



臨床研ニュース

(財)東京都医学研究機構

東京都臨床医学総合研究所

THE TOKYO METROPOLITAN INSTITUTE OF MEDICAL SCIENCE (RINSHOKEN)

ISSN 0914-0735 第301号 (平成13年12月号) 平成13年12月31日発行 (財)東京都医学研究機構 東京都臨床医学総合研究所 〒113-8613 東京都文京区本駒込3-18-22 Tel 03-3823-2101 内線 5130 FAX 03-3823-2965
バックナンバーは第257号 (平成10年4月号) から臨床研ホームページ (<http://www.rinshoken.or.jp/>) でご覧いただけます。



目次

研究部門紹介	1~3
臨床研集談会	4~5
臨床研セミナー	6
平成13年度民間財団等研究費採択状況	6
ホットニュース	7
お知らせ	7
海外学会報告	8



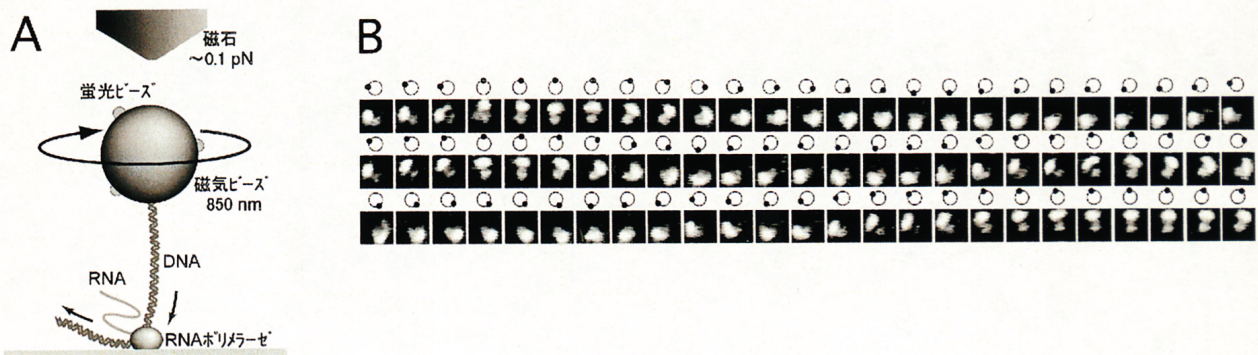
研究部門紹介

生理活性物質研究部門
谷 知己

生理活性物質研究部門 (室長: 原田慶恵、研究員: 茶圓茂、谷知己、貴家康尋) は、核酸・蛋白質などの生体分子の働きを、1分子単位で、リアルタイムで可視化することによって、DNAや細胞骨格に沿って運動する蛋白質の動作原理、核酸・蛋白質分子間相互作用のメカニズム、生理活性物質の刺激にともなう細胞内シグナルの増幅と伝達の仕組みにアプローチする研究室です。

【生体分子の大きさ】

我々を含めて、生命学者は多くの場合、何らかのかたちで、蛋白質を研究の対象としてあつかっています。ところで蛋白質って、どれくらい大きさなのでしょうか。例えば、筋肉の主要蛋白質アクチンのモノマーは、直径およそ5ナノメートルの球状蛋白質です。ヒトのサイズを1.7メートルとして、両者のサイズ比を求めると、およそ1:340000000となります。仮にヒトがアクチン1分子のサイズになったとすると、このサイズの340000000倍は57万8千キロメートルとなります。地球の直径はおよそ1万3千キロメートルですから、ヒトがアクチンモノマー1分子のふるまいを見ることは、地球がピンポン玉ぐらいのサイズに見える怪物が、地球表面にいるヒトひとりの振る舞いを見ることと、サイズのには同じ比になります。



A; RNAポリメラーゼはカバーガラスに固定されている。DNAの片端に付けられた磁気ビーズ (直径850 nm) は磁力によって上方に引き上げられている。

B; 図Aの上側から観察したビーズの蛍光像を133ミリ秒間隔で、左から右に向かって並べた。各像の上に、磁気ビーズ (白い丸) 上に付着した蛍光ビーズ (黒い点) の位置を模式的に示す。磁気ビーズは時計回りに回転している。

