

「素過程と連携」研究領域活動・事後評価報告書

平成13年度終了研究課題

領域総括 大嶋 泰治

1. 研究領域の概要

「素過程と連携」は、生命の営みにおける個々の細胞内要素の素過程と、複数の素過程の連携によるさまざまな形質発現のダイナミックな様相を包括的に研究する領域である。例えば、刺激の認識と信号伝達、DNA 結合タンパク質の活性調節と転写因子の活性化などの素過程からなる遺伝子転写制御系、また細胞周期、成熟分裂への移行、物質輸送、修復と再生から器官分化と形態形成に関する研究などを含む。

2. 研究課題、研究者名

別紙一覧表参照

3. 選考方針

基本方針：

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

4. 選考の経緯

審査	書類選考	面接選考	採用者数
対象数	263人	32人	20人

5. 研究実施期間

平成10年10月～平成13年9月

6. 領域の活動状況

領域会議を6回（年2回）開催し、研究進捗状況の報告と研究交流を図った。
また、領域総括は、研究開始に際し全研究者を訪問するほか、随時、各研究者の研究実施場所に赴き研究の進捗状況把握に努めた。

7. 評価の手続き

領域総括が、個人研究者からの報告書及び自己評価（事後報告）を基に、領域アドバイザーの協力を得て行った。

（評価の流れ）

- 平成13年 9月 研究期間終了
- 平成13年11月および12月 研究報告会開催（東京および大阪）
- 平成13年12月～平成14年1月 研究報告書および自己評価提出
- 平成14年 2月上旬 領域総括による評価

8. 評価項目

ア. 外部発表（論文、総説・解説、口頭発表など）、招待講演、特許、研究を通じての新たな知見

の取得などの研究成果の状況
イ．得られた研究成果の科学技術への貢献度

9．研究成果

第二期生として多士済々の研究者 20 名を集め、微生物、植物からマウスに至る多彩な材料を用いて活発な研究が行なわれた。これらの研究を一括して述べることは困難であるが、類縁の課題をまとめて研究内容を述べる。

細胞周期と DNA 複製に関連して、酵母を材料に、水島 徹は DNA 複製が細胞周期ごとに 1 回に限定される機構について、荒木 弘之は DNA 複製開始と複製鎖伸長への移行メカニズムについて、また平田 大は、細胞周期に沿って規則的に起る細胞形態変化の制御系を解析した。仁木 宏典は、細胞分裂時の染色体移動を、原核生物の大腸菌で初めて可視化し、その様相を明らかにした。岩崎博史は成熟分裂における染色体交叉についてのホリデー・モデルについて、そこに働くタンパク質の機能分担を調べた。

シグナル伝達系に関連して、岸田 昭世は初期胚発生時の体軸形成を制御する Wnt シグナル伝達系の解明を進め、後藤 由季子は神経細胞の生存に必要なシグナルについて調べた。関本 弘之はミカズキモの性フェロモンと有性生殖過程の様相について大略を示した。

転写制御について、三谷 昌平は線虫の神経組織形成についての突然変異の新しい分離法と、それに関連する転写制御タンパク質 UNC-86 が支配する遺伝子の検索法を開発し、多くの関連遺伝子を検出した。田中 正史は遺伝子転写活性化因子の DNA 結合の様相を生きた酵母細胞において観察し、転写因子に新しいドメインの存在を示唆した。

細胞分化の機構について、澤 斉は非対称分裂の実験系を線虫で構築して成果を上げた。伊藤啓はショウジョウバエ脳神経回路の分化発生の形態学的研究により、多くの知見をもたらした。平田 たつみは神経軸索の伸長に関わる道標細胞の実体について調べた。また多田 政子は、体細胞ゲノムの脱プログラム化について、ES 細胞や EG 細胞との融合細胞の挙動を調べて考察した。疋田 正喜は、一旦骨髄中で決定された免疫抗原の結合性は変化しないとの概念に反して、末梢リンパ組織中で免疫遺伝子が再々構成されることを示した。

生体機構について、金井 好克は哺乳類アミノ酸トランスポーターの 2 つのサブユニットからなる構造を明らかにし、倉橋 隆は嗅覚における匂い物質の検出とシグナル伝達の分子機構について大きな成果をあげた。

その他、川口 正代司はマメ科植物と根粒菌の共生による生物窒素固定の研究を目指してミヤコグサに着目し、既存の Gifu 系統株に対し Miyakojima 株を採集分離して交配系を確立し、モデル生物として広く採用されるに至った。野村 一也は糖鎖の重要性に注目し、糖鎖の様々な生理学的意義を明らかにした。更に、佐々木 裕次は、SPRING-8 の施設を使用して、分子生物学を超えてタンパク質の 1 分子レベル計測法の開発に挑戦した。

第一期生の募集時とほぼ同数の 263 名の応募者から 20 名を採用したためか、20 名の素質に少々玉石混交の感を否めない。しかし、本二期生の成果を概観すれば、それぞれの原著論文、著作、また招待講演などにより、更に 2 名の教授と 4 名の助教授への昇任者を得たことから推察されるごとく、それぞれの研究は国際的にも高いレベルを保ち、学界からも概ね高い評価を受けていると云えよう。研究者は現在ますます意欲を持って研究を続け、支援期間に会得したことを伸ばそうとしている。この領域を通しての交流が契機となり、それぞれの人格と研究を触発し、更にスケールの大きな研究者に成長されることを期待したい。機に臨んで適切な論議とご教示を戴いたアドバイザー諸氏をはじめ、関係者の方々に深く感謝する。

10．評価者

所属は平成 13 年 9 月末現在のもの。()内は当領域発足時の所属。

領域総括：大嶋 泰治 関西大学 工学部 教授

領域アドバイザー氏名：

大島 靖美 九州大学 大学院理学研究院 教授

岡山 博人 東京大学 大学院医学系研究科 教授

小川 智子 岩手女子看護短期大学 教授(元国立遺伝学研究所 副所長)

勝木 元也 岡崎国立共同研究機構 基礎生物学研究所 所長(元東京大学医科学

研究所 教授 ヒト疾患モデル研究センター・センター長)

東江 昭夫 東京大学 大学院理学系研究科 教授
 西田 育巧 名古屋大学 大学院理学研究科 教授
 古澤 満 第一製薬(株)創薬基盤研究所 特別参与
 豊島 久真男* (財)住友病院 院長

*平成 12 年 4 月 1 日より参画

(参考)

1) 外部発表件数*

	国内	国外	計
論文**	17	163	180
口頭発表	231	64	295
総説・出版物**	79	8	87
合計	327	235	562

* : 件数は、各研究者が研究報告書に記したデータを採用した。

** : 平成 13 年 11 月末現在、印刷中のものは含むが、投稿中のものは含まない。

2) 特許出願件数：国内 5 件（外国なし）

金井好克、多田政子 各 1 件、平田たつみ 3 件

3) 受賞：国内 3 件

- ・岩崎博史：日本遺伝学会 奨励賞（2001 年 9 月）
- ・岸田昭世：日本癌学会 奨励賞（2001 年 9 月）「Wnt シグナル伝達経路における -カテニンの分解制御機構とその異常による癌化の分子機構
- ・平田 大：日本農芸化学会 奨励賞（1999 年 3 月）「酵母の細胞増殖に必要な機能分子に関する研究」

4) 招待講演

国内 102 件 国外 22 件 計 124 件

5) 研究者の流動状況

応募時から所属機関を移った研究者（20 名中）： 7 名

「素過程と連携」領域 研究課題名および研究者名

研究者名 (参加形態)	研究課題名 (研究実施場所)	現職** (応募時所属)	研究費* (百万円)
荒木 弘之 (兼任)	DNA複製開始からDNA鎖伸長過程 への移行機構 (国立遺伝学研究所)	国立遺伝学研究所 微生物 遺伝研究部門教授 (同上)	45
伊藤 啓 (兼任)	細胞系譜の観察によるショウジョウ バエの脳神経回路モジュール構造 の解析 (基礎生物学研究所)	基礎生物学研究所 細胞増 殖研究部門 助手 (同上)	55
岩崎 博史 (兼任)	相同組換えにおけるホリデー中間体 プロセッシングの機構 (横浜市立大学大学院総合理学研 究科)	横浜市立大学大学院総合理 学研究科 助教授 (大阪大学 微生物病研究所 助手)	49
金井 好克 (兼任)	蛋白質/蛋白質相互作用による物 質輸送機能発現の機構 (杏林大学 医学部)	杏林大学 医学部 教授 (同大学 同学部 助教授)	38
川口正代司 (兼任)	ミヤコグサで開く根粒共生系の分子 遺伝学 (東京大学大学院総合文化研究科)	新潟大学 理学部 助教授 (東京大学大学院総合文化研 究科 助手)	40
岸田 昭世 (兼任)	体軸形成における Wnt シグナル伝 達経路と Axin の役割 (広島大学医学部)	広島大学 医学部 講師 (同大学 同学部 助手)	50
倉橋 隆 (兼任)	「味」と「香り」を認識する分子機構 (大阪大学大学院基礎工学研究科)	大阪大学大学院基礎工学研 究科 教授 (同大学理学研究科助教授)	53
後藤由季子 (兼任)	神経細胞の生存シグナル伝達機構 の解析 (東京大学 分子細胞学研究所)	東京大学 分子細胞学研 究所 助教授 (同上)	51
佐々木裕次 (専任)	X線1分子計測による細胞膜動的機 能解析 (高輝度光科学研究センター)	高輝度光科学研究センター副 主幹研究員 (日立製作所基礎研究所 研究員)	57

(前頁つづき)

研究者名 (参加形態)	研究課題名 (研究実施場所)	現職** (応募時所属)	研究費* (百万円)
澤 斉 (兼任)	細胞はどのようにして非対称に分裂するか? (理化学研究所発生再生科学総合研究センター)	理化学研究所発生再生科学総合研究センター 細胞運命研究チーム チームリーダー (科学技術振興事業団CREST)	43
関本 弘之 (兼任)	植物における異性の認識と有性生殖成立の機構 (東京大学大学院総合文化研究科)	東京大学大学院総合文化研究科 助手 (同上)	51
多田 政子 (専任)	体細胞から個体発生におけるゲノム再プログラム化機構 (科学技術振興事業団さきがけ研究21 京都大学再生医科学研究所)	京都大学 再生医科学研究所 リサーチアソシエイト (鳥取大学医学部 日本学術振興特別研究員)	42
田中 正史 (専任)	転写制御の基本的枠組みを探索: モデル制御系の構築とその定量的解析 (科学技術振興事業団さきがけ研究21 東海大学医学部)	東海大学 医学部 非常勤教授 (東海大学総合医学研究所奨励研究員)	50
仁木 宏典 (兼任)	DNA はいかにして分配されていくのか? (国立遺伝学研究所)	国立遺伝学研究所 助教授兼・放射線アイソトープセンター長 (熊本大学医学部 講師)	42
野村 一也 (兼任)	血液型糖鎖を通じて知る生命の素過程 (九州大学大学院理学研究院)	九州大学 大学院理学研究院 助教授 (同大学 理学部 助教授)	47
疋田 正喜 (兼任)	胚中心における新規なB細胞選択機構の解明 (岡山大学工学部生物機能工学科)	岡山大学 工学部生物機能工学科 講師 (同上)	40
平田 大 (兼任)	酵母の形態形成と細胞増殖との連携制御機構 (広島大学大学院先端物質科学研究科)	広島大学 大学院先端物質科学研究科 助教授 (同上)	48
平田たつみ (兼任)	神経軸索の伸長経路を決める道標細胞の発現分子の検索 (国立遺伝学研究所脳機能研究部門)	国立遺伝学研究所 脳機能研究部門 助教授 (名古屋大学大学院理学研究科 助手)	49
水島 徹 (兼任)	染色体DNA複製の再開抑制機構の解明 (岡山大学 薬学部)	岡山大学 薬学部 助教授 (同上)	38
三谷 昌平 (兼任)	分子遺伝学と逆遺伝学による線虫の神経発生の解析 (東京女子医科大学医学部)	東京女子医科大学 医学部 助教授 (同上)	42

*: 研究費には研究者の人的費は含まず。 **: 平成 14 年 1 月末現在

DNA複製開始からDNA鎖伸長過程への移行機構

- 複製開始にみる素過程と連携 -

荒木 弘之

(国立遺伝学研究所・微生物遺伝研究部門)

1. 研究のねらい

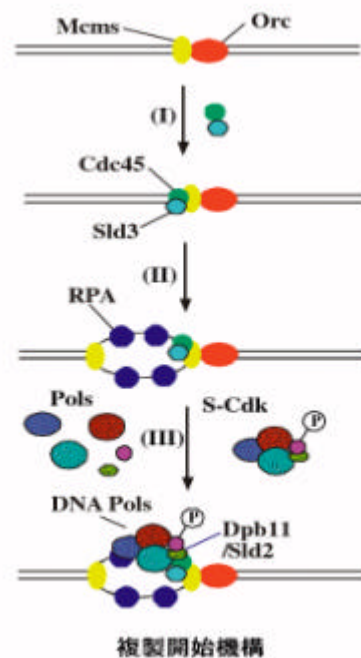
真核生物複製開始部位の活性化は、精力的に研究されているが、この活性化に続くDNA合成の開始、そしてDNA鎖伸長反応へと続く移行過程については、全く分かっていなかった。我々は、出芽酵母Dpb11がこの移行過程に関与することを示唆していたので、Dpb11及びそれと遺伝的に相互作用するSld (Synthetic lethal with dpb11-1) タンパク質群の機能解析により、DNA複製の開始からDNA鎖伸長反応への移行の分子機構を解明することを目的とした。

2. 研究結果及び自己評価

研究結果

(1) Dpb11のDNA複製における機能

真核生物の複製開始領域には、図に示すようにOrcが細胞周期を通じて結合し、M期後期にCdc6及びCdt1の働きでMcmが加わり、pre-RC(pre-Replication Complex)を形成する。そして、Cdc45がpre-RCに加わり(ステップI)、開始領域が1本鎖に解離して1本鎖DNA結合タンパク質RPAが結合する(ステップII)。その後、DNAポリメラーゼが開始領域に結合すると考えられている(ステップIII)。染色体DNA複製にはDNAポリメラーゼ(Pol)、Pol α 、Pol δ が必要であるが、DPB11遺伝子は、Pol δ のサブユニットをコードするPOL2、DPB2の変異を多コピーで抑圧する遺伝子として分離された。Dpb11及びPol δ のクロマチンへの結合をCHIP(Chromatin immunoprecipitation)法を用いて調べたところ、Dpb11はPol δ と同じくS期に複製開始領域に結合することが分かった。また、dpb11-1変異株では、Pol δ の複製開始領域への結合は検出されない。さらに、dpb11-1変異ではPol δ の複製開始領域へのローディングも起こらないが、Pol δ の変異ではDpb11は複製開始領域に結合する。一方、dpb2変異ではDpb11の複製開始領域への結合は起こらない。架橋剤により細胞を処理すると、Pol δ とDpb11の複合体を検出することができるので、上記の結果は、Dpb11とPol δ が複合体を作り、複製開始領域に結合した後、Pol δ がローディングされることを示唆している。即ち、図のステップIIIにDpb11が必要であることを明らかにした。



(2) Dpb11と複合体を形成するSld2のリン酸化

Dpb11はSld2と複合体を形成し、この複合体の形成が染色体DNAの複製に必須である。このSld2-Dpb11複合体はS期にのみ形成されることが分かった。また、Sld2のSDS-PAGEでの移動度はG1/S期に遅くなり、遅くなったSld2はG2期からM期にかけて消失することが分かった。この移動度の変化は、ホスファターゼ処理により解消するため、Sld2がリン酸化されていると結論できる。次に、Sld2はそのアミノ酸配列中にCdk (Cyclin dependent protein kinase) によりリン酸化可能な部位を6つ持つため、その全ての部位のセリン、スレオニン残基をアラニン残基に置換した変異遺伝子を作成した。この変異遺伝子は、Sld2欠失株の増殖を相補することができない。さらに、この変異Sld2はDpb11と複合体を形成しない。これらのことから、Sld2がS期Cdkによりリン酸化されると、Dpb11と複合体を作り、この複合体が(1)に記述したDNAポリメラーゼの複製開始領域への結合に働くと考えられる。

(3) Sld3 の機能

我々の分離した Sld3 は、前述の Cdc45 と複合体を形成することが分かった。そこで、CHIP 法により Sld3 と Cdc45 の複製開始領域への結合を調べた。Sld3 と Cdc45 は、初期複製開始領域には G1 期から S 期に結合がみられたが、後期複製開始領域には S 期でのみ結合していた。また、変異株を用いた解析から、Sld3 の開始領域への結合には Cdc45 の機能が、Cdc45 の開始領域への結合には Sld3 の機能が必要であることが分かった。更に、RPA の開始領域への挙動を調べることにより、開始領域が開裂したかを検討した結果、sld3-5 細胞では RPA の結合が観察されず、Sld3-Cdc45 複合体が複製開始領域の一本鎖解離反応に必要であることが示唆された。Dpb11 は、RPA の変異株では開始領域に結合せず、Sld3-Cdc45 は DNA ポリメラーゼローディングの早い段階、即ち図の(I)(II)のステップに参与していると考えられる。

(4) Sld5-Psf1-Psf2 複合体の機能

Sld5 は遺伝的及び生化学的解析から、Psf1 (Partner of Sld Five)、Psf2 と細胞周期を通じて複合体を形成していることが分かった。また、この複合体が DNA ポリメラーゼ同様に、初期複製開始領域には S 期初期に、後期複製開始領域には S 期後期に結合することが、CHIP 法により明らかになった。さらに、psf1-1 温度感受性変異では、Cdc45 の強固なクロマチン結合は起らない。これらの結果は、この複合体が DNA ポリメラーゼの開始領域への結合に必要であることを示しているが、正確な作用位置を特定することは出来なかった。

自己評価

複製開始から DNA 鎖伸長に関わる因子を多数分離し、それらの間の相互作用を明らかに出来たことは、出芽酵母の遺伝解析法を有効に利用できたこととして評価できる。一方、各因子の生化学的解析は、タンパク質量が少ないことや多量発現系の構築が難しかったことから、予定通りには進まなかった。しかし、Sld5-Psf1 複合体の分離は順調に進んでいるので、これを突破口に今後タンパク質の解析も進めてゆきたい。

3 . 領域総括の見解

本研究では、出芽酵母における DNA の複製開始から DNA 鎖伸長に関わるタンパク質相互の機能順序の決定している。特に、本研究者が検出した Dpb11 と Sld2 の 2 種のタンパク質を始めとする数種のタンパク質と Orc (origin recognition complex) との協調性について着実に解明を進めている。本研究は国際的に関心の高い細胞周期制御機構に対し、DNA 複製制御機構との連携を示すことに意義があり、いずれ高く評価されるであろう。

4 . 主な論文

1. Masumoto, H., Sugino, A., and Araki, H. (2000). Dpb11 controls the association between DNA polymerases and , and the ARS region of budding yeast. *Mol. Cell. Biol.* 20, 2809-2817.
2. Kamimura, Y., Tak, Y.-S., Sugino, A. and Araki, H. (2001). Sld3, which interacts with Cdc45 (Sld4), functions for chromosomal DNA replication in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 20, 2097-2107.

