

[0022]九州大学生体防御医学研究所年報 : 2007年

<https://doi.org/10.15017/10326>

出版情報 : 九州大学生体防御医学研究所年報. 22, 2008-05. 九州大学生体防御医学研究所
バージョン :
権利関係 :



感 染 防 御 研 究 セ ン タ ー

Research Center for Prevention of Infectious Diseases

感染制御学分野

Division of Host Defense

当研究分野では病原微生物から宿主を防御する生体防御機構を解明し、その分子基盤に基づいて生体防御機構を再構築することによって、難治性疾患（感染症、癌、アレルギー、自己免疫疾患、移植拒絶）の先端的治療法の開発をめざしている。生体防御機構を γ δ 型T細胞などの原始的リンパ球による自然免疫と α β 型Tリンパ球による獲得免疫に分類し、以下のテーマで研究をすすめている。

- (1) 自然免疫： γ δ 型T細胞、粘膜系T細胞と感染防御
- (2) 獲得免疫：メモリーT細胞の産生、維持の分子機構

人事面では平成19年4月1日から大学院医学系学府博士課程2年梅田健二（第二外科）が参加した。平成19年6月1日医科学修士課程1年寺田茉衣子が参加した。平成20年3月31日で柴田健輔、孫遜が医学博士号（短縮修了）を取得した。中村梨沙、鷲東みのりが医科学修士を取得した。

A. 自然免疫

- ①IL-15 ノックアウト(KO)マウスでは腸管上皮間リンパ球のなかでとくに γ δ 型T細胞が減少していることを見いだした。IL-15KOマウス \times Bcl-2トランスジェニック(Tg)マウスを作製したところ、腸管上皮間 γ δ 型Tリンパ球数は回復したが、転写因子T-bet, Eomesderminが低く、サイトカイン産生能および細胞傷害活性は回復しなかった。粘膜系 γ δ 型T細胞のホメオスタシスにはIL-15誘導bcl-2による抗アポトーシス作用のみならず、転写因子の誘導が関与していると考えられた（*J. Immunol.* 178:757-64. 2007）。
- ②C57BL/6マウスに *Escherichia coli* (ATCC26) 1×10^8 CFU を腹腔内に感染させると、感染早期に腹腔内でIL-17が産生され、好中球の浸潤を誘導した。IL-17産生細胞をサイトカインFACSで同定したところ、 $V\gamma 6/V\delta 1$ TCR陽性T細胞であることがわかった。 $V\delta 1$ KOマウスではIL-17の産生は認められなかった。今回の結果から、大腸菌感染による好中球浸潤に $V\delta 1$ 陽性 γ δ 型T細胞はIL-17を産生することに貢献していると考えられた。（*J. Immunol* 178:4466-4472. 2007）

B. 獲得免疫

- ①IL-15はエフェクターCD8T細胞のアポトーシスを抑制することによってメモリーCD8+T細胞の産生を促進するとともに、homeostatic proliferationを誘導することによって、メモリーCD8+T細胞増殖維持因子として働く。BCGワクチンは、成人の慢性結核症の防御に対しては不完全であり、それゆえ、BCGの代わる結核ワクチンの開発が早急に必要とされている。我々は

結核菌由来の防御抗原である Ag85B とメモリーCD8T 細胞の増殖維持因子である IL-15 の融合蛋白質を分泌するレコンビナント(r)BCG ワクチンを作成して, IL-15/Ag85B 融合蛋白質産生 rBCG ワクチンの結核感染に対する防御効果をマウスで検討した. IL-15/Ag85B 融合蛋白質産生 rBCG ワクチンはマイコバクテリア抗原特異的メモリーCD8+T 細胞のみならず抗原特異的メモリーCD4+T 細胞数を有意に増加させ, その結果, 強い結核防御を誘導することが明らかとなった. (*J. Infectious Dis* 197, 2008)

②腸管は食べ物や細菌などの異物に常に曝されており, 腸管粘膜では免疫系が常に活性化されている. 一方で過剰な免疫反応は正常な組織に対して傷害を引き起こす可能性がありますので健康人の腸管では過剰な免疫反応がおこらないようにきびしく制御されている. 炎症性腸疾患はこの免疫のバランスが乱れたためにおこる病気で腸の粘膜に慢性の炎症または潰瘍が形成される. 炎症性腸疾患の代表がクローン病と潰瘍性大腸炎である. クローン病は免疫反応が細胞性免疫(Th1 タイプという)に傾いたためにおこり, 一方, 潰瘍性大腸炎は液性免疫(Th2 タイプ)に傾いたためにおこると考えられているが, 現在までその詳細な機序は不明であり, また, 免疫抑制療法以外には特異的治療法がない. CD30L は TNF というサイトカイングループの一つで, そのレセプターが CD30 である. クローン病と潰瘍性大腸炎の患者の血清では可溶性 CD30 分子の増加がみられる. CD30L 欠損マウスでは, クローン病モデルの腸炎の軽減と Th1 応答の低下が見られ, 逆に潰瘍性大腸炎モデルでは腸炎の増悪と Th2 応答の増が見られた. CD30 に対する刺激抗体を投与すると, クローン病動物モデルでは腸炎の悪化と Th1 応答の増強が見られ, 逆に潰瘍性大腸炎動物モデルでは腸炎の軽減と Th2 タイプの低下が認められた. 以上の結果より CD30L とそのレセプターである CD30 は炎症性腸疾患の病態形成の重要な分子であることが世あきらかになった. また動物モデルの段階で, これら分子を標的とした抗体療法は炎症性腸疾患の新規治療法として有用であることを証明した. 現在までクローン病の重症例で抗ヒト TNF α モノクローナル抗体製剤が使用されている. ヒト型の抗 CD30 抗体が炎症性腸疾患の新規治療法として有用であると考えられる. (*Gastroenterology* 134:447-458, 2008)

業績目録

原著論文

1. Nakazato K., Yamada H., Yajima T., Kagimoto Y., Kuwano H. and Yoshikai Y. 2007.
Enforced expression of Bcl-2 restores numbers but not functions of TCR $\gamma\delta$ intestinal intraepithelial T lymphocytes in IL-15-deficient mice.
J.Immunol. 178:757-764.
2. Kajiwara T., Tomita Y., Okano S., Iwai T., Yasunami Y., Yoshikai Y, Nomoto K and Yasui H. 2007.
Effects of cyclosporine A on the activation of NKT cells induced with α -galactoceramide.
Transplantation 83:184-192.
3. Murakami D., Yamada H., Yajima T., Masuda A., Komune S. and Yoshikai Y. 2007.
Lipopolysaccharide aggravates allergic airway inflammation via direct stimulation of mast cells.
Clin. Exp. Allergy 37:339-347.
4. Eto M., Harano M., Yatsugami K., Harada M., Kamiryo Y., Kiyoshima K., Hamaguchi M., Tsuneyoshi M., Yoshikai Y. and Naito S. 2007.
Cyclophosphamide-using nonmyeloablative allogeneic cell therapy against renal cancer with a reduced risk of graft-versus-host disease.
Clin. Cancer Res.13:1029-1035.
5. Doi T., Yamada H., Yajima T., Wajjwalku W., Hara T. and Yoshikai Y. 2007.
Peptide-pulsed dendritic cells for MHC class Ib-restricted CD8 $^+$ T cells confer protection against Mycobacterium tuberculosis.
J. Immunol. 178:3806-3813.
6. Shibata K., Yamada H., Hara H., Kishihara K., and Yoshikai Y. 2007.
Resident V δ 1 $^+$ $\gamma\delta$ T cells control early infiltration of neutrophils after Escherichia coli infection via IL-17 production.
J. Immunol. 178:4466-4472.
7. Li W., Yamada H., Yajima T., Nakagawa R., Shimoda K., Nakayama K. and Yoshikai Y. 2007.
Tyk2 Signaling Is Important for Contraction of Antigen-Specific CD8 $^+$ T Cells Following a Microbial Infection.
J. Immunol. 178:4482-4488.
8. Sun X., Yamada H., Yoshihara K., Awaya A., and Yoshikai Y., 2007
In vivo treatment with a nonapeptide thymic hormone, facteur thymique serique (FTS), ameliorates chronic colitis induced by dextran sulphate sodium in mice.
Int. Immunophar. 7:928-936
9. Chiba N, Masuda A, Yoshikai Y, Matsuguchi T. 2007
Ceramide inhibits LPS-induced production of IL-5, IL-10, and IL-13 from mast cells.
J. Cell Physiol. 213:126-36.
10. Yoshihara, K., Yamada, H., Yajima, T., Kubo, C., and Yoshikai Y. 2007

- Interleukin-15 exacerbates collagen-induced arthritis through promoting IL-17 production by CD4⁺ T cells.
Eur. J. Immunol 37:2744-52.
11. Iwai T, Tomita, Y, Kajiwara T, Onzuka T, Okano S, SDhimizu I, Yasunami Y, Yoshikai Y, Nomoto K, Tominaga R. 2007
 The immunoregulatory roles of NKT cells in cyclophosphamide-induced tolerance
Transplantation 84:1686-1695.
 12. Yamada H, Kaibara N, Okano S, Maeda T, Shuto T, Nakashima Y, Okazaki K, Iwamoto Y. 2007
 Interleukin-15 selectively expands CD57⁺ CD28⁻ CD4⁺ T cells, which are increased in active rheumatoid arthritis.
Clin. Immunol. Sep;124(3):328-35.
 13. Li S., Kishihara K., Akashi N., Hara H., Yoshikai Y. Maekawa Y., and Yasumoto K. 2008
 V δ 1⁺T cells are crucial for repertoire formation of $\gamma\delta$ T cells in the lung.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 365:246-5
 14. Kagimoto Y., Yamada H., Ishikawa T, Maeda N., Goshima F, Nishiyama Y., Furue M., and Yoshikai Y., 2008
 A regulatory role of interleukin 15 in wound healing and mucosal infection in mice
J.Leukoc. Biol. 83:165-72
 15. Sun X, Somada S., Shibata K., Muta H., Yamada H., Yoshihara H., Honda K., Nakamura K., Takayanagi R., Tani K.,
 Podack E.R., and Yoshikai Y. 2008
 A critical role of CD30 ligand/CD30 in controlling inflammatory bowel diseases in mice.
Gastroenterology 134:447-458
 16. Nishimura J., Saiga H., Sato S., Okuyama M., Kayama H., Kuwata H., Matsumoto S., Nishida T., Sawa Y., Akira S.,
 Yoshikai Y., Yamamoto M., and Takeda K. 2008
 Potent antimycobacterial activity of mouse secretory leukocyte protease inhibitor
J.Immunol. 180,4032-9
 17. Yamada, H., Nakashima, Y., Okazaki, K., Mawatari, T., Fukushi, J., Hori, A., Iwamoto, Y., and Yoshikai Y., 2008
 Th1 but not Th17 cells predominate in the joints of patients with rheumatoid arthritis.
Ann. Rhem. Dis. in press
 18. Tang C., Yamada H., Shibata K., Maeda N., Yoshida S., Wajjwalku W., Ohara N., Yamada, T. and Yoshikai Y. 2008
 Efficacy of recombinant BCG vaccine secreting IL-15/Ag85B fusion protein on protection against *Mycobacterium tuberculosis*
J. Infectious Dis in press
 19. Kaibara N, Yamada H, Shuto T, Nakashima Y, Okazaki K, Miyahara H, Esaki Y, Hirata G, Iwamoto Y. 2008
 Comparative histopathological analysis between tenosynovitis and joint synovitis in rheumatoid arthritis
Histopathology in press

