

分子生物学分野

Division of Molecular Biology

スタッフ紹介



教授 初沢 清隆



准教授 堀 直裕



助教 櫻井 千恵

元教授	遠藤 英也
元教授	佐藤 建三
元助教授	守山 正胤
元講師	伊藤 敬三
元助手	小原 ひろみ
元助手	中田 知里
元助教	中西 友子
元技官	原 照子
元技官	足立 幸一

分子生物学分野の歴史

1990 年 4 月 生命科学科の設立と同時に第 1 講座として分子生物学講座が設立されました。前身は医学部附属ステロイド医学研究施設生化学部門で、改組に伴い分子生物学教室へ転換したものでした。教職員：遠藤英也 教授、佐藤建三 助教授、小原ひろみ 助手、伊藤敬三 教務員、足立幸一 技官、原照子 技官で、分子生物学分野はスタートしました。研究はがん患者の悪液質の原因となる分子機構の解明で「グリーンシュタインの分子生物学」としての新たな展開を目指したものでした。

1992 年 4 月 小原ひろみ 助手がステロイド研化学部門（平成 5 年から生命科学科病態生化学教室）への配置転換。伊藤敬三 教務員が助手に昇任。

1994 年 3 月 遠藤英也 教授が定年退官しました。

1994 年 4 月 佐藤建三 助教授が教授に昇任しました。同時に、伊藤敬三 助手が講師に昇任、堀直裕 助手が着任しました。また、原照子 技官が医学部動物実験施設に移りました。肝癌細胞でのカタラーゼ遺伝子転写抑制因子の解析の他、アデノウイルスベクターの開発が始まりました。

1998 年 3 月 伊藤敬三 講師が退職、守山正胤 助教授が加わり、ARPP 遺伝子の単離と機能に関する研究が始まりました。また、インプリント遺伝子の脱メチル化を制御するメカニズムの研究が始まりました。

2003 年 4 月 守山正胤 助教授が大分大学医学部教授として転任。堀直裕 助手が助教授に昇任。中田知里 助手が着任しました。分子生物学教室は 21 世紀 COE プログラム（リーダー：押村光雄 教授）へ参加し、また、文部科学省都市エリア産官学連携促進事業にも参加しました。

2006 年 4 月 中田知里 助手が大分大学に転任。中西友子 助手が着任しました。モデル動物の作成や X 染色体不活性化機構の研究が始まりました。

2013 年 3 月 佐藤建三 教授が定年退職しました。

2013 年 4 月 初沢清隆 教授が着任しました。細胞内小胞輸送系に着目した生体防御機構の研究が始まりました。

2014 年 3 月 中西友子 助教が東京大学へ転出しました。

2014 年 6 月 櫻井千恵 助教が着任しました。自然免疫反応における細胞内膜融合機構についての研究が始まりました。



1. 細胞内小胞輸送系に着目した生体防御機構の研究

私たちは生体防御に重要な「自然免疫のしくみ」について研究しています。自然免疫は大きく 2 つの反応から成り、1 つは、細菌など体内への侵入者の形や成分を感知する受容体による反応です。これは、侵入者を撃退するため炎症反応を惹起するシグナルを核に伝えます。2 つ目は、好中球やマクロファージ(MΦ)など食細胞による貪食(ファゴサイトーシス)反応です。これによって、細胞内に取り込んだ侵入者を速やかに無害化します。いずれも生体の恒常性維持に欠かせない反応です。

時として、侵入者は宿主の防御機構を逆手に取り重篤な障害を引き起こしますが、これらの機構には未解明な問題が多く残された状況にあります。私たちは、細胞内の小胞輸送において膜融合を担う一連の分子(SNARE タンパク質など)やオートファジーに関連する分子に着目することで、これらの解明を目指しています。

