

# 「認識と形成」研究領域 領域活動・評価報告書

平成 16 年度終了研究課題

研究総括 江口 吾朗

## 1. 研究領域の概要

生物は、内的あるいは外的要因を認識して、フレキシブルに形づくりを営み、また部分的欠損を自ら修復しようとします。このように生物に固有の能力に注目し、遺伝子、分子、細胞等生物の構成要素の機能に基礎を求め、生物の形づくりと形の修復を制御している細胞内や細胞間の認識、情報伝達、各種調節因子の機能的カスケードなどについて研究するものです。

単に個体発生や再生のみならず、細胞そのものの構造形成をはじめ、生体防御系・内分泌系、神経系などによる生体の恒常性維持機構、さらには個体集団の形成等に関する研究を含みます。

## 2. 研究課題、研究者名

別紙一覧表参照

## 3. 選考方針

基本方針

- (1) 自ら単独で研究を実施する研究者を対象とする。
- (2) 研究課題が「認識と形成」研究領域の感覚に富む課題を優先する。
- (3) 時代を先駆ける独創性豊かな基礎研究を優先する。
- (4) 研究計画を具体的に実施していくための、必要不可欠な研究技術が伴っている研究者を優先する。

## 4. 選考の経過

選考	書類選考*	面接選考	採用者**
対象者数	160名	24名	11名

\* 1応募課題につき選考アドバイザー3名が書類審査を行った。

\*\* 採択2年後、研究者1名が辞退した。

## 5. 研究実施期間

平成13年12月1日～平成17年3月31日

## 6. 領域の活動状況

領域会議を6回開催し研究進捗状況の報告、討論、研究交流を図り、研究報告会を東京国際フォーラムにて開催し、3年間の研究成果を広く公表し評価をいただいた。

また、研究総括は研究者を訪問し、研究環境の調査と研究進捗状況の把握を行い、各研究者には、研究生活における心構えに関して種々のアドバイスを行った。

## 7. 評価の手続き

研究総括が、研究者の領域会議での報告、自己評価報告書、研究最終報告書を基に、必要に応じて領域アドバイザーの協力を得て行った。また、一般公開の研究報告会における、外部参加者からの研究成果に対する評価をも参考にした。

(評価の流れ)

平成 16 年 12 月	研究報告会開催
平成 17 年 3 月	研究終了
平成 17 年 3 月	研究報告書および自己評価提出
平成 17 年 4 月	研究総括による評価
平成 17 年 4 月	総括評価の研究者へのフィードバック
平成 17 年 5 月	評価決定

## 8. 評価項目

- (1) 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新しい知見の取得等の研究成果の状況
- (2) 得られた研究成果の科学技術への貢献

## 9. 研究結果

平成 12 年度に、さきがけ研究 21 の一領域として発足した本「認識と形成」領域は昨年 14 名の第一期生を送り出し、本年では 10 名の第二期生が所定の研究期間を無事完了することとなった。

160 名の応募研究課題から当初 11 課題が厳選されたが、2 年後に 1 名が理化学研究所の独立主幹研究ユニットのユニットリーダーに採用されたことにより、結果的には 10 名の第二期生が所定の研究期間を全うした。これら 10 名の第二期生はいずれも本領域の目的を深く理解し、領域会議等における領域アドバイザーや同僚研究者の助言や示唆を自己の研究に積極的に組み入れ、研究費の有効活用にも努め、互いに協力しつつ真摯に研究を推進した。第二期生 10 名それぞれの研究成果とその評価の詳細は、個々の研究結果、自己評価および研究総括の見解に委ねるが、本領域総体としては第二期生の研究は非常に順調に進捗し、期待された成果を大略達成したと考える。

10 名中 5 名にあっては、初期の目的をしのぐ成果を達成したと評価でき、うち 1 名は将来の応用をも射程内に収めるまでに研究を発展させた。初期の目的を達成するまでには至らなかったと判断されがちな研究者も見られるが、これらはいずれも、当初想定した結果が得られなかったか、あるいは予想とは逆の結果となったために、計画変更を余儀なくされたことによる。しかし、こうしたことは研究の常であり、これら第二期生はいずれもアドバイザー、第一期生あるいは同僚研究者の助言や提言を適切に取り入れ、問題点を着実に克服して、自己の研究を当初の目的を超えるより発展的な研究に仕向けた点で高く評価したい。また、従来に無い方法論、解析手法等を確立するのに時間を要し、目的達成に至らなかった研究者についても、目的達成を十分基礎づけるデータを蓄積し得たことから、目的は概ね達成されたと評価できよう。

このように、第二期生全体としての成果が良好であったのは、領域会議、報告会等に常に出席された本領域アドバイザー諸先生の御協力と熱意に負うところ極めて大きく、特に記して感謝する。

## 10. 評価者

研究総括 江口 吾郎 学校法人尚絅学園 理事長、同大学長

### 領域アドバイザー

井出 宏之	東北大学 大学院生命科学研究科 研究科長
大箸 信一	金沢工業大学 東京赤坂研究所 教授
岡田 清孝	京都大学 大学院理学研究科 教授
坂野 仁	東京大学 大学院理学系研究科 教授
谷口 功	熊本大学 工学部 学部長
藤澤 幸夫	大阪大学 知的財産本部 特任教授
安田 國雄	奈良先端科学技術大学院大学 学長
山森 哲雄	大学共同利用機関法人 自然科学研究機構 基礎生物学研究所 教授

(参考)

(1)外部発表

	国内	国際	計
論文	1	33	34
口頭	89	26	115
出版物	14	2	16
合計	104	61	165

(2)特許出願件数

国内	国際	計
2	1	3

(3)受賞等

- ・ Arthritis Foundation Arthritis Investigator Award (平成 14 年 2 月、浅原 弘嗣)
- ・ Arthritis Foundation Hulda Irene Duggan Arthritis Investigator  
(平成 14 年 6 月、浅原 弘嗣)
- ・ バイオイメージング学会 ベストイメージ賞(ニコン賞) (平成 15 年 11 月、加藤 薫)
- ・ 日本光学会 光設計優秀賞 (平成 16 年 11 月、加藤 薫、他 2 名)

(4)招待講演

国内 42 件  
国際 12 件

## 別紙

## 「認識と形成」領域 研究課題名および研究者名

研究者名 (参加形態)	研究課題名 (研究実施場所)	現職 (応募時所属)	研究費 (百万円)
秋山-小田 康子 (専任)	左右相称動物の共通祖先のボディープランの究明 (JT 生命誌研究館)	科学技術振興機構 さきがけ研究者 (科学技術振興事業団 月田細胞軸プロジェクト)	42
浅原 弘嗣 (兼任)	軟骨に特異的な遺伝子機能による軟骨分化制御の解明 (国立成育医療センター研究所)	国立成育医療センター研究所移植外科研究部 部長 (米国ソーク研究所ペプチド生物学研究室 スタッフサイエンティスト)	41
岩里 琢治 (兼任)	大脳皮質の生後発達分子基盤 (理化学研究所 脳科学総合研究センター)	理化学研究所 脳科学総合研究センター 副チームリーダー (同上 研究員)	44
太田 訓正 (兼任)	眼の形態形成制御遺伝子の機能的カスケードの解明 (熊本大学大学院医学薬学研究部)	熊本大学大学院医学薬学研究部 助教授 (熊本大学大学院医学研究科 助手)	46
加藤 薫 (兼任)	成長円錐の運動解析による神経細胞形成へのアプローチ (産業技術総合研究所 脳神経情報研究部門)	産業技術総合研究所 脳神経情報研究部門 主任研究員 (同上 研究員)	40
桑原 一彦 (兼任)	胎児形成における DNA 複製酵素系の制御機構 (熊本大学大学院医学薬学研究部)	熊本大学大学院医学薬学研究部 講師 (熊本大学医学部 助手)	51
中村 輝 (兼任)	初期発生における母性 RNA の時空間的制御機構 (理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター)	理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター チームリーダー (筑波大学生物科学系 遺伝子実験センター 講師)	41
新美 輝幸 (兼任)	遺伝子機能によるテントウムシ斑紋のパターン形成機構 (名古屋大学大学院生命農学研究科)	名古屋大学大学院生命農学研究科 助手 (同上 助手)	38
吉田 松生 (兼任)	ほ乳類の精子形成を支える幹細胞の究明 (京都大学大学院医学研究科)	京都大学大学院医学研究科 助手 (同上 助手)	46
和田 洋 (兼任)	脊椎骨形成の制御遺伝子ネットワークの系統発生的解析 (筑波大学生命環境科学研究科)	筑波大学生命環境科学研究科 助教授 (京都大学大学院理学研究科 助手)	41

## 研究課題別評価

1 研究課題名: 左右相称動物の共通祖先のボディープランの究明

2 研究者氏名: 秋山-小田 康子

3 研究の狙い:

左右相称動物の共通祖先はどのような形態をした動物であったのか、そして進化の過程で遺伝子や遺伝子カスケードにどのような変化があり、節足動物や脊索動物など、形態的特徴をもつ動物分類群が誕生したのかを理解することを目指している。近年、分子発生学的に解析された動物の発生メカニズムに関して、類似点や相違点が動物門を越えて論じられてきた。しかし動物の系統関係と、形態や発生メカニズムを整合性をもって結び付けるには至っていない。また同じ動物門内で同様の形態を作り上げるための発生メカニズムにも、例えば節足動物の体節形成メカニズムなどにも、多様性があることが分かってきている。進化の過程での動物門の形態的特徴の確立や、動物門間の相違点を理解するためには、それぞれの動物門の祖先的な形質を見出す必要がある。そこで本研究では、ショウジョウバエの情報を有効に利用できることに着目して、節足動物の初期胚発生メカニズムの祖先的形質の理解を目的とした。そのために節足動物の中では進化の早い時期に昆虫類と分岐したと考えられている鋏角類のオオヒメグモを研究材料として選んだ。方法として、このクモで遺伝子機能や遺伝子カスケードを解析する実験系を開発し、ショウジョウバエの初期胚発生に関わる遺伝子のオオヒメグモ相同遺伝子を網羅的に単離する。発生の初期に起こる現象である、体軸形成・胚葉形成・体節形成を解析し、ショウジョウバエとの比較、さらには脊索動物など他の動物門との比較を行う。

4 研究成果:

(1) オオヒメグモにおける dsRNAi 法の開発

線虫やある種の昆虫で行われていた parental RNAi 法を参考にして、オオヒメグモで遺伝子発現を抑制する実験系を作ること成功した。これは、成熟したメスのクモの後体部に二本鎖 RNA を注入し、特異的に遺伝子発現が抑制された卵を得るものである。オオヒメグモは5~7日ごとに200個程の卵を産むが、例えば *sog* 遺伝子に対する二本鎖 RNA を注入した時には、注入後3回目以降の産卵で得られた卵のほぼ100%に表現型が現れた。この方法は1つ1つの卵に RNA を微量注入する方法よりもはるかに手軽であり、確実に効果がでる。高率で表現型が現れるので遺伝子発現の変化の解析や表現型のライブ観察を確実にできる系となった。

(2) 体軸形成の解析

クモ胚でははじめに形態的に放射相称の胚盤が形成され、続いて胚盤の中心から縁に向かって一方向にクムルスという膨らみが移動して前後・背腹の軸をもつ左右相称になる。ショウジョウバエ初期胚のパターン形成に関わる遺伝子のクモ相同遺伝子を単離し、発現を解析した結果、次のようなことが明らかとなった。クムルス移動前の胚盤では *sog*, *snail*, *otd*, *hox* など多くの遺伝子が環状に発現する。クムルスには *dpp* 遺伝子を発現する間充細胞塊が存在し、上皮細胞の基底側を移動しながらシグナルを伝え、背側胚外組織を誘導する。この細胞塊の移動により、環状であった他の遺伝子の発現パターンは非対称となる。さらに *dpp* RNAi 胚では、他の遺伝子発現は環状のままであり、放射相称性が保たれていると考えられた。以上のことから、胚盤は分子的にも放射相称であり、*dpp* を発現する細胞塊の移動が非対称性を作り出すはじめのものであると考えられた。

(3) 背腹のパターン形成の解析

クモの発生では上記の *dpp* の働きにより背側胚外組織と胚組織に分かれ、続いて胚組織には背腹軸に沿って、付属肢、中枢神経系、腹側正中線といった組織が形成される。このような体軸に沿ったパターンの形成について解析した。形態的な変化に先立って、*sog* 遺伝子の発現領域が徐々に腹側に限局し、Dpp シグナルはこの *sog* の発現と相補するように、より腹側の領域にまで伝わるようになっ

た。*sog* RNAi 胚では、背側に形成される左右の付属肢が腹側でもつながり、腹側正中線で発現する *fkf* や *sim* の発現が見られなくなった。中枢神経系の細胞の数が激減することも分かった。一方 *fkf* RNAi 胚では *sog* の発現領域の腹側への限局は起こっていた。以上の結果から、背腹軸に沿ったパターンの形成には *Sog* と *Dpp* を介する細胞間相互作用が重要であり、腹側正中線の形成には *sog*, *fkf*, *sim* というカスケードがあること、中枢神経系の形成は腹側正中線の形成と強く相関していることが考えられた。腹側正中線で発現する *sog*, *fkf*, *sim* の相同遺伝子は脊椎動物やナメクジウオで脊索や floor plate などで発現する。これらは神経誘導に関わる組織なので、クモの腹側正中線の機能や他の動物における相同な組織に関して慎重に検討する必要が出てきた。

(2),(3)の結果からハエとクモの体軸形成の違いが見えてきた。ハエでは母性因子の非対称な分布をもとに並列的に体軸に沿ったパターンが形成されるのに対し、クモでは細胞間相互作用に重きをおいた直列的な方法により形成される。これはクモの胚発生に調節的な側面が多く見られることとも関係していると考えられる。ハエとクモの様式のどちらが節足動物としてより祖先的なものであるのかは現時点では判断できないが、クモの様式が明らかになったことにより、節足動物の祖先的な形質の新たな可能性を示すことができた。

#### (4) 中胚葉形成の解析

ショウジョウバエの中胚葉は、*twist*, *snail* 遺伝子を発現する胚のもっとも腹側の領域が一度に内側に入り込むことによって形成される。オオヒメグモで *twist*, *snail* 遺伝子を同定し発現を解析したところ、*twist* は中胚葉で発現するが、*snail* はしないことが分かった。そこで *twist* の発現をもとにクモの中胚葉形成を解析した結果、*twist* を発現する細胞は胚盤の中心付近と周縁部に現れ、個々の細胞が非同調的に内側に入り込むことが分かった。つまりハエとは異なり、背腹軸形成とは独立に起こる現象である。胚盤上の細胞が中胚葉としての運命をもつことに Notch, Delta 遺伝子が関わることも分かってきた。

#### 5 自己評価:

生物の進化の問題は簡単に理解できるものではないので、タイトルやはじめに掲げた目標は3年間でやる研究としては大き過ぎるものだったかもしれない。しかし、クモの胚発生の解析を通して明らかになったことは、節足動物の祖先的な形質や、動物の系統関係、組織の相同性をあらためて考えるきっかけとなるものであったので、動物進化学の分野に対して意義のある知見を提供できたと考えている。また、具体的な研究の目標として、ショウジョウバエの初期胚発生に関わる遺伝子の相同遺伝子を網羅的にクモから単離し、クモの体軸形成・胚葉形成・体節形成を総合的に解析し、ハエと比較することを、はじめに設定したが、実際には詳細に解析できたのは体軸形成だけにとどまった。体軸形成に関しては発生学としても興味深い知見を得ることができ、意味のある研究になったと思う。胚葉形成や体節形成は動物の系統関係を知る上で重要な現象であるので、これらに関しては今後精力的に取り組みたい。オオヒメグモという、ほとんど誰も研究していない生き物を研究材料としたが、最終的には RNAi による機能解析ができるようになり、よい実験系を作ることができた。このことは今後の研究の発展につながると考えている。

#### 6 研究総括の見解:

左右相称動物の共通祖先を明らかにしようとする研究の最終的目標には未だ道程はある。しかし、これまでに個体形成の領域では注目されなかったクモ類(オオヒメグモ)を実験材料とし、発生研究に十分活用できるユニークな実験系を確立した。また、RNAi 法をいち早く導入し、方法論としての遺伝子機能解析系を立ち上げてクモの初期発生の特徴的な様式を明らかにした挑戦的独創性は高く評価でき、今後の研究の進め方次第で飛躍的展開が十分期待できる。

