

平成17年度科学研究費補助金（基盤研究（S））研究状況報告書

ふりがな（ローマ字）		MIURA MASAYUKI					
①研究代表者氏名		三浦 正幸		②所属研究機関・部局・職		東京大学・大学院薬学系研究科・教授	
③研究課題名	和文	発生と変性における細胞死による神経選択機構の分子遺伝学的基盤					
	英文	Molecular genetic basis of neural selection by cell death during development and pathological conditions					
④研究経費		平成15年度	平成16年度	平成17年度	平成18年度	平成19年度	総合計
17年度以降は内約額 金額単位：千円		26,500	27,900	18,600	18,600	0	91,600
⑤研究組織（研究代表者及び研究分担者）							
氏名	所属研究機関・部局・職	現在の専門		役割分担（研究実施計画に対する分担事項）			
三浦 正幸	東京大学・大学院薬学系研究科・教授	分子神経生物学		研究全般			
⑥当初の研究目的（交付申請書に記載した研究目的を簡潔に記入してください。）							
<p>細胞選択では適切な細胞の選別と除去機構が働いており、具体的には細胞社会での細胞死制御が鍵を担っている。個体発生の様々な場所で観察される細胞死の調節は、周りの細胞との相対的な相互関係に依存していると考えられ、その実行機構においても多様である。すなわち、類似した性質を持ったほぼ均一な細胞集団の中から、ある特定の細胞のみを抽出・決定するメカニズムの存在が示唆され、これは神経発生や神経変性での選択的細胞死を理解する上で極めて重要である。神経系での選択的細胞除去は散在的に観察される。発生初期のほぼ均一な細胞集団における細胞選択機構については、特定の細胞死因子によって死細胞が選択されるメカニズムに加え、細胞間でのわずかなシグナルの差が細胞に不可逆的な変化を与え、その結果選択の方向（細胞死・生存）が決定づけられる可能性が想定される。このような生体での選択的細胞除去制御機構は、ショウジョウバエや線虫などの個体を対象にした遺伝学的な手法によって初めて明らかにされると期待される。本研究は、ショウジョウバエを用いた遺伝学的な手法で神経細胞除去に関与する遺伝子群を同定し、その知見を生かし今までアプローチの難しかった発生と病態で観察される哺乳類神経系の細胞選択機構を遺伝学的に明らかにしようとするものである。</p>							

⑦これまでの研究経過（研究の進捗状況について、必要に応じて図表等を用いながら、具体的に記入してください。）

【遺伝子の過剰発現スクリーニングによる神経細胞死関連遺伝子の同定】

ショウジョウバエ遺伝子の過剰発現スクリーニング（GS スクリーニング）を取り入れることで、神経細胞死シグナルの機能的ゲノムスクリーニングを行い、ポリグルタミンによる神経細変性に関与する遺伝子として小胞体に存在する不良品タンパク質の輸送チャンネル（Sec61a）を同定した。小胞体で正しい立体構造を取れなかったタンパク質（不良品タンパク質）は正常であれば細胞質に逆輸送され、そこでユビキチン化修飾を受けた後、プロテアソームによって分解される（小胞体関連タンパク質分解 Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation:ERAD）。ポリグルタミン病患者が保有する伸長型ポリグルタミンを細胞で発現させると、細胞内のプロテアソームの酵素活性が低下することが知られていたが、このような状況下では、ERAD が機能せず不良品タンパク質が細胞内に蓄積すると考えられる。Sec61aは、分泌経路で合成されるタンパク質の小胞体への移行と、ERAD において小胞体から細胞質への不良品タンパク質の輸送を担う重要なチャンネルである。Sec61aをショウジョウバエ複眼や培養細胞で過剰発現すると不良品タンパク質が細胞質に逆輸送されて蓄積し細胞死が誘導されること、逆に Sec61aの活性を遺伝学的に弱めることによりポリグルタミン病モデルにおいて細胞質に蓄積していた不良品タンパク質が減少し、晩発性の神経変性が回復することが明らかになった。

