

「素過程と連携」研究領域活動・事後評価報告書

— 平成12年度終了研究課題 —

領域総括 大嶋 泰治

1. 研究領域の概要

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

2. 研究課題、研究者名

別紙一覧表参照

3. 選考方針

基本方針：

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

4. 選考の経緯

審査	書類選考	面接選考	採用者数
対象数	176人	20人	10人

5. 研究実施期間

平成9年10月～平成12年9月

6. 領域の活動状況

領域会議6回(年2回)、研究報告会1回(公開:東京ガーデンパレス)を開催し、研究進捗状況の報告と研究交流を図った。

また、領域総括は、研究開始に際し海外を含め全研究者を訪問するほか、随時、各研究者の研究実施場所へ赴き、研究の進捗状況把握に努めた。

7. 評価の手続き

領域総括が、個人研究者からの報告書および自己評価(事後報告書)を基に、領域アドバイザーの協力を得て行った。また、一般公開の研究報告会における外部研究者からの意見、評価を参考とした。

(評価の流れ)

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

8. 評価項目

- ア. 外部発表(論文、口頭発表など)、招待講演、特許、研究を通じての新たな知見の取得などの研究成果の状況
- イ. 得られた研究成果の科学技術への貢献度

9. 研究成果

さきがけ研究 21 一領域の総括をお引き受けするに際して、モデル生物を用いた生命の包括的理解を目標とした研究を支援したいと考え、領域の旗印を「素過程と連携」とした。最初の研究者を募集するに当って、応募者にこの趣旨が十分理解されているかがいささか不安であったが、案ずることも無く、多数の応募者の中から期待通り酵母から線虫や昆虫、また魚類や哺乳動物を対象とした研究者 10 名を、1期生として採用することができた。その中には国外での萌芽的研究の支援があり、さきがけ研究 21 でなければ出来ないこととして、本領域の運営に大いに期待と希望が膨んだ。当然のことながら、研究材料の違いに加えて各研究者の発想とアプローチは大きく異なる。これがまたどの様に研究者相互に影響するかが当初よりの興味であった。そこで研究会では努めて平易な言葉で解説的に指導した。その効果は、研究材料と実験法の相互交換のかたちで具体的に表れ、それぞれの研究者の幅を広げることに結び付いたと思っている。本研究支援の成果を概観すれば、個々の研究者の所属部門と分野の環境により違いはあるが、4名の教授昇任者は勿論のこと、それぞれの招待講演や著作などにより、各研究者いずれもが国内外の学界からの評価を顕著に高めている。

いずれの研究者も現在も充実した環境で研究を続けており、今後の発展が大いに期待される。領域アドバイザーの適切なご助言により、このような人材を支援することが出来たことは、領域総括としてもその幸運を感謝している。

10. 評価者

領域総括:大嶋 泰治 関西大学 工学部 教授

領域アドバイザー氏名:

大島 靖美 九州大学 大学院理学研究院 教授
岡山 博人 東京大学 大学院医学系研究科 教授
小川 智子 国立遺伝学研究所 副所長
勝木 元也 東京大学 医科学研究所 教授 ヒト疾患モデル研究センター・センター長
東江 昭夫 東京大学 大学院理学系研究科 教授
西田 育巧 名古屋大学 大学院理学研究科 教授
古澤 満 第一製薬(株)創薬基盤研究所 特別参与
豊島 久真男*(財)住友病院 院長

*平成12年4月1日より参画

(参考)

1) 外部発表件数

	国内	国外	計
論文	1	74	75
口頭	128	32	160
書籍・出版物	55	10	65
合計	184	116	300

2) 特許出願件数

国内1件 外国2件 計3件

2) 受賞

国内1件:日本免疫学会賞(2000)「Tリンパ球の分化機構の研究」

海外1件:Motohatsu Fujiwara Award(1999)「Evidence for cross-bridge regulation by calponin in contracting smooth muscle cells」

3) 招待講演

国内51件 国外18件 計69件

「素過程と連携」領域 研究課題名および研究者名

研究者名 (参加形態)	研究課題名 (研究実施場所)	現職 (応募時所属)
上村 匡 (兼任)	神経突起のパターン形成における シグナリング機構 (京都大学ウイルス研究所)	京都大学ウイルス研究所 教授 (京都大学大学院理学研究科 助手)
大矢 禎一 (兼任)	細胞の形態形成を決定する 分子機構の研究 (東京大学大学院領域創成研究科)	東京大学大学院領域創成研究科教授 (東京大学大学院理学系研究科 助教授)
杉本 亜砂子 (兼任)	線虫の発生におけるプログラム 細胞死の制御機構 (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 助手 (同上)
清木 誠 (専任)	脊椎動物の新しい神経系形態形成遺 伝子の同定 (フライブルグ大学第一生物学研究所)	科学技術振興事業団 ERATO 研究員 (フライブルグ大学インディペンデントポスト ドクトラルフェロー)
高橋 克仁 (兼任)	組織修復と器官形成を制御する 新しい細胞内分子機構 (大阪府立成人病センター研究所)	大阪府立成人病センター研究所主任研究員兼 大阪大学大学院薬学研究科 助教授 (同上センター研究所 主任研究員)
高浜 洋介 (兼任)	Tリンパ球の分化と選択を決定 づける細胞内信号 (徳島大学ゲノム機能研究センター)	徳島大学ゲノム機能研究センター 教授 (筑波大学基礎医学系 講師)
谷 時雄 (兼任)	mRNA を運ぶしくみ: 制御ネット ワークと核の動的機能構造 (九州大学大学院理学研究院)	九州大学大学院理学研究院 助教授 (同大学理学部 助教授)
升方 久夫 (兼任)	試験管内反応系を用いた分裂酵母 複製開始制御機構の解析 (大阪大学大学院理学研究科)	大阪大学大学院理学研究科 教授 (同大学院理学研究科 助教授)
三浦 猛 (兼任)	ウナギが解き明かす精子形成の謎(北 海道大学大学院水産科学研究科)	北海道大学大学院水産科学研究科 助教授 (同大学水産学部 助手)
荻山 明子 (専任)	脊髄ニューロンにおける痛み信号 の処理機構 (岡崎国立共同研究機構生理学研究 所)	岡崎国立共同研究機構生理学研究 所 助手 (長崎大学医学部 日本学術振興会特別 研究員)

研究課題別研究評価

1. 研究課題: 神経突起のパターン形成におけるシグナリング機構

2. 研究者名: 上村 匡

3. 研究のねらい

神経回路が正しく形成されるためには、ニューロンの細胞体から、軸索(出力装置)と樹状突起(入力装置)の2種類の神経突起が伸長し、それぞれが適切なパターンを形成しなければならない。軸索と樹状突起が細胞体から出芽する位置はどのように決定されているのだろうか。樹状突起の伸長・分岐のパターンはどのように調節されているのだろうか。本研究では、これらの分子機構の解明に取り組んだ。

4. 研究成果

生体内での神経突起の伸長・分岐形成などの機構を明らかにするには、モデル生物を用いた個体レベルでの解析が不可欠と考え、ショウジョウバエを材料に選択した。ショウジョウバエの神経系では、多極性を示すニューロン (multiple dendrite neuron ; md neuron) が同定されており、複雑に分岐する樹状突起と軸索とを識別して観察することが容易である。

アプローチの一つとして、神経突起のパターン形成に働く細胞間相互作用を想定し、新規の細胞膜表面レセプターを探索した。その結果、ニューロンで強く発現する7回膜貫通型分子を発見し、Flamingo と命名した。flamingo 遺伝子突然変異体を分離し、その系統の表現型を解析した結果、Flamingo は軸索と樹状突起の双方のパターン形成に重要な働きをすることが明らかになった。すなわち、軸索のパターン形成においては成長円錐の走行経路の選択や標的認識に必要であり、樹状突起の伸長においては過度の伸長を抑える。また研究開始当初は予想していなかったが、Flamingo は上皮平面内における細胞極性の調節因子でもあることを明らかにした。Flamingo は上皮の細胞間境界に存在するが一様には分布せず、特定の方向に沿って偏って存在し、しかもこの偏った分布が正常な極性形成に必須である。

また別のアプローチとして、レセプター様分子にこだわらず、md neuron に比較的限局して発現する遺伝子を探索し、その中からニューロンの極性形成または樹状突起のパターンを調節する遺伝子を分離しようと試みた。ショウジョウバエにおいて開発している発現パターンに基づいて遺伝子を探索する方法(エンハンサートラップ法)を採用し、約 4,500 株のトラップシステムを探索した結果、現在までに 20 余りの候補遺伝子に絞り込んだ。それぞれの遺伝子が期待する機能を担っているかを、以下の方針に基づき検証中である。1)すでに突然変異が分離されている遺伝子については、その変異体を取り寄せ、md neuron の突起パターンを調べる。

2)ホモ接合体が致死となるトラップシステムについては、md neuron の突起パターンを調べる。この手法により、樹状突起の伸長を負に制御する遺伝子が分離できた。この遺伝子は Zn^{++} フィンガーモチーフを持つタンパク質をコードしていた。さらに、3)遺伝子破壊変異が分離されていなかったり、全くの新規の遺伝子については、2本鎖 RNA 干渉(double-stranded RNA interference ; RNAi)による遺伝子ノックアウトを計画しており、実験を進めている。

