



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320号(平成15年7月号) 平成15年7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 03-3823-2105 内線 5133 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

研究部門便り	1~3
ポスター発表会	4~5
データベース公開について	6
お知らせ	6
図書館ニュース	
臨床研セミナー	7
海外学会レポート	8~7



研究部門便り

腫瘍細胞研究部門の簡単な御紹介

腫瘍細胞研究部門
渡邊 伸昌

まずは、藤田先生の学生時代からのテーマであります、ウイルス感染や二重鎖RNA刺激によるインターフェロン(IFN)遺伝子の活性化機構の解析。藤田先生自ら、毎日ルシフェラーゼアッセイ、ウエスタンブロッティング、細胞染色と次々と実験を行っています(さすがにもうプラスミドの構築はしなくなりました)。シスエレメントの同定からスタートし、現在はIFNシステムにおいて最も重要な転写因子の一つであるIRF-3の活性化機構の解明に取り組んでいます。また最近ではToll like receptor (TLR)と呼ばれる受容体ファミリーを介した自然免疫の賦活化においてもIRF-3が重要であることが明らかとなり、米山さんを中心に、研究員の忍さん、菊池さん、大学院生の森くん、学部生の中村くんらが、図1に示しましたブラックボックスの解明に挑んでいます。

平井さんはTGF- β 刺激によって誘導される遺伝子の転写活性化機構の解析を、やはりこのシグナル伝達系において最も重要な転写因子とされるSmadの活性化の仕組みに関して研究を行っています。

木村さんは今年度より独立研究員となりましたが、研究員の小板橋さんといっしょに、ポリグルタミン病の発症のメカニズムを明らかにすることを目的として、遺伝学的手法の容易な酵母を用いて解析をされています。

そして自分の仕事の話。bcl-3遺伝子産物(BCL-3)およびBCL-3 binding protein (B3BP)の機能解析。このプロジェクトは藤田先生がアメリカ留学中に始められたもので、もともとbcl-3遺伝子はB細胞のリンパ球性慢性白

