

## 【基盤研究 (S)】

生物系 (総合生物)



### 研究課題名 大脳皮質の領野間相互作用を担う神経回路の細胞・シナプスレベルでの機能解明

九州大学・大学院医学研究院・教授

おおき けんいち  
大木 研一

研究分野: 神経科学

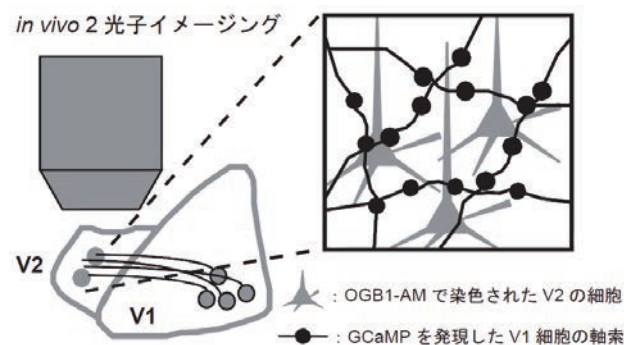
キーワード: 大脳皮質、視覚野、領野間相互作用、2光子イメージング、シナプス

#### 【研究の背景・目的】

大脳皮質における情報処理は、各領野における局所回路において行われているとともに、複数の領野間の相互作用においても行われている。視覚情報処理においては、一次視覚野から高次視覚野へのボトムアップの相互作用と、高次視覚野から一次視覚野(V1)へのトップダウンの相互作用が存在し、これらの双方向性の相互作用を介して情報処理が進められている。

このような領野間の相互作用は巨視的な相互作用として研究されてきたが、それを担う神経回路の細胞・シナプスレベルでの機能は研究されていない。本応募課題では①複数の領野への並列的な情報の分配、②複雑な反応選択性の形成、③注意による細胞の反応修飾について、他の領野から入力する軸索と、局所の細胞体の活動を、2光子イメージングにより同時に調べ、それらの間の相互作用を明らかにし、領野間相互作用のメカニズムの解明を目指す。

#### 【研究の方法】



#### 高次視覚野における入出力の同時イメージング

ボトムアップの相互作用 (課題①、②) について:

(1) V1 に GCaMP5g (カルシウム感受性蛍光タンパク) を持つアデノ随伴ウイルス(AAV)を感染させ、高次視覚野(V2)に OGB-1(カルシウム指示薬) を注入する。

(2) 高次視覚野(V2)で、V1 の軸索の活動と高次視覚野(V2)の細胞の活動を2光子イメージングにより同時に計測し、両者の相互作用を解明する。

#### V1 における入出力の同時イメージング

トップダウンの相互作用 (課題③) について:

(1) 高次視覚野に GCaMP5g を持つ AAV を感染させ、V1 に OGB-1 を注入する。

(2) V1 で、高次視覚野の軸索の活動と V1 の細胞の活動を同時に計測する。(上図の V1 と V2 を入れ替える)

#### 【期待される成果と意義】

大脳皮質の領野間をつなぐ軸索の2光子イメージングにより、領野間でどのような情報が伝えられているのかが、初めて見えるようになり、以下の諸問題が解決されると予想される。

- ①高次視覚野は複数あり、それぞれ異なる機能に特化している。一次視覚野からこれらの高次視覚野への情報の分配が、一次視覚野からの出力の段階でされているのか、出力は選択的でなく高次視覚野内の回路により必要な情報だけが選択されているのかを明らかにし、大脳皮質の領野間での情報分配メカニズムを明らかにする。
  - ②一次視覚野の神経細胞の比較的単純な反応選択性から、二次視覚野の神経細胞の比較的複雑な反応選択性が、どのように形成されるのかをシナプスレベルで明らかにする。
  - ③視覚的注意により、一次視覚野の神経細胞の反応が修飾されるメカニズムを明らかにする。高次視覚野から一次視覚野へのトップダウン入力が、視床から一次視覚野へのボトムアップ入力と、どのように相互作用するかを明らかにする。
- 以上3種類の領野間相互作用の解明を通じて、複数の領野にわたるグローバルな視覚情報処理のメカニズムを明らかにする。

#### 【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

- Ohki K, Reid RC. Specificity and randomness in the visual cortex. *Curr Opin Neurobiol.* 17, 401-7, 2007.
- Ohki K, Chung S, Ch'ng YH, Kara P, Reid RC. Functional imaging with cellular resolution reveals precise micro-architecture in visual cortex. *Nature.* 433, 597-603, 2005.

#### 【研究期間と研究経費】

平成 25 年度 - 29 年度  
96,700 千円

#### 【ホームページ等】

<http://www.physiol2.med.kyushu-u.ac.jp/kohki@med.kyushu-u.ac.jp>

## 【基盤研究 (S)】

### 生物系 (総合生物)



## 研究課題名 シナプス可塑性・神経機能と神経発達制御における IP<sub>3</sub>受容体の役割

理化学研究所・脳科学総合研究センター・  
発生神経生物研究チーム・チームリーダー

みこしば かつひこ  
御子柴 克彦

研究分野: 脳神経学

キーワード: IP<sub>3</sub>受容体、カルシウムシグナリング、神経可塑性、小胞体ストレス

### 【研究の背景・目的】

IP<sub>3</sub>は細胞内のセカンドメッセンジャーである。1983年にIP<sub>3</sub>が細胞内の袋からCa<sup>2+</sup>を出すことが報告されたが、その機構は全く不明であり、全世界中でIP<sub>3</sub>の標的分子を追い求めていた。申請者は行動異常を示す突然変異マウスを解析して欠落する膜蛋白質(P400)がIP<sub>3</sub>受容体であることを発見し、分子量約31万の巨大膜蛋白質の全構造を世界で最初に決定し(*Nature* 1989)、3種のアイソフォーム全構造も決定した(*Cell* 1993, *Receptors & Channels* 1994, *J.Biol.Chem.* 2007)。当時、IP<sub>3</sub>受容体はCa<sup>2+</sup>チャネルとは別分子と考えられていたが、精製して人工脂質二重膜へ組み込み、チャネルであることを証明した(*Nature* 1989)(*J.Biol.Chem.* 1991)。IP<sub>3</sub>受容体を阻害するとCa<sup>2+</sup>振動と受精が停止することから、Ca<sup>2+</sup>振動の発振装置であることを証明した(*Science* 1992)。受精後8細胞期の背側と腹側の決定(*Science* 1997, *Nature* 2002)や、神経の突起伸長に関わることを(*Science* 1998)示した。遺伝子欠損マウスを作製し発育障害や、成体では癲癇発作・小脳失調を示すこと(*Nature* 1996)、学習・行動やシナプス可塑性に異常がおきること(*Nature* 2000)を明らかにした。IP<sub>3</sub>受容体がレドックス(酸化・還元)制御(*Cell* 2005)や外分泌機能にも関わることを証明し(*Science* 2005)、更に小胞体ストレスが神経細胞を変性させるが、その際GRP78シャペロンとIP<sub>3</sub>受容体が協調して障害から神経細胞を防御していることを明らかにした(*Neuron* 2010)。また新しい技術開発により世界で最も感度の高いCa<sup>2+</sup>指示薬の作成(*Nature Methods* 2010, *PLoS One* 2010)と量子ドットにより、1分子動態の解析に成功した(*Neuron* 2009, *Science Signaling* 2012)。これらの技術を導入して新しい視点を加えて、IP<sub>3</sub>受容体の役割を解明する。

### 【研究の方法】

1. スパインの神経可塑性及び脳の発生・発達過程での機能解析。
2. 蛍光共鳴エネルギー移動法と近接場光及び量子ドットによる1分子イメージングを用いて機能分子の動態解析。
3. IP<sub>3</sub>受容体に関連したマイクロRNA(miRNA)による神経可塑性・発達の解析。
4. 小脳・海馬・大脳皮質神経細胞の電気生理学的解析
5. 背腹軸の形成や神経の発生・発達及び病態に関わるIP<sub>3</sub>受容体関連分子の探索

6. セカンドメッセンジャーとしてのIP<sub>3</sub>のインジケーター(指示薬)の改良
7. マクロピノサイトシスを介する神経成長円錐退縮による神経回路形成の制御機構の解明
8. IP<sub>3</sub>受容体の障害に伴う神経機能の障害解析  
a) タイプ1型IP<sub>3</sub>受容体とその病態解析  
b) 脳の部位特異的なタイプ1型IP<sub>3</sub>受容体欠損動物の作製及びその神経機能解析
9. IP<sub>3</sub>受容体の阻害剤の開発
10. 細胞膜を透過するカルシウム阻害剤の合成

### 【期待される成果と意義】

IP<sub>3</sub>受容体は小胞体に局在するCa<sup>2+</sup>チャネルで、細胞内のCa<sup>2+</sup>濃度を制御する重要な役割を果たす。脳を構成するニューロン、グリア細胞等で解明することにより、脳機能をIP<sub>3</sub>受容体カルシウムシグナルの視点から解析することにより、脳に障害がおきるその発症メカニズムをも明らかにすることができ、かつその発症予防と治療法の開発の為の基盤を確立しうる。更に申請者らが発見したIP<sub>3</sub>受容体から放出される3rdメッセンジャーとしてのIRBITは酸・塩基平衡を制御し、そのノックアウトマウスは強度な精神障害・認知障害を示すことから、全く新しい領域も開拓でき、IP<sub>3</sub>受容体の機能解明を大きく前進することが可能となる。

### 【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

- Furuichi T, Yoshikawa S, Miyawaki A, Wada K, Maeda N, Mikoshiba K. Primary structure and functional expression of the inositol 1,4,5-trisphosphate-binding protein P400. *Nature* 342(6245):32-8. (1989)
- Higo T, Hattori M, Nakamura T, Natsume T, Michikawa T, Mikoshiba K. Subtype-specific and ER luminal environment-dependent regulation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 by ERp44. *Cell* 120(1):85-98. (2005)

### 【研究期間と研究経費】

平成25年度-29年度  
166,000千円

### 【ホームページ等】

<http://www.brain.riken.jp/jp/faculty/details/29>

## 【基盤研究(S)】

### 生物系 (総合生物)



## 研究課題名 霊長類を含む哺乳動物の生殖エピゲノム形成機構

慶應義塾大学・医学部・教授

しおみ はるひこ  
塩見 春彦

研究分野: ゲノム科学、RNA生物学、生化学、分子生物学

キーワード: 転移因子、エピゲノム、RNAサイレンシング、生殖細胞

#### 【研究の背景・目的】

近年、20~30塩基長の小分子RNAが鍵となる遺伝子発現抑制機構が動植物で次々に明らかとなってきた。これら小分子RNAはArgonauteタンパク質と作動複合体(RNA induced silencing complex: RISC)を形成することで、この複合体を標的遺伝子にガイドする配列特異性決定因子として機能する。RISC複合体による遺伝子発現抑制機構を一般にRNAサイレンシングと呼ぶ。

分裂酵母ではArgonauteタンパク質とsiRNAを中核とする核内RISC複合体が特定クロマチン領域にヒストン修飾酵素を呼び込むことでヘテロクロマチン化が達成される。哺乳動物細胞においてもArgonauteはエピゲノム形成に関与するが、未だ、核内RISC複合体は同定されていない。生殖細胞特異的なArgonauteであるPiwiタンパク質は生殖細胞の発生/分化に必須の因子である。PiwiはpiRNAと複合体を形成し、転移因子の配列特異的なエピゲノム形成に関与する。この仕組みは種間で保存性が高いが、その分子機構は未だ不明である。

哺乳類核内Piwi-piRNA複合体(piRISC)の解析、霊長類特異的Piwiの解析、そして人工的に生殖細胞エピゲノムを改変する技術の開発をとおして、**霊長類を含む哺乳動物の生殖エピゲノム形成機構**の解明を目指す。

#### 【研究の方法】

モデル系としてマウス、コモンマーモセット、そしてヒト(組織と培養細胞)を用い、以下の3課題に重点的に取り組む。

1. 核内piRISC複合体の同定及びその機能解析: 生殖細胞の細胞質にはpiRNAに結合した機能的なpiRISCの形成を感知する仕組みがあり、“カラ”(piRNA free)のPiwiが核に移行することを防いでいる。したがって、Piwiの核移行メカニズムの解明は、“機能的なpiRISC”の実体を明らかにすることでもある。機能的なpiRISCの形成を感知する仕組みと核内piRISCそのものの同定を行う。さらに、同様の実験をマーモセットやヒトの材料を用いて行い、マウスと霊長類のpiRISC機能の差異を明らかにする。
2. 霊長類特異的なpiRISCの解析とその標的遺伝子探索: マウスには3種類のPiwiタンパク質が存在するが、霊長類では第4のPiwiが存在する。この第4のPiwiが形成する複合体の解析を行い、霊長類特異的な生殖細胞形成機構及び生殖エピゲノム形成機構

の解明をめざす。

3. 人工的に生殖細胞エピゲノムの改変を可能にする技術の開発: piRNAを産生するゲノム領域にはしばしば100塩基長程度のhot spotが存在する。hot spotの上流にはpiRNAの産生を誘導するシス配列が存在する。その配列を含む領域を用いることでhot spotを任意の配列で置き換え、人工piRNAとして哺乳動物生殖細胞で発現させるシステムの構築を用い行う。

#### 【期待される成果と意義】

ゲノムの転移因子領域が特異的にヒストンやDNAの修飾を受け抑制される機構はほとんど理解されていない。本研究はその特異性を決めているメカニズムの解明につながる。また、本研究は人工piRNA発現システムの構築につながり、生殖エピゲノムの人工改変を可能にする技術を生む。さらに、マウスではPiwi遺伝子変異は精子形成異常とそれに伴う不妊を引き起こす。霊長類Piwiの研究はヒト不妊症の発症分子機序の理解にも寄与する。

#### 【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

- "Biology of PIWI-interacting RNAs: new insights into biogenesis and function inside and outside of germlines" H. Ishizu, H. Siomi, & M.C. Siomi, *Genes Dev* **26**: 2361-2373 (2012)
- "How does the Royal family of Tudor rule the PIWI-interacting RNA pathway?" M.C. Siomi, T. Mannen, & H. Siomi, *Genes Dev* **24**: 636-646 (2010)
- "On the road to reading the RNA-interference code" H. Siomi, & M.C. Siomi, *Nature* **457**: 396-404 (2009)

#### 【研究期間と研究経費】

平成25年度-29年度  
167,800千円

#### 【ホームページ等】

<http://www.siomilab.med.keio.ac.jp/>



## 【基盤研究 (S)】

### 生物系 (総合生物)



#### 研究課題名 哺乳類概日振動体の構成的な理解

東京大学・大学院医学研究科・客員教授

うへだ ひろき  
上田 泰己

研究分野: 総合生物  
キーワード: 合成生物学

#### 【研究の背景・目的】

我々はこれまでに哺乳類概日振動体を構成する転写あるいはタンパク質ネットワークの解析を行い、転写ネットワークの設計様式が時間遅れをもった負のフィードバックであることを実験的に示してきた[文献 1]。

しかしながら、転写翻訳に基盤をおく機構は、概日時計を特徴づける周期長の温度非依存性(概日時計の 24 時間周期が反応温度によらずほぼ一定の性質)を説明することは難しい。転写、翻訳、タンパク質分解の速度は一般的に反応温度に強く依存する過程だからである。興味深いことに、我々は CKI $\epsilon/\delta$  によるリン酸化反応が哺乳類概日周期長決定における律速過程であり、かつ温度非依存的な反応速度を示すことを見出した[文献 2]。さらに理論的な側面からは、温度非依存的な振動子が、可逆的なリン酸化過程のみから構築可能であることを示している[文献 3]。

これらの結果に基づき、本研究計画では、CKI $\epsilon/\delta$  の温度非依存的なリン酸化速度の分子機構の理解に基づいて、温度補償された自律的振動子を設計することを目指す。

#### 【研究の方法】

CKI $\epsilon/\delta$  反応速度の温度補償機構を知るために、粗過程の反応速度を異なる温度条件で測定する。つまり、1) 酵素と基質の結合、2) リン酸基の基質への転移、3) リン酸化産物と酵素の解離の各過程である。ほとんどの酵素的な反応は、原理上は逆反応も生じうることを踏まえて、CKI $\epsilon/\delta$  についても逆反応にも着目