5. 自己評価

7回膜貫通型レセプター Flamingo の発見と遺伝学的解析により、神経回路研究のブラックボックスであった樹状突起のパターン形成機構の解明への足掛りが得られた。また、上皮平面内極性の研究においても、調

節因子の細胞内動態を明らかにし突破口を開いた。ただし、Flamingo の樹状突起の伸長における役割については、海外のグループに先に論文報告されてしまった。Flamingo の活性化機構や、下流のシグナル伝達経路の実体には不明な点が多く、今後の研究が必要である。また、ショウジョウバエを用いた本研究の成果が哺乳類に適用できるかを検証する目的で、マウスでのホモログ遺伝子をすでに認定しており、その解析にも力点を置きたい。

Flamingo 以外の遺伝子を探索するアプローチは、ようやくスクリーニングの最終段階に到達した。Flamingo に関する研究に比してこのアプローチに十分な労力を割けなかったことと、多数の系統を維持するためのスペースの整備が遅れたことが、具体的な成果を挙げられなかった原因である。

6. 領域総括の見解

複雑に分岐する樹状突起と軸索が識別可能なショウジョウバエの初期胚の神経系を対象に、そのパターン形成に焦点を当てた研究である。まずニューロンで強く発現する細胞膜結合タンパク質の Flamingo を同定し、軸索と樹状突起のパターン形成におけるその役割を明らかにし、さらにこれが上皮細胞の極性にも関わることを示した。この成果は、ほとんど未知であったこの分野での着実な進歩として評価される。また、緑色蛍光タンパク質を応用した簡便な方法を導入し、ニューロンで限定発現する遺伝子の検索を行い、多くの候補遺伝子を収集している。その解析による今後の成果が楽しみである。

7. 主な論文

- Uemura, T. (1998). The cadherin superfamily at the synapse: more members, more missions. *Cell* 93, 1095–1098.
- Usui, T., Shima, Y., Shimada, Y., Hirano, S., Burges, W. R., Schwarz, L.T., Takeichi, M., and Uemura, T. (1999). Flamingo, a seven-pass transmembrane cadherin, regulates planar cell polarity under the control of Frizzled. *Cell* 98, 585–595.
- 碓井理夫と上村匡 (2000). 「平面内細胞極性形成の分子機構」細胞工学 19, 1627–1633.
- Liu, B., Usui, T., Uemura, T., Jan, L., and Jan, Y.-N. (1999). Flamingo functions in the Frizzled pathway to control the orientation of asymmetric precursor divisions and the planar polarity of sensory bristles in *Drosophila*. *Current Biology* 9, 1247–1250.
- Takeichi, M., Nakagawa, S., Aono, S., Usui, T., and Uemura, T. (2000). Patterning of cell assemblies regulated by adhesion receptors of the cadherin superfamily. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 355, 885–890.

8. その他

招待講演 16件 うち国内14件、国外2件
受賞、特許出願なし。

研究課題別研究評価

1. 研究課題:細胞の形態形成を決定する分子機構の研究

2. 研究者名:大矢禎一

3.研究のねらい

菌類や植物の細胞形態は、細胞骨格に加えて細胞の外側から形を決める細胞壁で規定されている。我々は出芽酵母を研究材料として細胞の形態形成を決定する分子機構を研究してきたが、その過程で低分子量 GTPase である Rho1p が細胞壁合成酵素であるグルカン合成酵素の活性化を行っていることを明らかにしてきた。本研究計画では、特にグルカン合成酵素による細胞の形態形成の制御機構、及びグルカン合成酵素へのシグナル伝達機構を解析した。

4.研究成果と自己評価

細胞壁は細胞外にあり、細胞内外からの圧力に抗して細胞の形態を保持している固い殻である。その固い殻がどのように合成されているかはほとんど不明であった。今回、グルカン合成酵素の触媒サブユニット Fksp に GFP (Green fluorescent protein) を融合させた Fks1p-GFP を作成し、触媒サブユニットの生細胞内における局在を観察した。その結果、細胞壁合成酵素がダイナミックに細胞膜上を移動することを発見した。生きた細胞中で 0.5 秒おきに連続して GFP 輝点を追うことにより、グルカン合成酵素が細胞膜表面を移動していることがわかった。出芽したばかりの小さな芽では、点状のシグナルが 1 秒間に数百ナノメートルの距離を動き回っていた。その動きは決して直線的ではなく、むしろランダムな動きであった。

既に細胞膜の表層近くでアクチン・パッチが同様な動きをすることが知られていること、およびアクチン・パッチとグルカン合成酵素の点状の局在は共局在していることから、アクチン・パッチの動きに連動して細胞膜上のグルカン合成酵素が移動していることが推測され、このことをアクチン・パッチの動きを止める酵母変異株を用いて証明した。さらに、この変異株を用いることにより、グルカン合成酵素の細胞膜上の移動を止めると、均一な細胞壁を形成できなくなり、異常な細胞壁を形成することを証明した。こうして、細胞壁合成の場が細胞膜上を移動していることを初めて明らかにし、細胞壁合成酵素が動くことの生理学的意義を示すことができた。

グルカン合成酵素へのシグナル伝達機構の解明に関しては、複数の観点から研究を行った。特に今回は、a) スフィンゴ脂質によるグルカン合成の制御、b) 細胞壁合成制御へのシグナルの遺伝学的解析、について研究を行った。

まず、グルカン合成酵素の活性制御機構としては、制御サブユニットである Rho1p による活性化以外の調節機構については全く知られていなかった。一方、1,3-β-グルカン合成酵素の活性に必要な因子として Gns1p が単離されていた。そこで、我々は、この Gns1p をより詳細に解析することによって、1,3-β-グルカン合成酵素の新たな調節機構、あるいは活性化機構の糸口が掴めるのではないかと考えた。gns1 遺伝子破壊株細胞を用いた酵素学的、また生化学的な解析から、スフィンゴ脂質の中間産物であるジヒドロスフィンゴシンがグルカン合成酵素活性を阻害すると結論づけた。

最後に、細胞壁合成酵素の変異株に対する多コピー抑圧変異を用いて、細胞壁合成へのシグナル伝達についての遺伝学的研究を行った。グルカン合成酵素の温度感受性変異の多コピー抑圧遺伝子として、MTL1、WSC1、WSC3、ROM2、LRE1、MSB1、ZDS1 の7遺伝子のコードする因子を新たに検出した。遺伝学的解析から、グルカン合成を正に制御する7つの因子は、グルカン合成酵素と Pkc1p の両経路の活性化に関わる因子

と、グルカン合成酵素だけに特異的に関与する因子に分類した。さらに、これらの因子の中には Rho1p の活性化に関与する因子と、それ以外の系に関与する因子があることが分かった。

今回の研究により、細胞壁の制御には従来考えられてきたような合成酵素の活性化というような単純なスカラー的な要素だけでなく、細胞膜上を動きながら数多くの上流因子の影響を受けつつ活性制御するという複雑なベクトル的な要素を加味しながら解析する必要があることが初めて明らかになり、この点は自分としても高く評価している。また、細胞壁の形成という細胞の外側でおきる現象が、実はアクチン細胞骨格と深い関係があることも明らかになった。今後は、細胞壁合成を細胞周期や芽の形成過程などの時間軸を加えながら解析するとともに、細胞骨格との連携、動的な制御を視野に入れて解析することにより、より深く細胞壁合成の分子メカニズムが理解されることになると考えている。

5. 領域総括の見解

細胞形態がどのようにして決められるかについて、分子遺伝学的解析の容易な出芽酵母を用いて研究している。まず、GFP 蛍光タンパク質を結合した細胞壁グルカン合成酵素の生細胞での動態から、本酵素がアクチン・パッチに乗って、細胞膜上を移動しながら均質な細胞壁を合成することを示している。さらにグルカン合成酵素の活性調節に関与する多くの因子の検出を行い、従来ほとんど不明であった細胞壁形成機構の解明に向かって、具体的な糸口を付けたことを評価したい。今後は(既に始められているが)、細胞壁の合成制御に関係する諸因子の時間的また物理的連携を調べることにより、総括的な知見が得られることを期待する。

6. 主な論文

Homma, K., Terui, S., Minemura, M., Qadota, H., Anraku, Y., Kanaho, Y., and Ohya, Y. (1998) Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase localized on the plasma membrane is essential for yeast cell morphogenesis. *J. Biol. Chem.* 273, 15779-15786

Sekiya, -K. M., Botstein, D., and Ohya, Y. (1998). Identification of functional connections between calmodulin and the yeast actin cytoskeleton. *Genetics* 150, 43-58.

Okano, H., Cyert, M., and Ohya, Y. (1998). Importance of phenylalanine residues of yeast calmodulin for target binding and activation. *J. Biol. Chem.* 273, 26375-26382.

Helliwell S.B., Schmidt A., Ohya Y., and Hall M.N. (1998). The Rho1 effector Pkc1, but not Bni1, mediates signalling from Tor2 to the actin cytoskeleton. *Curr. Biol.* 5, 1211-1214.

Inoue, S.B., Qadota, H., Arisawa, M., Watanabe, T., and Ohya, Y. (1999). Prenylation of Rho1p is required for activation of yeast 1,3- β -glucan synthase. *J. Biol. Chem.* 274, 38119-38124.