Toll 様受容体4 (TLR4) の刺激依存的な細胞内局在化のメカニズムについて

細胞膜に局在する TLR4 は、リガンド(刺激物質)が結合すると核に信号を伝え、炎症を惹起する因子の放出を促します。同時に、信号伝達の遮断のためエンドサイトーシスされます。しかし、この TLR4 に加え細胞内に貯蔵されていたものが、速やかに細胞膜へ送られより多くが局在化します。この過程に SNARE タンパク質である syntaxin11(stx11)と SNAP23 という分子が関与することを明らかにしてきました。現在、これらの調節機構と細胞種による分子の違いなどについて研究しています。

LC3-associated phagocytosis (LAP) における異物の分解制御について

LAP は近年見出されたファゴサイトーシスの一つの形態で、オートファジー関連因子 LC3 が関与します。特徴として、外来異物の分解が亢進することや、状況により分解がやや抑制され抗原提示の効率が上昇することなどが知られていますが、詳細なメカニズムはよくわかっていません。最近、LAP 反応にも SNARE タンパク質が関与することを見出しました。引き続き LAP において、SNARE タンパク質がどのように動員されその機能が調節されているのかについて研究しています。

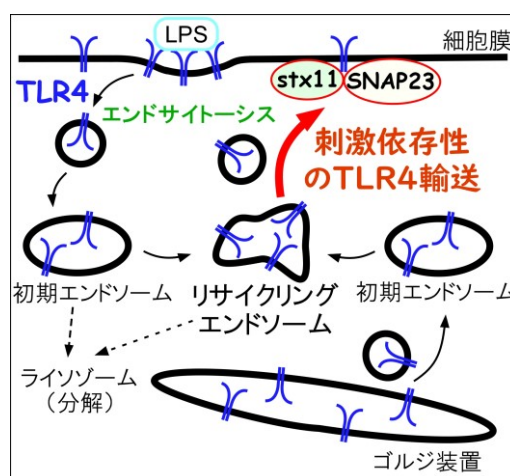


図1:刺激依存的な TLR4 の輸送に SNARE タンパク質が関与する

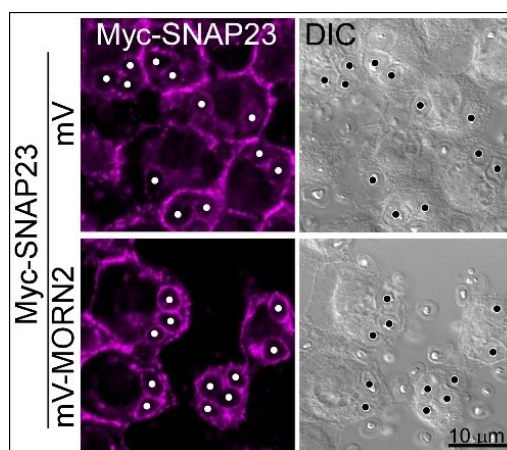


図 2:LAP が亢進している mVenus-MORN2 発現マクロファージでは、酵母ザイモサンを含むファゴソーム(丸印)膜上に Myc-SNAP23 (マゼンダ)の局在量が増加する

2. 領域特異的な DNA メチル化状態の調節機構の研究

DNA のメチル化修飾は遺伝子からの情報の読み出しを調節するために用いられており、哺乳類の正常な個体発生や細胞の生存に必要な要因であることが知られています。また、様々な疾患で特定の DNA 部位にメチル化修飾の異常が観察され、疾患と関連があることが報告されています。

特定の領域に生じる DNA メチル化の程度は、「DNA へのメチル基の付加」(メチル化)と「DNA からのメチル基の除去」(脱メチル化)が生じる頻度のバランスで決定されています。私たちは、これらの頻度の調節に関与する要因や調節方法、またそれらの柔軟性を明らかにする事によって、メチル化状態の制御やその制御が破綻する現象の理解を目指しています。

非メチル化状態を維持するための塩基配列とそれらの役割

マウスの H19-ICR という転写制御領域は、特定の塩基配列依存的にメチル化と脱メチル化の両方の頻度を調節し、メチル化されていない状態（非メチル化）を維持できることを見出しました。またこの時、個々に機能できる二種類の調節配列の一方が、他方をメチル化から保護することによって、この領域の転写調節機能が失われない様な関係を構築していました（図 1, 2）。現在はこれらのさらに詳細な解析を進めています。

