別紙4

「代謝と機能制御」研究領域 領域活動・評価報告書
－平成20年度終了研究課題－

研究総括 西島 正弘

1. 研究領域の概要

本研究領域は、細胞内の代謝産物を解析し、細胞機能を効率的に制御することを可能とする基盤的な技術に関して、個人の独創的な発想に基づく革新的な技術の芽の創出を目指す研究を対象とする。

具体的には、脂質、糖、アミノ酸、核酸関連物質などの代謝産物群の体系的あるいは網羅的解析、代謝産物情報に基づく細胞状態の評価・分類、細胞の代謝経路のモデル化とシミュレーション、代謝経路を制御する化合物の予測と設計、新機能を付与した細胞の作製などに関して、新たな方法論の創出や技術展開の契機となることが期待される研究であり、それぞれの要素技術から細胞制御研究までを対象とする。

細胞内の代謝研究は、現在、質量分析計などを活用して代謝産物群を体系的あるいは網羅的に解析するメタボローム解析手法の導入により新しい時代に入っている。我が国の代謝研究は脂質や糖をはじめ様々な物質領域で国際的に高いレベルに有り、まだ端緒についたばかりのメタボローム研究においても世界をリードする独創的な研究成果が出ることが期待される。

2. 研究課題・研究者名

別紙一覧表参照

3. 選考方針

選考の基本的な考えは下記の通り。

1） 選考は「代謝と機能制御」領域に設けた領域アドバイザー15 名の協力を得て研究総括が行う。
2） 選考方法は、書類選考、面接選考及び総合選考とする。
3） 選考に当たっては、研究構想、研究のねらい、研究の主体性、独創性、新規性、等を中心に審査した。研究課題が戦略目標、並びに、本研究領域の趣旨に合致していることについても重視した。また、イノベーションの芽を育む基礎研究の見地から、将来大きく発展する可能性が高いかを考慮した。

4. 選考の経緯

一応募課題につき領域アドバイザー3 名が書類審査し、書類選考会議において面接選考の対象者を選考した。続いて、面接選考および総合選考により、採用候補者を選定した。

選 考	書類選考	面接選考	採用者
対象者数	216 名	26 名	12 名

5. 研究実施期間

平成 17 年 10 月～平成 21 年 3 月

6. 領域の活動状況

領域会議：7 回
研究報告会：1 回
研究総括（または技術参事）の研究実施場所訪問：研究開始時に研究総括と技術参事、事務参事が研究現場を訪問し、研究状況の把握と研究環境、設備等の確認、並びに、上司への協力依頼を行った。その後は、研究実施場所の移動環境の確認、物品確認等の際に、研究総括または技術参事、事務参事が適宜訪問し、研究進捗状況の把握と支援に役立てた。

7. 評価の手続き

研究総括が研究者からの報告・自己評価を基に、領域アドバイザーの協力を得て行った。また、研究報告会の参加者の意見も参考にした。

（評価の流れ）

平成 20 年　1 月　　中間研究報告書提出
平成 20 年 12 月　　研究報告会開催
平成 21 年　2 月　　研究報告書及び研究課題別評価提出
平成 21 年　3 月　　研究総括による評価
平成 21 年　3 月　　研究期間終了

8．評価項目
（1）　研究計画書の目標に対する研究課題の達成度
（2）　外部発表(学術論文、口頭発表など)、特許など研究成果の発信状況
（3）　学術賞、学会招待講演、新聞記事発表など外部からの評価状況
（4）　得られた研究成果の科学技術への貢献

9．研究結果
本研究領域では、メタボローム研究に資する新しい分析手法の開発、微生物・動物・植物の変異・病態・発生過程等におけるメタボローム解析、特定の細胞状態を規定する代謝産物の同定、新しい代謝過程の発見、代謝産物の変化情報に基づく細胞機能の解明と制御など、広い分野の研究課題が採択されている。広い専門分野の研究者やアドバイザーの交流により活発な研究課題の展開が見られ、新しいメタボローム研究の流れが示された。新しい生理活性代謝産物の発見、疾患特異的な代謝マーカーによる診断法の開発、並びに、代謝疾患治療薬の開発、有用な代謝産物を効率よく産生する実用生物の開発に結びつくことが期待される。研究者別にそれらの研究目的と結果および評価を記述する。

〇青木淳賢　研究者
脂質に関するメタボローム解析はポストゲノムの重要課題の一つである。本研究では、生体内で重要な役割を担っている生理活性リゾリン脂質に焦点を絞り、新たな脂質代謝系の発見、新しい脂質の機能解明を目指した。その結果、生理活性脂質の 1 つであるリゾホスファチジン酸(LPA) の産生ならびに生理機能の解析を行い、LPA の産生酵素オートタキシン、および、mPA-$PLA_{1\alpha}$を見出した。さらに、それらのノックアウトマウスの解析から、LPA が血管形成に必須であること、肺繊維症にLPAが大きく関与していること等を発見した。世界的にもこの分野を圧倒的にリードしており、今後、治療薬の開発に道を開くものである。

〇阿部郁朗　研究者
医薬品として重要な天然物基本骨格構築に関わる二次代謝酵素の触媒能の可能性を引き出し、さらに酵素機能を制御することにより、効率的な新規有用物質の生産を目指した。その結果、植物のポリケタイド合成酵素、スクアレン環化酵素を例に取り、酵素工学で基質や生成物を比較的自由に変更することが出来る事を実証した。タンパク質工学、酵素工学、化学合成など異分野融合の素晴らしい成果と言える。また、X 線構造解析の成果を基に構造化学の成果も活用して解析した点は共同研究の効果としても優れている。今後は実用化に向けた研究につなげると共に、各酵素でキャビティーの大きさの解析だけでなく、酵素反応機構、特に反応終結機構の解明を進め合成化学としても更に進化することを期待する。

〇石井聡　研究者
ヒトゲノム解析の結果から、100 を超える未だリガンド不明のオーファン G タンパク質共役型受容体（GPCR）の存在が明らかになった。本研究では、オーファン GPCR の脂質天然リガンドを見つけること(脱オーファン化)を目指した。オーファン受容体の解析を進めた結果、リゾホスファチジン酸(LPA)の 6 番目の受容体として P2Y5 を同定した。LPA4 受容体についても一部の性質を明らかにした。P2Y5 が LPA の受容体であることの証明や LPA4 ノックアウトマウスの解析など質の高い成果を挙げた。これまで知られていた LPA 受容体とは異なるファミリーに、新たな LPA 受容体を見出したことは高く評価できる。今後の研究の糸口も見出しており、脂質リガンドの受容体の全体像の解明を期待する。

〇稲田利文　研究者
生命の基本は遺伝と代謝であり、代謝産物の遺伝子発現における機能、特に翻訳段階での機能はほとんど不明である。本研究では特に、翻訳制御の解析により、機能性RNAによる代謝調節の解明を目指した。その結果、mRNA の PolyA 鎖の機能解析を行い、mRNA およびその翻訳産物の品質管理機構のひとつとして PolyA 鎖が機能することを見出し、mRNA とタンパク質の分解系を同定した。PolyA 鎖が翻訳されることによりタンパクの安定性

に影響を与えるという新たな概念を提唱した点は独創性が非常に高く、高く評価すべきものである。今後詳細な点をつめるべきことが多いが、疾病との関連で発展する可能性が期待できる。

○尾池雄一　研究者
　メタボリックシンドロームの基盤病態の一つである内臓脂肪型肥満を研究対象に、メタボローム解析で生体内の代謝変化を網羅的に解析し、脂質蓄積・分解・燃焼・消費システムにおける恒常性維持の分子基盤解明を目指した。その結果、肥満症に関するエネルギー、脂質代謝、血管新生に焦点を当てた広範な研究で様々な新しい知見を得た。アンジオポエチン様因子 Angptl2, 6 等、各因子の分子基盤の解明においては、計画以上の成果を挙げたものといえる。また、各因子と疾患の密接な関連も明らかにしている。今後は、ヒトにおける診断や治療においてどの様に展開するのか、注目に値するし、期待も持てる研究である。

○木下俊則　研究者
　植物の表皮に存在する気孔は、光合成に必要な二酸化炭素の唯一の取り入れ口で、太陽光に含まれる青色光に応答して開口し、植物と大気間のガス交換を行っている。本研究では、気孔開閉の分子機構の解明、気孔開口を含め植物細胞において多様な機能を担っている細胞膜プロトンATPアーゼ（H^+-ATPase）の活性調節機構の解明を目指した。その結果、青色光からH^+-ATPaseを介して気孔開口にいたるシグナル伝達を分析し、種々の変異体を葉の形態や重量を手掛かりに単離して同定した。H^+-ATPaseについての機能・構造相関を独自の方法で解析するなど、アイデアを凝らした分析法を駆使した研究で、レベルは非常に高いと評価できる。今後は、新しい農作物の作出へも展開させることを期待する。

○田中元雅　研究者
　最近、プリオン感染がプリオン蛋白質の凝集体（アミロイド）に由来することがほぼ証明されたが、どのようなアミロイドの構造的、物理的特徴がプリオン株の異なる表現型を決定しているのか、その分子機構の詳細には不明な点が多い。本研究では、酵母プリオンの系を用いてプリオン凝集体代謝産物の構造、物理的性質とそれが引き出す細胞機能、表現型との相関関係を解明することを目指した。その結果、温度の違いが生み出す酵母プリオン株の表現型を説明するメカニズムを解明した。凝集の素過程が解析され、凝集にクリティカルな過程が明らかにされた点は非常に大きく評価できる。今後は、ヒトへの展開、実際にプリオン感染を阻止する道筋まで発展させることを期待する。

○豊島文子　研究者
　生物が卵からその固有の形を作っていく過程では、個々の細胞が一定の軸方向に沿って分裂する現象が重要である。本研究では、細胞膜の脂質成分が分裂軸方向を制御する分子メカニズムを解明することを目指した。その結果、細胞分裂の軸の決定に膜リン脂質ホスファチジルイノシトール 3,4,5-三リン酸 PI(3,4,5)P3 とアクチンが重要な決定因子であることを示した。その分裂軸決定機構と関連付けた成果は細胞生物学的に極めて重要な事実で、世界に与えるインパクトも非常に大きい。本成果に絡んで様々な発展が期待されるが、分裂を決定する初期のマーカーが発見できれば、創薬等への応用も可能であろう。今後は応用研究にも視野を広げて大きく展開することを期待する。

○初谷紀幸　研究者
　病害抵抗性作物の分子育種の技術基盤として、病原体感染に対する植物の生体防御機構を分子レベルで解明することは緊急かつ必須の課題である。本研究では、液胞に着目した解析を通して、植物が獲得した生体防御戦略を理解することを目指した。その結果、病原体が植物体に感染した際に働く防御機構である過敏感細胞死の機構を解析し、プロテアソームが関与すること、これにより液胞膜と細胞膜が融合すること、液胞内容物が細胞外へ放出されることを見出した。当初の目標は達成され、レベルは高いと評価できる。今後、この成果を病害抵抗性作物の作出へ展開することを期待する。

○深田正紀　研究者
　蛋白質は翻訳後修飾により、遺伝情報を超えて新たな機能や制御機構が付加され、複雑な細胞機能を制御する。中でも S-アシル化修飾は多くの機能蛋白質にみられる脂質修飾であり、本研究では特に、その神経シナプス機能制御機構との関連を明らかにすることを目指した。その結果、S-アシル化（パルミトイル化）と神経活動の関係を解析し、新しい基質も発見した。多くの酵素による PSD95 のパルミトイル化制御に関する成果は非常に大きく評価できる。てんかんとの関係も示され、疾患上の意義も明らかとなった。技術的には、全反射顕微鏡を用いた

パルミトイル化の可視化を中心に新規な方法を開発しつつ研究を展開した。技術開発としても戦略目標に合致し、高く評価すべき内容である。

○村上誠　研究者

膜リン脂質分解酵素である PLA_2 には多くの分子種が存在するが、機能が未だ不明確な分泌性 PLA_2（$sPLA_2$）群の生理機能を明らかにすることを目指した。その結果、$sPLA_2$-II, III, V, Xなどの生理機能をトランスジェニック(TG)マウス、ノックアウト(KO)マウスを作出して解析し、メタボローム解析の結果も含め、いくつかの非常に興味深いフェノタイプを解明した。特に、アレルギー疾患、生活習慣病等に関して、全く新しい発症メカニズムを提供し、薬剤の新たなターゲットも提供したことは高く評価できる。今後も作出したTGやKOマウスの解析を進めることで更なる成果の発展が期待できる。研究レベル、成果のインパクト何れも国際的に見ても第一級で、素晴らしい研究と言える。

○由良茂夫　研究者

近年の疫学的研究から、胎生期の低栄養が脂肪細胞などの代謝制御機構に恒常的な変化を残し、メタボリックシンドロームのリスク因子となることが判明している。本研究では、胎生期低栄養に起因する成長後の代謝異常発生機序を解明し、その予防・治療戦略の立案を目指した。その結果、胎生期低栄養モデルマウスを使って、胎生期に低栄養、低タンパク質に晒された事実と、新生児の代謝異常、循環器異常との相関を明らかにした。これまでそれほど注目されていなかった、胎生期の低栄養とその後のメタボリックシンドロームのリスクについての解析が、本研究において大きく進展したものと、評価できる。今後はその分子機序の解明と予防・治療を目指した研究の進展を期待する。

10.　評価者

研究総括　西島　正弘　　国立医薬品食品衛生研究所　所長

領域アドバイザー氏名（五十音順）

新井　洋由　　東京大学大学院薬学系研究科　教授
稲垣　暢也　　京都大学大学院医学研究科　教授
寒川　賢治　　国立循環器病センター研究所　所長
木下　タロウ　　大阪大学免疫学フロンティア研究センター　副拠点長／微生物病研究所　教授
斉藤　和季　　千葉大学大学院薬学研究院　教授
鈴木　明身　　東海大学未来科学技術共同センター　教授
鈴木　紘一　　東レ株式会社　専任理事／先端融合研究所　所長
田口　　良　　東京大学大学院医学系研究科　客員教授
寺部　　茂＊1　兵庫県立大学　名誉教授
冨田　　勝＊1　慶應義塾大学先端生命科学研究所　所長／環境情報学部　教授
永井　良三　　東京大学大学院医学系研究科　教授
西村　　紀　　島津製作所ライフサイエンス研究所　技術顧問
深見　希代子　東京薬科大学生命科学部　教授
正木　春彦　　東京大学大学院農学生命科学研究科　教授
横田　明穂　　奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科　教授

＊1 平成 17 年 8 月～平成 19 年 5 月まで参画

（参考）

（1）外部発表件数

	国　内	国　際	計
論　文	3	156	159
口　頭	259	79	338
その他	30	9	39
合　計	292	244	536

※平成 21 年 3 月現在

（2）特許出願件数

国　内	国　際	計

8	0	8

（3）受賞等

・阿部　郁朗
日本生薬学会　学術貢献賞（H19.9）
日本薬学会　学術振興賞（H20.3）

・木下　俊則
文部科学大臣表彰　若手科学者賞（H19.4）

・田中　元雅
文部科学大臣表彰　若手科学者賞（H20.4）

・深田　正紀
国際ヒューマン・フロンティア・サイエンス・プログラム　Young Investigator Grant Award（H18.3）
文部科学大臣表彰　若手科学者賞（H20.4）

・村上　誠
東京都医学研究機構職員表彰（H20.10）

（4）招待講演

国際　31 件
国内　78 件

別紙

「代謝と機能制御」領域　研究課題名および研究者氏名

研究者氏名 （参加形態）	研　究　課　題　名 （研究実施場所）	現　職 （応募時所属）	研究費 （百万円）
青木　淳賢 （兼任）	生理活性リゾリン脂質の多様性とその意義の解明 （東北大学大学院薬学研究科）	東北大学大学院薬学研究科　教授 （東京大学大学院薬学系研究科　助教授）	62
阿部　郁朗 （兼任）	二次代謝酵素の機能開拓と新規生物活性物質の創製 （静岡県立大学薬学部）	静岡県立大学薬学部　准教授 （同上　講師）	48
石井　聡 （兼任）	オーファン受容体の脂質天然リガンドの探索 （東京大学大学院医学系研究科）	東京大学大学院医学系研究科　准教授 （同上　講師）	48
稲田　利文 （兼任）	機能性 RNA による代謝調節の分子基盤の解析 （名古屋大学大学院理学研究科）	名古屋大学大学院理学研究科　准教授 （同上　助教授）	49
尾池　雄一 （兼任）	「肥満症」におけるエネルギー・脂質代謝制御と血管新生制御との連関の解明 （熊本大学大学院医学薬学研究部（医））	熊本大学大学院医学薬学研究部（医）　教授 （慶應義塾大学医学部　講師）	55
木下　俊則 （兼任）	気孔開閉と細胞膜 H^+-ATPase の活性調節機構の解明 （名古屋大学大学院理学研究科）	名古屋大学大学院理学研究科　准教授 （九州大学大学院理学研究院　助手）	49
田中　元雅 （兼任）	プリオン凝集体の代謝産物に着目した細胞機能制御 （理化学研究所脳科学総合研究センター）	理化学研究所脳科学総合研究センター　ユニットリーダー （UCSF　ポストドクトラルフェロー）	58
豊島　文子 （兼任）	細胞膜脂質による分裂軸方向の制御とがん化に伴う変化 （京都大学ウイルス研究所）	京都大学ウイルス研究所　教授 （同上　大学院生命科学研究科　助手）	55

初谷　紀幸 （兼任）	耐病性植物作出を目指した植物細胞死制御系の解明 （北海道大学大学院医学研究科）	北海道大学大学院医学研究科　特任助教 （京都大学大学院理学研究科　日本学術振興会特別研究員）	46
深田　正紀 （兼任）	シナプス機能における S-アシル化動態の時空的解析 （自然科学研究機構生理学研究所）	自然科学研究機構生理学研究所　教授 （国立長寿医療センター研究所　省令室長）	48
村上　誠 （兼任）	分泌性ホスホリパーゼ A_2群の分子種固有の機能の解明 （東京都臨床医学総合研究所）	東京都臨床医学総合研究所　副参事研究員 （同上）	53
由良　茂夫 （兼任）	胎生期低栄養による成長後の代謝異常発生機序の解明とその予防戦略の開発 （京都大学医学部附属病院）	京都大学医学部附属病院　研究員 （同上　大学院医学研究科　助手）	46

研究課題別評価書

1．研究課題名

生理活性リゾリン脂質の多様性とその意義の解明

2．氏名

青木　淳賢

3．研究のねらい

近年、リゾホスファチジン酸（LPA）、スフィンゴシン 1−リン酸（S1P）、リゾホスファチジルコリン（LPC）、リゾホスファチジルセリン（LPS）などのリゾリン脂質が生理活性脂質として細胞間（あるいは膜間）のシグナリング分子として機能し、生体内で重要な役割を持っていることが明らかになってきた。これらの分子は、従来盛んに研究されてきたプロスタグランジン・ロイコトリエンとは構造・機能が大きく異なる第二世代の生理活性脂質として注目されている。我々は、これらの生理活性リゾリン脂質に関して、作用（受容体）・代謝（産生・分解酵素）機構を解明し、さらにノックアウトマウスを解析することによりその個体レベルでの意義を明らかにしてきている。これらの研究過程で、これらのリン脂質性生理活性脂質には、リン脂質頭部の極性基と脂肪酸の種類・結合様式により実に多様な分子種が存在し、それらが特有の機能を有することが明らかとなってきた。例えば、我々が同定したLPA受容体LPA_3は、グリセロール骨格の*sn*−2 位に不飽和の脂肪酸を結合した特殊なLPA分子種にのみ反応し、受精卵の着床過程に関与する。また、様々な組織・細胞由来の脂質をマススペクトロメトリーの手法で網羅的に解析すると、実に多様かつ未同定なリン脂質の分子種が実在することが分かってきている。これらの中には微量で強い生物活性を有するものが存在する可能性がある。本研究では、生理活性リゾリン脂質の多様性とその意義を明らかにすることを目標に、（1）従来のリン脂質性生理活性脂質（LPA, LPS）の多様な分子種の実態とその意義を明らかにし、（2）さらに新規生理活性リン脂質の同定、代謝機構、さらにその機能に関する解析を行った。

4．研究成果

（1）生理活性リゾリン脂質リゾホスファチジン酸（LPA）の産生機構とその意義

(A) LPA 産生酵素オートタキシンの機能

LPAの産生経路は複数想定されているが、生化学的に考えると、主に二つの経路に大別できる。1 つ目は、まず、リゾホスファチジルコリン（LPC）などのリゾリン脂質が産生され、続いてリゾリン脂質にリゾホスホリパーゼDという血漿酵素が作用しLPAが産生される経路である（図1A）。この経路の存在は古くから知られていたが、この経路に関与する酵素の実態は不明であった。我々はこのリゾホスホリパーゼDが癌細胞浸潤促進因子として知られていたオートタキシン（Autotaxin; ATX）と同一であることを明らかにした。さらにATXが脳腫瘍、リンフォーマなど様々な癌細胞で発現が亢進してこと、ATXはLPAを産生しLPA_1受容体を介し癌細胞の細胞運動を促進すること（図2）、血中ATXは慢性肝硬変、妊娠末期で顕著に上昇し、手術後一過的に減少するなど様々な生理的条件、病態で血中ATX

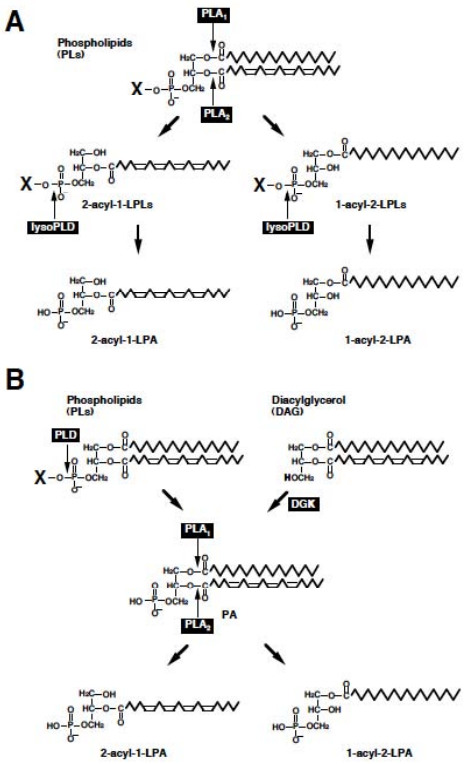


図１　二つの LPA 産生経路

レベルが変動することなどを明らかにした。また、ATX KOマウスを解析し、KOマウスは血管形成不全により胎生致死となり、ATXが胎生期の血管新生に必須の分子であることも明らかにした。このような結果から、ATXは癌細胞の運動性を促進するだけでなく、ホストの血管形成を促進することにより癌の形成に深く関与することが想定された（図2）。また、我々は担癌モデルでATX阻害剤が有効である知見を得ている。一方、ATXはリンパ節内へのリンパ球の流入、神経因性疼痛に関与する重要な因子であることも明らかにしている（図2）。

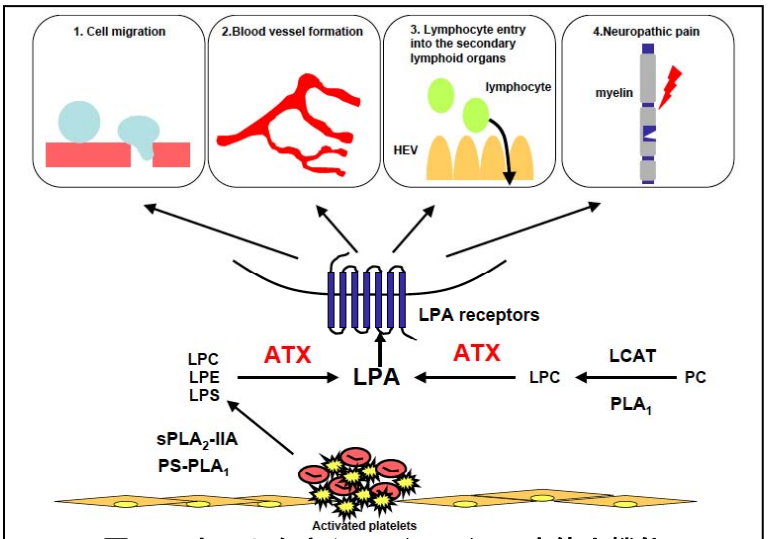


図２　オートタキシン（ATX）の生体内機能

(B) LPA産生酵素mPA-$PLA_{1\alpha}$の発毛における機能

２つ目は、ホスファチジン酸（PA）が産生され、次にPAのアシル基が加水分解されLPAが産生される経路である（図1B）。PAは細胞膜に存在するため、この経路は主に細胞からのLPA産生に重要であると考えられる。PAを産生する酵素としてホスホリパーゼD（PLD）とジアシルグリセロールキナーゼ（DGK）が、PAからLPAを産生する酵素としてホスホリパーゼA_1（PLA_1）とPLA_2が挙げられる。これらの酵素については未だ不明な点が多かったが、我々は、PAからLPAを産生するPLA_1、膜結合型ホスファチジン酸特異的ホスホリパーゼA_1(mPA-$PLA_{1\alpha}$)を同定し、ノックアウト（KO）マウスの解析を行った。mPA-$PLA_{1\alpha}$は毛包に特異的に発現し、KOマウスは縮毛の表現型を示した。興味深いことに、ヒトでもmPA-PLA_1aの遺伝性変異が見つかり、mPA-$PLA_{1\alpha}$の欠損者は脱毛症を引き起こすことが報告された。また、P2Y5という機能未知のオーファンGPCRの欠損が、ヒトにおける脱毛症の原因遺伝子であることも報告された。P2Y5 はmPA-$PLA_{1\alpha}$と同じく毛包に高いレベルで発現し、また、LPAに対する4番目の受容体であるLPA_4と高い相同性を示し、LPA受容体であることが予想されたが、生化学的にLPA受容体であることがどの研究者によっても証明されず、既存のGPCRとは異なったシグナル系を有するものと予想されていた受容体である。我々は、最近、mPA-$PLA_{1\alpha}$により産生されたLPAがP2Y5 を効率よく活性化すること（図3）、また、その下流で膜結合型プロテアーゼを活性化するというユニークなシグナル系を持っていることを明らかにした。

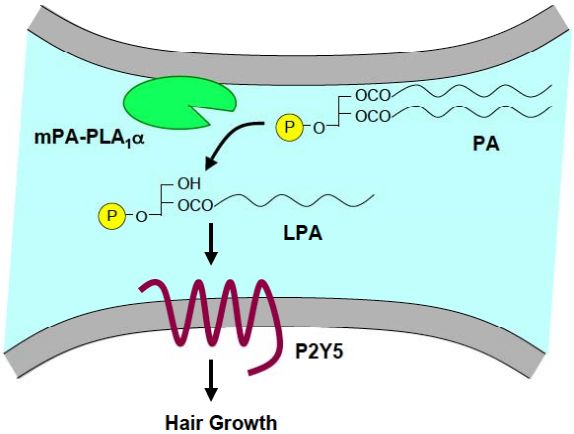


図３　mPA-$PLA_1\alpha$, P2Y5 を介する発毛

（2）新規生理活性リゾリン脂質リゾホスファチジルスレオニンの発見

リゾホスファチジルセリン（LPS）は、LPA、S1P に続く新しいリゾリン脂質メディエーターとして注目されている。LPS は極性頭部にアミノ酸の一つであるセリン残基を有しており、マスト細胞脱顆粒促進活性、細胞遊走、T 細胞増殖抑制活性、神経細胞突起伸長促進作用などが報告されている。中でも、LPS によるマスト細胞の脱顆粒促進作用は、多くの研究グループにより解析されている（図4）。しかし、LPS の作用メカニズムは全く不明であった。LPS は極性頭部に L-セリンを持つリゾリン脂質であるが、この L-セリンの構造は非常に厳密に認識されていることが分かっていた。そこで、我々は様々な LPS 誘導体を有機化学的に合成し、マスト細胞の脱顆粒促進活性を示す化合物の探索を行った結果、LPS よりも数十倍強い活性を示す誘導体、リゾホスファチジルスレオニン（LPT）が同定された。スレオニンはセリンのβ位の炭素にメチル基を持つアミノ酸である。また、LPT はラット、マウス血清に存在することが明らかになり新規生理活性リゾリン脂質である可能性が想定された。

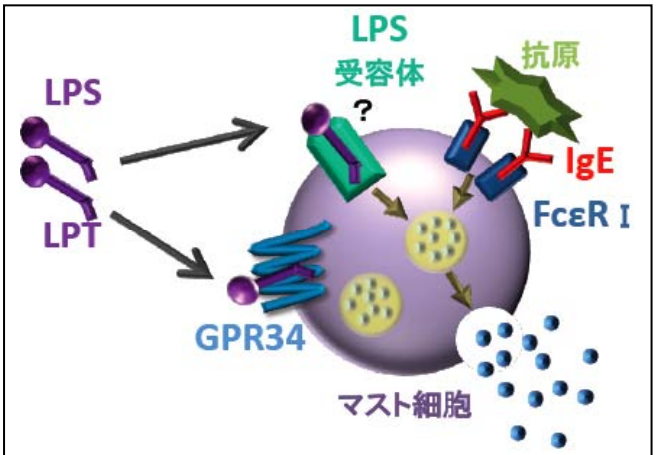


図４ LPS, LPT によるマスト細胞脱顆粒促進効果

5. 自己評価

本研究では、（1）新たなリゾリン脂質の発見、（2）新規脂質代謝系の発見、（3）新しい脂質の機能解明を目指した。

まず、「（1）新たなリゾリン脂質の発見」においては、本研究において、極性頭部にアミノ酸の一種であるスレオニンを持つユニークなリゾリン脂質、リゾホスファチジルスレオニン（LPT）を発見し、LPT がマスト細胞の脱顆粒を強く促進する物質であることを明らかにした。次に、「（2）新規脂質代謝系の発見」に関しては、LPT が産生される生合成系に関して検討を加え、LPT が生体内に存在すること、その生合成系は LPT 類似脂質リゾホスファチジルセリン（LPS）とは全く異なることを明らかにし、新規 LPT 生合成系の存在を示した。「（3）新しい脂質の機能解明」に関しては、LPT がマスト細胞の脱顆粒を引き起こすことを示した。また、別のタイプの生理活性リゾリン脂質リゾホスファチジン酸（LPA）が血管形成、育毛に関与することを明らかにした。このように、本研究を開始する際に掲げた目標は達成できたと考えている。

6. 研究総括の見解

リゾホスファチジン酸（LPA）産生酵素オートタキシン(ATX)により作られる LPAがLPA_1受容体を介して、肺の線維化を起こす原因となっていることをノックアウトマウスで証明した。また、LPA産生酵素mPA-$PLA_{1\alpha}$ - LPA受容体P2Y5 の系が毛包の形態、機能に関与することを見出した。LPA の受容体の一つと考えられたP2Y5 が、その受容体であることを独自のアッセイ系を構築して確定したこと、また、LPAが関係する特発性肺繊維症の機構解明、発毛におけるLPAの機能解明は、高く評価すべき成果である。また、新規生理活性物質と想定される候補物質を同定し、生理機能の解明を行うなど興味深いデータも多く、今後の発展も期待できる。医療応用に繋がる国際レベルの成果を挙げることが出来たものと考える。

7. 主な論文等

（A）さきがけの個人研究者が主導で得られた成果

（1）論文（原著論文）発表　＊Corresponding author

1. Autotaxin is overexpressed in glioblastoma multiforme and contributes to cell motility of glioblastoma by converting lysophosphatidylcoholine to lysophosphatidic acid.