7. その他

招待講演6件 うち国内4件、外国2件

研究課題別研究評価

1. 研究課題: 線虫の発生におけるプログラム細胞死の制御機構

2. 研究者名: 杉本亜砂子

3. 研究のねらい

発生過程の中で、プログラム細胞死は形態形成や細胞数の調整等のために重要な役割を果たしている。細胞が死ぬか生きるかの運命決定、細胞死の素過程、死細胞の貪食等の分子機構を明らかにするために、線虫(*C.elegans: Caenorhabditis elegans*)をモデル系として、新規細胞死関連遺伝子を探索および解析する。

4. 研究成果と自己評価

(1) 巨大な死細胞を示す *tDf6* 染色体欠失変異体の解析

これまでに分離した 20 株以上の細胞死異常を示す染色体欠失変異体のなかから、*tDf6* 染色体欠失変異体について解析を行った。*tDf6* 変異体のホモ接合胚では、死細胞が通常よりも巨大であり、また、細胞死の起こる数が顕著に減少するという表現型を示す。この表現型を引き起こしているのが *K08E3.6* 遺伝子の機能欠損によることを明らかにした。*K08E3.6* 遺伝子は Rho ファミリーの GTPase 活性化因子をコードしており、細胞質分裂の完了に必須であることが示された。*tDf6* 胚では *K08E3.6* 遺伝子の maternal 産物が使い切られる胚発生後期に細胞質分裂異常が起き、そのために生じた多核細胞の死によって巨大な死細胞が作られたと考えられた。

本研究において *K08E3.6* 遺伝子を同定したのと同時期に、Michael Glotzer らが細胞質分裂異常を示す *cyk-4* 変異体の原因遺伝子としてこの遺伝子を同定した。別個の表現型に着目して独立に行った研究ではあるが、細胞質分裂異常については本研究においてもかなりの解析を行っていただけに、論文発表が彼らより遅れてしまったのは残念であった。

興味深い遺伝子が同定できた一方で、細胞死制御の根幹の理解という当初のねらいからは若干離れてしまったという感は否めない。今回の結果によって、「変異により面白い細胞死異常の表現型を示す遺伝子が必ずしも細胞死制御の中心的因子というわけではない」という、遺伝学の避けられないリスクを再認識することとなった。

(2) 細胞死と形態形成に異常を示す *cdl-1* 変異体の解析

cdl-1(Cell Death Lethal)変異体は、胚発生期に死細胞の起きる時期が遅延するとともに、体躯および咽頭前部の伸張不全という特徴的な形態形成異常を示し胚性致死となる。*cdl-1* 遺伝子を同定したところ、脊椎動物で見いだされていた Stem-loop binding protein (SLBP)遺伝子と高い相同性を示した。SLBP はコアヒストン(ヒストン H2A, H2B, H3, H4)mRNA の 3'非翻訳領域に保存された Stem-loop 構造に結合し、ヒストン mRNA の輸送・安定性・翻訳効率などに関与していると考えられている。胚発生後期で CDL-1 の機能が失われるとヒストンの発現低下により細胞死実行時の染色体凝縮が不全となり、そのため細胞死の進行が遅れると推測された。

コスミドクローンの導入による表現型の回復が困難だったため、*cdl-1* 遺伝子のクローニングに予想以上の時間を費やすことになってしまった。しかし、*cdl-1* 遺伝子の解析により、*C. elegans* の細胞死の素過程として染色体凝縮が重要であるとの示唆が得られたことは評価できると考えている。また、他生物の SLBP は主に生化学的な解析がなされているが、その生理的機能についてはほとんど未知であった。*cdl-1* 変異体の解析から、SLBP が発生に必須であることが明確に示せたことも重要な知見である。

(3) 一般的な自己評価

さきがけ研究の期間中に、細胞死異常を示す変異体の原因遺伝子の同定を複数行うことを目指していたので、*tDf6* と *cdl-1* の 2 つの原因遺伝子を同定できたことは最低限の目標を達成したといえる。しかし、残念ながら、私をもっとも興味を持っている「細胞が生きるか死ぬかという運命決定」に関与する遺伝子の同定には至らなかった。残りの染色体欠失変異体のなかに、そのような遺伝子欠損が含まれている可能性も大きいので、今後もこれらの変異体の解析を進めていく予定である。ただし、原因遺伝子の同定は時間と労力のかかる作業なので、どの変異体を優先的に解析するかという選択が重要となってくる。そのためには、細胞系譜の解析などにより各変異体の理解をさらに深めることが必須である。

本研究では順遺伝学的手法により新規細胞死関連遺伝子の同定を行ったが、遺伝子クローニングにかなりの時間を費やさざるを得なかった。そこで、今後は、並行して逆遺伝学的手法を用いることも検討している。具体的には、最近われわれのグループで確立した、RNAi-by-soaking 法による high-throughput な遺伝子機能破壊法を用いて、細胞死関連遺伝子の探索を行う計画である。

この 3 年間で獲得できた多くの技術的なノウハウを生かして、今後も発生における細胞死制御の理解を深めていきたいと考えている。

5. 領域総括の見解

多細胞生物の形態形成において重要な役割を果たすプログラム細胞死についての制御機構を解明するために、線虫の染色体欠失変異体より巨大細胞死を示す *tDf6* 変異と、胚発生後期に死細胞数が増加し体躯と咽頭前部の伸長不全の表現型を示す *cdl-1* 変異について集中的な解析を行い、それぞれの原因遺伝子を同定している。この研究進捗度は本人にとっては不満足のようなようであるが、線虫における細胞死機構の一端を確かに把握したことは評価される。さらにその反省に立って新しい戦略と実験法の開発に進んでおり、今後の発展を期待したい。

6. 主な論文

Ohmachi, M., Sugimoto, A., Iino, Y., and Yamamoto, M. (1999). *kel-1*, a novel Kelch-related gene in *Caenorhabditis elegans*, is expressed in pharyngeal gland cells and is required for the feeding process. *Genes Cells* 4, 325–337.

Karashima, T., Sugimoto, A., and Yamamoto, M. (2000). *Caenorhabditis elegans* homologue of the human azoospermia factor DAZ is required for oogenesis but not for spermatogenesis. *Development* 127, 1069–1079.

Maeda, I., Kohara, Y., Yamamoto, M., and Sugimoto, A. (2001). Large-scale analysis of gene function in *Caenorhabditis elegans* by high-throughput RNAi. *Current Biology*, *in press*.

Sugimoto, A., Kusano, A., Hozak, R. R., Derry, W. B., Zhu, J., and Rothman, J. H. (2001). Genomic regions required for programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*: cell death can be uncoupled from nuclear proliferation. *Genetics*, *in press*.

7. その他

招待講演 国内 9 件、海外 1 件

研究課題別研究評価

1. 研究課題名:脊椎動物の新しい神経系形態形成遺伝子の同定

2. 研究者名:清木 誠

3. 研究のねらい

脊椎動物の脳(中枢神経系)は、前から後ろに向かって前脳、中脳、後脳、脊髄という一定の構造をとっており、前2者を前方神経系、後の2者を後方神経系と呼ぶ。後方神経系は前方神経系と同様に、将来、脊索となる中軸中胚葉が神経外胚葉に働きかけて形成されると長い間考えられてきた。最近、体幹の筋肉になる組織(非中軸中胚葉)が神経外胚葉に働きかけて後方神経系を形成することがわかり、ゼブラフィッシュを用いてその分子機構を探った。

4. 研究結果及び自己評価

発生初期に、背腹の区別のない胚にまず背側ができる。この背側組織の一部(中軸中胚葉)が、胚の残りの部分に働きかけ、前後、背腹方向に秩序ある体の形づくりをしていく。中軸中胚葉の前方は脊索前板、後方は脊索になり、それぞれ前方と後方の神経外胚葉に働きかけ、前方、後方神経系ができると考えられてきた。最初に、前方の中軸中胚葉である脊索前板に発現されている分泌因子 Dickkopf1(Dkk1)をクローニングした。脊索前板のみに Dkk1 を過剰発現させると、中脳が縮小し前脳が拡大したことから、前脳と中脳の比率を決定するという脊索前板の新しい機能を見出すことができた。

Wnt シグナル抑制因子である Dkk1 を、脊索前板だけでなく胚全体に過剰発現させると、将来後方神経系になる部分が前方神経系に分化転換し、前方神経系だけの胚になった。この胚で非中軸中胚葉が消失していることに着目し、非中軸中胚葉の形成および後方神経系形成への Wnt シグナルの関与を調べる目的で、非中軸中胚葉に発現される分泌因子 Wnt8 のレセプター frizzled8c と frizzled 9 をクローニングした。胚全体に Wnt8 を過剰発現させると前方神経系が後方神経系に分化転換することから、Wnt8 は後方神経系の形成分子の候補とされてきたが、その可能性を Wnt8 レセプター遺伝子を用いた解析により否定し、Wnt8 はむしろ非中軸中胚葉の形成と維持に関わっていることを明らかにした。さらに、非中軸中胚葉から分泌され神経外胚葉に働きかけて後方神経系を形成する新規分子を探索する目的で、非中軸中胚葉に特異的に発現されている 14 の新規遺伝子をクローニングした。このうち1つが TGFβ 遺伝子ファミリーに属する分泌因子であり、残りの 13 遺伝子は、非中軸中胚葉が神経外胚葉に働きかけた際に、神経外胚葉で活性化されることが判明した。これらの遺伝子がどのようにクロストークすることにより後方神経系を形成していくのかは、今後の重要な課題であると考えられる。

