

# 「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16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。こうした仕組みとその応用について研究する領域です。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アドバイザー(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

応募課題1件につき担当選考アドバイザー3名が書類選考を行い、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	採用者
対象者数	191名	35名	14名

(採択者14名の内1名の辞退者があり、第二期生は13名である)

## 5. 研究実施期間

平成13年12月1日～平成17年3月31日

## 6. 領域の活動状況

領域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、研究進捗状況を把握した。更に、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。技術参事は研究実施場所を随時訪問し、現状の視察、研究実施に対する要望などを直接聴取し、研究が円滑に実施できるように調整した。事務参事は研究者の実験実施場所を訪問し、購入備品の調査を行った。

## 7. 評価の手続き

永井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 16 年 12 月 22 日	研究報告会開催
平成 17 年 1 月 31 日	研究課題別評価提出
平成 17 年 2 月 25 日	研究総括による各研究者に対する見解
平成 17 年 3 月 11 日	研究者からの研究総括見解に対する意見の受付終了
平成 17 年 3 月 25 日	研究課題別評価の推進部提出
平成 17 年 3 月 31 日	研究終了・研究報告書提出締切

8. 評価項目

- (1) 外部発表(論文、口頭発表、出版物等)、特許、研究を通じての受賞等、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

「さがけ研究21(ポスドク参加型)」の第二回修了生は13名である。ポスドク参加型は、提案者個人の研究構想を実現するために、研究員(ポスドク)や技術員(テクニシャン)1~2名と共にチームを編成し、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13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を明白に示している。以下に、各研究者の目指したものとその研究成果を簡単に述べる。

笠原 浩二

細胞上に存在するシアル酸を含むスフィンゴ糖脂質であるガングリオシドの機能を中枢神経系で明らかにすることを目指した。ガングリオシドは種々の蛋白質と会合し、脂質ラフトと呼ばれるミクロドメインを形成している。スフィンゴ糖脂質と会合している蛋白質を同定し、神経突起形成の調節に関わるシグナル伝達系に関与していることを明らかにした。脂質ラフトが生体内シグナル伝達系で中継点として作用していることを明らかにした。

菊地 和也

生きている細胞内で機能する分子のリアルタイムで可視化あるいは不活化することで生きた状態における生体分子の機能解析を目指した。このため、新たな実験系として生細胞蛍光プローブと名付けた化学プローブをデザイン・合成し、生きた細胞や生きている個体に直接応用した。亜鉛イオン(Zn<sup>2+</sup>)応答性蛍光プローブを用いた実験からはZn<sup>2+</sup>がNMDA作動性グルタミン酸受容体を介した神経活動を制御することをはじめ明らかにした。FRET型チロシンフォスファターゼ測定用蛍光プローブ、光誘起電子移動原理を用いた蛍光性ランタノイド錯体プローブの合成にも成功した。これらを応用した実験結果はポストゲノム時代での指針となる成果を導くことが期待される。

後藤 由季子

大脳皮質をモデル系として、神経系前駆(幹)細胞の増殖・自己複製に関与する分子とニューロン分化に関与する分子の同定とその分子機構の解明を目指した。Wntシグナル経路、Notch/STAT3経路、Wnt/カテニン経路を明らかにした。神経幹細胞の自己複製からニューロン分化への運命転換が、分化誘導因子の発現上昇や自己複製促進因子の発現低下だけで説明されるものではなく、むしろ同じシグナル分子に対する神経幹細胞側の応答性の時期依存的な変化(intrinsicな細胞状態の変化)が、増殖から分化への運命転換の鍵を握っていることを示唆した。この成果は今後の中枢神経移植再生医療に大きな貢献することが期待

される。この研究テーマは内容を充実させ、「発展・継続研究」として採択された。

#### 齊藤 実

加齢に伴う記憶・学習能力の低下(加齢性記憶障害:AMI)に関与する分子機構の解明を目指した。ほ乳動物モデルと共通した学習記憶の分子メカニズムをもつことが知られている寿命の短いショウジョウバエを用いて解析した。amnesiac 遺伝子変異体のハエが加齢性記憶障害を示すハエと同じ記憶障害を持つことを発見した。amnesiac 遺伝子は中期記憶と関連する遺伝子であることが知られており、ヒトを含めほ乳動物にも同様な遺伝子の存在が認められていることから、この成果はヒトの加齢に伴うAMIに対しても大きな示唆を与えるものである。

#### 佐田 政隆

動脈硬化や血管形成術後再狭窄、移植後血管障害といった血管病の発症に至る機構の解明を目指した。血管病の主原因は平滑筋細胞の蓄積である。長年受け入れられてきた平滑筋細胞の蓄積機構が「中膜平滑筋細胞が血管内皮下へ遊走し増殖する」という考え方に対して、「新生内膜の大部分は中膜平滑筋細胞由来でなく流血細胞由来である」ことを証明した。その平滑筋ならびに内皮前駆細胞の「骨髄からの動員」「傷害血管への定着」「血管細胞への分化」「増殖」の過程を分子レベルで明らかにし、血管リモデリングの新しい概念を確立し、動脈硬化研究にブレークスルーをもたらした。臨床的にも注目される成果である。

#### 篠原 彰

減数分裂期のゲノムの再編を司る相同組換えと呼ばれる DNA 鎖の交換反応機構を分子レベルで解明することを目指した。組換えは体細胞分裂期では空間的に“近い”姉妹染色体間で起こるのに対して、減数分裂期は空間的に“遠い”相同染色体間で起こる。このような組換えの特異性を決める減数分裂期特異的な蛋白質群を明らかにするために、酵母のゲノム情報の網羅的解析と *in silico* 解析による RecA ホモログの機能に関わる新規遺伝子の同定に成功した。減数分裂期の組換えの欠損は不妊症やダウン症に代表される異数体病を引き起こす。分裂異常で起きる種々の疾患や人工受精での効率向上への寄与が期待される成果である。

#### 鈴木 匡

自らが発見した小胞体における品質管理機構に関連する酵素、細胞質ペプチド: *N*-グリコナーゼ(PNGase)、の機能解析を目指した。PNGase が機能的な構造が取れない糖タンパク質、あるいは正しいサブユニット構造をとれない糖タンパク質を分解、除去する小胞体関連分解(ERAD)とよばれる過程に関わっていることを明らかにした。出芽酵母における細胞質 PNGase 複合体の同定とプロテアソーム分子、ERAS 経路との遺伝学的相互作用、PNGase の反応により生じる遊離 N 型糖鎖の代謝機能の解析を通し、酵母の *in vivo* での ERAD / PNGase のアクセシ系を確立した。この系を用いて細胞質における遊離高マンノース型 N 型糖鎖の細胞質における主要な代謝の分子機構の詳細を明らかにした。

#### 芹沢 尚

哺乳動物では、嗅覚細胞に存在するどの種類の嗅覚受容体(OR)が匂い分子を受容したかという情報を、脳の嗅球表面上に存在するどの組み合わせの糸球が発火したかという位置情報(匂いマップ)として捉えている。匂いマップが形成される際の2つの分子基盤、OR 遺伝子の単一発現制御 と 嗅神経細胞軸索投射のそれぞれの分子機構を遺伝子構造側面から解明することを目指した。このために世界に先駆けて開発した YAC (yeast artificial

chromosome) トランスジェニックマウスによる OR 遺伝子の発現系を駆使して、ほ乳動物の嗅覚神経による匂いの分別認識機構を遺伝子レベルで明らかにする種々の成果を挙げた。前者については、OR 遺伝子が stochastic に1つ選択されて活性化する正の制御と、発現された OR 分子が残りの OR 遺伝子に対し新たに活性化することを阻止する負の制御によって保証されていることを提唱した。

#### 中山 潤一

個体の多様性はDNAの一次配列の変化だけでは説明できず、エピジェティクスと呼ばれる現象が重要な働きをしている。クロマチン構造に基づいたエピジェティックな遺伝現象が、どのように形成され、細胞分裂を通して維持されるのか、分子レベルで明らかにすることを目指した。分裂酵母をモデルに用いて、クロマチンの基本構成単位に含まれるヒストンの修飾と、クロマチン結合蛋白質の動態を詳細に解析し、高次クロマチンであるヘテロクロマチンの形成・維持の機構を明らかにした。

#### 深川 竜郎

細胞周期の間に複製された染色体はセントロメアと呼ばれる構造を介して娘細胞に分配される。正しい染色体分配が起きるために必要なセントロメアの形成機構を分子レベルで明らかにすることを目指した。各種セントロメア蛋白質のノックアウト解析や表現型の解析を通して、新規のセントロメア蛋白質を同定した。更に、新しく樹立したヒト 21 番染色体を保持するニワトリDT40細胞を対象にしてRNAiマシーナリーに關与する Dicer 遺伝子がセントロメア形成に關わる役割を明らかにした。

#### 古川 貴久

網膜視細胞(光受容体細胞)の分化・発生機構を遺伝子の側から明らかにすることを目指した。網膜視細胞と松果体に特異的に発現する転写因子 Crx 遺伝子を単離し、いくつかの網膜変性疾患の原因遺伝子であることを明らかにした。さらに、Crx のコンディショナルノックアウトマウス解析から、網膜幹細胞から視細胞に分化する際の最初の鍵を握る遺伝子が Otx2 であることを明らかにした。また Otx2 が網膜視細胞および松果体の初期発生を制御する最上流に位置する遺伝子であることを明らかにした。これは網膜変性疾患などの難治性疾患の治療への道を拓くバイオニクス的研究である。

#### 星野 幹雄

高等動物の中樞神経系が正常に働くためには、正しい神経回路網の形成が必須であり、そのために正しい神経細胞移動は重要である。神経回路網形成に果たす神経細胞移動の役割を分子レベルで明らかにすることを目指した。子宮内エレクトロポレーション法を用いたコンディショナルノックアウトマウスの作製を通して、Rho 類似 G 蛋白質 Rac1 の作用だけでなく、その上流因子(神経栄養因子 P Rex1 / STEF/Tiam1)および下流因子(JNK MAP1B 微小管)の存在を証明し、神経細胞移動に關わる新しいシグナル伝達カスケードを提唱した。更に、研究過程で得られた小脳無形成マウスの遺伝学的解析から、GABA 作動性細胞の形質獲得の道筋を明らかにした。

#### 横溝 岳彦

医薬品開発の標的として注目されている細胞膜にある G 蛋白質共役受容体(GPCR)のうちでリガンドの不明な孤儿受容体に注目した。受容体の過剰発現による細胞膜移行を解析した。その中でこれまでリゾリン脂質(LPC)受容体と考えられていた G2A 受容体が細胞外プロトン濃度に感受性を示す pH センサーとして働く受容体であり、LPC はむしろ拮抗作用を有

することを示した。更に、強力な炎症起炎性物質であるロイコトリエンB<sub>4</sub> の高親和性受容体BLT<sub>1</sub>、低親和性受容体BLT<sub>2</sub>の同定と解析を進めた。BLT<sub>1</sub>欠損マウスの作成・解析から、この受容体が気管支喘息など免疫反応・炎症反応で重要な役割を果たしている可能性を指摘した。

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者の研究領域は多岐に渡っている。各研究者は自己の研究領域のみでなく、他方面の研究分野の研究者とも交流することにより、より視野の広い視野で研究を推進し、世界に先駆けた成果を挙げている。グループメンバーの寄与は大きい。中には「人を雇用する」という点で研究以外にも大きなかつ貴重な経験をした研究者もいる。

#### 10. 評価者

研究総括 永井 克孝 三菱化学(株) 顧問

#### 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 総長
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	理化学研究所免疫・アレルギー科学総合研究センター センター長
中野 洋文	協和発酵工業(株)先端バイオ研究所 所長
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

	国内	国際	計
論文	130	64	194
口頭	10	66	76
出版物	12	3	15
合計	152	133	285

(外部発表投稿表が提出されたもの:平成17年1月31日現在)

(2)特許出願件数

国内	国際	計
5(1)	1	6(7)

「外国」の数字は「国内出願」の内、外国出願を希望し、JSTの知的財産委員会で出願が「妥当」と判定されたものの数を示す。  
「国内」の(1)はグループメンバーのもの。

(3)受賞等

笠原 浩二:

湯山耕平(グループメンバー)

平成16年 第7回日本糖質学会ポスター賞受賞

「三量体Gタンパク質Goの神経細胞膜ラフトにおけるシグナル伝達とガングリオシド」

菊地 和也

平成14年 日本薬学会奨励賞受賞

平成14年 とやま賞受賞

平成16年 日本バイオイメージング学会奨励賞受賞

後藤 由季子

平成15年 第1回分子生物学会三菱化学奨励賞

平成16年 第9回日本女性科学者の会奨励賞

平成16年 平成16年度日本癌学会奨励賞

佐田 政隆

平成13年 日本心臓病学会 Young Investigator's Award 最優秀賞

平成14年 日本循環器学会八木賞

平成14年 The Japanese Vascular Biology Organization Young Investigator's Award

平成15年 日本循環器学会佐藤賞

平成15年 日本炎症・再生医学会第9回奨励賞

深川 竜郎

平成14年 日本遺伝学会奨励賞

(4)特許出願

発明人: 菊地和也, 岩澤伸哉, 長野哲雄

発明の名称:「蛍光性ランタニド錯体」  
特願 2003-045786  
国際出願番号: PCT/JP2004/001680  
出願人: 独立行政法人科学技術振興機構  
出願日: 平成 15 年 2 月 24 日

発明人: 菊地 和也, 水上進, 長野 哲雄  
発明の名称:「アニオン検出用蛍光センサー」  
特願 2002-61098、特開 2003-254909  
出願人: 独立行政法人科学技術振興機構  
出願日: 平成 14 年 3 月 6 日

発明人: 斎藤 実  
発明の名称:「老人性記憶障害モデル非ヒト哺乳類及び非哺乳類動物」  
特願 2003-402319  
出願人: 独立行政法人科学技術振興機構  
東京都医学研究機構  
出願日: 平成 15 年 12 月 1 日

発明人: 黄 科(芹沢尚研究者のグループメンバー)  
発明の名称:「ベクターに含まれる非ウイルス由来のエンハンサー」  
特願 2004-363338  
出願人: 独立行政法人科学技術振興機構  
出願日: 平成 16 年 12 月 15 日

発明人: 古川貴久  
発明の名称:「Otx2 遺伝子を用いた網膜視細胞の再生と新生」  
特願 2003-026353(平成 15 年 2 月 3 日)  
出願人: 独立行政法人科学技術振興機構(50%)  
大阪バイオサイエンス研究所(50%)  
出願日: 平成 15 年 2 月 3 日

(5) プレス発表

齋藤 実

科学技術振興機構報 第 14 号(平成 15 年 12 月 2 日)

“ショウジョウバエを用いた老人ボケを引き起こす記憶過程の解明”

Neuron:

“Aging specifically impairs *amnesiac*-dependent memory in *Drosophila*”

(加齢により特異的に障害されるショウジョウバエ *amnesiac* 遺伝子依存性の記憶成分の同定)の内容に関するもの。

篠原 彰

科学技術振興機構報 第 139 号(平成 16 年 12 月 24 日)

精子・卵子(配偶子)の多様性を産み出す蛋白質複合体の発見 ~ 不妊の原因解明、遺伝子治療や品種改良への期待 ~

Cell:

“A protein complex containing Mei5 and Sae3 promotes the assembly of the meiosis-specific RecA homolog Dmc1”

(Mei5 と Sae3 を含む蛋白質複合体は減数分裂期特異的な RecA ホモログ Dmc1 の集合反応に必要である)

の内容に関するもの。

芹沢 尚

科学技術振興機構報 第 8 号(平成 15 年 10 月 28 日)

“匂い知覚のメカニズム ~ 匂いセンサーの特性は"負のフィードバック機構"が決定する ~ ”

SCIENCE:

“Negative feedback regulation ensures the one receptor-one olfactory neuron rule in mouse”

(マウスにおいて、負のフィードバック機構が "1 匂いセンサー、1 受容体"ルールを保証する)

の内容に関するもの。

深川 竜郎

科学技術振興機構報 第 90 号(平成 16 年 7 月 9 日)

“染色体分配を制御する RNA 分子 ~ がんの要因解明とがん創薬への期待 ~ ”

Nature Cell Biology:

“Dicer is essential for formation of the heterochromatin structure in vertebrate cells”

(脊椎動物においてダイサーはヘテロクロマチン形成に必須である。)

の内容に関するもの。

古川 貴久

科学技術振興機構報 第 12 号(平成 15 年 11 月 14 日)

“網膜再生治療への期待 ~ 網膜視細胞の発生メカニズムの解明 ~ ”

Nature Neuroscience:

“*Otx2* homeobox gene controls retinal photoreceptor cell fate and pineal gland development”

(*Otx2* 遺伝子は網膜視細胞と松果体の発生を制御する)

の内容に関するもの。

## 別紙

## 「タイムシグナルと制御」領域 研究課題名および研究者氏名

研究者氏名 (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)
笠原 浩二 (兼任)	神経系におけるスフィンゴ糖脂質ミクロドメイン超分子構造の機能発現と制御 (東京都臨床医学総合研究所)	(財)東京都臨床医学総合研究所 独立研究員 (同上 研究員)	94
菊地 和也 (兼任)	新規蛍光プローブの創製による機能分子の細胞内可視化 (東京大学大学院薬学系研究科)	東京大学大学院薬学系研究科 助教授 (同上)	86
後藤 由季子 (兼任)	大脳神経系前駆細胞の生死の制御とその生理的意義 (東京大学分子細胞生物学研究所)	東京大学分子細胞生物学研究 助教授 (同上)	82
齊藤 実 (兼任)	加齢に伴う学習・記憶低下の遺伝子プログラミング (東京都神経科学総合研究所)	東京都神経科学総合研究所 部門長 (同上 主任研究員)	90
佐田 政隆 (専任 兼任)	骨髄由来血管前駆細胞の同定と機能解析 (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 客員助教授 (ヒューマンサイエンス振興財団 リサーチ・レジデント)	95
篠原 彰 (兼任)	減数分裂期の染色体機能部位におけるプロテインプロファイリング (大阪大学蛋白質研究所)	大阪大学蛋白質研究所 教授  (大阪大学大学院理学系研究科 助教授)	94
鈴木 匡 (専任 兼任)	小胞体タンパク質品質管理機構に関わる PNGase の構造と機能 (大阪大学大学院医学系研究科)	大阪大学大学院医学系研究科 特任助教授 (ニューヨーク州立大学ストーニーブルック校 リサーチアシスタントプロフェッサー)	114
芹沢 尚 (専任)	嗅神経回路の形成と再構築の分子機構 (東京大学大学院理学系研究科)	科学技術振興機構 さきがけ研究者 (日本学術振興会 特別研究員)	82
中山 潤一 (専任 兼任)	クロマチンの動的構造変換による遺伝子発現の制御 (理化学研究所発生・再生科学総合研究センター)	理化学研究所発生・再生科学総合研究センター チームリーダー (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)	78
深川 竜郎 (兼任)	染色体分配の制御機構の解明 (国立遺伝学研究所)	国立遺伝学研究所 助教授  (総合研究大学院大学 / 国立遺伝学研究所 助手)	86

研究者氏名 (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)
古川 貴久 (兼任)	網膜光受容体細胞の運命決定機構と再生 (大阪バイオサイエンス研究所)	大阪バイオサイエンス研究所 部長 (同上)	74
星野 幹雄 (兼任)	Rho 類似 G 蛋白質の神経回路網形成に果たす役割 (京都大学大学院医学研究科)	京都大学大学院医学研究科 助手 (同上)	87
横溝 岳彦 (兼任)	医薬品創製標的としてのGタンパク質共役受容体の膜移行の分子機構 (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 (同上)	87

## 研究課題別評価

1 研究課題名: 神経系におけるスフィンゴ糖脂質マイクロドメイン超分子構造の機能発現と制御

2 研究者氏名: 笠原浩二

研究員: 鈴木直子(研究期間: H14.4.1. ~ H17.3.31)

湯山耕平(研究期間: H14.4.1. ~ H17.3.31)

3 研究の狙い:

シアル酸を含むスフィンゴ糖脂質であるガングリオシドは脳の発生段階において組成が顕著に変化することが知られ、神経細胞分化に関わる可能性が示唆されてきた。しかし、ガングリオシドは機能がいまだに解明されておらず、ポストゲノム時代における重要な研究標的として残されている。我々は独自にガングリオシドが細胞膜マイクロドメインにおいて神経細胞分化に関わるシグナル伝達分子と会合し、それを制御していることを見つけた。現在このスフィンゴ糖脂質マイクロドメインは脂質ラフトとも呼ばれ、生体内でシグナル伝達の中継点として働いていることが明らかになりつつあり、世界的に注目を集めている。本研究は、脳神経系におけるスフィンゴ糖脂質マイクロドメインの機能を明らかにすることを研究の狙いとする。

4 研究成果:

(1) スフィンゴ糖脂質会合タンパク質の同定

我々はスフィンゴ糖脂質マイクロドメインにおけるシグナル伝達を解明することを目的として、抗スフィンゴ糖脂質抗体で免疫沈降する際に共沈してくる「スフィンゴ糖脂質会合タンパク質」の単離を試みた。その結果、小脳顆粒神経細胞において抗ガングリオシド GD3 抗体で、135kDa、80kDa、56/53kDa、40kDa のタンパク質が共沈することを見つけ、それぞれ 135kDa は GPI アンカー型神経細胞接着分子 TAG-1、80kDa は src ファミリーキナーゼ基質 Csk-binding protein (Cbp)、56/53kDa は src ファミリーキナーゼ Lyn、40kDa は神経特異的三量体 G タンパク質 Go の サブユニットであることを見出した。

