

## 新学術領域研究 領域代表者からの報告

### 2. 研究の進展状況及び成果の概要

【領域番号】 3002

【領域略称名】 ロジスティクス

【領域代表者（所属）】 吉森 保（大阪大学・生命機能研究科・教授）

領域全体としては、病態にかかわる物流システムのメカニズムの解明という最重要目標に対し期間内に多くの発見があり（下記及び項目 8,9 参照）、予想を上回る達成度であったと考える。中間評価における最高評価 A+の後も停滞することなくさらなる発展があり、前半後半を通して著しい成功を収めたと言えよう。画像デジタル解析ソフトウェアの開発・公開も達成できた。また公募研究により、次世代をリードする細胞内ロジスティクス研究者を育てることができたと自負している（項目 5 参照）。3 個以上の有用化合物の同定も達成した。細胞内ロジスティクス概念の啓蒙・普及については、生物系学会に加え情報・工学系学会でも活発に活動した。画像解析技術開発とケミカルバイオロジーの 2 つの融合研究の詳細は、項目 2 で述べた。以下に各個別研究の状況を記す。

#### 【計画研究】

**吉森 保**：生体防御に働くオートファジーの作動・制御機構を明らかにし、感染症・タンパク質凝集病・がん等の病態理解促進を目指すという目標に対し、PI3 キナーゼ複合体によるオートファジー制御機構や病原体に対するオートファジーに特異的な機構を明らかにした。オートファゴソーム膜の起源解明については、生成場所の特定に成功し 40 年の論争に終止符を打つブレイクスルーを成し遂げた。エンドサイトーシス経路の新しい制御因子を同定し作用機序を明らかにした。予想を上回る成果が多数得られ、目標の多くは達成度 100%超と言えらる。またオートファジーの促進剤・阻害剤を化合物スクリーニングにより同定し現在も解析を続けている。**大野博司**：極性物流システムの破綻は、吸収障害や免疫系の破綻のみならず、発癌にもつながる可能性があるが、極性物流システムの個体レベルでの役割は明らかではない。そこで本研究では、①AP-1B 遺伝子欠損マウスの解析、ならびに②研究代表者が最近同定した腸管上皮細胞特異的な物流制御因子 GP-2 および M-sec の構造機能解析上皮細胞における極性物流システムについて明らかにすることを目的とした。その結果、AP-1B は上皮細胞の極性と増殖をリンクすること、これに関連して AP-1B の発現が上皮細胞の癌化に関与する可能性が示唆された。さらに、AP-1B を欠損するとサイトカイン受容体のミスソーティングの結果腸炎を自然発症することを明らかにすることができた。また、GP2 は細菌の取り込み受容体としてその後の細菌特異的粘膜免疫応答の誘導に重要なこと、M-Sec は遠隔細胞の細胞膜を物理的に連結する細胞ナノチューブの形成制御因子として重要なことを明らかにした。**福田光則**：メラノソームの細胞内動態の分子機構の解明を目標に、メラノソームの形成・成熟・輸送に必須の役割を果たす新規因子の同定を行った。これまでに微小管上のメラノソーム輸送の分子機構等の解明に成功し、十分な成果を挙げることが出来た。**泉 哲郎**：Rab27 エフェクター granuphilin、exophilin7、exophilin8 の膵β細胞インスリン分泌における役割に関する知見を発表できた。ただ、他のエフェクターに関する遺伝子改変マウスや、膵β細胞以外の細胞における知見は未発表である。また、生きた膵β細胞でインスリンと開口放出を制御する分子を別々の蛍光で標識して、50-100 ms 単位の高速度で顆粒の動態と分子の関係を観察できる系を構築した。今後、この系を用いて顆粒の細胞膜ドッキング、プライミング、フュージョン（融合）の関係に関する新知見を発表予定である。論文発表に至っていない知見が多い点を考慮すると、達成度としては 70% くらいである。**佐々木卓也**：本研究では、高次神経機能を支える細胞内物流システムとしてシナプス小胞輸送とシナプス形成に関わる分子輸送の制御機構を解析した。前者については、シナプス小胞輸送を制御する Rab3A の関連蛋白質 Rabconnectin-3 のノックアウトマウスが神経機能障害を示すことを見出した。後者については、Rab13 とその標的蛋白質 JRAB が、小胞輸送とともにアクチン細胞骨格の再編成を時空間制御することでシナプス形成に関与していることを明らかにした。**牧野内**：細胞内の多様な輸送経路の統括的理解を目的に、様々なイメージング技術の開発がなされ、撮影した画像情報からの定量解析技術の確立が求められている。本研究では、個人の判断基準によらない画像解析手法の開発を目的とし、細胞内物流システム解析に特化した画像処理アルゴリズムの研究開発と、細胞内物流システムの長時間観察システムの開発を実施した。これらの新規手法を元に、細胞生物学者に優しい画像処理計算ソフトウェアを開発し、

