九州大学学術情報リポジトリ
Kyushu University Institutional Repository

[0017]九州大学生体防御医学研究所年報 : 2002年

https://doi.org/10.15017/6249

出版情報：九州大学生体防御医学研究所年報. 17, 2003-07. 九州大学生体防御医学研究所
バージョン：
権利関係：

感　染　防　御　研　究　セ　ン　タ　ー
Research Center for Prevention of Infectious Diseases

感染防御学分野
Division of Molecular Immunology

当部門での研究目的は、免疫系の分化、免疫応答機構の解明とその制御、それらの異常によって生ずるアレルギー病、自己免疫病、免疫不全症の解明である。研究方法として、免疫学的、分子生物学的、発生工学的手法を駆使して行っている。すなわち、免疫系の分化および免疫応答の機構を、分子レベル及び細胞レベルさらには個体レベルで解析して、免疫細胞の分化および免疫反応の制御機構を解明する研究を推進するとともに、その制御機構の破綻によって生じる自己免疫病、アレルギーの解析と治療法の確立や難治感染症の新しい治療法の開発を目指している。また、免疫学的方法によるヒト癌の診断と治療法の開発についても鋭意、研究を進めている。さらにこれらの疾病の治療法の開発に向けての研究を行っている。
また、癌の免疫療法についても新たな視点から研究を推進しており、特に免疫監視機構からの癌の逸脱（Escape）機構に関わる新しい分子、RCAS1（２２−１−１抗原）の機能の解明に向けて鋭意研究を行っている。免疫細胞、特にＢ細胞の増殖、分化、細胞死の制御機構に関与する分子、遺伝子の同定および機能解析を通してその制御機構の解明を行っている。

さらに、２年前より、新たな immunological intervention の展開を目指して、造血幹細胞を用いる人工免疫組織の構築に向けた研究に力を入れている。特に、ヒト人工リンパ節の構築を試みている。本研究の目的は、リンパ組織の立体的構築について時間的、空間的に細胞レベル、分子レベルで解明すること、および AIDS などの重症感染症、免疫不全症、あるいはガン、さらにアレルギー、自己免疫病の有効かつ迅速な治療法としてへの応用を目指すことである。

２００２年（平成１４年）度は昨年に引き続き、(1)Ｂ細胞抗原受容体からシグナル伝達機構と遺伝子発現制御およびその異常によって発症する自己免疫病の解析にむけての研究、特に、自己抗原反応性の未熟Ｂ細胞がアポトーシスにより除去される機構について、抗原受容体からシグナルによって誘導される新規の分子、iWH37 の機能解析を中心に行っている、(2)プレＢ細胞受容体およびＢ細胞抗原受容体からのシグナル伝達機構の解析、(３) 我々の研究室で作製されたヒスタミン H1 およびＨ２受容体遺伝子欠損マウスでの免疫異常の解析、特に、Th1 型自己免疫病におけるヒスタミン受容体、Ｇタンパク結合型受容体からのシグナルの役割についての解析、(４)癌抗原の分子生物学的遺伝子学的研究および癌の免疫監視機構からの逸脱に関わる分子、RCAS1 の解明、(５)生体適合材料を用いたハイブリッド型人エリンパ節の構築、等を主な研究テーマして研究を進めた。

２００２年（平成１４年）における主な人事異動は次のとおりである。助手の中島　学君、末松佐知子さんは、引き続き助手として研究に従事している。平成９年度から大学院学生であったナスリン・バヌーさんは一身上の都合で母国に帰国された。平成１０年度からの大学院生である久原尚子さんは引き続き研究を続けている。また平成１１年４月から前沢　浩君、平成１１年５月に MD-PhD コースの学生として入学してきた老籾英毅君の両君は大学院生として研究を続けている。研究補助員の古賀律子さんは引き続き研究を行っている。事務補助員の今奈良　香さんは引き続き勤務している。２００３年２月には米国アラバマ大学バーミンガム校のピーター・バロース教授が

訪問研究員として来日され共同研究を実施した。タイ国の Mahidol 大学からの留学生 Kawin Leelawat 君は 1 年間の研究を修了して帰国した。同君はバンコックの Rajavithi 病院外科に勤務するかたわら Mahidol 大学医学部にて引き続き我々との共同研究を続けている。

A. 免疫細胞の分化、活性化、細胞死に関与する機構の解析

a . 自己抗原反応性未熟Ｂ細胞の細胞死に関わる分子、iWH37, の解析

マウスＢ細胞株 WEHI-231 を抗 IgM 抗体で架橋すると 24 時間以降にアポトーシスに陥る。この場合、カスパーゼの活性化と DNA の切断が誘導及び細胞膜透過性の亢進を引き起こすこと、カスパーゼの活性化には新規タンパクの合成が必要であること、この新規タンパクの合成はＢ細胞抗原受容体(BCR) からのシグナルが関与すること、その新規タンパクの候補分子として iWH37 を単離したことを昨年度までに示した。カスパーゼ阻害剤 Z-VAD は核の分画化、DNA 切断を完全に阻止するが、細胞膜透過性の亢進は阻止しない。マウス未熟Ｂ細胞株である WEHI-231 細胞では BCR 刺激後、膜透過性の亢進に先立って、ミトコンドリア膜電位の変化および活性酸素の増加が生ずる。BCR からの Death signal はまずミトコンドリアに伝達され、その後にカスパーゼの活性化と DNA 切断及び膜透過性の亢進が生ずると考えられた。即ち、自己反応性未熟Ｂ細胞では、抗原受容体からのシグナルはまずミトコンドリアを標的して伝達され、その後にアポトーシス及びネクローシスの反応が引き起こされると考えられた。この系にタンパク合成阻害剤シクロヘキシイミドを加えておくと、ミトコンドリア膜電位の変化および活性酸素の増加は６０−７０％抑制された。抗原受容体からからのシグナルによる新たな蛋白の合成が、抗 IgM 抗体の架橋によるアポトーシス誘導には深く関わっていることがわかった。抗 IgM 抗体で架橋して刺激 (１２時間) した WEHI-231 細胞から cDNA library を作製し、ミトコンドリア膜電位の変化を指標として、ミトコンドリア膜をアタックする新規のタンパク分子の探索を行い、5 種類以上の新規候補タンパクを同定単離した。その中で iWH37 という cDNA クローンに注目した。iWH37 は WEHI-231 細胞を抗 IgM 抗体で架橋することによりその発現が誘導されること、未熟骨髄Ｂ細胞では、抗 IgM 刺激で発現が誘導されること、成熟Ｂ細胞ではその発現が抗 IgM 抗体で架橋で強く抑制されること、Flag-tag iWH37 タンパクはミトコンドリアに局在すること、iWH37 タンパクはミトコンドリア膜に存在するイオンチャンネル VDAC に結合すること、さらに Bak タンパクと結合すること、iWH37 を高発現させた WEHI231 細胞や COS7 細胞では細胞死が誘導されることなどから、ミトコンドリア膜をアタックして細胞死を誘導する分子の可能性が高いことを示した (古賀律子、渡邊　武)。

b. プレＢ細胞受容体からのシグナルとＢ細胞初期分化

プレＢ細胞受容体からのシグナルによるＢ細胞初期分化の制御機構についてはこれまで充分に解明されていない。マウスプレＢ細胞をプレＢ細胞受容体の架橋により刺激すると、３６kDa のタンパクがチロシンリン酸化を受けることを見出した。教室の大屋は、種々の抗体を用いたウエスタンブロットにより、このタンパクが LAT 分子である可能性が示した。LAT 分子はＴ細胞にのみ発現されるシグナル伝達のアダプター分子として重要であることは、この分子を欠損させたマウスではＴ細胞分化の障害、Ｔ細胞活性化の低下を示すことから明らかである。この分子がプロＢ細胞、プレＢ

細胞でも発現されていることを大屋が見出した。しかし、LAT 分子は未熟Ｂ細胞以後の成熟Ｂ細胞では全く発現されていない。プレＢ細胞受容体を刺激すると、LAT タンパクの発現が強く抑制された。すなわち、プレＢ細胞受容体からのシグナルは LAT の発現に対して負の制御を行っていると考えられた。このような幼若Ｂ細胞における LAT 分子の機能とその発現およびプレＢ細胞受容体シグナルによる発現抑制の意味について研究するために、Ig heavy chain エンハンサーに LAT cDNA を結合させて、LAT 分子をＢ細胞で発現させたトランスジェニックマウスを作製した。このトランスジェニックマウスの末梢血を調べたところ、Ｂ細胞数が著明に減少していた。リンパ節におけるＢ細胞数も著しく減少していた。しかし、Ｔ細胞数には変化は見られず、胸腺も正常であった。骨髄細胞では、未熟Ｂ細胞の減少が著明であったが、プレＢ細胞数はやや増加していた。残っている末梢のＢ細胞を、抗 IgM 抗体、LPS で刺激するとその反応は正常であった。以上の結果は、マウスのプロＢ、プレＢ細胞に発現している LAT 分子はＢ細胞初期分化の負の制御分子として働いている可能性が示唆された。また、未熟Ｂ細胞受容体からのシグナル伝達を阻害するが成熟Ｂ細胞受容体からのシグネル伝達には何ら影響を与えないことが示された（大屋和也、渡邊　武）。

Ｂ．ヒスタミン受容体シグナルの免疫反応の制御について

ヒスタミンはよく知られているようにアレルギー症状の発症に関与している活性アミンであるが、免疫反応への作用についてはこれまで余り研究されて来なかった。しかし、この数年の我々を含めた研究から、造血細胞、免疫細胞上にはヒスタミン受容体、H1, H2, H4 が種々の程度で発現されている、ヒスタミンは免疫細胞の機能に影響を与えていること、マスト細胞のみならずマクロファージなどの細胞もヒスタミンを産性することがわかってきた。すなわち、ヒスタミンは単なる防御分子としてだけではなく、自然免疫の一翼を担い、さらに獲得免疫の制御に関与していることが予想された。そこで我々はヒスタミン H1 および H2 受容体遺伝子のノックアウトマウスを作成して（H4 遺伝子については作成中）ヒスタミンによる免疫反応の制御について解析を行ってきた。ヒスタミン H1 受容体(H1R) および H2 受容体(H2R) は 7 回膜貫通部位を持ち、三量体型 G-タンパクが共役している受容体である。H1 受容体には特に Gαタンパクとして Gαq サブファミリーが会合していることが報告されている。一方、H2 受容体には Gαs が会合している。

ヒスタミン H1 受容体は、平滑筋、心臓その他多くの組織で発現されており、さらに脳中枢にはヒスタミンニューロンが存在し、覚醒、睡眠、食欲、日内リズムなどの制御に関与していることが示唆されている。我々はこれまでに、ヒスタミン H1 受容体欠損マウスにおいて日内リズムの異常、行動の異常について報告してきた。一方、ヒスタミン H2 受容体は、胃および脳中枢に発現している。ヒスタミン H2 受容体は胃粘膜細胞、特に壁細胞に多く発現されており、従来より胃酸分泌の促進制御に重要であることが知られている。そこで、H2 受容体遺伝子ノックアウトマウスにおける胃の変化について調べた。予想に反して、ノックアウトマウスの胃酸度は正常であった。しかし、H2 受容体アンタゴニストには全く反応しなかった。一方、H2 受容体遺伝子ノックアウトマウスでは、胃壁が異常に厚くなり、趨壁は巨大になり、胃の hypertrophy が著明となった。また、その壁細胞の構造は異常であった。これらの結果から、H2 受容体からのシグナルは、胃酸分泌の制御のみならず、胃壁細胞、ECL 細胞の増殖の調節、構造維持に重要な機能を有していることが初めて明らかになった。

６ヶ月から一年ぐらいになると、H2 受容体遺伝子ノックアウトマウスの胃はさらに巨大となり、胃壁構造は異常となる。さらに血清アルブミン値が低下してくる。これは、ヒトの病気、メネトリエル病に酷似している。

ヒスタミン受容体欠損マウスの作成し、免疫能および即時型アレルギー反応について解析した。ヒスタミン H1 受容体欠損マウスの T 細胞あるいは B 細胞をそれぞれ、抗 CD3e 抗体あるいは抗 IgM 抗体で架橋して細胞増殖を誘導させると、wild マウスのそれに比べて細胞増殖反応の低下が見られた。そのような増殖反応の低下はマイトゲンや種々のサイトカイン（IL2, IL4, IL7）や CD40L などの刺激では見られず、抗原受容体からの情報伝達に特異的であった。さらに正常脾細胞よりマスト細胞を除去した後に、抗 CD3e 又は抗 IgM で刺激して生ずる細胞増殖反応はヒスタミンの添加により増強された。H1R 欠損マウスの脾細胞ではそのような増強作用は見られなかった。以上の結果は、三量体型 G-タンパクからのシグナルが抗原受容体からのシグナル伝達に対して正の制御を行っていることを示している。