細胞系譜に依存したショウジョウバエ脳の神経回路モジュール構造の解析

伊藤 啓

(岡崎国立共同研究機構・基礎生物学研究所・細胞増殖研究部門)

1. 研究のねらい

脳を構成する神経細胞やグリア細胞は、神経幹細胞と呼ばれる少数の特殊な細胞が、不等分裂を繰り返して作られる。言い換えれば脳の細胞集団は、幹細胞の子孫のファミリー（クローン）ごとに区分できるわけである。では幹細胞は単に未分化の細胞集団を作るだけで、子孫細胞は出自に関係なく、それぞれ独自に分化していくのだろうか？それとも子孫細胞は、細胞系譜に応じて特定の神経回路を作るのだろうか？もしそうだとしたら、クローン単位の回路構造はどのような仕組みで作られるのだろうか？本研究ではこれらの問いに答えることを目標にした。

2. 研究結果及び自己評価

研究結果

胚発生だけでなく、成体の脳まで細胞系譜を追うことは技術的に難しく、上記のような問いに答えることはこれまで殆ど不可能だった。そこで私は、合成遺伝子の個体への導入が極めて容易なショウジョウバエの利点を活かし、一部の神経幹細胞とその子孫の細胞のみをラベルする技術「FRT-GAL4 システム」を開発した。ショウジョウバエの脳には片半球2~2.5万個の細胞があるが、これらはずか85個程度の神経幹細胞から産み出される。このうち少なくとも半数近い幹細胞で、1つの幹細胞の子孫は限られた種類の回路だけを形成していることが分かった。こうして発見された細胞系譜単位のモジュール回路構造を「クローナルユニット」と名付けた。ショウジョウバエ脳のかなりの部分は、クローナルユニットがモザイク状に組み合わさった構造だと言える。

このようなユニット構造は、どのようにして作られるのだろうか？成虫脳の細胞の大多数が作られる幼虫期に神経幹細胞とその子孫をラベルすると、1つのクローナルユニットの細胞群から伸びる神経線維は、全体が1本の束にまとまって脳を中心へ向かっていた。線維がこのような束を作るメカニズムとして、隣り合う兄弟細胞や線維同士が、互いに強く接着している可能性が考えられる。このような細胞接着を担う細胞接着因子に対する特異的な抗体を用いて分布を調べた結果、Fasciclin II (Fas II), Fas III, Connectin などの細胞接着因子が、それぞれ特異的な一部のクローナルユニットで細胞の間に分布しているのが観察された。

では、細胞接着因子の分布を乱したらどうなるだろうか？接着因子の1つ Fas II について詳しく解析した。本来 Fas II が存在しないクローナルユニットにおいて強制的に Fas II 遺伝子を発現させてみても、逆に本来 Fas II が存在するユニットで Fas II を無くしてみても、線維束の形成状況には顕著な影響は見られなかった。この結果には2つの解釈が可能である。さまざまな細胞接着因子が同時に作用しているため、1つを異常にしても顕著な影響が出ないという可能性と、クローナルユニットの構造を保つメカニズムが細胞接着因子以外にも存在する可能性である。

Fas II を隣接するクローナルユニットで強制的に発現させると、Fas II タンパクはクローナルユニット内の細胞間の境界には分布するが、ユニット間の境界には分布しない。詳しく調べると「細胞体グリア」と呼ばれるグリア細胞が1つ1つのクローナルユニットを包むように存在していることが分かった。グリア細胞が隣り合うクローナルユニットの間の障壁となることで、異なるユニットに属する細胞間の接着を阻止しているのだと推察できる。

幹細胞から生まれた子孫細胞の神経線維は、どのように1つの束を形成するのだろうか？これを調べるため、もともとある細胞の線維と新しく出来た細胞の線維を染め分ける新しい方法を開発した。クラゲ由来の緑色蛍光色素GFPに比べ、サンゴ由来の赤色蛍光色素DsRedは、タンパクが作られてから蛍光を発するようになるまでの時間が長い。DsRedとGFPをクローナルユニットの細胞で共発現させると、線維束の中心部はGFPのみ、外側はGFPとDsRed両方の蛍光が観察された。つまり、中心部の線維は外側より新しい。新しく生まれた細胞の線維は、古い線維の束の芯部へ伸びることで伸長方向が制限され、結果的に同じ方向に投射していると推察される。

以上のように本研究では、ショウジョウバエの脳には細胞系譜に依存したユニット回路構造が存在すること、その形成には細胞接着因子、グリア細胞の障壁、線維の同心円的新旧関係など様々な要素が関与していることを明らかにした。一方で、クローナルユニットによっては単一でなく複数の標的

へ線維束が分岐するが、この分岐の形成がどのように制御されるかを時系列的に調べる点では、当初計画したレベルの解析を終えることができず、今後の課題となった。

自己評価

複雑な脳神経回路の中に、従来まったく知られていなかった単純で整然とした構造が潜んでいることを明らかにできた。しかし評価の高い論文にまとめるためには、単にこのような構造を発見したことを報告するだけでなく、この構造がどのようにして出来てくるのか、メカニズムにまで踏み込んだ解析が要求される。神経細胞間の相互接着を阻害しても大きな影響がなく、グリア細胞を選択的に除去する実験が難航しているため、さきがけ期間終了までに最終的な成果を論文発表できなかったのが残念である。

3．領域総括の見解

組織分化の機構解明を目標に、本研究者は複雑なショウジョウバエの脳神経回路に焦点を合わせて形態学的な研究を続けている。研究過程では、任意の神経幹細胞とその子孫のみをラベルする技術、また既存の細胞と新生細胞を染め分ける技術は、いずれも本研究の独創性によるものであり、その成果は未発表の部分が多いが、複雑な昆虫の脳神経を選びながら実り多い成果を挙げていることを高く評価したい。

4．主な論文

1. Verkhusha, V. V., Otsuna, H., Awasaki, T., Oda, H., Tsukita, S., and Ito, K. (2001). An enhanced mutant of red-fluorescent protein DsRed for double labeling and developmental timer of neural fiber bundle formation. *J. Biol. Chem.* 14, 29621-29624.

5．その他

招待講演数 国内 1 回 海外 4 回

6．謝辞

本研究の遂行にあたっては、基礎生物学研究所細胞増殖研究部門教授の勝木元也、科学技術振興事業団戦略的基礎研究推進事業「脳を知る」勝木グループの研究員栗崎健（現さきがけ研究 21 「認識と形成」研究員）、科学技術振興事業団創造科学推進事業月田細胞軸プロジェクトの研究員 Vlad Verkhusha の各氏を始め、多くの方に協力をいただいたことを篤く感謝します。

相同組換えにおけるホリデー中間体プロセッシングの機構

岩崎 博史

(横浜市立大学・大学院総合理学研究科・生体超分子システム科学専攻)

1. 研究のねらい

遺伝的相同組換えは、生物界に普遍的かつ重要な生理機能にもかかわらず、その反応中間体として形成されたホリデー構造がプロセスされるメカニズムは、長い間不明であった。我々は、大腸菌 RuvA RuvB RuvC タンパク質がホリデー構造のプロセッシングに直接関わり、組換え体分子の生成の過程に働くことを明らかにしていた。そこで本研究では、RuvABC が触媒する反応機構の詳細を解明するとともに、真核生物における組換え中間体のプロセッシングに関わる因子の同定を目指した。

2. 研究結果及び自己評価

2-1 研究結果

2-1-A バクテリア RuvABC タンパク質によるホリデー中間体プロセッシングの機構

RuvA はホリデー構造特異的 DNA 結合タンパク質で、RuvB ATPase をホリデー分岐に呼び込む働きがある。RuvB は ATP の分解エネルギーを利用してホリデー分岐点の移動反応を触媒する。RuvC はホリデー分岐点特異的エンドヌクレアーゼで、ホリデー構造の解消に働く。これらの反応の詳細を理解するために、多数の変異株の機能解析と X 線結晶立体構造解析を行った。これらの相補的な解析の結果、反応の素過程の概要が原子レベルで明らかになった。具体的成果は以下の通りである。

2-1-A-i) RuvA 4量体は、ディスク状の形態を取り、正電荷を帯びた凹面でホリデー分岐と結合する。RuvA モノマーは3つのドメインからなり、中央ドメインが、ホリデー分岐 DNA との結合に直接関与する。このドメインにはヘリックス-ヘアピン-ヘリックス(HhH)モチーフが存在し、モチーフ中の複数の塩基性残基によって DNA リン酸残基が認識される。その結果、ホリデー分岐は“開いた十字構造”に変化する。N 末端ドメインは安定な 4 量体形成に、C 末端ドメインは RuvB との結合に関与する。

2-1-A-ii) RuvB は、AAA⁺ ATPase [ATPase associated activities with various cellular activities] に属する 6 量体リング状タンパク質である。モノマーは3つのドメインからなり三日月型をしている。N-末端ドメインが多くの ATPase に共通するドメインであるが、このドメインから飛び出した RuvB 特異的な -ヘアピンが RuvA と相互作用する。中央部は、ATPase 活性の調節ドメイン、C-末端は DNA 結合ドメインである。ATP の水解に伴って、C-末端ドメインの空間的配置が変化し DNA を繰り出すことによって、分岐点移動が促進されると予想される。

2-1-A-iii) RuvC は RNaseH スーパーファミリーに属する。活性中心にある 4 個の酸性アミノ酸が Mg²⁺ イオンを配位し、加水分解反応の中心的役割を司る。さらに、近傍にあるフェニルアラニンが DNA 塩基と stacking 相互作用をし、2 個の塩基性アミノ酸が DNA 主鎖のリン酸と静電的結合をすることによって、切断反応を補助する。

2-1-B 真核微生物のホリデー中間体プロセッシングの機構

真核生物におけるホリデー中間体プロセッシングの機構を明らかにする目的で、2種類の酵母を用いて、遺伝的解析を行った。

2-1-B-i) 分裂酵母の新規組換え遺伝子の同定とその解析

rad2 遺伝子は、DNA 複製の際生じる Okazaki 断片のプロセッシングに関与する。この変異との合成致死性を利用すると、相同組換え遺伝子の変異株が効率よく分離できることを示した。この方法

を用いて、組換え変異株候補を約 500 株分離した。これまでに、 rhp57 遺伝子を発見し、2重鎖切断修復に関するヒト XRCC3 の構造的かつ機能的ホモログであることを明らかにした。

2-1-B-ii) 出芽酵母 MGS1 遺伝子の機能解析

MGS1 は ruvB と配列上高い相同性を示し、最初、酵母における ruvB ホモログであると予想されたが、変異株の解析の結果、相同組換えには直接関与していないことがわかった。しかし、大腸菌からヒトまで高度に保存されていることから重要な遺伝子であると予想されたので詳細な遺伝学的解析を行った。その結果、MGS1 はゲノムの安定維持機構に重要な役割をすることが明らかになった。

2-2 自己評価

原核生物 RuvABC の解析では、ほぼ満足のいく成果であった。一方、よりチャレンジングな計画であった酵母の実験系では、多数の組換え変異株を分離でき、今後大きな発展が期待できる。以上のことから、総じて、現時点での成果と将来における先行投資的な研究という両面でほぼ満足のいく成果を残せたと思う。

3 . 領域総括の見解

染色体交叉のメカニズムとして、古くから考察されてきたホリデーモデルについて、原核生物の大腸菌と真核生物の酵母を材料に、そこに働く数々のタンパク質について具体的な機能の決定を行い、国際的な成果を挙げていることを評価したい。

4 . 主な論文

1. Hishida, T., Iwasaki, H., Ohno, T., Morishita, T., and Shinagawa, H. (2001). A yeast gene, MGS1, encoding a DNA-dependent AAA⁺ ATPase is required to maintain genome stability. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 98, 8283-8289.
2. Yamada, K., Kunishima, N., Mayanagi, K., Ohnishi, T., Nishino, T., Iwasaki, H., Shinagawa, H., and Morikawa, K. (2001). Crystal structure of the Holliday junction migration motor protein RuvB from *Thermus thermophilus* HB8. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 98, 1442-1447.
3. Yoshikawa, M., Iwasaki, H., and Shinagawa, H. (2001). Evidence that phenylalanine 69 in *Escherichia coli* RuvC resolvase forms a stacking interaction during binding and destabilization of a Holliday junction DNA substrate. J. Biol. Chem. 276, 10432-10436.
4. Ariyoshi, M., Nishino, T., Iwasaki, H., Shinagawa, H., and Morikawa, K. (2000). Crystal structure of the Holliday junction DNA in complex with a single RuvA tetramer. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 97, 8257-8262.
5. Tsutsui, Y., Morishita, T., Iwasaki, H., Toh, H., and Shinagawa, H. (2000). A recombination repair gene of *Schizosaccharomyces pombe*, rhp57, is a functional homolog of the *Saccharomyces cerevisiae* RAD57 gene and is phylogenetically related to the human XRCC3 gene. Genetics 154, 1451-1461.

5 . その他

日本遺伝学会 奨励賞 2001 年 9 月

招待講演 7 件 (うち国内国際会議 1 件、海外 0 件)

蛋白質 / 蛋白質相互作用による物質輸送機能発現の機構

- アミノ酸トランスポーターの構成サブユニットと機能・調節の多様性 -

金井 好克

(杏林大学医学部・薬理学教室)

1.

細胞膜を介する物質輸送は、トランスポーター（輸送体）と呼ばれる膜タンパク質によって行われる。従来トランスポーターは、単一のタンパク質で機能すると考えられていたが、我々は哺乳類アミノ酸トランスポーターの分子クローニングの過程で、ヘテロ2量体構造をとるトランスポーターを見出した。本研究は、アミノ酸トランスポーターの構成サブユニットを明らかにし、タンパク質間相互作用により機能と調節の多様性が生みだされる機構を明らかにすることを旨とした。

2. 研究結果及び自己評価

研究結果

(1) アミノ酸トランスポーターの構成サブユニットの同定

我々がすでに明らかにしていたヘテロ2量体型アミノ酸トランスポーターは、1回膜貫通型の主サブユニット LAT1(L-type amino acid transporter 1) と1回膜貫通型の補助サブユニット 4F2hc(4F2 抗原重鎖;CD98) が、ジスルフィド結合により連結することによって形成される。本研究において、LAT1 と類似のタンパク質をコードする cDNA を単離することにより、6種の新規主サブユニットを同定し、LAT1 及び他のグループによる2種をあわせて、多様な基質選択性を示す9種の主サブユニットからなるヘテロ2量体型トランスポーターファミリーを確立した。このファミリーのメンバーのうち、LAT1 をはじめとする6種は、補助サブユニット 4F2hc と連結し、1種は4F2hc 類似の構造を持つ rBAT (related to b⁰⁺ amino acid transporter; 輸送系 b⁰⁺ 関連因子) と呼ばれる1回膜貫通型タンパク質とジスルフィド結合を介して連結する。残りの2種は、未知の補助因子と連結すると考えられる。

(2) 補助サブユニットの役割

ヘテロ2量体型トランスポーターファミリーは、特定の補助サブユニットと連結し、タンパク質複合体として、細胞膜へと輸送される。極性細胞においては、現在同定されている2種の補助サブユニット 4F2hc 及び rBAT は、それぞれ側底側細胞膜、頂端側細胞膜への移行シグナルを内在すると考えられる。2種の補助サブユニットの分子キメラを作製することにより、主サブユニットの認識に関わる領域、及び細胞膜移行を決定する領域の解析が進行中である。

補助サブユニット 4F2hc は、インテグリン beta-1 サブユニットと連結し、主サブユニットを加えて高分子複合体を形成することが免疫沈降により明らかになった。さらに、yeast two hybrid 法により、4F2hc の細胞内ドメインと相互作用するタンパク質が同定され、4F2hc が細胞内外のシグナル経路と連結し、主サブユニットの機能を調節する可能性が示唆された。

(3) 細胞増殖におけるアミノ酸トランスポーターの役割

LAT1 は、悪性腫瘍細胞に発現が亢進する。ヒト悪性腫瘍細胞株 T24 は、インヒビターやアンチセンス DNA による LAT1 の抑制により細胞増殖が抑制された。この増殖抑制は、細胞死の誘発ではなく、細胞周期全体の延長によることが示唆された。また、LAT1 の強制発現により、細胞増殖が促進することが明らかになった。従って、LAT1 を介するアミノ酸の取り込みが、細胞増殖の律速段階の一つとなると考えられる。

LAT1 / 4F2hc 複合体の役割を in vivo で検討する目的で、cDNA をインスリンプロモーターに繋いで膵臓 b 細胞に過剰発現させるトランスジェニックマウスを作製した。トランスジェニック個体の膵臓では、ランゲルハンス島が肥大し、beta 細胞の配列の乱れと増殖像が観察され、LAT1 / 4F2hc 複合体の細胞増殖促進効果が支持された。

