

未来開拓学術研究推進事業

— Research for the Future Program —

(平成12年度開始分)

研究プロジェクト成果概要

独立行政法人日本学術振興会

目 次

ページ

【生命科学領域】 (3 研究推進委員会、26 研究プロジェクト)

(1) ゲノム研究	1
(2) 発生・分化・再生	27
(3) 植物遺伝子	43

【プロジェクトリーダー氏名索引】	119
------------------	-----

1. ゲノム研究

(1) 評価対象研究推進委員会：「ゲノム研究」研究推進委員会

(委員長)	吉川 寛	JT 生命誌研究館常勤顧問
	小笠原直毅	奈良先端科学技術大学院大学情報科学研究科教授
	黒川 清	東海大学医学部教授
	小原 雄治	情報・システム研究機構国立遺伝学研究所長
	笹月 健彦	国立国際医療センター総長
	高木 利久	東京大学新領域創成科学研究科教授
	矢崎 義雄	独立行政法人国立病院機構理事長
	吉田 光昭	万有製薬つくば研究所長

(2) 評価対象研究プロジェクト

番号	研究プロジェクト名	プロジェクトリーダー
1	体系的SNP解析に基づく喘息・アトピー性皮膚炎の発症に関連する遺伝的要因の解明	井ノ上逸朗 (東京大学医科学研究所客員助教授)
2	体系的ゲノム解析にもとづく病因遺伝子の解析とオーダーメイド医療への応用	中村 祐輔 (東京大学医科学研究所教授)
3	ゲノム解析による脳疾患遺伝子の解明	辻 省次 (東京大学大学院医学系研究科教授)
4	疾患遺伝子の解明を目指した個体レベルのゲノム機能解析	板倉 光夫 (徳島大学ゲノム機能研究センター教授)
5	ゲノム解析を基盤とする新たなヒト分子生物学・医学の展開	清水 信義 (慶應義塾大学医学部教授)
6	マイクロサテライト多型を用いた疾患関連遺伝子の解明	猪子 英俊 (東海大学医学部教授)
7	体系的SNP解析に基づく骨粗鬆症の発症に関する遺伝的要因の解明	江見 充 (日本医科大学老人病研究所教授)
8	生命システム情報統合データベースの構築とゲノム情報理学の創成	金久 實 (京都大学化学研究所教授)
9	多型マーカーを利用した疾患遺伝子解析のためのコンピュータプログラムの開発と応用	鎌谷 直之 (東京女子医科大学膠原病リウマチ痛風センター教授)
10	微生物のゲノム配列解析による病原性と有用遺伝子システムの解明	林 哲也 (宮崎大学フロンティア科学実験総合センター教授)
11	モデル生物の配列情報と発現・表現型情報に基づくゲノム機能の情報科学的解明	久原 哲 (九州大学大学院農学研究院教授)
12	アルツハイマー病の疾患関連遺伝子の解明	武田 雅俊 (大阪大学大学院医学系研究科教授)

体系的 SNP 解析に基づく喘息・アトピー性皮膚炎の発症に関与する遺伝的要因の解明

Systematic Genetic Study of Asthma and Atopic Dermatitis Based on the Genome-wide SNP Informatics

プロジェクトリーダー

井ノ上 逸朗 東京大学医科学研究所・客員助教授



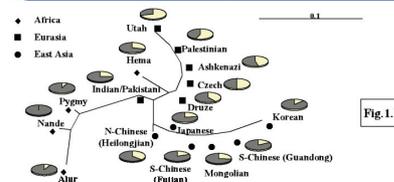
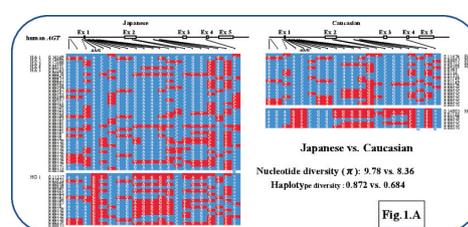
1. 研究目的

気管支喘息・アトピー性皮膚炎はその罹患率が近年増加の一途を辿っており（気管支喘息、全人口の3-6%：アトピー性皮膚炎、全人口の3-10%）、「21世紀の国民病」の様相を呈している。医療の現場での重要性は当然であり、一部の症例は難治性で社会生活に支障をきたすことから、根本的治療に向けて分子レベルでの病態解明が急務である。近年、ヒト集団において認められる遺伝子多型が疾患関連遺伝子を同定するための指標として有用性の高いものであることが判明してきた。本研究はゲノム上の数万種類の多型マーカー（特に SNP、一塩基多型マーカー）を用い、気管支喘息の発症、進展、そして薬剤感受性に関与する遺伝子を体系的にスクリーニングする。得られたすべての遺伝子変異の機能的関与も解明し、気管支喘息分子病態解明を目指す。このような「ゲノム医療」により個々人に即した診断・治療が可能となり、「オーダーメイド医療」が実践できる。

2. 研究成果概要

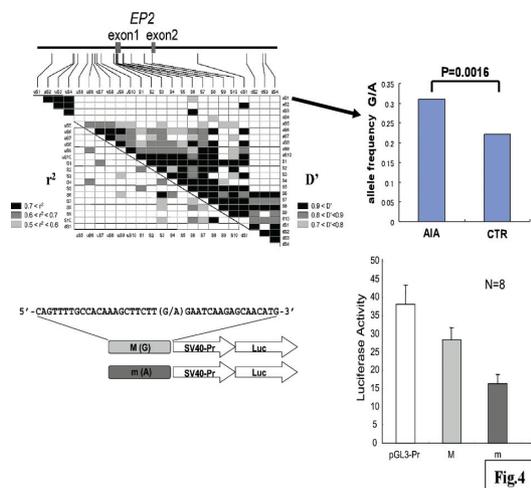
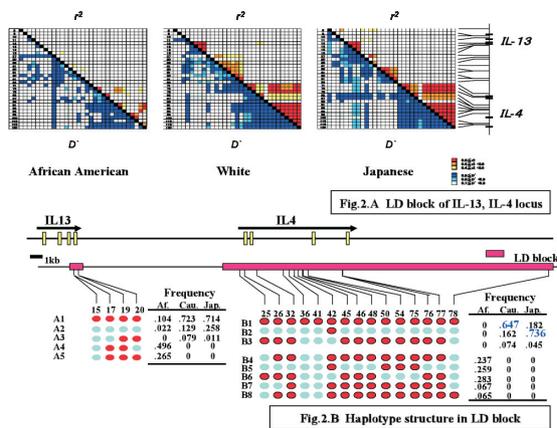
2-1. 日本人における SNP の特徴および進化的成り立ち：

SNP による疾患遺伝子同定には日本人における SNP の多様性、連鎖不平衡の保たれ方などの特徴を明らかにする必要がある。同様に日本人の進化的成り立ちを研究することも可能である。高血圧遺伝子であるアンジオテンシノーゲンの詳細な SNP 解析によりハプロタイプを構築し、その頻度を日本人と白人で比較検討した。予想に反して日本人の方がハプロタイプの種類が多く多様性に富むという結果を得た。これを受けて、ユーラシア大陸を中心とした集団での進化的距離はハプロタイプを用いて測定した。人類はアフリカ起源であることが確認できるとともに、アジアにおいては韓国人が最も遺伝学的距離が離れており、地理的距離と一致している。日本人はアジア系のルート部位に位置しており、地理的距離と一致しない。ハプロタイプ多様性が高いことと考え合わせると、日本人は少なくともふたつの集団が混和してできた集団と推定された。いわゆる、縄文人と弥生人の混和を反映しているのかもしれない。(Fig.1A, B)



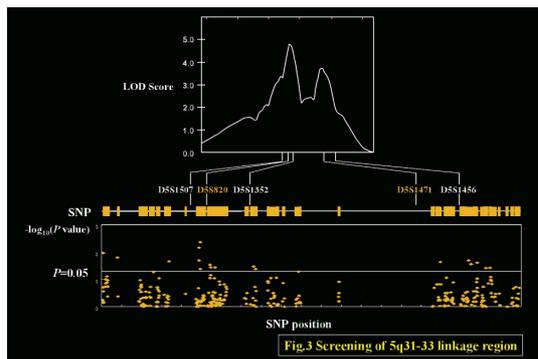
2-2. 喘息関連遺伝子、IL-4, IL-13 の進化遺伝学的考察：

気管支喘息の発症にはヘルパーT細胞の分化バランスが重要な役割を果たしており、Th2細胞優位の状態とされている。Th2分化に関わる重要なサイトカインとしてインターロイキン4 (IL-4)、インターロイキン13 (IL-13)が知られている。同時にこれらのサイトカインは喘息の病態に関わる分子である。IL-4, IL-13のハプロタイプ構造、連鎖不平衡を日本人と黒人(African American)、白人(European American)で比較検討した。IL-4は、すべての集団で連鎖不平衡が強く保たれていた。一方、IL-13は日本人、白人で比較的保たれている程度で黒人ではかなり崩れている。ハプロタイプ構造は両遺伝子ともに非常に特徴的であった。日本人、白人では主にもふたつのハプロタイプが見出され、それらは日本人と白人で頻度が逆転していた。また、これらのハプロタイプは黒人ではほとんど見出されない。IL-13でも似たような傾向であった。また中立検定(Tajima's D, Fu and Li's D)により、IL-4は強い自然選択を受けていることが明らかになった。IL-4で連鎖不平衡が保たれていることを考え合わせると、なんらかの適応により（おそらくウイルス感染、結核感染に対して）ハプロタイプが保持され、集団により頻度が変化したものと予想された。(Fig.2A, B)



2-3. 喘息連鎖領域、5q31-33、からのポジショナル・クローニング:

日本人ダニ感受性アトピー性喘息において連鎖を認めた5q31-33領域、20センチモルガン(20M塩基に相当)、からの責任遺伝子同定(ポジショナル・クローニング)を試みている。500 SNPsを65同定し、TaqMan法によりタイピングをおこなっている。1次スクリーニングにはダニ感受性喘息で家族歴を有する、またダニRAST>4の症例200例を用いた。図に示すよう、いくつかのSNPで有意差を認めている。これらから関与する遺伝子を同定し、その機能的関与について検討中である。(Fig.3)



2-4. アスピリン喘息関連遺伝子同定:

アスピリン喘息はアスピリンに代表される、非ステロイド抗炎症剤の投与により惹起される重症型の喘息である。薬剤作用点からアラキドン酸代謝に関連する遺伝子になんらかの異常があると推測された。アラキドン酸代謝関連遺伝子64個、335SNPsについて、AIA患者130例、アスピリン耐性喘息300例、対照200例で、関連解析をおこなった。21個の遺伝子でP<0.05の有意差を得、検体数を増やした解析の結果、prostaglandin E receptor 2 (EP2)で最も強い有意差を得ている。いくつかの遺伝子内SNPsで有意差を認め、プロモーター領域に存在するSNPが最も強く相関していた(P=0.0007)。このSNPによりEP2転写量が減少することをin vitro機能的実験により確認できた。EP2低下により、PGE2による気道弛緩作用を減弱させ、そこに薬剤投与により気道過敏性をきたすと予想された。(Fig.4)

3. 主な発表論文

- (1) Nakajima T, Wooding S, Satta Y, Jinnai N, Goto S, Hayasaka I, Saitou N, Guan-Jun J, Tokunaga K, Jorde LB, Emi M, Inoue I. Evidence for natural selection in the HAVCR1 gene: high degree of amino-acid variability in the mucin domain of human HAVCR1 protein. *Genes Immun.* 6, 398-406, 2005.
- (2) Jinnai N, Sakagami T, Sekigawa T, Kakihara M, Nakajima T, Yoshida K, Goto S, Hasegawa T, Koshino T, Hasegawa Y, Inoue H, Suzuki N, Sano Y, Inoue I. Polymorphisms in the prostaglandin E2 receptor subtype 2 gene confer susceptibility to aspirin-intolerance asthma: a candidate gene approach. *Hum Mol Genet*, 13, 3203-3217, 2004.
- (3) Sakagami T, Witherspoon DJ, Nakajima T, Jinnai N, Wooding S, Jorde LB, Hasegawa T, Suzuki E, Gejyo F, Inoue I. Local adaptation and population differentiation at the interleukin 13 and interleukin 4 loci. *Genes Immun*, 5, 389-397, 2004.
- (4) Nakajima T, Wooding S, Sakagami T, Emi M, Tokunaga K, Tamiya G, Ishigami T, Umemura S, Munkhbat B, Jin F, Guan-jun J, Hayasaka I, Ishida T, Saito N, Pavelka K, Lalouel J-M, Jorde LB, Inoue I. Natural selection and population history in the human angiotensinogen gene (AGT): 736 AGT sequencing in worldwide chromosomes. *Am J Hum Genet*, 74, 898-916, 2004.
- (5) Nakajima T, Jorde LB, Ishigami T, Umemura S, Emi M, Lalouel J-M, Inoue I. Nucleotide diversity and haplotype structure of the human angiotensinogen gene in two populations. *Am J Hum Genet* 70, 108-123, 2002.

体系的ゲノム解析にもとづく病因遺伝子の解析と オーダーメイド医療への応用

Systematic Expression Profile Analysis and its Application to Personalized Medicine

プロジェクトリーダー

中村 祐輔 東京大学医科学研究所・教授



1. 研究目的

生活習慣病などを含めた多くの成人疾患は、食事・生活環境・ストレスなどさまざまな外的要因や内的要因によって、正常な生活の維持に必要な遺伝子の働きにアンバランスをきたしたために生じたものであると理解することができる。したがって、ゲノム上の数万種類に及ぶ遺伝子の体系的な発現情報解析を行うことは、どのような遺伝子の働きのアンバランスが疾患の発症につながっているのかを明らかにすることにつながり、科学的かつ詳細な疾患発症機序の解明に寄与することは確実である。また、ヒトにおいて認められる遺伝子多型は疾患関連遺伝子を見つけるための指標として有用であるのみではなく、病気のリスク診断や薬剤の使い分けなどに利用することができる。十万種類もの多型マーカー（特に、SNP=1塩基多型マーカー）を用いてIgA腎症・クローン病などの発症に関連する遺伝子を探索する。これらのゲノムワイドの遺伝子発現・遺伝子多型解析の成果は、画期的な薬剤開発や新規の診断法の開発などに繋がり、社会的に大きな貢献をするものと期待される。

2. 研究成果概要

2-1. 発現情報解析：

われわれの研究室で準備した 32,000 種類の cDNA クローンをマイクロアレー化し、これらを利用して体系的発現情報解析を行うとともに、医学的に重要と判断された遺伝子については、それらの機能解析を行った。そのうち、主な成果を以下に示す。

(1) 正常型 p53 によって転写活性化される遺伝子の同定とそれらの機能解析：

図に示したような p53 下流遺伝子の同定とその機能解析によって、細胞が種々のストレスを受けた際に、p53 蛋白が異なる修飾を受け、細胞のストレスの種類やその重篤度に応じて、極めて多彩な下流遺伝子を動員することにより、細胞の生死を運命づけていることが解明された。したがって、p53 は単なるがん抑制遺伝子ではなく、免疫応答を含めて細胞の生死に関わる非常に重要な分子であることが、あらためて浮き彫りにされたものと考えている。

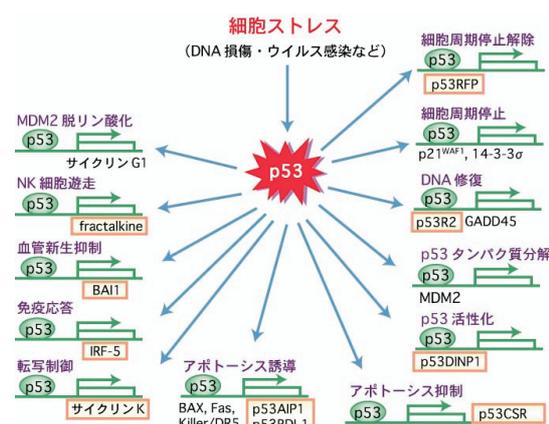


図1. p53 下流遺伝子とその働き（黒抜きの緑字で示したものはわれわれが見つけた遺伝子）

(2) がん治療薬・診断薬開発のための標的分子の同定と機能解析：

32,000 種類の cDNA を利用した体系的発現情報解析をもとに (A) がんの発生・進展に関与する遺伝子群の同定、(B) 抗がん剤感受性予測法の確立、(C) 抗がん剤や抗体薬開発のための分子標的の同定、(D) がんペプチドワクチンの開発を目指した。10 種類以上のがん特異的遺伝子を同定したが、そのうち、FZD10 は滑膜肉腫に特異的に発現する腫瘍特異的抗原として同定した蛋白である。FZD10 に対するモノクローナル抗体を作成して検討したところ、この細胞膜に発現し、このタンパクに対する抗体がマウスモデルにおいて腫瘍細胞に集積することを確認した。また、HIG2 と名付けている腎臓がんおよび胎児の腎臓においてのみ特異的に発現している分泌タンパクが、Autocrine 的に細胞増殖を刺激していることを見いだした。さらに、SMYD3 (SET and MYND domain containing 3) は、大腸がんや肝臓がんなどでがん特異的に高発現しているがん遺伝子を見つけた。

in vivo binding of monoclonal antibodies to SS xenografts

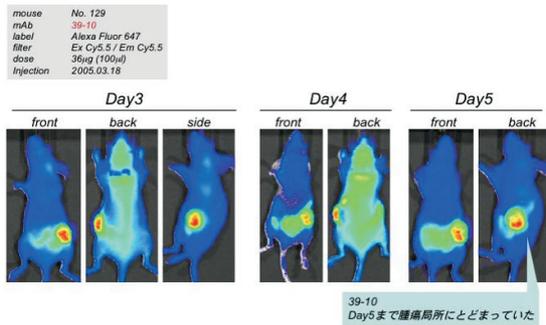


図2. マウスに移植したヒト滑膜肉腫細胞に集積したモノクローナル抗体 (赤で示される部分が腫瘍に集積した抗体)

(3) 抗がん剤および放射線感受性予測法：
 発現情報をもとにした抗癌剤感受性予測法の研究を進めている。たとえば、肺がんに対する分子標的治療薬イレッサに関しては、感受性に関する可能性のある12種類の遺伝子を選別し、スコア化した。スコアがプラスであれば有効、マイナスであれば無効となっており、矛盾はない。症例数が少ないので断定的なことは言えないが、点数と腫瘍に対するイレッサの効果には関連があるものと考えている。

(4) 難聴原因遺伝子の特定：
 われわれは、マイクロアレーによる発現情報解析により、20種類以上の内耳特異的、あるいは内耳高発現遺伝子を特定した。これらの遺伝子について難聴患者における変異の有無を順次解析した結果、CRYM 遺伝子、KIAA1199 遺伝子、FBXO2 遺伝子など内耳のリンパ液の貫流に関する遺伝子の異常が見つかり、内耳におけるリンパ圧の異常が音の伝達異常を引き起こし聴力の低下を引き起こしていることが推測された。

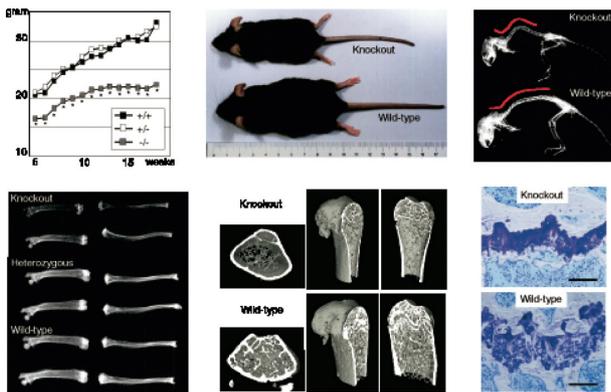


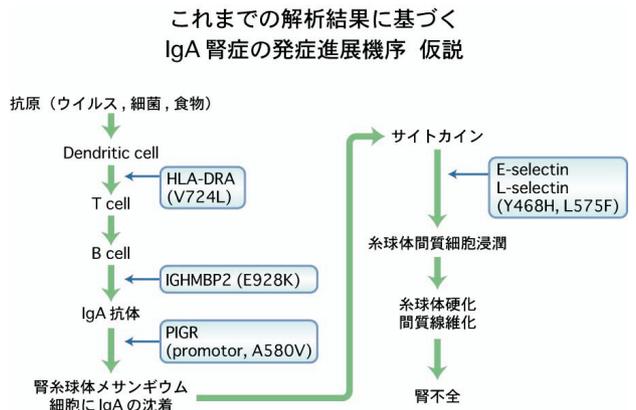
図3. ZNT5 遺伝子をノックアウトしたマウスに認められた脊椎の彎曲と骨粗鬆症

(5) 新生内膜肥厚に関連する遺伝子：
 家兔大動脈バルーン障害モデルを作成し、新生内膜肥厚の過程で発現の変化する遺伝子を単離

し、これらの遺伝子をノックアウトとしたマウスを作成した。ZNT5 遺伝子を破壊したマウスで、生殖年齢の雄マウスの約80%で突然死の起こることが観察され、かつ、その原因が不整脈である可能性が示唆された。また、このマウスでは造骨細胞数の減少が原因と考えられる重篤な骨粗鬆症が認められ、酸化ストレスと骨粗鬆症の関係を考える上で重要な所見であると考えている。

2-2. ゲノムワイドの SNP を利用したアソシエーション解析：

IgA 腎症・クローン病の遺伝的な素因を明らかにするために、全ゲノムにわたる SNP を利用したアソシエーション解析を行った。両疾患とも、複数の疾患関連遺伝子を同定し、IgA 腎症では、図に示すような発症の仕組みが推測された。



3. 結論
 ゲノムワイドの発現解析・遺伝子多型解析は医学的・生物学的に重要な遺伝子を単離するために非常に有効な手法であり、がんやその他の疾患の治療薬診断法の開発に有用である。

- 4. 主な発表論文**
- (1) S. Okamura et al.: p53DINP1, a p53-inducible gene, regulates p53-dependent apoptosis. *Molecular Cell*, 8:85-94,2001.
 - (2) C. Tanikawa et al.: p53RD L1 regulates p53-dependent apoptosis. *Nature Cell Biology*, 5:216-223,2003.
 - (3) T. Kimura et al.: Impaired function of p53R2 in Rrm2b-null mice causes severe renal failure through attenuation of dNTP pools. *Nature Genetics*, 34:440-445,2003.
 - (4) R. Hamamoto et al.: SMYD3 encodes a histone methyltransferase involved in the proliferation of cancer cells. *Nature Cell Biology*, 6:731-740,2004.
 - (5) M. Tsuge et al.: VNTR Polymorphism of E2F-1 binding element in the 5' flanking region of SMYD3 is a risk factor for human cancers. *Nature Genetics*, in press, 2005.

ゲノム解析による脳疾患遺伝子の解明

Identification of Genes Involved in Brain Diseases

プロジェクトリーダー

辻 省次 東京大学大学院医学系研究科・教授



1. 研究目的

- 1-1. 発症機構が未解明である神経疾患に焦点を絞り、ゲノム解析によるアプローチを駆使することにより、神経疾患の発症に関わる遺伝子を同定する。
- 1-2. 対象とする疾患は、単一遺伝子疾患としては、常染色体優性遺伝性脊髄小脳変性症、常染色体劣性遺伝性脊髄小脳変性症、Cerebral autosomal recessive arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CARASIL) などの疾患を主な対象とする。
- 1-3. complex trait と考えられる疾患としては、多系統萎縮症、筋萎縮性側索硬化症などを対象とする。
- 1-4. 病因遺伝子が解明された疾患については、病因遺伝子の生理機能および変異によってもたらされる病態機序を明らかにする。

2. 研究成果概要

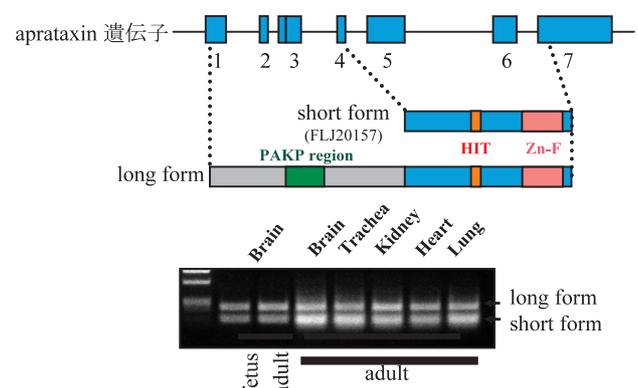
- 2-1. 常染色体劣性遺伝性の脊髄小脳変性症の1つである、「眼球運動失行・低アルブミン血症を伴う早発型失調症」の病因遺伝子を発見し、アプラタキシン遺伝子と命名し、その遺伝子産物（アプラタキシン）の機能が、一本鎖DNA損傷修復に関与する新たな酵素であることを示した。
- 2-2. SCA15 遺伝子座に連鎖する家系を同定し、候補領域の絞り込みを行った。
- 2-3. 遺伝性末梢神経障害については、軸索障害型の Cahrcot-Marie-Tooth 病 2A 型について、病因遺伝子 (MFN2 遺伝子) を見だし、CMT2A の多くについて MFN2 遺伝子に変異が見いだされることを報告した。
- 2-4. CARASIL については、連鎖解析により候補領域を同定し、ポジショナルクローニングが進行中である。
- 2-5. 家族性多系統萎縮症の存在を見だし、genome-wide linkage analysis を行った。
- 2-6. CAG リピートの異常伸長による疾患

(ポリグルタミン病) について、変異タンパクの核内集積と転写障害が重要な病態機序であることを証明した。

3. 結論

- 3-1. 常染色体劣性遺伝性の脊髄小脳変性症の1つである、「眼球運動失行・低アルブミン血症を伴う早発型失調症」の病因遺伝子を同定し、その遺伝子産物（アプラタキシン）が1本鎖DNA損傷修復にある酵素であることを示した。この研究成果は、脊髄小脳変性症の新たな病態機序を示したという点で意義の高いものである。
- 3-2. これまで孤発性の疾患と考えられていた多系統萎縮症において、家族性の発症が見いだされたことは、多系統萎縮症の病態機序を解明する上で有力な手がかりを与えるものと期待される。
- 3-3. CAG リピートの異常伸長による疾患（ポリグルタミン病）において、変異タンパクの核内集積とそれに伴う転写活性化の障害を見いだした点については、転写活性化の障害の緩和に基づく治療法開発研究の基盤を築くものとして期待される。

aprataxin 遺伝子の構造と、2種類のmRNA



4. 主な発表論文

- (1) Shimohata, T, Nakajima, T, Yamada, M, Uchida, C, Onodera, O, Naruse, S, Kimura, T, Koide, R, Nozaki, K, Sano, Y, Ishiguro, H, Sakoe, K, Ooshima, T, Sato, A, Ikeuchi, T, Oyake, M, Sato, T, Aoyagi, Y, Hozumi, I, Nagatsu, T, Takiyama, Y, Nishizawa, M, Goto, J, Kanazawa, I, Davidson, I, Tanese, N, Takahashi, H and Tsuji, S.: Expanded polyglutamine stretches associated with CAG repeat diseases interact with TAFII130, interfering with CREB-dependent transcription. *Nature Genet.* 26:29-35, 2000
- (2) Date, H., Onodera, O., Tanaka, H., Iwabuchi, K., Uekawa, K., Igarashi, S., Koike, R., Hiroi, T., Yuasa, T., Awaya, Y., Sakai, T., Takahashi, T., Nagatomo, H., Sekijima, Y., Kawachi, I., Takiyama, Y., Nishizawa, M., Fukuhara, N., Saito, K., Sugano, S. and Tsuji, S.: Early-onset ataxia with ocular motor apraxia and hypoalbuminemia is caused by mutations in a new HIT superfamily gene. *Nature Genet.* 29: 184-188, 2001
- (3) Hara, K, Fukushima, T, Suzuki, T, Shimohata, T, Oyake, M, Ishiguro, H, Hirota, K, Miyashita, A, Kuwano, R, Kurisaki, H, Yomono, H, Goto, J, Kanazawa, I and Tsuji, S. Japanese SCA families with a distinct phenotype linked to a locus overlapping with SCA15 locus *Neurol.* 62:648-651, 2004
- (4) Züchner S, Mersiyanova, I V, Muglia, M, Bissar-Tadmouri, N, Rochelle, J, Dadali, E L, Zappia, M, Nelis, E, Patitucci, A, Senderek, J, Parman, Y, Evgrafov, O, Jonghe, P D, Takahashi, Y, Tsuji, S, Pericak-Vance, M A, Quattrone, A, Battaloglu, E, Polyakov, A V, Timmerman, V, Schröder, J M, Vance, J M, Battaloglu, E. Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Nature Genet.* 36:449-51, 2004.
- (5) Shimohata, M, Shimohata, T, Igarashi, S, Naruse, S, and Tsuji, S. Interference of CREB-dependent transcriptional activation by expanded polyglutamine stretches - Augmentation of transcriptional activation as a potential therapeutic strategy for polyglutamine diseases. *J. Neurochem.* 93:654-663, 2005

疾患遺伝子の解明を目指した個体レベルの ゲノム機能解析

Whole Body Functional Genomics Directing toward the Understanding of Disease-related Genes

プロジェクトリーダー

板倉 光夫 徳島大学ゲノム機能研究センター・教授



1. 研究目的

自然界に存在する遺伝子変異が個体の表現型に与える影響を個体レベルで解析するために、以下の研究を行った。

- 1-1. 先天性代謝異常症の疾患原因遺伝子を連鎖解析と候補遺伝子のシーケンスによるポジショナルクローニングにより明らかにする。
- 1-2. レプチン受容体欠損により糖尿病を発症する db マウスを、糖尿病を発症しない系統のマウスに交配し、雑種第二世代の子孫マウスを用いる QTL 解析を行い、遺伝背景の中に含まれる疾患感受性座位を特定する。コンジェニックマウスを作成し、糖尿病の疾患感受性遺伝子を抽出する。
- 1-3. 糖尿病、関節リウマチの患者群と健常対照者群を用いて大規模関連解析により疾患感受性遺伝子を明らかにする。
- 1-4. 遺伝子変化が個体に及ぼす効果をマウス、脆弱 X 症候群ショウジョウバエ、メダカ等を用いて個体レベルで明らかにする。

2. 研究成果概要

- 2-1. 家族性若年性高尿酸血症性腎症の原因遺伝子として *uromodulin* を同定した。顎骨骨幹異形成症の原因遺伝子として *GDD1* を同定した。ワグナー症候群の原因遺伝子として、コンドロイチン硫酸プロテオグリカン 2 (*CSPG2*) を同定した。
- 2-2. 糖尿病発症 db マウスと C3H マウスとの雑種第 2 世代交配系を用いる QTL 解析により、6 箇所の候補座位を同定し、DBA2 マウスとの交配系では mRNA レベルを表現型とする QTL 解析により複数の候補遺伝子を抽出した。db マウスと DBA2 マウスとの交配系で得られた座位に関して作成した 4 系統のコンジェニックマウスの内 2 系統が雑種第 2 世代で認められた表現型を再現し、現在サブコンジェニックマウスを用いて修飾遺伝子を同定する作業を進行させている。