さらに、ヘルパー T 細胞上のヒスタミン H1、H2 受容体からのシグナルはヘルパー T 細胞の活性化に重要な制御機能を果たしていることがわかった。すなわち、Th1 細胞上にはヒスタミン H1 受容体が優位に発現されているが、ヒスタミン H2 受容体の発現は低い。一方、Th2 細胞上には H2 受容体が優位に発現されているが、H1 受容体の発現は低い。Th1 細胞上のヒスタミン H1 受容体からのシグナルは Th1 細胞の活性化に正の制御を行い、IFNγの産生を増強させる。従って、H1R 欠損マウスの T 細胞では、抗原刺激後の IFNγの産生が非常に低くなる。Th2 細胞の活性化には負の制御をしていることが明らかとなった。一方、ヒスタミン H2 受容体もまた、ヘルパー T 細胞上に発現されているが、ヒスタミン H2 受容体からのシグナルは Th2 細胞、Th1 細胞の活性化を抑制し、負の制御を行っていることが示された。すなわち、H2R 欠損マウスの T 細胞では、サイトカイン産生がいずれも非常に亢進する。以上の結果から、H1 受容体と H2 受容体が免疫細胞の活性化に対して拮抗的に働いていることがわかった。

ヒスタミンは即時型アレルギーの初期には発症の引き金となっているが、最終的には、Th1 細胞を活性化し、Th2 細胞の活性化を抑制することから、アレルギー反応を終息させる効果を持っていることを世界ではじめて示した。

樹状細胞上にもヒスタミン H1、H2 受容体は発現されている。骨髄細胞から GM-CSF を用いて誘導した樹状細胞を用いて、正常、H1R 欠損マウス、H2R 欠損マウスの樹状細胞のサイトカイン分泌能を調べた。H2R 欠損マウスの樹状細胞では IL-10 の産性の亢進が顕著であり、IL-12 の産性が逆に低下していた。すなわち、樹状細胞では、ヒスタミンは H2 受容体を介して、IL-10 の産性を正に制御し、IL-12 のそれを負に制御しているという結果が得られた。

即時型アレルギー反応について調べた。H1R 欠損マウスでは、IgE が引き金となる即時型アレルギー反応は殆ど完全に消失する。一方、ヒスタミン H2 受容体欠損マウスでは即時型アレルギー反応は正常であった。以上の結果から、アレルゲン特異的な IgE 抗体を介するヒスタミンによる初期のアレルギー反応はヒスタミン H1 受容体を介して起こることが明快に示された(古賀律子、渡邊　武)。

C. 22-1-1 抗体と癌関連抗原 RCAS-1

我々が確立したヒト子宮頸部腺癌細胞 SiSo に対するモノクローナル抗体を作成して、「22-1-1 抗体」と命名した。モノクローナル抗体「22-1-1」が認識する癌関連抗原は、その発現が癌細胞に比較的特異的であること、癌の進展とその発現がパラレルであること、子宮癌、大腸癌、肺癌などでの臨床における５−１０年の経過観察から、22-1-1 抗原陽性の癌ではその予後が陰性の場合に比べて悪いこと等がわかってきた。すなわち、「22-1-1」抗体が認識する抗原の発現は癌の進展、悪性度と強い相関関係がある。免疫組織染色法にて 22-1-1 抗原は子宮頚部腺癌以外にも子宮頚部扁平上皮癌、卵巣癌、胃癌、大腸癌、乳癌、食道癌、膵臓癌、皮膚癌等にも高率（70-90%陽性率）に発現している。一方、これらの臓器では、胃腺上皮細胞の正常細胞内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。さらに腫瘍細胞の進達度とその発現の強さが関連していること、本抗原の発現と生存率の関係において抗原陽性例が抗原陰性例と比べて有意に低いこと、さらに臨床的に癌細胞と識別が困難な異形成細胞においてはその発現が認められない点において、この抗原が癌関連抗原分子として非常に興味が持たれる。従って、22-1-1 抗体は新しい腫瘍マーカーとして、癌の免疫学的診断、経過観察、治療等において非常に有用である（抗体はすでに市販されている）。

癌患者の血清中にも可溶性の 22-1-1 抗体が結合する抗原が存在することがわかり、血清中の抗原を測定しうる ELISA を作製してキット化した。肺癌、大腸癌、胆嚢癌、膵臓癌などで、６０−７０％の陽性率が得られた。特に、膵臓癌では高率に陽性となるが、慢性膵臓炎では陰性であることから、従来より診断に用いられている CA19-9 （慢性膵臓炎でしばしば陽性となる）に比べてもより特異的な腫瘍マーカーであることがわかった。臨床への応用に向けて企業と準備している。

この新しい癌関連抗原分子の機能の解析を目的として、22-1-1 抗体が認識する抗原分子の一つとして、213 個のアミノ酸より成る 23~24kDa のコア蛋白分子（RCAS1）を同定した。N 末端側に膜貫通部（N-terminal transmembran segment ）、C 末端側に coiled-coil 構造が存在する II 型膜蛋白である。 Cos7 細胞にて発現させると、40kDa の分子量をもつ膜タンパクとして同定された。さらに、RCAS1 分子に結合する細胞表面分子（受容体）の存在が確認された。正常活性化ヒトリンパ球においても受容体の存在が確認された。SiSo 細胞の培養上清を結合分子陽性細胞の一つである K562 細胞に加えて培養したところ、細胞増殖の停止とアポトーシスが誘導された。さらにこの反応は 22-1-1 抗体の添加により抑制された。一方、K562 細胞を RCAS1 タンパクとともに培養したところ、細胞死が誘導された。このように、癌細胞に特異的に強く発現している 22-1-1 抗体によって検出される抗原分子（恐らくは RCAS1）は、その受容体分子を発現しているリンパ球系細胞に細胞死を誘導すること事が示された。このことは、癌細胞の免疫系細胞からの逸脱において 22-1-1 抗原が重要な作用を担っている可能性を示唆している。現在、この細胞死誘導機構の解明を目的として、受容体遺伝子の単離を試みている。

さらに、最近、マウスの RCAS1 cDNA の単離にも成功した。マウス RCAS1 cDNA をプローブとしてノーザンブロットを行ったところ、胎生初期(７−８日)に強い発現が見られることがわかった。マウスの系を用いて RCAS1 の発生分化における役割についても検討を加える予定である。また、ジーンターゲティングのために、マウスゲノム遺伝子の単離も行い、ターゲティングマウスの作成を行っている。

SiSo 細胞の培養上清、あるいは RCAS1 タンパクの添加により、受容体陽性細胞では、細胞周期の停止とアポトーシスが誘導される。ヒト末梢血 T リンパ球を活性化して細胞増殖を誘導しこれに RCAS1 タンパクを添加すると、細胞増殖は早期に停止する。この時、cyclin D3 量が 3－6 時間以内に、9 時間以内に PCNA の量的な著明な減少が見られる。さらに、１２時間後には、高リン酸化 Rb 蛋白の量的減少が認められた。しかし、cyclin B, cyclin E, cdk2, cdk4, p16 (ink4a), p21 (Cip1/Waf1), p27 (Kip1), p57 (Kip2)などは全く変化しない。この cyclin D3 および高リン酸化 Rb 蛋白の減少が 22-1-1 抗原、RCAS1 による細胞周期停止機構に深く関わっていることが示唆された。現在、受容体の遺伝子の単離、cyclin D3 および高リン酸化 Rb 蛋白の減少を誘導するシグナル伝達系の解明を行っている。

また、造血系細胞における RCAS1 受容体の発現について第三内科の牟田、松島、生体防御医学研究所（別府）の末広らとの共同研究をおこなった。ヒト末梢血から造血系幹細胞を分離し、種々のサイトカインを添加すると赤芽球系細胞に分化する。

さらに培養を続けると赤血球が生成される。この系において、RCAS1 receptor の発現を検討したところ、分化初期の赤芽球細胞では、９０％以上の細胞で RCAS1 受容体の発現がみられた。しかし、赤血球へと分化するに従って、RCAS1 受容体陽性細胞は減少し、ついには消失する。この RCAS1 受容体陽性赤芽球細胞に SiSo 培養上清あるいは RCAS1 を添加すると強いアポトーシスが誘導された。また、マクロファージに多くの RCAS1 受容体陽性赤芽球細胞が口ゼットを形成している像が観察された。活性化マクロファージでは、膜上に 22-1-1 抗原が発現されており、さらに分泌していることと考えあわせると、RCAS1-RCAS1 受容体相互作用（あるいは、22-1-1 抗原と RCAS1 受容体との相互作用）は、赤芽球の分化、特に大量の赤芽球細胞の細胞死と脱核による赤血球の生成の過程で重油な役割を演じていることが推察された。今後は、RCAS1 およびその受容体の生理学的役割についても研究を推進していく予定である（中島　学、前沢　浩、老籾英毅、Nasreen Banu、久原尚子、渡邊　武）。

Ｄ．人エリンパ節の構築

我々はつぎのような目的を持って生体内で機能するハイブリッド型人エリンパ節の構築と臨床への応用を目指している。(１)病原微生物などに対して、特異的に強力、迅速に感染防御能を発揮し、緊急に患者に提供出来る免疫装置の開発、(２)従来よりヒト免疫細胞を試験管内で抗原刺激を行うことにより抗体の産生、キラーＴ細胞の誘導が行われているが、その効率は良くなく実際に広く臨床的に応用出来るものではない。そこで、体外でも体内でも手軽に使用することが出来、がん細胞（がん抗原）、あるいは毒素や病原性の強い微生物、AIDS などのウイルスなどに対して効率的に迅速で、強力な免疫反応が得られる免疫学的装置の開発、(３)後天的あるいは先天的免疫不全症の新しい治療法の開発、(４)濾胞形成、胚中心形成を試験管内で再現しうるリンパ節様臓器の開発して、免疫組織のオルガノジェネシスをリアルタイムで空間的に分子レベル、細胞レベルで解明する。現在までの成果として、ストローマ細胞、生体適合性材料の三次元骨格、種々のケモカイン、サイトカインを用いて再構成することにより、自然のリンパ節と構造上、類似した人エリンパ節の構築が可能となった。現在、その免疫機能の解析を行っている（末松佐知子、渡邊　武）。

業績目録

原著論文

1. D.Himeji, T.Horiuchi, H.Tsukamoto, K.Hayashi, T.Watanabe, M.Harada: Characterization of caspase-8L: a novel isoform of caspase-8 that behaves as an inhibitor of the caspase cascade. Blood 99: 4070-4078, 2002.
2. M.Jutel, T.Watanabe, M.Akdis, K.Blaser and C.Akdis: Immune regulation by histamine. Current Opinion in Immunology, 14:735-740, 2002
3. R. Z. Ma, J. Gao, P. D. Fillmore, N. D. Meeker, K. S. K.Tung, T.Watanabe, J. F. Zachary, H. Offner, E. P.Blankenhorn, and C. Teuscher. Identification of *Bphs*, an autoimmune disease locus, as histamine receptor H1. Science 297: 620-623, 2002.
4. R.Bahar, J.O-Wang,K.Kawamura, M.Semiya, Y.Wang, M.Hatano, S.Okada, T.Tokuhisa, T.Watanabe and M.Tagawa: Growth retardation, polyploidy and multinucleation induced by Clast3, a novel cell cycle-regulated protein. J. Biol. Chem. 277: 40012-40019, 2002
5. S. Oizumi, K. Yamasaki , M. Nakashima, T. Watanabe,T.Hommura, S.Ogura, R.Kayasuga, Y.Sugimoto, T.Watanabe and C.Kamei: Participation of chemical mediators other than histamine in nasal allergy signs; a study using mice lacking histamine H1 receptor. European. J. Pharmacology 449: 287-291, 2002
6. M.Nishimura, H.Dosaka-Akita: RCAS1 expression, A potential prognostic marker for adenocarcinomas of the lung. Oncology, 62: 333-339, 2002.
7. R. Z. Ma, J. Gao, P. D. Fillmore, N. D. Meeker, K. S. K.Tung, T.Watanabe, J. F. Zachary, H. Offner, E. P.Blankenhorn, and C. Teuscher. Identification of *Bphs*, an autoimmune disease locus, as histamine receptor H1. Science 297: 620-623, 2002.
8. J.I.Mobarakeh, S.Sakurai, T.Hayashi, T.Orito, T.Sakurada, T.Watanabe, T.Watanabe, K.Yanai: Enhanced antinociception by intrathecally administered morphine in histamine H1 receptor gene knockout mice. Neuropharmacology 2002 (in press)
9. K.Izushi, H.Nakahara, N.Tai, M.Mio, T.Watanabe and C.Kamei: The role of histamine H1 receptors in late phase reaction of allergic conjunctivitis. Eur. J. Pharmacology. 440: 79-82, 2002.
10. M.Enjoji, M.Nakashima, H.Nishi, I.Choi, H.Oimomi, R.Sugimoto, K.Kotoh, K.Taguchi, M.Nakamura, H.Nawata and T.Watanabe: The tumor-associated antigen, RCAS1, can be expressed in immune-mediated diseases as well as in carcinomas of biliary tract. J. Hepatology. 36: 786-792, 2002.
11. M.Seimiya, R.Bahar, Y.Wang, K.Kawamura, Y.Tada, S.Okada, M.Hatano, T.Tokuhisa, H.Saisho, T.Watanabe, M. Tagawa, and J.O-Wang: Clast5/Stra13 is a negative regulator of B lymphocyte activation. Biochem. Biophys. Res. Comm. 292:121-127, 2002.
12. R.Kayasuga, Y.Sugimoto, T.Watanabe and C.Kamei: Histamine H1receptor is involved in mouse nasal allergic responses: A demonstration with H1 receptor- deficient mice. International Immunopharmacology 2:745-750, 2002
13. M.Enjoji, M.Nakamuta, K.Noguchi, R.Sugimoto, K.Katoh, H.Nawata,