(4) 今後の展望

1回膜貫通型の補助サブユニットを中心に複数のタンパク質が連結し、トランスポーターの機能が細胞内外の情報伝達系の web の中で調節され、細胞及び組織の恒常性が維持される機構を、本研究の延長上に明らかにしたい。また、本研究でアミノ酸トランスポーターが細胞増殖の律速段階のひとつとなることが示されたが、その抑制による細胞周期延長の機序の解明と、悪性腫瘍治療への応用の可能性の探究が今後の課題となる。

自己評価

本研究は、従来単一の分子で機能するとされていたトランスポーターが複数の分子の複合体として形成される事例を提示した。本研究により、トランスポーター研究に「タンパク質間相互作用」の概念が導入され、この研究分野のポストゲノム研究への橋渡しがなされた。トランスポーター分子複合体の、他の細胞構成タンパク質との機能的連結等の問題は残されたが、研究開始時の到達目標の骨子は実現されたと考える。

3 . 領域総括の見解

哺乳類のアミノ酸トランスポーターは、12回膜貫通型の主サブユニットと1回膜貫通型の補助サブユニットからなることが、本研究者のこれまでの研究で明らかとなっていた。本研究期間では、二種類の異なる補助サブユニットについて対比しながら機能を調べ、これらが主サブユニットの活性調節、ひいては細胞増殖制御に働くことを見出した。その全容が明らかになれば、悪性腫瘍の治療に応用される可能性が示唆される。

4 . 主な論文

1. Segawa, H., Fukasawa, Y., Miyamoto, K., Takeda, E., Endou, H., and Kanai, Y. (1999). Identification and functional characterization of a Na⁺-independent neutral amino acid transporter with broad substrate selectivity. *J. Biol. Chem.* 274. 19745-19751.
2. Chairoungdua, A., Segawa, H., Kim, J.Y., Miyamoto, K., Haga, H., Fukui, Y., Mizoguchi, K., Ito, H., Takeda, E., Endou, H., and Kanai, Y. (1999). Identification of an amino acid transporter associated with the cystinuria-related type II membrane glycoprotein. *J. Biol. Chem.* 274. 28845-28848.
3. Fukasawa, Y., Segawa, H., Kim, J.Y., Chairoungdua, A., Kim, D.K., Matsuo, H., Cha, S.H., Endou, H., and Kanai, Y. (2000). Identification and characterization of a Na⁺-independent neutral amino acid transporter that associates with the 4F2 heavy chain and exhibits substrate selectivity for small neutral D- and L-amino acids. *J. Biol. Chem.* 275. 9690-9698.
4. Kanai, Y., Fukasawa, Y., Cha, S.H., Segawa, H., Chairoungdua, A., Kim, D.K., Matsuo, H., Kim, J.Y., Miyamoto, K., Takeda, E., and Endou, H. (2000). Transport properties of a system y⁺L neutral and basic amino acid transporter: Insights into the mechanisms of substrate recognition. *J. Biol. Chem.* 275. 20787-20793.
5. Kim, D.K., Kanai, Y., Chairoungdua, A., Matsuo, H., Cha, S.H., and Endou, H. (2001). Expression cloning of a Na⁺-independent aromatic amino acid transporter with structural similarity to H⁺/monocarboxylate transporters. *J. Biol. Chem.* 276. 17221-17228.

5 . その他

招待講演：国内 21 件、海外 5 件

特許出願：「広い基質選択性を有する中性アミノ酸トランスポーター及びその遺伝子」
(特開 2000-342270)

ミヤコグサで開く根粒共生系の分子遺伝学

- ミヤコグサのモデル化に向けた基盤形成と根粒の数をシステム的に制御する宿主因子の
同定 -

川口 正代司

(東京大学・大学院総合文化研究科)

1. 研究のねらい

マメ科植物は、根粒細菌と共生し、空中窒素を固定をすることができる。またマメは非常に多くの種を有し、有用資源が多い。これらの形質を分子レベルで明らかにするためには、マメのモデル系が必要である。近年、日本に自生するミヤコグサが、その候補として注目されている。本研究ではミヤコグサの分子遺伝解析に必要とされる遺伝地図を構築するために、世界で広く使われている系統 Gifu と多くの DNA 多型をもつ交配パートナーの探索を行った。また根粒菌との共生を、システム的(全体的)に制御する宿主因子を明らかにするために、2つの根粒過剰着生変異体から原因遺伝子の単離を試みた。

2. 研究結果及び自己評価

(1) Gifu の交配パートナーとしての Miyakojima MG-20

日本各地より収集した15系統のミヤコグサを用い、Gifuと最も多くのDNA多型を示すミヤコグサを探した。その結果、南西諸島の宮古島で見いだしたミヤコグサ Miyakojima MG-20 が、AFLP 解析で4.5%と最も高いDNA多型率を示すことが明らかとなった。Gifu と Miyakojima は相互に交配が可能であり、F1植物は良好に生育し多くの豆果をつけた。以上の結果から、Gifu の交配パートナーとして、Miyakojima は優れていると考えられる。Miyakojima は、当研究者が日本各地のミヤコグサの中から、最も早咲きのものとして1998年1月に見出したもので、Gifu では難しかった実験室内の遺伝解析が可能である。遺伝的背景を均一にするために自家受粉を7回繰り返し、系統 Miyakojima MG-20-S7 を確立した。現在この系統は13カ国で使われており、大規模なEST解析とゲノム解析が、かずさDNA研究所で始まっている。また国内研究者の協働により、Gifu と Miyakojima のDNA多型に基づく高密度連鎖地図の構築も始まった。Miyakojima の発見と系統の確立は、ミヤコグサのモデル化に大きく貢献した。

(2) 根粒の数をシステム的に制御する2つの宿主遺伝子 HAR1, ASTRAY の同定

古くからダイズ等を用いた生理学的実験により、根粒の数をシステム的(全体的)に制御する宿主因子の存在が示唆されていた。この制御は「オートレギュレーション」と呼ばれ、その抑制シグナルは葉で合成されることが知られている。Gifu に EMS 処理を施して単離した har1 (Ljsym78)変異体は、植物の生長が著しく阻害されるほどに多くの根粒を着生する。ミヤコグサの接ぎ木実験により、har1 変異体は葉で合成される「オートレギュレーションシグナル」を欠損していることが分かった。我々はGifu と Miyakojima のDNA多型に基づくポジショナルクローニングを試み、原因遺伝子を同定することに成功した。同定した遺伝子は、アラビドプシスの頂端分裂組織の構築に働くレセプターカイネースと高い相同性を有していた。これにより根の根粒細菌の感染情報は、葉で発現する HAR1 遺伝子産物により認識され、さらにそれに続くリン酸化によりオートレギュレーションシグナルが合成されるというメカニズムが見えてきた。植物におけるシステム的な制御は、病原菌やウイルスの感染を防ぐ術として重要でありながら、それに与るレセプターは過去同定されていない。従って今回の発見は、根粒共生系の域を越えて、システム的制御の分子的理解に大きく貢献するものと思われる。

一方、astray (Ljsym77)変異体は、光や重力に対する応答など全身的な環境応答の異常を示す新規の根粒過剰着生変異体である。astray の変異形質は Arabidopsis の hy5 変異体と酷似していることから、原因遺伝子を HY5 のホモログであると推定し、ミヤコグサより高い相同性をもつ遺伝子(LjBZF)を単離した。LjBZF 遺伝子のコードするタンパク質は、HY5 のそれに見られる bZIP motif を良く保存していた。しかし、N末側にはHY5 遺伝子のそれにはない zinc finger motif などの領域が見いだされ、これらの領域はダイズ、ソラマメにも保存されていた。astray 変異体の原因遺伝子が LjBZF であることを確認するために、遺伝子内における Gifu, Miyakojima 間の一塩基多型(SNPs)を検出し、dCAPS 法による連鎖解析を行った。その結果 F2 世代の変異体すべてにおいて、LjBZF 遺伝子との

連鎖が確認された。astray 変異株細胞への LjBZF 遺伝子の導入により変異形質が相補されたことから、ASTRAY は根粒形成を抑制するマメに特徴的な転写因子であることが証明された。以上の研究を通じ、世界で初めて根粒形成をシステミックに制御する2つの宿主因子を明らかにすることができた。

自己評価

マメ科植物の分子遺伝学的解析を実現しようと日本各地をさまよい歩き、沖縄県宮古島の早咲きミヤコグサ Miyakojima にたどり着いたのは1998年1月25日のことであった。その年、業績のない私は幸運にもさきがけ研究21に採用された。当時 *Medicago truncatula* との競合など多くの困難があったが、ミヤコグサ研究を支援する人がひとりまたひとりと増えてゆき、大規模 EST 解析が始まり、Miyakojima を交配パートナーとする高密度連鎖地図が構築され、ゲノムプロジェクトまで始動した。共生と器官形成をシステミック（全身的）に制御する宿主因子を分子遺伝学的に同定することが一つの大きな目標であった。Gifu, Miyakojima 間の DNA 多型を活用し、それは2001年6月29日に達成された。大きな力に支えられ、過去最高の発見をすることができた。

3 . 領域総括の見解

マメ科植物と根粒菌の共生による窒素固定反応は、地球規模の生物生存に重大な影響を及ぼす。本研究者は、窒素固定メカニズムの解明を目的として、モデル生物としてのミヤコグサに着眼し、既存のGifu系統に対する交配パートナーを探索し、Miyakojima 株を得たところからさきがけ研究の支援を得た。現在、根粒形成の制御に働く2種の宿主遺伝子変異を同定し、植物学界に大きな波紋を広げている。将来、窒素固定機構の改善を通して、農業に寄与することが期待される。

4 . 主な論文

1. Kawaguchi, M. (2000) *Lotus japonicus* 'Miyakojima' MG -20: An early flowering accession suitable for indoor handling. *J. Plant Res.* 113, 507-509.
2. Kawaguchi, M., Motomura, T., Imaizumi-Anraku, H., Akao, S., and Kawasaki, S. (2001) Providing the basis of genomics of *Lotus japonicus*: the accession Miyakojima and Gifu are appropriate crossing partners for genetic analyses. *Mol. Gen. Genomics* 226, 157-166.
3. Kawaguchi, M., Imaizumi-Anraku, H., Koiwa, H., Niwa, S., Ikuta, A., Syono, K., and Akao, S. (2002). Root, root hair and symbiotic mutants of the model legume *Kotus japonicus*. *Mol. Plant Microbe Interac.* 15, 17-26.

5 . その他

招待講演： 国内16件 海外1件

体軸形成におけるWnt シグナル伝達経路とAxin の役割

- Wnt シグナル伝達を制御する新規分子の同定 -

岸田 昭世

(広島大学医学部・生化学第一教室)

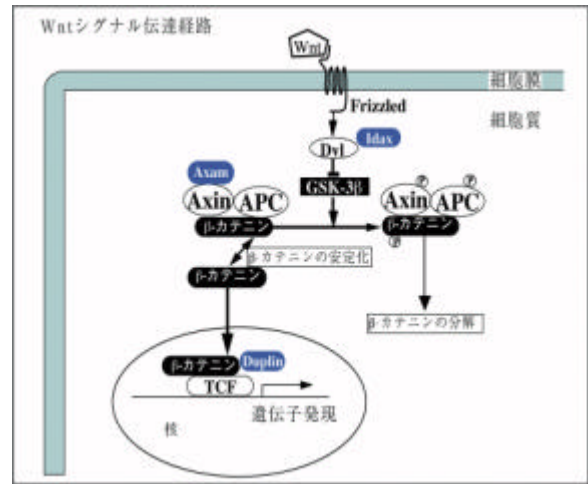
1 . 研究のねらい

Wnt (ウイント) は分泌性のタンパク質で、そのシグナルは受容体から細胞内のDM、GSK-3 、 Axin へと伝達され、 β -カテニンのリン酸化と分解を抑制する。その結果、 β -カテニン/転写因子TCF複合体の形成と、それに続く標的遺伝子の発現がおり、発生時の体軸や体節の形成、細胞の増殖や分化が制御される。本研究では、Axinがリン酸化酵素GSK-3 結合タンパク質であることに着目し、タンパク質のリン酸化や相互作用によって、Wntシグナルの伝達が制御される分子機構の解明と、この経路を制御する新規タンパク質の同定を目指した。

2 . 研究結果及び自己評価

(1)APC/Axin複合体による β -カテニンの分解機構

β -カテニンは、リン酸化酵素GSK-3 によってリン酸化されると、ユビキチン化を経て分解される。癌抑制遺伝子産物APC は β -カテニンと結合し、Axin は、APC、GSK-3 、 β -カテニンに結合するので、 β -カテニンのリン酸化と分解におけるAxin とAPC の結合の意義を検討した。APC、Axin 両者の共存下では、GSK-3 による β -カテニンのリン酸化が著明に亢進し、Axin 上のAPC 結合領域を添加すると亢進が認められなくなった。さらに、APC と β -カテニンの両者に結合できないAxin 変異体は、Wnt依存性の β -カテニンの蓄積や遺伝子発現を抑制する作用を示さなかったことから、APC/Axin 複合体中でのGSK-3 による β -カテニンのリン酸化の亢進の結果、 β -カテニンが分解することが示唆された。



(2) Wntシグナル伝達経路を制御する新規タンパク質の同定と機能の解析

DvlやAxin、 β -カテニンは、Wntシグナルを伝達する他の分子と複合体を形成して、シグナル伝達を巧妙に制御することが明らかとなったので、これらと結合する分子をさらに検索して、Wntシグナル伝達を制御する新たな仕組みを見出すことを目指した。その結果、以下の3種類の分子を見出した。

新規Dvl結合タンパク質Idax (Inhibition of the Dvl and Axin complex) は、Dvlと複合体を形成し、培養細胞におけるWnt依存性の β -カテニンの蓄積とTCF転写活性の亢進を抑制した。Idaxは、アフリカツメガエル初期胚でのWnt8やDvl依存性の二次体軸形成を抑制したが、 β -カテニン依存性の二次体軸形成を抑制しなかった。したがって、IdaxはDvl と結合することにより、 β -カテニンの上流でWntシグナルを抑制する制御因子として作用することが示唆された。

新規Axin結合タンパク質Axam (Axin associating molecule) は、DMのAxinに対する結合を阻害して安定なリン酸化型Axinを増加させた。アフリカツメガエル初期胚にAxamを導入すると頭部形成が抑制された。従って、AxamはAxin複合体に対するDvl の結合を抑制して、Axinを安定化することにより、 β -カテニンの分解を促進して、体軸形成を抑制することが示唆された。

新規 β -カテニン結合タンパク質Duplin (Duplexinhibitor) は、 β -カテニンと転写因子TCFの複合体形成を阻害し、Wnt-3a刺激依存性のTCF転写活性の亢進を抑制した。Duplinは、アフリカツメガエル初期胚の頭部の形成や、TCFの標的遺伝子siamois の発現を抑制し、Wnt8 や β -カテニンによる二次体軸の形成を抑制した。

自己評価

Wntシグナル伝達経路の解析に蛋白質間の相互作用に着目した解析法を導入することにより、こ

のシグナルが複数の蛋白質からなる複合体の上でリン酸化や競合阻害などの組み合わせで巧妙に調節されることを世界に先駆けて見出し、いくつかの新規分子を見出してその体軸形成やWntシグナル伝達経路における作用をJBC、MCBといった英文誌に報告できたことで、なんとかさきがけ研究に選ばれた研究者としての責任を果たせたのではないかと考えている。

3 . 領域総括の見解

Wntシグナル伝達系は、初期胚発生時の体軸形成を制御する。この系に属する既知因子について、アフリカツメガエルを用いてその機能を調べ、体軸形成に関わる多くの遺伝子発現を直接支配する -カテニンの安定化と崩壊の選択機構、またこれを支配する制御因子に付随する新規因子の検出を行ない、遅々としているが、本シグナル伝達系についての知見を着実に深めている。

4 . 主な論文

- 1 . Hino, S. -I., Kishida, S., Michiue, T., Fukui, A., Sakamoto, I., Takada, S., Asashima, M., and Kikuchi, A. (2001). Inhibition of Wnt signaling pathway by Idax, a novel Dvl-binding protein. *Mol. Cell. Biol.* 21, 330-342.
- 2 . Hinoi, T., Yamamoto, H., Kishida, M., Takada, S., Kishida, S., and Kikuchi, A. (2000). Complex formation of adenomatous polyposis coli gene product and Axin facilitates glycogen synthase kinase-3 -dependent phosphorylation of -catenin and down-regulates -catenin. *J. Biol. Chem.* 275, 34399-34406.
- 3 . Kadoya, T., Kishida, S., Fukui, A., Hinoi, T., Michiue, T., Asashima, M., and Kikuchi, (2000). Inhibition of Wnt signaling pathway by a novel Axin -binding protein. *J. Biol. Chem.* 275, 37030 - 37037.
- 4 . Kishida, S., Yamamoto, H., Hino, S. -I., Ikeda, S., Kishida, M., and Kikuchi, A. (1999). DIX domains of Dvl and Axin are necessary for protein interactions and their ability to regulate -catenin stability. *Mol. Cell. Biol.* 19, 4414 -4422.
- 5 . Sakamoto, I., Kishida, S., Fukui, A., Kishida, M., Yamamoto, H., Hino, S. -I., Michiue, T., Takada, S., Asashima, M., and Kikuchi, A. (2000). A novel -catenin binding protein inhibits -catenin -dependent Tcf activation and axis formation. *J. Biol. Chem.* 275, 32871 -32878.

