

## 「タイムシグナルと制御」研究領域領域活動・評価報告書

－平成17年度終了研究課題－

研究総括 永井 克孝

### 1. 研究領域の概要

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

### 2. 研究課題、研究者名

別紙一覧参照

### 3. 選考方針

- 1) 選考は「タイムシグナルと制御」領域に設けた選考会議で行う。
- 2) 選考会議は領域総括と選考委員(領域アドバイザー、10名)により構成し、研究総括が統括する。
- 3) 選考方法は、書類選考、面接選考および総合選考とする。

### 4. 選考の経緯

応募課題1件につき担当選考アドバイザー3名が書類選考を行い、書類選考会議において面接選考の対象者を選定した。続いて面接選考及び総合選考により、採択候補者を選定した。

選考	書類選考	面接選考	採択者数
対象数	172	35	10

### 5. 研究実施期間

平成14年11月1日～平成18年3月31日

## 6. 領域の活動状況

領域における研究者に対する対応は領域会議、さきがけ研究報告会の開催により行った。それぞれに於いて研究進捗状況の報告と討論、研究交流を行った。研究総括は研究実施場所を訪問し、研究進捗状況を把握した。更に、研究実施場所の上司と懇談し、研究者の研究がスムーズに運ぶように協力を要請した。技術参事は研究実施場所を随時訪問し、現状の視察、研究実施に対する要望などを直接聴取し、研究が円滑に実施できるように調整した。事務参事は研究者の実験実施場所を訪問し、購入備品の実態調査を行った。

## 7. 評価の手続き

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

(評価の流れ)

平成 17 年 12 月 20 日 研究課題別評価提出

平成 18 年 1 月 10 日 研究総括による各研究者に対する見解

平成 18 年 1 月 20 日 研究者からの研究総括見解に対する意見の受付終了

平成 18 年 1 月 27 日 研究報告会開催

平成 18 年 1 月 30 日 研究課題別評価の推進部提出

研究報告書提出締切

平成 18 年 3 月 31 日 研究終了・研究報告書推進部提出

## 8. 評価項目

- (1) 外部発表(論文、口頭発表、出版物等)、特許、研究を通じての受賞等、研究領域での新たな知見の取得等の研究成果の状況
- (2) 得られた研究成果の科学技術への貢献

## 9. 研究結果

「さきがけ研究21(ポスドク参加型)」の第三回修了生は10名である。ポスドク参加型は、提案者個人の研究構想を実現するために、研究員(ポスドク)や技術員(テクニシャン)1~2名と供にチームを編成し、自由度の高い研究資源を提供し、研究を実施するという精神の上に構成されている。3年間という限られた時間ではあるが、以下に示す10名の研究成果はそれぞれ注目されるものであり、新しいシステムでの研究支援が有効に働いたことを明白に示している。以下に、各研究者の目指したものとその研究成果について簡単に述べる。

岡澤 均

RNA ポリメラーゼ II の機能障害による神経細胞死の機構解析をテーマにした。RNA ポリメラーゼ II の機能障害による神経細胞死は、アポトーシス、ネクローシス等の細胞死や、大規模なオートファジーとは異なる形態を示すことから、この細胞死をオメガプロセスと命名し、オメガプロセスを制御する蛋白質分子 YAPdeltaC を同定した。ハンチントン病ショウジョウバエモデルを作製し、複眼の形態変化によりハンチントン病異常蛋白質の挙動を追跡し、HMGB1、YAPdeltaC はショウジョウバエモデルにおいて神経編成を抑制する可能性を示唆した。この系の開発には第二期生の齊藤研究者の寄与がある。

佐渡 敬

X 染色体不活性化の鍵を握る *Xist* とそのアンチセンス遺伝子 *Tsix* をモデルとして、non-coding RNA が DNA やヒストンの修飾と協調的に作り上げる遺伝子発現制御機構やクロマチン構造制御機構の理解を目指した。解析に用いた遺伝子改変マウス作成は、業者に委託することなく研究室で作製できるようにした。*Tsix* は *Xist* 遺伝子座のクロマチン構築に深く関与することで *Xist* の発現を制御していることを強く示唆する結果を得た。

下村 伊一郎

脂肪細胞以外の細胞からの内分泌因子と生活習慣病(主に糖尿病)との関連が示唆される肥満との関係を明らかにすることをテーマとした。研究方法は、食事により産生が調節される内分泌因子群を signal sequence trap 法で、網羅的に解析し、種々の候補遺伝子を抽出した。その一つに、骨格筋から“Musclin”を同定した。他の臓器からも栄養の変化により変動する分子を同定し、それらのネットワークにより生活習慣病が発生する可能性を示唆した。

瀬藤 光利

蛋白翻訳後修飾としての側鎖アミノ酸付加の機構と機能解析をテーマとした。微小管の構成分子  $\alpha$ 、 $\beta$ -チューブリンにグルタミン酸を付加する酵素を同定し、構造を決定し、各チューブリンに特異的な酵素であることを示した。これらの酵素は大きなファミリーを形成している。また、モーター蛋白質の末端での蓄積を防ぐ蛋白質として Scrapper を同定した。更に、質量分析顕微鏡を作製し、マウス脳内でのチューブリンの分布を可視化することに成功した。

高倉 伸幸

造血幹細胞の幹細胞性(自己複製能、未分化性維持)機構の解明をテーマとした。遺伝子改変マ

ウスによる機能解析を主な実験手段とし、造血幹細胞の DNA 複製に関与する遺伝子改変マウス PSF1 の機能解析、造血幹細胞の幹細胞性に関わる基盤分子 TIE2 の機能解析、造血幹細胞の接着、細胞死抑制に関与する候補遺伝子、galectin-3 の機能解析などを行った。TIE2 が恒常的に活性化状態にあると幹細胞が休眠状態にあることを示し、骨髄における骨芽細胞由来のアンジオポエチン-1 が幹細胞の休眠状態を誘導するという仮説を証明した。各プロセスにおける主要な遺伝子の同定に成功した。

高橋 考太

染色体の分配機構に中心的な働きをするセントロメアに焦点を当て、その構造と機能の解析をテーマとした。分裂酵母遺伝学を駆使して、Cnp1 のセントロメア DNA 局在化因子、Mad2 のキネトコア局在化因子など、Mad2 および CENP-A のキネトコア局在機構の分子的理解を推進し、染色体分配の安定性とカリオタイプ変動の可塑性についての基本原理の一端を明らかにした。紡錘体形成チェックポイントと並んで、細胞が異数化することを未然に阻止するシステムのひとつを提案した。

畑田 出穂

ゲノムインプリンティングを介した、ゲノムのエピジェネティック情報の維持とリプログラミング機構の解明をテーマにした。遺伝子改変マウス(Dicer ノックアウトマウス、Ago2 ノックアウトマウス等)を用いてリプログラミングの過程を解析した。卵母細胞の成長培養系を確立した。エピジェネティック情報の異常は生殖細胞でのリプログラミングに影響ないという結論を得たが、この結果は、今後、同一性のみによる交配技術など応用につながると考えられる。エピジェネティック情報の網羅的解析法としてゲノム DNA のメチル化を正確に把握できる“Microarray-based Integrated Analysis by Isomerization (MIAMI 法)”を開発した。

松野 健治

ショウジョウバエをモデル生物として、Notch を介する情報伝達における O-フコシル化の多面的機能を明らかにすることをテーマとした。Notch 情報伝達に不可欠な新規遺伝子を検索し、O-フコシルトランスフェラーゼをコードする *O-fut1* を同定し、その突然変異体を利用し研究を進めた。種々の実験方法を用いて解析を試みている。研究の過程で、ヒト免疫不全症(先天性グリコシル化異常症 II C)患者で見られる発生異常や精神遅延の原因が Notch 情報伝達系の機能低下に関係することを示した。またショウジョウバエの体軸を決定する遺伝子も同定した。

三浦 猛

魚類を用いて、雄と雌の配偶子形成過程で共通に認められる制御機構の解析をテーマとした。卵巣細胞の培養系を確立し、黄体ホルモンは成熟後期にのみ作用するのではなく、減数分裂開始という配偶子形成の初期過程に対しても雌雄とも、重要な役割を果たすことが明確となった。また精子形成に関しては、これまで全く精子形成への関与が示されていなかった副腎皮質系ステロイドや消化酵素であるトリプシンが黄体ホルモンの制御により作用することが明らかとなった。黄体ホルモンの細胞生理学的な研究を、生化学的実態に結びつけた。

水島 昇

バルクな細胞内蛋白質分解系であるオートファジー過程とその機能解析をテーマにした。オートファジーに特異的な蛋白質を同定し、オートファジー欠損マウスでの表現系の変化を解析した。このマウスは世界の研究者の間で利用されており、オートファジー研究になくてはならないツールとなっている。オートファジーが哺乳動物においても重要な過程(栄養補給(飢餓応答)と細胞内浄化(細胞内品質管理))に関与していることを世界に先駆け明らかにした。神経変性疾患におけるオートファジーの役割についても明らかにした。

## 10. 評価者

研究総括            永井 克孝            三菱化学(株)顧問

### 領域アドバイザー氏名

浅島 誠	東京大学大学院総合文化研究科	教授
石川 冬木	京都大学大学院生命科学研究科	教授
金澤 一郎	国立精神・神経センター	総長
佐邊 壽孝	(財)大阪バイオサイエンス研究所	部長
鈴木 紘一	東レ株式会社融合先端研究所	所長
谷口 直之	大阪大学大学院医学系研究科	教授
谷口 克	理化学研究所免疫・アレルギー科学総合研究センター	センター長
中野 洋文	協和発酵工業(株)バイオフィロンティア研究所	リサーチフェロー
鍋島 陽一	京都大学大学院医学研究科	教授
本間 好	福島県立医科大学医学部	教授

別紙

「タイムシグナルと制御」領域研究課題名及び研究者名

研究者名 (参加形態)	研究課題名 (研究実施場所)	役職(平成18年1月末現在) (応募時所属)	研究費 (百万円)
岡澤 均 (兼任)	RNAポリメラーゼⅡ機能障害 による神経変性 (東京医科歯科大学難治疾患 研究所)	東京医科歯科大学難治疾患研 究所 教授 (東京都神経科学総合研究所 部門長)	97
佐渡 敬 (兼任)	Non-coding RNA とエピジェネ ティックな修飾の協調的遺伝 子発現制御 (国立遺伝学研究所)	国立遺伝学研究所 助手 (同上)	83
下村 伊一郎 (兼任)	“老化遅延”を目指した新たな 内分泌因子の同定と応用 (大阪大学大学院医学系研究 科/生命機能研究科)	大阪大学大学院医学系研究科 /生命機能研究科 教授 (同上)	92
瀬藤 光利 (兼任⇒専任 ⇒兼任)	蛋白翻訳後側鎖アミノ酸付加 の分子機構 (三菱化学生命科学研究所)	自然科学研究機構生理学研究 所 助教授 (東京大学大学院医学系研究科 助手)	108
高倉 伸幸 (兼任)	造血幹細胞の自己複製を誘 導する生態学適所の解明 (金沢大学がん研究所)	金沢大学がん研究所 教授 (同上)	87
高橋 考太 (兼任)	染色体動態の時空間制御技 術の開発 (久留米大学分子生命科学研 究所)	久留米大学分子生命科学研 究所 教授 (同上)	84
畑田 出穂 (兼任)	雄の生殖細胞への卵子型イ ンプリントの導入ー雄どうしは 交配できるか？ (群馬大学生体調節研究所附 属生体情報ゲノムリソースセ ンター)	群馬大学生体調節研究所附属 生体情報ゲノムリソースセン ター 助教授 (同上(旧:群馬大学遺伝子実験 施設))	90

松野 健治 (兼任)	フコース修飾による Notch 情報伝達の制御機構 (東京理科大学基礎工学部)	東京理科大学基礎工学部 助教 (同上)	83
三浦 猛 (兼任)	雌雄両配偶子形成の共通原理の解明 (愛媛大学農学部)	愛媛大学農学部 教授 (同上)	85
水島 昇 (兼任)	哺乳動物におけるオートファジーの役割とその制御機構 (東京都臨床医学総合研究所)	東京都臨床医学総合研究所 室長 (岡崎国立共同研究機構基礎生物学研究所 助手)	83

(参考)

外部発表件数(外部発表投稿表が提出されたもの:平成 18 年 1 月 31 日現在)

	国内	国際	計
口頭	73	29	102
論文	6	58	64
出版物	13	3	16
合計	92	83	182

(2)特許出願件数

国内	外国
5	2

「外国」の数字は「国内出願」の内、外国出願を希望し、JST の知的財産委員会で出願が「妥当」と判定されたものの数を示す。

(3)受賞等

下村 伊一郎

平成 15 年度 日本糖尿病学会賞リリー賞

瀬藤 光利

平成 15 年 平成15年度東京都医師会医学研究賞奨励賞

水島 昇

平成 17 年 第 3 回分子生物学会三菱化学奨励賞

(4)特許出願

発明人: 瀬藤 光利

発明の名称: ユビキチンリガーゼ SCF 複合体の F-box タンパク質、及び該タンパク質をコードする核酸分子

機構整理番号: K052P10

特願 2004-006551

出願人: 独立行政法人科学技術振興機構

出願日: 平成 16 年 1 月 14 日

(外国出願せず)

発明人: 瀬藤 光利

発明の名称: グリシン付加酵素、グリシン付加酵素活性の測定方法、及び、グリシン付加酵素を用いる細胞増殖制御物質のスクリーニング

機構整理番号: K052P11

特願 2004-006552

出願人: 独立行政法人科学技術振興機構

出願日: 平成 16 年 1 月 14 日

(外国出願せず)

発明人: 瀬藤 光利

発明の名称: ポリグルタミン付加酵素の同定とそれを用いたスクリーニング

機構整理番号: K052P12

特願 2004-006553

出願人: 独立行政法人科学技術振興機構

出願日: 平成 16 年 1 月 14 日

(外国出願せず)

発明人: 高倉 伸幸(80%)、山田賢裕(20%)

発明の名称: 脂肪組織を用いた心筋細胞の作製技術とその応用



機構整理番号 K052P14(K05208US(PCT))

特願 2004-429088:PCT/JP2004/17778

出願人:金沢大学 TLO (80%)

独立行政法人科学技術振興機構 (20%)

出願日:平成 16 年 12 月 25 日

発明人:岡澤 均(100%)

発明の名称:神経疾患の予防又は治療薬

機構整理番号 K052P21(K05209US(PCT))

特願 2004-204615:PCT/JP2005/011008

出願人:独立行政法人科学技術振興機構(100%)

出願日:平成 16 年 7 月 12 日

#### (5)プレス発表

水島 昇

科学技術振興機構報 第 122 号(平成 16 年 11 月 1 日)

“飢餓適応機構としての自己蛋白質分解の意義の解明 ～新生児は出生に伴う飢餓をオートファジーで凌ぐ～”

**Nature** **432**:1032-1036 (2004)

“The role of autophagy during the early neonatal starvation period”

(新生児初期の飢餓期におけるオートファジーの役割)の内容に関するもの。

#### (6)招待講演件数

国際 21 件

国内 25 件

## 研究者とグループメンバー

研究者名	グループメンバー名 R: 研究員 T: 技術員	在籍機関
岡澤 均	(R) 戚 美玲	H15.4.1～H17.3.31
	(R) 野村 和美	H17.4.1～H18.3.31
佐渡 敬	(R) 大畑 樹也	H15.4.1～H18.3.31
	(T) 保木 裕子	H15.4.1～H18.3.31
下村 伊一郎	(T) 鈴木 英美	H15.4.1～H18.3.31
瀬藤 光利	(R) 矢尾 育子	H15.4.1～H16.3.31
	(R) 早坂 孝宏	H15.10.1～H16.3.31
	(T) 新井 麻友美	H15.4.1～H18.3.31
	(T) 富永 由香	H16.4.1～H16.8.31
	(T) 畠中 靖恵	H16.5.1～H17.10.31
高倉 伸幸	(R) 山田 賢裕	H15.2.1～H16.3.31
	(R) 岡本 理香	H17.4.1～H17.8.31
	(T) 佐藤 美帆	H15.4.1～H18.3.31
	(T) 清水 有理	H16.4.1～H18.3.31
	(T) 石田 久美	H16.4.1～H18.3.31
高橋 考太	(R) 高山 優子	H15.4.1～H16.3.31
畑田 出穂	(R) 野村 扶	H15.3.1～H18.3.31
	(R) 深澤 正幸	H15.4.1～H16.8.13
	(R) 森田 純代	H16.12.1～H18.3.31
松野 健治	(R) 笹村 剛司	H15.4.1～H18.3.31
	(T) 金井 麻衣子	H15.4.1～H18.3.31
三浦 猛	(R) 三浦 智恵美	H15.1.1～H18.3.31
	(R) 尾崎 雄一	H15.4.1～H18.3.31
水島 昇	(R) 久万 亜紀子	H15.4.1～H16.3.31
	(R) 金澤 匠	H115.7.1～H17.3.31
	(R) 砂山 潤	H16.11.1～H18.3.31

## 研究課題別評価

1 研究課題名: RNA ポリメラーゼ II 機能障害による神経変性の研究

2 研究者氏名: 岡澤 均

研究員: 戚 美玲 (研究期間 H.15.4~H.17.3)

研究員: 野村和美 (研究期間 H.17.4~H.18.3)

3 研究のねらい:

RNA ポリメラーゼ II は細胞の最も基本的機能である転写を担う核蛋白であり、その C 末端ドメインのリン酸化/脱リン酸化を利用して種々の蛋白と結合し、転写と RNA プロセッシングを段階的に調節している。私たちが神経変性の仲介分子として同定した WW ドメイン蛋白 (PQBP-1) はこの C 末端ドメインに結合する蛋白の一つであった。疾患蛋白は PQBP-1 との結合により RNA ポリメラーゼ II に作用し、転写/RNA プロセッシングを阻害すると考えられた。この知見は、疾患蛋白が RNA ポリメラーゼ II 結合蛋白群の核内分布と機能に対して広範な“時空間的影響”を与えることを示唆している。本研究では、トランスクリプトーム解析、プロテオーム解析等の網羅的手法を用いて、ポリグルタミン疾患蛋白による転写機能障害の全体像の解明、RNA ポリメラーゼ II 機能障害による細胞死モデルの構築を主要な目標とし、さらに得られた知見から神経変性疾患の治療の可能性を探ることとした。

4 研究成果:

本研究では 1) RNA ポリメラーゼ II 機能障害による細胞死モデル、2) ポリグルタミン変異蛋白発現神経細胞、3) PQBP1 モデルマウスの 3つの対象に対して網羅的解析を行った。これにより、各々、転写障害性細胞死の制御分子の発見、異常ポリグルタミン蛋白による転写障害の全体像解明、PQBP1 による神経変性のシグナル経路解明を目指した。以下各々の項目について成果を述べる。

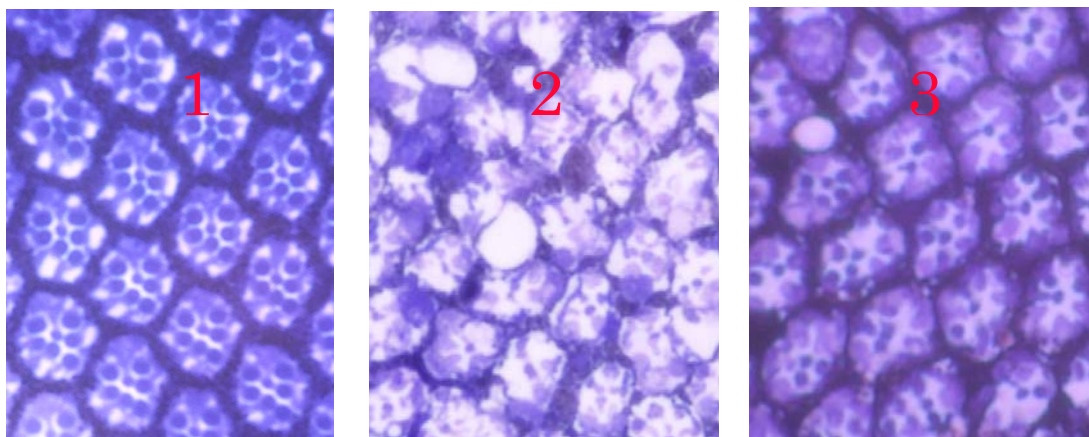
### (1) RNA ポリメラーゼ II 機能障害

ポリグルタミン異常蛋白は様々な転写関連分子と結合することがこれまでに報告されている。しかし結果として、総転写量が増加するか否かについてはこれまで検討されたことはなかった。そこで、私たちは培養液からの BrU の取込みで総転写量を測定する実験系を開発し、初代培養神経細胞にアデノウィルスベクターでポリグルタミン異常蛋白を発現させ、総転写量の変化を検討した。その結果、5-10%程度ながら統計学的に有意な減少がポリグルタミン異常蛋白(ハンチンチンお

