドリア分裂を促進した。ULK1はFUNDC1を活性化し、FUNDC1とMAP1LC3B-IIとの相互作用を亢進して、マイトファジーを誘導した。siRNAを用いてERR α 、ULK1、DRP1、あるいはFUNDC1をノックダウンした結果、THに誘導されるオートファジーによるミトコンドリアのクリアランスは阻害され、OXPHOSは減少した。これらの知見は、THによって誘導されるミトコンドリア活性の多くが、ERR α の発現および活性促進を介して調節されること、PPARGC1A-ERR α -ULK1経路を介したミトコンドリアのターンオーバーのco-regulationがミトコンドリアの分裂とマイトファジーの調節により媒介されることを示している。ホルモンまたは薬剤によるERR α の発現/活性の誘導により、代謝疾患におけるミトコンドリアの品質改善につながるが期待される。

Figure and Note

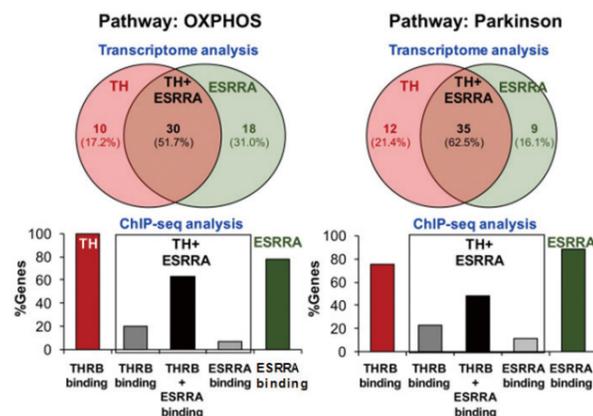


図: ミトコンドリア代謝経路に関与する多くの遺伝子はTR $\beta 1$ とERR α によってco-regulateされる。OXPHOS、Parkinsonのpathwayに関わる遺伝子の半分以上はTHとERR α (ESRR α)によってco-regulateされ、大部分のプロモーター領域にTRおよびERR α はともに結合する。

甲状腺ホルモンはERR α とともにミトコンドリアの品質管理を調節する

ミトコンドリアは細胞内でエネルギー産生を行うのみならず、酸化ストレスの発生源であることなどから多様な病態形成に関与する重要なオルガネラと認識されています。近年、障害を受けたミトコンドリアの品質管理の分子理解に注目が集まり、オートファジーによる分解 (マイトファジー) の概念などが提唱されています。これまで私たちは、甲状腺ホルモン (thyroid hormone: TH)によるマイトファジー活性化を肝臓 (Sinha RA, *et al.*, *Autophagy* 2015)あるいは骨格筋 (Lesmana R, *et al.*, *Endocrinology* 2016)にて明らかにしました。一方、THはその受容体 (TH receptor: TR)と結合し、標的遺伝子上に存在する応答配列に結合することで、遺伝子発現を調節することが以前から知られています。さらに近年では、TH/TRは他の転写因子 (PGC1 α など)の活性化を惹起することにより、応答配列を持たない遺伝子の発現を間接的に調節することも明らかにされています (Singh BK, *et al.*, *Mol Cell Endocrinol* 2017)。ところでTRと同じ核内受容体に属するエストロゲン関連受容体 α (estrogen-related receptor α : ERR α)はエストロゲン受容体 α と70%のアミノ酸相同性があり、ミトコンドリア関連遺伝子を含むエネルギー代謝に関わる遺伝子群の転写を調節することが知られてきました。しかし、TRとERR α のクロストークについては、これまで明らかにされていません。

今回私たちは、TH、XCT790 (ERR α のインバーサゴニスト) および両者を投与したマウス肝臓を用い、トランスクリプトーム解析を行いました。パスウェイ解析の結果、ミトコンドリア代謝経路に関わるOXPHOS、Parkinson diseaseなどにおいて、半分以上の遺伝子はTH/TRとERR α によってco-regulateされ、これらの大部分の遺伝子 (プロモーター領域)に、TRおよびERR α がともに結合することをChIP-seqにて見出しました。さらに、① THはPGC1を介してERR α の遺伝子発現を増加させること、② THによるミトコンドリアの新生、分裂、分解 (マイトファジー)はERR α 依存性であること、なども明らかにしました。

今後、臓器特異的なリガンドなどの開発により、TRあるいはERR α の発現/活性を誘導することで、加齢や代謝疾患におけるミトコンドリアの品質改善につながるが期待されます。

シンガポール随一の甲状腺研究室

私が留学したDuke-NUS Medical School (デューク大学とシンガポール国立大学により共同で設立)のPaul Yen教授の研究室は、ホルモンによるオートファジー制御、あるいはエピジェネティック制御などを主要なテーマとしています。特に甲状腺領域の基礎研究はシンガポール随一です。



ヒト、ニワトリ、ワニ、カエル、ゼブラフィッシュの ミネラルコルチコイド受容体の進化： ステロイド特異性へのアロステリックな影響

Evolution of human, chicken, alligator, frog, and zebrafish mineralocorticoid receptors: Allosteric influence on steroid specificity

Michael E. Baker

Division of Nephrology-Hypertension, Department of Medicine, University of California, San Diego, La Jolla, CA 92093-0693, USA.



左から勝 義直、岡 香織

勝 義直 Yoshinao Katsu

北海道大学 大学院理学研究院 教授

岡 香織 Kaori Oka

北海道大学 大学院生命科学院(現 熊本大学大学院 生命科学研究部 博士研究員)

Contact

勝 義直

E-mail : ykatsu@sci.hokudai.ac.jp

所在地 : 060-0810 北海道札幌市北区北10条西8丁目 北海道大学理学部5号館10-08室

U R L : https://www.repdev-katsu.jp/index.html

Abstract

グルココルチコイド、ミネラルコルチコイド、プロゲステンファミリーの複数のステロイドリガンドが、ミネラルコルチコイド受容体(MR)に結合し、その活性を調節するが、これらのリガンドに対する反応は種によって異なる。MRの異なるドメインが、MR活性のリガンド誘導性の活性化または抑制に寄与する仕組みを理解するために、われわれは、ヒト、ニワトリ、ワニ、カエル、ゼブラフィッシュの全長型MRと、N末端ドメイン(NTD)およびDNA結合ドメイン(DBD)を欠損した切断型MRの、8種類のステロイド(アルドステロン、11-デオキシコルチコステロン、11-デオキシコルチゾール、コルチゾール、コルチコステロン、プロゲステロン、19-ノルプロゲステロン、スピロラクトン)に対する反応を検討した。全長型MRと比較して、切断型MRの中には、ステロイドによって活性化されないものや、活性化に必要なステロイド濃度がより高いものがあった。プロゲステロン、19-ノルプロゲステロン、スピロラクトンは、全長型または切断型のヒト、ワニ、カエルMRを活性化させなかった。しかし、これらのステロイドは、10nMで全長型のニワトリおよびゼブラフィッシュMRを活性化させ、100nMでは、切断型ニワトリMRにはほとんど活性を示さなかった一方、切断型ゼブラフィッシュMRに対する活性を維持していた。このことから、プロゲステンによるニワトリMR活性化の調節はNTD-DBDによってなされ、ゼブラフィッシュMR活性化の調節はヒンジ-LBDによることが示唆される。ヒトMRのSer⁸¹⁰は、プロゲステロンのヒトMRに対するアンタゴニスト活性に必要とされ、ゼブラフィッシュおよびニワトリMRにはこれに相当するセリンが存在することから、これまで明らかにされていなかった、プロゲステンによるニワトリおよびゼブラフィッシュMRの活性化の調節機構が示唆される。これらの結果から、プロゲステロンは、ニワトリおよびゼブラフィッシュMRの生理的活性化因子ではないかと考えられる。

Figure and Note

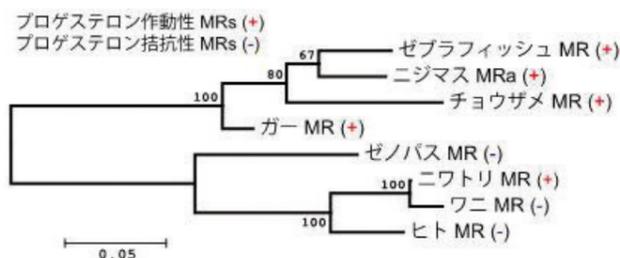


図1：プロゲステロンによる作動性および拮抗性ミネラルコルチコイド受容体(MR)の系統樹

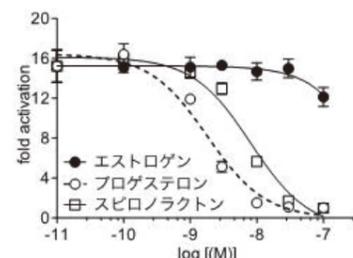


図2：ヒトのミネラルコルチコイド受容体(MR)の転写活性
アルドステロンによって活性化したヒトMRをプロゲステロン、スピロラクトンおよびエストロゲンで処理したところ、プロゲステロンとスピロラクトンは濃度依存的にヒトMRの活性を抑えた。

ミネラルコルチコイド受容体の分子進化を探る

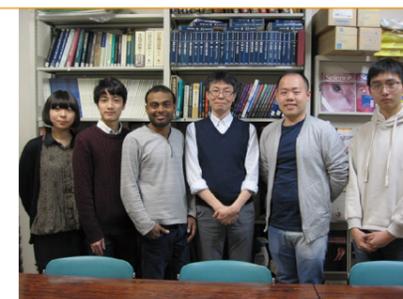
1987年に世界で初めてヒトのミネラルコルチコイド受容体のcDNAが単離されて以来30年がたちます。これまでに様々な動物からミネラルコルチコイド受容体のcDNAが単離され、ステロイドによる転写活性や発現解析などが行われてきました。一方で、ミネラルコルチコイド受容体のリガンドに関する研究も進められ、ヒトではアルドステロンが生体内リガンドであり体内の血圧を上昇させる作用をもつことなどがわかってきました。そのため、スピロラクトンなどミネラルコルチコイド受容体に対して拮抗的に作用する薬が開発され、医療現場で使用されるようになってきました。このようにミネラルコルチコイド受容体は、アルドステロンを介した生理的な恒常性維持に関与すると考えられていますが、生物の進化の過程における生理的機能の獲得に関する知見は乏しいのが現状です。

私たちの研究グループは、様々な動物種からステロイドホルモン受容体の単離を行い、ホルモン応答性を調べることによって受容体の分子進化の解明を目指しています。今回私たちは、カリフォルニア大学のMichael E. Baker教授と共同で、脊椎動物のミネラルコルチコイド受容体のホルモン応答性を詳細に調べました。その結果、ホルモンとの結合には関係しないと考えられているN末側のA/B領域が受容体のホルモン応答性に影響を与えること、また、ゼブラフィッシュとニワトリのミネラルコルチコイド受容体は黄体ホルモンであるプロゲステロンによって転写の活性化が誘導されますが、ヒト、ワニ、カエルのミネラルコルチコイド受容体は活性化されないことを明らかにしました。さらに、プロゲステロンは受容体による転写の活性化は誘導できませんが、ミネラルコルチコイド受容体タンパク質とは結合できることが競合実験により世界で初めて明らかになりました。

