

## [010]九州大学生体防御医学研究所年報 : 1995年

<https://hdl.handle.net/2324/2195860>

---

出版情報 : 九州大学生体防御医学研究所年報. 10, pp.1-, 1996. Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University

バージョン :

権利関係 :

## 感染防御学部門

### Department of Molecular Immunology

当部門ではヒト及び動物における免疫応答機構を、分子レベル及び細胞レベルさらには個体レベルで解析することにより、免疫反応の制御機構の分子レベルでの解明、その破綻の結果生じる免疫病の原因の解明と治療法の確立、免疫学的方法による癌の診断と治療法の開発、免疫系と神経系との関わり等について鋭意、研究を進めている。本年も昨年から引き続いて、(1) 遺伝子標的法 (ジーンターゲティング) の応用による免疫細胞の分化に関わる分子、遺伝子の解析、(2) 免疫細胞におけるシグナル伝達に関わる新しい分子の同定とその機能の解明、特に HS1 及び Lyn 遺伝子欠損マウスの作製と解析、(3) B 細胞活性化の終息機構、特に CD40 リガンド刺激後における Fas 抗原の発現と活性化 B 細胞死の機構、(4) 胸腺内 T リンパ球分化、骨髄内 B 前駆細胞分化におけるサイトカインの役割、特に IL7 とインターフェロンによる調節、(5) 自己免疫病の発症に関する分子生物学的解析、とりわけ自己免疫性糖尿病マウス及びヒト HTLV I 関連自己免疫病についての解析、(6) 癌抗原の解析、ヒト子宮癌の癌抗原のモノクローナル抗体による同定、解析、その遺伝子の単離と解析等について研究を進めた。

1995 年度中の主な人事異動は次のとおりである。9 月に北村助教授が東京理科大学生命科学研究所の教授に栄転した。王継揚助手がアラバマ大学バーミンガム校のマックス・クーパー教授のもとでの研究を終了して帰国した。大学院生では、園田顕三君、福田隆浩君が研究を終了して学位取得の後それぞれの臨床教室にもどった。谷内一郎君は学位取得のうえ平成 8 年 4 月より当部門助手となる予定である。井上勲君は平成 8 年より臨床教室にもどる。松尾州裕君は一身上の都合で退学した。本年度の大学院生は蘇東明君、鈴木康弘君、竹下弘道君、加藤純君、勝田 仁君、呉暁牧君、ヤスミン・バヌーさんの他に新たに、土井俊郎君、豊田雅樹君、渡辺裕美さん、増田啓次君 (歯学部大学院) が加わってくれた。また研究生として赤司朋之君、小林隆志君が研究を行っている。徳島大学医学部大学院より特別研究生として参加してくれていた前川洋一君は徳島大学に戻った。神経内科助手の原英夫君が引き続き当部門で研究を行ってくれている。遠城寺宗近君 (第三内科)、岡部泰二郎君 (第三内科) も研究を続けてくれている。

8 月から秋田大学医学部眼科教室より小泉敏樹君が国内留学研究員として研究に加わってくれている。

#### A. B 細胞の分化と選択に関与するシグナル伝達機構の解析

##### 1. ジーンターゲティング法を用いた Lyn 欠損マウスの作製とその解析

T 細胞表面抗原受容体 (TCR) あるいは B 細胞表面抗原受容体 (BCR) からのシグナル

はそれぞれのリンパ球の分化、活性化、増殖あるいはアポトーシスを誘導に重要な役割を演じていると考えられている。しかし、そのシグナル伝達のメカニズムはまだ充分にはわかっていない。抗原受容体の刺激直後に、受容体と会合する Lyn, Fyn, Blk, Lck 等の Src 型のチロシンキナーゼ及び Syk/ZAP70チロシンキナーゼが活性化され、さらに多くの細胞内蛋白がチロシンリン酸化されることが見出され、これらがリンパ球の抗原刺激後の反応を誘導するシグナルにおいて中心的な役割を担っていると考えられている。我々は、Lyn チロシンキナーゼ欠損マウスを遺伝子標的的を用いて確立し、src 型チロシンキナーゼの免疫反応における役割を明らかにしようと考えた。

