

「情報と細胞機能」研究領域 領域活動・評価報告書
—平成17年度終了研究課題—

研究総括 関谷 剛男

1. 研究領域の概要

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

2. 研究課題・研究者名

別紙一覧表参照

3. 選考方針

選考の基本的な考えは下記の通りである。

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

4. 選考の経緯

全応募課題につき領域アドバイザー8名が書類審査し、書類選考会議において面接選考の対象者を選考した。研究提案の口頭説明による面接選考は、研究総括ならびに領域アドバイザー8名で実施し、その結果に基づく総合選考を経て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	177名	28名	11(12*)名

*:1名は途中辞退。

5. 研究実施期間

平成14年11月～平成18年3月

6. 領域の活動状況

領域会議(非公開)を6回開催し、研究進捗の報告、討論および研究交流を図り、最終年度に研究成果報告会を開催し、3年間の研究成果を公表して評価をいただいた。

また、研究総括は研究開始時に研究者全員を訪問し、研究環境を確認した。なお、研究期間中に異動または研究調整の必要が生じた場合、状況に応じて研究者を訪問し、研究環境の調査および研究進捗状況の把握を行いつつ、アドバイスをを行った。

7. 評価の手続き

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

(評価の流れ)

平成 18 年 3 月	研究期間終了
平成 18 年 2 月	研究成果報告会開催
平成 18 年 3 月	研究報告書及び研究課題別評価提出
平成 18 年 3 月	研究総括による評価

8. 評価項目

課題研究目標の達成

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

9. 研究結果

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

本領域二期生 11 名は 3 年間の研究を順調に推進し、着実な成果をあげ、将来に向かっての研究基盤を固めたと考える。これらの研究成果は、生命科学および関連分野に大きなインパクトを与えるものとする。なお、研究成果と研究目標に対する達成度等は以下の個々の研究者による研究成果報告、自己評価および領域アドバイザーの評価を加味した研究総括の見解の通りである。

10. 評価者

研究総括 関谷 剛男 三菱化学生命科学研究所 所長

領域アドバイザー氏名(五十音順)

菊谷 仁	大阪大学 微生物病研究所 教授
渋谷 正史	東京大学 医科学研究所 教授
下遠野 邦忠	京都大学 ウイルス研究所 所長 兼 教授
中島 元夫	ジョンソン・エンド・ジョンソン株式会社ニュービジネス & テクノロ ジートランスファー ディレクター 兼 信州大学医学部客員教授
野田 哲生	東北大学 大学院医学研究科 教授
半田 宏	東京工業大学 大学院生命理工学科 教授
古市 泰宏	(株)ジーンケア研究所 所長
若林 敬二	国立がんセンター研究所 副所長

(参考)

(1) 外部発表件数

	国内	国際	計
論文	2	61	63
口頭	80	28	108
その他	25	0	25
合計	107	89	196

※平成 18 年 3 月現在

(2) 特許出願件数

国内	国際	計
8	1	9

※平成 18 年 3 月現在

(3) 受賞等

- ・秋光和也
日本植物病理学会 論文賞 (H16.3)
- ・高橋倫子
日本生理学会 奨励賞 (H16.6)

(4) 招待講演

- 国際 4 件
- 国内 8 件

別紙

「情報と細胞機能」領域 研究課題名および研究者氏名

研究者氏名 (参加形態)	研究課題名 (研究実施場所)	現職 (応募時所属)	研究費 (百万円)
秋光 和也 (兼任)	ミトコンドリア病発生制御分子の認識機構の解明	香川大学 農学部 教授 (同上 助教授)	33
石井 浩二郎 (兼任)	染色体ゲノムの機能領域を区分するバウンダリーエレメントの解明とその応用	久留米大学分子生命科学研究所 講師 (ジュネーブ大学 アシスタント研究員)	43
曾根 雅紀 (兼任)	シナプス回路形成機構のゲノム遺伝学的解析と精神研究への応用	京都大学 医学研究科 特任助教授 (日本学術振興会特別研究員 PD)	43
高橋 倫子 (兼任)	2光子励起法で解析する開口放出関連蛋白質の作用機序と糖尿病の病態解明への応用	東京大学 大学院医学系研究科疾病生命工学センター 特任講師 (自然科学研究機構 生理学研究所 助手)	34
茶野 徳宏 (兼任)	がん抑制遺伝子 RB1CC1 の機能解明とがん克服への挑戦	滋賀医科大学 医学部 助教授 (同上 助手)	43
豊田 英尚 (兼任)	糖鎖構造マスターコントロール遺伝子群による細胞機能の制御と創薬研究への応用	千葉大学大学院薬学研究院 助教授 (同上 助手)	44
西 毅 (兼任)	組織特異的なアイソフォームの関与する新しい細胞内ネットワークの解明	大阪大学 産業科学研究所 特任助手 (Tufts University School of Medicine, Research Assistant Professor)	36
平井 宏和 (兼任)	小脳失調症関連遺伝子の機能解明と治療に向けた標的遺伝子の導入技術開発	金沢大学 大学院医学系研究科 助教授 (St. Jude Children's Research Hospital、特別研究員)	57
牧野 雄一 (兼任)	低酸素シグナルによる生体機能調節機構の解明と疾患治療への応用	東京大学 医科学研究所附属病院 助手 (同上 教務職員)	42
宮戸 健二 (兼任)	受精の膜融合を制御する分子メカニズムの解明と不妊治療への応用	国立成育医療センター研究所 生殖医療研究部 研究室長 (大阪大学微生物病研究所 助手)	42
渡辺 英治 (兼任)	脳のナトリウムレベルセンサーの解明と生活習慣病克服への応用	自然科学研究機構 基礎生物学研究所 助教授 (同上)	46

研究課題別評価

1 研究課題名: ミトコンドリア病発生制御分子の認識機構の解明

2 研究者氏名: 秋光 和也

3 研究のねらい:

糸状菌の生産する毒素により引き起こされる植物ミトコンドリア病に関する研究を進める。この毒素への感受性は、ミトコンドリアゲノム遺伝子 *ACRS* で決定され、毒素への感受性/抵抗性は *ACRS*mRNA へのプロセッシングの有無により決定される。本研究は、この核ゲノム由来の *ACRS*mRNA プロセッシングに関連する蛋白質の遺伝子単離と制御メカニズムの解明を目指す。また、本毒素により阻害される宿主防御機構と、病原菌において毒素生合成に関与する遺伝子クラスターの単離と解析を進める。

4 研究成果:

カンキツに感染する病原性 *Alternaria* 菌の感染機構に関する研究を進めた。特定のカンキツ品種に発病する *Alternaria* 病は、1903 年オーストラリアで最初に報告され、現在では世界各地のカンキツ栽培地帯で重要病害となっている。本病原菌は、当初 *A. citri* と同定されたが、後にタンゼリン・マンダリン等を宿主とする系統とラフレモンを宿主とする系統の異なる宿主範囲を持つ 2 系統の *A. alternata* により引き起こされ、またそれぞれの系統が異なる宿主特異的毒素を生産することが明らかになった。現在では、これら 2 系統は *A. alternata* tangerine pathotype と *A. alternata* rough lemon pathotype と呼ばれ、またそれぞれの系統が生成する ACT および ACR 毒素はその化学構造も明らかにされた(図)。

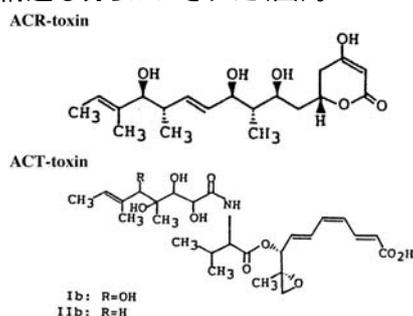


図 ACT・ACR 毒素の化学構造

この宿主特異的毒素の一つである ACR 毒素の第一次作用点は宿主細胞のミトコンドリアにあり、毒素の作用機構は酸化的リン酸化の脱共役と補因子の漏出による TCA 回路の停止である。この毒素に対する宿主カンキツのレセプター遺伝子探索を進め、ドーパミン、グルタミン酸、黄体形成ホルモン等のレセプターの部分領域と高い相同性を示すラフレモンミトコンドリアゲノム遺伝子 *ACRS* を単離した。

ACRS 遺伝子を介した宿主特異性決定機構の解析をさらに進展させ、毒素への感受性/抵抗性

は本遺伝子転写物へのプロセッシングの有無により制御されていることも明らかにした。ACR 毒素はラフレモンミトコンドリアにのみ、脱共役と TCA 回路関連補因子のミトコンドリア外部への漏出を誘起する。また、pH 電極と単離ミトコンドリアを用いた解析でも、ACR 毒素処理直後から膜電位の消失がおり、ACR 毒素の作用機構は毒素処理直後に起こるミトコンドリア膜への孔(pore)形成ではないかと推測された。*ACRS* の推定アミノ酸配列から本遺伝子産物の分子量は 6683 と算出されたが、ACRS 抗体により、ラフレモンミトコンドリア画分から本遺伝子産物の 2,3,4 量体が検出され、ACRS は SDS-PAGE により解離しない SDS 耐性型多量体を形成することが明らかとなった。このような SDS 耐性型の多量体形成蛋白質は、孔形成型の膜貫入レセプター蛋白質に多く、ACR 毒素の作用であるミトコンドリア膜への孔形成による脱共役と TCA 回路の補因子の漏出と合致した。そこで、サブミトコンドリアパーティクルを用いたミトコンドリア膜の孔形成の実測を試みた。サブミトコンドリアパーティクルとは、ミトコンドリア膜に膜蛋白質等を入れたままの状態、リポソームを形成させたものである。このサブミトコンドリアパーティクル形成時に蛍光色素である ANTS とその消光剤である DNTP の複合体を混入して、毒素処理後に孔形成が起きて、ANTS/DNTP が漏出すると DNTP が解離して、ANTS 由来の蛍光が測定できる。本手法により、孔形成の実測を行ったところ、ラフレモンミトコンドリア膜に毒素を処理した場合にのみ、膜に孔形成

がおきて膜内の物質の漏出が認められた。この膜への孔形成は、*ACRS* を発現させた大腸菌膜由来のパーティクルを用いた検定においても認められ、ラフレモンミトコンドリアにおける *ACR* 毒素処理後の孔形成は *ACRS* 発現産物との相互反応の結果誘起されることを明らかにした。

先にも述べたように、*ACR* 毒素への感受性／抵抗性は本遺伝子転写物へのプロセッシングの有無により制御されている。このプロセッシングに関与する因子は核遺伝子支配であり、毒素抵抗性の 2 品種の細胞を融合させ、核とオルガネラの由来が異なるサイブリッドにすると、核因子とオルガネラの不親和により *ACRSmRNA* のプロセッシングが起きずに毒素感受化する。そこでこの核遺伝子由来のプロセッシングに関与する因子の単離に向けて 2 つの研究を進めた。

一つ目の研究は、*ACRS* を発現ベクターにより発現させることにより感受化した大腸菌ゲノムに、毒素抵抗性植物の cDNA ライブラリーを溶原化させ、*ACRS* と cDNA の共発現により毒素感受性が消失した個体を選抜した。毒素感受性が消失した個体の挿入 cDNA を解析したところ、19 bp の cDNA でその配列から *ACRSmRNA* の 3 カ所にアニールする可能性が示された。近年、短鎖の RNA が microRNA として生物的に重要な役割を果たすことが明らかにされてきた。この 19 bp RNA が *ACRSmRNA* の修飾にどのような役割を持つのかは現時点では明らかではないが、継続してその役割の解明に努めたい。

次に *ACRSmRNA* を StrepTag 法でセファロースに結合させてアフィニティーカラムを作製した。このカラムを用いて、毒素抵抗性カンキツ葉組織磨砕液の可溶性蛋白質画分から分子量約 30kd の *ACRSmRNA* 結合蛋白質を単離した。本手法は、mRNA と 30kd 蛋白質が結合した状態で回収するが、mRNA 結合は 30kd 蛋白質のトリプシンへの耐性を誘導し、アミノ酸内部配列の決定が困難であった。そこで、mRNA を解離させる条件下でトリプシン処理して、6 つのトリプシン処理断片からそれぞれ 3 から 7 残基のアミノ酸配列を決定した。この配列をもとに RT-PCR で本蛋白質遺伝子の内部配列を決定したところ、動物の RNP タイプの RNA 結合蛋白質と配列類似性が認められた。これまで、植物では RNP タイプの RNA 結合蛋白質の研究例は少ないが、葉緑体に局在する同タイプの RNA 結合蛋白質の研究例で、免沈により premature な tRNA が落ちてきた例があった。葉緑体での研究はその後進んでいないが、*ACRS* はミトコンドリアゲノムの tRNA-Ala の介在領域に座乗することから、本 30kd 蛋白質は標的とする *ACRSmRNA* 結合蛋白質であり、本蛋白質を毒素感受性カンキツで発現させ、ミトコンドリアに局在させることにより、*ACRSmRNA* 結合による翻訳阻害を引き起こし、毒素レセプターの欠損による耐性化が期待できると考えている。

ACR および *ACT* 両毒素を生産し、タンゼリン及びラフレモンの両植物に対し病原性を示すフロリダ産圃場菌株 BC3-5-1-OS2A を得た。この OS2A 株の染色体をパルスフィールド電気泳動で解析したところ、これまで 10 個の生合成遺伝子を単離して、その機能を解析してきた *ACT* 毒素生合成遺伝子クラスターが 1.05Mb の小型染色体に座乗し、*ACR* 毒素生合成関連遺伝子は 2.0Mb と 1.05Mb 染色体に座乗することが明らかとなった。この *ACR* 毒素生合成関連遺伝子は、*ACR* 毒素生産菌株のみが保有する 1.5 Mb の小型染色体に座乗することを明らかにした。本病原菌 HC1 株のゲノム DNA を用いて BAC ライブラリーを作製して、HC1 株の 1.5 Mb 小型染色体に座乗するゲノム領域から作製した RP10-2 プローブを用いて BAC ライブラリーを選抜し、BAC クローン 3M8 を得た。この BAC クローン 3M8 の挿入ゲノム領域約 100,000 bp の塩基配列決定をショットガン法により試み、総決定配列数 610,740 bp からアッセンブル解析を行い、平均リダンダンシー 5.34 で配列長が数百 bp から 58,600 bp の 16 個の contigs を得た。得られた contigs の配列解析により推定 ORF を導き出し、各種 *Alternaria* 宿主特異的毒素生産・非生産菌ゲノムにおけるそれぞれの ORF 配列の分布検定を行ったところ、その中に rough lemon pathotype のゲノムにのみ特異的に存在する ORF がいくつか存在することが明らかとなった。

さらに、*ACR* 毒素感受性のラフレモンの防御機構を明らかにするために、非病原性 *Alternaria* 属菌 (SH20) を接種して抵抗性を誘導したラフレモン葉から調製した cDNA と、無処理葉から調製した cDNA を用いて subtractive PCR を行い、抵抗性誘導下でより強く発現する遺伝子の探索を試みた。得られた 500 クローンの配列を解析した結果、約 6% のクローンが抵抗性に関連すると既に報告されている遺伝子と相同性を示し、約 10% は病原菌以外のストレス応答性関連遺伝子と相同性を示した。得られた各遺伝子の解析を順次進展させ、10 個の遺伝子の機能解析を完了した。また、*Alternaria* 属菌で宿主特異的毒素を生産しない菌株も用いて、毒素以外の病原性因

子として細胞壁分解酵素の機能を解析した。

5 自己評価:

研究開始時の最大の目標とした ACR 毒素のレセプター遺伝子 mRNA に結合する蛋白質の単離に成功した。このことから研究期間の目標の最低限はクリアーしたと考える。また、ACR 毒素合成に関与する遺伝子クラスターも特定でき、標的遺伝子破壊法を用いた個々の遺伝子の機能解析が順調に進んでいる。さらに、病原菌に対する防御関連遺伝子の単離と、毒素を生産しないタイプの *Alternaria* 属菌の病原性因子として細胞壁分解酵素の機能を解析することができた。これらの成果より、当初の目標以上の進展・成果が得られたと考える。今後これらの成果の論文公表により、より目に見える形で成果を示していく。

6 研究総括の見解:

糸状菌毒素 ACR に対するミトコンドリア遺伝子のコードする受容体ACRSを同定し、そのミトコンドリア膜に穴を開ける機構を明らかにしたこと、核遺伝子でコードされる30KD蛋白質がACRS mRNAに結合して翻訳を阻害することによりACRSの産生を抑え毒素耐性をもたらす機構を解明したこと、は研究の目的を見事に達成した成果として高く評価できる。19bpRNAの関与などまだ解けない謎の解明が楽しみである。植物におけるこのような機構の存在の意義から何か人の疾病克服へのヒントが期待される。

7 主な論文等:

論文:

1. Isshiki, A., Ohtani, K., Kyo, M., Yamamoto, H. and Akimitsu, K. Green fluorescent detection of fungal colonization and endopolygalacturonase gene expression in the interaction of *Alternaria citri* with citrus. *Phytopathology* **93**, 768-773 (2003).
2. Gomi, K., Yamamoto, H. and Akimitsu, K. Epoxide hydrolase: A mRNA induced by a fungal pathogen *Alternaria alternata* on rough lemon (*Citrus jambhiri* Lush). *Plant Molecular Biology* **53**, 189-199 (2003).
3. Timmer, L.W., Peever, T.L., Dolel, Z. and Akimitsu, K. *Alternaria* diseases of citrus: novel pathosystems. *Phytopathologia Mediterranea* **42**, 99-112 (2003).
4. Akimitsu, K., Ohtani, K. and Yamamoto, H. Mitochondrial gene controlling toxin sensitivity and specificity in plant and fungus interaction. *Proceeding of 2003 International Symposium of Korean Society of Agricultural Chemistry and Biotechnology*, 61-68 (2003).
5. Gomi, K., Yamasaki, Y., Yamamoto, H. and Akimitsu, K. Characterization of a hydroperoxide lyase gene and effect of C6-volatiles on expression of genes of the oxylipin metabolism in Citrus. *Journal of Plant Physiology* **160**, 1219-1231 (2003).
6. Ohtani, K., Isshiki, A., Katoh, H., Yamamoto, H. and Akimitsu, K. Involvement of carbon catabolite repression on regulation of endopolygalacturonase gene expression in citrus fruit, *Journal of General Plant Pathology* **69**, 120-125 (2003).
7. Akimitsu, K., Peever, T.L. and Timmer, L.W. Molecular, ecological and evolutionary approaches to understanding *Alternaria* diseases of citrus. *Molecular Plant Pathology* **4**, 435-446 (2003).
8. Akimitsu, K., Ohtani, K., Masunaka, A., Yamasaki, Y., Katoh, H. and Yamamoto, H. A role of mitochondrial gene controlling specificity in plant disease. *The proceedings of 9th US-Japan Science seminar*, 259-269 (2003).
9. Ito, K., Tanaka, T., Hatta, R., Yamamoto, M., Akimitsu, K. and Tsuge, T. Dissection of the host range of the fungal plant pathogen *Alternaria alternata* by modification of the secondary metabolism. *Molecular Microbiology* **52**, 399-411 (2004).
10. 秋光和也、山本弘幸:糸状菌へのカンキツ防御応答機構:植物病の探求、35-40, 植物病の探求出版会(2004).

