

「認識と形成」研究領域 領域活動・評価報告書
— 平成 17 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する。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

1応募課題につき選考アドバイザー3名が書類審査をし、書類選考会議において面接選考の対象者を選考した。続いて、面接選考および総合選考により、採用候補者を選定した。

選考	書類選考*	面接選考	採択者数
対象者	106	24	9

5. 研究実施機関

平成 14 年 11 月 1 日～平成 18 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、研究報告会を東京ガーデンパレスにて開催し、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 17 年 12 月	研究課題別評価提出
平成 17 年 12 月	研究報告会
平成 17 年 12 月	アドバイザーによるコメント
平成 18 年 1 月	研究総括による評価
平成 18 年 1 月	総括評価の研究者へのフィードバック
平成 18 年 1 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

さきがけ研究21の一領域として平成 12 年度に発足した「認識と形成」領域は本年度を以って領域としての全研究期間を完了し、本年 3 月には第三期生を送り出すこととなった。

15 名の第一期生、11 名の第二期生に次いで、第三期生 9 名が平成 14 年 10 月までに 106 名の応募者から選考された。書類選考を通過した 24 名が、9 名の領域アドバイザーおよび研究総括による面接選考に臨み、2 日間にわたる慎重な選考審査を経て最終的には 9 名の第三期生が本領域の研究に参画することとなった。これら 9 名の第三期生は、応募時から「認識と形成」領域の趣旨と目的を正しく深く理解し、領域アドバイザーはもとより、先輩研究者および同僚研究者の助言や示唆を真摯に受けとめ、自己の研究に積極的に組み入れつつ鋭意研究を推進した。第三期生個々の研究成果とその評価の詳細は、夫々の研究結果、自己評価それに研究総括の見解に委ねるが、第三期生の研究は総体としてきわめて順調に進捗し、1 名の脱落者を生むこともなく、当初の目的を十分達成し得たと敢えて自己評価したい。

9 名中、5 名の研究者が多くの領域アドバイザーから目的を超える成果を収めたと高く評価され、内 3 名にあたっては既に新しい研究を展開しつつあると大きく期待された。他の 4 名についても、いずれも当初の目的を概ねあるいはほぼ達成し、成果を踏まえた今後の研究展開が期待できると評価された。当初の目的が期待通りに達成されなかったと低く評価された研究者を生むことなく研究を終了し得たことに感謝の念を禁じ得ない。

このように第三期生の成果が総体として第二期生に比しても更に良好であったのは、領域会議、研究報告会等に多忙の中をつとめて出席された本領域アドバイザー諸先生の熱意に負うところきわめて大きく、研究総括として特に深く感謝したい。また、本領域の発足以来協力を惜しまれなかった本領域研究者諸君および領域事務所、科学技術振興機構関係者各位に深謝したい。

10. 評価者

研究総括	江口 吾朗	学校法人尚綱学園 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 教授
	大箸 信一	金沢工業大学 ゲノム生物工学研究所 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
論文発表	0	39	39
口頭発表	42	25	67
出版物	14	3	17
計	56	67	123

* 平成 18 年 1 月 10 日現在

2) 招待講演

国内 15 件
国際 8 件

3) 特許出願件数

国内 2 件
国際 1 件

4) 受賞

- ・ 川口 義弥 第 22 回 Cytoprotection 研究会奨励賞 (平成 17 年 2 月)
「腹側腓－胆管の発生における Notch signal による分化制御」
- ・ 松田 勝 (他 7 名) 日本遺伝学会第 75 回大会 Best Papers 賞 (平成 15 年 9 月)
「メダカ性決定遺伝子 DMY の同定とその機能解析」
- ・ 柳 茂 日本生化学会奨励賞 (平成 16 年 10 月)
「神経回路形成の分子機構の研究業績」
- ・ 吉崎 悟朗 文部科学大臣表彰 若手科学者賞 (平成 17 年 4 月)
「始原生殖細胞を用いた新たな魚類発生工学技術の研究」
- ・ 吉崎 悟朗 マリンバイオテクノロジー学会賞岡見賞 (平成 17 年 5 月)
「魚類生殖細胞を利用した新たな発生工学技術の開発」
- ・ 吉崎 悟朗 若手農林水産研究者賞 (平成 18 年 2 月)
「生殖細胞の異種間移植を利用した魚類養殖法に関する研究」
- ・ 渡邊 直樹 平成 16 年度 (第一回) 日本学術振興会賞 (平成 17 年 3 月)
「細胞内アクチン重合制御機構の分子動態の研究」

「認識と形成」領域 研究課題名及び研究者名

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)
川口 義弥 (兼任)	ptfla 遺伝子導入による異所性 腓組織誘導の機能解明 (京都大学大学院医学研究科)	京都大学大学院医学研究科 腫瘍外科学教室 (同)	36
川崎 能彦 (兼任)	神経軸索側枝の形成機構 (国立遺伝学研究所 総合遺伝 学系・脳機能研究部門)	国立遺伝学研究所 総合遺伝学系・脳機能研究部門 (同)	37
中邨 智之 (兼任)	弾性線維の形成と再生の分子機 構 (京都大学医学研究科先端領域 融合医学研究機構)	京都大学医学研究科先端領域 融合医学研究機構 (University of California San Diego)	43
西中村隆一 (兼任)	腎臓発生の分子生物学的解析と その応用 (東京大学医科学研究所、熊本 大学発生医学研究所)	熊本大学発生医学研究センター 細胞識別分野 (東京大学 医科学研究所)	41
服部 光治 (兼任)	神経細胞のダイナミクスにおける 情報統合機構 (東京大学医科学研究所、名古 屋市立大学)	名古屋市立大学大学院 薬学研究科病態生化学分野 (東京大学 医科学研究所)	44
松田 勝 (専任)	メダカ未分化生殖腺の精巣への 分化のしくみ (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)	さきがけ研究員 (科学技術振興機構 CREST)	43
柳 茂 (兼任)	神経回路網形成の分子情報伝 達システムの解明 (神戸大学医学系研究科、東京 薬科大学生命科学部)	東京薬科大学生命科学部 分子生化学研究室 (神戸大学大学院医学系研究科)	49
吉崎 悟朗 (兼任)	培養系での魚類始原生殖細胞 からの個体創生技術の確立 (東京海洋大学海洋科学部)	東京海洋大学海洋科学部 海洋生物資源学科 (東京水産大学資源育成学科)	40
渡邊 直樹 (兼任)	細胞運動制御の単分子スペク ル法による総括的解析 (京都大学大学院医学研究科)	京都大学大学院医学研究科 神経細胞薬理学 (同)	43

研究課題別評価

1. 研究課題名:ptf1a 遺伝子導入による異所性膵組織誘導の機構解明

2. 研究者氏名:川口 義弥

3. 研究の狙い:

糖尿病に対する根本的治療法の確立を目的に、生物学的活性を持つ異所性膵組織の誘導を目指す。異所性組織誘導の場として、ヒトでしばしば異所性膵組織が形成される胃・十二指腸を想定し、胎生期膵形成で未分化内胚葉上皮から膵への運命決定に重要な役割を演じる ptf1a を遺伝子導入することにより、膵組織が誘導されるか否かの検討を目的とする。膵内分泌／外分泌細胞の分化には単なる転写因子の ON・OFF ではなく、転写因子発現量の調節が重要であると仮定すると ptf1a 発現量の調節により誘導される膵細胞の種類が異なってくる事が予想され、インシュリン産生細胞の誘導に最適な遺伝子導入量／発現量の決定が最大の問題点であると考えられた。また、膵内分泌細胞の分化過程で ptf1a 発現量は次第に減弱することが分かっていたので、遺伝子導入後に細胞分裂とともに発現量が低下することを期待して非増殖型アデノウイルスによる遺伝子導入を行う事、さらに、遺伝子導入後の組織の viability を常時確認できるという3次元組織培養の強みを活かして最適アデノウイルス力価と培養条件の決定を行う方針を固めた。

4. 研究結果:

① 異所性膵組織形成のメカニズムを解明

生体の形態形成は胎生期における極めて正確な body patterning 機構に沿って行われる。ところがヒトではしばしば異所性組織が形成される。Body patterning は homeobox 遺伝子、hedgehog シグナリング、BMP シグナリング、Notch シグナリング等により制御されていることが次第に分かってきた。我々は Notch シグナリングの主要な effector である Hes1 ノックアウトマウスに ptf1a lineage tracing を組み合わせる事により、ヒトでしばしば異所性膵組織が発見される胃前庭部、十二指腸、胆管、Vater 乳頭部に ptf1a の異所性発現があり、それらはすべて膵組織である事を明らかにした。すなわち、Hes1 は胃・十二指腸・胆管において ptf1a を負に制御することにより、細胞外からの膵形成誘導因子 (ptf1a ポジティブレギュレーター) の影響を受けずに本来の臓器への分化を維持していると考えられる。また、発生早期の検討から、十二指腸異所性膵は cdx2 陽性十二指腸前駆細胞からの transcommitment により形成される事が明らかとなった。このことは Notch シグナリングが異なった臓器の前駆細胞間における可塑性を制御すると同時に、細胞の運命決定に重要な遺伝子 (ptf1a) の発現制御を行うことで臓器形成 (膵形成) の場を定めている事を示唆している。

② 胎生期十二指腸組織からの異所性膵組織誘導

上に述べた Hes1 ノックアウトマウスにおいて異所性膵組織が形成された場所は全て、もう一つの膵形成に重要な遺伝子である pdx1 の発現領域内であった。そこで pdx1 陽性胎生期胃・十二指腸に対してアデノウイルスによる ptf1a 遺伝子導入を行い、異所性膵が形成されるか否かを組織培養で観察した。様々なアデノウイルス力価と培養期間による条件で PCR によるマーカー発現を検討した結果、ウイルス力価を低力価 ($1 \sim 10 \times 10^6$ PFU) で感染させると培養開始 4 日目で endogenous ptf1a が発現しはじめ、7 日目でインシュリン産生細胞の誘導に成功した。Endogenous ptf1a の発現は膵前駆細胞を経た分化を示す。組織学的には十二指腸腸管上皮から複数の場所でインシュリン産生細胞が pdx1 陽性細胞と連続して間質へと発芽しており、

正常膵形成と類似した形態を示していた。(しかし、詳細な検討でも胃上皮からは内分泌細胞の誘導は確認されなかった。) 誘導されたインシュリン産生細胞は培養液の糖濃度の変化に反応してインシュリンを分泌し、ストレプトゾトシン誘発糖尿病ヌードマウスへの移植実験で血糖値を低下させることが確認された。また、この条件ではグルカゴン産生細胞、ソマトスタチン産生細胞も誘導され、内分泌前駆細胞を経た分化誘導であることを示唆している。

一方、高力価の感染では内分泌細胞は誘導されず、外分泌細胞のみが誘導された。低力価感染で、十二指腸のみに内分泌細胞が誘導された事実を重視し、正常膵発生初期の *pdx1* 発現量を胃と十二指腸で比較したところ、十二指腸により多く発現することが判明した。そこで *ptf1a/pdx1* の共遺伝子導入を行った。その結果、4日目の endogenous *ptf1a* の誘導はアデノ *ptf1a* 力価 $1 \sim 30 \times 10^6$ PFU と、*ptf1a* 単導入の場合より広い範囲でみられた。ところが、実際に7日目にインシュリンが誘導されたのは $10 \sim 30 \times 10^6$ PFU で、*ptf1a* 単導入の場合よりより高力価にシフトした。実験前に予想していた転写因子発現量による運命決定だけではなく、転写因子発現量比によっても細胞分化の方向性が制御される可能性を示している。

