

因となる可能性を示唆している。膜表在酵素活性の低下は、neprilysin タンパクの細胞表面への提示が低下したか、あるいは、細胞内取込み系が亢進したものと考えられる。次いで、neprilysin 活性微量測定法を改良し、ごく少量の脳組織のホモジネートを試料として酵素活性を測定する系を確立した。感度の上では、培養細胞のホモジネートを分画し、その中に含まれる neprilysin の酵素活性が測定可能である。また、海馬スライス片を用いた neprilysin 活性測定法が確立できたので、酵素活性に影響を及ぼす薬物の探索が可能となった。一方、FLAG あるいは c-Myc タグを付加した neprilysin および neprilysin 2 の発現およびその酵素活性を確認することができた。細胞質側の N 末端側の挙動を FLAG に対する抗体を、細胞マトリックス側の C 末端側の挙動を c-Myc に対する抗体を用いて蛍光標識することにより、各種ストレス下における neprilysin および neprilysin 2 の細胞膜での挙動の分析が可能となった。現在、これらの酵素活性に影響を及ぼす因子のスクリーニングを行っている。

GDNF 遺伝子の発現誘導を引き起こすストレスとして、TG 誘導性の ER ストレスが関与することを見出し、その誘導には少なくとも二つのリン酸化経路が関わっていることを明らかにした。一つは、Ca<sup>2+</sup> 非依存性 PKC のグループに含まれる PKC $\delta$  が候補として考えられる。これまでの報告から、ラット肝臓の上皮細胞において TG 刺激後 0.5 分で非受容体型チロシンキナーゼ Fyn が活性化されることが知られている。一方、Fyn は C6 細胞において PKC $\delta$  の 187 番目のチロシン残基をリン酸化することが報告されており、今回の実験系でもこのリン酸カスケードが関わっている可能性が示唆された。もう一つの細胞内シグナル経路として明らかにされたのは MEK-Erk1/2 経路と JNK 経路であるが、PKC 経路との係わりでは Ro-31-8220 の効果より、atypical PKC の一つである PKC $\zeta$  の GDNF 遺伝子発現誘導への関与が示唆された。PKC $\zeta$  は Raf-1 を活性化することが報告されてい

るので、今回の実験系でも MEK-Erk1/2 の上流に位置しているものと考えられる。JNK に関しては相反する実験結果が報告されており、その活性がメカニズムについては今後の問題である。

LPS 刺激で誘導された新規の Ex4 GDNF mRNA は従来のエキソン 4 とその 5' 上流の非翻訳領域のみで構成される転写物である可能性が高い。この場合、従来のエキソン 4 内の最初の ATG コドンより 48 bp 上流にインフレイムの終止コドンが存在しているので、Ex4 GDNF mRNA より翻訳されたタンパク質は従来のものとは異なる性質を有することが示唆される。

今回の二つの実験系で得られた結果より、イントロン 3 に GDNF 遺伝子の発現に係わる未知の応答配列が存在する可能性があるため、今後、そのプロモーター解析を進めていきたい。

## E. 結論

今回、我々が構築した 96 穴細胞培養プレート低酸素培養システムを用いた neprilysin 微量定量法により、96 穴細胞培養プレート 1 ウェル分の培養細胞で膜表在 neprilysin 活性を評価することが可能となった。5% O<sub>2</sub> という低酸素条件下で 24 時間培養した場合、SH-SY5Y 細胞の膜表在 neprilysin 活性が有意に低下することを明らかにし、低酸素ストレスによる A $\beta$  蓄積の可能性が示唆された。本研究で作製した neprilysin あるいは neprilysin 2 コンストラクトを高発現させた安定株を用い、各種ストレス下における neprilysin および neprilysin 2 の細胞内動態の分析が可能となった。また、改良した neprilysin 活性簡微量測定法は、neprilysin 活性に影響を及ぼす薬物のスクリーニングが可能ばかりでなく、本測定法を用いれば微量の病理検体を試料としてその酵素活性が測定できることを実証した。

TG 誘導性 ER ストレスにおいて、刺激後短時間で一過性に GDNF 遺伝子の発現誘導が起こることを初めて明らかにした。この結果は、中枢神経系損傷モデルにて損傷初期に一過性に誘導される

GDNF 遺伝子の発現誘導には、ER ストレスが関与する可能性を示唆している。一方、LPS 刺激による炎症性ストレスでは、GDNF 遺伝子の発現誘導は NF- $\kappa$ B 非依存性であることが示唆された。このことから、損傷初期における局所的な NF- $\kappa$ B 阻害剤の使用は神経保護作用を有する GDNF の遺伝子発現には影響を及ぼさないものと考えられる。また、LPS 刺激で誘導された新規 GDNF mRNA は単一エクソン遺伝子様であり、従来の GDNF タンパク質の性質とは異なった翻訳産物を生み出す可能性がある。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### (1) 論文発表

1. Differential effect of nerve growth factor on dopaminergic neurotoxin-induced apoptosis, Y. Hirata, T. Meguro and K. Kiuchi, *J. Neurochem.*, 99 (2), 416-425 (2006)
2. Elevated neprilysin activity in vitreous of patients with proliferative diabetic retinopathy, H. Hara, K. Oh-hashii, S. Yoneda, M. Shimazawa, M. Inatani, H. Tanihara and K. Kiuchi, *Mol. Vis.*, 12, 977-982 (2006)
3. ER calcium discharge stimulates GDNF gene expression through MAPK-dependent and-independent pathways in rat C6 glioblastoma cells, K. Oh-hashii, M. Kaneyama, Y. Hirata, and K. Kiuchi, *Neurosci. Lett.*, 405 (1-2), 100-105 (2006)
4. GRP78-binding protein regulates cAMP-induced glial fibrillary acidic protein expression in rat C6 glioblastoma cells, K. Oh-hashii, Y. Hirata, H. Koga and K. Kiuchi, *FEBS Lett.*, 580 (16), 3943-3947 (2006)
5. p44/42 MAP kinase and c-Jun N-terminal kinase contribute to the up-regulation of caspase-3 in manganese-induced apoptosis in PC12 cells, Y. Ito, K. Oh-Hashi, K. Kiuchi and Y. Hirata, *Brain Res.*, 1099 (1), 1-7 (2006)
6. *Rehmannia glutinosa* induces glial cell line-derived neurotrophic factor gene expression in astroglial cells via cPKC and ERK1/2 pathways independently, H. Yu, K. Oh-Hashi, T. Tanaka, A. Sai, M. Inoue, Y. Hirata and K. Kiuchi, *Pharmacol. Res.*, 54 (1), 39-45 (2006)
7. Determination of hypoxic effect on neprilysin activity in human neuroblastoma SH-SY5Y cells using a novel HPLC method, K. Oh-Hashi, T. Nagai, T. Tanaka, H. Yu, Y. Hirata and K. Kiuchi, *Biochem Biophys Res Commun.* 334 (2), 380-385 (2005)
8. Amyloid- $\beta$  peptides induce cell proliferation and macrophage colony-stimulating factor expression via the PI3-kinase/Akt pathway in cultured Ra2 microglial cells, S. Ito, M. Sawada, M. Haneda, S. Fujii, K. Oh-Hashi, K. Kiuchi, M. Takahashi and K. Isobe, *FEBS Lett.* 579 (9), 1995-2000 (2005)
9. Recruitment of mRNA-destabilizing protein TIS11 to stress granules is mediated by its zinc finger domain, T. Murata, N. Morita, K. Hikita, Kiyomi Kiuchi, K. Kiuchi and N. Kaneda, *Exp. Cell Res.* 303 (2), 287-299 (2005)
10. Localization of cyclooxygenase-2 induced following traumatic spinal cord injury, K. Adachi, Y. Yimin, K. Satake, Y. Matsuyama, N. Ishiguro, M. Sawada, Y. Hirata and K. Kiuchi, *Neurosci Res.* 51 (1), 73-80 (2005)
11. Effects of hyperbaric oxygen on GDNF expression and apoptosis in spinal cord injury, Y. Yu, Y. Matsuyama, M. Yanase, S. Ito, K. Adachi, K. Satake, N. Ishiguro and K. Kiuchi, *Neuroreport*, 15, 2369-2373 (2004)
12. Suppression of GDNF production by MPSS treatment following spinal cord injury in the rat, S. Nakashima, Y. Matsuyama, Y. Yu, K. Kiuchi and N. Ishiguro, *Neuroreport*, 15 (15), 2337-2340 (2004).
13. Effects of MPSS and a potent iNOS inhibitor on traumatic spinal cord injury, Y. Yu, Y. Matsuyama, S. Nakashima, M. Yanase, K. Kiuchi and N. Ishiguro N, *Neuroreport*, 15 (13), 2103-2107 (2004).
14. Anti-apoptotic and pro-apoptotic effect of NEPP11 on manganese-induced apoptosis and JNK pathway activation in PC12 cells, Y. Hirata, K. Furuta, S. Miyazaki, M. Suzuki and K. Kiuchi, *Brain Res.*, 1021,241-247 (2004)

