

[0020]九州大学生体防御医学研究所年報 : 2005年

<https://doi.org/10.15017/6244>

出版情報 : 九州大学生体防御医学研究所年報. 20, 2006-07. 九州大学生体防御医学研究所
バージョン :
権利関係 :

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. 生体防御機構を食細胞による自然免疫, γ δ 型 T 細胞などの原始的リンパ球による早期誘導免疫, さらにリンパ球による適応免疫に分類し, 以下のテーマで研究をすすめている.

- (1) 自然免疫: 好中球, マクロファージ, Toll-like receptor (TLR) と感染防御
- (2) 早期誘導免疫: γ δ 型 T 細胞, NKT 細胞, 粘膜系 T 細胞と感染防御
- (3) 適応免疫: 感染後のメモリー CD8T 細胞の産生, 維持の分子機構

人事面では平成17年(2005)9月1日より矢島俊樹助手が群馬大学医学研究科病態総合外科へ転任した. 同9月1日山田久方助教授が医学研究院整形外科助手より配置転換となった. 同10月1日デジタルメディスン中川竜介助手が共同研究者として参加した. 平成17年4月1日から, 柴田健輔, 唐策, 孫遜, 石川天洋, 逸見百江が大学院医学系学府博士課程に入学した. 平成18年3月31日増田徳子が医科学修士号を, 李偉と吉原一文(心療内科)が短期修了で医学博士号を取得した.

A. 自然免疫

- ① IL-15 の産生機構について alternative splicing で産生される非分泌型の IL-15 によるフィードバック機構を明らかにした (*FASEB J.* 19:19-28, 2005). alternative splicing の新しい生物学的意義を示した.
- ② 閉塞性黄疸モデルの胆管結紮マウスでの肝障害および内因性感染に TLR が関与していることを各種の TLR ノックアウトマウスを用いて明らかとした (*Gut* 55:105-113, 2006). 閉塞性黄疸での易感染の機序解明に道を開いた.
- ③ IL-15 によって IL-12 レセプター β 1 遺伝子の発現機構を明らかにした (*Blood* 105:711-20, 2005). IL-15 が Th1 細胞を誘導する分子機序を提供した.
- ④ 酢酸菌由来の β 1-4 グルカンが TLR4 を介して IL-12 産生を誘導し, 経口投与によってメラノーマに対する抗腫瘍防御効果を示した. 強い感染防御機構を活性化するグルカンが癌に対しても効果があることを実験的に証明された. また納豆成分のレバン, 初乳およびオリゴ糖(イソオリゴマルトース)が腸管免疫を介して細胞免疫(TH1)を増強することを見いだした (*Int. J. Cancer* 115:769-76, 2005, *Int. Immunopharm.* 5:581-90, 2005, *J.Nutr.* 135: 2857-2861, 2005). 機能性食品として商品開発につながると期待される.

B. 早期誘導免疫

TLRからのシグナル伝達で重要な役割を担うアダプター分子 MyD88 ノックアウト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. さらにこのマウスでは腸管上皮での IL-15 の発現が現弱していた. そこで IL-15 トランスジェニックマウス x MyD88 ノックアウトマウスを作製したところ, 腸管上皮間 γ δ 型 T リンパ球が回復した. 上皮系に IL15 トランスジーンを導入して骨髄キメラで同様に腸管上皮間 γ δ 型 T リンパ球が回復したことから粘膜系 T 細胞のホメオスターシスに腸管上皮から産生される IL-15 が関与していると考えられた (*J.Immunol.* 176:6180-5, 2006).

C. 適応免疫：メモリーT細胞の産生，維持の分子機構

病原菌排除後, 活性化T細胞の多くは活性化誘導細胞死(AICD)に陥りその一部がメモリー細胞として生存維持される. 我々は, IL-15 がメモリーCD8T細胞の維持において重要な役割を担っていることを報告しているが, AICDにおけるその役割については不明である. 本研究ではエフェクターCD8T細胞のAICDにおけるIL-15 の役割について検討した. OT-Iマウス(OVA₂₅₇₋₂₆₄ 特異的TCR Tgマウス)から OT-I細胞を単離しコントロールマウス, IL-15 トランスジェニック(Tg)マウスまたはIL-15 ノックアウト(KO)マウスに移入後, OVA産生 *Listeria monocytogenes* を感染させ OT-I細胞の動態をフローサイトメーターにて解析した. 感染 7 日目のエフェクターOT-I細胞の細胞数は三群間で顕著な差を認めないが AICDが起る 10 日目ではコントロールマウスと比べIL-15 Tgマウスで多くIL-15 KOマウスで著明に低下していた. 10 日目のOT-I細胞をエフェクター細胞(CD127-CD62L-), エフェクターメモリー細胞(CD127+CD62L-), セントラルメモリー細胞(CD127+CD62L+)に分けて検討するとIL-15 Tgマウスではエフェクター細胞の分画が増加しIL-15 KOマウスではその分画が完全に消失していた. 感染 7 から 10 日目にかけコントロールマウスでエフェクターOT-I細胞のBcl-2 発現上昇を認めるがIL-15 KOマウスでは認めずIL-15 Tgマウスではより上昇していた. 感染7-10 日目にIL-15 KOマウスにIL-15を連日投与するとエフェクターOT-I細胞はBcl-2 の発現上昇に伴い生存することができた. Bcl-2を強制発現させたOT-I細胞はIL-15KOマウスでもAICDを逃れ生存することができた. IL-15 によるBcl-2 発現上昇は, エフェクターCD8T細胞の生存に必須であることが明らかとなった (*J.Immunol.* 174:3590-3597, 2005, *J.Immunol.* 175:4627-34, 2005, *J.Immunol.* 176:507-15, 2006, *J.Immunol.* 176: 2496-2504, 2006).

業績目録

原著論文

1. Musikacharoen T, Oguma A, Yoshikai Y, Chiba N, Masuda A, Matsuguchi T. 2005
Interleukin-15 induces IL-12 receptor β 1 gene expression through PU.1 and IRF 3 by targeting chromatin remodeling
Blood. 105:711-20.
2. Nishimura H, Fujimoto A., Naoyuki T., Yajima T., Wajiwalku W, and Yoshikai Y. 2005
A novel autoregulatory mechanism for transcriptional activation of IL-15 gene by non-secretable Isoform of IL-15

generated by alternative splicing.

FASEB J. 19:19-28.

3. Yajima T., Nishimura H., Sad S., Shen H., Kuwano H. and Yoshikai Y. 2005
Critical role of IL-15 in early activation of memory CD8⁺ CTL after re-infection.
J. Immunol. 174:3590-7.
4. Yoshioka Y., Kudo S., Saito K., Nishimura H., Yajima T., Kishihara K., Kuroiwa S., Suzuki Y., Suzuki T., and Yoshikai Y. 2005
Oral administration of bovine colostrum stimulates intestinal intraepithelial lymphocytes to polarize Th1-type in mice.
Int. Immunopharm. 5:581-90.
5. Kamiryo Y., Yajima T., Saito K., Nishimura H., Fushimi T., Ohshima Y., Tsukamoto Y., Naito S. and Yoshikai Y. 2005
Soluble branched β -(1,4)glucans from *Acetobacter* species enhance anti-tumor activities against MHC class I-negative and -positive malignant melanoma through augmented NK activity and cytotoxic T cell response.
Int. J. Cancer 115:769-76.
6. Mizubuchi H., Yajima T., Aoi N., Tomita T., and Yoshikai Y. 2005
Isomaltoligosaccharides polarize Th1-like response in intestinal and systemic immunity in mice.
J. Nutr. 135: 2857-2861.
7. Harano M., Eto M., Iwai T., Tatsugami K., Kiyoshima K., Tsuneyoshi M., Yoshikai Y., and Naito S. 2005
A novel model system for renal cancer treatment with low levels of mixed chimerism by nonmyeloidablative allogeneic hematopoietic cell transplantation in combination with cyclophosphamide in mice.
Cancer Res. 65:10032-10040
8. Eto M., Koga H., Noma H., Yamaguchi A., Yoshikai Y. and Naito S. 2005
Importance of urinary interleukin-18 in intravesical immunotherapy with bacillus calmette-guerin for superficial bladder tumors.
Urol Int. 75:114-118
9. Nishimura H., Yajima T., Muta H., Podack E.R., Tani K., and Yoshikai Y. 2005
A novel role of CD30/CD30L signaling in the generation of long-lived memory CD8⁺T cells.
J. Immunol. 175:4627-4634
10. Yajima T., Yoshihara K., Nakazato K., Kumabe S., Koyasu S., Sad S., Shen H., Kuwano H., and Yoshikai Y. 2006
IL-15 regulates CD8⁺ T cell contraction during primary infection
J. Immunol. 176:507-15
11. Xu Q., Yajima T., Li W., Saito K., Fushimi T., Ohshima Y., Tsukamoto Y., and Yoshikai Y. 2006
Levan (b-2, 6-fructan), a major fraction of fermented soybean mucilage, displays immunostimulating properties via Toll-like receptor 4 signaling: Induction of IL-12 production and suppression of Th2 response with IgE production.
Clin. Exp. Allergy 36:96-101
12. Ogawa A., Tagawa T., Nishimura H., Yajima T., Abe T., Arai T., Taniguchi M., Takeda K., Akira S., Nimura Y., and Yoshikai Y. 2006
Toll-like receptors 2 and 4 are differentially involved in Fas-dependent apoptosis in Peyer's patch and liver at an early stage after bile duct ligation in mice.

- Gut**55:105-13
13. Yoshihara K., Yajima T., Kubo C., and Yoshikai Y. 2006
The role of IL-15 in colitis induced by dextran sulphate sodium in mice.
Gut 55:334-341
 14. Khajooe V., Saito M., Takada H., Nomura A., Kusuhara K., Yoshida S., Yoshikai Y., and Hara T. 2006
Identification of a new role of CXCL7 in the defense against mycobacterial infection through microarray comparison of two types of cytokine-induced macrophages.
Clin. Exp.Immunol. 143:260-8.
 15. Saito K., Yajima T., Kumabe S., Doi T., Sad S., Shen H., and Yoshikai Y. 2006
Impaired protection against Mycobacterium bovis Bacillus Calmette-Guérin Infection in IL-15 deficient mice.
J.Immunol. 176: 2496-2504
 16. Yu Q., Tang C., Xun S., Yajima T., Takeda K. and Yoshikai Y.2006
MyD88-dependent signaling for IL-15 production is important for the development of CD8 $\alpha\alpha$ and TCR $\gamma\delta$ intestinal intraepithelial T lymphocytes.
J.Immunol.176:6180-6185
 17. Dai SY, Nakagawa R, Itoh A, Murakami H, Kashio Y, Abe H, Katoh S, Kontani K, Kihara M, Zhang SL, Hata T, Nakamura T, Yamauchi A, Hirashima M. 2005
Galectin-9 induces maturation of human monocyte-derived dendritic cells.
J. Immunol. 175(5):2974-81.
 18. Inui T, Nakashima H, Habu Y, Nakagawa R, Fukasawa M, Kinoshita M, Shinomiya N, Seki S. 2005
Neutralization of tumor necrosis factor abrogates hepatic failure induced by alpha-galactosylceramide without attenuating its antitumor effect in aged mice.
J. Hepatol. 43(4):670-8.
 19. Holmberg J, Tuncel J, Yamada H, Lu S, Olofsson P, Holmdahl R. Pristane, 2006
a non-antigenic adjuvant, induces MHC class II-restricted, arthritogenic T cells in the rat.
J. Immunol. 76(2):1172-9.
 20. Dzhambazov B, Holmdahl M, Yamada H, Lu S, Vestberg M, Holm B, Johnell O, Kihlberg J, Holmdahl R. 2006
The major T cell epitope on type II collagen is glycosylated in normal cartilage but modified by arthritis in both rats and humans.
Eur J Immunol. 35(2):357-66.
 21. Nagata S., Okano S., Yonemitsu Y., Yoshida K., Nagata H., Nakagawa K., Tomita Y., Yoshikai Y., Shimada M., Maehara Y., and Sueishi K. 2006
The critical roles of memory T cells and anti-donor immunoglobulin in rejection of allogeneic bone marrow cells in sensitized recipient mice.
Transplantation in press
 22. Aoi N., Masuda T., Murakami D., Yajima T., Mizubuchi H., Kawauchi H., and Yoshikai Y. 2006
Interleukin-15 prevents allergic rhinitis through activation of antigen-specific CD8 $^{+}$ T cells.
J.Allergy Clin. Immunol. in press