#### 7 主な論文等:

##### 主な論文

1. Yasuko Akiyama-Oda and Hiroki Oda. Early patterning of the spider embryo: A cluster of

mesenchymal cells at the cumulus produces Dpp signals received by germ disc epithelial cells. *Development* 130, 1735-1747 (2003)

2. Hiroki Oda, Yasuko Akiyama-Oda and Shicui Zhang. Two classic-cadherin related molecules with no cadherin extracellular repeats in the cephalochordate amphioxus: distinct adhesive specificities and possible involvement in the development of multicell-layered structures. *J. Cell Sci.* 117, 2757-2767 (2004)
3. Kazunori Yamazaki, Yasuko Akiyama-Oda and Hiroki Oda. Expression of a *twist*-related gene in embryos of the spider *Achaearanea tepidariorum* reveal divergent aspects of mesoderm development in the fly and spider. *Zool. Sci.* 22, 177-185, (2005)
4. Hiroki Oda, Kunifumi Tagawa and Yasuko Akiyama-Oda. Diversification of epithelial adherens junctions with independent reductive changes in cadherin form: identification of potential molecular synapomorphies among bilaterians. 投稿中

#### □答発表・招待講演

1. 2002.05.23 クモ胚における体軸形成機構 ~ショウジョウバエ胚発生との違い~ 日本発生生物学会 第35回大会
2. 2002.08.04 ショウジョウバエとクモの体軸形成機構の比較 日本進化学会 第4回大会
3. 2002.10.14 節足動物の初期胚発生の比較: ショウジョウバエとクモの体軸形成機構 第75回日本生化学会大会(招待講演)
4. 2003.06.11 クムルス間充織細胞の非対称な移動によるクモの体軸形成 日本発生生物学会 第36回大会
5. 2003.08.02 ハエとクモの比較胚発生学 日本進化学会 第5回大会
6. 2004.03.31-04.04 Establishing bilateral symmetry in the spider embryo. The second Cold Spring Harbor meeting on Evolution of Developmental Diversity
7. 2004.06.06 クモ胚発生における放射相称から左右相称への変換 日本発生生物学会 第37回大会
8. 2004.12.09 クモ胚における体軸形成機構の解析 第27回 日本分子生物学会年会

## 研究課題別評価

1 研究課題名: 軟骨に特異的な遺伝子機能による軟骨分化制御の解明

2 研究者氏名: 浅原 弘嗣

3 研究の狙い:

発生学において、形作りの巧緻性および多様性は、HOXをはじめとした、DNA 結合型の転写因子に加え、それら転写因子活性の細かな調節によって制御されていると考えられる。本研究では発生を制御する新しいパラメーターとして、DNA とヒストンの複合体であるクロマチンとその制御ファクターに注目する。特にstem細胞および四肢発生の分化制御をモデルとして、その新しい分子生物学に参入、その研究のなかから、新しいクロマチン制御機構の発見とstem細胞の分化に関わるクロマチン修飾ファクターの同定をおこなう。以上の研究を遂行することで、基礎研究分野において、さらにクロマチンを介した発生制御のメカニズムの解明をすすめると同時に、その臨床応用、特に外科、整形外科領域における移植、再生技術への応用を推進し、発生分子生物学の用(患者、社会への還元)と美(他の学問との競争、またより純粋なサイエンスのテーマ)を追求する。

4 研究成果:

遺伝子発現と遺伝子複製が転写コアクティベーターと転写因子の同期発現によって統合制御されることを示し、そのメカニズムを明らかにした(Mol.Cell.Biol.2002、Nat Cell Biol. 2003)。転写コアクティベーターである CBP/p300 が、軟骨分化において必要である転写因子 Sox9 と複合体を形成し遺伝子発現に関与するという仮説をたて、CBP/p300 と Sox9 の相互作用を生化学的に検証、さらにこの二つの因子が複合体を形成することで軟骨特異的遺伝子である II 型コラーゲンなどの転写活性化を引き起こすことを明らかにした。また、タンパク質間の相互作用を阻害するペプチドを同定し、それをアデノウイルスによって間葉系幹細胞に発現させるシステムを開発した。このシステムを用いて Sox9/CBP 複合体形成を阻害したところ、軟骨への分化がおこらなくなることを明らかにした(JBC, 2003)。このモデルにより、CBP/p300 の変異による骨格形成異常を部分的に説明できると考える。さらに、軟骨初期分化に必要な TGF-beta による Smad2/3 を介したシグナルは、Sox9 の転写活性を促進させ、II 型コラーゲンのエンハンサー領域において Sox9 と CBP/p300 複合体の形成を調節することで軟骨分化を促進することを明らかにした(JBC, 2005)。また、これまで PPAR- など核内レセプターのコファクターとされてきた PGC-1 は、マウス胚の四肢特に軟骨部位に発現し、ニワトリ胚の肢芽に PGC-1 を過剰発現させると、軟骨特異的遺伝子の産生が高まり、Sox9 と PGC-1 を同時に過剰発現させると、さらに強い作用を示し軟骨基質量が増大した。そして、ヒト間葉系幹細胞を用いた軟骨への分化誘導においても Sox9 や PGC1 単独に比べて、Sox9 と PGC-1 を同時に過剰発現させると軟骨基質量が増大し、軟骨細胞への分化が促進されることを明らかにした。PGC-1 は、軟骨発生・分化において Sox9、p300 と結合し、II 型コラーゲンの発現を促進することから、Sox9 の転写コアクティベーターとして、軟骨特異的遺伝子発現と軟骨分化誘導に関わることを示した(PNAS, 2005)。すなわち、この一連の研究成果で、転写コアクティベーターは、軟骨分化特異的な発現とその機能解析を通して、発生・分化を制御する新しい分子パラメーターであること、また、それによって引き起こされるクロマチン修飾の重要な役割を果たしていることを提唱した。

5 自己評価:

発生を制御する新しいパラメーターとして、クロマチン制御ファクターに注目し、発生、生理学的意義とその分子メカニズムの解明においては、一連の研究結果をもって、新しいサイエンスに貢献できたと思う。同時期にこの分野は、多くの研究者の参入もあり、また、いろんな研究報告、情報が錯綜して混沌としている感がある。さらなる発展のための今後の研究指針として、より深く、分子メカニズムを解析する準備をおこない、クロマチンを再構成させた系においた試験管内転



写実験と個体でのフェノタイプを比較検討する実験が現在進行中である。

また、ここで得られた組織特異的発現機構のモデルは、全組織、全遺伝子において、スクリーニングをおこなっており、さらなる公理の発見を目指している。

本研究は、スタート間もない時点で、研究のオリジナリティーを確立するため、出身研究室指導教官と十分な話し合いのもと、本プロジェクトの遂行ということで、他施設に独立ラボを開く事ができた。研究の速さと量の面では、かなりマイナス面もあったが、さきがけ研究の趣旨を自分なりに解釈して、結果として、世界の多くの先輩研究者にオリジナリティーの面での評価もいただくことができた。

さきがけ研究発表会での、領域アドバイザーの厳しく、素晴らしい指導のもと、サイエンスに対する姿勢についても多く考えさせられた。また、以上の研究がまとまることで評価を頂き、アメリカ NIH、アメリカウマチ基金、厚生労働省などの研究費審査もお手伝いできる機会にめぐまれ、日米のサイエンスを支えるグラントシステムについても勉強させて頂いた。

3年という期間をあたえられて、やっと研究の基盤らしきものができてきた。これより行う研究こそが、自身においても外部からも厳しい評価をうけるべきものと思う。37歳になった今、30代の残り3年で、本プロジェクトから真の公理を導きだす事ができるかどうか、研究に集中したい。

#### 6 研究総括の見解:

軟骨形成をモデル系とし、研究成果の医療への活用を強く意識しつつ、クロマチン構造の制御といった独創性の高い視点から軟骨に特異的な遺伝子発現の解明に取り組んだ。実に積極的かつ精神的に研究を展開し、日米にわたる共同研究を推進しつつ、目的を超える成果を得つつある。将来の発展の方向性が本領域の目標とは必ずしも完全には一致しないとしても、期待できる成果の重要性はきわめて大きく、正にさきがけ的研究の典型として高く評価したい。

#### 7 主な論文等:

##### 主な論文

1. Kawakami Y, Tsuda M, Takahashi S, Taniguchi N, Esteban CR, Zemmyo M, Furumatsu T, Lotz M, Belmonte JC, Asahara H. Transcriptional coactivator PGC-1{alpha} regulates chondrogenesis via association with Sox9. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102(7):2414-9, 2005.
2. Furumatsu T, Tsuda M, Taniguchi N, Tajima Y, Asahara H. Smad3 induces chondrogenesis through the activation of SOX9 via CBP/p300 recruitment. *J Biol Chem*. In press 2005.
3. S. Omoto, K. Nishida, Y. Yamaai, M. Shibahara, T. Nishida, T. Doi, H. Asahara, T. Nakanishi, H. Inoue, M. Takigawa. "Expression and localization of connective tissue growth factor (CTGF/Hcs24/CCN2) in osteo-arthritic cartilage" *Osteoarthritis Cartilage*, 12(10):771-8, 2004.
4. K. Nishida, T. Komiyama, S. Miyazawa, Zheng-Nan Shen, T. Furumatsu, H. Doi, A. Yoshida, J. Yamada, M. Yamamura, Y. Ninomiya, H. Inoue, H. Asahara. "Histone deacetylase inhibitor suppression of autoantibody-mediated arthritis in mice via re-gulation of p16INK4a and p21 (WAF1/Cip1) expression" *Arthritis Rheum*, 50(10):3365-76, 2004.
5. M. Tsuda, S. Takahashi, Y. Takahashi, H. Asahara. "Transcriptional co-activators CBP/p300 regulate chondrocyte specific gene expression via association with Sox9" *J Biol Chem*, 18;278(29):27224-9, 2003.
6. Y. Kawakami, J. Rodriguez-Leon, C. M. Koth, D. Buscher, T. Itoh, A. Raya, J. K. Ng, C. Rodriguez Esteban, S. Takahashi, D. Henrique, M. F. Schwarz, H. Asahara, J. C. Belmonte. "MKP3 mediates the cellular response to FGF8 signalling in the vertebrate limb" *Nat Cell Biol*, 5(6):513-9, 2003.
7. H. Asahara, S. Tartare-Deckert, T. Nakagawa, T. Ikehara, F. Hirose, T. Hunter, T. Itoh, M. Montminy. "Dual roles of P300 in chromatin assembly and transcriptional activation in cooperation with

nucleosome assembly protein 1 in vitro." *Mol cell Biol*, 22(9), 2974-83, 2002.

主な口頭発表・招待講演

Keystone Symposia

January 29, 2002 Albuquerque, New Mexico, USA

A transcriptional switch mediated by co-factor methylation

W. Xu, H. Chen, H. Asahara, K. Du, M. Tini, B. M. Emerson, M. Montminy, R. M. Evans

American College of Rheumatology 66th Annual Scientific Meeting

October 26-29, 2002 New Orleans, Louisiana, USA

Dual roles of CBP and NAP-1 complex in chromatin assembly and transcriptional activation.

S. Takahashi, M. Tsuda, T. Ito, S. Tartare-Deckert, H. Asahara.

Arthritis Research Conference

June 26-28, 2003 Keystone, Colorado, USA

The Transcriptional complex Creb/CBP regulates chondrocytes differentiation

H. Asahara (招待講演)

3rd World Congress of the Global Arthritis Research Network: International Arthritis Summit

September 14-17, 2003 Miyazaki, Japan

(Symposium)

Transcriptional mechanism of chondrogenesis

H. Asahara (招待講演)

ACR/ARHP Annual Scientific Meeting

October 24-28, 2003 Orlando, USA

Transcriptional co-activator CBP/p300 regulate chondrocyte specific gene expression via association with Sox9

M. Tsuda, S. Takahashi, N. Taniguchi, T. Furumatsu, Y. Takahashi, H. Asahara

The 48<sup>th</sup> Annual General Assembly and Scientific Meeting of Japan College of Rheumatology and

The 13<sup>th</sup> International Rheumatology Symposium

April 15-17, 2004 Okayama, Japan

(Symposium)

Molecular mechanism of chondrogenesis via chromatin modifications (招待講演)

ACR/ARHP Annual Scientific Meeting

Transcriptional co-activator PGC-1 regulates chondrogenesis via association with Sox9

M. Tsuda, N. Taniguchi, Y. Kawakami, S. Takahashi, T. Furumatsu, T. Ito, K. Yoshida, S. Miyaki, S. Yokoyama, M. Hashimoto, C.R. Esteban, M. Lotz, J.C. I. Belmonte, H. Asahara

October, 2004 San Antonio, USA

第 16 回日本軟骨代謝学会 平成 15 年 3 月 7 日 岡山

(シンポジウム)

Transcriptional regulation of Chondrogenesis

浅原弘嗣 (招待講演)

第 16 回日本軟骨代謝学会 平成 15 年 3 月 8 日 岡山  
(ランチョンセミナー)  
関節軟骨研究の用と美 - クロマチンレベルでの研究を通して -  
浅原弘嗣 (招待講演)

第 19 回日本整形外科学会 基礎学術集会 平成 16 年 10 月 21,22 日 東京  
(シンポジウム)  
クロマチンを標的にした RA 治療戦略  
浅原弘嗣 (招待講演)

第 48 回 日本リウマチ学会総会・学術集会 第 13 回国際リウマチシンポジウム 平成 16 年 4 月  
15-17 日  
(ランチョンセミナー)  
クロマチン制御を介した関節軟骨の保護と再生  
浅原弘嗣(国立成育医療センター研究所) (招待講演)

## 研究課題別評価

1 研究課題名: 大脳皮質の生後発達の分子基盤

2 研究者氏名: 岩里琢治

3 研究の狙い:

高等動物の神経回路が機能的なものとして成熟するためには、生後の一定期間に外界からの適切な刺激を受け、微調整されることが必須である。こうした活動依存的回路発達の実体および分子機構はほとんど未解明である。私は、マウス体性感覚野第4層のバレル形成という優れたモデル系に注目して、この問題に取り組んできた。本研究では、NMDA型グルタミン酸受容体 (NMDAR) と cAMP という神経可塑性の中心的分子が、バレル形成という発達期可塑性に関して、体性感覚経路のどこで、どのように働いている(あるいは働いていない)かを、明らかにしようとした。そのために、条件的遺伝子ノックアウトの手法を用いたが、未だ発展途上の技術であり、その開発、改良も同時に行ってきた。

4 研究成果:

4-1. 研究の背景: バレルは、1970年に報告されて以来、発達期可塑性のモデルとして注目されてきた。しかし、方法論的な困難のため、その分子レベルの機構は未解明であった。1990年代半ばに、遺伝子ノックアウトの手法が導入され、ようやくバレル形成に関与する分子が同定され始めた。しかし、これらの研究で用いられたのは全て全身性のノックアウトであったため、多くの場合、広範囲な異常がみられ、そのためそれぞれの分子が経路のどこでどのように働くかという問題を明らかにすることができなかった。さきがけ研究に先行して、私達は、Cre/loxP 組換えシステムを応用し、体性感覚系の脳幹、視床という中継核での遺伝子機能を保存したまま、大脳皮質においてのみ遺伝子をノックアウトすることを可能とし、問題解決の手がかりをえた。また、大脳皮質の興奮性神経細胞でのみ NMDAR を欠損する CxNR1KO マウスを作製、解析することにより、大脳皮質 NMDAR がバレル形成において重要な働きをすることを明らかにした (Iwasato et al., 2000)。

4-2. NMDAR: NMDAR はシナプス後膜に局在するイオン透過型グルタミン酸受容体であり、活性化されるとカルシウム流入によって、様々な経路を動かす「可塑性の鍵」となる分子である。CxNR1KO マウスの第4層で、バレル形成のどのステップがどのように障害されているかを詳細に解析することによって、NMDAR によるバレル形成機構を知る手がかりが得られるはずである。

