



## 研究課題名 病原細菌の自然免疫克服戦略の解明とその応用

東京大学・医科学研究所・教授

ささかわ ちひろ  
笹川 千尋

研究分野：医歯薬学

キーワード：バリアー、腸管、自然免疫、赤痢菌

### 【研究の背景・目的】

消化管粘膜には多様なバリアーが幾重にも備えられ、微生物の体内への侵入を防いでいる。消化管粘膜バリアーは、粘膜上皮に固有のバリアーと、そして感染に反応して誘導される自然免疫バリアーから成り立っている。これまでの我々の研究から、消化管粘膜に定着する赤痢菌やピロリ菌をはじめとする粘膜病原菌は、粘膜バリアーを巧みに回避・克服する高度に進化した感染システムを備えていることが明らかになってきた。赤痢菌等のグラム陰性病原菌は、感染と定着を促進し、また同時に感染に反応して誘導される自然免疫を克服するために、III型分泌装置を通じて多様に機能分化した病原因子（エフェクターと呼ぶ）を宿主細胞へ分泌する。本研究では、赤痢菌をモデルにして、粘膜病原菌の自然免疫バリアーの回避戦略の解明とその応用を目的とする。具体的には、赤痢菌のIII型分泌装置より分泌される機能未知のエフェクターの宿主細胞における作用機序と腸管感染における役割に着目して、それらの標的宿主因子との相互作用の解明を通じて、本菌の感染戦略を明らかにする。また他の病原菌と比較して、赤痢菌の自然免疫克服における普遍のおよび特異的な感染戦略を、分子、細胞、個体の各レベル明らかにする。本研究ではこれまでの研究成果を基盤にして、赤痢菌の自然感染動物モデルを確立すると同時に、赤痢菌に対する宿主感受性獲得の分子機構を解明する。また病原菌で広く用いられているエフェクター機能を特異的に遮断する化合物のハイスループットスクリーニングを行い、抗生物質の代替創薬を目指す。

### 【研究の方法】

本研究では、赤痢菌のエフェクター機能およびその宿主標的因子を同定し、またその両者の相互作用を解明する。具体的には、(i)エフェクター欠損赤痢菌とその野生株の培養細胞および腸管感染に対する腸管炎症と免疫応答を解析する。(ii)エフェクタータンパク質の生化学的および細胞生物学的解析を行う。(iii)宿主標的因子の細胞生物学的解析を行う。また赤痢菌自然感染動物モデルの確立では、マウスおよびモルモットの腸管感染系を確立する。いずれも抗生剤処理を行い、マウス経口感染モデルと、そしてモルモットでは直腸感染モデルを確立する。さらにエフェクター機能を特異的に遮断する化合物のスクリー

ニングでは、赤痢菌のE3ユビキチンリガーゼ活性を示すエフェクターを標的に、そのE3リガーゼ活性を特異的に阻害する低分子化合物を東大創薬オープンイノベーションセンターとの共同研究（長野哲雄教授）で実施する。

### 【期待される成果と意義】

病原菌の自然免疫克服戦略は、それに関わる病原体と宿主側の因子が多く、それらの相互作用も複雑で、その実体は多くが不明であった。本研究では、赤痢菌のエフェクターを解析ツールとして、病原体の腸管における感染機構を包括的に理解するとともに、病原体とその感染を認識する新たな自然免疫システムの発見を導くことが期待される。また感受性マウスモデルの開発を通じて、ヒトに対する病原菌の感受性の分子基盤が強化され、ワクチン開発と創薬の評価系が確立される。またエフェクターを標的とした化合物の同定を通じて、抗生物質の代替創薬への道が拓かれることが期待される。

### 【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

1. Ogawa, M, Yoshikawa, Y, Kobayashi, T, Mimuro, H, Fukumatsu, M, Kiga, K, Piao, Z, Ashida, H, Yoshida, M, Kakuta, S, Koyama, T, Goto, Y, Nagatake, T, Nagai, S, Kiyono, H, Kawalec, M, Reichhart, J.-M, Sasakawa, C. A *tecpr1*-dependent selective autophagy pathway targets bacterial pathogens. *Cell Host Microbe* 9, 376-389, 2011
2. Kim M, Ogawa M, Fujita Y, Yoshikawa Y, Nagai T, Koyama T, Nagai S, Lange A, Fässler R, Sasakawa C. Bacteria hijack integrin-linked kinase to stabilize focal adhesions and block cell detachment. *Nature* 459, 578-82, 2009