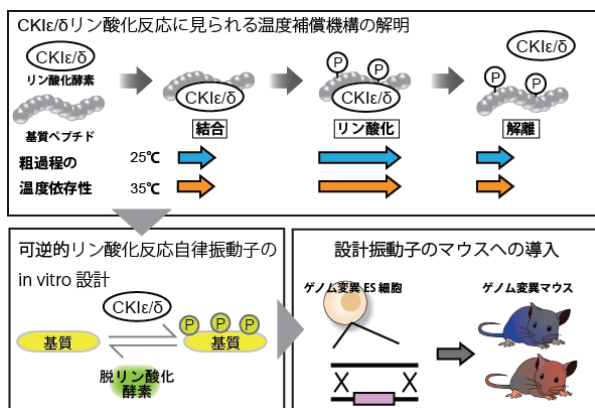


図 1 堅牢な振動子の設計

して解析する。これらの結果に基づき、温度補償性を成立させるために重要な反応ステップを明らかにする。次に、CKI $\epsilon/\delta$  を用いて、試験管内での可逆的リン酸化反応に基づく自立振動子を設計する。このために、概日振動子において重要な役割を果たすリン酸化基質や脱リン酸化酵素の探索を行い、リン酸化振動子の構成要素に加える。

最後に、温度補償された周期的なリン酸化振動の反応様式をマウス個体内に導入する。これは、近年確立された、遺伝子組換えマウスの高効率作成法を用いて遂行する。

#### 【期待される成果と意義】

CKI $\epsilon/\delta$  リン酸化反応における温度補償性の分子機構の解明は、概日時計周期長を遺伝的あるいは薬理的に制御するうえで重要な知見をもたらすであろう。また、酵素反応速度の堅牢性を担保するしくみについての新たなコンセプトを提示することに繋がると期待される。

自律的制御された堅牢な酵素反応動態を、それを構成する粗過程の詳細な測定結果をもとにしながら、試験管内および生体内で設計することは、複雑で動的な生命システムを、組み上げながら理解する(構成的アプローチによる理解)一つの成功例となるだろう。

#### 【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

1. Ukai-Tadenuma et al, Delay in feedback repression by Cryptochrome 1 is required for circadian clock function. *Cell*, 144, 268-281 (2011)
2. Isojima et al, CKI  $\epsilon/\delta$ -dependent phosphorylation is a temperature-insensitive, period-determining process in the mammalian circadian clock. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106, 15744-15749 (2009)
3. Jolly et al, A design principle for a post-translational biochemical oscillator. *Cell Reports*, 2, 938-950 (2012)

#### 【研究期間と研究経費】

平成 25 年度 - 平成 29 年度  
159,300 千円

#### 【ホームページ等】

<http://sys-pharm.m.u-tokyo.ac.jp/>

## 【基盤研究 (S)】

生物系 (生物学)



### 研究課題名 トランスポゾン侵略から生殖細胞ゲノムをまもる piRNA 動作原理の統合的理解

東京大学・大学院理学系研究科・教授

しおみ みきこ  
塩見 美喜子

研究分野: 生物学

キーワード: PIWI、piRNA、トランスポゾン、RNAサイレンシング、ショウジョウバエ

#### 【研究の背景・目的】

20-30塩基長の小分子RNAによる遺伝子発現抑制機構をRNAサイレンシングと呼ぶ。正しい遺伝情報を次世代へと受継ぐ使命を担う生殖細胞では、PIWI-interacting RNA (piRNA) がDNA損傷を引き起こす転移性因子トランスポゾンからRNAサイレンシングを介して生殖細胞のゲノムをまもると同時に生殖組織の分化を正常に導く。しかし、その動作原理は未だ不明である。本研究では、piRNAによるトランスポゾン発現制御機構の全貌を、学際的先端技術を相互創出しつつ理解することを目指す。特に、piRNA生合成とpiRNAによる核内サイレンシングの仕組みに焦点を絞り、これまでのpiRNA研究を通して培った研究基盤や成果を活かしつつ本研究を進展させる。不妊治療など応用へつなげる。

#### 【研究の方法】

piRNAによるトランスポゾン発現制御機構の全体像を、次世代シーケンサーや電顕、ライブイメージングなど学際最先端技術を相互創出しつつ、生化学・細胞生物学・生物情報学的側面から包括的に理解する事を目指す。[I] piRNA生合成機構: 生殖組織体細胞第一次piRNA生合成、生殖組織生殖細胞第一次piRNA生合成とPing-Pongサイクルの三経路それぞれに焦点をあて解析する。[II] piRNAによる核サイレンシング機構: piRNAによるエピジェネティック転写制御の動作原理をPiwi, Mael, SpnEに焦点をしばりつつ解析をすすめる。さらに、[III] 人工piRNA依存的に特定遺伝子の発現を制御する系を確立し、その最適化を目指す。研究材料としては主にショウジョウバエ卵巣由来体細胞株OSCとカイコ卵巣由来生殖細胞株BmN4を用いる。

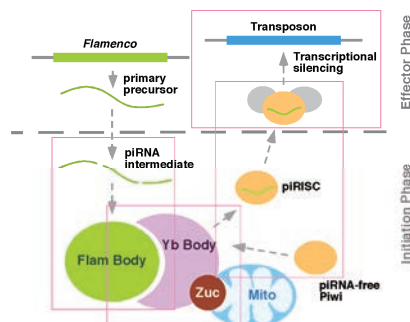


図: OSC-piRNA生合成機構と核サイレンシング機構 (モデル)

#### 【期待される成果と意義】

応募者らは、ここ十年余りRNAサイレンシングの基礎研究に従事し第一線に位置しつつ当該分野の発展に大きく貢献してきた。解析には欠かせない高品質なモノクローナル抗体作製の技術・経験をもつこと、解析に有用な培養細胞株OSCを独自で樹立し保持していることなどを優位性要因として挙げることが出来る。また、生化学・細胞生物学・遺伝学的手法のみならず、次世代シーケンサーや最新のバイオインフォマティクスを取り入れた学術統合的な解析をすすめる点、特色があり独創的であるといえる。この事実はこれまでの研究成果に大きく反映されている。今後もこれまでに培った研究基盤を活かしつつ、さらに研究を進展させるため、多大な成果を期待できる。piRNA研究は、siRNAやmiRNA研究に比較して出発が遅れたため、また生殖組織特異的であるため研究が遅々としており未解決な部分を多く残す。この状況の打破を目指す本研究の意義は大きい。今後不妊の解明や診断・治療など応用面につながる可能性も充分高く、本研究への期待度は大きい。

#### 【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

- Saito K, Inagaki S, Mituyama T, Kawamura Y, Ono Y, Sakota E, Kotani H, Asai K, Siomi H, Siomi MC. A regulatory circuit for piwi by the large Maf gene traffic jam in Drosophila. *Nature* 461: 1296-1301. 2009
- Nishimasu H, Ishizu H, Saito K, Fukuhara S, Kamatani MK, Bonnefond L, Matsumoto N, Nishizawa T, Nakanaga K, Aoki J, Ishitani R, Siomi H, Siomi MC\*, Nureki O\*. Structure and function of Zucchini endonuclease in piRNA biogenesis. *Nature* 491: 284-289. 2012 (\*double corresponding)

#### 【研究期間と研究経費】

平成25年度-29年度  
160,300千円

#### 【ホームページ等】

<http://www-siomilab.biochem.s.u-tokyo.ac.jp/index.html>

## 【基盤研究 (S)】

### 生物系 (生物学)



## 研究課題名 プロテアソームの動態と機能制御機構の解明

東京大学・大学院薬学系研究科・教授

むらた しげお  
村田 茂穂

研究分野: 生物科学、機能生物化学

キーワード: 細胞内タンパク質分解

### 【研究の背景・目的】

プロテアソームは細胞内の主要なタンパク質分解酵素であり、主としてユビキチン化されたタンパク質を分解することにより、細胞周期、転写制御、シグナル伝達、タンパク質品質管理をはじめとした細胞中の様々な生命活動において必須の役割を担っている。

近年、がん、神経変性疾患、代謝異常、ES 細胞や iPS 細胞の多能性維持、初期胚発生、老化、個体の寿命など、ヒトの主要な疾患や生理作用において、プロテアソームの量や活性の亢進あるいは低下が密接に関与していることが明らかになってきた。実際、プロテアソームの発現や機能が異常亢進しているがんに対して、プロテアソーム阻害剤が新しい分子標的薬として脚光を浴びている。しかし、プロテアソームの発現や活性がどのように制御されているのか、その具体的な分子機構はほとんど分かっていない。

本研究では、プロテアソームを制御する分子機構を明らかにし、プロテアソーム機能の破綻により病態に至るメカニズムの解明を目指す。

### 【研究の方法】

#### (1) プロテアソームの分子集合機構の解明

プロテアソームは 33 種類 (合計 66 個) のサブユニットから構成される複雑かつ緻密な複合体である。どのようにその組み立てが行われているのか、分子機構を解明する。

#### (2) プロテアソームの転写機構の解明

プロテアソーム機能阻害時にストレス応答性転写因子 Nrf1、Nrf2 がプロテアソームサブユニット群の転写を一斉に促進することが知られるが、平常時の責任転写因子は不明である。この因子の同定を目指す。

#### (3) プロテアソームの細胞内動態の解析

プロテアソームは細胞の状態によって局在を変化させることが知られており、病態に関与している可能性が考えられる。癌では核に集積する一方、正常細胞では核と細胞質に均等に分布する。どのような機構でプロテアソームの局在が制御されているのか、また局在を変化させる生理的意義を明らかにする。

#### (4) プロテアソーム機能低下と病態

私たちはプロテアソーム機能低下を示すマウスの作製に成功しており、早期老化、ミトコンドリア形態異常、代謝異常など様々な病態を示すことを見出している。プロテアソーム機能低下によりどのよう

な分子機構でこれらの病態に至るのかを明らかにする。

### 【期待される成果と意義】

大半のがん細胞においてプロテアソームの発現と機能が亢進していることが知られている。一方、老化にともなってプロテアソーム機能が低下することも知られており、プロテアソーム機能を高めると寿命が延長することがショウジョウバエや線虫を用いた研究で観察されている。すなわち、プロテアソーム機能の低下が老化に伴って引き起こされる様々な病態の主因である可能性が考えられる。プロテアソームサブユニット群の転写、分子集合、局在変動はプロテアソーム機能を左右する主要な制御過程であり、これらの分子機構を解明することによりプロテアソームの活性を人為的に適正化させる創薬につながることを期待できる。将来的にはプロテアソーム機能の高低が大きく関与しているがん、神経変性、老化に伴う疾患など、多くのヒトの疾患の治療に大きく貢献できる可能性がある。

### 【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

- Sasaki K, Hamazaki J, Koike M, Hirano Y, Komatsu M, Uchiyama Y, Tanaka K, Murata S. PAC1 gene knockout reveals an essential role of chaperone-mediated 20S proteasome biogenesis and latent 20S proteasomes in cellular homeostasis. *Mol Cell Biol* 20, 3864-3874, 2010.
- Kaneko T, Hamazaki J, Iemura S, Sasaki K, Furuyama K, Natsume T, Tanaka K, Murata S. Assembly pathway of the mammalian proteasome base subcomplex is mediated by multiple specific chaperones. *Cell* 137, 914-925, 2009.

### 【研究期間と研究経費】

平成 25 年度 - 29 年度  
133,200 千円

### 【ホームページ等】

<http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~tanpaku/>



## 【基盤研究（S）】

生物系（生物学）



### 研究課題名 可視化による膜交通の分子機構の解明と植物高次システムへの展開

東京大学・大学院理学系研究科・教授 なかの あきひこ  
**中野 明彦**

研究分野： 生物学

キーワード： オルガネラ形成・動態、膜交通

#### 【研究の背景・目的】

膜交通（図1）は、細胞内のさまざまなオルガネラの間で、小胞の出芽、繫留・融合などを通じてタンパク質の選別輸送を行う過程である。その分子機構について、重要な未解明の問題に加え、最近の研究の進展によってさらに新たな謎が次々に生まれ、解決が待たれている。本研究では、応募者等が自ら開発した超解像ライブイメージング顕微鏡を駆使し、生きた細胞の中で起こっている現象を精密に観察し、定量し、操作する方法論を推進する。優れた実験系である出芽酵母を用いた研究に加え、植物の形態形成や環境応答反応において重要な役割を果たす膜交通の意義を理解する。

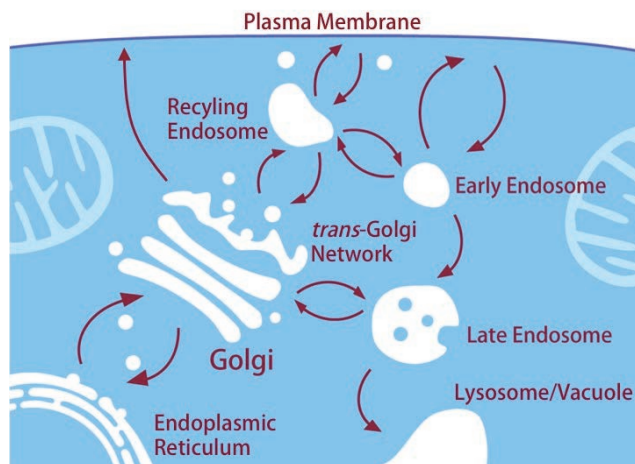


図1. 細胞内膜交通

#### 【研究の方法】

膜交通の選別分子機構の解明については、主に酵母を材料に用い、超解像共焦点ライブイメージング顕微鏡（SCLIM）をさらに高性能化し、これを駆使して、未解決の多くの謎を解決していく。また、植物における膜交通に関しては、植物を用いる利点（ゴルジ体の独立性と明瞭な層板構造、ポストゴルジ交通網の分業化など）を大いに生かすとともに、膜交通が組織レベル、個体レベルでの高次機能で果たす生理的な意義に結びつける研究を、シロイヌナズナやタバコを材料にして進める。

1. 膜交通の可視化による選別分子機構の解明：主に酵母を材料に用い、開発した超解像共焦点ライブイメージング顕微鏡（SCLIM）をさらに高性能化し、これを駆使して次のような研究を進める。

- (1) ゴルジ体槽成熟の分子機構
- (2) 小胞体からゴルジ体を形成する分子機構
- (3) ポストゴルジ交通網
- (4) 共焦点レーザー顕微鏡の改良開発

2. 植物における膜交通の研究：植物の利点を生かしたメカニズム研究を進めると同時に、膜交通が組織、個体レベルでの高次機能で果たす役割を理解する。

- (1) Rab5 GTPase をツールとした植物膜交通研究
- (2) 植物のゴルジ体と TGN が担う膜交通の制御
- (3) 細胞極性形成と維持

#### 【期待される成果と意義】

私たちは、これまで出芽酵母を材料にした研究で、膜交通の分子機構の解明に大きく貢献し、またスピニングディスク式共焦点スキャナと超高感度カメラシステムの組み合わせによって、超高速・超高解像のライブイメージング顕微鏡を自ら開発してきた。本研究ではさらに、動態を観察するばかりでなく、キネティックスや相互作用の定量、そしてさらには摂動操作を加えた可視化の方法論を精力的に進めていく。膜交通の意義を植物の多細胞システムの中で理解していこうという研究も、本研究の大きな特徴である。動物とは大きく異なる進化を遂げた植物であるが、細胞極性の形成と維持にはやはり膜交通のリサイクリングが決定的に重要であり、分化の可塑性、無限成長の可能性を秘めた植物ならではの、個体における役割の理解に大胆に迫っていく。

#### 【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

- ・ A. Nakano and A. Luini (2010). Passage through the Golgi. *Curr. Opin. Cell Biol.* 22:471-478.
- ・ Y. Suda and A. Nakano (2012). The yeast Golgi apparatus. *Traffic* 13:505-510.
- ・ T. Ueda, M. H. Sato, and T. Uemura (2012). The role of Rab GTPases and SNARE proteins in plant endocytosis and post-Golgi trafficking. *Endocytosis in Plants* (ed. J. Samaj). pp. 201-216, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.