(2) TAG-1 の Lyn を介するシグナル伝達

TAG-1 は免疫グロブリンスーパーファミリーに属する神経細胞接着分子で、神経突起伸長活性を持つことが知られている。しかし TAG-1 は、GPI アンカー型タンパク質であり膜貫通領域を持たないことから、細胞内シグナル伝達機構について研究があまり進んでいなかった。我々は TAG-1 と Lyn はともにスフィンゴ糖脂質マイクロドメイン画分に存在し、TAG-1 をリガンドまたは抗体でクロスリンクすると Lyn が一過的に活性化することをすでに報告した(Kasahara et al. J.Biol.Chem. 275 34701-34709, 2000)。本研究では、スフィンゴ糖脂質マイクロドメインでの TAG-1 と Lyn の会合を再構成系を用いて確認し、そのシグナル伝達機構の解析を進めた。CHO 細胞に TAG-1 cDNA を発現させると、その細胞は自己凝集活性を示し TAG-1 は接着活性を持つことがわかった。このとき TAG-1 はスフィンゴ糖脂質マイクロドメイン画分に存在し、この細胞にガングリオシド GD3 の生合成酵素遺伝子の cDNA を共発現させると、抗ガングリオシド GD3 抗体による免疫沈降で TAG-1 が共沈し、スフィンゴ糖脂質マイクロドメインでの TAG-1 とガングリオシド GD3 の会合が確認された。そしてメチルシクロデキストリン処理によるコレステロールの除去で小脳顆粒細胞のスフィンゴ糖脂質マイクロドメインを破壊すると、TAG-1 の Lyn を介するシグナル伝達が阻害されることから、シグナル伝達がスフィンゴ糖脂質マイクロドメインでおこっていることが証明された。また小脳顆粒細胞をスフィンゴ糖脂質生合成酵素阻害剤である ISP-1 で処理しても同様にシグナル伝達が抑制されることから、TAG-1 のシグナル伝達にスフィンゴ糖脂質が必要であることがわかった。

### (3) Cbp のシグナル伝達

Cbp はスフィンゴ糖脂質マイクロドメイン膜貫通タンパク質で、src ファミリーキナーゼの基質であることが知られている。CHO 細胞に発現させた Cbp はスフィンゴ糖脂質マイクロドメイン画分に存在し、Lyn を共発現させると Cbp がチロシンリン酸化され、非活性型の Lyn ではリン酸化されないことから、Cbp が Lyn の基質になることが確認された。TAG-1 は神経突起伸長や神経束形成に関与し、実際にそれが機能していると考えられる発生初期段階におけるシグナル伝達を成体期と比較したところ、発生初期段階と成体で Lyn はどちらもスフィンゴ糖脂質マイクロドメインに存在していたが、発生初期段階でのみスフィンゴ糖脂質マイクロドメインにおける Lyn 活性化および Cbp チロシンリン酸化が見られた。これらの結果は、Cbp は TAG-1 のシグナル伝達の下流分子であることを示している。リン酸化 Cbp は、src ファミリーキナーゼの負の制御因子である Csk を細胞質からスフィンゴ糖脂質マイクロドメインに移行させることが知られていることから、Cbp は Lyn のネガティブフィードバック調節に関与しているものと考えられる。

### (4) Go のシグナル伝達

三量体 G タンパク質は活性化に伴って サブユニットと サブユニットに分かれるが、不活性化状態では両者ともにスフィンゴ糖脂質マイクロドメイン外に存在するのに対し、非水解性 GTP アナログで活性化してやると サブユニットのみがスフィンゴ糖脂質マイクロドメイン画分に移行することがシオ糖密度勾配遠心法により明らかとなった。興味深いことに、Go のスフィンゴ糖脂質マイクロドメインへの移行はラット小脳の発生初期にのみ見られ、成体では見られなかった。百日咳毒素処理で Go を不活化すると、その Go の移行は見られなくなった。さらに小脳顆粒細胞に発現している G タンパク質共役受容体 CXCR4 の生理的リガンドである SDF-1 を添加すると、Go の活性化、脂質ラフトへの移行、成長円錐の退縮がおこることを見つけた。これらの結果は、活性化に伴う Go のスフィンゴ糖脂質マイクロドメインへの移行は SDF-1 による成長円錐の退縮に関与していることを示唆している。

### (5) スフィンゴ糖脂質会合タンパクと神経成長円錐

本研究で同定したスフィンゴ糖脂質会合タンパク質 TAG-1, Lyn, Cbp, Go はすべて成長円錐画分に存在していた。これは成長円錐のスフィンゴ糖脂質マイクロドメインにおけるシグナル伝達が、神経突起形成の調節に関わっていることを示している。

## 5 自己評価:

ガングリオシドが神経突起伸長に関わっていることは以前より知られていたが、そのメカニズムについてはまだよくわかっていなかった。その中で本研究は、抗ガングリオシド抗体による免疫沈降というオリジナルな方法を用いてガングリオシドが神経突起伸長に関わっている分子と直接会合していることを示し、ガングリオシドがそのシグナル伝達の間を提供していることを明らかにした。機能解明の困難だったガングリオシド研究に新たな道を開いたものと考えている。

スフィンゴ糖脂質マイクロドメインの研究は盛んにおこなわれるようになったが、その中でスフィンゴ糖脂質自身の役割についてはほとんど注意を払われてこなかった。最近、ガングリオシド生合成酵素遺伝子ノックアウトマウスが神経系において様々な表現型を示すことがわかってきた。しかし、そのメカニズムについてはまったくわかっていない。本研究はそれらの謎の解明にもつなげる可能性を持つと考えられる。本研究で得られた成果の多くを論文発表の形までもっていきなかつたことは、多に反省すべき点である。

## 6 研究総括の見解:

研究は順調に進んでいる。脳を特徴付けるガングリオシドの機能解明に向かって新たな一歩を進めたことは評価し得る。今後の課題として、対象としているマイクロドメインの動的な、機能的超分

子構造の解析にも更なる一歩を進めて欲しい。今後は、単なるシグナル分子系列の同定に終始しないように気をつけ、掘り下げた密度の高い研究を展開すべきであろう。ラフトコンセプトの使用には批判も多く、注意して使用すること。発表には前向きで対処されたい。

## 7 主な論文等:

### 論文・総説

1. Yamauchi, S., Tokita, Y., Aono, S., Matsui, F., Shuo, T., Ito, H., Kato, K., Kasahara, K., Oohira, A. Phosphorylation of neuroglycan C, a brain-specific transmembrane chondroitin sulfate proteoglycan, and its localization in the lipid rafts. J. Biol. Chem. **277** 20583-20590, (2002)
2. Kasahara, K., Watanabe, K., Kozutsumi, Y., Oohira, A., Yamamoto, T. and Sanai, Y. Association of GPI-anchored protein TAG-1 with src-family kinase Lyn in lipid rafts of cerebellar granule cells. Neurochemical Res. **27** 823-829, (2002)
3. Yuyama K, Sekino-Suzuki N, Sanai Y and Kasahara K Lipid rafts in cellular signaling and disease. Trend.Glycosci.Glycotech. **15**(83) 139-151 (2003)
4. Hiramatsu T, Sonoda H, Takanezawa Y, Morikawa R, Ishida M, Kasahara K, Sanai Y, Taguchi R, Aoki J, Arai H. Biochemical and molecular characterization of two phosphatidic acid-selective phospholipase A1s, mPA-PLA1 alpha and mPA-PLA1 beta. J. Biol. Chem. **278** 49438-49447, (2003)
5. Yuyama K, Sekino-Suzuki N, Sanai Y and Kasahara K Translocation of Activated Heterotrimeric G Protein Go to Lipid Rafts in Cerebellar Neurons (submitted)
6. Hirai M, Koizumi M, Hirai H, Hayakawa T, Yuyama K, Suzuki N and Kasahara K Structures and dynamics of glycosphingolipid-containing lipid mixtures asraft models of plasma membrane J.Phys.: Condens.Matter (in press)
7. Sekino-Suzuki N, Yuyama K, Sanai Y and Kasahara K Tyrosine phosphorylation of Cbp by ligation of GPI-anchored neuronal adhesion molecule TAG-1 in lipid rafts. (in preparation)
8. 笠原浩二 佐内豊 「神経系細胞膜ラフトとシグナル伝達」蛋白質核酸酵素 共立出版 **47**(4) 333-337 (2002)
9. 笠原浩二、佐内豊 「脂質ラフトと複合糖質」蛋白質核酸酵素 **48**(8) 1164-1170 (2003)
10. 鈴木直子、湯山耕平、佐内豊、笠原浩二 「神経系における脂質マイクロドメイン」蛋白質核酸酵素 **49** 2397-2403 (2004)
11. 湯山耕平、鈴木直子、佐内豊、笠原浩二 「神経細胞接着分子 TAG-1 の脂質ラフトを介するシグナル伝達」膜 (日本膜学会編) 30(印刷中)

## 受賞

湯山耕平(グループメンバー)

平成 16 年 第 7 回日本糖質学会ポスター賞受賞

「三量体 G タンパク質 Go の神経細胞膜ラフトにおけるシグナル伝達とガングリオシド」

## 招待講演等

1. 笠原浩二、佐内豊  
フォスファカンの脂質ラフトにおける TAG-1/Lyn を介するシグナル伝達  
第 4 5 回日本神経化学会 2002 年 7 月 17-19 日札幌(シンポジウム)  
Neurochemical Research 28(7) 1082 (2003)
2. 笠原浩二  
スフィンゴ糖脂質マイクロドメインの構造と機能  
第 47 回 F C C A セミナー第 9 回 グライコサイエンス若手会  
埼玉 2002 年 9 月 14 日(招待講演)
3. 笠原浩二、渡辺和忠、大平敦彦、小堤保則、佐内豊  
小脳顆粒細胞膜ラフトを介する GPI アンカー型神経細胞接着分子 TAG-1 の機能発現  
第 75 回日本生化学会大会 2002.10.16. 京都(シンポジウム)
4. 笠原浩二  
神経細胞膜ラフト機能制御とコレステロール  
第 26 回日本神経科学会大会 2003.7.23. 名古屋(シンポジウム)  
Neuroscience Research 26 Supplement 1 S11 (2003)
5. Kasahara K.  
“Signal transduction by GPI-anchored neuronal cell adhesion molecule TAG-1 in lipid rafts”  
“Symposium on Glyco-Neurobiology---Glycolipids, Glycoproteins, and other Glycoforms”-A  
Satellite Meeting for the 2003 International Society of Neurochemistry Annual Meeting  
(February 8 to 11, 2004, Taipei, Taiwan) (招待講演)
6. 笠原浩二、佐内豊  
神経細胞接着分子 TAG-1 の脂質ラフトを介するシグナル伝達  
日本膜学会第 26 年会 2004.5.20. 東京(ミニシンポジウム)
7. Yuyama K, Suzuki N, Sanai Y, Kasahara K  
Activation-dependent recruitment of trimeric G protein Go· to lipid rafts in cerebellar granule  
neurons.  
第 77 回日本生化学会大会 2004.10.16 横浜(ワークショップ)

## その他

国外発表 7 件

国内発表 18 件

## 研究課題別評価

1 研究課題名:新規蛍光プローブの創製による機能分子の細胞内可視化

2 研究者氏名:菊地 和也

研究員:橋本茂樹(研究期間:H14.6.1~H17.3.31)

平山裕樹(研究期間:H14.4.1~H16.11.30)

3 研究の狙い:

生細胞において生体内分子は、その生理機能が発揮される特殊な生体組織や個体発生上の特殊な時間に発現している。本研究では、生体内で機能する分子をリアルタイムに可視化あるいは不活化することで生きた状態における機能解明を行う。この結果、タイムシグナルについて詳細な解析が可能になる。

上記の目的のため、新たな実験系として生細胞蛍光プローブと名付けた化学プローブをデザイン・合成し、生細胞あるいは生きた個体に直接応用する。具体的には、機能分子可視化プローブをデザイン・合成し、生物系へ応用する。

この様に生体内分子が時間的・空間的にどのように振る舞って機能するか調べることはポストゲノム時代の重要な研究課題であると考えられる。

4 研究成果:

(1)亜鉛イオン( $Zn^{2+}$ )応答性蛍光プローブ

遊離の  $Zn^{2+}$ は神経伝達に関与していることが報告され、近年着目されている。そこで、 $Zn^{2+}$ を可視化するための蛍光プローブの開発を行った。このうち、ZnAF-2 は最高感度かつ選択的であり、ラット脳海馬スライスを用いた実験で生きた状態での  $Zn^{2+}$ 濃度変化を初めて可視化することに成功した。まず正常時、 $Zn^{2+}$ はCA3及び歯状回において vesicle 内に高濃度で存在することを示した。さらに、 $Zn^{2+}$ の存在が示された CA3 領域の苔状線維に電気刺激を与え、 $Zn^{2+}$ 放出を可視化した。この結果、神経伝達物質放出に遅れて放出された  $Zn^{2+}$ は近位の放線層へとゆっくりと拡散することが可視化された。さらに、放出された  $Zn^{2+}$ の機能を調べるため、苔状線維刺激と同時に NMDA 受容体及び AMPA 受容体の機能を調べ、 $Zn^{2+}$ が NMDA 作動性のグルタミン酸神経系を抑制することが初めて示された。

次に、 $Zn^{2+}$ 放出の濃度を調べるプローブを作製した。ZnAF-2 の  $Zn^{2+}$ に対するみかけの解離定数 ( $K_d$ )は nM オーダーであり、0.1 nM ~ 10 nM の  $Zn^{2+}$ を検出することができる。しかし、これまでの実験では脳内においてはるかに高い  $Zn^{2+}$ 濃度変化が生じることが示唆された。そこで、 $Zn^{2+}$ に対する選択性を維持したまま親和性を変化させた蛍光プローブを5種類デザイン・合成した。いずれのプローブも ZnAF-2 より高濃度の領域で蛍光強度が変化し、この5種類のプローブを用いれば、 $10^{-10}$  ~  $10^{-3}$  M と広い範囲にわたる  $Zn^{2+}$ の濃度変化を捉えられる。これらのプローブを用いて脳内の  $Zn^{2+}$ 放出が nM から  $\mu$ M オーダーまで部位によって変化することを示した。

最後に、高精度の測定を行うために長寿命蛍光を発するランタノイド金属錯体を用いた  $Zn^{2+}$ 蛍光プローブを作製した。生体試料中には蛍光成分が含まれており、通常の測定ではバックグラウンド蛍光が大きい。時間分解蛍光測定を行いノイズレベルを減じることができる。そこで、ミリ秒オーダーの長寿命蛍光を持つ  $Eu^{3+}$ 錯体を用いた  $Zn^{2+}$ 蛍光プローブをデザイン・合成した。この蛍光プローブはキノリン環を  $Zn^{2+}$ キレーターかつ  $Eu^{3+}$ へのエネルギー供与を行うアンテナとして有しており、 $Zn^{2+}$ 配位により蛍光スイッチとなることを期待した。このプローブは  $Zn^{2+}$ の添加により大きな蛍光上昇を示し、時間分解蛍光イメージングを組み合わせることでノイズである短寿命蛍光を取り除くことができた。

## (2) FRET 型チロシンフォスファターゼ(PTP)測定用蛍光プローブ

異なる2波長での蛍光強度を測定しその比(レシオ)を検出するレシオ測定法は、蛍光プローブ自身の局在や濃度変化、試料の大きさや厚さの違い、励起光強度のばらつきなどの影響を減じることができるため、バイオイメージングを行う際に特に有利な測定法である。FRET 型蛍光プローブはこのレシオ測定を可能とする。FRET 効率を決定する因子のうち分子デザインによって変化させうる因子は3つ(配向定数:  $\kappa^2$ , 重なり積分:  $J$ , ドナーとアクセプターの距離:  $r$ )ある。このうち、2つの因子(距離:  $r$ , 重なり積分:  $J$ )に着目し、研究を開始した。

まず、距離変化型プローブを開発し、細胞質環境で機能するプローブを作製するためには、消光の原因となる色素の会合が起こらない分子設計が必要であることを示した。次に、重なり積分( $J$ )を変化させるプローブデザインを行った。Fluorescein が吸収特性の大きく異なる2つのコンフォメーション(lactone 型と quinoid 型)をとることに着目して、重なり積分変化をスイッチとする設計法を新規に考案した。この原理に基づき、PTP レシオプローブを設計・合成した。次に、このプローブを用いたイメージングで正常細胞の接触阻止と PTP 活性の関連について解析することを試みた。接触阻止を起こすマウス筋芽細胞 C2C12 を用いて細胞密度と PTP 活性との関係を調べたところ、接触阻止が起こる際に PTP 活性が増大することを示した。また、阻害剤を用いた検討の結果、アラキドン酸代謝経路より産生される ROS が PTP 活性の調節因子となっていることが示唆された。

## (3) 蛍光性ランタノイド錯体の蛍光強度制御

希土類金属のうち  $Tb^{3+}$ ,  $Eu^{3+}$  は適切な発色団(antenna)を持つ ligand と錯形成し、特徴的なミリ秒オーダーの長寿命蛍光を発する。通常の有機化合物の蛍光寿命はナノ秒オーダーであるため、この蛍光が減衰した後、蛍光測定を開始することで希土類金属蛍光錯体からの蛍光を選択的に得ることができる。この希土類金属蛍光錯体は主に蛍光標識化試薬として用いられていた。本研究においては、特定のシグナルにตอบสนองして蛍光 off/on 制御を可能とすることを目的とした。

蛍光制御手段として光誘起電子移動(Photoinduced Electron Transfer, PET)を用いた。PET とは一電子励起された蛍光団の近傍に電子供与性を有する官能基が存在するときに起きる官能基から蛍光団への電子移動である。電子供与性の違う off/on switch を持つ錯体を新規にデザイン・合成し、水溶液中で蛍光測定を行ったところ蛍光量子収率は off/on switch の HOMO level とよい相関を示した。蛍光 off/on の threshold が - 5.8 eV 付近と見積もられ、off/on switch の HOMO level がこの threshold より低い錯体は蛍光性であり、高い錯体は無蛍光性であった。さらに、off/on switch に aniline を用いた錯体の蛍光は pH 依存性を持ち、中性条件下では無蛍光性であるが、酸性条件下では強い蛍光を有する。

本研究において、希土類金属蛍光錯体の蛍光が PET により制御が可能であることを示し、機能性希土類金属蛍光錯体の開発における設計指針を示した。この研究内容については特許取得申請も行った。

## 5 自己評価:

研究代表者は、実際に生物学研究に応用して新しい現象を見つけ出すプローブ分子を作製することを謳ってこの領域に採用して頂いた。この生物応用の成功の度合いから考えると、項目4に記したプローブ類については目標が達成されたと考えている。しかし、蛋白質リン酸化や *in vivo* イメージングプローブについては、試験管レベルでの測定には成功したが、実際の生物応用には成功していない。また、この結果から、これまでのプローブが個々の測定対象に向けられていたのに対し、汎用性のある技術を創り出すことの重要性が明らかになった。これらの今後の課題が残された点が残念ではあるが、実際の生物学の研究者との交流を持つことで、問題点が明確になった点で研究開始時より着実に進歩したとは考えている。

研究開始時に蛍光顕微鏡システムを調達することができ、また有機合成のためのインフラ整備も整い、研究しやすい環境が整った。さらに、これ以上に私にとって意義深かった面が2つ挙げられ

る。一つは、生物学の研究者との人的交流である。同世代の生物学の研究者と話し合うことができ、今後の研究方向性を考える上で非常に役に立った。もう一つの意義としてはこの人的交流の結果、研究内容のみならず研究哲学についても考え直すことができ、研究に対する意識が深まったことである。今後も分野融合に基づく研究を行っていきたいと考えているが、この研究方向を進む上で、自分の独自性についてさらに改善が必要な点と自信を持つべき点が明確となった。これらの点からこの3年で得られた成果は研究人生において大変有意義であり、今後の展開につながると考えている。

全体としての反省点としては、上記の成果の上でもまだ生物学についての深さが身に付いていない点が挙げられる。これについては、今後の課題として残っている。しかし、研究代表者の独自性は化学のバックグラウンドから生まれるものである。この化学研究について深めながらも、生物学に積極的に取り組んでいきたい。

#### 6 研究総括の見解:

極めて順調に推移しており、将来への更なる展開を期待できる成果をあげ、この分野のリーダーシップをとりつつあることは評価出来る。本人も自己評価で述べているように、生物学者、更には医学分野の研究者など異分野の研究者との交流、連携、共同に一層心がけて欲しい。それにより、単なる課題解決型研究に止まることなく、課題発見型研究へと展開する転機をつかんで欲しい。発表のほとんどは一流の紙上で為されているが、トップあるいはラスト順位のものがない点は注意のこと。所属する研究室のポリシーによるのかもしれないが、将来への発展を考えると一考を要する。

#### 7 主な論文等:

##### 論文

1. Kawabata, K. Kikuchi, Y. Urano, H. Kojima, A. Odani & T. Nagano, Design and Synthesis of Zinc-Selective Chelators for Extracellular Applications. *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, ASAP article (2005)
2. K. Hanaoka, K. Kikuchi, H. Kojima, Y. Urano & T. Nagano, Development of a Zinc Ion-selective Luminescent Lanthanide Chemosensor for Biological Applications. *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 12470-12476 (2004)
3. T. Yogo, K. Kikuchi, K. Hirose, M. Iino & T. Nagano, Modification of Intracellular  $Ca^{2+}$  Dynamics by Laser Inactivation of Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor Using Membrane-permeant Probes. *Chemistry & Biology*, **11**, 1053-1058 (2004)
4. K. Hanaoka, K. Kikuchi, H. Kojima, Y. Urano & T. Nagano, Selective Detection of Zinc Ions with Novel Luminescent Lanthanide Probes. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **42**, 2996-2999 (2003)
5. T. Inoue, K. Kikuchi, K. Hirose, M. Iino & T. Nagano, Spatiotemporal Laser Inactivation of Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptors Using Synthetic Small-molecule Probes. *Chemistry & Biology*, **10**, 503-509 (2003)
6. H. Takakusa, K. Kikuchi, Y. Urano, H. Kojima & T. Nagano, A Novel Design Method of Ratiometric Fluorescent Probes Based on Fluorescence Resonance Energy Transfer Switching by Spectral Overlap Integral. *Chem. Eur. J.*, **9**, 1479-1485 (2003)
7. S. Mizukami, T. Nagano, Y. Urano, A. Odani & K. Kikuchi,