##### (2) 学会発表

1. S. Shibata, T. Okano, M. Maeda, K. Furuta, M.

- Suzuki, K. Oh-hash, K. Kiuchi and Y. Hirata,  
The study of anti-apoptotic effects of NEPP  
derivatives, 20<sup>th</sup> IUBMB International Congress  
of Biochemistry and Molecular Biology and 11<sup>th</sup>  
FAOBMB Congress (June 18-23, 2006, Kyoto,  
Japan)
2. T. Tanaka, H. Yu, K. Oh-hash, A. Sai, M. Inoue,  
Y. Hirata and K. Kiuchi, *Rehmannia glutinosa*  
induces glial cell line-derived neurotrophic  
factor gene expression in astroglial cells via  
cPKC and ERK1/2 pathways independently,  
20<sup>th</sup> IUBMB International Congress of  
Biochemistry and Molecular Biology and 11<sup>th</sup>  
FAOBMB Congress (June 18-23, 2006, Kyoto,  
Japan)
  3. K. Oh-hash, Y. Hirata, H. Koga and K. Kiuchi,  
A novel function of rat GRP78-binding protein  
in regulating glial fibrillary acidic protein  
expression in rat C6 glioblastoma cells, 20<sup>th</sup>  
IUBMB International Congress of Biochemistry  
and Molecular Biology and 11<sup>th</sup> FAOBMB  
Congress (June 18-23, 2006, Kyoto, Japan)
  4. 大橋憲太郎、平田洋子、磯部健一、木内一壽、  
低酸素ストレスのヒト神経芽細胞 (SH-SY5Y)  
膜表在ネプリリン活性におよぼす影響、日  
本基礎老化学会第 29 回大会、平成 18 年 6 月、  
長崎
  5. S. Shibata, T. Okano, M. Maeda K. Furuta, M.  
Suzuki, K. Oh-hash, K. Kiuchi and Y. Hirata,  
Anti-apoptotic effects of neurite  
outgrowth-promoting prostaglandin  
derivatives, Society for Neuroscience, 36<sup>th</sup>  
Annual Meeting, Oct, Atlanta.
  6. 田中達英、大橋憲太郎、伊藤正敏、設楽裕信、  
平田洋子、木内一壽、新規 GDNF mRNA の同  
定とその機能解析、日本分子生物学会 2006 フォ  
ーラム、平成 18 年 12 月、名古屋
  7. 大橋憲太郎、平田洋子、藤井 智、伊藤佐知子、  
磯部健一、木内一壽、cAMP による C6 glioma 細  
胞分化における新規 GRP78 結合タンパク質の  
役割、日本基礎老化学会第 28 回大会、平成 17  
年 6 月、東京
  8. 大橋憲太郎、平田洋子、兼山雅代、木内一壽、  
Calcium mobilization stimulates GDNF gene  
expression through MAP kinase pathways in  
rat C6 glioma cells、第 78 回日本生化学大会、平  
成 17 年 10 月、神戸
  9. 平田洋子、伊東義真、大橋憲太郎、木内一壽、  
Erk activation contributes to the up-regulation  
of caspase-3 in manganese-induced apoptosis  
of PC12 cells、第 78 回日本生化学大会、平成 17  
年 10 月、神戸
  10. 鶴田忠実己、大橋憲太郎、上野義仁、北出幸夫、  
長田茂和、木内一壽、平田洋子、RNAi  
knockdown of caspase-activated DNase  
inhibits rotenone-induced DNA fragmentation  
in HeLa cells、第 78 回日本生化学大会、平成 17  
年 10 月、神戸
  11. Hirata Y, Ito Y, Oh-hash K, Nagatsu T and  
Kiuchi K, Erk activation contributes to the  
up-regulation of caspase-3 in  
manganese-induced apoptosis of PC12 cells,  
Society for Neuroscience, 35<sup>th</sup> Annual Meeting,  
Nov, Washington DC.
  12. Tsuruta T, Oh-hash K, Ueno Y, Kitade Y,  
Nagata S, Kiuchi K and Hirata Y, RNAi  
knockdown of caspase-activated DNase  
inhibits rotenone-induced DNA fragmentation  
in HeLa cells, Society for Neuroscience, 35<sup>th</sup>  
Annual Meeting, Nov, Washington DC.
  13. 平田洋子、森博之、古田享史、前田将秀、鈴木  
正昭、大橋憲太郎、木内一壽、Cyclopentenone  
prostaglandin derivatives inhibit  
manganese-induced apoptosis in PC12 cells、第  
77 回日本生化学大会、平成 16 年 10 月、横浜

14. 鶴田忠実己、大橋憲太郎、木内一壽、平田洋子、  
Involvement of CAD in rotenone-induced  
apoptosis、第 77 回日本生化学大会、平成 16 年  
10 月、横浜
15. 平田洋子、大橋憲太郎、中西信介、木内一壽、  
Glial cell line-derived neurotrophic factor  
(GDNF) prevents rotenone-induced apoptosis  
in GFR $\alpha$ 1 overexpressed PC12 cells、第 77 回日  
本生化学大会、平成 16 年 10 月、横浜