今回、脊椎動物のミネラルコルチコイド受容体のホルモン依存的な転写活性化について詳細な解析を行いました。ヒトではミネラルコルチコイド受容体の生体内リガンドはアルドステロンというステロイドホルモンであることが判明しています。しかし、ゼブラフィッシュのミネラルコルチコイド受容体は、アルドステロンに対して高い親和性をもっていますが、ゼブラフィッシュなどの魚類では生体内でアルドステロンは生合成されていません。それでは一体魚類における生体内リガンドは何なのでしょう。そして、生物の進化に伴ってミネラルコルチコイド受容体遺伝子が出現した当初のリガンドは何だったのでしょうか。解き明かされていない大きな謎です。私たちはこの謎に迫るために、生物進化の初期に出現した生物のミネラルコルチコイド受容体の解析を進めています。また、受容体とリガンドの相互作用の詳細な解析は、関連する内分泌疾患の新たな治療薬の創出にも貢献できると期待しています。

北の大地で内分泌制御システムの解明を目指す

私たちの研究グループは、北海道大学理学部内にあり、理学部生物科学科(生物学)の4年生、生命科学院生命システム科学コースの大学院生が所属しています。ステロイドホルモン受容体の分子進化の研究を通して、ステロイドホルモンによる動物の内分泌制御システムが動物の進化の過程でどのように成立したのか、その全体像の解明を目指しています。また、基礎研究だけではなくヒトの内分泌疾患の治療への応用を目指した取り組みも進めています。ご興味をもってくださった方は、ぜひご連絡ください。



コレステロール硫酸は眼の組織特異的免疫回避を仲介するDOCK2阻害因子である

Cholesterol sulfate is a DOCK2 inhibitor that mediates tissue-specific immune evasion in the eye

杉浦 悠毅^{1,2} 竜口 崇明³ 山村 和彦³ 牛島 美保³ 服部 裕子¹ 新野 (柊元) 睦子⁴ 津曲 千恵美⁴ 渡邊 真裕紀³ 末松 誠¹

¹慶應義塾大学 医学部 医化学教室 ² 科学技術振興機構 PRESTO
³九州大学 生体防御医学研究所 免疫遺伝学分野 ⁴ 理化学研究所 ライフサイエンス技術基盤研究センター



左から櫻井 哲哉、宇留野 武人、福井 宣規

櫻井 哲哉 Tetsuya Sakurai
九州大学 生体防御医学研究所 免疫遺伝学分野

宇留野 武人 Takehito Uruno
九州大学 生体防御医学研究所 免疫遺伝学分野 准教授
九州大学 免疫機構研究センター

福井 宣規 Yoshinori Fukui
九州大学 生体防御医学研究所 免疫遺伝学分野 教授
九州大学 免疫機構研究センター長

Contact

福井 宣規 E-mail: fukui@bioreg.kyushu-u.ac.jp
所在地: 812-8582 福岡県福岡市東区馬出3-1-1
URL: http://www.bioreg.kyushu-u.ac.jp/iden/

宇留野 武人 E-mail: uruno@bioreg.kyushu-u.ac.jp
所在地: 812-8582 福岡県福岡市東区馬出3-1-1
URL: http://www.bioreg.kyushu-u.ac.jp/iden/

Abstract

免疫応答は生体にとって感染に対する必須の防御機構であるが、その結果周辺組織へ害を及ぼすこともある。このため、特定の組織や器官、例えば眼などは、局所的に免疫反応を抑制する特殊な微小環境を形成することが知られている。DOCK2(dedicator of cytokinesis protein 2)は、主に造血細胞に発現するRac 特異的なグアニヌクレオチド交換因子(GEF)である。DOCK2は白血球の活性化と遊走に不可欠な分子で、免疫監視に重要な役割を演じており、その変異はヒトにおいて重篤な免疫不全症を引き起こす。私たちは、DOCK2を介したRac 活性化と白血球遊走が、コレステロール硫酸(CS)によって効果的に阻害されるが、コレステロールやその他の硫酸化ステロイドによっては阻害されないことを見出した。CSはDOCK2の触媒ドメインに結合し、そのGEF 活性を抑制した。質量分析を用いた定量解析の結果、CSは、涙の油層を形成する脂質を供給するハーダー腺において、最も大量に産生されることが明らかになった。コレステロールの硫酸化は、硫酸基転移酵素SULT2B1bを主体とし、一部SULT2B1aによっても仲介されるが、これらの酵素は、同一遺伝子から選択的スプライシングによって生成される。私たちは、*Sult2b1* 遺伝子を不活化することによりCSを産生できないようにしたマウスでは、紫外線および抗原によって誘導される眼表面の炎症が増強され、それが、CSを含有する点眼剤を投与することで抑制されることを示した。したがって、CSは生体内に初めから存在する天然のDOCK2阻害因子であり、眼の免疫回避環境の形成に寄与している。

Figure and Note

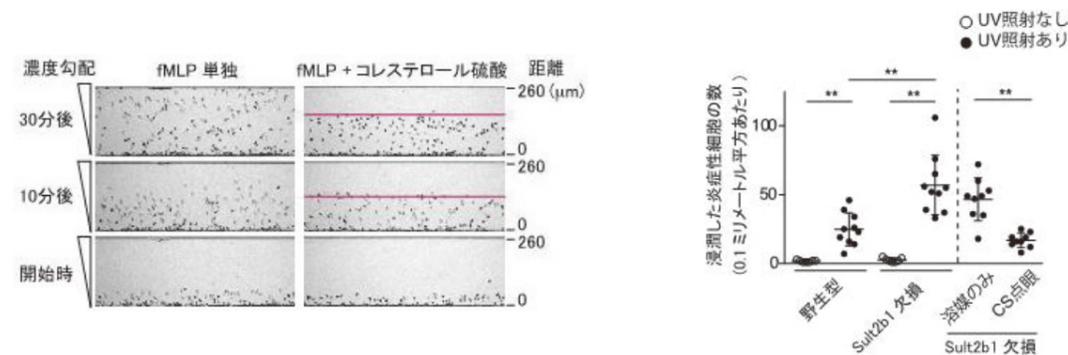


図1: CSは化学的バリアを形成し、免疫細胞の遊走・浸潤を抑制する。fMLPは細菌由来のケモアトラクタントであり、好中球は通常fMLPがけて活発に遊走する。しかしながら、fMLPにCSを添加しておく、好中球はある一線を越えて先に進むことができなくなる。

図2: CSは、眼の免疫回避環境の形成に重要な役割を演じている。紫外線照射後の前眼房への炎症細胞(好中球)の浸潤は、*Sult2b1* 欠損マウスでは亢進し、それはCSの点眼によって抑えられる。

炎症細胞の浸潤から眼を守る涙の秘密を発見

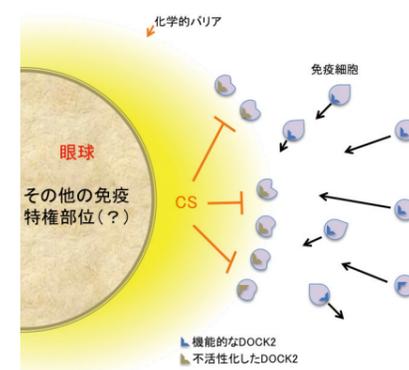
免疫系は、生体を守るために進化した必須の防御システムであり、免疫細胞は生体内を常にパトロールして、病原微生物などの異物の侵入を監視しています。しかしながら、過剰な免疫応答は、正常組織も攻撃するリスクをはらんでいます。このため、生体には免疫監視機構が発動しにくい組織や空間が存在し、これを免疫特権部位と呼びます。例えば、胎児が母体の免疫系からの攻撃を回避するメカニズムを有していることはよく知られた事実であり、眼球、精巣、脳に加えて、がん組織においても同様の抑制機構が存在すると考えられています。この免疫特権という概念は、1948年にPeter Medawar博士(1960年ノーベル生理学・医学賞受賞)により提唱されたものですが、70年経った今も、これらの組織がどのようにして免疫のセンサーをかいぐっているのか、その詳細は依然として明らかではありません。

私たちは、2001年に世界に先駆けてDOCK2が免疫細胞が動くために必須の働きをしていることを発見して以来、DOCK2の生体機能やシグナル伝達機構の解析を進めてきました。DOCK2は、DHR-2という領域を介してRacという分子を活性化させることで、細胞運動を惹起します。今回、その阻害物質の探索を進める過程で、コレステロール硫酸(CS)が特異的にDOCK2のDHR-2領域に結合し、DOCK2によるRac活性化を強く阻害することを見出しました。実際、CSの存在下では、免疫細胞の遊走応答が大きく障害されていました。特に、好中球のケモアトラクタントであるfMLPにCSを添加すると、好中球はある一線を越えて先に進むことができなくなります(図1)。このことから、CSは、DOCK2の機能を阻害する化学的バリアを形成し、免疫細胞の遊走・浸潤を抑制することが明らかになりました。

CSの局在を調べるために、まず、コレステロールからCSを産生するのに重要なタンパク質であるSULT2B1bのマウス組織における発現を調べました。その結果、ハーダー腺と呼ばれる眼に附随した組織で最も高い発現が認められました。ハーダー腺は涙に脂質成分を供給する腺組織で、ヒトにおけるマイボム腺に相当します。次に、各組織におけるCSの含量を質量分析法によって調べたところ、CSはハーダー腺で最も大量に産生されており、前眼房や涙の中にも多量に含まれることがわかりました。

眼の炎症におけるCSの重要性について検討するために、二つのモデルを用いて解析しました。一つは、紫外線(UV)誘導性の角膜炎モデルです。眼にUVを照射すると、角膜上皮細胞の障害に伴い、前眼房に炎症細胞(好中球)の浸潤が認められますが、野生型マウスに比べて、*Sult2b1* 欠損マウスではその数が倍増していました(図2)。同様の結果は、ブタクサ花粉を用いて、野生型マウスと*Sult2b1* 欠損マウスにアレルギー性結膜炎を誘導した場合にも認められました。いずれのモデルにおいても、炎症細胞の浸潤はCSを点眼することによって抑制されました(図2)。

本研究により、CSがDOCK2の機能を阻害し、免疫細胞の遊走・浸潤をブロックすることで、眼における免疫回避環境の形成に重要な役割を演じていることが明らかになりました(図3)。他の特権組織におけるCSの機能解析は今後の課題ですが、CS-SULT2B1b経路は、免疫特権を人為的に付与したり、剥奪したりするための方法を開発するうえで、格好の標的分子となることが期待されます。



九州大学 生体防御医学研究所 免疫遺伝学分野 メンバー

DOCKファミリーは、線虫からヒトに至るまで保存された低分子量Gタンパク質の活性化因子であり、細胞骨格の再構築を介して、種々の細胞高次機能を制御します。私たちは、DOCKファミリー分子が、免疫細胞の遊走や活性化、がん細胞の浸潤・転移・生存に重要な役割を担っていることを明らかにするとともに、その研究成果を踏まえ、免疫難病・アレルギー疾患・がんの革新的治療法の開発に取り組んでいます。このような中、免疫細胞の動きに重要なDOCK2の阻害物質が、涙の中にあることは予想外の発見でした。免疫特権環境の理解と応用につながることを期待して、今後さらに研究を進めて参ります。興味を持たれた方は、是非ご連絡ください。