- A Fluorescent Anion Sensor That Works in Neutral Aqueous Solution for Bioanalytical Application.  
*J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 3920-3925 (2002)
8. T. Hirano, K. Kikuchi, Y. Urano & T. Nagano,  
Improved Fluorescent Probes for Zinc, ZnAFs, Suitable for Biological Applications.  
*J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 6555-6562 (2002)
9. H. Takakusa, K. Kikuchi, Y. Urano, S. Sakamoto, K. Yamaguchi & T. Nagano,  
Design and Synthesis of an Enzyme-Cleavable Sensor Molecule for Phosphodiesterase  
Activity Based on Fluorescence Resonance Energy Transfer.  
*J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 1653-1657 (2002)
10. S. Maruyama, K. Kikuchi, T. Hirano, Y. Urano & T. Nagano,  
A Novel, Cell-Permeable, Fluorescent Probe for Ratiometric Imaging of Zinc Ion.  
*J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 10650-10651 (2002)

#### 総説

1. K. Kikuchi, K. Komatsu & T. Nagano,  
Zinc Sensing for Cellular Applications.  
*Curr. Opin. Chem. Biol.*, **8**, 182-191 (2004)
2. K. Kikuchi, H. Takakusa & T. Nagano,  
Recent Advances in Design of Small Molecule Based FRET Sensors for Cell Biology.  
*Trends Anal. Chem.*, **23**, 407-415 (2004)

#### 口頭発表

##### 国際会議

招待講演 7件(海外 4件, 国内 3件)

##### 国内学会・研究会等

招待講演 33件

(受賞講演 2件, 特別講演 1件, 教育講演 2件, シンポジウム 23件, 研究会 5件)

#### 受賞

平成 14 年 日本薬学会奨励賞受賞

平成 14 年 とやま賞受賞

平成 16 年 日本バイオイメージング学会奨励賞受賞

#### 特許出願

1. 菊地和也, 岩澤伸哉, 長野哲雄(2003)「蛍光性ランタニド錯体」  
特願 2003-045786 国際出願番号: PCT/JP2004/001680
2. 菊地 和也, 水上進, 長野 哲雄(2002)「アニオン検出用蛍光センサー」  
特願 2002-61098 特開 2003-254909

## 研究課題別評価

1 研究課題名: 大脳神経系前駆細胞の生死の制御とその生理的意義

2 研究者氏名: 後藤 由季子

研究員: 鎌倉幸子(研究期間 H13.12.1~H16.3.31)

樋口麻衣子(研究期間 H16.8.1~H16.11.30)

3 研究の狙い:

マウス胎生期大脳皮質由来の神経系前駆細胞は、ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトへの多分化能を持った組織幹細胞として捉えられている。大脳皮質をモデル系として、神経系前駆(幹)細胞の増殖と分化および細胞死を制御する分子メカニズムを検討し、組織の大きさと質を決める機構の理解に迫った。ひとつの焦点は、増殖から分化への転換機構である。もうひとつの焦点は分化と細胞死の連携あるいは増殖と細胞死の連携である。本研究では特にひとつ目の課題に関連して増殖・自己複製に関与する分子とニューロン分化に関与する分子の同定とメカニズムの解析を行った。胎生期の大脳皮質において、神経幹細胞は自己複製期 ニューロン分化期 グリア分化期と、発生時期に従ってその運命を変化させる。分化のタイミングは非常に厳密に制御され、最終的な細胞の数を決定する重要な要因であるが、その制御メカニズムは未だ大部分が不明である。また細胞死も細胞の数(と質)を決定する重要な要因である。本さきがけ研究では、神経幹細胞の自己複製から分化に移行するタイミングおよび細胞死がいかなる分子メカニズムで制御されているかを明らかにし、大脳皮質という組織をモデル系に細胞の数と質が制御される機構を理解することを目的とした。

4 研究成果:

本研究において、大脳皮質由来神経幹細胞のニューロン分化誘導因子として Wnt7a を同定した(Hirabayashi et al. Development 2004)。また、神経幹細胞の自己複製において重要な Notch の下流シグナル伝達を解析し、転写因子 STAT3 が主要な役割を果たすことを明らかにした(Kamakura et al. Nat.Cell Biol. 2004)。ここで特筆すべき点は、これらのシグナル分子による神経幹細胞の運命制御が、神経幹細胞の“時期”に依存しているという結果である。すなわち、Wnt シグナルは、早期の神経幹細胞においては自己複製を促進するのに対して、後期の神経幹細胞においては逆に自己複製を抑制し分化を促進した。また Notch-STAT3 経路も早期の神経幹細胞においては自己複製の促進に働き、後期においてはアストロサイト分化に働いた。以上の結果は、神経幹細胞の自己複製からニューロン分化への運命転換が、分化誘導因子の発現上昇や自己複製促進因子の発現低下だけで説明されるものではなく、むしろ同じシグナル分子に対する神経幹細胞側の応答性の時期依存的な変化(intrinsic な細胞状態の変化)が、増殖から分化への運命転換の鍵を握っていることを示唆している。

大脳皮質神経幹細胞の生死制御機構を検討し、Notch シグナルが未分化な神経幹細胞の生存促進に重要な役割を果たすことを見出した(Oishi et al. Dev.Biol. 2004)。またこのとき、Notch の下流で分化抑制に働く Hes たんぱく質は Notch による生存促進には関与せず、Bcl-2 と Mcl-1 の発現上昇を介した新しい経路によって Notch が神経幹細胞の生存促進に貢献することを示した。

大脳皮質神経幹細胞の増殖からニューロン分化への転換メカニズムを知る手がかりとして、早期には増殖促進に働き、後期には分化促進に働くシグナル経路を同定することが出来た。これらのシグナルがどのようなメカニズムで増殖と分化を時期特異的に制御するかを明らかにすることが、次の重要なステップであると考えている。そのためには、各シグナル因子の直接のターゲットを同定し、その時期特異的制御を検討することが鍵となる。これまでに Wnt-β-catenin 経路がニューロン分化を促進する際、neurogenin1(ngn1)遺伝子がターゲット分子のひとつであることを明らか

にした。Ngn1 は Ngn2 と共に大脳皮質におけるニューロン分化に必須の役割を果たす転写因子であり、ニューロン分化のタイミングを決定する因子であると考えられている。しかしこれまでその発現制御機構に関してはほとんどわかっていなかった。従って、Wnt 経路による ngn1 遺伝子制御の解明はニューロン分化のタイミングを理解する上で大きな意味を持つ。また、STAT3 がいかなるターゲット遺伝子の発現を介して神経幹細胞の自己複製の促進およびニューロン分化の抑制に働いているかについても今後検討する予定である。

#### 5 自己評価:

当初は大脳神経系前駆細胞の生死制御と増殖・分化の関わりが中心となる予定であったが、研究の展開から生死制御のメカニズムに加えて増殖から分化への転換へと重点がシフトした。本研究の遂行において、ポスドク研究者の参加が不可欠であった。

#### 6 研究総括の見解:

神経幹細胞に着目し、増殖から分化への転換メカニズムをシグナル分子レベルで追求し、同一シグナル分子に対する細胞の応答性(状態の変化)が時期依存的に変化し、制御されることを見出した成果は、高く評価し得る。但し、初期の目標の一つであった、分化方向転換の鍵を握る究極のメカニズムの追求は今後の課題として残った。今後、単なるシグナル分子種、および関連遺伝子の個別的な追求にとどまることなく、新たなブレークスルーに向かって焦点を定め、設定課題の本質の解明に向かって掘り下げた研究を進めて欲しい。

#### 7 主な論文:

1. Oishi, K., Kamakura, S., Isazawa, Y., Yoshimatsu, T., Kuida, K., Nakafuku, M., Masuyama, N. and Gotoh, Y.  
Notch promotes survival of neural precursor cells via mechanisms distinct from those regulating neurogenesis.  
Dev. Biol. In press (2004)
2. Kamakura, S., Oishi, K., Yoshimatsu, T., Nakafuku, M., Masuyama, N. and Gotoh, Y.  
Hes binding to STAT3 mediates crosstalk between Notch and JAK-STAT signaling.  
Nature Cell Biol. 6, 547-554. (2004)
3. Tsuruta, F., Sunayama, J., Mori, Y., Shimizu, S., Tsujimoto, Y., Yoshioka, K., Masuyama, N. and Gotoh, Y.  
JNK promotes Bax translocation to mitochondria through phosphorylation of 14-3-3 proteins.  
EMBO J. 23, 1889-1899. (2004)
4. Hirabayashi, Y., Itoh, Y., Tabata, H., Nakajima, K., Akiyama, T., Masuyama, N. and Gotoh, Y. The Wnt-beta-catenin pathway directs neuronal differentiation of cortical neural precursor cells  
Development 131, 2791-2801. (2004)

#### 受賞

- 平成15年 第1回分子生物学会三菱化学奨励賞  
平成16年 第9回日本女性科学者の会奨励賞  
平成16年 平成16年度日本癌学会奨励賞

## 研究課題別評価

### 1 研究課題名:加齢に伴う学習・記憶低下の遺伝子プログラム

### 2 研究者氏名:齊藤 実

研究員:堀内 純二郎(研究期間:H14.4.15~H16.11.30)

松野 元美(研究期間:H14.9.1~H16.7.31)

本多 敦子(研究期間:H14.10.1~H15.3.31)

### 3 研究の狙い:

加齢に伴う学習・記憶能力の低下は全てのヒトに起こる現象である。加齢性記憶障害(Age-related Memory Impairment = AMI)と相関して脳神経系の生理学的機能の変化や・解剖学的変化が、老齢マウス・ラットを中心とした哺乳類モデルで報告されている。高齢化社会を迎えようとしている現在、どのような分子メカニズムが加齢性記憶障害に関与しているかを明らかにすることは、AMI の改善・予防策を立てる上での分子標的を設定するためにも大変重要である。また、AMI は老化と密接に関連した現象であるが、老化のメカニズムとどのような重複、乖離があるかも、AMI の分子メカニズムが解析されなければ明らかとはならない。これまでの哺乳類モデルでは年単位の寿命が障害となり、AMI の分子メカニズムを解明するための行動遺伝学的解析が非常に難しかった。ショウジョウバエは寿命が約 1 ヶ月と短く、哺乳類モデルと共通した学習記憶や老化の分子メカニズムを持つ。従ってショウジョウバエでも AMI が起こるのであれば、ショウジョウバエは哺乳類モデルに替わる AMI の分子メカニズム解析のモデル動物となり得る。本研究ではショウジョウバエの AMI を検証しモデル動物としての有効性を確立した上で、AMI の行動遺伝学的解析を行い、AMI がどのような記憶過程(記憶の分子メカニズム)の障害を反映したものなのか?また、老化と AMI とはどのような関わりを分子レベルで持っているのか?などを明らかにし、「AMI の分子メカニズム」という萌芽研究領域の確立を目指した。

### 4 研究成果:

#### (1)加齢性記憶障害(AMI)の分子遺伝学的解析

ショウジョウバエの学習記憶過程は匂いと電気ショックを組み合わせた匂い条件付けによる連合学習課題で詳細に解析されている。先ず寿命が約 1 ヶ月と短いショウジョウバエでも加齢性記憶障害が起こるのか?を調べるため、羽化後 1 日目から 50 日までのハエで、匂い条件付けによる記憶の保持曲線を調べ、比較した。その結果、20 日齢から、顕著な 1 時間記憶を中心とした記憶スコア(Performance Index)の低下がみられ、その記憶保持曲線は、中期記憶過程に障害を持つ *amnesiac (amn)* 変異体のものと極めて良く似ていることが分かった(図 1)。さらに 20 日齢のハエでは匂い条件付けに関連した匂い感受性や、電気ショックに対する忌避性が 1 日齢のハエと変わらなかった。これらのことからショウジョウバエも哺乳類モデル同様、加齢による記憶障害(AMI)が起こること、この記憶障害は *amn* 変異体の示す記憶障害と極めて良く似ていることが明らかになった。そこで、次に AMI を、*amn* 変異体を含む複数の学習記憶変体で調べたところ、図 2 に示すとおり、*amn* 変異体では他の変異体と異なり、もはや加齢による記憶低下はみられなかった。さらに *amn* 変異体では記憶保持曲線も加齢による顕著な変化を示さなかった。これまで AMI は神経細胞の変性・脱落などによる記憶過程の非特異的な障害と考えられてきた。しかし上記の結果から AMI は、*amn* 遺伝子依存性の中期記憶が特異的に障害されて起こることが示唆された。*amn* 遺伝子は神経ペプチドをコードし、その遺伝子産物は記憶に重要な脳部位のキノコ体に終末を投射する DPM 細胞で高い発現を示す。しかしながら DPM 細胞に加齢による目だつた形態的变化は観察されなかった。また *amn* 遺伝子を DPM 細胞で過剰発現させても加齢性記憶障害の抑制は見られなかった。これらの結果から、*amn* 遺伝子産物の神経ペプチドを受容して起こるキノコ体

(MB) 内の中期記憶に關与する情報伝達系に AMI の原因があることが示唆された (Neuron, 2003)。

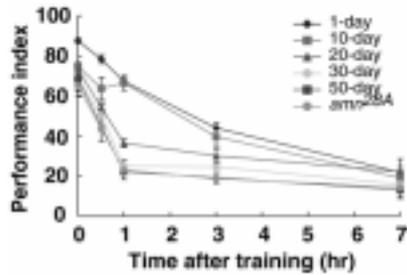


図 1 野生型加齢体の記憶保持曲線：  
匂い条件付けの後、任意の時間で記憶テストを行い記憶保持曲線を各日齢の野生型で作成した。20日齢(20-day)から顕著なAMIが見られるようになり、*amn*変異体(*amn*)と極めてよく似た中期記憶の障害(1時間記憶の顕著な低下に注意)が記憶保持曲線に現れる

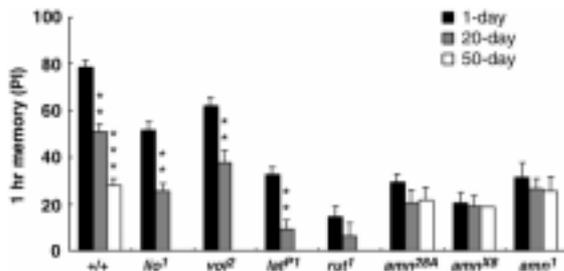


図 2 AMIの遺伝学的解析  
野生型同様多くの学習記憶変異体では20日齢で顕著な1時間記憶の低下を示す。しかし、*amn*変異体では加齢により障害されるべき記憶成分が既にないためAMIはもはや起こらない。短期記憶変異体*ltp1*には中期記憶が存在しているためAMIが見られる。

## (2) AMI 変異体の同定

上記のとおり AMI の原因がキノコ体での情報伝達系にあることが示唆されたので、MB に発現する遺伝子のランダムな変異体約 50 系統で AMI の抑制・促進変異体検索し、「若い学習記憶力」を加齢体となっても保持している (AMI が抑制されていた) 変異体 2 系統を見出した。これらの系統で変異を起こしている遺伝子産物は MB で極めて高い発現を示していた。さらに興味深いことに、これらの変異体では有意な寿命の延長がみられなかった。このことは体の老化とは独立した加齢性記憶障害の分子メカニズムの存在を示唆している (投稿準備中)。

## (3) 寿命と記憶の遺伝学的相関

若齢体で既に加齢体と同じ記憶障害を示す *amn* 変異体は老化が促進している可能性がある。このことを確かめるため、*amn* 変異体の寿命を調べたところ、全く意外なことに野生型コントロールと比べて約 40% もの寿命の延長が観察された。*amn* 遺伝子を DPM 細胞で発現させることにより、*amn* 変異体の記憶が回復するが、興味深いことに、記憶の回復と同時に寿命も野生型コントロールレベルにまで戻った。これらのことから記憶遺伝子 *amn* は記憶に關与する部位で、老化の制御にも關与していることが示唆された。*amn* 変異体は多くの長命変異体と異なり体型、体重の減少が見られない。*amn* 変異体と同じ身体的特徴を持つ長命変異体に G タンパク共役型受容体 (GPCR) の変異体 *methuselah* (*mth*) がある。そこで *mth* が *amn* 同様、老化と記憶に共役しているか否かを調べたところ、*amn* 変異体と同じ記憶成分 (中期記憶) が障害されていることが分かった。*amn*、*mth* いずれも老化と記憶に共役して働き、*mth* も *amn* 同様中期記憶に障害があることが分かったので、*amn*、*mth* は重複するメカニズムにより寿命と記憶の制御に關与しているか、*amn*、*mth* 二重変異体で寿命と記憶を調べた。その結果、*amn* に対して *mth* が抑制因子として働き、二重変異体では寿命が野生型コントロールレベルにまで戻り、記憶も *amn* の大きな障害が部分的に回復した。これらのことから記憶と老化に共役して働く遺伝子シグナリングが存在し、*amn* と *mth* の両者がそのシグナリングに含まれていることが推測された (論文投稿中)。

## 5 自己評価:

ショウジョウバエを使って加齢性記憶障害の分子遺伝学的解析を行うという研究は、ハエでもヒ

トのような加齢性記憶障害が起こるかどうかさえ分からない状況からのスタートだった。しかし幸いにもさきがけの助成を3年にわたり受け、非常に思い切った研究を進めることが可能となり、加齢性記憶障害の分子メカニズムという未開拓の研究領域に先鞭を付けることが出来た。本研究により、加齢性記憶障害がこれまで考えられていたような、記憶過程全般の非特異的な障害でなく特定の記憶過程(記憶成分)の特異的な障害であることを明らかにし、続いて加齢性記憶障害の変異体を単離出来た。これらのことは、加齢性記憶障害が分子遺伝学的解析の対象となり得ることを示した点でも意義深いと感じている。また、本研究から加齢により障害される記憶成分に関与する遺伝子が、実は寿命の制御にも関わっているということも見出すことが出来た。こうした記憶と寿命の負の相関は、生殖行動と寿命、発育と寿命など「遺伝子の拮抗的多面発現」の新たな一例と捉えることが出来る。また、記憶遺伝子が関わる老化機構は、インスリンシグナリングなどの良く知られている老化機構とは異なることを示唆するデータも得られ、新たな老化機構の発見に繋がる可能性が出てきた。加齢性記憶障害は老化と密接に関連した現象であるが、加齢性記憶障害がどこまで老化のメカニズムにより支配され、どのような独自のメカニズムを持っているかなどは殆ど解析されていない。ショウジョウバエは老化や記憶の分子メカニズムに加えて、その二つの相関である加齢性記憶障害の分子メカニズムを解析する上でも優れたモデル動物であることが本研究により実証された。今後研究をさらに発展させることにより、加齢性記憶障害の分子メカニズムという萌芽研究領域を哺乳類モデルへ敷衍していきたい。

#### 6 研究総括の見解:

新しい領域を拓きつつある研究として高く評価し得る。高齢化社会を迎えつつあるわが国にとっても重要な寄与を期待し得る。分子メカニズムの追求はこれからである。頑張ってもらいたい。ショウジョウバエでの成果を哺乳類に結び付けるには一段の工夫が必要であろう。その為にも、国内における他の老化(加齢)研究者との情報交換・連携に前向きでとり進んで欲しい。また、シグナルレベルでのメカニズムの追求に際しては、シグナル系路の単なる特定に止まらないよう配慮しつつ、研究を進めて欲しい。

#### 7 主な論文等:

##### 論文

1. Xia S, Miyashita T, Fu T-G, Lin W-Y, Wu C-L, Pyzocha L, Lin I-R, Saitoe M, Tully T, Chiang A-S. (2005).  
NMDA receptors mediate olfactory learning and memory in *Drosophila*.  
***Current Biology*** (in press) (Saitoe, Tully and Chiang groups share senior authorship equally).
2. Saitoe M, Tamura T, Ito N, Horiuchi J (2005). *Drosophila* as a novel animal model for studying the genetics of age-related memory impairment. ***Rev Neurosci*** (in press)  
Horiuchi J, Saitoe M (2005).  
Can flies shed light on our own age-related memory impairment? ***Ageing Res Rev* 4**, 83-101.  
Tamura T, Chang AS, Ito N, Liu HP, Horiuchi J, Tully T, Saitoe M. (2003) Aging specifically impairs *amnesiac*-dependent memory in *Drosophila*.  
***Neuron* 40**, 1003-1011.
2. Saitoe M, Schwarz TL, Umbach JA, Gundersen CB, Kidokoro Y. (2002).  
Meaningless minis?  
***Trends Neurosci* 25**, 385-386
3. Saitoe M, Schwarz TL, Umbach JA, Gundersen CB, Kidokoro Y. (2001).  
Absence of junctional glutamate receptor clusters in *Drosophila* mutants lacking spontaneous transmitter release.  
***Science* 293**, 514-517

4. 齊藤 実, 田村拓也, 堀内純二郎, 伊東直美 (2004).  
ハエから探る老人痴呆:ショウジョウバエによる加齢性記憶障害と老化の分子メカニズムの解析  
*日本薬理学雑誌* 24, 231-237
5. 齊藤 実 (2004).  
ショウジョウバエによる学習記憶関連遺伝子の同定とそのシナプス機能の解析  
*ブレインサイエンスレビュー* 2004, 109-123.
6. 齊藤 実 (2004).  
加齢により障害される記憶過程とその遺伝子経路の同定  
*バイオインダストリー* 21, 27-35.
7. 齊藤 実 (2002).  
老年期記憶障害の分子メカニズムの探索  
*医学のあゆみ* 202, 1053-1057.