- 2-3. 関節リウマチ・2 型糖尿病患者、および健常対照者由来末梢不死化 B リンパ芽球株をそれぞれ 1,000 株以上収集した。日本人ゲノム上で約 90,000 スニップスのマイナーアレル頻度を明らかにした (http://www.genome.tokushima-u.ac.jp/dgi/JAPDGI/ASNP/index_Japanese.html)。関節リウマチの罹患同胞対解析の結果得られた第 7 染色体上の候補領域から疾患感受性遺伝子として *SEC8L1* を抽出した。2 型糖尿病に関する第 12 染色体上の候補領域から疾患感受性遺伝子として *SOCS2* を抽出した。
- 2-4. *Pax6* を膵β細胞で発現するトランスジェニックマウスが膵島腫瘍を形成することを明らかにした。*regI* を膵β細胞で発現するトランスジェニックマウスが糖尿病を発症し膵島腫瘍を形成することを明らかにした。*FGF8* と *FGF10* を膵β細胞で発現するトランスジェニックマウスが膵島細胞をそれぞれ肝細胞および膵外分泌細胞に分化させることを明らかにした。アルドース還元酵素を全身で過剰発現するトランスジェニックマウスとソルビトール還元酵素を欠損するマウスの交配系を用いることにより糖尿病性蛋白尿が酸化還元状態依存性であることを明らかにした。G1 期から S 期への移行を進める *CDK4* を膵β細胞で発現するトランスジェニックマウスが、癌化させることなく膵β細胞を増殖させることを明らかにした。ブタ活性化型 *TGFβ1* を膵島の細胞で発現させるトランスジェニックマウスが *p15* の発現上昇を介して膵島面積を縮小させることから、*TGFβ1* が G1 から S 期への細胞周期の移行を遅らせることにより膵島面積を縮小することを提唱した。
- 2-5. ショウジョウバエでヒト脆弱 X 症候群の原因遺伝子 *dFMR1* を欠損させると日内リズムに異常をきたすこと、さらにこの欠損が生化学的解析により *dFMR1* と RNAi(RNA 干渉)分子との結合をなくすこ

とよることを明らかにした。また、遺伝学的な研究により、dFMR1がRNAiの経路に関わることを明らかにした。さらに、RISC (RNA-induced silencing complex) に必須な Argonaute (AGO) 蛋白の内、AGO1がmiRNAの経路に、またAGO2がRNAiの経路に関わることを明らかにした。これらの結果、脆弱X症候群は、miRNA(マイクロRNA)の代謝異常を介してこれまでに知られていなかった機序で精神神経症状を発症することを提唱した。

2-6. Tリンパ球の選択と負の選択がひきおこされる抗原レセプタートランスジェニックマウスの幼若胸腺細胞を対象にマイクロアレイ遺伝子発現解析を行った。その結果、胸腺Tリンパ球の選択過程に伴って発現上昇のみられる分子としてImmune-associated nucleotide-1 (IAN1) およびIAN4を見出した。

また、ethyl nitrosourea (ENU)による変異導入をメダカに適用し、ホモザイガスの状態で胸腺形成の異常をきたす22の変異メダカを抽出した。さらに、これらの変異メダカが発生のどの時期に胸腺形成の異常を来たすかを明らかにした。

3. 結論

3-1. 3つの先天性代謝異常症の疾患原因遺伝子が同定されたことにより、病因の遺伝的診断が可能になるのみならず、同定された疾患原因遺伝子の多型が疾患感受性を決める可能性を持つ候補として抽出された。

3-2. 糖尿病と関節リウマチ等の「ありふれた病気」を対象とした場合に、有効な関連解析の方法として、

(1)罹患同胞対等の解析で疾患感受性が示唆される領域を対象とすること、

(2)遺伝子領域を中心として一定間隔(5~10 kb)にひとつ、マイナーアレル頻度が高いスニップス(単一ヌクレオチド多型)を用いて、760例~950例程度の患者群と同数の健常対照者を用いる関連解析により、比較的高率に疾患感受性遺伝子が抽出できることが明らかとなった。

3-3. このような関連解析を行うために必要なマイナーアレル頻度が例えば15%以上と比較的高いスニップスとして、日本人ゲノム上に90,000個以上特定されたことにより関連解析の研究基盤のひとつが整備された。

3-4. FMR1蛋白質がArgonaute (AGO) 蛋白等のRNAi必須因子と相互作用することを見出したことを発端とし、「RNAi分子経路の異常による疾患」というヒト分子遺伝学におけるまったく新しい領域を開いた。「モデル動物を用いた機能性ノンコーディングRNA、特にRNAi/miRNA関連分子経路の解析とその利用」という研究分野に発展していくことが予想される。

3-5. Tリンパ球の分化過程には、生体に有用な抗原認識特異性を持つ細胞のみが成熟を許される生死の選択、多様なTリンパ球機能亜集団へと分岐する一方で他の細胞種を産生しない分化系譜の決定、そして胸腺移住や胸腺内移動における細胞の位置移動といった、多細胞生物に固有の精緻な、しかし未だ機構不明の生体制御の研究分野への展望が予想される。

以上の「生体における病態・代謝調節に関わるゲノム機能が個体レベルの研究」に関する研究成果を土台として、ゲノム機能学の研究をさらに進展させることが期待される。

4. 主な発表論文

- (1) Inoue S, Shimoda M, Nishinokubi I, et al. A role for the Drosophila fragile X-related gene circadian output. *Curr Biol.* 2002 Aug 6;12(15):1331-5. PMID: 12176363
- (2) Kudo E, Kamatani N, Tezuka O, et al. Familial juvenile hyperuricemic nephropathy: detection of mutations in the uromodulin gene in five Japanese families. *Kidney Int.* 2004 May;65(5):1589-97. PMID: 15086896
- (3) Tsutsumi S, Kamata N, Vokes TJ, et al. The novel gene encoding a putative transmembrane protein is mutated in gnathodiaphyseal dysplasia (GDD). *Am J Hum Genet.* 2004 Jun;74(6):1255-61. PMID: 15124103
- (4) Hino S, Yamaoka T, Yamashita Y, et al. In vivo proliferation of differentiated pancreatic islet beta cells in transgenic mice expressing mutated cyclin-dependent kinase 4. *Diabetologia.* 2004 Oct;47(10):1819-30. PMID: 15480536
- (5) Ueno T, Saito F, Gray DH, et al. CCR7 signals are essential for cortex-medulla migration of developing thymocytes. *J Exp Med.* 2004 Aug 16;200(4):493-505. Erratum in: *J Exp Med.* 2004 Oct 4;200(7):following 946. PMID: 15302902
- (6) Hamada D, Takata Y, Osabe D, et al. Association between single-nucleotide polymorphisms in the SEC8L1 gene, which encodes a subunit of the exocyst complex, and rheumatoid arthritis in a Japanese population. *Arthritis Rheum.* 2005 May;52(5):1371-80. PMID: 15880602

ゲノム解析を基盤とする新たなヒト分子生物学・医学の展開

Human Molecular Biology and Medicine Based on Genome Analysis

プロジェクトリーダー

清水 信義 慶應義塾大学医学部・教授



1. 研究目的

ヒト 22 番・21 番・8 番染色体塩基配列の緻密な解析により同定した遺伝子の構造と機能解析を行なう。それらの遺伝子の発現調節機構と産生される蛋白質の生理機能を系統的かつ総合的に解明し、その中で新たなヒト分子生物学・医学を志向し展開する。また、遺伝子のコピー数変化による疾患も含めた遺伝子疾患の原因遺伝子を、独自に作製した BAC ライブラリーとゲノムシーケンシング能力を活用して効率よく探索する。すでに発見した疾患原因遺伝子（若年性パーキンソン病：*PARKIN*、自己免疫疾患 APECED：*AIRE*、開放隅角緑内障 *GLC1A*：*MYOC*）について、発症機構と病態の解明のために、産物蛋白質の機能及び突然変異の種類と症状との関連の解析を行う。

2. 研究成果概要

2-1. ヒトゲノム解析（マッピング、シーケンシング、遺伝子解析）：

慶應 BAC ライブラリーと独自のゲノム解析技術を駆使して、ヒト 8 番染色体（8q22-q24.1 領域 14Mb）、6 番染色体（*PARKIN* 遺伝子 1.4Mb）、2 番染色体（免疫グロブリン κ 鎖遺伝子）のシーケンシングと遺伝子解析を行った。また 22、21、8 番染色体塩基配列の緻密な解析により、ヒトゲノム高精度シーケンスの完成と遺伝子探索に重要な貢献をした。

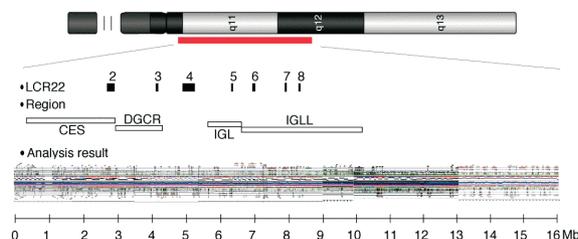


図 1. 22 番染色体の遺伝子マップ

22 番染色体からは RNAi 機構の重要なタンパクである Argonaute ファミリーの *PIWIL3* を同定した。さらに、それを出発点として、全ゲノムから同ファミリーの全 8 遺伝子を見つけて cDNA クローニングし、ゲノム構造を決定した。また、(2-2.)で述べる *DGCR8* は、siRNA、miRNA の生体内生成機構の重要な因子であることが示されたため、

Argonaute ファミリーと合わせて、RNA による細胞機能調節の新しい世界の理解を深めた。さらに、*Drosophila yippee* と相同性の高い *YPEL1* を発見した。*YPEL1* を発端として、全ゲノムから相同性の高い 5 遺伝子を同定し、*YPEL* ファミリーと命名した。*YPEL* ファミリーは事実上、すべての真核生物に存在し、細胞分裂装置の新規構成成分と考えられた。

ダウン症の原因となる 21 番染色体については、発見した多数の候補遺伝子（*DYRK1A*、*SIM2*、*UMODL1*、*TRPM2*、*ZNF295*、*ZNF298* など）の構造・機能解析を行い、ダウン症における遺伝子量効果に関してミニクロモソームの活用の基盤を整備した。また、通常の方法では発見が困難な単一エクソンからなる最小のコーディング遺伝子である毛髪ケラチン付随タンパク（*KAP*）遺伝子群を 48 個、ヒトゲノム全体からさらに 45 個を発見し、総数は、5 クラスター、93 個となった。21q22.3 の *KAP* クラスターのうち 8 個の遺伝子は、別の遺伝子 *TSPEAR* のイントロン中に同じ向きで入れ子状に存在しており、未知の転写終結制御機構の存在を強く示唆した。

2-2. 遺伝子量効果で発症する疾患の原因遺伝子追究：

全ゲノムの約 37% をカバーする BAC クローン計 7,809 個をスポットした高密度 BAC マイクロアレイを作製し、癌その他の疾患のアレイ CGH 解析を行いゲノムの不安定性を検出できた。癌に伴う増幅欠失領域のみならず、ダウン症の部分トリソミー領域の決定など遺伝子量効果による疾患の染色体領域を迅速に決定することが可能になった。

22 番染色体の部分欠失で発症する DiGeorge/円錐動脈幹異常顔貌症候群については典型的欠失領域 DGCR (1.5Mb) に存在する *TBX1* 遺伝子に患者特異的な変異を発見し臨床症状との相関を決定的にした。また、DGCR から新規候補遺伝子 *DGCR8* を発見した。*DGCR8* は、マウス胎仔において、同症候群発症組織（特に胸腺）に一致する発現を認めた。

図 2. *DGCR* 遺伝子のマウス胎仔における発現

2-3. 常染色体劣性非症候群性難聴 DFNB8/10 の原因遺伝子 *TMPRSS3* のクローニング:

常染色体劣性非症候群性難聴 DFNB8/10 については、21 番染色体の遺伝子探索から同定した *TMPRSS3* 遺伝子が原因遺伝子であることを突き止め、さらに遺伝子産物である膜貫通型セリンプロテアーゼ *TMPRSS3* が小胞体に局在することと上皮ナトリウムチャンネル *ENaC* を活性化することを解明した。さらにマウス疾患モデルの作成にも成功した。

2-4. すでに発見した疾患原因遺伝子の性状解析:

若年性パーキンソン病の原因遺伝子 *PARKIN* については 1.4Mb におよぶ巨大遺伝子の全構造を決定し、患者に多く見られる大きな欠失変異の部位を塩基配列レベルで解明した。また、遺伝子産物 *Parkin* がユビキチンリガーゼ E3 であることを発見し、パーキンソン病が神経細胞内タンパク分解システムの異常で起こるという考え方を決定的にした。

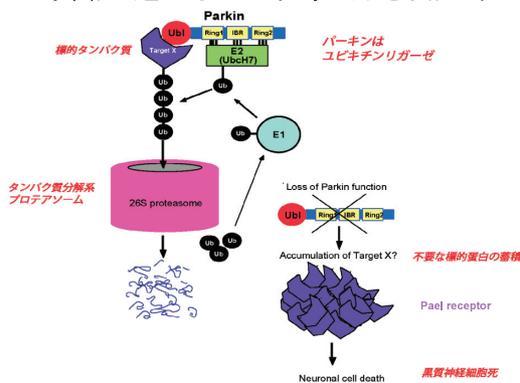


図3. パーキンソン病の分子病態モデル

自己免疫疾患の原因遺伝子 *AIRE* については、転写促進活性や、転写コアクチベーターCBP との結合など転写因子としての性質を示すのみならずユビキチンリガーゼ E3 でもあることを発見した。胸腺における「末梢組織特異的抗原遺伝子の異所性発現」に関して *AIRE* の機能を解析するため、胸腺髄質上皮細胞由来の *AIRE* 発現細胞株を新たに樹立した。

緑内障の原因遺伝子 *Myocilin* (*MYOC*) については、緑内障発症条件に類似する条件化での発現量の変動をもう一つの緑内障遺伝子 *Optineurin* (*OPTN*) と比較解析したところ、両者は異なる挙動を示し、発症機序が異なることが推測された。

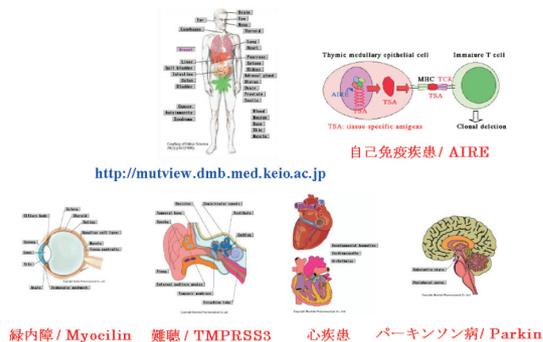


図4. 遺伝子疾患変異知識ベース *M*..

2-5. 遺伝子疾患変異知識ベース *Mutation View* の構築:

システム構築とデータ充実を図り、500 疾患 (292 遺伝子) の変異・多型 17,119 件を 2,147 の文献より抽出・入力し DNA 診断と遺伝子治療開発に供した。また、OMIM の記述を利用した高度な検索システムを新規に開発した。

3. 結論

本研究の成果として得られたヒトゲノムの高精度塩基配列と、緻密な解析によって我々が発見し構造を決定した多数の遺伝子群が、未来への重要な知的財産となることには、疑いの余地もない。また、パーキンソン病、自己免疫疾患、緑内障などの重要な疾患の発症機構解明の尖兵として当該分野の研究の進展に多大な影響を与えた。さらに、ゲノムワイドな BAC マイクロアレイの実用化など今後のゲノムからプロテオームへの包括的解析のための画期的なツールと基盤を確立したことも重要な成果である。

4. 主な発表論文

- (1) International Human Genome Sequencing Consortium; Finishing the Euchromatic Sequence of the Human Genome, *Nature*, 431(7011):931-945,(2004).
- (2) International Human Genome Sequencing Consortium; Initial Sequencing and Analysis of the Human Genome, *Nature*, 409(6822):860-921,(2001).
- (3) Scott, H.S., Kudoh, J., Wattenhofer, M., Shibuya, K., Berry, A., Chrast, R., Guipponi, M., Wang, J., Kawasaki, K., Asakawa, S., Minoshima, S., Younus, F., Mehdi, S.Q., Radhakrishna, U., Pappasavvas, M.-P., Gehrig, C., Rossier, C., Korostishevsky, B., Gal, A., Shimizu, N., Bonne-Tamir, B., Antonarakis, S.E.; Insertion of β -satellite Repeats Identifies a Transmembrane Protease Causing Both Congenital and Childhood Onset Autosomal Recessive Deafness, *Nature Genet*, 27(1):59-63,(2001).
- (4) Shimura, H., Hattori, N., Kubo, S., Mizuno, Y., Asakawa, S., Minoshima, S., Shimizu, N., Iwai, K., Chiba, T., Tanaka, K. and Suzuki, T.; Familial Parkinson Disease Gene Product, Parkin, is a Ubiquitin-protein Ligase, *Nature Genet*, 25(3):302-305,(2000).
- (5) Sasaki, T., Shiohama, A., Minoshima, S. and Shimizu, N.; Identification of Eight Members of the Argonaute Family in the Human Genome, *Genomics*, 82(3): 323-330, (2003).
- (6) Shibuya, K., Obayashi, I., Asakawa, S., Minoshima, S., Kudoh, J. and Shimizu, N.; A Cluster of 21 Keratin-associated Protein Genes within Introns of Another Gene on Human Chromosome 21q22.3, *Genomics*, 83(4):679-693,(2004).

マイクロサテライト多型を用いた疾患関連遺伝子の解明

Identification of Disease-related Genes Using Microsatellite Polymorphisms

プロジェクトリーダー

猪子 英俊 東海大学医学部・教授



1. 研究目的

本研究プロジェクトでは、SNP (single nucleotide polymorphism) による疾患の関連遺伝子を効率的に推進するため、SNP に比べ多型に富み、したがってより精度の高いマッピングが可能なマイクロサテライトに注目した。すなわち、まずゲノムワイドにマイクロサテライト多型による疾患の関連遺伝子のマッピングを行い、100 kb 以内に関連遺伝子候補領域が絞り込んだのち、100 kb の関連遺伝子候補領域について、SNP 解析により、疾患の関連遺伝子の同定を行うことを目的とする。

2. 研究成果概要

2-1. 多型マイクロサテライトマーカーの収集:

マイクロサテライト多型を検出する実験の効率を上げ、コストを下げる目的で、使用する各個体由来 DNA を混合する Pooled DNA 方法を確立した。さらに日本人健康者 100 個体から調整された DNA を用い、この Pooled DNA 法によりゲノムワイドに設定したマイクロサテライトマーカーの多型の有無を検査した。すなわち、ヒトゲノムドラフト配列から新規のマイクロサテライト配列 56,207 個の PCR プライマーセットを設計して多型の有無を調べ、うち多型を有するものとして 30,950 個の新規マイクロサテライトマーカーを見いだした。一方、国外の研究機関によって白人集団を用いて同定されているマイクロサテライトマーカー 9,880 個についても日本人集団を用いてタイピングを行い、9,099 個が多型を有することが明らかとなった。以上を総計して、多型マイクロサテライトマーカー 40,049 個を設定することに成功した。その平均解像度は 75kb/マーカーであった。

また平均のヘテロ接合率とアレル数はそれぞれ 0.69 と 7.0 個と計算され、遺伝的相関解析を行うに足る、多型性に富んだマーカーをゲノム全体にわたって高密度に収集することに成功した。しかしながら、実際にゲノムワイドな相関解析においては、最近傍のマイクロサテライト間の距離を 100 kb にすること並びに費用の面のことを考慮して、27,039 個のマイクロサテライトを使用している。

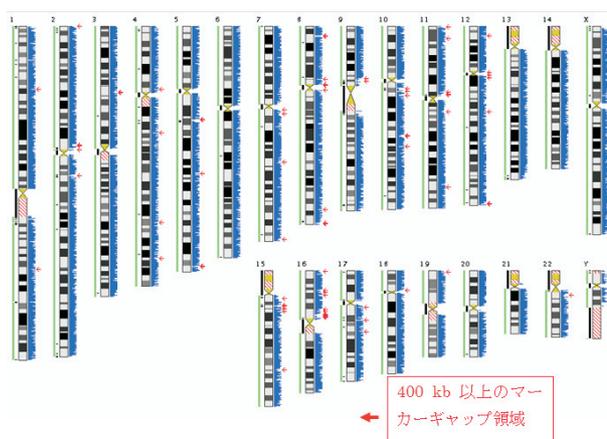


図 1. 多型マイクロサテライトマーカーの概要

2-2. 日本人集団の遺伝的均質性:

日本人集団を Y 染色体の系統に基づいてグループ分けし、常染色体マイクロサテライトの対立遺伝子頻度分布を調べた。その結果、上記グループ間では、調査したマーカー全てにおいて対立遺伝子頻度分布に有意差が認められず、従って、日本人集団を用いた遺伝的相関解析において、階層化を考慮する必要はないと判断した。

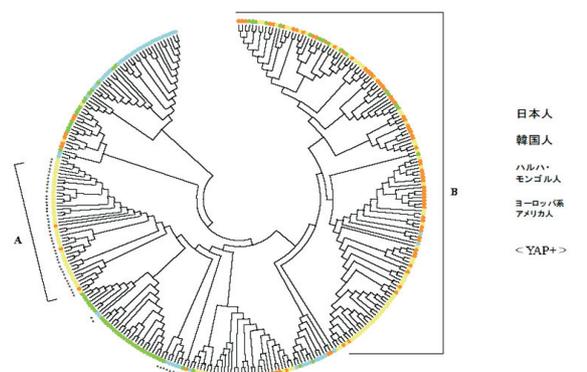


図 2. Y 染色体マイクロサテライトマーカーに基づくハプロタイプ系統樹

これは、多型マイクロサテライトマーカーを用いたゲノムワイドな遺伝的相関解析の可能性を支持するものであり、重要な基礎的知見を得ることができた。

2-3. HLA 領域内における複合遺伝性疾患関連遺伝子の検索：

皮膚がん、無精子症ならびに関節リウマチを対象に HLA 領域に限定して関連遺伝子のマッピングを実施した。皮膚がんでは HLA-C 遺伝子座のテロメア側に約 180kb のセグメントに感受性領域が、また無精子症では HLA-DQ、-DR 遺伝子座付近の約 200kb のセグメントに多型マイクロサテライトマーカーを用いた解析により感受性領域が見出された。このモデル領域において多型マイクロサテライトマーカーによる感受性領域の検索に成功した事実は、ゲノムワイドな疾患感受性遺伝子の検索の可能性を指示するものであり、さらに観察された連鎖不平衡が 100~200kb 程度であることから、設定するマーカー密度も適当であることが改めて確認された。また関節リウマチにおいても HLA class III 領域のテロメア側に感受性領域を見出し、さらに SNP マーカーを用いて詳細なマッピングを実施したところ、関連遺伝子を同定することに成功した。

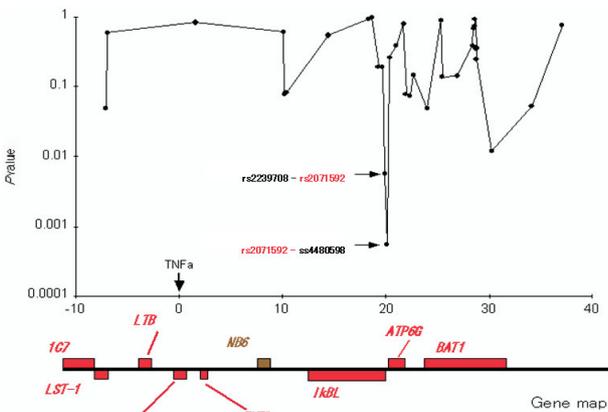


図3. ハプロタイプ頻度による相関解析

この結果、SNP マーカーにて観察される連鎖不平衡領域は多型マイクロサテライトマーカーで示されるものより短かったことから、ゲノムワイドな多型マイクロサテライトマーカーにて関連遺伝子のマッピングを行い、その後絞り込まれた領域内で SNP マーカーを用いて関連遺伝子を同定する我々の方法論が正しいことが実証された。

2-4. ゲノムワイドな複合遺伝性疾患感受性遺伝子の検索：

関節リウマチ、尋常性乾癬、高血圧ならびに強度近視を対象にゲノムワイドに関連遺伝子のマッピングを実施した。関節リウマチは Pooled DNA 法によるスクリーニング、さらには individual タイピングによる確認の結果、候補領域が 47 箇所明らかにされた。

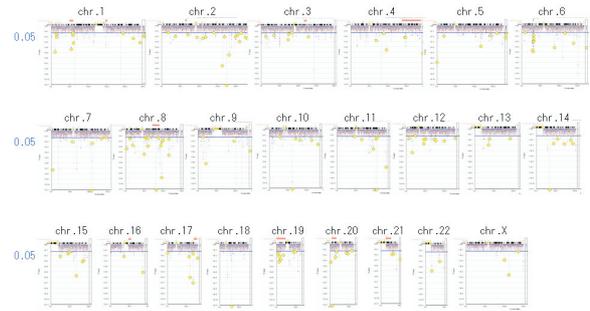


図4. 3次スクリーニングにおける陽性マーカーの染色体位置

これらのうち、最も相関の高い7箇所の領域について SNP による相関解析を行ない、その結果、7個の感受性遺伝子が同定された。これら7個のうち、2個は既知の感受性遺伝子であり、残り5個は新規の感受性遺伝子であった。

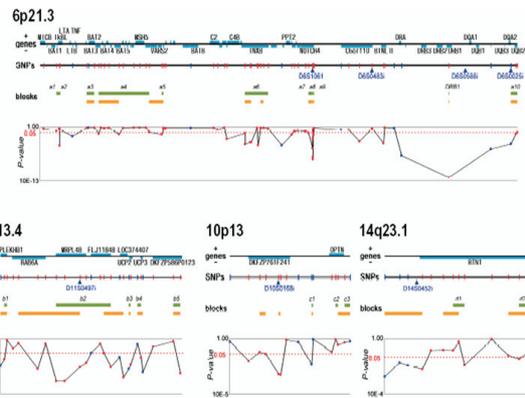


図5. SNP アリルと関節リウマチの相関

3. 結論

ここに世界的にも類を見ない全く新しい疾患関連遺伝子の追求方法が完成し、本研究プロジェクトの最終目標が達成された。引き続き尋常性乾癬、高血圧ならびに強度近視にも着手し、これらに関しては多型マイクロサテライトマーカーによるマッピングが完了し、それぞれ約 30 個程度の関連遺伝子候補領域が見出された。時間および予算的に SNP マーカーによる関連遺伝子の特定まで完遂できなかったが、継続して研究を続けていく予定である。

4. 主な発表論文

- (1) Tamiya G et.al: "Whole genome association study of rheumatoid arthritis using 27,039 microsatellites." *Hum Mol Genet*, (2005) *in press*.
- (2) Okamoto K et.al: "Identification of IkBL as the second Major Histocompatibility Complex-Linked susceptibility locus for rheumatoid arthritis." *Am J Hum Gene*, 72, 303-312, (2003).
- (3) Katoh T et.al: "Genetic Isolates in East Asia:A study of Linkage Disequilibrium" *Am J Hum Gene*, 71, 395-400, (2002).

