

「生命システムの動作原理と基盤技術」研究領域 領域活動・評価報告書

—平成23年度終了研究課題—

研究総括 中西 重忠

1. 研究領域の概要

本研究領域は、生命システムの動作原理の解明を目指して、新しい視点に立った解析基盤技術を創出し、生体の多様な機能分子の相互作用と作用機序を統合的に解析して、動的な生体情報の発現における基本原理の理解を目指す研究を対象とします。具体的には、近年の飛躍的に解析が進んだ遺伝情報や機能分子の集合体の理解をもとに、細胞内、細胞間、個体レベルの情報ネットワークの機能発現の機構、例えば生体情報に特徴的な非線形で動的な反応機構などを、新しい視点に立って解析を進めることによって生命システムの統合的な理解をはかる研究を対象とします。さらには、生体情報の発現の数理モデル化や新しい解析技術の開発など基盤技術の創成を目指した研究も対象としますが、生命現象の実験的解析と融合した研究を重視するものです。

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。

- 1) 選考は「生命システムの動作原理と基盤技術」領域に設けた選考委員10名と研究総括で行う。
- 2) 選考方法は、書類選考、面接選考及び総合選考とする。
- 3) 選考に当たっては、募集要項に示した選考基準を基本としたが、下記の点に特に留意した。

研究者は、論文数(過去の実績)ではなく、自らの研究であるか、将来性にかけることができるかを重視する。研究として同じレベルであれば女性研究者や地方大学・私立大学・企業に所属する研究者を採択したい。

4. 選考の経緯

一応募課題につき領域アドバイザー10名が書類審査し、書類選考会議において面接選考の対象者を選考した。続いて、面接選考および総合選考により、採用候補課題を選定した。

選 考	書類選考	面接選考	採択数
対象数	299 件	27 件	13 件

備考:

- 1) 平成 20 年度採択課題のうち、以下は今年度事後評価を実施しない。
 - ・白壁 恭子研究者
ライフイベントにより研究を一時中断し、終了年度がずれるため。
 - ・本田 賢也研究者、森田 美代研究者
内閣府の「最先端・次世代研究開発支援プログラム」への採択に伴い、同プログラムの規定により平成 23 年 3 月末をもって研究を終了したため。
- 2) 平成 19 年度採択課題のうち、小早川 令子研究者は、ライフイベントによる研究一時中断のため、今年度の評価対象とする。

5. 研究実施期間

平成 20 年 10 月～平成 24 年 3 月

6. 領域の活動状況

- 1) 領域会議: 7 回
- 2) CREST 公開シンポジウム(2010.6.1)ポスター参加
- 3) 研究報告会(公開): 1 回
- 4) 研究総括(または技術参事)の研究実施場所訪問:

研究開始時に、研究総括と技術参事、事務参事が研究者を訪問し、指導教授への本研究領域の説明、協力を要請した。本人からは、研究内容、設備、施設の状況の説明を受け、動機付け、進路、注意事項などを助言、指導した。その後、技術参事、事務参事が、異動の際や知財相談や大型機器納品など具体的な要件の度に、適宜、訪問し、支援した。

7. 評価の手続き

研究総括が研究者の研究終了報告会での報告、質疑応答、そして報告書・自己評価表を基に、アドバイザーの意見も参考にして行った。

(評価の流れ)

平成 23 年 12 月	研究報告会開催
平成 24 年 2 月	研究報告書提出
平成 24 年 3 月	研究総括による評価
平成 24 年 3 月	研究期間終了

8. 評価項目

- (1) 研究開始時の研究構想を基準に研究の達成度
- (2) 外部発表(学術論文、口頭発表など)、特許など研究成果の発信状況
- (3) 学術賞、学会招待講演、新聞記事発表など外部からの評価状況
- (4) 得られた研究成果の科学技術への貢献

9. 研究結果

研究者は、生命システムという新しい研究分野に、分子生物学、生体工学(ノックアウト、トランスジェニック)、電気生理学、行動科学、数理モデル解析、バイオイメージングなどの最新の基盤技術を駆使して、各課題の動作原理の探求とそれに用いる新しい基盤技術の開発を進めてきた。三期の研究者の対象は、植物細胞系(3)、胚発生(2)が主流となったが、神経、免疫、単細胞生物、細胞構成など、広範囲に及んでいる。米国、シンガポールに研究拠点を置く2名を含む研究者は、38名となり、アドバイザーの適切な助言やCREST研究者やさきがけ研究者間での横断的で、自由な情報交流により、生命システム全体としてネットワークができ、大きな成果を生む結果となった。海外に研究拠点を置く2名の研究者の影響も大きく、国際的に舞台を広げている。

○伊藤 寿朗 研究者

「植物分裂組織の再生システム」

花幹細胞の制御において、鍵となる遺伝子 KNUCKLES (KNU)を同定した。KNU の発現のタイミング制御に抑制的ヒストン修飾(H3K27me3)が寄与していることを示した。KNU 発現誘導のためのヒストン修飾の変化は細胞周期の進行に依存したものであることを示した。生化学的解析に基づき、上流転写因子 AGAMOUS と Polycomb complex との競合的作用モデルを提唱した。数理モデル解析により、遺伝子長とタイミング制御の相関モデルを構築した。KNU レポーターラインを構築し、細胞レベルでのイメージングを行った。細胞間の情報伝達にかかわるシグナル因子の解析として、候補となる植物ホルモンサイトカイニンの花メリステムにおける影響を調べた。

○岩楯 好昭 研究者

「アメーバ運動の伸長収縮システムを用いた生物リズムの解明」

細胞が、自分が基質に発揮する牽引力の反作用を自分で感知して、アメーバ運動のための前後極性や周期性を形成しているか、形成しているならその分子メカニズムはどのようなものであるのかを検討し、細胞性粘菌のアメーバ運動では、牽引力の反作用の大きなところに myosin II が集積すること、myosin II の集積しない方向に、運動のための前後極性が形成されること、さらに、この極性形成には myosin II の ATPase 活性は必要無いことを実験的に明らかにした。

○大杉 美穂

「母性因子依存的初期胚分裂の特異性と個体発生の保証機構の解明」

分裂終期の核膜再形成のタイミングに着目して、卵には母性因子として核膜形成タイミングを遅延させる因

子が個々の卵に異なる活性量で存在し、これが Kid 欠損時に高頻度に多核化するという母性因子依存的分裂期の特性の基盤のひとつであることを示した。この特性について、受精後の精子核に必須の大規模な変化（染色体の膨化、プロタミン放出、ヒストン取り込み等）が核膜形成以前に完了することを保証する生物学的意義があることを示した。

○小山 時隆

「植物の概日振動子の観測と相互作用の検出」

発光測定装置については、自動測定プログラム、発光色分離用フィルタチェンジャー制御、植物育成用条件変動の同期制御などを開発し、安定な概日リズムを示す発光レポーター系も確立し、単一細胞レベルの測定を可能にした。赤色光を出すルシフェラーゼと黄緑色のルシフェラーゼの活性をそれぞれ、フィルタで分離することを可能とした。これらの系を用いて、同一個体内で細胞概日振動子が脱同期する傾向を定量的に示した他、個体内の小さな領域単位では同期可能となる現象を見いだした。また、使用しているウキクサでは気孔開閉リズムがないことを示し、個体内の細胞概日振動子間に見られる同期現象は気孔によるガス交換リズムを介した間接的なものではなく、細胞間の直接的な相互作用による可能性を示唆した。

○小池 千恵子

「網膜 ON・OFF 回路基盤と視覚行動制御メカニズムの解析」

網膜 ON 型双極細胞の視覚伝達チャネルの本体が TRPM1 であることを明らかにした。TRPM1 と mGluR6 はともに ON 型双極細胞の視覚応答に必須であるが、KO マウスに関してのいくつかの相違点を明らかにした。網膜神経節細胞において、TRPM1 KO 網膜では ON 型応答が消失するのみでなく、特有のシグナルが検出される。TRPM1 KO マウスに関して視運動性応答(OKR)、光同調、自発運動活性、睡眠活動解析を行った結果、自発運動活性の高さのみが顕著な差として現れた。

○小早川 令子

「匂いに対する忌避行動を規定する神経回路の解明」

Cre-loxP システムを用いたジフテリア毒素遺伝子の選択的発現による部分的な嗅覚神経回路の除去マウスを用いて、背側の嗅覚神経回路によって匂い分子に対する忌避行動が先天的に制御されることを発見した。先天的な恐怖反応を制御する嗅覚神経回路の機能に着目して、既知の天敵の分泌物由来の匂い分子に比較して最大で10倍以上の Freezing 行動の誘発活性を持つ一連の人工物由来の匂い分子「恐怖臭」を発見した。「恐怖臭」によって誘発される匂いに対する先天的な恐怖は、既知の後天的な恐怖と共通する Freezing 行動とストレスホルモンの分泌に加え、様々な特徴的な生理指標の変化を伴う新たな生理反応であることを発見した。先天的な恐怖反応の制御に特異的に関与する複数の脳領域を同定した。

○佐藤 政充

「核・細胞質間コミュニケーションと微小管の連携機構の解明」

細胞が分裂しない時期(間期)には、微小管は細胞質に網目状に形成されて、物質の運搬や細胞極性の確立の役割を担い、分裂期には、微小管は紡錘体(スピンドル)微小管へとその姿を激変させる。つまり、間期では微小管は細胞質に形成され、核内には形成されない。この核内に任意の微小管結合タンパク質を強制局在させたときに微小管が形成誘導されれば、その因子は微小管を形成するために必要十分な因子であると仮説を立てた。こうして、特定の微小管結合タンパク質と中心体タンパク質を両者が相互作用した状態で核内に蓄積させると、核内に微小管が形成誘導されることを見いだした。これらが、微小管を形成するための最小限の因子であることを強く示唆するものである。

○鈴木 健一

「1分子追跡によるラフト量子化信号システムの解明」

細胞膜上で膜受容体を低発現させ高い蛍光ラベル効率(～95%)で1分子観察する手法を確立した。これより、受容体のモノマー、ダイマー、オリゴマーの比や反応の kinetics を手に取るように調べることが可能となった。ラフトプローブである GPI アンカー型タンパク質は、短寿命のホモダイマーを形成し、タンパク質相互作用によって誘起され、脂質相互作用により安定化されていることを発見した。これがラフトの最小ユニットだと考えている。さらに、受容体の高発現時、短寿命のホモオリゴマーも形成された。高速時間分解能 1 分子観察により、ダイマーやオリゴマーの入るラフトの大きさは、数 nm 以下と小さいことが推測された。リガンド刺激後オリゴマーは、他のラフト分子も集めて非常に安定になり、時々一時停留した際に、下流のシグナル分子を活性化し

た。このように細胞刺激前後におけるラフトがはたらく仕組みの一端が明らかとなった。

○鈴木 孝幸

「指の個性の決定メカニズムの定量発生生物学による解明」

実験発生学的手法と統計学的手法を組み合わせる超多細胞集団の動的な形の変化を3次元で定量的に計測する新しい手法を構築した。得られたデータを解析し、発生過程で特徴的な変形を起こす部位を時空間的に定量的に明らかにした。この変形が何のシグナルによって引き起こされるのかを阻害剤を用いた実験で明らかにした。ニワトリ胚を用いてエメラルドルシフェラーゼと赤色ルシフェラーゼの2色の発光レポーターを用いて SHH シグナルの強度を胚芽で直接可視化・定量化する実験系を構築した。特に注目していた親指領域特異的に発現する遺伝子を7つ単離した。

○鳥居 啓子

「植物表皮組織における気孔パターン形成の動的ネットワーク」

シロイヌナズナ芽生えの発芽過程における子葉の長時間タイムラプスイメージング法を確立した。本手法により、原表皮細胞から気孔が分化するまでの全過程を高精度解析ができるようになり、隣接細胞のシグナル動態を real time に観察、またレーザー殺傷法により動態を操作することが可能となった。イメージ定量解析ソフトを共同開発した。種々の蛍光タンパク質レポーターをもちいた計時イメージング解析から、気孔系譜の開始にいたるダイナミクスを明らかにした。具体的には、転写因子 SPCH(SPEECHLESS)と SCRM、および分泌性ペプチド EPF2 による、ネガティブフィードバック機構の存在を示した。さらに、気孔系譜を制御するリガンド-受容体ペアの同定に成功した。生化学的手法および in vitro 受容体バイオセンサーチップを開発し、EPF リガンド-ERECTA ファミリー受容体が高い親和性を持ち結合することを世界で最初に示した。これらの結果から、気孔系譜を制御するマスター転写因子と細胞間シグナル因子の制御階層の動態が明らかとなった。さらには、気孔分化の突然変異体を巧妙に利用することにより、気孔系譜の幹細胞(メリステモイド細胞)に特徴的な全遺伝子をプロファイルし、非対称分裂や気孔の分化に関与すると思われる新奇遺伝子を同定した。

○南野 徹

「細菌べん毛蛋白質輸送装置の動作機構の解明」

べん毛蛋白質輸送のダイナミクスを計測するため、3種類の蛍光を同時に観察できる高感度蛍光顕微システムを開発した。0.01pH ユニット差を有為に検出できる高感度 pH イメージング装置を開発した。野生株のサルモネラ菌および輸送ゲート複合体でもべん毛を構築できる変異株の輸送ゲート近傍に pH 感受性蛍光蛋白質を標識した後、高分解能 pH イメージング装置を用いて局所 pH を解析した結果、輸送ゲート複合体のみでもべん毛を形成できる変異株の輸送ゲート近傍の pH は野生株に比べて 0.1pH ユニット高いことが判明した。輸送ゲート複合体自体は、プロトン駆動力を構成する2つの成分、電位差とプロトン濃度差を、蛋白質輸送の異なる段階で明確に区別して利用していること、FliH、FliI および FliJ がともに働く野生株では、FliH-FliI 複体の助けによって FliJ が FliA と特異的に結合することにより、輸送ゲートは膜電位だけで駆動される高効率な輸送エンジンとして働くことが明らかとなった。

10. 評価者

研究総括 中西 重忠 財団法人 大阪バイオサイエンス研究所 所長

領域アドバイザー氏名(五十音順)

岡田 清孝	自然科学研究機構・基礎生物学研究所 所長
川人 光男 * 1	(株)国際電気通信基礎技術研究所 脳情報研究所 所長
郷 通子 * 2	情報・システム研究機構 理事
後藤 由季子	東京大学分子細胞生物学研究所 教授
近藤 滋	大阪大学 大学院生命機能研究科 教授
榊 佳之	国立大学法人 豊橋技術科学大学 学長
桜田 一洋	(株)ソニーコンピュータサイエンス研究所 シニアリサーチャー
笹井 芳樹	理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター グループディレクター
武藤 誠	京都大学 大学院医学研究科 教授
垣生 園子 * 3	順天堂大学 医学部 客員教授
平野 俊夫 * 4	大阪大学 総長

- *1 平成 18 年 6 月～平成 22 年 3 月まで参画
- *2 平成 18 年 6 月～平成 18 年 12 月まで参画
- *3 平成 19 年 3 月～参画
- *4 平成 18 年 6 月～平成 23 年 10 月まで参画

(参考)

(1) 外部発表件数

	国 内	国 際	計
論 文	4	61	65
口 頭	70	49	119
その他	9	0	9
合 計	83	110	193

※平成 24 年 3 月現在

(2) 特許出願件数

国 内	国 際	計
5	1	6

(3) 受賞等

- ・小山 時隆
文部科学大臣表彰若手科学者賞 (H22.4.13)
- ・大杉 美穂
文部科学大臣表彰若手科学者賞 (H22.4.13)
科学研究費補助金審査委員表彰 (H22.10.29)
- ・鈴木 孝幸
手島精一記念研究賞 (H23.2.23)
- ・鳥居 啓子
第5回 日本学術振興会賞「植物の気孔のパターン形成と分化のメカニズムの解明」(H20.3.9)
2010 Undergraduate Research Mentor Award, University of Washington (H22.5.21)
“HHMI-GBMF '15 most innovative plant scientists in the US”/HHMI investigator (H23.6.16)
Distinguished Professor of Biology, University of Washington (H23.10.1)
- ・佐藤 政充
Human Frontier Science Program (HFSP) Young Investigator Grant (2009) 受賞
文部科学大臣表彰若手科学者賞 (H24.4.内定)

(4) 招待講演

国際 10 件
国内 13 件

別紙

「生命システムの動作原理と基盤技術」領域 終了評価実施 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(平成24年3月末現在) (応募時所属)	研究費 (百万円)
小早川 令子 (兼任)	匂いに対する忌避行動を規定する神経回路の解明 (大阪バイオサイエンス研究所)	大阪バイオサイエンス研究所 室長 (さががけ専任研究者)	42
伊藤 寿朗 (兼任)	植物分裂組織の再生システム (テマセック生命科学研究所)	テマセック生命科学研究所 主任研究員 (同上)	40
岩楯 好昭 (兼任)	アメーバ運動の伸長収縮システムを用いた生物リズムの解明 (山口大学大学院医学系研究科)	山口大学 大学院医学系研究科 准教授 (同上 助教)	40
大杉 美穂 (兼任)	母性因子依存的初期胚分裂の特異性と個体発生の保証機構の解明 (東京大学医科学研究所)	東京大学 医科学研究所 准教授 (同上)	39
小山 時隆 (兼任)	植物の概日振動子の観測と相互作用の検出 (京都大学大学院理学研究科)	京都大学大学院理学研究科 准教授 (同上)	40
小池 千恵子 (兼任)	網膜 ON・OFF 回路基盤と視覚行動制御メカニズムの解析 (立命館大学薬学部)	立命館大学 薬学部 准教授 (大阪バイオサイエンス研究所研究員)	40
佐藤 政充 (兼任)	核・細胞質間コミュニケーションと微小管の連携機構の解明 (東京大学大学院理学系研究科)	(東京大学大学院理学系研究科) 助教 (同上)	40
鈴木 健一 (兼任)	1分子追跡によるラフト量子化信号システムの解明 (京都大学物質細胞統合システム拠点)	京都大学物質細胞統合システム拠点) 准教授 (JST さががけ研究者)	39
鈴木 孝幸 (兼任)	指の個性の決定メカニズムの定量発生生物学による解明 (名古屋大学理学部)	名古屋大学理学部 助教 (東北大学加齢医学研究所助教)	41
鳥居 啓子 (兼任)	植物表皮組織における気孔パターン形成の動的ネットワーク (ワシントン大学生物学部)	ワシントン大学生物学部 教授 (同上 准教授)	40
南野 徹 (兼任)	細菌べん毛蛋白質輸送装置の動作機構の解明 (大阪大学生命機能研究科)	大阪大学生命機能研究科 准教授 (同上 助教)	43

研究報告書

「匂いに対する忌避行動を規定する神経回路の解明」

研究期間：平成19年10月～平成24年3月

(ライフイベント; 平成22年4月1日～平成23年3月31日)

研究者：小早川 令子

1. 研究のねらい

情動とは嫌悪、恐怖、食欲、母性などの生存に欠かせない多様な本能を呼び起こす脳の働きです。適切な情動はヒトや動物の行動を生存に有利な方向へ動機付けるという役に立つ側面を持っています。その一方で、異常な情動は治療が難しい精神疾患を誘発してしまうという困った側面も持ち合わせています。本研究の目的は、脳が外界の情報の価値を判断して適切な情動や行動を誘発する未知のメカニズムを解明することです。この目的は心の原理の一つを説き明かすという科学的な挑戦であるという意味と、物質的に満ち足りた現代社会において寧ろ拡大する心の問題への対策法のイノベーションを創造するという2つの意味で重要です。

2. 研究成果

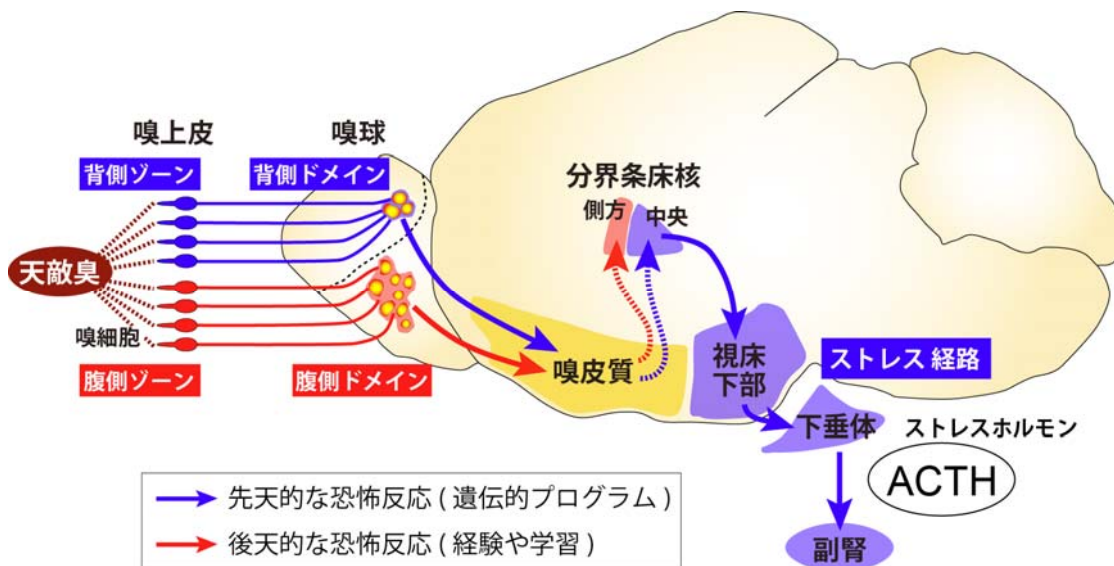


嗅覚系の匂い分子の種類に応じて多様な情動を誘発できるという特徴に着目して研究を進めました。マウスの鼻腔内にはゾーン構造、匂い情報が初めに伝達される脳の領域である嗅球にはドメイン構造が存在することが知られていました。私たちは、これらの構造の生物学的な機能を解明するために、一部のゾーンやドメインに対応する匂いセンサー細胞（嗅細胞）がジフテリア毒素遺伝子の作用で除去されるように設計した遺伝子操作マウスを作製しました。鼻腔内には背側ゾーンと腹側ゾーンがあります。この中で背側ゾーンのみを選択的に除去した「背側除去マウス」の匂い認識能力を解析したところ、腹側ゾーンの嗅細胞を用いて腐敗臭や天敵臭を正常に感知できるにもかかわらず、これら匂い分子に対する忌避行動を全く示さないことが明らかになりました。野生型マウスは天敵臭を嗅いだときに脳のストレス中枢が活性化し、血液中にストレスホルモンが分泌されます。しかし、背側除去マウスでは天敵臭を嗅いだときのストレス中枢の活性化や、ストレスホルモンの分泌が起こりませんでした。背側除去マウスであっても天敵臭や腐敗臭を嗅がせた後に、痛み刺激を与えると、後天的に匂いに対す

