

「代謝と機能制御」研究領域 領域活動・評価報告書
ー平成22年度終了研究課題ー

研究総括 西島 正弘

1. 研究領域の概要

- 本研究領域は、細胞内の代謝産物を解析し、細胞機能を効率的に制御することを可能とする基盤的な技術に関して、個人の独創的な発想に基づく革新的な技術の芽の創出を目指す研究を対象とする。
- 具体的には、脂質、糖、アミノ酸、核酸関連物質などの代謝産物群の体系的あるいは網羅的解析、代謝産物情報に基づく細胞状態の評価・分類、細胞の代謝経路のモデル化とシミュレーション、代謝経路を制御する化合物の予測と設計、新機能を付与した細胞の作製などに関して、新たな方法論の創出や技術展開の契機となることが期待される研究であり、それぞれの要素技術から細胞制御研究までを対象とする。
- 細胞内の代謝研究は、現在、質量分析計などを活用して代謝産物群を体系的あるいは網羅的に解析するメタボローム解析手法の導入により新しい時代に入っている。我が国の代謝研究は脂質や糖をはじめ様々な物質領域で国際的に高いレベルに有り、まだ端緒についたばかりのメタボローム研究においても世界をリードする独創的な研究成果が出ることが期待される。
2. 研究課題・研究者名
別紙一覧表参照
3. 選考方針
選考の基本的な考えは下記の通り。
1) 選考は「代謝と機能制御」領域に設けた選考委員 13 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、研究構想、研究のねらい、研究の主体性、独創性、新規性、等を中心に審査した。研究課題が戦略目標、並びに、本研究領域の趣旨に合致していることについても重視した。また、イノベーションの芽を育む基礎研究の見地から、将来大きく発展する可能性が高いかを考慮した。
4. 選考の経緯
一応募課題につき領域アドバイザー3 名が書類審査し、書類選考会議において面接選考の対象者を選考した。続いて、面接選考および総合選考により、採用候補者を選定した。
- | | | | |
|------|-------|------|------|
| 選 考 | 書類選考 | 面接選考 | 採用者 |
| 対象者数 | 156 名 | 22 名 | 10 名 |
5. 研究実施期間
平成 19 年 10 月～平成 23 年 3 月
6. 領域の活動状況
領域会議:7 回
研究報告会:1 回
研究総括(または技術参事)の研究実施場所訪問:研究開始時に研究総括と技術参事、事務参事が研究現場を訪問し、研究状況の把握と研究環境、設備等の確認、並びに、上司への協力依頼を行った。その後は、研究実施場所の移動環境の確認、物品確認等の際に、研究総括または技術参事、事務参事が適宜訪問し、研究進捗状況の把握と支援に役立てた。
7. 評価の手続き
研究総括が研究者からの報告・自己評価を基に、領域アドバイザーの協力を得て行った。また、研究報告会の参加者の意見も参考にした。

(評価の流れ)

平成 19 年 10 月～ 研究期間終了
平成 23 年 3 月
平成 22 年 12 月 研究報告会開催
平成 23 年 2 月 研究報告書提出
平成 23 年 3 月 研究総括による評価

8. 評価項目

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

9. 研究結果

本研究領域では、メタボローム研究に資する新しい分析手法の開発、微生物・動物・植物の変異・病態・発生過程等におけるメタボローム解析、特定の細胞状態を規定する代謝産物の同定、新しい代謝過程の発見、代謝産物の変化情報に基づく細胞機能の解明と制御など、広い分野の研究課題が採択されている。平成 19 年度には当領域の全ての研究者(1 期生～3 期生)が揃い、広い専門分野の研究者やアドバイザーとの交流により活発な研究課題の展開が見られ、メタボローム研究の新しい流れができつつある。新しい生理活性代謝産物の発見、疾患特異的な代謝マーカーによる診断法の開発、並びに、代謝疾患治療薬の開発、有用な代謝産物を効率よく産生する実用生物の開発に結びつくことが期待される。研究者別にそれらの研究目的と結果および評価を記述する。

○池ノ内 順一 研究者

体を構成する細胞を包む膜は様々な秩序だった領域から成り立っており、構成成分であるタンパク質については多くの研究がなされてきたが、もう一方の主成分である脂質についての理解は遅れている。本研究では、細胞膜のそれぞれの領域での脂質の違いを明らかにし、細胞膜区画の分離に関わる分子機構を解明することを目指した。その結果、細胞膜を構成する脂質分子組成の解析法を確立し、上皮細胞の細胞膜領域間に形成されるタイトジャンクションはタンパク質と脂質から形成されたとする新しいモデルを提唱し、特色ある脂質の同定に成功した。さらに、上皮細胞の極性形成に関与する新たなタンパク質を見いだした。独自の手法を用いたオリジナルな成果であり、困難な課題に挑戦して、糸口を見出したことは十分に評価できる。細胞膜の高次構造の組織化の解明など、今後の発展が大きく期待できる。

○今村 博臣 研究者

アデノシン三リン酸(ATP)は細胞内の主要なエネルギー通貨であり、細胞内の ATP 濃度は細胞のエネルギー状態の指標となると考えられるが、これまでは個々の生きた細胞について ATP 濃度を測定する事は困難であった。本研究では、細胞内の ATP 濃度をモニターする手法を確立して、ATP の細胞内での振る舞いを明らかにすることを目指した。その結果、蛍光 ATP プローブを開発し、細胞内、ミトコンドリア内の ATP 濃度を一細胞レベルで測定できる系を確立した。これを用いて、ミトコンドリアは細胞質と比べて ATP 濃度が低く保たれていることを新たに発見した。独自性が高い成果であり、広く活用され得る有用なツールになる方法と評価できる。ATP の細胞内外のシグナルとしての役割やエネルギー代謝の破綻と疾患の関連が明らかになってきており、今後の進展が期待できる。

○岩脇 隆夫 研究者

生体内にはタンパク質の品質を広い範囲で管理し、その代謝過程を調節している機構が存在するが、その実態は完全にはわかっていない。本研究では、細胞内小器官である小胞体で合成される分泌タンパク質や膜タンパク質の品質管理を担っている小胞体ストレス応答機構を解析し、関連するヒト疾患・生理現象の謎に迫ることを目指した。その結果、小胞体内に変性タンパク質が蓄積する小胞体ストレスに対して応答する小胞体関連分解機構をストレスセンサーである IRE1 分子に注目して、解析した。IRE1 の基質 mRNA を同定、マウス個体で小胞体ストレスを可視化できるマウスを作製した。遺伝子破壊マウスを作製し、胎盤で小胞体ストレスが生じていることを見出した。小胞体ストレスのメカニズム理解に進展をもたらしたもので、十分に評価できる。今後、ヒト疾患との関連性について期待したい。

○酒井 達也 研究者

植物は植物ホルモンオーキシンの代謝調節によって、細胞の成長、分裂、分化、ひいては個体の大きさ、発生、生殖など、様々な営みを制御している。本研究では、光に応答したオーキシン合成・代謝・細胞間輸送の調節機構、及びオーキシンを介した植物の成長制御機構について分子レベルでの解明を目指した。その結果、植物の光源方向への胚軸屈曲を引き起こすメカニズムを光受容体からのシグナル伝達で引き起こされるオーキシン量の調節の観点から解析し、オーキシン勾配形成におけるオーキシン輸送体の働きを解明した。特に、植物の三つの主要な光受容体ファミリーにおけるシグナル伝達のクロストークの研究では世界的にもトップクラスの成果を得た。本研究成果により光屈性の主要な点は明らかになったものと考えられ、十分に評価できる。物質生産性向上に資する遺伝子機能の萌芽的研究成果も生まれつつあり、今後、植物の物質生産性、環境適応性向上への応用を期待する。

○中野 雄司 研究者

ステロイドホルモンは種を越えて広く保存される生理活性化合物であり、植物においてはブラシノステロイドが重要な役割を担っている。本研究では、ブラシノステロイド生合成阻害剤を用いて、ブラシノステロイドによる植物発生と植物自然免疫の制御機構、植物ブラシノステロイド情報伝達経路と動物情報伝達経路との進化的保存性の解明を目指した。その結果、ブラシノステロイドの細胞内情報伝達機構が解析され、数種の遺伝子を同定し、機能を解析した。いずれも植物自然免疫に関与する可能性が示された。これら遺伝子の類縁遺伝子が動物にも存在し、Toll 様受容体を介するシグナル伝達機構との対比が示された。植物自然免疫の制御機構が、動物の自然免疫に対しても類似性があるのではないかという点に着目した独創的な研究であり、十分に評価できる。哺乳類がん細胞等に対する植物ブラシノステロイドの効果など、今後応用性にも期待する。

○前田 裕輔 研究者

細胞内小器官であるゴルジ体の pH 調節はタンパク質輸送・糖鎖修飾・ゴルジ体の形態を制御する根幹的なホメオスタシスの一つである。本研究では、ゴルジ体の pH 上昇によりそれらの異常を示す変異細胞を解析することにより、これまでほとんどわかっていない pH の調節機構、および pH によるタンパク質輸送の制御機構の詳細な仕組みを明らかにすることを目指した。その結果、ゴルジ装置に局在する Golgi pH regulator (GPHR)を発見、同定し、機能を解析した。GPHR はカウンターイオンチャンネルで、ゴルジ内腔の pH を低下させる。GPHR の遺伝子破壊細胞を使って、糖鎖修飾の異常、ゴルジ形態の異常、コレステロール代謝への影響を見いだした。タンパク質輸送の仕組みにまで発展しつつあり、研究成果は高く評価できる。今後、疾患と関連した研究の展開も期待できる。

○南野 徹 研究者

糖尿病やメタボリック症候群といった代謝性疾患では、肥満に伴う内臓脂肪の蓄積と、それによって惹起されるインスリン抵抗性がその病態の基盤にあると考えられる。しかし、蓄積した内臓脂肪がどのようにしてインスリン抵抗性を惹起するのか、また、加齢に伴ってこれらの疾患が増えるのはなぜかといったことについては明らかとなっていない。本研究では、脂肪の老化制御によって変化する代謝調節分子を同定し、その分子を標的とした新しい治療法を目指した。その結果、内臓脂肪の蓄積から糖尿病に至る過程の重要な因子として、脂肪細胞での p53 の活性化を発見した。加齢とテロメラーゼ、p53 シグナル、インスリン抵抗性の関係を明らかにした一連の研究は、独創性が高く、科学的インパクトもある。p53 抑制は発がんとの関係から正確な調整が必要とされるが、新たな研究の方向性が見いだされたと評価する。今後、糖尿病や心不全の治療へつなげることを期待する。

○宮本 健史 研究者

骨は骨を吸収する破骨細胞と骨を形成する骨芽細胞により常にリモデリングと呼ばれる組織再構築が行なわれており、これらの細胞活性の総和としての代謝が骨粗鬆症などの骨代謝疾患対策には欠かせない。本研究では、自ら同定した破骨細胞の細胞融合因子 DC-STAMP の発現制御機構を切り口に、骨の恒常性維持機構ならびにその破綻による病態を解明することを目指した。その結果、DC-STAMP を介した破骨細胞の融合が骨芽細胞の活性を調節し、骨量の制御に重要な役割を果たしている事を明らかにした。さらに、破骨細胞分化を制御する分子機構として Blimp1-Bcl6 軸という新しいメカニズムを見いだした。独自性のある研究が展開され、骨代謝制御の新たな分野を開くものと評価する。今後、臨床的応用性も期待できる。

○村山 明子 研究者

ATP の生産と消費のバランス維持は、細胞にとって極めて重要である。本研究では、ATP 代謝制御に関わる自

ら見いだした新規蛋白質 Nucleomethylin (NML)の機能解析を行い、NML 複合体を中心とする ATP 代謝制御ネットワークの解明とその個体における役割を明らかにすることを目指した。その結果、NML が複合体を形成するヒストン脱アセチル化酵素とヒストンメチル化酵素に関する解析から、細胞内のエネルギー状態を感知し、エピジェネティックなタンパク質合成の抑制、エネルギー消費の調節を行う機構を明らかにした。エネルギー代謝分野に大きく貢献したと評価する。また、ヒストンのアセチル化、メチル化を介するエピジェネティック制御研究はこれから発展する分野と考えられ、先鞭をつける研究である。今後、メタボリック症候群、癌などを含む疾患の理解や革新的治療戦略の確立につなげることを期待する。

○山口 英樹 研究者

癌細胞が周辺組織を浸潤する際には、癌細胞の底部に観察される浸潤突起と呼ばれる構造が重要な働きをしていると考えられている。しかし、その生体内での機能や形成の分子機構は未だほとんど明らかになっていない。本研究では、浸潤突起形成に関わる細胞膜脂質代謝メカニズムを明らかにし、癌転移治療法の開発につながる分子基盤を得ることを目指した。その結果、癌浸潤に関与する浸潤突起形成に脂質ラフト構成タンパク質であるカベオリン1が関与すること、細胞外基質分解に関わるマトリックスメタロプロテアーゼであるMT1-MMPの活性化にカベオリンが必要であることを明らかにした。また、浸潤突起の形成に関与する分子を明らかにした。細胞膜脂質の構成が癌浸潤において重要な役割を果たしていることが示され、当初の計画に沿った着実な成果があがったと評価する。今後、癌転移治療の標的としてこれらの分子の有用性を評価し、治療法の開発につなげることを期待する。

10. 評価者

研究総括 西島 正弘 国立医薬品食品衛生研究所 所長

領域アドバイザー氏名(五十音順)

新井 洋由	東京大学大学院薬学系研究科 教授
稲垣 暢也	京都大学大学院医学研究科 教授
寒川 賢治	国立循環器病センター研究所 所長
木下 タロウ	大阪大学免疫学フロンティア研究センター 副拠点長／微生物病研究所 教授
斉藤 和季	千葉大学大学院薬学研究院 教授
鈴木 明身	東海大学未来科学技術共同センター 教授
鈴木 紘一*1	東京大学 名誉教授
田口 良	東京大学大学院医学系研究科 客員教授
寺部 茂*2	兵庫県立大学 名誉教授
富田 勝*2	慶應義塾大学先端生命科学研究所 所長／環境情報学部 教授
永井 良三*3	東京大学大学院医学系研究科 教授
西村 紀	島津製作所ライフサイエンス研究所 技術顧問
深見 希代子	東京薬科大学生命科学部 教授
正木 春彦	東京大学大学院農学生命科学研究科 教授
横田 明穂	奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科 教授

*1 平成 17 年 6 月～平成 22 年 4 月まで参画

*2 平成 17 年 6 月～平成 19 年 5 月まで参画

*3 平成 18 年 6 月～平成 22 年 4 月まで参画

(参考)

(1) 外部発表件数

	国 内	国 際	計
論 文	0	68	68
口 頭	196	29	225
その他	11	3	14
合 計	207	100	307

※平成 23 年 3 月現在

(2)特許出願件数

国 内	国 際	計
5	1	6

(3)受賞等

- ・池ノ内 順一
日本細胞生物学会 若手優秀発表賞(H21.6)
- ・今村 博臣
日本生物物理学会 若手奨励賞(H19.12)
- ・酒井 達也
日本植物生理学会 奨励賞(H21.3)
- ・前田 裕輔
文部科学大臣表彰 科学技術賞(H22.4)
- ・南野 徹
日本心血管内分泌代謝学会 高峰譲吉研究奨励賞(H19.11)
千葉大学医学部いのはな同窓会 学術賞(H20.6)
日本循環器学会 日本心臓財団佐藤賞(H22.3)
- ・宮本 健史
日本整形外科学会 学会奨励賞(H20.5)
日本軟骨代謝学会 学会賞(H21.3)
日本骨代謝学会 研究奨励賞(H21.7)
慶應義塾大学医学部 三四会北里賞(H22.6)
- ・村山 明子
文部科学大臣表彰 若手科学者賞(H21.4)

(4)招待講演

国際 10 件
国内 72 件

「代謝と機能制御」領域 研究課題名および研究者氏名

研究者氏名 (参加形態)	研究課題名 (研究実施場所)	現職 (応募時所属)	研究費 (百万円)
池ノ内 順一 (兼任)	細胞の極性形成に関わる膜ドメインの 形成・維持機構の解明 (京都大学大学院工学研究科)	京都大学大学院工学研究科 准教授 (日本学術振興会特別研究員)	50
今村 博臣 (専任)	蛍光 ATP プローブを用いた ATP 代謝 の解析 (大阪大学産業科学研究所)	科学技術振興機構 専任研究者 (日本学術振興会特別研究員)	49
岩脇 隆夫 (兼任)	細胞内の蛋白質代謝を管理するストレ ス応答機構の解明 (理化学研究所基幹研究所)	群馬大学先端科学研究指導者育成 ユニット 講師 (理化学研究所フロンティア研究シ ステム ユニットリーダー)	50
酒井 達也 (兼任)	オーキシン調節による植物の成長制 御機構の解明 (新潟大学大学院自然科学研究 科)	新潟大学大学院自然科学研究科 准教授 (理化学研究所植物科学研究セン ター チームリーダー)	41
中野 雄司 (兼任)	ブラスノステロイド情報伝達による発生 と自然免疫制御の分子機構 (理化学研究所基幹研究所)	理化学研究所基幹研究所 ユニット リーダー (同上 中央研究所 専任研究員)	50
前田 裕輔 (兼任)	オルガネラの pH によるタンパク質輸送 の制御 (大阪大学微生物病研究所)	大阪大学微生物病研究所 准教授 (同上)	50
南野 徹 (兼任)	老化シグナルにより制御される代謝ネ ットワークの解明 (千葉大学大学院医学研究院)	千葉大学大学院医学研究院 講師 (同上 医学部附属病院 助教)	50
宮本 健史 (兼任)	「骨代謝」における破骨細胞の細胞融 合と代謝制御 (慶應義塾大学医学部)	慶應義塾大学医学部 特別研究准 教授 (同上 講師)	49
村山 明子 (兼任)	新規蛋白質 NML による ATP 代謝制御 ネットワークの解明 (筑波大学大学院生命環境科学 研究科)	筑波大学大学院生命環境科学研究 科 講師 (同上)	45
山口 英樹 (兼任)	癌浸潤転移における細胞膜脂質代謝 及びドメイン構造の機能解析 (国立がん研究センター研究所)	国立がん研究センター研究所 ユニ ット長 (東京薬科大学生命科学部 講師)	49

研 究 報 告 書

「細胞の極性形成に関わる膜ドメインの形成・維持機構の解明」

研究期間：平成19年10月～平成23年3月

研究者：池ノ内 順一

1. 研究のねらい

上皮細胞の細胞膜は、消化管や腎尿細管などの管腔に面するアピカル膜と、基底膜と接するバソラテラル膜に分けられる。アピカル膜とバソラテラル膜の境界に、タイトジャンクションと呼ばれる細胞接着構造が認められる。このように上皮細胞には様々な膜ドメイン（細胞膜区画、細胞膜領域）が存在することが知られている。

細胞膜の主たる構成成分は、膜タンパク質と脂質分子である。近年の研究により、膜ドメインにそれぞれ特異的な膜タンパク質が存在することが明らかになった。一方、脂質分子については、それぞれの細胞膜領域に異なる種類の脂質分子が存在するか否か、については、ほとんど明らかになっていない。本研究提案の1つ目の狙いは、上皮細胞の様々な細胞膜ドメインは、それぞれ特徴的な脂質組成になっているか、を明らかにすることである。特にタイトジャンクションの細胞膜領域の脂質分子組成について詳細に解析し、細胞膜構造の形成における脂質代謝の重要性や膜タンパク質と脂質分子の自己組織化過程について考察した。

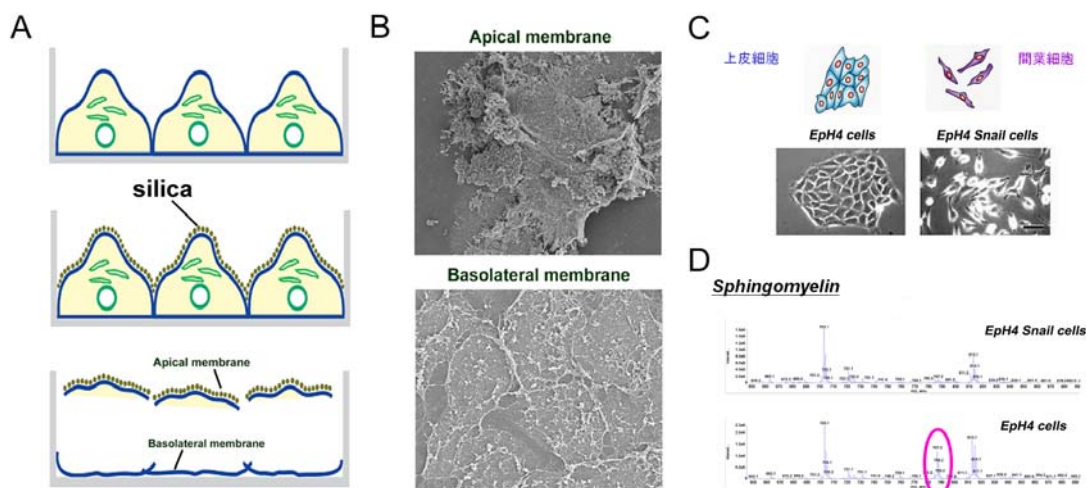
2つ目の狙いは、細胞膜ドメインを形成する上で、膜タンパク質や脂質分子の自由拡散を防いでいる分子機構の解明である。これまで長らく上皮細胞のアピカル膜とバソラテラル膜の分離にはタイトジャンクションが不可欠であるとされてきた。しかしながら、研究代表者らは、遺伝子操作によりタイトジャンクションを消失した細胞を樹立し、タイトジャンクションがなくてもアピカル膜とバソラテラル膜の分離が正常に起こることを報告した（*Cell* 2006; *JCB* 2007）。そこでアピカル膜とバソラテラル膜の分離に関する新たな分子機構を提唱すべく、アピカル膜及びバソラテラル膜の分離に関わる新規遺伝子群の探索を行った。

2. 研究成果

(1) 細胞膜を構成する脂質分子組成の解析法の確立

細胞を構成する脂質は数千種類あることが知られているが、どのような脂質が細胞膜（形質膜）上に存在しているか、に関する情報は極めて断片的である。細胞膜を構成する脂質は、細胞全体の脂質のわずか1%であり、細胞膜の脂質組成を知ろうとすると、細胞膜のみを単離する必要がある。これまでの細胞膜の単離手法には、界面活性剤が必要不可欠であった。界面活性剤の利用は、膜タンパク質の解析には大きな影響を及ぼさないが、脂質の解析を行う上では大きな障害となる。なぜならば、界面活性剤と脂質は容易にミセルを形成し、異なる膜分画同士を自由に行き来してしまい、正確な脂質組成を求めることを困難にしてしまうからである。そこで私は、界面活性剤の代わりに、コロイド状シリカ粒子を用いて、細胞膜のみを単離する技術を確立した。図 A に示すように、細胞に対して、陽電荷を付与した直径 80nm のシリカ粒子を付着させる。細胞膜は、負電荷を帯びているため、シリカ粒子は細胞膜に強く結合する。シリカ粒子を細胞膜に付着させた後、細胞を破碎する。細胞破碎液を密度勾配遠心にかけることにより、シリカ粒子のついた細胞膜（アピカル膜画分）はペレットとして沈殿する。そのほかの膜成分（細胞内小器官や核膜など）は、シリカ粒子がついていないため、沈殿しない。またバソラテラル膜は、破碎時に培養皿に残る膜画分として回収される（図 B）。このようにして、細胞膜を単離し、単離細胞膜から従来の Bligh & Dyer 法により脂質を抽出した後、液体クロマトグラフィーで分離し、質量分析計で解析することにより、個々の脂質分子種の解像度で、細胞膜を構成する脂質分子の組成を決めることが出来るようになった。

この手法を用いて、マウス由来の培養上皮細胞（EpH4 細胞）および EpH4 細胞を遺伝子操作により間葉細胞に転換した細胞（図 C）から、それぞれ単離した細胞膜を構成する脂質分子の解析結果の一部を図 D に示す。



(2) タイトジャンクションを構成する脂質の同定と機能解析

タイトジャンクション(以下 TJ)は、上皮細胞に認められる細胞接着構造であり、この領域において隣あった細胞同士の2枚の細胞膜はゼロの距離に近づく(図 A)。TJ は、上皮細胞の間隙を通るイオンや小分子の透過性を制御し、生体内の恒常性を維持する上で必須の構造である。TJ は図 A に示すように電子顕微鏡観察により、形態学的に極めて特徴的な細胞膜ドメインであることが知られている。このため、TJ 領域の細胞膜構造のモデルとして、1)他の細胞接着装置と同様に膜タンパク質同士が接着するとする「タンパク質モデル」と、2)コーン型脂質分子によって形成される逆ミセル構造を主体とする「脂質モデル」の二つの対立する説が提唱されてきた(図 B、C)。1998 年に TJ を構成する膜タンパク質クローディンが同定され、間葉細胞にクローディンを発現させるだけで TJ が再構成されるという観察事実(図 D)に基づいて、現在では「タンパク質モデル」が広く受け入れられている(図 C)。しかしながら、TJ は、水やイオンの透過性をも制御する細胞膜接着構造である点を考慮すると、クローディンの細胞外領域が細胞膜から突き出た構造で果たしてイオンや水の透過性を制御できるか、疑問が残る。私は、クローディンと特定のコーン型脂質分子種が協調して逆ミセル構造を主体とする膜構造となっているのではないかと考えた(図 E)。