体系的 SNP 解析に基づく骨粗鬆症の発症に関する 遺伝的要因の解明

Genetic Analysis of Osteoporosis by Systematic SNP Typing

プロジェクトリーダー

江見 充 日本医科大学老人病研究所・教授



1. 研究目的

骨粗鬆症は、骨構造の質的・量的な変化によって骨の脆弱化をきたす疾患で、特に高齢者における骨折の危険性を増やすことが社会的な問題とされています。我が国における診断基準によれば、人口の約 20 分の 1 を占める 600 万人が罹患しているとされる、きわめて発症頻度の高い疾患です。21 世紀において高齢化は地球規模で進むと考えられ、骨粗鬆症は唯一我が国だけの問題ではなく、その発症機構の解明により実現される発症前診断および新しい有効な治療法の開発は、豊かな国民生活の実現にはならないものと考えます。

骨粗鬆症の発症には、幾つもの遺伝的な要因が複雑に関与するものと考えられます。これまでに、幾つかの遺伝子多型がこれに関与するものと推定されて、散発的に検討されてきましたが、明らかとされる個別的な遺伝要因（ふつう「疾患関連遺伝子」と呼ばれます）は、まだひとつも確定されてはおりません。

本研究計画において私共は、骨粗鬆症の有効な予防・治療法を開発するために、その発症メカニズムの一端を担う遺伝的素因を明らかにすることを目指しました。

2. 研究成果概要

骨粗鬆症の発症に関わる遺伝的素因を明らかにするため、具体的には以下に示す目標を掲げてその成果をおさめることが出来ました。

2-1. 解析方法の確立：

信頼度の高い感受性遺伝子を同定するための遺伝疫学的な解析法を確立するため、信頼度の高い表現形質の評価法の確立・解析用 SNP の抽出法確立・ハイスループットなジェノタイプ解析法の確立・多段階スクリーニングによる相関解析法の確立を行いました。

まず対象となる集団を信頼度の高い方法で抽出する必要がありましたが、我が国において本領域の指導的立場にある東京大学老年病科および東京都老人医療センター、東京都老人総合研究所、成人病診療研究所の協力により約 2,000 例の一般日本人集団および約 1,500 例の十分な臨床情報の得られた日本人集団を集めることが出来ました。

また近年になって急速に解明の進められたヒトゲノム上に多数存在する一塩基多型 (SNP) に関する情報を利用して、特定の遺伝子座に限定することなく、多型として遺伝子情報の発現に影響を及ぼすと考えられた 5 千個におよぶ遺伝子多型のリストを作成し、さらに DXA 法による骨密度値の年齢および肥満指数による補正評価法と、図に示すような多段階スクリーニング法を確立致しました(図 1)。

骨粗鬆症の多段階スクリーニング



図 1. 我々の確立した多段階スクリーニング法

2-2. 感受性多型候補の同定と人口遺伝学的な評価：

スクリーニングの成果として、収集された検体のうち 384 例について 5 千種類の遺伝子多型のジェノタイプを決定し、その中から特に 64 個の有力候補遺伝子多型を 52 遺伝子上に同定できました。

また、多数の遺伝子多型のもつ相互関係について人口遺伝学的な検討を重ねるとともに、再現性の検討を地域集団約 1,000 例と、臨床データのある集団約 400 例などに分けてそれぞれ解析し、個々の遺伝子多型のもつ意義について検討を行いました。

2-3. 分子機構の解明と複合的関与の検討：

これらの中には分子機能の上からも非常に重要なゴナドトロピン遊離ホルモンや低比重リポ蛋白受容体関連蛋白 5 遺伝子上のミスセンス多型が含まれており、分子機能上の変化についても検討を進めることができました。最後に、これら少数の有力感受性遺伝子多型について、図 2 に示すような複合的な関与を推定して重回帰分析を行いました。

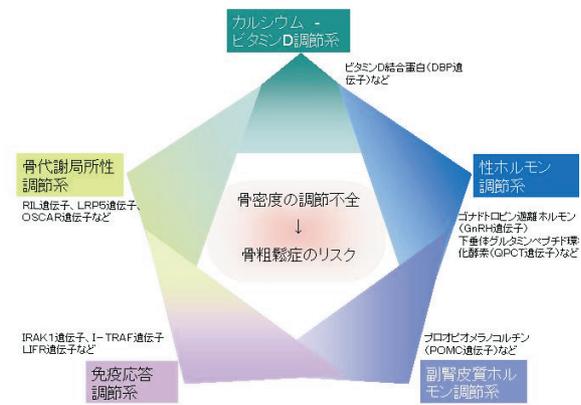


図2. スクリーニングにより判定した感受性遺伝子多型群による骨密度規定機構の概念図

なお、スクリーニングを行ってきた検体の一部は血清コレステロール値などについても解析を行うことができました。全SNPの解析結果から、HDLコレステロール値への影響について解析を行うと、従来から日本人高HDLコレステロール者に多いとされている変異が一般集団にも特定頻度で見られ、全体として有意相関を示す感受性多型であることが判明するなど、再現性の高い結果が得られており、このほかにも有力な遺伝子多型が複数同定されたことから、骨密度値と平行して血清脂質値についても解析を進め、骨代謝調節との相互関係等についても検討して行きたいと考えています。

2-4. 診断マーカーと治療効果予測法の開発：

骨粗鬆症の予防に役立つリスク診断と治療効果を予測する遺伝子多型マーカーを開発することがプロジェクトの最終目標でした。5年間の研究期間での成果をもとに、この研究計画と平行して、多型検出に基づくDNA診断技術の開発研究を用い、株式会社ビー・エム・エルを資金提供および事業化事業者としてインベスター法を用いた検出パネルを作製し、発症リスク予知診断検査法の構築の研究開発を行いました。現時点で有力なマーカーと考えられる遺伝子多型の組み合わせについて検出パネルの作成を提案し、平成15年には特許出願を2件おこないました。

3. 結論

本研究プロジェクトで遂行された5年間の研究によって、過去十数年にわたり提示されてきた候補感受性遺伝子の数を超えた新規の候補感受性遺伝子多型を同定することができ、そのうち少なくとも二つの遺伝子多型は非常に有望であることが判明しています。真に確からしい感受性遺伝子多型がひとつでも確定することで、それ以外の感受性多型の検出感度は高まることから、我々の目指したリスク診断の遺伝子多型マーカーの組み合わせは近い将来開発されうると思われます。また、こうした研究がさらに進められることにより、関連する薬剤感受性に関与する遺伝子多型マーカーの開発や、新たな標的分子をもつ治療薬の開発にもつながることが期

待されております。

本研究プロジェクトによる研究は、本事業の目指した「我が国の経済・社会の発展と我が国の未来の開拓につながる創造性ある研究」として推進されたものと確信しております。

4. 主な発表論文

- (1) Shimizu, M., Kosaka, N., Shimada, T., Nagahata, T., Iwasaki, H., Nagai, H., Shiba, T., Emi, M. : Universal Fluorescent Labeling (UFL) Method for Automated Microsatellite Analysis. DNA Res. 9(5), 173-178, 2002.
- (2) Iwasaki, H., Emi, M., Ezura, Y., Ishida, R., Kajita, M., Kodaira, M., Yoshida, H., Suzuki, T., Hosoi, T., Inoue, S., Shiraki, M., Swensen, J., Orimo, H.: Association of a Trp16Ser variation in the Gonadotropin Releasing Hormone (GnRH) Signal Peptide with Bone Mineral Density, revealed by SNP-dependent PCR (Sd-PCR) Typing. Bone. 32(2), 185-190, 2003.
- (3) Ishida, R., Emi, M., Ezura, Y., Iwasaki, H., Yoshida, H., Suzuki, T., Hosoi, T., Inoue, S., Shiraki, M., Ito, H., Orimo, H.: Association of a haplotype (196Phe/532Ser) of variations in the Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase (IRAK1) Gene with Low Radial Bone Mineral Density in Two Independent Populations. J. Bone. Miner. Res. 18(3) 419-423, 2003.
- (4) Ishida, R., Ezura, Y., Emi, M., Kajita, M., Yoshida, H., Suzuki, T., Hosoi, T., Inoue, S., Shiraki, M., Ito, H., Orimo, H.: Association of a promoter haplotype (-1542G/-525C) in the Tumor Necrosis Factor Receptor Associated Factor-Interacting Protein (I-TRAF) Gene with Low Bone Mineral Density in Japanese Postmenopausal Women. Bone. 33(2) 237-241, 2003.
- (5) Ezura, Y., Kajita, K., Ishida, R., Yoshida, S., Yoshida, H., Suzuki, T., Hosoi, T., Inoue, S., Shiraki, M., Orimo, H., Emi, M.: Association of Multiple Nucleotide Variations in The Pituitary Glutaminyl Cyclase Gene (QPCT) with Low Radial Bone Mineral Density in Adult Women. J. Bone. Miner. Res. 19(8) 1296-1301, 2004.

生命システム情報統合データベースの構築と ゲノム情報理学の創成

Biological Systems Database and Genome Information Science

プロジェクトリーダー

金久 實 京都大学化学研究所・教授



1. 研究目的

ゲノムの情報は、細胞・個体・生物界といった高次レベルの生命システムを原理的に理解するための基盤情報であり、同時に医療や産業をはじめとした応用の可能性をもつ情報でもある。しかしながらこれまでの情報技術では、ゲノムに書かれた個々の遺伝子やタンパク質を解読することはできても、これら基本部品から構成される生命システムとしてのはたらきを直ちに解読することはできなかった。そこで本研究では、ゲノムから細胞レベルでの生命システムのはたらきと有用性を見いだすための知識集約型データベース（生命システム情報統合データベース KEGG）を構築し、生命システムの情報構築原理を理解すると同時に、産業化へつながるバイオインフォマティクス技術を確立する。

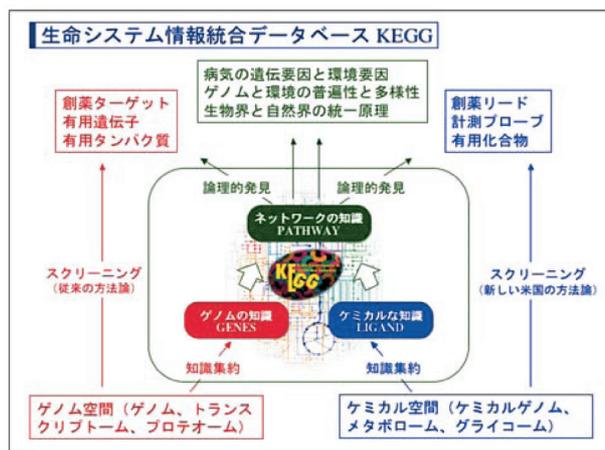
2. 研究成果概要

2-1. 新しいデータベースの概念：

バイオインフォマティクスの究極の目標は、細胞・個体・生物界といった生命システムをコンピュータの中に再現し、高次複雑システムとしての生命現象をゲノムの情報から計算で予測可能にすることである。このような観点から、本研究では「生命システムのコンピュータ表現」というデータベースの新しい概念を提唱し、これを実用化した。

2-2. KEGG データベースの構築：

KEGG は旧文部省ヒトゲノムプログラム第 I 期の最終年度である 1995 年に特定領域研究「ゲノム情報」の下で開始し、第 II 期に特定領域研究「ゲノムサイエンス」で発展させてきたデータベースである。ミレニアムプロジェクトの一貫として 2000 年に開始された本研究における新しい KEGG は、細胞レベルでの生命システムのコンピュータ表現であり、下図に示したように、ゲノム情報（GENES）とケミカル情報（LIGAND）をネットワーク情報（PATHWAY）で統合した「生命システム情報統合データベース」である。



データベースとは何か

	NCBI	京大
データベース	レポジトリ、インフラ	生命システムのコンピュータ表現
データ内容	既知のすべてのデータ	基本部品と配線図
統合化	リンク	システム再構築
実用化	Entrez	KEGG
検索	個々のデータ (例, BLAST)	ネットワークの特徴 (例, SSDB)

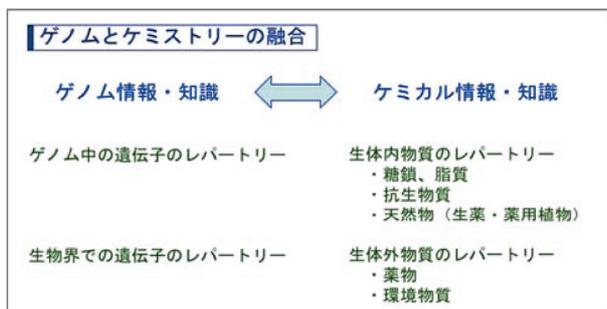
従来のバイオインフォマティクス技術が、大量データのスクリーニングで有用遺伝子や有用タンパク質など個々の部品を見いだすことに主眼があったのに対し、本研究では部品間の配線図（相互作用ネットワーク）を明らかにすることで、生体システム全体としての機能や有用性を見いだす方法論を開拓した。KEGG に集約された配線図の知識は、代謝再構築をはじめ、ゲノムの情報から細胞レベルでの生命システムの機能解読のため、国際的に幅広く利用されている。

KEGG データベース構築に関して、本研究の具体的な成果は以下の通りである。

- (1) ネットワーク (パスウェイ) 情報に関しては、代謝系中心の KEGG からシグナル伝達をはじめとした様々な制御系や病気のパスウェイを含む KEGG へと発展させた。また KEGG パスウェイマップの XML 化を実現し、パスウェイデータベースの国際標準となった。
- (2) ゲノム情報に関しては、KEGG パスウェイに対応づけてオースログ遺伝子グループ KO を定義し、ゲノム中の遺伝子に KO づけを行うことで、パスウェイ再構築とそれに伴う高次機能解釈を可能とした。KO づけの自動化システムを広く提供することで、遺伝子アノテーションにおいても KEGG は国際標準になると考えている。
- (3) ケミカル情報に関しては、化合物・化学反応に加えて糖鎖の構造情報をデータベース化した。また化学構造比較アルゴリズムを開発して、化合物や糖鎖の類似構造検索を可能とし、さらに生体内化学反応の分類体系 RC を開発して、EC 番号づけの自動化を実現した。このような先駆的研究により、米国 NCBI、欧州 EBI、米国糖鎖コンソーシアムなどとの国際連携が進んでいる。
- (4) 幅広い基盤的なデータベースである KEGG を個々のニーズに応じて利用できるよう、標準的なプログラミングインターフェース KEGG API を開発し提供した。

2-3. ゲノム情報理学の創成:

本研究では、生命システムのコンピュータ表現 (オントロジー) について、ネステッドグラフ (階層グラフ) とライングラフの概念を導入した。ネステッドグラフは KEGG パスウェイの階層表現に使われ、ゲノムからパスウェイ再構築と高次機能解釈を行う方法論として実用化した。



もう 1 つの概念であるライングラフとはノードとエッジを入れ替えたグラフのことで、代謝系において酵素 (遺伝子) ネットワークと化合物ネットワークの相補性に関する概念である。これをもとにゲノム中の遺伝子レパートリーから生物が生産し得る物質を予測したり、逆に天然物の構造からゲノム中の遺伝子や合成経路を予測したり、ゲノムとケミストリーを融合した研究を開拓した。これは近年のケミカルゲノミクス研究とともに、ゲノムと環境との相互作用を理解するゲノム情報理学の研究領域としてさらに発展しつつある。

3. 結論

KEGG を中心としたゲノムネットのウェブサイト (<http://www.genome.jp/>) へのアクセス件数は、本研究開始時に月間 200 万件であったのが終了時には月間 800 万件に達し、5 年間で KEGG が飛躍的に発展したことを物語っている。アクセス件数の 6~8 割は海外からであり、国際的な知的情報基盤としての地位を確立した。これは下に示した Google のリンク検索 (他のサイトからどの程度リンクされているかの目安) でも明らかであり、KEGG は世界で最もよく利用されているデータベースの 1 つとなった。

Googleによるデータベース引用回数		
データベース	アドレス	回数
NCBI	www.ncbi.nlm.nih.gov	29,800
ExPASy (SwissProt)	www.expasy.org	18,300
EBI	www.ebi.ac.uk	13,200
GenomeNet (KEGG)	www.genome.jp	9,430
DDBJ	www.ddbj.nig.ac.jp	620
JSNP	snp.ims.u-tokyo.ac.jp	55
PDBj	www.pdbj.org	23
H-invitational	www.h-invitational.jp	19

(2005年7月16日のリンク数検索結果)

4. 主な発表論文

- (1) Kanehisa, M. and Bork, P. (2003) Bioinformatics in the post-sequence era. *Nat. Genet.* 33, 305-310.
- (2) Kanehisa, M., Goto, S., Kawashima, S., and Nakaya, A. (2002) The KEGG databases at GenomeNet. *Nucleic Acids Res.* 30, 42-46.
- (3) Kanehisa, M., Goto, S., Kawashima, S., Okuno, Y., and Hattori, M. (2004) The KEGG resource for deciphering the genome. *Nucleic Acids Res.* 32, D277-D280.
- (4) Hashimoto, K., Goto, S., Kawano, S., Aoki-Kinoshita, K.F., Ueda, N., Hamajima, M., Kawasaki, T., and Kanehisa, M. (2005) KEGG as a glycome informatics resource. *Glycobiology*, in press.
- (5) Hattori, M., Okuno, Y., Goto, S., and Kanehisa, M. (2003) Development of a chemical structure comparison method for integrated analysis of chemical and genomic information in the metabolic pathways. *J. Am. Chem. Soc.* 125, 11853-11865.
- (6) Kotera, M., Okuno, Y., Hattori, M., Goto, S., and Kanehisa, M. (2004) Computational assignment of the EC numbers for genomic-scale analysis of enzymatic reactions. *J. Am. Chem. Soc.* 126, 16487-16498.

多型マーカーを利用した疾患遺伝子解析のための コンピュータプログラムの開発と応用

Development and Application of Computer Programs for Mapping Disease-related Genes Using Polymorphic Markers

プロジェクトリーダー

鎌谷 直之 東京女子医科大学膠原病リウマチ痛風センター・教授



1. 研究目的

ゲノム配列の個人間の違いを基礎にした多型マーカーを用いて、形質マッピング（疾患や薬剤反応性に関係するゲノム配列の場所を特定する）を行うためのアルゴリズムを作成し、それを搭載したコンピュータプログラムを作成する。それを用いて形質に関係するゲノム配列を特定する。ゲノムデータを分析し、形質と結びつけるための様々な手法（遺伝統計学的手法）を解説し、指導するためのホームページを公開する。多くの研究者と共同してゲノムデータの遺伝統計学的解析を支援する。

2. 研究成果概要

2-1. アルゴリズムとコンピュータプログラムの作成と応用

8 個のアルゴリズムに基づいたコンピュータプログラムを開発し、6 個のアルゴリズムについては以下のように論文として発表した。

(1) Checkfam (1 : 下記の発表番号論文番号) :
家系の遺伝子型データの矛盾を検出する。我々はこの方法を開発し、Web 上で使用可能にした。<http://www.genstat.net>において搭載した。

(2) SimPack (2) :
様々な連鎖解析、連鎖不平衡解析のシミュレーションを行い、研究デザインの評価を行う。遺伝統計、あるいは遺伝疫学の計画を事前に評価し、そのデザインを成果が得られるように組み立てることは大切である。特に連鎖不平衡に基づいたゲノムワイドの関連解析を効率よく進めるためのアルゴリズムを開発した。ステップワイズに検索座位を絞っていく手法が有効である。現在では、これに準じた方法が主流になりつつある。

(3) Ldsupport (3) :
ハプロタイプは連鎖する複数の座位のアレルの由来親ごとのリストである。最尤法を用い、集団のハプロタイプ、個人のディプロタイプ形を推定する。ゲノム情報に関しては、個人の完全情報は 2 つのハプロタイプの組み合わせであるディプロタイプ形である。現在は個人のディプロタイプ形を確定することは困難であり、

遺伝統計的に推定した情報を用いる。
(4) Penhaplo (4) :
ハプロタイプ、ディプロタイプ形を基礎にした cohort, clinical trial, case-control サンプルの検定と推定を行う。一般に、連鎖不平衡を利用した関連解析においては連鎖する複数の座位について統計的有意性が見られ、個々の SNP よりハプロタイプとの関連が問題となることが多い。このアルゴリズムはハプロタイプと表現型との関連を検定する。また、最尤法で推定される各ディプロタイプ形の浸透率を推定する。

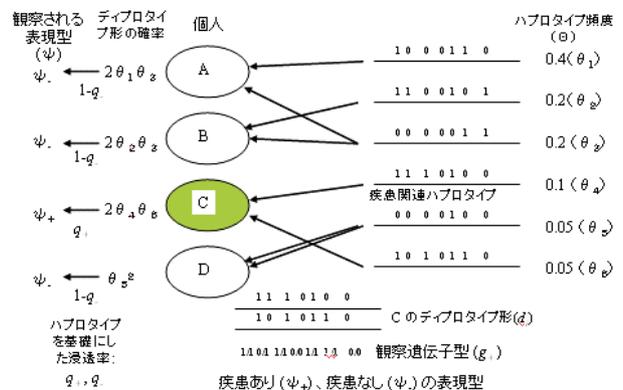


図 1. Penhaplo のアルゴリズムの基礎の標本空間

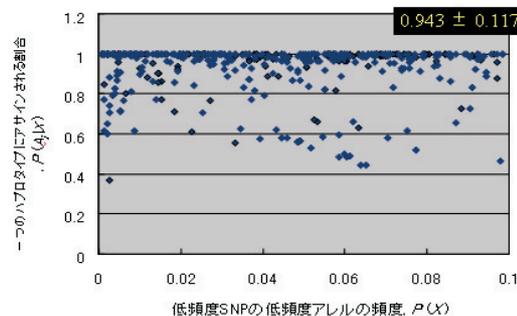


図 2. ブロック内の低頻度 SNP が主要なハプロタイプにアサインされる割合

(5) AssignHaplo (5) :

LD block内の低頻度 SNP を主要ハプロタイプにアサインする。ブロック内の低頻度 SNP の低頻度アレルのほとんどは一つのハプロタイプにアサインされる。

(6) Popstruct (6) :

Case control, cohort, clinical trial において集団の構造化を検出し構造化の存在下で関連解析を行う。

2-2. 手法の解説と指導 :

遺伝統計学的手法の解説を行うホームページ (<http://www.genstat.net>) を開設した。本 (ポストゲノム時代の遺伝統計学) も出版した。多くの研究者の問い合わせに答え手法の解説と指導を行った。

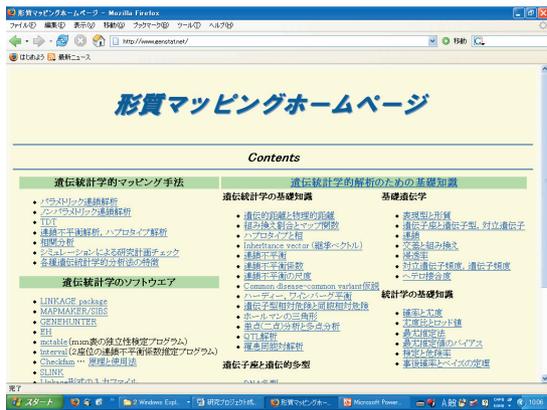


図 3. 形質マッピングホームページ

2-3. データ解析の支援 :

他の研究者にプログラムを提供、あるいはデータを解析する事により 34 個の既報の英文論文において共著者となった。内容は、糖尿病の原因、糖尿病の合併症、薬物反応性、APRT 欠損症、AMP deaminase 欠損症、抗癌剤代謝 (イリノテカン)、家畜のプリオン遺伝子、統合失調症の原因、関節リウマチ、薬物の副作用など多数である。

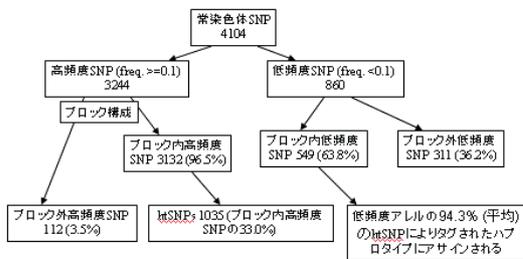


図 4. 薬物関連 SNP の統計

752 人の情報と 5,000 以上の SNP から haplotype block 構築を行い htSNPs を抽出して数百の SNP を選択 (このような膨大な薬物に関する SNP 情報は世界に無い)。

日本人の薬物関連遺伝子の SNP 解析をファルマスイップコンソーシアム (PSC)、理化学研究所と共同で行い、我々はサンプル収集とデータ解析を担当した。日本人の 1,000 人以上から血液を採取。200

以上の薬物関連遺伝子の 5,000 以上の SNP を解析した。SNP 頻度のデータは既に以下のサイトで公開されている。

<http://www.jpma.or.jp/psc/11data/index.html>

3. 結論

個人のゲノムデータが豊富に得られるようになると、それを用いて健康保持や疾患治療に役立てる事ができると期待される。本プロジェクトで個人のゲノム配列の違いである、多型データを用いて形質マッピング (疾患や薬物反応性がどの配列に関係していくかを決める) を行うためのアルゴリズムとコンピュータソフトウェアを 8 個開発した。それらを用いた我々の施設、および他の施設との共同研究により多くの疾患、薬物反応性などの遺伝子を発見した。遺伝統計学という、未来の科学にとって極めて重要だが、本邦にはこれまで手薄だった科学分野の確立のための端緒が出来た。

4. 主な発表論文

- (1) Saito M, Saito A, Kamatani N. Web-based detection of genotype errors in pedigree data. *J. Hum Genet.*, 47, 377-379 (2002).
- (2) Saito A, Kamatani N. Strategies for genome-wide association studies: optimization of study designs by the stepwise focusing method. *J. Hum Genet.*, 47, 360-365, (2002).
- (3) Kitamura Y, Moriguchi M, Kaneko H, Morisaki H, Morisaki T, Toyama K, Kamatani N. Determination of probability distribution of diplotype configuration (diplotype distribution) for each subject from genotypic data using the EM algorithm. *Ann Hum Genet.*, 66, 183-93, (2002).
- (4) Kamatani N, Sekine A, Kitamoto T et al. Large-Scale Single-Nucleotide Polymorphism (SNP) and Haplotype Analyses, Using Dense SNP Maps, of 199 Drug-Related Genes in 752 Subjects: the Analysis of the Association between Uncommon SNPs within Haplotype Blocks and the Haplotypes Constructed with Haplotype-Tagging SNPs. *Am J. Hum Genet.*, 75, 190-203, (2004).
- (5) Ito T, Inoue E, Kamatani N. Association Test Algorithm Between a Qualitative Phenotype and a Haplotype or Haplotype Set Using Simultaneous Estimation of Haplotype Frequencies, Diplotype Configurations and Diplotype-Based Penetrances. *Genetics.*, 168, 2339-2348, (2004).
- (6) Nakamura T, Shoji A, Fujisawa H, Kamatani N. Cluster analysis and association study of structured multilocus genotype data. *J. Hum Genet.*, 50, 53-61, (2005).

微生物のゲノム配列解析による病原性と有用遺伝子システムの解明

Virulent/Valuable Genome Systems in Microorganisms

プロジェクトリーダー

林 哲也 宮崎大学フロンティア科学実験総合センター・教授



1. 研究目的

自然界には多種多様な微生物が棲息し、ヒトはその生態系の中で生活している。多くの微生物は皮膚・粘膜上で細菌叢を形成してヒトと共生して、環境中に棲息して地球環境の形成や保全に大きな役割を果たしている（有用微生物）が、疾病の原因となるもの（病原微生物）も多数存在する。これらの微生物の特性をゲノム配列から解明することは、ヒトと微生物の調和のとれた生態系を維持する上で必要不可欠である。様々な新興・再興感染症が国内外で問題となっている現状では、特に病原微生物のゲノム配列を優先的に決定して、各々のゲノム特性を解明し、有効な感染症対策の考案に活用することが特に重要である。そこで、以下の2点を目的として本研究プロジェクトを遂行した。

1-1. 病原細菌を中心とする微生物の大規模ゲノム解析を行うことによって、各菌の病原性や有用性の基盤となるゲノム情報を抽出し、データベースを構築する。

1-2. 抽出されたゲノム情報の感染症対策や微生物の有効利用への応用を目指して、新規発見病原遺伝子の機能解析、病原性発現制御機構の解析、病原微生物の多様性解析など、多面的なポストシーケンシング研究を展開する。

2. 研究成果概要

2-1. 16種類の病原細菌の全ゲノム配列を決定し、表1に示した9菌種については、ゲノム解析の結果を論文として発表するとともに（論文リスト参照）、各菌のゲノム情報データベースを作成してウェブサイト上で公開した。嘔吐型セラウス菌・ネコクラミジア・セラチア菌など、残りの7菌種については、現在、論文投稿中または論文投稿準備中である。その他、腸管出血性大腸菌 O26・腸管出血性大腸菌 O111・セパシア菌などの7種類の病原細菌については、8-5xのドラフト配列を得た。

2-2. 様々な病原細菌由来の病原プラスミドやバクテリオファージに関しても個別に配列解析を行い、ボツリヌス菌の神経毒素伝達ファージ、種々の O157 菌株から発見された8種類の新規志賀毒素変換ファージ、新たに発見されたプロピデンシアの病原プラスミドなどの全ゲノム配列を決定した。

表1 ゲノム配列を公表した病原細菌

菌種（菌株）	特徴・疾患	ゲノムサイズ
肺炎クラミジア	異型肺炎（動脈硬化にも関与）	1.2 Mb
病原性大腸菌 O157（堺株）	出血性大腸炎、HUS、脳症	5.6 Mb
メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）	化膿性疾患、院内感染	3.0 Mb
ウェルシュ菌	ガス壊疽、食中毒	2.9 Mb
腸炎ビブリオ	食中毒（海産物が原因）	5.1 Mb
劇症型 A 群溶血連鎖球菌	化膿性疾患 重症軟部組織炎（劇症型）	1.9 Mb
バクテロイデス (<i>B. fragilis</i>)	主要な腸内常在菌 膿腹腔内感染症	5.3 Mb
ノカルジア (<i>N. farcinica</i>)	結核菌の近縁種 日和見感染症	6.0 Mb
腐性ブドウ球菌	尿路感染症	2.6 Mb

1 Mb は 100 万塩基対

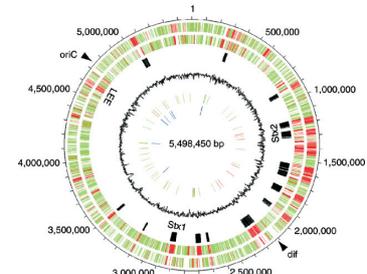


図1. 腸管上皮に付着した病原性大腸菌 O157 の電子顕微鏡写真(左、O157 に赤で着色)と O157 のゲノム構造(右)。

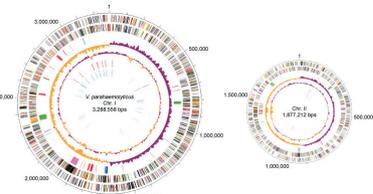


図2. 腸炎ビブリオの電子顕微鏡写真(左)とゲノム構造。腸炎ビブリオは2つの染色体をもつ。

2-3. ゲノム配列の解析を行う過程で、様々な配列解析用ソフトウェアを開発した。

2-4. ゲノム解読終了後は、得られた各菌のゲノム情報に基づいて、様々なポストシーケンシング研究を展開した。特に DNA マイクロアレイの作成とそれを利用した研究を重点的に進め、9 菌種のマイクロアレイ（肺炎クラミジア、ウェルシュ菌、O157、腸炎ビブリオ、A 群溶血連鎖球菌、黄色ブドウ球菌、ノカルジア菌、嘔吐型セレウス菌、セラチア菌）が完成した。本研究プロジェクト前半でマイクロアレイが完成したウェルシュ菌と O157 ではアレイを利用した解析が進み、病原遺伝子の発現制御機構やゲノム多様性に関して、様々な新しい知見が得られた。また、O157 のゲノム多様性解析の中で、新しいゲノム比較解析法として開発した全ゲノム PCR スキャンニング法は、他の菌種のゲノム多様性解析においても活用された。こういったゲノムワイドな解析以外にも、ゲノム解読によって発見された新規病原遺伝子の個別機能解析を行った。

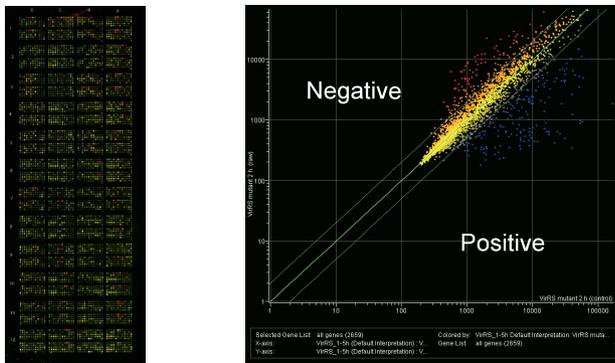


図3. ウェルシュ菌のDNAマイクロアレイ（左）と調節遺伝子変異株における遺伝子発現プロファイル解析（右）

3. 結論

シーケンシングセンター（北里大学・服部グループ）の配列決定能力が大幅に向上したため、本研究プロジェクト開始当初に想定した以上に数多くの病原菌ゲノムを決定できた。論文発表に至っていないものについては、できる限り早い時期に論文発表を行うとともに、各々のゲノム情報データベースをウェブサイト上で公開する予定である。また、配列決定作業が終了していないものについても、プロジェクト終了後も作業を進め、全配列を決定する予定である。

これらのゲノム解読とその後の研究により、各菌の病原性を規定する様々なゲノム情報を抽出することができた。その結果明らかとなった主な知見として、以下の4点を挙げる事ができる。

- 3-1.** 多くの細菌のゲノム上には、大量の外来性遺伝子が存在し、その獲得にはプラスミドだけでなくバクテリオファージが重要な役割を担っている。
- 3-2.** 各病原菌には従来の研究で明らかになっていた以上に多数の病原性関連遺伝子が存在しており、病原性の全体像を解明するためには、それらの機能や発現制御の解析を進める必要がある。
- 3-3.** 同一菌種の中でも「菌株」間では高いゲノ

ムの多様性が見られることが多く、病原遺伝子レパートリーの違いが各菌株の病原性の違いと密接に関係する。

- 3-4.** 代謝系などの遺伝子群も狭義の病原遺伝子と協調的に制御されていることが多く、病原遺伝子と増殖に必要な遺伝子との区別は必ずしも明快ではない。したがって、病原性を理解するためには、狭義の病原遺伝子だけでなく、生体内での増殖に必要な遺伝子群の機能や発現制御機構も解析する必要がある。

今後、各菌の病原性の全体像を解明していくためには、さらに詳細な解析を進めなければならないが、本研究プロジェクトで取得したゲノム情報はその重要な情報基盤であり、マイクロアレイや全ゲノムPCR スキャンニングなどは強力な解析ツールとなる。本研究プロジェクトの成果とそれに基づいた今後の研究は、新しい診断法・治療法・予防法の開発といった形で、感染症の克服に貢献すると期待される。

4. 主な発表論文<ゲノム論文のみを記載>

- (1) M. Shirai, *et al.*: Comparison of whole genome sequences of *Chlamydia pneumoniae* J138 from Japan and CWL029 from USA. *Nucleic Acids Res.*, 28: 2311-2314, 2000.
- (2) T. Hayashi, *et al.*: Complete genome sequence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and genomic comparison with a laboratory strain K-12. *DNA Res.*, 8: 11-22, 2001 (supplement 8: 47-52).
- (3) M. Kuroda, *et al.*: Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet*, 357: 1225-1240, 2001.
- (4) T. Shimizu, *et al.*: Complete genome sequence of *Clostridium perfringens*, an anaerobic flesh-eater. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 99: 996-1001, 2002.
- (5) K. Makino, *et al.*: Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *V. cholerae*. *Lancet*, 361: 743-749, 2003.
- (6) I. Nakagawa, *et al.*: Genome sequence of an M3 strain of *Streptococcus pyogenes* reveals a large-scale genomic rearrangement in invasive strains and new insights into phage evolution. *Genome Res.*, 13: 1042-1055, 2003.
- (7) T. Kuwahara, *et al.*: Genomic analysis of *Bacteroides fragilis* reveals extensive DNA inversions regulating cell surface adaptation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101: 14919-14924, 2004.
- (8) J. Ishikawa, *et al.*: The complete genomic sequence of *Nocardia farcinica* IFM 10152. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101: 14925-14930, 2004.
- (9) M. Kuroda, *et al.*: Whole genome sequence of *Staphylococcus saprophyticus* reveals the pathogenesis of uncomplicated urinary tract infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 202: 13272-13277, 2005.