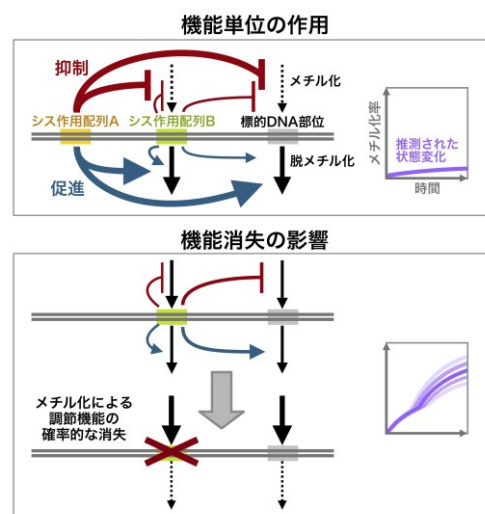


図 1: 低メチル化維持配列の機能と階層的な協力関係

DNA メチル化状態の異常を伴う疾患と関連した配列変化とメチル化状態制御との関連性

ヒトの H19-ICR 内には、DNA の異常な高メチル化状態を伴う疾患の発症と関連して塩基配列の変化が報告されています。異常な高メチル化は塩基配列の変化を伴わずに生じる場合もあるため、見出された変化がメチル化状態の制御に影響を与えるものであるのかどうかは不明でした。私たちは、疾患と関連して見出された 3 種類の 1 塩基変化が非メチル化状態を維持する機能を抑制することを示しました（図 3）。現在は、ヒトに特有の配列に疾患と関連して見出された変化とメチル化状態の調節能力との関係やその特徴の解明に取り組んでいます。

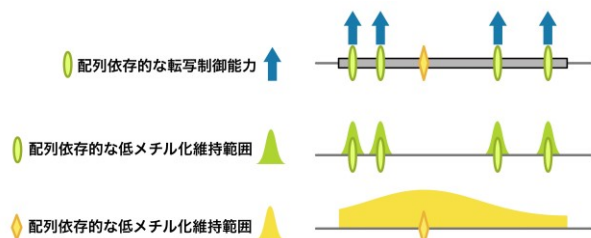


図 2: マウス H19-ICR の配列依存的な低メチル化維持機能とその範囲

この領域は 配列に依存して転写調節能力が生じます。 配列と 配列はそれぞれ低メチル化維持に関与しています。図にはこれまでの結果から予想される低メチル化維持範囲を示しています。

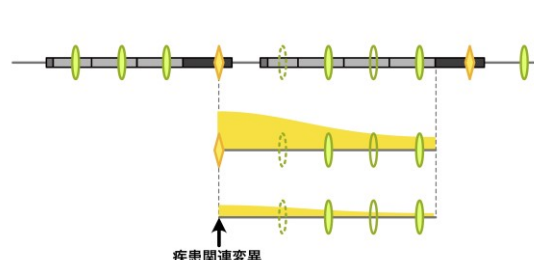


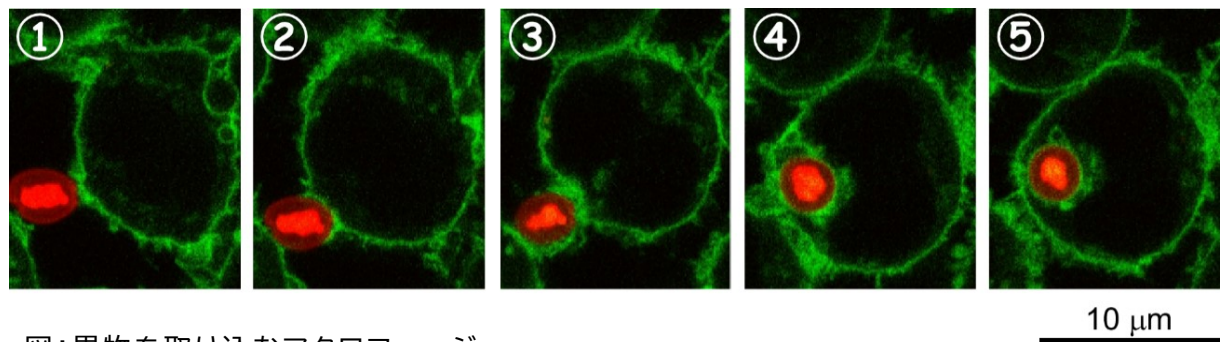
図 3: 疾患と関連する 3 種類の配列変化はヒト H19-ICR の配列依存的な低メチル化維持能力を減弱させる