#### 特許

齊藤 実 (2003) 老人性記憶障害モデル非ヒト哺乳類及び非哺乳類動物  
特願 2003-402319

#### 招待講演(国内)

1. 齊藤 実(2004)  
ショウジョウバエによる加齢性記憶障害の分子機構の解析  
平成 16 年度シナプス研究会 (岡崎生理研)
2. 齊藤 実 (2004)  
加齢性記憶障害と寿命の分子メカニズムとその相関「老化研究:新たなパラダイムの形成を目指して」  
第 27 回日本分子生物学会年会 (神戸ポートアイランド)
3. 齊藤 実 (2004)  
ハエから探る老人痴呆: ショウジョウバエによる加齢性記憶障害と老化の分子メカニズムの解析  
第 36 回脳の医学・生物学研究会 (名古屋サマニアンホール)
4. 齊藤 実 (2004)  
加齢による記憶障害の分子メカニズムの解析と新規老化経路の検索  
冬の学術シンポジウム「寿命と老化研究のフロンティア」(東京セントラルプラザ飯田橋)
5. 齊藤 実 (2003)  
学習記憶と加齢による記憶障害の分子メカニズム:ショウジョウバエによる分子遺伝学的研究  
生理学若手サマースクール 2003 (東京医科歯科大学)
6. 齊藤 実, 城所良明 (2003)  
自発開口放出が受容体集積過程に果たす役割の遺伝学的解析  
第 80 回日本生理学会大会学術・研究委員会シンポジウム(福岡国際会議場)
7. 齊藤 実 (2002)  
老人性記憶障害の発現と老化に関わる amnesiac 遺伝子経路  
第 25 回神経研シンポジウム (東京安田生命ホール)
8. 齊藤 実, 城所良明 (2002)  
自発開口放出が受容体集積過程に果たす役割の遺伝学的解析  
第 25 回日本神経科学大会シンポジウム(東京ビッグサイト)

### 招待講演(国外)

- 1 . Horiuchi J, Saitoe M. (2004).  
A novel interaction between memory and aging: the *amnesiac* mutation affects middle-term memory formation, age related memory impairment and lifespan.  
*Neural Physiology and Behavior*, 45th Annual *Drosophila* Research Conference. (Washington DC)
- 2 . Saitoe M (2003).  
Genetic dissection of age-related memory impairment in *Drosophila*.  
*The second Japan-Korea Drosophila symposium* (Tokyo)
- 3 . Saitoe M, Tamura T (2001).  
Impairment of olfactory memory during aging in *D. melanogaster*.  
*Neurobiology of Drosophila*, Cold Spring Harbor Laboratory Meeting. (Cold Spring Harbor, NY)

## 研究課題別評価

1 研究課題名: 骨髄由来血管前駆細胞の同定と機能解析

2 研究者氏名: 佐田 政隆

研究員: 白川 伊吹(研究期間: H16.4.1 ~ H17.3.31)

3 研究の狙い:

動脈硬化や血管形成術後再狭窄、移植後血管障害といった血管病では、平滑筋細胞の蓄積が主要要因である。この原因として、中膜平滑筋細胞が血管内皮下へ遊走し増殖するという「Ross の仮説」が長年受け入れられてきた。そして、中膜平滑筋細胞を標的とした治療法が検討されてきたが、未だ有効な方法は確立していない。研究開始時、研究者は心臓移植後動脈硬化モデルにおいて、「新生内膜の大部分はドナー中膜平滑筋由来でなくレシピエントの流血細胞由来である」ことを報告した。本研究では、各種血管病変における平滑筋細胞ならびに内皮細胞の起源を明らかにすることを目指した。また、その平滑筋ならびに内皮前駆細胞の「骨髄からの動員」「傷害血管への定着」「血管細胞への分化」「増殖」の過程を分子レベルで明かし、血管リモデリングの新しい概念の確立を図ることを目的とした。

4 研究成果:

以下のモデルを用いて、骨髄由来細胞の血管病理への関与を検討した。

(1) マーカー遺伝子発現マウスを用いた心臓移植

野生型のマウスの心臓を LacZ マウスに移植した。野生型のグラフト冠動脈にヒトと同様の求心性の動脈硬化が生じた。この新生内膜の9割以上は LacZ 陽性であった。つまりグラフト上の冠動脈の中膜を起源としたものでなく、レシピエントの血流中の細胞を起源としていることが明らかとなった。この逆に、LacZ マウスの心臓を野生型マウスに移植した場合は、LacZ 陽性の中膜平滑筋細胞は中膜に留まり、新生内膜はレシピエント由来の細胞で構成されていた。同様の現象は、性不一致個体間心臓移植後の動脈硬化病変においても、Y 染色体をマーカーとした *in situ* hybridization によって確認された。この新生内膜は、平滑筋細胞に特異的なミオシン重鎖、カルボニン、h-カルデスモン、アクチンを発現していた。以上の実験結果により流血中の前駆細胞が付着することで病変が形成されることが明らかとなった。

レシピエント中の平滑筋前駆細胞の起源を同定するために、野生型マウスの骨髄を致死量 X 線で照射し LacZ マウスもしくは GFP マウス(全身に蛍光物質 GFP(green fluorescent protein, 緑色蛍光蛋白質)を発現するトランスジェニックマウス)の骨髄を移植した。骨髄、脾臓、胸腺などでは移植骨髄細胞が同定されたが、無処置の血管には骨髄細胞は定着していなかった。この骨髄移植マウスに野生型マウスの心臓を移植したところ、グラフト動脈硬化病変の8割以上の細胞は骨髄由来であった。

(2) マーカー遺伝子発現マウスの骨髄移植とバルーニング血管傷害モデル

野生型マウスの骨髄を LacZ マウスの骨髄で置換したのち、大腿動脈にワイヤーを挿入し、内皮の剥離と血管の拡張を行った。傷害後4週目に形成された新生内膜の大部分と中膜の一部は骨髄由来の LacZ 陽性細胞で構成されていた。注目すべきことには再内皮化された内皮細胞も骨髄由来のものが大部分をしめていた。以上より、流血中に骨髄由来「血管前駆細胞」が存在し、血管形成術後の再狭窄部の平滑筋細胞や再内皮化内皮細胞へも分化していることが明らかになった。

### (3) 粥状動脈硬化病変でみられる平滑筋細胞の起源に関する検討

自然発症動脈硬化(粥状動脈硬化)鼠における平滑筋細胞の起源について探索した。アポE欠損マウスでは著明な高脂血症をきたしヒトと同様の動脈硬化が生じる。動脈硬化の生じていない8週齢において、アポE欠損マウスの骨髄をLacZマウスもしくはGFPマウスのもものと置換した。20週齢で大動脈に形成された粥腫の周辺部には平滑筋細胞が認められたが、その半数は移植された骨髄細胞由来のものであった。この骨髄由来平滑筋細胞は、各種の平滑筋細胞のマーカー陽性であり、電子顕微鏡による形態観察では、「合成型」平滑筋細胞に特異的な分泌顆粒の存在と筋線維成分の減少を認めた。

### (4) Parabiosis モデルを用いての検討

皮下組織の結合によって、従来から知られているように液性因子が交流するばかりでなく、末梢血、骨髄細胞も二マウス間を交流していた。すなわち、GFPマウスと野生型マウスを結合すると、7-10日には野生型マウスの末梢血の約50%がGFP陽性になっていた。3-4ヶ月後には、骨髄においてもほぼ50%のキメリズムが確認された。片方のマウスの血管にワイヤー傷害を加えると、パートナー由来の細胞が新生内膜形成に関与していた。以上より、非照射下においても、循環している前駆細胞が血管の修復に関与しうることが明らかとなった。

### (5) 末梢血から血管前駆細胞の分離

マウス、ラビット、ヒトの末梢血単核球を培養すると、炎症性マクロファージのみならず平滑筋様細胞もしくは内皮様細胞に分化させることができた。高脂血症、加齢によって平滑筋前駆細胞数は増加した。アンジオテンシンIIの持続注入によって血管前駆細胞数は増加し病変進行は加速した。また、動脈瘤形成も認められた。ApoE欠損マウスにカンデサルタンもしくはスタチンを投与すると、末梢血中の前駆細胞が減少し病変進行が抑制された。

### (6) 考察

以上の結果から、免疫学的、機械的、液性(サイトカインや酸化脂質)傷害が血管に加わると骨髄などの遠隔臓器から未分化細胞が動員され、平滑筋ないし内皮細胞に分化し血管の修復とリモデリングに関与することが明らかとなった。

## 5 自己評価:

さきがけ研究で提案した「血管病変で増殖する細胞の起源は血中の前駆細胞にある」という仮説を種々の動物実験を用いて証明することができた。この過程で、ポスドクの加藤は動物実験、鷲田は細胞実験、FACSなど、白川は組織学的検討で中心的役割を果たした。この新しい概念はその後世界で広く受け入れられ、研究者の実験を追試する研究が次々と報告されている。このことは、いくつものReview Articleや招待講演を依頼されていることも明らかである。さきがけ研究によって、動脈硬化研究にブレークスルーをもたらすことができた。

## 6 研究総括の見解:

研究は順調に推移している。臨床医学分野に対しても、波及効果の高い成果が挙げられつつある。特に、新しいコンセプトをもたらし、それが認められつつあることは注目に値する。幹細胞の特定方法(マーカー等)のブラッシュアップ、ニッチへの定着メカニズムの解明等を含めて、今後の展開に期待したい。

## 7 主な論文等:

### 論文

1. Sata, M., Saiura, A., Kunisato, A., Tojo, A., Okada, S., Tokuhisa, T., Hirai, H., Makuuchi, M., Hirata,

- Y., Nagai, R.  
Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis.  
*Nature Medicine*. 2002. 8: 403-409.
- 2 . Shindo, T., Manabe, I., Fukushima Y, Tobe, K., Aizawa, K., Miyamoto S, Kawai-Kowase K, Moriyama N, Imai Y, Kawakami H, Nishimatsu H, Ishikawa T, Suzuki T, Morita H, Maemura, K., Sata, M., Hirata, Y., Komukai, M., Kagechika, H., Kadowaki, T., Kurabayashi, M., Nagai, R  
Ruppel-like zinc-finger transcription factor KLF5/BTEB2 is a target for angiotensin II signaling and an essential regulator of cardiovascular remodeling.  
*Nature Medicine*. 2002. 8: 856-863.
- 3 . Sata, M., Nagai, R.  
Phosphatidylinositol 3-kinase. A key regulator of vascular tone?  
*Circ. Res.* 2002. 91: 273-275.
- 4 . Sata, M.  
Circulating vascular progenitor cells contribute to vascular repair, remodeling and lesion formation.  
*Trends Cardiovasc Med*. 2003. 13: 249-253.
- 5 . Tanaka, K., Sata, M., Hirata, Y., Nagai, R.  
Diverse contribution of bone marrow cells to neointimal hyperplasia after mechanical vascular injuries.  
*Circ Res*. 2003. 93: 783-790.
- 6 . Natori, T., Sata, M., Washida, M., Hirata, Y., Nagai, R., Makuuchi, M.  
Nicotine enhances neovascularization and promotes tumor growth.  
*Mol Cells*. 2003. 16: 143-146.
- 7 . Sata, M.  
Molecular strategies to treat vascular diseases; Circulating vascular progenitor cell as a potential target for prophylactic treatment of atherosclerosis.  
*Circ J*. 2003. 67: 983-991.
- 8 . Kumano, K., Chiba, S., Kunisato, A., Sata, M., Saito, T., Nakagami-Yamaguchi, E., Yamaguchi, T., Masuda, S., Shimizu, K., Takahashi, T., Ogawa, S., Hamada, Y., Hirai, H.  
Notch1 but not notch2 is essential for generating hematopoietic stem cells from endothelial cells.  
*Immunity* 2003. 18: 699-711.
- 9 . Sata, M., Nishimatsu, H., Osuga, J.I., Tanaka, K., Ishizaka, N., Ishibashi, S., Hirata, Y., Nagai, R.  
Statins augment collateral growth in response to ischemia but they do not promote cancer and atherosclerosis.  
*Hypertension*. 2004. 43: 1214-1220.
- 10 . Fukuda, D., Sata, M., Tanaka, K., Nagai, R.  
Potent inhibitory effect of sirolimus on circulating vascular progenitor cells.  
*Circulation*. 2005. 111: 926-931.
- 他 14 件

## 受賞

平成 13 年 日本心臓病学会 Young Investigator's Award 最優秀賞

平成 14 年 日本循環器学会八木賞

平成 14 年 The Japanese Vascular Biology Organization Young Investigator's Award

平成 15 年 日本循環器学会佐藤賞

平成 15 年 日本炎症・再生医学会第9回奨励賞

### **招待講演等**

1 . Masataka Sata

“Bone marrow-derived progenitor cells contribute to vascular repair and atherosclerosis.”  
Annual Spring Conference of the Korean Society of Circulation. Cheju, Korea, April 17<sup>th</sup>, 2003.

2 . Masataka Sata

“Bone marrow-derived progenitor cells participate in the pathogenesis of atherosclerosis.” 1<sup>st</sup>  
Euregio-Symposium Workshop on Atherosclerosis-Molecular Basis of an Inflammatory Disease.  
Vaals, Netherlands, September 27<sup>th</sup>, 2003.

3 . Masataka Sata

“Circulating progenitors contribute to vascular repair and remodeling”  
4<sup>th</sup> Taipei vascular molecular biology symposium, Taipei, September 11<sup>th</sup>, 2004.

4 . Masataka Sata

“Potential Roles of Circulating Vascular Progenitor Cells in Progression and Remodeling of  
Atherosclerotic Lesions”  
The 48<sup>th</sup> Annual Scientific Session of Korean Society of Circulation. Seoul, Korea, October 14<sup>th</sup>,  
2004.

## 研究課題別評価

1 研究課題名: 減数分裂期の染色体機能部位におけるプロテインプロファイリング

2 研究者氏名: 篠原 彰

3 研究の狙い:

精子、卵子といった配偶子形成は個体を再生するという点において生命の根幹を成す反応である。配偶子形成において、減数分裂はゲノムを半減する役目を担っている。配偶子は父母由来のゲノムを混ぜ合わせる事で、ゲノムの多様組み合わせのプールを産み出し、進化を進める大きな力になる。相同組換えと呼ばれる DNA 鎖の交換反応が減数分裂期のゲノムの再編を司る。減数分裂期の組換えの欠損は不妊症やダウン症に代表される異数体病を引き起こす。減数分裂期の相同組換えは体細胞分裂期の反応とは異なっている。特に、体細胞分裂期では空間的に“近い”姉妹染色体間で組換えが起こるのに対して、減数分裂期は空間的に“遠い”相同染色体間で起こる事が知られている。このような組換えの特異性は減数分裂期特異的な蛋白質群により産み出されると考えられるが、その詳細は不明な点が多い。特に、DNA 間の相同鎖検索反応には体細胞分裂期型の RecA ホモログ Rad51 に加え、減数分裂期型の Dmc1 が必要であり、その2つの蛋白質の協調的な働きが特異性を産み出すと考えられている。これまでに体細胞分裂期における、Rad51 の DNA への集合反応は詳細に解析されているが、Dmc1 (Rad51 を含む) 複合体の形成経路はほとんど把握されていなかった。減数分裂期組換えに関わる新規因子を同定するために、組換えの部位を精製する系を確立する事、また、酵母のゲノミックスの情報を使い、未知の遺伝子を網羅的に解析する事で、RecA ホモログの機能に関わる新規遺伝子を同定する事を試みる。このような解析を通じて、減数分裂期の組換えの分子機構の解明を目指す。

4 研究成果:

減数分裂期特異的な RecA ホモログ Dmc1 と一緒に働く因子を探すために、酵母の減数分裂期特異的な発現のデータベースあるいは、機能ゲノミックスのデータベースを使い、減数分裂期特異的な RecA ホモログ Dmc1 と発現パターンが同じで、かつ変異株の表現型が似ているものを選び出した。検索の結果、減数分裂期特異的に発現する2つの遺伝子、*MEI5*、*SAE3* が候補として残り、その変異株の詳細な解析を行った。その結果、これらの変異株は減数分裂期に特異的に染色体の特定部位に導入される DNA 2重鎖切断(double-strand breaks; DSB)の修復に欠損を持つ事から、組換えに関与することが明らかになった。さらに、これらの変異株では Rad51 の染色体への結合は正常であるが、Dmc1 の染色体への結合に欠損を持つ事が分かった。クロマチン免疫沈降法により、組換えのホットスポットへの Dmc1 の結合が低下していることも確認出来た。つまり、Mei5, Sae3 蛋白質は減数分裂期特異的な RecA ホモログ Dmc1 を DSB 部位に呼び込む働きを持つと考えられる。Mei5, Sae3 蛋白質共、染色体上で Rad51 や Dmc1 と組換えが起こる時期に共存する。興味深い事に Dmc1 が欠損した変異株では Mei5, Sae3 の染色体の結合が見られない。つまり、Dmc1, Mei5, Sae3 は相互依存的に染色体に結合することが分かり、この3者が複合体として機能する事を強く示唆している。実際に、Dmc1-Mei5, Mei5-Sae3 の間での相互作用が免疫沈降あるいは2-ハイブリッド法で確認出来た。Mei5-Sae3 複合体を精製した所、安定な複合体として精製出来、DNA に強く結合する活性を有している事が分かった。また、ヒトやマウスにおいて、Mei5, Sae3 の相同遺伝子も同定出来た。

5 自己評価:

当初の目的とする減数分裂期の組換えに関わる新規遺伝子の同定と機能解析といった点においては、前述の通り、新規複合体 Mei5-Sae3 を同定し、その解析結果を論文として発表した(Cell,

2004)ことから、目的を達成出来たと言える。一方、この研究の柱の1つである、染色体機能部位の精製法の確立にはもう少しの努力と時間を必要とすると考えている。本研究の大きな特色は博士研究員のような人的支援が受け入れる事が可能な点であるが、研究員の人選の困難さ(短期契約の難しさ)と研究員の出入りが激しかったため、そのシステムを十分に活かされなかった事にも起因しているかもしれない。そういった問題点があったにも関わらず十分な業績を上げ、この分野の研究の進展に多大な貢献をしたと断言出来る。

#### 6 研究総括の見解:

減数分裂の機構解明に一つのブレークスルーをもたらしたことは高く評価したい。この分野の重要性は高まっており、研究はこれからである。今後の展開を期待する。発表論文の質は高い。

#### 7 主な論文等:

##### 論文

1. Shinohara, M., Sakai, K., Shinohara, A. and D. K. Bishop.  
Crossover interference in *Saccharomyces cerevisiae* requires a *TID1/RDH54*- and *DMC1*-dependent pathway.  
**Genetics**, 163, 1273-1286. 2003.
2. Shinohara, M., Sakai, K., Ogawa, T. and A. Shinohara.  
Mitotic DNA damage checkpoint proteins Rad17 and Rad24 promote repair of double-strand breaks during meiosis.  
**Genetics**, 164, 855-865. 2003.
3. Tsukamoto, M., Yamashita, K., Miyazaki, T., Shinohara, M. and A. Shinohara.  
The N-terminal DNA binding domain of Rad52 promotes *RAD51*-independent recombination in *Saccharomyces cerevisiae*.  
**Genetics**, 165, 1703-1715, 2003.
4. Miyazaki T., Bressan, D.A., Shinohara, M., Haber, J.E. and A. Shinohara.  
*In vivo* assembly and disassembly of Rad51 and Rad52 complexes during double-strand break repair.  
**EMBO. J.** 23. 939-949, 2004.
5. Zierhut, C., Berlinger, M., Rupp, C. Shinohara, A. and F. Klein.  
Mnd1 is required for meiotic inter-homolog repair.  
**Current Biology**, 14. 752-762, 2004.
6. Yamashita, K., Shinohara, M. and A. Shinohara.  
Rad6-Bre1-mediated histone H2B ubiquitylation modulates the formation of double-strand breaks during meiosis.  
**Proc. Natl.Acad. Sci. USA.** 101. 11380-11385, 2004.
7. Hayase, A., Takagi, M., Miyazaki, T., Oshiumi, H., Shinohara, M. and A. Shinohara.  
A protein complex containing Mei5 and Sae3 promotes the assembly of the meiosis-specific homolog RecA Dmc1.  
**Cell**, 119. 927-940. 2004.

##### 総説

1. Shinohara, A. and M. Shinohara.  
Roles of RecA homologues Rad51 and Dmc1 during meiotic recombination.  
**Cytogenetics and Genome Research**, 107, 201-207. ,2004.
2. 篠原 彰, 篠原美紀

染色体上での DNA 鎖交換反応-相同組換えの分子メカニズムと細胞機能  
細胞工学 Vol. 22, 278-282, 2003.

