

「素過程と連携」研究領域活動 事後評価報告書

平成 14年度終了研究課題

研究総括 大嶋 泰治

1. 研究領域の概要

地球上のすべての生物は太陽エネルギーの恵みにより生を受けている。すなわち植物の光合成による有機物の合成と微生物によるその無機化反応を主動力とした物質循環とエネルギーの大きな流れ、それに対する動物たちの寄与により成立する生態系を通して、全ての生命が維持されている。人類に限ってみても、衣食住を支える農林業、牧畜、水産において、また医学はもとより、地球の抱擁力を超える規模に至った人間活動を考えるとき、様々な生命機構に対する適切な理解は、今後の地球環境の保全にも必須である。

「素過程と連携」領域では、個々の細胞内のダイナミックな生命現象を、多くはモデル生物の特徴を生かして包括的に理解しようとする研究を支援した。例えば刺激の認識と信号伝達、DNA結合タンパク質と転写因子の活性化、細胞周期と成熟分裂への移行、物質輸送、修復と再生から器官分化と形態形成などに関する研究を対象とした。しかも、「さきがけ研究 21」の趣旨により、独立して研究を行う比較的若い世代の研究者を対象とし、将来における大きな発展と波及効果を目指して、3年間の支援期間にそれぞれが取り組む基礎的課題に対するアイデアあるいは方法論の確立を求めた。基礎的知見の蓄積なくして、新原理に基づく革新的技術の開発は不可能であり、また近年のゲノミクスの進歩をもってしても、本領域の目指すモデル生物を用いた研究は必須と考えたからである。決して短期間に完成を求める開発研究の支援ではない。

2. 研究課題、研究者名

別紙一覧表参照

3. 選考方針

基本方針：

- (1) 自ら単独で研究を実施する研究者を対象とする。
- (2) 領域課題は「素過程と連携」の感覚に富むものを優先する。
- (3) 時代を先駆ける独創性の強い基礎的研究を優先する。
- (4) 今後に大きく開花の望みのある世代を優先する(30～40才が最も望ましい)。
- (5) 機会均等のため、過去に本事業団の諸事業を含む何らかの有力な研究支援を受けた経験のない申請課題を優先する。

4. 選考の経緯

審査	書類選考	面接選考	採用者数
対象数	264人	20人	8人

5. 研究実施期間

平成 11年 10月～平成 14年 9月

6. 領域の活動状況

領域会議を6回(年2回)開催し、研究進捗状況の報告と研究交流を図った。

また、研究総括は、研究開始に際し全研究者を訪問するほか、随時、各研究者の研究実施場所を訪問し研究の進捗状況把握に努めた。

7. 評価の手続き

研究総括が、研究報告会ならびに研究報告会要旨、さらには研究者からの報告書などに
対し、領域アドバイザーの協力を得て行った。

(評価の流れ)

平成14年 9月 研究期間終了

平成14年11月 研究報告会開催

平成14年10月～平成14年12月 研究報告書および自己評価提出

平成14年12月 研究総括による評価

8. 評価項目

ア. 外部発表 (論文、総説・解説、口頭発表など)、招待講演、特許、研究を通じての新たな知
見の取得などの研究成果の状況

イ. 得られた研究成果の科学技術への貢献度

9. 研究成果

第三期生は以下の8名であったが、一・二期生に劣らずそれぞれが独自の研究を活発に展開し、
下記の成果を得た。

植物の葉緑体は強光下で逃避し、弱光下では広く会合して受光効率を上げる。加川 貴俊は、こ
れに二種のフォトロピンタンパク質が関与していることをシロイヌナズナで検出し、同じフォトロ
ピンが光屈性と気孔の開口にも関与することを見出した。動かないと思われる植物でも、効率よい
光合成を行うためには、環境の光強度を認識し、光受容体の葉緑体と二酸化炭素取込みのため
の気孔を連動して開閉する機構があり、本研究はその解明に具体的な糸口を付けるものである。
この成果により日本植物学会より奨励賞 (2001 年度) を受けている。

生体、特に動物は鋭い時間的感受性をもっている。しかし、その機構については、現象に対する
解明の糸口がなく、よく理解されていない。電気魚のジムナルカスは微弱な交流電流を発生し、接近
する個体同士相互の発電周波数 (300～500 ヘルツ) をずらして混信を回避する。このとき百万分
の一秒以下の時間差を識別すると言われている。川崎 雅司はこのユニークな現象に着目し、対
応する機構が卵形細胞と中脳の半円隆起に存在するニューロンにあると突き止めた。この成果は
学界の話題となり、数回の招待講演を受けている。動物の知覚における時間差の認識という困難
な課題が、対応するニューロンを同定したことにより、今後はより具体的な解析に進むものと期待
される。

仲嶋 一範は、マウスの子宮内胎児に対して新開発の電気穿孔法により外来遺伝子を導入する
技術を開発し、さらに移動中の神経細胞に任意の遺伝子を導入発現させ、複雑な大脳皮質の形
成過程を可視化する方法を開発した。これらの方法を駆使して多極性細胞移動と称する新規な
現象を観察した。今後、さらに詳細な機構の解明が期待される。また、ここで開発された方法は、
本課題の研究のみならず、広く様々な器官分化の研究への応用が可能であり、大きな波及効果
が期待される。その成果により、2 件の学会賞 (2000、2001 年度) を受賞し、数多くの国内外での
講演に招かれ、また 2 件の特許出願がある (別記参考・特許出願の項参照)。

中島 利博は真核生物において、転写と翻訳を統合して行う因子のひとつとして RNA ヘリケース
に注目し、ショウジョウバエのそれに相当する Mle タンパク質が、核内での転写と細胞質における
過程でも機能することを見出した。この研究は難病のひとつであるリユーマチの研究に端を発し、
その病理あるいは治療法の開発に関わるものである。その成果により中島は国内外の学会賞各
1件を受けている。

古田 寿昭は、活性部位をマスクした様々な生理活性物質 (ケージド化合物) の合成を試みてい
る。アミノ酸やペプチド類、cAMP またメッセンジャーRNA に既開発の光分解性保護基 6-プロモ-
7-ヒドロキシクマリン-4-イルメチル基を結合し、白血病細胞のアポトーシス、メダカ色素胞ある
いはゼブラフィッシュの初期胚中で、それらの光制御による細胞機構の操作に成功している。これら
の研究の多くは、本領域の研究会を通して他研究者の興味を引き応用が試みられたものであり
新規な研究技術として浸透しつつある。今後の普及による成果が期待される。

水島 昇は、細胞内のタンパク質、一部の核酸や糖質、さらにはミトコンドリアなどのオルガネラの分解と物質リサイクルを行うオートファジー現象について研究し、酵母で検出したオートファゴソーム形成に関わる3個の遺伝子の相同遺伝子をマウスでも見出した。さらに、これらがコードするタンパク質の活性が、肝臓のみならず様々な器官でも発現していることを示した。このオートファジー現象により、不特定多種のタンパク質その他が分解されるのに対し、山野 博之は、特異的なタンパク質を厳密な選定のもとで分解するユビキチン・プロテアソーム系について、主として分裂酵母を対象にユビキチンリガーゼ APC (M 期後期進行複合体) のサイクリン B 認識機構について研究した。また、ユビキチンリガーゼ APC が細胞周期により活性変化することやその細胞内所在を可視化すること、その他基質の検索などの研究を行なった。これらの研究成果は、細胞周期における細胞構成物質の合成面に注がれていた興味を分解面にも広げ、抗がん剤の開発につながるものである。多くの学会招待講演あるいはセミナーの依頼、また学会奨励賞 (水島) の対象となったことに、それらの学術的評価の高さが示されている。

体細胞分裂では複製された染色体が均等に姉妹細胞に分配される。成熟分裂においてはその第一分裂で相同染色体を両極に分ける還元分裂を行う。渡辺 嘉典は、この違いについて分裂酵母を用いて研究し、それぞれの過程で働く染色体接着因子コヒーシンの分子種の違いによることを示した。すなわち体細胞分裂では Rad21 コヒーシンが動原体を除く側近領域に分布し、還元分裂では別の Rec8 コヒーシンが染色体の接着に働き、それが動原体とその側近領域に共に存在して紡錘系の接着を待つ。この違いにより、体細胞分裂と還元分裂での染色体分配が異なることを示した。この成果は総ての動植物の繁殖と結実に関わる知見であり、そのインパクトは大きく国内外の学会から講演の招きを受けている。

これら第三期生は 264 名の応募者から大変な難関を経て選ばれた 8 名であり、いずれも優秀な研究者であった。本プロジェクト採用後に、1名の教授昇任者、2名の助教授昇任者があったこと、また4名が国内外の学会賞を受賞し、いずれもが多くの招待講演を行っていることから明らかに、国際的にも高い研究レベルを保っている。

なお、本事後評価報告書における各研究者の発表論文、総説リストには、主要なもの最高 5 報までを研究者の選択で掲載した。さらにその内代表的な論文、総説の演題と雑誌名にはアンダーラインを付した。