モデル生物の配列情報と発現・表現型情報に基づく ゲノム機能の情報科学的解明

Computational Biology on Genome Function Based on Expression and Phenotype Data

プロジェクトリーダー

久原 哲 九州大学大学院農学研究院・教授



1. 研究目的

多量に蓄積されつつあるモデル生物のゲノム配列と表現型情報を基盤にして、ポストシークエンス時代の中核となるトランスクリプトーム解析・プロテオーム解析などの発現情報解析や蛋白質の網羅的な機能解析などの技術を確立する。また、これらのゲノム構造・機能情報を基盤として、ゲノム DNA 配列から遺伝子の機能を、個々の遺伝子機能から遺伝子ネットワークの機能を予測する情報学的方法を開発する。

2. 研究成果概要

2-1. 微生物ゲノム配列決定支援システムの基礎技術の構築とその応用：

配列決定支援システムとして図 1 の Gambler システムのアセンブルシステムを構築し、配列決定の高速化を図った。この支援システムはシーケンサーからのデータをアセンブルし、ゲノム配列を決定し、ゲノム配列から遺伝子領域を推定し、その機能予測を行うものである。

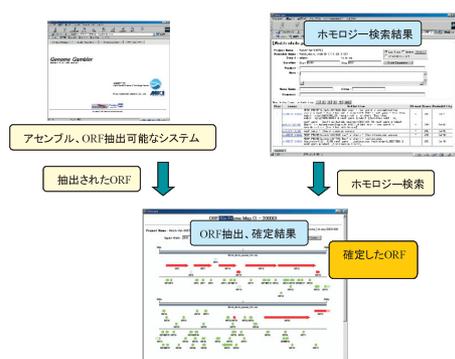


図 1. Gambler の機能の流れ

このシステムは、国内のほとんどの微生物ゲノム配列決定プロジェクトで利用され、その有用性を立証した。*Bacteroides fragilis* のゲノム解析では(図 2)、プロモーターを含む塩基配列が逆位を起こすことで、莢膜合成遺伝子の発現を制御していることを見出した。(久原 哲)

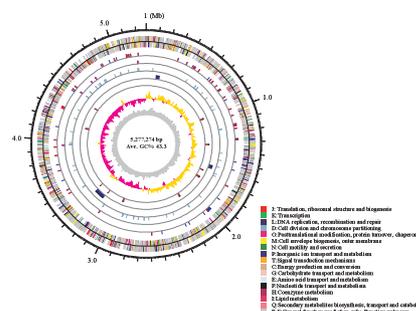


図 2. *Bacteroides fragilis* のゲノム構造

2-2. 配列決定が完了した微生物の DNA チップの作成と発現情報の収集：

本研究プロジェクト期間中、ゲノム配列が決定されたクラミジア菌 (cDNA チップ 96 枚)、腸炎ブドウ球菌 (cDNA チップ 576 枚)、A 群溶連菌 (cDNA チップ 672 枚)、ウェルシュ菌 (cDNA チップ 864 枚)、大腸菌 O-157 (オリゴチップ 3120 枚)、黄色ブドウ球菌 (cDNA チップ 240 枚)、ノカルジア菌 (オリゴチップ 288 枚)、出芽酵母 (cDNA チップ 3000 枚)、細胞性粘菌 (cDNA チップ 1152 枚)、総計 10000 枚以上を作成し、各ゲノムチームに提供し、発現解析を行った。(田代康介)

2-3. 発現プロファイルデータに対し、多数のプロファイルデータ間の関連性を導き出し、特定の実験に特異的変動をする遺伝子群を検出する計算機的手法の開発：

発現プロファイル解析の最初のステップである、正規化プログラムの開発を行った。従来から言われていた 3 つの誤差に加えて、新規の誤差要因 (スポットオーダー) を特定し、その修正法を開発し実際の発現データに適用し、誤差の解消を行った。また、時系列データ解析では、個体差を伴う多数の経時的データの関数化と関数化データ集合に基づくモデリングとモデリングの過程に於いて本質的なモデル評価法について研究し、関数データ解析の枠組みで新しい解析手法を提唱した。開発した解析手法をゲノム解析における細胞周期データの分析へ応用し、の有効性を立証できた (図 3)。(小西貞則、佐藤賢二)

複雑な非線形構造を内包する高次元データからの情報抽出

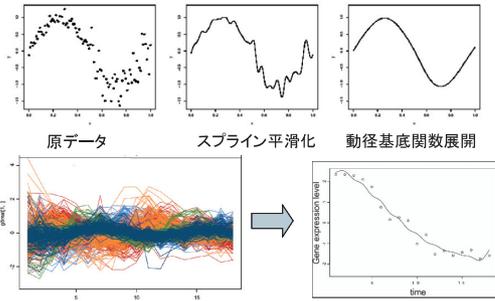


図3. 経時的に測定された発現パターンを情報量規準に基づいた関数回帰モデリングで平滑化

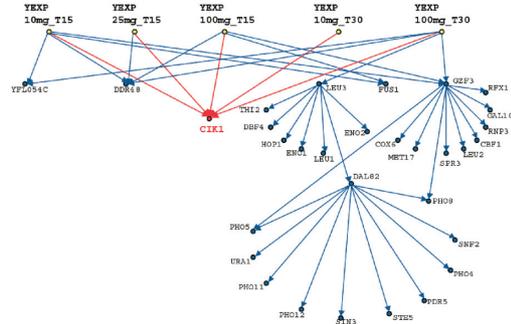


図5. グリセオフルビンのターゲット遺伝子群

2-4. DNA チップデータからの遺伝子発現制御機構の解明:

(1) ブーリアンモデリングによる遺伝子ネットワーク解析法の確立。Multi-level digraph 法を開発し、収集した遺伝子発現プロファイルから、遺伝子間の影響の有無を抽出し、その行列の変換を行うことにより、遺伝子制御関係のトポロジーを明らかにした。最後に間接的な関係を除くことにより遺伝子発現制御のネットワークを推定した (図4)。

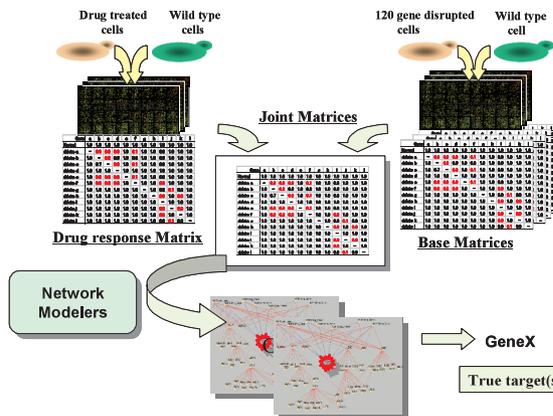


図4. 発現制御ネットワークを用いた薬剤ターゲット遺伝子の推定法

(2) グラフィカルモデリングによる遺伝子ネットワーク解析法の確立。遺伝子発現プロファイルの値を直接使い相関行列を作成し、偏相関行列を求めることにより直接的な遺伝子の因果関係を推定した。最初に発現プロファイルでクラスター化を行い、クラスター間の制御関係を求め行列のランクの問題を解決した。

(3) これらの手法の応用。出芽酵母を用いた抗真菌剤であるグリセオフルビン薬剤のターゲット遺伝子の検索を行った。155 遺伝子破壊株の発現プロファイルと薬剤処理後のタイムコースデータ (10, 50 and 100 mg の濃度 0, 15, 30, 45, 60 分) からグリセオフルビンの作用ターゲット遺伝子を図5に示す10 遺伝子程度に絞ることができ、CIK1 が可能性の高い遺伝子と推定した。(堀本勝久、久原 哲)

3. 結論

ゲノム研究分野のなかで、ゲノム配列決定からDNA チップによる遺伝子発現解析分野までの基本的手法の確立とその応用を行った。DNA チップを用いれば、遺伝子発現制御のネットワークを解析できることを明らかにしたもので、発現プロファイル解析の新たな方向性を示した。この流れはチップ等の研究スタイルの普及と同調して大きな流れとなっている。

4. 主な発表論文

- (1) Savoie, C.J., et.al., Use of gene networks from full genome microarray libraries to identify functionally relevant drug-affected genes and gene regulation cascades. *DNA Research*, 10, 19-25, 2003.
- (2) Aburatani, S., et.al., Discovery of novel transcription control relationships with gene regulatory networks generated from multiple-disruption full genome expression libraries. *DNA Research*, 10, 1-8, 2003.
- (3) Araki, Y., Konishi, S. and Imoto, S. 2004. Functional discriminant analysis for microarray gene expression data via radial basis function networks, Proceedings of COMPSTAT'2004 Symposium, Physica-Verlag/Springer, pp. 613 – 620.
- (4) Uchida, S., et.al., Detection and Normalization of Biases Present in Spotted cDNA Microarray Data : a composite method addressing dye, intensity-dependent, spatially-dependent, and print-order biases. *DNA Research*. 12, 1, 2005.
- (5) Aburatani, S., et.al., Deduction of a Gene Regulatory Relationship Framework from Gene Expression Data by the Application of Graphical Gaussian Modeling. *Signal Processing*, 83, 777-788, 2003.
- (6) T. Kuwahara, T., et. al., Genomic analysis of *Bacteroides fragilis* reveals extensive DNA inversions regulating cell surface adaptation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 101, 14919-14924, 2004.

アルツハイマー病疾患関連遺伝子の解明

Analysis of Alzheimer Disease-Related Genes

プロジェクトリーダー

武田 雅俊 大阪大学大学院医学系研究科・教授



1. 研究目的

アルツハイマー病の新たな疾患関連遺伝子を検索し、その発症メカニズムを明らかにすることを目的とする。アルツハイマー病は老年期認知症の第一の原因疾患であり、本邦での患者数は2025年に200万人を超えると予想され、その治療と予防対策は社会的にも関心が高い。日本人での認知症の病理学的原因疾患頻度はアルツハイマー病が52%、次いで血管性認知症28%であり、レビー小体病も18%に認められている。

アルツハイマー病は脳に老人斑および神経原線維変化が出現する中枢神経変性疾患であり、単一ではなく様々な原因が関係する異質性の高い疾患と考えられる。現在のところ、常染色体性優性遺伝を示す早期発症型アルツハイマー病の遺伝子解析により、 β アミロイドの産生異常を主因とするアミロイドカスケード理論が支持されている。しかし、アルツハイマー病の90%以上は高齢発症型アルツハイマー病であり、これは神経老化と遺伝を基盤として環境が発症を促進する多遺伝子疾患と考えられている。その発症機構はより複雑であるが、それゆえに治療予防の可能性がある。そこでゲノム解析により、その発症関連遺伝子群の発症リスクあるいは発症促進効果を検討した。

2. 研究成果概要

2-1. 検体の収集：

画像診断のある高齢発症型アルツハイマー病300例、病理診断例80例および非痴呆高齢者380例を始めとして、リスク効果のスクリーニングをおこなった。さらに患者群および対照群各々合計約1000検体を収集し、ゲノムスキャンに供した。

2-2. 既報のリスク遺伝子：

これまでに報告されたリスク遺伝子の解析では、その近傍に位置するSNPによる座位近接効果を利用してリスク効果を検討した。その結果、ネプリライシン遺伝子(MME, 3q21-q27)、インスリン分解酵素遺伝子(IDE, 10q23)、アポリポ蛋白C1遺伝子(APOC1, 19q13.2)の3遺伝子でのみリスク効果が再現された。なお、高血圧関連遺伝子群ではIL1RAP(3q28)、COL9A1(6q23)、ASE-1(19q13)遺伝子にリスク効果が検出された。

2-3. β アミロイド/認知機能関連遺伝子：

β アミロイド産生関連遺伝子では、早期発症型アルツハイマー病の原因遺伝子として知られるプ

レセニン1遺伝子(PS1, 14q24.3)の遺伝子発現調節領域(プロモータ領域)に発症リスク効果を認めた。一方、BDNF遺伝子(11p13)に発症リスク効果が認められた。BDNFはニューロンの生存、認知機能の発達にも関与している。

2-4. 脂質代謝関連遺伝子群：

高齢発症型アルツハイマー病のリスク遺伝子として、アポリポ蛋白E(APOE, 19q13.2)遺伝子のみが認知されている。このAPOE遺伝子座位にはアポリポ蛋白ファミリーの遺伝子群がクラスターを形成している。アポリポ蛋白C-II(APOC2)遺伝子もそのひとつで、その遺伝子内部の(GT) n (GA) m からなるマイクロサテライトリピート配列に着目した。アルツハイマー病190例を対象として、このリピートの量と発症年齢との関係を検討したところ、リピート量が少ないほど発症年齢が早いという相関が認められた。さらに、APOC2遺伝子のリピート量がその血漿アポリポ蛋白C2濃度と逆相関しており、血漿アポリポ蛋白C2濃度上昇が発症促進に関係すると結論された。

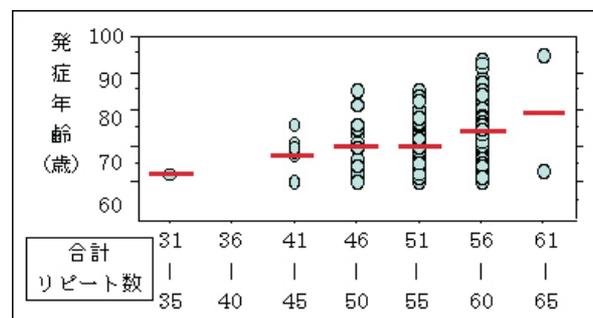


図1. APOC2 遺伝子マイクロサテライトのリピート量と発症年齢との相関関係

一方、高齢発症型アルツハイマー病患者と年齢性をマッチさせた非痴呆患者、各々26例とを対象に、血漿脂質およびアポリポ蛋白濃度を比較したところ、血漿アポリポ蛋白A2濃度の低下が最も顕著であった($p < 0.001$)。アポリポ蛋白A2は、いわゆる善玉コレステロールであるHDLコレステロールの構成蛋白のひとつである。アポリポ蛋白A2をコードするアポリポ蛋白A-II(APOA2)遺伝子にもマイクロサテライトリピート配列、(TG) n があり、エクソン3のわずか6塩基上流に位置している。

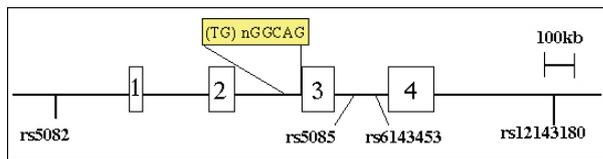


図2. APOA2 遺伝子の構造

APOE-ε4 キャリヤーの高齢発症型アルツハイマー病では、APOA2 遺伝子の(TG)n 量が発症年齢と逆相関しており、(TG)n 量が多いほど発症が早かった。そのメカニズムとして、マイクロサテライト配列の(TG)n リピートが長いほど mRNA でのエクソン3の欠損が多いことがミニジーンでの発現アッセイで認められ、血漿 APOA2 濃度低下が遺伝的な影響を受けていると考えられた。

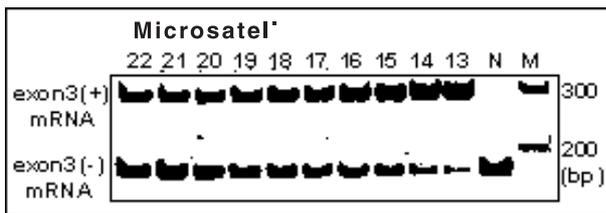


図3. APOA2-(TG)n 長とエクソン3欠損

以上の結果より、APOA2 および APOC2 マイクロサテライトのリピート量が高齢発症型アルツハイマー病の遺伝的な発症年齢修飾因子であることが明らかにされ、血漿脂質の制御が発症を遅延させる遺伝学的根拠が得られた。

2-5. 候補領域限定ゲノムスキャン:

欧米でのゲノムスキャンにより、アルツハイマー病のリスク遺伝子座位として、1q21-q23, 4q32, 5p12-p14, 6q26-q27, 9p23-p22, 10p11-p14, 10q24, 12p13-p11, 19q13, 21q21-q22 の合計 10 座位が複数のゲノムスキャンで検出されている。19q13 は先述した APOE 遺伝子の座位である。

Marker	Odds ratio (95% C.I.)	p value
F12D18	5.66 (1.72 - 18.7)	0.00500
12p124H	3.84 (1.95 - 7.55)	0.00000
12p317	1.75 (1.19 - 2.63)	0.00300
12p316	1.56 (1.28 - 1.92)	0.00001
12p043	1.45 (1.14 - 1.85)	0.00087
12p161	1.37 (1.10 - 1.70)	0.00300
12p075	1.35 (1.10 - 1.64)	0.00227
12p212	1.26 (1.04 - 1.53)	0.02000

表1. 第12染色体短腕座位のリスク遺伝子座位

そこで、第12染色体短腕座位および第21染色体座位を対象として、SNPによる領域限定ゲノムスキャンをおこなった。DNA マーカーは、約100kb 間隔にある SNP (マイナーアレル頻度 5%以上) を選択し、かつ1遺伝子に1以上のSNPが分布するように選択した。その結果、第12染色体短腕座位では8遺伝子に有意な連鎖不平衡を検出した。第21染色体では9座位6遺伝子に有意な連鎖不平衡が認められ、1遺伝子はダウン症候群責任領

域に位置しており、現在、機能解析が進行中である。

10q24 座位の詳細な連鎖不平衡地図を検討した結果、インスリン分解酵素 (IDE) 遺伝子および KNSL1 遺伝子に有意な連鎖不平衡が認められた。両遺伝子は隣接し、向かい合って位置しており、転写制御部位の詳細な解析を続行中である。

2-6. 患者脳での海馬発現変化遺伝子:

アルツハイマー脳での発現増減を認める遺伝子を対象に連鎖不平衡解析をおこなった。その結果、発現低下 18 遺伝子中 5 遺伝子 (27.8%)、発現上昇 17 遺伝子中 3 遺伝子 (17.6%) に有意な関連を認め、発現低下している POU2F1 遺伝子 (1q22-q23) に最も有意な関連を認めた (p=0.0007)。

3. 結論

合計 27 の新規リスク遺伝子、14 の新規リスク座位に発症関連効果を認めた。今後詳細な遺伝子解析が必要であるが、これらの遺伝子は高齢発症型アルツハイマー病の発症基盤として、その発症メカニズムを解析する基盤情報となると期待される。

4. 主な発表論文

- (1) Kamino K, Kida T, Tanaka T, Tanii H, Okochi M, Kudo T, Kobayashi T, Takeda M: Apolipoprotein and β amyloid transport pathway. *PSYCHOGERIATRICS*, 2, 149-155, (2002).
- (2) Nishimura M, Sakamoto T, Kaji R, Kawakami H: Influence of polymorphisms in the genes for cytokines and glutathione s-transferase omega on sporadic Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.*, 368, 140-143, (2004).
- (3) Kida T, Kamino K, Yamamoto M, Kanayama D, Tanaka T, Kudo T, Takeda M: C677T polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene affects plasma homocysteine level and is a genetic factor of late-onset Alzheimer's disease. *PSYCHOGERIATRICS*, 3, 4-10, (2004).
- (4) Matsubara-Tsutsui M, Yasuda M, Yamagata H, Nomura T, Taguchi K, Kohara K, Miyoshi K, Miki T: Molecular evidence of presenilin mutation in familial early onset dementia. *Am. J. Med. Genet. (Neuropsychiatric Genetics)*, 114, 292-298, (2002).
- (5) Yamagata H, Chen Y, Akatsu H, Kamino K, Ito J, Yokoyama S, Yamamoto T, Kosaka K, Miki T, Kondo I: Promoter polymorphism in fibroblast growth factor 1 gene increases risk of definite Alzheimer's disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 321, 320-323, (2004).
- (6) Taguchi K, Yamagata H, Zhong W, Kamino K, Akatsu H, Hata R, Yamamoto T, Kosaka K, Takeda M, Kondo I, Miki T: Identification of hippocampus-related candidate genes for Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.*, 57, 585-588, (2005).

2. 発生・分化・再生

(1) 評価対象研究推進委員会：「発生・分化・再生」研究推進委員会

(委員長)	竹市 雅俊	独立行政法人理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター長
	相沢 慎一	独立行政法人理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター副センター長
	帯刀 益夫	東北大学加齢医学研究所長
	勝木 元也	自然科学研究機構基礎生物学研究所長
	西川 伸一	独立行政法人理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター副センター長
	浜田 博司	大阪大学大学院生命機能研究科教授
	藤澤 肇	名古屋大学 21 世紀 COE プログラム 「システム生命科学」客員教授

(2) 評価対象研究プロジェクト

番号	研究プロジェクト名	プロジェクトリーダー
1	胚性・体性幹細胞を用いた細胞・臓器移植治療法の確立	吉田 進昭 (東京大学医科学研究所教授)
2	免疫細胞医学に基づく免疫応答の制御と細胞移植医療の展開	谷 憲三朗 (九州大学生体防御医学研究所教授)
3	分化プログラム制御による組織の再生と構築に関する研究	中辻 憲夫 (京都大学再生医科学研究所教授)
4	体性幹細胞の単離・操作と組織再構築に関する研究	須田 年生 (慶應義塾大学医学部教授)
5	肝膵胆管形成と疾患制御に関する研究	遠藤 文夫 (熊本大学大学院医学薬学研究部教授)
6	遺伝子の系統的・網羅的解析による発生・再生原理の解明	上野 直人 (自然科学研究機構基礎生物学研究所教授)
7	脳細胞の発生・分化・再生の分子機構	池中 一裕 (自然科学研究機構生理学研究所教授)

胚性・体性幹細胞を用いた細胞・臓器移植治療法の確立

Establishment of Cell and Organ Transplantation Therapy Using Embryonic and Somatic Stem Cells

プロジェクトリーダー

吉田 進昭 東京大学医科学研究所・教授



1. 研究目的

本研究においては、幹細胞基礎研究から細胞臓器移植という臨床応用を目指したプロジェクトを計画した。幹細胞の特徴である「多分化能」と「自己複製能」を解析するため、胚性幹細胞 (ES 細胞) の自己複製機構をシグナル伝達、細胞周期などの観点から解明を試みた。また広範な組織・臓器での存在が明らかにされ、可塑性を持つともいわれる体性幹細胞をプロスペクティブに分離同定し、その分化と自己複製の制御機構を解明していくこと、さらには腎臓という臓器を例にとりて組織形成、再生医療への可能性の研究を試みた。すなわち腎臓発生機構を分子生物学的に解析し、腎臓の前駆細胞を単離、増幅し、最終的にそれを移植することによって腎機能回復の可能性を検討することを最終目標とした。

2. 研究成果概要

2-1. 未分化 ES 細胞における PTB の機能解析 :

未分化 ES 細胞特異的に発現される Rex-1 遺伝子のプロモーター領域に Oct-3/4 と共に結合する Rox-1 に注目し同定を試みた。PTB (polypyrimidine tract binding protein) が Rex-1 のプロモーター領域のピリミジン配列に特異的に結合すること、その結合は 1 本鎖 DNA により強いこと、Rex-1 の発現に関与することが明らかとなった。また PTB は未分化 ES 細胞で重要な機能を果たしている Nanog 遺伝子の発現制御にも関与することが示唆された。一方、PTB ノックアウトマウスは着床前後のステージにおいて胎性致死となることが判明、この個体の胚盤胞から ES 細胞が樹立できないことから、PTB は ES 細胞の生存、増殖などに関与する可能性が示唆された。Cre の発現により遺伝子発現が消失する ES 細胞株の作製を試みた結果、PTB がない ES 細胞は細胞増殖が障害されていて (図 1)、最終的に樹立できた 2 クローンにおいてもやはり対照と比べて増殖が非常に遅いことが証明された。また、後述の腎臓研究において解析していた Sall4 遺伝子も、胚盤胞の培養および遺伝子欠損 ES 細胞の解析結果から未分化 ES 細胞において重要な機能を果たしていることが明らかとなった。(吉田進昭)

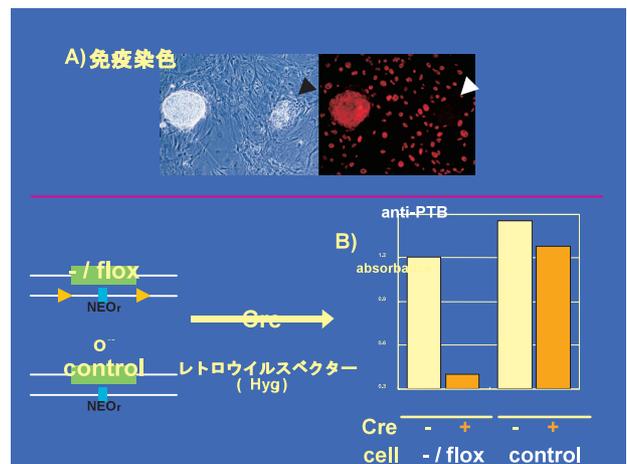


図 1. PTB 欠損 ES 細胞の増殖能低下

2-2. 造血幹細胞における Bmi-1 の機能解析 :

幹細胞に特徴的な性質である自己複製能および多分化能の制御機構を解明することは医学的にも生物学的にも極めて重要かつ興味深い。

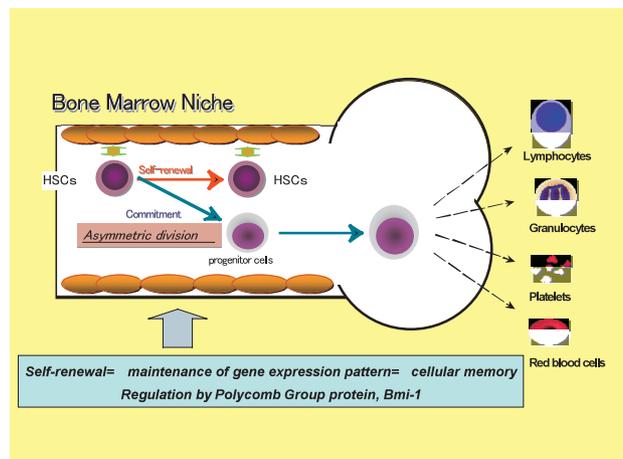


図 2. Bmi-1 は造血系幹細胞の自己複製に重要

我々は造血幹細胞を純化する方法を確立し、得られた造血幹細胞を材料としてその分化と自己複製の機構を対娘細胞解析や *in vitro* ならびに *in vivo* の機能解析系を用いて解析した。その結果、造血幹細胞は非対称性に自己複製して造血幹細胞と造血前駆細胞を供給すること、このプロセスは外的因子によって影響を受けること、そして自己複製にはエピジェネティックに遺伝子発現を制御するポリコムタンパク群の **Bmi-1** が重要な役割を果たしていることを明らかにした。

(図2) (中内啓光)

2-3. 腎臓発生における *Sall1* の機能解析と腎臓前駆細胞の単離：

カエルでは試験管内で腎臓様構造が誘導できることを利用して、新たな遺伝子 *Xsal-3* を、さらにマウスから *Sall1* を単離した。これは腎臓の前駆細胞集団である後腎間葉に発現する核内蛋白で、ノックアウトマウスは左右の腎臓を欠損し、この遺伝子が腎臓発生に必須であることが判明した。ヒト *SALL1* の変異による疾患も報告されており、この遺伝子は種を超えて腎臓形成に必須である。さらに *Sall1* の遺伝子座に蛍光蛋白 GFP をノックインしたマウスを作製し、その胎生期腎臓から GFP 陽性の腎臓前駆細胞集団を単離した。この RNA を用いてマイクロアレイで網羅的検索を行い、未知の遺伝子も新たに同定することができた。また GFP が高発現する細胞を *Wnt4* が発現するフィーダー上で培養すると、1 個の細胞から多系統に分化するコロニーが形成されることを見いだした。これは多能性の腎臓前駆細胞が胎生期腎臓に存在することを示す。(図3) (西中村隆一)

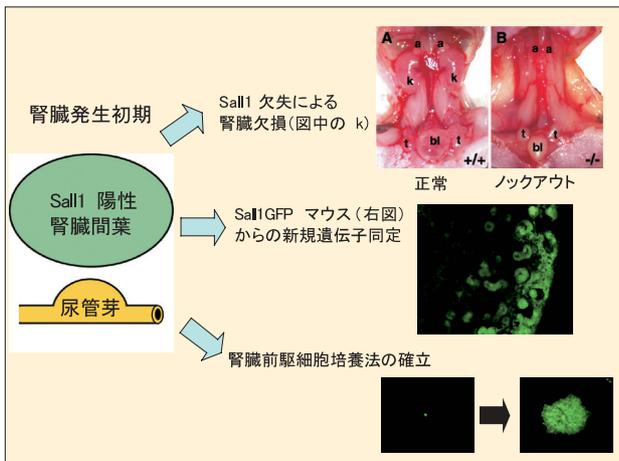


図3. 腎臓初期発生に *Sall1* は重要な機能を果たす

3. 結論

胚性幹細胞の未分化能維持機構は、その分子機構の解析を通じて、ヒト ES 細胞の安定的維持、また体性幹細胞の分離同定への足がかりになり得る点で非常に期待が大きいと考えられる。このプロジェクトでは複数の新しい遺伝子の ES 細胞未分化性維

持における重要性が発見され、それらがすぐに ES 細胞へ導入されて使用できるという分子ではないものの、その遺伝子発現やシグナル伝達系の解析などを通じての応用可能性など、今後の詳細な解析が期待される。

造血幹細胞は非対称性に分裂して造血前駆細胞を供給しうる。このプロセスは確率的に決まるのではなく、外界からの影響を受ける。ポリコムタンパクである **Bmi-1** の発現量が造血幹細胞の自己複製を制御する因子の一つであることが明らかとなった。

また腎臓発生における重要遺伝子を単離し、国内発の腎臓発生研究が立ち上がった意義は大きい。これによって腎臓発生の分子機構が明らかになりつつあると同時に、*Sall1*GFP マウスを使った新たな候補遺伝子も単離された。これらの解析によって、より網羅的に発生機構が解明されるだろう。また腎臓細胞分化系の確立によって、ES 細胞などからの腎臓誘導時における検定系が得られたことになるので、この系を使用して腎臓誘導を試みる計画である。

4. 主な発表論文

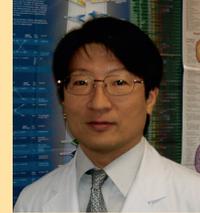
- (1) Takano H, Ema H, Nakauchi H. Asymmetric division and lineage commitment at the level of hematopoietic stem cells: inference from differentiation in daughter cell and granddaughter cell pairs. *J Exp Med.* 2004 199:295-302, 2004.
- (2) Iwama A, Oguro H, Negishi M, Kato Y, Morita Y, Tsukui H, Ema H, Kamijo T, Yuko Kato-Fukui, Koseki H, van Lohuizen M, and Nakauchi H. Enhanced self-renewal of hematopoietic stem cells mediated by the polycomb gene product, *Bmi-1*. *Immunity.* 21: 843-51, 2004.
- (3) Takasato, M., Osafune, K., Matsumoto, Y., Yoshida, N., Meguro H., Aburatani, H., Asashijima, M., and Nishinakamura, R. Identification of kidney mesenchymal genes by a combination of microarray analysis and *Sall1-GFP* knockin mice. *Mech. Dev.* 121: 547-557, 2004.
- (4) Sato, A., Matsumoto, Y., Koide, U., Kataoka, Y., Yoshida, N., Yokota, T., Asashima, M., and Nishinakamura, R. Zinc finger protein *Sall2* is not essential for embryonic and kidney development. *Mol. Cell. Biol.* 23: 62-69, 2003.
- (5) Nishinakamura, R., Matsumoto, Y., Nakao, K., Nakamura, K., Sato, A., Copeland, NG., Gilbert, DJ, Jenkins, NA., Scully, S., Lacey, DL., Katsuki, M., Asashima, M., and Yokota, T. Murine homolog of *SALL1* is essential for ureteric bud invasion in kidney development. *Development* 128: 3105-3115, 2001.

