

「情報と細胞機能」研究領域 領域活動・評価報告書  
—平成18年度終了研究課題—

研究総括 関谷 剛男

1. 研究領域の概要

この研究領域は、細胞がプログラム化された遺伝子情報(内的情報)でそれぞれの機能を発揮していること、この機能が環境等に由来する多くのシグナル(外的情報)の作用で様々な影響を受けていることの観点から、これらの内的ならびに外的情報と細胞機能との関わりを独創的で斬新な手法、アプローチで明らかにすることにより、生命システムの謎に挑む研究を対象とするものです。具体的には、これら情報と細胞との相互作用の結果として発症するがん、痴呆など高齢者の疾患、生活習慣病、アレルギー疾患など様々な疾患の病因解明ならびにその克服のための方法の探索に関する研究が含まれます。

2. 研究課題・研究者名

別紙一覧表参照

3. 選考方針

選考の基本的な考えは下記の通りである。

- 1) 選考は研究総括および「情報と細胞機能」領域に設けた領域アドバイザー8名が行う。
- 2) 選考方法は、書類選考、面接選考による総合選考とする。
- 3) 「情報と細胞機能」研究領域の趣旨に沿う独創的で斬新な手法、アプローチで行う研究であり、今後の発展が期待される課題であること。
- 4) 自らのアイデアで、個人として主体的に研究を実施する研究者であること。

4. 選考の経緯

全応募課題につき領域アドバイザー8名が書類審査し、書類選考会議において面接選考の対象者を選考した。研究提案の口頭説明による面接選考は、研究総括ならびに領域アドバイザー8名で実施し、その結果に基づき総合選考を経て採用者を選定した。

選考	書類選考	面接選考	採用者
対象者数	378名	21名	8名

5. 研究実施期間

平成15年10月～平成19年3月

6. 領域の活動状況

領域会議(非公開)を6回開催し、研究進捗の報告、討論および研究交流を図り、最終年度には研究成果報告会を開催し、3年間の研究成果を公表して評価をいただいた。また、研究総括は研究開始時に研究者全員を訪問し、研究環境を確認した。なお、研究期間中、異動または研究調整の必要が生じた場合、状況に応じて研究者を訪問し、研究環境の調査および研究進捗状況の把握を行いつつ、アドバイスをを行った。

7. 評価の手続き

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

(評価の流れ)

平成 19 年 2 月	研究成果報告会開催
平成 19 年 3 月	研究総括による評価
平成 19 年 3 月	研究報告書及び研究課題別評価提出
平成 19 年 3 月	研究期間終了

8. 評価項目

課題研究目標の達成

- (1) 新事実の発見と解明、新技術の創成
- (2) 外部発表(論文、口頭発表等)、特許等の公表研究成果

9. 研究結果

本領域の目的は、正規の遺伝子情報によって細胞が正しく機能を発揮する仕組みの解明、ならびに、これら正規の遺伝子情報を邪魔する外的情報による細胞機能の変化の解明を分子レベル、細胞レベル、個体レベルでの研究で行い、その結果を手掛かりに、生命の設計原理を知るとともに各種疾病の理解と克服を目指すものである。

本領域 3 期生 8 名は 3 年間の研究を順調に推進し、着実な成果をあげ、将来に向かっての研究基盤を固めたと考える。これらの研究成果は、生命科学および関連分野に大きなインパクトを与えるものとする。なお、研究成果と研究目標に対する達成度等は以下の個々の研究者による研究成果報告、自己評価および領域アドバイザーの評価を加味した研究総括の見解の通りである。

10. 評価者

研究総括 関谷 剛男 三菱化学生命科学研究所 所長

領域アドバイザー氏名(五十音順)

菊谷 仁	大阪大学 微生物病研究所 教授
渋谷 正史	東京大学 医科学研究所 教授
下遠野 邦忠	京都大学 ウイルス研究所 教授
中島 元夫	ジョンソン・エンド・ジョンソン株式会社 ディレクター 兼 信州大学医学部客員教授
野田 哲生	癌研究会 癌研究所 所長
半田 宏	東京工業大学 大学院生命理工学科 教授
古市 泰宏	(株)ジーンケア研究所 所長
若林 敬二	国立がんセンター研究所 副所長

(参考)

(1) 外部発表件数

	国内	国際	計
論文	0	84	84
口頭	57	36	93
その他	67	18	85
合計	124	138	262

※平成 18 年 12 月現在

(2) 特許出願件数

国内	国際	計
8	2	10

(3) 受賞等

・村田茂穂: 日本分子生物学会「三菱化学奨励賞」(2006/12/7)

研究業績: 哺乳類プロテオソームの多様性と分子基盤の解析

・廣瀬哲郎: (財)病態代謝研究会「最優秀理事長賞」(2006/12/15)

研究業績: 核小体低分子 RNA による遺伝子発現のファインチューニング機構の解明

(4) 招待講演

国際 19 件

国内 7 件

## 別紙

## 「情報と細胞機能」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)
齋藤 通紀 (兼任)	単一細胞での網羅的遺伝子発現解析によるマウス生殖細胞決定機構の解明 (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  (同上)	40
白根 道子 (兼任)	膜輸送分子 Protrudin による神経突起形成機構の解明と神経再生への応用 (九州大学 生体防御医学研究所)	九州大学 生体防御医学研究所 助教授  (九州大学 生体防御研究所 COE 上級研究員)	43
豊田 実 (兼任)	有糸分裂チェックポイント遺伝子 CHFR のがん診断・治療への応用 (札幌医科大学医学部)	札幌医科大学 医学部 講師  (同上 助手)	41
東山 繁樹 (兼任)	膜型増殖因子の持つ細胞増殖のアクセセル機能とブレーキ解除機能の分子機構の解明 (愛媛大学 大学院医学系研究科)	愛媛大学 大学院医学系研究科 教授  (愛媛大学医学部 教授)	45
廣瀬 哲郎 (兼任)	核マトリクス結合蛋白質による RNP 再構築と分配機構の解明 (産業技術総合研究所 生物情報解析研究センター)	産業技術総合研究所 生物情報解析研究センター 機能性 RNA 解析チーム長 (Yale University School of Medicine, Postdoctoral Fellow)	40
三木 裕明 (兼任)	Wnt シグナルによる神経細胞のネットワーク形成制御 (東京大学 医科学研究所)	東京大学 医科学研究所 助教授  (同上)	40
村田 茂穂 (兼任)	ユビキチンと分子シャペロンの連携による細胞機能制御機構の解明 (東京都臨床医学総合研究所 基盤技術研究センター)	東京都臨床医学総合研究所 基盤技術研究センター 主席研究員  (同上 研究員)	40
山下 潤 (兼任)	新規試験管内誘導システムによる分化再生研究 (京都大学 再生医科学研究所)	京都大学 再生医科学研究所 附属幹細胞医学研究センター 助教授  (京都大学大学院医学研究科 助教授)	43

## 研究課題別評価

### 1 研究課題名:

単一細胞での網羅的遺伝子発現解析によるマウス生殖細胞決定機構の解明

### 2 研究者氏名:

斎藤 通紀

### 3 研究のねらい:

本研究のねらいは大きく2つに分けられる。第一のねらいは、人類を含む多細胞生物を構成する細胞群の中で、唯一その全遺伝情報を次世代に継承させる細胞系譜である生殖細胞系列が形成される分子機構を明らかにし、その過程を試験管内で再構成する基盤を築くこと、第二のねらいは、その目的を達成するために必要と考えられる、単一細胞に発現する全遺伝子を定量的に捉える技術を開発すること、である。

現個体の恒常性を維持する体細胞群とは対照的に、生殖細胞は、次の世代を多様にかつ誤りなく構成する機能を担う。この機能を遂行するため、生殖細胞には大きく分けて3つのユニークかつ本質的な能力、1)ゲノム/細胞の潜在的全能性の再獲得・維持機構、2)ゲノムの後成遺伝学的情報の再編集能、及び3)減数分裂及びそれに伴う特異的代謝能、が備わっている。本研究者は生殖細胞の持つこうした特性獲得機構をその出発点から理解すべく、哺乳類における生殖細胞形成機構の研究を推進してきた。本研究ではこれまでの研究を更に発展させ、生殖細胞形成に関わる分子群の全貌とその関係性を明らかにすることを目的とし、またその目的達成のために必要な単一細胞 cDNA マイクロアレイ法の開発を行った。単一細胞 cDNA マイクロアレイ法の開発は、生体に存在するいかなる細胞のいかなる時点でのゲノムワイドな遺伝子発現プロファイルをも検証することが基本的には可能となることを意味し、今後生物学全般における様々な応用も期待される。

### 4 研究成果:

#### 1) 生殖細胞形成過程における Blimp1 の役割の解明

我々は、決定直後(発生(E)7.5日目)のマウス単一始原生殖細胞(Primordial Germ Cells;PGCs) (*stella* 遺伝子発現陽性細胞)cDNA とそれらと近接する体細胞(胚体外中胚葉細胞)cDNA で発現する遺伝子群を比較することにより、*Blimp1* と呼ばれる遺伝子が PGC 特異的に発現することを見出した<sup>7)</sup>。*Blimp1* はその N 末に PR ドメイン(ヒストンメチルトランスフェラーゼ活性を有する SET ドメインに似た構造)、その C 末に5つの Zn フィンガーを有する転写制御因子で、これまでの研究から、B 細胞が、イムノグロブリンを分泌する形質細胞に最終分化する過程で機能するマスター因子として知られていた。我々は in situ hybridization 法により、*Blimp1* が PGC 特異的に発現することを確認し、その発現を real time で観察可能とすべく、*Blimp1* の発現制御領域下に形質膜に標的化した EGFP を発現するトランスジェニックマウスを作成した。これらの実験の結果、*Blimp1* は E6.25~E6.5 の一部の胚体外胚葉細胞でその発現を開始し、それらの細胞はすべて PGC へと分化することが示唆された。これまで生殖細胞系列の細胞は E7.5 においてアルカリフォスファターゼ活性陽性 *stella* 遺伝子発現陽性の細胞として同定される PGC がその起源であると考えられてきたが、我々の実験結果はこれまでの定説を覆し、それよりも1日以上前に運命決定された *Blimp1* 陽性生殖前駆細胞が存在することを示唆するものとなった。

さらに Cambridge 大学、Rockefeller 大学との共同研究により、*Blimp1* は PGC 形成に必須の因子であること、*Blimp1* を発現する初期の細胞は確かにすべて PGC に分化することが遺伝学的実験により明らかとなった。また *Blimp1* 欠損細胞から単一細胞 cDNA を作成しその構成を解析した結果、野生型の成熟した PGC(*Blimp1* 陽性 *stella* 陽性細胞)ではほぼ例外なく認められる *Hoxb1* 遺伝子の発現抑制が、*Blimp1* 欠損細胞では異常になっていることが明らかとなり、*Blimp1* が PGC の遺伝子プログラム規定する重要な因子であることが示された。

*Blimp1* はその後の発生過程では、内胚葉、体節中胚葉、肢芽後部中胚葉、毛包、血管など幅

広い領域で非常に動的な発現を示し、それぞれの組織分化に重要な役割を果たしていることが示されつつある。PGCを含む様々な細胞分化過程における *Blimp1* の機能に共通の要素があるのか、その生化学的機能の解析が今後の課題となる。また PGC 形成における *Blimp1* の機能、PGC において *Blimp1* が発現誘導される機序をより正確に理解することも重要であろう。

## 2) マウス生殖細胞形成過程に伴う定量的遺伝子発現動態

マウス生殖細胞系列は *Blimp1* 陽性の数個から十数個の細胞を起源とし徐々にその数を増し、E7.5において約40個のアルカリフォスファターゼ陽性 *stella* 遺伝子発現陽性の細胞集団(PGCs)を形成する。これら PGC はその後1細胞毎に移動を開始し、発生過程の後腸を經由して腸間膜、そして生殖原器へと移入する。また PGC は移動の過程でそのゲノムワイドな後成遺伝学的修飾を変換することがわかっており、この過程も1細胞毎に進行する。従って、PGC の形成機構、その内部でのゲノム再編機構を正確に理解するためには、1細胞内でおこる遺伝子発現の変化を捉える実験系が必須となる。単一細胞 cDNA マイクロアレイ法の開発に先立ち、これまで用いてきた単一細胞 cDNA 増幅法を改変し、我々は簡便かつ定量的に単一細胞から cDNA を増幅する方法を確立し[3]の項参照)、その方法を用いて CD1 マウスにおける E6.75、E7.25、E7.75、E8.25 の PGC 及び E6.75、E7.25、E7.75 の近隣体細胞(胚体外中胚葉)から単一細胞 cDNA を増幅、それら細胞における PGC 形成に重要な関連を示すと考えられる遺伝子発現を定量的 PCR(Quantitative PCR; Q-PCR)にて解析した。

その結果、*Blimp1* 陽性の生殖前駆細胞から *stella* 陽性の PGC が成立する過程では非常に動的な遺伝子発現の変動が起こることがわかった。具体的には *Blimp1* 陽性となった生殖系列細胞は、多能性を司るマスター因子の一つである *Sox2* の発現を再獲得し、生殖系列に特異的な発現を示す遺伝子(*fragilis*, *stella*, *Blimp1*に加えて *Nanos3*, *Dnd1*, *Kit*, 新規に同定された *Prdm14* etc)の発現を段階毎に活性化するとともに、体細胞系列の特異化に関わる遺伝子(*Hoxb1*, *Hoxa1*, *T*, *Fgf8*, *Snai1*, etc)発現を時期依存的に抑制する。さらに PGC の成立過程では、その過程に関わりうるシグナル伝達分子(*Smad1*, *Smad3*, *Smad5*, *Bmpr1a*, *Acvr2b* etc)の発現や、ゲノムの後成遺伝学的修飾に関わる因子(*Dnmt3b*, *Glp*)の発現も動的に変化することが明らかとなった。これらの結果は、この過程に関わる遺伝子の機能解析の基盤を築くとともに、この過程を将来的に試験管内で再構築する際の良い指標と成る。さらに単一細胞マイクロアレイ解析を含むより包含性の高い解析を行うことにより、生殖細胞系列形成過程に伴うシグナルと転写制御因子の階層的関わりが明らかになることが期待される。

## 3) 単一細胞 cDNA マイクロアレイ法の開発

生殖細胞形成・分化過程に関わるゲノムワイドな遺伝子発現を単一細胞レベルで解析するために、我々は単一細胞 cDNA マイクロアレイ技術の開発を目指した。単一細胞 cDNA マイクロアレイ法の開発は、生殖細胞形成過程の研究にとどまらず、単一細胞レベルでの解像度を必要とする様々な生物学的問題(成体の体性幹細胞の研究、神経細胞の多様性の研究、発生生物学に関する多くの課題等)にとって重要な技術開発となると考えられる。

少量の開始材料から cDNA を合成・増幅する方法としては、PCRを用いる対数的増幅法と、T7 RNA polymerase を利用する線形増幅法が主として用いられてきた。両方法論は増幅効率・感度・定量性において、それぞれ固有の利点・欠点を有しており、相補的なものであると考えられる。しかし、単一細胞レベルの極微量の資料から cDNA を増幅する場合、操作の簡便性や増幅力の点から PCR 法が有利であろうと考えられた。既存の PCR 法は単一細胞から cDNA を増幅する場合、50~80 回の増幅サイクルを用いるので、開始材料と比較した際の増幅産物に存在する遺伝子群の定量的な関係が大きく損なわれ、また単一のプライマーを用いて増幅するので増幅産物から方向性が失われ、汎用されている様々な市販のマイクロアレイスライドに使用するプローブを効率よく作成しづらいという問題点を有している。また増幅途中で本来存在している遺伝子とは無関係な増幅副産物が多量に形成され、これらの産物はマイクロアレイハイブリダイゼーションを行う際にその感度を低減させると考えられた。