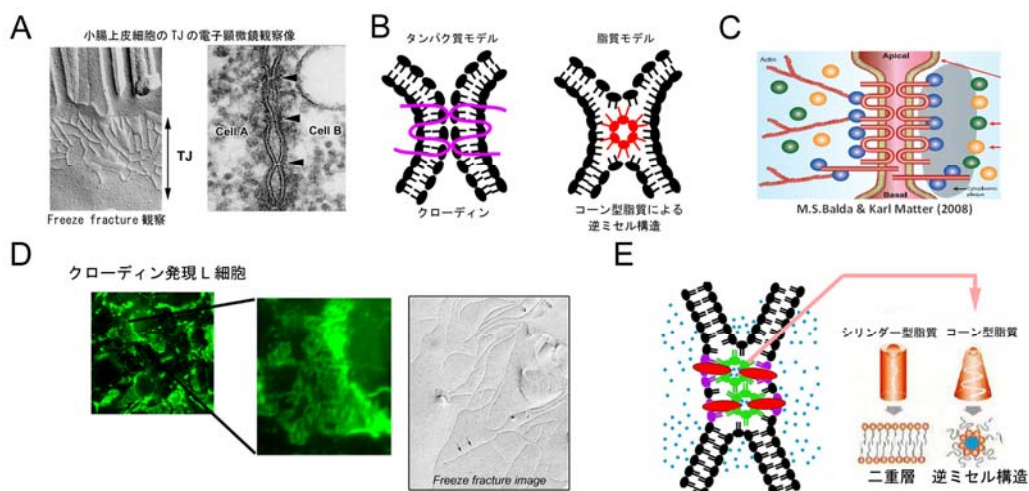
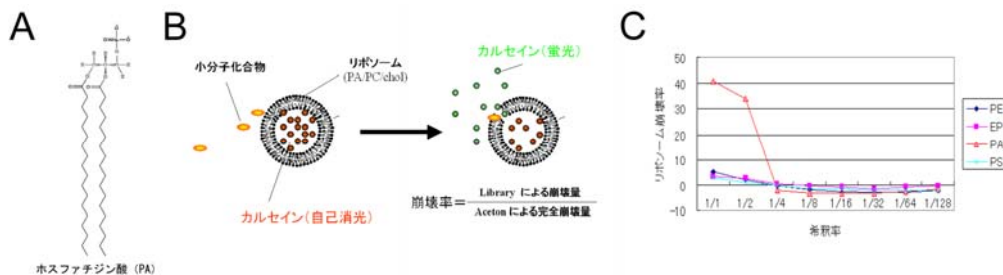


図 D で示したクローディン発現 L 細胞と、TJ を持たない元来の L 細胞から細胞膜のみを単離して質量分析による脂質分子組成の解析を行ったところ、興味深いことに、特定の脂質分子種がクローディン発現 L 細胞の細胞膜に多く含まれていた。更に図 E のモデルを詳細に

検証する目的で、TJ 細胞膜領域の脂質組成を反映させたリポソームと精製したクローディングタンパク質を用いて TJ の試験管内再構成に取り組んでいる。

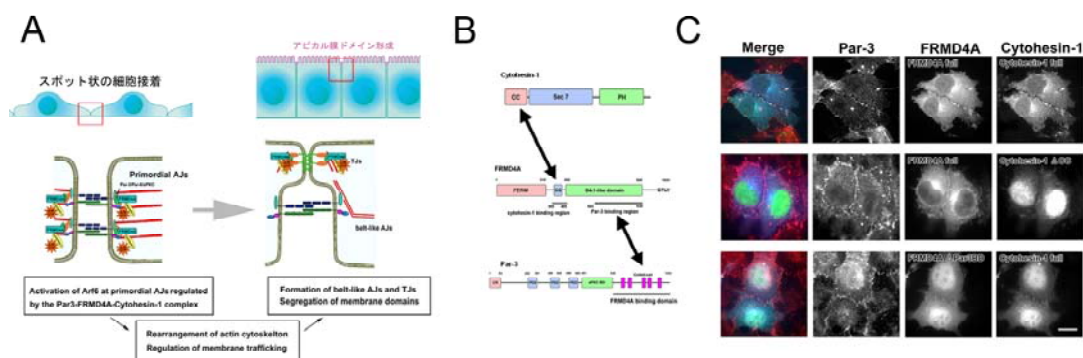
(3) 脂質分子を可視化する為の小分子プローブの探索

生体膜を構成する脂質分子の機能を解析する上で、細胞における局在を知ることは重要な手がかりになる。ライセニン(スフィンゴミエリン)や、PHドメイン(PIP2)などの特定の脂質分子に特異的に結合するプローブがこれまでに報告されている。しかし現在、多くの脂質分子については、特異的なプローブが存在せず、細胞内局在が不明である。リン脂質の一つ、ホスファチジン酸(PA: 図 A)は、小胞輸送やシグナル伝達などの生命現象において重要なリン脂質であるという報告がなされているが、有効なプローブが存在しないため、細胞内局在について不明である。そこで、PA のプローブの候補となる化合物を見つけ出す目的で、約 2000 種類の真菌の培養上清ライブラリーをスクリーニングした。まず、蛍光色素カルセインを内包させた様々な脂質組成のリポソームを作製し、培養上清を添加した際にPAを含むリポソームのみを選択的に崩壊させるか否か、について調べた(図 B)。結果、目的の真菌培養上清を 1 株同定した(図 C)。現在、この上清中に含まれるPAに結合する化合物について、液体クロマトグラフィと NMR を用いて、分離・精製と物質の同定を進めている。



(4) 上皮細胞の細胞膜ドメインの分離に関わる分子機構の解明

上皮細胞のアピカル膜およびバソラテラル膜という非対称な細胞膜ドメインの形成に関わる新規遺伝子の探索を行った。上皮細胞は細胞接着を失うと、アピカル膜・バソラテラル膜の非対称性(細胞極性)を維持できなくなる。この点に着目して、細胞の接着を一度壊し、再度細胞接着を誘導する過程で、細胞接着部位に濃縮するタンパク質は、細胞膜ドメインの形成に重要ではないかと考えた。上皮細胞は、間葉細胞と同様に、細胞接着の初期には、スポット状の細胞接着を形成する(図 A)。スポット状細胞接着同士が融合して、細胞の全周を取り囲むようなベルト状の細胞接着装置が形成されると、細胞膜のアピカル膜とバソラテラル膜が分離される。上皮細胞の極性形成に重要とされる遺伝子群として、ZO-1,ZO-2,Par-3,Par-6,aPKC などが知られているが、いずれも上皮細胞の細胞接着初期過程においてはスポット状の接着部位に局在し、後期過程においては、タイトジャンクションに局在する。細胞接着過程で、同様の局在の変化を示すタンパク質をスクリーニングした結果、新規遺伝子である FRMD4A(FERM domain containing 4A)を同定した(図 B)。FRMD4A 遺伝子および FRMD4A と高い相同性を示す遺伝子である GRSP-1 を同時にノックダウンすると極性形成過程が顕著に遅延した。Yeast two hybrid 法により FRMD4A の結合相手を探した結果、FRMD4A は、前述の Par-3 と Arf6 の活性化因子 Cytohesin の双方に結合する Scaffolding タンパク質であることがわかった(図 C)。



3. 今後の展開

細胞膜単離手法と質量分析を用いた脂質分子種の同定を組み合わせることにより、細胞の種類や細胞膜の領域によって、細胞膜を構成する脂質分子種に違いがあることが明らかになった。今後は、脂質代謝酵素や脂質輸送タンパク質の発現や局在に着目して脂質分子種の違いを生み出す分子群の同定を試みると共に、このような脂質分子種の違いが、細胞膜の構造や細胞固有の機能の違いにどのように寄与しているかについて詳細に解析したい。

また、上皮細胞に於いて細胞膜を分離して細胞の極性の形成に関わる分子メカニズムについては、今回のさきがけ研究で同定した新規タンパク質複合体 FRMD4A-Cytoshesin-1 の下流で機能する分子群の同定を行い、Lateral diffusion barrier の実体を明らかにしたい。

4. 自己評価

本研究で提案した細胞膜脂質の解析法の確立については、当初の目的どおり、細胞膜ドメインにおける構成脂質分子種の違いを明らかにできるようになった。特にタイトジャンクションに着目して、タイトジャンクションの脂質分子種組成と細胞膜構造の関連について、独自性の高い結果を得ることが出来たと考えている。今後は、試験管内再構成系を用いて、タンパク質と今回同定した脂質分子の相互作用の様式を物理化学的手法により解析し、細胞膜の高次構造がどのように組織化されているかについて検討したい。

膜タンパク質や脂質分子の自由拡散を防いでいる分子機構の解明については、上皮細胞において細胞極性形成に関わる新たな遺伝子 FRMD4A を同定した。しかしながら、その下流で働く分子群の同定などの詳細な機能解析には至らなかった。今後の研究で、FRMD4A 遺伝子の機能と細胞骨格や細胞内輸送との関連に着目し、細胞膜ドメイン形成機構の解明を行いたい。

5. 研究総括の見解

界面活性剤を用いずにアピカル膜を単離する方法を確立し、タイトジャンクション(TJ)を形成する膜にコーン型脂質のプラズマローゲン型 PE が多く含まれること、更にこの脂質の生合成を阻害すると TJ の形成が抑制されることを明らかにし、TJ が蛋白質と脂質から形成されるとする池ノ内モデルを支持する結果を得た。更に、上皮細胞の極性形成に関与する蛋白質として FRMD4A を見出し、これが Par3 など極性に関わる蛋白質と結合することも明らかにした。これらの成果は極めてオリジナリティーの高い成果であり、今後更に発展するものと期待している。

6. 主要な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. Ikenouchi J, Sasaki H, Tsukita S, Furuse M, Tsukita S.

	“Loss of occludin affects tricellular localization of tricellulin.” <i>Molecular Biology of the Cell</i> 19:4687–93. 2008
	2. Ikenouchi J, Umeda M. “FRMD4A regulates epithelial polarity by connecting Arf6 activation with the PAR complex.” <i>Proc Natl Acad Sci U S A</i>. 107:748–53. 2010
	3. Masuda S, Oda Y, Sasaki H, Ikenouchi J, Higashi T, Akashi M, Nishi E, and Furuse M. “LSR defines cell corners for tricellular tight junction formation in epithelial cells.” <i>Journal of Cell Science</i> 124:548–55. 2011
	4. Yoshihara K, Ikenouchi J, Izumi Y, Akashi M, Tsukita S, and Furuse M. “Phosphorylation state regulates the localization of Scribble at adherens junctions and its association with E-cadherin-catenin complexes.” <i>Experimental Cell Research</i> 317:413–22. 2011

(2)特許出願

なし

(3)その他

招待講演

1. 池ノ内 順一

Cell Surface Polarity In Epithelial Cells

Cell Cycle and Cell Architecture(名古屋)

2009 年 2 月 28 日

2. 池ノ内 順一

上皮細胞の細胞膜ドメインを規定する脂質の探索

第 61 回日本細胞生物学会(名古屋)

2009 年 6 月 3 日

受賞

1. 第 61 回日本細胞生物学会 優秀若手発表賞 「上皮細胞の細胞膜ドメインを規定する脂質の探索」(2009 年 6 月 3 日)

著作物

1. 池ノ内 順一

「上皮細胞の極性形成—膜ドメイン形成・維持機構の観点から」

蛋白質 核酸 酵素 Vol. 52, No. 14, 1863–1870 (2007)

2. 池ノ内 順一、梅田真郷

「上皮細胞の細胞膜における膜ドメイン」

実験医学 Vol. 28, No. 8, 1212–1219 (2010)

研 究 報 告 書

「蛍光 ATP プローブを用いた ATP 代謝の解析」

研究期間：平成19年10月～平成23年3月

研究者：今村 博臣

1. 研究のねらい

アデノシン三リン酸(ATP)は細胞内の主要なエネルギー通貨であり、筋肉の収縮や細胞運動、膜輸送、代謝反応、タンパク質分解といった様々な生体内の反応を進行させるために不可欠である。また、ATPは細胞内外のシグナル伝達物質としての役割もっており、例えば細胞内では K_{ATP} チャンネルやAMP-activated protein kinase (AMPK)に作用してインスリンの分泌や細胞機能の制御を行い、細胞外ではイオンチャンネル型のP2X受容体あるいは7回膜貫通型のP2Y受容体に結合して神経伝達や発生、細胞の走化性に関与していることが知られている。細胞内外のATPの振る舞いを知ることは、生命の機能を理解する上で非常に重要である。従来、細胞内のATP量を分析する方法としては、細胞破碎液に含まれるATP量をホタルのルシフェラーゼによる発光、もしくは高速液体クロマトグラフィーによって計測する方法が広く用いられてきた。しかし、細胞を破壊してしまうため、細胞内コンパートメントや細胞ごとのATP濃度の分布やダイナミクスを調べることはできない。そのため、生きた細胞や組織・生体におけるATPの時空間的な動態の理解はほとんど進んでいなかった。本研究では、個々の生きた細胞内のATP濃度を可視化・定量する技術確立し、細胞内ATPの基本的性質や制御機構、さらに生命現象(特に細胞死、細胞周期、インスリン分泌)におけるATPの役割を明らかにすることを目指した。

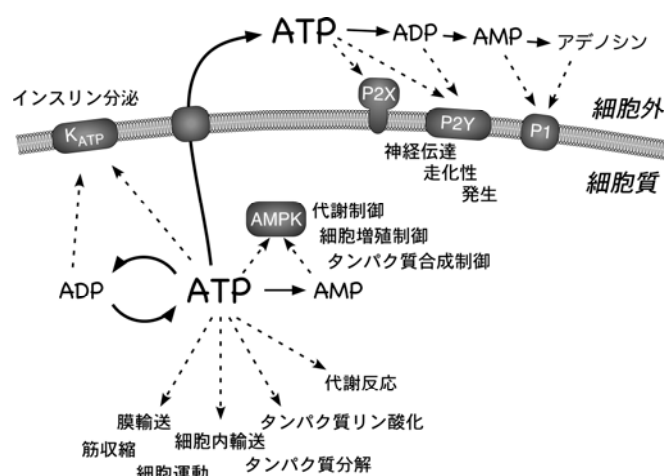


図1. 細胞内外におけるATPの多様な役割

2. 研究成果

2-1 蛍光 ATP プローブ(ATeam)の開発

生細胞内ATP濃度を可視化・定量するために、ATP濃度に応じてフェルスター共鳴エネルギー移動(FRET)効率が変化する蛍光プローブの開発をおこなった。FRETは2つの蛍光物質の間で距離と相対角度に応じて励起エネルギーが移動する物理現象であり、タンパク質内の構造変化やタンパク質間の相互作用を測定する手法として適している。開発にあたり、バクテリア F_0F_1 -ATP合成酵素の調節サブユニットである ϵ に着目した。 ϵ サブユニットは、ATPを特異的に結合する、ATPを加水分解しない、ATPの結合によって大きな構造変化を起こす、という特徴を備えている。 ϵ サブユニットのATP結合に伴う構造変化をFRET効率の変化という形に変換できれば、 ϵ サブユニットとATPの結合・解離平衡の変化(すなわちATP濃

度の変化)を蛍光で可視化できると考えた。そこで、 ϵ サブユニットをシアン色蛍光タンパク質 (CFP) および黄色蛍光タンパク質 (YFP) ではさんだ融合タンパク質を作成した。この融合タンパク質では ϵ サブユニットの構造の変化によって CFP と YFP の距離と向きが変化し、CFP から YFP への FRET 効率が変化すると予想された。蛍光タンパク質の種類や ϵ サブユニットの生物種を変えて作製した様々な融合タンパク質の性質を蛍光分光器を用いて調べた。その結果、枯草菌由来 ϵ サブユニット、CFP として単量体化 super enhanced CFP (mseCFP)、YFP として 173 番目のアミノ酸が先頭になるように円順列変異を導入した単量体化 Venus (cp173-mVenus) を用いたときに、ATP 濃度変化に対応した FRET 効率の大きな変化が観察された。ATP 濃度が高い時には FRET 効率が上昇して YFP/CFP 比は高くなり、逆に ATP 濃度が低ければ FRET 効率が下がり YFP/CFP 比は低くなった。筆者らはこのプローブを ATeam (adenosine 5'-triphosphate indicator based on epsilon subunit for analytical measurements) と名付けた。ATeam は ATP に対する解離定数が 3.3 mM であり、これまでに報告されている細胞内 ATP 濃度の範囲に適していると考えられた。しかも、少なくとも 10 mM 以下の dATP, ADP, GTP には反応せず、ATP を選択的に検出できることも確認された。pH 7 以上では pH の変化に対して安定であることから、通常の細胞質の pH (約 7.3~7.5) やミトコンドリア内の pH (8.0~8.5) の範囲では多少の pH の変化があってもシグナルが影響を受けない。ATP に対する反応速度定数は 10 秒程度であり、それ以上遅い ATP 濃度の変化であれば追従することが可能であることがわかった。

2-2 ATP の細胞内分布

真核細胞に存在する細胞内小器官は、基本的には脂質の膜で囲まれ隔離された区画である。極性の高い ATP は脂質二重膜を通過できないため、特定のタンパク質の助け無しにこれらの区画の間を行き来できない。しかし、細胞を破碎する従来の ATP 測定法ではこれらの区画間の ATP 濃度の違いを検出することは不可能であった。特に着目したのは、細胞質、核、ミトコンドリアの違いである。核は DNA や RNA を合成するために大量に ATP を消費する区画であり、ミトコンドリアは細胞の ATP 合成の一端を担う区画である。そこで、HeLa 細胞の細胞質、核、そしてミトコンドリアマトリックスに ATeam を発現させてそれぞれイメージングを行い、ATeam の FRET シグナルを比較した。その結果、細胞質と核では YFP/CFP 比に大きな違いは見られなかった。一方、ミトコンドリアマトリックスでは細胞質や核と比べて YFP/CFP 比が顕著に低く、ATP 濃度が低く保たれていることが明らかとなった。おそらくミトコンドリアで合成された ATP がミトコンドリア内膜に存在する ATP:ADP 輸送体によってすみやかに排出されるのだろう。この結果はミトコンドリアの主な役割が ATP 合成であることと一見矛盾するように見えるが、ATP をミトコンドリア内に溜め込まずに、その主要な消費場所である細胞質に運ばれるのは理にかなっている。脱共役剤である CCCP を加えると濃度差が解消したことから、細胞質とミトコンドリアの ATP 濃度差はミトコンドリア膜電位依存的に保たれている事が明らかとなった。

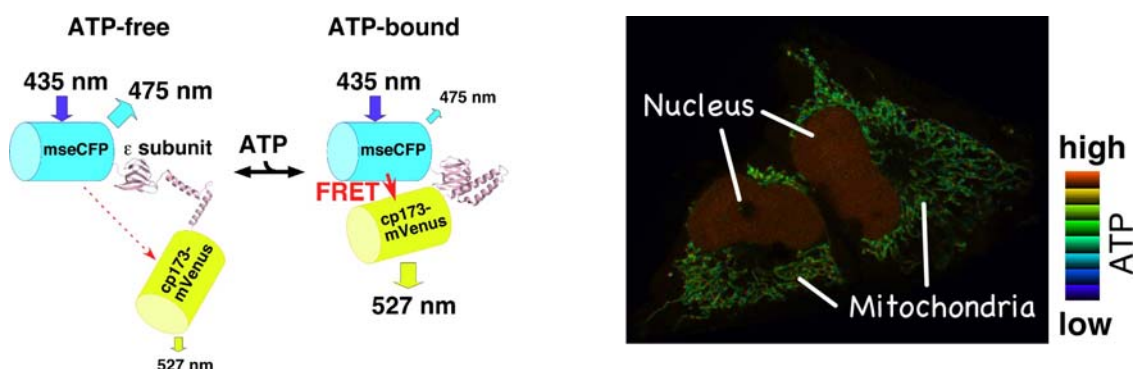


図2. 蛍光 ATP プローブ「ATeam」(左)および ATeam を用いた細胞内 ATP 濃度の可視化(右)

2-3 癌細胞内 ATP 濃度の薬剤感受性

好気的な条件下では、動物細胞の ATP は主として酸化的リン酸化によって合成される。しかし、虚血時などの嫌気的な条件では、酸化的リン酸化は働けないため解糖系が ATP 合成の大部分を担う。解糖系だけの ATP の合成効率は非常に低く、酸化的リン酸化が働いてグルコースを完全酸化できる場合の 20 分の 1 程度である。ところが、癌細胞のエネルギー代謝は特徴的であり、好気条件であっても解糖系に ATP 合成を頼っていることが知られている。しかし、どのような仕組みで解糖系と酸化的リン酸化のスイッチが起きているかはほとんどわかっていない。ヒト癌由来の細胞株である HeLa 細胞の細胞質 ATP 濃度が、解糖系あるいは酸化的リン酸化の阻害剤に対して示す応答を、ATeam を用いたリアルタイムイメージングによって調べた。グルコースを含む通常の培地で培養した細胞に酸化的リン酸化の阻害剤であるオリゴマイシンあるいは CCCP を加えても、ATP 濃度の変化はほとんど観察されなかった。このことから、HeLa 細胞における ATP 合成の酸化的リン酸化への依存度は非常に低く、解糖系だけでも十分細胞内 ATP 濃度を維持できることがわかった。一方で、解糖系の阻害剤を加えた場合は顕著な ATP 濃度の顕著な低下が観察された。ところが、培地に含まれるグルコースをガラクトースに代えて同様の実験を行ったところ、酸化的リン酸化の阻害剤によって HeLa 細胞の ATP 濃度は速やかに減少し、10 分程度でほぼ枯渇した。この結果は、解糖系を主とした HeLa 細胞のエネルギー代謝が一つの培地成分の違いによって酸化的リン酸化を主としたものに変換したことを示しており、癌細胞の特徴的なエネルギー代謝を考える上で興味深い。

2-4 改変 ATeam を用いたカルシウムによるミトコンドリア ATP 合成活性化の可視化

カルシウムは細胞内メッセンジャーとして様々な細胞の活動を制御しており、細胞内カルシウム濃度の上昇は ATP 消費を亢進させる。ミトコンドリアの ATP 合成に参与する酵素がカルシウムによって活性化されるというこれまでの知見から、細胞内カルシウムの上昇は ATP 消費の亢進と平行して ATP の合成を上昇させる事で ATP の恒常性を保っていると考えられてきた。しかし、実際に生きた単一の細胞内で ATP とカルシウムを同時に計測した研究はなかった。一方、CFP-YFP の FRET を利用した ATeam は紫外領域の光で励起されるために、既存の蛍光カルシウムプローブとの併用には問題があった。

そこで、より長波長の蛍光を発する蛍光タンパク質の FRET ペアを探索し、オワンクラゲ由来緑色蛍光タンパク質 (GFP) の変異体である cp173-mEGFP とサンゴ由来オレンジ蛍光タンパク質 (OF) の変異体である mKO κ のペアを用いた時に、CFP-YFP ペアの場合と同様に ATP 濃度に応じた大きな FRET シグナルの変化が起こる事を見いだした。この新しい ATP バイオセンサーを GO-ATeam と名付けた。GO-ATeam は紫外領域の光でほとんど励起されないため、最も広く用いられる蛍光カルシウムセンサーである fura-2 との蛍光のクロストークはほとんどみられなかった。そこで、ミトコンドリアに GO-ATeam を発現させた HeLa 細胞に fura-2 をロードし、ミトコンドリア内 ATP と細胞内カルシウムの同時イメージングをおこなった。細胞をヒスタミンで刺激したところ、急速なカルシウムの上昇に続いてゆっくりとしたミトコンドリア ATP の上昇が観察された。また、細胞あたりのカルシウム上昇と ATP 上昇の幅には正の相関が見られた。この結果から、カルシウムが実際に細胞内でもミトコンドリア ATP 合成を亢進していることが明らかとなった。

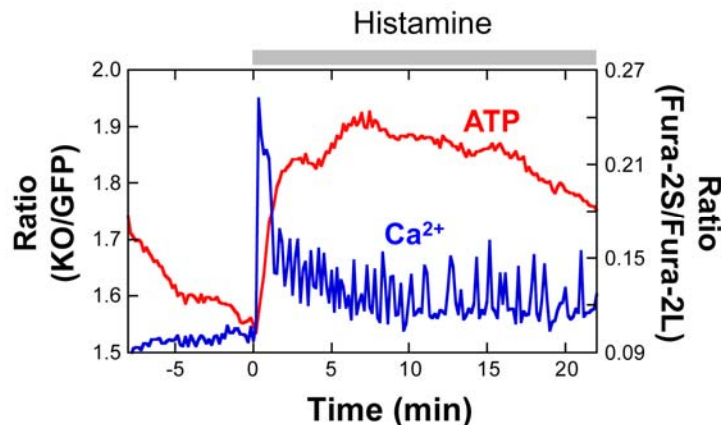


図3. ATP 濃度とカルシウム濃度の同時計測結果

2-5 細胞死におけるATPのダイナミクスの解析

これまでの研究から、細胞内ATPがアポトーシスの制御にも深く関わっている事が強く示唆されている。しかし、細胞死のどのタイミングでATP濃度が変化しているのかという知見は全くなかった。そこでATeamを用いて細胞死におけるATPのイメージングを試みたが、ATeamはアポトーシスで活性化されるカスパーゼによって分解を受ける事が判った。そこでカスパーゼによって分解を受ける部位を同定し、カスパーゼに耐性なプローブATeam^{DNDG}を開発した。ATeam^{DNDG}を用いて単一のHeLa細胞のアポトーシスの進行とATPの変化を同時に計測した結果、いくつかの事が明らかとなった。まず、細胞質ATP濃度は、ミトコンドリアからのチトクロムcの放出に続くミトコンドリア膜電位の消失が起こった後に徐々に低下を始め、数時間かけて枯渇することが明らかとなった。ガラクトース培地を用いた場合は膜電位の消失によって細胞質ATPは急速に枯渇することから、アポトーシスにおけるミトコンドリア膜電位の消失によって細胞のATP合成が解糖系のみに依存することが改めて確認された。また、細胞質ATPの低下には細胞膜の透過性の亢進は伴わなかったことから、ATPが細胞膜から漏れでているわけではない。上記のようにHeLa細胞ではCCCPでミトコンドリア膜電位を消失させた際には細胞質ATPの減少はみられないことから、アポトーシス細胞においてはATP合成と消費のバランスが崩れていると考えられた。

3. 今後の展開

ATP は細胞内のエネルギー通貨としての役割が強調され、注目される事は多くなかった。しかし、細胞内外のシグナルとしての役割やエネルギー代謝の破綻と疾患の関連が明らかになるにつれ、生体内のATPを視ることの重要性は近年増して来ている。本さきがけ研究によって、培養細胞を用いた細胞内ATPイメージングの方法論をほぼ確立出来たと考えられる。今後はこの手法を用いる事によって、細胞内のエネルギー代謝状態をより詳細に解析する事が可能になると期待される。また、個体・組織レベルでのATPイメージング法も確立することにより、より高次の空間階層におけるエネルギー代謝制御機構を明らかにしていく必要があるだろう。さらに、細胞外ATPシグナリング機構を明らかにするため、この手法を細胞外ATPのイメージングにも応用する必要がある。最終的にはATeamの技術を用いて、オルガネラレベルから個体レベルまで階層をまたいでATPの役割が理解される事を期待したい。