11. Akimitsu, K., Ohtani, K., Gomi, K., Nalumpang, S., Yamasaki, Y, Masunaka, A., and Yamamoto, H. A role of host-selective toxin for controlling citrus defense systems against *Alternaria* pathogens. *Botanica* **54**, 1-11 (2004).
12. 秋光和也・大谷耕平・五味剣二・増中章・多々納智・小野由希子・佃晋太郎・本田篤・加藤寛・山崎祐未子・山本弘幸:カンキツにおける宿主特異的毒素の認識機構と異物認識反応: 自他識別と応答のバイオフィロントニア、1-12, 日本植物病理学会 (2004).
13. Ohtani, K., Masunaka, A., Yamasaki, Y., Yamamoto, H. and Akimitsu, K. Tailor-made toxin target controlling the specificity of ACR-toxin. In *Biology of Molecular Plant-Microbe Interactions*, Volume 4, (Lugtenberg B. et al. Eds). APS Press, 154-157 (2004).
14. Akimitsu, K., Isshiki, A., Ohtani, K., Yamamoto, H., Eshel, D. and Prusky, D. Sugars and pH: A clue to the regulation of fungal cell wall-degrading enzymes in plants. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **65**, 271-275 (2004).
15. Masunaka, A., Ohtani, K., Peever, T.L., Timmer, L.W., Tsuge, T., Yamamoto, M., Yamamoto, H., and Akimitsu, K. An isolate of *Alternaria alternata* that is pathogenic to both tangerines and rough lemon and produces two host-selective toxins, ACT- and ACR-toxins. *Phytopathology* **95**, 241-247 (2005).
16. Tsukuda, S., Gomi, K., Yamamoto, H. and Akimitsu, K. Characterization of cDNAs encoding two distinct miraculin-like proteins and stress-related modulation of the corresponding mRNAs in *Citrus jambhiri* Lush. *Plant Molecular Biology* **59**, in press (2005).

特許: 1件

相沢慎一、秋光和也、水崎英明、山崎祐未子:モノテルペンを含む細菌性物質分泌阻害剤、及び該阻害剤を用いる保存処理方法:特願 2004-133197(2004).

受賞:

平成16年3月28日 日本植物病理学会論文賞

招待講演:計5件

- 1) International Congress of Plant Pathology (ICPP): NZ, Christchurch (2003)
- 2) International Congress of Molecular Plant-Microbe Interactions (IS-MPMI):
Russia, St. Peterburg (2003)
- 3) US-Japan Scientific Seminar: Shizuoka (2003)
- 4) 岡山県生物科学総合研究所(RIBS)シンポジウム: 岡山(2003)
- 5) NIAS-COE/PROBRAIN/TOKUTEI Joint International Symposium: Tsukuba (2004)

研究課題別評価

1 研究課題名: 染色体ゲノムの機能領域を区分するバウンダリーエレメントの解明とその応用

2 研究者氏名: 石井浩二郎

3 研究のねらい:

染色体ゲノムからの遺伝子の発現制御は、主に遺伝子 DNA の折り畳み度を調節するクロマチン構造の変化で体现される。従って遺伝子が連なった各染色体には、全長に沿って異なるクロマチン構造領域が混在することになる。しかしながら各領域のクロマチン構造は近傍 DNA に自律的に伝播していく特性を有するため、特に遺伝子が近接している染色体部位においては、クロマチン構造変換効果を遮断してあいまいさを排除する「隔壁」が、ダイナミックな細胞プログラムの緻密かつ正確な発動にとって不可欠となる。そのようなクロマチン構造の隔壁として働く「バウンダリーエレメント」の研究は現在世界各地で進められているが、その分子的本質は未だ不明なままである。本研究では、染色体ゲノムの機能領域を区分すると考えられるバウンダリーエレメントが特にヘテロクロマチン構造を遮断する仕組みについて、分裂酵母を実験材料に詳細な解析を行った。

4 研究成果:

本研究においては、1) 染色体上でヘテロクロマチンを遮断している生来のバウンダリーエレメントの解析、2) ヘテロクロマチン領域の拡大を引き起こす分子作用の理解、3) ヘテロクロマチンの拡大を構造的に阻止する能力を持つ蛋白質因子の機能的探索、の 3 点を中心にバウンダリーエレメントの解析を進めた。

1) 染色体上でヘテロクロマチンを遮断している生来のバウンダリーエレメントの解析

ヘテロクロマチンは遺伝子転写を抑制する閉じたクロマチン構造であり、特異的なヒストン修飾やその修飾特異的な結合蛋白質 HP1 が分子基盤を担う。分裂酵母でもそれらの要素は高度に保存され、染色体動態を制御するセントロメア DNA 部分では、Mis6 キネトコア複合体を構成する中央ドメインの両端の反復 DNA 部位上に形成される。セントロメア DNA でのヘテロクロマチン領域と非ヘテロクロマチン領域を決定する分子要因を解析した結果、開かれた中央ドメインと閉じたヘテロクロマチンドメインの領域画定は相互のクロマチン構造に依存して拮抗的に達成されていることが判明した。中央ドメインの周辺ヘテロクロマチンとの境界は DNA 一次配列に規定された絶対的なものではなく、この領域には構造的な隔壁は存在しないと考えられる。

2) ヘテロクロマチン領域の拡大を引き起こす分子作用の理解

ヘテロクロマチンの遮断機構を解明するためには、ヘテロクロマチンの拡大を引き起こす機構の十分な理解も必要である。これまでヘテロクロマチンの拡大は、特異的なヒストン修飾が結合蛋白質を通じてヌクレオソームアレー上を隣に伝播していくことで引き起こされていると考えられていた。しかし近年になって、ヘテロクロマチンを形成する反復 DNA 配列から RNA が転写され、その産物が RNAi 機構によって siRNA に処理されてエフェクター複合体に取り込まれることが、ヘテロクロマチンの形成自体に関わっていることが報告された。ヘテロクロマチンが siRNA に導かれて染色体上を伝播する可能性を検証するために、分裂酵母で生成される siRNA の詳細な解析を行った。その結果、siRNA 生成は SIRE (siRNA regulatory element) を含む特異的な転写産物によって引き起こされ、それが誘導するヘテロクロマチンの近傍 DNA 領域への拡大は siRNA の配列とは独立であることが判明した。RNAi 機構を介するヘテロクロマチン形成はヘテロクロマチンの核として特徴的な役割を果たすが、領域の境界の画定自体はヒストン修飾のレベルで行われているものと思われる。興味深いことに、SIRE はセントロメア以外のヘテロクロマチン領域のゲノム配列にも存在し、遺伝子のコード領域に含まれる例も見出された。SIRE は RNA を鋳型とした RNA 転写反応の開始に関与することを示すデータを得ており、RNAi 機構の引き金となる二本鎖 RNA 形成において機能すると考えられる。

3) ヘテロクロマチンの拡大を構造的に阻止する能力を持つ蛋白質因子の機能的探索

ヘテロクロマチンを遺伝子転写の上で拮抗的ではなく中立的に遮断する因子を探索するために、分裂酵母染色体上に二つの栄養要求性マーカーなどを組み合わせたバウンダリーエレメントのアッセイコンストラクトを作成した。両端に SIRE に関連したヘテロクロマチン源を配置し、DNA 標的配列で一方のマーカーのみを挟むことにより、そのマーカーのみのヘテロクロマチンからの脱抑制をバウンダリーエレメント樹立の指標とした。ヘテロクロマチンを拮抗的に遮断する因子は両マーカーを共に活性化するため、区別が可能となる。このアッセイシステムに DNA 標的化蛋白質と融合させた発現ライブラリを適用して、中立的バウンダリーエレメントを誘導する蛋白質の直接的単離を目指した。当初の LexA 蛋白質を活用した DNA 標的化システムは、LexA 自体の示すバックグラウンド活性によって十分に機能しなかったが、Gal4 蛋白質との融合に切り替えることで特異性の向上が得られた。その結果、分裂酵母においても核膜孔複合体への染色体の物理的相互作用がヘテロクロマチンの遮断を引き起こすことが判明した。その他の構造的要素についても解析が進んでいる。

5 自己評価:

本研究は、分裂酵母を用いたバウンダリーエレメントアッセイ系の樹立を大前提としたが、予想に反してその達成に大変に時間を要した。分裂酵母では十分に確立されたヘテロクロマチン源の報告が皆無で、ヘテロクロマチン源の配列同定を自ら行う必要があり、それが難航したことが大きな理由としてあげられる。また、DNA 標的化システムも分裂酵母にはほとんど導入前例が無く、系を確立し終えて初めて LexA の不適切さが判明するなど、全てにおいて常に手探りの状態が続いた。既に何十年もヘテロクロマチン源や DNA 標的化システムに関して蓄積のある出芽酵母と同様に分裂酵母を捉えたことに関して、当初の見込み違いを認めざるを得ない。しかし、留学終了後の何もない状態から諦めることなく地道にデータを積み上げ、最終的に予定したアッセイ系の樹立に至った。高等生物への応用も含めたその重要性和出芽酵母をしのぐ有用性については高く評価でき、今後の発展が大いに期待できると考える。また、ヘテロクロマチン源同定の試みの一環として分裂酵母 RNAi 機構にも正面から取り組み、その結果 SIRE に関する大きな発見と産業応用の期待できる2件の特許が生まれた。こちらの関連研究も今後の発展が高く期待できると捉えている。

6 研究総括の見解:

ヘテロクロマチン構造を遮断するバウンダリーエレメントの解明という大きな課題に、分裂酵母を材料に挑み、siRNA生成に関与するSIREの解明、核膜孔複合体への染色体の相互作用の存在などヘテロクロマチンと非ヘテロクロマチン構造領域を決定する要因に関してしかるべき成果を挙げたと考える。しかし、いずれも、既にこの分野では考えられていたことを分裂酵母でその存在を示したに留まった感がある。分裂酵母で築いた解析システムを駆使して、この系ならではの独自の発見を積み重ねていただきたい。

7 主な論文等:

論文(3件)

1. Ishii, K. and Laemmli, U. K.: Structural and dynamic functions establish chromatin domains. **Molecular Cell** 11: 237-248, 2003
2. Saitoh, S., Ishii, K., Kobayashi, Y. and Takahashi, K.: Spindle checkpoint signaling requires the Mis6 kinetochore subcomplex, which interacts with Mad2 and mitotic spindles. **Molecular Biology of the Cell** 16: 3666-3677, 2005
3. Ishii, K., Hiraga, Y. and Takahashi, K.: An RNA element controlling siRNA production and heterochromatin assembly in fission yeast. (submitted)

総説(4件)

1. 石井浩二郎:核膜孔への連繋による染色体の機能的区分。 **実験医学** 21: 1874-1880,

2003

2. 石井浩二郎: バウンダリーエレメント。 **生体の科学** 55: 398-399, 2004
3. 石井浩二郎: 小分子 RNA と染色体制御。 **BIO Clinica** 20: 1077-1082, 2005
4. Ishii, K.: Breaking and tessellating the contiguous nuclear genome. In **Nuclear Dynamics**, Nagata T. and Takeyasu K. Ed., Springer-Verlag Inc. (in press)

特許(2件)

特願 2005-013338 「小分子 RNA の検出方法および小分子 RNA 検出用試薬」

特願 2005-145876 「RNA 干渉誘導エレメント及びその用途」

招待講演(5件)

1. 石井浩二郎、Ulrich K. Laemmli; 染色体の区分化を担うバウンダリーエレメントの分子機構。 **日本細胞生物学会大会**(第 56 回; 大津; 2003)
2. Ishii, K. and Laemmli, U. K.: Molecular mechanisms of boundary elements that delimit heterochromatin domains. **日本生化学会大会**(第 76 回; 横浜; 2003)
3. 石井浩二郎、Laemmli, U. K.、平賀由利子、高橋考太: バウンダリーエレメントによるヘテロクロマチン領域画定機構。 **日本分子生物学会年会**(第 26 回; 神戸; 2003)
4. 石井浩二郎: 酵母を用いた染色体機能ドメイン構築の機構解剖。 **酵母合同シンポジウム**(第 16 回; 大阪; 2004)
5. 石井浩二郎、平賀由利子、高橋考太: 分裂酵母セントロメア配列による siRNA 産生とヘテロクロマチン形成の誘導。 **日本分子生物学会年会**(第 28 回; 福岡; 2005)

研究課題別評価

1 研究課題名: シナプス回路形成機構のゲノム遺伝学的解析と精神研究への応用

2 研究者氏名: 曾根 雅紀

3. 研究のねらい:

ヒト、マウス、ショウジョウバエなどの多くの生物の全ゲノム配列が決定された現在でも、未だに機能が未解析の遺伝子が多く存在する。ゲノム上の遺伝子の大多数は神経系で発現しているが、そのうちで神経系における機能が記載されているものは少数であり、未同定の重要な機能分子を探索していくことが、脳神経系の機能原理の解明、および脳神経系の機能異常によって起きる様々な精神神経疾患の発症機序と病態解明のために不可欠である。未同定の機能分子を網羅的に探索していくためには様々なアプローチがあるが、その中でもショウジョウバエ遺伝学はある生物学的プロセスにおいて重要な機能を持つ未知の遺伝子を探索するための強力な手法であり、実際に例えば発生生物学の分野では、多くの先駆的な研究成果がショウジョウバエ遺伝学から明らかになってきている。本研究では、ショウジョウバエ遺伝学を用いて脳神経系の機能および病態に関わる新規分子の同定を目指した。特に、われわれがこれまでに明らかにしてきたシナプス分子のシナプスへの局在化機構に関する知見を応用して、シナプスに局在化する分子を遺伝学的に探索するための新しい方法の開発を目指した。

4. 研究成果:

われわれは、ショウジョウバエの既知シナプス分子であるHIG蛋白質のシナプスへの局在化機構を解析し、シナプスへの局在化シグナルを同定するとともに、その局在がアルツハイマー病原遺伝子であるAPP(アミロイド前駆体蛋白質)のショウジョウバエホモログによって制御されていることを明らかにした。さらに、シナプスへの局在化を失った改変 HIG 蛋白質を用いてシナプス分子のエクソントラップスクリーニングを行っていくための予備実験を現在進めている。

以上の研究の過程で、われわれは、神経変性疾患、特にアルツハイマー病に関連する可能性のある興味深い新規ショウジョウバエ遺伝子(仮称: 517 遺伝子)を同定した。517 遺伝子のホモ接合体は羽化後早期に死亡した。さらに、この早期死亡の表現型は、APP 遺伝子との二重 loss-of-function 変異で顕著に増悪した。517 変異体は、複眼神経組織において、光受容神経細胞の発生異常と組織極性異常を示し、いくつかの個体においては神経変性が起きていることが示唆された。517 変異体の翅には、Notch シグナルの異常を示唆する表現型が認められ、遺伝学的レポーター系統を用いた実験から、APP と Notch を切断するプロテアーゼであるガンマセクレターゼ活性が低下している可能性が示唆された。また、ショウジョウバエ APP 蛋白質は神経細胞内でシナプスに輸送されて局在するが、517 変異体では APP のシナプスへの輸送が異常になり、細胞体の核辺縁領域(小胞体である可能性がある)に留まっているのが観察された。以上の結果から、517 遺伝子産物は、APP および関連分子の小胞体からのトラフィッキングを制御しており、517 変異体においては、それらの分子の局在および機能が異常になることによって神経変性が起きるのではないかと考え、この仮説を検証するための実験を現在進めているところである。

