

# 「遺伝と変化」研究領域延長研究者・事後評価報告書

—平成13年度終了研究課題—

領域総括 豊島 久真男

## 1. 研究領域の概要

種や個体の同一性を維持する「遺伝」の機能と、細胞、組織、器官、個体あるいは種における形態や生理的機能の多様性を生み出す「変化」の機能に着目するものである。具体的には、遺伝子の転写、細胞の複製、組織や器官の再生、個体の生殖などに代表される複製に関する研究、及び、突然変異、ウイルスの迅速な自発的变化機構、発がん代表される脱分化、免疫応答、遺伝子の選択的発現機構、細胞の組織や器官への分化などに代表される変化に関する研究を含む。

## 2. 研究者名、所属

研究者名 (参加形態)	現職 (延長時所属)
相垣 敏郎 (兼任)	東京都立大学大学院理学研究課 助教授 (同上)
後飯塚 僚 (兼任)	東京理科大学生命科学研究所 助教授 (同上)

## 3. 延長研究について

事後評価を行って、領域総括から「3年間の研究結果を踏まえた上で、さらに一定期間の研究を行えば一層の展開が期待され、我が国の科学技術に大きな貢献をされると考えられる」との考察(別紙8)をもとに、事後評価の対象となった研究課題の一部について、研究期間の延長を試行的に行うこととした。具体的には、領域総括が必要に応じ領域アドバイザーの協力を得て選考を行い、事業団が以下の研究課題について、引き続いて研究を支援することとした。これらの課題についてはあらかじめ具体的な研究目標を明確化することとし、追加する研究期間は最長2年間とした。

研究期間を追加する研究課題名及び研究者名

「遺伝と変化」領域

(1)研究課題:「新しい遺伝子探索システムの開発とその応用」

研究者名: 相垣 敏郎(東京都立大学大学院理学研究科 助教授)

(2)研究課題:「免疫系の多様性を産み出す分子基盤」

研究者名: 後飯塚 僚(東京理科大学生命科学研究所 助教授)

## 4. 研究実施期間

平成11年5月～平成13年4月

## 5. 研究状況

各研究者は、各自研究を実施するとともに、関連する進行中の研究領域(素過程と連携)の領域会議、さきがけの研究報告会に積極的に参加し、研究進捗状況の報告と討論、研究交流を図るよう努めた。

## 6. 評価の手続き

領域総括が個人研究者からの報告・自己評価を基に必要に応じて領域アドバイザーの協力を得て行った。

(評価の流れ)

平成13年4月	研究終了
平成13年10月まで	研究報告書及び自己評価提出
平成13年11月	領域総括等による評価

## 7. 評価項目

- (1) 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じた新たな知見の取得など、研究成果の状況
- (2) 得られた研究成果の科学技術への貢献

## 8. 研究結果

「遺伝と変化」領域第2期10人は、平成7年から10年の3年の研究期間中いずれも注目すべき成果をあげたが、それらの中で、終了後も国内で大きなグループに属さず、今少しの支援により新しい展開が期待される2研究者を追加研究の対象とした。

その中で、相垣君は自らの開発した強制発現による遺伝子探索法を用いて、長寿関連遺伝子の研究に一歩踏み出すと共に、探索法で作成したショウジョウバエライブラリーの国際的な普及を進めた。又、後飯塚君は、ニワトリで発見した免疫系のシグナル伝達遺伝子のマウスホモログを確定すると共に、アレルギー疾患の制御解明に向けて、新しい手掛かりを得た。

何れの選択的も射たもので、今後の発展を期待し得ると考えている。

## 9. 評価者

領域総括 豊島 久真男 住友病院 院長

領域アドバイザー

江口 吾朗 熊本大学学長

喜多村 直実 東京工業大学 生命理工学部 教授

谷口 維紹 東京大学大学院医学系研究科 教授

中西 重忠 京都大学大学院 医学研究科 教授

廣近 洋彦 農業生物資源研究所 分子遺伝部 ゲノム動態研究室長

堀田 凱樹 国立遺伝学研究所 所長

松本 邦弘 名古屋大学大学院理学研究科 教授

(参考)