Lyn は p56, p53 と二つのイソフォームを持つが、B 細胞では p56, p53 共に発現しており、B 細胞株を用いた系で、sIgM を抗体で架橋すると、Lyn は速やかに活性化され sIgM 複合体に会合する事が示されている。また、Lyn は BCR の補助受容体となる CD19 とも会合していると言われている。アンチセンス-オリゴヌクレオチドを用いた実験では、Lyn は BCR を介した増殖抑制に関与する事が示され、また Lyn を欠損するニワトリの B 細胞株では、BCR 刺激によって誘導されるチロシンリン酸化や Ca-influx に障害が見られ、BCR からのシグナル伝達に Lyn が機能的に関与していることが示されていた。我々が作製した Lyn 欠損マウスでは、末梢リンパ組織における B 細胞の減少が観察され、Lyn 欠損マウスの B 細胞は BCR 刺激による増殖反応が低下し、LPS に対する増殖反応も低下していた。また、我々の結果では、可溶性 CD40L に対する増殖反応も低下が見られた。これらの結果は、Lyn を介したシグナルが増殖反応に重要である事を示すものである。Lyn 欠損マウスの B 細胞で架橋による細胞内タンパクのチロシンリン酸化は一見正常であるが、HS1, Vav, PLC-g2 等のチロシンリン酸化は全く認められず、B 細胞では Lyn がこれらの分子のチロシンリン酸化反応に必須である事が示された。一方、肥満細胞では高親和性 FcεR の架橋による細胞内タンパクのチロシンリン酸化反応は Lyn 欠損のリンパ球のそれよりもより強く障害されており(谷内ら、未発表データ)、B 細胞との相違に興味を持たれる。Lyn 欠損マウスでは、末梢リンパ組織における B 細胞の減少に反して、各種クラスの血清 Ig (特に IgM) は高値を示し、週令を経るにつれ、脾臓及びリンパ節の腫大が認められた。組織学的検索により、Lyn 欠損マウスの脾臓では形質細胞様のリンパ芽球化細胞の増殖が認められ、これが血清 Ig 高値、脾腫大の原因と考えられた。重要な事は、Lyn 欠損マウスでは自己抗体である抗 DNA 抗体の産生が観察され、自己免疫病変である糸球体腎炎も認められたことである。この様に、Lyn 欠損マウスでは、B 細胞が正常に分化、増殖せず、しかしながら何らかの原因により形質細胞様のリンパ芽球化細胞が大量に蓄積することが、自己免疫病変を呈する原因の一つと考えられ、この原因追及が最重要課題といえる。Lyn 欠損マウスの脾細胞は *in vitro* において、大量の Ig を非刺激状態でも分泌し、しかも細胞死が生じにくいことが示されており、Lyn を介したシグナルが B 細胞の細胞死あるいは抗体産生細胞への分化に深く関わっていることが示唆される。また、Lyn 欠損マウスで見られる糸球体腎炎は、

ヒトの自己免疫病であるSLEで見られる糸球体腎炎と組織学上類似していることから、SLEの原因の一つとしてLynの異常が関与するののかといった問題も重要な課題である。血清IgMの高値と形質細胞の増加は、モスイートン(me/me)マウスにも見られる現象でもある。me/meマウスは、チロシンホスファターゼの一つである1Cの異常がその原因であるが、PTP1Cからのシグナルの強弱も制御すると考えられており、Lyn 1Cとの関わりにも興味を持たれる。転写因子の一つであるEts-1はT細胞において、TCR刺激などにより活性が制御されると考えられているが、Ets-1欠損マウスに見られる血清IgMの高値、形質細胞の増加とLPSや抗CD40抗体に対する反応の低下も、Lyn欠損マウスと類似するものであり、Lynを介したシグナルの下流にEts-1が位置するののかという事も興味を持たれる。