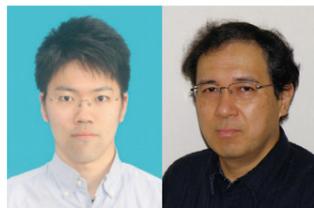


ロイコトリエンB₄受容体1の段階的リン酸化がロイコトリエンB₄に対する細胞応答を規定する

Stepwise phosphorylation of leukotriene B₄ receptor 1 defines cellular responses to leukotriene B₄

談 莫東¹ 市木 貴子² 井上 飛鳥³ 吉原 純一⁴ 前川 直斗⁴ 竹之下 逸樹⁴ 柳田 圭介⁵
山平 真也¹ 山口 哲志¹ 青木 淳賢³ 長棟 輝行¹ 横溝 岳彦² 清水 孝雄^{5,6}

¹ 東京大学大学院 工学研究科 化学生命工学専攻 ⁴ 岡山理科大学大学院 理学研究科 臨床生命科学専攻 細胞情報学研究室
² 順天堂大学大学院 医学研究科 生化学 細胞機能制御学講座 ⁵ 東京大学大学院 医学系研究科 細胞情報学研究室
³ 東北大学大学院 薬学研究科 分子細胞生化学分野 ⁶ 国立国際医療研究センター 脂質シグナリングプロジェクト



中西 由光 Yoshimitsu Nakanishi
東京大学大学院 医学系研究科 細胞情報学研究室
(現 大阪大学大学院 医学系研究科 呼吸器・免疫内科学講座)

中村 元直 Motonao Nakamura
岡山理科大学大学院 理学研究科 臨床生命科学専攻 細胞情報学研究室 教授

左から中西 由光、中村 元直

Contact

中村 元直 E-mail: moto-nakamura@dls.ous.ac.jp
所在地: 700-0005 岡山県岡山市北区理大町 1-1
URL: http://www.dls.ous.ac.jp/staff2/nakamura.html

Abstract

ロイコトリエンB₄(LTB₄)の1型受容体(BLT1)は食細胞や免疫細胞に高く発現し、さまざまな炎症性疾患に重要な役割を担う。BLT1は、リン酸化修飾を受けるセリンおよびスレオニン残基をカルボキシ末端内に7つもつ。われわれはPhos-tagゲル電気泳動法を用い、ヒトBLT1カルボキシ末端の7カ所のリン酸化が恒常的およびリガンド誘導的という2種類のタイプに分けられることを見出した。7カ所のうち、5カ所はさまざまな程度でLTB₄非存在下でも恒常的にリン酸化修飾される。一方、LTB₄刺激が起こると、その濃度依存的に残りの2カ所が段階的にリン酸化され、これらのリガンド誘導的修飾は、恒常的リン酸化部位のさらなるリン酸化を亢進した。好中球はLTB₄の濃度勾配に沿って炎症部位に向かって遊走するため、BLT1のリン酸化度は、遊走に伴う細胞周囲のLTB₄濃度上昇と並行して亢進する可能性がある。7カ所のリン酸化部位を欠失させたBLT1をチャイニーズハムスター卵巣(CHO-K1)細胞に発現させると、この細胞は高いLTB₄濃度域における走化性が障害され、ラット好塩球性白血球(RBL-2H3)細胞においては、脱顆粒の1つの指標であるβ-ヘキソサミンダーゼの細胞外放出が低下した。これらの結果から、炎症部位周囲のLTB₄勾配が、BLT1リン酸化を段階的に増強し、食細胞と免疫細胞の炎症部位への的確な遊走と、脱顆粒などの局所応答の開始を促進することが示唆される。

Figure and Note

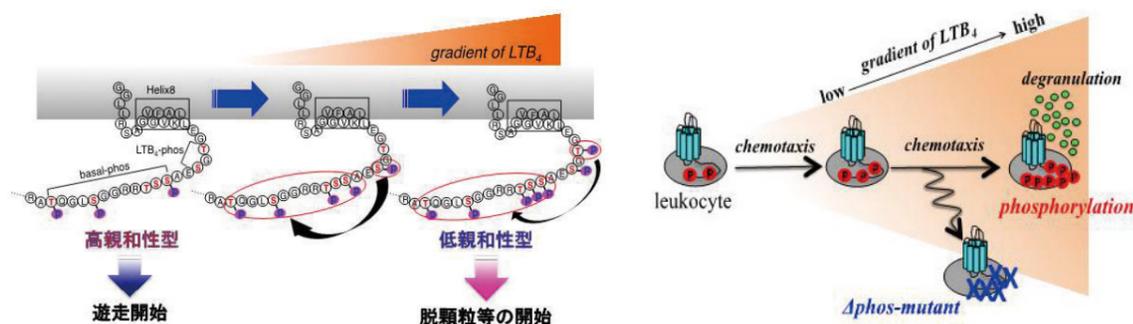


図1: BLT1カルボキシ末端の7つのセリン(S)/スレオニン(T)残基は段階的にリン酸化修飾される。7つのS/T残基(赤字)の内、5つ(basal-phos)は恒常的に幾つかがリン酸化状態にあり、残りの2つ(LTB₄-phos)はLTB₄刺激濃度に依って段階的修飾され、これが恒常的修飾も亢進させる。

図2: LTB₄の高濃度域におけるBLT1リン酸化の重要性。リン酸化欠失BLT1を発現させたCHO-K1細胞はLTB₄高濃度域における遊走が障害され、RBL-2H3細胞は脱顆粒の指標となるβ-ヘキソサミンダーゼの放出が低減した。

ロイコトリエンB₄受容体は段階的リン酸化によって“2つの顔”をつくる

強力な脂質メディエーターであるロイコトリエンB₄(LTB₄)は、特異的受容体(BLT1)への結合を介し、好中球に対して遊走や脱顆粒を引き起こします。BLT1はGタンパク質共役型受容体(GPCR)ファミリーに属する受容体です。LTB₄/BLT1の情報伝達経路は、炎症、アレルギーや関節リウマチなどの発症に深く関わることから、BLT1は長年、創薬標的として重要視されてきました。しかし、いまだに有効なBLT1拮抗剤は開発されず、創薬現場では斬新な開発戦略が切望されています。こうした背景の中、わたしたちはBLT1の未知の制御機構を見出し、これを新規のBLT1拮抗剤開発に応用したいと考えました。

好中球の表面にはLTB₄によって特異的に活性化されるBLT1という受容体タンパク質が存在します。炎症部位で産生されたLTB₄は血中に放出されて濃度勾配を形成します。血中の好中球は表面に存在するBLT1でこれを感じて遊走を開始し、LTB₄濃度の高い方へと向かいます。同時に、LTB₄の結合で活性化されたBLT1は、LTB₄の濃度勾配下でリン酸化修飾が段階的に亢進し、これによって高親和性から低親和性へと構造変化すると考えられます。リン酸化の亢進で親和性を低下させたBLT1は、高濃度LTB₄域に到達する時期を待ちます。やがて好中球が高濃度LTB₄域である炎症局所に到達すると低親和性BLT1は再び活性化され、局所で必要な細胞応答(脱顆粒や活性酸素産生など)を開始させます。即ち、親和性を低下させたBLT1は、炎症局所への到達を知るセンサーとして働いているとも考えられるわけです。ヒトはGPCRを900種類以上持ちますが、こうした特徴の受容体は見出されていません。この発見が起点となり、GPCRの機能制御研究が新展開を迎えることを期待します。

LTB₄のBLT1への結合は、炎症、アレルギーや関節リウマチなどの発症に深く関わるのがBLT1遺伝子破壊マウスの解析などから示唆されています。こうした背景からBLT1は長年、創薬標的として注目されてきましたが、いまだにこれら疾患に対してBLT1特異的拮抗剤が臨床応用されるに至っていません。従来拮抗剤は高親和性型を標的としたものでしたが、例えばリン酸化部位を酸性アミノ酸に置換した低親和性様構造のBLT1を標的とし、阻害薬を創製することで新たなBLT1拮抗剤の開発が期待できます。

GPCR研究に魅せられて

私がGPCRの魅力に取り憑かれたきっかけは、東京大学医学部時代に清水孝雄先生(現国立国際医療研究センター 脂質シグナリングプロジェクト長)のもとで血小板活性化因子受容体の研究をさせていただいたことでした。現在の研究室には毎年15名ほどの学部・大学院生が籍を置きます。私は今でもベンチで学生と一緒に実験していますが、少々老眼が加速し、エタ沈の沈殿物が目視し辛いのが寂しい今日この頃です。GPCR研究に興味をお持ちの若手の方(自称でも可)、一緒に研究しませんか。まだまだ未発表の面白い課題があります。お待ちしております。

(写真:今年度の研究室メンバーの集合写真)

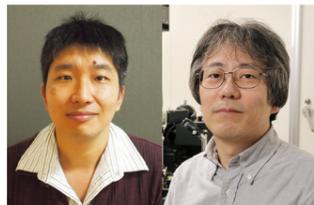


Gタンパク質共役受容体に対する リガンド作用の1分子拡散動態に基づく評価

Single-molecule diffusion-based estimation of ligand effects on G protein-coupled receptors

廣島 通夫^{1,2,3} 富樫 祐一^{2,4,5} 阿部 充弘¹ 山下 高廣⁶ 七田 芳則^{6,7} 村田 昌之⁸ 上田 昌宏^{2,9}

¹ 理化学研究所 開拓研究本部 佐甲細胞情報研究室 ² 京都大学 大学院理学研究科 生物物理学教室
³ 理化学研究所 生命機能科学研究センター 細胞シグナル動態研究チーム ⁴ 立命館大学 総合科学技術研究機構
⁵ 日本科学技術振興機構 (JST) 戦略的創造研究推進事業 (CREST) ⁶ 東京大学 大学院総合文化研究科 広域科学専攻 生命環境科学系
⁷ 広島大学 大学院理学研究科 ⁸ 大阪大学 大学院生命機能研究科 1分子生物学研究室
⁹ 大阪大学サイバーメディアセンター



左から柳川 正隆、佐甲 靖志

柳川 正隆 Masataka Yanagawa
理化学研究所 開拓研究本部 佐甲細胞情報研究室 研究員

佐甲 靖志 Yasushi Sako
理化学研究所 開拓研究本部 佐甲細胞情報研究室 主任研究員



柳川 正隆 E-mail: masataka.yanagawa@riken.jp
所在地: 351-0198 埼玉県和光市広沢2-1
佐甲 靖志 E-mail: sako@riken.jp
所在地: 351-0198 埼玉県和光市広沢2-1
URL: http://www.riken.jp/cell-info/