□頭発表

国際学会(招待 3件)

国内学会(招待 3件)

## 研究課題別評価

1 研究課題名:小胞体タンパク質品質管理機構に関わる PNGase の構造と機能

2 研究者氏名:鈴木 匡

研究員:村部(川村)麻由 (研究期間:H.14.4.1~H.17.3.31)

3 研究の狙い:

細胞質ペプチド: *N*-グリカナーゼ (PNGase) は小胞体における品質管理機構に関連する分子である。すなわち、機能的な構造が取れない糖タンパク質、あるいは正しいサブユニット構造をとれない糖タンパク質を分解、除去する小胞体関連分解 (ERAD) とよばれる過程に関わっていることが示唆されている。私はこれまで本酵素の活性および遺伝子の同定を行ってきており (Suzuki, T., *et al.* (2000) *J. Cell Biol.* **149**, 1039)、本研究ではその生物学的重要性を特に ERAD との関わりにおいて記述することを目指した。また、PNGase によって遊離される糖鎖がどのように細胞内で分解されるか、その代謝経路の分子基盤の解明とその生理機能にも焦点をあてて実験を行った。

4 研究成果:

(1) 出芽酵母における細胞質 PNGase の複合体の同定と、プロテアソーム分子、ERAD 経路との遺伝学的相互作用

分子の詳細な機能を明らかに手法のひとつとして、その分子と物理的に相互作用する分子を検索、同定することは非常に重要である。我々はこれまでに細胞質 PNGase が Rad23 タンパク質というプロテアソーム結合タンパク質と *in vivo* で複合体を形成することを明らかにした (Suzuki, T., *et al.* (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 21601)。これを受けて、最近 PNGase と Rad23 に別々のタグを導入し、それらのタグを用いて複合体を高度に精製する手法を確立し、この複合体に含まれると思われる新たな分子群を同定した。また、これまで ERAD の基質となることが知られていた植物の毒素タンパク質であるリシンの無毒化変異体を用いて、酵母の *in vivo* の ERAD / PNGase のアッセイ系を確立した。プロテアソーム阻害剤を用いることが出来る哺乳動物細胞とは異なり、出芽酵母ではこれが PNGase の *in vivo* アッセイ系では唯一の例である。このアッセイ系を確立する過程で、プロテアソームの変異株と PNGase の欠損株をあわせ持つ二重変異株において、リシン変異体を大量発現させると細胞が死に至る表現型を見出した。この表現型は上記の3つの条件(プロテアソームの変異、PNGase の欠損と ERAD 基質の大量発現)がそろって初めて観察され、これらの分子・現象の関連性を改めて明確にした。

(2) PNGase の反応によって生じる遊離 N 型糖鎖の代謝機構の解析

ERAD の過程において、プロテアソームによる構造不良のタンパク質分解の機構は良く研究されているものの、PNGase によって遊離された糖鎖の代謝がどのように起こっているかについては未だ不明な点が多い。例えば哺乳動物においては、永年の生化学的研究によって、出芽酵母の系とは対照的に非常に順序だった、洗練された反応機構によって代謝が起こることが予想されている。即ち、PNGase によって遊離された糖鎖は還元末端にジ-*N*-アセチルキトビオース (GlcNAc

1 4GlcNAc) 構造をもつ (Gn2 糖鎖) が、まずその酵素により還元末端の GlcNAc が外れることによって Gn1 型に変換され、更に非還元末端のマンノースの刈り込みが起こったあとで糖鎖がリソソーム内に取り込まれ、単糖まで分解される、という経路である。これらの分子機構は最近まで全く不明なままであった。我々は最近 Gn2 から Gn1 に変換する酵素の分子クローニングに世界に先駆けて成功し (Suzuki, T., *et al.* (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 9691)、更に細胞質のマンノースの刈り込みを担う細胞質マンノシダーゼの遺伝子も従来 ER マンノシダーゼとして取られていた酵素であることを明らかにした。これらのことから、細胞質における遊離高マンノース型 N 型

糖鎖の細胞質における主要な代謝の分子機構の詳細が明らかとなった。

#### 5 自己評価:

留学から帰国後この3年間で2度の研究室のセットアップを経験し、研究が出来ない期間が短からず存在したという点は、研究の推進という面で非常に残念ではあったが、JST の暖かい援助やメンバーの協力を得ながら、一から研究室の立ち上げを行えたことは、何物にも替え難い良い経験になった。また研究については、当初掲げた“PNGase の構造と機能”という壮大なテーマに比べれば、現状はそのいずれも解明の端緒についたに過ぎないが、複合体の解析や ERAD における PNGase の機能解析を行ったことで、一定の成果を残すことが出来た。特に、酵母の酵素欠損株に顕著な表現型が見られないことからその重要性が周囲から疑問視する声も聞かれる中で、細胞質 PNGase の生物学的重要性を示すデータがはじめて酵母の遺伝学的解析によって得られたことは、本酵素の機能解明において非常に大きいブレイクスルーになったと自負している。

またこの研究で得られた新しい成果として、PNGase によって生じる遊離糖鎖の代謝の分子機構の一端を世界に先駆けて明らかにすることが出来た。これらの研究から、“細胞質は糖鎖の代謝場所として重要である”という新しい概念を提唱するに至った。現在の糖鎖代謝研究はリソソーム病関連の研究以外殆ど世界的に行われていないのが現状であるが、これはちょうどタンパク質分解研究においてその研究の中心がリソソーム分解だった 1980 年代前半の状況を想起させる。その後プロテアソームがキラ星のごとく登場し、細胞質におけるタンパク質分解がありとあらゆる生命現象に深く関わることが判明したのは周知の通りである。糖鎖の細胞質代謝がどれほどの生物学的重要性を持つのか、現段階では知る由もないが、このポストゲノムと称される時代に“N 型糖鎖の代謝”という真核細胞にとって基本的と思える生物学的素過程の分子機構はおろか、その存在すら殆ど知られていないということは驚きでもある。今後は細胞質の糖鎖代謝の全容解明にむけて、その存在の証明と関連分子の同定を目指すと共に、その生理機能を - 重要であるか否か、ということを含めて - 明らかにしていきたい。

#### 6 研究総括の見解:

研究環境が必ずしも好適ではなかったにも拘らず、ブレイクスルーと云ってよい成果をあげたことは注目してよい。特に、課題発見型の研究を可能にする新しいコンセプトを提唱する段階にまでこぎつけたことを評価する。今後どのような方向に研究を集約し、展開するのが注目したい。医学分野との連携を実現することにも前向きに取り組んで欲しい。

#### 7 主な論文等:

##### 論文

1. T. Suzuki, H. Park and W. J. Lennarz (2002)  
Cytoplasmic peptide: *N*-glycanase (PNGase) in eukaryotic cells: occurrence, primary structure and potential functions.  
*FASEB J.*, **16**, 635-641.
2. S. Katiyar, T. Suzuki, B. J. Balgobin and W. J. Lennarz (2002)  
Site-directed mutagenesis study of yeast peptide: *N*-glycanase. Insight into the reaction mechanism of deglycosylation.  
*J. Biol. Chem.* **277**, 12953-12959.
3. T. Suzuki, and W. J. Lennarz (2002)  
Glycopeptide export from the endoplasmic reticulum into cytosol is mediated by distinct mechanism from that for export of misfolded glycoprotein.  
*Glycobiology*, **12**, 803-811.
4. T. Suzuki, K. Yano, S. Sugimoto, K. Kitajima, W. J. Lennarz, S. Inoue, Y. Inoue, and Y. Emori

- (2002)  
Endo- $\beta$ -*N*-acetylglucosaminidase, an enzyme involved in the processing of free oligosaccharides in the cytosol.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 9691-9696.
5. T. Suzuki, and W. J. Lennarz (2003)  
Hypothesis: a glycoprotein-degradation complex formed by protein-protein interaction mediated by the PUB/PUG domain.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **302**, 1-5.
6. T. Suzuki, M. A. Kwofie, and W. J. Lennarz (2003)  
Characterization of mouse *Ngly1*, a gene encoding a deglycosylating enzyme implicated in proteasomal degradation; expression, genomic organization and chromosomal mapping.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **304**, 326-3332.
7. M. Chavan, T. Suzuki, M. Rekowicz, and W. J. Lennarz. (2003)  
Genetic, biochemical, and morphological evidence for the involvement of *N*-glycosylation in biosynthesis of the cell wall  $\cdot$ 1,6-glucan of *Saccharomyces cerevisiae*.  
*Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **100**, 15381-15386.
8. T. Suzuki (2004)  
Free *N*-linked oligosaccharide chains: formation and degradation.  
In “**Encyclopedia of Biological Chemistry**” (W J. Lennarz and M. D. Lane, eds.) Academic Press/Elsevier Science.
9. T. Suzuki (2004)  
A simple, sensitive *in vitro* assay for cytoplasmic deglycosylation by peptide:*N*-glycanase (PNGase).  
*Methods*, in press.
10. T. Suzuki (2005)  
Free *N*-linked glycan chains: Formation and Degradation.  
*Biochim. Biophys. Acta* (Review; invited for submission).

和文総説(下記のものを含め、計 11 件)

1. 鈴木 匡  
細胞質 PNGase と小胞体品質管理機構  
わかる実験医学シリーズ「ポストゲノムの糖鎖生物学が分かる」実験医学別冊(羊土社)  
pp103-108. (2002)
2. 鈴木 匡  
小胞体における N 型糖鎖のプロセッシングと糖タンパク質品質管理機構 「糖鎖機能:第3の生命鎖」  
蛋白質核酸酵素 2003 年 6 月号増刊(共立出版)pp967-973. (2003)
3. 鈴木 匡  
細胞質ペプチド:*N*-グリカナーゼの構造と機能  
生化学(日本生化学会)pp1405-1413. (2003)
4. 鈴木 匡  
N 型糖鎖のペプチド:*N*-グリカナーゼ (PNGase) による脱グリコシル化  
日本農芸化学会誌(日本農芸化学会)pp37-38. (2004)
5. 鈴木 匡  
糖タンパク質の品質管理機構

メディカル・サイエンス・ダイジェスト(北隆館/ニューサイエンス社) pp487-490. (2004)

6. 鈴木 匡

細胞質における遊離糖鎖の生成、代謝とその生理機能

遺伝子医学 MOOK「糖鎖と病気」(メディカル ドゥ)印刷中 (2005)

国際学会講演(下記招待講演 4 件を含め、口頭発表 6 件)

1. T. Suzuki, H. Park, S. Katiyar, and W. J. Lennarz.

Cytoplasmic peptide:*N*-glycanase (PNGase) in eukaryotic cells: its structure and potential functions.

*17th International Symposium on Glycoconjugates* at Bangalore (India), January 13, 2003.

2. T. Suzuki

ENGase and PNGase; two cytoplasmic deglycosylating enzyme act on *N*-linked glycan chain.

*William J. Lennarz Symposium* at San Diego, December 7, 2003

3. M. Kawamura, I. Hara, T. Suzuki

A putative glycoprotein-degradation complex that includes cytoplasmic peptide:*N*-glycanase.

*2004 American Society for Biochemistry and Molecular Biology (ASBMB) Annual Meeting* at Boston, June 15, 2004

4. T. Suzuki

Cytosolic free oligosaccharides: formation and cytosolic processing.

*US/Japan Glyco 2004 (Joint meeting of the society for glycobiology and the Japanese society of carbohydrate research)* at Honolulu, November 18, 2004

国内講演 / 発表(下記招待講演 / セミナーを含め、口頭発表 14 件、ポスター発表 2 件)

1. 鈴木 匡

Structure and functions of cytoplasmic peptide:*N*-glycanase.

理化学研究所 2002 年 1 月 24 日

2. 鈴木 匡

Cytoplasmic peptide:*N*-glycanase: proteasomal connection?

東京都臨床医学総合研究所 2002 年 4 月 25 日

3. 鈴木 匡

Cytoplasmic peptide:*N*-glycanase; structure and possible functions.

大阪大学微生物病研究所 2002 年 8 月 27 日

4. 鈴木 匡

プロテアソーム分解系に関わる酵素、PNGase

GlycoTOKYO 2002 シンポジウム(東京)2002 年 11 月 18 日

5. 鈴木 匡

細胞質ペプチド:*N*-グリカナーゼと 26S プロテアソームをつなぐタンパク質、Rad23

第 25 回日本分子生物学会年会(横浜)2002 年 12 月 13 日

6. 鈴木 匡

真核細胞細胞質に存在する N 型糖鎖脱離酵素:PNGase と ENGase

理化学研究所シンポジウム<生体分子の化学>(和光)2003 年 1 月 23 日

7. 鈴木 匡

細胞質ペプチド:*N*-グリカナーゼによる N 型糖鎖の脱離

日本農芸化学会 2003 年度大会、藤沢 2003 年 4 月 3 日

8. 鈴木 匡

細胞質 PNGase: プロテアソーム分解系に関わる脱糖鎖酵素

東京大学 2003 年 5 月 26 日

9. 鈴木 匡

Cytoplasmic 細胞質 PNGase: 構造と機能

日本薬学会東海支部講演会(名古屋)2003 年 9 月 12 日

10. 鈴木 匡

Cytoplasmic deglycosylating enzymes: Why do they exist???

大阪大学 2003 年 11 月 20 日

11. 鈴木 匡

細胞質 PNGase の構造と機能

第 5 回関西グライコサイエンスフォーラム(大阪) 2004 年 5 月 29 日

12. 鈴木 匡

Cytosolic Processing of *N*-glycans: more important than you think?

第 77 回生化学会大会、横浜 2004 年 10 月 15 日

## 研究課題別評価

1 研究課題名: 嗅神経回路の形成と再構築の分子機構

2 研究者氏名: 芹沢 尚

研究員: 黄 科 (研究期間: H14.5.15 ~ H15.11.14)

3 研究の狙い:

哺乳動物では、個々の嗅神経細胞は約 1000 種類ある嗅覚受容体(OR)遺伝子のうち1種類のみを選択的に発現する。一方、同じ種類の OR 遺伝子を発現する嗅神経細胞は嗅球表面上の片側半分に約 1000 個ある中から同じ特定の一つの系球に軸索を収斂させる。従って、どの種類の OR が匂い分子を受容したかという情報を、脳では嗅球表面上のどの組み合わせの系球が発火したかという位置情報(匂いマップ)として捉えている。本研究では、嗅球表面上に匂いマップが形成される際の2つの分子基盤、OR 遺伝子の単一発現制御 と 嗅神経細胞軸索投射のそれぞれの分子メカニズム について、我々が世界に先駆けて開発した YAC (yeast artificial chromosome) トランスジェニックマウスによる OR 遺伝子の発現系を駆使して、遺伝子構造の側からの解明を目指す。

4 研究成果:

### (1) OR 遺伝子のシス制御領域の同定

嗅覚受容体 (OR) 遺伝子発現制御機構の解明を目指し、まず OR 遺伝子の1つである *MOR28* 遺伝子の制御領域の同定を試みた。*MOR28* 嗅覚受容体遺伝子クラスターを、YAC (yeast artificial chromosome) を用いてマウスに導入し、クラスター中の OR 遺伝子の発現を解析した。様々なコンストラクトが含む DNA 領域とその発現パターンの比較により、*MOR28* 遺伝子の上流 40-150kb の領域内に、このクラスターの発現を正に制御するシスエレメントの含まれることが示唆された。このような制御領域は進化的に保存されている事が多いので、*MOR28* クラスターの上流領域の塩基配列をヒトとマウスの間で比較した。その結果、*MOR28* から 75kb のところに約 2kb のホモロジー (H) 領域が検出された。次に、この H 領域が OR 遺伝子の発現制御に必要なかどうかを検定する為、H を欠失させた YAC コンストラクトを作成した。H 領域を欠失させるといずれの OR 遺伝子の発現も見られなくなることが判明した。また、H 領域を含む 2kb の DNA を、それ自体では発現しないコンストラクトの先端に継ぐと、OR トランスジーンが発現が回復した。興味深いことに、H 領域をより近傍に付加すると、先頭に位置する *MOR28* の選択頻度が異常に高まり、それと拮抗する形で、下流の OR 遺伝子が発現する細胞の数が減少した。H の位置を移動させる事によって生じる OR 遺伝子の選択頻度の変化は、H 領域と OR 遺伝子プロモーター間の距離に依存する両者の相互作用の効率の変化を反映したものと考えられる。これらの結果から、H 領域に形成される転写活性化複合体が、一つのプロモーターとしか相互作用出来ないために、クラスター内からは一つの OR 遺伝子しか活性化出来ないと考えた。

### (2) OR 分子による負の制御

マウスでは約 1400 の OR 遺伝子があると言われている。これら遺伝子は約 40 のクラスターをなし、ほぼ全ての染色体に分散している。前節の通り、各クラスターから1つの OR 遺伝子しか発現されない理由として、シス制御領域(H 領域)のクラスター内での共有を考えた。それでは、各嗅神経細胞で別のクラスターから OR 遺伝子の発現が見られないのは何故か。我々は OR 遺伝子の発現産物が、他の OR 遺伝子あるいはクラスターの新たな活性化を阻害するというモデルを考えた。これを検証する為、*MOR28* のコーディング領域を全て欠失した変異型コンストラクトを作成した (*del-MOR28*)。先ず、欠失型 *del-MOR28* をトランスジーンとして導入し、内在性の *MOR28* との

共発現の有無を調べたところ、共発現する細胞が高頻度に観察された。*MOR28* 遺伝子はどのような状況にあろうとも複数の allele を同時発現する事がないので、ここで得られた *del-MOR28* のデータは、コーディング領域の欠失によってその発現の排他性が失われる事を示唆するものである。我々は次に、*del-MOR28*発現細胞における、他の内在性 OR 遺伝子との共発現を検定した。その結果、コントロールとして用いた欠失のない外来性 *MOR28*との共発現は、いずれの OR 遺伝子の場合にも認められなかったが、*del-MOR28*を発現する細胞では、その殆どが、いずれかの内在性 OR 遺伝子を同時発現している事が確認された。これらの結果は、嗅覚受容体遺伝子の単一発現が、発現した OR 分子が残りの OR 遺伝子を新たに活性化することを阻止する負の制御によって保証されていることを示している。

### (3) 単一 OR のセミモノクローナル発現マウス

OR 分子依存的な嗅神経細胞軸索投射の解明に取り組むにあたり、これまで同じ OR 分子を発現する細胞集団(すなわち軸索投射に関して同じ性質を持つ集団)を得ることが困難であることが研究を進める上でのネックとなっていた。我々は *MOR28* クラスターのシス制御領域である H 領域を *MOR28* 遺伝子プロモーター近傍に持ち寄ると *MOR28* 遺伝子の発現頻度が上昇することを見出したが、これを利用し、嗅上皮の 1/4 の領域で 90%以上の嗅神経細胞が *MOR28* 遺伝子を発現するトランスジェニックマウスの作製に成功した。このトランスジーンは *MOR28* 遺伝子の近傍領域 13kb からなるミニジーンに H 領域を付加したもの(*H-MOR28*トランスジーン)である。このマウスでは *MOR28*トランスジーンが他の内在性 OR 遺伝子と相互排他的に発現しており、同じ *MOR28* 分子をセミモノクローナルに発現する細胞集団を簡便に得ることが出来る。このトランスジェニックマウスと内在性 *MOR28* 遺伝子が *EGFP* レポーター遺伝子により標識されたノックインマウスを掛け合わせた上で内在性 *MOR28* 遺伝子発現細胞の投射の様子を観察すると、一つの糸球に収斂することなく *H-MOR28*トランスジーンの導入により出現した複数の糸球に分散して投射していることが判明した。この結果は、*H-MOR28*トランスジーンの導入により出現した *MOR28* 遺伝子のセミモノクローナル嗅神経細胞集団は投射の性質に関してもほぼ均一であると考えられることができる。この単一 OR のセミモノクローナル発現系は今後嗅覚の研究を進める上で強力なツールとなることが期待出来る。実際に、セミモノクローナルな嗅神経細胞集団とヘテロな集団の間で転写産物を比較することで、複数の軸索ガイダンス様分子のクローニングに成功している。

## 5 自己評価:

当初、OR 遺伝子発現制御機構と嗅神経細胞軸索投射機構の解明という2つの大きな目標があった。OR 遺伝子の単一発現機構に関しては、OR 遺伝子が stochastic に1つ選択されて活性化する正の制御と、発現された OR 分子が残りの OR 遺伝子が新たに活性化することを阻止する負の制御によって保証されていることを提唱することが出来た。研究前は全く未解明だった OR 遺伝子発現機構の大枠を世界に先駆けて解明出来たこと、また今後の更なる詳細な解明に向けて方向性を示すことが出来、満足のいく結果を得ることが出来た。一方、嗅神経細胞軸索投射機構に関しては分子機構の解明に至らなかったことは反省すべき点である。現在、stochastic な OR 遺伝子の選択からどの様に嗅神経細胞の投射先が規定されるのかという問題に取り組んでいる。この重要問題を解くにあたり本研究で開発した OR 分子のセミモノクローナル発現系が大きく役立つと確信している。

## 6 研究総括の見解:

対象としている嗅覚分野は競争が激しくなっている。遺伝発現のメカニズムの解明はフエーム領域として把握されるようになった。そうした現時点で、好適な実験系の樹立に成功した本研究の新たな展開を期待する。発表論文数は少ないが質は高い。なお、グループメンバーの統括には十分注意し、工夫していただきたい。ハイランクの研究者への成長の要件である。

## 7 主な論文等:

### 論文・総説

1. Serizawa S, Miyamichi K, Nakatani H, Suzuki M, Saito M, Yoshihara Y, Sakano H.  
Negative feedback regulation ensures the one receptor-one olfactory neuron rule in mouse.  
*Science* 302: 2088-2094, 2003.
2. Nakatani H, Serizawa S, Nakajima M, Imai T, Sakano H.  
Developmental elimination of ectopic projection sites for the transgenic OR gene that has lost zone specificity in the olfactory epithelium.  
*Eur. J. Neurosci.* 18: 2425-2432, 2003.
3. Serizawa S, Miyamichi K, Sakano H.  
One neuron-one receptor rule in the mouse olfactory system.  
*Trends Genet.* 20: 648-653, 2004.
4. 芹沢尚、宮道和成、坂野仁  
マウス嗅覚系における1神経-1受容体ルールを支える分子機構  
細胞工学。23: 460-467, 2004.
5. 芹沢尚、宮道和成、坂野仁  
マウス嗅覚系における1神経-1受容体ルール  
実験医学。22: 860-864, 2004.
6. 芹沢尚、宮道和成、坂野仁  
嗅覚受容体遺伝子の単一発現制御 対立形質排除の実態に迫る  
蛋白質核酸酵素。49: 1403-1412, 2004.