これらの問題点を解決すべく様々な試行錯誤を行った結果、1)単一細胞レベルの産物からマ

マイクロアレイハイブリダイゼーションを行うプローブを作成するのに十分な cDNA 合成には初期の PCR 増幅回数が20回で十分であること、2)増幅副産物は cDNA を合成するために用いる過剰の第1プライマーに由来するものであるため、それらをエクソヌクラーゼにより分解することが必要であること、3)異なる配列を有する2つのプライマーを用いて単一細胞レベルの資料から cDNA を効率よく合成するためにはプライマーの配列が重要であること、4)PCR 増幅ではチューブ毎にランダムな増幅エラーが生じるため、PCR を4本のチューブに分けて行い、その後それらを再混合することでエラーを最小限にできること、が明らかとなった。これらの点を考慮に入れ、また増幅後に T7 プロモーター配列を有する第3のプライマーと第2のプライマーを用いて少数回増幅することで、その後線形増幅を行うことによりマイクロアレイハイブリダイゼーションに適したプローブが作成できる方法論を確立した。

本方法論を用いた増幅産物は、従来の方法で得られるものに比較し、非常に優れた定量性と再現性を有していることが明らかとなった。多量の開始 mRNA に含まれる遺伝子群の比率と、単一細胞レベルから増幅したものに含まれる遺伝子群の比率を比較した結果、従来の方法では correlation coefficient ( $R^2$ ) が 0.496 であったのに対し本方法論では 0.734 であった。単一細胞あたり20コピー以上発現している遺伝子に関しては、擬陽性及び擬陰性率がそれぞれ3及び6%と低く、単一細胞あたり5コピーの発現しか示さない遺伝子についても60%に及ぶ遺伝子が検出され、それらの70%が正しく発現しているものであることが示された。

実際に本法論の有効性を検証すべく、E3.5 の胚盤胞内部細胞塊細胞 (Inner Cell Mass; ICM) を取り出し、それらを単一細胞に解離して単一細胞 cDNA を合成した。E3.5 の ICM は、形態学的には区別し難い未分化な細胞集団 (~30個) と考えられ、これらからすべての胚組織が形成され、また胚性幹細胞 (Embryonic stem cells; ES cells) が樹立される重要な細胞集団である。総数50個の *Oct4* 陽性 *Cdx2* 陰性単一細胞 cDNA を合成し、そのうちランダムに選んだ20個を用いてマイクロアレイハイブリダイゼーションを行った結果、これらの細胞は遺伝子発現の明らかに異なる2つの細胞群に分けられることが明らかとなった。一つは未分化な胚性外胚葉様細胞で、もう一つはそれらを覆う胚体外組織となる原始内胚葉様細胞である。これら2つの細胞群の遺伝子発現は、1日を経て形態学的に明らかに分化した E4.5 胚性外胚葉細胞及び原始内胚葉細胞のそれと多くの点でそれぞれ共通しており、結果の正しさを示唆している。

本研究の結果を受け、では哺乳類胚発生のいつの時点で初めて割球毎の遺伝子発現の差異が生じるのかに関し共同研究が進行中である。また本技術はすでに多くの国内・国外の研究室に情報提供を行い、その一部に関しては共同研究が進行中である。我々自身は生殖細胞系列形成過程の解明に向けて応用し、現在それに関する論文を作成中である。

## 5 自己評価:

単一細胞 cDNA マイクロアレイ法の開発という点では良い成果を挙げることが出来たのではと考えられる。現在生殖細胞系列の時系列に沿ったゲノムワイドな遺伝子発現の解析と *Blimp1* を含むこの過程に重要な働きをする遺伝子群の変異体における遺伝子発現の異常を詳細に検討することで生殖細胞形成過程に関わる階層的転写制御因子の関係性を明らかにすべく努力中であるのと同時に、その成果を論文としてまとめる作業を進行中であるが、これらを完成できればこの方法論をもう少しアピールできるのではと考えている。これらの解析から得られた結果に沿い、この過程を今度は試験管内で再現するべく努力中である。当然ながら遺伝子発現の変化を追跡するだけではわからない現象が多く存在し、本方法論を用いた解析は現象理解の第一段階に過ぎず、複合的な視点から解析を進めて行くことの重要性を感じている。本方法論を他の系に応用したり、共同研究者ときっちりとした実験を進めて行くことでその発展性を確認したい。方法論のより適切な改善の余地も残っており、さきかけ開始から3年を経たが研究はまだまだ始まったばかりという印象である。

## 6 研究総括の見解:

マウスを材料に生殖細胞形成機構の解明を目指し、数個から十数個の細胞を起源に約 40 個の始原生殖細胞が形成される過程、その 1 個ずつがそれぞれ生殖原器へ移行する過程などで、

発現するあるいは発現が抑制される遺伝子を明らかにしたことは目的達成に大きく前進したと評価できる。特に細胞 1 個ずつにおける遺伝子発現を知ることが鍵となる計画において、それを可能とした単一細胞 cDNA マイクロアレイ法の開発は、他の研究領域でも威力を発揮できる優れた成果である。これらの成果の論文発表による世界への発信も十分に達成している。今後独自の切り口でのさらなる生殖細胞形成機構の解明の進展を期待する。

## 7 主な論文等:

### 原著論文

1. Yabuta, Y., Kurimoto, K., Ohinata, Y., Seki, Y., and Saitou, M. (2006). Gene expression dynamics during germline specification in mice identified by quantitative single-cell gene expression profiling. **Biol. Reprod.**, 75, 705–716
2. Kurimoto, K., Yabuta, Y., Ohinata, Y., Ono, Y., Uno, D. K., Yamada, R. G., Ueda, H. R., and Saitou, M. (2006). An improved single-cell cDNA amplification method for efficient high-density oligonucleotide microarray analysis. **Nuc. Acids Res.**, 34, e42.
3. \*Saitou, M., Payer, B., O'Carroll, D., Ohinata, Y., and \*Surani, M. A. (2005). Blimp1 and the emergence of the germ line during development in the mouse. **Cell Cycle**, 4, 1736–1740.  
\* Co-correspondence
4. Ohinata, Y., Payer, B., O'Carroll, D., Ancelin, K., Ono, Y., Sano, M., Barton, S. C., Obukhanych, T., Nussenzweig, M., Tarakhovskiy, A., \*Saitou, M., and \*Surani, M. A. (2005). Blimp1 is a critical determinant of the germ cell lineage in mice. **Nature**, 436, 207–213.  
\* Co-correspondence
5. Seki, Y., Hayashi, K., Itoh, K., Mizugaki, M., Saitou, M., and Matsui, Y. (2005). Extensive and orderly reprogramming of genome-wide chromatin modifications associated with specification and early development of germ cells in mice. **Dev. Biol.** 278, 440–458.

他に論文 4 件(国際)、総説 9 件(国際 2 件、国内 7 件)、口頭発表 20 件(国際 9 件、国内 11 件)

特許出願:国内1件

受賞:なし

### 招待講演

1. 斎藤通紀、平成 18 年 8 月 4–5 日、第 25 回分子病理学研究会、東京、特別講演、「生殖細胞の起源と特質：ゲノム情報の再編集と全能性」
2. 斎藤通紀、平成 18 年 3 月 1–3 日、第 5 回日本生化学会国際シンポジウム(JBS バイオフロンティアシンポジウム)、軽井沢、「Germline specification in mice: A genetic program for epigenetic reprogramming」
3. 斎藤通紀、平成 18 年 2 月 24–26 日、第 2 回宮崎サイエンスキャンプ、宮崎、「生殖細胞の起源と特質：ゲノム情報の再編集と全能性」
4. 斎藤通紀、平成 17 年 12 月 7–10 日、第 28 回日本分子生物学会年会、福岡、シンポジウム、「Germline recruitment in mice: A genetic program for epigenetic reprogramming」
5. 斎藤通紀、平成 17 年 11 月 22 日、第 2 回クロマチン・フロンティアーズ・ジャパン、京都、「マウス生殖細胞系列の決定とゲノム再編成」
6. Mitinori Saitou、平成 17 年 10 月 22 日–23 日、Mammalian Oogenesis and Epigenetic

- Modification、上総、'Specification of germ cell fate in mice: A genetic program for epigenetic reprogramming'
7. 斎藤通紀、平成 17 年 10 月 19–22 日、第 78 回日本生化学会大会、神戸、ミニシンポジウム、'Germline recruitment in mice: A genetic program for epigenetic reprogramming'
  8. Mitinori Saitou、平成 17 年 10 月 17–18 日、The 17<sup>th</sup> Annual Meeting of the Korean Society for Molecular and Cellular Biology、Seoul、シンポジウム、'Germ line specification in mice: A genetic program for epigenetic reprogramming'
  9. Mitinori Saitou、平成 17 年 9 月 1–3 日、Ernst Schering Research Foundation Workshop 60、'Stem Cells in Reproduction and in the Brain'、神戸、'Germline recruitment; a genetic program for epigenetic reprogramming'
  10. Mitinori Saitou、平成 16 年 11 月 15–16 日、Kobe University The 21st Century COE Program Symposium 'Signal Transduction in Gametogenesis and Fertilization'、神戸、'Single cell analysis of a molecular programme for the birth of germ cell lineage in mice'
  11. 斎藤通紀、平成 16 年 5 月 15–16 日、第 45 回日本哺乳動物卵子学会、大津、特別講演、「マウス生殖細胞形成機構の全容解明に向けて」
  12. 斎藤通紀、平成 15 年 10 月 15–18 日、第 76 回日本生化学会大会、神戸、「マウス初期発生と生殖細胞形成の分子プログラム」

## 研究課題別評価

### 1 研究課題名:

膜輸送分子 Protrudin による神経突起形成機構の解明と神経再生への応用

### 2 研究者氏名:

白根 道子

### 3 研究のねらい:

脳の複雑な働きを担っている神経細胞は、情報ネットワークを身体中に張り巡らせるために、神経突起と呼ばれる突起を有している。神経変性疾患や、脳虚血・脳挫傷・脊髄損傷といった神経損傷において、神経再生の為に神経突起形成の分子機構を解明することは重要な問題である。私は中枢神経系に高発現しているイムノフィリン FKBP38 に結合する新規タンパク質 protrudin を同定し、その神経突起形成能を見出した。本研究課題においては、protrudin による神経突起形成のメカニズムを解明し、更に神経再生への応用を目指すことを目的とした。

### 4 研究成果:

脳の構成単位である神経細胞は、神経回路を形成するために多数の神経突起を出しており、情報の入力・出力を担っている。神経突起の中には1メートルにも及ぶ長いものも存在する。

これまで神経突起形成のメカニズムについては、細胞骨格の再構築の制御という観点で多くの研究がなされてきた。しかし、突起が形成されるということは必然的にその部位における細胞膜の表面積が増大することでもある。つまり神経突起を形成するためには突起部分の細胞膜を構成する材料を供給する必要があるが、細胞膜成分の輸送システムの機構についてはほとんど知られていなかった。

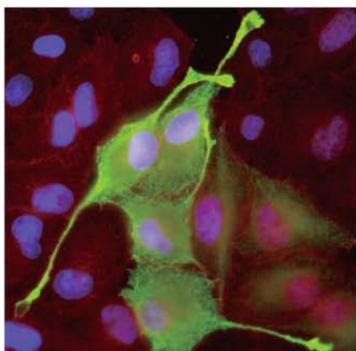
#### 1) 膜のリサイクルによる神経突起形成

神経突起が形成されるためには、細胞内の膜成分が突起形成部位に限定して供給されなければならない。その突起への膜成分の供給は、細胞膜のリサイクルを介してなされていることが既に知られていた。細胞膜のリサイクルとは、細胞膜の一部が細胞内に取り込まれて(エンドサイトーシス)、リサイクルエンドソームという細胞内小器官にいったん回収され、再び特異的な部位に向けて分泌される(エキソサイトーシス)システムである。私は、このリサイクルシステムを制御することにより神経突起形成を誘導する活性を持つ新規のタンパク質を発見した。

#### 2) 突起形成を誘導する protrudin の発見

私は、膜シャペロンタンパク質の FKBP38 が、結合分子の細胞内局在や機能を制御していることを明らかにしてきたが、FKBP38 の結合タンパク質を探索し、新規の膜タンパク質を同定した。たまたまこのタンパク質を HeLa 細胞(ヒト子宮頸癌由来)に過剰発現させたところ、神経突起を思わせるような突起が出現した(図 1)。

図1



Protrudinによる突起形成誘導

Protrudinを非神経細胞である子宮頸癌細胞株(HeLa細胞)に強制的に発現させると、神経突起に類似した突起が出現した。

(緑:Protrudin、赤:アクチンフィラメント、青:核)

この突起は、いわゆる filopodia と呼ばれるアクチンフィラメントを主体とする微小な構造物ではなく、

microtubule の芯が通ったシャフトのような大型の構造物であり、その先端は神経突起の成長円錐のような形態をしていた。そこで「突起が伸びる」という意味の“protrude(プロトルード)”という英語にちなんで、このタンパク質を“protrudin(プロトルーディン)”と命名した。

### 3) Protrudin の発現分布

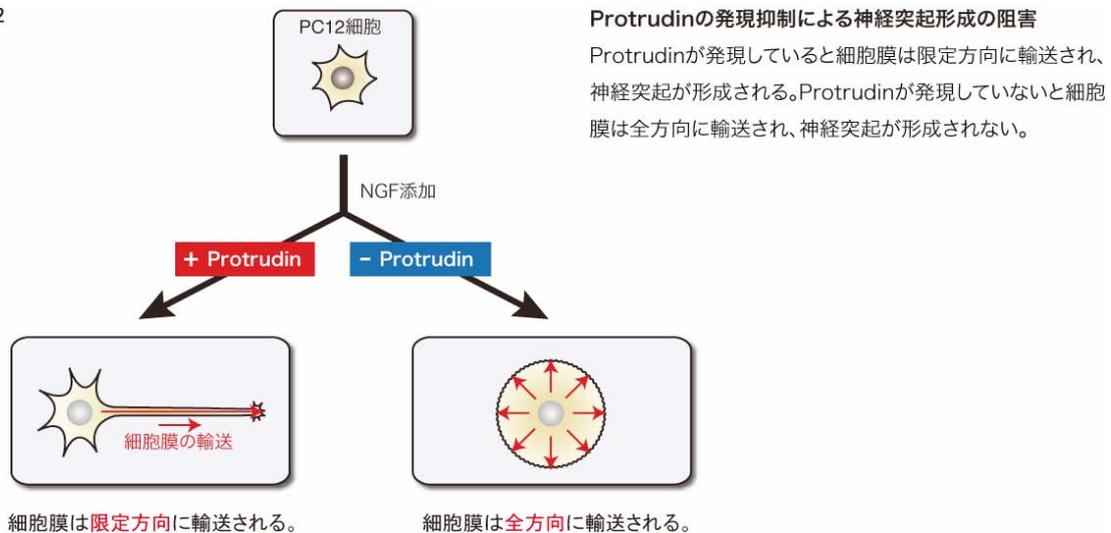
Protrudin の組織発現分布を調べたところ、脳、脊髄などの中枢神経系に高い発現が認められた。さまざまな細胞株において protrudin の発現レベルを比較すると、PC12 細胞などの神経細胞株で高い発現が認められた。