生後数日の間にヒゲを傷害して入力を遮断すると、対応するバレルが縮小し、隣接するバレルが拡大するという可塑性があることが知られている。従来、薬理学的手法を用いた研究から、この種の可塑性に大脳皮質 NMDAR が関与すると考えられていた。本研究において、この仮説を、CxNR1KO マウスを用いて検証した。その結果、大脳皮質の興奮性神経細胞の NMDAR がなくても、この種の可塑性が正常に起きることを見いだした。私は、「この種の可塑性」には大脳皮質ではなく脳幹や視床といった中継核での機構が重要であり、薬理学的阻害実験では大脳皮質だけでなく視床などの NMDAR の機能が阻害されたために、可塑性が減少したと考えている。私達の条件的遺伝子欠損マウスの系では、薬理学にみられるような、分子特異性、領域特異性に関する不確かさはなく、大脳皮質興奮性神経細胞の NMDAR はヒゲ傷害によって誘導される視床-皮質軸索の微調整には関与しない、ということが明らかとなった。この研究は、米国のグループとの共同研究として、こちらの主導でおこなったものだが、共同研究者の博士号取得のため、筆頭第一著者を譲った。

CxNR1KO マウスの解析より、ポストシナプス側に存在する NMDAR がプレシナプス側、ポストシナプス側それぞれの回路微調整に重要な働きをすることはわかっていた (Iwasato et al., 2000)。本研究では、CxNR1KO マウスのプレ側、ポスト側でどのような異常が起きているかをより詳細に解析した。ポストシナプス側に関しては、ゴルジ染色によって樹状突起の方向性を解析した。野生型マウスでは、

樹状突起はバレル中心に向かって非対称的な伸展をするが、CxNR1KO マウスでは、そのような方向性はみられなかった。また、プレ側としては、単一視床-皮質軸索終末の形態を発達段階を追って解析した。その結果、生後3日目ごろから、野生型と比較して、CxNR1KO マウスでは、側方により広い領域に投射することが明らかとなった。また、層特異性に関して、野生型マウスの視床-皮質軸索は、第4層に選択的に投射するが、そのような傾向は CxNR1KO マウスでは薄れていることが明らかとなった。これらの結果は、ポストシナプスに存在するNMDARがポスト側、プレ側双方に働きかけ、ヒゲと一群の第4層神経細胞との1対1対応を形成することを示唆する。第4層細胞の細胞体クラスターであるバレルが形成されるまでには、さらに多くの機構の関与が必要であることは自明だが、その最初かつ最も重要なステップは1対1対応が形成されることであるはずであり、そのステップに大脳皮質 NMDAR が関与していることが示された。

今後は、CxNR1KO マウス体性感覚野第4層のシナプスレベルの形態、生理学的な解析を行うことにより、NMDAR の機能をより詳細に解析していきたい。また、CxNR1KO マウスは、NMDAR 下流の分子をスクリーニングするための材料としても有効であると考えられ、その方向の研究を進めたい。

4-3. cAMP: アデニル酸シクラーゼ1(AC1) の自然発生変異マウスの解析から、cAMP 経路がバレル形成に重要であることが知られている。しかし、この全身性の変異マウスを用いた研究では、AC1 を起点とする cAMP 経路が、体性感覚経路のどこで機能しているかについては解明できなかった。cAMP は NMDAR と同様に可塑性に関して、多くの経路の起点となる重要な分子であり、その機能する領域によって異なった作用が期待される。バレル形成機構の理解のためには、この分子の作用する場所を明確にすることは、重要と考えられた。私達は、先に開発した大脳皮質興奮性神経細胞特異的遺伝子欠損システムと、今回新しく作製した floxed AC1 マウスを交配することによって、大脳皮質特異的 AC1 ノックアウト (CxAC1KO)マウスを作製した。結果は、未発表であるため、ここには記載できないが、従来の考え方とは異なる AC1 の新しい作用の仕方が明確となった。さらに、このマウスは、これまでに隠されていた可能性のある微小な(しかし重要な)AC1 の機能を知るための有益な材料となることが示された。この研究は、今後1年間ぐらいの予定で第一報にまとめたいと考えています。また、このマウスの解析の途中で、いくつかの予想外の結果に遭遇し、その解決の中で条件的遺伝子ノックアウトを使った研究の進め方に関して多くを学ぶことができた。

4-4. Emx1-Cre マウス: 2000年の論文で発表した大脳皮質特異的 Cre (Emx1-Cre)マウスは、3種類の方法で作製した計5系統の1つであり、他の4系統のマウスの解析は、時間の制約上保留されていた。4.2のテーマで遭遇した問題点解決のための必要性から、本研究において、5系統に関して、発達段階を追って Cre/loxP 組換えのパターン、および Cre 蛋白質の発現のパターンを詳しく解析した。その結果、大脳皮質興奮性神経細胞で遺伝子ノックアウトを行う点では、すべて共通であるが、それぞれ少しずつ異なった特徴を持つことが明らかとなり、目的によって選択できる貴重なリソースを提供することができた。この解析を行ったことは、私自身の条件的遺伝子ノックアウト法に関する理解を深め、上述の問題点解決のための大きな力となった。極言すれば、この解析を行っていなければ、問題点に気付かず間違った結論を導いていた可能性も捨てきれない。

## 5 自己評価:

バレル形成において、どのような分子がどこでどのように働いているかを知るという目標は、残念ながらまだ入り口のあたりをうろついている段階である。条件的遺伝子ノックアウトの手法は、時間がかかるので、敬遠されたり、不適切に簡略化されて使用されることがしばしば見受けられる。しかし、本研究によって、NMDAR, AC1 の働き方について少しずつ明確になってきているのは間違いなく、それは従来の方法ではなしえなかったことである。発達期可塑性の研究の確実な発展のためには、結局、時間がかかっても条件的遺伝子ノックアウトの手法を洗練しながら、一步一步解析を進めることも必要と考えられる。この3年間の研究の進展のスピード、深みに関しては決して満足のいくものとはいえない。今後は、これまでに作製したマウスや培った経験を活かし、もう少し研究のスピード、幅、深み

を増して行きたいと思う。

#### 6 研究総括の見解:

神経生物学の重要課題であり、応募時までに蓄積した自己の優れた研究成果を踏まえて、バレル形成の構築という非常に困難な目的に挑戦した。Conditional Knock Out 等の手法を果敢に導入して着実に成果を挙げてきた。中でも、従来の常識とは異なり、大脳皮質 NMDAR は末梢感覚器の傷害によって誘導される可塑性に大きく関与しないことを明示し公表したことは高く評価できる。いずれにせよ、解析が容易でなく時間を要する課題であるので、進捗のスピードは今一步であるが、豊かなデータの蓄積がなされているので今後の展開に十分期待できる。

#### 7 主な論文等:

##### 主な原著論文

1. Lee, L.-J., Iwasato, T., Itohara, S., Erzurumlu, R. Exuberant Thalamocortical Axon Arborization in Cortex-Specific NMDAR1 Knockout Mice. *J. Comp. Neurol.* (in press)
2. Iwasato, T.+, Nomura, R., Ando, R., Ikeda, T., Tanaka, M and Itohara, S.+ Dorsal Telencephalon-Specific Expression of Cre Recombinase in PAC Transgenic Mice. *Genesis* 38, 130-138 (2004) +The corresponding authors
3. Inoue, H., Tsukita, K., Iwasato, T., Suzuki, Y., Tomioka, M., Tateno, M., Nagao, M., Misawa, H., Saïdo, T.C., Miura, M., Itohara, S., Takahashi, R. The crucial role of caspase-9 in the disease progression of a transgenic ALS mouse model. *EMBO J.* 22, 6665-6674 (2003)
4. Datwani, A.\* , Iwasato, T.\*+, Itohara, S., and Erzurumlu, R.S.+ , Lesion-induced thalamocortical axonal plasticity in the S1 cortex is independent of NMDA receptor function in excitatory cortical neurons. *J. Neurosci.* 22, 9171-9175 (2002).  
\* *The first two authors contributed equally to this work.*  
+ *The corresponding authors*
5. Datwani, A., Iwasato, T., Itohara, S., and Erzurumlu, R.S. NMDA receptor-dependent pattern transfer from afferents to postsynaptic cells and dendritic differentiation in the barrel cortex. *Mol Cell Neurosci*; 21: 477-92 (2002).

##### 招待講演

1. 岩里 琢治 背側終脳特異的遺伝子操作法の開発と体性感覚野神経回路発達研究への応用 2003年神経化学学会(新潟)シンポジウム
2. Takuji Iwasato Genetic Dissection of Barrel Formation in the Rodent Somatosensory System. Workshop on "the Molecular Basis of Synaptic Plasticity" (2004年7月1-2日:米国、New York University)

##### 主な口頭発表(シンポジウム、ワークショップ、海外学会)

1. 岩里 琢治 マウス体性感覚野の発達と NMDA 受容体機能、24回日本分子生物学会年会(2001年12月9-12日:横浜)ワークショップ
2. Takuji Iwasato Genetic Dissection of Activity-dependent Development of the Mouse Somatosensory Cortex: Roles of NMDA receptor in the barrel formation. 特定領域A 神経回路の成熟と特異的機能発現のメカニズム 冬の公開シンポジウム(2002年1月30日:東京)(英語発表)
3. Takuji Iwasato, Ryochi Nomura, Reiko Ando, Shigeyoshi Itohara. Cerebral Cortex-Specific Gene Manipulation by PAC Transgenic Mouse. 32<sup>nd</sup> Annual Meeting, Society for Neuroscience (2002年11月7日:米国)
4. 岩里 琢治 体性感覚野マップ精緻化の分子機構:マウス逆遺伝学的解析 平成14年

シナプス研究会 (2002年12月5-6日:生理研)シンポジウム

分担執筆

1. Reha S. Erzurumlu and Takuji Iwasato 『Patterning of the Somatosensory Maps with NMDA Receptors』: 図書名「Development and Plasticity in sensory Thalamus and Cortex」, Guido, Erzurumlu, Zoltan 編 Kluwer Academic/ Plenum Publishers(印刷中)
2. 岩里琢治 『大脳皮質神経回路のメカニズムをタンパク質、遺伝子レベルで探る-マウス体性感覚(バレル)野をモデル系として』 「運動とタンパク質・遺伝子」柳原大、内藤久士編 有限会社ナップ 50-65頁(2004年)
3. 岩里琢治 『神経活動依存的メカニズムによる脳回路発達』 「みる見るわかる脳・神経科学入門講座 下巻」渡辺雅彦編 株式会社羊土社 73頁-87頁 (2002年)

総説

1. 岩里琢治 『げっ歯類バレル構造の活動依存的発達』 蛋白質酵素増刊「神経回路の機能発現のメカニズム」大森治紀、澁木克栄、野田亮、山森哲雄編 49巻3号 351-357頁(2004年)
2. 岩里琢治、糸原重美 『マウス遺伝学による神経回路網精緻化の研究』 生体の科学 54巻2号 138-145頁 (2003年)

## 研究課題別評価

1 研究課題名: 眼の形態形成制御遺伝子の機能的カスケードの解明

2 研究者氏名: 太田訓正

3 研究の狙い:

眼はほとんどの動物が持つ重要な感覚器官である。眼の発生は形態学的にはよく研究されてきたが、眼の形づくりの分子メカニズムはほとんど明らかになってない。しかしながら、レンズが眼の形成に関わる重要な分子を発現していることは古典的な実験から示されている。本研究では、レンズ由来の新しい分泌型タンパク質の機能解析を中心として、眼の形態形成時における分子間の機能的カスケードを研究することにより、眼の形づくりの分子メカニズムの解明を目指した。

4 研究成果:

レンズ由来の分子は分泌型または膜貫通型タンパクと考えられるので、私はシグナルペプチドをコードする cDNA フラグメントを効率よく単離できるシグナルシーケンストラップ法を用いて分子の探索を行った。スクリーニングの結果3つの新規分泌型タンパクを同定した。

**Akhirin:** 748アミノ酸から構成され、LCCLドメインと2つのVWAドメインを持つ。Akhirinを恒常的に発現する細胞株を樹立し、細胞集合解析を行ったところ Akhirin は細胞接着活性を持つことが明らかになった (Ahsan et al., in press)。Akhirin は網膜神経幹細胞が存在する ciliary marginal zone (CMZ) と呼ばれる領域に特異的に発現している。アフリカツメガエル胚を用いた過剰発現実験では、異所性の網膜色素上皮や眼胞の発現を誘導した。

**Equarin:** 601アミノ酸から構成される Equarin-S と958アミノ酸から構成される Equarin-L が存在する。両分子ともレンズにおいて赤道線上に発現し、背 腹に沿って濃度勾配を持って発現する。過剰発現実験では、網膜の腹側半分を欠損する表現系が得られた (Mu et al., 2003)。レンズにおいて背 腹軸に濃度勾配を持って発現する分子として Equarin が初めて報告され、眼の背 腹軸の極性形成にも関与することが期待できる。

**Tsukushi:** 369アミノ酸から構成され、その構造の大部分を12個のロイシンリッチリピートからなりN末端とC末端にシステインリッチドメイン持つ。眼胞 眼杯形成時には背側に発現が見られ、発生が進むとCMZに局在する。いろいろな動物種の Tsukushi (トリ、アフリカツメガエル、マウス、ヒト、ゼブラフィッシュ) をアフリカツメガエル胚に過剰発現させると、注入する Tsukushi mRNA の濃度に依存して網膜の形成異常を示す様々な表現系が観察され、最もひどいものでは眼が全く形成されなかった。また、Tsukushi 遺伝子を欠損させたマウスでは網膜の層構造が形成された後、光受容体細胞層が特異的に欠失していく表現形を得た。

アフリカツメガエル胚やニワトリ胚を用いた実験や生化学的解析により、Tsukushi は全く新しいタイプのBMPアンタゴニストであることを明らかにした。ニワトリ初期胚ではTsukushiはオーガナイザーであるヘンゼン結節と線条に発現し、BMP4とそのアンタゴニストである chordin と共に3量体を形成することにより極めて初期の形づくりにおいて重要な役割を持つことを示した (Ohta et al., 2004)。

今後の研究課題として各々の分子について以下のように計画している。Tsukushi はBMPやchordinと相互作用をすることが示せたが、Equarin, Akhirin については相互作用を行う相手分子の同定が急務であると考えられる。Equarin はレンズ上皮細胞がファイバー細胞に分化する赤道領域に局在し、背側から腹側にかけて勾配を持って発現しているが、この発現パターンは何を意味するのか(例えば、網膜の背 腹軸の極性を決定する)を解明したい。細胞接着活性を持つ Akhirin は網膜の層構造形成時期には全ての層に発現している。細胞接着分子 N-cadherin は網膜の層構造形成に関与していると報告されているので、Akhirin も同様の機能を有するか検討する。Tsukushi に関してはオーガナイザー形成に関わる重要なコンポーネントの一つであることが示せたが、体軸形成にも関与していることが分かりつつある。また、いろいろな動物の神経網膜幹細胞に Tsukushi が発現していることから、神



経網膜幹細胞における機能を明らかにしたい。さらに Tsukushi KO マウスの光受容細胞が加齢と共に特異的に欠失する表現形とヒトの網膜疾患の関係も調べていきたい。

#### 5 自己評価:

眼は中枢神経系の一部であり、神経の発生・分化や軸索伸長のよいモデルとして研究されてきたが、私を含めて神経網膜の研究をしている多くの研究者は物を見るためには必須であるレンズにほとんど関心を持たなかった。レンズが眼の発生に欠かせないことや視神経の伸長や伸びる方向を決めていることから、レンズ由来の網膜発生に影響を与える分子を探索する目的で本研究はスタートした。3つの新規分泌型タンパクを同定し、それぞれが眼の形態形成において何らかの機能を持つことが示せた。これは私自身が Cambridge 大学の Harris 教授の研究室に1ヶ月間滞在して習った、アフリカツメガエル胚を用いたマイクロインジェクション法を機能解析手段として用いたことが良かったと思う。Tsukushi はニワトリ初期胚においてオーガナイザーと線条に特異的に発現しており、アフリカツメガエルやゼブラフィッシュの初期胚でも同様の発現パターンを示す。また Tsukushi が BMP アンタゴニストであることが分かりつつあったので、初期発生における Tsukushi の機能解析を中心に研究を進めてしまい、さきがけ研究のテーマからはしばらく外れてしまったが総括並びにアドバイザーの先生方から理解をしていただきとても有り難かった。学生時代から神経一筋で研究を行ってきたが、初期発生やシグナルカスケードの勉強を行い改めて発生生物学のおもしろさを認識した。さきがけ研究の3年間を通して今後の研究課題を見出せたと思う。