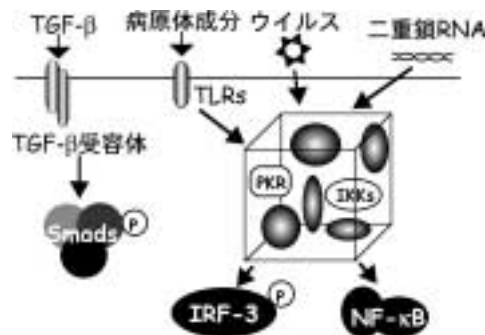


図1

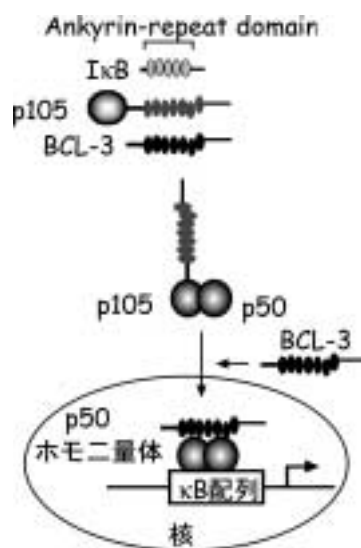


図2

血病においてみられる染色体転座の切断点に位置する遺伝子として同定されました。コードされるタンパク (BCL-3)の構造に変化はないものの、イムノグロブリン遺伝子のエンハンサーと融合することによりその発現が亢進していることが明らかにされ、白血病発症への関与が強く示唆されました。アミノ酸の一次構造から転写因子NF- κ BのインヒビターであるI κ Bとの相同性が示され、機能的にもI κ Bファミリーの一つとして捉えた仕事がいづつか報告されましたが、その後、藤田先生の研究により、転写制御においてはI κ Bとは全く逆の作用、つまりシスエレメントに κ B配列を持つ遺伝子の発現を増強することが明らかになりました。BCL-3自身はDNAに対する親和性はありませんが、NF- κ BのサブユニットであるNFKB1p50もしくはNFKB2p52のホモ二量体と結合して転写活性化能を付与することが示されました。しかしながら、そのように協調して働くべきパートナーであるp50（およびp52）はその前駆体であるp105（およびp100）からプロテアゾームによる限定分解を経てようやく生まれ、さらには、前駆体のC末領域は構造的にも機能的にもI κ Bと同じ作用をもつため、せっかく作られたp50はホモ二量体になる前にp105によって捕捉され細胞質に留まっていることが示されました。我々は、BCL-3がその不活性型の複合体p50/p105に作用しタンパク質分解を経ずに分子間の平衡を移行させることによりパートナーであるp50ホモ二量体を生み出し一緒に核へ移行することを明らかにしました（図2）。次なる課題は、では白血病発症にいたる標的遺伝子とは何か？ということですが、我々もいろいろ検討を行いました。転写因子の側からその標的遺伝子を見つけるのはなかなか難しいようです。しかしながら最近いくつかのグループからCyclin D1遺伝子が少なくともその一つであることが報告されました。Cyclin D1遺伝子は別名bcl-1と呼ばれ、やはり白血病をはじめ種々の腫瘍において発現の亢進が見られることが知られており、BCL-3の標的遺伝子として話が合うと思われます。またbcl-3遺伝子欠失マウスは、やはり免疫系に異常がみられ、種々の感染に対して抵抗性が弱くなっていることが報告されました。その原因は脾臓など末梢リンパ組織において胚中心とよばれる微細構造の形成不全であることが報告されました。胚中心では外来抗原に対して高い親和性を有する抗原受容体をもつB細胞が爆発的に増殖するとともに、イムノグロブリン遺伝子のクラス

スイッチ組み換え、体細胞突然変異の亢進、といったプログラムされた遺伝子の再編成が進行します。我々はこれらの表現型を説明するBCL-3の標的遺伝子を探るとともに、BCL-3と共に働く因子を検索する過程においてB3BPを同定し、解析を進めています。ヒトB3BPは1770アミノ酸からなり、図3に示すようなドメイン構成をしています。まずC末端に存在するSnrドメインに関して。このドメインの同定の起源は大腸菌のDNA修復機構の一つであるミスマッチ修復に遡ります。図4にありますように大腸菌では複製時に誤って取り込まれた塩基により生じたミスマッチは、そのミスマッチ構造を認識するMutS、MutSとMutHとの間をとりもつMutL、

そしてヘミメチル化されたDNAを認識し、まだメチル化を受けていない新生鎖に切れ目（nick）を入れるMutH、これらの因子により修復がスタートします。MutS、MutLに関しては、真核生物においても酵母から

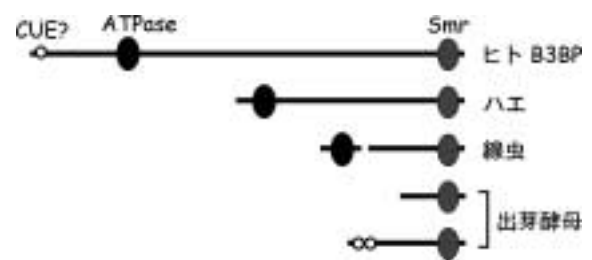


図3

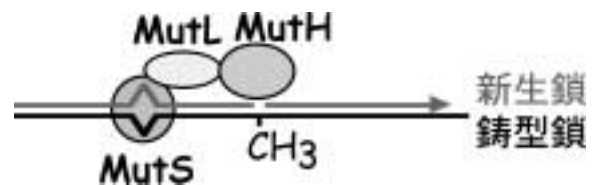


図4

ヒトまでホモログが存在しゲノムの恒常性の維持に重要な役割を果たしています。しかしながらMutHに相当するものは見つかっておらず、鋳型鎖と新生鎖を見分ける仕組みと共に重要な課題となっています。MutSファミリー（真核生物の場合、MSH）は、そのATPaseドメインを含む領域のアミノ酸一次構造の比較から図5にありますようにMutS-IとMutS-IIの二つの系統に分類され、原核生物では大腸菌に代表されるMutS1と他の細菌に見い出されるMutS2に分かれています。MutS2系統にはC末端によく保存された領域があり、その保存された領域は真核生物では、多くの場合、単独で（つまりMutSファミリー共通のATPaseドメインを有していない）存在することが次第に明らかとなり、この保存された領域がSmr（small mutS-related）ドメインと名付けられました。次にB3BPのややN末側にはATP結合部位がありバクテリオファージT4のpolynucleotide kinaseと相同性を有することが分かりました。またN末端にはCUEドメインによく似た配列が見い出されます。CUEドメインはCoupling of Ubiquitin-conjugation to ER degradation の略ですが、最近、モノユビキチン結合ドメインであることが報告されました。リン酸化チロシンとSH2ドメインのよう