## <分担研究報告書>

細菌産物による老化制御

分担研究者 長谷川忠男

(名古屋大学大学院医学系研究科分子病原細菌学助教授→  
名古屋市立大学大学院医学研究科感染防御・制御学教授)

研究要旨：A群レンサ球菌においてADPリボシル化活性を有するNga蛋白質は近年発現、機能ともに増強している株が存在する。そのメカニズムの一つとして二成分制御系因子CsrSの二ヶ所のアミノ酸変異とNga蛋白質の一ヶ所のアミノ酸変異が重要であることを示した。またこれらの変異は宿主防御の食食機構にも影響することが示唆された。ヒトと細菌の間の相互に与えるストレスのネットワークは時代とともに変化している可能性がある。

### A. 研究目的

ヒトは様々なストレス刺激の積み重ねにより、細胞、個体レベルで不可逆的な変化をきたし老化が進展すると考えられる。ストレス刺激として細菌などの微生物感染もそのひとつとして考えることができる。細菌感染における宿主の防御機構を考えた場合、免疫担当細胞より生ずるラジカルは細菌に対する強力な武器となるが、宿主そのものへの損傷を引き起こす可能性もある。また細菌は宿主からの防御手段、感染進展の武器として種々の毒素蛋白質を放出し、宿主防御機構からの回避、あるいは宿主へのダメージを来す。その細菌毒素の一つとして宿主細胞傷害性のADPリボシル化酵素活性を持つ毒素蛋白質が存在する。この毒素は宿主の様々な蛋白質をADPリボシル化し、その機能を阻害し、細胞レベル、ひいては個体レベルへのダメージを引き起こす。一方ヒトにおいてもポリADPリボシル化酵素ファミリーの存在が明らかにされ、

ゲノムの安定性、転写レベルへの関与、生活習慣病とのかかわりが注目されてきている。以上のことを総合的に考えると細菌から放出されるADPリボシル化酵素は、宿主への様々な損傷、その不可逆的な変化、老化の促進へと関連している可能性がある。この研究においてA群レンサ球菌における主たるADPリボシル化酵素と考えられるNga蛋白質に注目し、時代変遷に伴う発現、機能の変化、それらのメカニズムを明らかにするとともに毒素蛋白質プロファイルの異なる臨床分離株の宿主の食食機能への関与を検討した。

### B. 研究方法

1) 分離時期、分泌蛋白質の二次元電気泳動プロファイルとパルスフィールドの結果に基づきA群レンサ球菌M1臨床分離株を分類し、ゲノム株SF370と他2株(グループA)、1529株と他3株(グループB)、GT01株と他5株(グループC)の計13株につき解析した。

SF370株においてゲノムより推定される13種の二成分制御系遺伝子領域、主要な制御因子をコードする *mga*, *rgg* 領域をPCRで増幅後、シーケンス解析を行った。Mタンパク、SIC蛋白質、この両者の発現制御因子である Mga蛋白質、Nga蛋白質、二成分制御因子である CsrR, CsrS, CsrRS のノックアウト株を樹立した。ノックアウト株の作製は、まず遺伝子コード領域の大部分をスペクチノマイシン耐性カセットと置き換え、pFW12ベクターに組み込んだ。次にこのベクターをエレクトロポレーション法で菌に導入し、相同組み換えを起こさせ、ノックアウト株を作製した。このノックアウト株を yeast extract を添加した brain heart infusion 液体培地で培養し、定常増殖期の培養上清蛋白質を二次元電気泳動法により分離し、各野生株とその発現プロファイルと比較した。一部のノックアウト株とその野生株をマウス腹腔マクロファージと混和し、貪食細菌の数を顕微鏡下で観察した。

2) *nga* 遺伝子について SF370株と GT01株との間で異なる領域のアミノ酸に注目した。GT01由来 *nga*DNA に変異を導入した後、大腸菌でリコンビナント蛋白質を作成し、ADPを分解する酵素活性を指標として、アミノ酸変異の Nga蛋白質における機能における役割を検討した。

### C. 研究結果

1) シーケンス解析の結果、主要な発現制御因子、Mga, Rgg をコードする遺伝子に変異は見出されなかった。一方二成分制御系因子のひとつ *csrS-csrR* 領域について、グループ A

の株においてはゲノム株 SF370 と比較して変異は認められなかったが、グループ B、C ともに *csrS* 遺伝子の同一部位に変異が見られ、これによるアミノ酸変異が確認された。また、グループ C の株ではさらに異なる場所に一ヶ所以上の塩基の変異とそれに伴うアミノ酸変異が確認された。この二個以上のアミノ酸変異により CsrS/CsrR 系が破壊もしくは機能異常を示すためにグループ A、B とグループ C の株で培養上清蛋白質の発現パターンが大きく異なっていると考えられた。*csrS* ノックアウト株を作製して行った二次元電気泳動法の結果は、SF370株、1529株においては野生型の発現プロファイルとは大きく異なり、SpeBの減少、SICの増加というグループ C と類似した発現プロファイルとなった。GT01株ノックアウトにおいても軽度ではあるが SpeBの減少と SICの更なる増加が認められ、グループ A、B とグループ C の株の培養上清蛋白質の発現プロファイルの差異は *csrS* の塩基、アミノ酸変異とそれに伴う CsrS の機能変化が原因となっている可能性が示唆された。

2) SF370, 1529, GT01株をそれぞれマウス腹腔マクロファージに20, 30, 60, 120分接触後、細胞を固定し顕微鏡観察したところ、SF370では20分接触ですでに多くの菌が貪食される様子が観察され、その他の接触時間でも数多くの菌が貪食されている像が観察された。一方GT01では20分接触では貪食像はほとんど観察されず、120分後においても少数の菌が貪食されているのみであった。1529株においてはSF370株とGT01株の中間の結果であった。ノックアウト株を用いた実験においては

GT01をバックグラウンドとするMga欠損株において貪食がやや促進され、Mgaが発現制御している因子が抗貪食に関係していることが示唆された。しかしMgaが制御する抗貪食に関係すると報告のあるM蛋白、SIC単独では効果が顕著でなく複数の毒素の関与の重要性が示唆された。

3) SF370株とGT01株においては数ヶ所にアミノ酸変異が認められ、更にGT01においてはSF370には認められないC末端の4アミノ酸が存在する。SF370, GT01それぞれのゲノムDNAを由来とするGSTリコンビナント蛋白質を作成したところ、SF370由来のものはADP分解活性が全く認められなかった。一方GT01由来のものは強い活性が認められた。GT01由来DNAに様々な変異をSF370ゲノムとの違いをもとに導入し、作成したリコンビナント蛋白質を用いて実験したところ、330番目のグリシンをアスパラギン酸に置換すると活性が全くなくなり、このアミノ酸が酵素活性に非常に重要であることが示された。

#### D. 考察

ADPリボシル化酵素活性を有するNga蛋白質の発現制御には二成分制御系因子が関連していること、蛋白質の機能変化には一ヶ所のアミノ酸変異が重要な役割を果たしていることが示された。また毒素蛋白質プロファイルの違い(抗貪食に関係すると報告されている、M蛋白、SIC、Nga蛋白質単独の欠損株では顕著な差は認められず、種々の毒素変化が宿主の防御機構に複雑に影響を与えていることが明らかとなった。またこれらの毒素発現は外