る忌避行動を学習できることが明らかになっています。従って、背側除去マウスは嫌だという感情そのものがなくなっているのではなく、嫌な匂いを嗅いだときに嫌だと判断することができなくなっていることが分かります。逆に、腹側の嗅覚神経回路を除去した腹側除去マウスでは腐敗物の匂いに対する先天的な忌避行動を示しました。

以上の実験結果から、背側ゾーンの嗅細胞によって腐敗臭が“嫌だ”や、天敵臭が“怖い”という情動判断が先天的に決まることが初めて明らかになりました。腐敗物にはカルボン酸やアルデヒドが含まれますが、これらの匂いは嗅球の背側-クラスⅠドメインという領域を活性化します。これに対して、天敵の匂いは嗅球の背側-クラスⅡドメインという領域を活性化します。背側クラスⅠドメインから始まる嗅覚神経回路によって腐敗臭に対する嫌悪反応、背側-クラスⅡドメインから始める嗅覚神経回路によって天敵臭に対する恐怖反応が制御されていると考えられました。腐敗臭も天敵臭も嫌な匂いであることに変わりはないように思われます。確かに、両方の匂いともにマウスは忌避行動を示します。しかし、脳のストレス中枢のひとつである分界条床核の活動領域を比較すると、腐敗臭に対する嫌悪と天敵臭に対する恐怖とは区別できることが明らかになりました。

匂いの好き嫌いには個人差が多いことなどから類推して、経験や学習によって後天的に決まると考えられてきましたが、この常識は覆されることになりました。写真は、背側除去マウスが恐れるそぶりも見せず子猫に近づいてしまう様子を示しています。匂い分子の持つ意味や価値の判断は脳の中枢部において初めてなされるのではないかと漠然と考えられてきましたが、鼻腔の内部の段階で既に意味や価値の決定の重要なプロセスが始まっていると考えられるようになりました。



天敵臭は背側ゾーンと腹側ゾーン双方の嗅細胞を同時に活性化させる。背側ゾーンから始まる青色の嗅覚神経回路は嗅皮質、ストレス中枢である分界条床核の中央領域視を經由して、床下部-下垂体-副腎経路を活性化する。この結果、血液中にストレスホルモンACTHが分泌される。腹側ゾーンの嗅細胞も天敵臭によって活性化されるが、匂いと報酬との後天的な学習などの異なる情報を脳へ伝達していると考えられる。

マウスなどの小動物にとってネコやキツネなどの肉食動物は天敵です。ネコの付けていた首輪や、キツネの糞に含まれる匂い分子であるトリメチルチアゾリンに対してマウスは恐怖

応答を示します。恐怖応答の一種に「竦(すく)み行動」があります。匂い分子を嗅いだときにすくんでいる時間の割合を計測することで、恐怖レベルを定量化することができます。これまで述べてきた天敵臭とはこのトリメチルチアゾリンのことです。しかし、これらの天敵由来の匂い分子によって先天的に誘発できる竦み行動のレベルは、電気ショックとの関連学習によって後天的に獲得した恐怖に比較するとずっと弱いことが知られていました。天敵の匂いは弱い竦み行動しか誘発できないので、実のところ、マウスは天敵の発する匂いを恐怖として認識しているのではなく、単なる嫌な匂いとして認識しているに過ぎないのではないかという議論が続いていました。なぜ、天敵臭は弱い恐怖応答しか誘発できないのでしょうか？これまでに発見されていない新しい匂い分子を用いることでより強い恐怖応答を誘発できるのでしょうか？

私たちは、先天的な恐怖応答を誘発する嗅覚神経回路を活性化する匂い分子を人工物匂い分子ライブラリーの中から探索しました。その結果、これまでに知られていた天敵臭に比較して最大で10倍以上も高い竦み行動の誘発活性を持つ一連の匂い分子群「恐怖臭」の発見に成功しました。これまでの研究では、自然物自体や、自然物の成分から生理活性を持つ匂い分子の探索が行われてきました。これに対して、私たちの成果は嗅覚神経回路の活性に基づくことで、人工物から極めて高い生理活性を持つ匂い分子が同定される可能性を示しているという点でも重要であると考えられます。

「恐怖臭」によって誘発された先天的な恐怖情動と、電気ショックとの関連学習によって後天的に獲得した恐怖情動の両者に伴う生理応答や、両者を制御する神経回路を比較解析しました。その結果、「恐怖臭」による先天的な恐怖は体温や心拍数が大きく低下するという性質を持つことから「冷たい恐怖」に例えられ、後天的な恐怖はこれらの変化が無いために「温かい恐怖」に例えられるというように、マウスには複数種類の恐怖応答が存在することが初めて明らかになりました。また、両者の恐怖は脳の異なる神経回路によって制御されていることも明らかになりました。

3. 今後の展開

さきがけ研究では匂いに対する恐怖や嫌悪などの忌避性の情動を制御する神経メカニズムの研究を主に実施しました。部分的に嗅覚神経回路を遮断した神経回路の改変マウスを用いた研究から、食欲、性、攻撃などの様々な種類の情動反応に関しても特定の嗅覚神経回路によって先天的に制御されている可能性が明らかになっています。今後は、匂いに対する誘因性を含む各種情動を制御する神経メカニズムの解明も進めたいと考えています。

「恐怖臭」は種類によって竦み行動などの恐怖応答の誘発レベルが異なっていることが明らかになっています。「恐怖臭」の化学構造は嗅覚受容体との結合特異性を規定していると考えられます。「恐怖臭」の発見によって、匂い分子の種類、嗅覚受容体との結合特異性、誘発される行動や情動の3者の相関関係を解析することが可能になりました。この相関関係の解析により、匂い分子の種類と特異的な情動や行動を結びつける未知の神経メカニズムを解明したいと考えています。

「恐怖臭」によって誘発される恐怖は繰り返し刺激によっても慣れることがありません。忘れることが困難な恐怖が引き起こすPTSD などの精神疾患の診断や治療薬の開発の新しい手段として活用できます。また、近年増加している野生獣による住居、倉庫、農地などへ

の被害を低減させる新たな忌避剤が開発できます。忌避剤に関しては様々な種類の有害野生動物に適応できる可能性が既に明らかになっており、実用化を急ぎたいと考えています。私たちの匂い研究から情動イノベーションが加速すると考えられます。

4. 自己評価

さがけ研究の目的は、脳が外界の情報の価値を判断して適切な情動や行動を誘発する未知のメカニズムを解明することでした。しかし、さがけ研究開始時点では先行研究も殆ど存在せず、研究戦略や方法論を構築するところから開始する必要がありました。私たちは、遺伝子操作の方法を応用して、嗅覚神経回路を部分的に除去した「神経回路の改変マウス」を作製し、その匂い認識能力を行動学、生化学、生理学の各種方法を総合的に用いて解析するという独自の方法を用いた研究方法を確立しました。この研究方法を使って、匂い分子に対する嫌悪と恐怖の応答が嗅球の背側ドメインのそれぞれ異なる領域から始まる嗅覚神経回路によって先天的に制御されていることを世界に先駆けて解明しました。続いて、ここで発見した先天的な恐怖応答を誘発する嗅覚神経回路の活性に着目して、極めて強力に先天的な恐怖応答を誘発する匂い分子「恐怖臭」を発見することにも成功しました。「恐怖臭」のバリエーションを用いて様々な強度で先天的な恐怖応答を誘発する技術を確立しました。この技術を用いて匂い分子による先天的と後天的な恐怖反応が異なる神経メカニズムにより制御されることを初めて明らかにしました。

これらの成果は、外界の情報と行動や情動との対応関係を解明する研究を、嗅覚系に着目して進める戦略や方法論の一つを示すと同時に、今後の研究を実行する際に必要となる道具立てを初めて整備したという点でも高く評価できると考えられます。さがけ研究の継続や、新たな共同研究の実施によって、脳の情報処理の原則を発見したいと考えています。

5. 研究総括の見解

部分的な嗅覚神経回路の除去マウスを用いて、背側の嗅覚神経回路によって匂い分子に対する忌避行動が先天的に制御されることを発見したことから、食欲、性、攻撃などの情動反応に関して特定の嗅覚神経回路によって先天的に制御されている可能性を示し、この分野の研究をリードしていることを高く評価している。応用面でも、PTSD などの精神疾患の診断や治療薬の開発や野生獣による住居、倉庫、農地などへの被害を低減させる新たな忌避剤が開発など、その拡がり大きく、楽しみにしている。

6. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. *Ko Kobayakawa, *Reiko Kobayakawa, Hideyuki Matsumoto, Yuichiro Oka, Takeshi Imai, Masahito Ikawa, Masaru Okabe, Toshio Ikeda, Shigeyoshi Itohara, Takefumi Kikusui, Kensaku Mori & Hitoshi Sakano (*equally contribution) "Innate versus learned odour processing in the mouse olfactory bulb" Nature vol450(7169),p503-508 (2007)
2. Imai T, Yamazaki T, Kobayakawa R, Kobayakawa K, Abe T, Suzuki M, Sakano H.

"Pre-target axon sorting establishes the neural map topography." Science (Article) 325, p585-590 (2009)
3. Matsumoto H, Kobayakawa K, <u>Kobayakawa R</u>, Tashiro T, Mori K, Sakano H and *Mori K. "Spatial arrangement of glomerular molecular-feature clusters in the odorant-receptor-class domains of the mouse olfactory bulb." J Neurophysiol. Vol.103, p3490-3500 (2010)
4. Haga S, Hattori T, Sato T, Sato K, Matsuda S, <u>Kobayakawa R</u>, Sakano H, Yoshihara Y, Kikusui T, and *Touhara K. "The male mouse pheromone ESP1 enhances female sexual receptive behavior through a specific vomeronasal receptor." Nature 466, p118-122 (2010)
5. *Yokoyama T K, Mochimaru D, Murata K, Manabe H, Kobayakawa K, <u>Kobayakawa R</u>, Sakano H, Mori K, and Yamaguchi M. "Elimination of adult-born neurons in the olfactory bulb is promoted during the postprandial period. Neuron 71(5) p883-897 (2011)

(2)特許出願

研究期間累積件数: 4件

① 発明者: 小早川令子(70%), 小早川高(30%)

発明の名称: 体重調節作用を有する物質の検出方法および不安行動に影響を及ぼす物質の検出方法ならびにそれらに使用する動物

出願人: JST(100%)

出願日: 2008/07/09

他3件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物等)

学会発表

1. 小早川高、伊早坂智子、小早川令子

第34回日本神経科学大会シンポジウム”Molecular and Neural Mechanisms of Chemosensory Information Processing”(2011.9.17)

「Neural mechanisms controlling innate and learned fear responses」

2. 小早川令子

第30回分子病理学研究会(2011.7.23)

「哺乳類の脳が多様な情動を生み出す神経メカニズム～猫を怖がらないネズミが教える心の仕組み」

3. 小早川高、小早川令子

第33回日本神経科学大会ISNシンポジウム「不情動の生物学的基盤: 生得的回路と獲得的回路」(2010.9.3)

「Innate versus learned odor processing in the mouse olfactory bulb」

4. 小早川令子、小早川高

第83回日本薬理学会年会(ランチョンセミナー)(2010.3.16)

「哺乳類の脳が匂いに対する忌避行動を引き起こすメカニズム～猫を恐がらないマウスが教え

る心の仕組み～」

5. 小早川高、小早川令子

第 32 回日本分子生物学会年会 (2009.12.9)

「Neural mechanisms to control odor evoked emotions and behaviors」

受賞

1. 第 10 回バイオビジネスコンペ JAPAN 最優秀賞 (2010)

「神経回路の機能に基づいて哺乳類の本能情動を制御する機能性匂い分子の開発」

2. 第一回湯川・朝永奨励賞 (2008)

「哺乳類の匂いに対する行動を先天的に決める神経細胞の発見」

著書

1. 小早川高、小早川令子

「嗅覚系による情動や行動の制御メカニズム」 Annual Review 神経 2011, p35-41 (2011)

2. 小早川高、小早川令子

「匂いに対する先天的な恐怖反応を制御する嗅覚神経回路の発見」

生化学みにれびゅう vol.83, p23-28 (2011)

3. 小早川高、小早川令子

「嗅覚の分子機構」 Clinical Neuroscience, vol.28, p1247-1250 (2010)

4. 小早川高、小早川令子

「匂いに対する情動や行動を先天的に制御する神経回路の発見－構造生物学と行動生物学の遠くて近い関係」 入門 構造生物学, p178-184 (2010)

5. 小早川高、小早川令子

「哺乳類の匂いに対する情動を先天的に制御する神経回路の発見」

医学のあゆみ, vol.232, no.1, p53-60 (2010)

研究報告書

「植物分裂組織の再生システム」

研究期間：平成 20 年 10 月～平成 24 年 3 月

研究者：伊藤 寿朗

1. 研究のねらい

複雑な多細胞生物体の生命システムも、元々はわずかな数の幹細胞から始まる。本研究は、動物と比べて高い可塑性をもつ植物細胞を研究対象とし、その幹細胞の制御機構を理解することをねらいとして研究を進めてきた。植物は人類にとってかかせないものであるが、その生長がどのように制御されているのか― 単一細胞からの再生能、分化転換、そしてその過程における細胞間の情報伝達―については未だ、ほとんど明らかにされていない。これは、植物分裂組織を遺伝学および生化学の両面から解析できる実験系がなかったことにも起因している。本研究は、モデル植物シロイヌナズナにおいて蓄積している遺伝学的解析に併せて、複数の花が同調した発生過程を示すトランスジェニック植物体を用いた生化学的解析、さらには数理生物学的なアプローチも用いることで、植物分裂組織の維持・再生システムを解明することを目指した。

2. 研究成果

植物は一生を通して、常に幹細胞を維持しており、その成長は幹細胞の絶え間ない増殖と分化のバランスに支えられている。茎や根においては、幹細胞活性は常に維持されているが、一方、生殖器官である花においては、ある一定数の花器官が作られた後、幹細胞活性は抑制される。

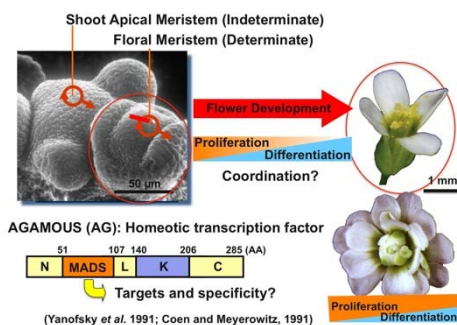


図. シロイヌナズナの花発生
野生型の花（上）とアガマスホメオティック突然変異体（下）とその原因遺伝子 AGAMOUS (AG)

花のマスター制御因子である AGAMOUS (AG) タンパク質は生殖器官の分化方向の決定および、花の幹細胞活性の抑制にかかわっており、その突然変異体は雄しべ、雌しべが多数のガク片、花弁に置き換えられるというホメオティックな変異を示す（レビュー Ito, Current Opinion in Plant Biology 2011）。AG は遺伝学的解析から導かれた ABC モデルの C クラス遺伝子であり、MADSドメインと呼ばれる DNA 結合領域を持つ進化的にも保存された転写因子をコードしている。しかし、遺伝学的解析からは、AG がどのような下流遺伝子を制御しており、さらにはどのようにして、花発生過程の増殖と分化のバランスを制御しているのかは、つい最近まで明らかにされていなかった。我々は AG の活性誘導系を確立し、ゲノミクス、逆遺伝学、生化学的手法を組み合わせることで、AG 下流の遺伝子カスケードを解明した。

1) AG による花幹細胞の制御

花発生過程において、幹細胞の増殖と分化のバランスは種特異的な花器官の数や大きさに、

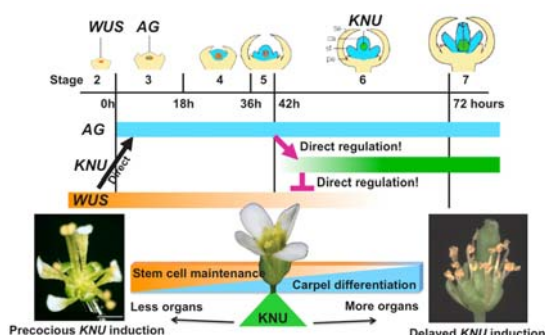


図. 花発生過程における幹細胞の増殖制御にかかわる *AG*, *KNU*, *WUS* による転写カスケード。*KNU* の早期発現により花器官の数は減少し、逆に遅延により、器官数が増大する。

影響をおよぼす。近年、我々のグループでは遺伝学的、逆遺伝学的および生化学的手法により、*AG* の下流において、*KNUCKLES* (*KNU*) と呼ばれる Zinc Finger モチーフを持った核タンパク質が花幹細胞の制御において、重要な役割を果たすことを示した (Sun et al., Genes & Development 2009)。*KNU* は *AG* の直接のターゲット遺伝子であり、かつ幹細胞の決定因子であるホメオボックスタンパク質である *WUSCHEL* (*WUS*) の上流の抑制因子として機能する。さら

に、*KNU* の発現のタイミングは幹細胞の増殖と分化のバランスを適性に保つのに重要であることを示した (Sun et al., Genes & Development 2009)。

2) AG による下流遺伝子の時期特異的な制御機構

ホメオティックタンパク質の下流には数千を超える遺伝子カスケードが時空間特異的に制御さ

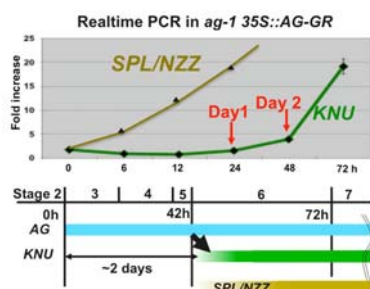


図. (上) *AG* 誘導系において、異なった誘導タイムコースを示す 2 つの *AG* ターゲット遺伝子 *SPL/NZZ* と *KNU* の Realtime PCR 解析
(下) 花発生過程における *AG*, *SPL/NZZ* と *KNU* の発現パターン

れていると予想されるが、実際にその特異性をもたらす機構についてはほとんど分かっていない。我々は花発生過程において同時期に誘導される *AG* の 2 つの直接のターゲット *SPL/NZZ* (Ito et al., Nature 2004) と *KNU* (Sun et al., Genes & Development 2009) が異なった機構により、誘導されることを見いだした。*SPL/NZZ* は *ag* 突然変異体バックグラウンドにおいて、本来誘導されるステージに *AG* 活性を誘導すると即座に転写が上昇したが、一方、*KNU* は *AG* 誘導後、本来のタイムラグである 2 日間を経た後、誘導された (Sun et al., Genes & Development 2009)。これは 2 つの遺伝子が *AG* により、異なった制御を受けていることを示している。*SPL/NZZ*

は *AG* 活性に非依存的にもたらされる花発生の時期特異的な「場」が必要なのにに対し、*KNU* の誘導には *AG* 依存の 2 日間のタイムラグを必要とすると考えられる。

我々は、花発生の同調系を活用し、その原因遺伝子を誘導系とすることにより、発生時期に特異的な生化学的解析を行うことで、*KNU* の転写誘導タイミングの制御には、*AG* 依存的に起きるヒストンの抑制的マーク (H3K27me3) の変化が重要な役割をはたしていることを明らかにした (Sun et al., Genes & Development 2009)。さらに、細胞周期の阻害剤や細胞周期の促進効果のある植

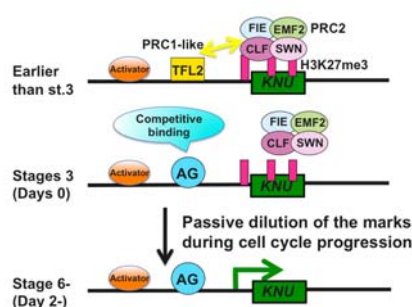


図. AG とポリコムタンパク質との競合的結合にもとづく *KNU* 遺伝子の時期特異的な発現調節機構のモデル。AG が *KNU* プロモーターに結合することによって、ポリコムタンパク質が結合できなくなり、細胞分裂を経ることにより、ヒストンの抑制的マークが希釈

物ホルモン処理による解析から、ヒストンの修飾変化には細胞周期の進行が必要であることを見出した（投稿準備中）。さらに、*KNU* 発現の誘導は、ヒストン修飾の確立と維持にかかわる Polycomb repressive complex (PRC) の因子と AG との *KNU* プロモーターにおける競合的な結合により制御されているという知見を得ている（投稿準備中）。つまり、時間的制御にかかわる抑制的ヒストンマークは、AG の結合によって維持されなくなること、細胞分裂によって希釈されることにより、除去されていくと考えられる。以上、植物幹細胞における発生時間の制御には、細胞周期とヒストン修飾を用いた新しい制御機構があることを明らかにした。