【遺伝子の機能欠損スクリーニングによる神経細胞死関連遺伝子の同定】

細胞死実行遺伝子である Reaper を複眼特異的なプロモーター（GMR）制御下で発現させたトランスジェニックフライ（GMR-Reaper）準備した。この Reaper 強制発現系統は複眼に Reaper が発現することで、IAP の分解とカスパーゼの活性化による過剰な細胞死が誘導されて複眼のサイズが縮小する。この系統とゲノムの 80%以上をカバーする既存の染色体欠失系統を交配し、その子供の複眼を観察すると、欠失領域に IAP 分解依存性細胞死に関する 1.促進・実行に関与する遺伝子が含まれる場合は複眼サイズの縮小が抑制され、2.抑制に関与する遺伝子が含まれる場合は複眼サイズがさらに縮小する。この観察を行い非常に効率良く機能欠失系統のスクリーニングを実行した。また、さらに狭い領域を欠失した染色体欠失系統を用いて、細胞死制御遺伝子を含む候補領域を絞り込み、その絞り込んだ領域に含まれる新規の IAP 分解制御遺伝子群の同定を試みた。既にゲノムの 80%以上をカバーする既存の染色体欠失系統のスクリーニングを終了し、現在までに 15 個の IAP 分解制御因子の候補を抽出することに成功している。候補因子のうち 1 つである APTX7 はほぼ乳類でも保存されたキナーゼをコードしており IAP 分解誘導能を持つことを明らかにした。APTX7 のノックダウンを Scabrous 陽性細胞クラスターで行ったところカスパーゼの活性化抑制が観察され、剛毛（外感覚器）の増加が観察された。このことから、APTX7 は IAP 分解を介してカスパーゼ活性を調節し、神経細胞数の調節を行っていることが示唆された。

【生体における細胞死・ストレスシグナルイメージングプローブの開発】

FRET（Fluorescence Resonance Energy Transfer）法を応用したカスパーゼの基質を作製した（Sensor for activated caspase based on FRET: SCAT）。蛍光物質 CFP と Venus の間にカスパーゼの基質切断部位のアミノ酸配列 DEVD を配置した融合タンパク質では、通常状態では 440nm の励起光を当てると CFP から 470nm の吸収波長が出され、近接する Venus から 530nm の緑色光が発生する。しかしカスパーゼにより切断を受けると、CFP が解離し、単独で青色光を発するようになる。個々の細胞でのカスパーゼ 3 活性化を記録して明らかになったことは、TNF 刺激後の初めの数時間はカスパーゼ 3 の活性化は見られないが、ひとたび活性化が始まると活性化が最大になりアポトーシスの形態を示して死んでいくには 7 分ほどしかかからないことである。カスパーゼ 3 活性化開始のタイミングはそれぞれの細胞で様々であったが、開始からアポトーシスに至るプロセスはどの細胞でも同じように進行した。これは TNF 濃度を変えたときには、開始細胞の出現頻度に変化は出るが活性化プロセスは同じであり、カスパーゼ 3 の活性化は all or none の様式で進行するものと考えられた。UAS-SCAT3 トランスジェニックショウジョウバエを作製し Scabrous-Gal4 を用いて剛毛前駆細胞で SCAT3 を発現させたところ、Scabrous 陽性細胞クラスターで Caspase の活性化が検出された。ショウジョウバエカスパーゼ活性化因子 Dapaf-1 突然変異ショウジョウバエでは、その剛毛（macrochaete）の増加が観察された。この現象は細胞死の阻害による細胞数の増加に依存しないことが明らかとなり、カスパーゼが細胞運命の決定に積極的に関与していることが示唆された。

次に小胞体ストレス反応に応じてユニークなスプライシングを行う XBP1 を利用した新しい小胞体ストレスモニター系を構築した（ERAI システム）。この系は非常に高感度に Ire1 の活性化による XBP1 のスプライシングを検出できる。ERAI トランスジェニックマウスの作成に成功したので、今後は神経発生や変性における ERAD とも関係した小胞体ストレスを生体レベルでモニターすることで神経細胞死シグナルの解明に利用できると期待される。

