

研究課題別評価

1 研究課題名:胎児形成における DNA 複製酵素系の制御機構

2 研究者氏名:桑原一彦

3 研究の狙い:

臓器形成においては未分化な前駆細胞がまず増殖によってその細胞数を増加させて、臓器を形成する上で十分な規模に達した後、分裂をとめて機能的細胞へと分化させるものと考えうる。このモデルは神経細胞の分化による大脳層構造の形成や各種感覚器官の形成、血液幹細胞からの血液細胞の形成の進行を説明しうるものである。本研究でテーマとする GANP はリンパ細胞の抗原刺激で増殖をして分化するプロセスで発現上昇する分子であるが、RNA プライマーゼ活性を有しており、また DNA 複製に必須な Minichromosome Maintenance protein の MCM3 と結合することから、分裂期の DNA 複製と様々な遺伝子ストレスに対して遺伝子を保護・修復する機能を有する分子であると仮説している。これまでの研究成果は GANP が特に、臓器形成のごく初期に必要なことを示している。遺伝子欠損マウスを作製したところ、ホモ欠損マウスは胎生致死で、その大脳新皮質では未分化神経細胞の増殖と分化の統御が乱れていた。RNA プライマーゼ GANP は MCM3 と結合することより、DNA 複製の制御を通して細胞の増殖、分化を調節しているものと考え、胎児形成、特に大脳皮質形成における GANP の機能解析を通して、細胞増殖のオン・オフから分化へのスイッチの機構を明らかにすることを目指している。

4 研究成果:

I) GANP プライマーゼドメインの構造解析

GANP 分子を蛋白質として純化し、結晶解析による機能モジュールを決定することを目指し、数々の機能蛋白質の結晶化に成功している熊本大学大学院医学薬学研究部の山懸ゆり子教授と様々なアプローチを試みた。核内蛋白質に共通の性質として DNA と強力に結合する性質を有している、全体は 210-kDa で精製が容易でない、金属に結合する性質を有する、など多くの問題があり容易ではなかったが、RNA プライマーゼ領域のみのリコンビナントの作製をして、金属フリーカラムを用いて高度精製することができた。しかし、まだ精製リコンビナントの結晶化の至適条件を広範に解析していく必要がある。これと並行して進めているアプローチとして GANP 蛋白質の純化において結合している分子を解析した。TAP ベクターによって 293T 細胞に強制発現した GANP 分子と結合する蛋白質を明らかにする方法から、これまで少なくとも3カ所の GANP の領域が機能ドメインとして結合する蛋白質 (MCM3、G5PR、その他新規分子2種類)を示している。これらの解析は GANP の有する分子機能を明らかにする上で有力な情報を与えている。

II) 神経特異的 GANP 欠損マウスの作製及び解析

GANP ホモ欠損胎仔の大脳新皮質で神経細胞の増殖と分化の統御が乱れていることから、少なくとも初期の脳形成に必須であることが明らかになっている。次に、果たして GANP は脳神経細胞の初期分化において特異的に機能するのかそれとも成熟の後にも機能して大脳層構造の形成に影響するのか疑問として残る。GANP ホモ欠損胎仔は胎生 12 日までで全例死亡するため、コンディショナル GANP 欠損マウスを作製し、Synapsin 1-Cre マウスと交配して神経特異的 GANP 欠損マウスを得た。このマウスは正常に生まれ、胎生 16 日の大脳層構造には特に異常を認めなかった。大脳層構造形成で異常を認めない理由として、Synapsin 1 の発現時期で GANP を欠損させても大脳の未分化

神経上皮ではそれほど効果がないことが考えられた。すなわち、脳神経細胞の前駆細胞が増殖してその増殖期から細胞分化を行う過程では必須な機能であるが、単なる細胞増殖の時期や、分化した後の臓器形成においては主とした役割を行っていないものと考えられた。一方、小脳ではプルキンエ細胞の高度脱落が認められた。行動解析でも異常を認めたことから、GANPは胎生16日頃の小脳の機能に関わる分化ステージで必要なことが明らかになった。これらの解析から、GANP分子の作用点は特に細胞の分裂増殖から分化の盛んな時期の細胞であることが示唆され、本研究の狙いである細胞の増殖から分化へのまさにその時点で機能していることを裏付けたものと考えている。現在、このことをさらに実証する為に、分化発達のより早期でのGANP欠損をおこす nestin-Cre マウスとの交配したマウスの解析を行っている。