これまでに、家族性アルツハイマー病の原因遺伝子として APP およびガンマセクレターゼの構成要素であるプレセニリンが同定され、APP のプロセシング産物であるアミロイドベータの異常産生と沈着がアルツハイマー病発症の原因であるとする有力な仮説がある。しかしながら、ヒト変異型 APP を発現するマウスにおいて、アミロイドベータの沈着、シナプスの機能異常、および認知障害が観察されるものの、神経変性がほとんど起きないことから、アルツハイマー病神経変性には未知の分子機構がさらに寄与している可能性がある。517 遺伝子産物が APP および関連分子の細胞内トラフィッキングを制御している新規分子であれば、この分子の発見が、未だによくわかっていない APP の生理的な機能の解明に示唆を与える可能性がある。さらに、興味深いのは、517 変異体で神経変性が起き、この表現型が APP の機能喪失変異によって増悪するという点である。したがって、今後の課題としては、517 変異体においていかなる分子機序で神経変性が起きるの

かを明らかにしていくことが重要である。それによって、APP の細胞生物学的な挙動および機能と神経変性を結びつける分子経路を明らかにすることができれば、アルツハイマー病神経変性機構の解明に示唆を与え貢献していくことができるものと期待される。

5 自己評価:

ショウジョウバエ遺伝学の最大のメリットは未知の重要な分子を何も手がかりのないところから探索し発見できるということであり、脳神経系の機能と病態に関わる全く新しい分子を発見していきたいと考えたことが本研究の動機である。本研究では、エクソトラップ法を応用したシナプス分子スクリーニング法の開発を試みたが、現在、既知シナプス分子を用いた予備実験の段階にある。最近、ゲノム研究の成果を応用した新規シナプス分子の同定が報告されてきているので、それらを用いて予備実験を行っていかうとしている。本研究において、APP のシナプス局在化機構を解析していた過程で、おそらく APP および関連分子のトラフィックに関わると思われる全く新しい分子を発見した。興味深いことに、発見した新規分子の表現型では神経変性が起き、またこの分子には哺乳類にもよく保存されたホモログがあることから、この分子を解析していくことによって、アルツハイマー病の神経変性機構解明に手がかりを与えられるのではないかと期待している。ぜひ早期に、(1)新規分子の分子機能(APP および関連分子のトラフィック制御?)、(2)新規分子の変異体における神経変性・早期死亡の原因、の二点を解明し、論文としてまとめたいと思っている。この二点をクリアに明らかにすることができれば、APP の生理的な機能およびそれを介した神経細胞の生存維持機構に重要な示唆を与えることができるのではないかと期待している。

6 研究総括の見解:

シナプスに局在する分子の探索の過程で、アルツハイマー病の原因蛋白質をもたらす APP のシナプスへの輸送に関与すると考えられる蛋白質をコードする517遺伝子を同定したことは評価できる。しかし、その機能、特にアルツハイマー病の理解との関連における機能の解明が端緒についたばかりでさきあげ研究が終了してしまうのは残念である。もう少し鋭い切り口での今後の発展を期待する。

7 主な論文等:

論文

1. M. Yoshizawa, M. Sone, N. Matsuo, T. Nagase, O. Ohara, Y. Nabeshima and M. Hoshino: Dynamic and coordinated expression profile of Dbl-family guanine nucleotide exchange factors in the developing mouse brain. *Gene Expr. Pat.* 3: 375-381, 2003
2. M. Yoshizawa, M. Sone*, T. Kawauchi*, Y. V. Nishimura, M. Terao, K. Chihama, Y. Nabeshima and M. Hoshino: Involvement of a Rac activator, P-Rex1, in neurotrophin-derived signaling and neuronal migration. *J. Neurosci.* 25: 4406-4409, 2005 (* : equal contribution)
3. M. Hoshino, S. Nakamura, K. Mori, T. Kawauchi, M. Terao, Y. V. Nishimura, A. Fukuda, T. Fuse, N. Matsuo, M. Sone, M. Watanabe, H. Bito, T. Terashima, C. V. E. Wright, Y. Kawaguchi, K. Nakao and Y. Nabeshima: *Ptf1a*, a bHLH transcriptional gene, defines GABAergic neuronal fates in cerebellum. *Neuron* 47: 201-213, 2005

研究課題別評価

1 研究課題名:

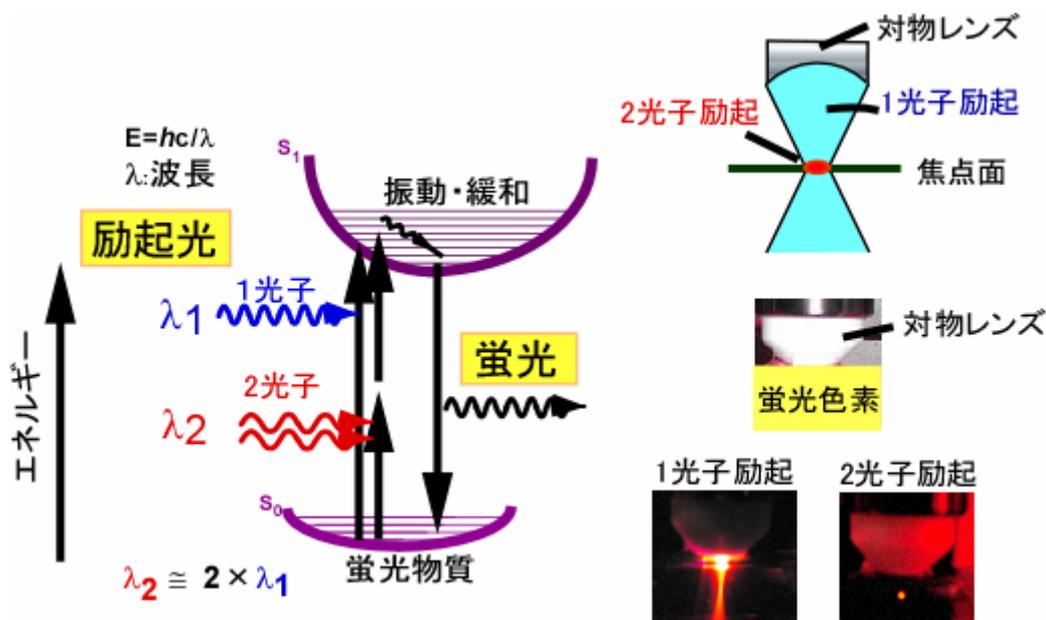
2 光子励起法で解析する開口放出関連蛋白質の作用機序と糖尿病の病態解明への応用

2 研究者氏名:

高橋 倫子

3 研究のねらい:

膜融合への関連の示唆される蛋白質が、開口放出過程において如何に作用するかは、どの分泌標本においても不明である。さきがけ研究を開始する前に、2光子励起断層画像法を用いて、膵島の内部でおこるインスリン分泌顆粒の開口放出現象を、定量的に可視化する実験系を確立した。そして、インスリン顆粒の融合細孔は他の細胞に比べ、より緩徐に開大することを見出し、細孔形成時期前後の解析に適した実験系を提供すると考えられた。そこで、当画像手法の同時多重染色性を利用して、SNARE に代表される関連蛋白質の動態と作用につき、開口放出の起こる部位において解析し、インスリン分泌異常をひとつの主因とする糖尿病の、病態解析と克服に向けた知見の獲得を目的とした。



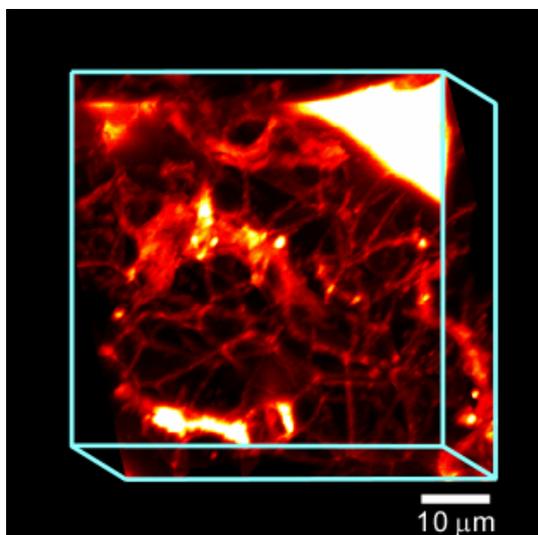
2光子励起の原理図。 1光子励起に必要な励起光に比べ2倍の波長を持つ光で起こる。実現確率が小さいため、対物レンズで集光した場合には、焦点面のみで断層的に起こる。近赤外超短パルスレーザーの実用化により、1990年代以降生物標本観察への応用が可能になってきた。

4 研究成果:

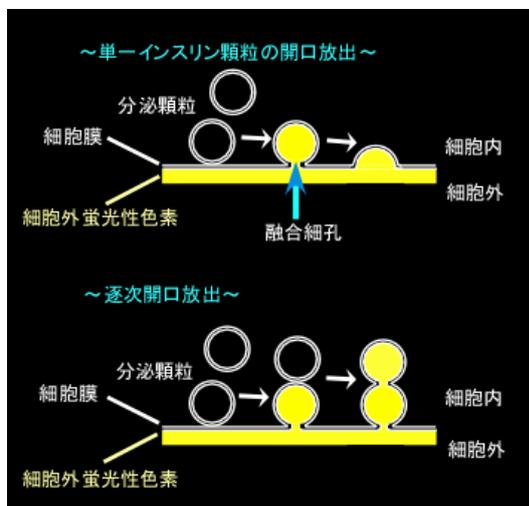
(1) 開口放出の様式と細胞膜性 SNARE 蛋白質

研究を進める上で、膵島では開口放出の様式が特異であり、複合型開口放出の抑制されている特徴をもつことを同定した¹⁾。複合型開口放出様式とは、複数の分泌顆粒が一つの融合細孔を共有する様式であり、①細胞膜と融合した分泌顆粒の膜に、深部の顆粒が膜融合する逐次開口放出と、②複数の顆粒が細胞内で予め融合した後に細胞膜と融合する multigranular exocytosis の2型に分類される。我々が選択している分泌の可視化法は、水溶性蛍光色素液で組織を還流しながら組織深部を観察する手法であるが (Two-photon Extracellular Polar-tracer imaging, TEP 法²⁾, Takahashi N., et al. *Science*, 297, 1349, 2002)、この実験は、内部遮蔽効果の回避される2光子励起法を利用することによって初めて可能となった。本法により、血球系・外分泌

系・内分泌系など、他の多くの分泌組織において、複合型開口放出が主に起こっていることがはじめて確定的になった(Nemoto T. et al., *Nat. Cell Biol.* 3,253,2001, Kishimoto T. et al. *J. Physiol.* 568,905,2005)。複合型の分泌様式は、大量かつ局所的な分泌を可能とし、各種組織の機能を最適化する上で合目的と考えられる側面がある。

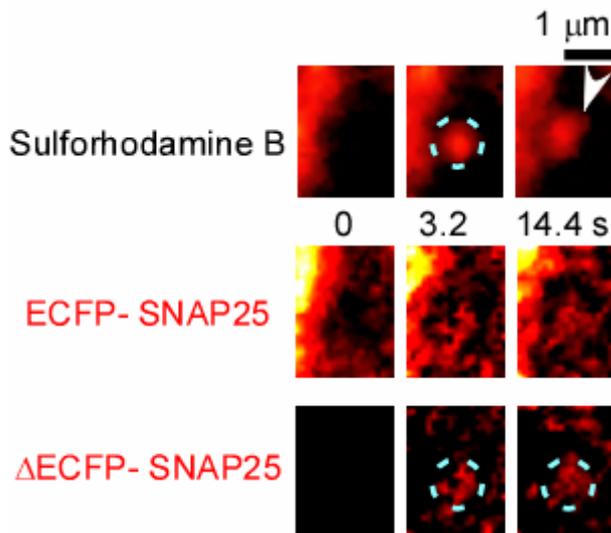


水溶性蛍光色素液 (Sulforhodamine B 液) で還流したマウス膵島の三次元再構築 2 光子励起画像 (TEP 画像²⁾)。



開口放出過程の画像化。細胞外蛍光色素が融合細孔を逆流して分泌顆粒内を染め出す過程と、その以降におこる現象 (post-fusional event) を観察できる。

膵島で複合型開口放出の頻度を測定した結果、逐次開口放出の出現頻度は全現象の 1-5 % にきわめて強く抑制されている事実を見出した。multigranular exocytosis も殆ど検知されなかったため、その分子基盤につき、検討を進めた。逐次開口放出を起こすためには、膜融合した第一の顆粒の膜に細胞膜由来の融合因子が供給されることが必須であると、推察されたが、膵島で細胞膜性 SNARE 蛋白質の一つ; SNAP25 分子を蛍光標識して、顆粒膜への側方拡散を検討したところ、拡散例では逐次開口放出を起こす頻度が 10 倍高く、かつ、膵島標本ではこうした拡散自体が 2% に抑制されている事実が判明し¹⁾、SNARE 分子の拡散と、逐次開口放出の間には関連のあることが示唆された。他に、逐次的な放出抑制につながりうる、 Ω 構造の不安定性や、顆粒密度の低さなどは膵島には該当しない。膵島に特徴的な複合型開口放出の抑制は、インスリンの急激かつ大量の分泌を起こりにくくし、生体を低血糖から守りうる生理的意義をもつ。また、顆粒の細胞膜直下への物理的な輸送が、分泌に必須となるため、この輸送過程が分泌調節の一つの標的になりうる構造を示す³⁾。なお、今回行った逐次開口放出の解析からは、顆粒膜に細胞膜性 SNARE 蛋白質が供給されてから平均 16 秒で次の開口放出が逐次的に誘発される事実も提供され、細胞膜性 SNARE と顆粒膜性 SNARE 間の複合化は予め起こっているのではなく、膜融合の比較的直前で起こりうる仮説が提示された。



蛍光標識した SNAP25 を発現させた膵島を、sulforhodamine B 液で還流。20mM グルコースで分泌を刺激し、逐次開口放出現象を検出した例(矢頭)。第一に融合した顆粒の領域(点線内)にて、SNAP25 のシグナル増強が認められる¹⁾。

(2) インスリン開口放出現象における SNARE 蛋白質の動態および構造変化

次により典型的な単一インスリン顆粒の開口放出過程における SNARE 蛋白質の動態・構造変化を検出するために、SNAP25 の分子内 FRET プローブを作製した。当分子が他の SNARE 蛋白(VAMP2, Syntaxin 1)と複合化する際には⁴⁾、4本の α ヘリックスがねじり合わさる構造をとることが結晶解析から示されており、複合化すると近づくことが予想される SNAP25 内の2箇所、二種類の GFP 変異蛋白質(CFP, Venus)を結合させた。アデノベクターを介して、当プローブの cDNA をマウス膵島に遺伝子導入し、発現させた。水溶性蛍光色素液内でグルコースによりインスリン分泌を刺激し、開口放出の出現部位(約 $0.5 \mu\text{m}^2$)における FRET 効率の変化を、同時三重染色により経時的に測定した。その結果、開口放出現象の約半数において、Alexa594 (分子直径 1.7 nm)の顆粒内流入開始時点に平均 3 秒先行して、分子内 FRET シグナルが検出された。FRET の持続時間は 平均 2 秒であった。

遺伝子導入の容易なインスリン分泌細胞株: INS-1 細胞においても類似の検討を行った。シグナルの増幅をはかるため、siRNA 処理により内因性の非標識 SNAP25 の発現をあらかじめ抑制したうえで、siRNA 耐性プローブとケイジドカルシウム試薬を用いて検討を行った。10 μM 以上の細胞内カルシウム濃度上昇を瞬時(1ms 以内)に細胞全体に与えると、一連のインスリン開口分泌が同期して誘発されるが、そのうち遅れて誘起される開口放出部位においては、一過性 FRET を約 4 割で検出することが判明した。

以前、単離膵 β 細胞にアンペロメトリー法とケイジド刺激法を用いて、カルシウム依存的開口放出機構を検討する機会をもち、インスリン開口放出路には時定数が 1 秒と 10 秒の二種類の経路があることを見出した(Takahashi N. et al. PNAS, 96,760,1999)。特に、前者の早い成分が、細胞内 ATP と cAMP に強い依存性をしめすことを報告したが、この成分が生理的なグルコース刺激によるインスリン分泌増強作用にも深く関与し、インスリンの初期分泌の形成に重要であることをこのたび報告した⁵⁾。そこで、ケイジド刺激による単離細胞の早期分泌成分と、グルコース刺激による膵島の初期分泌成分には類似点があると見ており、いずれも開口放出の起こる部位で SNAP25 の folding が先行しておこっている仮説を持っている。

なお、インスリン分泌を阻害するボツリヌス毒素の作用部位は、SNAP25 の C 末端にあり、切断することが知られている。そこで、SNAP25C 末端欠損体についても検討を進めた。9 アミノ酸欠損体 (A 型毒素処理 SNAP25 に相当)における FRET シグナルには正常体と優位差はなく、

26 アミノ酸欠損体(E型毒素処理 SNAP25 相当)発現系においては、開口放出自体が誘起されなかった。末端26アミノ酸残基内には、カルシウムセンサーであるシナプトタグミンとの結合部位が含まれており、当該部位の重要性が改めて示唆された。FRET のシグナルの時間経過と空間的な広がりについては、とくに、FRET シグナル出現前後から細孔形成までの過程につき他の関連分子の動態を調べる必要があり、その検討にむけて現在も準備を進めている。

5 自己評価:

生物物理学的手法を基軸に従来研究をすすめていたが、さきがけ研究の支援と共同研究者の指導のもとに、研究室内に分子生物学的手法を取り入れることができたことに感謝している。開口放出過程における SNARE 分子の画像解析は、シグナルが小さく困難を極めているが、融合細孔の形成にあたり実際に機能を発揮する分子数の少なさが主因であると推察し、光学系を中心に条件の最適化を進める。現在分子間 FRET を含めた複数種類の実験系で、類似した時間経過を示す変化が検出されるので、シグナルをつかめていると判断している。さらに、その時間経過と空間的な広がりには、あらたな仮説の存在を示唆する事実があり、現在検討を進めている。糖尿病に関連する病態解析にあたっては、内因性の SNARE 分子の動態・機能につき、量的・質的な違いを検討する必要があり、最適と評価されるプローブが確認された時点で knock-in マウスの作製をはじめ、遺伝子工学的に動物個体レベルで操作する必要性を感じている。

6 研究総括の見解:

自ら確立した2光子励起断層画像法を駆使して、膵島における開口放出の機構を目で見える形で、しかもSNARE分子のレベルで明らかにした成果は高く評価できる。明らかにした膵島における複合型開口放出の抑制の持つ生理的意義など多くの発見を、糖尿病の病態解明に役立てて社会貢献につながることを期待する。

7 主な論文等:

代表論文

1. Takahashi N., Hatakeyama H., Okado H., Miwa A., Kishimoto T., Kojima T., Abe T., Kasai H. Sequential exocytosis of insulin granules is associated with redistribution of SNAP25. *J. Cell Biol.* 165, 255–262, 2004.
2. Kasai H., Hatakeyama H., Kishimoto T., Liu T. T., Nemoto T., Takahashi N. A new quantitative (TEPIQ) analysis for diameters of exocytic vesicles and its application to pancreatic islets. *J. Physiol.* 568, 891–903, 2005.
3. Kasai K., Ohara-Imaizumi M., Takahashi N., Mizutani S., Zhao S., Kikuta T., Kasai H., Nagamatsu S., Gomi H., Izumi T. Rab 27a mediates the tight docking of insulin granules onto the plasma membrane during glucose stimulation. *J. Clin. Invest.* 115, 388–396, 2005.
4. Fukui K., Yang Q., Cao Y., Takahashi N., Hatakeyama H., Wang H., Wada J., Zhang Y., Marselli L., Nampo T., Yoneda K., Onishi M., Higashiyama S., Matsuzawa Y., Gonzalez F.J., Weir G.C., Kasai H., Shimomura I., Miyagawa J., Wollheim C.B., Yamagata K. The HNF-1 target Collectrin controls insulin exocytosis by SNARE complex formation. *Cell Metab.* 2, 373–84, 2005.
5. Hatakeyama H., Kishimoto T., Nemoto T., Kasai H., Takahashi N. Rapid glucose sensing by protein kinase A for insulin exocytosis in pancreatic islets. *J. Physiol.* 2006 in press.

