

細胞レベルでの生化学をめざして

細菌感染研究部助教授 大海 忍



略歴

1954年生まれ。1977年、東京大学理学部物理学科卒業。聖マリアンナ医科大学研究員を経て、1979年、東京大学大学院理学系研究科に進学（医学部第二生化学教室、今堀和友教授）。1983年、同大学院を中途退学し、（財）東京都臨床医学総合研究所に就職（遺伝情報研究部、鈴木絃一郎長）。1984年、東京大学理学博士取得。1987年、東京大学医科学研究所細胞化学研究部助手に採用される。研究部名称変更に伴う配置換えにより、細菌感染研究部助手を経て、1992年から現職。

私が（財）東京都臨床医学総合研究所から医科学研究所に移ったのは12年前、30代前半でした。それ以前は、カルパイン（カルシウム依存性プロテアーゼ、私達は当時CANP; calcium-activated neutral proteaseと呼んでいました）および関連タンパク質の構造と機能に関する研究をしていました。高等生物の組織にはカルパインが必ず存在します。このタンパク質分解酵素が実際に何をやっているかは未だ分かっていません。「酵素があるから性質を調べよう、それにはまず精製する。きれいにしたら構造をやる。全一次構造ならばcDNAをとるのが手取り早い。」というのが古典的な生化学から出発した、1980年代はじめの我が国における分子生物学でした。そのストラテジーで、カルシウム感受性の異なる2種類のカルパイン前駆体の触媒サブユニットと活性調節サブユニット、カルパインの内在性阻害タンパク質であるカルバスタチンなど、次々と構造を決めていったわけです。研究チームは各自の得意なテクニックを受け持つ分業体制をとることが多かったようです。私は、タンパク質の精製と部分アミノ酸配列を解析するためのサンプル調製、そして遺伝子クローニングができた後の構造と機能の関係をタンパク質レベルで解析することが専らでしたが、余裕のあるときは核酸を扱う機会もありました。このような研究環境でひたすらアミノ酸配列とにらめっこしながら、生命現象に立脚した生化学をやりたいと思っていたのは私だけではなかったかもしれません。

医科研に來てから研究テーマが大きく変わりました。当然のことながらこれまでのカルパイン研究は、新しいテーマが軌道に乗るまでは中断しました。研究部全体の興味は白血球による活性酸素産生に向けられていました。この研究を始めたのが、活性酸素産生系を構成するタンパク質の一次構造が海外のグループによって次々と明らかにされた時期と一致したこともあって、やりがいのある仕事だと思ったものです。すぐに抗体を作り始めました。抗原は、医科研に導入されたばかりのペプチド合成機を利用して、cDNAから推定されるアミノ酸配列にしたがってデザインしました。それまでは、抗体というものは高度に精製した抗原を免疫して得られるもので、ましてやcrudeな状態で抗体を使うことは邪道だとさえ思っていました。ペプチドの化学合成そのものも素人でありましたし、実際に抗ペプチド抗体を作りはじめた数々の失敗を経験しました。しかし、完成した抗体は非常に役に立ちました。すなわち、活性酸素産生にかかわるタンパク質の膜におけるトポロジーや種々の細胞・組織における系の発現を解析するためのツールとして活用しました。また、系の活性化において個々のタンパク質間の相互作用を解析するためにも合成ペプチドを利用することができました。そこで私は生きた細胞にペプチドを導入して細胞の中のタンパク質の動きを見ようと試みしました。しかし、細胞の活性を保ったまま水溶性ペプチドを細胞質に入れるにはかなりの技術を要します。結局、皆技術的に比較的楽な無細胞系での実験を行っていたようです。

そうこうしているうちに私も自分自身の研究テーマについて考えなければならない年齢になってしまいました。最近では、アポトーシスにかかわる研究に専念しようとしています。アポトーシスは、活性化された細胞死ということですが数年前から興味をもっていました。今のようなブームになるとは思わず、誤算でした。（私は競争するのは好みません。自分のペースを守って納得の行く研究したいものです。）もちろん、細胞を壊したりすればアポトーシスはおこりません。アポトーシスを誘導した細胞の細胞質を用いれば無細胞系で核の凝縮を再現できることから、cell free apoptosis などということばも生まれましたが、これはアポトーシスの本質を見ているわけではありません。すなわちアポトーシスは、私が考えていた細胞レベルでの現象という条件を満たしており、これをいかに生化学的に扱うかは、やる価値があると思います。さらに最近では、アポトーシスの情報伝達にgranzyme や interleukin-1 β -

converting enzyme (ICE) などのプロテアーゼがかかわっていることが注目されています。また偶然にも私たちはアポトーシス途上の細胞で活性型カルパインに再会することができました。これは切断部位特異抗体があっ
てはじめて可能になったわけです。切断部位特異抗体は限定分解を受けたポリペプチド鎖に特異的で、未切断のタンパク質とは反応しません。合成ペプチドを活用して免疫原を分子設計し、作成します。アポトーシス研究においても、タンパク質の翻訳後修飾を見分ける特殊抗体を含む新しいアプローチを用いて細胞レベルでの生化学を目指しています。小規模な研究グループですが、若いひとたちと並んで研究ができることをうれしく感じています。

現在の研究テーマ

1. 細菌感染と細胞死に関する研究 微生物侵入によって引き起こされる細胞死が注目されている。これは感染症を宿主・病原体相互作用の観点から理解する上でも重要である。赤痢菌は宿主のマクロファージに侵入して細胞死を惹起する。赤痢菌の病原性にかかわるタンパク質と宿主のアポトーシス関連分子との相互作用を中心に解析を進めている。本研究テーマは、次項のマクロファージ分化とも密接な関係があることが最近わかってきた。
2. 食細胞の増殖・分化と細胞死に関する研究 マクロファージ様に分化した細胞は、抗Fas抗体や腫瘍壊死因子 α (TNF α) に対して耐性を示す。このとき、細胞表面の受容体発現は低下しないが、受容体に共役し、アポトーシスの引き金と考えられているタンパク質分解酵素カスパーゼ8前駆体の活性化を含めてこれ以降の連鎖反応が抑制される。耐性化の分子機構を追究している。
3. アポトーシス受容体の翻訳後修飾と受容体機能調節に関する研究 TNF α 受容体やFasは、多価性リガンドが結合すると細胞表面で会合し、アポトーシスの引き金となるシグナルを細胞内に送り込む。これらの受容体はアポトーシス誘導時に様々な翻訳後修飾を受け、機能調節が行われると考えられる。アポトーシス受容体のリン酸化、架橋反応、プロテオリシスなどにかかわる外的因子および内在生因子の同定、さらに修飾反応の生物学的意義の解明をめざしている。
4. 細胞死にかかわるプロテアーゼに関する研究 アポトーシスの情報伝達にはカスパーゼファミリーのプロテアーゼがかかわっている。また、カルパインやプロテアソームなどの細胞内プロテアーゼもアポトーシスの調節に関与すると考えられている。これらのタンパク質分解系のネットワークにこだわって横断的解析を重点に研究を進めている。さらに、活性型カスパーゼあるいは標的タンパク質が限定分解を受けて生じたポリペプチドに特異的に反応する特殊抗体を作成し、細胞レベルでのプロテオリシスを解析している。

発表論文：

1. Kikuchi, H., Sugiyama, S. and Imajoh-Ohmi, S.: J. Biochem. 117, 936-939 (1995): A novel anti-apoptosis serum factor that down-regulates Fas-mediated apoptosis.
2. Kikuchi, H. and Imajoh-Ohmi, S.: Cell Death & Differentiation 2, 195-199 (1995): Activation and possible involvement of calpain, a calcium-activated cysteine protease, in down-regulation of apoptosis of human monoblast U937 cells.
3. Kikuchi, H. and Imajoh-Ohmi, S.: Biochim. Biophys. Acta 1269, 253-259 (1995): Antibodies specific for proteolyzed forms of protein kinase C α .
4. Imajoh-Ohmi, S., Kawaguchi, T., Sugiyama, S., Tanaka, K., Omura, S. and Kikuchi, H.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 217, 1070-1077 (1995): Lactacystin, a specific inhibitor of the proteasome, induces apoptosis in human monoblast U937 cells.
5. Kikuchi, H., Iizuka, R., Sugiyama, S., Mori, H., Arai, M., Mizumoto, K. and Imajoh-Ohmi, S.: J. Leukoc. Biol. 60, 778-783 (1996): Monocytic differentiation modulates apoptotic response to cytotoxic anti-Fas antibody and tumor necrosis factor α in human monoblast U937 cells.
6. Nonaka, T., Kuwae, A., Sasakawa, C. and Imajoh-Ohmi, S.: FEMS Microbiol. Lett. in press: *Shigella flexneri* YSH6000 induces two types of cell death, apoptosis and oncosis, in the differentiated human monoblastic cell line U937.



わがJCウイルス研究—10年の歩み

ウイルス感染研究部助教授 余郷 嘉明



略歴：1965年 東京大学薬学部を卒業、同大学大学院（薬学系研究科）に入学、大腸菌 5S-RNA の機能を解析（水野伝一教授）。
1970年 同大学院修了、学位（薬学博士）取得。
1970-73年 米国セントルイス大学に留学し、ポリオウイルスRNAの研究に従事（Eckard Wimmer 博士）。
1975年 本研究所助手に採用され（1993年、助教授）、動物ウイルスRNAの研究に従事。76年からポリオマウイルスの研究を開始し、現在に至る。

JCウイルス（JCV）との出会い

内田清二郎教授は国立予防衛生研究所時代に、BKウイルス（BKV）がハムスターに様々な腫瘍を作ることを見つけた。内田教授が1976年に当研究部部長に就任し、私はポリオマウイルスの研究を始めることとなった。ポリオマウイルスは小型DNAウイルスであり、ヒトに感染するポリオマウイルスとしてはBKVとJCVの2つが知られている。内田教授の退官後、私は独立して研究を行うようになり、BKVの調節領域（エンハンサー・プロモーター領域）の構造と機能の研究を進めた。この頃、泌尿器科医である北村唯一博士（現、医学部教授）と共に、軽い免疫不全の患者の膀胱癌からヒトパピローマウイルス16型を検出した。そして、膀胱癌で始まった北村博士との共同研究は患者尿からのBKVの検出というプロジェクトへ発展した。しかし予想に反して、尿から検出されたのはBKVではなく、JCVであった。これが私とJCVとの出会いである。

尿からのウイルス分離

JCVは1971年にPadgettらにより進行性多巣性白質脳症(PML)の患者の脳から初めて分離された。その後、JCVに対する血中抗体の調査が行われ、このウイルスはヒト集団で蔓延していることが判明した。1990年に私と北村博士は、JCVが頻繁に健康人の尿中に排泄されていること、そして、その排泄率は加齢と共に増加し、40歳以上では50%を超えることを発見した。尿JCVは以後の研究において私たちが常用する材料となった。当初、尿JCVはDNAとして分離されたが、最近、SV40のT抗原を発現しているサル腎細胞を用いて、尿からJCVを分離培養するのに成功した。

親から子へ伝播

私たちは尿JCVを用いて、JCVの伝播様式を検討した。いろいろな家族の親と子から尿を採取し、尿JCV DNAの塩基配列を解析した。家族が異なると、塩基配列に違いがあったが、同じ家族の子と親（父または母）の間では塩基配列が一致する例が半数に達した。また、沖縄県民がどのくらいアメリカ人がばらまくJCVに感染しているかを調査した。数百名もの沖縄県民を調べたが、アメリカ型のJCVを持っている人は1人も見つからなかった。このような研究から、子供は通常、日常的に接している親や他の成人の排出するJCVに感染するが、通りすがりの人からは感染しないことがわかった。

原型調節領域の発見

尿JCVの発見後、私たちは直ちに同ウイルスDNAのクローニングを試みた。健康人2名と免疫正常な患者8名の尿から全長ウイルスDNAをクローニングするのに成功した。得られたJCV DNAの調節領域を解析したところ、その基本構造は一定で、欠失や重複を一切含まないことが分かった。この調節領域を原型調節領域と命名した。当時、PML患者の脳からクローニングされたJCV DNAの調節領域は欠失や重複に富む変動領域であることが知られていた（これをPML型調節領域と呼ぶ）。PML型調節領域と原型調節領域の塩基配列の比較から、前者は後者から塩基配列の再編成（欠失や重複）により作られたことが示唆された。その後、私たちは分子系統解析法を用いて、PML型調節領域は患者個体内において原型調節領域から作られたことを証明した。