界からなんらかのストレス刺激によって変化することが示唆され、これらのことはヒトの細菌に与えるストレス、すなわち細菌に対する応答の差によって毒素蛋白質の発現が異なり、それがひいては逆にヒトに対する細菌からのストレスの変化につながると考えられる。したがって、細菌がどのようなヒトからのストレスを感知し、そのストレスが逆にヒトに与えるストレス変動を生み出すというネットワークを明らかにしていくことが感染症とそれが起因するところの外的ストレスとその蓄積という概念の老化研究にとって重要である。

更に染色体DNAの変異に伴う毒素、あるいは毒素発現調節因子の変化が、宿主の防御機構に大いに影響を与えるということは、時代の変遷に伴い同じ細菌感染ストレスであっても毒素発現の違いによっては、宿主へ及ぼす感染ストレス刺激が異なることを意味する。

#### E. 結論

細菌感染症における感染ストレスを考慮する上で、毒素発現は外界からの影響を受けるため宿主の因子が菌に影響を与え、それが再び宿主への感染ストレスにも影響するという図式が成り立つ。また時代変遷に伴う細菌のゲノムの変化が毒素蛋白質の量的、質的变化を生み、それが宿主へのストレスを変化させると同時に、逆にそれらの細菌の変化が宿主の防御機構にも影響を与えるといった複雑なネットワークを構築していることが示唆された。したがって感染ストレスを軽減するためには、細菌の毒素の宿主への影響(細胞に障害を与える機構や、防御機構に及ぼす影響)

を詳細に検討し、制御することが重要であり、その感染ストレスの軽減が老化を防止する手段になると考えられる。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

##### (2) 論文発表

1. Hashikawa S, Iinuma Y, Furushita M, Ohkura T, Nada T, Torii K, Hasegawa T, Ohta M. Characterization of group C and G streptococci strains that caused streptococcal toxic shock syndrome (STSS). *J Clin Microbiol.* 42:186-192, 2004.
2. Nakamura T, Hasegawa T, Torii K, Hasegawa Y, Shimokata K, Ohta, M. Two-dimensional gel electrophoresis analysis of the abundance of virulent exoproteins of group A streptococcus caused by environmental changes. *Arch Microbiol.* 181:74-81, 2004.
3. Hasegawa T, Hashikawa S, Nakamura T, Torii K, Ohta M. Factors determining prognosis in streptococcal toxic shock-like syndrome: Results of a nationwide investigation in Japan. *Microbes and Infection* 6:1073-1077, 2004.
4. Minami M, Ando T, Hashikawa S, Torii K, Hasegawa T, Israel DA, Ina K, Kusugami K, Goto H, Ohta M. Effect of glycine on *Helicobacter pylori* in vitro. *Antimicrob Agents Chemother.* 48: 3782-3788, 2004.

5. Tanaka M, Hasegawa T, Okamoto A, Torii K, Ohta M. The effect of antibiotics on group A streptococcus exoprotein production analyzed by two-dimensional gel electrophoresis. *Antimicrob Agents Chemother.* 49:88-96, 2005.
6. Matsumoto M, Sakae K, Hashikawa S, Torii K, Hasegawa T, Horii T, Endo M, Okuno R, Murayama S, Hirasawa K, Suzuki R, Isobe J, Tanaka D, Katsukawa C, Tamaru A, Tomita M, Ogata K, Ikebe T, Watanabe H, The Working Group for Group A Streptococci in Japan, Ohta M. Close Correlation of Streptococcal DNase B (sdaB) Alleles with emm Genotypes in *Streptococcus pyogenes*. *Microbiol Immunol.* 49: 925-929, 2005.
7. Kawamura-Sato K, Hasegawa T, Torii K, Ito H, Ohta M. Prevalence of a ParE Ile460-Val substitution in clinical *Streptococcus pneumoniae* isolates that were less susceptible to fluoroquinolones. *Curr Microbiol.* 51: 27-30, 2005
8. Kawamura-Sato K, Hiramata Y, Agata N, Ito H, Torii K, Takeno A, Hasegawa T, Shimomura Y, Ohta M. Quantitative analysis of cereulide, an emetic toxin of *Bacillus cereus*, by using rat liver mitochondria. *Microbiol Immunol.* 49: 25-30, 2005
9. Sawai J, Hasegawa T, Kamimura T, Okamoto A, Ohmori D, Nosaka N, Yamada K, Torii K, Ohta M. Growth phase dependent effect of clindamycin on the



production of exoproteins by *Streptococcus pyogenes*. *Antimicrob Agents Chemother.* in press

10. Minami M, Ohta M, Ohkura T, Ando T, Torii K, Hasegawa T, Goto H. A novel, rapid and safe detection system for *Helicobacter pylori*: the combination of brushing technique and loop-mediated isothermal amplification method (LAMP). *J Clin Microbiol.* in press

11. Vassileva M, Torii K, Oshimoto M, Okamoto A, Agata N, Yamada K, Hasegawa T, Ohta M. Phylogenetic analysis of *Bacillus cereus* isolates from severe systemic infections using multilocus sequence typing scheme. *Microbiol Immunol.* 50:743-749, 2006

## (2) 学会発表

1. 長谷川忠男、田中恵、岡本陽、鳥居啓三、太田美智男 A 群レンサ球菌の病原因子発現制御における Mga 関連蛋白質に関する解析 第 77 回日本細菌学会総会 平成 16 年

2. 田中恵、長谷川忠男、岡本陽、鳥居啓三、太田美智男 A 群レンサ球菌の菌体外毒素タンパク質の発現に及ぼす抗生物質の影響：二次元電気泳動による解析 第 77 回日本細菌学会総会 平成 16 年

3. 岡本陽、長谷川忠男、田中恵、鳥居啓三、太田美智男 *Streptococcus pyogenes* における signal peptide 依存性タンパク質分泌機構の解析 第 77 回日本細菌学会総会 平成 16 年

4. 松本昌門、鈴木匡弘、秦眞美、池辺忠義、

渡辺治雄、鳥居啓三、長谷川忠男、太田美智男 A 群レンサ球菌が産生する DNase B の遺伝子解析とその発現に影響を及ぼす環境因子の検討 第 41 回日本細菌学会中部支部総会 平成 16 年

5. 岡本陽、長谷川忠男、澤井潤、鳥居啓三、太田美智男 2D-PAGE および多次元 LC-MS による *S. pyogenes* 分泌タンパク質、菌体膜成分（不溶性画分）の網羅的解析 第 41 回日本細菌学会中部支部総会 平成 16 年

6. 澤井潤、長谷川忠男、岡本陽、鳥居啓三、太田美智男 *Streptococcus pyogenes* の ADP リボシル化酵素活性を持つ毒素蛋白質 NAD-glycohydrolase、溶血毒素 Streptolysin O の発現に関する研究 第 41 回日本細菌学会中部支部総会 平成 16 年