総説

1. 吉開泰信. 2005
自然免疫と獲得免疫のクロストーク
最新医学 60:10-18
2. 田川哲三, 吉開泰信. 2005
 γ δ 型 T 細胞
日本臨床 (補)4:149-53.
3. 池辺日王理, 吉開泰信. 2005
ナイーブおよびメモリー CD8T 細胞の機能と IL-15
臨床免疫 44:671-675
4. 柴田健輔, 吉開泰信. 2005
大腸菌感染防御と γ δ T 細胞
臨床免疫 41(1):37-42
5. 吉開泰信. 2005
感染防御におけるサイトカインの役割
日本医師会雑誌 134(1):73-75
6. 鍵本香子, 吉開泰信. 2006
HSV に対する免疫応答
日本臨床社 ヘルペスウイルス学, 890:178-183

著書

1. 吉開泰信. 2005
細菌感染と T 細胞応答
解明が進むウイルス・細菌感染と免疫応答 実験医学増刊号 23(17)(笹川千尋, 柳雄介, 審良静男編)
羊土社 東京
2. 吉開泰信. 2006
T 細胞受容体の遺伝子 P.34-35
食細胞の機能測定 P.126-128
感染免疫応答の検出 P.178-182
感染症:新しいワクチンの作成 P.306
免疫実験法ハンドブック(中島泉編)
名古屋大学出版会 名古屋
3. 吉開泰信. 2006
感染に対する免疫 P.111-142
免疫の傷害:免疫不全症 P.143-156

シンプル免疫学(改訂第3版)(中島泉, 高橋利忠, 吉開泰信共著)

南江堂 東京

4. Yoshikai Y., Tagawa T., Shibata K., Yajima T., Hara H., Kishihara K. 2005
V δ 1⁺ γ δ T cells producing CC chemokines may bridge a gap between neutrophils and macrophages in innate immunity during *Escherichia coli* infection in mice. P155-159
The Innate Immune System: Strategies for Disease Control (Masaru Taniguchi, Shizuo Akira, Toshinori Nakayama)
Uehara Memorial Foundation Tokyo

学会発表

1. 吉開泰信. (2005, 6/3-4)
粘膜免疫とその意義
第46回日本臨床ウイルス学会教育講演, 福岡.
2. Yoshikai Y. (2005, 7-28-30)
Protection against *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette-Guerin infection in IL-15 deficient mice.
US-JAPAN COOPERATIVE MEDICAL SCIENCE PROGRAM, Seattle, Washington, USA
3. 村上大輔, 吉開泰信. (2005, 10/20-22)
LPSによる喘息増悪の肥満細胞の関与
第55回日本アレルギー学会秋期学術大会, 花巻.
4. 柴田健輔, 田川哲三, 矢島俊樹, 山田久方, 吉開泰信 (2005, 12/13-15)
大腸菌特異的V δ 1陽性 γ δ 型T細胞抗原認識機構
第35回日本免疫学会総会・学術集会, 横浜.
5. 上領頼之, 山田久方, 矢島俊樹, 江藤正俊, 原野正彦, 立神勝則, 濱口益光, 内藤誠二, 吉開泰信 (2005, 12/13-15)
マウスミニ移植モデルでの膀胱腫瘍に対する移植片対腫瘍効果の検討
第35回日本免疫学会総会・学術集会, 横浜.
6. 李偉, 矢島俊樹, 会津恵司, 山田久方, 中川竜介, 下田和哉, 吉開泰信 (2005, 12/13-15)
Tyk2 signalling is required for contraction of antigen-specific CD8⁺Tcell following a microbial infection.
第35回日本免疫学会総会・学術集会, 横浜.
7. 隈部志野, 矢島俊樹, 松口徹也, 吉開泰信 (2005, 12/13-15)
Th1細胞分化におけるMKP-1 (JNK特異的Dual specificity phosphatase)の役割
第35回日本免疫学会総会・学術集会, 横浜.
8. 土居岳彦, 矢島俊樹, 齋藤紀美香, 原寿郎, 吉開泰信 (2005, 12/13-15)
結核菌由来ペプチド/樹状細胞の全身免疫はマイコバクテリアの結構感染に有効だが、気道感染には無効である。
第35回日本免疫学会総会・学術集会, 横浜.
9. 矢島俊樹, 吉原一文, 中里健二, 隈部志野, 小安重夫, 桑野博行, 吉開泰信 (2005, 12/13-15)
エフェクターCD8⁺T細胞の活性化誘導細胞死はインターロイキン 15により制御されている。

- 第35回日本免疫学会総会・学術集会, 横浜.
10. 増田徳子, 矢島俊樹, 青井典明, 吉開泰信(2005,12/13-15)
IL-15 の点鼻により鼻粘膜アレルギー反応の抑制機構.
第35回日本免疫学会総会・学術集会, 横浜.
 11. 徐慶雲, 矢島俊樹, 李偉, 齋藤紀美香, 吉開泰信(2005,12/13-15)
Levan(β -2, 6-fructan), a major frantion of fermented soybean mucilage, shows activities in induction oh IL-12 production and suppression oh Yh2 response with IgE production.
第35回日本免疫学会総会・学術集会, 横浜.
 12. 齋藤紀美香, 矢島俊樹, 吉開泰信(2005,12/13-15)
BCG を用いた慢性細菌感染症モデルにおける IL-15 依存 CD8T 細胞の感染防御機構
第35回日本免疫学会総会・学術集会, 横浜.
 13. 中里健二, 矢島俊樹, 小安重夫, 桑野博行, 吉開泰信(2005,12/13-15)
インターロイキン 15KO マウスでの Bcl-2 の強制発現による腸管上皮間 γ δ T cell の分化
第35回日本免疫学会総会・学術集会, 横浜.
 14. 吉原一文, 矢島俊樹, 久保千春, 吉開泰信(2005,12/13-15)
コラーゲン誘導性関節炎モデルにおける IL-15 の役割
第35回日本免疫学会総会・学術集会, 横浜.
 15. 村上大輔, 矢島俊樹, 松口徹也, 小宗静男, 吉開泰信(2005,12/13-15)
TH2 細胞分化における MKP-M(JNK 特異的 Dual Specificity phosphatase)の役割
第35回日本免疫学会総会・学術集会, 横浜.
 16. 吉開泰信(2006,2/8-10)
細菌感染で誘導されるメモリーCD8 細胞の産生/維持機構とその役割
科学研究費補助金「特定領域研究-感染の成立と宿主応答の分子基盤-」
平成17年度第2回全体班会議, 東京.
 17. 吉開泰信(2006,3/18-19)
自然免疫と獲得免疫のストローク
第5回アレルギー・臨床免疫医を目指す人達のための研修会, 福岡.

ワクチン開発構造生物学分野

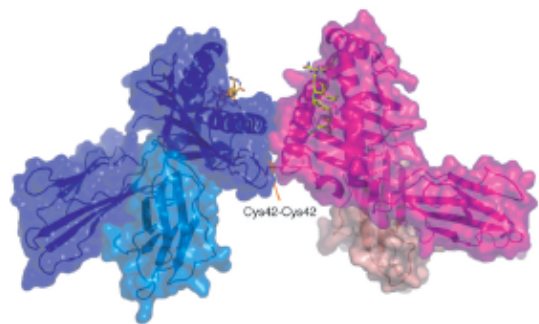
Division of Structural Biology

タンパク質の立体構造を決定することで、タンパク質の構造と機能の関連を明らかにしていくことを目的とする。細胞表面および細胞内部のシグナル伝達に関与する蛋白質を主なターゲットにしているが、これに特に限定している訳ではない。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。当分野は21世紀COE「統合生命科学」の構成員として分子構造解析センターの役割を果たしている。

A.免疫系レセプター群

(LIRタンパク質ファミリー, MHC Iタンパク質ファミリー, MILLタンパク質) 免疫系細胞表面に広く発現するイムノグロブリン様ドメインをもつ膜タンパク質は、他の細胞表面にあるMHCクラスI分子やその他のタンパク質に結合して、免疫反応の増強や減弱などの調節を行っている。LIR9蛋白質を大腸菌を用いて封入体として発現後、巻き戻しにより調製した。セレノメチオニン誘導体蛋白質を用いて結晶化に成功した。1.8ÅのMADデータを収集し、立体構造解析を完了した。Mill1については大腸菌での発現、巻き戻しにより組換え蛋白質を得ることに成功し、微結晶の出る条件を見出した。また、Mill1およびMill2の両者ともヒトHEK293細胞を用いて発現させ、糖鎖修飾の均一な組換え蛋白質を得ることに成功した。CD160蛋白質について大腸菌での発現、巻き戻しにより組換え蛋白質を得ることに成功したが、これまでの報告と異なりモノマー分子で得られた。そのため、ヒト由来のHEK293細胞で発現させることを検討した。糖鎖修飾の均一な組換えCD160分子を得ることに成功し、現在何量体であるかを決定するなどの生化学的実験を進めている。

母体と胎児の接点である胎盤では免疫系の働きを抑える特殊な免疫寛容システムが存在する。胎盤の栄養膜細胞にはHLA-Gと呼ばれる細胞表面抗原が特異的に発現し、母体側の免疫細胞はHLA-Gに対する抑制性レセプター(LILRなど)を発現するため、胎盤では免疫寛容が誘導される。HLA-Gが通常モノマー型以外にダイマー型を有することに着目し、その機能解析を行った。HLA-Gはダイマー化により抑制性LILR群を介するシグナル伝達が100倍程度増強されることを見出した。さらに、HLA-Gダイマーの立体構造解析に成功し、HLA-Gがダイマー化によりLILRの細胞内ドメインが近接し、シグナルが増強される構



図A.1 ヒトHLA-Gの2量体の構造
SS結合で2量体化している

造であることがわかり、機能解析を裏付ける結果であった。これらの結果は HLA-G ダイマーが免疫抑制タンパク製剤として応用可能であることを示すもので、特許申請を行った。