総説

1. 吉開泰信. 2007
感染防御機構における自然記憶リンパ球の役割
日本臨床社 新感染症学, 上巻 : 109-112
2. 前田 直良, 吉開 泰信. 2007
ウイルス発癌の新しい分子機構—レトロウイルス由来構造タンパク質エンベロープを利用した細胞トランスフォーメーション
日本ウイルス学会誌 ウイルス, 57(2): 159-170

著書

1. 山田久方, 吉開泰信. 2007
免疫応答による正常組織の破壊 P. 373-375
エッセンシャル免疫学 (笹月健彦監訳)
メディカル・サイエンス・インターナショナル 東京

学会発表

1. 山田久方, 貝原信孝, 堀亜希子, 中島康晴, 岡崎賢, 馬渡太郎, 福土純一, 岩本幸英 (2007, 4/26-29)
関節リウマチにおける IL-17 産生 T 細胞の解析
第 51 回日本リウマチ学会総会・学術集会, 横浜市
2. 貝原信孝, 山田久方, 中島康晴, 岡崎賢, 馬渡太郎, 福土純一, 岩本幸英 (2007, 4/26-29)
関節リウマチの腱鞘滑膜炎の分子生物学的検討
第 51 回日本リウマチ学会総会・学術集会, 横浜市
3. 福土純一, 中島康晴, 光安廣倫, 馬渡太郎, 岡崎賢, 山田久方, 貝原信孝, 前田健, 岩本幸英 (2007, 4/26-29)
膠原病に伴う距骨下関節脱臼の 2 例
第 51 回日本リウマチ学会総会・学術集会, 横浜市
4. 中島康晴, 岡崎賢, 馬渡太郎, 福土純一, 山田久方, 貝原信孝, 前田健, 岩本幸英 (2007, 4/26-29)
生物学的製剤による加重関節破壊抑制効果の検討
第 51 回日本リウマチ学会総会・学術集会, 横浜市
5. 貝原信孝, 山田久方, 中島康晴, 岡崎賢, 馬渡太郎, 福土純一, 堀亜希子, 岩本幸英 (2007, 5/24-27)
関節リウマチの腱鞘滑膜炎の病理学的, 分子生物学的検討
第 80 回日本整形外科学会学術集会, 神戸市
6. 吉開泰信 (2007. 7. 10)
A critical role of CD30 ligand/CD30 in controlling inflammatory bowel diseases in mice.
ICMI 国際粘膜免疫学会, 東京

7. 前田直良 (2007. 7. 15)
ウイルス表面膜たんぱく質と発癌
日本ウイルス学会後援第6回みちのくウイルス塾, 仙台
8. Ce Tang and Yoshikai Y. (2007. 9. 12)
Efficacy of Recombinant BCG Vaccine Secreting IL-15/Ag85B Fusion Protein on Protection Against Mycobacterium Tuberculosis.
CHINA-JAPAN-US TUBERCULOSIS SEMINAR AND US-JAPAN COOPERATIVE MEDICAL SCIENCE PROGRAM FORTY=SECOND TUBERCULOSIS AND LEPROSY RESEARCH CONFERENCE, Zhengzhou, China
9. 中島康晴, 岡崎賢, 馬渡太郎, 福士純一, 山田久方, 堀亜希子, 前田健, 吉澤誠司, 首藤敏秀, 岩本幸英 (2007. 9. 8-9)
Total Larsen score を用いた RA 加重関節の画像評価
第34回九州リウマチ学会, 北九州市
10. 馬渡太郎, 中島康晴, 岡崎賢, 福士純一, 前田健, 首藤敏秀, 山田久方, 三浦裕正, 濱井敏, Keaveny TM, 岩本幸英 (2007. 9. 8-9)
QCT を用いた骨粗鬆症評価
第34回九州リウマチ学会, 北九州市
11. 山田久方, 中島康晴, 岡崎賢, 馬渡太郎, 福士純一, 岩本幸英 (2007. 10. 25-26)
関節リウマチにおける IL-17 産生 T 細胞の解析
第22回日本整形外科学会基礎学術集会, 浜松市
12. Hisakata Yamada and Yasunobu Yoshikai (2007, 11/20-22)
Identification of IL-17-producing T cells in rheumatoid arthritis
日本免疫学会第37回日本免疫学会総会・学術集会, 東京
13. 前田直良, 牟田浩実, 山田久方, 中村和彦, 高柳涼一, 吉開泰信 (2007, 11/20-22)
CD30-mediated growth inhibition of cells derived from patients with adult T-cell leukemia
日本免疫学会第37回日本免疫学会総会・学術集会, 東京
14. 柴田健輔, 山田久方, 中村理沙, 吉開泰信 (2007, 11/20-22)
Molecular mechanism of IL-17 producing gdT cells.
日本免疫学会第37回日本免疫学会総会・学術集会, 東京
15. Xun Sun, Hisakata Yamada, Kensuke Shibata, Hiromi Muta, Kenzaburo Tani, Eckhard R. Podack, and Yasunobu Yoshikai (2007, 11/20-22)
A critical role of CD30 ligand/CD30 in controlling inflammatory bowel diseases in mice.
日本免疫学会第37回日本免疫学会総会・学術集会, 東京
16. 中村梨沙, 柴田健輔, 山田久方, 吉開泰信 (2007, 11/20-22)
Tyk2 is indispensable for IL-17 production by peritoneal gamma delta T cells induced by *Escherichia coli* infection
日本免疫学会第37回日本免疫学会総会・学術集会, 東京

17. Irsumi Momoe, YAMADA Hisakata, MAEDA Naoyoshi, MATSUGUCHI Tetsuya, YOSHIKAI Yasunobu (2007, 11/20-22)
Roles of a novel dual specificity phosphatase, DUSP16, in the development and functions of CD8+ T cells
日本免疫学会第37回日本免疫学会総会・学術集会, 東京
18. 堀亜希子, 池辺日王里, 中山敬一, 吉開泰信, 山田久方 (2007, 11/20-22)
実験的自己免疫性脳脊髄炎発症における Tyk2 の役割
日本免疫学会第37回日本免疫学会総会・学術集会, 東京
19. Yang Ce, Yamada Hisakata, Shibata Kensuke, Muta Hiromi, Podack R. Eckhard, Yoshikai Yasunobu (2007, 11/20-22)
Roles of CD30L in CD4 and CD8 T cell responses against *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guerin Infection.
日本免疫学会第37回日本免疫学会総会・学術集会, 東京
20. 武内在雄, 山田久方, 柴田健輔, 上領頼之, 内藤誠二, 吉開泰信 (2007, 11/20-22)
Soluble branched (1,4)-B-D-glucans from *Xanthomonas canpestris* enhance antitumor activity against murine malignant tumor through augmented NK activity and cytotoxic T-cell response
日本免疫学会第37回日本免疫学会総会・学術集会, 東京
21. 鷲東みのり, 山田久方, 逸見百江, 老初英毅, 牟田浩実, 吉開泰信 (2007, 11/20-22)
Roles of CD30 ligand in primary infection with *L. monocytogenes*.
日本免疫学会第37回日本免疫学会総会・学術集会, 東京
22. 山田久方 (2008. 1/19-20)
関節リウマチにおける IL-17 産生 T 細胞の解析
第12回リウマチフォーラム, 東京都
23. 中島康晴, 岡崎賢, 馬渡太郎, 福土純一, 山田久方, 堀亜希子, 首藤敏秀, 岩本幸英 (2008. 3/815-16)
生物学的製剤による RA の関節破壊抑制効果の検討
第34回九州リウマチ学会, 北九州市

ワクチン開発構造生物学分野

Division of Structural Biology

タンパク質の立体構造を決定し、他の分子との相互作用を詳細に解析することで、分子認識の問題や酵素活性メカニズムを構造生物学の手法を駆使することで明らかにしていく。ターゲット選択にあたっては、単に生物学的機能の重要性だけでなく、分子機能が構造生物学的に興味ある課題を含んでいるかどうかを重要視する。研究手法として、X線結晶解析と核磁気共鳴解析を組み合わせることを特徴とする。将来的にはワクチンなどの創薬研究の構造的な基盤を提供する。

九州大学共同利用施設として、X線結晶回折装置や核磁気共鳴装置のユーザー管理を行っており、九州大学における構造生物学の拠点形成を目指している。また、九州大学グローバルCOEのポストゲノム研究センター構造生物学部門として、研究支援を行っている。

A. Tom20タンパク質のプレ配列認識機構

ミトコンドリアを構成するタンパク質の大部分は細胞質のリボソームで合成された後に、ミトコンドリアへと輸送される。ミトコンドリア・マトリクスへ輸送されるタンパク質はN末端に余分な配列（プレ配列）が付加された前駆体として合成される。昨年度までにプレ配列受容体であるTom20サブユニットとプレ配列との複合体について、分子間SS結合を用いて安定化して結晶構造決定を行い、プレ配列のコンセンサス配列 $\phi_1\chi\chi\phi_4\phi_5$ (ϕ は疎水性残基)をTom20が少なくとも2つの異なる結合様式を使って、動的に認識しているという新規な分子認識機構を提案し、NMR¹⁵N緩和時間解析を行った。

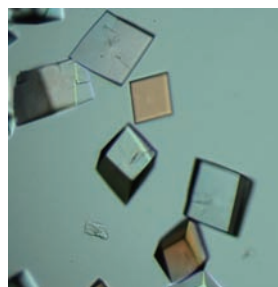
今年度は緩和時間解析をさらに進めた。プレ配列が結合していないTom20のコア構造の¹⁵N緩和時間解析を行ったところ、意外にも分子全体にわたる大きな動きがあることがわかった。プレ配列が結合すると分子全体の動きは抑制されるが、プレ配列との接触面に特殊な動的結合様式を反映した異なる種類の動きが生じることになる。また、Tom20の結合ポケットにある3つのアミノ酸残基を置換して、結合をNMRでモニターした。予想通り、疎水性残基のセリン残基への置換は結合を低下させた。以上の結果をまとめて論文発表(Ref.7)したところ、Faculty of 1000 Biology (<http://www.f1000biology.com>)において、読む価値のある論文として選出された。