7. 長谷川忠男、澤井潤、岡本陽、鳥居啓三、太田美智男 *Streptococcus pyogenes* の ADP リボシル化酵素活性を持つ毒素蛋白質の発現と機能に関する研究 第 78 回日本細菌学会総会 平成 17 年

8. 岡本陽、長谷川忠男、澤井潤、鳥居啓三、太田美智男 翻訳後修飾酵素欠失変異株を用いた *Streptococcus pyogenes* におけるリポタンパク質輸送機構の解析 第 78 回日本細菌学会総会 平成 17 年

9. 澤井潤、長谷川忠男、岡本陽、鳥居啓三、太田美智男 *Streptococcus pyogenes* の菌体外分泌毒素蛋白質発現に対する抗生物質投与時期の影響 第 78 回日本細菌学会総会 平成 17 年

10. 神村卓也、長谷川忠男、岡本陽、山田景子、鳥居啓三、太田美智男 *S. pyogenes* M1

臨床分離株の分泌タンパク質プロファイルと  
二成分制御系発現制御因子 CsrS のアミノ酸  
変異の関連 第 42 回日本細菌学会中部支部  
総会 平成 17 年

11. 岡本陽、長谷川忠男、神村卓也、山田景  
子、鳥居啓三、太田美智男 LC/LC-MS/MS  
を用いた *Streptococcus pyogenes* の細胞分  
画による階層的プロテオーム解析 第 42 回  
日本細菌学会中部支部総会 平成 17 年

12. 長谷川忠男、神村卓也、岡本陽、山田景  
子、鳥居啓三、太田美智男

M1 型 A 群レンサ球菌の時代変遷に伴う発現  
制御因子の変化と分泌蛋白質発現への影響  
第 79 回日本細菌学会総会 平成 18 年

13. 神村卓也、長谷川忠男、岡本陽、山田景  
子、鳥居啓三、太田美智男 M1 型 *S. pyogenes*  
における CsrS/CsrR 二成分制御系の機能解  
析 第 79 回日本細菌学会総会 平成 18 年

14. 岡本陽、長谷川忠男、神村卓也、山田景  
子、鳥居啓三、太田美智男 *Streptococcus*  
*pyogenes* の階層的プロテオーム解析による  
新奇翻訳領域の発見 第 79 回日本細菌学会  
総会 平成 18 年

## <分担研究報告書>

### マクロファージによる老化制御

分担研究者 長瀬文彦（名古屋大学医学部保健学科、教授）

研究要旨：マクロファージ系細胞は感染等刺激により分化し、T細胞を活性化することが知られている。それと同時にトリプトファンからIDOによって産生される物質がT細胞の制御の役割を担っていると考えられている。IDOによるトリプトファン代謝産物3HAAは細胞内にROSを産生したが、3HAAによる細胞のアポトーシス誘導はROSと関係なかった。また、3HAAからCAが産生され、この物質は細胞のアポトーシスを強く誘導した。骨髄細胞からGM-CSFで分化誘導させた樹状細胞(BMDC)のIDO活性はNO産生によって抑制されており、外から加えたキヌレニン<sup>①</sup>を細胞内に盛んに取込む。

研究目的：マクロファージ、樹状細胞、ミクログリアは生体の異物を認識し、排除する。また、情報をT細胞に伝える。これらの細胞は刺激により免疫抑制物質を産生することで免疫系の恒常性を保っている。その1つ indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO)によって産生される物質に焦点を当てて検索した。トリプトファン代謝はIDOを律速酵素とするキヌレニン代謝経路によって調節されている。IDO発現は加齢とともに増加し、加齢に伴う免疫不全とも関係する。このようにIDOの発現の調節は免疫応答の制御において重要である。

IDOは免疫応答や炎症により産生されるIFN- $\gamma$ によって発現が増強される。トリプトファン代謝は免疫応答を第一にトリプトファンの枯渇によるT細胞増殖の阻止、第二に3-hydroxyanthranilic acid (3-HAA)をはじめとするトリプトファン代謝産物によるT細胞のアポトーシスの誘導により制御している。

IDOは微生物感染に対する防御、妊娠や移植における拒絶反応の抑制、腫瘍免疫の抑制、アレルギーや自己免疫性疾患の発症の制御など免疫応答と深く関係している。最近、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>制御性T細胞が恒常的に発現するCTLA-4によって抗原提示細胞である樹状細胞(DC)やマクロファージ(M $\phi$ )のCD80/CD86を刺激すると、IDOを発現する制御性のDCやM $\phi$ が誘導され、ナイーブT細胞の応答を抑制することが示された。一方、quinolinic acidなどのトリプトファン代謝産物はアルツハイマー疾患の発症やAIDSにおける脳の障害に関わっている。本研究ではトリプトファン代謝産物の3HAAの働きと骨髄細胞からGM-CSFで分化誘導したBMDCがIDO活性を発現するか否かを検討した。

#### B. 研究方法

##### 1. 細胞培養

BALB/cマウス胸腺細胞に3-HAA、SOD、

MnCl<sub>2</sub>、カタラーゼ、CA 等を添加し、18 時間培養した。BMDC は骨髄細胞を GM-CSF で 6 日間培養して得た。これらの未熟な BMDC を 5 μM の CpG で 24 時間刺激して成熟・活性化させた。

## 2. アポトーシスと ROS 産生の測定

アポトーシスはフローサイトメトリーと電気泳動により測定した。細胞内の ROS 産生はフローサイトメトリーにより測定した。

## 3. CA の測定と合成

6 時間培養した培養上清中の CA を 450 μm にピークを示す吸収スペクトルで測定した。

CA の合成は Prinz と Savage の方法により 3-HAA から作製し、HPLC と吸収スペクトルにより 98%以上の純度を確認した。

## 4. IDO 活性の測定

IDO 活性は細胞抽出液を用いた酵素活性の測定と細胞の培養上清の HPLC によるキヌレン濃度測定によって算定した。また、エールリッヒ試薬を用いた間接的な方法で測定した。

(倫理面への配慮)

実験中にはマウスに苦痛を与えぬよう十分に配慮した。

## C. 研究結果

### 1. 3-HAA によるアポトーシスの誘導と ROS の産生の非相関性

3-HAA による胸腺細胞のアポトーシスの誘導は 300~500 μM でピークを示し、100 μM と 1mM ではアポトーシスを誘導しなかった。100 μM の 3-HAA に SOD または MnCl<sub>2</sub>

を添加するとアポトーシスが誘導され、カタラーゼを併用するとさらに増強された。しかしカタラーゼのみではアポトーシスの誘導を増強しなかった。3HAA による細胞内の ROS の産生は 300 μM 以上の 3HAA の濃度に依存して増加した。ROS を産生しない 100 μM の 3-HAA に SOD または MnCl<sub>2</sub> を添加すると ROS の産生が誘導されたが、カタラーゼはそれを抑制した。それゆえ、3-HAA によるアポトーシスは ROS の産生のみでは説明できない。