Yasuhiro Kishi, Shinichi Okudaira, Masayuki Tanaka, Kotaro Hama, Dai Shida, Joji Kitayama, Takao Yamori, **Junken Aoki***, Takamitsu Fujimaki, and Hiroyuki Arai
J. Biol. Chem. 281, 17492-17500 (2006)

2. Autotaxin stabilizes blood vessels and is required for embryonic vasculature by producing lysophosphatidic acid.
Masayuki Tanaka, Shinichi Okudaira, Yasuhiro Kishi, Ryunosuke Ohkawa, Sachiko Iseki, Masato Ota, Sumihare Noji, Yutaka Yatomi, **Junken Aoki***, and Hiroyuki Arai
J. Biol. Chem. 281, 25822-25830 (2006)
3. Embryo Spacing and Implantation Timing Are Differentially Regulated by LPA3-Mediated Lysophosphatidic Acid Signaling in Mice.
Hama K, **Aoki J***, Inoue A, Endo T, Amano T, Motoki R, Kanai M, Ye X, Chun J, Matsuki N, Suzuki H, Shibasaki M, Arai H.
Biol. Reprod., 77, 954-959 (2007)
4. Beta-catenin asymmetry is regulated by PLA1 and retrograde traffic in C. elegans stem cell divisions.
Kanamori T, Inoue T, Sakamoto T, Gengyo-Ando K, Tsujimoto M, Mitani S, Sawa H, **Aoki J***, Arai H.
EMBO J. 27, 1647-1657 (2008)

（2）特許

研究期間累積件数：4 件

1. 発　明　者：大和田智彦、岩下真純、新井洋由、青木淳賢、巻出久美子
発明の名称：リゾホスファチジルスレオニンおよびその誘導体
出　願　人：東京大学
出　願　日：2006 年 4 月 19 日
出願番号：特願 2006-116114
2. 発　明　者：青木淳賢、矢冨裕、新井洋由、池田均、五十嵐浩二、井手和史
発明の名称：天然形態ヒトオートタキシン特異的抗体及びそのスクリーニング方法
出　願　人：東京大学／東ソー株式会社
出　願　日：2006 年 8 月 3 日
出願番号：特願 2006-212275
3. 発　明　者：五十嵐浩二、新井洋由、青木淳賢
発明の名称：ホスファチジルセリン特異的ホスホリパーゼA1測定方法および検査試薬
出　願　人：東ソー株式会社／東京大学
出　願　日：2007 年 2 月 19 日
出願番号：特願 2007-038304
4. 発　明　者：五十嵐浩二、井手和史、新井洋由、青木淳賢、矢冨裕、中村和宏
発明の名称：ヒトオートタキシンの免疫学的定量方法および定量試薬
出　願　人：東ソー株式会社／東京大学
出　願　日：2007 年 3 月 31 日
出願番号：特願 2007-092412

（3）招待講演（国際）

1. 2007 FASEB SUMMER RESEARCH CONFERENCES「Lysophospholipid Mediators in Health & Disease」
Patho-physiological role of autotaxin
Tucson, Arizona, USA, June, 2007
2. The 10th International Conference of International Conference on Bioactive Lipids in Cancer, Inflammation and Related Diseases

Recent progress in study of lysophosphatidic acid production
Montreal, Canada, September, 2007

（B）その他の主な成果

（1）論文（原著論文）発表

1. Protection against oxidative stress-induced hepatic injury by intracellular type II PAF-acetylhydrolase by metabolism of oxidized phospholipids in vivo.
Kono N, Inoue T, Yoshida Y, Sato H, Matsusue T, Itabe H, Niki E, **Aoki J**, Arai H.
J. Biol. Chem. 283, 1628-1636 (2008)

研究課題別評価書

1．研究課題名

二次代謝酵素の機能開拓と新規生物活性物質の創製

2．氏名

阿部　郁朗

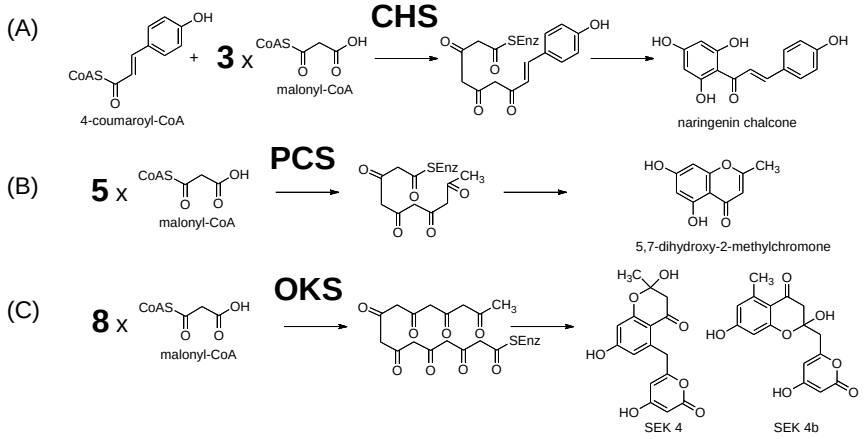
3．研究のねらい

医薬資源として重要な天然物の基本骨格を構築する二次代謝酵素の中には、活性部位の微妙な構造の違いで基質特異性や反応様式が大きく変化するものがあり、これが天然物の分子多様性を生み出す大きな要因となっている。こうした二次代謝酵素が示す広範な基質特異性と潜在的触媒能力を活用することにより、効率的な物質生産が可能になる。一方、酵素タンパクの立体構造に基づく合理的な触媒機能の改変により、さらなる分子多様性と新規骨格の創出が期待される。本研究では，人為的な酵素機能の制御と分子多様性創出の格好のモデルともいえる植物Ⅲ型ポリケタイド合成酵素（PKS）をとりあげた。マロニルCoAに由来するC_2単位の縮合により炭素鎖伸長反応を繰り返し、生成したポリケトメチレン中間体がさらに閉環して芳香環を構築する反応はカルボニルの化学が中心となる。私は、天然より新規酵素触媒活性を探索した結果、これまでにない全く新しいタイプの酵素遺伝子の取得に成功し、従来関連性の考えられなかった植物ポリフェノールの生合成に一連のⅢ型PKSが関与することを明らかにした。今回、この特異な酵素のX線結晶構造解析の結果から、基質及び生成物特異性を決定する酵素活性中心構造の解明、さらに合理的な変異の導入により、C_2単位縮合数の拡大、非天然型炭素−炭素結合の形成、また、芳香環縮合系の構築など、これまで困難とされてきた酵素触媒機能の操作に挑戦した。

4．研究成果

（1）アロエ由来新規触媒活性を有する植物ポリケタイド合成酵素

バルバロインなどアンスロン配糖体に加えて、クロモンやパイロンなど、ポリケタイドを豊富に産生する薬用植物キダチアロエ（*Aloe arborescens*）から単離した、ペンタケタイドクロモン合成酵素（PCS）とオクタケタイド合成酵素（OKS）は、全く新しいタイプの新規Ⅲ型 PKS 酵素である。互いに微妙に異なる配列を有するこの2つの酵素は、植物に普遍的に存在するフラボノイド生合成の鍵酵素となるカルコン合成酵素（CHS）とはアミノ酸レベルで 60%程度の配列相同性を示すものの、クマロイル CoA を基質としてカルコンの合成能は示さず、代わりにそれぞれ5分子あるいは8分子のマロニル CoA を直接縮合して芳香族ポリケタイドを生成する。

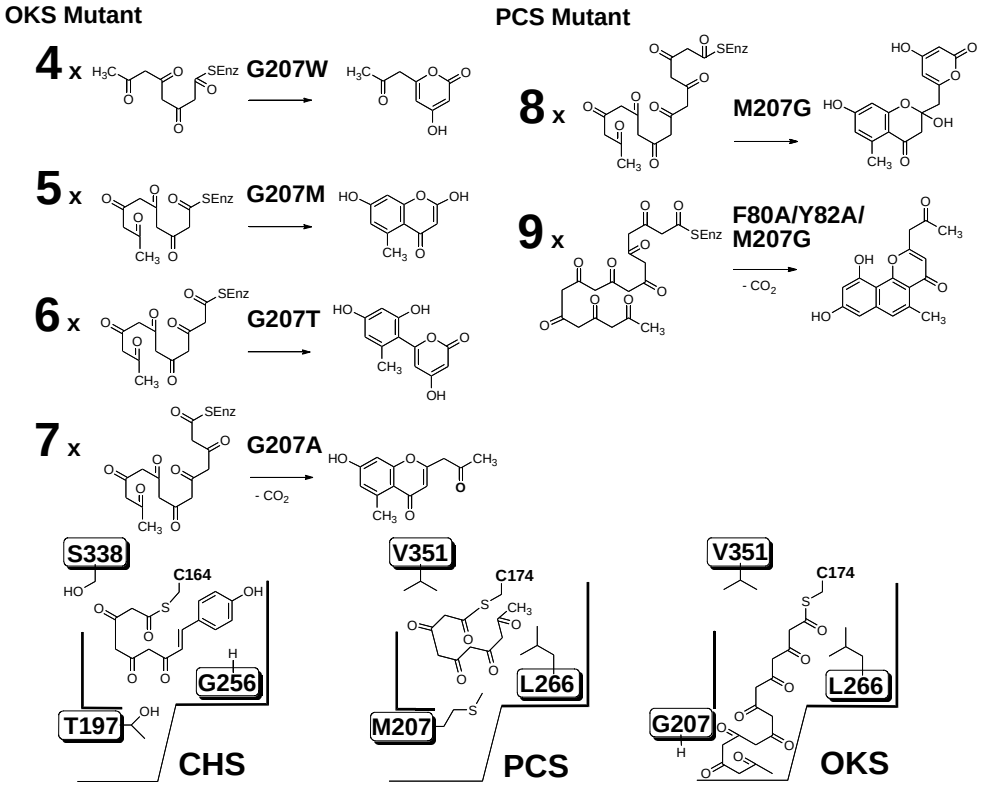


（2）ポリケタイド鎖長と生成物特異性の制御

アミノ酸レベルで互いに 92%という非常に高い配列相同性を示す両酵素が、このように全く異

なる生成物を与えるのは何故か、マロニル CoA 縮合数の違いを決定する要因が何か、大変興味がもたれるところである。これら2つの酵素においては、CHS の触媒残基 Cys164, His303, Asn336 がすべて保存されている一方で、活性中心キャビティを構成する3つのアミノ酸残基 Thr197, Gly256, Ser338（CHS のナンバリング）が置換されているのが特徴的である（PCS では T197M/G256L/S338V, OKS では T197G/G256L/S338V）。これら3アミノ酸残基は、機能の異なるⅢ型PKSにおいて特徴的に置換されており、酵素反応の基質や生成物特異性の決定に関与する可能性が考えられる。私はまず、CHS の Thr197 が、PCS においては Met207 に、また、OKS においては Gly207 に置換されていることに着目し、この残基に部位特異的変異を導入することにより、酵素活性に及ぼす影響を調べた。

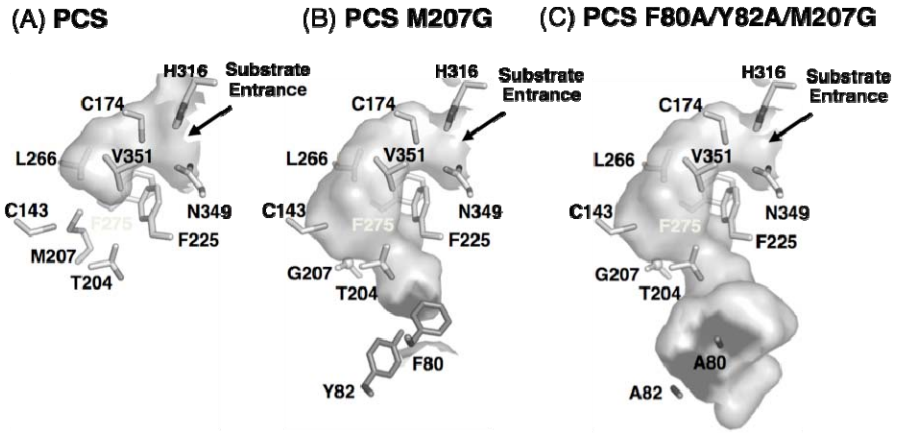
その結果、驚くべきことに、本来5分子のマロニル CoA の縮合を触媒する PCS の、M207G 置換体では、酵素活性が劇的に変化して、8分子のマロニル CoA から SEK4/SEK4b を生成すること、逆に、OKS の G207M 置換体ではオクタケタイドの代わりにペンタケタイドを生成することを見出した。即ち、単一アミノ酸残基の置換によって、PCS と OKS の酵素機能が相互変換したことになる。そこで次に、本来8分子のマロニル CoA の縮合反応を触媒する OKS について、G207A や G207T 置換体を作成してやると、今度はそれぞれ7分子あるいは6分子のマロニル CoA を縮合するが、これらはそれぞれアロエが産生する抗ヒスタミン成分アロエニン及び抗炎症成分アロエシンの生合成前駆体となる。また、最も嵩高いアミノ酸側鎖を導入した G207W 置換体では、4分子のマロニル CoA を縮合するのみであった。以上きわめて明快な結果であり、酵素活性中心キャビティを構成する、化学的に不活性な、単一アミノ酸残基側鎖の立体的な嵩高さに応じて、ポリケタイド鎖伸長ポケットの大きさとマロニル CoA の縮合数が決定されることが明らかとなった。Ⅲ型 PKS におけるこのような縮合数の制御と分子多様性の創出はこれが最初の報告である。



（3）結晶構造に基づく触媒機能の拡張と新規骨格創出

三菱化学生命科学研究所の河野俊之博士との共同研究により、PCS については、それぞれ5分子あるいは8分子のマロニル CoA の縮合を触媒する、野生型及び M207G 変異型酵素の X 線結晶構造解析に 1.6 Å の分解能で成功した。まず、アミノ酸レベルで 60%の相同性を示す CHS の結晶構造との比較により、両酵素はタンパク全体ではほぼ同一の立体構造を共有する

ことが示された。しかも驚くべきことに、活性中心を構成するほとんどのアミノ酸残基を見事に重ね合わせることが可能である。一方、活性中心キャビティの大きさはPCSの方が明らかに小さく、こうしたキャビティの大きさと形状の違いが、酵素反応の基質及び生成物特異性を決定することになる。次に、野生型とM207G変異型の構造の比較により、Met207をGlyに置換することで、実際にキャビティの大きさが劇的に変化することが示された。即ち、点変異 M207G の導入により、活性部位の下側に今まで埋もれていたポケットの入り口が開いて、これによりポリケタイド鎖の伸長がさらに進行して、5分子の代わりに8分子のマロニル CoA の縮合反応が進行することになる。



活性中心キャビティを構成する3アミノ酸残基のうち、197 番の残基以外にも、256 番と 338 番の残基（CHS のナンバリング）が酵素反応の基質と生成物特異性の決定に重要な役割を担うことを明らかにした。まず、CHS においてクマロイル CoA の結合ポケットを構成する Gly256 は、酵素反応の開始基質の特異性を決定する残基である。Gly256 は、PCS や OKS においては嵩高い Leu266 で置換されており、この結果、両酵素はもはやクマロイル CoA を基質として受け入れることが出来ず、代わりにマロニル CoA を開始基質として酵素反応が進行することになる。一方、ポリケタイド鎖伸長の起点となる Cys164 に隣接する Ser338 は、ポリケタイド鎖の伸長方向の制御に寄与するものと考えられる。本来クマロイル CoA を開始基質として3分子のマロニル CoA を順次縮合してカルコンを生成する CHS は、マロニル CoA のみを基質とした場合、その3分子縮合によりトリケタイドパイロンを生成することが知られている。ところが驚くべきことに、CHS に点変異 S338V を導入しただけで、OKS の場合と同様に、マロニル CoA8分子の縮合反応が進行して、SEK4/SEK4b を微量生成することを見出した。しかも、その生成能は、OKS と同様な T197G/G256L/S338V 三重変異の導入で、さらに顕著に増大した。CHS 結晶構造を精査すると、活性部位キャビティの下側に埋もれているポケットの入り口が既にある程度開いているようにも見える。この結果、点変異の導入で、一部のポリケトメチレン中間体の先端がこのポケットに向かって伸長したものと考えられる。植物に普遍的に存在し、Ⅲ型 PKS のプロトタイプともいうべき CHS が、このような単純な変異の導入によって、触媒活性を劇的に変化させることは、Ⅲ型 PKS スーパーファミリー酵素の分子進化や酵素機能の改変を考える上で大変興味深い。

本来5分子のマロニルCoAの縮合を触媒するPCSのMet207に点変異を導入することで，マロニルCoAの縮合数を8分子まで拡大することに成功したわけであるが、結晶構造解析の結果に基づいて、活性部位の下側に新たに出現したポケットを掘り進めてキャビティを広げてやることにより、さらなるC_2単位縮合数の拡大に挑戦した。即ち，ポケットの底面を形成するPhe80, Tyr822つの残基についても同時にAlaで置換したF80A/Y82A/M207G三重変異酵素を作成したところ、今度は9分子のマロニルCoAを縮合して、これまでに例のない非天然型新規化合物を生成することを見出した。単純な構造のⅢ型PKSによるマロニルCoA9分子の縮合はこれが最初の例であり、しかも変異の導入により、芳香環縮合系の合成能を新たに獲得した点は特筆に値する。三重変異酵素のホモロジーモデルを作成して活性中心キャビティの構造を比較してみると、僅か3アミノ酸残基の置換により、その大きさが4倍まで拡大することが予想された。

5. 自己評価

当初の計画通り概ね順調に進行した。部位特異的変異実験の結果、基質及び生成物特異性を決定する活性中心アミノ酸残基を明らかにし、単一アミノ酸残基の置換によって、PCSとOKSの酵素機能が相互変換すること、さらに、この単一残基側鎖の立体的嵩高さに応じて、マロニルCoA縮合数の人為的な制御が可能であることを示した。また、この特異な酵素のX線結晶構造解析の結果から、酵素活性中心構造を解明し、さらに結晶構造に基づく合理的な部位特異的変異の導入により、C_2単位縮合数の拡大、非天然型炭素-炭素結合の形成、芳香環縮合系の構築など、これまで困難とされてきた酵素触媒機能の操作にも展望を開きつつある。一連の生理活性二次代謝産物の基本骨格構築において決定的な役割を演ずるⅢ型PKSの酵素触媒機能の人為的な制御にむけて大きな前進といえる。今後の課題として、酵素反応基質やポリケタイド鎖長の制御に加えて、閉環・芳香環形成反応機構の解明と人為的な制御にも挑戦していきたい。進化分子工学などの手法を取り入れた変異酵素の触媒活性の最適化や、遺伝子導入による新機能賦与生物の作出など、非天然型新規化合物の生産効率の向上と実用に供する有用物質生産系の構築についても検討を加えたい。

6. 研究総括の見解

ポリケタイド合成酵素の立体構造の知見を取り入れ、反応機構の解析、反応の人為的制御を行った。アミノ酸の変異で反応産物を収納する部位の立体構造の変化と反応産物の分子の大きさとの対応関係が見事に示された。酵素機能を制御することにより効率的に新規有用物質を生産するという、当初の目的は達成できたと考える。今後は、実際に欲しい物を取れるようなブレークスルー的技術進歩、また、合成した新規物質の生物活性やその有用性の検討が望まれる。特に、遺伝子改変植物で、どのように機能や産物が変わるかを示して欲しい。

7. 主な論文等

(A)さきがけの個人研究者が主導で得られた成果

(1)論文(原著論文)発表　＊Corresponding author

1. I. Abe*, S. Oguro, Y. Utsumi, Y. Sano, H. Noguchi, "Engineered biosynthesis of plant polyketides: chain length control in an octaketide-producing plant type III polyketidesynthase", *J. Am. Chem. Soc. 127*, 12709-12716 (2005).
2. I. Abe*, T. Watanabe, H. Morita, T. Kohno, H. Noguchi, "Engineered biosynthesis of plant polyketides: manipulation of chalcone synthase", *Organic Letters 8*, 499-502 (2006).
3. H. Morita, S. Kondo, S. Oguro, H. Noguchi, S. Sugio*, I. Abe*, T. Kohno*, Structural insight into chain length control and product specificity of pentaketide chromone synthase from *Aloe arborescens*", *Chemistry & Biology 14*, 359-369 (2007).
4. I. Abe*, H. Morita, S. Oguro, H. Noma, K. Wanibuchi, N. Kawahara, Y. Goda, H. Noguchi, T. Kohno*, "Structure-based engineering of a plant type III polyketide synthase: formation of an unnatural nonaketide naphthopyrone", *J. Am. Chem. Soc. 129*, 5976-5980 (2007).
5. S.-P. Shi, K. Wanibuchi, H. Morita, K. Endo, H. Noguchi, I. Abe*, "Enzymatic formation of unnatural novel chalcone, stilbene, and benzophenone scaffolds by plant type III polyketide synthase", *Organic Letters 11*, in press (2009).