特許 なし

受賞 日本生理学会奨励賞 (平成 16 年度)「インスリン開口放出機構の解析」

招待講演 2 件

1. 高橋倫子

2光子励起法を用いた膵島におけるインスリン開口放出過程の可視化解析
第9回バイオ・メディカル光科学研究会 静岡

2. 高橋倫子

2光子励起法を用いたインスリン分泌過程の解析
宮崎大学 21 世紀 COE シンポジウム“生理活性ペプチドと生体システムの制御”

研究課題別評価

1 研究課題名:がん抑制遺伝子 *RB1CC1* の機能解明とがん克服への挑戦

2 研究者氏名:茶野 徳宏

3 研究のねらい:

RB1CC1 (RB1-inducible Coiled-Coil 1) は全く新しいがん抑制遺伝子で、網膜芽細胞腫遺伝子 (RB1) の発現を調節することによって細胞のがん化を抑えている。しかし、RB1CC1 の働きの機序など不明な点は多く、本研究では、将来的な新規治療、創薬を見据え、RB1CC1 と介在する、もしくは標的となる分子を明らかにする。そして、ここより得る知見をがん克服への新たな切り口として応用する。

4 研究成果:

RB1CC1 と介在する分子を明らかにする目的で、共免疫沈降→蛋白質質量分析、yeast two hybrid、これら方法を用いて解析を進めた。この結果、RB1CC1 結合分子として TSC1, GADD34, hSNF5, Smad7 等を同定した。

RB1CC1 は TSC1 と結合することによって、TSC1 の ubiquitin 化を促進し、この分解を促すことを明らかにした。TSC1 の分解は TSC1/2 complex の mTOR への抑制作用を解除し、mTOR-S6K 経路を活性化する。このことは、蛋白質合成レベルの維持、そして細胞サイズの維持をもたらすこともわかった。RB1CC1 のこの作用は、本来 RB1CC1 発現レベルの高い神経、筋の細胞、組織において、細胞生物学的にも特に重要であることが明らかとなった。RB1CC1 の高発現は RB1 経路の増強を促し、細胞増殖を抑制するが、元々 RB1CC1 発現レベルの高い神経、筋では RB1 経路、mTOR 経路、両者が強く維持されている。このことは、神経細胞及び筋細胞が細胞増殖をきたさず、より大きな細胞サイズであり続けることに積極的に関わっており、これら神経、筋組織における細胞、組織の構築維持に重要であることが明らかとなった(投稿中)。ヒト疾患との関連においては Alzheimer 病を代表とする神経変性疾患の病態に関与することもわかってきている。

RB1CC1-TSC 経路の解析をきっかけに、RB1CC1 結合分子の一つである GADD34 の新しい機能も明らかになった。発現誘導によってがん抑制作用のある分子として以前よりクローニングされていた GADD34 は、通常細胞においては各種ストレス時にも発現誘導されてくるが、この時 RB1CC1 同様、GADD34 も mTOR 経路に機能することが明らかとなった。GADD34 は mTOR 経路に対して negative な働きを示し、一時的な蛋白質合成の抑止を促す。ストレス時における蛋白質合成の過剰亢進は細胞に apoptosis をもたらしてしまうが、細胞はストレス時に GADD34 を誘導発現し、mTOR 経路をストレス回避時まで抑制することによって蛋白質合成を抑止し、apoptosis を回避していることが明らかとなった(投稿中)。Rapamycin を代表とする mTOR 経路の抑制剤は結節性硬化症を代表とする種々の疾患の治療に応用されてきているが、GADD34 はこの経路に作用し、蛋白質合成、細胞死をコントロールする新規創薬の分子モデルとなりうる可能性を示唆された。

RB1CC1 は核内クロマチンリモデリングファクターの一つである hSNF5/INI1 と複合体を形成することが明らかとなったが、RB1CC1-hSNF5 complex は p53 と更にも複合体を形成し、これを安定化させることによって、p21 発現亢進をきたすことが解ってきた。つまり、p53→p21→RB1 の経路において、p53 による p21 の転写過程に RB1CC1-hSNF5 complex が貢献し、これを安定化、持続させる。このことにより、RB1 経路は増強され、細胞増殖は抑制される。更に、RB1CC1-hSNF5 の強発現は p21 発現亢進による細胞老化を通して、がん化抑制に貢献していることも明らかとなっている(投稿準備中)。

RB1CC1 は TGF- β 経路の negative regulator である Smad7 と結合するが、この結合は Smad7 の分解を促し、TGF- β シグナルを増強することが分かった。増強された TGF- β シグナルは、抗腫瘍活性を示すが、Smad7 分解の様式と合わせ、この詳細については現在も解析中であり、今後更なる解明の待たれるところである。

5 自己評価:

これまで、RB1CC1 結合分子を同定することを発端として、RB1CC1 の経路、機能の一部についてその詳細を明らかにすることができた。

特に TSC-mTOR 経路との関わりについては、これまで不明であった神経、筋組織における RB1CC1 高発現の意義を説明するものであった。この解明は、研究開始当初に提唱していた RB1CC1 機能と神経、筋疾患との関与をさらに論拠づけるものと考えられた。RB1CC1 機能の更なる解明が、がんのみならず、現在治療法の存在しない、神経、筋疾患の理解、そして新たな治療法の創出にも繋がるものであると期待された。また、この経路の解明より副次的に明らかとなった GADD34-mTOR 経路の詳細は、あらたな細胞ストレスに対応する経路の解明であるばかりか、新規創薬分子モデルとしての GADD34 の可能性も示唆している。

RB1CC1-hSNF5 の解明は、当初に提唱した RB1 経路、がん増殖抑制経路の解明に直接繋がるもので、未だ論分準備段階ではあるが、がんという疾患の理解、克服への新たな切り口としては一定の評価ができると考えているが、未だ data としては不十分な部分がある。TGF- β →Smad 経路と RB1CC1 との関わりについては今後の課題であり、更なる解明が待たれる。

一方で、当初より提案していた RB1CC1 knockout mouse の作成は未だ完成していない。これまで既に targeting vector を作り替えながら約 4,000-5,000 個の ES clones を解析したが、未だ遺伝子相同組換え ES 細胞が cloning できず、現在も version5 の targeting vector (conditional knock-out) を用いて、組換え ES 細胞をスクリーニング中である。あきらめることなく、作成を試みているが、非常に難航しているのが実情で、当初の提案通りの期間内では一定の見解も得られなかった。反省点ではあるが、今後の研究課題として残っている。しかしながら、RB1CC1 発現異常モデル動物の作成に関しては、CAG-loxP-neo-loxP-RB1CC1 導入による conditional overexpression の transgenic mouse を作成し、現在4系統のマウスラインを樹立できたので、この解析を進めている。今後その結果の期待される場所である。

6 研究総括の見解:

RB1CC1に結合する蛋白質を免疫沈降やyeast two hybrid法などを利用して明らかにした成果は評価できる。しかし、研究の方向が見つけた蛋白質次第で散乱してゆくため、がん、神経、筋組織等々散漫になった感がする。ノックアウト動物作成の成功がこの研究の意義を明らかにすると考えられる。今後は、徹底的に蛋白質相互作用の関係を広げることに意義を見いだすのか、本来の目的であるがんへの取り組みに集中するのか、どちらがサイエンスにまた社会に貢献できるかを考える時期に来ていると考える。

7 主な論文等:

論文

1. Watanabe R, Chano T, Inoue H, Isono T, Koizumi O, Okabe H. Rb1cc1 is critical for myoblast differentiation through Rb1 regulation. *Virchows Arch.* 2005; 447(3): 643-8.
2. Tsuchiya T, Osanai T, Ogose A, Tamura G, Chano T, Kaneko Y, Ishikawa A, Orui H, Wada T, Ikeda T, Namba M, Takigawa M, Kawashima H, Hotta T, Tsuchiya A, Ogino T, Motoyama T. Methylation status of EXT1 and EXT2 promoters and two mutations of EXT2 in chondrosarcoma. *Cancer Genet Cytogenet.* 2005; 158(2): 148-55.
3. Bamba N, Chano T, Taga T, Ohta S, Takeuchi Y, Okabe H. Expression and regulation of RB1CC1 in developing murine and human tissues. *Int J Mol Med.* 2004; 14(4): 583-7.
4. Mori K, Kizawa H, Ushiyama T, Chano T, Inoue H, Tsuchiya N, Okabe H, Matsusue Y, Ikegawa S. Association of CYP17 with HLA-B27-negative seronegative spondyloarthritis in Japanese males. *Am J Med Genet A.* 2004; 130(2): 169-71.
5. Mori K, Chano T, Matsumoto K, Ishizawa M, Matsusue Y, Okabe H. Type-selective muscular degeneration promotes infiltrative growth of intramuscular lipoma. *BMC Musculoskelet Disord.* 2004; 5:20. Review.
6. Mori K, Chano T, Yamamoto K, Matsusue Y, Okabe H. Expression of macrophage inflammatory

- protein-1alpha in Schwann cell tumors. *Neuropathology* 2004; 24(2): 131-5.
7. Chano T, Mori K, Scotlandi K, Benini S, Lapucci C, Manara MC, Serra M, Picci P, Okabe H, Baldini N. Differentially expressed genes in multidrug resistant variants of U-2 OS human osteosarcoma cells. *Oncol Rep.* 2004; 11(6): 1257-63.
 8. Serra M, Reverter-Branchat G, Maurici D, Benini S, Shen JN, Chano T, Hattinger CM, Manara MC, Pasello M, Scotlandi K, Picci P. Analysis of dihydrofolate reductase and reduced folate carrier gene status in relation to methotrexate resistance in osteosarcoma cells. *Ann Oncol.* 2004; 15(1): 151-60.
 9. Teramoto K, Chano T, Ozaki Y, et al. Expression of *RB1CC1*, a novel tumor suppressor gene, is inversely correlated with the Ki-67 proliferation index in primary breast cancers. *Cancer Therapy* 1: 103-107. 2003.
 10. Kontani K, Chano T, Ozaki Y, Tezuka N, Sawai S, Fujino S, Saeki Y, Okabe H. RB1CC1 suppresses cell cycle progression through RB1 expression in human neoplastic cells. *Int J Mol Med.* 2003; 12(5): 767-9.
 11. Ushiyama T, Chano T, Inoue K, Matsusue Y. Cytokine production in the infrapatellar fat pad: another source of cytokines in knee synovial fluids. *Ann Rheum Dis.* 2003; 62(2): 108-12.
 12. Mori K, Chano T, Ikeda T, Ikegawa S, Matsusue Y, Okabe H, Saeki Y. Decrease in serum nucleotide pyrophosphatase activity in ankylosing spondylitis. *Rheumatology.* 2003; 42(1): 62-5.
 13. Ozaki Y, Kontani K, Hanaoka J, Chano T, Teramoto K, Tezuka N, Sawai S, Fujino S, Yoshiki T, Okabe H, Ohkubo I. Expression and immunogenicity of a tumor-associated antigen, 90K/Mac-2 binding protein, in lung carcinoma. *Cancer.* 2002; 95(9): 1954-62.

特許

- ・ 特許出願P2003-132095「細胞・組織の機能評価方法」

受賞、招待講演

なし

研究課題別評価

1 研究課題名: 糖鎖構造マスターコントロール遺伝子群による細胞機能の制御と創薬研究への応用

2 研究者氏名: 豊田英尚

3 研究のねらい:

細胞表面の糖鎖が細胞間の情報伝達に重要な役割を担っていることは周知の事実になりつつある。しかしながら糖鎖構造は複数の糖鎖合成関連遺伝子の共同作業によって完成するため、どのようなメカニズムでゲノムの支配下にあるのかよくわかっていない。糖鎖生合成の主な担い手は糖転移酵素であり、様々な糖転移酵素が整然とゴルジ装置のコンパートメント内に並んで機能していると考えられるが、糖鎖構造の秩序ある多様性や、発生や分化に対応した正確な変化を理解するためには、これらの糖転移酵素群がどのようにしてゲノムに支配されているかを解明する必要がある。すなわち、糖鎖機能を遺伝子レベルで明らかにするためには、糖鎖の生合成にかかわる既知の遺伝子群に働きかけて糖鎖構造を支配する、マスターコントロール的な制御機構を明らかにしなくてはならない。そこでショウジョウバエ機能獲得変異体を用いたスクリーニング法を用いてこの新しいタイプの糖鎖遺伝子群を探索し、細胞機能制御の仕組みを理解すると同時に、その情報を応用した創薬研究を試みた。

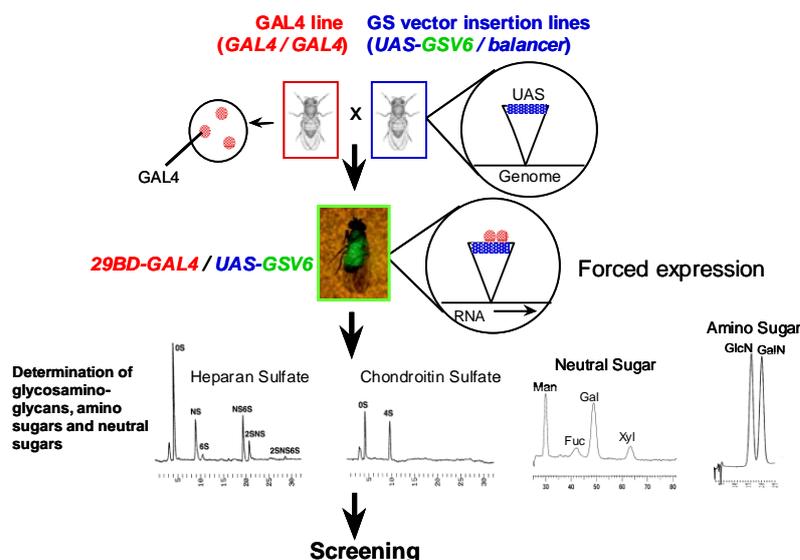
4 研究成果:

1) ショウジョウバエを用いた新規糖鎖遺伝子の探索とプロテオームおよびグライコーム解析法の確立

酵母転写因子 GAL4 の認識配列 UAS を含むP因子ベクターの挿入系統と、GAL4 を発現する個体を交配させることにより、遺伝子を過剰発現している機能獲得変異体を網羅的に作製し、表現型の観察とともに糖鎖分析を行うことで機能未知の糖鎖遺伝子をスクリーニングした(図参照)。スクリーニングの簡便・迅速化のために、ショウジョウバエ糖鎖の微量分析法を検討し、10匹以下のショウジョウバエを用いて正確な分析結果を出せる方法を検討した。

糖組成分析: 2-シアノアセトアミドを用いた蛍光ポストカラムHPLCを用いて、ショウジョウバエ10匹を用いてアミノ糖および中性糖の一斉分析を可能にした。ショウジョウバエが産生する複合糖質

遺伝子過剰発現系による新規糖鎖遺伝子のスクリーニング



質の中性糖は主に Fuc, Gal, Man, Xyl から、アミノ糖は主に GalN と GlcN から構成されており、哺乳動物と同様の構成単糖からなることが示された。

グリコサミノグリカンの二糖組成分析: 本プロジェクトの開始前に、ショウジョウバエが産生するグリコサミノグリカンの、蛍光ポストカラムHPLCによる二糖組成分析法を報告したが(Toyoda *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **275**, 2269–2275, 2000), この方法では、測定にショウジョウバエ 100 匹を必要とする。詳細な検討の結果、10 匹のショ