免疫細胞医学に基づく免疫応答の制御と細胞移植医療の展開

Regulation of Immune Response Based on Immuno-cytology and its Clinical Application to Cell Transplantation Medicine

プロジェクトリーダー

谷 憲三郎 九州大学生体防御医学研究所・教授



1. 研究目的

ヒト胚性幹 (ES) 細胞が樹立され、将来的には ES 細胞を試験管内で培養後、細胞もしくは臓器として医療に利用する新しい移植医療が展開される可能性がある。しかし、マウスと異なりヒト ES 細胞に関する研究は倫理的観点から極めて慎重に行われるべきであり、ヒトに近い実験動物モデル系で先ず詳細に検討していく必要がある。本研究はヒトに造血・免疫系が類似し、実験系としての取り扱いが比較的容易な上に、本邦に複数個の実験動物コロニーが存在する小型霊長類コモンマーモセットを用いた研究を中心において、ES 細胞を用いた医療研究開発を行うとともに、その有用性と安全性についても具体的に検討することを目的としている。



図1. 小型霊長類コモンマーモセット

2. 研究成果概要

2-1. コモンマーモセット(CM)ES 細胞の樹立と血球細胞への効率良い分化誘導系の確立:

(1) CMES 細胞株の樹立:

CMES は Wisconsin 大学で 1996 年に世界で初めて樹立されたが、その細胞株の多分化能は証明されなかった。われわれは実験動物中央研究所との共同研究として多分化能を有する CMES 細胞の樹立に向けた研究を行った。すなわち先ず CM 排卵誘発系の確立、受精卵採取法の確立、および内部細胞塊採取法の確立、を行った。これらの系の確立により CMES 細胞の独自技術による樹立に成功した。本細胞は胎生抗原である SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81 が陽性であった。さらにこれまでに Wisconsin 大学で樹立されていた CMES 細胞クローンで

は証明されていなかった多分化能を *in vitro* ならびに *in vivo* で証明することができた。

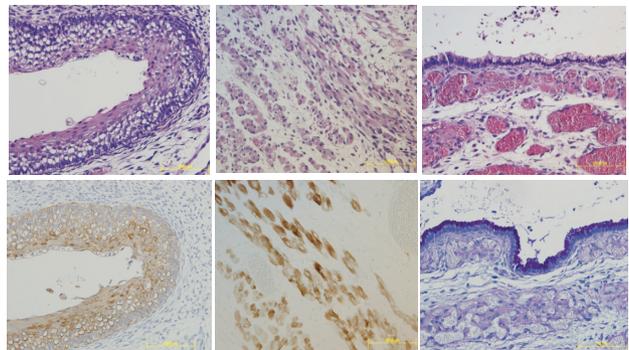


図2. CMES 由来テラトーマの特徴: 左上段から外胚葉、中胚葉、内胚葉の特徴を示す HE 染色図。左下段はサイトケラチン、デスミン、アルジーヤンブルーPAS 陽性の各細胞を示す。

(2) CMES 細胞からの効率よい血球細胞分化系の確立:

従来マウス ES 細胞の *in vitro* 培養系として用いられていた OP9 ストローマ細胞との共培養システムを含む種々の培養条件を用いて CMES 細胞の血球系への分化条件を模索したが良好な条件は見いだせなかった。そこで遺伝子強制発現による分化誘導実験を試みる目的で造血幹細胞の発生・増殖・分化に関わる、HoxB4, Bmi-1, Lh2, Tal1/scl, gata1, gata2 の各遺伝子導入レンチウイルスベクターを作製し、各遺伝子導入 CMES 細胞の血球細胞への分化を検討したところ、Tal1/scl が顕著に CMES 細胞を造血細胞に分化することができ、誘導された CD34 陽性細胞は CM 骨髄 CD34 細胞とほぼ同様な血球前駆細胞コロニー形成能を有していた。さらにこの CD34 細胞からは *in vitro* ならびに免疫不全マウス *in vivo* において 3 系統の血球への分化が確認された。今後われわれは Tal1/scl 遺伝子導入により分化誘導させた CD34 細胞の造血幹細胞移植ソースとしてのコモンマーモセット *in vivo* での有用性を検討していく予定である。

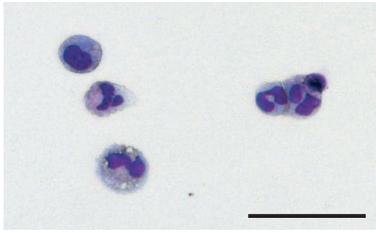


図3. CMES 細胞への *Tal1/scl* 遺伝子導入により分化した血球系細胞

2-2. 新規造血幹細胞増幅因子、組織特異的ホーミング因子の同定と遺伝子のクローン化：

新しい細胞療法の開発の為には造血幹細胞の増幅を効率化させることに加え、機能を有する細胞を目的とする組織に集積させる技術の開発が重要であることから本研究では以下の研究を実施した。

(1) 造血幹細胞増幅因子の同定と遺伝子クローン化：

アダプター蛋白質 *Lnk* 欠損により造血幹細胞の増加と造血能亢進が生じること、*Lnk* が造血幹細胞の新しい抑制制御機構を担う分子であることを明らかにした。さらに、*Lnk* の機能阻害変異体を作成しこれが造血幹細胞の造血能を亢進しうることを示した。

(2) ストローマ細胞由来新規造血幹細胞増幅因子/*ES* 細胞維持因子の同定およびその解析：

ISF(immune suppressor factor)の造血幹細胞増幅能は少なくとも一部は *TIMP3* (造血幹細胞の自己複製に重要とされているチロシンキナーゼ型レセプター*Tie2* シグナルの抑制因子) と *SFRP-1*(*Wnt* の抑制因子)の発現抑制を介していることが示唆された。また *Wnt3a* に *ES* 細胞の未熟性維持活性があることが判明したが、*Wnt3a* 単独では長期間の維持は不可能で、何らかの共因子の存在が必要であると考えられた。

(3) 組織特異的ホーミング法の開発：

SDF-1 - *CXCR4* 系が破骨細胞の骨表面へのホーミングに重要な役割を果たしていることがわかり、*CXCR4* 分子を細胞表面に発現させることで特定の細胞を効率よく、骨表面に分布させることが可能であり、関節リウマチ等治療への応用が考えられた。

3. 結論

コモンマーマセット *ES* 細胞ならびにコモンマーマセット個体を用いた再生医療研究はヒトに対する再生医療の前臨床研究として極めて重要であると考えられる。本研究で明らかになった *Tal1/scl* 遺伝子導入による血球系細胞への高効率分化系の確立は今後ヒト *ES* 細胞においても同様な機構の有無を検討しなくてはならないが、新たな造血細胞療法ならびに輸血療法の発展への貢献が期待できる。

Lnk の機能阻害変異体ならびに *ISF* の造血幹細胞増幅能、さらには血球細胞の組織特異的ホーミン

グ法の開発に関しては今後コモンマーマセットならびにヒト造血・免疫組織に対しても同様な作用があるかについて検討する必要があるものの、今後の臨床的展開に強い期待がもたれた。

4. 主な発表論文

- (1) Izawa K, Tani K, Nakazaki Y, Hibino H, Sugiyama H, Kawasaki A, Sasaki E, Nishioka C, Ishii H, Soda Y, Yagita H, Tanioka Y, Tojo A, Asano S : "Hematopoietic Activity of Common Marmoset CD34 Cells Isolated by a Novel Monoclonal Antibody MA24" *Exp Hematol.*, 32(9), 843-851, (2004).
- (2) Soda Y, Tani K, Bai Y, Saiki M, Chen M, Izawa K, Kobayashi S, Takahashi S, Uchimaruru K, Kuwabara T, Warashina M, Tanabe T, Miyoshi H, Sugita K, Nakazawa S, Tojo A, Taira K, Asano S : "A novel Maxizyme vector targeting a *bcr-abl* fusion gene induced specific cell death in Philadelphia chromosome positive lymphoblastic acute leukemia" *Blood*, 104(2), 356-363, (2004).
- (3) Ueno H, Sakita-Ishikawa M, Morikawa Y, Nakano T, Kitamura T, and Saito M : "A stromal cell-derived membrane protein that supports hematopoietic stem cells." *Nat. Immunol.*, 4(5), 457-463, (2003).
- (4) Horai R, Nakajima A, Habiro K, Kotani M, Nakae S, Matsuki, T, Nambu A, Saijo S, Kotaki H, Sudo K, Okahara A, Tanioka H, Ikuse T, Ishii N, Schwartzberg P. L, Abe R, and Iwakura Y : "TNF α is crucial for the development of autoimmune arthritis in IL-1 receptor antagonist-deficient mice" *J Clin Invest.*, 14(11), 1603-1611, (2004).
- (5) Ema H, Sudo K, Seita J, Maeda A, Morita Y, Osawa M Takatsu K, Takaki S, Nakauchi H. : "Quantification of self-renewal capacity in single hematopoietic stem cells from normal and *Lnk*-deficient mice" *Dev Cell*. 2005 (in press).
- (6) Sasaki E, Hanazawa K, Kurita R, Akatsuka A, Yoshizaki T, Ishii H, Tanioka Y, Ohnishi Y, Suemizu H, Sugawara A, Tamaoki N, Izawa K, Nakazaki Y, Hamada H, Suemori H, Nakatsuj N, Okano H, and Tani K : "Establishment of Novel Embryonic Stem Cell Lines Derived from the Common Marmoset (*Callithrix jacchus*)" *Stem Cells* 2005 (in press).

分化プログラム制御による組織の再生と構築に関する研究

Tissue Regeneration and Construction by Control of Differentiation Programs

プロジェクトリーダー

中辻 憲夫 京都大学再生医科学研究所・教授



1. 研究目的

現在行なわれている臓器移植などの先端医療にはドナー不足と拒絶反応など問題点と限界が存在する。当研究プロジェクトはこれらを解決する次世代医療である再生医学の発展を目指した基盤研究である。すなわち、再生医科学研究所で進められている次の研究項目の展開を目的とした。

- 1-1. 霊長類 ES 細胞株の樹立と特性解析、培養操作技術の開発
- 1-2. 幹細胞からの分化制御機構の解明
- 1-3. 脱分化や分化転換など細胞の再プログラム化機構の研究

2. 研究成果概要

- 2-1. カニコイザル ES 細胞株の樹立と特性解析：世界的にも少数のみ樹立されているが、前臨床研究などにとって重要なサル ES 細胞株を複数樹立して特性解析を行うとともに、これらの細胞株を全国の研究者へ供給することに成功した。
- 2-2. 霊長類 ES 細胞の培養条件の改良：マウス ES 細胞と比べて困難な点が多い霊長類 ES 細胞の無血清培養液や継代方法、フィーダー細胞などの培養条件を改良して、安定して未分化性を維持しながら長期増殖を可能にした。少なくとも一定期間はフィーダー細胞なしで未分化性を維持することが可能になった。
- 2-3. 霊長類 ES 細胞に対する遺伝子導入法の確立：障害に対する感受性の高い霊長類 ES 細胞に対して、汎用性の高いエレクトロポレーション法による遺伝子導入と薬剤選別方法を確立して、再現性良く外来遺伝子を組み込んだ ES 細胞株の作出を可能にした（図 1）。

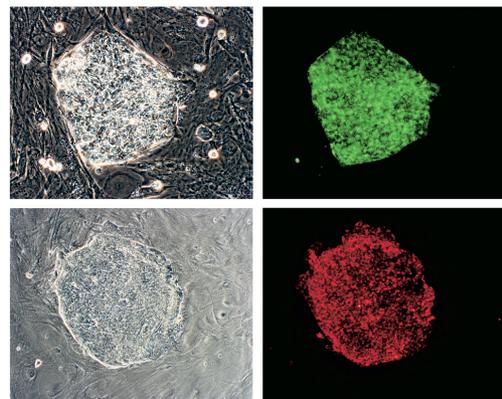


図 1. 緑色または赤色蛍光蛋白遺伝子を導入したカニコイザル ES 細胞コロニー

- 2-4. 霊長類 ES 細胞の LIF/STAT3 シグナル伝達経路など未分化性維持機構の解析：霊長類 ES 細胞の未分化性維持に働く分子シグナル機構がマウス ES 細胞とは大きく異なることを実証した（図 2）。

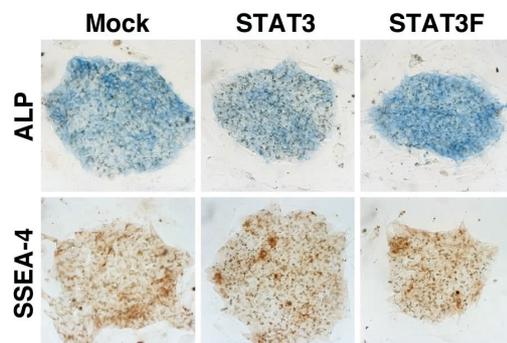


図 2. サル ES 細胞では LIF/STAT3 シグナルをドミナントネガティブベクターで抑制しても効果がない

2-5. サル ES 細胞を用いた細胞治療の前臨床研究：カニクイザル ES 細胞から分化誘導したドーパミン産生神経細胞をパーキンソン病カニクイザルの脳内へ移植して治療効果を検証する前臨床研究が京大脳外科グループとの共同研究として行われ、症状を改善することに成功し、世界をリードする研究成果として世界的に注目された。

3. 結論

ヒト ES 細胞による再生医療を実現するための基盤となる、霊長類 ES 細胞の培養方法、凍結保存方法、遺伝子導入方法などを改良して、安定した増殖維持と実験操作を可能にした。未分化性維持の分子機構がマウス ES 細胞と大きく異なることを明らかにすると共に、フィーダー細胞なしの培養を一定期間可能にするなど、今後の医療応用の基盤を固めた。ES 細胞を用いた細胞移植治療実現のためには霊長類モデルを用いた前臨床試験が不可欠であり、このような研究に使用するために適したサル ES 細胞の基盤研究と全国研究者への細胞供給を実現した当該プロジェクトは世界的に重要な意義をもつ。さらに、京都大学再生医科学研究所において日本国内で始めて樹立されたヒト ES 細胞株については、特性解析と分配体制確立を完了して、全国の使用機関への細胞分配を開始しており、当該プロジェクトはその基盤作りに貢献した。

4. 主な発表論文

- (1) Suemori, H., Tada, T., Torii, R., Hosoi, Y., Kobayashi, K., Imahie, H., Kondo, Y., Iritani, A. and Nakatsuji, N. Establishment of embryonic stem cell lines from cynomolgus monkey blastocysts produced by IVF or ICSI. *Dev. Dynamics*, 222, 273-279, (2001).
- (2) Tada, M., Takahama, Y., Abe, K., Nakatsuji, N. and Tada, T. Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells. *Curr. Biol.*, 11, 1553-1558, (2001).
- (3) Kawasaki, H., Suemori, H., Mizuseki, K., Watanabe, K., Urano, F., Ichinose, H., Haruta, M., Takahashi, M., Yoshikawa, K., Nishikawa, S.-I., Nakatsuji, N. and Sasai, Y. Generation of dopaminergic neurons and pigmented epithelia from primate ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 99, 1580-1585, (2002).
- (4) Saba, R., Nakatsuji, N. and Saito, T. Mammalian BarH1 confers commissural neuron identity upon dorsal cells in the spinal cord. *J. Neurosci.*, 23, 1987-1991, (2003).
- (5) Furuya, M., Yasuchika, K., Mizutani, K., Yoshimura, Y., Nakatsuji, N. and Suemori, H. Electroporation of cynomolgus monkey embryonic stem cells. *Genesis* 37, 180-187, (2003).
- (6) Sumi, T., Fujimoto, Y., Nakatsuji, N. and Suemori, H. STAT3 is dispensable for maintenance of self-renewal in nonhuman primate embryonic stem cells. *Stem Cells* 22, 861-872, (2004).
- (7) Kimura, H., Tada, M., Nakatsuji, N. and Tada, T. Histone code modifications on pluripotential nuclei of reprogrammed somatic cells. *Mol. Cell. Biol.*, 24, 5710-5720, (2004).
- (8) Takagi, Y., Takahashi, J., Saiki, H., Morizane, A., Hayashi, T., Kishi, Y., Fukuda, H., Okamoto, Y., Koyanagi, M., Ideguchi, M., Hayashi, H., Imazato, T., Kawasaki, H., Suemori, H., Omachi, S., Iida, H., Itoh, N., Nakatsuji, N., Sasai, Y. and Hashimoto, N. Dopaminergic neurons generated from monkey embryonic stem cells function in a Parkinson primate model. *J. Clin. Invest.* 115:102-109, (2005).

体性幹細胞の単離・操作と組織再構築に関する研究

Characterization of Somatic Stem Cells and Tissue Reconstruction

プロジェクトリーダー

須田 年生 慶應義塾大学医学部・教授



1. 研究目的

生体内の各組織・臓器は多細胞の集合体であり、それらは通常体性幹細胞と呼ばれる組織・臓器特異的な母細胞から派生した子孫細胞により形成される。発生過程で組織や臓器が形成される機構を解明する上で、体性幹細胞の自己複製や分化誘導を担うシグナルメカニズムの理解が必要不可欠である。またこのような制御機構の解明は、その分子基盤に基づいた組織・臓器の再構築への応用を図る上で重要と考える。本研究課題においてはこれらを背景として、体性幹細胞を単離してその特性を知り、また、自己複製能の獲得や未分化性の維持ならびに体性幹細胞から派生する細胞の増殖分化の運命づけを明らかにするとともに、組織構築と再構築の制御技術を開発することを目的とした。

2. 研究成果概要

平成 14 年度、プロジェクトリーダーが熊本大学から慶應義塾大学に転出したことに伴い、慶應義塾大学を主拠点、熊本大学を副拠点として遂行され、その研究結果は下記の通りである。

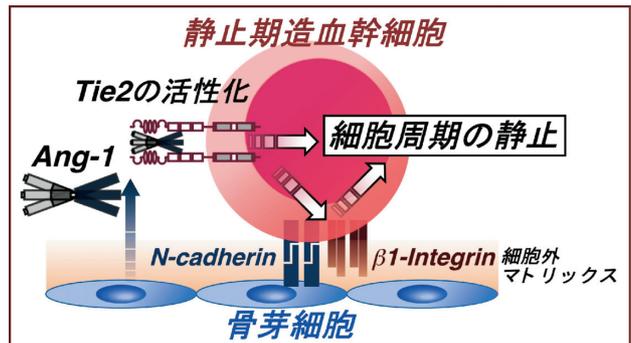
2-1. <主拠点>:

幹細胞の未分化性維持・自己複製機構を解明することを目標として、造血幹細胞の研究を行った(須田年生)。

(1) 骨髄におけるニッチ細胞は、骨芽細胞、血管内皮細胞、さらには幹細胞以外の前駆細胞を含む造血細胞からなると考えられる。そこで造血の場となる骨髄形成の過程を骨芽細胞ならびに破骨細胞の分化を中心に解析した。軟骨膜から FACS を用いて ALCAM 陽性細胞を分離し、骨芽細胞・軟骨細胞・脂肪細胞が分化することを明らかにした。また、造血幹細胞からの破骨細胞の分化過程を解析し、細胞融合に関わる分子の存在を遺伝子破壊マウスで示した。

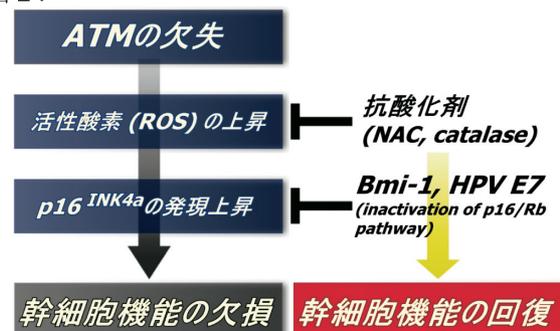
(2) Tie2 受容体陽性の造血幹細胞は、静止期幹細胞であり、骨内表面上で骨芽細胞に接して存在する。一方、骨芽細胞から Tie2 受容体の結合因子であるアンジオポエチン-1 (Ang-1) が産生され、幹細胞の接着を促し、幹細胞を静止期 (G0 期) にとどめている。

図 1.



(3) 細胞がニッチにあるというのはいかなる意味をもつのかを問い、細胞周期のチェックポイント遺伝子である Ataxia telangiectasia mutated (ATM) 欠損マウスにおける造血幹細胞の機能を検討した。その結果、このマウスでは幹細胞の自己複製能の低下が見られた。造血幹細胞において活性酸素レベルが上昇しており、これを還元剤投与によって低下させると幹細胞の機能が正常に復した。さらに、下流のシグナルには、p16^{INK4a}, Rb などの細胞周期制御因子が関与していることを明らかにした。また、ATM 遺伝子欠損マウスの骨髄造血幹細胞は静止期になく、自己複製能の回復に伴い、静止期幹細胞が出現することを見いだした。

図 2.



以上、造血の場である骨髄がどのように形成され、ニッチにある造血幹細胞が外的ストレスから守られているかについて、一定の解を与えることができたと考えている。

2-2. <副拠点>:

組織構築の際の細胞増殖・分化シグナルの研究を通して、組織構築の制御技術を開拓し疾患の克服を目指す目的で、特に造血系と神経系に焦点をあてて体性幹細胞を制御するシグナルメカニズムに取り組んだ(田賀哲也・佐谷秀行)。

- (1) 脳形成の後期にみられるアストロサイト分化は、STAT3 転写因子の活性化による場所が大きい。しかし、マウス胎仔 11.5 日目では、STAT3 が活性化されても、神経上皮細胞からの GFAP 陽性のアストロサイトの出現をみることはなく、14.5 日目で出現する。GFAP 遺伝子のプロモーターの STAT3 結合領域の CpG は、11.5 日目ではメチル化されていて、その後、脱メチル化し、STAT3 活性化により GFAP が発現することを明らかにした。これにより、細胞特異的な遺伝子のプロモーターのメチル化がニューロン・グリアの分化決定に重要な現象であることを示した。
- (2) 脊髄損傷後に損傷部位およびその近傍においてアストロサイト分化誘導性のサイトカインである BMP 群の発現が増強し、それがニューロン分化の阻害やグリア性瘢痕の形成など損傷治癒に悪影響を与えていることがわかった。この研究では BMP 群のアンタゴニスト noggin 分子を神経系前駆細胞に発現ベクターを用いて恒常的に発現させて脊髄損傷マウスに移植することで、移植細胞由来ニューロン分化誘導と運動機能の改善が見られることを報告した。
- (3) オリゴデンドロサイトの分化に bHLH 型の転写因子 Olig2 が重要な役割を担っている。胎生期終脳において Olig2 の発現は腹側の ganglionic eminence (GE) に限定されており、また、オリゴデンドロサイト前駆細胞は GE において発生し、それが背側 (cotex) を含む終脳全体に移動して成熟することが報告されている。本研究では、背側 (cotex) 神経上皮を bFGF で培養すると、i) 本来発現しない Olig2 の発現が誘導されること、ii) 背側マーカー蛋白の発現が消失する一方でいくつかの腹側マーカー蛋白の発現が誘導されること、および iii) GE 神経上皮と動揺にオリゴデンドロサイト分化脳を獲得することを見出した。
- (4) 正常組織細胞を Hoechst33342 で染色しフローサイトメトリーで蛍光強度を 2 種類の波長で二次元展開することにより、大部分の細胞が属する主集団よりも蛍光強度の低い細胞群 (side population, SP) として同定される分画に組織特異的幹細胞が多く含まれていることが報告されている。本研究により、C6 グリオーマの SP 細胞が、神経幹細胞と同様に自己複製能と多分化能を併せ持っていることを示した。
- (5) 分裂期キナーゼ Aurora-A の発現が分裂期後半でタンパク分解によって減少すること、そして発現の現象が起こらないと細胞質分裂に障害をきたすことを見出した。
- (6) 細胞がマトリクス内を浸潤するために接着子 CD44 が細胞外で切断を受ける必要があることを見出し、その酵素として ADAM10 及び ADAM17 が関わっていることを明らかにした。

- (7) Aurora-A の過剰発現マウスでは細胞質分裂障害が見られるものの、p53 依存性アポトーシスによってそれらの分裂異常細胞は排除されることを見出した。
- (8) 分裂期キナーゼ Warts が細胞分裂後チェックポイントに関わり、さらに細胞死を制御していることを見出した。

3. 結論

5 年間の研究は、予想以上の成果を収めたと考える。それは、5 年前の研究計画が、幹細胞の単離・その属性の解析という少し漠としたものであったものが、より明確な課題になったことから分かる。平成 12 年度から 16 年度にわたる 5 年間の研究で、幹細胞は、造血・神経といった組織の壁を超えて、細胞生物学的な視野で議論できるようになった。すなわち、幹細胞は未分化性を維持するためにどのような微小環境 (ニッチ) にあるのか、外来からどのようなシグナルを受けているのか、また、幹細胞自身は、どのような遺伝子発現制御をして分化に向かうのか、一定の知見を得ることができた。主拠点・副拠点ともに、すぐれた成果をあげることができたことと自負している。以上のことは、未来開拓研究費による 5 年間のサポートによると考える。また毎年発表に対する評価委員のコメントは研究遂行上極めて貴重であった。

4. 主な発表論文

- (1) Arai F, Hirao A, Ohmura M, Sato H, Matsuoka S, Takubo K, Ito K, Koh GY, Suda T: Tie2/Angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell*, 118: 149-161, 2004.
- (2) Ito K, Hirao A, Arai F, Matsuoka S, Takubo K, Nakagata N, Ikeda Y, Tak W, Mak, Suda T: Regulation of oxidative stress by ATM is required for self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature*, 431: 997-1002, 2004.
- (3) Setoguchi T, Nakashima K, Takizawa T, Yanagisawa M, Ochiai W, Okabe M, Yone K, Komiya S, Taga T: Treatment of spinal cord injury by transplantation of fetal neural precursor cells engineered to express BMP inhibitor. *Exp Neurol*, 189: 33-44, 2004.
- (4) Hirota T, Kunitoku N, Sasayama T, Marumoto T, Zhang D, Nitta M, Hatakeyama K, Saya H: Aurora-A and an interacting activator, the LIM protein Ajuba, are required for mitotic commitment in human cells. *Cell*, 114: 585-598, 2003.
- (5) Takizawa T, Nakashima K, Namihira M, Ochiai W, Uemura A, Yanagisawa M, Fujita N, Nakao M, Taga T: DNA methylation is a critical cell-intrinsic determinant of astrocyte differentiation in the fetal brain. *Dev Cell*, 1: 749-758, 2001.