M.Nakashima and T.Watanabe: RCAS1 Expression in immune-mediated liver diseases.
J. Clin. Gastroenterol. 34: 286-287,2002.
14. T.Ogawa, K.Maeda, S.Tonai, T.Kobayashi, T.Watanabe, S.Okabe: Utilization of knockout mice to examine the potential role of gastric histamine H2-receptors in Menetrier's disease.
J. Pharmacological Science 91: 61-70, 2003.
15. M.Enjoji, K.Noguchi, H.Watanabe, Y.Yoshida, K.Katoh, M.Nakashima, T.Watanabe, M.nakamuta, H.Nawata: A novel tumor marker RCAS1 in a case of extramammary Paget's disease.
Clinical and Experimental Dermatology 28:1-3, 2003.
16. J. F. Gao, S.B. Call, P.D. Fillmore, T. Watanabe, N.D. Meeker, C. Teuscher: Analysis of the role of *Bphs/Htrh1* in the genetic control of responsiveness to pertussis toxin.
Infection and Immunity 71:1281-1287, 2003
17. Akashi, H.Oimomi, K.Nishiyama, M.Nakashima, T.Ito, T.Sumii, T.Kimura, H.Nawata, T.Watanabe: Expression and diagnostic evaluation of human tumor-asociated antigen RCAS1 in pancreatic cancer.
Pancreas 26:49-55, 2003.
18. J.Umeda, S.Sano, K.Kogawa, N.Motoyama, K.Yoshikawa, S.Itami, G.Kondoh, T.Watanabe and J.Takeda: In vitro cooperation between Bcl-xL and the phophoinositide 3-kinase-Akt signaling pathway for the protection of epidermal keratinocytes from apoptosis.
The FASEB Journal. 17: 610-620, 2003
19. M.Jutel, T. Watanabe, S.Klunker, M. Akdis, O.A.R. Thomet, J.Malolepszy, T. Zak-Nejmark, R.Koga, T. Kobayashi, K. Blser, C.A. Akdis: Histamine regulates T cell and antibody responses by differential expression of H1 and H2 receptors.
Nature 413: 420-425, 2001

感染制御分野
Division of Host Defense

本来、免疫系は病原微生物から宿主を防御する生体防御機構として存在しており，その進化の歴史は感染症の脅威によってつくられてきたといえる．したがって，菌，寄生虫やウイルスなどの病原微生物の侵入に対する感染防御機構を明らかにすることが，免疫機構の分子基盤の解明につながる．当研究分野では免疫系を感染防御機構ととらえ，それを構成する複雑な要素を解析することによって、免疫機構の分子基盤を整理、再構築し、免疫制御による難治性疾患（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，γδ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：Toll like receptor の発現制御およびシグナル伝達機構
(2)早期誘導免疫：γδ型 T 細胞，NKT 細胞，粘膜系 T 細胞のリガンドと機能
　の解析
(3)適応免疫：メモリーT 細胞の産生，維持の分子機構

人事面では平成１４年(2002) 3 月 1 日より吉開泰信が名古屋大学医学研究科より併任し，当新設分野を担当することとなった．平成１３年４月１日矢島俊樹助手が群馬大学医学研究科（外科学専攻）を短期修了して赴任した．また名古屋大学より，特別研究生として大学院医学研究科（外科学専攻）２年小川敦司，医学科修士課程２年斉藤紀美香が参画してくれた．平成１４年５月から岸原健二助手が免疫制御学分野から配置転換となり，新たに技能補佐員として長澤江里子が参加してくれた．平成１４年９月１日から吉開泰信が当分野専任となり，平成１４年１０月１日岸原健二助手が徳島大学医学部寄生虫学教室講師として栄転した，平成１４年１０月１日から名古屋大学大学院医学研究科（外科学専攻）会津恵司が特別研究生として，１２月１日から西村仁志が名古屋大学医学部講師を辞し，COE 研究員（助教授相当）として参画してくれた．

A. 自然免疫：Toll-like receptor(TLR)のでの役割

Toll は初めショウジョウバエで見つけられた膜貫通性蛋白であるが，その後，植物から哺乳類に至る多くの種で保存され，生体の感染防御に重要な働きを果たしていることが分かってきた．哺乳動物の Toll-like receptors (TLRs)は現在まで 10 種類の報告されて，それぞれの TLR がいろいろな細菌の構成成分をパターン認識することによって，細胞内にシグナルを伝達して感染防御に重要な種々のサイトカインやアクセアリー分子を誘導させることが明らかになりつつある．

a. 肥満細胞と TLR

肥満細胞はⅠ型アレルギー（アナフィラキシー型，あるいは即時型）に関係する細胞である．肥満細胞におけるＴＬＲの役割について検討した．培養肥満細胞株の MC/9 ではマクロファージより少ない TLR4 mRNA が，骨髄由来肥満細胞の BMMCs ではマクロファージと同等の TLR4 mRNA が発現していた．これらの肥満細胞を合成 lipid A で刺激すると MC/9 では IL-13 産生が，

BBMCs では IL-5 , IL-10 および IL-13 産生がそれぞれ誘導された . また , LPS 単独の刺激ではなく , 肥満細胞と IgE のクロスリンクと同時に LPS 刺激を行うと , Th2 サイトカイン産生の誘導はより顕著に認められ , このことから LPS と IgE クロスリンクが相乗的に作用することが示唆された . 一方 , TLR4 変異 C3H/HeJ マウスを用いた検討では , lipid A で刺激しても IL-13 産生は誘導されず , IL-5 , IL-10 および IL-13 の mRNA 発現も誘導されなかった . 肥満細胞の TLR が LPS を認識した後の細胞内シグナル伝達に関する知見も得られている . NF- k B の経路だけでなく MAPKs 活性化の経路も確認された .MAPKs として ERK(extracellular signal-regulated kinase) , JNK(c-Jun N-terminal kinase) ,および P38(p38MAPK)の 3 種類の MAPKs の活性化は IgE クロスリンクと LPS の相乗作用によってさらに顕著に認められた .MAPKs の種類とサイトカイン産生との関係については , JNK の活性化がサイトカインの mRNA および蛋白の発現に重要であること .P38 の活性化はサイトカイン mRNA の発現に影響しないが蛋白の発現には重要であること . ERK はサイトカインの mRNA と蛋白のいずれにも影響しないことなどが明らかになった . したがって , 肥満細胞と IgE がクロスリンクするときに , グラム陰体細菌感染が存在すると , 菌由来の LPS によって TLR4 を刺激し , 3 種類の MAPKs を介して Th2 サイトカイン産生を誘導し , 悪影響を及ぼす可能性があると考えられる .

b. 上皮細胞と TLR

腎炎は免疫複合体の沈着が関与するIII型アレルギーの一種で , 膀胱から逆流したグラム陰性菌は尿細管上皮細胞に作用して腎炎を憎悪させると考えられている .尿細管上皮細胞における TLR の役割について検討した . 尿細管上皮細胞を LPS で刺激すると , ケモカインである MCP-1 や RANTES の産生が誘導され , これは mRNA レベルでも蛋白レベルでも認められた . これらの誘導は ,シクロヘキサミドを用いて他のサイトカイン(TNF-α ,IFN など)産生を抑制した場合にも , また抗 TNF-α抗体を用いた場合にも認められたことから LPS の直接の刺激がこれらケモカイン mRNA を誘導したと考えられる . 尿細管上皮細胞では TLR4 mRNA が発現しており , LPS 刺激すると TLR2 mRNA の発現も誘導された . マクロファージの TLR4 と同様に , CD14 , MD2 , MyD88 および TIRAP といった細胞内シグナル伝達のための蛋白も発現していた .

TLR4 変異 C3H/HeJ マウスでは , lipid A で刺激しても MCP-1 や RANTES の mRNA や蛋白レベルにはほとんど影響がみられなかった . LPS 刺激による MCP-1 産生の誘導には NF- k B が , RANTES 産生の誘導には MAPKs の JNK や P38 が ,それぞれ必要であった .そのほか ,TLR2 KO マウスでは , リポ蛋白で刺激しても MCP-1 や RANTES の mRNA や蛋白レベルにはほとんど影響がみられなかった . これらの結果から , 尿細管上皮細胞には TLR4 や TLR2 および TLR の細胞内シグナル伝達のための蛋白が発現しており ,ケモカイン産生の誘導に重要な役割を果たしていると考えられる .

B. 早期誘導免疫：NKT 細胞の機能の解析

TLR は T リンパ球にも発現しているがその役割についてはよくわかっていない . 種々のタイプの T リンパ球のうち NKT 細胞は末梢血よりも肝臓に比較的多く認められ , 肝臓において重要

な役割を果たしている可能性がある．NKT 細胞は自己抗原を認識して免疫制御に関係している可能性も指摘されている．これらの点を踏まえて，グラム陰性菌による肝障害の系で NKT 細胞や TLR が果たす役割について検討した．グラム陰性菌である *Salmonella choleraesuis* 31N-1 を種々のタイプのマウスの肝臓に接種すると，NKT 細胞が特異的に欠損しているマウス(Jα 281 KO マウス)では，菌の排除は NKT 細胞を有するマウスと同等であったが，肝障害はほとんど認められず，この肝障害には NKT 細胞が関与することが示唆された．NKT 細胞では TLR2 および TLR4 の発現が認められ，感染後に肝障害のエフェクター分子である FasL の発現が著しく増加した .また ,FasL 変異 *gld/gld* マウスでは ,菌の排除は FasL を有するマウスと同等であったが，肝障害は有意に軽度であった．これらの結果から，NKT 細胞の TLR は FasL 発現を介して肝障害と関係することが示唆された .TLR2 と TLR4 のいずれが FasL 発現を誘導するかについては，TLR4 のリガンドである lipid A よりも TLR2 のリガンドであるリポ蛋白で刺激したほうが FasL 発現の誘導能が高く認められた．TLR2 KO マウスでは感染後にも NKT 細胞における FasL 発現が増加しなかったが，TLR2 を有するマウスでは FasL の発現が増加した．TLR4 変異 C3H/HeJ マウスでは ,TLR4 を有するマウスと同様に感染後に Fas 発現が増加したが ,肝障害は抑制される傾向にあり .TNF-α産生が低かった .こうしたことから ,グラム陰性菌による肝障害の系では，NKT 細胞の TLR2 に対するリポ蛋白刺激が FasL を誘導して肝障害をもたらし，一方では，マクロファージの TLR4 に対する lipid A 刺激が TNF-α産生を誘導して肝障害を起こすという 2 つの機序が働いていると考えられる．

C. 適応免疫：メモリーT 細胞の産生，維持の分子機構

結核菌などの細胞内寄生性細菌や HIV などのウィルス感染に対して細胞傷害活性やγIFN 産生能をもつ Th 1 細胞と Tc 1 細胞が重要な防御機構を担う．インターロイキン 15(IL-15)は，IL-2 と IL-2Rβ,Cγ鎖を共有し，NK 細胞や T 細胞の増殖因子として働く．我々の作製した分泌型 IL-15 トランスジェニック（Tg）マウスの解析から，IL-15 は，主にメモリー型 $CD8^+$ T 細胞の産生と維持，増殖に重要であることが明らかとなった．マウス白血病ウィルス（LP-BM5）感染で引き起こされるマウス後天性免疫不全症（MAIDS）に対する IL-15 の役割を検討するために IL-15Tg mice での MAIDS の発症を検討した．その結果，IL-15 Tg mice では gag 蛋白に対する CD8 キラーT 細胞が誘導され ,MAIDS 発症が有意に抑制された .IL-15 によるメモリー型 T 細胞の産生，維持機構の解明は結核のみならず ,マラリア ,エイズなどの難治性感染症や癌に対するワクチン / 免疫療法の開発へとつながるものと期待される．

業績目録

原著論文

1. Uchimura, K., Kadomatsu, K., Nishimura, H., Muramatsu, H., Nakamura, E., Kurosawa, N., Habuchi, O., El-Fasakhany, F. M., Yoshikai, Y., and Muramatsu, T. 2002.
Functional analysis of the chondroitin 6-sulfotransferase Gene in relation to lymphocyte subpopulations, brain development and

oversulfated chondroitin sulfates.
J. Biol. Chem., 277: 1443-1450.

2. Yajima, T., Nishimura, H., Ishimitsu, R., Watase, T.,. Busch, D.H, Pamer, E.G., Kuwano, H., and Yoshikai, Y. 2002
Overexpression of IL-15 *in vivo* increases antigen-driven memory CD8+T cells following a microbe exposure.
J. Immunol., 168:1198-203.