ウジョウバエを用いてグリコサミノグリカンの二糖組成分析に成功し、簡便・迅速なスクリーニングが可能になった。

以上の方法を用いて機能未知の約 1,000 遺伝子を探査して新規糖鎖遺伝子候補を選び出した。また、選び出した遺伝子の機能解析のため、微量のショウジョウバエを用いたプロテオーム解析のプロトコルを新たに確立した。さらに、ショウジョウバエの *N*-結合糖鎖およびムチン型糖鎖の解析法を確立することに成功し、ショウジョウバエ グリコサミノグリカンの解析法と合わせて、新規糖鎖遺伝子の機能解析に用いるグライコーム解析法を完成することができた。その成果を、ショウジョウバエのみならず、線虫、培養細胞等の様々な生体試料に応用した¹⁻⁸⁾。

2) *Unbalanced amino sugars (unbas)* 遺伝子群の発見

ショウジョウバエの複合糖質を構成しているアミノ糖はグルコサミンとガラクトサミンであり、その組成比は発生段階に応じて正確に変動していた。スクリーニングの結果、強制発現によりグルコサミンとガラクトサミンの産生量を野生型と比べて大きく変動させる遺伝子群を見いだした。その中の一つ、*unbas-1* は種を越えてよく保存されており、ヒト、マウス、アフリカツメガエル、ゼブラフィッシュ、線虫、シロイヌナズナなど、全ての多細胞生物に非常に高い相同性をもつ遺伝子が存在していた。*Unbas-1* は7回膜貫通領域を有するレセプター用の構造を取っていることが推定され、強制発現によってムチン型糖鎖を増加させることが明らかになった。*unbas-1* は現在研究されている糖転移酵素や糖ヌクレオチド輸送体をコードする従来の糖鎖遺伝子とは全く異なり、糖鎖合成に関して上位で糖転移酵素等を制御している新しいタイプの“糖鎖遺伝子”と予想される。このことは糖転移酵素や糖ヌクレオチド輸送体を制御している未知のシグナル伝達系の存在を強く示唆している⁸⁻¹⁰⁾。また主に *N*-結合糖鎖の産生にかかわっていると予想される *unbas-2* や、*N*-結合糖鎖およびムチン型糖鎖の産生に影響を与え、グリコサミノグリカンは変化させない *unbas-3* を発見し解析中である。

3) *Glycomaster* 遺伝子の発見

unbas 遺伝子群は、それぞれ特定のタイプの糖鎖合成に作用を及ぼすが、これらとは別に、広範な糖鎖合成に関与する新規糖鎖遺伝子を探査した。その結果、コンドロイチン硫酸、ヘパラン硫酸、アミノ糖、中性糖全てが変動する一系統を発見し、原因遺伝子を *Glycomaster-1* と命名した。FGF, Wnt, Hh, Dpp, Notch が関与するシグナル伝達系を制御しているヘパラン硫酸も大きく変化することから、*Glycomaster-1* は糖鎖を介した数多くの機能発現に関与していることが推察された。最近、コンドロイチンが初期胚の形態形成や細胞分裂の完結に必須であることが線虫の *Sqv-5* 変異体を用いて報告され、ヘパラン硫酸のみならずコンドロイチン硫酸のもつ種を越えた重要性も注目されている。*Glycomaster-1* はショウジョウバエのコンドロイチン硫酸産生にも深く関与しており、詳細を解析中である¹¹⁾。

今後の展開

さきがけ研究により、糖鎖合成の担い手である糖転移酵素や糖ヌクレオチド輸送体を上位でコントロールしていると予想される複数の遺伝子が発見した。今後、ホモロジーサーチにより様々な相同遺伝子、あるいは共通モチーフ構造を有するファミリーを検索し、糖鎖機能発現機構の網羅的解明に発展させる予定である。また、本研究の目的は、新しいタイプの糖鎖遺伝子群を探査して細胞機能制御の仕組みを理解するのみならず、その情報を応用した創薬研究を試みることである。そこで、全ての多細胞生物に相同遺伝子が存在し、ムチン型糖鎖の産生を増加させる *unbas-1* に注目した。ムチン型糖鎖は糖鎖研究の中でも未解決の問題が非常に多く、また研究しにくい糖鎖であるが、生体防御システムと密接な関係がある。そこでヒト培養細胞を用いてショウジョウバエ *unbas-1* の相同遺伝子の機能解析を開始した。今後 *unbas-1* がムチン型糖鎖の制御を介して生体防御反応にどのように関係しているかを追究し、創薬研究へ発展させたいと考えている。

5 自己評価:

本研究の目的とする新規の遺伝子は、既知の遺伝子の情報を基にしたホモロジー検索では絶対に見つからない。糖鎖構造は糖転移酵素や糖ヌクレオチド輸送体の発現量や活性測定を行っても明らかにすることができず、常に化学的な分析で実際に調べてみるしか方法がない。従って、本研究で用いた糖鎖の化学分析を基盤とするスクリーニング法は非常に優れた戦略である。しかしながら、手間のかかるスクリーニングを簡便・迅速にするための分析法の微量化や、当初、比較的簡単に確立できると予想していたショウジョウバエの *N*-結合糖鎖およびムチン型糖鎖の解析法を検討するのに予想外の時間を取られてしまった。そのため、*unbas-1*, *unbas-2*, *unbas-3*, *Glycomaster-1* といった魅力的な遺伝子が発見できたにもかかわらず、研究期間内に十分な機能解析を終了させることが出来なかった。今後、特許申請を見据えた遺伝子機能の解析を継続したい。

6 研究総括の見解:

糖鎖構造を制御するマスターコントロール遺伝子群を明らかにする壮大な研究であったが、地道な生化学的手法を駆使して、糖鎖構造に変化をもたらす *unbas-1*, *glycomaster-1* など、従来からの糖転移酵素や糖ヌクレオチド輸送体の遺伝子とは異なる糖鎖関連遺伝子を同定したことは高く評価できる。これら新しいタイプの遺伝子の機能解明により、マスターコントロールとしての意義が明らかにされることを期待する。

7 主な論文等:

原著論文

1. H. Morio, Y. Honda, H. Toyoda, M. Nakajima, H. Kurosawa and T. Shirasawa: EXT gene family member *rib-2* is essential for embryonic development and heparan sulfate biosynthesis in *Caenorhabditis elegans*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 301: 317-23, 2003
2. H. Barth, C. Schafer, M.I. Adah, F. Zhang, R.J. Linhardt, H. Toyoda, A. Kinoshita-Toyoda, T. Toida, T.H. Van Kuppevelt, E. Depla, F. Von Weizsacker, H.E. Blum and T.F. Baumert: Cellular binding of hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 requires cell surface heparan sulfate. **J. Biol. Chem.** 278, 41003-41012, 2003
3. S. Kamiyama, T. Suda, R. Ueda, M. Suzuki, R. Okubo, N. Kikuchi, Y. Chiba, S. Goto, H. Toyoda, K. Saigo, M. Watanabe, H. Narimatsu, Y. Jigami and S. Nishihara: Molecular cloning and identification of 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate transporte. **J. Biol. Chem.** 278: 25958-25963, 2003
4. S. Nishihara, R. Ueda, S. Goto, H. Toyoda, H. Ishida and M. Nakamura: Approach for functional analysis of glycan using RNA interference. **Glycoconj. J.** 21: 63-68, 2004
5. H. Yano, M. Yamamoto-Hino, M. Abe, R. Kuwahara, S. Haraguchi, I. Kusaka, W. Awano, A. Kinoshita-Toyoda, H. Toyoda, and S. Goto: Distinct functional units of the Golgi complex in *Drosophila* cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 102: 13467-13472, 2005
6. Y.W. Ha, B.T. Jeon, S.H. Moon, H. Toyoda, T. Toida, R.J. Linhardt and Y.S. Kim.: Characterization of heparan sulfate from the unossified antler of *Cervus elaphus*. **Carbohydr. Res.** 340: 411-416, 2005
7. P. Vongchan, M. Warda, H. Toyoda, T. Toida, R.M. Marks and R.J. Linhardt: Structural characterization of human liver heparan sulfate. **Biochim. Biophys. Acta** 1721: 1-8, 2005

学会発表

8. 豊田英尚、吉田真記、岡野奈穂子、伊藤美樹子、細山沙織、豊田亜希子、戸井田敏彦: 複合糖質の超微量分析法の開発と糖鎖機能発現遺伝子探索への応用。第 16 回 バイオメディカル分析科学シンポジウム 富士吉田 (2003)
9. H. Toyoda: Comparative structural analysis of glycosaminoglycans in model organisms. 第 76 回日本生化学会 横浜 (2003)

10. 豊田 英尚:モデル生物を用いた糖鎖機能の分析科学。第125回 日本薬学会 東京 (2005).
11. 豊田英尚、鈴木淳、吉田真記、戸井田敏彦、相垣敏郎、豊田亜希子:ショウジョウバエ機能獲得変異体を用いた新規糖鎖遺伝子の包括的研究。第25回 日本糖質学会 大津 (2005)

研究課題別評価

1 研究課題名:組織特異的なアイソフォームの関与する新しい細胞内ネットワークの解明

2 研究者氏名:西 毅

3 研究の狙い:

本研究では細胞内に広く存在している V-ATPase の持つ多彩なサブユニットアイソフォームに着目し、このアイソフォームの細胞機能への役割を明らかにすると共に、各々のアイソフォームと相互作用する因子を同定する事で、細胞内での生理的、物理的な相互作用ネットワークを明らかにして、新たな細胞機能や疾病への関わりを明らかにすることを目的とした。

4 研究成果:

1) V-ATPase の新規サブユニットアイソフォームの同定

異なる細胞における V-ATPase の働きを明らかにするために、新規サブユニットアイソフォームの同定を行なった。その結果、腎臓に強く発現するアイソフォームとして d1 及び a4 を明らかにした。d サブユニットのアイソフォームを酵母の V-ATPase と再構成して、酵素の性質を調べたところ、d サブユニットのアイソフォームによって V-ATPase の V1 部位で起こる ATP の加水分解活性と Vo 部位でのプロトン輸送との間の共役が変化する事が分かった。これは同一の細胞内の ATP 濃度でも、異なるアイソフォームを持つ酵素による酸性化の度合いが異なることを示しており、d サブユニットが酸性度の調節サブユニットである可能性を示している。

2) V-ATPase のプロトン輸送機構

この酵素は膜を介したプロトン輸送を行なう事が分かっているが、その詳細な機構についてはよく分かっていなかった。そこで、プロトン輸送路を形成する Vo のサブユニットのトポロジーをシステム変異とピオチンマレイミドを用いて決定した。その結果、c' サブユニットについて新しい4回膜貫通モデルを提唱した。さらに、新に明らかにした構造と、これまでに同定してきた機能必須残基の位置情報をもとに、サブユニット間の膜貫通ヘリックスのプロトン輸送における相互作用を分子内架橋実験により調べた。その結果、プロトン輸送路を形成する a サブユニットの7番目の膜貫通ドメインの必須残基である Arg735 を含むヘリックスの 1/3 の面と、c' サブユニットの4番目の膜貫通ドメインでプロトンを結合する Glu145 を含むヘリックスの半分が相互作用する事を明らかにした。この事は a と c' を含むプロテオリピッドリングの境界面で、ヘリックスがねじれてプロトンの受け渡しを行なっている事が示唆された。

5 自己評価:

本研究で得られた成果は、当初の目的の初期の段階、アイソフォームの同定とそれらアイソフォームの V-ATPas のプロトン輸送性 ATPase としての機能への関りを一部のものについて明らかにできた。しかし、中心的な課題である新しい機能への関わりと、細胞内の相互作用ネットワークの解明については結果が伴わず、全く進展することができなかったため、非常に悔いが残る結果となった。

6 研究総括の見解:

V-ATPaseの数多くのサブユニットにおけるアイソフォームの機能解析はかなりユニークな解析法と独自の戦略で攻めないと泥沼に陥る可能性が大きいと考えられる。所期の目的達成には遠く至らなかった感があるが、本研究期間に明らかにした新規アイソフォームを足がかりに、今後の発展を期待する。

7 主な論文等:

論文

1. Y. Kubo, S. Sekiya, M. Ohigashi, C. Takenaka, K. Tamura, S. Nada, T. Nishi, A. Yamamoto and A. Yamaguchi: ABCA5 resides in lysosomes and ABCA5 knockout mice develop lysosomal disease-like symptoms. *Mol. Cell. Biol.* 25: 4138–4149, 2005

総説

2. 西 毅: サブユニットアイソフォームによる V-ATPase の局在と活性の制御。 *生化学* 77: 354–358, 2005
3. 横山 謙、西 毅: 精巧で巧妙な仕組みを持つプロトンポンプ、V 型 ATPase。 *蛋白質核酸 酵素* 49: 2035–2043, 2004

学会発表

1. T. Nishi, S. Kawasaki-Nishi and M Forgac: The first putative transmembrane segment of subunit c (Vma16p) of the yeast V-ATPase is not necessary for function. Gordon Research Conference "Molecular and Cellular Bioenergetics" Boston, USA (2003)
2. S. Kawasaki-Nishi, T. Nishi and A. Yamaguchi: Analysis of the mechanism of proton translocation through the integral V0 domain of the vacuolar (H⁺)-ATPase. Third 21st Century COE "Towards Creating New Industries Based on Inter-Nanoscience" International Symposium, Shiga (2004)
3. 西毅、西(川崎)晶子、山口明人、Michael Forgac: V-ATPase の d サブユニットは ATP 加水分解とプロトン輸送の共役に重要な役割を果たしている。第77回 日本生化学会大会 横浜 (2004)

特許出願

なし

受賞記録

なし

研究課題別評価

1 研究課題名:小脳失調関連遺伝子の機能解明と治療に向けた標的遺伝子の導入技術開発

2 研究者氏名:平井 宏和

3 研究のねらい:

小脳は歩行などの複数の筋肉を使用する協調運動、スキーが上達するといった運動学習に重要な役割を果たしている。小脳に障害があるとスムーズな動作ができなくなり、平衡感覚も悪化するため日常生活にも大きな障害が生じる。小脳が障害される代表的な疾患として脊髄小脳変性症がある。小脳皮質には脳幹から2つの入力経路が存在し、最終的にプルキンエ細胞に情報が伝えられ処理される。プルキンエ細胞は小脳皮質からの唯一の出力ニューロンであり、プルキンエ細胞の活動が小脳の機能として反映される。したがって、小脳研究において、プルキンエ細胞の生理学的、病理学的性質を分子レベルから理解することは重要であり、そのためには外来遺伝子をプルキンエ細胞特異的に発現させる技術が必要である。ところが、*In vivo* のプルキンエ細胞への遺伝子導入・発現は極めて困難で、現在まで 5 本の論文しかなく(PubMed 検索による)、そのいずれもがプルキンエ細胞特異的でなく、遺伝子発現効率も十分とはいえない。そこで本研究では、ウイルスベクターを用いて、プルキンエ細胞に特異的かつ効率的に遺伝子導入する技術の確立を目的とした。さらにこの技術を、小脳失調関連遺伝子の機能解明および脊髄小脳変性症などの遺伝性小脳疾患に対する遺伝子治療として応用することを目指した。

4 研究成果:

近年、開発の進むアデノ随伴ウイルスベクターと HIV 由来レンチウイルスベクターを用いて小脳プルキンエ細胞への遺伝子導入を目的として実験を行った。遺伝子発現マーカーとして GFP を用い、ウイルスベクターをマウスの小脳に接種した。7 日後に灌流固定して、小脳の薄切切片を作製し GFP の局在を観察した。アデノ随伴ウイルスに関しては、高力価のウイルスを得ることが困難で

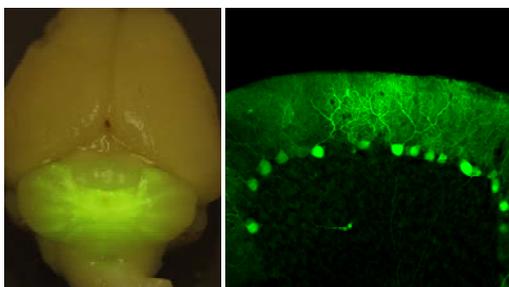


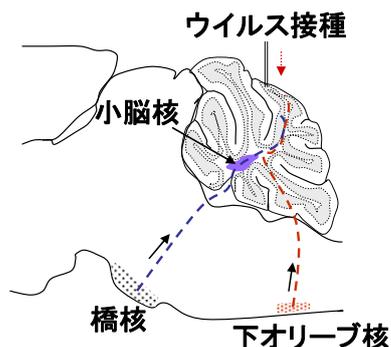
図1 レンチウイルスベクターを用いた小脳プルキンエ細胞への遺伝子発現

あり、最もよく遺伝子導入された小脳の小葉でも全プルキンエ細胞の 5~10%程度しか GFP 発現が見られなかった。これに対して、レンチウイルスベクターに関しては、 10^8 から 10^{10} (TU/ml)のオーダーの高力価ウイルスが得られ、プルキンエ細胞への GFP 発現効率もアデノ随伴ウイルスより著明に高かった(図 1:本課題の終盤で、確立したプロトコルで得られたデータ)。このようなことから、これ以降、レンチウイルスベクターを用いて研究を進めた。