10. 評価者

研究総括 大嶋 泰治 関西大学 工学部 教授

領域アドバイザー氏名：

大嶋 靖美	九州大学 大学院理学研究院 教授
岡山 博人	東京大学 大学院医学系研究科 教授
小川 智子	岩手看護短期大学 教授 副学長 (国立遺伝学研究所 副所長)
勝木 元也	岡崎国立共同研究機構 基礎生物学研究所 所長 (東京大学 医科学研究所 教授 ヒト疾患モデル研究センター センター長)
東江 昭夫	東京大学 大学院理学系研究科 教授
西田 育巧	名古屋大学 大学院理学研究科 教授
古澤 満	第一製薬 (株) 創薬基盤研究所 特別参与
豊島 久真男*	(財)住友病院 院長

*平成 12 年 4 月 1 日より参画

(所属は平成 14 年 9 月末現在のもの。()は当領域発足時の所属)

(参考)

1) 外部発表件数*

	国内	国外	計
論文	3	47	50
口頭発表**	138	85	223**
総説・出版物	32	5	37
合計	173	137	310

* 件数は、各研究者が研究報告書に記したデータを採用した。論文、総説・出版物では印刷中のものは含むが、投稿中のものは含まない。

** 招待講演 90件 (うち国外 32件)を含む。

2) 特許出願 :国内 2件 (外国なし)

- (1) 発明者 :仲嶋 一範 「遺伝子導入動物の製造方法」(特開 2002-65112)
- (2) 発明者 :仲嶋 一範 「中枢神経系の再生方法」(特願 2002-335249)

3) 受賞 :6件

加川 貴俊 :日本植物学会奨励賞 (2001年10月) 「葉緑体光定位運動機構の解明」

仲嶋 一範 :

- (1) 日本神経化学会第1回最優秀奨励賞 (2000年10月) 「脳皮質形成のメカニズム」
- (2) 第5回上田英雄賞 (2001年4月) 「脳神経細胞の配置決定のメカニズム」

中島 利博 :

- (1) 日本リウマチ学会賞 (2002年4月) 「Role of Notch-1 intracellular domain in activation of rheumatoid synoviocytes」
- (2) 国際ベトナム免疫学会賞 (2002年3月) 「Implication of transcriptional coactivator/cointegrator CBP complexes in rheumatoid synoviocytes」

水島 昇 :平成13年度日本生化学会奨励賞 (2001年10月) 「オートファジーの分子機構に関する研究 :Apg12 結合システムの役割」

4) 招待講演

国内 58件、国外 32件、計 90件

別紙

素過程と連携」領域 研究課題名および研究者名

研究者名 (参加形態)	研究課題名 (研究実施場所)	現職* (応募時所属)	研究費 (百万円)
加川 貴俊 (専任)	光を求めて動く葉緑体の運動機構の 解明 (岡崎基礎生物学研究所)	岡崎基礎生物学研究所 非常勤研 究員 (同研究所 非常勤研究員)	48
川崎 雅司 (兼任)	電気魚が解き明かす超短時間感覚 のメカニズム (バージニア大学 生物学部)	バージニア大学 生物学部 准教授 (同上)	47
仲嶋 一範 (兼任)	中枢神経細胞が層構造を形成する メカニズム (慶応義塾大学 医学部)	慶応義塾大学 医学部 教授 (東京慈恵会医科大学 DNA 研究所 部門長 講師)	55
中島 利博 (兼任)	多角的遺伝情報発現系の分子モー ター複合体による協調化機構の解明 (聖マリアンナ医科大学 難病治療 研究センター)	聖マリアンナ医科大学 難病治療 研究センター 部門長兼助教授 (筑波大学 応用生物化学系 講師)	45
古田 寿昭 (兼任)	シグナル伝達の時空間動態を光で制 御して光で解析する (東邦大学 理学部)	東邦大学 理学部 助教授 (同大学 講師)	51
水島 昇 (兼任)	オートファジーの分子機構と生理的 役割 (岡崎基礎生物学研究所 細胞内エ ネルギー変換機構研究部門)	岡崎基礎生物学研究所 助手 (同研究所 非常勤研究員)	46
山野 博之 (専任)	タンパク質分解ユビキチンシステムと 細胞機能の連携制御機構 (英国癌研究所 細胞周期制御部門)	英国癌研究所 細胞周期制御部門 Research Fellow (CRF Post-doctoral Fellow)	42
渡辺 嘉典 (兼任)	生殖細胞の染色体分配の仕掛け (東京大学 大学院理学系研究科)	東京大学 大学院理学系研究科 助教授 (同上)	45

* :平成 14 年 9 月末現在

1. 研究課題名：光を求めて動く葉緑体の運動機構の解明
- 青色光受容体フォトロピンの役割 -

2. 研究者氏名：加川 貴俊

3. 研究のねらい：

動き回ることができない植物は、外界の環境を上手に感知し、様々な方法で対応している。特に周りの光を認識し、「もやし」のように伸長したり、光の方向に曲がったりしている。細胞内でも葉緑体の光環境に依存した定位運動が知られている。しかしながら、どんなタンパク質が光を受容しているかは知られていなかった。本研究ではこの葉緑体の位置を決めている光受容体を同定し、これらの光受容体が植物の生存における重要性を明らかにした。

4. 研究結果：

光合成装置としての葉緑体は、弱い光環境のもとでは効率よい光合成を行うために、光をできるだけ受容しようと細胞表面に分散して、この反応は集合反応と呼ばれている。一方強い光環境下では、その光による葉緑体の損傷を防ぐために、葉緑体は光から逃げる位置に移動しており、逃避反応と呼ばれている。また暗黒下ではこれらと異なった場所に位置している。これらを称して葉緑体光定位運動といわれている。

(1) 突然変異体の単離と同定

葉の一部分に強光を照射することで、逃避反応を肉眼で確認できる実験系を開発した。この方法を利用して、シロイヌナズナの逃避反応が起きない突然変異体を単離した。しかし、この変異体は集合反応は正常だった。遺伝学的解析を行い、この変異はシロイヌナズナめばえの光屈性の光受容体であるフォトロピン1遺伝子(PHOT1)のオルソログであるフォトロピン2遺伝子(PHOT2)であった。すでに全ゲノムが解読されたシロイヌナズナでは、これらの他にはフォトロピンはない。そこで、phot1phot2の二重変異体を作成し、葉緑体光定位運動を調べた。この二重変異体では、逃避反応のみならず集合反応も認められなかった。この結果から、集合反応の光受容体は phot1 および phot2 であることが明らかになった。phot2 変異体は野生株と比較して、強光耐性が著しく低いことから、逃避反応は強光ストレスの回避メカニズムとして働いていることが示された。

(2) フォトリポピンの性質

フォトロピンはN末端側に2つのLOV(light oxygen voltage)ドメイン、C末端側にはキナーゼドメインがある。1つのLOVドメインには、光受容を担う発色団としてFMNが1つ結合していた。LOVドメインだけでも光受容を持っていた。組み換えフォトロピンを昆虫培養細胞で発現させると、光依存的な自己リン酸化をすることが認められた。(1)で得られたphot2-2変異体はキナーゼドメインに変異が起きている突然変異体なので、逃避反応はフォトロピンのリン酸化活性が必須と思われる。

(3) フォトリポピンの生理学的役割

葉緑体光定位運動において、phot2は逃避・集合両反応を、phot1は集合反応のみの光受容体とし、役割分担をして機能していた。そこで、フォトロピンが関与する他のシロイヌナズナの光反応でも役割分担が認められるかを探索した。

暗所で生育したphot1変異体のめばえは、弱光下では光屈性を起こさなかったが、強光下では光屈性が起きた。しかもphot2変異体のめばえの光屈性は正常ではあったが、二重変異体では強光下でも光屈性は認められなかった。これらの結果は、弱光下ではphot1が、強光下ではphot1及びphot2の両者が光受容体として機能していることを示している。明所で生育しているシロイヌナズナの葉柄や花茎も光強度依存的にphot1とphot2の同様な役割分担があった。

気孔の開口も青色光により誘導されることが知られている。phot1 や phot2 変異体では気孔開口運動は起きるが、二重変異体では起きない。つまり、青色光による気孔開口運動の光受容体がフォトトロピンである phot1 と phot2 ではほぼ同等に役割を分担していることが示された。

(4) まとめ

フォトトロピンは葉緑体光定位運動のみならず、光屈性や気孔開口といった生理現象の光受容体であった。光屈性や葉緑体光定位運動は直接より良い光合成を行うために、より多くの光を受容するための反応である。気孔開口運動は、二酸化炭素と酸素のガス交換を行うために気孔を開く運動であり、より多くの光合成産物を作り出すのに重要な反応である。このように、植物が効率よい光合成を調整するために、フォトトロピンは外界の光環境を認識する光受容体として統合的に機能している。

5.自己評価：

葉緑体光逃避反応の光受容体フォトトロピンを同定できた。さらにこの光受容体が光屈性・葉緑体光集合反応・気孔開口運動といった青色光反応の光受容体であったことは、非常に驚くべき結果であり、国際的にインパクトある成果を得ることができた。さらに、葉緑体逃避反応が植物の生存に大変重要であることを示せたことを含めて、研究開始時の到達目標に到達できたと思っている。これは今後の発展の起点となろう。

