

「情報と細胞機能」研究領域 領域活動・評価報告書

- 平成 16 年度終了研究課題 -

研究総括 関谷 剛男

1. 研究領域の概要

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

2. 研究課題・研究者名

別紙一覧表参照

3. 選考方針

選考の基本的な考えは下記の通り。

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

4. 選考の経緯

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

選 考	書類選考 *	面接選考	採用者
対象者数	175 名	27 名	13 名

* 1 応募課題につき領域アドバイザー2 名が書類審査を行った。

5. 研究実施期間

平成 13 年 12 月～平成 17 年 3 月

6. 領域の活動状況

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

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

7. 評価の手続き

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

(評価の流れ)

平成 17 年 1 月	研究報告会(公開)開催
平成 17 年 3 月	研究期間終了
平成 17 年 3 月	研究報告書及び研究課題別評価の提出
平成 17 年 4 月	研究総括による評価

8. 評価項目

- (1) 課題研究目標の達成
- (2) 新事実の発見、解明、新技術の創成
- (3) 外部発表(論文、口頭発表等)、特許等の公表研究成果

9. 研究結果

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

本領域一期生 13 名は 3 年間の研究を順調に推進し、着実な成果をあげ、将来に向かっての研究基盤を固めたと考える。これらの研究成果は、生命科学および関連分野に大きなインパクトを与えるものとする。なお、研究成果と研究目標に対する達成度等は以下の個々の研究者による研究成果報告、自己評価および領域アドバイザーの評価を加味した研究総括の見解の通りである。

10. 評価者

研究総括 関谷 剛男 三菱化学生命科学研究所 所長

領域アドバイザー氏名(五十音順)

菊谷 仁	大阪大学微生物病研究所 教授
渋谷 正史	東京大学医科学研究所 教授
下遠野 邦忠	京都大学ウイルス研究所 所長 兼 教授
中島 元夫	(株)ノバルティスファーマ 主幹研究員
野田 哲生	東北大学大学院医学研究科 教授
半田 宏	東京工業大学大学院生命理工学科 教授
古市 泰宏	(株)ジーンケア研究所 所長
若林 敬二	国立がんセンター研究所 副所長

(参考)

(1) 外部発表件数

	国 内	国 際	計
論 文	2	62	64
口 頭	85	33	118
その他	32	4	36
合 計	119	99	218

平成 17 年 3 月現在

(2) 特許出願件数

国 内	国 際	計
10	1	11

(3) 受賞等

・阿部 高明

日本薬物動態学会 奨励賞 (H15)

病態代謝研究会 研究所奨励賞 (H16)

日本内分泌学会 奨励賞 (H17)

・武川 睦寛

日本癌学会 奨励賞 (H15)

・吉田 秀郎

日本生化学 奨励賞 (H15)

(4) 招待講演

国際 10 件

国内 22 件

別紙

「情報と細胞機能」領域 研究課題名および研究者氏名

研究者氏名 (参加形態)	研究課題名 (研究実施場所)	現職 (応募時所属)	研究費 (百万円)
芦高 恵美子 (兼任)	1 分子からの定量的解析によるシナプス活性化機構の解明 (関西医科大学医化学講座)	関西医科大学医化学講座 講師 (同上)	42
阿部 高明 (兼任)	有機アニオントランスポーター遺伝子群の機能解明と制がん剤デリバリーへの応用 (東北大学医学部)	東北大学医学部附属病院 講師 (東北大学医学部 講師)	42
大場 雄介 (兼任)	生きたマウスにおけるがん遺伝子産物活性化の観察 (東京大学大学院医学系研究科)	東京大学大学院医学系研究科 助手 (大阪大学微生物病研究所 助手)	45
小坂 仁 (兼任)	神経難病におけるタンパク質リフォールディング・分解能検出系の構築 (神奈川県立こども医療センター)	神奈川県立こども医療センター 神経内科長 (国立精神神経センター 外来研究員)	42
角谷 寛 (兼任)	睡眠時呼吸障害と痴呆との関係解明 (京都大学大学院医学研究科)	京都大学大学院医学研究科 助教授 (京都大学医学部 研修員)	41
亀井 康富 (専任)	核内受容体コファクターによる脂肪形成の制御 (国立健康・栄養研究所)	(独)科学技術振興機構 さきがけ研究者 (大阪バイオサイエンス研究所 研究員)	43
後藤 聡 (兼任)	ゴルジ体の多様性とその生理学的意義の解明 (三菱化学生命科学研究所)	三菱化学生命科学研究所 グループリーダー (国立遺伝学研究所 助手)	50
佐々木 雄彦 (兼任)	疾病の発症、進行におけるリン脂質因子の生体内動態解析 (秋田大学医学部)	秋田大学医学部 教授 (東京都臨床医学総合研究所 研究員)	55
武川 睦寛 (兼任)	環境ストレスに応答する細胞内情報伝達機構の解明 (東京大学医科学研究所)	東京大学医科学研究所 助教授 (東京大学医科学研究所 助手)	43
門叶 冬樹 (兼任)	新素材キャピラリーガス検出器による細胞機能解析 (山形大学理学部)	山形大学理学部物理学教室 助手 (同上)	32
中田 和人 (兼任)	ミトコンドリア病の病態発現機構の解明と遺伝子治療法の探索 (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 助教授 (筑波大学生物科学系 講師)	42

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)
山口 雄輝 (兼任)	転写伸長反応の制御を介した細胞機能発現機構の解明 (東京工業大学大学院生命理工学部)	東京工業大学大学院生命理工学研究科 助手 (バイオテクノロジー開発技術研究組合 博士研究員)	30
吉田 秀郎 (兼任)	センサー型転写因子とセンサー型RNaseによる生体防御ネットワークの解明 (京都大学大学院理学研究科)	京都大学大学院理学研究科生物物理学教室 助教授 (京都大学大学院生命科学研究科 研修員)	50

研究課題別評価

1 研究課題名: 一分子からの定量的解析によるシナプス活性化機構の解明

2 研究者氏名: 芦高 恵美子

3 研究の狙い:

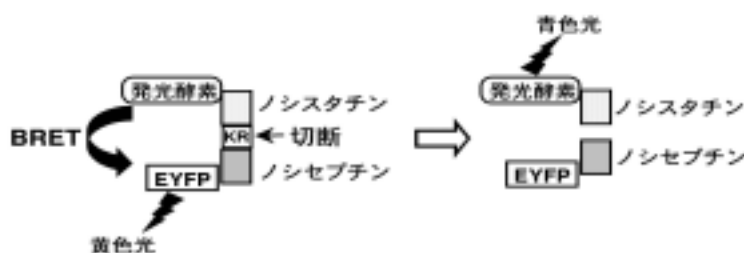
痛みは生体警告反応としての生理的機能を担う一方、がん末期の激痛や脊髄損傷に伴う神経因性疼痛などは、痛み自身が有害な病態をもたらす。我々は、同一前駆体タンパク質に隣り合わせに存在し、痛覚伝達において相反する作用を示す神経ペプチド、ノシセプチンとノシスタチンを見出した。ノシセプチンは、オピオイド受容体類縁体の内因性リガンドで、オピオイドペプチドと相同性を有しているが、従来のオピオイドペプチドが鎮痛作用を示すのとは対照的に、触覚刺激などの非侵害性刺激による痛覚反応(アロディニア)や熱刺激による痛覚過敏反応を誘導することを明らかにしてきた。一方ノシスタチンは、同じ前駆体より切り出され、ノシセプチンによる痛覚反応を抑制するペプチドであることを発見した。同一前駆体に存在するペプチドが相反する作用を示すのは初めての報告である。また、疼痛制御のみならず記憶、学習や食欲の制御においてもこれらのペプチドの相反する作用が認められている。この制御機構としては、シナプスにおけるペプチドの産生、遊離および受容体との結合が重要な鍵を担っていると考えられる。本研究においては、ノシセプチンとノシスタチンの生物活性をモデルとしたシナプスの活性化機構の解明を目的とする。

4 研究成果:

(1) ノシセプチンとノシスタチンの産生・遊離機構

(i) プロセッシングモニター系の確立

神経ペプチドは、前駆体タンパク質として合成され、その後プロセッシングや糖鎖付加等の翻訳後修飾を受け成熟ペプチドとなる。ペプチド産生機構である前駆体タンパク質からのプロセッシングは、これまで生化学的な解析や無細胞系における解析であった。本研究においては、プロセッシングを細胞外で定量的にモニターできる分泌型プローブによる一分子内 Bioluminescence resonance energy transfer (BRET)システムを開発した。分泌型発光酵素 (*Vargulla luciferase*) は、460 nm に発光スペクトルのピークを示し、蛍光タンパク質(EYFP)との融合タンパク質では、460 nm に加え 525 nm のピークを示し、この 525 nm のピークは YFP の蛍光スペクトルと一致していたことより、BRET が生じていることが確認できた。また、525 nm / 460 nm の比は 1.00 であり、従来型の BRET パートナーである *Renilla luciferase* と GFP が DeepBlueC を基質とした場合 (0.14) に比べ、BRET 効率において優れていた。さらに、(分泌型発光酵素)-(ノシスタチン-Lys(K)Arg(R)-ノシセプチン)-(EYFP)の融合タンパク質の遺伝子ベクターをデザインし、細胞に導入した。この融合タンパク質は、ノシスタチンとノシセプチンがプロセッシングされない場合は、発光酵素の光は BRET により、EYFP が励起され 525nm の黄色光を発したが、プロセッシングされた場合、発光酵素自体の 460 nm の青色光を発した(下図)。



しかも、分泌型発光酵素を用いたことで、分泌経路を介するタンパク質のプロセッシングの細胞外でのモニターが可能になり、かつ細胞を破壊することなく培地を連続的に分取し、発色光を指標にペプチドのプロセッシング過程のリアルタイムな追跡が可能となった。また、BRET の効率とプロセッシング量の変化は非常に強く相関していたことより、タンパク質プロセッシングの定量的モニターに適用できるものである(*Anal. Biochem.* 329, 230-237, 2004; 国内特許出願[特許出願番号 2002-360744]; PCT 出願審査中)。今後、BRET 測定による神経刺激に応答する神経ペプチド産生、遊離の定量化と細胞の膜電位や細胞内 Ca^{2+} 動態との同時イメージングにより、二次元的なシナプスの活性化機構の解明が可能になると考えられる。

(ii) プロセッシング酵素の同定および分泌機構

確立したシステムを用い、ノシセプチンとノシスタチンの産生に関与するプロセッシングに、少なくともプロセッシング酵素のproprotein convertase (PC)1、PC2およびfurinが関与していることを明らかにした。内因性にfurinを発現している細胞に、PC1およびPC2を発現させると、ノシセプチンはデンスコア小胞に認められた。一方、ノシスタチンは、PC2発現細胞では、デンスコア小胞に存在するのに対し、PC1発現細胞においては、未熟なデンスコア小胞さらに微小な小胞に存在していることが認められた。ノシスタチンは、PC1発現により恒常的分泌経路を、PC2発現により調節的分泌経路を介して分泌された。また、炎症性の痛覚モデルマウスにおいて、脊髄後角においてfurinとPC2が顕著に上昇する興味深い結果が得られた。このことは、プロセッシング酵素の誘導により、ノシスタチンの産生や分泌経路が異なり、ノシセプチンの痛覚発症が制御されている可能性が示唆された(論文発表準備中)。

(iii) ペプチドの遊離に関するシナプス活性化および痛覚発症機構

ノシセプチンは、用量、動物種、投与方法により疼痛と鎮痛の両方の作用が報告されてきた。そこで、新規ノシセプチン受容体拮抗薬 JTC-801 を用い、痛覚反応における受容体の関与を明らかにした。マウス脊髄腔内投与による低用量のノシセプチンによる痛覚過敏反応、アロディニア、炎症性疼痛モデルのホルマリン試験による痛覚反応は、JTC-801 によって抑制効果を示し受容体を介していたが、ノシセプチンの高濃度による鎮痛作用に対しては効果を示さなかった。(*J. Pharmacol. Exp. Ther.* 303, 424-430, 2002)。また、L5 脊髄神経損傷に伴う神経因性疼痛においても、JTC-801 は、神経型一酸化窒素合成酵素を介した一酸化窒素の産生抑制により鎮痛効果を示すことを明らかにした(*Eur. J. Neurosci.* 17, 1384-1392, 2003)。JTC-801 は、ノシセプチンによる痛覚反応のみならずプロスタグランジン(PG) E_2 に対するアロディニアに対しても抑制効果を示した。さらに、ノシセプチン受容体欠損マウスにおいて、ノシセプチンおよび PGE_2 によるアロディニアが認められず、ノシスタチンも、ノシセプチンのみならず PGE_2 による痛覚反応に対して抑制効果を示すことより、ノシセプチンと PGE_2 の痛覚発症において共通の伝達経路や神経回路網の関与が示唆された。PG 産生阻害薬によって、ノシセプチンによるアロディニアは抑制されなかったことより、 PGE_2 がノシセプチンの痛覚伝達経路の上流に位置すると考えられたので、 PGE_2 のノシセプチンの遊離に対する効果を検討した。脊髄スライスにおいて、 PGE_2 は、 EP_4 受容体を介してノシセプチンの遊離を引き起こし、ノシセプチン前駆体タンパク質欠損マウスにおいて PGE_2 のアロディニアは消失した。以上の結果より、 PGE_2 によるアロディニアは、 EP_4 受容体を介したノシセプチンの遊離を介していることが示唆された(論文投稿中)。これまで、ノシセプチンによるアロディニアは、一次求心性線維の C 線維を介し、そのシナプス終末から遊離される興奮性神経伝達物質グルタミン酸の受容体である NR2A サブタイプを含む NMDA 受容体の活性化や、抑制性神経伝達物質グリシンの脱抑制によって発症することを報告しているが、今回の結果を総合的に考えると、脊髄後角におけるシナプス伝達機構が下図のように推定される。一方、ノシスタチンは PGE_2 により遊離されないが、 PGE_2 による痛覚反応に対して抑制効果を示すことより、グルタミン酸やノシセプチンの

ノシセプチン受容体はオピオイド受容体と相同性を示す7回膜貫通型 GTP 結合受容体であるが、ノシスタチンはノシセプチン受容体には結合せず、ノシスタチン自身の受容体の存在が示唆された。ノシスタチン受容体のクローニングをタンパク質精製からのアプローチにより行うため、光アフィニティー修飾ノシスタチン誘導体およびノシスタチン結合ピーズを用いた精製を行った。マウス脊髄膜画分において、光アフィニティー修飾ノシスタチン誘導体により約 33 kDa の結合タンパク質が認められた。このタンパク質は細胞膜のラフト画分に存在したが、GTP γ S の処理により消失したことより、GTPase ファミリーの膜タンパク質である可能性が示唆された。さらに、ノシスタチン結合ピーズによっても分子量の異なるノシスタチン結合タンパク質が認められた。

5 自己評価:

6 研究総括の見解:

- 318 -

れるノシセプチンとノシスタチンの動態解析を可能にしたBRET解析法の開発と、それを駆使した前駆体タンパク質のプロセッシングに関わる酵素類の同定、ノシセプチンの遊離とその受容体を介した痛覚反応の亢進へのシグナル伝達系、ノシスタチンによるその受容体を介した痛覚反応の抑制などノシセプチン、ノシスタチンを中心とする痛覚反応ワールドの多くの部分を明らかにしたことは、さきがけ研究の優れた成果と考える。惜しむらくは、ノシスタチン受容体の解明と抑制シグナル伝達系に未解明部分が残ったことである。今後の更なる研究での全貌解明を期待する。

7 主な論文等：

主な論文

1. Muratani, T., Minami, T., Enomoto, U., Sakai, M., Okuda-Ashitaka, E., Kiyokane, K., Mori, H. and Ito, S.: Characterization of nociceptin / orphanin FQ-induced pain responses by the novel receptor antagonist JTC-801. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 303: 424-430.(2002)
2. Mabuchi, T., Matsumura, S., Okuda-Ashitaka, E., Kitano, T., Kojima, H., Nagano, T., Minami, T. and Ito, S.: Attenuation of neuropathic pain by nociceptin/orphanin FQ antagonist is mediated by inhibition of nitric oxide production. *Eur. J. Neurosci.* 17: 1384-1392.(2003)
3. Otsuji, T., Okuda-Ashitaka, E., Kojima, S., Akiyama, H., Ito, S. and Ohmiya, Y.: Monitoring for dynamic biological processing by intra-molecular bioluminescence resonance energy transfer system using secreted luciferase. *Anal. Biochem.* 329: 230-237.(2004)
4. Okuda-Ashitaka, E., Minami, T., Matsumura, S., Takeshima, H., Reinscheid, R. K., Civelli, O. and Ito, S.: Mediation by the opioid peptide nociceptin/orphanin FQ of prostaglandin E₂-induced allodynia, tactile pain associated with nerve injury. (submitted.)

著書・総説

1. 芦高恵美子、伊藤誠二：ノシセプチン。痛み-基礎・診断・治療-（編集：花岡一雄、朝倉書店）37-40. (2003)
2. Zeilhofer, H. U., Reinscheid, R. K. and Okuda-Ashitaka, E.: Nociceptin, Nocistatin and Pain. Progress in Pain Research and Management. *International Association for the Study of Pain, IASP press*, 24: 469-480. (2003)
3. 芦高恵美子、伊藤誠二：痛みシグナルの制御機構と最新治療エビデンス、ノシセプチンの疼痛制御。医学のあゆみ 211: 375-379. (2004)

特許

特願 2002-360744 蛋白質のプロセッシングを測定するためのモニター蛋白質。

招待講演

1. Okuda-Ashitaka, E., Minami, T., and Ito, S.: Molecular approaches to nocistatin signaling. The 10th World Congress on Pain (2002, San Diego, USA)
2. Okuda-Ashitaka, E., Otsuji, T., Ito, S., and Ohmiya, Y.: A novel intra-molecular bioluminescence resonance energy transfer (BRET) for dynamic biological processing. The 31th Annual meeting of the American Society of Photobiology (2003, Baltimore, USA)
3. 芦高恵美子、尾辻智美、近江谷克裕、伊藤誠二：A novel intra-molecular bioluminescence

resonance energy transfer (BRET) for monitoring the processing of prepronociceptin/orphanin FQ. 第 76 回日本生化学会大会 (2003、横浜)

4. 芦高恵美子、尾辻智美、近江谷克裕、伊藤誠二：新規一分子内 BRET を用いたノシセプチン/オーファニン FQ 前駆体のプロセッシング機構の解析。第 81 回日本生理学会大会 (2004、札幌)

5. 芦高恵美子：Bioluminescence resonance energy transfer (BRET) とは？第 81 回日本生理学会大会 (2004、札幌)

6. 芦高恵美子：BRET システムの特徴と分泌型 BRET システムの可能性。第 77 回日本生化学会大会 (2003、横浜)

研究課題別評価

1 研究課題名: 有機アニオントランスポーター遺伝子群の機能解明と制がん剤デリバリーへの応用

2 研究者氏名: 阿部 高明

3 研究の狙い:

有機アニオントランスポーター遺伝子群は胆汁酸や甲状腺ホルモン、抱合型ステロイドなどの内因性化合物やジゴキシン、プラバスタチン、メトトレキセートといった薬物やオピオイドなどのペプチド化合物を輸送する蛋白質である。我々は今日までにヒトおよびラット遺伝子 15 種類以上を単離し、それまで多くの疑問があった胆汁酸、甲状腺を含めた各種ホルモン等の輸送研究を分子生物学的に明らかにした。

ヒト肝臓特異的有機アニオントランスポーター LST-1 と相同性を有する新しいクローン LST-2 は正常ではヒト肝臓のみに弱く発現しているが、胃がん、大腸がん、膵臓がんにおいて多量に発現していたこと、各種発現系の結果から LST-2 はメトトレキセートを飽和的にかつ濃度依存的に輸送すること、培養細胞への LST-2 遺伝子の導入は細胞のメトトレキセートに対する感受性を高めることから有機アニオントランスポーター遺伝子群が消化器固形がんにおいて抗がん剤に対する感受性を決定するトランスポーターであることが明らかとなった。そこで本研究では有機アニオントランスポーター遺伝子群を用いた新たながん治療法の開発を目的とした。

4 研究成果:

我々は LST-2 を発現するアデノウイルスを作製し、アデノウイルスを導入した動物細胞は効率的に各種基質を輸送することを明らかにした。さらに LST-2 を導入することによりその細胞はメトトレキセートに対する感受性が増加し、導入細胞が死にやすくなることを確認した。次にスキッドマウス皮下に移植したがん細胞に LST-2 のアデノウイルスを注入し、抗がん剤を投与したところ腫瘍細胞の著明な消退が認められ、LST-2 はがん治療に役立つことが *in vivo* レベルでも明らかとなった。そこでこのアイデアを JST より特許出願した。

また LST-2 を強制発現させた培養細胞を用いて、蛍光標識胆汁酸輸送に対する阻害力を指標として LST-2 に特異的な薬物を探し、新たな抗がん剤を探索するハイスループット検討系を確立し、製薬メーカの持つ化合物ライブラリーから LST-2 の特異基質となりうる基本薬剤の探索を開始した。更にがん細胞の質的診断に欠かせない LST-2 に対する特異的モノクローナル抗体を作製した。

LST-2 を用いた消化器固形がん特異的指向性システムの開発は、その治療に役立つのみならず、転移がんや腹膜播種巣の治療にも有効な手段となり、さらに放射性標識化を行いシンチグラフィに利用することで微小がん病巣や転移病巣の画像診断を可能にする。また LST-2 に特異的に輸送される基質に抗がん剤を結合させ、細胞内に取り込まれた段階で基質から切断され作用する様に薬物をデザインすることによって副作用の少ない治療法が開発できると考えられた。また LST-2 の細胞外部位に対するモノクローナル機能阻止抗体を作製し、スキッドマウスに移植したがん細胞に対する特異性と抗増殖作用を今後検討する予定である。

5 自己評価:

さきがけ研究期間で得られた成果により有機アニオントランスポーターががん治療に有効なツールになりうることを更に明らかにした。当初、有機アニオン系抗がん剤であるメトトレキセートを中心とした抗がん剤のスクリーニングを考えていたが、LST-1 と LST-2 を識別する抗がん剤は見つからなかった。そのためハイスループットの系を作製し、製薬会社に化合物ライブラリーの提供

あるいはスクリーニングの提案をした中で、1社が共同研究に応じてくれた。このような共同研究先をJSTが仲介するシステムを構築して頂けるとより研究が進展すると思われた。

6 研究総括の見解:

有機アニオントランスポーターLST-2遺伝子は、ヒト肝臓でのみ弱く発現しているが、すい臓がんをはじめとするヒト消化器がんで強く発現していることを見出し、がん細胞選択的に抗がん剤の導入を期待し、本研究を遂行した。LST-2遺伝子をアデノウイルスベクターで導入した動物細胞はメトトレキセートを取り込みやすく、死にやすくなり、マウス皮下に移植したLST-2遺伝子導入ヒトがん細胞の増殖が抑制されることを明らかにし、がん細胞選択的制がん剤導入によるがん治療へのユニークな方法を開発した。LST-2で特異的にトランスポートされる抗がん剤を工夫することにより、がん治療に大きく貢献するものと考えられ、さきがけ研究としてすばらしい成果を挙げたと評価する。

7 主な論文等:

論文

1. Abe, T., Suzuki, T., Unno, M., Tokui, T., Ito, S.; Thyroid hormone transporters: recent advances. *Trends in Endocrinol. Metab.* 13: 215-220. (2002)
2. Abe, T., Suzuki, T., Ito, S., Unno, M., Onogawa, T., Tokui, T.; The Human hepatocyte-specific organic anion transporter encoded by the SLC21A8 gene. *Gastroenterology* 122: 1545-1546. (2002)
3. Unno, M., Abe, T., Onogawa, T., Adachi, H., Ando, T., Ohtsuka, H., Sato, T., Katayose, Y., Suzuki, M., Matsuno, S.; Functional analysis using adenovirus-mediated over-expression of liver-specific organic anion transporter, LST-1/OATP-C/OATP2 and LST-2/OATP8. *Hepatology* 36: 1121 Part 2 Suppl. S (2002)
4. Kodawara, T., Masuda, S., Wakasugi, H., Uwai, Y., Futami, T., Saito, H., Abe, T., Inui, K.; Organic anion transporter oatp2-mediated interaction between digoxin and aminodarone in the liver. *Pharmaceutical Res.* 19: 738-43. (2002)
5. Shitara, Y., Sugiyama, D., Kusuhashi, H., Kato, Y., Abe, T., Meier, P. J., Itoh, T., Sugiyama, Y.; Comparative inhibitory effects of different compounds on rat oatp1(slc21a1)- and oatp2(slc21a5)-mediated transport. *Pharmaceutical Res.* 19: 147-153. (2002)
6. Ito, A., Yamaguchi, K., Onogawa, T., Unno, M., Suzuki, T., Nishio, T., Suzuki, T., Sasano, H., Abe, T., Tamai, M.; Distribution of organic anion-transporting polypeptide 2 (oatp2) and oatp3 in the rat retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 43: 858-863. (2002)
7. Sasaki, M., Suzuki, H., Ito, K., Abe, T., Sugitama, Y.; Transcellular transport of organic anions across a double-transfected Madin-Darby canine kidney II cell monolayer expressing both human organic anion-transporting polypeptide(OATP2/SLC21A6) and multidrug resistance-associated protein 2(MRP2/ABCC2). *J. Biol. Chem.* 277: 6497-6503. (2002)
8. Sugiyama, D., Kusuhashi, H., Shitara, Y., Abe, T., Sugiyama, Y.; Effect of 17beta-estradiol-D-17beta-glucuronide on the rat organic anion transporting polypeptide 2-mediated transport differs depending on substrates. *Drug Metab. Dispos.* 30: 220-223. (2002)
9. Kodawara, T., Masuda, S., Wakasugi, H., Uwai, Y., Futami, T., Saito, H., Abe, T., Inui, K.; Organic anion transporter oatp2-mediated interaction between digoxin and aminodarone in the rat liver. *Pharmaceutical Res.* 19: 738-743. (2002)
10. Adachi, H., Suzuki, T., Abe, M., Asano, N., Mizutani, H., Tanemoto, M., Nishio, T., Onogawa, T., Toyohara, T., Kasai, S., Satoh, F., Suzuki, M., Tokui, T., Unno, M., Shimosegawa, T., Matsuno, S.,