1 塩基の配列変化は 配列中に存在します。 配列依存的なメチル化制御は現在不明です。

3. 自然免疫反応における細胞内膜融合機構についての研究

自然免疫における貪食(ファゴサイトーシス)反応においては、好中球やマクロファージ、樹状細胞といった食細胞が機能します。食細胞は体内に侵入した異物を貪食し、殺菌・分解によって代謝、また一部のペプチドを T 細胞へと抗原提示します。異物の貪食により形成される小胞は食胞(ファゴソーム)と呼ばれ、ファゴサイトーシスはファゴソームの形成(異物の貪食)とファゴソームの成熟(異物の殺菌・分解)から成ります。これらの反応は小胞体やエンドソームなどの細胞小器官と融合を繰り返すことで進行するため、ファゴサイトーシスには膜融合が必須となります。

細胞内の膜融合は、SNARE タンパク質によって行われます。SNARE タンパク質は融合する二つの膜上それぞれに局在しており、各々が適切な組合せで複合体を形成することで膜融合を完遂します。ファゴサイトーシスは SNARE タンパク質による膜融合反応が繰り返し起こることで進行しますが、その詳細な機構については未だ解明されていない点が多々あります。私たちは、この分子機構を解明することで疾患の治療や創薬へ向けた分子基盤の構築を目指しています。



図：異物を取り込むマクロファージ

マクロファージ(緑)が、酵母ザイモサン(赤)を細胞内へ取り込む様子。マクロファージの外にあった酵母ザイモサン(①)は、最終的には完全にマクロファージ内へ取り込まれます(⑤)。

ファゴサイトーシスにおける SNARE タンパク質による膜融合とその制御機構について

ファゴサイトーシスは複数の膜融合反応が連続的に起こるため、その解析は困難です。私たちはこれまでに複数の SNARE タンパク質について、その関与を明らかにしてきました。しかしながら、その制御機構はよくわかっていません。当研究室では SNARE タンパク質のリン酸化修飾に着目し、ファゴサイトーシス制御機構の解明を試みています。

標的異物の種類に応じたファゴサイトーシスと抗原提示反応に機能する SNARE タンパク質について

最近、SNARE タンパク質の 1 つである SNAP23 が異物の種類に応じてファゴサイトーシス時の機能を変化させることを突き止めました。体内に侵入した異物は細胞表面に存在する特異的受容体によって認識されることから、SNAP23 が受容体依存的なファゴサイトーシス反応の切替スイッチである可能性があります。SNAP23 が異物の種類に応じてどのように機能するのか、そのときの抗原提示反応への影響も含めて明らかにしたいと考えています。

英文原著

Morita, M., Kajiye, M., Sakurai, C., Kubo, S., Takahashi, M., Kinoshita, D., Hori, N., & Hatsuzawa, K. Characterization of MORN2 stability and regulatory function in LC3-associated phagocytosis in macrophages. **Biology Open** 9, bio051029. (2020). doi: 10.1242/bio.051029

Kono, Y., Saito, H., Miyauchi, W., Shimizu, S., Murakami, Y., Shishido, Y., Miyatani, K., Matsunaga, T., Fukumoto, Y., Nakayama, Y., Sakurai, C., Hatsuzawa, K., & Fujiwara, Y. Increased PD-1-positive macrophages in the tissue of gastric cancer are closely associated with poor prognosis in gastric cancer patients. **BMC Cancer** 20, 175. (2020). doi: 10.1186/s12885-020-6629-6

