

「タイムシグナルと制御」研究領域 領域活動 評価報告書

- 平成 15 年度終了研究課題 -

研究総括 永井 克孝

1. 研究領域の概要

生物は、自らが一旦遺伝子の内にセット(制御)したプログラムを、環境変化に応じてリセットすることにより、生命を維持しようとしている。当研究領域は、こうした仕組みとその応用について研究するものです。高齢化への方策に向け、個体から細胞、ゲノム、分子に至る様々な階層的次元で生命を時間的存在として捉えようとする研究などを含みます。例えば、配偶子形成は成長から加齢に至るタイマーのリセット機構、幹細胞の存在や再生は個体レベルでのタイムプログラムのリセット機構であり、また老化はその機構の能力低下として理解できます。

2. 研究課題、研究者名

別紙一覧表参照

3. 選考方針

選考は「タイムシグナルと制御」領域に設けた選考会議で行う。会議は研究総括及び選考委員(領域アドバイザー、10名)により構成し、研究総括が統括する。

基本方針は以下のとおりとする。

選考方法は、書類選考、面接選考及び総合選考とする。

4. 選考の経緯

1応募課題につき担当選考委員3名が書類選考し、書類選考会議に於いて面接選考の対象者を選定した。続いて面接選考及び総合選考により、採択候補者を選定した。

選考	書類選考	面接選考	採択者数
対象数	215名	32名	16名

5. 研究実施期間

平成 12 年 10 月 1 日～平成 15 年 9 月 30 日

6. 領域の活動状況

領域における研究者に対する対応は領域会議、さきがけ研究報告会の開催により行った。それぞれに於いて研究進捗状況の報告と討論、研究交流を行った。研究総括は研究実施場所を訪問し、研究進捗状況の把握、研究実施場所の上司と懇談し、研究者の研究がスムーズに運ぶように協力を要請した。

7. 評価の手続き

研究総括が個人研究者からの報告を基に行った。研究報告会での参加研究者からの研究成果に対する意見、質問の内容などを参考にした。

(評価の流れ)

平成 15 年 9 月	研究終了
平成 15 年 12 月	研究報告会開催
平成 15 年 1 月まで	研究報告書及び自己評価提出
平成 15 年 2 月	研究総括による評価

8. 評価項目

- (1) 外部発表 (論文、口頭発表等)、特許、研究を通じた受賞等、研究領域での新たな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 (ポスドク参加型)」の第一回修了生は 16 名である。ポスドク参加型では提案者個人の研究構想を現実にするために、研究員 (ポスドク) や技術員 (テクニシャン) を 1~2 名とともにチームを編成する自由度の高い研究資源を提供して研究を実施するという精神の上に構成されている。3 年間という限られた時間ではあるが、以下に示す 16 名の研究成果はそれぞれ注目されるものであり、新しいシステムでの研究支援が有効に働いたことは明白である。

脳神経科学系：

小阪 美津子は網膜虹彩上皮細胞が幹細胞としての機能を有することを示し、その大量培養に成功した。患者個人の細胞を用いた再生医療の可能性を拓いた。田中 光一は神経系を構成するグリア細胞に着目し、ある種のグルタミン酸トランスポーターの作用を遺伝子改変マウスを用いて明らかにし、グルタミン酸の脳における重要性に 1 ページを加えた。田辺 康人は脳における領野形成に細胞の遊走が重要であることを示した。尾藤 晴彦は長期記憶のトリガーとしての細胞骨格の再構築に注目し、記憶形成部位でのアクチンフィラメントの動的挙動の意味を解明した。星 美奈子はアルツハイマー病の原因物質としてアミロスフェロイドを単離し、その毒性を明らかにし、ヒトへの応用に大きく前進した。若松 義雄は幹細胞の根本に関わる問題を神経系の細胞を用いて検討し、神経系幹細胞の分化と非対称分裂に関与する新規の分子を単離し、その作用機序を明らかにしようとした。

細胞生物学系：

柴原 慶一はシロイヌナズナを用いてポストゲノムの重要課題であるエピジェネティック機構の解明に向けて新たな道筋を拓いた。下田 修義はノーテイルと呼ばれる現象にエピジェネティック機構が関与していることを、ゼブラフィッシュを用いて明らかにした。三木 裕明は細胞の形態形成に関与するアクチンフィラメントの再構成の制御に注目し、WASPファミリー蛋白質による制御機構を明らかにした。

免疫科学系：

渋谷 彰は IgM 抗体に対する受容体を世界で最初に同定し、粘膜に存在する受容体の機能解明に新しい道を拓いた。清野 研一郎は臨床医としての視点から NK 細胞の免疫調節・生体防御における役割を解明し、移植やガンに関する問題も含めて、免疫寛容機構の解明に 1 ページを加えた。中野 裕康は TNF を中心に細胞死機構の解明を目指し、アポトーシスとネク

ローシスの2種類の細胞死機構の違いを明らかにした。山下 政克は末梢T細胞の機能分化とクロマチン構造の安定的調節と制御を分子レベルで明らかにすることを旨とし、エピジェネティックな調節の関与を明らかにした。

生物物理学系：

佐甲 靖志は1分子イメージング法を更に前進させ、受容体及びチャンネルなどの機能解明にブレークスルーに値する成果を上げた。高田 彰二は蛋白質の三次構造の解析をバイオインフォマティクスの手法により挑戦し、世界のトップに肩を並べる成果を上げた。さらに、蛋白質凝集のシミュレーションは他の研究領域の研究者にも大きな影響を与えた。若杉 桂輔は蛋白質工学的手法により新規の蛋白質を構築し、シグナル伝達の制御を人工分子の創出により可能にすることが近いことを示した。

以上概観したように、「タイムシグナルと制御」領域に提案を採択された研究領域は多方面に渡り、各研究者は自己の研究領域のみでなく他方面の領域の研究者とも交流することにより、より視野の広い研究を推進し、世界に先駆けた成果が得られている。グループメンバーの寄与は予想以上に大きい。若い研究者の中には「ヒトを雇用する」という点で大きな経験をしたものもいる。

10. 評価者

研究総括 永井 克孝 三菱化学生命科学研究所取締役所長

領域アドバイザー氏名 (五十音順)

浅島 誠	東京大学大学院総合文化研究科 教授
石川 冬木	京都大学大学院生命科学研究科 教授
金澤 一郎	国立精神・神経センター神経研究所 所長
佐邊 壽孝	(財)大阪バイオサイエンス研究所 部長
鈴木 紘一	東レ株式会社 先端研究所 所長
谷口 直之	大阪大学大学院医学系研究科 教授
谷口 克	千葉大学大学院医学研究院 教授
中野 洋文	協和発酵株式会社 室長
鍋島 陽一	京都大学大学院医学研究科 教授
本間 好	福島県立医科大学医学部 教授

(参考)

(1) 外部発表件数 (外部発表投稿表が提出されたもの)

	国内	国際	計
論文	5	80	85
口頭	158	31	189
出版物	23	7	30
合計	186	118	304

(2) 特許出願件数

国内	国際	計
5	0	5

(3) 受賞等

・中野 裕康

Young Investigators' Grants Award (Human Frontier Science Program)(2001年3月)

“Signal dependent regulation of NF- κ B activity”

・尾藤 晴彦

Young Investigators' Grants Award (Human Frontier Science Program) (2002年4月)

日本薬理学会学術奨励賞 (2003年3月)

(4) 招待講演

総計 106 件

別紙

「タイムシグナルと制御」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)
小阪 美津子 (専任)	眼の再生を支える幹細胞システムの 解明とその医学応用 (岡山インキュベーションセンター)	科学技術振興事業団 さきがけ研究 者 (倉敷成人病センター 医科学研究所 主任研究員)	85
佐甲 靖志 (兼任)	細胞内 1分子測定で見る増殖と文化 の情報 (大阪大学大学院生命機能研究科)	大阪大学大学院生命機能研究科 助教授 (大阪大学大学院医学系研究科 助 教授)	82
柴原 慶一 (兼任)	クロマチン情報が親鎖から娘鎖に維持 伝承される機構 (国立遺伝学研究所)	国立遺伝学研究所 助教授 (コールドスプリングハーバー研究所 ポスドクトラルフェロー)	109
渋谷 彰 (兼任)	免疫グロブリン受容体を介した生体防 御機構 (筑波大学基礎医学系)	筑波大学基礎医学系 教授 (筑波大学基礎医学系 助教授)	82
下田 修義 (専任)	環状遺伝子の形成とその生物学的意 義 (徳島大学ゲノム機能研究センター)	科学技術振興事業団 さきがけ研究 者 (理化学研究所脳科学総合研究セン ター 研究員)	99
清野 研一郎 (兼任)	免疫の調節機構、その制御と新しい治 療コンセプト (理化学研究所免疫・アレルギー科学 総合研究所)	理化学研究所免疫・アレルギー科学 総合研究所 研究員 (筑波大学臨床医学系 講師)	79
高田 彰二 (兼任)	構造トポロジーを用いた細胞内蛋白質 の生涯プログラム (神戸大学理学部)	神戸大学理学部 助教授 (神戸大学理学部 講師)	82
田中 光一 (兼任)	神経幹細胞の分化過程と神経回路網 の再構築 (東京医科歯科大学難治疾患研究所)	東京医科歯科大学大学院疾患生命 科学研究部 教授 (東京医科歯科大学難治疾患研究 所 教授)	80
田辺 康人 (出向)	大脳皮質における機能的領野のパタ ーン形成機構 (三菱化学生命科学研究所)	三菱化学生命科学研究所 主管研 究員 (大阪バイオサイエンス研究所 研 究副部長)	104
中野 裕康 (兼任)	老化により生じる神経細胞死を抑制す る遺伝子 (順天堂大学医学部)	順天堂大学医学部 講師 (順天堂大学医学部 助手)	76

尾藤 晴彦 (兼任)	長期記憶の分子機構の検索 (東京大学大学院医学系研究科)	東京大学大学院医学系研究科 助 教授 (京都大学大学院医学研究科 講 師)	73
星 美奈子 (出向)	アルツハイマー病からの脳の老化制 御機構を探る :新たな Amylospheroid 仮説提唱と検証 (三菱化学生命科学研究所)	三菱化学生命科学研究所 准主管 研究員 (三菱化学生命科学研究所 副主任 研究員)	100
三木 裕明 (兼任)	細胞骨格の動的再構成による細胞形 態と分化の制御 (東京大学医科学研究所)	東京大学医科学研究所 助教授 (東京大学医科学研究所 助手)	72
山下 政克 (兼任)	免疫細胞遺伝子構築の人為的制御 (千葉大学大学院医学研究院)	千葉大学大学院医学研究院 講師 (千葉大学医学部 助手)	73
若杉 桂輔 (兼任)	細胞工学的手法によるタイムシグナル の人工制御系の構築 (京都大学大学院工学研究科)	京都大学大学院工学研究科 助手 (同上)	73
若松 義雄 (兼任)	脊椎動物の神経系幹細胞の分化と非 対称分裂のプロセス (東北大学大学院医学系研究科)	東北大学大学院医学系研究科 講師 (同上)	73

研究課題別評価

1.研究課題名 眼組織の再生を支える幹細胞システムの解明とその医学応用

2.研究者氏名 小阪 美津子

グループメンバー 江崎 真理子(研究期間 H12.10.1.~H14.3.31.)

孫 廣イ(研究期間 H13.4.1.~H15.8.31.)

3.研究の狙い：

ヒトを含めた多細胞動物には、きわめて複雑な体制を長期間維持するため体制構築に高度なフレキシビリティが備わっている。「再生」は、その動物個体が示すフレキシビリティの代表的現象のひとつと位置付けられる。有尾両生類イモリは、その生涯を通じて、色素上皮から眼の主要組織であるレンズや網膜神経を再生することが知られているが、実は、この色素上皮細胞の分化転換能力はニワトリやヒトを含めた脊椎動物に普遍的に保持されていることが、示唆されてきた。本研究の狙いは、次の2点からなる。

1)動物体制の基本的理解:一旦確実に分化した細胞が、全く別種の細胞へと変化する「分化転換」現象は、多細胞動物の体制構築と維持のしくみを正しく理解するためのきわめてユニークな系である。申請者が確立した、脊椎動物の色素上皮細胞の分化転換を試験管内で制御する系を用いて、組織細胞の分化形質発現の安定化機構あるいは脱分化機構を分子レベルで解明する。

2)再生医療への応用:これまでの申請者自身の研究成果から、眼の主要組織を再構築させるための幹細胞として「虹彩色素上皮細胞」に注目している。虹彩上皮細胞の分化転換能力を活用して、細胞移植により、哺乳動物の眼球内でのレンズおよび網膜神経の組織再生を試み、ヒト眼科系難病に対する新しい再生医療の道を開拓する。

4.研究結果：

(1)ニワトリ虹彩上皮細胞の神経細胞への転換の実証

本研究を開始する前に、ニワトリ虹彩上皮細胞のレンズ細胞への転換を試験管内で示すことに成功していた。そこでまず第一に、この細胞の神経系への転換の可能性を検証した。その結果、孵化後2日齢のニワトリ虹彩上皮細胞が試験管内で神経系細胞(ニューロン、グリア)へ転換すること、さらに一部の細胞では、特定の網膜神経細胞(網膜視細胞(ロッドおよびコーン)、ミューグリア細胞)への分化を起こすことを明らかにした。

(2)ニワトリ虹彩上皮細胞の神経幹細胞(前駆細胞)としての性状

中枢神経系幹細胞の選択培養として知られる neurosphere 法で虹彩上皮細胞を培養すると、neurosphere が形成し幹細胞マーカーや網膜前駆細胞マーカーの発現が認められた。さらに、成体組織内の虹彩上皮細胞の少なくとも一部の細胞でそれらの幹細胞マーカーの発現が確認された。

(3)成体哺乳動物虹彩上皮細胞から視細胞への転換の誘導

成体哺乳動物(ラット)の初代培養系を確立し、網膜視細胞の発生期に特異的に働く *crx* 遺伝子を強制発現させたところ、細胞形態は視細胞様に変化し、光受容に関わる視細胞特異的蛋白質の産生が誘導された。この実験は、京大眼科グループと共同で実施し、今後網膜疾患に対する再生治療に、虹彩細胞が有力な材料となり得ることを世界にさきがけて示した。

(4) 哺乳類虹彩上皮細胞の分化ポテンシャルの実証

マウスおよびラットの幼若個体の眼球から虹彩上皮細胞を効率よく単離する方法を確立し(特許申請済)、トJの場合と同様に neurosphere を形成可能であること、ニューロン、グリア細胞へ分化が可能であることを確認した。さらに、マウス虹彩上皮細胞のトJ胚眼球内への移植やトJ網膜幹細胞との共培養系による解析から、マウス虹彩上皮細胞にもレンズや網膜神経細胞へ分化する能力があることを実証した(特許申請済)。

(5) 哺乳類虹彩上皮細胞由来幹細胞の可塑性の解析

マウス虹彩上皮細胞から得られる幹細胞の中には、予想を超えた多分化能を有する可能性が全能性細胞マーカーの発現や胚葉性を超える分化細胞の出現から示唆された(特許申請済)。この事は、分化転換現象を理解する上で極めて重要であり、従来の概念を再検証する必要を提起するものである。

5. 自己評価 :

哺乳類の虹彩上皮細胞を培養可能とし、レンズや網膜神経への転換、さらには、より広範囲な分化スペクトルを示せたことは、基礎生物学、再生医学双方の分野において大きな意味を持つと考えている。虹彩組織はその一部を外科的手術で切除することが可能であるため、本細胞が再生治療に有用となれば、臨床応用に直結することが期待される。また、ある種の動物生体内で実際にその可塑性を示し、分化転換を引き起こす虹彩上皮細胞から得られる知見は、未だ謎の多い生体組織幹細胞研究においても、多大な貢献をもたらすことと考える。本研究期間内では、多くの新しい知見を得ることができ研究を大きく展開することができた。しかしながら、成果の多くが正式な発表が未完成な段階にあり、現在論文の投稿を多数かかえる状況になっていることが反省すべき点である。

6. 研究総括の見解 :

眼の機能の解明とその医療への応用に大きな波及効果をもつ、「虹彩色素上皮細胞」の幹細胞性に着目して、独自の実験系を立ち上げて、その展開を着実にやってきた。胚性幹細胞(ES細胞)とは別に体性幹細胞が存在することが次第に注目され、その医療への応用技術も動きだしている現在、先駆的役割を果たしてきたことは評価できる。

7. 主な論文等 :

1. Haruta M, Kosaka M, Kanegae Y, Saito I, Inoue T, Kageyama R, Nishida A, Honda Y, Takahashi M. Induction of photoreceptor-specific phenotypes in adult mammalian iris tissue. Nat Neurosci. 2001 Dec;4(12):1163-4.

学会発表 国際 5件 / 国内 8件

出版物 国際 1件

研究課題別評価

1.研究課題名 細胞内 1分子測定で見る増殖と分化の情報

2.研究者氏名 佐甲 靖志

グループメンバー：一之瀬 純也 (研究期間 H12.10.1. ~ H15.9.30.)

森松 美紀 (研究期間 H13.4.1. ~ H15.9.30.)

3.研究の狙い：

発生・老化の過程で根本的に重要な細胞レベルのタイムプログラムは増殖と分化である。この両者は細胞の運命決定としては正反対の現象であるが、細胞内分子過程には密接な関係があり、たとえば上皮成長因子(EGF)による増殖と神経成長因子(NGF)による分化のプログラムは、ほとんど共通の細胞内情報伝達回路によって担われている。したがってプログラム制御のしくみを解明するには、この回路における増殖と分化それぞれの情報処理反応を定量的に解析しなければならない。本研究はこれを目的としておこなった。

我々の開発した細胞内 1分子測定法を用いて、情報処理の要であるチロシンリン酸化酵素 EGF 受容体および NGF 受容体と、低分子量 GTPase Ras の反応ダイナミクスを 1分子計測する。同時に、細胞のカルシウム応答、軸索伸長および細胞質の Raf1 の細胞膜への局在変化などを出力と捉えて、情報回路の大局的な応答特性を測定することを具体的目標とした。

長期的には、両者の結果を、分子の反応と回路の反応の動的相補性という観点から統合することによって、増殖と分化それぞれの情報処理の特性を明らかにすることを目指していた。

4.研究結果：

(1)細胞内 1分子計測法の開発 改良

複数分子種を同時観察するために、1分子蛍光顕微鏡を多色化した。2色同時観察によって受容体の活性化や、分子間相互作用の検出などを行った。3色同時観察を可能にする装置まで製作した。

細胞表面など凹凸を持った試料をむらなく観察するための光学系を考案した(上村他特許出願中)。細胞表面への情報分子の結合数計測などに利用できる。

蛍光 1分子観察と落射蛍光観察を同時におこなう顕微鏡を開発した。情報分子の結合の 1分子計測と細胞内カルシウム応答の同時観察が可能になった。(Sako and Uyemura, 2002)

セミ-インタクト細胞技術と 1分子観察技術を最適化し、細胞構造を保ったままで、情報分子間の結合・解離反応速度を解析する方法を開発した。(東大 総合文化、村田昌之氏との共同研究； Sako et al., 2003)

細胞内での 1分子動態(分子数、分子密度、拡散速度、会合状態、結合時間など)の計測をより正確、かつ高速・自動化するためのソフトウェア開発をおこなった。(阪大・生命機能、渡邊朋信、小塚淳氏との共同開発； Hibino et al., 2003)

細胞に安定した局所的刺激、濃度勾配刺激を与える方法を開発した。NGF による細胞伸長反応の解析に利用した。(柴田ら学会発表)

(2)EGF 受容体の 1分子反応計測

EGF 受容体の活性化増幅・伝搬反応の分子機構の解析・受容体の活性化の 1分子計測により

個々の EGF 結合部位での活性化受容体分子数の増加、細胞膜全体の活性化部位数の増加という2種の信号増幅が起ることが示された。この増幅過程は膜受容体の動的組織化(クラスター化)と熱ゆらぎによる膜上での速報拡散運動を利用して起こることが分かった。また、活性化の速度は細胞膜上で局所により大きく異なっており、受容体分子の活性が分子毎に多様であることが分かった。活性化が受容体分子間の相互作用で増幅伝搬することから、増幅率は細胞膜の受容体密度に依存すると考えられる。従来の実験に使用してきた A431 細胞は細胞当たり 3×10^6 個の受容体分子を持つ。 5×10^5 個 (A431 の 1/60) の受容体を持つ HeLa 細胞で受容体の活性化を計測したところ、生細胞では活性化増幅が観察されなかった。しかし、セミインタクト化して細胞質を流出させた細胞で計測を行ったところ、HeLa においても活性化増幅が起こり、細胞当たりほぼ同一の EGF 結合数で比較した増幅率は A431 細胞と同程度であった。生細胞とセミインタクト細胞の違いは、細胞質の脱リン酸化酵素の有無に依ると考えられ、活性化の増幅率は、受容体密度と逆反応速度のバランスにより決定されていると思われる。また、EGF が結合した受容体の内、活性化しているものは約 30%に過ぎないこと、この 30%に由来する活性化が約 10 倍に増幅されていることが明らかになった。以上の結果をまとめた論文を執筆中である。(Ichinose et al., 投稿準備中)