#### 【研究期間と研究経費】

平成 25 年度－29 年度  
159,500 千円

#### 【ホームページ等】

<http://www.biol.s.u-tokyo.ac.jp/users/hasseipl/H/P/japanese/index.html>

## 【基盤研究 (S)】

生物系 (生物学)



### 研究課題名 中心体に依存しない微小管による細胞構築の研究

理化学研究所・発生・再生科学総合研究センター・  
グループディレクター

たけいち まさとし  
竹市 雅俊

研究分野： 細胞生物学

キーワード： 細胞構造・機能、細胞骨格・運動、微小管、細胞極性、細胞接着

#### 【研究の背景・目的】

微小管は、細胞の形態や動態に様々なかたちで関与する重要な構造体である。動物細胞の微小管は、細胞周期間期において、中心体から重合する成分とそれ以外の成分とに分けられ、上皮や神経細胞の微小管は主として後者から成る(図1)。中心体による微小管重合の制御機構については多くの知見が集積しているが、中心体に依存しない微小管に関しては、伸長機構、特性などについて未だ謎が多い。近年私達は、微小管のマイナス端に結合する新分子 *Nezha/CAMSAP3* を同定し、これが、中心体とは独立に微小管重合を制御していることを明らかにした。本研究では、*Nezha/CAMSAP3* および関連分子 (*CAMSAP1*, *CAMSAP2*) が上皮細胞や神経組織において微小管ネットワークを構築するしくみ、そして、このネットワークが、微小管に依存するとされる細胞極性、細胞接着、細胞移動など種々の細胞現象に果たす役割を明らかにする。

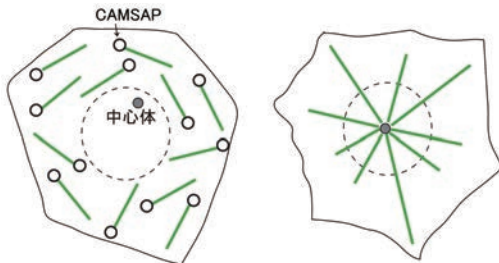


図1. 中心体由来微小管と CAMSAP 由来微小管。細胞タイプによってその割合は異なる。

#### 【研究の方法】

上皮細胞の構築に関しては、生体の腸上皮、及び、腸上皮由来の細胞株をモデルとして、極性構築、微小管パターン形成等における CAMSAPs の役割を遺伝子ノックアウト等の技術を用いて解析する。神経組織構築に関しても同様な方法を用い、神経細胞の移動、大脳皮質の構築等における CAMSAPs の役割について研究する。

細胞間接着における CAMSAPs の役割に関しては、上皮細胞株を用いて研究する。とくに、モータータンパク質 *KIFC3* が *CAMSAP3* に依存して細胞接着部位に移動することを見出しているため、*KIFC3* が運搬する分子を同定し、その機能を明らかにする。また、CAMSAPs がどのように微小管マイナス端に結合し、その重合を維持するか、分子生物学的研究を展開する。

#### 【期待される成果と意義】

細胞の構築・機能における微小管の役割は、現在考えられているほど単純ではない。中心体依存・非依存微小管の比較研究を通じて、細胞周期間期における微小管機能の真の姿を明らかにする。特に、上皮組織、神経組織の構築における微小管の役割、細胞接着の微小管による制御、細胞の移動・運動・オルガネラ輸送等における中心体依存・非依存微小管の役割分担等について新知見がもたらされると期待している。研究の進捗状況に応じて、微小管が関与するとされる他の細胞現象についても解析し、その成果を通じて微小管生物学に新潮流を生み出す。

#### 【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

- Meng, W., Mushika, Y., Ichii, T., and Takeichi, M. (2008) Anchorage of microtubule minus-ends to adherens junctions regulates epithelial cell-cell contacts. *Cell* 135, 948-959.
- Tanaka, N., Meng, W., Nagae, S., and Takeichi, M. (2012) *Nezha/CAMSAP3* and *CAMSAP2* cooperate in epithelial-specific organization of non-centrosomal microtubules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 109, 20029-20034.

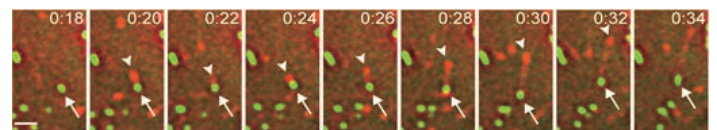


図2. CAMSAP (矢印) から微小管プラス端 (矢尻; EB1 コメット) が伸びる様子をタイムラプス撮影により捉えた像。

#### 【研究期間と研究経費】

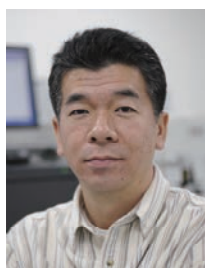
平成 25 年度 - 29 年度  
166,000 千円

#### 【ホームページ等】

<http://www.cdb.riken.go.jp/ctp/>



【基盤研究 (S)】  
生物系 (生物学)



研究課題名 翻訳後修飾ペプチドを介した植物形態形成の分子機構

基礎生物学研究所・細胞間シグナル研究部門・教授

まつばやし よしかつ  
松林 嘉克

研究分野: 基礎生物学

キーワード: 翻訳後修飾、ペプチドホルモン、形態形成、リガンド、受容体、糖鎖

【研究の背景・目的】

細胞間シグナル分子と細胞膜上の受容体を介した細胞間情報伝達は、植物を含む多細胞生物のかたちづくりを支える重要なしくみのひとつである。個々の細胞の性質をごく僅かな量で大きく変化させることができる細胞間シグナル分子を見つけ出すことは、植物形態形成の理解および植物成長の化学制御の観点から極めて重要な課題であるが、多数の細胞外分子群の中から重要なシグナル分子を見出すことは容易ではない。そこで我々は翻訳後修飾ペプチドに注目する。分泌型ペプチドにはしばしば見出される翻訳後修飾ペプチドの生合成には、ATPを消費してつくられる基質や専用の酵素が必要であり、通常のペプチドよりも高いエネルギーコストが必要である。それにも関わらず翻訳後修飾というしくみが進化的に保存されてきたのは、コストを上回る生理的メリットがあったからであろう。すなわち翻訳後修飾ペプチドには重要な生理機能が付与されている可能性が高い。また、翻訳後修飾酵素の欠損株では、その基質となっているすべてのペプチドの修飾が行なわれなくなるため、その表現型から未知の重要なペプチドシグナルの存在を知ることができる。

本研究では、分泌型ペプチドの翻訳後修飾酵素の同定と、その欠損株の表現型を主な手がかりとして、植物における新しいペプチドシグナルの探索を行なう。さらにそれらシグナルの受容体の同定や下流情報伝達経路の解析を基軸として、植物形態形成のしくみの解明に取り組む。

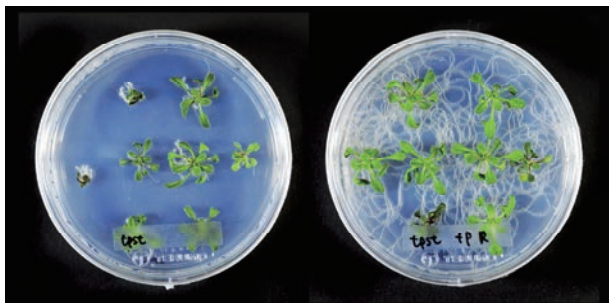


図1 新規ペプチドシグナルの培地添加による表現型回復の例

【研究の方法】

遺伝子重複の壁を突破し、これまで見過ごされてきた新しいペプチドシグナル経路を明らかにするために、以下の課題に取り組む。(1) 植物の分泌型ペプチドにおける翻訳後修飾の代表例は、チロシン残

基の硫酸化とヒドロキシプロリン残基のアラビノシル化である。前者を担う酵素は同定済みであるため、後者に関与する酵素の同定を行なう。(2) 翻訳後修飾酵素の欠損株を作成し、その表現型解析を行なう。シロイヌナズナに限定せず、ボディープランの異なる様々な植物種について解析する。(3) 観察された表現型の原因となっているペプチドシグナル分子を、配列情報、発現パターンなどによって絞り込み、構造解析と化学合成、生物検定などを駆使して同定する。(4) 受容体の同定や下流情報伝達経路の解析を進め、新しい植物形態形成メカニズムの解明を目指す。

【期待される成果と意義】

シグナル分子やその受容体は、植物成長における細胞間シグナリングのマスターレギュレーターとして下流で機能する多数の遺伝子群の発現に影響を与え、直接的あるいは間接的に植物の栄養吸収器官や光合成器官の数および形やサイズを支配している。こうしたシグナル分子の同定や作用機構の解明は、基本的な植物成長メカニズムの理解の深化に加え、化学的に植物成長を調節するためのターゲット探索として大きな意義がある。

【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

- Matsuzaki Y., Ogawa-Ohnishi M., Mori A. and Matsubayashi Y. Secreted peptide signals required for maintenance of root stem cell niche in *Arabidopsis*. *Science* 329, 1065-1067 (2010).
- Komori R., Amano Y., Ogawa-Ohnishi M. and Matsubayashi Y. Identification of tyrosyl-protein sulfotransferase in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 15067-15072 (2009).
- Ohyama K., Shinohara H., Ogawa-Ohnishi M. and Matsubayashi Y. A glycopeptide regulating stem cell fate in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Chem. Biol.* 5, 578-580 (2009).

【研究期間と研究経費】

平成 25 年度 - 29 年度  
161,400 千円

【ホームページ等】

<http://www.nibb.ac.jp/ligand/>

## 【基盤研究 (S)】

生物系 (生物学)



### 研究課題名 染色体分配を制御するセントロメアの分子基盤の解明

国立遺伝学研究所・分子遺伝研究系・教授

ふかがわ たつお  
深川 竜郎

研究分野: 遺伝・染色体動態

キーワード: 染色体再編・維持、染色体構築・機能・分配、エピジェネティクス

#### 【研究の背景・目的】

生物の生命維持には、染色体が安定に保持・増殖されなければならない。染色体分配に狂いが生じると染色体の異数化など細胞に対する悪影響が生じる(染色体不安定化)。染色体分配が正確に遂行されるために必要な分子機構を解明することは、遺伝学における本質的かつ重要な課題の一つである。

本研究では、高等動物の染色体分配機構に必須なセントロメア構造の形成機構や細胞分裂の制御におけるセントロメア機能の解明を目指した研究を行う。これまでに我々は、世界に先駆けての新規セントロメア構成因子の同定や、各種ロックアウト細胞の表現型解析を通じたセントロメア構成因子の機能解析を進めてきたが、本研究では、我々がこれまでに推進してきたセントロメアに関する基礎研究をベースとして、セントロメアの分子基盤の解明を目指す。

#### 【研究の方法】

本研究の遂行には、多角的なアプローチが必須であり、DT40 細胞を用いた染色体工学、試験管内でのセントロメアタンパク質複合体の再構成を目指した生化学、タンパク質複合体の原子レベルでの構造理解を目指す構造生物学の手法を用いる。具体的には、以下の3つの計画を平行に進める。

##### I) 染色体工学を活用したセントロメアの形成機構の解明

セントロメア領域は、通常、染色体上の決まった場所に規定されるが、非セントロメア領域が何らかの理由でセントロメア化することも知られている(ネオセントロメア現象)。本研究では、どのようにセントロメアが規定されるかを知る目的で、DT40 細胞を用いて実験的にネオセントロメアを作出する実験系を確立する。また、この実験系とバクテリアの LacO-LacI のシステムを併用して、各種セントロメアタンパク質を非セントロメア領域に局在化させ、人工セントロメアの作成を目指す(図1)。

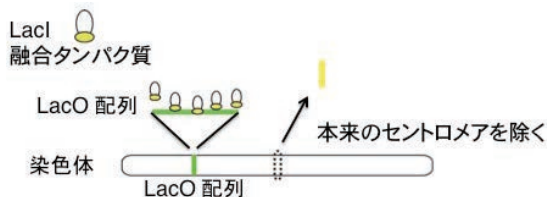


図1 人工セントロメア作出の試み

##### II) セントロメア構成タンパク質の試験管内再構成

セントロメアは、DNA と多数のタンパク質で構成

される巨大複合体であり、セントロメア機能を理解するためには、個々の構成タンパク質の性質を明らかにしなければならない。本研究では、いくつかのセントロメアタンパク質を発現・精製して試験管内で(サブ)複合体の再構成を行う。再構成された複合体の機能は、DNA や微小管との結合活性を解析することで評価する。

##### III) セントロメアタンパク質複合体の原子レベルでの構造基盤の解明

再構成されたタンパク質複合体は、X線結晶構造解析を行い、原子レベルでの構造決定も行う。また、得られた構造を参考に、複合体形成に重要と予想されるアミノ酸に変異を加えた細胞を作成し、その複合体形成の生物学的意義を細胞生物学的に検証する。

#### 【期待される成果と意義】

我々がこれまでの研究で得てきた知識に、本研究で得られる結果が加わることによって、セントロメア構造の分子基盤がより明らかになると期待される。特に、遺伝学的研究で得られた成果と生化学・構造生物学・細胞生物学研究を統合させる試みは、学術的に大変意義深い。得られた構造の生物学的意義の検証を独自の系で速やかに遂行できると言う点において、我々は世界をリードできる位置にいると考えている。さらに、将来的には、タンパク質構造に立脚した創薬研究へと発展できる可能性も秘めており、その意義は高い。

#### 【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

- Nishino T et al., CENP-T-W-S-X forms a unique centromeric chromatin structure with a histone-like fold. Cell, 148, 487-501 (2012).
- Hori T et al., CCAN makes multiple contacts with centromeric DNA to provide distinct pathways to the outer kinetochore. Cell, 135, 1039-1052 (2008).

#### 【研究期間と研究経費】

平成 25 年度 - 29 年度  
166,000 千円

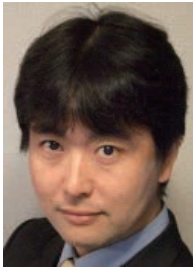
#### 【ホームページ等】

[http://www.nig.ac.jp/labs/MolGene/index\\_j.html](http://www.nig.ac.jp/labs/MolGene/index_j.html)  
tfukagaw@nig.ac.jp



## 【基盤研究 (S)】

生物系 (生物学)



### 研究課題名 昆虫—大腸菌人工共生系による共生進化および分子機構の解明

産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・首席研究員

ふかつ たけま  
深津 武馬

研究分野: 基礎生物学

キーワード: 実験進化学、比較ゲノム、機能進化

#### 【研究の背景・目的】

生物界において微生物との共生関係は普遍的であり、しばしば重要な生物機能を担っている。高度な共生関係が具体的にどのように始まり、成立したのかは進化生物学における重要な問題である。

最近私たちは、チャバネアオカメムシという昆虫において、生存に必須な腸内共生細菌が自然集団で顕著な多型を示すことを発見した。さらに、もとの共生細菌と大腸菌の置換により、正常な感染局在を示し、垂直伝達され、継代維持が可能であり、さまざまな操作実験や分子遺伝学の適用が可能な人工共生系の創出に成功した (図1)。

本研究課題では、この画期的なモデル共生系について、実験進化学的アプローチ、ゲノム科学的アプローチおよび分子遺伝学的アプローチを駆使し、共生進化の過程および機構の本質に関する理解を従来なし得なかったレベルにまで深めることを目指す。

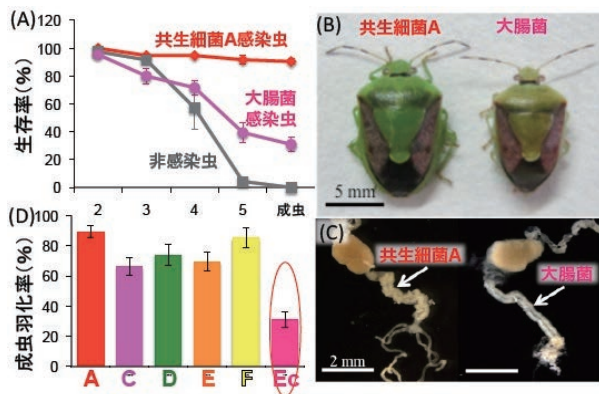


図1 チャバネアオカメムシにおける (A) 共生細菌 A 感染虫、大腸菌感染虫、非感染虫の生存曲線。(B) 共生細菌 A 感染虫と大腸菌感染虫の外観および (C) 共生器官の発達過程。(D) 共生細菌 A-F に感染した虫と大腸菌感染虫の成虫羽化率の比較。

#### 【研究の方法】

チャバネアオカメムシ共生系について、以下の研究を推進する:

- (1) 6種の共生細菌ゲノムの完全塩基配列決定
- (2) 共生細菌の形質転換系、遺伝子破壊系の確立
- (3) 共生細菌フォスミドライブラリー導入大腸菌のスクリーニングによる共生関連遺伝子候補の網羅的取得

- (4) 共生関連遺伝子の同定、機能解析
- (5) 異なる共生細菌間での共生関連遺伝子群の比較解析
- (6) チャバネアオカメムシに人工共生させた大腸菌の継続的な飼育維持、選抜による実験共生進化解析

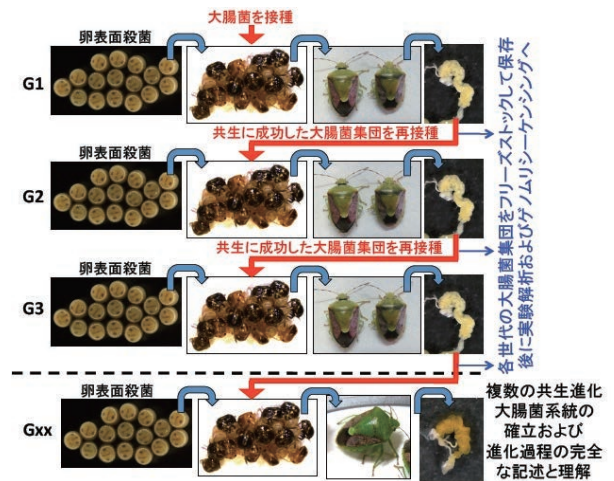


図2 大腸菌人工共生進化実験デザインの概要。

#### 【期待される成果と意義】

大腸菌の高度な分子遺伝学的システムとリソースを駆使して共生の分子基盤を徹底的に明らかにし、さらに大腸菌が共生細菌に進化していく様子をリアルタイムで記述し、解析することにより、共生進化の過程および機構に関して従来にない画期的な理解が得られることが期待される。

#### 【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

- ・ 深津武馬 (2011) [特集] 共に生きる昆虫と微生物—運命共同体となる仕組み。遺伝 65(1): 19-79.
- ・ Kikuchi Y., Hosokawa T., Fukatsu T. (2008) Diversity of bacterial symbiosis in stinkbugs. In: *Microb. Ecol. Res. Trends* (ed. T. V. Dijk), pp. 39-63. Nova Science Publishers Inc., N. Y.