脊椎動物の中で、ゼブラフィッシュは、変異体を網羅的にスクリーニングし、原因遺伝子を突き止めるという順遺伝学的なアプローチをとることができる。しかし、本研究の最初の1年間の大規模な変異体のスクリーニングでは、神経系の前後軸形成に異常のある新規の変異体を得られなかったために、神経系の前後軸形成において、機能の重複した遺伝子が存在する可能性を想定した。本研究を開始した当時、日本ではゼブラフィッシュを用いて変異体の大規模スクリーニングを行える施設がなかったために、ドイツで本研究を行わせていただいた。1年余りで順遺伝学的なアプローチから、遺伝子をまず同定し機能を解析していく逆遺伝学的なアプローチに切り替えることができたのは、ドイツで既存の施設と技術を用いて、最初から変異体のスクリーニングを行えたからである。

以上の逆遺伝学的な解析は、遺伝子探索とそれらの機能解析を別々に行わなくてはならず、本研究期間内

に機能解析を終えることができなかった。このような問題点を克服するために、より鋭敏な新規遺伝子探索とそれらの機能解析を平行して行える新技術の開発を平行して行った。生細胞で蛍光を発する GFP (Green fluorescent protein) をレポーター遺伝子に用い、これをゲノムにランダムに挿入した系統を効率よく作成する方法を樹立した。これにより、生きた胚で、レポーター遺伝子挿入先のゲノム遺伝子(トラップ遺伝子)の発現場所とタイミングを蛍光でリアルタイムに観察しスクリーニングすることが可能になった。興味ある発現パターンを示した系統では、レポーター遺伝子を指標として、トラップ遺伝子を迅速にクローニングでき、この系統を2世代交配することにより、トラップ遺伝子が働かない変異体の作成を可能とした。本研究の期間中に8系統のトラップ系統を確立し、この方法の有用性を示した。このエンハンサートラップ法は、脊椎動物ではマウスを中心に行われてきたが、ほ乳類では子宮内で発生が進行するため、発生過程でダイナミックな発現をする遺伝子の同定には適していない。当初、母胎外で発生が進行するため、発生過程の一部始終を観察できるゼブラフィッシュを用いてこの技術の開発を行ったがうまくいかず、代わりに日本で独自に開発されてきた実験系であるメダカを用いて、未知の遺伝子の発現パターンを生きた胚で観察分離する事を可能にした。

今後、日本国内でサポートを得て、是非とも本研究により樹立した技術を用いて、発生途上の生きた胚で発現パターンによる新規遺伝子のスクリーニングを大規模に行い、脳の形づくりに重要な役割を果たす遺伝子群を同定し、神経難病治療へ向けた脳組織の再生、移植などへの基礎研究としたい。

5. 領域総括の見解

小型魚類のゼブラフィッシュは胎外で発生が進行し、その様子を終始観察できる上に遺伝学的解析が可能なことから、脊椎動物の発生・分化過程の研究に好適な材料と考えられている。この特徴に注目して、神経系の前後軸形成機構の解明を当面の目標として、突然変異の大規模スクリーニングの可能なライプツィグ大学において実験を行い、幾らかの遺伝子 DNA クローンを得て、神経系形成に新たな知見を加えている。しかし、より効率良く突然変異体を分離することの必要性を痛感し、GFP 蛍光遺伝子をレポーターとしたエンハンサートラップ法を考案し、その有用性を確認している。最近はこの方法をメダカにも適用し、発生中の胚を観察しながら突然変異体を選択することを行っている。この新しいモデル生物の開発への努力は高く評価されるべきである。

6. 主な論文等

- Kondoh, H., Uchikawa, M., Yoda, H., Takeda, H., Furutani-Seiki, M., Karlstrom, R. O. (2000). Zebrafish mutations in Gli-mediated hedgehog signaling lead to lens transdifferentiation from the adenohipophysis anlage. *Mech Dev* 96, 165-174.
- Shinya, M., Eschbach, C., Clark, M., Lehrach, H. and Furutani-Seiki, M. (2000) Zebrafish Dkk-1, induced by the pre-MBT Wnt signaling, is secreted from the prechordal plate and patterns the anterior neural plate. *Mech Dev* 98, 3-17.
- Yoda, H., Eschbach, C., Steinbeisser, H. and Furutani-Seiki, M. Identification and Functional Analysis of Wnt8 Receptor in Zebrafish. in submission.

7. その他

招待講演 国内2件

研究課題別研究評価

1. 研究課題: 組織修復と器官形成を制御する新しい細胞内分子機構

2. 研究者名: 高橋克仁

3. 研究のねらい

カルポニン¹は成体では平滑筋で特異的に発現しており、平滑筋分化の指標となっている。カルポニンはアクチンのC末端と結合し、アクチン・ミオシンの滑り運動を抑制する。また、カルポニン遺伝子を平滑筋肉腫細胞に導入すると、増殖が抑制され、腫瘍の悪性度が低下する。本研究では、遺伝子欠失マウスを用いてカルポニンの機能を解明することを目的とした。

4. 研究成果

(1) カルポニン遺伝子欠失マウスにおける骨形成の亢進

カルポニン遺伝子のホモ型欠失マウス(-/-)には致死性はなく、外観は野性型マウス(+/+)と変わらなかった。骨格組織を比較すると、-/-マウスでは、骨膜骨芽細胞の活性化を伴う骨形成の亢進が認められ、骨芽細胞のマーカーである血清アルカリホスファターゼ(ALP)活性が有意に高値を示したが、+/+型マウスでは、カルポニン遺伝子が未分化な骨芽細胞にも発現していることを見出した。

(2) カルポニン遺伝子欠失マウスにおける骨折治癒の促進

骨折治癒は、(1) 出血、血腫形成を伴う炎症反応、(2) 骨膜骨芽細胞による骨形成、(3) 軟骨細胞による仮骨形成など、種々の細胞における諸反応の連鎖から成る組織の修復過程を経て行われる。肋骨骨折モデルを用いて、-/-マウスと+/+マウスの比較検討により、カルポニン遺伝子の欠失によって骨折治癒が促進されることが明らかになった。

(3) カルポニン遺伝子欠失マウスにおける骨形成因子(BMP)応答性の亢進

ヒト組み換え体 BMP-2 (rhBMP-2)を凍結乾燥し、マウスの背部筋膜下に埋め込んだところ、-/-マウスにおいて、正常骨髄をもつより大きな異所骨が形成された。続いて、マウス胎仔の大腿筋から酵素処理により未分化な間葉系細胞を分離し、BMPによる骨芽細胞への分化を検討した。ALP活性はrhBMP-2によって用量依存性に誘導され、-/-マウスの細胞で有意に高値で、より多くの細胞が骨芽細胞に分化誘導された。また、大動脈を摘出し、BMPの存在下で器官培養を行ったところ、-/-マウスの大動脈では、中膜全層の平滑筋細胞がALP陽性の骨芽細胞様細胞へと分化誘導された。

(4) BMPのシグナル伝達におけるカルポニンの役割

BMPの細胞内シグナル伝達分子であるSmadがカルポニンと結合することによって、BMPの細胞内シグナル伝達を抑制することが示唆された。

(5) 間葉系細胞由来の腫瘍(肉腫)におけるカルポニン遺伝子の発現

後に骨や軟骨、腱、筋肉細胞に分化し得る胎生期の未分化間葉系細胞を発生母体とした腫瘍である肉腫でのカルポニンの発現をRT-PCR法および免疫染色法で検討し、骨肉腫や平滑筋肉腫など広範なヒト腫瘍でカルポニン蛋白が発現していることがわかった。

(6) 難治性肉腫に対する標的遺伝子治療法の開発

ヒトカルポニン遺伝子プロモーターを単純ヘルペスウイルス(HSV)ゲノムに挿入し、正常な平滑筋には影響を与えず、カルポニンを発現する肉腫細胞のみで複製しその細胞を選択的に破壊する新規HSVベクターを構築した。このベクターでヒト由来の培養肉腫細胞に対する抗腫瘍効果を培養細胞系とヌードマウス移植系で検討し、ヌードマウスに移植したヒト平滑筋肉腫に対して、腫瘍内へのウイルスの直接注入により、6例中5例で腫瘍が3-4週間以内に消失することを認めた(図1)。



図1 腫瘍内へのHSVベクター溶液を1回注入後11日目。

5. 自己評価と今後の展望

平滑筋アクチンへの結合蛋白として精製されたカルポニンが、未分化な間葉系細胞にも発現し、成熟骨芽細胞や骨細胞への分化を抑制することが示唆された。ホモ型欠失マウスの細胞でのBMPに対する応答性の亢進と骨折治癒が促進されたことは、カルポニン遺伝子の機能を抑制する薬物が骨形成促進薬になる可能性を示している。また、BMPシグナル伝達系におけるアクチン細胞骨格関

連蛋白の関与は新しい知見であり、そのメカニズムが明らかになれば、力学的負荷による骨形成促進機序の解明に寄与するものと思われる。今後、Smad4 の核内外での移行などの動態や転写活性化機構に対するカルポニンの作用をさらに明らかにする必要がある。