よびアタキシン1)によって生じることが明らかになった(Hoshino et al., 2004)。

次に、総転写量減少が神経細胞に与える影響を検討した。RNA ポリメラーゼ II に対する RNAi は有効に働かなかつたため、RNA ポリメラーゼ II の特異的阻害剤であるアルファアマニチンを用いて、神経細胞の生存を観察した結果、RNA ポリメラーゼ II 阻害は神経細胞に極めて緩慢な細胞死(半減期5日)を起こすことが明らかになった。電子顕微鏡を用いて観察すると一部の神経細胞に細胞質の空胞が生じていた。各種の細胞内小器官マーカー蛋白に対する抗体を用いて、この空胞の由来を検索した。オートファゴゾームのマーカーである LC3 は空胞と一致しなかった。最終的に局在の一致したものは小胞体マーカーである ECFP-ER であり、空胞は何らかの要因で拡張した小胞体と考えられる。一方、ネクローシスに特徴的なミトコンドリアや細胞質の膨張は見られず、また、アポトーシスに特徴的な核の分節化やクロマチンの濃縮も認められなかった。Genomic DNA の解析においても断片化は見られなかった。カスパーゼ活性化とチトクローム C のミトコンドリアからの放出も見られなかった。以上から、RNA ポリメラーゼ II 機能障害によって生じる神経細胞死は、ネクローシス、アポトーシス、オートファジーのいずれとも異なる細胞死であると考え、この細胞死をトリアド TRIAD(第3の細胞死の意味を込めて)と名付けた。

続いて、トリアドで生じる遺伝子発現変化とアポトーシスの遺伝子発現変化をマイクロアレイ(1万4千遺伝子)で解析し、両者を比較することでトリアドに特異的な分子変化を捕らえることを試みた結果、yes-associated protein (YAP)の減少を検出した。YAP は転写因子 p73 の補助因子として働き、細胞死促進遺伝子(Bax,PUMA など)の発現量を上昇させ、アポトーシスを起こすことが知られている。YAP 減少は、RNA ポリメラーゼ II 機能障害においてアポトーシスにならない理由の一つと考えられた。さらに、神経細胞には従来報告のない新規 YAP isoform が発現していることを発見した。YAPdeltaC と名付けたこの分子は、転写活性化ドメインである C 末端を欠損しており、YAP に対して dominant negative に働いて YAP-p73 を介したアポトーシスへの細胞死シグナルを抑制することを確認した。



## 図1 ハンチントン病蛋白の神経毒性に対する YAP 新規分子の治療効果

1: 正常ハエの複眼、2: ハンチントン異常蛋白発現ハエ、3: ハンチントン異常蛋白に加えて新規 YAP (YAPdeltaC) を発現した。ハエ複眼の変性が顕著に改善している。

また、トリアドとポリグルタミン病態との関連を調べるために、YAPdeltaC, p73 のポリグルタミンモデルおよびヒト疾患脳における動態を検討した。異常ポリグルタミン蛋白を神経細胞に発現させると、p73 の活性化(リン酸化)が誘導された。同じく、ヒトのハンチントン病脳の罹患部位である線条体の神経細胞でも p73 の活性化が免疫組織学的に確認された。YAPdeltaC は活性化 p73 と同じ神経細胞に発現していることが確認できた。また、ハンチントン病ショウジョウバエモデルにおいて YAPdeltaC は複眼の神経細胞変性を抑制した(図1)。以上から、トリアドとハンチントン病神経変性は共通性を持つ可能性が示唆された(JCB in press)。

### (2) ポリグルタミン変異蛋白発現

#### a) トランスクリプトーム解析

大脳、小脳、線条体から準備した3種類の初代培養神経細胞にハンチンチンおよびアタキシン1をアデノウィルスベクターを用いて発現させた。この6種類の組み合わせについて、正常ポリグルタミン蛋白、異常ポリグルタミン発現、モックウィルス感染の3処理を行い、RNA 抽出してマイクロアレイを行い比較検討した。これによって、遺伝子特異的な発現変化、神経細胞特異的な変化、2種の疾患遺伝子に共通した変化などを検出することを試みた。

この結果、疾患耐性の神経細胞では病態において保護因子と考えられる hsp70 の発現が上昇していることが明らかになった。hsp70 はシャペロン分子として異常ポリグルタミン蛋白の構造変換に関わり、細胞実験あるいはトランスジェニックマウスの掛け合わせから、多くの報告がポリグルタミン蛋白の毒性を緩和すると報告している。私たちの実験からは、hsp70 は小脳細胞(顆粒細胞)において異常ハンチンチンを発現した場合に正常ハンチンチン発現と比較して27倍もの発現上昇が見られるものの、他の神経細胞あるいはアタキシン1では2倍以下の変化に止まるという結果が得られた。さらに Western blot でも蛋白が約8倍に上昇することが確認できた。

続いて hsp70 の発現上昇を RNAi を用いて抑制すると小脳細胞の異常ハンチンチンへの抵抗性が失われること、大脳神経細胞に hsp70 を過剰発現すると抵抗性を獲得することを認めた。また、発現上昇のメカニズムを解析し、HSF(heat shock factor)は直接関連せず、別の抑制性転写因子が核内封入体に取り込まれることで、転写抑制解除が起きていることが判明した(投稿準備中)。Hsp70 以外にも複数の候補分子が同定されており、現在その解析を急いでいる。

#### b) プロテオーム解析

トランスクリプトーム解析と同様な組み合わせでウィルスベクターによる異常蛋白発現を行った。従来、核内封入体に取り込まれる蛋白については同様な解析の報告がある。しかし、核の可溶性分画のプロテオーム変化については報告がなかった。核機能障害を考える上では、この情報は必須のものと考えられた。

核可溶性分画を2次元電気泳動で展開すると約400のスポットが恒常的に認められ、これらについて、蛋白量を定量して、異常蛋白発現、正常蛋白発現、モック処理の3群で比較した。変化の起きたスポットを中心に質量解析をおこなって、約100スポットを同定した。次に、変化を疾患遺伝子／神経細胞種類で比較した。この際に、ヒト病態でのぜい弱性／抵抗性と対応した蛋白量変化を示す分子 X に着目した。この分子 X は免疫染色において、ヒト疾患脳の神経細胞の核内マトリックスで染色性が低下していること、モデルマウスでも同様であることを確認した後に、初代培養神経細胞における異常ポリグルタミン毒性に対する効果を検討した。細胞死、細胞突起伸長など複数のパラメーターに対して、ウィルスベクターによる X の補充は保護的に作用した。最後に、ショウジョウバエモデルにおいて X の発現の影響を解析した。ハンチンチン、アタキシン1両者のモデルショウジョウバエと X のトランスジェニックショウジョウバエを交配させると、複眼の神経変性は明らかに改善を示した(論文投稿中)。

以上の結果から、同定した X は新しい病態関連分子であり、今後治療に利用することができる可能性が示唆された。

### (3) PQBP1 モデルマウス

PQBP1 はポリグルタミン病異常蛋白に結合する分子として私たちが発見した新規分子である(Waragai et al., Human Molecular Genetics 1999; Okazawa et al., Neuron 2002)。ポリグルタミン蛋白の核内封入体に取り込まれてその機能は stabilize するものと考えられ、実際 PQBP1 過剰発現マウスは遅発性の神経変性を示した(Okuda et al., Human Molecular Genetics 2003)。私たちはさらに、神経変性の分子経路を解析するために、PQBP1トランスジェニックマウスより変性前組織を採取して、コントロールマウスとトランスクリプトームを比較して、トランスジェニックマウスに特異的に変化する遺伝子14個を同定した。

このうち約半数はミトコンドリアによってコードされる遺伝子であり、対応して変性前の脊髄運動ニューロンでミトコンドリア蛋白の上昇が免疫組織学的に確認できた。そこで、電子顕微鏡を用いて観察すると形態異常を示すミトコンドリアが多数認められた。また、PQBP1 を神経細胞で過剰発現してミトコンドリア電位を測定すると過分極していることが明らかになった。以上から、PQBP1 過剰発現はなんらかの経路を介してミトコンドリアストレスを生じると想定された。

一方、発現が上昇する分子のなかに HDGF(HGF ではない)が認められた。これは癌細胞から単離された特異な栄養因子である。HDGF 抗体を新たに作成して免疫染色を行うと、変性前の運動

ニューロンの核での染色が顕著に上昇していた。HDGF は、初代培養運動ニューロンの生存率をあげ、突起伸長を促した。さらに、新生児ラットの顔面神経切断における顔面神経(運動ニューロン)の生存率を上昇させた。以上のことから、HDGF が新しい運動ニューロン栄養因子であることが明らかになった。また、病態上の位置付けとしては、変性前の運動ニューロンでは p53 の上昇が見られ、p53 が HDGF の上流域の配列に結合して HDGF の転写量を増加させていること、また、運動ニューロンで増加した HDGF は随液中に放出されて濃度が上昇していることを認めている。したがって、HDGF 上昇は変性病態に対して抑制的に働く一種の防御反応と考えられる(論文 revise 中)。

## 5 自己評価:

神経変性疾患の病態解析は、異常蛋白発現をきっかけに、正常では起きにくい(あるいは起きることのない)細胞内の反応を捉えることであり、生理現象の解析とは違った難しさがある。網羅的解析はこの問題を解決する可能性を含むものであり、さきがけ研究の支援を得て、泥沼のような変性疾患病態に正面から取り組む機会を与えて頂いたことは大変な幸せであった。RNA polymerase II を中心とした転写機能が障害された場合に如何なる細胞死が生じるかについて新しいモデルを提唱したこと、トランスクリプトーム、プロテオームの網羅的解析から新しい病態関連分子を発見したこと、は当初の目標に対応した成果と考えている。一方、網羅的解析から得られた候補分子が真に病態に関与するかを証明するには予想以上の労力と時間を必要とした。このため本研究の主要テーマについての論文発表は終了しておらず、完結したとは言いがたい。しかしながら本研究の目的は、変性疾患の理解と治療開発のためには避けて通れないことと考えており、今後も研究を継続して目標の完遂を目指したい。

また、さきがけ研究では異なる領域の研究者と交流することで視点が広がり今後の研究の推進のための貴重な財産となりました。深く感謝致します。

## 6 研究総括の見解:

転写を担う基本要素である核蛋白質の一つとして知られる RNA ポリメラーゼ II の機能と脳神経機能疾患とを結び付けようとする意欲的な研究である。脳神経におけるアポトーシスとの関連を追及した結果、従来とは異なる細胞死であるとの結論に達し、これをオメガプロセスと命名した。オメガプロセスの病理をショウジョウバエ、培養神経細胞等を使って追求し、ポリグルタミン病、ハンチントン病等の神経変性疾患の病態解明に迫るとともに、治療法を目指す注目すべき成果をあげつつある。こうした研究は本来、中・長期を要する課題であり、今後の展開を期待する。

## 7 主な論文等:

## 論文

1. Okuda T, Hattori H, Takeuchi S, Shimizu J, Ueda H, Palvimo JJ, Kanazawa I, Kawano H, Nakagawa M, and Okazawa H (2003) PQBP-1 transgenic mice show a late-onset motor neuron disease phenotype. *Human Molecular Genetics* 12, 711–725.
2. Busch A, Engemann S, Lurz R, Okazawa H, Lehrach H, and Wanker EE. (2003) Mutant huntingtin promotes the fibrillogenesis of wild-type huntingtin: a potential mechanism for loss of huntingtin function in Huntington's disease. *J. Biol. Chem.* 278, 41452–41461.
3. Tagawa K, Hoshino M, Okuda T, Ueda H, Hayashi H, Engemann S, Okado H, Ichikawa M, Wanker EE and Okazawa H (2004) Distinct aggregation and cell death patterns among different types of primary neurons induced by mutant huntingtin protein *J. Neurochem.* 89, 974–987.
4. Marubuchi S, Wada Y, Okuda T, Hara Y, Qi ML, Hoshino M, Nakagawa M, Kanazawa I and Okazawa H (2005) Polyglutamine tract-binding protein-1 dysfunction induces cell death of neurons through mitochondrial stress. *J. Neurochem.* 95, 858–70.
5. Hoshino M, Qi M-I, Yoshimura N, Miyashita T, Tagawa K, Wada Y-i, Enokido Y, Marubuchi S, Harjes P, Arai N, Oyanagi K, Blandino G, Sudoi M, Rich T, Kanazawa I, Wanker EE, Saitoe M, and Okazawa H (2006) Transcriptional repression induces a slowly progressive atypical neuronal death associated with changes of YAP isoforms and p73. *J. Cell Biol.* in press.

## その他 国際誌 6件

### 招待講演

1. Okazawa H. Atypical neuronal death by transcriptional repression. Lecture Series of Center for Neurogenetics and Neurotherapeutics, University of Washington, Seattle, USA, December 6, 2004.
2. Okazawa H. Toward understanding of nuclear responses to polyglutamine disease proteins. Max-Delbruck Center Seminar, MDC, Berlin, Germany, February 19, 2004
3. 岡澤均: 転写障害による新しい非典型的な神経細胞死 Novel atypical neuronal death induced by transcriptional repression. 第28回日本神経科学大会 シンポジウム 2005.7.28
4. 岡澤均: Expression and function of Oct-3/4 in neural stem cells. 第48回日本神経化学学会大会 シンポジウム 2005.9.29

## その他 国内発表 12件

国外発表 2件



特許

1. 発明人: 岡澤 均

発明の名称: 神経疾患の予防または治療薬

機構整理番号: K052P21

特願2004-204615(PCT/JP2005/01108)

出願人: 独立行政法人科学技術振興機構

出願日: 平成 16 年 7 月 21 日

## 研究課題別評価

1 研究課題名: Non-coding RNA とエピジェネティックな修飾の協調的遺伝子発現制御

2 研究者氏名: 佐渡 敬

研究員: 大畑 樹也 (研究期間 H.15.4~H.18.3)

技術員: 保木 裕子 (研究期間 H.15.4~H.18.3)

3 研究のねらい:

最近の研究から, non-coding RNA が遺伝子発現制御やクロマチン構造制御に重要な役割を果たしていることがわかってきた。ほ乳類におけるエピジェネティックな遺伝子発現制御機構の1つとして知られる X 染色体不活性化においても non-coding RNA が中心的な役割を果たしていることが知られる。X 染色体不活性化はメスの胚発生過程で細胞分化にともなって起こる。その不活性化に先立って一方の X 染色体から発現される *Xist* RNA は機能性 non-coding RNA と考えられ、その X 染色体全域にわたってシスに結合し、ヘテロクロマチンの構築に関わるタンパク質をリクルートすることで染色体ワイドの不活性化を引き起こすと考えられる。また、この *Xist* 遺伝子座には、*Xist* の発現をシスに制御するアンチセンス non-coding 遺伝子である *Tsix* が存在することも明らかとなっている。

X 染色体不活性化は、これまで最もよく研究されてきた安定な遺伝子発現抑制システムの1つであるが、その分子機構は未だ不明な点が多い。当該プロジェクトでは、ジーンターゲットングにより遺伝子改変を施したマウスを作製し、その胚を用いて(1) *Tsix* による *Xist* 遺伝子座のアンチセンス制御機構、(2) *Xist* RNA による不活性クロマチンの構築機構、について分子レベル、あるいは細胞レベルの解析を行い、X 染色体不活性化機構の鍵を握る *Xist* RNA と *Tsix* RNA の機能に迫り、その知見をもとに non-coding RNA が DNA やヒストンの修飾と協調的に作り上げる遺伝子発現制御機構やクロマチン構造制御機構の理解を目指した。

4 研究成果:

(1) *Xist* 発現制御における DNA メチル化の意義

研究開始当初私たちは、*Tsix* RNA が *Xist* 遺伝子座のエピジェネティックな修飾の構築に関わるのではないかと考えていたが、もしそうであれば、そうした修飾の一つである DNA メチル化が *Xist* の発現制御、あるいは X 染色体不活性化自体にどのようなインパクトを持つか調べることは当該研究の方向性をうらなう上で非常に重要であると思われた。そこで、*de novo* DNA メチル化酵素欠損マウス、および ES 細胞における X 染色体不活性化について詳細な検討を行った。

*Xist* の発現が抑制されている活性 X 染色体上では、*Xist* プロモーター領域の CpG 配列は高度にメチル化されているのに対し、*Xist* が転写されている不活性 X 染色体上では、その領域に CpG 配列のメチル化はほとんど認められない。従来 *Xist* アリル間の二者択一的な DNA メチル化が、X 染色体不活性化の開始に先立つ *Xist* の片アリル性の発現亢進に重要な役割を果たしていると考えられていた。*de novo* DNA メチル化酵素欠損マウス胚は、胎生 9.5 日目 (E9.5) ごろに致死となるが、この時期のメス胚で *Xist* プロモーター領域のメチル化レベルを調べると、通常胚盤胞期以降起こる *de novo* メチル化が起こらないため、両アリルともメチル化レベルは低いままで、野生型のメス胚で見られるような二者択一的なメチル化は認められなかった。ところが、ミュータント胚で *Xist* の発現を RNA-FISH によって調べると、雌雄ともに *Xist* の発現が正常に制御されていた。さらに X 染色体の複製タイミング解析や免疫染色など細胞遺伝学的な解析結果からも *de novo* メチル化酵素の欠損による X 染色体不活性化機構の異常は認められなかった。つまり、ミュータント胚では、*Xist* プロモーター領域の二者択一的なメチル化は構築されず両アリルとも低メチル化状態であるにもかかわらず、*Xist* の片アリル性の発現制御機構に顕著な影響は認められず、X 染色体の不活性化も正常に進行することがわかった。以上のことから、*Xist* の二者択一的なメチル化は不活性化に先立つ片アリル性の発現を誘導するための主要な機構ではないことが強く示唆された。また、X 染色体不活性化の開始および不活性化状態の伝播にも *de novo* DNA メチル化は必要ではないことが示された。これまで維持型 DNA メチル化酵素欠損マウス胚を用いた解析から、X 染色体不活性化によって不活化した遺伝子および活性 X 染色体上の *Xist* の安定な発現抑制に DNA メチル化の維持が重要であることは示されていたが、本研究により不活性化の鍵を握る *Xist* の片アリル性の発現亢進を引き起こす主要な機構は DNA メチル化ではなく、むしろヒストン修飾のような他の修飾であることが強く示唆された。

## (2) *Tsix* による *Xist* 遺伝子座のクロマチン制御

胎盤などのいわゆる胚体外組織においては、父性 X 染色体が選択的に不活性化し、母性 X は決して不活性化しない (インプリント型 X 染色体不活性化)。ところが、母親に由来する *Tsix* 欠損を持つマウス胚は、胚体外組織において本来発現することのない母性 *Xist* アリルの異所的な発現を招き、その結果雄では唯一の X 染色体がメスでは双方の X 染色体が不活性化するため着床後間もなく死亡する。こうした *Tsix* 欠損マウスの解析から、*Tsix* が *Xist* の発現を負に制御する因子であることが明らかとなったが、その分子基盤は依然不明であった。

本研究では、*Tsix* の欠損が *Xist* の発現異常を引き起こす分子機構を明らかにするため、*Tsix* 欠損が *Xist* 遺伝子座のクロマチンに及ぼす影響を調べた。雌雄の胚において *Tsix* 欠損 X 染色体上の *Xist* プロモーター領域の DNA メチル化、クロマチン構造、ヒストン修飾を解析した結果、*Tsix* の機能を阻害すると、*Xist* プロモーター領域は抑制型のクロマチン構造を構築できず、弛緩したク

ロマチン構造をとることがわかった。上述のように、DNAメチル化自体は *Xist* の片アリル性発現を誘導する主要な機構ではないと考えられるが、*Tsix* が *Xist* プロモーターのエピジェネティックな修飾に深く関わることで *Xist* の発現を制御しているというさきがけ研究採択当初の私たちの作業仮説はおおむね妥当であったと言える。

### (3) 胚体組織における *Tsix* 非依存的 *Xist* 抑制機構

母由来 *Tsix* 欠損が胚体組織においても胚体外組織同様  $X^{\Delta Tsix}$  の不活性化を引き起こすかは不明であった。私たちは、4倍体に由来する細胞が胚体外組織にのみ寄与できることを利用した、いわゆる4倍体レスキューの実験を行うため、 $X^{\Delta Tsix}$  ヘテロ接合体のメスに由来する8細胞期胚と4倍体の野生型4細胞期胚の凝集キメラ胚を偽妊娠マウスの子宮に戻した。その結果、通常着床後間もなく致死となるはずの  $X^{\Delta Tsix}X$  および  $X^{\Delta Tsix}Y$  の子どもが誕生することが示された。 $X^{\Delta Tsix}Y$  が誕生したことは、*Tsix* 欠損が胚体組織では、*Xist* の異所的発現を引き起こしその X 染色体を不活性化させることはないことを示している。すなわち、胚体外組織の場合とは異なり胚体組織では *Tsix* 欠損によつてたとえ *Xist* の異所的発現が引き起こされても、細胞が X 染色体のカウンティング機構によつてその不適切な発現を感知し *Xist* の発現を抑えてしまう機構が備わっていることを示唆している。

### (4) ヒストンメチル化酵素 G9a 欠損マウスにおける X 染色体不活性化

ヒストンメチル化酵素 G9a は転写に抑制的な効果を持つヒストン H3-Lys9 のメチル化を触媒する酵素の1つである。私たちは、*Xist* RNA がヒストンメチル化酵素や他の転写抑制因子を X 染色体ヘリクルートすることで染色体ワイドのヘテロクロマチン化を引き起こすという可能性検討することを計画した。ヒストンメチル化酵素 G9a がこの過程に直接関与するか調べるため、京都大学ウィルス研究所眞貝洋一教授との共同研究で、G9a 欠損マウスにおける X 染色体不活性化を解析した。G9a 欠損マウス胚は胚性致死であるものの体節期初期までは発生を進めることから、X 染色体不活性化の開始には問題ないと考えられた。そこで、いったん不活性化した X 染色体の不活性化状態の維持に G9a 欠損がどのような影響をおよぼすかに着目して解析を行った。まず、G9a 欠損の遺伝的背景に *Xist* 欠損 X 染色体 ( $X^{\Delta Xist}$ ) とマーカー遺伝子を持つ X 染色体 ( $X^{GFP}$ ) を導入し、発生初期に起こる不活性化を専ら  $X^{GFP}$  に限定させた。このようなメス胚 ( $X^{\Delta Xist}X^{GFP}$ ) で、いったん不活性化された  $X^{GFP}$  の再活性化が起こるか調べた。その結果、G9a が機能しなくてもいったん不活性化した X 染色体の不活性化状態は安定に維持されることがわかった。しかし、G9a と他の H3-Lys9 メチル化酵素が重複した機能を持つ可能性は否定できず、不活性 X 染色体の維持における H3-Lys9 メチル化の役割についてはさらなる解析が必要である。

## 5 自己評価:

*Tsix* による *Xist* のアンチセンス制御機構に関する解析は研究開始当初の計画からそれることなく比較的順調に進み、私たちの作業仮説が概ね妥当であったことを明らかにすることができたという点で、当初の目標は達成できたと考えている。この成果をもとに新たに着手した2つのプロジェクトについても現在投稿準備を進めており、当該プロジェクト自体も今後順調に発展していくと思われる。*Xist* によるヘテロクロマチン構築機構に関する解析については、*Xist* と相互作用する因子を単離することを計画したわけであるが、関連分野の研究の予想を上回る急速な展開により、次々とそのような因子が報告され当初の計画を中止せざるを得なくなった。しかし、不活性 X 染色体のヒストンメチル化における *Xist* RNA の意義は依然不明であり、この問題にアプローチすることを念頭に最初に行ったヒストンメチル化酵素 G9a 欠損マウス胚における X 染色体不活性化の解析は関連分野の研究者に価値ある情報を提供できたとは思っている。

研究課題のほかに私が目標したことは、当該研究を推進するための研究系を自前で確立することであった。その点で、私たちの研究の中核をしめる遺伝子改変マウス作製技術を自分達の手で確立し、一定の成果を挙げることができたことには非常に満足している。当該研究は全てさきかけ研究の支援でグループに加わってもらった2人のメンバーとともに3人で行ったものであるが、一致団結して充実した研究を展開できたと考えている。

## 6 研究総括の見解:

エピジェネティクスはポストゲノム解読時代の重要なテーマとして急速に関心を集め、現在 non-coding RNA を中心に展開されつつある。本研究はその基盤を構成している“しくみ”の解明に迫り、制御因子の単離においては一步譲ったものの注目すべき成果をあげることが出来たとみてよい。問題はこれからであり、RNA ワールド中心に推移する現在の研究の趨勢は、次第にその枠を拡大しつつある。Genome 対 Phenome という生物多様性の中核的テーマの解明に迫り得る壮大な構想へと発展することを期待する。既発表論文の質は高い。

## 7 主な論文等:

### 論文・総説

1. Ohhata, T., Hoki, Y., Sasaki, H., and Sado, T. *Tsix*-deficient X chromosome does not undergo inactivation in the embryonic lineage in males: implications for *Tsix*-independent silencing of *Xist*. *Cytogenet. Genome Res.* (in press).
2. Sado, T., Hoki, Y., and Sasaki, H. (2005). *Tsix* silences *Xist* through modification of chromatin structure. *Dev. Cell*, 9, 159–165.