#### 6 研究総括の見解:

自己が発見した新規タンパク質 Clone 179 の眼形成における機能の解明を当初の目的とした。研究を進めるに及び、眼に発現する分泌因子 Tsukushi が発生の初期過程でオーガナイザー領域等に発現することを見出し、その発現パターンが「つくし」に似ているところから Tsukushi と命名したこの因子に焦点を絞って研究を展開した。その結果、このタンパク質が chordin との相互作用を通じて BMP 活性を阻害することで、オーガナイザー・インデューサーとして作用するという重要な発見に結びつけた。したがって、当初の目標の到達は今後の課題となったが、本研究で得られた成果は個体形成の機構の解明に大きく貢献すると考えられる。アドバイザー等の助言や指摘を十分活かし研究の方向を果敢に変更し発展性のある成果を収めた点を高く評価する。

#### 7 主な論文等:

##### 原著論文

1. Mu, H., **Ohta, K.**, Kuriyama, S., Shimada, N., Tanihara, H., Yasuda, K., and Tanaka, H. (2003). Equarin, a novel soluble molecule expressed with polarity at chick embryonic lens equator, is involved in eye formation. *Mech. Dev.* 120, 143-155.
2. **Ohta, K.**, Lupo, G., Kuriyama, S., Keynes, R., Holt, C.E., Harris, W.A., Tanaka, H., and Ohnuma, S. (2004). Tsukushi functions as a novel organizer inducer by inhibition of BMP activity in cooperation with chordin. *Dev. Cell* 7(3), 347-358.
3. Ahsan, M., **Ohta, K.**, Kuriyama, S., and Tanaka, H. (2005). A novel soluble molecule, Akhirin, is expressed in the embryonic chick eye exhibits a heterophilic cell adhesion activity. *Dev. Dyn.* 233, 95-104

##### 口頭発表

1. 太田訓正, Giuseppe Lupo, 大沼信一, 栗山正, 田中英明: 新規 BMP アンタゴニスト, Tsukushi, はオーガナイザー形成に関与する。第36回日本発生生物学会 札幌 2003年6月
2. 栗山正, Giuseppe Lupo, 大沼信一, 太田訓正, 田中英明: 新規分泌型因子 *Xenopus Tsukushi* の発現及び機能解析。第36回日本発生生物学会 札幌 2003年6月
3. Ohta, K., Lupo, G., Ohnuma, S., Kuriyama, S., Keynes, R., Holt, C.E., Harris, W.A., and Tanaka, H.

Tsukushi, a novel BMP inhibitor, is involved in the organizer formation. Society for Developmental Biology 62<sup>nd</sup> Annual Meeting, July 30-August 3, 2003 Boston, MA, USA.

4. 太田訓正、Giuseppe Lupo、大沼信一、栗山正、田中英明: 新規 BMP アンタゴニスト, Tsukushi, の同定と機能解析。第26回日本分子生物学会 神戸 2003年12月
5. 栗山正、Giuseppe Lupo、大沼信一、太田訓正、田中英明: 新規分泌型因子 Xenopus Tsukushi の発現及び機能解析。第26回日本分子生物学会 神戸 2003年12月
6. 太田訓正、Giuseppe Lupo、大沼信一、栗山正、田中英明: Tsukushi と Chordin によるオーガナイザー形成の制御。第37回日本発生生物学会 名古屋 2004年6月
7. 栗山正、Giuseppe Lupo、大沼信一、太田訓正、田中英明: 新規 BMP アンタゴニスト X-TSK の神経提形成における機能解析。第37回日本発生生物学会 名古屋 2004年6月
8. 太田訓正、Giuseppe Lupo、大沼信一、栗山正、田中英明: Involvement of Tsukushi in organizer formation by inhibition of BMP activity in cooperation with chordin。第27回日本分子生物学会 神戸 2004年12月
9. 栗山正、Giuseppe Lupo、大沼信一、太田訓正、田中英明: Tsukushi ノックアウトマウスの解析。第27回日本分子生物学会 神戸 2004年12月

## 研究課題別評価

1 研究課題名: 成長円錐の運動解析による神経細胞形成へのアプローチ

2 研究者氏名: 加藤 薫

3 研究の狙い:

成長円錐は伸長中の神経の先端に見られる構造で、神経発生の過程で、周囲の環境を「認識」し、神経系を「形成」する上で重要な役割を果たす。本研究はこの成長円錐の運動機構の解明を目的としている。神経成長円錐の運動はアクチンによるといわれているが、生きた細胞での細胞骨格(繊維状アクチン)の観察は従来の光学顕微鏡では難しく、その仕組みは明らかではない。この分野の研究には、生物学の新しい知見だけでなく、新しい実験系の開発と導入が必要である。

本研究では、最新の光学顕微鏡技術を駆使し、または自ら開発し、生きた神経細胞の観察に応用し、成長円錐の運動機構の解明を目指した。つまり、「偏光顕微鏡」や「位相差顕微鏡」により細胞骨格(アクチン束)の形態を可視化し、「蛍光」により細胞質 Ca<sup>2+</sup>濃度や蛍光ラベルした調節分子(アクチン関連蛋白質)の細胞内分布を同時に可視化し、外界からの刺激により、細胞質の調節分子の分布が変化し、アクチンからなる細胞骨格の動きが変わり、成長円錐の運動が変化する課程を観察し明らかにすることを目指した。

4 研究成果:

I) 神経成長円錐における、アクチン関連蛋白質とアクチンの役割

アクチン関連蛋白質ファシンのアクチンへの結合制御

群馬大学の石川良樹講師と共同で、ファシン(アクチン繊維の束化蛋白質)の動態を解析した。これまでの報告通り、ファシンは filopodia とそれに付随したアクチン束に存在するだけでなく、成長円錐のアクチンの網目でアクチンが束化した部分にも特異的に存在することをみいだした。この性質を利用し、蛍光ファシンをマーカーとして使いアクチンの網目を光学顕微鏡で直接観察することに成功した。

さらに、ファシンのアクチンへの結合乖離とリン酸化の関係を成長円錐で解析した。野生型、リン酸化型、脱リン酸化型のファシンを成長円錐に発現させ比較した。野生型ファシンは細胞質とアクチン束の両方に、リン酸化型は細胞質のみに、脱リン酸化型はアクチン束に分布した。ファシンのアクチンへの結合はリン酸化で制御されることを示した(2003年バイオイメージング学会の年会でベストイメージ賞を受賞)。

成長円錐内部のアクチン関連蛋白質の網羅的解析

プロテオミクスの手法で、成長円錐のアクチン関連蛋白質の同定を進めている新潟大学の五十嵐道弘教授と共同で、成長円錐のアクチン関連蛋白質の動態の網羅的解析を試みた。プロテオミクスの手法で同定した成長円錐のアクチン関連蛋白質と GFP の融合蛋白質を作り、ニューロプラストーマの成長円錐に発現させ、網羅的に運動解析を行った。成長円錐のアクチン関連蛋白質(約30種類)で、それらの動態を記録した。現在、解析精度をあげ、1分子に近い状態での解析を試みている。

II) 神経成長円錐のアクチンの可視化手法の高解像度化

成長円錐のラメリポーディアの運動はアクチンの網目が担う。この成長円錐のアクチンの網目(太い部分でも 20nm 程度)は、電子顕微鏡では観察される。光学顕微鏡で、無染色の生きた状態で動きを捉えた報告はなく、この分野の研究の壁になっている。もし生きた細胞のアクチンの網目が検出できる顕微鏡が開発できれば、大きな進歩になると考えた。これまでの研究では、ケラサイトの細胞でのみ、汎用の位相差顕微鏡でアクチンの網目が観察できると報告されている。位相差顕微鏡を高解像度化すれば、成長円錐でもアクチンの網目が観察できると考えた。

位相差顕微鏡では、試料(細胞など)の周囲が光る(ハロ)アーティファクトが知られている。最近、こ

のハロを減弱する方法(アポディゼーション位相差法)をニコンの大瀧氏が考案した。この方法は、対物レンズ内部の位相リングを、特殊な位相リング(アポディゼーション位相リング)で置き換えるだけで、光学系は極めて単純である。それ故、顕微鏡設計の専門家から過小評価され、安価な低倍率(10-40倍)のレンズのみに応用されていた。私と大瀧氏は、低倍率のアポディゼーション位相差顕微鏡の評価を通じて、高倍率でこそハロ(アーティファクト)の除去効果が大きいと考えた。高倍率のアポディゼーション位相差法の高倍率の対物レンズを作れば、アクチンの網目が見えるかも知れないと考え、大瀧氏と共に光学条件を決め試作した。

この方法を成長円錐の観察に適用した。誰も可視化に成功していない成長円錐のアクチンの網目の無染色の生きた状態で可視化に成功し、その運動を記録することが出来た。この高倍率のアポディゼーション位相差法は様々な細胞観察に応用可能で、かつ、光学系も単純である。生物学者だけではなく、光学者にも大きなインパクトを与えた(「アポディゼーション位相差顕微鏡の生細胞への適用」として、ニコンの大瀧氏、鈴木氏と共に日本光学会から光設計優秀賞受賞)。生物学に留まらず、広範な分野の光学顕微鏡観察で、利用されると期待される。

### III) 高解像度の光学顕微鏡による各種細胞運動や粒子の観察

本研究で用いた高解像度の光学顕微鏡による各種細胞運動の計測および観察依頼があり、共同研究を行った。「心筋」、「好中球」、「コロイド粒子」等を可視化した。

#### 5 自己評価:

この研究は成長円錐の動態解析を目指した。提案書では、新型偏光顕微鏡と蛍光顕微鏡を組み合わせ用いて、成長円錐内部の、蛍光ラベルした特定の分子の動態解析を行うと提案した。しかし、実際に蛍光顕微鏡と偏光顕微鏡を組み合わせた系で、実験を行ってみると、偏光顕微鏡の分解能が足りず、蛍光像との比較解析は難しいことがわかった。そこで方針転換し、以下の2点を重点的に進めた。

GFP-アクチン関連蛋白質の動態解析を主体とした実験を進める

高解像で細かい構造が見える光学顕微鏡を作る

結果を出しやすい を経常的なテーマとして進め、出来れば画期的だが、結果が出ないリスクがあるをサブテーマとして進めた。

GFP を用いたアクチン関連蛋白質の動態解析はうまく進み、ファシオンとアクチンの相互作用について一定の成果がでて学会発表した(バイオイメージング学会ベストイメージ賞)。しかし、論文投稿の直前に、アメリカのグループに先を越されてしまった。更にデータを加えた上で、投稿せねばならなかった。努力不足を反省している。

高倍率(高開口数)のアポディゼーション位相差顕微鏡の試作は大瀧氏(ニコン)と共同で進め、位相差顕微鏡の高解像度化を進めた。光学顕微鏡や位相差顕微鏡の理論は、50年以上前のアップ(分解能の定義をした人)やゼルニケ(位相差法の開発者)の時代に完成された。顕微鏡設計の専門家の多くが、位相差顕微鏡を改良しても、光学顕微鏡観察の大きな進歩には繋がらないと考えていた。私たちは、低倍率のアポディゼーション位相差法の技術評価を行い、その画像データから、高倍率(高開口数)でこそアポディゼーション位相差法の効果が大きいと予想した。そして、大瀧氏と共にニコンを説得し、試作を進め、位相差顕微鏡の高解像度化に繋がった。神経成長円錐内部の微細なアクチンの網目(直径20nm程度)の可視化に成功した。

位相差顕微鏡の理論は、既に完成し、改良の余地がないという一般的考えに反し、位相差顕微鏡の高解像度化を図ることが出来た。2004年6月、光学シンポジウムの一般講演の口頭発表では、大きな反響があった。プレリミナルなデータの発表だったが評価され、「アポディゼーション位相差顕微鏡の生細胞への適用」として、日本光学会から大瀧、加藤、鈴木の3名の共同研究として、光設計賞を頂いた。生物学者、光学者の両方にインパクトを与える仕事になった。このアポディゼーション位相差顕微鏡の試作が完成したのは、さきかけの最終年である。秋から本格的な観察データを取り始め、まもなく投稿である。また、このアポディゼーション位相差顕微鏡での試料の実測を通じて、従来の位

相差顕微鏡の理論では説明が出来ない部分があることを見いだした。今後、この部分を実験的に検証し、生体試料への応用へと繋げたい。

本研究は、成長円錐の運動解析を目指し、院生や共同研究者と共に進めることを想定して計画を立てた。しかし、人が集まらなかった。周囲に生物系の研究室がない建物で、本当に単独で進めることになった。さきがけの領域会議の期間中、培養細胞の培地替えにも困っていた。このため、GFP とアクチン関連タンパクの融合蛋白質の発現解析は、マンパワーの面で無理が出てしまった。この点は深く反省している。

そこで、アポディゼーション位相差顕微鏡の試作を主体に進めることに、最終年度に戦略を換えた。この仕事は、私と大瀧氏の連携がうまく進み、他の人には真似の出来ないものになった。今後、この顕微鏡は、様々な分野で広く使われると期待されている。

自己評価としては、GFP-アクチン関連蛋白質の動態解析に関してはマイナス評価、アポディゼーション位相差顕微鏡の開発試作ではプラス評価と考えている。総合的には5段階評価で3と思う。

私は「認識と形成」という生物系の領域で、成長円錐が観察できる光学顕微鏡の開発という物理系の仕事を結果として報告した。計画通りに生物系の実験が進まなかった点は、言い訳できないと思う。今後、この研究を基礎として、成長円錐の運動のメカニズムに迫りたいと考えている。

#### 6 研究総括の見解:

光学顕微鏡を用いて神経細胞を生きのまま観察し成長円錐の運動機構を解明することを目的とした。GFP-アクチン関連タンパク質を neuroblastoma の成長円錐に発現させ、それを標識として成長円錐の運動を解析した。その過程でアポディゼーション位相差顕微鏡を企業(Nikon)との共同研究によって開発試作し、成長円錐内部の微細なアクチン繊維の網目構造を可視化することに成功した。初期計画は実質的には機器開発に変更されたが、その成果は非常に高く評価でき関連研究に対する貢献度も大きい。この機器開発の成功によって、当初の目的はいずれ達成されるものと期待する。

#### 7 主な論文など:

##### 原著論文

1) Yang B., Matsumura H, Katoh K, Kise H, Furusawa K.

Formation of multilayer particles comprised of silica vesicle / silica particles by heterocoagulation. *Langmuir* 17,p2283-2286. 2001

2) Yasuda S, Sugiura S, Kobayakawa N, Fujita H, Yamashita H, Katoh K, Saeki Y, Kaneko H, Suda Y, Nagai R, and Sugi H

A novel method to study contraction characteristics of a single cardiac myocyte using carbon fibers coupled with a feedback system.

*Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 281, p1442-1446, 2001

3) Yasuda S, Sugiura S, Yamashita H, Saeki Y, Momomura S, Katoh K, Nagai R Sugi H

Unloaded shortening increases peak of Ca<sup>2+</sup> transients but accelerates their decay in rat single cardiac myocytes.

*Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol* 285 p470-475. 2003

4) Matsuoka T, Katoh K, Hoshino N, Matsunaga T, Saito N, Suzuki K, Yamada M, Shimojo N, Kono Y, Arai T and Suzuki K.

Disorganization of actin polymerization in neutrophils of a patient with leukocyte adhesion dysfunction: A bioimaging analysis using a polarized microscopic system LC-polscope.