4. 自己評価

ATeamを用いて細胞の様々な場所におけるATP濃度をリアルタイムに測定する系を確立したことから、細胞内ATPイメージングの手法を確立するという第一の目標は達成出来たと考えている。また、ATPとカルシウムの同時イメージングの手法を確立し、カルシウムによるミトコンドリアATP合成の活性化を証明したことから、ATP代謝制御機構を明らかにするという第二の目標は部分的には達成出来たと考えている。しかし、当初はRNAiによる遺伝子ノック

アウトと ATP イメージングを組み合わせる事で、より詳細なメカニズムに迫る事を想定していたが、そこまでには至らなかった。また、第三の目標である生命現象における ATP の役割についての研究は、期間中に成果を挙げることが出来なかったが、研究自体は既にスタートしており、今後成果を報告出来ると確信している。

計画に多少無理があり予定していた研究全てをおこなう事は出来なかったのは反省点であるが、生細胞内蛍光 ATP イメージングという新しい手法を開発し、今後の研究の礎を築く事が出来たと評価している。

5. 研究総括の見解

ATP 合成酵素の ϵ サブユニットに着目して、細胞内の ATP 濃度をリアルタイムで測定するプローブを開発した成果は、オリジナリティーが極めて高いものと評価する。このプローブを用いることにより、より分解能の高い方法を確認するなどし、細胞内の種々のオルガネラや細胞内局所における ATP の測定に取り組んで欲しい。このためには多くの研究者との共同研究も必要と考える。

6. 主要な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Nakano, M, <u>Imamura, H</u> , Toei, M, Tamakoshi, M, Yoshida, M, Yokoyama, K. "ATP hydrolysis and synthesis of a rotary motor V-ATPase from <i>Thermus thermophilus</i> ." <i>J Biol Chem</i> , 283, 20789-20796 (2008)
2. Okuno, D, Fujisawa, R, Iino, R, Hirono-Hara, Y, <u>Imamura, H</u> , Noji, H. "Correlation between the conformational states of F_1 -ATPase as determined from its crystal structure and single-molecule rotation." <i>Proc Natl Acad Sci U S A</i> , 105, 20722-20727 (2008)
3. <u>Imamura, H</u> , Huynh Nhat, KP, Togawa, H, Saito, K, Iino, R, Kato-Yamada, Y, Nagai, T, Noji, H. "Visualization of ATP levels inside single living cells with fluorescence resonance energy transfer-based genetically encoded indicators". <i>Proc Natl Acad Sci U S A</i> , 106, 15651-15656 (2009)
4. Kotera, I, Iwasaki, T, <u>Imamura, H</u> , Noji, H, Nagai, T. "Reversible dimerization of <i>Aequorea victoria</i> fluorescent proteins increases the dynamic range of FRET-based indicators." <i>ACS Chem Biol</i> , 5, 215-222 (2010)

(2) 特許出願

なし

(3) その他

招待講演

1. 今村博臣「 F_0F_1 -ATP合成酵素 ϵ サブユニットを用いた蛍光ATPプローブの開発」
第8回日本蛋白質科学会年会(東京)(2008年6月11日)
2. 今村博臣「新規ATPプローブを用いた細胞内ATP動態の計測」
第1回定量生物学の会年会(東京大学)(2009年1月12日)
3. 今村博臣「蛍光プローブを利用した細胞内ATPイメージング」
第1回光塾(情報通信総合研究機構)(2009年8月15日)
4. 今村博臣「イメージングによる細胞内ATPダイナミクスの計測」
第49回生命科学夏の学校(神戸セミナーハウス)(2009年8月28日)
5. 今村博臣「細胞内ATP濃度を可視化する」
特定領域研究—NAIST 植物科学研究教育推進事業「視る生物学4—進化するイメージング—」(奈良先端科学技術大学院大学)(2009年11月25日)

受賞

1. 日本生物物理学会 若手奨励賞「細胞内ATPを蛍光で可視化する研究」(2007年)

12 月 22 日)

著作物

1. 今村博臣, 野地博行, 「新規蛍光プローブを用いた細胞内ATPイメージング」**蛋白質・核酸・酵素** 2009; 54 巻 15 号: 1937-1944.
2. 今村博臣, 「新規FRETプローブを用いた生細胞内ATP濃度イメージング法」**実験医学** 2010; 28 巻 8 号: 1303-1308.
3. 今村博臣, 「蛍光イメージングによる細胞内および細胞外ATPの可視化」**生化学** 2010; 82 巻 11 号: 1056-1060.

研 究 報 告 書

「細胞内の蛋白質代謝を管理するストレス応答機構の解明」

研究期間：平成19年10月～平成22年3月

研究者：岩脇 隆夫

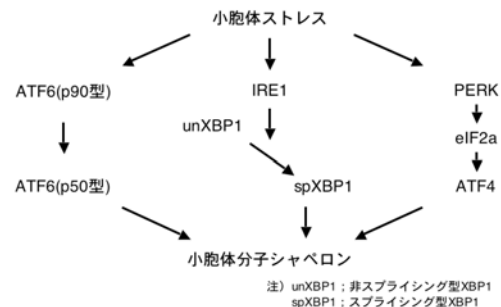
1. 研究のねらい

細胞の中または外でタンパク質は様々な生体反応を制御している主要分子である。しかし、そのタンパク質も古くなり機能しなくなれば、壊され、新しいものにとって代わっていく。このようなタンパク質の正常な代謝はわれわれが生きていく上で非常に重要である。例えば神経細胞内でのタンパク質代謝異常、つまり変性タンパク質を壊せず、蓄積させてしまった場合は神経細胞死が起こり、アルツハイマー病等に代表される神経変性疾患等の原因となる。異常なタンパク質の排除や機能的なタンパク質の供給というタンパク質の品質管理は、特に分泌タンパク質(ホルモン、抗体、神経伝達物質など)や膜タンパク質(ホルモン受容体、細胞接着因子、イオンチャンネルなど)の場合、細胞に備わっている小胞体ストレス応答や小胞体関連分解(ERAD)機構がその一部を担っている。本研究では小胞体ストレス応答のメカニズムを分子レベルで詳細に解析することにより分泌タンパク質および膜タンパク質の生成や分解がどのように制御されているのかを解明するべく研究を行ってきた。また、一方で小胞体ストレス応答の役割を生物個体レベルで解析することにより、分泌タンパク質や膜タンパク質の品質管理がどんな生理現象で特に重要になるのかを解明することにもチャレンジしてきた。

2. 研究成果

IRE1alpha による小胞体ストレス感知機構

細胞が高温環境におかれると、多くのタンパク質は熱変性し、機能を失う。変性して異常なフォールディング構造となったタンパク質の蓄積は細胞機能に障害を与える。そこで細胞は熱ストレスからの防衛策として、熱変性したタンパク質を正常なフォールディング構造に戻すため、分子シャペロン(HSP70 や HSP40 など)の発現を誘導する分子機構を発達させた。タンパク質のフォールディング構造に影響を及ぼすストレスは熱ストレスに限った

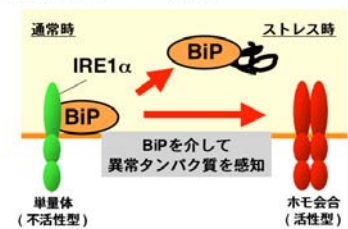


ものではなく、小胞体においても細胞がグルコース飢餓やある種の薬剤に曝されると、多くのタンパク質が異常なフォールディング構造をとり、変性タンパク質が蓄積する。小胞体内に変性タンパク質が蓄積することは一般に「小胞体ストレス」とよばれる。小胞体は真核細胞に存在する細胞小器官の一つで、膜タンパク質や分泌タンパク質の合成・修飾・輸送に関与する。また小胞体はその内腔での変性タンパク質の蓄積を感知し、他の細胞小器官(核など)にシグナル伝達する機能も有している。そのシグナル伝達経路のひとつに小胞体分子シャペロン(BiP や GRP94 など)の発現を誘導するものがあり、熱ストレス時と同様に、細胞を小胞体ストレスから守る。この小胞体分子シャペロンの発現誘導は unfolded protein response (UPR) とよばれており、近年、その分子機構は酵母や培養細胞を用いた研究で明らかになってきた。哺乳動物においては3つの小胞体膜タンパク質、IRE1、ATF6 及び PERK、が UPR 機構において重要な役割を果たす。これら3つの分子は小胞体内腔環境を感知し、それぞれ下流へとシグナルを伝達する。IRE1 は小胞体ストレスにより活性化されると、XBP1 mRNA のスプライソーム非依存的スプライシングを誘導し、活性型 XBP1 の産生を促す。ATF6(p90 型)は小胞体ストレスを感知すると切断され、細胞質側の切断断片(p50 型)が核へと移行する。PERK が小胞体ストレスにより活性化されると、eIF-2alpha のリン酸化を介して ATF4 遺伝子の翻訳を

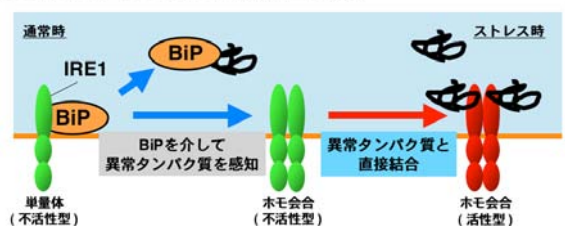
促進する。最終的に、活性型 XBP1、切断型 ATF6(p50 型) 及び ATF4 は全て転写因子として小胞体分子シャペロン群を活性化する(上図参照)。

ここまでの説明でわかるように、ストレスを受けた後の分子メカニズムは随分理解が進んだ。しかし、研究開始当初、ストレスの感知については(特に哺乳動物に関して)ほとんど未解明であったので、本研究期間ではヒトの IRE1alpha に着眼し、この問題に取り組んだ。哺乳動物の小胞体ストレスセンサーには、先に示した図からも分かるように、ATF6、IRE1、PERK が知られるが、これらのうち IRE1 を選んだのには、ATF6 や PERK と異なり IRE1 は酵母から哺乳動物に至るまで進化的に保存されていて、その重要性を予感させたことと、その発見から自身が関わって研究してきたことがあげられる。さて、ここから実際に行ってきた研究について説明する。IRE1 は I 型膜タンパク質として小胞体膜上に局在し、アミノ末端側を小胞体内腔に向けている。IRE1 の小胞体内腔領域は主要な小胞体分子シャペロンである BiP と結合することが、これまでの研究で明らかになっていたので、IRE1 の小胞体ストレス感知について次のような仮説を立てた。小胞体ストレスに曝されていないとき、IRE1 は BiP の結合により活性を負に制御されていて、逆に小胞体内で未フォールディングまたは異常フォールディングのタンパク質が増えてくると、BiP はそれらのタンパク質のフォールディングに駆り出されるため IRE1 から解離し、抑制が解除された IRE1 は二(多)量体化・自己リン酸化して活性を発揮するようになる。これを証明するために、まず小胞体ストレスを引き起こさせたときには IRE1 から BiP が解離することを確認した。そして IRE1 に対して連続的な部分欠失を施し、恒常的に(ストレスがなくても)活性化する IRE1 変異体の作成に成功した。その後、その変異体が BiP との結合能を部分的に欠損していることを突き止めた。これらの事象は先の仮説を支持するものである。一方、酵母菌の IRE1 は BiP の結合／解離に加え、変性タンパク質の直接的な結合も小胞体ストレス感知において重要であるとの報告があり、ヒトの IRE1alpha についても変性タンパク質の直接的な結合の可能性をテストしてみたが、酵母 IRE1 で見られるような活性はなかった。IRE1 の存在は酵母から高等動物に至るまで進化的に保存されていることを述べたが、そのストレス感知機構は進化の過程で変化してきているようで、酵母では BiP の結合／解離と変性タンパク質の直接結合との二段階で調節されるが、本研究においては哺乳動物の IRE1 は BiP の結合／解離だけで調節される可能性を見出し、小胞体ストレス感知の進化における重要な知見を得た(右図参照)。

哺乳動物モデル：BiP解離



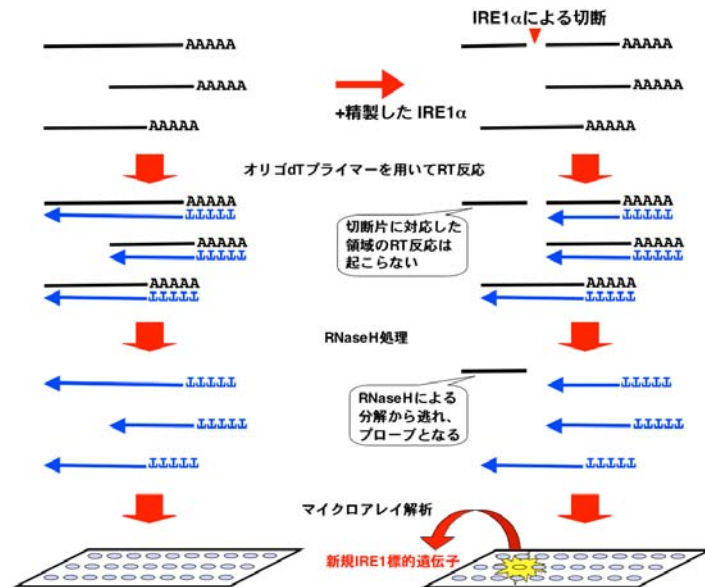
出芽酵母モデル：BiP解離と直接結合の二段階



IRE1alpha による基質 RNA 認識機構

IRE1 が小胞体ストレスにより活性化されると、XBP1 mRNA のスプライソーム非依存的スプライシングを誘導し、活性型 XBP1 の産生を促すことは先に述べた通りである。このとき IRE1 は XBP1 mRNA の特異的なサイトに対して働くエンドリボヌクレアーゼとして機能することが分かっているが、その基質認識機構には未だ多くの謎が残されており、本研究では、この問題にも取り組んだ。研究開始当初、哺乳動物の IRE1alpha の基質となる RNA 分子としては XBP1 しか知られていなかったため、IRE1 の基質認識機構に迫る研究は XBP1 mRNA 上に変異を導入し、切断効率を評価するような実験しかできなかった。ここにブレイクスルーをもたらすには網羅的に IRE1 の基質 RNA を探索し、XBP1 以外の基質 RNA を同定して、その切断サイトの決定と切断サイトの特徴比較が重要だと考えた。実際に本研究で行われた IRE1 の網羅的な基質探索の方法は以下の通りで、知恵をしぼり、こだわりをもって考案したので、少し詳しく説明したい(下図参照)。ヒト培養細胞に由来するトータル RNA を精製した IRE1a と試

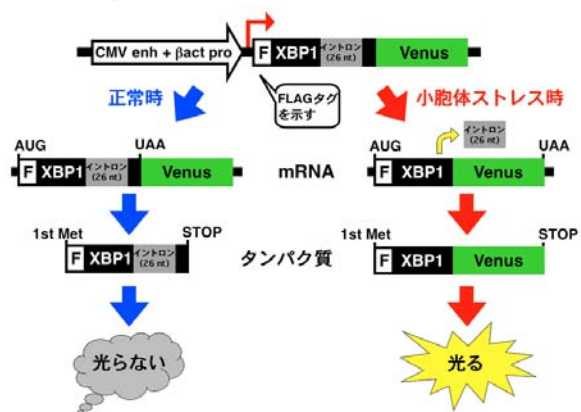
試験管内で反応させた後、オリゴ dT プライマーと逆転写酵素を用いて、cDNA を合成し、鋳型となった mRNA は RNaseH で分解処理する。この段階で殆どの mRNA は消化されてしまうが、あらかじめ IRE1a によって切断された mRNA の 5' 側断片は逆転写反応の鋳型とならず、RNA/DNA ハイブリッドを形成しないため、RNaseH による分解を受けない。始めの IRE1 との反応を行わなかったものをコントロールに RNaseH 処理後の RNA をマイクロ(エクソン)アレイ解析のプロープに用いれば、IRE1a の特異的基質を網羅的に探索できる。今回、この方法により、新たに IRE1 の基質 mRNA を 13 種類同定することができ、そのうちの 8 種類について切断サイトの決定と切断サイト付近の二次構造比較を行うと、これらは共通したコンセンサス配列(CUGCAG)および構造(スチームループ構造)を有し、これらの特徴がおそらく IRE1 の基質認識に重要であることを突き止めた。また奈良先端科学技術大学院大学との共同研究で XBP1 mRNA には小胞体膜上へ局在し、効率良く IRE1 に認識される仕組みが備わっていることも明らかにした。



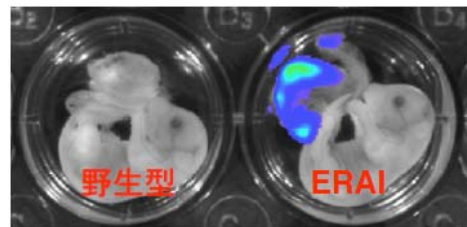
生体レベルでの小胞体ストレスの可視化と IRE1alpha 条件的破壊マウスの表現型解析

小胞体ストレスの研究は 1990 年代初めに酵母菌を材料にスタートしたことから細胞レベルでの解析が長い間盛んに進められてきた。しかし 1990 年代の終わり頃に大阪大学の遠山博士らのグループが家族性アルツハイマー病と小胞体ストレスの関連性を発表した。これを皮切りに、現在まで、いくつかの神経変性疾患や脳虚血、躁鬱病、ウイルス感染、ガン、糖尿病、動脈硬化、炎症、リウマチなど様々な疾患と小胞体ストレスとの

関連性が世界中で調査・報告されてようになった。一方、私自身も哺乳動物個体レベルでの小胞体ストレス研究の重要性を考え、世界に先駆けて小胞体ストレスをマウス生体でイメージできる技術を開発してきた。この技術の詳細は次の通り(上図参照)で、小胞体ストレス特異的イントロンを含む部分的 XBP1 cDNA を終止コドンを挟み GFP(緑色蛍光タンパク質)やルシフェラーゼなどのレポーター遺伝子 cDNA と連結する。この人工的遺伝子を発現する細胞が小胞体ストレスに曝されていない場合、スプライシングは起きないため XBP1 タンパク質の部分断片だけが生じるので、蛍光を発することはない。一方、小胞体ストレスに曝された場合、26 塩基からなるイントロンがスプライシングされる。結果としてフレームシフトが生じ、部分的 XBP1 とレポーターとの融合タンパク質が産生され、細胞はレポーター由来の光を発するようになる。このさきがけ研究期間には、さらに小胞体ストレス可視化技術に改良を行い、これまでに明らかとなっていた臓器での生理的小胞体ストレスに加え、他の組織での小胞体



ストレスも検出できるようにした。特に重要なのは胎盤での小胞体ストレス(狭義的には IRE1alpha 活性)の発見である(下図参照; ERAI は小胞体ストレス可視化モデルマウス)。IRE1alpha ノックアウトマウスは胎生致死となることが知られていたが、その原因は解らないままであった。そこで胎盤に着目した IRE1alpha ノックアウトマウスの解析を行ったところ、胎盤迷路部(胎児・母体間でガス、栄養および老廃物交換を行う血管が高度に発達した部位)の発達不全と血管内皮成長因子(VEGF)の発現レベルの低下が明らかとなった。また、もしかすると胎盤での IRE1alpha の機能がマウス胎児の生死を左右するかも知れないと考え、胎児での IRE1alpha 機能は欠損するが、胎盤での IRE1alpha 機能は残る IRE1alpha 条件的破壊マウスを作製したところ、このマウスは胎生致死を逃れメンデルの法則に従って生まれてきたのである。胎盤でなぜ小胞体ストレスが生じているのか?(IRE1alpha が活性化状態にあるのか?)、未だに、その答えは得られていないが、生体イメージングからノックアウトマウスの解析まで非常に丁寧に研究を進めてきたことで、小胞体ストレス応答分子のマウス個体レベルでの機能解明に近づいたと自負している。また IRE1alpha ノックアウトマウスの胎盤で発現レベルが低下していたのは VEGF だけではなく、CEA ファミリー遺伝子群も IRE1alpha および XBP1 ノックアウトマウスの胎盤で発現レベルが低下していた。胎盤で発現する CEA ファミリー遺伝子群にコードされるタンパク質は胎盤から分泌され、母親の体内で免疫系のクラススイッチを引き起こし、胎児が異物として排除されないようにする働きが知られている。これはこれまで想像もしていなかったような小胞体ストレス応答分子の機能である。



先に、胎盤での IRE1alpha 機能を残せば、胎児の IRE1alpha 機能を欠損させてもマウスは胎生致死にならないことを述べた。しかし、これらマウスも全くの正常という訳ではなく、通常飼育下でも低体重および高血糖の傾向を示した。糖負荷などを施した場合にも、これらマウスはコントロールに比べ高血糖で低インスリン血漿傾向にあった。逆にインスリンを投与した場合はコントロールと同様に血糖値の低下が見られたので、IRE1alpha はインスリン抵抗性というよりも何らかのかたちでインスリン生合成に関わっていると考えられる。今後、この部分を重点的に調査していきたい。

3. 今後の展開

動物個体レベルでの小胞体ストレス研究はまだ始まったばかりで、多くの問題が残されているし、自らの調査で新たに浮かび上がった疑問もある。そこで今後の研究展開として、以下の四つの課題への取り組みを考えている(1; 新たなストレスイメージング技術の開発・改良と応用、2; 個体発生・器官発生・器官機能維持における小胞体ストレス応答分子の機能解明、3; 小胞体ストレス応答における分子メカニズムの徹底解明、4; 小胞体タンパク質の品質管理に関わる分子の機能解析)。これら課題への取り組みを通じて、小胞体ストレスと他のストレスや疾患等との関連性を調べ、生物の環境対応システムの包括的な理解を進めたい。また、小胞体ストレス応答は主に小胞体タンパク質の品質管理機構の 1 つとして見られているが、生物個体レベルにおいて別の機能を持つことも明らかにし、新たな研究分野を開拓したい。もちろん、小胞体ストレス応答の分子メカニズムについて未解明の問題にも新たな研究手法を独自に開発しながら挑戦したい。

4. 自己評価

本さがけ研究において当初掲げていた目標は①XBP1 スプライシング機構の解明、②新規標的分子のスクリーニング、および③動物個体レベルでの機能解析、という 3 つの観点から IRE1 による小胞体タンパク質の代謝制御機構に取り組むことであった。前述した研究成果の通り、この 3 つの課題には十分取り組めたと思う。また、本研究の成果は予想以上の影響があり、国内外問わず多くの方から共同研究の申入れがあった事は大変嬉しく思う。一方で

細かい部分になるが、本研究では哺乳動物の RNA リガーゼの発見を狙っていたのに、それが期間内に出来なかった事は非常に残念である。

5. 研究総括の見解

小胞体ストレスに関与する小胞体分子シャペロンの発現誘導 (UPR: Unfolded Protein Response) の主要因子の一つである IRE1 α は、これに結合する BiP が変性蛋白質に奪われ、遊離した IRE1 α が2量体化し、リン酸化されることで活性化されることを証明した。また、IRE1 α の新規基質の網羅的探索法を開発し、13 種を同定し、8種の IRE1 α 結合部位を特定し、共通の特徴を見出した。更に、IRE1 α ノックアウトの致死性は胎盤における小胞体ストレスが原因であることも明らかにした。これらの成果は、当初計画を達成しており、小胞体ストレスのメカニズム解明に大きな進展をもたらしたものとして評価できる。今後は、疾患治療薬や化粧品開発への応用も期待したい。

6. 主要な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Kota Yanagitani, Yusuke Imagawa, Takao Iwawaki , Akira Hosoda, Michiko Saito, Yukio Kimata, and Kenji Kohno. "Cotranslational Targeting of XBP1 Protein to the Membrane Promotes Cytoplasmic Splicing of Its Own mRNA." Mol. Cell , vol. 34, 191–200, 2009.
2. Daisuke Oikawa, Yukio Kimata, Kenji Kohno, and Takao Iwawaki "Activation of mammalian IRE1alpha upon ER stress depends on dissociation of BiP rather than on direct interaction with unfolded proteins." Exp. Cell Res. , vol. 315, 2496–2504, 2009.
3. Takao Iwawaki , Ryoko Akai, Shinya Yamanaka, and Kenji Kohno "Function of IRE1alpha in the placenta is essential for placental development and embryonic viability." Proc. Natl. Acad. Sci. USA , vol. 106, 16657–16662, 2009.
4. Daisuke Oikawa, Ryoko Akai, and Takao Iwawaki "Positive contribution of the IRE1alpha–XBP1 pathway to placental expression of CEA family genes." FEBS Lett. , vol. 584, 1066–1070, 2010.
5. Daisuke Oikawa, Mio Tokuda, Akira Hosoda, and Takao Iwawaki "Identification of a consensus element recognized and cleaved by IRE1alpha." Nucleic Acid Res. , vol. 38, 6265–6273, 2010.
6. Takao Iwawaki , Ryoko Akai, and Kenji Kohno "IRE1alpha Disruption Causes Histological Abnormality of Exocrine Tissues, Increase of Blood Glucose Level, and Decrease of Serum Immunoglobulin Level." PLoS ONE , vol. 5, e13052 (1–11), 2010.