EGF 受容体と SH2 蛋白質の相互作用キネティクスの細胞内計測 :リン酸化された EGF 受容体は Shc, Grb2, c-Cbl, PLC γ など SH2 蛋白質と相互作用し、情報処理を行う。活性化型受容体と mSos1(Ras の Guanine nucleotide exchange factor)を繋ぐアダプター蛋白質 Grb2 との分子間相互作用の 1分子可視化計測を行った。蛍光色素(Cy5)で標識した EGF でセミインタクト細胞中の EGF/EGFR 複合体の位置を 1分子検出し、リコンビナント精製して N-末端を蛍光色素(Cy3)で標識した Grb2 との結合・解離を観察した。両蛍光色素の共同在の時系列変化から、EGFR と Grb2 との結合速度定数、解離速度定数を求めることができた。両方向の反応とも複数の速度成分を持つことが明らかになった。各成分の重み付き平均から推定した平衡状態の解離定数は、従来受容体の断片を用いて in vitro 計測された解離定数とほぼ一致した。連続した2回の結合・解離反応時間の相関関係を解析し、複数の反応様式が、各回の反応毎にランダムに選択されていることが明らかになり、情報伝達が複雑な相互作用変化によって制御されている可能性が示唆された。EGFR と Grb2 の認識反応が受容体蛋白質全長が正しく細胞膜構造に保持されたままで計測されたことは初めてであり、反応速度定数は従来の in vitro 計測においても求められていなかった。今回の 1分子計測による分子間相互作用パラメータ計測法は、細胞内分子システム研究の重要な技術となり得る。(森松他、学会発表)

(3) NGF 受容体の 1分子反応計測

蛍光 NGF の 1分子観察によって、神経成長円錐での NGF/NGF 受容体複合体の形成と運動を解析した。複合体は、極めて速い拡散運動、成長円錐基部へ向けた方向性輸送など、いくつかのモードで複雑に運動することが分かった。(都立臨床研、原田慶恵氏ら、産総研関西、田口隆久氏らとの共同研究、谷ら学会発表)

NGF は TrkA, p75 の 2種の受容体を持つ。p75-GFP を PC12 細胞に発現させ、1分子運動解析を行った。NGF の添加によって、不動成分が 5%から 15%に増加するとともに、可動成分の拡散係数は約 2倍に増加すること、すなわち NGF による受容体の運動様式の分化が観察された。(由井ら学会発表)

(4) Ras, Rho family の反応計測

Ras, Raf1 の 1分子計測 :Ras は EGF, NGF の下流で共通に働く低分子量 GTPase であり Ras

の活性化は細胞質の Raf1 を細胞膜へ局在変化させることによって Raf1 のリン酸化による活性化を促す。HeLa 細胞に GFP, YFP を融合した Ras, Raf1 を発現させることにより EGF による Raf1 の局在変化を可視化し、また、Ras, Raf1 の細胞膜における挙動を 1 分子計測した。EGF の結合が細胞膜全体でほぼ均一に起こり、数分後には EGF の細胞内取り込みが起こるのに対し、Ras, Raf1 の相互作用部位は空間的に不均一であり、また、Ras の存在するすべての場所に Raf1 が結合する訳ではないこと、Ras, Raf1 の相互作用が、局所的には生化学的に計測されていたよりも数倍長く持続し、そのような部位から細胞の形態変化が起こること、長期的な相互作用部位に置いても個々の Raf1 分子は細胞質と細胞膜の間で常に交換されていること、Raf1 の膜滞在時間には 2 つの成分があり、その一方は長期集積部位のみに限られていることなどを明らかにした。これらは、Ras の活性化と分子認識が細胞内の時間・空間特異的に制御されていることを示唆している。(Hibino et al., 2003)

Rho, Rac は Ras の下流で働き、細胞の伸展、収縮運動を制御する情報分子である。細胞内で Rho の活性化(GTP 結合)を可視化計測するために、YFP-Rho と蛍光 GTP の結合を蛍光共鳴エネルギー移動により画像化する方法を開発した。PC12 細胞を NGF 刺激すると、細胞-基質間接着部位に GTP-Rho が濃縮することを発見した。一方、GTP-Rac は葉状仮足やその他の細胞膜に集積した (Murai et al., 2003; Miyachi et al., 投稿中)。

(5) 細胞内カルシウム応答

HeLa 細胞においてカルシウム応答と EGF の結合数の関係を測定した。細胞集団のうち半数の細胞にカルシウム応答を引き起こす EGF 結合数 (応答率 50%) は 300 分子であり、このとき 100 分子は単量体として、残りの 200 分子は多量体として受容体に結合した。応答率は多量体の結合数と比例関係があった。通常の HeLa 細胞は 5×10^4 程度の EGF 受容体を持つが EGF の連続投与による down regulation で細胞当たり 10^4 まで受容対数を減らしても EGF 結合数当たりの応答率はほとんど変化しなかった。いずれの場合も EGF 結合数の減少とともに反応開始時間は遅延したが、その後の反応の大きさは EGF 結合数によらず、EGF 受容体によって活性化された PLC β の反応による IP $_3$ の蓄積をまって、それ以降の反応は on/off 的に進行することが分かった。(Uyemura et al., 投稿準備中)

(6) NGF による軸索伸長

神経伸長モデルとして PC12D 細胞の NGF による突起伸長を使い、神経突起の形成部位決定と伸長機構を明らかにするために、細胞周辺部の運動と突起伸長の関係を計測した。NGF 添加後数分で広く細胞周囲に葉状仮足の形成が起こり、1 時間後には 1 ~ 数本の軸索様突起が伸長する。将来的に突起伸長が起こる部位においては、NGF 添加 5-15 分後の葉状仮足の伸展収縮運動周期が有意に短縮していた。これに対し、伸展および収縮の速度と継続時間は部位による差が認められなかった。すなわち、伸展収縮 1 周期あたりの伸長は、細胞周囲のどこでも均一であるが、将来的な伸長部位では運動周期の短縮により、他の部位よりも速い伸長がおこる。伸長には伸展収縮のダイナミクスが重要であり、伸展運動が一方向的に促進されるのでは無いことが分かった。(柴田ら、学会発表) NGF による運動周期短縮の分子機構を研究するため、蛍光 NGF の 1 分子観察により、NGF 入力と伸展収縮運動変化の関係を計測している。

(7) その他

細胞性粘菌の走化性応答反応の計測 (さきがけ上田昌宏氏との共同研究) : 細胞性粘菌の cAMP による走化性応答反応において、cAMP と受容体の解離速度を 1 分子計測し、細胞の前後軸に沿って前端では解離速度が速く、後端で遅いことを発見した。分子の結合密度に空間的差違

はないが、反応速度を制御することによって前後軸の形成、運動方向の安定化が図られていることを明らかにした。(Jeda et al., 2001)

CD44 の会合体形成による Rac の活性化計測 (阪大医 村井稔幸氏との共同研究) : CD44 の会合が CD44 細胞外部位の切断を通してがん細胞の運動、浸潤を起こす過程において、Rac の活性化が起こることを蛍光共鳴エネルギー移動法によって計測した。(Murai et al., 2003)

細胞性粘菌のミオシンフィラメントの動態解析 (山口大 理、祐村恵彦氏との共同研究) : 走化性応答、細胞分裂中の細胞内でミオシン II のフィラメントの動態を観察している。空間的に制御されたミオシンモノマーとフィラメントの動的平衡によってフィラメントの細胞内局在が起こることなどが明らかになりつつある。(祐村他、学会発表)

その他、阪大 医、神戸大 理、九大 医、東レリサーチセンターとの共同研究が進行中である。

5. 自己評価 :

細胞内 1 分子計測法をはじめとする顕微計測法に関しては、かなりの進展があり、分子数、分布、動態、リン酸化等の修飾、分子間相互作用などを計測することが可能になった。すなわち、今や、細胞内情報処理システムの反応素過程のほとんどを定量することが原理的に可能である。これらの方法を利用して、分子素子として情報処理システムの要である細胞膜受容体(EGFR, NGFR)と低分子量 GTPases (Ras, Rho family)の動態・反応を計測した。EGFR に関しては、分子のシステム化を利用した活性化、分子認識など、情報処理反応のかなりの部分を明らかにすることができ、現在論文を準備している。GTPase の分子動態、分子認識にも 1 分子レベルでの反応の空間的多様性などをみることができた。NGF 受容体(TrkA, p75)は発現系構築の難しさから EGF 受容体ほど研究が進展しなかったが、p75 の 1 分子動態計測など、徐々に結果が出始めている。以上のように、分子素子の反応計測に関しては相当の進展があった。

分子システムの反応としては、細胞のカルシウム応答システムの EGF 入力に対する応答関数を求めた。また、神経細胞分化にともなう形態変化を定量し突起形成との関係を計測した。結果をとりまとめているところであるが、細胞反応の研究に定量性という視点を導入できるものと期待している。

以上のように、分子素子、分子システムの反応計測ともに一定の成果を得ることができたが、多くの反応素過程を含む複雑な反応システムを対象としているため、決定すべきパラメータはまだ多数存在する。また、分子システムの入出力関係の計測もある程度可能になったが、素子の反応を闇雲に計測すればシステムの応答特性を説明できるというものではない。素子とシステムという2つの階層をどのように結びつけて全体を理解するかが問題である。残念ながら、この問題にあまり踏み込むことができなかったが、以下の2つのアプローチを開始した。ひとつはセミインタクト細胞技術を利用した情報処理システムの再構成系の構築である。要素数を最小にし、かつ要素濃度を自由に制御して反応計測を行い、これを分子ネットワークシミュレーションと比較検討することを計画している。また、個々の反応の詳細に拘泥することなく一般論として分子システム、情報処理の原理を解明することが基礎生物学としては最重要であると考え。この線に沿って、複雑系物理学との融合を目指して広島大 柴田達夫、東京大 金子邦彦氏らと定期的に意見交換を行っている。

本研究の進展につれて明らかになってきたことは、分子、分子システム、細胞レベルいずれにおいても、細胞情報処理反応には大きな多様性とゆらぎがあることである。分子反応の多様性やゆらぎが情報処理に利用されているのか否か。細胞反応の多様性、ゆらぎがどのような法則で推

移すのかを研究することが今後の課題である。幸いにして、平成15年度より5年間、文部科学省リーディングプロジェクト「細胞・生体機能シミュレーション」の一部として、生命機能可視化技術の開発を行うこととなり、本研究の研究グループを新プロジェクトへ移行することができた。本研究で得られた成果を継続・発展させることを目指して研究を進める。

6. 研究総括の見解：

一分子イメージング領域におけるトップリーダーと目される阪大・柳田研究室における助教授として、実質的かつ高度な活動を行ってきた。本研究領域に選ばれてから、受容体およびチャネルなどの機能に対してブレークスルーに値する画期的な成果をあげたことは高く評価できる。その評価もあってか、今後は指導者として名実ともに独立した活動を続けることになった。

7. 主な論文等：

論文 総説

1. Ueda, M., Sako, Y., Tanaka, T., Devreotes, P. N., and Yanagida, T. (2001) Single molecule analysis of chemotactic signaling in Dictyostelium cells. *Science*, 294, 864-867.
2. Sako, Y. and Uyemura, T. (2002) Total internal reflection fluorescence microscopy for single-molecule imaging in living cells. *Cell Struct. Funct.*, 27, 357-365.
3. Sako, Y. (2002) Imaging of biological molecules. 2. Membrane receptors. in "Nano-Optics" Kawata, S., Ohtsu, M., and Irie, M. ed. pp.209-215. Springer.
4. Hibino, K., Watanabe, T., Kozuka, J., Iwane, A. H., Okada, T., Kataoka, T., Yanagida, T., and Sako, Y. (2003) Single- and multiple-molecule dynamics of the signaling from H-Ras to c-Raf1 visualized on the plasma membrane of living cells. *Chem. Phys. Chem.*, 4, 748-753.
5. Sako, Y. and Yanagida, T. (2003) Single-molecule visualization in cell biology. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 4, SS1-5.
6. Sako, Y., Ichinose, J., Morimatsu, M., Ohta, K., and Uyemura, T. (2003) Single-molecule visualization of cell signaling processes of epidermal growth factor receptor. *J. Pharmacol. Sci.*, 93, 253-258.
7. Murai, T., Miyazaki, Y., Nshinakamura, H., Sugahara, K. N., Miyauchi, T., Sako, Y., Yanagida, T., and Miyasaka, M. (2003) Engagement of CD44 promotes Rac activation and CD44 cleavage during tumor cell migration. *J. Biol. Chem.* in press.
8. 佐甲靖志 (2001) 上皮成長因子受容体の1分子反応計測 *細胞工学* 20, 678-682.
9. 佐甲靖志 (2002) 一分子イメージング *医学のあゆみ* 200, 1092
10. 上田昌宏、佐甲靖志 (2002) GPCR 型走化性受容体の細胞内1分子可視化解析 *バイオイメージングでここまで理解る* 楠見明弘、小林剛、吉村昭彦、徳永万喜洋編 *実験医学別冊* pp.99-103.
11. 宮内崇行、日比野佳代、佐甲靖志 (2002) 蛍光共鳴エネルギー移動のイメージング *シリーズ・バイオサイエンス新世紀 第12巻 感覚器官と脳内情報処理* 御子柴克彦、清水孝雄編 共立出版 pp.210-217.
12. 上田昌宏、佐甲靖志 (2003) 1分子と細胞 *ナノテクノロジーハンドブック IV 編 バイオ化学へ使う* ナノテクノロジーハンドブック編集委員会編 pp.123-127 オーム社
13. 佐甲靖志 (2003) 細胞内情報処理過程の1分子観察 *生理学会誌* 65, 277-282.

招待講演

1. 佐甲靖志、蛍光 1分子可視化法の細胞生物学への応用 (2000) 第53回日本細胞生物学会大会 細胞機能を見て、知る」福岡
2. 佐甲靖志、細胞内情報処理過程の 1分子計測 (2001) 第13回バイオエンジニアリング講演会 単一細胞における物理現象の計測」仙台
3. Sako, Y., Single molecule imaging of cell signaling reactions in the plasma membrane. (2002) "Moving beyond the boundaries: New trends of biotechnology in the post-genomic era" Kazusa
4. Sako, Y., Single molecule analysis of cell signaling in living cells using total internal reflection fluorescence microscopy (2003) Japan-France conference on molecular photonics and biophotonics at micro and nano-scale JFC2003. Awaji

他37件

口頭発表

1. 佐甲靖志、上田昌宏、一ノ瀬純也、宮内崇之、上村武、日比野佳代、太田康友、柳田敏雄、細胞内情報伝達反応の 1分子観察 (2000) 日本生物物理学会第38回年会 仙台
2. 佐甲靖志、箕口滋、吉村昭彦、柳田敏雄、細胞膜の上皮成長因子受容体クラスターの動的構造変化 (2001) 第54回日本細胞生物学会大会 岐阜
3. Sako, Y., X. Yu, E. Mekada, and T. Yanagida. (2002) Accelerated signal transduction depending on pre-clustering of epidermal growth factor receptor: a single-molecule analysis. 46th Annual meeting of the American Biophysical Society, San Francisco, USA.
4. 森松美紀、太田康友、村田昌之、柳田敏雄、佐甲靖志、蛍光 1分子観察による上皮成長因子受容体とアダプター分子間相互作用様式の解析 (2003) 日本生物物理学会第41回年会 新潟

他42件

特許出願

1. 上村武、佐甲靖志、柳田敏雄 (2002) 新規光学系、及びその光学系を備える顕微鏡 特願 2002-09915

研究課題別評価

1. 研究課題名 :クロマチン情報が親鎖から娘鎖に維持伝承される機構

2. 研究者氏名 柴原 慶一

グループメンバー 小山 真 (研究期間 H13.4.1. ~ H14.3.31.)

3. 研究の狙い:

遺伝子発現状態を制御するクロマチン情報が、真核生物の細胞増殖過程において、親細胞から娘細胞へと維持・伝承される仕組みに興味があり研究を展開している。当プロジェクトでは、DNA 複製に伴う速やかなヌクレオソーム形成反応に着目し、その機構及び生物学的意義の理解を目指した。

具体的には、自身が提案した *in vitro* 再構成系により、同反応に必要な活性群を同定し、その解析を進めることで反応機構を理解すること。DNA 複製装置と同ヌクレオソーム形成反応の機能的関連を明らかにすること。さらに、関連する因子群の高等植物シロイヌナズナホモログの変異株を解析し、クロマチン情報が維持・伝承される仕組みへの同ヌクレオソーム形成反応の寄与を実証すること、の三点を目指した。

4. 研究結果:

(1) DNA 複製に伴うヌクレオソーム形成反応機構の理解

CAF-1 による複製 DNA の識別機構は長らく不明であった。我々は、DNA ポリメレースクランプとして機能する複製必須因子 PCNA が、CAF-1 と蛋白-蛋白相互作用することで CAF-1 依存的なヌクレオソーム形成に関与することを、本プロジェクト開始以前に提唱していた。そこで、出芽酵母の CAF-1p150 サブユニットホモログとの結合能が弱い変異型 PCNA をもった出芽酵母変異株を探索し、解析した。cac 変異株と同様の表現型、例えば、ジーンサイレンシングの脱抑制が認められることなどを観察した。さらに、他のグループからは、ヌクレオチド除去修復に伴う CAF-1 依存的なヌクレオソーム形成にも PCNA が関与すること、PCNA 結合モチーフに変異をもつ出芽酵母 CAF-1 複合体では、ヌクレオソーム形成反応を促進する活性は維持されるが、複製 DNA に対する選択的なヌクレオソーム形成反応を促進する活性が、特異的に失われていることが示された。これら一連の観察から、PCNA と CAF-1 との相互作用が、CAF-1 による複製 DNA への選択的なヌクレオソーム形成反応に必要であると、ほぼ結論できると考えた。

複製後 DNA に PCNA が滞留している限り、その DNA が CAF-1 依存的なヌクレオソーム形成反応の優れたテンプレートに成り得るといふ観察を元に、ゲル濾過カラムにより粗精製した複製反応後 DNA を CAF-1 依存的なヌクレオソーム形成に用いるという新規な再構成系を提案した。この系により、複製 DNA、CAF-1、ヒストン、PCNA 以外の複数の未同定因子が、効率的なヌクレオソーム形成反応には不可欠であることを示し、その同定を試みた。そのうちのひとつは、他グループから既に報告されていた RCAF (ASF1/CIA とヒストン H3.H4) であった。CAF-1 の p60 サブユニットは ASF1/CIA と相互作用することをいち早く見いだしたが、生細胞中での結合の正否の確認がとれず論文発表を躊躇していた。しかし最近になって、タグを付けた CAF-1 を恒常発現するヒト293細胞を樹立し、CAF-1 を含む蛋白複合体の精製を試みたところ、生細胞中でも RCAF は一部の CAF-1 と機能的複合体を形成することが判明した。RCAF の CAF-1 依存的なヌクレオソーム形成

における作用機序に興味を持たれる。一方、RCAF 以外の活性の同定には、アッセイ上の問題もあり苦難している。

酵母の遺伝学的解析等より存在が予想された CAF-1 に依存しないが、複製 DNA に対して選択的をもつヌクレオソーム形成経路の同定を試みた。具体的には、出芽酵母で *cac1?* 変異株を作成し、その酵母細胞抽出液中に、CAF-1 同様、複製 DNA を選別しそれを選択的にヌクレオソームに変換する活性があるかどうかを入念に検討した。結果、検出できる明らかな活性は存在しないという結論に至った。

(2) シロイヌナズナ変異株の解析

CAF-1 のシロイヌナズナホモログ変異株 (*fas* 変異株) の解析を、京都大学のグループと共同で行った。ヒトCAF-1 の3つのサブユニットはシロイヌナズナでも保存されていて、複合三量体を形成し複製 DNA を選択的にヌクレオソームに変換する反応を促進するというヒトCAF-1 と同様な活性が確認された。*fas* 変異株の茎頂分裂組織は、幹細胞集団と器官分化に関わる細胞集団との組織学的区分がはっきりしていない。また、根端分裂組織は、様々な始原細胞の配列 振る舞いに異常が認められ、細胞の層状構造も不規則になっていた。さらに、この表現型の程度が個体ごとに、或いは同じ個体でも分裂組織ごとにまちまちであった。分裂組織の特殊な細胞のみで限局的な発現を示す遺伝子、WUS と SCR の発現を観察したところ、興味深い異常が観察された。本来発現しない細胞での異所性発現や、本来発現するはずの細胞での発現消失が認められた。また、この異常の方向性、時期、部位に一貫性がないばかりでなく、その程度も分裂組織毎にまちまちで低頻度なものであった。

セントロメア近傍に位置する通常野生型では発現が認められない遺伝子 TSI と CACTA の発現を *fas* 変異株で検討した結果、個体内の一部の細胞のみにて散発的で低頻度にそのジーンサイレンシングの脱抑制が認められた。また、このジーンサイレンシングの脱抑制は個体の成育につれて蓄積する傾向にあった。

これらユニークな遺伝子発現異常は、*caf-1* 変異株ではあたかも、細胞の増殖過程を通じて遺伝子の発現状態が安定的に維持され難いといったことを推察させるような結果であった。

5. 自己評価：

当初は、生化学的な解析を元にした DNA 複製に伴うヌクレオソーム形成機構の解析を中心に課題を提案したが、蛋白解析の研究環境を立ち上げるのに時間がかかったこと、データの不備を理由に論文投稿に慎重になりすぎ競合相手に先をこされたことなどにより期待した成果を発表できなかったことは大いに悔やまれる。一方、シロイヌナズナ *caf-1* 変異株の解析を通じて、CAF-1 依存的なヌクレオソーム形成の細胞内での役割を考察し、複製後の速やかなヌクレオソーム形成の意義を理解する上で先鞭となるような研究ができたことは一定の評価に値すると思う。

6. 研究総括の見解

ヒト遺伝子コト解読終了に続いて、ポストゲノムの重要課題としてエピジェネティック機構の解明への動向が急上昇しつつある。シロイヌナズナという植物材料を用いて、その利点を巧みに活用して実質的かつ波及効果の高い成果をあげ、上記分野の新たな展開に貢献したことは高く評価できる。

7. 主な論文等：

(1) 論文

- Zhang Z, Shibahara K-i, Stillman B. PCNA connects DNA replication to epigenetic inheritance in yeast. *Nature* 408:221-225. 2000.
- Kaya, H., Shibahara, K-i, Tasaka, K-I, Iwabuchi, M, Stillman, B., and Araki, T. FASCIATA genes for chromatin assembly factor-1 in Arabidopsis maintain the cellular organization of apical meristems. *Cell*. 104, 131-142. 2001
- Yang, H-s, Jansen, AP, Rajalakshimi, N, Shibahara, K-i, Verma, AK, Cmarik, JL, and Colburn, NH. A novel transformation suppressor, Pdcd4, inhibits AP-1 transactivation but not NF-kB or ODC transactivation. *Oncogene*, 20 (6): 669-676. 2002
- Takeda, S., Tadele, Z., Hofmann, I., Probst, A. V., Angelis, K. J., Kaya, H., Araki, T., Mengiste, T., Scheid, O. M., Shibahara, K-i, Scheel, D., Paszkowski, J.. BRU1, a novel link between responses to DNA damage and epigenetic gene silencing in Arabidopsis. *Genes & Dev* 18, 782-793 2004.
- Ishikawa, Y., Endo, M., Osakabe, K., Abe, K., Ito, Y., Kameya, T., Kaya, H., Araki, T., Ichikawa, H, Shibahara, K-i, Hohn, B. and Toki, S.: Enhanced homologous recombination in chromatin assembly factor-1 mutants of Arabidopsis thaliana Submitted.
- Kaya, H., Araki, T., Shibahara, K-i: fas mutant shows de-repression of gene silencing at peri-centromeric region in a stochastic manner. in preparation.