リンカーを用いない複合体の安定化技術として、プレ配列内にD型システインを導入することで3残基離れたL型システインと分子内ジスルフィド結合を形成させ、ヘリックス状態を安定化することで複合体を安定化する手法を試みた。ALDHプレ配列のうち、Tom20の認識に関与しない位置であるPro13とSer16の位置にそれぞれD型とL型のシステインを導入し、分子内ジスルフィド結合を形成させた(図A.1)。このペプチドを¹⁵NラベルしたTom20に滴定する化学シフト変化実験を行った結果、結合ポケットに存在するアミノ酸残基に大きな化学シフトの変化が観察され、プレ配列ペプチドに

分子内ジスルフィド結合を導入することで複合体を形成しやすくなったことを確認できた。このペプチドとTom20を混合し、複合体の結晶化を試みたところ、約0.2mm³の結晶を得ることができた(図A.2)。この結晶を0.1% TFAに溶かし逆相HPLCで分析した結果、Tom20とペプチドが結晶中にモル比1:1で存在していることを確認した。この結晶を放射光施設で測定し、分解能2.5Åまでの反射を得ている。



図A.1 分子内ジスルフィド結合をもった新しいTom20結合ペプチドのデザイン。小文字のcはD型システインを示す。



図A.2 Tom20・プレ配列ペプチドの共結晶

B. 膜タンパク質酵素・オリゴ糖転移酵素の大腸菌による発現

アスパラギン結合型糖鎖修飾は、その全過程において数百種類の酵素が関与する複雑なプロセスであるが、糖鎖が特定の箇所に付加するか否かはオリゴ糖転移酵素(OST)が決定している。OST酵素を構成する複数のサブユニットのうちSTT3サブユニットがOST活性を担っていることが明らかになっている。昨年度までに、我々は超好熱古細菌*Pyrococcus furiosus*の膜画分にOST活性が局在し、糖鎖がAsn-X-Thr/Ser(X≠Pro)コンセンサス配列依存的に転移されること、ブルーネイティブ電気泳動とSDS-PAGEを組み合わせた2次元電気泳動の結果、*P. furiosus*のOST酵素はSTT3タンパク質(PfSTT3)のみからなることを明らかにした。PfSTT3のC末端側半分に位置する可溶性ドメインを大腸菌で発現させ、結晶構造決定を行った(Ref. 6, 9)が、精製した可溶性ドメインにはOST活性を検出できなかった。このことから、N末端側半分に存在する膜貫通ヘリックス領域(13個程度の膜貫通ヘリックス)が必要と考え、PfSTT3の大腸菌による全長発現を試みた。その結果、大腸菌の膜画分に全長PfSTT3を発現させることに成功し、その全長PfSTT3はOST活性を有していることを確認した。しかし、ウエスタンブロッティングによりPfSTT3の分解が生じていることが判明した。そこで、大腸菌株及び培養条件を検討することで改良し、収量を上げることができた。さらに、界面活性剤共存下でヒスタグ精製、熱処理、ゲルろ過を行うことによりCBB染色で単一のバンドまで精製できた。また、種々の界面活性剤存在下でのゲルろ過の溶出位置の解析から、全長PfSTT3はミセルと結合した単量体であると推定された。

C. 麻疹ウイルスHタンパク質の構造決定

近年日本で大流行している麻疹(はしか)は、麻疹ウイルスが原因で発症する急性ウイルス感染症である。全世界的には、発展途上国を中心に幼児の死亡原因の4-5%(数十万人/年)を占める大変恐ろしい疾患であるが、ワクチンを接種することにより効果

的に予防ができる代表でもある。これまでのところ、何故ワクチンが大成功を収めているのか、また 50 年前に分離されたウイルス由来のワクチンで現在も有効に働くか、については不明であった。

九州大学医学研究院の柳教授のグループと共同で、麻疹ウイルス表面蛋白質のうちヒト細胞受容体 SLAM(CD150)を直接認識して侵入に関わる H 蛋白質の X 線結晶構造解析を行った(Ref. 8)。その結果、この麻疹ウイルス H 蛋白質は、糖鎖で表面の大部分が覆われていた(図 C. 1)。受容体 SLAM との結合部位は糖鎖に覆われず露出していたが、逆にこの部位に集中的に抗体が産生されるため、ウイルス侵入を防ぐ中和抗体ができやすくなっていることがわかった。本来麻疹ウイルスが抗体から逃避するには SLAM 結合部位に変異を導入する必要があるが、これは SLAM との結合を阻害することにつながる可能性が高く、ヒト細胞へと侵入できなくなると考えられる。以上の結果から、50 年以上もワクチンが有効に働く分子基盤の一端が明らかとなった。

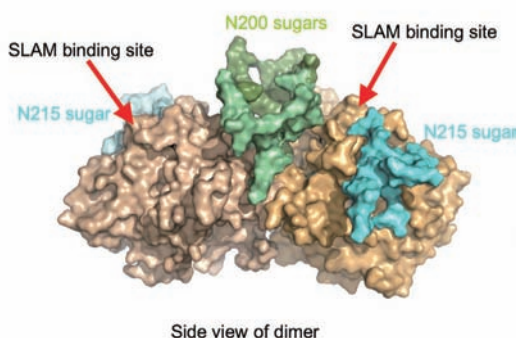


図 C. 1 麻疹ウイルス H 蛋白質ダイマーの結晶構造： H 蛋白質（茶色、肌色）と糖鎖モデル（青、緑）

業績目録

原著論文

1. K. Sasaki, T. Ose, N. Okamoto, K. Maenaka, T. Tanaka, H. Masai, M. Saito, T. Shirai, D. Kohda, 2007.
Structural basis of the 3'-end recognition of a leading strand in stalled replication forks by PriA.
EMBO J 26, 2584-2593.
2. T. Tanaka, T. Mizukoshi, K. Sasaki, D. Kohda, H. Masai, 2007.
Escherichia coli PriA protein, two modes of DNA binding and activation of ATP hydrolysis.
J Biol Chem 282, 19917-19927.
3. T. Ose, N. Soler, L. Rasubala, K. Kuroki, D. Kohda, D. Fourmy, S. Yoshizawa, K. Maenaka, 2007.
Structural basis for dynamic interdomain movement and RNA recognition of the selenocysteine-specific elongation factor SelB.
Structure 15, 577-586.
4. K. Kuroki, K. Maenaka, 2007.
Immune modulation of HLA-G dimer in maternal-fetal interface.
Eur J Immunol 37, 1727-1729.

5. D. Kohda, M. Yamada, M. Igura, J. Kamishikiryo, K. Maenaka, 2007.
New oligosaccharyltransferase assay method.
Glycobiology 17, 1175-1182.
6. M. Igura, N. Maita, T. Obita, J. Kamishikiryo, K. Maenaka, D. Kohda, 2007.
Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of the soluble domain of the oligosaccharyltransferase STT3 subunit from the thermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*.
Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun 63, 798-801.
7. T. Saitoh, M. Igura, T. Obita, T. Ose, R. Kojima, K. Maenaka, T. Endo, D. Kohda, 2007.
Tom20 recognizes mitochondrial presequences through dynamic equilibrium among multiple bound states.
EMBO J 26, 4777-4787.
8. T. Hashiguchi, M. Kajikawa, N. Maita, M. Takeda, K. Kuroki, K. Sasaki, D. Kohda, Y. Yanagi, K. Maenaka, 2007.
Crystal structure of measles virus hemagglutinin provides insight into effective vaccines.
Proc Natl Acad Sci U S A 104, 19535-19540.
9. M. Igura, N. Maita, J. Kamishikiryo, M. Yamada, T. Obita, K. Maenaka, D. Kohda, 2008.
Structure-guided identification of a new catalytic motif of oligosaccharyltransferase.
EMBO J 27, 234-243.
10. S. Tabata, K. Kuroki, N. Maita, J. Wang, I. Shiratori, H. Arase, D. Kohda, K. Maenaka, 2008.
Expression, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of human paired Ig-like type 2 receptor alpha (PILRalpha).
Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun 64, 44-46.
11. A. Takada, S. Yoshida, M. Kajikawa, Y. Miyatake, U. Tomaru, M. Sakai, H. Chiba, K. Maenaka, D. Kohda, K. Fugo, M. Kasahara, 2008.
Two novel NKG2D ligands of the mouse H60 family with differential expression patterns and binding affinities to NKG2D.
J Immunol 180, 1678-1685.
12. S. Tabata, K. Kuroki, J. Wang, M. Kajikawa, I. Shiratori, D. Kohda, H. Arase, K. Maenaka, 2008.
Biophysical characterization of O-glycosylated CD99 recognition by paired Ig-like type 2 receptors (PILR).
J Biol Chem, in press
13. K. Mamegano, K. Kuroki, R. Miyashita, M. Kusaoi, S. Kobayashi, K. Matsuta, K. Maenaka, M. Colonna, S. Ozaki, H. Hashimoto, Y. Takasaki, K. Tokunaga, N. Tsuchiya, 2008.
Association of LILRA2 (ILT1, LIR7) splice site polymorphism with systemic lupus erythematosus and microscopic polyangiitis.
Genes Immun, in press

14. C.K. Navaratnarajah, S. Vongpunsawad, N. Oezguen, T. Stehle, W. Braun, T. Hashiguchi, K. Maenaka, Y. Yanagi, R. Cattaneo, 2008.
Dynamic interaction of the measles virus hemagglutinin with its receptor SLAM.
J Biol Chem, in press

総説

1. 神田大輔. 2007
第1章 タンパク質-タンパク質相互作用解析法, 19. NMRによる解析法
実験医学別冊(羊土社), 分子間相互作用解析ハンドブック
2. 前仲勝実. 2007
薬系免疫学(南江堂) 編者
3. 白石充典、前仲勝実. 2008
第7章免疫系の細胞表面受容体
基礎から学ぶ構造生物学(共立出版)
4. 橋口隆生、柳雄介、前仲勝実. 2008
結晶構造が解き明かす麻疹ウイルスワクチン成功の理由
Medical Bio(オーム社)