3. Sado, T. and Ferguson-Smith, A. C. (2005). Imprinted X inactivation in the preimplantation mouse embryos. *Hum. Mol. Genet.*, 14, Spec. 1, R59–64.
4. Ohhata, T, Tachibana M., Tada, M., Tada, T., Sasaki, H., Shinkai, Y., and Sado, T. (2004). X-inactivation is stably maintained in mouse embryos deficient for histone methyltransferase G9a. *genesis* 40,151–156.
5. Sado, T., Okano, M., Li, E., and Sasaki, H. (2004) *De novo* DNA methylation is dispensable for the initiation and propagation of X chromosome inactivation. *Development* 131, 975–982.

他, 論文2編・日本語著書および総説5編

#### 招待講演

1. CNRS, Jacques Monod Conference “Epigenetics in development and disease: perspectives from multiple organisms” Aussois (France), January 2006.

## 研究課題別評価

1 研究課題名：“老化遅延”を目指した新たな内分泌因子の同定と応用

2 研究者氏名：下村 伊一郎

技術員：鈴木 英美（研究期間 H15.4.1.～H18.3.31.）

3 研究のねらい：

広範な生物種において、種々の老年病の発症を遅延させ寿命を延長する最も効果的な方法はカロリー制限である。そして、その対極に過食により発生する生活習慣病があり、つまり生活習慣病は老化加速病と言える。私たちは、それまで単なるエネルギー貯蔵臓器と考えられていた脂肪組織が、実は活発に生理活性因子を産生・分泌していることを見だし、それら脂肪細胞由来分泌因子をアディポサイトカインとして概念づけた。アディポサイトカインの中で、レプチンが脂肪萎縮性糖尿病に対し抗糖尿病効果を示すことを見だし臨床応用に至らしめた。また私たちが発見した脂肪組織特異的分泌因子アディポネクチンは抗糖尿病効果に加え、直接血管壁に作用して抗高血圧および抗動脈硬化作用を持ち、肥満時の低アディポネクチン血症が、これら生活習慣病の最上流に位置すること、さらにはアディポネクチン産生増強が治療につながることを示した。これらの知見は、脂肪組織以外の末梢臓器も、生活習慣病の病態に重要な分泌因子を産生している可能性を示唆した。

本研究では、活発な栄養の負荷を受け、生活習慣病・老年病と関連すると考えられる肝臓、小腸、筋肉、などの末梢組織由来の分泌因子を同定し、エネルギー代謝との相関を明らかにすることを目的とした。今回、分泌因子をより選択的に同定する signal sequence trap (SST)法を導入し、肝臓、小腸、筋肉、より摂食抑制および過食という老化の速度を決定する生理状況により、その産生が調節される新たな分泌因子群を同定する。これらの分泌因子群を介した新たな臓器連関を見出すことで、生活習慣病発症のメカニズムひいては「老化遅延」にむけた診断・治療法の開発を目指す。

4 研究成果：

(1)方法

a) SST 法による分泌蛋白 cDNA 断片クローニング

分泌因子検索にあたり、signal sequence trap (SST) 法を用いた。本法では分泌蛋白に比較的特有なシグナルシーケンスをアミノ末端に有する cDNA フラグメントのみを選択的に単離する。オリジナルのベクターは東京大学医化学研究所北村俊雄博士らにより開発された。

## b) 試料とする組織サンプル

摂取量の減少及び過食により、様々なホルモンをお互いに産生しあうことで末梢臓器連関に関与している可能性を有する臓器として、骨格筋、小腸、肝臓をそのサンプルとする。極端な摂食抑制状態、過食状態、のモデルとして、24 時間絶食マウス、及びその絶食後の 12 時間再摂食マウス、過食を呈する肥満糖尿病マウスのそれぞれの上記臓器より、Total RNA を採取。臓器ごとに、絶食群、再摂食群、過食群のすべての RNA サンプルを同量ずつプールした poly A RNA を SST 法への試料とした。

### (2) 肝臓における結果

肝臓において 1156 クローンの解析を終了した。そのうち 965 クローンがシグナルシーケンスを有し、SST 法の系がうまくいっていることがわかった。958 クローンは 88 種類の既知遺伝子であった。7 クローンが新規あるいは機能未知遺伝子であった。7 クローンの中 6 クローンは機能未知遺伝子として登録済みで、2 クローンが膜貫通領域を有せず、シグナルシーケンスのみで、分泌蛋白である可能性が考えられた。また 1 クローンは完全な新規遺伝子であった。しかしこれらの遺伝子はいずれも肝臓特異的なものではなく、広く他臓器・組織にも発現しているものであり、さらなる解析に関して priority の高いものとは判断しなかった。

### (3) 小腸における結果

小腸において 780 クローンの解析を終了した。80 種類の既知遺伝子と 8 種類の機能未知遺伝子よりなっていた。8 種類のうち、4 種類は膜貫通領域を持たず分泌蛋白と考えられた。

Intectin(インテクチン)と命名した 1 つのクローンはシグナルシーケンスを含んで 111 アミノ酸よりなる新規の機能未知蛋白で、組織分布上完全に小腸特異的なものであった。さらに絶食・再摂食で小腸遺伝子発現量が低下・上昇し、かつ過食肥満糖尿病マウスである db/db マウス小腸で発現増強が見られ、栄養により活発に発現制御を受けていた。さらに in situ hybridization により小腸内での発現分布を見ると、小腸粘膜上端の粘膜上皮細胞にのみ強い遺伝子発現が見られた。粘膜上皮細胞への発現実験により、栄養因子である脂肪酸により引き起こされるアポトーシスを増強させる作用が見られた。小腸粘膜上端の栄養性脱落に関わることが推察された。

### (4) 骨格筋における結果

骨格筋において 1812 クローンの解析を終了した。シグナルシーケンスを有した 66 種類の機能未知遺伝子が同定された。このうち 18 種類は膜貫通領域を持たず分泌蛋白と考えられた。

Musclin(マスキリン)と命名した遺伝子はマウスの組織分布において、ほぼ骨格筋特異的に遺



伝子発現が見られた。シグナルシーケンスをふくんで約 130 アミノ酸よりなる新規蛋白であった。アミノ酸配列上、2 種の蛋白切断部位が見られ、プロセッシングを受けていた。C2C12 筋肉細胞の分化系で、本遺伝子の著明な発現誘導が見られた。さらに絶食・再摂食により遺伝子発現の低下・再上昇が見られ、栄養による活発な制御が見られた。そして in vivo, in vitro の系で、本遺伝子発現がインスリンにより正に、cAMP により負に制御されることがわかった。さらに肥満糖尿病マウス筋肉において本遺伝子発現の上昇が見られ、生理作用として筋肉や肝臓に対してインスリン作用を抑制することがわかった。肥満時に筋肉でのマスクリン産生が上昇することが、筋肉そのものおよび肝臓に作用して、インスリン抵抗性を引き起こし、糖尿病の発症および病態に関与することが推察された。現在ノックアウトマウスの解析を進めている。

#### (5) 考察

シグナルシーケンストラップ法(SST法)を用いることにより、末梢臓器で発現調節される分泌因子の候補遺伝子を同定した。

肝臓における解析では、同法により取れてくるクローンの4-5割がアルブミンであった。我々は共同研究者らと、肝臓特異的分泌因子である ANGPTL3 についての生理病態学的意義を明らかとしてきたが、今回の SST 法で、ANGPTL3 はクローンとして取れてこなかった。原理的には、遺伝子発現レベルの多寡に応じて取れてくるはずだが、

小腸由来のインテグリンに関しては、ヒトホモログを同定すべく解析を進めたが、分子生物学的手法およびデータベース上も当該クローンを同定することができず、老化予防の観点からヒトにおける意義付けの解明を進めるのは現在のところ困難である。

マスクリンについては、ヒトホモログも同定し、骨格筋における高発現も確認された。他のグループが、同因子(osteocrineと命名)がマウス胎生期の骨芽細胞に発現することを報告した。現在おこなっているノックアウトマウスの解析を通じて、本因子の生理病態学的意義を明らかにしていきたい。また現在、血中濃度測定系の開発をおこなっており、この血中濃度測定系を用いて肥満・2型糖尿病の病態診断応用を目指したい。さらに、マスクリン受容体探索をおこなっており、すでにその候補分子のひとつが見いだされている。さらなる受容体探索、細胞内シグナル伝達を明らかにし、受容体作動薬の開発を通じて創薬へと発展させたい。本因子マスクリンの発見は、骨格筋が代謝の上で重要な分泌臓器として機能するというミオカイン概念の提唱に至った。

#### 5 自己評価:

当初の目標として以下の5点を挙げた。1)新規分泌因子を発見する。2)脂肪組織以外の末梢臓器が分泌因子を産生していることを示す。3)新規因子の生理活性を見いだし他臓器への関与を明らかにする。4)病態学的意義を明らかにする。5)老化加速病と言える生活習慣病診断治療

に向けた今後の医学応用へ向かわせる。

1)については骨格筋特異的に産生分泌される新規因子マスキリンの発見に至り、その後の解析を進展させることができた。小腸より同定し当初分泌因子と考えていた新規因子インテクチンに関しては、その完全な小腸特異的発現、強い栄養制御、そして脂肪酸誘導性の粘膜アポトーシスへの関与から、高脂肪食時の小腸粘膜恒常性維持に関わる因子として注目したが、GPI アンカー型蛋白である可能性およびヒトホモログを同定することができず、ヒトへの医学応用の側面からは、その後の研究の発展には至らなかった。

2)については、骨格筋が、予想を超えて種々の分泌因子遺伝子を発現・産生していることがわかり、特に強い栄養制御を受け、肥満糖尿病状態に変化し、かつ代謝と関わる生理作用を有するマスキリンの発見は、生活習慣病領域における骨格筋由来分泌因子群ミオカイン(myokine)概念の創成に至った。これはすでに多くの医学応用へと発展したアディポサイトカイン概念に引き続くものとする。

3)マスキリンの作用臓器について、現在、筋肉自身および肝臓が考えられ、これらの培養細胞への生理活性を見いだすことができた。現在、マスキリン欠損動物および過剰産生動物モデルの確立および表現型解析をおこなっており、筋肉、肝臓に加えてどのような臓器に作用が及ぶのか、および全身の恒常性にどう関わるのかを明らかにしようとしている。

4)現在、ヒトおよびマウスの血中マスキリン濃度を決定するための ELISA 系の構築をおこなっている。この系の確立により、種々の生理状態および疾患時におけるマスキリン血中濃度を知ることができ、病態学的意義の解明につながると考える。

5)は4)と関わるが、まず、現在構築中のヒト血中マスキリン濃度測定系の確立は、私たちが予想している肥満糖尿病状態の予知および病勢把握につながると考えている。同じ肥満度でも、筋肉からのマスキリン産生の多くなる個体では糖尿病になりやすく、逆にマスキリンの上昇しない個体では糖尿病になりにくいのではないかという可能性を考えている。またマスキリンが糖尿病発症につながる因子とした場合、その受容体の同定は作動薬による糖尿病治療につながる可能性を有する。現在、マスキリンと結合性を有した膜蛋白の同定をおこなっており、すでに既知の膜蛋白に強く結合することを見いだしている。今後、未知の結合蛋白の同定とその生理活性発揮に至るシグナル伝達系を明らかにしたい。

以上、本研究は、脂肪組織以外の末梢臓器である骨格筋が新規の分泌因子を産生し、他臓器に作用し、栄養代謝および病態発症にかかわる可能性を示し、筋肉由来分泌因子ミオカイン概念の創成につながった。見いだされた新規因子マスキリンに関して得られる知見は、今後、老化加速状態である過食による肥満そしてそれに付随して発症する糖尿病状態克服に向けた新たな診断薬および治療薬の創出につながる可能性を有していると考えられる。医学応用へ向けては、簡便で正確な血中濃度測定系の開発と、糖代謝調節に関わる受容体の同定が、今後の重要な課題で

ある。

## 6 研究総括の見解:

網羅的アプローチは誰も試みるところであるが、それを医療に具体化しようとするところに特色がある。その狙いの成就是、常に対象とするところを自分の眼でみ、自分の手でふれることから自ずと生じる医学思想の形成があつて始めて可能となるであろう。さもなければ、散漫なデータの集積にとどまってしまう。たとえ、因子の同定に個別的に成功したとしてもである。本研究者は優れた医学的感覚と臨床医としての才能に恵まれているだけに将来の大成を期待したい。

## 7 主な論文等:

### 論文

1. Kitazawa H, Nishihara T, Nambu T, Nishizawa H, Iwaki M, Fukuhara A, Kitamura T, Matsuda M, and Shimomura I. Intectin, a novel small intestine-specific glycosylphosphatidylinositol-anchored protein, accelerates apoptosis of intestinal epithelial cells. *J Biol Chem*. 279:42867-42874, 2004.
2. Nishizawa H, Matsuda M, Yamada Y, Kawai K, Suzuki E, Makishima M, Kitamura T, and Shimomura I. Musclin, a novel skeletal muscle derived secretory factor. *J Biol Chem*. 279: 19391-19395, 2004.

### 日本語総説(9件)

1. 福原淳範、西澤 均、下村伊一郎 (2005)  
「代謝系サイトカイン Musclin と Visfatin」  
実験医学 23(20)増刊:118-123(羊土社)
2. 松田守弘、下村伊一郎 (2005)  
「肝由来因子 Angptl3 と筋肉由来因子 Musclin の病態的意義」  
メタボリックシンドローム 病態の分子医学:111-117
3. 西澤 均、船橋 徹、下村伊一郎 (2005)  
「Musclin-新規骨格筋由来分泌因子-」,糖尿病学 2005: 60-64(診断と治療社)
4. 西澤 均、船橋 徹、下村伊一郎 (2005)  
「アディポサイトカインとミオカイン」  
実験医学増刊 ダイナミックに新展開する脂質研究 23(6):198-203(羊土社)
5. 西澤 均、下村伊一郎 (2004)  
「肥満とエネルギー代謝」  
Annual Review 内分泌,代謝 2004:142-145(中外医学社)

## 受賞

平成 15 年度 日本糖尿病学会賞リリー賞

### 招待講演(国内 28件)

1. 下村伊一郎 (2005)  
ランチョンセミナー「生活習慣病の新たな標的と治療」, 日本薬学会第125年会(東京ビッグサイト)
2. 下村伊一郎 (2004)  
ワークショップ「老化加速病・生活習慣病に関わる新たな分泌因子の同定と応用」  
第27回日本分子生物学会年会(神戸ポートピアホテル)
3. 下村伊一郎 (2004)  
シンポジウム「肥満症・生活習慣病にかかわる新たな分泌因子の同定と医学応用」  
日本人類遺伝学会第49回大会(東京:シェーンバツハ・サボー)
4. 下村伊一郎 (2004)  
ランチョンセミナー「新たな末梢臓器由来分泌因子とメタボリックシンドローム」  
第46回日本脂質生化学会(熊本市産業文化会館)
5. 下村伊一郎 (2004)  
ランチョンセミナー「臓器特異的内分泌因子と疾患」  
第81回日本生理学会大会(札幌コンベンションセンター)
6. 下村伊一郎 (2004)  
特別講演「新規内分泌因子の同定と医学応用」  
第32回薬物活性シンポジウム(大阪:千里ライフサイエンスセンター)
7. 下村伊一郎 (2004)  
特別講演「新たな内分泌因子の同定とメタボリックシンドローム」  
社団法人 日本薬学会 第20回創薬セミナー(八ヶ岳ロイヤルホテル)
8. 下村伊一郎 (2004)  
ランチョンセミナー「メタボリックシンドロームの治療標的」  
第77回日本内分泌学会学術総会(国立京都国際会館)

### 招待講演(国外)

1. Shimomura I (2005)  
‘Novel Secretory Factors, Associating with Metabolic Syndrome’  
Seoul Symposium on Obesity and Diabetes (Seoul National University Hospital, Korea)

2. Shimomura I (2005)

Keystone Symposia 'Diabetes Mellitus: Molecular Mechanisms, Genetics and New Therapies' 'Obesity: Molecular Physiology and Genetics of the Control of Body Weight'  
(Keystone Resort, Colorado USA)

3. Shimomura I (2004)

Symposium 'Molecular Target in the Metabolic Syndrome'  
American Heart Association Scientific Sessions 2004 (Ernest N. Morial Convention Center,  
New Orleans USA)

4. Shimomura I (2004)

Symposium 'Adipocytokines'  
American Diabetic Association 64th Scientific Sessions (Orange County Convention Center,  
Orland USA)

5. Shimomura I (2004)

Keystone Symposia 'Molecular Control of Adipogenesis and Obesity'  
(Fairmont Banff Springs, Banff, Alberta, Canada)

## 研究課題別評価

### 1 研究課題名:単アミノ酸側鎖付加の分子機構

### 2 研究者氏名: 瀬藤光利

研究員:早坂 孝宏 (研究期間 H.15.10~H.16.3)

矢尾 育子 (研究期間 H.15.5~H.16.3)

新井 麻友美 (研究期間 H.15.4~H.17.10)

富永 由香 (研究期間 H.16.4~H.16.8)

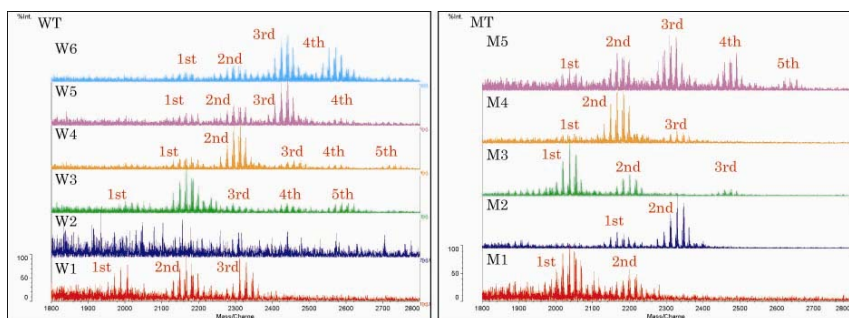
畠中 靖恵 (研究期間 H.16.5~H.17.10)

### 3 研究のねらい:

ストレス、加齢発達、記憶学習といったタイムシグナルに対して我々の体は応答機構を備えている。応答の重要な制御ポイントに、ホルモンや神経ペプチドといった伝達物質やその受容体の輸送がある。伝達物質の細胞内輸送のレールとしてチューブリンという蛋白質でできる微小管が重要である。チューブリンはグルタミン酸やグリシンといった単アミノ酸の付加を受けるが、その酵素実体は明らかでなかった。酵素実体を明らかにすれば、生化学的、細胞生物学的、遺伝学的に細胞内輸送の制御の実体に切り込むことが出来る。私はこのチューブリンの翻訳後修飾が細胞内輸送の制御ポイントである可能性に注目し、酵素実体とその分子機構を明らかにすることを狙った。