(2)特許

研究期間累積件数:3 件

1. 発　明　者:阿部郁朗, 安部剛史, 野口博司
   発明の名称:4-ヒドロキシ-2-キノリノン類の酵素合成法
   出　願　人:独立行政法人科学技術振興機構
   出　願　日:2006 年 6 月 22 日
   出願番号:特願 2006-172160

2. 発　明　者:阿部郁朗, 野口博司
発明の名称:アロエソン合成酵素
出　願　人:独立行政法人科学技術振興機構
出　願　日:2007 年 1 月 24 日
出願番号:特願 2007-014183

3. 発　明　者:阿部郁朗
発明の名称:非天然型デカケタイドを産生する植物ポリケタイド合成酵素
出　願　人:独立行政法人科学技術振興機構
出　願　日:2007 年 3 月 13 日
出願番号:特願 2007-062770

(3)受賞
1. 日本生薬学会　学術貢献賞 「天然薬物の生合成工学に関する研究」(2007 年 9 月)
2. 日本薬学会　学術振興賞 「天然物の生合成工学に関する研究」(2008 年 3 月)

(4)招待講演
1. I. Abe, "Structure and function of plant type III polyketide synthase", International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM 2005), Symposium on "Natural Product Biosynthesis", Honolulu, Hawaii, USA, 2005.12.15
2. I. Abe, "Engineered biosynthesis of plant polyketides", ICOB-5 & ISCNP-25 IUPAC International Conference on Biodiversity and Natural Products, Kyoto (Japan), 2006.7.27
3. I. Abe, "Enzymatic synthesis of cyclic triterpenes", TERPNET 2007 8th International Meeting on Biosynthesis and Function of Isoprenoids, Strasbourg, France, 2007.5.1
4. I. Abe, "Engineered biosynthesis of plant polyketides", 7th Japan-US Seminar, Biosynthesis of Natural Products, San Diego, USA, 2008.6.22
5. 阿部郁朗、「天然物の生合成工学に関する研究」、第 128 回 日本薬学会年会 学術振興賞受賞講演、横浜、2008.3.28

(5)学会発表
1. 阿部郁朗、「二次代謝酵素の機能開拓と新規生物活性物質の創製」、植物科学研究プロジェクトシンポジウム-植物生産機能の総合的向上を目指して-、東京、2005.12.2
2. 阿部郁朗、「植物ポリケタイド合成酵素を利用した非天然型新規化合物ライブラリー構築」、日本農芸化学会 2006 年度大会 シンポジウム「21 世紀の新資源分子ライブラリー:酵素合成と化学合成の新しい融合に向けて」、京都、2006.3.25
3. 阿部郁朗、「植物由来 III 型ポリケタイド合成酵素の生合成工学」、第 127 回 日本薬学会年会 シンポジウム「生合成機構の解明から有用物質生産系の合理的構築へ」、富山、2007.3.28
4. 阿部郁朗、「天然薬物の生合成工学」、第 129 回 日本薬学会年会 シンポジウム「創薬をめざした機能性天然分子の探索と開発、ケミカルバイオロジー研究の最前線」、京都、2009.3.28
5. 阿部郁朗、「植物ポリケタイド合成酵素の生合成工学」、日本化学会 第89春期年会 シンポジウム 先端ウォッチング「生合成工学ー複雑な構造を持つ生物活性天然物の大量供給を目指して」、千葉、2009.3.27

(B)その他の主な成果
なし

研究課題別評価書

1．研究課題名

オーファン受容体の脂質天然リガンドの探索

2．氏名

石井　聡

3．研究のねらい

7回の膜貫通部位を持つ G タンパク質共役型受容体（GPCR）は哺乳動物では数百種類存在し、タンパク質の中で最大のスーパーファミリーを形成している。細胞膜上に存在して多彩な細胞内シグナルを惹起する GPCR は、匂いやフェロモン、味、光など外来刺激に反応するものと、脂質やペプチド、アミン、核酸など生体の代謝産物（天然リガンド）に反応するものに大別される。後者の GPCR はヒトの生理現象や病態に重要な役割を果たしていると考えられている。事実、現在販売されている薬の多くは天然リガンドに反応する GPCR をターゲットとしており、その割合は 30%とも 50%とも言われている。ヒトゲノム解析の結果から 100 を超えるリガンド不明の GPCR、いわゆるオーファン GPCR の存在が明らかになったが、一部の脂質はこのオーファン GPCR を介して病態生理学的に強い影響を生体へ及ぼしている可能性が高い。そこで本研究では、オーファン GPCR の脂質天然リガンドを見つけること（脱オーファン化）を目的とする。さらにその GPCR の生物学的な機能を解析することにより、関連疾患を解明することに加え、新規薬剤の開発を介して疾患治療に貢献する可能性を模索する。

4．研究成果

A. p2y5 受容体の脱オーファン化 (Manuscript under revision.)

脂質をリガンドとすることが既に明らかになっているヒト GPCR（図 1）のアミノ酸配列を元に、本研究の対象となる「脂質をリガンドとすることが予想される」オーファン GPCR 候補（約 20 種類）を選んだ。これら GPCR の DNA クローニングを行ったが、その際に各 GPCR の N 末に 9 アミノ酸から成る「エピトープタグ」が付加されるように DNA 塩基配列を改変した。次にこれらオーファン GPCR の安定発現動物細胞を樹立した。細胞は CHO-K1 細胞、CHO-S 細胞（チャイニーズハムスターの卵巣由来という点では CHO-K1 と同じであるが、まったく別系統の細胞）、RH7777 細胞（ラット肝臓由来の細胞）及び B103 細胞（ラット神経由来の細胞）を用いた。各 GPCR の N 末（空間配置的には細胞外に向いている）に付加したエピトープタグの細胞表面における発現量を指標に、セル

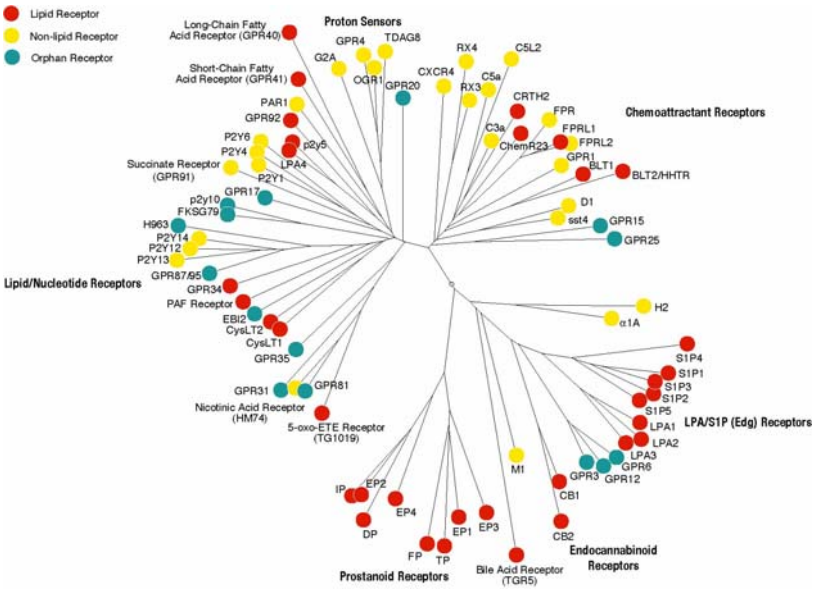


図 1　種々のヒト GPCR のアミノ酸配列をもとに構築した系統樹。任意の２つの受容体を結ぶ線の長さの総和が小さい程、お互いは近縁でアミノ酸相同性が高い。リガンドが同じまたは類似の化学構造をもつ GPCR どうし、また機能が類似する GPCR どうしはこの系統樹上で集まる傾向がある。

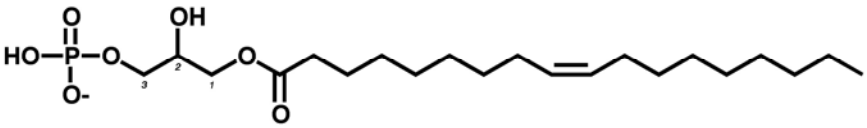


図 2　LPA の化学構造。LPA は 3 価のアルコールであるグリセロールに脂肪酸が *sn*-1 位または *sn*-2 位に、そしてリン酸が *sn*-3 位に結合したリン脂質の総称である。この図では *sn*-1 位にオレイン酸が結合した 1-オレオイル LPA を示したが、断りのない限り以降の実験ではこの LPA を用いた。

ソーターを用いて受容体発現レベルの高い細胞集団を選別して回収して実験に用いた。GPCR の発現レベルは、発現させる細胞によってもまた GPCR の種類によっても異なっていた（データ略）。

樹立したオーファン GPCR の安定発現細胞のそれぞれに対して約 200 種類の脂質分子を作用させ、細胞に及ぶ変化を観察した。具体的には、細胞内カルシウムや細胞内サイクリック AMP という GPCR の活性化に伴って濃度が変化するセカンドメッセンジャーに加え、細胞形態も変化の指標とした。その結果、オーファン GPCR の 1 つである p2y5 を安定発現した B103 細胞と RH7777 細胞において、リゾホスファチジン酸(LPA：図 2)が神経突起退縮と小疱形成をそれぞれの細胞に引き起こすことが明らかとなった（図 3）。LPA が p2y5 を介して引き起こす細胞形態変化は、Rho キナーゼ阻害剤である Y27632 の前処理によってほぼ抑制できたことから（図 3）、低分子量 G タンパク質の一種である Rho が関与する現象であると考えられた。なお、LPA はどの細胞に対しても細胞内カルシウムやサイクリック AMP 濃度に影響を及ぼさなかった。

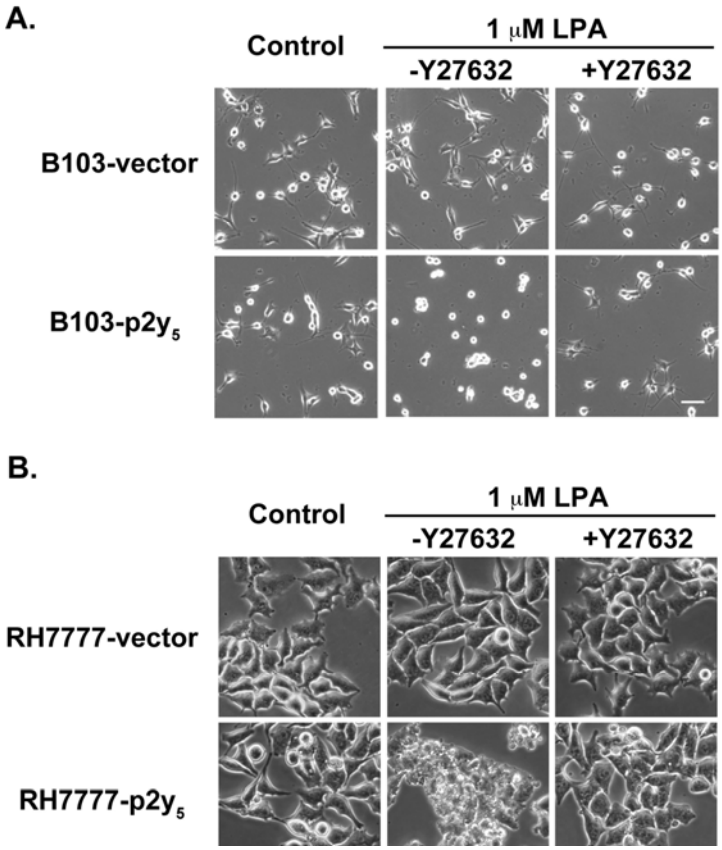


図 3　LPA による B103 細胞の神経突起退縮と RH7777 細胞の小疱形成。A. p2y5 安定発現 B103 細胞を血清飢餓条件で 12 時間培養した後に、1 μM LPA で 15 分間刺激した。2%パラホルムアルデヒドで固定した細胞を写真撮影した。Rho キナーゼを阻害した実験では、5 μM Y27632 で予め 10 分間処理した。横向きのバーは 50 μm を表す。B. p2y5 安定発現 RH7777 細胞を A と同じ実験条件で処理した。横向きのバーは 50 μm を表す。

RH7777 細胞から膜画分を調製し、これをトリチウムで放射ラベル化した LPA と反応させた。その結果、ネガティブコントロール細胞から調製した膜画分では認められない LPA の特異的結合が、p2y5 を発現する細胞の膜画分で観察することができた（図 4）。この結果は p2y5 が LPA の受容体であることを強く支持する。さらに、p2y5 を一過的にまたは安定的に発現させた RH7777 細胞の膜画分において、LPA による GDP/GTP 交換反応の促進も観察された（データ略）。この結果もまた p2y5 が LPA の受容体であることを支持し、しかも G タンパク質と共役するタイプの GPCR であることを示す。G タンパク質にはいくつか種類があり、GPCR によって共役する G タンパク質は異なることが知られている。p2y5 の場合、低分子量 G タンパク質 Rho の活性化に伴う形態変化を細胞に惹起したが、過去の報告を考慮すると p2y5 は G13 タンパク質と共役することが予想された。そこで、p2y5 を発現する B103 細胞にさらに Gs と G13 タンパク

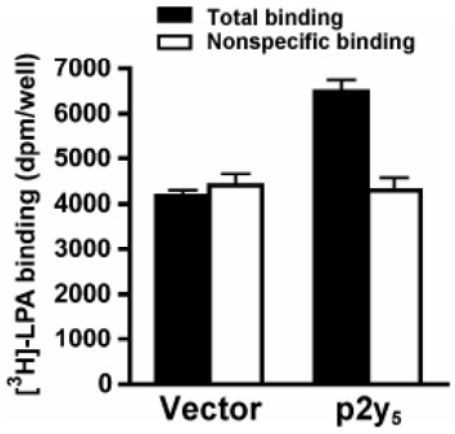


図 4　p2y5 安定発現RH7777 細胞由来の膜画分へのトリチウムラベルした 1-オレオイル LPA の結合。30 nM の [^{3}H]-1-オレオイルLPAを膜画分と 4℃で 70 分間インキュベートした。反応液をガラスフィルターでろ過し、洗浄した後にフィルターに吸着している放射能を計測した（総結合）。非特異的結合を検出するために 10 μMのトリチウムラベルしていない 1-オレオイルLPAを共存させた実験も平行して行った。「特異的結合」とは「総結合」から「非特異的結合」を差し引いた値を指す。データは平均値＋標準誤差（n = 3）。

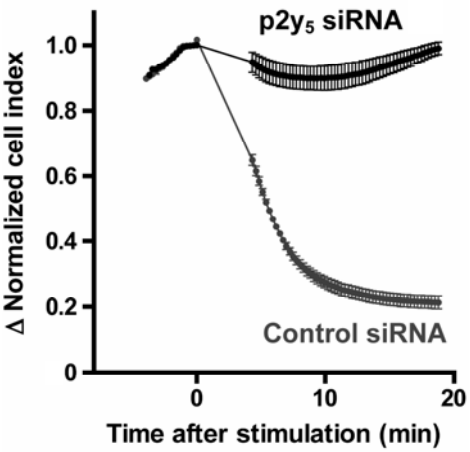


図 5　HUVEC の形態変化に対する p2y5 の役割。siRNA を導入した HUVEC を血清飢餓状態で 4 時間培養後、5 μM LPA で刺激した。その後の細胞形態変化を示す指標としての細胞-ディッシュ間の抵抗値（Δ Normalized cell index と示す）の時間変化を示す。データは平均値±標準誤差（n = 6）。

質のキメラタンパク質を発現させて LPA で刺激した。このキメラタンパク質の存在下で G13 タンパク質と共役する GPCR が活性化すると、アデニル酸シクラーゼが活性化されるためにサイクリック AMP 産生量が増加する。やはり予想通り、LPA 濃度依存的なサイクリック AMP 産生の亢進がこのキメラタンパク質発現細胞で観察された（データ略）。

最近、遺伝学的アプローチにより p2y5 がヒトの毛髪成長異常原因遺伝子であることが報告され、p2y5 が LPA の受容体であることも併せて示唆された (Pasternack *et al.* (2008) Nat Genet 40, 329–334)。グリセロール骨格の *sn*–2 位に脂肪酸を結合した 2–アシル LPA の産生酵素である mPA–PLA1 の変異も p2y5 の変異と同様の毛髪異常につながることから、p2y5 の天然リガンドとして 2–アシル型 LPA は 1–アシル LPA よりも強力である可能性が高い。そこで、上述した Gs と G13 のキメラタンパク質を発現させてサイクリック AMP 産生を観察するアッセイ系を利用してこの点についての検討を行った。その結果、実際に 2–オレオイル LPA が 1–オレオイル LPA に比べて p2y5 のより強いリガンドとして機能することが明らかになった（データ略）。さらに、オレイン酸以外の脂肪酸が結合した LPA についてもいくつか調べたが、やはりどの 2–アシル LPA でも 1–アシル LPA より強力であった（データ略）。

ここまでの実験では培養細胞に外来性の p2y5 を発現した条件で行い、この GPCR の機能を解析してきた。そこで次に、細胞に内在的に発現する p2y5 の機能を解析することとした。ヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）は LPA 刺激により Rho の活性化を起こすことが論文報告されている。これに加え、トランスクリプトームデータベース（東京大学システム生物医学データベースシステム）には HUVEC における p2y5 mRNA の高い発現が示されている。このことから私は、p2y5 を内在的に発現する細胞として HUVEC を解析対象に選び、この細胞の形態に対する p2y5 の機能を調べた。もともと扁平型の HUVEC は LPA に反応して球形に細胞形態を変化させた（データ略）。この変化は先に述べた p2y5 を発現する B103 細胞で観察されたものと似ており（図 3A）、p2y5 が関わる可能性が考えられた。そこで、RNA 干渉法によって HUVEC 内の p2y5 mRNA レベルを低下させたときの LPA への反応を観察した。この際、細胞の形態変化を客観的に評価するために Roche 社の xCELLigence というシステムで細胞とディッシュの間の抵抗値を計った。ネガティブコントロールの siRNA を導入された HUVEC では、LPA によって細胞が球形になることに起因すると思われる抵抗値の急激な低下が起きた（図 5）。一方で p2y5 の siRNA を導入された HUVEC では LPA による抵抗値の低下は大きく抑制された。この結果は内因性の p2y5 もまた細胞の形態を調節する

機能をもつことを示唆する。

本研究では、オーファン GPCR の p2y5 が新規 LPA 受容体であることを明らかにした。さらに p2y5 は G13 タンパク質と共役して細胞形態を調節する機能を持つことが示唆された。HUVEC を解析した結果より、p2y5 は血管内皮細胞における形態変化を通して血管透過性の調節因子として働く可能性が示された。p2y5 のリガンド指向性に関しては 2−アシル LPA の方が 1−アシル LPA よりも高く、この結果はともに毛包の内根鞘に発現する p2y5 または mPA−PLA1 の欠損が毛髪成長異常に至ることと矛盾しないと思われた。LPA は多彩な生理機能を発揮する脂質メディエーターであるが、現在までに 5 種類の GPCR（LPA1−LPA5）が明らかになっている。本研究の結果は p2y5 の生物学的機能の一端を明らかにしたと同時に、p2y5 が第 6 番目の LPA 受容体 LPA6 と命名できる分子であることを示した。今後の更なる LPA6 の解析によって毛髪の成長や血管透過性に関する詳細なメカニズムはもとより、この GPCR の別の生物学的機能を解明することを目指したい。

B. LPA4 受容体の機能解析 (Yanagida, K., Ishii, S., Hamano, F., Noguchi, K., and Shimizu, T. (2007) *J. Biol. Chem.*, 282, 5814−5824)

2003 年に私どもは、p2y9 または GPR23 と呼ばれていたオーファン GPCR が、第 4 番目の LPA 受容体（LPA4）であることを突きとめ報告した（Noguchi, K., Ishii, S., and Shimizu, T. (2003) *J. Biol. Chem.* 278, 25600−25606）。脳に豊富な LPA は神経細胞の形態や生存に影響を及ぼすことが数多く報告されている。LPA4 mRNA はラットの胎児海馬由来神経細胞や不死化した海馬神経前駆細胞で発現するとの報告がある。またマウス胎児の脳においても高いレベルで発現していることを私は観察している（データ略）。そこで、神経細胞における LPA4 の機能を評価するために、LPA4 を安定発現した B103 細胞における細胞内シグナル伝達経路の解析を行った。比較対象として、やはり神経細胞で機能することが明らかにされている LPA1 受容体を安定発現した B103 細胞を用いた。安定発現細胞の樹立は、上記 A.と同様の方法に依った。

LPA4−B103 細胞においてG_q依存性Ca反応がLPAによって惹起されたが、アデニル酸シクラーゼ活性への影響は認められなかった。故にこの細胞においてLPA4 はG_sにも$G_{i/o}$にも共役していないと考えられた。さらに図 7 に示すように、この細胞はLPAに反応して顕著な細胞形態変化、すなわち神経突起の退縮および細胞凝集を示した。これらの形態変化にはp2y5 と同様に$G_{12/13}$とRhoを介した細胞内シグナルが関わっていることが明らかになった。これとは対照的に、LPA1−B103 細胞は LPA 刺激時に LPA4−B103 細胞とは異なる形態変化、すなわち扁平化および分散化に至った（図 7）。しかし、百日咳毒素処理で$G_{i/o}$の活性を阻害した LPA1−B103 細胞では、LPA4−B103 細胞のように凝集化するようになった。この結果は、LPA1−B103 細胞では$G_{i/o}$によって活性化されたRacがRhoの活性を抑制するため、普段は$G_{12/13}$からの細胞内シグナルがマスクされていることを示唆する。以上の結果から、LPA4 は LPA1 とは異なった細胞内シグナルを介して、発生期の神経細胞移動、さらには神経回路のリモデリングやシナプスの可塑性などに対して独特の機能を発揮している可能性が伺えた。

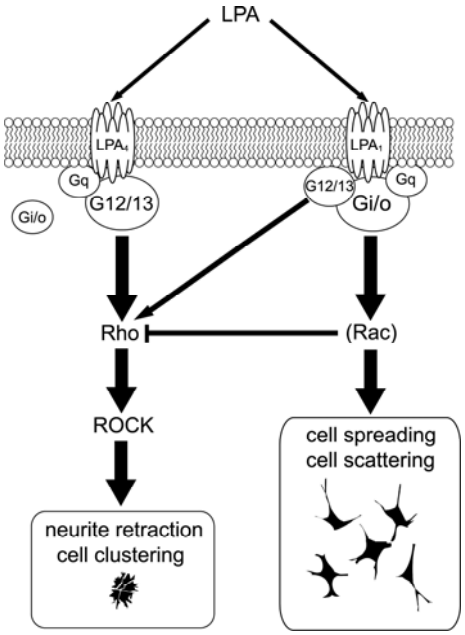


図 6　B103 細胞に異なる形態をもたらす LPA1 とLPA4 の独特な細胞内シグナル経路。LPA4 はLPA1 と同様にG_qと$G_{12/13}$と共役する一方で、LPA1 と違って$G_{i/o}$とは共役していない。この性質の違いが、細胞形態変化の違いをもたらす。詳細は本文参照。

5. 自己評価

本研究期間中に二つのオーファン GPCR の脱オーファン化をすることができた点については、当初の目標を概ね達成することができたと考えている。しかしながら、リガンドとして同定された脂質分子はすべて購入した精製品であった。生体試料から抽出した脂質の中から精製することにより、未知の生理活性脂質リガンドを同定する試みは、結局のところ成功に至らなかったことには力量不足を感じている。LPA4 受容体に関しては、少なくとも 6 種類の LPA 受容体が存在する中で、この受容体が担う独特な機能を培養細胞やノックアウトマウスを用いてある程度明らかにすることができた。この点についてもある程度満足できる成果と考えている。これら脱オーファン化および LPA4 解析の結果について、総じて論文発表が研究終了までに間に合わないものが多々あったことは反省すべき点である。

6. 研究総括の見解

オーファン受容体の機能の解析を出発点とし、リガンド結合実験ではうまく解析できなかった受容体を、細胞の形態変化を指標に突き止める方法、レポーターを組み込んだキメラタンパク質を使った系を開発して、同定した。LPA の受容体が P2Y5 であることを証明できた点は高く評価できる。今後さらに、新規生理活性脂質およびその受容体の同定が望まれる。新規因子の探索は非常に困難であることは理解できるが、新たな探索法の確立など、次のステップに繋がるチャレンジングな方向に進めて欲しい。

7. 主な論文等

(A)さきがけの個人研究者が主導で得られた成果

(1)論文(原著論文)発表　＊ Corresponding author

1. Yanagida, K., Ishii, S.*, Hamano, F., Noguchi, K., and Shimizu, T. (2007) $LPA_4/p2y_9/GPR23$ mediates Rho-dependent morphological changes in a rat neuronal cell line. **J. Biol. Chem.** 282, 5814-5824.

(2)特許

なし

(3)総説　＊ Corresponding author

1. Hikiji H., Takato T., Shimizu T., and Ishii S.* (2008) The roles of prostanoids, leukotrienes, and platelet-activating factor in bone metabolism and disease. **Prog. Lipid Res.** 47, 107-126.

(4)招待講演

1. 石井聡　G タンパク質共役型受容体の機能解明と呼吸器学への応用
   第 47 回日本呼吸器学会学術講演会　2007 年 5 月 12 日
2. 石井聡　システイニルロイコトリエンの生体機能　-CysLT2 とアレルギー性炎症-
   第 28 回日本炎症・再生医学会ワークショップ　2007 年 8 月 2 日
3. 石井聡　リゾホスファチジン酸受容体 LPA4 と LPA5 の生体機能
   BMB2007(第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会合同大会)
   2007 年 12 月 13 日
4. 石井聡　脂質メディエーター受容体の病態機能　-ベンチサイドからの呼吸器研究-
   第 5 回東京レスピレーションフロンティア　2008 年 11 月 7 日
5. 石井聡　非 EDG 型リゾホスファチジン酸受容体の生体機能
   BMB2008(第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会)
   2008 年 12 月 9 日

（B）その他の主な成果

（1）論文（原著論文）発表

1. Shindou, H., Hishikawa, D., Nakanishi, H., Harayama, T., **Ishii, S.**, Taguchi, R., and Shimizu, T. (2007) A single enzyme catalyzes both PAF production and membrane biogenesis of inflammatory cells: cloning and characterization of acetyl-CoA:lyso-PAF acetyltransferase. **J. Biol. Chem.** 282, 6532-6539.
2. Tsuda, M., **Ishii, S.**, Masuda, T., Hasegawa, S., Nakamura, K., Nagata, K., Yamashita, T., Furue, H., Tozaki-Saito, H., Yoshimura, M., Koizumi, S., Shimizu, T., and Inoue, K. (2007) Reduced pain behaviors and ERK activation in primary sensory neurons by peripheral tissue injury in mice lacking platelet-activating factor receptor. **J. Neurochem.** 102, 1658-1668.
3. Kihara, Y., Yanagida, K., Masago, K., Kita, Y., Hishikawa, D., Shindou, H., **Ishii, S.**, and Shimizu, T. (2008) Platelet-activating factor production in the spinal cord of experimental allergic encephalomyelitis mice via the group IVA cytosolic PLA2-LysoPAFAT axis. **J. Immunol.** 181, 5008-5014.

研究課題別評価書

1. 研究課題名
機能性 RNA による代謝調節の分子基盤の解析

2. 氏名
稲田　利文

3. 研究のねらい

1．代謝ストレスに応答した遺伝子発現制御と新規機能性RNAの探索。我々は、環境応答の代表例である大腸菌グルコース効果の分子機構の解析を行い、以下を明らかにした。１）一般的に受け入れられているcAMPによる制御ではなく、グルコースによる他の糖の輸送阻害がグルコース応答の主因である。２）解糖系中間産物の蓄積という代謝ストレスに応答して機能性RNAが発現し、グルコーストランスポーターの発現が転写後段階で抑制される。本研究では、この研究を真核生物で発展させ、解糖系中間産物の蓄積という代謝ストレスに応答した遺伝子発現、特に機能性RNAを介した翻訳制御について明らかにすることを目標とした。具体的には、我々が開発した迅速なポリソーム解析法を中心に、解糖系代謝遺伝子の欠損変異株における代謝遺伝子の発現を、翻訳段階での制御を中心に解析し、代謝産物の変化情報に基づく新たな細胞機能の解明を目指した。近年、代謝産物がRNAに直接結合して構造を変化させ、翻訳段階で遺伝子を制御することが原核生物で明らかになり、リボスイッチという概念が提唱されている。リボスイッチは主にシス因子として機能し、代謝産物への結合を介して下流の遺伝子の翻訳開始効率を制御している。真核生物には同様のRNA分子は同定されていなかったため、本研究により特定の代謝産物結合する**真核生物におけるリボスイッチ**が明らかになることが期待された。

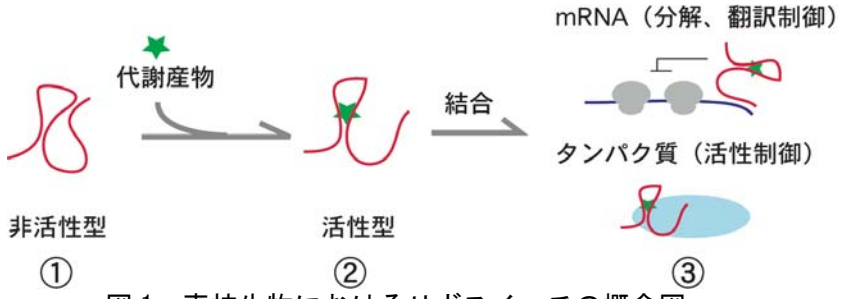


図１　真核生物におけるリボスイッチの概念図
非活性型の機能性 RNA①が代謝産物と結合し、活性化型の構造②に変換する。活性型 RNA が標的 mRNA の 3'UTR と相補対を形成し、翻訳が抑制される（③）。またはタンパク質に結合して、活性を制御する。

2．遺伝子発現の正確性を保証する品質管理機構の解析。遺伝情報の担い手であるmRNA自身が正確に合成され、正しく局在し制御を受けることは、生命現象の基礎であり極めて重要である。一方DNA変異等に起因する異常mRNAは、生命活動を担うタンパク質の発現量や活性の低下を介して、様々な悪影響を細胞にもたらたす可能性がある。最も劇的なアミノ酸配列の変化を引き起こす変異は、塩基の欠失や挿入による読み枠のずれ（フレームシフト変異）であり、かつ多くの場合には正常な位置より上流で翻訳が終結する。また、強制的に翻訳を終結させるナンセンス変異や終止コドンを失った場合にも、異常な長さのタンパク質が発現される。これらの変異の結果として共通する性質は、終止コドンの位置の異常による**翻訳終結の異常**であり、その遺伝子産物が発現した場合には正常なタンパク質の活性を阻害す

る可能性がある。しかしながら、細胞の持つ品質管理機構によって異常タンパク質の発現が強く抑制され、細胞は生存可能となる。ナンセンス変異を持ったmRNAは、NMD（nonsense-mediated decay；ナンセンス変異依存分解系）と呼ばれる特異的分解系によって速やかに分解される。

