

個 体 機 能 制 御 学 部 門

Department of Immunobiology and Neuroscience

免疫遺伝学分野

Division of Immunogenetics

教授：福井 宣規

Professor : Yoshinori Fukui, M.D., Ph.D

免疫系は「自己」と「非自己」を識別し、非自己成分（微生物，変異タンパク質）をすみやかに生体より排除し、その恒常性を維持するために構築されたシステムである。免疫系が真に生体にとって有益な監視システムとして機能するには、免疫系独自に進化した細胞高次機能の存在が不可欠である。例えば、外来異物やアポトーシス細胞の貪食，リンパ球やマクロファージの遊走，抗原認識といった細胞高次機能は免疫監視機構の根幹をなすものであり、それらはいずれも細胞骨格の再構築により巧妙に制御されている。私達はこれまでに免疫系特異的に発現する CDM ファミリー分子として DOCK2 を同定し、この分子がリンパ球や好中球の遊走や活性化において極めて重要な役割を演じることを明らかにした。本分野では、DOCK2 及びその関連分子を中心に、各種受容体刺激から細胞骨格再構築に至るシグナル伝達を解明し、免疫系の発生，分化，構築や機能発現における各シグナル伝達系の意義を明らかにすると共に、その理解に立脚して、自己免疫疾患，移植片拒絶など現代医学が抱える難治性疾患の新しい治療法，予防法を開発することを目標とし、研究を進めている。

今年度から、田尻 裕匡，山村 和彦が大学院博士課程学生として，春若 航一路が大学院修士課程学生として，生命科学科 4 年生の櫻井 哲哉が卒業研究のため，新たに研究室に参加した。

A. CDM ファミリー分子を介したシグナル伝達機構の解明とその機能解析

突然変異体を用いた遺伝学的解析より，*Caenorhabditis elegans*（線虫）において生殖巣の形成に重要な遠端細胞（distal tip cell）の移動に関与するいくつかの分子が同定されている。CED-5 もその 1 つであり，ヒトにおける DOCK180 および *Drosophila melanogaster*（ショウジョウバエ）における Myoblast City（MBC）と相同性を示すことより，これらの分子は現在その頭文字をとって CDM ファミリー分子とよばれている。これら分子はいずれも Rac の上流で機能することで細胞骨格の再構築に関与すると考えられており，細胞運動以外にも CED-5 はアポトーシス細胞の貪食，MBC は筋芽細胞の融合といった種々の細胞機能制御に関与することが知られている。私達は，マウス胸腺 cDNA ライブラリーよりこの CDM ファミリーに属する新しい遺伝子として *DOCK2* を単離し，ノックアウトマウスを作製することで，この分子が Rac 活性化を介してリンパ球の遊走および免疫シナプス形成を制

御することを明らかにすると同時に (Nature 412:826-831, 2001; Immunity 19:119-129, 2003; Immunity 21: 429-441, 2004), その欠損によりアロ移植心臓の長期生着が可能になることを実証し (J. Exp. Med. 22:1121-1130, 2005), その低分子阻害剤として CPYPP を開発した (Chem. Biol. 19:488-497, 2012). また, DOCK2 が好中球の遊走や活性酸素産生において重要な役割を演じること実証すると共に (J. Cell Biol. 174:647-652, 2006; Science 324:384-387, 2009), アレルギー反応や形質細胞様樹状細胞による I 型インターフェロン産生の制御分子として機能することを明らかにした (Nature Immunol. 8:1067-1075, 2007; J. Exp. Med. 207:721-730, 2010). 哺乳類において, 全部で 10 種類の DOCK ファミリー分子が発現しているおり, これらはその構造や低分子量 G タンパク質に対する特異性から 4 群に分類される. 以上の知見をふまえ, 今年度は以下のような研究を行った.

a. NK 細胞における DOCK2 の機能とその制御機構

NK 細胞はウイルス感染細胞や腫瘍細胞の排除において重要な役割を演じる一方、骨髄移植片の拒絶に働くことが知られている。活性型の NK 受容体が標的細胞上のリガンドを認識すると、その接触面に受容体が集積し、アクチン重合が惹起され、ここに向かって溶解性顆粒 (lytic granule) が移動する。これまで NK 細胞の細胞障害活性に Rac が重要であり、Vav1、Vav2、Vav3 が受容体の種類に応じて Rac の活性化を担うというモデルが信じられてきたが、Vav は SH3 ドメインや SH2 ドメインを有しており、これらを介してアダプター分子として機能することから、Vav が本当に Rac GEF として NK 細胞の細胞障害活性を制御しているか疑問であった。そこで、NK 細胞における DOCK2 の役割について詳細に解析した。その結果、DOCK2 を欠損した NK 細胞では、活性型受容体の種類と無関係に、腫瘍細胞や MHC クラス I 分子の発現を欠く骨髄細胞に対する細胞障害活性が、著しく低下することを見いだした。標的細胞との conjugate formation は、DOCK2 欠損 NK 細胞と野生型 NK 細胞間で遜色なかったが、DOCK2 欠損 NK 細胞では受容体刺激に伴う Rac 活性化がほぼ完全に消失し、その結果、接触面におけるアクチンの重合や受容体および溶解性顆粒の集積がひどく障害されていた。この lytic synapse の形成障害は、アデノウイルスベクターを用いて野生型 DOCK2 を発現させることで回復したが、Rac GEF 活性を欠く DOCK2 変異体では、回復させることができなかった。以上より、DOCK2 こそが NK 細胞の活性型受容体の下流で機能する Rac GEF であり、lytic synapse 形成を介して細胞障害活性を制御していることを明らかにした。

b. DOCK2 シグナル伝達機構の解明

DOCK2 シグナル伝達の全貌を明らかにする目的で yeast two hybrid, プロテオミクスを用

いたスクリーニングを行い、新たに DOCK2 会合分子を同定すると共に、DOCK2 自身が刺激に伴いリン酸化修飾を受けることを見だし、その部位を特定した。さらに、会合分子との相互作用部位やリン酸化部位に変異をいれたノックインマウスを作成した。

c. DOCK1 の機能とシグナル伝達機構

受容体型チロシンキナーゼの活性化は、peripheral ruffle と dorsal ruffle という 2 つの異なったタイプのラッフル膜を形成する。うち、細胞の背側にむけて形成される dorsal ruffle は細胞外マトリクスへの浸潤に重要であることが示唆されているが、その形成を制御するメカニズムの詳細は依然として不明である。DOCK1 と DOCK5 は、マウス胎児線維芽 (MEF) 細胞において発現する Rac 活性化分子である。私達は DOCK1/DOCK5 欠損 MEF を用いて、PDGF 刺激による Rac の活性化及び peripheral ruffle 形成が DOCK1 と DOCK5 により協調的に制御されているのに対し、DOCK1 単独欠損により dorsal ruffle 形成が障害されることを見出した。DOCK1 は DOCK5 と異なり、C 末の polybasic amino acid cluster を介して phosphatidic acid (PA) と結合し、dorsal ruffle 膜へ局在した。また、PA 産生を触媒する酵素である phospholipase D (PLD) の活性化を遺伝学的及び薬理的にブロックしたところ、dorsal ruffle の形成は顕著に抑制された。以上より、PDGF 受容体の下流で PLD が活性化し、PA の産生を介して DOCK1 の局在をコントロールすることで、dorsal ruffle 形成を選択的に制御していることが明らかとなった。

d. DOCK1 とがん細胞の浸潤・転移

「がん」が「がん」たる所以は、その浸潤能や転移能にあると言っても過言ではない。転移の有無が、がんの予後を規定する重要な因子のひとつとなっていることを考慮すると、がん細胞の浸潤、接着、遊走を制御するメカニズムの理解は、「次世代のがん治療」を考える上で極めて重要である。前述したように、DOCK1 は dorsal ruffle 形成に重要な役割を演じており、その発現はグリオブラストーマを初め、多くのがんにおいて、悪性度と相関することが指摘されている。私達はカナダのグループと協力して、臨床検体やマウスモデルを用いて、DOCK1 が HER2 陽性の乳がんの予後を規定する重要な分子であることを明らかにすると共に、CPYPP が DOCK2 のみならず DOCK1 にも作用し、乳がん細胞の浸潤を抑制する明らかにした。以上より、DOCK1 は新規抗がん剤開発の分子標的になると期待され、現在、薬効や選択性、溶解性に優れた次世代 DOCK 阻害剤の開発を進めている。

e. DOCK8 の機能とシグナル伝達機構

DOCK8 は DOCK-C ファミリーに属する分子であり、その変異は、ヒトにおいて

複合型免疫不全症を惹起することが知られている。私達は、DOCK8 を欠損した樹状細胞では、リンパ節実質への集積が障害されており、その結果 T 細胞を活性化できないことを見出した。DOCK8 欠損樹状細胞は、二次元環境下では正常に動くことができるが、三次元環境下での繊維状ネットワーク間隙の遊走や、subcapsular sinus floor の通過がひどく障害されていた。この DOCK8 の機能は Cdc42 の活性化を担う DHR-2 ドメインに依存していた。DOCK8 欠損樹状細胞においても、Cdc42 の活性化自身は障害されていなかったが、活性化した Cdc42 が先端膜に局在せず、結果として、アメーバ様の極性形成と運動性が顕著に障害されていた。この知見をさらに発展させるべく、樹状細胞以外の白血球における DOCK8 の機能を解析すると共に、その細胞内局在の制御機構や会合分子の同定を進めている。