### 招待講演

1. 芹沢尚、宮道和成、坂野仁  
Semi-monoclonal expression of the odorant receptor transgene,  
日本発生物学会第37回大会、名古屋、2004年6月
2. 芹沢尚  
嗅覚受容体の種類が嗅球上の位置に変換されるメカニズム  
第1回 Neuroscience Frontier Research Conference、宮崎、2004年9月
3. 芹沢尚  
嗅覚の仕組みの分子メカニズム  
ISS 産業科学システムズ ブレインセンター セミナー、東京、2005年3月

## 研究課題別評価

1 研究課題名: クロマチンの動的構造変換による遺伝子発現の制御

2 研究者氏名: 中山潤一

研究員: 定家真人(研究期間: H14.4.1. ~ H17.3.31)

3 研究の狙い:

細胞が個体を形作るための多様性を生み出すには、決まった時期に適当な遺伝子をオン、あるいはオフにしてその状態を維持させることが重要になる。この際、DNA の一次配列の変化では説明できない、エピジェネティクスと呼ばれる現象が重要な働きをしていると考えられている。この現象を説明する機構として、DNA 自身のメチル化やクロマチン構造の変化、あるいは短い二本鎖 RNA による転写後の発現抑制などが考えられているが、その詳細な分子メカニズムについては不明な点が多く残されている。本研究では、クロマチン構造に基づくエピジェネティックな遺伝現象が、どのように形成され、またどのように細胞分裂を通じて維持されているのか、その分子メカニズムの理解を目指した。具体的には、高次クロマチン構造という点で高等動物細胞の優れたモデル生物となる分裂酵母を用いて、クロマチンの基本構成単位であるヒストンの修飾の変化と、クロマチン結合蛋白質の動態について詳細な解析を進めることで、代表的な高次クロマチン構造であるヘテロクロマチンの形成・維持機構の解明を目的とした。

4 研究成果:

(1) DNA の複製過程とエピジェネティックな情報の維持

分裂酵母のヘテロクロマチン構造の維持に関わる因子として、研究者はこれまでにヒト HP1 の相同蛋白質 Swi6 と、ヒストン H3-K9 特異的メチル化酵素 Clr4 が重要な働きをしている事を明らかにしていた(Nakayama *et al.*, Cell, 2000; Nakayama *et al.*, Science, 2001)。もしこれらの因子の発現量を、自在に誘導・変化させることができれば、DNA の複製過程におけるクロマチン構造の動態を、分子レベルで解析することが可能になると考え、まずこれらの因子の誘導発現系の構築を試みた。既に報告のある数種類の発現誘導系を応用し、実際に発現の誘導が起きる事を確認することができた。しかし、発現量のコントロールと基底発現の抑制が困難であり、実際に DNA 複製過程とクロマチン構造変換との関連を詳細に解析するためには、さらに厳密な発現量のコントロールをする工夫が必要である事が明らかになった。DNA 複製過程におけるクロマチン情報の伝播機構は、未だ解決されていない重要な問題であるため、現在さらに発現系の改良を継続して進めている。

(2) ヘテロクロマチン構造維持に関わる因子の機能解析

分裂酵母の Swi6 は、進化的に良く保存されたクロモドメインを有しており、このドメインを介してメチル化修飾されたヒストン H3 に結合することで、高次クロマチン構造を形成していると考えられている。しかし分裂酵母に存在する Swi6 以外のクロモドメイン蛋白質が、ヘテロクロマチン構造形成にどのように関わっているのかは不明であった。そこで、遺伝学的な解析からヘテロクロマチンとの関連が示唆されていたクロモドメイン蛋白質、Chp1 と Chp2、について Swi6 との関連を含めてヘテロクロマチン構造形成に関わる機能を調べた。その結果、1) Chp1 と Chp2 は Swi6 と同様にセントロメア、テロメア、接合型遺伝子座 (*mat* 座) に共通して局在すること、2) これらの局在はメチル化酵素 Clr4 に依存していること、3) Chp1 の欠損によってセントロメアの Swi6、Chp2 の局在と H3-K9 メチル化が特異的に減少し、テロメアや *mat* 座には影響しないことが明らかになった。特に Chp1 のセントロメア特異的な表現型に着目し、ヘテロクロマチンの形成過程を調べる実験を行ったところ、Chp1 がヘテロクロマチン構造の確立(establishment)の過程に必須な機能を有しており、

RNAi 因子(Ago1, Dcr1, Rdp1)と機能的な相関を持つことが明らかになった。さらに、確立の過程が不全な Chp1, RNAi 欠損株においても検出される、H3-K9 のメチル化がどのような機構で維持されているか、クロマチン免疫沈降法で詳しく調べた結果、Swi6 と Chp2 が H3-K9 メチル化の維持(maintenance)に重要であり、それぞれが協調的に働いている事が明らかになった。以上の結果から、異なるクロモドメイン蛋白質が、高次クロマチン構造の指標である H3-K9 メチル化修飾の確立と維持という別々の過程に、それぞれ重要な働きをしている事が解明された。さらに、異なるヘテロクロマチン領域において、共通の構造因子が存在しているにも関わらず、Chp1 や RNAi の欠損株で異なる表現型が見られる現象は、各染色体領域間で確立と維持のバランス異なるという機構で説明できるという、新しい考えを提唱することができた(Sadaie *et al.*, EMBO J., 2004)。

一方、ヒストンのメチル化酵素については、進化的に良く保存された SET ドメインを有することが、近年の解析から明らかにされているが、分裂酵母における Clr4 以外の SET ドメイン蛋白質の基質や、その修飾の生物学的な意義についてはほとんど明らかにされていない。Clr4-Swi6 で見られるクロマチン構造変換に関わる関係が、他の SET ドメイン蛋白質にも存在するのか解析を行うことにした。分裂酵母に存在する 11 の SET ドメイン蛋白質を網羅的に遺伝子破壊して、クロマチンの構造変換の指標である表現型を調べたところ、幾つかの SET ドメイン蛋白質の破壊株で、クロマチン構造や染色体の分配の異常に関わる、興味深い表現型が見いだされた。現在これらの SET ドメイン蛋白質の機能について、詳細な解析を継続して進めている。

### (3) ヒト・クロモドメイン蛋白質 MRG15 の機能解析

分裂酵母で明らかにされた知見を、さらに高等動物細胞における現象の理解へと結びつける試みとして、分裂酵母ヒストン修飾酵素の精製過程で見いだされたクロモドメイン蛋白質 Alp13 (Nakayama *et al.*, EMBO J., 2003) のヒトの相同蛋白質であり、腫瘍細胞株の分裂寿命との関連が示唆されていた、MRG15 蛋白質についての機能解析を行った。まずヒト培養細胞中の MRG15 の局在を解析したところ、核内の転写領域へ局在する事が明らかとなり、転写制御に重要な役割を担う蛋白質であることが推測された。さらに、ヒト培養細胞から MRG15 を含む蛋白質複合体を精製したところ、MRG15 がヒストンのアセチル化酵素 Tip60 の酵素複合体と相互作用している事を見いだした。残念ながらこの知見は、他のグループによって先に報告されたが、依然 MRG15 がヒストン修飾の動態に果たす役割は不明であり、そのクロモドメインの役割も含め、引き続き機能解析を継続中である。

### 5 自己評価:

本研究の計画段階では大きく三つの研究課題を掲げて研究を推進した。特にヘテロクロマチン構造の形成に関わる因子の機能解析を目指した研究では、従来考えられていたような、ヒストンのメチル化修飾とそれを認識するクロモドメイン蛋白質 HP1/Swi6 の結合によって一義的に決まる単純な構造ではなく、複数のクロモドメイン蛋白質がそれぞれ確立と維持という別々の機能に関わり、ダイナミックな制御によって形成される構造である事を明らかにできたという点は、非常に重要な研究成果と考えられる。また、クロモドメイン蛋白質 Chp1 が、ヘテロクロマチンの確立という過程で、RNAi 因子と深く関係することを明らかにした点は、現在注目されている RNAi 機構の核内での遺伝子発現調節という観点からも興味深い結果であり、今後より詳細な機能解析へつなげていきたいと考えている。

一方、最初に提案した他の研究課題について、全て順調に展開し研究成果に結びついたかという観点で振り返って考えてみると、計画段階の熟考の不足や研究の進展のさせ方という点で反省すべき点もあるように思われる。しかし、SET ドメイン蛋白質の新規の機能を示唆する実験結果や、徐々に解明されてきたヒト MRG15 蛋白質の機能など、着実に研究成果は蓄積してきており、引き続き解析を進め発展させることで、近い将来それぞれの研究成果を報告できると考えている。

最後に、本研究によって設備も人材も全くのゼロから独立した研究室を立ち上げ、それを主宰するという、実に貴重な経験をすることができた。本研究が現在の研究チームの核になった事は間違いなく、ポストドク参加型の本研究の意義は非常に大きかったと考えられる。今後、本研究で得られた知見をさらに発展させ、クロマチン構造変化とエピジェネティックな遺伝現象の理解を目指して研究を進めたい。

#### 6 研究総括の見解:

今後、エピジェネティック機構解明領域では、その重要性の認識とともに競争も国際レベルで激化しつつある。これまでに注目すべき成果を上げつつあり、ハイランク研究者としての今後の着実な成長が期待できよう。発表論文の数は多くないものの質は高い。

#### 7 主な論文等:

##### 論文

1. Nakagawa, H., Lee, J.-K., Hurwitz, J., Allshire, R.C., Nakayama, J., Grewal, S.I.S., Tanaka, K., and Murakami, Y. (2002)  
Fission yeast CENP-B homologs nucleate centromeric heterochromatin by prompting heterochromatin-specific histone tail modifications.  
*Genes Dev.* 16: 1766-1778.
2. Tamaru, H., Zhang, X., McMillen, D., Singh, P., Nakayama, J., Grewal, S., Allis, D., Cheng, X., and Selker, E.U. (2003)  
Trimethylation of Histone H3 Lysine-9 Associated with Methylated DNA in *Neurospora*.  
*Nature Genet.* 34: 75-79.
3. Nakayama, J., Xiao, G., Noma, K., Malikzay, A., Bjerling, P., Ekwall, K., Kobayashi, R., Grewal, S.I.S. (2003)  
Alp13, an MRG family protein, is a component of fission yeast Clr6 histone deacetylase required for genome integrity.  
*EMBO J.* 22: 2776-2787.
4. Sadaie, M., Iida, T., Urano, T., and Nakayama, J. (2004)  
A chromodomain protein, Chp1, is required for the establishment of heterochromatin in fission yeast.  
*EMBO J.* 303: 3825-3835.

##### 総説・解説

1. 中山潤一  
ヒストンのメチル化修飾によるクロマチン構造の変化  
*細胞工学* 21: 269-273, 2002.
2. 中山潤一  
ヒストンのメチル化とクロマチン構造の変化  
実験医学増刊「ゲノム機能を担う核・染色体のダイナミクス」(花岡文雄・永田恭介編) 20: 82-88, 2002.
3. 中山潤一  
ヒストン修飾酵素  
in「クロマチンと遺伝子機能制御」(堀越正美編, シュプリンガー・フェアラーク東京) p81-90, 2003.
4. 定家真人, 中山潤一  
ヘテロクロマチン化の分子機構

実験医学増刊「エピジェネティクスと遺伝子発現制御」(押村光雄・伊藤敬編)21: 94-100, 2003.

5. 中山潤一  
ヘテロクロマチン-構造形成と維持の分子メカニズム-  
医学のあゆみ 201: 811-816, 2003.
6. 中山潤一  
ヒストン H3 のメチル化によるクロマチン構造の制御  
分子細胞治療 3: 14-20, 2004.

#### 招待講演

国際会議・シンポジウム等 3件  
国内会議・シンポジウム等 8件

#### その他学会発表

海外 2件, 国内 8件

## 研究課題別評価

### 1 研究課題名:染色体分配の制御機構の解明

### 2 研究者氏名:深川 竜郎

研究員:西橋 藍 (研究期間:H13.12.1 ~ H14.6.30)

野上 正弘 (研究期間:H14.1.1 ~ H17.3.31)

堀 哲也 (研究期間:H14.4.1 ~ H17.3.31)

### 3 研究の狙い:

生物が生命を維持するためには、全ゲノム情報を包括する構造体である染色体は安定に保持・増殖されなければならない。正常な細胞では、ほぼ決まった時間周期で染色体の複製と分配が正確に行われる。染色体の複製・分配といった基本的な生体反応に狂いが生じると染色体の異数化、がん化など細胞に対する悪影響が生じる。したがって、染色体複製や分配機構を解明することは、複雑な細胞システムを理解するために不可欠である。細胞周期の S 期で複製された染色体は、M 期では両極から伸びた紡錘体に捕えられ、娘細胞へと分配される。この際、紡錘体が結合する染色体の特殊構造はセントロメアと呼ばれている。染色体分配の制御機構を解明するためには、セントロメアに関する研究は極めて重要であり、本研究では、セントロメアの形成機構を明らかにすることを目的とした。具体的には、哺乳類細胞の数十から数百倍の頻度で相同組換えを起こすニワトリの DT40 細胞の実験系を用いて、以下の 3 課題に取り組んだ。1) DT40 細胞を用いたセントロメアタンパク質の系統的ノックアウト解析 本計画は、さきがけ研究を始める以前から継続的に行ってきた研究である。さきがけ研究においても、各種セントロメアタンパク質のノックアウト解析と表現型解析を通じてセントロメアの形成機構についての知見を得ることを目指した。また、下記の 2) の計画で得られた新規タンパク質のノックアウト解析も行った。2) プロテオミクスおよび DNA データベースを用いた新規セントロメアタンパク質の同定とその機能解析 いくつかのセントロメアタンパク質にタグを融合させたタンパク質を発現させて、免疫沈降を行うことで、セントロメアタンパク質複合体を得ることを目指した。新規のセントロメアタンパク質が同定できれば、1) の計画にあるように、そのタンパク質のノックアウト解析を通じて、セントロメア機能に関して新しい制御機構を明らかにできると考えられる。3) RNAi マシーナリーとセントロメア形成との関連解明 我々は、以前よりヒト染色体をニワトリ細胞へ移行させる技術を確立していた。その手法を用いて分子レベルの詳細な構造が明らかになったヒト染色体由来の人工染色体を保持する DT40 細胞を複数種類樹立している。このうち、ヒト 21 番染色体を保持する DT40 細胞を対象にして、RNAi マシーナリー - に関与する Dicer 遺伝子の条件的ノックアウト細胞を樹立して、Dicer の発現が失われた細胞で、ヒト人工染色体のセントロメア領域からの RNA 転写やセントロメア形成の関わる影響を解析することを目指した。

### 4 研究成果:

#### (1) DT40 細胞を用いたセントロメアタンパク質の系統的ノックアウト解析

さきがけ研究において、我々がノックアウトしたセントロメアタンパク質は、CENP-A、CENP-I、Nuf2、NDC80 (Hec1) と下記の 2) の計画で同定した新規セントロメアタンパク質群である。CENP-A のノックアウト細胞の解析の結果、細胞分裂時期のみならず、間期にも異常が生じることが明らかになった。また、明らかな分配異常が観察された。また、CENP-A 欠損細胞で、CENP-C、-H、-I の局在異常が認められた (論文投稿中)。Nuf2 および Hec1 のノックアウト細胞は、約 450 分の細胞分裂の遅延が起きた後、次の細胞周期に進行することなく死滅した。Nuf2 の欠損した染色体のセントロメアにも CENP-C や CENP-H は存在していた。また、Nuf2 が Mad2 と直接結合することが明らかになったが、ノックアウト細胞で BubR1 の局在異常は認められなかった。Nuf2 および Hec1 の

欠損細胞における細胞分裂遅延は、チェックポイント依存的であるため、BubR1 の活性化がその要因の一つであると考えられた。さらに、京都大学の木村博士の協力を得て、FRAP 実験を行い Nuf2 は間期ではダイナミックな挙動であるが、分裂期では非常に安定した構造をとることが明らかになった (J. Cell Sci., 2003)。CENP-I は、分裂酵母の Mis6 ホモログとして我々が同定、命名したタンパク質である。ロックアウト解析から、CENP-I は、CENP-H と協調して CENP-C の局在に関わることが明らかになった。また、分裂酵母の Mis6 とは異なり、CENP-A の局在には影響を与えなかった (Dev. Cell, 2002)。なお、これまでのロックアウト解析の結果をまとめて、国際雑誌の総説に、現時点のセントロメア形成に関するモデルを発表した (Exp. Cell Res., 2004; Mol. Cell. Biol., 2005)。

## (2) プロテオミクスおよび DNA データベースを用いた新規セントロメアタンパク質の同定とその機能解析

Nuf2-GFP および Hec1-GFP が発現している細胞からシクロース密度勾配遠心法と免疫沈降実験から、複合体を形成すると予想される複数のバンドが得られた。コアの複合体は 4.3S の沈降度であった。LC-MS/MS の質量分析システムを用いてペプチドの配列情報を得た。Km23 と呼ぶ新規タンパク質が得られた。km23 と呼ぶタンパク質がセントロメアに局在することを明らかにした。さらに、Km23 と配列の良く似たもう一つの遺伝子が存在することが分かった。最近、両遺伝子のダブルロックアウト細胞が樹立でき、表現型の解析を開始している。また、CENP-H-GFP および CENP-I-GFP 発現する細胞を用いてプロテオミクス解析を行い、5 種類の新規セントロメアタンパク質を同定できた。CENP-H ロックアウト細胞において、それら新規タンパク質のセントロメア局在は失われた (論文準備中)。

## (3) RNAi マシーナリーとセントロメア形成との関連解明

我々は、ヒト染色体由来の人工染色体をニワトリ細胞へ移行する技術を確立して各種ヒト染色体を保持する DT40 細胞を樹立している (EMBO J., 2002)。そのうちヒト 21 番染色体を保持する DT40 細胞を対象にして、RNAi マシーナリー - に関与する Dicer 遺伝子の条件的ロックアウト細胞を樹立した。Dicer の発現が失われた細胞では、DT40 細胞に保持されたヒト染色体の反復配列からの転写が確認された。表現型を解析した結果、Dicer の発現が失われた細胞では、姉妹染色分体の接着に異常が起こることが判明した。また、ヘテロクロマチンタンパク質 HP1 が過剰発現してその局在が変化していた。CENP-A や -C などのセントロメアタンパク質に異常は起きていなかった。これらの結果は、高等脊椎動物においても、RNAi マシーナリーがヘテロクロマチンの形成に関わっていることを示唆している (Nature Cell Biol., 2004)。

## 5 自己評価:

ゲノムの一次配列が決定されたポストゲノム時代には、ゲノム情報そのものが如何にして次世代細胞へ伝えられるかを研究することが極めて重要になると考えられる。そこで、我々はゲノム分配機構の視点から高等動物のセントロメア形成機構の研究に取り組んだ。はじめに、逆遺伝学的手法を用いてセントロメアに局在する複数のセントロメアタンパク質のロックアウト細胞のコレクションを作ることを試みた。一見、単純な研究のように見えるが、高等動物のセントロメアを理解するためには欠かせないステップであり、ロックアウト細胞という研究材料は関連研究者によって共有できる財産になる。さきかけ研究を開始する前から取り組んでいた計画であるが、さきかけ研究の間にも着実な成果を挙げたと評価できる。さらに、プロテオミクスの手法で新規セントロメアタンパク質の同定も試みた。研究開始当初は、ニワトリゲノムの配列が未決定であったこととタンパク質の精製技術が未熟であったため進行が遅れた。しかしながら、2004 年に入り技術の向上とニワトリのゲノム配列が大量に決定されたことに伴い、複数種類の新規セントロメアタンパク質を同定できた。これらの機能解析は大変興味深く今後、力をいれて解析を急ぐ予定である。最後に、ヒト染

色体を保有するニワトリ細胞を用いて RNAi マシーナリーと染色体分配の関係を解析した。分裂酵母を対象として RNAi マシーナリーとセントロメアヘテロクロマチンとの関連は指摘されていたが、技術的な困難さから高等動物の実験系では研究が遅れていた。それを、我々独自の系で解析できた点は、大きな収穫であったと考えている。プロジェクト全体としては、複数の計画を同時進行で進めることを試みた。これはポストドク参加型のプロジェクトではじめて可能になる試みであり、多くに点を学んだ。個々の解析での反省点は多々あるが、全体的には、グループ研究という利点を用いての研究推進により、個人研究以上の成果は挙げたと信じている。

#### 6 研究総括の見解:

セントロメアを中心とする視座からの挑戦であり、ポストゲノム期に入った現在、本研究領域での競争は激しくなりつつある。その中で、着実に成果を上げてきたことを評価したい。今後の展開に注目している。

#### 7 主な論文等:

##### 論文・総説

- 1 . Yoshikazu Mikami, Tetsuya Hori, Hiroshi Kimura, and Tatsuo Fukagawa  
"Functional region of CENP-H interacts with Nuf2 complex, which functions as a connector between the inner and outer kinetochores."  
Molecular and Cellular Biology in press (2005)
- 2 . Tomoko Motohashi, Tsukasa Shimojima, Tatsuo Fukagawa,  
Katsumi Maenaka, and Enoch Y. Park .  
"Efficient large-scale protein production of larvae and pupae of silkworm by Bombyx mori nuclear polyhedrosis virus bacmid system."  
Biochemical and Biophysical Research Communications Vol. 326, 564-569 (2005)
- 3 . Tatsuo Fukagawa, Masahiro Nogami, Mitsuko Yoshikawa, Masashi Ikeno, Tuneko Okazaki, Yasunari Takami, Tatsuo Nakayama, and Mituso Oshimura  
"Dicer is essential for formation of the heterochromatin structure in vertebrate cells."  
Nature Cell Biology Vol. 6, 784-791 & Cover (2004)
- 4 . Tatsuo Fukagawa  
"Centromere DNA, proteins and kinetochore assembly in vertebrate cells."  
Chromosome Research Vol. 12, 557-567 (2004)
- 5 . Tatsuo Fukagawa  
"Assembly of kinetochores in vertebrate cells."  
Experimental Cell Research Vol. 296, 21-27 (2004)
- 6 . V. Regnier, J. Novelli, T. Fukagawa, P. Vagnarelli, W. Brown  
"Characterization of chicken CENP-A and comparative sequence analysis of vertebrate centromere-specific histone H3-like proteins."  
Gene Vol. 316, 39-46 (2003)
- 6 . Tetsuya Hori, Tokuko Haraguchi, Yasushi Hiraoka, Hiroshi Kimura, and Tatsuo Fukagawa  
"Dynamic behavior of Nuf2-Hec1 complex that localizes to the centrosome and centromere and is essential for mitotic progression in vertebrate cells."  
Journal of Cell Science Vol. 116, 3347-3362 (2003)
- 7 . Jenny M. Spence, Ricky Critcher, Tom A. Ebersole, Manuel Valdivia, William C. Eranshaw, Tatsuo Fukagawa, and Christine J. Farr  
"Co-localisation of Centromere Activity, Proteins and a Topoisomerase II within a subdomain of the major human X -satellite array. "

- The EMBO Journal Vol. 21, 5269-5280 (2002)
8. Tomoko Hayashi, Masayuki Seki, Daisuke Maeda, Wensheng Wang, Yoh-ichi Kawabe, Takahiko Seki, Hisato Saitoh, Tatsuo Fukagawa, Hideki Yagi, and Takemi Enomoto "Ubc9 is essential for viability of higher eukaryotic cells." Experimental Cell Research Vol. 280, 212-221 (2002)
  10. Mizuki Ohno, Tatsuo Fukagawa, Jeremy S. Lee, and Toshimichi Ikemura "Triplex-forming DNAs in the human interphase nucleus visualized in situ by polypurine/polypyrimidine DNA probes and antitriplex antibodies." Chromosoma Vol. 111, 201-213 (2002)
  11. Ai Nishihashi, Tokuko Haraguchi, Yasushi Hiraoka, Toshimichi Ikemura, Vinciane Regnier, Helen Dodson, William C. Earnshaw, and Tatsuo Fukagawa "CENP-I is essential for centromere function in vertebrate cells." Developmental Cell Vol. 2, 463-476 (2002)
  12. 深川 竜郎  
「高等脊椎動物のセントロメアタンパク質の集合と機能発現」  
細胞核のダイナミクス (竹安邦夫 / 米田悦啓編シュプリンガー・フェアラーク東京) (2004) pp149-158.
  13. 深川 竜郎  
「染色体構造と機能に関わるエピジェネティクス」  
わかる実験医学シリーズ「注目のエピジェネティクスがわかる」押村光雄編 (2004) 80-87.
  14. 深川 竜郎  
「高等脊椎動物のセントロメア構築と機能発現」  
医学のあゆみ (2004) Vol. 208, 793-798.
  15. 深川 竜郎  
「セントロメア特異的なクロマチン構造」  
生体の科学(2003) Vol. 54, 179-184.
  16. 深川 竜郎  
「染色体分配に必須な構造: 動原体」  
細胞工学(2003) Vol. 22, 267-271.
  17. 深川 竜郎  
「動物細胞の M 期での動態の可視化」  
遺伝子医学 (2003) Vol. 7, 96-100.