- Ito, S., Abe, T.; Molecular characterization of human and rat organic anion transporter OATP-D. *Am. J. Physiol.* 285: F1188-1197. (2003)
11. Hagiwara, K., Nunoki, K., Ishii, K., Abe, T., Yanagisawa, T.; Differential inhibition of the transient outward currents of Kv1.4 and Kv4.3 by endothelin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 310: 634-640. (2003)
 12. Arima, S., Kohagura, K., Xu, H.L., Sugawara, A., Abe, T., Satoh, F., Takeuchi, K., Ito, S.; Nongenomic vascular action of aldosterone in the glomerular microcirculation. *J. Am. Soc. Nephrol.* 14: 2255-2263. (2003)
 13. Ito, A., Yamaguchi, K., Tomita, H., Suzuki, T., Tohru, O., Sato, T., H., Mikkaichi, T., Nishio, T., Suzuki, T., Unno, M., Sasano, H., Abe, T., Tamai, M.; Distribution of rat organic anion transporting polypeptide-E (oatp-E) in the rat eye. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44: 4877-4884. (2003)
 14. Suzuki, T., Onogawa, T., Asano, N., Mizutamari, H., Mikkaichi, T., Tanemoto, M., Abe, M., Satoh, F., Unno, M., Nunoki, K., Suzuki, M., Hishinuma, T., Goto, J., Shimosegawa, T., Matsuno, S., Ito, S., Abe, T.; Identification and characterization of novel rat and human gonad specific organic anion transporters. *Mol. Endocrinol.* 17: 1203-1215. (2003)
 15. Ohtsuki, S., Takizawa, T., Takanaga, H., Terasaki, N., Kitazawa, T., Sasaki, S., Abe, T., Hosoya, K., Terasaki, T.; In vitro study of the functional expression of organic anion transporting polypeptide 3 at rat choroid plexus epithelial cells and its involvement in the cerebrospinal fluid-to-blood transport of estrone-3 sulfate. *Mol. Pharmacol.* 63: 532-537. (2003)
 16. Tanemoto, M., Abe, T., Obara, N., Abe, M., Satoh, F., Ito, S.; Successful treatment of severe hypertension with combination of angiotensin converting enzyme inhibitor and angiotensin II receptor blocker. *Hypertension Res.* 26: 863-868. (2003)
 17. Kusuhashi, H., He, Z., Nagata, Y., Nozaki, Y., Ito, T., Masuda, H., Meier, P. J., Abe, T., Sugiyama, Y.; Expression and functional involvement of organic anion transporting polypeptide subtype 3 (Slc21a7) in rat choroid plexus. *Pharm. Res.* 20: 720-727. (2003)
 18. Sato, K., Sugawara, J., Sato, T., Mizutamari, H., Suzuki, T., Mikkaichi, T., Ito, A., Onogawa, T., Tanemoto, M., Unno, M., Abe, T., Okamura, K.; Expression of organic anion transporting polypeptide E(OATP-E) in human placenta. *Placenta* 24: 144-148. (2003)
 19. Unno, M., Abe, T.; Similarity and dissimilarity of LST-1/OATP2/OATP-C (SLC21A6) and OATP8/LST-2 (SLC21A8). *J. Gastroenterol.* 38: 108-109, 2003
 20. Mikkaichi, T., Suzuki, T., Onogawa, T., Tanemoto, M., Mizutamari, H., Okada, M., Masuda, S., Tokui, T., Eto, N., Abe, M., Cyaki, T., Unno, M., Hishinuma, T., Inui, K., Ito, S., Goto, J., Abe, T.; Isolation and characterization of novel kidney-specific digoxin transporters. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 101: 3569-3574. (2004)

特許

1. 特願平 11-156750 肝臓に発現している新規トランスポーター遺伝子(LST-1)。
2. 特願 2002-227543 癌細胞内部への抗癌剤の選択的輸送組成物。
3. 特願 2002-228131 腎臓の薬物排泄機能に関する有機アニオントランスポーター。
4. 特願 2004-104750 新規なヒト肝特異的アニオントランスポーター、及びそれをコードする遺伝子。

受賞

平成 14 年度： ウルソ賞、
持田医学薬学振興財団研究奨励賞

平成 15 年度：	日本薬物動態学会奨励賞 東北医学会賞金賞
平成 16 年度：	三共生命科学財団研究奨励賞 病態代謝研究会研究奨励賞 宮城腎臓協会研究奨励賞
平成 17 年度	第 78 回日本内分泌学会奨励賞

研究課題別評価

1 研究課題名: 生きたマウスにおけるがん遺伝子産物活性化の観察

2 研究者氏名: 大場 雄介

3 研究の狙い:

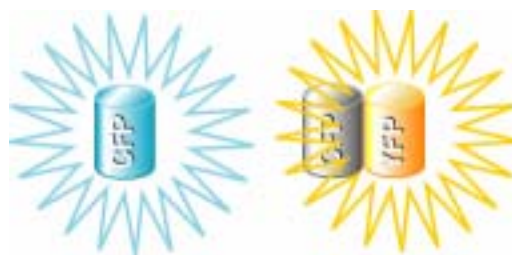
生体内において細胞の増殖、分化、物質の合成や分泌など多くの生理現象は、複雑かつ巧妙なネットワークから形成される「細胞内シグナル伝達」により制御されている。実際その破綻は癌や免疫疾患の原因となる。したがってこの複雑なネットワークは厳密に調整される必要があるが、その制御メカニズムの根幹はシグナル伝達分子の時空間的制御にあると考えられる。本研究では蛍光共鳴エネルギー移動 (Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET) の原理に基づくプローブ分子を用いた可視化技術を利用して、生きた細胞と生きた個体における分子の活性化や分子間相互作用に関する時空間的情報を得る

ことにより、細胞内シグナル伝達の時空間的ダイナミクスを解明する。また、ここから明らかになった事実をもとに、疾患の分子メカニズムと病態生理学的な細胞内シグナル伝達機構の役割についての理解を深め、難治性疾患の予防や治療に応用する未知を切り開きたい。

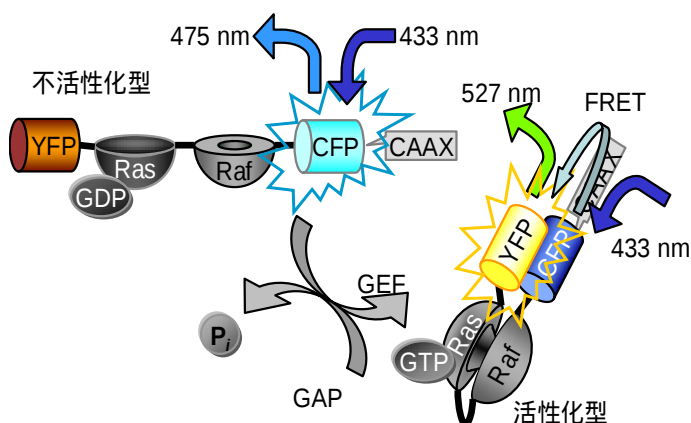
4 研究成果:

Ras 蛋白質活性化の時空間的制御機構の解析

分子内 FRET プローブ分子を利用した Ras と Rap1 の活性化モニター分子を開発・改良し、増殖因子依存性の時空間的活性化機序を解析した。アフリカミドリザル由来の Cos-1 細胞に、Ras と Rap1 の活性化プローブ分子を発現させ、上皮細胞増殖因子 (Epidermal growth factor, EGF) で刺激して活性化の局在を経時的に観察した。その結果両者共に EGF で活性化するが、活性化の強さは細胞内で均一ではなく、細胞の辺縁がより強く活性化し、中心部では低いという、勾配が存在することがわかった。そこで、この活性化の勾配の形成機序について研究を進めた。既に報告があるすべての Ras や Rap1 の活性化因子を共発現したところ、いずれの場合にも活性化の局在は変化しなかった。一方、モニター分子に変異を導入し、不活性化因子である GTP 水解促進因子 (GTPase-activating protein, GAP) への感受性を低下させたところ、活性化勾配が Ras も Rap1 ともに野生型の場合とは異なるパターンを示した。したがって、この活性化の勾配は GAP が制御していることが示唆された。実際に細胞内の GAP 活性に勾配が存在することを、画像データと反応速度論



FRET の原理 CFP 単独の時には CFP を励起すると CFP の蛍光が観察される。CFP と YFP が近接する時は CFP の励起エネルギーが YFP に遷移し、CFP の代わりに YFP の蛍光が観察される。

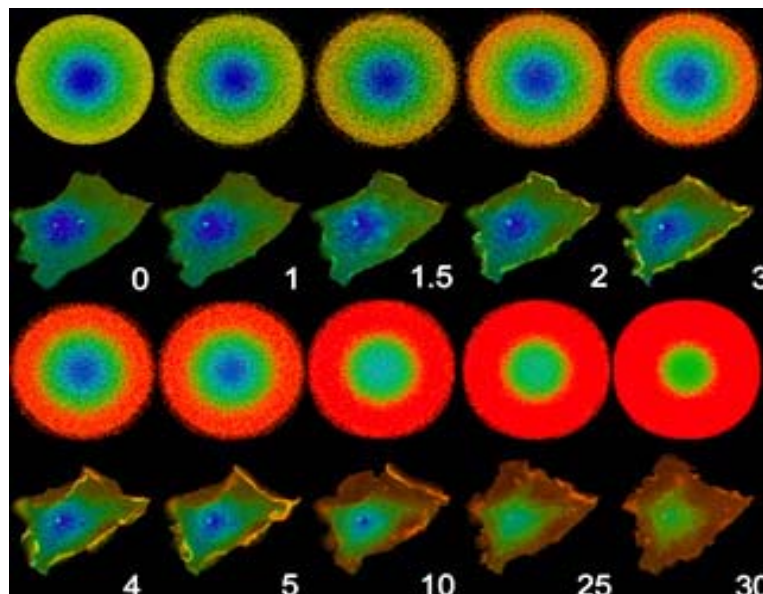


的解析の融合という新しい手法により証明した。またこの解析によって明らかになったパラメータを元に、コンピュータ上に仮想の細胞を再構成した。

生きた個体レベルでのイメージング

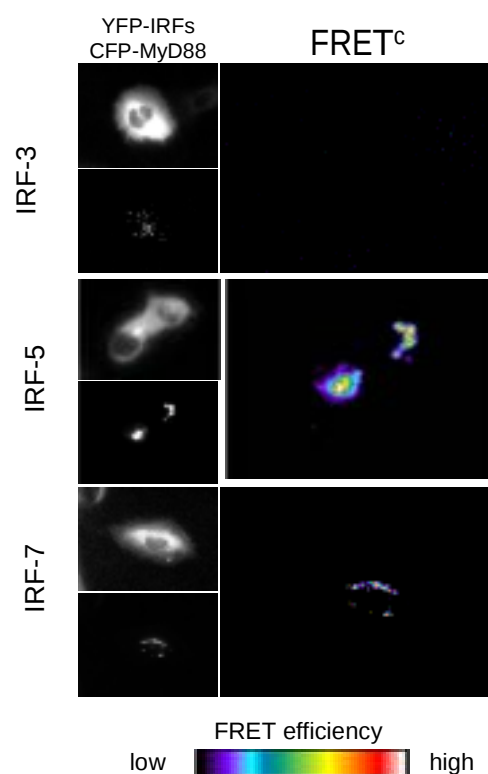
小型魚類であるゼブラフィッシュ用いて、生体内における 1 細胞レベルでのイメージングに成功した。特に原腸陥入時に見られる細胞移動時における Rho ファミリー蛋白質の活性化を観察し、Rho の活性化が発生初期胚での細胞運動に必須であること、活性と移動速度に相関があることを見出した。細胞一つに

注目した場合、Rho の活性は細胞の形態変化に伴い上昇すること、すなわち葉状に細胞膜が伸展する部位で特異的に高いことが明らかとなった。Rac の活性は細胞の進行方向で有意に高かったものの、Cdc42 の活性と細胞の形態の間には相関が認められなかった。



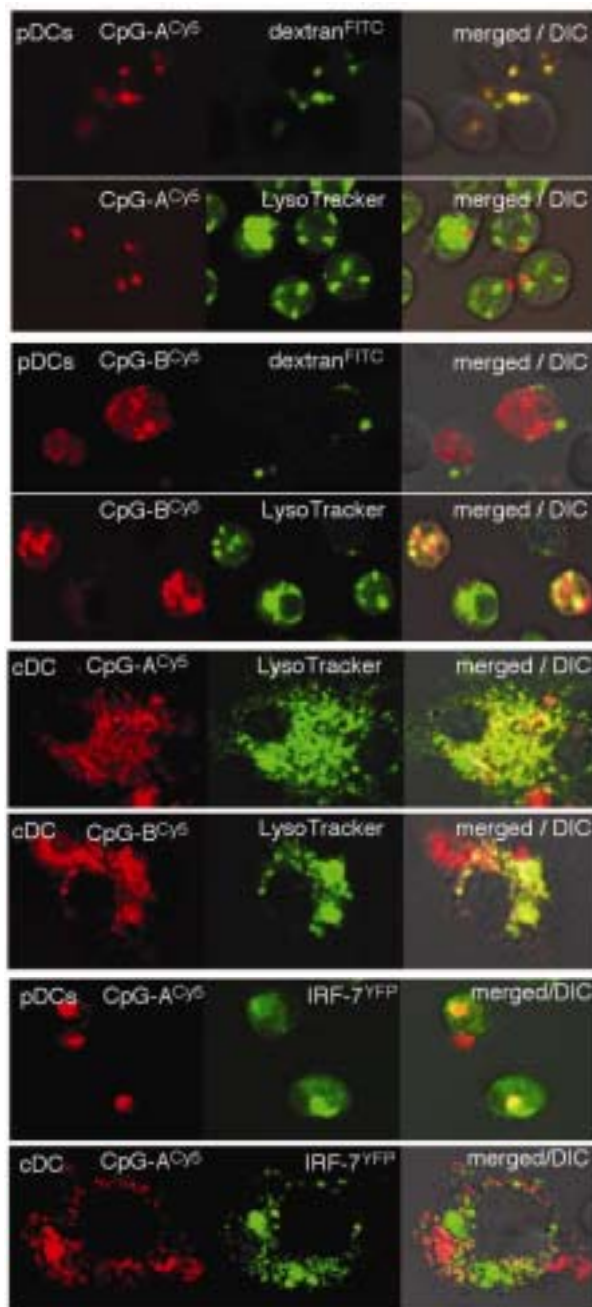
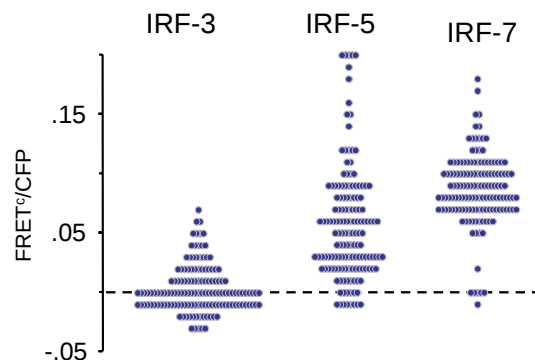
EGF 依存性の Ras 活性化の経時変化とモデル細胞

分子間 FRET を利用した免疫系シグナル伝達の時空間的解析



分子間 FRET による MyD88 と IRF ファミリー結合の可視化

分子間 FRET を利用して免疫系シグナル伝達の蛋白質間相互作用の時空間的ダイナミクスの解明を試みた。自然免疫と獲得免疫はインターフェロン (interferon, IFN) を初めとするサイトカイン産生を介してつながっている。そこで自然免疫発動に重要な Toll 様受容体 (Toll-like receptor, TLR) の下流で働くアダプター分子 MyD88 と、IFN 産生に必須の Interferon regulatory factor (IRF) ファミリーのうち、IRF-3、IRF-5、IRF-7 の相互作用に注目



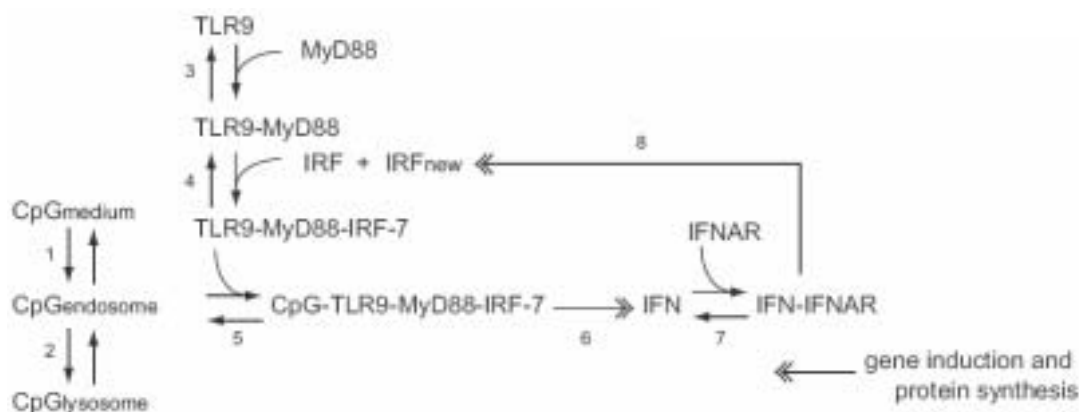
pDC と cDC における核酸とシグナル分子の局在 Dextran, LysoTracker はそれぞれエンドソームとリソソームのマーカー

した。両者に蛍光蛋白質タグをつけて培養細胞に発現させると、IRF-5 と IRF-7 のみが細胞質内の顆粒状構造をとる MyD88 と共局在し、分子間 FRET や免疫共沈法により両者の結合が確認された。IRF-5 と IRF-7 は TLR9 のリガンドである非メチル化 DNA の刺激により、MyD88 依存性に核移行し、転写活性が増加した。MyD88 に同じように結合し活性化する IRF-5 と IRF-7 が類似の機能を呈するかどうかを調べるために、IRF-5 と IRF-7 の欠損マウスを作製し、そこから樹状細胞 (dendritic cell, DC) を採取し非メチル化 DNA 刺激によるサイトカイン産生を定量した。

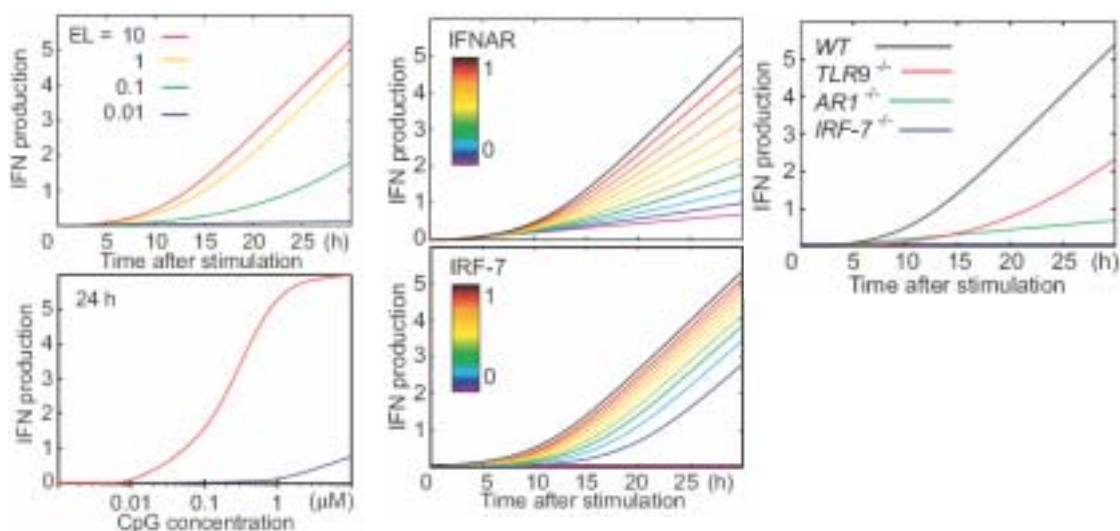
興味深いことに、IRF-5 は炎症性サイトカインの産生に、一方の IRF-7 は IFN の産生に必須であり、互いに他の産生には影響を与えなかった。実際、IRF-7 と IRF-5 は共に MyD88 が形成する顆粒状構造に共局在するものの、両者間に FRET は検出されないために、MyD88-IRF-5、MyD88-IRF-7 は別々の複合体を形成し、効率よく、かつ独立したシグナル伝達経路を担っているものと考えられた。

核酸-シグナル伝達分子の時空間制御による IFN 産生の誘導機構の解析

非メチル化 DNA 刺激した DC による IFN 産生には二つの特徴がある。一つはプラズマ細胞様 DC (plasmacytoid DC, pDC) が多量のインターフェロンを産生



エンドゾームでの DNA 刺激による IFN 産生経路の模式図



IFN 産生のシミュレーション

(左上) 核酸の局在による IFN 産生経時変化の差異 (EL=10 がエンドゾームへの局在を示す)。(左下)核酸の局在による濃度依存的な IFN の産生。(中上)IFN 受容体の発現量によるインターフェロン産生経時変化の差異。(中下) 定常状態の IRF-7 の発現量による IFN 産生経時変化の差異。(右) 各分子欠損細胞における IFN 産生の経時変化。

可能であるのに対し、通常の DC (conventional DC, cDC) からの IFN 産生はごく少量である。もう一つは非メチル化 DNA のうち、CpG-A といわれるものは多量の IFN を産生するが CpG-B はごく少量の産生に留まることである。この多量の IFN 産生は、ロックアウト細胞を用いた実験から MyD88-IRF-7 経路に完全に依存することが判明した。そこでこの産生に至る機序を探るために、蛍光分子でラベルした非メチル化 DNA の挙動を観察したところ、pDC における CpG-A のみがエンドゾームに非常に長い時間 (5 時間以上) 局在することがわかった。一方の pDC における CpG-A あるいは cDC における両者の核酸は刺激後速やかにリソソームに輸送される。このことからエンドゾームがシグナル伝達のものである、ここに核酸が長時間局在することが多量の IFN を産生する必要条件であることが示唆された。実際に pDC や他の細胞株において、MyD88-IRF-7 複合体もエンドゾームに局在する。そこで、上記の仮説を検討するために、細胞内の核酸輸送に対して人為的に変調することを試みた。ある種のカチオン性脂質は DNA と複合体を形成し、DNA を長時間エンドゾームに貯留させる効果を有することが報告されている。そこで、DNA をカチオン性脂質との複合体を形成させた後細胞に投与させたところ、cDC において CpG-A が長時間エンドゾームに

滞在した。同一条件下で IFN 産生を測定したところ、興味深いことに pDC と同程度の IFN 産生が認められた。また pDC においては CpG-A のみならず CpG-B さえもカチオン性脂質と複合体を形成させることにより、エンドゾームへの局在が観察された。この動態は CpG-B の濃度依存性があり、エンドゾームに長期停滞する場合のみ IFN の産生が認められた。以上の結果より、エンドゾームが多量の IFN 産生に帰着するためのシグナル伝達を行う場であり、そこに核酸が長期にわたって局在することが必要であることが示された。

本研究の結果はこれまで pDC が大量の IFN を産生できる理由、すなわち pDC においては定常状態の IRF-7 の発現量が高いという定説に相反するものであった。実際に定常状態の IRF-7 の発現量の違いによって IFN の大量産生に違いが起らないかどうかを検証するために、今回明らかになった経路に対してシミュレーションを行った。このモデルは得られた結果をよく反映していることを確認してある。その結果、IFN の大量産生には、刺激前の IRF-7 の発現量はあまり関係なく、むしろ IFN 受容体刺激とそれによる IRF-7 の新規産生というポジティブフィードバックが重要であることがわかった。実際に IFN 受容体欠損細胞では初期の少量の IFN 産生は認められるものの、大量産生には至らないことが実験的にも示された。また本シミュレーションの結果を通して、pDC には少なくとも二つの未知の因子が存在することが示された。

5 自己評価:

さきがけ研究期間内で得られた成果は、細胞レベルの解析については当初の目標をある程度達成し、さらに反応速度論を取り入れた解析など、予想を越えた発展をすることができた。これらの結果の一部は実際の個体内での反応を再現するものもあり、今後の発展も期待できる。実際の個体内でのイメージングは魚類ではある程度系に乗ったものの、マウスでは技術的な課題も多く、成果を発表するまでには至らなかった。さきがけ研究で得られた知見を元にさらに発展させて、今後成果として発表できるように努力したい。

6 研究総括の見解:

FRET を原理とするプローブ分子を用いた可視化技術を RAS 蛋白質の活性化の様子を培養細胞で、Rho ファミリー蛋白質の発生過程での活性化をゼブラフィシュの個体レベルで、また、培養細胞内でのインターフェロンの産生ならびにその制御の様子を可視化する成果を挙げている。当初の目的であった動物個体における分子の動態を可視化するまでには至らなかったが、今後の発展に期待する。

7 主な論文等:

論文

1. Honda, K.^{*}, Ohba, Y.^{*}, Yanai, H.^{*}, Negishi, H., Mizutani, T., Takaoka, A., Taya, C., Taniguchi, T.: MyD88-IRF-7 signalling pathway for robust type-I interferon induction is contingent on spatiotemporal regulation. *Nature*, in press (2005). [^{*}These authors contributed equally to this work]
2. Takaoka, A., Yanai, H., Kondo, S., Duncan, G., Negishi, H., Mizutani, T., Kano, S., Honda, K., Ohba, Y., Mak, T., Taniguchi, T.: Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors. *Nature*, 434(): 243-249. (2005)
3. Honda, K., Yanai, H., Mizutani, T., Negishi, X., Shimada, N., Suzuki, N., Ohba, Y., Takaoka, A., Yeh, W.C., Taniguchi, T.: Role of a transductional-transcriptional processor complex involving MyD88 and IRF-7 in Toll-like receptor signaling.. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101(43): 15416-15421. (2004)
4. Miyagi, C., Yamashita, S., Ohba, Y., Yoshizaki, H., Matsuda, M., Hirano, T.: STAT3 noncell-autonomously controls planar cell polarity during zebrafish convergence and

- extension. *J. Cell Biol.* 166(7): 975-981. (2004)
5. Yoshizaki, H., Ohba, Y., Parrini, M. C., Dulyaninova, N. G., Bresnick, A. R., Mochizuki, N., Matsuda, M.: Cell Type-specific Regulation of RhoA Activity during Cytokinesis. *J. Biol. Chem.* 279(43): 44756-44762. (2004)
 6. Takaya, A., Ohba, Y., Kurokawa, K., Matsuda, M.: RalA Activation at Nascent Lamellipodia of EGF-stimulated Cos7 cells and Migrating MDCK Cells. *Mol. Biol. Cell* 15(6): 2549-2557. (2004)
 7. Yoshizaki, H., Ohba, Y., Kurokawa, K., Itoh, R. E., Nakamura, T., Mochizuki, N., Nagashima, K., Matsuda, M.: Activity of Rho-family GTPases during cell division as visualized with FRET-based probes. *J. Cell Biol.* 162(2): 223-232. (2003)
 8. Ohba, Y., Kurokawa, K., Matsuda, M.: Mechanism of the spatio-temporal regulation of Ras and Rap1. *EMBO J.* 22(4): 859-869. (2003)

その他

1. 大場雄介, 松田道行: がん遺伝子産物 Ras の情報伝達とその可視化。生化学 76(1): 16-28. (2004)
2. 大場雄介: FRET イメージングと画像解析による細胞内情報伝達の時空間的解析。第 1 回 Live Cell Imaging 研究会 (2004; 東京)
3. 大場雄介: FRET を用いた細胞内情報伝達のイメージング。第 26 回日本分子生物学会 (2003; 神戸)
4. Y. Ohba, K. Kurokawa and M. Matsuda: Mechanism of the spatio-temporal regulation of Ras and Rap1. Keystone Symposium 2003, Optical Imaging: Applications to Biology and Medicine (2003; Taos, NM, USA)
5. 大場雄介, 松田道行: Ras ファミリー蛋白質の時空間制御機構。第 25 回日本神経科学会 (2002; 東京)

研究課題別評価

1 研究課題名: 神経難病における蛋白質リフォールディング・分解能検出系の構築

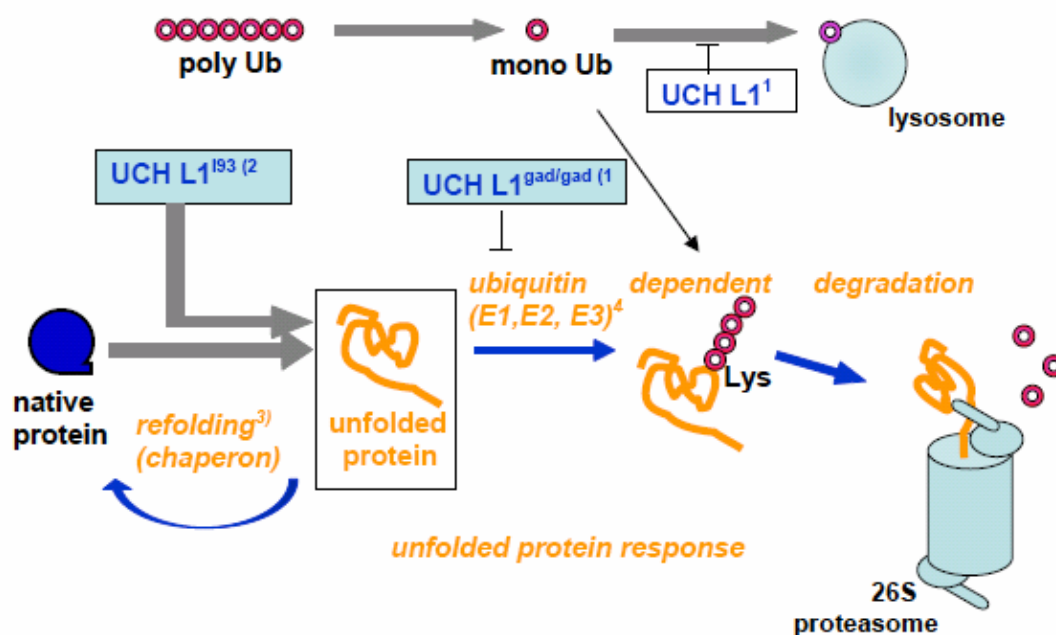
2 研究者氏名: 小坂 仁

3 研究のねらい:

生体内には正常な立体構造を保てない蛋白質(unfolded protein)が常に存在し、リフォールディングにより巻き戻されるが、それが奏効しない場合は、ATPを用いユビキチン化による選択的な蛋白質分解により凝集を防いでいる。しかし、それらの防御機構を用いてもunfolded proteinが排除できず、unfolded protein responseの果たす負荷の強い場合にはアポトーシスを誘導して個体の生命維持をはかる。本研究では、神経難病の根本治療薬開発のために、原因蛋白質のリフォールディング・分解能検出系を構築し、神経難病治療薬の探索を行う。

4 研究成果:

Fig. 1 ユビキチン化と生体防御系からみた今回の成果のまとめ

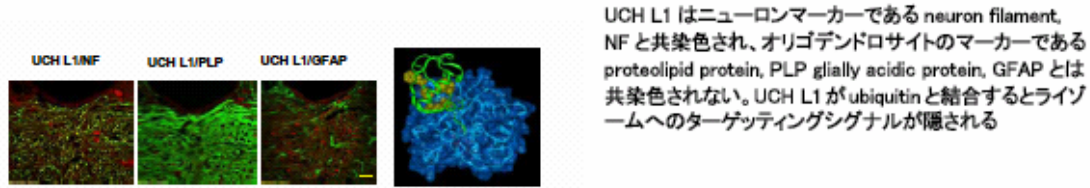


研究成果1: ユビキチン分解系異常マウスの確立とユビキチンシステムと神経変性の関係解明

(1) ユビキチン C 末端水解酵素の機能解析 (Fig. 1¹, ref. 2,3)

自然発症神経変性マウス、gracile axonal dystrophy; gad mouse のポジショナルクローニングの結果に基づき、欠損酵素であるユビキチン C 末端水解酵素; Ubiquitin C-terminal hydrolase, UCH L1 の機能解析を進めた。その結果 UCH L1 は神経細胞特異的に存在し、ユビキチンと生体内で会合しユビキチンに内在するライソゾームへのターゲティングシグナルを被い、ライソゾームでのユビキチンの分解を抑制することにより神経系のユビキチン量を保ち、ユビキチン依存性蛋白質分解を保持していることを明らかにした(ref. 1)。UCH L1 が神経細胞特異的に、しかも、非常に豊富に(可溶性蛋白質の数パーセント)存在することが全長1 mにも及ぶ細胞末端にユビキチンを供給し、ユビキチン分解を保つ必要のある神経細胞にとっては必要であることを示している (Fig. 2)。

Fig2 ユビキチン G 末端水解酵素(UCH L1)は神経細胞特異的に存在しユビキチンと会合している。



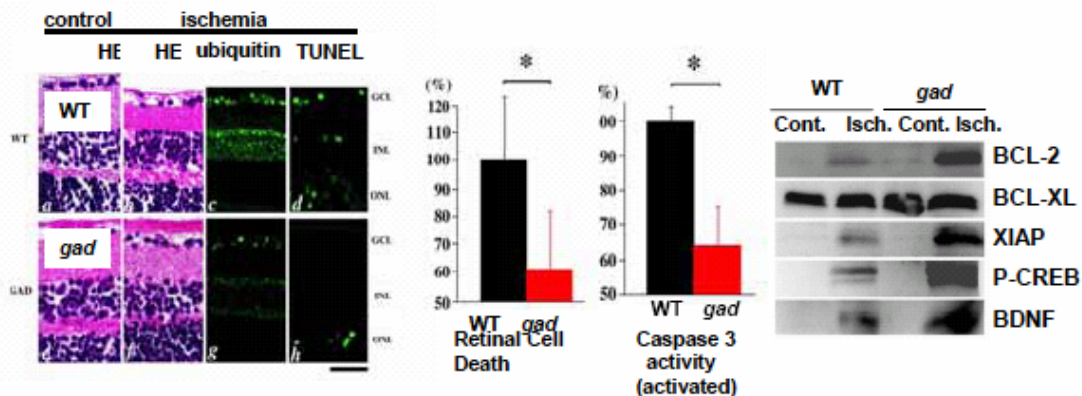
(2) ユビキチン分解系異常マウスを用いた神経系におけるユビキチンシステムと神経変性の解明

虚血により中枢神経細胞である網膜細胞はアポトーシスが誘導される。Ubiquitin 含量のすくない *gad* mouse では、有意に網膜細胞のアポトーシス誘導は少ないことがわかった。驚くべきことに *gad* mouse では BCL-2, XIAP, p-CREB, BDNF といった ant-apoptotic に働く蛋白質のユビキチン化と引き続く分解が押さえられる事実が判明した。一方, apoptotic に作用する BCL-XL はユビキチン分解で制御されないためにその量に変化はなかった(ref. 7, Fig. 3)。

その他に、このマウスを用いユビキチンシステムと神経変性について明らかにした(ref. 5, 6, 9, 10)。

Fig3 虚血による網膜細胞のアポトーシス誘導とアポトーシス関連蛋白の変化

虚血による網膜細胞の脱落は正常マウスに強く起きる(左)、*gad* mouse では細胞脱落の程度も活性化型カスプー3の誘導も優位に低下している。Cont.; control, Isch., ischemia



研究成果2: パーキンソン病のモデルマウスの樹立 (Fig. 1²)

神経変性疾患のなかでも罹患率が高いパーキンソン病は、古くからその成因と蛋白質分解系の破綻との関係が示唆されていた。1999 年に優性遺伝形式をとるパーキンソン病の家系で UCH L1 の I93M の変異が報告された。この変異蛋白質がベータシート構造をとり易く、不溶化し易いことを突き止め(ref. 2)、トランスジェニックマウスを作成した。そのうちの一つのラインで、パーキンソン病の病態を反映したドパミン産生細胞が脱落し、この神経細胞が投射している線条体でのドパミンの含有量が有意に低下していた。またホモのトランスジェニックマウスでは、歩行の不安定さが認められた。以上の結果、人のパーキンソン病を再現する初めてのモデルマウスとして、特許を申請した。

研究成果3: 蛋白質の巻き戻し能を測定する系の開発と治療薬開発 (Fig. 1³)

(1) 蛍光蛋白質のリフォールディング能力測定系

生体内に備わる防御機構を可視化するため細胞導入ペプチド(塩基性に富む11個のアミノ酸)の融合蛋白質として蛍光蛋白質を精製し、denatureさせ蛍光を消失させた。次に培地に加え、細胞内に取り込まれ細胞内のシャペロン蛋白質により巻き戻され、蛍光が検出される立ち上がりを計測した。しかしながら、塩基性蛋白質を負荷した蛍光蛋白質は大量精製が非常に困難であり、

動態解析には適していないことが判明し、また、蛍光蛋白質のリフォールディングを高める薬物が疾患遺伝子産物の巻き戻しを促進する可能性は少ないのではという考察に基づき、下記の戦略に切り替えた。

(2) 疾患特異的な、蛋白質構造検出による治療薬開発

Pelizaeus-Merzbacher病(PMD)は男児に発症し、進行性の運動障害と精神運動発達退行を呈する先天性の脳変性疾患である。この疾患は中枢神経のプロテオリピドプロテイン(*proteolipid protein; PLP*)の異常により起こる。我々は70例を超える患者の遺伝子解析により、この蛋白質のアミノ酸変異を20-30%の患者で見いだした。さらに興味深いことには、遺伝子重複がほぼ半数の原因となること、一方、この蛋白質を欠く欠失型の患者(~ 1 %)では症状は軽いことを見だし、遺伝子変異・重複による何らかの機能の獲得が病態に関わると推測した (ref. 1)。

正常型PLPをCOS細胞に発現させたと細胞膜を含む細胞質に均一に分布するのに対し、患者さんで見いだしたアミノ酸変異型PLP(W162L、W162R、A242V)を発現させた場合異常PLPは小胞体に集積したり、細胞質内に凝集体を形成することが判明した。局在化の変化は蛍光蛋白質との融合蛋白質; GFAP-PLP^{WT}, GFAP-PLP^{W162L}, GFAP-PLP^{W162R}, GFAP-PLP^{A242V}を発現させたと同様の経過を示した。

また、これら蛋白質の半減期重症度に応じて短くなっていくことを見いだした。また、異常PLPを発現している細胞では小胞体ストレス時に誘導されるBiP、CHOPの発現が上昇していることから、アミノ酸変異に基づくPMDの病態は変異型PLPがその高次構造不全により小胞体でのストレスを招き、細胞死を招来しているのではないかと推測するに至った。そこでGFAP-PLP^{WT}, GFAP-PLP^{W162R}, GFAP-PLP^{A242V}の安定発現株を作成し(Fig. 4)、変異型PLPの異常局在を正常型に変えるような薬物のスクリーニングを行ったところ、1つの薬剤 (化合物 X) の添加により異常局在が正常化し、半減期の延長効果を確認することができた(Fig. 5)。今後は、安定発現株を用いさらにスクリーニングを進めるとともに化合物X(あるいはその誘導体)の臨床応用を目指す。

Fig 4 変異型PLPの安定発現株

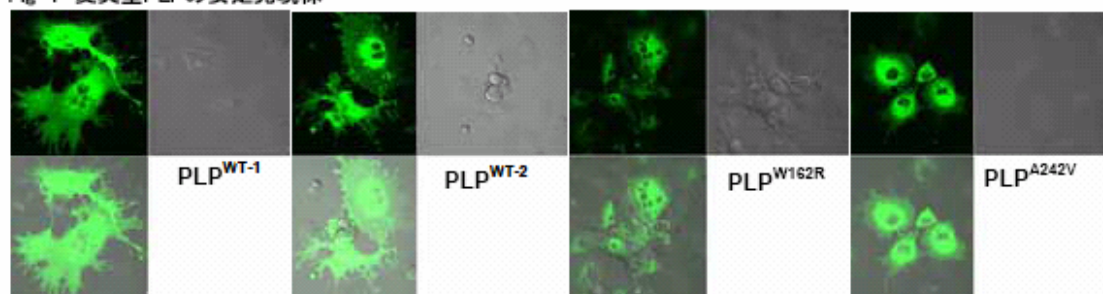
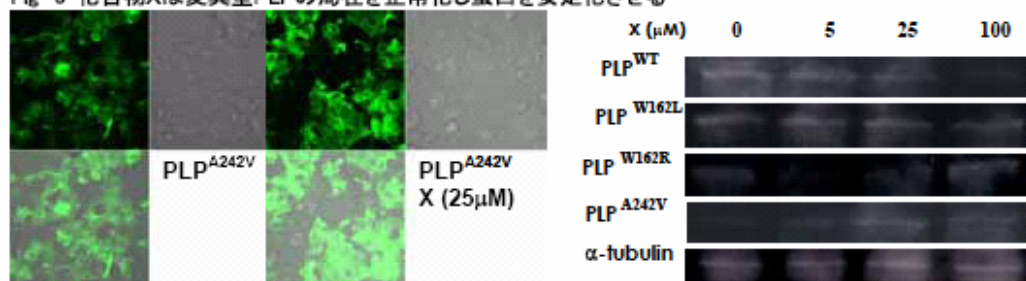


Fig 5 化合物Xは変異型PLPの局在を正常化し蛋白を安定化させる



研究成果4: 神経芽細胞腫ユビキチン分解抑制による新しい治療 (Fig. 1⁴)

神経芽細胞腫におけるレチノイン酸による細胞死の経路が主としてレチノイン酸アルファ受容体を介することを示した。また、この受容体がユビキチン化分解を受けることを示し、この分解系に異

常がある患者細胞株では、受容体の高発現が続くためレチノイン酸感受性が高いことを見いだした。逆に感受性が低い細胞株でもプロテオゾーム阻害剤を加えることで感受性が高まることを示した。プロテオゾーム阻害剤を従来のビタミンE治療に加えることで生存率を高め得ると考え、動物実験に着手した。また、平行してレチノイン酸アルファ受容体の分解に関わる E3, ubiquitin ligase を同定し、特異的な阻害薬の開発も目指したい。

5 自己評価:

神経変性治療薬スクリーニングのプロープとして、細胞導入ペプチド融合蛋白質として蛍光蛋白質を用いた試みは途中で断念せざるを得なく、結果として、最初の提案と内容が異なってしまった。

しかしながら、大脳先天遺伝性疾患で細胞内局在を指標にして、高次構造を局在化情報に還元し、治療薬を探索する系を作成し、有望なシャペロン様物質のスクリーニングに成功した。これまでにシャペロン治療による大脳変性疾患の治療の報告はなく、この分野に先鞭をつけるものと考ええる。また神経変性疾患とユビキチンシステムの関係をもっと明らかにするとともにパーキンソン病の新しいモデルマウスの確立に成功し、今後多方面で利用されたいと考える。加えて神経変性のみならず、神経系腫瘍でもユビキチンシステムをターゲットとした新しい治療戦略を見いだした。以上より、実際に治療に適用可能な薬物(化合物)とモデル動物を得ることができ、難治性神経疾患の治療法を開発するという当初のもう一つの目的は達成できたと思う。

6 研究総括の見解:

治療薬のスクリーニングのため神経変性の原因蛋白質のリフォールディングや分解を検出する系の構築を目指し、細胞導入ペプチド融合蛋白質の利用を試みる過程で、Pelizaeus - Merzbacher病の原因である変異PLP蛋白質と蛍光蛋白質GFAPとの融合蛋白質が、小胞体や細胞質に凝集体として局在することを見出している。この融合蛋白質を発現する細胞株を樹立し、凝集体の局在を解除する薬剤が、疾病の重症度に関連する短い半減期を延長することを明らかにし、薬剤探索の系として有用であることを見出している。シャペロン用物質の探索法として有用であり大脳変性疾患のシャペロン治療に道をつけるものとして評価できる成果と考える。

7 主な論文等:

論文

1. Inoue, K., Osaka, H., Thurston, V.C., Clarke, J.T., Yoneyama, A., Rosenbarker, L., Bird, T.D., Hodes, M.E., Shaffer, L.G. and Lupski, J.R.; Genomic rearrangements resulting in PLP1 deletion occur by nonhomologous end joining and cause different dysmyelinating phenotypes in males and females. *Am J Hum Genet.* 71, 838-53. (2002)
2. Nishikawa K, Hang Li, Kawamura R, Osaka H, Yu-Lai Wang, Hara Y, Hirokawa T, Manago Y, Amano T, Noda M, Aoki S, Wada K.; Alterations of structure and hydrolase activity of parkinsonism-associated human ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 variants. *Biochem Biophys Res Com.* 304:176-183. (2003)
3. Osaka, H., Wang, YL., Takada, K., Takizawa, S., Setsuie, R., Li, H., Sato, Y., Nishikawa, K., Sun, YJ., Sakurai, M., Harada, T., Hara, Y., Kimura, I., Chiba, S., Namikawa, K., Kiyama, H., Noda, M., Aoki, S., Wada, K.; Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 binds to and stabilizes monoubiquitin in neuron. *Hum Mol Genet*, 12: 1945-1958. (2003)
4. Bonin M, Pothe S, Osaka H, Wang Y.-L., Wada K, Riess O.; Microarray expression analysis of gad mice implicates involvement of Parkinson's disease associated UCH-L1 in multiple metabolic pathways. *Mol Brain Res* 126: 88-97. (2004)
5. Castegna A, Thongboonkerd V, Klein J, Lynn BC, Wang Y-L, Osaka H, Wada K, Butterfield

AD.; Proteomic analysis of brain proteins in the gracile axonal dystrophy (gad) mouse, a syndrome that emanates from dysfunctional ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L-1, reveals oxidation of key proteins. *J Neurochem* 88: 1540-1546. (2004)

6. Wang YL, Takeda A, Osaka H, Hara Y, Furuta A, Setsuie R, Sun YJ, Kwon J, Sato Y, Sakurai M, Noda M, Yoshikawa Y, Wada K; Accumulation of beta- and gamma-synucleins in the ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1-deficient gad mouse. *Brain Res*. 1019:1-9. (2004)
7. Harada T, Harada C, Wang YL, Osaka H, Amanai K, Tanaka K, Takizawa S, Setsuie R, Sakurai M, Sato Y, Noda M, Wada K.; Role of ubiquitin carboxy terminal hydrolase-L1 in neural cell apoptosis induced by ischemic retinal injury in vivo. *Am J Pathol* 164: 59-64. (2004)
8. Nagai J, Yazawa T, Okudela K, Ito T, Kigasawa H, Kitamura H, Osaka H.; Retinoic acid induces cell death on neuroblastoma cell lines by inhibition of proteasome-dependent degradation of retinoic acid receptor α . *Cancer Res* 64: 7910-7917 (2004)
9. Manago Y, Kanahori Y, Shimada A, Sato A, Amano T, Sato-Sano Y, Setsuie R, Sakurai M, Aoki S, Wang Y-L, Osaka H, Wada K and Noda M; Potentiation of ATP-induced currents due to the activation of P2X receptors by ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 *J Neurochem*. (in press)
10. Mi W, Beirowski B, Gillingwater TH, Adalbert R, Wagner D, Grumme D, Osaka H, Conforti L, Arnhold S, Addicks K, Wada K, Ribchester RR, Coleman MP; The slow Wallerian degeneration gene, WldS, inhibits axonal spheroid pathology in gracile axonal dystrophy mice. *Brain* (in press)

特許

1. 特願 2003-303370 ユビキチンC末端水解酵素変異体導入動物。

招待講演

1. Hitoshi Osaka, Yu-Lai Wang, Koji Takada, Shuichi Takizawa, Hang Li, Tae Sato, Kaori Nishikawa, Ying-Jie Sun, Mikako Sakurai, Takayuki Harada, Yoko Hara, Ichiro Kimura, Mai Noda, Kazuhiko Namikawa, Hiroshi Kiyama, Shunsuke Aoki and Keiji Wada: Ubiquitin Carboxy-Terminal Hydrolase L1 mediates ubiquitin stability and function in neurons COE International Symposium on Recent Advances in Research for Neurodegeneration (2002.3.5)
2. 小坂仁、王玉来、佐藤野衣、節家理恵子、李航、西川香里、青木俊介、高田耕司、野田百美、和田圭司:脱ユビキチン化酵素によるユビキチン代謝制御と神経変性 S16. 神経疾患とタンパク質分解・分子シャペロン 第25回日本神経科学大会シンポジウム (2002.7.8)

研究課題別評価

1 研究課題名:睡眠時呼吸障害と痴呆との関係解明

2 研究者氏名:角谷 寛

3 研究の狙い:

「睡眠時呼吸障害」とは、睡眠中に無呼吸・低呼吸をきたすものであり、眠気などの自覚症状を伴えば「睡眠時無呼吸症候群」と診断される最も頻度の高い睡眠障害である。2003年2月に睡眠時無呼吸症候群が新幹線運転手の居眠りの原因となったことは記憶に新しい。しかしながら、本邦における有病割合や、それがもたらす影響については不明であった。睡眠時呼吸障害の重症患者は睡眠時間1時間あたり30回以上もの低酸素状態を繰り返し、放置すれば認知障害、高血圧、不整脈を来すことが知られていた。2003年の米国高血圧合同委員会報告(JNC-7)において二次性高血圧の原因の筆頭とされ、この点でも注目され始めている。

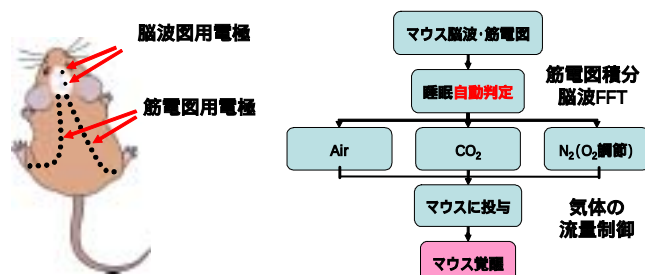
本研究の目的は(1)睡眠時呼吸障害のマウスモデルを作成することにより、睡眠時呼吸障害のもたらす影響を解析すること、(2)本邦における睡眠時呼吸障害を含む睡眠・リズム障害の有病割合やそれらが個人及び社会にどのような影響をもたらすかを解明することであった。さらに、この疫学研究から得たサンプルの解析は、睡眠・リズム障害の原因解明に繋がると考えている。

4 研究成果:

(1)睡眠時呼吸障害のマウスモデルの開発

マウスの脳波・筋電図を計測し、睡眠・覚醒のステージを自動で判定し、その結果に基づいて外気中の酸素・二酸化炭素濃度を24時間全自動で変化させるシステムを作成した(図1, 図2)。