B. PriAタンパク質

大腸菌由来の PriA 蛋白質はDNA複製に関与するヘリカーゼの1つで、停止した DNA 複製フォークの再開に必要である。PriA タンパク質の一次構造はN末端の約200残基の PriA に特有な領域とC末端側のヘリカーゼ領域からなる。BIAcore 解析とNMR滴定実験から PriA 蛋白質のN末端200残基は DNA の3'末端を特異的に結合し、さらにその結合は DNA 複製再開に必須であることが示されている。この DNA 3'末端結合の構造的基盤を明らかにするために、昨年度に PriA 蛋白質のN末端ドメイン(105残基)の結晶構造決定(2.7 Å)をおこなった。今年度は、分子置換法により、ApA,ApC,ApT,ApG,CpCpC との共結晶の構造決定をおこなった。

オリゴヌクレオチドのうち3'末端残基のみの電子密度が観察された。結合ポケットに存在するアミノ酸残基を同定した。これらのアミノ酸残基は以前行ったNMRで大きな化学シフト変化を起こす残基と一致したことから、溶液状態における相互作用を結晶構造として正しく見ていることがわかる。1分子蛍光相関分光法により蛍光ラベルしたオリゴヌクレオチドと PriA 蛋白質のN末端ドメインの相互作用を解析した。3'末端の塩基の種類にはよらずにほぼ同じ親和性で相互作用できることが示された。通常、塩基特異性が低い場合、塩基部分は塩基対をつくるか、またはタンパク質との接触がないと考えられる。しかし、PriA では4種の塩基はアスパラギン酸残基(Asp17)で認識されている。このような相互作用様式がユニークであることをPDBの全サーチを行って明らかにした。

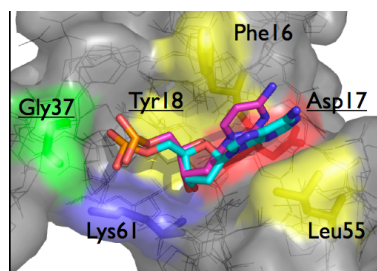


図 B.1 大腸菌 PriA タンパク質のDNA 3'末端結合ポケットのクローズアップ

C. オリゴ糖転移酵素

オリゴ糖転移酵素はN型糖鎖の生合成において、ドリコールリン酸に結合している糖鎖をタンパク質のアスパラギン残基に転移する関与する活性をもつ。オリゴ糖転移酵素は多数の膜タンパク質が会合したタンパク質複合体であり、その酵素活性本体は Stt3 と呼ばれるタンパク質である。N型糖鎖修飾は真核生物のみならず、古細菌と一部の原核生物にも存在する。古細菌

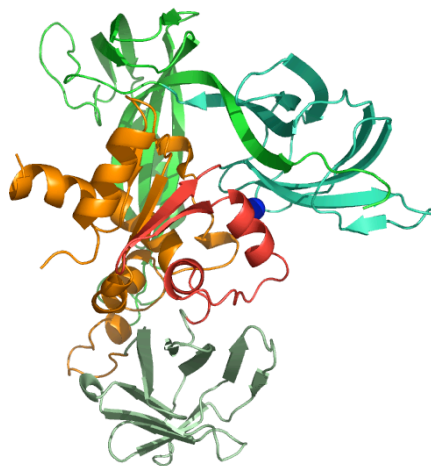


図 C.1 古細菌のN型糖鎖転移酵素の活性サブユニット Stt3 の立体構造

Pyrococcus furiosus には2つの Stt3 遺伝子が存在する。本年度は Stt3L (968res) のC末端ルーメン側ドメイン(酵素活性ドメイン, 約500残基)を大腸菌で発現させた。10%程度が可溶性分画に来るので, 熱処理をおこなって大腸菌タンパク質を除いた。SeMet 結晶を使って SAD 法で位相決定し, Native 結晶を用いて分解能 2.7Å で構造決定ができた。Stt3L は5つのドメインからなっている。4番目のドメインが Ig-like ドメインとされた他は既知のタンパク質に似たフォールドはなかった。Stt3 分子には高度に保存された WWDYG 配列があり, 酵素活性中心であると予想されている。しかし, 結晶構造からではリガンド(Asn-X-Ser/Thr ペプチドや脂質結合型糖鎖)の結合部位や様式を予想することは困難であった。そこで, リガンドとの2者あるいは3者複合体の共結晶を作製し, 測定を行っている。

古細菌のN型糖鎖転移酵素の全体像を明らかにするために, 生化学的な解析を同時に進めている。1) 脂質結合型糖鎖ドナーは古細菌では真核生物とは異なる可能性がある。そこで, 脂質結合型糖鎖ドナーの化学構造を決定するために *P. furiosus* を培養して菌体からクロロホルムとメタノールを用いる2相分配により精製をおこなった。2) *P. furiosus* のミクロソーム分画を調製し, Asn-X-Thr モチーフを含むペプチドに糖鎖を付加する活性があることを確認した。3) *P. furiosus* の糖タンパク質を精製して, そのうちいくつかについてはプロテオーム的手法によりタンパク質の種類を決定した。大量に存在するSレイヤーと呼ばれる細胞表層タンパク質が糖タンパク質であることが判明した。(生体防御医学研究所プロテオーム室の協力による)。4) 免疫電顕法で *P. furiosus* 菌体における Stt3L の局在を調べた(生体防御医学研究所技術室電顕室の協力による)。

業績目録

原著論文

1. K. Kuroki, N. Tsuchiya, M. Shiroishi, L. Rasubala, Y. Yamashita, K. Matsuta, T. Fukazawa, M. Kusaoi, Y. Murakami, M. Takiguchi, T. Juji, H. Hashimoto, D. Kohda, K. Maenaka, and K. Tokunaga, 2005.
Extensive polymorphisms of *LILRB1* (*ILT2*, *LIR1*) and their association with *HLA-DRB1* shared epitope negative rheumatoid arthritis.
Human Molecular Genetics **14**, 2469-2480
2. K. Mizuki, R. Takeya, F. Kuribayashi, I. Nobuhisa, D. Kohda, H. Nunoi, K. Takeshige, and H. Sumimoto, 2005.
A region C-terminal to the proline-rich core of p47^{phox} regulates activation of the phagocyte NADPH oxidase by interacting with the C-terminal SH3 domain of p67^{phox}.
Arch. Biochem. Biophys. **444**, 185-194
3. M. Shiroishi, K. Kuroki, K. Tsumoto, A. Yokota, T. Sasaki, K. Amano, T. Shimojima, Y. Shirakihara, L.

- Rasubala, P. Anton van der Merwe, I. Kumagai, D. Kohda, and K. Maenaka, 2006.
Entropically-driven MHC class I recognition by human inhibitory receptor Leukocyte Ig-like receptor B1 (LILRB1/ILT2/CD85j).
J. Mol. Biol. **355**, 237-248
4. K. Sasaki, T. Ose, T. Tanaka, T. Mizukoshi, T. Ishigaki, K. Maenaka, H. Masai, and D. Kohda, 2006.
Crystallization and preliminary crystallographic analysis of the N-terminal domain of PriA from *Escherichia coli*.
Biochim. Biophys. Acta **1764**, 157-160.
5. Y. Miao, Y. Zhang, K. Nakagaki, T. Zhao, A. Zhao, Y. Meng, M. Nakagaki, E. Y. Park, K. Maenaka, 2006.
Expression of spider flagelliform silk protein in *Bombyx mori* cell line by a novel Bac-to-Bac/BmNPV baculovirus expression system.
Appl. Microbiol. Biotechnol. in press
6. M. Shiroishi, D. Kohda, K. and Maenaka, 2006.
Preparation and Crystallization of the disulfide-linked HLA-G dimer.
Biochim. Biophys. Acta, in press
7. M. Shiroishi, K. Kuroki, T. Ose, L. Rasubala, I. Shiratori, H. Arase, K. Tsumoto, I. Kumagai, D. Kohda, K. Maenaka, 2006.
Efficient leukocyte Ig-like receptor signaling and crystal structure of disulfide-linked HLA-G dimer.
J. Biol. Chem., in press
8. I. Nobuhisa, R. Takeya, K. Ogura, N. Ueno, D. Kohda, F. Inagaki, H. Sumimoto, 2006.
Activation of the superoxide-producing phagocyte NADPH oxidase requires co-operation between the tandem SH3 domains of p47^{phox} in recognition of a polyproline type II helix and an adjacent alpha-helix of p22^{phox}.
Biochem. J., in press
9. M. Shiroishi, M. Kajikawa, K. Kuroki, T. Ose, D. Kohda, K. Maenaka, 2006.
Crystal structure of the human monocyte activating receptor, "Group2" leukocyte Ig-like receptor A5 (LILRA5/LIR9/ILT11).
J. Biol. Chem., in press

総説

1. 神田 大輔, 2005.
「ミトコンドリアへの蛋白質輸送の構造基盤」
蛋白質核酸酵素増刊「生命秩序を担う生体超分子」50, 1303-1310.

2. 神田 大輔, 2005.
「タンパク質の構造」
タンパク質科学イラストレイテッド (竹縄忠臣編集) 羊土社 45-56.
3. 尾瀬農之, Linda Rasubala, 吉澤聡子, Dominique Fourmy, 神田大輔, 前仲 勝
実, 2005.
「21 番目のアミノ酸セレノシステインを取り込むための分子基盤」
構造生物 11, 21-30.
4. 尾瀬農之, Linda Rasubala, 吉澤聡子, Dominique Fourmy, 神田大輔, 前仲 勝
実, 2006.
「21 番目のアミノ酸を取り込むための分子機構」
生物物理 46, 102-105.

学会発表

1. 前仲勝実 (2005, 1/20)
Structure and function of MHC class I specific receptors.
シンポジウム "Strategies for the acquirement of functional diversity of proteins" タンパク質の多
様性は限られたゲノム情報からいかにして生み出されるか? 東京
2. 神田大輔 (2005, 2/23)
K A S T (神奈川科学技術アカデミー) 教育講座講師
ポストゲノム医科学・プラットフォーム技術コース第3日目1時限目 「タンパク質立体
構造」, 東京大学医科学研究所, 東京
3. 黒木喜美子, 白石充典, ラズバラリンド, 土屋尚之, 神田大輔, 徳永勝士, 前仲勝
実 (2005, 4/17-4/20)
関節リウマチ (RA) 関連 Leukocyte Immunoglobulin-like Receptor (LILR) B1 ハプ
ロタイプの構造・発現解析
第49回日本リウマチ学会総会・学術集会, 横浜
4. 佐々木香織, 尾瀬農之, 岡本直明, 田中卓, 前仲勝実, 正井久雄, 神田大輔 (2005,
6/30-7/2)
E. coli 由来 PriA の N 末端ドメインの立体構造解析
第5回日本蛋白質科学会年会, 福岡
5. 黒木喜美子, 白石充典, ラズバラリンド, 梶川瑞穂, 小林佐代子, 岡本直明, 神田