5 . その他

受賞：2001年度日本癌学会奨励賞 「Wntシグナル伝達経路における -カテニンの分解制御機構とその異常による癌化の分子機構」（平成13年9月）

「味」と「香り」を認識する分子機構

倉橋 隆

(大阪大学・大学院基礎工学研究科)

1. 研究のねらい

私たちは五感によって自分のおかれた状況を知ります。本研究では、匂い順応の機構と苦味受容、体内ホルモンと嗅覚コントラストとの相関に関する新知見を得るために、感覚センサーとしての味覚と嗅覚におけるエネルギー変換機構を感覚細胞内の受容体タンパク質、酵素と物質連鎖の観点から定量的な解析を行った。

2. 研究結果及び自己評価

研究結果

(1) 嗅覚情報処理機構

本研究では、まず、電気生理学的手法(パッチクランプ法)を適用し、酵素拡散法を用いて生体から単離した単一の細胞が匂い物質による刺激に対して生じる膜チャネルの同定を行うことを世界に先駆けて着手した。そして、各国の同分野、他分野の研究者、特に分子生物学や生化学などの研究手法を用いる研究者との情報交換を通して、嗅覚情報変換にG蛋白介在性の酵素カスケードが中心的役割を担うことを情報源に、cAMPが二次伝達物質として機能していることを明らかにした。さらに、このイオンチャネルの単一チャネル特性や、細胞内密度解析などの特性を解析研究し、嗅覚の特性(繊毛における情報変換部位の局在、高S/N特性など)を解析した。

また、嗅覚では特異的な性質として、細胞興奮を司るイオンチャネルには陽イオンチャネルと陰イオンチャネルが共役して働くという、興奮性細胞に極めて特徴的な性質を証明した。この性質は、他の感覚細胞や興奮性細胞でみられる情報変換システムとは性質を異にするが、嗅細胞のおかれた特殊な環境と関係するものであると考えている。すなわち、嗅覚組織は外界環境と直接接するために、情報変換の場である繊毛を取り巻く嗅粘液のイオン環境が著しく変化する。たとえばNaイオンのみが細胞興奮のトリガーであるなら、細胞外イオン強度が減少した際には、細胞興奮を司る電荷の移動がなくなってしまう。しかし、陰イオンチャネルが共役していれば、細胞外イオン強度の減少は陰イオンの流出の増大(すなわちプラス電荷の流入増大)をおこし、結果的には細胞興奮性を恒常的に維持することが出来ると提唱した。

さらに、嗅覚ではマスキングと呼ばれる現象があり、ある匂いが提示されている条件で、他のある種の匂いが加わると、元の匂いを感じなくなることがある。嗅細胞のレベルでは、ある種の匂い分子は他の匂いによって生ずる応答を瞬時に抑制してしまうものがある。また、嗅細胞は脳へ直接軸索を投射する感覚細胞であり、軸索伝導性の活動電位を発生する。我々は、この活動電位の発生のイオン機構を解明した。すなわち、活動電位は電位依存性のNaチャンネルと一過性特性を持つCaチャンネル(T型Caチャンネル)が開くことによって発生することを明らかにした。

最近では、光で生理活性物質を自由にコントロールする「ケージド化合物」を利用して、生体細胞内のcAMP濃度を光(実際には紫外域光)で制御し、システムを定量的に解析する手法を開発中である。すでに現段階のシステムにおいて、嗅細胞膜のチャンネル活動を電氣的に記録しながら匂い物質による刺激を与え、同時に記録中の細胞に光刺激を当てて細胞内のcAMP濃度を制御する実験系を確立している。電気応答記録、電気刺激、匂い刺激(pufferピペットに対する圧力制御)、UV調光等のすべての実験系は単一コンピュータで制御し、制御プログラムはPascal(一部にアセンブラ)を用いて作成し、単一タスク上で動くシステムである。この最新装置を利用し、従来からの問題点の一つであった嗅細胞における嗅覚順応の分子機構を解明するに至った。すなわち、嗅細胞レベルにおける嗅覚順応は、情報変換チャンネルを通して細胞内に流入するCaイオンがCa-CAM複合体を形成し、細胞内からcAMP感受性イオンチャネルのリガンドアフィニティを減少させることによって制御されていることを明らかにしている。

(2) 味覚、味情報処理機構

味覚の研究は嗅覚研究よりもさらに混沌とした状況にある。味覚には5基本味というものが存在し(塩、甘、苦、酸、うま味)、それぞれが異なる機構によって情報変換されているとされている。その中でも我々が特に最近興味を持つのは、脊椎動物味細胞苦味受容にGタンパクが関与しているのではないかとする報告であり、Gタンパクのノックアウトマウスが苦味を感じなくなることなどが報告されている。

本研究では、生体から単離した単離味細胞にキニーネ刺激を行い、陽イオンチャネルが開くことを見出した。今後、このチャネル開口とGタンパク系とがいかなる細胞内情報伝達システムを示すのかを知ることは、非常に興味深い問題である。

自己評価

さきがけ研究21に参加した3年間に、電気生理学的・心理物理学的方法も導入した新たな試みをスタートし、その成果を論文として残すことが完了した。十分な評価を与えてよいものであると自負している。

3. 領域総括の見解

匂い物質をいかに検知するかの分子メカニズムについて、世界に先駆けて、嗅覚情報変換にGタンパク質を頂点とするカスケードが働き、また二次伝達物質としてcAMPが働く系を解明したことは、本研究者の能力がいかに優れているかを示している。さらに、本支援期間では、複数の匂い物質を嗅ぐときのマスクング効果の解析、またケージド化合物を使用しての解析、さらに味覚情報処理機構の解明に進んでおり、その成果を高く評価する。

4. 主な論文

1. Takeuchi, H., Tsunenari, T., Kurahashi, T., and Kaneko, A. (2001). Physiology of morphologically identified cells of the bull frog fungiform papilla. *NeuroReport* 12, 2957-2962.

神経細胞の生存シグナル伝達機構の解析

- Akt とNotch による細胞死の抑制 -

後藤 由季子

(東京大学・分子細胞生物学研究所)

1. 研究のねらい

神経細胞は発生期に分化を遂げると、そのあと数十年の間生き続ける必要がある。培養条件下では非常に死に易い神経細胞が、生体内ではなぜ生存が維持されているのか、そのメカニズムを知ることが本研究のねらいである。神経生存のメカニズムが明らかになれば、将来的に、神経が死ぬことによって起こる病気（神経変性疾患など）を抑止するのに応用できる可能性がある。さらに本研究では、移植への適用が期待される神経幹細胞（未分化な神経系前駆細胞）の生存促進機構にも迫った。

2. 研究結果及び自己評価

研究結果

神経栄養因子など、種々の生存促進刺激による神経細胞の生存促進シグナル伝達において、PI3K-Akt経路が重要な役割を果たしていることが、我々を含む多くのグループから報告されている。そこで本研究では、分化した小脳顆粒細胞などの系を用い、生存促進においてAktの果たす役割について検討した。様々なアポトーシス（プログラム細胞死）のシグナルは、ミトコンドリアからのシトクロームc放出を引き起こす。放出されたシトクロームcはApaf-1/カスパーズ9複合体を活性化し、細胞死の引き金を引くと考えられている。私は、この細胞死開始に中心的な役割を果たすカスパーズ9が、Aktの良い基質になることを見出した。また、invitroの再構成系の実験などから、少なくともAktのリン酸化により、カスパーズ9の活性化に重要なステップであるApaf-1との結合が、阻害されることが示唆された。このことが、結果的にAktによるカスパーズ9活性化阻害に貢献していると考えられる。

Aktによる生存促進において、カスパーズ9だけでなく、他にもターゲットが存在することが様々な状況証拠から予想されている。本研究において、新たに転写因子Nur77がAktのターゲットとなっていることが明らかになった。即ちAktがNur77を直接にリン酸化し、そのDNA結合能、転写活性ならびにアポトーシス誘導活性を抑制することを見いだした。現在、カスパーズ9とNur77のAktによる抑制メカニズムを更に詳細に検討すると共に、Aktの生存促進機構の生理的役割について研究を進めている（図1）。

神経系前駆細胞（神経幹細胞）とは、中枢神経系を構成する神経およびグリア細胞を生み出す能力（多分化能）を持った未分化な細胞集団をいう。増殖能・生存能・未分化状態を保っている（自己複製能）が、その分子メカニズムは明らかではない。本研究では、神経系前駆細胞の生存を促進するシグナル伝達経路の解明を目的とし、マウス胎生11日目の神経上皮細胞の初代培養系を用いて解析を行った。神経系前駆細胞をin vitroで培養する際、FGF2やEGFなどの増殖因子が不可欠であるが、培養系からこれらの増殖因子を除去することによりアポトーシスを観察した。そこでFGF受容体からいかなるシグナル伝達で生存を促進しているかを検討し、Akt経路とそれ以外の生存シグナル伝達が重要であることが明らかになった。増殖因子以外にも、細胞密度依存的な生存促進因子の存在が示唆され、細胞間相互作用に関わる分子Notchの生存促進効果が認められた（図2）。

Notchは、神経系前駆細胞の神経分化抑制に働くことがこれまでに示されていたが、この系における生存促進効果については、本研究で初めて明らかになった。面白いことに、Notchによる神経系前駆細胞の生存促進は、神経分化抑制に使われるRBP-J/Hes経路を用いていないという結果を得た。現在、神経系前駆細胞におけるこれらの生存シグナル伝達の分子メカニズムについて、さらに検討中である（図1）。

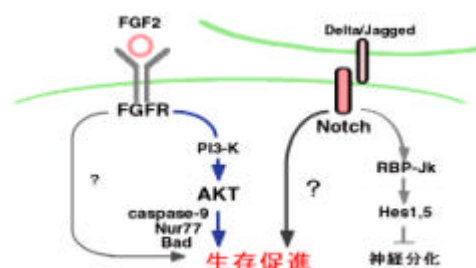
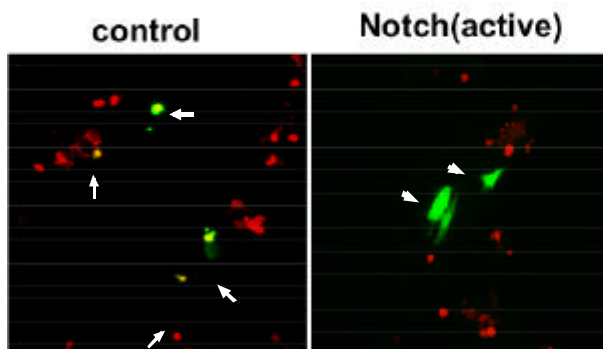


図1 生存シグナル伝達



細胞死誘導条件下では、カスパー3が活性化する（赤は、活性型カスパー3の染色を表す）。しかし、活性型 Notch を発現した右図（矢印、緑）の細胞では、カスパー3の活性型が抑えられており、細胞死が抑制されていることがわかる。

図2 Notch は神経系前駆細胞の生存を促進する

自己評価

分化した神経細胞の、神経栄養因子による生存シグナル伝達は、本研究を始めた当時は殆どわかっていなかった。本研究により、神経栄養因子の生存シグナルにおいて中心的な役割を果たすAktの基質が明らかになったことで、具体的な生存メカニズムの解明にほぼ至ったと言える。また、本研究の実行過程で、神経系の細胞死は、実は分化した神経細胞だけでなく神経系前駆細胞に多く起きていることが初めて解明され、神経死研究の大きな転換点となる発見となった。さらに本研究において、具体的に神経系前駆細胞の生存に関わる分子(Notch)を同定することが出来たのも、今後の研究発展につながる重要な点である。

3. 領域総括の見解

分化を遂げた神経細胞は数十年の寿命をもっている。しかし、その細胞培養は非常に死に易い。本研究者は、ここで起こる死にアポトーシスとの関連を見出し、カスパー3とAktが関わること、また細胞間相互作用に関わるNotchの関与を見出し、これらが神経細胞への生存シグナルの伝達に働くことを示唆している。精力的に研究を行っていることが窺われるが、いまだ具体的姿には遠いようである。

4. 主な論文

1. Masuyama, N., Oishi, K., Mori, Y., Ueno, T., Takahama, Y., and Gotoh, Y. (2001). Akt inhibits the orphan nuclear receptor Nur77 and T cell apoptosis. *J. Biol. Chem.* 276, 32799-32805.
2. Ura, S., Masuyama, N., Graves, J., and Gotoh, Y. (2001). Caspase cleavage of MST1 promotes nuclear translocation and chromatin condensation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98, 10148-10153.
3. Morishima, Y., Gotoh, Y., Barrett, T., Takano, H., Davis, R. J., Shirasaki, Y., and Greenberg, M. E. (2001). β -Amyloid induces neuronal apoptosis via JNK pathway activation and the subsequent induction of Fas ligand. *J. Neurosci.* in press
4. Graves, J. D., Draves, K. E., Gotoh, Y., Krebs, E. G., and Clark, E. A. (2001). Both phosphorylation and caspase-mediated cleavage contribute to regulation of the Ste-20-like Protein Kinase Mst1 during CD95/Fas-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 276, 14909-14915.
5. Ura, S., Masuyama, N., Graves, J., and Gotoh, Y. (2001). MST1-JNK promotes apoptosis via caspase-dependent and -independent pathways. *Genes to Cells* 6, 519-530.

5. その他

招待講演 国内 18件 海外 4件

X線1分子計測による細胞膜動的機能解析

X線で原子の1/100の運動が見えた！

佐々木 裕次

([財]SPring-8/高輝度光科学研究センター、[兼]大阪大学蛋白質研究所)

1. 研究のねらい

X線を用いて生体1分子内の実時間運動計測に成功した。X線1分子計測は、金属ナノ結晶を分子の目的部位に1個修飾し、その分子の局所的な運動を、ナノ結晶からの回折斑点を追跡することで実現した。本法によって、原子サイズの1/100の精度で、タンパク質分子内の運動を実時間計測することが可能となった。また、本法は細胞内でも、1分子機能発現に伴う分子内運動の可視化が可能であり、生命科学全領域で使用される新規計測手段へと発展するであろう。

2. 研究結果及び自己評価

これからのタンパク質科学では、タンパク質分子の静的な構造情報だけではなく、動的な構造情報がより重要になる。動的情報を正確に計測するには原理的に1分子計測以外ない。しかし、現状の可視光による方法では、タンパク質分子の移動や分子間相互作用は計測できるが、機能発現に伴う分子内構造変化の計測は難しい。つまり、分子内部位の位置決定精度や時間分解能が不足している。そこで、私は現状の可視域光を使用する1分子法ではなく、それよりも2桁以上短い波長であるX線を使う1分子計測を提案し、実際~pm(1/1000nm)レベルの精度で位置決定能力があることを、DNA分子やミオシン分子の実験を通して確認した。多くの研究者は、“X線を用いて1分子を検出できるのか？”という疑問を持つ。それは、物質と電磁波との断面積の大きさは、波長に比例するという常識からの当然の疑問である。無論、X線の発光、吸収、散乱現象を用いて1分子を検出することは、大型(第3世代)放射光施設を用いても不可能である。そこで、私はX線の物理現象で一番高感度な現象、つまりX線回折を利用する時間分割型回折X線追跡法(Diffracted X-ray Tracking: DXT)を考案した(図1)。原理は、まず直径数nm程度の極微ナノ結晶を、タンパク質分子にその機能を損なわないように標識する。そして、極微ナノ結晶からのラウエ斑点を指標に、着目したタンパク質分子の動きを時間分割(~ms)追跡する。実験は大型放射光施設SPring-8(BL-44B2)にて行った。検出器はX線イメージンシファイヤーを使用し、数ミリ秒の積算時間で1秒間(ビデオレート)の連続計測を行った。

筋肉の主成分であるミオシン分子によるATP加水分解に関する構造変化計測結果について説明する。石英基板上に、取りはずし可能な化学法で固定化したミオシン分子(図1)に、直径20nmの金極微ナノ結晶をラベルし、溶液内にATP分子、ADP分子、及び核酸非存在下の各条件下でnmレベル以下の1分子内運動の実時間計測を行った。1分子全体が(1粒子として)溶媒中をブラウン運動しながら拡散して行く現象は数多く確認されている。

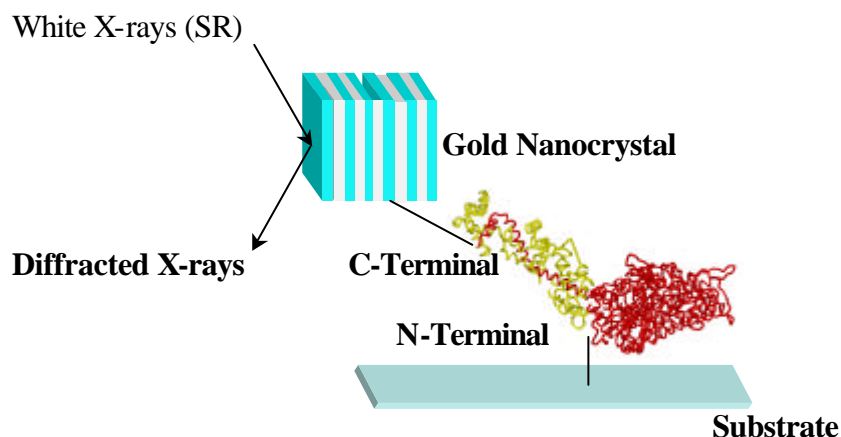


図1 DXTの原理

しかし、分子内の任意に選択できる特定の部位、この場合は筋肉力発生メカニズム解明の中心的存在であるレバーアーム部位において、各溶液条件下での1分子内運動の計測に成功した例はない。具体的には、ミオシン分子のレバーアーム部位は核酸非存在下、及びMg-ADP分子存在下では、全く自由な拘束されないブラウン運動をしていた。また、Mg-ATP存在下では、回折X線斑点は1秒間に5～6回、100-150 mradの領域内で反復振動していた。これは、明らかに核酸非存在下の際に確認されたブラウン運動に帰属された斑点運動とは異なっており、解析結果から、推定拘束面積1.1 nm²程度の空間内に拘束されたブラウン運動であることが確認された。

これは生化学で常識的な“Mg-ATPはATP加水分解の阻止剤として働く”という現象を、1分子の分子内動的情報と合致させた非常に重要な計測結果であると考えている。また、本計測法でpm精度の能力を持っていることを証明するために、サンプルにDNA分子を用いた実験を行った。結果的には、基板に吸着されたDNA分子は自由なブラウン運動をしていることが確認され、計測限界も4.5 pmという数字を得た。

人間のDNA塩基配列が決定し、そのゲノムが設計しているタンパク質分子の機能発現メカニズムを正確に理解するためには、最終的には機能を具現化している細胞内で、どのように運動しているのかを実時間計測する必要がある。そのためにも、一刻も早く細胞内実時間1分子計測の完成を目指し、X線1分子計測を発展させていかなければならない。

自己評価

X線1分子計測法という新しい概念を持った計測手法を世に問うことが出来て非常に幸運であった。3年間の研究計画であげた内容は、5割程度しか完成しなかったが、この研究の“勢い”がJST/CREST採択へと結びついたと思う。また、この研究期間に異分野の研究を自分の研究に取り込む“コツ”のようなものを取得できたのは、さきがけ研究の同じ領域のアクティブな研究者達に囲まれたおかげである。

3. 領域総括の見解

様々な生体分子間の反応や干渉は、究極的には分子間の親和性の変化で説明される。その実体としてDNA上の特異的認識配列、またタンパク質の機能ドメインとして表現されている。これを超えた機構については物理学の世界であり、分子生物学では答えられない。本研究者の意図するところは、この問題についてのブレークスルーであり、具体的にはタンパク質の1分子計測を課題としている。幸いにもSPring-8の優れた装備に恵まれて成果を挙げることができた。しかし、その大きな部分は当人の素質と意欲によるものである。

4. 主な論文

1. Sasaki, Y. C., Suzuki, Y., Yagi, N., Adachi, S., Ishibashi, M., Suda, H., Toyota, K., and Yanagihara, M. and Yagi, N. (2000). Tracking of individual nanocrystals using diffracted X rays. Phys. Rev. E. 62, 3843-3847.
2. Sasaki, Y. C., Okumura, Y., Adachi, S., Suzuki, Y., and Yagi, N. (2001). Diffracted X-ray tracking: new system for single molecular detection with X-rays. Nucl. Instrum. Methods A, in press.
3. Sasaki, Y. C., Okumura, Y., Adachi, S., and Yagi, N. (2001). Picometer-scale dynamical X-ray imaging of single DNA molecules. Phys. Rev. Lett., 87, 248102-248105.