業績目録

原著論文

1. Sakai Y, Tanaka Y, Yanagihara T, Watanabe M, Duan X, Terasawa M, Nishikimi A, Sanematsu F, Fukui Y. 2013.
The Rac activator DOCK2 regulates natural killer cell-mediated cytotoxicity in mice through the lytic synapse formation.
Blood, 122:386-393.
2. Sanematsu F, Nishikimi A, Watanabe M, Hongu T, Tanaka Y, Kanaho Y, Côté JF, Fukui Y. 2013.
Phosphatidic acid-dependent recruitment and function of the Rac activator DOCK1 during dorsal ruffle formation.
J Biol Chem. 288:8092-8100.
3. Unoki M, Masuda A, Dohmae N, Arita K, Yoshimatsu M, Iwai Y, Fukui Y, Ueda K, Hamamoto R, Shirakawa M, Sasaki H, Nakamura Y. 2013.
Lysyl 5-hydroxylation, a novel histone modification, by Jumonji domain containing 6 (JMJD6).
J. Biol. Chem. 288:6053-6062.
4. Cimino PJ, Yang Y, Li X, Hemingway JF, Cherne MK, Khademi SB, Fukui Y, Montine KS, Montine TJ, Keene CD. 2013.
Ablation of the microglial protein DOCK2 reduces amyloid burden in a mouse model of Alzheimer's disease.
Exp. Mol. Pathol. 94:366-371.

5. Laurin M, Huber J, Pelletier A, Houalla , Park M, Fukui Y, Haibe-Kains B, Muller WJ, Côté JF. 2013.
The Rac-specific guanine nucleotide exchange factor DOCK1 is a critical regulator of HER2-mediated breast cancer metastasis.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 110:7434-7439.
6. Kamakura S, Nomura M, Hayase J, Iwakiri Y, Nishikimi A, Takayanagi R, Fukui Y, Sumimoto H. 2013.
The cell polarity protein mlnsc regulates neutrophil chemotaxis via a noncanonical G protein signaling pathway.
Dev. Cell. 26:292-302.
7. Floc'h AL, Tanaka Y, Bantilan NS, Voisinne G, Altan-Bonnet G, Fukui Y, Huse M. 2013.
Annular PIP3 accumulation controls actin architecture and modulates cytotoxicity at the immunological synapse.
J. Exp. Med. 210:2721-2737.
8. Laurin M, Dumouchel A, Fukui Y, Côté JF. 2013.
The Rac-specific exchange factors Dock1 and Dock5 are dispensable for the establishment of the glomerular filtration barrier in vivo.
Small GTPases 4:4.
9. Damoulakis G, Gambardella L, Rossman K, Lawson C, Anderson K, Fukui Y, Welch H, Der, C, Stephens L, Hawkins P. 2014.
P-Rex1 directly activates RhoG to regulate GPCR-driven Rac signalling and actin polarity in neutrophils.
J. Cell Sci. in press

総説

1. 福井宣規. 2013.
新たな免疫抑制剤開発標的としての Rac 活性化因子 DOCK2.
細胞工学, 32, 1227-1231.
2. 宇留野武人、福井宣規. 2013.
免疫抑制剤開発の新しい分子標的としての DOCK2.
実験医学増刊, 32, 184-189.

学会発表

1. Tajiri H, Sanematsu F, Watanabe M, Uruno T, Fukui Y (2014, 2/7).
DOCK1 as a key molecule for dorsal ruffle formation and cancer cell metastasis.
International Symposium between Kyushu U. Post-Global COE and School of Biomedical Sciences,

- Monash U., Melbourne.
2. Yamamura K, Tanaka Y, Harada Y, Fukui Y (2014, 2/7).
Critical role of DOCK8 in dendritic cell trafficking during T cell immune responses.
International Symposium between Kyushu U. Post-Global COE and School of Biomedical Sciences,
Monash U., Melbourne.
 3. Ogawa K, Tanaka Y, Fukui Y (2013, 12/11-12/13).
Identification of a molecule critical for degranulation of mast cells and anaphylactic reaction.
Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology 2013, 千葉.
 4. Watanabe M, Nishikimi A, Terasawa M, Jean-François Côté, Fukui Y (2013, 12/11-12/13).
Critical roles of DOCK2 and DOCK5 in neutrophil chemotaxis, ROS production, and NETs formation.
Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology 2013, 千葉.
 5. Fukui Y (2013, 12/5-12/8).
Immune regulatory functions of DOCK family proteins in health and disease.
Germany-Japan Immunology Seminar, 静岡.
 6. Harada Y, Tanaka Y, Terasawa M, Stein JV, Kinashi T, Fukui Y (2013, 8/22-27).
DOCK8 is a Cdc42 activator critical for interstitial dendritic cell migration during immune responses.
15th International Congress of Immunology, Milan.
 7. Shiraishi A, Tanaka Y, Fukui Y (2013, 8/22-8/27).
Critical role of DOCK8 in dendritic cell trafficking during T cell immune responses.
15th International Congress of Immunology, Milan.
 8. Watanabe M, Nishikimi A, Terasawa M, Jean-François Côté, Fukui Y (2013, 8/22-8/27).
Critical roles of DOCK2 and DOCK5 in neutrophil chemotaxis, ROS production, and NETs formation.
15th International Congress of Immunology, Milan.
 9. Ogawa K, Tanaka Y, Fukui Y (2013, 8/22-8/27).
Identification of a molecule critical for degranulation of mast cells and anaphylactic reaction.
15th International Congress of Immunology, Milan.
 10. Ushijima M, Nishikimi A, Fukui Y (2013, 8/22-8/27).
B cell-intrinsic role of DOCK2 in T cell-dependent humoral immunity.
15th International Congress of Immunology, Milan.
 11. Yanagihara T, Sakai Y, Tanaka Y, Fukui Y (2013, 8/22-8/27).
The Rac activator DOCK2 regulates natural killer cell-mediated cytotoxicity through the lytic synapse
formation.
15th International Congress of Immunology, Milan.

脳機能制御学分野

Division of Neurofunctional Genomics

教授：中別府 雄作

Professor : Yusaku Nakabeppu, D.V.M., D. Sc.

生物にとって、その遺伝情報を担うゲノム DNA を細胞から細胞へ、親から子へと正確に伝え維持することは最も基本的な生物学的機能であるが、ゲノム DNA やその前駆体であるヌクレオチドは、酸素呼吸の過程で必然的に発生する活性酸素や生体防御のために生体が能動的に産生する活性酸素によって酸化される危険に常に曝されている。活性酸素に曝された DNA やヌクレオチドは様々な酸化的化学修飾を受けるが、このような酸化損傷は修復、除去されないと突然変異を引き起こすことで細胞のがん化の原因となり、あるいは細胞死を引き起こすことでパーキンソン病やアルツハイマー病などの神経変性疾患の原因となる。

本分野では、活性酸素による非増殖性細胞の障害として「脳・神経細胞死」に、また増殖性細胞の障害として「突然変異と発がん」と「神経新生の異常」に注目して「活性酸素によるゲノム障害とその防御機構」の解明を目指している。神経細胞はその個体の生涯を通して生存し機能する必要があるが、分裂能を欠くため加齢に伴う活性酸素等による障害により変性脱落する運命にある。そのため成体においても神経幹細胞からの新たな神経細胞の供給など神経回路網を保持する機構が幾重にも用意されていると考えられる。成体脳における神経新生は脳虚血や神経興奮毒性などに伴い脳障害が引き起こされた際に著しく亢進する。本分野では、これまでに脳における酸化ストレス応答遺伝子として前初期遺伝子群の *Jun*, *Fos* ファミリー遺伝子とその下流で発現が制御される遺伝子群を同定しており、「成体脳における脳・神経細胞の運命決定機構」の制御機構の解明を進めている。

平成 25 年度の人事異動は次の通りであった。4 月には、Erika Katherine Castillo Carrión が博士課程へ、加藤木敦央が修士課程へ進学し、生命科学科 4 年生の高橋香妃と森岡紀子が当分野で卒業研究を開始した。平成 26 年 3 月に大学院生の小早川優子が博士課程を修了し、米嶋康臣が単位修得の上退学した。

A. アルツハイマー病脳における糖尿病関連遺伝子の発現異常

現在、世界中で 2,000 万人以上の人々が認知症に苦しんでおり、この数は高齢者人口の急速な増加により、2040 年までに 8,000 万人を超えると予想されている。わが国でも

高齢者人口の急速な増加とともに認知症患者が増加しており、厚生労働省の推計によればその数は現在 500 万人を越える可能性があるといわれている。予防、早期治療を含めた総合的な対策を講じてこの老年期認知症の増加に歯止めをかけることは、わが国の医療行政における焦眉の課題である。最近の研究から、インスリン抵抗性や糖尿病がアルツハイマー病を含む認知症発症や進行の危険因子となることが報告され、糖尿病患者の増加が原因で認知症高齢者が増加している可能性が示唆されている。しかし、なぜ糖尿病がアルツハイマー病の危険因子となるのか、その分子メカニズムはよく理解されていない。