また、マウス脳神経の初代培養細胞において protrudin の細胞内発現分布を観察すると、細胞周縁の細胞膜や核に近接した中心体近傍、さらに神経突起先端の成長円錐に強い発現が認められた。PC12 細胞は神経成長因子 NGF を添加すると神経突起を形成する。PC12 細胞に NGF を添加すると、初め細胞質全体に分散していた Protrudin は、数時間後にいったん中心体近傍に強く蓄積し、その後突起の伸長と共に突起先端へと移動する、という特徴的な局在変化が観察された。また中心体近傍の protrudin が集積する部位は、Rab11 が局在するリサイクルエンドソームという細胞内小器官であった。

### 4) Protrudin の抑制による神経突起形成の阻害

PC12 細胞において RNAi により protrudin のタンパク質発現を低下(ノックダウン)させたところ、NGF 添加による神経突起形成が阻害された。NGF 添加の時間経過と共に、コントロール細胞では限定方向へ細胞膜が伸展して突起形成を示したのに対し、ノックダウン細胞では全方向へ細胞膜が伸展して細胞全体が広がった形態を示した(図 2)。よって protrudin は神経突起の形成に必要なタンパク質であることがわかった。

図 2



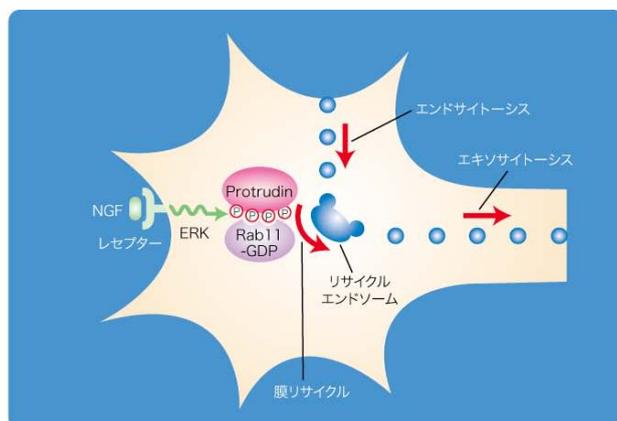
### 5) Protrudin と Rab11 の結合による膜リサイクルの制御

細胞内のさまざまな小胞輸送は各種膜系の変形や移動などを行っており、それらは Rab という GTPase タンパク質ファミリーによって厳密に制御されている。Rab11 はリサイクルエンドソームにおいて膜のリサイクル輸送を制御している分子である。共免疫沈降結合実験により、protrudin は GDP 結合型の Rab11 と結合することがわかった。Rab ファミリーを含む多くの GTP 結合タンパク質のエフェクター分子のほとんどが GTP 結合型に親和性を持ち、GDP 結合型には付かないことを考えると、protrudin はその点において特殊である。Protrudin の Rab11 結合部位は、GDP 結合型の Rab と結合する GDI(GDP Dissociation Inhibitor)と部分的に類似性があり、この点からも GDP 結合型に親和性を示す数少ないタンパク質のひとつであることが支持される。Protrudin と Rab11 の結合は、NGF 依存的に protrudin がリン酸化されることで促進されることがわかった。この詳細を検

討すると、NGFによって活性化されるMAPKのERKがprotrudinをリン酸化していることが明らかになった。さらにprotrudinが及ぼす膜リサイクルへの影響について検討するために、神経軸索特異的に輸送されるリサイクルエンドソームの動態を間接的な方法で観察した。その結果、protrudinが実際に方向限定的な膜リサイクルの促進作用を有することが明らかになった。

以上、protrudinの作用機序を解析し、以下のようなメカニズムで神経突起が形成されることを突き止めた(図3)。

図3



Protrudinによる神経突起形成のメカニズム

ProtrudinはNGFからのシグナルの下流でERKによってリン酸化され、Rab11-GDPと結合する。そして細胞膜成分がリサイクル輸送によって突起形成部位に運ばれ、神経突起の形成が誘導される。

①NGFが細胞表面の受容体に結合する。②そのシグナルに応じてERKが活性化され、protrudinの複数の部位がリン酸化される。③リン酸化されたprotrudinがRab11-GDPと結合する。④それに伴い、突起形成部位への方向限定的な細胞膜成分のリサイクル輸送が促進される。⑤その結果、神経突起形成が誘導される。Protrudinがないと、この方向限定性が失われ、細胞膜全体に小胞輸送が起こる結果、細胞膜は全方向に向けて伸展し、細胞が菲薄化する。

#### 6) Protrudinの神経変性疾患への関与

遺伝性痙性対麻痺は皮質脊髄路の神経変性によって徐々に歩行困難になる疾患であり、細胞膜輸送の異常が関与することが示唆されている。最近、遺伝性痙性対麻痺の患者においてprotrudinの遺伝子変異が報告された。私の結果と併せて考えると、遺伝性痙性対麻痺患者の神経細胞においてprotrudinの機能異常によって細胞膜の輸送に障害が生じることが、この疾患の発症メカニズムであると推定される。

私の発見は、この疾患の病因解明に大きく寄与するだけでなく、protrudinによる神経変性疾患の治療や神経移植への応用の可能性を示すものである。

#### 5 自己評価:

神経突起形成の分子機構として、新たに細胞膜のリサイクリングシステムの関与を見出した。またその鍵となるタンパク質protrudinによる、神経突起形成の詳細な作用機序を明らかにした。更に、神経変性疾患の発症原因との関連性が明らかになった。

期間内に達成できなかったこととして、神経変性疾患への応用を試みるまでに至らなかった。また、研究課題を提案した当初、protrudinとリン脂質との関連を解明することを研究項目のひとつに掲げていたが、期間内に明らかに出来なかった。

#### 6 研究総括の見解:

自ら見いだしたprotrudinの膜輸送分子としての機能を解析し、神経突起形成機構の新しい局面を開いたことは、その結果がScience誌から発信されたことから明らかなように高く評価できる。Protrudinのリン酸化、GDPと結合したRab11との反応、方向限定的な細胞膜成分のリサイクル輸送の促進など独自のProtrudin世界を作り出したことはさきがけ研究の成果として誇るべきものである。この成果を神経変性疾患の理解、治療への応用が次の課題と考える。

## 7 主な論文等

### 原著論文

1. Shirane, M., and Nakayama, K.-i.:  
Protrudin induces neurite formation by directional membrane trafficking. **Science**. 314: 818–821, 2006
2. Wang, H. Q., Nakaya, Y., Du, Z., Yamane, T., Shirane, M., Kudo, T., Takeda, M., Takebayashi, K., Noda, Y., Nakayama, K. I., Nishimura, M.:  
Interaction of presenilins with FKBP38 promotes apoptosis by reducing mitochondrial Bcl-2. **Hum. Mol. Genet.** 14: 1889–1902, 2005

他に論文 0 件、総説 3 件(国内 3 件)、口頭発表 6 件(国際 4 件、国内 2 件)

特許出願: 外国 1 件

受賞: 無し

招待講演: 無し

## 研究課題別評価

### 1 研究課題名:

有糸分裂チェックポイント遺伝子 CHFR のがん診断・治療への応用

### 2 研究者氏名:

豊田 実

### 3 研究のねらい:

細胞周期のチェックポイントは細胞に様々なストレスが加えられた際、細胞がストレスに対応するため、細胞周期を停止させ、問題を修復することに重要である。がんにおいては、しばしば細胞周期のチェックポイントに関与する遺伝子に異常が起き、その分子機構について報告されてきた。われわれは、これまで報告が少ない有糸分裂期チェックポイントに関連する CHFR について、がんにおける異常メチル化によるサイレンシングについて報告した(Proc Natl Acad Sci USA, 2003)。CHFR は ring finger domain を有する、ユビキチンリガーゼで、G2 期から分裂期への途中 prophase において、微小管ストレスがあった際、核膜が崩壊するか否かのチェックポイントに関与する。しかし、チェックポイントの分子機構や生理的役割、ユビキチンの基質などについては未知の点が多い。本研究では、CHFR による分裂期チェックポイントの分子機構を明らかにし、がんにおける微小管阻害剤感受性予測への応用や、分子標的としての可能性について検討する。また、CHFR 不活化の機構として、DNA メチル化を有するがんの特徴を明らかにする。さらに、ノックアウトマウスを作成による、個体における機能解析や発がんにおける役割の解析を行う。

### 4 研究成果:

#### 1). CHFR 遺伝子の異常メチル化を指標とした微小管阻害剤感受性の予測およびがん診断

CHFR が異常メチル化を示すがん細胞株は、微小管阻害剤処理により、Cyclin B1 の核への蓄積、Histone H3ser10 のリン酸化、核の凝集など Prophase チェックポイントの異常を示した。CHFR が異常メチル化を示すがん細胞株は、paclitaxel や docetaxel などの微小管阻害剤により誘導されるアポトーシスに高い感受性を示した。口腔扁平上皮がん臨床例の術前化学療法においても、CHFR の異常メチル化は、docetaxel によるネオアジュバント治療の感受性予測に有用と考えられた。CHFR が正常に機能している腫瘍細胞は微小管阻害剤投与により、G2 期に停止してしまい、薬剤抵抗性を示す。そこでわれわれは、CHFR をノックダウンすることにより、微小管阻害剤の作用を増強出来るか検討した。CHFR ノックダウンするための shRNA ベクターを作成し、CHFR が発現している細胞株に導入したところ、微小管阻害剤処理による mitotic index の増加や薬剤感受性の増強を認めた(図1)。これらの結果より、CHFR は微小管阻害剤の感受性を増強する重要な分子標的と考えられた。また、CHFR の異常メチル化は、便や胃液、膵液、胆汁液からも検出可能であり、がんの分子マーカーとして有用である可能性が示唆された。大腸がんや胃がん以外でも、口腔扁平上皮がん、成人 T 細胞性白血病において、CHFR の異常メチル化による発現消失を認め、その不活化は幅広い腫瘍において重要であることが示唆された。

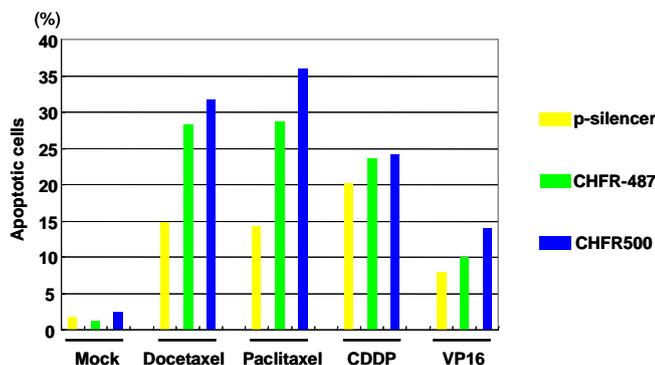


図1. CHFR のノックダウンにより微小管阻害剤、docetaxel、Paclitaxel に対する薬剤感受性が増強した。

2). CHFR 遺伝子の異常メチル化と CpG island methylator phenotype、EB ウイルス

CHFR がメチル化している腫瘍の特色を明らかにする目的で、CHFR 以外の遺伝子のジェネティックあるいはエピジェネティックな異常の解析を行った。大腸がんや胃がんにおいては、CHFR の異常メチル化は、ゲノムワイドな異常メチル化、CpG island methylator phenotype (CIMP)を示す腫瘍に特異的に認められた(図2)。これらの腫瘍は、K-ras あるいは BRAF 遺伝子の異常が非常に高率で、p53 の遺伝子変異をほとんど有しない、などの特徴を有した。胃癌においては、Epstein-Barr ウイルス陽性の胃がんにおいて CHFR のメチル化を高率に認めた。以上の結果から、異常メチル化はランダムに起きているのではなく、メチル化の制御機構に異常を有する腫瘍に特異的に起きている可能性が示唆された。

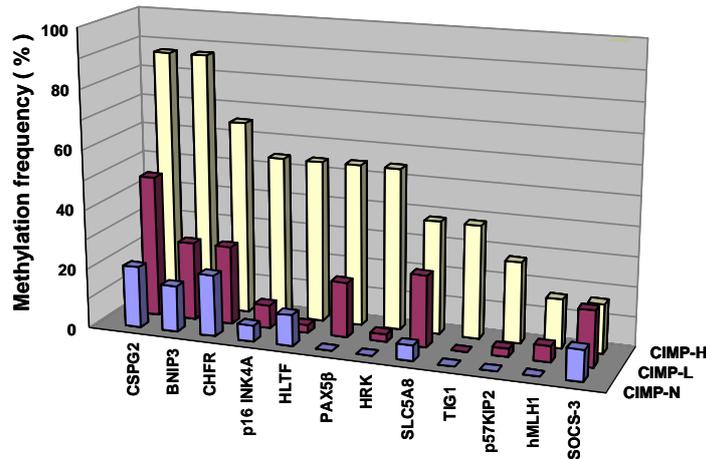


図2. CHFR の異常メチル化は、ゲノムワイドな異常メチル化、CpG island methylator phenotype (CIMP)を有する腫瘍で高率に認められる。

3). CHFR と相互作用する分子の解析

CHFR の機能を明らかにする目的で、Two hybrid screening 法あるいは、Flag-CHFR を遺伝子導入した細胞において、抗 Flag 抗体で免疫沈降される分子をマスペクトメトリーによって解析し、CHFR と相互作用する分子の同定を試みた。その結果、PARP1、TAB2 が CHFR と相互作用する分子として同定された。PARP1 は CHFR がメチル化している大腸がん細胞株 HCT116 に CHFR を遺伝子導入すると、PARP1 はユビキチン化を認め、CHFR の新しい基質と考えられた。また、PARP1 は微小管ストレスの際、Ku80 と相互作用することを明らかにした。また、CHFR が DNA メチル化により不活化されている腫瘍細胞において、PARP1 の発現が上昇していることを見出した。

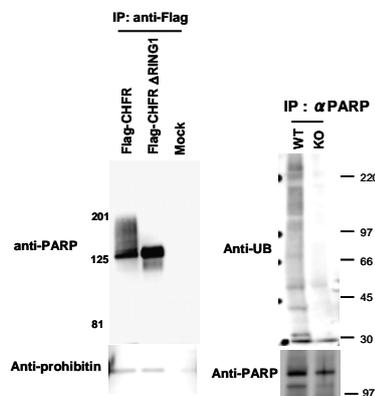


図3. CHFR による PARP1 のユビキチン化

#### 4). CHFR が関与するシグナル伝達経路の解析

CHFR が関与するシグナル伝達経路の解析する目的で、adenovirus vector により CHFR を遺伝子導入し、発現が変動する遺伝子に関して、cDNA microarray による網羅的解析を行った。CHFR の遺伝子導入により、IL-8 をはじめとする NF- $\kappa$ B の標的遺伝子の発現が抑制されており、CHFR が NF- $\kappa$ B を抑制する可能性が示唆された。また、CHFR により発現が抑制される遺伝子群には、Jun を始めとする MAPK 経路の下流遺伝子が多数存在し、CHFR による微小管ストレス応答に MAPK 経路の抑制が関与する可能性が示唆された。ルシフェラーゼアッセイにより、CHFR を HCT116 細胞に遺伝子導入すると NF- $\kappa$ B の転写活性が抑制されることが明らかとなった。また、この転写抑制は ring finger ドメインを欠く変異体にも認められ、CHFR が E3 活性非依存的に NF- $\kappa$ B を抑制していることが示唆された。クロマチン免疫沈降法により、CHFR による、IL-8 の発現抑制には、p65 のプロモーターへの結合が阻害されていることが関与すると考えられた。