- 大輔, 前仲勝実 (2005, 6/30-7/2)
蛍光相関分光法 (FCS) を用いた白血球受容体 LILRB1 と MHC クラス I との相互作用解析
第 5 回日本蛋白質科学会年会, 福岡
6. 井倉真由美, 帯田孝之, 尾瀬農之, 遠藤斗志也, 前仲勝実, 神田大輔 (2005, 6/30-7/2)
ラット Tom20 タンパク質と ALDH プレ配列複合体の X 線結晶構造解析
第 5 回日本蛋白質科学会年会, 福岡
7. 梶川瑞穂, 笠原正典, 神田大輔, 前仲勝実 (2005, 6/30-7/2)
MHC クラス I 様分子 MILL の発現系構築と機能解析
第 5 回日本蛋白質科学会年会, 福岡
8. 前仲勝実 (2005, 7/1)
ヒト非古典的 MHC 分子 HLA-G の機能構造解析
第 5 回日本蛋白質科学会年会シンポジウム, 福岡
9. 佐々木香織, 尾瀬農之, 岡本直明, 田中卓, 前仲勝実, 正井久雄, 神田大輔 (2005, 7/22-7/24)
Structural basis for the stalled DNA replication fork recognition by *E.coli* PriA (aural presentation)
第 1 回研究所ネットワーク国際シンポジウム, 東京
10. M. Shiroishi, K. Kuroki, T. Ose, L. Rasubala, I. Shiratori, H. Arase, D. Kohda, and K. Maenaka. (2005, 8/7-8/13)
Crystal structure and efficient Leukocyte Ig-like receptor signaling of disulfide-linked HLA-G dimer.
Gordon Research Conference, Oxford, UK.
11. K. Sasaki, T. Ose, T. Tanaka, T. Mizukoshi, T. Ishigaki, N. Okamoto, K. Maenaka, H. Masai, and D. Kohda (2005, 8/23-8/31)
Structural basis for the stalled DNA replication fork recognition by *E.coli* PriA
XX Congress of the International Union of Crystallography Florence, Italy
12. D. Kohda (2005, 8/23-8/31)
Cracking of the targeting signal embedded in mitochondrial presequences (invited speaker)
XX Congress of the International Union of Crystallography Florence, Italy
13. M. Igura, T. Obita, T. Ose, T. Endo, K. Maenaka, and D. Kohda (2005, 8/23-8/31)
Cracking of the targeting signal embedded in mitochondrial presequences
XX Congress of the International Union of Crystallography Florence, Italy

14. M. Shiroishi, K. Kuroki, T. Ose, D. Kohda, and K. Maenaka. (2005, 8/23-8/31)
Crystal structure of Leukocyte Ig-like Receptor 9 (LIR9/ILT11 /CD85f)
XX Congress of the International Union of Crystallography Florence, Italy
15. 神田大輔 (2005, 9/21)
<ゆるい>相互作用に対する構造生物学アプローチ
よこはまNMR構造生物学研究会 第27回ワークショップ「細胞シグナリングの構造生物学」, 横浜
16. 井倉真由美, 帯田孝之, 尾瀬農之, 遠藤斗志也, 前仲勝実, 神田大輔 (2005, 10/9-10/10)
プレ配列に隠されたミトコンドリア行き標的シグナルの Tom20 タンパク質による解読機構
「日本バイオインフォマティクス学会 第一回プロテイン・インフォマティクスワークショップ in 九州」, 福岡
17. 佐々木香織, 尾瀬農之, 田中卓, 岡本直明, 前仲勝実, 正井久雄, 神田大輔 (2005, 10/9-10/10)
E. coli 由来 PriA の N 末端ドメインによる DNA 3'末端認識の構造的基盤
「日本バイオインフォマティクス学会 第一回プロテイン・インフォマティクスワークショップ in 九州」, 福岡
18. 神田大輔 (2005, 10/12-10/13)
”ゆるい”相互作用に対する構造生物学的アプローチ
第22回NMRユーザーズ・ミーティング (ブルカー・バイオスピン), 大阪と東京
19. 白石充典, 黒木喜美子, 尾瀬豊之, ラスバラリンダ, 白鳥行大, 荒瀬尚, 神田大輔, 前仲勝実 (2005, 10/22)
非古典的 MHC クラス I 分子 HLA-G のダイマー形成による強いシグナル伝達効果とその構造基盤
第78回日本生化学学会年会 ワークショップ, 神戸
20. T. Obita, M. Igura, T. Ose, K. Maenaka, T. Endo, and D. Kohda, (2005, 11/1-11/3)
Crystal structures conformationally locked with a disulfide tether suggest a dual-mode interaction mechanism for mitochondrial presequence recognition by Tom20
"International Symposium on Life of Proteins", Hyogo, Japan
21. K. Kuroki, N. Tsuchiya, M. Shiroishi, L. Rasubala, Y. Yamashita, K. Matsuta, T. Fukazawa, M. Kusaoi,

- Y. Murakami, M. Takiguchi, T. Juji, H. Hashimoto, D. Kohda, K. Maenaka, and K. Tokunaga (2005, 11/4-11/8)
Extensive polymorphisms of LILRB1 (ILT2, LIR1) and their association with HLA-DRB1 shared epitope negative rheumatoid arthritis
9th Meeting The Society for Natural Immunity, Poipu Beach, Kauai, USA
22. M. Shiroishi, K. K., T. Ose, L. Rasubala, I. Shiratori, H. Arase, D. Kohda, and K. Maenaka (2005, 11/4-11/8)
Crystal structure and efficient Leukocyte Ig-like receptor signaling of a disulfide-linked dimer of non-classical MHC molecule, HLA-G
9th Meeting The Society for Natural Immunity, Poipu Beach, Kauai, USA.
23. 神田大輔 (2005,11/23)
シグナリング構造としてのP Xドメイン
第43回日本生物物理学会年会, 札幌
24. 真板宣夫, 青柳秀幸, 藤原晴彦, 白川昌宏 (2005, 12/7-12/10)
non-LTR 型レトロトランスポゾン R1Bm のエンドヌクレアーゼドメインの結晶構造解析
第28回日本分子生物学会年会, 福岡
25. 井倉真由美, 帯田孝之, 尾瀬農之, 遠藤斗志也, 前仲勝実, 神田大輔 (2005, 12/7-12/10)
ミトコンドリアプレ配列認識のためのTom20 タンパク質の動的構造
第28回日本分子生物学会年会, 福岡
26. 黒木喜美子, 白石充典, ラスバラリンダ, 小林佐代子, 梶川瑞穂, 田畑栄一, 福永裕子, 岡本直明, 神田大輔, 前仲勝実 (2005, 12/7-12/10)
白血球抑制性受容体 LILRB1 と MHC クラス I との蛍光相関分光法(FCS)およびNMRを用いた相互作用解析
第28回日本分子生物学会年会, 福岡
27. 佐々木香織, 尾瀬農之, 田中卓, 岡本直明, 前仲勝実, 正井久雄, 神田大輔 (2005, 12/7-12/10)
E. coli 由来 PriA の N 末端ドメインによる DNA3'末端認識の構造的基盤
第28回日本分子生物学会年会, 福岡
28. L. Rasubala, H. Hatanaka, M. Kohjima, K. Maenaka, H. Sumimoto and D. Kohda (2005, 12/7-12/10)
NMR analysis of the interaction between intrinsically unstructured polybasic peptide and

phosphatidylinositol phosphates (PIPs)”

第28回日本分子生物学会年会，福岡

29. 田畑栄一，黒木喜美子，白鳥行大，荒瀬尚，神田大輔，前仲勝実（2005，12/7-12/10）

ペア型レセプター Paired Ig-Like type2 Receptor(PILR)の構造解析

第28回日本分子生物学会年会，福岡

30. 中村聖子，黒木喜美子，佐々木香織，丸山拓馬，伊藤昌之，山本一夫，松本直樹，神田大輔，前仲勝実（2005，12/7-12/10）

NK 細胞抑制型レセプター-KLRG1（ Killer Cell Lectin-Like Receptor G1）による KLRG1 リガンド認識の構造基盤

第28回日本分子生物学会年会，福岡

31. 梶川瑞穂，笠原正典，神田大輔，前仲勝実（2005，12/7-12/10）

MHC クラス I 様分子 MILL の構造・機能解析

第28回日本分子生物学会年会，福岡

32. 前仲勝実（2005，12/7-12/10）

Structural basis for selenocysteine incorporation

第28回日本分子生物学会年会シンポジウム，福岡

33. 田畑栄一，黒木喜美子，白鳥行大，荒瀬尚，神田大輔，前仲勝実（2005，12/13-12/15）

ペア型レセプター Paired Ig-Like type2 Receptor (PILR)のリガンド認識機構の構造基盤

第35回日本免疫学会総会・学術集会，横浜

34. 黒木喜美子，白石充典，ラスバラリンダ，小林佐代子，梶川瑞穂，田畑栄一，福永裕子，岡本直明，神田大輔，前仲勝実（2005，12/13-12/15）

白血球抑制性受容体 LILRB1 と MHC クラス I との FCS および NMR を用いた相互作用解析

第35回日本免疫学会総会・学術集会，横浜

35. 中村聖子，黒木喜美子，佐々木香織，丸山拓馬，伊藤昌之，山本一夫，松本直樹，神田大輔，前仲勝実（2005，12/13-12/15）

NK 細胞抑制型レセプター-KLRG1（ Killer Cell Lectin-Like Receptor G1）による KLRG1 リガンド認識の構造基盤

第35回日本免疫学会総会・学術集会，横浜

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。

平成 17 年度の当分野の異動は以下の通りである。4月から藤 博幸(教授)により新たに研究室としての活動を開始し、10月より加藤 和貴(デジタルメディスンイニシヤティブ・助教授)が加わった。

A. タンパク質の生化学的機能解析

a. GPCR のインターフェイス予測

G タンパク質共役受容体 (G-protein coupled receptor, 以下 GPCR) は、7回膜貫通ヘリックスを持つ膜タンパク質である。GPCR は多様なリガンドの受容体として働く。各 GPCR は対応するリガンドに結合すると、そのコンフォメーション変化を通じて、G タンパク質を介したシグナル変換を引き起こす。近年、GPCR が複合体を形成すること、複合体の形成によってシグナル変換が修飾されること、また統合失調症やパーキンソン病などいくつかの疾病に複合体形成が関与することが報告されてきている。複合体形成において、インターフェイスとして働く部位を正確に予測できれば、細胞内シグナル伝達機構や疾病機構の解明、また創薬の研究に役に立つと思われる。通常、インターフェイスにおいて相互作用に関与する残基は、その機能的制約から保存されている。そのため、アミノ酸配列のマルチプル・アラインメントから、保存残基をモチーフあるいは進化トレースとして同定し、それらを既知三次構造にマッピングし、表面でそのような残基がクラスタを形成している部分を見つけることで、インターフェイスは予測される。この方法では、比較しているアミノ酸配列ではインターフェイスの空間的な位置が保存されていることが仮定されている。しかし、同じリガンドに結合する GPCR であってもサブタイプレベルで異なる領域がインターフェイスとして使用されていることがあり、この仮定は成り立たない。我々は、この問題を考慮すると同時に、立体構造情報をより積極的にインターフェイス予測に利用した方法を開発した。まず、GPCR のアミノ酸配列のアラインメントから分子系統樹を構築し、インターフェイス予測のターゲットである GPCR が含まれているクラスタを同定する。そのクラスタの構成メンバーは同じインターフェイスを持つものと仮定し、そのクラスタのメンバーに構造既知のロドプシンの配列を含めてアラインメントを再度構築する。ロドプシンを除いて、得られたアラインメントの各サイトの保存度を計算する。一方で、ロドプシンの立体構造中の各残基の座標について主成分分析を行う。この解析により得られる第二主成分と第三主成分で規定される平面は、脂質二重膜とほぼ平行になる。この平面にロドプシンの