Abstract

Gタンパク質共役受容体(GPCR)は主要な薬剤標的である。GPCRの活性を測定する方法の開発は、薬理学と薬剤スクリーニングに不可欠である。しかし、細胞表面での受容体の観察によって薬剤の作用を測定することは困難である。そのため、受容体のシグナル伝達経路選択性に依存する下流シグナル伝達分子の濃度の変化が、受容体活性の指標として用いられることが多い。われわれは、1分子イメージングが、GPCRに対するリガンドの作用を評価するための代替的方法になることを示す。全反射蛍光顕微鏡法(TIRFM)を用いて、クラスC GPCRの1つである代謝型グルタミン酸受容体3(mGluR3)の拡散のダイナミクスを、様々なリガンド条件下で観察した。1分子追跡解析により、mGluR3の平均拡散係数の上昇と低下それぞれが、受容体のリガンド依存性の不活性化と活性化を定量的に反映することが示された。阻害剤と2色同時1分子イメージングを用いた実験により、受容体分子の拡散は、GPCRに関連する共通の生理的事象であるGタンパク質結合やクラスリン被覆ピットへの受容体集積などによって変化することがわかった。さらに、アゴニストによってクラスAおよびBのGPCRの平均拡散係数が低下することも確認され、このパラメータが、受容体の系統群、リガンドの化学的性質、Gタンパク質共役選択性を問わず、多数のGPCRに対するリガンド作用を推定するのに適した指標であることが証明された。

Figure and Note

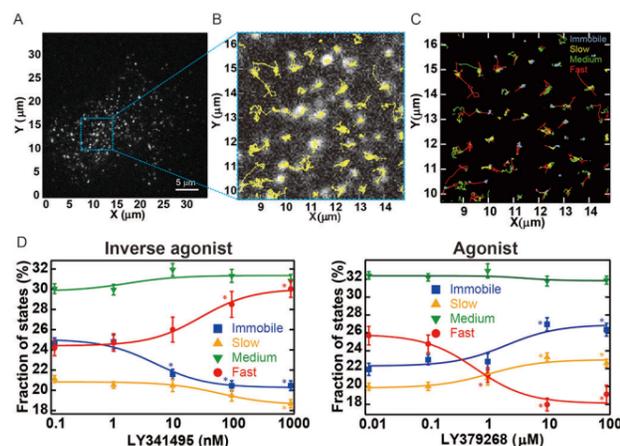


図: mGluR3の1分子イメージングの解析
A) mGluR3に蛍光標識をしたHEK293細胞の全反射蛍光顕微鏡像
B) mGluR3分子の軌跡
C) mGluR3の軌跡を拡散係数の異なる4状態に分類
D) リガンド濃度依存的な拡散状態の割合の変化

生きた細胞膜中の受容体1分子の動きを見て薬効を評価

私たちが現在使用している薬の34%はGタンパク質共役受容体(GPCR)という膜タンパク質ファミリーを標的としています。ヒトはゲノム上に約800種のGPCRの遺伝子を持ち、各GPCRは感覚受容・神経伝達・免疫応答など幅広い生理機能を担います。しかし、現時点で薬の標的として利用されているGPCRは100種程度にすぎず、いまだ高い潜在性を有しています。GPCRを標的とした創薬の初期段階において、特定のGPCRに対する化合物の活性を培養細胞において評価する必要があります。しかしながら、活性化したGPCRが引き起こす細胞応答は結合するGタンパク質の種類により異なるため、任意のGPCRの活性を1つの手法で定量することは困難でした。本研究では、私たちがこれまでに開発してきた全反射蛍光顕微鏡を用いた生細胞内1分子イメージングの技術を応用し、GPCR分子自体を見て薬効を評価できないか検証しました。

私たちは、代謝型グルタミン酸受容体(mGluR3)をモデルとしてGPCRの1分子イメージングをはじめました。様々なリガンド条件下でmGluR3の細胞膜上の動きを定量した結果、従来の生化学的手法で評価したGタンパク質活性化能と対応して4つの拡散状態の割合が変化することが明らかになりました(図1)。

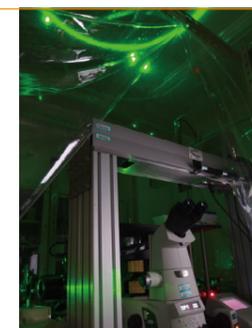
さらに、2色同時1分子イメージングや阻害実験により、Gタンパク質やクラスリンと結合時のmGluR3の拡散状態を解析しました。その結果、Gタンパク質と結合中のmGluR3は動きが遅いものが多いのに対し、クラスリンと結合中のmGluR3は静止したものが多くことがわかり、mGluR3の機能状態と拡散状態の間に一定の相関関係があることが明らかになりました。

最後に、私たちはmGluR3で生じたリガンド依存的な拡散動態変化が他のGPCRに共通しているかを検証しました。mGluR3とはアミノ酸配列の相同性がほとんどないGPCRのファミリーから、Gタンパク質共役特異性の異なる8種のGPCRについてリガンド依存的な拡散係数の変化を定量したところ、いずれのGPCRでも活性化依存的に動きが遅くなることが明らかになりました。活性化依存的なGPCRの拡散動態の変化は、多様なGPCRに共通した現象であることが確認できました。

ヒトのGPCRのうち、嗅覚受容体を除く340種程度が創薬の標的分子になりうると考えられています。その中で、約80種はリガンド未知のオーファン受容体であり、私たちの体内でどのような生理機能を担っているかほとんどわかっていません。オーファン受容体の多くは下流の細胞応答もわかっていないため、化合物スクリーニング手法の選択自体が難しいという問題があります。本研究では、多くのGPCRに共通して活性化した受容体分子は動きが遅くなるということがわかりましたので、オーファン受容体のリガンド探索への応用が期待されます。

理化学研究所 佐甲細胞情報研究室

私たちは、細胞内1分子計測技術をはじめとする顕微計測・細胞工学・生体システムの再構成・反応ネットワークの数理解析・計算機実験などの技術開発と、それらに応用した研究を通じて、タンパク質分子から分子システム、細胞、そして細胞間相互作用の各階層において、生体システムが有する情報処理機能の性質とその発現機構を解明することを目指しています。

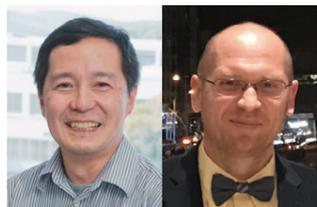


RSK2は平滑筋ミオシンおよびNa⁺/H⁺ 交換輸送体を活性化することにより抵抗動脈の筋原性血管収縮に寄与する

RSK2 contributes to myogenic vasoconstriction of resistance arteries by activating smooth muscle myosin and the Na⁺/H⁺ exchanger

Swapnil K. Sonkusare^{1,2} Miranda E. Good² 江藤 真澄^{3,4} Brant E. Isakson^{1,2} Thu H. Le^{1,5} Eric L. Cope² Zygmont S. Derewenda¹ Urszula Derewenda¹ Avriil V. Somlyo¹

¹ Department of Molecular Physiology and Biological Physics, University of Virginia ² Robert M. Berne Cardiovascular Research Center, University of Virginia ³ Department of Molecular Physiology and Biophysics, Sidney Kimmel Medical College at Thomas Jefferson University ⁴ 岡山理科大学 獣医学部 ⁵ Department of Medicine, University of Virginia



百溪 江 Ko Momotani
山陽小野田市立山口東京理科大学 薬学部 教授

Mykhaylo V. Artamonov
Research Scientist, Department of Molecular Physiology and Biological Physics, University of Virginia

Contact 百溪 江 E-mail: kmomotani@rs.socu.ac.jp
所在地: 756-0884 山口県山陽小野田市大学通1-1-1
URL: http://www.socu.ac.jp

Abstract

平滑筋収縮は、Ca²⁺/カルモジュリン依存性ミオシン軽鎖キナーゼ(MLCK)によるミオシン調節軽鎖(RLC20)のリン酸化によって誘発される。しかしながら、Mlck欠損マウス胚由来の血管は収縮能を保持しており、さらなる調節機構の存在を示唆している。われわれは、p90リソソムS6キナーゼ2(RSK2)もRLC20をリン酸化し、平滑筋収縮を促進することを示した。活性化されたリン酸化RSK2は、マウスの抵抗動脈の平常基礎緊張時に存在し、そのRSK2のリン酸化は、筋原性血管収縮またはアゴニストの刺激とともに増加した。Rsk2欠損マウス由来の抵抗動脈は、拡張および筋原性緊張、RLC20リン酸化の減少傾向を示した。RSK2は、in vitroでRLCのSer¹⁹をリン酸化した。さらにRSK2は、Na⁺/H⁺交換輸送体(NHE-1)の活性化部位をリン酸化し、細胞質のアルカリ化および血管収縮を促進する細胞内Ca²⁺の増加をもたらした。筋原性収縮時にNHE-1の活性は増加し、Rsk2欠損マウスにおいては細胞内pHの上昇が抑制された。動脈内圧加圧時において、RSK2によるNHE-1の活性化は、細胞内Ca²⁺の過渡的な増加と関連しており、それによりMLCK活性上昇が誘発され、基礎緊張および筋原性応答に寄与していると推定できる。結果として、Rsk2欠損マウスは、正常な同腹仔より低い血圧を示した。このように、RSK2は、基礎血管緊張、筋原性血管収縮、および血圧の調節に寄与する収縮前シグナル伝達経路を媒介し、併せて平滑筋収縮障害における治療標的となる可能性を秘めている。

Figure and Note

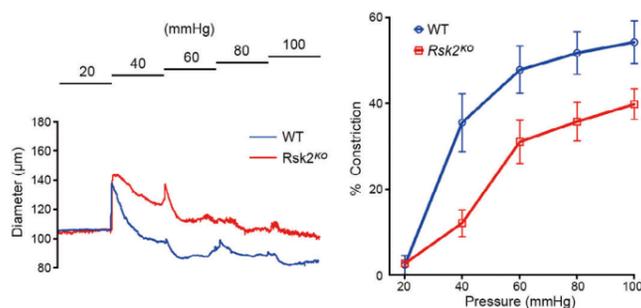


図1: 野生型およびRsk2欠損マウスにおける腸間膜血管内圧加圧により誘発された刺激筋原性血管収縮
野生型と比較し、Rsk2欠損マウスにおける血管収縮量(左)および収縮率(右)の減退(収縮時直径の増大)が見られる。

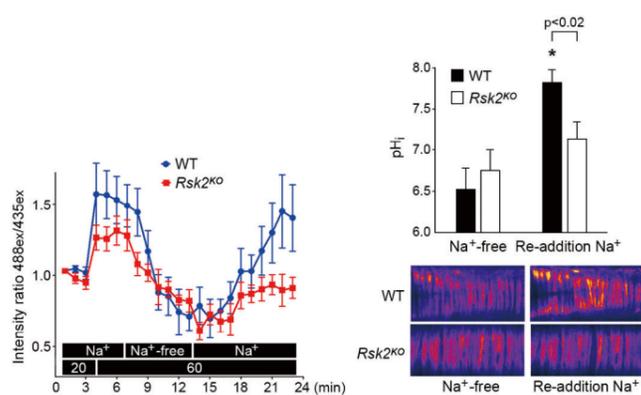


図2: 野生型およびRsk2欠損マウスにおける腸間膜血管内圧加圧後のナトリウム濃度変更に対する細胞内pHの変化
腸間膜血管内圧加圧(RSK2活性化)後に灌流液のナトリウム濃度を一度低下させ、その後再上昇させた。野生型と比較し、Rsk2欠損マウスにおいて細胞内pHの再上昇量および速度の低下が見られる。