#### 受賞

平成 14 年 日本遺伝学会奨励賞受賞

#### 招待講演

1. 深川 竜郎, 堀哲也, 野上正弘, 三上剛和, 岡田聖裕  
「ゲノム安定性を保障するセントロメアの機能構築」  
ワークショップ「染色体ダイナミクスとゲノム維持」日本分子生物学会, 神戸, 2004 年 12 月
2. Tatsuo Fukagawa  
"Formation of kinetochores and heterochromatin structures in vertebrate cells."  
The 21st Radiation Biology Center International Symposium, Kyoto, October (2004).
3. Tatsuo Fukagawa  
"Formation of kinetochores and heterochromatin structures in vertebrate cells."  
The 15th International Chromosome Conference, London, September (2004).

4. 深川竜郎  
「高等動物染色体セントロメアの機能構築」  
シンポジウム「細胞核のアイデンティティー」日本分子生物学会、神戸、2003年12月
5. Tatsuo Fukagawa  
“Functional Analysis of the Centromere Protein Complex.”  
The 9th Japanese-Germany Workshop on Carcinogenesis, Essen, Germany, Sep. (2003).
6. 深川竜郎  
「高等動物染色体セントロメア領域のクロマチン収納メカニズム」  
シンポジウム「クロマチン機能の基本相：遺伝情報の収納／とりだし／廃棄の分子メカニズム」  
日本分子生物学会、横浜、2002年12月.
7. 深川竜郎  
「ゲノム安定性を保証する分子機構ー特にセントロメアを中心として」  
シンポジウム「ゲノムダイナミクスと発がん」日本がん学会、東京、2002年10月.
8. 深川竜郎  
「DT40細胞を用いた染色体分配の研究」  
哺乳動物遺伝学研究会、千歳、2002年6月.
9. 深川竜郎  
「DT40細胞を用いたセントロメア・クロマチンの解析」  
ワークショップ「クロマチン編成・再編成の生物機能」、日本細胞生物学会、横浜、2002年5月.

口頭発表

Tatsuo Fukagawa

Kinetochore assembly and formation of heterochromatin structures in vertebrate cells. CSHL meeting on Dynamic organization of nuclear function, Cold Spring Harbor, New York, October, 2004.

他 20件

## 研究課題別評価

1 研究課題名: 網膜光受容体細胞の運命決定機構と再生

2 研究者氏名: 古川 貴久

3 研究の狙い:

網膜視細胞(光受容体細胞)は哺乳類において唯一の光センサーであり、昔より生理学的、生化学的、解剖学的、および臨床眼科学的に盛んに研究されてきた。しかし驚くべきことに、その分化発生機構は全くといっていい程不明であった。また、網膜視細胞の異常に起因する病気であるヒト遺伝的網膜変性症の患者は全世界に約400万人いるが、根本的な治療法は存在しない。失明あるいは重篤な視力障害もたらず網膜変性症の原因解明と治療は待ち望まれている。また網膜色素変性症のみならず糖尿病性網膜症、黄斑部変性症などの多くの網膜疾患で網膜視細胞が変性あるいは障害されるので、網膜視細胞の再生や新生を可能にするためにその発生・分化の分子機構の解明は非常に重要である。したがって網膜視細胞の分化機構を明らかにすることは神経発生のモデルとしてだけでなく臨床医学的にも極めて重要である。網膜視細胞の運命決定機構の解明を目指して2つのプロジェクトの展開を目指した。

### [Crx の発現制御機構の解明]

Crx は分化しつつある網膜視細胞特異的にもっとも早い時期から発現する特異的のマーカで、Crx の発現を開始する機構を明らかにすることが、網膜視細胞の分子機構を明らかにする最短経路であると考えられる。

### [錐体の発生分化にかかわる遺伝子の単離]

脊椎動物の網膜視細胞は杆体と錐体の2種類から構成される。杆体は薄暗い所での視覚を担当し、錐体は昼間視と色覚を担当する。ヒトの視覚の主役は錐体であり、先進国において大きな失明原因のひとつとなっている黄斑部変性症などで主に障害されるのはこの錐体である。その重要性にもかかわらず、錐体の数が光受容体細胞数全体の約5%と少なく、また錐体の発生は網膜形成直後の早い時期におこることから、その発生分化のメカニズムはほとんど解明されてこなかった。錐体の発生分化に重要な役割を果たす遺伝子の単離を試みた。

4 研究成果:

我々は以前より網膜視細胞の発生機構を明らかにすべく研究してきた。以前の研究において、我々は網膜視細胞と松果体に特異的に発現する転写因子 *Crx* を単離し、いくつかの網膜変性疾患の原因遺伝子であることを明らかにした。その後、ノックアウトマウスの解析により、*Crx* が視細胞における光受容反応および松果体におけるメラトニン合成に重要であることを示した。しかしながら、*Crx* のホモ接合ノックアウトマウスにおいても視細胞の初期発生がみられることから、*Crx* と機能的に重複する遺伝子の存在が示唆されていた。そこで今回、*Crx*と同じ *Otx*ファミリーに属し、網膜における発現が報告されている *Otx2* に注目した。*Otx2* はショウジョウバエの遺伝子 *orthodenticle* の哺乳類におけるホモログとしてクローニングされ、前脳、中脳、松果体、神経網膜、網膜色素上皮といった組織における発現が報告されている。我々は今回の研究において、視細胞が網膜幹細胞から分化する際の最初の鍵を握る遺伝子が *Otx2*であることを明らかにした。

まず、*in situ* hybridization により *Otx2*の時間的、空間的発現パターンを *Crx*と比較した。*Otx2*の神経網膜における発現は *Crx*よりもやや先行して発生過程の視細胞にみられ、胎生期網膜では *Crx*の発現パターンに類似していたが、生後網膜では視細胞での発現がほとんどみられなくなった。次に、*Otx2*の網膜視細胞発生における役割を調べるために、コンディショナルノックアウトマ

ウスを解析した。*Otx2* のホモ接合ノックアウトマウスは胎生致死であるので、*Crx* プロモーターの制御下に網膜視細胞および松果体において特異的に *Otx2* の発現が消失するようなコンディショナルノックアウトマウスを作成した。*Otx2* コンディショナルノックアウトマウスでは、網膜視細胞の発生はみられず、網膜神経細胞の一種であるアマクリン細胞が著明に増加していた。これは、本来であれば網膜視細胞に分化すべき細胞が、*Otx2* の機能消失により、アマクリン細胞へと細胞運命を転換したことによると考えられる。また、松果体は完全に欠損していた。*Otx2* コンディショナルノックアウトマウスの網膜における各種転写因子の発現を調べたところ、*Crx* の発現が著しく低下していた。また、レトロウイルスベクターを用いてラットの網膜未分化前駆細胞に *Otx2* を強制発現させるとアマクリン細胞、双極細胞、ミュラー細胞への分化が抑制され、視細胞への分化が促進されることが明らかになった。さらに、*Crx* のプロモーター領域を用いてルシフェラーゼアッセイを行い、*Otx2* が *Crx* プロモーター上の OTX 結合部位を介して *Crx* の発現を制御することを示唆するデータが得られた。これらの結果から、*Otx2* は網膜視細胞の運命決定に必要な十分であり、また *Crx* の上流遺伝子として働くことが示された。

今回の研究で、*Otx2* が網膜視細胞および松果体の初期発生を制御する最上流に位置する遺伝子であることが明らかになった。今後、網膜幹細胞や神経幹細胞に *Otx2* を導入することにより、視細胞への分化誘導が可能になることが期待される。今回の研究は、現在の医学では治療の方法がない難治性網膜疾患の治療につながる研究であると考えられる。

## 5 自己評価:

我々は網膜視細胞特異的なノックアウトマウスの系を開発した。この系を用いて、網膜視細胞の運命決定の鍵となる遺伝子が *Otx2* であること、さらに *Otx2* は網膜幹細胞を視細胞に誘導できるマスター遺伝子としての機能を持つことを明らかにした。以前の一連の *Crx* 関係の仕事と合わせ、視細胞の分化の経路の主要な部分は解明できたのではないかと思う。実際、2004年12月のハーバード大学医学部での招待講演の講演者紹介で、「Takahisa のここ数年の努力によって、以前はほとんど分かっていなかった網膜視細胞の発生の主要な点はだいたい解明されたと言って過言ではないだろう」とのコメントを頂いた。現在は、マスター遺伝子の *Otx2* の発現がどのような機序で視細胞において活性化されるのかを解明すべく、研究を継続している。この点が解明できれば、視細胞の運命決定と分化を最終的に解明できるだけでなく、ニューロンの分化一般の理解に大きくつながるのではないかと期待している。また、我々が論文に報告し特許も申請している、*Otx2* の視細胞分化誘導能をもとにした応用が既に報告されはじめている。例えば、毛様体に存在するヒトの網膜幹細胞を *Otx2* によって視細胞へ効率よく誘導できた結果が報告された。今後の網膜疾患の *Otx2* を用いた移植再生治療の発展を期待したい。

一方、錐体細胞の分化の解明に関しては大きな進展を得ることはできなかった。マーキングされた少数の錐体を生体の網膜から FACS ソーティングにより単離し、桿体との遺伝子発現を比較解析するという手法であったが、少数の細胞からの材料を用いた解析は、テクニカルに予想以上にチャレンジングであった。現在は担当の研究員を交代し、研究を継続している。是非、少数の細胞からの遺伝子比較解析の技術を確立して、他の様々な系の解析にも応用したいと考えている。

また、我々は網膜視細胞特異的なノックアウトマウスの系を活かして、様々な重要な遺伝子の機能の生体レベルでの解析も行っている。ニューロンは明確な細胞極性を持っており、その極性形成のメカニズムの解明は神経科学の重要なテーマのひとつである。最近、我々は、網膜視細胞特異的なノックアウトマウスの系を用いて視細胞という極性をもったニューロンのメカニズムの一端を生体レベルで明らかにした(論文投稿中)。この研究をはじめとして、新しい網膜特異的遺伝子の同定と解析など、いくつかの研究の結果がまとめ、PRESTO の成果として投稿中である。これは、グループメンバーがいたからこそ成し遂げられた事であると確信しており、ポストドク参加型のプロジェクトであることの大きな利点だと感謝したい。3年間という期間は短かったが、そこでの「成果」だけでなく、得られた「種」をもとにさらに研究を進展させていくつもりである。

## 6 研究総括の見解:

本研究領域を対象としている研究者は多い。その中であって着実に成果をあげてきていることを評価する。細胞の運命決定と分化メカニズムの解明という基本課題の解決にどのように焦点をしばって迫っていくか。視細胞系という特徴ある実験系に取り組んでいるだけに、今後は期待する。

## 7 主な論文等:

1. Nishida, A., Furukawa, A., Koike, C., Tano, Y., Aizawa, S., Matsuo, I., Furukawa, T.  
*Otx2* homeobox gene controls retinal photoreceptor cell fate and pineal gland development.  
Nature Neuroscience, 6: 1255-1263
2. Morrow, E.M., Furukawa, T., Raviola, E., Cepko, C.L.  
Synaptogenesis and outer segment formation are perturbed in the neural retina.  
BMC Neuroscience, in press (2005)
3. Koike, C., Nishida, A., Akimoto, K., Ohno, S., Furukawa, T.  
aPKC is for polarity formation in retinal photoreceptor cells and total retinal lamination *in vivo*. (submitted)
4. Terada, K., Kitayama, A., Kanamoto, T., Ueno, N., Furukawa, T.  
Nucleosome regulator HMGB3 controls retinal proliferation as a novel downstream target of *Xenopus rax/XRx1*. (submitted)
5. Inoue, T., Terada, K., Furukawa, A., Tamaki, Y., Araie, M., Furukawa, T.  
Cloning and characterization of mr-s, a novel SAM-domain protein, predominantly expressed photoreceptor cells. (submitted)
6. Kanamoto, T., Terada, K., Yoshikawa, H., Furukawa, T.  
Cloning and expression pattern of *lhx3*, a novel chick homeobox gene. (submitted)
7. Nishida, A., Furukawa, A., Tano, Y., Aizawa, S., Matsuo, I., Furukawa, T.  
Redundant roles of *Otx2* and *Crx* homeobox genes in retinal photoreceptor and bipolar cell development. (submitted)

## 総説

1. 古川晶子、古川貴久(2003)  
「網膜視細胞の発生、維持を制御する転写因子 *Crx*」  
「眼科診療プラクティス」(文光堂)Vol.6
2. 井上達也、西田明弘、古川貴久(2004)  
「網膜視細胞の分化機構」  
「蛋白質 核酸 酵素」(共立出版)Vol.49 1413-1420
3. 西田明弘、古川貴久(2004)  
「網膜視細胞の運命を決定する遺伝子は *Otx2* であった」(2004)  
「細胞工学」(秀潤社)Vol.23 204-205
4. 古川晶子、古川貴久(2004)  
「網膜の再生医学-遺伝子治療、移植・再生治療、人工網膜について」  
「ケミカル・エンジニアリング」(化学工業社)Vol.49 453-456

## 特許

発明の名称: *Otx2* 遺伝子を用いた網膜視細胞の再生と新生  
発明者: 古川貴久

出願番号: 特願 2003-026353

出願日: 平成 15 年 2 月 3 日

出願国: 日本

#### 招待講演

##### 海外

- 1 . Harvard Medical School, Massachusetts Eye and Ear Infirmary (平成 16 年 12 月)
- 2 . Gordon Research Conference (Pineal Cell Biology) (平成 16 年 8 月)
- 3 . Max-Planck Institute at Berlin (平成 16 年 8 月)

国内 9 件

#### 学会発表

海外 4 件

国内 9 件

## 研究課題別評価

1 研究課題名: Rho 類似 G 蛋白質の神経回路網形成に果たす役割

2 研究者氏名: 星野 幹雄

研究員: 松尾 直毅(研究期間; H14.4.1 ~ H15.3.31)

川内 健史(研究期間; H16.4.1 ~ H16.6.15)

3 研究の狙い:

神経細胞移動は、その異常によっててんかん、精神遅滞などがもたらされることから、重要な発生過程であると考えられるが、様々な研究がなされてきたにも関わらずその個体レベルでの分子機構については未だに良くわかっていない。我々は、神経細胞移動に関わる未同定の重要な分子、あるいは分子カスケードがまだ数多くあるだろうと推測した。特に、神経細胞移動過程では細胞形態のダイナミックな変化があることが知られており、それ故、細胞骨格系を制御する Rho 類似 G 蛋白質が、神経細胞移動時の振る舞いを決定する分子スイッチとして中心的な働きをしているのではないかと考えた。Rho 類似 G 蛋白質の単純なロックアウト動物は早い発生過程で致死となることから、我々は子宮内エレクトロポレーション法を応用することによって、Rho 類似 G 蛋白質が神経回路網形成に果たす役割について個体レベルで明らかにしていくことを目指した。

4 研究成果:

(1) 神経細胞移動の分子機構の理解

子宮内エレクトロポレーション法を用いて STEF/Tiam1 および Rac1 に対するドミナントネガティブ体 (DN-STEF/Tiam1・DN-Rac1) を発生期の脳皮質 (胎生 14 日) に導入する実験を行ったところ、DN-STEF/Tiam1 もしくは DN-Rac1 を発現させた細胞は皮質板まで移動することができず、中間帯にとどまることが観察された。さらに、DN-STEF/Tiam1 を導入した脳皮質の表現型は、DN-Rac1 を導入した場合と比較して神経細胞移動の異常がマイルドであったことから、この過程に関わる Rac1 活性化因子は STEF および Tiam1 以外にも存在することが示唆された。実際、我々は別の Rac1 特異的 GEF である P-Rex1 も神経細胞移動に関与するという結果を得た。P-Rex1 は EGF や NGF に応答して活性化する GEF であることを我々は見いだしており、また EGFR は神経細胞移動に関与しているという過去の知見を考え合わせると、EGF などの外部シグナルによって移動神経細胞で P-Rex1 が活性化し、さらに Rac1 経路が活性化しているのかもしれない (J. Neurosci, in revision)。

DN-Rac1 導入細胞では、特異的に JNK の活性化が阻害されていたことから、脳皮質の移動神経細胞において Rac1 の下流で JNK が活性化していることが示された。さらには、脳皮質への DN-JNK の導入実験や脳皮質スライス培養系に JNK 阻害剤を添加する実験などで、やはり神経細胞移動が阻害されたことから、JNK も脳皮質の放射状神経細胞移動に関与していることが示された。我々はさらに脳皮質の初代培養系に対して JNK 活性阻害剤を加えると、神経突起での微小管の安定性が低下することを明らかにし、その際には MAP1B のリン酸化が大きく阻害されることを見いだした。脳皮質における DN-JNK 発現細胞の先導突起が異常な形態を示すことを考え合わせると、Rac1 は JNK-MAP1B 経路を介して微小管動態を制御し、先導突起の形態・動態を適切に調節することにより神経細胞移動に関与していると考えられた (EMBO J. 2003)。核へのシグナルを伝えると考えられてきた JNK が微小管の安定性を制御し、神経細胞移動に関与しているというこれらの結果は我々が報告した当時としては非常に意外なものであったが、我々の報告 (EMBO J., 2003) と全く同時期に Huang らによって JNK がケラトサイトなどのいくつかの培養細胞の移動にも関与していることが報告され、その後、いくつかのグループの研究により JNK が広範囲の細胞種において移動を制御していることが最近では明らかとなって来ている。

## (2)小脳無形成マウス *cerebellless* の解析

我々はあるトランスジェニックマウス作製の過程で、成体において、小脳皮質の全ての領域を欠失し、よろめく、頻繁に転倒するなどの小脳失調性症状を示す、新たな突然変異マウス *cerebellless (cbl)* を得た。このマウスの小脳原基では全ての発生過程を通じて、プルキンエ細胞、ゴルジ細胞、籠細胞、星状細胞、小型小脳核細胞などの GABA 作動性の抑制性神経細胞が全く誕生してこないが、大型小脳核細胞や顆粒細胞などのグルタミン酸作動性の興奮性神経細胞は誕生してくることがわかった。発生が進むにつれて、顆粒細胞は二次的に消失していくが小脳核細胞は成体まで残る。また、少なくとも胚発生の段階では、小脳原基以外の中枢神経系においては異常が認められていない。以上から、この *cbl* ミュータントでは小脳原基脳室帯からの GABA 作動性神経細胞の発生に関与する遺伝子に異常があると考えられたため、連鎖解析によりその原因遺伝子 *Ptf1a* をクローニングした。*Ptf1a* は、膵臓の発生に必須な bHLH 転写因子をコードしている遺伝子であった。*in situ* ハイブリダイゼーションにより、*Ptf1a* 遺伝子が小脳原基の脳室帯のみ発現していることが明らかになった。*Ptf1a* locus に Cre リコンビナーゼをノックインしたマウスを手に入れたので、*ROSA26-loxP-lacZ* マウスとの交配によって、*Ptf1a* 遺伝子が発現していた細胞の lineage trace が可能となった。これをノックインのヘテロ接合体バックグラウンド(正常な表現型を示す)で解析を行ったところ、小脳における全ての GABA 作動性細胞では陽性であったが、グルタミン酸作動性である大型小脳核細胞では陰性であった。すなわち *Ptf1a* 遺伝子は、小脳の脳室帯の神経前駆体細胞の中でも、将来 GABA 作動性神経細胞を生み出す細胞でのみ発現しているということが明らかになった。さらに、子宮内エレクトロポレーション法により、胎生 14 日目のマウスの大脳皮質の脳室帯に *Ptf1a* 発現ベクターを導入し、数日後に遺伝子導入された細胞について調べた。マウスでは大脳皮質脳室帯からはグルタミン酸作動性の興奮性神経細胞しか生まれないとされており、実際にコントロール実験においてはそれが再確認されたが、*Ptf1a* を導入された細胞は GABA 陽性となっていた。コントロールのグルタミン酸作動性細胞が放射状細胞移動をするのに対して、それらの GABA 陽性細胞は接線方向の移動様式を示すことも明らかになった。これは、グルタミン酸作動性神経細胞のみを生み出す神経前駆細胞でこの遺伝子を発現させると、そこから生み出される神経細胞に GABA 作動性細胞の様々な形質を付与させることができることを示している。以上の結果から、*Ptf1a* が小脳の脳室帯の GABA 作動性神経細胞を生み出す神経前駆細胞で発現し、そこから生み出される細胞が GABA 作動性神経細胞の形質を獲得するのに必要な働きをしていることを示しているということが明らかになった (Neuron, in revision)。