(2) 総説

- 賀屋秀隆, 柴原慶一, 荒木崇 :CAF-1 のシロイヌナズナ後胚発生において役割、細胞工学、Vol.20 No.2,176-177. 2001
- 柴原慶一 :DNA 複製に伴うクロマチン構築のメカニズム、細胞工学、Vol.20 No.3、368-372 2001
- 久保知大, 柴原慶一 DNA 複製に伴うヌクレオソームアセンブリー、'ゲノムの複製と分配' シュプリンガー・フェアラーク社刊、p194-p199. 2002
- 久保知大, 柴原慶一 DNA 複製期のヌクレオソームアセンブリー、実験医学増刊「エピジェネティクスと遺伝子発現制御」、VOL.21 No.11, 24-28. 2003
- 久保知大, 柴原慶一 DNA 複製及びヌクレオチド除去修復に伴うヌクレオソーム形成、わかる実験医学「DNA 複製とDNA 修復」、88-93. 2004

(3) 口頭発表

国際会議

- Kaya, H., Araki, T., Shibahara, K-i: Implications of FAS and ASF1 in Maintaining the Cellular Organization of Apical Meristems, XIII International Conference on Arabidopsis Research, July 2002
- Werner, M. H., Ahujas, S., Mendeleev, N., Ito, Y., Huang, G., Shigesada, K., Osato, M., Liu, P. P., Krude, T., and Shibahara, K-i. Chromatin assembly and acute human leukemia. HFSP Awardees Meeting in Japan, May 2004

国内会議 (下記の招待口演 14 件を含む計 16 件)

- ・ 柴原慶一 :DNA 複製、クロマチンアセンブリー 及びエピジェネティック維持のリンカー因子としての PCNA の役割、第 18 回染色体ワークショップ、2001 年 1 月
- ・ 賀屋秀隆、柴原慶一、荒木崇 :高等植物における CAF-1 の機能、第 18 回染色体ワークショップ、2001 年 1 月
- ・ 賀屋秀隆、久保知大、荒木崇、柴原慶一 :複製期クロマチン構築に関与する因子群がシロイヌナズナ形態形成において果たす役割、第 74 回日本生化学会大会、2001 年 10 月
- ・ 柴原慶一 :DNA 複製に伴うヌクレオソームアセンブリー において CAF 1 及び ASF1 が果たす役割、第 9 回弘前大学遺伝子実験施設シンポジウム、2001 年 11 月
- ・ 賀屋秀隆、柴原慶一 :シロイヌナズナ HIRA 遺伝子の機能欠損変異体の単離、第 24 回日本分子生物学会年会
- ・ 賀屋秀隆、久保知大、柴原慶一 :DNA 複製に伴うヌクレオソームアセンブリー において CAF? 1 及び ASF1 が果たす役割、第 24 回日本分子生物学会年会、2001 年 12 月
- ・ 賀屋秀隆、柴原慶一 :FAS と相互作用するシロイヌナズナ ASF 1 の機能欠損変異体の単離、第 42 回日本植物生理学会年会、2002 年 3 月
- ・ 柴原慶一 :細胞複製に伴うクロマチン維持の機構、The 841st Biological Symposium、2002 年 7 月
- ・ 柴原慶一 :DNA 複製に伴うヌクレオソームアセンブリー の機構論と生命システムにおける意義、第 75 回日本生化学大 2002 年 11 月
- ・ 賀屋秀隆、柴原慶一 :第 25 回日本分子生物学会、ヒストン結合蛋白 ASF1 のシロイヌナズナの器官形成における役割、2002 年 12 月
- ・ 賀屋秀隆、荒木崇、柴原慶一 :シロイヌナズナ形態形成におけるヌクレオソーム形成関連遺伝子群の役割、第 43 回日本植物生理学会、2003 年 3 月
- ・ 賀屋秀隆、荒木崇、柴原慶一 :クロマチン構築因子 ASF1 のシロイヌナズナ形態形成における役割、日本植物学会第 67 回大会、2003 年 8 月
- ・ 賀屋秀隆、柴原慶一 :DNA 複製に伴うヌクレオソーム形成機構及びそ生体内における役割、国立遺伝学研究所研究会「クロマチンの生物学」、2003 年 11 月
- ・ 久保知大、賀屋秀隆、柴原慶一 :DNA 複製に伴うヌクレオソーム形成反応の機構、第 26 回分子生物学会年会シンポジウム、2003 年 12 月

研究課題別評価

1. 研究課題名 :免疫グロブリン受容体を介した生体防御機構

2. 研究者氏名 渋谷 彰

グループメンバー 張 華(研究期間 H14.5.1. ~ H15.9.30.)

亀山 東光恵(研究期間 H13.11.1. ~ H14.12.31.)

本多 伸一郎(研究期間 H12.12.1. ~ H14.3.31.)

田原 聡子(研究期間 H13.4.1. ~ H14.3.31.)

3. 研究の狙い :

高等動物であるヒトは病原微生物に対する生体防御機構としてきわめて精緻な免疫システムを築き上げてきた。ヒトの進化と生存は感染症との戦いにおける勝利の歴史であったとも言える。しかし、感染症は現代にいたってもなお人類にとっての最大の脅威である。これは免疫システムの異常や破綻、加齢による質的、量的脆弱化によってもたらされる。一方で、免疫システムの異常は自己免疫病やアレルギーといったきわめて今日的な難治疾患の本質的病因ともなっている。これらの疾病の本質的な制御法を開発するためには、免疫システムの成り立ちを解明し、その生理と病理を理解することが必須である。

ヒトなどの高等動物では、病原微生物などの侵入を補体や喰細胞などによる非特異的な認識機構で排除する自然免疫に加えて、初めて侵入した病原微生物(抗原)をリンパ球が特異的に認識し、記憶することによって、再感染時にこれを強力に排除する特異免疫機構を獲得する。この特異免疫反応による生体防御機構においては、Bリンパ球より分泌される免疫グロブリン(抗体)がTリンパ球とともに中心的な役割をはたしている。免疫グロブリンは抗原と結合して免疫複合体を形成しその病原性を中和する一方で、形成された免疫複合体がリンパ球や顆粒球など種々のエフェクター細胞と免疫グロブリン受容体を介して結合することにより、エフェクター細胞の活性化を制御している。これまでIgGやIgEなどの免疫グロブリンに対する受容体が同定されており、病原微生物の貪食や炎症、アレルギー反応などの病態に重要な役割をになっていることが明らかにされてきた。

IgM抗体は病原微生物の初回感染後にナイーブBリンパ球から分泌される免疫グロブリンであるが、これまでIgMに対する免疫グロブリン受容体が同定されていなかったため、IgM抗体の生理的役割は未だ十分に解明されていなかった。一方、IgA抗体は粘膜面から分泌され粘膜からの感染防御に働いているが、IgA抗体による病原体排除機構については不明の点が多い。本研究では、本研究者が世界に先駆けて同定したIgMおよびIgAに対する免疫グロブリン受容体(Fc μ R)の機能解析を行うことによって、IgMおよびIgA抗体の生体防御機構における役割を明らかにする。さらに新たな免疫グロブリン受容体類似分子の同定も積極的に試み、高次生命調節機構としての免疫システムの成立の理解とワクチンなどを含む免疫制御法の開発のための分子基盤を築くことを狙いとした。

4. 研究結果 :

(1)Fc μ Rの機能解析

(発表関連論文 1, 3, 4, 7, 11, 19, 20, 24)

A) 抗原提示機能の証明

卵白アルブミン (OVA) を抗原として用いて、OVA に対する IgM や IgA 抗体との免疫複合体が Fc / μ R を介して腹腔マクロファージ抗原提示細胞に取り込まれることを明らかにした。さらに OVA 抗原がプロセッシングを受け抗原提示され、ヘルパーT細胞の活性化をトリガーすることを *in vitro* の系で証明し、Fc / μ レセプターが自然免疫から獲得免疫への連携に重要な役割を担っていることを明らかにすることができた。

B) Fc / μ R の発現の解析

ヒトおよびマウスの Fc / μ R に対するモノクローナル抗体を作製しその発現を解析したところ、抗原提示細胞などの免疫系細胞のみならず、腎臓や小腸などにも多量に発現することを明らかにした。

C) Fc / μ R の遺伝子欠損マウスおよびトランスジェニックマウスの樹立

個体レベルでの Fc / μ R の生体内機能解析をするために、Fc / μ R の遺伝子欠損マウスおよびトランスジェニックマウスを樹立することができ、現在その解析をおこなっている。

(2) 新しいペア型免疫グロブリン様受容体ファミリー (MAIR) の同定と機能解析

(発表関連論文 14, 23, 25, 27)

抗原の非特異的なパターン認識により免疫応答が誘導される自然免疫システムでは、自己の組織傷害の危険が常に存在する。したがって自然免疫システムでは免疫細胞の活性化の厳密なコントロールによるホメオスタシス維持機構がなければならない。抑制性受容体は活性化受容体と対をなし、免疫応答のホメオスタシス維持に重要な役割を担っている。本領域の研究でマクロファージ、顆粒球、肥満細胞、樹状細胞、B細胞などに発現する新しい免疫グロブリン様受容体分子であるMAIR-I およびMAIR-IIを同定した (J Exp Med 2003)。これらは細胞外領域が互いに高度に保存されるが、細胞内領域が異なるためにMAIR-I は細胞の活性化を抑制するシグナルを伝え、MAIR-IIは活性化を促すシグナルを伝えるペア型受容体であった。さらにMAIR-IIはSHIPと会合して抑制性シグナルを伝え、IgE受容体刺激による肥満細胞からの脱顆粒を抑制した。一方MAIR-IIIはアダプター分子であるDAP12と会合し、マクロファージからの炎症性サイトカインやケモカインの分泌を亢進させることを明らかにした。これらの結果より、MAIRは、自然免疫に関与する免疫細胞の活性化を誘導したり、その活性化を収束したりするファミリー分子群であることがわかり、これらから自然免疫による生体防御と自己寛容の両立の制御機構の理解に新しい概念が展開されることが期待される。

(3) リンパ球接着分子DNAM-1(CD226)のリガンドの同定と機能解析

(発表関連論文 6, 8, 9, 15, 17, 18, 28)

DNAM-1は本研究者が同定した免疫グロブリンスーパーファミリーに属する膜受容体分子である (Shibuya, et al. Immunity 1996)。DNAM-1はT、NK、マクロファージなどに発現する接着分子であるが、そのリガンドは不明であるため免疫応答における役割は充分解明されていない。リガンドを同定するためにDNAM-1分子の細胞外ドメインとヒト免疫グロブリンFc部分とのキメラ蛋白を作製しこれをプローブとして発現クローニングを行った結果、poliovirus receptor ファミリーのメンバーである CD155 (poliovirus receptor/PVR) とCD112(Nectin-2/PRR-2)の2つがDNAM-1のリガンドであることを明らかにした (Int Immunol, in press)。

一方、DNAM-1 は免疫系細胞のみならず、血小板や巨核球などにも発現することを見いだした。DNAM-1のリガンドが血管内皮細胞に発現しており DNAM-1 とそのリガンドとの相互作用が血小板や巨核球の血管内皮細胞への接着に関与する事を示し、血栓、止血機構において DNAM-1 が

重要な役割を担っていることを示唆した (J Biol Chem, 2003)。

さらに DNAM-1 はもう一つのリンパ球接着分子 LFA-1 と会合し、LFA-1 による T 細胞への副シグナルに重要な役割をになうことを明らかにした (J Exp Med, 2003)。

5. 自己評価 :

本領域での研究の中心は IgM/IgA 免疫グロブリン受容体である Fc / μ R の生体内での機能を明らかにすることであり、そのためにノックアウトマウスの樹立とその解析が主たる研究内容となる予定だった。しかしノックアウトマウスの樹立に予想外の時間がとられ、最終年までかかってしまったことから、研究期間内にその十分な解析ができなかったことは残念であった。しかしこれと併行しておこなってきた Fc / μ R の機能解析から、1) Fc / μ R が抗原提示機能に関与するという当初の仮説を証明する結果に加え、2) Fc / μ R が免疫系細胞のみではなく、腎臓や小腸など免疫系細胞以外にも発現を認め、これらの臓器における生体防御機構を調節している可能性が明らかになったことは興味深く、今後の研究の発展に直接つながる基盤的成果と考えている。また、現在までのノックアウトマウスの解析から Fc / μ R が個体レベルで免疫応答に重要な役割を担っていることを示唆する結果が得られており、今後新しい重要な展開がもたらされるものと考えている。一方、Fc / μ R の解析のみにとどまらず、新しい免疫グロブリン様受容体である MAIR ファミリーを同定し、その *in vitro* での機能を明らかにしたこと、および以前に我々が同定した免疫グロブリンスーパーファミリーに属する膜分子である DNAM-1(CD226)のリガンドと DNAM-1 の LFA-1 シグナルにおける役割を明らかにし、いずれも国際一流誌に報告できたことは満足できるものと考えている。

6. 研究総括の見解 :

免疫学において、IgM 抗体を中心とする免疫機構の解明が後まわしにされてきたことは否定できない。渋谷研究者は、この IgM 抗体に対する受容体の同定に世界で初めて成功した。それに基づく免疫機能の制御に取り組み生体防御機構解明に新生面を拓いたことは高く評価し得る。

7. 主な論文等 :

主な論文 著書

1. Shibuya A, Sakamoto N, Shimizu Y, Shibuya K, Osawa M, Hiroyama T, Eyre HJ, Sutherland GR, Endo Y, Fujita T, Miyabayashi T, Sakano S, Tsuji T, Nakayama E, Phillips JH, Lanier LL, Nakauchi H. Fc alpha/mu receptor mediates endocytosis of IgM-coated microbes. *Nature Immunol.* 1:441-446, 2000
2. Motohashi T, Nakamura Y, Osawa M, Hiroyama T, Iwama A, Shibuya A, Nakauchi H. Increased cell surface expression of C-terminal truncated erythropoietin receptors in polycythemia. *Eur J Haematol.* 67:88-93, 2001
3. Sakamoto N, Shibuya K, Shimizu Y, Yotsumoto K, Miyabayashi T, Sakano S, Tsuji T, Nakayama E, Nakauchi H, Shibuya A. A novel Fc receptor for IgA and IgM is expressed on both hematopoietic and non-hematopoietic tissues. *Eur J Immunol.* 31:1310-1316, 2001
4. Shimizu Y, Honda S, Yotsumoto K, Tahara-Hanaoka S, Eyre HJ, Sutherland GR, Endo Y, Shibuya K, Koyama A, Nakauchi H, Shibuya A. Fc(alpha)/mu receptor is a single gene-family member closely related to polymeric immunoglobulin receptor encoded on Chromosome 1.

- Immunogenetics. 53:709-711, 2001
5. Tokoro Y, Shibuya K, Osawa M, Tahara-Hanaoka S, Iwama A, Kitamura T, Nakauchi H, Shibuya A. Molecular cloning and characterization of mouse Tspan-3, a novel member of the tetraspanin superfamily, expressed on resting dendritic cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 288:178-183, 2001
 6. Yamada O, Ichikawa M, Okamoto T, Park C, Motoji T, Mizoguchi H, Shibuya A. Killer T-cell induction in patients with blastic natural killer cell lymphoma/leukaemia: implications for successful treatment and possible therapeutic strategies. *Br J Haematol.* 113:153-160, 2001
 7. Shibuya A, Shibuya K., Shimizu Y., Yotsumoto K., Nakauchi H. Identification of Fc γ / μ receptor expressed on B lymphocytes and macrophages. in Cooper M.D., Takai T., Ravetch J. V. (Eds) *Activating and inhibitory immunoglobulin-like receptors.* Springer-Verlag Press, 2001, pp79-84
 8. Shibuya A., Shibuya K., Yotsumoto K., Nakauchi H. DNAM-1 is a leukocyte adhesion molecule associated with LFA-1. in Mason D., et al (Eds) *Leukocyte Typing VII.* Oxford University Press, 2002, pp686-688
 9. Lanier L.L., Shibuya A., Burns G. CD226 (DNAM-1, PTA1, Tlisa). in Mason D., et al (Eds) *Leukocyte Typing VII.* Oxford University Press, 2002, pp921-922
 10. Iwama A, Osawa M, Hirasawa R, Uchiyama N, Kaneko S, Onodera M, Shibuya K, Shibuya A, Vinson C, Tenen DG, Nakauchi H. Reciprocal roles for CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) and PU.1 transcription factors in Langerhans cell commitment. *J Exp Med.* 195:547-558, 2002
 11. Nakahara J, Seiwa C, Shibuya A, Aiso S, Asou H. Expression of Fc receptor for immunoglobulin M in oligodendrocytes and myelin of mouse central nervous system. *Neurosci Lett,* 2003;337:73-76
 12. Fujiki Y, Fukawa K, Kameyama K, Kudo O, Onodera M, Nakamura Y, Yagami K, Shiina Y, Hamada H, Shibuya A, Nakauchi H. Successful multilineage engraftment of human cord blood cells in pigs after in utero transplantation. *Transplantation* 75:916-922, 2003
 13. Shibuya A. The development and functions of natural killer cells. *Int J Hematol,* 78:1-6, 2003
 14. Yotsumoto K, Okoshi Y., Shibuya K., Yamazaki S., Tahara-Hanaoka S., Honda S., Osawa M., Kuroiwa A., Matsuda Y., Tennen D. G., Iwama A., Nakauchi H., Shibuya A. Paired activating and inhibitory immunoglobulin-like receptors, MAIR - I and MAIR - II, regulate mast cell and macrophage activation. *J. Exp. Med.* 198:223-233, 2003
 15. Kojima H., Kanada H., Shimizu S., Kasama E., Shibuya K., Nakauchi H., Nagasawa T., Shibuya A. CD226 mediates platelet and megakaryocytic cell adhesion to vascular endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 278:36748-53, 2003
 16. Yoh K., Shibuya K., Morito N., Nakano T., Ishizaki K., Shimohata H., Nose M., Izui S., Shibuya A., Koyama A., Engel JD., Yamamoto M., Takahashi S. Transgenic Overexpression of GATA-3 in T Lymphocytes Improves Autoimmune Glomerulonephritis in BXSB/MpJ-Yaa Genetic Background Mice. *J. Am Soc Nephrol,* 14:2494-2502, 2003
 17. Shibuya K., Shirakawa J., Kameyama T., Honda S-I, Tahara-Hanaoka S., Miyamoto A., Onodera M., Sumida T., Nakauchi H., Miyoshi H. and Shibuya A. CD226 (DNAM-1) is involved in LFA-1

costimulatory signal for naive T cell differentiation and proliferation. J Exp Med 198:1829-1839, 2003

18. Tahara-Hanaoka S., Shibuya K., Onoda Y., Zhang H., Yamazaki S., Miyamoto A., Honda S-I, Lanier LL., Shibuya A. Functional characterization of DNAM-1 (CD226) interaction with its ligands PVR (CD155) and Nectin-2 (PRR-2/CD112). Int Immunol, in press

和文総説

19. 渋谷 彰 IgM に対する免疫グロブリン受容体の発見 細胞工学 20:24-25, 2001
20. 渋谷 彰 IgM、IgA に対する免疫グロブリン受容体 感染、炎症、免疫 31:65, 2001
21. 渋谷 彰 NK 細胞とNKT 細胞レセプターと機能、序. 炎症と免疫 9:499-500, 2001
22. 渋谷 彰 NK 細胞機能と病態 Ann Review 免疫 2002 76-82, 2001
23. 四本克己、大越 靖、渋谷 彰 骨髄球系細胞の活性化制御を担う新しい paired receptor; MAIR 免疫 2003 (Molecular medicine)14-20, 2002
24. 本多伸一郎、渋谷 彰 IgM および IgA Fc 受容体の発現と機能 Ann Review 免疫 2003 1-8, 2002
25. 四本克己、渋谷 彰 新しい正と負の自然免疫制御レセプターMAIR ファミリー。蛋白質 核酸 酵素 47: 2123-2126, 2002
26. 大越 靖、渋谷 彰 KIR. 分子細胞治療. 2:105-106, 2003
27. 大越 靖、四本克己、渋谷 彰 MAIR ファミリー分子と正と負の自然免疫制御 Ann Review 免疫 2004 93-102, 2003
28. 渋谷和子、三好浩之、渋谷 彰 レンチウイルスベクターを用いた静止期免疫細胞への安定的遺伝子導入法とその応用 細胞工学 22:1232-1239, 2003

口頭発表

海外 6 件

国内 34 件

招待講演

国際会議・シンポジウム等 5 件

国内会議・シンポジウム等 5 件

研究課題別評価

1.研究課題名 環状遺伝子形成のメカニズムとその生物学的意義

2.研究者氏名 :下田 修義

グループメンバー :山越 貴水 (研究期間 H13.4.1. ~ H.15.9.31.)