図1. マウス睡眠時無呼吸症候群モデル



- ・睡眠・覚醒のステージ特異的に低酸素 / 高CO2を投与
- ・24時間 完全自動で、睡眠を障害
- ・覚醒時に同等の低酸素 / 高CO2を投与: 対照実験が可能

これまでに実験動物の睡眠を剥奪する実験系としては、動物が寝たときに実験者が刺激して起こすというものや、睡眠・覚醒状態に拘わらず60 - 90秒おきに低酸素を投与するというものがあった。これらには、長時間の断眠実験に向かない、あるいは、コントロール実験が出来ないなどの欠点があった。我々の実験系は数日間以上の長期に渡って実験が可能であり、同様の時間・頻度の低酸素 / 高二酸化炭素を覚醒中に投与するというコントロール実験が可能であるという利点がある。

3 ~ 4匹のマウスを同時に2 ~ 5日間の断眠実験を行えるシステムを完成した。断眠中はほとんどの時間覚醒しており(覚醒:71.6%、ノンレム睡眠:18.5%、REM睡眠:9.9%)、断眠終了直後はほと

んどの時間入眠している(覚醒:9.3%、ノンレム睡眠:44.6%、REM睡眠:46.1%)。断眠直後にレム睡眠が多いことは、睡眠呼吸障害の患者が治療開始直後にレム睡眠をまとめて取ることに相当すると考えられる。また、断眠後の睡眠に多くの時間(90.7%)を費やしていることは、強い眠気があることを示唆するため、本モデルは睡眠呼吸障害、特に睡眠時無呼吸症候群の病態を再現していると考えられる(図3)。

図2 . マウス睡眠時低酸素、高CO2投与装置

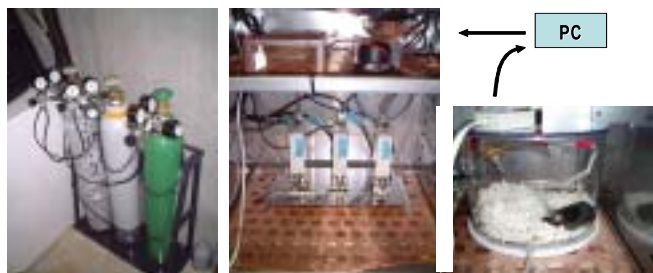
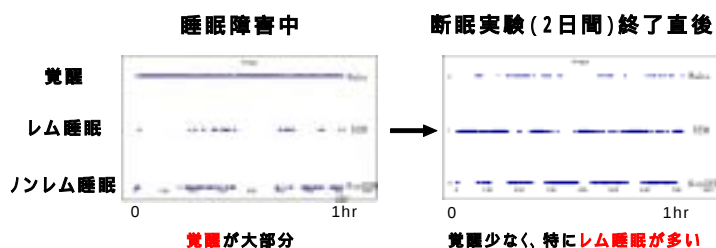


図3 . 断眠実験



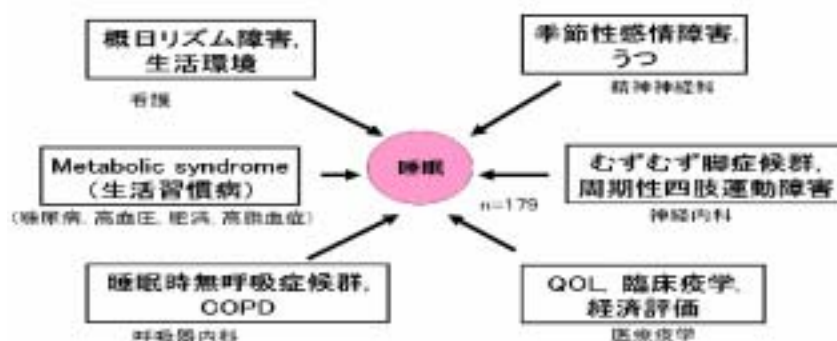
睡眠呼吸障害患者が治療開始直後にREM睡眠を連続して取ることに相当

睡眠時呼吸障害のモデル実験系が確立してきたので、今後はこれを用いて、組織学的変化・学習などの個体の変化・遺伝子発現の変化などの関係を解析していく予定である。

(2) 京都 睡眠と健康のコホート研究(KSHS: Kyoto Sleep and Health Cohort Study)の実施

ヒト睡眠・覚醒リズム障害の疫学的研究

— 京都睡眠と健康のコホート研究 —



主に 20～60 歳の男性 179 人を対象として、睡眠と健康の縦断的調査を実施した(図 4)。
 その際に、質問票だけでなく、呼吸器内科・神経内科・睡眠の専門医による診察、ならびに、簡易睡眠 PSG(睡眠呼吸障害モニター)・行動量モニター装置などによる睡眠検査も施行した。精神神経科的疾患に関しては DMS-IV に基づいた構造面接により診断した。スパイロメトリーによる一秒率(FEV_1/FVC)が 70%未満を慢性閉塞性肺疾患(COPD)と診断した。同時に包括的健康関連 QOL(SF-36)および睡眠の質(PSQI)に関する質問紙、また、過去 1 年の病気による休業の有無および回数を調査した。なお、京都大学医の倫理委員会に承認された内容に従って研究を遂行している。

この集団において、中程度以上の睡眠呼吸障害の頻度は 30%であった(表 1、表 2)。

表 1 . 睡眠時呼吸障害 (n=150)

正常 (AHI<5)	45 人	(30.0%)
軽症(5 AHI<15)	60 人	(40.0%)
中等症(15 AHI<30)	29 人	(19.3%)
重症(30 AHI)	16 人	(10.7%)

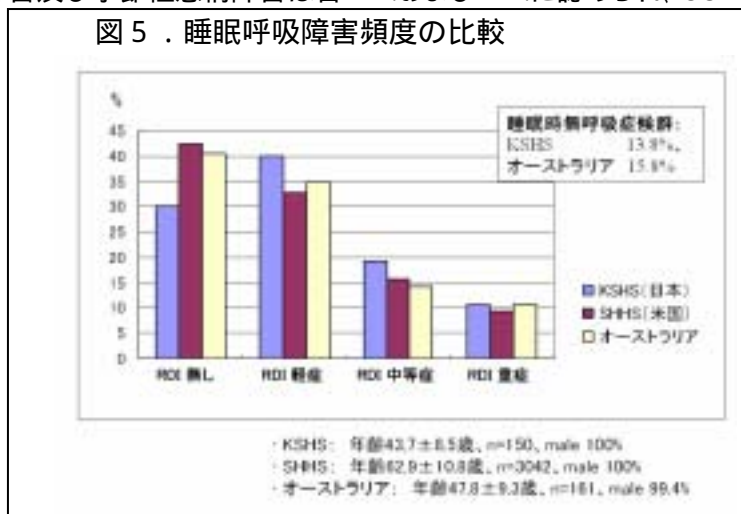
AHI: Apnea Hypopnea Index (無呼吸低呼吸指数: 睡眠 1 時間あたりの無呼吸・低呼吸の回数)

表 2 . 睡眠・リズム障害などの頻度 (n=178-179)

RLS	確定:13 人(7.3%)	疑い:13 人(7.3%)
ナルコレプシー	確定:0 人(0%)	疑い:3 人(1.7%)
概日リズム睡眠障害	確定:4 人(2.2%)	軽症:6 人(3.4%)
季節性感情障害	確定:3 人(1.7%)	軽症:6 人(3.4%)
大うつ病性障害	現病:0 人(0%)	既往:12 人(6.7%)
COPD	確定:15 人(8.4%)	

この頻度は昨年相次いで発表された米国及び豪州の疫学調査のデータに近く(図 5)、人種間で大きな頻度の差がない可能性を示唆している。また、むずむず脚症候群は 7.3%、概日リズム睡眠障害及び季節性感情障害は各 2.2%および 1.7%に認められ、COPD は 8.4%に認められた。

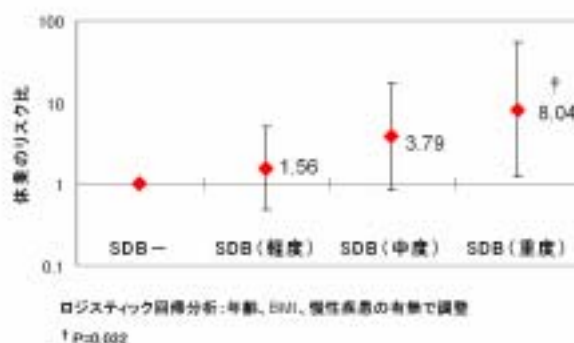
図 5 . 睡眠呼吸障害頻度の比較



睡眠時呼吸障害と休業の関係を解析するために、説明変数を睡眠時呼吸障害

(Sleep-Disordered Breathing: SDB)の重症度、アウトカム変数を病気による休業の有無とし、調整因子を年齢・BMI・慢性疾患の有無とした、ロジスティック回帰分析を行った。その結果、重症の睡眠時呼吸障害は、睡眠時呼吸障害のないものと比べて、休業のオッズ比が 8.04(95%CI: 1.19-54.5)と有意に上昇していることが明らかとなった(図6)。QOL や交通事故の頻度などに対してどのような影響を与えるかを今後解析予定である。

図6．睡眠時呼吸障害と病気による休業との関連
(n=102)



5 自己評価:

マウス睡眠時呼吸障害モデルの開発は当初の予定よりも1年近く長い時間が掛かり、解析結果の報告に至ることは出来なかった。しかしながら、当初は低酸素のみの投与を考えていたが、高二酸化炭素投与も行えるようにモデルを組み直すことが出来た。低酸素投与および高二酸化炭素投与はいずれも覚醒効果を持つが、高二酸化炭素投与では動脈血中の酸素飽和度の低下は認められなかった(Data not shown)。したがって、この二つは異なる経路によって覚醒効果を引き起こしていると考えられ、断眠実験によって生じる変化が、低酸素によるものなのか、睡眠の障害によって生じたものなのかを区別出来ると考えている。睡眠を長期に障害した時の変化を、遺伝子から個体のレベルまで総合的に解析することは、睡眠調節機構に関与する候補遺伝子及びその生理機能の解明に繋がると期待している。

主観的变化や微細な表現型の解析にはヒトを対象とした調査研究が必要と考えていたため、国際的にもほとんど例がない多角的・総合的な睡眠とリズムに関する調査プロジェクトを立ち上げることが出来た。これは、当初想定していなかった大きな成果である。インフォームドコンセントを得て血液サンプリングも行っているため、睡眠・リズム障害の有無やその程度が診断済みの多数例を対象に、今後はその原因をゲノミクスやプロテオミクスの手法を用いて解明予定である。日本人は遺伝的背景が比較的均一であるため、精度の高い解析が可能という大きなメリットがある。

睡眠障害の頻度が研究開始時点で想定していたよりも遙かに高いため、多型解析や相関解析によってその原因解明に迫れると考えている。なお、睡眠時呼吸障害は高頻度であるのみならず、健康を理由として休業のリスクを上げていることは、今回初めて明らかとなったことであり、睡眠科学・睡眠医学の重要性を再認識させられるとともに、社会に対して大きなインパクトを持つと考えている。

6 研究総括の見解:

睡眠時呼吸障害を定量的に解析できるマウスを用いた実験系を構築したことは、これまでほとんど分子レベルでの解析がなされていなかった領域に一つの切り口を提供したことになり、大きな

成果と評価する。睡眠時無呼吸症候群をはじめとする睡眠時呼吸障害における分子機構の解明を可能にするものであり、薬剤開発など対処の方策に道を開くことから、コホート研究ともあいまって、更なる研究の進展が楽しみである。

7 主な論文等：

論文

1. Hamada H, Taniguchi M, Ohi M., Nakai N, Okura M, Wakamura T, Kadotani H, Chin H: Acceptance and short-term tolerance of nasal continuous positive airway pressure therapy in elderly patients with obstructive sleep apnea. *Sleep and Biological Rhythms* 2: 53- 56, 2004
2. Kadotani H, Taniguchi M, Takahashi, Inoue Y.: Genetic approach to sleep-disordered breathing. *Sleep and Biological Rhythms* 2: S49, 2004
3. Tsuchiya Y, Minami I, Kadotani H, Nishida E.: Resetting of peripheral circadian clock by prostaglandin E2. *EMBO Report* 6: 256-61, 2005

特許

1. 特願 2004-162469 気体流量制御による睡眠障害システム。
2. 特願 2004-162468 レストレスレッグズ症候群・周期性四肢運動障害モデル動物。

受賞

なし

招待講演等

1. Kadotani H : Systemic approach to Sleep-Disordered Breathing.. 米国 Pittsburgh 大学 MHIRC, (2003/11/13)
2. Kadotani H : Kyoto Sleep and Health Cohort Study (KSHS) -Ongoing Multidisciplinary Sleep Epidemiological Study- (特別講演)。台湾仁愛総合病院 (2005/3/20)

研究課題別評価

1 研究課題名:核内受容体コファクターによる脂肪形成の制御

2 研究者氏名:亀井 康富

3 研究の狙い:

核内受容体はステロイドや脂溶性ビタミンをリガンドとする転写因子である。核内受容体は複数のコファクターと蛋白質—蛋白質相互作用し、機能している。本研究者は、さきがけ研究21において、「環境の変化に应答してコファクター蛋白質の発現量が変動し、生体外部あるいは内部の環境に適応するシステム」を仮説モデルとして提言した。そして、1)コファクターPGC1 β を筋肉等で過剰発現するトランスジェニックマウス(「PGC1 β マウス」)の表現型を解析する。2)PGC1 β 以外にも刺激誘導性のコファクターが存在し機能しているかどうかを検討する、ことを研究の進め方の骨子とした。

4 研究成果:

1)PGC1 β について

「PGC1 β マウス」は餌をよく食べるがやせていた(「やせの大食い」であった)。また「PGC1 β マウス」のエネルギー消費量(酸素消費量)は増大していた。筋肉はエネルギー消費に重要な組織である。「PGC1 β マウス」の筋肉における遺伝子発現変化をマイクロアレイ法により網羅的に解析した。その結果、コファクターPGC1 β の発現量増加により、核内オーファン受容体 ERR を介して、エネルギー消費に関わる一群の遺伝子が活性化され、代謝の変動が起こっていることが明らかになった。

2)FOXO1について

コファクターFOXO1 がエネルギー欠乏状態のマウスの骨格筋(絶食、ストレプトゾトシンによる糖尿病)で顕著に発現増加することを見出した。骨格筋における FOXO1 の役割を理解するため、骨格筋で特異的に FOXO1 を生理的な範囲で過剰発現するトランスジェニックマウス(「FOXO1 マウス」)を作成した。「FOXO1 マウス」は野生型のコントロールマウスに比べ体重が少なく、骨格筋の量が減少しており、また筋肉が白色化していた。FOXO1 は骨格筋の量と赤筋繊維の遺伝子発現を負に制御し、廃用性筋萎縮/アトロフィーをひき起こすことが示唆された。

5 自己評価:

さきがけ21の研究を通じて、当初の仮説モデルを主に骨格筋で例証することができた。これはオーファンを含む核内受容体の転写制御機構の新たな経路であり、オーファン受容体がリガンドがない場合に、どのように活性を調節されるかという問題にひとつの解答を提示することができたと考えている。PGC1 β マウスの表現型の解析から、骨格筋における PGC1 β の発現増加は肥満、さらには糖尿病予防に有効であり、特に副作用も認められなかった。また、FOXO1 の発現誘導が骨格筋のアトロフィーをひき起こすという実験結果は、これまでアトロフィーをひき起こす因子が見つかっていなかったことから、今後、寝たきり等により生じるアトロフィーの予防を目指す上で意義があると考えている。骨格筋はエネルギー消費、運動、糖代謝等に重要な役割を果たす器官である。本研究で得られた成果を手がかりに、さらに詳しい機序の解析を行ない、生活習慣病(肥満・糖尿病)や筋機能の低下に対する薬剤の開発に結びつくように今後研究を進展させたい。

6 研究総括の見解:

核内受容体と相互作用するコファクター蛋白質PGC1 β とFOXO1の遺伝子をそれぞれ導入したトランスジェニックマウスを解析し、PGC1 β がエネルギー消費に関わる遺伝子の発現を亢進し

て肥らないマウスを作り出し、また、FOXO1の過剰発現は骨格筋量、赤筋繊維形成を促進する遺伝子の発現を抑え、筋萎縮をもたらすことを明らかにした。これらの成果は、肥満の予防、寝たきりによる筋萎縮への対処など生活習慣病や関連症状の予防改善につながる本領域の目的としたものであり、高く評価する。

7 主な論文等：

[論文]

1. Kamei, Y., Suzuki, M., Miyazaki, H., Tsuboyama-Kasaoka, N., Wu, J., Ishimi, Y., and Ezaki, O.: Ovariectomy in mice decreases lipid metabolism-related gene expression in adipose tissue and skeletal muscle with increased body fat. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* (in press)
2. Takahashi, M., Kamei, Y. and Ezaki, O.: Mest/Peg1 imprinted gene enlarges adipocytes and is a marker of adipocyte size *Am. J. Physiol.* 288, E117-124, 2005
3. Hirabayashi, M., Ijiri, D., Kamei, Y., Tajima, A., and Kanai, Y.: Transformation of skeletal muscle from fast to slow-twitch during acquisition of cold tolerance in the chick. *Endocrinol.* 146, 399-405, 2005
4. Kamei, Y., Miura, S., Suzuki, M., Kai, Y., Mizukami, J., Taniguchi, T., Mochida, K., Hata, T., Matsuda, J., Aburatani, H., Nishino, I. and Ezaki, O.: Skeletal muscle FOXO1 (FKHR)-transgenic mice have less skeletal muscle mass, down-regulated type I (slow twitch / red muscle) fiber genes. *J. Biol. Chem.* 279, 41114-41123, 2004
5. Kamei, Y., Mizukami, J., Miura, S., Suzuki, M., Takahashi, N., Kawada, T., Taniguchi, T. and Ezaki, O.: A forkhead transcription factor FKHR up-regulates lipoprotein lipase expression in skeletal muscle. *FEBS Lett.* 536, 232-236, 2003
6. Ikeda, S., Miyazaki, H., Nakatani, T., Kai, Y., Kamei, Y., Miura, S., Tsuboyama-Kasaoka, N. and Ezaki, O.: Up-regulation of SREBP-1c and lipogenic genes in skeletal muscles after exercise training. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 296, 395-400, 2002
7. Takahashi, N., Kawada, T., Yamamoto, T., Gotoh, T., Taimatsu, A., Yokohama, K., Kamei, Y., and Fushiki, T.: Overexpression and ribozyme-mediated targeting of transcriptional coactivators, CBP and p300, revealed their indispensable roles in adipocyte differentiation through the regulation of PPAR- γ . *J. Biol. Chem.* 277, 16906-16912, 2002

[総説]

1. 亀井康富、江崎治、三浦進司：運動による筋肉の赤筋化、運動不足による白筋化機序。カレントセラピー（ライフメディコム東京）（印刷中）
2. 亀井康富：遺伝子組み換え動物。遺伝子工学の基礎（昭晃堂）（印刷中）
3. 江崎治、亀井康富：老化と運動器。日本医師会雑誌（日本医師会）132, 977-979, 2004
4. 亀井康富、垣塚彰：肥満のモデル動物。現代医療（現代医療社）36, 1181-1186, 2004

[特許]

1. 特願 2004-73806 骨格筋の組成および量を改善する薬剤をスクリーニングする方法。
2. 特願 2002-375432 糖尿病改善薬をスクリーニングする方法。

[招待講演等]

1. 亀井康富：生活習慣病の発症および予防における、骨格筋での核内受容体コファクターの役割。国立精神・神経センター神経研究所セミナー（2005年3月11日）

2. 亀井康富:生活習慣病発症・予防における骨格筋での核内受容体コファクターの機能。 東京大学医科学研究所セミナー (2005 年 2 月 22 日)
3. 亀井康富、三浦進司、江崎治:骨格筋における FOXO1 の発現増加は、筋量(赤筋)の現象をひき起こす。 第 27 回日本分子生物学会年会ワークショップ(2004 年 12 月 10 日)
4. Yasutomi Kamei, Shinji Miura, Osamu Ezaki:FOXO1 in Skeletal muscle. The 6th Insulin action symposium (2004 年 9 月 25 日)
5. 亀井康富:生活習慣病に関わる遺伝子発現調節。 京都大学大学院農学研究科セミナー (2004 年 9 月 24 日)
6. 亀井康富:遺伝子の発現制御と生活習慣病。 生化学若手研究者の会、第 43 回夏の学校 (2003 年 8 月 9 日)
7. 亀井康富:PGC1(PPAR γ コファクター1)関連分子の機能。 東京大学先端科学技術研究センターセミナー (2002 年 12 月 20 日)
8. 亀井康富:脂肪細胞形成における核内受容体コファクターの役割。 大阪大学蛋白質研究所セミナー (2002 年 11 月 28 日)
9. 亀井康富:核内ホルモン受容体のコファクター。 広島大学大学院生物圏科学研究科セミナー (2002 年 9 月 20 日)

研究課題別評価

1 研究課題名: ゴルジ体の多様性とその生理学的意義の解明

2 研究者氏名: 後藤 聡

3 研究の狙い:

細胞外に分泌または細胞膜上に提示される蛋白質のほとんどのものは、何らかの糖修飾を受けることによって正しい機能を発揮するようになる。そのような糖修飾は、蛋白質の種類や修飾位置、細胞の種類や生物種、ひいては個人の違いによって、大きく異なり複雑である。しかし、そういった複雑な糖修飾が、どのようにして制御されているかについては、現在のところほとんどわかっていない。我々は、糖修飾の重要な制御メカニズムのひとつとして、ゴルジ体には様々な種類があること、それぞれ異なる種類のゴルジ体では異なるタイプの糖修飾が行われている可能性を新たに見いだした。本研究では、そのような「ゴルジ体の多様性仮説」を検討し、その生理学的意義の解明を目指した。

4 研究成果:

我々は、ショウジョウバエをモデル系に用いて解析を行った。その理由として、ショウジョウバエではゴルジ体が細胞内に分散しているので解析が容易であること、さらに遺伝学・細胞生物学的解析が可能であることが挙げられる。

我々は、先行実験から新規の糖核酸輸送体 fringe connection (frc) が細胞内の一部のゴルジ体にしか局在しないことを見いだしていた。本研究において、この FRC と異なるゴルジ体に局在する蛋白質の検索を行った結果、新たに sulfateless (sfl) と呼ばれる糖修飾酵素が FRC とは異なるゴルジ体に局在することがわかった。

次に、FRC が局在するゴルジ体と SFL が局在するゴルジ体が、機能的にも異なっているかを検討した。FRC は NOTCH 蛋白質の糖修飾に必要であること、SFL はプロテオグリカンの糖修飾に必要であることがわかってきた。また、FRC は多くの糖鎖の基質として用いられる UDP-sugars を輸送する活性を持っていることもわかってきた。そこで、frc 変異体においてプロテオグリカンの修飾に異常が生じないかを調べたところ、幼虫の成虫原基という組織においては、異常がないことがわかった。この結果は、FRC が局在するゴルジ体と SFL が局在するゴルジ体が機能的にも異なっていることを示している。

さらに、frc 変異体の胚においては NOTCH の糖鎖に加えてプロテオグリカンの糖鎖も異常になることが知られていた。そこで、胚期における FRC と SFL の局在を調べたところ、幼虫期とは異なり、FRC と SFL は同じゴルジ体に局在していることがわかった。さらに、同じ幼虫でも異なる種類の細胞である唾液腺を用いて FRC の局在を調べたところ、成虫原基細胞とは異なり、FRC はすべてのゴルジ体に局在していることもわかった。これらの結果は、ゴルジ体の種類は一定ではなく、細胞の種類や発生段階において変化することを示している。

次に、異なるゴルジ体では実際に異なる糖修飾が行われているかを直接調べてみることにした。方法は、特定の糖鎖構造を認識するレクチンをプローブにして、成虫原基のゴルジ体を染色した。PNA レクチンを用いると、細胞内のアピカル側に局在するゴルジ体には多くシグナルが観察されたが、ベースル側に局在するゴルジ体にはあまり観察されなかった。さらに、その PNA レクチンで認識される糖鎖は細胞のアピカル側に分泌されることもわかった。これらの結果は、異なるゴルジ体では異なる糖鎖が生成されていることを直接的に示すとともに、細胞のアピカル・ベースルといった極性に応じて異なる糖鎖が生成・分泌されていることを示している。つまり、ゴルジ体の多様性は細胞の分泌方向にも関与して

いる可能性が示された。

5 自己評価：

本研究期間において、ショウジョウバエのゴルジ体には機能的に異なる種類があることを証明することができた。現在、この全く新しい概念をまとめて論文投稿中であり、世界にさがけることができたと考えている。しかし、この多様なゴルジ体が形成される分子メカニズムおよびそのようなゴルジ体の多様性が哺乳動物でも保存されているかといった問題については、この短い研究期間ではアプローチできなかったのが、今後の課題としたい。

6 研究総括の見解：

ゴルジ体に多様性があり、蛋白質の糖鎖修飾において役割り分担があること、細胞の種類や発生の過程で役割り分担が変動すること、修飾蛋白質の分泌方向にもこの多様性が関与していることなど、ショウジョウバエでの知見によるこれまでにない新しい概念の提唱は、教科書を塗り替えるものであり、さがけ研究の成果として大きく評価できる。当初の仮説であった哺乳類細胞のゴルジ体でのコンパート構造による多様性の解明が待たれる。海外研究者によってやられてしまわないようがんばっていただきたい。

7 主な論文等：

1. Yano,H., Yamamoto-Hino,M., Abe,M., Kuwahara,R., Haraguchi,S., Toyoda,A., Toyoda,H., and Goto,S.: Distinct functional blocks of the Golgi complex in Drosophila cells. (submitted)