## 2. HS1欠損マウスを用いた解析

我々の単離した血球系細胞特異的に発現する遺伝子HS1の産物はSrc型チロシンキナーゼのSH2ドメインと会合し、抗原受容体刺激直後にチロシンリン酸化される。HS1蛋白は細胞質のみならず核にも存在し、刺激後リン酸化されたHS1蛋白は核に増加してくる。さらにHS1蛋白はN末端側にDNA結合ドメイン様構造を、C末端側に多くのシグナル伝達分子が持つSH3ドメイン及び酸性 $\alpha$ ヘリックスを有することにより、細胞内シグナル伝達及び転写調節に関与することが示唆される。

ジーンターゲットングによりHS1欠損マウスを作製して調べたところ、抗IgM抗体腹腔内投与により表面IgMを架橋すると正常腹腔内B細胞はアポトーシスにより死滅するが、HS1欠損マウスの腹腔内B細胞はこれに対し抵抗性であった。さらに、このマウスとの交配によりHS1陰性となった雄抗原(H-Y)特異的T細胞受容体トランスジェニックマウスの雄では、胸腺における陰性選択、すなわち自己(H-Y)反応性胸腺T細胞の除去が不完全であった。以上よりHS1は、B及びT細胞のアポトーシスを誘導する抗原受容体からのシグナル伝達に、ひいては自己免疫を抑制する免疫系トレランス機構に深く関与すると考えられた。

我々は現在、HS1欠損マウスをさらに解析し、また、HS1蛋白に結合する細胞内蛋白やDNA塩基配列を同定することによってHS1蛋白の機能や作用機序を探求している。さらに現在、HS1欠損マウスとLynキナーゼ遺伝子ノックアウトマウスを掛け合わせを行なっている。

## 3. HS1に会合する細胞内タンパクの単離

Yeast two hybrid法を用いてHS1分子に会合する分子のクローニングを行った。ヒトB細胞cDNAライブラリーより一つのクローンが単離された。得られたタンパク分子をHAX-1となすけた。HAX-1は35Kdaの分子量を有し、細胞内のミトコンドリア膜、核膜、粗面小胞体膜などに存在する。HS1とHAX-1は非刺激状態のB細胞内で既に会合しており、HS1のリン酸化はその会合に必要としない。HAX-1タンパクの機能についてはまだ不明であるが、

HAX-1はBcl-2タンパクファミリーに見いだされているBHモチーフを持つことから、細胞死の制御に関係した分子である可能性が示唆された。

#### 4. c-myc 遺伝子のB細胞特異的ノックアウトマウスの作製

c-mycタンパクはB細胞の分化、活性化、細胞増殖にも重要な機能を有していると考えられている。しかし、c-myc遺伝子ノックアウトマウスは致死であることが知られている。そこで、我々は大腸菌の組換え酵素Creとその標的DNA配列lox-Pを用いて分化段階特異あるいはB細胞特異的なc-myc遺伝子ノックアウトマウスの確立を試みている。すなわち、c-mycエクソンをlox-Pで囲んだ形のジーンターゲティングベクターを構築し、ES細胞を用いてジーンターゲティングを行い、このES細胞変異ゲノム由来のマウスを作製した。現在、c-myc-lox-Pが正しくターゲットされたES細胞が得られており、さらに得られたES細胞にCreを導入して正しくc-myc遺伝子の欠損が生じる事を確認している。一方、免疫グロブリン遺伝子エンハンサーを用いてB細胞特異的に発現するCre遺伝子のトランスジェニックマウスを作製し、先の変異マウスと交配することを目指している。このマウスでは成熟B細胞のみでc-myc遺伝子の組換え除去がoccurり、その他の組織のc-myc遺伝子は正常に機能することが期待される。また同時に、Cre遺伝子にインターフェロンによって誘導されるMxプロモーターを結合したMx-Creトランスジェニックマウスを作製を試みている。この系を用いれば、外からインターフェロンを投与した時点から以後に各組織でc-myc遺伝子の欠損が生ずることが期待される。