以上、胎児組織にたいする *ptf1a* 遺伝子導入による異所性膵組織の誘導という当初の研究目的は達成され、そこではある一定の *ptf1a* 発現量、*ptf1a/pdx1* 発現量比が重要であると考えられた。

5. 自己評価:

糖尿病に対する根本的な新規治療法として膵再生を考えた場合、必要となる(再生すべき)インシュリン産生細胞の数はそれほど多いものではないことは膵亜全摘術と膵全摘術の予後の違いが端的に証明している。そこで、これまでに得られた発生生物学的解析による知見を基とし、ヒトで実際に見られる異所性膵組織形成をふまえ、腸管に対する“膵決定遺伝子/*ptf1a*”遺伝子導入というアイデアで実験を行った。第一回の領域会議で江口総括から「この研究は必ず成功する。まずは胎児組織に的を絞って始めなさい。」という力強い助言に支えられて研究に着手した。

研究開始後、Notch シグナリングの異常によって下部胆管が膵組織に置き換わるという報告が出た。異所性の膵形成においても *ptf1a* 発現が必ず先行しているはずだと考え、*Hes1* ノックアウトと *ptf1a* lineage tracing を組み合わせたと、胆管のみならず胃前庭部、十二指腸、Vater 乳頭部に異所性 *ptf1a* 発現と膵組織形成を見いだした。これはヒト異所性膵組織形成のメカニズムの一端を示した可能性がある。そこでは異なった臓器の前駆細胞間に Notch シグナリングで制御される“可塑性”が存在することが判明し、少なくとも胎児組織を用いた遺伝子導入による分化誘導は可能であるとの自信を深めた。ところが、実際の実験ではインシュリン産生細胞の誘導の至適条件設定にかなり苦労した。実験前の予想通り、転写因子発現量が細胞分化の方向性を決定することが明らかとなっただけでなく、転写因子発現量比の重要性を示す結果が得られた事は大きな収穫であった。以上、今回の研究で胎児組織を用いた膵組織誘導、糖尿病モデルマウスへの移植実験による血糖低下の確認が出来たことは幸いであった。

その一方で、実際の膵再生医療にむけた成体組織での検討が研究期間内に完了できなかったことが非常に残念である。そこでは胎児組織でみられたような可塑性が存在するか否かが大きな問題となり得る。しかし、自分としてはその点はかなり楽観している。すなわち、ヒトにおける様々な疾患でみられる“組織化生”は、成体組織の可塑性を十分に示していると思われるからである。たとえば、胃や食道組織にみられる腸上皮化生、膵管細胞が腸上皮や胃上皮の性質を獲得する膵管内乳頭状粘液産生腫瘍などはその好例である。今後も転写因子遺伝子導入という方法にこだわらず、これらの疾患の原因となり得る細胞外環境の解析とあわせて異所性膵組織誘導の条件をひとつひとつ同定してゆくというスタンスで幅広く研究を続け

て行きたいと思います。

6. 研究総括の見解:

個体の発生過程で膵臓がいかにして形成され、それに如何なる遺伝子が関与しているかを論理的に考察し、腸管から膵組織を誘導形成させることによって、膵臓障害を克服するための再生医療技術の確立を最終目標とする将来性の高いユニークな研究である。

ptf1 遺伝子の導入による異所性膵組織の誘導形成に真正面から取り組み、異所的な膵組織分化には、ptf1 遺伝子と pdx1 遺伝子の発現量とそれらの量比が重要であることを実証した。この成果を踏まえ、人工的に形成された膵組織を糖尿病モデルマウスに移植し、その有効性を確認することに成功した。さらに、マウス胎児を用いて異所性膵組織を誘導形成させ得ることも明らかにした。このように、臨床応用を目標としながら、基礎的な面でも大きな貢献しており、当初の目的を十分達成し、将来の臨床応用への道を着実に歩みつつある研究として高く評価する。

7. 主な論文等:

•Tulachan S.S., Doi R*, Kawaguchi Y, Tsuji S, Nakajima S, Masui T, Koizumi M, Toyoda E, Mori T, Ito D, Kami K, Fujimoto K and Imamura M
All-Trans Retinoic Acid Induces Differentiation of Ducts and Endocrine Cells by Mesenchymal/Epithelial Interactions in Embryonic Pancreas. Diabetes 52: 76-84, 2003

•Koizumi M, Doi R*, Toyoda E, Masui T, Tulachan S.S, Kawaguchi Y, Fujimoto K, Gittes, G.K and Imamura M

Increased PDX-1 expression is associated with outcome in patients with pancreatic cancer. Surgery 134:260-6, 2003

•Hingorani S.R., Petricoin III E.F., Maitra A, Rajapakse V., King C., Jacobetz M. A., Ross S., Conrads T. P., Veenstra T. D., Hitt B. A., Kawaguchi Y., Johann D., Liotta L.A., Crawford H. C., Putt M. E., Jacks T., Wright C.V.E., Hruban R.H., Lowy A.M and Tuveson D.A.*

Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. Cancer Cell 4:437-49, 2003

•Koizumi M, Doi R*, Toyoda E, Tulachan S.S, Kami K, Mori T, Ito D, Kawaguchi Y, Fujimoto K, Gittes G.K, and Imamura M.

Hepatic regeneration and enforced PDX-1 expression accelerate transdifferentiation in liver. Surgery 136: 449-57, 2004

•Hoshino M*, Nakamura S, Mori K, Kawaguchi T, Terao M, Nishimura YV, Fukuda A, Fuse T, Matsuo N, Sone M, Watanabe M, Bito H, Terashima T, Wright C.V.E. Kawaguchi Y, Nakao K, Nabeshima Y.

Ptf1a, a bHLH transcriptional gene, defines GABAergic neuronal fates in cerebellum. Neuron.47:201-13, 2005

•Koizumi M, Doi R*, Fujimoto K, Ito D, Toyoda E, Mori T, Kami K, Kawaguchi Y, Gittes GK, Imamura M.

Pancreatic epithelial cells can be converted into insulin-producing cells by GLP-1 in conjunction with virus-mediated gene transfer of pdx-1. Surgery.138:125-33 2005

•Fukuda A, Kawaguchi Y*, Furuyama K, Kodama S, Kuhara T, Horiguchi M, Koizumi M, Fujimoto K, Doi R, Wright C.V.E, and Chiba T

Loss of the Major Duodenal Papilla Causes Common Bile Duct Stone Formation in Pdx1 null Mice. Gastroenterology. in press

・Fujitani Y, Fujitani S, Boyer D, Gannon M, Kawaguchi Y, Ray M, Shiota M, Stein R, Magnuson M.A, and Wright CVE*

Targeted deletion of cis-regulatory region for pdx1 reveals dosage responses of foregut differentiation, pancreas organogenesis and function.

Genes & Dev. in press

・Fukuda A, Kawaguchi Y*, Furuyama K, Kodama S, Horiguchi M, Kuhara T, Koizumi M, Boyer D, Fujimoto K, Doi R, Kageyama R, Wright C.V.E, and Chiba T

Notch Pathway Controls Regional Specification of Pancreas in Mouse Endoderm by Regulating Ptf1a Expression. (submitted)

(* : corresponding author)

・川口 義弥

膵、十二指腸分化における転写因子ptf1aの機能 医学のあゆみ 204 : 507-508, 2003

・川口 義弥

膵臓はどのように再生されるのか? 分子消化器病 1 : 43-49, 2004

・川口 義弥、土井隆一郎、河本 泉、藤本 康二、今村 正之

インスリン治療下糖尿病患者の周術期輸液管理 消化器外科 27 : 437-442, 2004

・川口 義弥

内胚葉系の分化に関する最近の動き Frontiers in Gastroenterology. 9 : 62-69, 2004

8. 受賞

第 22 回 Cytoprotection 研究会奨励賞 (平成 17 年 2 月 4 日 京都)

「腹側膵—胆管の発生における Notch signal による分化制御」

研究課題別評価

1. 研究課題名: 神経軸索側枝の形成機構

2. 研究者氏名: 川崎能彦

3. 研究の狙い:

脳の神経回路の多くは、神経軸索の枝分かれ“軸索側枝”を介して形成される。しかしながら、その形成機構は多くの点で未知のままである。その主な理由として、正確な軸索側枝形成を観察する培養系が存在しなかったことが挙げられる。本研究では、マウス嗅球-終脳神経回路をモデルとして、側枝の形成機構を明らかにすることを目指して研究を行った。具体的なアプローチとして、軸索側枝の形成を再現する培養系を確立した後、タイムラプス撮影により生体に近い状態での軸索側枝形成の過程を可視化して解析するとともに、各種の遺伝子破壊マウスを用いて軸索側枝を制御する分子機構の探索を行った。

4. 研究結果:

(1) 嗅球-終脳神経回路を用いて、培養下で軸索側枝形成を正確に再現する系を確立した。培養条件を検討した結果、終脳組織の器官培養下で *in vivo* に近い状態の軸索側枝形成を再現することが出来るようになった。このことにより、生体内に近い状態での軸索側枝の形成過程を培養下で解析することが可能となった。

(2) 正立型顕微鏡下で、タイムラプス撮影を行うための新しいシステムを構築し、これらのシステムを用いて、軸索側枝の形成過程を鮮明な映像として撮影することに成功した。得られた映像を解析した結果、(I) 軸索側枝形成は可逆的な幾つかのステップを経て主軸作上に形成されること、(II) 主軸索上の瘤状構造の位置と側枝の形成部位には大きな相関は認められないこと、(III) 側枝が伸長する際には生長円錐に似た構造体が側枝上を移動すること、などを明らかにすることができた。また、確立したタイムラプス撮影システムを用いて、嗅球軸索のガイドポスト細胞の移動を詳しく解析することなどにも成功した。器官培養に対しての汎用性の高いタイムラプス観察システムを構築することができたと言える。

(3) ノックアウトマウスを用いた実験から、Neuropilin/PlexinA/sema3 シグナル経路の一部が欠失すると、嗅球軸索の側枝形成が低下することを見いだした。これらの結果は、これらのシグナルが嗅球軸索の側枝形成に関与することを示唆している。

(4) 嗅球軸索のガイドポスト細胞の移動と、嗅球軸索の伸長の制御に Netrin-1/DCC シグナルが関与する事を明らかとした。一方、軸索側枝形成には Netrin-1/DCC シグナルの関与は認められないことも明らかとなった。これらの結果は、主軸索の伸長制御機構と、軸索側枝の伸長制御機構は、異なる分子機構によって制御されていることを示唆している。

(5) 嗅球神経細胞のサブタイプに注目して軸索伸長の制御機構の解析を行い、サブタイプごとに異なる分子機構が軸索伸長を制御していることを見いだした。

5. 自己評価:

・神経軸索の側枝形成の過程を可視化できたことにより、軸索側枝形成という現象についての全体的なイメージを得ることができた。これらの映像からは、幾つかの重要な情報を見いだすことができた。また、試行錯誤の末に側枝形成の美しい映像を観察できたことは大きな喜びでもあった。側枝形成の分子機構の解析はなかなか進展しなかったが、遺伝子破壊マウスを用いた解析から、嗅球軸索の側枝形成に関わる分子を見いだすことができた。ただし、これらの分子が側枝形成時にどのように機能するのかなど、依然として未知の部分が多く、さらに解析を進める

必要がある。

・側枝形成のモデルとして用いてきた嗅球-終脳神経回路は、臭い情報を伝達する嗅覚2次ニューロンの神経回路としての役割を担っている。嗅球神経細胞のサブタイプに注目した解析から、それぞれのサブタイプごとに異なる軸索伸長制御機構が存在することが明らかとなった。これらの研究は、嗅球に集められた臭い情報が終脳にどのように伝達されるのかという問題に対しての有効なアプローチの一つであると考えている。

・本研究過程に多くの成果を得る事ができたものの、多くのことに手を出した結果、論文としてまとめる作業が遅れてしまっていることは、大いに反省すべき点だと考えている。特に、形態形成のイメージング解析からは、新たな疑問点や研究の方向性を導きやすい反面、得られた映像を記述可能なデータとして数値化し整理するためには、幾つかの工夫を必要とすることもあり、これらの作業を急いで進めている。

6. 研究総括の見解:

蛍光染色法を巧みに活用し、嗅覚器からの神経軸索の成長を生体観察し得る脳の器官培養系を確立できたことは、この実験系の汎用性からみても、極めて高く評価できる。また、この実験系によって各種のノックアウトマウスについて嗅球神経軸索の側枝形成について多くの観察結果を得た。現在なお、観察記述の域に止まっており、成果の公表も遅れがちではあるが、当初の目的は概ね達成したと評価する。今後、解析的に研究を鋭意推進し、本課題の目標である神経軸索側枝形成の分子機構の解明に迫ることを期待する。

7. 主な論文等:

論文

1. Kawasaki T, Takagi Y, Yamatani H and Hirata T: Systematic screening and identification of antigens recognized by monoclonal antibodies raised against the developing lateral olfactory tract. *J. Neurobiol.* 62: 330-340, 2005
2. Kawasaki T, Ito K and Hirata T: Netrin-1 regulates ventral tangential migration of guidepost neurons in the lateral olfactory tract. *Development* (in press)

招待講演

2004.02.20 嗅球軸索ガイドポスト細胞と嗅球軸索束形成 東北大学医学部

口頭発表

1. 2004.06.04 嗅索ガイドポスト細胞の移動と嗅球軸索束形成 日本発生生物学会大 37 回大会
2. 2004.09.19 Mechanism of ventral tangential migration of guidepost neurons in the lateral olfactory tract: Cold Spring Harbor Laboratory meeting; Axon Guidance & Neural Plasticity.

研究課題別評価

1. 研究課題名: 弾性線維の形成と再生の分子機構

2. 研究者氏名: 中邨 智之

3. 研究の狙い:

加齢に伴って体中の組織の弾性は失われていく。このことは単に「体が硬くなる」とか皮膚がたるむといった問題だけではなく、肺気腫や動脈中膜の硬化・大動脈瘤といった高齢者の主要疾患の原因にもなっている。組織の弾性を担っているのは弾性線維という細胞外線維であり、弾性線維の劣化・分解が上記疾患の直接原因である。しかし弾性線維のターンオーバーは非常に遅く、弾性線維が劣化・分解しても弾性線維が再生されることはない。弾性線維の再生の研究には弾性線維の形成機構の解明が不可欠であるが、弾性線維形成の分子メカニズムについて知られていることは少ない。弾性線維はマイクロフィブリルという線維のまわりにエラスチンタンパクが沈着・クロスリンクされてできるとされている。しかしマイクロフィブリルの主要構成タンパクであるフィブリリン 1, 2 をはじめ、数種類のタンパクが弾性線維と共存すると報告されているが、それぞれの役割は不明である。

私は DANCE (Developmental Arteries and Neural Crest EGF-like、別名 fibulin-5) と名付けたインテグリンリガンドをクローニングし、その遺伝子欠損マウスを作成したところ、全身の弾性線維形成異常を来していることを見出した。このため DANCE 遺伝子欠損マウスは人の老化に非常によく似ており、皮膚はたるみ、肺気腫を来し、動脈は硬化・蛇行していた。このマウスでは弾性線維分解酵素の亢進はなかったため、DANCE は弾性線維形成に必須の分泌タンパクであるといえる。

エラスチン、クロスリンク酵素を除いて弾性線維形成に必須であることが証明されているのは DANCE だけであるため、DANCE を手がかりに弾性線維形成の分子メカニズムの解明に近づくことをさきがけ研究の目的とした。

4. 研究結果

1) DANCE と会合するタンパクの同定

DANCE がなぜ弾性線維形成に必要とされるのかを探るため、DANCE 結合タンパクを同定した。まず、DANCE のアミノ末端ドメインで DANCE どうしが結合すること、DANCE 中央ドメインでマイクロフィブリル構成タンパクである LTBP-2 (latent TGF β -binding protein 2) と結合すること、DANCE カルボキシル末端でエラスチンクロスリンク酵素である LOXL1,2,3,4 (lysyl oxidase-like 1,2,3,4) と結合することを明らかにした。これにより、DANCE はマイクロフィブリル上にエラスチンクロスリンク酵素をつなぎとめ、もってマイクロフィブリル上でエラスチンの沈着・クロスリンクがおこるのを助けていると考えられた。アフィニティー精製と質量分析によってさらに2つの DANCE 結合タンパクを同定したが、その意義については現在研究中である。

2) DANCE のプロテアーゼによる切断

DANCE はアミノ末端にカルシウム結合性 EGF 様モチーフをひとつ、カルボキシル末端に fibulin ファミリーに共通する fibulin ドメイン、中央部にカルシウム結合性 EGF 様モチーフが5つならんだドメインを持っている。アミノ末端ドメインはインテグリン結合ドメインであり、DANCE どうしが結合するためのドメインでもあるが、この部分がプロテアーゼによって切断を受けることを培養細胞・生体内の両方で見出した。ヒト皮膚サンプルでは、加齢によって DANCE 量が減少し、特に全長型はほとんど無くなることがわかった。

3) DANCE を用いた弾性線維再生系の開発と応用

ヒト線維芽細胞は血清を加えて培養すると2週間後には弾性線維ができ、抗エラスチン抗体で観察することができる。しかし無血清で培養すると弾性線維は形成されない。血清中には無数のタンパクが含まれるため、何が弾性線維形成に必要なのかは細胞培養系ではわからず、弾性線維研究を滞らせる一因となっていた。今回の研究において、無血清培養でもリコンビナント DANCE を加えると弾性線維形成が強く誘導されることを発見した。この系は無血清で弾性線維形成を再現できる点で他に類のないものである。

この系を用いて、DANCE のインテグリン結合作用が弾性線維形成に必要かどうかを検討した。インテグリン結合モチーフに変異を入れてインテグリンと結合できなくした DANCE タンパクを入れると正常型 DANCE と同様に弾性線維形成が誘導された。従って、DANCE とインテグリンとの結合は弾性線維形成には必須ではないと考えられる。しかし、上記のアミノ末端ドメイン切断型 DANCE には活性がなかった。すなわち、DANCE アミノ末端ドメインはインテグリン結合以外の重要な作用を持っていると考えられる。プロテアーゼによる DANCE アミノ末端の切断は、活性型から不活性型への変化であるといえる。

DANCE には強力な弾性線維再生誘導作用があるということがわかったため、弾性のある人工皮膚作成への応用を目指して、線維芽細胞の3次元培養においても DANCE が弾性線維形成を促進できるかを検討中である。

5. 自己評価

はじめの計画では、弾性線維形成をみる良い *in vitro* の系がないことから、DANCE のはたらきのメカニズムを *in vivo* で明らかにする予定であった。すなわち、さまざまな DANCE 変異体のトランスジェニックマウスを作成し、それらを DANCE ノックアウトマウスと掛け合わせて表現型がレスキューできるかどうかを定性的・定量的に評価するという実験を考えていた。しかし実際にいくつもトランスジェニックマウスを作成して DANCE ノックアウトマウスと掛け合わせたと、全長 DANCE トランスジェニックですらほとんどレスキューすることができなかった。これは、トランスジェニックマウスに使用した SM22 プロモーターが弱く、DANCE が十分発現しなかったことによる。この反省を生かし、DANCE 変異体のノックインマウスを現在作成中である。

しかし結果的には、無血清細胞培養系において DANCE が弾性線維形成誘導活性を持つことを発見したため、この系を用いて DANCE による弾性線維形成誘導メカニズムを研究することが可能になり、上記のマウスの実験がうまくいかなかったことを代償することができた。さらにこの系ではマウスを作成するよりもはるかに早く結果を得ることができるため、今後の研究が大きくスピードアップすると期待している。

6. 研究総括の見解

本研究は従来あまり取り上げられなかった組織の柔軟性の維持に不可欠な弾性線維の重要性に着目し、肺気腫、動脈硬化症等の高齢者疾患の克服のための臨床応用を目指す独創性の高い研究である。

本研究が自身が発見した弾性線維の形成に不可欠な分泌タンパク質 DANCE の結合タンパク質と結合ドメインを同定することから研究を進めた。残念ながら、各種の DANCE トランスジェニックマウス作成の試みからは有意義な成果が生まれなかったが、無血清細胞培養系に DANCE タンパク質を添加することで、弾性線維の形成が可能であることを見出した成果の意義は重大であり、研究目的は十分達成されたと評価できる。今後、前記無血清細胞培養系を活用し、DANCE の機能解析を進めることで、臨床応用への道が拓かれることを期待する。

7. 主な論文等

論文・総説

Chen, Q., McLaughlin, P.J., Horiguchi, M., Starcher, B.C., Stanton, J.B., Broekelmann, T.J., Marmorstein, A.D., McKay, B., Mecham, R., Nakamura, T., Marmorstein, L.Y.: Targeted disruption of Fibulin-4 abolishes elastogenesis and causes perinatal lethality in mice. *Mol Cell Biol* *in press*.

中邨智之: Signal Sequence Trap. Heart View 増刊号「これからの臨床医に必要な分子生物学」Vol. 7 No. 12, 52-53, (2003)

口頭発表

・Hirai, M., Ohbayashi, T., Kita, T., Nakamura, T.: Latent TGF- β binding protein-2 (LTBP-2) interacts with DANCE, suggesting a novel mechanism of elastogenesis. COE Genomic Analysis of Disease Model Animals with Multiple Genetic Alterations. The 1st Symposium (October 28, 2004, Kyoto).

・平井希俊、大林徹也、堀口真仁、北 徹、中邨智之: 「DANCE は LTBP-2 と結合し、弾性線維を形成する」 第 27 回日本分子生物学会年会 (神戸、2004 年 12 月 8-11 日)

・Hirai, M., Ohbayashi, T., Horiguchi, M., Kita, T., Nakamura, T.: Latent TGF- β binding protein-2 (LTBP-2) interacts with DANCE, suggesting a novel mechanism of elastogenesis. 第 69 回日本循環器学会総会学術集会 (横浜、2005 年 3 月 19-21 日)

・Hirai, M., Ohbayashi, T., Horiguchi, M., Kita, T., Nakamura, T.: Latent TGF- β binding protein-2 (LTBP-2) interacts with DANCE, suggesting a novel mechanism of elastogenesis. 第 58 回日本細胞生物学会大会 (大宮、2005 年 6 月 15-17 日)

招待講演

・Nakamura, T.: Molecular mechanisms of elastic fiber organization by DANCE/fibulin-5. Gordon Conference on Elastin and Elastic Fiber (July 31, 2005, New Hampshire, U. S. A.).