我々は、アルツハイマー病をはじめとする認知症患者の脳における遺伝子発現プロファイルの変化を明らかにすることで、認知症発症の危険因子とその分子メカニズムを遺伝子レベルで解明できるのではないかと考え、九州大学で 50 年間にわたって継続されている久山町研究に献体された方の死後脳を用いて遺伝子発現プロファイルを詳細に解析し、さらにその結果をアルツハイマー病のモデルマウスの脳における遺伝子発現プロファイルと比較した。

2008 年から 2012 年までに久山町研究に献体された方の死後脳 93 例について RNA を抽出し、マイクロアレイ解析を行った結果、前頭葉（非認知症 18 例、アルツハイマー病 15 例）、側頭葉（非認知症 19 例、アルツハイマー病 10 例）、海馬（非認知症 10 例、アルツハイマー病 7 例）について全遺伝子の発現プロファイルを得ることができた。性別、脳血管性認知症、アルツハイマー病の三要因について分散分析を行ったところ、アルツハイマー病による発現プロファイルの変化が最も大きく、さらに海馬>側頭葉>前頭葉の順に顕著な変化を認めた。アルツハイマー病患者の脳における発現プロファイルを 14 ヶ月齢のアルツハイマー病のモデルマウス(3xTg-AD-H マウス[変異型マウス *Psen1* 遺伝子, 変異型ヒト *APP/MAPT* トランスジーン のホモ接合体]) の海馬における発現プロファイルと比較したところ、精神疾患やアルツハイマー病に関連する既知の遺伝子群の発現変化に加えて、両者共にインスリン不応答性を示す遺伝子発現プロファイルが明らかになった。

アルツハイマー病患者の海馬ではインスリンレセプターと協調的に作用してインスリン・シグナリング、さらに糖代謝の制御を司る肝細胞増殖因子の受容体 MET とプロインスリンの切断、インスリン産生に必須な PCSK1 の発現低下がもっとも顕著であった。正常脳サンプルの免疫染色による解析から MET と PCSK1 が大脳皮質や海馬の神経細胞に高発現している事が明らかになったが、アルツハイマー病患者脳では神経細胞における MET と PCSK1 の発現が著明に低下していた。興味深い事に、アルツハイマー病患者脳で

は反応性アストロサイトにおいて MET の高発現が認められた。また、PCSK1 とともにプロインスリンの切断に不可欠な PCSK2 についても mRNA レベルとタンパク質レベルでの発現の低下が観察された。

アルツハイマー病患者脳において顕著な発現低下を認めたインスリン産生に不可欠な PCSK1 は、3xTg-AD-H マウスの海馬でも顕著に発現低下していた。我々は、PCSK1 を発現している海馬神経細胞でインスリンが発現していることを確認している。3xTg-AD-H マウスでは、導入した変異型遺伝子によりアミロイド β 産生と神経原線維変化が著しく亢進し、数ヶ月齢から認知機能の低下を示す。しかしながら、アルツハイマー病患者脳におけるインスリン・シグナリング系の遺伝子発現の低下は、インスリン抵抗性や糖尿病の履歴とは無関係であった。すなわち、アルツハイマー病に特徴的な病理変化がインスリンの産生低下を引き起こし、その結果インスリン・シグナリングの下流の遺伝子発現の低下をもたらしたと結論される。

アミロイド β に曝された細胞ではミトコンドリア等からの活性酸素の産生が亢進し、NF- κ B など炎症性応答に関わる遺伝子が活性化される事が知られている。興味深い事に、インスリン産生の主要な組織である膵臓ランゲルハンス島の β 細胞では NF- κ B の活性化により PCSK1 の発現が抑制されることが報告されており、アルツハイマー病患者の脳においても同様のメカニズムで PCSK1 の発現が抑制されている可能性が高い。ミトコンドリア関連遺伝子の発現を詳細に検討したところ、アルツハイマー病患者の脳では正常コントロールと比べてほとんどの遺伝子の発現が低下していることが明らかになった。アルツハイマー病患者の脳ではミトコンドリア機能が低下し、活性酸素の生成が亢進しているようである。

インスリン・シグナリング系は神経細胞の生存やその機能維持に不可欠で、インスリン・シグナリング系が破綻したアルツハイマー病患者の脳は代謝障害や炎症反応に起因する様々なストレスに対して著しく脆弱であると考えられる。このような状況下で末梢のインスリン抵抗性または糖尿病を発症すると、さらに代謝障害や炎症反応に起因する様々なストレスが増悪し、アルツハイマー病の病態の進行が促進されることが考えられる。このように、アルツハイマー病の病理変化そのものがインスリン・シグナリング系の遺伝子発現の低下をもたらすために、末梢のインスリン抵抗性または糖尿病がアルツハイマー病の発症や進行を増悪すると結論される。

これらの知見は、アルツハイマー病発症の病理学に新たな分子機構を提案するものであり、アルツハイマー病の予防および治療のための新たな戦略を開発するのに役立つ新規の分子標的を提供するものと位置づけられる。

以上の研究は、九州大学久山町研究の一環として医学研究院環境医学分野ならびに神経病理学分野との共同研究として推進している。

B. ヒトミトコンドリア転写因子 hTFAM の発現はアルツハイマー病モデルマウスの認知機能低下を改善する

アルツハイマー病の病態において、ミトコンドリア機能障害が重要な役割を持つことが示唆されている。アミロイドβはミトコンドリアのABAD蛋白質に結合し、ミトコンドリアの機能不全と活性酸素の生成を亢進することが報告されているが、ミトコンドリアから漏出した活性酸素はさらに近傍のミトコンドリアに作用してミトコンドリア機能不全を増幅し、軸索の輸送障害や神経細胞死の誘導を介して認知症の病態を増悪すると考えられる。アルツハイマー病患者の剖検脳の解析から、神経細胞脱落の顕著な部位では生残している神経細胞のミトコンドリアと核のDNAに主要な酸化塩基である8-オキシグアニン(8-oxoG)が高度に蓄積していることが報告されている。今回我々は、ミトコンドリアDNAに結合してDNAを安定に維持するヒトミトコンドリア転写因子(hTFAM)の高発現が3xTg-ADマウスの病態に及ぼす影響を解析した。3xTg-ADホモ接合体(3xTg-AD-H)とhTFAMトランスジェニックホモ接合体(hTFAM-Tg-H)を交配し、得られたヘミ接合体マウス(3xTg-AD-h/TFAM-Tg-h)と3xTg-ADヘミ接合体マウス(3xTg-AD-h)を比較解析した。hTFAMの発現により、13ヶ月齢の3xTg-AD-hマウスの大脳皮質と海馬におけるアミロイドβ蓄積が著明に抑制されていた。さらに8-oxoGの蓄積も顕著に抑制されていた。モーリス水迷路試験の解析により、hTFAMの発現が3xTg-AD-hマウスの空間記憶および学習能力の低下を著明に改善することを見いだした。次に、変異型*PSEN1* (*P117L*) 遺伝子を導入したヒトiPS細胞由来のコリン作動性神経細胞を用いて、ミトコンドリア機能を解析した。変異型*PSEN1* (*P117L*) 遺伝子を導入した神経細胞では、細胞外に分泌されるアミロイドβ量が野生型*PSEN1* 遺伝子を導入した神経細胞よりも有意に増加しており、アルツハイマー病モデル細胞として有用と考えられた。ミトコンドリア膜電位感受性色素JC-1を用いた解析により、野生型*PSEN1* 遺伝子を導入した神経細胞と比較し、変異型*PSEN1* (*P117L*) 遺伝子を導入した神経細胞では明らかなミトコンドリア膜電位の異常を認めた。さらに、リコンビナントhTFAMタンパク質の細胞外投与により、変異型*PSEN1* (*P117L*) 遺伝子を導入した神経細胞のミトコンドリア機能不全の改善が示唆された。

以上の結果から、ミトコンドリアDNAを安定に維持するhTFAMタンパク質の高発現がミトコンドリア機能の改善を介してアルツハイマー病における認知症の進行を抑制することが示唆された。

以上の研究は、医学研究院臨床医学分野との共同研究として推進している。

C. *Fosb* 遺伝子によるミクログリアの機能制御

転写因子 AP-1 (Activator Protein-1) の構成タンパク質, FOS family の一つである FOSB は, JUN family と協調的に働き転写を制御している。FOSB タンパク質をコードしている *Fosb* 遺伝子は alternative splicing によって *Fosb* mRNA と Δ *Fosb* mRNA の 2 つの mature mRNA をコードし, *Fosb* mRNA から全長型 FOSB, Δ *Fosb* mRNA から FosB の C 末端領域が欠けた Δ FOSB タンパク質が翻訳される。*Fosb* 遺伝子産物は海馬や線条体を含む脳内の複数の部位で発現しており, *Fosb* 遺伝子を完全に欠損する *Fosb*-null マウスはうつ様行動や自然発生てんかんを起こすため, *Fosb* 遺伝子は脳機能に重要な役割を持っていると考えられる。これまで神経細胞における *Fosb* 遺伝子の機能に注目した研究が主流であったことから, 我々は脳内の免疫担当細胞であるミクログリアに注目し, *Fosb* 遺伝子産物により発現が制御される遺伝子をマイクロアレイにより探索した。その結果, 6 つの遺伝子の発現が有意に変化していることを見出した。このうち, 補体 C5a の受容体をコードする *C5ar1* と *C5ar2* 遺伝子の発現レベルに特に顕著な変化が見られたことから, この 2 つの遺伝子に注目して解析を行った。野生型ミクログリアと比較すると, *C5ar1*, *C5ar2* mRNA レベルはいずれも *Fosb*-null ミクログリアで顕著に減少しており, 分解型 C5a への細胞遊走性も低下していた。また, *Fosb*-null マウスはカイニン酸誘発てんかんに抵抗性を示し, カイニン酸投与 24 時間後のマウスで見られる *C5ar1* mRNA の発現量の増加が, *Fosb*-null マウスでは顕著に低下していることがわかった。さらに, カイニン酸投与 24 時間後に見られるミクログリアの活性化が, *Fosb*-null マウスでは有意に減弱していることを, 形態学的変化, 活性化ミクログリアのマーカーである CD68 の発現, *I16*, *Tnf* mRNA の発現等で確認した。以上のことから, *Fosb* 遺伝子産物はミクログリアでの *C5ar1*, *C5ar2* 遺伝子発現を制御することによりミクログリアの活性化に寄与している事が明らかになった。