3. 今後の展開

まずは、今回明らかにした細胞周期とヒストン修飾を用いた新しい発生時間の制御機構を別の細胞系にて再現することを目指す。具体的には、細胞周期を同調可能な動植物の培養細胞系を用いて、制御系の再構築および、イメージング解析を行う。

さらにこれまでの生化学的解析の解像度を上げることで、幹細胞とそのまわりの細胞において別々に、分子レベルでの解析を行っていききたい。これによりヒストンの修飾から個々の細胞の積み重ねによって決定される下流遺伝子の発現制御、および細胞間の情報伝達の機構、さらには組織、器官レベルでの調和の取れた形作りにいたるまでの統合的理解を目指したい。

4. 自己評価

本研究提案を行うにあたって、柱の一つとして考えていたトランスジェニックシロイヌナズナによる花再生誘導系は、継続的な試行錯誤にもかかわらず、その形質の不安定性のために、当初計画していた遺伝学的、生化学的解析に用いることが出来なかった。一方、花の幹細胞の増殖制御にかかわるホメオティック遺伝子 *AGAMOUS* の下流カスケードの解析を通した幹細胞制御機構の解析から、まったく新しい発生時間の制御機構を明らかにすることができた。さきがけ研究を通して、生物研究の広い分野での知見を得ることができ、さらにそこで培った人脈を通して、数理生物学的解析の共同研究も行うことが出来た。これらの新しい知見は、自分のこれまでの研究人生のマイルストーンの一つとなるべく、現在、投稿準備中である。

5. 研究総括の見解

花発生過程の花幹細胞の制御において、鍵となる遺伝子 *KNUCKLES* (*KNU*) を同定し、さらに、*KNU* の発現のタイミング制御に抑制的ヒストン修飾 (*H3K27me3*) が寄与していることを示した。生化学的解析に基づき、上流転写因子 *AGAMOUS* と Polycomb complex との競合的作用モデルを

提唱するなど、植物分裂組織の維持・再生システムの解明に大きな貢献をしつつある。現在の研究拠点のネットワークを活かし、国際的な視野で、研究活動の益々の進展を期待します。

6. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Sun, B., Xu, Y., Ng, K-H. and Ito, T. (2009) "A timing mechanism for stem cell maintenance and differentiation in Arabidopsis floral meristem." *Genes & Development* 23: 1791-1804 (Cover issue)
2. Ng, K-H., Yu, H. and Ito, T. (2009) "AGAMOUS controls GIANT KILLER, a multifunctional determinant of reproductive organ patterning and differentiation." *PLoS Biology* 7 (11): e1000251 (1-17, Featured image of Nov issue)
3. Das, P., Ito, T., Wellmer, F., Vernoux, T., Dedieu, T., Traas, J., Meyerowitz, E. M. (2009) "Floral stem cell termination involves the direct regulation of *AGAMOUS* by *PERIANTHIA*." *Development* 136: 1605-1611
4. Liu, X., Huang, J., Parameswaran, S., Ito, T., Seubert, T., Auer, M., Rymaszewski, A., Jia, G., Owen, H. A., and Zhao, D. (2009) "The *SPOROCTELESS/NOZZLE* Gene Is Involved in Controlling Stamen Identity in Arabidopsis." *Plant Physiology* 151: 1401-1411
5. Li, D., Liu, C., Shen, L., Wu, Y., Chen, H., Robertson, M., Helliwell, C. A., Ito, T., Meyerowitz, E.M. and Yu, H. (2008) "A Repressor Complex Governs the Integration of Flowering Signals in Arabidopsis." *Developmental Cell* 15: 110-120

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 0 件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物等)

主要な学会発表

1. Meyerowitz' 60th Birthday Symposium, California Institute of Technology, Pasadena, USA, Invited speech, May 23, 2011
2. Plant Development of the III Brazilian Meeting on Plant Molecular Genetics, Brazil, Keynote speech, Apr 11, 2011
3. Cold Spring Harbor Conferences Asia, From Plant Biology to Crop Biotechnology, Suzhou, China, Invited speech, Oct 26, 2010
4. FASEB Summer Research Conferences Mechanisms in Plant Development, Saxtons River, Vermont, USA, Invited speech, Aug 16, 2010
5. 32nd Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, Yokohama, Japan, Invited speech, Dec 10, 2009
6. Global COE International Symposium "Explore, Exchange, Innovate-A glance at the leading researches in Bioscience-Nagoya Univ, Japan, Keynote speech, Nov 17, 2009

著作 総説

Ito, T (2011) “Coordination of flower development by homeotic master regulators.”, *Curr Opin Plant Biol*, 14: 53–59

研 究 報 告 書

「アメーバ運動の伸長収縮システムを用いた生物リズムの解明」

研究期間：平成20年10月～平成24年3月

研 究 者：岩 楯 好 昭

1. 研究のねらい

アメーバ運動は神経ネットワークの形成や白血球の遊走など生命活動に不可欠な細胞の機能である。細胞は外部に誘引物質が無くても自律的に運動することができる。運動をするためには、運動方向を決める前後の極性や、前端的伸長と後端的収縮の協調などの秩序を、何もない条件から生み出していることになる。細胞はアメーバ運動という秩序をどういうメカニズムで自律的に形成しているのだろうか？この大きな目標に向かう本研究の具体的なねらいは

(A)細胞の前後極性はどのように決まるのか？

(B)前端的伸長と後端的収縮の周期性はどのように決まるのか？

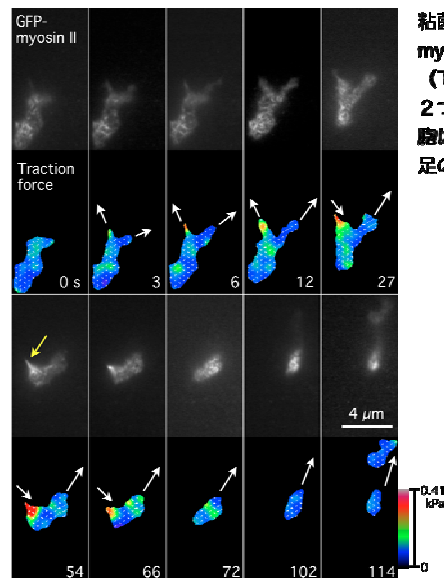
という2点を明らかにすることであった。

2. 研究成果

細胞は、外界に誘引物質が無くても、自ら前後の極性を創りアメーバ運動できる。このとき、細胞の受け取り得る情報は、自らが地面に及ぼす牽引力の反作用の力のみである。だとすれば、細胞は自分で地面に探りをいれ、その反作用の力の細胞全体でのバランスを計算して、極性を創り出し運動方向を決めていることになる。もしそうならば、これは根源的なアメーバの極性形成機構であるといえる。

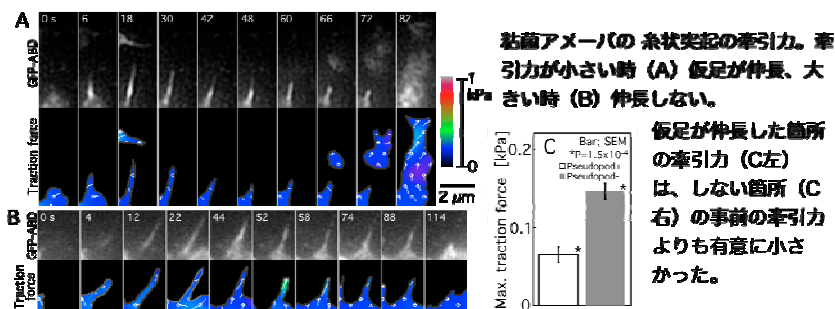
細胞のアメーバ運動では、前端的伸長がアクチン重合によって起こり、後端的収縮は、後端に集積したミオシンⅡがもともと後端に存在するアクチン網目構造に結合してできるアクトミオシンの収縮によって起こることが知られている。

牽引力とアメーバ運動の前後極性形成との関係を調べるため、我々はまず、細胞性粘菌アメーバの生細胞を用い、細胞の発揮する牽引力と動力源の一つであるミオシンⅡの細胞内動態を同時に観察した(下図)。粘菌アメーバは左右に同時に仮足を伸長させ、左の仮足は大きな牽引力を基質に発揮した一方、右の仮足は牽引力を発揮しなかった。その後細胞は左の仮足にミオシンⅡを集積させ、右の仮足の方向に進行した。これは、細胞が牽引力の小さい方向を前とした前後極性を形成することと、この前後極性形成にはミオシンⅡが関与していることを示唆している。



粘菌アメーバの GFP-myosin II (上) と牽引力 (下) の同時観察。同時に2つ出した仮足のうち、細胞は牽引力の小さい右の仮足の方向に進行した。

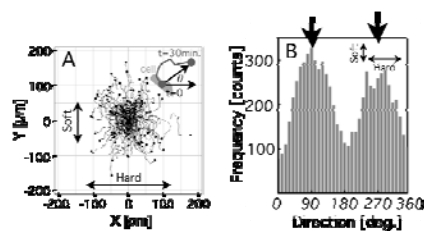
細胞が牽引力の小さい方向を前とした前後極性を形成するならば、細胞は牽引力の大きい方向よりも小さい方向に仮足を伸長させる頻度が高いはずである。そこで、牽引力の大きさと仮足の伸長の関係を定量的に検討した。粘菌アメーバが基質に向かって突出させた糸状突起の牽引力の大きさとその後同じ箇所での仮足の伸長の有無を調べてみると(下図)、牽引力が小さな箇所での仮足の伸長の頻度は大きな箇所での頻度よりも有意に高いことがわかった。



粘菌アメーバの糸状突起の牽引力。牽引力が小さい時 (A) 仮足が伸長、大きい時 (B) 伸長しない。

仮足が伸長した箇所の牽引力 (C左) は、しない箇所 (C右) の事前の牽引力よりも有意に小さかった。

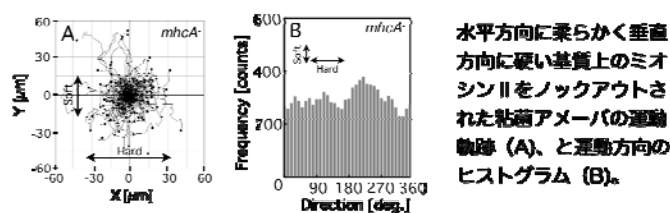
細胞が牽引力の小さい方向を前にした前後極性を作るならば、もし、硬さに方向性のある基質の上を細胞にアメーバ運動をさせれば、細胞は基質の柔らかい方向に進むはずである。ある方向に柔らかく、その方向とは垂直な方向には硬い基質を作成し、この上を粘菌アメーバに這わせてみた。すると粘菌アメーバは予想通り基質の柔らかい方向に進行した(下図)。



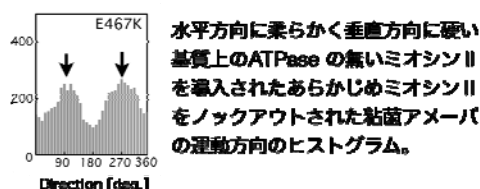
水平方向に柔らかく垂直方向に硬い基質上の粘菌アメーバの運動軌跡 (A) と運動方向のヒストグラム (B)。

先に述べたようにこの極性形成にミオシン II が関与しているかどうかを検討するために、ミオシン II をノックアウトされた粘菌アメーバをこの基質の上に載せ運動を観察したところ、細胞の

運動方向に方向性は見られなかった(下図)。



牽引力による細胞の前後極性形成に、ミオシン II が牽引力に応じて集合することのみが必要なのか、あるいは、アクトミオシンとして収縮することが必要なのかを調べるために、ATPase のない改変ミオシン II を導入されたミオシン II をノックアウトされた粘菌アメーバを、硬さに方向性のある基質の上で運動をさせた。細胞は基質の柔らかい方向に運動した(下図)。これはミオシン II のアクトミオシンとしての収縮が極性形成に必要ない事を示している。



以上の実験結果を踏まえた細胞のアメーバ運動の牽引力に基づく極性形成の仮説は、以下のようになる。

- (1) 細胞はランダムに牽引力を発揮する。
- (2) 牽引力の大きな箇所にミオシン II を集積させる。
- (3) ミオシン II はその後の仮足の形成を抑制する。この抑制には ATPase は必要ない。
- (4) (1) ~ (3) を時々刻々繰り返すことで運動の前後極性を形成する。

上記の実験はこの仮説を示唆するものではあるが、証明してはいない。この仮説を実験的に直接証明するのは難しいので、細胞が牽引力の小さい方向に運動することが物理現象としてありえるかどうか、数理モデルを作成し検討した。牽引力にある閾値を設定し、細胞のある箇所の牽引力がその閾値を超えると、その箇所が基質から脱着する、という条件をモデルに導入すると、計算機上で細胞は牽引力の小さい方向に運動した。牽引力の大きさで細胞が基質から脱着するというのは実験事実と合致しているので、この数理モデルは、細胞が牽引力の大きい方向に進むことがあり得ることを示唆している。

外部に誘引物質等のない状況でのアメーバ運動はアメーバ運動の最も根本的な機構である。本研究では、細胞自身の牽引力に注目し、細胞がそれを自分で反作用として受容し前後極性を形成する仕組みを明らかにした。

3. 今後の展開

本研究で作成した数理モデルのなかのパラメータは実験的に得られたものではない。牽引力の大きさと集積するミオシン II の量の関係などを定量的に測定し、パラメータを求め、モデルの正当性を検討しなければならない。さらに、自己の牽引力による細胞の前後極性形成機構が粘菌アメーバだけのものではなくて、他の細胞も含めたアメーバ運動の根本的な原理であることを確かめるため、白血球(好中球)や魚類ケラトサイトなど、他のアメーバ運動する細胞の運動も

詳細に調べていかなければならない。

4, 自己評価

研究の狙いで述べた、

(A)細胞の前後極性はどのように決まるのか？

(B)前端の伸長と後端の収縮の周期性はどのように決まるのか？

のうち、残念ながら、(B)についてはうまくいかなかった。しかし(A)については研究の大きな進捗をみた。おしむらくは、期間内に数理モデルに定量的な実験データに基づくパラメータを代入するところまで進行出来なかったことと、そのために、論文の投稿(現在投稿中と投稿直前で準備中)や特許の出願(現在出願直前で準備中)が遅れてしまったことである。今後、実験材料を粘菌アメーバだけでなく、白血球(好中球)などに拡張できれば、研究の幅が大きく広がると共に、その重要性も高まるだろう。

5, 研究総括の見解

細胞性粘菌のアメーバ運動では、牽引力の反作用の大きなところに myosin II が集積すること、myosin II の集積しない方向に、運動のための前後極性が形成されること、さらに、この極性形成には myosin II の ATPase 活性は必要無いことを実験的に明らかにし、細胞が牽引力の反作用を受容して、前後極性を形成する仕組みを解明した。今後、様々な細胞のアメーバ運動が同じメカニズムで、説明できるモデルの提唱を期待します。

6, 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. Uyeda TQP, Iwade Y, Umeki N, Nagasaki A, Yumura S (2011) Stretching Actin Filaments within Cells Enhances their Affinity for the Myosin II Motor Domain. PLoS ONE Vol.6: e26200.
2. Iwade Y, Okimura C, Sato K, Nakashima Y, Minami K Myosin II Mediated directional migration of *Dictyostelium* cells in response to cyclic stretching of substratum (Submitted).
3. Iwade Y, Sakumura Y, Okimura C, Hiratsuka Y. Polarity generation for cell migration by their own traction forces (In Preparation).

(2)特許出願

研究期間累積件数:1件
(非公開)

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物等)

招待講演

岩楯好昭 アメーバ運動の“力”による自律的な前後極性形成 第1回粘菌学会 2011 年
11月 大阪大学

Iwade Y. A possible mechanism of traction forces and directional migration in
Dictyostelium cells. MBI seminar. 2011 年9月 National University of Singapore

岩楯好昭 アメーバ運動の力と極性形成の機構 日本分子生物学会 ワークショップ テ
ーマ名: 細胞が感じる力と生み出す力 2010 年12月 神戸ポートピアホテル
岩楯好昭 アメーバ運動の力計測と力受容による運動方向の決定 定量生物学の会第
二回年会 2010 年1月 大阪大学

研究報告書

「母性因子依存的初期胚分裂の特異性と個体発生の保証機構の解明」

研究期間：平成20年10月～平成24年3月

研究者：大杉 美穂

1. 研究のねらい

動物が生まれ、育ち、命を次世代へとつなぐ過程において、個体内では二つの様式の細胞分裂、体細胞分裂(mitosis)と減数分裂(meiosis)によって染色体分配による遺伝情報の伝達と細胞の増殖が行われている。多くの動物では、次世代の生命は減数分裂を経てつくられた卵と精子の受精により始まる。従来の研究から、哺乳動物におけるこの生命の始まりの時期、すなわち減数分裂から体細胞分裂への転換期には、そのどちらとも異なる性質を示す“母性因子依存的分裂”と呼ぶべき染色体分配・核形成機構が存在することが示唆された。

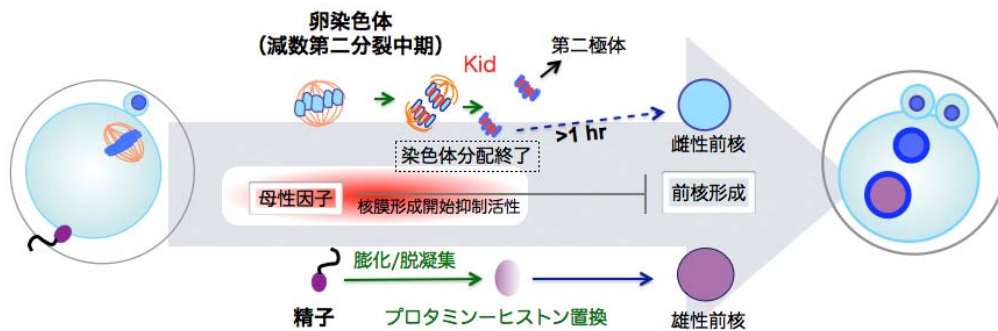
本研究のねらいの1つは、この哺乳動物の母性因子依存的分裂期の特異性の詳細とその分子基盤を紡錘体形成、染色体運動、核形成という各ステップに着目して明らかにし、更にその特異性が、胚ゲノムからの遺伝子発現に依存した体細胞分裂への転換とその後の正常な個体発身に果たす生物学的意義を明らかにすることである。また、母性因子依存的分裂期は哺乳類以外の動物にも存在するが、脊椎動物の中でも母親の胎内で発生が起こる哺乳動物と受精後の発生が体外で急速に進むカエルなどではその回数も特徴も大きく異なる。しかし、特に哺乳動物に関する知見は乏しく、相違に関する具体的な知見はごく限られた観察結果に基づいたものしかない。本研究の第2のねらいは哺乳動物についての知見を深めることにより、母性因子依存的分裂の種を超えた普遍性と哺乳動物の特異性を明らかにし、その成果を第1のねらいに還元することにある。

2. 研究成果

＜母性因子依存的分裂期の核膜形成保証の意義の解明＞

本研究では、微小管や染色体などの分裂装置や核膜を可視化したマウス卵、初期胚のライブイメージング観察を中心とした手法により、主に分裂後期／終期の分裂期進行を解析した。母性因子の影響をもっとも強く受ける受精直後の前核形成期に着目した研究から、マウス卵には母性因子として、染色体分配後におこる核膜再形成の開始タイミングを遅延させる活性が存在し、これが母性因子依存的分裂期の特性のひとつであることを明らかにした。さらに、母性因子として核膜形成遅延活性をもつ生理的意義は、受精後の精子核に起こる大規模な変化(染色体の膨化、プロタミン放出、ヒストン取り込み等)が終了するまで核膜形成が開始しないことを保証する点にあることを示す知見を得た。

核膜形成遅延活性は精子核からの雄性前核形成には重要なものであるが、卵染色体からの雌性前核形成過程においては、不都合なものであると考えられる。実際、卵の染色体は減数第二分裂後期における分配運動終了後約1時間ものあいだ、核膜に覆われることなく細胞質に存在しつづけていた。マウス初期胚における核形成に関して、私たちは以前にKid/kinesin-10による分裂後期染色体の一塊化(分裂後期染色体コンパクション)活性が重要であることを見出ししていた。すなわち、Kid欠損マウスの初期胚は、受精後数回の分裂後の核



形成時にのみ、染色体のまとまりが悪く多核を生じるが、雌性前核は特に多核化度合いが高く、ひとつにまとまるべき雌性前核が5個以上に分割される例が頻発する。このことは、Kid による染色体コンパクション活性の重要性が雌性前核期形成には特に高いことを意味する。その理由は不明なままであったが、本研究により、雌性前核形成前の分裂後期／終期は他の分裂期に比較して格別に長いため、分配後の染色体が散逸しないようにする Kid の活性がより重要であることが明らかになった。実際、雌性前核形成時の核膜形成開始タイミングを早めた場合、Kid 欠損時に雌性前核が多核になる頻度や多核度合いは顕著に低下した。

<考察>

前核形成時の核膜形成開始が非常に遅いという現象は、カエルなど体外で胚発生する生物では報告されておらず、哺乳動物特有のものであると考えられる。逆に、両生類や魚類の卵割分裂時には核膜形成開始は体細胞分裂時に比べ早いことが知られている。このことは、分裂後の核がどのような性質をもつか、ということと密接に関連していると考えられる。両生類や魚類の卵割分裂は、間期が存在しない非常に早い細胞周期中にある。早期の核膜形成開始は早期のDNA複製開始のためと考えられており、つくられた核では転写は起こらず、DNA複製のみが起こっている。一方、哺乳動物、特にマウスの場合、前核期から転写が起こることが知られており、前核はDNA複製のみならず転写／翻訳が可能な状況でなくてはならない。更に受精は細胞周期上異なる相にある2つの細胞(減数分裂中期の卵と減数分裂完了後の精子)が融合する事で始まる。そのような特殊な細胞内状況下で異なるプロセスを経る必要のある雌雄の染色体が機能的な前核を形成するために、マウス卵は母性因子として分裂期を特殊制御する機構をもっているのではないだろうか。