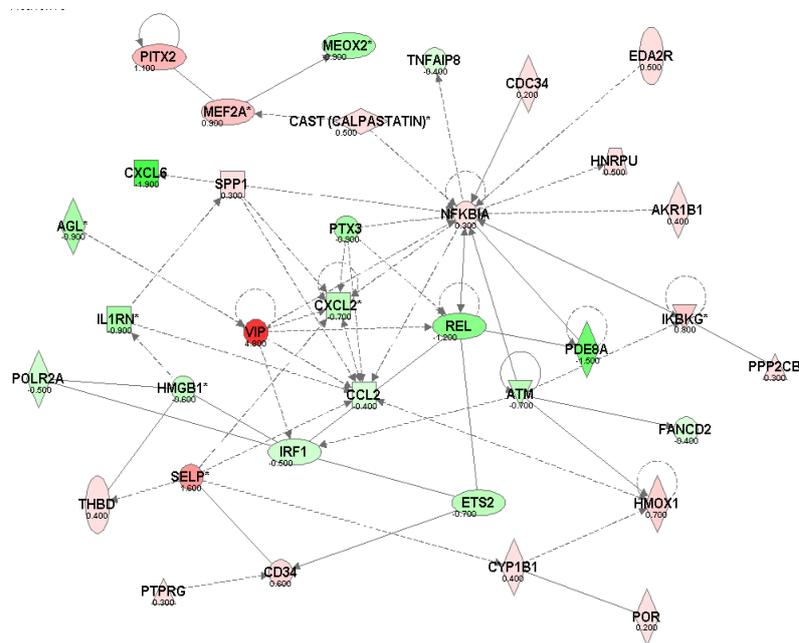


図4. CHFR の遺伝子導入により発現が上昇(赤字)あるいは減少した遺伝子(緑字)と NF- $\kappa$ B 経路 CHFR 導入により発現が変動した遺伝子をマイクロアレイで解析し、Ingenuity software にて可視化した。

#### 5). CHFR ノックアウトマウスの作成

CHFR<sup>-/-</sup>マウスは正常に発生し、CHFR は個体の発生には必須でないことが示唆された。CHFR<sup>-/-</sup>マウス由来の MEF は、docetaxel 処理により、8n 細胞の出現、アポトーシスの増強を認めた。CHFR が染色体の安定性の維持に重要であることが示唆された。CHFR ノックアウトマウスを作製し、バッククロスにより、C57B6 のバックグラウンドを持ったヘテロ欠失マウスを作製中である。

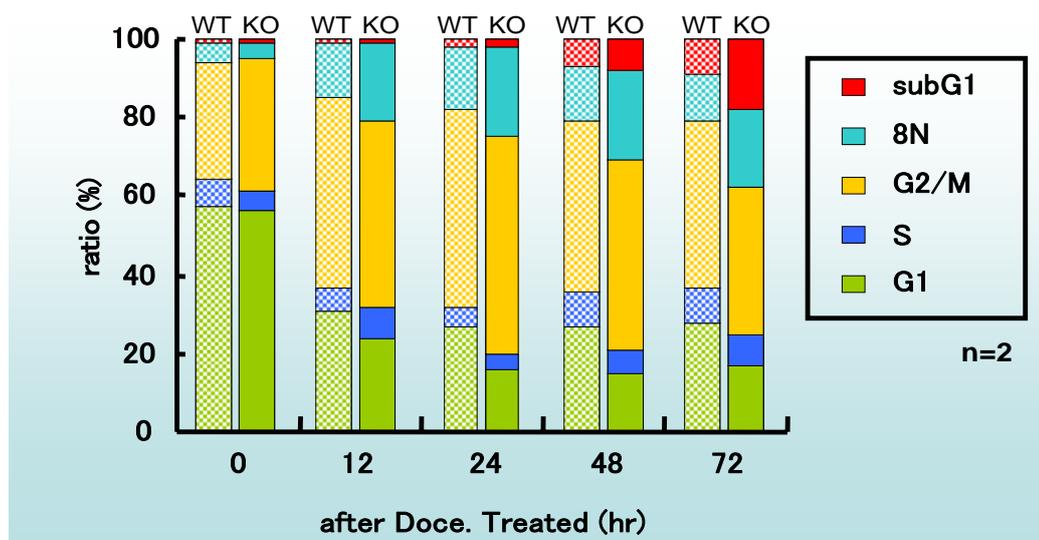


図5. CHFR ノックアウトマウス由来の MEF(KO)は、decetaxel 処理により、8N および subG1 分核の細胞が WT マウス由来 MEF(WT)に比べ優位に多い。

#### 5 自己評価:

当初目標とした、CHFR のメチル化をマーカーとした、微小管阻害剤に対する感受性予測や、CHFR の発現抑制による、微小管阻害剤の感受性の増強に関しては、一定の成果を上げたと思う。遺伝子メチル化解析に関しては、CHFR がメチル化している大腸がんや胃がんの分子異常を網羅的に解析し、メチル化陽性腫瘍の特徴を明らかにした。ここまでは、比較的予想通りの結果であった。今後異常メチル化がなぜ起こるのかについて、前がん病変における解析やモデル動物を用いた解析を詳細に行いたい。また、最近では、DNA メチル化に、RNA 依存性遺伝子サイレンシングが関与する可能性も見出し、今後さらに研究を進める予定である。

一方、生化学的解析や個体を用いた解析は、研究期間内に終了出来なかったものが多く、今後の課題である。CHFR が NF- $\kappa$ B の経路に関与することは予想外であったが、がん抑制遺伝子としての機能や、炎症への関与を考えると興味深い。NF- $\kappa$ B 抑制における、CHFR の作用点をピンポイントで抑えることができておらず、これも今後の課題である。今後、ノックアウトマウスを用いた個体レベルでの解析により、炎症や癌の感受性に CHFR 欠損がどのような役割を果たしているか、疾患との関連を重点に明らかにしていきたい。

#### 6 研究総括の見解:

有糸分裂チェックポイントで機能する CHFR に関して、遺伝子 CpG アイランドの異常メチル化を中心に、相互作用をする分子、シグナル伝達経路などいくつかの方向から解析し、しるべき結果を出して評価できる。このさきがけ研究では CHFR 遺伝子のメチル化解析が独自性の発揮ポイントであり、その方向でいかにがんに迫るかが期待されたので、他でもやりそうな機能解析に広がってしまったことに少々物足りなさを感じる。結果としての CHFR 遺伝子の異常メチル化であったとしても、その細胞ではなぜ異常メチル化が起こるのかの本源に切り込むことが重要と考えられ、今後の研究発展が期待される。

#### 7 主な論文等:

##### 原著論文

1. Suzuki H, Watkins DN, Jair KW, Schuebel KE, Markowitz SD, Chen WD, Pretlow TP, Yang B, Akiyama Y, Van Engeland M, Toyota M, Tokino T, Hinoda Y, Imai K, Herman JG, Baylin SB. Epigenetic inactivation of SFRP's complements genetic alterations to allow constitutive Wnt

- pathway signaling in human colorectal cancer. **Nat Genet**, 36: 417–422, 2004.
2. Ogi K, Toyota M, Mita H, Satoh A, Kashima L, Sasaki Y, Suzuki H, Akino K, Noguchi M, Shinomura Y, Imai K, Hiratsuka H and Tokino T. Small interfering RNA-induced CHFR silencing sensitizes oral squamous cell cancer cells to microtubule inhibitors. **Cancer Biol. Ther.** 4: 773–780, 2005.
  3. Akino K, Toyota M, Suzuki H, Mita H, Sasaki Y, Ohe–Toyota M, Issa JP, Hinoda Y, Imai K, Tokino T. The RAS effector RASSF2 is a novel tumor suppressor in colorectal cancer. **Gastroenterol**, 129: 156–169, 2005.
  4. Kusano M, Toyota M, Suzuki H, Akino K, Aoki F, Fujita M, Hosokawa M, Shinomura Y, Imai K, Tokino T. Genetic, epigenetic and clinicopathological features of gastric cancers with CpG island methylator phenotype and an association with Epstein–Barr virus. **Cancer**, 106, 1467–1479, 2006.
  5. Maruyama R, Aoki F, Toyota M, Sasaki Y, Akashi H, Mita H, Suzuki H, Akino K, Ohe–Toyota M, Maruyama Y, Tatsumi H, Imai K, Shinomura Y, Tokino T. Comparative genome analysis identified the vitamin D receptor gene as a direct target of p53-mediated transcriptional activation. **Cancer Res**, 66: 4574–4583.2006.

他に論文 14 件(国際)、総説 11 件(国際 4 件、国内 7 件)、口頭発表 15 件(国際 4 件、国内 11 件)

特許出願:国内 3 件

受賞:なし

招待講演:なし

## 研究課題別評価

### 1 研究課題名:

膜型増殖因子の持つ細胞増殖のアクセル機能とブレーキ解除機能の分子機構の解明

### 2 研究者氏名:

東山 繁樹

### 3 研究のねらい:

細胞が外界から様々なリガンド刺激を受けると膜型増殖因子 Heparin-binding EGF-like Growth Factor (proHB-EGF)が細胞膜表面上で shedding を受ける。shedding によって生じる遊離型細胞外ドメインは、EGF レセプターを活性化して増殖シグナルを惹起する。我々は shedding 後に細胞膜に残る C 末端断片ペプチド(CTF)が速やかに核内に移行し、転写抑制因子と結合しこれを核外に汲み出す反応を誘導することを見出した。これにより、HB-EGF-CTF が遺伝子転写抑制解除機能を持つことを明らかにし、新たなシグナル分子として機能すると共に、新たな細胞増殖シグナル経路が存在することを示した(J. Cell Biol. 163, 489-502, 2003)。本研究では膜型増殖因子が持つ増殖アクセル機能と増殖ブレーキ解除の巧妙な分子機構を明らかにし、細胞増殖分子機構の新たな概念を創出することを研究のねらいとした。

### 4 研究成果:

#### HB-EGF shedding (HB-EGF-CTF 産生) の分子機構

これまでに膜結合型 HB-EGF (proHB-EGF) の shedding の分子機構解明に向けてまず shedding 酵素の同定を行ってきた。さきがけ研究を始めるまでに、proHB-EGF の shedding 酵素として膜型メタロプロテアーゼ ADAM12 を同定していたが(Nature Med. 8: 35-40, 2002)、さらに、他の ADAM ファミリーメンバーの shedding 酵素活性を検討した。ADAM9、10、12、15、17、19 の各遺伝子欠損細胞株を用いて proHB-EGF の shedding を解析した。その結果、proHB-EGF の basal shedding には ADAM10、誘導型 shedding には ADAM17 がさらに関与することを示す実験結果を得た(文献 1)。またこれらの ADAM の活性制御機構を明らかにする目的で ADAM の細胞内ドメインに結合する蛋白質の同定を試みた。ADAM12 細胞内ドメインをベイトにし、ヒト心臓の cDNA ライブラリーより酵母 two-hybrid 法によりスクリーニングした結果、16種類の遺伝子を同定した。ADAM12 細胞内ドメインは4つのプロリンリッチドメインを持つことから、その結合相手と考えられる SH3 ドメインをコードする1つの遺伝子に着目しその cDNA 全長を PCR によりクローニングした。得られた遺伝子は EST データベースでは SH3d19 として登録されている新規の遺伝子であり、ADAM に結合することから Eve-1 と名付けた。

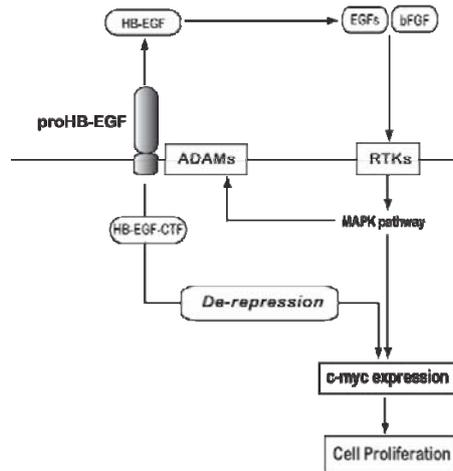
Eve-1 は 767 個のアミノ酸からなる蛋白質で C-末端領域に SH3 ドメインをタンデムに 4 個持つ Eve-1a と、さらにこの分子の中段に 23 アミノ酸の挿入を持つことにより新たな SH3 ドメインを形成し、合計 5 個の SH3 ドメインをもつスプライシングバリエーションの Eve-1b からなる。また、翻訳開始が 371 番目の Met から始まるバリエーションが Eve-1a と Eve-1b に存在し、それぞれ Eve-1c と Eve-1d と名付けた。Eve-1 蛋白質は SH3 ドメインを介して ADAM12 のプロリンリッチドメインと相互作用する。また Eve-1a と Eve-1b は N-末端領域にプロリンリッチドメインを 7 個持ち、この領域は ADAM12 との相互作用するための制御ドメインとして機能することが予測される。Eve-1 の機能を明らかにするために、ADAM12 による HB-EGF のプロセッシングに及ぼす効果を、Eve-1 の特異的 siRNA によるノックダウンにより検討した。siRNA は HT1080/HB-EGF-AP 細胞に効率良く導入され、導入後 48 時間での Eve-1 の遺伝子発現を PCR により検出した結果、顕著に抑制しているのを確認した。この細胞を用いて、フォルボールエステル(TPA) および angiotensin II によって引き起こされる HB-EGF-AP のプロセッシングを処理後 30 分後の培養上清中の AP 活性の検出により検討した。その結果、Eve-1 のノックダウンにより TPA による HB-EGF-AP の shedding は約 70% 抑制された。一方、Eve-1 のノックダウンにより angiotensin II による HB-EGF-AP のプロセッシングは各々約 55% 抑制された。以上の結果から、Eve-1 は TPA ならびに angiotensin II 刺激による HB-EGF shedding

のシグナル経路に位置し、ADAM12 の活性化を正に制御する因子であると推測された(文献 2)。

#### **HB-EGF-CTF による細胞周期および周期関連因子の制御**

1) **HB-EGF-CTF と PLZF の細胞周期進行に伴う細胞内局在変化**: proHB-EGF の shedding によって産生される HB-EGF-CTF は核に移行し、転写抑制因子 PLZF と相互作用しながらその細胞内局在を核内から核外へと大きく変化させることをこれまでに報告してきた。また、培養細胞系においては細胞周期進行に伴い内在性 proHB-EGF が shedding されることが考えられていたが、その詳細は明らかではなかった。そこで、proHB-EGF shedding のモニタリング用細胞として作製した proHB-EGF-Alkaline phosphatase 発現ヒト繊維芽肉腫細胞株 HT1080 /HB-AP 細胞と HB-EGF と PLZF を内在性にもつ初代培養ヒト表皮角化細胞を用いて、細胞周期一回転における proHB-EGF shedding の反応、HB-EGF-CTF 産生とその細胞内局在変化、ならびに PLZF の細胞内局在変化を、蛍光免疫染色とレーザーสキャンサイトメーターにより細胞周期画分解析と細胞内局在を同時に解析することで検討した。その結果、細胞表面 proHB-EGF の shedding は細胞周期 G1 後期で shedding が誘導されることが示された。更に G1 後期により産生される HB-EGF-TMC は S 期と G2 期には核内に集積が認められ、M 期前期では中心体付近に局在する様になる。一方、PLZF は G1 期では核に局在し、S 期には細胞質への移行が観察され、G2 期では完全に細胞質へとその局在を変化させた。これらの観察結果から、HB-EGF-CTF と PLZF の細胞周期進行に伴う局在変化は、予測通りの排他的局在の変化を示した。以上のことから、proHB-EGF の shedding は細胞周期進行と連動し、PLZF の機能解除を誘導する HB-EGF-CTF シグナルが稼働することを示すことができた(文献3)。