3. Matsuzaki G., Yamada H., Kishihara K., Yoshikai Y., Nomoto K. 2002
Mechanism of murine Vgamma1+ gamma delta T cell- mediated innate immune response against *Listeria monocytogenes* infection.
Eur J Immunol., 32:928-35.

4. Shimizu, H., Matsuguchi, T., Fukuda, Y., Nakano, I., Hayakawa, T., Takeuchi, O., Akira, S., and Yoshikai, Y. 2002
Toll-like receptor 2 contributes to liver injury induced by *Salmonella* infection through Fas ligand expression on NKT cells in mice.
Gastroenterology, 123:1265-1277.

5. Masuda, A., Yoshikai, Y., Aiba, K. and Matsuguchi T. 2002
Th2 cytokine production from Mast cells is directly induced by LPS and distinctly Regulated by JNK and p38 pathways.
J. Immunol., 169:3801-10.

6. Tsuboi, N., Yoshikai, Y., Matsuo,S., Kikuchi,T., Iwami,K., Nagai, Y., Takeuchi, O., Akira, S., and Matsuguchi , T. 2002
Roles of toll-like receptors in C-C chemokine production by renal tubular epithelial cells.
J. Immunol., 169:2026-2033.

7. Umemura M, Nishimura H., Yajima T., Wajjwalku W, Matsuguchi T., Takahashi M, Nishiyama Y, Makino M, Nagai Y., and Yoshikai Y. 2002
Overexpression of interleukin 15 prevents the development of murine retrovirus-induced acquired immunodeficiency syndrome.
FASEB J., 16:1755-1763.

8. Ogawa T., Asai Y., Hashimoto M., Takeuchi O., Kurita T., Yoshikai Y., Miyake K., Akira S. 2002
Cell activation by Porphyromonas gingivalis lipid A molecule through Toll-like receptor 4-and myeloid differentiation factor 88-dependent signaling pathway.
Int. Immunol., 14:1325-1332.

9. Liu, T., Matsuguchi, T., Tsuboi, N., Yajima, T., and Yoshikai, Y. 2002
Differences in expression of Toll-like receptors and their reactivities by dendritic cell between BALB/c and C57 BL/6 mice.
Infect. Immun., 70:6638-6645.

10. Yajima, T., Nishimura, H., Wajjwalku, W., Harada, M., Kuwano, H., and Yoshikai, Y. 2002
Overexpression of interleukin-15 in vivo enhances anti-tumor activity against MHC class Ⅰ- negative and -positive B16 melanoma throught augmented NK activity or Ag-specific cytotoxic T cell responses.
Int. J. Cancer, 99:573-8.

11. Itoh, N. Nishimura, H., Matsuguchi, T., Mokuno, Y., Nimura, Y., and Yoshikai, Y. 2002
Increasesd susceptibilty to endogenous infection in CD8α- deficient mice following adminstration of 5-fluorouracil.
Clin. Diagn. Lab. Immun., 9:550-7.

12. Hasegawa, T., Matsuguchi, T., Noda K., Tanaka, K., Shoyama, Y., and Yoshikai, Y. 2002
Toll-like receptor 2 (TLR2) is at least partly involved in anti-tumor

activity of glycoprotein from *Chlorella vulgaris*.
Int. Immunopharmac, 2: 579-589.
13. Murosaki S., Muroyama K., Yamamoto Y., Liu T., and Yoshikai Y. 2002
Nigerooligosaccharides augment natural killer activity of hepatic mononuclear cells in mice.
Int. Immunopharmac, 2:151-159.
14. Ishimitsu, R., Yajima,T., Nishimura,H., Kawauchi H., and Yoshikai Y. 2003
NKT cells are dispensable in induction of oral tolerance but indispensable in abrogation of oral tolerance by prostaglandin E.
Eur. J. Immunol., 33:183-93.
15. Musikacharoen T, Yoshikai Y, Matsuguchi T. 2003
Histone acetylation and activation of CREB regulate transcriptional activation of MKP-M in LPS-stimulated macrophages.
J. Biol. Chem. 278:9167-9175.
16. Matsuguchi T, Takagi A, Matsuzaki T, Nagaoka M, Ishikawa K, Yokokura T, Yoshikai Y. 2003
Lipoteichoic acids from lactobacillus strains elicit strong tumor necrosis factor alpha-inducing activities in macrophages through Toll-like receptor 2.
Clin. Diagn. Lab. Immunol. 10:259-266.
17. Hiromatsu T., Yajima T, Matsuguchi ,T, Nishimura, H, Wajjwalku W, Arai T, Nimura Y, and Yoshikai Y. 2003
Overexpression of IL-15 protects against *Escherichia coli*-induced shock accompanied by inhibition of TNF-α-induced apoptosis.
J. Infect. Dis. 187:1442-1451.
18. Matsuguchi T, Masuda A and Yoshikai Y. 2003
JNK-interacting protein 3 associates with Toll-like receptor 4 and is involved in LPS- mediated JNK activation.
EMBO J. in press

総説

1. 吉開泰信　2002
免疫系とストレス蛋白質
最新医学 57.499-504
2. 吉開泰信　2002
メモリー型Ｔ細胞と感染症
Molecular Medicine 39, 202-208
3. 吉開泰信　2002
粘膜免疫の担当組織細胞の発生，分化と構造機能
アレルギー・免疫 (Vol.9 No.08) p102 (946) ～p104 (948)
4. 吉開泰信　2002
粘膜Ｔリンパ球による免疫応答の調節機構
耳鼻免疫アレルギー２０：15-21

著書

1. 吉開泰信　2002
   粘膜免疫と感染症
   粘膜免疫学の最前線(吉開泰信編)　pp42-56
   医薬ジャーナル社　東京

学会発表

1. 吉開泰信，矢島俊樹，石川紀美香，梅村正幸，西村仁志，松口徹也（2002，4/3-4/5）.
   細胞内寄生菌に対する免疫記憶の形成機構．
   第７５回日本細菌学会総会，
2. 松口徹也，Tipayaratn Musikacharoen，吉開泰信（2002，4/3-4/5）.
   Toll Like Receptor4(TLR4)の新たな下流シグナル伝達分子の解析．
   第７５回日本細菌学会総会，横浜．
3. 矢島俊樹，西村仁志，桑野博行，吉開泰信（2002，4/3-4/5）.
   BCG 感染マウス肝障害モデルにおけるメモリータイプ CD8T 細胞の役割．
   第７５回日本細菌学会総会，横浜．
4. Yasunobu YOSHIKAI（2002，8/24-26）
   Overexpression of interleukin 15 prevents the development of murine retrovirus-induced acquired immunodeficiency syndrome.
   淡路感染フォーラム
5. Yasunobu Yoshikai　(2002, 8/21-23)
   Development of an immune adjuvant given with BCG vaccination to enhance its biologic efficacy on the basis of mechanisms for maintenance of memory T cells : Roles of extracellular and intracellular IL-15 in Mycobacterial infection
   US-JAPAN COOPERATIVE MEDICAL SCIENCE PROGRAM
   Thirty-Seventh Tuberculosis and Leprosy Research Conference
6. 吉開泰信（2002、8/17）
   Toll-like receptor の発現調節機構と感染防御機構での役割.
   第 4 回伊豆カンファレンス、静岡
7. 吉開泰信（2002、9/20-21）
   インターロイキン 15 によるマウス後天性免疫不全症候群の制御.
   第 3 回熊本エイズセミナー、熊本.
8. Yasunobu Yoshikai　(2002, 10/10-11)
   Development of an immune adjuvant given with BCG vaccination to enhance its biologic efficacy on the basis of mechanisms for maintenance of memory T cells.
   The Seventh Nagasaki-Singapore Symposium on Medical Sciences, Nagasaki
9. 大畑六宏，矢島俊樹，岸原健二，西山幸廣，松口徹也，吉開泰信
   （2002,12/4-6）
   γδ型 T 細胞の単純ヘルペスウイルス II 型粘膜感染に対する感染防御での役割

第 32 回日本免疫学会総会・学術集会，東京

19. 広松孝，矢島俊樹，清水秀幸，新井利幸，二村雄次，吉開泰信，松口徹也 （2002,12/4-6）
大腸菌感染で誘導される肝障害における Toll-like receptor 陽性 NKT 細胞の役割
第 32 回日本免疫学会総会・学術集会，東京

20. 石川紀美香，矢島俊樹，小川敦司，岸原健二，饗場啓子，松口徹也，大島芳文，塚本義則，吉開泰信（2002,12/4-6）
細菌由来の水溶性の産性ヘテロ多糖による IL-12 産生誘導と
Th2 応答の制御
第 32 回日本免疫学会総会・学術集会，東京

12. 杉本憲治，吉開泰信，松口徹也（2002,12/4-6）
Cot/tpl-2 の各 Toll-like receptor(TLR)下流シグナルにおける役割の比較
第 32 回日本免疫学会総会・学術集会，東京

13. 矢島俊樹，広松孝，石川紀美香，小川敦司，桑野博行，吉開泰信
（2002,12/4-6）
インターロイキン１５の異なったエンドトキシンショックモデルでの相反する役割
第 32 回日本免疫学会総会・学術集会，東京

14. 小川知彦，朝井康行，橋本雅仁，竹内理，吉開泰信，三宅健介，審良静男
（2002,12/4-6）
Porphyromonas gingivalis リピド A 分子による TLR4/MD-2 を介した
細胞の活性化
第 32 回日本免疫学会総会・学術集会，東京

15. 坪井直毅，八尾村多佳朗，MUSHIKACHAROEN Tipayaratn，松尾清一，
吉開泰信，松口徹也（2002,12/4-6）
腎尿細管細胞での MKP―M（MAP kinase phosphatese isolated from macrophage）発現の検討とストレス刺激後 chemokine 産生，apoptosis 誘導における機能解析
第 32 回日本免疫学会総会・学術集会，東京

16. 小川敦司，矢島俊樹，安倍，新井，二村雄次，松口徹也，吉開泰信
（2002,12/4-6）
閉塞性黄疸での bacterial translocation の免疫学的機序の解析
第 32 回日本免疫学会総会・学術集会，東京

17. 杉本憲治，吉開泰信， 松口徹也（2002,12/4-6）
Cot/Tpl-2 の各 Toll-like receptor (TLR)下流シグナルにおける役割の比較
第 32 回日本免疫学会総会・学術集会，東京

ワクチン開発構造生物学分野
Division of Structural Biology

当分野は２００２年４月よりスタートした新しい研究室である．２００２年１０月１日より，前仲勝実助教授が国立遺伝研より赴任した．生体高分子の立体構造を決定し，それをもとに構造と機能の関連を明らかにしていく．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，研究対象はこれに限定せず，常に広く求めている．

蛋白質と他の分子との相互作用を高い親和性と特異性で結合する場合（強い相互作用）と弱い結合力と広い特異性で結合する場合（緩い相互作用）に分けた時に，後者の緩い相互作用に特に興味がある．Ｘ線結晶解析やＮＭＲ，その他の物理化学的な測定を総合的に駆使して緩い相互作用の構造的基盤を明らかにする．

Ａ．コラボステーション２にＮＭＲ装置とＸ線回折装置を設置

九州大学全学共用施設として，コラボステーション２の１階に３台のＮＭＲ装置（ブルカー社 Avance700 と Avance600，バリアン社 Inova600）が設置されて，２００３年３月に使用可能となった．Avance700 と Avance600 にはクライオプローブと呼ばれる最新の検出器が付属していて，従来の検出器の３〜４倍の感度を持つ．これを利用して蛋白質の高感度測定を行う．当分野がユーザー管理責任者として，液体窒素や液体ヘリウムの超伝導磁石への充填，ＮＭＲ装置の維持，パルスプログラムの整備とテストなどを行っている．

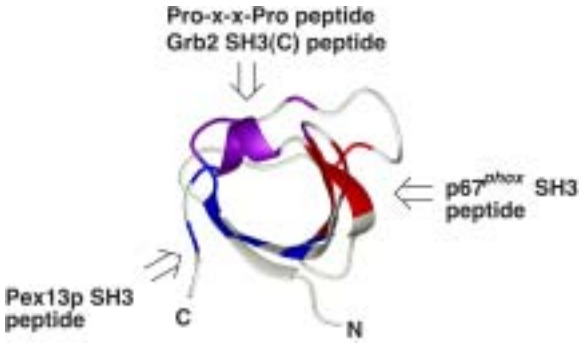
コラボステーション２の２階にブルカー社のＸ線回折装置 PROTEUM Ｒが２００３年３月に設置された．ＣＣＤ検出器を備えていて，高感度で高速なＸ線回折測定が行える．当分野がユーザー管理責任者として装置の維持を行っている．

安全性確保のために，ＮＭＲ装置とＸ線装置の制御用ＰＣをファイアーウオールＰＣの下に置き 1000baseT で学内のネットワークに接続した．情報共有のためのイントラネットシステムを整備した．