### 4 研究成果:

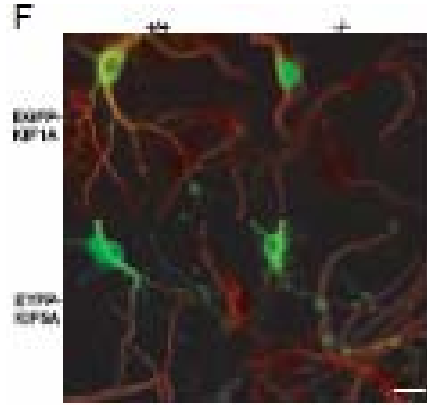
まず、チューブリンの翻訳後修飾等(文献1, 2)をイオンラックタイムフライト多段階質量分析等で解析観察する系を試



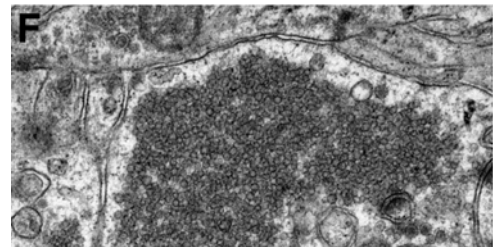
行、確立した(文献3, 4, 5, )。ランダム muta ジェネシスから拾われた ROSA22マウス(現在の知見からはPGs1 mutantマウス)に、グルタミン酸付加の異常があることに気が付いたことから研究は急速に進展した。PGs1 からのイーストツーハイブリッドで同定した酵素は ATP 加水分解中心を持ち、チューブリンチロシンリガーゼ(TTL)に類似した新しい分子群であり、TTLLファミリー蛋白質群と名づけた。 $\alpha$  チューブリンにグルタミン酸を付加する酵素は TTLL1 を活性中心とした PGs complex であった。PGs1の mutantマウスでは $\alpha$  チューブリンのグルタミン酸付加が消失してい

た(上図)。WT の W6 スポットの3rdが-Y+2E、4thが-Y+3E であり、MT の4thは+E、5thは何もつけないチューブリンである。

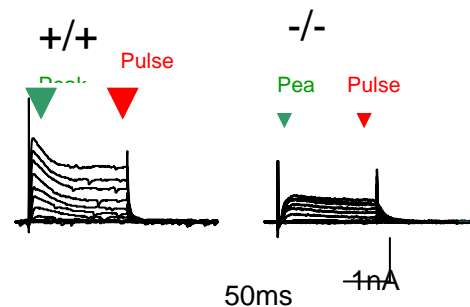
PGs1のミュータントマウスでは多くの微小管関連蛋白質の異常がみられ、KIF1 キネシンモーター蛋白質は細胞体の出発が障害されていた。意外なことに、KIF5 キネシンモーター蛋白質はむしろ輸送が亢進していた(文献6)。右図緑色が KIF で、上が KIF1, 下が KIF5。KIF1 のシグナルは右列のミュータント由来の神経細胞で細胞体から出られずにいる。一方 KIF5 はむしろ突起にシグナルが強い。つまり、モーターの種類によって微小管の翻訳後修飾によって受ける影響が異なることが明らかになった。



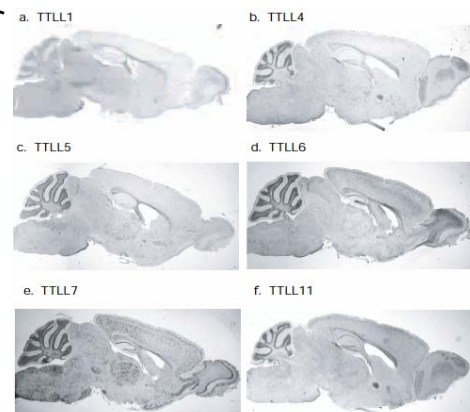
突起に向かった KIF はユビキチンリガーゼで分解されていた。この新規のユビキチンリガーゼのノックアウトマウスには神経伝達の異常とシナプス小胞の輸送の異常が見られた(文献7)。右図はそのミュータントマウスの脳の電顕像である。巨大なプレシナプスとシナプス小胞の過大な集積と変性が見られた。



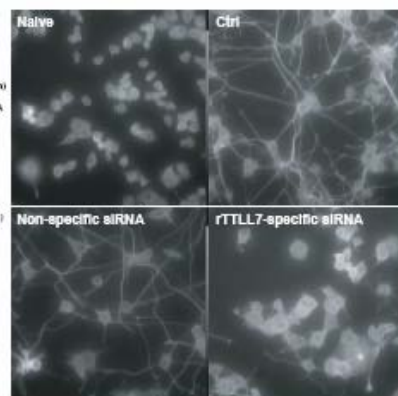
PGs1ミュータントマウスでは KIF17 モーター蛋白質などによる樹状突起輸送も傷害されており、Kv4.2 を主体とする A 電流の異常と LTP の抑制が見られた(文献8)。右図ホモロジーからゲノムを解析した結果、TTLL1 はそれ以外の13種類以上の大きな蛋白質とファミリーを作っていることが明らかになり、TTLL ファミリーと名づけた。それらは生体内でそれぞれに特徴的な分布をしていた(右中図)。興味深いことに、TTLL7 mRNA は樹状突起内 mRNA 輸送を受けており、樹状突起での翻訳制御が示唆された(文献9)。



全種類の TTLL に対する RNAi 解析を神経細胞で行ったところ、 $\alpha$  チューブリンと  $\beta$  チューブリンでグルタミン酸付加酵素は異なっており、 $\beta$  チューブリンにグルタミン酸を付加する酵素は神経細胞ではこの TTLL7 が主体であることが明らかになった。RNAi による TTLL7 阻害では神経突起伸張が阻害された(文献10)。右下図



我々の *in vitro* の解析によると TTLL1 は単独では酵素活性を持たずPGs1等の補酵素が必要であるが、TTLL7は大腸菌リコンビナントで試験管内反応を再構成可能である(発表準備中)。脂肪細胞では TTLL4 が $\beta$  チュブリンにグルタミン酸を付加する酵素であり、TTLL4のRNAiで脂肪細胞表面へのトランスポーターの輸送(投稿中)が抑制され、糖の取り込みが抑えられた(発表準備中)。



以上、チュブリンのc末端の複雑な翻訳後修飾の分子実体として TTLL 酵素ファミリーを同定した。この成果によって、モーター蛋白群それぞれに適したレールの特異的な変化が引き起こされることで細胞内輸送が制御され、タイムシグナルに対する細胞の環境応答様式を変化させているという、いわば“Tubulin code hypothesis”という新しい概念を確立した(文献1, 2)。

## 5 自己評価:

スイスのグループの原虫の結果を参考にして最初解析に取り掛かったマウスの酵素 Nek2 は非常に弱い活性しか持たず、ミュータントマウスにチュブリンの異常がなかったことから否定的な結果となり、3年のうち最初の1年半を費やしてしまったのは痛かったが、よい国際共同研究者を得たことと、技術員や研究員の皆の努力でこの報告書を書いている時点で多くの論文を投稿するまでにいったのは、ポスドク参加型でこそ可能であり、大変よい経験になった。もっとレベルを落としたジャーナルに投稿すればアクセプトがこの原稿に間に合ったかとも思うが、レビューワーの指摘に沿った追加実験での新しい発見もあり、結果良かったと考えている。

酵素があるのかすらが、そもそもさだかでなかった3年前の出発からスタートして、目標であった同定、再構成、ミュータントの解析、まで期間内にすべて我々の手で達成できたことは大変うれしい。ミュータントマウスにグルタミン酸付加の異常があることはもとより、その細胞内輸送に与える影響はチュブリンのc末端の修飾の種類とモーターの種類組み合わせにより異なるという思いがけない精緻なもので、電気生理的異常や行動の異常はまったく予測できなかった興味深いものであった。夢中の3年間であったが、こうしてふりかえてみると、顕微質量分析の発明、PGs-TLLの物質の発見、それによるチュブリンコード概念の提唱、という流れで論文がまとまり、シドニーブレナーの「新しい発見は方法、物質、概念、多分この順番」というまったくその通りであった。

以上の活動が認められ、多くの国内外の招待口演を行った。特に前スタンフォード大学総長で現サイエンス編集長の Don Kennedy 氏に招待いただき、全米科学者協会(AAAS,サイエンス誌発行の母体)の今年の年次総会で、ブッシュ米国大統領科学補佐官の McBurger 氏らの前で講演を行う栄誉を得たのは大変な光栄であった。また、医師会からの表彰もいただいた。



このさきがけ研究の苦闘の中から質量分析顕微鏡のゼロから1の芽生えがあった。この発明は JST に将来性を高く評価していただき栄誉ある先端機器計測の第一回の支援を得ることになり、さきがけは皆さんよりも半年早く卒業させていただき、より大きな JST の委託研究に発展させていただいている。そのためさきがけの発展研究には応募を辞退させていただいた。また、付加酵素が大きな蛋白質ファミリーを作っていたのは想定外であった。それら多様な TLL ファミリー分子群の解析は続けており今後さらに楽しみである。自由でオリジナルな発想を支援していただけたこのタイムシグナルと制御のご理解とご支援に大変感謝している。

## 6 研究総括の見解:

質量分析顕微鏡の開発にみられるように、多彩な資質に恵まれているだけに、興味を分散させること無く、常に何を最重要な課題としているかに思いを致し、進んでいって欲しい。今後の注目すべき展開が期待される。論文のまとめは新たな課題の存在を提示し、盡きることがない。その意味で論文作成は研究終末ではない。研究の全行程を百里とすれば、その五十里と云ってよい。論文作成は新たな道程へと研究者を導く貴重な実り多い作業であることを銘記すべきであろう。

## 7 主な論文等:

### 1 Setou M, Hayasaka T, Yao I

Axonal transport vs dendritic transport

J Neurobiol. 2004 Feb;58(2):201-6.

### 2 Setou M, Matsumoto M, Yang HJ

The role of receptor transports by motor proteins.

Seikagaku (in press)

### 3 Shimma S & Setou M,

Review of Imaging Mass Spectrometry,

Journal of the Mass Spectrometry Society of Japan

Vol. 53, No. 4, 2005 (p230 - p238)

### 4 Shimma S, Furuta M, Ichimura K, Yoshida Y & Setou M,

Direct MS/MS analysis in mammalian tissue sections using MALDI-QIT-TOFMS and chemical inkjet technology, Surface and Interface Analysis (in press)

### 5 Setou M, Shimma S, Sugiura Y, Yao I, Toyoda M, Hoshikawa Y, Suzuki M, Katakuse I, Nagayama K & Yoshida Y,

Development of MS microscope,

Surface and Interface Analysis (in press)

- 6 Ikegami et al., (PGs1) Submitted
  - 7 Yao I, et al (ubiquitin ligase) Submitted
  - 8 Takagi et al., (A current defect) Submitted
  - 9 Matsumoto et al., (TTLL characterize) Submitted
  - 10 Ikegami et al., (TTLL7) Submitted
- その他 7編

#### 特許

1. 発明人: 瀬藤 光利

発明の名称: ユビキチンリガーゼ SCF 複合体の F-box タンパク質、及び該タンパク質をコードする核酸分子

機構整理番号: K052P10

特願 2004-006551

出願人: 独立行政法人科学技術振興機構

出願日: 平成 16 年 1 月 14 日

(外国出願せず)

2. 発明人: 瀬藤 光利

発明の名称: グリシン付加酵素、グリシン付加酵素活性の測定方法、及び、グリシン付加酵素を用いる細胞増殖制御物質のスクリーニング

機構整理番号: K052P11

特願 2004-006552

出願人: 独立行政法人科学技術振興機構

出願日: 平成 16 年 1 月 14 日

(外国出願せず)

3. 発明人: 瀬藤 光利

発明の名称: ポリグルタミン付加酵素の同定とそれを用いたスクリーニング

機構整理番号: K052P12

特願 2004-006553

出願人: 独立行政法人科学技術振興機構

出願日: 平成 16 年 1 月 14 日

(外国出願せず)

#### 受賞

2004年2月4日 平成15年度東京都医師会医学研究賞奨励賞

招待講演(国内)

- 1 瀬藤光利(2004)  
AMPA receptor interacting protein GRIP1 steers kinesin to dendrites  
平成15年度生理学研究所研究会 神経可塑性の分子的基盤
- 2 瀬藤光利(2004)  
シナプス脱構築の分子機構の解明に向けて  
平成15年度生理学研究所研究会 神経回路網形成と可塑性機構研究における領域横断的  
アプローチ
- 3 瀬藤光利(2004)  
受容体動態の分子機構  
第1回 Neuroscience Frontier Research Conference (NEFRE)
- 4 瀬藤光利(2004)  
受容体動態の分子機構  
第8回 Molecular Cardiovascular Conference Keynote Lecture
- 5 瀬藤光利 et al.,(2005)  
顕微質量分析顕装置の開発  
第53回質量分析総合討論会
- 6 瀬藤光利 et al.,(2005)  
質量分析顕微鏡の開発  
学振 141 委員会第 119 回研究会
- 7 瀬藤光利(2005)  
Novel polyglutamylase regulates the traffic of K channel  
第29回日本神経科学学会大会
- 8 瀬藤光利 (2006)  
顕微質量分析によるナノバイオマシン制御解析と創薬  
日本薬学会第7回創薬ビジョンシンポジウム

その他2件

招待講演(国外)

1. Setou M (2005)

Personalized medicine in Japan

American Association of Advance of Science, Annual Meeting (Washington DC)

2. Setou M et al., (2005)

Development of MS microscope

5<sup>th</sup> international conference of Atomic Level Characterizations (Hawaii)

## 研究課題別評価

### 1 研究課題名:造血幹細胞の自己複製を誘導する生態学適所の解明

### 2 研究者氏名:高倉 伸幸

研究員:山田 賢裕 (研究期間 H.15.2~H.16.3)

研究員:岡本 里香 (研究期間 H.17.4~H.17.8)

### 3 研究のねらい:

我々は造血幹細胞の試験管内での増幅法の確立を最終的な目標に据え、造血幹細胞の自己複製能、未分化性維持機構といういわゆる幹細胞性がいかなる分子メカニズムにより制御されているのかを解析することを研究の目的とした。手段としては、1)未分化造血幹細胞に特異的に発現する分子の中でも、DNA複製の開始に関与する分子の探索、2)造血幹細胞に発現し、造血幹細胞の接着性や未分化性維持に機能することを証明してきた造血幹細胞上のレセプター型チロシンキナーゼ TIE2 の活性化により制御される網羅的遺伝子探索である。本研究では1)、2)の解析により得られた遺伝子の単なる機能解析にとどまらず、これら遺伝子の機能解析を通して、幹細胞生物学における幹細胞制御のあたらしい概念を導き出すことをねらいとして研究を遂行してきた。また、近年再生医療に対する社会的な注目が集まる中、胚性幹細胞などを用いた細胞治療は期待通りには発展してきていない。これは、これら細胞を用いた際の倫理的、免疫抵抗性の問題がクリアされてきていないことに起因する。そこで、本研究では自己のもつ再生能力という観点から、脂肪組織の幹細胞による細胞分化誘導技術の開発を合わせて行ない、再生医療に対する新しい提言を行なうことも研究のねらいの一つとした。

### 4 研究成果:

#### 1)造血幹細胞の DNA 複製に関与する遺伝子マウス PSF1 の機能解析

造血幹細胞の自己複製に関わる新規分子を発見するために、未分化造血幹細胞と成熟した血液細胞のサブトラクションから E11 と名付けた新規核内分子を単離し、本分子が酵母において DNA 複製の開始に重要とされてきた Psf1 のほ乳類相同遺伝子であることが判明した。本遺伝子の機能を解析するため、PSF1 ノックアウトマウスを作成したところ、造血の生じる前の胎生6日前後において全能性幹細胞群である内部細胞塊の増殖停止により致死となり、このマウスにおける PSF1 遺伝子が未分化細胞における細胞増殖に必須の役割を果たすことが示された(Mol. Cell. Biol. In press)。しかし、本ノックアウトマウスは造血幹細胞の発生前に致死となるために造血幹細胞における本分子の機能を判定することができなかった。そこで PSF1<sup>+/-</sup>成体マウスを用い 5-FU

による骨髄破壊後の骨髄再建能を解析したところ、野生型マウスでは 5-FU 投与後6日目には骨髄機能が回復し生存したが、PSF1+/-マウスは骨髄機能の回復が遅れ、5-FU 投与後 7 日目には全て致死となった。正常マウス由来の造血幹細胞を放射線照射した PSF1+/-マウスに移植後、同量の 5-FU を投与した際には骨髄の再建はすみやかに生じることから、PSF1+/-の骨髄環境が造血幹細胞の増殖支持能に与える影響は否定された。よって PSF1 そのものが、造血幹細胞の増殖にとって重要であることが証明された。詳細な検討結果 PSF1+/-マウス由来の造血幹細胞は 5-FU 投与後の急速な造血幹細胞増殖期において、S/G2/M 期へのエントリーが遅延するために骨髄再建能に遅延が生じることが判明した。よって、PSF1 は造血幹細胞の増殖機構に関わることが示唆された (Reviewed in Nature, preparation for resubmission)。

これまでの解析では酵母と同様に、マウス PSF1 は SLD5 と結合することが、two-hybrid 法を用いて明らかとなり (paper in submission)、さらに最近その他 PSF2、PSF3 とも結合して 4 量体を形成することが判明した (図1)。興味深いのは、1) この PSF1 分子群は酵母では DNA 複製フォークの形成時に必須の役割を果たしており、進化的に考えれば哺乳動物の全ての細胞増殖に関するいわゆる細胞増殖の普遍的分子と考えられる、しかし、本分子はマウスの発生初期ほぼ全ての細胞が増殖期にある際にも、ある一定の幹細胞群にしか発現していないことと、さらに成体でも、造血幹細胞や皮膚の基底層に存在する表皮幹細胞や精巣や卵巣の生殖幹細胞にしか発現が認められない点、2) そして本分子は染色体分配にも関与していることである (paper in preparation)。このことは、PSF1 が哺乳動物ではある特定の幹細胞の DNA 複製と染色体分配という G1/S/M 期に全般に細胞分裂を制御している可能性があるといえ、特定の幹細胞レベルのみに DNA 複製に関るといふ分子はこれまで知られておらず、幹細胞性における新しい機能解析につながる可能性がある。実際、静止期の造血幹細胞では PSF1 の発現が非常に弱くしか発現が認められないのに対し、増殖期の幹細胞には発現が強いことから、いかなるシグナルがこの PSF1 の発現を制御するのかに興味を持たれる。そこで、我々は現在 PSF1 や SLD5 の上流領域についての解析を行ない、それぞれ 5Kb 上流域のプロモーターを単離し、これらのプロモーターに EGFP を連結した遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを作成中である。これらのマウスからソーティングした造血幹細胞を用い、細胞分裂、なかでも自己複製のメカニズムを解析すべく、外来性シグナルによる PSF1 遺伝子の発現制御機構につき詳細にする計画である。

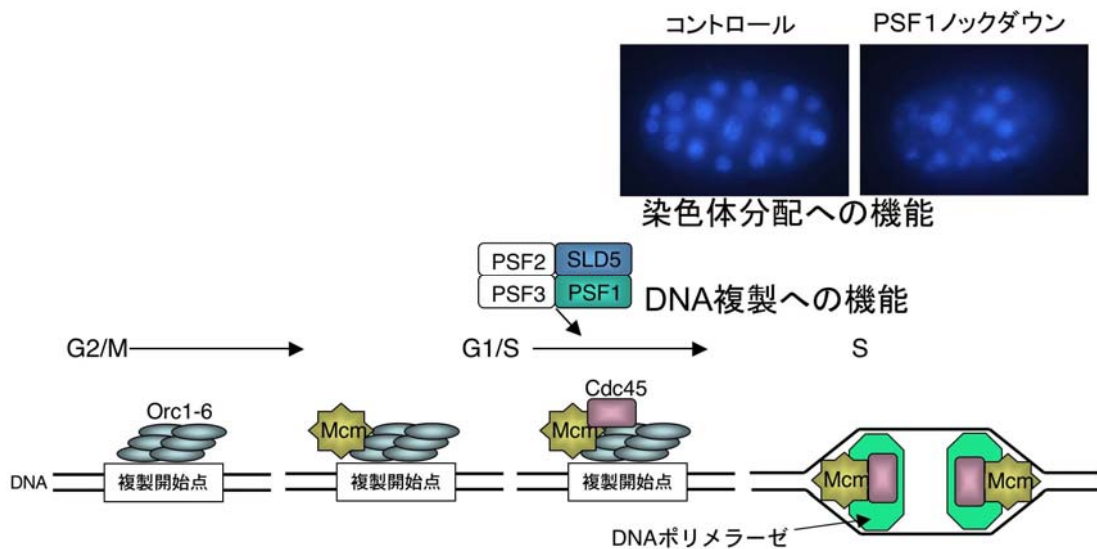


図1: 酵母における PSF1 の機能は DNA ポリメラーゼの DNA 複製フォークへの動員に必須とされる CDC45 と会合して DNA 複製に関ることが解明されてきているが、ほ乳類ではまだその機能が明らかではない。我々は PSF1 が DNA 複製に関るだけでなく、染色体の分配にも関与することを突き止めた。上の写真は *C.elegans* を用い PSF1 のノックダウンによって観察される染色体分配の異常像。