*Bioimages* 11 p105-114. 2003

## 著書

- 1) 加藤 薫 (2003)  
ナノバイオテクノロジーの最前線 (植田充美監修)  
「4.3 偏光顕微鏡等による細胞の観察」(分担執筆) p389 - 394
- 2) KATOH K., Yoshida F., Ishikawa R.: "Actin dynamics in neuronal growth cone revealed with a polarized light microscopy" .  
'Molecular and cellular aspects of muscle contraction' (H. Sugi 編集),  
Plenum Press (NY), p347-359, 2004
- 3) Seiryu Sugiura, So-ichiro Yasuda, Hiroshi Yamashita, Yasutake Saeki, Kaoru KATOH, Ryozo Nagai, Haruo Sugi (2003)  
"A novel method to measure force, displacement and Ca<sup>2+</sup> transients of a single cardiac myocyte."  
in 'Molecular and cellular aspects of muscle contraction' (H. Sugi ed) Plenum Press (NY)  
p381-388

## 総説

1. 加藤 薫, 山田雅弘 (2002)  
光学顕微鏡による成長円錐の運動の観察  
*Molecular Medicine 別冊 39巻* p210-220
2. 加藤 薫, 吉田史子 (2004)  
新しい偏光顕微鏡 (Pol-Scope) その原理と応用  
*生物物理* Vol. 44, p226-229
3. 加藤 薫, 大瀧達朗, 鈴木基弘 (2004)  
アポディゼーション位相差法による生体試料の可視化  
*生物物理* Vol 44, p260-264

## 招待講演(国際)

1. **Kaoru KATOH**, Fumiko Yoshida, Ryoki Ishikawa  
"Actin dynamics in neuronal growth cone revealed with a polarized light microscopy.----Difference and similarity between growth cones and muscles.----"  
The fourth Fujiwara Seminar "Molecular and Cellular Aspects of Muscle Contraction"  
(2002年10月) 箱根
2. Seiryu Sugiura, So-ichiro Yasuda, Hiroshi Yamashita, Yasutake Saeki, **Kaoru Katoh**, Ryozo Nagai, Haruo Sugi "A novel method to measure force, displacement and Ca<sup>2+</sup> transients of a single cardiac myocyte."  
The fourth Fujiwara Seminar "Molecular and Cellular Aspects of Muscle Contraction"  
(2002年10月) 箱根

## 招待講演(国内)

1. 杉浦清了, 保田壮一郎, 山下尋史, 三枝木泰丈, 加藤 薫, 杉 晴夫, 永井良三  
"心筋細胞の力学負荷に対する応答とその調節"  
第75回日本薬理学会年会 シンポジウム「メカニカルストレス応答による細胞機能制御 創薬と再生臓器開発への応用」(2002年3月13日) 熊本
2. 加藤 薫  
"神経成長円錐の形態から動きのメカニズムを探る"  
バイオレオロジー学会 (2002年6月) 信州大学  
(第25回日本バイオレオロジー学会年会 プログラム・抄録集 p44)

3. **加藤 薫**,吉田史子

"新しい偏光顕微鏡と蛍光法の組み合わせによる成長円錐の観察"

浜松医科大学 メディカルホトニクスコース (2002年7月)浜松

4. 大瀧達朗, **加藤 薫**, 吉田史子

「光学顕微鏡における位相物体観察法」

日本顕微鏡学会 第47回シンポジウム「顕微鏡法の限界とそのブレイクスルーを目指して」

(2002年11月) 仙台

5. **加藤 薫**, 吉田史子, 山田亨

「液晶偏光顕微鏡法の新展開 - 偏光等を用いた数十 nm 物体の検出 -」

日本顕微鏡学会 第47回シンポジウム「顕微鏡法の限界とそのブレイクスルーを目指して」

(2002年11月) 仙台

6. **加藤 薫** (2003.2)

「光学顕微鏡による生細胞のナノオーダーの計測」

公開シンポジウム「バイオイメージングとナノテクノロジー」(2003年2月)東京

7. **Kaoru KATOH**

「Direct Observation and Analysis of Actin Bundle Dynamics in Neuronal Growth Cones」

システム神経科学スプリングスクール(2003年3月) 奈良先端大

8. **加藤 薫**

「光学顕微鏡で生細胞のナノオーダーの現象をみる」

岡山県医用工学研究会 シンポジウム(2003年3月) 岡山

9. 石川良樹, **加藤 薫**, 小浜一弘

「Actin dynamics in filopodia: Possible roles of actin-binding proteins」

第26回日本神経科学大会(2003年7月) 名古屋

10. **加藤 薫**, 吉田史子, 萩原妙子, 古川孔基, 山田雅弘

「マイクロスコープ(光学顕微鏡)でナノメートルオーダーの試料をとらえる」

日本機械学会, オrganizedセッション(2003年8月) 徳島

11. **加藤 薫**, 吉田史子, 石川良樹

「Dynamics of actin filaments and actin associate proteins revealed by polarized light and fluorescence microscopy」

第46回日本神経化学学会年会シンポジウム(2003年9月)新潟

12. **加藤 薫**

「偏光顕微鏡による観察」

第2回細胞生物学ワークショップ(2003年11月) 北海道大学

13. 大瀧達朗, **加藤 薫**, 鈴木基弘

「アポディゼーション位相差顕微鏡の生細胞への適用」

(日本光学会, 光設計 優秀賞 受賞講演) OpticsJapan, (2004年11月) 大阪

14. **加藤 薫**

「新型偏光顕微鏡や, アポダイズド位相差顕微鏡による神経成長円錐の運動の可視化・動態解析」

バイオメディカル光科学研究会(2004年11月) 静岡県立大学

15. **加藤 薫**

「新型偏光顕微鏡や, アポダイズド位相差顕微鏡による神経細胞の可視化・動態解析」

第4回細胞生物学ワークショップ(2004年11月) 北海道大学

16. **加藤 薫**, 大瀧達朗

「アポディゼーション位相差法による生細胞の内部構造の動態観察とその利点」

生物物理学学会 ランチョンセミナー(2004年12月) 京都

**口頭発表(一般) 11件**

**特許**

- 1) 加藤 薫, 岡本治正, 金子浩子, 須田吉久, 山田邦生  
細胞培養観察方法, 細胞培養観察用基板, およびその製造方法(2005年2月21日出願)

**受賞**

- 1) バイオイメージング学会 ベストイメージ賞(ニコン賞) 2003年11月
- 2) 日本光学会 光設計優秀賞 2004年11月  
(大瀧, 加藤, 鈴木の3名での受賞)



## 研究課題別評価

1 研究課題名:胎児形成における DNA 複製酵素系の制御機構

2 研究者氏名:桑原一彦

3 研究の狙い:

臓器形成においては未分化な前駆細胞がまず増殖によってその細胞数を増加させて、臓器を形成する上で十分な規模に達した後、分裂をとめて機能的細胞へと分化させるものと考えうる。このモデルは神経細胞の分化による大脳層構造の形成や各種感覚器官の形成、血液幹細胞からの血液細胞の形成の進行を説明しうるものである。本研究でテーマとする GANP はリンパ細胞の抗原刺激で増殖をして分化するプロセスで発現上昇する分子であるが、RNA プライマーゼ活性を有しており、また DNA 複製に必須な Minichromosome Maintenance protein の MCM3 と結合することから、分裂期の DNA 複製と様々な遺伝子ストレスに対して遺伝子を保護・修復する機能を有する分子であると仮説している。これまでの研究成果は GANP が特に、臓器形成のごく初期に必要なことを示している。遺伝子欠損マウスを作製したところ、ホモ欠損マウスは胎生致死で、その大脳新皮質では未分化神経細胞の増殖と分化の統御が乱れていた。RNA プライマーゼ GANP は MCM3 と結合することより、DNA 複製の制御を通して細胞の増殖、分化を調節しているものと考え、胎児形成、特に大脳皮質形成における GANP の機能解析を通して、細胞増殖のオン・オフから分化へのスイッチの機構を明らかにすることを目指している。

4 研究成果:

I) GANP プライマーゼドメインの構造解析

GANP 分子を蛋白質として純化し、結晶解析による機能モジュールを決定することを目指し、数々の機能蛋白質の結晶化に成功している熊本大学大学院医学薬学研究部の山懸ゆり子教授と様々なアプローチを試みた。核内蛋白質に共通の性質として DNA と強力に結合する性質を有している、全体は 210-kDa で精製が容易でない、金属に結合する性質を有する、など多くの問題があり容易ではなかったが、RNA プライマーゼ領域のみのリコンビナントの作製をして、金属フリーカラムを用いて高度精製することができた。しかし、まだ精製リコンビナントの結晶化の至適条件を広範に解析していく必要がある。これと並行して進めているアプローチとして GANP 蛋白質の純化において結合している分子を解析した。TAP ベクターによって 293T 細胞に強制発現した GANP 分子と結合する蛋白質を明らかにする方法から、これまで少なくとも3カ所の GANP の領域が機能ドメインとして結合する蛋白質 (MCM3、G5PR、その他新規分子2種類)を示している。これらの解析は GANP の有する分子機能を明らかにする上で有力な情報を与えている。

II) 神経特異的 GANP 欠損マウスの作製及び解析

GANP ホモ欠損胎仔の大脳新皮質で神経細胞の増殖と分化の統御が乱れていることから、少なくとも初期の脳形成に必須であることが明らかになっている。次に、果たして GANP は脳神経細胞の初期分化において特異的に機能するのかそれとも成熟の後にも機能して大脳層構造の形成に影響するのか疑問として残る。GANP ホモ欠損胎仔は胎生 12 日までで全例死亡するため、コンディショナル GANP 欠損マウスを作製し、Synapsin 1-Cre マウスと交配して神経特異的 GANP 欠損マウスを得た。このマウスは正常に生まれ、胎生 16 日の大脳層構造には特に異常を認めなかった。大脳層構造形成で異常を認めない理由として、Synapsin 1 の発現時期で GANP を欠損させても大脳の未分化

神経上皮ではそれほど効果がないことが考えられた。すなわち、脳神経細胞の前駆細胞が増殖してその増殖期から細胞分化を行う過程では必須な機能であるが、単なる細胞増殖の時期や、分化した後の臓器形成においては主とした役割を行っていないものと考えられた。一方、小脳ではプルキンエ細胞の高度脱落が認められた。行動解析でも異常を認めたことから、GANPは胎生16日頃の小脳の機能に関わる分化ステージで必要なことが明らかになった。これらの解析から、GANP分子の作用点は特に細胞の分裂増殖から分化の盛んな時期の細胞であることが示唆され、本研究の狙いである細胞の増殖から分化へのまさにその時点で機能していることを裏付けたものと考えている。現在、このことをさらに実証する為に、分化発達のより早期でのGANP欠損をおこす nestin-Cre マウスとの交配したマウスの解析を行っている。

### III) GANP に結合する機能分子群の同定

GANPの機能を明らかにする目的で結合分子の同定を酵母ツーハイブリッド法とプロテオミクスによって行った。プロテインホスファターゼ制御因子 G5PR と機能未知の分子 THP-1 を同定することができ、それぞれのコンディショナル遺伝子欠損マウスの作製も行った。Synapsin 1-Cre マウスとの交配により神経特異的遺伝子欠損マウスを作製した。これまでのところコントロールマウスと比べて臓器形成上は特に異常は認めていないが、G5PR欠損を免疫系のBリンパ細胞で欠損すると、抗原刺激に対して細胞死の感受性が上昇することから、GANP/G5PRの分子複合の機能は臓器形成における刺激伝達の標的となっていることが示唆された。このことは細胞の増殖のオン・オフから分化という観点から極めて重要なことであると思われるので、新しい研究展開を進める必要がある。

### IV) GANP の機能ドメインの解析

GANPの中央部分600アミノ酸は酵母相同分子 Sac3 と23%の相同性がある。本研究でこの Sac3 相同領域の機能解析を進めた。Sac3 相同領域のみを有する新規分子 SHD1 を同定してその発現及び機能を調べた。SHD1は特に中心体や紡錘体に局在が限局していて、SHD1をsiRNAで発現低下させると、中心体複製が起こらず単一の状態で染色体分配に入るため、微小核を多数形成する異常を起こす。また過剰発現すると中心体の分配が多極になることから染色体のaneuploidyを生じた。このloss-of-functionとgain-of-functionの結果からSHD1が中心体複製や染色体分配に重要であることを明らかにした。Sac3 相同領域が細胞周期、特にM期制御に関与することより、GANPが臓器形成に必要なのはこの細胞周期を調節する機能を有することによるものと考えられた。

### V) GANP の遺伝子組換えにおける役割

2003年にAguileraらによりSac3欠損酵母がhyperrecombinationを呈することが示された。哺乳動物のGANPは酵母のSac3の領域以外にRNAプライマーゼ領域とMCM3結合領域を共に有するより複雑な機能に関わる分子であると考えられる。GANPのDNA hyperrecombinationに及ぼす影響を見ることは哺乳動物の臓器形成時の生じるDNA損傷をどのように保護・修復しているかを明らかにするためには避けられない。そこで、GANPの遺伝子組換えに及ぼす影響を明らかにするためIntra-chromosomal及びExtra-chromosomal assayを用いた。興味あることに両アッセイによってGANPが遺伝子組換えに対して積極的に制御する機能を有している。GANPのSac3の領域、RNAプライマーゼ領域とMCM3結合領域のすべてが存在することによって遺伝子の相同組み替えを抑制することが示された。さらにこの組換え制御の作用点はDNAの二重鎖切断後であることが明らかとなった。

## 5 自己評価:

本研究では、GANPがRNAプライマーゼ活性を持つこと、DNA複製に必須の分子MCM3と結合することの二点から、GANPが胎児形成におけるDNA複製に関与するというを前提条件として研究

計画を組み立てた。さらにこの DNA 複製異常が GANP ホモ欠損胎仔の脳新皮質形成障害に影響を与えると予測して研究を開始した。(1) GANP の $\beta$ プライマーゼ領域は哺乳動物に特有の機能分子であることからその構造決定によって、これまで知られている $\alpha$ プライマーゼとの相違を知ることができる有力な手段と考えて研究を進めたが、この分子の結晶化は容易ではなかった。しかし、この過程で蛋白質純化が進み、それと結合する機能分子を明らかにすることができた。プロテオミクス解析を連動させ、現在4種類の結合分子の機能との関連を解析している。GANP 分子は細胞内で DNA 複製の制御分子であることをほぼ明らかにしたが、その際に細胞外からの信号が DNA 複製、修復に至る信号伝達経路に関しての機能分子 G5PR の同定に至っている。この成果は臓器形成に関わる細胞外信号の解析へと展開していくものとしての起点となりうるものと考えている。

蛋白質結晶化の試み以外では大きな進展があったと言える。(2) 2種類の GANP 欠損マウスの解析から GANP の機能は神経細胞の増殖から分化の時期に関わっていることが明らかになった。これらの成果と nestin-Cre マウスの成果を集積して発表する。(3) 結合分子、関連分子の解析は GANP 分子が細胞の分裂において必要であることを示した。一部既に論文発表を行ったが、さらに遺伝子欠損マウスの解析結果を報告する。(4) GANP が DNA 組換えを抑制する効果を持つということを見いだした。酵母の $\alpha$ プライマーゼでは、DNA 複製だけでなく DNA 修復にも関与すると報告されており、GANP が DNA 修復系に関わる遺伝子組換えの制御を抑制するという結果は、RNA プライマーゼとしての本来の機能とかけ離れたものではないと考えている。GANP が細胞生物学的に極めて重要な役割を果たすことを明確に示すことができた。この成果に関して発表を計画している。今後 GANP の臓器形成における機能をさらに解析していきたい。

## 6 研究総括の見解:

胎児形成期における DNA 複製に関与すると想定した GANP の機能を、ことに大脳皮質の形成に注目して解析した。Conditional Knock Out マウスを作成してその解析を進め、分裂増殖から分化にかけての盛んな DNA 複製に GANP が深く関わっていることを明らかにした。さらに、この分子が DNA 組換えの制御をも担っていることを明らかにした。「分化のスイッチ機構」にまで研究が及ばなかったとはいえ、本研究の成果は胎児形成における増殖と分化の制御機構を解明する上で、基本的に重要であると評価でき、今後の飛躍的展開が十分期待できる。