間葉系細胞由来の悪性、すなわち肉腫は化学療法や放射線療法に抵抗性で、外科的切除後も再発を繰り返す、最終的には肺、肝、腹膜などに転移し患者を死に至らしめる。我が国における症例数は、癌と較べて少ないものの、若年者にも多発し、有効な治療法がないことより、究極の治療法である遺伝子治療法が強く望まれている。しかし、国内外において、遺伝子レベルの研究はほとんど行われていないのが現状である。本研究で開発した新規 HSV-1 ベクターは、すべての腫瘍細胞に遺伝子導入できないという、現在のがん遺伝子治療での問題点を克服できると思われる。この研究の成果は *Cancer Research* 誌に投稿中である。今後、複製可能型 HSV-1 ベクターの安全性が確認され、さらに複製効率の良い高力価のベクターが開発されれば、難治性肉腫に対する世界で初の腫瘍選択的遺伝子治療法となるであろう。

6. 領域総括の見解

本研究者によりニワトリ砂嚢平滑筋アクチン結合タンパク質として単離精製されたカルポニンについて、その発現部位と骨形成における機能の解明を徹底的に行っている。この過程で種々のヒト肉腫細胞でカルポニン遺伝子が異常に強く発現していることを見出した。この知見から肉腫細胞のみを選択的に破壊する新規 HSV-1 ベクターを構築し、腫瘍内へのウイルスの直接注入による平滑筋肉腫の遺伝子治療法への可能性を導いたことを高く評価したい。

7. 発表論文

- Yoshikawa, H., Taniguchi, S., Yamamura, H., Mori, S., Sugimoto, M., Miyado, K., Nakamura, K., Nakao, K., Katsuki, M., Shibata, N., Takahashi, K. (1998). Mice lacking smooth muscle calponin display increased bone formation that is associated with enhancement of bone morphogenetic protein responses. *Genes Cells* 3, 685-695.
- Parker, C. A., Takahashi, K., Tang, J. X., Tao, T., Morgan, K. G. (1998). Cytoskeletal targeting of calponin in differentiated, contractile smooth muscle cells of the ferret. *J. Physiol. (London)* 508, 187-198.
- Yamamura, H., Yoshikawa, H., Tatsuta, M., Akedo, H., Takahashi, K. (1998). Expression of the smooth muscle calponin gene in human osteosarcoma and its possible association with prognosis. *Intern. J. Cancer* 79, 245-250.
- Ono, H., Yoshikawa, H., Ueda, T., Yamamura, H., Kudawara, I., Manou, M., Ishiguro, S., Funai, H., Koyanagi, Y., Araki, N., Hashimoto, N., Sonobe, H., Tatsuta, M., Takahashi, K. (1999). Expression of smooth muscle calponin in synovial sarcoma. *Sarcoma* 3, 107-113.
- Matthew, J. D., Khromov, A. S., McDuffie, M. J., Somlyo, A. V., Somlyo, A. P., Taniguchi, S., Takahashi, K. (2000). Contractile properties and proteins of smooth muscles of a calponin knockout mouse. *J. Physiol. (London)* 529, 811-824.

8. その他

招待講演 10 件 うち 国内6件、海外4件

受賞講演 海外1: Motohatsu Fujiwara Award, 4th US-Japan Workshop, May 1999

“Evidence for cross-bridge regulation by calponin in contracting smooth muscle cells”

研究課題別研究評価

1. 研究課題:Tリンパ球の分化と選択を決定づける細胞内信号

2. 研究者名:高浜洋介

3. 研究のねらい

免疫応答において中心的役割を担うTリンパ球は胸腺にて分化する。このとき胸腺内では、外来抗原反応性の有用なTリンパ球は分化促進される(正の選択)一方、自己反応性の有害なTリンパ球は除去される(負の選択)。本研究では、任意の信号伝達分子を発現させた幼若Tリンパ球の分化と移動を解析する技術を開発することによって、Tリンパ球の分化と選択が胸腺内のどのような場所でどのようなシグナルによって決定されるのかを解明することを目的とした。

4. 研究成果と自己評価

Tリンパ球の正と負の選択を特徴づける細胞内シグナル伝達機構を解析するために、まずクラゲ蛍光タンパク green fluorescence protein (GFP)を発現する組換えレトロウイルスを用いて、胸腺細胞への遺伝子導入法を検討した。その結果、胸腺から幼若Tリンパ球を一旦遊離して、ウイルス産生細胞およびリンパ球生存因子 interleukin-7 とともに1日培養し、蛍光励起セルソーターにて精製した後に器官培養に戻すことによって、30-50%の胸腺細胞に GFP 発現を認める遺伝子導入法を確立することができた。一方、阻害剤を用いた実験の結果から、MKK1 を介した信号が正の選択に、p38 キナーゼを介した信号が負の選択に、それぞれ特異的に関与することが示唆されたので、MAP キナーゼ分子群を GFP とともに発現する組換えウイルスを作製して幼若Tリンパ球へ導入した。その結果、幼若Tリンパ球に活性化型 MKK1 を発現させると正の選択誘導信号が代替されて成熟Tリンパ球様細胞が出現し、p38 活性化酵素 MKK6 を過剰発現させると負の選択誘導信号が代替されて幼若Tリンパ球が著しく減少した。

これらの結果より、MKK1→ERK キナーゼ経路の活性化は正の選択誘導をもたらし、一方、MKK6→p38 キナーゼ経路の活性化は負の選択誘導をもたらすことが明らかになり、正と負の選択には異なる MAP キナーゼ経路による信号が介在することが示された。最近更に、MKK1 および MKK6 をそれぞれ活性化するキナーゼ Raf-1 および ASK1 の選択的活性化が正と負の選択誘導に部分的に関与することを明らかにした。これらの成果は、正と負の選択を担う信号伝達経路の違いを初めて明らかにしたものであり、Tリンパ球の「自己・非自己の識別」を支える分子機構の理解、その破綻による病態の理解、そしてそれら免疫病の修復に向けた治療法の開発に有用と考えられる。また、開発した幼若Tリンパ球への遺伝子導入法は、治療用ベクターへの後天的免疫寛容を誘導することによってベクター排除応答を抑制することを可能にし、遺伝子治療の持続性改善に役立つと考えられる。

ところでTリンパ球分化の際には、幼若Tリンパ球の胸腺移住、正の選択に伴う皮質から髄質への胸腺内移動、成熟Tリンパ球の胸腺移出と、ダイナミックな細胞移動を伴う。しかしこれら細胞移動がどのように制御され、どのようにTリンパ球の分化・選択に寄与しているのか不明である。そこで本研究では、幼若Tリンパ球の胸腺での細胞移動を直接顕微鏡下の映像として追跡するため、低倍率倒立顕微鏡ステージ上での高酸素分圧液層コーゲン埋包器官培養法を開発した。これにデジタルCCDカメラを介した映像の自動経時的記録技

術を組み合わせ、既に成熟Tリンパ球の胸腺移出に細胞遊走因子 CC ケモカインのひとつ ELC (Epstein Barr virus-induced molecule 1-ligand chemokine) が関与することを明らかにした。現在さらに、幼若Tリンパ球の位置識別と移動の分子機構、特に移動の正負選択への関与について解析を進めている。これらの成果は、Tリンパ球の生体内制御を目指す医療応用に重要な知見を提供すると考えられる。

このように本研究では、従来困難とされてきた幼若Tリンパ球への体細胞遺伝子導入法や細胞移動可視化胸腺器官培養法の開発に成功し、胸腺内でのTリンパ球の生死運命選択や移動を担う分子機構の解明に大きな一歩を踏み出すことができた。今後これら新技術を用いた解析を更に推進することによって、胸腺Tリンパ球の生死分岐と位置移動において細胞運命の分岐を支配する分子シグナルの解明をめざしたい。今後の成果は、自己免疫疾患や免疫不全症さらにはアレルギー疾患を含めた免疫病に対して根本的な治療法を提供すると考えられる。

5. 領域総括の見解

本研究は、胸腺内における有用/有害リンパ球の分化選択機構の解明が目的である。この間、胸腺内へのDNA導入技術を研究し、上記のTリンパ球の分化選択には異なるMAPキナーゼ信号伝達系が関与することを見出している。また培養中の胸腺細胞の顕微鏡下での追跡観察技術の研究により、幼若リンパ球の胸腺への移住、胸腺内移動、あるいはTリンパ球の胸腺移出機構の解析にも進んでいる。これらの成果は、後天的免疫寛容の獲得法など、生体内Tリンパ球制御に重要な糸口を見出し、新しい医療技術の開発に大きく貢献することが期待される。

6. 主な論文

Sugawara, T., Di Bartolo, V., Miyazaki, T., Nakauchi, H., Acuto, O. and Takahama, Y. An improved retroviral gene transfer technique demonstrates inhibition of CD4-CD8⁻ thymocyte development by kinase-inactive ZAP-70. *J. Immunol.* *161*, 2888-2894, 1998.

Tokoro, Y., Sugawara, T., Yaginuma, H., Nakauchi, H., Terhorst, C., Wang, B. and Takahama, Y. A mouse carrying genetic defect in the choice between T and B lymphocytes. *J. Immunol.* *161*, 4591-4598, 1998.

Sugawara, T., Moriguchi, T., Nishida, E., and Takahama, Y. Differential roles of ERK and p38 MAP kinase pathways in positive and negative selection of T lymphocytes. *Immunity* *9*, 565-574, 1998.