## 2) 造血幹細胞の幹細胞性に関わる基盤分子 TIE2 の機能解析

従来我々が造血幹細胞の発生に必須であることを報告してきた造血幹細胞に発現するレセプター型チロシンキナーゼ、TIE2 は、造血幹細胞の分化により発現が消失する。造血幹細胞の骨髄内におけるニッチ(生態学適所)では、造血幹細胞は骨梁領域の骨芽細胞と接着して未分化な状態が維持されていると考えられてきた。また、このニッチでは骨芽細胞が分泌するアンジオポエチン-1が造血幹細胞上の TIE2 を活性化することで、造血幹細胞と骨芽細胞の接着が誘導され、幹細胞のニッチ領域への棲息および未分化性の維持がなされているのではないかと示唆されてきた。成体の骨髄では多くの造血幹細胞は静止期にあるのに対し、胎児では造血幹細胞が対数的増殖傾向を示す。そこで、上記 TIE2 の機能を証明するために、胎児期において造血幹細胞上の TIE2 を恒常的に活性化させることで、造血幹細胞の増殖が抑制されるかどうかを解析する計画を立てた。まず TIE2 の細胞膜貫通領域直下に点突然変異を挿入し、恒常的活性型 TIE2 を構築し、本遺伝子を TIE2 制御下に発現するコンディショナルトランスジェニックマウスを Cre-LoxP システムにより作成した。本マウスは胎生12日目までに血管新生の抑制と貧血により致死となったが、予想したように、造血幹細胞の発生は認められたがその分化および増殖が抑制されていた(図2)。このことから、成体骨髄における骨芽細胞ニッチにおいては TIE2 の活性化により造血幹細胞の分裂を抑制することで、造血幹細胞の休眠状態を誘導していることが証明された(paper in

submission)。

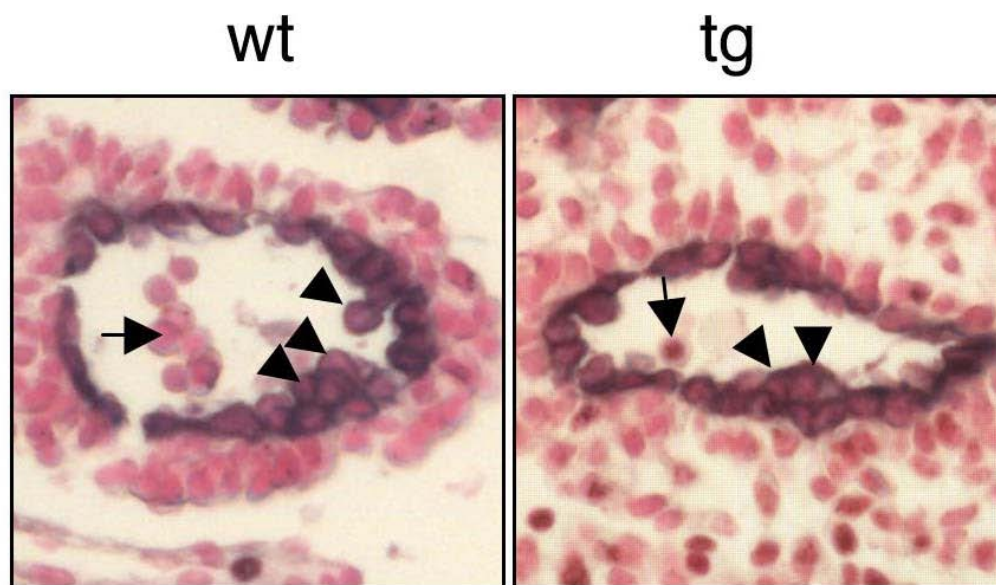


図2:造血幹細胞上の TIE2 が恒常的に活性化するコンディショナルトランスジェニックマウスにおける造血幹細胞の増殖・分化。写真は造血幹細胞の発生増殖現場である胎生 9.5 日目の臍腸間膜動脈を CD34 抗体で染色したもの。wt(野生型)、tg(トランスジェニックマウス)。Tg では造血幹細胞の増殖が抑制され(矢頭)、またその分化も抑制されているのが分かる(矢印)。

### 3)造血幹細胞の接着、細胞死抑制に関与する候補遺伝子、galectin-3 の機能解析

上記2)の結果より、造血幹細胞の幹細胞性(未分化性維持、ニッチ構成細胞への細胞接着)に関わる分子が、造血幹細胞上に発現する TIE2 の活性化により制御されていることが証明された。そこで B リンパ球前駆細胞株 Ba/F3 に恒常的活性型 TIE2 を発現させ、親株の Ba/F3 細胞との subtractive cloning 法にて発現の上昇する分子に注目して遺伝子の単離を行った。複数の遺伝子が単離されたが、その発現量の差が極めて著しい galectin-3(carbohydrate lectin-3)に関して検討を行い、本分子を Ba/F3 細胞に遺伝子導入したところ、恒常的活性型 TIE2 を導入した際と同様に、細胞死の抑制および細胞接着による細胞塊の形成が観察された。galectin-3 は従来の報告から、インテグリンを結束させて細胞接着を促進し、Bcl-2 と会合して細胞周期・細胞死抑制に関与することが報告されている。我々の解析では galectin-3 は骨芽細胞ニッチ領域の造血幹細胞に発現することから、actin-LoxP-CAT-polyA-LoxP-galectin-3-polyA のトランスジーンを発現するマウスを作製し(現在1ライン作製、最終的に3ラインを作製予定)、本マウスと TIE2 制御下に Cre を発現するマウスとかけ合わせ造血幹細胞特異的に galectin-3 を過剰発現させることによる幹細胞性に与える影響を解析した。その結果、galectin-3 を過剰に発現するようになった造血幹細胞の低酸素条件における細胞死の抑制が観察された(paper in preparation)。ニッチの領域は



血管領域から離れており、低酸素状態になっていることが予想される。このような低酸素抵抗性に造血幹細胞が細胞死から回避するために galectin-3 の機能が利用されていることが予想された。

#### 4) 幹細胞の可塑性、多分化能を利用した再生医療への応用

脂肪組織は骨髄と同様、非常に緻密な血管網の構築がなされており骨髄環境と類似する。また脂肪組織に存在するある特定の細胞系譜は、血管内皮細胞や骨格筋細胞や神経細胞などへの分化能を有することから、骨髄の幹細胞コンポーネントと同様、幹細胞の多分可能性を利用した再生医療への応用が期待できるのではないかと考えられた。そこで脂肪組織を試験管内で維持させる培養系の構築を開始したところ、意外なことに我々の培養系では脂肪組織から非常に豊富に、拍動する心筋細胞が分化することが判明した。これら心筋細胞は  $\alpha$ -sarcomeric protein など心筋特異的な細胞骨格分子や GATA4、Nkx2.5 など転写因子を発現しており、これら培養した心筋細胞が実際、心筋梗塞モデルラットの心臓へ生着し、心筋虚血を改善させることが可能であることが判明した (paper in submission)。しかも興味深いことに本脂肪組織の培養中に  $2\mu\text{m}$  の有孔フィルターにて隔離して骨髄細胞を培養すると、骨髄細胞も心筋細胞に分化することが判明した。この系を用いた、心筋細胞の分化誘導系に関しては、心再生医療に貢献すると考えられ本 JST および金沢大学 TLO からの特許出願をしていただいた (paper in preparation)。本心筋細胞の分化培養系では、興味深いことに脂肪組織を試験管内で培養後、2、3日の間に骨髄細胞を共培養しないと、骨髄細胞の心筋細胞化が誘導できないことである。実際には生体内では脂肪組織中には心筋細胞は存在せず、また脂肪組織で心筋細胞が発生しているとは考えられず、個体から試験管内に細胞を展開した際に一過性に脂肪組織から分泌される何らかの分子が、骨髄や脂肪組織の幹細胞レベルの細胞を心筋細胞に分化させているものと考えられる。細胞融合により幹細胞の可塑性説が否定されつつある中、我々の実験系では細胞融合は完全に否定できており、この実験データに立脚し、『なぜ脂肪組織内では自発的に心筋の分化が生じないのか』について、幹細胞の可塑性を抑制するシステムの存在、そして成体から組織が切り離された際に、瞬時に反応する心筋細胞誘導因子の分泌制御について今後検討を進めていく予定である。

#### 5 自己評価:

恒常的活性型 TIE2 の造血幹細胞における発現により、造血幹細胞の分化・自己複製が抑制されたことから、従来示唆されてきた、骨髄における骨芽細胞由来のアンジオポエチン-1 が幹細胞の休眠状態を誘導するという仮説を実証できた。このことから TIE2 が生態学適所における造血幹細胞の自己複製を制御する重要な分子であることを証明できた。また、この TIE2 により制御される遺伝子の網羅的解析から、galectin-3 が低酸素抵抗性に幹細胞の細胞死を抑制する実行的分子であることが判明してきた。また幹細胞の自己複製を DNA 複製という細胞周期の基本機序

において機能する PSF1 が、TIE2 の活性化により負に制御されていることが明らかになりつつある。これらの解析により、これまで明確にされてこなかった、ニッチにおける幹細胞性維持機構の解明に対して、分子論的に幹細胞の“自己複製”のメカニズムを明らかにすることを可能にしたのではないかと考えられる。3年間の研究期間では、まだ造血幹細胞の増殖を試験管内で誘導できる完全な培養システムの構築には至らなかったが、いかにすれば造血幹細胞を増幅できるか、分化させないまま維持できるかについてのいくつかのヒントが、幹細胞のニッチの解析から明らかになったと考えられる。3年間の研究期間で、新規に始めたプロジェクトであったため、受理された論文数は少ないが、この研究から発生した新しい分子機序について現在多くの論文の投稿に至っており、成果としては上げられたと自己評価する。

#### 6 研究総括の見解:

取りあげたテーマは単に造血組織のみにかかわるものではなく、幹細胞生物学の根幹にかかわるものである。3年間という短い期間において波及効果の高い成果をあげ得たことは、高く評価される。また、再生医療に対する寄与においても新しい可能性を開拓したと云ってよいであろう。

#### 7 主な論文等:

##### 論文

1. Ueno M., Itoh M., Kong L., Sugihara K., Asano M., and Takakura N. *PSF1* is essential for Early Embryogenesis in mice. *Mol. Cell. Biol.* In press
2. Yamada Y., and Takakura N. Physiological Pathway of Differentiation of Hematopoietic Stem Cell Population Into Mural Cells. (in submission)
3. Okamoto R., Naruse T., Ueno M., Suda T., Takakura N. Silencing of Hematopoiesis and Angiogenesis by the Constitutive Activation of Tie2 (in submission)
4. Yamada Y., Wang X.-D., Yokoyama S., Fukuda N., Takakura N. Regeneration of infarcted myocardium by adipose tissue derived cells (in submission)
5. Kong L., Ueno M., Itoh M., Yoshioka K., and Takakura N. Identification and Characterization of Mouse PSF1 Binding Protein, SLD5 (in submission)

現在受理1件、その他投稿中5件、投稿準備中2件

##### 特許:

1. 発明人: 高倉 伸幸(80%)、山田賢裕(20%)

発明の名称: 脂肪組織を用いた心筋細胞の作製技術とその応用

機構整理番号 K052P14(K05208US(PCT))

特願 2004-429088:PCT/JP2004/17778

出願人:金沢大学 TLO (80%)

独立行政法人科学技術振興機構 (20%)

出願日:平成 16 年 12 月 25 日

招待講演:(2 件)

1. 高倉伸幸 リンクする血管の発生・再生と造血  
基礎研究報告会(JST 主催)、2003 年 9 月 1 日
2. 高倉伸幸 再生医療への応用をめざした臓器特異的幹細胞の増殖培養法  
新技術説明会(JST 主催)、2004 年 8 月 5 日

## 研究課題別評価

### 1 研究課題名:染色体動態の時空間制御技術の開発

### 2 研究者氏名:高橋 考太

研究員:高山 優子(研究期間 H15.4.1~H16.3.31)

### 3 研究のねらい:

細胞周期と染色体研究に先導的役割を果たしてきた分裂酵母をモデル生物にして、染色体動態の時空間制御技術の開発を推進する。そのために主として二つの異なった研究アプローチをとる。ひとつはこれまで我々のグループで研究の蓄積があるセントロメアクロマチン構築の分子基盤を、セントロメア特異的ヒストン CENP-A の局在化機構に焦点を絞って推進する。第二のアプローチとして、細胞活動(特に染色体の時空間動態)に条件的にリバーシブルな変化を付与することのできる遺伝子変異の選択的取得戦略を確立する。これらの方法により、将来的には細胞周期進行に伴う染色体動態のタイムプログラムを統一的に理解し、ヒト人工染色体の制御技術や癌悪性化に関与する異数体生成を阻止する技術開発に資することを目標にしている。

### 4 研究成果:

研究助成を受けた期間中、当初の研究計画に沿って、主として以下の7つの項目について研究を行った。第一のアプローチであるセントロメアクロマチン構築の分子基盤解明については、予想以上の満足できる結果を得た。研究目標に掲げた CENP-A の局在機構だけでなく、新たにスピンドル形成チェックポイント制御に中心的役割を果たす Mad2 蛋白質の局在制御についても多くの知見を得ることができた。その研究結果の一部は、研究期間内に論文として公表したかあるいは現在投稿中である。残りの結果の多くについては、現時点でまだここに公表できる状態にはないが、今後 1-2 年のうちに論文の形にまとめることが可能と考えている。第二のアプローチであるゲノム改変によって細胞に新たな制御特性を与える手法の開発については、当初の研究計画通りには全く進まなかった。1 年あまり条件検討などの試行錯誤を繰り返したが、条件的リバーシブル変異の効率的な取得手法の改善がみられず研究進展の見込みがたたなかったので、大幅な研究方針の転換を行った。すなわち効率的かつ確実なゲノム改変技術の開発を新たに試み、分裂酵母のゲノム構造を大幅に改変する手法を確立した。このようにして取得した多くのゲノム改変分裂酵母株は、新たな制御特性を有する有用酵母を産出する技術基盤になる可能性があり、今後さらに技術開発を進めていきたい。

## スピンドル形成チェックポイント Mad2 蛋白質のキネトコア局在制御と Mis6 および Nuf2 複合体の機能関連

分裂酵母 Mis6 セントロメアコア結合蛋白質は染色体均等分配に必須で、セントロメア特異的ヒストン H3 バリエント CENP-A のセントロメア局在過程に関与している。*mis6-302* 変異株では、M 期において染色体の不均等分配を誘発するにもかかわらず、スピンドルチェックポイントは発動せず、細胞周期が進行、様々な染色体構成を持つ異数体を生成して致死となる。これらの変異におけるチェックポイント異常の原因を、Mad2 経路および Bub1 経路の二つのスピンドルチェックポイントについて調べた結果、Mad2 経路に特異的な異常を持つことがわかった。Bub1 経路は姉妹セントロメア間の張力を、Mad2 経路はスピンドル微小管との結合をモニターしていると考えられている。これら遺伝子変異では、Bub1 経路で認識される染色体分配異常が頻出するにもかかわらず、それらは Mad2 経路では検出されない。蛍光ラベルしたこれらチェックポイント蛋白質の挙動を各セントロメア構成蛋白質遺伝子変異株中でライブ観察する系を立ち上げ、網羅的解析を行った結果、Mis6-Sim4 複合体と Nuf2-Hec1 複合体が協調的に Mad2 蛋白質のセントロメア局在を制御していることがわかった。また実際、*mis6-302* 変異株では、Mad2 依存的スピンドル微小管結合チェックポイントが機能していないこともわかった。Mad2 と Mis6 の物理的相互作用を検出、Mis6 の進化的に保存された N 末側ドメインが、M 期微小管構造と相互作用することを明らかにした (Saitoh et al., MBC, 2005)。以上の結果は、Mis6 複合体が、セントロメア特異的ヒストン CENP-A と微小管結合チェックポイント因子 Mad2 の局在制御を行っていること、これらが属する異なった制御系 (S 期のセントロメアクロマチン構築および M 期のスピンドル微小管結合) が Mis6 複合体を介して何らかの機能関連を持つ可能性を示唆しており、非常に興味深い研究成果である。

## スピンドル形成チェックポイント Mad2 蛋白質のキネトコア局在制御と Bub1 張力チェックポイント経路および DASH 複合体の機能関連

DASH 複合体はリング状分子構造をとって微小管上を滑り、微小管の + 端 (キネトコア側) に強い親和性を持つことが出芽酵母で報告されている興味深いセントロメア蛋白質である。我々は、Mis12 セントロメア複合体の構成因子のひとつ Nnf1 の温度感受性変異 *nnf1-495* を単離し機能解析を行っていたが、その過程で *nnf1-495* の多コピーサプレッサーとして分裂酵母 DASH 複合体の構成因子 Dad2 を取得した。Dad2 は M 期の前中期と中期で異なる特徴的なスピンドル局在およびセントロメア局在を示すことがわかった。また Dad2 は実際にセントロメア中央領域に結合し、そのセントロメア局在には Mad2 結合に必須な Mis6 および Nuf2 複合体が必須であることがわかった。そこで DASH 複合体と Mad2 および Bub1 の局在依存性を調べたところ、Mad2 のセントロメア局在が Bub1 および Dad2 の二重破壊株で全く見られなくなることが判明した。これは微小管結合チェックポイント Mad2 の局在が、ある遺伝的バックグラウンドでは Bub1 張力チェックポイントにより制御

されていることを示唆しており、極めて重要な発見である。Bub1 張力チェックポイントと Mad2 局在の関連をさらに探るために、姉妹染色分体間の接着が特異的に阻害される遺伝的バックグラウンドで分裂後期促進複合体 APC/C を不活化し、微小管は二極結合しているが姉妹キネトコア間に張力が発生しない状態をつくりだし、Mad2 局在と Bub1 の遺伝的関係を調べた。その結果、微小管の二極結合が起こっても張力が発生しない状況では、Mad2 はセントロメアに局在し続けること、その局在維持には Bub1 が必須であることがわかった。さらに Bub1 破壊株で M 期に薬剤処理で微小管構造を完全に破壊すると、Mad2 がセントロメア局在すること、この遺伝的バックグラウンドで微小管構造の崩壊を Mad2 に伝達しているシグナル系に Dad2 が必要であることを見いだした。以上の結果は、これまで未解明であった微小管結合から張力発生を経て APC/C にいたるスピンドル形成チェックポイント(SAC)情報伝達を分子的に理解する上で、Mad2 のセントロメア局在が DASH 依存的な微小管結合シグナルと Bub1 依存的な張力シグナルの双方で二重に制御され、SAC 情報伝達に中心的役割を果たしていることを示唆している (Kobayashi, Saitoh et al., 投稿準備中)。

#### セントロメアコア蛋白質 Mis6 の結合因子 Sim4/Mix1 の同定とそのヒトホモログ MORE の機能解析

*mis6-302* 温度感受性変異の多コピーサプレッサースクリーニングを行い、新規セントロメア蛋白質 Sim4/Mix1 を分離、染色体分配に必須な細胞周期を通じてセントロメア局在する Mis6 の結合パートナーであることを示した。ヒト Mis6 ホモログとして CENP-I が報告されているが、Mis6 と複合体を作る Sim4/Mix1 については明確なヒトホモログが同定されていなかった。そこでホモロジー検索を行い、ヒト Sim4/Mix1 ホモログの候補として CENP-H および新規蛋白質 MORE を見いだした。ヒト MOREcDNA をクローン化し、細胞周期を通じてセントロソームに存在することを示した。CENP-H は Sim4 のヒトセントロメアホモログ、MORE はヒトセントロソームホモログなのかもしれない。GFP-Histone H2B 発現および Tubulin-YFP 発現 HeLa 細胞株に対し、RNAi による MORE ノックダウンをおこない、ライブ観察を行ったところ、多くの細胞で微小管構造の異常が観察され、M 期に多極を形成するものやスピンドル微小管のセントロソーム近傍でのバンドリングが崩れているものなどがみられた。これらの結果は MORE がセントロソーム機能に関わることを強く示唆している。さらに two hybrid スクリーニングにより、MORE と直接結合する機能関連蛋白質の探索を試みたところ、セントロメアおよびセントロソームの双方に局在化し M 期制御に必須なヒト蛋白質を 2 つ同定した (Kobayashi et al., 未発表)。これらのうちのひとつは Sim4/Mix1 のヒトセントロメアホモログと考えられる CENP-H とも相互作用する。現在、論文公表に向けて MORE、CENP-H と two hybrid スクリーニングにより同定された結合因子の機能関連を解析中である。

#### 新規セントロメア蛋白質の同定とセントロメアヌクレオソームのアセチル化修飾に関連する HDAC

## 同定の試み

*mis6-302* 変異株と全く同じ表現型を示す温度感受性変異株をスクリーニングし、Sim4/Mix1 以外にも多くの新規セントロメア蛋白質を同定した (Hayashi et al., Cell, 2004, Kobayashi et al., 未発表)。セントロメア領域のヒストンは通常、低アセチル化状態を維持しているが、Mis6 や CENP-A の局在に關与する *mis16* 変異株中では高アセチル化状態に変換していた。さらに *mis6-302* 変異株はヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) の阻害剤である TSA に超感受性を示す。Mis6 の機能不全とセントロメア領域のヒストンアセチル化修飾との関連を探るため、分裂酵母に複数存在する HDAC 遺伝子との遺伝的相互作用を検討することにより、Mis6 と特定の HDAC との機能関連を調べた。これまでに *mis6-302* 変異と準許容温度下で破壊株が合成致死性を示す HDAC を同定した。興味深いことに、二重変異株は高頻度の染色体分配異常を示した (Masuda et al., 未発表)。