6.研究総括の見解：

植物の葉緑体は強光下では逃避し、弱光下では分散して受光効率を上げる。シロイヌナズナについて、この動きを支配するフォトトロピン遺伝子の PHOT1 と PHOT2 を同定した。phot2 変異では逃避が、phot1 phot2 二重変異では葉緑体の展開が不能となる。この二重変異体では光屈性と気孔の開口も停止する。またその分子構造から、フォトトロピンが光の強弱を認識する受容体として統合的に機能すると考察した。この成果は、環境の光強度を認識し、光受容体の葉緑体と二酸化炭素取込みのための気孔を連動して開閉するメカニズムの解明につながるものと期待され、光合成に関連して行う植物操作法に新たな可能性を与えるものである。

7.主な論文等：

1. Kagawa, T., and Wada, M. (2000). Blue light-induced chloroplast relocation in Arabidopsis thaliana as analyzed by microbeam irradiation. Plant Cell Physiol. 41, 84-93.
2. Kagawa, T., Sakai, T., Suetsugu, N., Oikawa, K., Ishiguro, S., Kato, T., Tabata, S., Okada, S., and Wada, M. (2001). NPL1, a phototropin homologue, controls the chloroplast high-light avoidance response in Arabidopsis. Science 291, 2138-2141.
3. Sakai, T., Kagawa, T., Kasahara, M., Swartz, T. E., Christie, J. M., Briggs, W. R., Wada, M., and Okada, K. (2001). Arabidopsis nph1 and npl1: Blue light receptors that mediate both phototropism and chloroplast relocation. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 98, 6969-6974.
4. Kinoshita, T., Doi, M., Suetsugu, N., Kagawa, T., Wada, M., and Shimazaki, K. (2001). The phot1 and phot2 photoreceptors redundantly mediate blue light regulation of stomatal opening in Arabidopsis. Nature 414, 656-660.
5. Kagawa, T., and Wada, M. (2002). Blue light induced chloroplast relocation. Plant Cell Physiol. 43, 367-371.

その他

受賞 葉緑体光定位運動機構の解明、日本植物学会奨励賞、平成 13 年 10 月
招待講演 4 件

1. 研究課題名：電気魚が解き明かす超短時間感覚のメカニズム

2. 研究者氏名 川崎 雅司

3. 研究のねらい：

生体はいったいどれほど高速の現象を認識することができるのだろうか？ ヒトや動物の行動を指標として感覚能力を調べた心理物理学的・動物行動学的研究では、100万分の1から10万分の1秒程度という非常に鋭い時間感覚が証明されている。しかしながら、このような超短時間感覚の神経機構は、まだよく理解されていない。おそらくこの鋭敏な時間感覚は、時間を検出する一つ一つの素過程と、平行して同時に起こるそれら素過程の連携とで生ずると考えられる。本研究は、時間検出が起こる脳部位と、その後の信号処理の流れの概略が解明されている電気魚の電気感覚系を用いて、超短時間感覚の神経機構の理解を深めることを目標とした。特に、時間差を検出するニューロンを同定することと、それらのニューロンから時間情報を受けとる上位のニューロンを同定することをねらいとした。

4. 研究結果

電気魚ジムナルカスは、混信回避のための電氣的行動（以下「混信回避行動」）をする際に、電気感覚信号に内在する100万分の1秒以下の時間の差を利用する。感覚信号内の短い時間差に応答するニューロンが後脳の電気感覚側線葉に存在することはすでに判っていたが、この細胞が時間差の検出を行うかどうかは不明であった。本研究で、このニューロンの前段階の、時間差の検出を行うニューロン（卵形細胞）の存在が、電気生理学的記録と電子顕微鏡観察により確認された。時間差を検出するために、異なる二つの時間の情報が二種類の神経繊維により卵形細胞に入力される。ひとつは、他に類のない巨大な神経終末（シナプス）による伝達・入力で、このシナプスは、シナプス後細胞である卵形細胞の細胞体の表面をほぼ蔽い尽くしている。もう一方の入力は、卵形細胞の樹上突起に比較的小型のシナプスで終末する。これらのシナプスには、化学的伝達を示唆するシナプス小胞と電氣的伝達を示唆するギャップ結合の両方が認められた。これまでに知られている聴覚系を含めた多くの系の中で最も時間感覚の鋭い電気魚で、時間差検出を担う細胞が同定された意義は大きい。現在、この細胞の形態的研究を進めるとともに、スライス標本でも記録系を確立しつつある。今後、スライス標本を用いて、卵形細胞における神経伝達やイオンチャンネルの動態を明らかにしてゆく予定である。形態学的な研究成果については、出版準備中である。

第2の成果は、後脳で検出された時間差情報が上位の脳でどのように処理されるかを明らかにしたことである²⁾。時間差に対する感度が証明されている「混信回避行動」がおこるためには、時間差だけでなく感覚信号の強さの変化（振幅変調）の情報が必須である。時間差感受性のニューロンと振幅変調感受性ニューロンは後脳に別々に存在し、それらが中脳の同じ部位（半円隆起）に投射することはすでにわかっていたが、本研究により、半円隆起に時間と振幅の情報を統合するニューロンが存在することがわかった。これらのニューロンは時間と振幅の情報を単に加算するのではなく、二つの情報の相互の時間関係に感受性がある。今後は、このニューロンが次の中継点としてどこに投射するのか、また時間差に対する感度が卵形細胞よりさらに鋭いのかどうかを調べる予定である。

第3に、既知のイオンチャンネルの性質を用いて超短時間感覚を説明しうることをシミュレーションで示した¹⁾。卵形細胞にどのような神経伝達物質が存在するか、また電気シナプスがいかなる影

響を持つかは現在のところ不明である。どのような機構であっても、シナプス後電位が 10 万分の 1 秒程度の時定数を持つことは考えにくい。そこで、現実的な時定数 (0.3 ミリ秒) を持った 2 つのシナプス入力を想定し、これを興奮性神経膜の一般的な挙動を支配すると考えられている Hodgkin-Huxley 方程式に入力した。その結果、方程式の出力である活動電位の発火率は、2 つのシナプス入力の間の時間差をわずか 100 マイクロ秒変化させただけで、ゼロから最高の発火率 (約 150 回/秒) まで変化することがわかった。

本研究はさらに、電気魚ジムナルカスの皮膚が、定常的な電気振動をすることを示した³⁾。ジムナルカスは、敵から身を守るために自らの電気器官からの発電を停止させることがある。ところが電気器官を停止させていても、全身の皮膚から微弱ではあるが正弦波上の定常的な発電があり、これが通常の電気器官からの発電と同じように電気定位の能力 (電気によってまわりの様子を知る能力) があることがわかった。皮膚からの自励発電は、電気信号を受容する電気受容器とそれに連なる神経繊維が、特定の周波数に強く同調していることを示している。この結果は、当初かかげた 2 つの研究のねらいには直接関係しないが、超短時間感覚の基礎となる末梢感覚神経系による時間情報の正確な捕捉に深く関係しており、研究の長期的目標に沿った重要な発見である。

この 3 年間で得られた最も大きな成果は、時間差検出を司るニューロンが同定できたことである。また、技術的にこれまで手がけてこなかった、電子顕微鏡、スライス標本による電気生理学、数理モデルによるシミュレーションを導入できたことも、将来の研究の発展につながるものと期待している。近年、聴覚系における時間差検出機構の研究が脚光をあびている。さきがけ研究で得た成果をもとに、電気魚というユニークな系の利点を生かした研究を今後さらに発展させていきたい。

5. 自己評価

さきがけのテーマにかかげた「超短時間感覚の解明」は、私の研究室の長期的な研究目標である「混信回避行動の神経機構の完全な理解」の一部をなすものではあるが、一般性の高いテーマであるために、スポットライトが当たったかたちになった。このテーマを掲げたことは成功であったと思う。研究計画は概ね半分か計画通り実行され成果を得た。またシミュレーションの結果は予想外のものであった。3 年間の限られた期間であったが、多くの重要な結果が得られた。中でも、時間差を検出する細胞を同定できたことは、今後の研究の進展におおいに貢献すると思う。また、さきがけ研究を通じて 2 人の共同研究者 (現在は当研究室のポストドク) を得たことも今後の進展におおいに寄与するものと期待している。

6. 研究総括の見解

生体には百万分の 1 秒から十万分の 1 秒の時間差を鋭く識別する能力がある。電気魚のジムナルカスは周波数 300 ~ 500 ヘルツの微弱な電流を発生して他の接近を知り、互いに周波数を僅かにずらして混信を回避する。この電気魚を対象に、その鋭敏な時間差識別機構の解明が課題である。時間差の異なる 2 種の電気信号の一方は卵形細胞と認定された細胞に、それを蓋いつくす大きな神経シナプスで伝達され、他方は比較的小型の樹状突起シナプスで入力されることを見出している。次いで、検出された時間差信号は中脳の半円隆起に伝達され、そこに時間差と振幅変調情報を統合するニューロンの存在を明らかにし、動物の鋭敏な時間差識別機構の解明に端緒をつけた。

7. 主な論文等

1. Takagi, H., and Kawasaki, M. (2003). Modeling of time disparity detection by the Hodgkin-Huxley equations. J. Comp. Physiology. in press.