(1) 外部発表件数

	国内	国際	計
論文	3	13	16
口頭	1	0	1
その他	0	0	0
合計	4	13	17

(2) 特許出願件数

国内	外国	計
2	1	3

(3) 受賞等  
なし

(4) 招待講演  
国内 1件

## 研究課題別研究評価

1. 研究課題名：  
遺伝子探索ベクターの開発とその応用
2. 研究者名：  
相垣敏郎
3. 研究のねらい：  
ショウジョウバエの遺伝子探索システムを使って、寿命を制御する遺伝子の構造と機能を解明する。
4. 研究結果：
  - 1) 老化や寿命決定機構に関する突然変異体は極めて少なく、その分子機構の解明を阻んでいる。化学物質や放射線、あるいはトランスポゾンの挿入によって得られる変異体は主に機能破壊変異であり、発生過程に障害があらわれるものもあるため、長寿命変異体を得ることは困難であった。さきがけ研究で開発した遺伝子探索システムを利用して、長寿命変異体の同定を試みた。飼育温度によって GAL4 の発現を制御できる hs-GAL4 系統を利用して、成体期に強制発現を誘導することにより、寿命を延長する作用をもつ遺伝子を探索した。hs-GAL4 系統を GS 系統に交配した F1 世代を通常の飼育温度(25°C)で発生させたあと、成体をやや高い温度(30°C)で飼育することによって緩やかな強制発現を誘導し、その寿命を測定した。これにより、強制発現された遺伝子の効果を老化過程に限定して検定することが可能となった。
  - 2) スクリーニングの結果、強制発現によって寿命を延長する作用を有する遺伝子6個を同定した。これらのうち 3 遺伝子は強制発現によりパラコート(活性酸素産生剤)に対する耐性を示し、酸化ストレスと老化や寿命の決定機構の密接な関連を示唆した(原著論文2参照)。
  - 3) 寿命決定機構とストレス耐性の関係をより具体的に明らかにすることを目的として、候補遺伝子の中でショウジョウバエの新規遺伝子 DPOSH (Drosophila Plenty of SH3s) 遺伝子について、構造と機能の解析をおこなった。マウスやヒト POSH に見られる4個の SH3ドメイン、および N 末端のリングフィンガードメインはよく保存されていたが、Rac1 結合ドメインの配列は存在しなかった。その発現は卵細胞に見られるほか、成虫の翅や脚原基でも低いレベルで発現が認められた。DPOSH を神経細胞で特異的に発現させたところ、25° C における成虫寿命が対照群に比べて 14%延長された(原著論文1参照)。このことは、熱ショックプロモーターを用いて 30° C のストレス環境下で行った前回の実験結果とよく一致した。同時に、神経系での発現が十分な寿命延長効果をもつことが明らかになった。また、DPOSH を発生過程で強制発現すると、DPOSH は細胞死を引き起こすことがわかった。そこで、細胞死に関与する JNK/SAPK カスケードの関与を検討したところ、JNK/SAPK の標的である puckard 遺伝子が活性化がおこり、また同カスケードで働く遺伝子の突然変異体では、DPOSH の強制発現の効果が抑制されることが判明した(原著論文1参照)。これらのことは、DPOSH の強制発現による寿命の延長は JNK カスケードの低レベルの活性化によっておこったものと推察される。
5. 自己評価：  
当初のさきがけ研究の3年間で作成した GS 系統をさらに2年間維持することができたのが大きい。寿命決定遺伝子のスクリーニングと同定した遺伝子の解析を行うことができた。老化研究の歴史は古いが、いまだに老化のしくみの解明にはいたっていない。今回確立した新しい方法を使って長寿命遺伝子を探索することにより、寿命や老化機構に大きくせまることができるものと考えている。