#### 【研究期間と研究経費】

平成 25 年度—29 年度  
104,100 千円

#### 【ホームページ等】

<http://staff.aist.go.jp/t-fukatsu/>



【基盤研究 (S)】  
生物系 (農学)



研究課題名 ナノ病原体の統合生物学 -宿主細胞内絶対寄生の複合生命体としての理解に向けて-

東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授

なんば しげとう  
難波 成任

研究分野： 農学  
キーワード： 植物-病原体相互作用

【研究の背景・目的】

ファイトプラズマは植物の篩部細胞に寄生する絶対寄生性の病原性細菌である。約 100-1,000 nm の不定形であり、またゲノムサイズも約 600-900 kbp と、いずれも他の細菌と比較して極めて小さい。ファイトプラズマは 700 種以上の農作物を含む各種植物に感染し、劇的な形態変化を伴う特徴的な病徴を引き起こす。

植物ウイルスもまた絶対寄生性の病原体であるが、自身の代謝系を持たない無生物である。球状や棒状など様々な粒子構造をとるが概して約 800 nm 以下の粒子サイズである。ゲノムサイズもファイトプラズマ同様に極めて小さく、極めて限られた遺伝子しか持たないため、植物宿主因子を巧みに利用しながら感染・増殖するものと考えられる。植物ウイルスは植物体全体の形態変化を伴う様々な病徴を引き起こし、作物生産に甚大な被害を与えている。

ファイトプラズマと植物ウイルスは生物と無生物という違いはあるものの、ともに絶対寄生性であり、篩部を通じて植物体に全身感染する。また、多くの植物ウイルスとファイトプラズマは昆虫によって伝搬される。さらにファイトプラズマと植物ウイルスは似た病徴を示す。特に植物の形態異常を伴う病徴は似ており、萎縮、黄化、叢生、葉化は共通した病徴である。このように両者はいくつかの点で似た性質を示し、いずれもナノメートルオーダーの病原体であることから、私達はこれらを新たに「ナノ病原体」と名付け、研究対象としている。本研究では、ナノ病原体が生存に必要な因子の大半を宿主に依存していることに着目し、ナノ病原体が寄生した宿主細胞を複合生命体としてとらえて統合生物学的研究を展開するとともに、植物病理学における新たなパラダイムの構築を目指す。

【研究の方法】

本研究ではナノ病原体の統合的解明に必要な研究基盤の構築を図る。具体的には、多数の植物にナノ病原体を接種し、ナノ病原体に抵抗性を示す植物のスクリーニングを通じて抵抗性遺伝子の単離とその機能解析を行う。同時に、ナノ病原体の増殖に必要な宿主遺伝子の単離と機能解析を行う。また、ナノ病原体の *in vitro* 増殖系の確立を行い、ナノ病原体増殖制御因子の探索を試みる。さらにナノ病原体の病原性因子の解析を行う。ファイトプラズマ分泌・膜タンパク質ならびに植物ウイルスタンパク質を植物に形質転換し、発現させ、植物の形態変化に関わる

病原性因子を明らかにする。また、ファイトプラズマの天狗巣病誘導因子 TENGU の機能領域を明らかにすることにより天狗巣症状の誘導メカニズムの全容を解明する。さらに、ナノ病原体に遺伝子を導入し、形質転換を行うためのベクター構築を行う。以上の研究を通じて、ナノ病原体の感染機構・病原性誘導機構、宿主植物の耐性機構を包括的に解明し、ナノ病原体の統合的理解に迫る。

【期待される成果と意義】

ナノ病原体による世界の作物生産損失額は年間 10 兆円に及ぶとも予想されるが、特効薬となる化学薬剤はいまだ存在せず、媒介生物の防除、弱毒ウイルスなど時間と手間のかかる耕種防除により被害を軽減させているのが実情であり、分子生物学的研究により得られた知見を応用した新規防除戦略の構築が切に求められている。本研究で行うナノ病原体に対する耐性機構の分子メカニズムの包括的解明により、ナノ病原体の防除・治療に向けた分子生物学的基盤の構築が期待される。また、ナノ病原体の病原性誘導機構の解明により、ユニークな病徴を利用した新規育種素材として品種改良の分野に波及効果をもたらすと考えられる。さらに、本研究ではウイルス・細菌・真核生物を統合的に解析することから、生物間相互作用に関する生命・非生命の枠を超えた新たな生命科学的理解が進展するものと考えられ、様々な学問分野に学術的な波及効果をもたらすことが予想される。

【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

- Yamaji Y., Komatsu K., Hashimoto M., Namba S. *et al.* Lectin-mediated resistance impairs plant virus infection at the cellular level. *Plant Cell* 24: 778-793, 2012.
- Hoshi A., Oshima K., Hashimoto M., Komatsu K., Yamaji Y., Namba S. *et al.* A unique virulence factor for proliferation and dwarfism in plants identified from a phytopathogenic bacterium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 6416-6421, 2009.

【研究期間と研究経費】

平成 25 年度 - 29 年度  
166,500 千円

【ホームページ等】

<http://papilio.ab.a.u-tokyo.ac.jp/planpath/index.html>

## 【基盤研究 (S)】

### 生物系 (農学)



## 研究課題名 植物の無機栄養ホメオスタシスと成長の統合的理解と仮説検証

東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授

ふじわら とおる  
藤原 徹

研究分野: 植物栄養学

キーワード: 無機栄養、輸送体、感知、制御、定量的モデル

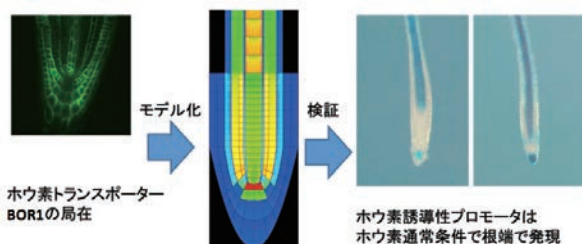
### 【研究の背景・目的】

私たちの生活は植物に依存しています。植物は食料、医薬品、建築資材、衣類などを提供してくれるだけでなく、環境保全にも役立ちます。植物がこのような素晴らしい役割を果たすことができるのは、動物とは違って植物が土壌から吸収する無機元素に依存して生育できるためです。

17種類の元素が植物の生育に必須であることが知られています。これらの元素の多くを植物は土壌から吸収していますが、土壌は様々な要因で生成しますので、植物の必要とする元素が少なすぎたり多すぎたりすることが多いです。植物はどの元素が足りない（あるいは多すぎる）かを感知し、元素の取込みや排出の速度を変化させたりしてなるべく細胞内の濃度を一定にしようとしています。これが無機栄養ホメオスタシスです。この能力があるために様々な土地に植物は生育できます。

本研究はこのホメオスタシス機構について、植物個体としての理解を深めることを目的としています。

私たちはこれまでに、生物界で初めての見出したホウ素のトランスポーターBOR1 や他のホウ素トランスポーターの性質を調べてきました。この過程でBOR1 がホウ素条件に応答して分解を受けたり、根の細胞の特定の方向の細胞膜に極在することを明らかにし、このような性質に関与するアミノ酸を特定して来ました (Kasai et al)。また、ホウ素の吸収に関与するNIP5;1 が mRNA 分解を介して制御されることも明らかにしてきました (Tanaka et al 2011)。さらに、これらのトランスポーターの性質をコンピューター内に作りだした *in silico* の根に付与して、培地からホウ素を拡散させる計算を行い、ホウ素の分布を予測するとともに、実験的な検証を進めてきました (図)。



### ホウ素輸送の定量モデル構築と検証

ホウ素輸送体の分布の実験結果(左側)に基づいて、コンピュータ上に構築した根でのホウ素分布の定量モデルを構築し(中央図、ホウ素濃度の分布を擬似カラーで示したものの)、ホウ素分布をホウ素誘導性プロモータを用いて推定した実験結果(右図)を示す。本研究では、さらに高度なモデルの構築と検証を行う。

この研究は植物におけるトランスポーターの分布考慮したミネラル輸送をモデル化し計算、検証した初めての例です。

さらに、ホウ素以外のカルシウム、マグネシウム、銅、モリブデン、マンガンなどの元素についても、新規の変異株を同定し、原因となる遺伝子を同定することを通じて、ホメオスタシス機構の一端を明らかにしてきました。本研究では、このような研究を一層発展させ、これまでに知られていないホメオスタシス機構を明らかにしたり、全体像を明らかにしたりすることを目的としています。

### 【研究の方法】

本研究では、ホウ素に限定せず、様々な栄養素について取得した変異株の解析を行うことを通じて無機栄養素のホメオスタシス機構を明らかにしていきます。また、ホウ素輸送のモデルを発展させ、広範な植物に適用可能なモデルに発展させます。また、mRNA 分解を通じたこれまでに知られていない栄養による遺伝子発現制御機構を明らかにします。

### 【期待される成果と意義】

本研究を通じて新しい無機元素のホメオスタシス機構が発見されるとともに、植物全体として輸送がどのように統合的に制御されているかを明らかにすることができると考えています。これを通じて、これまでにない手法で植物の持つ機能をさらに強化し、ひいては食糧問題、環境問題に貢献できると考えています。

### 【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

- Boron-Dependent Degradation of NIP5;1 mRNA for Acclimation to Excess Boron Conditions in Arabidopsis. Tanaka, M., Takano J., Chiba, Y., Lombardo, F., Ogasawara, Y., Onouchi, H., Naito, S. and Fujiwara, T. *Plant Cell* 23(9):3547-59 (2011)
- High boron-induced ubiquitination regulates vacuolar sorting of the BOR1 borate transporter in Arabidopsis thaliana. Kasai K, Takano J, Miwa K, Toyoda A, Fujiwara T. *J Biol Chem.* 286(8): 6175-6183 (2011)

### 【研究期間と研究経費】

平成 25 年度 - 29 年度  
166,700 千円

### 【ホームページ等】

<http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/syokuei/index.html>  
[atorufu@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp](mailto:atorufu@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp)

## 【基盤研究 (S)】

生物系 (農学)



### 研究課題名 コレステロール恒常性の鍵をにぎる ABC 蛋白質の作用機構解明

京都大学・物質—細胞統合システム拠点 (WPI-iCeMS)・教授

うへだ かずみつ  
植田 和光

研究分野: 農芸化学、応用生物化学

キーワード: 膜輸送蛋白質、動脈硬化、アルツハイマー病、細胞膜メゾ領域

#### 【研究の背景・目的】

コレステロール恒常性の破綻は動脈硬化症の原因であり、日本人の死因の約 30% を占める血管系の異常を引き起こす。コレステロール恒常性は、生合成、取り込み、貯蔵の各段階において綿密に制御されている。近年、それらに加えて細胞からのコレステロール排出が重要であり、複数の ABC 蛋白質が余剰コレステロールの排出に関与していることが明らかになった。しかし、それら ABC 蛋白質の生理的役割や作用機構には多くの謎が残されている。ABC 蛋白質は、共通の ATP 加水分解ドメインをもち、ATP 依存的にさまざまな物質を輸送する膜輸送蛋白質の総称であり、ヒトには 48 種類の ABC 蛋白質が存在する。本研究は、コレステロール恒常性に関与する ABC 蛋白質の作用機構を、生化学的解析、細胞生物学的解析、蛍光プローブを用いた 1 分子観察や結晶構造解析などを統合し、解明することを目的とする。

#### 【研究の方法】

①全反射照明蛍光顕微鏡を用いた 1 分子イメージングによる HDL 形成機構の解明 (1 分子生物学)

ABCA1 は、コレステロール恒常性にとって重要な善玉コレステロール (HDL) 形成の鍵を握っている。これまでの研究により、ABCA1 が HDL 形成途中で細胞膜上で二量体化し、静止することを明らかにした。本研究では、ABCA1 変異体などの 1 分子解析によって、ABCA1 による HDL 形成メカニズムを明らかにする。さらに、ABC 蛋白質によって形成および破壊される細胞膜メゾ領域の可視化を試みる。

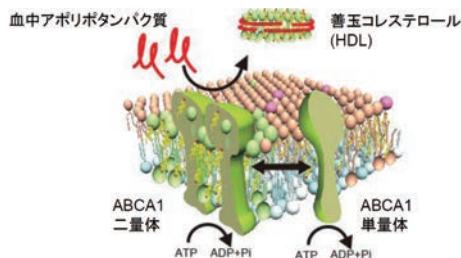


図 1

我々が提唱している ABCA1 による HDL 形成機構モデル

②結晶構造解析による ABC 蛋白質の作用機構の解明 (構造生物学)

真核単細胞生物 (紅藻) の ABC 蛋白質の構造を世界最高レベルの高分解能で明らかにし、ABC 蛋白質の基質認識機構および ATP 加水分解に伴う構造変化

のメカニズムを解明する。

③生化学的、細胞生物学的解析による ABC 蛋白質の作用機構の解明 (生化学・細胞生物学)

②の研究で明らかになった構造に基づいたアミノ酸置換導入によって、基質認識と輸送に重要なアミノ酸残基を同定する。体内および脳内の脂質恒常性に関与する ABCA1、ABCA7、ABCA13、ABCB4、ABCG1、ABCG4 などの特異的に発現した培養細胞および精製蛋白質を用いた生化学・細胞生物学的実験などによって、これら ABC 蛋白質の基質特異性、輸送機構、活性制御機構を明らかにする。

#### 【期待される成果と意義】

ABC 蛋白質は動脈硬化予防の鍵を握る HDL 形成にとって必須だけでなく、脳内コレステロール恒常性にも関与し、アルツハイマー病や他の神経疾患とも関係する。ABC 蛋白質の作用機構を解明することは、これら疾病の予防や治療にとって重要である。

しかし、ABC 蛋白質は巨大な膜蛋白質であり、機能の解析は容易ではない。申請者は、これまで積み上げてきた経験を生かして、生化学的解析、細胞生物学的な解析だけでなく、1 分子イメージングと結晶構造解析を統合することによって作用機構を解明しようとしており、成果が期待できる。

