

細胞修復機構研究チーム

Laboratory for Cell Recovery Mechanisms

チームリーダー 三浦正幸

MIURA, Masayuki

神経系は免疫系とともにプログラム細胞死が観察される代表的な組織である。プログラム細胞死は神経幹細胞が生まれるステージから観察され、神経組織の形態形成や神経回路網形成に重要な機能を果たすことが示されている。さらに、成体においては細胞死メカニズムの異常活性化によって様々な神経変性疾患が引き起こされることが考えられる。当研究チームでは、神経系の基本的な細胞死メカニズムを分子遺伝学的な研究によって明らかにし、その研究成果をもとに細胞死を個体レベルで人為的に操作することによって、発生や病態での神経細胞死の意義に迫る研究を展開していく。遺伝学的な研究に適したショウジョウバエとマウスを用いた研究を同時進行させることによって進化的に保存された神経細胞死の基本メカニズムを明らかにできると考えられる。

1. 神経発生・病態における細胞死の動的解析（竹本^{*1}，柿沼，斉藤，岩脇^{*2}，赤井，三浦）

カスパーゼは細胞死に共通のメディエーターであり、その活性化状態を可視化することができれば細胞死の初期過程をも検出しうると考えられる。そこで、CFP-YFPのFluorescence-Resonance Energy Transfer (FRET) を応用してカスパーゼの活性化をリアルタイムに検出する実験系を構築し SCAT と命名した。（細胞機能探索技術開発チームとの共同研究）培養細胞を用いた観察によってカスパーゼ3は刺激の種類や強さにかかわらず all or none で活性化され、その活性化は細胞質から核へと伝搬していくことが明らかになった。現在 SCAT トランスジェニック動物を作製しており、生体での細胞死を動的に解析できるものと期待している。

カスパーゼの活性化を特徴とするアポトーシスに対して、神経変性では必ずしもカスパーゼの関与がはっきりしない細胞死も観察される。ER ストレスは様々な神経変性疾患に関与すると考えられているが、その動態をリアルタイムでモニターするレポーターの開発を行った。新たに作製した ER ストレス応答性に *venus* が活性化されるレポーター (ERAI と命名) は、高感度に ER ストレスのかかった細胞を検出した。

2. 未分化神経系細胞における細胞死実行機構と発生における意義（嘉糠^{*2}，平等，三浦）

ショウジョウバエカスパーゼ活性化因子 Apaf-1 ホモログ Dapaf-1 変異体では末梢神経系外感覚器が増加する表現型が見られた。この表現型は広範なカスパーゼ阻害遺伝子 p35 や DIAP1 の発現でも見られることからカスパーゼ活性に依存したものであることが示唆される。SCAT を用いた解析によって *scabrous* を発現する細胞クラスターが実際に

カスパーゼ活性を有していることが明らかになった。さらに、カスパーゼ阻害による剛毛の増加表現型を亢進または抑圧する因子の遺伝学的スクリーニングを行った結果、新規カスパーゼの基質候補を同定した。

3. 神経細胞死実行経路に関わる遺伝子の探索（嘉糠^{*2}，平等，倉永^{*1}，井垣^{*3}，小林，徳重，菅田^{*3}，岩脇^{*2}，藤井，三浦）

ショウジョウバエの複眼に *reaper* を過剰発現させると細胞死が誘導され複眼がつぶれる。複眼の回復を指標に遺伝子のスクリーニングを行ったところ TRAF ファミリーに属する遺伝子 *dtraf1* を同定した。私たちは DIAP1 と DTRAF1 が結合すると DTRAF1 にユビキチンがつけられ分解され、TRAF ファミリー、ASK1、JNK というカスケードが抑制されることを見いだした。しかし、ここに Reaper が発現してくると DIAP1 は自分自身をユビキチン化して分解されるため、DTRAF1 が安定化して ASK1、JNK カスケードが動き出し、細胞死を誘導することが明らかになった。*reaper* は様々な細胞ストレスによって共通に発現上昇が見られる遺伝子であり、このメカニズムは細胞ストレスによる細胞死に広く使われていると考えられる。