⑧特記事項 (これまでの研究において得られた、独創性・新規性を格段に発展させる結果あるいは可能性、新たな知見、学問的・学術的なインパクト等特記すべき事項があれば記入してください。)

本研究によって得られた成果の一部がプレスリリースによって発表された。

【理化学研究所プレス発表 (2003. 9. 16)】

研究グループでは、ショウジョウバエを用いて神経変性の主要要因である神経細胞死に關与する遺伝子群を網羅的に同定しました。その中から、神経細胞死に關与する遺伝子として小胞体に存在する不良品蛋白質の輸送チャンネル (Sec61 α) を同定しました。さらにショウジョウバエ・ハンチントン舞踏病モデルで觀察される晩発性の神経変性が、研究グループが発見した輸送チャンネルの働きを弱めることによって回復することが明らかになりました。さらに、このチャンネルの作用を詳しく調べることによって、ポリグルタミン病では不良品蛋白質が細胞内に蓄積することが神経変性の原因となり、それを抑えることによって変性が抑制される可能性が見出されました。本成果は、ポリグルタミン病の発症機構の研究に新たな道を切り拓くだけでなく、プリオン病を含む他の神経変性疾患の発症機構解明や治療法の開発に将来大きく貢献するものと期待されます。

(この成果は Proc. Natl. Acad. Sci. USA.100, 11723-11728, 2003 として発表した)。

【理化学研究所プレス発表 (2003. 12. 15)】

研究グループでは、脳科学総合研究センター細胞機能探索技術開発チーム (宮脇敦史チームリーダー) により開発された蛍光タンパク質Venusを用いて、小胞体ストレスに曝された細胞や組織が緑色蛍光を発するトランスジェニックマウスの作製に成功しました。わたしたちはこのマウスをER stress Activated IndicatorにちなんでERAI (偉い) マウスと名付けました。このマウスでは、インシュリンなどの分泌タンパク質を盛んに分泌する膵臓はER負荷がかかりやすく、成体ERAIマウスでは緑色蛍光を発します。さらに、ERストレスを引き起こす薬物を投与すると特定の組織で緑色蛍光が觀察されました。このERAIマウスとヒト疾患モデルマウスとを交配させることで疾患病理部位での小胞体ストレスの有無が蛍光觀察するだけで容易に調べられるようになると期待されます。そして、いつ、どこで小胞体ストレスがかかっているかについての生体レベルでの情報を解析することにより、その疾患の診断・予防・治療の標的を提示することができ、疾患の治療法開発に広く貢献できるものと期待されます。

(この成果は Nature Medicine 10, 98-102, 2004 として発表した)。

⑨研究成果の発表状況 (この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文(掲載が確定しているものを含む。)の全著者名、論文名、学協会誌名、巻(号)、最初と最後のページ、発表年(西暦)、及び国際会議、学会等における発表状況について記入してください。なお、代表的な論文3件に○を、また研究代表者に下線を付してください。)

(1) 論文(原著論文)発表

Tamura, M., Nakamura, M., Ogawa, Y., Toyama, Y., Miura, M., and Okano, H.: Targeted expression of anti-apoptotic protein p35 in oligodendrocytes reduces delayed demyelination and functional impairment after spinal cord injury. *Glia* in press

Nelson, B., Nishimura, S., Kanuka, H., Kuranaga, E., Inoue, M., Hori, G., Nakahara, H., and Miura, M.: Isolation of gene sets affected specifically by polyglutamine expression: implication of the TOR signaling pathway in neurodegeneration. *Cell Death Diff.* in press.