#### 【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

- Nagata, K., O., Nakada, C., Kasai, R. S., Kusumi, A. and Ueda, K. ABCA1 dimer-monomer interconversion during HDL generation revealed by single-molecule imaging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 110, 5034-5039 (2013)
- Hozoji-Inada, M., Munehira, Y., Nagao, K., Kioka, N., and Ueda, K. LXR $\beta$  directly interacts with ABCA1 to promote HDL formation during acute cholesterol accumulation. *J. Biol. Chem.* 286, 20117-24 (2011)

#### 【研究期間と研究経費】

平成 25 年度 - 29 年度  
159,600 千円

#### 【ホームページ等】

<http://www.biochemistry.kais.kyoto-u.ac.jp/>



【基盤研究 (S)】  
生物系 (農学)



研究課題名 インスリン受容体基質複合体の機能修飾を介したインスリン様活性制御法の開発

東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授

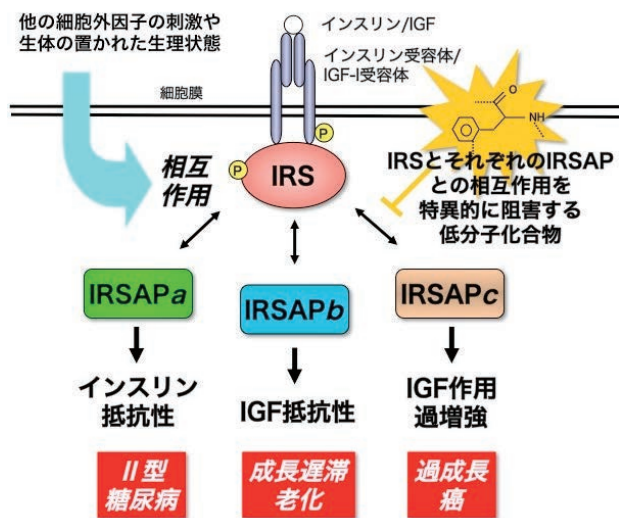
たかはし しんいちろう  
高橋 伸一郎

研究分野： 動物生命科学、動物生産科学

キーワード： 代謝・内分泌制御、インスリン様活性

【研究の背景・目的】

動物の正常な生命活動に必要な同化ホルモン、インスリン (INS) /インスリン様成長因子 (IGF) の広範な生理活性 (インスリン様活性) は、これらのホルモンの受容体に内蔵されたチロシンキナーゼによりチロシンリン酸化されるインスリン受容体基質 (IRS) を介して発現されます。何らかの理由で IRS を介した INS/IGF 細胞内シグナル伝達が過度に抑制されると、糖尿病や成長遅滞、老化などが誘導・進行することが明らかになっています。反対に、シグナルが過剰に伝達されると、過成長・癌化などが起こります。我々は、IRS が多種類のタンパク質 (IRSAP と命名) と相互作用して巨大なシグナル分子複合体 (IRSome と命名) を形成しており、他の細胞外因子の刺激や生体が置かれた生理状態にตอบสนองして IRSome の構成タンパク質が変化することにより、INS/IGF シグナルやインスリン様活性が調節されていることを発見しました。この独創性の高い研究成果を背景に、本研究では、INS/IGF 抵抗性あるいは感受性増強を引き起こしている IRSAP を特定し、これらの IRSAP と IRS との相互作用を阻害する低分子化合物を開発、これらを用いてインスリン様活性の制御が可能であることを示すことを目的としています。



【研究の方法】

既に我々は、種々の INS/IGF 標的細胞より、40 種類以上の IRSAP の同定に成功しています。そこで最初に、これらの IRSAP を中心に、INS/IGF の生

理活性が抑制あるいは増強されているモデル細胞あるいはモデル動物で IRS と IRSAP との相互作用が増加する IRSAP を選択します。続いて、ここで選択された IRSAP の中から、細胞系を用いてインスリン様活性を変動させる IRSAP を特定します。これまで同定された IRSAP の多くは、広範な臓器で発現が認められ、他のタンパク質とも相互作用することで多彩な生命現象に関与することがわかっています。これらの結果は、IRSAP の過剰発現や発現阻害だけでは、IRS と相互作用している IRSAP の特異的機能は解明できず、当該 IRSAP と IRS の相互作用を特異的に阻害する必要があることを示しています。そこで本研究では、IRS と IRSAP の相互作用領域を過剰発現する手法と IRSAP と IRS の相互作用を阻害する低分子化合物をスクリーニング・最適化し、これらの相互作用を阻害する二つの手法を開発します。この手法を用いて、INS/IGF の生理活性が抑制あるいは増強されているモデル細胞あるいはモデル動物で IRS と IRSAP との相互作用を抑制し、INS/IGF の生理活性の異常が正常化することを示すのが本研究のゴールです。

【期待される成果と意義】

本研究の成果は、IRSome によってインスリン様活性が調節される新しい分子メカニズムを明らかにすると同時に、開発された低分子化合物はリード化合物として、全く新しい作用点を有する抗糖尿病薬や成長調節薬、抗老化薬、抗癌剤などの開発などに利用されることが期待されます。

【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

- ・ Fukushima T *et. al.*, Insulin receptor substrates form high-molecular-mass complexes that modulate their availability to insulin/insulin-like growth factor-I receptor tyrosine kinases. *Biochem Biophys Res Commun* 404: 767-773 (2011)
- ・ 高橋伸一郎ら 解説：インスリン様活性と高齢化社会で克服すべき疾病 *化学と生物* 51: 389-399 (2013)

【研究期間と研究経費】

平成 25 年度 - 29 年度  
166,000 千円

【ホームページ等】

<http://endo.ar.a.u-tokyo.ac.jp/lab/shingroup/index.html>

【基盤研究 (S)】  
生物系 (農学)



研究課題名 組織修復・再生における間葉系細胞のダイナミズム：統合型研究

東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授 おざき ひろし  
尾崎 博

研究分野： 農学

キーワード： 組織修復・再生、筋線維芽細胞、間葉系細胞、運動機能

【研究の背景・目的】

上皮系細胞は臓器の内面や外面の表層に二次元に整然と並び、秩序正しい動きをするので注目されやすいが、線維芽細胞などの間葉系細胞は、単に間質をうめる要素と考えられ(間充織)、あまり表舞台にでることはなかった。しかし最近の研究で、これらの間葉系細胞は置かれた状況によってダイナミックに機能分化して特異的な臓器機能調節機能を示すこと、さらに病態時には、炎症や免疫機能を発揮して生体防御の中心的な機能を示すことが次第に明らかになりつつある。

一方、実質臓器(肝、心、肺、腎、消化管など)にみられる線維症は、放置すればいずれも死の機転をとる重篤な慢性疾患である。しかし、研究は著しく立ち遅れ、有効な医薬品は皆無である。これまでの臓器線維化に関する研究は、組織増殖因子 TGFβ の作用を中心に、間質細胞の免疫機能とコラーゲン産生能の獲得という点に注がれてきた。

本研究の目的は、臓器線維化のキープレイヤーである筋線維芽細胞の運動機能に着目し、筋線維芽細胞への分化機構と収縮制御の細胞内情報伝達系を明らかにすることによって、収縮系の人為的制御で臓器線維症が治療できるかどうかの可能性を探ることにある。

【研究の方法】

本研究は、腸、腎および肝臓に分布する筋線維芽細胞へと分化する細胞群を対象として、運動機能(収縮機能ならびに遊走活性)亢進の分子機構の解明に取り組む。これら臓器に分布する様々な細胞を対象とするが、具体的には以下の7つの研究項目を設定して研究を進める。(括弧内は特に注目する分子)

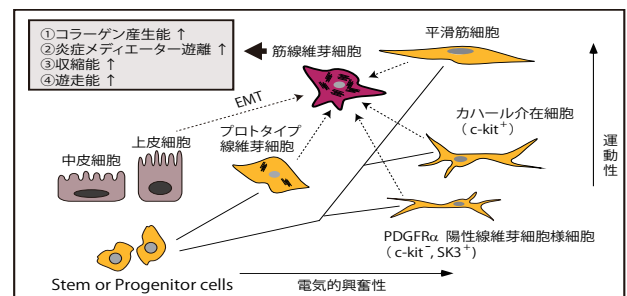
- (1) 筋線維芽細胞の筋分化機構(転写制御系の解明)(SRF/Myocardin, CPI-17, MYPT-1, RhoA, MLCK, SM22 など)
- (2) 筋線維芽細胞の収縮機能情報伝達系(CPI-17, MYPT-1, RhoA, MLCK など)
- (3) 筋線維芽細胞のソースとしての上皮・間葉転換、内皮・間葉転換(cadherin, cytokeratin など)
- (4) 筋線維芽細胞が産生する細胞外マトリックスの役割(tenascin-C, collagens など)
- (5) 細胞遊走時の細胞変形の分子機構(特に水チャネルの関与)(aquaporins, CPI-17, MYPT-1)
- (6) カハール介在細胞の病態変化(c-kit, contractile proteins など)
- (7) PDGFRα陽性線維芽細胞様細胞の病態変化

(PDGFRα, SK3など)

- (8) ヒト臨床からのアプローチ(小腸移植後の腸線維化、カハール介在細胞不全に着目した運動機能障害など)(上記の分子群のすべて)

【期待される成果と意義】

「動き」を制御することにより筋線維芽細胞の線維素産生という本来の機能を発揮できなくするという発想が証明されれば、臓器線維症さらには癌研究分野においても新しい創薬ターゲットが生まれる。病態時に三次元に躍動する間葉系細胞の姿が再認識され、収縮機能という別次元からの臓器線維症治療戦略を提示できる。



【図：間葉系細胞の分化系統樹と収斂ポケット】

組織障害時には、間質細胞のみならず上皮系細胞も間葉系の筋線維芽細胞へと脱分化(収斂)し、コラーゲン産生を高めるとともに収縮能や遊走能を変化させる。

【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

- ・ Iwanaga K, Okada M, Murata T, Hori M, Ozaki H (2012) Prostaglandin E2 promotes wound-induced migration of intestinal subepithelial myofibroblasts via EP2, EP3, and EP4 prostanoid receptor activation. *J Pharmacol Exp Ther* 340(3):604-611.
- ・ Iizuka M, Murata M, Hori M, Ozaki H (2011) Increased contractility of hepatic stellate cells in cirrhosis is mediated by enhanced Ca<sup>2+</sup>-dependent and Ca<sup>2+</sup>-sensitization pathways. *Am J Physiol* 300, G1010-G1021.

【研究期間と研究経費】

平成 25 年度 - 28 年度  
151,000 千円

【ホームページ等】

<http://www.vm.a.u-tokyo.ac.jp/yakuri/>  
(aozaki@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp)



研究課題名 **ロイヤル・エピジェネティクス：社会性昆虫の超長寿化の分子基盤**

京都大学・大学院農学研究科・教授 **まつうら けんじ**  
**松浦 健二**

研究分野： 境界農学、昆虫科学

キーワード： 社会性昆虫、昆虫生態、昆虫分子生物学

【研究の背景・目的】

複雑で多様な寿命の仕組みを解き明かすことは、生物学の究極の課題である。従来の寿命研究では、線虫やショウジョウバエ、マウスなど各分類群の中でも短命なモデル生物を対象としており、劇的な「長寿」の分子機構については未開拓である。アリ・ハチ、シロアリなどの真社会性昆虫では、女王の寿命が数十年に上る種が稀ではない。さらに、同じ遺伝子でも社会役割が異なれば遺伝子発現の違いにより、数十倍もの寿命差が生じており、寿命を制御する分子基盤の解明に絶好の材料である。本研究では、分子生物学的手法を駆使し圧倒的な「長寿」を可能にする分子基盤を解明し、寿命の進化ダイナミズムの統合的理解を目指す。

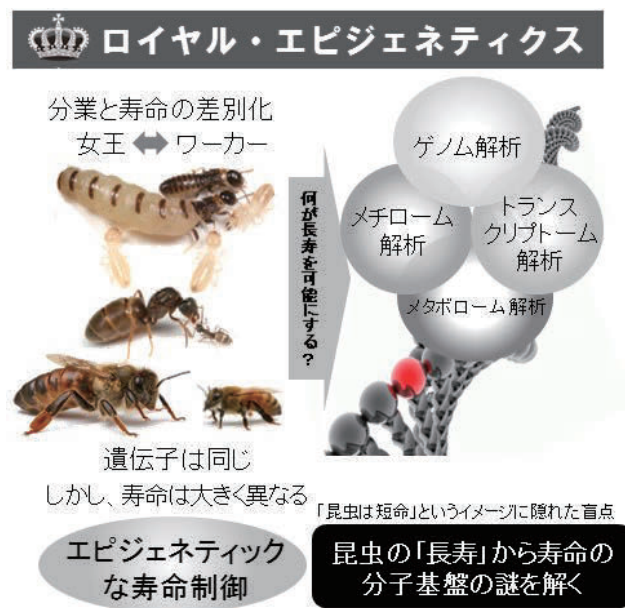


図2 研究戦略

【研究の方法】

1. シロアリの王と女王の長寿の分子基盤  
女王の遺伝的不老不死化と王の超長寿化をもたらした「単為生殖による女王継承システム (AQS)」の分子基盤の解明と、寿命の性差やカースト差に関わる遺伝子の探索と機能解明を行う。トランスクリプトーム解析により発現量の異なる遺伝子を探索方向と、ゲノム解析・メチローム解析によりプロモーター領

域も含めたメチル化の全貌を明らかにする方向の両側からアプローチし、既知の寿命関連因子との照合にとどまらず、新規の長寿因子を含めて網羅的に探索する。さらに、老化の原因となる活性酸素に対する王と女王の対抗戦術を解明するため、活性酸素発生を抑える代謝機構とそれを除去する抗酸化能の解析を行う。

2. ミツバチ女王の長寿の分子基盤

ロイヤラクチンを摂取させた後のミツバチの染色体の網羅的なメチローム解析、さらにメチル化因子と寿命との関係についての解析を実施し、ロイヤラクチンによるエピジェネティック制御と寿命との関係を明らかにする。また、寿命とクロマチンのアセチル化との関係についても解析する。さらに、女王蜂分化を再現したショウジョウバエ飼育モデル系を用いて、ロイヤラクチン投与/過剰発現後の脂肪体から分布される液性因子をハエの脂肪体のトランスクリプトーム解析により寿命を制御する内因性因子を同定する。

【期待される成果と意義】

女王や王の長寿は、一般的な「繁殖と寿命のトレードオフ」の制約を打破した逆転現象であり、幅広い分類群の長寿の分子基盤の相同性が明らかになるだけでなく、新たな長寿実現の仕組みが明らかになることが期待できる。

【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

- ・ Matsuura K. et al. (2010) Identification of a pheromone regulating caste differentiation in termites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107: 12963-12968.
- ・ Matsuura, K. et al. (2009) Queen succession through asexual reproduction in termites. *Science* 323:1687.
- ・ 松浦健二著 (2013) 「シロアリ：女王様、その手がありましたか！」岩波書店

【研究期間と研究経費】

平成 25 年度 - 29 年度  
163,800 千円

【ホームページ等】

<http://www.insecteco.kais.kyoto-u.ac.jp/kenjijpn@kais.kyoto-u.ac.jp>



## 【基盤研究 (S)】

### 生物系 (医歯薬学)



#### 研究課題名 希少化合物の供給および有用化合物の構造改変を指向した生体機能分子の合成研究

名古屋大学・大学院創薬科学研究科・特任教授

ふくやま とおる  
福山 透

研究分野： 有機合成化学、天然物合成化学

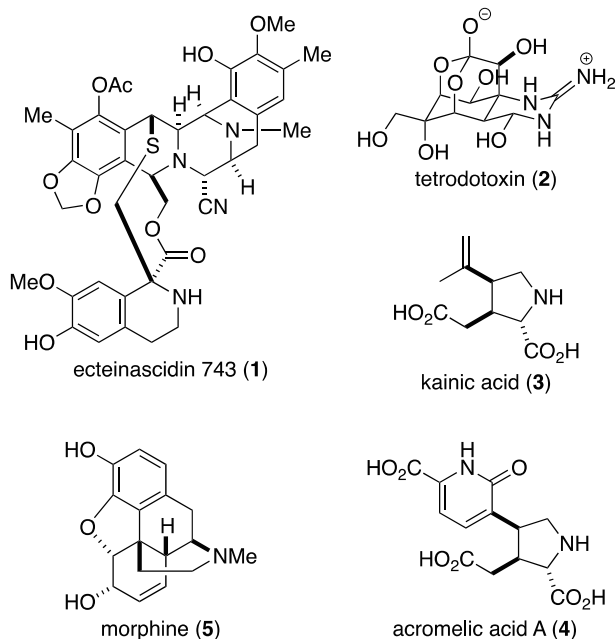
キーワード： 全合成、生体機能分子、量的供給、構造改変、天然有機化合物

#### 【研究の背景・目的】

日本は高齢化社会を迎え、がんや認知症といった難治性疾患の克服に対する社会的要請が強く、新規医薬品の開発に対する期待は極めて大きい。とりわけ新規医薬品のシーズとして、幅広い構造的および生理活性の多様性を持つ天然有機化合物に注目が集まっている。しかしながら天然有機化合物は複雑な構造を有するものが多く、優れた活性を有しながらも、その複雑さ故に化合物およびその類縁体の合成・供給に問題が生じて医薬品開発にまで至らないことがある。そこで本研究では、合成デザインの卓抜性と高効率性を追求することにより、際立った生物活性を有する希少な天然有機化合物およびその類縁体の量的供給を可能にし、多様な新規生物活性化合物を創出する基盤となる効率的骨格構築法の確立を目的とする。