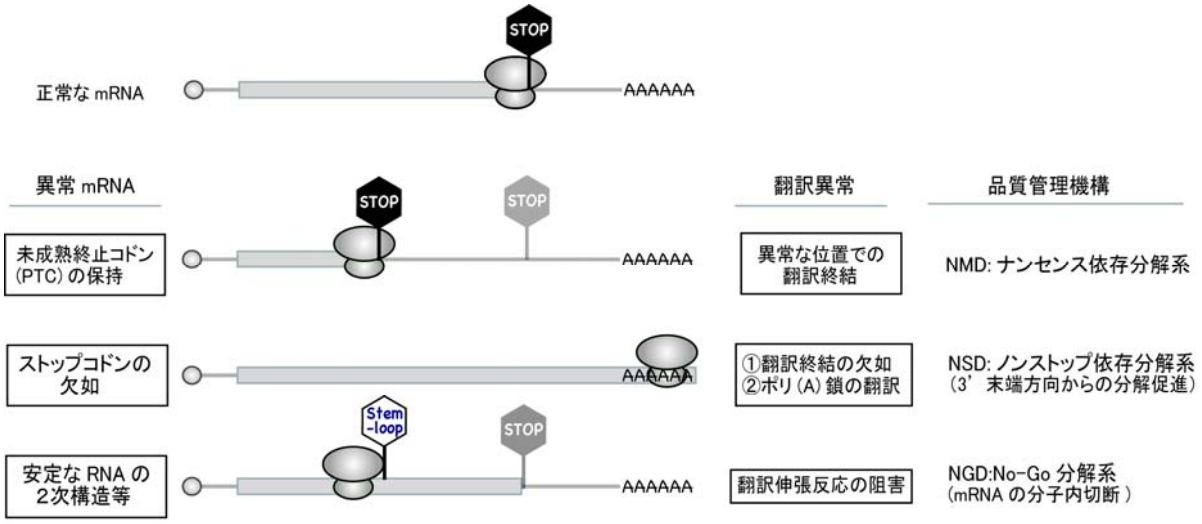


図2　真核生物における mRNA 品質管理機構
ナンセンス変異を持った mRNA は、NMD（nonsense-mediated decay；ナンセンス変異依存分解系）と呼ばれる特異的分解系によって速やかに分解される。また終止コドンを持たない異常 mRNA は、NSD（nonstop decay；ノンストップ分解系）によって分解される。また翻訳伸長阻害に伴って mRNA の分子内切断 NGD（No-Go Decay）が引き起こされる。

終止コドンの位置が異常である mRNA として、最も極端なケースは終止コドン自体を含まない mRNA である。最近真核生物におけるノンストップ mRNA 特異的な分解系 NSD（nonstop decay；ノンストップ分解系）が発見された。我々は、ノンストップ mRNA の翻訳と分解について解析し、ノンストップ mRNA 由来の翻訳産物が非常に低いレベルに抑制されることを最近明らかにした。また、リボソームの動態を解析することにより、リボソームが mRNA の 3' 端で停滞する結果、ノンストップ mRNA の翻訳効率が顕著に低下することを明らかにした。この品質管理機構における翻訳開始以降の段階での新たな制御機構の分子メカニズムを明らかにすることを目標に解析を行った。

4．研究成果

1．代謝ストレスに応答した遺伝子発現制御と新規機能性RNAの探索。

解糖系遺伝子を始めとする多数の代謝系変異株の作成ならびに確認と、アレイを用いた網羅的な翻訳効率の解析条件を確立した。アレイによって候補として挙げられた遺伝子について、網羅的なポリソーム解析を行い、ポリソーム中の mRNA の分布が変化するかについての解析を行い、候補遺伝子を探索した。代謝遺伝子欠損変異株における遺伝子発現制御については、翻訳制御に関する新たな知見は得られなかったため、mRNA 品質管理機構等の発現制御機構と解糖系などの代謝経路との関係の解明が今後の課題である。

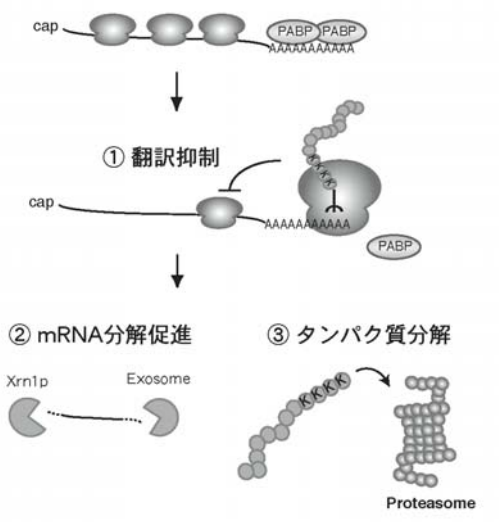
2．遺伝子発現の正確性を保証する品質管理機構の解析。

現在明らかになっている mRNA 品質管理機構は、リボームによって翻訳終結の異常を認識し、mRNA の分解を促進する機構である。例えば、ナンセンス変異を持った mRNA は、NMD（nonsense-mediated decay；ナンセンス変異依存分解系）と呼ばれる特異的分解系によ

って速やかに分解される。また終止コドンを持たない異常 mRNA は、NSD（nonstop decay；ノンストップ分解系）によって分解される。また翻訳伸長阻害に伴って mRNA の分子内切断が引き起こされる。しかしながら、細胞内に存在する様々な異常 mRNA 由来の遺伝子産物の発現抑制機構の全体像は明らかでない。特に、異常な mRNA の翻訳抑制機構や異常タンパク質の安定性制御の役割は全く明らかでなかった。我々は、遺伝子発現の正確性を保証する品質管理機構の全体像を明らかにする目的で、代表的な異常 mRNA であるノンストップ mRNA とナンセンス変異をもつ mRNA における翻訳抑制と異常タンパク質分解機構についても解析を行った。

【結果】

ノンストップmRNAにおける翻訳抑制と異常タンパク質分解機構について解析を行った結果、通常翻訳されないポリ(A)鎖が翻訳され、１）合成中のポリリジンとリボソームとの相互作用による翻訳アレスト（一時停止）と、２)プロテアソームによる異常タンパク質の速やかな分解、を見いだした（論文２）。この結果は、**ポリ(A)鎖の翻訳自体が、多段階での発現抑制機構を作動させ、品質管理機構において必須な役割を果たす**ことを初めて明確に示し、真核生物のmRNAの普遍的な修飾であるポリ(A)鎖が、翻訳開始とmRNA安定性制御に加えて、品質管理機構にも重要な役割を果たすことを世界に先駆けて明らかにした。



ノンストップmRNA品質管理機構におけるポリ(A)鎖の新たな役割

【研究の意義と波及効果】

（１）ポリ(A)鎖の新しい役割の発見

ポリ(A)鎖は真核生物のmRNAの普遍的な修飾であり、ポリ(A)結合因子(PABP)を介して、１）翻訳開始の促進と、２）mRNA 安定化に極めて重要な役割を果たすことは広く知られている。この研究により、正常なmRNAでは決して翻訳されることがないポリ(A)鎖が、終止コドンを持たない異常mRNAのみで翻訳されることで、翻訳伸張阻害とタンパク質の分解が起こり、ポリ(A)鎖の翻訳自体が発現抑制を引き起こす品質管理機構として働くことが明確に示された。ポリ(A)鎖の新しい機能を明らかにした点で、独創性の高い研究であると考えられる。

（２）品質管理機構の新しい機構の発見

遺伝子発現の正確性を保証するmRNA品質管理機構の解析は、世界的にもmRNA分解のみが解析されてきた。異常タンパク質の認識と分解機構の解明を目的とした本研究は、mRNA品質管理機構に全く新しい視点をもたらした。さらに翻訳中の遺伝子産物の異常を認識し、積極的に分解する機構の分子実体が明らかになったことは、品質管理機構にとどまらず、遺伝子発現制御機構全体の理解に大きな影響を与えたものと考えられる。

（３）新生ポリペプチド鎖による翻訳伸長制御の普遍性

さらにポリ(A)鎖由来の連続したリジン残基のみでなく連続したアルギニン残基によっても翻訳アレストが引き起こされることが明らかとなり、塩基性新生ポリペプチド鎖の持つ正の電荷とリボソームトンネルを形成するリボソーマルRNAの負の電荷の間の静電的相互作用による翻訳抑制機構が示唆された。以上の結果は、限定された例のみが報告されている合成途中の新生ポリペプチド鎖とリボソームトンネル（合成途中の新生ポ

リペプチド鎖が通るリボソーム中のトンネル）との相互作用による翻訳制御が普遍的であることを強く示唆する点で、遺伝子発現制御研究全体に大きな影響を与えるものと考える。

５．自己評価

正確な遺伝子発現を保証し、異常な RNA とタンパク質を速やかに代謝する品質管理システムに関して、独自の視点から新たな知見を得たと考える。品質管理機構の解析は、ヒトの遺伝病の主要な原因変異であるナンセンス変異が原因で引き起こされる遺伝病の治療法開発に直結しており、今後さらに解析を進めたい。これらの新しい品質管理の分子機構の解明は、治療薬開発の基盤であるが、ほとんど明らかに出来ておらず、今後の大きな課題である。また、mRNA 品質管理機構に対する細胞内代謝環境の影響に関する研究が不足しており今後の課題である。

６．研究総括の見解

遺伝子産物の品質管理や分解機構に関する進捗が見られ、non-stop RNA 産生抑制、ポリ塩基性アミノ酸による翻訳抑制、プロテアソーム系での異常タンパク質の処理のメカニズムを明らかにした。翻訳段階での異常タンパク質、mRNA の分解・制御の成果は高く評価できる。ただし、当初の計画の代謝産物と mRNA との直接的作用による転写制御に関しては、殆ど進展は見られなかった。今後は代謝の機能制御という視点からの研究を推進することを意識して欲しい。

７．主な論文等

（A）さきがけの個人研究者が主導で得られた成果

（1）論文（原著論文）発表　＊Corresponding author

1. Ito-Harashima, S., Kuroha, K., Tatematsu, T. and Inada, T.* Translation of poly(A) tail plays crucial roles in nonstop mRNA surveillance via translation repression and protein destabilization by proteasome in yeast. ***Genes Dev.*** **21**: 519-524. (2007)
2. Dimitrova, LN., Kuroha, K., Tatematsu, T. and Inada, T.* Nascent Peptide-dependent Translation Arrest Leads to Not4p-mediated Protein Degradation by the Proteasome. ***J. Biol. Chem***. in press
3. Kuroha, K., Horiguchi, N., Aiba, H. and Inada, T.* Analysis of nonstop mRNA translation in the absence of tmRNA in *E. coli*. ***Genes to Cells.*** in press

（2）特許

なし

（3）著書

1. 稲田利文「mRNA の品質管理機構」
   化学と生物 44:589-595. (2006)
2. 稲田利文「正常と異常を識別する品質管理機構」
   蛋白質核酸酵素増刊『遺伝暗号解読 40 周年』51:842-843. (2006)
3. 稲田利文「mRNA 品質管理機構における poly(A)鎖の新たな役割」
   蛋白質核酸酵素増刊『RNA と生命』51: 2549-2555. (2006)
4. 稲田利文、塩見春彦編
   無敵のバイオテクニカルシリーズ『RNA 実験ノート』羊土社 (2008)
5. 稲田利文「mRNA の動態とプロテアソーム」
   実験医学増刊『タンパク質の分解機構』26: 237-241. (2008)

（4）招待講演

1. Toshifumi Inada 「Novel roles of a poly(A) tail in nonstop mRNA surveillance system」
RNA2006Izu 平成18年12月
2. 稲田利文 「mRNA 品質管理と翻訳制御」
日本分子生物学会シンポジウム 平成18年12月
3. 稲田利文 「mRNA 品質管理と疾患」
Wako ワークショップ 平成19年11月
4. 稲田利文 「遺伝子発現の正解性を保証する mRNA 品質管理機構」
酵母合同シンポジウム 2008 酵母の挑戦 平成20年6月

（5）学会発表（国際）

1. 平成19年 6月 The Ribosomoe, MA, USA
2. 平成19年 9月 Translational Control, EMBL, Germany

（6）ワークショップ・学会オーガナイザー

1. 平成18年12月 日本分子生物学会シンポジウム「mRNA 品質管理と翻訳制御」
2. 平成19年 7月 第9回日本 RNA 学会年会（名古屋）
3. 平成20年10月 日英最先端シンポジウム(UK-JFOS2008)
4. 平成20年12月 日本分子生物学会シンポジウム「拡大する品質管理の概念」

（B）その他の主な成果

（1）論文（原著論文）発表

1. Nukazuka, A., Fujisawa, H., Inada, T., Oda, Y. and Takagi, S. Semaphorin controls epidermal morphogenesis by stimulating mRNA translation via eIF2a in *Caenorhabditis elegans*. ***Genes Dev.*** **22**: 1025-1036. (2008)
2. Endo, A., Matsumoto, M., Inada, T., Yamamoto, A., Nakayama, K., Kitamura, N. and Komada, M. Nucleolar structure and function are regulated by the deubiquitinating enzyme USP36. ***J. Cell Sci.*** **122**: 678-686. (2009)

研究課題別評価書

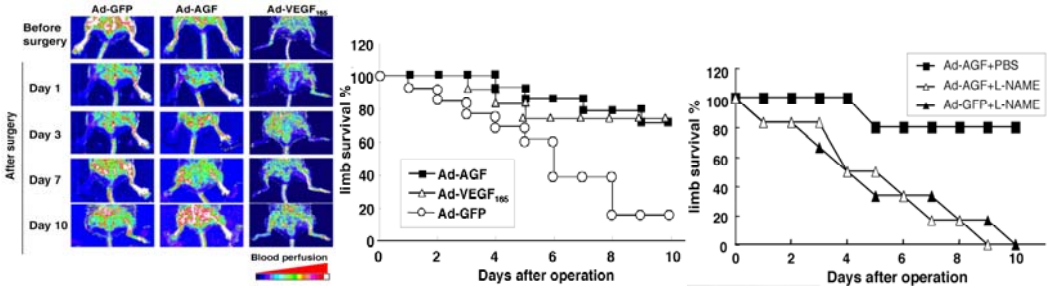
1．研究課題名
「肥満症」におけるエネルギー・脂質代謝制御と血管新生制御との連関の解明

2．氏名
尾池　雄一

3．研究のねらい
我が国では 65 歳以上の人口が 4 人に 1 人という超高齢化時代に突入し、社会が『健康長寿』を真剣に考えないといけない状況になっている。一方でインスリン抵抗性、糖代謝異常、脂質代謝異常、高血圧などが一個体に集積し階層的、相互的に連関しながら重症化し、『健康長寿』を脅かす心筋梗塞や脳卒中などの動脈硬化性疾患に発展する危険性が高まる「メタボリックシンドローム」という病態の増加が注目されている。実際に、厚生労働省の 2004 年国民健康・栄養調査では 40 歳から 74 歳までの男性の 2 人に 1 人、女性の 5 人に1人がメタボリックシンドロームに該当し、その予備軍を含めると 1960 万人にのぼることが明らかにされている。このように生活習慣（ライフスタイル）が関連する疾患が増加の一途をたどり、今後益々心筋梗塞、脳血管疾患、がんなど健康長寿のみならず生命を脅かす疾患の増加が予想される。それ故、生活習慣が関連する疾患に対する有効な予防、早期診断、治療法の開発が医学的のみならず社会的にも重要な意義を持つ。生活習慣に依存した様々なストレス刺激に対して生体の恒常性を維持させ、疾患の発症を阻止しようとする生体防御システムが我々生物には備わっているが、詳細な機構解明は未だ十分ではない。近年、組織特異的遺伝子欠損マウスが自在に作製されるようになり、生体防御システムにおける個別の臓器の役割が明らかにされてきた。その成果により、脂肪組織、骨格筋、肝臓、消化管、脳、血管、血球細胞などが様々な生理活性物質を分泌して遠隔臓器、細胞の機能を調節する複雑かつ巧妙な臓器間クロストークによる生体防御システムが注目されている。そのために分子、細胞レベルで得られた成果を個体レベルで統合して理解することの重要性が求められている。近年、我々の研究によりAngptlファミリー分子は個体レベルで様々な遠隔臓器を標的とし、多彩な機能を示すことが明らかになってきており、臓器間クロストークによる生体防御シグナルシステムで重要な役割が示唆されている。本研究では、メタボリックシンドロームの基盤病態の一つである「内臓脂肪型肥満」を研究対象に発症、進展への生体防御機構に Angptl ファミリー分子がどのように関わっているかを解明し新規治療法、診断法開発を目指した基礎研究を行う。さらに生体の脂質蓄積・分解・燃焼・消費システムにおける恒常性維持の分子基盤解明、さらには新しい代謝過程の発見、新しい生理活性代謝産物の同定、血管新生制御とエネルギー、脂質代謝制御の連関解明、新規創薬標的の特定を目指す。

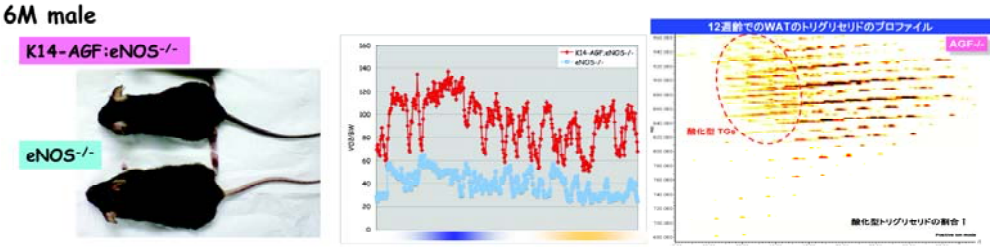
4．研究成果
<u>AGF/Angptl6 に関する成果</u>
（背景）我々はこれまでに AGF/Angptl6 の遺伝子欠損マウスが内臓脂肪型肥満を呈し、脂質代謝異常、糖代謝異常などメタボリックシンドロームの表現型を示すこと、逆に AGF/Angptl6 を CAG プロモーター制御下に発現亢進させたマウスが高脂肪食負荷による肥満病態形成及び脂質代謝異常、糖代謝異常に対して抑制的な表現型を示すことより、AGF/Angptl6 が抗肥満、抗糖尿病因子であることを明らかにしてきた(Oike et al. Nat Med 2005)。一方で AGF/Angptl6 を K14 プロモーター制御下に皮膚表皮の基底層細胞に発現亢進させたマウスでは、皮下で健常な血管の新生が亢進していることを明らかにしてきた(Oike et al. PNAS 2003, Blood 2004)。本研究では、AGF/Angptl6 を研究対象として、血管新生制御とエネルギー代謝制御の連関解明を目的とし研究を行った。
（結果）AGF/Angptl6 によって誘導される血管は健常であることを示してきたが、マウス下肢虚血モデルを用いた研究により、虚血部にアデノウイルスを用いて AGF タンパクを発現させると、強

力な血管新生因子である VEGF と遜色なく、新規な血管新生と側副血行路の形成が促進されることにより、血流が回復し虚血によっておこる下肢の自然切断のイベントが著明に減少することを見出し、血管再生医療への血管新生因子としての AGF/Angptl6 の機能を明らかにした。また、血管内皮細胞を用いた in vitro の実験で AGF/Angptl6 によって ERK-eNOS 経路が活性化すること、ERK の活性化を阻害することにより、AGF/Angptl6 によって促進される血管内皮細胞の走化性がみられなくなることを見出した。またマウスにおいて NO 阻害剤の L-NAME 投与や eNOS の遺伝子欠損マウスでは、AGF/Angptl6 によるマウス下肢虚血の改善が減弱することより、AGF/Angptl6 の血管新生因子としての機能には ERK-eNOS-NO 経路の活性化が重要であることを見出した(ATVB 2008)。



骨格筋などのインスリン感受性臓器で末梢血管が増えることは、抗肥満、抗インスリン抵抗性に対して有利であることが知られているため、AGF/Angptl6 の血管新生作用と代謝作用(抗肥満作用)は何らかのリンクは存在していると考えているが、興味深いことに eNOS KO マウスでは AGF/Angptl6 の血管新生作用が減弱していたが、AGF/Angptl6 の抗肥満作用はみられたため、基本的には AGF/Angptl6 の代謝作用(抗肥満作用)は、血管新生に非依存的にも有することを見出した(論文準備中)。

メタボローム解析により、AGF/Angptl6 の遺伝子欠損マウスが示す内臓脂肪型肥満の特徴としては、①肝臓のリン脂質及びトリグリセリドにおいて、SFA や MUFA に対して PUFA の比率が減少する。②PUFA の中でも EPA はアラキドン酸や DHA に比べて比率が高い。③内臓脂肪のトリグリセリドの解析で、酸化型トリグリセリドが蓄積されており、肥満発症時にこれが増加傾向にあることなどが判明した。肥満の脂肪組織における脂質成分及び酸化状態の改善が内臓脂肪型肥満に伴うメタボリックシンドロームの新規治療標的になる可能性が考えられた。



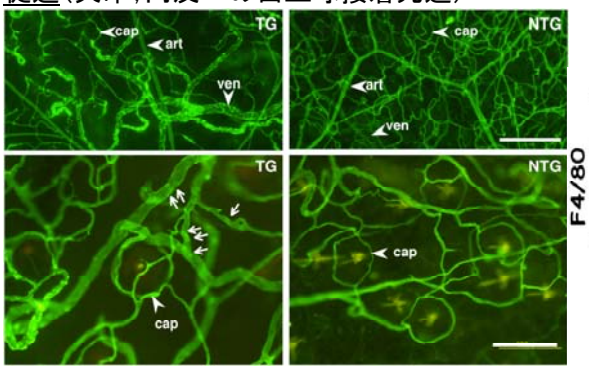
<u>Angptl2 に関する成果</u>

(背景)動脈硬化病変部の動脈壁内の微小血管である Vasa vasorum で血管の増加(血管新生)や、動脈硬化巣にマクロファージの浸潤など血管壁リモデリングが進み動脈硬化病態が進展すると考えられている。近年、肥満形成時の脂肪組織でも、脂肪細胞から分泌されるアディポサイトカインや増殖因子により脂肪組織へのマクロファージの浸潤、活性化が惹起され、さらにはそのマクロファージから分泌される炎症性サイトカインにより脂肪細胞が活性化され、さらに脂肪からの病態を促進させるアディポサイトカインの分泌を増大させるといった悪循環が脂肪細胞の形態学的変化である脂肪組織リモデリングを引き起こし、インスリン抵抗性増悪などのメタボリックシンドローム病態進展に関わることが解明されつつある。多くの研究から MCP-1(CCL2)がこれらの病態形成に関与していることがわかった一方で、その寄与率は予想より低く、我々が予想していたよりもっと複雑な分子機構が存在することが明らかとなってきた。そこで、我々は強力な血球及び血管内皮細胞走化因子である VEGF シグナルの本病態における役割をこれらの遺伝子欠損マ

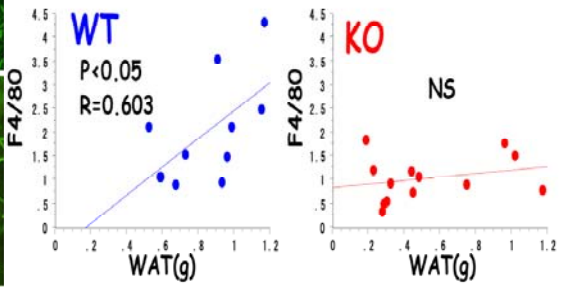
ウスを用いて、病態を作製して検討したが、VEGF シグナルの病態形成への寄与はほとんどなかった。つまり、MCP-1 や VEGF 以外の鍵因子の探索・同定が重要であることが明らかとなってきた。我々はこれまでにゼブラフィッシュを用いた解析により、Angptl2 が血管新生因子であることを明らかにしてきた(Kubota, Oike et al. PNAS 2005)。その後、マウスやヒトでは、Angptl2 が脂肪組織、血管平滑筋に豊富に発現していることを見出し、内臓脂肪型肥満や動脈硬化の発症、進展へ Angptl2 がどのように関わっているかを解明し新規治療法、診断法開発を目指した基礎研究を行った。

（結果）Angptl2 のメタボリックシンドローム病態との関連を検討するため、ANGPTL2 の ELISA システムを作製し、正常ボランティア（無疾病群）、糖尿病患者群、虚血性心疾患患者群で血中の ANGPTL2 濃度を測定した。血中 ANGPTL2 濃度は、無疾病群では BMI、インスリン値、CRP 値と正相関がみられ、糖尿病患者では、内臓脂肪面積、インスリン抵抗性、CRP 値と正相関がみられ、インスリン感受性とは負の相関が見られることを見出している。また、糖尿病患者や虚血性心疾患患者では、血中濃度が上昇していた。また、ヒトにおいて内科的治療により糖尿病、内臓脂肪肥満状態が改善されたときに、血中 ANGPTL2 濃度もパラレルに変動していた。これらから、Angptl2 がメタボリックシンドローム病態と深く関連していることが明らかとなった。次に、Angptl2 がこれらの病態の結果なのか原因なのかを血管内皮細胞、マクロファージ細胞を用いた in vitro の実験系、及び実験マウスを用いて検討を行った。Angptl2 は血管内皮細胞、マクロファージ細胞に対してその走化性を促進させること、特に血管内皮細胞を用いた解析で、その分子機構として Rac を活性化させることがわかった。また、NF-κB を活性化させ炎症シグナルも活性化にも寄与していた。また、Angptl2 を K14 プロモーター制御下に皮膚表皮の基底層細胞に発現亢進させたマウスでは、皮下で炎症性変化を伴った病的な血管形成の促進が認められた。また、Angptl2 の遺伝子改変マウスを用いた研究では、Angptl2 の発現抑制により肥満形成に伴って認められる脂肪組織へのマクロファージの浸潤抑制、炎症性血管の減少などにより脂肪組織の炎症が抑制され肥満に伴う脂肪組織再構築（リモデリング）が軽減されており、インスリン抵抗性などの糖代謝異常が改善されていた。反対に脂肪組織に過剰に発現させた場合、肥満がない状態でも病的血管の誘導などで炎症性変化を惹起し、インスリン抵抗性の原因になりうることを見出した。

Angptl2 シグナルは血管に炎症性変化を促進（矢印；内皮への白血球接着亢進）



Angptl2 抑制は肥満脂肪組織へのマクロファージ浸潤を抑制



以上の結果より、Angptl2 シグナルが炎症性変化を伴う血管新生、骨髄由来の炎症性細胞の浸潤促進を介して肥満に伴う脂肪組織リモデリング促進に寄与していることが明らかとなり、Angptl2 シグナルを減弱させることが肥満に伴う脂肪組織の炎症、糖代謝異常に対する新たな治療戦略になることを見出した（論文投稿中）。

その他の成果

脂肪組織リモデリングにおける骨髄由来細胞の役割を明らかにするために、以前我々が血管内皮細胞の分化に重要であることを報告している（J Biol Chem 2004）。細胞周期関連分子のたんぱく質分解を介して細胞周期を抑制的に制御するユビキチンリガーゼ Fbxw7 の骨髄細胞特異的遺伝子欠損マウスを作製・解析した。結果として、高脂肪食負荷による肥満、メタボリックシンドロームになりにくいことを見出し脂肪組織リモデリングにおける骨髄由来細胞の重要性を認めた（未

発表）。予想外に Fbxw7 骨髄細胞特異的欠損マウスは、約半数が T 細胞性急性リンパ性白血病(T-ALL)を発症したため脂肪組織リモデリングにおける骨髄由来細胞の役割に関する詳細な解析は行えなかった。このマウスの白血病細胞は、正常マウスに移植すると同様の白血病を繰り返しひきおこすことから、その中に白血病幹細胞が存在することが示唆された。さらに日本人のＴ細胞性急性リンパ性白血病(T-ALL)の 44 症例中 8 症例で FBXW7 の遺伝子変異が存在することも確認し、Fbxw7 が造血幹細胞を細胞周期の静止期にとどめ、過剰な細胞分裂に伴う造血幹細胞の枯渇を未然に防いでいるとともに白血病発症を阻止する安全弁としても機能していることを報告した（Genes Dev 2008）。

５．自己評価

期間中にメタボリックシンドロームの基盤病態の一つである「内臓脂肪型肥満」を研究対象に発症、進展に Angptl ファミリー分子、特に Angptl2 と Angptl6 がどのように関わっているかに関する研究はかなり解明され、新規治療法、診断法開発に大きく近づけたと評価している。一方、メタボローム的手法を用いた研究に関しては、新しい代謝過程の発見、新しい生理活性代謝産物の同定までは至らなかったが、内臓脂肪のトリグリセリドの解析で、内臓脂肪蓄積型肥満による全身性インスリン抵抗性のみならず、脂肪萎縮による全身性インスリン抵抗性を示すマウスでも、酸化型トリグリセリドが脂肪細胞に蓄積されており、病態に応じて増加傾向にあることを明らかにし、全身性インスリン抵抗性病態における脂肪組織の質的変化を初めて明らかにし、脂質成分及び酸化状態の改善が内臓脂肪型肥満に伴うメタボリックシンドロームの新規治療標的になる可能性を見出した点は評価できると考えている。全体として期間中の論文発表に関するアクテビィティーが低かったことが反省点であるが、これらの成果はこれから数年以内で全て論文化できる予定である。