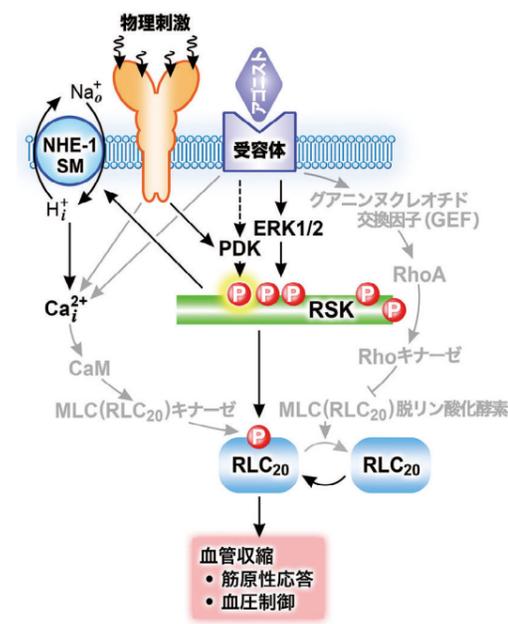
血管平滑筋収縮制御作用機序における新因子: RSK2キナーゼ

2010年に行われた291種にわたる非感染性疾患や障害が健康に及ぼしている疾病負荷に関する世界的な大規模調査報告によれば、高血圧は、940万の死亡例と約1億6千万例の健康被害をもたらす最大の懸念事項と結論づけられています(Lancet 2012; 380: 2197-223)。高血圧の健康被害においては日本も例外ではなく、より効果的かつ副作用の少ない高血圧治療薬の開発が急務です。特に、血管平滑筋の収縮は血圧の制御に深く関わっていることが知られており、血管平滑筋収縮メカニズムの解明は、高血圧治療薬の分子標的の策定に深く寄与すると考えられます。平滑筋収縮は、ミオシン軽鎖(MLC)のリン酸化に依存しています。これまで、MLCのリン酸化は、細胞内Ca²⁺濃度に依存して活性化されるMLCキナーゼと、細胞内Ca²⁺濃度に依存せず、アゴニスト刺激などによって制御されるMLC脱リン酸化酵素の支配下にあると考えられていました。しかし、MLCキナーゼ発現遺伝子欠損マウスの平滑筋においてもMLCのリン酸化および平滑筋の収縮が確認されたことから、MLCのリン酸化に関与する未知のキナーゼが存在することが示唆されました。そこで、未知のキナーゼの同定と、その作用機序の解明を目的として本研究を開始しました。

その過程で、複数のp90 ribosomal S6キナーゼ2(RSK2)阻害剤が血管平滑筋の収縮力の減退を誘発することを確認したためRSK2に着目しました。その結果、血管収縮を誘発するアゴニストや血管内圧上昇(物理刺激)によるRSK2のリン酸化/活性化、活性化RSK2によるMLCのリン酸化/活性化を見出しました。また、RSK2が、Na⁺/H⁺交換輸送体(NHE-1)のリン酸化/活性化を引き起こし、それによって誘発された細胞内Ca²⁺濃度上昇を介してMLCのリン酸化・平滑筋収縮を誘発していることも特定しました(図参照)。

本論文ではその結果を上記の従来型平滑筋制御作用機序とはまったく異なる、新たな平滑筋制御作用機序として報告しています。

血圧の制御には抵抗血管が大きく関わっていると言われています。Rsk2遺伝子欠損マウスの腸間膜血管をモデルとした抵抗血管においては拡張/弛緩傾向が観察され、その表現型は、本研究によって特定された作用機序の関与によるものに他ならないと考えます。また、その結果は、キナーゼRSK2が高血圧治療薬などの新たな分子標的となりうる可能性を示すものでもあります。現在でも複数の高血圧治療薬が存在していますが、そのいずれもが副作用の問題をかかえています。血管収縮制御に関して、本研究で明らかになった特定病理条件下においてのみ活性化しているシグナリング因子や作用機序は、より限定的な条件下においてのみ効果を発揮する分子標的となる可能性が期待され、結果として副作用が少ない高血圧治療薬の開発において極めて重要であると考えています。



山口東京理科大学新設薬学部で目指す、新薬開発

山陽小野田市立山口東京理科大学は、幕末維新ゆかりの地、下関を中心とする関門都市圏に位置しています。本研究室は、米国バージニア大学Somlyo研究室よりのれん分けをし、新設学部というフレッシュな環境の下、薬学部第一期生とともに新たなスタートを切りました。今後もバージニア大学循環器研究センターや、山口大学医学部に於いて血管平滑筋研究を行ってられる小林誠研究室のご助力も得ながら、RSK2や、GPCR-RhoA間に介在するグアニンヌクレオチド交換因子(GEF)の一種、p63RhoGEFなど、血管平滑筋収縮において、特定・限定条件下で機能しているシグナリング分子の機能解析を、高血圧治療薬の分子標的候補として行っていく予定です。



哺乳類の色素沈着はcAMPに依存してメラノソームのpHを調節する特有の機構によって制御される

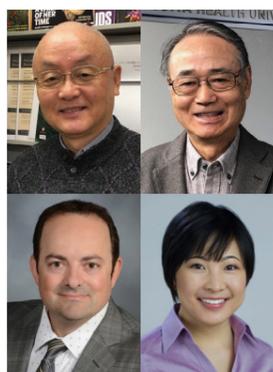
Mammalian pigmentation is regulated by a distinct cAMP-dependent mechanism that controls melanosome pH

太田 宏治¹ Charlee Nardin^{1,2} Michelle Feldman¹ Adam Widman¹ Olivia Wind¹ Amanda Simon¹ Michael Reilly¹ Lonny R. Levin³ Jochen Buck³

¹ Department of Dermatology, Weill Cornell Medical College, New York, NY 10021, USA.

² Service de Dermatologie, Centre Hospitalier Universitaire, Besançon 25030, France.

³ Department of Pharmacology, Weill Cornell Medical College, New York, NY 10065, USA.



若松 一雅 Kazumasa Wakamatsu

藤田医科大学 医療科学部化学教室 特任教授
藤田医科大学 保健学研究科保健学専攻(修士課程)臨床検査学領域
藤田医科大学 保健学研究科医療科学専攻(博士後期課程)生体情報検査科学分野

伊藤 祥輔 Shosuke Ito

藤田医科大学 名誉教授

Jonathan H. Zippin

Department of Dermatology, Weill Cornell Medical College

Dalee Zhou

Department of Dermatology, Weill Cornell Medical College

Contact

若松 一雅
E-mail: kwaka@fujita-hu.ac.jp
所在地: 470-1192 愛知県豊明市春掛町田楽ヶ窪 1-98 藤田医科大学医療科学部化学教室
伊藤 祥輔
E-mail: sito@fujita-hu.ac.jp
所在地: 470-1192 愛知県豊明市春掛町田楽ヶ窪 1-98 藤田医科大学

Abstract

メラニンが産生されると皮膚の色素沈着が促進され、皮膚がんリスクが軽減されることが知られている。メラニンの産生はメラノソームのpHに依存し、皮膚の色がより明るい人の方がより濃い人よりもメラノソームの酸性度が高い。われわれは細胞およびin vivoの両方において、可溶性アデニリルシクラーゼ(sAC)を阻害すると、メラノソームのpHが高まり、色素沈着が調節されることを示した。遺伝子発現を変化させて色素沈着を調節する古典的なメラノコルチン1受容体(MC1R)依存性cAMP経路とは異なり、sACを阻害すると、メラニン合成の律速酵素であり、pHが塩基性の場合により活発に働くチロシナーゼの活性が亢進されて色素沈着が促進された。われわれは、ヒトメラニン細胞のpHとメラニン産生に対するsAC活性のこのような作用が提供者の皮膚の色に依存することも実証した。さらに、in vivoにおいてメラノソームのpHを高めて色素沈着を促進する新規クラスの薬物としてsAC阻害物質を同定した。これは、この経路を薬理的に阻害すれば皮膚がんリスクや色素沈着症状に影響を及ぼす可能性があることを示唆している。

Figure and Note

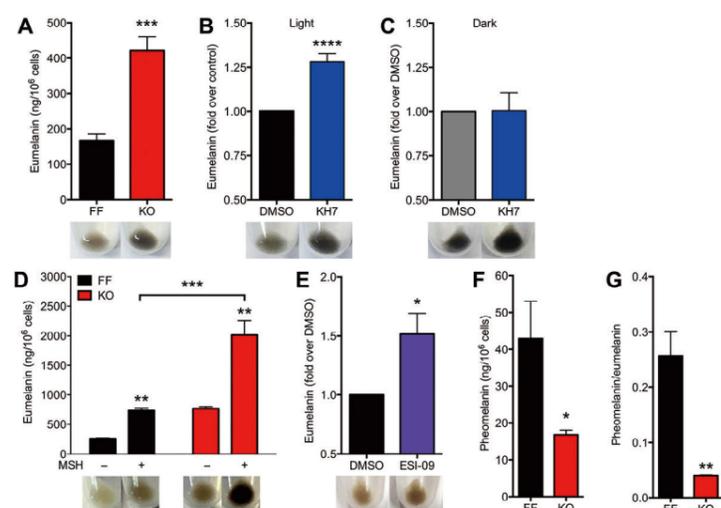


図1: メラノサイトのsACならびにtmAC(膜貫通AC)依存性シグナル伝達機構

(A) sAC^{FF} [floxed/floxed (FF)] および sAC^{KO} [knockout (KO)] マウスメラノサイト中のユーメラニン量。

(B) および (C) KH7 または DMSO で処理された Light, Dark ヒトメラノサイト中のユーメラニン量。

(D) NDP-MSH の添加、未添加の条件下、sAC^{FF} または sAC^{KO} マウスメラノサイト中のユーメラニン量。

(E) ESI-09 または DMSO で処理された light ヒトメラノサイト中のユーメラニン量。

(F) sAC^{FF} および sAC^{KO} マウスメラノサイト中のフェオメラニン量。

(G) sAC^{FF} および sAC^{KO} マウスメラノサイト中のユーメラニンとフェオメラニンの比率。

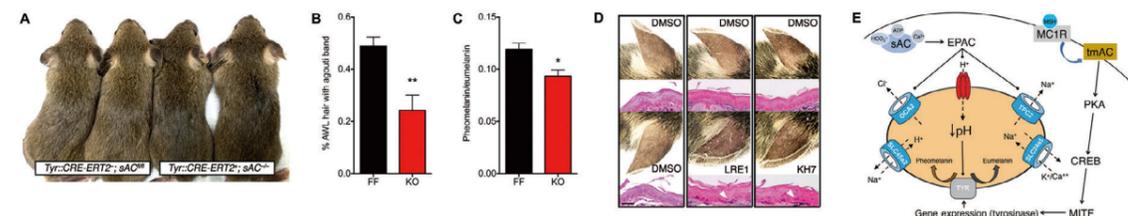


図2: メラノサイトのsACならびにtmAC(膜貫通AC)依存性シグナル伝達機構

MC1RはMSHに結合し、tmACの活性化をもたらす。tmAC依存性cAMPはPKAの活性化、CREB(cAMP応答要素結合タンパク質)依存性MITF発現をもたらす、最終的に膜貫通メラノームタンパク質であるTYR(チロシナーゼ)を増加させる。sACは、HCO₃⁻、ATP、およびCa²⁺の変化に応答し、EPAC(cAMPにより直接活性化される交換タンパク質)を刺激し、メラノソームイオンチャネルを調節することによってメラノソームpHを変化させ、pH感受性チロシナーゼの活性を変化させる。チロシナーゼのpH調節は、ユーメラニンおよびフェオメラニン合成に差別的に影響する。

sACは、マウスおよびヒトのメラノサイトにおけるメラニン合成を調節する

一般に、肌の色が濃い人は肌にメラニンが多く、皮膚がんのリスクが低いことが知られています。メラニン産生は、メラノソームと呼ばれるオルガネラで起こり、メラノソームのpHによって調節されます。メラノソームのpHは、メラニンの主たる二つのタイプ、ユーメラニンおよびフェオメラニンの合成にそれぞれ影響を与えます。即ち、中性付近ではユーメラニン生成、弱酸性付近ではフェオメラニン生成が有利になり、各メラニンの相対比は、色素沈着、皮膚がんリスクおよび老化にも影響します。ユーメラニン対フェオメラニン比はメラノソームのpHを反映すると考えられていますが、メラノソームのpHを直接調節してこの比を変化させるシグナル伝達経路は不明でした。