もう1つのプロジェクトとして、遺伝子の過剰発現系を用いた神経細胞死実行因子の検索を行っている。GS 系統 5,000 のスクリーニングの結果、その中に無脊椎動物では初めての TNF ファミリーリガンド (*Eiger* と命名) が含まれていた。*eiger* の過剰発現は複眼に細胞死を誘導するがその細胞死はカスパーゼ非依存的であり、JNK 活性化に依存したものであった。*eiger* 過剰発現による複眼縮小の表現型を亢進または抑圧する因子の遺伝学的スクリーニングを行った結果、新規 TNF 受容体ファミリー (*Wengen* と命名) を得ることができた。培養細胞での免疫沈降実験によって *Eiger* と *Wengen* は結合すること、さらに RNA 干渉法によって *wengen* が *eiger* による細胞死に必要な遺伝子であることが明らかになった。

4. 神経変性疾患モデルでの細胞死実行機構と治療戦略（嘉糠^{*2}，平等，倉永^{*1}，井垣^{*3}，松田^{*2}，Nelson，柿沼，斉藤，大澤，三浦）

ショウジョウバエは遺伝学的な研究が難しい晩発性神経変性疾患の研究に優れたモデル系を提供する。ショウジョウバエ複眼にポリグルタミンを発現させたハンチントン舞踏病やマチャド・ジョセフ病のモデルが作製されている。これらの疾患モデルに対する前章3の研究によって得られた神経細胞死誘導因子の関与を遺伝学的に明らかにする実験を行っている。*endd2* は ER 膜に存在するタンパク質をコードしていて、酵母からヒトまで高く保存されている。この

変異体を同定し、ハンチントン舞蹈病モデルショウジョウバエと交配させたところその病態が軽減された。ポリグルタミンは特定の転写因子に結合し、遺伝子の発現に影響を与えることが報告されている。そこで、ポリグルタミン病ショウジョウバエモデルにおいて、発症前後の遺伝子変動をジーンチップを用いて解析を進めている。さらにショウジョウバエゲノム中にはヒト神経変性疾患原因遺伝子のホモログが存在することから、RNA 干渉法を用いた遺伝子のノックダウンによって新たな疾患モデルを作製することが可能になると考えられるため、その方法の検討を行っている。

多発性硬化症 (MS) やそのモデルとされる実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) では病態の増悪・緩解が繰り返しているが、この過程では OLG 変性に加え機能回復・再生が効率よく起こっていることが予想される。炎症性サイトカインが OLG 傷害や再生に関わることが考えられるため、サイトカインに対する OLG やその前駆体細胞の反応を遺伝子のサブトラクション法によってプロファイリングを行った。

^{*1} ジュニア・リサーチ・アソシエイト, ^{*2} 基礎科学特別研究員, ^{*3} 研修生

1. Dynamics of neural cell death

We developed a new technique (named SCAT) for the real-time tracing of caspase activation using CFP/Venus FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer). SCAT allowed us to monitor the precise spacio- temporal activation of caspases in living cells. We also developed a new ER monitoring system (named ERAI) using Venus. In this system, ERAI is specifically activated by ER stress and we could monitor ER stress in living cells.

2. Roles of cell death execution mechanisms in neural progenitor cells

The presence of extra sensory organs on the notum is a well-defined phenotype of the *Drosophila* peripheral nervous system. We observed ectopic bristles on the scutellum of a dapaf-1 mutant or p35 expressing flies. We identified the novel caspase substrate by genetic modifier screening of flies exhibiting an extra sensory organ.

3. Comprehensive analysis of the genetic pathway of neural cell death

We studied the genetic control of caspase-dependent cell death by performing a dominant modifier screen of *reaper* (*rpr*) and showed Diap1 mediated protein degradation system is crucial for JNK activation by *rpr*. To identify novel genes that affect neuronal cell death and degeneration, we performed a gain-of-function screen (GS screen). In this screen, we identified the first invertebrate TNF family (named eiger). We also identified TNF receptor family gene (named wengen), and showed that wengen is required for eiger signaling.