PMLのDNA診断と臨床研究

世界的なエイズの蔓延により、免疫が低下した患者における日和見感染症が問題になっているが、PMLもそのような病気の一つである。PMLは中枢神経系での感染症であるため、その診断が困難であった。私たちは最近、髄液からJCV DNA（調節領域）を増幅するnested PCR法を作出した。この方法を用いて、この2年間に、全国から送られてきた約50名の患者の髄液に対してJCVの検索を行った。その結果、13名の患者の髄液からJCV調節領域を検出し、PMLの診断に貢献した。

PMLの動物モデルは存在しない。したがって、PMLの発症機構の解明には、患者におけるJCVの動態を詳細に解析することが不可欠である。このような臨床ウイルス学的な研究を神経内科の医師と共同で進めている。

人類移動を追跡する指標

私は、以上述べたJCV研究の初期の段階でJCVのゲノム型と人種との間には密接な関係があることに気づいた。個人的な興味もあって、JCVのゲノム型と人種との関係を明らかにするプロジェクトが直ぐに始まった。対象はヨーロッパ人、アフリカ人、アジア人の尿である。泌尿器科医である北村博士が共同研究者であることが幸いし、多くの地域から尿が集まった。大学院生の杉本智恵により、膨大な数のJCV DNAの塩基配列が決定された。得られた塩基配列を用いて系統樹解析が行われ、1997年初めには旧大陸におけるJCVゲノム型の分布の全貌が明らかになった。JCVゲノム型の世界的な分布パターンはJCVがヒトに伴って分化し、ヒトと共に地球上を移動、拡散してきたことを示している。

人類学界へ進出

ヒト集団の移動や成り立ちを明らかにするのに、骨や歯などの形態を解析する方法や遺伝子の塩基配列を解析する方法などが用いられる。JCVを用いる私たちの方法は、ヒト集団を構成する個々の系統を検出することができるので、従来のどの方法よりも優れている。私たちは人類学研究におけるJCVの有用性を積極的に宣伝していくこととした。まず、日本人類学会に入会し、一昨年から大会で演題を発表することを始めた。本年度の大会では「JCウイルスから見た世界各地の先住民族の起源」と題するセッションを企画している。昨年末には、日本人の起源に関する論文を人類学雑誌（英文）に発表した。

医科学と人類学的研究

人類学的な研究は医科学領域で行うべきでないとする意見もあるかもしれない。この点に関して私は次のように考える。現代のウイルス学は単にウイルスの複製、病原性などの研究のみならず、ウイルスを道具として利用する分野（例ベクター、遺伝子治療）をも包含する。JCVを用いた人類学的な研究もウイルス学の一分野であると考えることができる。実際、JCVを人類学的に利用するには、伝播様式などJCVの特性を把握することが不可欠であるが、それはウイルス学者でなければできない。その上、最近、ゲノム医科学という新分野が登場し、また、人種的な素因と疾患との関係が研究されだした。このように、医科学領域でも、各ヒト集団を構成する人種に関する正確、かつ詳細な情報が必要になってきている。

主要発表論文

- 1) Kitamura T. et al.: High incidence of urinary JC virus excretion in nonimmunosuppressed older patients. *J. Infect. Dis.* 1990; 161: 1128-1133
- 2) Yogo Y. et al.: Isolation of a possible archetypal JC virus DNA sequence from nonimmunocompromised individuals. *J. Virol.* 1990; 64: 3193-3143
- 3) Iida T. et al.: Origin of JC polyomavirus variants associated with progressive multifocal leukoencephalopathy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993; 90: 5062-5065
- 4) Kunitake T. et al.: Parent-to-child transmission is relatively common in the spread of human polyomavirus JC. *J. Clin. Microbiol.* 1995; 33: 1448-1451
- 5) Sugimoto C. et al.: Typing of urinary JC virus DNA offers a novel means of tracing human migrations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997; 94: 9191-9196
- 6) Kitamura T. et al.: Peopling of Japan as revealed by genotyping of urinary JC virus DNA. *Anthropol. Sci.* 1998; 106: 311-325
- 7) Hara K. et al.: Archetype JC virus efficiently replicates in COS-7 cells, simian cells constitutively expressing simian virus 40 T antigen. *J. Virol.* 1998; 72: 5335-5342

分子微生物学の21世紀への発信

—RNA研究を軸として遺伝学と構造生物学の融合にチャレンジする—

癌体質学研究部助教授 中村 義一



略歴：1972年 京都大学理学部卒。同大学院博士課程で生物物理学を専攻（ウィルス研究所由良隆教授）。理博。日本学術振興会奨励研究員をへて、

1978年 東京大学医科学研究所、生物物理化学研究部、助手。

1986年 より現職。その間、ユタ大学博士研究員、米国NIH癌研究所Expert、NIH-PRCコンサルタント、Institut de Biologie Physico-Chimique（仏）客員研究員。日本生化学会奨励賞（1986年）、Bouboulina Prize（1998年）受賞。

主たる研究領域：分子微生物学。転写後の遺伝子発現調節、とくに翻訳調節機構、RNA情報機能、蛋白質とRNAの分子擬態。

エディター等：DNA Research (Tokyo)、Biochimie (Paris)、Genes to Cells (Oxford)、J. Eukaryotic Microbiology (Lawrence)

趣味：スキー

21世紀における分子微生物学の方向、に思うこと

1. 生命メカニズム研究のフロンティア：生命科学は現象からメカニズム解明へ進むことが理念であり、21世紀では、メカニズム研究の深化がより鮮明になるであろう。真のメカニズム研究は生物種をこえた普遍的な概念や発見を生み出すものであり、我々もこの基本姿勢にもとづき分子微生物学の真価を発揮したい。
2. ゲノム研究のフロンティア：21世紀には、ヒトを対象とする複雑系の研究の高次な「ひろがり」と同時に、単純系の生命自立システム研究の「ふかまり」の2方向が推進されると考えられる。後者では、コンピューター科学と融合した分子微生物学が新しいフェーズの発展を遂げると期待される。
3. 感染症研究のフロンティア：今後、ヒト疾患における微生物感染症の重大性が拡大し、新しい医薬品の開発が急務となる。そのために病原性の分子機構やターゲット分子の構造を基礎とする分子微生物学のさらなる発展が必要となる。
4. 構造遺伝学研究のフロンティア：21世紀では、遺伝学と構造生物学が融合することによって、生体高分子の基本構造・機能の解明が微生物を材料としてシステマティックに進展すると期待される。このような学問領域は、「構造遺伝学（Structural Genetics）」と呼ぶことが適切かもしれない。

我々の研究室で行ってきた翻訳研究について <分子擬態>

1. 背景：遺伝暗号が解読されてから30年余、蛋白質合成（翻訳）の停止信号である終止コドンを読み解く仕組みは、謎であった。
2. 成果：研究のブレークスルーは、翻訳調節に働く一群の蛋白質が、核酸であるtRNAの構造とそっくり、という「分子擬態」の発見である。我々は、終結に働く解離因子がアンチコドンをも擬態し終止コドンを読み解くと考え、分子擬態（molecular mimicry）仮説を提出した。現在、分子擬態の基盤原理の解明とともに、蛋白質による遺伝暗号の解読という新しい領域を確立する方向へ研究を進めている。また、出芽酵母の解離因子の一つは、プリオンと同じ性質をもつことが近年明らかにされ、その基礎的解析も進めている。

もう一つの分子微生物学研究について <カリニ肺炎真菌>

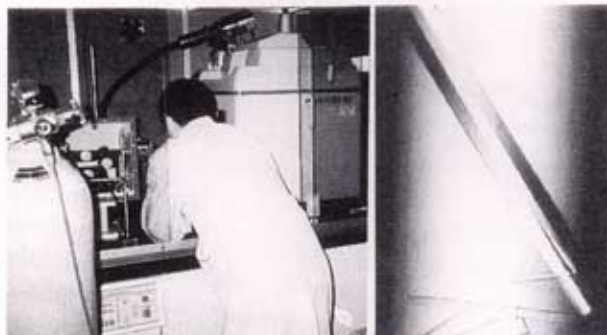
1. 背景：カリニ肺炎はエイズ患者の2/3に発症する重篤な日和見感染症であるが、我々が研究を開始した1987年には、世界的に基礎研究は皆無であった。



2. 成果：分子生物学の導入により、分子系統学、DNA工学、DNA診断等に、先導的な成果を挙げることができた。特に、カリニ肺炎真菌の病原性の中心である主要表面抗原（MSG, major surface glycoprotein）に多型多重的な遺伝子編成と遺伝子スイッチによる「抗原変換」を発見できたことは、生物学や臨床医学にインパクトを与えた。現在、欧米の研究者と協力してカリニ肺炎真菌の全ゲノム配列決定のプロジェクトを開始している。今後、それらの成果を創薬へ展開したい。

これからの研究の方向・意義

1. 我々の研究の中心は、翻訳調節とRNAの制御機能を中心とした遺伝子発現の転写後調節機構に関する分子遺伝学な研究であり、構造生物学へも研究を展開しつつある。平成10年4月から、生研機構プロジェクトとして研究室にX線結晶構造解析装置を設置し専任の構造学者を迎えて稼働を開始した（写真）。今後、遺伝学と構造生物学を自在に駆使できる研究体制を実現し、蛋白質とRNAの分子擬態の意味を明らかにしたい。
2. RNAに関する研究は基礎と応用が直結しうるポテンシャルが極めて高く、癌やエイズの制圧、遺伝病の治療にとって、RNAを基盤とする臨床遺伝子工学が重要になってくるものと考えられる。分子擬態の研究は、バイオテクノロジーに新たな技術を生み出すチャレンジともいえる。サイトカインを擬態するRNA分子の設計等、積極的に我々の研究成果を医薬分野へ展開して行きたい。
3. 蛋白質とRNAの分子擬態は、生物学にとって新しい概念であるが、生命がRNAワールドから蛋白質（DNA）ワールドへと進化してきたことを考えれば、生命の根幹に係わる基本的な原理の一つと考えられる。一見、クラシックな蛋白質合成の研究から、生物学の基本的な概念が提唱された事実は基礎研究の重要性を象徴するものであろう。翻訳終結をテーマとして、1997年に申請したヒューマン・フロンティア・サイエンス研究グラントが、1993-95年にひき続き、好スコアで採択され、我々としては大変に勇気づけられた。



癌体質学研究所に設置したX線回折装置（リガクR-Axis IV型）を操作する豊田博士（左）。この装置を使って解析した高度好熱菌解離因子の結晶（右）。回折データから、三方晶系の結晶で、空間群は $P3_1$ または $P3_2$ 、格子定数が $a=b=64.9$ Å、 $c=86.9$ Åで、非対称単位に解離因子が1分子存在することが明らかになった。

現在の研究をサポートする科学研究費（研究代表者分）

1. 文部省特定領域研究（I）、「RNA情報機能の分子基盤」（平成9-12年）
2. 生研機構（農水省）、新技術・新分野創出のための基礎研究推進事業、「分子擬態を利用した生物系素材の基礎研究」（平成9-13年）
3. Human Frontier Science Program Grant (HFSPG)、「Molecular mechanism of translational termination」（平成9-11年）
4. ヒューマンサイエンス振興財団（厚生省）、エイズ国際研究推進事業、「HIVフレームシフト抑制化合物の創薬研究」（平成10-12年）
5. 文部省国際学術研究、「翻訳終結の調節機構（翻訳機構における分子擬態の研究）」（平成8-13年）

主要発表論文

- 1998 Ito, K., Uno, M., Nakamura, Y.: Single amino acid substitution in prokaryote polypeptide release factor 2 permits it to terminate translation at all three stop codons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 8165-8169.
- 1998 Nakamura, Y., Wada, M.: Molecular pathobiology and antigenic variation of *Pneumocystis carinii* (Review). *Adv. Parasitol.* (Academic Press: London), 41: 63-107.
- 1996 Nakamura, Y., Ito, K., Isaksson, L. A.: Emerging understanding of translation termination (Minireview). *Cell*, 87: 147-150.
- 1996 Ito, K., Ebihara, K., Uno, M., Nakamura, Y.: Conserved motifs of prokaryotic and eukaryotic polypeptide release factors: tRNA-protein mimicry hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 5443-5448.