#### 5. その他の遺伝子欠損マウスの作製と解析

B P-1抗原はB細胞分化のマーカーとして重要である。B P-1はB細胞分化初期にB前駆細胞上に発現される。B P-1抗原は成熟B細胞ではその発現が見られなくなることから、B前駆細胞において何らかのシグナルを受ける受容体の可能性が考えられていた。そこで我々はジーンターゲティング法により、B P-1欠損マウスを作製した。B P-1欠損マウスはしかしながら、全く正常の発育を示し、免疫系の分化発生にも何ら異常は見られなかった。また、種々の抗原に対する免疫反応にも異常は見られなかった。従って、B P-1抗原はB細胞初期に細胞表面に特異的に発現する分子ではあるが、B細胞分化にたいして直接的な機能を有する分子ではないと結論づけられた。CD26分子は胸腺内でのT細胞初期分化の重要なマーカーとなるアミノペプチダーゼ活性を有する細胞表面抗原である。CD26分子はまたHIVウイルスのT細胞への感染に何らかの機能を有することが報告されている。我々が作製したCD26欠損マウスでは胸腺およびT細胞の分化発育は全く正常であった。しかし、コンカナヴァリンなどのマイトゲンに対する反応性の亢進、老齢マウスにおける胸腺細胞の増加などが見られており、胸腺細胞の増殖制御に関与していることが考えられた。さらに解析を行う必要があると考えている。

## B. リンパ球の初期分化における増殖とアポトーシスの制御機構

初期B細胞に作用する増殖因子として、これまでにIL-7, SCF, IGF-1, PBSF, PBEF, BST-1等の正の因子が同定された。このうち、IL-7が単独で初期B細胞増殖を強く促進することが示された。しかし、初期B細胞に直接に作用し、その増殖を抑制する因子に関する研究はきわめて少ない。

我々は、タイプIインターフェロン ( $IFN\alpha$  又は  $\beta$ ) が、IL-7によって誘導される正常骨髄由来の初期B細胞又は、IL-7依存性細胞株の増殖を抑制し、さらにアポトーシスを引き起こすことを見出した。この抑制は極めてIL-7に特異的なもので、IL-2, IL-3及びIL-4によって誘導される細胞増殖はIFNによって全く阻害されない。また正常マウス由来の骨髄マクロファージが機能的なIFN  $\beta$  を発現していることを示したことで、IFNによる初期B細胞増殖の抑制は生理的な条件下で起こっていると考えられる。このことから骨髄における初期B細胞の増殖はIL-7, SCFなどの正の因子と、IFN  $\alpha$   $\beta$ のような負の因子によって巧妙に制御されていると考えられる。

また、初期B細胞の場合と同様に、IL-7が誘導する胸腺内初期T細胞の増殖もIFNによって抑制されることを見出した。興味深いことに、免疫グロブリンH鎖 (IgH) またはT細胞受容体b鎖 (TCRb) 遺伝子の再構成を終えていないPro-BまたはPro-T細胞はIFNに高い感受性を示すのに対し、機能的なIgH鎖またはTCR  $\beta$  鎖を発現しているPre-BまたはPre-T細胞はIFNに耐性になる。このことは、IgH鎖またはTCR  $\beta$  鎖の再構成に失敗した初期Bまたは初期T細胞を除去するために、IFN  $\alpha$   $\beta$  によって誘導されるアポトーシスが何らかの役割を果たしていると考えられる。機能的な抗原受容体の発現が、どのような分子機構によって、IFNに対する感受性の低下につながるのか研究を進めている。その作用機序を解明することは、リンパ球の分化、増殖、及びその癌化とアポトーシスによる癌細胞の除去のメカニズムを理解する上で重要な手がかりになる。また、プレB細胞性白血病をはじめ白血病化B細胞腫瘍の治療にも有用な知見を提供する。