研究課題別評価

1 研究課題名: 疾病の発症、進行におけるリン脂質因子の生体内動態解析

2 研究者氏名: 佐々木 雄彦

3 研究の狙い:

リン脂質の一種であるホスファチジルイノシトールは、細胞内情報伝達において重要な役割を果たす。そのイノシトール環水酸基がリン酸化を受けることで、ホスホイノシチドと総称される 7 種類の代謝産物が派生する。これらは固有の機能を有する生理活性脂質であることが、主に試験管レベル、培養細胞レベルの研究から明らかになっている。本研究では、ホスホイノシチド代謝酵素欠損マウスの表現型解析によってホスホイノシチド代謝系の病態生理的な役割を明らかにするとともに、生体内でのホスホイノシチド動態解析を可能とするトランスジェニックマウスを開発する。これらのマウスを用いて、ホスホイノシチド代謝酵素欠損とがん、免疫疾患、アレルギー等の病態との関連を提示し、病態発生の根底となる細胞機能異常の発現機構をリン脂質動態の側面から解明することを目指す。

4 研究成果:

(1) ホスホイノシチド代謝酵素欠損マウスを新規に4系統作製し、その表現型を解析した。

その中の一つがホスファチジルイノシトール 4,5 - ニリン酸[PI(4,5)P₂]の主要な産生酵素である phosphatidylinositol phosphate kinase I alpha (PIPKI α) の欠損マウスである。予想に反して、PIPKI α ホモ欠損マウスは野生型マウスと比べて、より重篤な全身性および局所性(皮膚)アナフィラキシー反応を呈した。骨髄由来マスト細胞を IgE で感作し、対応する抗原によって FcεRI を刺激したところ、ヒスタミン含有小胞の放出(脱顆粒)、サイトカイン産生の顕著な亢進が認められた。生化学的な解析の結果、PLC や PI3K の基質としてセカンドメッセンジャーの前駆体となる PI(4,5)P₂ の供給は他の PIPKI アイソザイムにより代償されうるが、PIPKI α はアクチン重合を制御する PI(4,5)P₂ の産生に必須であることが明らかになった。また、PIPKI α が IgE 受容体である FcεRI の細胞膜ラフトへの移行を負に制御することにより、FcεRI を介した細胞応答を総じて抑制することを見出した。これらの知見は、動物個体における PIPKI α の生理機能を明らかにした初めてのものである。即ち、PIPKI α は FcεRI を介したマスト細胞の脱顆粒やサイトカイン産生を阻害することで、アレルギー抑制因子として機能することが明らかとなった。さらに、他のホスホイノシチドと比較して大量に存在し、細胞膜受容体刺激に伴う顕著な増加が見られない PI(4,5)P₂ が、如何にしてセカンドメッセンジャー様の役割を果たしているかという長年の疑問に関する答えとして、機能的に重複しない PI(4,5)P₂ のコンパートメント化を個々の PIPKI アイソザイムが実現しているというアイデアを提示することができた。

この他3系統の代謝酵素遺伝子欠損マウスの解析結果は未発表であり詳細は省略するが、著明な不随意運動、細胞内オートファゴソーム様腔胞の蓄積などの興味深い新規の知見を得た。

(2) ホスホイノシチド可視化マウスの開発と応用

個々のホスホイノシチドに特異的な結合能を有する脂質結合モジュールと GFP との融合タンパク質(ホスホイノシチド可視化プローブ)を全身性に発現するトランスジェニックマウス(ホスホイノシチド可視化マウス)の作製を試みた。これまでに4種類のホスホイノシチドを特異的に検出できる5系統のホスホイノシチド可視化マウスの樹立に成功した。これまで不可能であった in vivo(臓器・組織を構成する状態にある細胞)でのホスホイノシチド動態の解析が、これらのマウスを用いれば可能となることを示した。また、ホスホイノシチド可視化プローブの導入が困難な初代培養細胞として好中球を用いて、走化性因子依存性の細胞運動(遊走)の素過程におけるホスホイノシチド

の生理機能の解析を行った。PI(3,4,5)P₃ は先端端に、PI(4,5)P₂ は後端膜に局在することを見出した。そして、PI(3,4,5)P₃ 局在化が細胞極性の発生に重要であることを遺伝学的に証明した。PI(3,4,5)P₃ 局在の規定には、phosphoinositide 3-kinase γ (PI3K γ) と共に PI(3,4,5)P₃ 脱リン酸化酵素が必須であることを、これらのホスホイノシチド代謝酵素欠損マウスと PI(3,4,5)P₃ 可視化マウスの交配によって証明した。また、脱リン酸化酵素の欠損による PI(3,4,5)P₃ 依存性遊走制御機構の破綻は、PI(3,4,5)P₃ 非依存性の遊走制御機構の破綻をも導くことなどから、二つの機構は最終的に共通の標的を先端端へとリクルートする役割を担うことが示された。また、PI(4,5)P₂ は後端膜の退縮に重要であることを示す知見を得た。これらの知見は新たな解析ツールであるホスホイノシチド可視化マウスの開発によって、哺乳類細胞の遊走制御におけるホスホイノシチドの役割に関する長年の疑問を解いたものである。解析が進んでいる細胞性粘菌の遊走制御機構との共通点と差異を明らかにすることができた。

5 自己評価:

当初の研究計画の中心であったホスホイノシチド可視化マウスを含め、本研究によって9系統の遺伝子改変マウスを作出することができたが、その解析や応用は不十分であった。しかしながら得られた知見は、従来のホスホイノシチド研究から派生したいくつかの大きな疑問に答えを与えるものであった。また、基礎医学研究としては、免疫疾患、がん、神経疾患等の病態発生機序の理解を深めるものであった。本研究で得られたツールと知見は、ホスホイノシチド代謝異常と病態発生機序に関して研究を進める上で、今後の大きな糧となるものであると考えている。

6 研究総括の見解:

ホスホイノシチド代謝酵素欠損マウス、ホスホイノシチド可視化マウスの作成を行い、その解析から、PI(4,5)P₂をはじめとするホスホイノシチドの機能、役割りに関して新しい知見を得たことは、免疫疾患、がん、神経疾患等の発生、病態の理解に大きく貢献するものであり、さきがけ研究の成果として高く評価できる。今後の研究で、ホスホイノシチド代謝異常と各種疾病の発生ならびに病態との関連が明らかにされてゆくことを期待したい。

7 主な論文等:

論文

1. J. Sasaki*, T. Sasaki*, M. Yamazaki, K. Matsuoka, C. Taya, H. Shitara, S. Takasuga, M. Nishio, K. Mizuno, T. Wada, H. Miyazaki, H. Watanabe, R. Iizuka, S. Kubo, S. Murata, T. Chiba, T. Maehama, K. Hamada, H. Kishimoto, M. Frohman, K. Tanaka, J. Penninger, H. Yonekawa, A. Suzuki & Y. Kanaho#: Regulation of anaphylactic responses by phosphatidylinositol phosphate kinase type I γ . *J. Exp. Med.* (in press); (top* and corresponding authors#)
2. T. Wada, N. Joza, M. Cheng, T. Sasaki, I. Kozieradzki, K. Bachmaier, T. Katada, M. Schreiber, E. Wagner, H. Nishina & J. Penninger: MKK7 couples stress signaling to G2/M cell cycle progression and cellular senescence. *Nat. Cell Biol.* 4: 1016-1022 (2004)
3. Y. Horie, A. Suzuki, E. Kataoka, T. Sasaki, K. Hamada, J. Sasaki, K. Mizuno, G. Hasegawa, H. Kishimoto, M. Iizuka, M. Naito, K. Enomoto, S. Watanabe, T. Mak & T. Nakano: Hepatocyte-specific Pten deficiency results in steatohepatitis and hepatocellular carcinomas. *J. Clin. Invest.* 113: 1774-1783 (2004)
4. A. Suzuki, T. Kaisho, M. Ohishi, M. Tsukio-Yamaguchi, T. Tsubata, P. A. Koni, T. Sasaki, T. Mak & T. Nakano: Critical roles of Pten in B cell homeostasis and immunoglobulin class switch

recombination. *J. Exp. Med.* 197: 657-667 (2003)

5. M. Woo, R. Hakem, C. Furlonger, A. Hakem, G. Duncan, T. Sasaki, D. Bouchard, L. Lu, G. Wu, C. Paige & T. Mak: Caspase-3 regulates cell cycle in B cells: a consequence of substrate specificity. *Nat. Immunol.* 4: 1016-1022 (2003)
6. C. Krawczyk, A. Olivera-dos-Santos, T. Sasaki, E. Griffiths, P. Ohashi, S. Snapper, F. Alt & J. Penninger: Vav1 controls integrin clustering and MHC/peptide-specific cell adhesion to antigen-presenting cells. *Immunity* 16: 331-343 (2002)
7. M. Crackower, G. Oudit, I. Kozieradzki, R. Sarao, T. Sasaki, E. Hirsch, A. Suzuki, T. Shioi, J. Sasaki, R. Sah, H. Cheng, V. Rybin, G. Lembo, L. Fratta, A. Oliveira-dos-Santos, J. Benovic, R. Kahn1, S. Izumo, S. Steinberg, M. Wymann, P. Backx, and J. Penninger: Regulation of myocardial contractility and cell size by distinct PI3K-PTEN signaling pathway. *Cell* 110: 737-749 (2002)

特許

1. 特願 2004-244482 イノシトールリン脂質可視化プローブ遺伝子導入モデル動物。

研究課題別評価

1 研究課題名:環境ストレスに応答する細胞内情報伝達機構の解明

2 研究者氏名:武川 睦寛

3 研究の狙い:

細胞は DNA 損傷、低酸素、温度や浸透圧変化、炎症性サイトカインなど、外界からの様々なストレス刺激に応答して特定の情報伝達経路を活性化し、環境変化に適応する。p38MAP キナーゼ情報伝達経路は細胞の主要なストレス応答シグナル伝達システムであり、細胞周期停止、アポトーシスやサイトカイン産生に代表されるストレス応答制御に中心的な役割を果たしている。近年、生体の恒常性維持を担うこの経路の異常が、がんや自己免疫疾患などの病態に深く関与する証拠が蓄積されてきた。しかしながら、細胞がどのようにして物理化学的ストレス刺激を感受し、その結果生じたシグナルを如何にして p38 経路の活性化へと変換していくのか、その分子機構はほとんど明らかにされていない。

我々はこれまでに、ストレス応答 MAPK 経路を特異的に活性化する主要なヒト MAPKKK、MTK1 を同定し、MTK1 が環境ストレスによる p38 の活性化に中心的な役割を担う分子であることを明らかにしてきた。そこで本研究では、生体のストレス応答、免疫制御機構を分子レベルで解明することを目的とし、MTK1 を代表とするストレス応答 MAPKKK の活性制御機構と生理機能の解析を行った。

4 研究成果:

本研究に於いては、1) GADD45 関連分子による MTK1 活性化メカニズムとその生理機能の解明、2) MTK1 の新規活性制御分子の探索、3) ストレス応答 MAPK 経路のシグナル特異性決定・維持機構の解明、の3点を中心に解析を進めた。

1) GADD45 関連分子による MTK1 活性化メカニズムとその生理機能の解明

我々はこれまでに、MTK1の制御領域に結合して活性化因子として作用する3種類のGADD45関連分子($\alpha/\beta/\gamma$)を同定してきた。ストレス応答シグナルにおけるGADD45分子の機能ドメインを同定するため、GADD45 β に系統的な欠失変異を導入して解析を行い、GADD45分子内でMTK1の活性化に必須のアミノ酸残基を同定した。さらに、MTK1活性化領域を欠くGADD45 β 変異体がドミナントネガティブに作用し、細胞内でMTK1の活性化を抑制することを見出した。また、MTK1分子内の機能ドメインの同定も平行して行った。これらの解析の結果、GADD45によるMTK1活性化機構として、GADD45分子がMTK1に結合すると、MTK1分子内の制御ドメインとキナーゼドメイン間の抑制的相互作用が解除され、MTK1分子同士の多量体化が誘導されること、さらにキナーゼドメイン内の自己リン酸化が起こってMTK1が活性化されることを明らかにした。

次に GADD45-MTK1 経路が担う生理機能の一端を明らかにするため、本研究では特に発がん抑制作用を持つサイトカインである TGF- β との関連を解析した。TGF- β は、その受容体を介して転写因子 Smad をリン酸化して活性化する一方で、p38 経路をも活性化するが、その分子機構や、TGF- β 情報伝達系と p38 経路のクロストークがどのような生理的意義を持つかは不明であった。我々は TGF- β シグナル伝達に関わる各分子に変異を有する様々な脾がん細胞株を利用して実験を行い、TGF- β 刺激後の p38 活性化に、Smad 依存的な転写を介する機構が存在することを見出し、さらに Smad によって発現誘導され、p38 活性化に作用する遺伝子が GADD45 β であることを明らかにした。即ち、TGF- β 刺激により Smad 依存的に転写誘導された GADD45 β が MTK1 を介して p38 経路を活性化するという新規シグナル伝達機構の存在を示した。また、cDNA アレイ法を用いて TGF- β と p38 経路のクロストークによって発現が制御される遺伝子のスクリーニングを行い、腫瘍血管新生抑制因子 TSP-1 を同定した。実際に、がん抑制遺伝子 Smad4 に変異を持つがん細胞では TGF- β 刺激後の p38 活性化と TSP-1 の発現が共に消失しており、Smad4 の機能喪失に伴う GADD45 β -MTK1 経路の制御異常が発がんに関与することが示唆された。

2) MTK1の新規活性制御分子の探索

まず p38MAPK カスケードの新規活性化因子の同定を目的として、p38 経路の活性化によって細胞内に GFP の発現が誘導される新たなレポーターシステムを構築し、このシステムを安定して発現する細胞株を樹立した。しかし様々な改良を試みたものの、バックグラウンドの問題で、このシステムを遺伝子スクリーニングに用いることは出来なかった。そこで出芽酵母を利用して MTK1 活性化能を持つヒト遺伝子を網羅的に同定する機能的遺伝子クローニング法を開発し、ヒト cDNA 発現ライブラリーのスクリーニングを行った。さらに哺乳類細胞を用いて MTK1 と特異的に結合する蛋白質分子を分離、精製して LC-MS/MS 法により同定した。これら複数のスクリーニングを並行して行った結果、新たな MTK1 活性制御因子の候補として、複数の分子を単離し得た。

3) ストレス応答MAPK経路のシグナル特異性決定、維持機構の解明

哺乳類細胞には、細胞増殖に作用する ERK と、ストレス応答に関与する p38/JNK 経路という少なくとも3種類の MAPK カスケードが存在するが、これら複数の MAPK 経路間でシグナルの誤った混線は起こらない。このような MAPK 経路の正確な情報伝達を可能にする機構は、細胞増殖と死の制御に極めて重要であると考えられるが、そのメカニズムには不明な点が多い。本研究では MAPKKK-MAPKK 分子間の選択的結合を規定し、シグナル伝達の特異性を決定づける未知メカニズムを解明するため、まず p38 経路の MAPKK である MKK6 分子内で、MTK1 等の MAPKKK 分子との結合に必要な領域の同定を試みた。その結果、MKK6 の非酵素領域に位置する約 20 アミノ酸の領域が MAPKKK との結合に必須の新規ドッキング・サイトであることを見出した。興味深いことに、同様のサイトが MKK6 のみならず、全ての MAPKK 分子に保存されており、それぞれが対応する上流の MAPKKK 分子との特異的結合に必要であることが確認された。また、ドッキング・サイトに変異を導入したり、この領域に対応する人工ペプチドを細胞に導入して、MAPKKK-MAPKK 間の結合を阻害することにより、ストレス刺激による MAPKK 分子の活性化がほぼ完全に抑制された。以上の結果から、ドッキング・サイトを介した分子間結合が MAPK 経路のシグナル伝達に必須であり、MAPK 活性阻害剤を創薬する上での新たなターゲットとなり得ることが強く示唆された(投稿中)。

5 自己評価:

当初、哺乳類細胞内で p38 経路の活性化を可視化するシステムを作成し、新規ストレス応答シグナル伝達分子の同定を試みた。その結果、p38 活性化に伴い細胞内に GFP の産生が誘導される新たなレポーターシステムを構築することには成功した。このシステムは p38 活性化を生細胞でモニターする簡便な方法として有用であり、今後 p38 活性阻害剤の同定等に応用可能であると考えられるが、バックグラウンド等の問題で遺伝子スクリーニングに用いることが出来なかった点は残念である。そこで別法として、出芽酵母を用いた機能的クローニング法を開発し、またプロテオミクスの手法を利用してスクリーニングを行い、新たな MTK1 活性制御因子の候補として、複数の分子を単離することが出来た。これらの分子の一つは、環境ストレス刺激による MTK1 活性化の早期反応に関与することを示唆するデータを得ており、今後さらに解析を進め、ストレス応答におけるその機能の全容を明らかにしたい。

一方、GADD45 関連分子-MTK1 経路の生理機能に関しては、このシグナル伝達システムが TGF- β の発がん抑制作用に寄与すること、また Th1 免疫応答に極めて重要であることを新たに示すことが出来た。また本研究により、GADD45 分子による MTK1 活性化の詳細な分子メカニズムが明らかとなった。今後、これらの知見を利用して、MTK1 キナーゼ活性を人工的に制御する薬剤の開発へと発展させて行きたい。

さらに、MAPK 経路の正確なシグナル伝達を可能にする機構として、MAPKKK-MAPKK 間の選択的分子間結合を規定する新規ドッキング・サイトを同定し、この経路が MAPK カスケードのシグナル伝達に必須であることを示すことが出来た。最近、MAPK 経路に対する特異的阻害剤を開発して、がんや免疫疾患の治療に応用しようとする試みが盛んになされている。我々の実験結果は、ドッキング・サイトをターゲットとした分子標的薬が、特定の MAPK 経路に対する新たな選択的阻害剤となり得る可能性を示唆している。本研究で得られた成果を基に、今後のがんや自己免疫疾患の病態解明や新規治療法開発への応用、発展が期待される。

6 研究総括の見解:

MKT1を中心に、その上流ならびに下流に位置する制御分子を明らかにし、ストレス応答シグナルの伝達経路を解明したことは、本領域の目指した目的に答える成果として評価できる。惜しむらくは、下流に位置する分子の十分な解明にまで至らなかったが、今後の進展に期待し、ストレス応答MKT1ワールドの完成を楽しみにしたい。

7 主な論文等:

論文

1. Takekawa,M., Tatebayashi,K., Itoh,F., Adachi,M., Imai,K. and Saito,H.; Smad-dependent GADD45 β expression mediates delayed activation of p38 MAP kinase by TGF- β . *EMBO J.* 21, 6473-6482 (2002).
2. Shonai,T.,Adachi,M., Sakata,K., Takekawa,M., Endo,T., Imai, K., and Hareyama,M.; MEK/ERK pathway protects ionizing radiation-induced loss of mitochondrial membrane potential and cell death in lymphocytic leukemia cells. *Cell Death Differ.* 9, 963-971, (2002).
3. Nakamura,K., Tanoue,K., Satoh,T., Takekawa,M., Watanabe,M., Shima,H., and Kikuchi,K.; A novel low-molecular-mass dual-specificity phosphatase, LDP-2, with a naturally occurred substitution that affects substrate specificity. *J. Biochem.* 132, 463-470 (2002).
4. Sakon,S., Xue,X., Takekawa,M., Sasazuki,T., Okazaki,T., Kojima,Y., PiaJ-H., Yagita,H., Okumura,K., Doi,T. and Nakano,H.; NF- κ B inhibits TNF-induced accumulation of ROS that mediate prolonged MAPK activation and necrotic cell death. *EMBO J.* 22, 3898-3909 (2003).
5. Tatebayashi,K., Takekawa,M., and Saito,H.; A docking site that determining specificity of Pbs2 MAPKK to Ssk2/Ssk22 MAPKKs in yeast HOG pathway. *EMBO J.* 22, 3624-3634, (2003).
6. Mitsuhashi,S., Shima,H., Tanuma,N., Matsuura,N., Takekawa,M., Urano,T., Kataoka,T., Ubukata,M. and Kikuchi,K.; Usage of tautomycin, a novel inhibitor of protein phosphatase 1 (PP1) reveals that PP1 is a positive regulator of Raf-1 in COS-7 cells. *J. Biol. Chem.* 278, 82-88, (2003).
7. Takagaki,K., Satoh,T., Tanuma,N., Masuda,K., Takekawa,M., Shima,H. and Kikuchi,K.; Characterization of a novel low-molecular-mass dual-specificity phosphatase 3 that enhances activation of JNK and p38. *Biochemical J.* 383, 447-455 (2004).
8. Chi,H., Lu,B., Takekawa,M., Davis,R.J., and Flavell,R.A.; GADD45 β /GADD45 γ and MEKK4 comprise a genetic pathway mediating STAT-independent IFN γ production in T cells. *EMBO J.* 23, 1576-1586 (2004).

総説

1. 武川睦寛、館林和夫、斎藤春雄:ストレス応答 MAP キナーゼ 蛋白質・核酸・酵素 Vol. 47: 1379-1389 (2002)

学会発表

1. 武川睦寛、斎藤春雄:TGF- β による Smad 依存的 p38MAP キナーゼ情報伝達系の活性化機構 日本癌学会(第 61 回;東京)
2. 武川睦寛、三宅善嗣、斎藤春雄:TGF- β による Smad 依存的 p38MAP キナーゼ情報伝達経路の活性化 日本分子生物学会(第 25 回;横浜)
3. 武川睦寛、斎藤春雄:MAPKKK と MAPKK の特異的分子間結合を規定する新規ドッキングドメインの同定と MAPK シグナル伝達におけるその意義 日本癌学会(第 63 回;福岡)

受賞

日本癌学会奨励賞(2003 年)「プロテインキナーゼ及びホスファターゼによるストレス応答シグナル制御機構の研究」

研究課題別評価

1 研究課題名:新素材キャピラリーガス検出器による細胞機能解析

2 研究者氏名:門叶 冬樹

3 研究の狙い:

ヒトゲノム計画に代表される「生物のゲノム解読」が完了に向かうことにより、細胞の内的情報を整理整頓する基盤が着実に整備されつつある。今後は、これら遺伝子情報によって細胞が正しく機能を発揮する仕組みの解明、ならびに、これら正規の遺伝子情報を邪魔する外的情報による細胞機能の変化の解明を分子レベル、細胞レベル、個体レベルで調べる研究が焦点となっている。

細胞内イオン測定、分子蛍光撮像、超微弱光実時間撮像による研究アプローチは、細胞機能解明において最も期待されている研究ツールであり、細胞内部からのルミネッセンス(発光)現象を精度良く定量的に測定できる新しい光イメージングデバイスの開発が強く望まれている。

本研究では山形大学が世界に先駆けて独自に開発を進めてきたマイクロパターンガス検出器の新しい素材である「新素材キャピラリープレートガス検出器」を用いて、幅広いダイナミックレンジと定量解析能力かつ撮像能力を持ち、高磁場、低温、電気ノイズの混在する環境下においても動作可能な「新しい光検出器」の開発を目的に、高感度なイメージングシステム構築のための開発研究を行った。

4 研究成果:

キャピラリープレート(以下 CP)は、穴径が $1\mu\text{m}$ から $1000\mu\text{m}$ のガラスの毛細管(キャピラリー)を規則正しく二次元配列し、 0.2mm から 1mm の厚さにした、円形または角形の板状構造のガラスプレートである。図1にキャピラリープレートの概念図を示す。

この CP の上面と下面に電極蒸着を施し、ガスチェンバー中に設置し、光・放射線によ

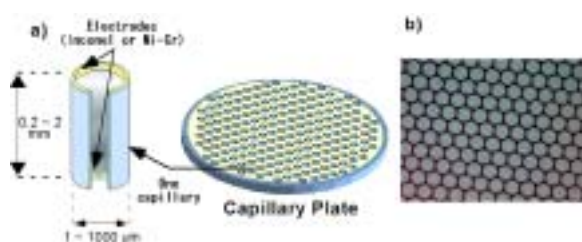


図1. キャピラリープレートの概念図

ってガス中に出来た光電子を穴の中一つ一つで電子・光増殖させたのが CP ガス検出器であり、我々が独自に開発を進めるマイクロパターンガス検出器の新しい素材である。

図2に本研究で開発を行った撮像型イメージングシステムの概念図を示す。本システムは1)可視光を電子に変換する電子変換領域部(一次電子生成)、2)光電子をキャピラリープレートで電子・光増殖する信号増殖領域部、3)および電子・光信号を検出するための読み出し装置部から構成されるハイブリッドタイプのイメージング検出器である。1)の電子変換領域部ならびに2)の光・電子増殖デバイス部はガスを充満したチェンバー内に設置される。3)の増殖電子・光読み出し部は、プレートからの光を検出するシステムを採用した場合、光・電子増殖部と隔離した場所での動作が可能となり、バックグラウンドの劣悪な環境下での動作が可能となる。

光電子は光電面と CP 上面に形成された電場によってキャピラリー管内に入射する。キャピラリー管内には、 10^4V/cm を超える電場が形成されており、管内に入射した一次電子は約 3000 倍の電子増殖を起こし、それに付随した励起分子の脱励起により約 2000 個の励起発光、即ち光増幅をキャピラリープレート管内で起こす。この励起発光光子または増殖電子をプレート下段に設けた光センサーもしくは電子センサー（陽極 PAD）で取得する。増幅された電子と励起発光の光子数は信号検出として十分な量であり、たった 1 個の光電子でさえも検出を可能とする (single photon counting)。電子・光増殖と定量解析の 2 点を「同時にコンパクトなシステムで高感度に達成できる」ことが、冷却 CCD カメラやイメージンテシファイド CCD カメラ (ICCD カメラ) と比べた場合の本検出器の利点である。本「さがけ研究」では、キャピラリープレートガス検出器を用いた二次元フォトンカウンティング法により、細胞機能を効率よく高感度に解析するための「光イメージングシステム開発」を目指し、**光増殖デバイスとしての 1) キャピラリープレートのガス検出器としての最適化、2) 光増殖デバイスとして動作させるためのガスの最適化、3) 光電面のガス中における化学的・物理的特性の研究**を行い、以下の成果を得た。