## セントロメア結合型 GATA 転写因子 Ams2 の関連制御遺伝子の同定および分解経路の分子基盤

分裂酵母 CENP-A の温度感受性変異株 *cnp1-1* は M 期に染色体の不均衡分配を起こし致死となる。その多コピーサプレッサー遺伝子として GATA 転写因子をコードする *ams2* 遺伝子をクローン化した。*ams2* 遺伝子を破壊しても致死とはならないが、染色体分配異常を頻出し、CENP-A のセントロメア局在が特異的に減少することが明らかとなった (Chen et al., Mol. Cell, 2003)。Ams2 蛋白質は G1/S 期にのみ存在し、核クロマチンに局在化する細胞周期依存的に制御されることもわかった。またこの制御は転写と蛋白質分解の両方でており、Ams2 蛋白質は細胞周期 S 期の後半にリン酸化され、ポリユビキチン化されて 26S プロテアソーム依存的に分解制御されることを見出した。Ams2 の段階的欠失体の作成と解析により、Ams2 のリン酸化およびユビキチン化部位の限定および NLS 配列の同定を行い、この領域部位特異的変異体の作成を推進した。英国がん研究所の登田隆博士との共同研究により、Ams2 の分解に関わる上流制御因子の同定にも成功した (Takayama et al, 未発表)。さらに、Ams2 の S 期における下流の転写ターゲット遺伝子を同定する目的で、情報通信研究機構の近重祐次博士および平岡泰博士との共同研究を実施し、Ams2 の破壊株および 1 コピー余分に遺伝子増量した株を作成してその遺伝子発現パターンを DNA マイクロアレイ解析で検討した。複数の候補ターゲット遺伝子を同定、Ams2 が転写抑制している一連の遺伝子群の制御ネットワークを解析した (Takayama et al., 投稿準備中)。

## セントロメア特異的ヒストン H3 バリエント CENP-A の細胞周期依存的局在化機構

*ams2* 遺伝子を破壊すると、コアヒストン遺伝子の S 期特異的な転写活性化が起こらず、それに伴って CENP-A の S 期以降のセントロメア局在が阻害されることを見出した。驚いたことに局在異常を示した CENP-A 分子は G2 期後期になると再びセントロメアへローディングされ、次の M 期の染色体分配はほぼ正常に起こることがわかった。G2 期の長さを遺伝子変異で短くしてみると、

CENP-A の再ローディングが阻害され Ams2 破壊株は M 期で染色体分配異常を示し致死となったことから、G2 期は CENP-A のローディングのバックアップ期として働いている可能性がある (Takayama et al., 投稿中)。細胞周期を通して恒常的セントロメア局在を示す CENP-A 分子だが、異なったローディング経路を使ってダイナミックな局在制御を受けていることがわかった (Takahashi et al., Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2005)。このように染色体分配が起こる細胞周期 M 期に入る前の間期に、CENP-A を再ローディングする隠れた活性があり、セントロメアクロマチンを再形成する機会がもうけられていることは、染色体が持つ可塑的性質の重要な生理機能の一例であろう。本研究成果において、スピンドル形成チェックポイントと並んで、細胞が異数化することを未然に阻止するシステムのひとつを見いだすことができたと考えている。

### 大規模ゲノム改変技術の開発

分裂酵母の染色体の大規模改変を誘導する実験系の構築に成功し、癌悪性化の過程で生成するようなカリオタイプの変化した株を分裂酵母で再現性よく取得できるようになった。これはこれまで解析が困難であった染色体の可塑性に関する実験的研究を可能にする。現在この系は、情報通信研究機構の平岡泰・近重祐次両博士との共同研究でゲノミクス解析にも展開させている。

### 5 自己評価:

研究者は、平成 14 年 4 月 1 日付けで久留米大学分子生命科学研究所において研究室運営をスタートさせる機会を得た。しかし前勤務先からはほとんど自前の研究機器を持ち合わせていない状態での単身の移籍で、研究補助員 1 名とのたった 2 人での船出だった。身軽な移動だった反面、ほとんど共通機器のない小さな研究所なので、最初の数ヶ月間は何もない研究室で全く実験らしい実験もできない状態に落ちってしまった。不安だらけの研究室運営をスタートさせてから現在までの期間は、ちょうどこのさきがけのサポートをいただいた時期に重なる。それまで 1 年毎更新の研究費しかない中、このさきがけは 3 年間の複数年グラントで、研究室立ち上げにあたり物心両面において大変助かった。現在では、必要な研究機器がほとんど揃い、研究室メンバーも 11 名に増え、基本的な研究環境を整備し終えることができた。この間、当初の計画通りには必ずしも研究は進まなかったが、予想外の展開から多くの実りある研究成果が生まれ、当初の研究目的は十分達成したのではないかと感じている。多くの研究結果について、さきがけ終了時までに論文発表の形に持っていけなかったことは反省材料であるが、研究室立ち上げに要した時間を考え合わせると、これが現時点でのベストを尽くした結果であった。地方の研究所で学生がなかなか入ってこないという状況の中、博士研究員や研究補助員を雇用して教育し戦力に育てるという貴重な体験もできた。また研究をスタートさせた時に、実は自分の中で不鮮明であった大まかな研究の方向性がこの 3 年間でクリアに設定できたこと、またその研究推進のためのハードおよびソフ



ト両面の下地が研究室内にできあがったことが、最も大きな成果であり財産になった。

## 6 研究総括の見解:

染色体の分配の分子機構の解明は、細胞生物学のもっとも中核的な基本課題であり、当該研究者はこれに正面から挑戦した。実験の場を移動したことから当初その深刻な影響が懸念された。しかし、それを見事にクリアした能力は高く評価できる。これにより、研究者としての自覚を高め、大きな成長を実現、未来への展開を確実にした。今後の大きな発展を期待してよい。また、本課題は研究者も述べているように発癌機構の解明へと繋がっている。その重要性を指摘しておきたい。たとえば、細胞の癌化がカリオタイプの異常な変化を必ず伴っていることは昔からよく知られているが、その重要な生物学的意味は未解決のまま現在に至っている。

## 7 主な論文等:

論文(論文 8 報、総説等 9 報)

1. Chen ES, Saitoh S, Yanagida M, Takahashi K. A cell cycle-regulated GATA factor promotes centromeric localization of CENP-A in fission yeast. *Molecular Cell*, 11; 175-187, 2003.
2. Chen ES, Yanagida M, Takahashi K. Does a GATA factor make a bed for centromeric nucleosomes? *Cell Cycle*, 12; 277-278, 2003.
3. Hayashi T, Fujita Y, Iwasaki O, Adachi Y, Takahashi K, Yanagida M. Mis16 and Mis18 are required for CENP-A loading and histone deacetylation at centromeres. *Cell*, 118; 715-729, 2004.
4. Takahashi K, Takayama Y, Masuda F, Kobayashi Y, Saitoh S. Two distinct pathways responsible for the loading of CENP-A to centromeres in the fission yeast cell cycle. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 360; 595-607, 2005.
5. Saitoh S, Ishii K, Kobayashi Y, Takahashi K. Spindle checkpoint signaling requires the Mis6 kinetochore subcomplex, which interacts with Mad2 and mitotic spindles. *Molecular Biology of the Cell*, 16; 3666-3677, 2005.

招待講演(8 件)

1. Kohta Takahashi, Two distinct pathways responsible for centromere localization of CENP-A in fission yeast. The 3rd international fission yeast meeting, San Diego, 2004 年 8 月 24 日 - 29 日
2. Kohta Takahashi, Two distinct cell cycle phases responsible for centromere localization of CENP-A in fission yeast. The Royal Society discussion meeting on chromosome segregation,

London, 2004 年 9 月 27 日－28 日

3. 高橋考太, セントロメア特異的ヒストン CENP-A の局在化機構, 日本分子生物学会第 5 回春季シンポジウム「新しい研究視野の提示」, 新潟, 2005 年 5 月 20 日－21 日
4. Kohta Takahashi, Backup reloading of centromeric histone CENP-A during gap phase prior to mitosis, The 58th Annual Meeting of Japan Society for Cell Biology, Symposium, Biology of Centromeres, Omiya, 2005 年 6 月 15 日－17 日
5. 高橋考太, セントロメア機能破綻が引き起こす染色体分配異常, 第 28 回日本分子生物学会年会シンポジウム「細胞周期の制御と癌化の接点」, 福岡, 2005 年 12 月 7 日－10 日

## 研究課題別評価

1. 研究課題名:雄の生殖細胞への卵子型インプリントの導入-雄どうしは交配できるか?

2. 研究者氏名:畑田出穂

研究員:野村扶(研究期間:H15.3.1~H18.3.31)

深澤正幸(研究期間:H15.4.1~H16.8.13)

森田純代(研究期間:H16.12.1~H18.3.31)

3. 研究のねらい:

ほ乳類の発生、分化においてゲノムのエピジェネティック情報の維持とリプログラミングは重要なはたらきをする。配偶子形成過程においてはインプリント遺伝子のエピジェネティックな情報のリプログラミングとその後の維持により、精子型、あるいは卵子型のそれぞれ特異的なエピジェネティックな情報の記憶が次世代に伝わり、受精後の個体発生において異なる働きをするため単一性の親由来ゲノムのみの胚の発生を不可能にしている。エピジェネティック情報の維持とリプログラミング機構を理解することにより、この機構を自由にあやつることができれば単一親からの固体発生や、発生分化を制御することが可能にもなると考えられる。この研究ではゲノムのエピジェネティック情報の維持とリプログラミング機構を理解することをめざした。

4. 研究成果:

(1)Dicer ノックアウトマウスを用いたリプログラミング機構の解析

エピジェネティックな遺伝子の不活性化の機構において RNAi が重要な働きをしていることは植物、酵母ではわかってきているがほ乳類では明らかではなかった。我々はインプリント遺伝子の1つの U2af1-rs1 が cosuppression という RNAi 機構と密接に関係した現象を起こすことをみだしており、ほ乳類においても RNAi がインプリンティングをはじめとするエピジェネティック機構に関与するのではないかという仮説を考えた。そこで RNAi 機構の最重要要素の1つである Dicer1 遺伝子のノックアウトマウスの解析を試みた。予想に反してホモマウスが致死ではなかった。このマウスは Dicer1 遺伝子のエクソンをトラップするかたちで作製されていたが、完全にトラップされていないことが遺伝子発現の漏れにつながり結果として Dicer1 遺伝子の大幅に低下したマウスになっていたことがわかった。しかしマウスにおける Dicer1 遺伝子発現の大幅な低下はインプリント遺伝子のエピジェネティックな状態の維持、あるいはメスの生殖細胞におけるリプログラミングには影響がないことがわかった。また Dicer1 遺伝子の低下のマウスへの表現型の影響を調べたところ、ホモマウスの出生率の低下、神経系の異常が起こることがわかった。

## (2) Ago2 ノックアウトマウスを用いたリプログラミング機構の解析

RNAi 機構のもう1つの重要な因子である Ago2 (Eif2c2)のノックアウトマウスの解析を試みた。その結果ホモマウスは出生せず、E3.5 では正常であるが E6.5 では明らかに異常であることがわかった。インプリント遺伝子の発現、メチル化を解析をおこなったが大きな異常はなく RNAi 機構はインプリンティングの維持にはあまり影響がないことがわかった。またその他、反復配列のメチル化を調べたが異常はないことがわかった。しかし一部の反復配列で発現上昇が DNA メチル化の変化なしにおこっていることがわかった。従ってほ乳類では RNAi 機構は DNA メチル化を介さない機構によりエピジェネティック機構をになっていることが示唆される。

## (3) エピジェネティック情報の異常は生殖細胞でのリプログラミングに影響するか？

正常な状態ではほ乳類の生殖細胞はインプリント遺伝子のリプログラミングをおこなうことができる。しかしもしリプログラミングされる前の生殖細胞のインプリント遺伝子のエピジェネティック情報が異常であったらリプログラミングが正常におこるかどうかはこれまでわかっていなかった。そこでインプリント遺伝子が母性型のものしかない単為発生胚と正常胚のキメラを作製し、単為発生胚由来の生殖細胞でのインプリント遺伝子のリプログラミングを調べた。その結果はリプログラミングは正常におこりエピジェネティック情報の異常はリプログラミングに影響しないことがわかった。このことは単一の親由来の生殖細胞も正常にリプログラミングが起こることを示しており、同一性の交配が可能なことを示唆する。

## (4) エピジェネティック情報の網羅的解析法の開発

エピジェネティック機構の研究をおこなううえでゲノム中のどのような遺伝子でこれらの情報の変化が起こっているかを把握することは重要である。そこでプロモーターマイクロアレイを作製し、ゲノム中の DNA のメチル化を正確に把握する Microarray-based Integrated Analysis by Isoschizomer (MIAMI)法を開発した。この方法では同じ認識部位を切断するメチル化感受性制限酵素 Hpa II とメチル化非感受性制限酵素 Msp I に対するゲノム DNA の感受性を比較することにより極めて正確にゲノムワイドな DNA のメチル化の解析をおこなうことができる。

## 5. 自己評価:

ほ乳類におけるエピジェネティック機構に RNAi 機構が関与するかどうかということは大きな注目の的となっている。RNAi の鍵となる遺伝子である Dicer1 の発現がかなり低下してもそれほど生命を維持していくことに影響ないということは驚くべき事である。このマウスにおいて Dicer1 を完全につぶせなかったなのでこの遺伝子とエピジェネティック機構との直接の関係に対する答えはでなかつ

たが、逆に生きた状態を観察することができ神経系における働きなど今後の展開が期待される。

一方、Ago2 のノックアウトマウスにおいては遺伝子が完全に破壊され重特な発生異常が起こったが、エピジェネティック機構にはほとんど影響がなかったのは驚くべき発見であると考えられる。しかしながら一部の遺伝子で DNA のメチル化を介さず発現に影響があるというのは他の生物とは RNAi 機構の関与の仕方が異なることを示唆し、今後の研究につなげていきたいと考えている。

エピジェネティック情報の異常は生殖細胞でのリプログラミングに影響するかどうかという課題は単純な課題であるがこれまでにきちっとした検証はおこなわれていなかった。そこでエピジェネティック情報の異常は生殖細胞でのリプログラミングに影響ないという結論は今後、同一性のみによる交配技術など応用につながる成果であると評価できる。

エピジェネティック情報の網羅的解析法はこれからのエピジェネティック研究において重要になっており、今後多くの研究者により利用されこの分野の研究の発展に寄与すると期待できる。

## 6. 研究総括の見解:

エピジェネティック生物学がいわゆるポストゲノム解読期の重要課題として急速に浮上しつつある。ことは始まったばかりであり、当該研究者のゲノムインプリントに焦点をあわせたアプローチは先駆的な取り組みであり評価できる。思いがけない結果に次々と遭遇しながらも研究を着実に進めていることは評価する。問題はこれからの展開であり、期待したい。ゲノム DNA のメチル化解析に注目しての新しい解析法を開発したことは評価してよい。その波及効果はこれからであって見守りたいところ。ただ、エピジェネティックスの抱えている課題は RNAi レベルにとどまらず、より大きな広がりを見せつつある。当該研究者の本分野での先駆者としての優れた活躍を期待する。興味を分散させることなく、基本的に最重要な点の解明に取り組んで欲しい。

## 7. 主な論文等

### 論文

1. Sumiyo Morita, Takuro Horii, Mika Kimura, Takahiro Ochiya & Izuho Hatada  
An Argonaute family, Eif2c2 is essential for the development of early post-implantation embryo not for epigenetic silencing. (*submitted*).
2. Fukasawa M, Morita S, Kimura M, Horii T, Ochiya T, & Hatada I  
Genomic imprinting in Dicer1-hypomorphic mouse. *Cytogenetic & Genome Res.* (*in press*).
3. Hatada I, Fukasawa M, Kimura M, Morita S, Yamada K, Yoshikawa T, Yamanaka S, Sakurada A, Sato M, Endo C, Kondo T, Horii A, Ushijima T, & Sasaki H  
Genome-wide profiling of promoter methylation in human.. *Oncogene* (*in press*).
4. Fukasawa M, Kimura K, Morita S, Matsubar K, Yamanaka S, Endo C, Sakurada A, Sato M, Kondo T,

Horii A, Sasaki H, & Hatada I

Microarray analysis of promoter methylation in lung cancers. *J Hum Genet* (*in press*)

5. Horii T, Nagao Y, Kimura M, & Hatada I.

Normal Reprogramming of Imprinting in Parthenogenetic Female Germ Cells.. *Reprod. Fertil. Dev.* 17: 236, 2005.

6. Higashimoto K, Soejima H, Yatsuki H, Joh K, Uchiyama M, Obata Y, Ono R, Wang Y, Xin Z, Zhu X, Masuko S, Ishino F, Hatada I, Jinno Y, Iwasaka T, Katsuki T, & Mukai T. Characterization and Imprinting Status of OBPH1/Obph1 Gene: Implications for an Extended Imprinting Domain in Human and Mouse. *Genomics*. 80:575–584. 2003.

#### 総説

1. Abe K, Hiroyuki A, Beck S, Bulyk ML, Farnham P, Greally JM, Hatada I et al.

Applying whole-genome studies of epigenetic regulation to study human disease.. *Cytogenetic & Genome Res.* (*in press*).

2. 畑田出穂, ゲノムのエピジェネティクス解析方法, *ゲノム医学*, 5: 481–487, 2005.

3. 尾畑やよい, 河野友宏, 畑田出穂, in vitro ゲノムインプリンティング確立システム, *細胞工学*, 21: 1220–1221. 2002.

#### 国際学会招待講演

1. Hatada I Microarray-based detection of DNA methylation. International Symposium on Genome-Wide Epigenetics., 2005. 11.7.

2. Hatada I In vitro culture system for studying genomic imprinting. 6<sup>th</sup> European Meiosis Meeting. Obertraun, Austria. 2003. 9. 13.

#### 国内招待講演 3件

## 研究課題別評価

1 研究課題名: フコース修飾による Notch 情報伝達の制御機構

2 研究者氏名: 松野 健治

研究員: 笹村 剛司 (研究期間 H.14.10~H.18.3)

3 研究のねらい:

最近になって、細胞シグナル分子の機能における糖鎖修飾の重要性が明らかにされ始めた。しかし、糖鎖修飾が細胞シグナルに影響を与える機構については、多くの場合、あまり理解されていない。細胞シグナルで機能する受容体やリガンドが、多彩な糖鎖修飾を受けていることを考えると、糖鎖修飾が、これらタンパク質の機能発現における多様な段階で必要とされることが予測できる。我々の研究は、発生プロセスで重要な機能をはたす Notch 受容体(Notch)の *O*-フコシル化に注目し、Notch を介する情報伝達系(Notch 情報伝達系)におけるその多面的機能を明らかにすることを目的としている。我々の研究から得られる知見は、特定の糖付加による細胞機能への多様な影響を理解していくうえでのパラダイムになると考えている。

4 研究成果:

a) 研究の背景

Notch は、一回膜貫通型の受容体であり、ショウジョウバエからヒトにいたるまで、細胞間の直接的接触を介する細胞間情報伝達で機能している。Notch 情報伝達系による局所的な細胞間相互作用によって、細胞運命の決定やパターン形成などの多様な生命現象が制御されていることが示されている。また、Notch 情報伝達系の異常と、細胞のガン化や遺伝病との関連が明らかになっている。最近、Notch 情報伝達系構成因子のうちいくつかは、アルツハイマー病の発症の鍵をにぎる因子と共通であることが明らかになり、医学的応用研究への展開が期待されている。我々は、ショウジョウバエ Notch 情報伝達系に必須な遺伝子として、*neurotic* を同定した。*neurotic* 遺伝子座をゲノム上で同定したところ、Notch の細胞外ドメインに存在する EGF-様リピートに、*O*-結合でフコースを付加する、*O*-フコース転移酵素

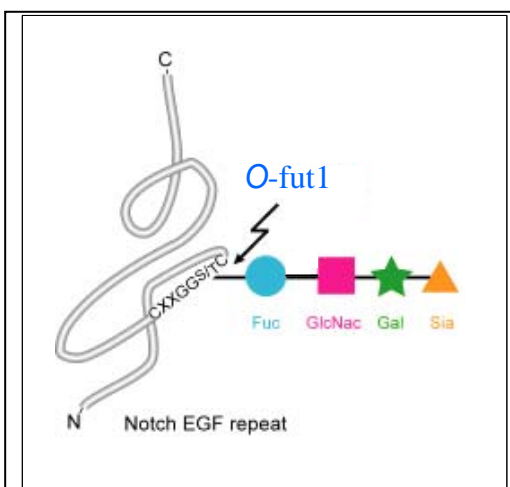


図1 Notch の細胞外ドメインに存在する EGF-リピートのうち、CXXGGS/TC のコンセンサス配列を持つものは、*O*-fut1 によって

(O-FUT1)をコードしていることがわかった。Notch の細胞外ドメインの EGF-様リピートのいくつかには、O-結合で四糖体(Sia-2,3-Gal-1,4-GlcNAc-1,3-Fuc)が付加されている。すなわち、O-FUT1 は、この四糖体の最初の O-フコースを付加する酵素である。以下では、この遺伝子を、*O-fut1* と呼ぶ。我々を含むいくつかのグループは、*O-fut1* が、Notch 情報伝達に普遍的に必要な遺伝子であることを明らかにした。さらに、*O-fut1* の機能は、Notch 情報伝達系に特異的であると考えられた。我々を含む複数のグループが、O-FUT1 による Notch の O-フコシル化が、Notch と Delta リガンドの結合に必須であることを示した。