肝膵胆管形成と疾患制御に関する研究

Studies on the Organogenesis and Disease Control
in the Hepatobiliary and Pancreatic System

プロジェクトリーダー

遠藤 文夫 熊本大学大学院医学薬学研究部・教授



1. 研究目的

倫理的、経済的に制約の大きい現在のヒト間での臓器移植に代わる、21世紀の移植医療創出をめざし、各種臓器を人為的に形成再生する基本技術を開発することを目的としている。内胚葉系臓器である肝膵胆管系は前腸から発生し、それらの分化決定には様々な転写制御因子、そして増殖分化の制御には既知あるいは未知の分泌性因子が関わっている。

本研究プロジェクトでは、これらの因子を同定し肝膵胆管系形成の分子メカニズムを明らかにし、この臓器の発生および器官形成気候を解析する研究と連動させて、幹細胞移植による肝再構築を試みる。これにより、肝のみならず胆管・膵臓疾患の克服への基盤技術の開発を目指した。

2. 研究成果概要

2-1. 目的に対する成果：

- (1) 肝細胞死を特徴とする遺伝的肝疾患モデルマウスにおける遺伝子改変肝細胞の細胞移植においては、この細胞移植を利用して新規の内胚葉系幹細胞を同定することができた(図1)。またマウスモデルにおいて肝臓を補正された細胞で置換する技術を確認した(図2)。これらの研究成果にたつて、成体に存在する肝臓前駆細胞の分離方法を確立した。この成果をもとに肝膵臓の幹細胞を分離する技術を確認した。さらに試験管内・生体内で肝臓細胞、膵臓細胞を産生する技術を確認した。

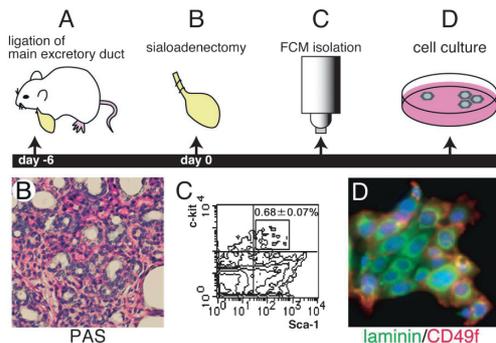


図1. マウス唾液腺から内胚葉系幹細胞を分離する方法(A)。6日間導管結紮を行った唾液腺は、腺細胞が脱落し腺管上皮細胞が増殖する(B)。導管結紮唾液腺より細胞分散液を作製し、フローサイトメトリー法にて細胞を回収する(C)。幹細胞はCD49f陽性、細胞内ラミニン陽性を示す(D)。

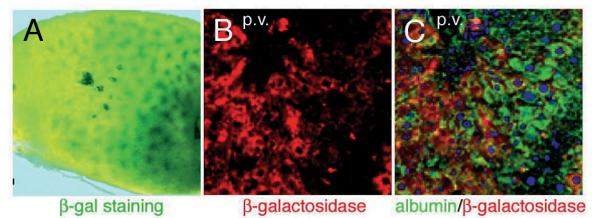


図2. β -gal⁻発現マウス(ROSA26)の唾液腺由来内胚葉系幹細胞を細胞移植した、致命的肝障害モデルマウスの肝臓を示す(Hisatomi et al.). ドナー由来細胞はレシピエント肝臓全体に分布していた(A)。これらの細胞はアルブミンを産生していた(B, C)。この細胞移植治療によって、肝障害による個体死を防ぐ事が出来た。(p. v.; portal vein)

- (2) 多能性幹細胞から誘導された肝・膵臓細胞の分離をおこなう方法を確立した。この方法ではGFP標識された細胞が膵臓の前駆細胞として認識された。この方法で分離した前駆細胞の遺伝子発現を網羅的に調べ、転写調節因子の検討を行い、新知見を得た。
- (3) ニワトリを用いて消化管から肝胆膵の発生に至る形態形成に関与する遺伝子を同定する研究では新たに4種の遺伝子を同定した。これによって、肝臓発生の早期の空間的・時間的遺伝子発現パターンについて新しい知見を得た。
- (4) これらの成果によって当初計画した成果はほぼ達成し、目的についても基盤技術の確立は十分に達成できたといえる。

2-2. 目的外の成果：

- (1) 成体に存在する内胚葉系幹細胞システムの理解とそのシステムを利用した新しい幹細胞の分離方法を確立した。このシステムには幹細胞のほか幹細胞の生存増殖を助ける支持細胞の存在が必要であることを見出し、その支持細胞の分離をおこなった。その結果、唾液腺から支持細胞をクローン化した。この支持細胞は、きわめて幼弱な段階の内胚葉系幹細胞を刺激し、生存、増殖させる液性因子を産生していることを見出した。この支持細胞の発見は今後の再生医療の展開にきわめて重

要と考える。

- (2) この研究で分離した未分化幹細胞はクローン動物を作成するドナー細胞として極めて優れていることが判明した。この細胞を利用したクローンブタのコロニーが作成され、医療応用のブタの作成の研究が進められている。

3. 研究成果の展望

本研究において遠藤は唾液腺に内胚葉系多分化能細胞が存在することを見出し、その分離方法の確立と細胞の解析を進め、セルソーターを用いた幹細胞分離方法を確立した(図1)。この方法はげっ歯類およびブタ、ヒトにおいて内胚葉系多分化能細胞を分離同定することを可能にした(図3)。さらに研究をすすめ、それまでに同定した内胚葉系多分化能細胞よりもさらに未熟と考えられる細胞を同定した。この新しい未熟多分化能細胞は浮遊状態で培養維持することが可能でCD49f陰性、細胞内ラミニン陰性の状態のまま長期間培養維持できる。この浮遊細胞を細胞外マトリックス上に播種すると、細胞はCD49f陽性、細胞内ラミニン陽性細胞へと成熟する。またこの過程には未熟細胞の生存を支持する別の種類の細胞が必要であり、この支持細胞のクローン化もおこなった。これらの研究から成体に存在する内胚葉系幹細胞の存在様式、増殖と分化についての新知見を蓄積することが出来た。それによって肝胆膵疾患の制御を目指す再生医学研究を大きく進展させたと考えている。今後は、ここで示した新規の方法と細胞を用いた再生医療研究が進むだけでなく、試験管内で作成した様々な細胞を用いた毒性試験、創薬研究など多方面での応用が広がると期待される。

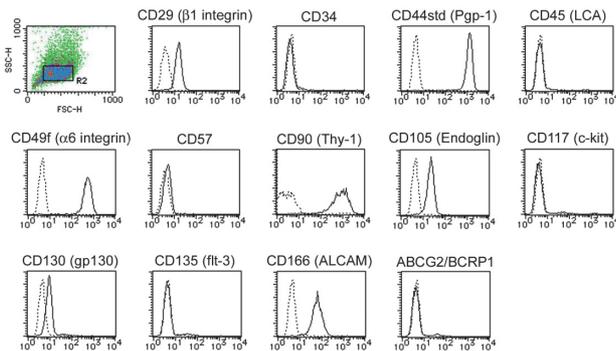


図3. 唾液腺由来の内胚葉系幹細胞の前方散乱光及び側方散乱光のパターンを示す。細胞は以下の一次抗体でラベルした。CD29/β1 インテグリン、CD34、CD44std/Pgp-1、CD45/LCA、CD49f/α6 インテグリン、CD57、CD90/Thy-1、CD105/Endoglin、CD117/c-kit、CD130/gp130 common β-chain、CD135、CD166/ALCAM、ABCG2/BCRP1。各ヒストグラム中に示した実線部分は各々の抗体のヒストグラムパターンを示し、破線部分はアイソタイプコントロール抗体のヒストグラムパターンを示す。7-アミノアクチノマイシンDを用いて、死細胞と生細胞を分別した。死細胞はフローサイトメトリー解析より除外した。

糸らはマウス胚性幹細胞(ES細胞)というモデル系を用いて内胚葉系器官である膵臓への発生分化を試験管内で再現させる実験系を構築した。この試験

管内分化誘導系を用いて、ES細胞から内胚葉幹細胞が分化誘導されてくる過程、また、内胚葉から特異的な器官が分化してくる過程の発生現象を解明した。その結果、ES細胞から内胚葉系幹細胞への効率のよい分化誘導系を構築した。将来、この方法はヒト細胞への応用も可能であり、直接ヒトの再生医学へ貢献する可能性がある。

横内らはニワトリ胚の肝臓発生段階表の作成、分化マーカーの同定、胚葉特異的遺伝子導入法の開発、器官培養法の開発を行ない、それらを確立した。この系を用いることで、マウス胚よりも圧倒的に短時間、低コストで肝臓発生関連遺伝子の機能を証明できるようになった。一方、肝臓発生に関与する遺伝子群を同定するために、発生関連遺伝子群の中規模発現パターンスクリーニングを行い、肝臓発生期に興味深い発現パターンを示す16種類の遺伝子群を同定した。その内訳は、肝内胚葉特異的遺伝子3個、横中隔間充織特異的遺伝子9個、血管内皮細胞層特異的遺伝子4個であった。近い将来これらの遺伝子の詳細が判明し、肝臓のメカニズムの理解に新しい視点をもたらしてくれるものと期待できる。

4. 主な発表論文

- (1) Endo F, Matsuura T, Yanagita K, Matsuda I.: Clinical manifestations of inborn errors of the urea cycle and related metabolic disorders during childhood. J Nutr. 134 (2004):1605S-1609S; discussion 1630S-1632S, 1667S-1672S.
- (2) Hisatomi Y., Okumura K., Nakamura K., Matsumoto S., Satoh A., Nagano K., Yamamoto T., Endo F.: Flow cytometric isolation of endodermal progenitors from mouse salivary gland differentiate into hepatic and pancreatic lineages. Hepatology 39 (2004) 667-675.
- (3) Nakamura K., Mitsubuchi H., Miyayama H., Yatsunami K., Ishimatsu J., Yamamoto T., Endo F.: Complete absence of bile and pancreatic ducts in a newborn: a new entity of congenital anomaly in hepato-pancreatic development. J Human Genetics 48 (2003) 380-384.
- (4) Okumura K., Nakamura K., Hisatomi Y., Nagano K., Tanaka Y., Terada K., Sugiyama T., Umeyama K., Matsumoto K., Yamamoto T., Endo F.: Salivary gland progenitor cells induced by duct ligation differentiate into hepatic and pancreatic lineages. hepatology 38(2003) 105-113.
- (5) Endo F., Tanaka Y., Tomoeda K., Tanoue A., Tsujimoto G., Nakamura K.: Animal model reveal pathophysiology of tyrosinemia. J. Nutr. 133 (2003) 2063S-2067S.
- (6) Endo, F. Sun, M.S.: Tyrosinaemia type I and apoptosis of hepatocytes and renal tubular cells. J. Inher. Metab. Dis. 25: 227-234. 2002.

遺伝子の系統的・網羅的解析による発生・再生原理の解明

Elucidation of the Principles of Development and Regeneration by Systematic Analysis of Genes

プロジェクトリーダー

上野 直人 自然科学研究機構基礎生物学研究所・教授



1. 研究目的

受精卵から始まる発生において、胚は卵割や細胞運動を経て、時々刻々と変化しながらダイナミックな形態変化を遂げる。同じ動物であれば、どの初期胚をとって見てもほぼ同じ形態をとっており、そこには精緻に制御されたプログラムが存在することを伺わせる。また、限られた生物ではあるが、失われた組織・器官を再構築する「再生」能力が知られている。再生過程では、あたかも発生過程を繰り返すように組織・器官が再構成され、この再生現象にも潜在的な発生プログラムの存在、再現を見ることが出来る。このような、いわば神秘的な発生・再生プログラムの基盤は遺伝子、およびその遺伝子にコードされるタンパク質の機能に還元することができる。ゲノム生物学の進歩によって、遺伝子の存在自体はすでに明らかにされつつある現在、生物学の残された課題は、ヒトでは2万種類ともいわれるゲノムにコードされる遺伝子がどのように機能し、この複雑なプログラムを構築しているのか、その全貌を明らかにすることである。本研究プロジェクトでは、それぞれ発生研究、再生研究に適したアフリカツメガエル、プラナリアをモデル生物として、遺伝子情報を完備し、その情報をもとに、限られた遺伝子に着目するのではなく、その対極にある系統的・網羅的なアプローチによって、発生・再生プログラムの解読を試みた。

2. 研究成果概要

2-1. 遺伝子の系統的・網羅的解析基盤の整備：

初期発生メカニズムの解明ばかりでなく、細胞生物学に大きく貢献してきた両生類、アフリカツメガエルは遺伝子の機能解析において優れた特徴をもっており、分子生物学的な研究の蓄積も十分にあるが、遺伝子の網羅的解析については、他のモデル生物の後塵を拝している現状があった。本研究プロジェクトの目的を達成するために、我々はまず、ツメガエルの遺伝子収集から開始し、平均化ライブラリーの作製、EST解析（遺伝子配列決定）を行い、2万種に近い遺伝子に関する情報を取得し、データベース XDB (<http://xenopus.nibb.ac.jp/>)に公開している。このように整備した遺伝子情報をもとに、遺伝子発現を網羅的に解析する DNA マイクロアレイの作製（図1）、各々の遺伝子の発生過程での時間的・空間的遺伝子発現の解析とデータベース化（図2）などを行っており、網羅的遺伝子機能解析のための基盤を構築した。この基盤をもとにさまざまな遺伝子導入個体（トランスジェニックガエル）の作製が可能になるなど、幅広い遺伝子機能解析への

応用が可能になった（図3）。

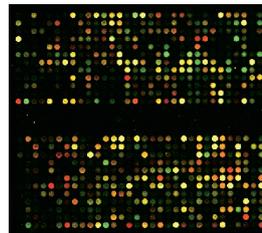


図1. マイクロアレイによる遺伝子発現動態解析

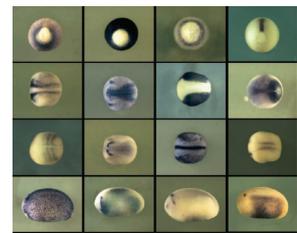


図2. 発生過程における遺伝子発現データベース



図3. 蛍光タンパク質 GFP の遺伝子導入によって蛍光を発するアフリカツメガエル

また、本研究で確立したマイクロアレイ法を用いて、FGF シグナルによって正の発現制御を受け、原腸形成制御の一端を担う分子 NRH を同定し、その細胞突起の形成促進作用を介した機能を明らかにしたことによって、ツメガエルを用いた発生生物学研究におけるマイクロアレイ法の有効性を実証できた。さらに、ツメガエル遺伝子ライブラリーを用いて原腸形成を制御する遺伝子のスクリーニングを行い、数十種類の候補遺伝子を同定できたことは、系統的・網羅的遺伝子解析が生物学にとって、強力なアプローチとなりうることを示している。

2-2. 再生研究への応用

アフリカツメガエル幼生（オタマジャクシ）はきわめて高い再生能力を持つが、それはさまざまな細胞になる能力を持った「幹細胞」が増殖し、分化することにより、失われた組織を修復することによって考えられている。幼生尾部を器官再生のモデルとして、経時的遺伝子発現変化を、cDNA アレイを用いて網羅的に解析した。その結果、再生過程で発現上昇あるいは、発現低下する遺伝子を多数同定したが、これら遺伝子の発現変化は、炎症、傷の治癒、細胞増殖、細胞分化といった再生プロセスを大筋で反映していた。また、この cDNA アレイ解析から、細胞増殖因子 Wnt の尾部再生過程における重要性が示唆された。尾部を切断した場合、*xWnt-5a* は尾部再生芽の先端で強く勾配を持って発現するが、尾部

の背側や腹側に切れ込みを入れた場合の治癒過程では決して発現しない。この *xWnt-5a* を発現しない背側切れ込み部分に、*xWnt-5a* mRNA を注入しておいたアニマルキャップを移植することにより、人為的に *xWnt-5a* の濃度勾配をつくりだしたところ、本来傷の治癒しかおきない切れ込み部分から、脊髄、脊索、筋肉を伴った二次的な尾部が形成された(図4)。



図4. *xWnt-5a* 発現細胞の移植により再生したオタマジャクシの尾。脊髄、脊索、筋肉などの組織が分化した。

2-3. プラナリア全能性幹細胞の性質解明:

淡水性プラナリア、*Dugesia japonica* は身体をナイフで小さな断片に切られても、すべての切断片が約一週間で完全な個体へと再生することができる。この過程では脳でさえも容易に再生される。この驚異的な再生能力を支える源は、新生細胞と呼ばれる万能(全能性)幹細胞であることが知られている。この何にでもなれる細胞をうまく維持、制御することによって、プラナリアの見事な再生は完遂される。本研究ではこの幹細胞を重点的に調べ、プラナリアの再生メカニズムを理解することを目的とし、以下のような成果を得た。

①通常の個体、②X線照射によって幹細胞を除いた個体、③精製した幹細胞、の3種類のサンプルについて遺伝子発現を網羅的(約16,000遺伝子)に比較し、幹細胞に特異的に働いている遺伝子を探索した。その結果、約40遺伝子が幹細胞において特異的に発現していることを突き止めた(図3)。これらの遺伝子は、その個体における発現パターンの違いから2種類に大別することができた。

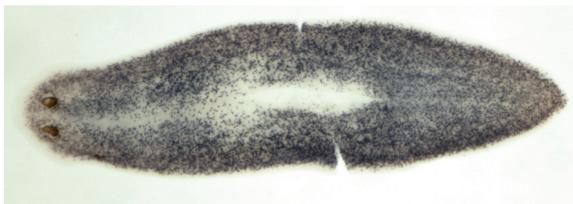


図5. プラナリアの幹細胞で特異的に発現している遺伝子。本研究でこのような遺伝子が多数見つかり、多様な細胞に分化する能力を持った幹細胞を特定することが容易になった。

3. 結論

遺伝子の系統的・網羅的解析手法を発生・再生研究に導入することが本研究の目的であり、したがってアフリカツメガエル、プラナリアの用いた本研究の初期に両モデル動物の遺伝子情報の収集に労力と時間をかけたことが功を奏した。完全長cDNAを含めて、質の高い遺伝子およびその構造情報を収集できたことが本研究の大きな成果の1つである。これらの情報基盤を最大限に生かし、マイクロアレイによるFGFなど細胞増殖因子によって制御される標的遺伝子の探索、および発現クローニング法と時空的遺伝子発現パターンデータによる機能的候補遺伝子の絞り込み、初期発生における細胞間相互作用、原腸形成における細胞運動の分子機構について研究を行い、複数の初期発生制御遺伝子の同定、機能解明に成功した。同時に、本研究プロジェクトで構築されたアフリカツメガエル遺伝子の情報が、今

後、さまざまな発生・再生現象の遺伝子機能解析において極めて有効な基盤となりうることを実証できた。具体的には、遺伝子の網羅的解析によってアフリカツメガエル尾部の再生においても細胞増殖因子の働きが重要であることが明らかになった。すなわち、細胞増殖因子 *xWnt-5a* は傷口の幹細胞に働きかけ、前後軸を持った完全な尾部を構築させたものと考えられる。以上のことから、*xWnt-5a* の新たな機能が明らかになったとともに、傷の治癒と器官再生との本質的な違いを明らかにするための手がかりが得られた。

強力な再生能力を持つプラナリアの研究においても、系統的・網羅的解析によって幹細胞の性質維持に関わる遺伝子について明らかになった。それぞれの遺伝子群を発現している細胞を詳細に解析すると、それらは盛んに分裂している幹細胞と分裂休止状態の幹細胞であり、さらに休止状態の幹細胞は分裂状態の幹細胞を産み出していることがわかった。この休止状態の幹細胞はプラナリアでは初めて同定できた細胞である。今回の結果は、プラナリアの再生システムの一端を明らかにしただけではなく、普遍的な幹細胞研究にプラナリアが有意義な生物であることを示している。

4. 主な発表論文

- (1) Kinoshita, N., Iioka, H., Miyakoshi, A. and Ueno, N. (2003). PKC delta is essential for Dishevelled function in a noncanonical Wnt pathway that regulates *Xenopus* convergent extension movements. *Genes Dev.* 17, 1663-76.
- (2) Ohkawara, B., Yamamoto, T. S., Tada, M. and Ueno, N. (2003). Role of glypican 4 in the regulation of convergent extension movements during gastrulation in *Xenopus laevis*. *Development* 130, 2129-38.
- (3) Takeuchi, M., Nakabayashi, J., Sakaguchi, T., Yamamoto, T. S., Takahashi, H., Takeda, H. and Ueno, N. (2003). The prickle-related gene in vertebrates is essential for gastrulation cell movements. *Curr. Biol.* 13, 674-9.
- (4) Iioka, H., Ueno, N. and Kinoshita, N. (2004). Essential role of MARCKS in cortical actin dynamics during gastrulation movements. *J. Cell Biol.* 164, 169-74.
- (5) Chung, H. A., Hyodo-Miura, J., Kitayama, A., Terasaka, C., Nagamune, T. and Ueno, N. (2004). Screening of FGF target genes in *Xenopus* by microarray: temporal dissection of the signalling pathway using a chemical inhibitor. *Genes Cells* 9, 749-61.
- (6) Sugiura, T., Taniguchi, Y., Tazaki, A., Ueno, N., Watanabe, K. and Mochii, M. (2004). Differential gene expression between the embryonic tail bud and regenerating larval tail in *Xenopus laevis*. *Dev. Growth Differ.* 46, 97-105.
- (7) Tazaki, A., Kitayama, A., Terasaka, C., Watanabe, K., Ueno, N. and Mochii, M. (2005). Microarray-based analysis of tail regeneration in *Xenopus laevis* larvae. *Dev. Dyn.* 233, 1394-404.
- (8) Chung, H.A., Hyodo-Miura, J., Nagamune, T. and Ueno, N. (2005). FGF signal regulates gastrulation cell movements and morphology through its target NRH. *Dev. Biol.* 282, 95-110.

脳細胞の発生・分化・再生の分子機構

Studies on Molecular Mechanisms Underlying Development, Differentiation and Regeneration of Neural Cells

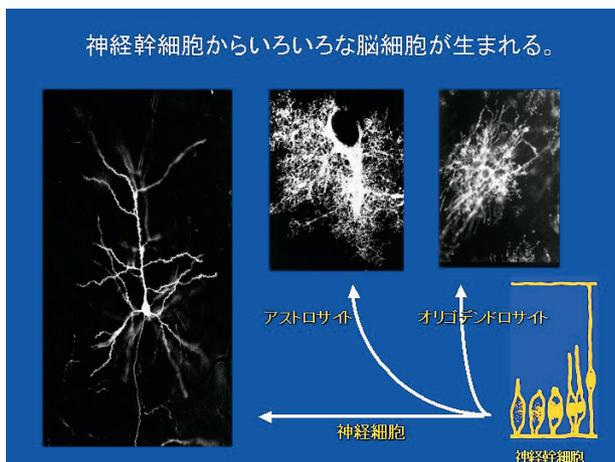
プロジェクトリーダー

池中 一裕 自然科学研究機構生理学研究所・教授



1. 研究目的

哺乳類脳神経系において、外傷や内因的な疾患のため脳細胞が死んだ時、脳を構成する神経細胞やグリア細胞は再生能力に乏しいため、十分な治癒が得られなかった。しかし、近年の研究により成人脳にも神経幹細胞（神経細胞にもグリア細胞にも分化することができる前駆細胞；図1参照）の存在することが明らかとなり、これをどのように処理すれば欠損した細胞にすることができるかが極めて重要な課題となっている。本研究プロジェクトにおいては神経幹細胞から神経細胞やグリア細胞の分化機構および病態時におけるその制御機構を明らかとし、神経幹細胞の分化を操作することを目的とする。



(図1)

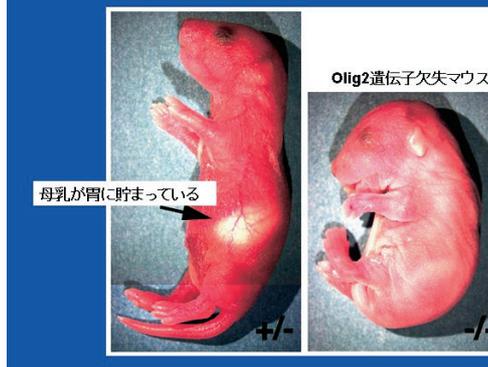
2. 研究成果概要

本研究プロジェクトでは対象とする神経変性疾患としてパーキンソン病と脱髄性疾患を取り上げる。このため、再生させたい脳細胞はドーパミン性神経細胞と髄鞘形成を行うオリゴデンドロサイトである。

2-1. オリゴデンドロサイトの発生には *olig2* 遺伝子の働きが必須である。:

オリゴデンドロサイト (OL) は中枢ミエリンを形成する細胞であり、神経細胞やアストロサイトと同様に神経幹細胞から産生される (図1参照)。しかし他の2種類の細胞とは異なり、ほ乳類脊髄のOL前駆細胞は腹側の限局した領域に存在する神経幹細胞からのみ産生される。OL産生期に脊髄脳室壁近傍の他の領域は神経細胞を産生しており、どのような機構で脊髄背腹軸の一部分だけを特殊な領域に決定できるか、極めて興味深い問題であった。この領域からはOL産生に先立ち、運動ニューロンが産生されるので、本領域は pMN (Motor Neuron) ドメインと呼ばれている。pMNドメイン特異的に発現する bHLH 型転写因子 *olig2* が発見され、しかもその発現がOL前駆細胞にも維持されるので、このものがOLの発生に深く関与することが予想された。そこで、*olig2* 遺伝子をノックアウトしたところ、予想通り脊髄OL前駆細胞の産生がなくなったが、それだけではなく *olig2* 遺伝子の発現が全くない運動ニューロンも産生されなくなった (図2参照)。このことからOLの産生には *olig2* 遺伝子の働きが必須であることが明らかとなった。

Olig2遺伝子欠失マウスは運動ニューロンもオリゴデンドロサイトもない。このために生まれたマウスは動くことができず、母乳を飲めない。



(図2)

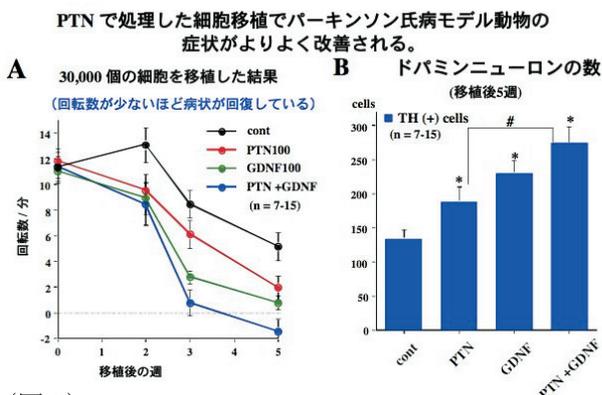
2-2. OLの分化はWnt蛋白質により抑制されている。:

マウス脊髄においてOLの分化は背側の因子により強く抑制されていることを明らかにしてきた。この因子の実体を同定したところ、その一つはWnt蛋白質であった。Wntが細胞にくっつくことでOLの分化のタイミングを調節し、OL前駆細胞の移動やミエリンの数を調節していることが示唆された。多発性硬化症など脱髄を示す疾患の治療法開発に重要な基礎知識となることが期待される。

2-3. プレイオトロピン (PTN) はドパミンニューロンの分化を促進し、生存促進作用を有する。:

ドーパミン(DA)ニューロンの分化機構の解明を目的とし、A) DA 入力欠如した線条体(パーキンソン病様の脳内環境)に発現増加するDAニューロン分化因子の探索を進めた。またB) 中脳由来neurosphereに発現する遺伝子の網羅的解析を進めた。その結果、DA欠如した線条体にGDNF, VEGF, pleiotrophin (PTN)等の発現が増加していること、中脳由来神経幹細胞にPTN遺伝子が高頻度に発現していることが明らかになった。

次に、PTNの作用を調べた。その結果、PTNを神経幹細胞に処置することによりDAニューロンへの分化が促進され、かつその生存も促進されることが明らかとなった(図3B参照)。さらにパーキンソンモデルにおいてPTNを移植ドナー細胞調整時に作用させた後移植することによって、移植後の運動機能の回復が促進されることが明らかになった(図3A参照)。



(図3)

3. 結論

神経幹細胞からDAニューロンの分化にはPTNの添加が、OLへの分化にはWnt機能の抑制が効果的であることを示すことができた。これらの発見はパーキンソン氏病や多発性硬化症などの疾患治療に役立つと思われる。

4. 主な発表論文

- (1) Shimizu T., Kagawa T., Wada T., Muroyama Y., Takada S., Ikenaka K. Wnt Signaling Controls the Timing of Oligodendrocyte Development in the Spinal Cord. *Developmental Biology*. *Dev Biol.* 282(2) : 397-410, (2005).
- (2) Jung C-G., Hida H., Nakahira K., Ikenaka K., Kim H-J, Nishino H.: Pleiotrophin mRNA is highly expressed in neural stem (progenitor) cells of mouse ventral mesencephalon and the product promotes production of dopaminergic neurons from ES cell-derived nestin-positive cells : *FASEB J* 18(11) : 1237-1239, (2004).
- (3) Iwasaki Y., Hosoya T, Takebayashi H., Ogawa Y, Hotta Y, Ikenaka K : The potential to induce glial differentiation is conserved between drosophila and mammalian glial cell missing genes : *Developmental* 130:6027-6035, (2003).
- (4) Takebayashi H., Nabeshima Y, Yoshida S, Chisaka O, Ikenaka K., Nabeshima Y : The Basic Helix- Loop- Helix Factor Olig2 Is Essential for the Development of Motoneuron and Oligodendrocyte Lineages : *Current Biology* 12: 1157-1163, (2002).
- (5) Yamazaki Y, Makino H, Hamaguchi-Hamada K, Hamada S, Sigino H, Kawase E, Miyata T, Ogawa M, Yanagimachi R, Yagi T : Assessment of the developmental totipotency of neural cells in the cerebral cortex of mouse embryo by nuclear transfer : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:14022-14026, (2001).