2. Kawasaki, M., and Guo, Y.-X. (in press). Emergence of temporal-pattern sensitive neurons in the midbrain of weakly electric fish *Gymnarchus niloticus*. J. Comp. Physiol. Paris.
3. Kawasaki, M. (2001). Cutaneous electrical oscillation in a weakly electric fish, *Gymnarchus niloticus*. J. Comp. Physiol. 187, 597-604.
4. 川崎雅司 (2000). 弱電気魚の比較生理学 . 電気的行動の運動制御 . 比較生理生化学 17, 60-67.
5. 川崎雅司 (2000). 弱電気魚の比較生理学 . 混信回避行動の神経機構 . 比較生理生化学 17, 68-74.

その他

招待講演 国内4 海外8

1. 研究課題名：中枢神経細胞が層構造を形成するメカニズム

- 神経細胞はどのように移動してその配置が決まるのか？ -

2. 研究者氏名：仲嶋 一範

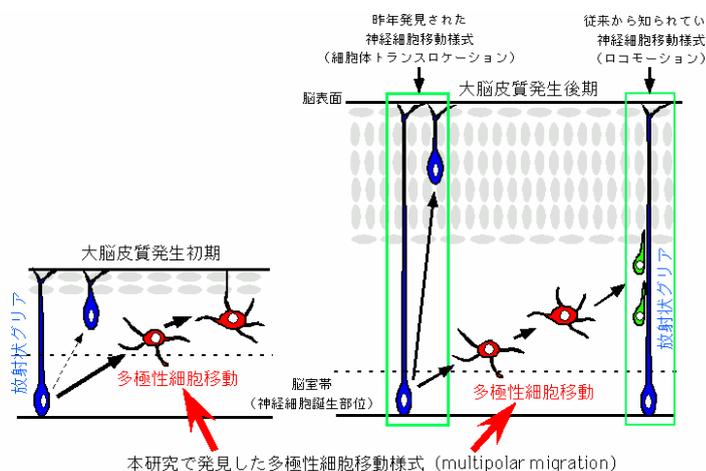
3. 研究の狙い：

我々の脳は、進化の最高傑作とも言われ、複雑な神経回路網を形成している。この複雑な構造も、最初は一層の細胞層であり、そこから徐々に神経細胞が誕生し、長い距離を移動して、整然とした構造を形作っていく。例えば大脳皮質では、脳表面に平行な6層構造を作って配列しており、この秩序だった構造ができることは、脳の正常な機能のために必須であることが知られている。そこで、本研究では、大脳皮質の発生期において、神経細胞がその誕生部位からいかにして移動し、その配置が決まっていくのかの機構の解明を目指した。

4. 研究結果：

(1) 移動神経細胞に外来遺伝子を特異的に発現させ、可視化する技術の開発

移動神経細胞の配置が決まっていく過程について、従来解析が進んでいなかった最大の理由は、移動細胞を、周囲の(既に移動を終えた)成熟神経細胞から区別して同定する簡便な手法がなかったためである。そこで、本研究では、電気穿孔法を用いて、子宮内胎児脳に対する高効率で簡便な遺伝子導入法を確立し、移動神経細胞に特異的に任意の外来遺伝子を発現させ、かつ可視化できる系を開発した。移動を終了した成熟神経細胞には発現しないため、特に移動終了時に起こる現象を解析する上で重要な技術と考えられる。この手法を用いて、大脳発生過程の細胞移動を生きたまま継時観察した結果、多極性神経細胞への形態変化を含む、全く新しい移動様式(“多極性細胞移動” 図参照)を発見した。これは、特に発生初期には、全体の9割を占める重要な移動様式であることも判



明した。従来の移動様式のような、脳室帯(神経細胞誕生部位)から脳表面への縦方向の直線的な移動とは異なり、今回発見した移動様式では、多くの突起を周囲にさかんに伸縮させて、何らかの環境因子を探索しているかのように、縦にも横にも動くのが最大の特徴である。その誕生の瞬間を観察したところ、従来、細胞移動の足場とされていた放射状グリア自身が、その突起を

短縮させて、直接多極性神経細胞に変化することを発見した。また、その後は、従来型のロコモーション細胞(図右)に変化してから皮質板に入っていくことを見いだした。以上より、神経細胞移動は、従来考えられていたような単純なものではなく、ダイナミックに大きく形態を変化させながら達成されることが明らかになった。

(2) 神経細胞の最終配置の制御機構

移動神経細胞は、その終点(脳表面)において、リーリン分子によってその最終配置が制御される。本研究でそのシグナル伝達機構の解析を行った結果、リーリンは、細胞外でホモ二量体を作って機能し、この二量体形成は、リーリンのシグナル伝達上重要な意義を有することを見いだした。また、リーリンは、その受容体に結合後、細胞内の Dab1 分子の細胞内移行を引き起こすことによってチロシンリン酸化を誘導し、その機能を発現することを発見した。さらに、リーリンは、細胞の移動終了シグナルと一般に考えられているが、上記の移動細胞可視化法を使って解析したとこ

る、細胞の分化に影響を与えることが強く示唆された。さらに、神経細胞は、脳室帯での細胞誕生直後に、すでに誕生時期依存的な相互の凝集機構を獲得していることを発見した。これは、脳表面で最終的に移動を終えて、誕生時期を共通にする細胞同士が集まって層を形成していく過程で重要な寄与をしている可能性が考えられた。

5.自己評価：

本研究では、大脳皮質神経細胞が層構造を作る機構を解明するために、1) 細胞誕生時における最終配置層についての運命決定、2) 誕生部位から最終配置部位への移動過程の制御、3) 移動終了地点における細胞外からの配置制御機構の3点からアプローチした。2) については、新たに開発した移動細胞の可視化法によって多くのことを明らかにできたと思われるが、1)、3) については、得られた知見は未だ断片的であり、全体のストーリーを構築するまでには至らなかった。本研究で開発した遺伝子導入法を駆使して、1) から2)、さらに3) に至る層形成過程を総合的に理解することが、今後の重要な課題と考えられる。

6.研究総括の見解：

哺乳類の脳は複雑な神経回路網から成っている。マウス胎児での大脳皮質の発生期を対象に、この形成過程が如何に進行するかを調べた。その研究過程で子宮内胎児の脳に対して電気穿孔法により外来遺伝子を導入し、移動中の神経細胞を可視化する方法を開発した。この方法により、従来考えられていた様相とは異なる多極性細胞移動と呼ぶ現象を発見し、大脳皮質が発生するプロセスを具体的に示した。さらに、この電気穿孔法には様々な応用が考えられ、今後の研究に大いに役立つと期待される。その成果の大きさは2件の学会賞と数多くの招待講演、また2件の特許申請に示される。

7.主な論文等：

1. Yip, J. W., Yip, Y. P. L., Nakajima, K., and Capriotti, C. (2000). Reelin controls position of autonomic neurons in the spinal cord. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97, 8612-8616.
2. Utsunomiya-Tate, N., Kubo, K., Tate, S., Kainosho, M., Katayama, E., Nakajima, K., and Mikoshiba, K. (2000). Reelin molecules assemble together to form a large protein complex, which is inhibited by the function-blocking CR-50 antibody. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97, 9729-9734.
3. Tabata, H., and Nakajima, K. (2001). Efficient in utero gene transfer system to the developing mouse brains using electroporation -- Visualization of neuronal migration in the developing cortex. Neuroscience 103, 865-872.
4. Kubo, K., Mikoshiba, K., and Nakajima, K. (2002). Secreted Reelin molecules form homodimers. Neurosci. Res. 43, 381-388.
5. Tabata, H., and Nakajima, K. (2002). Neurons tend to stop migration and differentiate along the cortical internal plexiform zones in the Reelin signal-deficient mice. J. Neurosci. Res. 69, 723-730.