1)レンチウイルスベクターを小脳皮質に接種したときの遺伝子発現プロフィール

小脳には 5 種類の神経細胞、すなわち顆粒細胞、プルキンエ細胞と 3 種類の介在神経(星状細胞、籠細胞、ゴルジ細胞)が存在する。レンチウイルスベクターがどの細胞に親和性を持つかを検討した。GFP 遺伝子を発現するレンチウイルスベクターを小脳皮質に接種し、1 週間後に GFP の発現を観察したところ、プルキンエ細胞、3 種類の介在神経とバグマンテリアに顕著な GFP 蛍光を認めた(プルキンエ細胞への親和性の詳細に関しては後述)。これに対して、顆粒細胞には蛍光を認めず、レンチウイルスベクターは顆粒細胞には極めて親和性が低いと考えられた。

次に、レンチウイルスベクターを小脳皮質に接種したときに、小脳皮質以外の細胞に遺伝子発現が見られるかを検討した。小脳皮質は、橋核と下オリーブ核から投射を受ける(図 2)。また小脳皮質からの唯一の出力であるプルキンエ細胞は小脳核に投射する。アデノウイルスを小脳皮質に接種した場合は、軸索終末にウイルスが感染し逆行性に輸送された結果、橋核と下オリーブ核の細胞体に遺伝子発現が見られることが報告されている。本研究では、ウイルスベクターを小脳



皮質に接種し、小脳皮質外の GFP 発現を、GFP に対する抗体で染色し調べた。その結果、橋核、下オリーブ核、小脳核など小脳皮質外への発現は全く観察されなかった。このことから、小脳皮質に接種した HIV 由来レンチウイルスベクターによる遺伝子発現は、小脳皮質に局限することが明らかになった。この結果は、基礎研究と遺伝子治療の両方において、小脳皮質以外の遺伝子発現の影響や副作用を考慮する必要が無いことを示しており、今後レンチウイルスベクターが頻用されていくと考えられた。

図2 小脳皮質への入力と出力

2) レンチウイルスベクターの力価と小脳皮質における遺伝子発現の関係

独立した培養で得られた 31 バッチのウイルスベクターを① $10^8 \sim 10^9$ 、② $10^9 \sim 10^{10}$ 、③ 10^{10} TU/ml 以上の3つのカテゴリー(それぞれ 10 バッチ、10 バッチ、11 バッチ)にわけ、それぞれ 20 匹のマウス(計 60 匹)の小脳第 6 小葉に接種した。7 日後に灌流固定し小脳虫部の矢状断切片を作製、小脳の各小葉において、GFP が発現している面積(%)を求めた。その結果、第 6、第 7 小葉を中心に GFP の発現が見られ、ウイルス力価が高いほど広範囲に発現することがわかった(図 3)。 10^{10} TU/ml 以上の力価を持つウイルスベクターの接種では、第 6、第 7 小葉の 80% 以上の領域に GFP の発現が認められ、さらに尾側の第 8、第 9 小葉にかけてもそれぞれ、55%、25% 程度の領域に GFP 発現が認められた。この結果に基づき、ウイルスベクターの接種部位を工夫して 3 箇所を増やしたところ、小脳虫部の約 80% におよぶ広範囲で外来遺伝子を発現させることができた。

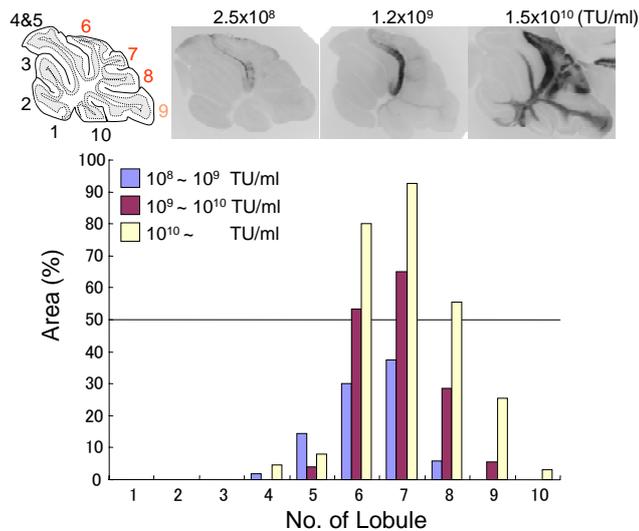


図3 ウイルスベクターの力価と小脳の遺伝子発現領域の関係

3) レンチウイルスベクターのプルキンエ細胞への親和性に影響を与える因子

レンチウイルスベクターのプルキンエ細胞に対する親和性は、ウイルスを産生する HEK293T 細胞の培養液の pH に依存することを発見した。pH7.2 の培養液から得られたウイルスを接種した小脳では、全 GFP 発現細胞のうち、約半分がプルキンエ細胞であった。これに対し、pH6.7-7.0 の培養液から得られたウイルスを用いた場合、全 GFP 発現細胞のうちプルキンエ細胞は 15% しか無く、80% 近くがバークマングリア細胞であった。このようにウイルス産生時の培養液 pH のわずかな変化が、得られたレンチウイルスベクターのプルキンエ細胞への親和性を大きく変化させることが明らかとなった。さらに、この現象の詳細なメカニズムについてもすでに解明しており、レンチウイルスのプルキンエ細胞への親和性を上昇させる方法に関して、現在、特許出願の準備を進めている。

4) レンチウイルスベクターを用いた小脳星状細胞、籠細胞特異的遺伝子発現法の確立

前述のごとく、小脳には 5 種類の神経細胞が存在する。顆粒細胞、プルキンエ細胞と 3 種類の介在神経(星状細胞、籠細胞、ゴルジ細胞)である。介在神経は抑制性の神経で顆粒細胞とプルキンエ細胞の活動を抑制することから、小脳活動を微調整していると考えられている。しかし、顆粒細胞やプルキンエ細胞と比較し、介在神経の機能はあまり解明されていない。介在神経の働きと、小脳機能に果たす役割を遺伝子レベルから理解するには、介在神経特異的に外来遺伝子を発現させる技術が必要であるが、これまで介在神経特異的なプロモーターは知られていなかった。

本研究課題で、レンチウイルスベクターに組み込んだときに神経細胞に特異性を持つプロモーターを探索していたが、その過程で偶然、星状細胞と籠細胞に高い選択性を持つプロモーターを発見した(図 4)。このプロモーターを組み込んだレンチウイルスベクターを用いることにより、星状細胞と籠細胞の研究が進むことが期待される。

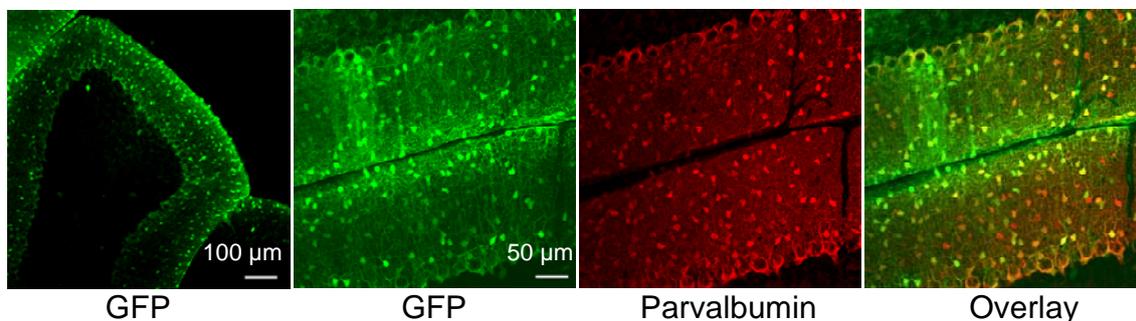


図4 レンチウイルスベクターを用いた星状細胞／籠細胞特異的な遺伝子導入

5) 小脳顆粒細胞で産生される糖蛋白質、Cbln1 の機能解明

Cbln1 は小脳顆粒細胞で作られ、顆粒細胞軸索(平行線維)終末より活動依存的に放出される。Cbln1 は 10 年以上前に発見されていたが、その機能は不明であった。そこで Cbln1 のノックアウトマウスを作成したところ、顕著な運動失調が観察された。電気生理学的には、① 平行線維-プルキンエ細胞シナプスの伝達障害、② 平行線維-プルキンエ細胞シナプスの長期抑圧現象(LTD)の誘導障害、③ プルキンエ細胞上の余剰な登上線維シナプスの排除障害、が観察された。電顕では、平行線維-プルキンエ細胞シナプスの数が野生型の 2 割程度しか形成されていないことが明らかになった。これらの所見は平行線維-プルキンエ細胞シナプスのプルキンエ細胞側(ポスト)に発現する $\delta 2$ グルタミン酸受容体のノックアウトマウスと極めて類似の表現型であった。以上より、顆粒細胞で合成され平行線維終末より放出される Cbln1 は、プルキンエ細胞に作用し、 $\delta 2$ グルタミン酸受容体と最終的には重なるシグナル伝達経路をトリガーし、平行線維-プルキンエ細胞シナプスの形成と可塑性、さらに登上線維シナプスの排除を制御していることがわかった。

5 自己評価:

本課題をはじめた当初は、小脳プルキンエ細胞への外来遺伝子の効率的な導入・発現に成功した論文は無く、うまく行くかどうか全くわからなかった。しかし HIV 由来レンチウイルスベクターがプルキンエ細胞に比較的高い親和性を持っていたことが幸いであった。研究を進めるに従い、レンチウイルスベクターのプルキンエ細胞に対する親和性に影響を与えるファクターも明らかになった。最終的には、プルキンエ細胞に高い親和性を持つウイルスベクターの産生法を確立することができ、小脳の広範囲のプルキンエ細胞に、従来より格段に高効率で外来遺伝子を導入し、発現させることが可能となった。

小脳失調関連遺伝子の機能解明に関しては、プルキンエ細胞に発現する $\delta 2$ グルタミン酸受容体、顆粒細胞で合成され平行線維終末より放出される Cbln1 の解析を行い、その成果は Nature Neuroscience 誌(2 編)と EMBO Reports 誌(1 編)に出版された。現在、これらの遺伝子に関して、本課題で開発したウイルスベクター発現系を用いて、さらに解析をすすめているところである。

一方、遺伝子治療の分野では、脊髄小脳変性症のモデルマウスを作成した。現在、治療用の遺伝子を、レンチウイルスベクターを用いて疾患モデルマウスのプルキンエ細胞に導入し、神経変性を抑える実験を行っているところである。以上、まとめると当初の計画より若干時間はかかっているものの、遺伝子導入法を確立するという最も重要な目標は達成でき、これに続く目標も達成されつつあると考えている。

6 研究総括の見解:

ウイルスベクターを用いて、プルキンエ細胞に特異的かつ効率的に遺伝子導入する技術の開発という所期の目的を、産生細胞の培養液のpHに依存して産生されたレンチウイルスベクターがプルキンエ細胞に高い親和性を持つことを発見して達成したことは、高く評価できる。特異的で、高い効率の遺伝子導入を可能にしたことは、小脳の機能に関する分子レベルでの解明、ならびに、小脳疾患の理解とその対策に大きく貢献すると考えられ優れた成果であった。

7 主な論文等:

論文

(1)原著論文

1. Hirai H, Launey T, Mikawa S, Torashima T, Yanagihara D, Kasaura T, Miyamoto A, Yuzaki M.: New role of delta2-glutamate receptors in AMPA receptor trafficking and cerebellar function. **Nat. Neurosci.** 6: 869-876, 2003
2. Hirai H, Miyazaki T, Kakegawa W, Matsuda S, Mishina M, Watanabe M, Yuzaki Y: Rescue of abnormal phenotypes of the delta2 glutamate receptor-null mice by mutant delta2 transgenes. **EMBO Rep.** 6: 90-95, 2005
3. Hirai H, Zeng P, Bao D, Miyazaki T, Li L, Miura E, Parris J, Rong Y, Watanabe M, Yuzaki Y, Morgan JI.: Cbln1 is essential for synaptic integrity and information processing in the cerebellum. **Nat. Neurosci.** 8:1534-1541, 2005

(2)総説

4. 平井宏和. 第1章 小脳のグルタミン酸受容体と運動. 柳原大/内藤久士編, 運動とタンパク質・遺伝子, 第1版, 東京:ナツ出版, 2-16, 2004
5. 平井宏和. 遺伝子レスキューマウス作出による小脳の運動学習機構の解明. 実験医学, 23(8): 1170-1175, 2005

特許出願(3件)

特願 2004-234912「プルキンエ細胞における遺伝子発現のための発現ベクター」

特願 2005-189518「パーキンソン病の治療のための医薬」

特願 2005-231514「小脳星状細胞及び籠細胞特異的な遺伝子発現方法」

研究課題別評価

1 研究課題名: 低酸素シグナルによる生体機能調節機構の解明と疾患治療への応用

2 研究者氏名: 牧野雄一

3 研究のねらい:

低酸素環境における生体応答あるいは低酸素シグナルによる生体機能の調節は実に多彩であり、その組織特異性、状況特異性などの多様性の分子機構については不明な点を多く残している。低酸素に対する生体適応の異常や破綻が多くの疾患・病態の成立に密接に関わることが明らかにされ、生体低酸素応答制御機構の本質的理解が生理学的のみならず臨床医学的にも要求されている。IPAS は低酸素などの細胞外環境因子によって誘導され、低酸素誘導性転写因子 HIF-1 とともに、低酸素シグナル伝達系におけるフィードバック制御、他の細胞内シグナルとのクロストークなどを媒介する重要な分子であり、低酸素下の生体機能の多様かつ精緻な制御に貢献していると考えられる。そこで、本研究は、① IPAS 発現制御機構の解析による生体低酸素応答のフィードバック制御機構の分子基盤の解明、② IPAS ネットワークの解析とその生理学的意義の解明、③ IPAS システムの異常と疾患・病態との関連の解明を目的とし、低酸素環境下における生体機能調節機構を分子から個体レベルまで明らかにして低酸素が関わる病態の克服法開発の分子基盤を築くことをめざして開始された。

4 研究成果:

1) IPAS mRNA 発現における低酸素依存性 IPAS 遺伝子プロモーター活性化機構および低酸素依存性選択的スプライシング機構とその役割の究明

(さきがけ研究開始時の研究背景)

IPAS の低酸素誘導性発現は、HIF-1-IPAS ネガティブフィードバック制御系の成立の中核をなす重要な機構であり、その解明は生体低酸素応答制御機構の理解に新展開をもたらす可能性が高い。研究者はそのメカニズムの解析に取り組み、さきがけ研究開始時まで、IPAS ゲノムが HIF-3 α のゲノムと同一であり、IPAS、HIF-3 α が同一遺伝子の選択的スプライシング産物であることを見出ししていた。HIF-3 α は HIF-1 α の paralogue であり、やはり HIF-1 β と 2 量体を形成して低酸素依存性に標的遺伝子の転写を活性化するらしい。低酸素応答の抑制 (IPAS)、促進 (HIF-3 α) という相反する機能を有する分子が同一の遺伝子領域から分かれ出することは非常に興味深い。さらに、低酸素下飼育マウスの各組織において IPAS 型 mRNA が優位に発現していることを突き止め、低酸素誘導性 IPAS 発現に IPAS/HIF-3 α 遺伝子の選択的スプライシング機構が密接に関わっている可能性を示していた。かかる低酸素依存性選択的スプライシングによる mRNA 発現の制御は、HIF-1 などによる遺伝子転写のレベルとは独立した、全く新しい低酸素誘導性遺伝子発現制御機構を提唱するものであり、その解明は低酸素応答における遺伝子発現の多様性の理解を進展させる上できわめて重要であることから、さきがけ研究において特に重点的に解明に取り組んだ。

(さきがけ研究の成果)

まず、IPAS、HIF-3 α 遺伝子の構造を詳細に対比し、IPAS と HIF-3 α がそれぞれ独立した第 1 エクソンを有することを明らかにした。IPAS の第 1 エクソン (エクソン 1a) は HIF-3 α の第 1 エクソン (エクソン 1) の約 6kb 上流に位置することから IPAS の primary transcript の生成には独自のプロモーターが関与している可能性が高く、IPAS スプライシング機構解明に先立って IPAS 遺伝子転写機構を明らかにすることは必須であった。IPAS 遺伝子転写開始点の上流約 5kb にわたるプロモータ

一を単離、断片化後、ルシフェラーゼレポーター遺伝子を作成し、低酸素下培養細胞におけるプロモーター活性の解析を行い、IPASプロモーターが低酸素により活性化されることを明らかにした。かかるプロモーターの低酸素依存性活性化は HIF-1 α の発現およびプロモーター内の HIF-1 結合配列に依存し、さらに同配列への HIF-1 の結合に依存していた。すなわち HIF-1 α 拮抗分子 IPAS の発現に HIF-1 α が寄与するというフィードバックループがここに完成する。HIF-3 α プロモーターには低酸素誘導性は認められず、かかるプロモーターの選択的活性化は IPAS/HIF-3 α 発現制御における重要な基本メカニズムの一つと思われた(未発表)。