3. 今後の展開

前核形成時期特異的な核膜形成タイミングの遅延がどのような分子機構によって成されているのか、母性因子としての核膜形成遅延活性の本体の解明に取り組む。また、細胞種、動物種によって分裂期にどのような多様性があり、その多様性はどのような分子機構によってなされているのかなど、本研究の最終目的であった、「染色体分配システムの共通基盤」の解明に向けた取り組みを続ける。

4. 自己評価

本研究により、受精後最初の核形成である前核形成期に特徴的な現象および、その生理的意義が明らかにできた点、また、これがマウスでは見られるがカエル等では見られないことの意義も考察できる現象であったことから、当初の目標の6割は達成できたと考えている。しかし、染色体運動、紡錘体形成に着目した研究については、公開できるまでの成果を出すには至らず、核形成に関して見出した上述の現象の分子メカニズム解明とともに今後の課題として残された。また、研究当初は母性因子依存的分裂期として受精後におこる卵減数第二分裂後期から第2卵割期のあたりまで共通に見出される特徴、現象が存在することを仮定していたが、今のところ前核形成とそれ以降の卵割分裂期における核形成には共通の特徴は見出せていない。しかし、このことは同じ大きさの細胞(卵と一細胞期胚)の中で、核内ゲノムからの転写が限定的にしか起きていない状況下にあるにも関わらず、大きく異なる特徴を示す分裂期が進行することを意味しており、このことを可能にする分子基盤の解明も今後の課題としたい。

5. 研究総括の見解

分裂終期の核膜再形成のタイミングに着目して、卵には母性因子として核膜形成タイミングを遅延させる因子が個々の卵に異なる活性量で存在し、これが Kid 欠損時に高頻度に多核化するという母性因子依存的分裂期の特性の基盤のひとつであることを示す大きな成果を見出した。このように、独自の着眼点から、哺乳動物の母性因子依存的分裂期の特異性を、生物学的に、丁寧に一つ一つ明らかにしていくことを期待します。

6. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

投稿準備中

(2)特許出願

なし

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物等)

<学会発表(招待講演)>

*“受精直後のマウス卵における染色体動態と核膜形成の特殊性” 第84回日本生化学会大会 (2011.9)

*“Regulation of multifunctional mitotic motor Kid/Kinesin-10” 第63回日本細胞生物学会大会 (2011.6)

*“核膜再形成タイミングの可視化でわかったマウス初期胚の特性” 平成23年度生化学会関東支部例会 企画講演 (2011.6)

*“マウス卵における減数第二分裂後期の染色体分配と前核形成の特性” 第32回日本分子生物学会年会 (2009.12)

* “Female pronuclear formation in mouse oocytes requires Kid-mediated telophase chromosome clustering” International Symposium on Chromosome Cycle and Genome Dynamics (2009.10)

* “マウス初期胚における染色体分配と核形成の特性” 第82回日本生化学会大会
(2009.10)

* “哺乳動物初期胚分裂期の特性” 第21回高遠シンポジウム(2009.8)

* “マウス初期胚における染色体分配と核形成の特性” 第82回日本生化学会大会
(2009.10)

<受賞>

* 平成20年度文部科学大臣表彰若手科学者賞「哺乳動物初期胚分裂期における染色体動態制御の研究」(2010.4)

研究報告書

「植物の概日振動子の観測と相互作用の検出」

研究期間：平成 20 年 10 月～平成 24 年 3 月

研究者：小山 時隆

1. 研究のねらい

多細胞生物においては、分子・細胞内小器官・細胞・組織・器官・個体など、それぞれの階層で自律的に働くシステムがある一方で、それらのシステムが階層を横断して有機的につながることで、個体(生命体)を実現している。逆に、システム間の相互作用様式を明らかにすることが、生命システムの理解の大きな柱になると考えられる。概日振動システムはほぼ全ての生物種が持つ基本的な生体システムである。どの生物種でも個々の細胞が細胞自律的な概日振動子を持っていると考えられており、振動子間の相互作用が個体等の高次の階層における多様な概日リズム現象に深く関与していると考えられる。概日振動システムの細胞内・近接細胞間・個体内のそれぞれのレベルで見られる相互作用様式とその基盤構造を明らかにすることを将来の大きな目標とし、本研究では高等植物の個々の振動子を細胞単位で解析する手法の確立を第一に、その技術を基にした振動子間相互作用の検出を試みた。具体的には、同一個体内で複数の細胞の概日リズムを個別かつ同時に測定する系を開発し、その系を活用することで、細胞概日振動子の特性・細胞振動子間の同期・外部環境への細胞振動子の応答の解明を目指した。これらの研究成果を元に、現在非常に勢いで明らかになりつつある個別の概日振動現象およびその分子機構について、それらの階層性を明確化し、概日振動システムを有機的に捉える手法の開発へと展開する。

2. 研究成果

研究課題の第一の目標であった、植物の概日リズムを細胞レベルで捉える系の開発に成功した。以下に具体的な成果を述べる。

(1) 生物発光細胞を発光スポット(輝点)として細胞毎に観測する手法の開発

植物材料としてウキクサを用い、その極小・平板な植物体の表面の細胞にランダムに生物発光レポーター系を導入することで、遺伝子導入細胞を互いに干渉しない発光スポットとして検出することに成功した(図 1、図 2)。超高感度 EM-CCD カメラにマクロレンズを取り付けた微弱発光検出装置の下に、光ファイバで導かれた植物育成用光照射装置をおいたセットを暗箱中に構築した。ウキクサへの遺伝子導入はレポーターコンストラクトを付着させた金粒子をパーティクルボンバードメント法により行い、個体表面の細胞へ導入した。発光基質であるルシフェリンを植物培地に導入することで、明確な発光スポットを検出した。さらに、一つのスポットが一つの細胞に対応していることを顕微鏡下での観測で明らかにした。また、発光量の定量性の良さを活かして、ボンバードメント法による導入遺伝子の発現量の分布も明らかにすることができた。これらの解析をとおして、遺伝子導入法と測定条件の最適化を行った。

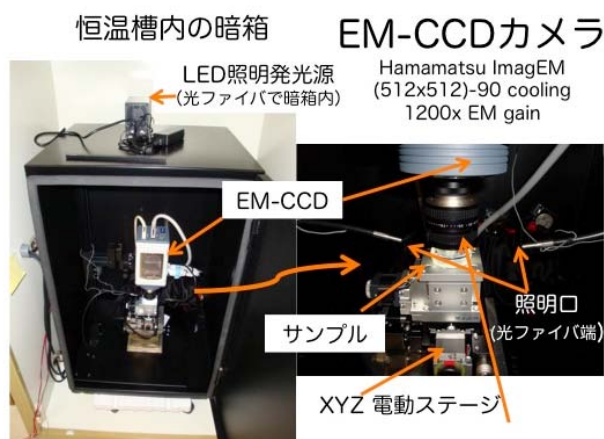


図1, 細胞生物発光イメージング装置

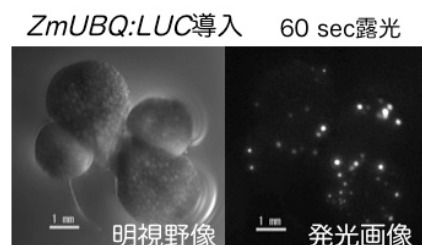


図2, 細胞生物発光イメージ

(2) 発光スポットの時系列データ取得法の確立

ウキクサは一般的な植物と異なり、垂直方向の運動や成長を行わない。この特性を活かして、撮影レンズのフォーカス位置を変えずに、同一個体を長期間測定することを可能にした。また植物の水平方向の移動は個体をピンで固定することにより抑制したが、完全に動きを封じ込めることは困難であった。そのため、時系列データとして取得した連続的なイメージ(群)の位置補正および発光スポットの発光量定量を ImageJ ソフトを用いて効率的に行う自動化スキームを構築した。

(3) 細胞概日振動子の観測

生物発光レポーターとして朝に発現する時計遺伝子 *CCA1/LHY* のプロモーター下で発現するホタルルシフェラーゼを用いた。発光スポットの光量が極大になる時点を朝と見なせる発光概日リズムを観測することができる。個体レベルでは、連続明条件・連続暗条件ともに概日リズムが減衰する傾向を示す(図3)。この発光レポーターをパーティクルボンバードメント法で遺伝子導入し、細胞毎の概日リズムを測定した。その結果、連続明条件では個々の細胞概日リズムは持続するが、周期が安定せず、全体として脱同期状態に陥ることが分かった。また、連続暗条件では細胞概日リズムが減衰することが分かった。このように、個体レベルの概日リズムは必ずしも細胞レベルの概日振動子の性質を表現しないことを明らかにした。

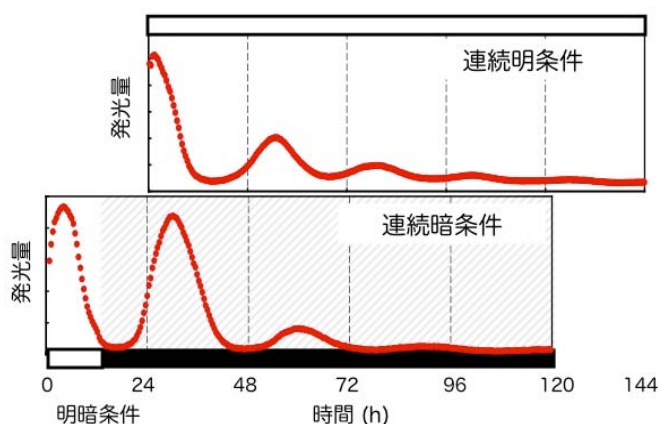


図3, ウキクサ個体の概日発光リズム (CCA1プロモーター::ルシフェラーゼ)

(4)細胞概日振動子の外部環境変動による同期特性

概日時計は外部の昼夜環境変動に同期することで、時刻をリセットしている。細胞外日振動子の光パルスに対する応答を調べた結果、個体の概日時計時刻を完全にリセットできる程度の強い光刺激(パルス)を与えると、細胞概日振動子はリセットされた。ただし、光刺激を与えられた位相が同じでも、リセット後の振動子毎の位相変動量は大きな幅を持っていることが分かった。細胞概日振動子の性質は周期だけでなく光に対する位相応答性も細胞毎のバラツキが顕著であることを示した。

上記した成果は、植物全体の概日時計システムの基盤となる細胞概日振動子の基本的な性質を実証した点で大きな意義があった。

3, 今後の展開

細胞振動子の観測が可能になり、個体レベルの概日リズムを細胞振動子レベルの挙動の集合体として再検討することが可能となった。今後は、個体内の細胞振動子が脱同期状態にある時や、組織・領域など局所的な同期・脱同期状態にある時などの植物個体の挙動を捉えることで、個体レベルの概日リズム(特性)のもつ生理学的役割に関して新たな発見につなげていきたい。また、同期や脱同期状態が観測可能になったことから、今後はそれらの状態を引き起こすメカニズムについて、遺伝子・分子・細胞構造レベルからアプローチしたい。

4, 自己評価

細胞振動子の観測という第一の目標は達成できた。研究期間中に測定系の開発と基礎的データを取り終えることができた点は評価できる一方で、個体内での細胞振動子間の同期・脱同期状態の定量的な分析やそれらを引き起こすメカニズムの問題が今後の課題として残った。

5, 研究総括の見解

このさきがけ期間中に、ウキクサの極小・平板な植物体の表面の細胞にランダムに生物発光レポーター系を導入することで、遺伝子導入細胞を互いに干渉しない単一細胞レベルの測定に成功したことは、細胞概日研究を加速させている。すでに、新しい現象を次々に見出しており、今後の成果、進展が楽しみである。

6, 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

投稿準備中

(2)特許出願

なし

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物等)

T. Oyama, Genetic Manipulation of Lemna in the study of circadian rhythm Meeting at Cold Spring Harbor, NY, USA "Aquatic Plants" Oct 18-21 2009

T. Oyama Gene introduction methods for the analysis of biological rhythms in duckweeds The 1st International Conference of Duckweed Research & Applications 2011 年 10 月 8 日～10 日 中国成都市

ウキクサの例にみる植物の光周性反応 伊藤(三輪)久美子、小山時隆 『光周性の分子生物学』 海老原史樹文、井澤毅編集 (シュプリンガー・ジャパン)1-14 2009 年

Photoperiodic control of flowering: *Lemna* plants. In "Photoperiodism: The biological calendar". Edited by Nelson RJ, Denlinger DL, Somers DE. Oxford University Press, New York, pp74-87 (2010) Ito-Miwa K, Oyama T

受賞

小山 時隆 平成 20 年度文部科学大臣表彰、若手科学者賞 「光合成生物の概日時計分子機構の研究」

研究報告書

「網膜 ON・OFF 回路基盤と視覚行動制御メカニズムの解析」

研究期間：平成 20 年 10 月～平成 24 年 3 月

研究者：小池千恵子

1. 研究のねらい

ものの形(輪郭)を捉えるために重要な視覚情報は、網膜における基本処理により抽出される。脊椎動物網膜において、全ての視覚情報は双極細胞においてON型・OFF型経路に分解される。神経系のON・OFF回路は脊椎動物網膜のみならず、ショウジョウバエの視覚中枢、線虫の嗅覚・味覚、昆虫の嗅覚などにも存在し、ひとつの入力刺激に対し二つの情報経路が正反対に応答することにより微妙な変化を強調し、最適化するという優れた回路である。

本研究は、コントラストの強調に関わる網膜ON型・OFF型情報経路と視覚応答との関係を明らかにし、得られた情報を元に網膜ON・OFF回路と視覚応答のシミュレーションモデルを作製、網膜機能再構築の基盤情報とすることを最終目的としている。

2. 研究成果

ほ乳類において網膜は光シグナルを神経シグナルに変換する唯一の組織である。視細胞において変換された光情報は、中間ニューロンである双極細胞においてON型・OFF型経路に分解される。ON型経路は光刺激の増加に対して作動し、OFF型経路は光刺激の減少に対して作動する(図1)。網膜視覚情報のON・OFF分解は、双極細胞におけるグルタミン酸応答の違いにより引き起こされる。

視細胞は神経伝達物質としてグルタミン酸を放出している。ON型・OFF型双極細胞の後シナプス膜には異なるグルタミン酸受容体が発現しており、グルタミン酸に対し正反対の応答を示す。ON型双極細胞(ON型錐体双極細胞および杆体双極細胞)は代謝型グルタミン酸受容体であるmGluR6を発現している一方、OFF型双極細胞はイオンチャネル型グルタミン酸受容体を発現している。暗所においてOFF型双極細胞はグルタミン酸を受け取り脱分極するが、ON型双極細胞はmGluR6が活性化する結果、視覚伝達チャネルが閉じることにより過分極応答する。長い間ON型双極細胞の視覚伝達チャネルは明らかとされていなかった。私たちは感覚受容器に広く発現するカチオンチャネルであるTransient receptor potential(TRP)ファミリーに属する遺伝子であり、生理学的意義が不明であったTRPM1(Melastatin related transient receptor potential 1)がON型双極細胞の視覚伝達チャネルであることを明らかにした(図2)。TRPM1にはイオンチャネル型のlong formとN末のみからなるshort formが存在し、イオンチャネル型TRPM1はマウスにおいて網膜ON型双極細胞のみに発

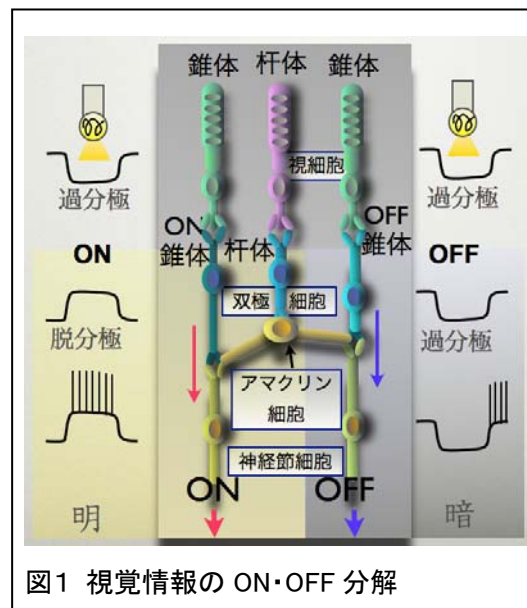


図1 視覚情報の ON・OFF 分解

現していた。TRPM1 ノックアウト(KO) マウスの網膜では OFF 型双極細胞の機能は正常である一方、ON 型双極細胞の視覚応答は消失していた。網膜 ON 型双極細胞の視覚伝達チャンネルは mGluR6 と共役している三量体 G タンパク質 Go により制御されていると推定されていたが、パッチクランプ的解析により、TRPM1 チャンネルが mGluR6 におけるグルタミン酸刺激により抑制されること、Go

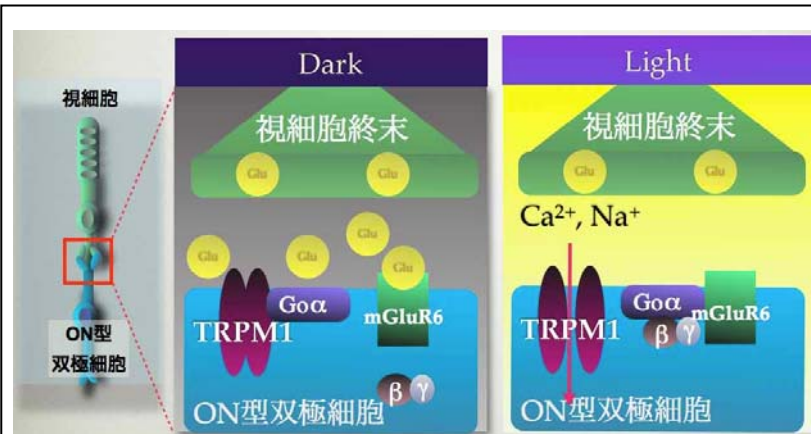


図2 TRPM1 は ON 型双極細胞の視覚伝達チャンネルである。視細胞は光刺激により過分極応答し、神経終末からのグルタミン酸の放出を抑制する。グルタミン酸存在下では mGluR6 が活性化され、共役している三量体 G タンパク質 Go のサブユニット Go α が活性型となり TRPM1 チャンネル活性を抑制しているが、光刺激によりグルタミン酸放出が抑制されると TRPM1 チャンネルは mGluR6 カスケードからの抑制から解除されて活性化される結果、ON 型双極細胞は脱分極する。

α により抑制制御されることが明らかとなった(図2)。また、TRPM1 は先天性停止性夜盲症の原因遺伝子であった。

ところで、視覚は知覚に基づいた応答であるイメージ形成応答だけでなく、眼球運動・瞳孔反射などの生理的作用を生じさせる非イメージ形成応答も担うことが知られている。さきがけ研究では、ON 型双極細胞あるいは OFF 型双極細胞機能欠損モデルマウスを用いての視覚応答の定量的・定性的解析を試みた。ON 型双極細胞の機能欠損モデルマウスとしては TRPM1 および mGluR6 KO マウスを用い、OFF 型双極細胞の機能欠損モデルマウスは特異的遺伝子が報告されていないことから、OFF 型双極細胞欠損を誘導するコンディショナル KO マウスを作製中である(図3)。

視覚応答解析としては、Microelectrode Array(MEA)法を用いた摘出網膜に対す

る microERG 解析およびスパイク解析と、マウス個体の視覚応答である、非イメージ形成応答およびイメージ形成応答解析を行った。光刺激そのものを情報とする非イメージ形成応答としては、

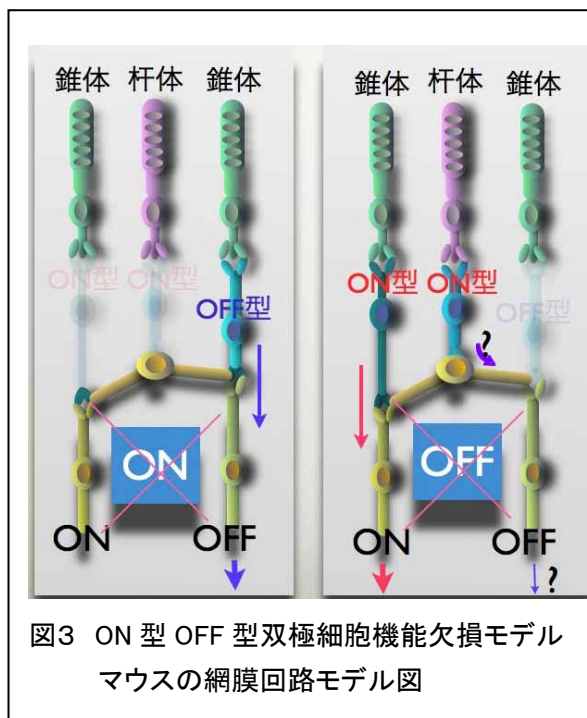


図3 ON 型 OFF 型双極細胞機能欠損モデルマウスの網膜回路モデル図

光同調、自発運動活性、睡眠活動などの解析を行った。イメージ形成応答に関しては簡便でストレスの少なく、かつ高空間・時間分解能のイメージを提示できるマウスの解析系がないことから、120Hz のリフレッシュレートで解像度 1920x1080 までのイメージが提示可能な新規視覚イメージ形成応答解析装置の作製を行った。本解析装置においては一定の距離からイメージを提示することにより視力測定が可能である。さらに解析装置を改良し、高時間分解能で持ち運びが簡便な点滅光刺激提示を可能とした。工学系研究者の協力の元マウスの視線を検出できるプログラムを作製済みであり、本プログラムを視覚イメージ形成応答解析装置に適用することにより、視覚応答の各試行においてマウスの視線を特定することによりイメージを認識し正解を認識しているかどうかを確認する予定である。