学会発表

1. S Nakamura, K Kuroki, I Ohki, K, Sasaki, T Maruyama, M Ito, M Ikura, K Yamamoto, N Matsumoto, D Kohda, K Maenaka (2007 4/11-4/14)
Molecular basis for recognition of KLRG1(Killer cell lectin-like receptorG1) to E-cadherin
10th Meeting of the Society for Natural Immunity, Cambridge
2. 山田真希, 井倉真由美, 上敷領淳, 中家修, 神田大輔 (2007, 5/15-5/17)
古細菌 *Pyrococcus furiosus* 由来オリゴ糖転移酵素により合成される糖鎖の構造解析
第55回質量分析総合討論会, 広島
3. 井倉真由美, 真板宣夫, 上敷領淳, 山田真希、前仲勝実, 神田大輔 (2007, 5/24-5/26)
Asn 結合型糖鎖修飾を決定するオリゴ糖転移酵素の構造生物学研究, (ワークショップ口演)

第7回日本蛋白質科学会年会， 仙台

4. 齊藤貴士, 井倉真由美, 尾瀬農之, 帯田孝之, 小島理恵子, 前仲勝実, 神田大輔 (2007, 5/24-5/26)
ミトコンドリア Tom20 によるプレ配列の動的認識機構：緩和解析からのアプローチ，(ワークショップ口演)
第7回日本蛋白質科学会年会， 仙台
5. 大木出, 真板宣夫, 前仲勝実, 神田大輔 (2007, 5/24-5/26)
クロマチン構造制御に関わる新規 CpG 配列結合ドメインの構造学的解析
第7回日本蛋白質科学会年会， 仙台
6. 佐々木香織, 尾瀬農之, 岡本直明, 田中卓, 前仲勝実, 正井久雄, 齊藤美保子, 白井剛, 神田大輔 (2007, 5/24-5/26)
PriA タンパク質による DNA 3'末端の塩基非選択的認識機構の解明
第7回日本蛋白質科学会年会， 仙台
7. 上敷領淳, 井倉真由美, 山田真希, 前仲勝実, 神田大輔 (2007, 5/24-5/26)
超好熱性古細菌 *Pyrococcus furiosus* の N 型糖鎖生合成機構の解明
第7回日本蛋白質科学会年会， 仙台
8. 白石充典, 黒木喜美子, ラスバラリンダ, 津本浩平, 熊谷泉, 栗本英治, 加藤晃一, 神田大輔, 前仲勝実 (2007, 5/24-5/26)
ヒト非古典的 MHC クラス I 分子 HLA-G と免疫系抑制型受容体 IL2RB2 / ILT4 との複合体の立体構造解析
第7回日本蛋白質科学会年会， 仙台
9. 田畑栄一, 黒木喜美子, 梶川瑞穂, 白鳥行大, 荒瀬尚, 神田大輔, 前仲勝実 (2007, 5/24-5/26)
ペア型レセプター Paired Ig-like type2 Receptor (PILR) の構造解析
第7回日本蛋白質科学会年会， 仙台
10. 中村聖子, 黒木喜美子, 大木出, 佐々木香織, 丸山拓馬, 伊藤昌之, 伊倉光彦, 山本一夫, 松本直樹, 神田大輔, 前仲勝実 (2007, 5/24-5/26)
NK細胞抑制型レセプター KLRG1 (Killer cell-lectin like receptor G1) による E-カドヘリン認識の分子機構
第7回日本蛋白質科学会年会， 仙台
11. 市川さおり, 高井敏朗, 奥村康, 小川秀興, 沖野望, 伊東信, 神田大輔, 畠中秀樹 (2007, 5/24-5/26)
ダニ主要アレルゲン Der f 2 リガンド探索と複合体の構造解析

第7回日本蛋白質科学会年会, 仙台

12. 井倉真由美, 上敷領淳, 真板宣夫, 山田真希, 前仲勝実, 神田大輔 (2007, 8/2)
アスパラギン結合型糖鎖修飾を決定するオリゴ糖転移酵素の構造生化学 (シンポジウム口演)
第27回日本糖質学会年会, 福岡
13. 齊藤貴士, 井倉真由美, 尾瀬農之, 帯田孝之, 小島理恵子, 前仲勝実, 神田大輔 (2007, 9/10-9/13)
構造基盤解析に向けたミトコンドリアTom20-プレ配列ペプチド複合体の安定化,
第46回NMR討論会, 札幌
14. 齊藤貴士 (2007, 10/11)
NMRスペクトルを用いた蛋白質分子の運動性の解析 -ミトコンドリアTom20によるプレ配列の動的認識機構-
第59回彩都バイオサイエンスセミナー, 大阪茨木
15. S Nakamura, K Kuroki, I Ohki, K, Sasaki, T Maruyama, M Ito, M Ikura, K Yamamoto, N Matsumoto, D Kohda, K Maenaka (2007 11/20-11/22)
NK 細胞抑制型レセプターKLRG1 (killer cell lectin-like receptor G1) による E-カドヘリン認識の分子機構/Molecular basis for recognition of KLRG1(Killer cell lectin-like receptor G1) to E-cadherin
第37回日本免疫学会総会・学術集会, 品川
16. 田畑 栄一, 黒木 喜美子, 白鳥 行大, 荒瀬 尚, 神田 大輔, 前仲 勝実 (2007, 11/20-11/22)
Paired Ig-Like type2 Receptor (PILR)のリガンド分子認識機構の分子基盤,
第37回日本免疫学会総会・学術集会, 品川
17. 大木出, 前仲勝実, 神田大輔 (2007,12/11-12/15)
クロマチン構造制御に関わる新規CpG配列結合ドメインのDNA認識の分子メカニズム
BMB2007(第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会),横浜
18. 田畑栄一, 黒木喜美子, 梶川瑞穂, 王静, 荒瀬尚, 神田大輔, 前仲勝実 (2007, 12/11-12/15)
ペア型レセプターPaired Ig-like type2 Receptor (PILR)のCD99認識機構の分子基盤
BMB2007(第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会),横浜
19. 佐々木香織, 田中卓, 正井久雄, 前仲勝実, 神田大輔 (2007, 12/11-12/15)
Structural basis for the DNA recognition of PriA protein in the stalled DNA replication fork.
BMB2007(第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会),横浜

20. 市川さおり, 高井敏朗, 奥村康, 小川秀興, 沖野望, 伊東信, 神田大輔, 畠中秀樹 (2007, 12/11-12/15)
ダニ主要アレルゲン Der f 2 リガンド探索と複合体の構造解析
BMB2007(第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同大会),横浜
21. 井倉真由美, 真板宣夫, 上敷領淳, 山田真希, 前仲勝実, 神田大輔 (2007, 12/11-12/15)
Asn 結合型糖鎖修飾を決定するオリゴ糖転移酵素の構造生物学研究
BMB2007(第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同大会),横浜
22. 梶川瑞穂, 佐々木香織, 黒木喜美子, 脇本義太郎, 豊岡勝, 武田茂樹, 矢木宏和, 近藤幸子, 加藤晃一, 本橋智子, 霧島司, 朴龍洙, 神田大輔, 前仲勝実 (2007, 12/11-12/15)
BmNPV expression system: Application to human immune receptors and membrane proteins.
BMB2007(第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同大会),横浜
23. 黒木喜美子, P.J. Morales, 福永祐子, 神田大輔, J.S. Hunt, 前仲勝実 (2007, 12/11-12/15)
Molecular basis for efficient immunosuppression of HLA-G dimmer isoforms in human placenta.
BMB2007(第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同大会),横浜
24. D Kohda (2008, 1/25-1/26)
Structure-guided identification of a new catalytic motif of oligosaccharyltransferase.
Fukuoka Symposium on Molecular Soft Interactions at Biomembrane Interface, Fukuoka

微生物ゲノム情報学分野

Division of Bioinformatics

当分野では、分子進化的視点からシステムとしての生体の機能解析を行っている。主要な題材は、核酸の塩基配列、タンパク質のアミノ酸配列と立体構造であるが、それらとゲノムやポストゲノムの情報を組み合わせた新たな機能情報の抽出の方法の開発を目指している。また、個別のケースについての応用解析も行っており、それらのいくつかについては実験研究者との共同研究を進めている。

A. 生体内ネットワークの解析

a. 共進化情報を利用したタンパク質間相互作用の予測

相互作用するタンパク質では、一方の進化が他方の進化に影響を及ぼし共進化すると考えられている。共進化がおきると、相互作用する2つのタンパク質の系統樹は、相互作用しないものよりも類似していることが期待される。逆に、系統樹の類似性を評価することで、相互作用するタンパク質を予測する方法がいくつかのグループで開発された。実際には系統樹そのものを評価するのではなく、系統樹構築に利用される距離行列の類似性を、相関係数で評価することで予測が行われる。この方法はミラーツリー(mirror tree)法とよばれる。ミラーツリー法には、擬陽性が多いという問題点が指摘されており、我々は、その原因が距離行列の中に含まれるソースの生物の系統関係が評価されてしまうためであると考えた。そこで、射影演算子や偏相関係数を用いて、生物の進化的関係の情報を距離行列から除去し、その残差の類似性をミラーツリー法と同様に相関係数で評価する方法を開発してきた。実際に、この方法によって、擬陽性を大幅に減少させることができた。

一方、この方法では擬陰性、すなわち相互作用しているにも関わらず、相関係数が小さくなるタンパク質ペアが多数存在することがわかった。以前の研究では、相互作用の様式が相関係数の大きさに影響することを報告した。注目するタンパク質ペアが1対1で相互作用しているか、あるいは他に相互作用するタンパク質があっても、それらの多くを注目するタンパク質ペアが共有している場合には、相関係数が大きくなるのに対し、注目するペアのそれぞれが独自に相互作用する他のタンパク質を有している場合は、相関係数が小さくなる傾向があった。しかし、他にも相関係数に影響を及ぼす因子があると考えられる。今回、タンパク質のインターフェイスの構造的特徴に着目し、それらが相関係数に及ぼす影響を調べてみた。その結果、いくつかのインターフェイスの構造的特徴と、相関係数の間に関連があることが示唆された。また、これらの傾向から、パーマナントな複合体は、我々の方法で改

変したミラーツリー法で相互作用を検出できるが、トランジェントな複合体については検出が困難であることが示唆された。これらの解析結果をふまえ、新規手法の開発に取り組んでいる。