#### 【研究の方法】

本研究課題では、以下にその構造式を示すエクチナサイジン 743 (1)、テトロドトキシシン (2)、カイン酸 (3)、アクロメリン酸 (4)、モルヒネ (5) などの効率的合成法を確立し、希少化合物の量的供給、新規生体機能分子を創出する基盤となる効率的骨格構築法の確立を行う。



特にエクチナサイジン 743 について述べる。エクチナサイジン 743 (ET-743) は、カリブ海原産のホヤより単離・構造決定されたアルカロイドである。欧米の臨床試験で好成績をあげ、進行性軟部肉腫治療薬として欧州、ロシアなどで承認され、現在、更なる適用拡大を目指した臨床試験が行われている。将来的な需要の増加が見込まれるものの、ホヤからは極微量にしか得ることができない。現在臨床に用いられる ET-743 の供給を行っている PharmaMar 社は、発酵生産で得られるシアノサフラシン B を原料として、22 工程という多段階ルートで ET-743 を半合成している。この半合成ルートよりも高効率な全合成による大量かつ安定的な供給が可能となれば、より安価に ET-743 を供給することが可能となるだけでなく、新たな類縁体の合成による新規抗腫瘍薬の開発へもつながる。研究代表者らはこれまでも ET-743 の全合成を達成し報告してきた。しかしながら、未だに十分量の化合物を供給できるまでには至っていない。本研究課題ではこれまでの合成研究で得られた知見をもとに、全く新しい合成ルートを立案し、超効率的かつ実用的な合成ルートの開発を行う。

#### 【期待される成果と意義】

本研究課題の遂行により、入手困難な化合物の供給という観点から、医薬化学の発展に直接貢献することができる。また一連の合成研究の過程で得られる様々な有機合成化学的知見は、医薬品開発の現場に直接・間接的に還元される。

#### 【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

- Endo, A.; Yanagisawa, A.; Abe, M.; Tohma, S.; Kan, T.; Fukuyama, T. *J. Am. Chem. Soc.*, 124, 6552 (2002)
- Imai, T.; Nakata, H.; Yokoshima, S.; Fukuyama, T. *Synthesis*, 44, 2743 (2012)

#### 【研究期間と研究経費】

平成 25 年度 - 29 年度  
165,600 千円

#### 【ホームページ等】

[http://www.ps.nagoya-u.ac.jp/lab\\_pages/natural\\_products/index.html](http://www.ps.nagoya-u.ac.jp/lab_pages/natural_products/index.html)

**【基盤研究 (S)】**

**生物系 (医歯薬学)**

**研究課題名 ストレスシグナルの動的制御機構解明による創薬基盤の確立**



東京大学・大学院薬学系研究科・教授  
いちじょう ひでのり  
一條 秀憲

研究分野： 生化学、分子生物学  
キーワード： ストレス、シグナル伝達、創薬

**【研究の背景・目的】**

ストレス応答は細胞が持つ最も基本的な生命現象のひとつであり、その破綻は、がん、神経変性疾患、自己免疫疾患、代謝性疾患などをはじめとする多様な疾患の発症原因となる。ホルモンやサイトカインなどの受容体を介したシグナル伝達機構と比して、物理化学ストレスによって活性化されるシグナルは、そのストレスセンサーの分子実体ならびにその動的制御機構について不明な点が多く残されている。本研究は、細胞の機能維持に深く関わる4つの根源的なストレス(酸化ストレス、浸透圧ストレス、小胞体ストレス、ミトコンドリアストレス)と、研究代表者が世界に先駆けて明らかにしてきたそれらストレスの受容・認識の鍵となる分子群に焦点を当てながら、ストレス受容から細胞応答に至る一連のストレスシグナル分子機構の解明とそれに基づいた新たな創薬基盤の創成を目指す。

**【研究の方法】**

本研究は上述の4つの目標を期間内に達成するために、研究代表者が最も得意とする【1】生化学・分子生物学的アプローチによる最先端のシグナル伝達分子機構解析、【2】各種ノックアウトマウスおよび病態モデルマウスを用いた病態生理学的解析を中心に据え、さらに共同研究も含めた【3】低分子化合物スクリーニングならびに阻害剤開発、【4】分子結晶構造解析を総動員して行われる。研究体制としては、研究代表者が全体を統括・運営し、目標ごとに設定された連携研究者が大学院生とともに共同で研究を進める。各目標の年次研究計画(平成25年度お

よび26年度以降)に関しては、表1にまとめて示す。

**【期待される成果と意義】**

本研究は、これまでの我々オリジナルの世界的にも高い評価を得た研究成果とそれを裏打ちする確固たる研究基盤をもとに、最新のハイスループット解析技術を組み合わせたゲノムワイドRNAiスクリーニング系や化合物スクリーニング系など、新たな研究手法を積極的に取り入れることで、ストレスシグナル研究の新たな局面を切り開くものであり、過去15年間にわたり一貫してこの分野の研究に従事してきた研究代表者を中心とする研究チームであるが故に、それが遂行可能であると確信している。複雑に絡み合ったストレスシグナル伝達機構を分子レベルで丁寧に解明することで、生命の機能維持の根幹に関わる重要な知見が得られるとともに、医学薬学分野における新たな疾患治療法・診断法の開発にも繋がること期待される。

**【当該研究課題と関連の深い論文・著書】**

- Naguro, I., Umeda, T., Kobayashi, Y., Maruyama, J., Hattori, K., Shimizu, Y., Kataoka, K., Kim-Mitsuyama, S., Uchida, S., Vandewalle, A., Noguchi, T., Nishitoh, H., Matsuzawa, A., Takeda, K. and **Ichijo, H.** ASK3 responds to osmotic stress and regulates blood pressure by suppressing WNK1-SPAK/OSR1 signaling in the kidney. *Nat. Commun.*, 2012;3:1285 (2012).
- Sekine, Y., Hatanaka, R., Watanabe, T., Sono, N., Iemura, S., Natsume, T., Kuranaga, E., Miura, M., Takeda, K. and **Ichijo, H.** The kelch repeat protein KLHDC10 regulates oxidative stress-induced ASK1 activation by suppressing PP5. *Mol. Cell*, 48, 692-704, (2012).

**【研究期間と研究経費】**

平成25年度ー平成29年度  
164,600千円

**【ホームページ等】**

<http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~toxicol/index.html>

| 表1          | 研究内容   | 平成25年度                           | 平成26年度以降                        |
|-------------|--|----------------------------------|---------------------------------|
| 酸化ストレス      | ASK2の誘導機構とASK1-ASK2複合体の細胞応答調節機構解析                          | 分子・細胞レベルでの解析                     | ASK1, ASK2 KOマウスを用いた解析          |
|             | E3/γ-ゼンによるASK1ユビキチン化機構解析                                   | 分子・細胞レベルでの解析                     | KOマウスの作製と表現型解析                  |
|             | PP5, KLHDC10, USP9K, E3/γ-ゼンによるASK1の持続的活性化誘導機構と細胞応答調節機構の解析 | 分子・細胞レベルでの解析                     |                                 |
|             | ASK1 KOマウスを用いた肺転移モデル、持続性皮膚炎モデルの検討                          | 表現型解析                            | ASK1阻害剤検証                       |
| 病態モデル       | ASK2 KOマウスを用いたLPS誘導モデルの検討                                  | 表現型解析                            | 改変阻害剤の検証                        |
|             | KLHDC10 KOマウスを用いた全身性炎症応答モデルの検討                             | 表現型解析                            |                                 |
|             | ASK3のWNK1-SPAK経路抑制機構と細胞応答調節機構の解析                           | 分子・細胞レベルでの解析                     | ASK3阻害剤開発                       |
| 化合物         | ASKファミリー分子の構造解析  | ASK1, 2, 3構造解析                   | 改変阻害剤の検証                        |
|             | RNAiスクリーニングによるASK3活性抑制因子探索と機能解析                            | 探索                               | 同等した因子の機能解析, KOマウスの作製と表現型解析     |
|             | Halo TagクロスリンクによるASK3結合因子探索と機能解析                           | 探索                               | 同等した因子の機能解析, KOマウスの作製と表現型解析     |
| 小胞体ストレス     | ASK3のWNK1-SPAK経路抑制機構と細胞応答調節機構の解析                           | 分子・細胞レベルでの解析                     | ASK3 KOマウスを用いた解析                |
|             | ASK3 KOマウスを用いた腎臓や免疫細胞におけるASK3の生理機能解析                       | 表現型解析                            |                                 |
|             | RNAiスクリーニングによる細胞結核菌感染耐性SOD1変異型因子の探索                        | 探索                               | 同等した因子の機能解析, KOマウスの作製と表現型解析     |
| 分子機構        | ALS患者由来細胞におけるSOD1変異型化の探索と機能解析                              | 探索                               | 2-アミノ-β-アミノ酸によるSOD1変異型化の探索と機能解析 |
|             | 既知のALS関連遺伝子SOD1変異型化に対する影響の検討                               | 分子・細胞レベルでの解析                     | in vivoでの効果の検証                  |
|             | AAV1によるDerlin-1 CT発現のALS病型マウス改善効果の検討                       | ベクター構築, in vivoでの効果の検討, ベクターの最適化 | 評価と改変                           |
| 病態モデル       | ALS病型マウスに対するDdit4ベクター導入による改善効果の検討                          | 1次, 2次スクリーニング                    | 評価と改変                           |
|             | FRET法を用いたSOD1-Derlin-1相互作用の探索                              | 結晶化と構造解析による構造の決定                 | 改変阻害剤の検証                        |
|             | 変異型SOD1と変異型特異的抗体の共結晶構造                                     | 結晶化と構造解析による構造の決定                 | 改変阻害剤の検証                        |
| ミトコンドリアストレス | RNAiスクリーニングによるPGAM5抑制因子の探索と機能解析                            | 探索                               | 同等した因子の機能解析, KOマウスの作製と表現型解析     |
|             | Pull down法によるPGAM5結合因子とリン酸化基質の同定と機能解析                      | 探索                               | 同等した因子の機能解析, KOマウスの作製と表現型解析     |
|             | PGAM5のネクロシス誘導における機能解析                                      | 分子・細胞レベルでの解析                     |                                 |
| 化合物         | PGAM5 KOマウスを用いたネクロシス病態モデルの検討                               | 表現型解析                            |                                 |
|             | PGAM5 KOマウスとPARL KOマウスの掛け合わせによる解析                          | 掛け合わせ, 表現型解析                     |                                 |
|             | PGAM5抑制剤・促進剤化合物の探索   | 探索系の構築, スクリーニング                  | 評価と改変                           |
| 構造          | PGAM5の構造解析   | PGAM5構造解析                        | 構造情報からの機能検証, 改変阻害剤の検証           |

## 【基盤研究(S)】

生物系 (医歯薬学)



### 研究課題名 幹細胞維持分子の機能解析と全身の幹細胞の可視化を目指した総合的研究

九州大学・生体防御医学研究所・教授

なかやま けいいち  
中山 敬一

研究分野: 医歯薬学

キーワード: 細胞増殖・細胞死

#### 【研究の背景・目的】

骨髄・神経・腸管等の組織以外では、幹細胞の純化がほとんど進んでおらず、その性質も明らかではない。幹細胞分画の同定は、その性質の解明に必須であるだけでなく、癌幹細胞の研究の基盤となる。われわれは造血幹細胞の研究から、1) 低増殖、2) 低代謝、3) 低酸化 (ストレス)、の三条件が幹細胞の機能維持に必須であることが明らかにした (図1)。

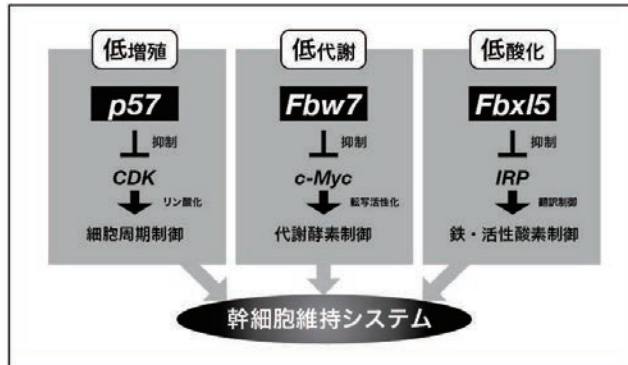


図1 造血幹細胞における3つの必要条件

われわれは造血幹細胞においてこの三条件を媒介する鍵分子 p57、Fbw7、Fbx15 を同定したが、この三分子は全身の組織幹細胞において必須ではないかと推定した。この仮説を証明するために、種々の幹細胞において p57、Fbw7、Fbx15 の発現を解析し、さらにその機能喪失変異体を作成して、この三分子が真の「幹細胞維持分子」であることを実証する。さらに、三分子の発現状態をモニターして未だ明らかではない全身の組織幹細胞を可視化する技術を開発し、その性質を明らかにする。このようにして同定された各組織の幹細胞の性質の理解は、それぞれの組織の再生医療の実現に向けて有用である。

#### 【研究の方法】

種々の組織幹細胞における p57、Fbw7、Fbx15 の詳細な発現パターンを検討する。次にこれらのコンディショナルノックアウトマウスにおける組織幹細胞の細胞周期・代謝・酸化状態を調べ、幹細胞機能が維持されているかどうかを調べる。またプロモーター領域内で遺伝子発現調節に必要なシス領域を同定し、そこに結合するトランス因子を決定すると共に幹細胞機能に与える影響を調べる。また p57、Fbw7、Fbx15 の発現をモニターするようなノックインマウスまたはトランスジェニックマウスを作製し、幹細胞

を可視化するシステムを開発する。同時に系譜追跡できるマウスも作製し、種々の組織における全ての幹細胞を同定する (図2)。

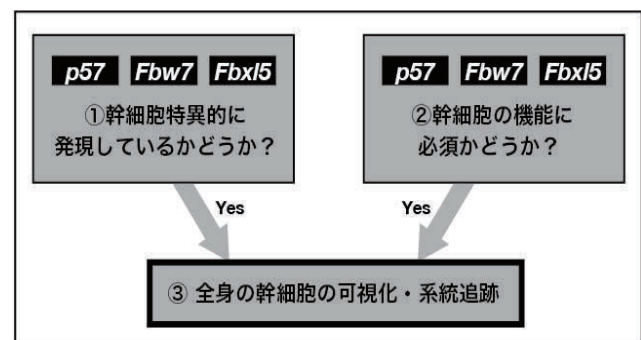


図2 本研究の基本戦略

#### 【期待される成果と意義】

この研究はマウスにおける全ての幹細胞維持システムの解明と幹細胞可視化を目指しているが、それは最終的にヒト幹細胞の維持メカニズムの理解とそれを応用した多くの医療応用の確立へつながることを期待させるものである。

#### 【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

- Takeishi, S., et al., Nakayama, K. I. (6人中6番目): Ablation of Fbxw7 eliminates leukemia-initiating cells by preventing quiescence. *Cancer Cell*, 23: 347-361 (2013).
- Matsumoto, A., et al., Nakayama, K. I. (8人中8番目): p57 is required for quiescence and maintenance of adult hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell*, 9: 262-271 (2011).
- Moroshi, T., et al., Nakayama, K. I. (5人中5番目): The FBXL5-IRP2 axis is integral to control of iron metabolism in vivo. *Cell Metab.*, 14: 339-351 (2011).