宍戸 裕二 (研究期間 H13.4.1. ~ H14.3.31.)

3.研究の狙い :

本研究の当初の狙いは、ゼブラフィッシュのノーテールという遺伝子が染色体外に環状遺伝子として存在する可能性を検討することにあった。しかし研究を開始してまもなく、少なくともノーテール遺伝子が染色体外に存在するという可能性については否定されたため、計画していた実験計画を中止した。そして方向転換をして、ノーテール遺伝子において観察されていたいくつかの不思議な現象に生物学的な意味を見いだすことを狙いとした。

4.研究結果 :

野生型ゼブラフィッシュにおいて突発的に尾ひれが欠損する、あるいは脊索形成に異常を持つ胚が現れるという現象が、ノーテールという遺伝子の不安定性によるものと予想し、ノーテールのゲノム構造、そして転写産物を徹底的に調べた。その結果、1)ノーテール転写産物の平均3%にほぼランダムな欠損変異が生じていること、2)ノーテールのイントロンにおいてDNAの二本鎖切断点が生じること、3)ノーテールの偽遺伝子様構造を持つDNAがゼブラフィッシュ細胞に存在することなどがわかった。私は2)と3)の結果から、偽遺伝子がノーテールの切断に乗じて対合し、その結果、ノーテールのメチル化が生じるのではないかという仮説を立てた。これは真菌類において、任意の遺伝子のコピーを導入すると、両者がメチル化により不活性化されるという報告や、その類似のシステムが植物から、哺乳類に至るまで存在するという報告から推測したものである。ゼブラフィッシュの発生過程を通してノーテールのメチル化の状態を解析したところ、予想した通りにノーテールがde novoのメチル化を受けることが明らかになった。そしてメチル化と時を同じくして、ノーテール転写開始点付近のクロマチン構造が、転写を抑制する形に変化していた。メチル化の進行する時期はノーテールの脊索および尾芽での発現が減少、消失する時期に当たり、ノーテールのメチル化により転写が抑制されることが強く示唆された。興味深いことにこのノーテールのメチル化は制御のあらゆる器官においてみられたが、精子は例外であった。つまりノーテールのメチル化は生殖細胞では生じないか、もしくはその分化の過程で脱メチル化が生じていることを意味した。また調べた限りほかのゼブラフィッシュ遺伝子においては、de novoのメチル化が観察されなかったことから、ゼブラフィッシュはノーテールだけをピンポイントでメチル化する仕組みを備えていることが明らかになった。

5.自己評価 :

研究開始当初に設定した実験計画は、ノーテールが染色体外に環状遺伝子として存在するという予想が外れて実際にはほとんど遂行しなかった。これは残念であったが、少なくともそれまでに観察していたノーテールに関するいくつかの奇妙な事実は、現在振り返ってみても、ノーテールの染色体外における存在により説明ができるものと思う。したがって申請した研究を計画したこと

自体は、誤りでなかったと判断している。研究開始早々にこの点に気がついたので、その後、研究を別の方向で展開をすることができた。そして最終的に、非哺乳動物において初めて遺伝子のエピジェネティカルな制御をノーテールにおいて見いだすに至った。私たちがノーテールメチル化の機構としてたてたモデルは、偽遺伝子がもとの遺伝子に対して DNA メチル化を通して発現を抑制するというもので、もしそれが正しければ、それは将来、遺伝子の機能発現における新たな仕組みとして認識されるものと考えている。本研究は特にその可能性を提示できた点で意義があると信じている。しかしそうであればなお一層そのモデルを検証する必要があるわけだが、そのための実験方法が現時点でも考えつかない。ここが悩みであり、そして我々の研究の弱点である。また本研究は、ゼブラフィッシュにおいてみられる尾や脊索の異常が、ノーテールの不安定性によるものではないかというところからスタートとしている。この点も明らかにできておらず、全体として、より一層の思考・実験が必要であったと反省している。

6. 研究総括の見解：

エピジェネティクスがポストゲノム時代の重要テーマとして注目され始めている。ゼブラフィッシュという独自の材料に着目し、特にそのノーテール現象を中心に、着実に成果をあげてきた。現在はまだ研究途上にあるが、今後の見るべき展開を十分に期待してよい。

7. 主な論文等：

1. K. Yamakoshi, Y. Shishido and N. Shimoda, "Generation of DNA Double-Stranded Ends in and Aberrant Transcripts of the Zebrafish no tail Gene" revised (2003)
2. K. Yamakoshi and N. Shimoda, "De novo DNA Methylation at the CpG island of the Zebrafish no tail Gene" *Genesis* 37, 195-202 (2003)
3. K. Yamakoshi and N. Shimoda, "PCR-based Cloning of an Intronless Zebrafish no tail Gene", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 306, 598-602 (2003)

口頭発表

1. 下田修義、山越貴水 「ジーンサイレンシングによるノーテール遺伝子転写調節の可能性」第26回日本分子生物学会年会、神戸、2003年12月
2. 下田修義、山越貴水 「ゼブラフィッシュのエピジェネティクス」第9回小型魚類研究集会、理研(和光)、2003年9月
3. 下田修義、山越貴水 「切れる遺伝子 no tail」第8回小型魚類研究集会、三島、2002年8月

研究課題別評価

1.研究課題名 :免疫の調節機構、その制御と新しい治療コンセプト

2.研究者 :清野 研一郎

グループメンバー 黒岩 憲二(研究期間 H.13.4.1. ~ H15.9.30.)

姜 暁峰 (研究期間 H12.11.15. ~ H.14.3.31.)

3.研究の狙い :

免疫寛容は、臓器移植、自己免疫疾患、アレルギー等の病態及び治療を考える上で非常に重要な概念であり、高齢化に伴う諸問題とも関連が深い。しかし、免疫寛容を司る詳細な分子機構については未だ明らかになっていない点が多く、これが臨床応用に足る新技術の開発を阻んでいる。我々は移植モデルを用いた実験を通じ、新しいリンパ球 NKT 細胞が免疫調節細胞として極めて重要な働きを担っている可能性を見出した。この知見を進展させ、NKT 細胞機能を分子レベルで明らかにしていくことを中心に据え、移植モデルを用いた免疫寛容の分子機構に関する研究を行っていく。さらに、NKT細胞は他の免疫反応、例えば抗腫瘍免疫などにも重要な役割を果たしていることが示されており、これらにおける NKT 細胞の機能解析もあわせて行い、「NKT 細胞生物学」を深めていく。その過程で同細胞を適切に制御する方法を探索し、その結果を種々の免疫疾患に対する新規治療法の開発へ繋げて行くことを目指し、研究を推進していく。

4.研究結果 :

マウス心移植モデルを用い、短期間の副刺激阻害で誘導される移植免疫寛容誘導は、NKT 細胞を欠くNKTKO マウスでは誘導されにくく、この反応には IL-4 に比し IFN- γ が重要であることを明らかにした。本寛容誘導においてアロ反応性 T 細胞に起こるアポトーシスは、野生型マウス、NKTKO マウス間で特に大きな差はなく、それ以外のメカニズムが考えられた。またその後、他のプロトコル(抗 CD40L 抗体の投与)による寛容誘導にもNKT細胞の存在が重要であることを明らかにした。

NKT細胞とconventional T細胞との遺伝子発現の比較をcDNA サブトラクションにて行い、NKT細胞に多く発現している遺伝子を解析した。その中で、ケモカインレセプターの一つ CXCR6 がNKT細胞に特に高く発現していることを発見し、そのリガンドCXCL16のNKT細胞に及ぼす作用の解析を行った。その結果、可溶性CXCL16はNKT細胞の遊走ならびに接着を引き起こすことが明らかにされた。引き続き、CXCL16の機能を阻害する抗CXCL16抗体の投与により、CXCL16/CXCR6の移植免疫反応における役割を検討した。MHC 完全不一致の心移植のアロ心移植の系で、抗CXCL16抗体の投与は移植心の生着を延長させなかった。一方、副刺激阻害によって寛容誘導されたマウスにこの抗体を投与すると、80%のマウスで拒絶が誘導された。この拒絶の進行程度は、NKTKOマウスで見られたものと同程度であり、同抗体はNKT細胞の機能を阻害したことにより寛容の維持が阻害されたものと考えられた。

上記のような結果から、NKT細胞の特異的活性化物質 - GalCer や OCH といった糖脂質を用いて免疫系の制御を行うというコンセプトが考えられる。我々は、これらの糖脂質を様々なプロトコルでマウスに投与し、その後アロの移植を行うという実験を行った。しかし、残念ながら完全アロの免疫反応を抑制するような効果はこれら糖脂質の単独投与では見られなかった。これは移

植免疫反応が、他の実験モデルで見られるものに比して強いということが原因の一つと考えられた。

NKT細胞は癌免疫にも大いに関わることが示されている。これまでの基礎研究の結果を受けて、米国、オーストラリア及び日本においてNKT細胞の特異的活性化物質 - GalCerを用いた癌治療の臨床試験が開始されている。我々は担癌状態個体におけるNKT細胞の機能を知ることは今後の臨床応用を進める上で重要であると考え、ヒトならびにマウスの検体を用い研究を行った。まず、消化器系癌患者から得られた末梢血リンパ球中のNKT細胞の - GalCerに対する増殖反応が、健康人に比し有意に低下していることを見出した。培養系への様々なサイトカインの添加により同反応の回復を試みたところ、試した中ではG-CSFのみが有効であり、実際NKT細胞上にG-CSFレセプターの発現を認めた。次にマウスに癌細胞を接種し担癌状態にした後のNKT細胞機能を評価した。するとヒトで見られたものと同様に、NKT細胞の機能低下が認められた。同マウスでは脾臓中にMac - 1⁺Gr - 1⁺の細胞が増加しており、これがNKT細胞機能を減弱させていることをつきとめた。さらに同細胞群の産生する活性酸素の役割を知るべく、iNOS阻害剤を作用させるとNKT細胞機能は回復した。即ち、担癌状態では、Mac - 1⁺Gr - 1⁺細胞の産生する活性酸素がNKT細胞機能を阻害しており、免疫能低下の一因となっていることが示された。

5.自己評価：

実験的移植免疫寛容におけるNKT細胞の重要性を明らかにすることを出発点に研究を推進して来た。その分子機構の解明は予想以上に困難であったが、NKT細胞に特徴的に高発現する分子としてケモカインレセプターの一つであるCXCR6を同定し、最終的にはそのリガンドとの相互作用(CXCL16/CXCR6)が、移植免疫寛容誘導の際に働く分子機構として重要であることを明らかにし(論文投稿中)、当初の狙い通りの進展を果たせた。一方、NKT細胞特異的活性化物質 - GalCerの投与による免疫反応の制御を試みてきたが、残念ながら我々がモデルとして用いたアロの移植では有意な結果は得られなかった。しかし同時期に、他の疾患(1型糖尿病や実験的アレルギー性脳脊髄炎など)においては - GalCerによるNKT細胞の活性化で病態の改善が可能であることが示されており、NKT細胞をターゲットにするという治療コンセプト自体は間違っていないかと考えている。また、ヒトおよびマウスの担癌状態におけるNKT細胞の機能不全の存在を示せたことは、予想外の展開ではあったが、癌と免疫の関係を説明する上で重要な知見である。その原因と改善の可能性をマウスで示すことができた。これらの結果は、現在計画されているヒト癌に対するNKT細胞療法の実現に大きく関与する可能性がある。

今回の研究プロジェクトにおいて、主に移植、癌をモデルとしてNKT細胞学の推進に寄与できた。その成果として、論文発表のほか、日本免疫学会学術集会シンポジウムにおいてNKT細胞と免疫制御に関する発表を3年連続して担当した。今後は、癌以外のヒト疾患への応用の可能性の探索、更なるメカニズム解析などのほかに、免疫系の他の制御システムとの関連性を明らかにしていくことが重要である。

6.研究総括の見解：

千葉大グループによって世界に先駆けて新しく見いだされたNKT細胞の免疫調節・生体防御における役割解明を追求して、着実な成果をあげている。移植やがん問題を含めて、大きな広がりを見せつつある新領域開拓である。理研免疫アレルギーセンターに移籍しての今後を期待したい。

7. 主な論文等：

1. Harada M, Seino K, Wakao H, Sakata S, Ishizuka Y, Ito T, Kojo S, Nakayama T, Taniguchi M. Down-regulation of invariant V α 14 antigen receptor in NKT cells upon activation. *Int. Immunol.* In press
2. Koike J, Wakao H, Ishizuka Y, Sato T, Hamaoki M, Seino K, Koseki H, Nakayama T, and Taniguchi M. Bone marrow allograft rejection mediated by a novel murine NK receptor, NKG21. *J. Exp. Med.* In press
3. Taniguchi M, Seino K, Nakayama T. The NKT cell system: bridging innate and acquired immunity. *Nat. Immunol.* 4, 1164- 1165, 2003
4. Kobayashi S, Kaneko Y, Seino K, Yamada Y, Motohashi S, Koike J, Sugaya K, Kuriyama T, Asano S, Tsuda T, Wakao H, Harada M, Kojo S, Nakayama T, and Taniguchi M. Impaired IFN-production of V α 24 NKT cells in non-remitting sarcoidosis. *Int. Immunol.* In press.
5. Yanagisawa K, Seino K, Nozue M, Todoroki T, Fukao K. Impaired proliferative response of V α 24 NKT cells from cancer patients against alpha-galactosylceramide. *J. Immunol.* 168, 6494-6499, 2002.
6. Seino K, Setoguchi, Y., Ogino, T., Kayagaki, N., Akiba, H., Nakano, H., Taniguchi, H., Takada Y., Todoroki, T., Fukuchi, Y., Yagita, H., Okumura, K., and Fukao, K. Protection against Fas- and TNF receptor 1-mediated liver injury by blockade of FADD without loss of NF-kappa B activation. *Annals of Surgery* 234, 681 -688, 2001
7. Seino, K., Fukao, K., Muramoto, K., Yanagisawa, K., Takada, Y., Kakuta, S., Iwakura, Y., Luc Van Kaer, Takeda, K., Nakayama, T., Taniguchi, M., Bashuda, H., Yagita, H., and Okumura, K. Requirement of natural killer T (NKT) cells in the induction of allograft tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* ,98, 2577-2581 , 2001
8. Seino, K., Yanagisawa, K., Taniguchi, H., Takada, Y., Yuzawa, K., Otsuka, M., and Fukao, K. The effect of alpha-galactosylceramide upon allogenic rejection. *Transplant. Proc.* 33, 437-438, 2001

総説

1. 清野研一郎、谷口克. NKT 細胞による免疫制御. *実験医学* 21、2179-2183、2003
2. 清野研一郎、谷口克. iNKT 細胞による自然免疫および獲得免疫応答の制御. *Annual Review 免疫* 2004、126-134、2003
3. Seino K. Immune regulation mediated by NKT cells. *Recent Res. Devel. Immunol.* 4,127-133, 2002
4. 清野研一郎. 免疫制御機構における NKT 細胞の役割. *炎症と免疫* 9,531-535,2001
5. 清野研一郎. 副刺激の阻害による寛容誘導. *医学のあゆみ* 196,949-952,2001

学会発表 18 件(うち英語発表 11 件)

招待講演 5 件(うち英語発表 1 件)

研究課題別評価

1. 研究課題名 構造トポロジーを用いた細胞内蛋白質の生涯プログラム

2. 研究者氏名 高田 彰二

グループメンバー 高城 史子 (研究期間 H12.11.1. ~ H15.7.31.)

3. 研究の狙い:

生体内でのタンパク質の生涯は一定の過程をたどるようにプログラムされている。主な過程に、1) 単一タンパク質の折りたたみによる構造形成、2) ストレス構造変性からのシャペロンによる修復、3) 調節機能としてのタンパク質分解、などがある。これらは、細胞内タンパク質に“プログラムされた生涯”であるのに対し、4) アルツハイマー病などの脳疾患の際、タンパク質の 転移を引き金としておこるアミロイド形成、などはそのプログラムのエラーと考えられる。そこで本研究の狙いは、この細胞内タンパク質の生涯プログラム (とそのエラー) を、タンパク質の“立体構造トポロジー”(=粗視化した3次構造、またはフォールド)を軸に、総合的に捉えることである。

“立体構造トポロジー”の役割は最近注目を集めている。例えば、“単一タンパク質の折りたたみ機構は概ねそのトポロジーで決まる”という概念が定着した。また、“シャペロンの基質タンパク質には / トポロジーが多い”ことが発見された。アルツハイマーやプリオン病に関連のあるアミロイド形成は、 の転移によって引き起こされる。

このような状況を鑑み本研究では、具体的に次の3つの狙いを設定する。

1. 単一タンパク質の折りたたみについて、トポロジーと折りたたみ困難さとの関係を物理化学的に明らかにし、それを基に折りたたみ経路と立体構造の理論的予測法を確立する。
2. 分子シャペロン (大腸菌 GroEL) 内のタンパク質折りたたみ機構の物理化学的解明。特に、シャペロンを必要とするタンパク質とそのトポロジーの関係を明らかにする。
3. 加齢とともに発症率が高まるアルツハイマー病の原因と考えられている、シートタンパク質の沈着機構の解明。最初に沈着の引き金になる 型トポロジー転移現象、生成し始めたアミロイドの成長機構、などを理論的に基礎付け、それらを制御できる条件を検討する。

4. 研究結果:

(1) 単一タンパク質の折りたたみ:

折りたたみ機構の物理化学的説明についての研究と、それに基づいてタンパク質立体構造予測を行う方法の確立との両面から研究を行った。

前者については、実験的に2状態転移をすることが知られている18個の小型蛋白質に (SH3, Cl2, protein G, protein L, リプレッサーなど) について、トポロジー情報のみを使ったモデルによってシミュレーションを行い、トポロジーと折りたたみ機構との関係について以下二点をあきらかにした。1) 折りたたみ速度定数 k_f はトポロジーと鎖の長さで概ね決まり、スケーリング則、 $\ln k_f \sim -a RCO \times N^{2/3}$ と書ける。ここで、RCO は Baker らの定義した、蛋白質のトポロジー情報を表す相対コンタクトオーダーである。このスケーリング則は、Baker らの発見したルールと Wolynes らによる折りたたみ速度の長さ依存性とを統一したものであり、折りたたみ反応機構の理解を大きく進めるものである。2) 折りたたみ経路は、トポロジーと配列の両方がそれぞれ重要な役割を果たしていることが明らかになった。計算したタンパク質の約半分では、計算による折りたたみ経路は実験結果とよく一致を示したものの、残り半分については有意な相違が見られた。以上の内容は、

学術論文として、J Mol Biol に掲載された。

また、アミノ酸配列情報からのタンパク質立体構造予測法の確立に向けて、数多くの新しい方法、アルゴリズムの開発を行った。特記すべきは、1) シートに特徴的な水素結合の相関を取り込んだ関数によりシートの安定性を決定的に向上させることに成功した点、2)数多くのパラメータを学習理論に基づいて最適化することができた点、および 3)既知構造タンパク質のフラグメントを組み合わせるBaker流の方法を我々のプログラムに導入し、さらに独自のマルチカノニカルアンサンブル法を開発して高速構造探索を可能にした点が挙げられる。これらの開発の結果、70残基程度の短いタンパク質では、そのフォールトを予測することがかなりの程度可能になってきた。2002年には、いわゆる構造予測コンテストに参加した。既知構造テンプレートを使わない New Foldの部門において、参加約150チーム中、16位の成績であった(Russell 2003)。小さいタンパク質では、好成績であったが、大きなタンパク質ではまだ計算速度の遅さがネックになってよい結果を出せなかった。またいくつか作戦間違いをしてしまった点で悔いが残る。力を出し切っていれば全体としては、もうすこしうまくやれたはずだと思う。(ただしこれは、敗者の言い訳でもある)それでも我々のグループ、日本からこの部門に主参加したチーム中では最高位である。これらの内容は、学術雑誌 J Chem Phys, Proteins などに掲載された。

②)分子シャペロン：

最近、実験的に、シャペロニンの空洞内に入るだけで、基質タンパク質の折りたたみが加速されるというデータが Hartl たちによって報告された。これを受けて、高城を中心に、理論的観点から、空洞内に閉じ込められたタンパク質の物性、とくに折りたたみなど、を徹底的に調べることにした。その結果、1)タンパク質は、普遍的に、シャペロン様の空洞に閉じ込められることで熱的に安定化すること、2)その安定化は、大きなタンパク質ほど大きいこと、3)折りたたみは、ある程度大きなタンパク質では加速される一方、非常に大きすぎると逆に遅くなってしまふこと、などを明らかにした。これらの結果は論文にまとめ、学術誌 PNAS に発表した。