## C. B細胞の活性化とアポトーシスの制御機構

我々は、CD40リガンド刺激によりB細胞にFas抗原が高率に誘導されることを見出し、CD40からのシグナルがB細胞の活性化と共に、活性化の終息にも関与していることを示している。さらに、Fas抗原の発現は誘導されてもB細胞に与える刺激の種類、並びに期間によってFasによるアポトーシスの感受性が変化することを示した。この感受性の変化は、アポトーシスを阻害するbcl-XL遺伝子の発現によって影響されている可能性があることを示した。Src familyチロシンキナーゼの一つであるLynがCD40架橋によって活性化されるが、ジーンターゲットングによって作製したLyn<sup>-/-</sup>マウスのB細胞は、CD40からのシグナルによるFas抗原の誘導が著しく低下し、Fasによるアポトーシスも起こりにくくなっていることを見出した。その結果、活性化抗体産生B細胞が蓄積し、抗DNA抗体を含む多量な抗体が産生され、免疫複合体の沈

着による腎炎が生じていることが示された。また、マウス腹腔内のB細胞の Subpopulation である B-1細胞において、通常のB細胞 (B-2) に比べて、CD40による Fas の発現誘導及び Fas によるアポトーシスは明らかに低下していることを見出し、B-1細胞による自己抗体産生及び自己免疫疾患との関連を現在調べている。この様に我々は、CD40からのシグナルによって起こる興味深い現象をいくつも見出したが、これらの現象を司る分子機構の解析を現在進めている。

#### D. ヒスタミンH1受容体遺伝子欠損マウスの確立と解析

ヒスタミンは最も古くから知られている活性アミンであり、末梢ではアレルギー反応をはじめとする生体防御反応に関与している。また、脳内にも大量のヒスタミン神経線維が存在することが知られており、脳内アミンとして日内リズム、睡眠、食欲などの制御に関与していると考えられている。ヒスタミン受容体には、H1, H2, H3の3種類が知られているが、特に上記の反応に深く関与するのはH1受容体と考えられている。我々はマウスのヒスタミン H1受容体ゲノム遺伝子を単離し、これをもとに遺伝子標的用のターゲティングベクターを作成し、ES細胞に導入し、相同組換えにより H1 受容体遺伝子のみが neo 遺伝子に置き換わった変異ES細胞を単離し、これをもとにヒスタミン H1受容体遺伝子欠損マウスを作製した。

ヒスタミン H1受容体遺伝子欠損マウスは正常の発育状態を示した。生殖能力も正常であった。即時型アレルギー反応について、抗原(卵白アルブミン)をアラム、百日咳菌をアジュバントとして用いて免疫し、抗原を全身性に、または局所に投与してしらべた。その結果、即時型アレルギー反応はやや減弱したが、消失はしなかった。この事は組織学的にも確かめられた。一方、ヒスタミン H1受容体遺伝子欠損マウスでは、行動の異常が観察された。ヒスタミン H1受容体遺伝子欠損マウスは新しい環境下での行動量の低下が観察されており、また、日内リズムの乱れが観察されている。現在、さらに解析を行っている。

末梢におけるヒスタミン H1受容体の正確な局在、受容体数などについては未だに不明な点が多い。これは、末梢にはヒスタミン H1受容体以外にヒスタミンを非特異的に結合する物質があるためと考えられている。また、動物種間の相同性が高いため良好な抗体が得られていない。そこで、ヒスタミンH1受容体遺伝子欠損マウスをヒトおよびマウスのヒスタミン H1受容体で免疫することにより、特異性の高い抗ヒスタミン H1受容体抗体の作製を行い、末梢における正確なヒスタミン H1受容体の局在と機能を明らかにするために、モノクローナル抗体の作製を行っている。

#### E. 癌の効果的な免疫学的治療法の開発

##### 1. 新しい癌関連抗原 (22-1-1抗原) 遺伝子のクローニングとその機能の解析

癌の免疫学的診断、経過観察、治療等において、癌抗原あるいは癌関連抗原を特異的に認識するモノクローナル抗体は、有用な役割を担うことが期待される。我々は、ヒト子宮頸癌細胞株