６．研究総括の見解

脂肪細胞への脂質の蓄積、血管新生の観点から、Angptl2, 6 について新たな知見を得た。血管新生に関与するタンパク質のノックアウトマウスを用いてメタボリックシンドロームを解析するという当初計画は意外性もあり、面白いものであった。Angptl2 が、脂肪細胞に発現して炎症性反応を介してインスリン抵抗性に深く関与していることを、トランスジェニックマウス、ノックアウトマウス等を用いて解明したことは高く評価できる。未発表のものも多い様であるが、目的通り多くの肥満関連、糖代謝関連、炎症関連のパラメーターを網羅的に解析し様々な成果が上がっている。新たな展開の材料も見出しており、生活習慣病の病因解明、治療法の開発に大きく貢献できると期待される。

７．主な論文等

（A）さきがけの個人研究者が主導で得られた成果

（1）論文（原著論文）発表　＊ Corresponding author

1. Morisada, T., Kubota, Y., Urano, T., Suda, T. & Oike, Y.*: Angiopoietins and Angiopoietin-like proteins in angiogenesis. **Endothelium** 13:71-79 2006
2. Hato T, Tabata M, & Oike Y.*: The role of angiopoietin-like proteins (Angptls) in angiogenesis and metabolism. **Trends Cardiovasc Med.** 18 6-14 2008
3. Urano, T., Ito, Y., Akao, M., Sawa, T., Miyata, K., Tabata, M., Morisada, T., Hato, T., Kadomatsu, T., Yano, T., Yasunaga, K., Shibata, R., Murohara, T., Akaike, T., Tanihara, H., Suda, T. & Oike Y.*: Angiopoietin-related growth factor enhances blood flow via activation of the ERK1/2-eNOS-NO pathway in a mouse hind-limb ischemia model. **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 28 827-834 2008
4. Matsuoka S, Oike Y. *, Onoyama I, Iwama A, Arai F, Takubo K, Mashimo Y, Oguro H, Nitta E, Ito K, Miyamoto K, Yoshiwara H, Hosokawa K, Nakamura Y, Gomei Y, Iwasaki H, Hayashi Y, Matsuzaki Y, Nakayama K, Ikeda Y, Hata A, Chiba S, Nakayama KI, & Suda, T.: Fbxw7 acts as a critical fail-safe against premature loss of hematopoietic stem cells and

development of T-ALL.. **Genes Dev** 22 986-991 2008

（2）特許

研究期間累積件数：1 件

1. 発　明　者：尾池雄一、岩瀬弘敬、片渕秀隆、馬場秀夫、小川久雄、安東由喜雄、宮下かずや

発明の名称：生活習慣病及び／又は癌の診断剤

出　願　人：熊本大学

出　願　日：平成 20 年 11 月 6 日（未公開）

出願番号：特願 2008－285006

（B）その他の主な成果

なし

研究課題別評価書

1．研究課題名

気孔開閉と細胞膜 H^+-ATPase の活性調節機構の解明

2．氏名

木下　俊則

3．研究のねらい

植物は光合成を行うことによって、農作物を提供するのみならず、二酸化炭素を吸収し、酸素を産出して地球環境を整えている。植物の表皮に存在する気孔は、光合成に必要な二酸化炭素の唯一の取り入れ口で、変転する環境に応答して開閉を行うことによってガス交換を調節しており、この微少な器官が無ければ陸上植物の生存は不可能に近い。気孔を構成する一対の孔辺細胞は、太陽光、特にシグナルとして作用する青色光域の光に応答して気孔を開口させ、植物と大気間のガス交換を促進し、乾燥ストレスに曝されると、植物ホルモン・アブシジン酸に応答して気孔を閉鎖し、植物体からの水分損失を防ぐ。このように気孔は、青色光による開口、アブシジン酸による閉鎖という明確な応答を示すことから、植物の環境応答のシグナル伝達機構の研究材料として大変優れた特質を有している

これまでの研究により、私たちは、青色光による気孔開口では、植物特有の青色光受容体フォトトロピンが青色光受容体として機能しており（Kinoshita et al., Nature 2001, Ueno et al. Plant Cell Physiol. 2005）、フォトトロピンに受容された光シグナルは、細胞内シグナル伝達を経て、細胞膜のプロトンポンプ、細胞膜H^+-ATPaseC末端のスレオニン残基のリン酸化とリン酸化C末端への14-3-3 蛋白質の結合により活性化し、気孔開口の駆動力を形成していることを明らかにした（Kinoshita and Shimazaki, EMBO J. 1999, Kinoshita and Shimazaki, Plant Cell Physiol. 2002）。しかしながら、フォトトロピンから細胞膜H^+-ATPase活性化に至るシグナル伝達の詳細については不明の点が多い。本研究では、気孔開閉のシグナル伝達、特に、フォトトロピンにより受容された光シグナルがどのようにしてH^+-ATPaseの活性化を引き起こしているのか、さらに、様々な物質輸送に関わる植物のマスター酵素、細胞膜H^+-ATPaseの活性調節機構について、生理・生化学的、分子遺伝学的手法を駆使し、分子レベルで解明することを目的として研究を進めてきた。

4．研究成果

①青色光シグナル伝達機構の解析

青色光受容体フォトトロピンは青色光を受容すると自己リン酸化し、下流へシグナルを伝え、様々な生理応答を引き起こしていることが知られているが、自己リン酸化部位とその意義については不明であった。そこで、モデル植物であるシロイヌナズナの黄化胚軸からフォトトロピンのアイソフォームの一つであるphot1を免疫沈降により精製し、質量分析による自己リン酸化部位の同定を行った。その結果、8カ所のセリンまたはスレオニンの自己リン酸化部位を同定した。さらに、これら自己リン酸化されるセリンまたはスレオニンをアラニンに置換した形質転換植物を作製し、表現型の観察を行った結果、キナーゼドメイン中の 849 番目と 851 番目のセリンをアラニンに置換した形質転換体においては、気孔開口のみならず、光屈性、葉緑体光定位運動や葉の横伸展が抑制され、これら2つのセリンの自己リン酸化が phot1 のシグナル伝達に必須であることが明らかとなった。一方、他の自己リン酸化部位は phot1 による青色光反応に影響が見られなかった（Inoue et al. PNAS 2008）。

また、これまでの研究により、青色光による気孔開口過程の青色光受容体フォトトロピンから細胞膜H^+-ATPaseに至るシグナル伝達において、タイプ1プロテインホスファターゼ（PP1）が正の制御因子として働くことが、阻害剤を用いた薬理学的研究により示されていた（Kinoshita and Shimazaki, Plant Cell Physiol. 1997）。そこで、孔辺細胞に発現するPP1 の触媒サブユニットをクローニングし、PP1 触媒サブユニットをパーティクルガンによる一過的発現系によりソラマメ孔辺

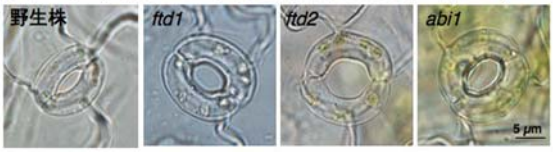
細胞に過剰発現させ、気孔開度の観察を行った。その結果、アミノ酸置換によりホスファターゼ活性をなくした不活性型PP1 触媒サブユニットを孔辺細胞に一過的に過剰発現させると、青色光による気孔開口が阻害されることが明らかとなった。一方、細胞膜H^+-ATPaseを直接的に活性化するカビ毒素フシコクシンは、不活性型PP1 触媒サブユニットを発現させた孔辺細胞においても気孔開口を引き起こすことから、PP1 が青色光受容体フォトトロピンから細胞膜H^+-ATPaseに至る細胞内シグナル伝達においてポジティブレギュレーターとして関与していることが明確となった（Takemiya et al. PNAS 2006）。

②モデル植物シロイヌナズナを用いた気孔開度変異体の単離

気孔開閉のシグナル伝達に関わる未知のシグナル伝達因子を同定するために、気孔開度に依存した葉の重量変動、青色光受容体フォトトロピンが仲介する反応の一つである葉の横伸展等を指標にしたシロイヌナズナの気孔開度変異体のスクリーニングを網羅的に進めてきた。

葉の重量変動を指標にしたスクリーニングでは、これまでに約 1.3 万株のスクリーニングを行い、気孔が閉じている*std*変異体（slow transpiration in detached leaf）2 ラインと、気孔が顕著に開口している*ftd*変異体（fast transpiration in detached leaf）2 ラインを単離した。このうち、*ftd1*と名付けた変異体は、常に気孔が大きく開口しており、気孔を閉じさせる植物ホルモン・アブシジン酸に対して非感受性に表現型を示す新奇の変異体であった（図1）。そこで、マッピングによる原因遺伝子の同定を進めた結果、アブシジン酸との結合能からアブシジン酸受容体として報告されているMg-キラターゼHサブユニット（Nature 2006）に新奇のミスセンス変異を持っていることが明らかとなり、気孔の表現型からアブシジン酸受容体を単離した初めての例となった（投稿準備中）。

図１、単離した気孔開度変異体（*ftd1, ftd2*）

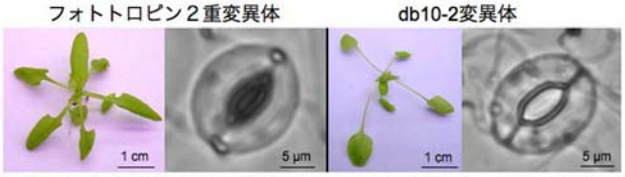


青色光照射下での典型的な気孔開度。*ftd*変異体では顕著に気孔が開口している。*abi1*：既知の気孔がよく開いた変異体。

また、*ftd1* 変異体同様に気孔が顕著に開口した*ftd2* 変異体も新奇の気孔開度変異体と考えられたため、現在マッピングによる原因遺伝子の同定を進めている。これまでのところ、第5染色体の下腕の 80 kbpの範囲に原因遺伝子が座乗していることがわかってきた。この*ftd2* 変異体は、アブシジン酸に応答した気孔閉鎖は見られることから、青色光受容体フォトトロピンから細胞膜H^+-ATPaseに至る気孔開口のシグナル伝達における抑制因子の新奇の突然変異体と考えている。

青色光受容体フォトトロピンが仲介する反応の一つである葉の横伸展を指標にしたスクリーニングでは、葉の横伸展と気孔開口に共通した抑制因子が単離されることが推定される。これまでに約 16 万株のスクリーニングを完了し、最終的に20株の気孔が顕著に開口し、葉が平らに伸展した変異体を単離した。これらのうち、db10-2 と名付けた変異体の孔辺細胞では、細胞膜H^+-ATPaseが常にリン酸化され活性化された状態にあるため気孔が顕著に開口した表現型を示すことが明らかとなり、原因遺伝子は青色光受容体フォトトロピンから細胞膜H^+-ATPaseに至る気孔開口のシグナル伝達における抑制因子であると推察された（図2）。そこで、マッピングによる原因遺伝子の同定を進めた結果、興味深いことに、花芽形成の抑制因子として機能することが知られている*ELF3*（*early flowering 3*）が原因遺伝子であることが明らかとなった（投稿準備中）。現在、花芽形成のシグナル伝達に関与する因子の気孔開口のシグナル伝達への関与について解析を進めている。

図２、 db10-2変異体における葉の形状と気孔開度



（左）フォトトロピン２重変異体では、葉は下向きにカールし、気孔は閉じている。
（右）単離した変異体では、葉が平らに横伸展し、かつ、気孔が顕著に開口している。

③細胞膜H^+−ATPaseの活性調節機構

これまでの孔辺細胞を用いた研究により、細胞膜H^+−ATPaseの活性化には、C末端のリン酸化と 14−3−3 蛋白質の結合が必須であることが明らかとなっているが、このリン酸化反応に関与するプロテインキナーゼやホスファターゼは未だ不明であり、これらの同定を目指して研究を進めてきた。まず、*in vitro*でのリン酸化反応系を確立し、解析を行った結果、ソラマメ孔辺細胞やシロイヌナズナ黄化芽生えにおいて、これらプロテインキナーゼやホスファターゼが、細胞膜H^+−ATPaseと同じ細胞膜に存在することが明らかとなった。また、プロテインキナーゼは一般的なキナーゼ阻害剤であるk−252aやスタウロスポリンに非感受性であること、ホスファターゼは、タイプ１/2Aホスファターゼの特異的阻害剤であるカリクリンAに非感受性であり、２価カチオンキレーターであるEDTAにより阻害される2価カチオン要求性のタイプ2Cプロテインホスファターゼ（PP2C）が関与していることを明らかにした（投稿準備中）。

次に、PP2Cの同定に向け、PP2C遺伝子の絞り込みを行った。シロイヌナズナには７６のPP2C遺伝子が存在するが、孔辺細胞では細胞膜H^+−ATPaseが他の細胞と比べ２０倍程度多く発現していることがわかっていたため、細胞膜H^+−ATPaseの脱リン酸化に関わるホスファターゼも発現も孔辺細胞に多いと考え、孔辺細胞で発現量の多い５つのPP2Cをマイクロアレイ解析によりピックアップした。現在、これら５つのPP2C遺伝子のクローニングを進めており、今後は、これらPP2Cの細胞膜H^+−ATPaseに対する脱リン酸化活性を測定し、PP2Cの同定を行う予定である。

また、細胞膜H^+−ATPaseを免疫沈降すると、キナーゼ活性は失われるが、細胞膜H^+−ATPaseを脱リン酸化するホスファターゼ活性は保持されていることも明らかとなった。細胞膜H^+−ATPaseの免疫沈降物の電気泳動による解析の結果、少なくとも９つの共同沈降蛋白質が存在することがわかったため、現在、PP2Cの同定を視野に入れ、細胞膜H^+−ATPaseと共同沈降する蛋白質の同定を質量分析により進めている。

④気孔孔辺細胞に特異的に発現する遺伝子の同定

気孔を構成する孔辺細胞は、気孔開閉という特有の細胞応答を行う細胞であり、孔辺細胞で特異的・顕著に発現する遺伝子は、気孔開閉に関与している可能性が高い。実際、これまでに気孔開閉に関与することが明らかとなっている細胞膜H^+−ATPase、内向き整流性カリウムチャネル、外向き整流性カリウムチャネル、アニオンチャネルなどの遺伝子は、葉肉細胞と比べ孔辺細胞において顕著に発現が高いことが知られている。そこで、孔辺細胞において特異的・顕著に発現する遺伝子を網羅的に同定することを目的として、マイクロアレイ解析とRT−PCR解析を行った。マイクロアレイ解析では、孔辺細胞プロトプラスト（GCP）と葉肉細胞プロトプラスト（MCP）由来のRNAを用いて解析を行い、GCPで特異的・顕著に発現する遺伝子について、GCP、MCPと根由来のRNAを用いたRT−PCRによる確認を行い、RT−PCRにおいてもGCP特異的・顕著に発現することが確認できた遺伝子を候補とした。その結果、マイクロアレイ解析によりこれまでに気孔開閉の関与が知られていない約２００の遺伝子がGCPにおいて特異的・顕著に発現することがわかり、現在、候補遺伝子のRT−PCRを順次進めている。これまでのところ、６０の候補遺伝子についてRT−PCRを行い、２０の遺伝子が、MCPや根にはほとんど発現が見られないが、GCPにおいて発現の見られることを確認している。これら遺伝子の中には、シグナル伝達への関与が推測される蛋白質リン酸化反応に関わる遺伝子や脂質代謝に関わる遺伝

子に加え、機能未知の遺伝子が含まれている。

今後は、これら遺伝子のノックアウト株や発現抑制株の表現型を観察し、気孔開閉に関与する遺伝子を同定したい。また、今回孔辺細胞で特異的に発現することが明らかとなった遺伝子は、様々な発現量で孔辺細胞に発現しているので、これらのプロモーターは、今後、孔辺細胞特異的に目的遺伝子を発現する研究に有用であると考えている。

5. 自己評価

本研究では、「気孔開閉と細胞膜H^+-ATPaseの活性調節機構の解明」を目的として進めてきたが、変異体のスクリーニングにより、気孔開口に関わる新奇変異体と気孔閉鎖に関わる新奇変異体の両者を複数単離し、気孔開閉の分子機構の解明に大きく貢献することができたと考えている。また、青色光受容体フォトトロピンの青色光反応の詳細な分子機構を明らかにし、さらに、シグナル伝達の過程に関与する因子を同定し、青色光シグナル伝達の分子機構を部分的に明確にすることができた。細胞膜H^+-ATPaseの活性調節機構については、活性調節に関わる因子の生化学的性質を明らかにした。以上の研究により、当初の目的に対する多くの知見が得られたと考えている。これらの中には、論文として成果を公表できたものと投稿準備中のものが含まれるが、投稿準備中の研究に関しては、出来るだけ早く公表できるようにしたい。

6. 研究総括の見解

気孔の開閉に至る青色光受容体フォトトロピンからのシグナル伝達機構を詳細に解析し、気孔開閉と細胞膜プロトンATPアーゼ (H^+-ATPase)の関係を、変異体を使って明らかにした。目的とした、気孔開閉の分子機構の解明、H^+-ATPaseの活性調節機構については、達成できたと考えられる。新規因子の同定、機能解明など高い成果を挙げ、この領域の研究をリードしていると認められる。今後、立てた仮説の実証を進め気孔開閉の全体像を明らかにし、さらに食糧生産性の向上、新しい農作物の作出に関する研究も行って欲しい。

7. 主な論文等

(A)さきがけの個人研究者が主導で得られた成果

(1)論文(原著論文)発表

1. Takemiya A, Kinoshita T, Asanuma M, Shimazaki K. (2006) Protein phosphatase 1 positively regulates stomatal opening in response to blue light in *Vicia faba*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 103, 13549-13554.
2. Inoue S, Kinoshita T, Matsumoto M, Nakayama K, Doi M, Shimazaki K. (2008) Blue light-induced autophoshporylation of phototropin is a primary step for signaling. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 105, 5626-5631.

(2)特許

なし

(3)受賞

1. 平成 19 年度文部科学大臣表彰若手科学者賞 (2007 年 4 月 17 日)

(4)総説

1. Shimazaki K, Doi M, Assmann SM, Kinoshita T (2007) Light regulation of stomatal movement. **Annual Review of Plant Biology** 58, 219-247.

(5)招待講演

1. 木下俊則「気孔開閉のシグナル伝達機構の解析」特定領域研究 LOV 光受容体による植物の運動制御機構 第 2 回若手ワークショップ、2008 年 12 月 18 日、京都

（6）学会発表

1. 木下俊則、小野奈津子、井上晋一郎、島崎研一郎「青色光受容体フォトトロピン 2 重変異体からの気孔開度変異体の単離」日本植物生理学会、2008 年 3 月 20 日、札幌
2. Toshinori Kinoshita「Stomatal opening and regulation of the plasma membrane H^+-ATPase」2008 Japan-Switzerland Workshop, Oct. 8, 2008, Nara Japan
3. 木下俊則、島崎研一郎「青色光による気孔開口と細胞膜H^+-ATPaseの活性調節機構」日本植物学会第 72 回大会シンポジウム、2008 年 9 月 25 日、高知

（B）その他の主な成果

（1）論文（原著論文）発表

1. Takahashi Y, Kinoshita T, Shimazaki K. (2007) Protein phosphorylation and binding of a 14-3-3 protein in *Vicia* guard cells in response to ABA. **Plant & Cell Physiology** 48, 1182-1191.
2. Inoue S, Kinoshita T, Takemiya A, Doi M, Shimazaki K. (2008) Leaf positioning of Arabidopsis in response to blue light. **Molecular Plant** 1, 15-26.

研究課題別評価書

1．研究課題名
　プリオン凝集体の代謝産物に着目した細胞機能制御

2．氏名
　田中　元雅

3．研究のねらい
　プリオン病はこれまでに有効な治療薬のない神経難病であり、その治療・予防法の開発は、近年のウシからヒトへのプリオン感染からも、急務となっている。プリオン病は蛋白質が感染源であるという点でユニークであるが、同じプリオン蛋白質から異なる疾患症状を示す“プリオン株”が存在することが、その大きな特徴である。最近、プリオン感染がプリオン蛋白質の凝集体（アミロイド）に由来することがほぼ証明され、そのアミロイド構造が異なる表現型を示すプリオン株の物理的基盤になっていることが明らかになった。しかし、どのようなアミロイドの構造的、物理的特徴がプリオン株の異なる表現型を決定しているのかは、ほとんど理解されていない。同様に、同じモノマー状態のプリオン蛋白質から、どのようにして異なるアミロイド構造ができ、ひいては異なる表現型を導き出すのか、その分子機構の詳細には不明な点が多い。
　本研究では、プリオン病におけるこれら重要な問題に対して、酵母プリオン[*PSI* $^{+}$]の系を用いる。プリオン化した酵母[*PSI*$^{+}$]は、酵母プリオン蛋白質Sup35 の凝集形成によって生じ、ヒトのプリオン病と同様に、異なるプリオン株が出現する。その多様なプリオン株は、[*PSI* $^{+}$]の系では、白からピンク色の異なる色表現型で表される。酵母プリオンは扱いやすく、遺伝学的な解析も容易なこともあり、近年、プリオン研究の発展に多大な貢献をしてきている。本研究では、プリオンにおける重要な特徴の一つである“プリオン株”に着目し、酵母プリオンSup35 モノマーから、凝集初期核（オリゴマー）、アミロイド、酵母表現型のグローバルな相関関係の全容解明を目指す。本研究成果は、プリオン病など蛋白質のミスフォールディングや凝集体形成が関わる他の神経変性疾患の分子機序解明や新規な治療法の開発にもつながると期待できる。

4．研究成果
　これまでの研究から、Sup35 を 4 度で重合させたSc4 アミロイドは酵母のプリオン感染によって白色の[*PSI*$^{+}$]表現型を、一方で、37 度で重合させたSc37 アミロイドはピンク色の[*PSI*$^{+}$]表現型を導くことが明らかになったが、その分子機構は不明である。白い表現型は、細胞内におけるSup35 凝集体がより多いことを、一方で、ピンク色の表現型は、Sup35 凝集体が存在はしているが凝集量がより少ないことを示している。したがって、Sc4 アミロイドをもつ[*PSI* $^{+}$]酵母内おいて、そのSup35 アミロイド（凝集）量がより多くなる何らかの分子機構が存在すると考えられる。まず、これらプリオン株の解析から、異なるSup35 アミロイド構造が異なる[*PSI* $^{+}$]表現型を導く分子基盤の解明を目指した。
　プリオンの伝搬は、一般的に、プリオン凝集体の成長と分割という二つの基本的な過程の繰り返しによると考えられている。したがって、プリオン凝集体の成長速度と分割速度が細胞内プリオンの凝集量を制御するパラメーターになる。Sc4 アミロイドを感染させた白い[*PSI* $^{+}$]酵母では、Sup35 凝集体量がより多いことから、単純に、Sc4 アミロイドではアミロイドの成長速度がSc37 アミロイドより速く、そのために細胞内のSup35 凝集量が多くなり、白い表現型を示している可能性を検証した。
　そこで、*in vitro*の系において、Sc4 アミロイドとSc37 アミロイドの成長速度を原子間力顕微鏡を用いて測定した。その結果、予想とは反して、Sc4 アミロイドの成長速度はSc37 アミロイドに比べて約 1/5 ほどに低下していることが明らかになった。この結果では、Sc4 アミロイドは弱い表現型（ピンク色）を示すはずであるが、実際はそうではない。そこで次に、細胞表現型を決定しうる二つめのパラメーターであると考えられる、アミロイドの分割速度に着目した。まず、*in vitro*におけるア

ミロイドの堅さ測定から、Sc4 アミロイドはSc37 アミロイドに比べて脆弱である知見を得た。この結果はSc4 アミロイドの分割速度がより速いことを示唆している。そこで、酵母内において、プリオン粒子の分割速度を測定したところ、Sc4 プリオン粒子はSc37 プリオン粒子より速く分割されることが明らかになった。また、それが事実であれば、Sc4 プリオン粒子の細胞内におけるサイズはSc37 プリオン粒子よりも小さいはずである。そこで、プリオン粒子の大きさをスクロース勾配実験やアガロースゲルを用いた電気泳動法で調べたところ、Sc4 プリオンの粒子はSc37 のプリオン粒子に比べてより小さいことが明らかになった。したがって、脆いSc4 アミロイドは容易にシャペロンなどによって分断され、より多くの種を生じ、それがより多くのSup35 モノマーをアミロイドへ取り込むことができるためにSup35 の凝集体量が増え、それによって白い[*PSI* $^{+}$]表現型が出現することが明らかになった。

次に、上記の実験結果が理論的に妥当かどうかを調べるために、異なる表現型を示すプリオン株出現の解析モデルを構築した。プリオン凝集体の成長速度、分割速度、細胞の成長に伴うプリオン凝集体の希釈効果、Sup35 蛋白質の翻訳速度を考慮に入れ、定常状態における方程式からSup35 アミロイドの成長および分割速度と細胞表現型の相関図を得た。この相関図によると、Sup35 の凝集量つまり細胞表現型は、Sup35 アミロイドの成長速度と分割速度でよく表されることを示している。そこで、実験で得られた結果がこの相関図に当てはまるかを調べた。Sc4 アミロイドは Sc37 アミロイドに比べて成長速度は遅いものの、分割速度が Sc37 より速くなったために、ピンク色の Sc37 から白色になったと考えられた。このように、解析モデルは実験結果と非常に良い一致を示した。

次に、同じモノマー蛋白質が異なる Sc4 および Sc37 アミロイドという異なるアミロイド構造をもたらす分子機構について調べた。まず、Sup35 蛋白質のモノマー状態の構造の差異を分光学的に調べたが、温度に関わらず、不規則構造に富んでいることが明らかになった。しかしながら、フォールディングの度合いが 4 度と 37 度で異なることが、抗体との反応性の差違から示唆された。一方、異なる温度下において、Sup35 の会合状態に変化があるかをX線小角散乱法などで調べたところ、4 度の Sup35 蛋白質は 10-20 量体からなるオリゴマーを形成していることが判明した。興味深いことに、そのオリゴマー形成は温度に依存し、37 度ではモノマーのみが存在すること、そのオリゴマー形成は温度に対して可逆的であることが明らかになった（図 1a）。また、そのオリゴマー形成の有無の境界となる温度を調べたところ、それは 9-10 度であった。このオリゴマーがプリオン株の表現型に最終的にどのような影響を与えるかを明らかにするために、Sup35 を 4〜37 度の様々な温度でアミロイド形成させ、そのアミロイドを酵母へプリオン感染させて、出現するプリオン株の表現型を解析した。その結果、9 度以下で作成したアミロイドは主に白色の強いプリオン株を引き出し、10 度以上で作成したアミロイドは主にピンク色の弱いプリオン株を引き出した。したがって、オリゴマー形成が、白色を示す強いプリオン株の出現と相関があることが明らかになった（図 1b）。