2) **PLZF による c-myc の発現抑制の解除**: 細胞増殖因子シグナルの下流に位置し、細胞分裂促進に必須の転写因子 c-myc の遺伝子発現が PLZF により抑制されることが報告されている。HB-EGF-CTF が PLZF の機能を解除することから、HB-EGF-CTF シグナルが増殖因子による c-Myc 遺伝子発現誘導シグナルの中間に位置するのではないかと考え、*Hb-egf*<sup>-/-</sup> 繊維芽細胞を用いて bFGF, EGF, PDGF による c-Myc 遺伝子発現誘導を解析した。まず、野生型繊維芽細胞 (*Hb-egf*<sup>+/+</sup>) で bFGF, EGF, PDGF 刺激により内在性の HB-EGF の shedding が誘導され、HB-EGF-CTF は核移行することを確認した。また、上記各増殖因子受容体からのシグナルは MAP kinase ERK1/2 の活性化で見る限り、*Hb-egf*<sup>+/+</sup> および *Hb-egf*<sup>-/-</sup> 繊維芽細胞で変化は無かった。次に、*Hb-egf*<sup>+/+</sup> および *Hb-egf*<sup>-/-</sup> 繊維芽細胞を上記各増殖因子により刺激し、c-Myc 遺伝子発現を RNA protection assay と定量 PCR により解析した。その結果細胞増殖因子シグナルにより誘導される c-Myc 遺伝子発現は *Hb-egf*<sup>-/-</sup> 繊維芽細胞では顕著に抑制されることが明らかとなった。また、*Hb-egf*<sup>-/-</sup> 繊維芽細胞では、*Hb-egf*<sup>+/+</sup> 繊維芽細胞に比べて、EGF と bFGF 増殖因子による細胞周期 S 期への進行が有意に抑制されることが明らかとなった。一方 PDGF による繊維芽細胞の増殖促進には有意さを持った細胞周期 S 期進行の遅延は認められなかった。さらに、*Hb-egf*<sup>-/-</sup> 繊維芽細胞に *Hb-egf* 遺伝子を導入し発現を回復させることで上記各増殖因子による c-Myc 遺伝子発現ならびに細胞周期 S 期進行への遅延が回復することを示した。これらの結果から HB-EGF-CTF シグナルが少なくとも EGF ならびに bFGF による c-Myc 遺伝子発現誘導において PLZF 等の転写抑制因子の解除に重要な機能をはたしていることを明らかにした。(論文投稿中)



**Figure 1.** A schematic diagram for the proposed role of HB-EGF-CTF signaling in c-Myc transcription induced by growth factor receptor activation.

### HB-EGF-CTF シグナルの破綻と病態

**遺伝子改変マウスの作製から:** これまでに HB-EGF のマウス個体での役割を明らかにするために遺伝子ノックアウトマウスを作製し、その表現型を解析した。その結果、ノックアウトマウスでは発生過程における心臓弁形成に致命的異常をきたすことを報告してきた (Pro. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100, 3221-3226, 2003)。さらに、*Hb-egf*<sup>lox/lox</sup> マウスと Tie-2 Cre マウスとの交配で作製した血管内皮特異的に *Hb-egf* 遺伝子を欠損させたマウス、ならびに、SM-22 Cre マウスとの交配で作製した平滑筋細胞特異的に *Hb-egf* 遺伝子を欠損させたマウスを作製し、表現型を解析した。その結果、両マウス共に発生過程における心臓弁形成に致命的な異常をきたし、肥大型心筋症を誘発した (Biochem. Biophys. Res. Commun. 350, 315-321, 2006)。一方、HB-EGF-CTF 領域を欠失させた遊離型のミュータント HB-EGF の遺伝子ノックインした soluble HB-EGF ノックインマウスはホモ接合体で重篤な肥大型心筋症を引き起こし死に至る。また、shedding 抵抗性のミュータント proHB-EGF の遺伝子をノックインした ucproHB-EGF ノックインマウスでは遊離型 HB-EGF の産生が抑制されていると同時に HB-EGF-CTF 産生も抑制されている。このマウスでは生後8ヶ月までに拡張型心筋症を引き起こし死に至ることを報告してきた (J. Cell Biol. 163, 469-475, 2003)。

また、これまでに proHB-EGF の shedding が皮膚創傷治癒に重要であること報告しており (J. Cell Biol. 151, 209-219, 2000)、これをさらに検討するために、*Hb-egf*<sup>lox/lox</sup> マウスと Keratin 5-Cre マウスとの交配により表皮細胞特異的に *Hb-egf* 遺伝子を欠損させたマウスを作製し、創傷治癒過程における HB-EGF の役割を解析した。Figure 10 と 11 に示す様に、*Hb-egf* 遺伝子欠損マウスでは背中への傷の治癒速度が創傷後7日目まで有意差を持って遅延することが示された(文献4)。

以上の結果から、proHB-EGF ならびに shedding は発生過程での心臓弁形成、ならびにその後の心筋細胞機能維持に必須であること、また表皮層創傷治癒過程で重要な役割を果たしていることが示唆された。しかし、HB-EGF-CTF シグナル本体が心臓弁形成や表皮層創傷治癒過程でどのように機能しているかはこのタイプの解析方法からでは限界があり、新たな技術開発が必要である。

### 5 自己評価:

膜型増殖因子 proHB-EGF が shedding され、細胞増殖アクセルとなる HB-EGF と増殖ブレーキ解除となる HB-EGF-CTF シグナルが EGF や bFGF などの他の増殖因子のシグナル伝達時にも連動して c-myc 遺伝子の発現を制御していることが示すことができたのは、当初の研究の狙いが適切であったと評価している。しかし、shedding は様々な細胞外刺激によって引き起こされる反応であることから、proHB-EGF の shedding のみを誘導したり、HB-EGF-CTF シグナルのみを起動させることは、生理的条件下ではほとんど不可能である。今後、CTF シグナルの解析を進めるため

には、CTF シグナルのみを起動させる新たな技術開発が必要であり、継続して本課題に取り組みたい。また、HB-EGF-CTF が細胞膜から核膜へ局在を変化させるその分子機構の解明には至らなかったが、これも生物学上、重要な課題として提案できたと考えている。今後、この分子機構の解明に迫りたい。

#### 6 研究総括の見解:

膜型増殖因子 proHB-EGF が、細胞外のリガンド刺激で膜型メタロプロテアーゼ ADAMS による切断を受け、細胞外ドメインは細胞増殖因子として機能し、細胞膜に残る C 末端ペプチドは核内に移行して転写抑制因子を核外に追い出すブレーキ解除の機能を発揮する分子機構を明らかにしたことは優れた研究成果と考える。特に、Eve タンパク質、転写因子 PLZF と C 末端ペプチドとの相互作用によるブレーキ解除機能の解明は、東山ワールドを作り出しユニークである。更なる研究展開と、その成果のヒト疾患の理解、克服への応用への貢献を期待する。

#### 7 主な論文等:

##### 原著論文

1. Sahin, U., Weskamp, G., Zhou, H., Higashiyama, S., Peschon, J., Hartmann, D., Safting, P. and Blobel, C.P.: Distinct roles for ADAM10 and 17 in ectodomain shedding of six EGFR-ligands. **J. Cell Biol.** 164: 769-779, 2004.
2. Tanaka, M., Nanba, D., Mori, S., Shiba F., Ishiguro, H., Yoshino, K., Matsuura, N. and Higashiyama, S.: ADAM-binding protein Eve-1 is required for ectodomain shedding of EGF receptor ligands. **J. Biol. Chem.** 279; 41950-41959, 2004.
3. Toki, F., Nanba, D., Matsuura, N. and Higashiyama, S.: Ectodomain shedding of membrane-anchored heparin-binding EGF like growth factor and subcellular localization of the C-terminal fragment in a cell cycle. **J. Cell. Physiol.** 202: 839-848, 2005.
4. Shirakata, Y., Kimura, R., Nanba, D., Morimoto, C., Yokota, K., Nakamura, M., Mekada, E., Higashiyama, S., and Hashimoto, K.: Heparin-binding EGF-like growth factor is essential for keratinocyte migration in skin wound healing. **J. Cell Science.** 118: 2363-2370, 2005.
5. Shiraiishi, K., Yamasaki, K., Nanba, D., Inoue, H., Hanakawa, Y., Shirakata, Y., Hashimoto, K., and Higashiyama, S.: Pbx1 is a major target of PLZF-mediated melanoma cell growth suppression. **Oncogene.** in press, 2006.

他に論文 18 件(国際 18 件)、総説 9 件(国際 3 件、国内 6 件)、口頭発表 8 件(国際 3 件、国内 5 件)

特許出願:なし

受賞:なし

##### 招待講演

1. Shigeki Higashiyama; Ectodomain shedding of membrane-anchored growth factor HB-EGF - new insight in signal transduction; International Symposium on Proteolysis (2003/11/12, Nagoya, Japan)
2. Shigeki Higashiyama; Ectodomain shedding of HB-EGF and novel cell signaling; International Symposium on Tumor Biology in Kanazawa (2005/1/20, Kanazawa, Japan).
3. Shigeki Higashiyama; Ectodomain shedding of membrane-anchored growth factor HB-EGF by ADAM and HB-EGF-C terminal fragment signaling; The Kennedy institute of Rheumatology Symposium. Metalloproteinases: Biology and Pathology (2005/11/21-22, London, UK)

## 研究課題別評価

### 1 研究課題名:

核マトリクス結合蛋白質による RNP 再構築と分配機構の解明

### 2 研究者氏名:

廣瀬 哲郎

### 3 研究のねらい:

ヒトをはじめとした哺乳類の遺伝子は数多くの長大なイントロンによって分断されている。そのため遺伝子が発現するためには、転写後段階でスプライシングなどの複雑な RNA プロセッシングが正確に行われ、さらにプロセッシングが完了した成熟 mRNA のみが選択的に細胞質に輸送され翻訳される必要がある。成熟 mRNA のみを効率的に核外輸送するための選択的な成熟 mRNA 認識には、その前段階の RNA スプライシング機構が重要な役割を果たしていることが知らせているが、その分子メカニズムは未知のままであった。一方、未成熟な前駆体 mRNA や切り出されたイントロン、さらには一部の蛋白質をコードしていないノンコーディング RNA(ncRNA)には積極的に RNA を核内に留め置く機構が働いており、このとき核マトリクスと呼ばれる核内構造体が重要な役割を果たしている事が示唆されている。そこで本研究では、細胞核で生み出された RNA がプロセッシングされ成熟化する過程と、それぞれの RNA 種のその後の細胞内の運命の決定機構との関わり合いを規定する分子メカニズムの解明を目標に研究を行った。

### 4 研究成果:

1) RNA の細胞内挙動を司る新規因子の同定  
RNA スプライシングの進行過程で、C1 と呼ばれるスプライシング中間体を含む段階で特異的にイントロンに結合する 160kDa の蛋白質 (IBP160) を部位特異的な UV クロスリンク法によって検出することに成功した。IBP160 は C1 ステージ特異的に、配列非依存的にイントロンのブランチ部位から 33~40 塩基上流の領域に結合する。また用いた4種類のイントロンのすべてで対応部位への結合が検出されたことからジェネラルなスプライシング因子であることが明らかになった。クロスリンクによって可視化した IBP160 の免疫沈降によってこの因子は、これまで機能未知であった KIAA0560 という RNA ヘリカーゼ様因子であることを同定した。さらに IBP160 は C1 複合体中で、核マトリクス結合因子の SRm160、スプライシングヘリカーゼ hPRP22 などと相互作用しており、イントロン内にコードされている機能性低分子 RNA(snoRNA)への蛋白質会合をスプライシング依存的に行う仲介因子であることも明らかにした<sup>[1]</sup>。

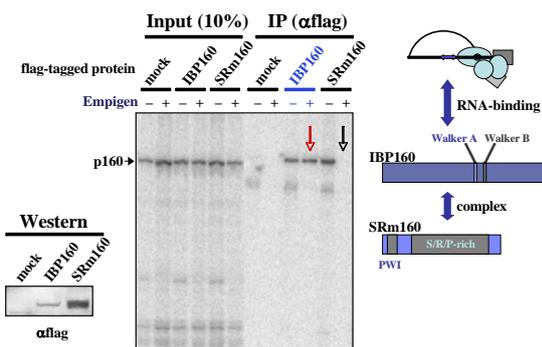


図 1 イントロンの部位特異的 UV クロスリンクにより検出された p160 の免疫沈降による同定 (赤矢印)。同じ移動度の SRm160 は IBP160 と相互作用している。

### 2) 成熟 mRNA の運命決定機構におけるイントロンの役割

核マトリクス結合因子 SRm160 は、成熟 mRNA の核外輸送や品質管理に中心的な役割を果たすエクソン境界複合体(EJC)の構成因子である。EJC はこれまでスプライシング反応の完了に連動して成熟エクソンの決まった位置(エクソン境界から 20~24 塩基上流)に会合し、成熟 mRNA を選択的に次のステップへと導くために働くことが分かっているが、EJC がどのようにスプライシングに連動して位置特異的に会合するのかについては未知のままであった。SRm160 がスプライシング中間体の C1 複合体においてイントロン上の IBP160 と結合しているという上記の発見から、その他の EJC 構成因子もスプライシング完了前の段階ですでにスプライシング装置内にリクルートされている可能性が浮上した。10 種類の EJC 構成因子の免疫沈降実験によって、C1 複合体中のイン

トロン結合 IBP160 が TAP を除くすべての EJC 因子と結合していることが明らかになった。このことからスプライシング完了時にエクソン上に会合すると考えられていた EJC が、その前段階ではイントロン結合因子と共にスプライシング装置内に存在していることが明らかになった。さらに驚くべき事にスプライシング完了時に EJC 会合が不可能な短いエクソンをもつ前駆体 mRNA を用いた場合にも、C1 複合体での EJC 因子は IBP160 と共にスプライシング装置に取り込まれていることが検出されたことから、この段階での EJC 因子の会合には、最終的に会合するエクソン配列は必要ないことが明らかになった。さらに RNAi による IBP160 のノックダウンによって、EJC 依存的な細胞内現象である NMD (ナンセンスコドン依存的な mRNA 分解) が著しく抑えられることが明らかになった。これによって C1 複合体での IBP160 と EJC 因子の結合は、最終的な EJC の機能にリンクしていることが証明された。この発見から EJC 会合が何故スプライシング (イントロンの除去) に依存して行われるのかについて部分的に答えが出せたといえる。

一方、P120 前駆体 mRNA を用いた *in vitro* スプライシング実験によって、EJC は第二のスプライソソームである U12 スプライソソームによるスプライシングの結果であってもエクソン上にリクルートされることを明らかにした<sup>[2]</sup>。また U12 スプライソソームによるスプライシング過程でも IBP160 がイントロンに結合することを検出し、これによって IBP160 を介した EJC 因子のリクルート経路は二種類のスプライソソーム間で共通であることを示す事ができた。

IBP160 はスプライシングが完了後イントロン上に留まり、イントロンのデブランチング前に解離することが明らかになった。上述のように IBP160 はスプライシングの完了した成熟 mRNA をスプライソソームから解離させるために働くヘリカーゼ hPRP22 とも相互作用していることから、IBP160 と相互作用している EJC 因子を解離させてエクソン上に会合させるステップと成熟 mRNA のスプライソソームからの放出がカップルしている可能性が浮上した。