SiSo を樹立した事を以前に報告した。ヒト子宮頸部腺癌細胞株 (SiSo) を免疫原として用い、IgM 型マウスモノクローナル抗体 (22-1-1) を作製した。この抗体の認識抗原 (22-1-1 抗原) は主として細胞質内に分布し一部細胞表面に存在しており、細胞外にも分泌されている。この抗原は免疫沈降法により、78KD の分子量を有している。免疫組織染色法にて 22-1-1 抗原は子宮頸部腺癌以外にも子宮頸部扁平上皮癌、卵巣癌、胃癌、大腸癌等にも高率 (70-80% 陽性率) に発現しており、正常組織では腺上皮細胞のみが僅かに染色されるのみであった。このように 22-1-1 抗原は広く癌組織に発現している。さらにこの抗原は子宮頸部の腫瘍において組織の悪性度及び癌の浸潤度に相関した発現を示すことが示唆された。

これらの結果から、22-1-1 抗体はヒトの癌細胞の同定に非常に有用な新しいモノクローナル抗体である事が示された。

一方、22-1-1 抗原の構造と機能にも興味を持たれた。SiSo 細胞由来の cDNA を発現ベクター (pME18sf) に組み込み、cDNA-ライブラリーを作製した。作製された cDNA-ライブラリーを 293T 細胞に transfection した後、22-1-1 抗原と抗マウス IgM 抗体を用いたパンニング法にて 22-1-1 抗原陽性細胞を選択した。ハート法にて選択された細胞よりプラスミドを回収し、大量培養後、その DNA を再び 293T 細胞に transfection した。この操作を繰り返すことにより、22-1-1 抗原をコードする遺伝子を濃縮しクローニングすることに成功した。クローニングされた遺伝子は全長約 1.2kb で現在、遺伝子配列、タンパクの解析及びその組織発現様式について研究を続けている。

## 2. 癌抗原ペプチドの同定・解析

癌細胞特異的 CTL 細胞が認識している抗原を解明することは、癌のワクチン療法の開発において重要なことである。

生体の癌細胞排除機構において、様々な免疫細胞群が相互に作用し合っていることが予測されている。我々は、特に腫瘍浸潤性の T 細胞群に注目し、癌細胞排除機構におけるこれら T 細胞群の相互作用を解析し、より効果的な癌免疫学的治療法を開発しようとしている。すでに我々は、癌組織に浸潤している T 細胞を *in vitro* で効率よく増殖させる培養系を開発し、ヒト・メラノーマ転移性リンパ節より自己癌細胞特異的細胞傷害性 T 細胞 (CTL) クローン (CD3+, CD4-, CD8+, CD11b-, CD56-, TcR  $\alpha/\beta$ ) を数多く樹立しており、長期培養にてもその細胞傷害特異性及び効率に変化がないことを確認している。さらに、これらの自己癌細胞特異的細胞傷害性 T 細胞のマウス移植自家癌に対する生体内における癌排除効果を検定した。これら CTL は外来性の IL-2 に依存して癌細胞を効率よく排除することが確認された。以上のことは IL-2 産生性の癌細胞特異的 T ヘルパー細胞 (Th) を同時に投与することで、癌局所での CTL による癌細胞排除をより効果的にしてくれるものと予想された。

我々はヒト子宮頸癌細胞株を樹立し、それに特異的に反応する CTL を確立した。CTL が抗



原を認識するときTcRがHLA-class Iとそれに結合している抗原ペプチドを認識することを利用して、標的細胞である自家癌細胞株よりHLA-class I複合体に結合している抗原ペプチドを分離し、HPLCにて分画した後、すでに樹立している自家腫瘍特異的CTL細胞株を用いた実験系を利用して、これらCTL株の認識する抗原ペプチドの分離・精製を試みている。

#### F. 脈絡叢細胞由来の未知の神経栄養因子の遺伝子クローニング

脈絡叢は、脳室の表面に存在し、髄液の産生に重要な働きをしている。その働きとしては、肝細胞と類似した作用を示し、神経細胞の生存、機能維持に重要な役割を果たしている。しかし、これまで、脈絡叢細胞の機能解析はあまり行われていない。その理由として、細胞株が樹立されていなかったことが挙げられる。我々は、免疫グロブリンエンハンサーにSV40T抗原を組み合わせた遺伝子を用いたトランスジェニックマウスを作製したところ、B細胞系のリンパ腫の他に脈絡叢細胞の腫瘍が高頻度で発生した。このマウスより脳脈絡叢細胞株を樹立した。脈絡叢細胞株の樹立は世界で初めてである。この脈絡叢細胞株の培養上清を用いて神経芽細胞株を培養したところ、神経栄養因子作用が認められた。そこで脈絡叢細胞株よりcDNAライブラリーを作成し、PC12細胞を用いてコロニー形成作用および神経突起形成作用のある未知の神経栄養因子の遺伝子クローニングを行なっている。