### 【研究期間と研究経費】

平成23年度－27年度

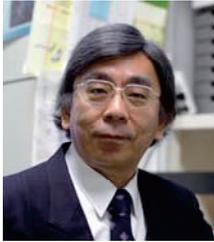
407,500千円

### 【ホームページ等】

<http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/bac/hp/mainpage.html>  
sasakawa@ims.u-tokyo.ac.jp

## 【特別推進研究】

## 生物系



### 研究課題名 キネシンモーター分子群の機能と制御の統合生物学的研究

東京大学・大学院医学系研究科・特任教授

ひろかわ のぶたか  
廣川 信隆

研究分野：生物学

キーワード：キネシンモーター分子群、細胞内物質輸送、微小管、統合生物学

#### 【研究の背景・目的】

私達の体を構成する神経細胞を始め全ての細胞は、細胞の働きに必須な機能蛋白分子を合成後、多種類の膜小器官、蛋白複合体、さらには mRNA 蛋白複合体として細胞内の目的地へ適正な速度で輸送する。この輸送は、細胞の機能、形作り、そして生存の為に必須である。私達はその主役である微小管をレールとする Kinesin superfamily 分子群 (KIFs) を発見し、哺乳類の全遺伝子 45 個を同定した。分子細胞生物学、分子遺伝学、を駆使して、KIFs が、多様な機能分子を輸送し分けるだけでなく、脳の高次機能、神経回路網形成、体の左右非対称性の決定、腸管神経系の発生、腫瘍の抑制など驚くべき重要な生命現象を司っている事を解明した。この様にモーター分子群 KIFs は、細胞機能の根幹を担っていると同時に様々な基本的生命現象を司っている。私達は、今まで KIFs 遺伝子群の発見、機能の解析、個体レベルの機能解析、作動原理の解析などすべての課題について常に世界をリードする研究を行ってきた。しかしながらまだ機能が解明されていない多くの KIFs が存在し、KIFs の制御機構、KIFs の個体レベルでの機能、KIFs の情報分子等としての新たな機能、微小管との相関による KIFs の作動・方向性輸送機構を含む多くの解明すべき課題が存在する。本研究は、下記にあげる未知の課題について世界に先駆けて研究を一層大きく発展させる事を目的とする。

1) KIFs の細胞内物質輸送における機能とその制御機構を神経細胞を主なモデル系として解明。

A) 未知の KIFs の機能の解明、B) KIFs のカーゴ認識・結合機構の構造生物学的解明、C) KIFs の機能のリン酸化による制御機構の解明、D) 神経系で発現する KIFs の脳・神経活動依存性の機能制御の機構の解明

2) 細胞内での KIFs の高空間・時間分解能での分子動態の可視化と KIFs と微小管との相互作用による輸送の方向性及び作動制御の機構の解明

3) KIFs の個体レベルでの機能の解明

4) KIFs の情報伝達因子等としての新しい機能の解明

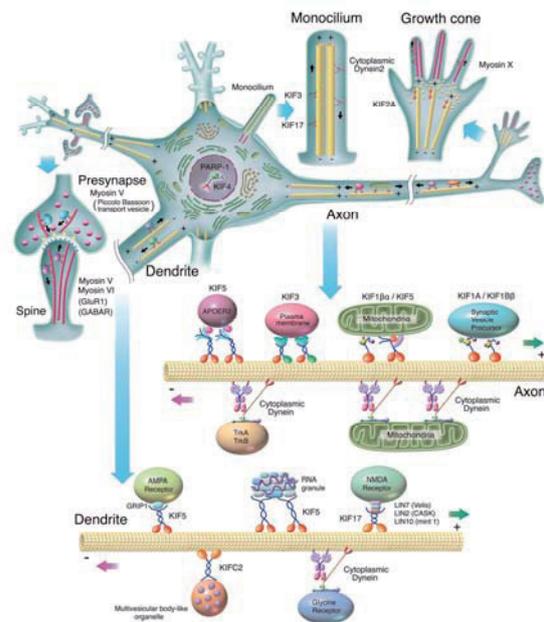
#### 【研究の方法】

分子細胞生物学、分子イメージング、マウスの分子遺伝学、X線結晶解析学、クライオ電子顕微鏡法、電気生理学などの多彩な手法を駆使する。

#### 【期待される成果と意義】

この研究によりモーター分子群 KIFs が担う、細胞内物質輸送とその制御機構という全ての細胞に共通な細胞機能の根幹が解明されると同時に脳、

発生、等を中心に様々な基本的生命現象の仕組みが解明される。さらにマウスの分子遺伝学により脳神経疾患をはじめ代謝疾患を含む疾患の病態が解明される。このようにしてこの研究は、広く分子細胞生物学、神経科学、発生生物学、生物物理学に留まらず、疾患の病態解明の臨床医学を含む広範な学問分野に非常に大きな学術的意義を有する。



#### 【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

1. Zhou R., S. Niwa, N. Homma, Y. Takei, and N. Hirokawa. KIF26A is an unconventional kinesin and regulates GDNF-Ret signaling in enteric neuronal development. *Cell* 139 (4): 802-813, 2009.
2. Hirokawa, N., S. Niwa and Y. Tanaka. Molecular motors in neurons: Transport mechanisms and roles in brain function, development and disease. *Neuron* 18: 610-638, 2010.