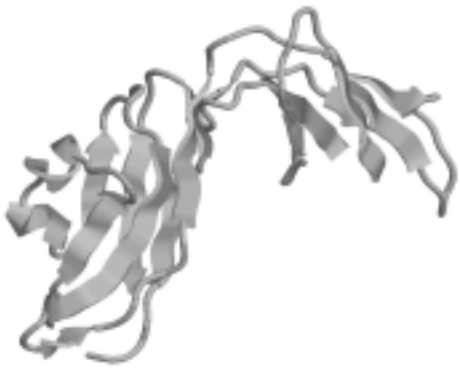
B. ＳＨ３ドメインの構造生物学

ＳＨ３ドメインは Pro-X-X-Pro をコア配列とするプロリンに富んだ短いアミノ酸配列に結合するとされている．ところが，最近，ＳＨ３ドメインが典型的な Pro-x-x-Pro 配列を含まないペプチドと相互作用することが数多く報告されてきた．これらのペプチドとＳＨ３ドメインの結合はそれほど強くないために，この非古典的な相互作用についての構造的基盤は不明であった．申請者は３種類のＳＨ３ドメインと，それぞれに結合する非 Pro-x-x-Pro ペプチドの組み合わせについて，ＮＭＲの新しい手法である交差緩和移動法を適用した．この方法を使うとＳＨ３上のどこの表面でペプチドと相互作用しているのかを明確に決定できる

（図Ｂ）. この結果，典型的な Pro-x-x-Pro 配列を含まないペプチドとの相互作用部位は３種のＳＨ３ドメインごとにすべて異なるという知見を得た．Ｇｒｂ２のＳＨ３ではPro-x-x-Pro配列が結合する場所と重なる部位で相互作用しているが，他２種のＳＨ３ドメインでは異なる部位で相互作用していた．
（九州大学生体防御医学研究所・住本英樹教授との共同研究）



Ｃ．免疫系レセプター群の構造生物学



免疫系レセプター群のひとつとして，単球系細胞などの機能抑制に関与するヒト由来の Ig-like transcript レセプター，ILT2 と ILT4 が MHC 分子（HLA-G など）を結合する機構を BIAcore を用いて詳細な速度論的解析を進めた．ILT2 の結晶を得て，分解能 3.0Åで構造決定を行った（図Ｃ）. 同じく MHC を認識する抑制型 NK 細胞レセプターの KIR 分子についても同様に MHC との複合体の結晶化スクリーニングを行った．さらに，活性型 NK 細胞レセプターの NKR-P1 について大腸菌で発現，巻戻しに成功し，得られた組換え蛋白質を用いて結晶化スクリーニングをおこなった．
（東京大学大学院新領域創成科学研究科・松本直樹助教授との共同研究）

Ｄ．ミトコンドリア蛋白質輸入装置の構造生物学

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，ミトコンドリア内部へと輸送される．膜通過は２つの膜それぞれに存在する膜透過装置の働きによって起こる．外膜のタンパク質透過チャネルを構成する酵母のＴｏｍ４０蛋白質を大腸菌内でインクルージョンボディとして発現した．界面活性剤存在下での再構成の条件検討をおこなった．再構成の正否は電子顕微鏡負染色観察（生体防御医学研究所・技術室）により穴があいた粒子が見えることでおこなった．界面活性剤のスクリーニングを行い、有望な界面活性剤を見いだした．
（名古屋大学大学院理学研究科・遠藤斗志也教授との共同研究）

Ｅ．ＰｒｉＡ蛋白質の構造生物学

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複製を再開するための蛋白質群の１つである．Ｎ末端側（約２００残基）にＰｒｉＡ蛋白質に特異的なアミノ酸配列があって役割が不明であったが，BIAcore および１分子蛍光分析装置を用いた実験で，ＤＮＡの３’末端を認識・結合する機能があることを見いだした．８残基のＤＮＡフラグメントを用いた実験では K_d=２０μM程度で結合するが，３’末端をリン酸基や蛍光ラベルでブロックすると

結合が検出できなくなった．ＰｒｉＡ蛋白質のＮ末端フラグメント（１０８残基）の結晶を得た．（東京都臨床医学総合研究所・正井久雄室長との共同研究）

業績目録

原著論文

1. T. Tanaka, T. Mizukoshi, C. Taniyama, D. Kohda, K. Arai, H. Masai. 2002.
   DNA binding of PriA protein requires cooperation of the N-terminal Dloop/arrested-fork binding and C-terminal helicase domains.
   J. Biol. Chem. 277, 38062-38071.
2. K. Shindoh, K. Maenaka, T. Akiba, H. Okamura, Y. Nishimura, K. Makino, Y. Shirakihara. 2002.
   Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies on the DNA-binding domain of the transcriptional activator protein PhoB from *Escherichia coli*.
   Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 58, 1862-1864.
3. K. Kami, R. Takeya., H. Sumimoto, D. Kohda. 2002.
   Diverse recognition of non-PxxP peptide ligands by the SH3 domains from $p67^{phox}$, Grb2 and Pex13p.
   EMBO J. 21, 4268-4276.
4. T. Endo, D. Kohda. 2002.
   Functions of Outer Membrane Receptors in Mitochondrial Protein Import.
   Biochim. Biophys. Acta, 1592, 3-14.
5. Y. Uemura, S. Senju, K. Maenaka, L. K. Iwai, S. Fujii, H. Tabata, H. Tsukamoto, S. Hirata, Y. Z. Chen, Y. Nishimura. 2003.
   Systematic analysis of the combinatorial nature of epitopes recognized by TCR leads to identification of mimicry epitopes for glutamic acid decarboxylase 65-specific TCRs.
   J Immunol. 170, 947-960.

総説

１．神田大輔.2002.
蛋白構造・機能解析実践ガイド４―蛋白質の立体構造決定を行うために―
ＮＭＲによる溶液中の立体構造解析
遺伝子医学,6, 113-119.

２．神田大輔. 2002.
新規ＰＸドメインの構造と機能　（特集：構造生物学の最前線）
生化学,74, 1244-1250.

著書

なし

学会発表

1. 神田大輔（2002, 5/18）
   ヒトＮＡＤＰＨ酸化酵素システムに存在するＰＸドメインとＳＨ３ドメインの新しい機能
   生化学会九州支部会シンポジウム「構造生物学−多角的アプローチ」, 福岡.
2. 神田大輔 (2002, 5/23)

ヒトＮＡＤＰＨ酸化酵素システムに存在するＰＸドメインとＳＨ３ドメインの新しい機能
東京都臨床医学研究所 集談会，東京.

3. 神田大輔 (2002, 5/24)
ＮＭＲ構造生物学の現状と展望
よこはまＮＭＲ構造生物学研究会 第 18 回ワークショップ，横浜.

4. D. Kohda (2002, 6/5) (invited)
Structure and Function of PX and SH3 Domains in the NAPDH Oxidase System
the 2nd Tsinghua International Conference of Protein Science, Beijing, China.

５．神田大輔 （2002, 6/15）
ポストゲノム時代における構造生物学研究
生医研・春の集談会，大分.

6. K. Kami, R. Takeya, H. Sumimoto and D. Kohda (2002, 8/25-8/30)
Diverse recognition of non-PxxP peptide ligands by the SH3 domains from p67*phox*, Grb2, and Pex13p
XXth ICMRBS (International conference on magnetic resonance in biological systems), Toronto, CANADA.

７．伊藤順香, 小代俊浩, 江崎雅俊, 神田大輔, 遠藤斗志也 (2002, 10/14-17)
ミトコンドリアプレ配列の pSu9 の Tom20 認識シグナルの NMR 解析
第７５回日本生化学会，京都.

8. 武谷立，紙圭一郎，神田大輔，住本英樹 (2002, 10/14-10/17)
食細胞 NADPH オキシダーゼ活性化における p47phox と p67phox の相互作用
第７５回日本生化学会，京都.

9. 神田大輔 (2002, 11/29)
ＮＭＲによるタンパク質研究の動向と展望
第２回材料評価・分析技術セミナー〜蛋白・高分子を中心として〜， 福岡.

10. 植村靖史, 千住覚, 前仲勝実, 藤井慎嗣, 塚本博丈, Y. Chen, 西村泰治 (2002, 12/4-12/6)
エピトープ発現ライブラリーを用いたGAD65自己反応性TCRの認識エピトープの多様性に関する解析．
第32回日本免疫学会総会・学術集会, 東京.

11. 紙圭一郎，武谷立，住本英樹，神田大輔 (2002, 12/11-12/14)
SH3 ドメインの non-PxxP リガンド認識部位の多様性
第２５回日本分子生物学会，横浜.

12. T. Tanaka, T. Mizukoshi, C. Taniyama, K. Arai, D. Kohda, H. Masai (2002, 12/11-14)
Molecular mechanisms of recognition of arrested replication forks by PriA protein in *E. coli*
第２５回日本分子生物学会，横浜.

13. 神田大輔 (2002, 12/11-12/14)
ＳＨ３ドメインによる非古典的アミノ酸モチーフ認識の多様性（シンポジウム）
第２５回日本分子生物学会，横浜.

14. 霜島司，白石充典，天野君江，津本浩平，熊谷泉，白木原康雄，前仲勝実
(2002, 12/11-12/14)

免疫グロブリン様レセプター群の多様なリガンド認識機構．
第25回日本分子生物学会，横浜.

15. 霜島司，天野君江，P. Sondermann, 白木原康雄，前仲勝実 (2002, 12/11-12/14)
ペプチドファージライブラリーを用いたヒトFcγレセプター特異的リガンドの単離
第25回日本分子生物学会，横浜

16. 前仲勝実 (2003, 2/7)
免疫グロブリン様レセプター群の分子認識機構
九州大学教育研究プログラム・研究拠点形成プロジェクト「九大における構造生物学の教育・研究環境の整備確立」公開セミナー，福岡

微生物ゲノム情報学
Division of Functional Genomics

微生物ゲノム情報学分野は平成 14 年 3 月より生体防御医学研究所に新設された. 主な研究分野はゲノム科学の中の, 遺伝子機能解析, 遺伝子発現解析, 遺伝子情報解析 (バイオインフォマティクス) である.

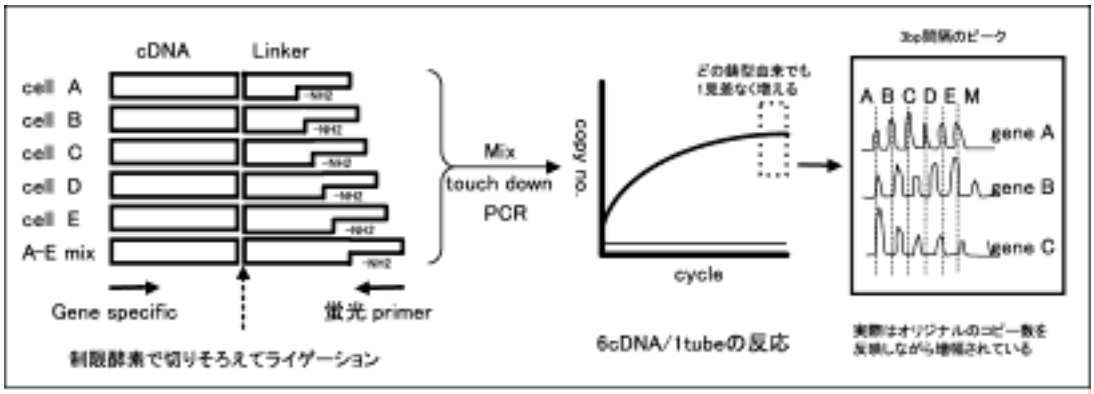
当分野の研究の開始は 1990 年頃に遡り, 当時ヒトゲノム解読計画が本格的にスタートした時期に, ゲノムの機能的側面である遺伝子発現を, cDNA のランダムシークエンスによって解析し, 以降の EST 解析に大きな役割を果たした. 特に, 細胞における多数の遺伝子の状態を, 発現量の多いものから順に記載したリストを作製し, 遺伝子発現プロファイルという考え方を定着させた. その後, 種々の細胞や組織から, 遺伝子発現プロファイルを集めることにより, 各々の細胞ではどういった遺伝子が最も活発に働いているのか, またＡでは働くがＢでは発現していない遺伝子は何か, 疾患に関連して発現量の変わる遺伝子は何かといった問題の解析を次々と行った. ヒト及びマウス合わせて約 100 種以上のサンプルから得られた約 3 万 5 千遺伝子のデータは, 遺伝子発現データベース BodyMap として公開している. 現在は, シークエンスによらない, PCR を用いた遺伝子発現比較解析法, iAFLP を用いて引き続き遺伝子発現の解析を行っている.

しかしながら, 膨大なゲノム情報, そこにコードされる遺伝子発現の情報, さらにタンパク質の構造と働きに関する情報は, もはや上記のようなウェットの実験のみでは全貌を眺め解釈することは不可能になりつつある. 情報が大量に溢れる中から重要な物のみを抽出する作業はコンピュータ無しには実現できない. このようなポストゲノム時代の重要課題に対して, 数学的統計的手法を用いて解決する研究を行っている.