### 2. 3-HAA によるアポトーシスの誘導と CA の産生の相関性

3HAA による CA の産生は MnCl<sub>2</sub> または SOD により増強され、カタラーゼによりさらに増強された。しかしカタラーゼのみでは CA の産生を増強しなかった。SOD や MnCl<sub>2</sub> による CA の産生は一定時間に停止したが、カタラーゼ存在下では経時的に増強した。それゆえアポトーシスの誘導は ROS の産生ではなく CA の産生と相関している。合成した CA によるアポトーシスの誘導は 30~50 μM でピークを示し、3HAA より 10 倍高いアポトーシス誘導活性を示した。

### 3. CA による ROS 非依存性アポトーシスの誘導

3HAA または CA によって誘導されるアポトーシスはカスパーゼ依存性であった。しかし、強くアポトーシスを誘導する 30-50 μM の CA は細胞内の ROS の産生を有意に増強しなかった。CA は培養中に徐々に崩壊し、カタラーゼによって崩壊は部分的に抑制された。しかし、CA によるアポトーシスの誘導は

SOD、MnCl<sub>2</sub>、カタラーゼによっては影響されなかった。NACは3-HAAからのCAの生成とROSの産生を抑制するとともに合成したCAを急速に崩壊させることにより3-HAAとCAによるアポトーシスの誘導を完全に阻止した。

#### 4. CpG 刺激によって BMDC に誘導されるIDO 活性と NO の産生

C57BL/6 マウスの骨髄細胞を GM-CSF で 6 日間分化誘導させた BMDC の大部分は CD11c<sup>+</sup>D11b<sup>+</sup> の骨髄系 DC であった。BMDC を CpG で 24 時間刺激すると NO 合成酵素 (NOS) のインヒビターの NG-monomethyl-L-arginine acetate (NMA) の存在にかかわらず IDO タンパクの発現が誘導された。NO 産生も CpG 刺激により誘導されたが、NMA によって阻止された。

MDC の細胞抽出液を用いた酵素測定によって検出される IDO 活性は弱かったが、NMA を細胞培養系に加えることによって増加した。これらの結果は IDO 活性が CpG で刺激された BMDC に誘導されるが、その活性は NO 産生によって抑制されることを示している。

酸化ナイトライトとキヌレニンの反応生成物をマススペクトロメトリーで解析した。キヌレニンのプロトン付加生成物(m+H)が 209 m/z に現れた。このピークは NaNO<sub>2</sub> 存在下で CTA や pH1 の酸処理によって消失し、220 m/z に新しいピークが出現した。220 m/z の付加生成物はキヌレニンと 12 m/z 異なる。この差は NaNO<sub>2</sub> の N (m/z:14) がキヌレニンの 2 個のアミノ基の 1 個に 2H(m/z:2) を放出

させて結合する変化に相当する。エールリッヒ試薬の反応結果とあわせるとキヌレニンのジアゾ化が誘導されたと考えられる。CpG で刺激した BMDC の培養上清のキヌレニン濃度をメタノールで除タンパクして測定した。CpG 刺激によってキヌレニン濃度は増加せず、培養系に加えたキヌレニン濃度は CpG 刺激をしなくても著しく低下した。CpG の取込みはシステム L のトランスポーターのインヒビターである BCH、トリプトファンインヒビターの 1-methyltryptophan およびトリプトファンによって抑制された。これらの結果より、BMDC は芳香族アミノ酸を広範囲に取込むシステム L トランスポーターによりキヌレニンを取込むことが明らかとなった。

#### G. 研究発表

##### 学会発表

1. 原稔晶、田中景子、秋元秀俊、滝川修、平松莉瑛、齋藤寛、川部勤、長瀬文彦 CpG、vitamin D<sub>3</sub>、dexamethasone の併用によりマウス骨髄由来樹状細胞に誘導される indoleamine 2,3-dioxygenase の発現と nitric oxide による酵素活性の制御 第 28 回日本トリプトファン研究会、2005 年 12 月 (愛知)
2. 平松莉瑛、原稔晶、齋藤寛、川部勤、長瀬文彦 トリプトファン代謝産物 3-hydroxyanthranilic acid が誘導する胸腺細胞のアポトーシスの SOD、MnCl<sub>2</sub> およびカタラーゼによる増強 第 28 回日本トリプトファン研究会、2005 年 12 月 (愛知)

3. 平松莉瑛、原稔晶、川部勤、長瀬文彦 ト  
リプトファン代謝産物 3-hydroxyanthranilic  
acid によって胸腺細胞に誘導されるアポトー  
シスの SOD とカタラーゼによる増強 第 34  
回日本免疫学会、2005 年 12 月 (横浜)
4. Hara T., Hiramatsu R., Kawabe T., Nagase  
F. Acid-initiated reaction of kynurenine to  
nitrite produced by bone marrow-derived  
myeloid dendritic cells stimulated with CpG.  
第 35 回日本免疫学会、2006 年 12 月 (大阪)
5. Hara T., Hiramatsu R., Akimoto H.,  
Takikawa O., Kawabe T., Nagase F.  
Trichloroacetic acid-triggered reaction of  
kynurenine to nitrite produced by bone  
marrow-derived myeloid dendritic cells  
stimulated with CpG. The 11<sup>th</sup> Meeting of  
International Study Group for Tryptophan  
Research p71, 2006 (Tokyo).

## <分担研究報告書>

### GDNF/RET系シグナルと神経変性疾患

分担研究者 高橋雅英 (名古屋大学大学院医学系研究科病理、教授)

#### 研究要旨

Dok 蛋白ファミリーの Dok-4, 5, 6 が受容体型チロシンキナーゼの中で RET に比較的特異的に結合することが知られている。RET チロシンキナーゼによる神経突起の伸長における Dok-4 の役割について解析した結果、Dok-4 を神経芽細胞腫細胞 TGW や海馬の神経細胞に導入すると、著しい神経突起の伸長を誘導することを明らかにした。この現象は Dok-4 が Rap-1 の活性化を介して、Erk の持続的な活性化をひき起こすことによるものであった。Dok-4 のこの活性には Dok-4 に存在するコドン 187, 220 および 270 のチロシンが重要な役割を果たしていることを証明した。

RET チロシンキナーゼの機能がプロテインキナーゼ A によるリン酸化によって制御されることを明らかにした。RET の細胞内ドメインに存在するセリン 696 が PKA によるリン酸化部位であること、セリン 696 をアラニンに置換すると、GDNF 刺激によって活性化される Rac1/JNK シグナル伝達系が特異的に障害されることを証明した。さらにその生体内における生理的意義について明らかにするため、マウス RET セリン 697 (ヒト RET セリン 696 に相当する) をアラニンに置換したノックインマウスを作成し、その表現型を解析した。その結果、セリン 697 のリン酸化により活性化される Rac1/JNK シグナルは胎生期における腸管神経前駆細胞の遊走能に重要な役割を果たしており、それが障害されることにより、大腸遠位部における腸管神経系が欠損することを明らかにした。神経系の発生・分化において Akt/Girdin のシグナル伝達経路が神経細胞の突起形成の制御に関与していることが示唆された。特に海馬神経細胞において Akt は極性決定に関わっており、Girdin はその機能の一端を担う可能性があると考えられた。

#### A. 研究目的

神経栄養因子 glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) は RET チロシンキナーゼを介して神経細胞の生存・分化に重要なシグナルを細胞内に伝達する。GDNF は