D. 中枢神経系における β -ガラクトシド結合レクチン, ガレクチン-1 の発現神経細胞の同定

我々は, 転写因子をコードする *Fosb* 遺伝子の研究を進める過程でガレクチン-1 の発現が *Fosb* の下流で制御されることを見出し, *Fosb* による細胞増殖やアポトーシス誘導にガレクチン-1 が関わることを明らかにしてきた。げっ歯類の脳においては, ガレクチン-1 は海馬歯状回の神経前駆細胞とアストロサイトに発現し, ストレス下に誘導され

る海馬歯状回における神経新生を促進的に制御する。我々は中枢神経系におけるガレクチン-1 発現細胞を同定するために、多重蛍光免疫染色によってマウス海馬におけるガレクチン-1 発現細胞の特徴を詳細に検討した。その結果、ガレクチン-1 発現細胞は、93%が NeuN 陽性の神経細胞であった。ガレクチン-1 発現神経細胞は、主に海馬多形細胞層と錐体細胞層、海馬門、そして海馬台に分布していた。また、ガレクチン-1 発現細胞の 88%が β -tubulin III 陽性で神経突起の発達が顕著であった。ガレクチン-1 を発現する神経細胞のほとんどはソマトスタチン(somatostatin) 陽性 (77%)、グルタミン酸脱炭酸酵素 (GAD67) 陽性 (79%) の介在神経であることがわかった。他の介在神経マーカーであるパルブアルブミン(parvalbumin) (34%) とニューロペプチド Y (neuropeptide Y) (31%) も 3 分の 1 程度に発現が認められた。一方、カルレティニン (calretinin) とカルビンディン (calbindin) の発現は 3~5%とわずかであった。以上の結果は、ガレクチン-1 が介在神経のサブグループのマーカーとして有用な可能性を示唆している。

E. *SOD1*^{G93A} トランスジェニック ALS モデルマウスにおけるガレクチン-1 の発現

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 患者の剖検例において、脊髄運動神経の腫大部にニューロフィラメントの凝集体とともにガレクチン-1 の過剰な蓄積が報告されている。ガレクチン-1 は還元的な環境下ではホモダイマーとして細胞増殖、細胞接着、腫瘍転移、T 細胞のアポトーシス誘導に関わるが、酸化的な環境下ではシステイン残基の酸化によりモノマーの酸化型ガレクチン-1 に変換される。酸化型ガレクチン-1 は神経の軸索再生を促進する活性を有し、ALS モデルマウスへの長期投与によりその生存率を改善することが報告されているが、内在性のガレクチン-1 が ALS の発症にどのように関わるのかこれまで全く報告がない。

今回我々は、ALS の発症におけるガレクチン-1 の関与を明らかにする目的で、*SOD1*^{G93A} トランスジェニックマウスにおけるガレクチン-1 の発現と局在を解析し、以下の事実を見出した。*SOD1*^{G93A} トランスジェニックマウスでは、運動機能失調の発症前から脊髄運動神経軸索の腫大部にニューロフィラメントとともにガレクチン-1 が過剰に蓄積したニューロスフェロイド (axonal spheroid) が確認された。この知見は、ALS 患者の脊髄運動神経のニューロスフェロイドに認められるガレクチン-1 の過剰蓄積が、*SOD1*^{G93A} トランスジェニック ALS モデルマウスで再現される ALS に普遍的な病理変化であることを世界で初めて明らかにしたものである。運動神経変性の進行期には軸索周囲に増生したアストロサイトにガレクチン-1 の高発現を認めた。現在、*SOD1*^{G93A} トランス

ジェニックマウスにおけるガレクチン-1 欠損の影響の解析を進めている。

F. 8-オキシグアニンはマウスの生殖系列自然突然変異の原因である

我々はこれまで、ヌクレオチドの修飾体やゲノム DNA 中に蓄積した修飾塩基に注目し、そのゲノム DNA への蓄積を防御する酵素系の研究を進めてきた。その過程で、活性分子種は DNA 中の塩基よりも遊離のヌクレオチドの塩基に作用しやすく、さまざまな修飾ヌクレオチドを生体内で生成することを明らかにした。大腸菌からヒトに至るまでほとんどの生物は、ヌクレオチドプール中で生成された修飾ヌクレオシド三リン酸を積極的に分解・排除するヌクレオチドプール浄化酵素系を備えて、ゲノム DNA や RNA への異常塩基の蓄積を防いでいる。一方で、このような修飾ヌクレオチドが DNA ポリメラーゼの作用でゲノム DNA に取り込まれたり、DNA 中の塩基が活性分子種で直接修飾されてゲノム DNA 中に生じた修飾塩基は、多様な DNA 損傷修復酵素系の働きで除去され常に低いレベルに保たれている。

ヒトやほ乳動物では、MutT Homolog-1 (MTH1) タンパク質が主要なヌクレオチドの酸化体である 8-oxo-dGTP を 8-oxo-dGMP とピロリン酸に分解し、DNA 複製の基質として利用されないようにしている。DNA 中に存在する 8-oxoG は OGG1 (8-oxoG DNA glycosylase) によって切り出され、塩基除去修復によってグアニンに置換される。一方、8-oxoG に対合したアデニンは MUTYH (MutY Homolog, adenine DNA glycosylase) によって切り出され、塩基除去修復によりシトシンに置換されると、次に OGG1 によって 8-oxoG が除去修復され、グアニン：シトシン対合が維持される。

8-oxoG で誘導される突然変異を回避する防御システムを欠損する *Mth1/Ogg1/Mutyh* triple knockout (TOY-TKO) マウスの体細胞と生殖細胞には、8-oxoG が野生型マウスの 1.5-2.5 倍程度まで蓄積する。TOY-TKO マウスの病理解析では複数種類の腫瘍が確認され、体細胞突然変異頻度の上昇が確認された。腫瘍はリンパ腫に加え皮膚や乳腺、涙腺等 C57BL/6J ではまれなものが発生していた。また遺伝性の水頭症など、先天性異常の発生が頻繁に観察された。水頭症はメンデル遺伝で優性遺伝パターンを示した。TOY-TKO マウスにおいて腫瘍に加えて遺伝性の水頭症が観察されたことは、8-oxoG の蓄積に起因する突然変異が体細胞のみならず生殖系列でも発生し、世代を越えて伝達されることを示している。我々は 40.9Mb のマウス転写領域をカバーするエクソーム解析を行い、TOY-TKO マウスの 1 世代当たりの生殖系列の突然変異発生率が野生型マウスと比較して約 18 倍 (2.0×10^{-7} mutation/base/generation) に上昇していることを見出した。同定された変異の 99% は 8-オキシグアニンに起因する G-T トランスバージョン突

然変異で、その約 60%は遺伝子の機能に影響を与えるものであった。

以上は実験室内で遺伝子改変マウスを用いて行った実験から明らかになった結果だが、同じほ乳類である人類においてもまた、日常生活において DNA の酸化が自然にかつ恒常的に起きていることが明らかにされている。ヌクレオチドプールや DNA 中に生じた酸化損傷が排除・修復されないと体細胞では腫瘍発生の原因となり、また生殖系列では遺伝的変異の原因となることが示唆される。一方で、我々の体の中では酸化された DNA を修復する機構が正常に働くことでこのような突然変異の発生を抑制し、これらの異常から体を守っていることを示している。以上の結果は、DNA の酸化が生殖細胞突然変異を通して一人一人が違った特徴を持つことの遺伝的要因、すなわち遺伝的多様性の原因になるとともに、がんだけでなく様々な遺伝子病の原因にもなることを意味している。

今回我々が作製した遺伝子改変マウス系統と全エクソンの DNA 配列解析によって、ほ乳類ではこれまで実験的に検出することが困難だった「新たに発生した遺伝的変異」を効率的に検出し、その特徴を解析することが可能になった。本研究は、ヒトの遺伝子病が新たに発生する原因を説明し、また個人間で特定の病気のかかりやすさに差があるなどの個体差を生む原因の理解に貢献する。また一人一人が違った特徴を持つことの遺伝的要因、すなわち遺伝的多様性の発生機構、さらには生物の進化に酸素がどのように関わってきたのかという普遍的な疑問を遺伝子の変化の観点から解明するための糸口になると期待している。