Ohsawa, S., Hamada, S., Kakinuma, Y., Yagi, T., and Miura, M.: A novel function of neuronal PAS domain protein 1 (NPAS1) in erythropoietin expression in neuronal cells. *J. Neurosci. Res.* 79, 451-458, 2005

Arai, H., Furuya, T., Yasuda, T., Miura, M., Mizuno, Y., and Mochizuki, H.: Neurotoxic effects of lipopolysaccharide on nigral dopaminergic neurons are mediated by microglial activation, interleukin-1 β and expression of caspase-11 in mice. *J. Biol. Chem.* 279, 51647-51653, 2004

Kakinuma, Y., Saitoh, F., Osawa, S., and Miura, M.: A mechanism of impaired mobility of oligodendrocyte progenitor cells by tenascin C through modification of Wnt signaling. *FEBS Lett.* 568, 60-64, 2004

Kakinuma, Y., Saitoh, F., Ohsawa, S., Furuichi, T., and Miura, M.: A sulfatase regulating the migratory potency of oligodendrocyte progenitor cells through tyrosine phosphorylation of β -catenin. *J. Neurosci. Res.* 77, 653-661, 2004

Furuya, T., Hayakawa, H., Yamada, M., Yoshimi, K., Hisahara, S., Miura, M., Yoshikuni Mizuno, Y., and Mochizuki, H.: Caspase-11 mediates inflammatory dopaminergic cell death in the 1-Methyl-4-Phenyl-1, 2, 3, 6-Tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease. *J. Neurosci.* 24, 1865-1872, 2004.

○Iwawaki, T., Akai, R., Kohno, K., and Miura, M.: A transgenic mouse model for monitoring endoplasmic reticulum stress. *Nature Medicine* 10, 98-102, 2004.

Inoue, H., Tsukita, K., Iwasato, T., Suzuki, Y., Tomioka, M., Tateno, M., Nagao, M., Kawata, A., Saido, T.C., Miura, M., Itohara, S., and Takahashi, R.: The crucial role of caspase-9 in the disease progression of a transgenic ALS mouse model. *EMBO J.* 22, 6665-6674, 2003.

○Kanuka, H., Kuranaga, E., Hiratou, T., Igaki, T., Nelson, B., Okano, H., and Miura, M.: Cytosol-ER interplay by Sec61a translocon in polyglutamine-mediated neurotoxicity in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100, 11723-11728, 2003.

Takahashi, M., Kanuka, H., Fujiwara, H., Koyama, A., Hasegawa, M., Miura, M., and Iwatsubo, T.: Phosphorylation of alpha-synuclein characteristic of synucleinopathy lesions is recapitulated in alpha-synuclein transgenic *Drosophila*. *Neurosci Lett.* 336, 155-158, 2003

○Takemoto, K., Nagai, T., Miyawaki, A., and Miura, M.: Spatio-temporal activation of caspase revealed by indicator that is insensitive to environmental effects. *J. Cell Biol.* 160, 235-243, 2003

(2) その他の著作物

Kuranaga, E., and Miura, M.: Genetic analysis for JNK-mediated apoptosis. *Acta. Histochem. Cytochem.* 37, 223-226, 2004

Kanda, H., and Miura, M.: Regulatory roles of JNK in programmed cell death. *J. Biochem.* 136, 1-6, 2004

Igaki, T., and Miura, M.: Role of Bcl-2 family members in invertebrates. *BBA* 1644, 73-81, 2004

Iwawaki, T., Kenji, K., and Miura, M.: Transgenic mouse model for monitoring endoplasmic reticulum stress in vivo. *Nature Medicine* 10, 1013-1014, 2004 (Correspondence)

Hisahara, S., Okano, H., and Miura, M.: Caspase-mediated oligodendrocyte cell death in the pathogenesis of autoimmune demyelination. *Neurosci. Res.* 46, 387-397, 2003

三浦正幸、脳神経疾患とモデル動物：遺伝子から個体レベルへ、脳神経疾患病態の分子生物学：精神疾患と神経疾患の新たな理解のために、南山堂、pp. 175-184, 2005