Hori, N., Kubo, S., Sakasegawa, T., Sakurai, C., & Hatsuzawa, K. OCT3/4-binding sequence-dependent maintenance of the unmethylated state of CTCF-binding sequences with DNA demethylation and suppression of *de novo* DNA methylation in the *H19* imprinted control region. **Gene** 743, 144606. (2020). doi: 10.1016/j.gene.2020.144606

Kubo, S., Murata, C., Okamura, H., Sakasegawa, T., Sakurai, C., Hatsuzawa, K., & Hori, N. Oct motif variants in Beckwith–Wiedemann syndrome patients disrupt maintenance of the hypomethylated state of the *H19/IGF2* imprinting control region. **FEBS Letters** 594, 1517–1531. (2020). doi: 10.1002/1873-3468.13750

Kinoshita, D., Sakurai, C., Morita, M., Tsunematsu, M., Hori, N., & Hatsuzawa, K. Syntaxin 11 regulates the stimulus-dependent transport of Toll-like receptor 4 to the plasma membrane by cooperating with SNAP-23 in macrophages. **Molecular Biology of the Cell** 30, 1085–1097. (2019). doi: 10.1091/mbc.E18-10-0653

Abe, Y., Yamamoto, N., Nakamura, K., Arai, K., Sakurai, C., Hatsuzawa, K., Ogura, Y., Iseki, K., Tase, C., & Kanemitsu, K. IL-13 attenuates early local CXCL2-dependent neutrophil recruitment for *Candida albicans* clearance during a severe murine systemic infection. **Immunobiology**, 224, 15-29. (2019). doi: 10.1016/j.imbio.2018.11.002

Sakurai, C., Itakura, M., Kinoshita, D., Arai, S., Hashimoto, H., Wada, I., & Hatsuzawa, K. Phosphorylation of SNAP-23 at Ser95 causes a structural alteration and negatively regulates Fc receptor-mediated phagosome formation and maturation in macrophages. **Molecular Biology of the Cell** 29, 1753–1762. (2018). doi: 10.1091/mbc.E17-08-0523

Morita, M., Sawaki, K., Kinoshita, D., Sakurai, C., Hori, N., & Hatsuzawa, K. Quantitative analysis of phagosome formation and maturation using an *Escherichia coli* probe expressing a tandem fluorescent protein. **Journal of Biochemistry** 162, 309–316. (2017). doi: 10.1093/jb/mvx034

Oji, A., Amano, T., Maeta, Y., Hori, N., Hatsuzawa, K., Sato, K., & Nakanishi, T. Fate of methylated/unmethylated *H19* imprinting control region after paternal and maternal pronuclear injection. **Experimental Animals** 66, 367–378. (2017). doi: 10.1538/expanim.17-0031

Pazienza, V., Panebianco, C., Rappa, F., Memoli, D., Borghesan, M., Cannito, S., Oji, A., Mazza, G., Tamburrino, D., Fusai, G., Barone, R., Bolasco, G., Villarroya, F., Villarroya, J., Hatsuzawa, K., Cappello, F., Tarallo, R., Nakanishi, T., & Vinciguerra, M. Histone MacroH2A1.2 Promotes Metabolic Health and Leanness by Inhibiting Adipogenesis. **Epigenetics & Chromatin** 9 (1), 45. (2016). doi: 10.1186/s13072-016-0098-9.

Kubo, K., Kobayashi, M., Nozaki, S., Yagi, C., Hatsuzawa, K., Katoh, T., Shin, H.W., Takahashi S., & Nakayama, K. SNAP23/25 and VAMP2 mediate exocytic event of transferrin receptor-containing recycling vesicles. **Biology Open** 4 (7), 910-920. (2015). doi: 10.1242/bio.012146.