4. Genetic pathway of neurodegeneration and novel strategies to treat neurodegenerative diseases

The expression of truncated versions of the pathogenic human *MJD/SCA3* gene or the human *Huntingtin* gene in the fly elicit late-onset progressive degeneration and the loss of photoreceptor neurons. The polyglutamine-induced

neuronal loss was suppressed by the reduction of the endd2 gene which we identified by GS screening. We are also studying the changes in gene expression during the course of disease progression by GeneChip.

Characteristics of experimental autoimmune encepharomyelitis (EAE) include its periodic progression and remission of its clinical course. Because the cytokines produced by inflammatory cells regulate the progression of EAE, we profiled the genes that are regulated in response to cytokines in OLGs or their progenitors.

Research Subjects and Members of Laboratory for Cell Recovery Mechanisms

1. Dynamics of neural cell death
2. Roles of cell death execution mechanisms in neural progenitor cells
3. Comprehensive analysis of the genetic pathway of neural cell death
4. Genetic pathways of neurodegeneration and novel strategies to treat neurodegenerative diseases

Laboratory Head

Dr. Masayuki MIURA

Research Scientists

Dr. Yoshihiko KAKINUMA
Dr. Masatomo KOBAYASHI
Dr. Tsuneko FUJII
Dr. Bryce NELSON

Technical Staff

Ms. Naoko TOKUSHIGE
Mr. Tetsuo HIRATOU
Ms. Fumiji SAITO
Ms. Ryoko AKAI
Ms. Shizue OSAWA

Assistants

Ms. Mika KASHIWAGI

Special Postdoctoral Researchers

Dr. Hirotaka KANUKA
Dr. Takao IWAWAKI
Dr. Nanami MATSUDA

Junior Research Associates

Ms. Erina KURANAGA
Mr. Kiwamu TAKEMOTO

RIKEN/BSI Collaborators

Dr. Atsushi MIYAWAKI (Lab. for Cell Function Dynamics, BSI)
Dr. Takeharu NAGAI (Lab. for Cell Function Dynamics, BSI)

Trainees

Mr. Tatsushi IGAKI (Grad. Sch. Med., Osaka Univ.)

Mr. Hiroshi KANDA (Grad. Sch. Med., Osaka Univ.)

誌 上 発 表 Publications

[雑誌]

(原著論文) *印は査読制度がある論文

Shibata M., Yamawaki T., Sasaki T., Hattori H., Hamada J., Fukuuchi Y., Okano H., and Miura M.: "Upregulation of Akt phosphorylation at the early stage of middle cerebral artery occlusion in mice", *Brain Res.* **942**, 1–10 (2002). *

Igaki T., Kanda H., Yamamoto Y., Kanuka H., Kuranaga E., Aigaki T., and Miura M.: "Eiger, a TNF superfamily ligand that triggers the *Drosophila* JNK pathway", *EMBO J.* **21**, 3009–3018 (2002). *

Igaki T., Yamamoto Y., Tokushige N., Kanda H., and Miura M.: "Down-regulation of DIAP1 triggers a novel *Drosophila* cell death pathway mediated by dark and DRONC", *J. Biol. Chem.* **277**, 23103–23106 (2002). *

Kanda H., Igaki T., Kanuka H., Yagi T., and Miura M.: "Wengen, a member of the *Drosophila* tumor necrosis factor receptor superfamily, is required for Eiger signaling", *J. Biol. Chem.* **277**, 28372–28375 (2002). *

Mochizuki H., Miura M., Shimada T., and Mizuno Y.: "Adeno-associated virus-mediated antiapoptotic gene delivery: in vivo gene therapy for neurological disorders", *Methods* **28**, 248–252 (2002). *