細胞はどのようにして非対称に分裂するか？

- 細胞運命の切り替えを行う転写調節複合体 -
澤 齊
(理化学研究所・発生再生科学総合研究センター)

1. 研究のねらい

分裂して生じた娘細胞が異なる運命をたどる非対称細胞分裂は、生物の発生の際、細胞の多様性を生み出す基本的な機構である。しかし、細胞系譜が分からなければ、分裂が非対称であるか判断出来ないため、非対称分裂の研究は特に高等動物においては進んでいない。細胞系譜が明らかにされている線虫*C. elegans*を用い、非対称分裂に關与する遺伝子を同定し、その機構を明らかにする。

2. 研究結果及び自己評価

研究結果

(1) 非対称分裂が異常になる変異体の同定

*C. elegans*の胚発生後に起こるいくつかの細胞(T細胞など)の非対称分裂は、LIN-44/Wntとその受容体LIN-17/Frizzledによって制御されている。LIN-44はT細胞の後方で発現しており、LIN-44によってT細胞の片側(後ろ側)でLIN-17受容体が活性化され、その結果、細胞内に極性が生まれ、分裂が非対称になると考えられている。T細胞の場合、野生型では前側の娘細胞(Ta)からは表皮細胞が、後ろ側の娘細胞(Tp)からは神経系の細胞が作られるが、lin-17変異体では分裂の非対称性が失われどちらの細胞も表皮細胞を作る。非対称分裂に關与する新たな遺伝子を同定するために、lin-17変異体のようにT細胞から表皮細胞のみが作られる変異体をスクリーニングした。その結果psa-1からpsa-12と名付けた12種類の異なる遺伝子の変異体を同定することに成功した。

(2) 非対称分裂は酵母から線虫まで保存されている。

新たに同定したpsa-1とpsa-4遺伝子をクローニングしたところ、SWI/SNF複合体の構成因子をコードしていた。SWI/SNF複合体はクロマチン構造のリモデリングを行う転写調節複合体である。温度感受性変異体を用いた温度シフト実験から、psa-1とpsa-4遺伝子がT細胞の分裂中、おそらく終期(telophase)に必要なことが分かった。このことから、T細胞の非対称分裂の終期に、片側(Tp)の娘細胞でのみSWI/SNF複合体が働き、クロマチン構造を変換することによって、娘細胞間の違いが生じていると考えられる。また、SWI/SNF複合体は酵母においても、非対称分裂に關与していることが知られている。酵母の場合にも、分裂の終期に片側の細胞(母細胞)でのみSWI/SNFがHOと呼ばれる遺伝子を活性化するため、非対称な運命が作られる。以上の結果、非対称分裂の機構が酵母から多細胞生物である*C. elegans*まで保存されていることが明らかになった。T細胞の分裂を制御するWntシグナルと、SWI/SNFがどのような関係にあるのか、今後解明する必要がある。

(3) 転写Mediator複合体は細胞運命のスイッチとして機能する。

psa-6とpsa-7遺伝子は、Mediatorと呼ばれる転写調節複合体の構成因子をコードしていた。Mediatorは、in vitroの転写系で、いくつかの配列特異的転写因子の活性をRNAポリメラーゼに伝える巨大な複合体であり、20以上もの構成因子から成る。しかし、そのin vivoでの機能はほとんどわかっていない。psa-7変異体はT細胞の分裂異常に加えて、Pnp細胞の融合の異常という、やはりWntシグナルに關連した表現型を示すので、MediatorはPSA-7を介して、Wntシグナルの下流で転写調節を行っていると考えられる。また、psa-6、psa-7変異体ではvulva(陰門)が過剰に作られる。vulvaの形成はRasとNotchのシグナル経路によって制御されている。これらのシグナル経路によって、vulvaを作る前駆細胞が1°、2°、3°と呼ばれる三種類の細胞運命を選択する。Rasシグナルは主に1°の運命を、Notchシグナルは2°の運命を誘導する。psa-7変異体では2°の運命が過剰に誘導されることが分かり、psa-7がnotchシグナルの下流で働いていることが示唆される。また、Mediatorの別の構成因子であるSUR-2は、Rasシグナルの下流で働いていることが知られている。psa-6、psa-7変異体ではvulvaが過剰に作られるのに対し、sur-2変異体ではvulvaが形成されない。さらに別の構成因子Med6の変異は、let-60/rasの機能獲得型変異およびlin-12/notchの機能獲得型変異の両方を抑

圧することが分かった。以上の結果、vulva の形成の際、RasとNotch のシグナルが、Mediator複合体で統合されて、三種類の細胞運命が選択されることが明らかになった。このように、Mediator複合体はあたかもコンピューターのように、様々なシグナルや転写因子の情報を統合して、転写を調節していると考えられる。

自己評価

本研究によって、非対称分裂に関与する遺伝子を多数同定することができた。クローニングしたものは全て転写調節に関与するものであったが、その標的となる遺伝子は不明である。またWntによって細胞極性が形成されるしくみも解明されていない。まだクローニングしていない遺伝子、そして今後さらに同定する遺伝子がこれらの問題を解く手がかりを与えてくれると期待している。

3 . 領域総括の見解

多細胞生物では受精卵から分化を重ねて個体となる。その基本的機構は非対称分裂である。本研究者は細胞系譜の追跡が可能な線虫を用い、その分裂で表皮細胞と神経細胞を生む T 細胞を対象に、分裂後に表皮細胞のみとなる突然変異を求め、既知の lin-17 の他に 12 個の psa 変異を得た。それらの解析と、既知の酵母接合型変換で起る非対称分裂の機構を合わせて優れた考察を行っている。その成果と共に着眼点を大きく評価したい。現在、組織分化の研究は広く ES 細胞に向けられているが、線虫での非対称分裂の研究はより実りある成果が期待出来るだろう。

4 . 主な論文

1. Rocheleau, C. E., Yasuda, J., Shin, T. H., Lin, R., Sawa, H., Okano, H., Priess, J. R., Davis, R. J., and Mello, C. C. (1999). WRM - 1 activates the LIT - 1 protein kinase to transduce anterior/posterior polarity signals in *C. elegans*. *Cell* 97, 717 - 726.
2. Sawa, H., Kouike, H., and Okano, H. (2000). Components of the SWI/SNF complex are required for asymmetric cell division in *C. elegans*. *Mol. Cell* 6, 617 - 624.

植物における異性の認識と有性生殖成立の機構

- ミカヅキモの細胞間情報伝達を探る -

関本 弘之

(東京大学・大学院総合文化研究科)

1. 研究のねらい

生物の有性生殖過程における2個の配偶子細胞間の認識・情報交換は、生物の生存をかけた根本的事象であるが、高等植物では顕著な業績が得られていなかった。本研究では、高等植物と極めて近縁な単細胞性藻類であるミカヅキモを材料として選択し、有性生殖過程に関わる性フェロモンの生化学的・分子的解析を行い、それらがどのように放出され、相手細胞に認識され、次の生理反応を誘起し、一連の生殖のプログラムを押し進めて、最終的な有性生殖の成立へと至るのかを解析することとした。

2. 研究結果及び自己評価

(1) *Closterium ehrenbergii*の有性生殖過程

*Closterium ehrenbergii*は、これまで主に用いてきた*Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex (*C. pslc*)とは異なる接合様式をもち、まず有性的なペア形成を行った後、その状態で両接合型の細胞が有性分裂と呼ばれる特殊な細胞分裂を行い配偶子嚢細胞へと分化し、さらにプロトプラストの放出及び融合を経て接合子を形成する。ペア形成時には、両性の細胞がお互いの位置を認識し、互いの存在方向へ移動する必要があるが、実際に、両性の細胞を寒天培地で隔てて培養すると、+型細胞が寒天中に侵入し、-型細胞の存在する方向に移動することが確認された。さらに、-型細胞を培養した培地上清を-型細胞の代わりに用いたところ、+型細胞はその培地の方向に移動することも確認された。

次に+型及び-型細胞を混合培養して接合を行わせた後の培地上清中に、+型細胞を有性分裂させる活性物質が存在することを見出した。この物質は-型細胞から放出されたが、少量の+型細胞の存在下でより顕著に放出されるようになった。

この有性分裂誘導フェロモンを精製したところ、+型細胞の有性分裂を誘起するのみならず、低い濃度では+型細胞を引き寄せる正の走化性をも示す20kDaの糖タンパク質であることが示された。この結果は、有性生殖時に起こるフェロモンの濃度変化に伴い、+型細胞に対する走化性と有性分裂という二種の生理反応が使い分けられることを強く示唆している。これらの事実から、まず-型細胞から性フェロモンが放出され、+型細胞が誘引されてペアを作り、+型細胞からの何らかの刺激を受けてさらにフェロモンの産生量が上がり、+型細胞の有性分裂が誘起され、以後の接合過程へと結びつくことが示唆された。

(2) *C. pslc*の有性生殖過程

*C. pslc*の接合においては、+型と-型細胞のペア形成に先立ち、有性分裂が起こる。この有性分裂を誘起する性フェロモンの活性検出により成功し、+型および-型細胞をそれぞれ単独で有性分裂させることが出来るようになった。有性分裂後の細胞同士を混合した場合、有性分裂させずに混合した場合と比べて、飛躍的に接合率が上昇することが見出され、有性分裂の結果、接合相手とのペア形成が起こりやすくなることが示唆された。+型細胞が放出し、-型の有性分裂を誘導するフェロモン(SCD-IP-plus)と、-型細胞が放出し、+型の有性分裂を誘導するフェロモン(SCD-IP-minus)は、それぞれ既知の二種の性フェロモン(PR-IP, PRIP Inducer)とそれぞれ特性が類似していることも示され、*C. pslc*においても有性生殖過程の進行にともないフェロモンの生理機能を使い分け、巧妙に有性生殖を成立させている可能性が示唆された。

(3) 性フェロモンをコードする遺伝子

*C. ehrenbergii*の有性分裂誘導フェロモンと*C. pslc*のPR-IP InducerをコードするcDNAをそれぞれクローニングしたところ、これらの遺伝子は、全長にわたって高い相同性を示した。PR-IP inducerは、-型細胞より分泌され、+型細胞に作用しPR-IPを分泌させる性フェロモンとして単離されてきたが、この生理活性に加えて、*C. pslc*における有性分裂誘起ないしは走化性をも担っている可能性が示唆された。

自己評価

ミカヅキモの有性生殖過程を研究してきた結果、性フェロモンが複数の生理活性を示すことにより、配偶子認識を起こしていることが強く示唆された。しかしながら、性フェロモンの作用メカニズムなど未解明な点が多く残されており、当初計画通りとはいえないことも事実である。ミカヅキモの市民権獲得に向けて、なお一層、多くのやり残した課題の追究を怠ってはならないと感じている。

3 . 領域総括の見解

高等植物と近縁と考えられる単細胞藻類のミカヅキモを材料に、植物の有性生殖過程における配偶子間認識機構について研究を行っている。三年間の成果として、その特異な有性生殖過程を明らかにし、+型あるいは-型細胞が分泌する性フェロモンの部分精製と、それぞれに対する異性細胞の挙動、また性フェロモンをコードする cDNA のクローニングにまで研究を進めている。今後も研究を推し進めることにより、新しい形の異性認識機構と、それに続く性挙動が明らかとなるであろう。

4 . 主な論文

1. Sekimoto, H. (2000). Intercellular communication during sexual reproduction of *Closterium* (Conjugatophyceae). *J. Plant Res.* 113, 343-352.
2. Tada, T., Sekimoto, H., and Ohmori, M. (2001). Biochemical characterization of an adenylate cyclase, *CyaB1*, in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Plant Res.*, in press.
3. Fukumoto, R., Dohmae, N., Takio, K., Satoh, S., Fujii, T., and Sekimoto, H. (2001). Purification and characterization of a pheromone that induces sexual cell division in the unicellular green alga *Closterium ehrenbergii*. *Plant Physiol. Biochem.*, in press.

5 . その他

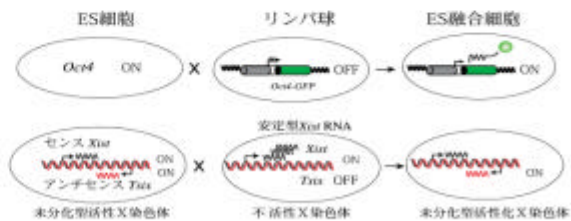
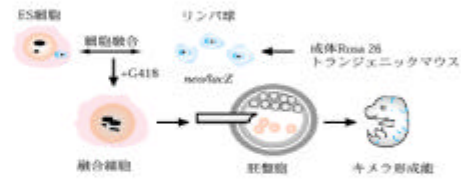
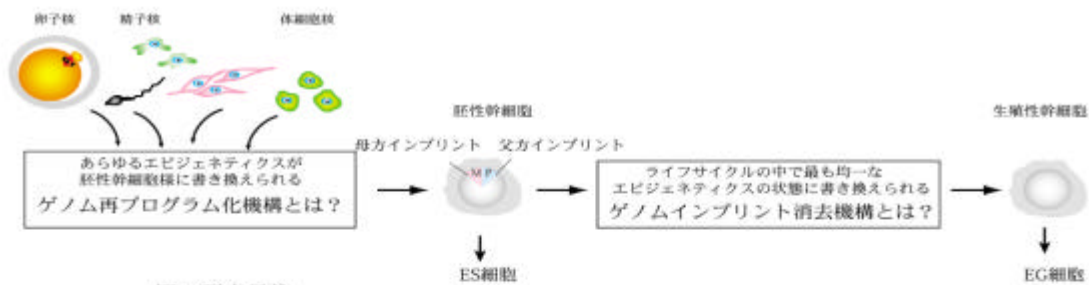
招待講演3件 (うち国内2件 海外1件)

体細胞から個体発生におけるゲノム再プログラム化機構

- 胚性幹細胞がもつゲノム再プログラム化活性 -
 多田 政子
 (京都大学・再生医科学研究所 共同研究員)

1. 研究のねらい

近年哺乳類でも体細胞クローン技術が確立され、1世代を何度も繰り返したり、生殖なしに個体数を増やしたり出来るようになった。この是非は別にして、細胞ゲノムが全能性を再び獲得するゲノム若返り機構が、ゲノム再プログラム化機構といえる。リンパ球と細胞融合することによって、卵子同様の再プログラム化活性が、胚盤胞由来の胚性幹細胞（ES細胞）と、始原生殖細胞由来の生殖性幹細胞（EG細胞）にもあることを明らかにした。胚操作を離れ、ES細胞およびEG細胞を用いて、体細胞核を再プログラム化する機構を解析する（図1）。



2. 研究結果及び自己評価

(A) ES細胞がもつゲノム再プログラム化活性

細胞分化後の体細胞（たとえばTリンパ球）とES細胞を細胞融合することによって、体細胞のゲノムの状態が未分化幹細胞の状態へと近づくことを確認した（図2）。ES融合細胞は、1.未分化細胞形態、2.体細胞由来のOct-4遺伝子の再活性化、3.体細胞由来の不活性X染色体の再活性化を示した。この四倍体融合細胞の性質は、融合前のES細胞に類似している（図3）。

(B) EG細胞がもつゲノム再プログラム化活性

EG融合細胞では、ES細胞にみられる活性に加えて、4.ゲノム全体の脱メチル化活性、5.インプリントを消去する活性を示した。一方、ES融合細胞の中では、体細胞核のインプリントは安定であったが、EG細胞と融合するとES細胞のインプリントが消去された。このことから、EG細胞の初期化活性はドミ

ナントであると考えられる（図4）。

（C）ES融合細胞がもつ多分化能

四倍体融合細胞は、培養により増殖させることが可能であるとともに、正常二倍体細胞と同様に多種類の組織細胞を作り出す多分化能をもつことを見いだした。この結果から、生体の細胞を、細胞融合法によって再プログラム化し、自己の遺伝情報をもった幹細胞を作り出せば、再生医療に貢献できると予想される。

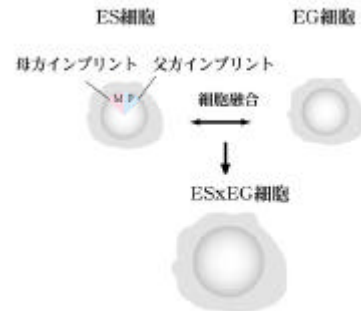


図4. EG細胞がもつ初期化活性

自己評価

クローン動物発生過程では、体細胞ゲノムは極短期間に再プログラム化されるため、実際に未分化型のプログラムに戻ったか解析することは困難である。私は、ES細胞に再プログラム化活性があることを発見したことで、再プログラム化のプロセス、因子を解析するためにより扱いやすい材料を提示したことになる。組織性幹細胞をES細胞と共培養すると自然に融合した多能性細胞が出現することが報告され、さきがけ研究での成果が再度注目された。

3．領域総括の見解

近年のクローン動物の造成あるいは組織再生への興味から、本研究者は体細胞が全能性を示すに必要な体細胞ゲノムの再プログラム化の研究を行っている。具体的には、ES細胞と体細胞あるいは生殖性幹細胞（EG細胞）間の融合細胞の未分化状態への復帰について、様々な点から検討を重ねている。その成果として、要点については未だにブラックボックスの状態であるが、実験を積み重ねる間に考案した多能性幹細胞の作成法は特許出願されている。

4．主な論文

1. Tada, M., Takahama, Y, Abe, K., Nakatsuji, N., and Tada, T. (2001). Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridisation with ES cells. *Current Biology* 11, 1553-1558.
2. Tada, T., Obata, Y., Tada, M., Goto, Y., Nakatsuji, N., Tan, S., Kono, T., and Takagi, N. (2000). Imprint switching for non-random X-chromosome inactivation during mouse oocyte growth. *Development* 127, 3101-3105.