続いて、さきがけ研究開始前に確立していた IPAS/HIF-3 α 各特異的エクソン-エクソン結合部を検出する PCR システムを用いて、低酸素下飼育マウス由来各組織中の mRNA スプライシングパターンの解析を行った。やはり、IPAS 型 mRNA 生成に関わる IPAS 特異的スプライシングは低酸素条件下でのみ認められ、一方、HIF-3 α 型スプライシング産物は正常酸素濃度下で優位に発現し、低酸素条件下ではほぼ消失している事が再確認された。すなわち、IPAS/HIF-3 α の選択的スプライシングが酸素分圧によって排他的制御を受けることをしめす。ここで、特に IPAS 型スプライシング産物の低酸素誘導性生成には、IPAS 特異的スプライシングが①低酸素下で活性化される、②正常酸素濃度下でスキップされる、という2つのメカニズムが関与することが想定される。研究者は IPAS 特異的スプライシング部位であるエクソン 4a の 3' スプライシング部位をモデルにかかる仮説の実証に取り組んだ。低酸素下で飼育されたマウスの小脳および肺に、IPAS mRNA が強く発現されていたが、かかる臓器の核抽出液中には IPASpre-mRNA エクソン 4a の 3' スプライシング部位特異的に結合する蛋白質が存在していた。質量分析の結果、既知の RNA 結合蛋白質『A』であることが判明した(未発表)。『A』は最近発見された RNA 結合蛋白質であり、mRNA の核外への輸送、mRNA の分解制御等に関わることが示されているが選択的スプライシング制御における役割についてはほとんど知られていない。かかる『A』による IPAS mRNA 特異的結合活性は低酸素マウスの小脳、肺の両組織の核抽出液中に共通して存在したが、正常酸素下飼育マウスの同臓器核抽出液では存在しなかった。従って、『A』は、臓器を問わず、低酸素環境下で IPAS pre-mRNA 特異的スプライシング部位への結合活性を示す蛋白質であり、IPAS mRNA の低酸素依存性スプライシングの制御に関わっている可能性が極めて高い。

かかる結果を受けて、『A』の細胞内発現量を変化させた場合の、IPAS エクソン 4a 含有/排除に関する酸素分圧依存性制御の変化を解析する事を試みた。遺伝子導入を行う必要があり、これまでのマウス組織由来 RNA の解析からマウス培養細胞由来 RNA の解析へと実験系を変更したが、培養細胞系では IPAS 発現レベルが低くエクソン 4a 含有の検出感度が低い事、また培養細胞系では『A』の核内発現量が極めて高く、『A』発現ベクターの導入等では細胞内(核内)『A』発現量を変化させる事は容易ではないことが問題点として浮上した。この問題を解決すべく、まず、IPAS エクソン 4a 周辺のゲノム配列を含むミニジーン(ミニクロモゾーム)を作製した。このミニジーンのマウス血管内皮細胞へ導入し、低酸素下培養後 RNA を採取し、上述 RT-PCR 法でスプライシングレベルを解析した結果、やはり低酸素依存性のエクソン 4a 含有が高感度で検出された。すなわち、マウス培養細胞系においても低酸素依存性 IPAS 特異的 mRNA スプライシングに寄与する細胞内装置が内在する事をしめす。一方、『A』の発現量を低下させる事を目的とする SiRNA 導入系を複数種施行したが、最終的に『A』発現量を約 30%にまで減少させる RNA 配列を得た。今後、これらミニジーン、SiRNA 実験系の組み合わせ、スプライシング解析を行う予定である。

一方、IPAS pre-mRNA エクソン 3 の 3' 側スプライシングは正常酸素下飼育マウス臓器では見られない。同スプライシング部位を含むミニジーンを作成し、正常酸素下で培養したマウス血管内皮細胞の核抽出液を用いて in vitro スプライシング解析を行ってもエクソン 3 の 3' 側スプライシングは認められない。さらに、同ミニジーンにスプライシング活性化シス配列を結合させた場合も正常酸素下細胞の核抽出液にはスプライシング活性は検出されなかった。すなわち、正常酸素分圧

下の細胞において IPAS スプライシングの或る部位を特異的に抑制するメカニズムが存在する可能性が示唆された。実際、正常酸素下細胞の核抽出液には IPAS エクソン 3 の 3' スプライシング部位特異的に結合する 37kd の蛋白質が検出される。現在、かかる結合蛋白質の同定を試みている(一部、Vilnius Biotechnology Institute の Kanopka 博士との共同研究)。

2) FLAG-IPAS 発現マウスの作出とその表現形質解析ならびに同マウス由来組織抽出液での IPAS 結合蛋白質検出システムの確立

FLAG 標識 IPAS(FLAG-IPAS)を高発現するトランスジェニック(Tg)マウスを作出した。FLAG-IPAS の組織発現量の異なる Tg マウスを得る目的で、CMV プロモーターおよび CAGG プロモーター支配下で FLAG-IPAS を発現する 2 種類のマウスを作成した。CMV-FLAG-IPAS-Tg マウスにおいて、FLAG-IPAS の高発現組織では HIF-1 標的遺伝子の低酸素誘導性発現が抑制されており、IPAS は生体内においても HIF-1 拮抗分子として働く事が示唆された。さらにかかる FLAG-IPAS 発現マウスにおいては皮膚創傷の治癒が野生型マウスと比し有意に遅延していた。IPAS 導入肝がん細胞/移植肝がんにおいて、血管内皮増殖因子の低酸素誘導性発現および血管新生が抑制されることがすでに証明されており、本マウスにおいても生体内 IPAS 過剰発現により創傷治癒に不可欠な血管新生が阻害された可能性が示唆される。今後、本マウスを用いて、関節炎モデル、担癌モデルなどを作成し低酸素応答/血管新生が密接に関連する病態の制御における IPAS の役割の解明を目指す。一方、CAGG-FLAG-IPAS-Tg マウスの繁殖も進んでおり、同様の解析を行う予定である。また、FLAG-IPAS 発現マウス由来の各組織抽出液を対象として、抗 FLAG 抗体を用いた免疫沈降法を確立しつつある。本法により、生体内で IPAS と相互作用する蛋白質の同定を目指している。

5 自己評価:

IPAS 発現制御機構の解明に関して、HIF-1 が転写因子として直接に IPAS の発現を誘導するメカニズムを解明した事、IPAS mRNA 選択的スプライシングの制御に係わる蛋白質の候補を同定した事は、さきがけ研究開始前には単なる現象論でしかなかった低酸素応答のフィードバック制御機構に分子論的理解を導入する成果と考えている。一方で、ゲノム科学、RNA 科学は本研究の遂行中も爆発的に展開し続け、たとえば選択的スプライシング産物の生成過程、産物の存在意義などに関する理解も日々多様化している。本研究の成果も単なる 1 モデルとしてだけでなく、多様な生命現象の中での位置づけを常に検証してゆく必要性を強く感じている。

また、トランスジェニックマウス研究など個体を用いた研究は予想より時間がかかっているが、解析個体数を増加させる事などにより比較的安定したデータが得られている。個体研究は最終的には医学応用を目指す本研究において必須のプロセスであるので、時間や数を費やしても目標通り継続すべきと考えている。

最後に、IPAS のこれまで未知の機能、役割の探索という目標を掲げているが、十分な結果が得られていない。各実験系の標準化という意味でも、既存のラインから結果の予想、評価が行い易い実験を優先させてきたことによる帰結と考えている。今後、探索型の実験も多く展開させて行きたい。

6 研究総括の見解:

IPAS プロモーターの低酸素条件下での活性化、ならびに、IPAS 遺伝子と同じ DNA 塩基配列上に存在する HIF-1 α 遺伝子の発現と HIF-1 α の IPAS プロモーターの結合配列への結合のこの活性化への関与を明らかにしたこと、また、IPAS mRNA への特異的スプライシングに関与する RNA 結合蛋白質を明らかにしたことは、低酸素シグナルによる生体機能調節機構の解明に貢

献した優れた成果と評価する。

7 主な論文等:

論文

1. Makiko Matsumoto, Yuichi Makino, Tetsuhiro Tanaka, Hirotoshi Tanaka, Nobuhiro Ishizaka, Eisei Noiri, Toshiro Fujita, and Masaomi Nangaku
Induction of Renoprotective gene expression by cobalt ameliorates ischemic injury of the kidney in rats.
J. Am. Soc. Nephrol., 14: 1825–1832 (2003)
2. Tsunenori Kodama, Noriaki Shimizu, Noritada Yoshikawa, Yuichi Makino, Rika Ouchida, Kensaku Okamoto, Testuya Hisada, Hiroshi Nakamura, Chikao Morimoto, and Hirotoshi Tanaka.
Role of the glucocorticoid receptor for regulation of hypoxia-dependent gene expression
J. Biol. Chem., 278: 33384–33391 (2003)
3. Yuichi Makino, Hiroshi Nakamura, Eiji Ikeda, Kei Ohnuma, Kenji Yamauchi, Yuataka Yabe, Lorenz Poellinger, Yasunori Okada, Chikao Morimoto, and Hirotoshi Tanaka
Hypoxia-inducible factor regulates survival of antigen receptor-driven T cells
J. Immunol., 171: 6534–6540 (2003)
4. Helene Ameln, Thomas Gustafsson, Carl Johan Sundberg, Lorenz Poellinger, Eva Jansson, and Yuichi Makino
Physiological activation of hypoxia-inducible factor-1 in human skeletal muscle
FASEB J., 19: 1009–1011 (2005)
5. Hiroshi Nakamura, Yuichi Makino, Kensaku Okamoto, Lorenz Poellinger, Kei Ohnuma, Chikao Morimoto, and Hirotoshi Tanaka
TCR-engagement increases HIF-1 α protein synthesis via rapamycin-sensitive pathway under hypoxic conditions in human peripheral T cells
J. Immunol., 174: 7592–7599 (2005)

総説

1. IPAS による低酸素応答性遺伝子発現の制御
牧野雄一
臨床免疫 41: 472–476 (2004)
2. 低酸素シグナルによる末梢での T 細胞の制御
牧野雄一、森本幾夫、田中廣壽
臨床免疫 43: 92–96 (2005)

学会発表・講演

1. 第8回酸素ダイナミクス研究会 (2003年、神戸市)
HIF-1 機能抑制分子 IPAS による生体低酸素応答制御の分子機構
牧野雄一、中村博志、岡本健作、田中廣壽
2. 第1回がんとハイポキシア研究会 (2003年、京都市)
IPAS による生体低酸素応答制御の分子機構
牧野雄一
3. 第48回日本リウマチ学会学術集会 (2004年、岡山市)
T 細胞における低酸素応答性転写因子 HIF-1 の役割の解析
牧野雄一、中村博志、大沼圭、森本幾夫、田中廣壽
4. 6th International Symposium on vonHippel-Lindau Disease (2004、Kouchi, Japan)
Plenary workshop
Negative feedback regulation of hypoxia-inducible gene expression by a bHLH/PAS factor IPAS
Yuichi Makino, Arvydas Kanopka, Hiroshi Nakamura, Lorenz Poellinger, Hirotoshi Tanaka
5. Vilnius Institute Biotechnology Seminar (2004, Vilnius, Lithuania)
Negative feedback regulation of hypoxia-inducible gene expression by IPAS
Yuichi Makino, Arvydas Kanopka, and Lorenz Poellinger

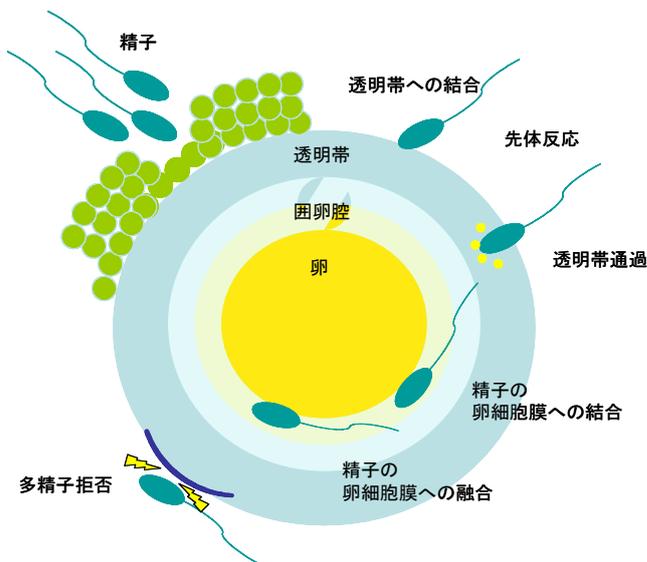
研究課題別評価

1 研究課題名:受精の膜融合を制御する分子メカニズムの解明と不妊治療への応用

2 研究者氏名:宮戸 健二

3 研究のねらい:

受精は、生命の始まりとして、多くの生物に共通したメカニズムが存在すると考えられてきたが、共通したメカニズムや因子はいままで発見されていない。哺乳動物では精子と卵の細胞膜にある因子でさえ、ほとんどわかっておらず、解明が遅れている現象の一つである。受精を分子レベルで解明するための研究は、避妊や不妊などの人類が直面する深刻な問題を解決するための基盤研究になると考えられるが、哺乳動物を材料にした研究者が少ないため研究が進まないのが現状である。このような状況にあって、私はマウスを用いた実験から膜4回貫通型蛋白質 CD9 が受精の膜融合に必須であることを明らかにしてきた。CD9 は、細胞接着分子や膜結合型細胞増殖因子などと細胞膜で複合体を形成し、細胞接着を介した細胞増殖を制御すると考えられている膜蛋白質である。卵細胞膜でも、CD9 と結合している因子群が、単独あるいは協同して機能することが予想される。そこで、CD9 に蛍光蛋白質 GFP を融合させた蛋白質(CD9-EGFP)を卵特異的に



発現させることによって受精のイメージング系を構築する。さらに、CD9 結合蛋白質の単離および機能解析を行うことにより、受精の膜融合を制御する分子メカニズムの解明をめざす。加えて、細胞膜の融合機構を応用した新規の不妊治療法の開発に挑戦する。

4 研究成果

哺乳動物の卵は、両生類や棘皮動物とは異なり、一個体から得られる細胞数がとても少なく、過排卵処理をしたマウスからでも 20 個前後が排卵されるだけである。そのために、生化学実験を行うためには、より多くの動物個体を飼育維持する必要がある。そこで本研究では、生化学実験よりも、受精前後

での精子と卵の動き、および蛋白質の動態をできる限り詳細に追跡することに重点を置いた。その結果、いままで知られていなかった受精の膜融合を制御するメカニズムを発見することができた(投稿準備中)。まず、免疫染色と電子顕微鏡による観察から、野生型マウス卵では CD9 は卵細胞膜を全体にわたって覆っている微絨毛に特異的に局在するのに対して、CD9 欠損卵ではほとんどの微絨毛が消失していることを見つけた。続いて、生きた卵での CD9 の挙動をイメージングするために、CD9-EGFP を発現させた CD9 欠損卵(CD9-EGFP 卵)を作製したところ、卵細胞膜の微絨毛が再形成され、しかも、精子との膜融合能を回復させることができた。この結果から、マウス卵では、CD9-EGFP は CD9 と同等の機能を有することが示された。続いて、CD9-EGFP 卵を使って、受精過程を生きた状態で観察する実験系を作ることにより、精子と卵細胞膜が相互作用する一連の過程をイメージングすることが可能となった。哺乳動物の受精過程をイメージングした研究は、本研究が初めてである。この実験系を用いて精子と卵の受精前後での挙動を観察したところ、従来の受精研究では、膜融合は精子が卵の細胞膜に結合した後に始まると考えられていたが、実際には全く異なる細胞膜間での相互認識メカニズムが存在することを示す結果が得られた。また、この膜融合の制御メカニズムが実際に機能していることを、CD9 欠損卵と野生型卵を用いた再構成系によって証明することができた。さらに、CD9 欠損マウスの解析から、CD9 は骨形成¹やミエリンの形成²にも関わることがわかってきた。このことは、本研究の成果が、受精研究ばかり

ではなく、その他の生命現象の理解にもつながることを示している。また、膜融合を調節する CD9 の機能領域を同定するため、未受精卵での遺伝子発現系の構築と未受精卵 cDNA ライブラリーを作製し³、CD9 の機能領域が C 末端の 7 アミノ酸であることを明らかにした。さらに、CD9 の C 末端に結合する蛋白質を同定した。応用面としては、受精の膜融合メカニズムを応用した新しい精子導入法を開発することができた。受精の分子機構に基づいた精子導入法を開発したことにより、現在行われているガラスキャピラリーによって卵に穴を開ける方法 (ICSI) よりも卵へのダメージが少ない生殖医療技術の開発も可能になると考えられる。また、精子ばかりでなく、DNA や蛋白質なども卵への導入が可能かどうかを今後検討していく。

今後の展開

この研究により、受精の膜融合を調節する新しい制御メカニズムが存在することを明らかにすることができた。しかし、2つの細胞膜に存在する異なった配向をもった蛋白質または脂質が、すみやかに混合するメカニズムを解明するためには、まだ不十分である。そこで、今後の研究を進めるために、膜成分の配向をすばやく検出する実験系を新しく構築する。ある種の脂質マーカーを使うことにより、膜成分の混合の有無を検出することが可能である。また、脂質に埋もれた蛋白質の構造変化を検出するための実験系を構築する。細胞膜では、膜貫通領域を有する膜蛋白質であっても、状況によって構造が不安定になったり、配向が逆転したりすることが予想され、現に、いくつかの状況証拠が得られている。今後は、膜融合の分子メカニズムを、蛋白質や脂質の配向と密接に関連させながら研究を展開していく。受精の膜融合の制御メカニズムをより詳細に解析することにより、受精後のシグナル伝達系の解明、受精以外の融合現象の解明にもつながると考えている。

5 自己評価:

卵を用いた生化学的解析を一つの柱としていたものの、マウス1個体から20個前後しか採取できないという材料確保の難しさから、蛋白質レベルでの解析に限界があり、免疫染色や GFP 融合蛋白質を用いた観察を中心とした研究に方向を変更せざるを得なかった。ただ、結果として、受精の研究では見落とされていた現象を新しく見つけることができたことは、運が良かったと考えている。

6 研究総括の見解:

CD9欠損卵に導入したCD9-EGFP遺伝子の発現で、CD9-EGFP融合蛋白質が機能し、卵細胞膜微絨毛の再形成、精子との膜融合能の回復をもたらすことを見いだしたことは、生きた細胞における受精の過程で起こる現象を目で見ることを可能にした優れた成果と考える。観察された現象は百聞は一見にしかずであるので、その現象を分生物学的に証明、説明して行くことが今後重要と考える。ユニークなアプローチであるので、ユニークな発見が続くことを期待する。

7 主な論文等:

論文

1. Takeda Y, Tachibana I, Miyado K, Kobayashi M, Miyazaki T, Funakoshi T, Kimura H, Yamane H, Saito Y, Goto H, Yoneda T, Yoshida M, Kumagai T, Osaki T, Hayashi S, Kawase I, Mekada E. Tetraspanins CD9 and CD81 function to prevent the fusion of blood monocytes/alveolar macrophages. *J Cell Biol.*, 100: 3221-6 (2003).
2. Ishibashi T, Ding L, Ikenaka K, Inoue Y, Miyado K, Mekada E, Baba H Tetraspanin protein CD9 is a novel paranodal component regulating paranodal junctional formation. *J Neurosci.* 24:96-102 (2004).
3. Nakanishi T, Kubota H, Ishibashi N, Kumagai S, Watanabe H, Yamashita M, Kashiwabara S, Miyado K, Baba T. Functional role of mouse poly(A) polymerase mGLD-2 during oocyte maturation. *Developmental Biology*. In press.