（発表英文論文総数140）

遺伝子・ゲノムの向こうに、癌の治療を見る

癌ウイルス研究部助教授 菅野 純夫



略歴

1978年東京医科歯科大学医学部卒業後、直ちに、医科研・癌ウイルス研究部の大学院生となる（下条寛人教授）。1982年医学博士。日本学術振興会特別研究員を経て、医科研ウイルス研究部助手。1984年より1987年までロックフェラー大学花房秀三郎教授のもとに留学。1992年ウイルス研究部が癌ウイルス研究部に、同年癌ウイルス研究部助教授

ご挨拶

エー、私が菅野です。変な言い方ですが、一応、東京医科歯科大学の医学部を1978年に卒業しました。医師免許も持っていますが、何分、卒業と同時に医科研の癌ウイルス研究部の大学院生になったため、医者をやることなしに医科研に入所、以来、出所せずというわけです。今は、助教授をしています。でも、気分は大学院生のころと変わりません（これが問題か）。

癌の研究、特に癌の治療を志しています。ただ、癌という病気は、体内で発生した癌細胞が、数億年にわたる進化の過程で生物が獲得してきた生きるためのノウハウを駆使し、体内で生き延びて増えていく病気です。一筋縄ではいきません。しっかりした基盤の上に立った取り組みが必要です。

で、今はゲノムプロジェクトに参加し、cDNAからヒトの全遺伝子を明らかにすべく努力しています。ずいぶんと、まだるっこしい話ですが、でも、ゲノムプロジェクトの進行は早く、2-3年で、全てとは言わないまでも、大部分の遺伝子は明らかになるはずで。この様な強固な基盤を得て、21世紀前半は医学の黄金時代となるでしょう。

1. 研究の方向

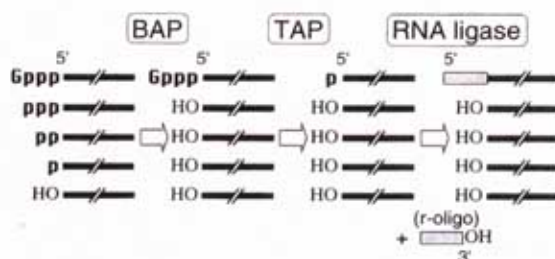
癌研究の過去20年は、oncogene、anti-oncogeneが発見され、「遺伝子病」という癌の本質が明らかにされた20年であった。それをふまえ、今後の20年は、癌治療研究の20年であるべきだと考えている。治療研究というと、応用研究と考えられがちであるが、癌の治療が満たすべき要件を考えると、そこに、創造的で高度な基礎研究が必要とされていることは明らかである。

癌の本質を明らかにしていくには、癌という現象を捨象し抽象化しなければならなかった。一方、癌を治療しようとする、まず現象を全体像として精密に正確に把握することが不可欠となる。そして、その把握も分子レベル、遺伝子レベルのものである必要がある。現状を見ると、これに必要な遺伝子の知識は不十分であり、把握のための方法論も原始的なレベルにある。高度な基礎研究が必要とされる所以である。また、治療の方法論は今後、分子生物学はもちろん、物性科学や情報科学といった現在急激に進歩している分野と連携して全く新しくなることが必要であろう。この様な認識のもとに、自ら方法論を開発しながら、一步一步課題を解決して、癌治療に迫ろうというのが研究の方向である。

2. cDNAプロジェクト

現在、主要なプロジェクトとして取り組んでいるのが、これである。

さて、ヒトの遺伝子（cDNAも含む）で配列決定されているものは7000といわれている。ヒトの全遺伝子数は8-10万と考えられているので、我々が知る遺伝子は1割にも満たないわけである。これでは、癌の全体像を、遺伝子レベルで、精密かつ正確に把握出来ない。実際、それまでの癌ウイルスや

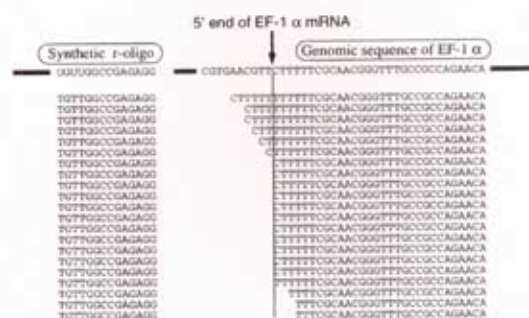


1. オリゴキャッピングの原理

癌遺伝子の研究を通じ、こうした不満を強く感じていたときにヒトゲノム計画がはじまった。ヒトの全遺伝子を明らかにする機会が生まれたわけである。そこで、主体的に参加することにした。

多数の遺伝子を効率よく短時間で手に入れるためには、cDNAが最適と考え、完全長cDNAライブラリーの作成法を、まず研究した。幸い、オリゴキャップ法を開発し、さらに大学院生の鈴木君がこの方法を基に、完全長及び5'端濃縮cDNAライブラリーの作成に成功した。現在、Helix研究所、医科研ヒトゲノム解析センターと共同で、これらのライブラリーからcDNAクローンを分離し、1バース配列決定を行い、mRNAの5'端の配列に対応する5'EST情報を得ると同時にcDNAクローンのカタログ化を行っている。

その数は、約8万クローンになり、既知の遺伝子と、未知の遺伝子合わせて、約1万種類の完全長cDNAクローンを手にしているものと考えられる。こうした、1バース配列決定からの、cDNAクローンのカタログ化は、さらに続けるものの、これら、カタログ化された遺伝子の機能解析や、それらの遺伝子の発現解析が、次なるプロジェクトとして視野に入ってきている。そのためには、新しい実験方法の開発のみならず、情報科学と連携した新しい研究スタイルが必要で、それをどの様実現していくか、模索する日々である。



2. オリゴキャッピングで明らかにされた EF1-alpha mRNA 5' 端の微細構造

3. 大学院生

大学院生は、研究の方向は菅野の目指す方向におおまかに一致したものであるが、各自のプロジェクトを持っている。これは一昨年急逝された山口宣生教授の遺風である。山口教授は、教授から大学院生まで、それぞれが独立した研究者であり、個々が独自の研究テーマを持ち、1人で最初から最後まで研究を行うべきだとの研究体制理念をお持ちであった。昨今の世知辛い世の中では、この理念を押し通すのは並大抵ではないが、この方針を踏襲し、院生の諸君には、1人で頑張ってもらっている。

例えば、鈴木君は、オリゴキャップ法を基に、完全長cDNAライブラリーの作成に成功し、想像もつかないほど、大規模になったcDNAプロジェクトを支えてくれている。

今井君は、マウスの尾静脈注射による肺転移系を我が研究室に導入し、転移巣で特異的に発現の変化する遺伝子の分離を、様々な方法で行っている。転移が癌治療における重要課題であることは論を待たない。

吉田君は、細胞移植実験を通じて各種臓器の幹細胞を同定分離する目的で、全身でGFPを発現するマウスを、疾患モデルセンター勝木教授の多大な支援の下、作成した。私が、細胞移植、人工臓器が癌治療でも重要になると考えたためである。また、彼は、新規のプロトカドヘリン遺伝子のクローニングを行い、その機能解明に情熱を燃やしている。

渡井さんは、遺伝子治療に興味を持ち、DNA直接注射による腫瘍免疫の惹起及び非ウイルス性遺伝子導入ベクターの開発を行っている。彼女の興味と、何か直接治療に関係することをしたいという私の考えが、丁度合ったわけである。各人、悪戦苦闘しながら、色々な新しいものを研究室にもたらしけてくれている。

主要発表論文

1. Maruyama, K., Sugano, S. Oligo-capping: a simple method to replace the cap structure of eukaryotic mRNAs with oligoribonucleotides. *Gene* 138: 71-174, 1994
2. Suzuki, Y., Yoshitomo, K., Maruyama, K., Suyama, A., Sugano, S. Construction and characterization of a full length-enriched and a 5'-end-enriched cDNA library. *Gene* 200: 49-156, 1997.
3. Yoshida, K., Yoshitomo-Nakagawa, K., Seki, N., Sasaki, M., Sugano, S. Cloning, expression analysis and chromosomal localization of BH-protocadherin, a novel member of the cadherin superfamily. *Genomics* 49: 458-461, 1998.
4. Sugano, S., Yoshitomo-Nakagawa, K., Yu, Y.-s., Mizushima-Sugano, J., Yoshida, K. Transmembrane-domain trapping: a novel method for isolation of cDNAs encoding putative membrane proteins. *DNA Res.* 5: 187-193, 1998.
5. Takada, T., Yoshida, K., Nakamura, K., Nakao, K., Tsujimoto, G., Katsuki, M., Sugano, S. Expression of Green Fluorescent Protein in Transgenic Mice. *Methods in Enzymology* 302: in press

生きた蛋白質の動きを超分解能で見る技術 (急速凍結フリーズレプリカ法)

微細形態学研究部 片山 栄作



略歴：1973年 東京大学医学部医学科卒。基礎医学系大学院中退後、薬理学第1講座（江橋節郎教授）の助手を経て当研究所助教授となる。その間、1984-87年、ワシントン大学、ペンシルヴェニア大学に留学、急速凍結電子顕微鏡法を修得した。

趣味：色々やったが、今も続けているのは、中学生の頃に始めた天体写真。子供の頃は、自分が天体物理学者となり、巨大な宇宙の画像を撮っている姿を夢に描いていたが、何故か極微の世界の画像を撮るようになってしまった。

研究方法の概略と特徴：

生体の多彩な機能を担う蛋白質やその複合体の動きを分子レベルで理解するためには、それらの立体構造の情報が必須である。昨今の「構造生物学」の隆盛は正にその状況を反映しており、さまざまな蛋白質の立体構造が、主としてX線結晶回折法や多次元NMR解析法により解明されてきた。しかしそれらの手法で解析できる蛋白質は、それぞれの適用条件に合ったごく限られたもののみであり、生物学的に興味深い任意の蛋白質の構造が何でも解かる訳ではない。また、機能を果たしつつある蛋白質の中間体の構造情報も容易には得られない。

電子顕微鏡を使えば、少量の試料で、ほとんど任意の蛋白質分子あるいはその複合体の構造を直接見ることができる。水分子に氷の結晶を作るひまを与えないほどの速度で試料を凍結し、そのまま電子顕微鏡に挿入して観察すれば、生きたままの、あるいは機能遂行中の生体分子の構造を直接捉えることが可能である（クライオ電子顕微鏡法）。しかし、生体試料は電子線に極端に弱く、また像のコントラストも非常に低いため、結局は結晶化して画像解析するなどの手法により非常に多くの分子の像を平均化することが必要となる。

最近、蛍光プローブなどで標識した1個1々の蛋白質分子やリガンドを、光学顕微鏡下で直接観察・操作する技術の進歩により、「1分子生理学」が急速に発展してきた。その結果、個々の分子の挙動は、集団として観測された物理量では到底表せない個性を持つことが明らかとなってきた。筆者が専門とする急速凍結フリーズレプリカ法は「構造生物学」と「1分子生理学」とをつなぐことのできるほとんど唯一の技術であるといえる。1ミリ秒以内に急速凍結した生体材料の表面を軽くかき取り、低温で真空中にさらすと、蛋白質は生きたままの状態で水と水を保ち、周辺の水分子のみが昇華される。そこに重金属で影付けをしてカーボンをかけ、元の材料をとかし去ると電子顕微鏡用のレプリカ試料ができ上がる。このような試料は電子線に強く機械的にも安定であるので3次元像再構成に必要な多くの傾斜像がたやすく撮影できる。また高コントラストの表面像が得られるため像解釈は直感的で容易である。さらに同じ理由で、細胞内の構造物やその構成分子の構造をも対象とできるのは他の方法では達成できない極めて大きな利点である。問題は、そのレプリカが分子表面の立体構造をどの程度忠実に写し取っているかであるが、いくつかの材料で実際に調べると、1nmよりも細かい構造が観察され、また隣接した構造がなければ1本の α -helixでさえ識別できることが判明した。つまり、機能を果たしつつある生物試料を1ミリ秒以内で瞬間的に凍結し、その中に含まれる個々の蛋白質分子の立体構造のスナップショットを1nmを割る空間分解能で捉えることができるのである。

最近の主な研究成果：

元来、筋収縮およびその調節の分子機構を専門として研究してきたため、細胞運動関連分子の研究が多いが、最近では共同研究として様々な材料を扱い、膜蛋白質や酵素あるいは核酸などの構造も研究している。以下には、その一部のみを挙げる。

- 1) アクトミオシン滑り運動中のクロスブリッジのコンフォメーションの解析：*in vitro*で滑り運動を行っているアクトミオシンを急速凍結し、アクチンフィラメントを支えるミオシン・クロスブリッジのコンフォメーションを観察した結果、静止時と滑っているときで大きな違いがあることを示した（文献1）。ミオシン頭部の立体構造はX線結晶回折により解かれているが、最近、レプリカ像においてそれと同様のサブドメイン構造が識別できることを