ユーメラニン量はチロシナーゼ活性を反映するので、sAC活性低下後のin vivoチロシナーゼ活性の増加が、メラノサイトにおけるユーメラニン産生に影響を与えるかどうかを調べました(図1)。図1Aでは、sAC^{KO}メラノサイトは顕著に暗くなりますが、これはユーメラニン含量の増加によるものでした。ヒトメラノサイトにおいて、sACのKH7による薬理的阻害は、ヒトドナーの皮膚色に応じて色素沈着を差別的に変化させました(図1B、C)。したがって、メラノソームpHに対するその効果と同様に、sACはドナーの肌の色調に応じてヒトメラノサイトの色素沈着を差別的に変化させました。MSHは、ユーメラニン合成を増加させることによってメラニン産生を誘導します(図1D)。われわれのデータは、sAC依存性cAMPの消失もまたユーメラニン合成を刺激し(図1A、B、D)、この効果は独立したcAMPシグナル伝達経路によって媒介されるようであることを示しました。また、ESI-09処置がヒトメラノサイトにおけるユーメラニン合成を増加させ、メラノソームpHに対するsAC依存性効果がEPACによって媒介されることを示唆していました(図1E)。sAC活性の喪失は、ユーメラニンの増加(図1A)および付随するフェオメラニン含量の減少(図1F)の両方を誘導し、フェオメラニン対ユーメラニンの比の減少をもたらしました(図1G)。これらの結果から、メラノサイトにおけるユーメラニン産生の調節因子としてsAC/EPACシグナル伝達経路が確立され、このcAMPシグナル伝達経路がTYR遺伝子発現を刺激するMC1R/tmAC依存性cAMPカスケードとは無関係に、sACによって生成されたcAMPがメラノソームのpHおよびチロシナーゼの活性を低下させ、sACの欠損またはその阻害剤が、マウスにおけるメラノソームのpHおよび色素沈着を増加させることを見出しました。メラノソームpHは、チロシナーゼの活性に決定的に影響します。その発現の変化によるチロシナーゼ調節のメカニズムとは対照的に、メラノソームのpHを直接調節することによってチロシナーゼ活性を鋭敏に制御するシグナル伝達経路はよく理解されていませんでした。われわれは、メラノソームpHのsAC依存性調節が、ユーメラニンおよびフェオメラニン合成の両方に影響を及ぼす可能性があることと推論しました。メラノソームpHのsAC調節は、メラノサイトにおけるユーメラニンおよびフェオメラニンの両方の合成に影響を及ぼすことがわかったので、sAC依存性cAMPシグナル伝達が細胞内のメラノソームpHおよびチロシナーゼ活性を迅速に(数時間以内に)制御し、遺伝子発現に依存しないチロシナーゼ調節の新しいcAMP依存性機構を明らかにすることができました(図2)。皮膚のユーメラニンとフェオメラニン量のバランスは、黒色腫/皮膚がんのリスクと老化に重要な意味を持っています。特に、メラノサイトが良性細胞から悪性細胞に移行するにつれて、sAC発現および細胞内局在化が変化し、sACに対する抗体が色素性病変、特にほろ性黒色腫の診断のための有効な補助剤であることを示すことができました。

sAC阻害剤がマウスのメラノソームのpHおよび表皮の色素沈着を増加させることを見出したことは、sACシグナル伝達カスケードを標的とする薬物が、色素異常症を治療するための、または皮膚がんのリスクを低減するための新たな治療戦略を示す可能性があります。

メラニン化学の新しい展開—メラニン分析のmecca

メラニン色素の機能は、その複雑な構造により、カモフラージュ、光の吸収と散逸、エネルギー調節、熱の保持、半導体の機能など多様な特徴を持つことが知られており、当研究室では、これまでにメラニンの簡便な化学分析法を開発し、その方法を、哺乳類、魚類、鳥類、爬虫類、両生類また化石中のメラニン含量の測定に応用し、種々のTopジャーナルに報告してきました。メラニン色素の機能を分子としてとらえることにより、様々な生命現象がこれからも解明されることを期待しております。



フィラミンと Drp1 の低酸素誘導性相互作用が ミトコンドリア過剰分裂を伴う心筋老化を引き起こす

Hypoxia-induced interaction of filamin with Drp1 causes mitochondrial hyperfission-associated myocardial senescence

島内 司^{1,2,3} 田中 智弘^{1,2} 下田 翔^{1,2,4} 外山 喬士^{1,5,6} 北島 直幸^{1,5} 石川 達也^{5,7} 進藤 直哉⁵ 富田 拓郎^{1,2,4}
安田 智⁸ 佐藤 陽治^{5,8} 桑原 宏一郎⁹ 熊谷 嘉人⁶ 赤池 孝章¹⁰ 井手 友美³ 王子田 彰夫⁵ 森 泰生¹¹

¹自然科学研究機構 生理学研究所 ⁴総合研究大学院大学 ⁷EAファーマ株式会社 ¹⁰東北大学大学院 医学系研究科
²自然科学研究機構 生命創成探究センター ⁵九州大学大学院 薬学研究院 ⁸国立医薬品食品衛生研究所 ¹¹京都大学大学院 工学研究科
³九州大学大学院 医学研究院 ⁶筑波大学 医学医療系 ⁹信州大学 医学部



左から西村 明幸、西田 基宏

西村 明幸 Akiyuki Nishimura
九州大学大学院 薬学研究院 創薬育薬研究施設統括室 講師

西田 基宏 Motohiro Nishida
自然科学研究機構 生理学研究所 (生命創成探究センター)
心循環シグナル研究部門 教授
九州大学大学院 薬学研究院 創薬育薬研究施設統括室 教授



西田 基宏 E-mail : nishida@nips.ac.jp
所在地 : 444-8787 愛知県岡崎市明大寺町東山 5-1
U R L : http://www.nips.ac.jp/circulation/
西村 明幸 E-mail : nishimura@phar.kyushu-u.ac.jp
所在地 : 812-8582 福岡県福岡市東区馬出 3-1-1
U R L : http://www.nips.ac.jp/circulation/

Abstract

ミトコンドリアとアクチン細胞骨格の異常な相互作用によるミトコンドリア過剰分裂は、心筋梗塞後の心臓脆弱性に関わる重要な因子であると認識されている。ミトコンドリア分裂の促進因子であるDynamamin-related protein1 (Drp1)は、アクチンとの相互作用を介して、ミトコンドリア分裂部位で局所的に活性化される。今回われわれは、アクチン結合タンパク質であるフィラミンAが、Drp1のグアニンヌクレオチド交換因子として作用し、心筋梗塞後のマウスにおいて、ミトコンドリア分裂に伴う心筋老化を仲介したことを報告する。ミトコンドリア過剰分裂と心筋老化を特徴とする梗塞部周囲領域において、ミトコンドリアの周辺でフィラミンAとDrp1が共局在した。ラット心筋細胞において、低酸素ストレスにより、フィラミンAとDrp1のGTPアーゼドメインとの相互作用が誘導され、Drp1の活性はアクチン結合依存的に上昇した。アクチン凝集を増強するA1545Tフィラミン変異体の発現によって、正常の酸素条件下でミトコンドリア過剰分裂が促進された。さらに、既承認薬シルニジピンによりDrp1とフィラミンAの相互作用を薬理的に阻害すると、心筋梗塞後のミトコンドリア過剰分裂を伴う心筋老化と心不全が抑制された。今回の結果は、Drp1、フィラミンおよびアクチン細胞骨格の三者複合体形成が心筋梗塞後の心臓脆弱性に寄与することを示すと同時に、シルニジピンの化合物構造を基盤とする革新的なDrp1阻害剤開発やシルニジピンの適応拡大につながることを示唆される。

Figure and Note

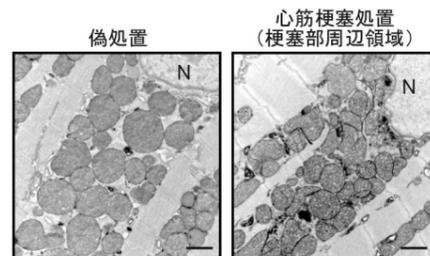


図1: 心筋梗塞4週間後のマウス心臓における心筋ミトコンドリア形態
心筋梗塞4週間後のマウス心臓でのミトコンドリア形態を電子顕微鏡で観察した。梗塞部周囲領域において、心筋細胞はサルコメア構造を維持しているが、ミトコンドリアの大きさは偽処置サンプルのものに比較して小さくなっていた。Nは核を示す。スケールバーは1μm。

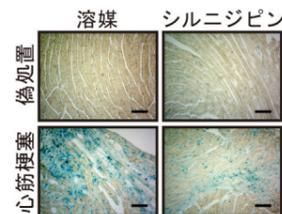


図2: シルニジピン投与による心筋早期老化の抑制
心筋梗塞処置後のマウスにシルニジピンを投与し、4週間後の心臓での心筋老化をSA-β-gal染色(青色)により評価した。心筋梗塞処置により起こる心筋老化はシルニジピン投与により抑制された。スケールバーは100μm。

ミトコンドリア品質を維持する既承認薬で 心筋梗塞後の予後を改善する

エネルギー産生器官であるミトコンドリアは分裂と融合を繰り返すことで自身の品質(機能)を維持しています。近年、心疾患を含む様々な疾患でミトコンドリアの異常分裂が報告されており、新たな創薬標的としても注目されています。ミトコンドリアの分裂・融合サイクルはミトコンドリア制御Gタンパク質群によって厳密に制御されています。中でもミトコンドリア分裂はDynamamin-related protein 1 (Drp1)によって制御されており、細胞質からミトコンドリアに移行したDrp1が分裂面に巻き付き活性化することでミトコンドリアを切断します。また、ミトコンドリアの分裂・融合サイクルは小胞体やリソソーム、細胞骨格といった他のオルガネラとの相互作用によっても制御されています。特に、アクチン細胞骨格はDrp1のミトコンドリア分裂面への集積および活性化に関与すると考えられてきましたが、その詳しい分子メカニズムは不明でした。