特に中脳ドーパミン作動性ニューロンや脊髄運動ニューロンの生存を増強する活性がみられ、パーキンソン病や筋萎縮性側索硬化症の治療薬として期待されている。生体内において GDNF/RET 系がこれらの神経細胞の

生存・分化にどのような役割を果たしているかを明らかにすることができれば、GDNFを用いたパーキンソン病や筋萎縮性側索硬化症の治療法開発のための有用な情報を提供できるものとする。われわれはこの数年の研究により、RET チロシンキナーゼからの細胞内シグナル伝達の機序を詳細に解析してきた。これらの情報を基礎に、生体内におけるそれぞれのシグナル伝達系の神経細胞の生存・分化や神経系機能に果たす役割を解明することは、将来特定のシグナル伝達系の操作による神経細胞の生存や再生を促進する技術開発につながり、ほかの神経栄養因子による神経再生の研究にも多大な貢献ができるものとする。

## B. 研究方法

### 1. RET のシグナル伝達におけるアダプター蛋白 Dok-4 の役割

RET を発現している神経芽細胞腫細胞株に Dok-4 を過剰発現し、RAS/ERK 系、PI3K/AKT 系などの細胞内シグナル伝達と形態変化に及ぼす影響を検討した。ラット海馬由来の初代培養神経細胞にも同様に Dok-4 を導入し、その効果を検討した。さらに、Dok-4 に存在するいくつかのチロシンをフェニルアラニンに置換した変異 Dok-4 を作成し、生理的活性におけるチロシン残基の重要性を検討した。

### 2. マウス RET のセリン 697 をアラニンに置換したノックインマウスの作成とその表現型の解析

RET の細胞内ドメインに存在するプロテ

インキナーゼ A のリン酸化部位であるセリン 697 をアラニンに置換したノックインマウスを作製し、形態学的変化を解析した。ノックインマウスの胎児の腸管を培養し、GDNF によって誘導される腸管神経前駆細胞の増殖、生存、分化、遊走能について検討した。ノックインマウスの培養後根神経細胞を用いて、GDNF により活性化される細胞内シグナル伝達系の解析を行った。

### 3. Akt、Girdin の神経突起伸長作用

胎生 13-17 日目のマウス胚の脳の固定組織切片を作成し、抗 Girdin 抗体を用いて免疫染色を行い、その発現様式を検討した。ラット褐色細胞腫由来の PC12D 細胞に Akt の恒常的活性化型変異体 (AktDA) あるいはベクター型 Girdin siRNA の導入し、形態変化を観察した。胎生 19 日目のラット胎児から海馬神経細胞を採取した。培養 1 日目にベクター型 siRNA を導入し、培養 5 日目 (DIV5, Stage4) において Girdin のノックダウンが神経細胞分化に与える影響を観察した。

## C. 研究結果

(ア) RET を発現する神経芽細胞腫細胞株 TGW に Dok-4 を過剰発現し、GDNF 処理による細胞の形態変化、シグナル伝達系の活性化について解析した。Dok-4 を TGW に発現させると、GDNF 刺激による神経突起の伸張を著しく増強した。この現象は Dok-4 を siRNA にてノックダウンするとキャンセルされた。GDNF による Dok-4 の活性化は Rap1 を活性化し、Erk の持続的な活性化を誘導することより神経突起の伸張を誘導すること



が示唆された。Dok-4 の発現による神経突起の伸張はラット海馬由来の初代培養神経細胞においても確認された。

さらに、GDNF により Dok-4 のチロシンリン酸化が誘導されることが知られているので、どのチロシン残基が Dok-4 の生理活性に重要であるかを解析した。いくつかのチロシンをフェニルアラニンに置換し、検討した結果、Dok-4, 5, 6 いずれにも保存されているチロシン 187, 220, 270 が突起伸張に重要な役割を果たしていることが判明した。

(イ) プロテインキナーゼ A のリン酸化部位である RET の細胞内ドメインに存在するセリン 697 をアラニンに置換したノックインマウスを作成した (S697A マウス)。病理組織学的変化を解析した結果、大腸遠位部における腸管神経系の形成が著しく障害されていることが明らかになった。大腸近位部から小腸にかけては異常は認められなかった。ノックインマウスの腸管神経系の形成過程を解析した結果、胎生期における腸管神経前駆細胞の遊走能が低下しており、そのことが大腸遠位部における腸管神経系の欠損を引き起こしていた。胎児腸管を培養し、腸管神経前駆細胞の GDNF に対する遊走能を検討した結果、予想どおりノックインマウス由来の腸管神経前駆細胞の遊走能は著しく低下していた。一方、ノックインマウス由来の腸管神経前駆細胞の増殖、生存、分化能については、野生型の腸管神経前駆細胞と比較して同等であった。さらにノックインマウス由来後根神経細胞を GDNF で刺激すると JNK のシグナルが特異的に障害されていた。以上の結果より、JNK シ

グナル伝達系が腸管神経前駆細胞の運動能を制御していることが明らかになった。S697A マウスでは腎臓発生への影響は極めて軽微であった。

胎生 13-17 日目のマウス胚の脳の固定組織切片を作成し、抗 Girdin 抗体を用いて免疫染色を行ったところ、脳皮質等の神経線維に一致して Girdin およびアクチン線維の局在が観察された。PC12D 細胞に Akt の恒常的活性型変異体 (AktDA) を強制発現したところ、NGF 刺激下で神経突起の数は減少しする一方、突起の長さが有意に延長する現象が観察された。PC12D 細胞に Girdin が発現していること、NGF 刺激下で Girdin が Akt 依存的にリン酸化されることをウエスタンブロットにより確認した。ベクター型 siRNA の導入により内因性の Girdin をノックダウンした細胞では、神経突起の数は変化しなかったが、伸長が有意に抑制された。胎生 19 日目のラット胎児から海馬神経細胞を採取し、培養 5 日目において Girdin の発現をウエスタンブロットおよび免疫染色にて確認した。培養 1 日目にベクター型 siRNA を導入し、培養 5 日目 (DIV5, Stage4) において Girdin のノックダウンが神経細胞分化に与える影響を観察した結果、Girdin のノックダウンにより神経樹状突起の数が抑制され、tau-1 陽性の軸索の数も減少傾向がみられた。AktDA の発現により複数の軸索が形成されることが最近報告されているが、Girdin をノックダウンした細胞では AktDA による軸索の複数形成が阻害された。

(ウ)

#### D. 考察

##### (ア) RET のシグナル伝達におけるアダプター蛋白 Dok-4 の役割

今回の解析のより Dok-4 が Rap1 の活性化を介して、持続的な Erk の活性化を誘導し、神経突起の伸張に重要な役割を果たしていることをヒト神経芽細胞腫細胞株およびラット海馬神経細胞を用いて明らかにした。さらに、Dok-4 のチロシン 187, 220, 270 が突起伸張に重要な役割を果たしていることを証明した。今後、Dok-4 がいかなる機序で Rap1 を活性化するかを明らかにすることが重要な課題である。1つの可能性としては Dok-4 のチロシン 187, 220, 270 に細胞内シグナル伝達蛋白、たとえば Rap1-GEF が結合することにより、Rap1 の活性化を誘導することが考えられる。あるいはこれらのチロシンが Dok-4 の生理的な 3 次元立体構造に重要なものかもしれない。