## 7 主な論文等:

### 主な論文:

1. Kono Y., Maeda K., Kuwahara K., Yamamoto H., Miyamoto E., Yonezawa K., Takagi K. & Sakaguchi N. MCM3-binding GANP DNA-primase is associated with a novel phosphatase component G5PR. *Genes Cells* 7:821-834 (2002).
2. Sakaguchi N., Fujimura S. & Kuwahara K. Involvement of GANP in B cell activation in T cell-dependent antigen response. *Dev. Immunol.* 9:169-172 (2002).
3. Fujimura S., Kuwahara K., Ezaki T., Tomita K., Hirose S. & Sakaguchi N. Spontaneous increase of plasma-like cells with high GANP expression in the extrafollicular region of lymphoid organs of autoimmune-prone mice. *J. Autoimmun.* 20:291-301 (2003)
4. Kuwahara K., Fujimura S., Takahashi Y., Nakagata N., Takemori T., Aizawa S. & Sakaguchi N. GANP contributes to affinity maturation of B cell antigen receptor during T cell-dependent responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:1010-1015 (2004).
5. Mirnics Z.K., Caudell E., Gao Y., Kuwahara K., Sakaguchi N., Kurosaki T., Burnside J., Mirnics

- K. & Corey S.J. Microarray analysis of Lyn-deficient B cells reveals germinal center-associated nuclear protein and other genes associated with the lymphoid germinal center. *J. Immunol.* 172:4133-4141 (2004).
6. Khuda S.E., Yoshida M., Xing Y., Shimasaki T., Takeya M., Kuwahara K. & Sakaguchi N. The Sac3-homologue shd1 is involved in mitotic progression in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 279:46182-46190 (2004).
  7. Sakaguchi N., Kimura T., Matsushita S., Fujimura S., Shibata J., Araki M., Sakamoto T., Minoda C. & Kuwahara K. Generation of high-affinity antibody against T cell-dependent antigen in ganp gene-transgenic mouse. *J. Immunol.* 174:4485-4495 (2005)
  8. Fujimura S., Xing Y., Takeya M., Yamashita Y., Ohshima K., Kuwahara K. & Sakaguchi N. Increased expression of GANP RNA-primase is associated with lymphomagenesis. *Cancer Res.* in press (2005)

#### 総説

1. 桑原一彦、阪口薫雄: 胚中心関連分子 GANP の B 細胞活性化における役割、蛋白質核酸酵素 47 巻 16 号 p2300-2305 (2002)

#### 口頭発表

1. 桑原一彦: 胚中心と B リンパ球分化ルート、第 107 回日本解剖学会総会(浜松)、2002 年 3 月(招待講演)
2. 桑原一彦、阪口薫雄: DNA プライマーゼ GANP と DNA 複製因子 MCM3 の細胞質 核間輸送における機能、第 61 回 日本癌学会総会(東京)、2002 年 10 月
3. 桑原一彦、藤村睦、高橋宜聖、竹森利忠、阪口薫雄: B 細胞特異的 GANP 欠損マウスにおける B 細胞分化異常、第 32 回日本免疫学会学術集会(東京)、2002 年 12 月
4. 桑原一彦、阪口薫雄: 胎仔期における DNA プライマーゼ GANP の発現と機能、日本発生生物学会第 36 回大会(札幌)、2003 年 6 月
5. 桑原一彦、藤村睦、大島孝一、阪口薫雄: 胚中心発現 GANP 分子のリンパ腫形成における evidence、第 62 回 日本癌学会総会(名古屋)、2003 年 10 月
6. 桑原一彦、藤村睦、大島孝一、阪口薫雄: 持続的 GANP 発現異常はリンパ腫誘導因子となる、第 63 回日本癌学会総会(福岡)、2004 年 10 月
7. Kuwahara K., Fujimura S., Xing Y. & Sakaguchi N. Transgenic expression of GANP caused lymphomagenesis. 12<sup>th</sup> International Congress of Immunology (Montreal) July, 2004

## 研究課題別評価

1 研究課題名: 初期発生における母性 RNA の時空間的制御機構

2 研究者氏名: 中村 輝

3 研究の狙い:

動物の初期胚発生は、しばしば卵内に局在している母性 RNA によって制御されている。このような RNA は、局在した領域でのみ翻訳されることにより細胞内非対称性を作り出す。ショウジョウバエ胚の腹部・生殖細胞形成には、胚後極に形成される生殖質と呼ばれる特殊な細胞質領域が重要である。生殖質の形成は、母性因子 *oskar* によって指揮される。卵形成過程において *oskar* mRNA は、卵母細胞後極に局在した後タンパク質へと翻訳される。そして、そこに腹部形成と生殖細胞形成に関わる様々な母性 RNA・タンパク質が集合して生殖質が形成される。*oskar* の機能を失った突然変異体、あるいは *oskar* mRNA が卵母細胞後極へ局在しない突然変異体から生まれた卵では、生殖細胞も腹部領域も形成されず致死となる。一方、遺伝学的操作により、*oskar* mRNA を前極に局在させた胚においては、前極にも生殖細胞が形成されると共に、腹部を前半部にも持つ双腹胚へと発生する。以上の知見は、*oskar* の活性を後極に限局することが正常な胚発生に必須であることを示している。しかし、*oskar* mRNA の局在だけでは *oskar* の活性を卵母細胞後極に限局するには不十分であり、局在していない mRNA の厳密な翻訳抑制と局在した領域でのみ翻訳抑制を解除する機構が必須である。すなわち、*oskar* mRNA 局在と翻訳制御は互いに連携した制御を受けている。このような過程には、*oskar* mRNA に結合し、RNP 複合体を形成するタンパク質が重要である。しかし、その分子機構については良くわかっていない。

私は、ショウジョウバエ母性 RNP 複合体を構成する主要タンパク質の1つとして RNA 結合タンパク質 Me31B を同定し、Me31B が *oskar* mRNA の輸送過程におけるマスキングに関わっていることを明らかにしてきた。さらに、Me31B 複合体中には、*oskar* mRNA の輸送に関わることが報告されている Exu タンパク質が存在している。以上の知見から Me31B 複合体は、*oskar* をはじめとする母性 RNA の輸送・局在化と翻訳を連携して制御する場として機能していると考えに至った。興味深いことに Me31B のホモログは、多くの動物において母性 RNP 複合体の主要構成タンパク質であることが報告されている。本研究では、機能的にも構成因子の点でも進化的に保存されていることが予想される母性 RNA の時空間的制御機構の解明を目指して、Me31B 複合体を構成する新規タンパク質の単離同定とそれらの分子機能の解析を行った。

4 研究成果:

(1) 母性 RNP 複合体を構成する新規タンパク質の単離・同定

抗 Me31B 抗体を用いた免疫沈降によって Me31B 複合体を精製し、共沈したタンパク質を SDS-PAGE で分離後、質量分析法によって同定を行った。その結果、mRNA の 5'キャップに結合する翻訳開始因子 eIF4E と、機能未知のタンパク質であった Cup を同定した。次に、Cup, eIF4E 両タンパク質に対する特異的抗体を作成し、ショウジョウバエ卵巣を染色した。その結果、Cup, eIF4E は共に Me31B と共局在していることを明らかにした。卵巣ライゼートを用いた免疫沈降実験によって、Me31B は、eIF4E, Cup と RNA 依存的に会合していること、一方、eIF4E-Cup 間の会合は RNase 耐性であることを見いだした。さらに、GST pull-down 法によって eIF4E と Cup とは *in vitro* において直接結合することを明らかにした。

(2) eIF4E-Cup 相互作用の解析

Cup はショウジョウバエ特異的な遺伝子で、他生物における明確なホモログの存在は確認できなかった。しかし、Cup の1次配列を慎重に検討した結果、eIF4G や 4EBP など既知の eIF4E 結合タンパク質に見いだされている eIF4E 結合のコンセンサス配列 (YxxxxL ; は疎水性アミノ酸を示す) が存在する事が明らかとなった。そこで、コンセンサス配列中のアミノ酸残基を Ala に置換した Cup タンパク質を作製し、eIF4E との結合能を GST pull-down 法によって検討した。その結果、この配列は、Cup

タンパク質においても eIF4E との結合に重要であることを明らかにした。さらに、哺乳類 eIF4E の X 線構造解析から、YxxxxL 配列と直接相互作用することが判明している eIF4E 上の Trp 残基を Ala に置換した変異 eIF4E は、Cup タンパク質との結合能を失った。以上の結果から、Cup は eIF4G や 4E-BP と同様のモードで eIF4E に結合すると考えられた。このことは逆に、Cup は、eIF4E-eIF4G の結合を競合的に阻害する活性を持っていると考えられた。

(3) Cup は *oskar* mRNA の翻訳抑制に関わる新規因子である。

eIF4E-eIF4G 間の結合は、5'キャップ依存的な翻訳開始に必須であることから、Cup は翻訳抑制因子として機能している可能性が考えられた。*oskar* mRNA の翻訳制御に対する Cup の役割について検討するため、P 因子が *cup* 遺伝子の 5' 非翻訳領域 (5' UTR) に挿入された系統を用いて新規 *cup* 突然変異体の作成を行った。その結果、eIF4E 結合領域を含む N 末端側約 1/3 の領域が欠失した *cup* 突然変異体 (*cup*<sup>212</sup>) を単離した。Cup<sup>212</sup> タンパク質が eIF4E と *in vivo* において会合しないことを卵巣ライゼートに対する免疫沈降法により確認した。次に、*cup*<sup>212</sup> 卵巣に対して抗 Oskar 抗体による免疫染色した結果、Oskar タンパク質が本来翻訳抑制を受けている卵形成初期から発現していることを見いだした。一方、*cup*<sup>212</sup> 突然変異体においても *oskar* mRNA は、野性型と同様に卵形成中期以降、卵母細胞後極に局在化した。また、RNA の輸送・局在化に重要な卵母細胞内の微小管極性に関しても異常は認められなかった。以上の結果から、*cup*<sup>212</sup> 突然変異体は、*oskar* mRNA の翻訳抑制が特異的に異常となっていると考えられた。

(4) Cup は *oskar* 3'UTR 結合タンパク質である Bruno と会合する。

Cup-eIF4E 相互作用による翻訳抑制が、どの様にして *oskar* mRNA に対する特異性を決定しているのかを明らかにする目的で、Cup タンパク質をベイトに用いた酵母 two-hybrid スクリーニングを行った。その結果、RNA 結合タンパク質である Bruno が、Cup 結合タンパク質の候補の 1 つとして単離された。Cup、Bruno の各種欠失変異体を作成し酵母 two-hybrid 法を用いて検討した結果、Cup-Bruno 相互作用には、Cup の eIF4E 結合領域も Bruno の RNA 結合ドメインも必要ないことを明らかにした。さらに、卵巣ライゼートを用いた免疫沈降実験により、Cup-eIF4E 複合体は、RNA 非依存的に Bruno と会合していることを明らかにした。すなわち、Cup は、*in vivo* においても Bruno と会合していると考えられた。Bruno は、*oskar* mRNA の 3'UTR に特異的に結合し、*oskar* mRNA の翻訳抑制に関与することが知られていた因子である。しかし、Bruno がどの様にして *oskar* mRNA の翻訳を特異的に抑制しているのかについては全くわかっていなかった。

今回得られた知見を総合すると、Cup タンパク質は、eIF4E-eIF4G の結合を阻害する活性を持った新規翻訳抑制因子であり、Cup の *oskar* mRNA に対する特異性は、*oskar* mRNA の 3' UTR に結合する Bruno タンパク質との会合により獲得されていると考えられた。興味深いことに、ツメガエル卵母細胞における *cyclinB1* mRNA もまた、5'末端と 3' UTR との相互作用を介した翻訳抑制を受けていることが報告されている。従って、このような翻訳抑制機構は、生物種間を超えて保存された分子機構であると推定される。さらに近年、mRNA の輸送・局在化と翻訳の制御が、卵形成や初期胚発生ばかりでなく、体細胞分化や神経細胞の可塑性にも重要であることがわかってきている。本研究で明らかとなった特定の mRNA 種を認識してその翻訳を特異的に制御する分子機構は、記憶・学習といった未解明の問題に対しても重要なヒントを提供すると期待される。

## 5 自己評価:

本研究をまとめた論文は、著名雑誌のニュースコーナーやすでに複数のレビューで取り上げられており、インパクトのある知見と評価されていると思われる。論文内容の一部が海外の複数のグループと重複したため論文発表に関して激しい競争となってしまったが、最終的には同時期に発表することができた。さきがけ研究のサポートにより、研究の初期段階で質量分析法によるタンパク質同定が行えたことと、研究総括、領域アドバイザー、研究者の方々とフォーメーション・インフォーマルな場でのディスカッションを通して、論理的なストーリーを組み立てることができたことが大きかったと感謝している。今後も、さきがけ研究を通じて知り合った研究者との交流を継続して、新たな研究手法や個人的なアプローチについて積極的に学んでいきたいと考えている。一方、当初の目標であった mRNA 輸送

と翻訳とを連携して制御する分子機構の解明」については果たすことはできなかった。3年間の個人研究としては大風呂敷を広げすぎた目標であったと感じている。しかし、本研究を通していくつかの新しいアイデアを得ることができたので、それら1つ1つについて今後検証を進めていきたい。

#### 6 研究総括の見解:

個体発生の初期過程での母性 RNA の翻訳制御機構の解明に迫る期待通りの成果を収めた。研究会等で指摘された助言や示唆等を積極的に自己の研究に取り入れ、問題点を着実に克服した。当初の目的の一つである mRNA 輸送と翻訳との連関制御のしくみの解明が今後の発展として大いに期待できると共に、若手研究者としての活躍をも大いに期待させる。

#### 7 主な論文等:

##### 原著論文

1. Nakamura, A., Sato, K., and Hanyu-Nakamura, K. (2004). *Drosophila* Cup is an eIF4E binding protein that associates with Bruno and regulates *oskar* mRNA translation in oogenesis. *Developmental Cell* 6, 69-78.

##### 総説

1. 矢野環, 中村輝(2004). ショウジョウバエ母性 RNA の時空間的制御を支配する RNP 複合体. *実験医学* 22, 2556-2562.
2. 中村 輝, 小林 悟(2002) 母性因子によって制御される生殖系列の形成機構. *生物のボディプラン: バイオサイエンスの新世紀* 第 10 巻(上野直人, 黒岩 厚編), 共立出版 pp134-153.

##### 口頭発表

1. Nakamura, A., Sato, K., and Hanyu-Nakamura, K. Cup binds to eIF4E and regulates *oskar* mRNA translation in *Drosophila* oogenesis. FASEB Summer Research Conference on Intracellular RNA Sorting, Transport and Localization. Snowmass, Colorado, USA (2003.7.21-26).
2. Nakamura, A., Sato, K., and Hanyu-Nakamura, K. *Drosophila* Cup is an eIF4E-binding protein that associates with Bruno and regulates *oskar* mRNA translation in oogenesis. RNA 2003 Kyoto: The New Frontier of RNA Science, Kyoto International Conference Hall (2003.11.24-27).

そのほか国際学会ポスター発表 2 件, 国内学会口頭発表 4 件, ポスター発表 1 件.