#### G. ニューロンの変性に関与する未知の遺伝子の単離と機能解析

我々は脳神経細胞の変性疾患の原因となる分子に興味をもち、ヒトの脳より神経変性に関わる遺伝子のクローニングを行った。線虫*C. elegance*において、遅発性にニューロンの変性を変性を起こす遺伝子 *degenerins family* (*deg-1*および *mec-4*) が、*Drosophila*において網膜に光が当たると網膜神経細胞の変性が起こる変異体からその原因遺伝子 (*retinal degeneration B protein, rdg B*) が単離されている。*Drosophila* 網膜では *rdg B* 遺伝子の一部が欠損しているため光による網膜神経細胞の変性が起こることが判明している。*rdg B* 蛋白は、網膜神経細胞のみならず、脳神経細胞にも発現していることが報告されている。我々は、ヒトの脳より、*deg-1*, *mec-4*, *rdgB* 遺伝子等に相当するヒト脳神経細胞変性をきたす遺伝子のクローニングを行っている。

ヒト脊髄組織および脳組織よりRNAを精製し、random primerを用いてcDNAを作成した。次に*C. elegance*の *degenerin family* 遺伝子である *deg-1*と *mec-4*に共通なシーケンスより *degenerative primer* を作成し、これを用いて、PCRを行った。得られた3種類のPCR産物の1つは、シーケンスの結果、膜貫通領域を示す構造が認められ、受容体型タンパクをコードする遺伝子である事がわかった。得られた遺伝子を *ned-1*と名づけた。アミノ酸のホモロジーの検索では、膜貫通領域を示す領域のみで、*Drosophila* の *retinal degeneration B (rdgB) protein* のC末側膜貫通領域と相同性が認められた。しかし、*ned-1*遺伝子の5'遺伝子領域は、ホモロ

ジー検索でも未知の塩基配列であることが判明した。ヒト脳cDNAライブラリーのスクリーニングおよび5'-RACE cDNA システムを用いてヒト脳組織より全長cDNA (約3 kbp) が得られた。ned 1 の遺伝子配列は、Gene Bankでの解析の結果、未知の遺伝子であることが分かった。アミノ酸のホモロジーの検索で *Drosophila* の retinal degeneration B protein と相同性が認められた事から、ned-1はほ乳類で初めてのニューロンの変性に関与する遺伝子である可能性が示唆された。今後はこの遺伝子産物に対するモノクローナル抗体を作製し、脳組織における分布や機能の解析をおこない、ヒトでの遅発性にニューロンの変性が起こる疾患との関連について検索を続けてゆく予定である。また、ned-1は脳の他に白血球、リンパ球でも強く発現していることから、免疫系、造血系における役割についても今後、検討していく予定である。