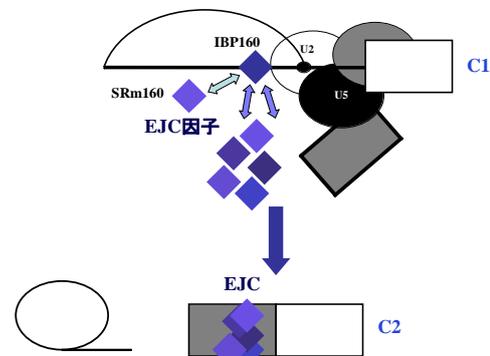


図2 EJC 会合前段階に各構成因子はイントロン上に IBP160 を介してリクルートされる。

### 3) 複数の RNA 核内留置パターンの検出

さきがけ研究期間に RNA 研究を取り巻く環境は大きく変化した。トランスクリプトーム解析の結果、膨大な数の蛋白質をコードしないノンコーディング RNA が発見され、その新規機能に注目が集まっている。こうした ncRNA が上記の研究で明らかにしたようなメカニズムによって品質管理を受けて細胞内を輸送されるのかどうかを明らかにする目的で、ヒト完全長 cDNA データベース (H-Inv Release2) に掲載されている ncRNA 様転写物のうち、遺伝子構造、発現に信憑性があり、かつ HeLa 細胞で発現している約 80 個の細胞内局在を解析した。HeLa 細胞を 1) 2 種類の界面活性剤を使って段階的に分画する方法、2) 物理的な破壊後にショ糖密度勾配遠心で分画する方法の 2 つを採用して、細胞質と核、さらに核内のサブ分画を調整し、それぞれの分画に含まれる RNA 中の各 RNA の量をリアルタイム PCR で測定した。その結果、mRNA は大部分が細胞質に局在化しているのに対して、ncRNA は核内の含有量が多く mRNA のように大部分が細胞質に存在しているものは全体の 2% に過ぎなかった。その他の ncRNA は核内と細胞質の両方、ほとんどが核質、核小体、その他の 4 つのパターンで局在していることが明らかになった。このうち、前駆体 mRNA が局在化している核マトリクス分画に多くの ncRNA も存在していることが明らかになった。このことから核内留置のメカニズムは、RNA プロセシングが不完全な前駆体 mRNA のみに適用されるのではなく、多数の ncRNA の局在決定にも重要な役割を果たしている事が明らかになった。また ncRNA に対する核内留置のメカニズムは複数あり、それによって核内の異なる場所で異なる機能を果たす事に寄与していることが考えられる。

### 5 自己評価:

本研究では、前駆体 mRNA と成熟 mRNA とがどのように選別されて核内留置と核外輸送という

2つの異なる挙動を選択するのかを理解することが目標であった。当初、この選別に重要な役割を果たすと考えられたイントロン結合蛋白質 IBP160 は、既知のスプライシング因子 SRm160 であると考えていたが、本研究の途上で実は SRm160 は別の因子を介して間接的にイントロンに結合しており、直接イントロンに結合している因子は、それまで機能未知であった KIAA0560 というヘリカーゼ様因子であることを同定することができた。当初の計画はこれによって方向を修正する必要に迫られたが、結果的にジェネラルな新規スプライシング因子の機能同定に結びつき、さらにはこの因子が EJC の会合パスウェイの基点となっていることも明らかにすることができた。これによって成熟 mRNA の核外輸送の側面は十分にオリジナリティの高い成果を得る事ができたと考えている。一方で RNA の核内留置に関しては、結局そのメカニズムの解明にまではいたらなかった。その代わりに核内に留置されて機能している数多くの ncRNA を見いだす事ができた。さらにその存在様式は核内の複数部位に局在化しており、核内留置機構が複数存在する可能性が浮上してきた。本研究の開始後、RNA 研究フィールドは世界的に注目の分野の一つに変貌し、ゲノムの中に数多く見つかったノンコーディング RNA の機能に大きな注目が集まっている。本研究で得られた ncRNA の核内留置の発見は、今後の ncRNA の機能解明のために重要な知見となると考えられる。本研究期間で成し遂げられなかった核内留置のメカニズムの研究は、今後の ncRNA 研究と交えて展開していきたいと考えている。

#### 6 研究総括の見解:

本さがけ研究において、核マトリクス結合因子 SRm160 による成熟 mRNA の核外輸送や欠陥 mRNA の核内留め置きによる品質管理の機構解明を目指したところ、同じ分子量で異なる新規因子 IBP160 を見出し、それがイントロンに結合してスプライシング中間体 C1 複合体形成の中心的役割をしていることを明らかにしたことは、高く評価に値する。狙ったとおりに進む研究はたいしたことはなく、思わぬ発見につながり理解を大きく変換させる結果が出る研究が優れた研究といえる。本研究はその範疇に入り、また、Steitz 研での研究の継続からの脱皮となる成果でもある。mRNA の品質管理、ncRNA の品質管理、細胞内輸送が今後の大きな課題と考えられるが、独自の切り口で世界に先駆けた展開を期待する。

#### 7 主な論文等:

##### 原著論文

1. Hirose, T., Ideue, T., Nagai, M., Hagiwara, M., Shu, M-D., Steitz, J.A. A spliceosomal intron binding protein, IBP160, links position-dependent assembly of intron-encoded box C/D snoRNP to pre-mRNA splicing. *Mol. Cell.* 23, 673-684. (2006)
2. Hirose, T., Shu, M-D., Steitz, J. A. Splicing of U12-type introns deposits an exon junction complex competent to induce nonsense-mediated mRNA decay. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101, 17976-17981 (2004)

他に総説 7 件(国内 7 件)、口頭発表 11 件(国際 2 件、国内 9 件)

特許出願:なし

##### 受賞

(財)病態代謝研究会、最優秀理事賞 (2006 年)

##### 招待講演

1. T. Hirose、イントロンとエクソンのスプライシング後運命決定機構、第 78 回日本生化学会ミニシンポジウム (2005/10/22)
2. T. Hirose Mechanistic insights into the linkage between pre-mRNA splicing and snoRNP biogenesis. 文部省特定領域研究「RNA 情報網」公開シンポジウム (2005/8/8)
3. T.Hirose Strategy for efficient expression of intron-encoded small RNAs. International symposium: Strategies for the acquirement of functional diversity of

proteins(東京, 2005/1/20)

4. T.Hirose Novel coupling mechanism between splicing and intron-encoded snoRNP biogenesis.  
国際シンポジウム「選択的スプライシングによる多様性の創造」(東京, 2004/12/4)

## 研究課題別評価

### 1 研究課題名:

Wnt シグナルによる神経細胞のネットワーク形成制御

### 2 研究者氏名:

三木 裕明

### 3 研究のねらい:

Wnt シグナルはショウジョウバエの形態形成を制御するシグナル伝達系として発見された。ヒトでも同様のシグナル系が進化的に保存されており、増殖や分化、また形態など様々な細胞機能を制御している。Wnt シグナルは Dishevelled などの細胞内シグナル伝達因子を経て伝えられるが、中でも最もよく解析されているのが beta-catenin という蛋白質を安定化して、細胞の増殖制御に関わる標的遺伝子の発現を誘導する経路である。この beta-catenin 安定化シグナル経路の異常な活性化が、ヒトにおける多くのがんの発生原因になっていることも知られており、強い注目を集めてきた。その一方で、Wnt シグナルが細胞の形態制御、特に神経細胞の軸索や樹状突起の伸展制御に重要であることも現象論レベルにおいて知られている。しかし、Wnt 刺激を受けた神経細胞がそのシグナルに対してどのように応答し、突起伸展を起こしているのかは殆ど未解明の状態に留まっている。本研究では、Wnt シグナルから神経細胞の突起伸展に至る未知のシグナル経路の究明を目指し、神経ネットワーク形成におけるその重要性の解明を目指した。

### 4 研究成果:

Dishevelled (Dvl) は Wnt シグナル伝達に必須の役割を果たすことが知られるアダプター蛋白質である。この Dvl を神経突起形成の分子メカニズム解析に汎用されている神経芽細胞腫 N1E-115 細胞に強制発現させたところ、非常に長い神経突起伸展を誘導することが分かった。海馬から採取した初代培養系の神経細胞に Dvl を発現させると、N1E-115 細胞と同様に神経突起の伸展を引き起こした。この海馬神経細胞の培養系においては、神経細胞が本来有している軸索と樹状突起という形態や機能の異なる 2 種類の突起構造が形成されている。Dvl の発現によって、これらの異なる突起のどちらが、もしくは両方が影響を受けているのか調べるため、Tau と MAP2 というマーカー蛋白質の局在を調べた。その結果、Dvl の発現によって影響を受けているのは樹状突起のみであり、軸索の本数や長さには全く影響しないことが分かった。これらの実験結果から Dvl が海馬神経細胞の樹状突起伸展を特異的に制御していることが分かった。

この分子メカニズムを明らかにするため、Dvl のどの部分が神経突起伸展に重要かを調べた。その結果、Dvl 蛋白質の中央部に位置する PDZ ドメインが突起伸展に必須であることが分かった。この部分に結合する蛋白質の探索などから、あるリン酸化酵素が重要な役割を果たしている可能性が示唆された。実際、その酵素を海馬神経細胞で過剰発現すると樹状突起が退縮し、RNA 干渉によって抑制すると樹状突起の異常な伸展が引き起こされた。その一方で、軸索に対しては Dvl の場合と同様に全く影響は観察されなかった。これらの実験結果から、このリン酸化酵素が Dvl と拮抗的に作用することによって、神経細胞の樹状突起伸展を制御している可能性が強く示唆された。

上記の神経突起伸展制御の研究と並行して、Dvl に結合する蛋白質の網羅的スクリーニングを行った。その結果、細胞内で Dvl と結合する蛋白質の中で量的に最も多いものとして nucleoredoxin (NRX) という酸化還元状態の制御に関わるものを見つけた。培養細胞で NRX を過剰発現すると Dvl の機能が阻害され、Wnt シグナル伝達が抑制された。一方、RNA 干渉により NRX の発現抑制を行うと Wnt シグナルが活性化され、繊維芽細胞の増殖が誘導された。さらにカエル初期胚で NRX の発現抑制を行うと、頭部の形態形成がうまく起こらなくなり、目が消失した。カエル初期胚での正常な頭部形成には Wnt シグナルが重要であることは以前から知られており、これらの実験結果はいずれも NRX が Wnt シグナル伝達の抑制因子であることを意味している。NRX はもともと、細胞内の酸化還元状態に応じて機能する分子として発見されていたが、Dvl との

結合に関しても酸化還元制御を受けており、過酸化水素などの活性酸素種で処理すると NRX と Dvl の結合が阻害された。さらに、細胞を過酸化水素で刺激すると、Wnt シグナルの一過的な活性化が観察され、この応答に NRX が重要であることも確認した。

#### 5 自己評価:

本さきがけ研究では Wnt シグナルによる神経細胞のネットワーク形成における神経突起伸展制御のメカニズムを明らかにすることを目指していた。特に、分子レベルにおいてその基礎を成すと考えていた、微小管細胞骨格の安定性制御との関連性について調べることを大きな目標と考えていた。

まず特定のリン酸化酵素が Wnt 刺激による神経突起伸展に重要であり、それが微小管安定性と関連していることを見つけたことができた点は、このさきがけ研究のメインテーマと言える課題に直結するものであり十分な評価に値する。さらに培養細胞レベルだけでなく、海馬から採取した初代培養系の神経細胞を用いることによって、神経突起の中でも樹状突起という神経シグナルを受容する突起の伸展を特異的に制御していることを発見できた点は、当初の予想を超える成果だと考えている。その一方で、Wnt シグナルが樹状突起伸展を特異的に制御するという点は、海外のグループに先んじて報告されており、発見のプライオリティを取ることができなかった点は残念である。また、微小管の安定性自体がどのようにして起こっているのかについて、現象論を超えて追究することができず、その点で不十分な成果に終わってしまったと考えている。

一方、さきがけ研究で副次的に行うことを想定していた Dvl 結合蛋白質 NRX の解析は非常に順調に進展した。実際に過剰発現実験や発現抑制実験を行い、また培養細胞だけでなくカエル初期胚を実験材料として用いることによって、極めて厳密な意味で NRX が Wnt シグナル伝達の抑制因子であることを確立することができた。また、この分子機能に立脚して、Wnt シグナルが酸化還元制御を受けていることを発見できた点も十分な評価に値すると考えている。今後生物個体レベルでの重要性を解明することによって、これまでの研究成果を確認するとどまらず、新たな研究の展開が期待できる。

#### 6 研究総括の見解:

多くの研究者が集中する Wnt シグナル伝達系の研究において、神経突起のうち軸索ではなく樹状突起の伸長に特異的に Dvl の発現が関与していることを明らかにしたことは評価に値する。海馬神経細胞の樹状突起伸長制御において、Dvl と拮抗的に作用するリン酸化酵素との関係の詳細解明が待たれる。並行して進められている Dvl 結合タンパク質の探索で、NRX などを見出しているが樹状突起伸長制御への関与などの解明が必要である。研究成果の神経変性疾患の理解への展開が成果の意義を明らかにするはずである。

#### 7 主な論文等:

##### 原著論文

1. Funato, Y., Michiue, T., Asashima, M., and Miki, H. Nucleoredoxin, a thioredoxin-related redox-regulating protein, inhibits Wnt/beta-catenin signaling through Dishevelled. **Nat. Cell Biol.** 8, 501–508 (2006)
2. Oda, A., Miki, H., Wada, I., Yamaguchi, H., Yamazaki, D., Suetsugu, S., Nakajima, M., Nakayama, A., Okawa, K., Miyazaki, H., Matsuno, K., Ochs, H. D., Machesky, L. M, Fujita, H., and Takenawa, T. WAVE/Scars in Platelets. **Blood** 105, 3141–3148 (2005)
3. Yamaguchi, H., Lorenz, M., Kempiak, S., Sarmiento, C., Coniglio, S., Symons, M., Segall, J., Eddy, R., Miki, H., Takenawa, T., and Condeelis, J. Molecular mechanisms of invadopodium formation: the role of the N-WASP-Arp2/3 complex pathway and cofilin. **J. Cell Biol.** 168, 441–452 (2005)
4. Kawamura, K., Takano, K., Suetsugu, S., Kurisu, S., Yamazaki, D., Miki, H., Takenawa, T., and Endo, T. N-WASP and WAVE2 acting downstream of phosphatidylinositol 3-kinase are

required for myogenic cell migration induced by hepatocyte growth factor. **J. Biol. Chem.** 279, 54862–54871 (2004)

5. Funato, Y., Terabayashi, T., Suenaga, N., Seiki, M., Takenawa, T., and Miki, H. IRSp53/Eps8 complex is important for positive regulation of Rac and cancer cell motility/invasiveness. **Cancer Res.** 64, 5237–5244 (2004)

他に論文 4 件(国際)、総説 2 件(国内)、口頭発表 5 件(国内 5 件)

特許出願:無し

受賞:無し

招待講演:無し

## 研究課題別評価

### 1 研究課題名:

ユビキチンと分子シャペロンの連携による細胞機能制御機構の解明

### 2 研究者氏名:

村田 茂穂

### 3 研究のねらい:

細胞内で異常となったタンパク質は分子シャペロンの助けにより正常に復帰するか、ユビキチン化された後プロテアソームにより分解されるかの運命をたどることにより、細胞内への異常タンパク質の蓄積が防がれている。異常タンパク質のクリアランスのためにシャペロンシステムとユビキチン・プロテアソームシステムが協調して働くことが必要であることが知られていたが、この二つのシステムを連携させる分子機構は長らく不明であった。本研究は、シャペロンとユビキチン・プロテアソームシステムの橋渡しをする機構の解明により、神経変性疾患をはじめとした異常タンパク質蓄積に基づく疾患の新たな理解を目指して開始された。