当分野現在のメンバーは次のとおりである. 教授の大久保公策は,平成１５年６月より国立遺伝学研究所　遺伝子発現解析研究室の教授に着任したことより、本研究室を兼任するかたちになった。平成１４年１２月よりポスドクとして大阪大学より移動してきた伊藤孝一が、平成１５年２月１日付けで助手に着任した。研究生だった尾辻真紀子が平成１５年４月より、システム生命科学府博士課程後期へ入学、当研究室に籍をおくことになった. 同じく、新たにシステム生命科学府博士課程前期に入学してきた久保田功も当研究室に籍をおくことになった。当研究室からの転出としては、助手の川本祥子は、平成１４年１２月に退職した。学術振興会特別研究員 (PD) の足立仁は、平成１５年４月１日付で兼任先の産業総合研究所生物情報解析センター　発現頻度解析チームへ移動となった。企業からの研究協力メンバーだった (株)日立ソフト, 峰崎雄一は平成１５年５月末、同じく (株)シーズ・ラボ, 久末和代も平成１５年３月末にそれぞれの勤務先に戻った。 教授の大久保は, 平成 12 年度より産業技術総合研究所・ 生物情報解析研究センター・ 発現頻度解析チームのチームリーダを兼任している. 当分野, 平成 13 年度の研究は, 文部省特定領域研究 (Ｃ) ゲノム医学から代表課題「遺伝子発現を基礎とする病態機序の解明」として研究費のサポートを受けた.

A.　iAFLP 法による遺伝子発現情報の解析

a.　iAFLP 法の原理



図A.1 iAFLP (introduced Amplified Fragment Length Polymorphism) 法の概略
合成されたcDNAをMboIで切断し遺伝子のpolyA側の断片に、3bpずつ長さの異なるリンカーをライゲーションする。次に全てのcDNAを同じチューブに等量づつ混合したものを鋳型にしてPCRを行う。各Ampliconは、長さの違いを出すための部分以外は同じ配列であるため増幅率に差が無く、競合PCRの原理が働き、鋳型比に応じて目的産物が増幅される。シークエンサを用いて分離するとピークの高さの差として検出される。

この方法によれば，1 反応につき 5 組織由来の cDNA が比較できる． 一般に普及している 96well の PCR 装置とシーケンサを用いれば，1 回の実験で 96 遺伝子 X 5 組織分の発現比較が可能となる．ただし，得られるデータは 5 組織間での cDNA 量の相対比であるのでピーク高が発現を定量的に表すものではない． 大規模発現解析の技術としては，マイクロアレイ法が最も盛んに行われている．マイクロアレイはハイブリダイゼーションによりシグナルを検出，増減を比較する方法であることから，一度の実験で多数の情報が得られることが特徴である． 一方 iAFLP 法は PCR によって得られるバンドの有無によって，実験の成否がはっきりしていることが特徴である（ハイブリダイゼーションの場合は、某かのシグナルが得られるため quality control をしっかり置かなければならない）．また数十から数百遺伝子単位で、確実に発現情報をとりたい場合などにも適した方法である．

b.　iAFLP 法による正常皮膚及び乾癬における遺伝子発現の解析

我々は本法を用いて、種々の疾患における遺伝子発現プロファイルの解析を行っている。ここでは皮膚疾患である乾癬（psoriasis）における結果を報告する。乾癬は皮膚の慢性炎症性角化疾患で，欧米で多いとされているが，最近は日本国内でも増加している慢性の難治性皮膚疾患の一つである．症状は皮膚に赤い皮疹が現れ，表面には白く乾燥した鱗屑と言う厚い垢が付着しするのが特徴で，かゆみは一般的には強くないと言われている． 患部の皮膚では，表皮の角層と有棘層が厚くなり，炎症をおこす細胞が集まる組織像が見られる． 乾癬の原因ははっきりしておらず，ストレス等の環境要因や免疫機構の異常なども関係していると考えられている． 現在治療はステロイド外用薬の他に，ビタミン D 誘導体外用剤等が効果を上げている． 当研究室では，大垣市民病院皮膚科，清島真理子博士，田辺製薬との共同研究により，この未解明の皮膚疾患の病態を遺伝子発現を通じて解析することとした． 実験は主に，京都府立医大・眼科の川崎諭博士が行った．

皮膚で働く遺伝子のみを効率的に調べるために，iAFLP に先だって、正常皮膚サンプル及び，乾癬サンプルからそれぞれ 7866, 6091 件の 3’EST を収集し、遺伝子発現プロファイルを解析した． 乾癬の列で示す数字は 6091 個の EST 中，何回その遺伝子が出現したかを表わしている(表 A. 1)． 正

常皮膚とともに皮膚の初代培養細胞から収集した (1701 EST) データも併記した。EST による解析からも, 乾癬においては炎症と角化が激しく起きていることがわかる. 次にこれら EST 配列を元に, 図 A.1 に示した GeneSpecific primer 遺伝子特異的プライマを設計, GenBank 登録の RefSeq から設計した遺伝子プライマとあわせて約 8 千遺伝子の発現情報を解析した. 解析サンプルは乾癬 14 例, アトピー性皮膚炎 2 例, 菌状息肉症 3 例, 正常 7 例. 乾癬のうち 4 例に関しては, 遠隔正常部もサンプルに加えた.

表 A. 1 乾癬の遺伝子発現プロファイル

gene signature	乾癬	正常皮膚	皮膚培養	GenBank	Definition
(乾癬の発現 profile 上位)					
1372	74	0	0	M21064	migration inhibitory factor-related protein 14
20893	71	3	0	M86757	psoriasin
5738	64	29	14	J00124	50 kDa type I epidermal keratin
9039	61	2	0	M21302	small proline rich protein (sprII)
5780	55	2	3	L42601	56kD TypeII/keratin 6 isoform K6c (KRT6C)
20905	47	0	0	Z18538	skin-derived antileukoproteinase
3324	37	9	0	X05978	radiated keratinocyte cysteine protease inhibitor
20924	35	6	0	L42592	keratin 6 isoform K6b (KRT6B)
20906	31	0	0	Z71389	skin-antimicrobial-peptide 1 (SAP1).
20912	30	31	0		
20918	27	21	0	M98776	keratin 1
(正常皮膚の発現 profile 上位)					
418	5	45	0	U09953	ribosomal protein L9
20959	3	42	0		
650	14	41	1	X69150	ribosomal protein S18
336	18	40	1	Z12962	ribosomal protein L41
743	15	39	2	U14973	ribosomal protein S29
543	13	39	2	X56932	23 kD highly basic protein
211	10	36	1	X67247	ribosomal protein S8
273	16	34	3	X16064	translationally controlled tumor protein
500	10	34	1	D14530	ribosomal protein S28
5738	64	29	14	J00124	50 kDa type I epidermal keratin

データ解析は iAFLP で得られた 30 サンプル×8000 遺伝子データを, 全てに共通な 6 番目のピークの数字で平均化し、得られた数値で距離を算出, 階層的クラスタリング法によりクラスター分析を行った . その結果、乾癬で発現が上昇しているクラスタ, 及び減少しているクラスタを分類することができた. 乾癬で発現が上昇する遺伝子群には, defensin, psoriasin, keratin6 といった乾癬で著明に増加することで知られている遺伝子の他, keratin16, 17, 炎症に関係する, lipocarin2, granzymeB, その他, tissue-plasminogen activator, histidine ammonia-lyase, integrin a5 がそれらと同様の発現パターンを示した. 一方, 上皮の分化マーカの一つ loricrin, さらに adherens junction に局在する beta catenin は乾癬で発現が低下していることがわかった . 分化した皮膚に存

在する keratin2, 15 も発現低下グループにクラスタされた. これらのデータから、乾癬の皮膚では真皮から表皮へと続く規則正しい重層構造が崩れ,不規則な増殖と炎症が起きていることがわかる . また, 脂肪酸β酸化系律速酵素 acetyl-CoA dehydrogenase, リソソーム酵素 Cathepsin, 数種の蛋白分解酵素も乾癬で低いパターンを示した. これら酵素の異常は乾癬の特徴である皮膚の角化と炎症の原因や進行に関わる変化として注目すべき点である . 以上のように乾癬の組織学的な所見と遺伝子発現プロファイルは非常によく一致するとともに,詳しい病態を明らかにすることができた . 現在これらの中からさらに乾癬に関連のある遺伝子を同定中である. 一つの試みとして川崎らは, 乾癬のうち 5 例に関して皮疹部の中心から外側に 5 つの部分に分けてmRNA を抽出し, 皮疹部と乾癬周囲の正常部における発現の差に注目して解析を行った. その結果, 乾癬でない患者の皮膚では発現が低いにも関わらず, 乾癬周辺部の正常部で発現が高いタイプの遺伝子を発見した. さらにこの遺伝子は乾癬患者の遠隔非病変部での発現も高いことが確認され, 乾癬の発症の保因の一つではないかと推測された. primer 番号 HP00161 のこの遺伝子は zinc finger motif を持ち, 染色体 20 番上にコードされる遺伝子であることが判明 , 解析を進行中である.

c. 発現プロファイルの解析と新しい知識発見法の開発

ここまで述べてきた発現プロファイルの解析は、得られた遺伝子発現情報の中から、ほんの一部のデータを、これまでの知見に照らし合わせて解釈可能なものにアプローチしたに過ぎない . ゲノム配列から得られるデータ , アミノ酸配列から得られるデータ等をとりこみつつ , 文献情報を加味し, 全体像を見て , 新たな知識のクラスタを発見するためには全く新しい手法を開発しなければならない . 次に , 現在直面しつつある , ポストゲノム時代のデータの諸問題と , 解釈の方法について解説する .

B. 新しい知識発見の方法

a. 始めに : ゲノム科学データの特徴

ゲノム科学は新しい測定手法の開発と機械化による ゲノム・トランスクリプトーム・プロテオームの高速高精度測定を特徴としている. 3 つのオームの測定を通じて遺伝子 蛋白という生体構成単位に様々な特徴値 (数値データ, またはパタンデータ) を与えるが, 個々の分子データとオームデータの異なる点は大多数の要素に比較可能なデータを与えることで要素間の関係を求めることが出来, 要素群の構造データを与える点である. ゲノム科学が生み出すデータからの専門知識の発見とは, 遺伝子蛋白群がつくる構造のなかに説明可能な部分を探し, 知識と対応するデータモチーフを見つける作業である.

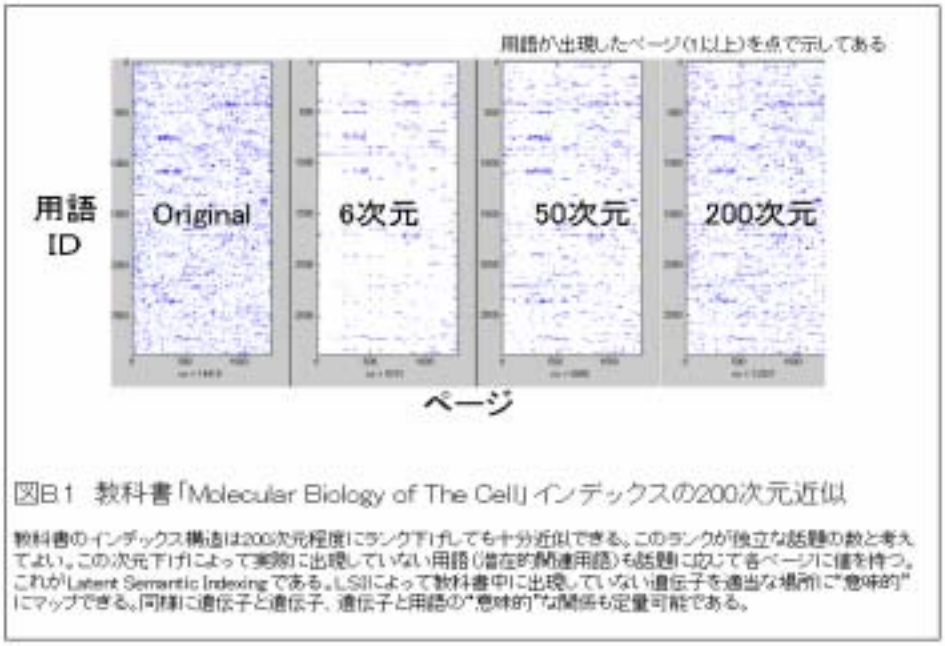
b. モチベーション : データ洪水

最近しばしば指摘されるデータ洪水とはデータ量に見合った知識が出ない状況を指している. 一般にデータ洪水の解消には, データ整理・保存・共有・ＤＢ化 (Data Management)と数値データとしての解析法の確立 (Data analysis) そしてドメイン的知識を見つける (Interpretation) の 3 つが全て効率よく行われなければならない. 特に医学的解釈は専門家のみの領域と信じられておりデータ洪水解消のための難関である. 医学知識表現を明示的に行うことが解釈を機械化する第一歩

であるが，これを宣言的に行う方法はジーンオントロジーとして最近注目を集めている． しかし専門家による知識の宣言には多くの労力と調整努力を要し，知識の更新に従って永久に続く宣言の更新作業が必要になるなどの問題点も指摘されている．