3. 植物遺伝子

(1) 評価対象研究推進委員会：「植物遺伝子」研究推進委員会

(委員長)	山田 康之	奈良先端科学技術大学院大学名誉教授
	岩槻 邦男	放送大学教授
	岩渕 雅樹	独立行政法人農業生物資源研究所理事長
	桂 直樹	生物系特定産業技術研究推進機構理事
	杉山 達夫	独立行政法人理化学研究所植物科学研究センター長
	日向 康吉	財団法人岩手生物工学研究センター所長
	福田 裕穂	東京大学大学院理学系研究科教授

(2) 評価対象研究プロジェクト

番号	研究プロジェクト名	プロジェクトリーダー
1	植物における個体統御機構解析と有用遺伝子組換え植物の育成・評価	鎌田 博 (筑波大学大学院生命環境科学研究科教授)
2	遺伝子解析を基盤とする植物多様性解析と環境安全性評価	井上 勲 (筑波大学大学院生命環境科学研究科教授)
3	植物の栄養貯蔵に関わる高次制御系の新規遺伝子機能の解明と利用基盤	中村 研三 (名古屋大学大学院生命農学研究科教授)
4	食糧危機および環境問題解決にむけた分子育種による植物の同化能力向上と悪環境耐性の付与	佐野 浩 (奈良先端科学技術大学院大学遺伝子教育研究センター教授)
5	植物の生産性向上に向けた形態形成制御と代謝制御の分子機構の解明	橋本 隆 (奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科教授)
6	植物におけるRNA機能の不活化と遺伝子機能解析	佐藤 文彦 (京都大学大学院生命科学研究科教授)
7	植物細胞死および増殖制御因子の高次発現機構の解明	内宮 博文 (東京大学分子細胞生物学研究所教授)

植物における個体統御機構解析と有用遺伝子組換え植物の育成・評価

Analyses of Molecular Mechanisms Controlling Plant Development and Production and Evaluation of Useful Transgenic Plants

プロジェクトリーダー

鎌田 博 筑波大学大学院生命環境科学研究科・教授



1. 研究目的

植物個体における発生・分化（胚発生、花芽形成、果実の肥大・成熟等）や成長（地上部と地下部の相互作用、含硫アミノ酸合成等）を制御する分子機構の一端を解明し、その機構を活用して有用な遺伝子組換え植物を育成する。さらに、遺伝子組換え植物の特性評価を行いつつ、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物多様性の確保に関する法律」（カルタヘナ担保法）に基づく環境影響評価を実施するための評価法や花粉飛散防止技術の開発を進める。

2. 研究成果概要

2-1. 形態形成制御機構：

植物細胞からの効率的な植物個体再分化法である体細胞不定胚形成について、従来の植物ホルモンを用いる方法とは全く異なる新しい方法としてストレス処理による不定胚誘導法を開発・改良し、モデル植物であるシロイヌナズナにおいても効率的に不定胚を誘導できる実験系を確立した（図1）。

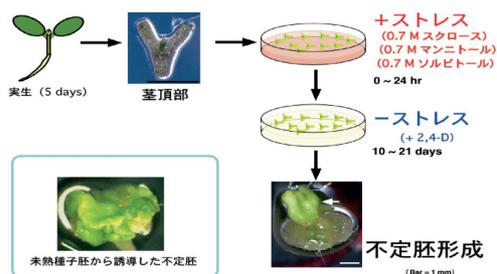


図1. モデル植物シロイヌナズナにおけるストレス不定胚形成

この実験系を活用し、胚で特異的に発現する遺伝子を単離・解析し、胚発生時における遺伝子の発現を決定する新規な塩基配列（シス配列）としてCEE1を決定すると同時に、このCEE1に結合する新規な転写促進因子（トランス因子）としてAP2/EREBPファミリー遺伝子を同定した（図2）。

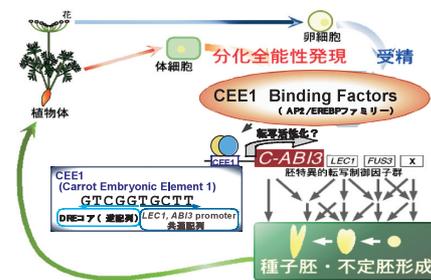


図2. 胚発生特異的な遺伝子発現を制御する分子機構の模式図

2-2. 含硫アミノ酸の生合成制御機構：

メチオニン（Met）は硫黄を含む重要な必須アミノ酸であり、タンパク質を構成するのみならず、S-アデノシルメチオニン（AdoMet）に代謝されて生体内のさまざまな反応に使われる。さまざまな生体物質の生合成経路において、律速段階の酵素は最終産物と結合して酵素活性が変化することによってフィードバック制御されるが、メチオニン生合成の律速酵素であるシスタチオニッシーシンターゼ（CGS）はmRNAの分解段階でフィードバック制御される。この制御にはCGS上の十数残基からなる短いアミノ酸配列（MTO1配列）が必要であり、AdoMet存在下でCGS mRNAを翻訳することによりCGS mRNAの分解が誘導されることが初めて明らかとなった（図3）。

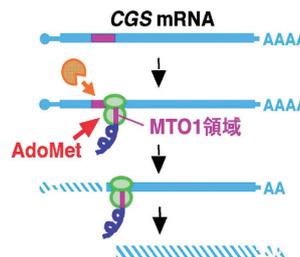


図3. CGS mRNAの分解制御

2-3. 遺伝子組換え植物からの花粉飛散防止技術の開発：

種子発芽から果実成熟に至る植物のさまざまな成長過程を制御する重要な植物ホルモンであるエチレンについて、植物がエチレンを感じるために必要なタンパク質（エチレン受容体）遺伝子に変異を導入

し、遺伝子組換えタバコを作成した。この組換えタバコはエチレン感受能力が低下しており、花の日持ちが長くなると同時に、全く種子を生産しない不稔個体が得られた。この不稔タバコでは、1) 葯のタペート組織の異常により花粉発達が抑制され、正常花粉数が減少すること(図5)、2) 花構造が受粉しにくい構造(長花柱花構造)になること(図4)が判明した。この組換えタバコを温度や光条件が自然に近い特定網室で栽培したところ、不稔性を引き起こすそれら2つの性質は極めて安定していた。このエチレン受容体改変遺伝子をレタスなど他の植物に導入したところ、組換え体を不稔にできた。

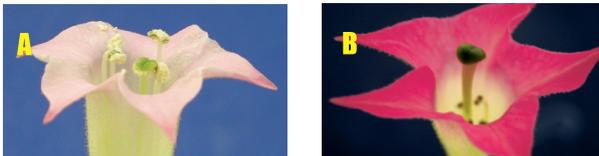


図4. エチレン受容体改変遺伝子を導入した組換えタバコの花構造
A: 非組換え体、B: 組換え体(長花柱花構造)

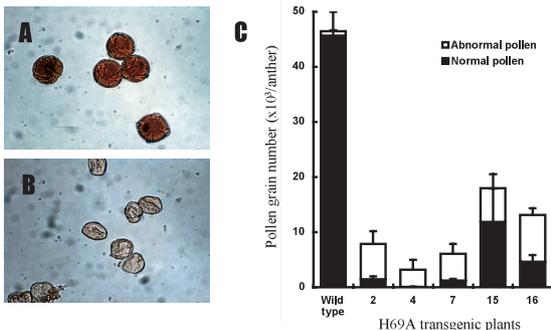


図5. エチレン受容体改変遺伝子を導入した組換えタバコの花粉発達
A: 非組換え体花粉、B: 組換え体の異常花粉、C: 花粉生産

2-4. 遺伝子多様性の解析と遺伝子拡散の評価法の開発:

遺伝子組換え植物による環境影響を評価する手法を検討するため、野生(ノラ)ニンジンモデルとし、生態特性調査、訪花昆虫による花粉飛散距離の推定法の開発、野生集団における遺伝的多様度の解析、栽培種との交雑の可能性等を検討した。

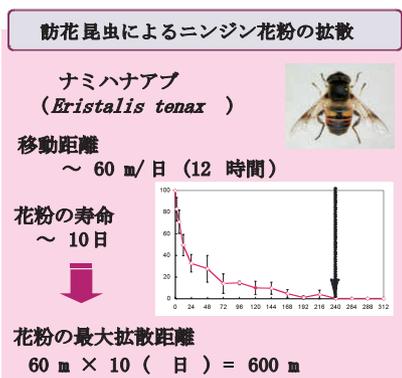


図6. ノラニンジンにおける訪花昆虫による花粉飛散距離の推定

遺伝子の多様度を解析する手法としてはニンジンにおいては Amplified fragment length polymorphism (AFLP) 法が最適であった。また、ノラニンジン自生地での訪花昆虫の調査およびその行動解析から、花粉飛散距離は600mと推定された(図6)。

3. 結論

植物個体における形態形成(胚発生や花芽形成等)を制御する分子機構の一端が明らかとなり、遺伝子組換え植物の効率的育成の基盤が築かれた。また、含硫必須アミノ酸として重要なメチオニン合成のフィードバック制御機構が明らかになった。さらに、エチレン受容体改変遺伝子を活用することで花粉飛散を防止する技術が開発された。一方、カルタヘナ担保法に基づく遺伝子組換え植物の環境影響評価法が開発された。

4. 主な発表論文

- (1) Miho Ikeda-Iwai, Mikiyoshi Umehara, Shinobu Satoh and Hiroshi Kamada : Stress-induced somatic embryogenesis in vegetative tissues of *Arabidopsis thaliana*. Plant J., 34; 107-114, (2003).
- (2) Yoshikatsu Matsubayashi, Mari Ogawa, Akiko Morita and Youji Sakagami : An LRR receptor kinase involved in perception of a peptide plant hormone. Science, 296; 1470-1472, (2002).
- (3) Yukako Chiba, Ryoko Sakurai, Michiko Yoshino, Kimihiro Ominato, Mari Ishikawa, Hitoshi Onouchi and Satoshi Naito : S-adenosyl methionine is an effector in the posttranscriptional autoregulation of the cystathionine γ -synthase gene in *Arabidopsis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100; 10225-10230, (2003).
- (4) Masashi Asahina, Hiroaki Iwai, Akira Kikuchi, Shinjiro Yamaguchi, Yuji Kamiya, Hiroshi Kamada and Shinobu Satoh : Gibberellin produced in the cotyledon is required for cell division during tissue-reunion in the cortex of cut cucumber and tomato hypocotyls. Plant Physiol., 129; 201-210, (2002).
- (5) Taichi Oguchi, Kimiyo Sage-Ono, Hiroshi Kamada and Michiyuki Ono : Characterization of transcriptional oscillation of an *Arabidopsis* homolog of *PnC401* related to photoperiodic induction of flowering in *Pharbitis nil*. Plant Cell Physiol., 45; 232-235, (2004).
- (6) Min-Long Cui, Keita Takada, Biao Ma and Hiroshi Ezura : Over expression of mutated melon ethylene receptor gene *Cm-ETR1/H69A* confers reduced ethylene sensitivity to heterologous plant *Nemesia strumosa*. Plant Sci., 167; 253-258, (2004).

遺伝子解析を基盤とする植物多様性解析と環境安全性評価

Gene Analysis of Plant Biodiversity and the Effects of Transgenic Plants on the Environment

プロジェクトリーダー

井上 勲 筑波大学大学院生命環境科学研究科・教授



1. 研究目的

植物多様性は分子から群落まで広い範囲の解析を必要とする巨大な研究対象である。環境安全性評価法の確立には、多様性について多くの基礎的知見の蓄積が不可欠である。本研究では、多様性そのものの把握、個体群レベルの多様性の把握、そして安全性評価の基礎としての遺伝的多様性解析技術の開発の3つの立場から研究を行った。

- (1) 植物多様性の解明：動物と異なり植物は10個の系統群からなる生物群である。本研究では、主要な生産者である緑色植物、不等毛植物、ハプト植物について、系統の解明を行い、形質進化過程を推定すること、特に、緑色藻類については、植物の陸上への進出という観点から解析を行い、陸上植物を生み出した系統群を明らかにすることを目標とした。
- (2) 個体群レベルの多様性：絶滅危惧植物サクラソウをモデルに、遺伝的変異が個体群維持や遺伝的多様性の維持に果たす役割を把握することにより、植物の保全戦略立案のための遺伝的指針の確立に寄与することを目指した。
- (3) 植物の遺伝的多様性測定技術の開発：多様性解析と環境へのジーンフロー推定の基盤を構築するために、倍数性植物を用いてゲノム多様性評価法の検討を行う、土壌、水塊等天然環境中における難培養性微生物を含めた生物多様性の簡便評価法を確立する、上記手法の試用や他の評価を行うため、組換え体ユーカリなどの非閉鎖系温室での環境安全性評価試験を行う、さらに、関連して、バイオセーフティ・リスクコミュニケーションについて問題事項を検討することを目標とした。

2. 研究成果概要

2-1. 緑色、不等毛、ハプト植物の系統と進化の解析のキーとなる生物を発見した。二つの新綱（ピンクギオ藻綱とプラシディア綱）の発見で、黄色植物の進化について理解が広がった。ハプト藻では、円石藻の単系統性を明らかにし、その祖先生物と考えられる生物を発見した。また、円石の代わりに珪酸質の鱗片をもつハプト藻を発見し、珪酸化と石灰化の進化について新たな可能性を示した。全体として、重要な藻類群の系統と進化について

の知見を大きく進めることができ、植物多様性解析の基盤を構築できた。さらに、未知の新規生物群を複数発見することができ、植物のみならず、真核生物全体の構成の理解の進展に資することができた。特に、未知の真核生物群、カタブレファリス植物門（カタブレファリス門）の発見と記載を行い、この系統群で進行する細胞共生の研究から植物の成立過程について、細胞分裂で共生体を一方の娘細胞にのみ継承する半藻半獣モデルを提唱した。（井上班）



図1. 新規に発見された鞭毛虫。細胞共生による葉緑体獲得の最初の段階を示すと考えられる。

2-2. 多数のマイクロサテライトマーカーを用いた階層な遺伝変異の解析および遺伝子流動や遺伝構造の詳細な把握により、サクラソウの遺伝的進化的な意味での保全単位を明らかにした。

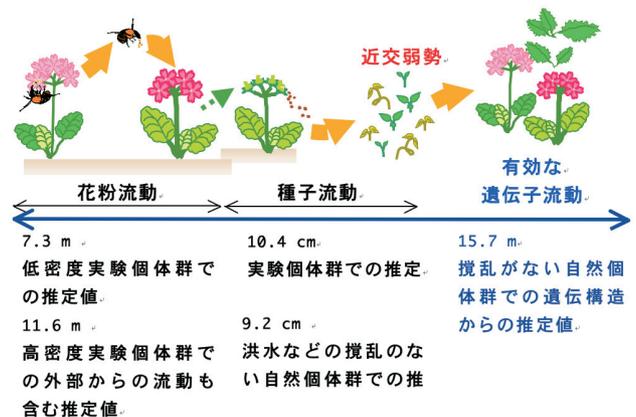


図2. 花粉と種子によるサクラソウの遺伝子流動距離の推定。

また、ポリネーターの訪花行動に基づく花粉流動と種子分散に基づく種子流動に関する理解が深まり、一部、定量的データに基づくモデル化がなされた。絶滅予測に寄与する知見として、個体群の縮小に伴って進行する遺伝的劣化のプロセスにおける近縁構造と近交弱勢の重要性が把握された。他殖性のサクラソウでは多くの致死遺伝子や有害遺伝子が蓄積しており、保全においてはこの点への特段の配慮が必要なことが示唆された。また、QTL マッピングに先駆け、遺伝子の連鎖地図が構築された。(鷲谷班)

2-3. P450 などの機能ゲノムマーカーを実用化して、遺伝的多様性測定に使用し、多様性解析と環境へのジーンフローの推定の基盤を構築した。また、鎌田プロジェクトとの連係により、上記手法の試用や他の評価を行うため、組換え体ユーカリの非閉鎖系温室での環境安全性評価試験を行った。

土壌微生物層の多様性評価を行うための諸要素を分析し、土壌からの核酸抽出法と種多様性の検定法を検討した。タンパク質変成剤を用いない土壌からの簡易核酸抽出法を工夫した。

NIR/FT-IR を用いた物理光学的方法による新規ゲノム評価法を検討し、組換え体や既存の品種・系統の効率的な判別方法の開拓の端緒を開いた。

異質倍数体のモデル植物であるコムギを材料として、Expressed Sequence Tags (EST)を大量に解析することにより、コムギの cDNA マイクロアレイを作成し、ゲノム融合により遺伝子の発現パターンがどのように変換されるのか、ゲノムワイドで解析した。えられた結果は遺伝子組換えによる遺伝子機能変換の基礎資料となる。(渡邊班)

3. 結論

植物多様性は遺伝子から群落まで多様な側面を持っており、1プロジェクトでカバーできるものではないが、本研究によって、今後の植物多様性研究についてある程度の方向性を示すことができたと考えている。

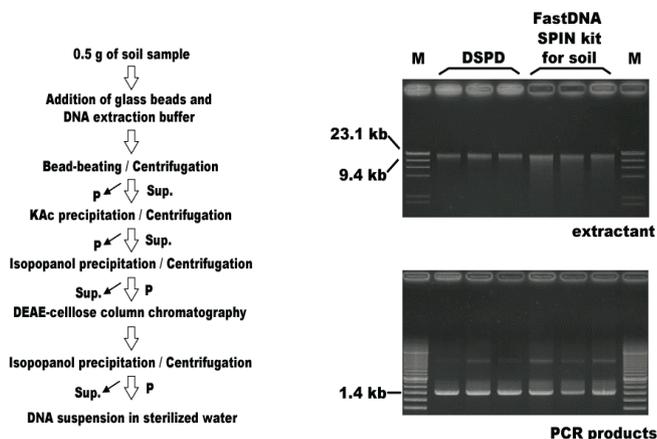


図3. 多様な土壌からの核酸の簡易抽出法の開発

植物の系統群としての多様性の理解がまだ十分でないこと、さらに共生による植物化による多様化のしくみの解明の重要性が示された。

植物の遺伝子レベルから個体群・生態系レベルにわたる遺伝子の挙動の階層横断的な理解は、生物多様性保全および生物安全性評価のための基礎となるばかりでなく、遺伝子組み換え植物の環境影響評価に必要な集団内での遺伝子の多様性の解析技術の開発に寄与するものである。

環境安全性評価には、未知の微生物を含む環境を対象にした簡便で正確な手法が必要だが、実際に遺伝子組換え体を環境放出した場合の、種多様性や遺伝的多様性への影響評価、また組換え形質の安定性ならびに環境に対する影響を評価する際の基盤的手法を開発することができた。

4. 主な発表論文

- (1) Okamoto, N. and Inouye, I. (2005) Is the secondary symbiosis in progress? *Science* 310:287.
- (2) Okamoto, N. and Inouye, I. (2005) The Katablepharids are a distant sister group of the Cryptophyta: A proposal for Katablepharidophyta *divisio nova*/Kathablepharida *phylum novum* based on SSU rDNA and beta-tubulin phylogeny. *Protist* 156: 163-179.
- (3) Washitani, I., Ishihama, F., Matsumura, C., Nagai, M., Nishihiro, J. & Nishihiro, M.A. (2004) Conservation ecology of *Primula sieboldii*: synthesis of information toward the prediction of genetic/demographic fate of a population. *Plant Species Biology*, 20: 3-16.
- (4) Ishihama, F., Ueno, S., Tsumura, Y., & Washitani, I. (2005) Gene flow and inbreeding depression inferred from fine-scale genetic structure in an endangered heterostylous perennial, *Primula sieboldii*. *Molecular Ecology*, 14: 983-990.
- (5) Watanabe, K. N., T. Fujimura, K. Shimamoto, T. Hashimoto, N. Koizumi, H. Fukuda, S. Naito, K. Nakamura, T. Mimura, Y. Ohashi, K. Shimazaki, I. Terashima, H. Uchimiya and T. Yamaya. (2004) Negative fallout from public sentiment in Japan. *Nature Biotech.* 22, 904.
- (6) Watanabe, K. N., M. Taeb and H. Okusu. (2004) Putting Cartagena into Practice. *Nature Biotech.* 22, 1207-1208.

植物の栄養貯蔵に関わる高次制御系の新規遺伝子機能の 解明と利用基盤

Novel Gene Function Involved in Higher-Order Regulation of Nutrition-Storage in Plants

プロジェクトリーダー

中村 研三 名古屋大学大学院生命農学研究科・教授



1. 研究目的

植物が同化・吸収した栄養分を貯蔵部位（シンク）に転流して種々の貯蔵物質として集積する能力は作物生産性の基盤である。本研究プロジェクトでは、シロイヌナズナやイネのゲノム解析情報とリソースを使い、栄養源の輸送、栄養源に応答した貯蔵機能制御、貯蔵物質高集積をもたらす各種シグナルの統御、生物時計機構などの栄養貯蔵の個体レベルでの高次制御に関与する新規遺伝子機能を解明し、栄養貯蔵能の改良と新しい物質生産の基盤開拓を進める。

2. 研究成果概要

2-1. 糖と窒素のトランスポーター機能：

イネ *OsSUT1* はショ糖の維管束への取込に関与すると考えられるが、登熟種子へのショ糖の移動や胚乳への再取込においても主導的な役割を担うことを明らかにし、アンモニウムトランスポーター遺伝子群のN吸収における役割分担を明らかにした。（山口淳二）

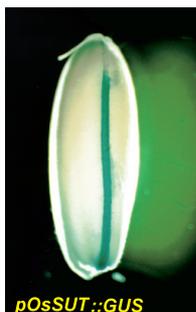


図1. 種皮維管束での *OsSUT* の発現

2-2. 糖栄養シグナル応答：

糖の滞留は光合成などのソース関連遺伝子の発現を抑制する一方で、シンクへの糖の豊富な供給は貯蔵物質合成系遺伝子の発現を活性化する。種々の糖シグナル応答突然変異株を単離し、ABAが糖による一群の遺伝子発現誘導に中間シグナルとして働

き、葉緑体機能やプロアソームサブユニットが糖シグナル応答に関わることを明らかにした。（山口淳二、森上敦、中村研三）

2-3. 糖誘導性遺伝子発現に関わる新奇転写因子：

植物の糖シグナル応答には複数のシグナル伝達経路が関わるということが知られるが、そこに関わる転写因子はほとんど知られていなかった。我々は、シンク機能を担う糖誘導性遺伝子の発現に関わる転写因子を種々のアプローチで探索し、(1) B3 DNA結合ドメイン持つ新奇転写レプレッサー HSI2、(2) AP2型転写アクティベーターASML1/WRINKLED1、(3) 一群の糖誘導性遺伝子の活性化に働く新奇CCTドメインタンパク質 ASML2、(4) 一群の糖誘導性遺伝子の共通シス配列に結合する HD-Zip 型転写アクティベーターTB10などを同定した。なかでも、ASML1/WRINKLED1は種子油脂含量の制御因子であり、種子油脂貯蔵の向上への利用が期待される。（中村研三、森上敦）

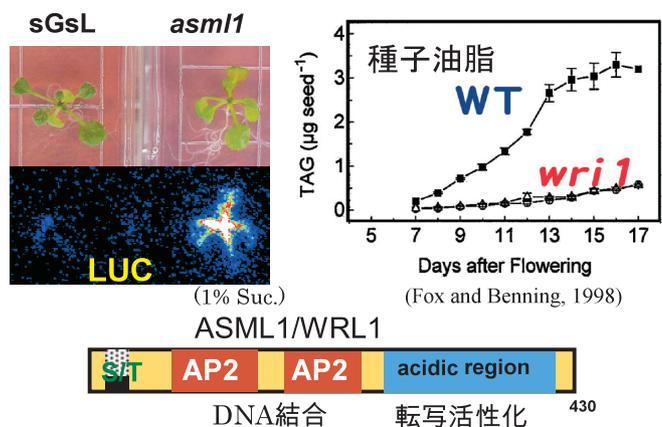


図2. 糖誘導性遺伝子を活性化する種子油脂貯蔵制御因子

2-4. 貯蔵タンパク質遺伝子の発現制御カスケード:

種子特異的転写因子 LEC1, ABI3, FUS3 が ABA 依存的に貯蔵タンパク質遺伝子を活性化する上で働く仲介転写因子を同定し、また ABA による促進効果は転写因子の特定 Ser 残基の SAPK8-10 による ABA 依存的リン酸化によることを見出し、種子形成過程での貯蔵タンパク質遺伝子の高発現をもたらす転写制御カスケードを始めて明らかにした。また、FUS3 や ABI3 は貯蔵タンパク質前駆体のプロテインボディへの輸送蓄積に関わる遺伝子群の発現も制御しており、貯蔵タンパク質の遺伝子発現と細胞内集積が共通の制御ネットワーク下にあることを始めて明らかにした。(服部東穂)

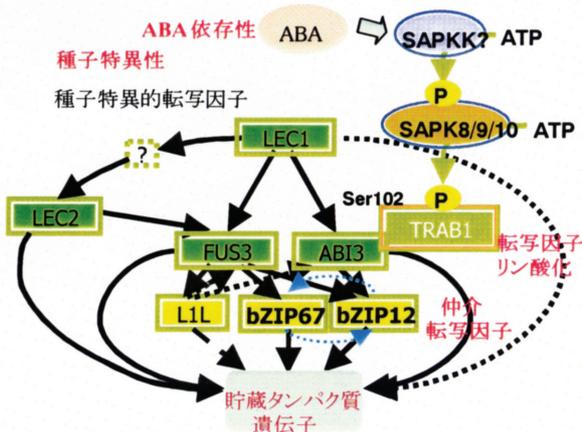


図3. 貯蔵タンパク質の種子特異的でABA依存的な高発現の制御ネットワーク

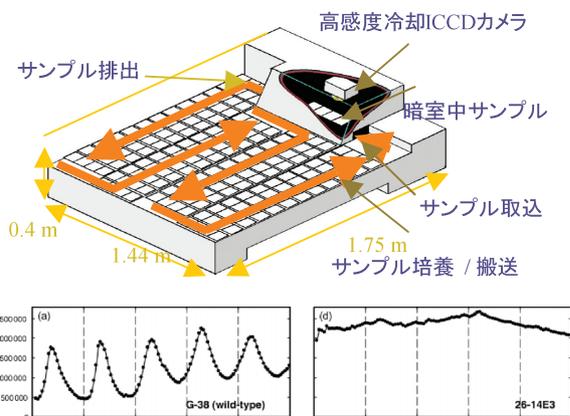


図4. 生物発光自動連続装置(上)とそれを用いて同定した無周期生物時計突然変異株(下;左一野生型株、右一変異株)

2-5. 植物の生物時計遺伝子:

藍色細菌時計タンパク質 KaiC の立体構造を始めとして解明した。高等植物用ハイスループット生物発光自動連続測定装置を開発してシロイヌナズナ時計変異体を網羅的にスクリーニングし、植物で初めての無周期変異体を含む計35株にのぼる変異体を

分離し、無周期変異体の3つの相補性群から、植物の「真の時計遺伝子」と思われる *ARI* のクローニングに世界で始めて成功した。(石浦正寛)

2-6. 器官形態と維管束系の形成制御:

葉の主脈形成に必須の AS2 は新奇タンパク質であり、茎頂メリステム特異的クラス1 KNOX 遺伝子の発現を抑制することを見出した。イネ種子形成過程でのデンプン合成系や貯蔵タンパク質の高効率遺伝子発現プロファイリングを行い、胚乳分化に重要と思われる遺伝子を同定した。(町田千代子、増村威宏)

3. 結論

シンク部位への栄養源供給に関わるトランスポーター、貯蔵物質への栄養分配や貯蔵物質の高効率発現に関わる未解明であった転写因子などの多くの新奇遺伝子を同定し、また植物の時計本体をコードすると思われる遺伝子が同定でき、これら遺伝子の形質転換体の解析が進んでいる。また、ポストゲノム研究に汎用性の高い新規技術・装置を開発した。

4. 主な発表論文

- (1) Tsukagoshi, H., Saijo, T., Shibata, D., Morikami, A. and Nakamura, K. (2005) Analysis of sugar response mutant of *Arabidopsis thaliana* identified a novel B3 domain protein with the EAR motif that functions as an active transcriptional repressor. *Plant Physiol.* 138: 675-685.
- (2) Masaki, T., Mitsui, N., Tsukagoshi, H., Nishii, T., Morikami, A. and Nakamura, K. (2005) ACTIVATOR OF *Spo^{min}::LUC1/WRINKLED1* of *Arabidopsis thaliana* transactivates sugar-inducible promoters (Rapid Paper). *Plant Cell Physiol.* 46: 547-556.
- (3) Sonoda, Y., Ikeda, A., Saiki, S., Von Wiren, N., Yamaya, T. and Yamaguchi, J. (2003) Distinct expression and function of three ammonium transporter genes (*OsAMT1;1-1;3*) in rice. *Plant Cell Physiol.* 44: 726-734.
- (4) Kagaya, Y., Hobo, T., Murata, M., Ban, A. and Hattori, T. (2002) Abscisic acid-induced transcription is mediated by phosphorylation of an abscisic acid response element binding factor TRAB1. *Plant Cell* 14: 3177-3189.
- (5) Onai, K., Okamoto, K., Nishimoto, H., Morioka, C., Hirano, M., Kami-ike, N., and Ishiura, M. (2004) Large-scale screening of *Arabidopsis* circadian clock mutants by a high-throughput real-time bioluminescence monitoring system. *Plant J.* 40: 1-11.

食糧危機および環境問題解決にむけた分子育種による植物の同化能力向上と悪環境耐性の付与

Plant Molecular Breeding for High Assimilation Potential and Stress Tolerance towards Food Security and Environmental Preservation

プロジェクトリーダー

佐野 浩 奈良先端科学技術大学院大学
遺伝子教育研究センター・教授



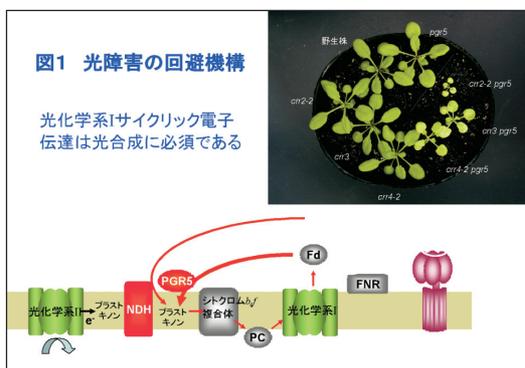
1. 研究目的

人類にとって21世紀の最大課題は「食糧危機と環境問題」の解決である。この両者は「生命の存続を危うくする問題」として捉えられる。その原因は地球の自浄能力を超えた人間の生活活動であり、その原因を取り除く方法の一つとして、遺伝子組換え技術を利用した植物の機能改良は有望である。それには二つの方向がある。第一は生理的に決められた同化能力の上限をさらに上昇させた品種の開発。それは従来の農業形態のままで、大幅な増産を可能にする。第二は従来の植物の持つ能力を十分に発揮させることで結果的に増産を達成する。例えば、病虫害による減収は40～60%に及ぶ。耐病虫害性の付与だけでも50%以上の増収が可能になる。こうした背景に基づいて、本研究の長期目標を「分子育種による植物の同化能力向上と悪環境耐性の付与」に置いた。具体的には、第一に同化系の律速段階（一連の反応系の中で一番遅くてネックになる部分）を明らかにし、その補強をめざす。第二に植物の機能改変をおこなう。こうした研究を緊急に行うことによって、できるだけ早く食糧危機と環境問題の解決を計った。

2. 研究成果概要

2-1. 同化機能研究分野：

炭素、窒素、硫黄などの同化反応は光エネルギー転換系で作られる還元力に依存する。同化反応を向上させるためには、還元力の上昇と再分配が必要であり、その分子機構を明らかにする。炭素固定能力の向上は全ての基礎になり、律速因子を同定して系の強化を計った。



(1) 光障害回避の機構：

シロイヌナズナ *pgr5* は、光化学系Iサイクリック電子伝達という、生理機能がよくわからなかった光合成電子伝達に関わる。このサイクリック電子伝達が、強光下あるいは、ストレス下など光化学系Iの電子受容体が欠乏する環境下で、熱散逸の誘導と光化学系Iの光障害回避に機能していることが明らかにした(図1)。

(2) 葉緑体機能の向上：

葉緑体FBPaseおよびSBPaseは、いずれも炭素の流れを制御する。SBPaseはRuBP再生の第一律速因子であること、FBPaseは固定した炭素をRuBP再生系とデンプン合成系に分配する重要な位置にあること、FBPaseは、シンク・ソース器官の炭素分配を制御すること、などを明らかにした(図2)。

図2 光エネルギーの利用効率向上

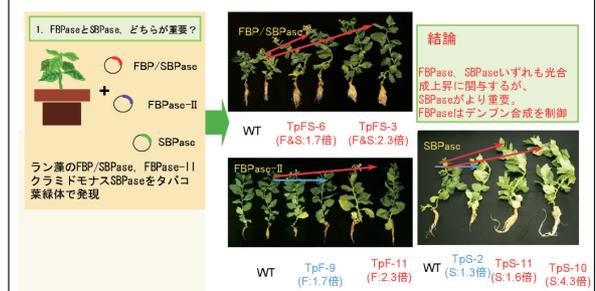


図3 ルビスコの改変

光合成ルビスコ遺伝子が枯草菌の生育をサポート



(3) 炭酸ガス固定酵素ルビスコの機能：

光合成における光エネルギー獲得反応の制御機構解明と炭酸ガス固定酵素ルビスコの構造活性相関研究を行った。また、ルビスコの構造活性相関研究から、枯草菌ゲノムにルビスコの化石遺伝子が存

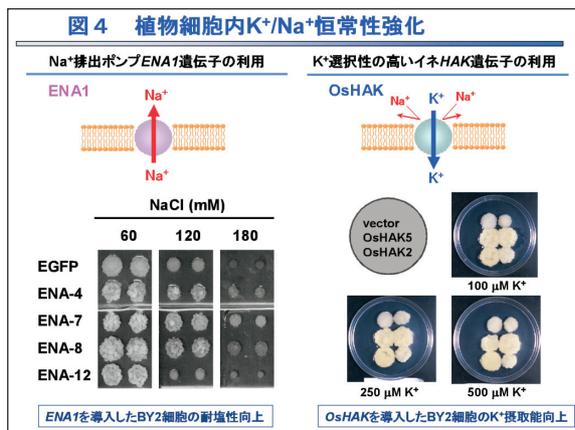
在し、光合成とはまったく関係のない代謝系で機能していることを見出した (図3)。

2-2. 分子育種分野:

病虫害や塩害・乾燥などストレスによる減収は40〜80%に及んでいる。それは作物種や栽培地を問わない。病虫害抵抗性は1遺伝子導入でも得られ、宿主植物へのエネルギー負荷も大きくはない。現実的に考えると当面の食糧増産にはこのアプローチが有効である。こうした植物は汚染の浄化にも利用できる。実用に供されている栽培作物を対象に抵抗性の付与をめざした。