5．その他

出願特許出願 1件：『体細胞と胚性幹細胞との融合による多能性幹細胞の作成方法』
科学技術振興事業団/京都大学 平成13年9月21日出願（国内）特願2001-290101号

転写制御の基本的枠組を探る：モデル制御系の構築とその定量的解析

- 細胞内で"見た"調節因子の標的DNA への結合 -

田中 正史

(東海大学・医学部 共同研究員)

1. 研究のねらい

遺伝子の転写反応のオン・オフや、転写量増減の基本を理解することを目的として、発現スイッチオンの引き金に当たる「転写活性化因子が特定のプロモーターに結合する過程」に焦点を絞って研究を進めた。従来は、主に試験管内反応を通じて精力的に解析されて来たが、本研究では、その"生きた細胞内での実像"を明らかにするために、この結合を直接観察する方法を確立し、結合に関わる基本的要素に検討を加えた。

2. 研究結果及び自己評価

研究結果

(1) 転写活性化因子のプロモーターへの結合の可視化

緑色蛍光タンパク (GFP) 派生体等を用いて、転写活性化因子の標的プロモーターへの結合を、生きた細胞内で可視化した。古典的な転写活性化因子として、極めてよく解析されている酵母Gal4を用い、GAL1プロモーター (Gal4の標的としてよく知られている) に結合したGal4分子を、黄色の蛍光輝点として検出した。細胞内におけるこの結合は非常に効率的で、核内の遊離Gal4分子が検出できないような低濃度でもGal4黄色蛍光輝点が見られる (図)。このアッセイ系の確立によって、転写活性化因子がプロモーターに効率的に結合するために必要な要素 (Gal4自身の機能ドメインや、DNA一次構造上での結合配列の存在様式) を、生きた"細胞内"で検討することが可能になった。

(2) 新たな機能ドメイン「DNA結合モデュレーター」の同定

GAL1プロモーターへの効率的結合に必要なGal4自身の機能領域を解析し、既に良く知られている「DNA結合ドメイン」(試験管内ではDNA結合に必要な十分の領域)、「転写活性化ドメイン」(転写促進に関わる領域)と協調する第三の機能ドメイン「DNA結合モデュレーター」を新たに同定した。Gal4のDNA結合ドメインは、試験管内とは異なり、細胞内ではGAL1プロモーターに効率的に結合出来ないが、DNA結合モデュレーターを持つことによって、結合効率が飛躍的に上昇する。Gal4タンパクは、各々独立に機能する二つのDNA結合モデュレーターを持つが、これらは、DNA結合ドメインや転写活性化ドメインと、物理的、もしくは、機能的に区別出来る。

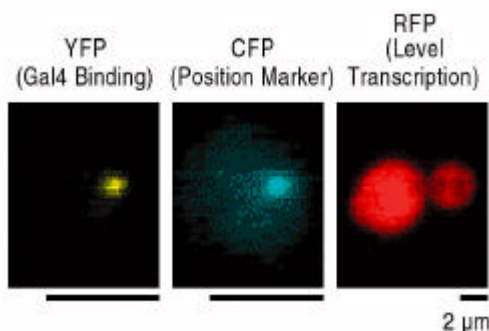


図 Gal4 のGAL1プロモーターへの結合

GAL1プロモーターに結合したGal4-YFP 融合タンパクは黄色輝点を形成しており、その核内での位置は、位置マーカーであるシアン色輝点と一致している。シアン色輝点は、lacO配列 (GAL1プロモーター近傍に挿入した) に結合したLacI-CFPによるものである。GAL1プロモーターの転写活性は、プロモーター下流に挿入したRFP (赤色蛍光タンパク) の発現量によってモニターした。

(3) 結合DNA配列のコンテキストの効果

DNA結合モデュレーターの効果は、自然のGAL1プロモーターの他にも、Gal4結合配列を無関係のプロモーターに融合した場合等にも見られ、ある程度の一般性を示す。しかし、DNA一次構造上における結合塩基配列の存在様式が影響を及ぼさないということではなく、極端な場合 (例えば、Gal4結合配列を数十個連結した場合) には、DNA結合モデュレーターの効果がまったく見られない。従って、DNA結合モデュレーターへの依存性は普遍的なものではなく、結合DNA配列のコンテキストに左右され得るものである。

(4) まとめと展望

転写活性化因子そのもの、さらには、DNA結合ドメインや転写活性化ドメイン等の基本的概念の確立に中心的な役割を果たしてきたGal4の場合でさえ、細胞内での実態は従来ほとんど解析されてなかった。本研究では、Gal4の細胞内解析を通して、第三の機能領域(DNA結合モジュレーター)を新たに同定した。Gal4の場合以外にも、転写やDNAの複製・修復等に関与する他のDNA結合性の因子が標的DNAに結合する際に、あるいは、他の生物種において、DNA結合モジュレーターと同様の機能領域が関わっている可能性が考えられる。そのような可能性の検証は、DNA結合モジュレーターの作用機構の解明と共に、今後の重要な課題である。

他方、DNA結合の可視化は、反応動態の細胞内解析にも道を開くものである。転写活性化因子の結合と解離を細胞内で既に可視化しており、DNA結合モジュレーターの主な機能は、結合の安定化であることを示す結果を得ている。このようなリアルタイム解析法の拡充によって、「遺伝子発現スイッチ」の動的な実像にさらに迫ることが出来ればと考えている。

自己評価

進展度としては、当初の計画の相半ばでもあり反省点もあるが、鍵であった「転写調節因子の標的DNA領域への結合の、細胞内での定量的解析」に関しては、独自の解析法を開発・確立し、さらに、転写調節因子の細胞内動態のリアルタイム解析にも着手することができた。「単なるプレーヤーの同定と、その役割の定性的理解」にとどまらず、転写制御機構の動的・定量的な理解に向けた *in vivo* 研究の端緒となればと考えている。

3. 領域総括の見解

真核生物の出芽酵母において、これまで提唱されてきた遺伝子転写制御機構について、緑色蛍光タンパク質で可視化した転写因子タンパク質の動きを *in vivo* で確認する実験を行ってきた。これまでの成果として、転写因子タンパク質がプロモーター上の特異的認識配列への結合には、既知のDNA結合ドメインの外に、新にDNA結合モジュレーターと称するドメインが関与することを示唆している。

DNA はいかにして分配されていくのか？

- バクテリアのセントロメアを求めて -

仁木 宏典

(国立遺伝学研究所 放射線・アイソトープセンター)

1. 研究のねらい

バクテリアの染色体は複製しながら娘細胞へと分配されていく。かつて、その移動は細胞伸長に因るものと考えられてきた。しかし、我々は分配過程の大腸菌染色体の特定領域の観察から、細胞伸長に因らない動的な染色体の移動があることを見出した。染色体の複製起点 (oriC) は細胞中央で複製し、それぞれのコピーは両極へ移動する。ではこのoriC領域の両極への移動の仕組みはどうなっているのか、oriC 近傍にはセントロメアに相当する部位があるのか？本研究では、バクテリアの染色体分配の分子機構の解明を目指した。

2. 研究結果及び自己評価

原核細胞において、染色体分配の研究が立ち遅れていた一因はその細胞が小さいことにあった。近年の光学顕微鏡とこれに伴う画像解析技術の発展により、数 μm というバクテリア細胞でも、十分に細胞学的研究方法が行えるようになった。その一つが蛍光in situハイブリダイゼーション (FISH) 法である。我々はこの方法により、プラスミドDNAや大腸菌染色体の特定領域の検出に成功し、分配過程におけるDNA局在性の変化を観察してきた。

この方法によって明らかになったことは、大腸菌染色体の特定の領域が、分配の進行に伴い細胞内での位置を大きく変えるということであった。環状の大腸菌染色体は、一ヶ所の複製開始点 (oriC) から両方向へと複製を始め、oriCのちょうど反対に位置する領域で、2つの複製フォークは出会い、複製を終了する。このため、この染色体部分は複製終結領域 (Ter) という。oriC領域とTer領域について、その細胞内の位置を調べたところ、両者はまったく異なる移動と局在のパターンを示した。複製後に倍化したoriC領域は、細胞の両極にそれぞれ分かれ、細胞が分裂するまでこの位置に留まる。一方、Ter領域は細胞中央部に移動し、細胞分裂中の大半の期間はここに位置し、最終的に複製した染色体はそれぞれ娘細胞へと分離していく。

さて、それでは他の染色体領域はどのように複製・分配されているのだろうか。本研究では、全長4.6 Mbの大腸菌染色体上で約230 kb間隔の22ヶ所の領域について、それぞれ細胞内での移動と局在性を調べた。その結果、oriC領域を含む約1 Mbに渡る染色体領域がoriC領域とほぼ同じ移動と局在性のパターンを示した。他方、Terを含む約1 MbもTer領域に特徴的な移動と局在性を示した。この結果から、細胞長の千倍もの長さを持つ染色体が細胞の中で遺伝子の並びに従って折りたたまれ、この高次構造によってoriC領域とTer領域に代表される局在性を示す染色体領域 (ドメイン) を形成していると考えられる。そこで両染色体ドメインをそれぞれOriドメインとTerのドメインと呼ぶ。染色体の逆位によりOriとTerのドメインが接近した変異株の解析からも両染色体ドメインが染色体の移動と局在性に深く関与していることが示唆された。特に、Oriドメインには、この染色体領域を複製後に両極へ移動させるのに必要なDNA領域、いわゆるセントロメアに相当する領域が存在していると予想された。その領域を特定するため、染色体を2つに分断した変異株を作成し、その染色体分配を調べた。

染色体上からセントロメアに相当する領域を切り離すと、その染色体の分配には異常が生じるであろう。しかし、切り離した染色体領域を第2の染色体として細胞内に保持させれば、この領域にある増殖に必須な遺伝子を失うことはない。このような方法で、Oriドメインの染色体領域を次々と切り出し、種々の染色体分断変異株を作成したところ、特定の染色体領域を失った変異株に、染色体分配の異常が見つかった。これら変異株では、複製後も倍化したoriC領域が両極へ移動せず、それぞれが近接している細胞の割合が高まっていた。これはoriC領域の両極への"速やかな"移動過程が阻害されたためと考えられる。

しかし、まだその染色体領域の限定は約220 kbの広範囲な領域であり、さらに狭い範囲にある機能配列を特定しなければならない。近い将来のこの解明をもって、真に本研究課題の終了としたい。

自己評価

大腸菌の染色体を FISH 法で検出し、細胞周期における染色体全体の変化を初めて示すことができた。さらに染色体分断変異株の作成を試み、これに成功したことで、バクテリアのセントロメアという

べき分配に關与する DNA 領域の存在を示すことができた。本研究期間内でこの領域を特定するまでに至らなかったことは残念である。が、終了後も研究を行い、この DNA 領域の塩基配列を決定することができ、本研究の最大目標を達成できた。

3 . 領域総括の見解

大腸菌における染色体配分について、FISH 法によりその複製開始点と終結点の動きを可視化することにより、これまで想像の域を出なかった細菌染色体の動きを具体的に示したことが評価される。また複製開始点として働く DNA 領域の限定にある程度の成功している。真核生物の DNA 分配機構との対比が可能となれば、相互の違いに着目した新しい抗菌剤の開発につながる可能性がある。

4 . 主な論文

- 1 . Inagawa, T., Kato, J., Niki, H., Karata, K., and Ogura, T. (2001). Defective plasmid partition in ftsHmutants of Escherichia coli. Mol. Gen. Genomics 265, 755-762.
- 2 . Yamaichi, Y., and Niki, H. (2000). Active segregation by the Bacillus subtilis partitioning system in Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 97, 14656 - 14661.
- 3 . Niki, H., Yamaichi, Y., and Hiraga, S. (2000). Dynamic organization of chromosomal DNA in Escherichia coli. Genes Dev. 14, 212-223.
- 4 . Hiraga, S., Ichinose, C., Onogi, T., Niki, H., and Yamazoe, M. (2000). Bidirectional migration of SeqA-bound hemimethylated DNA clusters and paring of oriCcopies in Escherichia coli. Genes Cells 5, 327-431.
5. Niki, H., and Hiraga, S. (1999). Subcellular localization of plasmids containing the oriC region of Escherichia coli chromosome, with or without the sopABC partitioning system. Mol. Microbiol. 34, 498 - 503.

血液型糖鎖を通じて知る生命の素過程
調節素子としての糖鎖機能の網羅的解析をめざして
野村 一也

(九州大学・大学院理学研究院・生物科学専攻情報生物学講座)

1. 研究のねらい

ほとんど全ての生物の細胞表面や細胞内には、様々な構造の糖鎖が存在している。こうした糖鎖の役割は一体何だろうか？私はヒトのB型血液型を決めているB型糖鎖そのものが、アフリカツメガエルでは細胞接着分子として機能していることを発見した。本研究では、この発見をもとに、血液型糖鎖やそれに関連した様々な糖鎖が、生物の発生や形態形成・細胞間相互作用などで「生命の基本的素子」としてどのように働いているかを明らかにしようと試みた。

2. 研究結果及び自己評価

現在、私は糖鎖の研究を行っている。一般の方が糖という言葉からまず思い浮かべるのは、「お砂糖のとりすぎは体に悪い」といった話ではないだろうか。たしかに糖はエネルギーの供給源として大変重要な働きをしているし、解糖系による糖代謝は生物のエネルギー代謝の根幹でもある。糖はいくつか集まって鎖になることが多く、そうした化合物は糖鎖とよばれる。細菌からヒトに至る全ての生物の細胞表面には、様々な糖鎖が存在して何らかの機能を果たしている。例えばインフルエンザウイルスは、細胞表面のシアル酸という糖鎖を利用して細胞に感染するし、様々なバクテリアは、特定の細胞の表面の糖鎖と結合して感染を開始する。また病原性大腸菌O157の毒素やコレラ毒素も、細胞表面にある血液型抗原Pkやシアル酸を含む糖鎖と結合して細胞内に侵入する。細胞に存在している糖鎖は「細胞の顔」ともよばれ、細胞に個性を付与して、リンパ球の免疫相互作用や細胞接着、神経回路網の形成など様々な局面で重要な機能を果たしている。糖鎖は生命あるものすべてにとって極めて重要な役割を果たしている一大分子グループであるが、その構造が複数の遺伝子の協同的働きによって始めて形成されること、および構造が多様で、かつ構造決定が極めて困難なことなどの理由から、その研究は遅々として進まなかった。本研究で私は、こうした糖鎖の生物における重要な働きを、網羅的に解明することを試みた。

手掛かりとして、まずアフリカツメガエル *Xenopus laevis* の初期胚に存在する Ca^{2+} 依存性細胞接着に働く糖鎖の研究を行った。この糖鎖はヒトのABO式血液型物質の一つであるB型血液型物質のB型活性を担う糖鎖であり、本研究ではこの糖鎖が細胞膜に存在しているGPI anchor型タンパク質 (glycosyl phosphatidylinositol anchored タンパク質) といつて細胞膜にうめこまれたある種の糖脂質の先端にタンパク質が結合した分子であり、細胞膜タンパク質の約30パーセントほどはこのタイプの分子といわれる。) に付加されていること、そしてこのB型活性を持ったGPI anchor型タンパク質がレクチン (糖鎖を結合するタンパク質のグループの1つ) として、細胞膜上に存在するB型活性をもった糖脂質と結合することを明らかにした。GPI anchor型のレクチンは世界で始めて同定されたものであり、このレクチンが α 型のガラクトースと結合することを発見した。またGPI anchor型タンパク質の構造一般についても、今まで知られていなかった新規の糖鎖修飾が存在していることも明らかにしている。

これと併行して、クラゲの分化転換を誘導するモノクローナル抗体 (糖鎖を認識するA19抗体) についての研究も進めた。地中海産のコツブクラゲ (*Podocoryne carnea*) の横紋筋を単離し、これをA19抗体を含む溶液中に入れると横紋筋の分化状態が転換して、平滑筋や神経細胞など全く別の種類の細胞へと分化転換する。この分化転換が糖鎖に対する抗体で誘導されることから、この抗体が結合する糖鎖が分化の安定化や転換に重要と考え、この糖鎖の構造解析を試みた。その結果、この抗体はB型血液型物質の末端に存在しているガラクトースを認識していることがわかり、ガラクトースが生命にとって極めて重要な糖鎖分子として働いていることが初めて示唆された。

線虫 *C. elegans* は、受精卵からの全発生過程をタイムラプス装置を備えた顕微鏡 (四次元顕微鏡) で逐一観察出来るため、糖鎖の胚発生や形態形成で果たす役割を解明するにはまたとない材料である。また全ての細胞の発生過程 (細胞系譜) や全神経細胞の結合様式も解明済みのため、神経系の研究にも最適な材料といえる。さらにそのゲノム塩基配列が判明している他、突然変異体が容易に分離出来ることや、特定遺伝子機能の阻害がRNAi法 (RNA mediated interference: 特定遺伝子に対する二重鎖RNA導入による機能阻害) によって手軽に出来るなど、遺伝子機能の研究に適した様々な手法が完備している。糖鎖分子の機能を完全に解析するためには、糖鎖を合成したり分