Narai, T., Katoh, M., Inoue, T., Taniguchi, M., Kazuki, K., Kazuki, Y., Sato, K., Kodani, I., Ryoke, K., & Oshimura, M. Construction of a Luciferase Reporter System to Monitor Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells by Using a Mammalian Artificial Chromosome Vector. **Yonago Acta Medica** 58, 23–29. (2015).

Ma, X., Yang, P., Kaplan, W.H., Lee, B.H., Wu, L.E., Yang, J.Y.-H., Yasunaga, M., Sato, K., Chisholm, D.J., & James, D.E. ISL1 Regulates Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Activation and Early Adipogenesis via Bone Morphogenetic Protein 4-Dependent and -Independent Mechanisms. **Molecular and Cellular Biology** 34, 3607–3617. (2014). doi: 10.1128/MCB.00583-14

Nakanishi, T., Saito, R., Taniguchi, M., Oda, H., Soma, A., Yasunaga, M., Yamane, M., & Sato, K. *In Vivo* Determination of Vitamin D Function Using Transgenic Mice Carrying a Human Osteocalcin Luciferase Reporter Gene. **BioMed Research International** 2013, 1–6. (2013). doi: 10.1155/2013/895706

Soma, A., Sato, K., & Nakanishi, T. Visualization of inactive X chromosome in preimplantation embryos utilizing MacroH2A–EGFP transgenic mouse. **Genesis** 51, 259–267. (2013). doi: 10.1002/dvg.22369

Yasunaga, M., Masui, E., Oji, A., Soma, A., Osaki, M., Nakanishi, T., & Sato, K. Identification of the Control Region of Pancreatic Expression of Bmp4 In Vitro and In Vivo. **PLoS ONE** 8, e61821. (2013). doi: 10.1371/journal.pone.0061821

Nakanishi, T., Kokubun, K., Oda, H., Aoki, M., Soma, A., Taniguchi, M., Kazuki, Y., Oshimura, M., & Sato, K. Bioluminescence imaging of bone formation using hairless osteocalcin-luciferase transgenic mice. **Bone** 51, 369–375. (2012). doi: 10.1016/j.bone.2012.06.012

Oumi, N., Taniguchi, K.A., Kanai, A.M., Yasunaga, M., Nakanishi, T., & Sato, K. A Crucial Role of Bone Morphogenetic Protein Signaling in the Wound Healing Response in Acute Liver Injury Induced by Carbon Tetrachloride. **International Journal of Hepatology** 2012, 1–10. (2012). doi: 10.1155/2012/476820

Hori, N., Yamane, M., Kouno, K., & Sato, K. Induction of DNA Demethylation Depending on Two Sets of Sox2 and Adjacent Oct3/4 Binding Sites (Sox-Oct Motifs) within the Mouse *H19*/Insulin-like Growth Factor 2 (*Igf2*) Imprinted Control Region. **Journal of Biological Chemistry** 287, 44006–44016. (2012). doi: 10.1074/jbc.M112.424580

Yasunaga, M., Oumi, N., Osaki, M., Kazuki, Y., Nakanishi, T., Oshimura, M., & Sato, K. Establishment and Characterization of a Transgenic Mouse Model for In Vivo Imaging of Bmp4 Expression in the Pancreas. **PLoS ONE** 6, e24956. (2011). doi: 10.1371/journal.pone.0024956

英文総説等

Hatsuzawa, K., & Sakurai, C. Regulatory Mechanism of SNAP23 in Phagosome Formation and Maturation. *Yonago Acta Medica* 63, 135–145. (2020). doi: 10.33160/yam.2020.08.001

和文著書、総説

櫻井千恵, & 初沢清隆 ファゴサイトーシスにおける SNAP-23 の役割と制御機構. **生化学** 91, 805–809 (2019). doi: 10.14952/SEIKAGAKU.2019.910805

初沢清隆 最近見出した自然免疫の分子機構の紹介 一生体膜の融合を担う SNARE タンパク質解析から一, **鳥取県医師会報** 765, 107–110 (2019)

櫻井千恵, & 初沢清隆 ファゴソームの形成と成熟の分子機構. **細胞工学** 34, 155–160 (2015)