#### 【研究期間と研究経費】

平成23年度-27年度

500,000千円

#### 【ホームページ等】

<http://cb.m.u-tokyo.ac.jp>


**研究課題名 薬剤開発を視野に入れた膜輸送体の構造研究**

東京大学・分子細胞生物学研究所・教授

 とよしま ちかし  
**豊島 近**

研究分野：生物学

キーワード：イオンポンプ、膜蛋白質、結晶解析、エネルギー変換

**【研究の背景・目的】**

本研究の目的は、第一に、イオン能動輸送機構を完全に理解することである。第二に、高等動物細胞を含む大量発現系を用いて、マラリア原虫や結核菌など、人類の脅威となっている生物の膜輸送体を大量生産してその構造を決定し、薬剤開発への道をつけることである。

我々はこれまで筋小胞体カルシウムポンプ ( $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase) に関しては反応サイクルほぼ全体をカバーする 9 つの状態の、また、医学的にはより重要ともいえる  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase では 2 つの状態の結晶構造を決定し、能動輸送のメカニズムの大略を原子構造に基づいて明らかにした。この研究は、イオンポンプをはるかに超えた広い領域に多大なインパクトを与えた。しかし、「どうしてそういう構造でなければならないのか」、「ATP の化学エネルギーはどう使われているのか」という本質的問いに対する正面からのアプローチは出来ていない。原子構造と熱力学を結びつけることが必要であるが、大きすぎる課題でもある。本研究では筋小胞体カルシウムポンプと腎臓のナトリウムポンプを主な対象とし、変異体の構造解析や熱測定等を通じてこの問いにアプローチしたい。

イオンポンプの構造解析の過程で、ポンプ蛋白質の阻害剤に関する知識は著しく深まった。ポンプ蛋白質は生体の恒常性の維持に本質的な役割を果たすため、疾病に関わるものは多くないにしても、病原菌を殺すためには優れた標的でありえる。実際、結核菌には多くのポンプ蛋白質があり、マラリア原虫のポンプに対する薬剤が開発されている。我々は独自の結晶化技術を持っているのであるから、病原菌の輸送体の構造研究を通して、薬剤開発にも貢献したい。

**【研究の方法】**

基本と成るものは X 線結晶解析である。本プロジェクトでは変異体の構造解析が重要となるため、大きな膜蛋白質の組替え体の大量生産が必須となる。そのためにアデノウイルス・COS1 細胞による発現系を確立した。また、エネルギー変換機構の理解のためには、熱測定や rapid quenching による部分反応の速度論的測定を系統的に行う必要があり、分子動力学計算も重要な手段となる。

**【期待される成果と意義】**

(a) 筋小胞体  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (SERCA1a) の残された中間状態と変異体の高分解能構造決定：まだ構造決定されていない中間状態で特に重要なものは  $\text{E1}(\text{Ca}^{2+}$ 無し) である。これによって、「 $\text{Ca}^{2+}$ 結合による磷酸化反応の活性化シグナルとは何であるか」が明らかになる。変異体構造で特に重要なものは、 $\text{Ca}^{2+}$ 通路のゲートである Glu309 の変異体である。これによって、最初の  $\text{Ca}^{2+}$  結合によって引き起こされる構造変化の実態が明らかになる。この二つの構造が明らかになると、ポンプサイクルの構造的記述はほぼ完成といえる。

(b)  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase の反応中間体の構造決定と薬剤や他の蛋白質・ペプチドとの複合体の構造決定：E2K 状態と E1~P 状態の構造決定のほかに、強心配糖体や他の蛋白質との複合体の構造決定を計画している。 $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase は単なるポンプではなく Src キナーゼや IP3 受容体などと巨大な信号複合体を作り、癌などにも深く関わると考えられているからである。

(c) マラリア原虫の P 型 ATPase の大量生産と構造決定：PfATP4 と PfATP6 はマラリア原虫のイオンポンプであり、薬剤の標的ともなっている。このポンプを大量生産し、生化学的測定と構造決定を行う。同時に、結核菌の膜輸送体をも研究対象とする。成功すれば、より有効な薬剤開発への大きな貢献が可能になる。