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 1件

(3) その他(主要な招待講演(学会発表)、受賞、著作物等)

学会発表

1. 岩脇隆夫 「小胞体ストレスの可視化システムから見えるもの」NAISTシンポジウム・見る生物学 2「イメージングの現在と未来」(2007 年 11 月; 奈良先端大)
2. 岩脇隆夫 「小胞体ストレスの可視化システムから見えるもの」住商ファーマインターナショナル株式会社第3回IVISユーザー会議(2008 年 11 月; 東京国際フォーラム)
3. 岩脇隆夫 「胎盤形成における小胞体ストレスセンサーとビタミンEの役割」エーザイ株式会社第 12 回Vitamin E Update Forum(2009 年 8 月; 如水会館、東京)
4. 岩脇隆夫 、細田章、赤井良子、徳田美緒「血糖値調節およびインスリン生合成における小胞体ストレス応答の役割」第 5 回臨床ストレス応答学会(2010 年 11 月; 徳島大)

研 究 報 告 書

「オーキシン調節による植物の成長制御機構の解明」

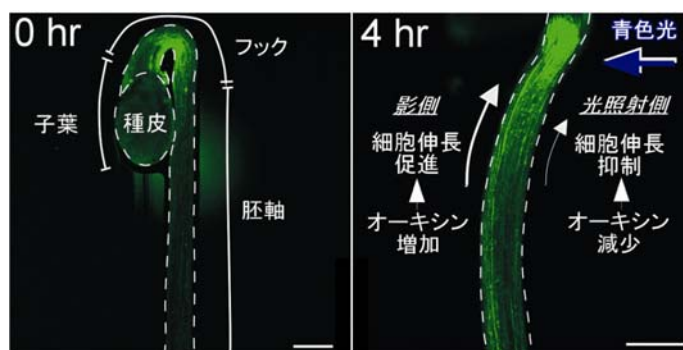
研究期間：平成 19 年 10 月～平成 23 年 3 月

研 究 者：酒井 達也

1. 研究のねらい

植物ホルモン・オーキシンは低分子量の成長制御分子である。細胞内オーキシン量の調節によって、細胞の成長、分裂、分化、ひいては個体の大きさ、発生、生殖など様々な植物の営みが制御されている。細胞内オーキシン量は、生合成・代謝調節及び細胞膜に局在するオーキシン輸送体を介した細胞内外への流出入調節によってなされているが、未だその分子機構の詳細は明らかになっていない。オーキシン量調節の仕組みを明らかにすることは、植物細胞を扱うすべての研究分野に影響を与える、植物科学研究の最重要課題の一つである。本研究は光による偏差成長制御、光屈性反応をモデルとして(図1)、植物細胞のオーキシン量調節の分子機構の解明を目的に行った。植物の三つの主要な光受容体ファミリー、フィトクロム(phy)、クリプトクロム(cry)、フォトロピン(phot)は、それぞれ異なるシグナル伝達経路を介してオーキシン量の調節を行っている。それらの分子機構を明らかにすることによって、光環境刺激に適応した細胞の成長・倍数化・分裂・分化の制御機構の解明を目指した。さらに将来、光によるオーキシン制御が葉や根器官の光形態形成に与える可能性を検証し、農作物の物質生産性及び環境適応性の向上に資するオーキシン作用の人工調節技術の基盤創出を目指した。

図 1. シロイヌナズナ芽生え胚軸のオーキシンレポーター遺伝子発現パターン(緑色)。矢印方向へ青色光を照射すると、4 時間後には光源方向への胚軸の屈曲と、胚軸影側におけるオーキシン蓄積が観察される。オーキシンは影側で細胞伸長を誘導し、胚軸全体を光源側に屈曲させる。



2. 研究成果

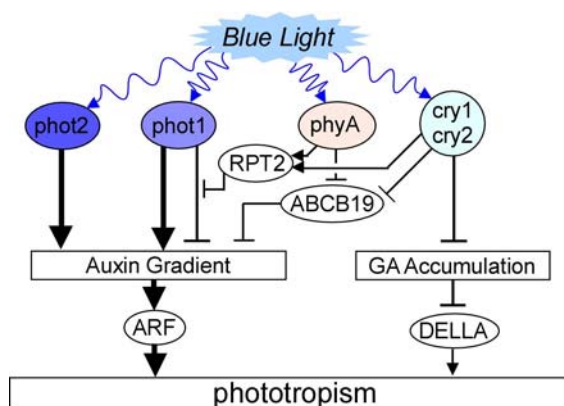


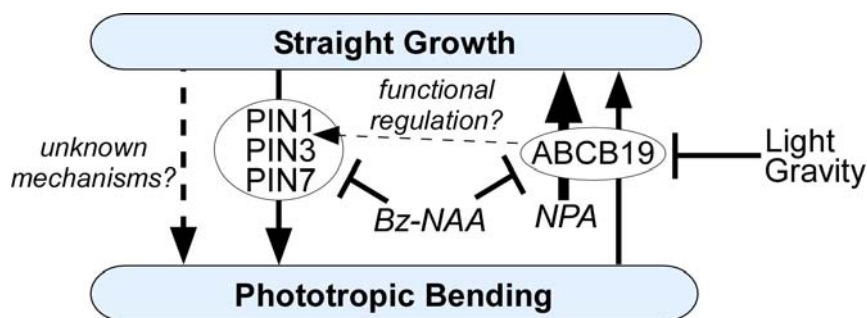
図2. 光屈性制御に働く光シグナリングの遺伝学的モデル

我々は phy・cry 光受容体が3つの機能を介して光屈性に重要な働きをすることを明らかにした(図2)。まず第一に、phy・cry は光屈性を負に制御しているオーキシン輸送体 ABCB19 の発現を抑制することによって、間接的に光屈性を促進していることを発見した(Nagashima et al., 2008a)。A. Murphy 博士らとの共同研究によって、ABCB19 は別のオーキシン輸送体 PIN1 の細胞膜局在安定化に寄与しており、その活性を調節していることを明らかにした(Titapiwatanakun et al., 2009)。

ABCB19 そのもののオーキシン極性輸送が光屈性を阻害するばかりでなく、PIN1 の機能の調節を介した働きがあることも示唆された。

第二に、*phy•cry* は *phot1* シグナル伝達因子 *RPT2* の転写発現制御を介して光屈性の促進を行うことを明らかにした (Tsuchida-Mayama et al., 2010)。第三に、これまで屈性応答への関与がほとんど報告されていなかった細胞伸長制御ホルモン・ジベレリンが光・重力屈性の抑制に働き、*cry* はジベレリン生合成・代謝関連遺伝子の発現制御を介してジベレリン量を減少させ屈性の促進を行うことを明らかにした (Tsuchida-Mayama et al., 2010)。

オーキシン輸送体の光屈性における機能を示唆する重要な証拠の一つは、オーキシン輸送阻害剤 NPA が光屈性を阻害する点にあった。しかし、我々は NPA の屈性阻害効果が ABCB19 の存在に依存しており、*abcb19* 変異体は NPA 存在下でも十分に屈性を示すことを明らかにした (Nagashima et al., 2008b)。さらに、岡山理科大学林謙一郎博士らによって新たに開発されたオーキシン輸送阻害剤 Bz-NAA (オーキシン輸送体すべての活性を直接阻害するオーキシン活性を持たないオーキシン派生体) の光屈性に対する効果を調べた結果、



Bz-NAA はシロイヌナズナ胚軸及び根の重力屈性を効果的に阻害するが、光屈性の阻害効果は低いことを明らかにした (図3: Tsuda et al. [2010] J. Biol. Chem, in press)。

図3. 胚軸の直線成長と光屈性におけるオーキシン輸送体及びオーキシン輸送阻害剤の関係

これらの発見は、まず第一に植物の胚軸には屈曲を誘導する機構ばかりでなく、屈曲を抑制する機構

が存在しており、*phy•cry* はこれらの屈曲抑制機構の働きを抑えることによって間接的に光屈性を促進しているという、新しい植物の屈曲成長の概念を示唆した。また *phy cry* 多重変異体の表現型が、*RPT2* の恒常的発現及びジベレリン生合成阻害のみで十分相補したことから、研究計画初期の予想に反し、*phy•cry* のオーキシン生合成・代謝調節機構は光屈性反応への貢献度が低いことが推測された。一方、オーキシン輸送阻害剤を用いた研究からは、オーキシン輸送体の光屈性における機能はこれまで予想していたよりも低い可能性が示唆された。

3. 今後の展開

光屈性に PIN オーキシン輸送体が重要な機能を果たしていることを予想して研究を始めたが、本研究によって、確かに機能するもののそれだけでは不十分であり、他の新たな分子機構を想定する必要があることが示唆された。今後、一方で PIN の光屈性における機能と *phot* による機能調節の仕組みの詳細を明らかにし、もう一方で PIN オーキシン輸送に依存しない光屈性誘導機構の発見を目指す必要があると考えている。もともと *phot* 光受容体が単細胞緑藻類から存在し機能していることを考慮すれば、オーキシンの細胞間輸送制御ばかりでなく、細胞自立的な細胞伸長制御機構の関与の可能性も視野にいて、今後研究を進めていく必要があると考えている。

4. 自己評価 (S、A、B、C、4 段階評価)

・研究目標1: 光屈性を誘導するフォトトロピンシグナル伝達経路の解明

B 評価。NPH3 の脱リン酸化機構及び *RPT2* の転写後発現制御機構の解明から、*phot* の生化学的機能を理解しようと研究を進めたが、未だその詳細が明らかになっていない。

・研究目標2: 光屈性を誘導するオーキシン輸送体の同定及びその機能制御機構の解明

B 評価。光屈性に関与するオーキシン輸送体を同定することに成功したが、その機能の

phot シグナリングによる制御について明らかにできていない。またこの研究から、光屈性は PIN だけでは説明がしにくいという次の課題が見つかった。

・研究目標3: phy、cry による光屈性制御機構の解明

S 評価。phy、cry による光屈性制御の詳細を明らかにし、phot シグナリングとのクロストークの研究では世界的にもトップクラスの成果を得た。本研究成果により、光屈性における phy、cry 機能の主要な点は明らかになったものと考えられる。

・研究目標4: 植物の物質生産性、環境適応性向上に資する遺伝子機能の発見

B 評価。phot の生化学的機能及びオーキシン濃度勾配形成に至るシグナル伝達経路の解明に至らず、そこから期待された応用面の遺伝子機能の発見・開発について見通しが立っていない。ただし、光屈性研究から離れることになったオーキシン生合成経路の研究では、物質生産性向上に資する遺伝子機能の発見の萌芽的研究成果が共同研究で生まれつつある。

5. 研究総括の見解

本研究は、ダーウィンが 100 年以上前に記載した植物の光屈性について、光受容から光屈性ホルモンであるオーキシンの不等分布によってこの現象が生起する分子機構の解明を目指した。光屈性を誘発する弱い青色光は青色光受容体である Phot1 によって受容され、その情報は RTP2 及び NPH3 を介してオーキシンの不等分布を引き起こされた。一方強い青色光は Phot2 によって受容され、NPH3 のリン酸化を介して光屈性を引き起こした。また、この光シグナル系は PhyB や Cry によっても巧みな制御を受けた。しかし残念ながらこれらの光シグナル伝達系がどのようにオーキシンの不等分布を引き起こすのか、とくにオーキシン輸送体としてこれまで知られている PIN との関連を明確にするには至らなかった。しかし新たに ABCB19 という PIN の機能に関わる輸送体を見出し、今後の研究展開が期待される。

6. 主要な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表 * corresponding author

1.	Tomoko Tsuchida-Mayama, Tatsuya Sakai*, Atsushi Hanada, Yukiko Uehara, Tadao Asami, and Shinjiro Yamaguchi. (2010) Role of the phytochrome and cryptochrome signaling pathways in hypocotyl phototropism. <i>Plant J.</i> 62, 653–662.
2.	Boosaree Titapiwatanakun, Joshua J. Blakeslee, Anindita Bandyopadhyay, Haibing Yang, Jozef Mravec, Michael Sauer, Yan Cheng, Jiri Adamec, Akitomo Nagashima, Markus Geisler, Tatsuya Sakai, Jiri Friml, Wendy Ann Peer and Angus S. Murphy. (2009) ABCB19/PGP19 stabilises PIN1 in membrane microdomains in Arabidopsis. <i>Plant J.</i> 57, 27–44.
3.	Akitomo Nagashima, Yukiko Uehara, and Tatsuya Sakai*. (2008b) The ABC subfamily B auxin transporter AtABCB19 is involved in the inhibitory effects of N-1-naphthylphthalamic acid on the phototropic and gravitropic responses of Arabidopsis hypocotyls. <i>Plant Cell Physiology</i> 49, 1250–1255.
4.	Tomoko Tsuchida-Mayama, Michiharu Nakano, Yukiko Uehara, Miho Sano, Noriko Fujisawa, Kiyotaka Okada, and Tatsuya Sakai*. (2008) Mapping of the Phosphorylation Sites on the Phototropic Signal Transducer, NPH3. <i>Plant Sci.</i> 174, 626–633.
5.	Akitomo Nagashima, Genki Suzuki, Yukiko Uehara, Kensuke Saji, Toshiko Furukawa, Tomokazu Koshiba, Masayo Sekimoto, Shozo Fujioka, Takeshi Kuroha, Mikiko Kojima, Hitoshi Sakakibara, Noriko Fujisawa, Kiyotaka Okada, and Tatsuya Sakai*. (2008a) Phytochromes and cryptochromes regulate the differential growth of Arabidopsis hypocotyls in both a PGP19-dependent and -independent manner. <i>Plant J.</i> 53, 516–529.

(2) 特許出願

なし

(3) その他(主要な招待講演(学会発表)、受賞、著作物等)

招待講演

1. 酒井達也, 槌田(間山)智子, 永島明知, 上原由紀子 (2009) 光屈性における光センシングのクロストーク。日本植物生理学会年会。招待講演。名古屋。
2. Tatsuya Sakai (2008) Phototropism of Arabidopsis seedlings. 4th Asia Oceania Conference on Photobiology. Varahasi, India.
3. Tomoko Tsuchida-Mayama, Akitomo Nagashima, and Tatsuya Sakai. (2008) Molecular mechanisms of hypocotyl phototropism in Arabidopsis. Plant Photobiology, Univ. Missouri, Columbia, USA.

受賞

1. 日本植物生理学会 奨励賞 「光に応答した植物の成長パターン制御機構の分子遺伝学的解析」 (2009 年 3 月 22 日)

著作物

1. 光屈性におけるオーキシシンシグナリング。植物のシグナル伝達、柿本辰男・高山誠司・福田裕穂・松岡信編。共立出版。(2010 年)

研 究 報 告 書

「ブラシノステロイド情報伝達による発生と自然免疫制御の分子機構」

研究期間：平成 19 年 10 月～平成 23 年 3 月

研究者：中野 雄司

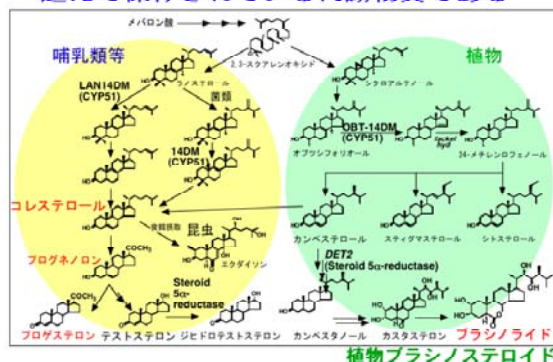
1. 研究のねらい

ステロイドホルモンは生物の種を越えて広く保存される代謝物質である。個々の生物種においては、独自の生理活性化合物とそれを用いた各生物種の生体制御を行う機構には多種多様な仕組みがあるが、それらの中でも、ステロイドホルモンは多くの生物の種を越え広く進化的に保存される希有な生理活性化合物ともいえる。ステロイドホルモンは生物の成長に促進的に働くという点に関しては、多くの生物種に共通な普遍性を持ち、それと同時に、哺乳類における妊娠や生殖の制御、昆虫における脱皮の制御など各生物種に固有の活性も併せ持つという両面性が見られる点ももう一つの希有な点ではないかと考えられる。生命の進化の過程において、哺乳類や両生類、昆虫類よりも古くから地球上に存在した植物においても、ブラシノステロイドと総称される化合物が存在し、植物生長の促進という他種生物と共通の活性と共に、植物独自の細胞内小器官である葉緑体における光合成活性の制御という植物独自の活性を持っていることが植物生理学的解析により明らかとされてきた。

ステロイドホルモンは代謝産物としてのステロイド化合物の保存性に加え、代謝産物の合成酵素において、動物から植物まで進化的に保存されている酵素群が明らかにされているが、細胞内のシグナル伝達経路においては受容体を含め動物・植物間に保存される因子は見つかっていない。しかしながら、本研究申請の開始当時に幾つか得られていた新規なブラシノステロイド情報伝達遺伝子候補群は、動物の自然免疫の情報伝達因子に類似したものが幾つも含まれていた。植物におけるこれらの遺伝子群は、主に分子遺伝学的手法によって得て来たもの、いわば無作為に単離してきた遺伝子であり、この類似性は偶然ではなく必然ではないのかと考え、本研究を構想した。

本研究では、これらの候補遺伝子群について、植物ブラシノステロイド情報伝達経路を担う新規な機能遺伝子であることを確定することを第一の目的とした。さらに、植物においてブラシノステロイドは植物発生に関わる分子メカニズムやその機能遺伝子の単離は試みられつつあったが、植物自然免疫との関わりについては、植物生理学的知見以外に、機能分担遺伝子同定や分子メカニズムについては知見が非常に少なかった。そこで、本研究で新規植物ブラシノステロイド情報伝達遺伝子としての確定を行った後、これらの遺伝子群が、植物において、発生と自然免疫の双方の制御を行っている共制御機構を担う可能性の検証とその分子メカニズムの解明を第2の目的とした。さらに、これらの知見に基づいた知見により、植物ブラシノステロイドが哺乳類においても生理活性を持つ可能性も考察されるため、その検証を第3の目的とした。これらの研究により得られる知見を統合的に考察することにより、ステロイドホルモンのシグナル伝達機構について、植物を基点としつつ、哺乳類をはじめとする他種生物種も視野に入れ、その分子機能の生物種間における進化的保存性について、総体的な考察を得ることを目指して本研究を開始した。

ステロイド化合物は多細胞生物の種間を越えて保存されている代謝物質である

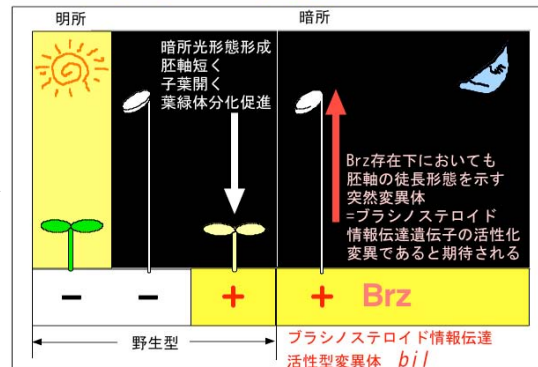


2. 研究成果

2-1 植物ケミカルバイオロジーによる新規ブラシノステロイド情報伝達遺伝子群の探索

具体的な研究展開としては、理化学研究所において創製されたブラシノステロイド生合成酵素である P450 酸化酵素 DWF4 の特異的阻害剤 Brz を用い、この Brz を実験植物アラビドプシスに適用する植物ケミカルジェネティクス研究を試みた。この実験植物は、暗所で発芽した場合、通常条件下では胚軸が徒長した「もやし様」の形態を示すが、Brz によりブラシノステロイド欠損状態になると、胚軸が短化し子葉が開く、あたかも光条件下で発芽したかのような形態「暗所光形態形成」を示す。この所 Brz 存在下において、胚軸伸長を示す変異体を単離し得れば、その変異体はブラシノステロイド情報伝達経路の活性化した変異体であると着想し、その形態変化を指標にして網羅的な大規模スクリーニングを実施した。その結果、Brz 耐性突然変異体 *bil* (*Brz-insensitive long hypocotyl*) を多く単離し、その変異原因遺伝子として数種類の遺伝子の同定、単離を行った。その結果、現在までに、本研究開始当初に同定していた bHLH 型値転写因子 *BIL1/BZR1* に続き、数種類の *bil* 遺伝子候補を特定した。

ブラシノステロイド情報伝達変異 *bil* (*Brz-insensitive long hypocotyl*) のスクリーニング戦略



2-2 新規ブラシノステロイド情報伝達遺伝子群の機能解析

2-2-1 Brz 耐性の胚軸徒長型変異体 *bil5*(*Brz-insensitive-long hypocotyl5*)

bil1 変異体の次に強い形質の変異体として得られた *bil5* 変異体は、暗所 Brz 存在下の発芽期において野生型の約 2 倍の胚軸徒長形質を示し、成熟個体はロゼッタ葉の細長形態での縮小化、花茎の短化と細化を伴う細矮性 slender dwarf 形質を示した。また、組織観察の結果、*bil5* では維管束数の増加と、維管束形成細胞数の減少、ロゼッタ葉の柵状組織の発達阻害が観察された。この *bil5* 変異体について、第一染色体の fine mapping により推定された約 80kbp 領域内の 17 の ORF 及びその上下流約 1 kbp 全てについて塩基配列の解析を行ったが、塩基配列上の変異は認められなかった。しかし、続いて、メチル化感受性制限酵素を用いたサザン解析、バイサルフェートシーケンス解析を行い、*bil5* 変異ゲノム脱メチル化変異とそれに起因する新規相同 2 遺伝子の発現増加を確認した。この 2 種の高発現株の二重形質転換体を作成した所、*bil5* に類似の Brz 胚軸伸長形質と成熟期の *bil5* 様の細矮性 slender dwarf 様の特徴的な矮性形質が再現された。よって、当遺伝子のエピジェネティック変異が *bil5* 変異の原因遺伝子であると確定した。

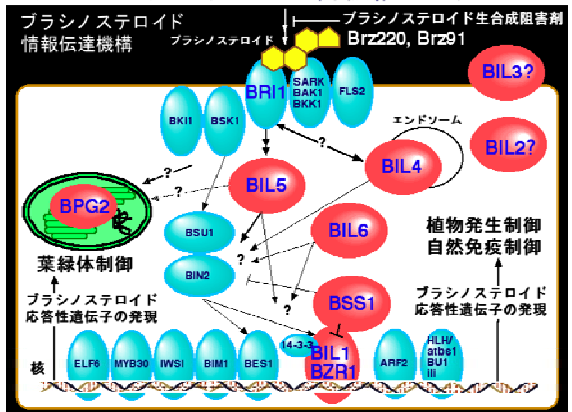
bil5 変異体を受容体 *bri1* 変異体の矮性形質を回復させること、ブラシノステロイド情報伝達の主要転写因子である BES1 がブラシノステロイド処理により脱リン酸化されるのに対して、*bil5* 変異体ではブラシノステロイド無処理状態でも BES1 が脱リン酸化状態である等の結果を得て、*BIL5* がブラシノステロイド情報伝達の主要経路の重要機能を担う遺伝子であることを明らかとした。さらに、病原性細菌 *Pseudomonas syringae* pv.DC3000 の接種試験を行った所、*bil5* 変異体において野生型の約 30 倍の病害抵抗性が検出された。これらのことより *BIL5* 遺伝子はブラシノステロイドによる発生と自然免疫の双方のシグナリングの要となる主要遺伝子であると考察された。今後、発生と自然免疫の制御バランス等、詳細な機能解明を進める予定である。

2-2-2 Brz 耐性の胚軸徒長型変異体 *bil4*(*Brz-insensitive-long hypocotyl4*)

bil5 と同様条件において、アラビドプシスのアクティベーションタギング変異ラインのスクリーニングを行い、*bil5* に類似の Brz 耐性を示す半優性変異体 *bil4* を選抜した。これらは *bil5*

と同傾向のロゼッタ葉の細小化と花茎の短化に基づく細矮性 slender dwarf 様の形質を示した。この *bil4* 変異原因候補遺伝子は7回膜貫通ドメインを持つ新規タンパク質であることが、高発現型形質転換体の示す暗所 Brz 存在下の胚軸徒長 *bil* 形質により確認された。続いて、*BIL4::GFP* 形質転換体の根端分裂組織近傍細胞の解析によって、発芽初期に細胞内の小胞体様のドット状構造体および液胞膜上に局在する性質を持つことが明らかになった。さらに *BIL4 promoter::GUS* 形質転換体の解析により、*BIL4* 遺伝子の発現は、発芽1〜3日目の初期胚軸および初期根に発現が認められ、成長後は茎長の発生初期の幼ロゼッタ葉およびロゼッタ葉基部の托葉、主根および側根の根端分裂組織の直上細胞など、分裂組織と、細胞伸長の極初期細胞に限定的に発現し、各々の細胞が伸長中期に達する時期には発現シグナルは検出限界以下まで低下する特徴的な発現パターンを示すことが明らかとなった。この *BIL4* タンパク質は、細胞伸長初期にエンドソームに、中期には液胞膜へ局在する。さらに、植物自然免疫のマーカー遺伝子 *PR1, PR5* 遺伝子の発現が *BIL4* 遺伝子高発現形質転換体で活性化されたことより、*BIL4* 遺伝子もブラシノステロイドによる発生と自然免疫の重要遺伝子である可能性が示唆された。*BIL4* タンパク質は、植物種のみでなく、ヒトやマウスでも相同性の高い遺伝子が存在することが確認されているが、どの生物種でも研究例のない機能未解明の遺伝子であり、今後、研究をより一層深めて行きたいと考えている。

ブラシノステロイド情報伝達因子による植物の発生と自然免疫の共制御機構が確認された



2-2-3 Brz 高感受性の胚軸矮化型変異体 *bss1* (*Brz-sensitive-short hypocotyl*)

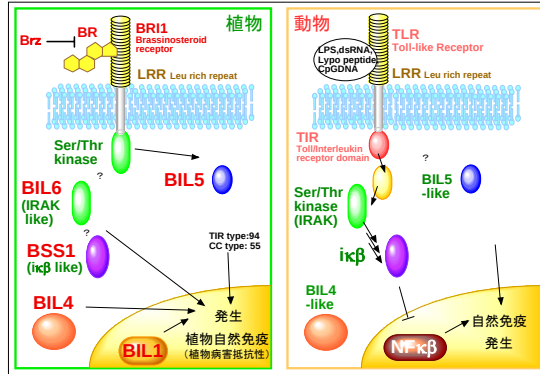
bil 変異体とは逆意に、暗所下通常条件下では野生型と同様の徒長胚軸ながら、暗所 Brz 存在下では野生型より矮化し、さらに生殖成長期にはほぼ花茎が認められない極端な茎軸伸長阻害形態を示す半優性変異体 *bss1* (*Brz-sensitive-short hypocotyl*) を単離した。この *bss1* 変異候補遺伝子として、哺乳類の自然免疫系の調節に関わる *ikB* (アイカッパービー) と相同性を持つ遺伝子を同定した。哺乳類における *ikB* はタンパク質と相互作用するアンキリンドメインを持ち転写因子 NFκB と結合することによって、細胞内シグナルを核内に伝える因子である。*BSS1* 遺伝子においても、転写因子 BIL1 との関わりについて更に詳細に解明を進めた所、Y2H 解析によって、*BSS1* タンパク質は、本研究の第一例として単離したブラシノステロイド情報伝達経路上の主要転写因子である bHLH タンパク質 BIL1/BZR1 と直接的に相互作用することが確認された。BIL1/BZR1 タンパク質のブラシノステロイド情報伝達機構における重要性を指摘する報告は年々増えており、その制御因子としての *BSS1* タンパク質の分子機能の解析を平行し進めて行きたいと考えている。