GroEL+GroES の構造変化とそれによる基質タンパク質の構造修復の分子シミュレーションはまだ進行中である。GroELは、ATP および GroES と結合することで大きな構造変化を起こす。その様子を分子動力学シミュレーションで再現した。現在なお、この中に基質を導入し、シャペロン内の基質タンパク質構造修復を調べている。多少の拡張、修正の後、これらの系の分子シミュレーション結果をまとめられる見込みである(Takagi & Takada unpublished)。

③)アミロイド形成：

アミロイド形成過程の理論研究をする際、関係する膨大な数のタンパク質をいかに取り扱うかが大きな問題である。金城を中心に取り組んだ、密度汎関数理論を用いたタンパク質高濃度溶液の理論化に成功し、それによってまず細胞内における構造安定性および凝集についての巨大分子混み合いの静的、および動的過程の研究を行った。

さらに、それに分子シャペロンの効果も加えることに成功した。分子シャペロンが存在すると、期待されるように、凝集は抑制される。その際、高分子混み合いは、1)凝集を促進する効果と、2)分子シャペロンのタンパク質への結合を促進し、それによって結果的に凝集を抑制する効果とが競合する可能性を明らかにした。この結果は、Biophys J.などに掲載された。

5.自己評価：

タンパク質の折りたたみ、構造予測については、3年前はごく簡単なヘリックスタンパク質のみで成功していた。この3年で1)シート型水素結合対の相関と2)フラグメント組み合わせ法による

高速探索との 2 つの大きな展開があり、かなりの小型タンパク質 (アミノ酸 60 残基程度) ではトポロジーを正解できるところまで来た。これは大きな前進だと思う。予測の確度、精度がまだ不十分である点、及び大きなタンパク質ではまだ構造が探索しきれない点が大いに不満である。2002 年の国際構造予測コンテスト CASP5 では、大きなタンパク質で軒並み作戦が失敗し、残念ながら目指したほどの上位には到達できなかった点に“大いに”悔いが残る。

分子シャペロンによるタンパク質の構造修復については、“かご閉じ込め効果”に関して、先駆的な Hartl らの実験を理論的にサポートする結果を出し、シャペロニンの役割についての新しい流れを作るのに貢献したと思う。さらに推し進めて、シャペロニンの構造変化まで含めて、基質タンパク質がどのようにかごの中に取り込まれるのかを明らかにするシミュレーションを計画、実行してきたが、予想以上に時間を要しておりまだ研究途中である。

アミロイド形成については、タンパク質高濃度溶液に対する新しい理論体系を定式化し、一般的な凝集や折りたたみの問題を扱えた点は意義があると思う。さらに推し進めて、タンパク質の異方性をとりこみアミロイド繊維などの高次の構造体形成を理論化したかったが、時間的制約などの問題で形になるところまで行かなかった。

総体的には、それぞれのサブテーマごとに、ワンステップの進歩が見られ点は良かったと思う。3 年間という期間は思った以上に短く、本来目指していたその先のレベルの研究は、期間中に形にすることが出来ず、残念である。

6. 研究総括の見解：

本研究領域で唯一の、タンパク質構造生物学研究者である。その利点を活かして、他の研究者に大きな影響を与えるとともに、当研究者自身も生物・医学領域の他研究者から多大な影響を受け、変身を遂げつつあることは注目してよい。今後のユニークな成長を期待し得る本研究領域が産んだ逸材である。

7. 主な論文等：

1. N Koga and S Takada, Roles of native topology and chain length scaling in protein folding: Simulation study with Go-like model, J Mol Biol, 313,171-180(2001)
2. G Chikenji, Y Fujitsuka and S Takada, A reversible fragment assembly method for de novo protein structure prediction, J Chem Phys, 119, 6895-6903 (2003)
3. W Jin, O Kambara, H Sasakawa, A Tamura, and S Takada, De novo design of foldable proteins with smooth folding funnel: Automated negative design and experimental verification, Structure, 11, 581-590 (2003)
4. F Takagi, N Koga and S Takada, How protein thermodynamics and folding mechanisms are altered by the chaperonin cage: Molecular simulations, PNAS, 100, 11367-11372 (2003)
5. AR Kinjo and S Takada, Competition between Protein Folding and Aggregation with Molecular Chaperones in Crowded Solutions: Insight from Mesoscopic Simulations, Biophys J 85, 3521-3531 (2003)

(上記を含め査読付き専門雑誌の論文 14 報、日本語総説 4 報)

(学会発表 国際学会 11 件、国内学会 52 件)

研究課題別評価

1.研究課題名 神経幹細胞の分化過程と神経回路網の再構築

2.研究者氏名 田中 光一

グループメンバー 天内 和人 (研究期間 H15.4.1. ~ H15.9.30.)

伊東 三穂 (研究期間 H12.11.1. ~ H.15.3.31.)

堀川 洋 (研究期間 H13.2.19. ~ H15.3.31.)

3.研究の狙い:

日本がこれから迎える超高齢化社会において、虚血などによる脳障害は痴呆・運動麻痺・言語障害をもたらす。活力ある社会の維持にとって大きな障害となる。近年、神経発生研究の進展により哺乳類の脳にも神経幹細胞が存在することが明らかになり、それを用いた脳機能の再建の可能性が出てきた。しかし、損傷した脳の再構築、さらには機能の再建には、未だ多くの問題が残されている。本研究では、脳形成のメカニズムを明らかにし、それに基づいた神経回路網の再構築法の確立を目指す。

4.研究結果:

(1)脳形成におけるグルタミン酸の役割の解析

グルタミン酸は、ほ乳類の中枢神経系において記憶・学習などの脳高次機能に重要な役割を果たす神経伝達物質としての作用だけでなく、神経系の発生・分化にも関与するシグナル分子としての作用を持っていると考えられているが、その詳細は不明である。我々は、細胞外グルタミン酸濃度調節にとって重要な役割を果たす2種類のグリア型グルタミン酸トランスポーター(GLT1, GLAST)を完全に欠損したマウス(DK マウス)を作製した。DK マウスの脳には、胎生16日以降様々な形態異常が観察された。嗅球の僧帽細胞層・海馬の錐体細胞層・大脳皮質の層構造の形成不全が観察された。これらの異常は細胞外グルタミン酸濃度の上昇による、神経前駆細胞の分裂能の低下、神経細胞の移動能の低下によるものであることがわかった。これらの実験結果は、グルタミン酸が脳の形成に重要な役割を果たすことを *in vivo* で初めて証明したものである。

(2)形成期に見られるグリア細胞の自発性活動の機序

脳は遺伝的なプログラムだけでなく、環境からの入力や脳自身の活動により改変を受け完成されていく。生後の脳形成初期には、同期した自発性の神経活動が観察され、その活動が脳の形成に関与している可能性が示唆されている。近年、自発性の活動は神経細胞だけでなくアストロサイトでも細胞内カルシウム濃度の変動として観察され、それが脳の形成に何らかの役割を果たしていると考えられている。本研究により、生後の脳形成初期に見られる自発性アストロサイト内カルシウム濃度変動は、神経細胞から放出されるグルタミン酸が、アストロサイトに存在するグルタミン酸に取り込まれ、それにより生じるわずかな脱分極(グルタミン酸トランスポーターは electrogenic なトランスポーターで、1分子のグルタミン酸を輸送する毎に1つの陽イオンが細胞内に輸送される)が L 型カルシウムチャネルを活性化することにより起こることが明らかになった。

(3)神経回路網の活動を維持するためのエネルギー補給のメカニズム

神経系は他の臓器に比べエネルギー要求性が高く、神経回路網が正常に形成し機能を維持するためには、神経活動の亢進した脳部位に選択的に代謝エネルギーを補充する必要がある。本

研究により、神経活動の亢進、シナプス間隙のグルタミン酸濃度上昇、グリア型グルタミン酸トランスポーターによるグルタミン酸の再吸収の活性化（同時に Na⁺がグリア内へ流入）、グリアの Na-K ATPase の活性化（グリア内でのエネルギー消費増大）、グリアによる毛細血管からのブドウ糖の取り込み増加、グリアの解糖系によるブドウ糖から乳酸の生成（グリア内の消費したエネルギーの補充）、生成した乳酸を神経細胞が取り込みエネルギーを補充、という経路が重要であることを、in vivo, in vitro で証明した。

5. 自己評価：

本研究により神経幹細胞の分裂に關与する因子としてグルタミン酸を同定し、さらに脳の形成への關与が示唆されているグリア細胞の自発活動の機序を明らかにした。いずれの結果も、脳形成の新しいメカニズムの一端を明らかにしたものである。当初の研究計画であった神経幹細胞の単離に關しては、マウスの作成に時間がかかったが、いくつかのマウスに關して作成を継続しており、近い将来この分野に貢献できると考えている。また、神経回路網の形成・維持に、グリア細胞が必要であることを示した本研究は、神経細胞を補充し、神経回路網を再構築するだけでは脳機能の再建は困難であり、グリア細胞網の再構築も必要であることを示唆しており、神経細胞自体の補充ではなく、グリア細胞の制御による脳機能の再建という再生医療の新しい方向性を示した。

6. 研究総括の見解：

対象とする神経幹細胞は、体性幹細胞という新たに開拓されつつある領域の主要な立役者として、胚性幹細胞 (ES 細胞) とともに現在注目を急速に集めている。本研究者はこの領域の我が国における代表的研究者の一人と目されている。今後の成長を期待してよい。

7. 主な発表等：

1. Espinosa-Parrilla, J.F., Carmona, M.A., Pozas, E., Senserrich, J., Tanaka, K., Soriano, E., Aguado, F. Activation of glial glutamate transporters underlie spontaneous calcium oscillations in astrocytes in situ. *Nature Neurosci.* (under revision)
2. Huang, Y., Dykes Hoberg, M., Tanaka, K., Rothstein J.D., Bergles D.E. Climbing fiber activation of EAAT4 transporters and kainite receptors in cerebellar Purkinje cells. *J. Neurosci.* in press
3. Mitani, A., Tanaka, K. Functional changes of glial glutamate transporter GLT-1 during ischemia: An in vivo study in the hippocampal CA1 of normal mice and of mutant mice lacking GLT-1. *J. Neurosci.* 23. 7176-7182, 2003
4. Voutsinos-Porche, B., Bonvento, G., Tanaka, K., Welker, E., Chatton, J.-Y., Magistretti, P.J., Pellerin, L. Glial glutamate transporters mediate a functional metabolic crosstalk between neurons and astrocytes in the mouse developing cortex. *Neuron* 37. 275-286, 2003.
5. Harada, T., Harada, C., Kohsaka, S., Wada, E., Yoshida, K., Ohno, S., Mamada, H., Tanaka, K., Parada L.F., and Wada, K. Microglia-Muller glia interactions control neurotrophic factor productions during light-induced retinal degeneration. *J. Neurosci.* 22. 9228-9236, 2002.

特許出願

1. 「グルタミン酸トランスポーターGLAST 機能欠損マウス」(特願 2003-114793)
- 研究課題別評価

1. 研究課題名 : 大脳皮質における機能的領野のパターン形成機構

2. 研究者氏名 : 田辺 康人

グループメンバー : 長谷川 潤 (研究期間 H13.2.1. ~ H15.9.30.)

高松 昌子 (研究期間 H12.11.14. ~ H15.9.30.)

3. 研究の狙い :

中枢神経系を構成する多種多様な神経細胞群は、その構成様式の根本である。中枢神経系においては、個々のシステム特有な内因的・外因的パターン形成機構によりシステムを構成する多種多様な構成要素の個々の特異性、並びに、他の構成要素との関係性が確立されていく。本研究は、中枢神経系のうち、ヒトにおいて特に発達している大脳皮質を系として取り扱い、大脳皮質の発生から成熟に到るまでの過程において、大脳皮質の皮質構築の為に、どのような層形成・領野形成といったパターン形成機構が働いているのか、包括的・システムの理解を目指すものである。

大脳皮質が構築されていく過程で、解析の対象となる構成要素には、少なくとも三種が存在する。それらは、興奮性の皮質投射ニューロン、抑制性の皮質介在ニューロン、そして他の皮質細胞に先駆けて発生してくる Cajal-Retzius 細胞である。それら個々の構成要素には、どのような多様性があり、どのような性質をもつのか、また、更には、これら三者が、発生・成熟過程において、どのような順序、関係性で作用しあい、大脳皮質を構成する個々の機能的領野の形成に結びつくのか、解析の対象となる。

このように、構成要素が多種多様であり、また個々の構成要素がお互いに特異的な関係性を構築しているようなシステムを対象とした場合の一つの解析手段として、それら一つ一つの構成要素に焦点を当て、個々の要素にどのような遺伝子情報が発現されているのか、ポストゲノム時代を踏まえて網羅的に解析するアプローチ (遺伝子プロファイリング) をとることが、その生命現象を正確に理解していくための確固とした基盤を与えると考えた。また、個々の細胞がどのような関係性でお互いを規定し、システム全体として統合されているのか、その細胞がシステム全体の中で示す役割を明らかにする (細胞プロファイリング) ことが、対象とした生命現象の細胞レベルでの包括的理解に結びつくと考えた。この為、本研究においては、単一細胞種レベルでの発現遺伝子プロファイリング、細胞プロファイリングに基づいて、大脳皮質の組織形成・機能的構築の制御・維持機構を明らかにすることを目指した。

4. 研究結果 :

皮質投射ニューロンの発生・発達機構の上での問題点として、まず、皮質投射ニューロンがどのように層特異性を獲得するのかを取り扱い、その層形成機構が FGF signalling により調節されている事を明らかにした (J. Neurosci 投稿中)。次に、単一細胞レベルでの遺伝子発現プロファイリング法を適用することにより、大脳皮質 6 層構造のうち、第 6 層を構成する皮質投射ニューロンの軸索投射パターンを調節するホメオドメイン転写因子の単離・同定に成功した。一方、皮質介在ニューロンは大脳皮質の腹側に位置する線条体原基において発生し、皮質内に細胞移動してくることが知られているが、皮質介在ニューロンを、個々の発生機構に従って標識し、選択的に単一細胞種レベルでの解析を可能にするマウス遺伝学を用いた解析系を構築した。また、

Cajal-Retzius 細胞の発生 発達機構の解析系として、Cajal-Retzius 細胞が特異的に GFP 蛍光色素により遺伝学的に標識されたトランスジェニックマウスを用いた。この GFP 標識された Cajal-Retzius 細胞に対する電氣的穿孔法を用いた解析から、今まで考えられていた様式とは異なる、新たな Cajal-Retzius 細胞の発生様式を明らかにした (J. Neurosci 投稿中)。更に、発現遺伝子プロファイリングの観点から、GFP 蛍光を指標に Cajal-Retzius 細胞を選択的に FACS を用いて単離し、皮質投射ニューロンとの比較で遺伝子発現プロファイリングをおこない、新たな生理的役割を説明しうる分子の同定を推し進めた。

5. 自己評価 :

研究の 3 本柱として打ち立てたもののうち、興奮性の皮質投射ニューロン、Cajal-Retzius 細胞に関して研究の一応の成果を得ることができたと考えている。単一細胞レベルで皮質投射ニューロンを解析していくために、GFP による電氣的穿孔法を用いた層特異的な in vivo 細胞標識系の導入 確立を図ったが、これに時間がかかり、当初の研究計画より大幅な遅れをとった。しかしながら、研究の後半に入り、実験系が動き始めると、深層投射ニューロンの軸索投射パターン獲得に働いている転写因子の同定に成功し、一応の成果を得たことを評価している。また、系の確立に努めている間に、副次的な仕事として展開していた FGF signalling に関する仕事においても一定の成果を得たことは評価できるのではないかと考えている。Cajal-Retzius 細胞は、従来、皮質層形成においてのみ重要な働きを示す事が知られていたが、我々が Cajal-Retzius 細胞に関して得た発見は、皮質領野形成にも Cajal-Retzius 細胞が重要な働きを示すことを示唆し、従来より謎の多かった大脳皮質のような大きな組織の包括的な領野形成機構の理解を進める大変重要なものであると考えている。以上の幾つかの仕事を論文としてまとめる段階に到っている。皮質構築といった問題に対して、このように、一つ一つの細胞に焦点を当てていくアプローチにおいては、木を見て森を見ず」といった個々の細胞種個別の問題に陥りやすい。そういった問題の可能性をいち早く予見し、細胞プロファイリングとして、個々の単一細胞種を生まれの機構に従って標識し、細胞欠失させ、全体の育ちの過程の中での機能を問う為のマウス遺伝学を用いた系の確立を研究計画の早い段階から計画した。皮質介在ニューロンが皮質構築の中でどのような機能的役割を演じているのかを解析していくことに焦点を当て、マウス実験系を構築 確立してきたが、ノックアウトマウスおよび 10 系統以上のトランスジェニックマウスの構築には多大な労力を必要とした。個々の単一細胞種に焦点を当てる遺伝子プロファイリング 細胞プロファイリングを用いた皮質構築発達機構の解析は、壮大な試みである。終わりは始まり。3つの柱として打ち立てたものをものから得られた発見は、いずれもこれからの大きな研究展開の萌芽となるものであり これらを確認とした基盤として、総和」としての皮質構築のための研究展開を進めていきたい。「人であるということは、とりもなおさず責任を負うということである。」一緒に研究を進めてくれた研究員 (長谷川潤博士)、研究技術員 (高松昌子さん) に心から感謝したい。

6. 研究総括の見解 :

一個の細胞のもつ遺伝情報を増幅し、実験の俎上に持ち込むシングルセル PCR 技術を持っている。その技術を駆使して、脳組織の形成およびそれが発現する高次機能とその異常を解析しようという野心的挑戦を行ってきた。本 PCR 技術を有する研究者はまだ数少なく、研究は漸く佳境期に入りつつある。今後の展開が注目される。

7. 主な論文等 :

1. Hiroshi Hasegawa, Sizuko Ashigaki, Masako Takamatsu, and Yasuto Tanabe
2. Laminar Patterning of the Developing Neocortex by Temporally-Coordinated FGF Signalling Pathway. Submitted to J. Neurosci.
3. Keiko Takiguchi-Hayashi, Mariko Sekiguchi, Shizuko Ashigaki, Masako Takamatsu, Hiroshi Hasegawa, Rika Suzuki-Migishima, Minesuke Yokoyama, Shigetada Nakanishi, and Yasuto Tanabe
4. Generation of Reelin-positive Marginal Zine Cells from the Caudal-Medial Wall of Telencephalic Vesicles. J. Neurosci., in revision.

発表

1. Yasuto Tanabe , Hiroshi Hasegawa, Shinichi Narita, Masako Takamatsu, The Application of single cell-based PCR approach for the analysis of CNS diversification. The 24th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society and the Second Joint-Meeting of the Japan Neuroscience Society and the Japanese Society for Neurochemistry, Kyoto, Japan, 2001 年 9 月 26 日

研究課題別評価

1. 研究課題名 老化にともない生じる神経細胞死を抑制する遺伝子

2. 研究者氏名 中野 裕康

グループメンバー 駒澤 (左近) 幸子 (研究期間 H12.11.1. ~ H15.9.30.)