3. 今後の展開

本研究は、網膜ON型・OFF型情報経路と視覚応答との関係を解析し、網膜ON・OFF回路と視覚応答のシミュレーションモデルを作製、網膜機能再構築の基盤情報とすることを最終目的としている。今後新規視覚イメージ形成応答解析装置を用い、提示イメージの空間・時間周波数のパラメーターを変動させることにより野生型マウスの応答を定量的に解析し、ON型・OFF型双極細胞機能欠損モデルマウスの応答を比較解析することにより、網膜回路と視覚応答のシミュレーションモデルを作成したいと考えている。得られたデータを元に網膜変性モデルマウスにおいて網膜の機能的再構築を段階的に行い、理論的な再構築が自然な知覚にどこまで近づけることができるか、検証していきたいと考えている。また、得られた結果を工学系の研究者との共同研究により人工網膜研究に適用し、人工網膜での応答と動物の本来の視覚応答の比較解析を行うことによる視覚再構築研究にも貢献したいと考えている。

学術的には、特にOFF型双極細胞が視覚イメージ応答においてどのような役割を果たしているのか注目して解析を進めていきたいと考えている。錐体双極細胞の一部のみがOFF型応答を担うが、ヒトをはじめとした黄斑を形成している動物では最も視力の良い中心窩に錐体視細胞が集中しているため、OFF型情報経路が視覚情報において重要な機能を担う可能性がある。しかしながらマウスには黄斑が存在しないため、将来的にサルを用いた解析への展開も視野に入れていきたいと考えている。

4. 自己評価

さがけ研究期間においては共同研究のモデルマウスの作製や Microelectrode Array 装置の立ち上げ、新規視覚応答解析装置の開発に時間が掛かり思うように進まなかったが、特に視覚イメージ応答解析装置は広い範囲の応用解析が期待できると考えており、今後の発展のための基礎がある程度できてきたのではないかと考えている。視覚再構築への展開には困難もあるかと思うが、内外の共同研究者と協力していきたいと考えている。

5. 研究総括の見解

網膜 ON 型双極細胞の視覚伝達チャネルの本体が TRPM1 であることを解明したことは大きな成果として挙げられる。その後も、ON 双極細胞の ON 反応の生成機構を明らかにしており、さらに、OFF 反応の生成機構への取り組みを楽しみにしている。他方、進行中の視覚イメージ形成応答解析装置を用いた網膜回路と視覚応答のシミュレーションモデルの提案を期待している。

6. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Koike C, Obara T, Uriu Y, Numata T, Sanuki R, Miyata K, Koyasu T, Ueno S, Funabiki K, Tani A, Ueda H, Kondo M, Mori Y, Tachibana M, Furukawa T. "TRPM1 is a component of the retinal ON bipolar cell transduction channel in the mGluR6 cascade" Proc Natl Acad Sci U S A. 107(1):332-7.2010 Epub 2009
2. Chieko Koike, Tomohiro Numata, Hiroshi Ueda, Yasuo Mori, Takahisa Furukawa "TRPM1: a vertebrate TRP channel responsible for retinal ON bipolar function "Cell Calcium (Review)2010 Aug-Sep 48(2-3)95-101

(2) 特許出願

研究期間累積件数:0件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物等)

1. 39th Annual Meeting of Society for Neuroscience(Chicago) "TRPM1 is a candidate transduction channel for visual signal transmission in retinal ON bipolar cells"
2. FASEB Summer Research Conference(Vermont,USA) "Functional roles of mouse and human TRPM1-L"
3. 50th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology(Philadelphia) "TRPM1 Is a Component of the Retinal on Bipolar Cell Transduction Channel in the mGluR6 Cascade"
4. 第 157 回生物科学セミナー(大阪大学) "網膜 ON 型双極細胞の視覚伝達チャネル TRPM1"

研 究 報 告 書

「核・細胞質間コミュニケーションと微小管の連携機構の解明」

研究期間：平成 20 年 10 月～平成 24 年 3 月

研 究 者：佐藤 政充

1. 研究のねらい

分裂中の細胞では、遺伝情報を正確に後世に伝えるために、微小管と呼ばれる繊維状の構造体が染色体を正確に2個の細胞に分配している。微小管の異常は細胞の癌化または細胞死を引き起こすため、その制御は細胞にとって重要な課題である。細胞が分裂しない時期（間期）には、微小管は細胞質に網目状に形成されて、物質の運搬や細胞極性の確立に不可欠の役割を担う。これに対して分裂期に突入する際に、微小管は紡錘体（スピンドル）微小管へとその姿を激変させる。この形態変化は細胞分裂にとって最も重要な現象のひとつであるにもかかわらず、その分子メカニズムはほとんど知られていない。そこでその分子メカニズムを探るためのアプローチを試みた。

2. 研究成果

本目的を達成するために、30 種類以上知られる微小管関連因子のなかのどの因子が、微小管構造の劇的な再構成を起こしているのか、その分子メカニズムに迫った。

前述のように間期では微小管は細胞質に形成され、核内には形成されない。最初に我々は、間期の細胞であるにもかかわらず、分裂期のように核内に微小管を形成してしまう突然変異体の単離を試みた。すなわち、伝統的な酵母の突然変異体を単離する方法に則り、酵母の野生型細胞に化学変異原による突然変異を誘発し、核内に微小管が形成されてしまう変異体を単離しようと試みた。このような変異体は過去に1株のみ単離されているが（Tange et al., J. Cell Sci., 2002）、今回の変異体単離スクリーニングではそのような変異体は単離できず、微小管形成を誘発する鍵となる因子の同定には至らなかった。

大きな原因のひとつは、このように核内に微小管を形成してしまうという現象は、何かのタンパク質の機能が突然変異によって低下することでは起きるのが難しく、逆に何かのタンパク質が核に蓄積することで微小管形成のプラットフォームが核内に形成されるのではないかと考えた。ただしタンパク質を過剰発現することは生理的な条件とはほど遠い人工的な結果をもたらす可能性があると考え、我々はあくまでも生理的な本来のタンパク質発現量を維持したまま、酵母の核内にタンパク質を蓄積させる手法にこだわった。

そこで我々は従来の遺伝学的アプローチとは異なり、酵母細胞を試験管のように利用して、微小管が形成されるための必要十分条件をあぶり出す別のスクリーンに移行することにした。核内に任意の微小管結合タンパク質を強制局在させたときに微小管が形成誘導されれば、その因子は微小管を形成するために必要十分な因子であるといえる。本方法を「ビルドアップ遺伝学」と名付け、従来の遺伝子の突然変異体を単離する遺伝学スクリーニングとは方向性が異なっている点に特徴がある。

実際に我々は、特定の微小管結合タンパク質複合体を 2 種類発現させることで微小管形成を誘導できることが分かった。特にそれらを相互作用した状態で核内に蓄積させると、高頻

度に核内に微小管が形成誘導されることを見いだした。このことは、これらが微小管を形成するための最小限の因子であることを強く示唆するものであり、本研究によって微小管形成という複雑な生命システムにおける動作原理のエッセンスが明らかになりつつある。

また、我々は、研究の過程で、微小管構造が細胞分裂、特に染色体分配においてどれだけ重要な意義を持つのかという微小管の基本機能の重要性を再探求した。これまですべての真核細胞生物では、細胞分裂においては微小管が必要不可欠な役割を果たしており、微小管以外の細胞構造が染色体分配に積極的に関わるという報告は得られていない。

しかし我々は、興味深いことに分裂酵母の減数第 2 分裂では、微小管に重篤な欠陥が生じていても、染色体分配が比較的正確に遂行できることを発見した。すなわち、中心体と中心体をつなぐ極間微小管が薬剤によって(あるいは特定のタンパク質の欠陥によって)破壊されていたとしても、中心体は分離して染色体分配がある程度の正確さで起きることが分かった。この条件で微小管を可視化すると、極間微小管は薬剤によって破壊されていたが、中心体と動原体を繋ぐ動原体微小管は残存していた。したがって、染色体分配をおこなう本体としての微小管は不可欠であるが、中心体を分離したり、核を分裂したりするための極間微小管は必ずしも必要ではないことが分かった。

それでは極間微小管のかわりに中心体の分離や核分裂を引き起こしているものはいったい何であろうか？ 減数第 2 分裂は配偶子形成とカップルしているため、我々は酵母の配偶子である胞子の形成過程が重要な役割を果たすと考え、前胞子膜と呼ばれる構造に注目した。微小管と前胞子膜の両方の形成を阻害すると、減数第 2 分裂でも中心体の分離は起きなくなった。このことは、極間微小管が阻害された状況下で中心体を分離しているのは前胞子膜であることを示している。このように我々は、分裂酵母の減数第 2 分裂においてスピンドル微小管をサポートする新しい構造として前胞子膜を同定した。これまで動原体微小管も極間微小管もいずれも必要不可欠であると考えられてきたスピンドルの常識を覆す新発見であり、今後の応用化が見込まれる。

3. 今後の展開

上記の研究から、微小管の形成を誘発するのに必要十分といえる因子の決定に至った。それでは、細胞が間期から分裂期に移行する際に、どのような分子メカニズムで微小管が形態変化するのであろうか？ 上記実験から得られている「微小管形成のための必要十分因子」が“いつ、どこで”機能するのか、その実態を明らかにすれば、微小管が“いつ、どこで”形成されるのかが見えてくるであろう。本研究を継続することで、細胞分裂におけるもっとも基礎的かつ重要な謎を解く手がかりが得られると期待している。

4. 自己評価

核・細胞質間輸送と微小管形成は酵母からヒトにいたるまで幅広く保存された生命システムであり、細胞周期依存的な微小管の形態変化に重要な役割を果たす。我々は本項目を酵母に着目して研究を進め、輸送にカップルして微小管を形成する重要因子の決定に至ったことは重要であると自己評価する。しかしながらこれは第一目標であり、本来の目標である細胞周期を通してどのように微小管が形態変化するのかという問いには未だ答えられていない。今後も研究を進め、さらに研究を高等生物に応用することを積極的に進めたい。

5. 研究総括の見解

細胞が分裂しない時期(間期)には、微小管は細胞質に網目状に形成されて、物質の運搬や細胞極性の確立の役割を担い、分裂期には、微小管は紡錘体(スピンドル)微小管へとその姿を激変させる。このことに注目し、酵母細胞を試験管とみなし、独自の仮説により、微小管を形成するための最小限の因子を見出し、着実に成果を挙げている。これらの詳細な機構の理解のもとに、微小管を介した生物学的現象の発展に繋がることを期待したい。

6. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. M. Sato, N. Okada, Y. Kakui, M. Yamamoto, M. Yoshida and T. Toda. Nucleocytoplasmic transport of Alp7/TACC organizes spatiotemporal microtubule formation in fission yeast. *EMBO reports*, 10 (10):1161–1167, (2009)
2. M. Sato, M. Toya and T. Toda. Visualization of Fluorescence-Tagged Proteins in Fission Yeast: The Analysis of Mitotic Spindle Dynamics Using GFP-Tubulin Under the Native Promoter. *Methods in Molecular Biology – Mitosis* 545:185–203 (2009)
3. C.S. Fong, M. Sato and T. Toda. Fission yeast Pcp1 links polo kinase-mediated mitotic entry to c-tubulin-dependent spindle formation. *EMBO Journal* 29:120–130 (2010)
4. K. Arai, M. Sato, K. Tanaka and M. Yamamoto. Nuclear compartmentalization is abolished during fission yeast meiosis. *Current Biology* 20:1913–1918 (2010)
5. T. Akera, M. Sato and M. Yamamoto. Interpolar microtubules are dispensable in fission yeast meiosis II. *Nature Communications* (2012) in press

(2)特許出願

該当項目なし

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物等)

主な学会発表

Masamitsu Sato, T. Akera, J. Li, M. Yamamoto. How is interpolar microtubule regulated?
The 6th International Fission Yeast Meeting (2011) Boston, USA

Masamitsu Sato, Y. Kakui, T. Toda, M. Yamamoto
How are microtubules reorganised upon entry into mitosis and meiosis in fission yeast?
The 6th UK-Japan Cell Cycle Workshop (2011) Windermere, UK

佐藤政充、角井康貢、太田緑、明楽隆志、山本正幸
分裂酵母において減数分裂特異的にみられる微小管、動原体、スピンドル極体の挙動
日本細胞生物学会 (2010) 大阪

Masamitsu Sato, Y. Kakui, T. Toda, M. Yamamoto

Regulation of Microtubule Formation in Fission Yeast Mitosis and Meiosis

“Cell Proliferation Control” International Workshop Chromosome Segregation Machinery
(2010) Tokyo

Masamitsu Sato, Y. Kakui, T. Toda, M. Yamamoto

Regulation of Spindle Microtubules in Mitosis and Meiosis

The 5th International Fission Yeast Meeting (2009) Tokyo

受賞

Human Frontier Science Program (HFSP) Young Investigator Grant (2009) 受賞

研究報告書

「1分子追跡によるラフト量子化信号システムの解明」

研究期間：平成20年10月～平成24年3月

研究者：鈴木 健一

1. 研究のねらい

本研究課題の目的は、細胞膜上での2種類の分子を同時に1分子ずつ観察する技術(世界初)を用いて、ラフト経由のシグナル伝達機構の全容を解明することであった。ラフトは細胞膜上のシグナル伝達のプラットフォームとして提唱されてはいるが、脂質相互作用だけで細胞刺激前にラフトは、「本当に存在するのか?」、あるいは「刺激後ラフトがどのようにしてシグナルを伝えているのか?」といった基本的な問題は何ら解決されていなかった。本研究では、これらの課題に、高精度1分子観察技術をさらに改善しつつ挑んだ。また、ラフト経由のシグナル伝達は短寿命で、パルス的に起きるが、これが、どのようにして長くアナログ的に続く細胞全体のシグナルを生み出すのかを解明しようとした。

2. 研究成果

細胞膜上の受容体の2量体、多量体形成観察のための基盤技術の開発

ラフトへの分子の濃縮を調べるためには、細胞膜上でラフトマーカーを蛍光ラベルし、その1分子ずつが、結合(2量体化)しては、離れる様子を全反射顕微鏡で観察する必要がある。しかし、そのためには、1)「細胞膜上で観察対象となる分子を低レベル(1細胞あたり 5000 分子以下)で発現させ、どの分子種でもだいたい同じ密度で観察する」、2)「発現している観察対象の分子を高い効率で蛍光ラベルする」の両条件とも満たす必要である。そこで、筑波大学・三輪先生にお願いして、Doxycycline で膜分子の低レベル発現を誘導、調節できるベクターをいただき、対象分子の配列を組み込んだコンストラクトを作成した。また、蛍光ラベル効率を高めるために、Halo-tag や ACP-tag といった tag をタンパク質の C 末側あるいは、N 末側に融合させた。こうして発現された膜分子を 95%以上の効率で蛍光ラベルすることができた。顕微鏡技術に加え、1分子観察向けのこのような膜タンパク質発現、ラベルの基盤技術をまず開発した。

定常状態の細胞膜上での GPI アンカー型タンパク質の2量体形成機構

CD59 というラフト親和性の GPI アンカー型受容体で補体制御タンパク質は、平均 160 ミリ秒間という短い時間だが、コントロールで非ラフトリン脂質分子 DOPE に比べて、4 倍の長さで2量体を形成していた(図1)。また、CD59 の2分子間の FRET(蛍光エネルギー共鳴移動)実験でも確かに、コントロール分子よりも長く頻繁に2量体形成が確かめられた。これらの結果は、CD59 の2量体は、確かに形成され、何らかの機構で分子は濃縮され、ランダムに分布しているわけではないことが明らかとなった。

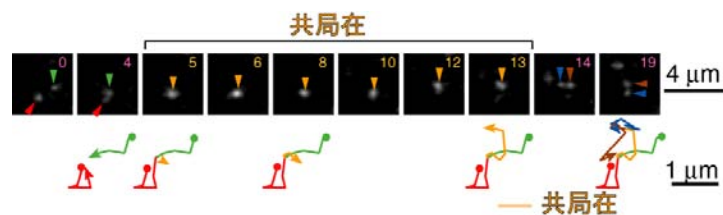


図1：CD59モノマー同士が会合し、拡散した後、再び解離するビデオ画像(上)と軌跡(下)

次に、この分子濃縮機構を調べた。細胞膜からコレステロール除去すると CD59 の2量体の寿命は半分の 80 ミリ秒になり、またコレステロールを細胞膜に戻すと2量体の寿命は長くなった。CD59 の GPI アンカー鎖の代わりに、非ラフト貫通型タンパク質(LDL 受容体の膜貫通部分)を融合したキメラタンパク質の2量体の寿命は、やはり 75 ミリ秒と短いものであったが、その寿命へのコレステロール除去の効果は見られなかった。従って、これらの結果は、コレステロールや GPI アンカー鎖など脂質相互作用が CD59 の2量体を安定化していることを示唆している。

次に、ectodomain タンパク質間相互作用も2量体形成に重要かどうかを検証するために、2量体形成能の異なる様々なタンパク質を ectodomain に持つ GPI アンカー型タンパク質の2量体の寿命を調べた。結果、ectodomain タンパク質の2量体形成能が高いほど、GPI アンカー型タンパク質の2量体の寿命が長くなっていたことから、確かに、ectodomain のタンパク質部分の相互作用も GPI アンカー型タンパク質の2量体の形成に重要であることが示された。一方で、タンパク質部分に2量体形成能がない場合には、GPI アンカー型タンパク質の2量体の寿命は、ほとんどコントロールの非ラフトリン脂質と同程度であった。このことから、GPI アンカー型タンパク質の2量体形成は、タンパク質相互作用によって誘起され、脂質相互作用がそれを安定化していることが示唆された。

また、タンパク質間の特異的相互作用が GPI アンカー型タンパク質の2量体形成に重要なことは、ホモ2量体の寿命の方が、ヘテロ2量体の寿命よりも、ずっと長かったことから示された。

ヘテロ2量体の寿命は、コントロールの非ラフトリン脂質の2量体とあまり変わらなかったが、この結果は、脂質相互作用だけでは、2量体を形成できないことをさらに支持していた(図2)。

1分子 FRET 観察、1分子 Bimolecular fluorescence complementation (BiFC)観察や、クロスカラーを用いた生化学アッセイなど、他の手法を用いても実験を行ったが、その結果は1分子共局在観察の結果とよく一致していた。

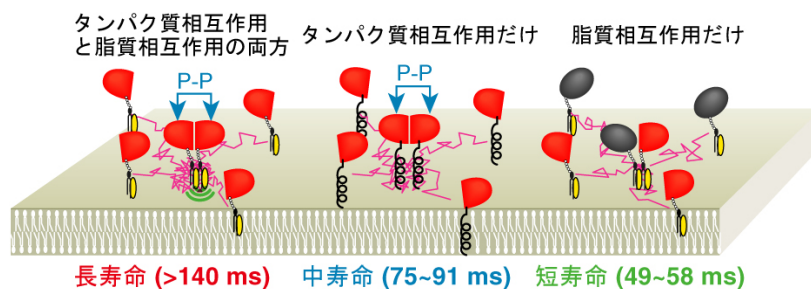


図2: GPIアンカー型タンパク質の2量体形成は、タンパク質相互作用によって誘起され、脂質相互作用がそれを安定化している

定常状態の細胞膜上での GPI アンカー型タンパク質の多量体形成機構

また、膜上の CD59 の発現密度を上げさえすれば、2量体だけではなく、3, 4量体などの多量体も頻繁に見られるようになったが、コントロールの分子では見られなかった。従って、CD59 の多量体形成は、化学平衡下で起きていることが示唆された。以前、GPI アンカー型タンパク質は、非平衡過程で、ヘテロオリゴマーが形成されるとする結果が報告されている(Sharma et al., Cell, 2004)。この報告では、発現分子密度が私の系の1000倍ほど高い条件下でFRET 観察を行っていた。そのため、ほとんどホモ2量体形成していた GPI アンカー型タンパク質が、脂質相互作用でヘテロ多量体を形成したと推測した。

そこで、この仮説を検証するために、IgG 抗体で CD59 と DAF のホモ2量体を形成させ、そのホモ2量体間(CD59 と DAF の IgG 抗体間)で形成されるヘテロ4量体を観察した。結果、ヘテロ2量体の場合と異なり、ヘテロ4量体の寿命は、コントロールの非ラフトリン脂質の4量体や

CD59TM-DAFTM のヘテロ4量体の寿命よりも2倍程度長いものであった。これらの結果は、いったんホモ2量体が形成されると、脂質相互作用が高まり、やや長寿命のヘテロ4量体を形成できるようになったことを示唆していて、上の仮説が正しいことを示している。

以上の結果から、定常状態において GPI アンカー型タンパク質は、タンパク質相互作用によって誘起されたホモ2量体を脂質相互作用が安定化し、さらに分子密度が高い場合には、化学平衡下、ホモ4量体やヘテロ4量体を形成するということが明らかとなった。

高速時間分解能1分子観察により推測されたラフト構造

以上の結果から、少なくとも CD59 など GPI アンカー型タンパク質は、分子の濃縮が見られることが明らかとなったが、まだこれらの結果は、2量体や4量体のまわりにどのくらいの範囲でラフトドメインが広がっているのかという問いに答えていない。そこで、この問いに答えるために、CD59 のほとんどは2量体以上である高発現下で、CD59 と非ラフト分子の拡散を比較し、膜から受ける抵抗を測ることで、ラフトの大きさを見積もろうと試みた。