【生体分子1分子の動きをみる】

蛋白質や核酸を含めて、そのように小さな生体分子は、1分子では、光学顕微鏡を使っても見えません。そこで、我々は分子に小さな蛍光物質を付けて光らせることによって、その位置を可視化します。暗闇で光っているものは、どんなに小さなものでも見る事が出来ます。大事なポイントは、生体分子の生理活性を失わせることなしに、蛍光物質を結合させることです。この方法を用いることによって、加水分解酵素とATPの結合解離、細胞膜上におけるリガンドと受容体との相互作用、受容体の多量体形成などを光学顕微鏡下で観察することが出来ます。我々の研究室ではこのような蛍光標識の手法を用いて、神経細胞の成長円錐膜における、神経成長因子(NGF)と受容体の相互作用を1分子レベルで可視化しています。NGF 1分子ごとの刺激入力に応じた、細胞内シグナルの増幅・伝達、その結果見られる細胞応答を見ることによって、神経成長円錐の運動活性や運動方向の制御に関わる情報処理の仕組みを明らかにしたいと考えています。

このように、蛍光分子で標識することによって、蛋白質や核酸1分子の動きをリアルタイムで可視化することが出来ますが、蛍光分子の発する光は非常に弱いので、生体分子サイズを反映するような精度（ナノメートルスケール）で、分子の動きを見ることは出来ません。そのような動きを見る場合には、分子のサイズに対して何百倍も大きな目印を標識して、分子の動きを拡大します。よく用いられるのは直径数百ナノメートルのプラスチックビーズです。キネシンやミオシンといった、細胞骨格上を運動する蛋白質や、RNAポリメラーゼのようなDNA 2重鎖上を動く蛋白質は、1分子だけでこのようなビーズを動かすことが出来ます。このようなビーズで標識することによって、我々は、分子の動きをリアルタイムで、分子サイズを反映した精度で計測することが出来ます。原核細胞のRNAポリメラーゼは、DNA 2重鎖をたぐり寄せながら、その塩基配列に対応するヌクレオチドを次々につなげてmRNAを合成しますが、この転写複合体をカバーガラス上に固定して、DNAの片端にビーズをつけてやると、このビーズがDNAの転写にともなって回転するのが見えます（図A,B）。回転速度を詳しく調べてみると、この回転運動は、右巻き2重らせん構造を反映したものであることがわかりました。つまり、RNAポリメラーゼは、DNA 2重鎖をたぐり寄せながら、そのらせん構造に沿ってDNAをぐるぐるとまわしているらしいのです。DNAらせん構造の1ピッチはおおよそ10塩基対ですから、転写反応が10塩基対進めばDNAは360度回転します。すると、転写反応がたった1塩基対進んだだけでも、DNAは36度回転するはずですが、目下我々の研究室では、RNAポリメラーゼが個々のヌクレオチドを付加するごとにおこる、36度ずつのDNAの回転を検出する実験系を確立し、転写反応の素過程、すなわち、1ヌクレオチドを付加する反応過程を可視化することを目指しています。このような実験系が確立すれば、転写の仕組みを、光学顕微鏡下で、RNAポリメラーゼが転写しつつある配列を観察しながら調べることが出来るかも知れません。

【生体分子1分子を操作する】

蛋白質に結合したこのようなビーズは、高精度の位置計測に用いられるのみならず、蛋白質に力を加えたり、DNA分子を引き延ばしたりする際のハンドルとしても用いることが出来ます。このハンドルを動かすために使われるのが、水分子に吸収されにくい近赤外光レーザーを用いた、光ピンセットの技術です。レーザー光を集光すると、光がビーズにおよぼす力（光が物体に対して力を作用させるひとつの例は、太陽光が及ぼす力によって、彗星の塵の尾が太陽から遠ざかる方向にふきとばされる現象）によって、ビーズがその集光位置にとらわれてしまう現象を利用したものです。この技術で、細胞骨格上を運動するモーター蛋白質が止まるような力を加えてやれば、そのモーター蛋白質1分子が発生する力を測ることが出来ます。我々の研究室では、アクチンフィラメントに沿って運動するモーター蛋白質、ミオシンが発生する