### 4 研究成果:

研究開始当初、異常タンパク質を特異的に認識してユビキチン化するユビキチンリガーゼの網羅的同定を目指して、マイクロアレイ解析やモデル基質のユビキチン化を指標とした生化学的精製を試みたが、同定まで至らなかった。そこで、構造上アンフォールドしたタンパク質はユビキチン化されなくてもプロテアソームにより分解されうることに着目し、プロテアソーム側に異常タンパク質を認識する機構が存在することを想定し、プロテアソームに会合する因子を LC-MS/MS 解析により探索した。同定された中に、これまで機能が全く未知な分子が存在し、これらに着目して解析を進めた結果、以下の成果が得られた。

#### 1) 20S プロテアソームの分子集合を促進するシャペロン分子 PAC1, PAC2 の発見と機能解析<sup>1)</sup>

プロテアソームはあらゆる真核生物に存在し、その機能と構造は酵母からヒトに至るまで高度に保存された必須のタンパク質分解酵素複合体である。通常プロテアソームと呼ばれるものは 26S プロテアソームのことであり、タンパク質分解実行ユニットである 20S プロテアソームの両端に、それを制御する 19S 複合体が会合した分子量 250 万の巨大複合体である。20S プロテアソームは各々7種類のサブユニットがリング状に集まった  $\alpha$  リングと  $\beta$  リングが  $\alpha \beta \beta \alpha$  の順で会合した 750kDa の円筒型粒子であり、酸性、塩基性、疎水性アミノ酸のいずれからも切断できる活性を有する多機能性のプロテアーゼ複合体である。このように 14 種類、計 28 個もの互いに類似した  $\alpha$  と  $\beta$  のサブユニットが一個ずつ正確に並んで 20S プロテアソームを形成する仕組みは、プロテアソームが発見されて以来大きな謎であり、自立的に形成されるものと漠然と考えられてきた。

Flag タグを付加した 20S プロテアソームのサブユニットの一つ ( $\beta 1i$ ) を HEK293 細胞に発現させ、Flag による免疫沈降産物を LC-MS/MS システムにより解析したところ、26S プロテアソームのサブユニットとともに機能未知の分子 DSCR2 (Down Syndrome Critical Region 2) 及び HCCA3 (Hepatocellular Carcinoma Associated gene 3) 由来のペプチドが多数検出されたことから、プロテアソームとこれらの分子の関連の解析を開始した。その結果、この二つの分子はヘテロ二量体を形成し、形成途上の 20S プロテアソームに選択的に会合することが分かった。さらにこれらの分子を RNA 干渉法によりノックダウンすると、前駆体プロテアソームが凝集してしまうことから、この新しいヘテロ二量体は形成途上の不安定なプロテアソーム前駆体が "off-pathway" へ向かうことを防ぐ役割を持った、分子集合のためのシャペロン分子であることが明らかとなった。DSCR2、HCCA3 をそれぞれ PAC1 (Proteasome Assembling Chaperone 1)、PAC2 と再命名し、新しいプロテアソーム分子集合のメカニズムを提唱した。

#### 2) もう一つの 20S プロテアソームの分子集合促進シャペロン PAC3 の発見と機能解析<sup>5)</sup>

PAC1, PAC2 を含むプロテアソーム前駆体を生化学的に精製したところ、PAC1, PAC2 およびプロテアソームのサブユニットの他に、ほぼ等モルで染色される分子を見いだした。この分子もプロテ

アソーム前駆体特異的に結合する。ロックダウンでは、 $\alpha$ リングの形成が阻害され、さらに PAC1,PAC2 との3者のロックダウンでは $\alpha$ リングの形成阻害とともに、特定のサブユニットを欠落した異常なプロテアソーム前駆体が形成された。この分子を PAC3 と命名し、PAC1,PAC2,PAC3 および 10 年前に他グループにより同定されていた別のシャペロン分子 Ump1 との4種類のプロテアソーム特異的シャペロン分子の協調的な働きによりプロテアソームが正確に形成されるメカニズムを解明した。

### 3) プロテアソームの脱ユビキチン化活性に必須な分子 ADRM1(hRpn13)の発見と機能解析<sup>4)</sup>

さらにプロテアソームと会合する新規分子の同定を試みたところ、従来 ADRM1(Adhesion regulating molecule 1)として知られていた分子が、プロテアソームと会合することが分かった。詳細な解析から、ADRM1 はプロテアソームの準サブユニットであること、哺乳類におけるプロテアソーム内の主要な脱ユビキチン化活性を担う UCH37(ubiquitin C-terminus hydrolase)の活性発揮に必須であることが明らかとなった。

### 4) 恒常的オートファジーによるユビキチン化タンパク質蓄積の抑制<sup>2)</sup>

順天堂大学のグループとの共同研究により、細胞内のもう一つの大規模タンパク質分解系であるオートファジーがユビキチン化蛋白質の除去に重要な役割を果たしていることがわかった。すなわちオートファジーを神経細胞特異的に欠如させると、神経細胞内にユビキチン化タンパク質が凝集体を形成して蓄積し、神経細胞死に至る。このことから、異常タンパク質の蓄積防止に、ユビキチン・プロテアソーム系のみならずオートファジー系が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

### 5) 新しいタイプのユビキチン鎖を形成するユビキチンリガーゼの発見<sup>3)</sup>

さきがけ研究開始当初、研究者が異常タンパク質ユビキチン化のユビキチンリガーゼの候補の一つとして解析していた分子(HOIP)が、別のユビキチンリガーゼ(HOIL-1)と複合体を作り、さらに従来とは全く異なるタイプのポリユビキチン鎖を形成することを明らかにした。すなわち、通常はユビキチン分子内のリジン残基へのユビキチン C 末端の共有結合が繰り返されることによりポリユビキチン鎖が形成され、プロテアソームによる認識のシグナルになったり、シグナル伝達を仲介したりする役割を果たすのだが、HOIP/HOIL-1 複合体リガーゼはユビキチンの C 末端へのユビキチン N 末端の共有結合が繰り返された、“直鎖状”のポリユビキチン鎖を形成する。このようなタイプのポリユビキチン鎖は初めての発見であり、生体内での機能解析が今後重要となる。

## 5 自己評価:

さきがけ開始当初は、異常タンパク質分解のためのユビキチンシステムの解明に重点をおいて研究を進めていたが、プロテアソームに着眼して解析を進めたところ、当初の研究の狙いとは異なる展開となったが、最終的には「プロテアソームの分子集合」というプロテアソーム研究に残された大きな命題の一つをほぼ解明することが出来た<sup>1,5)</sup>。近年、癌をはじめ、神経変性疾患や免疫異常などプロテアソームとヒトの病気との関連が注目されており、プロテアソーム研究はヒトの病気の理解に大きく貢献できると考えられる。とくに今回の研究成果は、「プロテアソームの合成過程」という全く新しい作用点を標的にした副作用のない新しい抗癌剤の開発の端緒となるものであり、実際、現在共同研究で PAC1-3 の機能を阻害する化合物のスクリーニングを行うところまで発展している。今後も哺乳類のプロテアソームの基本原則を解明することにより、プロテアソームが関連する病態の理解と治療戦略の開発に貢献できるような研究を行っていきたい。

さきがけ開始当初の目標「異常タンパク質分解のためのユビキチンシステムの解明」に関しては、決定的なものを捕まえることが出来なかったが、世界的に見てもこの3年間に大きな進歩はなく、今後も積極的に推進していけばイニシアチブを取ることが可能と考えている。一方、順天堂大学のグループとの共同研究により、細胞内のもう一つの大規模タンパク質分解系であるオートファジーがユビキチン化蛋白質の除去に重要な役割を果たしていることがわかり<sup>2)</sup>、今後はユビキチンシステムとオートファジーの連携機構も念頭に置いて、異常タンパク質除去機構の理解のための研究を推進していきたい。

## 6 研究総括の見解:

本さがけ研究の開始時目指していた方向とは異なる局面で研究が展開されたことは、人知の及ばない自然の謎に直面した結果であり、したがって、得られた成果も際立ったものになったと考える。さがけ研究の醍醐味といえる。多数の構成ユニットを集めて巨大なプロテアソームを形成するときに分子集合を司るシャペロン分子 PAC1, PAC2 さらには PAC3 を発見し、Nature 誌で研究結果の発信をしたことは誇るべき成果である。当初目指した方向も考えたとおりに行かず壁にぶち当たったことは、真の自然に直面したことの証と考えられるので、もがいてブレークスルーが得られれば大きな発見につながると考えられる。PAC ワールドの更なる広がりを期待する。

## 7 主な論文等:

### 原著論文

1. Hirano, Y., Hendil, K., Yashiroda, H., Iemura, S., Nagane, R., Hioki, Y., Natsume, T., Tanaka, K. and Murata, S. A heterodimeric complex that promotes the assembly of mammalian 20S proteasomes. **Nature** 2005, 437: 1381–1385.
2. Komatsu, M., Waguri, S., Chiba, T., Murata, S., Iwata, J., Tanida, I., Ueno, T., Koike, M., Uchiyama, Y., Kominami, E., and Tanaka, K. Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. **Nature** 2006, 441: 880–884.
3. Kirisako, T., Kamei, K., Murata, S., Kato, M., Fukumoto, H., Kanie, M., Sano, S., Tokunaga, F., Tanaka, K., and Iwai, K. A ubiquitin ligase complex assembles linear polyubiquitin chains. **EMBO J** 2006, 25: 4877–4887
4. Hamazaki, J., Iemura, S., Natsume, T., Yashiroda, H., Tanaka, K., and Murata, S. A novel proteasome interacting protein recruits UCH37 to 26S proteasomes. **EMBO J** 2006, 25: 4524–4536.
5. Hirano, Y., Hayashi, H., Iemura, S., Hendil, KB., Niwa, S., Kishimoto, T., Kasahara, M., Natsume, T., Tanaka, K., and Murata, S. Cooperation of multiple chaperones required for the assembly of mammalian 20S proteasomes. **Mol Cell** 2006, *in press*.

他に論文 4 件(国際)、総説 23 件(国際 5 件、国内 18 件)、口頭発表 3 件(国際)

特許出願:なし

### 受賞

第 4 回日本分子生物学会三菱化学奨励賞;平成 18 年度

### 招待講演

1. Shigeo Murata, Yuko Hirano, Hideki Yashiroda, Shun-ichiro Iemura, Tohru Natsume, Keiji Tanaka; Novel proteasome-interacting molecules that facilitate the formation of the precursor complex of the mammalian 20S proteasome; 第 77 回日本生化学会大会;2004 年 10 月 15 日
2. Shigeo Murata, Yuko Hirano, Shun-ichiro Iemura, Tohru Natsume, Keiji Tanaka; New mechanism for assembly of mammalian 20S proteasomes; 第 78 回日本生化学会大会;2005 年 10 月 20 日
3. Shigeo Murata, Yuko Hirano, Klavs B. Hendil, Shun-ichiro Iemura, Tohru Natsume, Keiji Tanaka; Molecular assembly of mammalian 20S proteasomes; 20th IUBMB;2006 年 6 月 23 日

## 研究課題別評価

### 1 研究課題名:

新規試験管内誘導システムによる分化再生研究

### 2 研究者氏名:

山下 潤

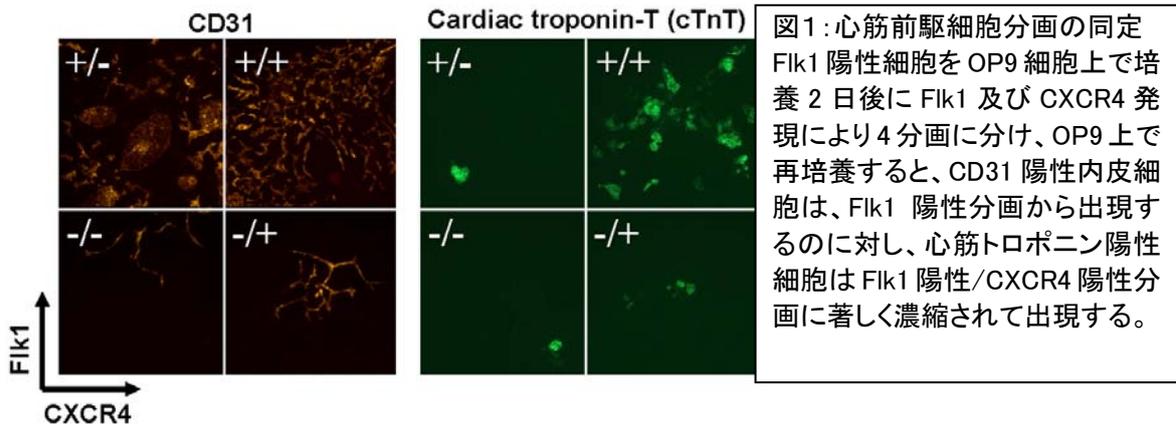
### 3 研究のねらい:

ES 細胞(胚性幹細胞)は体中すべての種類の細胞に分化することができる「万能」の幹細胞と考えられている。我々は ES 細胞を用いて、共通の前駆細胞(Flk1 陽性細胞)から血管(血管内皮、血管壁細胞、血球細胞)および心筋細胞を系統的に分化誘導する新しい試験管内心血管分化系を構築した。この分化系は2次元培養下で単一細胞から分化誘導可能なシステムであり、個々の細胞に注目して分化過程を検討することができる。本研究は、細胞分化過程の解析が可能である同分化系の特性を活かし、トランスクリプトーム解析をはじめとする様々な Omics 解析と、RNAi などによる遺伝子機能解析実験を組み合わせることにより、試験管内だけで細胞分化の全体像を包括的に解析する新しい分化研究法を開発し、新しい再生医学を開拓することを目的とした。本研究は、遺伝子改変動物を中心とした従来の研究とは異なり、構成的に細胞を作り出すことにより分化機構を理解しようとする新しいアプローチにより、新たな分化再生機構の発見・解明をもたらすことが期待される。また、他の細胞・組織の分化再生研究やヒト ES 細胞を用いた研究への応用・展開が可能であり、遺伝子改変動物モデルが作れないヒト研究において不可欠な新しい分化再生研究基盤を創出できると考えられた。

### 4 研究成果:

#### 1) 新しい心筋分化過程解析系の構築

我々は ES 細胞由来 Flk1 陽性中胚葉細胞をマウス OP9 ストローマ細胞上で培養することにより、2次元培養下に拍動心筋細胞を誘導できることを見出し、同システムを用いて単一細胞からも心筋細胞が誘導できることを明らかにするとともに、中胚葉(Flk1 陽性細胞)から心筋細胞に至る中間段階において特異的に心筋分化能を有する心筋前駆細胞の同定を行い、未分化 ES 細胞→中胚葉細胞→心筋前駆細胞→心筋細胞という心筋分化の経時的変化を培養下に再現し、その過程を解析できる実験システムを構築した。Flk1 陽性細胞を OP9 細胞上で培養すると、培養 4.5 日目から拍動心筋細胞が認められる。心筋分化の前段階である培養 2 日目に細胞を単離し、FACS を用いて種々の細胞分画を分取・再培養し、特異的に心筋細胞が出現する細胞分画を探索した。その結果、Flk1 陽性 CXCR4 陽性 vascular endothelial cadherin (VE-cad)陰性の細胞分画(FCV 細胞)が他の約20倍の心筋分化能を有することを見出した。FCV 細胞の単一細胞培養により、約 80%のコロニーに心筋細胞が認められ、FCV 細胞は高い心筋分化特異性を有することが単一細胞レベルで明らかとなった。早期マウス胎仔(8.5dpc)においても FCV 細胞分画は高い心筋分化能を有した。Flk1 陽性細胞からの心筋及び心筋前駆細胞分化において、BMP 阻害物質の noggin 及び wnt3a が抑制的に、wnt 阻害物質 Dkk1 が促進的に作用することも明らかにした。(原著論文4: Yamashita et al, **FASEB J**, 2005)。