III) GANP に結合する機能分子群の同定

GANPの機能を明らかにする目的で結合分子の同定を酵母ツーハイブリッド法とプロテオミクスによって行った。プロテインホスファターゼ制御因子 G5PR と機能未知の分子 THP-1 を同定することができ、それぞれのコンディショナル遺伝子欠損マウスの作製も行った。Synapsin 1-Cre マウスとの交配により神経特異的遺伝子欠損マウスを作製した。これまでのところコントロールマウスと比べて臓器形成上は特に異常は認めていないが、G5PR 欠損を免疫系の B リンパ細胞で欠損すると、抗原刺激に対して細胞死の感受性が上昇することから、GANP/G5PR の分子複合の機能は臓器形成における刺激伝達の標的となっていることが示唆された。このことは細胞の増殖のオン・オフから分化という観点から極めて重要なことであると思われるので、新しい研究展開を進める必要がある。

IV) GANP の機能ドメインの解析

GANP の中央部分 600 アミノ酸は酵母相同分子 Sac3 と 23%の相同性がある。本研究でこの Sac3 相同領域の機能解析を進めた。Sac3 相同領域のみを有する新規分子 SHD1 を同定してその発現及び機能を調べた。SHD1 は特に中心体や紡錘体に局在が限局していて、SHD1 を siRNA で発現低下させると、中心体複製が起こらず単一の状態で染色体分配に入るため、微小核を多数形成する異常を起こす。また過剰発現すると中心体の分配が多極になることから染色体の aneuploidy を生じた。この loss-of-function と gain-of-function の結果から SHD1 が中心体複製や染色体分配に重要であることを明らかにした。Sac3 相同領域が細胞周期、特に M 期制御に関与することより、GANP が臓器形成に必要なのはこの細胞周期を調節する機能を有することによるものと考えられた。

V) GANP の遺伝子組換えにおける役割

2003年に Aguilera らにより Sac3 欠損酵母が hyperrecombination を呈することが示された。哺乳動物の GANP は酵母の Sac3 の領域以外に RNA プライマーゼ領域と MCM3 結合領域を共に有するより複雑な機能に関わる分子であると考えられる。GANP の DNA hyperrecombination に及ぼす影響を見ることは哺乳動物の臓器形成時の生じる DNA 損傷をどのように保護・修復しているかを明らかにするためには避けられない。そこで、GANP の遺伝子組換えに及ぼす影響を明らかにするため Intra-chromosomal 及び Extra-chromosomal assay を用いた。興味あることに両アッセイによって GANP が遺伝子組換えに対して積極的に制御する機能を有している。GANP の Sac3 の領域、RNA プライマーゼ領域と MCM3 結合領域のすべてが存在することによって遺伝子の相同組み替えを抑制することが示された。さらにこの組換え制御の作用点は DNA の二重鎖切断後であることが明らかとなった。

5 自己評価:

本研究では、GANP が RNA プライマーゼ活性を持つこと、DNA 複製に必須の分子 MCM3 と結合することの二点から、GANP が胎児形成における DNA 複製に関与するというを前提条件として研究

計画を組み立てた。さらにこの DNA 複製異常が GANP ホモ欠損胎仔の脳新皮質形成障害に影響を与えると予測して研究を開始した。(1) GANP のβプライマーゼ領域は哺乳動物に特有の機能分子であることからその構造決定によって、これまで知られているαプライマーゼとの相違を知ることができる有力な手段と考えて研究を進めたが、この分子の結晶化は容易ではなかった。しかし、この過程で蛋白質純化が進み、それと結合する機能分子を明らかにすることができた。プロテオミクス解析を連動させ、現在4種類の結合分子の機能との関連を解析している。GANP 分子は細胞内で DNA 複製の制御分子であることをほぼ明らかにしたが、その際に細胞外からの信号が DNA 複製、修復に至る信号伝達経路に関しての機能分子 G5PR の同定に至っている。この成果は臓器形成に関わる細胞外信号の解析へと展開していくものとしての起点となりうるものと考えている。

蛋白質結晶化の試み以外では大きな進展があったと言える。(2) 2種類の GANP 欠損マウスの解析から GANP の機能は神経細胞の増殖から分化の時期に関わっていることが明らかになった。これらの成果と nestin-Cre マウスの成果を集積して発表する。(3) 結合分子、関連分子の解析は GANP 分子が細胞の分裂において必要であることを示した。一部既に論文発表を行ったが、さらに遺伝子欠損マウスの解析結果を報告する。(4) GANP が DNA 組換えを抑制する効果を持つということを見いだした。酵母のαプライマーゼでは、DNA 複製だけでなく DNA 修復にも関与すると報告されており、GANP が DNA 修復系に関わる遺伝子組換えの制御を抑制するという結果は、RNA プライマーゼとしての本来の機能とかけ離れたものではないと考えている。GANP が細胞生物学的に極めて重要な役割を果たすことを明確に示すことができた。この成果に関して発表を計画している。今後 GANP の臓器形成における機能をさらに解析していきたい。