各残基を射影し、そこからループ構成残基と rASA が 25% 以下の残基を除去する。残された平面上の残基のプロットに、アラインメントを利用して保存度の値を割り当てる。全残基の幾何重心を平面に射影したプロットを原点として、角度 θ の扇型の領域を考える。保存度に対して閾値を与えて、それ以上に高い保存度を示す残基を保存的な残基と見なし、扇型の領域に入っている保存残基を調べる。ad hoc な評価関数を定義し、その領域内保存残基の集積度を評価する。これを、扇型の角度や位置、また保存度の閾値を変えながら求め、その関数の値が最大になった扇形領域を、インターフェイス部分からの射影であると考え、それに対応する元の立体構造の部分をインターフェイスとして予測する。得られた方法を、インターフェイスに関しての知見がある GPCR に適用したところ、高い確度でインターフェイスを予測できた。現在、一般の球状タンパク質のインターフェイス予測への拡張について研究している。

B. 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、一方のタンパク質に生じた変異が、相互作用に影響を及ぼす場合、相手方タンパク質において、それを相補する形での変異が生じることで、相互作用が維持される。このため、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。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いる。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。ミラーツリー法で複数のタンパク質の間での相互作用を評価する際、共通のソース生物のセットから各タンパク質についてオーソログ配列を収集し、それらのアラインメントから距離行列が計算される。そのため、どの距離行列にも、同じ生物のセットの系統関係の情報が含まれることになる。我々は、そのような情報を除いた残差の中に相互作用情報が含まれていると考え、生物の系統関係の情報を除去する方法を開発した。まず、全ての距離行列の下あるいは上三角行列の要素を1次元に配置して、ベクトルの形式に変換した。このそれぞれを系統ベクトルとよび、 $|v\rangle$ で表す。一方、生物の系統関係を反映した単位ベクトル ($|u\rangle$ で表す) を次の3種の方法で推定した。(1) 16SrRNA の距離行列から系統ベクトルを作成し、単位ベクトルに変換、(2) タンパク質の系統ベクトルを全て単位ベクトルに変換し、各要素の平均を求めた後に、改めて単位ベクトルに変換する。(3) タンパク質の系統ベクトルに、主成分分析を適用し、第一主成分ベクトルを単位ベクトルに変換する。いずれに方法にせよ、得られた単位ベクトルを用いて射影演算子 $I - |u\rangle\langle u|$ を作成し、これに $|v\rangle$ を作用させると、 $|v\rangle$ 中の $|u\rangle$ に直交する成分、すなわち生物の系統関係では説明できない部分が得られる (I は単位行列を表す)。この残

差成分で相関係数を計算すると、予想通り擬陽性を大幅に減じる事ができた。しかし、同時に擬陰性が増加してしまった。この問題を相互作用の多重性という観点から調べてみたところ、1対1で相互作用するものや、相互作用のパートナーが共有されているタンパク質ペアでは高い相関が得られ、それぞれが独立に相互作用のパートナーを有している場合は、相関が弱いという結果が得られた。

b. 古細菌の極性脂質合成経路の解析

古細菌の極性脂質合成系では、他の生物界同様、膜貫通ヘリックスを複数本有すると考えられている CDP alcohol phosphatidyl- transferase family が中心的な役割を演じている。そのメンバーである phosphatidylserine synthase の遺伝子について、ゲノム上の近接する領域で遺伝子順序の保存する遺伝子を調べてみた。オペロン中で隣接する位置にある ORF が、他の生物では下流反応を触媒することが知られている phosphatidylserine decarboxylase のホモログをコードしていた。またこの遺伝子順序の保存は、古細菌ばかりでなく真性細菌でも観察された。通常、遺伝子順序やオペロン構造は保存されないが、相互作用するタンパク質の場合、遺伝子順序が保存されやすいことが知られており、タンパク質間相互作用予測に利用されている。このことより、phosphatidylserine synthase 遺伝子に対して隣接関係が保存されている遺伝子は phosphatidylserine decarboxylase をコードすることが強く示唆された。また、phosphatidylserine decarboxylase 遺伝子の有無をゲノム情報既知の古細菌と真性細菌で調べたところ、真性細菌では、非相同な二種類の phosphatidylserine decarboxylase が利用されていること、それらの遺伝子はいずれも phosphatidylserine synthase の遺伝子に隣接しているものの、phosphatidylserine synthase の遺伝子に対する位置が逆転していること、また一方の phosphatidylserine decarboxylase をコードしているものは、他方の phosphatidylserine decarboxylase 遺伝子を欠失していることが判明し、phosphatidylserine decarboxylase には non-orthologous gene displacement が生じていることがわかった。また、分子系統解析から、古細菌の phosphatidylinositol synthase 遺伝子と phosphatidylglycerol synthase 遺伝子のアノテーションを精密化することができた。

業績目録

原著論文

1. S.Aburatani,, K.Goto,, S.Saito,, H.Toh,, K.Horimoto,. 2005.
ASIAN: a web server for inferring a regulatory network framework from gene expression profiles.
Nucleic Acids Res. 33, W659-W664.
2. T.Sato, Y.Yamanishi, M.Kanehisa,, H.Toh. 2005.
The inference of protein-protein interactions by co-evolutionary analysis is improved by excluding the information about the phylogenetic relationships.

Bioinformatics 21, 3482-3489.

3. K.Katoh, K.Kuma, T.Miyata,, H.Toth. 2005.

Improvement in the accuracy of multiple sequence alignment program MAFFT
Genome Informatics 16, 22-33

4. D.M.Standley, H.Toth, H.Nakamura. 2005.

GASH: An improved algorithm for maximizing the number of equivalent residues between two protein structures.

BMC Bioinformatics 6, 221.

5. S.Matsuda,, J.-P.Vert., H.Saigo,, N.Ueda,, H.Toth, T.Akutsu. 2005.

A novel representation of protein sequences for prediction of subcellular localization using support vector machines.

PROTEINS: Structure, Function, and Bioinformatics 14, 2804-2813.

6. H.Daiyasu, K.Kuma, T.Yokoi, H.Morii, Y.Koga, H.Toth. 2005

A study on archaeal enzymes involved in polar lipids synthesis by an approach linking the information about amino acid sequences, genomic contexts and lipid composition

Archaea 1, 399-410 (2005)

7. S.Aburatani, S.Saito,, H.Toth, K.Horimoto,, 2005.

A graphical chain model for inferring regulatory system networks from gene expression profiles.

Statistical Methodology 3, 17-28.

総説

1. 根本 航、藤 博幸. 2005.

クラス A GPCR 複合体のインターフェイス予測

蛋白質核酸酵素 増刊号生体超分子 50, 1382-1387.

2. 岩部 直之、菅 裕、廣瀬 希、隈 啓一、藤 博幸. 2006.

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

ゲノムから読み解く生命システム - 比較ゲノムからのアプローチ 第六回

細胞工学 25, 80-86.

3. 富井 健太郎、藤 博幸. 2006.

配列データベース検索の現在

情報処理 47, 205-232 (2006)

著書

1. 藤 博幸. 2006.
タンパク質の進化
In: シリーズ進化2 遺伝子とゲノムの進化 (石川統・斉藤成也・佐藤矩行・
長谷川真理子 編)pp. 67-105 岩波書店, 東京都.

学会発表

1. 大安 裕美、水谷 正治、斎野 廣道、坂田 完三、藤 博幸 (2005, 6/30-7/2)
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
第5回日本蛋白質科学会年会、福岡
2. 藤 博幸、野原 祥夫 (2005, 6/30-7/2)
配列/構造統合アラインメント解析パッケージ ASH
第5回日本蛋白質科学会年会、福岡
3. 根本 航、藤 博幸 (2005, 6/30-7/2)
膜タンパク質複合体のインターフェイスについての解析
第5回日本蛋白質科学会年会、福岡
4. 市原寿子、藤 博幸 (2005, 6/30-7/2)
Quorum-sensing 機構に関わるタンパク質の進化的解析
第5回日本蛋白質科学会年会、福岡
5. 藤 博幸 (2005, 9/22)
バイオインフォマティクス人材養成について思う事
「産総研生命情報化学人材養成コース」最終シンポジウム, 東京.
6. W.Nemoto, H.Toh (2005, 8/27-9/1)
Prediction of GPCR oligomer interface
Joint 15th IUPAB & 5th EBSA International Biophysics Congress, Montpellier
7. 藤 博幸 (2005, 10/9-10)
共進化情報を利用したタンパク質間相互作用予測
第一回バイオインフォマティクス学会九州支部講演会

8. 藤 博幸 (2005, 11/24-25)
共進化情報を利用したタンパク質間相互作用予測
統合脳 プロテオミクス教育研究講演会, 岡崎
9. 根本 航、藤 博幸 2005, 11/23-25)
G タンパク質共役受容体がオリゴマー化する際のインターフェイス予測手法の開発
とその適用例
第 43 回日本生物物理学会年会、札幌
10. 隈 啓一、廣瀬 希、藤 博幸、岩部 直之, (2005, 12/7-10)
シグナル伝達系遺伝子についての系統樹データベースの作成
第 28 回日本分子生物学会年会、福岡
11. 大安 裕美、水谷 正治、斎野 廣道、坂田 完三、藤 博幸 (2005, 12/7-10)
植物由来の二糖配糖体特異的グリコシダーゼの基質特異性:モデリングによる解析
第 28 回日本分子生物学会年会、福岡
12. 佐藤 哲也、山西 芳裕、金久 實、藤 博幸 (2005, 12/7-10)
共進化情報を利用したタンパク質間相互作用の予測
第 28 回日本分子生物学会年会、福岡
13. T.Sato, H.Yamanishi, H.Ichihara,, M.Kanehisa,, H.Toh (2005, 12/19-21)
Comparison of prediction methods for protein-protein interaction using co-evolutionary information.
Genome Informatics 2005, Yokohama.
14. 藤 博幸 (2006, 1/13)
Prediction of protein-protein interaction by co-evolutionary analysis.
特定領域研究「生命秩序の膜インターフェイスを制御するソフトな分子間相互作用」
公開シンポジウム、東京
15. 藤 博幸 (2006, 1/20)
進化的情報を利用したタンパク質間相互作用の解析
第 1 回 加齢研ゲノムリサーチセンターワークショップ
「ポストゲノム時代のメディカルサイエンス」, 仙台.
16. 藤 博幸 (2006, 1/30-31)
共進化情報を利用したタンパク質間相互作用の予測
ゲノム特定 領域横断バイオインフォマティクス研究会, 福岡.

17. 藤 博幸 (2006, 3/17)

バイオインフォマティクスによるタンパク質の機能解析

文部科学省タンパク 3000 プロジェクト 第 4 回産学連携フォーラム, 福岡.