## b) 研究の目的

本研究では、(i)Notch の O-フコシル化の機能的意義、(ii)Notch の O-フコシル化の経路とその Notch 情報伝達における機能、を理解することを目的とした。哺乳類を用いたこれまでの研究から、O-フコシル化に必要ないくつかのプロセスが明らかにされている。これらの各プロセスの、Notch 情報伝達系における機能を明らかにしたいと考えた。O-フコシル化には、フコース転移反応のフコースのドナーとして、GDP-フコースが必要である。GDP-フコースは、細胞質で合成され、フコース転移酵素が小胞体やゴルジ体の内腔に、GDP-フコース輸送体を介して搬入される。そこで、本研究では、Notch の O-フコシル化におけるこれらの過程の機能を調べるために、GDP-フコースの合成に必要な酵素の遺伝子、GDP-フコースをゴルジ体内腔に輸送する遺伝子の突然変異体を作成した。さらに、一歩進んで、Notch の O-フコシル化で機能する新規な遺伝子の同定を試みた。具体的には、ショウジョウバエを用いた遺伝的スクリーニングによって、*O-fut1* と機能的相互作用を示す遺伝子を網羅的に検索した。

## c) 研究の成果

(1) O-FUT1 は、Notch が、細胞膜からエンドソームに小胞輸送されるのに必要である。

*O-fut1* 突然変異細胞では、Notch が細胞内の小胞に蓄積する。最近、Irvine (ラトガース大学)らは、O-FUT1 が、Notch に対するシャペロンとして機能し、*O-fut1* 突然変異細胞では、Notch の折りたたみが異常になって小胞体に蓄積しているとするモデルを提唱した(Science, 2005)。しかし、我々の結果は、*O-fut1* は、小胞体におけるクオリティーコントロールではなく、Notch のエンドサイトーシスに必須であることを示している。

まず、我々は、*O-fut1* 突然変異細胞における Notch の細胞内分布を、共焦点レーザー顕微鏡とデコンボリューション法を用いて詳しく解析した。その結果、Notch は、小胞体と近接して存在するが、小胞体マーカー陰性の細胞内小胞に蓄積していることが明らかになった。この結果から、Notch は、小胞体に蓄積しているのではないことがわかった。

次に、*O-fut1* 突然変異細胞において、小胞体から細胞膜への Notch の輸送が遅滞している



可能性について検討した。タグを付加した Notch を *in vivo* で発現させ、新規に合成された Notch のエキソサイトーシスによる輸送を経時的に調べた。その結果、野生型細胞と *O-fut1* 突然変異細胞のあいだで、Notch のエキソサイトーシスによる輸送に差異は観察されなかった。この知見は、*O-fut1* 突然変異細胞では、Notch が、クオリティーコントロールの機構によって小胞体に蓄積しているとする仮説と矛盾した。

これらの結果から、*O-fut1* 突然変異細胞で Notch が蓄積しているのは、小胞体からの輸送の異常によるものではないと考えられた。そこで、*O-fut1* 突然変異細胞において Notch が異常に蓄積するのは、その輸送経路のどこなのかを調べることにした。前述の結果から、*O-fut1* 突然変異細胞において、Notch の細胞膜への小胞輸送は正常であると考えられたので、Notch のエンドサイトーシス経路の異常について調べることにした。ショウジョウバエ 3 齢幼虫の翅成虫原基を、抗 Notch 抗体を含む培養液中で短期間培養することで、エンドサイトーシスによって取り込まれた Notch を検出した。その結果、Notch は、*O-fut1* 突然変異細胞においても、細胞膜表面に到達していることがわかった。さらに、*O-fut1* 突然変異細胞においても、エンドサイトーシスによる Notch の取り込みは起こるが、Notch は、初期エンドソームまで輸送されないことが明らかになった。

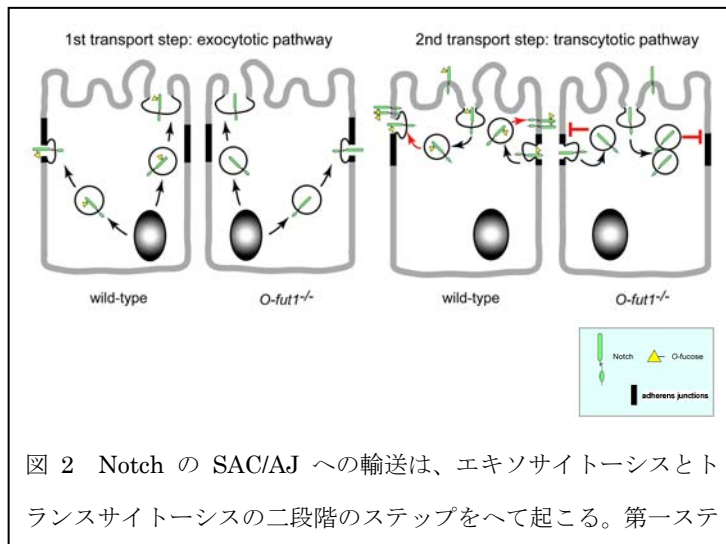
これらの結果と、これまでの知見を総合すると、O-FUT1 は、Notch の細胞外ドメインに結合し、その酵素活性非依存的に、Notch のエンドサイトーシスによる輸送を制御していると考えられた。*O-fut1* 突然変異細胞において、Notch は、初期のエンドサイトーシス小胞に蓄積している可能性が高い。これらの成果については、現在、論文投稿準備中である。

(2) 上皮細胞における Notch の *O*-フコシル化は、Notch が subapical complex と adherens junction に局在化するのに必要である。

ショウジョウバエの上皮細胞の Notch が、頂端部付近に局在していることは、すでに知られていた。しかし、Notch の頂端部への局在化機能や、その機能的な意義については、まったく研究されていない。我々は、ショウジョウバエ上皮細胞において、Notch が、adherens junctions (AJ) と subapical complex (SAC) に局在化していることを明らかにした(以下、SAC/AJ とする)。Notch のリガンドである Delta と Serrate も、SAC/AJ に局在した。興味深いことに、Notch の SAC/AJ 局在化は、Notch の *O*-フコシル化には依存しておこった。しかし、Delta と Serrate の SAC/AJ 局在化は、*O-fut1* に依存していなかった。

Notch が AJ/SC に輸送される経路を解析した。ショウジョウバエ翅成虫原基で新しく合成された Notch は、まず、エキソサイトーシスによって、AJ や、頂端面の細胞膜に特異的に輸送された。この過程は、Notch が新規に合成された後、30 分間持続した。しかし、ほとんどの Notch が局在化する SAC には、新生 Notch がほとんど輸送されないことから、エキソサイトーシスに

よる輸送では、Notch の SAC への局在化は説明できないと考えられた。また、*O-fut1* は、Notch の SAC/AJ 局在化に必須であるにもかかわらず、新生 Notch のエキソサイトーシスには影響しなかった。そこで、新生 Notch の SAC/AJ 局在化には、O-FUT1 に依存しない、第二のステップが必要であると予測した。これらの結果に加えて、新しく合生された Notch は、45 分



後において、*O-fut1* 突然変異細胞では、SAC/AJ に小胞輸送されないのに対して、野生型細胞では、効率的に輸送された。この時間的ずれから、第二のステップには、トランスサイトーシスが関与しているのではないかと考えた。そこで、温度感受性のダイナミン突然変異体を用いて、ダイナミンの機能を抑制すると、Notch の SAC/AJ への局在化

が起こらなくなった。これらの結果から、ダイナミン依存的なトランスサイトーシスによって、細胞膜上の Notch が AJ/SC に再輸送されて、安定に局在化するようになると考えられた。この過程には、Notch の *O*-フコシル化に依存して起こる。

ショウジョウバエ E-カドヘリン (DE-カドヘリン) を、翅成虫原基の上皮でノックダウンすると、SAC が正常に形成されず、Notch とそのリガンドの局在が異常になる。このとき、Notch 情報伝達の低下が観察された。しかし、細胞膜貫通型の受容体とリガンドによるもう一つの細胞情報伝達系である、Fat 情報伝達系は正常であった。これらの結果から、Notch やそのリガンドの SAC/AJ への局在化は、上皮細胞における Notch 情報伝達に必須であると考えられた。これらの成果については、現在、論文投稿中である。

(3) GDP-マンノース脱水酵素遺伝子は、Notch 情報伝達に必要である。

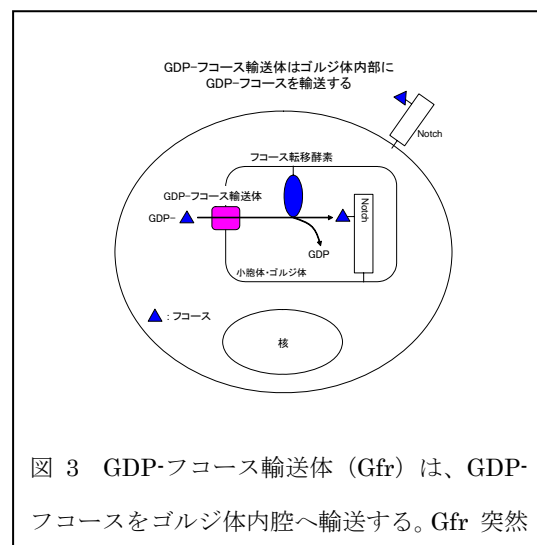
哺乳類における GDP-フコースの合成は、*de novo* 合成経路と、サルベージ経路の二つを介して起こる。しかし、ショウジョウバエでは、サルベージ経路で機能する酵素の遺伝子が存在しないので、GDP-フコースは、*de novo* 合成経路のみによって供給される。したがって、ショウジョウバエの *de novo* 合成経路で機能する遺伝子の突然変異体について解析すれば、フコシル化がまったく起こらない場合の発生過程への影響を調べることができる。*de novo* 合成は、細胞質に存在する Gmd (GDP-マンノース脱水酵) を介して起こる。我々は、これまでの研究で、*gmd* 遺伝子突然変異体の作出に成功している。また、*gmd* 突然変異体では、GDP-フコースの含有量が検出

限界以下であること(阪大医・谷口)や、Notch 情報伝達系が機能しないことを明らかにしている。興味深いことに、*gmd* は、細胞非自立的に機能することが明らかになった。今回、ハネ成虫原基のごく一部の細胞で発現した *gmd* が、*gmd* の致死性や、ハネ成虫原基全体の Notch 情報伝達の欠如を救済することを明らかにした。この結果は、GDP-フコースが、細胞-細胞間で移動することを示唆している。現在、GDP-フコースの移動機構に関する研究を進めている。

(4) GDP-フコース輸送体は、Notch 情報伝達に必要である。

O-FUT1 による Notch の O-フコシル化には、フコースのドナーとして GDP-フコースが必要である。GDP-フコースは、細胞質で合成された後、ゴルジ体や小胞体の内腔に輸送され、N-グリカンのフコシル化と、O-フコシル化に利用される。我々は、O-フコシル化の過程で特異的に機能する GDP-フコース輸送体が存在すると予測し、その同定を試みた。ヒトですでに同定されていた O-フコース輸送体のショウジョウバエ相同遺伝子 *Gfr* (Golgi GDP-フコース輸送体)を同定した。*Gfr* は、Notch や、バルク・タンパク質の N-グリカンのフコシル化に必要であった。さらに、*Gfr* 突然変異体では、Notch の O-フコシル化も、部分的に低下していると考えられた。しかし、O-フコシル化が完全に消失していないことから、ショウジョウバエ・ゲノムには、少なくとももう一つの GDP-フコース輸送体遺伝子が存在すると考え

られた。*Gfr* は、ヒト免疫不全症 CDGIIc (先天性グリコシル化異常症 IIc) の責任遺伝子である。そこで、哺乳類培養細胞において、ヒト *Gfr* 相同遺伝子 (*HsGfr*) をノックダウンし、Notch 情報伝達系に対する影響を調べた。その結果、*HsGfr* は、リガンド依存的な哺乳類 Notch1 の活性化に必要であることが明らかになった。これらの結果は、CDGIIc の病態の一部が、Notch 情報伝達の低下に起因する可能性を示している。



(5) Notch の O-フコシル化やその機能発現に必要な新規遺伝子の同定。

我々は、Notch の O-フコシル化経路で機能する新規な遺伝子の同定を目的として、遺伝的スクリーンを行った。ショウジョウバエの翅成虫原基で、RNA 干渉法を用いて *O-fut1* のノックダウンを行うと、Notch が機能しない場合と同様の表現型が得られる。このとき、RNA 干渉法と同時に、任意の遺伝子を強制発現させ、RNA 干渉法による表現型を抑制・増悪する遺伝子を探索した。任意遺伝子の強制発現は、Gene Search 系統(首都大・相垣)を用いて行った。当初の目的

どおり、約 11,000 系統のスクリーンを完了した。その結果、*O-fut1* に対して促進的に機能している可能性がある 12 遺伝子と、抑制的に機能している可能性がある 1 遺伝子を同定した。このうち、2 つの遺伝子については 2 回、1 つの遺伝子については 3 回、スクリーニングの過程で独立に繰り返し同定された。これらの遺伝子は、Notch の *O*-フコシル化の過程や、*O*-フコシル化に依存する Notch の機能の発現に機能している可能性がある。現在、得られた遺伝子の機能に関する研究を進めている。

## 5 自己評価:

本研究計画のうち、*O*-フコシル化に関与することが予測されていた遺伝子の、Notch 情報伝達系における機能の解明については、十分な進展があった。これらのうち、*gmd* と *Gfr* については、ショウジョウバエ突然変異体を作成することに成功し、その機能を明らかにできた。*gfr* の突然変異体の解析から、ヒト遺伝病である CDGIIc 患者における発生異常や精神遅延の原因が、Notch 情報伝達の低下である可能性を示唆できた。しかし、もう一つの目標であった、Notch の *O*-フコシル化に関与する新規遺伝子の同定に関しては、一次スクリーニングが終了し、その候補を得ることができた時点で、研究期間が終了した。しかし、これらの遺伝子が、Notch の *O*-フコシル化で実際に機能しているかどうかについては、現時点では不明である。今後、これらの遺伝子の機能を明らかにしていく必要がある。

本研究で最も残念であった点は、二度にわたって、米国のグループに、研究成果の論文発表で先行されてしまったことである。我々の結果が、米国のグループの発表と一致していないにもかかわらず、研究成果を同時に発表することができなかった。この経験を、今後の研究のかたみにしていきたい。

## 6 研究総括の見解:

蛋白質の糖質化の重要性がポストゲノム解読期に入った現在、注目を浴びつつある。本研究者はこの分野において、細胞シグナル伝達、発生・分化に重点的な役割を演ずるシグナル伝達受容体蛋白質の機能に、糖鎖化が必須で極めて重要な役割を果たしているという予期しない新知見をショウジョウバエを使って見出した。このブレークスルー的発見によって国際舞台におどりと出たといつてよい。米国では競争者が居り、現在互いに激しくせりあっている。発生・再生、癌、免疫、脳等において、糖鎖の重要性が以前から示唆され、その役割の解明が期待されている現在、糖鎖関連遺伝子クローンの60%を有する我が国において、当該研究者に期待するところは大きい。

## 7 主な論文等:

論文

1. Ishikawa, H. O., Higashi, S., Ayukawa, T., Sasamura, T., Aoki, K., Ishida N., Sanai, Y. and Matsuno, K. A *Drosophila* model of congenital disorder of glycosylation IIc implicates the deficiency of Notch signaling in its pathogenesis *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* in press (2005).
2. Fuwa, T. J., Hori, K., Sasamura, T., Higgs, J., Baron, M., and Matsuno K. The first *deltex* null mutant indicates tissue-specific *deltex*-dependent Notch signaling in *Drosophila*. *Mol. Genet. and Genom.* in press (2005).
3. Hori, K., Fuwa, J. T., Seki, T. and Matsuno, K. Genetic regions interacting with loss- and gain-of-function phenotypes of *deltex* implicate novel genes involved in *Drosophila* Notch signaling. *Mol. Genet. and Genom.* 272, 627-638 (2005).
4. Hori, K., Fostier, M., Ito, M., Fuwa, J. T., Go, M., Okano, H., Martin Baron, M. and Matsuno, K. *Drosophila* Deltex mediates Suppressor of Hairless-independent and late-endosomal activation of Notch signaling. *Development* 131, 5527-5537 (2004).
5. Sasamura, T., Sasaki, N., Miyashita, F., Nakao, S., Ishikawa, H. O., Ito, M., Kitagawa, M., Harigaya, K., Spana, E., Bilder, D., Perrimon, N. and Matsuno, K. *neurotic*, a novel maternal neurogenic gene, encodes an O-fucosyltransferase that is essential for Notch-Delta interactions. *Development* 130, 4785-4795 (2003).

#### 招待講演

1. The 12<sup>th</sup> CDB meeting, “Diversity of developmental mechanisms in invertebrates”  
平成 17 年 2 月 2 日(神戸)

## 研究課題別評価

1 研究課題名:雌雄両配偶子形成の共通原理の解明

2 研究者氏名:三浦 猛

研究員: 三浦 智恵美 (研究期間 H.15.1~H.18.3)

尾崎 雄一 (研究期間 H.15.4~H.18.3)

3 研究のねらい:

生物は、生殖を行うことにより、そのたびに若返りながら生命の連続性を保ち続けてきた。生物の生殖の基本原則を解明することは、少子・高齢化への方策に大きく貢献するものと考えられる。生殖の主役である配偶子形成過程は、有性生殖を保障するために必須な減数分裂の過程を含んでいる。減数分裂は、生殖細胞のみで起こる分裂様式であり、遺伝子の多様性を保つのに中心的な役割を担う機構である。この過程を人為的に操作することができれば、全く新しい概念の生物生産技術を確立することも可能である。そこで本研究は、精子形成および卵形成での減数分裂開始の制御機構を、実験モデルとして数種の硬骨魚類を用いて解明し、将来減数分裂の人為制御を伴う新しい生物生産技術確立への布石とすることを目的として行った。

4 研究成果:

黄体ホルモン:DHP の精子形成への作用機構の解析

雌の卵成熟過程と雄の精子成熟過程の制御に黄体ホルモンが関わっていることが魚類を中心に明らかとなっているが、同ホルモンの配偶子形成の初期過程への作用は全く知られていない。そこで本項目では、ウナギ精巣の各種培養系を用い、黄体ホルモンの精子形成初期に与える影響を解析した。

黄体ホルモンレセプターI型およびII型のウナギ精巣での発現を観察したところ、どちらの型も精子形成開始前の精巣で発現することが明らかとなった。また、魚類の主要な黄体ホルモンである17,20-ジヒドロキシ-4-プレグネン-3-オン(DHP)の精子形成に伴う精巣での含有量の変化を調べたところ、精子形成開始後直ちに認められる精子形成誘起雄性ホルモンである11-ケトテストステロン(11-KT)の上昇の後、精巣での産生が開始することが明らかとなった。DHPの精巣での産生機構を解析したところ、DHPは11-KTの刺激によりP450-c17等のステロイド合成酵素の発現量が増加し、その結果として精巣での産生量が増加することが明らかとなった。以上よりDHPは、11-KTの下流で精子形成の初期過程に作用する可能性が示された。

DHPの精子形成への直接的な作用を調べるため、DHPをウナギの未熟精巣を用いた器官培

養系に添加し6日間培養し、その影響を調べたところ、DHPの刺激により精原細胞でのDNA合成が誘導された。DHPの添加は、減数分裂マーカーDmc1およびSpo11の発現を誘導すること、DHP処理した精巣片には減数分裂時の相同染色体の対合時に認められるシナプトネマ構造を持つ生殖細胞が認められることより、DHPの刺激による生殖細胞でのDNA合成は、精原細胞の増殖によるものではなく、減数分裂の前期過程に由来するものであることが示唆された。このことは、DHPの刺激が精子形成で行われる精原細胞の増殖をスキップさせ、精原細胞に減数分裂を誘導させたことを示している。また、11-KTにより誘導された精子形成のうち、減数分裂開始の過程を、抗DHP抗体でDHPの作用を低下させることにより抑制することができることから、DHPは精子形成の過程で減数分裂の開始に必須の因子であることが明らかとなった。

#### DHPによって精巣で発現が変化する遺伝子のクローニング

上述のように、DHPで減数分裂開始の引き金が引かれることが明らかとなったので、DHPの刺激によって、精巣での発現が変化する遺伝子のクローニングを試みた。DHP100ng/mlの濃度で添加して6日間培養したウナギ精巣とDHPを添加せずに培養した精巣片からそれぞれmRNAを抽出し、2種のRNAを用いて遺伝子発現差解析を行ったところ、DHPの刺激により精巣での発現が誘導される独立したcDNAクローンを25種類得ることに成功した。本研究では、これらのクローンのうち、11 $\beta$ -HSDおよびトリプシンについてその精子形成に対する作用を調べた。