G. ITPA 欠損細胞では dITP が DNA 合成時に取り込まれ、ミスマッチ修復に依存して細胞増殖抑制が誘導される

イノシン三リン酸 (ITP) およびデオキシイノシン三リン酸 (dITP) は、それぞれ ATP と dATP のアデニン塩基の炭素 6 位に位置するアミノ基が酸化的に脱アミノ化されたものである。ほ乳動物には ITP や dITP を一リン酸型へと分解して排除する Inosine triphosphate pyrophosphatase (ITPA) や Nucleoside diphosphate linked moiety X-type motif16 (NUDT16) といったヌクレオチドプール浄化酵素が備わっている。我々は、ITPA や NUDT16 の欠損あるいは発現低下は、核ゲノム DNA の一本鎖切断を伴って細胞増殖の抑制を誘導することを明らかにしてきた。

今回、ITPA や NUDT16 を欠損した細胞で認められる細胞増殖抑制の分子機構を解明することを目的として研究を行った。まず DNA 一本鎖切断が生じていることから dITP が DNA 複製時に取り込まれることが原因になると考え、DNA 中のデオキシイノシン (dI) を認識して DNA 鎖を切断することが報告されていた 2 つの修復酵素、

N-Methylpurine-DNA glycosylase と Endonuclease V が関与している可能性を検討した。しかし、これらの酵素のノックダウンでは ITPA や NUDT16 欠損細胞の増殖抑制は解除されず、その関与は否定された。次に、DNA 中に取り込まれた dI がミスマッチ修復 (MMR) により認識されて DNA 鎖が切断される可能性を検討した。MMR に必須なタンパク質 MLH1 をノックダウンもしくは完全欠失させたところ、NUDT16 ノックダウンヒト子宮頸癌由来 HeLaMR 細胞、ITPA ノックダウンヒト大腸癌由来 H414 細胞、ITPA ノックアウトマウス胚由来初代線維芽細胞のそれぞれにおいて認められる細胞増殖の抑制が完全もしくは部分的に解除された。また、これらの細胞において核ゲノム DNA における一本鎖切断の蓄積が消失していることをコメントアッセイにより確認した。次に、ITPA ノックダウン H414 細胞の培養液中に dI を添加したところ、増殖抑制の亢進を認めた。dI 添加による増殖の抑制効果は ITPA をノックダウンしない細胞では弱く、MLH1 欠損細胞では全く認めなかった。これらの結果から dITP が複製時に DNA に取り込まれると MMR 依存的に DNA 一本鎖切断が生じて細胞増殖の抑制が誘導されることが示唆された。最後に、DNA 中の dI がどのヌクレオシドとペアを形成した場合に MMR タンパク質複合体により認識されるのかという問題についてゲルシフトアッセイを用いて検討した。その結果、dI:デオキシグアノシン (dG) ペアを含む DNA 鎖に核抽出液を加えると DNA バンドのシフトが認められ、さらに抗 MSH6 抗体を加える事で DNA バンドのスーパーシフトを認めた。これらの結果は、MMR の基質認識ユニットである MSH2/MSH6 複合体 MutS α が DNA 中の dI:dG ペアを認識、結合することを示している。以上から、哺乳動物における ITPA の欠損は MMR に依存して DNA 一本鎖切断と細胞増殖の抑制を引き起こすことが明らかになった。

業績目録

原著論文

1. H. Nomaru, K. Sakumi, A. Katogi, Y. N. Ohnishi, K. Kajitani, D. Tsuchimoto, E.J. Nestler, Y. Nakabeppu. 2014.
Fosb gene products contribute to excitotoxic microglial activation by regulating the expression of complement C5a receptors in microglia.
Glia. in press.

2. M. Ohno, K. Sakumi, R. Fukumura, M. Furuichi, Y. Iwasaki, M. Hokama, T. Ikemura, T. Tsuzuki, and Y. Nakabeppu. 2014.
8-oxoguanine causes spontaneous de novo germline mutations in mice.
Sci Rep. in press.
3. F. Takahashi-Yanaga, T. Yoshihara, K. Jingushi, K. Igawa, K. Tomooka, Y. Watanabe, S. Morimoto, Y. Nakatsu, T. Tsuzuki, Y. Nakabeppu, and T. Sasaguri. 2014.
DIF-1 inhibits tumor growth in vivo reducing phosphorylation of GSK-3beta and expressions of cyclin D1 and TCF7L2 in cancer model mice.
Biochem Pharmacol, in press.
3. F. Yogiarti, M. Kunisada, E. Nakano, R. Ono, K. Sakumi, S. Oka, Y. Nakabeppu, and C. Nishigori, 2014.
Inhibitory effects of dietary *Spirulina platensis* on UVB induced skin inflammatory responses and carcinogenesis.
J Invest Dermatol, in press.
4. Y. Kobayakawa, K. Sakumi, K. Kajitani, T. Kadoya, H. Horie, J. Kira, and Y. Nakabeppu. 2014.
Galectin-1 deficiency improves axonal swelling of motor neurons in SOD1G93A transgenic mice.
Neuropathol Appl Neurobiol. in press.
5. H. Hamasaki, H. Honda, S.O. Suzuki, M. Hokama, Y. Kiyohara, Y. Nakabeppu, and T. Iwaki. 2014.
Down-regulation of MET in hippocampal neurons of Alzheimer's disease brains. Neuropathology. in press.
6. M. Hokama, S. Oka, J. Leon, T. Ninomiya, H. Honda, K. Sasaki, T. Iwaki, T. Ohara, T. Sasaki, F.M. Laferla, Y. Kiyohara, and Y. Nakabeppu. 2014.
Altered Expression of Diabetes-Related Genes in Alzheimer's Disease Brains: The Hisayama Study. Cereb Cortex. in press.
7. C. M. Jalland, S.L. Benestad, C. Ersdal, K. Scheffler, R. Suganthan, Y. Nakabeppu, L. Eide, M. Bjoras, and M.A. Tranulis. 2014.
Accelerated clinical course of prion disease in mice compromised in repair of oxidative DNA damage.
Free Radic Biol Med. 68, 1-7.
8. K. Kajitani, Y. Kobayakawa, H. Nomaru, T. Kadoya, H. Horie, and Y. Nakabeppu. 2014.
Characterization of galectin-1-positive cells in the mouse hippocampus.
Neuroreport. 25, 171-176.

9. N. Murakami, T. Ohtsubo, Y. Kansui, K. Goto, H. Noguchi, Y. Haga, Y. Nakabeppu, K. Matsumura, and T. Kitazono. 2014.
Mice heterozygous for the xanthine oxidoreductase gene facilitate lipid accumulation in adipocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 34, 44-51.
10. Matsumoto, M. Yamafuji, T. Tachibana, Y. Nakabeppu, M. Noda, and H. Nakaya. 2013.
Oral 'hydrogen water' induces neuroprotective ghrelin secretion in mice. *Sci Rep.* 3, 3273.
11. Y. Sakai, K. Ohkubo, Y. Matsushita, S. Akamine, Y. Ishizaki, H. Torisu, K. Ihara, M. Sanefuji, M.S. Kim, K.U. Lee, C.A. Shaw, J. Lim, Y. Nakabeppu, and T. Hara. 2013.
Neuroendocrine phenotypes in a boy with 5q14 deletion syndrome implicate the regulatory roles of myocyte-specific enhancer factor 2C in the postnatal hypothalamus. *Eur J Med Genet.* 56, 475-483.
12. H. Tsuji, H. Ishii-Ohba, T. Shiomi, N. Shiomi, T. Katsube, M. Mori, M. Neno, M. Ohno, D. Yoshimura, S. Oka, Y. Nakabeppu, K. Tatsumi, M. Muto, and T. Sado. 2013.
Nature of nontargeted radiation effects observed during fractionated irradiation-induced thymic lymphomagenesis in mice. *J Radiat Res.* 54, 453-466.
13. N. Yutsudo, T. Kamada, K. Kajitani, H. Nomaru, A. Katogi, Y.H. Ohnishi, Y.N. Ohnishi, K. Takase, K. Sakumi, H. Shigeto, and Y. Nakabeppu. 2013.
fosB-null mice display impaired adult hippocampal neurogenesis and spontaneous epilepsy with depressive behavior. *Neuropsychopharmacology.* 38, 895-906.

総説

1. 中別府雄作. 2013.
核酸の酸化損傷に起因する神経変性の分子機序.
医学のあゆみ, 27, 961-968.

著書

1. Sango, K., Niimi, N., Tsukamoto, M., Utsunomiya, K., Sakumi, K., Nakabeppu, Y., Kadoya, T., and Horie, H. 2014.
What have we learn from cultured adult dorsal root ganglion neurons

Ganglion Cells (ed. Liora G. Vlastimil), pp. 125-148.

Nova Science Publishers, Inc. Hauppauge, NY, USA.

2. 中別府雄作. 2014.

遺伝子変異の機構.

図説 分子病態学 5版 (一瀬白帝, 鈴木宏治編集), p. 118-126.

中外医学社

学会発表

1. Yusaku Nakabeppu, Mizuki Ohno, Ryutaro Fukumura, Yuki Iwasaki, Yoshimichi Ikemura, Teruhisa Tsuzuki, Yoichi Gondo, Kunihiko Sakumi (2014, 3/21-3/22).