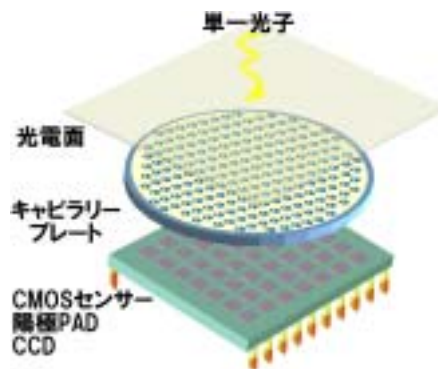


図2 . CP ガス検出器の概念図

1) キャピラリープレートのガス検出器としての最適化

感度とダイナミックレンジ特性試験：本検出器の感度とダイナミックレンジの特性を調べることを目的とし研究計画とした。専用ガスチェンバー内にアルゴン混合ガスを封入し、5.9keV の X 線及び約 5MeV の α 線を入射させて、ガスチェンバー内で生じる電子数比を約 1000 倍に変化させてガス検出器としての特性を調べた。図3 (左) に実験の概略図を示す。その結果約 1000 倍のエネルギー比を持つ X 線および α 線に対して本検出器は安定に動作した。また、各々のイベントに対する CCD の光量分布を比較したところ、その光量比も約 1000 倍の値を示し、高光量部での線形性が保たれており、ダイナミックレンジが 1000 でも安定に動作することを示した。更に、エネルギーの異なった X 線をチェンバーに入射させて、それぞれ約 110,230,320,850 個の電子をガス中で生じさせて電子数と検出器からの出力関係を調べた。その結果を図3 (右) に示す。以上の結果から、光、電荷それぞれの出力信号がガス内に生じる電子数に線形で比例していることを示した (IEEE Nucl. Trans. Sci., 49, No.3, pp1560-1565, 2002、Nucl. Instr. and Meth. A, 505, pp219-222, 2003)。

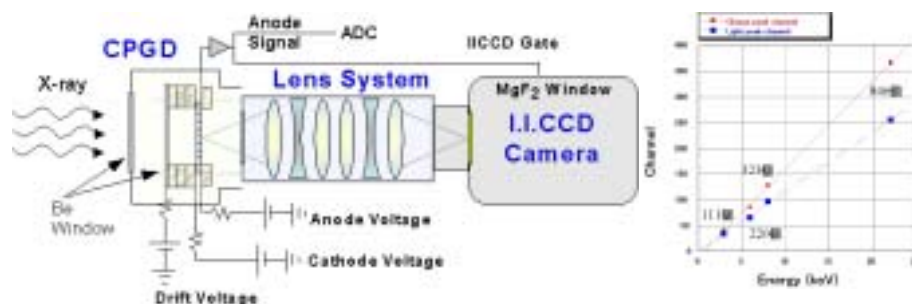


図3 . 左) CP ガス検出器の基礎特性試験のセットアップ。右) CP ガス検出器に入射する X 線のエネルギーを変えたときに得られた検出器の出力信号。

高感度 CP ガス検出器の開発試験：これまでの開発から 1 枚のプレートを用いた CP ガス検出器において、電子増幅度約 10000 まで検出器が安定に動作する事がわかっている。さらに、電子増殖率を上げて検出器を動作させることにより超微弱光に対して高い感度で動作することが

期待できる。また、高い信号増幅率は、電荷信号による信号処理を可能とするため、より高い時間分解能を持つ検出器開発に有効となる。そこで、10000 を超える高い電子増幅率下での安定動作を目指して、2 枚のキャピラリープレートを用いた 2 段階電子増幅方式の CP ガス検出器の開発試験を行った。図 4 に 2 段階電子増幅方式 CP ガス検出器において得られた印加電圧と電子増幅度の関係を示す。この結果から、2 段階電子増幅方式によって 20000 以上の電子増幅を容易に得ることが可能となり、細胞サンプルから放出されたたった 1 個の光子を検出するために十分な像倍率であることが確認出来た。以上の結果から、発現率、発生率の極めて低い細胞機能解析への応用が期待できることを示した (Nucl. Instr. and Meth. A, 513, pp282-286, 2003)。

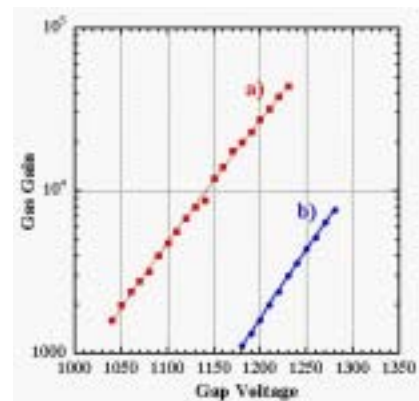


図 4 2 段階増幅型 CP ガス検出器の電子増幅度。a)が 2 段階増幅、b)が 1 段階増幅。2 段階増幅により、1 段階増幅型の約 20 倍となる 20000 以上の電子増幅度を得ることが出来る。

低バックグラウンド CP ガス検出器の開発: CP ガス検出器の低バックグラウンド化を目的に、ソーダガラスを素材とした新しいキャピラリープレートを製作し開発試験を行った。図 5 に従来の鉛ガラス CP (図左) と今回開発したソーダガラス CP の α 線バックグラウンドスペクトル (図中) を示す。その結果、ソーダガラス CP のバックグラウンドは 0.03 カウント/分であり、鉛ガラスを用いた従来の CP が持つバックグラウンドに対して約 18 分の 1 以下のバックグラウンドであることがわかった。本開発によって、 α 線バックグラウンドに起因した放電現象による CP ガス検出器の不安定動作を抑えることが出来るようになった。本開発実験で得られたソーダガラス CP のマイクロパターンガス検出器としての性能を図 6 に示す。

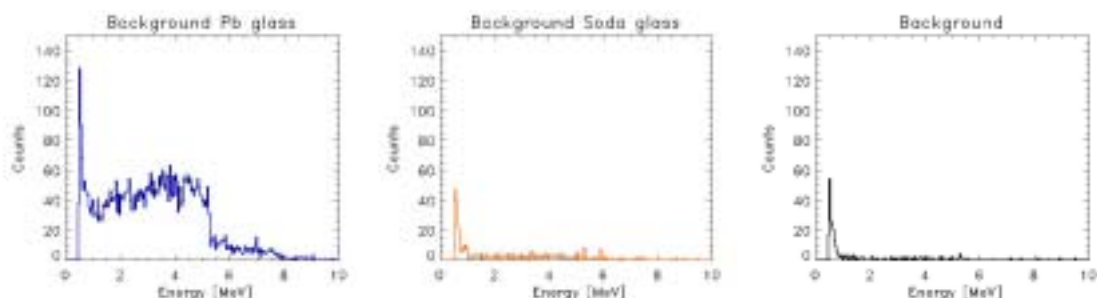


図 5. α 線バックグラウンドスペクトル。左) 鉛ガラスを使用した従来の CP、中) 今回開発したソーダガラス CP、右) α 線検出器のバックグラウンド。

図 6 (左) は、使用した CP の写真であり、開口率は 70 % である。図 6 (中) は、5.9keV の X 線に対して得られたエネルギー波高分布であり、エネルギー分解能 24% (半値幅) を達成している。使用したガスはアルゴン + メタン + トリメチルアミンの混合ガス 1 気圧である。図 6 (右) は、5.9keV の X 線を約 500 発入射して撮像した X 線イメージである。使用したソーダガラス CP の 100 μ m ϕ の穴径が鮮明に見て取れる。以上の結果から、ソーダガラスを材料として用いたキャピラリープレートのガス検出器としての動作が確認でき、低バックグラウンドが要求される環境下に適した CP ガス検出器の開発に成功した。(2004 IEEE Nuclear Science Symposium, Medical Imaging Conference: 特願 2003-030797「キャピラリープレート、その製造方法、ガス比例計数管、及び撮像システム」)

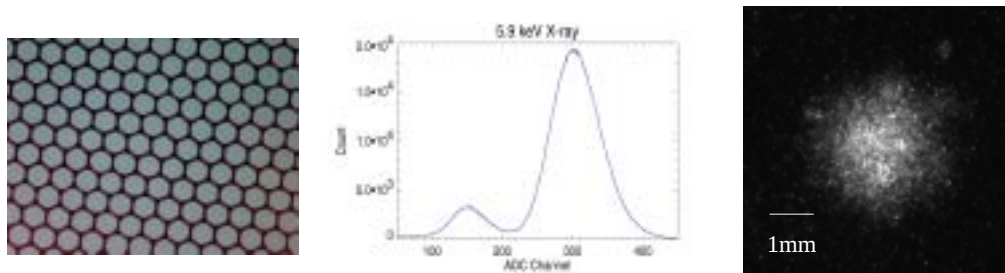


図6. 左)ソーダガラス CP の写真。中)5.9keV の X 線に対するエネルギー波高分布。使用したガスはアルゴン+メタン+トリメチルアミンの混合ガス 1 気圧。右)X 線を積算したイメージ。100 μm の穴径が鮮明に見て取れる。

2) 光増殖デバイスとして動作させるためのガスの最適化

CP のマイクロパターンガス検出器としての特性試験を SPring-8,高エネルギー加速器研究機構の両放射光施設ならびに原子力研究所の JRR-3M 施設を用いて行い光増殖デバイスとしての性能評価を行った。これらの研究から、CP ガス検出器にアルゴン、ヘリウム、ネオンを主ガスとし、波長変換ガスとしてトリメチルアミンを混合ガスとして使用した場合に、光増殖デバイスとして動作する事を示した。(Nucl. Instr. and Meth. A, 525: 6-11, 2004, Nucl. Instr. and Meth. A, 529: 332-335, 2004, Nucl. Instr. and Meth. A, 530: 446-452, 2004)

これまでの CP ガス検出器を用いた光イメージング方法は、CP からの電子・光増殖に伴う発光をレンズ光学系とイメージンシファイド CCD カメラを用いたシステムによって観測するものであった。本システムを用いた開発を続ける中で、現在のレンズ光学系における光損失が本システムの高感度性能を劣化させる一つの要因となることがわかった。この問題は、1つのキャピラリー管で発生した光子が光学系の開口率によって透過率 0.5%以下に制限されるため、増殖された光の大部分を読み出し系に導く前に損失することに起因している。そこで、光学系で光量を減らすことなく CP 内での発光を高感度に撮像できるデバイスの開発を本研究でおこなった。まず、CP ガス検出器からの励起発光をファイバーオプティクスプレート(FOP)を介して光検出器に導く方法を考案した。本手法における光学系の透過率は約 20 %程度と見積もられ、従来の光学系と比較して約 40 倍の光増量が期待できる。しかしながら、従来使用していたアルゴン+メタン+トリメチルアミンの混合ガスの発光波長は 290nm であり、その励起発光波長に対する FOP の透過率が 1%以下と低いことがわかった。そこで、テトラフルオロメタン(CF_4 ガス)を CP ガス検出器の混合ガスとして充填し、光励起発光型ガス検出器の開発を行った。このガスは、2000 年にポルトガルのフラガ博士らが発表した成果であり、テトラフルオロメタン(CF_4 ガス)とアルゴン(Ar)の混合ガスからの励起発光が、可視光から赤外光領域の波長領域にかけて分布し、ピーク波長が約 620nm にあることが示されている。私はまず CP ガス検出器に充填するガスに Ar(90%) + CF_4 (10%)混合ガスを選択し、X 線を用いてマイクロパターンガス検出器としての性能を調べた。

図7にAr + CF_4 混合ガス1気圧を封入したCPガス検出器のキャピラリープレート間の印加電圧

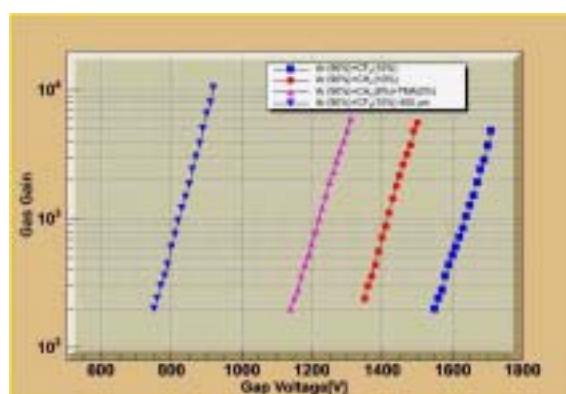


図7. Ar + CF_4 混合ガス 1 気圧のキャピラリープレート間の印加電圧に対する電子増幅度の関係(青 400 μm 厚、青□ 800 μm 厚)を示す。参考のためにメタン(赤)、TMA 混合ガス(ピンク)の電子増幅度も示す。

に対する電子増幅度の関係を示す。電子増幅度は印加電圧に対して指数関数的に上昇し、ガス比例計数管としての動作が確認できた。また、400・m厚と800・m厚のCPの比較を行ったところ、400・m厚は800・m厚のCPに比べて、同じ電子増幅度を得るのに約800Vも低い電圧で動作することがわかった。この結果は、薄いCPを使うことによって低電圧で、安定に高い増幅率が達成できることを示しており、検出器の高感度化が期待できる。比較のために同じセットアップにおいてAr(90%) + CH₄(10%)混合ガスおよびAr(90%) + CF₄(8%) + TMA(2%)混合ガス1気圧を充填したときのガス増幅度を示す。Ar + CF₄ガスでは、Ar + CH₄混合ガスおよびAr + CH₄ + TMA混合ガスに比べて同じガス増幅度を得るのに230Vおよび420V高い印加電圧を必要とした。

続いて、Ar(90%) + CF₄(10%)混合ガスを封入したCPガス検出器に10keVのX線を入射させ電荷信号および励起発光特性を調べた。ガス増幅度が約4000の時にCGPCのアノード電荷信号から得られた波高分布と励起発光を光電子増倍管で取得した際に得られたパルス波高を図8a)およびb)にそれぞれ示す。電荷信号、励起発光信号ともに10keVのメインピークと7keVのエスケープピークが分離されているのがわかる。エネルギー分解能は電荷信号で約22% (FWHM) 励起発光信号で約24% (FWHM) であった。また、図8c)は、光電子増倍管で得られた励起発光に対するアノード電荷信号の関係を示しており、励起発光量と電荷信号が良く相関していることがわかる。

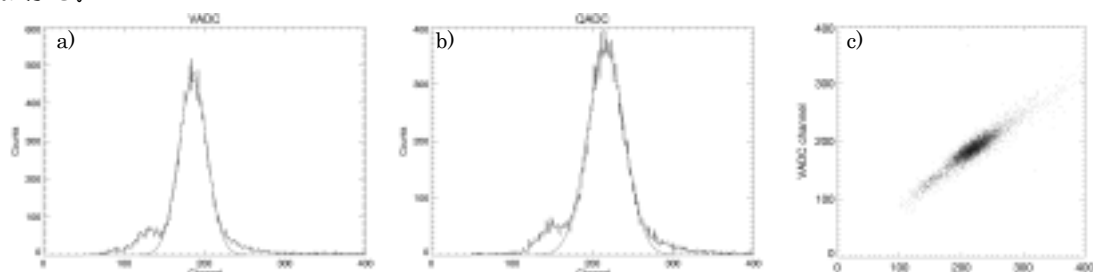


図8. Ar+CF₄(10%) 1気圧を使用したCPガス検出器で得られた10keVのX線に対するa)電荷信号とb)励起発光のパルス波高分布。c)励起発光量と電荷信号の相関関係。

図10に、Ar(90%) + CF₄(10%) 1気圧を充填したCPガス検出器にマイクロフォーガスX線ビームを入射させた時のX線透過イメージ(左)とテストチャートイメージ(右)を示す。Ar + CF₄混合ガスを充填したCPガス検出器において、優れた撮像能力と25μmの位置分解能を達成することができた。以上の基礎特性試験から、Ar + CF₄ 混合ガスを充填したCPガス検出器はX線に対して十分な発光特性を示していることがわかった。また、可視光から赤外線に至る波長領域における発光特性がCCD素子の量子感度に良くあっていることから、CPガス検出器イメージングシステムの読み出し装置としてCCDセンサーを用いた場合、使用する充填ガスとして最も適したガスの一つであることがわかった。(2005年3月物理学会、応用物理学会発表)

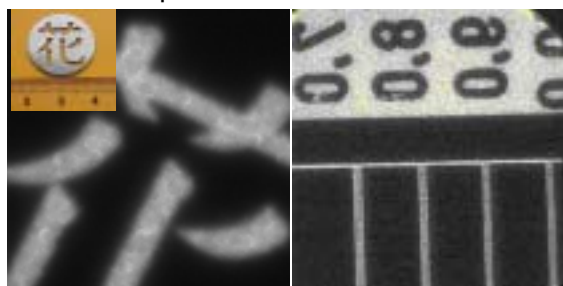


図10. Ar(90%) + CF₄(10%) 1気圧を充填したCPガス検出器にマイクロフォーガスX線ビームを入射させたときのX線透過イメージ(左)とテストチャートイメージ(右)

3) 光電面のガス中における化学的・物理的特性の研究

光電面の製作には専用の蒸着装置と特殊真空装置が必要であり、国内では浜松ホトニクスがその高い製作技術を有している。ノーベル物理学賞を受賞した小柴昌俊先生が、神岡で行ったニュートリノ研究に浜松ホトニクス社製の光電子増倍管が大きく貢献したことは記憶に新しい。一般的に光電面の取り扱いは、極微量の酸素の混在によって急激に酸化反応が進み化学的

に劣化してしまうことから、真空中で製作し、また真空容器の中で動作させる事となっている。我々は、ガスを封入した新しい光電面作成のための技術提携ならびに共同開発を浜松ホトニクスと2003 年度から開始し、本検出器の実用化に向けて開発研究を行った。光電面は、ガラスに薄く蒸着したアンチモンにセシウムやカリウムのアルカリ系金属を反応させたバイアルカリタイプを製作した。光電面製作後にアルゴンガスを充満して化学的特性の試験を行ったところ 18 ヶ月以上安定に動作することがわかった。図9に光電面試験を行ったガス封入型光電面付 CP ガス検出器の写真を示す。ガスを封入した光電面を持つ CP をガス検出器として動作させることによって、外圧の影響を受けずまた高磁場、低温、電気ノイズの混在する環境下においても動作可能な「新しい光検出器」の開発が期待でき、高感度なイメージングシステムの実用化に一步近づいた。



図 10 . 山形大学が浜松ホトニクスと共同で開発を続ける光電面付 CP ガス検出器。

5 自己評価:

本研究では、「新しい光イメージングデバイスの開発」のために、ガラス毛细管であるキャピラリープレートを「穴の開いたマイクロパターンガス検出器」として動作させ

- 1) キャピラリープレートのガス検出器としての最適化
- 2) 光増殖デバイスとして動作させるためのガスの最適化
- 3) 光電面のガス中における化学的・物理的特性

の研究を行った。その結果、当初の研究目標をほぼ達成することができた。特に、アルゴン + テトラフルオロメタンの混合ガスを用いた本検出器の開発の際、光増殖のための印加電圧が従来使用しているアルゴン + メタン + トリメチルアミン混合ガスにくらべて 200V 以上高い印加電圧を必要とした。このことから、検出器で使用する絶縁体の耐圧を超える結果となり、放電問題にぶつかった。この問題を検出器内部構造ならびに CP の形状の改良によって克服できたことが、本研究を大きく推進したと考えている。今後は、得られた成果をもとに本研究で開発を進めてきた撮像型イメージングシステムの実用化を目指す。光電面開発については、浜松ホトニクス・電子管事業部と共同でガス中での光電面開発を開始している。CP ガス検出器を用いた信号増殖領域部では、キャピラリープレート (CP) の材料・および穴径や厚みといったプレートのパラメータおよび封入するガスの最適化について研究を行ってきており、ソーダガラスを用いたプレート製作により、低バックグラウンド化を実現した。今後は、増殖された光・電子信号読み出し部の開発を行い効率よく増幅信号を読み出すシステムを開発し実用化を目指したい。

6 研究総括の見解:

細胞内の出来事を目で見ることは重要である。その観点から、細胞内の発光現象を精度良く定量的に測定できる新しい光イメージングデバイスとして、新素材キャピラリープレートガス検出器を応用すべく様々な検討をしてきたことは評価に値する。しかし、所期の目的である細胞への応用に対する検討にまでは至らなかったことが残念である。これまでの努力を無駄にしないよう、さらに目的に向かって進み、日本発の画期的な細胞期の解析ツールにしていきたい。

7 主な論文等:

論文

1. F. Tokanai, T. Atsumi, S. Gunji, T. Okada, H. Sakurai "Soda glass capillary plate gas detector.", *IEEE Trans. on Nucl. Sci.*, 2004 (In press)

2. F. Tokanai, H. Sakurai, S. Gunji, S. Motegi, H. Toyokawa, M. Suzuki, K. Hirota, S. Kishimoto and K. Hayashida, "Hard X-ray polarization measured with a Compton polarimeter at synchrotron radiation facility", *Nucl. Instr. and Meth. A*, 530: 446-452, 2004
3. F. Tokanai, S. Motegi, H. Sakurai, S. Gunji, J. I. Suzuki, T. Oku, "A test of track imaging by cold neutron using optical capillary gas proportional counter", *Nucl. Instr. and Meth. A*, 529: 332-335, 2004
4. H. Sakurai, F. Tokanai, S. Gunji, S. Motegi, H. Toyokawa, M. Suzuki, K. Hirota, S. Kishimoto, "Measurement of X-ray polarization using optical imaging detector with capillary plate". *Nucl. Instr. and Meth. A*, 525: 6-11, 2004
5. H. Sakurai, S. Gunji, F. Tokanai, T. Maeda, N. Ujiie, N. Saitoh, "Characteristics of an X-ray Imaging Detector with Double Capillary Plates", *Nucl. Instr. and Meth. A*, 513, pp282-286, 2003.
6. H. Sakurai, S. Gunji, F. Tokanai, T. Maeda, N. Ujiie, N. Saitoh, "Photoelectron Track Image of Capillary Gas Proportional Counter", *Nucl. Instr. and Meth. A*, 505, pp219-222, 2003.
7. H. Sakurai, S. Gunji, F. Tokanai, Y. Inoue, T. Maeda, T. Masuda, "Detection of photoabsorption point with capillary imaging gas proportional counter", *IEEE Nucl. Trans. Sci.*, 49, No.3, pp1560-1565, 2002

特許出願

研究期間累積件数:2 件

1. 特願 2003-030797 キャピラリープレート、その製造方法、ガス比例計数管、及び撮像システム。
2. 特願 2003-2720328 ガス比例計数管及び撮像システム。

学会発表

1. F. Tokanai, T. Atsumi, S. Gunji, T. Okada, H. Sakurai: Soda Glass Capillary Plate Gas Detector. IEEE 2004 Nuclear Science Symposium, Medical Imaging Conference in ROMA
2. H. Sakurai, S. Gunji, F. Tokanai, T. Maeda, N. Ujiie, N. Saitoh: Characteristics of an X-ray Imaging Detector with Double Capillary Plates. PSD6 6TH INTERNATIONAL CONFERENCE ON POSITION SENSITIVE DETECTORS 9-13 SEPTEMBER 2002 AT THE UNIVERSITY OF LEICESTER, UK
3. H. Sakurai, F. Tokanai, S. Gunji, S. Motegi, H. Toyokawa, M. Suzuki, K. Hirota, S. Kishimoto: Measurement of X-ray polarization using optical imaging detector with capillary plate. IMAGING 2003 INTERNATIONAL CONFERENCE ON IMAGING TECHNIQUES IN SUBATOMIC PHYSICS, ASTROPHYSICS, MEDICINE, BIOLOGY AND INDUSTRY
4. 櫻井敬久, 門叶冬樹, 郡司修一, 茂木鈴香, 豊川秀訓, 鈴木昌世, 広田克也, 岸本俊二, 鈴木淳市, 奥隆之: キャピラリーガス比例計数管による放射光偏光 X 線撮像 II。; 日本物理学会 第 59 回年次大会 (2004 年、福岡)
5. 櫻井敬久, 郡司修一, 門叶冬樹, 茂木鈴香, 豊川秀訓, 鈴木昌世, 広田克也, 岸本俊二, 林田清: キャピラリーガス比例計数管による放射光偏光 X 線撮像。; 日本物理学会 秋季大会 (2003 年、宮崎)