一方、この方法では擬陰性、すなわち相互作用しているにも関わらず、相関係数が小さくなるタンパク質ペアが多数存在することがわかった。以前の研究では、相互作用の様式が相関係数の大きさに影響することを報告した。注目するタンパク質ペアが1対1で相互作用しているか、あるいは他に相互作用するタンパク質があっても、それらの多くを注目するタンパク質ペアが共有している場合には、相関係数が大きくなるのに対し、注目するペアのそれぞれが独自に相互作用する他のタンパク質を有している場合は、相関係数が小さくなる傾向があった。しかし、他にも相関係数に影響を及ぼす因子があると考えられる。今回、タンパク質のインターフェイスの構造的特徴に着目し、それらが相関係数に及ぼす影響を調べてみた。その結果、いくつかのインターフェイスの構造的特徴と、相関係数の間に関連があることが示唆された。また、これらの傾向から、permanent な複合体は、我々の方法で改変したミラーツリー法で相互作用を検出できるが、transient な複合体については検出が困難であることを示唆された。これらの解析結果をふまえ、新規手法の開発に取り組んでいる。

b. PET システム開発

今年度より、文部科学省によるバイオインフォマティクス推進事業における「ターゲットタンパク研究プログラム」の研究題目「タンパク質の複合体構造を推定するための構造バイオインフォマティクス」に参加し、「タンパク質間相互作用部位の予測法の開発」を担当することになった。そこで、タンパク質間相互作用のインターフェイスを予測する方法として、1996年に Lichtarge らによって開発された進化トレース(evolutionary trace, 以下ETと略す)法を改変して、インターフェイスで相互作用する残基対を予測する新規手法の開発に取り組んでいる。ET法はインターフェイス予測の非常に有効な手法として、広く利用され、新たな方法の開発も行われている。ETはインターフェイス予測には有効であるが、どの残基とどの残基が相互作用しているかというような情報は与えてくれない。

本研究では、二つのタンパク質のオーソログのセットを同じソース生物種から取り出し、そのET解析を同時に実施することで、インターフェイスだけではなく、残基接触も予測できる方法の開発を目指す。この手法を、ペアワイズ進化トレース(pairwise evolutionary trace, 以後PETと略す)法と名付けた。本年度はPET法の開発に向けて、PET解析を実施できる環境の構築と、PETで得られるトレース残基のペアの性質を調査することを目的とし、そのためのアルゴリズム及びプログラム開発とシステム環境の構築を行った。

B. バイオインフォマティクスの基盤ツールの開発

a. MAFFT の改良

構造ゲノミクスの進展により多くのタンパク質の立体構造が利用できるようになってきたが、アミノ酸配列の情報に比べるとその数は非常に少ない。一方、配列情報だけでは進化的な関係を検出することが困難な遠い進化的関係にあるタンパク質は多数存在しており、立体構造情報を利用しないとそのような配列についての正確なアラインメントの構築は困難である。そこで、我々では、構造アライメントを制約条件として利用しながら、多数の相同なアミノ酸配列について、（配列類似度が微弱であっても）正確なアライメントを作成することを目的として、配列-構造統合マルチプル・アラインメントシステムの開発を行っている。

構造アラインメントには、Standley によって開発されている一連のプログラムの内、GASH (http://pdbjs3.protein.osaka-u.ac.jp/gash/run_gash.do) を使用した。また、それを制約条件として、配列を含めた一つのアラインメントの構築には MAFFT を用いた。MAFFT (<http://align.bmr.kyushu-u.ac.jp/mafft/software/>) は、我々の研究室の加藤が京大・宮田研在籍時に開発した配列マルチプル・アラインメントのプログラムであり、実用的に優れたツールとして国際的にも高く評価されている。今回開発したシステムは、<http://timpani.bmr.kyushu-u.ac.jp/~mash/> の中の Str-Seq Alignment から使用できる。

今回、MAFFT の制約条件となる入力構造アライメントとして、GASH の出力が適していたので、それを用いたが、Standley によって開発された別の構造アラインメントプログラム RASH (http://pdbjs3.protein.osaka-u.ac.jp/rash/run_rash.do) の方が高速かつ精度が良いので、次年度はその出力を利用すると同時に、構造情報の取り込みについても改良を加え、さらに精度の高い配列-構造統合アラインメント・システムを構築していきたいと考えている。この研究開発は、JST-BIRD のデータベース高度化の支援をうけて進めている。

また、本研究開発とは別に、MAFFT では、ncRNA を高精度で行う新規のアルゴリズムの実装も行っている。

C. 個別の応用研究

a. アラキドン酸カスケードの解析

細胞に化学的あるいは電氣的刺激が加わると、生体膜からアラキドン酸が切り出され、それを出発点として、プロスタグランジンやロイコトリエンなどの様々な生理活性物質が合成される。アラキドン酸に由来する様々な脂質メディエータはエイコサノイドを総称される。プロスタノイドは、エイコサノイドの中でもシクロオキシゲナーゼを律速酵素として生

成される4種類のプロスタグランジン(PGD₂, PGE₂, PGF₂, PGI₂)とトロンボキサン(TXA₂)をさす。これらのプロスタノイドは、細胞外に分泌され、Class A GPCRに属す受容体を介して作用する。

近年、東亜大学の渡部教授は、新規のPGE合成酵素、PGF合成酵素を同定した。新規PGF合成酵素は、チオレドキシシン様スーパーファミリーに属していた。一方、PGE合成酵素は、その立体構造解析からグルタチオンSトランスフェラーゼと同じ構造をとっていることが明らかにされた。構造分類データベースSCOPによれば、グルタチオンSトランスフェラーゼは、N末にチオレドキシシン様ドメイン、C末にヘリカル・ドメインを有している。新規PGE合成酵素は、チオレドキシシン様ドメイン中に、チオレドキシシンと同じくCXXCモチーフを持っており、活性にはグルタチオンを必要としない。それまでに、造血型PGD合成酵素がグルタチオンSトランスフェラーゼに属すことは知られていたが、その反応はグルタチオン依存性であり、プロスタノイド合成系においてチオレドキシシン様の反応が存在することは認識されていなかった。我々は、プロスタノイド合成系におけるチオレドキシシン様ドメインの意味を調べるため、プロスタノイド合成系に存在するチオレドキシシン様ドメインと、構造分類データベースSCOPに登録されているチオレドキシシン様ドメインの代表的なものについて分子系統解析を実施した。その結果、以下の3点が明らかとなった。(1)系統樹中で、新規PGE合成酵素、造血型PGD合成酵素、新規PGF合成酵素のチオレドキシシン様ドメインは、一つのクラスタを形成せず、系統樹中、異なるサブツリー中に存在していた。このことは、これらの酵素のチオレドキシシン様ドメインが、それぞれ独立に各酵素に取り込まれ、プロスタノイド合成に関与するようになったことが示唆している。また、(2)グルタチオンSトランスフェラーゼでは一般に、CXXCモチーフはチオレドキシシン様ドメイン内では保存されておらず、系統樹上それらの共通祖先に最も近い所から分岐した2つの酵素(その内一つは新規PGE合成酵素)のN末ドメインではCXXCモチーフが保存されている事が明らかになった。このことから、チオレドキシシン様タンパク質と α ヘリカル・ドメインが融合してグルタチオンSトランスフェラーゼが形成された当初は、CXXCモチーフが活性を担っていたが、次第にグルタチオンを使用するものが増え、CXXCモチーフの役割がグルタチオンに乗っ取られて(take-over)しまったことが示唆された。さらに、(3)リポカリン型PGD合成酵素は、リポカリンと呼ばれる疎水性低分子のトランスポーターから進化してきたと考えられている。構造上基質結合部位と思われる β バレル構造のクレフト内部にPGD合成酵素に特異的に保存するCys残基が存在しており、そのCysの獲得が非酵素から酵素への進化に重大であったと考えられている。このCysの獲得は比較的近年(魚類と他の脊椎動物の分岐後)に生じたと考えられることから、リポカリン型PGD合成酵素は、CXXCモチーフ、あるいはグルタチオ

ンの役割をこの Cys でミミックすることで酵素へ進化じたと考えられる。また、以前に同定されていた PGF 合成酵素は、TIM バレル型の構造をとっており、NADPH 依存的に反応を制御するが、これも広い意味ではチオレドキシン・システムのみミックといえる。

この他に、Prof. Ragolia, の依頼により、リポカリン型 PGD 合成酵素の分子進化解析を行い、リポカリン型 PGD 合成酵素の進化を調べ総説を作成した。

業績目録

原著論文

1. D.M., Standley, H.Toh, H. Nakamura, 2007

ASH structural alignment package: Sensitivity and selectivity in domain classification.

BMC Bioinformatics 8, 116

2. H. Moriuchi, N. Koda, E. Okuda-Ashitaka, H. Daiyasu, K. Ogasawara, H. Toh, S. Ito ,

D.F. Woodward, K. Watanabe , 2008

Molecular Characterization of a Novel Type of Prostamide/Prostaglandin F Synthase,

Belonging to the Thioredoxin-like Superfamily.

J. Biol. Chem. 283, 792-801.

3. G Sasaki, K. Katoh, N. Hirose, H. Suga, K. Kuma, T. Miyata, Z.H. Su, 2007

Multiple receptor-like kinase cDNAs from liverwort *Marchantia polymorpha* and two charophycean

green algae, *Closterium ehrenbergii* and *Nitella axillaris*: Extensive gene duplications and gene

shufflings in the early evolution of streptophytes,

Gene 401, 135-144.

4. Y. Yamanishi, H. Mihara, M. Osaki, H. Muramatsu, N. Esaki, T. Sato, Y. Hizukuri, S. Goto, M. Kanehisa, 2007

Prediction of missing enzyme genes in bacterial metabolic network: a reconstruction of lysine degradation pathway of

Pseudomonas aeruginosa,

FEBS J.,274, 2262-2273.

5. 大橋智子,佐藤哲也,桑田実,藤村庄,竹谷茂, 2007

ストレス蛋白質遺伝子のプロモーター活性の可視化と評価,
薬学雑誌,127, 757-764.

6. M. Koyanagi, N. Nagata, K. Katoh, S. Yamashita, F. Tokunaga

Molecular evolution of arthropod color vision deduced from multiple opsin genes of jumping
spiders,

J. Mol. Evol. (in press)

7. D.M. Standley,, H. Toh,, H. Nakamura

Functional annotation by sequence-weighted structure alignments: Statistical analysis and case studies from the Protein
3000 structural genomics project in Japan

PROTEINS (in press).

総説

1. H. Ichihara,, K. Kuma,, Y. Urade,, H. Toh, 2007

Evolutionary analysis of lipocalin-type prostaglandin D₂ synthase.

In: prostaglandin D₂ synthase - A Multitude of Biological Functions (Ed. Ragolia, L.),
Research Signpost, Kerala, pp. 29– 46.

2. H. Daiyasu,, K. Watanabe,, H. Toh

Recruitment of thioredoxin-like domains into prostaglandin synthases.

Biochem, Biophys. Res. Commun. (in press).

3. K. Katoh,, H. Toh

Recent developments in the MAFFT multiple sequence alignment program.

Briefings in Bioinformatics (in press).

4. K. Katoh G Asimenos , H. Toh

Multiple Alignment of DNA Sequences with MAFFT

Methods in Molecular Biology (in press)

5. C.B. Do, K. Katoh

Protein multiple sequence alignment

Methods in Molecular Biology, (in press)

著書

1. 藤 博幸, 2007

微生物ゲノム・ポストゲノムデータベース

In: 戸田新細菌学(改訂 33 版) (吉田眞一, 柳雄介, 吉開泰信 編) pp990-993,

南山堂.