#### 【研究期間と研究経費】

平成25年度-29年度  
166,500千円

#### 【ホームページ等】

<http://www.bioreg.kyushu-u.ac.jp/saibou/index.html>  
nakayak1@bioreg.kyushu-u.ac.jp



## 【基盤研究 (S)】

### 生物系 (医歯薬学)



#### 研究課題名 中枢神経系ネットワークのカルシウム制御と病態生理機構

東京大学・大学院医学系研究科・教授 **飯野 まさみつ**  
**正光**

研究分野: 薬理学

キーワード: 受容体・チャネル・輸送系・シグナル情報伝達系

#### 【研究の背景・目的】

中枢神経系は、多数の神経およびグリア細胞間の複雑なネットワーク機構により、正常から病態に至る様々な機能を果たしている。その中で、 $\text{Ca}^{2+}$ シグナルは重要でかつ広範な機能制御に関与するとともに、病態にも深く関与している。私たちは、先行する研究において、脳傷害に伴う細胞応答に  $\text{Ca}^{2+}$ シグナル機構が密接に関与することを具体的に示す結果を得ている。本研究ではこの成果を発展させ、シグナル分子イメージング法を効果的に用いながら、病態生理機構を分子レベルから個体レベルまで統合的に明らかにする成果をあげ、治療標的の同定への基盤形成を目的としている。

#### 【研究の方法】

$\text{Ca}^{2+}$ シグナルが関与する中枢神経系の病態生理機構について、新たに準備した3系統の遺伝子改変マウスを用い、先端的な蛍光分子イメージング法を活用して、分子細胞レベルでのメカニズムを明確にするとともに、個体レベルでの解析を行う。具体的には、病態により生ずる NO による細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 放出機構 (NICR 機構) と神経細胞死の関係 (図1)、および活性化アストログリオシス (図2) の神経細胞保護作用を主たる標的とする。これに際して、細胞死に深く関与するミトコンドリアの  $\text{Ca}^{2+}$ 動態について、新開発の小器官用  $\text{Ca}^{2+}$ インジケータを用いて明らかにする。

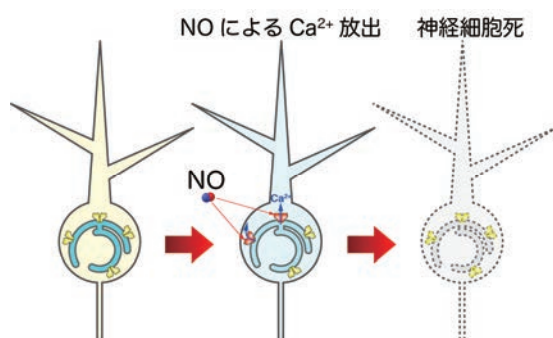


図1 NICR 機構と神経細胞死

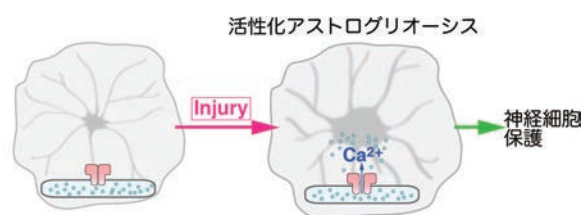


図2  $\text{Ca}^{2+}$ シグナルと活性化アストログリオシス

#### 【期待される成果と意義】

新たに準備した研究リソース用い、生体内二光子励起顕微鏡法などの先端的計測技術を融合させて、独創的な研究成果を目指す。予想される成果として、てんかん発作などに伴う神経細胞死に NICR の関与が証明されれば、NICR 機構を治療標的とした新たな創薬の足がかりとなる。また、活性化アストログリオシス解析から得られる成果は、脳傷害に伴う神経細胞死を抑制する新たな治療法開発の基盤となる。そして、細胞死との関連において注目されているミトコンドリアについて、その  $\text{Ca}^{2+}$ 動態と神経細胞死の関係を明確にできると期待される。

#### 【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

- Kakizawa, S., Yamazawa, T., Chen, Y., Ito, A., Murayama, T., Oyamada, H., Kurebayashi, N., Sato, O., Watanabe, M., Mori, N., Oguchi, K., Sakurai, T., Takeshima, H., Saito, N. and Iino, M. Nitric oxide-induced calcium release via ryanodine receptors regulates neuronal function. *EMBO J.* 31, 417-428, 2012.
- Okubo, Y., Sekiya, H., Namiki, S., Sakamoto, H., Inuma, S., Yamasaki, M., Watanabe, M., Hirose, K. and Iino, M. Imaging extrasynaptic glutamate dynamics in the brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 6526-6531, 2010.

#### 【研究期間と研究経費】

平成 25 年度 - 29 年度  
178,800 千円

#### 【ホームページ等】

<http://calcium.cmp.m.u-tokyo.ac.jp/>

## 【基盤研究 (S)】

生物系 (医歯薬学)



### 研究課題名 炎症抑制と組織修復を促す細胞シグナルの解明

慶應義塾大学・医学部・教授

よしむら あきひこ  
吉村 昭彦

研究分野: 基礎医学、免疫学

キーワード: 炎症、免疫制御、シグナル伝達

#### 【研究の背景・目的】

免疫システムは正負のシグナルがバランスを保って進行することで恒常性が維持される。一方でこのバランスにはある程度の弾性があり、免疫シグナルの強度が免疫応答の性質を決定する。このような恒常性と可塑性の維持機構は主にサイトカインや増殖因子によって制御され、この制御機構が破綻し、免疫過剰な状態となればアレルギー疾患、炎症性疾患や自己免疫疾患につながる (図1)。本研究はこのような免疫応答の恒常性を支えるサイトカインとそのシグナル制御の基本原理の解明し、疾患治療に応用することを目的とする。特に炎症細胞の活性化シグナル、炎症を終息させる負のシグナル、さらに組織修復にかかわる未知のシグナルの解明を中心に研究を行う。

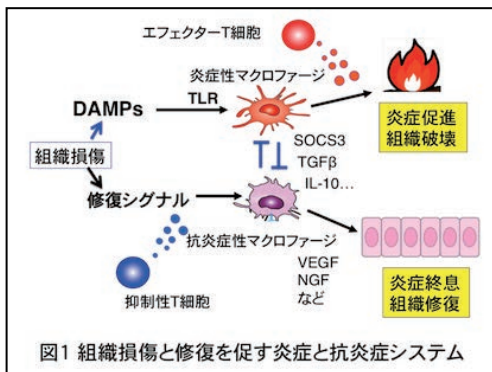


図1 組織損傷と修復を促す炎症と抗炎症システム

#### 【研究の方法】

本研究課題ではシグナルネットワーク制御の観点から免疫シグナル間相互作用を解析し、他の疾患制御系にも通じる新たなパラダイムの確立をめざす。(1) 抗炎症シグナル (IL-10-STAT3 経路、TGFβ-Smad 経路、PGE2-cAMP 経路) による免疫抑制の分子機構を明らかにするとともに、これらが STAT1 や NF-kB 経路などの炎症シグナルとどのように相互作用して炎症バランスを制御するのかを明らかにする (図2)。特に 転写因子複合体のプロテーム解析や Chip シークエンス法によるゲノムワイドの epigenetic な修飾変動の解析などのオミックス方法を活用する。(2) 消化管や脳における免疫寛容維持のメカニズムを、野生型マウスと各種サイトカインレポーターマウスやシグナルレポーターマウスを用いて解析する。これによってサイトカイン産生細胞と受容細胞を明らかにし、サイトカインによるシグナル制御を空間的に、また経時的に観察する。(3) 炎症の終息から組織修復を促進する細胞と因子を同定

し、各種炎症性疾患モデルの治療実験を行う。

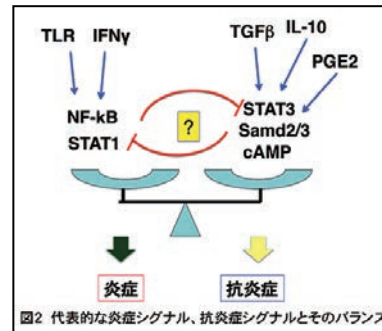


図2 代表的な炎症シグナル、抗炎症シグナルとそのバランス

#### 【期待される成果と意義】

免疫系ではシグナル経路の本体の理解は格段に進んでいる。しかし抑制経路や組織修復に働く因子やシグナルの解明は遅れている。本研究の推進により炎症経路と抗炎症経路を統合して免疫系の恒常性と可塑性を理解し、予測することが可能になると期待できる。さらに『障害を受けた細胞の除去』からさらに『組織修復』へと至る炎症過程を理解し、これに関与する新しいシグナルを同定することで脳梗塞をはじめとする急性の組織傷害の新たな治療法の開発が期待できる。

#### 【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

- Sekiya T, Yoshimura A, et al. Nr4a receptors are essential for thymic regulatory T cell development and immune homeostasis. *Nature Immunol.* 2013 Jan 20;14(3):230-7.
- Hasegawa E, Yoshimura A et al. IL-23 Independent Induction of IL-17 from  $\gamma\delta$ T Cells and Innate Lymphoid Cels Promotes Experimental Intraocular Neovascularization. *J Immunol.* 2013 Feb 15;190(4):1778-87.
- Shichita T, Yoshimura A et al. Peroxiredoxin family proteins are key initiators of post-ischemic inflammation in the brain *Nature Medicine* 2012 Jun;18(6):911-7.

#### 【研究期間と研究経費】

平成 25 年度 - 29 年度  
147,600 千円

#### 【ホームページ等】

<http://new.immunoreg.jp/>

## 【基盤研究 (S)】

生物系 (医歯薬学)



### 研究課題名 WNK シグナルによる塩分ストレス応答の分子病態解明と治療法の開発

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・准教授

うちだ しんいち  
内田 信一

研究分野: 医歯薬学

キーワード: 塩分ストレス、高血圧

#### 【研究の背景・目的】

塩分ストレスが身体に与える影響についての研究は古くからある研究課題であるが、最近高塩食が高血圧以外にも引き起こす病態（癌、炎症、神経疾患など）に注目が集まっている。近年 WNK キナーゼのように 1 分子で塩分感受性高血圧症（偽性低アルドステロン症 II 型、PHAII）を引き起こすような重要な分子が同定され、病態を分子レベルで説明できるようになった。塩分感受性自体が心血管イベントの危険因子である事を考慮すると、塩分ストレスの影響を、改めて分子レベルにまで掘り下げて、かつ生体レベルで包括的に解き明かす研究が今求められていると思われる。

本研究では、塩分ストレスが血圧・体液恒常性維持機構の破綻のみならず、全身の臓器障害を引き起こす分子病態を解明し、それに基づいた治療法の開発を行う事を目的とする。

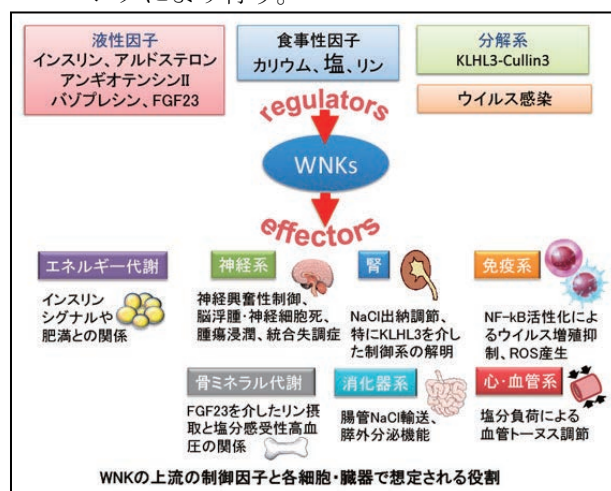
#### 【研究の方法】

我々は WNK キナーゼの基質として、SPAK と OSR1 キナーゼを同定し、さらにそれらのキナーゼの基質として Slc12a 輸送体ファミリーが存在することを明らかにしてきた。特に PHAII では、WNK4 の変異によりこのシグナル系が活性化され、Slc12a3（サイアザイド感受性 NaCl 共輸送体、NCC）が腎臓遠位尿細管で恒常的に活性化される事が塩分感受性を引き起こす病態であることを明らかにし<sup>1)</sup>、最近さらに、WNK4 の変異が WNK4 の KLHL3-Cullin3 複合体による Ub 化障害をきたすことで WNK-OSR1/SPAK-NCC 系を恒常的に活性化している可能性を報告した<sup>2)</sup>。

本研究では、これらのシグナル系にかかわる分子の遺伝子改変マウスの解析を軸として、

- ① この系のさらなる制御因子を明らかにすることで塩分感受性を惹起する因子を解明する。すでにインスリンがこの系の強力な制御因子であり、メタボリック症候群における塩分感受性発生の機序として報告した。
- ② WNK キナーゼの各臓器での役割を解明し、PHAII のように系が活性化した際の病態を探ることで、塩分感受性が亢進する際に各臓器で並行して発生する病態を解明する。この過程で、塩分ストレスが腎臓を含めた全身の臓器機能に与えるごく初期からの影響を解明でき、塩分ストレスに対するバイオマーカーや創薬の標的の探索につながる。

- ③ 腎機能障害を上記モデルに負荷し、上記病態に与える変容を解析し、慢性腎臓病における臓器連関を媒介する因子を明らかにする。
- ④ 上記の研究で明らかになる新たな創薬ターゲットとともに WNK シグナル伝達系(等)の阻害薬の探索をケミカルライブラリースクリーニングにより行う。



#### 【期待される成果と意義】

本研究に進展により、塩分ストレスのもたらす新たな病態の理解とそれに基づいた治療法が明らかになる。

#### 【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

1. Yang SS, Uchida S et al. Molecular pathogenesis of pseudohypoaldosteronism type II: generation and analysis of a Wnk4 D561A/+ knock-in mouse model. *Cell Metab.* 5:331-344, 2007.
2. Wakabayashi M, Uchida S et al. Impaired KLHL3-mediated ubiquitination of WNK4 causes human hypertension. *Cell Rep.* 3(3):858-68, 2013.