見出した。現在、その配置の変化を追求している。これにより筋収縮や細胞運動の詳細な分子メカニズムを解明することを目指している。併せて、通常の10倍近い速度の滑り運動を起こす植物ミオシンの特徴も探っている(文献2)。近々、微小管/ダイニン系で同様な研究を始める予定である(文献3)。

- 2) 細菌細胞膜中のべん毛モータ基部の構造の解明: 細菌のべん毛は、プロトンの流れを駆動力として膜内に埋めこまれた状態で回転する分子モータである。同時に、細胞内から特定の蛋白質を分泌する機構も備えているが、その機能に対応する構造は全く不明であった。細胞膜の内外を同時に観察できるフリーズレプリカ法の特長を生かして細胞膜の裏側に新たな構造物を発見し、べん毛モータ基部の詳細な3次元モデルを構築した(文献4)。

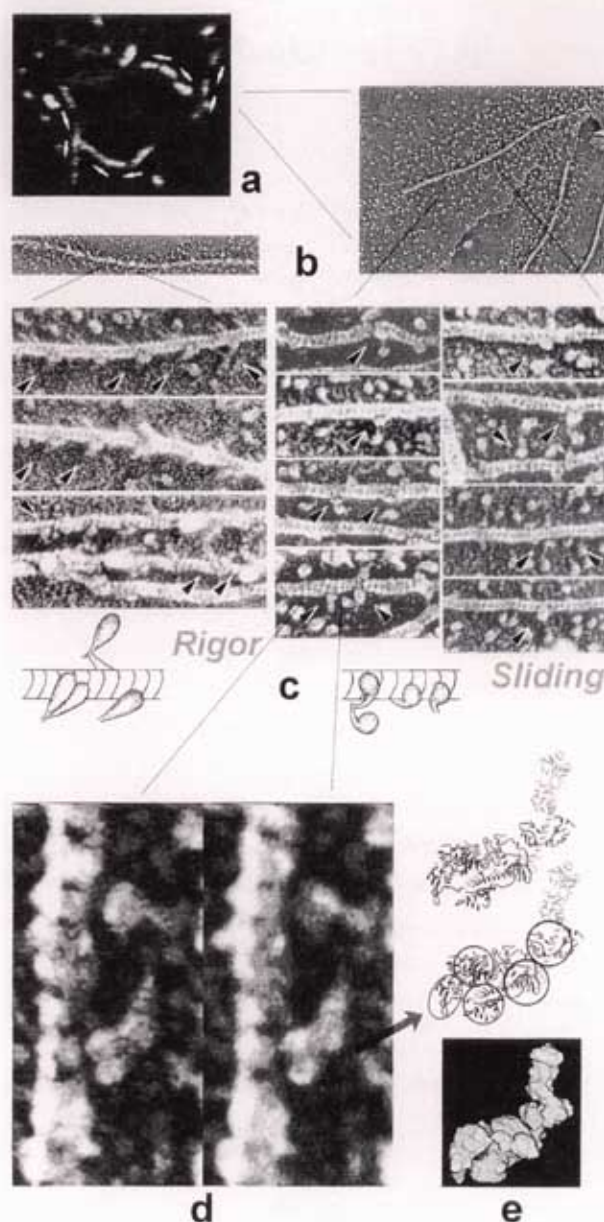
- 3) 細胞内におけるイノシトール3リン酸受容体およびリアノジン受容体の構造の解明: これらの受容体はいずれも細胞内情報伝達の重要な構成要素

であり、 Ca^{2+} チャネルを形成する。アミノ酸配列にもかなりの共通点を有するが、前者の構造は全く不明であった。われわれは、フリーズレプリカ法を用いて、小脳プルキンエ細胞内で2次元結晶を形成する受容体分子の姿を明瞭に捉え、リアノジン受容体と構造を比較した。両者とも整った正方形の分子配列を示したが、意外なことにそのサイズは著しく異なっていた(文献5)。

主要文献:

- 1) Katayama, E. Quick-freeze deep-etch electron microscopy of the actin-heavy meromyosin complex during the *in vitro* motility assay. *J. Mol. Biol.* 278: 349-367 (1998)
- 2) Yamamoto, K., Kikuyama, M., Sutoh-Yamamoto, N., Kamitsubo, E. & Katayama, E. Myosin from *Alga Chara*: Unique structure revealed by electron microscopy. *J. Mol. Biol.* 254: 109-112 (1996)
- 3) Shingyoji, C., Higuchi, H., Yoshimura, M., Katayama, E. & Yanagida, T. Dynein arms are oscillating force generators. *Nature*, 393: 711-714 (1998)
- 4) Katayama, E., Shiraishi, T., Oosawa, K., Baba, N. & Aizawa, S.-I. Geometry of the flagellar motor in the cytoplasmic membrane of *Salmonella typhimurium* as determined by stereo-photogrammetry of quick-freeze deep-etch replica images. *J. Mol. Biol.* 255: 458-475 (1996)
- 5) Katayama, E., Funahashi, H., Michikawa, T., Shiraishi, T., Ikemoto, T., Iino, T. & Mikoshiba, K. Native structure and arrangement of inositol-1,4,5-trisphosphate receptor molecules in bovine cerebellar Purkinje cells as studied by quick-freeze deep-etch electron microscopy. *EMBO J.* 15: 101-108 (1996)

ミオシンによるアクチンの滑り運動
(蛍光顕微鏡像から原子モデルまで)



a) 蛍光ファロイジンで染色した単一アクチンフィラメントの *in vitro* 滑り運動(蛍光顕微鏡像)。アクチンフィラメントは矢印の方向に移動した。

b) 滑り運動中の急速凍結フリーズレプリカ電子顕微鏡像。左はATPを加える前の対照像(硬直複合体)を示す。

c) (b)の拡大像。ミオシン頭部のコンフォメーションは、左右で大きく異なっている(文献1参照)。

d) アクチンフィラメント(モノマーの周期は5.9 nm)に結合した滑り運動中のミオシン頭部の強拡大像(ステレオ表示)。ミオシンのサブドメイン構造が明瞭に認められ、(e)の原子モデルとは配置が変わっていることが分かる(先端のドメインに着目)。

e) X線結晶回折により得られたミオシン頭部の原子モデル(Rayment et al., 1993)。中段はそのドメイン構成を示す。下段は表面プロファイルのシミュレーション像。

個人レベルのがん研究

細胞化学研究部 仙波 憲太郎



略歴

1988年 医科研・制癌研究部にて理学博士号取得（指導教官：豊島久真男教授）同年、
制癌研究部・助手に採用
1991年－94年 米国Salk研究所 Tony Hunter 教授のラボに留学
1995年－医科研・細胞化学研究部（吉田光昭教授）のラボにて助教授となり現在に至る

研究対象

制癌研究部ではニワトリに癌を起こす癌遺伝子v-src、v-erbBの類似遺伝子fyn、erbB2をヒトより単離して、細胞がん化能の検討、ヒトがんとの関連について研究した。留学中よりがん抑制遺伝子WT1について研究を始め、現在に至っている。

ここでWT1について少し説明して、現在の私の興味について述べたい。小児の腎臓に発生するWilms'腫瘍の原因遺伝子として単離されたWT1遺伝子はZincフィンガーモチーフを持つ蛋白質であり、DNA結合性の転写制御因子である。細胞に発現させると増殖を阻害することから、「がん抑制遺伝子」としての機能を持つことが証明された。その後RNA結合性とspliceosomeへの局在が報告されてスプライシングにも関わることが想像されている。一方、急性骨髄性白血病や急性リンパ性白血病ではWT1遺伝子の過剰発現が見い出され予後との相関が指摘されている。この場合は、WT1が「がん遺伝子」のように増殖の維持、分化の阻害に働くと考えられている。また、desmoplastic small round cell tumor (DSRCT)に見られる染色体転座t(11;22)(p13;q12)ではEWS遺伝子のアミノ末端側とWT1遺伝子のカルボキシル末端側3個のZnフィンガードメインが融合した蛋白質が発現することが知られている。このようにWT1はさまざまな顔を持つが、私は特にWT1が非常に深く関わっている泌尿生殖器の形成異常とそれに続く癌化がどうやって起こるのかという点と白血病ではどうして「がん遺伝子」のように振る舞うのかという点について興味を持っている。

現在進行中の研究

制癌研究部時代の研究は「ボスの仕事」であり、私にとって既によい思い出となっているのでここでは省略するが、erbB2が乳癌などに関わる重要な遺伝子であるという概念の確立に多少なりとも貢献が出来て満足している。現在進めているWT1に関しては他人がクローニングしたものでありかなり解析が進んでしまっており、またこちらもごく少人数でなかなか苦しい状況であるがもう少し追ってみたいと考えている。

1) 泌尿生殖器の異常とWT1

上述のようにWT1は泌尿生殖器の発生に必須の機能を持つことが既に知られているが、その分子機構についてはよく分かっていない。WT1はDNA結合性の転写抑制因子と活性化因子という2面性があることが知られていたし、我々も何らかの因子との相互作用がWT1の活性に必要なのではないか、その活性を調節するものがあるのではないかと考えられるようなデータを持っていたので、WT1結合因子のスクリーニングからこの問題にアプローチした。その結果、WT1が種々の既知および未知の転写因子と結合することがわかった。このうちの未知遺伝子（Sox30と命名）については構造と活性および癌との関連について分かってきたことがあるので次項に示した（大崎ら、論文投稿中）。WT1はZincフィンガードメインを介してSox30のDNA結合ドメインであるHMG boxに結合してその活性を抑制する。すなわち、WT1蛋白質がこれまでのようなDNA結合性の転写因子ではなく、転写因子の補助因子として機能する性質があることが明かになった。したがって、WT1を調べるならその標的遺伝子を知らなければならないが、WT1結合配列だけを見てはいけなくなる。HMG boxを持つ蛋白質にはヒト性逆転(sex reversal)

の原因遺伝子であるSRYやSox9など30種類にのぼる関連遺伝子が報告されており、生殖器、神経、骨など様々な形態形成に重要な役割を果たすことが知られている。生殖器の異常や腎臓の発生とがん化についてもWT1と共発現して結合するようなSoxファミリーを同定すれば、これらの疾患を解明する糸口になるかもしれないと考えて研究を進めている。

2) Sox30と胚細胞腫瘍

Sox30の発現は精巣特異的であり、しかも生殖細胞（胚細胞）に強く発現する（高山ら、論文作製中）。東京医科歯科大学の稲澤譲治先生との共同研究でこの遺伝子をマップしたところ、胚細胞腫瘍で想定されているがん抑制遺伝子の近傍5q33にマップされた。そこで癌研究所の福井巖先生、慶応大学の秦順一先生との共同研究で胚細胞腫瘍の細胞株および組織を調べたところ、ほぼ全例でSox30の腫瘍特異的な選択的スプライシングを検出した。Sox30蛋白質はDNA結合配列依存的な転写活性化因子として機能するが、選択的スプライシングにより生ずるSox30蛋白質は転写活性化能を失っていた。胚細胞腫瘍は20-40代に発症する腫瘍で治癒可能な腫瘍であるが、前癌病変での腫瘍細胞の検出ができれば、早期の治療により生殖能力の温存が可能であるという。現在、Sox30の腫瘍特異的なスプライシングをマーカーとして前癌病変を検出できるかどうかについて検討を進めている。

3) 白血病とWT1

白血病細胞でのWT1のがん遺伝子としての振る舞いは白血病細胞におけるWT1結合因子もしくはSox30のようにWT1を補助因子として持つ転写因子の特長ととらえることができるかも知れないと考え、WT1結合因子のスクリーニングを行った。その結果、血球細胞の分化に非常に重要な役割を果たすことが既に知られている転写因子GATA-1がWT1に結合することが明かになった。現在、GATA-1蛋白質により分化誘導される細胞にWT1を発現させてWT1による分化阻害が見られるかどうかを調べている。