2. 佐藤 哲也, 金久 實, 藤 博幸, 2007

計算による相互作用の予測

In: 分子間相互作用解析ハンドブック (磯辺俊明, 中山敬一, 伊藤隆司 編)

pp.127-131 (2007) 羊土社, 東京

3. 岩部直之, 管 裕, 廣瀬 希, 隈 啓一, 藤 博幸, 岡田雅人, 2007

分子進化と比較ゲノム: 立襟鞭毛虫の遺伝子から探る動物の多細胞化

In: 比較ゲノムから読み解く生命システム - 基本概念からゲノム情報まで -

(監修 藤山 秋佐夫) pp74-81, 秀潤社.

4. T. Sato, Y. Yamanishi, K. Horimoto, M. Kanehisa, H. Toh, 2007

Inference of Protein-Protein Interaction by Using Co-evolutionary Information.

Algebraic Biology - 2nd International Conference, Algebraic Biology 2007 Proceedings - (Eds. Anai, H., Horimoto, K.,

Kursita T.), pp322-333, Springer, Berlin

学会発表

1. Standley, D.M., Toh, H., Nakamura, H. (2007/5/26)

Using ASH and Pfam to Functionally Annotate Structural Genomics Targets

第7回日本蛋白質科学会年会, 仙台

2. 大安裕美, 水谷正治, 斉野廣道, 戸本浩央, 坂田完三, 神谷成敏, 藤 博幸

(2007/5/24)

二糖配糖体特異的グリコシダーゼの基質特異性に関する情報科学的研究と変異体実験

第7回日本蛋白質科学会年会, 仙台

3. 藤 博幸, 野原 祥夫 (2007/5/26)

進化トレース法におけるトレース残基の自動同定

第7回日本蛋白質科学会年会, 仙台

4. 市原寿子, 隈 啓一, 藤 博幸 (2007/5/26)

レンサ球菌の自然形質転換を制御する CSP-ComD 系における正の選択圧の解析

第7回日本蛋白質科学会年会, 仙台

5. Katoh K, Toh H, (2007/6/26)

MAFFT-Q-INS-i: multiple alignment of ncRNAs taking into account predicted secondary structure,

The Society for Molecular Biology and Evolution 2007 Annual Meeting, Nova Scotia

6. Toh, H. (2007/7/2)

Inference of Protein-Protein Interaction by Using Co-evolutionary Information.

2nd International Conference, Algebraic Biology 2007, Linz (招待講演, Tutorial Talks)

7. 隈啓一, 加藤和貴, 宮田隆, 岩部直之 (2007/8/31)

細胞外カドヘリンドメインを持つタンパク質の進化,

日本進化学会第9回大会, 京都

8. 岩部直之, 隈啓一, 加藤和貴, 菅裕, 廣瀬希, 藤博幸, 岡田雅人, 笠原雅弘, 森下真, 小原雄治,

藤山秋佐夫, 宮田隆 (2007/9/2)

立襟鞭毛虫・ゲノムと多細胞動物体制の進化,

日本進化学会第9回大会, 京都

9. 加藤和貴, 藤博幸, (2007/9/20)

アラインされていない多数の配列から案内木を計算する方法について,

日本遺伝学会第79回大会, 岡山

10. 王永剛, 中島信孝, 栗原淑子, 佐藤哲也, 藤博幸, 小林秀紀, 関口猛 (2007/12/13)
ストレス応答に働く G タンパク質 GTR2 の 44 番目のスレオニンの変異が GTR2
欠失株の変異を相補する
第 30 回日本分子生物学会年会, 第 80 回日本生化学会 合同大会, 横浜
11. 佐藤哲也, 山西芳裕, 金久 實, 藤 博幸 (2007/12/14)
共進化の強度とインターフェースの構造的特徴
第 30 回日本分子生物学会年会, 第 80 回日本生化学会 合同大会, 横浜
12. 岩部直之, 隈啓一, 廣瀬希, 管 裕, 加藤和貴, 藤 博幸, 宮田 隆 (2007/12/14)
立襟鞭毛虫遺伝子から探る動物初期進化における遺伝子多様性: (1) シグナル
伝達系関連遺伝子の進化
第 30 回日本分子生物学会年会, 第 80 回日本生化学会 合同大会, 横浜
13. 隈啓一, 岩部直之, 廣瀬希, 管 裕, 加藤和貴, 藤 博幸, 宮田 隆 (2007/12/14)
立襟鞭毛虫遺伝子から探る動物初期進化における遺伝子多様性: (2)
細胞接着, アポトーシス, 転写調節関連遺伝子の進化
第 30 回日本分子生物学会年会, 第 80 回日本生化学会 合同大会, 横浜
14. Johansson, F, Toh, H. (2007/12/17-19)
Guided Pattern Search for SVM Feature Scaling
JSBi 2007 (日本バイオインフォマティクス学会年会), 東京
15. Sato, T., Toh, H. (2007/12/17-19)
Analysis of Correlation between Subunits within the Same Protein Complex
JSBi 2007 (日本バイオインフォマティクス学会年会), 東京
16. 蝦名鉄平, 藤 博幸, 黒田 裕 (2007/12/21)
ループ長依存性を利用した SVM によるドメインリンカー予測法の開発
日本生物物理学会第 45 回年会, 横浜
17. 小田浩之, 佐藤哲也, 太田元規, 藤 博幸 (2007/12/22)

タンパク質間相互作用のインターフェイス解析のためのプロファイル比較
日本生物物理学会第 45 回年会, 横浜

18. Standley, D.M., Toh, H., Nakamura, H. (2007/12/22)

Functional Annotation Sequence-weighted Structural Alignments.

シンポジウム「構造プロテオミクスを推進するバイオインフォマティクス」

(オーガナイザー：藤 博幸, 黒田 裕)

日本生物物理学会第 45 回年会, 横浜

19. 藤 博幸 (2007/12/22)

タンパク質間相互作用の情報解析

シンポジウム「構造プロテオミクスを推進するバイオインフォマティクス」

(オーガナイザー：藤 博幸, 黒田 裕)

日本生物物理学会第 45 回年会, 横浜

20. Toh, H. (2008/2/29)

Analysis of Protein Interface by Profile Comparison (招待講演)

JST-BIRD International Workshop, IPR seminar. - Computatinal and experimental approaches
to protein interactions and complexes -, Suita

防御分子構築学分野

Division of Molecular Design

当部門では、タンパク質ネットワーク解析からケミカルバイオロジーを展開している。細胞内のタンパク質相互作用を大規模に解析し、ネットワークとして俯瞰することにより、これまで見いだすことの出来なかった、新たな制御ポイントや創薬ターゲットを明らかにすることが出来る。このような相互作用を標的とした効率的な化合物スクリーニングを展開し、バイオロジーを深化するための化合物プローブを発見することが研究の目的である。そのための基本技術として超々高感度な質量分析システム、タンパク質相互作用を可視化する蛍光イメージング技術等の研究開発を行っている。また、化合物のソースとして天然物を活用し、ヒット化合物を最適化・合成展開するための *in silico* シミュレーションと第二世代のコンビナトリアル化学合成を融合し、日本独自の戦略によるケミカルバイオロジーの発展を目指している。

A. 超々高感度質量分析

我々は、これまでに世界最小のダイレクトナノ LC を開発し、質量分析計とのオンライン化を測り、大規模なタンパク質ネットワーク解析を実施してきた。このシステムを更に発展させ、より高感度で且つ S/N 比の高い第二世代のダイレクトナノ LC を開発した。精密電気鋳造技術によるマイクロ流路と、新規なバルブレス流路セクターを備えたこの第二世代は、検出感度を 2 倍以上向上させた。また、ノイズレベルを従来の 1 万分の 1 に減少させるという飛躍的な S/N 比の向上を達成した。従来の技術ではバルブ由来の樹脂と、配管に用いるステンレスからの鉄イオンが大量のノイズ源であった。しかし、今回の開発による第二世代のダイレクトナノ LC では、これらのノイズ源を完全に廃することに成功したため、このような驚異的な S/N 比が達成された。このシステムを活用し、今年度は、骨パジェット病原因遺伝子である p62 の機能解析と、神経活動から神経突起形成を惹起するシグナルパスウェイの発見などの成果をあげることが出来た。

B. ケミカルバイオロジー

前年度より、タンパク質相互作用を指標とした化合物スクリーニングを行っている。その目的は、得られた化合物プローブを活用したバイオロジーを展開することである。タンパク質間相互作用を包括的にネットワークとして俯瞰することにより、生体システムを制御する上で重要なタンパク質相互作用を見だし、それらをターゲットとして統一的なスクリーニングを行い、効率的に化合物プローブを取得するのである。ま

た、タンパク質はすべからく、他のタンパク質と相互作用し機能を発揮するのであるから、相互作用を指標に化合物をスクリーニング出来れば、酵素活性などの明確なスクリーニング指標を持たないタンパク質にも化合物プローブを発見可能である。従来の化合物スクリーニングでは、細胞死などの生物活性を指標にした個別のアッセイ系を構築しなければならず、アッセイ系を構築するためにかかる労力と時間がこれまでの化合物スクリーニングのボトルネックであった。しかし、タンパク質相互作用を指標とするならば、個別のスクリーニング系を立ち上げることなく、共通のプラットフォームにてスクリーニングが可能であるため、これまでのボトルネックを除去可能であり、ケミカルバイオロジーを大きく加速できる。このような目的のために、タンパク質相互作用を可視化し化合物スクリーニングを行うため、蛍光イメージング技術に注力してきた。蛍光イメージング法の優れている点は（１）分子を固相化することなく、全て溶媒中での分子間相互作用検出を基礎としているため、試験管レベルは勿論、細胞レベル、ひいては臓器レベル、個体レベルでの検出・解析系へと共通の原理でスクリーニングを展開可能である。（２）検出のための反応処理時間を必要としないリアルタイムモニターが基本であるため、ハイスループット化に適する。また反応試薬が不要のため安価である。（３）試験管・細胞レベルのアッセイでは 384 マルチプレートでのアッセイが容易に行えるため、この点からも化合物スクリーニングに適する。既に蛍光イメージングによるタンパク質相互作用解析の有用性は周知のことであったが、化合物が持つ自家蛍光などの問題からこれまで広く用いられておらず、スクリーニングのためにハイスループット化はなされていない。しかし、日本独自の蛍光タンパク質の開発等からこれらの問題は基本的には克服されつつある。たとえば、自家蛍光の影響を避けるために、蛍光タンパク質の輝度を増大する、あるいは励起波長と蛍光波長とを極端に離す、などの数々の工夫がなされてきている。また、励起光源と検出装置の高速スイッチングを行う。また、蛍光寿命範囲を考慮して、自家蛍光や散乱などの影響を避ける等、光学的に行う手法もまた有効である。これらのハードを支えるためのソフト開発などの研究開発を行なう。