そのため、CD59 の1分子の運動を高速カメラを用いて時間分解能 56 μ s で追跡したところ、CD59 の拡散は、単純拡散ではなく、軌跡はコンパートメント化していた。また、コンパートメントの大きさは 110nm ほどで、コンパートメント内での滞在時間は、平均 25 ミリ秒であった。驚くべきことに、非ラフトリン脂質の DOPE も CD59 とほぼ同じホップ拡散をしていた。

このホップ拡散は、膜骨格に直線上にアンカーされた貫通型タンパク質(ピケライン)の効果により起こることが知られている。モンテカルロシミュレーションの結果からアンカーされた貫通型タンパク質間の距離は、平均で5ナノメートルであると見積もられた。また、上記のように、CD59 はホモ2量体に基づくラフトを形成しており、平均で 160 ミリ秒ほどラフトと相互作用していると考えられる。これは、コンパートメント内での平均の滞在時間25ミリ秒よりも6-7倍長い時間である。つまり、CD59 の2量体形成後、平均で6-7回はピケラインを飛び越えて、ホップしているはずである。これらの結果より、CD59 の2量体化によって形成されるラフトの大きさは、ピケラインを構成する膜貫通型タンパク質間の距離よりも小さい数ナノメートル以下であると推定することができた(図3)。同じ IgG 抗体でラベルされた CD59 同士は 10 ナノメートル離れているが、この IgG で誘起された CD59 の2量体のホップの頻度が、CD59 の1分子のホップの頻度の半分になっていた。このことは、定常状態で自然に形成される CD59 の2量体が入っているラフトの大きさが数ナノメートル以下であるという考えとよく一致している。他に様々な高速1分子追跡を行ったが、これらの結果もラフトが数ナノメートル以下の大きさしかないことを支持していた。

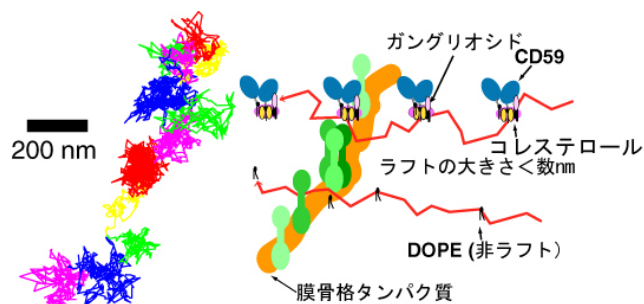


図3 (左) 56 μ s の時間分解能で蛍光観察された CD59 の 1 分子の 0.33 秒間の軌跡。コンパートメントに分かれている。
(右) アンカーされた膜貫通タンパク質間をすり抜ける CD59 の 2 量体形成で生じた直径数ナノメートルのラフト。

リガンド刺激後に形成され細胞内シグナル伝達を誘起する安定化ラフト

次に定常状態で形成された短寿命の2量体や4量体に基づくラフトの生物学的意義について

調べた。CD59 の機能は、補体のコンプレックス(membrane attack complex, あるいは MAC)の自己攻撃から形質膜を守ることだが、MAC が形成されると、CD59 は MAC の受容体なので、MAC と CD59 は結合する。観察の結果、MAC 形成後の CD59 は、非常に安定なホモ4量体を形成していることが明らかとなった。このホモ4量体は、コレステロール除去後や、CD59 の貫通型キメラタンパク質で非ラフト分子の場合には、MAC 形成後もあまり形成されなかった。これらの結果は、ラフト相互作用が刺激依存的な CD59 のホモ4量体形成に必須であることを示唆している。

MAC 形成後に誘起された CD59 のホモ4量体は、他のラフト分子である GM3 や GM1 を 100 ミリ秒ほどリクルートしていたが、コントロールの非ラフトリン脂質はリクルートされなかった。従って、CD59 クラスターラフトとも呼ぶべき構造が形成されていることが明らかとなった。

さらに MAC 形成により誘起される CD59 クラスターラフトは、運動しては一時停留するといった非常に奇妙な挙動を示した。2007 年にこの一時停留のことを Stimulation-induced temporal arrest of Lateral diffusion から STALL と名づけたが、STALL は、細胞内信号分子の PLC γ の結合サイトを用意し、細胞内カルシウム応答のプラットフォームとしてはたらくことを見出している。案の定、MAC 形成後に細胞内カルシウム応答が確認され、CD59 の貫通型キメラタンパク質を発現した細胞では、確認できなかった。これらの結果は、MAC 形成により誘起された CD59 の安定なクラスターラフトが、STALL というシグナル伝達のプラットフォームを形成し、細胞内のカルシウム応答を誘起していることを示している。

定常状態における細胞形質膜は、準安定状態にある、つまり、ほんのわずかなタンパク質の変化が分子間の相互作用の微妙なバランスをシフトさせ、安定なクラスターラフトを誘起し、それが細胞内信号伝達を誘起すると提案した。

免疫染色のための細胞膜分子の固定法

ラフト内外での分子の分布を研究するために、細胞膜を固定後抗体ラベル金コロイドで分子をマーキングし、電子顕微鏡で観察することが、しばしば行われてきた。しかし、固定が不十分な場合、抗体処理の過程で抗原分子が集合してしまい、もとの分子の分布とは全く違った分布になってしまう。細胞膜上では、分子の凝集自体がシグナルになることも多いので、さらに、その部分に別の未固定分子がリクルートされてくる可能性がある。従って、「2種類の分子が多数集まって働いている」という「発見」をしたという誤解が起こりうる。これが、まさに細胞膜上でのラフト研究において起こり、ラフト研究に大きな混乱を起こしていたことが分かってきた。さきがけ研究により、様々なラフト分子を化学「固定」した後に、我々が開発してきた1分子イメージング法を用いて観察したところ、通常の化学固定条件では、多くのラフト分子が、まだ動き回っていることがわかった。1分子法は、固定処理後の細胞膜分子のように、易動度が1分子毎に大きく違うときに、それらを細大漏らさず調べるために極めて有用であった。さらに、最近の多くの固定法では、抗体の結合を減らさないという配慮が優先され、固定の程度が極めて弱いことが示された。このように、化学固定後の分子運動を1分子追跡によって調べた結果は、過去50年の免疫抗体染色データに見直しを迫ることとなった。この成果は、Nature Methods, 7, 855-856, 2010 に掲載された。また、読売新聞、京都新聞、日刊工業新聞で報道された。

3. 今後の展開

刺激後、CD59 は安定なホモオリゴマーを形成し、短期間一時停留を繰り返しながら、カルシ

ウム応答などの細胞内の下流シグナルを誘起することを明らかにした。一方で、様々なシグナル分子が CD59 クラスターラフト内で 100–200 ミリ秒という短期間活性化されていることを、さきがけ研究以前に見出していた。個々のパルスのシグナルが、どのようにして細胞全体のシグナル強度を調整しているのかという問題は、次の面白い課題である。1 分子 FRET の観察技術は、このさきがけ期間中に確立したので、シグナル分子の活性化や不活性化の瞬間を高速 1 分子 FRET 観察することで、この課題に挑みたい。蛍光色素のプリンキング(明暗を繰り返すこと)が、1 分子 FRET による活性化と不活性化のサイクルの高速時間分解能観察の邪魔になるのが問題だった。しかし、最近になってプリンキングを制御し、蛍光 1 分子を長時間観察する方法も見出せそうになったので、シグナル分子の活性化の可視化解析は実現できると考えている。

また、1 分子共局在観察、1 分子 FRET 観察、1 分子 BiFC 観察など、膜分子のホモ多量体、ヘテロ多量体やクラスターの形成を観察するための基盤技術を創出できたので、今後はこの技術を利用し、ラフト分子に限らず他の様々な重要な受容体に関する問題に挑戦していきたい。

4. 自己評価

当初の目的は、信号入力前の定常状態でのラフト構造を明らかにし、ラフト中の GPI アンカー型受容体刺激後、どのようにしてシグナルを細胞内へ伝達するのかを解明することであった。さきがけ研究では、GPI アンカー型受容体の短寿命ホモ 2 量体が形成されることを見出した。また、このホモ 2 量体は、受容体刺激後にシグナル伝達分子をリクルートし、シグナルを下流へ伝える能力を持つ安定なホモ 4 量体形成のためのソースとなっていることを発見した。また、高速時間分解能での受容体の拡散の観察から、ホモ 2 量体のまわりに広がるラフトの大きさは、大きくてもせいぜい数ナノメートル程度であることが明らかとなった。つまり、ラフト経由のシグナル伝達を誘起するための最小ユニットを見出したといえる。「コレステロールなどの脂質相互作用の関わる分子集合体をもラフトと呼んでも良い」と多くの研究者が言い始めているのを考慮すると、このシグナル伝達のための最小ユニットもラフトと言っても良いであろう。当初の目標の一部を達成できたと思うが、一方で、これでラフトの全容が分かったわけではない。細胞膜上で 37°C で脂質相互作用だけで 1 μm くらいの直径のラフトが形成されるという「初期ラフト仮説」を多くの研究者が疑問視するようになってきたが、ラフトについて、まだまだ分かっていないことが多い。ラフト分子、非ラフト分子の拡散挙動を高精度で観察し、研究を続けていく必要がある。

5. 研究総括の見解

細胞膜上で膜受容体を低発現させ高い蛍光ラベル効率で 1 分子観察する手法を確立したことを高く評価する。そのことより、高速時間分解能 1 分子観察により推測されたラフトの基本構造モデルを提唱するまでに進めた。今後、さらに、新しい視点を加えて、ラフト経由のシグナル伝達機構を解明することを目指してほしい。

6. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Suzuki, K. G. Biotechnology Journal (Review) in press.
2. Kusumi, A., Suzuki, K. G., Kasai, R. S., Ritchie, K., Fujiwara, T. K. Hierarchical mesoscale

domain organization of the plasma membrane. (Review) Trends in Biochemical Sciences, 36, 604–615, 2011.
3. Kasai, R.S., <u>Suzuki, K.G.</u> , Prossnitz, E.R., Koyama–Honda, I., Nakada, C., Fujiwara, T. K., Kusumi, A. Full characterization of GPCR monomer–dimer dynamic equilibrium by single molecule imaging. J. Cell Biol. 192, 463–480, 2011.
4. Tanaka, K.A.*, <u>Suzuki, K.G.*</u> (*equal contribution), Shirai, Y. M., Shibutani, S. T., Miyahara, M. S., Tsuboi, H., Yahara, M., Yoshimura, A., Mayor, S., Fujiwara, T. K., Kusumi, A. Membrane molecules mobile even after chemical fixation. Nature Methods, 7, 855–856, 2010.
5. <u>Suzuki, K. G.</u> , Kusumi A. Mechanism for signal transduction in the induced–raft domains as revealed by single–molecule tracking. (Review) Trends in Glycoscience and Glycotechnology, 20, 341–351, 2008.

(2)特許出願

なし

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物等)

国際学会招待講演

1. K. G. N. Suzuki (2011, Aug.)
Single–molecule imaging studies of meso–scale raft domains in cell plasma membranes. International Conference on futuristic science and technology in frontier areas & 2nd annual conference of indian JSPS alumni association, Trivandrum, India (Invited Speaker)
2. K. G. N. Suzuki (2011, Jul.)
The 2nd Heidelberg–Kyoto Joint Symposium, Heidelberg, Germany (Invited Speaker)
3. K. G. N. Suzuki (2010, Dec)
How does the meso–scale raft domain exist and transform to work? : a single–molecule imaging study. The 2nd iCeMS–NCBS Joint Symposium, Kyoto, Japan (Invited Speaker)
4. K. G. N. Suzuki (2010, Nov.)
Single–molecule imaging studies of meso–scale raft domains in steady–state cells. Association of Pacific Rim Universities Research Symposium, Kyoto, Japan (Invited speaker)
5. K. G. N. Suzuki (2010, Nov.)
Meso–scale raft domains: whether and how they exist and work in steady–state cells? The 8th iCeMS international symposium, Kyoto, Japan (Invited speaker)
6. K. G. N. Suzuki (2010, Jan.)
Lipid–stabilized homo–dimers of GPI–anchored proteins based on ectodomain protein interactions. The 13th International Membrane Research Forum, Kyoto, Japan (Invited speaker)
7. K. G. N. Suzuki (2009, Jun.)
Mechanism for RAFT–based signal transduction as studied by single–molecule tracking. The 5th Leukocyte Signal Transduction Workshop, Crete, Greece (Invited Speaker)

研究報告書

「指の個性の決定メカニズムの定量発生生物学による解明」

研究期間：平成 20 年 10 月～平成 24 年 3 月

研究者：鈴木 孝幸

1. 研究のねらい

私たちの体は胎児期における複雑な遺伝子のネットワークが協調的に機能する事によって形作られています。近年の発生生物学の手法は、主として遺伝学的に標的遺伝子を破壊したり、トランスジェニックの手法を用いて遺伝子を過剰発現する手法が用いられています。これらは個々の遺伝子の発生期における機能を解析する上で、多くの知見を与えてくれました。しかしながら、遺伝学的解析から得られた表現型は、遺伝子があるかないかを反映した一局面の結果であり、モルフォゲンとしての分泌因子の濃度勾配がどのように時空間的に組織に作用して似て非なる組織や器官が出来るのかなど、動的な知見はこれまでほとんど報告されていませんでした。本研究では、細胞外シグナルの受け手側の細胞内応答を luciferase(ルシフェラーゼ)の発光を用いた *in vivo* イメージングシステムを用いて組織レベルで解析することにより、時空間的な細胞群の応答のメカニズムから生物のかたち作りのシステムを個体レベルで生化学的に定量化・分析する、“定量発生生物学”を樹立する事をねらいとしました。具体的にはニワトリ胚後肢の発生をモデルシステムとして用い、動的な形態変化の定量化、特徴的な形態変化を誘導するシグナルの解析、発光イメージング法の確立と形の変化との関係を調べ、私たちの体がなぜこのような形をしているのか明らかにする新しい解析方法の樹立を試みました。

2. 研究成果

アクチビンや Sonic hedgehog(SHH)、Bone morphogenic protein(BMP)に代表される分泌因子は発生期において Morphogen(モルフォゲン)と呼ばれ、これらの分泌因子の濃度依存的に様々な異なった組織・器官が作られます。手足(肢芽)の発生においては *Shh* が肢芽の後側だけに偏って発現し、肢芽の前側に拡散する事で、SHH の濃度依存的に指の前後軸に沿った形の違いが産まれると考えられています。*Shh* の発現が全くない標的遺伝子破壊マウスでは親指しか指が形成されません。この結果は SHH があるかないかを反映した all or nothing の表現型であり、どれだけの量の SHH がどのくらい時間的に作用した結果それぞれ異なる 5 本の指の形の違いが生まれるのか、と言った動的な発生システムは明らかに出来ません。ヒトの疾患においても、このように機能するタンパク質の量的な違いによる疾患の表現型の差異が様々な見られる事から、今後の発生生物学・薬理学においては all or nothing の表現型に加えて、時空間的に細胞群がどれだけのシグナルを受け取っているか、という動的なダイナミズムを解析する必要があります。これを解析する為に、私はニワトリ胚後肢の発生における形態変化を定量的に解析することから研究を始めました。

ニワトリ胚後肢を用いた理由は、前肢と比べて全体の形が3次元的に複雑ではなく、さらには内臓器官のように体の中にあるのではなく外から観察が出来るという利点からです。これまで組織の細胞群が将来的にどの領域になるのかという Fate map の作成は、炭や蛍光色素を局所領域にインジェクションし、何日か後にラベルされた細胞群がどの領域に分布するのかを調べて来

ました。この方法の場合、ラベルされた領域が細胞増殖が激しい場所では広がりすぎて Fate map の精度が悪いという欠点がありました。また時間的に2点間だけの Fate map ではその間の細胞の挙動が分かりませんでした。本さがけ研究では理化学研究所発生再生科学総合研究センターの森下喜弘博士との共同研究で、数学的手法を用いて肢芽の細胞群の変形を解析する新しい手法を構築しました。

まず、従来までの発生のステージ表による発生段階を用いずに、肢芽の遠近軸の長さを測定し、絶対的な長さによるステージングを肢芽の長さが $500\mu\text{m}$ の時から12時間おきに行いました。次に各大きさにおけるニワトリ胚後肢の肢芽に Dil/DiO の蛍光色素をタングステン針を用いてランダムに数十個単位の細胞集団をラベルし、写真撮影を行いました。そして12時間孵卵させた後、再び写真撮影を行いました。次に統計推定学的手法を用いて12時間における蛍光色素の行き先が最も説明出来る様な肢芽の組織の変形パターンを推定しました(図1)。その結果肢芽全体の変形パターンを解析出来る様になりました。この手法を用いて指原器が発生するまで解析を次々と行い、ダイナミックに変化していく肢芽の変形パターンを取得しました。背腹軸に沿った肢芽の厚み成分の情報は OPT スキャナーを用いて肢芽の3次元像を定量解析し、厚み成分の情報のみを Avizo を用いて抽出しました。このデータと2次元における肢芽の変形パターンのデータを合わせて肢芽の3次元における組織の変形パターンを定量的に解析しました。これまでの共焦点顕微鏡を用いた解析では見る事の出来ない超多細胞集団の組織の動的な変形パターンが解析出来たのは世界で初めての事です。

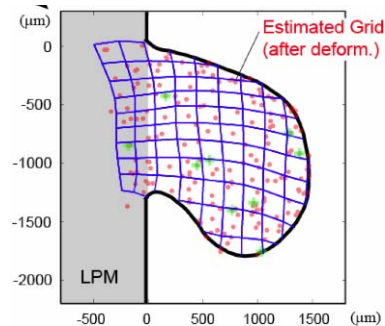


図1. $500\mu\text{m}$ 時の肢芽の変形パターン

本解析からこれまで分からなかった様々なことが明らかになりました。まず肢芽の組織が伸長して行く時には、大別して3つの領域が時空間的に成長率が高い事が分かりました。特に小指の部分形成する肢芽の後側の領域は後述する SHH のシグナルが最も強く活性化する時期と領域で変形が大きくみられることが分かりました。このような解析手法を用いることで今後肢芽だけではなく他の組織や器官の形成過程が3次元で明らかになると期待されます。

次に遠近軸に沿った肢芽の成長パターンを見てみると、これまでは肢芽の先端部分の領域が特異的に細胞増殖が起こって伸長していくと考えられて来ましたが(プログレスゾーンモデル)、そのようなことはなく肢芽全体が均一に遠近軸に沿って伸長している事が分かりました。この結果は今まで考えられて来た学説を修正する必要があることを示しており、定量的に発生生物学を研究する意義の重要性を改めて認識できます。

本解析結果から、時空間的に肢芽の伸長には3つの特徴的な領域があることが分かりました。そこで次にそれぞれの肢芽の変形時にどのようなシグナルが必要であるかを調べるために FGF と SHH の阻害剤をアクリルビーズに吸着させ肢芽に移植する実験を行いました。その結果 FGF シグナルは肢芽の先端部分と後側の部分の増殖に必須である事が分かりました。また SHH シグナルは肢芽の後側の部分の増殖にのみ必須であることが分かりました。このようにこれまでの遺伝学的解析から肢芽の伸長に必要と言われていたシグナルが実質的に時空間的には限られた領域とタイミングで肢芽の特徴的な形を誘導していることが明らかとなりました。組織の特徴的

な変形パターンを抽出し、それに必要な細胞内シグナルの時空間的必要性を解析することは、今後脊椎動物の種による特異的な形の解明や、新生児の奇形のメカニズムの解明に繋がると期待されます。

次に FGF シグナルと SHH シグナルが実際に特徴的な形態変化が起こる時にどの領域で働いているのか調べました。FGFシグナルが細胞内で活性化するとErk1/2が活性化する事が知られています。そこでリン酸化 Erk1/2 の活性化を認識する抗体を用いた抗体染色を行いました。その結果肢芽の先端部分の領域の変形が大きいタイミングではリン酸化 Erk1/2 の活性化状態が強い事が分かりました。

そこで SHH シグナルについても同様に検討を行いたかったのですが、SHH シグナルの活性化を検出出来る抗体はこれまでの所ありませんでした。さらに SHH の受容体である Ptc1, Ptc2 や転写因子の Gli1,2,3 は肢芽内で非常に不均一に発現しており、SHH の分泌状態を抗体染色で観察するだけでは SHH シグナルがいつ何処でどれくらい活性化しているのか予測することさえ難しいことが分かりました。そこで私はこのような問題点を一気に解決するために転写因子 Gli1,2,3 の結合配列の下流にエメラルドルシフェラーゼを連結させたベクターを構築しました。これを用いると SHH シグナルが活性化された細胞だけエメラルドルシフェラーゼタンパク質ができ、基質のルシフェリンを加えることで細胞が発光します。またこの値を補正する為に CMV プロモーターの下流に赤色ルシフェラーゼを連結させたベクターも作成しました。これらの遺伝子をニワトリ胚の後肢に電気穿孔法を用いて遺伝子導入し、上述した肢芽の長さにおいて SHH の活性化の状態を発光顕微鏡を用いて肢芽内で可視化・定量化する実験系を構築しました(図2)。その結果 SHH シグナルは肢芽が伸長するに従って細胞内での活性化量が大きくなる事が分かりました。さらには小指が出来る肢芽の後側の領域の成長率が大きい時にシグナルの活性化量も大きい事が分かりました。このように本システムを用いることにより生体内において特定の細胞内シグナル伝達の強度を可視化・定量化出来る様になりました。このシステムは赤色ルシフェラーゼで厚み成分の細胞量も補正しているため異なるサンプル間での比較が出来るのが大きな利点です。