力を計測しながら、先に述べた1分子可視化技術によってATPとミオシンの相互作用を1分子単位で観察しています。ミオシンによるATPの加水分解反応はどのようなしくみでミオシンの力発生を引き起こすのか、逆に、ATP加水分解という化学反応の進行は、ミオシンにかかる力に応じてどのような影響を受けるのか、といった、蛋白質によるエネルギー変換の動作原理を、ミオシンをモデルとして明らかにしたいと考えています。

【生体分子の働きを、リアルタイムで、1分子単位で見ることの意義】

これまでに、蛋白質や核酸を含めた生体分子の機能は、多くの場合、精製された分子を用いた方法や、何万個、何億個の同一分子が集まった特殊な組織を用いて、その活性をまとめて計測する手法（例えばアクチンとミオシンの相互作用を、筋線維を用いて調べる方法）によって明らかにされてきました。このような方法で明らかとなった蛋白質の機能を、さらに1分子単位でみることに、どんな意味があるのでしょうか。ひとつの意味は、1分子単位でみる生体分子の働きは、平均値ではない、その生体分子の動作を直接反映した結果であるという点です。蛋白質というものは、スイッチを入れれば同時に動き出すというような機械ではなくて、スイッチを入れても、その後動くかどうかは確率的に決まる機械でしかないことは、イオンチャンネル1分子の開閉をパッチクランプ法で計測してはじめてわかったことでした。大量の酵素と基質を混合してから、時定数 τ 秒で反応生成物が産生されてゆくという結果は、多数の酵素反応の平均的な進行を見ているわけで、それは決して、酵素1分子が基質と結合してから τ 秒で、反応生成物を37%産生したという事を意味するわけではありません。酵素1分子が働くさま、つまり、基質とどれくらいの時間結合して、その間のどのあたりのタイミングで反応生成物を産生するのかは、酵素1分子の反応を見なければわからないことなのです。また、最近明らかにされつつある様々な蛋白質の原子構造は、蛋白質結晶という膨大な数の分子の平均的な構造を見ているので、蛋白質の中でもっともダイナミックな動きをする部分の構造は、はっきりと見えない可能性があります。1分子のダイナミックな動きをみる研究が、このような構造生物学の研究と相補的に進められることで、様々な蛋白質の動作原理が明らかにされてゆくことを、我々は期待しています。

生体分子の働きを、リアルタイムで、1分子単位で見ることのもうひとつの意味は、生体分子の活性を、それがそもそも働いている環境でモニターすることが出来る点です。例えばリガンドと受容体の相互作用を、生きた細胞上で、1分子レベルで観察することによって、細胞の場所に応じた受容体の活性化を定量的に計測することが出来ます。蛋白質の活性が細胞の場所ごとに異なって制御されることは、細胞の極性制御、さらには個体の組織や器官、ボディープランの方向性を制御することにつながります。蛋白質ひとつひとつのふるまいを見ることで、個体の発生や脳の活動といった生命の秩序をどこまで語ることが出来るだろうかと考えながら、我々は光学顕微鏡を覗いています。

著 者 紹 介

生理活性物質部門 谷 知己

温厚な人柄とともに、一見、博多人形のような色白ふっくらな童顔の下に、研究者としての自信と野心を秘めているようです。「花の写真を撮る」という美しい趣味を持ち、世俗の塵にまみれず研究一筋に取り組んでいるため少々世間の常識をこえるところもありますが、周囲がそれを許してしまうのは谷さんの人柄でしょうか。被写体が花から女性に代わるのは何時のことやら……。

(老婆心)