その他

受賞：

- (1) 日本神経化学会第1回最優秀奨励賞 脳皮質形成のメカニズム('00年10月)
- (2) 第5回上田英雄賞 脳神経細胞の配置決定のメカニズム('01年4月)

招待講演 国内24件、海外7件

特許出願：

- (1) 「遺伝子導入動物の製造方法」(特開2002-65112号)
- (2) 「中枢神経組織の再生方法」(特願2002-335249号)

1. 研究課題名：多元的遺伝情報発現系の分子モーター複合体による協調化機構の解明
 - 遺伝子発現系における転写統合装置複合体の共通機能 -

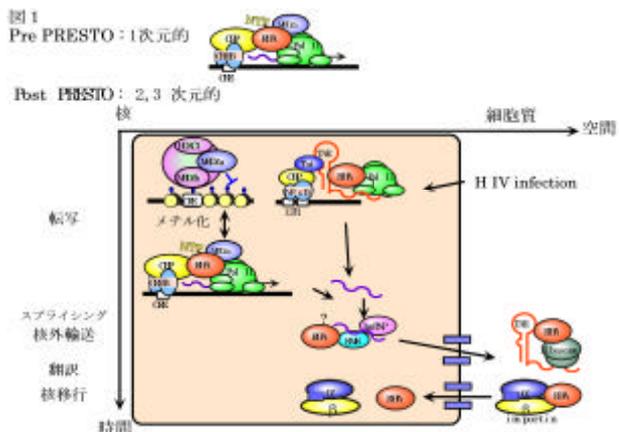
2. 研究者氏名：中島 利博

3. 研究のねらい：

真核細胞の遺伝情報発現系は転写、プロセッシング、翻訳の反応が核、細胞質という異なる“場”において協調的に営まれています。この協調的遺伝情報発現系の統一的理解のため、個々の反応に関与し、かつ場を変えうる能力を有する“分子モーター”の存在を想定し、そのモデルの検証を行います。

4. 研究結果：

これまで申請者は転写研究を一貫として行い、ほとんどすべての転写因子が転写統合装置 CREB binding protein (CBP) に結合する、すなわち核内の集積装置 IC として作用するという概念を報告しました。さらに、PRESTO のメンバーとして、転写統合装置複合体のコンポーネントの一つである RNA ヘリケース A (RHA) が遺伝子発現の初期反応である“転写”にかかわるのみならず、核から細胞質に局在を変え、遺伝子発現の各過程へと関与することを見出しました。すなわち、一次的、もしくは“点”としての転写反応から、時空間的な多次元の反応としての遺伝子発現系へと研究テーマを発展させることができました (図 1)。



また、RHA のショウジョウバエのホモログは雌雄決定因子の一つ Maleless (Mle) として知られています。Mle はメスのハエに比べオスの一つしかない X 染色体上の遺伝子の発現を強度に活性化することによりオスを生存させると考えられています。これまで、転写後の過程で Mle は作用すると報告されていましたが、転写活性化のみが欠失した変異型 Mle のトランスジェニックフライを用いることにより、転写レベルでの Mle の関与を証明することにも成功しました (この研究は理化学研究所の中村輝博士との共同研究で行いました)。

時空間的にさまざまな“索過程”での RHA の関与については証明することができましたが、遺伝子発現系としての協調性、すなわち“連携”については、PRESTO の期間では検証できていません。しかしながら、ショウジョウバエを用いた系での Mle の転写レベルでの関与は古典的課題である雌雄決定機構に大きな貢献をしえる研究結果となりました。

5. 自己評価：

遺伝子発現系での時空間的にさまざまな“索過程”での RHA の関与については証明することができました。しかしながら、遺伝子発現系としての協調性、すなわち“連携”については、PRESTO の期間では検証できていません。今後の大きな課題として残されています。一方で、PRESTO に参加すること無くしては考えもしなかった、モデル生物としてのショウジョウバエの系を導入し、MLE の転写レベルでの関与を証明できました。これは、ショウジョウバエの雌雄決定という古典的の学問に一石を投じるきわめて独創的な成果となりました。

6. 研究総括の見解：

真核生物における転写と翻訳は核と細胞質に分かれて行われている。その転写と翻訳の進行を統合する因子の一つとして RNA ヘリケースを想定してその検証を行った。RNA ヘリケースのショ

ウジョウバエのホモログである雌雄決定因子の Mle タンパク質は、これまで転写後の過程で機能すると考えられていたが、本研究で、Mle が転写にも関与することを検証した。この研究はリウマチ病理の解明と治療法の開発に関わるものであり、その成果に対して国内外の学会賞各 1 件を受けている。

7. 主な論文等：

1. Aratani, S., Fujii, R., Oishi, T., Fujita, H., Amano, T., Ohshima, T., Hagiwara, M., Fukamizu, A., and Nakajima, T. (2001). Dual roles of RNA helicase A in CREB-dependent transcription. *Mol. Cell. Biol.* 21, 4460-4469.
2. Fujii, R., Okamoto, M., Aratani, S., Oishi, T., Ohshima, T., Taira, K., Baba, M., Fukamizu, A., and Nakajima, T. (2001). A role for RNA helicase A in TAR-dependent transcriptional regulation of the human immunodeficiency virus type 1. *J. Biol. Chem.* 276, 5445-5451.
3. Shimohata, T., Nakajima, T., Yamada, M., Uchida, C., Onodera, O., Naruse, S., Kimura, T., Koide, R., Nozaki, K., Sano, Y., Ishiguro, H., Sakoe, K., Ooshima, T., Sato, A., Ikeuchi, T., Oyake, M., Sato, T., Aoyagi, Y., Hozumi, I., Nagatsu, T., Takiyama, Y., Nishizawa, M., Goto, J., Kanazawa, I., Davidson, I., Tanese, N., Takahashi, H., and Tsuji, S. (2000). Interaction of expanded polyglutamine stretches associated with CAG repeat diseases and hTAFII130 interferes with CREB-dependent transcription. *Nature Genetics* 26, 29-36.
4. Miyagishi, M., Fujii, R., Hatta, M., Yoshida, E., Araya, N., Nagafuchi, A., Ishihara, S., Nakajima, T., and Fukamizu, A. (2000). Regulation of Lef-mediated transcription and p53-dependent pathway by associating β -catenin with CBP/p300. *J. Biol. Chem.* 275, 35170-35175.
5. Kawabata, H., Kawahara, K., Kanekura, T., Araya, N., Daitoku, H., Hatta, M., Miura, N., Fukamizu, A., Kanzaki, T., Maruyama, I., and Nakajima, T. (2002). Possible role of transcriptional coactivator P/CAF and nuclear acetylation in calcium induced keratinocyte differentiation. *J. Biol. Chem.* 277, 8099-8105.

その他

受賞：

1. 受賞対象研究名 Role of Notch-1 intracellular domain in activation of rheumatoid synoviocytes 学会名 :日本リウマチ学会 受賞年月 2002 年 4 月
2. 受賞対象研究名 Implication of Transcriptional Coactivator/Cointegrator CBP Complexes in Rheumatoid Synoviocytes 学会名 :12th Annual Joint Meeting on Immunology Teaching and Research 受賞年月 2002 年 3 月

招待講演 国内 5 回、海外 3 回

1.研究課題名：シグナル伝達の時空間動態を光で制御して光で解析する
- 生理活性を光で制御するケージド化合物の開発とその応用 -

2.研究者氏名：古田 寿昭

3.研究のねらい：

複雑で高度に秩序化された生体内反応を制御するために、生体はさまざまな情報をやり取りしている。これらはいくつかのシグナル伝達系で制御されているが、より深く理解するためには、シグナリングに關与する分子が、いつ、どこで、どのように働くかを明らかにする必要がある。しかし従来の方法論だけでは、この素過程を生理的条件に近い時間および空間分解能で解析することは困難である。そこで、ケージド化合物を利用して細胞内あるいは細胞間での情報のやり取りを高い時空間分解能で操作する手法の開発を目的として研究を行った。

4.研究結果：

ケージド化合物とは、光分解性の保護基で生理活性分子を保護し、一時的にその活性を失わせた分子のことである。光を照射することで、瞬時に元の生理活性分子を出現させることが出来る。シグナル分子が機能発現する時期と場所を、光を照射する時期と場所で制御することが可能になり、照射光量で発現する量を調節することも原理的には可能となる。本研究では、我々のグループが開発した光分解性保護基である Bhc 基 (6-プロモ-7-ヒドロキシクマリン-4-イルメチル基)を用いて、さまざまな情報分子のケージド化合物を合成することから始めた。

(1)神経伝達物質およびセカンドメッセンジャーのケージド化合物の設計 合成

神経伝達物質のケージド化合物として、グルタミン酸、グリシン、アスパラギン酸、GABA および D-セリンのケージド化合物の合成に成功した。これらの化学的な性質を調べて、ケージド化合物として適当かどうか検討した結果、いずれの化合物も1光子励起の光感受性の面では申し分ない性質を持っていた。カルボキシル基側にケージを導入したものについては、暗所での安定性がそれほど高くない(半減期 12-30 時間)という問題点も明らかとなったが、Bhc 基がアミノ酸全般をケージド化合物に変換できることが分かったので、これをペプチドに拡張し、RGD (アルギニン - グリシン - アスパラギン酸)モチーフを持つペプチドのケージド化合物を合成した。合成したケージド RGD ペプチドが、光照射によってほぼ定量的に元の RGD ペプチドを放出することと、HL-60 細胞(前骨髄性白血病細胞)のアポトーシスを光制御できることが確認出来た。例えば、細胞接着に伴うインテグリンを介したシグナル伝達の分子機構を調べるツールとしての応用が期待できる。また、合成したケージド神経伝達物質を脳スライスサンプルに適用して、電気生理学的手法と組み合わせることで、神経細胞間の情報伝達を光照射によって擬似的に再現して解析することも可能となる。