今後のこと

ごく少人数で成果を出すのは非常に困難であるが、腎臓と生殖器の発生におけるWT1の機能について現在持っている仮説を検証したいと思う。

発表論文

1. Kentaro Semba, Rika Saito-Ueno, Gensuke Takayama and Mariko Kondo. cDNA cloning and its pronephros-specific expression of the Wilms' tumor suppressor gene, WT1, from *Xenopus laevis*. *Gene*, 175, 167-172. (1996)
2. Mariko Kondo, Kentaro Semba, Koichiro Shiokawa, and Tadashi Yamamoto. Molecular cloning of *Xenopus* activin type I receptor and the analysis of its expression during embryogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 218, 549-555. (1996)
3. Masatsugu Moriyama, Tadanori Yamochi, Kentaro Semba, Tetsu Akiyama, and Sigeo Mori. Bcl-6 is phosphorylated at multiple sites in its serine- and proline-clustered region by mitogen-activated protein kinase (MAPK) in vivo. *Oncogene*, 14, 2465-2474. (1997)
4. Yoshimasa Sakamoto, Mitsuaki Yoshida, Kentaro Semba, and Tony Hunter. Inhibition of the DNA-binding and transcriptional repression activity of the Wilms' tumor gene product, WT1, by cAMP-dependent protein kinase-mediated phosphorylation of Ser-365 and Ser-393 in the zinc finger domain. *Oncogene*, 15, 2001-2012. (1997)
5. Satomi Kuramochi, Tetsuo Moriguchi, Keisuke Kuida, Junji Endo, Kentaro Semba, Eisuke Nishida, and Hajime Karasuyama. LOK, a novel mouse STE20-like protein kinase that is expressed predominantly in lymphocytes. *J. Biol. Chem.*, 272, 22679-22684. (1997)

遺伝子の死と再生

生物物理化学研究部助教授 小林 一三



略歴：1974年東京大学理学部生物化学科卒。薬学系大学院に属し、医科研（生物物理化学研究部）で博士号。

医科研助手（生物物理化学）、アメリカ合衆国オレゴン大学分子生物学研究所リサーチアソシエート、医学部助手（細菌学）、国立小児医療研究センター研究員（感染症）を経て、現職。

研究領域：遺伝子学。分子遺伝学。分子生物学。微生物学。細菌学。ウイルス学。生化学。分子進化学。分子生態学。ゲノム再編。

遺伝子の切断と組換えとの関係を追求した結果、「遺伝子自身を攻撃する病原体と、それに対する遺伝子群の抵抗」というビクチャーが現れた。「本来利己的な性質をもつ遺伝子が互いに戦い協調する社会としてのゲノム」という見方によって、遺伝子の病いと死、修復と相同相互作用を理解する展望が開けた。

相同組換えとDNA両鎖切断。まず大学院生、助手時代には、相同組換えの機構を試験管内ウイルス再構成法を利用して解析した。バクテリオファージラムダDNAを空のラムダ頭部に詰め込み感染性粒子を作るパッケージ反応を使い、細胞内組換え中間体と一次組換え産物を定量的に検出し、電子顕微鏡などで解析した。

続いて、アメリカ合衆国でラムダの相同組換えの研究を続けた。パッケージの際にマルチマーDNAからモノマーが切りだされる反応が、相同組換えに重要であることを証明した。さらに、細胞内で制限酵素を働かせることによって、DNAの両鎖切断自身が重要であることを証明した。より具体的には、大腸菌自身のRecBCD組換え系については、「二重鎖切断からRecBCD酵素がDNA上を移動していき、カイ配列に出会うと、組換えを起こす」というスキームを提出した。ラムダ類縁ファージ自身の組換え系については、「二重鎖切断が、無傷なDNAを鋳型とする合成によって修復され、これに交叉が伴う」という「二重鎖切断修復モデル」を提唱した。

では、なぜ相同組換えが、両鎖切断によって始まらなければならないか？

相同組換えのプラスミドを用いた解析。帰国後、「二重鎖切断修復モデル」を実証し、関与する遺伝子産物を同定した。「二つのDNA分子の相同組換えによって、二つの組換え体DNA分子ができるか、一つの組換え体DNA分子ができるか」という基本的な問題にも答えた。相同組換えの繰り返しによって、遺伝子変換が起きることを示した。

制限酵素修飾酵素遺伝子の「利己的な」ふるまいの発見。通常制限酵素遺伝子には、同じ認識配列をメチル化し制限酵素から保護する修飾酵素の遺伝子が隣接する。制限修飾酵素のペアは、「侵入DNAを切断することによって細胞を守るためにある」というのが定説であった。私達は、「制限修飾遺伝子を失うと細胞が死ぬ」ことを発見した。「細胞から制限修飾遺伝子が失われると、細胞分裂に伴って修飾酵素がうすまっていき、染色体上の認識配列をメチル化しきれなくなる。そこに残った制限酵素が切断すると、細胞は殺される」という過程の実験的証拠を得た(図1)。さらに、染色体上の制限修飾遺伝子も同様の機構によって喪失に抵抗すること、この過程でゲノムの大規模再編が起きることを発見した。

制限修飾系の利己的遺伝子説。これらの実験から、制限修飾遺伝子はウイルスのような独自の遺伝単位であり、この「分離後宿主殺し」戦略と「動く」戦略とによって広がり維持されている、という「利己的遺伝子」仮説を提唱した。

同じ塩基配列を認識する制限修飾系は同じ宿主細胞内では同時には安定化されないことを実験によって証明した。

つまり、制限修飾系の間には塩基配列を取り合う競争がある。これが、制限修飾酵素の認識配列の多様性と特異性への淘汰圧と考えられる。「宿主細胞に既に居る制限修飾系が、あらたに感染してくる制限修飾系に、制限酵素をいきなり発現させて、染色体を切断させ宿主を殺させる」という「重感染排除」現象を発見した。重感染排除と認識配列によって、制限修飾系の二次元自然分類ができる。細菌ゲノムの解読から、制限修飾遺伝子の挿入、制限サイトの淘汰など、利己的遺伝子説を支持する証拠が報告されている。

相同組換えの役割。「相同組換えで、なぜ二重鎖切断が重要な役割を果たすのか」という謎は、上の制限修飾遺伝子が「生き物」であるという発見によって解決しようとしている。ファージの「二重鎖切断修復」は、様々な制限酵素の攻撃に対するファージ

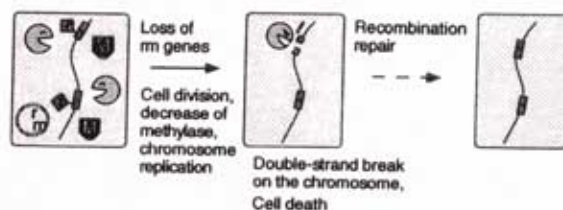


図1. 制限修飾遺伝子の喪失による細胞死。

ジ側の防御機構であることを、実験で証明した。細胞のRecBCD系は、制限修飾系が侵入したDNAを攻撃するときは制限修飾系を助けるが、分離後宿主殺しに対しては染色体を修復して抵抗することを実験で証明した。これらから、RecBCDカシの系は、非自己DNAを破壊し、カイでマークされた自己DNAを守る系であると提案した(図2)。実際、RecBCD酵素は別の配列を認識するように変異することを証明した。自然にできる染色体二重鎖切断の修復にもこれらは関与していた。

遺伝子の治療へ。相同組換えなどの相同相互作用によって体細胞変異を修正することを目標に、基礎的研究を進めている。複製欠損アデノウイルスベクターによってドナーDNAを導入し、マウス内ウシバビロームウイルスプラスミド上の変異を高効率高精度で修正した。

相同相互作用に依存した非相同組換え。従来、相同組み換えと非相同組み換えは別の機構と考えられていた。上の実験などで、「DNAのホモロジー相互作用が、非相同組み換えを引き起こした」ことを示唆する産物を発見した。さらに大腸菌での定量的な実験で、「ホモロジーとRecA機能と制限酵素作用に依存する非相同組み換え機構」の存在を証明した。

相同組換え反応効率とホモロジー長さ。上の発見に示唆されて、「相同組換えの中間体で、相同なDNAを連結する点が、ホモロジーに沿ってランダムウォークし、ホモロジーの端にぶつくと破壊される」という定式化をした。その結果は、マウス遺伝子ターゲティングでの3乗依存性など、多くの系におけるホモロジー長さ依存性をうまく説明できた。

将来の方向。「死をプログラムするもっとも単純な病原体」としての制限修飾遺伝子のふるまいの解析を続け、さらに、「利己的な遺伝子の戦いと協力の社会としての生命体」という仮説を検討しつつ、遺伝子どうしの社会的相互作用、遺伝子の本質的利己性由来する病原性、遺伝子間ホモロジー相互作用、について機構と意味を解明していきたい。「ヒト体細胞遺伝子変異の修正」という長期目標も持ち続けたい。今後も独立して研究を進めたい。

評価。相同組換え関連について。分野の標準的モノグラフD. Leach "Genetic recombination", Blackwell, 1996を参照。詳しくは、G.R. Smith, in Lambda II, Cold Spring Harbor Lab, 1983、およびR.G. Lloyd & K. B. Low, in Escherichia coli and Salmonella, 2/e, ASM Press, 1996。制限修飾遺伝子関連の評価。「細菌のプログラム死」という見方から：M. Yarmolinsky, Science 267:836 (1995)。ゲノム情報から：Rocha et al. NAR 26: 2971 (1998)。制限酵素修飾酵素から：T. Lindahl, Biol. Chem. 379:375 (1998)。プラスミド生物学から：K. Gerdes ら、Ann. Rev. Genetic 31:1(1997)。進化生態学から：D. Haig, in Behavioural Ecology, Blackwell (1997)p. 284。(教科書にも引用されている。)

主要発表論文

- 1) N. Takahashi, I. Kobayashi. Evidence for the double-strand break repair model of bacteriophage λ recombination. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 2790-2794 (1990).
- 2) N. K. Takahashi, K. Yamamoto, Y. Kitamura, Si-Qin. Luo, H. Yoshikura, I. Kobayashi. Nonconservative recombination in Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 5912-5916 (1992).
- 3) T. Naito, K. Kusano, I. Kobayashi. Selfish Behavior of Restriction-Modification Systems. Science 267, 897-899 (1995).
- 4) K. Kusano, T. Naito, N. Handa, I. Kobayashi. Restriction-modification systems as genomic parasites in competition for specific sequences. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 11095-11099 (1995).
- 5) I. Kobayashi. DNA modification and restriction: Selfish behavior of an epigenetic system. in Epigenetic mechanisms of gene regulation. Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996)
- 6) N. Handa, K. Kusano, S. Ohashi, I. Kobayashi. χ^* , a χ -related 11-mer sequence partially active in an E. coli recC* strain. Genes to Cells 2, 525-536 (1997).
- 7) K. Kusano, K. Sakagami, T. Yokochi, T. Naito, Y. Tokinaga, E. Ueda, I. Kobayashi. A new type of illegitimate recombination is dependent on restriction and homologous interaction. J. Bacteriol. 179, 5380-5390 (1997).
- 8) A. Fujita, K. Sakagami, Y. Kanegae, I. Saito, I. Kobayashi. Gene targeting with a replication-defective adenovirus vector. J. Virol. 69, 6180-6190 (1995).
- 9) Y. Nakayama and I. Kobayashi. Restriction-modification gene complexes as selfish gene entities: Roles of a regulatory system in their establishment, maintenance, and apoptotic mutual exclusion. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 95, 6442-6447 (1998).
- 10) I. Kobayashi. Selfishness and death: raison d'être of restriction, recombination and mitochondria. Trends in Genetics 14, 368-374(1998).