一方、この *bss1* 変異体において、*BSS1* 遺伝子の隣接遺伝子の高発現株は、逆に胚軸伸長形質を示し *BIL6* と命名した。*BIL6* 遺伝子は、哺乳類自然免疫系で TLR と *ikB* の間に位置するリン酸化酵素 IRAK と相同性が高く、更に植物において、*PR1, PR5* 遺伝子の発現が *BIL6* 高発現形質転換体で活性化されていたことから、植物自然免疫との関わりが示唆された。隣接遺伝子が情報伝達経路上で正逆の生理機能を持つことは、機能遺伝子がゲノム上でクラスターを形成するという希少な可能性を示唆するとも考えられるため、今後は両遺伝子の活性を比較しつつ研究を進めたい。

2-3 植物ブラシノステロイドの哺乳類における生理機能

上記に代表される植物ブラシノステロイド情報伝達 BIL 遺伝子群は、動物に類縁遺伝子が相同遺伝子が存在することが多く、さらに、その数種は特に哺乳類の自然免疫のシグナル伝達経路上に認められる遺伝子であった。これらの知見に着想を得て、植物ブラシノステロイドが動物においても生理活性を持つ可能性があるのではないかと、との考察に至った。植物ブラシノステロイドは、ほぼ全ての植物／野菜に含有されているものであり、食餌として哺乳類に摂取された後、哺乳類に対する生理制御活性を持ちながら、現時点迄、その方向性でブラシノステロイド機能について研究が行われて来なかったことが、学術的に知られて来なかったことに起因するという観点である。この考察に基づく試行により、少なくともヒトの 9 種類のガン細胞に対して *in vitro* での抗ガン活性を持つ事、*in vivo* でもマウス皮膚に移植したガン細胞の抑制活性を持つ事が明らかになった。さらに、哺乳類の自然免疫制御のブラシノステロイドが関与する予備的な知見も得られた。

植物情報伝達経路と哺乳類遺伝子の進化的保存性の可能性に基づき、哺乳類におけるブラシノステロイドの生理活性を検証する。



3. 今後の展開

得られた研究成果の内、植物に関する研究で得られた知見は、特許出願も行っており、植物バイオマス増産や植物バイオマスでの物質生産に貢献し得る部分が多くあり、現在、国家レベル・地球レベルでの課題とされる低炭素社会の実現へ向けた実用化研究への活用を行っていきたいと考えている。

得られた研究成果の内、ブラシノステロイドの哺乳類における活性については、特許出願も行っており、健康食品や医薬シーズとしての応用展開が出来ればと考えている。

植物と動物との進化的保存性に関して得られた成果は、次なる検証も継続して準備中である。本研究の成果を礎に、今後は、分子レベルでの詳細な検証を行い、発展・深化させて行きたい。

4. 自己評価

研究申請当初に志したテーマの内、植物ブラシノステロイド情報伝達経路で重要な役割を果たす新規遺伝子候補数種を確定すること、それらが少なくとも植物においては発生と自然免疫の共制御機能を持つ可能性を示すことについては一定の成果が得られたと考えている。

発展的に目指した、これらの遺伝子が植物と動物間で進化的に保存されている可能性の検証については、現時点では研究途上となり、現時点で区切りとなるような段階での結論までは到達出来なかった。しかし、生理活性解析レベルでの研究では、仮説を支持する可能性を示す結果も得られた、と考察出来るのではないかと考えられる。

5. 研究総括の見解

ブラシノステロイドの情報伝達経路の解明を目指し、ブラシノステロイド生合成阻害剤存在下で胚軸伸長できる変異体を作製、解析し、Bil4、Bil5、Bss1 遺伝子を同定し、機能を解析した。これら遺伝子はどれも植物の自然免疫に関与する可能性が示され、これら遺伝子の類縁遺伝子が動物にも存在し、TLR 経路との類似性が示された。植物の自然免疫系に関するオリジナルな成果として評価できる。ブラシノステロイドの免疫増強作用の検討がマウスで行われ、増強作用が示されつつある。この化合物はアジュバントとして利用できる可能性があり、今後の更なる検討を期待する。

6. 主要な研究成果リスト

(1) 主要論文(原著論文)5報

1.	Iino M, Nomura T, Tamaki Y, Yamada Y, Yoneyama K, Takeuchi Y, Mori M, Asami T, <u>Nakano T</u> , Yokota T. (2007) Progesterone: Its occurrence in plants and involvement in plant growth. <i>Phytochemistry</i> , 68, 1664–1673
2.	Goda H, Sasaki E, Akiyama K, Maruyama-Nakashita A, Nakabayashi K, Li W, Ogawa M, Yamauchi Y, Preston J, Aoki K, Kiba T, Takatsuto S, Fujioka S, Asami T, <u>Nakano T</u> , Kato H, Mizuno T, Sakakibara H, Yamaguchi S, Nambara E, Kamiya Y, Takahashi H, Hirai MY, Sakurai T, Shinozaki K, Saito K, Yoshida S, Shimada Y. (2008) The AtGenExpress hormone- and chemical-treatment data set: Experimental design, data evaluation, model data analysis, and data access. <i>Plant J</i> 55(3):526–42
3.	Yamagami, A., Nakazawa, M., Matsui, M., Tsujimoto, M., Sakuta, M., Asami, T., and <u>Nakano, T.</u> : (2009) Chemical genetics reveal the novel transmembrane protein BIL4, which mediates plant cell elongation on brassinosteroid signaling. <i>Biosci. Biotechnol. Biochem.</i> , 73, 415–421
4.	Nakamura A, Fujioka S, Takatsuto S, Tsujimoto M, Kitano H, Yoshida S, Asami T, <u>Nakano T.</u> (2009) Involvement of C-22-hydroxylated brassinosteroids in auxin-induced lamina joint bending in rice. <i>Plant Cell Physiol.</i> 50(9):1627–35
5.	Komatsu, T., Kawaide, H., Saito, C., Yamagami, A., Shimada, S., Nakazawa, M., Matsui, M., Nakano, A., Tsujimoto, M., Natsume, M., Abe, H., Asami T., <u>Nakano, T.</u> : (2010) The chloroplast protein BPG2 functions in brassinosteroid-mediated posttranscriptional accumulation of chloroplast rRNA, <i>Plant J</i> , 61(3): 409–422

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 4 件

(3) その他

学会発表

1. 中野雄司、山上あゆみ、嶋田勢津子、Joanne Chory、浅見忠男「化学遺伝学による新規ブラシノステロイド情報伝達因子の解明」第 45 回植物化学シンポジウム、2008 年 11 月(東京)
2. 中野雄司、山上あゆみ、嶋田勢津子、Joanne Chory、浅見忠男「植物ステロイドホルモン・ブラシノステロイド生合成阻害剤を用いた植物ケミカルバイオロジー研究」日本農芸化学会 2009 年度大会・シンポジウム、2009 年 3 月(福岡)
3. 中野雄司「植物ステロイドホルモン・ブラシノステロイドのケミカルバイオロジー研究」第 149 回日本獣医学会学術集会・教育シンポジウム、2010 年 3 月(東京)
4. 中野雄司、山上あゆみ、嶋田勢津子、Joanne Chory、浅見忠男「ブラシノステロイド研究の新しい展開を切り拓くケミカルバイオロジー研究」第 74 回 日本植物学会・シンポジウム、2010 年 9 月(名古屋)

著作物

1. 中野雄司(共著)(2008) 入門ケミカルバイオロジー、オーム社、入門ケミカルバイオロジー編集委員会編
2. 中野雄司(2008)ブラシノステロイド作用の分子機構、遺伝, vol.62, No.2, 51–56
3. 中野雄司、浅見忠男、植物機能有用物質・遺伝子・形質の探索と応用を目指した植物ケミカルバイオロジー研究—植物ステロイドホルモン制御剤による光合成司令塔遺伝子の発見、ブレインテクノニュース、139、1–7 (2010)
4. 中野雄司、浅見忠男、植物機能制御剤の探索・創製と生理学、化学生物学への応

用:ブラシノステロイド、化学と生物、48、(2010)

新聞発表

1. 「司令塔遺伝子を発見、食料増産など貢献期待」化学工業日報(2009年12月15日)
2. 「光合成の司令塔遺伝子」朝日新聞(2010年1月15日)

研 究 報 告 書

「オルガネラの pH によるタンパク質輸送の制御」

研究期間：平成 19 年 10 月～平成 23 年 3 月

研究者：前田 裕輔

1. 研究のねらい

細胞は、生命の営みのために、細胞増殖・分化、エネルギー代謝、細胞成分の生合成・輸送、シグナル応答・伝達など数多くの複雑な反応を非常に巧妙に調節している。それらは時間的、空間的な調節機構を使うことによって効率的に達成されている。細胞のコンパートメント化、即ち細胞内小器官(オルガネラ)はそういった巧妙な空間的調節機構の一つであり、それぞれの機能・役割にとって最適な環境やタンパク質・脂質成分を保持している。その環境を規定する重要な因子の一つは pH である。細胞質が細胞内ホメオスターシスを維持する為に、代謝活動によって生産される酸(プロトン)を、 Na^+/H^+ 交換輸送系や $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 交換輸送系によって、その pH を中性付近に保っているということはよく知られている。それに対して、分泌経路、エンドサイトーシス経路に位置するオルガネラであるゴルジ装置、分泌顆粒、エンドソーム、リソソームなどが各々固有の酸性 pH、大雑把に言ってタンパク質の流れに沿ってより酸性になる pH 勾配を維持しているという事実は意外と知られていない。しかしながら、この酸性 pH の重要性は、酸性化阻害剤を用いた実験や、pH 調節の破綻から生じる疾患の存在から明らかである。すなわち酸性化の阻害剤は細胞レベルでタンパク質輸送遅滞や糖鎖修飾不全を引き起こすし、酸性 pH の調節・維持異常に起因するかまたはそれを伴う疾患として大理石病、デント病、遠位尿細管アシドーシス、皮膚弛緩症、XMEA(遺伝性ミオパシーの一つ)などが近年報告された。また癌細胞においてはしばしばゴルジ装置→エンドソーム系の pH 上昇が起こっており、抗癌剤に対する感受性に関与することが報告されている。

このように個体・細胞にとって酸性 pH の調節が重要なホメオスターシスの一つ(酸性 pH ホメオスターシス)であると認識されつつあるが、その基本的機序に対する理解、即ち、どうやってその酸性 pH (勾配)が調節されているのか、なぜ酸性 pH の維持異常で様々な異常表現型が顕われ疾患の発症に結びつくのかという疑問に対する理解は依然として全く不十分である。

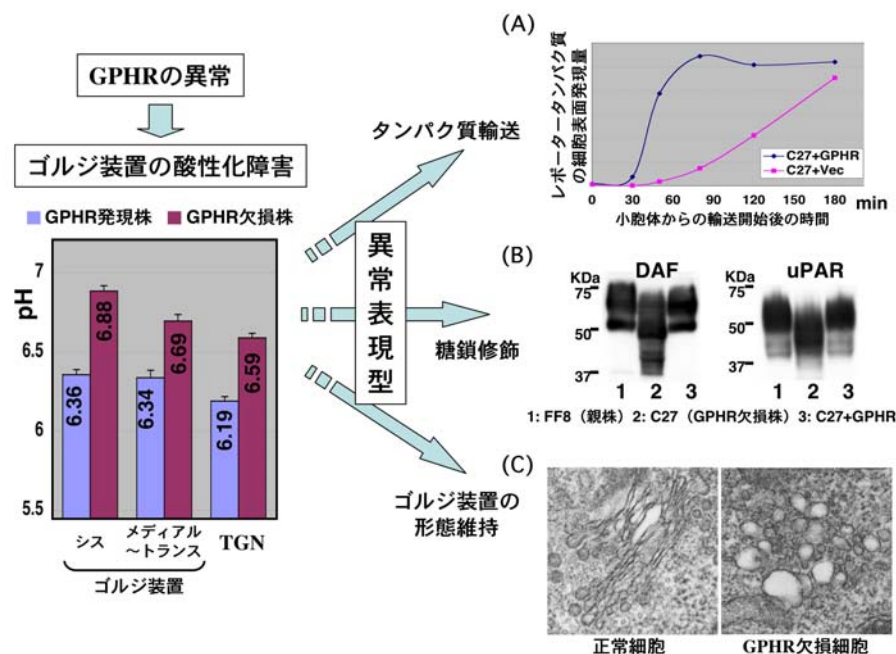
この研究課題を始めるにあたって、私はそれらの疑問に答えを与えてくれるかもしれない変異細胞を得ることが出来たので、変異細胞の解析を通じてゴルジ装置で酸性 pH が維持されているメカニズムの解明を、次いで、pH 調節・維持の異常が及ぼす影響を細胞や個体レベルで調べることでその機序や生理的重要性を解明していくことを試みた。

2. 研究成果

2-1 ゴルジ装置の pH 調節機構の解明

タンパク質の輸送を制御する因子の網羅的同定という研究の過程で非常に強い輸送遅滞を示すハムスター CHO 細胞由来の変異細胞株を樹立することができた。このタンパク質の輸送アッセイ法は私が独自に開発したものであるが、輸送をモニターするためのレポータータンパク質(温度感受性 vesicular stomatitis virus G protein (VSVGts)、FLAG タグと蛍光タンパク質(EGFP)の融合タンパク質)を用い、その細胞内の総発現量を EGFP の蛍光強度で、細胞表面の発現量を抗 FLAG 抗体染色することでセルソーターにより定量的に解析できる。変異細胞の原因遺伝子を同定するために、今度はタンパク質輸送が回復するという事を指標に、cDNA ライブラリーを使った発現クローニングを行なった。その結果、新規膜タンパク質をコードする遺伝子を同定した。このタンパク質の役割を理解するために引き続き変異細胞の解析を行なった。変異細胞のいくつかの細胞膜タンパク質を SDS-PAGE で解析すると意外にもすべて分子量が減少していることが観察され、糖鎖修飾に異常があることが判明した。しかもこの糖鎖修飾異常は、タンパク質の N 型、O 型糖鎖と糖脂質の全てにわたって、しかもシアル酸

やガラクトースなどの複数の糖転移にまたがって見られ、単一の糖転移酵素の異常では説明ができないことが判った。この広範囲にわたる糖鎖修飾異常は糖転移酵素というよりはその場であるゴルジ装置の異常を強く示唆していた。このことは、電顕像でゴルジ装置の著しい変形(小胞・空胞化)が観察されたことから支持された。これらの異常表現型はそのプライマリーの異常がゴルジ装置の酸性化障害にあるのではないかと疑わせた。上述したように、分泌経路・エンドサイトーシス経路に位置するオルガネラは酸性化しているが、その酸性化を非特異的に阻害するような薬剤(モネンシン、バフィロマイシン、塩化アンモニウムなど)を投与すると同様な表現型が顕われることが報告されていたからである。そこでゴルジ装置のpHを直接測定することにした。pHに感受性のある蛍光タンパク質pHluorinはpH依存的に励起一発光スペクトラム特性が変化する。このpHluorinにゴルジ装置局在シグナルを付加して発現させ共焦点レーザー顕微鏡でpHを測定したところ、予想通りゴルジ装置のpHが正常細胞より0.3~0.5程度上昇していることが確認できた。原因タンパク質がゴルジ装置のpHを調節していることが判ったのでGPHR(Golgi pH Regulator)と命名した。他の酸性オルガネラであるエンドソーム・リソソームの酸性化には異常は認めなかったため、酸性化阻害剤と異なって初めてゴルジ装置特異的な障害だと言える。これは、GPHRの発現がゴルジ装置に局限しているという結果から説明された。

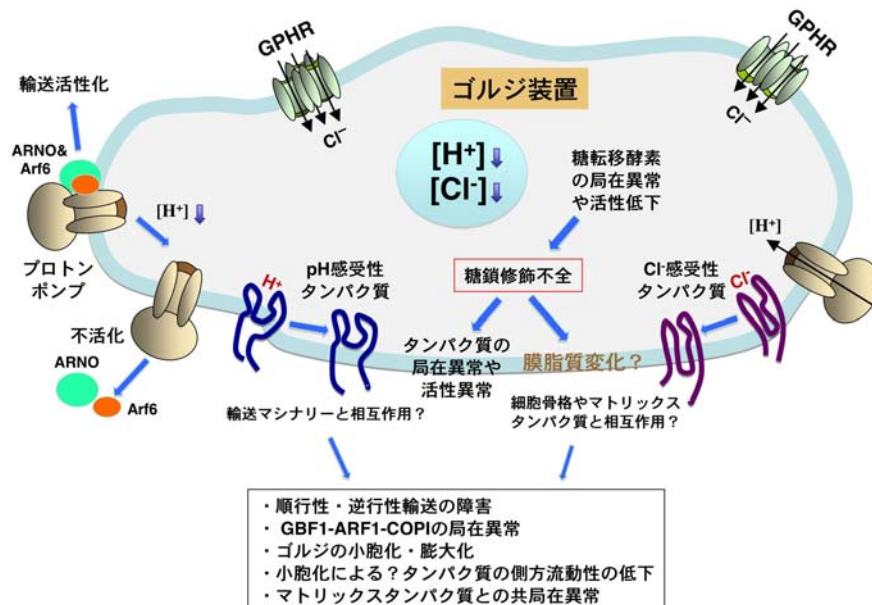


次に、GPHRの欠損でゴルジ装置のpHが上昇する機序、言い換えるとGPHRの機能を検討した。電気生理学的な解析から、酸性オルガネラのpHはプロトンポンプ、カウンターイオンチャンネル、プロトンリークの三者のバランスで維持されていると考えられている。プロトンポンプによる内腔へのプロトンの搬入は膜電位を形成し、更なるプロトンの搬入にとって負荷になる。カウンターイオンチャンネルは、陰イオン(クロライドイオン)を流入させるか陽イオン(ナトリウムイオン)を流出させることによってその膜電位を打ち消し、プロトンポンプが効率よくさらなるプロトンを搬入させることを可能にすると考えられている。変異細胞ではGPHRが発現していないこと、即ちloss of functionでpHが上昇すること、GPHRの構造が8回以上の膜貫通部分を持つことから、GPHRはカウンターイオンチャンネルであると考えた。パッチクランプ法を用いるために、細胞表面へ強制発現を試みたがほとんど発現を認めず、その方法は使えなかったため、人工脂質膜に高度に精製したGPHRを組み込んでイオンチャンネルの活性を測定するplanar lipid bilayer systemという方法を用いた。その結果、GPHRは確かに陰イオンチャンネルの活性を有することが判明した。これらの結果は、①ゴルジ装置における初めての力

ウンターイオンチャネルの存在、②その障害によってゴルジ装置の pH が上昇することからカウターイオンチャネルが pH の調節に必須であること、③ゴルジ装置の pH 上昇が、輸送障害・糖鎖障害を起こすのに十分であることを明確に証明した。

2-2 ゴルジ装置の酸性 pH によるタンパク質輸送の制御機構の解明

上述したように変異細胞の解析からゴルジ装置の酸性 pH は正常なタンパク質輸送（小胞輸送）にとって不可欠である。小胞輸送は多くの細胞質タンパク質によって調節されているので、どのようにゴルジ装置の内腔側で起こる pH の変化が感知され、内腔側から細胞質側に伝わっていき、小胞輸送マシナリーを制御するのか、というとても興味深い問題に遭遇する。当然、ゴルジ装置内腔側の pH を感受して細胞質側に情報を伝える分子、すなわち pH センサーが存在するということが予想され、当研究課題において pH センサーの同定に精力を注いだがおよばず同定できなかった。しかしながら、タンパク質輸送障害に関する幾つかの知見を得ることができた。一つ目は、GPHR 欠損細胞では、上記の輸送アッセイ法で検出された順行方向の輸送障害に加え、ゴルジ装置から小胞体への逆行輸送が障害されているということである。これは、Brefeldi A を添加した時の逆行輸送を見ることで検証された。もともと順行輸送（小胞体からゴルジ装置）の輸送が障害されており、その2次的な現象である可能性も否定できないが、逆行輸送を司る COPI 小胞のゴルジ装置からの形成を制御する GBF1（ARF1 のグアニンヌクレオチド交換因子）、ARF1（低分子量 GTPase）、beta-COP のゴルジ装置への局在が減少し、より末梢側に分布している現象を見いだした。現在のところ、その機序は不明であるが、3者とも細胞質タンパク質であるのでこれらを pH 依存的にゴルジ膜へリクルートしているタンパク質が pH センサーとして機能している可能性も考えられ、非常に興味深い。2つ目は、GPHR 欠損細胞では、ゴルジ装置に局在するタンパク質の側方流動性が著しく悪くなっていることである。電顕でゴルジ装置の著しい小胞化が見られゴルジ装置そのものが細かく分断化されているためかも知れない。また、ゴルジ装置マトリックスタンパク質のノックダウンで同様にゴルジ装置に局在するタンパク質の側方流動性が悪くなることが最近報告されたが、この細胞では、ゴルジ装置膜タンパク質とマトリックスタンパク質の共局在が損なわれていることが判明した。今後、pH センサーの同定を含め輸送障害のメカニズムのより詳細な解析を続行していく予定である。



2-3 細胞・個体におけるゴルジ装置の酸性 pH の生理的役割の解明

ゴルジ装置の pH ホメオスタシスの生理的役割を理解するために2つの手段を用いた。一つは、マイクロアレイを用いた転写レベルのゲノムワイドなスクリーニングである。もう一つは、

GPHR ノックアウトマウスの作出である。

ゴルジ装置の酸性化障害の影響を網羅的に解析するためには、ハムスター由来の細胞は、遺伝子データベースが無いため適当ではない。そこで GPHR^{-/-}のマウス胎児線維芽細胞(MEF)を作成し、その MEF が CHO 由来の変異細胞と同様の異常表現型を示すことを確認したうえで、マイクロアレイを用いて転写産物解析を行なった。その結果、コレステロールの生合成に関与する遺伝子群の転写レベルが低下していることが判明した。実際、細胞内コレステロール量を測定すると有意に低下していた。SREBP2 という転写因子が多くのコレステロール生合成関連遺伝子の転写を制御しコレステロール生合成を調節していることはよく知られている。SREBP2 の活性化には、小胞体からゴルジ装置への輸送ならびにゴルジ装置で S1P、S2P という2つのプロテアーゼによるプロセッシングを必要としており、GPHR 欠損による輸送障害やゴルジ装置の機能障害で SREBP2 の活性化障害が起こっているという仮説を検証した。その結果、1)少なくともレポーターアッセイからは、通常培養時の SREBP2 活性の有意な低下を認めなかった、2)コレステロールの生合成の調節に多面的に関与していることが最近提唱されている Akt キナーゼの活性化レベルは低下していた、3)GPHR 欠損 MEF では、小胞体分画でのコレステロール量は正常であるが細胞膜分画のコレステロール量は低下しており、コレステロールの輸送・分布障害が示唆された、4)小胞輸送障害がコレステロール輸送・分布に関与しているかどうかを調べるために、小胞体からの COPII 小胞形成に必須の低分子量 GTPase の Sar1 変異体を用いた。小胞輸送を抑制する Sar1-H79G 変異タンパク質を発現する MEF 細胞でコレステロール量を測定したところ、有意な低下を認めたことから小胞輸送がコレステロール輸送・分布に関与していることが示唆された。現在、GPHR 欠損細胞では、コレステロールの分布異常が主要な原因ではないかと考え、その正当性・機序を解析中である。

ノックアウトマウスは、タンパク質の個体における役割を見ることにおいては非常に優れた方法である。GPHRの全身でのノックアウトでは胎生致死となった。そこで、その致死性を回避するためにコンディショナルノックアウトマウスが必要となり、そのためのGPHR^{fllox}マウスを作出した。現在、Lck-Creマウス、K5(ケラチン5)-Creマウス、LysM-Creマウスなどとの交配により、コンディショナルノックアウトマウスを作出し、そのフェノタイプの解析を行っている。中でも、K5-Creマウスとの交配により作出されたマウスは、基底細胞の機能異常から生じる毛根機能の低下、皮膚バリアー機能の低下を示し、その結果、角質層などの肥厚と強い落屑を伴う魚鱗癬様症状を呈した。その分子メカニズムについては現在解析中である。このようにコンディショナルノックアウトマウスはゴルジ装置のpHホメオスタシスの生理的役割の解明と同時に疾患モデルマウスの作出としても有用であると思われる。

3. 今後の展開

酸性オルガネラの pH ホメオスタシスに関しては、まだまだ研究の進んでいない領域であり、解明していかなければならないことが山積している。その制御機構という面からは、特にゴルジ装置の内腔側で起こる pH の変化がどうやって感知され内腔側から細胞質側に伝わっていくのか、その細胞質側のターゲットは何かということについて解明されなければならない。このためには pH の変化から発信するシグナル伝達の最上流部分即ち、pH センサー付近の分子の同定が必須であり、現在精力的に行っているところである。また生理的機能という面からは、この pH ホメオスタシスとクロストークする他のシグナル伝達やホメオスタシスの同定が重要である。これは、pH ホメオスタシスの生理的役割を考える上で必須であり、また同時に酸性オルガネラの機能を知る上でも重要である。これには、トランスクリプトームやメタボロームなどの網羅的解析を今後も継続して行い解析していく予定である。すでに情報の得られている部分(たとえばコレステロール生合成異常など)に関しては、そのメカニズムの解析をなるべく早く終了できるように努力する。またコンディショナルノックアウトマウスに関しても迅速に解析を進め個体での役割を解明していく予定である。最後に、他の酸性オルガネラ(たとえばリソソーム)に関しても研究をすすめ、何故オルガネラ間で pH 勾配が必要なのかということや疾患との関連についての研究も推進していくことで、酸性オルガネラの pH ホメオスタシ

スの機能・役割を包括的に理解することができると考えており、当研究課題を基に更に発展させていくつもりである。

4. 自己評価

当研究課題の採択時にその目標として、1)ゴルジ装置の pH 調節機構の解明、2)このオルガネラ pH の異常細胞と正常細胞を比較することによりその局在・発現量・修飾が変化しているタンパク質を、既知のタンパク質のスクリーニングやプロテオミックスの手法によりシステマティックに同定する、3)それらのタンパク質の pH センシング機構や分泌経路オルガネラ(特にゴルジ体)の酸性 pH によるタンパク質輸送の制御機構を解明する、という3点を提案した。ゴルジ装置の pH 調節機構に関しては、ゴルジ装置でこれまで未発見であった新しいカウンターイオンチャネル GPHR が同定でき、カウンターイオンチャネルが確かに pH の酸性化に寄与しているということを明確に示すことができた。これは、これまでカウンターイオンチャネルの意義についての様々な議論に一定の決着を持つことができたという意味で非常に重要である。2)に関しては、マイクロアレイを用いたゲノムワイドな解析によりコレステロールの生合成異常や免疫系遺伝子群の転写量異常を見出すことができ、コレステロール生合成異常についてはそのメカニズムを検討しそのモデルを提唱することができた。今後の研究の足掛かりとして十分な成果が得られたと考えている。3)に関しては pH センサーの同定までは至らなかったが酸性 pH によるタンパク質輸送の制御機構のメカニズムに関して、全体像と幾つかの興味深い観察を得ることができた。まだ十分に検討しきれていない部分もあるがおおむね予定通りの成果が出せたと考えている。

さらに最初の提案ではなされていなかったが、GPHR のコンディショナルノックアウトマウスを作製したことで pH ホメオスタシスの個体での役割を検討できるようになった。GPHR 欠損細胞も含めて今後、これらを利用して、疾患との関連についても念頭に置きながら研究をより推進していくことが可能となったことは重要な成果であった。

5. 研究総括の見解

CHO 細胞から蛋白質輸送遅滞変異株を分離することから研究をスタートさせ、ゴルジ体の pH を調節する Golgi pH regulator (GPHR)を発見し、これがカウンターイオンチャネルとしてゴルジ内腔の pH を低下させていること、更に GPHR の遺伝子破壊細胞において、糖鎖修飾、ゴルジ体の形態、コレステロール代謝が異常となることなど、オリジナリティーの高い優れた研究成果を挙げた。GPHR のノックアウトマウスも作成されており、今後、疾患との関連についても研究することが計画されており、更なる発展が期待できる。今後の研究の中で、コレステロールをはじめとする代謝物に関する研究を、メタボローム解析を含めて展開することも期待する。

6. 主要な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1.	Maeda Y, Ide T, Koike M, Uchiyama Y, Kinoshita T: GPHR is a novel anion channel critical for acidification and functions of the Golgi apparatus. <i>Nat. Cell Biol.</i> 10(10): 1135-45, 2008.
2.	Fujita M, Maeda Y, Ra M, Yamaguchi Y, Taguchi R, Kinoshita T: GPI-glycan remodeling by PGAP5 regulates transport of GPI-anchored proteins from the ER to the Golgi. <i>Cell</i> 139(2): 352-365, 2009.