6. 櫻井敬久, 郡司修一, 門叶冬樹, 茂木鈴香, 豊川秀訓, 鈴木昌世, 広田克也, 岸本俊二, 林田清: キャピラリーガス比例計数管による放射光偏光 X 線撮像。; 応用物理学会 秋季大会 (2003 年、宮崎)
7. 茂木鈴香, 門叶冬樹, 櫻井敬久, 郡司修一, 齋藤信人, 氏家夏樹, 豊川秀訓, 鈴木昌世, 広田克也: コンプトン散乱計を用いた放射光硬 X 線の偏光度測定。; 日本物理学会 第 58 回年次大会 (2003 年、東北学院大学)
8. 齋藤信人, 門叶冬樹, 櫻井敬久, 郡司修一, 氏家夏樹, 茂木鈴香, 岸本俊二, 林田清: ガス比例蛍光計数管を用いた X 線偏光計の放射光実験。; 日本物理学会 第 58 回年次大会 (2003 年、東北学院大学)
9. 茂木鈴香, 門叶冬樹, 櫻井敬久, 郡司修一, 齋藤信人, 氏家夏樹, 林田 清, 豊川秀訓, 鈴木昌世, 広田克也, 岸本俊二: トムソン散乱検出器を用いた放射光硬 X 線の偏光度測定。; 日本物理学会 秋季大会 (2002 年、立教大、中部大)
10. 櫻井敬久, 郡司修一, 門叶冬樹, 氏家夏樹, 齋藤信人, 茂木鈴香, 林田 清, 豊川秀訓, 鈴木昌世, 広田克也, 岸本俊二: 放射光偏光 X 線を用いた撮像型キャピラリーガス比例計数管の特性試験。; 日本物理学会 秋季大会 (2002 年、立教大、中部大)
11. 門叶冬樹, 櫻井敬久, 郡司修一, 齋藤信人, 氏家夏樹, 茂木鈴香, 林田 清, 豊川秀訓, 鈴木昌世, 広田克也, 岸本俊二: CZT 検出器を用いた放射光硬 X 線の偏光度測定。; 日本物理学会 秋季大会 (2002 年、立教大、中部大)
12. 櫻井敬久, 郡司修一, 門叶冬樹, 氏家夏樹, 齋藤信人, 前田啄哉: キャピラリープレートを用いた X 線光電子飛跡イメージング。; 日本物理学会第 57 回年次大会 (2002 年、立命館大)

研究課題別評価

1 研究課題名:ミトコンドリア病の病態発現機構の解明と遺伝子治療法の探索

2 研究者氏名:中田 和人

3 研究の狙い:

欠失突然変異型や点突然変異型のミトコンドリア DNA(mtDNA)の蓄積はミトコンドリア脳筋症(ミトコンドリア病)の原因となり、さらに最近では、糖尿病や個体老化、パーキンソン病やアルツハイマー病等の原因となる可能性が強く示唆されている。しかし、突然変異型 mtDNA とこれらの多様な病態発症の因果関係は立証されておらず、さらに、その詳細な病態発症機構も解明されていない。そこで本研究は、病原性欠失突然変異型 mtDNA(欠失型 mtDNA)を導入したミトコンドリア遺伝子疾患モデルマウス(mito-mice)を用いて、1)欠失型 mtDNA が引き起こす多様な病態の実体を精査し、その病態発現機構を解明し、2)細胞内のミトコンドリアが機能的に単一のオルガネラとして振る舞うこと(ミトコンドリア間相互作用)を利用し、mtDNA の突然変異に起因する様々な疾患群の効果的な治療法の探索を目指すものである。

4 研究成果:

本研究の成果は、以下の3点である。

(1) mito-mice を用いたミトコンドリア機能異常による多様な病態の精査

さきがけ研究遂行以前に、欠失型 mtDNA を優位に蓄積した mito-mice は多臓器のミトコンドリア呼吸不全を呈し、これにより低体重、高乳酸血症、心伝導障害、腎不全を発症することを突き止めていた。さきがけ研究の遂行によって、欠失型 mtDNA の含有率の高い mito-mice は、難聴、運動障害、精子形成異常、骨化の異常、網膜異常を発症することが分かった。これらの多様な病態発症は欠失型 mtDNA の蓄積によって誘導されるため、その原因は欠失型 mtDNA の蓄積のみに起因すると結論できる。現在のミトコンドリア遺伝子疾患に関する研究は患者研究に依存するところが多く、その基礎研究として患者由来の培養細胞を用いた体細胞遺伝学的研究がなされているに過ぎない。このような状況の中で、mito-mice が呈する多様な臨床症状の列挙は、実際の臨床における確定診断の一助として極めて重要な知見となる。

一方、欠失型 mtDNA の含有率の高い mito-mice は、これまでの報告とは異なり、糖尿病を発症しないことが分かった。特筆すべきは、欠失型 mtDNA の含有率が増加すると、インスリン分泌が亢進し、血糖値が低下してしまうのである。また、このようなエネルギー欠損に陥った mito-mice は糖負荷後に高乳酸血症になってしまう。つまり、エネルギー欠損に陥った mito-mice では、インスリン分泌を亢進させ、解糖系による ATP 産生を増強させるため、低血糖となり、結果として高乳酸血症に陥ってしまうと考えられる。したがって、少なくともマウスにおいては、突然変異型 mtDNA の蓄積は糖尿病発症の直接的な原因ではなく、むしろ、核ゲノムの突然変異や生活習慣に起因する糖尿病の発症を増強するような十分条件的な要因である可能性を示唆している。この結果だけでヒトのミトコンドリア糖尿病の再検討を提唱するわけにはいかないが、少なくともこの結果は、核—ミトコンドリア両ゲノム変異による新たな病態発症調節機構の存在を示唆しており、新たな研究分野の創出が十分に期待できると考えられる。

(2) ミトコンドリア相互作用と病態発症調節機構

ミトコンドリア病では、変異型 mtDNA が優位に蓄積しない限り、病態発症は起こらない。つま

り、病態発症には変異型 mtDNA の閾値効果が存在している。この実体を突き止めるため、正常な *M. spretus* 型の mtDNA を有した受精卵 (正常なミトコンドリア呼吸機能を有する) に *M. m. domesticus* 由来の欠失型 mtDNA 含有するミトコンドリア (呼吸不全を呈する) を導入し、新たな mito-mice を作製した。このマウスの組織を構成する細胞の個々のミトコンドリアは、呼吸機能を有する宿主由来のミトコンドリアと呼吸不全のドナー由来のミトコンドリアがモザイクに存在するはずである。しかし、mito-mice の臓器の細胞は、一様に呼吸機能を有するミトコンドリアのみ、または、一様に呼吸不全のミトコンドリアのみを含有していた。さらに、呼吸機能を有するミトコンドリアのみを含有する細胞でさえ、ドナー由来の *M. m. domesticus* の欠失型 mtDNA が検出された。これらの結果は、ドナー由来のミトコンドリアと宿主由来のミトコンドリアの融合とそれに続く物質の交換、すなわちミトコンドリア間相互作用を想定してはじめて説明することができる。つまり、ミトコンドリア内の *M. m. domesticus* の欠失型 mtDNA の割合が閾値を超えない場合は、存在する *M. spretus* の野生型 mtDNA から転写される遺伝子産物のおかげでミトコンドリア呼吸機能も正常に近い状態を保つことができる。しかし *M. m. domesticus* の欠失型 mtDNA が閾値を超えると、*M. spretus* の野生型 mtDNA から転写される遺伝子産物が減少し、急激に全てのミトコンドリアの呼吸機能が失われてしまうのである。この全てのミトコンドリアの機能喪失こそが、様々な病態発症を引き起こす原動力となるのである。

このミトコンドリア間相互作用を検証するために作製した mito-mice では、個体内に含有されている mtDNA 分子の識別が可能である。これを利用して mtDNA の分子間組換えの解析を行ったところ、ドナーミトコンドリアに含まれていた *M. m. domesticus* の欠失型 mtDNA 分子内に宿主ミトコンドリアに含まれているはずの *M. spretus* の mtDNA の塩基配列が存在する、組換え型 mtDNA 分子を見出すことができた。このような分子の存在は、明らかに宿主とドナーのミトコンドリア間で物質交換が起きていることを示している証拠となる。

(3) ミトコンドリア相互作用を利用した遺伝子治療法の探索

ミトコンドリア間相互作用の存在は、新規治療法の開発の可能性を示唆している。つまり、欠失型 mtDNA を多含する受精卵であっても、野生型 mtDNA や欠失変異によって喪失している塩基配列を有する DNA 分子を持つミトコンドリアを導入できれば、相互作用によって、ミトコンドリア呼吸機能を相補できるわけである。しかし、現時点では、二重の生体膜によって完全に閉ざされたミトコンドリアマトリックス内に外来性の DNA 分子を導入する手段がないため、具体的な方法論の確立には至らなかった。

1つの治療方法としては、欠失型 mtDNA の含有率の高い mito-mice の受精卵の前核を、野生型 mtDNA を有する受精卵に核移植によって導入することが極めて現実的である。もちろん、mito-mice の受精卵の前核移植では核の周辺に存在する欠失型 mtDNA を含有するミトコンドリアも同時に移植されてしまうが、移植先の野生型 mtDNA を有するミトコンドリアと相互作用し、呼吸不全を回避できると考えられる。

5 自己評価:

提案した研究課題には大きくわけて2つの課題があった。1つは、mtDNA の突然変異に起因する多様な病態を枚挙し、その病態発症機構を明らかにすることであった。この課題に関しては、当初の目的を達成することができたと考えている。特に、細胞内の個々のミトコンドリアが分裂/融合を介して内容物を交換(ミトコンドリア間相互作用)することで、病態発症が制御されている事実、さらにはこの物質交換はmtDNA の遺伝子産物だけでなく、mtDNA も交換され組換えを起こすという事実を明確にできたことは特筆に値すると考えている。もう1つ課題である治療法の探索に関しては、具体的な治療法の開発ができず、前述のミトコンドリア間相互作用を利用して新たな治療法の開発が可能であるという提唱にとどまってしまった。この点は、研究立案段階や実際の研究

遂行段階で研究の方向性を明確に決定できなかったことが原因と考えている。

さがけ研究では研究者個人の研究立案、実行、評価を最優先して頂けるため、研究者自身の questions に対する answers を得るためには最良の研究環境であった。このような研究環境を与えて頂いた領域代表の関谷先生、アドバイザーの先生方、領域事務所の皆様に心より感謝申し上げます。また、楽しい時間をともに過ごした本領域の仲間にも多くの助言を頂き、また多くの刺激も受けました、ありがとう。

6 研究総括の見解:

変異ミトコンドリアDNAを導入した疾患モデルマウス(mito - mice)の病態解析から、細胞内のミトコンドリアの分裂、融合を介して内容物を交換していることを明らかにしたことは優れた成果と評価できる。一方、モデルマウスを用いた治療法の開発に関しては、ミトコンドリアへの外来遺伝子導入の難しさから不発に終わったが、今後の新たな切り口での挑戦を期待したい。

7 主な論文等:

原著論文

1. A. Sato*, K. Nakada*, M. Akimoto, K. Ishikawa, T. Ono, H. Shitara, H. Yonekawa, and J.-I. Hayashi (2005): Rare creation of recombinant mtDNA haplotypes in mammalian tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, in press. *These authors contributed equally.
2. K. Nakada*, A. Sato*, H. Sone, A. Kasahara, K. Ikeda, Y. Kagawa, H. Yonekawa, and J.-I. Hayashi (2004): Accumulation of pathogenic Δ mtDNA induced deafness but not diabetic phenotypes in mito-mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 323: 175-184. *These authors contributed equally.
3. A. Sato, K. Nakada, H. Shitara, H. Yonekawa, and J.-I. Hayashi (2004): *In vivo* interaction between mitochondria carrying mtDNAs from different mouse species. *Genetics*, 167: 1855-1861.
4. C.-S. Chen, R. Matsuoka, S. Arai, Y. Momiyama, H. Murakami, S.-y. Kuno, K. Ishikawa, K. Nakada, M. Tawata, and J.-I. Hayashi (2004): Determination of normal ranges of mitochondrial respiratory activities by mtDNA transfer from 54 human subjects to mtDNA-less HeLa cells for identification of the pathogenicities of mutated mtDNAs. *J. Biochem.*, 135: 237-243.
5. T. Ono, Y. Kasahara, K. Nakada, and J.-I. Hayashi (2004): Presence of interaction but not complementation between human mtDNAs carrying different mutations within a *tRNA^{Leu(UUR)}* gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 314: 1107-1112.
6. K. Nakada, T. Ono, and J.-I. Hayashi (2002): A novel defense system of mitochondria in mice and human subjects for preventing expression of mitochondrial dysfunction by pathogenic mutant mtDNAs. *Mitochondrion*, 2: 59-70.

総説

1. 中田和人、林純一:「ミトコンドリア病の研究に有効なモデル細胞とモデルマウス」*Molecular Medicine* 41:306-312 (2004)。
2. 中田和人、林純一:「ミトコンドリア遺伝子疾患モデルマウスとミトコンドリア病」*実験医学* 21:1724-1729(2003)。
3. 中田和人、小野朋子、林純一:「ミトコンドリア連携説」*遺伝子医学* 7:121-124(2003)。
4. 中田和人、井上貴美子、小野朋子、林純一:「ミトコンドリア遺伝子疾患の細胞・動物モデル」*脳の科学* 25:349-356 (2003)。
5. 中田和人、井上貴美子、小野朋子、林純一:「ミトコンドリア遺伝子疾患モデルマウスの病

態発症とミトコンドリア連携説」蛋白質核酸酵素 増刊号 48:487-492(2003)。

特許 なし。

受賞 なし。

招待講演

1. 中田和人:「老化とミトコンドリア遺伝子制御」;第8回 Wako つくばフォーラム 長寿に向けて;最新の基礎研究と実践(2004年、筑波)
2. 中田和人、林純一:「ミトコンドリア病モデルマウス(mito-mouse)の開発」;第3回日本ミトコンドリア研究会、市民公開講座(2003年、福岡)
3. 中田和人、林純一:「マイトマウス:欠失変異型 mtDNA 導入マウスの思いがけない病態発症」;日本分子生物学会大会 シンポジウム (2003年、神戸)
4. K. Nakada and J.-I. Hayashi: Mouse models with mitochondrial DNA-based diseases; The 3rd Meeting on Pathology of Genetically Engineered Mice. (2003, Kumamoto).
5. K. Nakada and J.-I. Hayashi: The first model mouse for mitochondrial DNA-based diseases.; The 6th Molecular Biology and Biotechnology Workshop (2002, Osaka).
6. K. Nakada and J.-I. Hayashi: Interaction theory of mammalian mitochondria.; The 1st J-mit International Symposium. (2002, Tokyo).
7. 中田和人、小野朋子、林純一:「ミトコンドリア連携説」;第75回日本生化学大会シンポジウム「ミトコンドリアのダイナミクス」(2002年、京都)

研究課題別評価

1 研究課題名: 転写伸長反応の制御を介した細胞機能発現機構の解明

2 研究者氏名: 山口 雄輝

3 研究の狙い:

RNA ポリメラーゼ II (RNAPII) は遺伝情報発現を担う中心酵素である。RNAPII による転写は様々なステップを経て進む。RNAPII はまず遺伝子のプロモーターに結合し (転写開始前 / 開始)、DNA 上を滑りながら mRNA 前駆体を合成していく (転写伸長)。私がこの研究を開始した頃は前者の研究が盛んで、後者はほとんど無視されていた。しかし私達はいくつかの理由から、転写伸長に注目した。理由の一つは単純で、転写伸長には思いのほか長い時間 (遺伝子の長さによって数分から数時間程度) がかかるという事実である。遺伝子発現は細胞内外の刺激に応じて迅速に制御される必要があり、このような長い時間、何の制御もないとは考えられない。

私達は試験管内のアッセイ系を用いて、転写伸長反応を制御する全く新しいタイプの転写因子、すなわち転写伸長因子を同定した (*Genes Dev.* 1998; *EMBO J.* 1998; *Cell* 1999; *J. Biol. Chem.* 1999; *Mol. Cell* 2000, *Science* 2002)。DSIF は Spt5 と Spt4 という 2 つのサブユニットからなり、転写伸長を抑制も促進もする。NELF は 4 つのサブユニットからなり、転写伸長を抑制する。P-TEFb は Cdk9 と Cyclin T という 2 つのサブユニットからなり、そのキナーゼ活性により転写伸長を促進する。私が提唱しているモデル (図1) によれば、DSIF と NELF は協調的に働いて転写伸長を抑制する。そしてタンパク質キナーゼ P-TEFb は RNAPII の C 末端ドメイン (CTD) をリン酸化することで、この抑制を解除する。さらに DSIF は、NELF とは無関係に転写伸長を促進する。

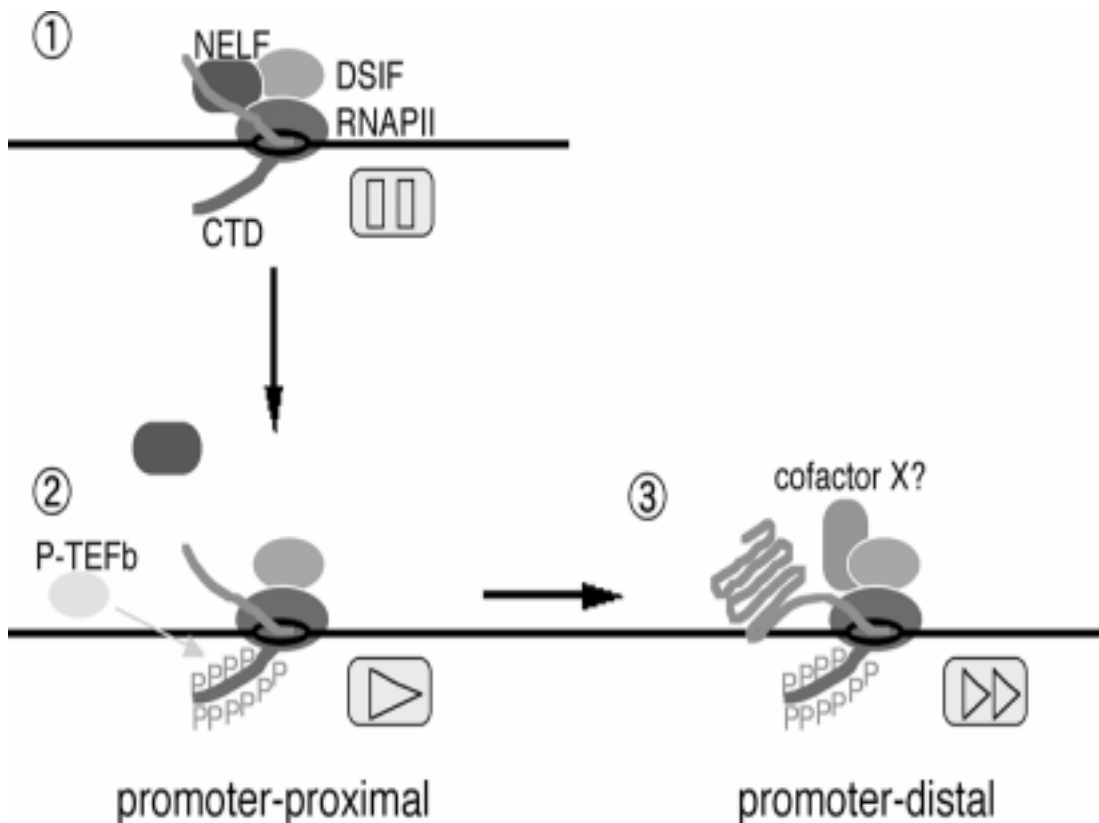


図1. DSIF, NELF, P-TEFbによる転写伸長制御のモデル

試験管内の実験結果から、これら転写伸長因子は基本的な転写装置の一部であり、極めて重要な因子群であると考えられた。しかし、これらは純粹に生化学的な手法により同定されたので、細胞内でどんな遺伝子を制御し、どんな役割を果たしているのか、そもそも本当に「転写伸長因子」として働いているのか、ということすら分からなかった。そこで、さきがけ研究において私は、これら転写伸長因子の細胞機能を解明することを目指した。

研究のアプローチとして、第一に、細胞内のタンパク質-DNA 間の相互作用を可視化することで、遺伝子上での RNAPII の「動き」を明らかにすることを目指した。その方法として、ショウジョウバエの唾液染色体の免疫染色とクロマチン免疫沈降の 2 つを用いた。唾液染色体の免疫染色は、空間分解能は低いがゲノムワイドの解析は容易、クロマチン免疫沈降は空間分解能は高いがゲノムワイドの解析は困難、という特徴がある。第二に、転写伸長因子の過剰発現や発現抑制を行なって表現型を解析することで、転写伸長因子の細胞機能を明かにすることを目指した。表現型としては、細胞増殖、トランスクリプトーム、RNAPII の動態の 3 つに注目した。

4 研究成果:

成果 1: NELF の生化学的解析 (*Mol. Cell. Biol.* 2002; *Mol. Cell. Biol.* 2003)

精製した NELF は 5 種類のポリペプチド A, B, C, D, E から構成される。さきがけ研究を開始した時点で、NELF-A と NELF-E 以外のポリペプチドは未同定だった。そこで、質量分析によりそれらの部分アミノ酸配列を決定し、全長の遺伝子を単離した。驚いたことに、NELF-C と NELF-D はほとんど同一のポリペプチドだった (図 2)。解析の結果、NELF-C は NELF-D の N 末端に 9 アミノ酸が付加したものであり、翻訳開始位置の使い分けによって同一の mRNA から生じることが明らかとなった。また、NELF は A, B, C または D, E という 4 種類のサブユニットを 1 分子ずつ含む複合体であることが明らかとなった。NELF-B は最近、バージニア大学の Rong Li 博士のグループによって、乳癌抑制遺伝子 BRCA1 産物の相互作用因子として同定された COBRA1 と同一だった。NELF-C/D は機能不明の TH1 というタンパク質と同一だった (図 2)。

バキュロウイルスベクターを用いて 4 種類の NELF サブユニットを昆虫細胞で共発現させ、活性のある組換え NELF 複合体を再構成することに成功した。この系を用い、NELF の各サブユニットの機能について解析した。その結果、NELF-E の RNA 結合ドメインが NELF の機能に重要であること、NELF-A の中に RNAPII との結合に重要な短い領域が存在すること、NELF-B と NELF-C/D が NELF 複合体の構造維持に不可欠であることなどが明らかとなった。言い換えれば、すべての NELF サブユニットが NELF の機能に何らかの不可欠な役割を果たしていることが明らかとなった。

以上をまとめると、NELF の全てのサブユニットのクローン化し、NELF 複合体を再構成し、個々のサブユニットの役割をある程度まで明らかにした。今後の研究に不可欠な基盤情報や基盤材料を得ることができた。

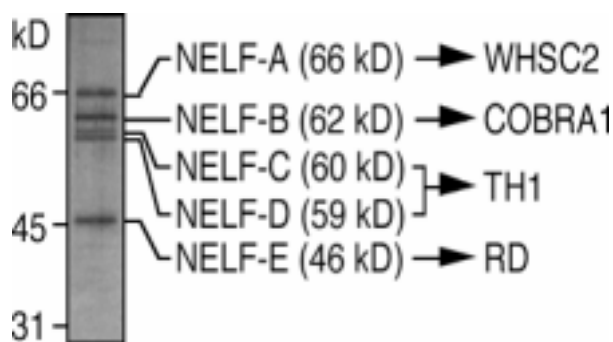


図 2. NELF のサブユニット構成

成果2:熱ショック応答における転写伸長因子の役割 (*Genes Dev.* 2003)

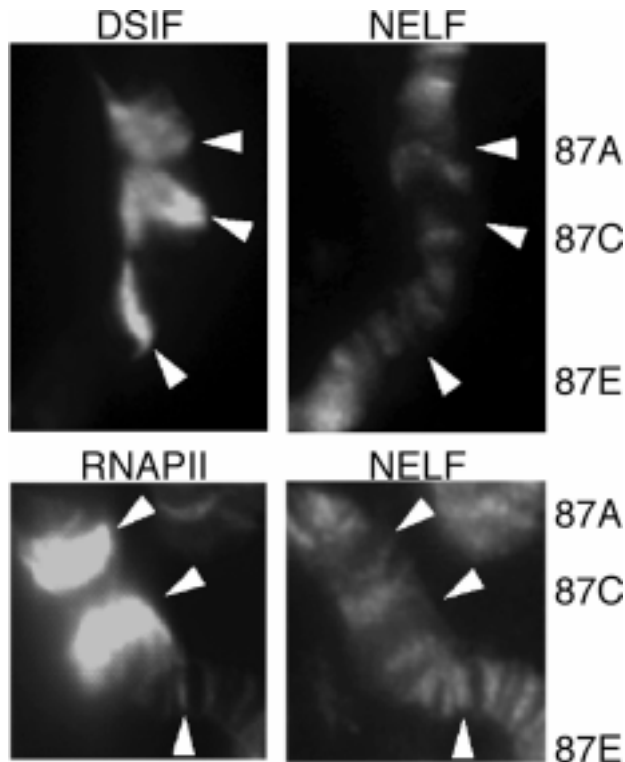


図3. NELFは熱ショック後に熱ショック遺伝子上から外れる。87A, 87C, 87Eは熱ショック遺伝子の場所を表す。

ショウジョウバエの熱ショック遺伝子群は転写因子 HSF によって制御され、熱ショックに应答して迅速に発現する。これらの遺伝子のプロモーター下流には RNAPII が結合していることが知られており、これらの遺伝子の発現が転写の伸長段階で制御されていることが予想された。そこで、熱ショック遺伝子の発現制御に転写伸長因子がどのような役割を果たしているのか調べた。ここでは唾液染色体の免疫染色を活用した。ショウジョウバエの唾液腺ではエンドレプリケーションによって染色体が数千本の束になっており、細胞周期の間期でも光学顕微鏡で見える太さになっている。DNA 色素の染色パターンから遺伝子の位置を特定することができる。

解析の結果、非誘導時に DSIF、NELF、RNAPII の3者が熱ショック遺伝子のプロモーター下流に結合しており、NELF が熱ショックに应答して遺伝子上から解離することが明らかとなった (図3)。さらにノックダウンの実験から、NELF がプロモーター下流における RNAPII の停止に関与していることが明らかとなった (図4)。