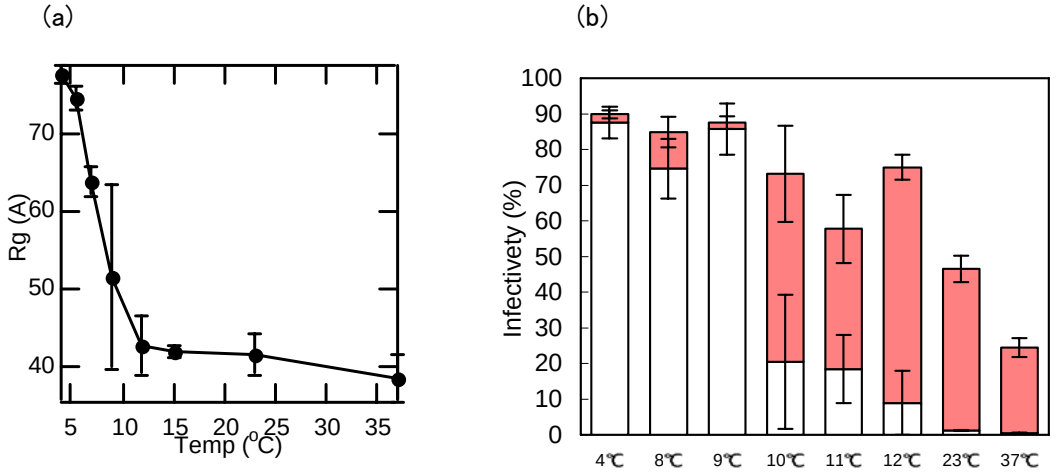


図 1 オリゴマー形成は強いプリオン株をもたらす
(a)オリゴマー形成の温度依存性 (b)プリオン株表現型のアミロイド形成温度依存性 白、ピンク色はそれぞれ強い、弱いプリオン株の割合を示す。

実際に、オリゴマーの直径は 10-15nmであり、それは最終的に生成するアミロイドの直径(4-5nm)と一致しないことも上記のことを支持する。また、このオリゴマーは、アミロイドに見られるようなβシート構造はほとんど含まず、モノマーに類似して、不規則構造に富んでいることが分光学的な解析から明らかになった。このことは、このオリゴマーが、βシート構造に富んでおり、アミロイドの直接的な前駆体としての“プロトフィブリル”とは異なる性質をもっていることを示している。以上から、Sup35 オリゴマーは、強い[*PSI* $^{+}$]表現型を出すアミロイド形成途中において、その核形成に必須であり、その後のアミロイド伸長反応の足場として働いていることが明らかになった。
Sc4 アミロイドでは、Sup35 の最初の 35 アミノ酸がそのアミロイドのコアになっていることが報告されている。そこで、Sc4 アミロイド形成前に生成するオリゴマーも、そのような最初の 35 アミノ酸がコアになっているか検討した。アミノ酸を部位特異的にプロリンへ置換した Sup35 変異体を作成し、そのオリゴマー形成能をX線小角散乱の強度を測定することで、オリゴマー形成に関わるアミノ酸領域を調べた。その結果、最初の 35 アミノ酸だけでなく、最初の 120 アミノ酸ほどの幅広いアミノ酸領域(プリオンドメイン)がオリゴマー形成に深く関与していることが明らかになった(図 2)。

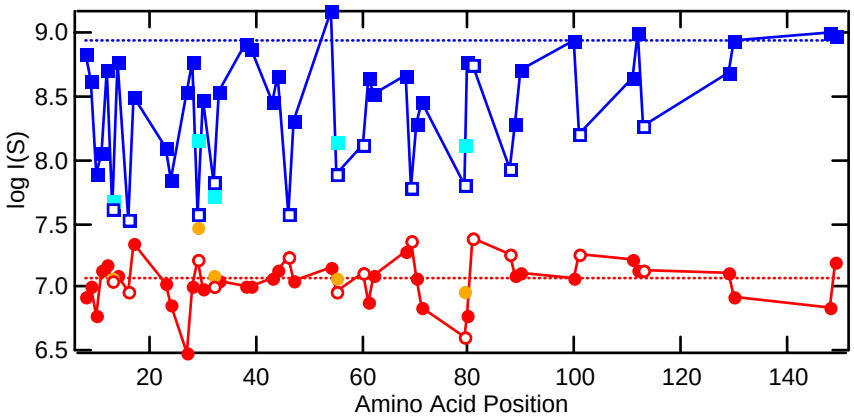


図 2 オリゴマー形成に関わるアミノ酸の同定
X, Y 軸はそれぞれX線小角散乱強度、プロリンまたはロイシンへ置換したアミノ酸の位置を示す。青、赤はそれぞれ、4 度、37 度での測定結果を示す。シアン、オレンジは、それぞれ 4 度、37 度でのロイシンへの変異体の散乱強度を表している。青、赤の点線は、それぞれ、野生型 Sup35 の 4 度、37 度での散乱強度を示す。

一方、プリオンドメインにおいてトリプトファンを導入した変異体はオリゴマー形成を促進させたことから、芳香環のオリゴマー形成への役割が明らかになった。また、オリゴマーを増大させる変異体は、そのアミロイドを酵母へプリオン感染させると強いプリオン株を引き出し、オリゴマーを減少させる変異体は、そのアミロイドが弱いプリオン株をもたらしたことから、オリゴマー形成とプリオン株表現型との強い相関が再確認された。さらに、オリゴマーのコアとなるアミノ酸領域を調べた。その結果、アミロイドのコア領域(1-35 アミノ酸)とは全く異なり、80-110 番目のアミノ酸領域がコアになることが明らかになった。つまり、一見、アミロイド内には存在しないような非天然な相互作用を巧妙に利用することで、オリゴマー形成を促進させ、それによって、アミロイド生成を効率よく進行させていることが明らかになった。つまり、本結果は、Sup35 が核形成とアミロイドの伸長反応に必要なアミノ酸領域を蛋白質内でうまく使い分けることで、効率的にアミロイドを形成させていることを示している。

一方、Sc37 アミロイドを形成する場合は、上記に述べたように、4 度で観測されたようなオリゴマーは形成されず、Sup35 のモノマー蛋白質が構造変化し、それが“核”になってアミロイドが形成さ

れていくことが示唆された。このように、37 度では、Sc4 アミロイドとは全く異なる経路でアミロイドが生成することが明らかになった。

以上、本研究によって、酵母プリオン[*PSI* $^{+}$]の系を用いて、異なる表現型を示すプリオン株に着目することで、Sup35 モノマーから、凝集初期核（オリゴマー）、アミロイド、[*PSI* $^{+}$]表現型のグローバルな相関関係の詳細を明らかにすることができた。このように、モノマー蛋白質の微妙な構造の違いが凝集初期核や凝集経路を大きく変え、異なるアミロイド構造、ひいては異なる[*PSI*$^{+}$]表現型を引き出す基礎になっていることが明らかになった。したがって、モノマー蛋白質や凝集初期核の性質や構造が最終的な病理的結果へもたらす影響は非常に大きく、逆に、これらの制御が、原因蛋白質のアミロイド形成を伴う神経変性疾患の治療戦略を考える上で非常に重要であることが示唆された。

5. 自己評価

本研究での目標としていたプリオン株の物理的基盤の解明がほぼ達成できたという点では評価できると考えている。これらの研究の論文発表はもとより、今後、本研究で得られた成果をさらに大きく飛躍させることで、本研究成果の評価をさらに高めたいと考えている。

6. 研究総括の見解

プリオンの分子レベルの形態観察、構造解析と毒性との相関を解析して神経疾患発症機構の解明に迫る計画は、モデル系でしか出来ない様々な利点を持っている。研究結果を Nature に発表するなど、質が高い成果を出した。プリオン様モデル蛋白質の微妙な構造の違いが凝集初期核や凝集経路を変え、さらに、異なるアミロイド構造をもたらすことを示したことは非常に高く評価できる。しかし、酵母での毒性と神経毒性との相関を議論するには系が離れており、酵母で得られた結果が哺乳類のプリオンにどのように還元できるのかについて、今後研究を発展させて欲しい。

7. 主な論文等

（A）さきがけの個人研究者が主導で得られた成果

（1）論文（原著論文）発表

1. Tanaka M, Collins SR, Toyama BH, Weissman JS, The physical basis of how prion conformations determine strain phenotypes. Nature, 442, 585-589 (2006).

（2）特許

なし

（3）受賞

1. 平成 20 年度文部科学大臣表彰若手科学者賞 （2008 年 4 月 15 日）

（4）招待講演

1. 田中元雅、The physical basis of strain diversity in the yeast prion [*PSI*$^{+}$] system、第 40 回日本発生生物学会・第 59 回日本細胞生物学会合同大会、2007.5.28.
2. 田中元雅、酵母プリオンを用いたプリオン株出現の分子機構解明、第 8 回日本蛋白質科学会、2008.6.11.
3. 田中元雅、Molecular basis of prion strain phenotype in yeast prion、第 31 回日本分子生物学会・第 81 回日本生化学会合同大会、2008.12.10.

（B）その他の主な成果

（1）論文（原著論文）発表

1. Krzewska J, Tanaka M, Burston SG, Melki R, Biochemical and Functional Analysis of the Assembly of Full-length Sup35p and Its Prion-forming Domain. J. Biol. Chem., 282,

1679-1686 (2007).

研究課題別評価書

1．研究課題名
細胞膜脂質による分裂軸方向の制御とがん化に伴う変化

2．氏名
豊島　文子

3．研究のねらい
生物が卵からその固有の形を作っていく過程では、個々の細胞が一定の軸方向に沿って分裂する現象が重要な役割を果たす。最近、細胞が分裂する方向、すなわち「細胞分裂軸」の異常は腫瘍形成や多発性嚢胞腎病の発症に関わることが明らかとなってきており、細胞分裂軸を制御する分子機構の解明は、これらの病態発症のメカニズムを理解する上でも重要な研究課題となっている。細胞分裂の軸方向は、紡錘体と細胞表層に存在する因子との相互作用で決まる。これまでに、この分子機構には微小管やモータータンパク質などの細胞骨格関連因子が必須であることが、多くのモデル生物で明らかとなってきた。しかしながら、細胞膜脂質の役割についてはほとんど解析がなされていなかった。本研究では、細胞膜の脂質成分が分裂軸方向を制御する分子メカニズムを解明することを目指す。

4．研究成果
細胞の分裂方向は、分裂期の紡錘体軸によって決まる。紡錘体軸の方向を決める要因としては、「細胞の形」「細胞極性」「細胞—細胞間接着」が知られてきた。我々は、哺乳類培養細胞において、紡錘体軸の方向を決める第４の要因として、インテグリンを介した「細胞—基質間接着」の存在を明らかにした。すなわち、HeLa 細胞などの通常の接着細胞をフィブロネクチンなどの細胞外基質の上で培養すると、紡錘体が基質面に対して平行に配置されることを見出し（図１）、かつこの現象は、細胞一細胞間接着や重力には非依存的であり、インテグリンを介した細胞一基質間接着に依存することを明らかにした(図１)。更に、現象にはアクチン細胞骨格と微小管が必要であることを明らかにした（EMBO J 26, 1487-1498, 2007）。
次に、インテグリンがどのような因子を介して紡錘体軸を制御するかについて研究を行った。インテグリンの下流で活性化することが知られていた、幾つかの細胞内シグナル伝達因子に注目して調べた結果、ホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ（PI3 キナーゼ）が分裂期にインテグリン依存的に活性化することを見出した。また、PI3 キナーゼが作る脂質であるホスファチジルイノシトール 3,4,5-三リン酸 PI(3,4,5)P3 が、紡錘体を基質面に対して平行に配置するのに必須であることを見いだした。更に、PI(3,4,5)P3 は、分裂期の細胞の中央表層に局在し、微小管モータータンパク質であるダイニン・ダイナクチン複合体を中央表層に濃縮させることが分かった。PI(3,4,5)P3 が無い状態、あるいは、過剰にある状態にすると、ダイニン・ダイナクチン複合体が細胞表層全体に広がり、細胞表層上のいろいろな場所から紡錘体を引っ張るため、紡錘体がＺ軸に沿って回転する（図２)。このことから、通常の状態では、PI(3,4,5)P3 がダイニン・ダイナクチン複合体を中央表層に濃縮させる結果、紡錘体を引っ張る力が細胞の中央領域で平衡化するため、紡錘体が基質面に対して平行に配置されることが示された(図３)。これらの結果は、細胞膜の脂質成分が、細胞分裂の方向を制御する機能があることを、世界で初めて明らかにしたものである(Dev. Cell 13, 769-811, 2007)。
これらの研究から、HeLa 細胞における紡錘体軸制御機構には、アクチン細胞骨格と PI(3,4,5)P3 が共に必要であることが分かった。しかしながら、アクチン細胞骨格と PI(3,4,5)P3 の協調的制御をおこなう分子の実態は不明である。そこで、低分子量 G タンパク質がこの分子機構を担う可能性について検討を行った。その結果、PI3 キナーゼの分裂期での活性化は、RhoA や Rac1 には非依存的であるが、Cdc42 に依存的であることを見出した。また、Cdc42 は HeLa 細胞における正常な紡錘体軸制御に必要であることが明らかとなった。しかしながら、Cdc42 を阻害した

場合と、PI3K を阻害した場合では、分裂期のアクチン細胞骨格への影響が違うことが分った。すなわち、PI3K を阻害した細胞ではアクチン細胞骨格への影響は認められなかったが、Cdc42 を阻害した細胞では、顕著な阻害が認められた。このことは、Cdc42 は PI3K- PI(3,4,5)P3 経路とは別の経路で、分裂期でのアクチンの再編成を制御しており、この二つの経路が共に紡錘体軸を制御することを示唆している。そこで、Cdc42 の下流で分裂期でのアクチン骨格の再編成を制御し、紡錘体軸を制御する因子の探索を試みた。その結果、p21-activated kinase (PAK2)が、この因子であることを突き止めた。この分子機構には、PAK2 のキナーゼ活性は必要ではなく、PAK2 は Cdc42 および Rac1 の GEF であるβPix への結合を介して、分裂期におけるアクチン細胞骨格の再編成と紡錘体軸制御を行うことを明らかにした。以上のことから、Cdc42 は PI3K- PI(3,4,5)P3 経路と PAK2/βPix 経路の二つの経路を介して、紡錘体軸を制御することが明らかとなった（図４）(submitted)。

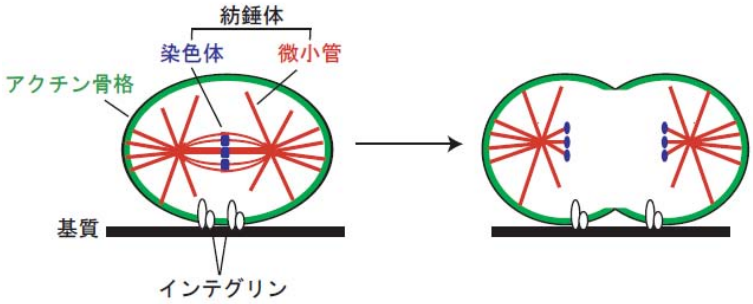


図１　接着細胞におけるインテグリン依存的な紡錘体軸制御機構

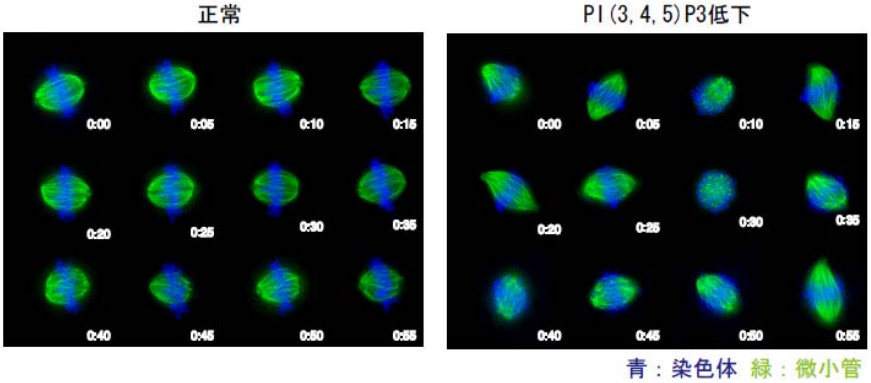


図２　PI(3,4,5)P3 の量が低下すると、紡錘体は z 軸に沿って回転運動する。

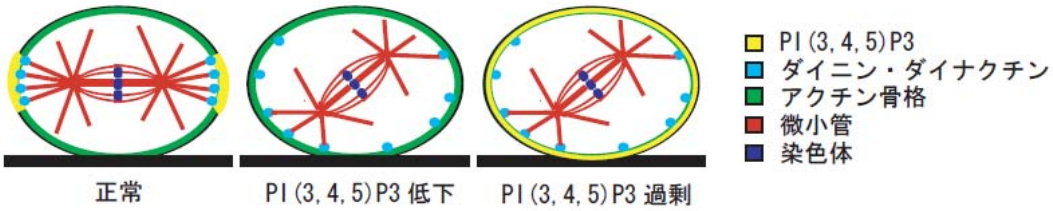


図３　PI(3,4,5)P3 依存的な紡錘体の方向制御のモデル図

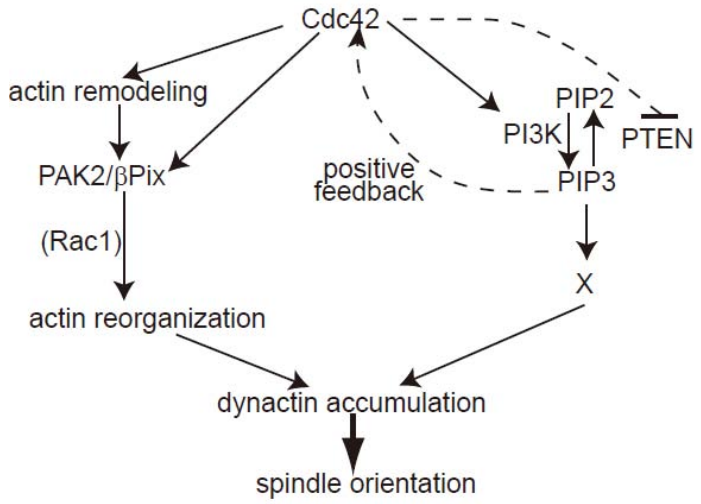


図4　HeLa 細胞の紡錘体軸を制御するシグナル伝達経路

5．自己評価

本研究により、哺乳類培養細胞で分裂軸を基質接着面平行に配置する分子機構が存在することが明らかとなり、さらに細胞膜脂質の PI(3,4,5)P3 が重要な役割を果たすことが見出された。この研究は、細胞分裂軸の制御機構に細胞膜脂質が関与することを初めて示したものである。これまで細胞分裂軸の研究は、細胞骨格関連タンパク質を中心に進められてきたが、本研究により脂質の役割とダイナミクスを解析することが、その分子メカニズムを明らかにする上で必須であることが分かった。これまで細胞分裂時の脂質ダイナミクスはほとんど研究されておらず、その制御機構と生理的役割は不明な点が多い。本研究により、分裂と脂質の関連が明らかとなり、新しい研究領域の発端を提示することが出来た。

6．研究総括の見解

細胞分裂時の紡錘体軸形成を制御する因子、メカニズムを明らかにした。Cdc42 依存的に、PAK2/betaPix-Rac1 を介するアクチン再形成、PI3K を介するダイナクチン集積の経路が示された。細胞膜の脂質成分が分裂軸方向を制御する分子メカニズムの解明を目的とした、基本的なメカニズムの解明についての成果は十分達成できたと考える。細胞の分裂軸方向の制御をリン脂質とインテグリンの関与という視点で解明したことは大いに評価できる。本研究ではがん細胞を用いての解析であるので、今後、増殖が制御されている正常細胞における機序との相異などの解明により、さらに大きな展開が期待できる。

7．主な論文等

（A）さきがけの個人研究者が主導で得られた成果

（1）論文（原著論文）発表　＊Corresponding author

1. Toyoshima, F.*, Matsumura, S., Morimoto, H., Mitsushima, M., and Nishida, E. PtdIns(3,4,5)P3 regulates spindle orientation in adherent cells. *Dev. Cell*, 13: 796-811 (2007).
2. Toyoshima, F.*, and Nishida, E. Integrin-mediated adhesion orients the spindle parallel to the substratum in an EB1- and myosin X-dependent manner. *EMBO J.*, 26: 1487-1498 (2007).
3. Mitsushima, M., Toyoshima, F.*, and Nishida, E. Dual role of Cdc42 in spindle orientation control in adherent cells. *Mol. Cell Biol.*, in press.

（2）特許
なし

（3）総説　＊Corresponding author

1. Toyoshima, F.*, and Nishida, E. Spindle orientation in animal cell mitosis: roles of integrin in the control of spindle axis. *J. Cell Physiol.*, 213: 407-411 (2007).
2. 豊島文子: イノシトールリン脂質による細胞分裂軸の制御機構　*蛋白質 核酸 酵素* 第53巻 9月号 pp1345-1350 2008.

（4）招待講演

1. Toyoshima, F. Integrin-mediated cell adhesion orients the mitotic spindle parallel to the cell-substrate adhesion plane. *Cell Regulations in Division and Arrest Workshop*, Okinawa, Japan, March, 2006.
2. Toyoshima, F. PtdIns(3,4,5)P3 plays a key role in the control of spindle orientation in mammalian cultured cells. *2nd International Workshop on Cell Regulations in Division and Arrest*, Okinawa, Japan, March, 2007.

（B）その他の主な成果

（1）論文（原著論文）発表

1. Matsumura, S., Toyoshima, F., and Nishida, E. Plk1 facilitates chromosome alignment during prophase through BubR1. *J. Biol. Chem.*, 282: 15217-15227 (2007).

研究課題別評価書

1．研究課題名
　耐病性植物作出を目指した植物細胞死の制御系の解明

2．氏名
　初谷　紀幸

3．研究のねらい
　これからの農業では、植物が本来もつ自己防衛能力を強化した耐病性作物の分子育種が注目されている。その技術基盤として、病原体感染に対する植物の生体防御機構を分子レベルで解明することが緊急かつ必須の課題である。植物は病原体の感染から身を守るために様々な防御系を進化させてきた。そのなかでも、汎用性の高い防御戦略が、病原体の認識に基づいて誘導される「過敏感細胞死（hypersensitive cell death）」である。過敏感細胞死は感染を受けた細胞が自らを犠牲にして自発的に死ぬことによって、病原体を封じ込め、周囲の健全細胞への感染拡大を抑制する防御機構である。私はこれまでに植物に固有の液胞が細胞の生死を決定する重要なオルガネラであることを明らかにしてきた。本さきがけ研究では、細胞死実行過程の液胞に着目し、過敏感細胞死の分子機構を解明することによって、植物独自の細胞死システムを提唱することを目指した。植物が獲得した生体防御戦略を理解し、細胞死における液胞の機能を制御することで病害抵抗性作物の分子育種に役立てようとするものである。

4．研究成果
　高等植物は、発生の過程や感染防御の過程で一部の細胞を死に至らせる能力を備えている。この植物の細胞死のシステムは動物のシステムとは大きく異なる。動物では老廃細胞は貪食細胞マクロファージによって補食・消化される。しかし、植物はマクロファージをもたないため、細胞が死に向かう際には細胞内成分を自力で分解しなければならない。私はこの際の速やかな分解に液胞が重要な役割を果たしていると考えている。プログラムされた細胞死は植物細胞と動物細胞の両方にとって基本的な生理プロセスであり、両者には共通した分子機構が働いているとする研究も多数ある。例えば、動物の細胞死の実行因子として知られる Caspase 活性は、植物の細胞死の局面でも検出され、特に Caspase-1 と Caspase-3 の阻害剤で細胞死が抑制されるという報告もある。しかしながら，国内外の多くの研究者の努力にも関わらず、Caspase 活性をもつ分子は長い間不明であった。私はこれまでに逆遺伝学的解析などから Caspase-1 活性を示す酵素の実体が液胞プロセシング酵素(VPE, Vacuolar Processing Enzyme)であることを見出した。また VPE は病原ウイルス(*Tobacco mosaic virus*)の感染に対する植物の防御機構を制御することを証明した。VPE はウイルス感染にともない液胞の崩壊を導くことによって細胞死を引き起こす。
　本さきがけ研究では、シロイヌナズナにおいて植物病原細菌 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*) strain DC3000 (*avrRpm1*)を接種した際に誘導される防御発現系をモデルとして、植物の耐病性に重要な役割を担っている「過敏感細胞死」について研究を進めた。*Pseudomonas* 属菌による農作物被害は世界的にも深刻で、既発生国および未発生国ともにその防除には多大の関心が寄せられており、研究対象として興味深い。

植物の Caspase-3 様活性を示す酵素の実体
　シロイヌナズナの葉に *Pst* DC3000 (*avrRpm1*)を接種すると、12 時間以内に過敏感細胞死が誘導され、感染細胞は死に至る。この過敏感細胞死がプロテアソームの阻害剤で抑制されることを見出した。さらに、Caspase 様の活性をもつプロテアーゼが関与する可能性について調べるために Caspase-1 および Caspase-3 の阻害剤を処理したところ、Caspase-3 阻害剤で過敏感細胞死が抑制された。この結果は、シロイヌナズナの過敏感細胞死に Caspase-3 様の活性を持つプロテアーゼが関与することを示唆する。

シロイヌナズナにおける Caspase-3 様活性およびプロテアソーム活性を測定した。Caspase-3 様活性はプロテアソーム阻害剤で抑制され、一方、プロテアソーム活性は Caspase-3 阻害剤で抑制された。この結果はプロテアソームに Caspase-3 様活性があることを示唆している。プロテアソームは 3 つのサブユニットβ1、β 2、β 5 にプロテアーゼ活性をもつ。シロイヌナズナのβ 1 タンパク質は *PBA1* 遺伝子によってコードされている。内在性の PBA1 の発現を抑制したシロイヌナズナ（*ipba1*）を作製し、プロテアソーム活性と Caspase-3 様活性を比較した。*ipba1* 植物ではプロテアソーム活性とともに Caspase-3 様活性が低下しており、両者の活性は相関関係を示した。この結果はシロイヌナズナにおける Caspase-3 様活性を示す酵素の実体がプロテアソームの PBA1 であることを示している。

プロテアソームは過敏感細胞死を制御する

過敏感細胞死におけるプロテアソームの関与について調べるために *ipba1* 植物に *Pst* DC3000（*avrRpm1*）を接種した。野生型のシロイヌナズナに *Pst* DC3000（*avrRpm1*）を接種すると、感染を受けた細胞は過敏感細胞死を起こし、図1に示すように死細胞がトリパンブルーで青色に染色される。一方、*ipba1* 植物では過敏感細胞死が起こらず（図1）、病原細菌が増殖していた。この結果は明らかにプロテアソームが過敏感細胞死において重要な役割を担っていることを示している。

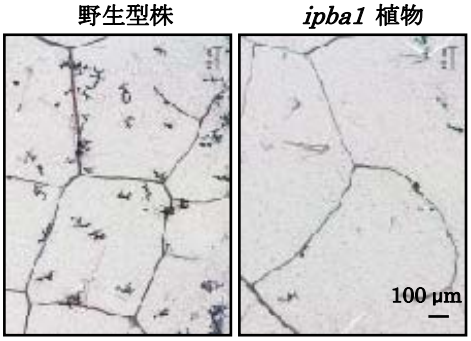


図１．病原細菌 *Pst.* DC3000（*avrRpm1*）を接種した葉のトリパンブルー染色。野生型株では染色された死細胞が観察されるが、*ipba1* 植物では染まった細胞が観察されず、細胞死が抑制されている。

過敏感細胞死におけるプロテアソームの役割

過敏感細胞死を起こしつつある細胞の形態変化を電子顕微鏡レベルで観察した。接種後 3 時間目の細胞に注目すると、液胞膜が細胞膜と融合することが分かった（図2）。このような膜融合は、*ipba1* 植物の細胞では観察されなかった。

液胞膜と細胞膜の融合をリアルタイムで観察するために、細胞膜を GFP-PIP2a で可視化し、液胞膜を RFP-Vam3 で可視化した。感染後3時間目の細胞において、細胞膜 GFP-PIP2a（緑）と液胞膜を RFP-Vam3（赤）が融合し、オレンジ色（緑+赤）になった。この膜融合は、プロテアソームの阻害剤を添加することによって抑制された。膜融合により液胞内の分解酵素群が細胞外に放出されることが期待できる。これについて検討するために、液胞局在型の GFP を導入したシロイヌナズナに *Pst* DC3000（*avrRpm1*）を接種し、GFP 蛍光の挙動を観察した。その結果、接種後約 4.5 時間で、GFP 蛍光が細胞外で検出された。この GFP 蛍光の漏出はプロテアソームの阻害剤を添加することによって阻害された。これら結果は、プロテアソームが植物の細胞死の過程において液胞膜と細胞膜の融合に関わっており、膜融合の結果、液胞内の分解酵素群が細胞外に放出されることを示唆する。