(2)特許出願

なし

(3)その他

招待講演

1. 前田 裕輔: 新規イオンチャネルGPHRによるゴルジ装置の酸性化は正常な糖鎖修飾に必要である 第 6 回糖鎖科学コンソーシアム(JCGG)シンポジウム 東京 2008.12.3
2. Maeda Y, Ide T, Koike M, Uchiyama Y, Kinoshita T: Acidification of Golgi apparatus is regulated by GPHR, a novel anion channel, and critical for glycosylation. BMB2008 シンポジウム「糖鎖による生体膜近傍の細胞機能制御機構」神戸 2008.12.10
3. 前田 裕輔、井出 徹、小池 正人、内山 安男、木下 タロウ: GPHRはゴルジ装置の酸性化・機能にとって重要な新規アニオンチャネルである 第 114 回日本解剖学会総会・全国学術集会シンポジウム「細胞内輸送と代謝」岡山 2009.3.28
4. Maeda Y, Ide T, Koike M, Uchiyama Y, Kinoshita T: GPHR is a novel anion channel critical for acidification and functions of the Golgi apparatus. 第83回日本薬理学会年会 シンポジウム「疾患と創薬の標的としての細胞内小器官イオン動態」大阪 2010.3.18

受賞

1. 平成22年度文部科学大臣表彰 科学技術賞 「蛋白質の糖脂質修飾に働く遺伝子群の解明とその医学応用研究」(2010 年 4 月 5 日)

著作物

1. 前田 裕輔 「酸性オルガネラのpHホメオスタシス」“蛋白質 核酸 酵素” 54(9): 1141-9、2009.
2. 前田 裕輔 「ゴルジ装置の酸性化とその機能に必須である新規イオンチャネルGPHRの同定」“実験医学” 27(3):419-23、2009.
3. Maeda Y and Kinoshita T: The Acidic Environment of the Golgi Is Critical for Glycosylation and Transport. In Minoru Fukuda, editor: *Methods in Enzymology*, Vol. 480, Burlington: Academic Press, pp. 495-510, 2010.

研 究 報 告 書

「老化シグナルにより制御される代謝ネットワークの解明」

研究期間：平成19年10月～平成23年3月

研究者：南野 徹

1. 研究のねらい

加齢に伴って、糖尿病や動脈硬化、高血圧などの生活習慣病の罹患率が増加し、その結果、虚血性心疾患や脳卒中の発症の基盤病態となっている。また加齢に伴い、認知症・神経変性疾患などの中枢性神経系疾患やがんなどもその有病率が増加し、現代の高齢化社会の大きな課題となっている。しかし、加齢がどのようにしてこれらの疾患を増加させるのかについては明らかとなっていない。一方、これらの病態は、多くの高齢者において共通に認められることから、老化の形質の一部としてとらえることができる。すなわち、次世代の加齢関連疾患に対する治療法の開発には、寿命・老化制御の分子基盤の探索も視野に入れた包括的な研究が必要であると考えられる。

通常ヒト正常体細胞は、ある一定回数の分裂増殖後、細胞老化とよばれる分裂停止状態となる。このような細胞の分裂寿命に重要な因子が、テロメアである。テロメアは、染色体の両端に存在し、その安定性に寄与するが、DNA複製が不完全であるため、細胞分裂とともに短縮する。ある一定の長さまで短縮したテロメアは、DNA損傷として認識され、p53依存性細胞老化シグナルの活性化によって、細胞は老化する(図1)。最近では、酸化ストレスや紫外線などのストレスによってDNA損傷が生じると、テロメアの短縮を伴わずに細胞が老化することが知られている(ストレス誘導性細胞老化)(図1)。老化した細胞が高齢者の皮膚へ集積することや、寿命の短い早老症候群患者より得られた細胞の寿命は有意に短いことなどが報告されていることから、加齢に伴って生じる組織における老化細胞の集積、あるいは、細胞老化シグナルの活性化が、寿命や加齢関連疾患の病態生理に関与する可能性がある。

実際、私はこのような仮説のもとに研究を進め、ヒト動脈硬化巣に老化した血管細胞が存在すること、テロメア短縮によるp53依存性細胞老化シグナルの活性化が加齢に伴う血管老化の病態生理に関与していることなどを報告してきた。

また、生活習慣病において認

められる高インスリン血症や高血糖、アンジオテンシン II の活性化が、テロメア非依存性にp53細胞老化シグナルを活性化し、血管細胞を老化させることによって動脈硬化を促進していることを、マウスモデルによって明らかにし、これらのマウスにおいてp53依存性の細胞老化シグナル活性化を抑制すると、動脈硬化の進展を制御できることなども報告した。さらに、加齢や心負荷に伴って心臓におけるp53依存性細胞老化シグナルが活性化され、心不全の発症・進展を促進していることなども明らかにした。以上のように、加齢や生活習慣に伴う様々なストレスが、細胞老化シグナルを活性化することによって、寿命や加齢関連疾患の病態に関わっていることが予想される。そこで本研究では、細胞老化シグナルによって制御される加齢関連疾患の病態生理を解明し、次世代の治療法を開発することを目指した。

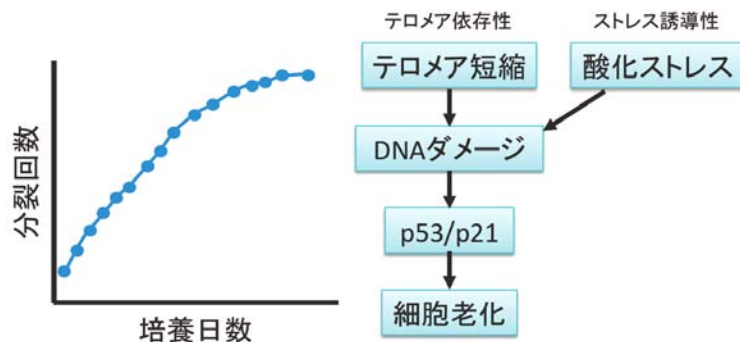


図1 細胞老化のメカニズム

2. 研究成果

近年、循環器疾患の発症基盤として、糖尿病やメタボリック症候群といった代謝性疾患が重要視されている。これらの疾患では、肥満に伴う内臓脂肪の蓄積と、それによって惹起されるインスリン抵抗性とその病態の基盤にあると考えられている。しかし、蓄積した内臓脂肪がどのようにしてインスリン抵抗性を惹起するのか、また、加齢に伴ってこれらの疾患が増えるのはなぜかといったことについては明らかとなっていない。一方、糖尿病患者ではテロメアの短縮が亢進していることが報告されており、細胞老化シグナルと糖尿病の発症の関連性が示唆されている。そこで私は、p53 依存性の細胞老化シグナルと糖尿病の関係について検討した。

2-1 2 型糖尿病の脂肪組織における老化シグナル

過食により脂肪組織に特異的に酸化ストレスが増加することが知られている。そこで、2 型糖尿病モデルマウス (Ay マウス) の脂肪組織の老化形質について調べてみることにした。その結果、糖尿病マウスの脂肪組織では細胞老化染色 (Senescence-associated β -galactosidase 染色) に陽性の老化細胞が多数存在することがわかった (図 2)。また、老化分子 p53 や p21 の発現を調べてみると増加していたことから、2 型糖尿病マウスの脂肪組織は老化形質を示しているものと考えられた (図 2)。これらの老化形質に伴って、マクロファージの浸潤や悪玉アディポカインの産生が増加していた。また、糖尿病モデルマウスの脂肪組織では脂肪細胞分画、間質細胞分画のいずれにおいても p53 の蓄積と、悪玉アディポカインの産生を認め、炎症の惹起には脂肪細胞、脂肪組織のマクロファージ両者が老化形質を獲得することが関与していると考えられた。

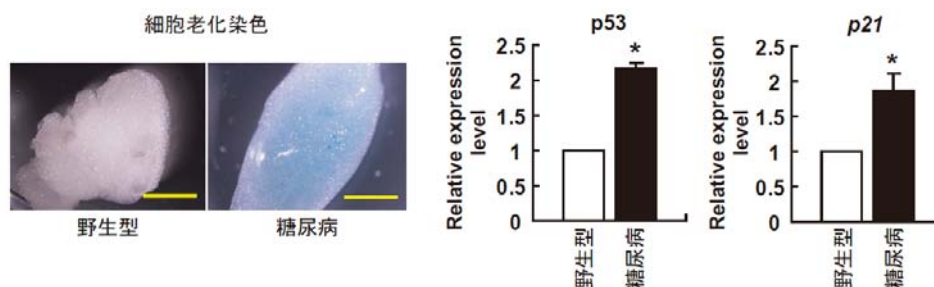


図 2 糖尿病マウスの脂肪老化

次に、p53 の役割を調べるために、p53 を欠損した糖尿病マウス (p53KO 糖尿病モデル) を作成した。その結果、このマウスでは脂肪組織の老化が抑制され、マクロファージの浸潤や悪玉アディポカインの産生が抑制されていた。これらに伴って、インスリン抵抗性や耐糖能異常が改善していたことから、p53 が糖尿病モデルマウスの脂肪組織の老化や炎症を制御している key molecule であると考えられた。

より生理的な肥満モデルにおいて検証するために、高脂肪高蔗糖食負荷マウスの脂肪組織を調べたところ、やはり p53 の蓄積と悪玉アディポカインの産生を認め、老化形質を獲得していた。また、脂肪組織特異的に p53 を欠損させたマウスに高脂肪高蔗糖食を負荷したところ、脂肪組織の老化形質とそれに伴う炎症が著明に改善し、全身のインスリン抵抗性も改善したことより、脂肪組織における p53 依存性老化シグナルがインスリン抵抗性を

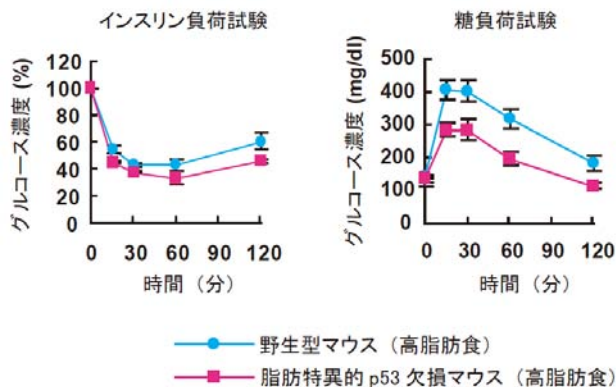


図 3 脂肪特異的 p53 欠損マウス

制御しているものと考えられた(図 3)。

さらに、脂肪組織における p53 の役割についてさらに検証するために、我々は脂肪組織特異的 p53 過剰発現マウスを作成した。脂肪組織特異的 p53 過剰発現マウスの脂肪組織では悪玉アディポカインの産生を認め、炎症が惹起されていた。またこのマウスでは全身のインスリン感受性が低下していた。以上より、糖尿病の脂肪組織では p53 が活性化されることによって悪玉アディポカインの産生が増加し、全身のインスリン感受性を低下させていると考えられた。

2-2 脂肪組織における老化シグナルの活性化とインスリン抵抗性

次に私は、脂肪組織の老化を促進させた際の表現系を解析することにした。染色体の DNA 末端はテロメア構造により保護され、テロメアの伸長はテロメラーゼという酵素によって行われているが、ほとんどの細胞でテロメラーゼの量が不十分なため、細胞分裂のたびにテロメアが徐々に短縮することが知られている。そこで私は、全身でテロメラーゼを欠損したマウスを解析に用いることにした。マウスのテロメア長は長いため、テロメラーゼ欠損マウスを 4 世代経代させたマウス(G4 マウス)を実際の解析に用いたところ、G4 マウスでは脂肪細胞のテロメア長が短縮することを確認することができた。

G4 マウスの脂肪組織では、老化染色陽性細胞を多数認め、p53 の蓄積を伴い、マクロファージの浸潤や悪玉アディポカインの産生が亢進していた。G4 マウスに高脂肪高蔗糖食負荷を行うと、全身のインスリン抵抗性が惹起され、肝臓、骨格筋においてインスリン抵抗性が惹起されていた(図 4)。

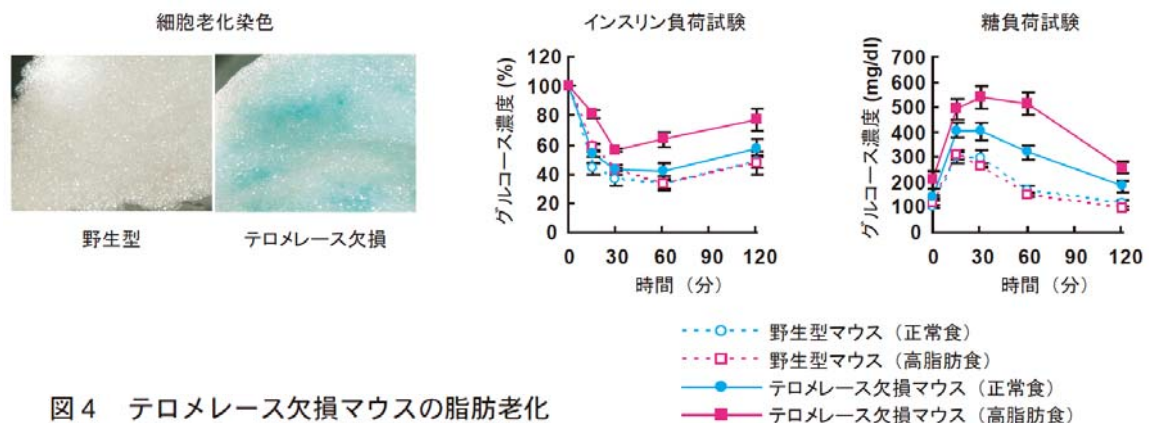


図 4 テロメラーゼ欠損マウスの脂肪老化

G4 マウスにおける脂肪の老化の役割を検討するため、G4 マウス(ドナー)の脂肪を野生型マウス(レシピエント)へ移植するという実験を行った。その結果、老化した脂肪を移植されたレシピエントマウスでは全身のインスリン抵抗性が惹起されるのに対して、老化した脂肪を摘出された G4 ドナーマウスでは全身のインスリン抵抗性が改善することがわかった。次に、p53 ヘテロ欠損 G4 マウスの脂肪を野生型マウスに移植したところ、G4 マウスの脂肪を移植された野生型マウスと比較して、相対的な改善を認めた。以上より、テロメアの短縮モデルにおいても、p53 依存性の老化シグナルにより、脂肪組織において炎症が惹起され、全身のインスリン抵抗性が生じるものと考えられた。

2-3 脂肪組織の老化シグナル活性化の機序

次に私は、脂肪組織において、p53 が蓄積する機序について検証した。以前報告されているように、糖尿病モデルマウスの脂肪組織では活性酸素の産生が亢進していることが観察された。酸化ストレスは DNA 損傷を惹起することによって、細胞老化を誘導することが知られている。そこで、DNA 傷害の指標である γ -H2AX について検討したところ、G4 マウスと同様に、糖尿病モデルマウスの脂肪組織においても γ -H2AX が増加していた。さらに酸化ストレスと

p53、炎症の関連性を調べるために、脂肪前駆細胞を用いて検討した。脂肪前駆細胞を過酸化水素で処理すると、p53 の蓄積と活性化とともに、NF- κ B 活性の増加がみとめられた。酸化ストレスによる NF- κ B の活性化は、p53 の siRNA によって抑制されたことから、p53 依存性であることがわかった。過酸化水素処理により悪玉アディポカインの産生の増加も生じるが、その増加は、p53 や NF- κ B 活性の抑制によって改善した。以上より糖尿病では、脂肪組織で産生される活性酸素により DNA 傷害が生じ、p53 依存的な老化シグナルの活性化により、NF- κ B を介して悪玉アディポカインが産生され、全身のインスリン感受性が低下するものと考えられた。

2-4 糖尿病患者の脂肪組織の老化形質

ヒトにおいて、同様の機序が存在するかどうかを調べるために、私は糖尿病患者の脂肪組織の老化形質を検討した。千葉大学医学部附属病院において胃癌、大腸癌患者の手術に際して摘出される内臓脂肪を解析したところ、糖尿病を合併した脂肪組織では老化染色陽性細胞を複数認め、p53 が蓄積し、悪玉アディポカインの産生の増加を認めた。以上より、ヒトの脂肪組織においても p53 依存性の老化シグナルが活性化され、糖尿病の発症・進展に密接に関わっている可能性が示唆された。

3. 今後の展開

本研究により、加齢や過食による脂肪組織の p53 依存性老化シグナル活性化によって、悪玉アディポカインが産生され、全身のインスリン抵抗性が惹起されることが明らかとなった(図 5)。これらの結果は、加齢に伴って増加する生活習慣病の発症機転を探る糸口となると思われる。また、脂肪組織の老化シグナルを標的とした治療方法を開発することで脂肪の老化を制御し、糖尿病の新たな治療法につながる可能性があると考えられる。

p53 はがん抑制遺伝子として有名であるが、そのシグナルの過剰な活性化は、細胞老化を促進することによって、加齢に伴う様々な疾患に関与する。一方、その活性を過剰に抑制するとがんの発症を招くことになる。多くの病態では、p53 依存性の老化シグナルによって炎症を惹起することが病態生理に直接関与していることから、そのような慢性炎症を惹起するメカニズムの解明によってがん化のリスクない抗老化治療の開発が可能と考えられる。

下等動物の老化研究において、脂肪における長寿シグナルの活性化が全身の老化シグナルに影響を与えることによって、寿命の延長をもたらすことが知られている。従って、私の研究結果は、脂肪における p53 の活性化が非細胞自律性に他の組織の老化シグナルに影響を与えることによって、個体の寿命にも影響を与える可能性があることを示唆している。したがって、脂肪の老化シグナル制御によって、糖尿病だけでなく、個体の老化を制御できるかもしれない。

4. 自己評価

本研究の結果は、加齢に伴う様々な疾患の病態の解明や治療の開発に貢献できると考えられることから、当初の目標は達成できたものと評価する。その解明のためにメタボローム解析も行ったが、現時点までにその結果を基盤とした研究展開となっていない。今後、メタボロ

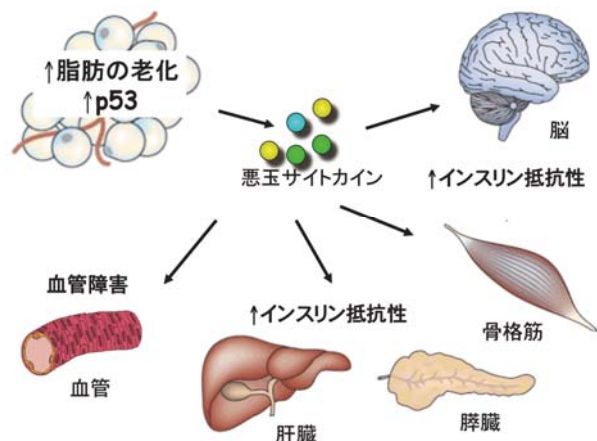


図5 脂肪老化とインスリン抵抗性

ーム解析結果も利用して、新たな展開を図っていきたい。

5. 研究総括の見解

加齢や過食による脂肪組織におけるp53の活性化が、悪玉サイトカインの産生を更新させ、全身のインスリン抵抗性を惹起させるとする新しい知見を得、結果をNat. Med.に発表するなど、科学的に大きなインパクトのある成果を挙げたものと高く評価できる。p53抑制は発がんとの関係から、正確な調整が必要であり、今後の課題として残されているが、新たな治療法の開発に繋がる方向性を示した点でも評価できる。今後、p53の活性化によって惹起される炎症のメカニズムについて、メタボロームの視点からも研究が更に展開されることを期待する。

6. 主要な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1.	<u>Minamino T</u> and Komuro I. Vascular aging: insights from studies on cellular senescence, stem cell aging, and progeroid syndromes. <i>Nat Clin Pract Cardiovasc Med</i> 5, 637–648 (2008).
2.	Kayama Y, <u>Minamino T*</u> , Toko H, Sakamoto M, Shimizu I, Takahashi H, Okada S, Tateno K, Moriya J, Yokoyama M, Nojima A, Yoshimura M, Egashira K, Aburatani H and Komuro I. Cardiac 12/15-lipoxygenase-induced inflammation is involved in heart failure. <i>J Exp Med</i> 206, 1565–1574 (2008). (*Co-first author)
3.	<u>Minamino T</u> , Orimo M, Shimizu I, Kunieda T, Yokoyama M, Ito T, Nojima A, Nabetani A, Oike Y, Matsubara H, Ishikawa F, Komuro I. A crucial role for adipose tissue p53 in the regulation of insulin resistance. <i>Nat Med</i> 15, 1082–1087 (2009).
4.	Moriya J, <u>Minamino T*</u> , Tateno K, Okada S, Uemura A, Shimizu I, Yokoyama M, Nojima A, Okada M, Koga H, Komuro I. Inhibition of semaphorin as a novel strategy for therapeutic angiogenesis. <i>Circ Res</i> 106, 391–398 (2010). (*Co-first author)
5.	Shimizu I, <u>Minamino T*</u> , Toko H, Okada S, Ikeda H, Yasuda N, Tateno K, Moriya J, Yokoyama M, Nojima A, Koh GY, Akazawa H, Shiojima I, Kahn CR, Abel ED and Komuro I. Excessive cardiac insulin signaling exacerbates systolic dysfunction induced by pressure overload. <i>J Clin Invest</i> 120, 1506–1514 (2010). (*Co-first author)

(2)特許出願

研究期間累積件数: 1件

発 明 者: 森谷純治、南野徹、小室一成、古閑比佐志、岡田光浩

発明の名称: 虚血性心血管系疾患の治療剤(PlexinD1-Fc)

出 願 人: 千葉大学

出 願 日: 2008/11/7

(3)その他(主要な招待講演(学会発表)、受賞、著作物等)

招待講演

1. Minamino T. Role of Cellular Aging in Cardiovascular Disease. Annual Spring Scientific Conference of the Korean Society of Lipidology and Atherosclerosis Busan, Korea 2008/4/18

2. Minamino T. Life style-related disease and cellular aging signal network. 2009 AVDRC International Symposium Daegu, Korea 2009/9/17

3. Minamino T. Aging signals involved in glucose homeostasis. JST Danish-Japanese Workshop “Molecular Diabetology” Copenhagen, Denmark 2010/03/23–24

4. Minamino T. (2010) Vascular aging and vascular injury: synonymous or analogous? 20th World Congress of the International Society of Heart Research 2010/5/13–16.