・中邨智之: 「血管機能と弾性線維」 第 1 回安曇野循環器フォーラム (長野、2004 年 8 月 17 日)

・中邨智之: 「弾性線維形成と再生の分子機構」 第 1 2 回皮膚創傷治癒フォーラム (東京、2005 年 6 月 11 日)

特許出願

発明の名称: DANCE またはその発現を増強する因子による弾性線維再生の方法

発明者: 中邨智之、平井希俊

国内出願日: 2005 年 2 月 7 日 出願番号: 特願 2005-030864

発明の名称: 切断型 DANCE、DANCE 複合体、及びこれらを用いる方法

発明者: 中邨智之

国内出願日: 2004 年 3 月 29 日 出願番号: 特願 2004-096685

国際出願日: 2005 年 3 月 4 日 国際出願番号: PCT/JP2005/004274

研究課題別評価

1. 研究課題名:腎臓発生の分子機構とその応用

2. 研究者氏名:西中村 隆一

3. 研究の狙い:

日本で人工透析を受ける人は23万人を超え、この10年で2倍となった。また医療経済からみた社会的負担も大きい。にもかかわらず、一旦悪化した腎機能を改善させる画期的な治療法はいまだ存在しない。腎臓再生が直ちには難しいとしても、腎臓の発生を探ることによって臓器を再生する手だてが考えられないだろうか。私はカエルとマウスを使って核内因子 Sall1 を単離し、これが腎臓形成に必須であることを示した。これを手がかりに腎臓発生の分子生物学的機構を解明することを主な狙いとした。またその情報から腎臓前駆細胞のアッセイ系を開発し、腎臓再生への可能性を検討することもさらなる課題とした。

4. 研究結果:

1) Sall ファミリー遺伝子の生体内での機能解析

ヒト SALL1 の変異は Townes Brocks 症候群という指、耳、肛門、腎臓、心臓の異常を呈するが、マウス Sall1 の欠失マウスには腎臓以外の症状はない。そこで Sall2 のノックアウトマウスを作成し、Sall1 との二重欠失マウスも解析したが、Sall1 欠失による腎臓欠損のみで、その他の異常は出現しなかった(Mol. Cell Biol. 2003)。これに対して、Sall1/Sall3 二重欠失マウスは、腎臓欠損の他に指の異常を呈し、胎生致死であった。さらに新規遺伝子として Sall4 を見出し、欠失マウスを作成したところ、予想外に胎生 5.5 日という極めて初期に死亡し、かつ胚性幹細胞(ES 細胞)において Sall4 が必須であることが明らかになった(投稿中)。ヘテロも肛門の異常、外脳症を呈し、さらに Sall1/Sall4 の二重ヘテロは、外脳症の頻度が顕著に上昇し、腎臓欠損を伴うものも出現した。これらから、Sall ファミリーが重複した機能をもちながら、各臓器の発生に関与していることが明らかになった。

2) Sall の分子機構の解明

Sall1, Sall4、及び一部の Sall3 はヘテロクロマチンに局在するが、Sall2 は局在しない。変異体作成によって、Sall1 も Sall4 も C 端の Zinc finger 領域がヘテロクロマチン局在に寄与しており、N 端が二量体形成に関わることを明らかにした。実際、内在性の Sall1 と Sall4 が結合することも免疫沈降によって証明した(投稿中)。ヒト SALL1 の変異でみられる N 端の truncated form はヘテロクロマチンに局在しないが、二量体形成能は保たれる。これが dominant negative に働いて Sall ファミリーすべての機能を抑制する機構が示唆され、ヒトの SALL1 変異とマウスの Sall ファミリー複合ノックアウトの症状が似通っていることを説明できた。

3) 腎臓間葉細胞の単離と新たな遺伝子の同定

Sall1 が腎臓前駆細胞集団である後腎間葉に発現することを利用し、Sall1 の遺伝子座に GFP をノックインしたマウスを作成した(Mech. Dev. 2004)。その胎生期腎臓から FACS を用いて GFP 陽性細胞集団を単離した。この RNA を用いてマイクロアレイで網羅的検索を行い、さらに発現パターンを解析した。その結果 Sall1 や GDNF、Pax8、FoxD1 など腎臓発生に必須な既知の遺伝子の他に、未知の遺伝子も新たに同定することができた。ゆえにマイクロアレイと Sall1-GFP ノックインマウスの組み合わせによって、胎生期腎臓における間葉系遺伝子の効率的な同定が可能であることが示された。未知遺伝子のいくつかについてはノックアウトマウスが完成し、中には胎生致死となるものもあり、現在解析中である。ただこれらが腎臓発生以前に致死となる可能性もあり、腎臓特異的なノックアウトの系を作成する必要がある。この目的のために Sall1-Cre マウスをノックイン

の手法で作成した。しかし腎臓発生以前にも作動が認められたため、Sall1-CreER マウスを作成し直し、現在作動を確認中である。

4) 腎臓前駆細胞アッセイ系の確立

Sall1-GFP ノックインマウスから、GFP を発現する後腎間葉細胞を単離し、Wnt4 を発現するフィーダー上で培養すると、一つの細胞からコロニーが形成され、糸球体や尿細管など多系統の分化マーカーを発現することを見いだした(Development 2006)。さらに GFP 発現細胞を再凝集させると 3 次元立体構造を再構築できることも示した。よってこのシステムは腎臓細胞の運命決定の解析に役立つとともに、腎臓前駆細胞を誘導する際の検定系となることが期待される。

5. 自己評価:

Sall ファミリーの機能を *in vivo* で明らかにすることができた。しかしこれがヘテロクロマチンに局在することによって、どのような蛋白複合体を形成し、下流でどんな遺伝子が働いて、臓器形成につながるのかが今後の課題である。幸い Sall4 が ES 細胞に必須であることが判明し、ES は *in vitro* で大量に増やせることから、これを使って細かい分子機構に迫り、その結果を腎臓にフィードバックしたいと考えている。腎臓間葉に発現する新たな遺伝子についてはノックアウトマウスを作成することによって、Sall 以外の新たな重要遺伝子の同定が期待できる。

ES 細胞からの腎臓誘導や腎臓細胞移植等は一部でがけたものの、はっきりした成果をあげられなかった。これは確固たる腎臓細胞のアッセイ系がなかったせいでもあるが、ようやく後腎間葉細胞を検出する系が開発できた。これがさらに早期の腎臓(中腎や中間中胚葉)にも応用可能かの検討を行い、今後 ES 細胞から腎臓細胞の誘導を行いたい。

作成したマウスと切った尻尾や切片は相当な数だと自負しているが、ノックアウトマウス作成を主体とするので、どうしても結果がでるのに時間がかかる。期間内に論文発表までいったものが少ないのが反省すべき点であり、また腎臓から他の分野に影響を与えられるような、もっと質の高い論文を目指したい。

6. 研究総括の見解

現在、日本では 23 万人に達する腎機能不全者が人工透析を受けており、患者の数は増しつつある。本研究は究極的には腎臓の再生医療を視野に入れた非常にチャレンジングなアプローチである。

Sall ファミリー遺伝子は腎臓の発生に深く関わる遺伝子群であるが、本研究者は、ノックアウトマウスによる Sall ファミリー遺伝子群の機能解析とマイクロアレイを利用して、腎形成に直接関与する遺伝子の分離に成功し、それらの機能解析を着実に進め、Wnt 遺伝子発現細胞をフィーダーとして活用することで、腎細胞の分化を成立させる実験系を確立した。このように、本研究は当初の目的を予定通りに達成したと評価でき、今後、腎臓形成の分子メカニズムの解明も十分期待できる。

7. 主な論文等:

1. Sato, A., Matsumoto, Y., Koide, U., Kataoka, Y., Yoshida, N., Yokota, T., Asashima, M., and Nishinakamura, R. Zinc finger protein Sall2 is not essential for embryonic and kidney development. *Mol. Cell. Biol.* 23 (1):62-69, 2003.
2. Nishinakamura, R. Kidney development conserved over species: essential roles of Sall1. *Semin. Cell Dev. Biol.* 14, 241-247, 2003. (edited by Nishinakamura, R)
3. Sato, A., Kishida, S., Tanaka, T., Kikuchi, A., Kodama, T., Asashima, M., and Nishinakamura, R. Sall1, a causative gene for Townes-Brocks syndrome, enhances the canonical Wnt signaling by localizing to heterochromatin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 319: 103-113. 2004.

4. Takasato, M., Osafune, K., Matsumoto, Y., Yoshida, N., Meguro H., Aburatani, H., Asashima, M., and Nishinakamura, R. Identification of kidney mesenchymal genes by a combination of microarray analysis and Sall1- GFP knockin mice. *Mech. Dev*, 121(6): 547-557. 2004.

5. Osafune, K., Takasato, M., Kispert, A., Asashima, M., and Nishinakamura, R. Identification of multipotent progenitors in the embryonic mouse kidney by a novel colony-forming assay. *Development* 133(1): 151-161. 2006.

招待講演 (5 件)

1. 腎臓発生の分子機構 第 6 回日本組織工学会、2003 年 6 月 12-13 日
2. 腎臓発生の分子機構 日本炎症再生学会、2003 年 7 月 2-3 日
3. Essential roles of Sall family in kidney development ISN (International Society of Nephrology) *Forefronts in Nephrology*、2005 年 1 月 20-22 日、軽井沢プリンスホテル
4. Essential roles of Sall family in kidney development 日本腎臓学会国際シンポジウム、2005 年 6 月 25 日、横浜パシフィコ
5. 腎臓発生の分子機構 第 8 回日本組織工学会、2005 年 9 月 1-2 日

口頭発表 6 件

和文総説 18 件

研究課題別評価

1. 研究課題名: 神経細胞のダイナミクスにおける情報統合機構

2. 研究者氏名: 服部光治

3. 研究の狙い:

神経ネットワークの形成には、神経細胞移動や軸索誘導などのダイナミクスが正確に制御されることが必須である。神経細胞のダイナミクスは様々な、ときに相反する作用を持つ多数の細胞外因子によって制御されている。これらの情報を統合する機構としての細胞内カルシウムパターンを、細胞内カルシウム放出チャネルという視点から解析する。中でも、様々な情報伝達機構によって制御を受け、オシレーションなどの複雑な細胞内カルシウム濃度変動において極めて重要な役割を担う、イノシトール1,4,5-三リン酸(IP₃)受容体に着目し、その寄与及び活性調節機構を明らかにする。

4. 研究結果:

(A) IP₃受容体遺伝子改変マウスの作製と、これを用いた解析

哺乳動物のIP₃受容体には、タイプ1、タイプ2、タイプ3の三種類が存在する。神経細胞のダイナミクスにおけるIP₃受容体の寄与を知るためには、これら全てのタイプのIP₃受容体を欠損したマウス(ノックアウトマウス)を作製することが理想であるが、IP₃受容体タイプ1のノックアウトマウスは神経系以外における異常が原因で生後三週間程度しか生きられないため、交配不能である。そこでCre-loxPシステムを用いて、神経細胞特異的にタイプ1を欠損したマウスの作製を行っている。これと、IP₃受容体タイプ2・3ダブルノックアウトマウス(既に樹立済み)を交配することで、特定の神経細胞ではIP₃受容体を全く持たないマウスを作製できる。実際の実験では、マウス胚性幹細胞(ES細胞)における相同組み換えの後に一過的にCreリコンビナーゼを発現させてネオマイシン耐性遺伝子を除く段階で多大な苦勞をし、ほぼ1年近くかかってしまったが、最終年度になりようやくタイプ1IP₃受容体の開始コドンを含むエクソン両端にloxP配列を挿入したマウスの作出に成功した。現在、大脳興奮性神経細胞にのみCreリコンビナーゼを発現するEmx-Creマウス(理化学研究所・岩里琢治先生より入手済み)と交配を行っており、その後さらにIP₃受容体タイプ2・3ダブルノックアウトマウスと交配し、特に神経細胞の移動が障害を受けるかどうかに着目して解析を行いたい。

一方、末梢神経細胞では従来、さしたる実験的根拠もないままにIP₃受容体タイプ1が主に発現していると考えられてきた。しかし私は新たに全てのIP₃受容体タイプを等しく認識する抗体を作製し、ノックアウトマウス由来の細胞を用いてタイプ別の存在比を定量した結果、後根神経節細胞(DRG)では、ほぼ全てがタイプ3であることを見いだした。さらに、IP₃受容体タイプ3ノックアウトマウスを用い、神経成長因子(NGF)依存的なDRGの軸索伸長に対してIP₃受容体からのカルシウム放出が負の制御を行うことを明らかにした。

(B) IP₃受容体各サブタイプの細胞内カルシウム濃度変動への寄与の差異に関する解析

三つのIP₃受容体サブタイプはリン酸化やカルシウムなどによってそれぞれ異なった制御を受けていると考えられているが、それを細胞レベルで示した研究はほとんど無い。私は遺伝子ノックアウトを補う技術として、RNA干渉法を用いてIP₃受容体の特定のタイプをノックダウンする系を確立した。その結果非常に興味深いことに、IP₃受容体タイプ1のノックダウンによってはカルシウム応答が減弱する一方、IP₃受容体タイプ3のノックダウンによってはカルシウムオシレーションが頻発することを見いだした。しかもこれは各タイプの発現比にはあまり依存しなかった。すなわち、タイプ3IP₃受容体は「反カルシウムオシレーション」という機能を持つことを明らかにした。カルシウム

オシレーションは神経細胞のダイナミクスにおいて極めて重要であることが近年いくつかのグループによって示されているが、このような複雑な現象がいかなるチャネル蛋白質によって制御されているかは今まで示されておらず、本知見はその突破口になるのではないかと考えている。

(C) IP₃受容体タイプ1の新規活性制御機構、及び細胞内カルシウム濃度変動おける機能の解析

IP₃受容体が細胞質側から制御されていることは良く知られているが、小胞体内腔側からも制御されているか否かは、その機構が不明なことから長い間論争となってきた。そこで、特に中枢神経細胞に非常に多く発現するIP₃受容体タイプ1に注目し、生化学的手法によって小胞体内腔側ループに結合する蛋白質をスクリーニングした。その結果、IP₃受容体タイプ1に特定に結合し、他のタイプには結合しない新規蛋白質Erp44を同定した。免疫沈降実験などから、Erp44とIP₃受容体タイプ1の結合は恒常的なものではなく、細胞の状態・環境に応じて変化するものであることが強く示唆された。一方、カルシウムイメージング実験及び人工脂質二重膜に埋め込んだIP₃受容体タイプ1を用いた電気生理学的実験から、Erp44は小胞体内腔のレドックス状態・カルシウム濃度・pH変化に依存してIP₃受容体タイプ1に結合し、そのチャネル活性を阻害していることを見いだした。これは小胞体内腔からのIP₃受容体の機能調節機構を分子レベルで明確に示した最初の例であり、高い評価を受けている。

5. 自己評価:

本研究の最終目的は、個々の神経細胞の形作り及び運動(ダイナミクス)の分子機構を理解することで、神経ネットワーク形成の基本原則を知るとともに、来るべき神経再生医療へつなげていくことである。細胞内情報伝達系のうち、神経細胞のダイナミクスに最も大きく影響するとされているのは、蛋白質リン酸化カスケードとカルシウム濃度変動である。私は、この両経路において極めて重要な役割を担う細胞内カルシウム放出チャネル、IP₃受容体に着目し、哺乳動物(マウス)におけるその寄与及び活性調節機構を解析した。

神経細胞特異的IP₃受容体ノックアウトマウス作製に予想以上の時間がかかったことや、既に利用を始めていた蛋白質性のカルシウム濃度インジケータが神経細胞では上手く機能しないことが判明したことなど、決して小さくない誤算もあったが、細胞種によって発現するIP₃受容体をきちんと定量しノックアウトマウスを用いてその機能の解析を行ったこと、RNA干渉法を用いてIP₃受容体タイプ選択的なカルシウム濃度変動への寄与を明確にしたこと、小胞体内腔からIP₃受容体を制御する蛋白質を初めて発見したこと、など主として細胞生物学的・生化学的解析ではある程度の成果を上げられたのではないかと考えている。今後はこれを組織レベル・個体レベルでの解析につなげていくことが必須である。時間のかかることではあるが、引き続き努力を重ねたい。

6. 研究総括の見解:

神経ネットワークの形成は多種多様な細胞外因子によって制御されているが、これらの情報を統合する仕組みとして細胞内カルシウム放出に注目し、神経ネットワーク形成を制御する情報伝達機構の解明に迫ろうとする非常にユニークな研究である。

3年間の研究を通じ、神経細胞の細胞内情報伝達系に關与するIP₃受容体を介しての細胞内カルシウム放出チャネルの解析に力点を置き、カルシウムイメージング化に成功するとともに、RNAi法等を巧みに活用して、細胞生物学的解析を進展させた。困難なノックアウトマウス作成に手間取り、個体レベルの解析は今後の課題となったが、当初の目的はほぼ達成されたと評価できる。

7. 主な論文等:

Higo, T., Hattori, M., Nakamura, T., Natsume, T., Michikawa, T., and Mikoshiba, K. (2005) Subtype-specific and ER-lumenal-environment-dependent regulation of inositol

- 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 by ERp44. **Cell** 120, 85-98.
- Iwai, M., Tateishi, M., Hattori, M., Mizutani, A., Nakamura, T., Futatsugi, A., Inoue, T., Furuichi, T., Michikawa, T., and Mikoshiba, K. (2005) Molecular cloning of mouse type-2 and type-3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptors and identification of a novel type-2 receptor splice variant. **J. Biol. Chem.** 280, 10305-10317.
- Tateishi, Y., *Hattori, M., Nakayama, T., Iwai, M., Bannai, H., Nakamura, Y., Michikawa, T., Inoue, T., and Mikoshiba, K. (2005) Cluster formation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor requires its transition to open state. **J. Biol. Chem.** 280, 6816-6822.
- *Hattori M., Suzuki, A.Z., Nakamura, T., Miyauchi, H., Michikawa, T., Inoue, T., and Mikoshiba, K. (2004) Distinct roles of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor types 1 and 3 in calcium signaling. **J. Biol. Chem.**, 279, 11967-11975
- Bannai H, Inoue, T., Nakayama, T., Hattori, M. and Mikoshiba, K. (2004) Kinesin dependent, rapid, bi-directional transport of ER sub-compartment in dendrites of hippocampal neurons. **J. Cell Sci.** 117, 163-175
- Nakayama, T., Hattori, M., Uchida, K., Nakamura, T., Tateishi, Y., Bannai, H., Iwai, M., Michikawa, T., Inoue, T., and Mikoshiba, K. (2004) The regulatory domain of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor is necessary to keep the channel domain closed. **Biochem. J.** 377, 299-3075
- *: Corresponding author.

その他出版物

服部光治、肥後剛康、御子柴克彦 「小胞体内腔からのイノシトール 1,4,5-三リン酸受容体の活性制御機構」蛋白質核酸酵素（別冊）50, 1292-1296 (2005).

招待講演

- ・ “Environment-Dependent Regulation of Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor (IP₃R) from the Lumen of Endoplasmic Reticulum.”
- ・ 科学研究費補助金特定領域研究「膜インタフェイス」公開国際シンポジウム “Molecular Soft Interactions at Membrane Interface” 2004年8月4日（大阪）

研究課題別評価

1. 研究課題名: メダカ未分化生殖腺の精巣への分化のしくみ

2. 研究者氏名: 松田 勝(自然科学研究機構・基礎生物学研究所・生殖生物学研究部門)

3. 研究の狙い:

ほとんどの生物は有性生殖を行い、減数分裂を経た配偶子を混ぜることで、種の多様性を生み出している。その配偶子を形成する「場」である生殖腺は、未分化な時には精巣、卵巣の両方向へ分化可能である。遺伝的に性の決定されている動物では、遺伝的な性に従って未分化生殖腺は、雄では精巣へ雌では卵巣へと分化する。ほ乳類ではこの生殖腺性分化の引き金的遺伝子(性決定遺伝子, *SRY/Sry*)は1990年に発見されたが、現在でも生殖腺の性分化機構はよくわかっていない。一方、哺乳類以外の脊椎動物においては、*SRY/Sry*の相同遺伝子は見つかっていないが、生殖腺の性分化に性ホルモンが重要な役割を果たすことが知られている。特に硬骨魚類では、孵化直後の生殖腺がまだ性的に未分化な時期に性ホルモンを投与することで遺伝的な性に関係なく不可逆的な機能的性転換を引き起こすことができる。従って、これらの魚類で性決定遺伝子を同定し、その遺伝子と性ホルモンとの関連を解析できれば、精巣、卵巣の形成機構の研究に突破口を開くことができると考えられる。

最近我々は、哺乳類以外の脊椎動物で最初の性決定遺伝子となる *DMY* を発見した。*DMY* はメダカY性染色体上の性決定領域に存在しており、*DMY* の突然変異体は雌へ分化することから、通常発生において雄への分化に必須の遺伝子であることがわかった。そこで、本研究では、*DMY* がメダカの性決定遺伝子であることを示し、この遺伝子の生殖腺の性(精巣)分化の引き金的役割としての機能、さらにはその下流に作動する遺伝子カスケードを解析することにより、メダカの精巣分化のしくみを分子レベルで明らかにすることを目的とした。*DMY* と *DMRT1* 遺伝子それぞれの機能解析を行うと共に、精巣分化に重要な時期に精巣特異的に発現する遺伝子探索することで、*DMY* に始まる精巣分化の遺伝子カスケードを明らかにしたいと考えた。また、ENU を用いた性分化関連遺伝子誘発突然変異体探索を加えることで、精巣分化関連遺伝子の解析に有効な突然変異体を単離する計画をたてた。

4. 研究結果:

DMY と *DMRT1* の機能解析

DMY のゲノム領域、および CMV プロモーターの制御下に *DMY* の cDNA をつないだコンストラクトをトランスジェニックしたメダカから XX ながら雄へ分化する個体を得ることができた。これによって、*DMY* がメダカの性決定遺伝子であることを示すことができた。