18. 藤 博幸 (2006, 3/22-23)

共進化情報を利用したタンパク質間相互作用の予測

大阪大学蛋白質研究所セミナー 「生体分子構造情報の時間軸への展開による生命機能の解読」, 大阪

防御分子構築学分野

Division of Molecular Design

当部門では、超高感度質量分析システムと、ヒト完全長 cDNA を活用した、大規模タンパク質ネットワーク解析プロジェクトを展開している。我々は世界最小のダイレクトナノLCシステムを独自に開発し、取り扱いにくく、失いやすいタンパク質を高感度に検出することに成功した。さらに、このシステムを用い、本来不可能とされてきた非特異的な吸着のないサンプルの処理の条件検討を高速に検索することに成功し、事実上ノイズのないハイスループット且つ高精度なタンパク質ネットワーク解析を可能とした。この解析プラットフォームの feasibility study としてヒト完全長 cDNA 2,200 個を bait として用い、ヒトの細胞中の約 3,500 の相互作用を検出した。これらのうちの新規相互作用から、これまでのゲノムの情報のみからは予想できなかった新たな生命システムの発見と、幾つかの疾患関連遺伝子の機能解析に成功した。

A. 疾患関連遺伝子の機能解析

プロテアソームを構成するサブユニット全てにタグを融合し相互作用分子を検出したところ、既知の全てのプロテアソームコンポーネントの他に、ダウン症の原因遺伝子である DSCR2 と癌関連遺伝子である HCCA3 及び Ump1 という遺伝子を発見した。これらは全て機能は不明で、機能に関わる報告は全くなされていなかった。面白いことにこれらの因子は成熟型のプロテアソームのコンポーネントを bait として時には検出されず、コア構造である alpha と beat サブユニットを bait とした時のみに検出される。またこれらの因子を bait とするとやはり、成熟型のプロテアソームのコンポーネントは同定されなかった。そこでこれらが巨大なプロテアソームのアッセムブリーをアシストするシャペロン(Proteasome Assembly Chaperone: PAC)であると仮説をたて検証実験を行った。その結果、DSCR2 と HCCA3 はヘテロ二量体を形成し、それぞれ別の alpha サブユニットと結合しアッセムブルの起点となり、alpha リングの形成を促進する。Ump1 は beat リングの形成を促進しかつ DSCR2/HCCA3 複合体に beat リングを会合させるのである。さらに Ump1 はホモ二量体を形成しリングをダブルとし 20S のプロテアソームを完成させるのである。プロテアソームのアッセムブリーはプロテアソーム研究の最後の謎と呼ばれていたものであり、それを我々それにかかわる分子とメカニズムを初めて明らかにしたのである。この研究は新たな生命システムを発見したのみならず、遺伝子と病気の関係おも説明した。よく知られていることであるがガン細胞は大量のプロテアソームを必要とする。従ってプロテアソームの新生を活発にするためこれらの因子もガン細胞に高発現しており、その結果 HCCA3 がガンマーカーとして報告されていても何の不思議もないのである。また DSCR2 に異常があることがダウン症に Critical であるというこの遺伝子に異常があれば、個体の細胞全てでプロテアソームの量が減り、個体発生から成長の過程であらゆる異常が起きてても不思議ではないのである。事実これらの PAC を細胞内でノックダウンすると新生プロテアソーム量が激減し、ガン細胞においては致命的である。この事はプロテアソ

ームインヒビターが強い抗腫瘍活性をもち、抗がん剤として有効である事実をもよく説明する。しかし、プロテアソームインヒビターは正常細胞を含め全てのプロテアソーム機能を阻害するため強い毒性があり、事実特殊な白血病の治療以外には認可されていない。しかし、我々が発見したPACの機能を弱めるなら、新生プロテアソーム量を減らすだけであるから、ここをターゲットとするなら毒性の少ない抗がん剤を発見可能である。

B. ケミカルバイオロジー

プロテアソームアッセンブリファクターの発見はほんの一例に過ぎないが、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が可能となれば、自ずと疾患の発症メカニズム、新規治療法の開発・ドラッグターゲットの発見やバリデーションへとつながっていくことは、ほぼ確信を持つことが出来た。そこで今年度より、このようなタンパク質ネットワーク解析より得られた情報を基に、生体の分子ネットワークを化合物で制御するための基盤研究開発プロジェクト¹がスタートさせた。プロジェクトに於いては、ネットワーク制御上重要と思われるタンパク質、またはタンパク質相互作用をターゲットとして統一的なスクリーニングを実施し、得られた活性化化合物の評価を行うことを目標としている。生体システムの制御に重要と思われれる相互作用を指標に化合物をスクリーニング出来れば効率よくケミカルプローブを取得可能なはずである。従来の化合物スクリーニングでは、酵素活性や細胞死など、所謂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、知恵と技術を搾りだし優れた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、ケミカルジェノミクスを大きく加速可能である。そこで本プロジェクトでは、このような目的に最も適した蛍光イメージング技術を駆使したタンパク質間相互作用検出技術に関する研究開発を一つの軸足とする。このような目的に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い、生体制

御に有用な相互作用が発見されれば直ちに化合物スクリーニングがスタートできるような体勢をパイプラインとして確立するのがプロジェクトの狙いである。またそのためのcDNAソース・リソースは「ヒト完全長cDNAプロジェクト」の成果として世界をリードしておりⁱⁱ、日本の持ち味が発揮できるものと思われる。

それとともにゲノムツールをモデル細胞・動物を駆使した表現型スクリーニングも平行して行う。これまで製薬業界あるいはアカデミアで行ってきたような個別のスクリーニングではなく、は広い疾患・ターゲット分子を共通のプラットフォームでスクリーニング出来る汎用性の高いシステムを構築する予定である。

ここで得られた化合物は、上市される治療薬とならなくても、タンパク質間の相互作用を制御・抑制する低分子化合物は生体を制御し、生物学を深化させるためのケミカルプローブとして有効に利用できることは想像に難くない

ⁱ NEDO「生物機能を制御する化合物等を探索・評価する技術の開発」

ⁱⁱ NEDO「ヒト完全長cDNAプロジェクト」

業績目録

原著論文

1. Higo T, Hattori M, Nakamura T, Natsume T, Michikawa T, Mikoshiba K. 2005
Subtype-specific and ER luminal environment-dependent regulation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 by ERp44.
Cell. 14;120(1):85-98.
2. Yoshida K, Yamaguchi T, Natsume T, Kufe D, Miki Y. 2005
JNK phosphorylation of 14-3-3 proteins regulates nuclear targeting of c-Abl in the apoptotic response to DNA damage.
Nat Cell Biol.;7(3):278-85
3. Kojima H, Sasaki T, Ishitani T, Iemura S, Zhao H, Kaneko S, Kunimoto H, Natsume T, Matsumoto K, Nakajima K. 2005
STAT3 regulates Nemo-like kinase by mediating its interaction with IL-6-stimulated TGFbeta-activated kinase 1 for STAT3 Ser-727 phosphorylation.
Proc Natl Acad Sci U S A. 102(12):4524-9.
4. Matsuda N, Azuma K, Saijo M, Iemura S, Hioki Y, Natsume T, Chiba T, Tanaka K,. 2005
DDB2, the xeroderma pigmentosum group E gene product, is directly ubiquitylated by Cullin 4A-based ubiquitin ligase complex.
DNA Repair (Amst). 4(5):537-45.
5. Moriguchi T, Urushiyama S, Hisamoto N, Iemura SI, Uchida S, Natsume T, Matsumoto K, Shibuya H. 2005

- WNK1 regulates phosphorylation of cation-chloride-coupled cotransporters via the STE20-related kinases, SPAK and OSR1.
J Biol Chem. 2005 Dec 30; 280(52):42685-93. Epub 2005 Oct 31.
6. Hirano Y, Hendil KB, Yashiroda H, Iemura S, Nagane R, Hioki Y, Natsume T, Tanaka K, Murata S. 2005
A heterodimeric complex that promotes the assembly of mammalian 20S proteasomes.
Nature. 2005 Oct 27;437(7063):1381-5.
 7. Hishiya A, Iemura S, Natsume T, Takayama S, Ikeda K, and Watanabe K. 2006
A novel ubiquitin-binding protein ZNF216 functioning in muscle atrophy.
Embo J; 25(3):554-64
 8. Honma M, Higuchi O, Shirakata M, Yasuda T, Shibuya H, Iemura S, Natsume T, Yamanashi Y.2006
Dok-3 sequesters Grb2 and inhibits the Ras-Erk pathway downstream of protein-tyrosine kinases.
Genes Cells. 11(2):143-51.
 9. Kitajima TS, Sakuno T, Ishiguro K, Iemura S, Natsume T, Kawashima SA, Watanabe Y. 2006
Shugoshin collaborates with protein phosphatase 2A to protect cohesin.
Nature. 441(7089):46-52

総説

1. 夏目 徹 (2005)
大規模プロテオミクスからバイオ NLP に望むこと
情報処理 Vol.46 No.2 通巻 480 号 p119-122
2. 夏目 徹(2005)
相互作用とトキシコゲノミクス
医学のあゆみ Vol.213 No.4 p263-268
3. 夏目 徹 (2005)
完全長ヒト cDNA を用いた大規模蛋白質ネットワーク解析
遺伝子医学 MOOK 疾患プロテオミクスの最前線 p91-98
4. 夏目 徹 (2005)
統合インフォマティクス
遺伝子医学MOOK 疾患プロテオミクスの最前線 p146-153
5. 夏目 徹 (2005)
大規模タンパク質相互作用ネットワーク解析
実験医学VOL.23 No.4(増刊)p118-124
6. 夏目 徹(2005)

相互作用とトキシコゲノミクス

週間 医学のあゆみVOL.213 No.4 p263-268

7. 夏目 徹(2005)

タンパク質の相互作用と機能の解析

ぶんせき 2005年第10号(通巻370号)p538-542

8. 夏目 徹(2005)

ポストゲノム時代のタンパク質科学

タンパク質科学 構造・物性・機能

9. 夏目 徹(2005)

タンパク質相互作用ネットワークの網羅的な解析

バイオテクノロジージャーナル2005Vol.5 No.6 p692-697

学会発表

1. 夏目徹(2005)

プロテオーム解析と質量分析.

ポストゲノム医科学・プラットホーム技術教育講座

2. 夏目徹(2005)

大規模タンパク質ネットワーク解析.

特定領域研究「統合ゲノム」第7回ワークショップ

微生物ゲノム研究のフロンティア

3. 夏目徹(2005)

タンパク質相互作用ネットワークの大規模解析.

日本癌学会カンファレンス

「がんゲノム研究の新戦略ーオーダーメイド医療を目指してー」

4. 夏目徹 (2005)

タンパク質相互作用ネットワークの大規模解析.

遺伝子機能プロテオミクスバイオインフォマティクス第2回公開シンポジウム

5. 夏目徹 (2005)

Systematic analysis of protein interaction networks using humanfull length cDNA.

Vith European Symposium of The Protein Society.

6. 夏目徹 (2005)

Large-scale systematic analysis of protein interaction networks using human full length cDNA.

Previous Seminars held at the Sanger Institute in 2005.

7. 夏目徹 (2005)

完全長ヒト cDNA を用いた大規模蛋白質ネットワーク解析.

Amercham Biosciences Symposium 2005.