Kyoto

5. Minamino T. Cellular aging and lifestyle-related disease. 7th Japanese-German Frontiers of Science Potsdam, Germany 2010/11/11-14

受賞

1. 日本循環器学会 第 35 回日本心臓財団佐藤賞 「Molecular mechanism of cardiovascular aging and regeneration」 (2010 年 3 月 6 日)

研 究 報 告 書

「骨代謝」における破骨細胞の細胞融合と代謝制御」

研究期間：平成19年10月～平成23年3月

研究者：宮本 健史

1. 研究のねらい

骨粗鬆症に代表される骨代謝の恒常性破綻に起因する骨疾患患者数は、今や国内だけでも1000万人を突破しているとされ、骨粗鬆症を基礎疾患とする大腿骨頸部骨折の患者数も年間に14万人を超える事態となってきた。骨は、骨を吸収する破骨細胞と、骨を形成する骨芽細胞の微妙なバランスの上に骨量が規定されており、破骨細胞活性が相対的に強い場合には骨量が低下し、逆の場合は骨量が増加する。しかし、骨の代謝はこの吸収と形成の中に恒常性が制御されており、一方的な骨吸収抑制や骨形成促進は骨の恒常性破綻を招き、さらなる病的状態を誘発する。つまり、この骨吸収と形成による骨のリモデリングを止めることなく骨量増加が達成できれば、骨の恒常性に破綻を来すことなく、生理的に骨量を増やすことが期待される。

本研究では、解析の切り口として破骨細胞の細胞融合による多核化を取り上げた。破骨細胞は単核の細胞同士の細胞融合により多核化する極めてユニークな細胞であり、私は、この破骨細胞の細胞融合には DC-STAMP (dendritic cell specific transmembrane protein) が必須の分子であることを、遺伝子欠損マウスを用いて世界で初めて報告した。今回、この遺伝子欠損マウスならびに DC-STAMP の発現制御機構を切り口に、破骨細胞の細胞融合を標的とした骨代謝制御機構の解明ならびに新たな破骨細胞分化制御機構の解明に挑戦した。

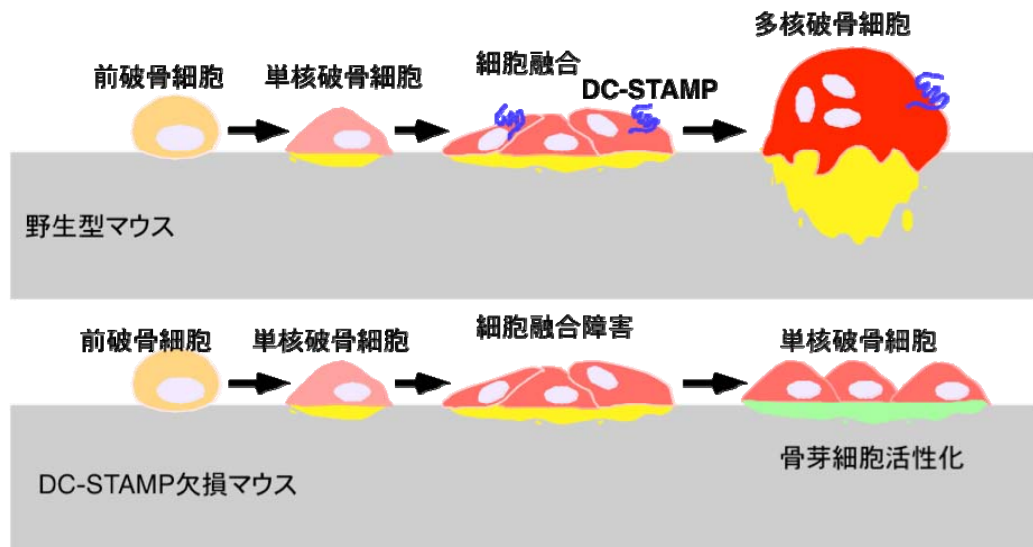
2. 研究成果

破骨細胞の細胞融合による骨芽細胞制御

破骨細胞が細胞融合するのはなぜか、多核化にはどのような意義があるのか、ということについては、これまで破骨細胞の細胞融合のみが特異的に障害されるモデル動物が存在しなかったため不明であった。破骨細胞の細胞融合は分化の最終段階で起こるため、途中の分化段階に障害があっても、結果として細胞融合が起こらない。DC-STAMP 欠損マウス由来の破骨細胞は分化マーカーの発現は正常であることから、細胞融合のみが障害されている特異的なマウスであることが明らかとなった。そこで、多核の破骨細胞が存在しない DC-STAMP 欠損マウス、逆に DC-STAMP を過剰に発現することで巨大な破骨細胞を形成する DC-STAMP 過剰発現マウスを用いた解析により、破骨細胞の細胞融合が破骨細胞の骨吸収効率を上昇させること、さらに興味深いことに DC-STAMP を欠損した単核の破骨細胞は、野生型マウスや DC-STAMP 過剰発現マウス由来の多核化した破骨細胞より効率的に骨芽細胞による骨形成を誘導することを見出した。つまり、DC-STAMP を標的とすることで、破骨細胞の骨吸収効率低下と骨芽細胞による骨形成促進の二重の作用により、結果として骨量を増加させ得ることが示された。実際、DC-STAMP 欠損マウスでは骨量増加を、逆に DC-STAMP 過剰発現マウスは骨量低下を示した。このことは、DC-STAMP が破骨細胞の細胞融合を介して、DC-STAMP を発現していない骨芽細胞の活性をも制御すること、また DC-STAMP を標的とすることで、骨のリモデリングを止めることなく、骨量増加を果たすことが可能になることが示された。

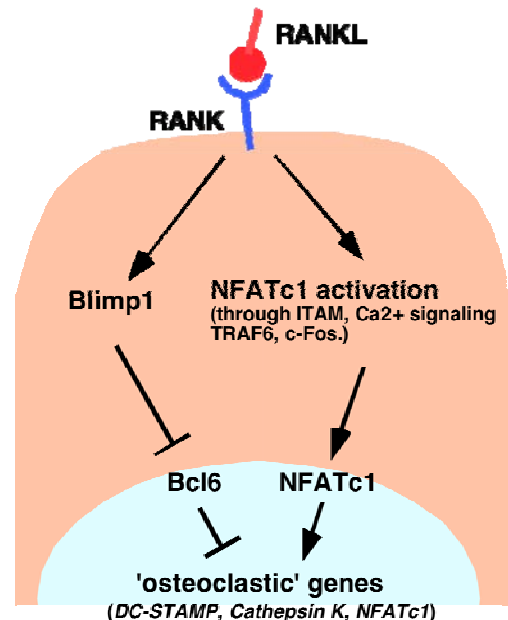
破骨細胞と骨芽細胞の相互作用は、coupling と呼ばれ、両細胞の活性が平行して動くことが知られている。すなわち、破骨細胞の活性が高い場合は骨芽細胞の活性も高くなり、逆に破骨細胞活性が下がった場合には骨芽細胞活性も低下する。しかし、両細胞の活性が高い場合は、破骨細胞による骨吸収側の表現型が強くなるため、結果として骨量が低下する。また、破骨細胞活性を強く抑制する薬剤は、骨形成をも抑制し、骨のリモデリングが停止することで、結果的には折れやすい骨になってしまう。今回の知見は、DC-STAMP を標的とすることで、骨の代謝状態を破骨細胞の活性は低く、骨芽細胞の活性は高くする、un-coupling の状態に導くことで骨量

を増加させる画期的な発見と言える。



Blimp1-Bcl6 axis による破骨細胞分化制御

破骨細胞分化は、分化のマスター転写因子と言われる NFATc1 (nuclear factor of activated T cells 1) の発現により、NFATc1 の発現や活性化に至る様々な経路の研究が中心に行われてきた。しかし、この NFATc1 を抑制する阻害剤は、実は以前より臓器移植などの際の免疫抑制剤として生体に使われてきたが、薬剤の投与により骨量が低下することが知られていた。これは、NFAT の阻害により破骨細胞の形成は強力に抑制されるものの、その作用を上回る骨芽細胞活性の抑制により、結果として骨量低下を来することが近年明らかにされた。つまり、NFATc1 に変わる、新たな制御機構の解明が待たれる状況であった。そこで、私は細胞融合因子である DC-STAMP の発現を制御する分子のスクリーニングを行い、転写抑制因子である Bcl6 (B cell lymphoma 6) を見出した。Bcl6 は DC-STAMP の転写制御領域上に直接結合し、DC-STAMP の発現を負に制御していた。さらに、Bcl6 は DC-STAMP ばかりではなく、NFATc1 や破骨細胞に特異的に発現する蛋白分解酵素である Cathepsin K の転写制御領域上に直接結合することで、これらの破骨細胞に特徴的な、すなわち破骨細胞の細胞融合、分化、蛋白分解、それぞれを制御する分子群: osteoclastic gene を直接負に制御する分子であることが明らかとなった。つまり、破骨細胞の分化や多核化、機能の発現に際しては、Bcl6 の発現が抑制されることが必要になる。実際、Bcl6 の発現は破骨細胞分化誘導因子 RANKL の添加により強く抑制されており、Bcl6 欠損マウスではこれらの分子の発現抑制がきかず、有意な破骨細胞分化亢進と骨量の低下を示した。そこで、さらに RANKL 刺激により Bcl6 の発現を抑制する分子の検索を行い、やはり転写抑制因子である Blimp1 (B lymphocyte-induced maturation protein-1) を同定した。Blimp1 は Bcl6 とは逆に、RANKL 刺激により発現が上昇した。Blimp1 欠損マウスは胎生致死であったため、破骨細胞特異的 Blimp1 欠損マウスを作製したところ、破骨細胞分化障害



と osteoclastic gene の発現の強力な抑制、さらに破骨細胞分化抑制による骨量増加を示した。さらに、Blimp1 欠損破骨細胞では、本来であれば RANKL 刺激により発現が低下するはずの Bcl6 の発現がむしろ上昇していたことから、Blimp1 が破骨細胞分化の過程で Bcl6 の発現を抑制するのに必須の分子であることが明らかとなった。Blimp1 は Bcl6 の転写制御領域に結合することも見出し、RANKL の下流で、RANKL-Blimp1-Bcl6-osteoclastic gene という axis が破骨細胞の分化、細胞融合および蛋白分解能を制御する必須のものであることを初めて報告した。この経路が骨代謝を制御する新たな標的であることが期待される。

3. 今後の展開

破骨細胞が示す最大の特徴の1つに、単核の細胞同士の細胞融合による多核化が挙げられる。この破骨細胞の細胞融合による多核化は、破骨細胞の定義ともされ、破骨細胞の骨吸収能の発揮に必須と考えられてきた。しかし、DC-STAMP 欠損マウスの解析により、‘単核’の破骨細胞が存在すること、破骨細胞の多核化は骨吸収効率を上昇させること、破骨細胞を単核化させることで骨芽細胞による骨形成を活性化し得ることが明らかとなった。今日、骨粗鬆症薬として承認されている薬の多くは、破骨細胞の活性を抑制するものであり、行き過ぎた破骨細胞の抑制は骨の大理石骨病化や大腿骨の非定型骨折、顎骨壊死など、様々な問題を呈することも報告されている。本研究に示すような、破骨細胞の活性を完全には抑制せず、しかも骨芽細胞を活性化し、骨代謝状態を un-coupling の状態にすることで、生理的な骨量増加を果たすことが可能になれば、骨粗鬆症のコントロールがさらに発展することが期待される。

DC-STAMP の発現を指標とした分子スクリーニングは、破骨細胞分化や骨恒常性を制御する分子基盤の解明において、大きな力を発揮することが明らかとなった。今後は、DC-STAMP がどのように細胞融合を制御するのか、また、破骨細胞の細胞融合がどのようにして骨芽細胞の活性を制御しているのか、といった点が課題になる。DC-STAMP を指標に同定されてきた分子群の機能やその制御機構の解析において新たに獲得してきた結果が、これらの課題解決のヒントになる。破骨細胞の細胞融合を指標とした骨代謝状態の un-coupling に基づく、生理的な骨量増加とその制御物質の創出に引き続き挑戦したい。

4. 自己評価

細胞融合因子 DC-STAMP を介した破骨細胞の細胞融合は、多核化にともなうダイナミックな細胞形質の変化をもたらすばかりではなく、破骨細胞の骨吸収効率を上昇させること、また、DC-STAMP を発現しない骨芽細胞の活性をも制御すること、DC-STAMP を標的とすることで骨の代謝状態を破骨細胞・骨芽細胞ともに骨量増加の方向へ制御できることを見出した成果は、当初目標とした破骨細胞の細胞融合から骨代謝制御機構を解明する目標にも合致した成果であると考えている。さらに、この DC-STAMP の発現制御機構の解析から DC-STAMP を含む破骨細胞に特徴的な遺伝子群の発現を制御する新たな分子機構として RANKL-Blimp1-Bcl6-osteoclastic genes の axis が存在すること、この機構が生理的な骨量を制御することを見出し、破骨細胞の細胞融合を基軸として、骨代謝の制御機構の解明を果たした点で、やはり本研究目標に合致した成果であると思われる。

5. 研究総括の見解

破骨細胞の分化、特に多核細胞形成に重要な因子である DC-STAMP を標的とすることで、破骨細胞の活性は低く、骨芽細胞の活性は高くすることで骨量を増加させることができることを明らかにした。更に、DC-STAMP の発現制御因子として Bcl6 と Blimp1 を発見し、RANKL-Blimp1-Bcl6-osteoclastic gene という、破骨細胞分化の新しい経路を明らかにした。これらの成果は、骨代謝の制御メカニズムの新たな分野を開くものであり、加えて、骨代謝を制御する新しい標的を示すものでもあり、高く評価できる。今後は、骨代謝を制御する化合物の探索や破骨細胞の分化過程等におけるメタボローム解析も取り入れて、研究を更に発展させるよう期待する。

6. 主要な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表(* corresponding author)

1.	Iwasaki R, Ninomiya K, Miyamoto K, Suzuki T, Sato Y, Kawana H, Nakagawa T, Suda T, <u>Miyamoto T*</u> . Cell fusion in osteoclasts plays a critical role in controlling bone mass and osteoblastic activity. <i>Biochem Biophys Res Commun.</i> 377, 899–904, 2008
2.	Miyamoto K, <u>Miyamoto T*</u> , Kato R, Yoshimura A, Motoyama N, Suda T. FoxO3a regulates hematopoietic homeostasis through a negative feedback pathway in conditions of stress or aging. <i>Blood.</i> 112(12), 4485–4493. 2008
3.	Sakai S, Takaishi H, Matsuzaki K, Kaneko H, Furukawa M, Miyauchi Y, Shiraishi A, Saito K, Tanaka A, Taniguchi T, Suda T, <u>Miyamoto T*</u> , Toyama Y. 1-Alpha, 25-dihydroxy vitamin D3 inhibits osteoclastogenesis through IFN-beta-dependent NFATc1 suppression. <i>J Bone Miner Metab.</i> 27(6):643–652. 2009
4.	Miyamoto K, Ninomiya K, Sonoda K, Miyauchi Y, Hoshi H, Iwasaki R, Miyamoto H, Yoshida S, Sato Y, Morioka H, Chiba K, Egarashi K, Suda T, Toyama Y, <u>Miyamoto T*</u> . MCP-1 expressed by osteoclasts stimulates osteoclastogenesis in an autocrine/paracrine manner. <i>Biochem Biophys Res Commun.</i> 383(3):373–377. 2009
5.	Miyauchi Y, Ninomiya K, Miyamoto H, Sakamoto A, Iwasaki R, Hoshi H, Miyamoto K, Hao W, Yoshida S, Morioka H, Chiba K, Kato S, Tokuhisa T, Saitou M, Toyama Y, Suda T, <u>Miyamoto T*</u> . The Blimp1-Bcl6 axis is critical to regulate osteoclast differentiation and bone homeostasis. <i>J Exp Med.</i> 207(4), 751–762, 2010

(2) 特許出願

なし

(3) その他

招待講演

- 6th Meeting of Bone Biology Forum 平成 21 年 8 月 21–22 日 富士教育研修所 Transcriptional Regulation of Osteoclastogenesis. Takeshi Miyamoto
- 第 8 回”Japan Conference on Bone & Joint Diseases”研究会 平成 22 年 1 月 23 日 海運クラブ 破骨細胞分化を制御する新規因子 宮本健史
- 第 54 回 日本リウマチ学会 平成 22 年 4 月 22–25 日 神戸ポートピアホテル・神戸 特別企画3「破骨細胞研究の最前線 あらたな治療戦略をめざして」細胞融合を標的とした破骨細胞制御機構の解明:DC-STAMP による破骨細胞制御 宮本健史
- 第 28 回日本骨代謝学会学術集会 平成 22 年 7 月 21–23 京王プラザ カレントコンセプト4「RANKL をめぐる最近の話題」 RANKL による新たな破骨細胞分化機構 宮本健史
- 第 28 回日本骨代謝学会学術集会 平成 22 年 7 月 21–23 京王プラザ シンポジウム2「オステオネットワーク」細胞融合の新たな展開 宮本健史

受賞

- 日本整形外科学会 学会奨励賞 「DC-STAMP is essential for cell-cell fusion in osteoclasts and foreign body giant cells」(2008 年 5 月 28 日)
- 日本軟骨代謝学会 学会賞 「活性酸素は内軟骨性骨化において軟骨の肥大化を誘導する」(2009 年 3 月 7 日)
- 日本骨代謝学会 研究奨励賞 「破骨細胞分化研究」(2009 年 7 月 24 日)
- 慶應義塾大学医学部三四会 北里賞 「破骨細胞分化と骨代謝制御機構の解明」(2010 年 6 月 12 日)

研 究 報 告 書

「新規蛋白質 NML による ATP 代謝制御ネットワークの解明」

研究期間：平成19年10月～平成23年3月

研 究 者：村山 明子

1. 研究のねらい

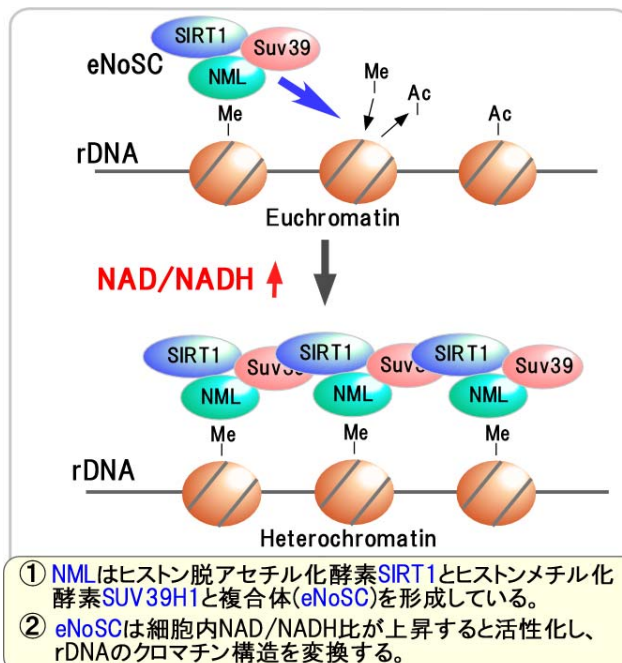
正常な細胞機能を維持するためには、解糖系やTCAサイクルなどの「ATP 産生系」と蛋白質の機能による「ATP 消費系」のバランスが保たれていなくてはならない。両者のバランスが崩れ、ATP を中心としたエネルギー産生系が消費系に対して優位になれば、その生物個体は生活習慣病などの種々の疾患を発症する。一方、消費系が産生系に対して有意に働けば細胞のエネルギーは枯渇し、死を招く。このように、ATP の生産と消費のバランスを維持することは、細胞にとって極めて重要であるが、その分子メカニズムについては不明である。ATP 代謝を制御する分子メカニズムが明らかになれば、そのネットワークを人為的に制御することによって、癌・生活習慣病・老化などの新たな治療戦略の開拓が期待できる。

私は、エネルギー制御システム的一端を明らかにするため、核内小器官である核小体に注目した。核小体には、多数のリボソーム DNA (rDNA)が存在し、そこからリボソーム RNA (rRNA)が転写される。転写されたrRNAは、リボソームタンパク質と核小体内で複合体を形成し、細胞質に輸送され、タンパク質合成工場として機能する。細胞内のエネルギーの大部分は核小体でのリボソーム合成およびリボソームでのタンパク質合成によって消費されることから、エネルギー消費をコントロールするためには、核小体でのリボソーム合成を制御することが最も理にかなっている。本研究者はこのような着想に基づき研究を進め、エネルギー生産系とリボソーム合成系が連動していることを見出し、さらに、両者の連動に必要な新規タンパク質複合体 NML/SIRT1 複合体を同定して eNoSC (energy-dependent Nucleolar Silencing Complex) と名付けた。本研究では eNoSC を中心とする ATP 代謝制御ネットワークの解明とその個体における役割、さらに、ネットワークの破綻と疾患との関係を明らかにすることを目標とした。

2. 研究成果

2-1 NML/SIRT1 複合体の rRNA 転写制御機構の解明

NML/SIRT1 複合体 eNoSC は、NAD 依存的ヒストン脱アセチル化酵素 SIRT1、ヒストンメチル化酵素 SUV39 を含み、新規蛋白質 Nucleomethylin (NML) を介して核小体の rDNA 領域のメチル化ヒストンに結合する。糖などの栄養分が少なくなり細胞内の ATP 濃度が低下すると、NAD⁺濃度が上昇し、その結果、SIRT1 が活性化される。SIRT1 の活性化は周辺のヒストンを脱アセチル化し、さらに、SUV39 によるヒストンメチル化が誘導される。メチル化されたヒストンには、それを足場として新たな eNoSC が結合する。このようなステップが繰り返されることによって、active 状態だった rDNA ユニットがエピジェネティックに不活性化され、rRNA の転写量が減少する【右図】。その結果、リボソーム合成量が下がり、タンパク質

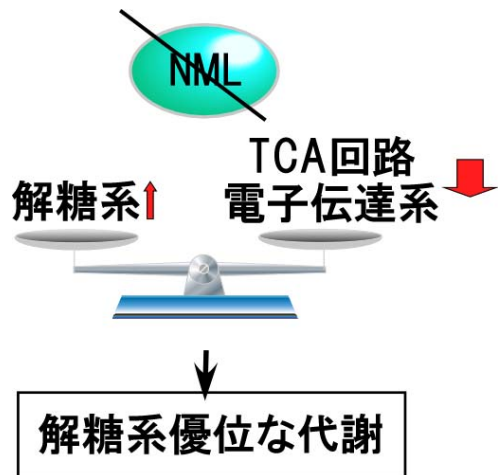


合成が抑制されるためエネルギー消費が低下する。

このように、eNoSC は、細胞内のエネルギー状態を感知し、rDNA のエピジェネティックな制御を介して蛋白質合成を抑え、エネルギー消費を調節する複合体であることを明らかにした。

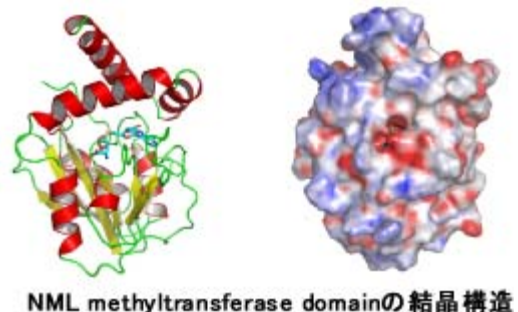
2-2 NML/SIRT1 複合体の rRNA 転写制御機構の解明

NML の 80% は核小体に局在するものの、20% 程度が核質にも存在することから、rDNA 以外の遺伝子上のジメチル化ヒストンにも結合し、その転写を制御している可能性が考えられた。そこで、NML がゲノム上のどの部分に結合しているかをクロマチン免疫沈降(ChIP)-シーケンスを用いて解析した。さらに、NML が結合するゲノムのクロマチン化学修飾状態についても同様の方法で検討した。その結果、NML が rDNA 以外の領域でもヒストン H3K9me2 に結合することを示唆するデータを得た。さらに、DNA マイクロアレイ解析から、NML が結合する遺伝子の転写量が NML ノックダウンによって変化することも確認した。これらの結果から、NML が核小体外の核においても、遺伝子制御に直接的に働くことが示唆された。そこで、ATP 合成系への影響について検討したところ、NML ノックアウト細胞では解糖系の軽度亢進と、ミトコンドリア機能の低下による TCA 回路および電子伝達系の抑制が認められた。つまり、NML ノックアウト細胞では解糖系優位な代謝に変化していることが明らかとなった。詳細な分子メカニズムについては解析中であるが、NML を介した核小体—ミトコンドリアクロストークが示唆された。



2-3 eNoSC を中心としたエピジェネティクスによる細胞内エネルギー制御システムの解明

eNoSC の鍵構成タンパク質 NML の X 線結晶構造を解析した結果、NML は C 末端領域に S-adenosylmethionine (SAM) 依存的 methyltransferase domain を持つことが明らかとなった。この領域中にアミノ酸置換を導入し、SAM を結合できない変異体を作製したところ、同変異体は rRNA 転写を抑制することが出来なかった。したがって、NML は何らかの標的分子をメチル化し、SIRT1 と協調して rDNA のクロマチン状態を変換しているものと考えられる。NML の標的分子の探索と解析から、エネルギー代謝制御の新たな側面が明らかになるものと考えられる。また、SIRT1 が NAD を、NML が SAM を受容することから、NML/SIRT1 複合体は両代謝系を結びつけ、細胞内の機能を制御している可能性も考えられる。構造解析から予想されるメチル化標的分子は低分子であることが示唆されており、これを参考に低分子 RNA を標的分子として視野に入れ解析を進めてきたが、本研究期間内に NML のメチル化標的分子を同定することができなかった。方法を変えて、今後も探索を続けていく。また、NML の SAM 結合ポケットに結合する化合物は NML の活性を制御することが可能であると考えられ、このポケットに結合する新たな化合物の探索も進めたい。一方、NML は、N 末端側でヒストン H3K9me2 と特異的に結合することが明らかとなった。N 末端側は結晶構造をとらないことから、天然変性タンパク質であることが予想された。



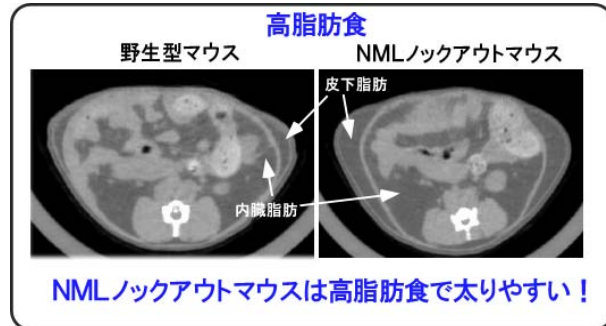
NML methyltransferase domain の結晶構造

2-4 eNoSC を中心とした細胞内エネルギー制御システムの破綻と疾患との関係の解明

A) eNoSC を中心としたエネルギー制御システムと代謝リック症候群との関係

NML 遺伝子欠損マウスはその多く(80-90%)が胎生致死であることが明らかになった。胎生致死の原因については検討中であるが、ある特定の時期に致死が認められるわけではない。したがって、NML は特異的な発生段階に作用しているわけではなく、発生段階での胎児の栄養状態などの環境応答に関与しているのではないかと考え、さらに検討を続けている。