続いて、セカンドメッセンジャーのケージド化合物として、cAMP、cGMP、ジアシルグリセロールおよびアラキドン酸のケージド化合物を合成した。合成法の最適化、光反応性の検討および酵素反応の光制御能等を明らかにし、さらに、cAMP に関しては、様々な細胞内への導入法に対応できるように、膜透過性のものと水溶性が高いものを合成した。膜透過性誘導体はメダカ色素胞へ導入し、cAMP が関わるシグナル伝達系を光照射によって繰り返し制御できることを確認した。また、水溶性誘導体をパッチピペットによって単離嗅細胞に導入し、匂い感知後のシグナル伝達を光照射によって再現できることも確認できた。しかし、これらのケージド化合物に2光子励起を適

用し、高い空間分解能で反応を制御することも目標としていたが、そちらはほとんど手付かずとして残ってしまった。今後の課題としたい。

(2) 任意の遺伝子の機能を光で制御する方法の開発

生体における情報のやりとりの主役分子はタンパク質である。Bhc ケージド化合物の応用の1つとして、遺伝子の機能を制御することを検討した。サイクリックヌクレオチドのケージド化合物合成用を開発した Bhc-ジアゾを用いることで、mRNA のケージド化合物 (Bhc-mRNA) を合成することができた。Bhc-mRNA をゼブラフィッシュ初期胚に導入することで、任意の mRNA の発現時期および部位特異的な過剰発現を *in vivo* で行うことも成功した。同様な考え方でタンパク質レベルでの機能発現の光制御も可能となる。さらに、ケージド化合物の化学を拡張することで、任意の遺伝子およびタンパク質の機能阻害を行うことも可能になるであろう。今後のさらなる発展への足掛かりができたと考えている。

(3) 新しいケージの開発

Bhc 基は、従来のものに比べて1光子励起の効率が遥かに高いという特徴を持つが、まだ万能ではない。そこで、これとは異なる性質を持ち、相補的に用いる事ができるようなケージの開発を目指し、Anthraquinon-2-ylmethoxycarbonyl (Aqmoc) 基の開発に成功した。これは、水酸基やアミノ基を持つ生理活性物質のケージド化合物合成への応用が可能で、特徴としては、1光子励起の効率が比較的高いことと、ケージ解除後の副生成物が紫外領域の光を吸収しないことがあげられる。今後は、さらに異なる性質を持つケージ (例えば、暗所での安定性が高いもの、可視光でケージ解除できるものなど) の開発も進めていく必要がある。

5. 自己評価 :

当初の計画では、ケージド化合物の化学を活用して生きた細胞の機能を制御することと、新しい蛍光プローブを開発して可視化解析することを目指した。3年間で各種のケージド化合物を開発することに成功し、さらに、遺伝子の機能制御という さきがけ参加以前では思いもよらなかった方向に研究を展開することが出来た。しかし、合成したケージド化合物を用いた機能制御は相変わらず共同研究頼みであること、成果の大部分を期間内に論文としてまとめられなかったこと、また、可視化解析に関しては全く手を付けることが出来なかったこと等、数多くの反省点も残ってしまった。

6. 研究総括の見解 :

生理活性物質の活性部位を特異な化合物を結合してマスク(ケージド化合物化)し、光の照射により瞬時にその活性部位を露出する技法の研究を行なっている。光分解性保護基として既に6-ブロモ-7-ヒドロキシマリリン-4-イルメチル基 (Bhc 基) を開発し、神経伝達物質としてのアミノ酸類やペプチド類に応用し、白血病細胞におけるアポトーシスの光制御に成功した。また、本領域の他研究者の注目を引き、cAMP などのケージド化合物を合成し、メダカの色素胞で cAMP 関与の信号伝達系を任意に操作することを示した。さらにメッセンジャーRNA をケージド化し、ゼブラフィッシュの初期胚中で、任意の時点で翻訳を行わせることも可能とした。その他、様々な可能性を示唆しており、新しい研究技法として注目される。

7. 主な論文等 :

1. Mizuta, H., Watanabe, S., Sakauchi, H., Nishiyama, K., Furuta, T., Kobayashi, Y., and Iwamura,

- M. (2002). Design, Synthesis, photochemical properties and cytotoxic activities of water-soluble caged leucyl-leucine methyl esters that control apoptosis of immune cells. Bioorg. Med. Chem. 10, 675-683.
2. Furuta, T., Hirayama, Y., and Iwamura, M. (2001). Anthraquinone-2-ylmethoxycarbonyl (Aqmoc): a new photovhemically removable protecting group for alcohols. Org. Lett. 3, 1809-1812.
3. Ando, H., Furuta, T., Tsien, R. Y., and Okamoto, H. (2001). Photo-mediated gene activation using caged RNA/DNA in zebrafish embryos. Nature Genetics 28, 317-325.

その他

招待講演 国内 1件

1. 研究課題名：オートファジーの分子機構と生理的役割

? オートファゴソームはいつ、どこで、どのように作られるか ?

2. 研究者氏名：水島 昇

3. 研究のねらい

生命を維持するためには、一旦合成したタンパク質を環境変化に応じて適切に分解処理する必要がある。オートファジーはリソソームにおける非特異的な主要分解機構であり、すべての真核生物に保存されている。しかし、オートファジーの分子機構はまだほとんど不明である。本研究では酵母および動物細胞を用いてオートファゴソームの形成機構を明らかにし、それを足がかりとして哺乳動物におけるオートファジーの生理的役割の研究へと発展させることを目指した。

4. 研究結果

(1) オートファゴソーム形成の分子機構

真核細胞は二つの主要な細胞内分解系をもっている。ひとつはユビキチン・プロテアソーム系であり、これは厳密な認識機構をもった選択的タンパク質分解系である。一方、オートファジーは大部分の長寿命タンパク質やミトコンドリアなどのオルガネラを分解する大規模なバルク分解系である。図1に示すようにオートファジーは巧妙な膜動態を伴うが、

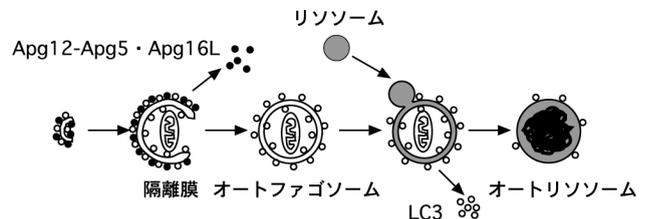


図1 オートファジーの模式図と Apg タンパク質の局在

その分子メカニズムは不明な点が多かった。私は Apg12 と Apg5 という二つのタンパク質が共有結合するという極めて特殊な翻訳後修飾システムを発見し、これが酵母オートファジーに必須であることを見出した。そこで本さきがけ研究ではこのシステムを手がかりに、オートファゴソーム形成の分子機構の解析を行った。酵母を用いたその後の研究によって、Apg12-Apg5 結合体が機能するには、さらに別の分子 Apg16 と結合することが必要であり、これらは Apg12-Apg5-Apg16 複合体としてはじめて機能することを示した。一方、得られた知見を哺乳動物へと応用することによって、ほとんど未知であった動物細胞のオートファジーのメカニズムの研究に着手することができた。まず Apg12 と Apg5 ホモログを単離し、それらが酵母と全く同様の結合反応によって共有結合することを明らかにした。さらに、マウス胚性幹細胞 (ES細胞) の APG5 遺伝子をホモに破壊することによって、哺乳動物においてもこの結合システムがオートファジーに必須であることを示した。結果としてオートファジーの機能を完全に欠損した初めての動物細胞を作成し得た。この細胞は正常に増殖するが、アミノ酸飢餓時のバルク分解が著明に低下しており、オートファジーが実際に主要な細胞内分解系であることを直接的に示した。次に、詳細な局在などの解析の結果、Apg12-Apg5 共有結合体がオートファゴソーム完成前の隔離膜に特異的に局在し、その膜の伸長に必須であることを示した (図1)。そして、生きた細胞内で蛍光標識した Apg5 を観察することによって、オートファゴソームが形成される過程を実時間観察することに初めて成功した。オートファゴソームがどのように形成されるかは依然多くの謎があるが、一連の研究によって、小さな膜がその場で伸長して形成されることが示された。

(2) 哺乳動物個体におけるオートファジーの意義

酵母では、栄養飢餓時の生存維持、胞子形成の際の細胞再構築にオートファジーが重要であることが明確に示されている。一方、哺乳動物でのオートファジー研究の歴史は古いものの、個体における役割は不明である。酵母の研究に基づいた哺乳動物ホモログの解析の結果、哺乳動物でのオートファジー関連タンパク質を多数得ることができた。そこで、哺乳動物個体におけるオートファジーの進行状況を簡便かつ特異的に観察する目的で、オートファゴソームが蛍光標識される GFP-LC3 トランスジェニックマウスを作成した。このマウスを用いて、いつ、どこでオートファジーが

おこっているかの網羅的解析に着手した。これまで飢餓時の肝臓のオートファジーばかりが強調されてきたが、実際は骨格筋、心筋、外分泌腺（胃主細胞、膵外分泌細胞、精嚢）、胸腺上皮細胞、眼レンズ上皮細胞、肺胞2型上皮細胞、腎足細胞などでもオートファジーが活発におこっていることが観察された。このことは、オートファジーは単に日常的な細胞内タンパク質やオルガネラのリサイクルを担っているだけではなく、各組織で特化した役割を果たしていることを示唆する。