現在文部科学省特定ゲノムの支援をうけて、合計2万系統を目指した大規模な系統作成計画が進行中である。今回の研究は長寿命遺伝子に注目したが、機能獲得変異体が得られることを利用した様々なスクリーニングが可能である。基礎研究者だけでなく、製薬企業からも注目されている。今後、作成した系統の長期にわたる維持と、国内外への分譲体制をうまくととのえる必要がある。

#### 6. 領域総括の見解:

相垣君は広く遺伝研究に用いられているショウジョウバエを利用し、遺伝子の探索を計画した。非常にユニークな所は、強制発現系による探索法開発を目指したことで、この方法はさきがけの3年間でほぼ完成され、多くの遺伝形質を探り出し、国際的にも認められるようになった。多くの系は国内外に広く分与され、使用されるようになったが、自らは寿命決定機構の研究を目指して、更に研究を進めた。

大学院生のみを相手の小規模研究室で、2年間の延長をしたが、この間にすでに特定研究領域や、ミレニアムプロジェクトに招かれるなど、従来よりの研究成果が認められると共に、寿命に関しても多くの変異体を分離し、寿命延長関連の遺伝子解析を進めるなど十分な成果が得られた。今後更なる発展を期待する。

#### 7. 主な論文等:

(特許、受賞、招待講演等)

原著論文

1. Seong, K.-H., Matsuo, T., Fuyama, Y. and Aigaki, T. (2001) Neural specific overexpression of *DPOSH*, *Drosophila Plenty of SH3s*, extends the longevity of adult flies. *Biogerontology* (in press)
2. Seong, K.-H., Ogashiwa, T., Matsuo, T., Fuyama, Y. and Aigaki, T. (2001) Application of the gene search system to a screen for longevity gene in *Drosophila*. *Biogerontology* 2:209-217
3. Aigaki, T., Ohsako, T., Toba, G., Seong, K.-H. and Matsuo, T. (2001) The gene search system: its application to functional genomics and a screen for longevity genes in *Drosophila melanogaster*. *J. Neurogenet.* (in press)
4. Ejima, A., Nakayama, S. and Aigaki, T. (2001) Phenotypic association of spontaneous ovulation and sexual receptivity in virgin females of *Drosophila melanogaster* *Behavior Genetics* Vol. 31, No. 5, 437-444
5. Toba, G. and Aigaki, T. (2000): Disruption of the *Microsomal glutathione S-transferase-like* gene reduces life span of *Drosophila melanogaster*. *Gene* 253, 179-187.
6. 相垣敏郎(2001): 老化促進遺伝子と老化抑制遺伝子. *Dementia Japan*, 15, 56-63
7. 相垣敏郎(2001)ポストゲノムの神経科学—ショウジョウバエの研究から—. *脳の科学* 23, 59-63.
8. 相垣敏郎(2001)ショウジョウバエゲノムの機能解析. 蛋白質・核酸・酵素(印刷中)

特許

名称: ジーンサーチシステムを用いた長寿命遺伝子の探索法, および同定した遺伝子

招待講演:

・国内 The 16th International Symposium in Conjunction with Award of the International Prize for Biology November, 2000, Tokyo, Japan Aigaki, T. "The gene search system and its application to a screen for longevity genes in *Drosophila*",

## 研究課題別研究評価

### 1. 研究課題名:

免疫系の多様性を産み出す分子基盤

### 2. 研究者名:

後飯塚 僚

### 3. 研究のねらい:

過去 3 年間のさきがけ研究の成果である「免疫レセプター特異的シグナル分子」の発見をさらに発展させ、免疫系の多様な機能発現における BASH や MIST 分子の役割を明らかにする。これらの研究を通して、免疫レセプターからのシグナル伝達機構の解明のみならず、免疫細胞の相互作用に基づく免疫系の多様な機能発現に至る過程を解明することをめざす。本研究は、免疫レセプター特異的シグナル分子の機能異常に由来する自己免疫病、免疫不全症ならびにアレルギーなどといった免疫異常症の解明への基礎となり、また、将来的には、これらの分子機能の制御を標的にした新たな免疫抑制・活性薬剤ならびに抗アレルギー剤創薬開発への道を開くものと考えられる。

