

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。神経系のプログラム細胞死は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. 神経発生における細胞死の動態解析 (嘉糠, 竹本)

現在細胞死を検出する手法として TUNEL 法が広く使われているが、検出感度や結果の再現性に関して安定した結果を得ることが難しいなどの問題があり必ずしも満足のいく手法とはいえない。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ようとえられる。そこで、蛍光タンパク質 CFP-YFP の FRET システム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ており、既に培養細胞系において細胞死に至る前の状態の細胞を検出することに成功している。

2. 未分化神経系細胞死の実行機構と発生における意義 (嘉糠)

遺伝学的な研究手法は、中枢神経系での細胞死を理解する上で強力かつ実際に即した分子機能を明らかにできる優れたアプローチであると考えられる。当研究チームは哺乳類でカスパーゼが細胞死に共通のメディエーターとして機能しうることを示し、さらにその活性化機構の研究を行ってきた。哺乳類での研究に加え、実際に生体で起こる細胞死の機構を解明する目的で遺伝学的な研究に適したショウジョウバエを用いて精力的にカスパーゼ活性化機構の研究を進めた。その研究成果の 1 つとして、逆向き遺伝学的に哺乳類のカスパーゼ活性化因子 Apaf-1 ホモログ Dapaf-1 を同定した。Dapaf-1 の変異体を分離して解析したところ、この変異体では中枢神経系の細胞死が顕著に抑制されていた。幼虫では細胞死抑制の結果とみられる脳の肥大が観察された。哺乳類での Apaf-1 ノックアウトマウスでも脳室周囲層の肥大が観察されていることから、Dapaf-1/Apaf-1 は進化的に保存された未分化中枢神経系細胞死の実行に必須の因子であることを初めて明らかにした。

3. 神経細胞死実行経路に関わる遺伝子の網羅的探索 (嘉糠, 井垣, 倉永, 徳重, 平等, 後藤)

多くの研究者がショウジョウバエにおける Bcl-2 ファミリーの存在を想定し同定を試みてきたが、成功するには至らなかった。当研究チームは、タンパク質の一次配列の相同性に加え、機能ドメインの高次構造を含めてデータベースを検索する方法を取り入れることによって、初めてショウジョウバエ Bcl-2 ファミリーメンバーを単離することに成功した。構造上の特徴や、培養細胞での強制発現、トランスジェニックショウジョウバエを用いた解析の結果、この遺伝子 (Drob-1: *Drosophila* Ortholog of the Bcl-2 family-1 と命名) は Bax や Mtd/Bok といったアポトーシスを促進するタイプの Bcl-2 ファミリーメンバーであることが明らかとなった。興味深いことに Drob-1 による細胞死はカスパーゼ活性に依存しない。この遺伝子と相互作用を示す遺伝子を遺伝学的に同定することによって全く明らかにされていないカスパーゼ非依存的な細胞死実行経路が明らかにできるものと期待される。

現在までに細胞死関連遺伝子の遺伝子産物の機能解析を中心に研究が進んできたが、生体内、特に発生過程において複雑かつ精巧に再現される細胞死のスイッチについては、ほとんど解明されていない。その重要性にも拘わらずこのような細胞死スイッチ担当遺伝子の網羅的探索に関しては哺乳類を含めてほとんど行われておらず、世界的に注目されている研究領域である。当研究チームはこれらの細胞死スイッチに関与する遺伝子群のゲノムワイドな網羅的スクリーニングを目指し、モデル生物として非常に優れたショウジョウバエを用いて、『異所発現トラップ法』により神経細胞死実行遺伝子の同定を機能的かつ効率的に行うシステムを確立した。異所発現トラップ法による細胞死スイッチ担当遺伝子の同定は、ショウジョウバエ個体の部分的な組織にのみ遺伝子を強制発現する方法をベースにしており、それにより引き起こされる局所的な表現型を観察し他の方法では今まで同定不可能だった神経細胞死スイッチ担当遺伝子を効率よく抽出することができる。既に当研究チームではこの方法により数種類の新規の神経細胞死実行遺伝子を同定している。

4. 神経変性疾患モデルを用いた細胞死操作 (三浦)

神経変性疾患の発症機構を研究する上で、細胞死の人為的な操作は不可欠である。カスパーゼファミリーが細胞死に共通のメディエーターであることから、その活性を人為的に操作することによって細胞死を調節できる可能性がでてきた。そこで、カスパーゼの阻害遺伝子 p35 をステージおよび組織特異的に発現できる Cre/loxP システムを利用したトランスジェニックマウスの作製を行った。オリゴデン

ドロサイトが選択的に脱落する自己免疫疾患として多発性硬化症 (MS) が知られている。オリゴデンドロサイト特異的なミエリン塩基性タンパク質遺伝子プロモーター制御に Cre を発現するトランスジェニックマウスを作製し、このマウスと loxP-p35 マウスを交配しオリゴデンドロサイトで特異的に p35 を発現させることによって、実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) の発症を軽減することに成功した。さらに、オリゴデンドロサイトで p35 を発現させたマウスでは虚血による白質変性が著しく軽減された。