##### 2. マウス RET のセリン 697 のリン酸化の *in vivo* における役割

ノックインマウスを用いた解析により、RET のセリン 697 のリン酸化が *in vivo* においても JNK の活性化に重要であり、胎生期における腸管神経前駆細胞の遊走能を制御していることを明らかにした。セリン 697 はプロテインキナーゼ A (PKA) によるリン酸化部位であり、神経系細胞における RET と PKA の活性を制御する G 蛋白共役型レセプターとのクロストークの可能性が示唆された。特に、腸管神経細胞において、RET とともにヒルシュスプルン

グ病の原因遺伝子であることが知られているエンドセリンレセプター B による PKA の活性の制御が、RET のセリン 697 のリン酸化レベルをコントロールすることにより、正常な腸管神経系の発生に寄与している可能性が示唆された。

3、神経系の発生・分化において Akt/Girdin のシグナル伝達経路が神経細胞の突起形成や極性決定の制御に関与していることが示唆された。しかしながら、このような生物学的現象には多くの分子が関与することが知られており、Akt/Girdin シグナル伝達経路が他の機能分子とどのような相互作用を有するかを解析することが今後の課題である。

#### E. 結論

(ア) アダプター蛋白 Dok-4 は RET の下流で Rap1 の活性化を介して、Erk の持続的活性化を誘導した。Dok-4 のチロシン 187, 220, 270 が神経突起の伸張に重要であった。

(イ) RET のプロテインキナーゼ A によるリン酸化部位セリン 697 をアラニンに置換したノックインマウスを作成した。RET のセリン 697 のリン酸化は *in vivo* においても Rac1/JNK 系の活性化に重要であり、腸管神経前駆細胞の遊走能を制御していることが明らかになった。

(ウ) 神経系の発生・分化において Akt/Girdin のシグナル伝達経路が神経細胞の突起形成の制御に関与していることが示

唆された。特に海馬神経細胞において Akt は極性決定に関わっており、Girdin はその機能の一端を担う可能性があると考えられた。

#### F. 研究発表

1. Kato, M., Takeda, K., Kawamoto, Y., Tsuzuki, T., Hossain, K., Tamakoshi, A., Kunisada, T., Kobayashi, Y., Ogino, K., Suzuki, H., Takahashi, M. and Nakashima, I.  
c-Kit-targeting immunotherapy for hereditary melanoma in a mouse model. *Cancer Res.* 64: 801-806 (2004).
2. Kawamoto, Y., Takeda, K., Okuno, Y., Yamakawa, Y., Ito, Y., Taguchi, R., Kato, M., Suzuki, H., Takahashi, M. and Nakashima, I.  
Identification of RET autophosphorylation sites by mass spectrometry. *J. Biol. Chem.* 279: 14213-14224 (2004).
3. Hashimoto, T., Ichihara, M., Watanabe, T., Kawai, K., Koshikawa, K., Yuasa, N., Takahashi, T., Yatabe, Y., Murakumo, Y., Zhang, J.-m., Nimura, Y. and Takahashi, M.  
Expression of CD109 in human cancer. *Oncogene* 23: 3716-3720 (2004).
4. Kodama, Y., Murakumo, Y., Ichihara, M., Kawai, K., Shimono, Y. and Takahashi, M.  
Induction of CRMP-2 by GDNF and analysis of the CRMP-2 promoter region. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 320:108-115 (2004).
5. Jijiwa, M., Fukuda, T., Kawai, K., Nakamura, A., Kurokawa, K., Murakumo, Y., Ichihara, M. and Takahashi, M.  
A targeting mutation of tyrosine 1062 in Ret causes a marked decrease of enteric neurons and renal hypoplasia. *Mol. Cell. Biol.* 24: 8026-8036 (2004).
6. Maeda, K., Murakami, H., Yoshida, R., Ichihara, M., Abe, A., Hirai, M., Murohara, T. and Takahashi, M.  
Biochemical and biological responses induced by coupling of Gab1 to phosphatidylinositol 3-kinase in RET-expressing cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 323: 345-354 (2004).
7. Jin, Y., Murakumo, Y., Ueno, K., Hashimoto, M., Watanabe, T., Shimoyama, Y., Ichihara, M. and Takahashi, M.  
Identification of a mouse cytoskeleton-associated protein, CKAP2, with microtubule-stabilizing properties. *Cancer Science* 95: 815-821 (2004).

8. Ichihara, M., Murakumo, Y., and Takahashi, M.  
RET and neuroendocrine tumors.  
*Cancer Lett.* 204: 197-211 (2004).
9. Kodama, Y., Asai, N., Kawai, K., Jijiwa, M., Murakumo, Y., Ichihara, M., and Takahashi, T.  
The RET proto-oncogene: a molecular therapeutic target in thyroid cancer.  
*Cancer Sci.* 96:143-148 (2005).
10. Zhang, J., Hashimoto, M., Kawai, K., Murakumo, Y., Sato, T., Ichihara, M., Nakamura, S. and Takahashi, M.  
CD109 expression in squamous cell carcinoma of the uterine cervix.  
*Pathol. Int.* 55: 165-169 (2005).
11. Ito, S., Sawada, M., Haneda, M., Fujii, S., Oh-Hashi, K., Kiuchi, K., Takahashi, M. and Isobe, K.  
Amyloid-beta peptides induce cell proliferation and macrophage colony-stimulating factor expression via the PI3-kinase/Akt pathway in cultured Ra2 microglial cells.  
*FEBS Lett.* 579:1995-2000 (2005).
12. Fukuda, T., Asai, N., Enomoto, A., and Takahashi, M.  
Activation of c-Jun amino-terminal kinase by GDNF induces G2/M cell cycle delay linked with actin reorganization.  
*Genes Cells* 10: 655-663 (2005).
13. Matsuura, T., Shimono, Y., Kawai, K., Murakami, H., Urano, T., Niwa, Y., Goto, H., and Takahashi, M. PIAS proteins are involved in the SUMO-1 modification, intracellular translocation and transcriptional repressive activity of RET finger protein. *Exp. Cell Res.* 308: 65-77 (2005).
14. Morinaga, T., Enomoto, A., Shimono, Y., Hirose, F., Fukuda, N., Dambara, A., Jijiwa, M., Kawai, K., Hashimoto, K., Ichihara, M., Asai, N., Murakumo, Y., Matsuo, S., and Takahashi, M.  
GDNF-inducible zinc finger protein 1 is a sequence-specific transcriptional repressor that binds to the HOXA10 gene regulatory region.  
*Nucleic Acids Res.* 33: 4191-4201 (2005).
15. Enomoto, A., Murakami, H., Asai, N., Morone, N., Watanabe, T., Kawai, K., Murakumo, Y., Usukura, J., Kaibuchi, K., and Takahashi, M.  
Akt/PKB regulates actin organization and cell motility via Girdin/APE.  
*Developmental Cell* 9: 389-402 (2005).