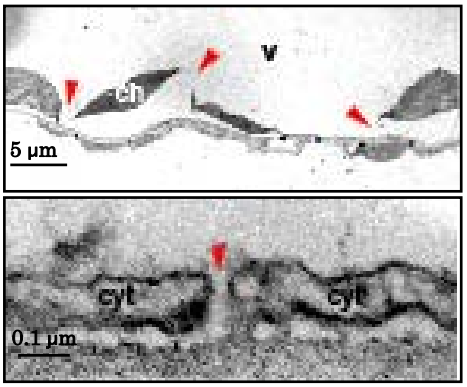


図２．病原細菌 *Pst.* DC3000（*avrRpm1*）を接種した葉の電子顕微鏡写真。矢頭で示す部分で液胞膜と細胞膜が融合している。

プロテアソーム/Caspase-3 様活性が制御する過敏感細胞死は、VPE/Caspase-1 様活性が関わる細胞死機構と同様に液胞が重要な役割を担っていた。しかし、植物の感染防御戦術という視点から見ると、液胞の役割は大きく異なっていた。植物は病原体の生活様式（細菌は植物の細胞間隙で増殖する、一方ウイルスは植物細胞内に侵入し増殖する。）の違いによって全く異なる感染防御戦術（細胞死メカニズム）を発動することが示唆された。プロテアソーム/Caspase-3 様活性が制御する防御戦術の大きな特徴は、液胞膜が細胞膜と融合することである。これによって、植物細胞は液胞内の分解酵素や抗菌物質を細胞外に放出し、細胞間隙に潜む細菌を攻撃すると同時に自らも死に至る。一方、これら抗菌物質はウイルスに対する効果は低く、ウイルスは細菌と

異なり細胞内に侵入し増殖する。VPE/Caspase-1 様活性を介する防御戦術では、液胞の崩壊を導くことによって素早く感染細胞を死に至らせることが特徴である。この戦術は、細胞内で増殖するウイルスにとっては効果的である。これまではウイルス、細菌、カビすべての病原体に対して植物は共通した防御戦術を発動していていると信じられてきた。ところが、本研究成果は、病原体それぞれの生活様式に応じた防御戦術を植物は進化させてきたことを示唆している。

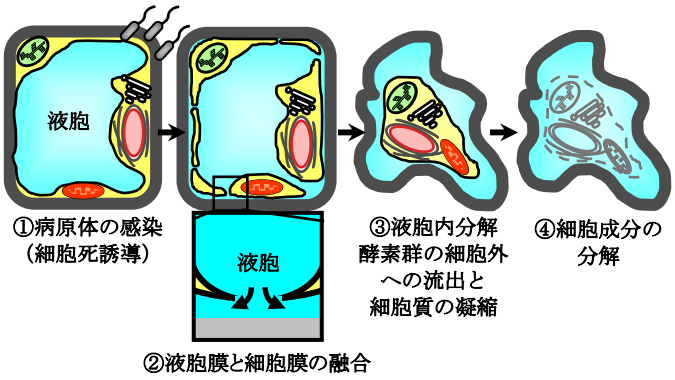


図３．細胞死モデル
①病原体の感染により過敏感細胞死のスイッチがオンになる。②プロテアソーム依存的に液胞膜と細胞膜が融合し、その結果、液胞内分解酵素群が細胞外に放出される。③細胞質が凝集し、④自らを分解し細胞は死に至る。

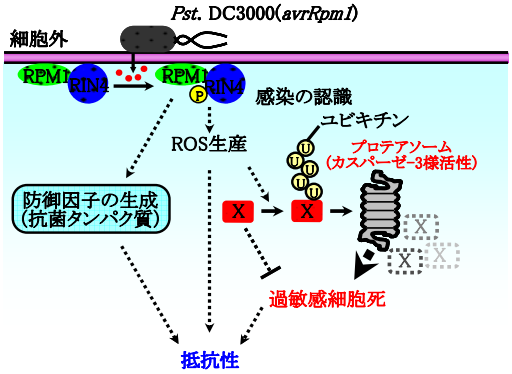


図４．細胞死の分子メカニズム仮説
プロテアソームはポリユビキチン化されたタンパク質を選択的に分解することから、過敏感細胞死を負に制御する因子“X”（プロテアソームの基質）の存在を仮定し、分子モデルを考えた。感染シグナル伝達の結果、“X”がユビキチン化される。ポリユビキチン化された“X”がプロテアソームで分解されることによって細胞死が実行される。

5. 自己評価

当初の研究計画である「液胞の機能に着目した植物細胞死機構の解明」に関して、期待以上の研究成果を得ることができた。長い間不明であった植物の Caspase-3 様活性を示す実体がプロテアソームの PBA1 であることを示すことができた。また、液胞に着目して解析を進めた結果、プロテアソームが植物の細胞死の過程において液胞膜と細胞膜の融合に関わっており、膜融合の結果、液胞内の分解酵素群が細胞外に放出されることを示唆する知見を得ることができた。これまで、ウイルス、細菌、カビすべての病原体に対して植物は共通した防御戦術を発動していていると考えられていた。ところが、ここで得られた研究結果は、病原体それぞれの生活様式に応じた防御戦術を植物は進化させてきたことを示唆する結果であり、非常に興味深い。

6. 研究総括の見解

病原体の攻撃から身を守る戦略である過敏感細胞死の機構を解析し、プロテアソームが作用する機構を明らかにした。プロテアソームの標的が不明であるが、植物での過敏感染細胞における細胞死の機構解明は大きな成果である。また、ウイルスとバクテリアでは感染機構が違うため、全く異なる感染防御戦術（細胞死メカニズム）を発動することを提唱している。バクテリア感染とウイルス感染の違いという視点でも面白い。植物細胞死の新しい研究であり、さらなる研究を継続して仮説を実証し、新しいパラダイムを拓いて欲しい。

7. 主な論文等

（A）さきがけの個人研究者が主導で得られた成果

（1）論文（原著論文）発表

1. Noriyuki Hatsugai, Miwa Kuroyanagi, Mikio Nishimura, Ikuko Hara-Nishimura
A cellular suicide strategy of plants: vacuole-mediated cell death
Apoptosis, vol. 6, 905-911 (2006)

（2）特許
なし

（3）招待講演
1. 初谷紀幸、西村幹夫、西村いくこ
液胞プロセシング酵素が制御するプログラム細胞死機構の解明
植物科学研究プロジェクトシンポジウム（東京）（2005 年）
2. 初谷紀幸、黒柳美和、中畦悟、西村いくこ
液胞プロセシング酵素が制御する植物のプログラム細胞死
日本分子生物学会 2006 フォーラム（名古屋）（2006 年）
3. 初谷紀幸、岩崎慎治、西村いくこ
プロテアソームを介した植物の感染防御機構
BMB2008（神戸）（2008 年）

（4）学会発表（国際）
1. Noriyuki Hatsugai, Miwa Kuroyanagi, Kenji Yamada, Tetsuo Meshi, Mikio Nishimura, Ikuko Hara-Nishimura
Involvement of VPE exhibiting caspase-1 activity in hypersensitive cell death
XII International Congress on MPMI 2005, Cancun, Mexico (2005)

（B）その他の主な成果
（1）論文（原著論文）発表
1. Ivana Saska, Amanda D. Gillon, Noriyuki Hatsugai, Ralf G. Dietzgen, Ikuko Hara-Nishimura, Marilyn A. Anderson, David J. Craik
An asparaginyl endopeptidase mediates in vivo protein backbone cyclization
J. Biol. Chem., vol. 282, 29721-29728 (2007)
2. Kimi Ogasawara, Kenji Yamada, John T. Christeller, Maki Kondo, Noriyuki Hatsugai, Ikuko Hara-Nishimura and Mikio Nishimura
Constitutive and inducible ER bodies of *Arabidopsis thaliana* accumulate distinct β-glucosidases
Plant Cell Physiol., vol. 50, 480-488 (2009)

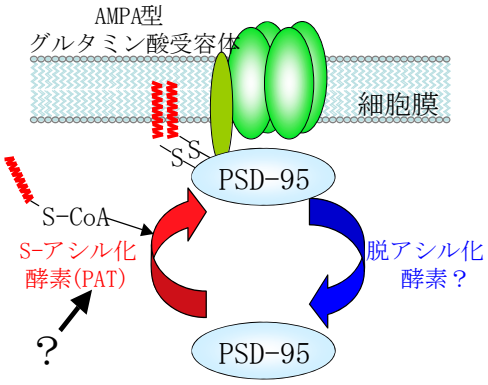
（2）招待講演（国際）
1. Ikuko Hara-Nishimura, Noriyuki Hatsugai, Miwa Kuroyanagi, Satoru Nakaune, Kenji Yamada and Mikio Nishimura
A VPE exhibiting caspase-1 activity regulates pathogen-induced cell death and developmental cell death in plants
XII International Congress on MPMI 2005, Cancun, Mexico (2005)
2. Ikuko Hara-Nishimura, Noriyuki Hatsugai, Miwa Kuroyanagi, Satoru Nakaune, Tadashi Kunieda, Kentaro Takahashi, Mikio Nishimura
Vacuolar processing enzyme (VPE): an executor of vacuole-mediated cell death in plants
20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, Kyoto, Japan (2006)

研究課題別評価書

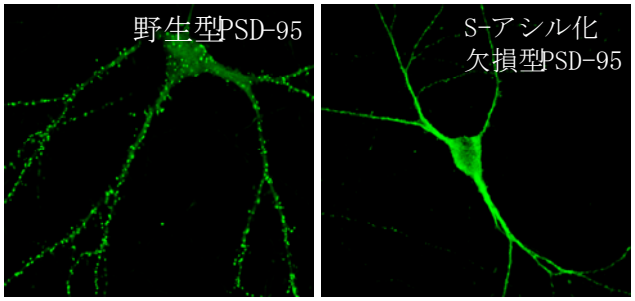
1．研究課題名
　シナプス機能における S-アシル化動態の時空的解析

2．氏名
　深田　正紀

3．研究のねらい
　蛋白質はリン酸化やユビキチン化、脂質修飾などの翻訳後修飾により、遺伝情報を超えて新たな機能や制御機構が付加され、複雑な細胞機能を制御する。中でもパルミトイル化に代表される *S*-アシル化修飾は多くの機能蛋白質にみられる脂質修飾であり、蛋白質を特定の膜ドメインに輸送し、その機能をダイナミックに制御する。*S*-アシル化は脂質修飾の中でも唯一、外界刺激依存的に可逆的に代謝回転する脂質修飾であり、生体の恒常性や可塑性を精密に制御していると考えられてきた。しかし、*S*-アシル化サイクルの発見以来 30 年以上その責任酵素は同定されず、また有効な測定、可視化技術がなかったため、*S*-アシル化サイクルの動態、およびその制御機構は長らく不明であった。私は酵母の遺伝学的知見を基に *S*-アシル化に関わると考えられる *S*-アシル化酵素群（全23種類）をゲノムワイドに探索し単離した。また、神経シナプスでイオンチャンネルの機能発現を制御する蛋白質 PSD-95 を特異的に *S*-アシル化する酵素(P-PAT)を同定した。
　本研究ではこの新規 *S*-アシル化(パルミトイル化)酵素群を手がかりとして、PSD-95 などのシナプス機能に関わる蛋白質のパルミトイル化動態を測定、可視化する技術を創出する。さらにはパルミトイル化酵素の活性制御機構を解明することによりパルミトイル化修飾反応の全容解明を目指すとともに、特に神経シナプス機能制御機構との関連を明らかにする。



S-アシル化（パルミトイル化）サイクル



S-アシル化（パルミトイル化）脂質修飾は PSD-95のシナプス後膜への局在に必要である。

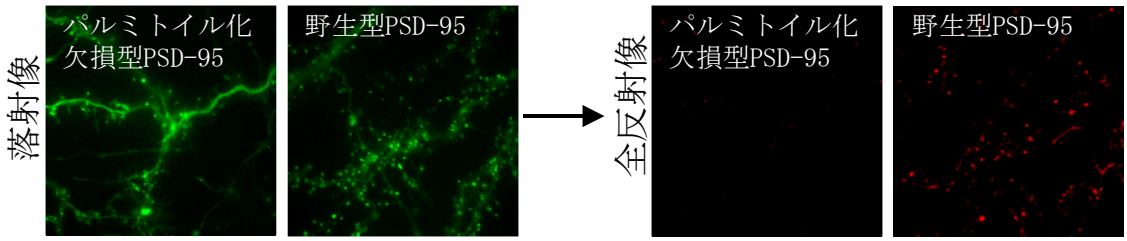
4．研究成果
I)パルミトイル化動態の可視化技術の創出
　S-アシル化（パルミトイル化）反応は外界刺激によりダイナミックに制御され、神経シナプス機能など様々な細胞状態を規定している。しかし、パルミトイル化の検出法にはこれまでラジオアイソトープを用いた代謝ラベリング法以外には有効な方法が開発されていなかった。本研究では、生化学的手法と生細胞イメージング法を組合わせて、細胞内のパルミトイル化動態のダイナミックな変動を検出する実験系を構築した。
1）ABE(Acyl-Biotinyl-Exchange)法による神経細胞におけるパルミトイル化蛋白質の精製法の確立
　ごく最近、酵母を用いた解析から酵母細胞内のパルミトイル化蛋白質を精製する手法として ABE法が報告された(Roth et al. Cell 2005)。私はABE法に改良を加え、海馬培養神経細胞から再現性良く高感度にパルミトイル化蛋白質を精製する技術を確立した。この手法により神経機能蛋

白質のパルミトイル化レベルを簡便にまた網羅的にモニタリングすることが可能となった。さらに電気泳動上の移動度からPSD-95 パルミトイル化の絶対量を測定できることを見出した。興味深いことに、シナプスの約2%を占める足場蛋白質PSD-95 のパルミトイル化レベルは神経活動を遮断した際に、2時間以内に大きく(stoichiometrical)上昇することが明らかになった。一方、他のパルミトイル化蛋白質である3量体G蛋白質αサブユニットGα_qや足場蛋白質GRIPのパルミトイル化レベルは神経活動に依存しなかった。私は、下記II)-4 で述べるように、さまざまな基質とパルミトイル化酵素群の関係を明らかにしてきたが、P-PAT(DHHC2, 3, 7, 15)のなかでも、DHHC3,7 はPSD-95 以外にGα_qなど多くの基質をパルミトイル化するが、DHHC2,15 はより選択的にPSD-95をパルミトイル化することを明らかにしている。すなわち、神経活動依存的に変動するPSD-95 のパルミトイル化を担う酵素はDHHC2,15 であると考えられた(則竹ら、投稿中)。生体内のパルミトイル化反応は基質蛋白質および責任酵素によって個別に、かつ精密に制御されていることが示唆された。そこで本研究では、細胞内で違った制御を受ける基質PSD-95 とGαに焦点を絞り、研究を進めた。

2)パルミトイル化動態の可視化技術の創出

a) 全反射顕微鏡を用いたパルミトイル化動態の可視化

上述の生化学的手法によりパルミトイル化蛋白質の時間的変動を生化学的に検出することが可能となったが、細胞内の空間的位置情報には言及できず十分とは言えない。そこで、私はパルミトイル化の時間的、空間的ダイナミクスを明らかにするために、全反射顕微鏡を用いてパルミトイル化動態の可視化を試みた。全反射顕微鏡はスライドガラス面から100-200 nmという極めて細胞膜に近接した領域のみを励起することができる。野生型の PSD-95-GFP を発現させた海馬培養神経細胞を観察してみると、細胞膜近傍(主にシナプス後部膜)に存在すると考えられるクラスター状の PSD-95 シグナルを落射蛍光像に比べて高い S/N 比で可視化できることが分かった(下図)。一方、パルミトイル化部位に変異を導入した PSD-95 は全反射顕微鏡では殆ど観察されなかったことから、全反射顕微鏡を用いれば、蛋白質のパルミトイル化レベルの変動と動態(シナプス局在化)の関係を時空的にモニタリングできると考えられた。私はこの手法により神経活動の遮断後 1-2 時間以内に、シナプス後部膜の PSD-95 が増加することを見出した。この結果は上述のABE法から得られた生化学的データと見事に合致していた。すなわち、海馬培養神経細胞においては神経活動遮断時に PSD-95 のパルミトイル化レベルが亢進し、シナプス後部膜へのPSD-95 の集積が増加することが明らかとなった(則竹ら、投稿中)。全反射顕微鏡に加えて、下記 II)-3で述べるように、Photoconversion 法や FRAP 法とパルミトイル化阻害剤、PAT の RNAi を組合わせて、パルミトイル化動態を解析する実験系も構築した。



b) PSD-95 のパルミトイル化部位特異的リコンビナント抗体の開発

さらに、内在性の PSD-95 のパルミトイル化動態を可視化するために、パルミトイル化されたPSD-95 のみを特異的に認識する抗体の作成に挑戦した。まず、P-PAT 酵素を用いることによりstoichiometrical にパルミトイル化された PSD-95 を抗原として精製した。Franck Perez 博士(Curie institut)との共同研究にて、パルミトイル化された PSD-95 を特異的に認識するリコンビナント抗体をスクリーニングし、有望な候補クローン(PF11)を得た。

II)パルミトイル化酵素の活性制御機構の解明

1)神経シナプスにおけるPSD-95 パルミトイル化の制御機構

細胞内のパルミトイル化動態の変動を検出することにより、PSD-95 のパルミトイル化レベルが神経活動遮断時に特異的に増加し、PSD-95 のシナプス局在が促進することが明らかになった。そこで、この神経活動感受性の PSD-95 パルミトイル化が神経細胞のどの部位でどのように制御されているかを明らかにすることを試みた。まず、神経活動依存的に PSD-95 をパルミトイル化すると考えられた DHHC2,15 のうち、海馬神経細胞で主に発現している酵素は DHHC2 であることを見出した。そこで、バキュロウイルスディスプレイ法により DHHC2 と DHHC3 の特異的モノクロナール抗体を作成した（東大、浜窪教授、児玉教授との共同研究）。興味深いことに、DHHC2 は樹状突起内およびスパイン近傍に小胞状に存在していた。さらに、神経活動の低下に伴い、DHHC2 はシナプス後部膜近傍にダイナミックに移動し、PSD-95 のパルミトイル化レベルを増加させること、その結果、AMPA 型グルタミン酸受容体のシナプス発現量を増加させることを見出した。一方、DHHC3 は細胞体内のゴルジ装置に限局して存在し、神経活動とは無関係に様々な基質蛋白質をパルミトイル化していると考えられた。このように、1）23 種類のパルミトイル化酵素は外界刺激の下流で分子種により異なる制御をうけていること、2）パルミトイル化酵素の細胞内局在がパルミトイル化の ON/OFF を規定すること、さらに3）パルミトイル化酵素がシナプス機能（AMPA 受容体の発現量）を一定に保つホメオスターシス（Synaptic scaling）という現象を制御していることを見出した（則竹ら、投稿中）。

2）脳内PSD-95 複合体の同定

一方、P-PAT の活性制御因子や PSD-95 の脱パルミトイル化酵素を同定するために、基質蛋白質 PSD-95 の免疫沈降を行い、脳内の生理的複合体を精製、同定した。大変興味深いことに、この過程で、てんかん関連たんぱく質 LGI1、ADAM22 および Stargazin が、脳内で PSD-95 に相互作用する主要な蛋白質であることを見出した。これら複合体の結合様式を解析した結果、分泌蛋白質である LGI1 は膜蛋白質 ADAM22 を受容体として結合し、ADAM22 は PSD-95 によりシナプスに裏打ちされることが明らかになった。LGI1 は ADAM22 と結合することにより AMPA 受容体の機能を促進したことから、AMPA 受容体機能を制御する新たなリガンド／受容体を同定したといえる（発表論文3）。

3）G蛋白質シグナルにおけるパルミトイル化酵素の役割

3 量体G蛋白質αサブユニット(Gα)は古くからパルミトイル化を受けることが知られており、パルミトイル化がGαの細胞膜への集積や機能の発揮に重要であることが示唆されてきた。しかし、Gαでは酵素非依存的なパルミトイル化反応も提唱されており、パルミトイル化酵素は同定されていなかった。私どもは独自のスクリーニング法（下記II-4および発表論文2、4）によりDHHCファミリーから$G\alpha_s$、$G\alpha_q$、$G\alpha_{i2}$をパルミトイル化する酵素を探索し、DHHC3 およびDHHC7 が特異的にGαのパルミトイル化を亢進することを見出した。また、RNA干渉法によりDHHC3 およびDHHC7 の発現を抑制したところ、$G\alpha_q$のパルミトイル化が低下するとともに$G\alpha_q$の細胞膜への局在が減弱した。また、アゴニスト依存的なα_{1A}アドレナリン受容体・$G\alpha_q$を介した情報伝達系にDHHC3 およびDHHC7 が必須であることを示した。さらに、photoconversion法ならびにFRAP法を利用し、$G\alpha_q$はパルミトイル化依存的にゴルジ装置-細胞膜間を双方向に恒常的にシャトルしており、このシャトリングにはDHHC3／7 によるゴルジ体でのパルミトイル化が必須であることを明らかにした（発表論文5）。本知見は、生体内のGαのパルミトイル化がパルミトイル化酵素によって起こっていることを初めて示したものである。

4）パルミトイル化酵素ファミリーの基質特異性の解明

独自に単離したパルミトイル化酵素群を用いて、PSD-95 以外にも様々な基質に対する特異的パルミトイル化酵素をスクリーニングする手法を確立した（発表論文2、4）。すでに、30 種類以上の基質蛋白質（SNAP-25、GAP-43、Gα、H-Ras、Lck、eNOS、CSP、NCAM など）の候補酵素のスクリーニングを終えており、パルミトイル化酵素群にサブファミリーが存在することを明らかにしている。これまでのスクリーニングの結果から、例えば1）DHHC21 はミリストイル化脂質修飾を同時にうけるパルミトイル化蛋白質を好んで基質とする、2）DHHC17 は Internal Cysteine cluster を

好んで基質とする等の法則（consensus sequence）を明らかにしつつある。これらの解析は殆どが国際共同研究(6 ヶ国、20 グループ)として展開しており、本分野を主導的立場で牽引していると言える（発表論文1、5等）。

5．自己評価

蛋白質 *S*-アシル化（パルミトイル化）修飾は多くの機能蛋白質の局在や機能を制御しているにも関わらず、有効な測定技術、可視化技術が開発されてこなかった。また、最近同定したパルミトイル化酵素群の活性制御機構および生理機能についても全く不明であった。本研究ではまず、生化学的（ABE 法の改良など）、細胞生物学的（全反射顕微鏡、Photoconversion 法、パルミトイル化特異抗体）に、生きた培養神経細胞レベルでパルミトイル化動態を測定、可視化することに成功した。そして、Gαのようなある種のパルミトイル化蛋白質は細胞膜に静的にあるのではなく、パルミトイル化と脱パルミトイル化からなるパルミトイル化サイクルに依存して細胞内小器官と細胞膜の間を双方向性にサイクルしていることを明らかにした。一方、PSD-95 は神経活動という特殊な外界刺激によりパルミトイル化レベルが精密に制御され、シナプス可塑性を制御していることを明らかにした。すなわち、パルミトイル化は DHHC 酵素群と基質の組み合わせにより多様な制御を受け、細胞機能を動的に調節していることを見出した。本研究は *S*-アシル化（パルミトイル化）という蛋白質の翻訳後修飾を解析するためのモデルケースを提供するとともに、解析が困難であった *S*-アシル化分野に新たな手法を確立したものと言える。さらに、独自のパルミトイル化酵素のスクリーニング法により酵素の基質特異性を詳細に解明できただけではなく、多くの国際共同研究を幅広く展開し、本分野を主導していると考えている。さきがけ研究により、上述した実験系を順調に構築することができ、また積極的に国際共同研究を進める基盤ができた結果、当初困難と考えていたパルミトイル化動態の可視化に成功し、パルミトイル化酵素群の制御機構を初めて明らかにした。当初の目標は達成できたと考えられる。

6．研究総括の見解

神経活動に応じて PSD95 のパルミトイル化が制御されていること、各パルミトイル化酵素に基質特異性があることを細胞レベルで明らかにした。また、Ｓ－アシル化蛋白質の細胞内局在性等を解析する生化学的・細胞生物学的手法を開発した。パルミトイル化の機能解析の研究成果は高く評価でき、目標は達成されている。新たな展開の糸口も見出しており、今後もさらに発展が期待できる研究であるので、可視化という技術に捉われずに、分子機序の本質的な面をさらに進めて欲しい。

7．主な論文等

（A）さきがけの個人研究者が主導で得られた成果

（1）論文（原著論文）発表　＊ Corresponding author

1. Fernandez-Hernando, C., Fukata, M.* Corresponding author, Bernatchez, P.N., Fukata, Y., Lin, M.I., Bredt, D.S., Sessa, W.C. Identification of Golgi-localized acyl transferases that palmitoylate and regulate endothelial nitric oxide synthase. J. Cell Biol.174, 369-377 (2006)
2. Fukata, Y., Iwanaga, T., Fukata, M.* Systematic screening for palmitoyl-acyl transferase activity of the DHHC protein family in mammalian cells. Methods 40, 177-182, (2006)
3. Fukata, Y., Adesnik, H., Iwanaga, T., Bredt, D.S., Nicoll, R.A., Fukata, M.* Epilepsy-related ligand/receptor complex LGI1 and ADAM22 regulates synaptic transmission. Science 313, 1792-1795 (2006)
4. Tsutsumi, R., Fukata, Y., Fukata, M.* Discovery of protein-palmitoylating enzymes. Pflugers Arch-Eur. J. Physiol. 456, 1199-1206 (2008)
5. Tsutsumi, R., Fukata, Y., Noritake, J., Iwanaga, T., Perez, F., Fukata, M.* Identification of G-protein α subunit palmitoylating enzyme. Mol. Cell. Biol. 29, 435-447 (2009)

（2）特許
なし

（3）受賞
1. 国際ヒューマン・フロンティア・サイエンス・プログラム
Young Investigator Grant Award （2006 年 3 月 29 日）
2. 平成 20 年度文部科学大臣表彰若手科学者賞 （2008 年 4 月 15 日）

（4）招待講演（国際）
1. Fukata, M. Synaptic activity regulates PSD-95 palmitoylating enzymes. Workshop on Receptor Trafficking and Cell Biology of Neurons:Physiology and Disease, US-Japan Brain Research Collaborative Program, Pacific Grove, USA (2008/2/24-27)
2. Fukata, M. and Fukata, Y. Synaptic palmitoylation of PSD-95 mediates AMPA receptor homeostasis. 11th International Neurochemistry Winter Conference, Solden, Austria (2009/3/31-4/4)

（5）新聞発表
1. 日本経済新聞 2006 年 9 月 22 日・12 版・朝刊・15 面
「脳神経制御するたんぱく質発見」

（B）その他の主な成果
なし

研究課題別評価書

1．研究課題名

分泌性ホスホリパーゼA_2群の分子種固有の機能の解明

2．氏名

村上　誠

3．研究のねらい

膜グリセロリン脂質の*sn*-2 位を加水分解して脂肪酸とリゾリン脂質を生成する酵素ホスホリパーゼA_2 (PLA_2)には多数の分子種が存在し、細胞内に存在するcPLA_2、iPLA_2群と、細胞外に分泌されるsPLA_2 (secreted PLA_2)群に大別される。細胞内のリン脂質代謝における細胞内PLA_2群の役割については多くの解析がなされてきたが、異なる組織分布を示す多数のsPLA_2分子種が、①細胞外環境の如何なる局面で、②どのようなリン脂質代謝反応を制御するのか、③その結果としてどのような生体応答と関連し、④その破綻が如何なる病態と結びつくのかについては、一部の分子種を除いて殆ど未解明であった。本研究では、遺伝子改変マウスを用いて6種の機能未知の sPLA_2 アイソザイムの生理的・病理的機能を解明し、脂質メタボロームの見地から各酵素の生体内基質を同定することを目指す。