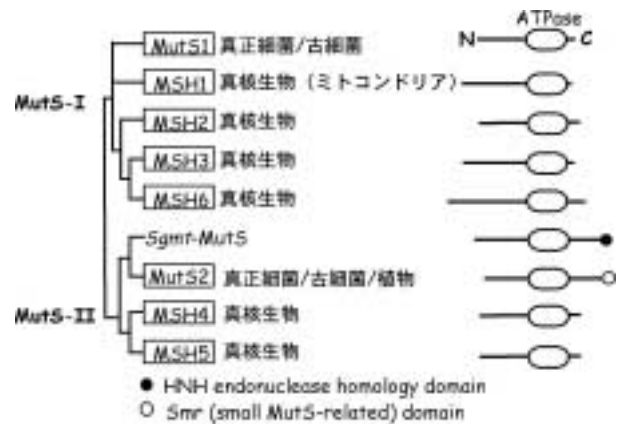


図5

な関係でしょうか。ショウジョウバエにはB3BPと相同性のあるATPaseドメインとC末端にSmrドメインをもつタンパク質をコードするORFが存在しますが、線虫では隣接する2つの遺伝子の独立した転写産物にそれぞれコードされている様です。出芽酵母ではSmrドメインをコードする遺伝子は2つ見い出されており、そのひとつはN末側にCUEドメインをコードしています。しかしながら、B3BPのATPaseドメインと高い相同性をもつタンパクは検出されていません。このようなアミノ酸一次構造の比較から得られた知見をもとに、生化学的な検討を加えたところ、現在B3BPのC末端にあるSmrドメインがnick-endonuclease活性をもつこと、ATPaseドメインはpolynucleotide kinaseであることが分かりました。またB3BPはBCL-3だけでなくヒストンアセチル化酵素CBP/p300とも相互作用することから、現在、転写とDNA修復（組み換え？）との共役に関して検討を進めています。遺伝学的な解析として忍さんがノックアウトマウスを用いた解析をされており、大学院生の小野口くんがSmrドメインの解析を進めています。

最後になりましたが、この原稿の担当（督促？）をされている福原さんは腫瘍細胞研究部門のOGで、IRF-3の結晶構造の解明にたいへん貢献されています。

著者紹介

玉川上水の近くに引っ越し。上水わきの畑と雑木林のあいだを自転車走らせています。朝は、ちょっとした森林浴。帰りは鼻をつままれても分からないほど（は、おおげさか？）の暗闇。なんだか懐かしい気分になります。で、へなちょこガーデニングを開始。周りも同じようなもので、むずかしそうな樹木系は少なく、一年草やコニファー類などのよっぼどのことがない限り枯れないか、枯れてもショックが少ないものからスタートしている様子。そんななか、なぜか思い出したのは、小学生の頃ハマっていた魚釣りのこと。生き物相手に試行錯誤、少しでも前進することを夢見て日々精進。実験もまた然り哉。

ポスター発表会

タンパク質分解において糖鎖はどのように認識されるか—ユビキチンリガーゼFbx2のX線結晶構造解析—

水島 恒裕

ポスター発表会では、やっと立体構造が決まったばかりでその後研究が進み、内容を見直すと間違っただけの発表をしてしまいましたが、蛋白質分解における糖鎖認識機構の構造学的な理解という研究を評価していただきました先生方に感謝しております。今回はポスター発表会の内容に、その後の研究成果を加えたものを紹介させていただきます。

蛋白質分解において糖鎖を分解シグナルとして認識するSCF^{Fbx2}は独立研究員の吉田雪子先生が見つけた酵素で小胞体関連分解(ERAD)において細胞質に逆行輸送された糖蛋白質に分解シグナルであるユビキチン(Ub)を付加する役割を担っています。この蛋白質分解における糖鎖認識機構及び、糖鎖を認識し糖蛋白質にどのようにUbを結合するかを、X線結晶構造解析による立体構造から解明することを目的として研究を行いました。

『研究成果』

本研究ではSCF^{Fbx2}の糖鎖認識サブユニットであるFbx2糖鎖認識ドメイン(SBD)を、Hisタグ蛋白質として大腸菌を用いて発現させNiアフィニティー、ゲルろ過クロマトグラフィーにより精製し結晶化を行い重原子同型置換法により2.0 Å解能でSBDの立体構造、