Apostolou, I., Takahama, Y., Belmont, C., Kawano, T., Huerre, M., Marchal, G., Cui, J., Taniguchi, M., Nakauchi, H., Fournie, J. J., Kourilsky, P. and Gachelin, G. Murine natural killer T cells contribute to the granulomatous reaction caused by mycobacterial cell walls. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *96*, 5141-5146, 1999.

Kaneta, M., Osawa, M., Osawa, M., Sudo, K., Nakauchi, H., Farr, A. and Takahama, Y. A role for Pref-1 and HES-1 in thymocyte development. *J. Immunol.* *164*, 256-264, 2000.

7. その他

・招待講演8件、うち 国内5件 海外3件

・受賞1件 『Tリンパ球の分化機構の研究』平成12年度 日本免疫学会賞

・特許2件

①『Composition pharmaceutique comprenant des cellules NKT actives par des PIM et son utilisation en therapie』1999年 国外(フランス)

②『後天的免疫寛容の獲得方法』1999年 国内および国外(米国、カナダ、EP)

研究課題別研究評価

1. 研究課題:mRNA を運ぶしくみ:制御ネットワークと核の動的機能構造

2. 研究者名:谷 時雄

3. 研究のねらい

遺伝子の保存と転写の場である核と、タンパク質への翻訳の場である細胞質が、核膜によって隔てられている真核生物においては、遺伝子から転写された mRNA の核から細胞質への輸送過程が遺伝子発現に必須である。しかしながら、その詳細な分子機構に関しては未だに不明な部分が多い。本研究では、分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* を用いて mRNA の核から細胞質への輸送機構に関わる因子群の同定とそれらの機能解析を行った。

4. 研究成果と自己評価

ポストゲノム研究の時代を迎えるにあたって、遺伝子の転写後発現調節機構の解明は重要な課題となっている。mRNA の核から細胞質への輸送は、転写後発現調節機構のなかでも解析が最も遅れている分野である。本研究では、mRNA の核外輸送に関わる因子群を、遺伝学的操作が行いやすく且つ高等真核生物と類似点の多い分裂酵母 *S. pombe* を用いて同定し、さらにそれら因子の機能を解析した。まず、分裂酵母の生育に関する温度感受性変異株バンクの中から、制限温度下で mRNA を核に蓄積する変異株を、オリゴ dT をプローブに用いた *in situ* hybridization 法を用いて、mRNA の細胞内分布を可視化することにより分離した。およそ 1,500 株からなる温度感受性変異株バンクをスクリーニングした結果、9 種類の異なる相補性グループに属する mRNA 核外輸送変異 (*ptr1*~*ptr9*; poly A⁺ RNA transport) が同定された。

次に、*ptr1* 変異から *ptr8* 変異までの原因遺伝子を、突然変異宿主の機能相補によってクローニングした結果、*ptr1*⁺ 遺伝子と *ptr3*⁺ 遺伝子がタンパク質のユビキチン化反応に関わるタンパク質をコードしていることが明らかになり、mRNA の核外輸送過程においてタンパク質のユビキチン化反応が重要な役割を果たしていることが初めて示された。また、*ptr6*⁺ 遺伝子はヒト転写因子複合体 TFIID の構成因子 hTAFII55 の分裂酵母相同因子を、*ptr8*⁺ 遺伝子は別の転写因子複合体 TFIIH の構成因子で、紫外線照射などによる DNA 損傷の除去修復機構に関与するヒト色素性乾皮症の原因遺伝子 ERCC3 の分裂酵母相同因子をそれぞれコードしていることが明らかになった。mRNA 核外輸送変異株の原因遺伝子がこれらの転写因子をコードしていたことは、遺伝子の転写機構と mRNA の核外輸送機構とが密接に連携していることを示唆している。*ptr6* や *ptr8* 変異株においては、タンパク質の核内外への輸送に異常がないことから、Ptr6p と Ptr8p タンパク質は mRNA の核外輸送に特異的に関わっていると考えた。

一方、*ptr7* 変異の原因遺伝子は生育に必要な新規核タンパク質をコードしていた。Ptr7p はヒトから酵母まで生物種間でよく保存されている因子で、ATP 結合活性を保持していることが *in vitro* 結合実験によって示された。興味深いことに、*ptr7-1* 変異株は制限温度下で培養すると、mRNA の核外輸送阻害のみならず、タンパク質の核内外への輸送阻害、mRNA の 3'末端形成異常、細胞形態の変化、核小体の構造変化(分断化)、G1 期停止などの非常に多面的な表現型を示した。また、yeast two-hybrid screening を用いて、Ptr7p と相互作用する因子を検索した結果、RasGAP、eIF4E、Hsp27 といった多様な因子と細胞内で相互作用している可能性が示された。これらの結果から、Ptr7p は ATP との結合を介して機能する様々な細胞内反応の分子スイッチとして機能している可能性が考えられた。

mRNAの核から細胞質への輸送機構に関する研究は、遺伝子の転写後調節機構解明の一環として、ここ2、3年の間に非常に多くの注目を集め、急速な進展が見られた。しかし、当初の予想以上に、mRNAの核外輸送過程は複雑であり、今回の研究によって8種類の核外輸送機構に関わる因子を同定したが、それらの因子の輸送機構における具体的な役割を解明するまでには残念ながら至らなかった。しかし、遺伝子の転写やプロセッシングに関わるPtr6pからPtr8pまでの一連の因子がmRNA核外輸送に必須な因子として同定され、近い将来これらの因子の解析を通して遺伝子の転写とmRNA核外輸送の連携機構が明らかになることが期待される。今後は本研究によって得られた知見を基に、mRNAの核外輸送制御による発生や分化といった高次生命現象の調節機構の解明までを視野に入れて、更なる研究を展開したいと考えている。

5. 領域総括の見解

真核生物では、転写されたmRNA分子は、翻訳の場であるリボソームの存在する細胞質へ核膜を通過して出て行く。本研究では分裂酵母を材料にこの機構に関与する因子の検索を行った。まず、制限温度(37°C)で生育不能となる温度感受性突然変異細胞の集団から、mRNA分子を核内に留める変異株を、mRNA分子の3'末端ポリA配列に結合するオリゴdTをプローブとして分離した。次いで、それら変異株よりptr1⁺からptr8⁺と命名する8遺伝子のDNA断片を得た。その内のptr1⁺とptr3⁺はタンパク質ユビキチン化反応に関わり、ptr6⁺とptr8⁺は転写因子を構成するタンパク質をコードすると示唆された。また、ptr7⁺は生育に必須の核タンパク質をコードし、ATPの外に様々なタンパク質と結合して分子スイッチとして働くことを示唆している。これらの成果は、解析操作の容易な分裂酵母でも注目すべき成果と評価したい。

6. 主な発表論文

Habara, Y., Urushiyama, S., Ohshima, Y., and Tani, T. Mutation in the *prp12⁺* gene encoding a homologue of human SAP130/SF3b130 causes differential inhibition of pre-mRNA splicing and arrest of cell cycle progression in *Schizosaccharomyces pombe*. (*RNA*, in press)

Tatebayashi, T., Tani, T., and Ikeda, H. Fission yeast Toi1p, which interacts with the small GTPase Ran, is required for mitosis-to-interphase transition, nuclear protein import, and poly (A)⁺ RNA metabolism. (*Genetics*, in press)

Shibuya, T., Tsuneyoshi, S., Azad, A. K., Urushiyama, S., Ohshima, Y., and Tani, T. (1999). Characterization of the *ptr6⁺* gene in fission yeast: A possible involvement of a transcriptional coactivator TAF in nucleocytoplasmic transport of mRNA. *Genetics*, 152, 869-880.

Habara, Y., Urushiyama, Y., Tani, T., and Ohshima, Y. (1998). The fission yeast *prp10⁺* gene involved in pre-mRNA splicing encodes a homologue of highly conserved splicing factor, SAP155. *Nucleic Acids Res.*, 26, 5662-5669.