無償公開を実施した。また、細胞内画像処理という新たな学問分野の確立に向け、国内外で研究発表や研究会・シンポジウムの開催、学会と共催でのアルゴリズムコンテストなどの啓蒙活動を積極的に実施した。**清水史郎**：第一に我々が開発した、ガラス基板上へ低分子化合物を「官能基非依存的」に固定化する技術と、理化学研究所内で整備されている化合物バンクを利用して、計画班員および公募班員からの標的タンパク質に結合する低分子化合物を網羅的に探索・解析することを目的に研究を行った。結果としてオートファジー制御化合物を含む複数の候補タンパク質に対して、阻害剤を発見することができた。中には *in vivo* においても効果を発揮するものも同定された。また、第二に糖鎖によるがん細胞転移の機構解析もケミカルバイオロジーの手法と質量分析法により、詳細な検討をすることができた。具体的には MMP-9, cathepsin V, PDGF などが挙げられる。双方の結果より、応募時に設定した目的に対して概ね達成できたと思われる。

#### 【公募研究】

(公募研究は多数のため、一部のみ記載する。本項目に記載しなかった公募研究は、項目 8 「主な研究成果」に記載する。)

**内田誠一**：バイオイメージの自動定量化課題、特に末梢神経細胞内の GFP 輝点群の追跡問題について、画像情報額の最新技術、特に大局的最適化に基づく技術を開発・適用し、目視による追跡結果と同程度の定量化を実現した。**堀田一弘**：細胞生物学の分野では手動による対象検出や追跡が行われており、大量のデータが得られないことやデータが主観的になるという問題があった。そこで、パターン認識法による高精度な対象検出および追跡の実現を目的とした。その結果、従来の ImageJ をはるかに上回る輝点の検出および追跡法を実現できた。**石井 優**：破骨細胞内でのケモカイン受容体やプロトンポンプの細胞内局在制御機構を明らかにすることを目的としていたが、正と負のシグナルを伝える 2 種類のケモカイン受容体の時空間制御機構を解明し、これを論文発表した。さらに、プロトンポンプの細胞内局在変化を生体内で観察するリポーターマウスを作成し、2 光子励起イメージング系を改良することにより、生体内での細胞内分子局在を追跡する系を確立した(研究期間終了後に論文発表を行った)。**村田昌之**：ゴルジ体を中心を持つゴルジ体依存的微小管中心の機能とその制御機構の一端を明らかにした。機能としてはゴルジ体からの特定方向の小胞輸送の活性化であり、その制御機構としてゴルジ体に結合している GSK3 $\beta$  による微小管結合タンパク質・CLASP2 のリン酸化である。**鈴木利治**：APP と Alcadin は、キネシン-1 のカーゴであるが、APP は Alcadin より高速の順行輸送を受け、Alcadin はキネシン-1 を活性化できる。二種類のカーゴ分子がキネシン-1 の機能を修飾し、異なる能力を発揮させる分子機構の解明に取り組んだ。APP 高速輸送に関してはキネシン-1 モーターとの結合を介在するアダプタータンパク質 JIP1 の機能を明らかにした。また、Alcadin は細胞質ドメインの WD モチーフがキネシン-1 を活性化出来る事を示した。**白根道子**：われわれは神経機能制御における小胞輸送システムの分子機構の解明を目指してきた。具体的には protrudin 依存的な小胞輸送システムの複合体の全体像を明らかにし、その制御機構を明らかにし、神経疾患との関係を明らかにすることを目標としてきた。本領域での研究により、protrudin の神経系におけるタンパク質複合体の網羅的解析を行い、KIF モーター分子と結合し輸送促進に寄与していることを明らかにした。また遺伝性痙攣性対麻痺の発症機構として ER 膜微細構造調節機構を明らかにした。また protrudin 結合タンパク質の FKBP38 が、マイトファジー誘導時にミトコンドリアから ER に局在変化することにより細胞死抑制に働いていることを明らかにした。**藤本豊士**：細胞内ロジスティクスの分子メカニズムを膜脂質局在の観点から解明することを目指した。イノシトール 4,5-二リン酸のナノレベル局在を決定する方法を確立し、さらに他の膜脂質についても研究が大きく前進した。**中山 和久**：応募時には、ARF-COPI 輸送系を遮断した時に起こる脂肪滴形成の亢進の機構について明らかにしようとした。研究期間 (H21-H22 年度) を過ぎてからではあるが、この脂肪滴形成の亢進が SREBP の活性化に起因することを明らかにした。**山口 英樹**：本研究では癌細胞の浸潤活性を担う浸潤突起における癌関連分子 CDCP1 の役割と細胞内ロジスティクスとの関連を明らかにすることを目的とした。その結果 CDCP1 が MT1-MMP の脂質ラフト及びカベオリン小胞を介した細胞内輸送に関与し、浸潤突起による細胞外基質分解を制御していることを明らかにし、概ね当初の研究目的を達成したと考えられる。**吉田秀郎**：ゴルジ体以降の小胞輸送能力を細胞の需要に応じて強化するゴルジ体ストレス応答の分子機構を解明することを目的として解析を行ったところ、ゴルジ体ストレス応答の中心的制御因子である転写因子 TFE3 を単離し、TFE3 の活性が脱リン酸化による核移行によって制御されていることを明らかにした。センサー分子まで明らかにすることはできなかった。**天野敦雄**：ヒト宿主細胞内