##### 招待講演

1. 関西学院大学理工学部セミナー, 三田, 兵庫 (2003.2.24)
2. 徳島大学ゲノム機能研究センターセミナー, 徳島, 徳島 (2003.3.10)
3. 日本学術振興会 JSPS Colloquium on RNA Biology, Uppsala, Sweden (2004.7.15)
4. 遺伝学研究所バイオリジカルシンポジウムセミナー, 三島, 静岡 (2004.10.7)
5. アリゾナ大学 Department of Molecular and Cellular Biology セミナー, Tucson, Arizona, USA (2004.10.19)

## 研究課題別評価

1 研究課題名: 遺伝子機能によるテントウムシ斑紋のパターン形成機構

2 研究者氏名: 新美輝幸

3 研究の狙い:

自然に生じた遺伝的に異なる前翅の斑紋多型が存在するナミテントウは、進化の過程でもたらされた遺伝子上の変化がどのように形態・紋様の多様性を引き起こしたのかを研究するよいモデルとなる。約90年前から行われてきた遺伝学的交配実験により、ナミテントウの多様な斑紋は、主要な4種の斑紋の組み合わせ、すなわち親から由来する任意の2種の斑紋の重ね合わせにより生じ、黒色と赤色が重なった領域では、黒色が優性として現れることが明らかにされている。さらに斑紋型のヘテロ接合体どうしを交配した次世代ではメンデルの法則に従って斑紋型が分離することから、斑紋の多型は同一遺伝子座の複対立遺伝子によりもたらされると考えられている。しかしながら、斑紋がどのような機構で形成されるかは全く不明である。本研究では、ナミテントウ斑紋のパターン形成機構を分子レベルで明らかにするため、斑紋の形成過程を明らかにし、遺伝子機能解析を行うことにより斑紋のパターン形成に関与する遺伝子を同定することを試みた。さらに遺伝子の機能解析を行うことにより、斑紋多型の要因となる遺伝子上の変化を特定し、斑紋の多様性をもたらした進化メカニズムの一端の解明につなげることを目標とする。

4 研究成果:

1) 斑紋形成メカニズム

斑紋色素の発現過程を解析した結果、ヘテロ接合体において黒色と赤色が重なる領域において黒色が優性として現れるのは、黒色が赤色を隠蔽するからではなく、黒色領域と赤色領域は互いに重ならないように制御されていること、さらに翅を形成する背側の細胞ではメラニン形成、腹側の細胞ではカロテノイドの着色が生じることが判明した。したがって、背腹細胞の相互作用を通して斑紋が形成される可能性が示唆され、チョウの紋様形成とは異なるこれまでに報告例のない新規のメカニズムによりナミテントウの斑紋が形成されると考えられる。

2) 候補遺伝子の発現解析

様々な抗体を用いて免疫染色を行った結果、完全変態昆虫の中で原始的な鞘翅目昆虫に属するナミテントウにおいても、ショウジョウバエ翅パターン形成因子の局在は翅形成の初期段階ではよく保存されていることが明らかとなった。

また、ショウジョウバエの翅脈形成に関与する遺伝子の発現はナミテントウの前翅原基の全体にわたって観察された。したがって、鞘翅目昆虫が獲得した新奇形態である翅全体が硬化した前翅(鞘翅)は、翅脈形成過程に生じた変化に起因し、翅脈が翅全体に広がって生じた可能性が示唆された。この知見は鞘翅目昆虫の進化を考える上で大変興味深く、この問題の解決の糸口となることが期待される。

3) Larval RNAi 法による遺伝子機能解析

初期胚への二本鎖 RNA のマイクロインジェクションによる RNAi 法では、RNAi の効果は長期間持続しないため、後胚発生期の遺伝子機能阻害は困難であった。そこでまず、ナミテントウを用いて後胚発生期の遺伝子機能阻害に有効な幼虫への二本鎖 RNA のインジェクションによる larval RNAi 法を確立した。次に、斑紋形成過程で機能する遺伝子を同定するため、ナミテントウからクローニングした12種類の遺伝子について Larval RNAi 法を行ったところ、斑紋に変化が生じたものを少なくとも2種類同定できた。これら2種の遺伝子についてはさらに解析を進め、斑紋形成過程での役割を明らかにしていきたい。



ナミテントウにおいて確立した larval RNAi 法は、他の非モデル昆虫に応用することにより、これまで遺伝子の機能解析が困難であった後胚発生期の現象解明への有効な方法となることが期待される。

#### 4) トランスジェニックナミテントウを用いた遺伝子機能解析

厳密な遺伝子の機能解析には形質転換体の利用は不可欠である。そこで、様々な昆虫において形質転換体の作出に有効な *piggyBac* ベクターを用い、多彩な遺伝子機能解析を行うため独自に工夫したベクターを開発し、以下の解析を行った。

異所的発現系には、テトラサイクリン的人為的な投与により発現の時期特異的な調節が可能なテトラサイクリン OFF システムを行うための *piggyBac* ベクターを作製した。まず、ショウジョウバエを用いてこれらベクターの有効性を確認した。次にこれらベクターを導入したトランスジェニックナミテントウを作出した。現在最適化の条件を検討中である。

遺伝子の機能解析を効率よく行うため、レポーターアッセイと異所的発現の両方に有効な、転写活性化能(テトラサイクリン制御性転写活性化因子、tTA)とレポーター能(GFP)を兼ね備えた融合タンパク質(tTA::GFP)の作製に成功した。

ゲノム中のエンハンサーの同定に有効なエンハンサートラップ法を行う基盤をナミテントウを用いて確立した。斑紋形成に関連した発現パターンを示す遺伝子を同定するためには、多くのエンハンサートラップシステムをスクリーニングする必要がある。キイロショウジョウバエでは、ジャンプスターターとミュテーターとの交配により多くの挿入変異系統が得られるジャンプスタート法が確立されている。ナミテントウにおいてジャンプスタート法を行うためには、*piggyBac* の転移酵素遺伝子が不動化したジャンプスターター因子がゲノム中に安定して維持されることが必要不可欠である。そこで、単一の *piggyBac* ベクターのみを用いてジャンプスタート法に必要なジャンプスターターとミュテーター(エンハンサートラップシステム)を同時に作出することができる画期的な新しい方法をトランスジェニックナミテントウを用いて開発した。これらのシステムを使用して、ナミテントウにおいてジャンプスタート法を行った結果、非常に高い効率で新規転移個体が得られることが判明した。さらに、計画では予定していなかった副次的な成果として、上記ベクターがナミテントウゲノムに挿入した系統の中で、8 世代にわたり雄のみしか得られない系統が見いだされた。この系統は、ナミテントウの性決定機構または雌の生存に必須の遺伝子を探る上で重要な手掛かりとなることが期待されるだけでなく、害虫管理技術の観点からも大変興味深い。今後は、tTA::GFP をレポーターにもつエンハンサートラップシステムを多数スクリーニングして、斑紋に関連する発現や異所的発現に利用可能な翅原基で発現を示すシステムのスクリーニングを行う。

本研究で開発した遺伝子機能解析系は汎用性が高く他の昆虫にも応用可能であり、未開の生物資源である昆虫的人為的な改変を容易にし、新規の昆虫機能利用法や害虫防除法への発展が期待される。

#### 5 自己評価:

本研究により、これまで全く不明であったナミテントウの斑紋形成機構の一端を明らかにすることができたことに加え、今後の研究の発展に必要な遺伝子機能解析系を大きく進展させることができた。なかでも、ナミテントウという非モデル昆虫を用いて、これまで不可能と考えられていたジャンプスターターの新規作出法を提案できたのは予想外の成果であった。

しかしながら反省すべき点も多々あった。作製したコンストラクトを導入したトランスジェニックナミテントウを確実に作出することは問題なく遂行できたが、予想以上に時間がかかってしまった。また一番の反省点は、論文の纏め方にあり、完成度が高くインパクトのある論文を目指したため、論文発表が遅れてしまったことにある。現在投稿準備中の論文は早期に完成させ、さらに次の論文では纏めるためのデータを早急に追加し、今後速やかに本研究成果のすべてを発表する予定である。

今後、最終目標を達成させるべく研究を継続し、本研究で得られた成果をもとにさらなる発展へと繋いでいきたい。

## 6 研究総括の見解:

テントウムシの斑紋パターンの形成機構を明らかにすることを目的とするユニークな研究である。遺伝子導入等の解析系を確立すると共に、今後の研究の展開に有用なトランスジェニック・テントウムシの作出にも成功し、斑紋形成機構の一端を明らかにした。しかし、方法論の確立に時間を要し研究の進捗は必ずしも良好とは言い難く、今後、確立された遺伝子機能解析系を活用しての研究展開を大いに期待したい。

## 7 主な論文等:

### 主な論文

1. Niimi, T., Kuwayama, H. and Yaginuma, T. (2005) Larval RNAi applied to the analysis of postembryonic development in the ladybird beetle, *Harmonia axyridis*. *J. Insect Biotechnol. Sericol.* **74** (in press)
2. Niimi, T., Kuwayama, H. and Yaginuma, T. A single versatile vector for genome-wide functional analyses. (submitted)
3. 新美輝幸・桑山久史・柳沼利信 (2003) ナミテントウの RNAi プロトコル. *細胞工学* **22**, 80-85.

### 口頭発表

1. 桑山久史・柳沼利信・新美輝幸: *piggyBac* ジャンプスターター因子を導入した形質転換ナミテントウの作出. 日本蚕糸学会中部支部第 58 回・東海支部第 54 回発表会ならびに特別講演会、名古屋、2002 年 11 月 15 日
2. Niimi, T., Kuwayama, H. and Yaginuma, T.: Generation of transgenic ladybird beetles for gene function analyses. Fourth International Workshop on Transgenesis and Genomics of Invertebrate organisms, California, USA, 2003 年 5 月 14 日
3. 新美輝幸・桑山久史・柳沼利信: ナミテントウにおける形質転換体作出法および RNAi 法の確立、第 39 回日本節足動物発生学会、潮来、2003 年 5 月 31 日
4. 新美輝幸・桑山久史・柳沼利信: ナミテントウにおける遺伝子機能解析系の確立. 日本発生生物学会第 36 回大会、札幌、2003 年 6 月 11 日
5. Niimi, T., Kuwayama, H. and Yaginuma, T.: Towards the establishment of gene function analysis systems in a nonmodel insect, ladybird beetle. ショウジョウバエ研究会第 6 回研究集会、東京、2003 年 7 月 30 日
6. 新美輝幸・桑山久史・柳沼利信: ナミテントウにおけるジャンプスタート法の確立. 日本蚕糸学会第 74 回大会 昆虫機能利用、盛岡、2004 年 3 月 30 日
7. 新美輝幸・桑山久史・柳沼利信: ナミテントウにおけるエンハンサートラップ法の試み. 日本発生生物学会第 37 回大会、名古屋、2004 年 6 月 6 日
8. 新美輝幸・桑山久史・柳沼利信: ナミテントウへの異所的発現系導入の試み. 第 40 回日本節足動物発生学会特別大会、菅平、2004 年 6 月 18 日

### 招待講演

1. 新美輝幸・桑山久史・柳沼利信: 形質転換ナミテントウを用いた遺伝子機能解析系の開発. 第 25 回日本分子生物学会年会ワークショップ「昆虫ゲノムの特異性と多様性」、横浜、2002 年 12 月 12 日
2. 新美輝幸: ナミテントウの斑紋パターン形成機構解明への分子遺伝学的アプローチ. 昆虫遺伝研究会「昆虫遺伝学 最近の話題」、東京、2003 年 3 月 29 日
3. 新美輝幸・桑山久史・柳沼利信: 遺伝子機能解析によるナミテントウ斑紋多型解明へのアプローチ. 第 26 回日本分子生物学会年会シンポジウム「21 世紀の進化発生学のチャレンジ」、神戸、2003 年 12 月 10 日
4. 新美輝幸: 遺伝子機能解析によるテントウムシの斑紋形成メカニズムの解明をめざして. 基生研

研究会「新しいモデル生物が拓く生物科学フロンティア」、岡崎、2004年3月2日

5. 新美輝幸・桑山久史・柳沼利信:非モデル昆虫における遺伝子機能解析系の開発. 昆虫ワークショップ '04 基調講演、つくば、2004年5月27日

6. 新美輝幸・桑山久史・大場裕一・柳沼利信:テントウムシ斑紋の多様性創出メカニズムの解明へ向けて. 日本進化学会第6回大会シンポジウム「表現型可塑性の進化学」、東京、2004年8月6日

7. 新美輝幸・桑山久史・柳沼利信:ナミテントウの斑紋研究から擬態現象の理解へ. 日本動物学会第75回大会シンポジウム「昆虫の適応戦略の分子基盤 社会性から擬態まで」、神戸、2004年9月10日

8. 新美輝幸:ナミテントウ斑紋のパターン形成メカニズムの解明をめざして. 杏林大学学術フロンティアワークショップ「多様性と共通性」、神戸、2004年9月13日

9. 新美輝幸:ナミテントウの斑紋多型の解明をめざして. 講演会「昆虫の体色多形性発現および斑紋形成に潜む分子メカニズム解明への挑戦」、上田、2004年10月5日

10. 新美輝幸・柳沼利信:テントウムシ斑紋のパターン形成機構. 第27回日本分子生物学会年会ワークショップ「発生現象の再発見」、神戸、2004年12月9日

11. Niimi, T. and Yaginuma, T.: Towards understanding the molecular mechanism of wing-color pattern formation in the ladybird beetle, *Harmonia axyridis*. The 12<sup>th</sup> CDB Meeting “Diversity of Developmental Mechanisms in Invertebrates”, Kobe, Japan, 2005年2月2日

12. Niimi, T. and Yaginuma, T.: Gene function analysis systems in the ladybird beetle, *Harmonia axyridis*. NIAS/COE International Symposium “Genetic resources and functional genomics in insects”, Tsukuba, Japan, 2005年3月8日

13. 新美輝幸:テントウムシの斑紋形成と擬態現象の分子基盤の解明をめざして. 京都大学21世紀COEプログラム「生物多様性研究の統合のための拠点形成」公開シンポジウム「擬態と幼形成熟-昆虫の多様性の世界-」、京都、2005年3月10日

## 研究課題別評価

1 研究課題名: ほ乳類の精子形成を支える幹細胞の究明

2 研究者氏名: 吉田松生

3 研究の狙い:

ほ乳類の精子形成においては、長期にわたり極めて多数の精子が産み出される。その一方で、精子は次の世代に遺伝情報を正確に伝達することが要求される。精子形成が品質を保ちながら高い生産性と継続性を実現することは、生物の存在に直結する大切な現象であり、本研究の究極の目標はこのメカニズムを明らかにすることである。

精子形成では、タネとなる「幹細胞」が自分自身を複製しながら精子になる細胞を産み出すと考えられている。しかし、精巣の中で幹細胞を同定しその性質や挙動を知ることは、まったく不可能であった。それは、幹細胞が精巣細胞の約1万個に1個と非常に少ないと考えられる上に、特異的な遺伝子発現が知られていなかったことなどから、精巣中で幹細胞を見つける手段がないことが大きな理由であった。研究開始時点で研究者は、マウス精子形成において幹細胞を含むことが実験的に明らかにされている最も少数の細胞集団、「未分化型精原細胞」に特異的に発現する遺伝子として、ngn3 (neurogenin3)を同定していた。本研究では、この遺伝子を利用して、未分化型精原細胞をラベルし、その性質や挙動を調べることにより、上記の目標にアプローチした。

4 研究成果

具体的な問題とそれに対するアプローチ、結果を記す。いずれも、未分化型精原細胞あるいは精子形成幹細胞についての新規の知見である。

1. ngn3 遺伝子の発現制御領域を用いて未分化型精原細胞を蛍光タンパク質 GFP でラベルしたトランスジェニックマウスを樹立した。1, 2, 4, 8, 16 個という、2 の n 乗個の細胞が細胞間橋で連結するのが観察された。これは、固定標本の観察から提唱されていた未分化型精原細胞の特徴に一致するもので、生きた組織で初めて可視化されたものである。(文献2)
2. 同様に ngn3 発現細胞に Cre リコンビナーゼを発現するマウスを樹立、その細胞の子孫の運命を追跡し、成熟精巣で作られる精子の全てが ngn3 陽性細胞に由来することを明らかにした。(文献2)
3. tamoxifen 誘導性の Cre リコンビナーゼを特異的に発現させ、ngn3 陽性細胞をパルスラベルする実験系を確立した。その子孫細胞の追跡と移植により、幹細胞として機能することを明らかにした(文献1、発表準備中)。
4. GFP ラベル精原細胞を生きた精巣中で連続観察する実験系を開発し、長時間(数日間)の連続観察を可能にした。その結果未分化型精原細胞の以下のような挙動が明らかになった(投稿準備中)。1)精細管の中で、間質や血管に面した部分に好んで局在する。2)精細管周期に強く依存して、増殖と移動、細胞死をおこす。3)分裂や細胞死は、原則として、細胞間橋で連結したクローンを単位として起こる。4)連結したクローンがいくつかの断片に分かれてそれぞれ違う挙動をとる場合がある。5)分化段階が進み ngn3 の発現を失った精原細胞(分化型精原細胞)の一部が再び ngn3 の発現を回復する場合がある。これらの知見はいずれも、固定標本の観察からの推定の域を超えておらず謎に包まれていた未分化型精原細胞の挙動を直接的に明らかにしたものである。特に、1)、2)は、精子形成幹細胞がどこに局在するか、どのような微小環境(ニッチ)により維持されているかを明らかにする上で重要な情報である。更に、4)、5)は、連結していない単一細胞である As 精原細胞のみが精子形成幹細胞であるという、現在広く信じられているモデル(As モデ