三浦正幸、カスパーゼの生化学と生理機能、生化学76、1519-1533、2004

竹本研、三浦正幸、細胞死シグナルの可視化：in vivoライブイメージングをめざして、実験医学22、2136-2140、2004

三浦正幸、アポトーシス研究から見たモデル生物系の疾患研究への応用：分子から個体レベルの疾患研究へ、ファルマシア 40、307-311、2004

三浦正幸、脳機能理解への総合的アプローチ、実験医学21、2292-2296、2003

三浦正幸、神経発生と細胞死の遺伝的制御、実験医学 21、2311-2317、2003

学会発表

三浦正幸（東大・院薬・遺伝）ポリグルタミン誘発性神経変性におけるトランスロコンの役割、日本生化学会、横浜、2004.10.15

倉永英里奈 1、三浦正幸 1（1 東大・院薬・遺伝）タンパク質分解系による生と死の制御：ショウジョウバエからの展開、日本分子生物学会、神戸、2004.12.8

松田七美 1、井垣達吏 2、三浦正幸 1（1 東大・院薬・遺伝 2 エール大・医）ショウジョウバエ Bax-like ファミリータンパク質 Drob-1 の神経保護作用、日本分子生物学会、神戸、2004.12.9

高橋潤 1、倉永英里奈 1、菅田浩司 1、西川彰男 2、三浦正幸 1（1 東大・院薬・遺伝 2 島根大・院生資）ショウジョウバエ TNF superfamily 分子 Eiger により誘導される神経細胞死はミトコンドリアを介した経路によって実行される、日本分子生物学会、神戸、2004.12.8

富岡武泰 1、倉永英里奈 1、岡野栄之 2、三浦正幸 1（1 東大・院薬・遺伝 2 慶大・医）TRAF タンパク質のキノコ体形態形成への関与、日本分子生物学会、神戸、2004.12.10

殿城亜矢子 1、倉永英里奈 1、三浦正幸 1（1 東大・院薬・遺伝）Reaper による細胞死経路を介在する新規制御因子の同定と機能解析、日本分子生物学会、神戸、2004.12.10

菅田浩司 1、井垣達吏 2、松田七美 1、三浦正幸 1（1 東大・院薬・遺伝 2 エール大・医）ショウジョウバエ TNF superfamily 分子 Eiger により誘導される神経細胞死はミトコンドリアを介した経路によって実行される、日本分子生物学会、神戸、2004.12.10

近藤周 1、三浦正幸 1、広海健 2（1 東大・院薬・遺伝 2 総研大・遺伝）新規蛍光プローブを用いた生体内におけるカスパーゼ活性のモニタリング、日本分子生物学会、神戸、2004.12.9

大澤志津江 1、濱田俊 2、八木健 2、三浦正幸 1（1 東大・院薬・遺伝 2 阪大・院生命）組織学的手法による神経細胞死の検出、日本分子生物学会、神戸、2004.12.10

富岡武泰 1、倉永英里奈 1、岡野栄之 2、三浦正幸 1（1 東大・院薬・遺伝 2 慶大・医）Role of Drosophila TRAF1-mediated JNK activation in the mushroom bodies. 46 th Annual Drosophila Research Conference. San Diego, California, USA., 2005. 3.30-4.5

殿城亜矢子 1、倉永英里奈 1、富岡武泰 1、三浦正幸 1（1 東大・院薬・遺伝）Identification of defender against cell death signal using genetic screen. 46 th Annual Drosophila Research Conference. San Diego, California, USA., 2005. 3.30-4.5

近藤周 1、広海健 2、三浦正幸 1（1 東大・院薬・遺伝 2 総研大・遺伝）Dual role of Drosophila caspases in execution of apoptosis and resumption of mitosis after DNA damage-induced cell cycle arrest. 46 th Annual Drosophila Research Conference. San Diego, California, USA., 2005. 3.30-4.5

三浦正幸（東大・院薬・遺伝）Genetic pathway of extrinsic and intrinsic cell death signaling in *Drosophila*. in The 8th GIST International Symposium on Life Science. Gwangju, Korea, Nov. 2004

三浦正幸（東大・院薬・遺伝）Regulatory mechanisms of IAP degradation in *Drosophila*. Symposium in Cell Death, Cell Cycling and Cell Senescence. Kazusa, Chiba, Japan, Nov. 2004

三浦正幸（東大・院薬・遺伝）Genetic pathway of TNF/TNFR signaling in *Drosophila*. Symposium in 10th International TNF superfamily conference. Lausanne, Switzerland, Sept. 2004