**【当該研究課題と関連の深い論文・著書】**

T. Shinoda, H. Ogawa, F. Cornelius and C. Toyoshima: Crystal structure of the sodium-potassium pump at 2.4 Å resolution. *Nature* **459**, 446-450 (2009)

C. Toyoshima, Y. Norimatsu, S. Iwasawa, T. Tsuda and H. Ogawa: How processing of aspartylphosphate is coupled to luminal gating of the ion pathway in the calcium pump. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. **104**, 19831-19836 (2007)

**【研究期間と研究経費】**

平成 23 年度 - 27 年度

399,600 千円

**【ホームページ等】**
<http://www.iam.u-tokyo.ac.jp/StrBiol/index.html>



## 研究課題名 オートファジーの分子機構の解明と細胞生理学への統合

東京工業大学・フロンティア研究機構・特任教授

おすすめ よしのり  
大隅 良典

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：オートファジー、ATG、タンパク質分解、ユビキチン様タンパク質、膜動態

### 【研究の背景・目的】

オートファジーは全ての真核細胞が有する自己構成成分のリソソーム/液胞系における主要な分解系である。我々の酵母のオートファジーの発見と関与する一群の *ATG* 遺伝子群の同定を契機として、近年高等動物におけるオートファジーの解析は爆発的に進展し、様々な高次生理機能や病態との関連が次々に明らかにされつつある。しかしその分子レベルでも理解はほとんど進んでいない。オートファジーを理解する上でオートファゴソームと呼ばれる特異な2重膜構造が形成され、分解すべき細胞質成分やオルガネラを隔離する過程が最も重要である。この膜動態の分子レベルでの解明にはまだ多くの基本問題が残されている。

従来、飢餓によって誘導されるオートファジーの分子機構の解明は進めて来たが、より生理的な条件下で何時どのような様式のオートファジーが誘導されるかを系統的に解析することが必要であると判断される。その解析を通じてオートファジーの生理機能を代謝、細胞増殖、細胞分化の中に位置づける。

本研究課題では、申請者の過去23年間にわたる研究の集大成として *Atg* タンパク質のオートファゴソーム形成過程における機能の全容解明を第一の目的とする。第二にオートファジーによる分解機構の多様性と、生理的な増殖過程におけるオートファジーによるタンパク質のターンオーバーの意義を理解する。

### 【研究の方法】

- *Atg* タンパク質の細胞内動態を解析し、隔離膜の可視化系の確立により、*Atg* タンパク質の時空間的な制御を明らかにする。
- *Atg* タンパク質の相互作用、複合体形成を解析する。
- 全 *Atg* タンパク質とそれらの複合体の立体構造をあきらかにする。また *Atg* タンパク質のリン酸化の網羅的な解析を通じて制御機構の詳細を明らかにする。
- 2つのユビキチン様結合反応系の機能を再構成系、及び *in vivo* の機能解析を通じて明らかにする。
- *Atg9* 膜小胞、膜構造中間体の生化学的な解析を通じてオートファゴソーム膜の脂質、タンパク質組成を生化学的に明らかにする。

- オートファジーに関わる必須遺伝子の系統的な解析系を構築し、新規周辺因子を明らかにする。
- 厳密に制御した培養系を用いて増殖相、細胞分化におけるオートファジーとメタボライトの関係を定量的に検証する。
- オートファジー機構の多様性、選択性の分子機構を明らかにし、代謝制御、オルガネラ機能の制御における役割を明らかにする。

### 【期待される成果と意義】

酵母の系によって、未だ残されているオートファゴソーム形成の謎の全容の解明が進む段階を迎えた。オートファゴソーム形成の基本装置は酵母からヒトに至るまで広く保存されており、その成果はただちにヒトに至るまで高等動物の理解に繋がるに違いない。これらの成果はオートファジーのみならず細胞内膜形成の理解を深めるものである。

現在多様な細胞、組織、器官などを用いてオートファジーの研究が行われているが、まだ統一的な理解が進んでいない。厳密に条件制御が可能な酵母の系によるオートファジーと代謝、オルガネラ機能、細胞増殖との関係が明らかになることで、細胞の生存戦略に位置づけることが可能となり、高等生物の現象の理解や病態への応用に有用な情報が与えられる。

### 【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

Nakatogawa, H. et al. *Cell*, 130, 165-178 (2007)  
Okamoto, K. et al. *Dev. Cell*, 17, 87-97 (2009)

### 【研究期間と研究経費】

平成23年度－平成27年度

423, 400千円

### 【ホームページ等】

<http://www.ohsumilab.ari.titech.ac.jp/>