### 原著論文 (1995年度)

1. Enjoji, M., Iwaki, T., Nawata, H. and Watanabe, T. 1995.  
IgH intronic enhancer element HE2 (mB) functions as a cis-activator in choroid plexus cells at the cellular level as well as in transgenic mice.  
J. Neurochemistry. 64 : 961-966.
2. Okabe, T., Takayama, R., Imasaki, K., Haji, M., Nawata, H. and Watanabe, T. 1995.  
cDNA cloning of a NGF1-B/nur77 related transcription factor from a apoptotic T cell line.  
J. Immunology. 154 : 3871-3879.
3. Kitamura, D., Kaneko, H., Taniuchi, I., Akagi, K., Yamamura, K. and Watanabe, T. 1995.  
Molecular cloning and characterization of mouse HS 1. Biochemical. Biophysical Research Communications. 208(3) : 1137-1146.
4. Sonoda, K., Nakashima, M., Saito, T., Amada, S., Kamura, T., Nakano, H. and Watanabe, T. 1995.  
Establishment of a new human uterine adenocarcinoma cell line, Siso, and its reactivity to anti-cancer reagents.  
International Journal of Oncology. 6:1009-1104.
5. Kishi, H., Su, D.-M., Muraguchi, A. and Watanabe, T. 1995.  
A novel cell surface antigen, IMT-1, involved in the differentiation of murine thymocytes.  
J. Immunology, 155(2):568-577.
6. Okabe, T., Haji, M., Takayanagi, R., Adachi, M., Imasaki, K., Kurimoto, F., Watanabe, T. and Nawata, H. 1995.  
Up-regulation of high affinity dehydroepiandrosterone binding activity by dehydroepi-

- androsterone in human T lymphocytes.  
*Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.* 80(10) : 2993-2996.
7. Taniuchi,I., Kitamura,D., Maekawa,Y., Kishi,H. and Watanabe,T. 1995.  
Antigen-receptor induced clonal expansion and deletion of lymphocytes are impaired in the mice lacking HS1 protein, a substrate of the antigen-receptor coupled tyrosine kinases.  
*EMBO J.* 14(15) : 3664-3678.
8. Fukuda,T., Kitamura,D., Taniuchi,I., Maekawa,Y., Benhamou,L.E., Sarthou,P. and Watanabe,T. 1995.  
Restoration of surface IgM-mediated apoptosis in an anti-IgM resistant variant of WEHI-231 lymphoma cells by HS1, a protein tyrosine kinase substrate.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92 : 7302-7306.
9. Nishizumi,H., Taniuchi,I., Yamanashi,Y., Kitamura,D., Mori,S., Watanabe,T., Yamamoto,T. 1995.  
Impaired proliferation of peripheral B cells and indication of autoimmune disease in lyn-deficient mice.  
*Immunity.* 3:549-560.
10. Zeng,H., Yoshida,T., Kurosaki,T., Yamamura,H, Oshima,A., Kitamura,D., Watanabe, T., Morikawa,M. 1995.  
Phosphorylation of HS1, GAP-associated p190 and a novel GAP-associated p60 protein by cross-linking of FcγRIIIA.  
*J.Biochem.* 118 : 1166-1174.
11. Egashira,M., Kitamura,D., Watanabe,T. and Niikawa,N. 1996.  
The human HS1 (HCLS1) gene maps to chromosome 3q13 by fluorescence in situ hybridization.  
*Cytogenetics and Cell Genetics.* 72 : 175-176.
12. Wang,J., Taniuchi,I., Maekawa,Y., Howard,M., Cooper,M.D. and Watanabe,T. 1996.  
Expression and function of Fas antigen on activated murine B cells.  
*Eur. J. Immunol.* 26 : 92-96.
13. Sonoda,K., Nakashima,M. and Watanabe,T. 1996.  
A novel tumor-associated antigen expressed on human uterine and ovarian carcinomas.  
*Cancer.* 77(8) : 1501-1509.
14. Kawabuchi,M., Nakamura,K., Hirata,K., Mori,K., Nakashima,M., Kishi,H., Islam,S., Chongjan,Z. and Watanabe,T. 1996.

Morphological study of thymus stromal cells(Tel-2) which play a role in the elimination of double positive immature thymocytes by phagocytosis.

The Anatomical Record. 244 : 271-283.

15. Wang,J., Walker,H., Lin,Q., Jenkins, N., Copeland,N.G., Watanabe,T., Burrows,P.D., Cooper,M.D. 1996.

BP-1 gene : structure, chromosomal localization and regulation of expression by type I interferons and interleukin-7.

Genomics (in press).

16. Inoue,I., Taniuchi,I., Kitamura,D., Jenkins,N.A., Gilbert,D.J., Copeland,N.G. and Watanabe,T. 1996.

Characterization of the mouse genomic histamine H1 receptor gene.

Genomics (in press).