6 研究総括の見解:

胎児形成期における DNA 複製に関与すると想定した GANP の機能を、ことに大脳皮質の形成に注目して解析した。Conditional Knock Out マウスを作成してその解析を進め、分裂増殖から分化にかけての盛んな DNA 複製に GANP が深く関わっていることを明らかにした。さらに、この分子が DNA 組換えの制御をも担っていることを明らかにした。「分化のスイッチ機構」にまで研究が及ばなかったとはいえ、本研究の成果は胎児形成における増殖と分化の制御機構を解明する上で、基本的に重要であると評価でき、今後の飛躍的展開が十分期待できる。

7 主な論文等:

主な論文:

1. Kono Y., Maeda K., Kuwahara K., Yamamoto H., Miyamoto E., Yonezawa K., Takagi K. & Sakaguchi N. MCM3-binding GANP DNA-primase is associated with a novel phosphatase component G5PR. *Genes Cells* 7:821-834 (2002).
2. Sakaguchi N., Fujimura S. & Kuwahara K. Involvement of GANP in B cell activation in T cell-dependent antigen response. *Dev. Immunol.* 9:169-172 (2002).
3. Fujimura S., Kuwahara K., Ezaki T., Tomita K., Hirose S. & Sakaguchi N. Spontaneous increase of plasma-like cells with high GANP expression in the extrafollicular region of lymphoid organs of autoimmune-prone mice. *J. Autoimmun.* 20:291-301 (2003)
4. Kuwahara K., Fujimura S., Takahashi Y., Nakagata N., Takemori T., Aizawa S. & Sakaguchi N. GANP contributes to affinity maturation of B cell antigen receptor during T cell-dependent responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:1010-1015 (2004).
5. Mirnics Z.K., Caudell E., Gao Y., Kuwahara K., Sakaguchi N., Kurosaki T., Burnside J., Mirnics

- K. & Corey S.J. Microarray analysis of Lyn-deficient B cells reveals germinal center-associated nuclear protein and other genes associated with the lymphoid germinal center. *J. Immunol.* 172:4133-4141 (2004).
6. Khuda S.E., Yoshida M., Xing Y., Shimasaki T., Takeya M., Kuwahara K. & Sakaguchi N. The Sac3-homologue shd1 is involved in mitotic progression in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 279:46182-46190 (2004).
 7. Sakaguchi N., Kimura T., Matsushita S., Fujimura S., Shibata J., Araki M., Sakamoto T., Minoda C. & Kuwahara K. Generation of high-affinity antibody against T cell-dependent antigen in ganp gene-transgenic mouse. *J. Immunol.* 174:4485-4495 (2005)
 8. Fujimura S., Xing Y., Takeya M., Yamashita Y., Ohshima K., Kuwahara K. & Sakaguchi N. Increased expression of GANP RNA-primase is associated with lymphomagenesis. *Cancer Res.* in press (2005)

総説

1. 桑原一彦、阪口薫雄: 胚中心関連分子 GANP の B 細胞活性化における役割、蛋白質核酸酵素 47 巻 16 号 p2300-2305 (2002)

口頭発表

1. 桑原一彦: 胚中心と B リンパ球分化ルート、第 107 回日本解剖学会総会(浜松)、2002 年 3 月(招待講演)
2. 桑原一彦、阪口薫雄: DNA プライマーゼ GANP と DNA 複製因子 MCM3 の細胞質 核間輸送における機能、第 61 回 日本癌学会総会(東京)、2002 年 10 月
3. 桑原一彦、藤村睦、高橋宜聖、竹森利忠、阪口薫雄: B 細胞特異的 GANP 欠損マウスにおける B 細胞分化異常、第 32 回日本免疫学会学術集会(東京)、2002 年 12 月
4. 桑原一彦、阪口薫雄: 胎仔期における DNA プライマーゼ GANP の発現と機能、日本発生生物学会第 36 回大会(札幌)、2003 年 6 月
5. 桑原一彦、藤村睦、大島孝一、阪口薫雄: 胚中心発現 GANP 分子のリンパ腫形成における evidence、第 62 回 日本癌学会総会(名古屋)、2003 年 10 月
6. 桑原一彦、藤村睦、大島孝一、阪口薫雄: 持続的 GANP 発現異常はリンパ腫誘導因子となる、第 63 回日本癌学会総会(福岡)、2004 年 10 月
7. Kuwahara K., Fujimura S., Xing Y. & Sakaguchi N. Transgenic expression of GANP caused lymphomagenesis. 12th International Congress of Immunology (Montreal) July, 2004