総説

4. 宮戸健二、谷河麻耶: テトラスパニンが制御する複合体形成と細胞機能 医学のあゆみ

209: 960-963, 2004.

口頭発表

5. Miyado, K. Tetraspanin and gamete membrane fusion.. Fertilization and activation of development, Gordon research conference, July 2003 (NH, USA)
6. 宮戸健二 受精の膜融合を制御する膜ドメインの形成機構の解明 理化学研究所筑波セミナー、2004年10月(筑波)
7. Miyado, K. Microvilli formation required for sperm-egg fusion is CD9-dependent. The 4th international symposium on the molecular and cell biology of egg- and embryo-coats, November 2004 (Mie, Japan)
8. Miyado, K. Tetraspanin and gamete membrane fusion.. Mammalian oogenesis and epigenetic modification, October 2005 (Chiba, Japan)
9. 宮戸健二 テトラスパニンによる膜融合の制御機構 第28回日本分子生物学会年会 ワークショップ、2005年12月(福岡)

特許出願

特願 2005-129198 「哺乳動物卵内への細胞外物質の導入促進剤および導入方法」

研究課題別評価

1 研究課題名: 脳のナトリウムレベルセンサーの解明と生活習慣病克服への応用

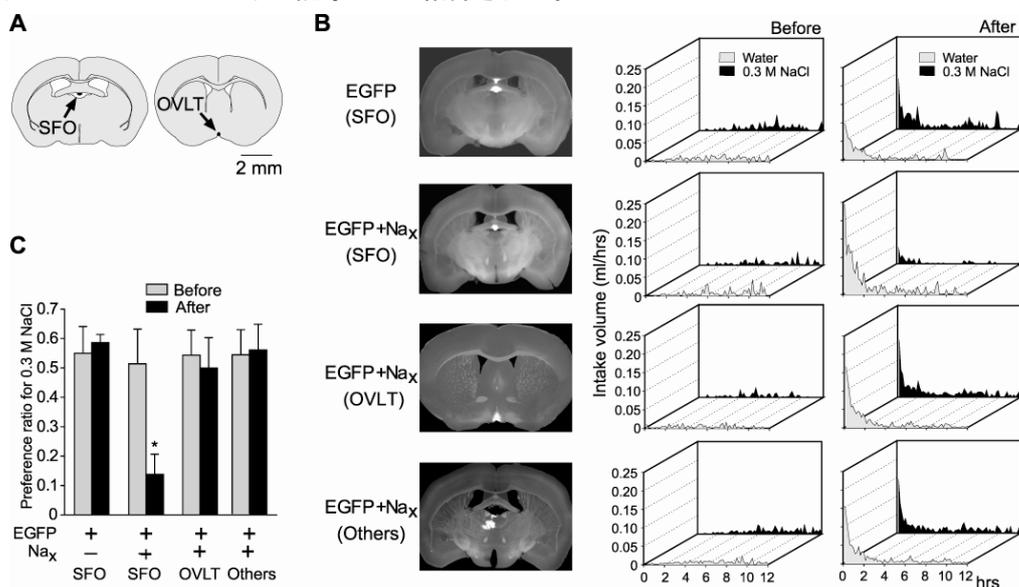
2 研究者氏名: 渡辺英治

3 研究のねらい:

塩分の慢性的な過剰摂取は、高血圧など成人病の一因になると考えられている。ヒトをはじめとする高等動物はこうした過剰な塩分摂取を避けるために、体液中のナトリウムレベルを検出する神経機構を持つ。これまで、脳におけるナトリウムレベルセンサーの実体については全く不明であったが、一連の遺伝子欠損マウスによる研究から、私たちの研究グループはナトリウムチャンネルの一種であるNaxが、ナトリウム濃度依存性ナトリウムチャンネルであり、脳のナトリウムレベルセンサーの実体であることを明らかにしてきた。本研究プロジェクトでは、Naxが細胞外ナトリウム濃度の変化を検出する分子機構について研究を進めていく。同時に脳のナトリウムレベルセンサーによって行動が制御されるメカニズムの解明についても研究を進める。本研究の成果は、蛋白質が電解質の絶対濃度を検出する機構を解明した世界で初めての例になる可能性を秘める。また、適度な塩分摂取をコントロールするための高血圧予防薬開発の第一歩にもなると考える。

4 研究成果:

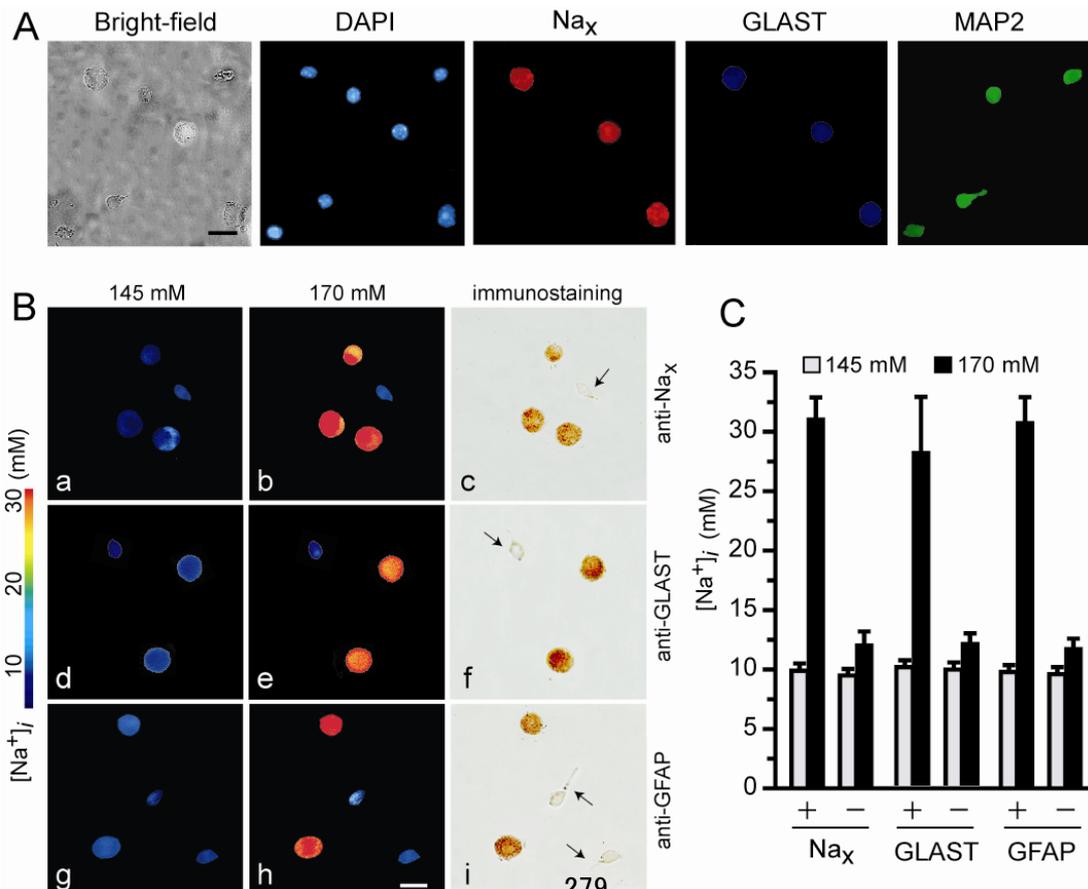
マウスの塩分摂取行動をリアルタイムで記録するために飲水量自動計測装置の開発を行った。本装置は1分間隔で自動的にマウスの飲水量を記録することができる。本装置を利用して脳のナトリウムセンシング機構について解析を行った。動物は脱水状態になると体内のナトリウム濃度が上昇し、新たな塩分摂取は回避する。以前の研究から、遺伝子欠損マウスは脱水時でも塩分摂取回避行動をとらないことがすでに判明している。今回は、脳室内にカニューレを挿入し高張ナトリウム溶液によってNaxが発現している脳室周囲器官を直接刺激した。その結果、野生型マウスは脳室内のナトリウム濃度の上昇に伴って塩分摂取行動が抑制されたが、遺伝子欠損マウスでは抑制反応が全く見られなかった。さらに、Naxを発現することのできるアデノウイルス発現ベクターを遺伝子欠損マウスの脳弓下器官に投与したところ、野生型マウスに近い行動を示すようになった(図1参照)。外来性Naxを発現させることで遺伝子欠損マウスの行動異常を改善することのできた領域は、脳の中でも脳弓下器官だけであった。このことは脳弓下器官で発現しているNaxが体液中のナトリウム濃度検出に必須であることを示している。また同時に動物の体内中のナトリウム濃度検出機構が脳内にあることを直接的に証明することができた。以上の結果は Journal of Neuroscience 誌に報告した。また本成果は、NATURE REVIEWS NEUROSCIENCE 誌(vol.5 (12): 897-897 DEC 2004)の記事として紹介された。



【図1】 Nax 遺伝子欠損マウスのレスキュー実験。 Nax 発現ベクターを Nax 遺伝子欠損マウスの脳に感染させ、その後48時間の絶水を行い、絶水前(Before)と絶水後(After)の飲水行動テストを行った。飲水行動テストではマウスに水と0.3MのNaCl水の二瓶を提示し、その飲水量を比較する。(A)では、 Nax が元来発現している脳弓下器官(SFO)と終盤脈管器官(OVLT)の位置を示す。 Nax 発現ベクターは蛍光タンパク質(EGFP)発現ベクターと共に打ち込むため、その感染部位を同定することができる(B)。(B)のグラフでは絶水直前(左)と直後(右)の飲水量の時間経過を示す。いずれのマウスも絶水直後に強い飲水行動を示すが、SFOに Nax チャンネルを戻したマウスだけが野生型マウスのような食塩水摂取を避けるような行動を示した。(C)では、(食塩水摂取量)/(総飲水量)の比で示した。

大阪大学人間科学研究科の山本隆教授らとの共同研究により、 Nax 遺伝子欠損マウスの行動異常が中枢性であるか、末梢性であるかを確認する研究を行った。実験は、野生型マウスと Nax 遺伝子欠損型マウスの味覚性の感覚神経を切断し、 Nax 遺伝子欠損マウスの行動異常に変化が起こるかどうかを調べた。結果として、遺伝子欠損マウスの行動異常は、中枢性であることが強く示唆された。以上の研究結果は、Brain Research 誌に報告した。

次に Nax チャンネルの機能を細胞レベルで解明することを目的として、 Nax チャンネルが機能している細胞の同定を行った。方法としては、抗 Nax 特異抗体による免疫電子顕微鏡法及び細胞種マーカーとの蛍光2重染色法である。結果、 Nax チャンネルは、脳弓下器官の神経細胞に巻き付いているグリア細胞性薄膜に特異的に発現していることが明らかとなった。また、脳弓下器官から単離したグリア細胞を使用してナトリウムイメージング解析を行ったところ、細胞マーカーで同定された単離グリア細胞に細胞外ナトリウムに応答するナトリウム感受性があることが判明した(図2参照)。以上のことから、脳弓下器官ではグリア細胞が細胞外のナトリウム濃度の上昇を感受しており、このグリア細胞の情報が神経細胞に伝えられると考えられる。すなわち、脳におけるナトリウム濃度の検出には神経細胞とグリア細胞の新しいコミュニケーションが必須であることを示唆している。以上の結果は American Journal of Physiology 誌に報告した。



【図2】 脳弓下器官の単離細胞でナトリウムイメージングを行った。(A)では単離細胞を各種マーカーで多重ラベルした。DAPIは核染色、Naxは抗Nax抗体、GLASTはグリア性の抗グルタミン酸トランスポーター抗体、MAP2は神経性のチューブリン修飾タンパク質に対する抗体で染色した。Nax陽性細胞は、グリア性マーカー分子を共発現している。(B)や(C)では、細胞外ナトリウム濃度を145mMから170mMに上昇させたときに細胞内に流入するナトリウムイオンをイメージング法によって解析した。結果、170mMの細胞外ナトリウム濃度に反応して細胞内にナトリウムを流入させている細胞はNaxチャンネルを発現させていると同時に、グリア性マーカー(GLASTとGFAP:GFAPは、グリア特異的な中間径フィラメント)も発現させていることが判明した。

最後にNaxの発現誘導ができるグリア細胞株を樹立した。本細胞にNaxの発現を誘導すると、微弱な応答ではあるがNax由来の細胞内へのナトリウムイオン流入が観察することができた。さらに、Nax誘導細胞を特定のホルモンで刺激しておくこととNax由来のナトリウムイオン流入が増強された。すなわちNaxは、細胞外のナトリウム濃度だけではなく、循環性ホルモンによっても活性が制御されていることが示唆された。また、グルコースイメージング法によって解析したところ、Naxチャンネルはグリア細胞へのグルコース取り込み能を格段に上昇させることが明らかとなった。また、酵母ツーハイブリッド法によってNa-KポンプとNaxチャンネルとの結合が明らかとなった。これらの実験結果は、Naxチャンネルがグリア細胞の代謝経路を刺激して、神経細胞に何らかのシグナルを伝達している可能性を示唆するものである。以上の結果は、論文投稿の準備中である。

5 自己評価:

当初の目標は、主として二つに分けられる。一つは、脳のナトリウムセンサーの存在を動物個体レベルで証明することにある。この課題に関しては、新たに開発したマウス用の飲水量自動測定装置とアデノウイルス発現ベクターを使った実験によってほぼ目標を達成したと考える。本研究成果によって、Naxが脳の中でも脳弓下器官でナトリウムレベルセンサーとして働いていることを立証することができた。もう一つの課題は、Naxナトリウムチャンネルがどのようにしてナトリウムイオン濃度の微小な変化を検出しているか、その分子メカニズムについて明らかにすることである。本課題については、Naxと相互作用する分子としてNa-Kポンプを明らかにし、これらがグリア細胞中で相互作用することによって代謝経路を制御していることを明らかにした。Naxチャンネルが電氣的にサイレントなグリア細胞に発現しているということは意外な新発見であった。しかしながら、Naxチャンネルがどのようにして細胞外のナトリウム濃度変化を検出しているかについて、具体的な分子機構は相変わらずとして大きな疑問として残したままである。その意味において、後半の課題に関しては道半ばである。

6 研究総括の見解:

細胞外ナトリウム濃度の変化を検出するレベルセンサーとして機能するNaxが、脳弓下器官中の神経細胞に巻き付いているグリア細胞性薄膜で特異的に発現することでその役割をはたしていること明らかにした成果は、所期の目的を達成するとともに、塩分摂取の制御機構における神経細胞とグリア細胞間のネットワークなどさらに詳細な解明への糸口を示したものとして高く評価できる。

7 主な論文等:

【オリジナル論文】

Watanabe, U., Shimura, T., Sako, N., Kitagawa, J., Shingai, T. Watanabe, E., Noda, M. and Yamamoto, T., A comparison of voluntary salt-intake behavior in Nax-gene deficient and wild-type mice with reference to peripheral taste inputs, *Brain Research* 967, 247-256 (2003)

Hiyama, T.Y., Watanabe, E., Okado, H. and Noda, M., The subfornical organ is the primary locus of sodium-level sensing by Nax sodium channels for the control of salt-intake behavior, *Journal of Neuroscience* 24, 9276–9281 (2004)

Niisato, K., Fujikawa, A., Komai, S., Shintani, T., Watanabe, E., Sakaguchi, G., Katsuura, G., Manabe, T. and Noda, M., Age-dependent enhancement of hippocampal LTP and impairment of spatial learning through the ROCK pathway in protein tyrosine phosphatase receptor type Z-deficient mice, *Journal of Neuroscience* 25, 1081–1088 (2005)

Watanabe, E., Hiyama, T.Y., Shimizu, H., Kodama, R., Hayashi, N., Miyata, S., Yanagawa, Y., Obata, K., and Noda, M., Sodium-level-sensitive sodium channel Nax is expressed in glial laminate processes in the sensory circumventricular organs, *American Journal of Physiology* (2005), in press

【総説】

渡辺英治、野田昌晴

ナトリウムチャネルの構造と機能

神経研究の進歩 Vol. 47: 159–168(2003)

渡辺英治

脳のナトリウムレベルセンサー

神経化学 Vol. 42: 75–87(2003)

渡辺英治

中枢神経系による塩分摂取制御機構

日本味と匂学会誌 Vol.10: 207–216(2003)