まとめると、非誘導時には NELF が DSIF とともに転写伸長を抑制することで、熱ショック遺伝子の発現を抑制しているが、その抑制は熱ショックによって解除されると考えられる。熱ショック依存的な伸長抑制の解除は P-TEFb が担っていると考えられる。これは、試験管内の解析結果から導かれたモデルが細胞内にそのまま適用可能であることの最初の直接的証拠となった。

成果3:性ホルモン応答における転写伸長因子の役割 (*Genes Dev.* 2004)

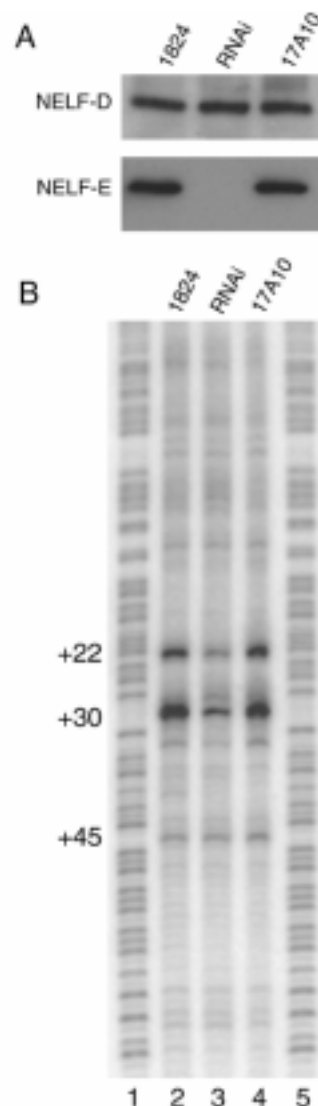


図4. NELFはプロモーター下流でのRNAPIIの停止に関与する

NELF のサブユニットの一つである NELF-B が、乳癌抑制遺伝子 BRCA1 産物の相互作用因子 COBRA1 であったことから、NELF と BRCA1 の間の機能的関係について調べた。BRCA1 は転写因子 ER α と結合し、エストロゲン応答性の遺伝子発現を負に制御することが知られている。NELF がこの過程に関与しているのではないかと考え、解析を行なったところ、およそ予想通りの結果が得られた。ただ興味深いことに、NELF はエストロゲン応答性の遺伝子をすべて抑制する訳でなく、C3 遺伝子や pS2 遺伝子は抑制するが、カテプシン D 遺伝子や c-Myc 遺伝子は抑制しないことが分かった。また熱ショック遺伝子の場合とは異なり、非誘導時には NELF や RNAPII が C3 遺伝子や pS2 遺伝子上に存在していないことが分かった。NELF はエストロゲン刺激後にこれらの遺伝子上にリクルートされ、転写伸長を負に制御していた。

以上のことから、NELF はエストロゲン応答性の遺伝子の一部に対して働き、転写活性化のレベルまたは期間を負に調節していると考えられる。標的遺伝子の選択性が何によって規定されているのかは不明である。

成果4:炎症応答における転写伸長因子の役割 (*Mol. Cell. Biol.* 2004)

ヒト培養細胞において、DSIF のサブユニットの一つである Spt5 の発現を siRNA を用いてノックダウンし、それが細胞の表現型に及ぼす影響を検討した。予備的な結果から、炎症性サイトカインの一つである TNF α に応答した遺伝子発現が異常をきたしていることが分かった。そこで、TNF α の標的遺伝子の一つであり、転写因子 NF- κ B によって制御される A20 遺伝子をモデル系として、DSIF の働きについて詳しく調べた。その結果、DSIF が A20 遺伝子の転写伸長を直接制御しており、その働きが NF- κ B によって制御されていることが明らかとなった。また意外なことに、A20 遺伝子のプロモーター上に、NF- κ B 結合配列とは別の、DSIF の機能を仲介する DNA 配列が存在することが示唆された。

以上のことから、A20 をはじめとする TNF α -NF- κ B 経路の遺伝子群は DSIF の標的遺伝子であることが分かった。また、DSIF の遺伝子特異的な作用メカニズムを理解する上での手がかりが得られた。

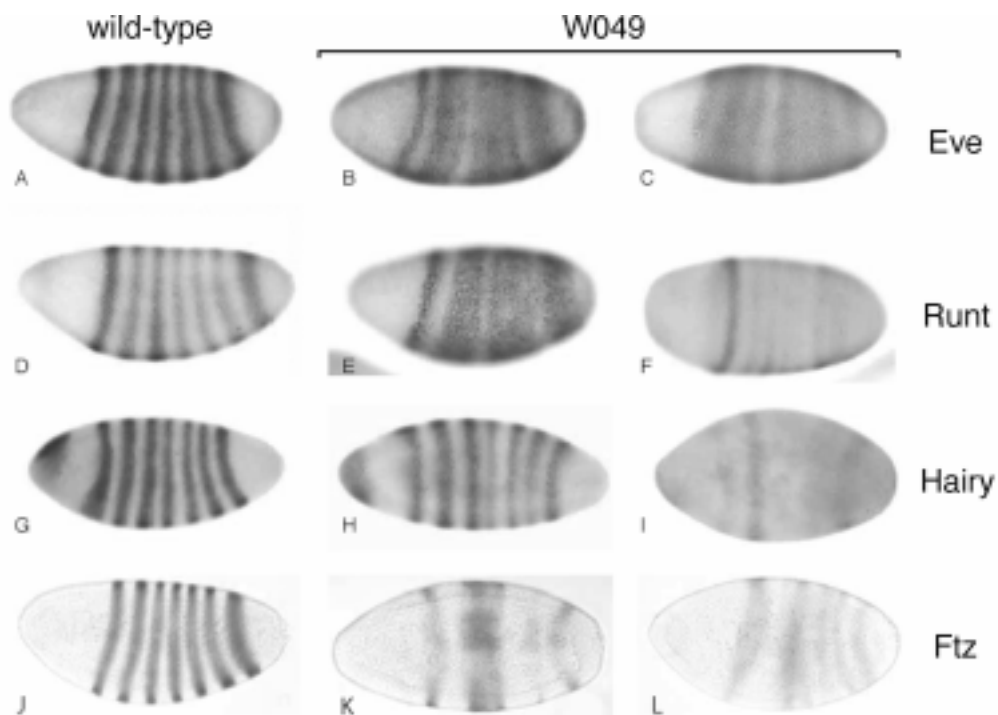


図5. Spt5 に点変異を持つショウジョウバエ (W049) は pair-rule 遺伝子群の発現に異常をきたしている

成果5: ショウジョウバエの体節形成における転写伸長因子の役割 (*Curr. Biol.* 2004)

英国癌研究所の David Ish-Horowicz 博士のグループは、Spt5 にミスセンス変異を持つショウジョウバエの変異体を同定した。この Spt5 の 994 番目の Gly を Asp に置換する変異は、初期発生過程における体節形成に異常を引き起こす。

私は Ish-Horowicz 博士のグループと共同で、この変異が遺伝子発現におよぼす影響について解析を行なった。その結果、この変異体では *pair-rule* 遺伝子群の発現に異常をきたしていることが明らかになった (図5)。また興味深いことに、この変異が試験管内で、DSIF の伸長促進活性にはほとんど影響しないが、伸長抑制活性を著しく損なうことが明らかとなった。

以上の結果から、DSIF の持つ伸長抑制活性が、初期発生過程における *pair-rule* 遺伝子群の発現に重要な役割を果たしていると考えられる。

5 自己評価:

転写伸長因子が細胞内で確かに「転写伸長因子」として働いていることが分かった。具体的には、熱ショック応答、TNF α —NF- κ B 経路、エストロゲン—ER α 経路、ショウジョウバエの体節形成など様々な場面において、転写伸長因子は重要な役割を果たしている。言い換えれば、環境ストレスや生体リガンドに応答するいわゆる前初期遺伝子や、分化によって制御される遺伝子など、様々な遺伝子が実は転写伸長段階で制御されていることが明らかとなった。転写反応は大部分、転写の開始段階で制御されているというこれまでのアイディアは見直しを迫られている。

その一方で、本研究はまだケーススタディを積み重ねていく段階にとどまり、当初の計画にあった、転写伸長制御の細胞内での役割を統一的に理解するまでには至らなかった。例えば、転写伸長因子の働きには明らかに遺伝子特異性があることが分かったが、その特異性が決定されるメカニズムを十分に理解することはできなかった。また、転写伸長因子が転写以外のプロセスにも関与するという予備的な証拠を得たが、十分に踏み込んだ解析を行なうことはできなかった。これらを今後の課題としたい。

6 研究総括の見解:

細胞機能を作り出す蛋白質の産生ならびにその量を調節する遺伝子の発現に関しては、転写開始段階での制御が重要であることは当然であるが、いったん開始してしまった mRNA 合成の制御の重要性を明らかにしたこと、その制御に関与する転写伸長因子ならびにその役割を様々な機能に関して明らかにしたことは、本領域の目指す大きな成果と評価する。さらに実験の場を哺乳動物に移して転写伸長反応の制御の持つ重要性を明らかにし、独自の領域を深めてゆくことを期待する。

7 主な論文等:

原著論文

1. Yamaguchi, Y., Inukai, N., Narita, T., Wada, T., and Handa, H.: Evidence that negative elongation factor represses transcription elongation through binding to a DRB sensitivity-inducing factor/RNA polymerase II complex and RNA. *Mol. Cell. Biol.* 22, 2918-2927. (2002)
2. Yamaguchi, Y., Delehouzee, S., and Handa, H.: HIV and HDV: evolution takes different paths to relieve blocks in transcriptional elongation. *Microbes Infect.* 4, 1169-1175. (2002)
3. Kuraoka, I., Endou, M., Yamaguchi, Y., Wada, T., Handa, H., and Tanaka, K.: Effects of endogenous DNA base lesions on transcription elongation by mammalian RNA polymerase II: Implications for transcription-coupled DNA repair and transcriptional mutagenesis. *J. Biol. Chem.* 278, 7294-7299. (2003)
4. Narita, T.*, Yamaguchi, Y.*, Yano, K., Sugimoto, S., Chanarat, S., Wada, T., Kim, D., Hasegawa, J., Omori, M., Inukai, N., Endoh, M., Yamada, T., and Handa, H.: Human transcription elongation factor NELF: Identification of novel subunits and reconstitution of the functionally active complex. *Mol. Cell. Biol.* 23, 1863-1873. (2003) (*筆頭著者).

5. Wu, C.-H., Yamaguchi, Y., Benjamin, L.R., Horvat-Gordon, M., Washinski, J., Enerly, E., Larsson, J., Lambertsson, A., Handa, H., and Gilmour, D.S.: NELF and DSIF cause promoter proximal pausing on the hsp70 promoter in *Drosophila*. *Genes Dev.* 17, 1402-1414. (2003)
6. Inukai, N., Yamaguchi, Y., Kuraoka, I., Yamada, T., Kamijo, S., Kato, J., Tanaka, K., and Handa, H.: A novel hydrogen peroxide-induced phosphorylation and ubiquitination pathway leading to RNA polymerase II proteolysis. *J. Biol. Chem.* 279, 8190-8195. (2004)
7. Ainbinder, E., Amir-Zilberstein, L., Yamaguchi, Y., Handa, H., and Dikstein, R.: Elongation inhibition by DRB sensitivity-inducing factor is regulated by the A20 promoter via a novel negative element and NF- κ B. *Mol. Cell. Biol.* 24, 2444-2454. (2004)
8. Aiyar, S.E., Sun, J.-L., Blair, A.L., Moskaluk, C.A., Lv, Y., Ye, Q.-N., Yamaguchi, Y., Mukherjee, A., Ren, D.-M., Handa, H., and Li, R.: Attenuation of estrogen receptor α -mediated transcription through estrogen-stimulated recruitment of a negative elongation factor. *Genes Dev.* 18, 2134-2146. (2004)
9. Jennings, B.H., Shah, S., Yamaguchi, Y., Seki, M., Phillips, R.G., Handa, H., and Ish-Horowicz, D.: Locus-specific requirements for Spt5 in transcriptional activation and repression in *Drosophila*. *Curr. Biol.* 14, 1680-1684. (2004)

特許出願 該当なし

その他の成果(口頭発表)

1. Yamaguchi, Y., Wada, T. and Handa, H.: The 5th EMBL Transcription Meeting, Heidelberg, Germany, Aug. 24-28, 2002.
2. Yamaguchi, Y. and Handa, H.: Cold Spring Harbor Laboratory Meeting 2003, Cold Spring Harbor, NY, USA, Aug. 27-31, 2003.
3. Yamaguchi, Y., Mura, T. and Handa, H.: The 6th EMBL Transcription Meeting, Heidelberg, Germany, Aug. 28-Sep. 1, 2004.
4. Yamaguchi, Y., Yamada, T., Kamijo, S. and Handa, H.: Transcriptional Regulation by Chromatin and RNA Polymerase II, Lake Tahoe, CA, USA, Oct. 29-Nov. 1, 2004.

研究課題別評価

1 研究課題名: センサー型転写因子とセンサー型 RNase による生体防御ネットワークの解明

2 研究者氏名: 吉田 秀郎

3 研究の狙い:

分泌蛋白質や膜蛋白質の合成が行われる小胞体では、合成された蛋白質の厳しい品質管理が行われている。合成の途上で異常蛋白質が生じると、小胞体膜上に存在する2つのセンサー分子: 膜貫通型転写因子 ATF6 と膜貫通型 RNase IRE1 が活性化され、その結果小胞体シャペロン遺伝子(異常蛋白質の構造を修正する)や ERAD 遺伝子(異常蛋白質の分解を促進する)の発現が誘導されて異常蛋白質が処理される。老化によってこの品質管理機能(小胞体ストレス応答)が低下すると、異常蛋白質が蓄積し、アルツハイマー病やパーキンソン病などの脳神経系疾患を引き起こす。

私は2つのセンサー分子がいかにして活性化されて小胞体シャペロンや ERAD 遺伝子の転写誘導を行うのか、その分子機構を明らかにすることを目指して研究を開始した。

4 研究成果:

さきがけ研究を開始するまでに小胞体ストレス応答の重要な因子を複数同定し、ATF6 経路と IRE1 経路の存在を明らかにしていたが、小胞体ストレス応答の分子機構をまだ不完全な形でしか明らかにできていなかった。特に、(1) 異常タンパク質の分解に関与する ERAD 関連遺伝子の転写誘導がどのような機構によって制御されているのか、(2) ATF6 経路と IRE1 経路は互いにどのような関係にあるのか、(3) ATF6 経路と IRE1 経路は小胞体ストレス応答の主要な経路であるのか、については全くわかっていなかった。さきがけ研究の結果、これらの問題を解決することに成功し、高等動物の小胞体ストレス応答の基本構造をついに明らかにすることができた(図参照)。

(1) ERAD 関連遺伝子の転写誘導の制御機構

IRE1 ノックアウト細胞及び XBP1 ノックアウト細胞を用いた実験から、これらの細胞では小胞体シャペロン遺伝子の転写誘導は正常であるが、ERAD 関連遺伝子の転写誘導が特異的に失われていることを見出した。更に、IRE1 ノックアウト細胞では異常タンパク質の分解能力が低下しており、この細胞に IRE1 遺伝子や ERAD 関連遺伝子を強制発現すれば分解能力を復活させることができることもわかった。これらのことから、ERAD 関連遺伝子の転写誘導は IRE1-XBP1-UPRE 経路によって制御されていることを明らかにした。

(2) 高等動物の小胞体ストレス応答は多段階の応答機構から成っている

ATF6 経路と IRE1 経路の関係を調べた結果、ATF6 経路の方(小胞体シャペロンの誘導)が IRE1 経路(小胞体シャペロンと ERAD 関連因子の誘導)よりも早くから働き始めることを見出した。ATF6 経路が特異的に欠損している変異細胞 M19 を用いた結果から、IRE1 経路が作動するためには ATF6 経路によって XBP1 pre-mRNA の転写が誘導されることが必須であり、この経路間のクロストークが両経路の活性化の時間的差異を生み出す分子機構であることを見出した。私の結果と他のグループの結果をあわせて考えると、高等動物の小胞体ストレスは、まず最初に PERK 経路(翻訳抑制)、次に ATF6 経路(シャペロンによる構造修正)、更に IRE1 経路(構造修正と分解処理)、それでもだめな場合はアポトーシスを誘導して細胞丸ごと処理し、個体としての生存を図るといった多段階の応答機構が時間依存的に次々と作動することによって緻密かつ柔軟な対応をしていることが明らかとなった。

(3) ATF6 経路・IRE1 経路は小胞体ストレス応答の主要な経路である

ATF6 経路と IRE1 経路の両方が欠損した細胞では、小胞体ストレスによる細胞死が著しく増大した。この細胞に小胞体シャペロン遺伝子を強制発現させた場合には細胞死はかなり抑制された。

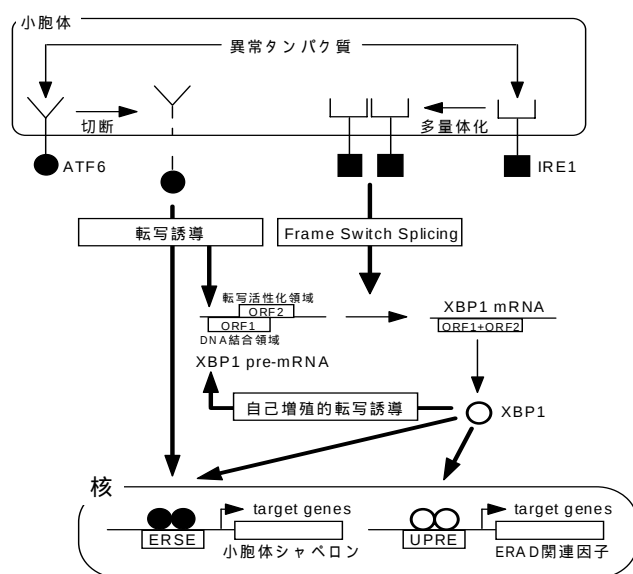
が、ERAD 関連遺伝子を強制発現してもあまり効果はみられなかった。IRE1 遺伝子を強制発現させて IRE1 経路を復活させると、細胞死が顕著に抑制された。以上の結果から、ATF6 経路及び IRE1 経路は高等動物の小胞体ストレス応答の主要な応答経路であることを明らかにした。

(4) 今後の展望

以上のように、小胞体ストレス応答の分子機構の基本的な部分を明らかにすることができたが、この研究の過程で2つの大きな問題と新たに遭遇することとなった。たいへんありがたいことに、さきがけ研究を更に2年間継続させていただけることとなったので、今後はこれらの問題に注力していく所存である。

第一の問題は、研究の過程で発見したフレームスイッチスプライシングである。これは従来知られている mRNA スプライシングとは全く異なる新規のスプライシング機構であり、その分子機構について解析する。これまでRNAスプライシングは核で起こると考えられてきたが、フレームスイッチスプライシングは細胞質で起こるのではないかと考えている。このことを明らかにすることによって、「細胞質スプライシング」という新しい概念を確立しようと考えている。

第二の問題として、小胞体の下流に位置するゴルジ体にも、小胞体ストレス応答と相似の生体防御機構が存在することを明らかにしようと考えている。小胞体ストレス応答によって大量の分泌蛋白質がゴルジ体にやってきた場合、ゴルジ体も相応の応答をする必要があると考えられる。このゴルジ体に蓄積した異常タンパク質の処理システムの存在を明らかにすることによって、「ゴルジ体ストレス応答」という新しい研究分野を開拓するとともに、その分子機構を解析することによって、分泌経路で機能している生体防御機構の全体像を明らかにしようと考えている。



高等動物の小胞体ストレス応答の分子機構

5 自己評価:

さきがけ研究開始時には、「それぞれのセンサーがいかにして異常タンパク質を検知しているか」「小胞体ストレス応答以外の生体防御機構にも同様の感知機構が存在するか」に重点を置いて小胞体ストレス応答の分子機構の解析を進めようと考えていたが、偶然の積み重なりによって意外な展開となり、結果として小胞体ストレス応答の分子機構の基本構造を明らかにすることができた。そして、この成果から生じた、また新たな難問「細胞質スプライシング」「ゴルジ体ストレス応答」。今度はどのような展開になるのか、今からわくわくしている。

6 研究総括の見解:

小胞体に生じた異常蛋白質によるストレス応答における、構造修復に向かう小胞体シャペロン誘導のATF6経路と、小胞体シャペロンの誘導ならびに異常蛋白質の分解に向かうERAD関連因子誘導のIRE1経路の、お互いの関連の糸を解きほぐしたことは生態防御機構の謎の一つを明らかにしたユニークな成果として高く評価できる。また、その鍵となるRNA切断酵素として働くIRE1が、これまでに知られていないまったく新しい機構で前駆体RNAのスプライシングに関与していることを発見している。これら一連の発見は、これまでの概念をやぶり、教科書の記述を変える優れた成果である。さきがけ研究としての本領域の趣旨を具現化した独創的な成果と考える。

7 主な論文等:

論文

1. Yoshida, H., Matsui, T., Hosokawa, N., Kaufman, R. J., Nagata K. and Mori, K.: A time-dependent phase shift in the mammalian unfolded protein response. *Dev. Cell.* **4**, 265-271.(2003)
2. Kumar, R., Krause, G. S., Yoshida, H., Mori, K., and DeGracia, D. J.: Dysfunction of the unfolded protein response during global brain ischemia and reperfusion. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **23**, 462-471. (2003)
3. Okada, T., Haze, K., Nadanaka, S., Yoshida, H., Seidah, N. G., Hirano, Y., Sato, R., Negishi, M., and Mori, K.: A serine protease inhibitor prevents endoplasmic reticulum stress-induced cleavage but not transport of the membrane-bound transcription factor ATF6. *J. Biol. Chem.* **278**, 31024-31032. (2003)
4. Nadanaka, S., Yoshida, H., Kano, F., Murata and M., Mori, K. : Activation of mammalian unfolded protein response is compatible with the quality control system operating in the endoplasmic reticulum. *Mol. Biol. Cell* **15**, 2537-2548. (2004)
5. Nozaki, J., Kubota, H., Yoshida, H., Naitoh, M., Goji, J., Yoshinaga T., Mori, K., Koizumi, A. and Nagata, K.: The endoplasmic reticulum stress response is stimulated through the continuous activation of transcription factors ATF6 and XBP1 in Ins2+/Akita pancreatic beta cells. *Genes Cells* **9**, 261-270. (2004)
6. Khan, M., M., Nomura, T., Chiba, T., Tanaka, K., Yoshida, H., Mori and K., Ishii, S. (2004). The fusion oncoprotein PML-RARalpha induces endoplasmic reticulum (ER)-associated degradation of N-CoR and ER stress. *J. Biol. Chem.* **279**, 11814-11824.
7. Romero-Ramirez, L., Cao, H., Nelson, D., Hammond, E., Lee, A. H., Yoshida, H., Mori, K., Glimcher, L., H., Denko, N., C. and Giaccia, A. (2004) XBP1 is essential for survival under hypoxic conditions and is required for tumor growth. *Cancer Res.* **64**, 5943-5947.
8. Yamamoto, K., Yoshida, H., Kokame, K., Kaufman, R. J. and Mori, K. (2004) Differential contributions of ATF6 and XBP1 in activating endoplasmic reticulum stress-responsive *cis*-acting elements ERSE, UPRE and ERSE-II. *J. Biochem.* (in press)

総説

1. 吉田秀郎・森和俊: unfolded protein response を制御する遺伝子群。; 遺伝子医学 第 6 巻 (2002) 130-134.
2. 吉田秀郎・森和俊: スプライソソーム非依存型 mRNA スプライシングシステムの高等動物基質の発見。; 細胞工学 第 2 巻 (2002) 302-303.
3. 森和俊・吉田秀郎: フレームスイッチ型スプライシング 新しいタンパク質の活性制御。; 実験医学 第 20 巻 (2002) 1000-1004.
4. 吉田秀郎: 小胞体ストレスに対する多段階の防御戦略。; タンパク質核酸酵素 第 48 巻 (2003) 1248-1255.
5. 吉田秀郎: 小胞体ストレス応答の分子生物学。; 生化学 第 76 巻 (2004) 617-630.

招待講演

1. H. Yoshida, T. Matsui, A. Yamamoto, T. Okada and K. Mori: XBP1 is a UPR-specific transcription factor which is activated by tripartite signals from ER membrane-bound transcription factor ATF6, RNase TRE1 and kinase PERK. FASEB Summer Research Conference (2002, Snowmass, USA)
2. 吉田秀郎: 高等動物の小胞体ストレス応答の分子機構の解析。; 2002 年度長期派遣研究者研究交歓会 (大阪、2002 年)
3. 吉田秀郎、松居利江、細川暢子、永田和宏、森和俊: 小胞体ストレスに対する多段階的防御戦略。日本細胞生物学会 (第 56 回; 大津、2003 年)
4. 吉田秀郎: 高等動物の小胞体ストレス応答の分子機構。; 日本生化学会大会 (第 76 回; 横浜、2003 年)
5. 吉田秀郎: 膜貫通型転写因子と膜貫通型 RNase による転写制御ネットワーク。; 細胞性粘菌研究会 (第 6 回; 東京、2004 年)

国際会議

1. 吉田秀郎、松居利江、和田匡史、細川暢子、永田和宏、Randal J. Kaufman、森和俊: Multiphase defense system in mammalian ER stress response.; Gordon Research Conference (2003, Oxford, UK)
2. 吉田秀郎、森和俊: TRANSCRIPTIONAL INDUCTION OF XBP1 pre-mRNA BY THE ATF6 PATHWAY IS CRUCIAL FOR ACTIVATION OF THE IRE1-XBP1 PATHWAY IN MAMMALIAN ER STRESS RESPONSE.; Cold Spring Harbor Laboratory meeting (2004, Cold Spring Harbor, USA)

受賞

平成 15 年度日本生化学会奨励賞