細菌感染に関与する細胞内ロジスティクス機構と、それに伴う遺伝子発現の分子機構の解明を目指した。その結果、細菌と宿主細胞のせめぎ合いの様が明らかとなるとともに、がん抑制遺伝子の発現への関与も示され、予想以上の成果をあげた。**紺谷 圈二**：リソソームや一次繊毛への物質輸送に介在すると考えられる ARL ファミリー低分子量 G タンパク質群の作動原理と機能的役割を明らかにすることを目的に、線虫を用いた遺伝学的・細胞生物学的手法による解析を行った。その結果、ARL8 が HOPS 複合体を介してリソソーム融合に促進的に機能していること、ARL13b がパルミトイル化修飾と RVxP モチーフの両者に依存して一次繊毛に輸送されることを明らかにし、当初の目的を 7~8 割程度達成できた。**山本 泰憲**：シナプス小胞の膜融合過程に着目して神経伝達物質の放出機構の解明に取り組み、以下を達成した。1) シナプス小胞の膜融合効率を調節する分子機構を明らかにした。2) シナプス小胞の膜融合を担う SNARE タンパク質の生合成機構を明らかにした。**山田 雅巳**：滑脳症原因因子 LIS1 が細胞質ダイニンをアイドリング状態で微小管プラス端(神経終末)までリサイクル輸送した後の細胞質ダイニンの(再)活性化メカニズムを、蛍光分子イメージングにより解明することを目的とした。本研究課題期間中に *in situ* 蛍光相互相関分光法(FCCS)、*in vitro* および *in situ* 蛍光 1 分子イメージングによる微小管上での物質輸送を直接的に観察あるいは計測できる実験系を確立し、活性型 GTPaseRab6a が、細胞質ダイニンに直接結合することで細胞質ダイニンを(再)活性化させるという新しい分子制御メカニズムを示すことができた。**原田 彰宏**：研究期間内に、細胞内極性輸送に関与する既知分子 (Rab8a, Rab8b, syntaxin3, VAMP7, SNAP23, PKD1, 2 など) のノックアウトマウスの解析とその細胞極性に与える影響を見ること、を目的としたが、VAMP7 ノックアウトマウスについては既に論文として報告した。また PKD1, PKD2, SNAP23 ノックアウトマウス、Rab8a, b のダブルノックアウトマウスについても助成期間内に解析が終了し、現在投稿中である。このように概ね順調に達成できたと考えている。**齋藤 康太**：コラーゲンの分泌異常によって惹起される疾患の病態理解に向け、コラーゲン分泌の分子機構の解析を行なった。小胞体におけるコラーゲン受容体である cTAGE5/TANGO1 巨大複合体の構成因子を明らかにし、構成因子の結合意義を明らかにすることを研究計画とした。結果、複合体中に Sec12 が含まれること、Sec12 によって Sar1 が活性化されることが cTAGE5/TANGO1 によるコラーゲン輸送に必要である可能性を提示した。さらに、各因子の線維化疾患における役割について解析することを計画したが、肝線維化には cTAGE5/TANGO1 および TANGOL は関与しないこと、また一方で他の分泌関連因子が関与する可能性を新たに見いだした。以上のようにおおむね当初の達成目標を遂行できたと考える。**北村 大介**：抗原受容体(BCR)シグナル伝達因子 BLNK に結合する 4 回膜貫通蛋白ファミリー CMTM3 と CMTM7 は細胞膜・クラスリン被覆小胞等に共局在し、BCR と共にエンドサイトーシスされる。CMTM3 と CMTM7 はそれぞれエンドサイトーシスを正と負に制御するが、本研究ではその制御機構と BLNK を介したシグナル伝達との関係を解明しようと試みた。しかし、ノックアウトマウス作製の失敗もあり、到達度は約 50%程度であった。**佐藤 美由紀**：線虫生殖腺をモデルに、脂質の取り込みを制御するエンドサイトーシスの分子メカニズムとその活性調節機構の解明を目指した。その結果、細胞内への脂質の取り込み活性が発生の時期特異的な受容体のダウンレギュレーションにより調節される現象を見出し、さらにそこに関わる因子も同定した。また、この研究の過程で、受精卵においてオートファジーが誘導され、父性ミトコンドリアの分解に働くことを発見した。**鰐田 武志**：抗原受容体(BCR)シグナル伝達の際のリガンド及び受容体の細胞内輸送の制御機構とその意義を明らかにしようとし、BCR 架橋の際の受容体エンドサイトーシスの際に、通常のエンドサイトーシスとは異なり mixed endosome を形成し、長時間比較的高い pH を保持したまま細胞内で保持されてシグナル伝達を行なうことを明らかにした。また、B リンパ球の活性化にはエンドソームでのシグナル伝達が必要であることを示唆する知見が得られた。これらの結果から、当初の目的は十分に達成できたものと考えられる。