3. 研究の狙い:

TNF により誘導される細胞死の分子メカニズムおよびそれを抑制する遺伝子を同定することにより、最終的には老化にともない出現してくる神経細胞死や活性酸素の蓄積を抑制する遺伝子の同定を目指した。

4. 研究結果:

(1) NF- κ B による JNK 活性化の抑制のメカニズム

最近 NF- κ B の活性化が障害された細胞では、通常では一過性におこる JNK の活性化が遷延化しており NF- κ B の新たな細胞死抑制のメカニズムとして JNK の活性化を抑制することが明らかにされた。しかし、その分子メカニズムは不明であった。我々は TNF レセプターの下流に存在するアダプター分子である traf2^{-/-}traf5^{-/-}(DKO)マウスを作製し、そのマウス由来胎児線維芽細胞(MEF)の解析から TNF による JNK の活性化は TRAF 依存性であることを明らかにしていた。そこでまず、遷延化する JNK の活性化が DKO MEF でも認められるかを検討した。その結果予想外なことに、TNF 刺激後早期の JNK の活性化は障害されているにもかかわらず、刺激後 60 分後より JNK の活性化が認められ、120 分後にはピークとなり、以後活性化が遷延化することが明らかとなった。種々のインヒビターを用いた実験や細胞内活性酸素(ROS)の蓄積を検討した結果、通常の細胞で見られる TNF 刺激による MAPK の早期で一過性の活性化は TRAF 依存性であり、NF- κ B の活性化の障害された細胞において見られる TNF 刺激後遅れて出現し、遷延化する MAPK の活性化は ROS 依存性であることが初めて明らかとなった。さらに DKO MEF を TNF 刺激した時に認められる ROS 蓄積のメカニズムを解析した結果、TNF により野性型と比較して、細胞内の主な抗酸化分子である還元型グルタチオンや NADPH のレベルが減少することが明らかとなった。そこで、そのメカニズムを明らかにするために、野性型および DKO MEF を用い、TNF 刺激前後で発現が誘導される遺伝子群を cDNA マイクロアレイを用いて検討した。その結果、野性型では TNF 刺激後に抗酸化分子の発現誘導が認められ、さらにこれらの遺伝子群の発現誘導は DKO MEF では野性型に比較し、低下していることも明らかとなった。以上より NF- κ B の細胞死抑制の新しい機能として、NF- κ B は一群の抗酸化分子の発現誘導を介して ROS の蓄積を抑制していることが明らかとなった。

(2) 新規転写活性化因子 BSAC の同定

DKO MEF は TNF 刺激により細胞死が誘導されることより、この細胞にレトロウイルスベクターで作製した cDNA ライブラリーを導入し、TNF 存在下で培養することにより生存してくるクローンより遺伝子を回収し、BSAC (Basic, SAP, and Coiled-coil domain)と命名した新規の転写活性化因子を同定した。BSAC は主に核内に存在することから BSAC の転写活性化能の有無を、酵母の GAL4 融合タンパクとして発現させ、GAL4 依存性の転写活性を検討したところ、BSAC の C 末に存在するプロリンに富む領域に強い転写活性が存在することが明らかとなった。次に BSAC の標的配列を検討した結果 BSAC は CArG box を有するプロモーターを強力に活性化することが明らかとなった。一方 BSAC の細胞死抑制効果およびそのメカニズムについて検討した結果、BSAC は確かに TNF により誘導される細胞死を不完全ながらも抑制すること、およびその抑制のメカニズムとしては caspase 3 や caspase 8 の活性化を抑制する結果であることが明らかとなった。また種々の BSAC の N 末および C 末の欠失変異体を用いた実験の結果、BSAC の転写活性化能と細胞死抑制効果は非常によく相関することから、BSAC は何らかの抗アポトーシス遺伝子の発現上昇を介

して細胞死抑制効果を発揮している可能性が示唆された。一方まったく独立した二つのグループにより t(1,22)転座により生じる急性巨核芽球性白血病で生じる融合遺伝子の片割れが MAL/MKL1 と命名されたヒトの BSAC ホモログであることが明らかにされた。このことは、我々の明らかにした BSAC の有する抗アポトーシス作用や強い転写活性化能が白血病の発症に深く関与していることを示している。現在我々は BSAC ノックアウトマウスの作製に成功しており、今後このマウスを用い BSAC の生理的な役割を明らかにしていきたい。

5. 自己評価 :

細胞死抑制遺伝子を同定するための機能的なスクリーニングにより、NF- κ B 依存性に発現が誘導される遺伝子を同定するねらいであったが、我々の同定したものは白血病の発症に深く関わっていることがその後明らかにされた新規転写因子であった。この予想外の発見は、今後この遺伝子のノックアウトマウスの解析や白血病発病のメカニズムを解析することにより、発展させていきたいと思う。一方 NF- κ B による JNK の活性化の抑制のメカニズムを解析することにより、遷延化する MAPK の活性化が TNF により誘導される ROS の蓄積によっていることを明らかにし、NF- κ B の新たな機能として、抗酸化分子の発現上昇を介して ROS の蓄積を抑制することを明らかにした。ただ残念なことに NF- κ B の標的遺伝子を完全に特定できなかったことに不満が残り、この点については今後明らかにしていきたいと思う。

6. 研究総括の見解 :

TNF 因子を中心に細胞死機構の解明に迫ろうと野心的な挑戦を続けている。途中テーマの一部変更もあったが、着実な歩みを続けてきた。但し、発表論文の数はやや少ない。これまでに得ている成果の質は中程度か。更なる奮起を望みたい。

7. 主な論文等 :

1. Tada, K., T. Okazaki, S. Sakon, T. Kobarai, K. Kurosawa, S. Yamaoka, H. Hashimoto, T.W. Mak, H. Yagita, K. Okumura, W.C. Yeh, and H. Nakano. 2001. Critical roles of TRAF2 and TRAF5 in tumor necrosis factor-induced NF- κ B activation and protection from cell death. *J Biol Chem* 276:36530-36534.
2. Honda, K., H. Nakano, H. Yoshida, S. Nishikawa, P. Rennert, K. Ikuta, M. Tamechika, K. Yamaguchi, T. Fukumoto, T. Chiba, and S.I. Nishikawa. 2001. Molecular basis for hematopoietic/mesenchymal interaction during initiation of Peyer's patch organogenesis. *J Exp Med* 193:621-630.
3. Sasazuki, T., T. Sawada, S. Sakon, T. Kitamura, T. Kishi, T. Okazaki, M. Katano, M. Tanaka, M. Watanabe, H. Yagita, K. Okumura, and H. Nakano. 2002. Identification of a novel transcriptional activator, BSAC, by a functional cloning to inhibit tumor necrosis factor-induced cell death. *J Biol Chem* 277:28853-28860.
4. Sakon, S., X. Xue, M. Takekawa, T. Sasazuki, T. Okazaki, Y. Kojima, J.H. Piao, H. Yagita, K. Okumura, T. Doi, and H. Nakano. 2003. NF- κ B inhibits TNF-induced accumulation of ROS that mediate prolonged MAPK activation and necrotic cell death. *Embo J* 22:3898-3909.
5. Hur, G.M., J. Lewis, Q. Yang, Y. Lin, H. Nakano, S. Nedospasov, and Z.G. Liu. 2003. The death domain kinase RIP has an essential role in DNA damage-induced NF- κ B activation. *Genes Dev* 17:873-882.

受賞

1. Young Investigators' Grants Award (Human Frontier Science Program) "Signal dependent regulation of NF- κ B activity" (2001年3月)

招待講演 国内 4 件、海外 1 件

研究課題別評価

1.研究課題名 :長期記憶の分子機構の探索

2.研究者氏名 :尾藤 晴彦

グループメンバー 野々村 貴美子 (研究期間 H14.4.1. ~ H.15.9.30.)

3.研究の狙い :

長期記憶が成立するために必須な分子機構として、1)転写因子 CREB がシナプス入力特異的に活性化することや 2)シナプス伝達の場合である樹状突起スパインにおけるシグナル伝達効率の上昇が維持されることがこれまで提唱されている。

前者について研究代表者は、以前、CaMKK-CaMKIV カスケードが海馬 CREB リン酸化の必須経路であることを世界に先駆けて示した。しかし、海馬以外の部位における CREB 活性化のメカニズムや意義については、不明であった。そこで本研究では、CaMKIV 類似キナーゼドメインを有するキナーゼを単離し、海馬以外の脳部位における CREB キナーゼの候補を同定し、その生物学的機能を決定することを試みた。

後者については、グルタミン酸受容体のシナプス膜への新規挿入が重要な意義を有することが示唆されているが、その背景にあるトラフィッキング機構や細胞骨格再編成については未解明のままであった。我々はとくにスパイン形態を規定する細胞骨格動員に焦点を絞った。興奮性シナプスが局在する樹状突起スパインにはアクチンのみが細胞骨格成分として存在することが知られていたことから、アクチンに蛍光分子 GFP を融合させて蛍光プローブ GFP-actin を作成し、その動態と神経活動依存的動員を生きた神経細胞で可視化する試みを行った。

これらの実験から、記憶形成・貯蔵に関する転写調節・細胞骨格シグナリングの果たす新たな役割を明らかにすることにより、記憶障害や痴呆の予防・進行阻害のための新たな創薬標的探索の端緒となることが期待される。

4.研究の結果 :

4-1) CaMKIV の小脳顆粒細胞生存における CREB キナーゼとしての必須の役割の解明 (See et al., FASEB J. 2001; Bito and Takemoto-Kimura, Cell Calcium, 2003) :

従来から、我々を含め多くのグループが、CaMKIV は小脳顆粒細胞において非常に強く発現していることを見出していたが、その機能は不明であった。フランス Strasbourg 大 Loeffler 研からの短期派遣留学生 Violaine See との協同研究により、a) 小脳顆粒細胞にて CREB が脱分極依存的にリン酸化され、この過程に CaMKIV が必須であること、b) basal な活動依存的 CREB リン酸化にも CaMKIV が関与していること、c) この後者によって、小脳顆粒細胞の長期的生存が可能となることを見出した。このことにより、CaMKIV-CREB が長期可塑性以外にも、細胞生存のような長期的表現型形成にも関与していることを初めて報告した。

4-2) CaMKIV 類似 CREB キナーゼ (CLICK) の同定と機能解析 (Takemoto-Kimura et al., JBC 2003; Ohmae et al., unpublished data) :

CaMKIV キナーゼ領域のホモロジーを指標に、PCR/ in silico cloning により、CREB 活性を修飾可能なキナーゼを 3 つ同定して、暫定的に CLICK-I、-II、-III と名づけた。これらはいずれも機能未同定のキナーゼで、脳特異的発現分布を有し、in vitro の CREB 転写活性を修飾することから、長期

記憶・長期可塑性に対する貢献があることが期待された。そこで、現在これらについて、遺伝子破壊マウスを作成中である。

CLICK-IIIについては、扁桃体中心核、視床下部内副側核、松果体に極めて強く発現しているCaMKIアイソフォームであることを見出し、かつ膜局在シグナルであるC末端CAAX配列により脂質修飾を受け、膜移行を行う神経特異的キナーゼとしては最初の例であることを報告した。

4-3) 樹状突起スパインへの神経活動依存的アクチン集積機構の解明 (Furuyashiki et al., PNAS, 2002) 突起形成におけるRhoシグナル経路の役割の解明 (Yamasaki et al., Development 2001; Arakawa et al., JCB, 2003; Bito, J. Biochem., 2003)

GFP-actin imagingを生きた初代培養海馬錐体細胞で行った結果、a)アクチン細胞骨格に動的な成分と静的な成分が共存すること、b)一定の条件下でスパインや細胞体辺縁膜へのアクチンの集積が神経活動依存的に引き起こされること、c)スパインへのアクチン移行はNMDA受容体依存的カルシウム流入により、また細胞体辺縁膜へのアクチン集積は、電位依存性カルシウムチャンネルにより特異的に引き起こされることを発見した。

また、突起形成初期におけるアクチン細胞骨格制御の分子機構を解明する目的で、小脳顆粒細胞神経突起モデルを選び、その形成・伸展機構を探索した。その結果、Rho結合キナーゼならびにformin蛋白mDia1の連携による突起制御経路を解明した。

5. 自己評価：

研究代表者がこれまで自分自身の手でオリジナルな発見をしてきた CaMKIV/CREB 経路 (Bito et al., Cell, 1996) ならびに Rho/ROCK/actin 経路 (Bito et al., Neuron, 2000) を出発点に、本さきあげ研究 21 を通じ、3 年間で以下の 3 つの新たなコンセプトを発見・提唱することができた。

(1) 長期可塑性制御を超えた CaMKIV/CREB 経路の普遍的重要性の発見

(2) 神経突起形成・制御に関わる Ca^{2+} /Rho 経路の解明

(3) CLICK-III の脂質修飾による膜局在制御の発見

(2) は京都大学成宮周教授を含む多くの協同研究者に恵まれたこともあり飛躍的な進展をとげ、幸いにも HFSP 若手研究者 Grant や日本薬理学会学術奨励賞をいただく契機となった。しかしむしろ今後の展開が興味深いのは (1) と (3) についてであり、望外の発見であった。これらについては、現在作製中 (あるいは現存) のマウス変異体の解析をしっかりと行い、その意義を詰めていきたい。

このように短期間で多くの発見があった反面、個々の発見の確認・解析に多くの時間を注入せざるを得ず、(委託業者での感染事故など想定外の要因があったにせよ) マウス変異体作製が遅れ、本事業の修了に間に合わなかったことは、おおいに反省すべきである。個体レベルでの解析なくして長期記憶の分子機構とはいえない、という批判は、甘んじて受ける覚悟である。また未発表の CLICK-I、-II 等についても興味深い中間結果が多く得られているが、論文発表まで至らなかった。

幸いにも本研究を引き続き JST の発展継続事業として採択していただけたので、一刻も早くこれらの点を修正し、さらなる発見を目指して今後とも探索を続けていきたい。

6. 研究総括の見解：

シャープな解析力をもつ。医学畑出身のキャリアを活かして大所、高所から課題の重要性を把握し、独自の着想のもとに精密なアプローチを行っていることは評価できる。長期記憶の形成機

構の解明を、記憶成立の中心的な場である海馬における転写調節因子 CREB の動態に狙いを定めて追求し、成果をあげている。将来的には記憶の病態解明とその制御技術の開発を目指している。最近のめざましい成果を評価されて、京大・大学院医学系研究科講師より東大・大学院医学系研究科助教授へと抜擢された。

7. 主な論文等：

原著論文

1. Takemoto-Kimura S, Terai H, Takamoto M, Ohmae S, Kikumura S, Segi E, Furuyashiki T, Arakawa Y, Narumiya S, Bito H. Molecular cloning and characterization of CLICK-III /CaMKI?, a novel membrane-anchored neuronal Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase (CaMK). J. Biol. Chem. 278: 18597-18605, 2003.
2. Arakawa Y, Bito H, Furuyashiki T, Tsuji T, Takemoto-Kimura S, Kimura K, Nozaki K, Hashimoto N, Narumiya S. Control of axon elongation via an SDF-1? / Rho / mDia pathway in cultured cerebellar granule neurons. J. Cell Biol., 161: 381-391, 2003.
3. Furuyashiki T, Arakawa Y, Takemoto-Kimura S, Bito H (corresponding author), Narumiya S. Multiple spatiotemporal modes of actin reorganization by NMDA receptors and voltage-gated Ca²⁺-channels. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 99: 14458-14463, 2002.
4. Yamasaki T, Kawaji K, Ono K, Bito H, Hirano T, Osumi N, Kengaku M. Pax6 regulates granule cell polarization during parallel fiber formation in the developing cerebellum. Development 128: 3133-3144, 2001.
5. Yamamoto M, Hilgemann DH, Feng S, Bito H, Ishihara H, Shibasaki Y, Yin HL. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate induces actin stress fiber formation and inhibits membrane ruffling in CV1 cells. J. Cell Biol., 152: 867-876, 2001.
6. See V, Boutiller AL, Bito H, Loeffler JP. Calcium-calmodulin dependent protein kinase type IV (CaMKIV) inhibits apoptosis induced by potassium deprivation in cerebellar granule cells. FASEB J., 15: 134-144, 2001.

総説・解説

1. Bito H, Takemoto-Kimura S. Ca²⁺/CREB/CBP-dependent gene regulation: a shared mechanism critical in long-term synaptic plasticity and neuronal survival. Cell Calcium, 34: 425-430, 2003.
2. Bito H. Dynamic control of neuronal morphogenesis by Rho signaling. J. Biochem. 134, 315-319, 2003.
3. 古屋敷智之、成宮周、尾藤晴彦. 神経細胞におけるアクチン細胞骨格系の制御 in 動くシナプスと神経ネットワーク (塩坂貞夫編、金芳堂) pp.25-34, 2003.
4. 尾藤晴彦、荒川芳輝. 中枢神経細胞における突起形態制御機構。脳神経外科速報 13: 845-850, 2003.
5. 尾藤晴彦. CREB の脳神経系における役割-長期記憶とアポトーシスの制御。医学のあゆみ, 203: 538-540, 2002.
6. 荒川芳輝、尾藤晴彦. Rho/ROCK と神経細胞形態。BioClinica 17: 1154-1158, 2002.
7. 尾藤晴彦、古屋敷智之、竹本-木村さやか、荒川芳輝、成宮周. マウス海馬錐体細胞初代培養法。実験医学, 20: 2247-2252, 2002.

8. 古屋敷智之、荒川芳輝、竹本-木村さやか、尾藤晴彦、成宮周. 神経活動によるアクチン細胞骨格制御とその多様性. 実験医学別冊「バイオイメージングでここまで理解る」(楠見明弘・小林剛・吉村昭彦・徳永万喜洋編)羊土社刊、pp.32-36, 2002.
9. 古屋敷智之、尾藤晴彦、成宮周. Rho と細胞骨格制御. in シグナル伝達 細胞運命と細胞機能を制御する仕組み. (西田栄介、大野茂男編、共立出版)pp.49-67, 2001.

口頭発表

国際会議

招待講演 8 件 (海外 4 件、国内 4 件)、一般演題発表 7 件

国内学会 研究会等

招待講演 25 件 (受賞講演 1件、シンポジウム 10 件、研究会 14 件)

一般演題発表 13 件 (協同研究者による招待講演 4件を含む)

受賞

2002 年 4 月 HFSP若手研究者 Grant 受賞

2003 年 3 月 日本薬理学会学術奨励賞受賞

研究課題別評価

1. 研究課題名 :アルツハイマー病から脳の老化制御機構を探る :
新たな Amylospheroid 仮説提唱と検証

2. 研究者氏名 :星 美奈子

3. 研究の狙い :

アルツハイマー病は老人性痴呆の主たる要因であり、高齢化社会に急速に移行する日本において重要な課題である。従来、発症機序は「脳内 $A\beta$ -アミロイド($A\beta$)量が増え老人斑(線維)を作ること」とされてきた。しかし、脳内の $A\beta$ 量や線維量は必ずしも臨床症状と対応せず、 $A\beta$ に由来する病的な構造体が他にあるのではないかと考えられたが、その実体に関しては1)複数の $A\beta$ 分子種($A\beta_{1-40}$ 、 $A\beta_{1-42}$)がともに神経毒性を発揮すること、2)in vitro で報告されている構造体(2/3量体、線維、球など)は様々な会合状態からなる混合物であることから、どれが神経毒性の担い手であるかを初め、多くが不明である。そのために、生理的 $A\beta$ が毒性会合体に変わる機構や神経細胞死機構等の基本的命題が解明されないまま、臨床応用が加速している状況であった。私は、複数ある $A\beta$ 会合体の中から神経細胞死を実際に引き起こす $A\beta$ 構造体の探求と、それによる発症機構の解明を目的として研究を開始した。そのために、我々が発見した $A\beta_{1-40}$ に由来する新たな球状会合体「amylospheroid」を手がかりに、(1)amylospheroid 形成機構の解明、(2)生体におけるamylospheroid の存在の検証、(3)amylospheroid による神経細胞死機構の解明を研究の3つの柱とした。

4. 研究結果 :

(1) amylospheroid 形成機構の解明

amylospheroid の発見 $A\beta_{1-42}$ に比べ毒性が低いと考えられていた $A\beta_{1-40}$ だが、我々が開発した回転法を用いることで再現的に神経毒性を発揮するようになる。その中には複数の会合体が含まれるが、遠心による粗精製から球状の構造体が毒性を発揮する成分と考えられ、これを amylospheroid と名付けた。今回、これをグリセロール密度勾配遠心により精製を行ったところ、中でも直径 10-15 nm のものに毒性があり、従来注目されてきた線維の約 400 倍の神経毒性を持つことを明らかにした (Hoshi, M. et al. PNAS2003)。

$A\beta_{1-42}$ 由来 amylospheroid 我々は、今回、より発症と相関するとされていた $A\beta_{1-42}$ も $A\beta_{1-40}$ と同様の 10-15 nm の amylospheroid を形成することを見いだした。しかし、 $A\beta_{1-42}$ 由来 amylospheroid は、 $A\beta_{1-40}$ 由来 amylospheroid の 100 倍以上強い比活性を持ち、ごく微量でかつ短時間に形成されるということを発見した (Hoshi, M. et al. PNAS2003)。この結果は、 $A\beta_{1-42}$ が発症と相関する理由が毒性会合体の形成能力の差に起因する可能性を示唆し、今後、この神経毒性の差を物理化学的に解明する端緒を開いた。

線維と amylospheroid の形成経路は分岐する :パーキンソン病を初めとする各種変性疾患でタンパク質の異常凝集、特に線維形成の「中間体」が注目されている。しかし、各々の凝集過程は必ずしも解明されていない。我々の実験条件下では重合開始時の $A\beta_{1-40}$ 濃度が低いほど amylospheroid 形成が優位となり、相対的に線維形成が抑制される。また、シート形成を阻害する 5 残基のペプチドは、線維形成は抑制するが、amylospheroid には影響がなかった。以上から

amylospheroid は線維形成とは異なる分子変化である可能性を示した (Hoshi, M. et al. PNAS2003)

amylospheroid 形成は分子内変化を伴う? :神経毒性を持つ amylospheroid の形成は、SDS-PAGE 上の 2-4 量体バンドと相関し、何らかの分子変化が起きていることが推測された。今回、我々は今まで注目されていない、A β の内部配列上の特定のアミノ酸が amylospheroid 形成に必要であることを見だし、現在さらなる解析を進めている。(Sato, K. et al. 投稿中、Noguchi, A., Hoshi, M. et al. 投稿準備中)

新たな手法の開発—液中中原子間力顕微鏡によるナノ領域の観察 :電子顕微鏡下ではサンプルを乾燥させるが、それを排除するため、困難とされる溶液下の原子間力顕微鏡観察に取り組み、プローブとマイカの表面処理方法を開発し、溶液下で amylospheroid が真球であることを示した (Hoshi, M. et al. PNAS2003)。近年、原子間力顕微鏡は DNA やタンパク質の観察に用いられるが、nm の定量的観察は未だ困難であり、今回確立した手法を汎用化した (Shibata-Seki, T, et al. Nanoscale seminar 2004&投稿準備中)

(2) 生体における amylospheroid の存在の検証

精製した amylospheroid を抗原にポリクローナル抗体を作製しつつ、amylospheroid 特異的抗体の 1次スクリーニング法についても検討中である。さらに、生体試料の検証、細胞内での局在など解析を進めるべく生命倫理の手続きを取り進めている。

(3) amylospheroid による神経細胞死機構の解明 amylospheroid による神経細胞死の初期に、我々が長年研究してきたタウリン酸化酵素 TPPI/GSK-3 β が関与する可能性を示した (Hoshi, M. et al. PNAS2003)。また、Fyn の関与を示唆する結果も得た (Hoshi, M. et al. 投稿準備中)。さらに、東京薬科大学との共同研究により amylospheroid によりカルシウム流入が起こり、カルパインが活性化することを示した。カルパイン阻害剤は amylospheroid 毒性を非常に効果的に遮断するため、カルシウム-カルパインは重要な神経細胞死経路であると考えられた。(Kobayashi, N. R. et al. 投稿中)