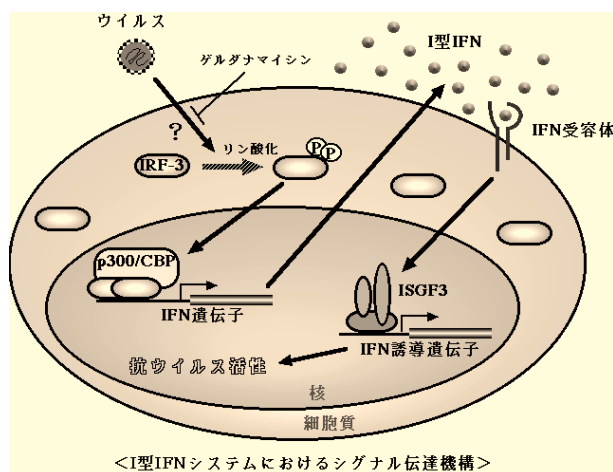
I型インターフェロン遺伝子の活性化へ至るシグナル伝達機構の解析

腫瘍細胞研究部門 米山光俊

I型インターフェロン(IFN)システムは、ウイルス感染に応答した自然免疫において重要な役割を果たしていることが知られている。ウイルス感染を受けた細胞はI型IFNを一過的に分泌し、そのIFNが周囲の細胞に作用することによってISGF3と呼ばれる転写因子が活性化される。ISGF3は種々のIFN誘導遺伝子の発現を誘導し、それらの機能によって細胞内に強い抗ウイルス活性がもたらされることになる。また、このシステムはその後の獲得免疫へ至る過程にも深く関わっていることが明らかになってきており、生体防御において広く重要な役割を担っていると考えられている。我々は、このIFNシステムを起動するために必須であるIFN遺伝子の転写活性化がどのような機構によって制御されているのかを明らかにすることを目的として解析を続けている。

これまでIFN regulatory factor (IRF)と呼ばれる転写因子ファミリーが関わっていることはわかっていたが、ヒトでは少なくとも9つのメンバーが知られるIRFのどの分子がIFN遺伝子の活性化に重要であるかは明らかになっていなかった。この数年の解析から我々は、IRF-3という分子がウイルス感染によるIFN遺伝子の転写誘導に必須な役割を果たしていることを明らかにしてきた。興味深いことに、IRF-3は通常核から排出されて細胞質に存在しているが、ウイルス感染によって特異的なセリン残基がリン酸化されることにより速やかに核へ移行し、多くの転写系におけるコアクチベーターとして知られるp300/CBP分子と複合体を形成して特異的DNA結合能を獲得し、IFN遺伝子の転写活性化因子として機能することがわかってきた。

そこで現在、ウイルス感染からどのようにしてIRF-3の活性化へ至るシグナルが伝達されているのかを明らかにするために、いくつかの観点から解析を行っている。様々なシグナルを抑制する薬剤に対する感受性についての検討から、チロシンキナーゼ阻害剤のゲルダナマイシンなどがウイルス刺激によるIRF-3の活性化を特異的に抑制することがわかってきた。また、IRF-3のリン酸化に関与する分子を明らかにする目的で、*in vitro*におけるIRF-3リン酸化反応について検討したところ、ウイルス刺激に特異的でゲルダナマイシンに感受性があり、かつIRF-3の活性化に必須なセリン残基をリン酸化する活性を検出することができた。今後、これらの結果をもとにして、リン酸化酵素の同定、さらにはウイルス感染からIRF-3のリン酸化へ至るシグナル伝達経路を明らかにしてゆきたいと考えている。



著 者 紹 介

腫瘍細胞研究部門
米山光俊



十年前の転写研究はプロモーター解析と転写因子の同定が中心でしたが、現在は同定された因子の詳細な機能解析と様々なシグナルとのクロストークへ移ってきました。さらに十年後はどうなっているのでしょうか。あたりまえのことですが、日々の興味と共に少し先のことも考えながら仕事ができればと思います。