## 2) 動静脈リンパ管内皮細胞の分化誘導

我々は、Fik1 陽性細胞を IV 型コラーゲン上で血清及び VEGF (vascular endothelial growth factor)存在下に培養すると、血管内皮細胞及び血管壁細胞が選択的に誘導されることを明らかにしてきたが(Yamashita et al, *Nature*, 2000)、さらに血管の分化多様化機構の解析を進め、動脈・静脈・リンパ管の 3 種類の内皮細胞をそれぞれ誘導することに成功した。従来どおり Fik1 陽性細胞を血清及び VEGF 存在下に培養した場合は、約 90%以上の誘導内皮細胞が動脈内皮細胞マーカー ephrinB2 陰性の静脈内皮細胞となった。VEGF に加えて cyclic AMP analogue の 8bromo-cAMP または cAMP を上昇させる液性因子の一つ、アドレノメデュリン(AM)を添加すると、ephrinB2 陽性の動脈内皮細胞が著しく増加した。cAMP 経路の活性化により、内皮細胞特異的に Notch 経路が活性化された。Notch の下流分子である RBP-J 欠損 ES 細胞を用いて Notch 経路の活性化を阻害すると動脈内皮細胞分化は認められなくなった。しかし、Notch1 細胞内ドメインの強制発現による Notch 経路の活性化のみでは動脈内皮細胞は誘導されず、動脈内皮分化には、VEGF, Notch, cAMP の 3 者が必要であることが明らかとなった。本研究は、動脈内皮細胞分化誘導に初めて成功するとともに動脈内皮分化の新しい分子機構を示したものである。(原著論文2:Yurugi-Kobayashi et al, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006)。また、Fik1 陽性細胞を OP9 ストローマ細胞上で培養するとリンパ管内皮マーカー prox1 陽性のリンパ管内皮細胞が誘導された。OP9 ストローマ上におけるリンパ管内皮誘導は、リンパ管誘導因子 VEGF-C 及び angiopoietin1 を阻害することによりほぼ完全に消失したが、VEGF-C 及び angiopoietin のみではリンパ管内皮細胞は誘導されなかった。一方、OP9 ストローマ細胞の培養上清の添加においてはリンパ管内皮細胞の出現を認めたため、OP9 ストローマ細胞培養上清中にリンパ管内皮誘導活性が存在することが示唆された。(原著論文3:Kono et al, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006)。ES 細胞からのリンパ管内皮分化誘導は 2006 年に同報告を含め 3 報が初めて報告された。

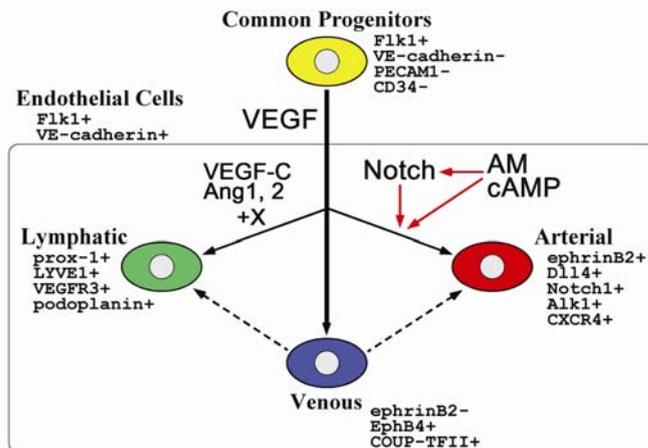


図2:Fik1 陽性細胞からの動静脈リンパ管内皮細胞分化

Fik1 陽性細胞は、血清及び VEGF 存在下に VE-カドヘリン陽性の内皮細胞に分化する。その際、Notch に加えて cyclic AMP や AM(アドレノメデュリン)が存在すると ephrinB2 陽性動脈内皮細胞が分化する。一方、OP9 細胞上で培養すると OP9 由来未知因子的作用により prox1 陽性リンパ管内皮細胞が分化する。

### 3) 誘導性 short hair-pin RNA (shRNA)発現による分化ステージ特異的遺伝子機能阻害システムの構築

これまでの遺伝子改変モデルを含む種々の研究により、分化ステージや発生段階、細胞種の違い等、遺伝子が発現される背景によって同じ遺伝子が異なった役割を果たすことが知られてきている。またES細胞においても、ES細胞分化諸段階からの遺伝子発現変化は、ES細胞の樹立や増殖を含めた様々な影響を及ぼし、分化過程における特異的遺伝子機能を反映しない可能性が考えられる。そこで我々は、分化ステージ特異的に遺伝子機能を解析するため、テトラサイクリン誘導性に shRNA を発現し、ES 細胞分化過程において恣意的に遺伝子発現を制御できる ES 細胞分化系の構築を行った。テトラサイクリン誘導性発現制御遺伝子 tetR-tTS 遺伝子ベクターと、テトラサイクリンオペレーター配列を挿入した tRNA 及び U6 プロモーターを用いた shRNA 発現ベクターを ES 細胞に導入し(Tet-ON システム)、テトラサイクリン誘導性 shRNA 発現株を構築した。ES 細胞分化初期からのテトラサイクリン添加による Flk1 遺伝子発現阻害により、Flk1 陽性中胚葉細胞の分化は著しく抑制された。また、ES 細胞分化誘導 2 日目からの shRNA 発現により中胚葉における Flk1 遺伝子発現抑制を試みたところ、VE-cad 陽性内皮細胞の分化が阻害された。一方、VE-cad 遺伝子に対する shRNA を発現させた場合には、内皮細胞分化は影響を受けなかったが、誘導内皮細胞における VE-cad 発現が有意に低下した。このように分化ステージ特異的遺伝子発現阻害により、ターゲット遺伝子の発現抑制とともにターゲット遺伝子の関与する細胞分化も制御できることが明らかとなった(原著論文1:Hiraoka-Kanie et al, *Biochem Biophys Res Commun*, 2006)。

### 4) 心血管分化過程における遺伝子プロファイルの作製

我々が開発した1)–2)の分化系を用いて、未分化ES細胞、Flk1陽性細胞、動脈・静脈・リンパ管内皮細胞、心筋前駆細胞、心筋細胞の各分画を分化誘導・純化し、RNAを抽出してDNAチップ解析(Affymetrix)を行い、心血管分化過程における遺伝子発現プロファイルを作製した。それぞれの分画に特異的に発現する遺伝子各 100–200 個を同定している。データマイニングには eXintegrator システム(理化学研究所発生再生医学総合研究センター)をおもに使用した。

### 5) ヒトES細胞からの心血管分化

ヒトES細胞使用計画「ヒトES細胞を用いた心血管細胞分化機構に関する研究」が文部科学省の承認を受け(平成17年3月)、ヒトES細胞を用いた心血管分化研究を開始した。すでにヒトES細胞からの2型 VEGF 受容体(マウス Flk1)の誘導と純化、内皮細胞分化、心筋細胞分化に成功している。

## 5 自己評価:

### 1) 達成できたこと

- 研究開始当初に我々が構築していた ES 細胞の血管分化系を研究期間内にさらに発展させ、1)心筋細胞に関しても同様に 2 次元培養下に単一細胞レベルで分化過程の解析が可能なシステムを構築したこと、および同システムを用いて新たな心筋前駆細胞を同定できたこと(原著論文4)、2)動静脈リンパ管内皮分化機構に関して研究を進め、最終的に 3 種類すべての内皮細胞の分化誘導に成功したこと(原著論文2, 3)。1)に関しては、2006 年になり Embryo 及び ES 細胞由来の Flk1 陽性前駆細胞が内皮・心筋・血管平滑筋細胞に分化するという研究が相次いで報告され(Kattman SJ, *Dev Cell*; Moretti A, *Cell*)、同論文が引用されている。また、2)に関しては、ES 細胞からのリンパ管内皮細胞誘導は、2006 年に我々を含め 3ヶ所から報告されたが、動脈内皮に関しては他に報告がなく動脈静脈リンパ管の 3 者すべての誘導に成功したのは我々のみである。同研究により、2006 年国際血管生物学会で招請講演を行うとともに *Trends cardiovascular Medicine* 誌に総説を執筆した。このようにこれらの研究は、国際的にも高い評価を受けている。
- 心血管分化遺伝子プロファイル作製: 1) 2) で樹立した心筋及び動静脈リンパ管分化過程を含む心血管分化における遺伝子プロファイルを Affymetrix の Genechip を用いて行い、理化

学研究所開発の解析ソフト eXintegrator (Sakurai, Stem Cells, 2006; Kobayashi, Cancer Res, 2006)を用いて、それぞれの細胞系列特異的遺伝子群を同定した。

- 誘導性 short hair-pin RNA (shRNA)発現による分化ステージ特異的遺伝子機能阻害システムの構築:本研究推進の中心的役割を果たす ES 細胞分化過程における遺伝子機能解析システムを構築することに成功した(原著論文1)。
- ヒト ES 細胞からの心血管細胞分化誘導:ヒト ES 細胞使用計画「ヒト ES 細胞を用いた心血管細胞分化機構に関する研究」が文部科学省の承認を得(心筋に関して国内 3 番目)、ヒト ES 細胞に研究を広げるとともに、マウス ES 細胞と類似の方法を用いて心血管細胞の誘導に成功した。
- 特許申請:我々の血管分化システムをもとに国内外合わせ 5 件の特許申請を行った。
- 共同研究関係の拡充:我々のマウス ES 細胞分化システムを用いて、国内6施設より合計 7 報の原著論文が発表されている。(Nakao Y, Angew Chem Int Ed, 2006; Yamamoto K, Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005; Huang H, J Artif Organ, 2005; Suzuki K, Blood, 2004; Watabe T, J Cell Biol, 2003; Fujita M, J Am Chem Soc, 2003; Sone M, Circulation, 2003)。

## 2) 達成できなかったこと

- 心血管分化に関する新規遺伝子の同定:研究当初、ES 細胞における shRNA を用いた遺伝子機能解析システムを早期に構築し、遺伝子発現プロファイルからの候補遺伝子に関する機能解析を行い、心筋分化に関与する新規遺伝子を多数同定する計画であったが、同遺伝子機能解析システムの構築が思いのほか難渋し、最終的に新規の機能遺伝子の同定に至らなかった。現在、原著論文1に報告したシステムを用いて順次機能解析を行い、すでに数個の shRNA 発現において心筋分化抑制効果を認めている。また、新たに Cre-loxP システムを用いた誘導性 shRNA 発現システム及びテトラサイクリン誘導性 cDNA 発現レスキューシステムを構築し、更なる機能解析を行う研究基盤形成を進めている。これら機能解析システムを用いて今後新規機能遺伝子の同定を進める予定である。
- ヒト ES 細胞を用いた心血管分化・機能解析システムの構築:ヒト ES 細胞使用計画の承認のもと、ヒト ES 細胞の心血管分化研究を開始したが、特に心筋細胞に関しては、同使用計画において承認された国内樹立のヒト ES 細胞 khES1, 2, 3 からは効率的な心筋分化が認められず、他の細胞株の検討を必要とした。海外樹立株輸入申請及び新規大学院生、研究員の使用研究への登録にそれぞれ 8 ヶ月から 1 年を要し、その間ほとんど研究が進められなかった。ヒト ES 細胞使用研究承認システムの簡素化が強く望まれる。

以上研究当初の目標であった心血管分化に関与する新規遺伝子の網羅的同定を中心とする心血管分化機構の解析はあまり進展が見られなかったが、分化誘導システムの拡充と遺伝子機能解析システムの構築は達成され、ES 細胞を用いて分化機構を解析するための研究基盤は形成された。今後の研究の継続により、当初の目的が果たされることが期待される。

## 6 研究総括の見解:

ES 細胞由来 Fik1 陽性中胚葉細胞の種々の条件下での 2 次元培養で、心筋前駆細胞、心筋細胞への分化、また、動脈、静脈、リンパ管 3 種類の内皮細胞への誘導に成功し、これら分化の過程におけるタンパク質因子の動態を明らかにしたことは優れた成果と評価できる。これらの研究成果は、世界をリードし、あるいは互角に戦っている独自性の高いものであり、今後は得られた成果の人類への貢献を意識した再生研究への発展を期待する。

## 7 主な論文等:

### 原著論文

1. Hiraoka-Kanie M, Miyagishi M, Yamashita JK. Differentiation stage-specific analysis of gene function with inducible short hair-pin RNA in differentiating embryonic stem cells.

**Biochem Biophys Res Commun**, 351: 669–674, 2006.

2. Yurugi-Kobayashi T, Itoh H, Schroeder T, Nakano A, Narazaki G, Kita F, Yanagi K, Hiraoka-Kanie M, Inoue E, Ara T, Nagasawa T, Just U, Nakao K, Nishikawa SI, Yamashita JK. Adrenomedullin/cyclic AMP pathway induces Notch activation and differentiation of arterial endothelial cells from vascular progenitors. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 26: 1977–1984, 2006.
3. Kono T, Kubo H, Shimazu C, Ueda Y, Takahashi M, Yanagi K, Fujita N, Tsuruo T, Wada H, Yamashita JK. Differentiation of lymphatic endothelial cells from embryonic stem cells on OP9 stromal cells. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 26: 2070–2076, 2006.
4. Yamashita JK, Takano M, Hiraoka-Kanie M, Shimazu C, Yan P, Yanagi K, Nakano A, Inoue E, Kita F, Nishikawa SI. Prospective identification of cardiac progenitor potentials by a novel single cell-based cardiomyocyte induction. **FASEB J**, 19: 1534–1536, 2005.

他に論文 9 件(国際)、総説 21 件(国際 4 件、国内 17 件)、口頭発表 25 件(国際 11 件、国内 14 件)

特許出願: 国内4件、外国1件

受賞: なし

招待講演

1. Yurugi-Kobayashi T, Shroeder T, Nagasawa T, Nakao K, Nishikawa SI, Yamashita JK. Differentiation of arterial, venous, and lymphatic endothelial cells from embryonic stem cells. 第 4 回日韓血管生物学シンポジウム (2006/12/13, 東京)
2. Yamashita JK. Differentiation of arterial, venous, and lymphatic endothelial cells from vascular progenitors. XIVth International Vascular Biology Meeting. (2006/6/8, Noordwijkerhout, Netherlands)
3. Yamashita JK. Mechanisms of vascular diversification: An approach from constructive developmental biology using ES cells. 第 39 回日本発生生物学会ワークショップ”Frontiers in Vascular and Lymphatic Development.” (2006/5/31, 広島.)
4. Yamashita JK. Human ES cell research in Japan. The 2<sup>nd</sup> Franco-Japanese Bioethics Workshop. “Approaching bioethical issues in their cultural context. (2005/12/19, Osaka).
5. Yamashita J.: Signaling for vascular cell differentiation and diversification. International Satellite Symposium, 77<sup>th</sup> Annual Meeting for the Japanese Endocrine Society ( 2004/6/27, Kyoto)