5. 自己評価：

本研究課題ではオートファジーの分子機構と多細胞生物における生理的役割の解明の2本の柱を掲げた。前者については当初の目標に極めて近い成果が得られ、一部は教科書の記載の修正へとつながった。一方、後者の生理的役割については、遺伝子破壊マウスの作製と解析が研究期間内に終了しなかったことが残念であったが、研究は着実に進行し近くその結果が得られる予定である。またオートファジー標識マウスを開発し得たことは大きな成果であり、これは今後のオートファジー研究の非常に重要なツールとなろう。オートファジー研究はこれまでの既存の研究領域には該当しない新しい生命科学の分野であるが、本さきがけ研究において大切な進歩が得られたと考えている。

6. 研究総括の見解：

細胞内の殆どのタンパク質、一部の核酸や糖質、またミトコンドリアなどのオルガネラはオートファジー機構によりゆっくりと分解され、リサイクルされる。まず出芽酵母を用いた研究で、この現象の主要過程であるオートファゴソームの形成に必要なタンパク質3種を検出した。次いでマウスを用いた実験で、これまで認められていた肝臓のみでなく、広く様々な臓器・器官の細胞でもオートファゴソームが、同様なタンパク質の関与のもとで機能することを検証した。これらの成果は、これまで殆ど不明であった細胞内物質リサイクルのメカニズムの解明に糸口を付け、医学におけるリソソーム異常疾患への対応をはじめ、細胞培養工学全般に影響を及ぼすことが期待される。学会奨励賞の受賞と多くの招待講演は、その学術的評価の高さを示している。

7. 主な論文等：

1. Kuma, A., Mizushima, N., Ishihara, N., and Ohsumi, Y. (2002). Formation of the ~350 kD Apg12-Apg5-Apg16 multimeric complex, mediated by Apg16 oligomerization, is essential for autophagy in yeast. *J. Biol. Chem.* 277, 18619-18625.
2. Suzuki, K., Kirisako, T., Kamada, Y., Mizushima, N., Noda, T., and Ohsumi, Y. (2001). The pre-autophagosomal structure organized by concerted functions of APG genes is essential for autophagosome formation. *EMBO J.* 20, 5971-5981.
3. Mizushima, N., Yamamoto, A., Hatano, M., Kobayashi, Y., Kabeya, Y., Suzuki, K., Tokuhiya, T., Ohsumi, Y., and Yoshimori, T. (2001). Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells. *J. Cell Biol.* 152, 657-667.
4. Ichimura, Y., Kirisako, T., Takao, T., Satomi, Y., Shimonishi, Y., Ishihara, N., Mizushima, N., Tanida, I., Kominami, E., Ohsumi, M., Noda, T., and Ohsumi, Y. (2000). A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature* 408, 488-492.
5. Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., Noda, T., Kominami, E., Ohsumi, Y., and Yoshimori, T. (2000). LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J.* 19, 5720-5728.

その他

受賞 :平成 13 年度日本生化学会奨励賞 「オートファジーの分子機構に関する研究 :Apg12 結合システムの役割」(平成 13 年 10 月)
招待講演 19 件 (うち海外 3 件)

1.研究課題名：タンパク質分解ユビキチンシステムと細胞機能の連携制御機構
？ ユビキチンリガーゼ APC の細胞周期での役割？

2.研究者氏名：山野 博之

3.研究のねらい：

増殖の基礎、細胞周期を周期たらしめる分子、サイクリン。分裂期 (M 期) から間期への移行はサイクリン B の分解が鍵である。ここでは、ユビキチンリガーゼ APC (M 期後期促進複合体) を介した分解が起こるものの、基質サイクリン B が認識される分子機構はほとんど分かっていなかった。私は認識に必須なシス配列を同定したので、何がその配列を認識しているのかを研究した。また、APC の基質特異性と細胞内局在の考察を加えるために、APC のライブ観察を行った。さらには、APC の新規機能を発見するため、新しい基質探索を目指した。

4.研究結果：

(1)サイクリン B が認識される仕組み

選択的なタンパク質分解 (ユビキチン依存性タンパク質分解) には、少なくとも、分解基質の (1) 認識、(2) ユビキチン化、(3) 分解という3つの過程が不可欠である。私は細胞周期のマスター酵素 Cdc2 の制御サブユニットであるサイクリン B をモデル基質として、基質の認識からユビキチン化までの過程を研究している。まず、サイクリン B の分解ボックス (ユビキチン化に必須な配列) が何によって認識されているのかを解析した。その結果、カエル卵抽出液では、酵母遺伝学的解析で基質特異性を付与する因子としての報告がある APC 活性化因子 Fizzy ではなく、APC 自身が分解ボックスを認識していることを見出した。APC のどのサブユニットが基質認識に関わっているのかを決定するためには、可溶性 APC を精製することが肝要かと考えた。しかしながら、ユビキチンリガーゼ APC は 11 種類以上のサブユニットからなる巨大複合体 (1.5 MD) 故に、活性のある可溶性 APC を短時間で精製する方法はなかった。APC が基質をユビキチン化する分子機構の研究が立ち後れていた一因でもあった。そこで、私は抗 APC3 抗体を用いた免疫精製法と新規な溶出ペプチドを組み合わせて、ヒト、マウス、カエル卵抽出液から短時間 (30 分) で APC を高純度で精製する方法を開発した。そして、この方法で精製した APC を用いて、APC がサイクリン B を認識するキネティクスを BIACORE (表面プラズモン共鳴センサ) で解析した。M 期後期の活性型 APC は特異的に、かつ非常に短い半減期 (約 1 分) で分解ボックスと相互作用していた ($k_d: 0.0123$, 1 秒間に 1.23 % 解離する)。APC が基質を効率よくユビキチン化していくには、これくらい早い認識、解離反応が必要なのである。対照実験として間期から精製した APC はサイクリンと相互作用をしなかったことから、基質認識は細胞周期で確かに制御されていることを明らかにした。また、ここで開発された精製法は APC と相互作用する新規なタンパク質を単離、解析するアプローチとしても今後有用となる。さらに、カエル卵抽出液を用いた試験管内分解アッセイ系から APC を免疫除去および精製 APC 再添加による相補できる系を構築した。この系を用いて、APC が M 期中期と後期で質的に違うことを見出した。この APC の質的相違が中期 後期遷移に起こる APC 依存的分解の引き金の分子機構ではないかと考えている。

(2) ユビキチンリガーゼ APC の細胞内局在変化

APC の細胞周期を通じての細胞内局在を観察するために、染色体上の Apc6/Cut9 を GFP (緑色蛍光色素) でタグした酵母を用いて解析した。その結果、間期には細胞全体に存在するが、M 期前中期頃から核内に蓄積し始め、中期には中期プレート構造に、染色体分配時 (M 期後期) には染色体分離に応じて染色体領域及びスピンドルに局在し、S 期頃にこの核内蓄積が消失することが分かった。この Apc6/Cut9 タンパク質量は細胞周期で変動することなくリン酸化が M 期前中期に起こることが報告されているので、リン酸化が核内 APC 局在の制御に関係しているようである。今後、この局在制御と APC の基質特異性 (分解のタイミング決定) の相関について研究していきたい。

(3) APC の細胞周期における新規基質の探索

ユビキチンリガーゼ APC は、複製されたゲノムの分配が行われる M 期後期からゲノムの複製が行われる S 期までのプログラムされた分解を制御する。APC の細胞周期での役割を詳細に把握するためには、新しい基質の同定とその認識、分解の制御機構を明かす必要がある。本研究で、新たに S 期サイクリン Cig2 および Nek2A キナーゼを APC 基質として同定した。分裂酵母 S 期サイクリン Cig2 が M 期後期に分解されないと、核が隔壁で分断された表現型が観察されることから Cig2 の APC 依存的分解は染色体分離を含む M 期後期事象と隔壁形成 (細胞質分裂) の共役に必須であることが分かった。さらに、Cig2 の細胞周期を通じての分解機構を研究した結果、Cig2 の発現は、これまでに報告がない 3 つの独立な分解系 (APC、SCF^{pop1}, pop2、SCF) が関わる新規なメカニズムで、G1/S 期にピークがくるように制御されていることを明らかにした。また、中心体の分離に働いているヒト Nek2A は、サイクリン B とは異なる少し長めの分解配列を用いて、サイクリン A のように M 期中期から分解されることを見出した。最近、ユビキチンリガーゼ APC は細胞周期制御のみでなく、分化した増殖していない細胞でも機能していることが報告されているので、さらなる APC 基質あるいは APC 相互作用タンパク質の網羅的解析が、生命活動を支える必須巨大複合体 APC の役割、制御機構を解明するために必要であろう。

5. 自己評価 :

巨大複合体ゆえに、認識、活性化の分子制御機構の研究が難解であった APC (M 期後期促進複合体) について、ヒト、マウス、カエルから可溶性 APC 精製法を確立し、また、カエルの卵抽出液を用いて、生化学的に APC を研究する系を構築したことは大きな成果である。特に構造解析をも可能にする精製度の高い可溶性 APC を用いた研究は、詳細なサブユニットの役割研究等、今後大きな発展性が期待できる。ただ、選択的な基質認識を行っているサブユニットの正体を決定するまでに至らなかったのは残念である。細胞生物学的な APC の研究としては、世界に先駆けて APC のライブ観察を成功させ、APC の局在が細胞周期で制御されていることを示せし、本研究期間中に新規な APC 基質を 2 つ同定し、その分解のメカニズムを明らかにしたことは、十分評価できる。