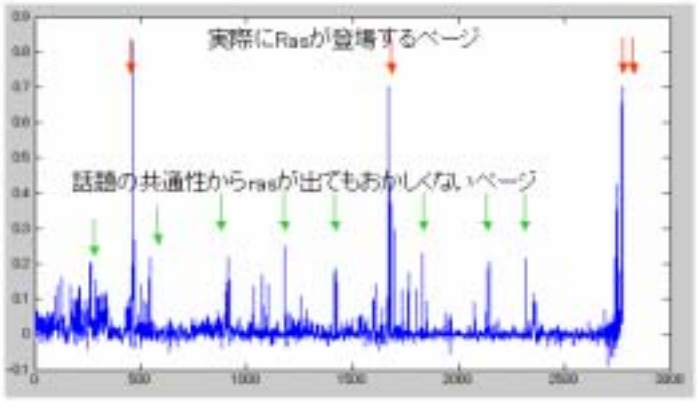
c.　機械学習による機械的解釈法：BOB

ゲノム科学でのデータ解釈は一般化するとデータ内にある要素関係に既存の知識で説明できる部分を探すという行為である． 例えばゲノム上のオペロンの検出や発現クラスタの解釈 phylogenetic profile の解釈や蛋白間の結合データの解釈に全て共通である． これは測定データ集合が作る遺伝子列または遺伝子群が与えられたときにそれらに共通の機能的な特徴を探すことである． 従って，解釈は遺伝子間の知識中での機能的な距離をあらかじめ教育しておけば　機械にも可能な行為であり，機械的解釈の一番の問題は「どうやって機能的関係を定義しそれを機械に学習させるか」という点である． 本年度構築を進めた BOB はベクター空間モデルと行列のランク下げによる特徴抽出を用いて①教科書からの小分野別基本用語の収集と構造化②遺伝子機能の文献データを用いたベクター表現③分野別の基本用語関係空間への遺伝子ベクターの写像の３つの工程によって小分野別の観点からみた遺伝子の相関構造を１００次元の高次空間で表現するシステムである.（図 B.　1）(図 B.　2)



図B1　教科書「Molecular Biology of The Cell」インデックスの200次元近似

教科書のインデックス構造は200次元程度にランク下げしても十分近似できる。このランクが独立な話題の数と考えてよい。この次元下げによって実際に出現していない用語（潜在的関連用語）も話題に応じて各ページに値を持つ。これが"Latent Semantic Indexing"である。LSIによって教科書中に出現していない遺伝子を適当な場所に"意味的"にマップできる。同様に遺伝子と遺伝子、遺伝子と用語の"意味的"な関係も定量可能である。



図B.2 SwissProtから作ったH-rasベクトルと200次元近似Cellのページの余弦分布

実際にはrasが現れないページやrasの説明で使用されていない用語のみのページにも話題の共通性に応じて高い余弦を示している。このように機能説明の内容の共通性により遺伝子間の関係や遺伝子と用語、話題の関係が求められる

BOB を用いれば測定データがつくる遺伝子系構造に知識的なクラスタを探す方法で，定量的に説明可能部分を検出し，さらに分野空間を用いてクラスタに適当な言語表現を与えることができる．

なお本研究は産業技術総合研究所･ 生物情報解析センターの日紫喜光良博士、NTT 基礎研究所･ 前田英作博士のグループとの共同研究である ．

業績目録

原著論文

1 . Nakajima, H., Takenaka, M., Kaimori, J. Y., Nagasawa, Y., Kosugi, A., Kawamoto, S., Imai, E., Hori, M., and Okubo, K. (2002). Gene expression profile of renal proximal tubules regulated by proteinuria. Kidney Int *61*, 1577-1587.

2 . Saito, K., Tanaka, T., Kanda, H., Ebisuno, Y., Izawa, D., Kawamoto, S., Okubo, K., and Miyasaka, M. (2002). Gene expression profiling of mucosal addressin cell adhesion molecule-1+ high endothelial venule cells (HEV) and identification of a leucine-rich HEV glycoprotein as a HEV marker. J Immunol *168*, 1050-1059.

3 . Sakai, R., Kinouchi, T., Kawamoto, S., Dana, M. R., Hamamoto, T., Tsuru, T., Okubo, K., and Yamagami, S. (2002). Construction of human corneal endothelial cDNA library and identification of novel active genes. Invest Ophthalmol Vis Sci *43*, 1749-1756.

4 . Takebayashi, H., Ohtsuki, T., Uchida, T., Kawamoto, S., Okubo, K., Ikenaka, K., Takeichi, M., Chisaka, O., and Nabeshima, Y. (2002). Non-overlapping expression of Olig3 and Olig2 in the embryonic neural tube. Mech Dev *113*, 169-174.

5 . Tanaka, S., Tatsumi, K., Okubo, K., Itoh, K., Kawamoto, S., Matsubara, K.,

and Amino, N. (2002). Expression profile of active genes in the human pituitary gland. J Mol Endocrinol *28*, 33-44.

防御分子構築学分野
Division of Functional Protein Molecular Biology

疾患特異的な蛋白質の同定及び発現定量に関する方法論の研究,及びそれらを用いて病気と関わる細胞内機械の動的なメカニズムを明らかにするために蛋白質複合体の同定とそれらの機能に関する研究をおこなっている.

A. 疾患特異的な機能タンパク質同定に関する研究

a. 同位体コード･アフィニティータグ (ICAT) 法及び質量タグ (MS-tag) 法による高感度脱染色定量法の研究

2次元電気泳動ゲル(2-DE) による蛋白質の発現ディスプレイが現在でも多くプロテオーム解析に用いられている.然しながら,見ることのできる蛋白質が可溶化成分に限られることや,ひとつの染色スポットから多数の異なった蛋白質が質量分析などで明らかになり,分解能が思ったより少ないことが知られてきた.また,どの成分が増大しているかも染色法では知ることができない.当研究室では,より汎用性と検出感度の広い脱ゲルプロテオミクスの基本技術の確立に関する研究をしている.すでに,ICAT (Isotope-Coded Affinity Tag) による発現定量を実現している(図1).また,対象試料をトリプシンで全消化して得たペプチド断片のC末端リジン基に特異的な修飾を行い,定量と翻訳後修飾の同定の両情報を一度に可能とするMS-tag法も開発している.このような方法により疾患特異的な機能蛋白質の同定や細胞周期での蛋白質の動的な挙動を翻訳後修飾の変化を含めた定量解析に適用し,細胞内分子機械の機能の解明に用いている.

b. 1-D SDS PAGE によるタンパク質一斉(ショットガン)解析

ゲノムの機能発現の本態としての蛋白質分子群に関する総合情報はプロテオームと呼ばれており,その発現レベルの包括的な定量･動態解析は,細胞の発生や老化などの現象を分子レベルで理解する上での新たな情報を提供することが期待されている. 上記の目的のために現在まで広く用いられている技術が,二次元電気泳動(2-DE)ゲルの染色画像の比較による'ディファレンシャルディスプレー'である.前述したように,2-DEには分離の再現性、検出感度や膜蛋白質の溶解性などに関して多くの問題を抱えており,その複雑な染色パターンは客観的で迅速な解析を困難にしている.医薬などの産業分野では,疾患マーカーや創薬の標的分子の効率的なスクリーニングのために,より簡便で処理能の高い解析システムの開発が求められている.

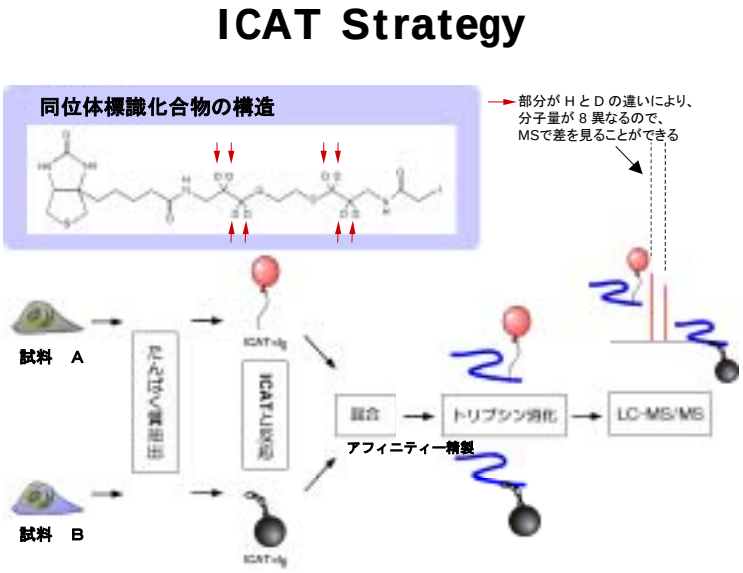


図１．ICAT (Isotope-Coded Affinity Tag)　による発現定量の概念図

当研究室では，より簡単な修飾法の組み合わせの評価を行い，我々のグループでこれまでに確立した一次元ゲル電気泳動（1-SDS　PAGE）とnanoLC/MS/MSからなる発現プロテオーム解析システムの研究を行っている．モデル試料としてマウス大脳皮質を用い，不溶性の蛋白質群に対する有効性や解析の処理能，および疾患モデルへの適用について研究し，1-SDS PAGE とnanoLC/MS/MSとの組み合わせによって，ゲルの染色処理までも省いた客観的で高感度かつ高速の発現プロテオーム定量解析が可能となった（図２）．一次元ゲル電気泳動による蛋白質混合物分画法は，細胞膜貫通型などの疎水性の高い蛋白質群や高塩基性の蛋白質群にも適用することができた．前者の結果は，主に SDS の強い溶解・変性作用に依っている．マウス大脳皮質の解析では，多くの膜結合型蛋白質や高塩基性蛋白質を含む合計約 750 個の蛋白質が一度の連続分析で同定された（‘ショットガン’蛋白質同定）．このことは，本法が細胞内の全蛋白質を視野に入れた発現プロファイリングに有効であることを示した．また，同定された蛋白質のなかには過去の研究ですでに明らかとなっている微量の疾患関連蛋白質を含んでおり，疾患マーカーや疾患責任遺伝子産物のスクリーニングに対しても有効性を明らかにした．

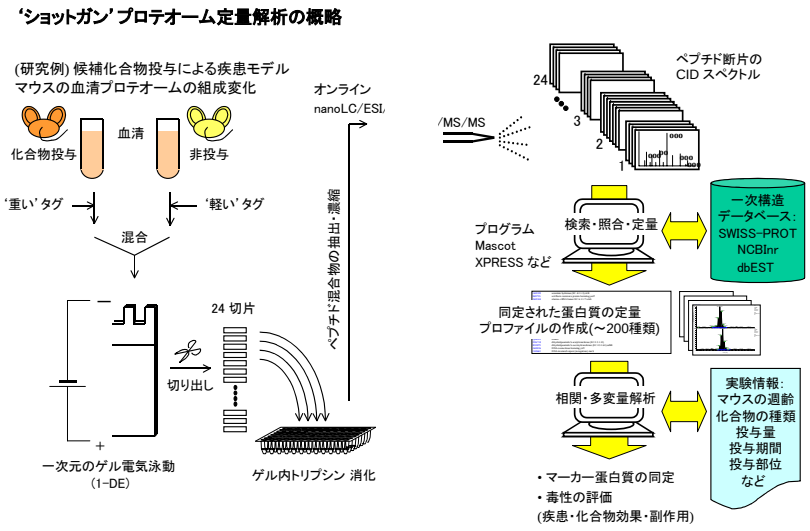


図２．　1-D SDS PAGE によるタンパク質一斉（ショットガン）解析の流れ。

c. 多次元液体クロマトグラフ (2-D LC) 法に基づく一斉プロテオーム解析技術に関する研究

ゲル・プロテオミクスの欠点を補い，異なった性質をもつ多く蛋白質を高速処理を可能とする新しい方法を研究している．ゲル・プロテオーム解析の諸課題を解消するために分画(精製)蛋白質群を可溶化した状態で消化後，LC-MS に直接導入することがこれまでも検討されてきた．消化後のペプチドフラグメント数によって，1D，2D-LC が考えられ，更にそこで用いる分離モードはイオン交換 / 逆相など，これまで幾つかの組み合わせが検討されてきた．

本研究室では次世代のプロテオミクス解析技術となる 2-D LC Peptide Mapping システム（図３）の構成は以下のとおりである．１）抽出タンパク質試料の有機溶媒中での高速酵素消化．２）サンプル，塩バッファー，コンディショニングバッファーの供給を行うオートサンプラリング・ロボット．３）１次元目の Strong Cation Exchange(SCX)カラムによる分画．４）SCX から分画溶出したペプチドフ群の濃縮と脱塩をおこなうマイクロトラップカラム CapTrap．５）HFBA(Hexafluoro Butylic Acid)含有バッファーを用い，２次元目の逆相 C18 カラムによるペプチド断片分離を行う低流速 (500 nl/min ~ 2,000 nl/min.) 液体クロマトグラフ Michrom BioResources 社製