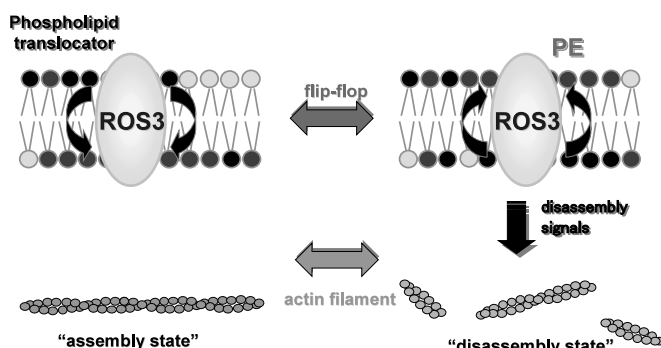
生体膜脂質のダイナミクスに基づく細胞骨格の時空的制御

炎症研究部門 榎本和生

私達の体は約60兆個の細胞群から構成されていますが、個々の細胞を見ると神経細胞、血球細胞、上皮細胞など機能に応じて多種多様な細胞形態を有しています。また、1個の細胞をとって見ても、色々な外部刺激に応答して時々刻々と形態を変化させていることが分かります。このような細胞の形態形成や運動は、アクチン線維を中心とする細胞骨格系が細胞内で変化し、それに伴い細胞を覆っている細胞膜の形が受動的に変化することで作り出されると考えられています。従って、細胞骨格系の機能や制御については、これまでに膨大な研究がなされていますが、細胞膜自体の寄与についてはほとんど注目されていません。私達は、細胞の形態形成や運動における膜の機能について、特に膜の主要構成因子である脂質に注目して研究してきました。最初のアプローチは、様々な脂質分子に対して特異的に結合するプローブ群を開発し、細胞活動に伴う脂質分子の動態を解析することでした。その過程で、細胞膜を構成する主要なリン脂質の1つであるホスファチジルエタノールアミン(PE)の膜分布が、細胞運動や細胞分裂に伴い局所的かつ一過的に変化することを見出しました。さらにPEの細胞内合成・輸送系に異常を持つ変異細胞株を樹立・解析したところ、PEの膜分布が一過的に変化することが細胞骨格系の再編制御に関与することが分かってきました。私達はこれらの結果を踏まえて、局所的なPEの分布変化が細胞骨格系に対して積極的に働き掛けることにより、膜系と細胞骨格系の動きを協調的に制御しているのではないかと考えています。

現在この仮説を証明するために(1)膜脂質の分布を制御する分子機構(2)膜脂質の分布変化を情報変換し、細胞骨格系に伝達する分子機構、の2点を明らかにすべく研究を進めています。(1)については、酵母変異株の樹立および原因遺伝子の同定という手法を用いて、新たな脂質輸送分子ROS3の同定に成功しました。ROS3分子は酵母から高等動物に到るまで保存された膜貫通タンパク質であり、脳、肝臓、腎臓に高い発現が見られます。これまでに酵母ROS3分子は膜脂質と細胞骨格を協調的に制御することで細胞極性の形成などに関与していることが明らかになりつつあり、現在、脳、肝臓、腎臓でも同様の機構を果たしているのか否かについて検討を行なっています。一方(2)に関しては、低分子量Gタンパク質Rhoが関与することが示唆されつつあります(京大・医、成宮周教授との共同研究)。今後(1)(2)それぞれについて更なる解析を行なうと共に、(1)と(2)がどのようにクロストークしているのかという問題についても明らかにしたいと考えています。

現在の作業仮説



著 者 紹 介

炎症研究部門
榎本和生



臨床研にお世話になりはじめて今年で8年目(学生3年+職員5年)になりました。ということは、現在のプロジェクトを始めて8年ということでもあります。改めて振り返ると、臨床研内外の数えきれない方々のお力添えにより、これまで何とか仕事をやってこれたことを痛感しています。この紙面をお借りして、皆さまに心より御礼申し上げます。

臨床研セミナー

日 時：11月5日（月） 午後4：00～ 6：00

演 題：ヒトDNA複製の制御とその癌診断への応用

演 者：ロン・ラスキー博士
（英国ケンブリッジハッチンソンMRC研究センター教授）

世話人：細胞生物学研究部門 正井 久雄



平成13年度民間財団等研究費採択状況

単位：千円

氏 名	研 究 課 題	研究費	財団名等
田中 啓二	パーキンソン病遺伝子“Parkin”の機能解析と医学的応用	7,000	(財) 三菱財団 学術研究助成
原 孝彦	骨髄幹細胞を利用した癌血管新生阻害法の開発	1,500	公益信託 原口記念癌研究 助成基金
宮武昌一郎	ヘルパーT細胞サブセットの分化系を用いた細胞分化メカニズムについての基礎研究	1,000	(財) 持田記念医学薬学 振興財団研究助成
金井 正美	Sox遺伝子Fサブグループと血管新生	1,000	(財) 持田記念医学薬学 振興財団研究助成
金井 正美	膵臓や大腸などの内胚葉由来組織の初期決定機構：再生医学に向けた基礎的解析	1,500	(財) 住友財団研究助成
原田 慶恵	分子イメージングによるタンパク質機能解析法の開発	1,000	(財) 島津科学技術 振興財団研究助成