8. 夏目徹 (2005)
タンパク質相互作用ネットワークの大規模解析
2005年度生理学研究所研究会
9. 夏目徹 (2005)
タンパク質相互作用ネットワーク解析の大規模解析
第5回日本蛋白質科学会年会
10. 夏目徹 (2005)
タンパク質相互作用ネットワーク解析の大規模解析
The 3rd JHUPO Conference.
11. 夏目徹 (2005)
質量分析による高感度・大規模プロテオミクスは本当に可能なのか？
東京コンファレンス 2005
12. 夏目徹 (2005)
Chemical Interactome:タンパク質相互作用大規模解析からの展開
第1回創剤フォーラム若手発表討論会
「生物薬剤学における架橋型研究の展開」
13. 夏目徹 (2005)
Systematic Analysis of Protein Interaction Networks Using Human Full Length
cDNA.
The 17th Annual Meeting of the Korean Society for Molecular and Cellular Biology
14. 夏目徹 (2005)
タンパク質相互作用ネットワークの大規模解析
第28回日本分子生物学会年会
15. 夏目徹 (2005)
Systematic Analysis of Protein Interaction Networks Using Human Full Length
cDNA.
International chemical congress of pacific basin societies.
16. 夏目徹 (2006)
大規模タンパク質ネットワーク解析
千葉県地域結集型共同研究事業
「ゲノム情報を基本とした次世代先端技術開発」平成17年度成果報告会

防御システム再生学

Division of Regeneration Biology

A. 成体神経幹細胞活性化の制御機構の解析

a. 神経幹細胞に強く発現する RNA 結合蛋白質 Musashi1 が PABP に結合して PABP-eIF4G 間の結合を阻害し、PABP-翻訳開始因子複合体によって促進される 5' cap 依存的な翻訳を低下させることを明らかにした。この翻訳阻害効果は、Musashi1 認識配列を有する RNA でのみ観察された。従って Musashi1 は PABP と eIF4G の結合を競合阻害することにより翻訳を抑制していると考えられた。

b. Galectin-1 は、その糖鎖結合能によって、成体脳内の神経幹細胞の増殖を制御している事が、我々の研究により示唆された。そこで今回、糖鎖結合型 Galectin-1 変異体 (CS-Galectin-1) 固定化カラムを作成し、そこに神経幹細胞を含む細胞破碎溶液を反応させ、Galectin-1 と結合する分子群を濃縮、精製した。それらの分子を質量分析計にて同定したところ、Atp1a3, GLT-1 等の分子群が見出された。また、同時に IntegrinBeta1 についても、成体脳内で Galectin-1 と結合している事を示唆する結果を得た。今後、これらの分子群の成体脳内での発現パターン、および Galectin-1 との結合が神経幹細胞の制御にどの様に関わっているかについて、詳細に解析する予定である(Sakaguchi et al., PNAS, 2006)

c. 組織免疫染色により Nestin-d4Venus トランスジェニックマウスでは、従来の Nestin-EGFP トランスジェニックマウスと比較して、発生期の神経幹細胞の局在が知られている脳室周囲においてより限局した発現パターンが確認された。これらの細胞は分化したニューロンのマーカーである β -tubulin III 陰性であった。さらに FACS を利用した解析により d4Venus 陽性細胞画分には自己複製能と多分化能を有する神経幹細胞が濃縮されることが確認された。

B. 成体脳で新生したニューロンの移動のメカニズムを解明

成体脳の側脳室周囲の脳室下帯(Subventricular Zone, SVZ)で生まれた新生ニューロンの後ろから前への方向性をもった移動には、上皮細胞の繊毛の運動によって生ずる髄液流により形成される化学発因子 Slit 蛋白質の濃度勾配が必須であることを明らかにした。細胞移動の新しい概念を提出するものとして、Cell 誌の解説記事にも取り上げられた (Sawamoto et al., Science, 2006)。

C. Notch シグナルの可視化に成功

昨年度同グループが報告した活性化型 Notch1 特異抗体を用いた免疫染色は、固定し

た標本を用いたものであり、生きた細胞におけるNotchシグナルの活性化状況をモニターするものではない。そこで我々は Notch シグナルの標的遺伝子 *hes1* プロモーターおよび Notch シグナルの下流転写因子 RBP-J の結合配列制御下に改変型 YFP (Yellow Fluorescent Protein) 蛋白 Venus の DNA 配列を結合した遺伝子を持つレポーターシステムを作成した(Kohyama et al., *Dev Biol*, 2005)。

D. 神経細胞樹状突起への mRNA 輸送メカニズムの解析

小脳のプルキンエ細胞のシナプス可塑性に重要な役割を果たす1型 IP3 受容体の mRNA は、同細胞の樹状突起に輸送されることが知られているがその詳細なメカニズムは不明であった。本研究では、同 mRNA の 3'UTR に輸送に関わる cis エlementが存在し、同 mRNA の 3'UTR に結合し樹状突起への輸送に関わる RNA 結合蛋白質 HZF を同定し、その機能解析を培養細胞レベル、ノックアウトマウスを用いた個体レベルで行い、HZF が同 mRNA への輸送に重要な役割を果たすことを示した(Iijima et al., *PNAS*, 2005)。

E. 神経系特異的 RNA 結合蛋白質 Hu による神経分化制御機構の解析

Hu は CDK 抑制因子 p21、p27 など細胞周期の制御に関わる因子、および GAP43、NF-M、Tau など神経分化に関わる因子の発現を転写後調節により促進することが報告されている。これらの知見から、Hu が細胞周期の制御と神経分化プロセスのそれぞれの過程に関わる複数の標的因子の発現を制御することにより、分裂/分化のスイッチングを統合的に管理する指揮者のような役割を担っていることが予想された。我々はその分子機序を解明するため、Hu と複合体を形成する因子の精製および同定を試みた。組み換えアデノウイルスによる Hu 強制発現系を用いて培養細胞および培養神経幹細胞から Hu と複合体を形成する因子の精製を試み、少なくとも3つのタンパク質が全長 Hu と RNA 非依存的に結合することを明らかにした。質量分析を行った結果、Hu に結合するタンパク質の一つは hnRNPK (RNA 結合タンパク質)であり、hnRNPK は Hu に直接結合していることが確かめられた。hnRNPK は翻訳抑制因子として知られており、15-LOX の発現を抑制することにより赤芽球の分化を制御することが報告されている。これらの因子の細胞周期および神経分化に与える影響について神経芽細胞腫株 N1E-115 細胞を用いて調べた結果、hnRNPK は Hu に結合するのみならず、Hu の細胞周期抑制機能および神経分化促進機能の両方を量依存的に阻害することが明らかとなった。さらに Hu の下流標的分子であり Hu によりタンパク質発現が促進されることが知られる CDK 抑制因子 p21^{CIP1} mRNA の翻訳に対しても、hnRNPK はその 3' 非翻訳領域の CU rich 配列に特異的に結合し、翻訳に対し抑制的に働くことが示された。また p21 に対する siRNA を用いた実験により、p21 が Hu の下流遺伝子として分化誘導及び細胞周期の停止に深く関わっていることが示され、この Hu-p21 経路が hnRNPK により量依存的に抑制されることがわかった。これらの結果により、2つの RNA 結合蛋白質 Hu と hnRNPK が p21 の転写後調節を介して拮抗的に働いて、細胞の増殖から神経分化へのタイミングをコントロールしていることが示唆された(Yano et al., *J Biol Chem*, 2005)。

F. 脊髄損傷に対する神経幹細胞移植法の改良

脊髄再生を目指した基礎研究につき下記のような成果を得た。

- a. ラット脊髄損傷に対するコラーゲンゲルタイプ1を用いた神経幹細胞移植の有効性の立証
- b. ラット脊髄損傷に対する肝細胞栄養因子の有効性を立証した。
- c. 損傷脊髄に対するラット嗅粘膜由来グリア細胞移植の有効性を立証した。
- d. Bio-imagingを用いて損傷脊髄に対する神経幹細胞の移植時期を明らかにした (Okada et al., FASEB J., 2005)。
- e. ラット脊髄損傷に対するセマフォリン3A阻害剤の有効性を立証した。
- f. ラット損傷脊髄に対する神経幹細胞移植とコンドロイチナーゼABCの併用の有効性を立証した(Ikegami et al., Eur. J Neurosci, 2005)。
- g. 自家組織(鼻粘膜、骨髄、皮など)からの神経幹細胞の培養に成功した。
- h. 損傷程度の異なるサル脊髄損傷モデルを確立した(Iwanami et al., J Neurosci Res, 2005a)。
- i. サル脊髄損傷に対するヒト神経幹細胞移植の有効性を立証した(Iwanami et al., J Neurosci Res, 2005b)。
- j. サル脊髄損傷に対するガレクチン遺伝子導入ヒト神経幹細胞移植の有効性を立証した。
- k. 脊髄損傷におけるreactive astrocyteの役割の新しい側面を解明 (Okada et al., Nat Med, 2006)

業績目録 (抜粋)

原著論文

- 1.Uemura O, Okada Y, Ando H, Guedj M, Higashijima S, Shimazaki T, Chino N, Okano H, Okamoto H: Comparative functional genomics revealed conservation and diversification of three enhancers of the *Isl1* gene for motor neuron and sensory neuron-specific expression. **Dev. Biol.** 278: 587-606, 2005.
- 2.Nakamura Y, Yamamoto M, Miyado K, Okano HJ, Fukagawa R, Higaki K, Yamasaki M, Okano H.: A novel marker for Purkinje cells, KIAA0864 protein. An analysis based on a monoclonal antibody HFB-16 in developing human cerebellum. **J Histochem Cytochem** 53: 423- 430, 2005.
- 3.Iwanami A, Yamane J, Katoh H, Nakamura M, Momomoshima S, Ishii H, Tanioka Y, Tamaoki N, Nomura T, Toyama Y, Okano H: Establishment of Graded Spinal Cord Injury Model in a Non-human Primate: the Common Marmoset. **J. Neurosci,Res.** 80: 172-181, 2005.

4. Iwanami, A., Kakneko, S., Nakamura, M., Kanemura, Y., Mori, H., Kobayashi, S., Yamasaki, M., Momoshima, S., Ishii, H., Ando, K., Tanioka, Y., Tamaoki, N., Nomura, T., Toyama, Y. and Okano, H.: Transplantation of human neural stem/progenitor cells promotes functional recovery after spinal cord injury in common marmoset. **J. Neurosci., Res.** 80: 182-190, 2005.
5. Yano M, Okano HJ, Okano H: Involvement of Hu and hnRNP K in neuronal differentiation through p21 mRNA post-transcriptional regulation. **J. Biol. Chem.** 280: 12690-12699, 2005.
6. Tamura M, Nakamura M, Ogawa Y, Toyama Y, Miura M and Okano H: Targeted expression of anti-apoptotic protein, p35, in oligodendrocytes reduces delayed demyelination and functional impairment after spinal cord injury. **Glia** 51: 312-321, 2005.
7. Yoda A, Kouike H, Okano H and Sawa H.: Components of the transcriptional Mediator complex are required for asymmetric cell division in *C. elegans*. **Development** 132: 1885-1893, 2005.
8. Pignatelli A, Kobayashi K, Okano H, Belluzzi O: Functional responses of dopaminergic neurons in the mouse olfactory bulb. **J. Physiol.** 564: 501-514, 2005.
9. Yuasa S, Itabashi Y, Koshimizu U, Tanaka T, Sugimura K, Fukami S, Itabashi Y, Hattori F, Shinazaki T, Ogawa S, Okano H and Fukuda K.: Transient inhibition of BMP signaling by Noggin induces cardiomyocyte differentiation of mouse embryonic stem cells. **Nature Biotech.** 23: 607-611, 2005.
10. Kambara H, Okano H, Chiocca A, Saeki Y: An oncolytic HSV1 mutant expressing ICP34.5 under control of a nestin promoter increases survival of animals, even when symptomatic from a brain tumor. **Cancer Research** 65: 2832-2839, 2005.
11. Yamashita T, Sawamoto K, Suzuki S, Suzuki N, Adachi K, Kawase T, Mihara M, Ohsugi Y, Abe K, Okano H.: Blockade of IL-6 signaling aggravates ischemic cerebral damage in mice. **J. Neurochem.** 94: 459-468, 2005
12. Matsuda Y, Wakamatsu Y, Kohyama J, Okano H, Fukuda K, Yasugi S: Notch signaling functions as a binary switch for the determination of glandular and luminal fates of endodermal epithelium during chicken stomach development. **Development** 132: 2783-2793, 2005.
13. Yoshimi K, Ren Y.-R., Seki T, Yamada M, Hayakawa H, Ooizumi H, Onodera M, Saito Y, Maruyama S, Okano H, Mizuno Y, Mochizuki H.: Possibility of neurogenesis in substantia nigra of parkinsonian brain. **Ann Neurol** 58: 31-40, 2005