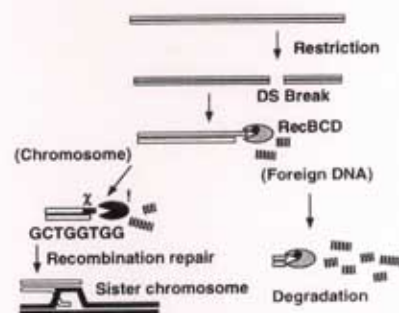


図2. 細胞のRec機構は、制限酵素が攻撃するのが外敵DNAなら分解し尽くすが、カイ配列でマークされた自己の染色体DNAなら組換えで修復する。

第三の鎖、糖鎖の機能解析

細胞生物化学研究部助教授 高崎 誠一



略歴:

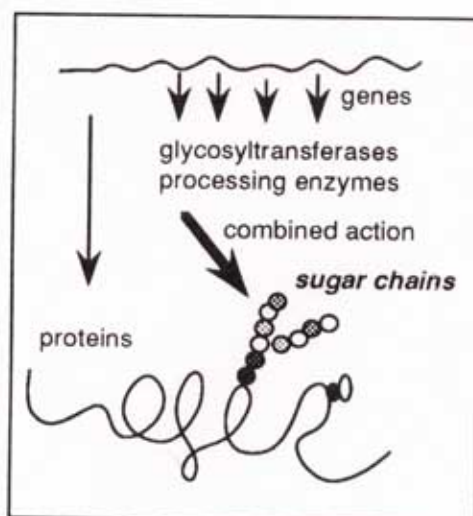
1971年 北海道大学薬学部卒業
1973年 北海道大学大学院薬学研究科修士過程修了
1977年 神戸大学大学院医学研究科博士過程修了
神戸大学医学部助手 (第一生化学教室)
1980年 講師、この間、1979-81年 米国 NIHに留学
1984年 本研究所助教授 (生物有機化学研究部)
1991年 現職、現在に至る。

研究の立脚点:

核酸、蛋白質に次いで第3の鎖とも呼ばれる「糖鎖」は、遺伝子の直接産物である種々の糖転移酵素群やプロセッシング酵素群の共同作用によって生合成される、言わば遺伝子の2次(間接)産物である。そのため、糖鎖の構造や機能の解析には取付き難い面もある。しかし、糖鎖は蛋白質等に共有結合して生体内に広く存在しており、その構造は発生や細胞の分化、成熟の過程で変化することから、様々な細胞間相互作用や細胞表面分子の機能発現を制御する上で、重要な働きをしているものと考えられる。その証明は、核酸や蛋白質のみでは説明しきれない生理的、病理的現象の解明を促進させる重要な課題と位置付け、以下の研究を進めている。

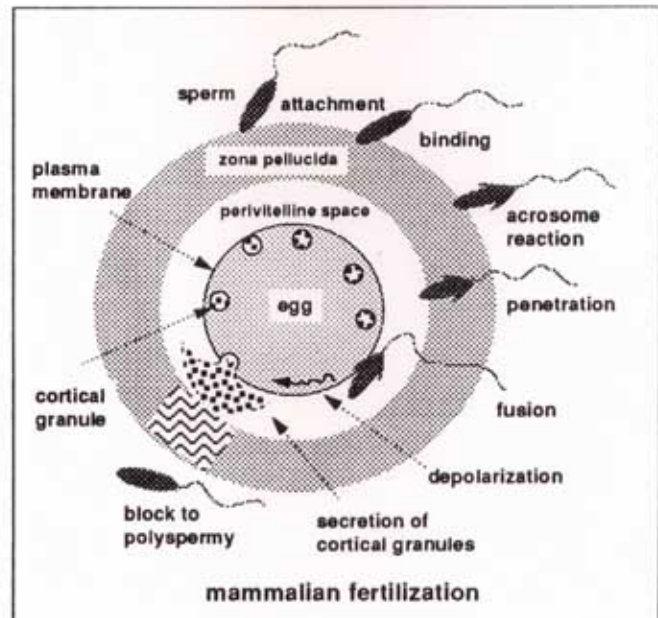
研究の内容と成果:

- 1) ヒトのエリスロポエチン(EPO)やインターフェロン β 1の天然型と遺伝子組替型の比較から、糖鎖の生合成が蛋白質の一次構造と、遺伝子を組み込んだ宿主細胞の生合成系に依存する両面があることを示し、組替型糖蛋白製剤の開発に有用な情報を提供した。in vivo 活性の異なる組替型EPO標品を解析し、Asn型糖鎖の側鎖数の増加と活性発現の間に正の相関があり、そして活性の違いの背景には腎でのクリアランスの違いがあることを示した。一方、標的細胞への直接作用(in vitro)には、側鎖部分はむしろ抑制的に働くことを明らかにした。
- 2) マウスのマクロファージ培養株を用いたFcレセプター介在性食食能誘導の実験系を確立した。この系を用いて、食食能誘導に伴って糖鎖のプロセッシングが抑制されることを示した。更に、糖鎖のプロセッシングや付加を阻害する薬剤による食食能誘導実験から、細胞の分化や成熟度に依存して発現する表面糖鎖によって、分化機能発現が制御されている側面があることを示した。
- 3) リンパ球細胞表面分子CD2は胸腺上皮細胞、抗原提示細胞、標的細胞への接着に関与し、抗原特異的なT細胞の活性化、細胞障害活性の発現を増強する。また、NK細胞などの標的細胞への接着にも介在し、非特異的な細胞障害活性の発現に関与する。CD2とそのリガンドであるCD58との結合機構に関して、T細胞と羊赤血球とのCD2依存性のロゼット形成反応をモデルとして解析し、CD2を介する接着にはガラクトース認識反応が含まれることを示し、リガンド候補となる糖鎖の構造を明らかにしてきた。
- 4) 哺乳動物の卵の外被には数種の糖蛋白質からなる透明帯と呼ばれる規則的な層構造が認められ、精子との結合、精子先体反応の誘導、多精阻止等において重要な働きをしている。とりわけ、精子と卵との結合には透明帯の糖鎖を認識する反応が含まれることが示唆されているが、その分子機構については十分に解明されていない。この問題の解



明には、糖鎖の実体を知り、精子に対する天然の受容体として働く糖鎖を同定することが必須という立場から、ブタの卵透明体糖蛋白質を用いて糖鎖の多様な構造を世界に先駆けて解明してきた。また、卵側の多様な糖鎖の中で、シアリル化された糖鎖やLewis X 構造を含む糖鎖がブタ精子との結合に関与するという知見を得た。卵側のシアロ糖鎖を認識する蛋白質の存在を、最近開発した糖鎖プローブを用いて実証した。一方、マウスではブタと異なり、糖鎖末端のガラクトース残基が精子との結合に関与することを示した。

5) 糖鎖機能解析技術の開発の一環として、立ち遅れていたムチン型糖鎖の高感度分析法、及びAsn型糖鎖の蛍光分析法を確立した。最近、糖鎖認識蛋白質の検出、単離などに有用な多価の糖鎖プローブの作製法を開発し、作製したプローブを受精機構の研究に応用してその有用性を示した。



将来の研究に対する抱負：

最近、糖鎖欠乏糖蛋白症候群や糖転移酵素のノックアウトマウス等の解析例から、発生、細胞の分化、成熟、活性化過程における細胞間相互作用や細胞表面分子の機能発現を制御する上で、重要な働きをしていることが、個体レベルで明かとなりつつある。その詳細な解析は、これまで以上に重要な課題となっており、これまでの研究を更に発展させながら糖鎖を認識する蛋白質にも焦点を当てて、研究を進めていきたい。

主要発表論文：

- 1) Fukushima, K. and Takasaki, S. (1993) Processing inhibition of N-linked sugar chains associated with induction of Fc receptor-mediated phagocytosis in the mouse monocytoïd cells. *Glycobiology*, 3(1), 15-22.
- 2) Misaizu, T., Matsuki, S., Strickland, T.W., Takeuchi, M., Kobata, A. and Takasaki, S. (1995) Role of antennary structure of N-linked sugar chains in renal handling of recombinant human erythropoietin. *Blood* 86, 4097-4104.
- 3) Ogasawara, H., Kusui, K., and Takasaki, S. (1995) Role of terminal galactose residues in N-linked sugar chains of sheep erythrocyte membrane glycoproteins in rosette formation with T lymphocytes. *Immunol. Lett.* 48, 35-38.
- 4) Mori, E., Mori, T. and Takasaki, S. (1997) Mouse sperm bind to β -galactose residues on egg zona pellucida and asialofetuin-coupled beads. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 238, 95-99.
- 5) Kotani, N. and Takasaki, S. (1997) Analysis of O-linked oligosaccharide alditols by high-pH anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *Anal. Biochem.*, 252, 40-47.
- 6) Mori, E., Hedrick, J. L., Wardrip, N. J., Mori, T. and Takasaki, S. (1998) Occurrence of reducing terminal N-acetylglucosamine 3-sulfate and fucosylated outer chains in N-glycans of porcine zona pellucida glycoproteins. *Glycoconjugate J.*, 15(5), 447-456.
- 7) Kotani, N. and Takasaki, S. (1998) Analysis of 2-aminobenzamide-labeled oligosaccharides by high-pH anion-exchange chromatography with fluorometric detection. *Anal. Biochem.*, 264, 66-73.

細胞増殖のかなめ—DNA複製とその制御— の分子機構の研究

分子細胞制御研究部 助教授 正井 久雄



略歴 1981年 東京大学理学部生物化学科卒業後、医科学研究所化学研究部（当時上代淑人教授）に修士課程大学院生として進学。
1986年 理学博士（東京大学理学系研究科、生物化学専攻）
1981年—1990年 DNAX分子細胞生物学研究所に留学（大学院生として。1986年よりポストドクトラルフェロー）
1990年 東京大学医科学研究所、助手
1996年 同助教授、現在に至る。
主な研究領域 生化学、分子生物学
趣味 音楽（最近は娘にピアノを教えること）

この研究に入ったきっかけ

DNA複製は生命現象のかなめであり、これを理解しないと細胞増殖のしくみは理解できない。したがって、この研究を開始した—と言いたところであるが、それはまったく事実とは異なる。私は大学院修士課程に進学当時DNA複製のDの字も知らなかった。修士の大学院生として進学した上代研究部では、たまたま現医科研所長の新井先生がKornberg博士の研究室で ϕ X174ファージの複製の再構成の仕事を完成させ帰国されたところであった。ビベットマンの使い方も知らない私は、精製された酵素を与えられ*in vitro*複製の反応を行い、TCA沈殿でDNA合成を測定するという実験を行ったのが、私とDNA複製の最初の出会いであった。DNA複製の反応はうまくいくときはall-or-noneの美しさでとり込みが起こるという最初の印象が忘れがたく、これが現在まで私にDNA複製の研究を行わせているmotivationである。

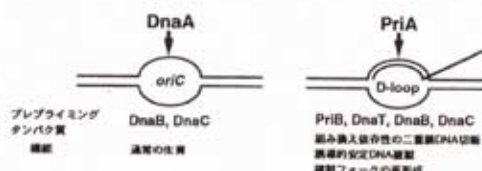
研究のアプローチ

大学院時代から続けている大腸菌のDNA複製の研究はdefineされた鋳型を用いた*in vitro*複製系による解析が主要なアプローチであった。まず、粗抽出液中で反応条件を設定する。DNA複製過程では、鋳型の構造がdynamicに変化する。*in vitro*の反応条件を工夫することにより、種々の中間体を濃縮し、その構造を注意深く解析すると同時に、遺伝学と組みあわせ関与する因子を同定するアプローチをとってきた。現在も基本的には、Kornberg博士の「細胞ができることは、生化学者は試験管のなかでもっとうまくできるはずである」という信念を信じて機能的*in vitro*系に基づいて解析を行うことを目指している。しかしながら、真核細胞では複製起点の同定が困難であったこともあり、*in vivo*を忠実に反映した*in vitro*系の開発が遅れており、これが分子機構の解明の急速な進展を妨げており、私自身のストレスともなっている。

最近の研究成果

- 1 大腸菌に寄生する一本鎖DNAファージの複製起点を認識するPriAタンパク質が、実は大腸菌の組み換えに依存したDNA複製（誘導的安定DNA複製）に必須であることを示した。さらに、PriAタンパク質は、組み換え過程そのものに関与すると同時に、組み換えによる二重鎖DNA切断修復に関与する(図)。生化学的にはPriAタンパク質は、組み換え中間体であるD-ループ構造を認識して複製を開始するユニークな酵素であることが明らかとなった。(文献2)(この研究の一部はニューメキシコ大学医学部の故古小間教授との共同研究でおこなわれた。改めて古小間教授のご冥福をお祈りします。)

- 2 Fプラスミドの接合伝達DNA複製起点近傍に一本鎖DNAの状態のみ機能するユニークなプロモーター配列を見出した。この配列は二本鎖状態ではプロモーター活性はなく、一本鎖になりさらにSSB(一本鎖DNA結合タンパク質)



の存在下で効率よいプロモーターとして機能する。Frp0と名付けられたこの配列は、1) 特徴的な 高次構造を形成すること、2) 転写のプロモーターとしての機能とDNA複製開始のためのプライマーRNA合成の機能の2つを有することを明らかにした。また、このようなユニークなプロモーターは接合伝達時に観察される、受容菌特異的な一過性の遺伝子発現をうまく説明する(文献4)。

- 3 真核細胞染色体複製開始を制御するCdc7キナーゼは、触媒サブユニットと活性制御サブユニットからなるが、この両者は、酵母からヒトまで機能的に保存されて存在することを証明した。また、制御サブユニットは、その発現が細胞周期依存的に変動しサイクリン様サブユニットとして触媒サブユニットのキナーゼ活性を活性化すること

を証明した(文献3、5)。また、制御サブユニットに保存された2つのモチーフを見出し、このモチーフを有するタンパク質はほかにも存在しファミリーを形成する可能性を示した。(この研究は当研究部の佐藤恵子助手、竹田忠行博士、浅野聡博士、熊谷啓之、Jung-Min Kim、Ming-Kwan Cho、山田正之、内田雅司、李明愛らの大学院生および、荻野桂子、松井悦子、飯山博美の3人の技官ら[一部敬称略]との共同研究である)