解したりする遺伝子、糖鎖を修飾したり認識したりする遺伝子の研究が不可欠であり、こうした糖鎖関連遺伝子の網羅的解析には、線虫は最適の材料と考えられる。もし私が今まで研究した様々な糖鎖が線虫にも存在すれば、それら糖鎖の機能の研究は飛躍的に進展するはずである。幸いなことに、線虫にはB型血液型糖鎖やガラクトース、硫酸化抗原の一つであるHNK-1抗原など、研究してきたすべての糖鎖が存在することが分かった。そこで、このモデル生物を用いて、糖鎖とそれに関連した全ての遺伝子の機能を網羅的に解析する研究を開始した。現在、線虫ゲノムのデータと系統的網羅的RNAi実験の結果を参考にしながら、線虫の糖鎖の合成・分解酵素、糖鎖の硫酸化・アセチル化などの修飾酵素、あるいは糖鎖を認識するレクチンなど、「すべての糖鎖関連遺伝子」の機能の系統的・網羅的解析を進めている。中でも糖鎖のアセチル化に必須であるacetyl CoA トランスポーター遺伝子とプロテオグリカン合成酵素遺伝子については、遺伝子欠失突然変異体とRNAiを用いた四次元顕微鏡などを利用した解析が最も進んでいる。同様の解析をレクチン遺伝子や糖鎖の硫酸化関連遺伝子などについて順次、精力的に進めており、さきがけ研究の成果をもとに、糖鎖の真の機能についての理解が飛躍的にすすむことを期待している。

自己評価

糖鎖が生命現象で本質的な役割を果たしているかどうかという問いに、胸をはって「はい」と答え得る研究成果が得られた。プロテオグリカンの糖鎖が細胞分裂を制御しており、その機能阻害が細胞分裂の逆行を引き起こすという衝撃的な発見は世界中で注目浴びており、それにまつわる遺伝子ネットワークの解明や糖鎖関連遺伝子の網羅的機能解析プロジェクトも順調である。更に高額の研究費の獲得で、糖鎖生物学の革命を日本から起したい。

3. 領域総括の見解

一般に、生命科学においては遺伝子とタンパク質の研究が大勢を占め、糖鎖の研究、特に基礎的研究は等閑に付されていた。本研究者は、ヒトの血液型を決定する糖鎖がツメガエルでは細胞接着分子となっていることの発見に端を発し、様々な糖鎖の生理学的意義を明らかにしている。特に最近では、線虫の糖タンパク質であるプロテオグリカン合成酵素活性の操作により、発生初期における細胞分裂が逆転する特異な現象を見出した。これらの成果は高く評価されるべきである。

4. 主な論文・総説

1. Nomura, K. H., Kobayashi, R., Hirabayashi, Y., Fujisue-Sakai, M., Mizuguchi, S., and Nomura, K.(1998). Involvement of blood-group-B-active trisaccharides in calcium-dependent cell-cell adhesion in the *Xenopus* blastula. *Dev. Genes and Evolution* 208, 9-18.
2. 野村一也、水口惣平、但馬達哉、野村和子 (2000). 血液型物質と細胞接着 *生化学* 72, pp.91-104.

5. その他

招待講演数：国内 5

胚中心における新規な B 細胞選択機構の解明

疋田 正喜
(岡山大学・工学部)

1. 研究のねらい

生体は、体内に侵入してきた無数の外来抗原に対応するために、様々な結合特異性を持つ抗体を産生する B 細胞を生成している。古典的には、個々の B 細胞が持つ抗原結合性は、体細胞突然変異による親和性上昇を除き、いったん骨髄中で決められてしまうと、末梢のリンパ組織中で変化することはないと考えられてきた。しかし、近年、抗体可変部を構成する遺伝子断片の組換えを行う recombination activating gene (RAG) -1、2 の遺伝子産物の発現が、末梢のリンパ組織中でも認められた。このことから、抗体可変部遺伝子の再々構成とも考えられる、receptor revision と呼ばれる現象の存在が示唆されている。本研究においては、receptor revision により、抗体可変部の構造が変化する B 細胞分化過程があることを示し、その現象にどのような生理的な意義があるのかを明らかにすることを目標として、以下のような検討を行った。

2. 研究結果及び自己評価

(1) Quasi-monoclonal マウスを利用した抗体産生応答の解析

野生型のマウスにおいては、B 細胞が様々な抗原特異性を有しており、ある一つの B 細胞に注目した場合、その細胞の抗原特異性が、骨髄中で獲得した抗原特異性が変化したものかどうかを明らかにすることは極めて困難である。そこで、本研究では、均一な抗原特異性の細胞集団を有する quasi-monoclonal (QM) マウスを使用して、抗原特異性の変化を調べることにした。

このマウスでは、4-hydroxy-3-nitrophenylacetyl (NP) ハプテンに対して結合性を有することが知られている VDJ 再構成後の抗体可変部遺伝子 (VHT) を、野生型マウスの抗体重鎖可変部遺伝子をコードしている染色体領域に組み込んである。そのため、80% 以上の B 細胞が VHT を重鎖の抗原結合部位に使用しており、比較的、均一な集団を形成している。

さらに、交配によりこのマウスと野生型マウスの F1 を作製し (QBF1 マウス) 種々の検討を行ったところ、QM マウスと同様、大多数の B 細胞が重鎖の抗原結合部位に VHT を使用していた。一方、軽鎖については、大部分の細胞が鎖を使用していた。そのため、QBF1 マウスにおいては、VHT 陽性鎖陽性細胞が主な B 細胞集団を形成していることが明らかとなった。

このような QBF1 マウスに、VHT に対して比較的低い親和性しか持たない p-nitrophenylacetyl (pNP) ハプテンを結合したニワトリ IgG (CGG) を免疫したところ、VHT を保持していない少数の細胞集団が抗原刺激に反応して、IgG 抗体産生細胞に分化することが明らかとなった。また、pNP-CGG 免疫後に流入リンパ節細胞の解析およびそれらの細胞から作製したハイブリドーマの解析を行った結果、以下のようなことが明らかとなった。1) 流入リンパ節中で RAG の発現が認められる。2) まったく同じ重鎖遺伝子を持つハイブリドーマであっても、鎖陽性ハイブリドーマは pNP に対して低親和性であり、鎖陽性ハイブリドーマは高親和性である。3) 免疫後の親和性成熟に伴って、血中抗体価に占める鎖陽性の抗 pNP 抗体の割合が減り、鎖陽性抗体の割合が上昇する。4) 流入リンパ節中で、鎖の V-J 領域における新規の組換えに伴って切り出される遺伝子断片が検出され、鎖可変部における切断点の存在も PCR 法によって明らかとなった。

これらの結果は、免疫に伴ってリンパ節中で RAG が発現し、鎖において新たな V-J 組換えが行われた結果、低親和性の鎖陽性細胞が高親和性の鎖陽性細胞に変化し、pNP に対して高親和性の抗体を産生するようになったことを強く示唆している。

(2) RAG の発現抑制が抗体の親和性成熟に及ぼす影響に関する解析

QBF1 マウスに抗原投与と同時に抗 IL7 レセプター抗体を投与し、末梢リンパ組織での RAG の産生を抑制すると、リンパ節中での鎖の新規な組換えが抑制されていた。そこで、流入リンパ節細胞からハイブリドーマを作製し、抗体軽鎖の定常部を調べたところ鎖陽性細胞の生成が著しく抑制されており、鎖陽性細胞が主要な応答集団を形成していた。さらに、血中抗体の pNP に対する親和性を経時的に測定したところ、抗 IL7 抗体未投与のマウスで観察された pNP に対する抗体の親和性成熟が強く抑制されていることが明らかとなった。

同様の現象が、鎖陽性 B 細胞を移入したリンパ球欠損マウスでも観察されたことから、骨髄にお

けるB細胞新生とは独立の機構で、流入リンパ節において抗原刺激に依存した鎖から鎖への組換えが起きていると考えられる。さらに、このような末梢リンパ組織中での抗体可変部の再組換えが、抗原に対する親和性成熟に重要な役割を果たしている場合があることが明らかとなった。

(3) V(D)J 組換え細胞の可視化方法の確立

従来の分子生物学的な手法では、どの細胞がRAGを発現し組換えを行ったのかを、QBF1マウスなどの特殊な実験材料を使用しない限り、簡単には検出・単離できない。そこで、新たに、V(D)J組換えが起こった細胞を、選択的に蛍光で標識する方法の開発を試みた。

レトロウイルスベクター中に、赤色蛍光タンパクであるDsREDの遺伝子をプロモーターに対して正方向に配置し、緑色蛍光タンパクGFPの遺伝子を逆方向に配置した。さらに、これらの遺伝子の両側にRAGの組換え認識配列を挿入し、RAGによる組換えが行われた場合にはDsREDとEGFPの遺伝子の方向が逆転するようにベクターを設計した。このレトロウイルスベクターを胸腺薄片に感染させたところ、皮下直下のV(D)J組換えを行っている細胞集団で緑色蛍光を観察することができた。そこで、免疫したマウスの脾臓薄片にも感染させたところ、免疫に伴って形成された胚中心でも、胸腺と同様に緑色の蛍光が観察された。このことは、少なくとも末梢リンパ組織中で、V(D)J組換えを行った細胞が胚中心に存在しており、抗原に対する免疫応答に参加していることを示している。

自己評価

本研究の当初計画において、B細胞の抗原結合性の変化に関するin vivoの検討は、比較的単純な遺伝子組換え反応にのみ制御されていると予想していた。しかし、抗体遺伝子を組み込んだマウスを用いた検討の結果、実際の免疫応答では、B細胞の抗原特異性は、何種類かの免疫反応に複合的に制御されており、従来の学説では説明できない複雑な調節を受けている点を明らかに出来た点を評価できる。

3. 領域総括の見解

通説では、個々のB細胞が示す抗原結合性は一旦骨髄中で決定されると、末梢リンパ組織では変化しないとされている。しかし、末梢リンパ組織中でも遺伝子組換え機能が認められ、抗体可変部遺伝子の再々構成が示唆されていた。本研究者はこの疑問に対し、特殊なマウスあるいは組換え検出ベクターを使用した実験で、いずれも抗体可変部遺伝子の再々構成を支持する結果を得、免疫遺伝子の再々構成が行なわれることがより確実となった。その組換え機構が明らかになれば、自己免疫の予防が可能となるであろう。

4. 主な論文

1. Kanayana, N., Fukue, C., Magari, M., Ohtani, K., Hikida, M., Yamada, M., Matsuda, S., and Ohmori, H. (2001). Use of secondarily revised VH genes in IgE antibodies produced in mice infected with the nematode *Nippostrongylus brasiliensis*. *Immunol. Lett.* 3, 181-186.

酵母の形態形成と細胞増殖との連携制御機構

- シグナル伝達分子と新規連携制御系 -

平田 大

(広島大学大学院・先端物質科学研究科)

1. 研究のねらい

細胞形態制御は、細胞増殖(分化・細胞周期)と連動している。細胞形態は、細胞内外の多様な変化に応答するシグナル伝達経路によって制御される。それら多様なシグナルの最終到達点は、一細胞そのものであることから、形態形成を理解する上で、単一細胞における形態形成制御機構の理解が重要である。本研究では、出芽によって増殖する酵母と分裂によって増殖する酵母を使って、形態形成と細胞増殖とを連携制御する機構、具体的には、シグナル伝達経路を構成する分子や新規連携制御系の同定を目指した。

2. 研究結果及び自己評価

2-1. Ca²⁺シグナル伝達経路による細胞周期制御機構(出芽酵母)

Ca²⁺シグナル伝達経路は、形態形成における変化(細胞膜ストレッチなどの細胞膜の生理変化)に応答し、Swe1キナーゼ(細胞周期エンジンの負の制御因子)を活性化し細胞周期M期開始を抑制する。遺伝解析により、Ca²⁺シグナル伝達経路で機能する新たな分子としてGSK-3キナーゼ・Mck1を同定した。解析の結果、高濃度のCa²⁺存在下で、Hsl1キナーゼ(Swe1の負の制御因子)が、出芽ネットワークから細胞質に移動しSCF-Cdc4依存的に分解されること、さらに、この機構に、Mck1とカルシニューリンが協調的に働くことを示した(Mizunuma et al., 2001)。

2-2. タンパク質合成阻害により誘導される成長極性変換の阻害(分裂酵母)

分裂酵母の細胞周期G2期0.34の時期に、成長極性が単極から両極へと変換するNETO(New End Take Off)という現象が起こる。NETO遂行の条件は、DNA複製の完了とある一定の細胞サイズへの到達であることから、この時期に、両者をモニターし、形態形成と細胞周期とを連携制御する機構が存在する。今回、分裂酵母において、タンパク質合成阻害により、NETO遅延(単極成長細胞の蓄積、成長極性変換の阻害)が起こることを見いだした。また、この際、M期開始の阻害にWee1キナーゼ(細胞周期エンジンの負の制御因子)が重要であることを示した(Suda et al., 2000)。

2-3. 極性異常により誘導される細胞周期遅延(分裂酵母)

形態形成と細胞増殖との連携制御機構を解析するため、円筒状の分裂酵母野生株より、温度感受性の極性異常(球形)変異体の取得を試みた。その中の一つmor2変異の原因遺伝子は、新規タンパク質をコードする。解析の結果、Mor2はアクチンの細胞端への局在、細胞質微小管末端の位置決定に重要であることが示唆された。また、mor2変異の成長極性異常は、細胞周期G2期遅延を誘導した。さらに、この増殖停止と生存率の維持に、Wee1キナーゼが必須であることが分かった。

2-4. 形態形成関連分子の同定(分裂酵母)

形態形成関連分子を同定するため、過剰発現により形態異常を引き起こす遺伝子の系統的スクリーニングを行った結果、タンパク質合成に必須なペプチド鎖伸長因子(EF1)の過剰発現が、成長極性制御系(アクチンや微小管)に影響をおよぼし、細胞形態異常を引き起こすことを示した(Suda et al., 1999)。また、温度感受性の形態異常変異体の解析から、 α -グルカン合成酵素Mok1がPKCの下流で、成長領域へのアクチンの局在に重要な機能をもつこと(Katayama et al., 1999)、微小管重合補助因子群が成長極性の方向維持に重要であることを示した(Radcliffe et al., 1999)。

2-5. 考察(今後の展望)

本研究では、出芽・分裂両酵母における形態形成と細胞増殖との連携制御機構、とくにシグナル伝達分子と新規連携制御系の同定を目指した。制御系の全体像はいまだ不明であるが、シグナル伝達分子、形態形成関連分子、新規制御機構の一部に到達した。今後は、形態異常シグナルの発生と認識のメカニズム、また、異常体から正常体への形態再形成のメカニズム、さらに、単細胞で見いだされた制御系の進化上の保存性について研究を展開したい。

2-6. 自己評価

本研究では、酵母における形態形成と細胞増殖との連携制御機構に關与する分子の同定と、その全体像の解明を目指した。關連分子の同定という、当初の目的の一部は達成できたが、全体像の解明には至っていない。しかし、本研究から、従来、不明であった連携制御系を動かすシグナルの手がかり、さらに、今後の研究展開について明確な方向性を得ることができた。その意味で、本さきがけ研究は、たいへん有意義な研究期間であった。

3 . 領域総括の見解

細胞増殖では、DNA の複製と細胞周期は細胞形態の変化として表現される。本研究は出芽酵母における形態変化に關連する Ca^{2+} シグナル伝達系を端緒に開始されたが、細胞周期に知見の豊かな分裂酵母を対象を含め、タンパク質合成阻害剤や形態異常突然変異の分離により、その全体像はいまだ不明であるが、新規に数個の既知または新規タンパク質の關与を検出し、細胞周期との連携に關わる因子の研究を着実に進めている。

4 . 主な論文

- 1 . Suda, M., Fukui, M., Sogabe, Y., Sato, K., Morimatsu, A., Arai, R., Motegi, F., Miyakawa, T., Mabuchi, I., and Hirata, D. (1999). Overproduction of elongation Factor 1 α , an essential translational component, causes aberrant cell morphology by affecting the control of growth polarity in fission yeast. *Genes Cells* 4, 517-527.
- 2 . Katayama, S., Hirata, D., Arellano, M., Perez, P., and Toda, T. (1999). Fission yeast α -glucan synthase Mok1 requires the actin cytoskeleton to localize the sites of growth and plays an essential role in cell morphogenesis downstream of protein kinase C function. *J. Cell. Biol.* 144, 1173-1186.
- 3 . Radcliffe, P.A., Hirata, D., Vardy, L., and Toda, T. (1999). Functional dissection and hierarchy of tubulin-folding cofactor homologues in fission yeast. *Mol. Biol. Cell* 10, 2987-3001.
- 4 . Suda, M., Yamada, S., Toda, T., Miyakawa, T., and Hirata, D. (2000). Regulation of Wee1 kinase in response to protein synthesis inhibition. *FEBS Letters* 486, 305-309.
- 5 . Mizunuma, M., Hirata, D., Miyaoka, R., and T. Miyakawa. (2001). GSK-3 kinase Mck1 and calcineurin coordinately mediate Hsl1 down-regulation by Ca^{2+} in budding yeast. *EMBO J.* 20, 1074-1085.