ル)が必ずしも正しくなく、実際には精原細胞がいろいろな段階で可逆的なプールを作っている(clone fragmentation モデルや  $A_0A_1$  モデルに相当)ことを示唆しており、幹細胞システムの本質に関わる重要な知見と考える。

5. 精子形成の初期段階を詳細に検討し、生後最初の精子形成 (first wave spermatogenesis) では、ngn3 の発現を伴わない特別な分化プログラムによって精子が作られることを明らかにした(文献1)。この精子は正常な受精能を有しており、精子への分化には幹細胞のステップを経る必要がないことが示唆された。

#### 5 自己評価:

本研究は、生物学的には重要でありながらほとんど謎に包まれていた精子形成幹細胞システムを担う細胞を、具体的に目に見える形で同定しその挙動を観察することができた、という点で意義深いと考えている。実験技術としては、マウス個体を用いて日単位の連続観察を行う系は現在まで開発されておらず、オリジナリティーのある研究として評価されてよいと考える。研究開始時にこのようなことができたらいいなあと考えていた実験に挑戦し、個人的には細胞の挙動を楽しく観察することができた。しかし、連続観察の実験系にめどが立つまでに時間がかかり、研究期間中にその結果を論文という形で発表するに至らなかったことが反省される。早期に発表したい。また、研究開始時には、未分化型精原細胞を更に細かく分類して検討するための遺伝子の検索とそれを用いた解析を計画していたが、その進展は遅く、ようやく候補遺伝子を得た段階であることは残念である。この問題は今後も問われるべきものとして残されている。本研究期間の間に精子形成幹細胞研究においては、幹細胞の性質を維持した細胞が *in vitro* で培養できる系が確立されるという画期的な進展があった。本研究の成果はこれと相補的なもので、今後主に *in vivo* でユニークな貢献をしていく基盤となると考えている。

#### 6 研究総括の見解:

哺乳類(マウス)について、精子形成幹細胞の究明を目的として着実に研究を展開した。未分化型精原細胞を特異的に標識し、マウスの精巣を直接に生体連続観察しうる未踏の実験系を確立した。この系を活用して、clone fragmentation modelの根拠となりうる成果を挙げたことは高く評価できる。プロジェクトが着実に遂行されているので、成果の積極的公表が望まれる。

#### 7 主な論文等:

1. S. Yoshida, M. Sukeno, T. Nakagawa, K. Ohbo, D. Melton, T. Suda and Y-i. Nabeshima: Leading population of the mouse first wave spermatogenesis is generated by distinct program lacking the stem cell stage (投稿中)
2. S. Yoshida, A. Takakura, K. Ohbo, K. Abe, J. Wakabayashi, M. Yamamoto, T. Suda and Y-i. Nabeshima: Neurogenin3 delineates the earliest stages of spermatogenesis in the mouse testis. *Developmental Biology* 269, 447-458 (2004)
3. K. Ohbo, S. Yoshida, M. Ohmura, O. Ohneda, M. Ogawa, H. Tsuchiya, T. Kuwana, J. Kehler, K. Abe, HR. Schöler and T. Suda: Identification and characterization of stem cells in pre-pubertal spermatogenesis in mice. *Developmental Biology* 258, 209-225 (2003)

## 研究課題別評価

1 研究課題名: 脊椎骨形成の制御遺伝子ネットワークの系統発生的解析

2 研究者氏名: 和田 洋

3 研究の狙い:

発生生物学の大きな目標の一つは、三次元的な空間を占める生物の形態の設計図が、一次元的なゲノムの情報の中にどのように書き込まれているかを解読することにある。形態形成に必要な情報がゲノムの一次情報に書き込まれているということは、すなわち、時を経て形態が進化を遂げてきた背景では、ゲノムの一次情報が書き換えられてきたことを意味する。20世紀の発生生物学は、多様な動物の体制が驚くほどの共通の遺伝子セットで築き上げられていることを明らかにした。そこで、本研究では、その共通性を基盤として、どのようにして多様性が創出されるかについてアプローチした。多様性創出の原動力の一つが遺伝子の発現を制御するシスエレメントの多様性に由来していると考えられていたが、具体的にシスエレメントがどのような進化的な振る舞いをするかについては不明な点が多かった。そこで、脊椎動物を特徴づける脊椎骨の進化に焦点を絞り、そこにどのようなシスエレメントの進化が関わってきたかについて明らかにすることを目指してきた。具体的には、脊椎骨の由来する硬節の分化に深く関わる Pax1/9 の硬節での新たな発現の獲得をシスエレメントの進化として理解することを目指した。また、脊椎骨を形成するための転写制御因子と構造遺伝子の関係性がどのようにして進化してきたのかを明らかにするために、特に Sox9 による type II collagen の発現制御の成立過程をホヤやナメクジウオ、ヤツメウナギを対象に調べた。

4 研究成果:

Pax1/9 の硬節での発現の獲得とシスエレメントの進化に関しては、硬節での発現を獲得する前の段階をとどめていると考えられるホヤの鰓での発現に必要なシスエレメントを 30bp にまで絞り込んだが、trans の因子の同定までには至らなかった。また、硬節での発現を獲得した後のモデルとしてフグの Pax1, Pax9 の鰓と硬節での発現に関わるシスエレメントをメダカで調べるという戦略をとって解析し、Pax1, Pax9 の鰓における発現に必要な領域をそれぞれ絞り込むことができたが、これらのシスエレメントがホヤの鰓の発現に関わるシスエレメントと同じトランスの因子によって制御されているかどうかを判定するまでには至っていない。また、Pax9 の硬節での発現に関わるシスエレメントが上流-7.1kb から-5.4kb の間に存在し、この中には Shh のシグナル伝達経路の転写因子である Gli の結合できる配列が含まれていることまでつきとめ、この Gli の結合配列を欠失させたものの活性を検討している段階であるが、このシスエレメントによって硬節での新しい発現の獲得という脊椎骨進化の第一歩が踏み出されたと考えられる。

この研究を進めていく過程で、メダカの Pax1 と Pax9 が鰓で少し異なっていることが明らかになってきた。Pax1 は第2咽頭嚢から後方でほぼ一様な発現を示すのに対し、Pax9 は第2咽頭嚢で強い発現が見られ、第3咽頭嚢以後では弱い発現しか見られないことがわかった。これに対応するように、Pax1 の鰓での発現に関わるシスエレメントはほぼ均一な発現を活性化するが、Pax9 のシスエレメントのうち 4.6kb 上流まで含む領域では上記の発現パターンに対応した第2咽頭嚢で強く、その後方では弱い発現が見られ、さらに 3.0kb 上流までにすると第2咽頭嚢でのみ活性が見られることが明らかになった。したがって、Pax9 の第2咽頭嚢での強い発現は 3.0kb 上流までのなかに新しいシスエレメントが生じることで進化したと考えることができる。この発現様式の違いが Pax1, Pax9 の機能的な分化に結びついているかを調べるために、それぞれの遺伝子のモルフォリノオリゴで機能阻害をしたところ、Pax9 では第2咽頭嚢に由来する角舌骨の形成不全が見られたのに対し、Pax1 では第3咽頭嚢より後方から生じる角鰓骨の形成不全が見られた。ただし、機能阻害実験で咽頭嚢がホメオティックな変異を示すわけではなく、Hoxa2 の第2咽頭嚢での発現も影響を受けなかったので、最近提唱されている咽頭嚢の個性化における内胚葉の役割の一端が Pax1, Pax9 の発現によって担われていると

は考えにくい。マウスやニワトリではこのような第2咽頭嚢での Pax9 の強い発現は報告されていないため、むしろ真骨魚類で派生した発現様式と考えている。真骨魚類は第2咽頭嚢から特有の構造として鰓蓋が形成される。現在 Pax9 の機能阻害をした場合の鰓蓋の形成への影響をみて、Pax9 の第2咽頭嚢での新たな発現の進化が鰓蓋の進化に結びついた可能性を検討している。

もう一つの研究テーマとして、軟骨の分化を制御する転写因子 Sox9 と構造遺伝子のコラーゲンやアグレカンの関係がどのようにしてくみ上げられてきたかについて調べた。まず、構造遺伝子のコラーゲンが軟骨の基質として進化するまでの分子進化過程を調べていく中で、繊維性コラーゲンは脊索動物の祖先で3つの遺伝子が存在しており、それらは脊索の構造タンパク質としての機能を持っていた。そしてそれらが脊椎動物の祖先で起こったゲノムの重複に伴ってレパートリーを11にまで増やし、その後その中から4つの遺伝子が独立に軟骨の基質としての機能を獲得したことがわかった。この過程には4つの遺伝子が独立に軟骨での発現に関わるシスエレメントを獲得し、そのうちの少なくとも二つは Sox9 によって直接制御を受けるシスエレメントを獲得したことを示している。したがって、軟骨の基質の進化は急速なシスエレメントの進化に裏付けられていることを示すと同時に、シスエレメントの進化という一般的な問題にも重要な知見をもたらした。

もう一つの基質であるアグレカンが軟骨の基質として進化する過程にも、複雑な分子進化過程が見られた。アグレカンは、コンドロイチン硫酸によって修飾されるプロテオグリカンであり、グリコサミノグリカンの一つヒアルロン酸とリンクドメインというモジュールを介して結合することで、軟骨特有の物性をもたらしていることが知られている。軟骨を持たないホヤでは決定されたゲノム配列からヒアルロン酸合成酵素が見つからず、ヒアルロン酸はないことがわかった。興味深いことにヒアルロン酸合成酵素は多細胞動物では脊椎動物からのみ見つかり、脊椎動物のヒアルロン酸合成酵素はゾウリムシなどのものと高い相同性をしめすことがわかった。遺伝子の水平感染によってヒアルロン酸が進化した可能性が示唆された。ところが一方で、ヒアルロン酸を持たないはずのホヤからもリンクドメインと配列の相同性が見られる遺伝子を見つけることができた。この遺伝子は同じくリンクモジュールを持つ脊椎動物の CD44 と構造的に似ており、血球で発現することがわかった。CD44 もリンパ球で発現して、炎症部位への動員やリンパ節へのホーミングに関わっているため、ホヤのリンク遺伝子も同様に血球の移動に関わっていると考えられる。この遺伝子がヒアルロン酸合成酵素の進化に伴って、ヒアルロン酸に対する結合特異性を獲得し、さらに、エクソンシャッフリングによってコンドロイチン硫酸によって修飾される領域やレクチンドメインと一つの遺伝子を形成するようになり、軟骨の基質として機能するようになったと考えられる。すなわち、軟骨の進化に、シスエレメントの進化のほかに遺伝子の水平感染やエクソンシャッフリングによる新たな遺伝子の創生という複雑な分子進化が関わっていたことを明らかにできた。

さらに、このようにして生じた軟骨の基質となる遺伝子が Sox9 の制御を受けるようになる過程にどのような分子進化過程が必要であったかを調べた。Sox9 は軟骨の分化に関わっていると同時に、鰓における軟骨の起源となる神経堤細胞の分化にも深く関わっていることが知られている。したがって、Sox9 が軟骨の基質であるコラーゲンやアグレカンの発現を制御するには、細胞の環境に応じてターゲットの遺伝子を制御する必要が生じる。すなわち神経堤の分化に関わるターゲットと軟骨の分化に関わるターゲットを区別する必要がある。この制御機構の進化には細胞の環境に応じて結合するコファクターの存在が示唆され、実際に Sox9 が環境に応じていくつかのコファクターと結合していることがわかっている。そこで、このようなコファクターと結合するために Sox9 自身が新たな機能ドメインを獲得した可能性について検討した。まずホヤの Sox9 を脊椎動物に導入したときに、神経堤細胞を誘導することができるかどうかを調べたところ、ニワトリ胚の神経板にホヤ Sox9 を過剰発現させると過剰な神経堤細胞が誘導された。同様な活性をニワトリの Sox9 も有していることから、神経堤細胞の分化に関しては機能ドメインの進化は必要なかったことがわかった。現在軟骨細胞の分化に関わる機能をホヤの Sox9 が代替できるかについて、Col2a1 の転写活性化をできるかどうか調べている。

## 5 自己評価:

当初の計画では、脊椎動物とホヤの間でシスエレメントを相互に入れ替えたりする実験(ホヤのシス

エレメントをメダカに導入するなど)を通してシスエレメントの進化の概略をつかみ、その後より詳細に解析していくことでシスエレメントの進化と脊椎骨の進化を結びつけていく研究を思い描いていた。実際に、それ以前にナメクジウオとマウスでこのような方法から Hox 遺伝子のシスエレメントの進化について成果を上げることができていた。ところが、Pax1/9 の解析ではそのような手法が通用せず、さらにコラーゲンの進化に関する研究や他の研究グループからの報告などから、シスエレメントがこれまで考えられてきた以上に急速に進化しようということがわかってきたことで、計画の大幅な見直しを迫られた。その段階で、計画を立て直すことができたのは、さきがけ研究のサポートのおかげであったが、成果の公開が遅れてしまったことは否めない。その後はむしろシスエレメントの進化に関しては、真骨魚類でむしろ最近起こった Pax9 の第2咽頭嚢での新しい発現と鰓蓋の進化に関して、成果が得られてきており、Sox9 に関しては遺伝子のコーディング領域の進化に関して成果が得られつつある。Sox9 の系からは、遺伝子の多面的な発現の進化と形態の進化の関係、すなわち転写因子が進化の過程で新しい発現を獲得するときに、どのようにして新しいターゲット遺伝子の制御の特異性を進化させるのか、またそれまでに制御していたターゲットをどの程度新しい発現部位で活性化させるのかという問題も浮かび上がってきており、進化発生学の新しい研究の展開についてもアイデアが熟成しつつある。

#### 6 研究総括の見解:

脊椎動物の進化生物学的起源を遺伝子レベルで解明しようとした意欲的な研究である。プロジェクトそのものは独創的であり評価できるが、当初の計画を遂行したところ、シスエレメントの進化速度が予想以上に大きいことが明らかとなり、計画の変更を強いられたことが研究の進捗を抑えた。しかし、Pax9 および Sox9 について有望な成果が得られているので、転写因子が進化の過程で如何にして新しいターゲット遺伝子を獲得するかという重要課題に関しては、今後の発展として大いに期待する。

#### 7 主な論文等:

##### 論文

1 . Molecular evolution of fibrillar collagen in chordates, with implications for the evolution of vertebrate skeletons and chordate phylogeny. Hiroshi Wada, Makiko Okuyama, Nori Satoh, Shicui Zhang. Submitted.

##### 総説など

- 1 .ゲノムの多様性と形態の多様性 和田 洋「ポストゲノムの分子生物学」村上康文編 化学同人 pp. 65-78. (2003)
- 2 .エンハンサーの進化 和田 洋「ゲノムからみた生物の多様性と進化」五條堀孝編 シュプリンガーフェアラーク東京 pp. 50-57. (2003)
- 3 .神経堤細胞の進化と遺伝子の進化 和田 洋「発生システムのダイナミクス」上野直人編 共立出版 印刷中
- 4 .脊椎動物の骨の進化と遺伝子進化 和田 洋・三瀬武史・小林麻理・米田雅彦「海洋生命系のダイナミクス」塚本勝巳編 東海大学出版会 印刷中

##### 招待講演

- 1 .脊椎動物の進化と遺伝子重複・シスエレメントの進化 分子進化と形態進化を結ぶ東京医科歯科大学 第24回生命情報学セミナー (2003)
- 2 . Molecular evolution for the vertebrate specific characters. Mini-symposium on Evolution and Development, University of Oxford, Dept. of Zoology. (2003)
- 3 . Evolutionary analysis of Hox1 regulation in the neural tube and neural crest. International



Urochordate Meeting 2003. Marseille (2003)

4 . 分子系統学と比較発生学から脊椎動物の起源を探る 筑波大学生物学系セミナー (2004)

5 . Molecular evolutionary background for the innovation of the neural crest. Banbury Center Meeting on “Origin and evolution of the nervous system” Cold Spring Harbor Laboratory. (2004).

6 . ホヤ、ナメクジウオとヤツメウナギから軟骨の起源を探る Bone and Joint Research Club. (2004)

7 . 脊椎動物の軟骨の進化と遺伝子進化 「境界動物の生物学」東京大学海洋学研究所 (2004)