さらに2.4 Å解能で基質であるキトビオースとの複合体構造を決定した。その結果SBDの構造は、10本の逆平行βシートからなるβサンドイッチ構造(図1)であり、βシート以外にN末端、b4とb5の間に二本のαヘリックスが存在していた。さらに、

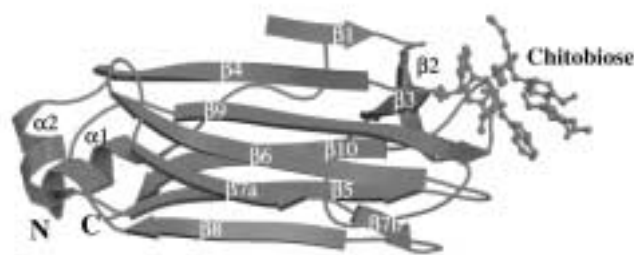


図1. Fbx2のSBDの立体構造。

キトビオースはSBDの先端領域のループに結合していることが明らかになった(図1)。SBDのようにβサンドイッチ構造を持ったレクチンは類似構造検索より見られたが、これらのレクチンでの糖鎖の認識は分子中央のβシートにできた窪みで行われており、Fbx2で見られたβシートから突き出したループ領域での認識とは異なっている。キトビオースとSBDの結合は、キトビオースの片側のGlcNAc(A)がSBDのTrp280の側鎖に重なって結合し、もう一方のGlcNAc(B)は水素結合とNAcのアセチル基がTyr177、Phe279、Lys281から形成された小さい疎水性のポケットに入ることで行われていた。この分子表面の小さな疎水性ポケットはFbx2と糖蛋白質の結合において、マンノースとGlcNAcを識別する役割を果たしていた。また、SBDと結合しているキトビオースは水素結合により2つのGlcNAcが固定された状態を取っており、これにより結合する糖鎖と蛋白質の位置づけが一定となるように決定していた。

Fbx2は糖蛋白質との結合において、これまでのレクチンとは異なり糖鎖の根元部分のキトビオースと特異的に結合する。Fbx2がβシートから突き出したループ領域で糖鎖の根元部分と結合することはキトビオースの配向を一定状態に保ち、キトビオースより先に位置する糖鎖と蛋白質領域を決まった方向に提示す

ることに役立っている。また糖鎖を認識することでFbx2は様々な構造異常に影響されずに異常蛋白質と結合し、分解シグナルであるUbを付加できることが構造より明らかになった。

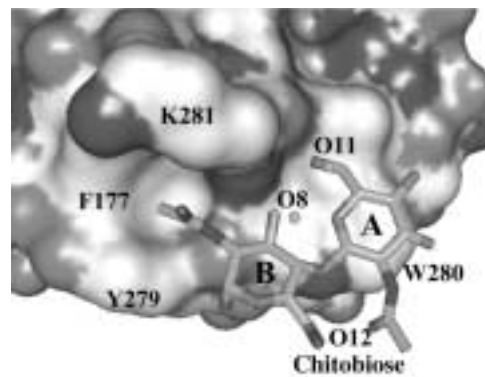


図2. SBD糖鎖結合部位の立体構造



研究員データベース公開について

臨床研では、ホームページ(<http://www.rinshoken.or.jp/>)にて、すべての都派遣職員の研究業績（研究員データベース）を公開しました。臨床研に勤務する個々の研究者の研究活動の様子をご覧いただけますので、各研究部門のホームページ（→臨床研紹介）とあわせてぜひ御閲覧ください。



お知らせ

図書館ニュース

＊新規購入図書＊

- Annual Review of Physiology, Vol.65 (Ed. Hoffman, J.E.), Annual Reviews, 2003
- 現行医学雑誌所在目録2003：2003年度受入医・歯・薬学及関係誌，東京：日本医学図書館協会，2003.5