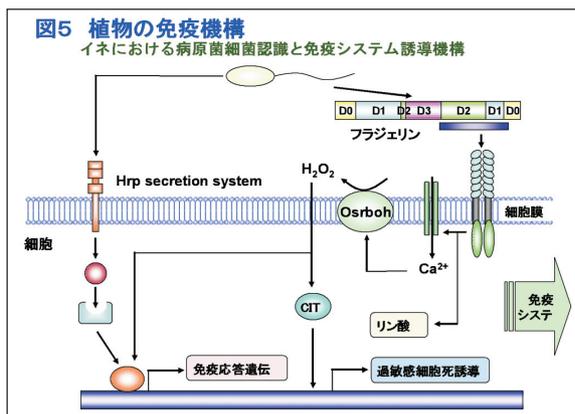
(1) 耐塩性植物の分子育種:

植物が受ける塩ストレスは、高浸透圧と Na⁺毒性による。Na⁺毒性ストレスに対する抵抗性を向上させる技術開発を目指した。Na⁺排出活性を有するイオン輸送分子 (Ena1)、および K⁺、Na⁺ 摂取に機能する輸送体分子群 (HKT、HAK) にかかわる遺伝子を導入することによってタバコ培養細胞の耐塩性を向上させられることを示した (図4)。



(2) イネの免疫機構:

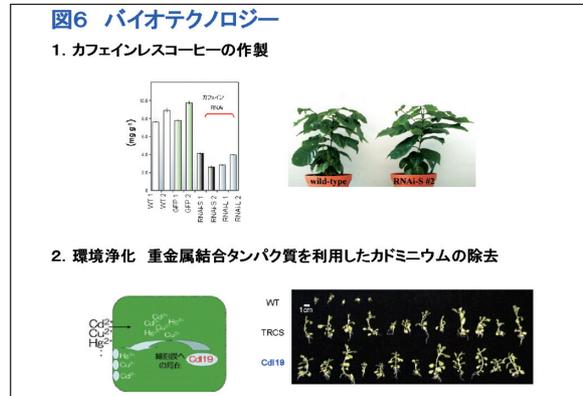
イネが *A. avenae* 非親和性菌株の鞭毛タンパク質フラジェリンを認識して免疫反応を誘導することを初めて明らかにした。フラジェリンの認識特異性にはフラジェリンのアミノ酸配列ではなく、糖鎖修飾が関与すること、この糖鎖はC末端側のスレオニン分子に結合していることを明らかにした (図5)。



(3) バイオテクノロジー:

重金属汚染を除去するために、シロイヌナズナよりカドミウム、水銀、銅などに結合するタンパク質遺伝子を単離、タバコに導入し、カドミウム耐性を確認した。カフェイン合成系に関する遺伝子群のRNAiでカフェイン合成を抑制、カフェインレスコーヒーを作成した。カフェイン合成遺伝子をタバコで発現、昆虫忌避を確認した (図6)。野外での遺伝

子流出を検証するために、アズキ/ヤブツルアズキの系を利用して交雑頻度を測定した。



3. 結論

ストレス耐性植物として除草剤抵抗性および害虫抵抗性の作物が実用化されているが対象はダイズ、トウモロコシなど商業作物に限られている。乾燥、塩害、傷害などに対する抵抗性付与は基礎研究の段階である。複合ストレスに対応するための多重遺伝子導入技術も基礎的な開発段階にある。また、同化能力の向上には還元力の上昇と再分配が必要だが、こうした視点からの研究も少ない。本研究はこうした諸問題を解明するため、体系的な実験系を組み、現在、世界で使用されている実用作物を材料とした分子育種の基礎と応用を開拓した。

4. 主な発表論文

- (1) Munekage Y, Hojo M, Meure J, Endo T, Tasaka M, Shikanai T (2002) *PGR5* is involved in cyclic electron flow around photosystem I and is essential for photoprotection in *Arabidopsis*. *Cell* 110: 361-371.
- (2) Munekage Y, Hashimoto M, Miyake C, Tomizawa K, Endo T, Tasaka T, Shikanai T (2004) Cyclic electron flow around photosystem I is essential for photosynthesis. *Nature* 429: 579-582.
- (3) Ashida H, Saito Y, Kojima C, Kobayashi K, Ogasawara N, Yokota A (2003) A functional link between RuBisCO-like protein of *Bacillus* and photosynthetic RuBisCO. *Science* 302: 286-290.
- (4) Horie T, Yoshida K, Nakayama H, Yamada K, Oiki S, Shinmyo A (2001) Two types of HKT transporters with different properties of Na⁺ and K⁺ transport in *Oryza sativa*. *Plant J.* 27: 129-138.
- (5) Suharsono U, Fujisawa Y, Kawasaki T, Iwasaki Y, Satoh H, Shimamoto K (2002) The heterotrimeric G protein alpha subunit acts upstream of the small GTPase Rac in disease resistance of rice. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:13307-13312.
- (6) Fujiwara S, Tanaka N, Takayama S, Isogai A, Che FS (2004) Rice cDNA microarray based gene expression profiling of the response to flagellin perception in cultured rice cells. *Mol Plant Microb Interact* 17: 986-998.
- (7) Suzuki N, Yamaguchi Y, Koizumi N, Sano H (2002) Functional characterization of a heavy metal binding protein Cd119 from *Arabidopsis*. *Plant J.* 32: 165-173.
- (8) Ogita S, Uefuji H, Yamaguchi Y, Koizumi N, Sano H (2003) Production of decaffeinated coffee plants by genetic engineering. *Nature* 423:823.

植物の生産性向上に向けた形態形成制御と代謝制御の分子機構の解明

Molecular Mechanisms on Regulation of Morphogenesis and Metabolism Leading to Increased Plant Productivity

プロジェクトリーダー

橋本 隆 奈良先端科学技術大学院大学
 バイオサイエンス研究科・教授



1. 研究目的

植物が蓄積する種特有の多様な低分子有機化合物（二次代謝産物）は古来より医薬、染料、香料、嗜好品などとして人類に利用されてきた。こうした有用代謝産物には化学合成や微生物による発酵生産が困難な化合物も多く、植物による効率的な生産が望まれている。分子育種による代謝産物の生産性向上のためには有用産物の生合成遺伝子のみならずそれら構造遺伝子群の発現を制御する分子機構の情報を蓄積することが重要である。一方、物質生産の場として植物形態をとらえた場合、代謝遺伝子の発現調節と器官・組織分化の関連を遺伝子レベルで理解し、植物形態の分子工学的改変により生合成を増大させる方策が考えられる。

本研究プロジェクトでは最新の分子生物学・分子遺伝学的手法を用いて代謝産物生合成とその制御の分子機構を解明し、物質生産の基盤となる形態形成の制御機構を分子解析することにより、植物による有用代謝産物の生産性向上と植物形態の改良に向けた分子基盤を確立することを目的としている。本研究プロジェクトによる代謝・形態制御機構の解明を通して、植物科学全般の発展に貢献する。

2. 研究成果概要

2-1. 代謝制御

- (1) タバコのコニコチン生合成の酵素遺伝子や輸送関連遺伝子をクローニングすることに成功し、傷害やジャスモン酸のシグナルが特異的な制御因子を介してニコチン生合成を制御する分子機構の詳細を明らかにした。
- (2) ベルベリンやシコニンの細胞内外への輸送機構を解明した。
- (3) フラボノイドやカンプトテシンについて遺伝子発現と代謝プロファイルの分子ネットワークを明らかにした。
- (4) フィトクロム発色団生合成遺伝子をクローニングし、代謝工学により新規生物活性をもつフィトクロムを産生するアラビドプシス植物体の光形態形成を調べた。

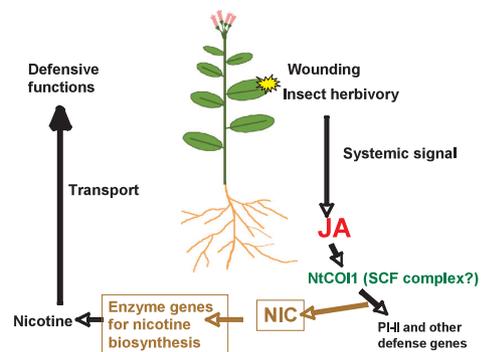


図1. ニコチン生合成の制御機構：
 葉への虫害や傷害によりジャスモン酸を介したシグナル伝達経路が活性化され、一般的防御反応がおこる。タバコではNIC制御因子による特異的シグナル経路によりニコチン生合成酵素やトランスポーターの遺伝子群が根で活性化される。合成されたニコチンは根から葉へ転流により運ばれて、防虫作用を発揮する。

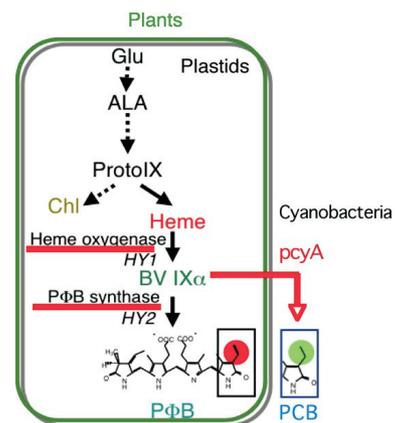


図2. 発色団の代謝工学：
 植物はP450合成酵素を最終反応としてフィトクロム発色団を合成し、特定波長の光を感じる。ラン藻のpcyAを代わりに発現させることにより、ラン藻型の光感受性をもつ植物を作ることができる。

2-2. 形態形成

- (1) 側根分化が異常な変異株を利用して、側根分裂組織形成の分子ネットワークを解明した。
- (2) 組織培養系を用いて、植物ホルモンによる不定根形成の変異株を多数取得し、変異遺伝子の解析から RNA 代謝が関与する不定根分化制御機構を解明した。
- (3) アブラナ科植物の自家不和合性で機能する花粉因子と柱頭因子、ならびに下流で機能する特異的キナーゼを明らかにし、種子形成の人為的制御の道を開いた。
- (4) イネの花芽分化を制御する遺伝子を同定した。
- (5) 活性酸素の成長促進効果の作用機構を明らかにした。

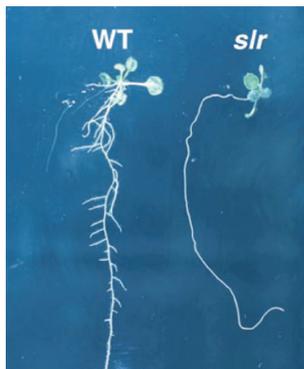


図3. オーキシン応答性 IAA14 が分解されないためにオーキシシグナルが正常に伝達されず側根分化の誘導がおこらない *slr* アラビドプシス変異株。サプレッサー変異株などの解析により、側根分化機構が明らかとなった。

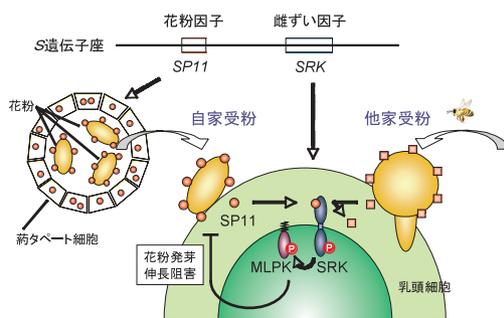


図4. 自家不和合の特異性を決定する S 遺伝子座には花粉側リガンド SP11 と雌ずい側のレセプター SRK が存在する。SP11/SRK を介したシグナル伝達には別のキナーゼ MLPK が必要であり、最終的に花粉の給水や発芽を阻害する。

3. 結論

アルカロイドを初めとする植物由来の低分子有用物質の生合成研究は世界的に益々活発に進められている。多くの生合成酵素遺伝子がクローニングされつつあるが、経路の特異的な発現制御や化合物の蓄積に関する分子生物学的知見は乏しい。本研究で明らかとなった発現制御機構や新規の蓄積関連遺伝子の解析をさらに発展させることにより、環境シグナルがどのように生理活性物質の合成を誘導し、さらに合成細胞から機能する細胞へどのように植物体内を移動するのかという、ダイナミックな代謝制御機構を研究する分野が今後急速に展開すると予想される。

また、オーキシンなどの植物ホルモンのシグナル伝達に機能する転写関連因子はかなり明らかになってきているが、その下流で側根などが分化誘導される分子機構は本研究により始めて解明されつつある。本研究成果を発展させることにより、植物ホルモンの下流で器官分化に直接関与する形態形成遺伝子群が明らかとなり、植物形態の人為的制御も可能になってゆくものと期待される。

4. 主な発表論文

- (1) T. Shoji, R. Winz, T. Iwase, K. Nakajima, Y. Yamada, and T. Hashimoto, Expression patterns of two tobacco isoflavone reductase-like genes and their possible roles in secondary metabolism in tobacco. *Plant Mol. Biol.* 50: 427-440, (2002).
- (2) C. Kami, K. Mukougawa, T. Muramoto, A. Yokota, T. Shinomura, J. C. Lagarias and T. Kohchi Complementation of phytochrome chromophore-deficient Arabidopsis by expression of phycocyanobilin:ferredoxin oxidoreductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 1099-1104, (2004).
- (3) N. Shitan, I. Bazin, K. Dan, K. Obata, K. Kigawa, K. Ueda, F. Sato, C. Forestier and K. Yazaki Involvement of CjMDR1, a plant MDR-type ABC protein, in alkaloid transport in *Coptis japonica*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 751-756, (2003).
- (4) H. Fukaki, Y. Nakao, Y. Okushima, A. Theologis, and M. Tasaka, Tissue-specific expression of stabilized SOLITARY-ROOT/IAA14 alters lateral root development in Arabidopsis. *Plant J.* 44: 382-395, (2005).
- (5) K. Murase, H. Shiba, M. Iwano, F.-S. Che, M. Watanabe, A. Isogai and S. Takayama A membrane-anchored protein kinase involved in Brassica self-incompatibility signaling. *Science* 303: 1516-1519, (2004).

植物における RNA 機能の不活化と遺伝子機能解析

RNA Silencing in Higher Plants and Functional Genomics

プロジェクトリーダー

佐藤 文彦 京都大学大学院生命科学研究科・教授



1. 研究目的

RNA 機能の不活化に基づいた新規な実用的遺伝子発現抑制技術 RNAi (RNA interference) 法を開発することにより、ゲノムプロジェクト等によって獲得した遺伝子情報から、植物遺伝子機能を迅速に同定する。さらに、RNAi 法により作製した遺伝子発現抑制植物個体を用いて高次の生命現象を解析する。また、RNA 機能の不活化の機構の解明により、次世代の遺伝子組換え技術の基盤を確立する。本研究で開発した RNAi 法とは、転写ならびに転写後の遺伝子発現抑制を引き起こすことにより遺伝子発現を特異的に阻害する手法である。

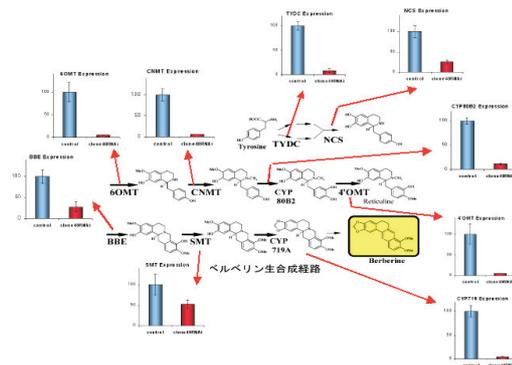


図 2. 転写因子遺伝子の一過的 RNAi による発現抑制と転写ネットワークの解析

2. 研究成果概要

2-1. 植物における簡便 RNAi 法の確立と、遺伝子発現抑制体を用いた高次の生命現象の解析:

有用アルカロイド・ベルベリン高生産オウレン細胞において、2 本鎖(ds)RNA を用いた一過的 RNAi 系を開発した。(佐藤文彦、福崎英一郎)

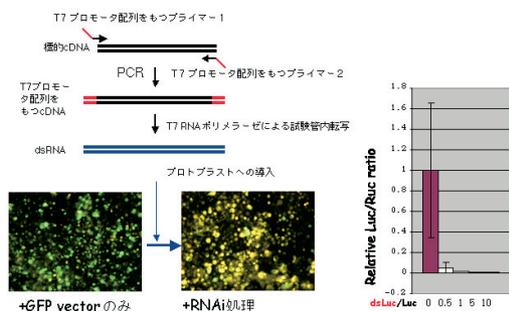


図 1. オウレンプロトプラストを用いた一過的 RNAi 法の開発

同手法を用いて、イソキノリンアルカロイド合成系に関与する転写因子遺伝子を新たに同定するとともに、転写ネットワークの解析を可能とした。(佐藤文彦)

2-2. ファミリー遺伝子に対する differential RNAi (dRNAi) ならびに包括的 RNAi の開発:

高等植物・緑藻に特異的な光化学系 II 酸素発生系 PsbP タンパク質遺伝子ファミリーやアントシアニン合成系カルコン合成酵素ファミリーに対して遺伝子特異的 3' UTR を標的とした dRNAi 法を適用することによりグループ遺伝子特異的発現抑制ができること、また、共通する保存配列に対する RNAi によってファミリー遺伝子全体の包括的発現抑制ができることを明らかにした。(佐藤文彦、福崎英一郎)

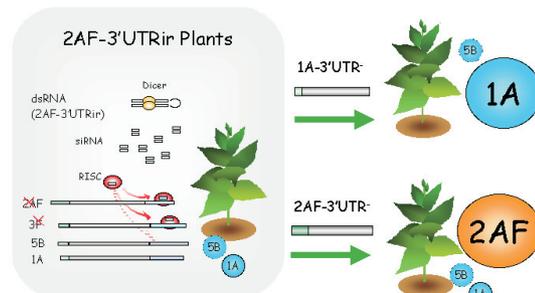


図 3. dRNAi の利用による分子置換体の作製

さらに、RNAi の配列特異性を利用し、標的配列を持たない発現ベクターの導入により遺伝子の実質的置換が可能であることを実証し、ファミリー遺伝子機能解析の新たな手法 (RNAi 分子置換法) を確立した。(佐藤文彦)

2-3. イネにおける簡便な RNAi ベクター系の開発:

Gateway system を用い、簡便に RNAi ベクターを構築する方法 pANDA を開発するとともに、RNAi 法がイネの耐病性、開花制御遺伝子の機能解析に有効であることを示した。(一色正之、島本功)

2-4. スプライス変異を利用した RNAi の量的制御:

スプライス変異を利用した RNAi ベクターを新たに開発し、植物特有の胚乳組織におけるアミロース合成遺伝子 Wx の発現を量的に調節できることを明らかにし、これを利用した汎用性の高いベクターの構築を行った。その結果、良食味米開発のターゲットである胚乳成分アミロースの量(もち性)を自在に制御できる事が可能になった。(伊藤紀美子)

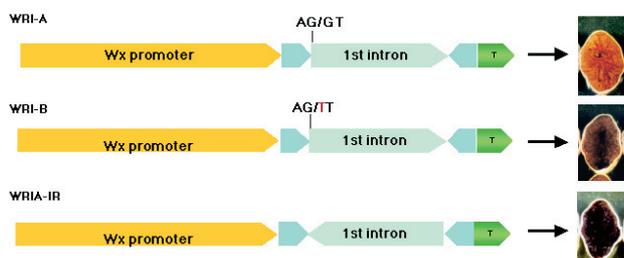


図4. スプライシング変異を利用した抑制効率の異なる胚乳特異的 RNAi ベクターの構築とコメもち性の制御

2-5. RNAi を用いた代謝の遮断と代謝中間体を蓄積する細胞系の確立:

RNAi により代謝の遮断を引き起こすことができるとともに、代謝中間体を蓄積する新奇有用細胞系を確立できることをイソキノリンアルカロイド合成酵素のひとつ berberine bridge 酵素をモデルに実証した。(佐藤文彦)

2-6. RNAi と DNA のメチル化の分子機構の解析:

シロイヌナズナの DNA 低メチル化突然変異 *dgm1* で誘発される発生異常を遺伝解析することにより、DNA メチル化の低下に伴って内在トランスポゾンや宿主遺伝子が抑制解除されることを明らかにした。さらに、シロイヌナズナよりもゲノム中の反復配列の割合が多いイネを用いて、低メチル化に伴い転写産物が顕著に増加するイネのレトロトランスポゾン様配列を同定した。(角谷徹仁)

2-7. RNA サイレンシング機能の抑制の分子機構:

農業上最重要ウイルスのひとつであるトマト黄化えそウイルスの機能未知タンパク質 NSs の RNAi 抑制活性を解析し、RNAi 抑制活性を支配する様々なアミノ酸残基を特定するとともに、NSs は RNA サイレンシングの複数のステップに関与していることを示唆した。また、*Red clover necrotic mosaic virus* にはウイルス複製と強くリンクした RNA サイレンシング抑制活性があることを示した。(三瀬和之、奥野哲郎)

3. 結論

植物細胞における実用的な RNAi 法 (dRNAi、包括的 RNAi、一過的 RNAi 等) を確立し、その利用によって、ゲノム情報の活用に必要な遺伝子機能の迅速同定を可能とするとともに、それぞれの遺伝子の機能ネットワークの解析を可能とした。さらに、RNAi 分子置換法などの開発により、合理的な分子育種による植物機能開発の基盤を確立した。また、RNA 機能の不活性化機構に関する多くの知見をえ、次世代遺伝子組換え技術を活用した植物生産性拡大の基盤を固めた。

4. 主な発表論文

- (1) Joseph G. Dubouzet, Takashi Morishige, Nanae Fujii, Chuang-Il An, Ei-ichiro Fukusaki, Kentaro Ifuku and Fumihiko Sato: "Transient RNA Silencing of Scoulerine 9-O-methyltransferase Expression by Double Stranded RNA in *Coptis japonica* Protoplasts", *Biosci. Biotech. Biochem.*, 69, 63-70, (2005).
- (2) Kentaro Ifuku, Yumiko Yamamoto, Taka-aki Ono, Seiko Ishihara, and Fumihiko Sato: "PsbP Protein, but not PsbQ Protein, is Essential for the Regulation and Stabilization of the Photosystem II in Higher Plants", *Plant Physiol.* 139, 1175-1184, (2005).
- (3) Ryosuke Hayama, Shuji Yokoi, Shojiro Tamaki, Masahiro Yano and Ko Shimamoto: "Adaptation of Photoperiodic Control Pathways Produces Short-day Flowering in Rice", *Nature* 422, 719-722, (2003).
- (4) Tetsu Kinoshita, Asuka Miura, Yeonhee Choi, Yuki Kinoshita, Xiaofeng Cao, Steven E. Jacobsen, Robert L. Fischer and Tetsuji Kakutani: "One-way Control of *FWA* Imprinting in *Arabidopsis* Endosperm by DNA Methylation", *Science*, 303, 521-523, (2004).
- (5) Masahiro Tatsuta, Hiroyuki Mizumoto, Masanori Kaido, Kazuyuki Mise and Tetsuro Okuno: "The *Red clover necrotic mosaic virus* RNA2 *trans*-activator is also a *cis*-acting RNA2 Replication Element", *J. Virol.* 79, 978-986, (2005).

植物細胞死および増殖制御因子の高次発現機構の解明

Studies of Intricate Mechanisms of the Regulatory Factors in Plant Cell Death and Proliferation

プロジェクトリーダー

内宮 博文 東京大学分子細胞生物学研究所・教授



1. 研究目的

植物は大地に根を張り、常に外界のさまざまなストレスに应答し、そのライフサイクルを完了する生命体である。その生命維持の諸過程には細胞の死と生という、一見相反する機構が複雑かつ厳密に制御されていると考えられる。植物は基本的には根と茎頂部に先端分裂組織を有し、その細胞増殖の制御により分化し、形作りを完了する。一方、組織形成過程において増殖を押さえ、遂には細胞を死に至らしめる事により植物への新機能を付与する遺伝的プログラムの存在も、最近明らかになりつつある。後者はいわゆるアポトーシス制御因子と総称される新規遺伝子の存在が推定されており、前者には、細胞周期をコントロールする極めて多様なタンパク質リン酸化機能を有する因子が関与する。本研究は、このような生命維持に必須な諸因子の高次機能を分子生物学的手法を用いて解明しようと計画された。すなわちアポトーシス制御因子や細胞周期の制御に関与する遺伝子を多数単離し、高等植物における細胞死や増殖の情報伝達の仕組みを明らかにした。あわせて、活性酸素消去系の制御による栽培植物への外的ストレス耐性の付与や、細胞寿命のコントロールによる作物生産性の向上、植物バイオマス生産の効率化に関与する基本因子が同定された。

2. 研究成果概要

- 2-1. 細胞死促進、抑制に関与する遺伝子を単離し、植物における具体的機能を明らかにした。細胞死の制御は活性酸素の消去と綿密な関係があるので、環境ストレス耐性における役割を明らかにした。さらにウイルスや病原菌等に対する抵抗性植物の育成を試みた。
- 2-2. 細胞周期の制御に関与する遺伝子を多数単離し、高等植物における細胞増殖の情報伝達機構を明らかにした。

- 2-3. タペート細胞は花粉の発育後期に細胞死を起こすが、それに伴い、花粉表面物質の供給が行われて花粉壁が完成する。葯の発育ステージ別にタペート細胞で発現誘導するプロモーターコレクションを作製し、タペート細胞の生死を人為的にコントロールした。
- 2-4. 植物細胞の生体膜を構成する脂質はトリエン脂肪酸 (TA) を特徴的に多く含んで含んでいる。葉緑体膜に由来するTAが、膜系を隔てた細胞膜に局在するNADPH オキシダーゼを活性化し、病害抵抗性獲得の端緒となるオキシダティブバーストを誘起することを確認した。

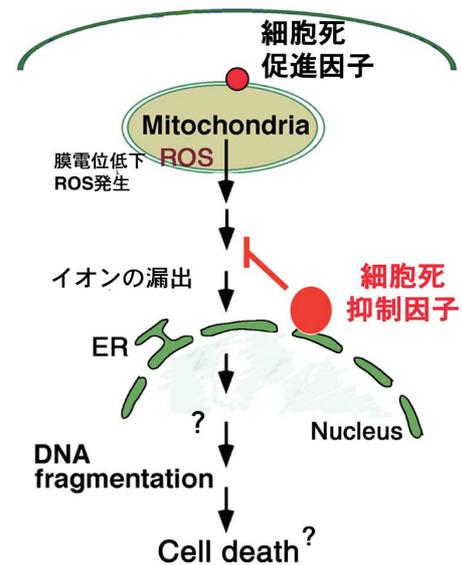


図1. 植物細胞死の制御：
植物細胞死が起きる際にミトコンドリアの膜電位の低下、活性酸素の生成、細胞外へのイオン漏出が検出された。植物から単離された細胞死抑制因子はイオン漏出を抑制し、細胞死を抑制した。

- 2-5. K トランスポーターとして分類されていた HKT/Ktr 系トランスポーターは植物において Na を植物内へ取り込む輸送体として機能することを見いだした。
- 2-6. ストレス応答や病原菌応答などにおいて栄養情報がいかに生長・老化の決定メカニズムに関わっているかを明白にするために、エチレン情報伝達系とグルコース情報伝達系のクロストークの分子メカニズムを明らかにした。以上の研究は、作物分子育種学への分子基盤となる新知見として有望である。

3. 結論

本研究は細胞がいかに生き、いかに死ぬか、そのメカニズムを物質的レベルで明らかにしようという基本的な考えのもとに遂行された。このため、細胞の分裂や分化を制御する遺伝子の解析、細胞の死をコントロールする因子を明らかにした。その研究成果は、生物生産の鍵ともいえるバイオマスのコントロール、病原菌や活性酸素などの発生に打ち勝つ環境抵抗性植物の作成、そして作物の老化や寿命の制御による新しい育種素材の提供を可能にし、多くの植物の改良に貢献するものである。

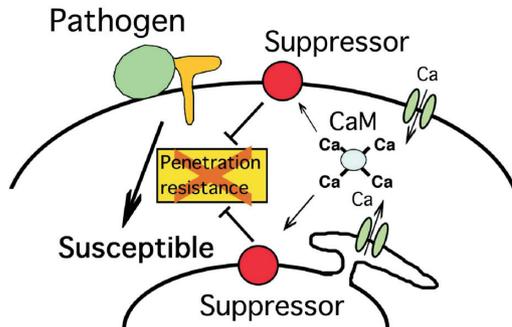


図2. 細胞死制御因子による病原菌への応答機構：病原菌により攻撃を受けた植物細胞では、カルシウムシグナルを介して応答反応を開始する。細胞死制御因子はこれらの制御にも関わっていることから、耐病性育種への利用が期待される。

バイオマスの積極的増産とその利用は、基盤となる原材料の安定的供給にとり欠くことの出来ない研究課題である。本研究の基礎的研究成果は、植物のもつ増殖能力をいかにして高めるか、葉や茎や根をいかに長生きさせて利用可能な状態を維持できるかという、植物生産上の基本的質問に答えるものであり、社会発展基盤への貢献は大である。

4. 主な発表論文

- (1) Kawai-Yamada, M., Jin, L., Yoshinaga, K., Hirata, A. and Uchimiya, H.: Mammalian Bax-induced plant cell death can be downregulated by over-expression of *Arabidopsis Bax Inhibitor-1 (AtBI-1)*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 98, 12295-12300, (2001).
- (2) Yamaguchi, M., Kato, H., Yoshida, Y., Yamamura, S., Uchimiya, H. and Umeda, M.: "Control of *in vitro* organogenesis by cyclin-dependent kinase activities in plants", *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 100, 13, 8019-8023, (2003).
- (3) Yanagisawa, S., Yoo, S.D., Sheen, J.: "Differential regulation of EIN3 stability by glucose and ethylene signaling in plants." *Nature* 425, 521-525, (2003).
- (4) Kawai-Yamada, M., Ohori, Y. and Uchimiya, H.: "Dissection of *Arabidopsis Bax inhibitor-1* suppressing Bax, hydrogen peroxide and salicylic acid-induced cell death" *Plant Cell* 16, 21-32, (2004).
- (5) Hayashi, M., Takahashi, H., Tamura, K., Huang, J., Yu, L.H., Kawai-Yamada, M., Tezuka, T., and Uchimiya, H. "Enhanced dihydroflavonol-4-reductase activity and NAD homeostasis leading to cell death tolerance in transgenic rice." *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 102, 7020-7025, (2005).

プロジェクトリーダー氏名索引

あ行

池中 一裕	40
板倉 光夫	8
井上 勲	46
井ノ上逸朗	2
猪子 英俊	12
上野 直人	38
内宮 博文	56
江見 充	14
遠藤 文夫	36

か行

金久 實	16
鎌田 博	44
鎌谷 直之	18
久原 哲	22

さ行

佐藤 文彦	54
佐野 浩	50
清水 信義	10
須田 年生	34

た行

武田 雅俊	24
谷 憲三朗	30
辻 省次	6

な行

中辻 憲夫	32
中村 研三	48
中村 祐輔	4

は行

橋本 隆	52
林 哲也	20

や行

吉田 進昭	28
-------------	----