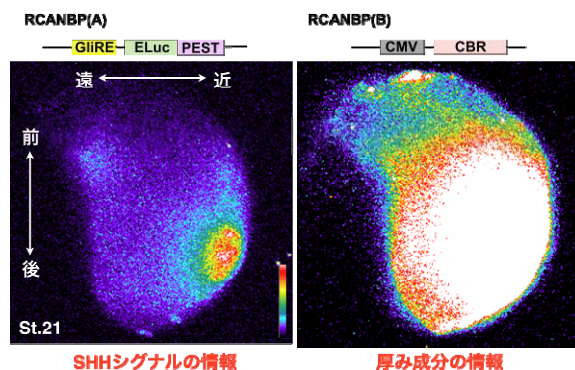


図2. 肢芽における SHH のシグナルの活性化量と厚み成分の情報を含む赤色ルシフェラーゼの発光量

以上の様に本さがけ研究で構築した、動的な形態変化を定量化する新しい手法と、形態変化を誘導する生化学的シグナルの可視化・定量化技術は、今後は肢芽だけではなく組織再生など特定の組織を正しい大きさや形に成長させるための研究にも応用される事が期待されます。現段階で形態変化が生化学的なシグナル伝達の強度でどれくらい説明出来るかさらに解析中です。

SHH のシグナルが正しい時期に正しい場所で働かないと、新生児の奇形につながる事が知られています。前側多指症は親指になる領域に本来は発現しない SHH が異所的に発現した結果2本の親指が形成されてしまう新生児の奇形です。本さがけ研究の間に、ニワトリの一種である烏骨鶏がこの SHH のプロモーターに1塩基のポイントミューテーションがあり、このため親指が1本多い前側多指症のニワトリであることを明らかにしました(図3)。烏骨鶏は古来より中国の王宮で不老不死の源である霊鳥として食されて来ました。現代においても高血圧や生活習慣病の漢方薬として用いられています。本研究で烏骨鶏の特徴である多指のメカニズムが明らかになった事は、烏骨鶏が他のニワトリと異なる仕組みを解明する手がかりとなる事が期待されます。

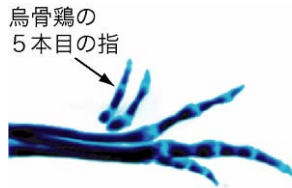


図3. 烏骨鶏の5本目の指

さらに、東京工業大学の半田宏先生、伊藤拓水先生との共同研究により新生児の手足に重篤な奇形を誘導するサリドマイドのターゲットタンパク質 CRBN の機能解析を行い発表しました。この研究によりサリドマイドは肢芽の伸長時に FGF10 の発現を低下させて伸長阻害を誘導することが明らかとなりました。

3. 今後の展開

本さがけ研究で構築した、動的な形態変化を定量化する新しい手法と、形態変化を誘導する生化学的シグナルの可視化・定量化技術は、今後は肢芽だけではなく組織再生など特定の組織を正しい大きさと形に成長させるための研究にも応用される事が期待されます。

今後はまずニワトリ胚の前肢についても同様の解析を行い、似て非なる組織である前肢と後肢の違いがどのような発生システムの違いで生み出されるのか解析します。また肢芽だけでなく、脳や内臓など他の組織についても本解析手法を応用したいと考えています。このような基礎データは将来的に試験管内で特定の臓器だけ培養して大きくしたり、その時に形を制御して行く上での判断材料になることが期待されます。

4. 自己評価

本さがけ研究を始める時に予定していた発光イメージングシステムの構築と形態形成の定量化の手法について構築出来ました。またこの解析を行っている時に遠近軸形成の仕組みや将来の指原器の形成位置など新たな発見が多数ありました。これは当初の予想を超えるものでした。最終的に解析しなかった SHH シグナルが各指の指原器になる細胞群でどれだけ受け取るシグナルの量が異なっているのかについて、研究期間内に解析するには至りませんでした。この点だけ予定期間内に出来ませんでしたが、データの取得は行ったので、今後の解析で各指原器がどれだけモルフォゲンとしての SHH のシグナル量を需要しているのか計算したいと思っています。

5, 研究総括の見解

実験発生学的手法と統計学的手法を組み合わせる超多細胞集団の動的な形の変化を3次元で定量的に計測する新しい独自の手法を構築し、定量発生生物学の進展に貢献したことは高く評価出来る。また、共同研究からサリドマイドは肢芽の伸長時に FGF10 の発現を低下させて伸長阻害を誘導することを明らかにしたことは、基礎研究の成果から社会への貢献へとつながりよい事例となっている。さらに、社会への還元を意識して、定量発生生物学を進展させることを期待している。

6, 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. Suzuki T. et al "Identification of spontaneous mutations within the long-range limb specific Sonic Hedgehog enhancer (ZRS) that alter Sonic Hedgehog expression in the chicken limb mutants oligozeugodactyly and Silkie Breed "Developmental Dynamics, 240 巻 1212-1222 (2011).
2. Ito T, Ando H, Suzuki T., Ogura T, Hotta K, Imamura Y, Yamaguchi Y, Handa H. "Identification of a primary target of thalidomide teratogenicity."Science 327 巻 1345-1350 (2010)

(2)特許出願

なし

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物等)

【主要な学会発表】

1. 2011 年 3 月 4 日 細胞システムコロキウム:理論生物学にて、「組織変形による肢芽形成」の演題で、発表した。
2. 2010 年 7 月 14 日 11th International Conference of Limb Development and Regeneration, College of William and Mary, USA にて"Quantification of Morphogen activity in the developing chick limb bud"の演題でポスター発表した。
3. 2010 年 6 月 22 日 International Society for developmental biology, 京都市にて"Quantification of Morphogen activity in the developing chick limb bud"の演題で発表した。
4. 2010 年 4 月 15 日 Fallon Symposium, Madison, USA にて"Role of GDF11 during hindlimb field determination"の演題で発表した。
5. 2009 年 9 月 7 日 第16回国際発生生物学会・エジンバラ(イギリス)にて"Molecular profile and functional role of the PFR to specify each digit identity"の演題でポスター発表した。
6. 2009 年 1 月 31 日 Suzuki T., Ogura T. "Electroporation into the limb: beyond misexpression" Electroporation and Sonoporation in Developmental Biology, p85-p97(2009)

【受賞】

1. 2011 年 2 月 23 日 手島精一記念研究賞「サリドマイドによる催奇性の主要な標的分子の同定」東京工業大学 (受賞者氏名: 伊藤拓水、安藤秀樹、鈴木孝幸、小椋利彦、堀川健太郎、今村佳正、山口雄輝、半田宏)

研究報告書

「植物表皮組織における気孔パターン形成の動的ネットワーク」

研究期間：平成19年10月～平成23年3月

研究者：鳥居 啓子

1. 研究のねらい

陸上植物の表皮組織に散在する気孔は、水や二酸化炭素の通気口であり、気孔口の開閉により植物の光合成や呼吸といった活動を制御している。このため、気孔のふるまいは陸上植物の繁栄、生存や、地球レベルの大気環境にも大きな影響を与えている。この気孔が正常に開閉するためには、気孔の形成段階において数、密度が適切に制御され、葉の一面に均等に散在するパターンが形成される必要がある。

モデル植物として用いられるシロイヌナズナを含めた双子葉植物では、葉など光合成器官の発生過程において、未分化な表皮細胞の一部が非対称分裂を起こすことにより気孔の形成が開始する。本さがけ研究者らのこれまでの研究などから、気孔を形成する一連のマスター転写因子や気孔分化を抑制するシグナル伝達因子の存在が明らかになっていた。しかし、それらの因子が気孔発生時にどのような時空間制御を受けているのか、またどのような制御階層(regulatory hierarchy)により、気孔系譜となる細胞が決定されるのか解っていなかった。本研究は、葉の発生過程において未分化細胞のシートからどのようにして自律的に気孔のパターン形成が起こるのか、その分子基盤と制御ネットワークの動態を、モデル植物シロイヌナズナの実験生物学とナノ材料工学・数理モデルなど異分野融合型研究により明らかにすることをねらいとする。

2. 研究成果

1: 気孔の初期パターン形成における細胞間相互作用のダイナミクスの可視化

1-a: 気孔系譜の最初の決定プロセスと側方阻害

未分化な原表皮細胞から気孔系譜が発生するプロセスには、bHLH 型転写因子 SPEECHLESS (SPCH) および SCREAM (SCRM と SCRM2) が必要である。また、初期気孔系譜細胞(メリステモイド母細胞)は、非対称分裂を阻害するペプチドシグナル遺伝子 EPF2 を発現することが知られている。蛍光タンパク質を用いた SPCH, SCRM, EPF2 などの転写レポーターおよび翻訳レポーターを互いの変異体に導入し、遺伝子発現とタンパク質蓄積の時空間制御を解析した。さらに、クロマチン免疫共沈法や生化学的解析を行った。これらの結果を合わせると、以下の気孔のパターン形成メカニズムが考察された。葉の発生過程において、均一な未分化細胞のシートから、まず広範囲に SPCH が発現し、その後 SCRM が発現する。未分化細胞の中で、SPCH-SCRM 転写因子 2 量体をより多く蓄積したの(勝者)は、分泌ペプチドシグナル EPF2 を誘導・分泌する。EPF2 は隣接する細胞へと移動し、受容体シグナル伝達を介して SPCH-SCRM 転写因子 2 量体を分解することにより、隣接細胞(敗者)が気孔系譜に入らないよう阻害している。これは、まさに Activator-Inhibitor モデル(Turing モデル)であることが示された。

1-b: 芽生え表皮のライブイメージング法の開発と気孔をつくる転写因子の時空間動態

共焦点レーザー蛍光顕微鏡を用いた、発芽過程における子葉の表皮組織の分化をリアルタイ

ムに観察する長期間ライブイメージング法とソフトウェアを開発した。これにより、気孔系譜がつくられる過程(すなわち気孔分化が起こる以前)におけるマスター転写因子の時空間動態を観察できるようになった。気孔系譜の開始～増殖～分化の全てのステップを司る、転写因子 SCRM タンパク質の動態を観察したところ、予想された抑制シグナルにより側方阻害が起こる前の段階では、なんらかのポジティブなシグナルにより、隣接する表皮細胞の両方の核において SCRM-GFP タンパク質が蓄積することがわかった。レーザー殺傷の予備実験から、隣接する細胞(敗者)は、気孔系譜の”バックアップ”である可能性が示唆された。

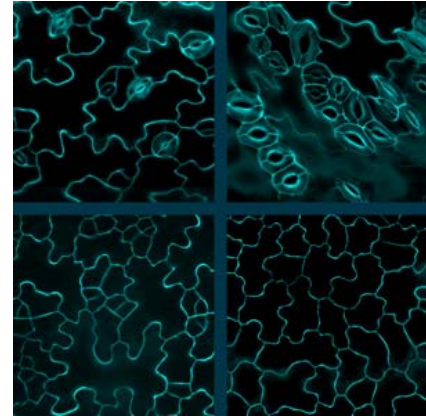


図1:大腸菌で生産した活性型 EPF1,EPF2 ペプチド、野生型(左上)、erecta ファミリー3重突然変異体(右上)、EPF1 ペプチド(左下)および EPF2 ペプチド(右下)処理した野生型芽生え

2. 気孔の数と分布を制御するペプチドシグナルの受容メカニズムと作用機作の解明

2-a:ペプチドシグナルと受容体の直接結合および受容体の二量体形成

気孔の前駆体細胞は2つの類似したペプチド EPF1 とEPF2を分泌し、隣接する表皮細胞で発現するERECTAファミリー受容体キナーゼ(ERECTA, ERL1)および TMM 受容体に結合し、気孔の数と分布を調節すると考察されている。しかし、これらペプチドが本当に受容体と結合するのか、どのペプチドがどの受容体にシグナル伝達するのか、どのような生化学相互作用により気孔のパターンが生じるのかなど全く分かっていなかった。

さきがけ研究者らは、まず候補となっているペプチドホルモンと受容体が、生体中で結合するかどうか調べるために、目印を付けた3種類のシロイヌナズナ受容体(ERECTA、ERL1、TMM)および2種類のペプチド(EPF1、EPF2)をタバコ表皮細胞に導入した。免疫共沈降法により、これらのペプチドがERECTA受容体とERL1受容体に強く結合すること、その一方でTMM受容体への結合は限られていること発見した。

次に、大腸菌で生産したペプチドホルモン(EPF1、EPF2)を巻き戻し、活性形ペプチドの大量生産に成功した。この活性EPF1とEPF2をシロイヌナズナ植物表皮に散布すると、EPF1は気孔の前駆体細胞の分化を阻害し、EPF2ホルモンは気孔系譜をつくる最初の非対称細胞分裂を阻害する、という生物活性を示した(図1) ペプチドホルモンと受容体の結合を生体外で詳しく解析するために、植物から精製したERECTA受容体、ERL1受容体、TMM受容体をそれぞれ固層化した「受容体バイオセンサーチップ」を開発した。水晶天秤(QCM)・表面プラスモン共鳴(SPR)という2つの解析技術を用いて、各々のチップ上に活性EPF1ホルモンと活性EPF2ホルモンを投与することにより、ERECTAファミリー受容体型キナーゼの EPF ペプチドとの結合動態を明らかにした。

さらにERECTAファミリー受容体キナーゼは、植物内でホモ2量体およびTMM受容体とのヘテロ2量体を作る一方、TMM受容体はホモ2量体を作らないことを明らかにした。一般にERECTAファミリー受容体型キナーゼやTMM受容体は、ホモ2量体を形成することで活性化することから、ERECTAファミリー受容体型キナーゼがEPFの受容体であり、TMM受容体はシグナル受容と伝達を調節する役割を持つことが示唆された。

これらの結果からEPF1とEPF2がERECTAファミリー受容体部位に直接結合することが明らかとなったが、その一方で、生体内で実際にどの受容体がどのペプチドに結合してシグナルを伝達か未知であった。そのため、さきがけ研究者らは不活性な ドミナントネガティブ型のERECTA受容体とERL1受容体を発現させた植物体を作り、植物体内でそれぞれの受容体由来のシグナル伝達を選択的に阻害した。その結果、ERECTA受容体を阻害した植物はEPF2ペプチドを認識できなくなり、ERL1受容体を阻害した植物は逆にEPF1ペプチドを認識できなくなった。これらの結果から、EPF2-ERECTAそしてEPF1-ERL1という2つのリガンド-受容体のペアが、気孔形成の開始と気孔前駆細胞の分化という、2つの重要なステップをそれぞれ制御していることが判明した。

3. 植物の幹細胞：気孔の幹細胞を特徴づける遺伝子群の発見

気孔の前駆細胞であるメリステモイド細胞(図2A)は、非対称分裂・自己再生という、幹細胞(Stem Cell)としての興味深い性質を持つが、メリステモイドを特徴づける遺伝子やタンパク質の存在はよくわかっていない。メリステモイド細胞は低頻度で一過的であるため、分

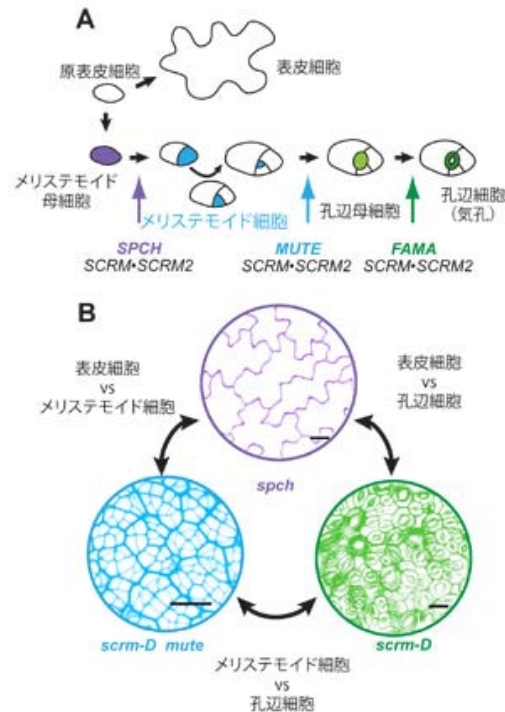


図2: (A) 気孔の分化における細胞状態の遷移。メリステモイド細胞(水色)は、非対称分裂を内巻き螺旋状に繰り返す特徴を持つ。(B) 突然変異体の組み合わせを利用したメリステモイド細胞の分子プロファイリング戦略の模式図。

子プロファイリングに耐えうる十分な量の高純度なメリステモイド細胞を単離回収することは不可能だった。

さきがけ研究者らは、気孔の分化を制御するマスター転写遺伝子の突然変異体を組み合わせることにより、表皮のほぼ全てがメリステモイド細胞になる植物を作出した(図2B, *scrm-D mute*)。この芽生えと、気孔系譜ができない *spch* 突然変異体(図2B)、逆に表皮全てが気孔になる *scrm-D* 突然変異体(図2B)の3者の全転写産物を比較することにより、メリステモイド細胞に特徴的な遺伝子群を同定した。

それら遺伝子産物の解析から、新奇タンパク質 POLAR を発見した。研究成果1b

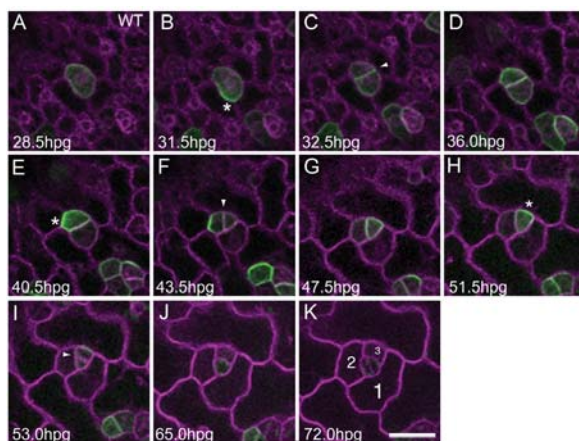


図3: 気孔系譜の非対称分裂時における POLAR-GFP タンパク質のダイナミックな局在。芽生え子葉の発芽後 28.5-72 までを示す。POLAR は非対称分裂直前に分裂面の遠心端(*)に局在する。

で開発したタイムラプスムービーによって、POLAR の鮮やかな動態が明らかになった。POLAR はメリステモイドの細胞表層に均一に局在しているが、非対称分裂直前(1-2時間前)に分裂面から遠心端へと移動する(図 3)。非対称分裂が正常に起こらなくなった植物体では、POLAR の極性局在も消失することから、気孔系譜の極性に深く関わっていることが示唆された。また、根端分裂組織の非対称分裂を制御する転写因子 SCZ がメリステモイド細胞にて強く発現することも判明した。

これら一連の成果から、未分化細胞から表皮気孔パターンが自己組織化するメカニズム、そして特定のペプチドホルモンが特定の受容体を介して気孔の数を制御するメカニズムが明らかになった。さらには、本研究により気孔の幹細胞であるメリステモイド細胞を特徴づける遺伝子の全貌が明らかになったと共に、今後、植物における非対称分裂の制御機構の解明への手がかりが得られた。今後、気孔形成の2つのステップを制御することが可能になると考えられ、乾燥耐性や二酸化炭素吸収に優れたバイオマス作物を開発が期待される。また、ペプチドホルモンを農薬として安価に大量生産することで、遺伝子組換えを介さない、塗布による作物の水利用効率改善などの応用への道がひらけた。

3. 今後の展開

本さきがけの成果から、各々の転写因子やシグナル因子がどう相互作用してパターン形成が起こるのか、その仕組みが明らかになってきた。今回明らかになった Activator-Inhibitor (SPCH-SCRM-EPF2)のネガティブフィードバックは、表皮上でどのくらいの距離まで働くのか。その空間制御を明らかにするために、現在、Cre-Lox 法を用いて葉表皮上の一部のみが EPF2(および EPF1)を過剰発現するキメラ植物を作出し、気孔のパターンを解析している。

その一方で、まだ解っていない問題も残されている。例えば、芽生えのタイムラプスイメージングでは、将来気孔になる細胞の隣の細胞では一過的に SCRM-GFP の発現が上昇する、という典型的な側方阻害だけでは説明できない現象が観察された。本研究課題が進行中に他グループにより発見された気孔のポジティブシグナルであるストマジエン(EPFL9)が、これら現象にどうかかわっているのか興味深い。また、DR-VISION 社(ワシントン州 ベルビュー市)と共同開発したソフト Stomatal Patterning Tracker (Ver 1.5)を使いこなす時間がなかった。今後は、各転写因子やシグナル因子のさらなる可視化と定量解析を行い、細胞間相互作用の基本原理にせまりたい。

本研究で、気孔形成を抑制するネガティブシグナルである EPF1 と EPF2 は、生体内ではそれぞれ ERECTA と ERL1 を介して、別々のプロセスで気孔の発生と分布を制御することがわかった。これらリガンド-受容体シグナル伝達経路を明らかにして、シグナルアウトプットの特異性がどうやって決まるのか解明したい。ストマジエン(EPFL9)は EPF1/2 と類似したペプチドであるが、気孔形成に正反対に作用する。その分子メカニズムも明らかにしたい。

メリステモイド細胞の分子プロファイルから得た POLAR に関しては、その局在ダイナミクスのメカニズムと細胞の非対称性への関与に関して、細胞骨格や細胞遷移との相互作用などを含め、細胞生物学的手法からせまりたい。

4. 自己評価

本研究で未分化細胞シートから均一な気孔のパターン形成が起こる制御動態の枠組みは解ってきた。しかし、既に知られている Activator-Inhibitor モデル以上の発生学的概念の提唱にはつながらなかった。一番の問題点は、当初計画した気孔系譜を決定する制御ダイナミクスの数理解析に全く切り込めなかったことである。実際問題として、現象(の普遍性と動作原理)の大枠をとらえる以前に、現象を制御している一群の分子(遺伝子・タンパク質)の同定とその制御動態を明らかにしてしまった。さきがけ研究者本人が、いったいどのような現象の予測とシミュレーションに数理モデルが有効なのか、どのような数理モデルが実験生物学に寄与するのか、きちんと理解できていなかったところが大きいと反省している。(さきがけのおかげで実際に数理モデル研究者と意見交換する機会に恵まれたのは幸いであった)。異なるリガンドー受容体ペアによる気孔系譜分化の微妙な outcome の違い等、数理シミュレーションが貢献できる現象も見えてきており、今後につなげたい。