14. Islam MO, Kanemura Y, Tajria J, Mori H, Kobayashi S, Miyake J Hara M, Yamasaki M, Okano H: Characterization of ABC transporter, ABCB1 expressed in human neural stem/progenitor cells. **FEBS Lett.** 579: 3473-3480, 2005.
15. Sasaki E, Hanazawa K, Kurita R, Akatsuka A, Yoshizaki T, Ishii H, Tanioka Y, Ohnishi Y, Suemizu H, Sugawara A, Tamaoki N, Izawa K, Nakazaki Y, Hamada H, Suemori H, Asano S, Nakatsuji N, Okano H, Tani K.: Establishment of novel embryonic stem cell lines derived from the common marmoset (*Callithrix jacchus*). **Stem Cells** 23:1304-1313, 2005.
16. Hishikawa K, Marumo T, Miura S, Nakanishi A, Matsuzaki Y, Shibata K, Ichiyangi T, Kohike H, Komori T, Takahashi I, Takase O, Imai N, Yoshikawa M, Inowa T, Hayashi M, Nakaki T, Nakauchi H, Okano H, Fujita T: Muscclin/MyoR is expressed in kidney sidepopulation cells and can regulate their function. **J. Cell Biol.** 169: 921-928, 2005.
17. Sahara M, Sata M, Matsuzaki Y, Tanaka K, Morita T, Hirata Y, Okano H, Nagai R: Comparison of various bone marrow fractions in the ability to participate in vascular remodeling after mechanical injury. **Stem Cells** 23: 874-878, 2005.
18. Tonchev AB, Yamashita T, Sawamoto K., Okano H: Enhanced proliferation of progenitor cells in the subventricular zone and limited neuronal production in the striatum and neocortex of adult macaque monkeys after global cerebral ischemia. **J. Neurosci Res.** 81:776-788, 2005.
19. Matsumoto T, Okamoto R, Yajima T, Mori T, Okamoto S, Ikeda Y, Mukai M, Yamazaki M, Oshima S, Tsuchiya K, Nakamura T, Kanai T, Okano H, Inazawa J, Hibi T, Watanabe M. Increase of bone marrow-derived secretory lineage epithelial cells during regeneration in the human intestine. **Gastroenterology** 128:1851-1867, 2005.
20. Okada S, Ishii K, Yamane J, Iwanami A, Ikegami T, Iwamoto Y, Nakamura M, Miyoshi H, Okano HJ, Contag CH, Toyama Y, Okano H: In vivo imaging of engrafted neural stem cells: its application in evaluating the optimal timing of transplantation for spinal cord injury. **FASEB J.** 19:1839-41, 2005.
21. Tomita Y, Wakamatsu Y, Shibuya I, Matsumura K, Kawaguchi H, Hisaka Y, Matsuzaki Y, Osumi N, Ogawa S, Okano H and Fukuda K: Cardiac neural crest cells as dormant multipotent stem cells, identified as side population cells. **J. Cell Biol.** 170: 1135-1146, 2005.
22. Kohyama J, Tokunaga A, Fujita Y, Miyoshi H, Nagai T, Miyawaki A, Nakao K, Matsuzaki Y and Okano H: Visualization of spatio-temporal activation of Notch signaling: live monitoring and

significance in neural development. **Dev. Biol.** 286: 311-325, 2005.

23. Kanuka, H., Kuranaga, E., Hiratou, T., Okano, H. and Miura, M.: Drosophila Caspase transduce Shaggy/GSK-3 β activity in neural precursor development. **EMBO J** 24: 3793-3806, 2005

24. Yamamoto S, Yoshino I, Shimazaki T, Murohashi M, Lax I, Okano H, Shibuya M, Sclegginger J, Gotoh N: Essential role of Shp2-binding sites on FRS2{alpha} for corticogenesis and for FGF2-dependent proliferation of neural progenitor cells. **Proc.Natl.Acad.Sci.USA**102: 15983-15988, 2005.

25. Ikegami T, Nakamura M, Yamane J, Katoh H, Okada S, Iwanami A, Kota W, Ishii K, Kato F, Fujita H, Takahashi T, Toyama Y, Okano H: Chondroitinase ABC combined with neural stem/progenitor cell transplantation enhances their migration and axonal regeneration after rat spinal cord injury. **Eur J Neurosci** 22: 3036-3046, 2005

26. Iijima T, Imai T, Kimura Y, Bernstein A, Okano HJ, Yuzaki M, Okano H. : RNA-binding protein HZF specifically binds to 3'-untranslated region of type1 inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor mRNA and is involved in its dendritic localization. **Proc.Natl.Acad.Sci.USA**102: 17190-17195, 2005.

27. Matsumoto A, Okada Y, Nakamichi M, Nakamura M, Aoki M, Sobue G, Itoyama Y, Okano H: Disease progression of SOD1 (G93A) ALS model rats. **J. Neurosci Res** 83: 119-133, 2006.

28. Sugiyama-Nakagiri Y, Akiyama M, Shibata S, Okano H, Shimizu H: Expression of RNA-binding protein Musashi in hair follicle development and hair cycle progression. **American J.Pathology** 168: 80-92, 2006

29. Fujioka M, Kanzaki S, Okano HJ, Masuda M, Ogawa K, Okano H: Proinflammatory cytokines expression in noise-induced damaged cochlea. **J. Neurosci Res** 83: 575-583, 2006.

30. Kawada H, Takizawa S, Takanashi T, Morita Y, Fujita J, Fukuda K, Takagi S, Okano H, Ando K, Hotta T: Administration of hematopoietic cytokines in the subacute phase after cerebral infarction is effective for functional recovery facilitating proliferation of intrinsic neural stem cells and transition of bone marrow-derived neuronal cells. **Circulation** 113: 701-710, 2006.

31. Nishimura T, Yamaguchi T, Tokunaga A, Hara A, Hamaguchi T, Katsuhiko Kato K, Iwamatsu A, Okano H, and Kaibuchi K: Role of Numb in dendritic spine development with a Cdc42 GEF intersectin and EphB2 **Mol. Biol. Cell.** 17: 1273-1285, 2006.

32. Toriya M, Tokunaga A, Sawamoto K, Nakao K, Okano H: Distinct functions of human Numb isoforms revealed by misexpression in neural precursor cells in Drosophila larval brain. **Dev. Neurosci.** 28: 142-155, 2006.
33. Sawamoto, K., Wichterle H, Gonzalez-Perez O, Cholfin JA, Yamada M, Spassky N, Murcia NS, Garcia-Verdugo JM, Martin O, Rubenstein JL, Tessier-Lavigne M, Okano H, Alvarez-Buylla, A: New neurons follow the flow of cerebrospinal fluid in the adult brain. **Science** 311: 629-631, 2006.
34. Sakaguchi M, Shingo T, Shimazaki T, Okano HJ, Shiwa M, Ishibashi S, Oguro H, Ninomiya M, Kadoya T, Horie H, Shibuya A, Mizusawa H, Poirier F, Nakauchi H, Sawamoto K, Okano H: A carbohydrate binding protein, Galectin-1, promotes proliferation of adult neural stem cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 103: 7112-7117, 2006.
35. Artaamangkul S, Torrecilla M, Kobayashi K, Okano H and Williams JT: Separation of Mu opioid receptor desensitization and internalization. **J. Neurosci.** 26: 4118-4125, 2006.
36. Rawal N, Castelo-Branco G, Sousa KM, Kobayashi K, Okano H, Arenas E: Spatial and temporal expression dynamics of Wnt signaling components in the developing midbrain. **Exp. Cell Res.** 312: 1626-1636, 2006.
37. Miyagi S, Nishimoto M, Saito T, Ninomiya M, Sawamoto K, Okano H, Muramatsu M, Oguro H, Iwama A, Okuda A.: The *Sox2* regulatory region 2 functions as a neural stem cell specific enhancer in the telencephalon. **J Biol. Chem.**, 281:13374-13381, 2006.
38. Murata J, Tokunaga A, Okano H, Kubo T: Notch1 activation demonstrated *in situ*, during mouse cochlear development. **J. Comp. Neurol.** 497:502-518, 2006.
39. Tonchev AB, Yamashita T, Sawamoto K., Okano H: Transcription factor protein expression patterns by neural or neuronal progenitor cells of adult monkey subventricular zone. **Neuroscience** 139:1335-1367, 2006
40. Hara T, Nakamura K, Nakahara Y, Migishima R, Yokoyama M, Okano H, Mizushima N.: Suppression of autophagy in neural cells causes a neurodegenerative disease. **Nature**, 441:885-889, 2006.
41. Okada S, Ishii K, Miyao T, Shimzakai T, Katoh H, Yamane J, Yoshimura A, Iwamoto Y, Nakamura M, Toyama Y, Okano H.: Conditional ablation of STAT3/SOCS3 discloses a dual role for reactive astrocytes after spinal cord injury. **Nat. Med.** In Press, 2006.

42. Arata Y, Kouike H, Zhang Y, Herman M, Okano H, Sawa H.: Wnt signaling and a Hox protein cooperatively regulate PSA-3/MEIS to determine daughter cell fate after asymmetric cell division in *C. elegans*. **Dev. Cell** In Press, 2006.

総説

1. Okano H, Kawahara H, Toriya M, Nakao K, Shibata S, Takao I: Function of RNA binding protein Musashi-1 in stem cells. **Exp. Cell Res.**306: 349-356, 2005.

2. Okano H, Okada S, Nakamura M, Toyama Y: Neural Stem Cells and Regeneration of Injured Spinal Cord. **Kidney International** 68: 1927-1931, 2005.

3. Nakamura M, Okada S, Toyama Y, Okano H: Role of IL-6 in spinal cord injury in a mouse model. **Clinical Reviews in Allergy & Immunology** 28: 197-204, 2005.

4. Okano H, Kohyama J, Ohba H, Sakaguchi M, Tokunaga A, Shimazaki T, Okano HJ: Neural stem cells: Isolation and self-renewal. In **Tissue Stem Cells; Biology & Applications**. (Edited by Potten, Wilson, Clarke, Renehan, Marcel Dekker), Taylor & Francis Group, LLC, New York, pp. 55-70, 2006.

5. Okano H: Transplantation of neural stem cells for spinal cord regeneration. In **Encyclopedic References of Neuroscience** (Edited by Binder D, Hirokawa N and Windhorst U) Springer-Verlag (Heidelberg, Germany), In Press, 2006.