DMY の相同遺伝子でもある *DMRT1* は、多くの脊椎動物において精巣分化に重要な働きがあると考えられている遺伝子である。親の精巣では両方の遺伝子が発現していることがわかっていたので、両遺伝子がいつから発現するかを詳細に検討した。その結果、*DMY* は孵化2日前の st.36 から発現が始まり、その後、親でも発現が続くこと、*DMRT1* の発現は孵化後20日頃から顕著になることがわかった。

DMY の機能阻害の実験系として gripNA を用いたノックダウンを試みた。*DMY* と *DMRT1* に特異的な gripNA を設計し、一細胞期の XY 卵に注入した。*DMY* をノックダウンすることで、雌の様に生殖細胞は増殖し、減数分裂特異的なマーカーである Scp3 の発現が観察された。これらのことから、*DMY* は生殖細胞の増殖に関する働きのあることが推察できた。

DMY/DMRT1 の発現する細胞を可視化するために、これらのプロモーター領域に蛍光レポーター

一をつないだトランスジェニックメダカを作出した。現在ホモ系統ができてきており、免疫組織化学やISH法でレポーター遺伝子の発現部位と本来の遺伝子それとを比較したところ、DMY-EGFP系統では、EGFPの発現はDMYの発現部位と一致していた。残念ながらEGFPの蛍光は体の外から観察できるほど強くなく、取り出した精巣を押しつぶすかばらして正立蛍光顕微鏡で観察する必要がある。

DMRT1はDNA結合型の転写因子だと考えられているので、DMYとDMRT1の結合DNA配列を同定するためのBinding site selectionを行った。DMYについて3種の結合配列を得た。これらの配列は、DMY、DMRT1の両方に結合することがゲルシフトアッセイにより確認された。

精巣分化に重要な時期に精巣特異的に発現する遺伝子の探索と解析

精巣特異的に発現する遺伝子をサブトラクション法とマイクロアレイ解析さらにISH法による探索を経て収集する計画を立てた。cDNAサブトラクションには、ふ化後5日、10日、20日のXX個体の生殖腺とXY個体の生殖腺より抽出したmRNAから合成したcDNAを用いた。作成したサブトラクションライブラリーから約1万クローンをシーケンス後、重複を減らして3,840のクローンに絞り込みそれらをスライドガラスにプリントした。一方、レーザーマイクロダイセクション(LMD)法を用いて、精巣の特定の発達段階の生殖細胞とその周辺の細胞よりRNAを抽出し、マイクロアレイで解析することに成功した。このことにより、精巣の特定の細胞特異的に発現する遺伝子を効率よく同定できるようになった。現在、親の精巣を用いたISH解析を進めており、この結果とマイクロアレイのデータを照らし合わせながら、遺伝子を絞り込んでいる。

ENUを用いた性分化関連遺伝子誘発突然変異体の探索

東京大学武田洋幸教授の突然変異体スクリーニングチームよりスクリーニングの終了したF₂を譲り受けF₃スクリーニングを行った。XXの雄を得たので、交配による確認作業を続けたが、戻し交配個体や次世代にXX雄は得られなかった。

5. 自己評価:

これまで、メダカの性分化関連遺伝子の機能解析の系は全くなかったが、本研究によりgripNAによるノックダウンやCMVプロモーターによる強制発現の系が有効であることがわかった。これらの系は、近い将来発見されると期待されるメダカ近縁種の性決定遺伝子やDMY発現以降に働く遺伝子の機能解析に有効であると考えられる。

マイクロアレイを用いた解析は、一度に多くの遺伝子の発現を解析できるが、胚全体や生殖腺全体からのRNAを材料とした解析でははっきりしたことがわかりにくかった。そこで、細胞の種類を絞り込むことで、解析が容易に成るのではないかと考え、LMD法により切り出した凍結切片由来のRNAを用いた解析を行った。この結果は予想通りであり、LMD法を組み合わせたマイクロアレイ解析は、特定の発達段階の生殖細胞もしくは体細胞に発現する遺伝子の同定に有効であることがわかった。これまで生殖腺を取り出すことの不可能だった孵化前後の稚魚においても凍結切片を作成することができたので、今後孵化前後の稚魚の生殖腺由来のRNAを用いて解析を進めることが可能だと思われる。

当初考えていたよりも、突然変異体のスクリーニングとトランスジェニック系統の飼育・選抜に多大な時間を割く必要があった。そのため、精巣特異的に発現する遺伝子の収集が思うように進まなかった。しかし、最近それらの実験系が整備でき、急速にデータを蓄積している。あと数ヶ月の間に精巣分化の指標となるような遺伝子の見つかることを期待している。また、精巣分化に関連する遺伝子の機能を解析するためには、孵化後の生殖腺を用いて遺伝子機能を解析できる系が必要であるが、このための系を構築するには至らなかった。器官培養系などの実験系の構築は今後の課題として残った。

6. 研究総括の見解:

ほ乳類以外の脊椎動物については、未だ、SRY/Sryに相当する遺伝子は見出されていない。本研究はメダカを用い、SRY/Sryに相当な性決定遺伝子を探索し、魚類における精巣及び卵巣の形成機構を解明しようとするものである。

トランスジェニックメダカによる解析や機能阻害実験などから、DMYの生殖細胞の分化における役割を解析し、その一端を明らかにした。研究着手の当初から課題の困難度は予想されたが、努力の結果、細胞を特異的に分離し得るLMD法とマイクロアレイ解析法を駆使し、候補分子の分離に成功した。近い将来、精巣特異的遺伝子の同定が十分期待でき、本研究は当初の目的をほぼ達成したと評価できる。

7. 主な論文等:

主な論文

- Nakamoto, M., Suzuki, A., Matsuda, M., Nagahama, Y. and Shibata, N. (2005) Testicular type *Sox9* is not involved in sex determination but might be in the development of testicular structures in the medaka, *Oryzias latipes*. *Biochem Biophys Res Commun* **333**(3), 729–736.
- Kobayashi, T., Matsuda, M., Kajiura-Kobayashi, H., Suzuki, A., Saito, N., Nakamoto, M., Shibata, N. and Nagahama, Y. (2004) Two DM domain genes, *DMY* and *DMRT1*, involved in testicular differentiation and development in the medaka, *Oryzias latipes*. *Dev Dyn* **231**(3), 518–526.
- Matsuda, M., Nagahama, Y., Matsuda, C., Kobayashi, T., Hamaguchi, S. and Sakaizumi, M. (2003) The sex determining gene of medaka: a Y-specific DM-domain gene (*DMY*) is required for male development. *Fish Phys. Biochem* **28**, 135–139
- Ohmuro-Matsuyama, Y., Matsuda, M., Kobayashi, T., Ikeuchi, T. and Nagahama, Y. (2003) Expression of *DMY* and *DMRT1* in various tissues of the medaka (*Oryzias latipes*). *Zoolog Sci* **20**(11), 1395–1398.

総説

- Matsuda, M. (2005) Sex determination in the teleost medaka, *Oryzias latipes*. *Annu. Rev. Genet.* **39**, 293–307.
- 長濱嘉孝, 小林亨, 松田勝. (2004) 魚類の性決定と生殖腺の性分化/性転換. *蛋白質核酸酵素* **49**(2), 116–123
- Matsuda, M. (2003) Sex determination in fish: Lessons from the sex-determining gene of the teleost medaka, *Oryzias latipes*. *Dev Growth Differ* **45**(5–6), 397–403.

口頭発表

- 松田勝, Bindhu Paul-Prasanth, 劉恩良, 長濱嘉孝: メダカ性決定遺伝子 DMY の機能解析. 日本動物学会第 75 回大会、2005 年 10 月 6–8 日
- 松田勝: メダカ生殖腺の器官形成〜未分化生殖腺からの精巣・卵巣形成〜. 日本発生生物学会第 37 回大会、名古屋、2004 年 6 月 5 日
- Masaru Matsuda : The sex determining gene of the teleost fish, medaka (*Oryzias latipes*). 第 76 回日本生化学会、横浜、2003 年 10 月 18 日
- 松田勝, 四宮愛, 木下政人, 小林亨, 劉恩良, 濱口哲, 酒泉満, 長濱嘉孝: メダカ性決定遺伝子 DMY の同定とその機能解析. 日本遺伝学会第 75 回大会、仙台、2003 年 9 月 23–26 日
- Masaru Matsuda, Yoshitaka Nagahama, Tohru Kobayashi, Satoshi Hamaguchi & Mitsuru Sakaizumi: The sex determining gene of medaka fish: a Y-specific DM-domain gene (*DMY*) is required for male development. Third International Symposium On Vertebrate Sex Determination, ハワイ、2003 年 3 月 24 日

招待講演

The sex determining gene of medaka: a Y-specific DM-domain gene(*DMY*) is required for male development. 7th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish. 18-23rd May 2003 in Mie, Japan.

取材

サイエンスチャンネル「メッセージフロームサイエンティスト」

受賞など

日本遺伝学会第75回大会 Best Papers 賞

研究課題別評価

1. 研究課題名: 神経回路網形成の分子情報伝達システムの解明

2. 研究者氏名: 柳 茂

3. 研究の狙い:

神経回路網形成は神経細胞が局所の標識分子を認識することの連続により、最終的な標的に至る。近年、これらの分子としてセマフォリンなどの反発因子が同定され、そのシグナル伝達機構が注目されている。私たちはセマフォリンのシグナル伝達への関与が推測されている CRMP 分子群に注目し、新規 CRMP ファミリー分子である CRAM および会合タンパク質の同定と機能解析を通して神経回路形成の分子メカニズムの解明を目指す。これらの研究が神経変性疾患の病因解明や治療法にも有効であると期待できる。

4. 研究結果:

4-1. チロシンキナーゼ Fes/Fps による微小管調節機構 (J. Biol. Chem. 2003)

私たちは Fes/Fps が微小管と結合し、微小管の核形成と微小管重合を促進すること、微小管の安定性に関与していることを見いだした。Fes/Fps はセマフォリンシグナルと微小管動態をリンクしているのではないかと推測された。

4-2. CRAM に会合するミトコンドリア Septin の同定 (Genes Cells 2003)

CRAM 結合蛋白質として新規の Septin ファミリー蛋白質が同定された。この Septin はミトコンドリアに移行することより Mitochondrial septin (M-septin) と命名した。M-septin は、傷害ミトコンドリアに集積し、傷害ミトコンドリアにユビキチン化を誘導し、消去機構に関与している可能性が示唆された。

4-3. CRAM はセマフォリン応答を負に制御する役割を発見 (Mol. Biol. Cell 2005)

CRAM は他の4つの CRMP と異なり、セマフォリンシグナルを抑制する役割が見いだされた。CRAM 過剰発現によりセマフォリンによる成長円錐の崩壊活性が完全に抑制された。また、CRAM が成長円錐の形成に必須であることが明らかとなった。

4-4. CRAM に結合する新規 GTPase 蛋白質 CRAG の発見 (論文投稿中)