5. 自己評価 :

研究場所こそ移動しなかったが、ラボのセットアップ (人的並びに環境) から運営まで小規模ながらフルコースを体験出来た。お陰で現在進めている次のグループ構築では、3年前とは異なりラボの絵がすんなりと頭に描けるようになっている。この貴重な体験を与えられたことを心から感謝したい。研究成果では生命研が実質は非営利組織であり科研費申請も可能になったにも関わらず、株式会社であることが足かせとなり、ブレインバンクの利用に関しての手続きに予想外に手間取り、ヒト脳での検証を着手する寸前に終わったことが大変残念である。マウスモデルの結果からも良い感触があり、倫理面での手続きが完了し次第、着手したい。

今回、「生理的 A β が何に変わることで病因となるのか」を解明するための貴重な手がかりを得ることが出来た。ヒトでの検証を踏まえ、次には生理的 A β が「どのような分子機構で毒性を持つ会合体に変わるのか」、それを「制御する機構は何か」と言う問題を解きたい。amylospheroid を初めとする複数の異なる A β 会合体が、試験管内で他のタンパク質等の助けを借りることな形成されること、そしてその内の少なくとも1つである線維は実際にヒト脳で形成されることから、A β は複数の会合体を形成する自己組織化能力を持つと推測される。どの可能性が選ばれるかを左右するのは A β を取り巻く水とイオン環境、そしてシャペロンが考えられるが、アルツハイマー病の最大の発症因子である老化とこれらの関係はまた今後の課題である。amylospheroid の場合、回転がど

のような物理化学的变化を A β に引き起こすかを明らかにすることが、制御機構の解明への最初の一步となるだろう。公表前なので委細は省くが、そのための手がかりを本研究で得ることが出来た。生理的 A β と各種 A β 会合体は全て A β からなり、コンフォメーションと連鎖様式のみが異なる。会合体が機能を喪失するだけではなく、新たな機能を発現することから、タンパク質はこの構造代謝とでも言うべき動的構造変化により、生体の各段階に応じた機能を発揮しているのかもしれない。我々の研究はまだ一步を踏み出したところだが、アミロスフェロイドを手がかりに、現在存在する技術的問題を打破し、病態と老化という生命現象を物理化学的に解き明かしていきたいと思っている。この3年間を見守ってくださった永井総括、領域アドバイザーの先生方、領域事務並びに JST の方々に心から感謝したい。

6. 研究総括の見解：

高齢化の進展に伴い社会的に益々問題化しつつあるアルツハイマー病とその治療法の開発に対して、従来の見解を一新する成果をあげることになり、国際的にも一躍注目をあびるに至った。即ちアミロスフェロイド神経毒仮説の提唱である。現在、研究の進展は加速されつつあり、予防と新治療法の開発を目指しての今後の展開が注目される。

7. 主な論文等：

論文

1. Hoshi M, Sato M, Matsumoto S, Noguchi A, Yasutake K, Yoshida N and Sato, K. (2003) Spherical aggregates of β -amyloid (amylospheroid) show high neurotoxicity and activate tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3 β ? Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100, 6370-6375 (May 27)
2. Sato, K., Takashima, A., Maeda, T., Ohtake, A., and Hoshi, M. (2004) Asn27 is Essential for the Neurotoxicity of Amyloid β (1-42) Peptide submission
3. Kobayashi, N.R., Hirasawa, T., Yoshida, N., Hoshi, M. and Kudo Y. (2004) β -amyloid1-40 disrupts calcium homeostasis of selective hippocampal neurons in organotypic slice culture submission

総解説

1. 星美奈子 (2002) 脳の老化-いかにタンパク質の自己重合を制御するか?、細胞工学 21、728-732 特集 老化 寿命決定のメカニズム 監修 鍋島陽一
2. 星美奈子 (2003) :アミロスフェロイドの発見-アルツハイマー病における神経細胞死の原因を探して 医学のあゆみ 206、986-987
3. 星美奈子 (2004) :新規毒性物質「アミロスフェロイド」の形成と神経細胞死 生化学 総説 (印刷中)
4. 星美奈子 (2004) 新規球状毒性会合体「アミロスフェロイド」の同定-アルツハイマー病発症に置ける神経細胞死機構の解明に向けて Dementia Japan (印刷中)
5. 星美奈子 (2004) : アミロイド自己組織化による神経毒性の発現-新規毒性物質「アミロスフェロイド」とアルツハイマー病 化学と工業 (印刷中)

著書

1. 星美奈子(2004) 『かたち』が制御する神経の死 :アミロスフェロイドから病態 老化の暗号を解く (印刷中) : 細胞における蛋白質の一生』共立出版 編集 小椋光他

監修

1. 星美奈子 (2004) 『Bioindustry 神経変性疾患研究の最前線 特集号監修 (印刷中)』

国際学会

1. Hoshi, M., Sato, M., Matsumoto, S., Noguchi, A. and Sato, K.: Spherical β -amyloid aggregate (amylospheroid) show high neurotoxicity and activate tau protein kinase i/gsk-3 β : 33rd Annual Meeting of Society for Neuroscience: Nov. 2003: New Orleans, LA, USA
2. Shibata-Seki, T., Karino, Y., Hoshi, M., Sato, M. and Matsumoto, S.: Three dimensional morphological analysis of β -amyloid aggregates in a buffer solution by atomic force microscopy: Seminar Nanoscale 2004, 6 th Seminar of Quantitative Microscopy and 2nd Seminar on Nanoscale Calibration Standards in Micro- and Nanometre Range: March 2004: Physikalisches-Technische Bundesanstalt, Germany

招待講演

1. 星美奈子 (2003年5月) 新規毒性物質 『Amylospheroid』の発見-アルツハイマー病発症における神経細胞死機構の解明に向けて :東京工業大学
2. 星美奈子 (2003年6月) 新規毒性物質 『Amylospheroid』の発見-アルツハイマー病発症における神経細胞死機構の解明に向けて :東京大学医学部
3. 星美奈子 (2003年9月) : 『かたち』が制御する神経の死 :アミロスフェロイド形成とアルツハイマー病 科学技術振興事業団第9回基礎研究報告会 『生命? その誕生から死まで』東京
4. 星美奈子 (2003年10月) : 『かたち』が制御する神経細胞死 :アミロスフェロイドとアルツハイマー病 第22回日本痴呆学会シンポジウム 『変性疾患における神経細胞死』東京
5. 星美奈子 (2003年10月) :アミロスフェロイドの発見 : 『かたち』が制御する神経細胞死 :京都大学医学部
6. 星美奈子 (2003年12月) Morphology and Toxicity of Newly Identified Spherical β -amyloid aggregates (Amylospheroid) :Spring8

受賞

1. 第35回 内藤記念科学奨励金(研究助成) 受賞

その他

PNAS の論文 『アミロスフェロイド』発見に関して、文部科学省においてプレスリリースを行った。(2003年5月)日経 朝日 読売 毎日 東京新聞 (2003.05.13) 日経産業新聞・日刊工業新聞 化学工業日報・日本工業新聞・日刊ゲンダイ (2003.5.14) 科学新聞 薬事日報 (2003.5.16) 日経バイオテク、全国地方紙

一般講演発表 3 件

研究課題別評価

1. 研究課題名 細胞骨格の動的再構成による細胞形態と分化の制御

2. 研究者氏名 三木 裕明

グループメンバー 竹中 圭 (研究期間 H15.4.1. ~ H15.9.30.)

福岡 麻衣子 (研究期間 H13.4.1. ~ H14.5.31)

3. 研究の狙い：

WASP ファミリーは外界からの刺激に応じてアクチン細胞骨格を再構成する機能を持つ。本研究ではその生理的な重要性を調べるため、神経組織形成の最も基本的なプロセスである神経突起形成や線虫の初期発生期における WASP ファミリーおよびその関連因子の機能解析を行う。WASP ファミリーによる動的な細胞骨格再構成が、細胞の形態 分化の制御や形態形成など高次レベルの生命現象においてどのような役割を担っているのかを解明することを目指す。

4. 研究結果：

本研究は大きく分けて、(1) 神経細胞での解析、(2) 線虫での解析、の2つの研究計画から成っている。(1)の神経細胞での解析については、まず N-WASP が神経突起形成時に強くチロシンリン酸化されていることを見付けた。次に、このリン酸化が 253 番目のチロシン残基で起こっていること、そして神経発生に重要な役割を果たすことが知られている Src ファミリーのチロシンキナーゼが直接 N-WASP に結合してリン酸化することを確認した。このリン酸化が生化学的にどのような意味を持つのかを調べるため、N-WASP の持つアクチン重合誘導活性 (WASP ファミリー下流因子 Arp2/3 複合体の活性化能) に対する影響を調べた。その結果、チロシンリン酸化された N-WASP は強く活性化されていることが判明した。恒常的リン酸化型 非リン酸化型を mimic する変異体 (Y253E および Y253F) を神経細胞に強制発現すると、Y253E 変異体はそれだけで突起形成を誘導し、反対に Y253F 変異体は突起形成を阻害した。興味深いことにチロシンリン酸化されて活性化された N-WASP はユビキチン付加を受け、プロテアソームですみやかに蛋白分解されるが、神経突起形成が起こっている時にはこの分解機能が減弱しており N-WASP が活性化型のままで長時間に渡って保持されることが分かった。実際、プロテアソームの阻害剤を神経細胞培養系に加えると、それだけで神経突起形成が誘導された。つまり N-WASP のチロシンリン酸化による活性化と並行して、その分解を妨げることによって、N-WASP の活性を高く保持することが神経突起形成に重要なステップであることを意味している。

一方、(2)の線虫での解析については、RNAi 法によって N-WASP およびその標的因子である Arp2/3 複合体各サブユニットのノックダウン (遺伝子発現阻害) による解析を行った。興味深いことに、いずれの場合においても線虫は初期発生の段階で発生を止めて死んでしまった。このとき、線虫個体は「ventral enclosure」と呼ばれる、表皮細胞集団のシートが腹側で互いに閉じて接着し個体を形作るプロセスに異常があった。このプロセスで重要な遺伝子としては細胞同士の接着に関わるものなどがいくつか知られているが、N-WASP や Arp2/3 複合体のノックダウンがどのような異常を引き起こしているのかは不明だった。この原因を突き止めるため、AJM-1 という表皮細胞同士の接着面に局在する蛋白の GFP 融合型を発現する線虫を作製し、個々の表皮細胞の形態を生きたまま顕微鏡観察できる状態で RNAi 処理を行った。その結果、RNAi 処理を施した線虫

初期胚では表皮細胞シートが閉じるべき発生段階になっても、表皮細胞が(将来の)境界面に向かって運動することができず、そのまま腹側が開いた状態で発生を止めて死んでしまうことが判明した。またこの時表皮細胞の表皮としての細胞分化は正常に起こっており N-WASP や Arp2/3 複合体の機能が表皮細胞の運動に特異的に必須であることを明らかにした。

5. 自己評価 :

N-WASP チロシンリン酸化の発見は世界で最初の報告であり、しかもそのアクチン重合活性の制御における重要性を明らかにできたことは非常に重要な研究成果と言える。従来 N-WASP は Cdc42 などの直接結合を受けて蛋白の立体構造が変化して活性化されることは知られていたが、リン酸化による活性制御はそれと異なる全く新たな活性制御メカニズムである。さらに、このリン酸化が本研究開始時の狙いとしていた神経突起形成時に強く誘導されており、突起形成に必須であることの発見も大きな意味がある。N-WASP は糸状仮足という細い突起状の構造形成に関わることを以前に突き止めていたが、それは数分単位で起こる現象である。一方、神経突起形成は数時間から数日かけて起こる現象であり、このような比較的長期間に渡る細胞形態変化においては N-WASP が全く新たなメカニズムで機能制御されているというのは非常に興味深い。リン酸化という共有結合による修飾によって活性を持続させることが神経突起形成には重要なのだろうと考えられる。これらの発見は N-WASP の神経突起形成における新たな機能制御メカニズムを明らかにしただけでなく、従来細胞形態制御との関連がよく解析されてきた Rho ファミリーの活性状態を調べるだけでは不十分な場合もあることを示唆しており、細胞形態・運動制御のより広い領域の研究にも強いインパクトを与えるものと考えられる。

一方、線虫での解析から N-WASP 相同分子やその下流で機能する Arp2/3 複合体が初期発生期の形態形成に重要であることを見付けた。その詳細な表現型の検討から、表皮細胞のシートが運動するプロセスに異常があり、その結果腹側で表皮が閉じられないことが分かった。この結果は、WASP ファミリーや Arp2/3 複合体が細胞運動制御に重要であることを明確に示す遺伝学的な証拠であり、これまで自分自身や国の内外を含め多くの研究者が行ってきた生化学的・細胞生物学的解析の成果を生物個体の中で初めて確認したものである。またそれと同時に、細胞の分裂や分化には大きな影響を与えなかったという点も重要な意味を持っている。つまり WASP ファミリーを分子標的とすることによって、細胞の増殖などには影響せず運動性のみを人為的に制御する可能性を示唆している。細胞運動が炎症反応、癌転移といった医学上重要な現象に関わることを考えると、その応用可能性は十分高いと考えられる。

6. 研究総括の見解 :

細胞の分化と組織化(形態形成)の解明を細胞骨格の再構成とその制御に焦点を定めて追求してきた。特にアクチン骨格形成を対象として取りあげ、これに関連し分子機能の判明している WASP ファミリーを中心に注目すべき成果をあげるに至った。これを評価されて、最近助教授に昇進した。

7. 主な論文等 :

論文

1. Yamazaki, D., Suetsugu, S., Miki, H., Kataoka, Y., Nishikawa, S., Fujiwara, T., Yoshida, N., and Takenawa, T. WAVE2 is required for directed cell migration and cardiovascular development. *Nature* 424, 452-456 (2003)

2. Kitamura, Y., Tsuchiya, D., Takata, K., Shibagaki, K., Taniguchi, T., Smith, M. A., Perry, G., Miki, H., Takenawa, T., and Shimohama, S. Possible involvement of Wiskott-Aldrich syndrome protein family in aberrant neuronal sprouting in Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 346, 149-152 (2003)
3. Kitamura, Y., Shibagaki, K., Takata, K., Tsuchiya, D., Taniguchi, T., Gebicke-Haerter, P. J., Miki, H., Takenawa, T., and Shimohama, S. Involvement of Wiskott-Aldrich syndrome protein family verprolin-homologous protein (WAVE) and Rac1 in the phagocytosis of amyloid-beta(1 - 42) in rat microglia. *J. Pharmacol. Sci.* 92, 115-123 (2003)
4. Nakagawa, H., Miki, H., Nozumi, M., Takenawa, T., Miyamoto, S., Wehland, J., and Small, J. V. IRSp53 is colocalised with WAVE2 at the tips of protruding lamellipodia and filopodia independently of Mena. *J. Cell Sci.* 116, 2577-2583 (2003)
5. Sawa, M., Suetsugu, S., Sugimoto, A., Miki, H., Yamamoto, M., and Takenawa, T. Essential role of the *C. elegans* Arp2/3 complex in cell migration during ventral enclosure. *J. Cell Sci.* 116, 1505-1518 (2003)
6. Sun, P., Yamamoto, H., Suetsugu, S., Miki, H., Takenawa, T., and Endo, T. Small GTPase Rah/Rab34 is associated with membrane ruffles and macropinosomes and promotes macropinosome formation. *J. Biol. Chem.* 278, 4063-4071 (2003)
7. Klein, C., Nguyen, D., Liu, C. H., Mizoguchi, A., Bhan, A. K., Miki, H., Takenawa, T., Rosen, F. S., Alt, F. W., Mulligan, R. C., and Snapper, S. B. Gene therapy for Wiskott Aldrich Syndrome: rescue of T-cell signaling and amelioration of colitis upon transplantation of retrovirally transduced hematopoietic stem cells in mice. *Blood* 101, 2159-2166 (2003)
8. Nozumi, M., Nakagawa, H., Miki, H., Takenawa, T., and Miyamoto, S. Differential localization of WAVE isoforms in filopodia and lamellipodia of the neuronal growth cone. *J. Cell Sci.* 116, 239-246 (2003)
9. Abe, T., Kato, M., Miki, H., Takenawa, T., and Endo, T. Small GTPase Tc10 and its homologue RhoT induce N-WASP-mediated long process formation and neurite outgrowth. *J. Cell Sci.* 116, 155-168 (2003)
10. Suetsugu, S., Hattori, M., Miki, H., Tezuka, T., Yamamoto, T., Mikoshiba, K., and Takenawa, T. Sustained Activation of N-WASP through Phosphorylation Is Essential for Neurite Extension. *Dev. Cell* 3, 645-658 (2002)
11. Yamaguchi, H., Miki, H., and Takenawa, T. Two verprolin homology domains increase the Arp2/3 complex-mediated actin polymerization activities of N-WASP and WAVE1 C-terminal regions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 297, 214-219 (2002)
12. Miki, H., and Takenawa, T. WAVE2 serves a functional partner of IRSp53 by regulating its interaction with Rac. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 293, 93-99 (2002)
13. Yamaguchi, H., Miki, H., and Takenawa, T. Neural Wiskott-Aldrich syndrome protein is involved in hepatocyte growth factor-induced migration, invasion, and tubulogenesis of epithelial cells. *Cancer Res.* 62, 2503-2509 (2002)
14. Suzuki, T., Mimuro, H., Suetsugu, S., Miki, H., Takenawa, T., and Sasakawa, C. Neural Wiskott-Aldrich syndrome protein (N-WASP) is the specific ligand for Shigella VirG among the WASP family and determines the host cell type allowing actin-based spreading. *Cell. Microbiol.*

- 4, 223-233 (2002)
15. Suetsugu, S., Miki, H., and Takenawa, T. Spatial and temporal regulation of actin polymerization for cytoskeleton formation through Arp2/3 complex and WASP/WAVE proteins. *Cell Motil. Cytoskeleton.* 51, 113-122 (2002)
 16. Mizutani, K., Miki, H., He, H., Maruta, H., and Takenawa, T. Essential role of neural Wiskott-Aldrich syndrome protein in podosome formation and degradation of extracellular matrix in src-transformed fibroblasts. *Cancer Res.* 62, 669-674 (2002)
 17. Kato, M., Miki, H., Kurita, S., Endo, T., Nakagawa, H., Miyamoto, S., and Takenawa, T. WICH, a novel verprolin homology domain-containing protein that functions cooperatively with N-WASP in actin-microspike formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 291, 41-47 (2002)
 18. Vetterkind, S., Miki, H., Takenawa, T., Klawitz, I., Scheidtmann, K. H., and Preuss, U. The rat homologue of Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP)-interacting protein (WIP) associates with actin filaments, recruits N-WASP from the nucleus, and mediates mobilization of actin from stress fibers in favor of filopodia formation. *J. Biol. Chem.* 277, 87-95 (2002)
 19. Suetsugu, S., Miki, H., Yamaguchi, H., Obinata, T., and Takenawa, T. Enhancement of branching efficiency by the actin filament-binding activity of N-WASP/WAVE2. *J. Cell Sci.* 114, 4533-4542 (2001)
 20. Shcherbina, A., Miki, H., Kenney, D. M., Rosen, F. S., Takenawa, T., and Remold-O'Donnell, E. WASP and N-WASP in human platelets differ in sensitivity to protease calpain. *Blood* 98, 2988-2991 (2001)
 21. Suetsugu, S., Miki, H., and Takenawa, T. Identification of another Actin-related protein (Arp) 2/3 complex binding site in Neural-Aldrich syndrome protein (N-WASP), that complements actin polymerization induced by the Arp2/3 complex activating (VCA) domain of N-WASP. *J. Biol. Chem.* 276, 33175-33180 (2001)
 22. Suetsugu, S., Miki, H., Yamaguchi, H., and Takenawa, T. Requirement of the basic region of N-WASP/WAVE2 for actin-based motility. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 282, 739-744 (2001)
 23. Martinez-Quiles, N., Rohatgi, R., Anton, I. M., Medina, M., Saville, P., Miki, H., Yamaguchi, H., Takenawa, T., Hartwig, J. H., Geha, R. S., and Ramesh, N. WIP regulates N-WASP-mediated actin polymerization and filopodium formation. *Nat. Cell Biol.* 3, 484-491 (2001)
 24. Nakagawa, H., Miki, H., Ito, M., Ohashi, K., Takenawa, T., and Miyamoto, S. N-WASP, WAVE and Mena different roles in the organization of actin cytoskeleton in lamellipodia. *J. Cell Sci.* 114, 1555-1565 (2001)
 25. Fukuoka, M., Suetsugu, S., Miki, H., Fukami, K., Endo, T., and Takenawa, T. A Novel Neural Wiskott-Aldrich Syndrome Protein (N-WASP) Binding Protein, WISH, Induces Arp2/3 Complex Activation Independent of Cdc42. *J. Cell Biol.* 152, 471-482 (2001)

総解説

1. Miki, H., and Takenawa, T. Regulation of Actin Dynamics by WASP Family Proteins. *J. Biochem. (Tokyo)* 134, 309-313 (2003)
2. Takenawa, T., and Miki, H. WASP and WAVE family proteins: key molecules for rapid

rearrangement of cortical actin filaments and cell movement. *J. Cell Sci.* 114, 1801-1809
(2001)

研究課題別評価

1.研究課題名 :免疫細胞遺伝子構築の人為的制御

2.研究者氏名 :山下 政克

グループメンバー :菅谷 薫子 (研究期間 H12.10.1. ~ H15.9.30.)