科学技術振興事業団

氏 名	さきがけ21(若手個人研究推進事業) 研 究 領 域		研 究 課 題
笠原 浩二	ポストドク参加型	タイムシグナルと制御	神経系におけるスフィンゴ糖脂質ミクロドメイン超分子構造の機能
佐々木雄彦	個人研究型	情報と細胞機能	疾病の発症、進行におけるリン脂質因子の生体内動態解析
水島 恒裕 (事業団派遣)	個人研究型	生体分子の形と機能	癌・パーキンソン病の解明を目指したミトコンドリア複合体の結晶構造に関する基礎的研究

ホットニュース

受賞おめでとうございます

東京都職員表彰（研究、発明、発見の分野）

生命情報研究部門 笠原 浩二

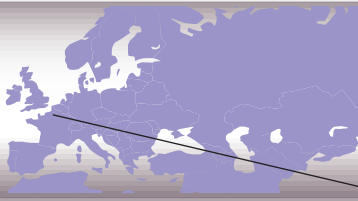
研 究 課 題 「脳神経系における糖脂質の機能解析」

お 知 ら せ

図書館ニュース 2001.12

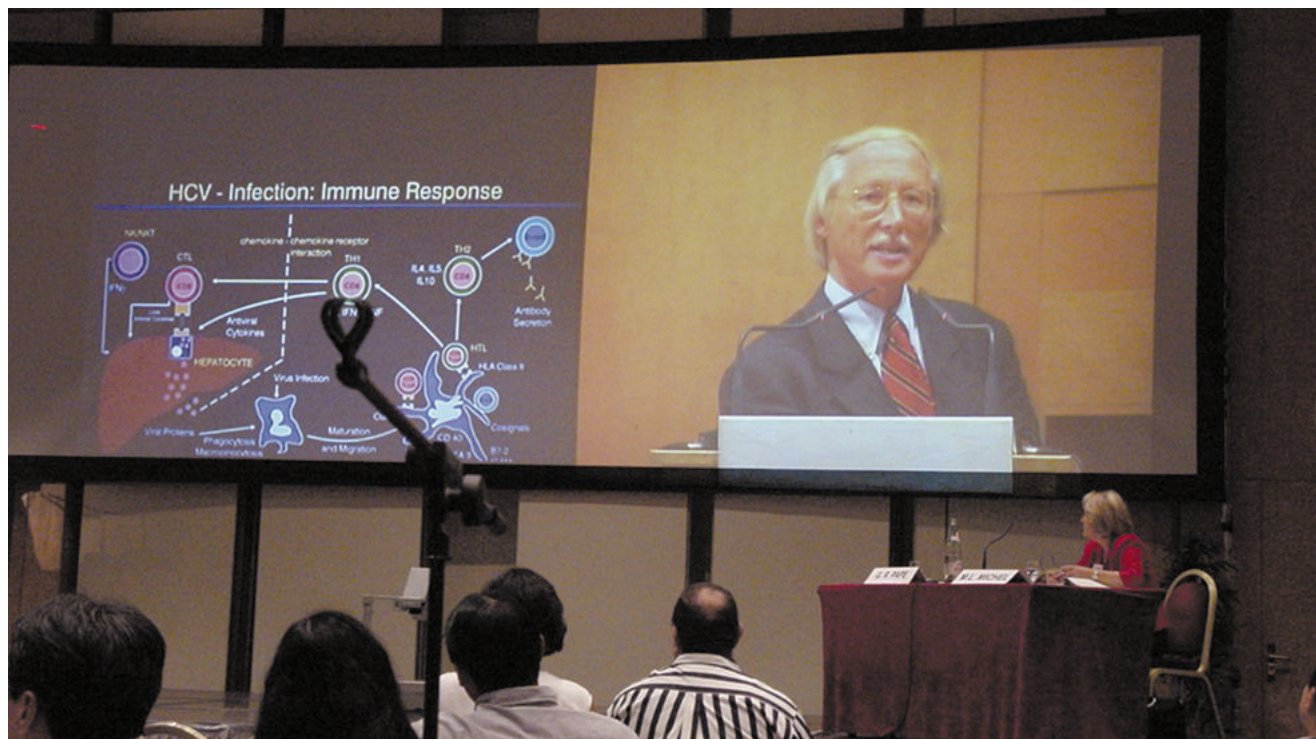
＊新規購入図書＊

- アット・ザ・ベンチ：バイオ研究完全指南（Kathy Barker [著]；中村敏一監訳），東京：メディカル・サイエンス・インターナショナル，2000.12
- EBM医学英語論文の書き方・発表の仕方（ウォーレン S.ブラウナー著；折笠秀樹監訳），東京：医学書院，2001.3
- 医療問題の本全情報 45/96（日外アソシエーツ編集），日外アソシエーツ 1996.11
- インターネットで文献探索（伊藤民雄著；実践女子大学図書館編集）日本図書館協会，2000
- 必ずデータが出るDNAマイクロアレイ実戦マニュアル：基本原理，チップ作製技術からバイオインフォマティクスまで（岡崎康司編）東京：羊土社，2000.12
- サイエンス・ダイレクトの使い方：進化する電子ジャーナル（松山裕二著），日本医学図書館協会，2001
- ザ・プロトコールシリーズ Vol.7：遺伝子の機能阻害実験法（多比良和誠著），羊土社，2001
- 図解 PubMedの使い方：インターネットで医学文献を探す（阿部信一，奥出麻理共著）日本医学図書館協会，2001
- 論文のレトリック：医学研究発表のTips & Pitfalls（廣谷速人著），南江堂，1995