今回、セマフォリンのシグナル伝達に関与する CRMP の結合蛋白質として新規 GTPase CRAG (CRMP-Associated GTPase) を同定した。CRAG は UV などの活性酸素種 (ROS) を発生するストレスによって核移行し、ユビキチンを伴う封入体を形成する。そして核内において PML と結合し、PML body の形態変化 (Large ring-like structure) と PML のユビキチンリガーゼを活性化することが見いだされた。今回の CRAG の発見により、セマフォリンシグナルと ROS シグナルという新しいシグナル伝達機構の存在が示された。さらに CRAG はポリグルタミン病の密接に関連していることが見いだされたので、神経変性疾患の病態解明と治療へ応用が期待できる。

5. 自己評価:

私の研究のバックグラウンドは細胞内情報伝達機構の解析である。この分野で会得した知識と実験手技を駆使して、神経回路形成の分子メカニズムの解明に挑んだ。具体的なテーマは反発因子セマフォリンを介するシグナル伝達機構であり、私たちが同定したタンパク質 CRAM

に注目して機能解析を行った。この3年間の研究においてCRAMが成長円錐の形成に関与していること、およびセマフォリンにより成長円錐崩壊活性を抑制することなどを明らかにすることが出来た。また、CRAMと複合体を形成する分子群の同定と機能解析より、神経軸索ガイダンス機構が活性酸素をセカンドメッセンジャーとするストレス応答シグナルである可能性を示唆することが出来た。当初の研究計画に沿って実験が進み、期待通りの実験結果が得られたように思う。しかしながら、詳細な解析が出来ておらず、予備的な実験結果が多い点は否めない。今後、この点を確実に進めていく必要がある。さらに、ポリグルタミン病の病態と関連するタンパク質やミトコンドリア機能に関連するタンパク質の同定という思いがけない展開がみられたので、今後の研究に活かしたい。

6. 研究総括の見解:

神経回路網形成を制御する分子情報の伝達機構を明らかにすることを最終的な目標とし、CRMP 遺伝子に焦点を絞って解析を進め、下流因子の解析にとどまらず、入力情報の解析も精力的かつ論理的に進捗させて、着々と優れた成果を生み出し公表しつつある。また、酸化ストレスによって封入体が形成され、ポリグルタミン病との関連を明らかにするなど、予定外の成果も挙げ、今後の研究の飛躍的な展開が大いに期待できる。本研究は目的を超える成果を収め、既に新しい研究展開がなされつつあり、「さきがけ的」研究の成功例であると評価できる。

7. 主な論文等:

原著論文

1. Qin Q., Inatome, R., Hotta, A., Kojima, M., Yamamura, H., Hirai, H., Yoshizawa, T., Tanaka, H., Fukami, K., and **Yanagi, S.** A novel GTPase, CRAM, mediates PML-associated nuclear body formation and degradation of expanded polyglutamine protein. *J. Cell Biol. In press*
2. Hotta, A., Inatome, R., Yuasa-Kawada, J., Qin, Q., Yamamura, H., and **Yanagi, S.** Critical role of CRMP-associated molecule CRAM for filopodia and growth cone development in neurons. *Mol. Biol. Cell* 16(1), 32-39 (2005)
3. Hirose, M., Kitano, J., Nakajima, Y., Moriyoshi, K., **Yanagi, S.**, Yamamura, H., Muto, T., Jingami, H., and Nakanishi, S. Phosphorylation and recruitment of Syk by ITAM-based phosphorylation of tamalin. *J. Biol. Chem.* 279(31), 32308-32315 (2004)
4. Takahashi, S., Inatome, R., Hotta, A., Qin, Q., Hackenmiller, R., Simon, M.C., Yamamura, H., and **Yanagi, S.** Role for Fes/Fps tyrosine kinase in microtubule nucleation through its FCH domain. *J. Biol. Chem.* 278(49), 49129-49133 (2003)
5. Takahashi, S., Inatome, R., Yamamura, H., and **Yanagi, S.** Isolation and expression of a novel mitochondrial septin that interacts with CRMP/CRAM in the developing neurons. *Genes Cells* 8(2), 81-93 (2003)

口頭発表

1. **Shigeru Yanagi**, Hirohei Yamamura: Elucidation of molecular signaling mechanism of axonal guidance 第75回日本生化学会. 2003, 10/17, 横浜.
2. 堀田あづさ、稲留涼子、秦慶宇、**柳茂**: 神経軸索の反発性ガイダンス因子セマフォリンのシグナル伝達に関与するCRAMの細胞内局在と機能解析、分子生物学会春季シンポジウム 2004、5/20、奈良

3. 秦慶宇、稲留涼子、堀田あづさ、山村博平、**柳茂**:ポリグルタミン病の変性蛋白質核内移行制御因子CRAGの同定と機能解析 A novel neuronal GTPase CRAG promotes nuclear translocation and degradation of inclusion bodies of the polyglutamine expanded protein、第77回日本生化学大会、2004、10、横浜

招待講演

1. **Yanagi, S.** Signaling mechanism of Semaphorin-mediated axon guidance. Symposium Signal Cascades in Tissue Remodeling 2003, 1(1/9), Geneva, Switzerland.

2. **Shigeru Yanagi**: Molecular mechanism for semaphoring-mediated signaling 第77回日本生化学会. 2004, 10/13, 横浜.

受賞

平成16年10月 日本生化学会奨励賞

研究課題別評価

1. 研究課題名:培養系での魚類始原生殖細胞からの個体創生技術の確立

2. 研究者氏名:吉崎悟朗

3. 研究の狙い:

in vitro で培養している細胞から個体を作出できれば、あらゆる遺伝子改変技術・細胞工学的技術を個体レベルで利用することが可能になるうえ、細胞が個体を形成するために必要な能力を解明していくための強力な実験系になることが期待される。そこで、個体に改変するための培養細胞の材料として、将来、配偶子に分化することが既に決定付けられた生殖細胞系列の前駆細胞に着目した。本研究ではこのニジマスから単離した生殖細胞を用い、その *in vitro* での培養方法の開発とともに、単離したドナー由来の生殖細胞を効率的に宿主個体に移植し、宿主生殖腺内で機能的な配偶子にまで改変する技術の開発・改良を目指した。

4. 研究成果

種々の成熟段階のニジマスから生殖細胞を単離し、これを孵化直後の稚魚の腹腔内に移植した結果、性的に未分化な始原生殖細胞のみならず、性分化が完了した精巣内に存在する精原細胞を移植した場合でも、ドナー細胞は宿主の生殖腺に取り込まれ、そこで増殖、分化することを見出した。さらに雄宿主に移植した精原細胞は宿主の精巣内で機能的な精子に分化すること、およびこれらドナー由来の精原細胞は複数の産卵期にわたり大量の精子を供給し続けることが確認された。このことは魚類精巣内にも生殖幹細胞集団が存在することを示唆している。一方、雌宿主に移植した精原細胞は、宿主自身の生殖細胞の成熟と完全に同調しながら、機能的な卵にまで分化し、正常な次世代個体を生産することが可能であった。これらの結果から、成体の精巣内に存在する生殖細胞(精原幹細胞と予想される集団)は未分化生殖腺体細胞に取り囲まれることで始原生殖細胞と同様に振舞い、性的両能性も獲得することが示唆された。

ドナーに由来する次世代個体の効率の良い選抜法を開発する過程で、始原生殖細胞の異種間移植が可能であることを明らかにした。すなわち、*in vitro* に単離した生殖細胞から個体を作製する際、上記のように宿主への細胞移植を施す必要が生じるが、宿主個体はドナー由来の配偶子に加え、宿主自身の配偶子も生産する。そこで、この両者に由来する次世代個体を簡便に判別する方法が必要となる。そこで生殖細胞の異種間移植に着目した。ヤマメの孵化稚魚にニジマスの始原生殖細胞を移植した結果、ニジマス細胞はヤマメ宿主に拒絶されることなく生殖腺に取り込まれ、増殖、分化した後、機能的な卵や精子が生産されることを明らかにした。さらに、これらの配偶子を通常のニジマスから得られた配偶子と受精させた結果、正常な次世代個体を作出することが可能であった。この際、宿主ヤマメは、ドナーニジマスに由来する配偶子と宿主ヤマメ自身の配偶子の両者を生産するが、これらをニジマス配偶子と受精させることで、宿主ヤマメ由来の配偶子がニジマス配偶子と受精した場合は致死性雑種となり、生残性の個体を選別するだけで効率良くドナー由来個体の同定が可能であった。

さらに、上記の精原細胞の培養条件の至適化を行った。GDNF、bFGF、プロゲステロン、エストラジオール 17 β 、およびニジマス 20 日胚の抽出液にこれら精原細胞の増殖促進活性が認められた。また、ニジマス顆粒膜細胞およびセルトリ細胞で特異的に発現している新規の TGF- β スーパーファミリーメンバーである *rtgr-1* も精原細胞の増殖を顕著に促進した。さらに、上記の増殖因子を加えた培地で 1 ヶ月間培養した細胞をニジマス孵化稚魚へ移植したところ、これらの細胞は宿主生殖腺内でコロニーを形成する能力を保持していることを確認した。

上記の始原生殖細胞や精原細胞の移植技術は、in vitro 培養系と組み合わせることで、マウスの ES 細胞を駆使した遺伝子ターゲティング実験と同様の遺伝子機能解析系に利用できることと期待される。さらに、これら生殖細胞の凍結保存により、魚類の遺伝子資源を半永久的に保存することが可能になるばかりでなく(魚卵や胚は凍結保存が不可能であるため、遺伝子資源の安全な保存策が無い)、サバのような小型魚種にマグロのような大型魚の配偶子を生産させることで、魚類種苗の生産技術を簡略化することも可能になるであろう。

5. 自己評価

当初の目標として掲げていた始原生殖細胞の in vitro 培養技術には、材料となる細胞を健康な状態で大量に調整する方法を見出すことができず、大きな進展が見られなかった。一方、移植技術の改良の過程で精巣内に大量に存在する精原細胞が、宿主へ移植後、始原生殖細胞と同様の挙動を示すことを見出すことができたため、調整が容易な本細胞を用いてほとんどの実験を行った。現段階では株化細胞の樹立には至っていないが、基本的な培養条件や種々の成長因子の効果は明らかになっており、今後継続的に研究を行うことで、精原細胞の株化が近い将来可能になると期待される。

6. 研究総括の見解

水産資源の維持と食料としての魚類の有効かつ持続的な養殖技術の確立を目標とした、きわめて独創的かつチャレンジングな基礎研究である。

非常にユニークな方法論によって、魚類個体の始原生殖細胞や精原細胞を異種魚類の宿主に移植し、そのドナー由来の精子または卵を得て個体にまで成育する系を確立し、それによって目覚ましい成果を収めた。当初の目的のひとつである始原生殖細胞を株化するまでには至らなかったが、始原生殖細胞のガラス器内培養系を確立しつつあり、近い将来の成果が十分期待できる。総合的には、応用面の研究も精力的に手掛けつつあり、当初の研究目的を超える成果を収めるとともに、新しい研究を展開しつつあり、高レベルのさきがけ的研究であると評価できる。

7. 主な論文

- Okutsu, T. Suzuki, K. Takeuchi, Y. Takeuchi, T. and Yoshizaki, G. (2005) Testicular germ cells can colonize sexually undifferentiated embryonic gonad and produce functional eggs. (submitted)
- Yoshizaki, G. Tago, Y. Takeuchi, Y. Sawatari, E. Kobayashi, T. and Takeuchi, T. (2005) GFP-labeling of primordial germ cells using a non-transgenic method and its application for germ cell transplantation in salmonidae. *Biology of Reproduction*. 73:88-93.
- Takeuchi, T. Yoshizaki, G., and Takeuchi, T. (2004) Surrogate broodstock produces salmonids. *Nature*, 430:629-630.
- Kobayashi, T., Takeuchi, Y., Yoshizaki, G., and Takeuchi, T. (2004) Isolation of highly pure and viable primordial germ cells from rainbow trout by GFP-dependent flow cytometry. *Molecular Reproduction and Development*, 67:91-100.
- Yoshizaki, G., Takeuchi, Y., Kobayashi, T., and Takeuchi, T. (2003) Primordial germ cell; a novel tool for fish bioengineering. *Fish Physiology and Biochemistry*, 28: 453-457.
- Boonanuntanasarn S, Yoshizaki G, Takeuchi T. (2003) Specific gene silencing using small interfering RNAs in fish embryos. *Biochem Biophys Res Commun*. 310:1089-1095.
- Takeuchi, Y., Yoshizaki, G., and Takeuchi, T. (2003) Generation of live fry from intra-peritoneally transplanted primordial germ cells in rainbow trout. *Biology of*

Reproduction, 69:1142-1149.