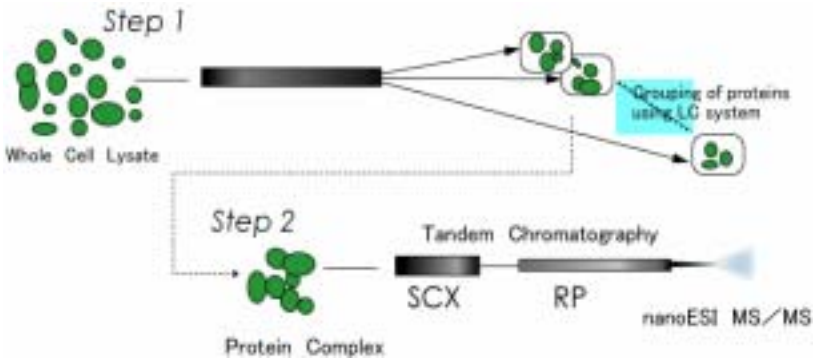


図３. 2-DLC プロテインマッピング及び 2-DLC ペプチドマッピング
システム（1-D SCX カラム，トラップカラム，2-D RP カラム）
を含む多次元液体クロマトグラフによるプロテオーム解析の流れ．

MAGIC2000．6）溶出するペプチド断片のナノエレクトロスプレー・イオン化(nano-electrospray ionization : nanoESI)システム．7）ペプチド断片の分子量とその配列情報を測定する(MS, MS/MS)イオントラップ型質量分析計(Ion Trap Mass Spectrometer: ITMS) サーモフィニガン社製 LCQ Advantage™．8）MS 及び MS/MS スペクトルデータからタンパク質・ゲノムデータベース上にあるタンパク質及び翻訳後修飾を同定する SEQUEST®または Matrix Science 社の MASCOT®検索ソフトのシステム．

ペプチド群の分画は PAL のプログラムを用いて行い，0.05% HFBA 及び 0.1%ギ酸を含む水–アセトニトリル系のグラジエント溶出プログラムでペプチド群の分離・溶出を行う．イオン化後，ペプチドは通常 2 価– 3 価のイオンとして生成される．配列情報をもつ MS/MS スペクトルは，ThermoQuest 社の Dynamic Exclusion スキャンモードで行うことにより共溶出する多くのペプチド群を見逃さずに同定することが可能である．タンパク質発現の定量を行うために，抽出タンパク質のシスティン基に同位体修飾（Isotope Coded Afinity Tag: ICAT など）を予め施し，その同位体比から発現量を見積もるソフトが SEQUEST®に盛り込まれている．これら一連の操作はすべて自動で行うことができる．2 次元目の液体クロマトグラフの溶出プログラムによるが，5 分画の場合には 3 時間 ~ 6 時間で 2-D LC Peptide Mapping が完了する．

図 4 は，酵素消化した 24 種類の標準蛋白質に対する 2-D LC Peptide Mapping 分析例である．従来の 1-D RP LC では多くの共溶出するペプチド群があり，量の少ないペプチドに対して MS と MS/MS のデータセットを取りこぼすことが多い．これに対して，2-D LC に基づく解析では，分画を行うことにより共溶出するペプチド群の数を少なくできるため，少ない量のペプチド群についても充分解析ができ,タンパク質/配列のカバー率を向上させることができる． 24 個の標準蛋白質群の場合，1-DLC に比べペプチドの同定数を約 2 倍に向上させることができた．本方法に基づいて，2,000 以上の蛋白質同定を一度の操作で実現することを目標に研究を行っている．

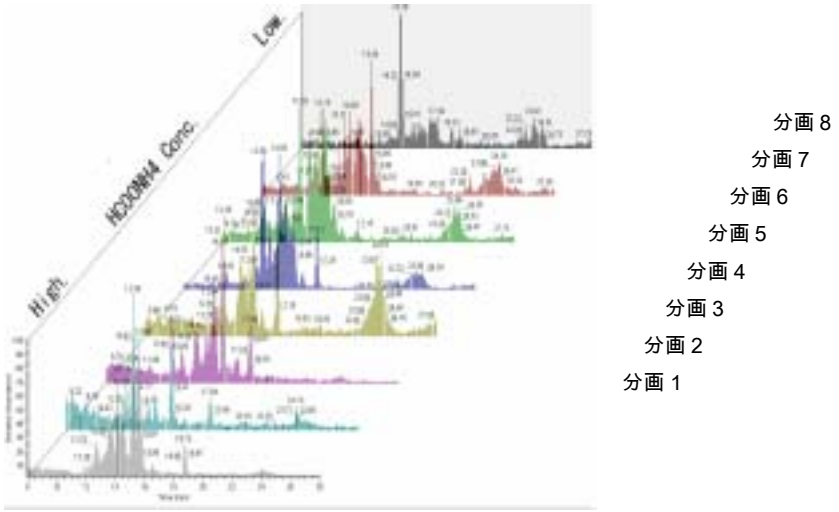


図 4 ．RED 消化した 24 種類の標準蛋白質に対する 2-D LC ペプチド・マッピング分析例 .各 8 塩濃度に対応して分画されたペプチド混合物の RPLC による得られたマス・クロマトグラフを示している．

このような“Beyond Gel Proteomics”による方法論の転換は ,これまでの 2 次元電気泳動ゲル法に比べ , プロテオーム解析の質と処理速度・ 量の点でまったく新しい蛋白質解析の地点に到達する . さらに , 試料の蛋白質分画を 2-D LC で予め行い , 各分画に対して本稿での 2-D LC ペプチドマッピングを適用することにより , 実試料ライセートなどに対して蛋白質同定数を古典的な 2 次元電気泳動ゲルと同等程度まで向上させることができると期待している .

B. 機能性複合体タンパク質の相互作用研究

a. アポトーシス誘導機能蛋白質の同定研究

哺乳動物の免疫系成立の際に ,自己に反応性のあるＴ細胞受容体を発現しているＴ細胞前駆体は , T 細胞前駆体 CD3 の複合体からのシグナルによってアポトーシスの過程を経由して胸腺内で消失することが知られている . このアポトーシスの機構を解析するために in vivo で抗 CD3 モノクローナル抗体で処理したマウス胸腺の細胞抽出液よりアポトーシス誘導能をもつ無細胞系を確立した . 遠心分離による細胞分画の各分画のうち , 細胞質分画にアポトーシス誘導能が局在していることを突き止めた . アポトーシス誘導能は抗体処理に依存していた . さらに抗体処理の有無で細胞質分画の蛋白質組成を二次元ゲルで比較したところ , 新たに出現するあるいは減少する蛋白質スポットを見出し , ゲル中酵素消化とタンデム質量分析によってこれら蛋白質を同定した . このうち増加した HMG2 蛋白質は Dnase による DNA 断片化の際に DNA 二重鎖の‘折り曲げ’を誘導する蛋白質のひとつであり ,アポトーシスの主な現象である核内 DNA の断片化との関係が示唆された .このように , ある生体活性の細胞内局在性を細胞分画により見出し , 活性の本態を突き止める上で重要な機能発現に関わる蛋白質群の同定をおこなっている .

b. 細胞内分子機械の動的構造の解析

細胞内で機能する蛋白質複合体は主要な要素とともに , これらと相互作用しながら蛋白質複合体の多様な機能発現を制御したり , 他の蛋白質複合体に一連の機械動作として伝達したりするアクセサリー蛋白質群がある . しかしながら , まずその構成要素やその機能についてよく理解されていない . プロテアゾームやリボゾームは細胞周期の時系列においてかなり正確に制御されている細胞内分子機械の典型である . プロテゾームで適切に蛋白質が壊されずに蓄積したり , また適切な速度で蛋白質が生産されなければ , 細胞機能に多様な障害をおこす . 今期は , 超遠心密度勾配法により分画された大腸菌由来 70S リボゾーム酵素消化して , 多次元液体クロマトグラフによるショットガン・ プロテオーム解析 (2-D LC peptide mapping) を行い , 翻訳開始因子(IF-2-a, IF-3) , 伸長因子 (EF-Tu) を含むアクセサリー蛋白質群 (15 個以上) の高感度な同定を行い , 新しく見出された蛋白質の機能に関する研究を行っている .

業績目録

原著論文

1. Kawakami, T., Anyoji, H. and Nishimura, T. 2002
Development of proteome analysis systems for efficient expression profiling: Towards high throughput identification and quantitation of disease target proteins

J. Mass Spectrom. Soc. Jpn., 50, 135 - 141.

2. Nishimura, T., Sakaguchi, Y., Usui, F., Kubota, M., Bando, Y. and Fujita, Y. 2002
Development of an automated “ shotgun” proteome-analysis system with multi-dimensional liquid-chromatography
Medical Science Digest 28, 205 - 209.

3. Kawakami, T., Nagata, T., Muraguchi, A. and Nishimura, T. 2003
Proteomic approach to apoptotic thymus maturation
J. Chromatography B, 787, 223 – 229.

4. Kawakami, T., Anyoji, H. and Nishimura, T. 2003
Use of Nano Liquid Chromatography/Nanoelectrospray Ionization/Ion Trap Mass Spectrometer for Proteome Quantitation and Identification
J. Mass Spectrom. Soc. Jpn., 51, 79 - 82.

総説

1. Nishimura, T. 2002
Introduction to “Role of mass spectrometry for proteomics in life science in new century”
J. Mass Spectrom. Soc. Jpn., 50, 112 – 115.

2. 西村俊秀 2002
「プロテオミクス研究における質量分析」
Molecular Medicine 西條長宏・横田 淳・吉田輝彦 編集 臨時増刊号 139『癌ゲノム学』第２節,pp.166 – 175.

3. 川上隆雄・西村俊秀 2002
「効率的な発現プロファイリングのためのシステム」及び「疾患関連タンパク質同定における課題」鈴木紘一 監修、平野久・鮎沢 大 編『病態プロテオミクス』現代化学増刊号 42、東京化学同人（株）、56-59 及び 87-92.

4. 川上隆雄、西村俊秀 (2002) 病態プロテオミクス方法論の現状と課題 Current state of the methodology of disease proteomics、実験医学 20(14) , 2002-2008.

5 西村俊秀 2003
創薬における新しいプロテオミクスの展開、薬事日報、平成１５年１月１日,
14 – 15.

6. 藤田芳司、川上隆雄 2003
「臨床プロテオミクスの現状と将来展望」(『特集 プロテオミクスと病態解析』) MEDICO, 34, 165 – 168.

7. 西村俊秀、荻原 淳 2003
「プロテオーム解析技術の現在と展望（方法論）」(『特集 プロテオミクスと病態解析』MEDICO, 34, 169 – 173.

8. Walter P. Blackstock、安養寺久栄 2003/06/17
「蛋白質-蛋白質相互作用–新しい治療と創薬のために」(『特集 プロテオミクスと病態解析』MEDICO, 34, 174 – 178.

著書

1. 川上 隆雄, 安養寺 久栄 、西村俊秀 2002

“発現プロファイリングの基本技術 :「タンパク質の分離と同定 」『生命科学のための最新マススペクトロメトリー　タンパク質解析と薬物動態解析 』原田健一, 田口良, 橋本豊 編, 講談社サイエンティフィク

2. 川上 隆雄、西村俊秀　2003
「プロテオーム解析のための基礎」『化学フロンティア⑩ポストゲノム・マススペクトロメトリー』, 化学同人社、出版予定.

学会発表

1. 川上隆雄、安養寺久栄、西村俊秀 (2002) 膜結合蛋白質を含む細胞蛋白質群の発現解析、第 74 回日本生化学会大会
2. 坂口裕理子 碓井史彦, 板東泰彦, 川上隆雄., 安養寺久栄, 西村俊秀 (2002) 多次元 LC/MS/MS を用いた複合体蛋白質の同定, 第 50 回質量分析総合討論会要旨集, pp 56-57.
3. 安養寺久栄、坂口裕理子、板東泰彦、三苫 博、川上隆雄、西村俊秀 (2002) ハイスループット発現プロテオミクスのためのオンライン多次元 LC-MS/MS システム: 広域定量、高速消化、高回収率の諸条件、第 50 回質量分析総合討論会要旨集 pp 58-59.
4. 川上隆雄、安養寺久栄、碓井史彦、板東泰彦、西村俊秀 (2002) 膜結合型蛋白質を含む発現プロテオームの同位体タグ修飾法による定量解析 第 50 回質量分析総合討論会要旨集、pp.142-143.
5. 川上隆雄 （2002） 質量分析を用いた有用蛋白質分子の探索、第 29 回 BMS コンフェレンス講演要旨集、pp.198-202.
6. 川上隆雄、安養寺久栄、阪井豊、荻原淳、碓井史彦、板東泰彦、西村俊秀 (2002) 質量分析タグ法による発現プロテオームの定量解析、第 75 回日本生化学会大会発表抄録集、生化学 *74 (8), 740* .
7. 安養寺久栄、坂口裕理子、板東泰彦、川上隆雄、西村俊秀 (2002) ハイスループット発現プロテオミクスのためのオンライン多次元 LC-MS/MS システム、第 75 回日本生化学会大会発表抄録集、生化学 *74 (8), 740* .
8. 坂口裕理子、安養寺久栄、川上隆雄、碓井史彦、板東泰彦、鈴木勉、西村俊秀 (2002) LC/LC/MS/MS によるリボソーム蛋白質の同定、第 75 回日本生化学会大会発表抄録集、生化学 *74 (8), 740* .
9 川上隆雄 （2002）質量分析法による疾患関連タンパク質の同定へのアプローチ、日本質量分析学会創立 50 周年記念若手講演会要旨集 pp.96-105.