## 5 自己評価:

当初は、子宮内エレクトロポレーション法の他に、コンディショナルターゲティングも併用して、Rho 類似 G 蛋白質の役割を調べる予定であった。しかし、そのマウスを作製している途中で、国内外で Rac のコンディショナルノックアウトマウスが作製されたという情報を得た事と、我々のドミナントネガティブ体の子宮内エレクトロポレーション実験が予想以上にうまく働いたことから、研究期間後半からは子宮内エレクトロポレーション法による解析に集中した。結果として、コンディショナルノックアウトマウスの作製に時間を取られなかったために、Rac1 の働きだけでなく、その上流因子(神経栄養因子-P-Rex1/STEF/Tiam1)および下流因子(JNK-MAP1B-微小管)の果たす役割にも切り込んで、神経細胞移動に関わる新たなシグナル伝達カスケードを提唱できたことは良かったと考えている。また、これまで神経細胞移動に関与すると考えられてきた分子は核の移動に関与するものが多かったが、先導突起の形成に関わる分子はほとんど明らかになってはいなかった。これはおそらくは先導突起の形成に関与する分子が Rac1 や JNK のように神経系以外の細胞において様々な細胞現象で重要な役割を果たしているために、神経細胞移動における機能については従来の遺伝学的な手法では解析できなかったためであろうと考えられる。その部分に貢献できたことも成果の一つであると考えている。

しかし、未だに神経細胞移動の分子機構の全貌は明らかになってはいない。今後も個体レベルでの研究にこだわって、その全体像を明らかにしていくことを目指す。

#### 6 研究総括の見解:

試行錯誤的な状況が続いていたが、漸く独自の優れた実験系を立ち上げることに成功し、注目すべき成果が上がり始めた。こうした成長経過は、PRESTOによる若手育成の一つのモデルであって参考になり、注目してよい。今後の成果を見守りたい。それを十分に期待し得るだけの素質が現れてきている。

#### 7 主な論文等:

##### (1) 論文・総説

1. Masato Yoshizawa, Mikio Hoshino, Masaki Sone and Yo-ichi Nabeshima  
Expression of stef, an activator of Rac1, correlates with the stages of neuronal morphological development in the mouse brain.  
Mech. Dev., 113, 65-68 (2002).
2. Naoki Matsuo, Mikio Hoshino, Masato Yoshizawa, and Yo-ichi Nabeshima  
Characterization of STEF, a guanine nucleotide exchange factor for Rac1, required for neurite growth.  
J. Biol. Chem. 277, 2860-2868 (2002)
3. Masato Yoshizawa, Masaki Sone, Naoki Matsuo, Takahiro Nagase, Osamu Ohara, Yo-ichi Nabeshima, and Mikio Hoshino  
Dynamic and coordinated expression profiles of Dbl-family guanine nucleotide exchange factors in the developing mouse brain.  
Gene Expression Patterns, 3, 375-381 (2003)
4. Naoki Matsuo, Mami Terao, Yo-ichi Nabeshima, and Mikio Hoshino  
Roles of STEF/Tiam1, guanine nucleotide exchange factors for Rac1, in regulation of growth cone morphology.  
Mol. Cell. Neurosci., 24, 69-81 (2003)
5. Takeshi Kawauchi, Kaori Chihama, Yo-ichi Nabeshima, and Mikio Hoshino  
The in vivo roles of STEF/Tiam1, Rac1 and JNK in cortical neuronal migration.  
EMBO Journal, 22, 4190-4201 (2003)
6. Mari Dezawa, Hiroshi Kanno, Mikio Hoshino, Hirotomi Cho, Naoya Matsumoto, Yutaka Itokazu, Nobuyoshi Tajima, Hitoshi Yamada, Hajime Sawada, Hiroto Ishikawa, Toshirou Mimura, Masaaki Kitada, Yoshihisa Suzuki and Chizuka Ide  
Specific induction of neuronal cells from bone-marrow stromal cells and application for autologous transplantation.  
J. Clin. Invest., 113, 1701-1710 (2004)
7. Takashi Nishimura, Tomoya Yamaguchi, Katsuhiko Kato, Masato Yoshizawa, Yo-ichi Nabeshima, Shigeo Ohno, Mikio Hoshino, and Kozo Kaibuchi  
PAR-6-PAR-3 mediates Cdc42 signaling to Rac activation through STEF/Tiam1, RacGEFs.  
Nature Cell Biol. in press
8. Mari Dezawa, Mikio Hoshino and Chizuka Ide  
Treatment of neurodegenerative diseases using adult bone marrow stromal cell-derived neurons. Expert Opinion on Biological Therapy, in press
9. Masato Yoshizawa, Takeshi Kawauchi, Masaki Sone, Yoshiaki V. Nishimura, Mami Terao, Kaori Chihama, Yo-ichi Nabeshima and Mikio Hoshino

Involvement of a Rac activator, P-Rex1, in neurotrophin-derived signaling and neuronal migration.

J. Neuroscience, in revision

10. Mikio Hoshino, Shoko Nakamura, Kiyoshi Mori, Takeshi Kawauchi, Mami Terao, Yoshiaki V. Nishimura, Akihisa Fukuda, Naoki Matsuo, Masaki Sone, Toshio Terashima, Christopher V.E. Wright, Yoshiya Kawaguchi, Kazuwa Nakao, Yo-ichi Nabeshima  
*Ptf1a*, a bHLH transcriptional gene, defines GABAergic neuronal fates in cerebellum, Neuron, in revision
11. 川内健史, 星野幹雄  
大脳皮質形成における神経細胞移動の分子機構  
神経研究の進歩 第49巻・第1号(2005年)

(2) 招待講演(英語)

1. Mikio Hoshino

Molecular Mechanisms underlying neuronal migration *in vivo*.

Special Seminar, Imperial College School of Medicine, ロンドン 2004年8月2日

2. Mikio Hoshino, Shoko Nakamura, and Yoichi Nabeshima

*Ptf1a*, a bHLH transcriptional gene, defines GABAergic neuronal fates in cerebellum

JBS International Symposium in 2005 "New Frontier of Transcription Research" 群馬県草津  
2005年1月11日

(3) 学会発表 17件(うち海外発表 8件)

## 研究課題別評価

1 研究課題名: 医薬品創製標的としての G 蛋白質共役受容体の膜移行の分子機構

2 研究者氏名: 横溝 岳彦

研究員: 戸田 晶子 (研究期間 H15.2 ~ H.17.3)

3 研究の狙い:

G-タンパク質共役型受容体(GPCR)は生体内では様々な細胞の形質膜に発現し、特異的なリガンドに結合して細胞内に情報を伝達することで、細胞の分化、増殖、形態形成、運動、細胞極性の形成に重要な役割を果たしている。ヒトゲノムに約 800-1000 種類存在すると考えられている GPCR の多くは未だにリガンドが不明であり(孤児受容体)、主として受容体過剰発現細胞を用いてリガンドの探索がなされている。ところが、孤児受容体の多くは過剰発現の系において細胞膜に発現させることが困難であり、効率の良いリガンド探索のためにはその細胞内移行のメカニズムの解明が必要であると考えた。本研究では以下の 3 点を主要な研究テーマとして設定した。

細胞膜に容易に移行する高親和性ロイコトリエン B4 受容体(BLT1)、細胞膜に移行しにくいケモカイン受容体(CXCR4, CCR7)をモデルに、細胞膜移行に関わる受容体ドメインの同定や結合因子の探索を行う。

細胞膜に移行できた孤児受容体については、安定発現細胞株を構築し、リガンドのスクリーニングを行う。

高親和性ロイコトリエン B4 受容体(BLT1)の欠損マウスを作成し、炎症・免疫反応における役割を *in vivo* で解明する。

4 研究成果:

(1) GPCR の細胞内移行に関する研究

細胞膜に移行しうる BLT1 の C 末端が細胞膜移行に必要なドメインであると考え、変異体受容体を作成したところ、C 末端を欠損した BLT1 受容体は正常に細胞膜に移行したため、C 末端は BLT1 の細胞膜移行に必須ではないことがわかった。しかし C 末端欠損 BLT1 では、リガンド刺激後の受容体の不活性化が生じず、リガンドに対する高親和性結合能と長時間にわたる細胞内シグナル伝達能を有していることが明らかとなった。以上より、BLT1 の C 末端は第 8 ヘリックスともいえる新規の構造を有しており、このドメインがリガンド刺激後の受容体の構造変化の支点として機能していることを明らかにした(Okuno, J. Biol. Chem. 2003)。また BLT1 に関しては詳細な細胞内伝達機構を明らかにし、脱顆粒反応における細胞外からのカルシウム上昇と PI3 キナーゼの活性化の必要性を証明した(Ito, J. Biol. Chem. 2002)。CXCR4, CCR7 はリンパ球系の培養細胞(Jurkat, TART-1)に遺伝子導入すると細胞膜に移行するが、GPCR のリガンドスクリーニングに用いられる培養細胞では細胞膜に移行せず、ゴルジ体に貯留する。そこで、TART-1 細胞から cDNA ライブラリを作成し、Yeast two-hybrid 法を用いてこれらの受容体を細胞膜に移行させる因子の単離を試みた。複数の受容体結合因子を同定したが、そのいずれも直接受容体の細胞膜移行には関わってはいなかった。より直接的に細胞膜移行に関わる因子を単離するため、レトロウイルスベクターとセルソータを用いた発現クローニング法を試みたが、CXCR4, CCR7 を細胞膜移行させる因子を単離することはできなかった。

(2) 孤児受容体のリガンド探索

約 20 個の孤児受容体 cDNA を単離し、過剰発現細胞を作成してリガンドの探索を行った。細胞膜上に受容体を発現できた受容体は 6 種類であったが、そのうち 2 種類のリガンドの同定に成功した。ペプチドロイコトリエン第二受容体 CysLT2 は、LTC4, LTD4 の両者に同様の結合能を示し、

細胞内カルシウム上昇反応、アデニル酸シクラーゼの抑制を引き起こした(Ogasawara, J. Biol. Chem. 2002)。また、他のグループによってリゾリン脂質 LPC の受容体として報告された G2A が、LPC に反応しないことを見だし、リガンドの探索を行ったところ、G2A は細胞外の pH の低下を感知し、G13 を介して低分子量 G タンパク質 RhoA の活性化を引き起こすプロトンセンサーであることを見いだした。さらに LPC が G2A に対して拮抗的に働くことを明らかにした(Murakami, J. Biol. Chem. 2004)。

### (3) BLT1 の生体内での機能の解明

強力な炎症起炎物質であるロイコトリエン B<sub>4</sub>(LTB<sub>4</sub>)の高親和性受容体 BLT1 を欠損するマウスを作成し、表現型の解析を行った。BLT1 欠損マウスの好中球は LTB<sub>4</sub> 依存性のカルシウム上昇、脱顆粒反応を消失していたため、好中球における主要な LTB<sub>4</sub> 受容体であることがわかった。卵白アルブミン感作・惹起による気管支喘息モデルにおいて、BLT1 欠損マウスは気道過敏性の上昇を起こさず、気道への好酸球浸潤、血中 IgE 上昇がほぼ完全に消失しており、Th2 型免疫反応の低下が推定された。感作後の傍気道リンパ節細胞を *in vitro* で抗原刺激した際の Th2 サイトカイン産生が BLT1 欠損マウスで大きく減弱していたことから、BLT1 は Th2 型免疫反応に重要な役割を演じていることが明らかとなった(Terawaki, 投稿中)。また、免疫反応における主要な抗原提示細胞である樹状細胞に BLT1 が発現していることを見いだした。BLT1 欠損マウス由来の樹状細胞では LTB<sub>4</sub> 依存性のカルシウム上昇と細胞走化性が完全に消失していた。アロジェニックなリンパ球混合試験において、BLT1 欠損マウス由来の樹状細胞は極めて減弱した Th1 反応を示した。この原因は、BLT1 欠損樹状細胞からの IL-12 産生が減弱しているためであった。*In vivo* においても、BLT1 欠損マウスでは Th1 型遅延反応が大きく減弱しており、BLT1 は樹状細胞を介して Th1 型免疫反応を引き起こすための重要な因子であることを見いだした(Toda, 投稿中)。以上より、BLT1 は、Th1/Th2 型免疫反応の両者に必要なユニークな分子であることを明らかにした。

### 5 自己評価:

リガンド不明の GPCR のリガンドの同定を効率よく行うために、受容体の細胞膜移行の分子メカニズムを明らかにすることが重要であるとの認識は現在でも変わっていない。しかしながら、複数の GPCR を用い、複数の手法を用いて実験を行ったにもかかわらず、受容体膜移行に関わる分子の同定は困難であり、当初の目的を果たすことはできなかった。世界的にも同様の問題意識をもつ GPCR 研究者が多いにもかかわらず、これまでに明確にその経路を示した研究が存在しないことから本研究の困難さが推定できる。今後は、新たなストラテジーを用いた研究方針の確立が必要であると考えている。一方、並行して進めた孤児受容体のリガンド探索では、二つの受容体のリガンドの同定に成功した。特に G2A 受容体が細胞外プロトン認識することを見いだした論文(Murakami, JBC, 2004)のインパクトは大きく、G2A がリゾリン脂質 LPC の受容体であるとした過去の論文(Science, 293, p702-705, 2001)は、つい最近リトラクションされるに至った(Science, 307, 2005)。申請者が単離した生理活性脂質 LTB<sub>4</sub> の受容体 BLT1 の欠損マウスの解析では予想外の表現型を見いだすことができた。これまで局所の炎症反応を引き起こすとされた LTB<sub>4</sub> が実は、Th1/Th2 型の免疫反応の制御を行っていること、特に Th1 型免疫反応においては、樹状細胞における BLT1 の発現が重要であることを見いだした今回の発見は、サイトカイン・ケモカインに偏重した免疫反応の解釈に大きく影響を与えるものだと自負している。BLT1 欠損マウスでは Th1/Th2 の両方の免疫反応が減弱したことから、Th1/Th2 バランス(Th1 反応が減弱すれば Th2 反応が増強する)の考え方が、必ずしも当てはまらないことを示すことができたと思う。今後は、脂質メディエーターとその受容体を中心に、*in vitro* と *in vivo* の両方の視点から、免疫反応・炎症反応を解析し、将来の創薬につなげていきたいと考えている。免疫学的な実験に長けたポストドクの採用は有効で、遺伝子改変マウスの解析に当たって実験手法の広がり、予想以上の表現型の解析が得られたものと評価している。

## 6 研究総括の見解:

GPCRは対象とする受容体分子の数が多いだけに、研究開始の初期段階では、研究焦点の分散化が懸念された。それが見事に克服され、注目すべき成果が現在着実に上げられつつある。医学部出身者としての本領を活かして、医療分野への波及効果にも見るべきものがある。今後の着実な成長とブレークスルーを期待できる逸材である。

## 7 主な論文等:

### 論文

1. Ito N, Yokomizo T, Sasaki T, Kurosu H, Penninger J, Kanaho Y, Katada T, Hanaoka K, Shimizu T:  
Requirement of phosphatidylinositol 3-kinase activation and calcium influx for leukotriene B4-induced enzyme release.  
**J. Biol. Chem.** 277, 44898-44904, 2002
2. Ogasawara H, Ishii S, Yokomizo T, Kakinuma T, Komine M, Tamaki K, Shimizu T, Izumi T:  
Characterization of mouse cysteinyl leukotriene receptors mCysLT1 and mCysLT2: differential pharmacological properties and tissue distribution.  
**J. Biol. Chem.** 277, 18763-18768, 2002
3. Obinata H, Yokomizo T, Shimizu T, Izumi T:  
Glucocorticoids up-regulate leukotriene B4 receptor-1 expression during neutrophilic differentiation of HL-60 cells.  
**Biochem. Biophys. Res. Commun.** 309, 114-119, 2003
4. Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, Sugiyama T, Miyagishi M, Hara K, Tsunoda M, Murakami K, Ohteki T, Uchida S, Takekawa S, Waki H, Tsuno NH, Shibata Y, Terauchi Y, Froguel P, Tobe K, Koyasu S, Taira K, Kitamura T, Shimizu T, Nagai R, Kadowaki T:  
Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects.  
**Nature** 423, 762-769, 2003
5. Masuda K, Itoh H, Sakihama T, Akiyama C, Takahashi K, Fukuda R, Yokomizo T, Shimizu T, Kodama T, Hamakubo T:  
A combinatorial G protein-coupled receptor reconstitution system on budded baculovirus. Evidence for G $\alpha$  and G $\beta$  coupling to a human leukotriene B4 receptor.  
**J. Biol. Chem.** 278, 24552-24562, 2003
6. Okuno T, Ago H, Terawaki K, Miyano M, Shimizu T, Yokomizo T:  
Helix 8 of the leukotriene B4 receptor is required for the conformational change to the low-affinity state after G-protein activation.  
**J. Biol. Chem.** 278, 41500-41509, 2003
7. Hori T, Yokomizo T, Ago H, Sugahara M, Ueno G, Yamamoto M, Kumasaka T, Shimizu T and Miyano M:  
Structural basis of leukotriene B4 12-hydroxydehydrogenase/15-oxo-prostaglandin 13-reductase catalytic mechanism and a possible SH3 binding loop.  
**J. Biol. Chem.** 279, 22615-22623, 2004
8. Murakami N, Yokomizo T, Okuno T, Shimizu T:  
G2A is a proton-sensing G-protein coupled receptor antagonized by lysophosphatidylcholine.  
**J. Biol. Chem.** 279, 42484-42491, 2004

### 総説

1. Toda A, Yokomizo T, Shimizu T:

- Leukotriene B4 receptors.  
**Prostaglandins Other Lipid Mediat.** 68-69, 575-585, 2002
2. Yokomizo T, Noiri E, Izumi T, Shimizu T:  
In vivo chemotaxis using CHO cells expressing human leukotriene B4 receptor.  
**Adv. Exp. Med. Biol.** 507, 357-361, 2002
  3. Brink C, Dahlen SE, Drazen J, Evans JF, Hay DWP, Nicosia S, Serhan CN, Shimizu T, Yokomizo T:  
International Union of Pharmacology-Classification of Leukotriene and Lipoxin Receptors: Distribution, Function and Molecular Aspects.  
**Pharmacol. Rev.** 55, 195-227, 2003
  4. Brink C, Dahlen SE, Drazen J, Evans JF, Hay DWP, Nicosia S, Serhan CN, Shimizu T, Yokomizo T  
International Union of Pharmacology XLIV. Nomenclature for the Oxoeicosanoid Receptor.  
**Pharmacol. Rev.** 56, 149-157, 2004
  5. 横溝岳彦  
ロイコトリエン B4.  
**炎症と免疫** 10, 712-715, 2002
  6. 横溝岳彦  
ロイコトリエン B4 の代謝と受容体.  
**生化学** 74, 1139-1147, 2002
  7. 伊藤伸子、横溝岳彦  
アラキドン酸カスケードに関する最新の知見.  
**ペインクリニック** 25, 1050-1058, 2004
  8. 横溝岳彦  
脂質メディエーターと炎症・免疫  
**脂質生物学がわかる** (清水孝雄編:羊土社, 東京) 90-97, 2004
  9. 横溝岳彦  
ロイコトリエンと肺線維症  
**分子呼吸器病** 8, 511-513, 2004
  10. 横溝岳彦  
ロイコトリエン受容体  
医学の歩み別冊 7 回膜貫通型受容体研究の新展開, 212, 89-94, 2005
  11. 寺脇 幹、横溝岳彦  
ロイコトリエンと免疫・炎症の基盤  
**アレルギーと炎症** 印刷中
  12. 戸田晶子、横溝岳彦  
ロイコトリエン  
**Annual Review 内分泌**, 印刷中
  13. 横溝岳彦  
オーファン受容体の脂質リガンド探索戦略  
**脂質研究の最前線**(実験医学増刊号) 印刷中
  14. 横溝岳彦  
免疫疾患・アレルギー病態におけるロイコトリエン  
**臨床免疫学**(山本一彦編:日本臨床社、大阪) 印刷中

招待講演

1. Yokomizo T, Terawaki K, Shimizu T  
Leukotriene B4 receptors: Cloning, Pharmacology, and Functions in vivo,  
6th World Congress on Inflammation, Vancouver, 2003
2. Yokomizo T. and Shimizu T  
*In vitro* and *in vivo* roles of leukotriene B4 receptors  
Keystone Symposia, Taos, 2004
3. Yokomizo T, Terawaki K., Toda A., Nagase T. and Shimizu T.  
Attenuated immunological and inflammatory responses in leukotriene B4 receptor 1  
(BLT1)-deficient mice  
2<sup>nd</sup> international conference on phospholipase A2 and 8<sup>th</sup> international congress on  
platelet-activating factor and related lipid mediators, Berlin, 2004
4. 横溝岳彦  
ロイコトリエン B4 受容体 BLT1 の生体内での機能  
第 24 回日本炎症・再生医学会ワークショップ, 京都, 2003
5. Yokomizo, T., Shimizu, T.  
Reduced airway hyperreactivity, eosinophil acculation, and IgE production in leukotriene B4  
receptor 1-null mice  
第 33 回日本免疫学会シンポジウム, 福岡, 2003
6. 横溝岳彦  
ロイコトリエン B4 受容体 BLT1 の気道過敏性における役割  
日本薬学会 第 124 年会, 大阪, 2004
7. 横溝岳彦  
ロイコトリエン B4 受容体を介した細胞走化性  
第 25 回日本炎症・再生医学会ワークショップ, 東京, 2004
8. 横溝岳彦, 清水孝雄  
生理活性脂質受容体の orphaning,  
第 111 回日本薬理学会関東部会, つくば, 2004
9. 戸田晶子, 横溝岳彦, 寺脇 幹, 清水孝雄  
免疫反応におけるロイコトリエン B4 受容体 BLT1 の役割  
第 78 回日本薬理学会年会, 横浜, 2005