出生後の NML の機能を解析するため、出生した一部の NML 遺伝子欠損マウスを解析したところ、野生型マウスに比べ、通常食で体重が軽い、高脂肪食ではより太りやすく、高コレステロール血症および高血糖を呈し、糖尿病や高脂血症などのメタボリック症候群になりやすいことが示唆された。さらに、出生した NML 遺伝子欠損マウスの 10-20%に、水頭症や骨格系の異常を認めることも明らかとなった。これらの結果は、NML が個体においてのエネルギーフローに影響することを示唆するものであると考えられた。



B) eNoSC を中心としたエネルギー制御システムと癌との関係

癌では TCA 回路の働きが鈍く、ATP 産生の多くの部分を解糖系に依存している(Werburg effect)。また、細胞内の SAM 濃度が低く、rRNA 合成が盛んである。これらの知見から、NML が rRNA 合成の制御を介して、癌細胞のエネルギー代謝をコントロールすることによって、細胞増殖を制御することが予想された。解析の結果、癌細胞に NML を過剰発現させると、軟寒天培地上のコロニー形成が強く抑制されることを見出した。また、NML をノックダウンした株では、コロニー形成の著しい増加を認めた。軟寒天培地は癌特異的な足場非依存的な増殖を観察するための培地である。通常の培養環境では、細胞増殖に差はなかったことから、NML が癌特異的な細胞増殖に関与していることが示唆された。NML ノックアウトから得たマウス胎児線維芽細胞を用いた解析においても、不死化処理を行うことによって、癌細胞様の代謝に変化することが明らかとなった。特に興味深いのは、解糖系酵素であるピルビン酸キナーゼの M2 型が発現されるようになることである。M2 型のピルビン酸キナーゼは癌細胞で発現が認められるようになることが報告されている。これらの結果から、癌細胞特異的なエネルギー代謝への移行に NML が関わることを示唆された。

3. 今後の展開

本研究では、核小体タンパクである NML を鍵因子とする複合体 eNoSC を中心とした細胞内エネルギーの動的平衡制御システムについて明らかにすることを目指した。NML 遺伝子欠損マウスは、高脂肪食の摂取によって野生型マウスよりも脂肪を蓄積しやすく、高コレステロール血症および高血糖を呈し、糖尿病や高脂血症などのメタボリック症候群になりやすいことが示唆された。同時に、癌細胞に NML を発現させるとコロニー形成を強く抑制することも見出した。これらの結果は、eNoSC を中心とした細胞内エネルギーの動的平衡制御システムが、細胞とともにからだのエネルギーフローをも調節していること、さらに、細胞内エネルギー制御システムの破綻がさまざまな疾患の原因となり得ることを示している。一方で、X 線結晶解析の結果から、NML は S-アデノシルメチオニン (SAM) 結合ポケットを持ち、SAM の結合が活性に必須であることが明らかとなった。このことは、SAM 結合ポケットに結合し、NML の活性を制御する低分子化合物の探索が可能であることを意味している。eNoSC を制御する化合物は、細胞内エネルギー制御システム異常に起因する疾患の治療に応用できるものと期待できる。以上の結果を踏まえ、今後も eNoSC を中心としたエネルギー制御システムの解明をさらに進め、メタボリック症候群、癌などを含む疾患の理解や革新的治療戦略の確立につなげることを目指したい。

4. 自己評価

核小体因子 NML の機能解析を通して、ATP 消費系の新たな制御機構を明らかにすることができた。さらに、細胞内エネルギー代謝ネットワークに、核小体—ミトコンドリアの存在を示唆することができた。この 2 点については、エネルギー代謝分野に大きく貢献できた点だと考えられる。しかしながら、ノックアウトマウス作製に時間がかかってしまったことにより、個体のエネルギー代謝制御への関与の詳細まで進めることができなかった。また、構造解析の結果から予想された NML 制御分子の同定を行う予定であったが、ここまで進めることができなかった。この 2 点については、今後も解析を続け、成果に結び付けたいと考えている。

5. 研究総括の見解

核小体での rRNA 転写を制御する NML の機能に関し、NML/SIRT1 複合体 (eNoSC:energy-dependent Nucleolar Silencing Complex)を同定し、この複合体が細胞内のエネルギー状態を感知し、エピジェネティック機構によるタンパク質合成の抑制を行い、エネルギー消費を制御することを明らかにした。また、NML のノックアウトマウスがメタボリック症候群になりやすいこと、がん細胞に NML を過剰発現させると軟寒天でのコロニー形成が強く抑制されることを明らかにした。これらの研究は、NML による ATP 消費系の新たな制御機構、並びに細胞内代謝ネットワークに核小体—ミトコンドリアが存在することを示すものであり、独創性が高い成果である。今後は、NML の構造解析から予想される NML 制御分子の同定やメタボローム解析などにより、メタボリック症候群やがんなどの治療薬開発も目指して欲しい。

6. 主要な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. Mikogai A, Yanagisawa J, Yasuzawa-Tanaka K, Murayama A . The nucleolar protein NML regulates hepatic ATP levels during liver regeneration after partial hepatectomy. <i>Biochem Biophys Res Commun</i> 390(3), 591-596 (2009).
2. Murayama A , Ohmori K, Fujimura A, Minami H, Yasuzawa-Tanaka K, Kuroda T, Oie S, Daitoku H, Okuwaki M, Nagata K, Fukamizu A, Kimura K, Shimizu T, Yanagisawa J. Epigenetic control of rDNA loci in response to intracellular energy status. <i>Cell</i> 133, 627-639 (2008).
3. Kajiro M, Hirota R, Nakajima Y, Kawanowa K, So-Ma K, Ito I, Yamaguchi Y, Ohie SH, Kobayashi Y, Seino Y, Kawano M, Kawabe YI, Takei H, Hayashi SI, Kurosumi M, Murayama A , Kimura K, Yanagisawa J. The ubiquitin ligase CHIP acts as an upstream regulator of oncogenic pathways. <i>Nat Cell Biol</i> 11, 312-319(2009).

(2)特許出願

なし

(3)その他

招待講演

1. 村山明子、「新規核小体たんぱく複合体 eNoSC による細胞内エネルギー代謝調節機構」、第 2 回 FANTASY、東京、2009 年 2 月 7 日
2. 村山明子、「核小体因子 Nucleomethylin による核内反応制御機構の解析」、第 82 回日本生化学会大会 シンポジウム、神戸、2009 年 10 月 23 日
3. 村山明子、「エピジェネティック機構を介した細胞内エネルギー代謝制御」、日本レチノイド研究会第 20 回学術集会・ランチョンセミナー、東京、2009 年 11 月 21 日
4. 村山明子、「核小体因子 Nucleomethylin によるリボソーム合成調節機構と細胞内エ

エネルギー代謝」、2010 年度 日本農芸化学会シンポジウム、東京、2010 年 3 月 30 日
受賞

1. 平成 21 年度文部科学大臣表彰 若手科学者賞 「細胞内エネルギー代謝調節機構の研究」(2009 年 4 月 14 日)

総説

1. 村山明子:代謝ストレス応答とrRNA転写制御機構 生化学 Vol. 81, No. 6, 456-464 (2009)
2. 村山明子・大森一二・柳澤純:新規核小体複合体eNoSCによるエピジェネティックなrRNA転写制御機構実験医学 Vol. 26, No. 16, 2610-2614 (2009)
3. 大森一二・村山明子・柳澤純:エネルギー代謝とrRNA転写制御 蛋白質核酸酵素 Vol.54, No.3, 230-236 (2009)

研 究 報 告 書

「癌浸潤転移における細胞膜脂質代謝及びドメイン構造の機能解析」

研究期間：平成19年10月～平成23年3月

研究者：山口 英樹

1. 研究のねらい

がんは日本人の死亡原因の1位であり約3人に1人はがんで亡くなる。がん患者の命を奪う最も大きな要因は悪性癌の転移であるが、その有効な治療法は未だほとんど無い。癌細胞が転移するためには、癌組織を取り囲む基底層の破壊や間質への浸潤が不可欠である。しかし基底層や間質に存在する細胞外基質は物理的障害となるため、癌細胞はこれを分解しながら遊走する必要がある。従って、癌細胞による細胞外基質分解機構の解析は、癌浸潤・転移の分子レベルでの本態解明と、それに基づく新たな治療法の開発に極めて重要である。

浸潤性の癌細胞を生理的な細胞外基質上で培養すると、細胞外基質分解活性を持つ浸潤突起(Invadopodia)と呼ばれる構造が細胞底部に観察される(図1)。癌細胞の浸潤突起形成能と浸潤・転移能には強い相関がみられることから、浸潤突起は癌細胞が周辺組織を浸潤する際に機能し、癌転移において重要な役割を果たすと考えられている。しかし未だ浸潤突起形成の分子機構には不明な部分が多く、特にどのような形質膜上のシグナルが浸潤突起形成を制御しているのか全く明らかになっていない。そこで本研究では、浸潤突起形成のトリガーとして働くと考えられる形質膜構成脂質に着目し、局所的なシグナル伝達に関わる細胞膜ドメイン構造である脂質ラフトと、シグナル伝達脂質であるイノシトールリン脂質について機能解析を行った。このようなアプローチから、癌浸潤・転移治療法の開発につながる分子基盤を得ることを目的とした。

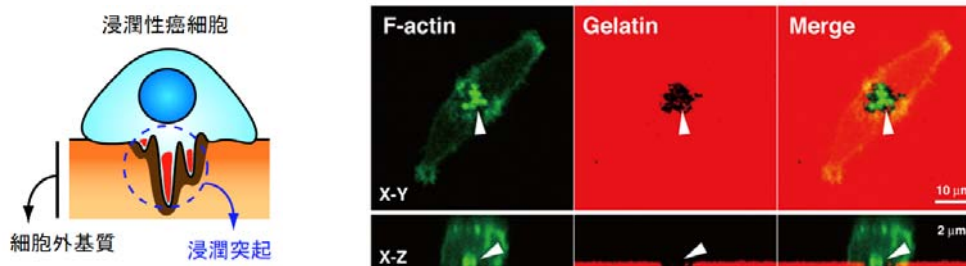


図1. ヒト転移性乳癌細胞 MDA-MB-231 による浸潤突起形成

左：浸潤突起の模式図。右：蛍光ゼラチンコートしたカバーガラス上で MDA-MB-231 細胞を培養するとアクチン繊維(F-actin)に富む浸潤突起が細胞底部に形成され、黒く抜けたゼラチンの分解部位が観察される(矢頭)。

2. 研究成果

2-1 脂質ラフトとCaveolin-1 の機能解析

脂質ラフトはコレステロールとスフィンゴ脂質に富む微小膜ドメインである。脂質ラフトは癌関連遺伝子産物を含む様々なシグナル伝達分子が集積する場を与え、局所的かつ効率的な細胞機能の制御に関与する。またいくつかの浸潤突起構成分子が脂質ラフトに集積することが知られている。そこで本研究では、浸潤突起を介した癌細胞の浸潤活性における脂質ラフトとその関連分子の機能解析を行った。

動物実験での転移モデルに広く使用され、進行性乳癌の遺伝子発現パターンを持つことが知られるヒト乳癌細胞株 MDA-MB-231 を主に用いて解析を行った。蛍光ラベルしたゼラチン上で MDA-MB-231 細胞を培養すると、アクチン繊維に富む浸潤突起が点状に観察され、その部分で黒く抜けたゼラチン分解部位が観察される(図1)。この実験系を用いて浸潤突起

形成と細胞外基質分解活性の解析を行った。

まず、脂質ラフトのマーカーであるコレラ毒 B サブユニット (CTxB) を用いて細胞染色を行った結果、浸潤突起において強いシグナルが観察された (図2)。また、生細胞イメージングにより脂質ラフトの動態を経時的に観察したところ、脂質ラフトは浸潤突起周辺で細胞内に取り込まれ、輸送されることが明らかになった。次に、浸潤突起形成における脂質ラフトの機能解析を行った。脂質ラフト形成を阻害するメチル- β -シクロデキストリンやナスタチンで細胞を処理したところ、浸潤突起形成と細胞外基質分解活性が顕著に低下した。RNAi により脂質ラフト構成タンパク質である Caveolin-1、Caveolin-2、Flotilin-1 の発現抑制を行った結果、Caveolin-1 の発現抑制により浸潤突起形成が抑制された。Caveolin-1 は脂質ラフトに存在するアダプタータンパク質であり様々な機能分子と結合することにより、膜輸送、細胞運動、シグナル伝達などに関与する。Caveolin-1 は浸潤突起に集積し、脂質ラフト膜と共局在する様子が観察された。浸潤能の異なるヒト乳癌細胞株において Caveolin-1 の発現を検討したところ、浸潤能の高い細胞においてのみその発現が確認された。またこれらの細胞は浸潤突起を形成し、その形成は Caveolin-1 の発現抑制により阻害された。さらに浸潤突起の細胞外基質分解活性を担うマトリックスメタロプロテアーゼである MT1-MMP が脂質ラフトに存在し、Caveolin-1 がその機能に必須であることを明らかにした。以上の結果から、浸潤突起は脂質ラフトに富む膜ドメインであり、脂質ラフトの形成が浸潤突起を介した癌細胞の浸潤活性に必要であることが示唆された (図3)。また高浸潤性の乳癌細胞は、Caveolin-1 の発現依存的に浸潤突起を形成することが明らかになった (*Cancer Res.* 2009)。

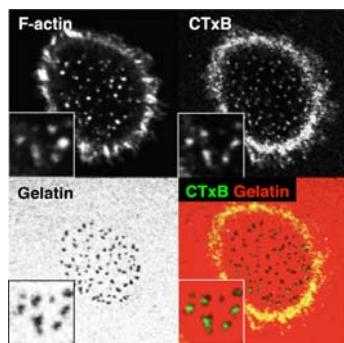


図2 浸潤突起における脂質ラフトの局在
脂質ラフトのマーカーであるコレラ毒 B サブユニット (CTxB) で細胞を染色すると、浸潤突起とゼラチン分解部位に強いシグナルが観察される。

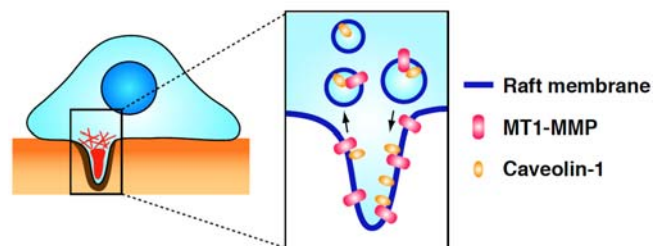


図3 浸潤突起形成における脂質ラフト及び Caveolin-1 の役割
脂質ラフトは浸潤突起形成に必要であり、浸潤突起にて細胞内に取り込まれ輸送される。脂質ラフト構成タンパク質である Caveolin-1 は、細胞外基質分解酵素 MT1-MMP の輸送や局在を制御し、浸潤突起を介した乳癌細胞の浸潤活性に関与すると考えられる。

2-2 イノシトールリン脂質代謝の機能解析

細胞膜構成脂質であるイノシトールリン脂質、ホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸 [PI(4,5)P₂] 及びホスファチジルイノシトール 3,4,5-三リン酸 [PI(3,4,5)P₃] は、標的タンパク質を介して多様な細胞機能を制御する。PI(4,5)P₂ と PI(3,4,5)P₃ の産生や代謝は、細胞外刺激に応じて活性化される数十種もの代謝酵素群により時空間的に厳密に制御されている。イノシトールリン脂質代謝酵素の活性異常は癌など様々な病変を引き起こすが、悪性癌の浸潤・転移における役割については未だ不明な部分が多い。そこで本研究ではこれらイノシトールリン脂質とその産生代謝酵素の浸潤突起形成における機能解析を行った。

まず PI(4,5)P₂ 及び PI(3,4,5)P₃ にそれぞれ特異的に結合するタンパク質ドメインの過剰発現により機能阻害を行ったところ、浸潤突起形成及び細胞外基質分解活性が顕著に抑制された。次にイノシトールリン脂質代謝酵素の浸潤突起形成における機能を解析した。PI(4,5)P₂ 産生は主に、タイプ I ホスファチジルイノシトール-4-リン酸-5-キナーゼ (PIP3K I) α 、 β 、 γ の3つのアイソフォームにより触媒される。一方、PI(3,4,5)P₃ は主にクラスIホスファチジルイ

シトール-3-キナーゼ(PI3-キナーゼ)p110 α 、 β 、 γ 、 δ の4つのアイソフォームにより産生される。これら各アイソフォームに対するsiRNAをMDA-MB-231細胞に導入して発現抑制を行った結果、PIPK I α を発現抑制した細胞において浸潤突起によるゼラチン分解活性が抑制された(*Cancer Sci.* 2010)。PI3-キナーゼについては、p110 α の発現抑制により浸潤突起形成が阻害され、p110 α の選択的阻害剤を用いた場合にも同様の結果が得られた。またPIPK I α 及びp110 α の細胞内局在を検討した結果、これらの分子が浸潤突起に集積している様子が観察された。p110 α をコードするPIK3CA遺伝子については、乳癌の約27%で恒常的活性化変異が見つかっており、浸潤・転移性や予後悪化との相関が報告されている。そこでこれらの変異体を発現する細胞株を作製した結果、顕著に浸潤突起形成能が促進された。またPI(3,4,5)P₃の下流シグナル伝達系の解析から、PDK1とAktがエフェクターとして機能することを明らかにした(論文投稿中)。以上の結果から、イノシトールリン脂質代謝ネットワークが癌細胞の浸潤活性を担う浸潤突起形成を制御することが明らかになった(図4)。

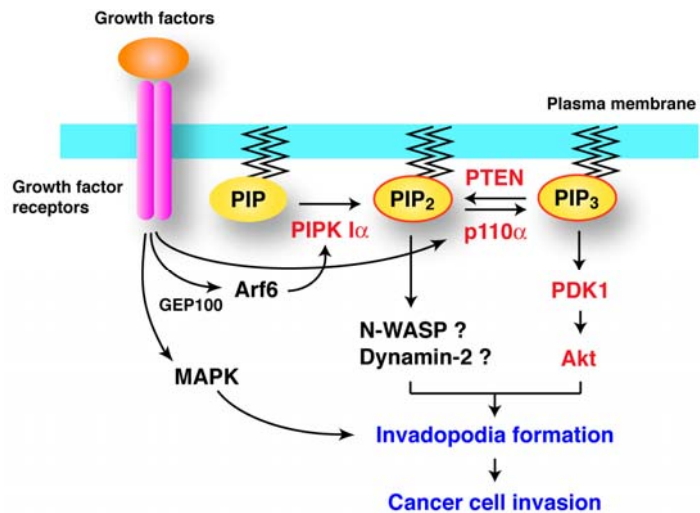


図4 浸潤突起形成におけるイノシトールリン脂質代謝の役割

2-3 アクチン細胞骨格制御タンパク質の機能解析

浸潤突起は、アクチン繊維を含む前駆体の形成、さらなるアクチン重合による安定化、マトリックスメタロプロテアーゼの集積による細胞外基質分解と突起伸長、というステップを経て形成される。本研究では米国グループとの共同研究により、この浸潤突起形成過程に関わる分子メカニズムを一部明らかにした(図5)。MenaはEna/VASPファミリータンパク質の1つで、細胞外からのシグナルに応じてアクチン細胞骨格を制御する。我々はMenaが浸潤突起の構成分子であり、転移癌に特異的に発現するMenaアイソフォームが浸潤突起の安定性と癌細胞の浸潤能を亢進し、動物モデルにおいて乳癌の転移を促進することを明らかにした(*Dev. Cell* 2008)。

乳癌の15%で遺伝子増幅と発現の亢進が見られるEMS1遺伝子は、癌遺伝子産物Srcチロシンキナーゼの基質であるCortactinをコードする。Cortactinはアクチン結合タンパク質であり、浸潤突起の構成分子であることが多数報告されているが、その詳細な機能は明らかになっていなかった。我々は、Cortactinのリン酸化が他のアクチン結合タンパク質との相互作用や活性調節のトリガーとなり、浸潤突起の成熟過程を制御することを明らかにした(*J. Cell Biol.* 2009)。

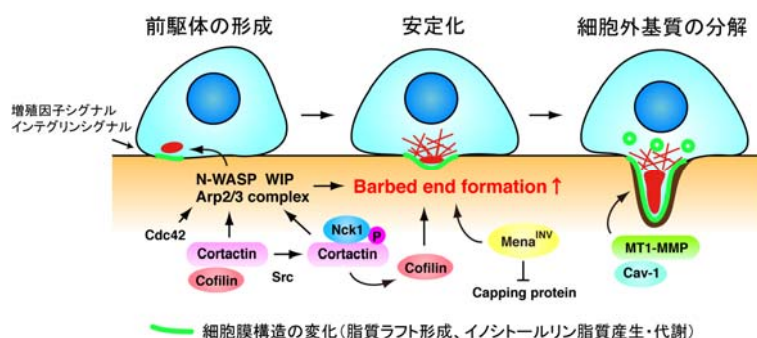


図5 浸潤突起形成のモデル

細胞増殖因子やインテグリンシグナルに応じた脂質ラフト形成やイノシトールリン脂質代謝により浸潤突起形成が誘導されると考えられる。形成された前駆体はさらなるアクチン細胞骨格構造の形成や細胞外基質分解酵素の集積を経て機能的に成熟していくと考えられる。

3. 今後の展開

本研究により、細胞膜ドメイン構造である脂質ラフトやイノシトールリン脂質代謝が転移性癌細胞の浸潤突起形成に関わることが明らかになった。これまで癌浸潤の分子機構については、細胞外基質分解酵素や細胞運動に関わるタンパク質の機能解析が主に行われてきた。本研究では細胞膜構成脂質のドメイン構造や代謝が癌細胞の浸潤活性に深く関与することを明らかにし、細胞膜脂質や関連分子が癌浸潤・転移治療の分子標的となる可能性を示した。また細胞膜脂質に関連する新規浸潤突起制御分子として Caveolin-1 や p110 α などを同定した。Caveolin-1 の発現亢進や p110 α の活性化変異は様々な癌の転移性及び予後悪性化と相関することが報告されているが、その詳細な分子機構は未だ明らかになっていない。今後はこれらの分子について発現抑制を行った癌細胞株を樹立し、マウスモデルを用いた癌転移実験を行うことにより、転移治療の標的としての有用性を評価していく予定である。将来的には、浸潤突起形成の分子機構の解析で得られた知見を、癌浸潤・転移の分子機構の理解や新しい治療法の開発につなげていきたい。

4. 自己評価

本研究課題の目標は、浸潤突起形成における細胞膜脂質のドメイン構造や代謝の役割と関連分子の機能を明らかにすることであった。本研究では脂質ラフトやイノシトールリン脂質代謝が転移性癌細胞の浸潤突起形成に関わることを明らかにし、関連する新規浸潤突起制御分子もいくつか同定した。特に脂質ラフトが浸潤突起に局在しその機能を制御するという知見は、細胞膜脂質の構成が癌浸潤において重要な役割を果たしていることを示した点で興味深い。一方、生化学的手法を用いた浸潤突起構成分子の網羅的な解析や動物モデルを用いた個体レベルでの機能評価などは研究期間内に終えることができなかったため、今後も引き続き解析を行う予定である。

5. 研究総括の見解

がん浸潤に関与する浸潤突起形成のメカニズムに関し、脂質ラフト形成に必須のカベオリン1が関与すること、細胞外基質分解を行う MT1-MMP の機能発現(おそらく輸送)にカベオリンが必要であることを明らかにした。また、p110 α の PI3K 活性化による PIP3 生成が浸潤突起の形成に関わっていることを示し、突起形成に関わる分子を明らかにしたことは評価できる。今後、カベオリンや MT1-MMP と相互作用する脂質の同定や PIP3 の動態について研究を進展させ、がん転移治療法に繋がる成果が出ることを期待する。

6. 主要な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. Philippar U, Roussos ET, Oser M, <u>Yamaguchi H</u> , Kim HD, Giampieri S, Wang Y, Goswami S, Wyckoff JB, Lauffenburger DA, Sahai E, Condeelis JS, and Gertler FB: A Mena invasion isoform potentiates EGF-induced carcinoma cell invasion and metastasis. <i>Dev. Cell</i> 15: 813-828 (2008)
2. Oser M, <u>Yamaguchi H</u> , Mader CC, Arias M, DesMarais V, van Rhee J, Koleske AJ, and Condeelis J: Cortactin regulates cofilin and N-WASP activities to control the stages of invadopodium assembly and maturation. <i>J. Cell Biol.</i> 186: 571-587 (2009)
3. <u>Yamaguchi H*</u> , Takeo Y, Yoshida S, Kouchi Z, Nakamura Y, and Fukami K: Lipid rafts and caveolin-1 are required for invadopodia formation and extracellular matrix degradation by human breast cancer cells. <i>Cancer Res.</i> 69: 8594-8602 (2009) *Corresponding author
4. <u>Yamaguchi H*</u> , Yoshida S, Muroi E, Kawamura M, Kouchi Z, Nakamura Y, Sakai R, and Fukami K: Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and PIP5-kinase I α are required for invadopodia formation in human breast cancer cells. <i>Cancer Sci.</i> 101: 1632-1638 (2010) *Corresponding author
5. <u>Yamaguchi H*</u> and Oikawa T: Membrane lipids in invadopodia and podosomes: Key

	structures for cancer invasion and metastasis. <i>Oncotarget</i> 1: 320-328 (2010) *Corresponding author

(2)特許出願

なし

(3)その他

学会発表

1. 山口英樹、深見希代子: 浸潤突起形成におけるイノシトールリン脂質の役割 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会シンポジウム(神戸)(2008年12月12日)
2. 山口英樹、竹尾由希子、吉田周平、河内全、中村由和、深見希代子: 浸潤突起形成における脂質ラフトとカベオリンの役割 第61回日本細胞生物学会ワークショップ(名古屋)(2009年6月2日)
3. 山口英樹、吉田周平、室井絵美、川村将洋、中村由和、河内全、堺隆一、深見希代子: PI3 キナーゼシグナルはヒト乳癌細胞による浸潤突起形成を制御する 第62回日本細胞生物学会大会ワークショップ(大阪)(2010年5月20日)
4. 山口英樹: 癌細胞による浸潤突起形成の分子機構 大阪大学大学院基礎工学研究科数理医学研究会招待講演(大阪)(2010年9月17日)
5. 山口英樹、堺隆一、深見希代子: 乳癌細胞の浸潤突起形成における PI3-kinase シグナル伝達経路の役割 第69回日本癌学会学術集会(大阪)(2010年9月22日)