実際に技術開発を行ったのは、蛍光補完（メモリーダイ）と蛍光相関（FCCS）である。In vitro メモリーダイはスループットが高くかつ再現性が高いため、一次ランダムスクリーニングに適する。また、FCCS は現時点ではスループットに劣るが、相互作用の高次情報が得られるため、二次スクリーニングでの化合物評価に適する。これらのシステムにより、プロテアソームのアセンブリー因子とプロテアソームとの相互作用を抑制する化合物など数個の新規化合物を得ており、現在、細胞・個体レベルでの評価を実施中である。

業績目録

原著論文

1. Ueda JY, Hashimoto J, Nagai A, Nakashima T, Komaki H, Anzai K, Harayama S, Doi T, Takahashi T, Nagasawa K, Natsume T, Takagi M, Shin-ya K. 2007
New aureothin derivative, alloaureothin, from *Streptomyces* sp. MM23.
J Antibiot (Tokyo). May;60(5):321-4
2. Iioka H, Iemura S, Natsume T, Kinoshita N. 2007
Wnt signalling regulates paxillin ubiquitination essential for mesodermal cell motility.
Nat Cell Biol. Jul;9(7):813-21
3. Nakagawa T, Shirane M, Iemura S, Natsume T, Nakayama KI. 2007
Anchoring of the 26S proteasome to the organellar membrane by FKBP38.
Genes Cells. Jun;12(6):709-19.
4. Lee RH, Iioka H, Ohashi M, Iemura S, Natsume T, Kinoshita N. 2007
XRab40 and XCullin5 form a ubiquitin ligase complex essential for the noncanonical Wnt pathway.
EMBO J. Aug 8;26(15):3592-606
5. Ueda JY, Togashi T, Matukura S, Nagai A, Nakashima T, Komaki H, Anzai K, Harayama S, Doi T, Takahashi T, Natsume T, Kisu Y, Goshima N, Nomura N, Takagi M, Shin-Ya K. 2007
A novel nuclear export inhibitor JBIR-02, a new piericidin discovered from *Streptomyces* sp. ML55.
J Antibiot (Tokyo). Jul;60(7):459-62.
6. Satoh K, Ohnishi J, Sato A, Takeyama M, Iemura S, Natsume T, Shibuya H. 2007
Nemo-Like Kinase-Myocyte Enhancer Factor 2A Signaling Regulates Anterior Formation in *Xenopus* Development.
Mol Cell Biol. Nov;27(21):7623-30.
7. Saijou E, Itoh T, Kim KW, Iemura SI, Natsume T, Miyajima A. 2007
Nucleo-cytoplasmic shuttling of the zinc finger protein EZI is mediated by importin-7-dependent nuclear import and CRM1-independent export mechanisms.
J Biol Chem. Nov 2;282(44):32327-37
8. Komatsu M, Waguri S, Koike M, Sou YS, Ueno T, Hara T, Mizushima N, Iwata J, Ezaki J, Murata S, Hamazaki J, Nishito Y, Iemura S, Natsume T, Yanagawa T, Uwayama J, Warabi E, Yoshida H, Ishii T, Kobayashi A, Yamamoto M, Yue Z, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K. 2007
Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice.
Cell. Dec 14;131(6):1149-63

9. Hamuro J, Higuchi O, Okada K, Ueno M, Iemura SI, Natsume T, Spearman H, Beeson D, Yamanashi Y. 2008
Mutations causing DOK7 congenital myasthenia ablate functional motifs in DOK-7.
J Biol Chem. Feb 29;283(9)
10. Saneyoshi T, Wayman G, Fortin D, Davare M, Hoshi N, Nozaki N, Natsume T, Soderling TR. 2008
Activity-dependent synaptogenesis: regulation by a CaM-kinase kinase/CaM-kinase I/betaPIX signaling complex
Neuron. Jan 10;57(1):94-107

総説

1. 家村 俊一郎、夏目 徹 2007
質量分析のための試料前処理法：プロテオミクス分野
Journal of the Mass Spectrometry Society of Japan, 55-3, pp.165-171、2007/06

著書

1. 夏目徹 2007.
大規模タンパク質ネットワーク解析からの展開
ゲノムを医学する、pp.107-115
南山堂
2. 夏目徹 2007.
大規模蛋白質相互作用ネットワーク解析から展開するケミカルバイオロジー
プロジェクト
ケミカルバイオロジー、pp.1649-1654 Vol152 No,13
共立出版

学会発表

1. 夏目徹 (2007, 5/24-26)
大規模タンパク質ネットワーク解析から展開するケミカルバイオロジー
第7回日本蛋白質科学会年会 シンポジウム, 仙台.
2. 夏目徹 (2007, 6/27)
パスウェイ・ネットワークの絶対定量による動態解析
文科省 特定領域研究「ゲノム」4 領域 2007 年度合同班会議 シンポジウム, 神戸
3. 夏目徹 (2007, 7/30)
タンパク質ネットワーク大規模解析から展開するケミカルバイオロジー
日本ヒトプロテオーム機構第5回大会, 日本科学未来館

4. 夏目徹 (2007, 8/10)
大規模タンパク質ネットワーク解析から展開するケミカルバイオロジー
CBI 学会, 御茶ノ水
5. 夏目徹 (2007, 10/3-5)
From systematic analysis of pritein interaction networks to chemicalbiology
第 66 回日本癌学会学術総会, 横浜
6. 夏目徹 (2007, 10/24)
タンパク質ネットワーク大規模解析から展開するケミカルバイオロジー
第 21 回 COE 講演会, 神戸大学
7. 夏目徹 (2007, 11/1)
タンパク質ネットワーク大規模解析から展開するケミカルバイオロジー
JBIC2007 プロジェクト研究成果報告会, 品川
8. 夏目徹 (2007, 11/28-30)
タンパク質ネットワーク大規模解析から展開するケミカルバイオロジー
第 26 回メディシナルケミストリーシンポジウム, 相模大野
9. 夏目徹 (2008, 3/26-30)
タンパク質ネットワーク解析から展開するケミカルバイオロジー
日本化学会第 88 春季年会, 立教大学

防御システム再生学分野

Division of Regeneration Biology

幹細胞は、多方向に分化する能力とともに再び幹細胞を生み出すという自己複製能力を有している。この自己複製能力によって、造血幹細胞の場合も個体の一生を通じて血液細胞を供給することができる。自己複製機構は、ニッチ(Niche)と呼ばれる幹細胞の“居場所”において、微小環境の細胞あるいは因子との相互作用により制御されると想定されている。成体骨髄においては、幹細胞のニッチとして骨芽細胞(osteoblastic niche)と血管細胞(vascular niche)が存在する。静止期幹細胞はTIE2受容体を発現して骨表面上に接着し、その結合因子であるAngiopoietin-1を産生する骨芽細胞と相互作用をもつと考える。我々は、成体骨髄における造血幹細胞の維持機構を細胞周期制御の観点から解析を進めている。また、幹細胞のニッチを制御する分子機構を詳細に検討することによって、幹細胞の未分化性維持機構や自己複製機構の解明に取り組んできた。

造血幹細胞の自己複製の適切な制御は、造血の恒常性維持ために極めて重要であり、幹細胞は骨髄中のニッチに細胞周期静止期の状態で維持されている。我々はこれまでに、細胞周期制御因子ataxia telangiectasia mutated(ATM)欠損マウスの解析から、活性酸素の制御が造血幹細胞の自己複製能の維持に常用であることを報告してきた。今までに活性酸素がp38 MAPKを活性化することにより、造血幹細胞の自己複製能、細胞周期の静止状態を障害することを明らかにし、活性酸素p38 MAPK経路が造血幹細胞の枯渇を引き起こすことを示してきた。さらに、連続骨髄移植実験では、p38 MAPKの活性化を抑制することにより造血幹細胞の骨髄再構築能が維持されることがわかった。これらの知見から、活性酸素p38 MAPK経路は造血幹細胞の自己複製能に影響を及ぼすことにより、寿命を制御していることが明らかになりつつある。

A. Foxo3aの造血幹細胞における機能

今年度、我々はPTEN/PI3K/Akt経路の下流に存在するフォークヘッド転写因子であるFoxo3aが造血幹細胞の自己複製に必須であることを見出した。Foxo3ノックアウトマウスは造血前駆細胞においては増殖能、分化能、アポトーシスともに正常であったが、ストローマ細胞との長期骨髄共培養の系においてコロニー形成能の低下を示した。さらに、*in vivo*における競合的骨髄再構築能で、ノックアウトマウス由来の造血幹細胞で有意に低下していた。また、ノックアウトマウスの造血幹細胞は活性酸素の上昇に伴う

p38MAPK のリン酸化が認められ、細胞周期を休止期に維持することができず、細胞周期特異的抗がん剤である 5-FU に対する感受性が高かった。また、高齢のノックアウトマウスは、造血幹細胞の頻度が野生型に比して有意に減少していた。

本研究にて、我々は転写因子 Foxo3a が哺乳類の造血幹細胞の休止期維持ならびに自己複製能の維持に重要な役割を果たすこと、さらに老化に伴う造血幹細胞プールの維持に必須であることを結論付けた。個体の老化は、それぞれの組織に存在する組織特異的幹細胞の機能低下の関与が示唆されている。また、酸化ストレスは個体の老化、寿命制御に重要な役割を果たすことが判明してきた。さらに、老化や酸化ストレスが関与する疾患として、癌は発生機序ならびに治療に関し、今後更なる研究の発展が期待できる。

Miyamoto K, Y. Araki K, Naka K, Arai F, Takubo K, Yamazaki S, Matsuoka, Miyamoto T, Ito K, Ohmura M, Chen C, Hosokawa K, Nakauchi H, Nakayama K, Nakayama K, Harada M, Motoyama N, Suda T, Hirao A: Foxo3a is essential for maintenance of the hematopoietic stem cell pool. *Cell Stem Cell*, 1: 101-112, 2007