7. その他

招待講演 3件 うち 国内2件、 国外1件

受賞、特許なし

研究課題別研究評価

1. 研究課題: 試験管内反応系を用いた分裂酵母複製開始制御機構の解析

2. 研究者名: 升方 久夫

3. 研究のねらい

ゲノム全体を細胞周期あたり1回だけ複製するための複製開始制御は、真核生物のゲノム情報を維持するために必須である。私は複製開始とその制御の分子メカニズムを普遍的に理解するために、高等動物との類似性が多く見られる分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* をモデル系として用い、複製開始点での複製因子複合体形成過程を試験管内で再現することを目指した。

4. 研究成果

(1) 分裂酵母複製開始必須領域の同定

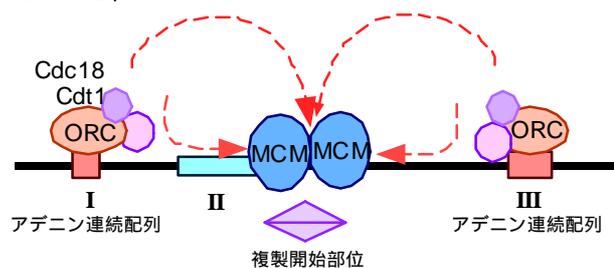
分裂酵母細胞内で、複製開始を引き起こすのに十分な染色体領域である約 1 kb の自律複製断片(ARS) *ars2004* に部分欠失と塩基置換を導入し、3つの複製開始必須領域を同定した。人為的配列を用いた置換実験から、分裂酵母複製開始に最も重要な配列は長いアデニン/チミン連続配列であると結論した。

(2) 染色体複製開始点への複製開始因子の局在

複製開始必須因子である ORC (origin recognition complex) や MCM (minichromosome maintenance) が、染色体上のどこに局在するかを明らかにするために、DNA-タンパク質を架橋後、特異的抗体を用いた免疫沈降により回収する CFhIP 法を用いて解析した。その結果、ORC は細胞周期を通じて複製開始点に結合していたのに対し、MCM は G1 期に発現する細胞分裂サイクル遺伝子の一つ Cdc18 に依存して、G1-S 期にのみ複製開始点に局在した。さらに詳細な解析から、ORC は *ars2004* 内の約 500 bp 離れた2つの必須領域に結合し、MCM はそれらの中間の実際に複製が開始する領域に局在することを見出した。

これらの結果は、高等動物と同様に複製開始に広い領域が必要である分裂酵母を用いることによって初めて明らかになった。

分裂酵母 pre-RC 構造



(3) 試験管内での ORC による複製開始点認識機構の解明

分裂酵母 ORC が複製開始点に直接結合するか否かを明らかにするために、分裂酵母細胞から免疫沈降法により回収した ORC 複合体に *ars2004* を含む標識 DNA 断片を加え、試験管内での結合反応を解析した。その結果、ORC は *ars2004* や他の複製開始点に特異的に結合し、アデニン/チミン連続配列を認識して *ars2004* 内の2ヶ所の必須領域に結合することを証明した。

(4) 試験管内複製開始系の開発

細胞内の解析だけでは複製開始に至る分子メカニズムを解明できない。そこで複製開始点上の高次タンパク質複合体形成と DNA 構造変化を解析する試験管内反応系の条件設定をおこなった。酵母細胞で GST (glutathione-S-transferase)-*lacI* リプレッサー融合タンパクを発現させ、*lacO* オペレーター配列を組み込んだ ARS プラスミドを細胞抽出液から回収し、回収 DNA に ORC が結合していることを確認した。さらに、G1 期で pre-RC 形成を制御できる細胞周期条件を作り出すことに成功した。これらを組み合わせることにより、pre-RC 形成と pre-RC から実際の複製開始に至る過程を試験管内で再現できると考えている。

(5) 複製開始に必須の新規タンパク質因子 Psl3 の機能解析

pre-RC 形成以降の複製開始に至る過程を明らかにするために、MCM や Cdc45 と相互作用する新規因子 Sld3 の分裂酵母ホモログ *psl3* (*S. pombe* of SLD3) を分離し、機能解析を行った。Psl3 は複製開始に必須であり、pre-RC 形成に依存して MCM と相互作用し複製開始点に局在することを示した。温度感受性変異株の解析から Psl3 は Cdc45 を染色体に結合させる機能を持つと同時に、複製伸長反応にも必要であることを見いだした。

5. 自己評価

高等動物の複製開始点に類似性を示す分裂酵母複製開始点の必須構造を明らかにし、さらにその認識機構を解明できたことに満足を感じている。さらに ORC と MCM が複製開始点上の異なる部位に順次結合するという結果を得たことは、分裂酵母解析系のモデルとしての有用性を示せたといえる。しかしながら、ORC 結合反応以降の試験管内反応系の開発は予想された以上に難航し、ようやく道具立てが完了した段階である。変異株を用いて複製開始前の段階で細胞周期を操作する条件を設定し、細胞内から DNA-タンパク質複合体を分離できる手法を確立したことにより、複製前複合体形成、S期シグナルによる複合体の構造と活性の制御機構を解明できる展望が開けた。

6. 領域総括の見解

染色体 DNA の複製は高度に制御されており、その全貌を明らかにすることは生命現象の根幹を理解することである。そこで、単細胞の分裂酵母をモデルに、試験管内での開始制御の再現を目指して、染色体 DNA 上の複製開始領域、また複製開始因子(ORC)とそこに働く各種タンパク質因子を検索し、DNA 複製に必要と思われる基本的諸因子の検出とそれらの作用点の理解に顕著な進歩を見せている。さらにこの間、様々な手法を案出していることから、近い将来に大きな発展が期待される。

7. 主な論文

Takahashi, T. and Masukata, H. Interaction of fission yeast ORC with essential adenine/thymine

stretches in the replication origins. (投稿中).

Ogawa, Y., Takahashi, T. and Masukata, H. (1999). Association of fission yeast Orp1 and Mcm6 proteins with chromosomal replication origins. *Mol. Cell. Biol.* *19*, 7228–7236.

Okuno, Y., Satoh, H., Sekiguchi, M. and Masukata, H. (1999). Clustered adenine/thymine stretches are essential for the function of a fission yeast replication origin. *Mol. Cell. Biol.* *19*, 6699–6709.

Ogawa, Y., Okazaki, T. and Masukata, H. (1998). Association of autonomous replication activity with replication origins in a human chromosome. *Exp. Cell Res.* *243*, 50–58.

Obuse, C., Okazaki, T. and Masukata, H. (1998). Interaction of transcription factor YY1 with a replication-enhancing element, REE1, in an autonomously replicating human chromosome fragment. *Nucle. Acids Res.* *26*, 2392–2397.

8. その他

招待講演 10 件、うち 国外5件、国内5件

研究課題別研究評価

1. 研究課題:ウナギが解き明かす精子形成の謎

2. 研究者名:三浦 猛

3. 研究のねらい

精子形成は、種の連続性を維持する上で必要不可欠であるが、その制御機構の詳細は、意外と明らかとなっていない。ウナギは、試験管内でホルモン処理により人為的に精子形成の全過程を誘導できる唯一の脊椎動物であることから、精子形成の制御機構を調べる上で優れた実験動物と判断される。本研究は、このウナギを実験材料として、謎の多い精子形成制御の分子機構の解明を目指した。

4. 研究成果と自己評価

ウナギの精子形成の進行過程は、①精原幹細胞再生分裂期、②精原細胞増殖期、③減数分裂期、④精子変態期、⑤精子成熟期の5期に分けることができる。このうち②から④の過程は、雄性ホルモンである11-ケトテストステロン(11-KT)、⑤の過程は黄体ホルモンである $17\alpha,20\beta$ -ジヒドロキシ-4-プレグネン-3-オン($17\alpha,20\beta$ -DP)によって制御されていることを以前明らかにした。本研究では更に、①の過程が雌性ホルモンであるエストラジオール- 17β (E2)によって制御されていることなどを明らかにした。

このような精子形成への性ステロイドの作用は、これらのレセプターが存在するセルトリ細胞(生殖細胞を取り囲む唯一の体細胞)での何らかの物質産生を介すると考えられる。この性ステロイド以降の制御に関わる因子(ウナギ精子形成関連因子:eSRS)は、精子形成の各過程で、或いは、性ステロイドの刺激によって、精巣での発現が変化するものと考えられる。そこで、その様な因子をコードするcDNAのクローニングを試みたところ、eSRSの候補となる35種類のcDNAクローンを得た。次いで、これらのうち精子形成の制御に関わると予想されるものの機能解析を試みた。

E2の下流で精原幹細胞の再生分裂の制御に関わると考えられるのが、血管新生因子の一種であるPD-ECGFの相同物質と考えられるeSRS34である。eSRS34はE2の刺激により精巣での発現が誘導され、さらにヒトの組換え体であるrhPD-ECGFは、生体外精巣器官培養系で、精原幹細胞の増殖誘導能を有していた。今後この仮説を証明するために、更に詳細な解析を行っていく予定である。

11-KTの下流で、減数分裂へ向けての精原細胞の増殖分裂の開始に関わると考えられるのが、eSRS1とeSRS21の2種類である。アクチビンBの相同物質であるeSRS1の発現は、精原細胞増殖開始と同時に11-KTの刺激によりセルトリ細胞で誘導される。eSRS1の組換え体タンパクを作製し、それを精巣器官培養系に添加して、eSRS1の精子形成に対する作用を解析したところ、本因子は精原細胞の増殖能を有していた。しかし、eSRS1のみの添加では、減数分裂以降の精子形成過程を誘導できなかった。このことより、ウナギではeSRS1が精原細胞の増殖を誘導する因子であることがほぼ明らかとなったが、減数分裂以降の制御に関してはeSRS1以外の因子の存在が必要であると考えられた。今後、この減数分裂開始の制御に関わる因子の検索を行う予定である。一方、eSRS21は、精原細胞増殖開始前のセルトリ細胞で発現し、増殖開始後、11-KTの刺激によ

って直ちにその発現が消失する。eSRS21 の組換え体タンパクを作製し、それを精巣器官培養に添加し、同因子の精子形成への作用を検討したところ、eSRS21 は 11-KT が持つ精原細胞増殖能を有意に抑制した。これは、eSRS21 が、その精子形成の進行を抑える機構の一翼を担う因子である可能性を示している。