誌上発表 Publications

(原著論文) *印は査読制度がある論文誌

Araki T., Shibata M., Takano R., Hisahara S., Imamura S., Fukuuchi Y., Saruta T., Okano H., and Miura M.: “Conditional expression of anti-apoptotic protein p35 by Cre-mediated DNA recombination in cardiomyocytes from loxP-p35-transgenic mice”, *Cell Death Differ.* **7**, 485–492 (2000). *

Hisahara S., Araki T., Sugiyama F., Yagami K., Suzuki M., Abe K., Yamamura K., Miyazaki J., Momoi T., Saruta T., Barnard C. C. A., Okano H., and Miura M.: “Targeted expression of baculovirus p35 caspase inhibitor in oligodendrocytes protects mice against autoimmune-mediated demyelination”, *EMBO J.* **19**, 341–348 (2000). *

Takano R., Hisahara S., Namikawa K., Kiyama H., Okano H., and Miura M.: “Nerve growth factor protects oligodendrocytes from TNF- α -induced injury through Akt-mediated signaling mechanisms”, *J. Biol. Chem.* **275**, 16360–16365 (2000). *

Shibata M., Hisahara S., Hara H., Yamawaki T., Fukuuchi Y., Yuan J., Okano H., and Miura M.: “Caspases determine the vulnerability of oligodendrocytes in the ischemic brain”, *J. Clin. Invest.* **106**, 643–653 (2000). *

Hisahara S., Yuan J., Momoi T., Okano H., and Miura M.: “Caspase-11 mediates oligodendrocyte cell death and pathogenesis of autoimmune-mediated demyelination”, *J. Exp. Med.* **193**, 111–122 (2001). *

Hisahara S., Takano R., Shoji S., Okano H., and Miura M.: “Role of caspase-1 subfamily in cytotoxic cytokine-induced oligodendrocyte cell death”, *J. Neural Transm.* **58**, 135–142 (2000). *

Miura M. and Yuan J.: “Transient transfection assay of cell death genes”, *Methods Enzymol.*, **322**, 480–492 (2000). *

Igaki T., Kanuka H., Inohara N., Sawamoto K., Núñez G., Okano H., and Miura M.: “Drob-1, a *Drosophila* member of the Bcl-2/CED-9 family that promotes cell death”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 662–667 (2000). *

口頭発表 Oral Presentations

(国際会議等)

Igaki T., Kanuka H., Okano H., and Miura M.: “Drob-1,

a *Drosophila* proapoptotic member of the Bcl-2/CED-9 family: Genetic studies for caspase-independent cell death”, *Keystone Symp. on Molecular Mechanisms of Apoptosis*, Keystone, USA, Jan. (2001).

(国内会議)

井垣達史, 嘉糠洋陸, 倉永英里奈, 岡野栄之, 三浦正幸: “Caspase 非依存的細胞死経路に関わる分子の遺伝学的スクリーニング”, 第23回日本分子生物学会年会, 神戸, 12月 (2000).

嘉糠洋陸, 倉永英里奈, 井垣達史, 相垣敏郎, 岡野栄之, 三浦正幸: “細胞死実行遺伝子の遺伝学的スクリーニング: in vivo 強制発現スクリーニングによる新規細胞死実行遺伝子の同定”, 第23回日本分子生物学会年会, 神戸, 12月 (2000).

倉永英里奈, 嘉糠洋陸, 井垣達史, 岡野栄之, 三浦正幸: “細胞死実行遺伝子の遺伝学的スクリーニング: Reaper の下流で機能する細胞死関連遺伝子の同定”, 第23回日本分子生物学会年会, 神戸, 12月 (2000).

久原真, 岡野栄之, 三浦正幸: “自己免疫性脱髄疾患の病態生理におけるカスパーゼ-11 の関与について”, 第23回日本分子生物学会年会, 神戸, 12月 (2000).

Research Subjects and Members of Laboratory for Cell Recovery Mechanisms

1. Dynamics of Neural Cell Death
2. Studies of Cell Death Execution Mechanisms and Roles of Cell Death in Neural Progenitor Cells
3. Comprehensive Analysis of Genetic Cascade of Neural Cell Death
4. Manipulation of Cell Death in Neurodegeneration

Laboratory Head

Dr. Masayuki MIURA

Technical Staffs

Ms. Naoko TOKUSHIGE

Mr. Tetsuo HIRATOU

Ms. Yuki GOTO

Assistants

Ms. Mika KASHIWAGI

Trainees

Mr. Hirotaka KANUKA

Mr. Tatsushi IGAKI

Ms. Erina KURANAGA

Mr. Kiwamu TAKEMOTO

Part Time Assistants

Ms. Ryoko AKAI