Oxidation of nucleic acids and control mechanisms of genetic diversity in mammals.

International Symposium on Germline Mutagenesis and Biodiversification, Fukuoka, Japan.

2. Megumi Yamafuji, Akio Matsumoto, Tomoko Tachibana, Yusaku Nakabeppu, Mami Noda, Haruyuki Nakaya (2014, 3/19-3/21).

Drinking "hydrogen water" induces ghrelin secretion and protects dopaminergic neurons in MPTP-induced Parkinson's disease model mice.

第 87 回日本薬理学会年会, 仙台.

3. Zijing Sheng, Sugako Oka, Yasuhiro Ikeda, Margherita Bignami, Yusaku Nakabeppu (2014, 3/16-3/17).

8-oxo-dGTP generated in nucleotide pools is a major cause of neurodegeneration under oxidative stress.

International symposium "New Frontier of Molecular Neuropathology 2014", Tokyo, Japan.

4. Mizuki Ohno, Kunihiko Sakumi, Ryutaro Fukumura, Yuki Iwasaki, Yoshimichi Ikemura, Teruhisa Tsuzuki, Yoichi Gondo, Yusaku Nakabeppu (2014, 3/14-3/17)

8-Oxoguanine causes spontaneous de novo germline mutations : a study from the mutator mouse line.

SMBE Satellite Meeting/NIG International Symposium: The Causes of Genome Evolution, Mishima, Japan.

5. Yusaku Nakabeppu, Mizuki Ohno, Kunihiko Sakumi (2014, 2/7).

Oxidation of nucleic acids by reactive oxygen species and control mechanisms of genetic diversity in mammals.

International Symposium between Kyushu University Post-Global Centers of Excellence Program

- and School of Biomedical Sciences, Monash University, Melbourne, Australia.
6. Yasuto Yoneshima, Daisuke Tsuchimoto, Nona Abolhassani, Teruaki Iyama, Kunihiro Sakumi, Naoko Shiomi, Masahiko Mori, Tadahiro Shiomi, Yusaku Nakabeppu (2014, 2/7).
Accumulation of deoxyinosine triphosphate induces mismatch repair-dependent cell growth arrest and instability of genomic DNA.
International Symposium between Kyushu University Post-Global Centers of Excellence Program and School of Biomedical Sciences, Monash University, Melbourne, Australia.
 7. Hiroko Nomaru, Kunihiro Sakumi, Atsuhisa Katogi, Yoshinori N Ohnishi, Daisuke Tsuchimoto, Yusaku Nakabeppu (2014, 2/7).
Microglial activation by *Fosb* gene.
International Symposium between Kyushu University Post-Global Centers of Excellence Program and School of Biomedical Sciences, Monash University, Melbourne, Australia.
 8. 外間政朗, 岡素雅子, Julio Leon, 二宮利治, 本田裕之, 佐々木健介, 岩城徹, 小原知之, 清原裕, 中別府雄作 (2013, 12/13-12/14).
アルツハイマー病脳における糖尿病関連遺伝子の発現異常 : 久山町研究.
第 18 回日本神経精神医学会, 大阪.
 8. 能丸寛子, 作見邦彦, 加藤木敦央, 大西克典, 梶谷康介, 土本大介, Eric J. Nestler, 中別府雄作 (2013, 12/3-12/6).
Fosb 遺伝子産物は補体 C5a レセプターの遺伝子発現を制御することにより, ミクログリアの活性化に寄与している
第 36 回日本分子生物学会, 神戸.
 9. 大野みずき, 中津可道, 中別府雄作, 續輝久 (2013, 12/3-12/6).
酸化 DNA 損傷と消化管がん.
第 36 回日本分子生物学会, 神戸.
 10. 岡素雅子, Julio Leon, 外間政朗, 加藤木敦央, 作見邦彦, 井手友美, Kang Dongchon, 中別府雄作 (2013, 12/3-12/6).
Expression of human mitochondrial transcriptional factor A (hTFAM) improves cognitive function in Alzheimer's disease model mice.
第 36 回日本分子生物学会, 神戸.
 11. 米嶋康臣, 土本大介, 外間政朗, Abolhassani Nona, 猪山輝昭, 作見邦彦, 塩見尚子, 森雅彦, 塩見忠博, 中別府雄作 (2013, 12/3-12/6).
デオキシイノシン三リン酸の蓄積はミスマッチ修復機構に依存した細胞増殖抑制とゲノム

不安定性を引き起こす。

第 36 回日本分子生物学会，神戸。

12. Erika Castillo, Julio Leon, 秋本頼子, 作見邦彦, 岡素雅子, 土本大介, 中別府雄作 (2013, 12/3-12/6).

Cytotoxic effects of X-ray irradiation on proliferating and differentiated human neuroblastoma cell line SH-SY5Y, and their modulation by BDNF and inhibitors for CDK5 and calpains.

第 36 回日本分子生物学会，神戸。

13. Hiroko Nomaru, Kunihiko Sakumi, Daisuke Tsuchimoto, Yusaku Nakabeppu (2013, 11/9-11/13).

Fosb gene products regulate expression of *C5ar1* and *C5l2* genes and microglial activation

The 43rd annual meeting of the Society for neuroscience, San Diego. CA, USA.

14. Yuko Kobayakawa, Kunihiko Sakumi, Yusaku Nakabeppu (2013, 11/9-11/13).

Dual effects of Galectin-1 in amyotrophic lateral sclerosis.

The 43rd annual meeting of the Society for neuroscience, San Diego. CA, USA.

15. Sugako Oka, Julio Leon, Masaaki Hokama, Atsuhisa Katogi, Sakumi Kunihiko, Dongchon Kang, Yusaku Nakabeppu (2013, 11/6-11/7)

Expression of human mitochondrial transcriptional factor A (hTFAM) improves cognitive function in Alzheimer's disease model mice.

International Symposium on Mitochondria 2013, Tokyo, Japan.

16. Zijng Sheng, Sugako Oka, Yusaku Nakabeppu (2013, 11/4-11/5)

MUTYH-dependent neurodegeneration initiated by mitochondrial accumulation of 8-oxoguanine in neurons is efficiently suppressed by MTH1 and OGG1.

10th Conference of the Asian Society of Mitochondrial Research and Medicine (ASMRM), Seoul, Korea.

17. 續輝久, 大野みずき, 中津可道, 中別府雄作 (2013, 10/3-10/5).

Oxidative stress-induced tumorigenesis in the small intestine of Mutyh-deficient mice: the effect of low-level exposure.

第 72 回日本癌学会学術総会，横浜。

18. 岡素雅子, 中別府雄作 (2013, 10/3-10/5).

MUTYH, an adenine DNA glycosylase, mediates p53 tumor suppression via caspase-independent cell death pathway.

第 72 回日本癌学会学術総会，横浜。

19. 中別府雄作, 大野みずき, 作見邦彦 (2013, 9/19-9/21).

- 活性酸素による核酸の酸化と哺乳動物における遺伝子多様性の制御機構。
日本遺伝学会第 85 回大会, 横浜.
20. 作見邦彦, 大野みずき, 福村龍太郎, 権藤洋一, 岩崎裕貴, 池村淑道, 續輝久, 中別府雄作 (2013, 9/19-9/21).
酸化 DNA 損傷に起因する de novo germline mutation の解析 (II).
日本遺伝学会第 85 回大会, 横浜.
21. 大野みずき, 作見邦彦, 福村龍太郎, 権藤洋一, 岩崎裕貴, 池村淑道, 續輝久, 中別府雄作 (2013, 9/19-9/21).
酸化 DNA 損傷に起因する de novo germline mutation の解析.
日本遺伝学会第 85 回大会, 横浜.
22. 中別府雄作 (2013, 8/28-9/1).
SOD1^{G93A} トランスジェニック ALS モデルマウスにおける galectin-1 の発現.
包括的脳科学研究推進支援ネットワーク 平成 25 年度夏のワークショップ, 名古屋.
23. 中別府雄作, 外間政朗, 岡素雅子, Julio Leon, 二宮利治, 本田裕之, 佐々木健介, 岩城徹, 小原知之, Frank M. LaFerla, 清原裕 (2013, 8/28-9/1).
Altered Expression of Diabetes-Related Genes in Alzheimer's Disease Brains: The Hisayama Study.
包括的脳科学研究推進支援ネットワーク 平成 25 年度夏のワークショップ, 名古屋.
24. Sugako Oka, Dongchon Kang, Yusaku Nakabeppu (2013, 7/13-7/18).
Expression of human mitochondrial transcriptional factor A (hTFAM) improves cognitive function in Alzheimer's disease model mice.
Alzheimer's Association International Conference, Boston, MA, USA.
25. Yoriko Akimoto, Sugako Oka, Julio Leon, Yusaku Nakabeppu (2013, 7/13-7/18).
Quantitative detection of oxidative DNA damage in brains of the triple transgenic Alzheimer's disease mouse model.
Alzheimer's Association International Conference, Boston, MA, USA.
26. 中別府雄作, 岡素雅子, 盛子敬, 土本大介, 作見邦彦 (2013, 7/10-7/12).
核酸損傷と生体防御.
第 24 回日本生体防御学会学術集会, 熊本.
27. 中別府雄作 (2013, 7/5-7/6).
活性分子種による核酸の化学修飾に起因する病態とその防御機構.
老化促進モデルマウス(SAM)研究協議会 第 28 回研究発表会, 名古屋.
28. Hiroko Nomaru, Kunihiko Sakumi, Noriko Yutsudo, Daisuke Tsuchimoto, Yusaku Nakabeppu

(2013, 6/20-6/23).