6. 研究総括の見解 :

細胞内で不要になった特定のタンパク質が、ユビキチン化による厳密な選定のもとで、プロテアソームにより速やかに分解される機構がある。その基質の一つに細胞周期の適切な進行に必要なサイクリン B がある。本研究者はユビキチンリガーゼ APC (M 期後期進行複合体) のサイクリン B 認識機構を分裂酵母について研究し、新開発の免疫精製法により APC を純化し、ユビキチン化の動力学、細胞周期による APC の質的变化と細胞内所在の可視化、さらに APC のその他の基質として S 期サイクリンを同定した。特に細胞周期の適切な進行に必要なタンパク質除去機構についての知見を深めた。なお APC の活性化剤は抗がん活性をもつものと期待される。

7. 主な論文等 :

1. Hames, R.S., Wattam, S.L., Yamano, H., Bacchieri, R., and Fry, A.M. (2001). APC/C- mediated destruction of the centrosomal kinase Nek2A occurs in early mitosis and depends upon a cyclin A-type D-box. *EMBO J.* 20, 7117-7127.
2. Yamano, H., Kitamura, K., Kominami, K., Lehmann, A., Katayama, S., Hunt, T., and Toda, T. (2000). The spike of S phase cyclin Cig2 expression at the G1-S border in fission yeast requires both APC and SCF ubiquitin ligases. *Mol. Cell.* 6, 1377-1387.

その他

招待講演 国内 1件、海外 5件

1. 研究課題名： 生殖細胞の染色体分配の分子仕掛け
 - 染色体接着因子コヒーシンの作用機序をさぐる -

2. 研究者氏名： 渡辺 嘉典

3. 研究のねらい

体細胞分裂では、複製された染色体 (姉妹染色分体) を分配する均等分裂を行う。一方、生殖細胞で見られる減数分裂では染色体数を半減化させるために、その第一分裂において相同染色体を分配する還元分裂を行う (図 1)。このとき、姉妹染色分体が同一極のスピンデル微小管によって捕らえられるような特殊な制御が働くと考えられているが、その機構はよく分かっていない。私のそれまでの研究から、動原体の制御に染色体接着因子コヒーシンが重要な役割を持つことが示唆されていた。本研究では、染色体接着因子コヒーシンの染色体分配における作用機序を明らかにすることを目指した。

4. 研究結果：

(1) 体細胞分裂型のコヒーシン Rad21 と減数分裂型のコヒーシン Rec8 の動原体での局在

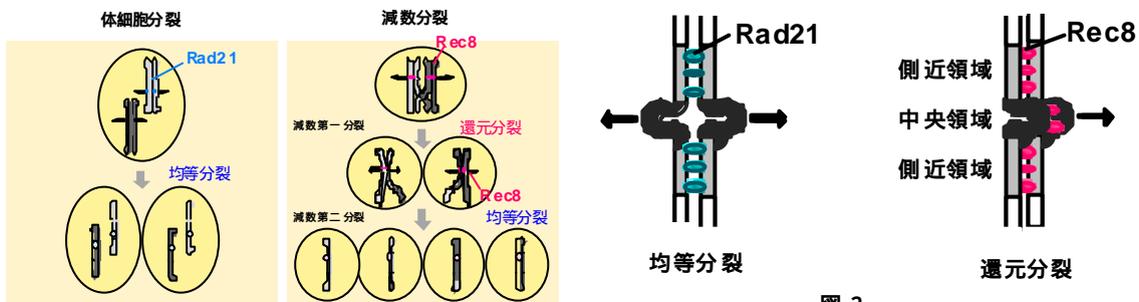


図 1

図 2

分裂酵母では、Rad21 が体細胞分裂に必須のコヒーシンとして機能するが、減数分裂のときには代わりに減数分裂特異的な相同因子 Rec8 が発現し機能する (図 1)。rec8 遺伝子破壊株では減数第一分裂が均等分裂へシフトしてしまうことから、普段は動原体に局在する Rec8 が、姉妹動原体が同一方向からのスピンデル微小管によって捕らわれようように制御する働きがあることが示唆された。さらに、Rad21 と Rec8 のセントロメアにおける局在を詳細に調べることにより、Rad21 は動原体の中央部を除く側近領域に強く局在するのに対して、Rec8 は側近領域に加え中央領域にも強く局在することが明らかになった。この結果は、Rec8 によってのみ姉妹動原体の中央領域の接着が確立され、同一方向へ配向した動原体構造が構築されることを上手く説明する (図 2)。

(2) 減数分裂前 DNA 合成期に Rec8 が機能し、還元的な動原体機構が確立される

一般に減数分裂細胞への細胞分化は、細胞周期のスタートの制御点である G1 期から起きる。人為的に減数分裂開始カスケードを G2 期で活性化すると、G2 期から減数分裂がはじまり、そのとき減数第一分裂で起きるべき還元分裂が均等分裂へシフトすることが分かった。G2 からの減数分裂では Rec8 は発現しているにもかかわらず正しく機能できないことが示唆された。また、通常の G1 期からの減数分裂で、プロモーターを換えることにより Rec8 の発現のタイミングを減数分裂前 DNA 合成期の直後へと遅らせると、減数第一分裂が均等分裂へとシフトした。以上の結果より、還元的な動原体構造は、減数分裂前 DNA 合成期に染色体接着因子 Rec8 に依存して確立されると結論された (図 2)。このことは、減数分裂が G2 期からではなく G1 期から起きることの生理的意義をうまく説明する。

(3)コヒーシンの動原体領域への濃縮機構の発見

体細胞分裂細胞では、分裂中期にスピンドルの両極から伸びた微小管が姉妹染色分体のそれぞれのセントロメアに形成された動原体を捕え、微小管の張力と姉妹染色分体間の接着力のバランスにより、姉妹染色分体の2つの動原体はスピンドルの両極へと配向した形で赤道面に整列する。スピンドル微小管が動原体を正しく捕らえるためには、コヒーシンが動原体に濃縮して局在していることが重要であると考えられるが、その分子機構は分かっていなかった。本研究で、動原体でのヘテロクロマチン形成に依存してコヒーシンがその領域に濃縮されることを明らかにした。本発見は、染色体細胞生物学におけるひとつの大きな謎であった動原体におけるヘテロクロマチン機能の一端をはじめ明らかにしたもので、ヘテロクロマチンの形成不全が染色体分配の異常につながる分子機構を説明している。

5.自己評価：

おおむね研究計画に沿って研究を進めることができた。個人研究としては、この3年間の研究の成果には大きな不満はない。動原体の制御因子として新規の因子を取得したかったが、本研究期間中には実現しなかったことが唯一心残りである。その努力は現在も継続しており、近い将来その成果がでると期待されるほどに研究の蓄積は実感できている。継続課題として選出いただけだったので、次の3年間の研究期間中にはそれを実現したい。

6.研究総括の見解：

体細胞分裂において染色体は均等に分配される。そこでは染色体接着因子コヒーシンが重要な役割を果たしている。一方、生殖細胞の形成時の還元分裂では姉妹染色分体と同じ極に引き寄せられる。この違いについて、分裂酵母を用いた様々な検討により、体細胞分裂では Rad21、還元分裂では Rec8 と、コヒーシンの分子種によるセントロメアへの局在性の違いにより説明した。これらの成果により、染色体分配が整然と行われる機構が具体的となってきた。この成果は、すべての動植物の繁殖と結実に関わる知見である。

7.主な論文：

1. 渡辺嘉典 (2000) 染色体接着因子コヒーシン - 染色体分配の精巧な分子しかけ. 細胞工学 19, 547-555.
2. Watanabe, Y., Yokobayashi, S., Yamamoto, M., and Nurse, P. (2001). Pre-meiotic S-phase is linked to reductional chromosome segregation and recombination. Nature 409, 359-363.
3. Higuchi, T., Watanabe, Y., and Yamamoto, M. (2002). Protein kinase A regulates sexual development and gluconeogenesis through phosphorylation of a Zn-finger transcriptional activator Rst2p in fission yeast. Mol. Cell. Biol. 22, 1-11.
4. Sato, M., Watanabe, Y., Akiyoshi, Y., and Yamamoto, M. (2002). 14-3-3 protein interferes with the binding of RNA to the phosphorylated form of fission yeast meiotic regulator Mei2p. Curr. Biol. 12, 141-145.
5. Nonaka, N., Kitajima, T., Yokobayashi, S., Xiao, G., Yamamoto, M., Grewal, S., and Watanabe, Y., (2002). Recruitment of cohesin to heterochromatic regions by Swi6/HP1 in fission yeast. Nature Cell Biol. 4, 89-93.

その他

口頭発表 14 件 (うち海外 5 件) 招待講演 11 件 (うち海外 3 件)