- Advances in Immunology, Vol.79 (Ed.Dixon, F.J.), Academic Press, 2001



海外学会レポート

フランス パリ



海外学会報告（感染生体防御研究部門 小原 道法）

2001年9月2日から5日まで4日間の日程で8th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses（C型肝炎ウイルスと関連ウイルスの国際会議）がフランスのパリで行われた。この国際会議はC型肝炎ウイルス（HCV）遺伝子が発見された3年後の1992年にイタリアのベネチアで第一回が開催され、その後ほぼ毎年アメリカ、オーストラリア、日本、フランス、イタリアで開催されてきた。新しく発見されたウイルスということもあり、第一回はHCV遺伝子の構造解析と臨床疫学が主な内容であった。これらの報告からウイルス性肝癌の70～90%がHCVによるものであり、重大な発癌ウイルスであることが明らかとなった。

それから9年後の今年の報告内容は

1. HCV感染の特徴のひとつである持続感染化の原因を、HCVによる免疫系の修飾にあるとするもので、これまでのHCV遺伝子の変異による逃避という考え方から、より積極的なウイルスの関与が示されるようになった。
2. HCVの感染細胞内での複製過程は有効な感染培養系がなかったためにあまり解明されていなかった。

今回はドイツのBartenschlagen博士らがHCV遺伝子を改変し、肝細胞中で自立的に遺伝子複製するレプリコンを発表しており、これを用いた遺伝子複製機序の解析が大きく進んでいた。また、このレプリコンシステムを用いた抗HCV薬のスクリーニングも多く行われており、近い将来に有効な薬剤が開発されることが期待された。

3. HCVによる高率な発癌機構についてはHCV遺伝子の強制発現細胞や、トランスジェニックマウスを用いた発癌モデルの報告があったが、ほとんど明らかになっておらず今後の研究の進展が望まれるものである。

これまでHCV研究は強制発現系による遺伝子機能解析と臨床免疫学が主であったが、これからはHCVの感染複製と発癌機序について宿主因子との相互作用や、持続感染化成立に関与する免疫系との相互作用などが、分子レベルで急速に解明されていくであろうことを実感した会議であった。