Comprehensive analysis of gene expression regulated by *Fosb* gene in brain-derived cells.

Neuro2013 Joint Conference of: The 36th annual Meeting of the Japan Neuroscience Society/The 56th Annual Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry/The 23rd Annual Meeting of Japanese Neural Network Society, Nagoya.

29. Yuko Kobayakawa, Kunihiko Sakumi, Yusaku Nakabeppu (2013, 6/20-6/23).

Dual effects of Galectin-1 in amyotrophic lateral sclerosis.

Neuro2013 Joint Conference of: The 36th annual Meeting of the Japan Neuroscience Society/The 56th Annual Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry/The 23rd Annual Meeting of Japanese Neural Network Society, Nagoya.

30. Zijing Sheng, Yusaku Nakabeppu (2013, 6/20-6/23).

Expression of the defense enzymes MTH1, OGG1 and MUTYH against oxidative damage in nucleic acids in the mouse brain.

Neuro2013 Joint Conference of: The 36th annual Meeting of the Japan Neuroscience Society/The 56th Annual Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry/The 23rd Annual Meeting of Japanese Neural Network Society, Nagoya.

31. Yoriko Akimoto, Sugako Oka, Yusaku Nakabeppu (2013, 6/20-6/23).

Quantitative detection of oxidative DNA damage in brains of the triple transgenic Alzheimer's disease mouse model.

Neuro2013 Joint Conference of: The 36th annual Meeting of the Japan Neuroscience Society/The 56th Annual Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry/The 23rd Annual Meeting of Japanese Neural Network Society, Nagoya.

32. Kazunori Sango, Shizuka Takaku, Hiroko Yanagisawa, Kazuhiko Watabe, Kunihiko Sakumi, Yusaku Nakabeppu, Françoise Poirier, Hidenori Horie, Toshihiko Kadoya (2013, 6/20-6/23).

Involvement of galectin-1 and galectin-3 in GDNF-induced neurite outgrowth from adult rat DRG neurons.

Neuro2013 Joint Conference of: The 36th annual Meeting of the Japan Neuroscience Society/The 56th Annual Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry/The 23rd Annual Meeting of Japanese Neural Network Society, Nagoya.

33. Noriko Yutsudo, Takashi Kamada, Kosuke Kajitani, Hiroko Nomaru, Atsuhisa Katogi, Yoko H. Ohnishi, Yoshinori N. Ohnishi, Kei-ichiro Takase, Kunihiko Sakumi, Hiroshi Shigeto, Yusaku Nakabeppu (2013, 6/20-6/23).

fosB-null mice display impaired adult hippocampal neurogenesis and spontaneous epilepsy with depressive behavior.

Neuro2013 Joint Conference of: The 36th annual Meeting of the Japan Neuroscience Society/The 56th Annual Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry/The 23rd Annual Meeting of Japanese Neural Network Society, Nagoya.

34. Sugako Oka, Dongchon Kang, Yusaku Nakabeppu (2013, 6/20-6/23).

Expression of human mitochondrial transcriptional factor A (hTFAM) improves cognitive function in Alzheimer's disease model mice.

Neuro2013 Joint Conference of: The 36th annual Meeting of the Japan Neuroscience Society/The 56th Annual Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry/The 23rd Annual Meeting of Japanese Neural Network Society, Nagoya.

35. Megumi Yamafuji, Kyota Fujita, Margaret Hamner, Nozomi Akimoto, Mizuho A Kido, Yoshinori Tanaka, Yusaku Nakabeppu, Bruce Ransom, Mami Noda (2013, 6/20-6/23).

Molecular hydrogen protects against ischemic injury in optic nerves.

Neuro2013 Joint Conference of: The 36th annual Meeting of the Japan Neuroscience Society/The 56th Annual Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry/The 23rd Annual Meeting of Japanese Neural Network Society, Nagoya.

36. Mami Noda, Kyota Fujita, Margaret Hamner, Chieri Higashi, Megumi Yamafuji, Nozomi Akimoto, Mizuho A Kido, Yoshinori Tanaka, Yusaku Nakabeppu, Bruce Ransom (2013, 6/20-6/23).

Neuroprotection and slow aging induced by oxidative stress-resistant signaling driven by medical gas.

Neuro2013 Joint Conference of: The 36th annual Meeting of the Japan Neuroscience Society/The 56th Annual Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry/The 23rd Annual Meeting of Japanese Neural Network Society, Nagoya.

37. Yusaku Nakabeppu (2013, 4/19)

Quality Control of Nucleotide Pools is Essential for Cellular Homeostasis. Invited seminar at Institute of Molecular Cancer Research University of Zurich, Zurich, Switzerland.

38. Zijng Sheng, Sugako Oka, Daisuke Tsuchimoto, Kunihiko Sakumi, Yusaku Nakabeppu (2013, 4/14-4/19).

8-Oxoguanine in brain causes complex neurodegeneration through DNA repair.

Gordon research conference on Oxidative Stress & Disease, Les Diablerets, Switzerland.

細胞統御システム分野

Division of Cell Regulation Systems

准 教 授 : 石 谷 太

Associate Professor : Tohru Ishitani, Ph.D.

細胞統御システム分野では、「多細胞生物体が如何に個として構築され、維持されるのか?」、そのメカニズムの解明を目指して研究を行っている。多細胞生物における細胞は、お互いにシグナルを送受信し、自身のなすべき役割（形態変化、分化、増殖、生死、移動など）を認識し、それを実行する。細胞間でやり取りされるシグナルの実体は、サイトカインなどの細胞外分泌蛋白質や膜表面に存在するリガンド蛋白質分子群である。これら細胞外シグナル分子は、受け手の細胞においてそれぞれに異なる細胞内シグナル伝達経路を活性化し、それぞれに異なる細胞応答を誘導する。私たち人間のからだは 60 兆個もの細胞が集まり、それらがシグナルを送受信することで細胞社会を形成し、個として成り立っている。言い方を変えれば、このようなシグナルの送受信（シグナル伝達）の厳密な制御が、私たちのからだの構築と維持を担っている。実際、シグナル伝達の制御が破綻すると、癌や糖尿病、精神疾患など、様々な疾病が引き起こされることが知られている。このようなことから、シグナル伝達の制御機構を明らかにすることは、多細胞生物のからだの構築と維持のメカニズムの解明、疾病発症のメカニズム解明、将来的な組織再生医療や疾病治療技術開発につながると考えることができる。

当分野では「遺伝学的解析及び細胞生物学的解析に適した脊椎動物モデルであるゼブラフィッシュを用いた細胞レベル個体レベルの研究」と「生化学的研究」そして「網羅的研究手法」を組み合わせ、シグナル伝達（化学反応カスケード）のナノ／マイクロレベルからマクロレベルまでの統合的理解を目指している。特に以下のテーマに注目して研究を進めている。

- (A) シグナル伝達経路の活性を制御するプロテインキナーゼ NLK の機能と制御の解明
- (B) 幹細胞の維持・増殖と腫瘍形成に関わるシグナル伝達経路である Wnt シグナル伝達経路の機能と制御の解明
- (C) 個体の形成と維持に関わるシグナル伝達経路の生個体における可視化

当分野のメンバーとして、あらたにテクニカルスタッフとして奥村浩美、学部4年生として竹之下憂祐が加わった。また、年度末に竹之下憂祐は卒業し、テクニカルスタッフの佐渡由希子、学術研究員の清水誠之は退職した（清水誠之は米国 New Jersey Medical School へ留学した）。

A. シグナル伝達経路の活性を制御するプロテインキナーゼ NLK の機能と制御の解明

私たちは、「シグナル伝達と“多細胞集合体である組織”の構築と維持の関係」の本質に迫るため、複数のシグナル伝達経路の活動を制御する能力をもつ分子である“Nemo-like kinase (NLK)”に注目して研究を行っている。NLKは種を越えて保存されているMAPキナーゼに類似したリン酸化酵素である。私たちはこれまでに、NLKが様々なシグナル伝達経路の転写制御因子をリン酸化してその活性を変化させ、シグナル伝達強度の加減調節を行うことを明らかにしている。例えばNLKは、転写制御因子Notch1をリン酸化してその活性を抑制したり (Nature Cell Biology 2010)、転写因子c-Mybをリン酸化することによりその安定性を低下させたり (G&D 2004 共同研究)、転写因子STAT3をリン酸化してその活性を促進したりする (PNAS 2005 共同研究)。また、非常に興味深いことに、NLKは、ヒト培養細胞株HEK293及びHeLaにおいてはLef1(Wntシグナルの転写因子)をリン酸化することによりそのDNA結合能を低下させてLef1の転写活性を減弱させ (Nature 1999; MCB 2003)、その一方で神経前駆細胞においてはLef1をリン酸化することでLef1の抑制因子であるHDAC1とLef1の結合を弱め、Lef1の転写活性を増強する (EMBO J 2012)。つまり、NLKは細胞の状況に応じてWntシグナルを正負双方向に制御する。現在私たちは、NLKによるWntシグナル制御の状況依存性を支える分子機構を詳細に解析している。