Kuranaga E., Kanuka H., Igaki T., Sawamoto K., Ichijo H., Okano H., and Miura M.: "Reaper-mediated inhibition of DIAP1-induced DTRAF1 degradation results in activation of JNK in *Drosophila*", *Nature Cell Biol.* **4**, 705–710 (2002). *

Takeyama K., Saya I., Yamamoto A., Tanimoto H., Furutani T., Kanuka H., Miura M., Tabata T., and Kato S.: "Androgen-dependent neurodegeneration by polyglutamine-expanded human androgen receptor in *Drosophila*", *Neuron* **35**, 855–864 (2002). *

Qiao J., Mitsuhashi I., Yazaki Y., Sakano K., Gotoh Y., Miura M., and Ohashi Y.: "Enhanced resistance to salt, Cold and wound stresses by overproduction of animal cell death suppressors Bcl-xL and Ced-9 in Tobacco cells: Their possible contribution through improved function of organella", *Plant Cell Physiol.* **43**, 992–1005 (2002). *

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

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

(総 説)

Kuranaga E. and Miura M.: "Molecular genetic control of caspases and JNK-mediated neural cell death", *Arch. Histol. Cytol.* **65**, 291–300 (2002).

三浦正幸: "神経発生における細胞死の調節機構", *Brain Med.* **14**, 408–413 (2002).

井垣達吏, 三浦正幸: "RNAi による遺伝子ノックダウン", *遺伝子医学* **6**, 455–460 (2002).

三浦正幸: "多発性硬化症とオリゴデンドロサイト細胞死: カスパーゼの関与について", *炎症と免疫* **10**, 522–528 (2002).

柿沼由彦, 三浦正幸: "カスパーゼを介した脱髄疾患におけるオリゴデンドロサイトの障害機構の解明", *最新医学* **57**, 1607–1614 (2002).

倉永英里奈, 三浦正幸: "死神 Reaper はタンパク質の死を導く: タンパク質分解による細胞死の調節機構", *細胞工と生体工学* **21**, 1326–1327 (2002).

井垣達吏, 三浦正幸: "細胞死促進型 Bcl-2 ファミリー分子による Caspase 非依存的細胞死", *実験医学* **19**, 149–156 (2002).

三浦正幸: "2002 年度ノーベル医学生理学賞", *からだの科学* **229**, 102 (2003).

[単行本・Proc.]

(原著論文) *印は査読制度がある論文

Mochizuki H., Hayakawa H., Migita M., Shimada T., Miura M., and Mizuno Y.: "Anti-apoptotic therapy for Parkinson's disease: Overexpression of an APAF-1-dominant-negative inhibitor can block MPTP toxicity", *Mapping the Progress of Alzheimer's and Parkinson's Disease*, edited by Mizuno Y., Fisher A., and Hanin I., Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, pp. 469–472 (2002). *

口 頭 発 表 Oral Presentations

(国際会議等)

Miura M.: "Roles of caspases in autoimmune allergic encephalomyelitis", *Ann. Meet. for the Korean Assoc. of Immunobiologists*, Seoul, Korea, May (2002).

Miura M.: "Dominant genetic modifier screening of *Drosophila* killer gene reaper", *4th Int. Cell Death Soc. Symp. on Mechanisms of Cell Death*, Noosaville, Australia, May–June (2002).

Igaki T., Kanda H., Yamamoto Y., Kanuka H., Kuranaga E., Aigaki T., and Miura M.: "Identification of a novel cell death trigger, Eiger, by a *Drosophila* misexpression screen.", *4th Int. Cell Death Soc. Symp. on Mechanisms of Cell Death*, Noosaville, Australia, May–June (2002).

Miura M.: "Genetic screening of novel cell death and degeneration pathway in *Drosophila*", *3rd FAONS Congr.*, (Korean Society for Brain and Neural Sciences), Seoul, Korea, Sept.–Oct. (2002).