鵜飼 磨貴 (研究期間 H14.4.1. ~ H.15.7.31.)

3.研究の狙い :

免疫担当細胞は、いったん遺伝子内に構築されているプログラムを病原体排除のための最適なプログラムに作り替え、細胞機能を変換して生体防御反応を行なっている。この機能変換にはエピジェネティックな変化、つまりクロマチンのリモデリングが伴っていると考えられ、その異常は、免疫疾患発症の一因になっていると予想される。よって、免疫担当細胞におけるクロマチンリモデリング誘導・維持のメカニズムを解明することが、免疫疾患の治療法の開発に結びつくことが期待される。そこで、本研究ではアレルギー疾患の発症に深く関与している、Th2 細胞の機能分化に伴うTh2 サイトカイン遺伝子座のクロマチンリモデリングの誘導機構について解析を行ない、アレルギー疾患発症のメカニズムを探りたい。

4.研究結果 :

(1)Th2 サイトカイン遺伝子座クロマチンリモデリング誘導機構の解析

ナイーブCD4T 細胞からTh2 細胞へ分化する過程において、Th2 サイトカイン遺伝子座でクロマチンのリモデリングが起きること、また、転写因子 GATA3 がリモデリングの誘導に必須であることをヒストンH3のアセチル化を指標に明らかにした。さらに、分化に伴うGATA3のゲノム上の結合部位の同定を行い、IL-13/IL-4 遺伝子座において CGRE (Conserved GATA Response Element)、IL-5 遺伝子座において CGRE2 を同定した。IL-13/IL-4 遺伝子座と IL-5 遺伝子座におけるGATA3の結合はGATA3の発現量によって差が認められ、IL-5 遺伝子座のクロマチンリモデリングにはより高いGATA3の発現が必要であった。これは、2つのGATA結合領域におけるGATA3に対する親和性の違いによるものであると推測された。また、分化に伴ってヒストンのアセチル化が誘導された領域に一致して、非翻訳領域においても広範囲にわたって転写が起きていることを見いだした。これらの知見をもとに、Th2 サイトカイン遺伝子座のクロマチンリモデリング誘導機構に関して新しいモデルを提唱した。

(2)CD8 T 細胞におけるTh2 サイトカイン遺伝子座のクロマチンリモデリング

末梢のT細胞は、CD4/CD8分子の発現パターンにしたがってCD4 T細胞とCD8 T細胞に分けられる。CD8 T細胞もTh2サイトカインを産生するTc2細胞に分化することが知られていたが、Th2細胞に比べてIL-4の産生能が低いためB細胞に作用して抗体産生誘導する能力が弱いことがわかっていた。そこで、Tc2細胞におけるTh2サイトカイン遺伝子座のヒストンアセチル化の状態を解析したところ、IL-13 遺伝子エクソン4の直後から、Tc2細胞においてアセチル化レベルが低下することがわかった。この一因として、活性化CD8 T細胞に強く発現する転写抑制因子ROG (Repressor of GATA)を同定した。ROGは、IL-13 遺伝子エクソン4の中にあるROG結合部位に結合し、ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)-1、-2をリクルートすることでIL-4の発現を負に制御していると考えられた。

(3) GATA3 発現誘導における Erk/MAPK 経路の役割の解析

Erk/MAPK 経路の活性化は Th2 細胞分化において重要であることは知られていたが、その標的分子は不明であったが、本研究において GATA3 がその一つであることが明らかとなった。GATA3 は、半減期が数時間の非常に不安定な分子でユビキチン-プロテアソーム系で素早く分解されることがわかった。Erk/MAPK 経路が活性化した場合、この分解が抑制されることで GATA3 タンパク質の発現量が上昇することがわかった。現在のところ、詳しい作用機序は不明ではあるものの、Erk/MAPK の Th2 細胞分化における役割の一つが、GATA3 の発現上昇にあることが明らかとなった。

(4) Th2 サイトカイン遺伝子座のクロマチンリモデリング誘導に必要な GATA3 機能部位の同定

GATA3 による Th2 サイトカイン遺伝子座のクロマチン誘導機構をさらに詳しく解析するため、誘導に必要な GATA3 の機能部位の同定を行なった。その結果、GATA3 の C 末端付近の約 20 アミノ酸を欠失することによって、GATA3 の機能は完全に消失することがわかった。この変異体は CGRE を含む幾つかの GATA3 結合配列結合しうること、Th2 サイトカイン遺伝子座ヒストンのアセチル化誘導に必要な転写共役因子 p300 と正常に会合することが確かめられた。現在、機能が消失する原因を解析中である。

5. 自己評価 :

3年前の研究計画は、今にして思えば非常に抽象的で焦点の絞りにくい計画であったと思う。その中で、Th2細胞の機能分化の誘導におけるGATA3の役割について明らかにできた点は評価できる。しかしながら、現時点においては現象論を見いだしたに過ぎず、この成果をアレルギー疾患の治療法開発に結びつけるためには、さらなるGATA3機能発現の分子メカニズムの解析が必要であると思われる。また、本研究においては分化の誘導について主に解析したが、実際の病気においては既に分化してしまったメモリーT細胞が病態に関与していることが予想されることから、分化誘導から維持につながる分子機構の解明を行なわなければならない。今後、本研究で得られた知見をもとに研究を発展させていけるか否かが、本当の意味での評価になると考えている。

6. 研究総括の見解 :

末梢 T 細胞の機能分化機構の解明を中心に免疫関連疾患の制御の実現を目指す。特にクロマチン構造の安定的調節と制御を遺伝子、分子レベルで実現しようとしている。見るべき成果があがりつつあるが、着想の秀抜さから、期待にこたえる為にもなお一層の努力が要求される。

7. 主な論文など :

論文

1. Omori, M., Yamashita, M., Inami, M., Ukai-Tadenuma, Maki., Kimura, M., Nigo, Y., Hosokawa, H., Hasegawa, A., Taniguchi, M. and Nakayama, T.: CD8 T cell-specific downregulation of histone hyperacetylation and gene activation of the IL-4 gene locus by ROG, repressor of GATA. *Immunity* 19:281-294 (2003). (equally contributed)
2. Murata, K., Inami, M., Hasegawa, A., Kubo, S., Kimura, M., Yamashita, M., Hosokawa, H., Nagao, T., Suzuki, K., Hashimoto, K., Shinkai, H., Koseki, H., Taniguchi, M., Ziegler, S F. and Nakayama, T.: CD69-null mice protected from arthritis induced with anti-type II collagen antibodies. *Int. Immunol.* 15:987-992 (2003).
3. Shirai, T., Magara, K K., Motohashi, S., Yamashita, M., Kimura, M., Suwazomo, Y., Nogawa, K., Kuriyama, T., Taniguchi, M. and Nakayama, T.: TH1-biased immunity induced by exposure to

- Antarctic winter. *Clinical Immunol.* 111:1353-1360 (2003).
4. Kamata, T., Yamashita, M., Kimura, M., Murata, K., Inami, M., Shimizu, C., Sugaya, K., Wang, C-R., Taniguchi, M. and Nakayama, T. : SH2 domain containing tyrosine phosphatase SHP-1 controls the development of allergic airway inflammation. *J. Clin. Invest.* 111:109-119 (2003). (equally contributed)
 5. Yamashita, M., Ukai-Tadenuma, M., Kimura, M., Omori, M., Inami, M., Taniguchi, M., and Nakayama, T. : Identification of a conserved GATA3 response element upstream proximal from the IL-13 gene locus. *J. Biol. Chem.* 277:42399-42408 (2002).
 6. Shibata, Y., Kamata, T., Kimura, M., Yamashita, M., Wang CR., Murata, K., Miyazaki, M., Taniguchi, M., Watanabe, N., and Nakayama, T.: Ras activation in T cells determines the development antigen-induced airway hyperresponsiveness and eosinophilic inflammation. *J. Immunol.* 169:2134-2140 (2002).
 7. Kikkawa, E., Yamashita, M., Kimura, M., Omori, M., Sugaya, K., Shimizu, C., Katsumoto, T., Ikekita, M., Taniguchi, M., and Nakayama, T.: T(h)1/T(h)2 cell differentiation of developing CD4-single positive thymocytes. *Int. Immunol.* 14:943-951 (2002). (equally contributed)
 8. Kimura, M., Koseki, Y., Yamashita, M., Watanabe, N., Shimizu, C., Katsumoto, T., Kitamura, T., Taniguchi, M., Koseki, H., and Nakayama, T.: Regulation of Th2 cell differentiation by mel-18, a mammalian polycomb group gene. *Immunity.* 15: 175-283 (2001).

総説・解説

1. 山下政克、中山俊憲 (2003) Th2 細胞分化とクロマチンリモデリング *Annual Review 免疫* 2003 17? 23
2. 山下政克 (2003) Th2 サイトカイン遺伝子座のクロマチンリモデリングとTh2、Tc2 細胞分化制御 *医学のあゆみ* 225? 230

口頭発表・招待講演

口頭発表 12回 (うち海外3回)

招待講演 1回 (うち海外1回)

研究課題別評価

1. 研究課題名 :蛋白質工学的手法によるタイムシグナルの人工制御系の構築

2. 研究者名 :若杉 桂輔

グループメンバー :中野 智美 (研究期間 H.13.2.1. ~ H.15.9.30.)

3. 研究の狙い :

本研究では、ニューログロビン及びアミノアシル tRNA 合成酵素に焦点をしばり、虚血・再灌流時のシグナル伝達系などにおける新規機能を解明し、さらにその知見をもとにシグナル伝達を制御可能にする新規機能性蛋白質をデザイン創製することにより、酸化ストレス下でのシグナル伝達系の新規な制御機構を分子レベルで明らかにすることを目指した。

4. 研究結果 :

4-1. ヒトの脳内グロビン蛋白質ニューログロビン(Ngb)の酸化ストレス下での新規機能の解明

4-1-1. Ngb が、酸化ストレス下、三量体 G 蛋白質の サブユニット(G)に対する GDP/GTP 交換反応抑制蛋白質(Guanine nucleotide dissociation inhibitor: GDI)として機能することを発見。

Ngb は、二つの大きく異なる構造をとりうる。一つは、通常の酸素正常状態の構造であり、この状態では、ヘム鉄は 2価であり、酸素などの配位子が結合できる。もう一つの構造は、虚血・再灌流時などの酸化ストレス下で生成する構造であり、ヘム鉄は 3価に酸化され、蛋白質由来のヒスチジンが直接ヘム鉄に配位することにより、酸素正常状態の構造と比べ大きな構造変化を生じる。

本研究では、この酸化ストレス下での大きな構造変化に着目し、Ngb に結合する蛋白質の解析を行った結果、酸化ストレス下で生成する鉄 3価 Ngb が脳神経系細胞内シグナル伝達蛋白質である G と特異的に結合すること、他方、通常の酸素正常状態の鉄 2価 Ngb は G とは相互作用しないことを発見した。さらに、Ngb との結合に伴い、G の酵素活性がどう変化するのか解析を行った結果、Ngb は酸化ストレス応答性のセンサー蛋白質として働き、酸化ストレスを受けた時のみ G と結合し、G の GDP/GTP 交換反応抑制蛋白質 GDI として機能することにより、神経細胞死を抑制し、さらに、神経再生を促進していることを明らかにした。

4-1-2. Ngb が制御する脳神経シグナル伝達系の全体像の解明

脳神経シグナル伝達系における Ngb の役割をさらに検討するために、ヒトNgb を bait とし、Yeast two hybrid system を用いて、Ngb と相互作用する相手分子を human brain cDNA library から探索した。次に、Yeast two hybrid 法で陽性となったクローンに対し、遺伝子を精製し、再度酵母菌に形質転換することによりfalse positive を除外する実験を行った。その後、その DNA 塩基配列の解析を行い、Ngb と相互作用する蛋白質を特定した。さらに、免疫沈降法によってもこの相互作用を確認でき、Ngb と特異的に結合する新たな脳内蛋白質を明らかにすることに成功した。

4-1-3. 新規機能性蛋白質の創製、及び、Ngb 複合体の構造解析による Ngb 制御メカニズムの解明。

Ngb に関し、モジュール置換した種々のキメラ蛋白質を作製した結果、安定な活性型 Ngb の創製に成功した。また、Ngb と脳内蛋白質がどのように複合体を形成するのか分子レベルで明らかにすることを目指した。具体的には、Ngb 及び脳内蛋白質の相互作用部位と推測されるアミノ酸残基の変異体を作製し、精製蛋白質を用いた表面プラズモン共鳴装置 (BIAcore)による in vitro で

の蛋白質間相互作用の解析、及び Yeast two hybrid system による in vivo の系での蛋白質間相互作用の解析を行った。また、Ngb 及び脳内蛋白質との会合体の構造解析を核磁気共鳴装置 (NMR)を用いて行い、会合に伴う構造変化をアミノ酸レベルで解析し、機能の制御と対応づけることに挑んだ。また、円二色性 (CD)、蛍光スペクトルなどの物理化学的解析も駆使した。さらに、Ngb が脳内のどこで発現しているか、Ngb と相互作用する脳内蛋白質が細胞内で Ngb の局在場所と同じであるかどうか、さらに、酸化ストレスにより Ngb の局在箇所がどう変化するか 経時変化を追跡可能なタイムラプス機能を有する蛍光顕微鏡」を用いて解析した。

4-2. アミノアシル tRNA 合成酵素の酸化ストレス下での新規機能の解明

4-2-1. アミノアシル tRNA 合成酵素が血管新生の制御因子として働くことを発見

チロシル tRNA 合成酵素 (TyrRS)とトリプトファン tRNA 合成酵素 (TrpRS)は、tRNA にそれぞれチロシン及びトリプトファンを付加 (アミノアシル化)する酵素であり、細胞質内で蛋白質合成において重要な役割を担っている。ヒトの TyrRS 及び TrpRS は、触媒活性ドメインのそれぞれ C 末端、N 末端側に、触媒活性には不要な余分な付加ドメインを融合している。そこで、この余分な付加ドメインに着目し実験を進めた結果、ヒト TyrRS 及び TrpRS がアポトーシスの初期段階でヒト細胞から分泌され、余分な付加ドメインがプロテアーゼにより切断された後、触媒活性ドメインがそれぞれ血管新生促進因子、血管新生抑制因子として働くことをはじめて明らかにすることに成功した。

4-2-2. 新規機能性蛋白質の創製に成功

ヒトの TrpRS と相互作用する蛋白質を探索したところ、解糖系の酵素であるグリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GapDH) が TrpRS と結合することが明らかになった。TrpRS と結合する GapDH の結合部位の特定を試みるために、様々なキメラ蛋白質を作製した。ミオグロビン (Mb) の N 末端側に GapDH のモジュールを融合したキメラ蛋白質は、Mb 同様、酸素を可逆的に配位でき、また GAPDH 同様に TrpRS と会合する安定な新規蛋白質であることが明らかになった。

5. 自己評価：

本プロジェクトでは、ニューログロビン (Ngb) 及びアミノアシル-tRNA 合成酵素が虚血、低酸素時にシグナル蛋白質として機能するという事を明らかにした。特に、Ngb が虚血時に立体構造を大きくかえ、シグナル伝達系に関与する蛋白質と相互作用することにより、神経細胞死を防ぎ神経再生のためのシグナルを伝達するという大きな発見をすることができた。この研究成果は、グロビン蛋白質は酸素結合蛋白質としてだけ働くという従来の固定観念をくつがえし、酸化ストレス応答性のシグナル伝達センサー蛋白質としても機能するという全く新たな概念を打ち立てた。また、アミノ酸を tRNA に結合させる反応 (アミノアシル化) を触媒する酵素であり蛋白質合成において重要な役割を担っているヒトのアミノアシル tRNA 合成酵素が血管新生の制御因子として働くことを発見した。さらに、トリプトファン tRNA 合成酵素のアミノアシル活性を制御する新規機能性蛋白質を創製することにも成功した。

これら Ngb 及び TyrRS, TrpRS の酸化ストレス下でのシグナル伝達過程における新規機能の解明に関する研究は、私自身が斬新な仮説をたて検証を行い築いた全くオリジナルな研究であり、国内外ともに類似の研究はない。酸化ストレスは、多くの病気と密接に関わっており、本研究成果は、虚血性疾患、再生医療などに大きなインパクトを与えることができたと考えている。

今後は、Ngb 及び TrpRS と相互作用するシグナル伝達蛋白質の複合体の構造解析、変異体を用いた構造及び機能解析をさらに押し進め、複合体の界面 (結合部位) の特定を目指し、どのよう

な蛋白質? 蛋白質間相互作用の違いで神経再生へのシグナルの on,off がされているかアミノ酸レベルで分子メカニズムを詳細に解明し、さらに、相互作用に重要なモジュールを使ってコンピューター・モデリングを駆使し神経再生を誘導あるいは抑制するペプチド(蛋白質)をデザインし、神経再生の人工制御系の構築を目指したい。この研究は、脳神経系の医学、医療、血管新生関連の再生医療に多大な貢献をもたらすだけでなく、再生、分化を誘導、制御できる人工蛋白質の創製のための革新的な概念を与えるものと期待できる。

6.研究総括の見解：

本領域でただ一人の工学畑出身。シグナル伝達の制御を人工分子の創出によって可能にすることを旨とする。今回国内に於いて他の生物学・医学分野出身者との直接的交流が実現したことは、人脈の拡大、発想の転換をもたらす多大な影響を与えた。そのプラス効果は研究対象範囲を拡大させるとともに今後の成長に役立つものと期待してよい。すでにその現実化が始まっていることに注目したい。

7.主な論文等：

主な論文

1. Wakasugi, K., Slike, B. M., Hood, J., Otani, A., Ewalt, K. L., Friedlander, M., Cheresch, D. A., and Schimmel, P. (2002) A human aminoacyl-tRNA synthetase as a regulator of angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 173-177.
2. Wakasugi, K., Slike, B. M., Hood, J., Ewalt, K. L., Cheresch, D. A., and Schimmel, P. (2002) Induction of angiogenesis by a fragment of human tyrosyl-tRNA synthetase. *J. Biol. Chem.* 277, 20124-20126.
3. Wakasugi, K., Nakano, T., and Morishima, I. (2003) Oxidized human neuroglobin acts as a heterotrimeric α protein guanine nucleotide dissociation inhibitor. *J. Biol. Chem.* 278, 36505-36512.
4. Wakasugi, K. (2004) Functional roles of neuroglobin, a vertebrate globin expressed in the brain. *Acc. Chem. Res.* (Review, invited for submission).
5. Wakasugi, K., Nakano, T., Kitatsuji, C., and Morishima, I. A membrane-bound protein interacts with neuroglobin. Submitted for publication.
6. Wakasugi, K., Nakano, T., Hira, S., and Morishima, I. Module-substituted myoglobin regulates an aminoacyl-tRNA synthetase activity. Manuscript in preparation.
7. Wakasugi, K., and Morishima, I. Module-substituted neuroglobin. Manuscript in preparation.

学会発表 国内学会 13 件、国際学会 4 件

招待講演 5 件

研究課題別評価

1.研究課題名 脊椎動物の神経系幹細胞の分化と非対称分裂のプロセス

2.研究者氏名 若松 義雄

グループメンバー 酒井 大輔 (研究期間 H13.4.1. ~ H15.7.31.)

藤井 恒子 (研究期間 H.13.4.1. ~ H.14.3.31.)

3.研究の狙い：

神経系の構築には、発生過程における神経幹細胞の増殖とニューロンやグリアへの分化が厳密に制御されている必要がある。本研究では、神経幹細胞が非対称分裂をおこなうことによって自己複製しながら分化した細胞を随時生み出しているのでは無いかと考え、細胞内因子の不等分配について生化学的な解析やタイムラプス観察による解析をおこなった。

4.研究結果：

本研究により、分化制御因子であるNumbはTransitinタンパク質と直接結合すること、Transitinは細胞膜と相互作用する事や中間径フィラメントタンパク質であるVimentinとも結合することが明らかとなり、Transitinが足場タンパク質としての役割を持っている事がわかった。さらに、分裂中の神経幹細胞でTransitin/Numb複合体がいったん基底膜側に非対称に局在した後側方にスライドし、細胞質分裂とともに不等分配される事がわかった。

5.自己評価：

本研究期間において、ポストドクとともに精力的に研究活動を行ない、現在いわれている神経幹細胞のふるまいが、大きく間違っている可能性を見い出した。また、これまでほとんどわかっていなかった脊椎動物の非対称分裂に関して、重要な知見が数多く得られ、今後の展開も非常に楽しみである。一方3年間とはかくも短いものであると、実感させられた。

6.研究総括の見解：

細胞の不均等分裂に焦点をしばり、神経系においてその存在が想定されている幹細胞の確認を実現するとともに、このような体性幹細胞の存在維持と分化方向決定の鍵を握る遺伝子発現機構を遺伝子および分子レベルで明らかにしようとする。現在かなりの進展を見つつあるが、更なる努力が必要な段階にある。ユニークな実験系と発想をもっていることから今後を期待したい。

7.主な論文等：

1. Endo,Y.,Osumi,N.,Wakamatsu,Y.Development 129,863-873,2002.
2. Endo,Y.,Osumi,N.,Wakamatsu,Y.Dev.Growth Differ.45,241-248,2003.
3. Wakamatsu,Y.,Endo,Y.,Osumi,N.,Weston,J.A.Dev.Dyn. in press.
4. Wakamatsu.Y.,Osumi,N.,Weston,J.A. Dev.Biol. in press