招待講演

- ・ 7th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish, 2003/5/18-5/23, Mie Japan, “Primordial germ cell: A novel tool for fish bioengineering”
- ・ 3rd International Congress on Embryo Biotechnology, 2003/10/29-10/30, Seoul Korea, “Germ cell transplantation in fish: can salmon make trout?”
- ・ 37th Annual meeting of Society for the Study of Reproduction, 2004/7/31-8/3, Vancouver, Canada, “Transplantation of primordial germ cells in fish: Can salmon make trout?”
- ・ 15th International Congress on Animal Reproduction, 2004/8/8-8/12, Port Seguro, Brazil, “Germ cell transplants in fish”
- ・ 放射線医学総合研究所第5回シンポジウム：放射線影響研究および被爆治療のキープレーヤー：幹細胞, 2005/12/1-2, 千葉, “生殖細胞移植実験が明らかにした魚類生殖幹細胞の可塑性”

受賞

- ・ 平成17年4月20日 文部科学大臣表彰 若手科学者賞「始原生殖細胞を用いた新たな魚類発生工学技術の研究」文部科学省
- ・ 平成17年5月29日 マリンバイオテクノロジー学会賞岡見賞「魚類生殖細胞を利用した新たな発生工学技術の開発」(社)マリンバイオテクノロジー学会
- ・ 平成18年2月2日 若手農林水産研究者賞「生殖細胞の異種間移植を利用した魚類養殖法に関する研究」農林水産省
- ・

取材

- ・ ニジマスの生殖細胞を移植した宿主ヤマメがニジマス精子を生産した研究について 2005/7/30, 朝日新聞、読売新聞、毎日新聞、共同通信、時事通信、東京中日新聞、産経新聞、日刊工業新聞、日経 BP

研究課題別評価

1. 研究課題名： 細胞運動制御の単分子スペクル法による総括的解析

2. 研究者氏名： 渡邊 直樹

3. 研究の狙い：

細胞の形態変化や運動は、細胞が生体の機能を支えるうえでの重要な過程の1つである。細胞質膜下に発達するアクチン線維は、構造を支持する足場を提供するのみならず、絶え間ない改変を繰り返し、細胞伸展縁ではアクチン重合が細胞質膜を押し出すための動力を発生している。このアクチン線維の重合・脱重合を捉えるために、蛍光アクチンを生細胞内で1分子ごとに可視化し、細胞内アクチンとの共重合を捉える「蛍光単分子スペクル法」を開発した。この手法をもとに、細胞伸展縁ではアクチン線維は先端部のみならず、そこから離れた起点より盛んに重合すること、重合後数秒以内に脱重合を開始することを解明した (*Science* 295:1083-1086 (2002))。この単分子スペクル法をアクチン制御分子にも応用することで、細胞伸展におけるアクチン重合、分解の各経路の役割を解明する。

4. 研究結果：

(1)私が以前、低分子量 G 蛋白質 Rho の標的分子として単離・クローニングした mDia1 は、細胞質分裂や細胞極性形成に重要な Formin ファミリー蛋白質の1員である。近年、Formin ファミリーが試験管内でアクチン核化を加速し、アクチン線維の伸長端に結合することが報告された。今回、mDia1 を単分子スペクル法によって生細胞内で観察したところ、数十マイクロンの距離を毎秒 2.0 マイクロメートルで分子移動することを見出した。その移動は微小管とは無関係で、アクチン重合、脱重合を阻害する3種の薬で停止した。その停止様式はアクチン線維の伸長速度の変化と一致した。また、顕微鏡下、ミオシン非存在下にて mDia1 は重合をつづけるアクチン伸長端に会合した。これらのデータは、mDia1 は重合するアクチンの重合端に結合しながらプロセッシングに移動することを示す。この発見はモーター蛋白質以外で長距離を移動する分子機構が存在することを、しかも生細胞内で直接明らかにするものである。(2)細胞伸展部分の葉状突起における主要なアクチン線維端結合分子である、Arp2/3 複合体とキャッピングプロテインの細胞内での分子キネティクスデータを得た。用いた標識体の忠実性を証明するため、キャッピングプロテインに関しては、GFP 標識体のヘテロダイマーのリコンビナントの生化学的解析を行い、アクチン反矢じり端に 1.3 nM の野生型に近い解離定数で結合することを確認した。Arp2/3 複合体に関しては、抗体を作製し内在性の分子と標識体の局在の一致を確認した。得られた分子キネティクスから、数理モデルを構築したところ、アクチン線維切断が恒常的に細胞内で起きることが高い確度で示された。また、得られた定量化データからは、アクチン線維が切断されるだけでなく、再結合も起きることも示唆されており、細胞の形態を制御するためにアクチン線維が切断・再結合を繰り返し、再編成されることが明らかにされた(投稿準備中)。(3)アクチンの求心性流動と細胞伸展端での線維重合速度が葉状仮足先端では負に相関するのを見出した。用いた薬剤解析のデータを付加した後、論文投稿の予定。

5. 自己評価：

生命科学の発展によって、多くの分子の構造やその遺伝子の表現系、分子間相互作用などが

明らかにされてきた。アクチン細胞骨格系においては、精密な生化学的解析により、個々の分子の性質の詳細が次々知られつつある。しかしながら、細胞1つをとっても、その内部は多数の分子機構が絡み合う複雑系であり、個々の分子機構の性質がどうして細胞や個体の表現系につながるのか、検証する手法の樹立が待たれている。今回のさきがけは、留学から帰国後間もないときからスタートしたが、顕微鏡システムの構築など順調に進み、当初の目的であった、アクチン関連蛋白質の蛍光単分子スペckル解析とそれによる細胞内アクチン線維代謝機構に新たな知見を提示することができた。特にリコンビナント蛋白質を用いた GFP 標識体の生化学的性質の検証や、細胞伸展部のアクチン生化学の数理モデル化による定量的解析など、他の類似の研究にはない高い水準で、細胞内分子機構の性質の解明を遂行できたと思う。また、思いがけず、かつて自らが単離した Formin ファミリー蛋白質の1つ、mDia1 について、アクチン伸長端をプロセシヴにキャップし、分子移動する性質を捉えることにも成功した。これらのことより、細胞内で分子機構がもつ性質を直接捉えたり、細胞内生化学反応を定量的に解釈することを可能とする、一段と進んだ高水準の研究に発展できたと考えている。

6. 研究総括の見解:

単分子スペckル法という斬新的な方法を導入し、アクチン線維の重合・脱重合に注目して、細胞の運動機構を解明することを最終的な目標とした。

きわめて順調に研究を進捗させ、生細胞のアクチン線維の形成過程におけるアクチン分子の重合・脱重合(解離)の過程を解明し、期待通りの成果を収めた。また、既に新しい研究の展開に着手しており、今後、一般的な細胞のほか、神経細胞の軸索伸長など細胞種に特異的な現象についても、解析を手掛けることで、従来にない新しい研究の展開も十分期待できる。

7. 主な論文等:

論文

1. Watanabe, N. and Higashida, C. (2004) Formins: Processive cappers of growing actin filaments. *Exp. Cell Res.* **301**: 16-22.
2. Higashida, C., Miyoshi, T., Fujita, A., Ocegüera-Yanez, F., Monypenny, J., Andou, Y., Narumiya, S. and Watanabe, N. (2004) Actin polymerization-driven molecular movement of mDia1 in living cells. *Science* **303**(5666): 2007-2010

和文総説・著書

1. 東田知陽, 三好拓志, 渡邊直樹(2005) 単分子スペckル顕微鏡によるアクチン生化学の1分子イメージング 蛋白質核酸酵素 第50巻 第11号 1436-1442
2. 渡邊直樹, 東田知陽, 三好拓志(2005) アクチン重合が駆動する細胞運動の謎に挑む単分子イメージング 生物物理 第45巻 第6号 292-296
3. 渡邊直樹(2005) 細胞の中を分子でのぞく—Less is moreとSerendipity— 学術月報 第58巻 第5号 389-391
4. 渡邊直樹, 東田知陽(2005) mDia1 とForminファミリー: アクチン伸長端をサーフィンするプロセシヴキャッパー 生化学 第77巻 第2号 136-140
5. 渡邊直樹(2005) 単分子スペckル顕微鏡がみせるアクチン重合の細胞内分子キネティクス 日本薬理学雑誌 第125巻 第2号 103-108
6. 渡邊直樹, 東田知陽(2005) アクチン重合駆動モーター“Forminファミリー” 化学と工業 第

58 卷 第 2 号 150-152

7. 東田知陽, 渡邊直樹(2004) アクチン重合端をサーフィンするmDia1 実験医学 第22巻 第15号 2178-2180
8. 渡邊直樹, 東田知陽(2004) 単分子スペckル顕微鏡法によるアクチン重合ダイナミクス解析 わかる実験医学シリーズ 細胞骨格・運動がわかる 131-135

招待講演

1. システム神経生物学スプリングスクール(SNSS2004) 平成16年3月22日大阪府四条畷市 Probing molecular kinetics with single-molecule speckle microscopy: Actin turnover and mDia1, the actin polymerization-driven motor Naoki Watanabe
2. 第18回細胞生物学シンポジウム「細胞膜骨格のイメージング:一分子から個体まで」平成16年11月25日名古屋 Actin turnover and the long-range processive actin capping motion of mDia1 as revealed by single-molecule speckle microscopy Naoki Watanabe
3. Keystone Symposia, Cell Migration and Adhesion 平成17年4月10日米国ユタ州スノーバード Molecular Kinetics of the Arp 2/3 Complex and Capping Proteins at the Leading Edge Takushi Miyoshi, Chiharu Higashida, ○Naoki Watanabe (○発表者)
4. 第58回日本細胞生物学会大会 平成17年6月17日埼玉県大宮 Evidence of constitutive actin filament severing in lamellipodia Takushi Miyoshi, Chiharu Higashida, ○Naoki Watanabe (○発表者)
5. 第14回日本バイオイメージング学会学術集会 平成17年10月27日東京 単分子イメージングによる細胞内アクチン重合機構の解析 渡邊直樹

受賞

平成16年度(第1回)日本学術振興会賞