私たちの研究グループはこれまでに、心不全を増悪化させる要因として心筋細胞の早期老化現象に着目してきました。そこで今回、心筋細胞の早期老化がどのようにして起こるのかについて検討を行いました。心筋梗塞4週間後のマウス心臓では梗塞領域に加えてその周辺領域(梗塞部周辺領域)で心筋老化が確認されました。より早い時期(心筋梗塞1週間後)の梗塞部周辺領域では低酸素ストレスの上昇に伴うDrp1の活性化およびミトコンドリアの異常分裂が確認され、ミトコンドリア異常分裂によって起こる活性酸素産生が心筋老化の引き金になることを明らかにしました。また、低酸素依存的にDrp1と相互作用する分子としてアクチン結合タンパク質フィラミンAを同定しました。フィラミンAはグアニンヌクレオチド交換因子としてDrp1を活性化するとともに、ミトコンドリア分裂面でDrp1-フィラミンA-アクチン線維複合体を形成することでミトコンドリア分裂を誘導することがわかりました。さらに、ミトコンドリア異常分裂の原因となるDrp1-フィラミンA相互作用を抑制する化合物を既承認薬の中から探索し、高血圧治療薬であるシルニジピンを同定しました。ミトコンドリア異常分裂が見られる心筋梗塞後1週間の時点からシルニジピンをマウスに投与することで心機能が改善されたことから、ミトコンドリア異常分裂を引き金とする心筋早期老化が心不全増悪化の一因であることが明らかになりました。

現在、日本の心不全患者数は100万人を超えており、少子高齢化に伴いその数はさらに増えていくと予想されています。心不全はまだまだ予後不良の病気であり、これまでの治療薬とは異なるコンセプトに基づいた薬の開発が必要とされています。今後、シルニジピンのドラッグリポジショニング研究をさらに進めていくことで、ミトコンドリア品質の改善が心不全に対する新たな治療戦略になりうるのかを検証していきたいと思っています。

自然科学研究機構生理学研究所・心循環シグナル研究部門 九州大学大学院薬学研究院 創薬育薬研究施設統括室

私たちの研究室では、血液循環を支配する筋組織(心臓・血管・骨格筋)が様々な環境変化に応答し、心循環恒常性を制御する機構を、シグナル伝達の視点から読み解こうとしています。生理研グループと九大グループで連携して心循環恒常性の基礎研究を進めるとともに、心循環恒常性の機能維持を主眼とする新薬開発(創薬)や既承認薬の適応拡大(育薬)を目指した応用研究も積極的に進めています。私たちの研究に興味を持たれた方は是非ご連絡ください。特に、若い学生、ポスドク研究者からのご連絡を楽しみにしています。



がん遺伝子産物ユビキチンリガーゼMDM2によるPERIOD2の分解と体内時計の制御

Distinct control of PERIOD2 degradation and circadian rhythms by the oncoprotein and ubiquitin ligase MDM2

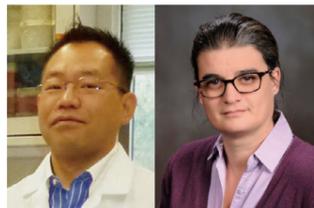
JingJing Liu^{1,4} Xianlin Zou¹ Anne M. Brown² Liang Jiang¹ Esther L. Wisdom¹ Jae Kyoung Kim³

¹ Integrated Cellular Responses Laboratory, Department of Biological Sciences, Biocomplexity Institute, Virginia Tech

² Research and Informatics, University Libraries, Virginia Tech

³ Department of Mathematical Sciences, Korea Advanced Institute of Science and Technology

⁴ Department of Computational Biology, St. Jude Children's Research Hospital



左から後藤 徹哉, Carla V. Finkelstein

後藤 徹哉 *Tetsuya Gotoh*

Research Associate, Integrated Cellular Responses Laboratory, Department of Biological Sciences, Biocomplexity Institute, Virginia Tech
現 株式会社プロテックス 和光理研研究所 研究開発部 主任研究員

Carla V. Finkelstein

Associate Professor, Integrated Cellular Responses Laboratory, Department of Biological Sciences, Biocomplexity Institute, Virginia Tech
Associate Professor, Department of Surgery, Virginia Tech Carilion School of Medicine
Associate Professor, Faculty of Health Sciences, Virginia Tech

Contact
後藤 徹哉
E-mail : gotoh@prote.jp
所在地 : 351-0104 埼玉県和光市南2-3-13
和光理研インキュベーションプラザ206号室
U R L : http://prote.jp

Carla V. Finkelstein
E-mail : finkielc@vt.edu
所在地 : Integrated Cellular Responses Laboratory, Biocomplexity Institute of Virginia Tech
1015 Life Science Circle, Blacksburg, VA 24061, USA
U R L : http://www.faculty.biol.vt.edu/finkelstein/index.htm

Abstract

体内時計は、主要な時計タンパク質群の分解タイミングを決める翻訳後修飾に応答する。時計タンパク質を標的とするユビキチン修飾酵素は、その分解を導くために、リン酸化された基質を主に認識する。時計タンパク質PERIOD2(PER2)の分解は、 β -TrCP(SCF ^{β -TRCP} ユビキチンリガーゼ複合体の基質認識サブユニットとして機能するF-ボックスタンパク質)によるPER2のリン酸化特異的な認識を必要とする。しかし、このリン酸化依存的なPER2の分解制御を欠如したとしても、そのような細胞は、体内時計の表現型として安定した周期的リズムを示す。このように、PER2タンパク質の量的な制御は、リン酸化依存的なPER2の分解制御だけでは十分に説明できなかった。私たちは、今回、PER2がユビキチンリガーゼMDM2の新規の基質であることを同定した。また、MDM2が、PER2のリン酸化に依存せずにその分解に関与することを明らかにした。MDM2の異常は、腫瘍発生の原因になるようなゲノム変異やエピジェネティック変異の蓄積に寄与して、結果的に腫瘍形成に主要な役割を果たす。MDM2を介するPER2のターンオーバーは、哺乳動物細胞における体内時計の周期長を決めるのに重要である。このことは、体内時計とがんとの関連を強く示す発見と言える。私たちの結果によって、MDM2の基質が、細胞周期を越えて体内時計にまで広がったというだけでなく、加えて、腫瘍形成時での薬剤ターゲットになり得るような、体内時計の調節因子を新たに同定したと言える。

Figure and Note

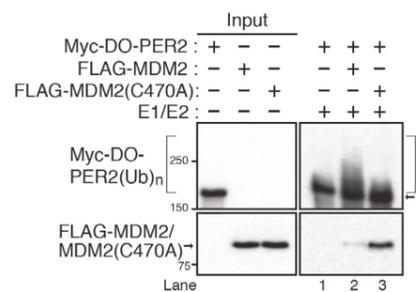


図1: MDM2はPER2をユビキチン化する
レーン2のように、試験管内でPER2とMDM2をE1/E2と混合した後、ユビキチン化アッセイを行う。その結果、PER2のユビキチン化が見られる(リガーゼ不活性型MDM2(C470A)では見られない)。

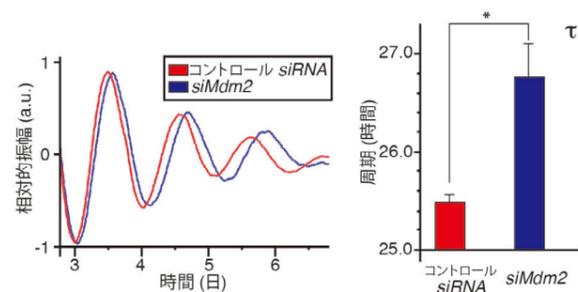


図2: MDM2は体内時計周期の長さに影響する
ルシフェラーゼ融合PER2を発現する細胞を用いて、体内時計の周期をリアルタイムで計測する(左図)。MDM2をノックダウンした場合、その体内時計の周期はコントロールに比べて長くなる(右図)。

規則正しい生活リズムは、病気の予防につながる

人間の体は、1日24時間の生体リズムを司る体内時計によって睡眠やホルモン分泌などの周期性が調節されています。この時計進行には、PERやCRYのような時計タンパク質の合成と分解が肝要です。分解タイミングの調節には、リン酸化のような翻訳後修飾が重要です。このリン酸化は、ユビキチン修飾酵素による基質認識に必要になります。例えば、リン酸化されたPER2は、SCF ^{β -TRCP}によってユビキチン化されて、プロテアソームによって分解されます。しかし、PER2の分解には、SCF ^{β -TRCP}に依存しない分解メカニズムも関与することが示唆されてきましたが、そのメカニズムは不明でした。

以前、私たちのチームでは、PER2がMDM2とがん抑制遺伝子産物 p53と結合して複合体を形成するという手掛かりを得ていました。そこで私たちはPER2とMDM2の間に存在するメカニズムについての解明に挑みました。本研究では、MDM2がp53を介さずにPER2と直接結合できること、および、MDM2がPER2のリン酸化に依存せずにそれをユビキチン化できることがわかりました。さらに、MDM2量を人為的に操作することによって体内時計の周期の長さに影響が出るわかりました。また、薬剤処理によるMDM2のリガーゼ活性阻害は、MDM2のノックダウンと同様に体内時計の周期を長くしました。まとめると私たちの研究は、MDM2が、PER2のユビキチン化を介して、体内時計の進行に関与することを明らかにしました。

現代社会は、暮らしが便利になる一方で、夜勤のシフトワークや夜更かしなどのように体内時計が攪乱される機会が増加しています。この体内時計の攪乱は、がんや心臓血管系疾患や糖尿病などの病気の発症率を高めることが報告されています。しかし、その発症メカニズムはほとんど明らかではありません。以前、私たちのチームでは、がん・糖代謝などに関与するがん抑制遺伝子産物 p53に注目して、非ストレス条件下においてPER2がMDM2によるp53のユビキチン化を阻害することを明らかにしました(*PNAS*(2016) vol113, p13516-13521; *MBC*(2015) vol26, p359-372; *MBC*(2014) vol25, p3081-3093)。これらの報告は、体内時計の攪乱ががん抑制遺伝子産物の正常な発現を阻害することを示唆しています。さらに、本論文は、MDM2が体内時計の進行の制御に関わることから、がん遺伝子産物の異常が体内時計の攪乱を引き起こすことを示唆しています。このように、PER2がp53の安定性に関わる一方で、MDM2がPER2の安定性に関わるという発見は、PER2-MDM2-p53の三つ巴の関係が絶妙なバランスのうえに成り立っていることを示しています。これら三つ巴を通じた分子メカニズムの解明は、体内時計と発がんメカニズムの関係性を考えていくうえで興味深く、システムバイオロジー的な解析で大いに発展すると期待しています。