変態した精子が運動能を持つ成熟精子になる過程は、精子成熟期の血中に認められる $17\alpha,20\beta$ -DP によって制御されている。この $17\alpha,20\beta$ -DP の精子成熟に対する作用は、精子に対し直接ではなく、輸精管内の精漿 pH 値の上昇を介している。本研究で、体液の pH 制御に関わる重碳酸塩緩衝系の主要な酵素、カルボニックアンヒドラーゼ II (CA II) のホモログ eSRS22 を得ることができた。eSRS22 タンパクは、 $17\alpha,20\beta$ -DP 受容体が存在する精子膜で発現していた。もし、精子に存在する eSRS22 が精漿 pH 値の上昇に関与し、精子成熟に関わるのであれば、精子成熟誘起能を持つ $17\alpha,20\beta$ -DP と eSRS22/CA II の活性との間に何らかの相関があるものと考えられる。そこで、ウナギ精子での、 $17\alpha,20\beta$ -DP と eSRS22/CA II の活性との関係を生体外で調べたところ、 $17\alpha,20\beta$ -DP は精子に作用し精漿 pH 値を有意に上昇させた。この結果より、eSRS22/CA II は精子成熟に関わる重要な酵素であることが明らかとなり、精子成熟の制御機構の一端が解明された。

本研究により、ウナギを精子形成の制御機構を調べるための実験モデルとして活用できるだけの道具立てが揃った。今後更に、ウナギを用いて精子形成の解析を進めていけば、その成果は、単に魚類だけに止まらず、生物における精子形成制御の全貌の解明に一役買うであろう。またこのような基礎研究の成果は、将来的には有用生物資源や絶滅が危惧されている希少種の繁殖技術の確立等、応用面においても貢献できるものと期待している。

5. 領域総括の見解

本研究は、試験管内で精子形成が誘導可能なウナギに着目して、脊椎動物の精子形成機構の解明を狙った本研究者の独創によるものである。本期間の研究では、既知の性ステロイドホルモンの機能と精子形成諸過程の変化を手掛かりに、新しい諸因子の発見と機能の解明に努め、雌性ホルモンのエストラジオール- 17β が精巣で精原幹細胞の増殖誘導因子を誘導発現すること、精原細胞の増殖を促進する雄性ホルモン 11-ケトテストステロンの機能を抑制する新因子の発見、pH 制御因子のカルボニックアンヒドラーゼ II が精子成熟に深く関ることなど、多くの知見をもたらしている。この努力は動物繁殖技術の発展に大きく寄与すると期待する。

6. 主な論文

Miura, T., Kudo, N., Miura, C., Yamauchi, K., and Nagahama, Y. (1998). Two testicular cDNA clones suppressed by gonadotropin stimulation exhibit ZP2- and ZP3-like structures in Japanese eel. *Mol. Reprod. Dev.* 51, 235-242.

Miura, C., Miura, T., Kudo, N., Yamashita, M., and Yamauchi, K. (1999). cDNA cloning of a stage specific gene expressed during HCG-induced spermatogenesis in the Japanese eel. *Dev. Growth. Differ.* 41, 463-471.

Nader, M. R., Miura, T., Ando, N., Miura, C., and Yamauchi, K. (1999). Recombinant human insulin-like growth factor I stimulates all stages of 11-ketotestosterone induced spermatogenesis in the testis

of the Japanese eel *Anguilla japonica*, *in vitro*. *Biol. Reprod.* *61*, 944–947.

Miura, T., Miura, C., Ohta, T., Nader, M. R., Todo, T., and Yamauchi, K.(1999). Estradiol-17 β stimulates the renewal of spermatogonial stem cells in males. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *264*, 230–234.

Miura, T. (1999). Spermatogenetic cycle in fish. In *Encyclopedia of Reproduction* vol.4.. E. Knobil and J. D. Neill, eds. (San Diego: Academic Press), pp. 571–578.

7. その他

招待講演 国内 4 件

研究課題別研究評価

1. 研究課題: 脊髄ニューロンにおける痛み信号の処理機構

2. 研究者名: 靱山明子

3. 研究のねらい

脊髄のニューロンが、どのような機構で痛み信号を処理しているのかという疑問に対して、ニューロンが発生する電気信号を中心に解析を行なった。そのため痛み信号伝達ニューロンを同定して記録できる実験系として、脊髄のスライス標本からのパッチクランプ記録法を確立することを目指した。そして信号伝達に関与する受容体チャネル特性、シナプス応答、ニューロン固有の特性、シナプスネットワークの解明を目指した実験を順次行った。

4. 研究成果と自己評価

(1) 成熟脊髄スライス標本からのパッチクランプ記録と受容体電流の解析

すでに幼若動物の脊髄のスライス標本からのパッチクランプ解析はなされてきたが、成熟動物におけるデータを得ることはより重要と考えた。特に成熟動物では、信号伝達に関与する受容体チャネル特性については全く知られていなかった。さまざまな種類の受容体チャネルのなかで、歴史的に痛みと関連づけて捉えられてきたのが、興奮性トランスミッター受容体の一種である N-メチル-D-アスパラギン酸 (NMDA) 受容体であった。そこで成熟脊髄の痛み伝達ニューロンにどのような NMDA 受容体が存在し、機能しているのかの解明を行なった。その結果、シナプス直下とシナプス外とは NMDA 受容体の異なるサブタイプが発現していることが明らかになった。従って、急性の痛みと慢性の痛みの際に、違うサブタイプが活性化されていると示唆される。

自己評価: 成熟動物脊髄のスライス標本でのチャネル特性解析という最初の目的を達成できたことには満足できるものの、効率の良い実験系とは言えない点が今後の課題である。また、NMDA 受容体の分子自体を、機能的な側面からサブタイプと同定した点は、基礎的な研究成果としての価値があると考えている。実際に、異なるサブタイプがシナプス内外で住み分けている意味については、それぞれのサブタイプに特異的な調節機構を中心に、今後の研究を待たなければならないと思われる。

(2) 脊髄視床路ニューロンの標識と記録

脊髄スライス標本には、痛みに関与しているニューロンと、そうでないニューロンとが混在している。その中から痛みに関与するニューロンを同定する方法を確立することは、実験上必須の課題である。痛み信号を脊髄から出力して上位の中枢に発信するニューロンは、視床に神経の突起(軸索)を伸ばして、脊髄視床路と呼ばれる痛み信号の伝達路を形成していることが知られている。このような脊髄視床路ニューロンだけを正確に同定し、その活動を解析できる実験系を確立した。すなわち、視床に蛍光色素をあらかじめ注入しておく、数日後には逆行性輸送によって脊髄内に位置する脊髄視床路ニューロンの細胞体が染まっているのが観察される。比較的幼若な動物を用いてであるが、この色素標識されたニューロンから電気信号を記録することができるようになった。その基本的性質のひとつとして、膜電位の過分極により活性化されるチャネル(hyperpolarization-activated channel、または H-チャネル)が発現していることがわかった。この

H-チャンネルは活性化されると、膜電位を反対に脱分極側に引き戻す働きがある。そこで過分極を引き起こす抑制性シナプス入力を刺激すると、それによって脊髄視床路ニューロンの H-チャンネルが活性化され、脱分極を誘発する結果として活動電位の発生を引き起こすことが分った。いいかえれば、興奮性ではなく抑制性のシナプス入力、結果としてはニューロンを興奮させることが分ったのである。また、抑制性シナプス入力は、痛み線維の支配をうけて発生することも明らかになった。

自己評価: 確実に脊髄の痛み信号出力ニューロンを同定して記録できるようになったことは、痛み研究には重要な点であると思う。上記の成果は、痛み入力線維－抑制性介在ニューロン－脊髄視床路ニューロン－視床、というニューロンネットワークの存在を強く示唆しているので、今後さらにこのネットワークを解剖学的にも同定したい。抑制性シナプス入力によっても、痛み信号が発信できることは意外な発見であったが、興奮性シナプス入力による痛み信号の発生の仕方とどう異なるのか、今後さらに詳しい解析が必要である。

5. 領域総括の見解

脊髄ニューロンでの知覚情報伝達機構の解明を目指して、その発生する電気信号をパッチクランプ法によって追跡する方法の開発を行っている。その過程で、これまで未知であった成熟脊髄において、痛み伝達物質 NMDA の受容体が場所により異なることを見出している。また、痛み信号を脊髄から中枢に伝える脊髄視床路が視床にまで軸索を伸ばしている。この脊髄視床路ニューロンだけに注目して、その動きを見ることのできる実験系を、視床に蛍光色素を注入して標識する方法により確立している。本研究者の努力はこれら実験法の確立に向けられてきた。その熟練した技法による今後の解明的研究を期待する。

6. 主な発表論文

Momiyama, A. (2000). Distinct synaptic and extrasynaptic NMDA receptors identified in dorsal horn neurons of the adult rat spinal cord. *J. Physiol.* 523, 621-628 .

Iwasaki, S., Momiyama, A., Uchitel, O.D., and Takahashi, T. (2000). Developmental changes in calcium channel types mediating central synaptic transmission. *J. Neurosci.* 20, 59-65.

朧山明子 (1998). 「受容体の電流測定」脳・神経研究の進め方 p.139-147 羊土社

朧山明子 (1999). 「成熟脊髄ニューロンの NMDA 受容体」ブレインサイエンスレビュー p.53-67
医学書院

朧山明子 (2000). 「電気生理学的手法」脳神経科学イラストレイテッド p.314-321 羊土社

7. その他

招待講演、受賞、特許出願なし