### 4. 研究結果:

本延長研究により、免疫レセプターシグナル伝達に関わる血球系列特異的アダプター分子、BASH および MIST 分子の機能ならびに生体免疫反応における役割について以下の基礎的な知見を得ることができた。

I) ニフトリ BASH 遺伝子のマウスホモログを単離し、さらに BASH 欠損マウスを作製することで、B 細胞の分化における BASH 欠損の影響を検討した結果、脾臓 B 細胞の著名な減少、骨髄における preB 細胞の著名な減少、ならびに腹腔 B1-B 細胞の消失が認められた。脾臓 B 細胞の B 細胞レセプター刺激に伴う増殖反応は著しく低下しており、血清 Ig 濃度も低下していることから、BASH は B 細胞分化および機能に必須のシグナル分子であることが判明した。(Hayashi, K. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2000) さらに、BASH の SH2 ドメインに血液細胞特異的なセリン・スレオニンキナーゼである HPK-1 が結合することを明らかにし、BASH と HPK-1 の会合が、B 細胞レセプターを介した NF- $\kappa$ B の活性化、すなわち B 細胞の生存に重要であることを示した。(Tsuji, S., et al. J. Exp. Med. 2001)

II) マウス MIST 分子は、マスト細胞株ならびにサイトカイン依存性骨髄球系・リンパ球系細胞において発現しており(Goitsuka, R. et al. 2000. Int. Immunol.)、その発現は、MIST 遺伝子発現制御領域に存在するマスト細胞特異的な転写制御領域とサイトカインに対する反応性に関与する領域によって制御されており、サイトカインレセプターシグナルに関与する転写因子 STAT がサイトカイン刺激依存的に MIST 遺伝子の転写制御領域に結合することが明らかになった。(Goitsuka, R. et al. 投稿準備中) また、BASH 欠損 B 細胞株へ MIST 遺伝子を導入する再構成解析で、MIST 分子は、分子内のリン酸化チロシン、プロリンに富む領域および SH2 ドメインを介して、PLC $\gamma$ 、LAT、HPK1、SLP-130 などの様々なシグナル分子と複合体を形成することにより免疫レセプターシグナルを下流に伝達することを明らかにした。(Goitsuka, R. et al. 2001. J. Biol. Chem.) さらに、生体における MIST の機能を解析するために、標的遺伝子組換え法を用いて MIST 欠損マウスを作製した。MIST 欠損マウス由来

の mast 細胞は IgE レセプターを介した脱顆粒反応ならびにサイトカイン産生が野生型に比べ低下しており、さらに *in vivo* における IgE による全身性受動アナフィラキシー反応も減弱していることが判明し、mast 細胞を介した生体のアレルギー反応においても MIST 分子が重要な役割を担っていることが明らかになった。(Goitsuka, R. et al. 投稿準備中)

#### 5. 自己評価:

さきがけ研究 3 年間で未開の分野を探索し、そこから新たなサイエンスの種子を見出す期間であったとするなら、本延長期間は、それらの種子を育て、実った果実を摘み取る収穫の期間であった。若干の遅延はあるものの、当初の研究目標のほぼ全てについて期間内に達成することができたものと考えている。また、最初の 3 年間の研究期間で副産物的に生まれてきた研究成果についても、延長期間の間に論文として発表することができた。(Morimura, T., et al. 2000. J. Biol. Chem., Morimura, T., et al. 2001. J. Immunol., Goitsuka, R., et al. 2001. J. Immunol.) 本来ならば最初の 3 年間の研究期間でここまで到達するべきものかもしれないが、当初の研究戦略の不備もあり、延長期間を頂いたことでやっとさきがけ研究で新規に始めた一つの研究をある程度形になるところまでもっていくことができた。今後は本研究で得られた成果をさらにアレルギー疾患などの免疫病の病態との関連ならびに治療への応用という形で発展させていきたいと考えている。