5. 研究総括の見解

未分化細胞から表皮気孔パターンが自己組織化するメカニズム、そして特定のペプチドホルモンが特定の受容体を介して気孔の数を制御するメカニズムを解明したこと、さらには、気孔の幹細胞であるメリステモイド細胞を特徴づける遺伝子の全貌が明らかにしたことなど、多くの成果を出してきたことを高く評価している。今後、共同研究により、気孔形成の制御により、乾燥耐性や二酸化炭素吸収に優れたバイオマス作物を開発への展開も期待したい。

6. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表 (*責任著者)

1. Lee, J.S., Kuroha, T., Hnilova, M., Khatayavich, D., McAbee, J.M., Kanaoka, M.M., Sarikaya, M., Tamerler, C., and Torii, K.U. (2012) Direct interaction of ligand-receptor pairs specifying stomatal patterning. **Genes & Development** 26:126-136
2. Pillitteri, L.J., Peterson, K.M., Horst, R.J., and Torii, K.U. (2011) Molecular profiling of stomatal meristemoids reveals new component of asymmetric division and commonalities among stem-cell populations in Arabidopsis. **Plant Cell** 23:3260-75
3. Guseman, J.M., Lee, J.S., Bogenschutz, N.L., Peterson, K.M., Virata, R.E., Xie, B., Kanaoka, M.M., Hong, Z., and Torii, K.U. (2010) Dysregulation of cell-to-cell connectivity and stomatal patterning by loss-of-function mutation in Arabidopsis *CHORUS/GLUCAN SYNTHASE-LIKE8*. **Development** 137: 1731-1741
4. Hara, K., Yokoo, T., Kajita, R., Onishi, T., Yahata, S., Peterson, K.M., Torii K.U., and Kakimoto, T. (2009). Epidermal cell density is auto-regulated via a secretory peptide, EPIDERMAL PATTERNING FACTOR2, in Arabidopsis leaves. **Plant and Cell Physiology** 50, 1019-1031
5. Uchida, N., Lee, J.S., Horst, R.J., Lai, H.H., Kajita, R., Kakimoto, T., Tasaka, M., and Torii, K.U. * Regulation of inflorescence architecture by inter-tissue-layer ligand-receptor communication between the endodermis and phloem. **Proc Natl Acad Sci USA**; currently under revision

(2)特許出願

研究期間累積件数: 1 件
(非公開)

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物等)

【主要な学会発表】

- Keystone Symposium “Receptors and Signaling in Plant Development and Biotic Interactions”(Tahoe City, CA) 3/14–3/19/2010 “Cell-Cell Communication and Stomatal Patterning” 招待講演
- International Conference in Arabidopsis Research 2010 (Yokohama, Japan) (国際シロイヌナズナ学会) 6/6–6/11/2010: “Receptor signaling in Stomatal Patterning: Complexity, Challenges, and New Insights” 招待講演
- Plant Biology 2010 (Montreal, Canada) (カナダ、アメリカ植物生理学会 合同国際会議) 7/31–8/4/2010 “Take a Deep Breath, Signaling in Stomatal Patterning and Differentiation” 招待講演
- ASCB 50th Annual Meeting (Philadelphia, USA) (アメリカ細胞生物学会年会) 12/11–15/2010 “Symmetry and Asymmetry in Plant Epidermal Patterning” 招待講演
- Cold Harbor Asia Conference on Plant Cell and Developmental Biology (Suzhou China) (コールドスプリングハーバー・アジア植物細胞発生学シンポジウム)(5/31–6/4/11) “Communication, Fate, and Decision Making during Stomatal Development” 招待講演
- Society of Developmental Biologists Annual Conference (7/21–7/25/11) (米国 発生生物学会年会) “Cell-cell communication in plant organogenesis and tissue patterning” 招待講演

【受賞】

- 第5回 日本学術振興会賞「植物の気孔のパターン形成と分化のメカニズムの解明」200/3/9
- 2010 Undergraduate Research Mentor Award, University of Washington 5/21/2010
- HHMI-GBMF Investigator '15 most innovative plant scientists in the US” 6/16/2011
- Distinguished Professor of Biology, University of Washington 10/1/2011

【著作物等】

- Pillitteri, L.J.,* and Torii, K.U.* (2012) Mechanisms of Stomatal Development. *Annual Review in Plant Biology*, Advance Online Publication [総説]
- Kanaoka, M.M. and Torii, K.U.* (2010) FERONIA as an upstream receptor kinase for polar cell growth in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 17461–17462 [コメンタリー]
- Rychel, A.L., Peterson, K.M., and Torii, K.U.* (2010) Plant Twitter: Ligands under 140 amino acids enforcing stomatal patterning. *Journal of Plant Research* 123: 275–280 [総説]
- Peterson, K.M., Rychel, A.L., and Torii, K.U.* (2010) Out of the mouths of plants: the molecular basis of the evolution and diversity of stomatal development. *Plant*

Cell 22: 296–306 [総説]

- Torii, K.U.* (2008) Transmembrane receptors in plants: receptor kinases and their ligands. In *Intracellular Signaling in Plants*. Eannual Plant Reviews. Ed. By ZB Yang, Wiley–Blackwell, London pp. 1–29 [著作: Book Chapter]

研究報告書

「細菌べん毛蛋白質輸送装置の動作機構の解明」

研究期間：平成 20 年 10 月～平成 24 年 3 月

研究者：南野 徹

1. 研究のねらい

蛋白質の局在化は細胞機能の、つまりは生命活動の根幹をなす現象であり、非常に特異性の高い反応である。この局在化に関わる、蛋白質の生体膜を越える輸送には、ATP やプロトン駆動力などの生体エネルギーが使われる。しかしながら、輸送装置がどのようにこれらのエネルギーを使って効率よく目的の蛋白質を適所に配送するのかは不明である。本研究では、蛋白質の膜透過に関わる輸送装置の動作機構、そしてエネルギー変換機構を解明するため、遺伝学的機能解析が容易に行えるバクテリアべん毛の蛋白質輸送系を研究対象とした。光学顕微ナノ計測装置を開発、活用し、遺伝学的機能解析法を組み合わせることで、生体膜に埋め込まれた蛋白質輸送装置の高精度でかつしなやかな、熱ゆらぎまでもうまく取り入れて動作する巧妙なしくみの解明を目指した。

2. 研究成果

多くの細菌は、べん毛と呼ばれる、細胞外に長く伸びたらせん繊維状の運動器官を持っている。べん毛は約 30 種類の蛋白質から構成される複雑な超分子ナノマシンで、細胞膜を貫通して回転モーターとして働く基部体、ユニバーサルジョイントであるフック、細胞外に伸びてらせん型プロペラとして働く繊維から構成される。べん毛が構築され細胞外に長く伸びる際には、べん毛を構成する蛋白質が次々にべん毛先端のキャップ直下へ運ばれて結合する。そのため、べん毛独自の蛋白質輸送装置がべん毛基部に存在する。輸送装置は 6 種類の膜蛋白質 (FliA, FliB, FliO, FliP, FliQ, FliR) と 3 種類の可溶性蛋白質 (FliH, FliI, FliJ) で構成される。これまでの遺伝学および生化学的解析から、輸送エンジンとして働く輸送ゲート複合体は細胞膜内外に形成されるプロトン駆動力をエネルギー源としてべん毛蛋白質を細胞外へと輸送すること、FliH, FliI, および FliJ は細胞質内で ATPase 複合体を形成し、輸送基質蛋白質やシャペロン・輸送基質蛋白質複合体を細胞質から輸送ゲートへと搬送すること、などが示されているが、その詳細な分子機構は不明であった。しかも、界面活性剤などで細胞膜を壊してべん毛基部体を単離精製すると、輸送装置の大半が基部体から解離してしまうため、輸送装置が基部体のどこに結合しているのかも謎のままであった。

本研究では、1) 輸送装置構成蛋白質 FliI ATPase の局在化と自己集合の解析、2) 輸送装置の基質認識機構の解析、3) 輸送ゲート複合体のエネルギーカップリング機構の解析、および 4) プロトンチャネル活性測定方法の確立を行ったので報告する。

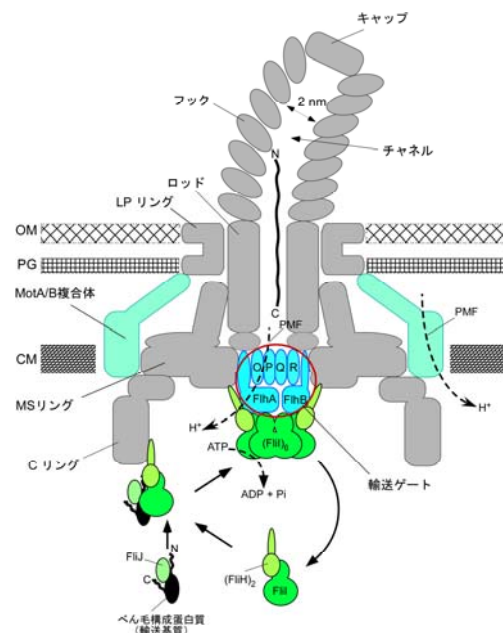


図 1. べん毛蛋白質輸送装置の模式図

1) 輸送装置構成蛋白質 FliI ATPase の局在化と自己集合の解析

FliI ATPase は、6 量体リングを形成して ATP を加水分解し、べん毛蛋白質輸送を促進する。しかしながら、FliI リング形成が蛋白質輸送にどのように共役しているのかは不明であった。精製した FliI を用いて *in vitro* で FliI リングの再構成実験を行った結果、ATP の結合により FliI が 6 量体リングを形成すること、ADT および Pi が FliI から解離するとそのリング構造が不安定になることを見いだした。さらに、輸送ゲート上で FliI リングが形成されることが輸送基質蛋白質の輸送ゲートへの挿入に必須であることが示唆された (Kazetani *et al. BBRC*. 2009)。

FliI ATPase のべん毛基部への局在化機構を明らかにするため、FliI-YFP および FliI-CFP を作製し、蛍光顕微鏡を用いてそれらの細胞内局在を解析した。その結果、FliI のべん毛基部へ局在には輸送装置構成蛋白質 FliH およびべん毛基部体 C リングが必要であること、FliH の N 末近傍に存在する 7 番目と 10 番目のトリプトファン残基が FliI および輸送ゲート複合体との相互作用に重要であることを見いだした (Minamino *et al. Mol. Microbiol.* 2009b)。

以上の結果から、ATP の加水分解反応に共役しておこる FliI ATPase の離合集散サイクルがべん毛蛋白質輸送過程を促進するというモデルを提案した (図 1)。

2) 輸送装置の基質認識機構

FliT は、4 本の α ヘリックスからなる可溶性タンパク質で、べん毛繊維キャップタンパク質 FliD に特異的に結合する分子シャペロンとして働く。FliT が輸送装置構成蛋白質の一つである FliI ATPase と特異的に相互作用することで、FliD の細胞外への輸送が促進される。しかしながら、FliI ATPase がどのように FliT-FliD 複合体を認識し、FliD の輸送を促進するのかは不明であった。そこで、FliT の X 線結晶構造解析および遺伝学的機能解析法を相補的に組み合わせて解析した結果、FliT の C 末端側の α -ヘリックスが分子スイッチのように構造変化することで、FliI ATPase との相互作用が巧みにコントロールされることを見いだした (Imada *et al. PNAS*. 2010)。さらに、GST アフィニティークロマトグラフィー法を利用したプルダウン法により FliT-FliI 相互作用を詳細に解析した結果、C 末端側の α -ヘリックスが欠失した FliT94 は FliI の N 末近傍領域 (FliI_{EN}) と強く、ATPase ドメイン (FliI_{CAT}) と弱く結合すること、C 末端側の α -ヘリックスが FliI_{EN} との強い相互作用を抑制すること、FliH の添加により FliT94 が ATP の有無に関係なく FliI から解離すること、FliD が FliT94-FliI_{CAT} 相互作用を安定化することなどを見だし、FliT-FliD 複合体は FliI の ATPase ドメインを介して FliH-FliI 複合体に結合することが示唆された (Minamino *et al. Mol. Microbiol.* 2012a)。

FliH は FliB とともに FliH-FliI-FliJ 複合体の結合プラットフォームを形成する。FliH の C 末端側細胞質領域 (FliH_C) は 4 つのコンパクトなドメイン (D1, D2, D3, D4) から構成される。FliH_C はべん毛蛋白質輸送に直接関与するが、その作用機構は不明であった。D1 ドメインに温度感受性 G368C 変異を持つ *fliH* 変異株の遺伝学機能的解析を行った結果、この変異により、FliH_C と、FliH、FliI、FliJ、および FliB の C 末端側細胞質ドメインとの相互作用は阻害されないが、輸送基質蛋白質の輸送ゲートへの挿入が阻害されることが明らかとなった (Minamino *et al. J. Bacteriol.* 2010)。さらに、フック・フィラメント連結蛋白質である FlgK および FlgL に特異的な分子シャペロンとして働く FlgN 欠損株の遺伝学的および生化学的解析を行った結果、保存性の高い疎水性残基で構成される FliH_C の D1 および D2 ドメインの境界面が FlgN-FlgK 複合体や FlgN-FlgL 複合体の結合部位であることが判明した (Minamino *et al. Mol. Microbiol.* 2012b)。

3) 輸送ゲート複合体のエネルギー共役機構

輸送エンジンとして働く輸送ゲート複合体は、細胞膜内外に形成されるプロトン駆動力をエネルギー源としてべん毛蛋白質を細胞内から細胞外へと運び出す。しかしながら、どのようにして輸送装置がプロトン駆動力を蛋白質輸送と言う力学的仕事に変換するのかは不明であった。本研究では、野生株のサルモネラ菌と、輸送ゲート複合体のみでも効率よくべん毛を形成することができる変異株を用い、輸送ゲート複合体自体は、プロトン駆動力を構成する2つの成分、細胞膜を隔て

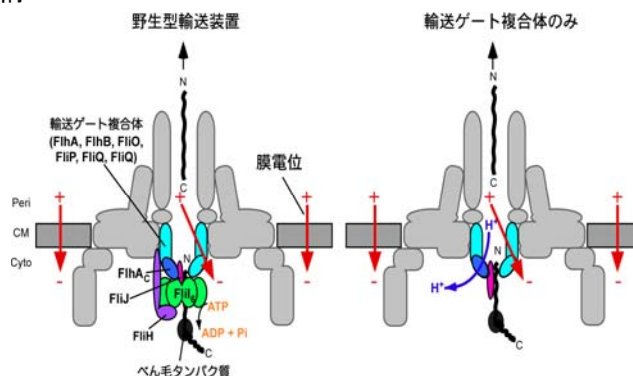


図 2. 輸送装置のエネルギー共役機構

た電位差 ($\Delta\psi$) と細胞膜内外のプロトン濃度差 (ΔpH) を、蛋白質輸送の異なる段階で明確に区別して利用していること、FliH、FliI および FliJ がともに働く野生株では、FliH-FliI 複合体の助けによって FliJ が FliA と特異的に結合することにより、輸送ゲートは $\Delta\psi$ だけで駆動される高効率な輸送エンジンとして働くことを明らかにした(図 2.) (Minamino *et al. Nat. Commun.* 2011)。

4) プロトンチャネル活性測定方法の確立

輸送ゲート複合体のプロトンチャネル活性を定量的に測定する方法を確立するため、pH 感受性の蛍光蛋白質 pHluorin 遺伝子を染色体 DNA 上の *araBAD* 遺伝子座に組み込んだサルモネラ菌を作製した。作製した pHluorin 発現株内でプロトンチャネル蛋白質を発現させ、pHluorin を用いた細胞内 pH 変化を計測することで、精製困難なプロトンチャネルのプロトン透過活性を簡便に計測できた (Morimoto *et al. FEBS Lett.* 2010)。

輸送ゲート複合体のエネルギー変換の分子機構を明らかにするには、入力エネルギーであるプロトン流と、出力であるべん毛蛋白質輸送を同時に計測する必要がある。輸送ゲート複体に流れ込むプロトンの量を計測するには、輸送装置近傍の局所的な pH 変化を定量的に測定すれば可能であると考えられる。そこで、pHluorin をべん毛基部体蛋白質 FliG やべん毛モーター蛋白質 MotB に融合した pHluorin-FliG および pHluorin-MotB 融合蛋白質を作製したが、大部分の融合蛋白質がフルオリン内部に存在する 153 番目のメチオニンで特異的に切断された。このメチオニン残基に様々な変異を導入した結果、M153R 変異によってこれらの pHluorin 融合蛋白質の安定性および S/N 比が著しく上昇した。さらに、精製した pHluorin(M153R)-FliG 融合蛋白質は pH indicator として利用できることが判明した (Morimoto *et al. PLoS One* 2011)

3. 今後の展開

物理学の概念では、プロトン駆動力を構成する $\Delta\psi$ と ΔpH は等価なエネルギーであると信じられてきたが、輸送ゲート複合体はこれらが等価であるという単純な物理学の方程式では説明できない複雑なしくみで働いていることが示唆された。しかしながら、どのように輸送ゲート複体がこれら2成分を区別して利用するのかは不明である。今後、べん毛蛋白質輸送システムを *in*

vitro で再構成し、蛋白質輸送に共役して輸送ゲートに流れ込むイオン流と蛋白質輸送速度を同時に計測することで、べん毛蛋白質輸送装置のエネルギー変換の仕組みの解明を目指す。

4. 自己評価

生体膜に存在する膜超分子ナノマシンは細胞膜内外に形成されるプロトン駆動力を使って ATP を合成し、また生体膜を越えたタンパク質などの物質輸送を行う。これまでに研究されたプロトン駆動型の膜超分子ナノマシンでは、 ΔpH 成分が存在しない場合でも $\Delta \psi$ によって、あるいは $\Delta \psi$ が消失した場合でも ΔpH によってプロトンは細胞内へ流れ、エネルギー源として利用されることが示されている。すなわち、物理学的に定義されるとおり、 $\Delta \psi$ と ΔpH は区別なく等価なエネルギー源として利用されるというのが長い間の通説であった。本研究では、輸送ゲート複合体自体は、 $\Delta \psi$ と ΔpH を明確に区別して利用していることを明らかにした。このことは、輸送ゲート複合体が、 $\Delta \psi$ と ΔpH が等価であるという単純な物理学の方程式では説明できない、複雑なしくみで働いていることを明確に示すものである。その一方で、輸送基質蛋白質の速度論的解析と、輸送に共役して細胞内に流れ込むプロトン流の計測を、同時に行うことができなかったため、輸送装置のエネルギー変換機構を本格的に解明するまでには至らなかった。さきがけ研究期間中にべん毛蛋白質輸送のダイナミクスを計測するための3波長同時イメージングシステムや局所 pH を高分解能で蛍光イメージングできる2波長励起1波長測光システムは構築できたので、今後、より定量的なデータ収集を行うことで、輸送装置のエネルギー変換の分子機構の解明に迫って行くことを目標としている。

5. 研究総括の見解

3種類の蛍光を同時に観察できる高感度蛍光顕微システム、および0.01pHユニット差を有為に検出できる高感度pHイメージング装置を開発したことにより、多くのべん毛蛋白質輸送のダイナミクスに関する成果を次々に見出している。これらの知見からべん毛蛋白質輸送のエネルギー変換の仕組みの解明へと進めていただきたい。

6. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. Minamino, T., Kinoshita, M., Hara, N., Takeuchi, S., Hida, A., Koya, S., Glenwright, H., Imada, K., Aldridge, P.D., & Namba, K. Interaction of a flagellar chaperone FlgN with FlhA is required for efficient export of its cognate substrates. *Mol. Microbiol.* 83: 775–788 (2012b).
2. Minamino, T., Kinoshita, M., Imada, K., & Namba, K. Interaction between FliI ATPase and a flagellar chaperone FliT during bacterial flagellar protein export. *Mol. Microbiol.* 83: 168–178 (2012a).
3. Minamino, T., Morimoto, Y.V., Hara, N., & Namba, K. An energy transduction mechanism used in bacterial flagellar type III protein export. *Nat. Commun.* 2: 475 doi: 10.1038/ncomms1488 (2011).
4. Imada, K., Minamino, T., Kinoshita, M., Furukawa, Y., & Namba, K. Structural insight into the regulatory mechanisms of the flagellar type III chaperone FliT with its binding partners. *Proc.*

Natl. Acad. Sci. USA 107: 8812–8817 (2010).

5. Minamino, T., Yoshimura, S.D.J., Morimoto, Y.V., González-Pedrajo, B., Kami-ike, N., & Namba, K. Roles of the extreme N-terminal region of FliH for efficient localization of the FliH-FliI complex to the bacterial flagellar type III export apparatus. *Mol. Microbiol.* 74: 1471–1483 (2009b).

(2)特許出願

研究期間累積件数:0 件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物等)

招待講演

1. Minamino, T. Switching mechanism of flagellar motor rotation. Gordon Conference on Sensory Transduction in Microorganisms. Ventura, California, USA. January 15– 20, 2012.
2. Minamino, T. Molecular mechanism of proton-driven bacterial flagellar type III protein export. Gordon Conference on Sensory Trasnduction in Microorganisms. Ventura, California, USA. January 24– 29, 2010.
3. Minamino, T. Molecular Mechanism of Bacterial Flagellar Protein Export. Japan–Mexico Workshop on “Pharmacobiology” and “Nanobiology”. Universidade Nacional Autónoma de México (UNAM), México City, México. February 25–27, 2009.