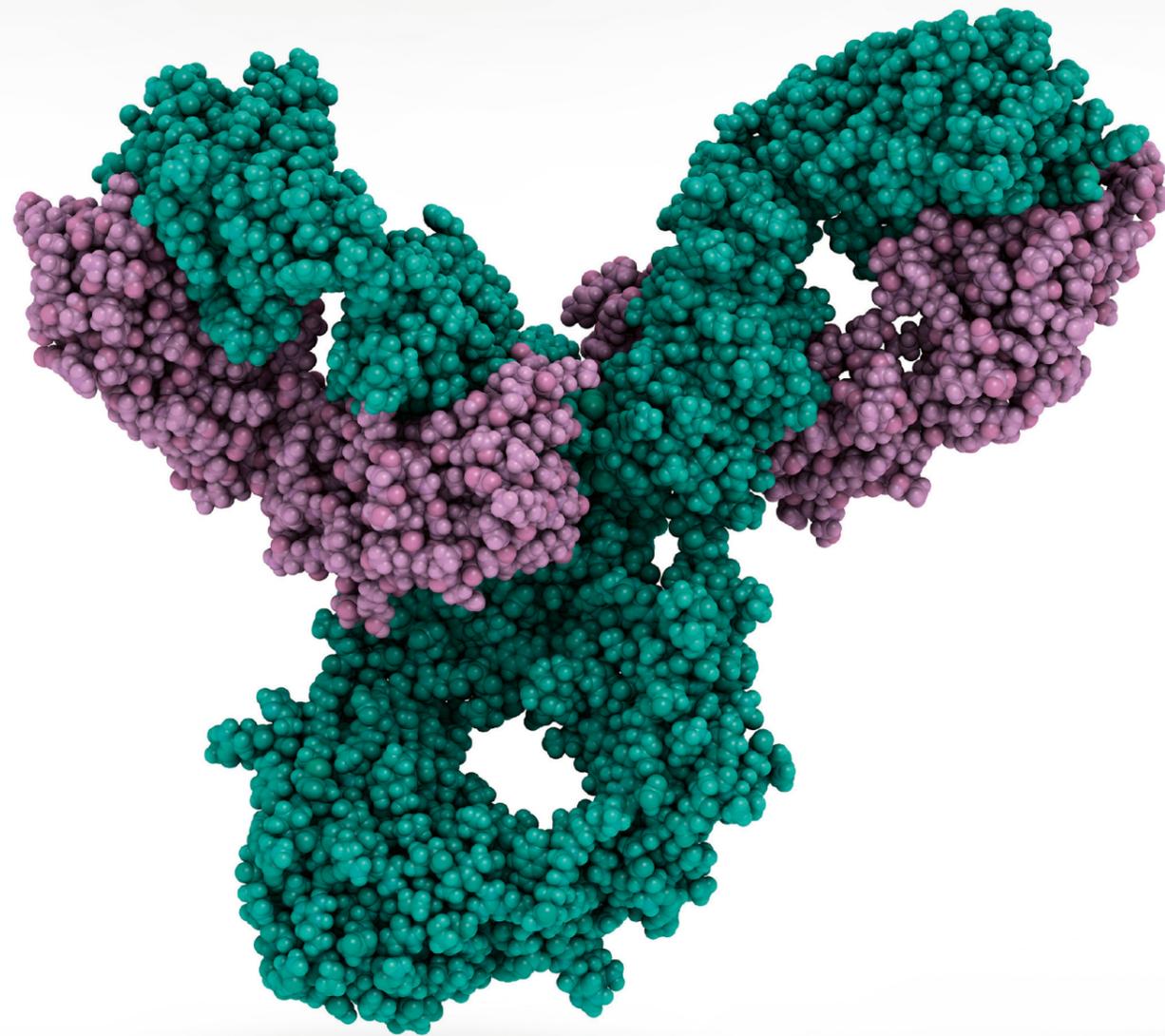
ヴァージニア工科大学 大学院生募集中@Finkelsteinラボ

Finkelsteinラボでは、細胞周期と体内時計のクロストークにおける新規の分子メカニズムを解明することに挑戦したい、研究に情熱的なラテン系(?)な大学院生を募集しています(Virginia Tech graduate program: <http://www.biol.vt.edu/graduate/index.html>参照)。ヴァージニア工科大学は、州で最多の学生数を抱える1872年創立の総合大学です。学生アメフトの強豪校として、また、全米一の学生食堂としても有名です。メインキャンパスは治安が良く、また、大自然に囲まれているのでアウトドアを楽しみながら勉学・研究に励めます。日本人はほぼ皆無なので英語学習に最適な環境です。



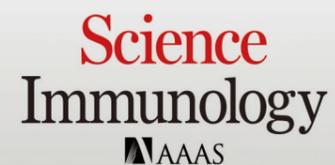
Antibodies Recognize Antigens...

How will you get **recognized** for your immunology research?



Science Immunology publishes original, peer-reviewed, science-based research articles that report critical advances in all areas of immunological research, including important new tools and techniques.

Submit your research today!
Learn more at ScienceImmunology.org



ScienceAdvances | AAAS

OPEN ACCESS, DIGITAL, AND FREE TO ALL READERS



Pushing the Boundaries of Knowledge

As AAAS's first multidisciplinary, open access journal, *Science Advances* publishes research that reflects the selectivity of high impact, innovative research you expect from the *Science* family of journals, published in an open access format to serve a vast and growing global audience.

Submit your research today!
Learn more at ScienceAdvances.org

とびらを開けたら、
ひみつの道具。



マイナス20℃ にスタンバイ
生物をみつめるひみつの道具。

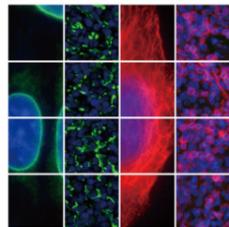
タンパク質レベルで解析をする
研究者の「みつける」に貢献したい。

私たちは、ワークする抗体をつくっています。

新登場

CoraLite

蛍光標識の一次抗体
ラインアップ拡大中！



🔍 プロテインテック

セールス / テクニカルサポート

国内販売

抗体百科 Web版

■ 探しま章 Web 検索データベース

100万品目以上の品ぞろえ、主要な約12,000ターゲットの抗体を国内に在庫。

■ 作りま章 抗体作製受託サービス

お客様とのコミュニケーションを大切にし、高い技術力であらゆるニーズに対応。



「コウタイガー」
コスモ・バイオオリジナルキャラクター

■ ファースト抗体

エピトープデザインからペプチド合成、
免疫までを安価にトライ

■ 翻訳後修飾アミノ酸抗体作製

リン酸化を含む修飾アミノ酸に対する
ポリクローナル抗体を作製

■ カスタマイズ抗体

使用目的や実験条件に応じて
カスタマイズしたプランをご提案

■ モノクローナル抗体作製

成果保証の有無を選択可能、
成果品の権利はすべてお客様に帰属

コスモ・バイオの抗体百科に Go! www.cosmobio.co.jp

ペプチド合成 受託サービス

国内
自社合成



「ペプチドドン」
コスモ・バイオオリジナルキャラクター

■ ペプチド合成 — 修飾品・合成難易度の高いペプチド合成にも対応

たとえば…

- 蛍光色素やリン酸化など様々な修飾
- 文献に掲載のある市販されていないペプチド
- 合成難易度の高い、環状化、ステーブル化など特殊な構造のペプチド

詳細は、コスモ・バイオのトップページ「記事ID検索」(17259) クリック！

■ AQUA グレードペプチド合成 — ● タンパク質絶対定量用途の安定同位体標識ペプチド合成 ● NEW! 配列デザインから合成までの一貫サービス

詳細は、コスモ・バイオのトップページ「記事ID検索」(17260) クリック！

📌 Web ページに記載のないサービスや他社で断られた仕様なども、お気軽にご相談ください。E-mail: peptide-ab@cosmobio.co.jp

セールス / テクニカルサポート

国内販売



コスモ・バイオは、 **Science Signaling**の

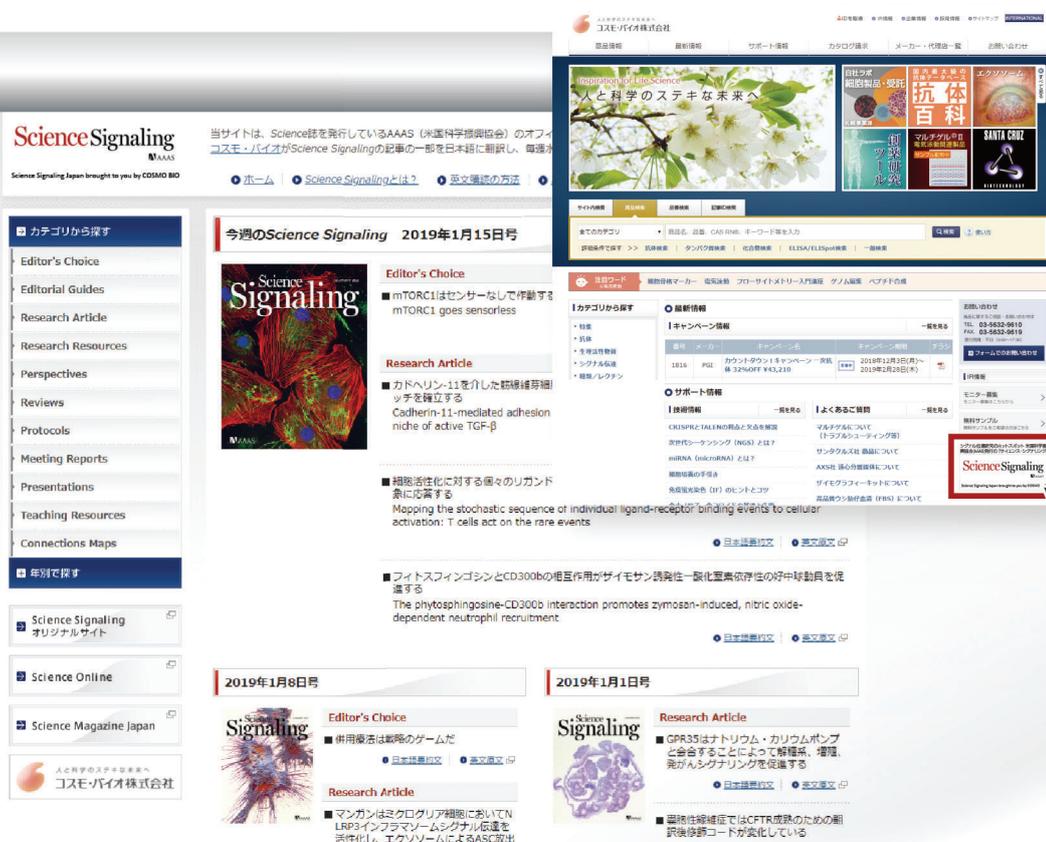
細胞シグナル伝達のトップジャーナル — 米国科学振興協会 (AAAS) 発行 —

日本語サイトを運営しています。

Science Signaling

AAAS

Science Signaling Japan brought to you by COSMO BIO
Signal Transduction Knowledge Environment



コスモバイオ



Science Signaling とは？

Cell Signaling (シグナル伝達) の先進的研究成果を発信する週刊の web ジャーナルです。本誌は 1999 年に米国科学振興協会 (AAAS) から *Signal Transduction Knowledge Environment* (STKE) として創刊され、2008 年からは「*Science Signaling*」に名称を変えて、シグナル伝達分野の最新情報を毎週お届けしています。

投稿受付中！

本誌に掲載の「*Science Signaling* 投稿について」もぜひご覧ください。



人と科学のステキな未来へ

コスモ・バイオ株式会社

毎週水曜日更新

http://www.cosmobio.co.jp/ にて公開中