5 . その他

受賞：酵母の細胞増殖に必須な機能分子に関する研究、農芸化学会奨励賞（日本農芸化学会）
1999年3月
招待講演：3件（国内）

神経軸索の伸長経路を決める道標細胞の発現分子の検索

- 道標細胞の本質を探る -

平田 たつみ

(国立遺伝学研究所)

1 . 研究のねらい

発生時、神経細胞の軸索は迷うことなく、特定の経路を正確に選んで伸長する。この時軸索が何を目印にしているのかは、神経生物学の長年の謎であった。私はマウスの嗅球-終脳神経回路を使って、このテーマに取り組んでいる。嗅球の神経細胞の軸索は、終脳の特定領域を選択的に伸長する。この軸索の道標となるのが、モノクローナル抗体 (mAb) lot1が認識する神経細胞である。この道標細胞は、軸索の伸長に先立って将来の経路に並び、軸索をこの経路へと導く。本研究では、この道標細胞の起源ならびに発生機構を解析した。また、道標細胞が特異的に発現する分子として、mAb lot1が認識する抗原分子を同定した。

2 . 研究結果及び自己評価

(1) 道標細胞の発生機構

道標細胞はどこで生まれ、どのようにして将来の軸索経路に配列するのだろうか？この疑問に答えるために、様々な培養法を用いて、道標細胞の起源を探索した。その結果、この細胞は終脳新皮質とよばれる領域から、広範囲にわたって分化してくることが示された。終脳新皮質は、将来道標細胞が並び軸索経路に比較すると、はるかに背側に位置する。もし実際の生体内で、道標細胞が新皮質で発生してくるとすれば、これらの細胞はかなりの距離にわたって終脳半球を腹側方向に移動しなければならない。しかし、このような方向への細胞移動は、これまで報告されていなかった。

そこで、この時期の終脳における実際の細胞移動の様子を、マウス胚全体を子宮外で培養する手法を用いて解析した。その結果、終脳新皮質で生まれた細胞が確かに腹側方向へと選択的に移動し、将来の軸索経路に並ぶことが確かめられた。このようにして移動した細胞の少なくとも一部は、mAb lot1陽性の道標細胞へと分化することも示された。以上の結果を総合すると、生体内で、道標細胞は終脳新皮質全体で発生し、腹側方向に移動して、将来の軸索経路に並ぶという興味深い発生過程をたどると考えられる。

(2) mAb lot1の認識する抗原分子の同定

mAb lot1 の認識する抗原は、免疫染色のパターンから膜タンパク質であると予想されたが、western blottingでも免疫沈降でも、この抗原分子を検出することはできなかった。このことは、mAb lot1の抗原決定部位が、膜からの抽出や可溶化にともなって破壊されるためであると考えられた。そこで、タンパク質を本来の立体構造に近い形で発現することにより、抗原分子を同定しようと考えた。具体的には、mAb lot1 の抗原分子を豊富に発現する領域からmRNA を調製してcDNA を合成し、これを哺乳類細胞用発現ベクターに組み込んでライブラリーを作成した。このcDNAライブラリーを哺乳類培養株細胞 (COS細胞) に導入し、コードするタンパク質を強制発現させた。その後、細胞をmAb lot1で免疫染色する事により、抗体が認識する分子を発現する細胞を顕微鏡下で検索した。約200,000クローンを検索したところ、mAb lot1で強く染色される細胞を生じるcDNAクローン1種類を単離する事ができた。このクローンの塩基配列を決定したところ、代謝型グルタミン酸レセプター1 (mGluR1)をコードしていることが明らかとなった。mGluR1は7回膜貫通タンパク質であり、神経伝達物質グルタミン酸のレセプターとして機能していると考えられている。この分子が本当にmAb lot1の抗原分子であるのかを確かめるために、mGluR1遺伝子欠損マウスを入手して、mAb lot1で免疫染色した。その結果、ホモ欠損マウス胚の脳において、染色性が完全に欠失していることが示された。このノックアウトマウスにおける道標細胞の動態と、この細胞がガイドする嗅球軸索の走行について現在解析中である。

自己評価

モノクローナル抗体lot1の認識する抗原分子を同定できたということで、本研究の第一目標は達成できたのではないかと考えている。しかし、同定した抗原分子が研究開始当初に期待した道標機能をもつとは考え難く、ある意味で研究がふりだしにもどった感は否めない。予想していたこととはいえ、分子の局在から機能を推測する事の難しさならびに危険性をあらためて認識する事になった。とはい

え、本研究から得られた結果は今後の研究活動につながる貴重な材料となっており、これらを最大限活用して、嗅球-終脳神経回路形成を素過程に分解する努力を今後も続けてゆきたいと考えている。また、本研究から副産物的に見つかった道標細胞のユニークな細胞移動は、脳における新しい神経細胞の移動様式として広く受け入れられ、新たな研究分野として発展しつつあることを嬉しく感じている。

3 . 領域総括の見解

本研究者は、神経軸索が的確に伸長すべきところへ向かって伸長する機構の解明を目的に、マウス胚終脳を器官培養する方法を考案し、嗅球-終脳神経回路の神経軸索の伸長を対象に研究を続けている。その結果、モノクローナル抗体 lot1 が認識する神経細胞が所定の位置へ移動して軸索を導き、その Lot1 抗体が認識するのは、代謝型グルタミン酸リセプター1 であることを見出している。しかし、今だ混沌の感が深い。

4 . 主な論文

- 1 . Sato, Y., Hirata, T., Ogawa, M., and Fujisawa, H. (1998). Requirement for early-generated neurons recognized by monoclonal antibody lot1 in the formation of lateral olfactory tract. *J. Neurosci.* 18, 7800-7810.
- 2 . Hirata, T., and Fujisawa, H. (1999). Environmental control of collateral branching and target invasion of mitral cell axons during development. *J. Neurobiol.* 38, 93-104.
- 3 . Tomioka, N., Osumi, N., Sato, Y., Inoue, T., Nakamura, S., Fujisawa, H., and Hirata, T. (2000). Neocortical origin and tangential migration of guidepost neurons in the lateral olfactory tract. *J. Neurosci.* 20, 5802-5812.
- 4 . Hirata, T., Fujisawa, H., Wu, J. Y., and Rao, Y. (2001). Short -range guidance of olfactory bulb axons is independent of repulsive factor slit. *J. Neurosci.* 21, 2373-2379.

5 . その他

口頭発表2件（うち海外1件）、招待講演10件（うち海外1件）

DNA 複製の再開抑制機構の解明

- 真核生物の DNA 複製制御に関する生化学的アプローチ -

水島 徹
(岡山大学・薬学部)

1. 研究のねらい

遺伝情報の複製という、生物にとって根本的な役割を担う DNA の複製反応は、細胞増殖の調節点としても重要である。従って、DNA 複製開始の制御機構、即ち、複製開始時に複製開始因子を活性化する機構と、それ以外の時期に複製開始因子を不活性化しておく機構は重要である。私は大腸菌の複製開始因子 DnaA の ATP 結合と ATPase 活性が、DnaA の活性化と不活性化にそれぞれ関与していることを見出した。さきげん研究 21 では、このような複製制御機構が真核生物にも存在するかを検討した。

2. 研究結果及び自己評価

研究結果

(1) ORC と Cdc6p の複合体形成の試験管内再構成系の確立

大腸菌の DnaA に相当する真核生物の因子として、ORC と Cdc6p が考えられた。ORC は、酵母の複製開始点 (origin DNA) に特異的に結合する因子として発見され、ヒトに至るまで真核生物に広く存在することが分かっている。一方で Cdc6p は、細胞周期に伴いその存在量が大きく変化し、DNA 複製制御の中心因子と考えられている。この両者に注目し、これらの ATPase 活性の複製開始制御における役割を明らかにすることを目指した。

真核生物の染色体 DNA 複製開始制御機構の研究は、大腸菌の場合に比べて大変遅れている。それは、その試験管内再構成系が確立されていないため、生化学アプローチが出来ないためである。真核生物の染色体 DNA 複製開始の最初の段階であり、且つ律速段階である ORC と Cdc6p の複合体形成ですら、これまでその試験管内再構成系は確立されておらず、複製開始制御機構の解明を困難にしてきた。そこでまず ORC と Cdc6p の origin DNA 上での複合体形成を、試験管内で再構成することに取り組んだ。数々の条件検討の結果、ORC と Cdc6p の origin DNA 上での複合体形成を精製タンパク質から再構成することに成功した。この再構成系は真核生物の DNA 複製研究のブレークスルーになると考えている。今後、この系を土台にして、酵母染色体 DNA 複製の精製したタンパク質からなる試験管内再構成系を確立したい。大腸菌の場合、oriC DNA 複製再構成系の確立後、数年間でその全体像がほぼ解明された。従って真核生物の複製再構成系を確立できれば、真核生物の DNA 複製機構の解明が急速に進むことが予想される。

(2) ORC の ATPase の機能解析

上記の試験管内再構成系を使って ORC の ATPase の機能解析を行い、ORC と Cdc6p の複合体形成が ATP に依存し、ADP によって阻害されることを見出した。この結果は、ORC あるいは Cdc6p に ATP が結合することが、両者の複合体形成に必須であることを示唆している。そこで次に変異タンパク質を用いた解析を行った。Cdc6p の ATP 結合活性不能変異タンパク質が、野生型 ORC に結合できたのに対し、ORC の ATP 結合活性不能変異タンパク質は、野生型 Cdc6p に結合できなかった。この結果は、ORC と Cdc6p の origin DNA 上での複合体形成において、ATP 結合型の ORC が活性型で、ADP 結合型は不活性であることを示している。従って、ORC の ATPase 活性は、ORC を ATP 結合型から ADP 結合型へ不活性化することにより、DNA 複製開始を負に制御していることが考えられる。即ち、ORC の ATPase 活性による自身の不活性化が、DNA 複製開始を細胞周期あたり一回に制限していると考えられる。

(3) Cdc6p の ATPase の機能解析

Cdc6p の ATPase 活性に関して、上記の再構成系を使って解析し、精製した Cdc6p が ATP 存在下で、ORC の重合を阻害することを見出した。この Cdc6p の活性は、自身の ATPase 活性に依存していた。また私は、Cdc6p が自身の ATPase 活性を使って、ORC の origin 結合性を上昇させていることを見出した。さらに、Cdc6p の ATPase 活性の細胞内における機能を明らかにする目的で、ATPase 活性を持たない変異型 Cdc6p を構築し、その遺伝学的解析を行った。変異型 Cdc6p は DNA ヘリカーゼである MCM を DNA 上に効率的にロード出来ないため、細胞周期の S 期の進行を遅らせること

が分かった。この結果から、Cdc6p の ATPase 活性は、ORC の高次構造を変化させ、MCM が ORC と結合しやすくしているというモデルを提唱した。このことは、Cdc6p の ATPase が、DNA 複製の進行を促進し、DNA 複製を正に制御することを示唆している。

自己評価

3年間の研究により、大腸菌と同様な再複製開始抑制機構が酵母にも存在することを示すことが出来、目標は達成できたと考えている。またその研究過程で、複製再構成系の確立への第一歩を踏み出すことが出来たのは、予想外の研究成果であった。今後は、これを土台に、真核生物の複製再構成系の確立という、大きな目標にチャレンジしていきたい。

3 . 領域総括の見解

真核生物では、DNA の複製開始が細胞周期毎に一回に制限されている。本研究者は、この問題に酵母を材料として迫るため、まず DNA 複製開始点に ORC(origin recognition complex) と、その結合に関係する Cdc6 タンパク質の機能を探った。まず、これらタンパク質の DNA 複製開始点への結合を、試験管内で再構成することを行い、次にこの再構成系を用いて、これらタンパク質の ATPase 活性と、ATP/ADP の関係を生化学的に明確にしている。今後、この再構成系により、続々と成果を挙げることを期待している。

4 . 主な論文

- 1 . Hase, M., Yoshimi, T., Ishikawa, Y., Ohba, A., Guo, L., Mima, S., Makise, M., Yamaguchi, Y., Tsuchiya, T. and Mizushima, T. (1998). Site-directed mutational analysis for the membrane binding of DnaA protein. J. Biol. Chem. 273, 28651-28656.
- 2 . Kondo, T., Mima, S., Fukuma, N., Sekimizu, K., Tsuchiya, T. and Mizushima, T. (2000). Suppression of temperature-sensitivity of adnaA46 mutant by higher DNA supercoiling. Biochem. J. 348, 375-379.
- 3 . Makise, M., Mima, S., Tsuchiya, T. and Mizushima, T. (2000). Identification of amino acids involved in the functional interaction between DnaA protein and acidic phospholipids. J. Biol. Chem. 275, 4513 - 4518 .
- 4 . Mizushima, T., Takahashi, N. and Stillman, B. (2000). Cdc6p modulates the structure and DNA binding activity of the Origin Recognition Complex in vitro. Genes & Dev. 14, 1631-1641.
- 5 . Makise, M., Mima, S., Tsuchiya, T. and Mizushima, T. (2001). Molecular mechanism for functional interaction between DnaA protein and acidic phospholipids; identification of important amino acids. J. Biol. Chem. 276, 7450-7456.

5 . その他

招待講演数 12 (国内 9、 海外 3)

分子遺伝学と逆遺伝学による線虫の神経発生の解析

- ポストゲノムシーケンス解析モデルとしての線虫実験系の開発 -

三谷 昌平

(東京女子医科大学・医学部・第二生理学)

1. 研究のねらい

ヒトを含めて多くの生物で、ゲノムおよびcDNAの塩基配列解析が進んでいる。近い将来、生物で使われているタンパク質の構造が、データベース中に網羅的に記載されると予想される。線虫*C. elegans*は、最も早くゲノム構造解析が進んだモデル多細胞生物であり、遺伝解析に適している。本研究では、線虫の既知転写因子を使い、その標的遺伝子を同定することにより、実際の表現型に至る経路を担う遺伝子群を見つけ出し、さらに、欠失変異体を分離することで、機能解析が出来る実験系の開発を目指した。

2. 研究結果及び自己評価

研究結果

(1) Green Fluorescent Protein (GFP) をエピトープタグとして用いる転写制御因子の標的遺伝子探索法の開発

線虫の多種類のニューロン(雌雄同体で302個あるうちの約5分の1)で発現し、それらの分化制御等を支配していると考えられる転写制御因子UNC-86をモデルとして、実験法の開発を行った。unc-86変異体の異常を、その正常ゲノムDNAのコード領域にフレームが合うようにGFPのcDNAを挿入することにより、GFPの蛍光タンパク質としての性質と、UNC-86転写制御因子本来の発現と機能の両方を持った分子をトランスジェニック個体として、unc-86変異体内で発現させた。このタンパク質は、抗体染色で記載されているような細胞および核特異的な発現を示した。さらに、unc-86変異体では失われている触覚異常の表現型や、神経伝達物質セロトニンの免疫反応性が回復した。従って、GFPをエピトープタグとした改変型転写因子は、蛍光タンパク質と本来の転写調節の両方の性質を保持したキメラタンパク質として機能していると考えられる。トランスジェニック個体を集め、抗GFP抗体で、タンパク質-DNA複合体を免疫精製し、DNAを抽出後、4塩基認識制限酵素で消化してクローン化した。ランダムにピックアップしたクローンの挿入DNA断片をシーケンスし、Blast解析により、線虫ゲノムDNAのどこに相当するかを調べた。

1,000クローン強の配列を染色体上にマップし、どのような遺伝子の近傍の塩基配列かを調べた。約5%がトランスジーン由来の配列であり、unc-86遺伝子の自己制御領域に結合したために、選択的に回収されたものと考えられた。その他の配列については、同一遺伝子の周辺部に複数の配列が回収されているものを有力候補として、約50個の遺伝子が得られた。この中から若干の遺伝子について発現様式を調べている。f47e1.1遺伝子は、既知の相同遺伝子が知られておらず、頭部、腹部、尾部において各々1対のニューロンで発現が見られ、野生型UNC-86タンパク質の発現細胞の一部であると考えられた。unc-86変異体のバックグラウンドでは発現が消失したことから、野生型動物ではUNC-86によって活性化を受けていると考えられる。f25e2.1遺伝子は、Gタンパク質共役型受容体に相同性があり、野生型動物では、咽頭部の非神経組織で発現している。unc-86変異体のバックグラウンドでは(野生型個体でUNC-86が発現している細胞の一部らしい)、頭部のニューロンで発現が見られるようになり、野生型動物ではUNC-86によって抑制を受けていると考えられる。これらの遺伝子がどのような機能を持っているか、遺伝子破壊法を用いて解析中である。本研究で開発に成功した、GFPを用いるエピトープタグ法は、他の生物種やタンパク質・タンパク質相互作用解析においても有用な技術であると考えられる。

(2) 線虫での遺伝子破壊法の効率化と応用

線虫では、RNA干渉法と呼ばれる手法で一過性に遺伝子機能を阻害することが可能である。しかし、神経系では作用しない例が多く、安定な遺伝子破壊株の分離が重要である。これまで、技術的な問題点のために変異体の分離には膨大な労力が必要とされてきた。本研究では、この手技を最適化し、変異体分離をルーチン化することに成功した。具体的には、トリメチルソラレンと紫外線で処理し、ランダムな欠失変異を導入した個体のプールを作っておき、遺伝子特異的なプライマーを用いて欠

失を持つ個体を含むプールを見つけ出し、そこから変異個体を同定する。過去約1年半で、200以上の新規変異体を分離済みであり、それらの変異体の表現型解析を通して、遺伝子機能を理解するための重要な生物遺伝資源となりつつある。また、国際C.elegans遺伝子破壊コンソーシアムに加盟し、株の配付を行っている。線虫を用いた遺伝子解析全体への貢献が期待されている (<http://elegans.bcgsc.bc.ca/knockout.shtml>)。

自己評価

本研究は、線虫を用いたポストゲノムシーケンス解析の開発に焦点を絞り行われた。近年、多種類の生物で、ゲノム構造解析が進展し、その構造的・機能的な保存性が明らかになるケースが多々ある。本研究は、そのような生物学の方向性に合致しており、この方法論が他のモデル生物も含めて、ポストゲノムシーケンス解析に応用できるだけでなく、この延長線上で見て来る生命のメカニズムが一般的な理解に貢献する可能性が期待される。

3. 領域総括の見解

線虫における転写制御因子タンパク質（ここでは多種類のニューロンで発現し、その分化に関係すると示唆されている UNC-86 タンパク質）を GFP でマークし、その転写支配下にある遺伝子を抗 GFP 抗体で効率よく分離し、ゲノム上の位置を決定する方法で被支配遺伝子を同定する方法を開発した。また、トリメチルソラレンと紫外線処理で欠失変異体を得る方法を考案し、国内外の研究者に向けて多くの突然変異体を供給している。自身の論文はいまだ少ないが、この努力は評価されるべきである。

4. 主な論文

1. Gengyo-Ando, K., and Mitani, S. (2000). Characterization of mutations induced by ethylmethanesulfonate, UV and trimethylpsoralen in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 269, 64-69.

5. その他

招待講演： 3件