4．研究成果

1）sPLA_2と生殖

6種類のsPLA_2アイソザイムのKOマウスのうち、sPLA_2-III KOマウスのみが著明な繁殖異常を示した。この表現型は雄側に起因しており、sPLA_2-III KOマウスの精巣上体尾部より得た精子は、数は正常であったが運動性が著しく低下しており、このためKO精子は卵子の透明体を通過する推進力が弱く、受精率が顕著に低下することがわかった。電子顕微鏡により精子の超微細形態を観察したところ、KO精子は鞭毛軸索の対照リング構造が損なわれていた。マイクロアレイによる遺伝子プロファイリングの結果、KOマウスでは精巣の遺伝子発現に異常は認められなかったが、精巣上体において精子の機能（鞭毛の軸索構造、運動性、透明体結合など）に関わる遺伝子群の発現が一括的に減少していた。雄性生殖器の免疫組織染色の結果、sPLA_2-IIIは精子の機能的成熟に関わる組織である精巣上体の起始部管腔上皮細胞に強く発現していた。更に、脂質質量分析により生殖器の脂質成分の網羅的プロファイリングを行ったところ、KOマウスの精巣上体においてアラキドン酸、ドコサヘキサエン酸などの高度不飽和脂肪酸、ならびにそのリポキシゲナーゼ代謝産物が減少傾向にあること、KOマウスでは精巣上体液中にリン脂質の異常蓄積が見られること、が明らかとなった。これらの結果から、sPLA_2-IIIは精巣上体起始部の上皮細胞から内腔に分泌されて精子の細胞膜あるいは液中のリン脂質輸送体の脂質ホメオスタシスの制御に関わっており、この代謝系の破綻が精子機能不全を導くものと推察される。

2）sPLA_2とアレルギー

6種類のsPLA_2アイソザイムのKOマウスのうち、sPLA_2-III KOマウスにおいてのみ、IgE/抗原依存的な受動皮膚感作アレルギー(PCA)反応の著しい軽減が観察された。逆に、sPLA_2-III Tgマウスではpca反応の増悪が見られた。また、sPLA_2-III KOマウスに全身性アナフィラキシー反応を施行すると、血中へのヒスタミンの遊離がWTマウスと比べて顕著に減少した。免疫組織染色の結果、sPLA_2-IIIはマウス皮下組織のマスト細胞に限局して発現していた。更に、WTおよびKOマウスより調整した骨髄由来培養マスト細胞(BMMC)をマスト細胞欠損*W/W*マウスに移植再構成したところ、KOマウス由来BMMCを移植した群はWT移植群と比べてPCA反応に不応答であった。これらの結果から、KOマウスのアレルギー不応答性はマスト細胞の異常に起因するものと結論した。KOマウス皮下組織中のマスト細胞は、数は正常（すなわち前駆細胞の分化と組

織への遊走定着は正常）であったが、分泌顆粒が未発達で、IgE/抗原刺激に伴う脱顆粒反応が起こりにくいことが判明した。また、KOマウス由来のBMMCは、繊維芽細胞との共培養により誘導されるヒスタミンの増加（分化成熟の指標）が見られなかった。更に、KOマウス由来のBMMCでは、IgE/抗原刺激した際に惹起される膜リン脂質からのアラキドン酸の遊離とそれに引き続くPGD_2, LTC_4の産生が有意に低下していた。以上の結果から、$sPLA_2$-IIIは組織中のマスト細胞の最終成熟ならびにそれに付随するエフェクター機能に関わるものと考えられる。$sPLA_2$-IIIがアレルギー惹起物質として知られるハチ毒PLA_2の唯一の哺乳動物ホモログであることを踏まえると、今回の結果は、$sPLA_2$-IIIが内因性のマスト細胞調節因子であることを強く示唆している。

3）$sPLA_2$と動脈硬化・メタボリックシンドローム

全$sPLA_2$アイソザイムのうち、$sPLA_2$-III, V, Xがリポタンパク質粒子(LDL, HDL)のホスファチジルコリン(PC)を分解してリゾホスファチジルコリン (LPC)を生成することを見いだした。これらの$sPLA_2$が作用したLDLは小径（変性）LDLの性質を示し、マクロファージの泡沫化を*in vitro*で促進した。$sPLA_2$-III Tgマウスでは血中の変性LDLが増加し、動脈硬化発症モデル動物である*apoE* KOマウスと交配後に高コレステロール食を負荷すると、動脈硬化の増悪が観察された。また、ヒト動脈硬化巣には$sPLA_2$-III, V, Xなどの複数の$sPLA_2$アイソザイムの発現増加が認められた。以上のことから、動脈硬化病巣における$sPLA_2$依存的なリポタンパク質の代謝異常が動脈硬化の進展を促進するものと予想している。

一方、$sPLA_2$-III Tgマウスを高脂肪食下で飼育すると、予期せぬことに肥満の表現型を発症することを見いだした。Tgマウスの内臓脂肪組織(WAT)ではWTマウスと比べて個々の脂肪細胞が肥大化し、間質へのマクロファージ浸潤の増加、炎症性サイトカインの発現増加が認められた。肝臓では脂肪肝増悪の組織所見が見られ、肝機能マーカーであるALTの血中濃度が顕著に増加した。また、脂質の合成、取り込み、代謝に関わる遺伝子群の発現がTgマウスの肝臓で一括的に増加していた。更に、Tgマウスの血中ではレプチンの増加が見られたほか、総コレステロール、血糖値、LPCなどのメタボリックシンドロームのマーカーが増加していた。一方、高脂肪食負荷を施した$sPLA_2$-III KOマウスではWTマウスと比べてWATならびに褐色脂肪(BAT)の縮小、肝機能の改善、血中レプチン、総コレステロール、血糖値、LPCなどの低下が認められ、Tgマウスとは全く逆の表現型を示した。また、高脂肪食負荷KOマウスはWTマウスと比べてインスリン感受性の改善傾向が認められた。脂肪代謝に関わる種々の組織より総脂質を抽出し、質量分析により網羅的な脂質プロファイリングを行った結果、WATのLPC含量がKOマウスにおいて有意に減少し、反対にTgマウスでは増加していた。また、血漿リポタンパク質の粒径測定を行った結果、小径LDLがKOマウスでは減少、Tgマウスでは増加傾向を示すことがわかった。更に、免疫組織染色ならびに定量的PCRの結果、内在性$sPLA_2$-IIIの発現はWAT間質で非常に高く、前脂肪細胞マーカーであるPref-1 の発現と一致した。以上の結果から、$sPLA_2$-IIIはWAT間質の前脂肪細胞から構成的に分泌されてリポタンパク質粒子中のPCのLPCへの変換＝小径LDLの生成に関わり、この代謝系の長期に渡る亢進または低下がメタボリックシンドロームの進行に正負の影響を及ぼすものと推察している。

4）$sPLA_2$と皮膚

$sPLA_2$-Xを全身に過剰発現したTgマウスは皮膚に際立った異常を発症し、第一毛周期に相関して一過的な全身脱毛、表皮角質化、皮脂腺肥大などの表現型を示した。$sPLA_2$-X Tgマウスの皮膚ではPUFAを含むPEが選択的に減少し、アラキドン酸代謝物としてPGE_2、ドコサヘキサエン酸の代謝物としてProtectin D_1の産生が亢進していた。しかしながら、野生型マウスの皮膚における内在性$sPLA_2$-Xの発現は体毛増殖期の毛胞外根鞘に限局しており、$sPLA_2$-X KOマウスの皮膚では体毛関連遺伝子群の部分的な発現減少を認める以外に目立った所見は現在までに観察されていない。したがって、$sPLA_2$-Xは本質的に体毛の増殖分化の制御に関わると考えられる。では、先に述べた$sPLA_2$-X Tgマウスに発症する表皮肥厚と皮脂腺肥大は何を意味しているのであろうか？ WTマウスと$sPLA_2$-X Tgマウスの皮膚の間でマイクロアレイ解析を

行った結果、Tgマウスの皮膚において別の$sPLA_2$アイソザイムである$sPLA_2$-IIFの内因性発現が顕著に上昇していることを発見した。免疫組織化学染色および*in situ* hybridizationの結果、$sPLA_2$-IIFは表皮と皮脂腺に発現している主要なアイソザイムであり、様々なヒト皮膚疾患で発現が顕著に増加することが判明した。そこで、$sPLA_2$-IIFを全身性および皮膚特異的に過剰発現したTgマウスを作出したところ、双方ともに著しい皮膚異常を発症した。また、$sPLA_2$-IIFマウスの皮膚ではドコサヘキサエン酸を含むPEが顕著に減少し、Protectin D_1の産生が亢進していた。更に、$sPLA_2$-IIF KOマウスの皮膚の超微細構造を電子顕微鏡で観察した結果、皮膚異常を示唆する予備的所見を得ている。したがって、皮膚の病態生理にメインに関わるアイソザイムは$sPLA_2$-IIFであると考えられる。

5）$sPLA_2$と樹状細胞

$sPLA_2$-IIDはマウス臓器の中で脾臓とリンパ節に特に発現が高いアイソザイムであるが、その発現細胞や機能については全く不明であった。$sPLA_2$-IIDの特異抗体を用いた免疫組織染色とautoMACSとFACSによるソーティングの結果、この酵素は$CD11c^+$樹状細胞に特異的に発現している$sPLA_2$であることが明らかとなった。$sPLA_2$-IIDを全身に過剰発現したTgマウスは肺、腸管のリンパ節肥大を伴う自己免疫様の症状を自然発症した。更に、OVAの免疫による抗体産生モデルを$sPLA_2$-IID KOマウスに施行したところ、WTマウスと比べてOVA特異的IgMの血中濃度の低下が認められた。以上の結果から、$sPLA_2$-IIDは樹状細胞を中心とする免疫ネットワークの調節に関与しているものと考えられる。

5．自己評価

従来、$sPLA_2$が生体内でどのような生命応答に関与しているのかについては、一部のものを除いて殆ど未解明であった。本研究を通じて、$sPLA_2$のそれぞれのアイソザイムが多様な生命現象に関わることを実証することができた。更に、当初目標であったアイソザイム固有の機能の解明に加えて、特定の生命現象において複数の$sPLA_2$が異なる作用点で機能することを示唆するという予想外の成果が得られ、「微小組織環境における$sPLA_2$群の時空間ネットワーク」という新しい概念を提唱するに至ったことは大いに評価できる。

6．研究総括の見解

$sPLA_2$遺伝子ファミリーについて、KOマウス、TGマウスを作製して、網羅的に解析を行った。さらに、精子成熟、アレルギーに関連する免疫、表皮の形態・機能に係る新たな知見を見出した。多くの$sPLA_2$アイソザイムのKOマウス、TGマウスを用いて、広く生理機能を解析した実績を高く評価したい。ただし、もう少し分子機序に踏み込めるとよりインパクトが高くなると考えられる。病態との関わりも深く、治療の基礎研究や診断にも貢献できると期待できるので、今後は疾患モデルや生理的意義の解析を進め、さらにはヒトの疾患との関連などに発展させて欲しい。

7．主な論文等

（A）さきがけの個人研究者が主導で得られた成果

（1）論文（原著論文）発表　＊Corresponding author

1. Ohtsuki, M., Taketomi, Y., Arata, S., Masuda, S., Ishikawa, Y., Ishii, T., Takanezawa, Y., Aoki, J., Arai, H., Yamamoto, K., Kudo, I., and **Murakami. M.*** Transgenic expression of group V, but not group X, secreted phospholipase A_2 in mice leads to neonatal lethality because of lung dysfunction. *J. Biol. Chem.* 281, 36420–36433, 2006
2. Masuda, S., Yamamoto, K., Hirabayashi, T., Ishikawa, Y., Ishii, T., Kudo, I., and **Murakami, M.*** Human group III secreted phospholipase A_2 promotes neuronal outgrowth and survival. *Biochem. J.* 409, 429–438, 2008
3. Sato, H., Kato, R., Isogai, Y., Saka, G., Ohtsuki, M., Taketomi, Y., Yamamoto, K., Tsutsumi, K., Yamada, J., Masuda, S., Ishikawa, Y., Ishii, T., Kobayashi, T., Ikeda, K., Taguchi, R., Hatakeyama, S., Hara, S., Kudo, I., Itabe, H., and **Murakami, M.*** Analyses of group III

secreted phospholipase A_2 transgenic mice reveals potential participation of this enzyme in plasma lipoprotein modification, macrophage foam cell formation, and atherosclerosis. *J. Biol. Chem.* 283, 33483-33497, 2008

（2）特許
なし

（3）受賞
1. 東京都医学研究機構職員表彰 （2008 年 10 月 21 日）

（4）著書（監修）
1. 村上誠：脂質の新たな機能を追う. 細胞工学, 11 (26), 2007

（5）総説
1. 村上誠：脂質メディエーター研究の現状と展望. 細胞工学, 11 (26), 1218-1220, 2007
2. 山本圭、平林哲也、村上誠：ホスホリパーゼA_2の多様性と機能. 細胞工学, 11 (26), 1221-1226, 2007
3. 村上誠：メタボリックシンドロームにおける脂質代謝異常と血管障害／ホスホリパーゼA_2群の代謝機能を中心に. 血管医学, 8 (1), 17-24, 2007
4. 村上誠：脂質メタボロームから見た動脈硬化. BioClinica, 22 (5), 80-85, 2007
5. 村上誠: $sPLA_2$群の生体内機能と脂質メタボロミクス：炎症・再生、28 (5), 454-460, 2008

（6）招待講演
1. **Murakami, M.** Diverse functions of $sPLA_2$ isozymes; insights from transgenic mice: *FASEB Summer Research Conferences on Phospholipases*. Saxtons River, VT, USA (2006)
2. **Murakami, M.** Transgenic and knockout mice for group V, X and III $sPLA_2$s: *The 3rd Conference on Phospholipases A_2 and Lipid Mediators*, Sorrento, Italy (2007)
3. **Murakami, M.** Diverse functions of $sPLA_2$s: from cells to transgenics and knockouts. *FASEB Summer Research Conference on Phospholipid Metabolism: disease, signal transduction and membrane dynamics*, New Haven, CT, USA (2008)
4. 村上誠：細胞外分泌性ホスホリパーゼA_2と病態. *日本薬学会*（東京）、2008 年 3 月
5. 村上誠：ホスホリパーゼA_2分子群の新しい機能. *BMB2008*（神戸）、2008 年 12 月

（7）学会シンポジウム・ワークショップオーガナイザー
1. 村上誠、横溝岳彦：脂質シグナリング研究の最前線／新たなる世代へ：*日本脂質生化学会*（東京）、2006 年 6 月
2. 村上誠、杉本幸彦：脂肪酸に由来する脂質メディエーターの最前線：*BMB2007*（横浜）、2007 年 12 月
3. 横溝岳彦、村上誠：脂質の新機能：*BMB2008*（神戸）、2008 年 12 月

（B）その他の主な成果
（1）論文（原著論文）発表
1. Taketomi, Y., Sunaga, K., Tanaka, S., Nakamura, M., Arata, S., Okuda, T., Moon, T. C., Chang, H. W., Sugimoto, Y., Kokame, K., Miyata, T., **Murakami, M.**, and Kudo, I. Impaired mast cell maturation and degranulation and attenuated allergic responses in *Ndrg1*-deficient mice. *J. Immunol.* 178, 7042-7053, 2007
2. Kuwata, H., Fujimoto, C., Yoda, E., Nakatani, Y., Hara, S., **Murakami, M.**, and Kudo, I. A novel role of group VIB calcium-independent phospholipase A_2 ($iPLA_2\gamma$) in the inducible

expression of group IIA secretory phospholipase A_2 in rat fibroblastic cells. *J. Biol. Chem.* 282, 20124–20132, 2007

研究課題別評価書

1．研究課題名

胎生期低栄養による成長後の代謝異常発生機序の解明とその予防戦略の開発

2．氏名

由良　茂夫

3．研究のねらい

I 背景

メタボリック症候群は肥満を背景とし、耐糖能異常、高脂血症、高血圧、心血管障害などを合併する。欧米の先進国のみならず、わが国においてもメタボリック症候群が近年広く認識されるようになり、その発症機序の解明と予防対策はますます重要な課題となっている。

一方で、第二次世界大戦前後の飢餓を妊娠中に経験した母親から出生した子宮内低栄養児の長期的予後に関する近年の疫学的研究を契機として、胎生期低栄養が出生児の成人後にメタボリック症候群を高率に引き起こすことや、骨粗鬆症や乳癌など多様な疾患の成人期における発生リスクを上昇させる事が明らかとなり（図 1）、*Developmental Origins of Health and Diseases* という概念が提唱されている*(Gluckman PD & Hanson MA, Science, 305;1733,2004)*。

近年本邦では低出生体重児の割合が増加し、20 年前に比べて 2 倍近くになっている（厚生労働省、人口動態調査）。これらの低出生体重児は出生前に低栄養環境に置かれていると考えられ、将来高率にメタボリック症候群や種々の疾患を発症する可能性が想定される。胎生期あるいは新生児期の管理の改善あるいは何らかの予防的治療により、これらの人々が成人後に疾病を発症するリスクを軽減することが可能となれば、患者個人の恩恵のみならず、少子高齢化社会における労働力の確保という視点からも多大なる社会的貢献が期待される。

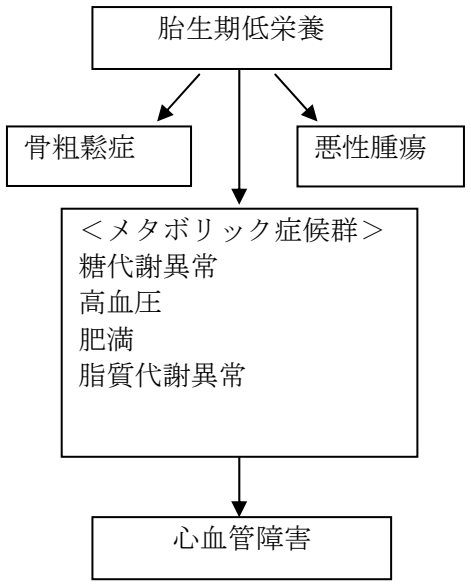


図 1. 胎生期低栄養による成長後の疾患発症リスクの増加

II「さきがけ」研究開始までの経過

従来エネルギーを貯蔵するだけの器官と思われていた脂肪組織が多数の生理活性因子を産生し、個体のエネルギー代謝を調節すると共に、耐糖能障害や高血圧、心血管障害などの疾患発生に深く関与する事が明らかとなって来た。特に、レプチンやレジスチン、アディポネクチン、TNF-αは脂肪細胞由来の生理活性因子いわゆるアディポサイトカインとして肝臓や脳、血管、骨格筋、膵臓、脂肪、骨など全身の臓器における代謝調節に関与し、生活習慣病とりわけメタボリック症候群の病態形成に深く関与する。本研究者は「さきがけ」研究の開始までに、妊婦において脂肪のみならず胎盤においてレプチンやレジスチンが産生され（*Trophoblast Research, 16:S80, 2002, J Clin Endocrinol Metab, 88:1394, 2003*）、母児のエネルギー代謝や性成熟の制御（*J Clin Invest. 105:749, 2000*）において重要な役割を果たすことを提唱してきた。さらに、マウスにおける胎生期の低栄養環境によって出生仔が成獣期に易肥満性をきたすこと、メタボリック症候群を発症することを確認し、このような成獣期の代謝異常の発現に新生仔期における血中レプチン濃度の一過性の上昇「レプチンサージの早期化」が重要な役割を果たす可能性を提唱した（*Cell Metabolism, 1:371, 2005*）。

Ⅲ 研究の目的

本研究では胎生期低栄養に起因する成長後の代謝異常発生機序を解明し、その予防戦略を開発する目的で、次のような検討を行うこととした。

1　胎生期低栄養モデル動物におけるメタボリック症候群の病態解析：マウスの胎生期低栄養モデルを用い、胎仔期、成獣期の代謝の変化を解析する。また、メタボロームの手法により代謝産物を網羅的かつ体系的に解析する。

2　新生仔期のレプチンへの暴露がメタボリック症候群の発症機序におよぼす影響の検討：新生仔期のレプチンサージの変化が成長後の肥満発症やメタボリックシンドロームの形成にどのように関与するかを野生型マウスだけでなく、レプチン遺伝子を欠損する *ob/ob* マウス、ヘテロ欠損マウス等を用いて解明する。

3　母体の食事組成の調整によるメタボリック症候群発症予防の試み：母体の食事組成の調整によるメタボリックシンドローム発症予防を試みるために、母獣の食餌組成を高蛋白または高アミノ酸食として胎生期低栄養の影響を検討する。また、胎生期・新生児期における種々の臓器発達において insulin like growth factor（IGF）やグルココルチコイドは重要な役割を担うことから、胎生期低栄養モデルにおけるこれら因子の変動を明らかにし、またグルココルチコイドの代謝酵素である 11β hydoxy steroid dehydrogenase type2（11β HSD2)の発現を検討する。

4．研究成果

Ⅰ 胎生期低栄養モデル動物におけるメタボリック症候群の病態解析

a）母獣摂餌制限によるマウス胎生期低栄養モデルでは、成獣期に血圧上昇ならびに心肥大や冠動脈周囲線維化の亢進などの心臓の形態的変化をきたすことが明らかとなった。これらの心リモデリングには心臓局所におけるレニン・アンギオテンシン系の関与が想定された。

b）胎生期低栄養マウスでは普通食飼育では血中脂質濃度に対照群と有意な差を認めなかったが、高脂肪食飼育とすると血中コレステロール値の有意な上昇が見られた。また、肝重量（体重量比で換算）は普通食飼育で対照群と比較して有意に高値を認め、重量あたりのリン脂質含量が低値を示し、中性脂肪は高値の傾向であった。高脂肪食負荷では対照群と差を認めなかった。肝臓における Acetyl－CoA carboxylase（ACC）、Acyl-CoA oxidase（ACO）、Peroxysome proliferator activated receptor α（PPARα）、PPARγ等の発現増加がこれらの変化に関与していると考えられた。

Ⅱ 新生仔期のレプチンへの暴露がメタボリック症候群の発症機序におよぼす影響の検討

われわれはすでに、脂肪細胞から産生されるレプチンの血中濃度の一過性上昇である新生仔期のレプチンサージが胎生期低栄養マウスでは早期にかつ増強して認められ、この変化が成獣期の代謝異常発症において極めて重要な役割を果たすことを明らかにしてきた。

a）レプチン遺伝子を欠損する *ob/ob* マウスの場合、野生型マウスと異なり胎生期に低栄養に曝露しても成獣期に易肥満性を示さず、一方新生仔期にレプチンを投与すると成獣期の肥満が増強することを示した。このことから、新生仔期の過剰なレプチンへの曝露が易肥満性の獲得に重要と考えられた。

b）新生仔期レプチン投与マウスでは成獣期の血圧上昇や心リモデリングが観察されなかったことから、胎生期低栄養による成獣期の心血管障害は新生仔期のレプチンサージの早期化とは異なった機序により引き起こされている可能性が示された。

c）新生仔期のレプチンサージの時期の変化による影響を検討すると、成長後の高脂肪食飼育下の肥満がレプチンサージの早期化によって増強し、レプチンサージの晩期化によって抑制された。

Ⅲ 母体の食事組成の調整によるメタボリック症候群発症予防の試み

a) 母獣摂餌制限による胎生期低栄養マウスモデルにおいて、母獣の蛋白質摂取量を増量することによって、胎仔の発育を改善し、成長後の血圧上昇や心肥大を改善した。また、妊娠中の母獣で蛋白質摂取の増量によって、分岐鎖アミノ酸(Branched chain amino acid: BCAA)血中濃度の上昇を認めた。
b) 母獣の蛋白質摂取量ないしBCAA摂取量を増量することにより、母獣および胎仔肝臓におけるIGF-1およびIGF-2の発現が増加しており、これが胎仔発育の改善に関与していると考えられた。
c) ラット妊娠母獣へのBCAA付加餌の投与により、母獣摂餌制限による出生仔の発育制限や成長後の血圧上昇を抑制する可能性が示唆された。

以上の研究により、胎生期低栄養に起因する成長後のメタボリック症候群の発症機序の一端が明らかにされ、その予防戦略開発の糸口を見出すことが可能であった。

5. 自己評価

本研究では、いまだに不明の点が多い胎生期プログラミングの病態解析を重要な柱として研究を進め、マウスモデルを用いた検討からさまざまな新知見を見出した。当初予定していたメタボローム解析による脂質代謝産物の網羅的解析からも有意義な知見を得ており、従来とは異なった新しい観点からの病態解析と代謝異常発症予防法の開発を進めることができたと考えている。

6. 研究総括の見解

妊娠マウスの食餌制限による胎生期低栄養モデル動物を使って、新生仔期におこる代謝の変異を解析した。胎生期の低栄養が、肝における脂質関連遺伝子の高発現をもたらし、成人後、肥満等のメタボリックシンドロームになりやすさを生んでいることが示された。胎生期低栄養による代謝異常の基礎研究で成果を挙げ、臨床的な意義も大きい。予防、治療に繋げる壮大かつ重要な研究である。しかし、真の物質レベル、分子レベルの研究がまだであり、今後、低栄養から遺伝子発現の分子メカニズムの解明、この現象に関わる鍵分子の確定が待たれる。疾患マーカーの取得や予防・治療法に繋がるさらなる進展を期待する。

7. 主な論文等

(A)さきがけの個人研究者が主導で得られた成果

(1)論文(原著論文)発表　＊Corresponding author

1. H Mise, S Yura*, H Itoh, M A. Nuama, M Takemura, N Sagawa, S Fujii.
   The Relationship between Maternal Plasma Leptin Levels and Fetal Growth Restriction
   Endocrine Journal, 54: 945-951, 2007.
2. S Yura*, H Itoh, N Sagawa, H Yamamoto, H Masuzaki, K Nakao, M Kawamura, H Mogami, Y Ogawa, S Fujii
   Neonatal Exposure to Leptin Augments Diet-induced Obesity in Leptin-deficient *ob/ob* Mice
   Obesity, 16:1289-1295, 2008.
3. H Mogami, S Yura*, H Itoh, M Kawamura, Tsuyoshi F, A Suzuki, S Aoe, Y Ogawa, N Sagawa, I Konishi, S Fujii
   Isocaloric high-protein diet as well as branched-chain amino acids supplemented diet partially alleviates adverse consequences of maternal undernutrition on fetal growth
   Growth Hormone & IGF Research, in press, 2009.

(2)特許

なし

(3)招待講演

1. 由良茂夫
「胎生期子宮内環境から見たメタボリックシンドローム発症機序の解析」
京都内分泌同好会
2006/09/09
2. 由良茂夫
「胎生期低栄養に起因するメタボリックシンドローム発症モデルマウスの解析」
日本産科婦人科ME学会
2006/07/21
3. 由良茂夫
「病態解析のための動物モデルの有用性」
第 59 回日本産科婦人科学会
2007/04/12

（4）シンポジウム
1. 由良茂夫
「胎児発育とレプチン」
第 23 回　日本糖尿病・妊娠学会
2007/11/23

（B）その他の主な成果
（1）論文（原著論文）発表
1. M Kawamura, H Itoh, S Yura, H Mogami, S Suga, H Makino, Y Miyamoto, Y Yoshimasa, N Sagawa, S Fujii.
Undernutrition *In Utero* Augments systolic blood pressure and cardiac remodeling in adult mouse offspring –Possible involvement of local cardiac angiotensin system in developmental origins of cardiovascular disease –
Endocrinology, 148: 1218–1225, 2007.
2. E Kitamura, Y Miki, M Kawai, H Itoh, S Yura, N Mori, K Sugimura, K Togashi
T1–signal intensity and height of the anterior pituitary in neonates: correlation with postnatal time.
American Journal of Neuroradiology, 29(7):1257–1260, 2008.

（2）学会発表
1. Haruta Mogami; Shigeo Yura; Hiroaki Itoh; Tuyoshi Fujii; Makoto Kawamura; Norimasa Sagawa; Shingo Fujii
「Improvement of the Fetal Growth Restriction caused by Maternal Food Restriction by Isocaloric High–Protein Diet」
The XXth Asian and Oceanic Congress of Obsterics and Gynaecology, Tokyo, Japan
2007/09/21–25