B. ATM による活性酸素の制御は、リンパ球における DNA の適切な組み換えに必須である

ATM 遺伝子は、ゲノムの安定性の維持において中心的な役割を果たしている。本研究で我々は、抗酸化剤よりの老化、放射線に対する感受性亢進、胸腺リンパ腫の発症といった *Atm*^{-/-}マウスの表現型が抑制されることを示した。*Atm*^{-/-}マウスにみられる Ig クラススイッチの障害が抗酸化剤により抑制されたことから、活性酸素の上昇が異常な programmed DNA double-strand break の引き金となることを示した。さらに驚くべきことに、抗酸化剤の投与により、*Atm*^{-/-}マウスにおいて T 細胞の正常な分化を誘導するとともに、異常な V(D)J recombination を抑制することがわかった。これらの知見から、ATM の機能を介した活性酸素の制御は DNA の正確な組み換えに必須であり、免疫不全やリンパ腫の発症を抑制していることが明らかとなった。

Ito K, Takubo K, Arai F, Satoh H, Matsuoka S, Ohmura M, Naka K, Azuma M, Miyamoto K, Hosokawa K, Ikeda Y, Mak TW, Suda T, Hirao A. Regulation of reactive oxygen species by Atm is essential for proper response to DNA double strand breaks in lymphocytes. *J Immunol*, 178 : 103-110, 2007

C. ATM 欠損精巣における精原細胞異常の同定

造血幹細胞異常の認められる ATM 欠損マウスの幹細胞を含む精原細胞分画に、細胞周

期停止とアポトーシスの亢進を同定した。そのメカニズムは、造血幹細胞異常とは異なり、活性酸素上昇や p16^{Ink4a} の活性化に依存せず、ATM は造血系とは全く異なったメカニズムで精巢未分化細胞分画の維持に貢献していることを明らかにした。

Takubo K, Ohmura M, Azuma M, Nagamatsu G, Yamada Y, Arai F, Hirao A, Suda T: Stem cell defects in ATM-deficient undifferentiated spermatogonia through DNA damage-induced cell cycle arrest. *Cell Stem Cell*, 2:170-182, 2008

D. Fbxw7 mutant マウスにおける急性 T 細胞型白血病の発症

九州大学生医研中山敬一教授らによって作成されたユビキチンリガーゼ Fbxw7 flox マウスと Mx-Cre マウスを交配し、造血幹細胞レベルにおいて Fbxw7 の欠失を図った。pIpC をマウスに投与すると赤血球と血小板の減少がみられ、投与 12 週目頃には、極めて高率に白血病発症を認めた。これらは CD4CD8 陽性の T 細胞型白血病で、他のマウスに移植しても白血病を引き起こした。造血幹細胞レベルにおいて、Fbxw7 の標的タンパクである c-myc, Notch1 の増加を認め、幹細胞は細胞周期を回転していた。これらの幹細胞は、放射線照射したマウスに移植しても造血を再構築することが出来ず、機能不全が認められた。以上より、Fbxw7 の欠損によって Myc が増加し静止期幹細胞が失われ、さらに Notch-1 の増加によって T 細胞型白血病を引き起こす過程を明らかにした。すでに中山教授らは、Lck-Cre マウスとの交配により T 細胞型リンパ腫の発症を認めており、標的細胞による造血器腫瘍の違いが明瞭に示された。これは、九大と慶應の 3 年間にわたる共同研究としておこなわれたものである。

Matsuoka S, Oike Y, Onoyama I, Iwama A, Arai F, Takubo K, Mashimo Y, Oguro H, Nitta E, Ito K, Miyamoto K, Yoshiwara H, Hosokawa K, Nagamatsu G, Nakamura Y, Gomei Y, Iwasaki H, Shima H, Hayashi Y, Matsuzaki Y, Nakayama K, Ikeda Y, Hata A, Chiba S, Nakayama K-i, Suda T: Fbxw7 acts as a critical failsafe against premature loss of hematopoietic stem cells and development of T-ALL. *Genes Dev*, 2008, in press

業績目録

原著論文

1. Ninomiya M, Abe A, Katsumi A, Xu J, Ito M, Arai F, Suda T, Ito M, Kiyoi H, Kinoshita T, Naoe T. Homing, proliferation and survival sites of human leukemia cells in vivo in immunodeficient mice. *Leukemia*, 21:136-42, 2007
2. Ito K, Takubo K, Arai F, Satoh H, Matsuoka S, Ohmura M, Naka K, Azuma M, Miyamoto K, Hosokawa K, Ikeda Y, Mak TW, Suda T, Hirao A: Regulation of reactive oxygen species by Atm is essential for proper response to DNA double-strand breaks in lymphocytes. *J Immunol*, 178: 103-10, 2007
3. Cho CH, Jun Koh Y, Han J, Sung HK, Jong Lee H, Morisada T, Schwendener RA, Brekken RA, Kang G, Oike Y, Choi TS, Suda T, Yoo OJ, Koh GY: Angiogenic role of LYVE-1-positive macrophages in adipose tissue. *Circ Res*, 2; 100: 47-57, 2007
4. Mishima K, Watabe T, Saito A, Yoshimatsu Y, Imaizumi N, Masui S, Hirashima M, Morisada T, Oike Y, Araie M, Niwa H, Kubo H, Suda T, Miyazono K: Prox1 induces lymphatic endothelial differentiation via integrin alpha9 and other signaling cascades. *Mol Biol Cell*, 18: 1421-9, 2007
5. Miyamoto K, Y. Araki K, Naka K, Arai F, Takubo K, Yamazaki S, Matsuoka, Miyamoto T, Ito K, Ohmura M, Chen C, Hosokawa K, Nakauchi H, Nakayama K, Nakayama K, Harada M, Motoyama N, Suda T, Hirao A: Foxo3a is essential for maintenance of the hematopoietic stem cell pool. *Cell Stem Cell*, 1: 101-12, 2007
6. Yagi M, Ninomiya K, Fujita N, Suzuki T, Iwasaki R, Morita K, Hosogane N, Matsuo K, Toyama Y, Suda T, Miyamoto T: Induction of DC-STAMP by alternative activation and downstream signaling mechanisms. *J Bone Miner Res*, 22: 992-1001, 2007
7. Morita K, Miyamoto T, Fujita N, Kubota Y, Ito K, Takubo K, Miyamoto K, Ninomiya K, Suzuki T, Iwasaki R, Yagi M, Takaishi H, Toyama Y, Suda T: Reactive oxygen species induce chondrocyte

hypertrophy in endochondral ossification. *J Exp Med*, 204: 1613-23, 2007

8. Yoshihara H, Arai F, Hosokawa K, Hagiwara T, Takubo K, Nakamura Y, Gomei Y, Iwasaki H, Matsuoka S, Miyazaki H, Takahashi T, Suda T: Thrombopoietin/Mpl signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence and interaction with the osteoblastic niche. *Cell Stem Cell*, 1:685-97, 2007

9. Suzuki T, Miyamoto T, Fujita N, Ninomiya K, Iwasaki R, Toyama Y, Suda T; Osteoblast-specific angiopoietin 1 overexpression increases bone mass. *Biochem Biophys Res Commun*, 362: 1019-25, 2007

10. Hosokawa K, Arai F, Yoshihara H, Nakamura Y, Gomei Y, Iwasaki H, Miyamoto K, Shima H, Ito K, Suda T: Function of oxidative stress in the regulation of hematopoietic stem cell-niche interaction. *Biochem Biophys Res Commun*, 363:578-83, 2007

11. Kubota Y, Takubo K, Suda T: Bone marrow long label-retaining cells reside in the sinusoidal hypoxic niche. *Biochem Biophys Res Commun*, 366:335-339, 2007

12. Takubo K, Ohmura M, Azuma M, Nagamatsu G, Yamada Y, Arai F, Hirao A, Suda T: Stem cell defects in ATM-deficient undifferentiated spermatogonia through DNA damage-induced cell cycle arrest. *Cell Stem Cell*, 2: 170-82, 2008

13. Murakami M, Zheng Y, Hirashima M, Suda T, Morita Y, Ooehara J, Ema H, Fong GH, Shibuya M: VEGFR1 tyrosine kinase signaling promotes lymphangiogenesis as well as angiogenesis indirectly via macrophage recruitment. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 28: 658-64, 2008

14. Matsuoka S, Oike Y, Onoyama I, Iwama A, Arai F, Takubo K, Mashimo Y, Oguro H, Nitta E, Ito K, Miyamoto K, Yoshiwara H, Hosokawa K, Nagamatsu G, Nakamura Y, Gomei Y, Iwasaki H, Shima H, Hayashi Y, Matsuzaki Y, Nakayama K, Ikeda Y, Hata A, Chiba S, Nakayama K-i, Suda T: Fbxw7 acts as a critical failsafe against premature loss of hematopoietic stem cells and development of T-ALL. *Genes Dev*, 2008 Mar 26: [Epub ahead of print]

学会発表

1. Suda T: Niche regulation of quiescent hematopoietic stem cells. The 5th Catholic International Stem Cell Symposium -Cutting Edges & Workshop-, Souel, June 1, 2007
2. Suda T: Quiescent stem cells regulated by niche cells. Kyoto University 21st Century COE Symposium -Integration of Transplantation Therapy and Regenerative Medicine-, Kyoto, June 29-30, 2007
3. 須田年生：「幹細胞とニッチ」第28回日本炎症・再生医学会<教育講演>
平成19年8月2日-3日 東京
4. 須田年生：「静止期造血幹細胞の制御」第28回日本炎症・再生医学会—シンポジウム：幹細胞研究の基礎と応用—平成19年8月2日-3日 東京
5. Suda T: Aging and dysfunction of quiescent hematopoietic stem cells. RUNX Meeting 2007, Singapore, August 20-22, 2007
6. Suda T: Quiescence of hematopoietic stem cells regulation by ROS. 36th Annual Scientific Meeting of International Society for Experimental Hematology, Hamburg, September 28-30, 2007
7. 須田年生：「幹細胞とがん幹細胞」第66回日本癌学会学術総会<特別講演>
平成19年10月3日-5日
8. Suda T: Aging and dysfunction of quiescent hematopoietic stem cells. The 48th Korean Society of Hematology Meeting, Busan, November 2-3, 2007
9. Suda T: Hematopoietic stem cells and the endosteal niche.
2007 Shanghai International Symposium on Stem Cell Research, Shanghai, November 6-9, 2007
10. Suda T: Oxygen, ROS and stem cells. The 1st Pacific Meeting for Angiogenesis and Lymphangiogenesis, Jeju, November 11-13, 2007

11. Suda T: Oxygen, ROS and stem cells. The 1st International Cell Therapy Conference, Soeul, November 15, 2007

12. Suda T: Aging and dysfunction of quiescent hematopoietic stem cells. American Association for Cancer Research, The Role of Cancer Stem Cells in the Initiation and Propagation of Tumorigenesis Los Angeles, February 12-15, 2008

13. Suda T: Hematopoietic stem cells (HSC) and induced pluripotent stem cells (iPS). Hematologic malignancy specialized clinic conference (Yonsei University College of Medicine), Souel, March 20, 2008