また一方で、腫瘍とNLKの関係の解析も行っている。NLKの制御下にあるWntシグナルやNotchシグナルは、腫瘍形成に深く関わっている。近年の疫学的解析により、グリオーマや前立腺がんではその悪性化に伴いNLKの発現量が低下することや、肝細胞がんにおいてはNLKの発現が亢進していることなどが報告されている。私たちは現在、疫学的解析とがん細胞を用いた生化学的解析、動物モデルを用いた個体レベルの解析を組み合わせ、腫瘍の形成と悪性化におけるNLKの活性・発現制御及び分子機能を詳細に解析している。

さらに本年度より、NLKの活性制御化合物の探索を開始した。東京大学創薬オープンイノベーションセンターより15000種類程度の低分子化合物の提供を受け、これらからNLK活性制御化合物の選別を行った。現在、一次スクリーニングがほぼ完了したところであり、今後は、種々のカウンターアッセイを行い、得られた候補化合物のさらなる絞り込みを行う予定である。NLKに特異的に作用する化合物が本研究により見つかれば、将来的にNLK研究の発展のみならず、疾患治療にもつながっていくことを期待している。

B. 幹細胞の維持・増殖と腫瘍形成に関わるシグナル伝達経路である Wnt シグナル伝達経路の機能と制御の解明

Wnt シグナル伝達系は、「体の形成」、「幹細胞の維持・増殖」、「腫瘍の形成と悪性化」に関わる重要なシグナル伝達経路である。Wnt シグナルの機能と制御の解明は、将来的な新たな医療技術の開発や創薬につながると期待されており、世界的に最もホットな研究課題の一つである。私たちはこれまで、「Wnt シグナルの転写因子 TCF/LEF1 の分子レベルでの制御」に注目して研究を行い、「TCF/LEF1 がリン酸化されること」と「TCF/LEF1 がユビキチン-プロテアソーム系によって破壊されること」を世界で初めて発見している。

本年度は、遺伝学研究所との共同研究により、小型魚類ゼブラフィッシュの感覚器官のサイズの決定において Wnt シグナルの厳密な制御が必要であることを見いだした (Wada et al., *Curr Biol* 2013)。また、日本発生生物学会の依頼を受け、動物個体発生における Wnt シグナルの活性制御とその意義、及び Wnt シグナル研究において今後明らかにすべき課題を著書にまとめた (Ishitani, *New Principles in Developmental Processes Chapter 17*)。

さらに、Wnt シグナルの新たな制御機構の解析を行い、タンパク質リン酸化酵素 Hipk2 がその酵素活性非依存的にタンパク質脱リン酸化酵素 PP1c を Dvl タンパク質 (Wnt シグナルの主要因子) へリクルートして PP1c による Dvl の C 末端領域のリン酸化部位の脱リン酸化を誘導することと、この脱リン酸化が、ユビキチンリガーゼ Itch による Dvl のユビキチン化と分解をキャンセルして Dvl を安定化し、その結果として Wnt シグナルが正に制御されることを見いだした (投稿中)。

C. 個体の形成と維持に関わるシグナル伝達経路の生個体における可視化

癌・感染防御・脳神経系形成に関わるシグナル伝達経路が脊椎動物の卵から幼体に至る発生/成長過程において「いつ」「どこで」「どの程度の強さで」活性化して働いているかを解明することは、私たちの体の形成と維持の分子メカニズムを理解する上で非常に重要である。これを解明するためには、個体レベルにおけるシグナル伝達の可視化が非常に有効な手段であると考えられる。当分野では、ゼブラフィッシュを用いて「生きた脊椎動物個体におけるシグナル伝達経路の時空間的動態の可視化」に取り組んでいる。ゼブラフィッシュは以下にあげるような優れた特性を持っており、脊椎動物におけるシグナル伝達の可視化に最も適したモデル動物である。ゼブラフィッシュの

特性：(1) 胚体が透明／(2) 体外で胚発生が起こること（ヒトやマウスなどの哺乳動物では、発生が母体内でおこることから、発生初期での重要な生物学的現象を経時的に観察することは技術的に困難）／(3) 多産／(4) ヒトと同様に脳神経系や消化器系などの器官をもち、それらがヒトのものと同様の発生機序を辿って形成され、そして維持されていること（ショウジョウバエや線虫といった無脊椎動物モデルにおいて形成される器官やその発生機序は我々脊椎動物のそれとは大きく異なるため、シグナル伝達経路の個体レベルにおける機能はヒトと大きく異なる）。今後、本研究により、「シグナル伝達経路がどのように機能することによって私たち脊椎動物の体が形成され、そして維持されるのか」を把握したい。そして、将来的にはこれを「各シグナル伝達経路の新規因子の探索と機能解析」や「病態とシグナル伝達の関連」を研究するための強力なツールとしたい。

業績目録

原著論文

1. *Wada H, Ghysen A, Asakawa K, Abe G, Ishitani T, Kawakami K Wnt/Dkk negative feedback regulates sensory organ size in zebrafish. 2013. Current Biology, 23. 1599-65

著書

1. *Ishitani T Context-dependent bidirectional modulation of Wnt/ β -catenin signaling. 2014.
著書名： New Principles in Developmental Processes (Chapter 17 担当) (in press)
Springer 社発行

学会発表

1. 石谷 太、清水 誠之、石谷 閑
タンパク質リン酸化酵素 NLK による神経前駆細胞の運命制御
日本薬学会第 134 年会シンポジウム, 熊本大学
2014 年 3 月 30 日
2. 清水 誠之、石谷 閑、石谷 太
Hipk2 と PP1c による Dishevelled の脱リン酸化は、細胞の Wnt シグナル応答性を支える
第三回細胞競合コロキウム, 北海道大学
2014 年 3 月 14 日

3. 石谷 閑、清水 誠之、石谷 太
タンパク質リン酸化酵素 NLK は Shh シグナルの負の制御を介して後脳組織の構築を支える
第三回細胞競合コロキウム, 北海道大学
2014年3月14日
4. Nobuyuki Shimizu, Shizuka Ishitani, Tohru Ishitani
Hipk2 and PP1c-mediated dephosphorylation of Dvl mediated by sustains Wnt signal transduction.
the 6th Asia Oceania Zebrafish Meeting, HKUST, Hong Kong
2014年1月21日
5. Satoshi Anai, Satoshi Ota, Tohru Ishitani
NFκB regulates dorsal-ventral patterning in vertebrates.
第36回日本分子生物学会年会, 神戸国際会議場
2013年12月3日
6. Shizuka Ishitani, Nobuyuki Shimizu, Tohru Ishitani
Hipk2 negatively regulates Wnt/beta-catenin signaling in colorectal cancer.
第36回日本分子生物学会年会, 神戸国際会議場
2013年12月3日
7. Nobuyuki Shimizu, Shizuka Ishitani, Atsushi Sato, Mitsuhiro Totani, Hiroshi Shibuya, Tohru Ishitani
Dephosphorylation of Dvl mediated by Hipk2 and PP1c sustains Wnt signal transduction.
第36回日本分子生物学会年会, 神戸国際会議場
2013年12月3日
8. Shimizu Nobuyuki, Mitsuhiro Totani, Shizuka Ishitani, Tohru Ishitani
Hipk2 plays essential roles in the Wnt-mediated early developmental events by cooperating with PP1 to induce Dishevelled dephosphorylation and stabilization.
第86回日本生化学会大会, パシフィコ横浜
2013年9月11日
9. Nobuyuki Shimizu, Tohru Ishitani
Dephosphorylation of Dishevelled mediated by Hipk2 and PP1c sustains Wnt signal transduction第
第19回小型魚類研究会, アエル仙台
2013年9月21日
10. Nobuyuki Shimizu, Shizuka Ishitani, Tohru Ishitani
Hipk2 plays essential roles in the Wnt-mediated early developmental events by inducing
Dishevelled dephosphorylation and stabilization.

第 65 回日本細胞生物学会年会, ウィンクあいち

2013 月 6 月 19 日

11. Shizuka Ishitani, Nobuyuki Shimizu, Tohru Ishitani

Nemo-like kinase blocks Hedgehog signaling by phosphorylating Gli1 transcription factor in neural progenitor cells and brain tumor.

第 65 回日本細胞生物学会年会, ウィンクあいち

2013 月 6 月 19 日

12. Tohru Ishitani, Nobuyuki Shimizu, Shizuka Ishitani

Nemo-like kinase blocks Hedgehog signaling by phosphorylating Gli1 transcription factor in neural progenitor cells and brain tumor.

Neuro2013, 京都国際会議場

2013 月 6 月 22 日

13. Tohru Ishitani, Nobuyuki Shimizu, Shizuka Ishitani

Nemo-like kinase blocks Hedgehog signaling by phosphorylating Gli1 transcription factor in neural progenitor cells and brain tumor.

第46回日本発生生物学会, くにびきメッセ

2013 月 5 月 30 日

14. Nobuyuki Shimizu, Tohru Ishitani

Hipk2 plays essential roles in the Wnt-mediated early developmental events by inducing Dishevelled dephosphorylation and stabilization.

第46回日本発生生物学会, くにびきメッセ

2013 月 5 月 30 日