#### 6. 領域総括の見解:

後飯塚君はニワトリの B 細胞という、生物学的にはマウス等の哺乳類とは異なった成熟過程をもつが、現在では殆ど他の研究者が目につけないユニークな系を用い、免疫系の制御という多くの競争相手のいる分野に切り込んだ。期待どおり BASH と MIST という面白いアダプター分子をみつけ解析して来た。しかし他の研究者と共通の言葉で話し、批判も受ける為に、マウスでの研究も必要となる回り道をとらねばならなかった。しかし、後者の系も開発された実験系へ、自ら研究材料を適応させる上で無駄ではなかったと思う。mast 細胞の特異的な制御系など、非常に興味ある展開も期待される。研究開始時の一人で進めていた状況から考え、よくここまで来てと評価したい。2 年間の追加は有効であったと考える。これから、本人の望むように、アレルギー疾患の制御に向けて、特異的なシグナル系のブロック法を、如何にして開発するか、真価が問われよう。

#### 7. 主な論文等:

Hayashi, K., Nittono R., Okamoto, N., Kawahara, S., Hara, Y., Goitsuka R., and Kitamura, D. 2000. B cell-restricted adaptor BASH is required for normal development and antigen receptor-mediated activation of B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:2755-2760.

Goitsuka, R., Kanazashi, H., Sasanuma, H., Fujimura, Y., Hidaka, Y., Tatsuno, A., Ra, C., Hayashi, K., and Kitamura D. 2000. A BASH/SLP-76-related adaptor protein MIST/Clnk involved in IgE receptor-mediated degranulation. *Int. Immunol.* 12: 573-580.

Fusaki, N., Tomita, S., Wu, Y., Okamoto, N., Goitsuka, R., Kitamura, D., and Hozumi, N. 2000. BLNK is associated with the CD72/SHP-1/Grb2 complex in the WEHI231 cell line after membrane IgM cross-linking. *Eur. J. Immunol.*, 30:1326-1330.

Morimura, T., Goitsuka, R., Zhang, Y., Saito, I., Reth, M., and Kitamura, D. 2000. Cell cycle arrest and apoptosis induced by Notch1 in B cells. *J. Biol. Chem.* 275:36523-36531.

Morimura, T., Miyatani, S., Kitamura, D., and Goitsuka, R. 2001. Notch signaling suppresses IgH gene

expression in chicken B cells: implication in spatially restricted expression of Serrate2/Notch1 in the bursa of Fabricius. *J. Immunol.* 166:3277–3283.

Goitsuka, R., Mamada, H., Kitamura, D., Cooper, M. D., and Chen, C-L, H. 2001. Genomic structure and transcriptional regulation of the early B cell gene chB1. *J. Immunol.* 167:1454–1460.

Tsuji, S., Okamoto, M., Yamada, K., Okamoto, N., Goitsuka, R., Arnold, R., Kiefer, F., and Kitamura, D. 2001. B cell adaptor containing Src homology 2 domain (BASH) links B cell receptor signaling to the activation of hematopoietic progenitor kinase 1. *J. Exp. Med.* 194:529–539.

Goitsuka, R., Tatsuno, A., Ishiai, M., Kurosaki, T., and Kitamura, D. 2001. MIST functions through distinct domains in immunoreceptor signaling in the presence and absence of LAT. *J. Biol. Chem.* 276:36043–36050.

(特許、受賞、招待講演等)

国内:特願平11-263778「マスト細胞特異的シグナル伝達分子とそのcDNA」

国際:PCT/JP00/06351「Mast cell-specific signal transducer and cDNA thereof」