三浦正幸（東大・院薬・遺伝）Genetic dissection of neural cell death and degeneration pathway. Symposium in 16th International Congress of International Federation of Association of Anatomists. Kyoto, Japan, August 2004

三浦正幸 (東大・院薬・遺伝) 細胞死実行シグナルの分子遺伝学的研究、日本解剖学会総会、福岡、2003.4.1

三浦正幸 (東大・院薬・遺伝) Dynamics of caspase activation revealed by FRET analysis、日本生化学会、横浜、2003.10.17

倉永英里奈 1、嘉糠洋陸 2、三浦正幸 1 (1 東大・院薬・遺伝 2 理研・脳センター) ショウジョウバエ IAP の分解と細胞死誘導に関するキナーゼの同定、日本分子生物学会、神戸、2003.12.10

菅田浩司 1、井垣達吏 1、松田七美 1、徳重直子 2、青沼宏佳 1、倉永英里奈 1、三浦正幸 1 (1 東大・院薬・遺伝 2 理研・脳センター) ショウジョウバエ TNF スーパーファミリー分子 Eiger が誘導する細胞死の分子機構の解析、日本分子生物学会、神戸、2003.12.11

松田七美 1、井垣達吏 1、三浦正幸 1 (1 東大・院薬・遺伝) ショウジョウバエ Bcl-2 ファミリー分子 Drob-1 は細胞死促進、及び抑制の2つの機能を有する、日本分子生物学会、神戸、2003.12.10

竹本研 1、三浦正幸 1 (1 東大・院薬・遺伝) Live Imaging を用いたカスパーゼ3活性化機構の解析、日本分子生物学会、神戸、2003.12.10

大澤志津江 1、濱田俊 2、柿沼由彦 3、八木健 2、三浦正幸 1 (1 東大・院薬・遺伝 2 阪大・院生命 3 高知医大・循環制御) bHLH-PAS タンパク質 NPAS1 の発生過程における発現パターンと機能探索、日本分子生物学会、神戸、2004.12.10

倉永英里奈 1、嘉糠洋陸 2、三浦正幸 1 (1 東大・院薬・遺伝 2 理研・脳センター) A cell death regulatory kinase is involved in the IAP degradation pathway in Drosophila. Cold Spring Harbor Meeting. New York, New York, USA., 2003.9.17-21

菅田浩司 1、高橋潤 1、井垣達吏 1、青沼宏佳 1、松田七美 1、倉永英里奈 1、三浦正幸 1 (1 東大・院薬・遺伝) Identification and characterization of downstream molecules of Eiger, a Drosophila TNF superfamily protein. Cold Spring Harbor Meeting. New York, New York, USA., 2003.9.17-21

竹本研 1、永井健治 2、宮脇敦史 2、三浦正幸 1 (1 東大・院薬・遺伝 2 理研・脳センター) Spatio-temporal dynamics of caspase activation in living cells. Cold Spring Harbor Meeting. New York, New York, USA., 2003.9.17-21

倉永英里奈 1、嘉糠洋陸 2、井垣達吏 1、澤本和延 3、一條秀憲 1、岡野栄之 3、三浦正幸 1 (1 東大・院薬・遺伝 2 理研・脳センター 3 慶大・医) Degradation of IAP protein induces DTRAF1-dependent JNK activation. 44 th Annual Drosophila Research Conference. Chicago, Illinois, USA. 2003. 3.5-3.9

三浦正幸 (東大・院薬・遺伝) Genetic screening of cell death regulatory genes in Drosophila. Symposium in 2nd Japan-Korea Drosophila Symposium. Tokyo, Japan, July 2003.

三浦正幸 (東大・院薬・遺伝) Genetic control of neural cell death and degeneration in Drosophila. Symposium in 10th Congress of Federation of Asian & Oceanian Biochemists and molecular Biologists. Bangalore, India, Dec., 2003.

三浦正幸 (東大・院薬・遺伝) Genetic dissection of neural cell death and degeneration pathway in Drosophila. International Symposium on Development and Regeneration of the Nervous System. Okazaki, Japan, Dec., 2003.