今後の展望

- 1 組み換え中間体を介して起こるDNA複製は、真核細胞にも存在し、組み換えおよび修復過程に重要な役割を果たしていると推察される。真核細胞にPriAタンパク質と機能的に類似したタンパク質が存在するかどうか生化学的、遺伝学的手法で探索する。
- 2 我々はすでに、複製複合体の一員であり複製開始に必須であるMCMタンパク質がCdc7の重要な基質である可能性を示唆してきた。今後、Cdc7によるリン酸化が複製開始と進行をどのような機構で制御するかを詳細に解析するためには、複製起点の活性化(DNA合成、あるいは鋳型構造の変化)を*in vitro*で測定できる系を開発することが鍵となるであろう。
- 3 Cdc7の活性制御サブユニットは、そのタンパクレベルが細胞周期で変化すること、また触媒サブユニットのキナーゼ活性を細胞周期特異的に活性化すること、などの点でサイクリンに類似している。我々はCdc7活性制御サブユニットに共通に保存される2つのモチーフを発見しこのモチーフを有する新たなタンパク質を同定した。今後、Cdc7活性制御サブユニットがサイクリン同様ファミリーを形成する可能性を追求し、それぞれのメンバーの機能解析を行う。
- 4 PriAタンパク質は転写産物が鋳型DNAにhybridを作ったR-ループからも複製を開始できると考えられている。実際大腸菌ではこのようにR-ループが染色体上に残っている状態ではDnaAもoriCも欠損した遺伝的背景でも大腸菌は生育できる(文献2)。私はこのR-ループ依存性のDNA複製は進化的にprimitiveな様式ではないかと推察している。ゲノムが単純であったと考えられる始原細胞においては、現在の真正細菌に見られるようなきわめてレプリコンごとの特異性が高い複製系が確立していたとは想像しがたい。転写産物が鋳型にはりついていれば始められる複製系は比較的promiscuousに複製を開始することができ単純なゲノムの複製には適しているように思われる。これに関連して私の興味をひくのは、高温、高塩濃度、高圧などの異常環境下に生息する細菌、特に古細菌と呼ばれる一群の生物の複製様式である。Archaeと呼ばれ、原核細胞および真核細胞とは進化的に別のグループに分類されるこの細菌のゲノムは真核細胞に類似した特徴も多く有する。100度に近い温度の中で、いかにして二本鎖DNAが安定に保たれそれが複製されるのだろうか?ここには、まだまったくわれわれが知り得ない未知の機構がoperateしているように思う。将来これらの問題にもとり組んでみたいと思う。

最後に

私がDNAXで初めてDNA複製の研究を始めたときに与えられたテーマは、医科研でも吉川昌之助先生らにより長い間研究が行われていた薬剤耐性プラスミドR因子(R1プラスミド)の複製機構であった。1年余りの研究の結果、R1プラスミドのイニシエーターであるRepAタンパク質は自分が合成された鋳型上に存在する複製起点しか活性化できないことすなわちcis-actingなタンパク質であることが明らかとなった(文献1)。その後の研究によりさらに、RepAタンパク質は起点を活性化した後何らかの機構で不活性化されることを示した。R1プラスミドのコピー数は細胞あたり1個ときわめて厳密に制御されており、cis-actionと複製起点活性化後の不活性化により宿主の分裂あたり1回りの複製が保証されると考えられる。私がこれらの現象をみ出したのは1982-1984年であったが、その後、1988年になって真核細胞のS期に1回限り(once-and-only once)の複製を説明するためにその後複製のキーワードとし定着した「ライセンシングモデル」が提出された。複製開始に必須な因子が複製開始前に起点に結合し、開始の後に何らかの機構で不活性化され再活性化が阻害されるというモデルである。retrospectiveに考えるとR1プラスミドはまさにonce-and-only-once replicationの典型的なモデル系であり、「ライセンシングモデル」のエッセンスはすべてそこに含まれていたのである。残念ながら私には自分の発見をそこまで一般化する洞察力はなかったのであるが、このincidentから私が学んだことは、どんな小さなことでも自分の発見を大切に、そこに隠れているかもしれない普遍性を見逃さないようにするということだった。面白くない生命現象はない。

主要文献

- 1 Masai, H., Kaziro, Y., and Arai, K. (1983) "Definition of *oriR*, the minimum DNA segment essential for initiation of R1 plasmid replication *in vitro*." Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 6814-6818.
- 2 Masai, H., Asai, T., Kubota, Y., Arai, K., and Kogoma, T. (1994) "*Escherichia coli* PriA protein is essential for inducible and constitutive stable DNA replications" EMBO J. 13, 5338-5345
- 3 Masai, H., Miyake, T. and Arai, K. (1995) "*hsk1+*, a *Schizosaccharomyces pombe* gene related to *Saccharomyces cerevisiae* CDC7 kinase, is required for chromosomal replication" EMBO J. 14 3094-3104
- 4 Masai, H., and Arai, K. (1997) "*Frpo*, a novel single-stranded DNA promoter for transcription and for primer RNA synthesis of DNA replication" Cell, 89, 897-907
- 5 Kumagai, H., Sato, N., Yamada, M., Mahony, D., Seghezzi, W., Lees, E., Arai, K., and Masai, H. (1999) A novel growth- and cell cycle-regulated protein, ASK, activates human Cdc7-related kinase and is essential for G1/S transition in mammalian cells. Mol. Cell. Biol. in press

癌の分子生物学的研究成果が蓄積しているのに なぜ癌は治らない？

細胞遺伝学研究部助教授 丸 義朗



略歴

- 1983年 東京大学医学部卒業。虎の門病院内科レジデント
- 1985年 東京大学医学部付属病院第3内科にて血液臨床をする傍ら平井久丸研究室にて白血病癌遺伝子の研究、神経細胞ガイダンス分子eph及びredox関連分子Itkのクローニングに従事（高久史磨教授）。
- 1989年 カリフォルニア大学ロサンゼルス校（UCLA）へ留学。ヒト慢性骨髄性白血病の癌遺伝子BCR-ABLの活性化メカニズム解明に従事。
- 1993年 東京大学医科学研究所細胞遺伝学研究部助手。UCLA留学中の仕事であるBCR-ABLの研究を継続するとともに、研究部のテーマである血管分子生物学に従事。
- 1996年 同助教授、現在に至る。

主たる研究領域：白血病癌遺伝子と血管分子生物学。

趣味：釣り、食べ歩き、映画鑑賞、音楽鑑賞。

研究の立脚点と素材：

ヒト悪性腫瘍の分子生物学的理解とその応用を最終目標とする。

ヒト悪性新生物は多様性に富み、『分子病理学的に責任分子を100%の症例において均一に特定できる』ということは多くの場合困難である。その中で、この条件を例外的に満たす慢性骨髄性白血病の責任分子BCR-ABLを実験材料としている。また血液細胞は分化／増殖／細胞死などを観察するのに扱い安だけでなく、これに働きかける多くのサイトカインとその受容体が同定されたため、これら生物学的事象に対する分子レベルでの説明が得られている。一方、悪性新生物の浸潤を考える点で、免疫同様宿主側の癌細胞に対する反応として近年注目をあびているのが血管新生である。血管新生が多種の細胞を巻き込む中で、中心的な役割をはたしている血管内皮細胞を第2の実験材料とし、その増殖／分化を研究する。まとめると、ヒト悪性腫瘍そのものとして白血病細胞の癌遺伝子とそれによって悪性化した細胞を、宿主側の細胞として血管内皮細胞を扱い、悪性腫瘍の生物学を理解する。

研究の進め方：

大きな問題を最初に置き（例えば、BCRの生物学的機能は何か？、など）、常にそれを意識しながら実験のstrategyを立案することを目標とする。また生物学的事象（例えば、細胞の形質転換など）が先にあった上での分子生物学的解析であることを忘れないよう努力する。これは分子（乃至そのドメイン）から入っても、生物学的事象から入っても同じである。

最近の主な研究成果：

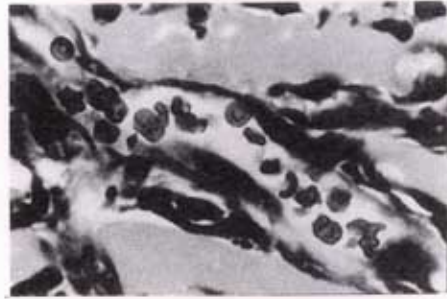
- (1) BCR蛋白がBCR-ABLや活性化型Fpsなどのチロシンキナーゼの基質となり、リン酸化部位の一つがGrb-2のSH2ドメインとの結合を介してRas活性化分子Grb-2/SOSと作用することを報告した（MCB、1995）。
- (2) BCRのN末端を欠失させるとBCR-ABLはその生物学的活性を喪失するが、欠失させたBCRシーケンスの換りに、結晶構造解析で二量体形成能をもつことがわかっているGST遺伝子を導入すると喪失した生物学的活性を部分的に回復させることができることを示し、BCRN末端領域の多量体形成能の重要性を証した（JBC、1996）。
- (3) BCRのCDC24相同性領域が色素性乾皮症B群蛋白XPB



(1) 1998年、VEGFの発見者であるNapoleone Ferrara先生をお招きし、渋谷正史会長のもと開催された第3回Vascular Medicine学会にて撮られた研究室集合写真。

と結合することを見出し、XPBがBCR-ABLによってチロシンリン酸化されて、そのHelicase活性を低下させTFIIHのDNA修復機構に干渉する可能性を示した (PNAS, 1999)。

- (4) 血管内皮細胞増殖因子VEGF受容体の一つFlt-1チロシンキナーゼの恒常的活性化型を人工的に作製し、それを樹立した内皮細胞株に導入することで、内皮細胞に管腔形成能を誘導した (Oncogene, 1998 ; 続報、投稿中)。



(2) 管腔形成能をもたない内皮細胞株に人工的に活性化させたVEGF受容体キナーゼを発現させin vitroで管腔を形成させた後、これを同種ラットの皮下に移植し血流を獲得した。

進行中の研究：

- (1) ABL SH3 ドメインに結合してその活性を阻害するThiol-specific antioxidant HBP23がABLの生理的活性化に関与するかどうか検討する。日本医科大／奈良先端大との共同研究により、HBP23/SH3複合体の結晶構造解析を検討している。
- (2) BCRのCDC24相同性領域のリン酸化などによる修飾が同領域の特定の機能に関係していないかどうか検討している。
- (3) BCR-ABLのシグナル伝達に関与すると考えられる分子を模索する。
- (4) BCR-ABLが他のTFIIH構成員に生化学的乃至機能的修飾を及ぼしていないかどうか検討する。
- (5) 活性化型Flt-1が如何なる分子メカニズムで内皮細胞に管腔形成能を付与するのか検討する。
- (6) 山梨医科大との共同研究により、Sphingosine 1-PのBCR-ABL発現細胞や内皮細胞に対する生物学的効果を検討している。
- (7) Angiostatinの生物学的効果に立脚し、その分子生物学的作用機序を解明すべく結合分子を模索している。

将来の方向等について：

細胞の増殖シグナルに加えて高次元細胞形態、DNA修復、実験動物モデルなども研究の対象としたい。

主要発表論文：

- (1) Takeda, N., Shibuya, M., and Maru, Y. The BCR-ABL oncoprotein potentially interacts with the xeroderma pigmentosum group B protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:203-207, 1999.
- (2) Maru, Y., Yamaguchi, S., and Shibuya, M. Flt-1, a receptor for vascular endothelial growth factor, has transforming and morphogenic potentials. *Oncogene* 16:2585-2595, 1998.
- (3) Maru, Y., Yamaguchi, S., Takahashi, T., and Shibuya, M. Virally Activated Ras Cooperates With Integrin to Induce Tubulogenesis in Sinusoidal Endothelial Cell Lines. *J. Cell. Physiol.* 176:223-234, 1998.
- (4) Maru, Y., Afar, D.E.H., Witte, O.N., and Shibuya, M. The dimerization property of glutathione S-transferase partially reactivates BCR-ABL lacking the oligomerization domain. *J. Biol. Chem.* 271:15353-15357, 1996.
- (5) Maru, Y., Peters, K.L., Afar, D.E.H., Shibuya, M., Witte, O.N., and Smithgall, T.E. Tyrosine phosphorylation of BCR by FPS/FES protein-tyrosine kinases induces BCR association with GRB-2/SOS. *Mol. Cell. Biol.* 15:835-842, 1995.
- (6) Hart, M.J., Maru, Y., Leonard, D., Witte, O.N., Evans, T., and Cerione, R.A. A GDP-dissociation inhibitor (GDI) also serves as a GTPase-inhibitor protein for the ras-like protein CDC42Hs. *Science*, 258:812-815, 1992.
- (7) Pendergast, A.M., Muller, A.J., Havlik, M.H., Maru, Y., and Witte, O.N. BCR sequences essential for transformation by the BCR-ABL oncogene bind to the ABL SH2 regulatory domain in a non-phosphotyrosine-dependent manner. *Cell*. 66:161-171, 1991.
- (8) Maru, Y., and Witte, O.N. The BCR gene encodes a novel serine/threonine kinase activity within a single exon. *Cell*. 67:459-468, 1991.