＊寄贈図書＊

- マウスラボマニュアル第2版：ポストゲノム時代の実験法，東京都臨床医学総合研究所 実験動物研究部門編，東京：シュプリンガー・フェアラーク東京，2003.5

臨床研セミナー



日 時：平成15年6月13日（金） 午後 3：00～5：00
会 場：（財）東京都医学研究機構 東京都臨床医学総合研究所 2階会議室

演 題：〔第一部〕
「ベンチャーで基礎から応用へ、なんとしても」

演 者：古市泰宏 氏
株式会社ジーンケア研究所、代表取締役社長



演 題：〔第二部〕
「ウエルナーヘリカーゼを標的としたsiRNAの制癌効果－
核酸医薬のトランスレーショナルリサーチモデルとして－」

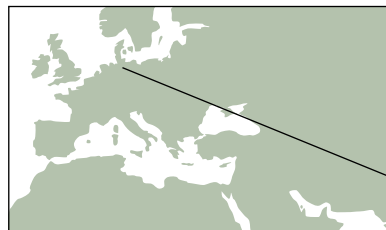
演 者：嶋本 顕 氏
同研究所、ターゲット探索研究部・部長

世話人：所長 新井賢一



⇒8ページつづき

る学会に参加することが多かった私にとって、新車の発表会にも似た米国の大きな学会よりも、地道ながらもじっくりサイエンスを考えることのできるヨーロッパスタイルの学会に新鮮味を覚えた。ドイツ、日本、カナダ、そして米国でも、お金儲けよりも生物学そのものを愛している研究者が沢山おり、だからこそ白熱した議論ができるのである。昨今、幹細胞研究の分野では、造血幹細胞の可塑性の真偽をめぐる米国の研究者同士が激しく争っている。大御所が「それはうそである」というキャンペーンをはっているために、可塑性の研究はお蔵入りしそうな状況であるが、驚いたことにWilsede Meetingで発表した二人の米国研究者はいずれも、「造血幹細胞は筋細胞へも肝細胞へも分化転換する」ことを支持するデータを示していた。あとで話をきいたところでは、「自分で確かめてみなければ事の真実はわからない。米国は自由な国だから意見統制はできない」とのことであった。ヨーロッパの地で、サイエンスの流行とは何かをもう一度考えさせられた学会であった。



海外学会レポート

ドイツ Wilsede

Wilsede Meeting-Modern Trends in Human Leukemia

腫瘍生化学研究部門 原 孝彦

2003年6月14～18日にドイツ北部で開催されたWilsede Meeting-Modern Trends in Human Leukemiaという学会に参加してきた。この学会はハンブルグとハノーバーの間に位置するLueneburger Heide国立公園の中にある人口400人余りの町Wilsedeにおいて、世界各国の血液学者と白血病学者を招いて1973年から開催されてきた集まりで今回で15回目となる。今回は本学会の運営に多大な尽力をしてきたWolfram Ostertag教授（Heinrich-Pete-Institute、写真



写真1 Ostertag教授（右）と筆者

1) の退官を祝しての特別大会となった。この学会の伝統により、メイン会場は築300年を越える大きな納屋のような建物（写真2の後ろにある藁葺きの建物）で、ここは車が入れない自然保護地域であるために、参加者（約170名）はすべて宿泊場所から馬車かレンタル自転車を使って片道30分かけて毎朝毎晩行き来する。全員が昼食も夕食もともにして、さらに学会会場には常にコーヒー・クッキー、夕方からはビールとワインが用意されていたので、いやがもうでも「おしゃべり」の連続である。参加者はどこにも逃げられないせいもあって、3日半にわたるセッションはどれも盛況で満席状態であった。

今回のトピックは、「幹細胞の分化・可塑性・遺伝子プログラム」であった。白血病の研究者の集まりなので、おのずから造血幹細胞の遺伝子発現異常による腫瘍化が話題の中心ではあったが、主催者はあえて他の系統の幹細胞研究者も招聘したため、こじんまりした学会にしては広い範囲の最新情報を得ることができた。遺伝子の機能研究においては、コンディショナルノックアウトマウスが全盛を迎えつつある。目的の遺伝子をLoxPサイトで挟み込んだノックインマウスを作製し、これをpMXプロモーター（ポリICによって転写誘導可能）にCre

リコンビナーゼをつなげたトランスジェニックマウスと交配する。こうしておくで生存に必須な遺伝子であっても成獣マウスでの遺伝子破壊による機能不全を解析できる。特に、米国の研究者はすべてとっていいほどこの方法を採用していた。

一方、ドイツや英国の研究者は細胞の連続ビデオ撮影やゲノム解析といった時間のかかる方法を使いながらも独自の結論を導いていたのが印象的であった。米国で開催され



写真2 学会のメイン会場の前で談笑する参加者

⇒7ページへつづく