#### 【研究期間と研究経費】

平成 25 年度 - 29 年度  
150,200 千円

#### 【ホームページ等】

<http://www.tmd.ac.jp/grad/kid/kid-J.htm>



## 【基盤研究 (S)】

生物系 (医歯薬学)



### 研究課題名 健康長寿のための普遍的代謝調節経路の包括的研究

東京大学・医学部附属病院・教授

かどわき たかし  
門脇 孝

研究分野: 代謝学

キーワード: 健康長寿、アディポネクチン、アディポネクチン受容体

#### 【研究の背景・目的】

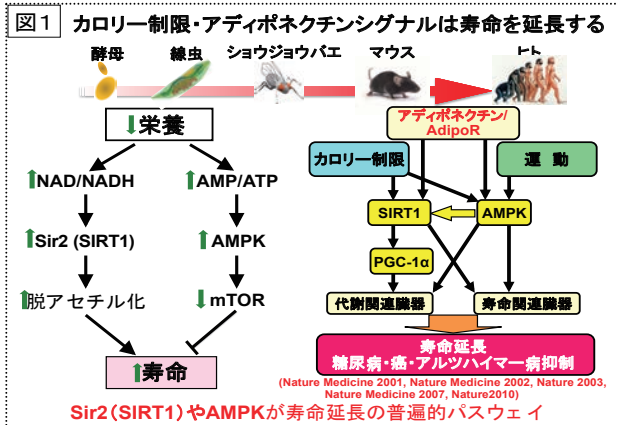
地球上の全ての生物の進化は、飢餓や低栄養に対する適応の歴史であり、人類も含め、生物の寿命はこれらの環境因子によって規定されてきた。実際、低栄養やそれに伴う免疫力の低下、感染症がヒトの死亡原因の主因を占めていたことは記憶に新しい。ところが20世紀後半より、人類はこれまでの歴史上経験したことがない未曾有の過栄養の時代を迎え、その過栄養が生活習慣病などの疾患を引き起こし、寿命短縮の原因になっている。このような短期間の劇的な栄養・環境の変化によってもたらされる問題を抜本的に解決するためには、様々な栄養・環境状態における生物の普遍的な生命現象の根源を俯瞰的に解明し、その破綻のメカニズムを理解することが不可欠である。本研究課題では、健康長寿のための普遍的代謝経路の解明とその実現への方法論を確立することを目的とする。

#### 【研究の方法】

様々な種類・程度の栄養環境下における生物学的反応やその調節機構をメタボローム解析、エピゲノム解析、トランスクリプトーム解析などの手法を駆使して明らかにする(栄養シグナルの解明)。この情報から栄養状態などの環境によって規定される老化や寿命として表現される個体としての生物学的反応を、各臓器の反応の違いと臓器間での協調の結果として俯瞰的に理解することを試みる(長寿シグナルの解明)。さらに、ごく最近、抗糖尿病ホルモンであるアディポネクチン/アディポネクチン受容体(AdipoR)シグナルが新規の寿命決定に深く関わる重要なシグナルであることを明らかにし(図1)、その活性化薬の取得にも成功している。栄養状態などの環境を変化させ、臓器別の生物学的反応を解析するほか、発生工学的手法やAdipoR活性化薬をツールとして、アディポネクチン/AdipoRシグナルを臓器特異的に遮断・増強することで、アディポネクチンや既に知られている長寿遺伝子以外の新たな健康長寿経路を明らかにする。最終的に、栄養シグナルと長寿シグナルの統合的解析により、健康長寿のための普遍的代謝経路を明らかにし、健康長寿薬としてのAdipoR活性化薬の臨床研究へのステージに進みうるだけの科学的エビデンスを構築する。

#### 【期待される成果と意義】

本研究により、普遍的代謝制御機構が明らかになることによって、「最も良い食事は何か」「健康長寿を実現するためにはどうすればよいか」の問いに科



学的根拠に基づいた答えを出すことが出来る。学術的には、生化学・分子生物学・細胞生物学・構造生物学・代謝学・糖尿病学などを融合した分野の垣根を越えた「総合ライフサイエンス分野」の構築に貢献し、それは、生活習慣病の克服、さらには活力ある高齢化社会、先制医療の実現をもたらす包括的研究として意義が高いと考える。さらに現在我々が取得に成功している AdipoR 活性化薬が本研究の遂行によって、ヒトへの最適化のエビデンスが得られることより、臨床研究へ進み、創薬が実現すると、糖尿病・生活習慣病治療、さらには健康長寿の実現に大きく寄与する。

#### 【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

- Yamauchi T, (24 authors) & Kadowaki T. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* 423, 762-769 (2003)
- Iwabu M, Yamauchi T, Okada-Iwabu M, (22 authors) & Kadowaki T. Adiponectin and AdipoR1 regulate PGC-1 $\alpha$  and mitochondria by Ca<sup>2+</sup> and AMPK/SIRT1. *Nature* 464, 1313-1319 (2010)
- Yamauchi T & Kadowaki T. Adiponectin receptor as a key player in healthy longevity and obesity-related diseases. *Cell Metab.* 17, 185-196 (2013)

#### 【研究期間と研究経費】

平成 25 年度 - 29 年度

177,200 千円

#### 【ホームページ等】

<http://dm301k.umin.jp>

## 【基盤研究 (S)】

生物系 (医歯薬学)



### 研究課題名 染色体工学技術を用いたダウン症候群の発がん機構の解明

鳥取大学・染色体工学研究センター・教授

おしむら みつお  
押村 光雄

研究分野： 医歯薬学、内科系臨床医学、小児科学

キーワード： 小児血液学、染色体工学

#### 【研究の背景・目的】

ダウン症候群は21番染色体トリソミーにより引き起こされる先天性疾患であり、白血病、心奇形、精神発達遅滞など多様な表現型を示す。中でも急性巨核芽球性白血病(acute megakaryoblastic leukemia: AMKL)は非ダウン症児に比べ、ダウン症児に約500倍も高頻度に見られる病態である。ダウン症児に見られるAMKL(DS-AMKL)には、X染色体上の転写因子GATA1遺伝子に変異が見られ、GATA1遺伝子のN末が欠損したGATA1sタンパク質が発現している。また、非ダウン症児のAMKLではGATA1変異が見られないことから、トリソミー21とGATA1変異がDS-AMKL発症の必要条件であると考えられている。現在のところ、「トリソミー21により、なぜGATA1変異が高頻度に誘発されるのか?」、「DS-AMKLを引き起こすヒト21番染色体上の原因遺伝子(群)は何か?」、についてはほとんど明かにされていない。このDS-AMKLの原因解明と有効な治療法・治療薬開発のためにはダウン症候群モデル細胞・モデル動物の作製が必要不可欠である。

本研究の目的は独自に開発した染色体工学技術を用いて、新規のダウン症候群モデルマウスおよびモデルヒトES細胞を作製し、ダウン症候群に高頻度に見られる急性巨核芽球系白血病の発症メカニズムを解明することである。具体的には、1)染色体工学技術により様々なヒト21番染色体領域を持つ染色体断片を作製し、2)マウスやヒトES細胞に個別に導入することで、様々な部分トリソミーマウスやヒトES細胞を作製し、3)急性巨核芽球系白血病と遺伝子領域との関係を明かにして、4)最終的には原因遺伝子の同定と発症メカニズムの解明を目指す。

#### 【研究の方法】

DS-AMKLの発症メカニズムを解明するために、以下の3つのステップにより、マウスおよびヒトES細胞を使ってモデル動物・細胞を作製する。1)染色体工学技術により様々なヒト21番染色体領域を持つ染色体断片を作製する。2)正常マウスまたはGATA1sマウスに1)の改変染色体を導入することで血液系表現型の異常と原因遺伝子領域を同定し、最終的にはヒト21番染色体上の特異的遺伝子破壊により原因遺伝子を同定する。3)ヒトES細胞またはGATA1s-ES細胞に1)の改変染色体を導入することで、様々な部分トリソミーヒトES細胞を作製し、in vitro および in vivo 血液分化誘導系により、原因遺伝子の同定と発症メカニズムの解明を目指す。

#### 【期待される成果と意義】

本研究で使用する人工染色体ベクターはヒトまたはマウス染色体に任意の改変を施しそれ自体を遺伝子導入ベクターとして利用するという新規のベクター系であり、導入可能なDNAの長さの制限がないなど、従来の遺伝子導入ベクターにはない多くの優れた特徴を備えている。従って、本研究で作製するヒト21番染色体導入モデルマウスやヒトESモデル細胞は独自のユニークなダウン症候群モデルマウス・モデル細胞になると考えられ、これまでのマウスモデル研究や患者由来細胞等を用いた研究では不可能であったDS-AMKLの症状に対応する原因遺伝子解明のための新たなツールとなることが期待される。また、本研究によりDS-AMKLだけでなく、染色体異数性の発がんへの役割など、成人のがん発症機構の理解を深め、症状改善のための医薬品開発などに貢献することが期待される。

#### 【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

- Takiguchi M, Kazuki Y, Hiramatsu K, Abe S, Iida Y, Takehara S, Nishida T, Ohbayashi T, Wakayama T, Oshimura M. (2012 Nov) A Novel and Stable Mouse Artificial Chromosome Vector. *ACS Synth. Biol.* doi.org/10.1021/sb3000723
- Shinohara T, Tomizuka K, Miyabara S, Takehara S, Kazuki Y, Inoue J, Katoh M, Nakane H, Iino A, Ohguma A, Ikegami S, Inokuchi K, Ishida I, Reeves RH and Oshimura M (2001 May) Mice containing a human chromosome 21 model behavioral impairment and cardiac anomalies of Down syndrome. *Human Molecular Genetics*, volume:10, number:11, 1163-1175

#### 【研究期間と研究経費】

平成25年度-29年度  
161,800千円

#### 【ホームページ等】

<http://www.med.tottori-u.ac.jp/chromosome/>

## 【基盤研究 (S)】

生物系 (医歯薬学)



### 研究課題名 中枢神経回路の障害と修復を制御する生体システムの統合的研究

大阪大学・大学院医学系研究科・教授

やました としひで  
山下 俊英

研究分野： 医歯薬学

キーワード： 神経回路、脳神経疾患

#### 【研究の背景・目的】

脳血管障害、脳・脊髄の外傷、脳脊髄炎などの中枢神経疾患においては、神経系のみならず免疫系、脈管系など様々な生体システムに時空間的变化をきたし、病態が形成される。本研究では、中枢神経回路の障害、その後の修復過程を、生体システムの機能ネットワークの観点から解析し、生体システムの時空間的ダイナミクスによる一連の過程の制御機構の解明に取り組む。特に、「神経系、免疫系、脈管系」の連関による制御機構を見いだすことを本研究の到達目標とする。中枢神経回路障害と機能回復の過程を、生体システム全体のダイナミクスとして捉え、各システムの連関を統合的に解析することで、中枢神経回路障害における生体の動作原理を明らかにする。

#### 【研究の方法】

免疫系および脈管系が、中枢神経回路障害と修復の過程をどのように制御しているかについて明らかにし、中枢神経回路障害における生体の動作原理を解明する。マウスの片側大脳皮質の挫傷、脊髄損傷および局所脳脊髄炎(EAE)が、明確に現象およびメカニズムを評価できるモデルである。これらの病態モデルを用いて、免疫系と脈管系の細胞群の動態と遺伝子発現の時空間的变化を解析する。さらに、免疫系細胞および脈管系細胞がどのように神経回路の障害と修復を制御しているか、そのメカニズムの解析を進める。得られた知見とともに、各細胞群の活性化による神経回路修復機構を見いだすことで、障害急性期と回復期における生体の反応の動作原理を明らかにする。



図1：生体システムによる神経回路の制御

#### 【期待される成果と意義】

これまでの研究の潮流は、中枢神経を独立した臓器として捉え、神経系細胞同士の連関を明らかにするものであった。中枢神経系を生体システムにおける1臓器として捉え、生体システム全体が、神経回路の障害と修復にどのように関わるかという観点からの研究は乏しい。私たちは、特に免疫系および脈管系による中枢神経回路の制御が重要であるという仮説のもと、研究に着手している。神経回路の障害とそれに続く修復の過程における生体の反応を、「スクラップ・アンド・ビルド」の戦略と捉え、一連の反応の機構と意義を明らかにする研究はこれまでになく、生命科学において新たな潮流を作り出すものと期待される。

#### 【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

- Ueno, M., Fujita, Y., Tanaka, T., Nakamura, Y., Kikuta, J., Ishii, M. and **Yamashita, T.** (2013) Layer V cortical neurons require microglial support for survival during postnatal development. **Nature Neurosci.** 16, 543-551.
- Muramatsu, R., Takahashi, C., Miyake, S., Fujimura, H., Mochizuki, H. and **Yamashita, T.** (2012) Neovessels formed through CNS inflammation promote neural rewiring. **Nature Medicine** 18, 1658-1664.
- Muramatsu, R., Kubo, T., Mori, M., Nakamura, Y., Fujita, Y., Akutsu, T., Okuno, T., Taniguchi, J., Kumanogoh, A., Yoshida, M., Mochizuki, H., Kuwabara, S. and **Yamashita, T.** (2011) RGMa modulates T cell responses and is involved in autoimmune encephalomyelitis. **Nature Medicine** 17, 488-494.

#### 【研究期間と研究経費】

平成25年度-29年度  
156,000千円

#### 【ホームページ等】

<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/molneu/index.html>  
yamashita@molneu.med.osaka-u.ac.jp



## 【基盤研究 (S)】

生物系 (医歯薬学)



### 研究課題名 骨代謝を制御する Wnt シグナルネットワークの解明

松本歯科大学・総合歯科医学研究所・教授

たかはし なおゆき  
高橋 直之

研究分野： 機能系基礎歯科学、生化学、骨代謝学

キーワード： 骨代謝共役、破骨細胞、骨芽細胞、骨細胞、Wnt シグナル、スクレロステチン

#### 【研究の背景・目的】

骨は生涯作りかえられる。破骨細胞が骨を吸収し、骨芽細胞が骨を作る。破骨細胞により吸収された部位に、骨芽細胞は同じ量の骨を作る。そのため、破骨細胞は骨芽細胞を活性化する共役因子を産生すると考えられているが、実体は不明である(図1)。

Wnt は古典経路と非古典経路を活性化する。Wnt は骨芽細胞の古典経路を活性化し骨形成を促進する。骨組織の中には骨芽細胞から分化した骨細胞が存在する。骨細胞は Wnt 古典経路を抑制するスクレロステチンを分泌する。すなわち骨細胞は骨芽細胞の機能を調節する細胞である。Wnt は破骨細胞の非古典経路を活性化してその分化を促進する。我々は、破骨細胞が、①骨芽細胞の分化を誘導する Wnt を発現すること、②骨細胞のスクレロステチン産生を抑制する因子を分泌する可能性を見出した。本研究では骨代謝を調節する Wnt ネットワークの全容解明を目指す。

#### 【研究の方法】

Ryk シグナルと Ror2 シグナル解析：RykはWnt 受容体であるがその作用は不明であった。Ryk-KOマウスの解析より、Rykシグナルは骨形成を促進すること、破骨細胞はRykに結合するWntを分泌することが示された。破骨細胞が分泌するWntの同定と骨形成におけるRykシグナルを明らかにする。骨芽細胞が産生するWnt5aはRor2受容体を介して破骨細胞を活性化する。破骨細胞活性化機構を明らかにする(図2)。

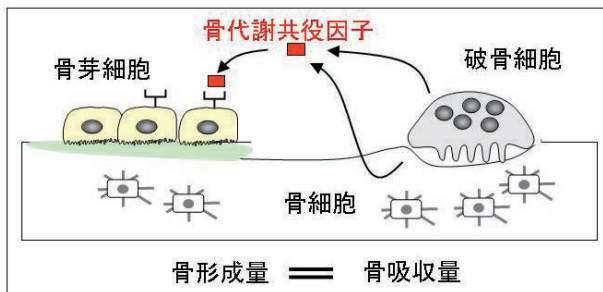


図1 骨代謝共役

骨代謝共役機構の解明：破骨細胞は骨細胞のスクレロステチン産生を抑制する因子Xを産生する。因子Xを同定し、作用機構を解明する。オステオプロテジェリン(OPG)は、破骨細胞分化因子のデコイ受容体である。OPG-KOマウスでは、骨吸収の亢進に伴い骨形成も亢進する。卵巣摘出マウス(OVX-マウス)

は、閉経後骨粗鬆症のモデルで、骨吸収と骨形成が共に亢進する。OPG-KOマウスとOVX-マウスを用いて、骨代謝共役機構を解明する(図2)。

Wntを標的とした治療：骨粗鬆症治療薬の大部分は骨吸収を抑制する薬剤であるため、骨形成を促進する治療の開発が望まれている。Wntシグナル分子を標的とした骨形成促進薬の開発を目指す(図2)。

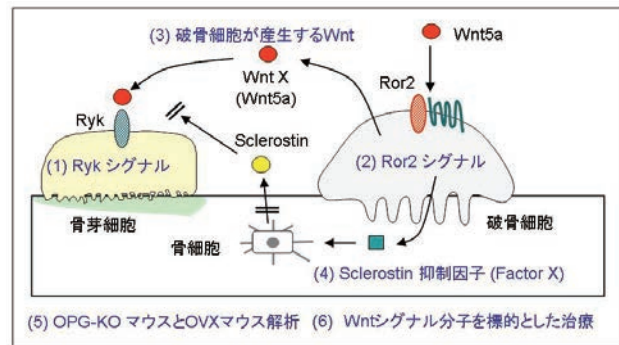


図2 本研究で行なう6つの実験

#### 【期待される成果と意義】

Wnt シグナルネットワークを解明し、長年の課題である骨代謝共役機構の解明に決着をつける。Wnt シグナルを標的とした骨量増加を目指した治療法の確立と治療薬の開発は、歯科と内科の患者にとって、大いなる福音をもたらすと期待される。

#### 【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

- Takahashi N, Kobayashi Y et al.: Regulatory mechanism of osteoclastogenesis by RANKL and Wnt signals. *Front Biosci* 16:21-30, 2011.
- Maeda K, Kobayashi Y, Takahashi N et al.: Wnt5a-Ror2 signaling between osteoblast-lineage cells and osteoclast precursors enhances osteoclastogenesis. *Nature Med* 18:405-412, 2012.

#### 【研究期間と研究経費】

平成 25 年度 - 27 年度  
101,400 千円

#### 【ホームページ等】

<http://www.mdu.ac.jp/graduate/index.html>  
[takahashinao@po.mdu.ac.jp](mailto:takahashinao@po.mdu.ac.jp)