#### 11 $\beta$ -HSDの精子形成への作用

ステロイド代謝酵素の1種である11 $\beta$ -HSDは、副腎皮質系ステロイドであるコルチゾールからコルチゾンの転換に関わる重要な酵素である。ウナギ精巣にDHPを添加するとコルチゾンが産生されることから、DHPによって精巣での発現が誘導される11 $\beta$ -HSDは、精巣でのコルチゾン産生に関係するものと考えられた。精子形成での副腎皮質系ステロイドの作用は、何れの動物でも明らかとなっていない。そこでコルチゾールおよびコルチゾンの精子形成への作用をウナギの精巣器官培養系により調べた。その結果、コルチゾールは1ng/mlの濃度で雄性ホルモン:11-ケトテストステロンによって誘導される精原細胞の増殖をさらに促進させるが、100ng/mlの高濃度では、精子形成の進行を抑制することが示された。一方、コルチゾールの代謝物であるコルチゾンは、低濃度でも高濃度でも精子形成に対しての作用は認められなかった。これらの結果より、コルチゾールは比較的低濃度(1ng/ml)では、精子形成に対し促進的に作用し、100ng/mlという高濃度では抑制的に作用することが明らかとなった。上述のようにDHPの刺激により精巣中の11 $\beta$ -HSDが活性化することが明らかとなったが、これは、ストレス存在下で血中量が著しく増加するコルチゾールを無害なコルチゾンへ代謝し、高濃度のコルチゾールから精子形成の進行を守る一種の生体防御機構であると考えられた。

### トリプシンの精子形成への作用

トリプシンは、膵臓で産生分泌される消化酵素の一種である。このトリプシンの前駆物質であるトリプシノーゲンの cDNA クローンが DHP により精巣で発現が誘導される cDNA の中に含まれていた。トリプシノーゲンの精巣での発現部位を調べるために、その特異抗体を作製し、免疫組織化学を行ったところ、その発現部位は、増殖型の精原細胞を取り囲むセルトリ細胞と精細胞および精子であった。トリプシンの精子形成への直接的な作用を調べるため、精原細胞とセルトリ細胞の共存培養系にトリプシンを添加して 3 日間培養したところ、精原細胞が増加するとともに、増加した精原細胞に減数分裂のマーカートンパクである Spo11 の発現が認められた。さらに、精原幹細胞の単独細胞培養系にトリプシンを添加して培養したところ、前述の精原細胞とセルトリ細胞との共存培養系の結果と同様、精原幹細胞の数の増加が認められるとともに、培養6日目にチューブリン分子を含む鞭毛様構造を持ち細胞表面にアクチン分子が局在化し細胞体が伸長した精子様細胞が多数出現した。これらの結果より、トリプシンは DHP による制御の下、精原細胞の増殖と減数分裂の誘導、さらには精子変態の制御に深く関わっていることが明らかとなった。

### 生体外卵巣培養系の開発

初期卵形成の制御機構を生体外で解析するための卵巣培養系の開発を、数種の魚類の卵巣を用いて試みた。まず、フグやサケ科魚類のイトウなど卵形成の進行が比較的遅い魚種に注目し、卵巣器官培養系の確立を試みた。これらの魚種を使って、雌性ホルモンや黄体ホルモンに対して反応する培養系の開発に成功した。しかしながら、これらの魚種は、入手や飼育が難しいこと、卵巣の発達段階の問題から培養を行うことができる期間が1年のうち1ヶ月程度と短いことから、必ずしも優れた解析系とは言えなかった。そこで、比較的入手し易いコイを用いて卵巣の培養系の開発を試みた。コイの卵巣には卵原細胞、卵黄形成前の卵母細胞、卵黄形成中の卵母細胞など様々なステージの生殖細胞が存在する。卵原細胞の増殖から減数分裂の開始の過程を解析するために、解析に必要な無い減数分裂開始期以降の大型の細胞をコラゲナーゼ/ディスパーゼ消化により取り去り、残った卵原細胞を卵巣壁ごと培養した。2週間から4週間基本培地で培養を行ったところ、培養卵巣壁中に多数の卵原細胞が認められ、減数分裂期以降の生殖細胞はほとんど認められなかったことから、本培養系は、初期卵形成過程の制御機構の解析に適しているものと考えられた。また、この培養方法は、ニジマスおよびウナギの卵巣でも利用可能であることが確かめられ、汎用性の高い方法であることが明らかとなった。

### 生体外卵巣培養系を用いた初期卵形成過程の解析

イトウおよびコイの卵巣培養系を用いて、初期卵形成過程での黄体ホルモンの作用を解析した。



各培養系に雌性ホルモン E2 または黄体ホルモン DHP を培養液に添加し卵巣を培養したところ、E2 および DHP のどちらを添加した場合でも、生殖細胞の DNA 合成を促進した。これらの培養卵巣片を電子顕微鏡により観察したところ、DHP 処理した卵巣片には、減数分裂時の染色体の対合像を示すシナプトネマ構造を持つ生殖細胞が多数観察されたのに対し E2 処理卵巣ではシナプトネマ構造を持つ生殖細胞がほとんど観察されなかった。以上の結果から、E2 は卵原細胞の増殖、DHP は減数分裂の開始に作用することが明らかとなった。精子形成に関しても E2 は精原幹細胞の再生分裂を制御していることを私たちは明らかにしており、また上述のように DHP は雄に関しても減数分裂の開始の引き金を引くことが明らかになっている。このように、本項目により、雌性ホルモンおよび黄体ホルモンは雌雄両配偶子形成共通の制御因子であることが明らかとなった。

本研究によって得られた結果を右図に示す。本研究によって、精子形成および卵形成のどちらに対しても減数分裂開始の引き金を黄体ホルモンが引くことが初めて明らかとなった。以前から知られているように、黄体ホルモンは雌では卵成熟、雄では精子成熟の制御に関与することが知られていたが、本研究により、黄体ホルモンは成熟後期にのみ作用するのではなく、減数分裂開始という配偶子形成の初期過程に対しても雌雄とも、重要な役割を果たすことが明確となった。また精子形成に関しては、これまで全く精子形成への関与が示されていなかった副腎皮質系ステロイドや消化酵素であるトリプシンが黄体ホルモンの制御により作用することが明らかとなった。特にトリプシンに関しては、古くから一般に知られている消化酵素が、これまで全く知られておらず、予想もされていなかった新規の、しかも生理学的に極めて重要な機能を持っていたことが明らかとなった。

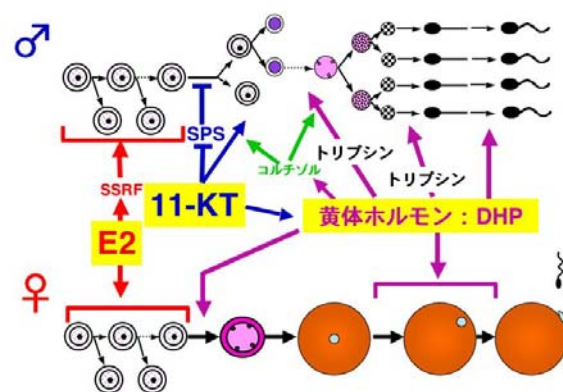


図. 本研究で得られた魚類雌雄両配偶子形成共通の制御機構

##### 5 自己評価:

当初の本研究の目標は、雌雄両配偶子形成に存在する共通の制御機構を明らかにし、配偶子形成過程でのみ認められる減数分裂を生殖原細胞や生殖細胞系列以外の幹細胞で起こさせる方法を開発することであった。雌雄両配偶子形成の共通制御機構の解明に関しては、解析に適した卵巣の培養系の開発に成功するとともに、雌雄ともに雌性ホルモンが精原幹細胞あるいは卵原細胞の増殖分裂に関係すること、黄体ホルモンが雌雄の減数分裂開始の引き金を引く因子であることを初めて明らかにすることができたことから、当初の目標を概ね達成できたものと考えて

いる。減数分裂の人為誘導に関しては、DHP の操作により、本来減数分裂が起こる時期ではない精原幹細胞に対し、減数分裂過程の一部を誘導させることに成功した。しかし、実験計画が遅延したために、生殖細胞系列以外の細胞での減数分裂の誘導に関しては試すことができなかった。この項目に関しては、目標の一部が達成されるにとどまった。

当初の予想を超えた成果としては、本来消化酵素として知られているトリプシンが、精子形成の制御のうち体細胞分裂、減数分裂、精子変態の3つの過程に対し重要な役割を果たす可能性が示されたことである。本成果については、さらに慎重な追加実験を行う必要があると思われるが、今後、配偶子形成研究の方向性を大きく変え、大きく発展する可能性のある「さきがけ研究」にふさわしい成果であるといえることができる。

成果の公表に関しては、研究の進行が予定より遅れ、さらに意外な方向へ研究が展開してしまったことを受けて、期間中に公表できなかった内容が多数あった。これに関しては、できるだけ早期に公表できるよう努力したいと考えている。

## 6 研究総括の見解:

本研究者の目指すところは二つである。第一は、ゲノムの多様性を保つ中心機構である減数分裂機構の分子レベルでの解明であり、第二は、その機構の人為的制御技術の開発と、その生物生産技術の確立である。研究は硬骨魚類を材料として実施されてきた。途中、実験の場を北海道から四国に移すという出来事があったが、その困難を乗り越えて、現在多くの注目すべき成果を挙げているのは高く評価し得る。トリプシンの精子形成の制御における意外な役割の発見は、当該研究者も云っているように、配偶子形成研究の方向を大きく変換させるものであるとともに、応用面でも波及効果の高い技術開発につながる可能性が高く、今後の展開を期待する。

## 7 主な論文等:

### 論文

1. Miura, T., Ohta, T., Miura, C. I., and Yamauchi, K.: Complementary Deoxyribonucleic acid cloning of spermatogonial stem cell renewal factor. *Endocrinology* 144: 5504–5510. (2003).
2. Miura, T. and Miura, I. C.: Molecular control mechanisms of fish spermatogenesis. *Fish Physiol. Biochem.* 28: 181–186 (2004)
3. Miura, C. Kuwahara, R. and Miura T.: Transfer of spermatogenesis-related cDNA into eel testis germ-somatic cell coculture pellets by electroporation: methods for analysis of gene function. *Mol. Reprod. Dev.* (印刷中)
4. Miura, T., Higuchi, M., Ozaki, Y., Ohta, T. and Miura, C.: Progesterin is an essential factor for the initiation of the meiosis in spermatogenic cells of the eel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (改定稿)

投稿中)

5. Ozaki, Y., Miura, C. and Miura, T.: Molecular cloning and gene expression of Spo11 and Dmc1 during spermatogenesis in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Comp. Biochem. Phys.* (改定稿投稿中)

招待講演3件

1. Miura, T.: Molecular control mechanisms of fish spermatogenesis. In “7<sup>th</sup> International symposium on Reproductive Physiology of Fish” 2003 年5月三重.
2. Miura, T.: The control mechanisms of spermatogenesis and early oogenesis in fish. In “37<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction.” 2004 年 8 月バンクーバー, カナダ
3. Miura, T.: The analysis of fish gametogenesis using in vitro culture systems. In “The 4<sup>th</sup> International Symposium “Reproductive, Genetic and Disease Management in Aquaculture and Ocean Ranching.” 2004 年 10 月函館.

## 研究課題別評価

### 1 研究課題名:哺乳動物におけるオートファジーの役割とその制御機構

### 2 研究者氏名:水島 昇

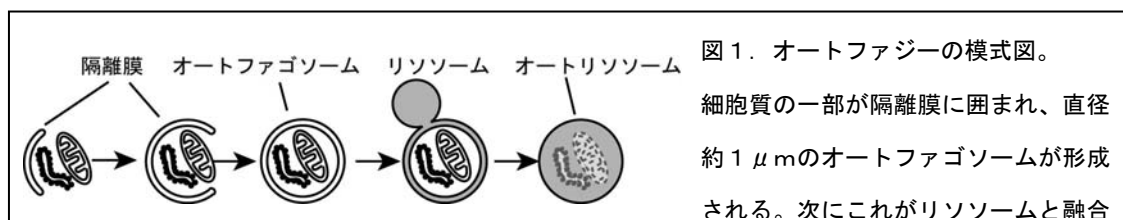
研究員:久万 亜紀子 (研究期間 H.15.4~H.16.3)

金澤 匠 (研究期間 H.16.4~H.17.3 (H.15.7~H.16.3 は技術員))

砂山 潤 (研究期間 H.16.11~H.18.3)

### 3 研究のねらい:

生体を最適な状態を保つためには自己の構成成分を合成するだけではなく、環境変化に応じてその構成要素を分解処理することも必要である。細胞内にはさまざまなタンパク質分解系が存在する。それらはユビキチン・プロテアソーム系に代表される選択的タンパク質分解系と、リソソームにおける原則として非選択的な分解系に大別される。オートファジー(自食作用)は後者の主要経路であり、細胞質の一部をまとめてリソソームで分解する方法である(図1)。これは一見大雑把で大胆とも思える分解方法であるが、全ての真核生物に備わっている普遍性の高い細胞機能である。本研究課題では、この不思議な分解系が、私たち哺乳類ではどのような役割を担っているのかを明らかにすることを目的とした。



### 4 研究成果:

私たちはまずオートファジーがマウス個体において、いつ、どこで、どのくらいおこっているかを調べた。この目的のために、私たちがこれまで明らかにしてきたオートファゴソーム形成に関わる分子を利用し、全身のオートファゴソームが蛍光標識される「オートファジー検出マウス(GFP-LC3トランスジェニックマウス)」を作製、解析した。このマウスは蛍光顕微鏡を用いてオートファジーの活性を判断できるため、個体レベルでのオートファジー研究に非常に有効となった。実際私たちは絶食時にマウスのほぼすべての器官(脳を除く)でオートファジーが誘導されることを確認した。また、絶食だけではなく、出生直後の新生児の全身でもやはりオートファジーが激しくおこっていることを発見した。哺乳類の新生児は出生直後に激しい生理的飢餓に遭遇することが知られているた

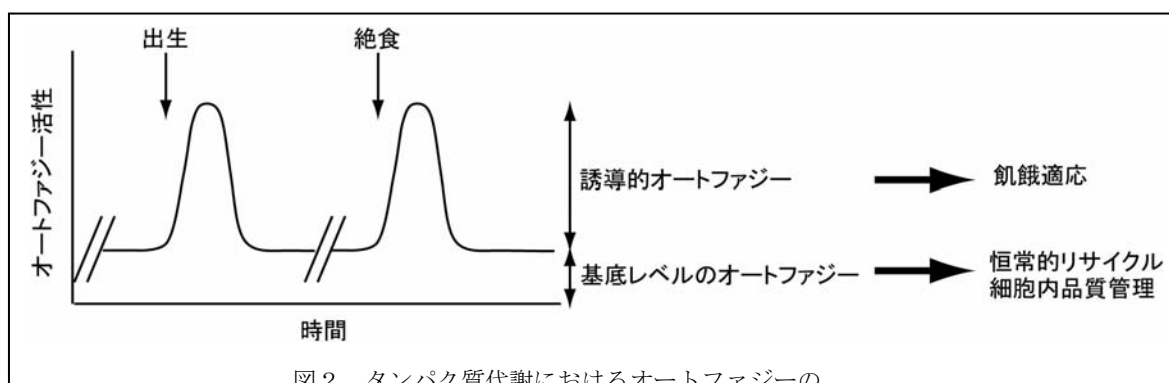
め、このことは糖や脂質のみならず、自らのタンパク質を分解することも重要であることを示唆した。

次にこの飢餓に応答して誘導されるオートファジーの生理的意義を知るために、私たちはオートファジーの能力を欠損したマウスを作製した。これにはオートファゴソーム膜の伸長に必要な Atg5 の遺伝子破壊を行った。このマウスは一見ほぼ正常に生まれてくるが、生後1日以内に死亡する。マウスの栄養状態を調べたところ、生直後は正常であった血中や組織内のアミノ酸濃度が生後10時間には著明に減少していることが判明した。このことは、新生児マウスはオートファジーを一過性に誘導することで、すなわち自己タンパク質の過剰分解によって産生したアミノ酸を利用することで、この新生児飢餓を凌いでいることを示している。

さらに生後の組織特異的オートファジーの機能を知るために、神経系特異的 Atg5 遺伝子欠損マウスを作製、解析した。神経細胞でオートファジーが機能なくなると、神経細胞内に異常タンパク質が蓄積し、やがて神経変性疾患様の症状を呈することが明らかとなった。このことはオートファジーがアミノ酸産生だけでなく、神経細胞内の品質管理機構としても重要であることを示している。一方、目の水晶体や赤血球の分化過程で細胞内オルガネラが大規模に分解されることが知られているが、オートファジーノックアウトマウスを用いた解析から、これらの過程にはオートファジーは重要ではないことが明らかとなった。

またオートファジーの制御機構については、GFP-LC3 マウスを用いた解析から少なくともインスリンが重要なオートファジー抑制因子であることを確認した。さらに未知のオートファジー誘導因子の存在が示唆されたため、現在その同定を進めている。

本研究課題では、独自のオートファジーモニターマウスを利用して、タンパク質代謝に焦点をあてて哺乳類におけるオートファジーの生理的意義を解析した。上記の結果より、誘導的オートファジーは栄養制御に、恒常的な基底レベルのオートファジーは細胞内新陳代謝に非常に重要であることが理解される(図2)。オートファジーはこの他にも、細胞内侵入細菌除去や、抗原提示、細胞死、癌化などにおいて多彩な役割をもつことが明らかになりつつある。本研究課題の研究資材と研究成果が今後この分野の発展に大きく寄与することが期待される。



## 5 自己評価:

本研究課題によって得られた研究資材と、研究成果は提案当初の目標を達成し得たと考えられる。オートファジーを簡便にモニターしうる GFP-LC3 マウスはすでに 60 カ所を超える国内外の研究室で利用されており、その有用性が裏付けられている。また、遺伝子ノックアウトマウスを用いた解析は哺乳類におけるオートファジーの生理的役割を世界に先駆けて報告するとともに、新生児期というユニークな時期における栄養代謝学における新たな視点を提供した。また神経変性疾患との関連は、今後臨床と直結すると思われる課題であり、抗加齢医学とも大きな接点をもつものであると考えられる。オートファジー研究は現在大きく展開している時期であり、国際的な競争に負けないためにも博士研究員の参加の意義は絶大であった。特に新生児マウスの研究はさきがけの博士研究員が筆頭著者としてなした仕事であり、本研究システムの機動性やメリットが十分に活用されたと考えられる。

## 6 研究総括の見解:

オートファジーの生理学的役割についてまったく新しい視座を導入し、国際的にもこの分野の第一人者と目されるに至った。近く本研究者主導で国際学会を主催することになった。当該研究者によれば、開発されたオートファジー能力欠損マウスは世界中で利用されているという。その結果、栄養学、加齢医学領域でもオートファジー現象を踏まえての新たな視座を中心に胎動が始まっている。今後の展開を見守りたい。

## 7 主な論文等:

### 論文

1. Matsui, M., Yamamoto, A., Kuma, A., Ohsumi, Y., Mizushima, N. Organelle degradation during the lens and erythroid differentiation is independent of autophagy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 339, 485-489 (2006).
2. Mizushima, N. A  $\beta$  generation in autophagic vacuoles. *J. Cell Biol.* 171, 15-17 (2005).
3. Mizushima, N. The pleiotropic role of autophagy: from protein metabolism to bactericide. *Cell Death Differ.* 12, 1535-1541 (2005).
4. Ogawa, M., Yoshimori, T., Suzuki, T., Sagara, H., Mizushima, N., Sasakawa, C. Escape of intracellular *Shigella* from autophagy. *Science* 307, 727-731 (2005)
5. Kuma, A., Hatano, M., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakaya, H., Yoshimori, T., Ohsumi, Y., Tokuhisa, T., Mizushima, N. The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature.* 432, 1032-1036 (2004).
6. Nakagawa, I., Amano, A., Mizushima, N., Yamamoto, A., Yamaguchi, H., Kamimoto, T., Nara, A.,

- Funao, J., Nakata, M., Tsuda, K., Hamada, S., Yoshimori, T. Autophagy defends cells against invading group A Streptococcus. *Science*. 306, 1037–1040 (2004).
7. Kabeya, Y., Mizushima, N., Yamamoto, A., Oshitani-Okamoto, S., Ohsumi, Y. and Yoshimori, T. LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation. *J. Cell Sci.* 117, 2805–2812 (2004).
  8. Mizushima, N., Yamamoto, A., Matsui, M., Yoshimori, T. and Ohsumi, Y. In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Mol. Biol. Cell* 15, 1101–1111 (2004).
  9. Mizushima, N., Methods for monitoring autophagy. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36, 2491–2502 (2004).
  10. Mizushima, N., Kuma, A., Kobayashi, Y., Yamamoto, A., Matsubae, M., Takao, T., Natsume, T., Ohsumi, Y. and Yoshimori, T. Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12–Apg5 conjugate *J. Cell Sci.* 116, 1679–1688. (2003)

(他英文 11 編、和文総説 15 編)

#### 受賞

平成 17 年 12 月 第 3 回日本分子生物学会三菱化学奨励賞受賞

#### 招待講演

1. 水島昇 哺乳類オートファジーの生理的意義:特に新生時期について 第77回日本生化学会大会 シンポジウム「Uncover the mystery of proteolysis」 横浜 2004年10月
2. Mizushima N, “Molecular dissection and visualization of autophagy in mammals”, 16th International Congress of the International Federation of Association of Anatomists, Symposium “Endosomal/lysosomal system in mammalian cells” 京都 2004年8月
3. Mizushima N “The role of autophagy in the embryonic and neonatal periods” Gordon conference “Autophagy in stress, development and disease” イタリア 2005 年 4 月
4. 水島昇 Autophagy: nutrient regulation and intracellular clearance 第 78 回日本生化学会大会 シンポジウム「Autophagy unveiled: defense and survival by self-eating」 神戸 2005 年 10 月
5. 水島昇 タンパク質代謝におけるオートファジーのふたつの役割 第 28 回日本分子生物学会 シンポジウム「多彩なタンパク質分解マシナリー」 福岡 2005 年 12 月

(他 5 件)