Miura M., Igaki T., Kanda H., Yamamoto Y., Kanuka H., Kuranaga E., Aigaki T., and Yagi T.: "TNF/TNFR system in *Drosophila*: caspase-independent cell death signaling mechanisms", *Keystone Symp. on Molecular*

- Mechanisms of Apoptosis, Banff, Canada, Feb. (2003).
(国内会議)
- 三浦正幸, 岡野栄之, 田村睦弘, 中村雅也, 小川祐人, 戸山芳昭: “MBP-Cre/p35 transgenic mouse を用いた脊髄損傷後の運動機能に関する実験的研究”, 第 1 回日本再生医療学会総会, 京都, 1 月 (2002).
- 三浦正幸: “神経細胞死の分子遺伝学的研究”, 第 27 回日本脳卒中学会総会, 仙台, 4 月 (2002).
- 嘉糠洋陸, 倉永英里奈, 平等哲男, 竹本研, 宮脇敦史, 岡野栄之, 三浦正幸: “カスパーゼは神経系細胞系譜の運命決定に関与する?”, 第 35 回日本発生生物学会大会, 横浜, 5 月 (2002).
- 三浦正幸: “ショウジョウバエ細胞死の分子遺伝学的研究”, 平成 14 年度生理学研究所研究会, 岡崎, 9 月 (2002).
- 三浦正幸: “プログラム細胞死の分子遺伝学的研究”, 第 44 回歯科基礎医学会, 東京, 10 月 (2002).
- 高橋牧郎, 嘉糠洋陸, 渋谷桂子, 三浦正幸, Mel F., 長谷川成人, 岩坪威: “FTDP-17 変異型タウ・トランスジェニックショウジョウバエの搾取と免疫組織化学的, 生化学的解析”, 第 21 回日本痴呆学会, 吹田, 10 月 (2002).
- Nelson B., 三浦正幸, 嘉糠洋陸: “DNA microarray analysis of polyglutamine toxicity using *Drosophila*”, 第 25 回日本分子生物学会年会, 横浜, 12 月 (2002).
- 井垣達史, 相垣敏郎, 菅田浩司, 山本友希, 嘉糠洋陸, 倉永英里奈, 三浦正幸: “Eiger, a TNF superfamily ligand that triggers cell death through the *Drosophila* JNK pathway”, 第 25 回日本分子生物学会年会, 横浜, 12 月 (2002).
- 竹本研, 三浦正幸, 宮脇敦史, 永井健治: “FRET を用いたカスパーゼの時空間的活性化の可視化”, 第 25 回日本分子生物学会年会, 横浜, 12 月 (2002).
- 嘉糠洋陸, 倉永英里奈, 平等哲男, 竹本研, 宮脇敦史, 岡野栄之, 三浦正幸: “カスパーゼによる神経系神経譜の運命決定の調節”, 第 25 回日本分子生物学会年会, 横浜, 12 月 (2002).
- 妹尾七美, 井垣達史, 三浦正幸: “ショウジョウバエ Bcl-2 ファミリー分子 DroB-1 の生理的役割: in vivo RNAi によるノックダウンモデルを用いた遺伝学的解析”, 第 25 回日本分子生物学会年会, 横浜, 12 月 (2002).
- 倉永英里奈, 嘉糠洋陸, 井垣達史, 澤本和延, 一條秀憲, 岡野栄之, 三浦正幸: “ショウジョウバエ IAP の分解は TRAF 依存的な JNK の活性化を促進する”, 第 25 回日本分子生物学会年会, 横浜, 12 月 (2002).
- 平等哲男, 嘉糠洋陸, 井垣達史, 菅田浩司, 倉永英里奈, 相垣敏郎, 三浦正幸: “ショウジョウバエ異所発現スクリーニングによる新規細胞死実行因子の検索”, 第 25 回日本分子生物学会年会, 横浜, 12 月 (2002).
- 菅田浩司, 三浦正幸, 井垣達史: “遺伝学的スクリーニングによるショウジョウバエ TNF superfamily 分子 Eiger の下流シグナル分子の同定”, 第 25 回日本分子生物学会年会, 横浜, 12 月 (2002).