医科学研究所外科と私

臓器移植生理学研究部（臓器細胞工学研究部）、外科助教授：江里口 正純



略歴：1973年 東京大学医学部卒業
1973年 東京大学医科学研究所外科入局
1981年 東京大学医科学研究所外科助手
1983年-1985年 仏国外務省給費留学生としてビルジュイフのポール・ブルス病院
付属癌免疫遺伝学研究所にてGeorges Mathé教授に師事
1994年 東京大学医科学研究所外科講師
1998年 東京大学医科学研究所臓器移植生理学研究部（臓器細胞工学研究部）、外科
助教授、現在に至る
専門領域：消化器癌及びその他の固形癌の診断と外科を中心とした集学的治療
認定医の資格：外科学会認定医、指導医、消化器外科学会認定医、指導医、消化器内視鏡
学会認定医、乳癌学会認定医

I. はじめに

私のことをお話するには、まず医科学研究所外科の“流れ”についてお話しておかなければなりません。と申しますのは、臨床、臨床研究に携わる場合、自分の属する科の“流れ”の中で、自己の力を最大限に発揮して仕事に従事することになりますが、医科学研究所のようなところでは、必要に応じて積極的に“流れ”を変えて行くことが課せられているからです。

私が外科に入局してからの外科の“流れ”について簡単に述べます。当時、外科、癌病態学研究部で藤井源七郎教授らによって癌に対する非特異的免疫療法の臨床研究がなされ、癌治療において免疫療法の重要性が認識されることになりました。外科系の他の科として人工臓器移植科、臓器移植生理学研究部が腎臓移植を主に行っていましたが、承認された肝臓移植プロジェクトが実現せずそのプロジェクトも終了しました。そして、浅野茂隆病院長のもと、病院、医科学研究所で外科系の一本化が決定され、1996年、癌病態学研究部は小児科の中畑教授が担当され、1997年、東京大学第一外科武藤徹一郎教授が外科系の研究部として臓器移植生理学研究部（臓器細胞工学研究部）教授を併任され、1998年、外科と人工臓器移植科は外科として一本化されました。

最近の外科の“流れ”のなかで実感しますことは、医科学研究所付属病院が進めつつある先端医療開発のためには科を超えて専門医が難病の治療のもとに結集するチーム作りが大切であるということです。

II. さてこれから私自身のことを述べます。

1. いままでに行ってきたこと

- 外科入局後、藤井源七郎教授のもとで外科手術の修練（特に癌の手術）、そしてBCGの経口投与による消化器癌の非特異的免疫療法の基礎実験、臨床研究¹に携わりました。
- フランスではMathé教授のもとで、臨床関係では化学療法、免疫療法の生存曲線の解析²を行い、基礎関係では発癌剤BOPを用いてハムスターに膀胱癌のできる過程（前癌状態）の研究³を行いました。
- 臨床面では高齢者の癌の手術⁴、早期胃癌のリンパ節転移⁵、新白金製剤Oxaliplatinの硬性胃癌に対する効果の検討⁶などに取り組みました。Oxaliplatinについては、その作用機序についてアポトーシスの観点から研究しています。
- 1980年代後半には、感染免疫内科でHIV感染症の治療が始まり、1992年から外科でHIV感染者の手術を行い始めました。私たちの手術経験にもとづいて手術適応基準を作り、AIDS患者を含めてHIV感染者に多くの手術を行ってきました⁷（図1）。

2. これから行うこと

- 原発性、転移性肝臓癌に対するp53遺伝子肝動注治療の臨床研究（第一相試験）を準備しています。手術ができず、

他の治療法も効果が期待できない患者で肝癌細胞に変異p53遺伝子が認められた場合、正常p53遺伝子を組み込んだアデノウイルスベクターを肝動脈に留置したカテーテルから5日間、反復注入します。2月現在、厚生省、文部省の審査を受けており、承認され次第、実施したいと思っています。

- b) もう一つのプロジェクトとして、ステージⅡ (n1β)、Ⅲ乳癌に対するDNP修飾自家腫瘍ワクチンによる腫瘍特異的免疫療法の臨床研究(第一相試験)を予定しています。Thomas Jefferson 大学のDavid Berd教授らとの協同研究です。手術で切除した病巣から癌細胞を取り出し、冷凍保存します。術後、一般的な化学療法、ホルモン療法などの補助療法が終了した後、癌細胞をハプテンのDNP (dinitrophenyl) で修飾して自家腫瘍ワクチンとして皮内接種します。
- c) 皆様のおかげで、平成10年度内に武藤教授のもと外科系の研究室(臓器細胞工学研究部)の改修と整備が終わります。今後は、スタッフを更に充実し、“流れ”を変え新たなプロジェクトを提出すべく研究を進めて行かなければなりません。

Ⅲ. 最後になりましたが、いままで、そしてこれからの臨床、研究でのチーム、協同研究者の方々は以下のとおりです。

プロジェクト診療部：山下直秀先生、内科：谷憲三郎先生、細胞プロセッシング研究部：高橋恒夫先生、輸血部：前川平先生、外科：富川伸二先生、武田泰隆先生、吉崎巖先生、別宮好文先生、野村祐二先生、西村洋治先生、柳衛宏先生、野中泰政先生、安藤裕一先生、銘形和彦先生、沢村聡美先生、長谷部浩亨先生、癌病態学研究部：広瀬偉美子さん、臓器細胞工学研究部：仲山節子さん、そして病院の各科、各部門の皆様。



図1：HIV感染者の手術

主要発表論文

- 1) Eriguchi M, Fujii G: Oral administration of BCG as a local immunotherapy of gastrointestinal cancer. *J. Surg. Oncol.* 1984;26:100-106
- 2) Eriguchi M, Mathe G: New survival curve model for comparison of adjuvant therapy of malignant diseases. *Biomed. Pharmacother.* 1986;40:143-147
- 3) Eriguchi M, Carre-Llopis A, Orbach S, Escribano M. J: Evolution of the expression of fetal acinar antigens during carcinogenesis of the pancreas in hamsters: Individual follow-up by open biopsy. *J. Natl. Cancer Inst.* 1987;78:519-525
- 4) Eriguchi M, Sekiguchi M, Samaru Y, Mikamo S, Fujii Y, Takahashi T, Takeda Y, Yoshizaki I, Shimizu H, Akiyama N, Yanagie H, Tagami M: Abdominal surgery in patients over 80 years of age. *Biomed. Pharmacother.* 1988;42:415-419
- 5) Eriguchi M, Miyamoto Y, Fujii Y, Takeda Y, Osada I, Hagiwara T, Yoshizaki I, Shimizu K, Akiyama N, Yanagie H, Nishimura Y, Takahashi T, Mikamo S, Samaru Y, Sekiguchi M, Uchida H, Wakabayashi T, Fujii G: Regional lymph node metastasis of early gastric cancer. *Eur. J. Surg.* 1991;197-200
- 6) Eriguchi M, Osada I, Fujii Y, Takeda Y, Yoshizaki I, Akiyama N, Yanagie H, Sekiguchi M, Kizu R, Matsushita H, Mathe G: Pilot study for preoperative administration of l-OHP to patients with advanced scirrhous type gastric cancer. *Biomed. Pharmacother.* 1997; 51:217-220
- 7) Eriguchi M, Takeda Y, Yoshizaki I, Yanagie H, Fujii Y: Surgery in patients with HIV infection: indications and outcome. *Biomed. Pharmacother.* 1997;51:474-479

ウイルスの病原性発現機構の解析

感染症研究部助教授 塩田 達雄



略歴：1982年 東京大学医学部保健学科卒業。同大学院医学系研究科修士課程進学
1984年 同大学院医学系研究科博士課程進学。
1986年 同中退。東京大学医科学研究所ウイルス感染研究部文部教官助手。
1989年 アメリカ合衆国カリフォルニア大学サンフランシスコ校がん研究所。
1991年 東京大学医科学研究所ウイルス感染研究部文部教官助手復職。
1997年 東京大学医科学研究所感染症研究部文部教官助教授。

主たる研究領域

HIV-1の病原性に関わるウイルスおよび宿主因子の解析

研究内容

最近の主な研究成果および進行中の研究

1. HIV-1の感染個体内進化と病態

HIV-1は感染者の病態の進行に伴ってマクロファージ指向性 (M tropic) から株化T細胞指向性 (T tropic) に変化する。この変化が病態進行の原因なのか結果なのかは未だ明らかではない。HIV-1の変化によって病態進行は本当に加速されるのか、また、HIV-1の変化は感染個体内環境のどのような変化を反映しているのか、を明らかにするために、様々な病期、様々な病態進行速度の感染者体内のHIV-1の解析を行った。その結果、病態進行速度の緩やかな感染者ほどアミノ酸置換が生じ易く、HIV-1の感染個体内変化とはHIV-1の適応的進化の結果と考えられること、しかし細胞宿主域の変化は病態進行速度に関わりなく病態の進行した感染者に認められること、また、病態進行の緩やかな感染者には外被膜糖蛋白質の2番目の高度可変領域V2に特徴的な延長が認められること、が明らかになった。V2の延長は病態進行の新たなマーカーと成り得る可能性があり、今後、詳細な解析が必要である。

2. ケモカインおよびケモカインレセプターの研究

Stromal cell derived factor (SDF-1) はT tropic HIV-1のコレセプターであるCXCR4の生理的リガンドであり、T tropic HIV-1の増殖を競合的に阻害する。我々はSDF-1がCD4陽性T細胞の活性化抗原であるCD26のdipeptidyl peptidase IVの基質となること、その結果、SDF-1のリンパ球走化作用も抗HIV-1作用も失われることを見出した。このことは、SDF-1の抗HIV-1作用が感染者の免疫系の活性化状態によって大きく影響されることを意味するとともに、SDF-1の生理作用もまた免疫系の活性化状態によって大きく左右されることを意味する。

3. HIV-1感染症の病態進行に関わる宿主因子の解析

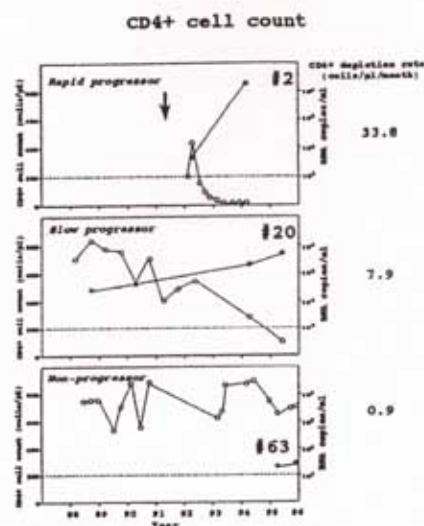
HIV-1感染症の進行速度は感染者ごとに大きく異なる。現在、HIV-1の生活環に関わる様々な宿主因子の遺伝的多型が病態進行速度に影響するか否かの検討を行っている。多数のHIV-1感染者について諸々の遺伝的因子を検討し、病態進行との関係を総合的に解析することにより、HIV-1感染症の病態進行の予測がある程度可能になるのではないかと考えている。現在までに、M tropic HIV-1のコレセプターCCR5の生理的リガンドであるRANTESのプロモーター領域に変異が存在し、この変異がRANTESの転写を増強させてAIDSの病態進行を遅延させることを見出した。今後、HIV-1増殖に関わる宿主因子をできるだけ多く解析する予定である。

将来の抱負

比較的単純な病原体であるウイルスが人体という複雑なシステムの中の様々な因子と相互作用をおこない、そのシステムを攪乱させた結果生じるのがウイルス感染症である。ウイルス感染症に関わる病原体側および宿主側の数多い因子とそれらの間の相互作用の素過程を分子生物学的手法を用いてひとつひとつ解明し、次いでそれぞれの素過程が疾患という高次な生命現象にどれ程貢献するのかを疫学的手法や将来的には発生工学的手法も取り入れて明らかにし、最終的には疾患の予防、診断、治療に役立てたい、と考えている。

主要な発表論文

1. Tatsuo Shioda, Jay A. Levy, and Cecilia Cheng-Mayer. Macrophage and T cell-line tropisms of HIV-1 are determined by specific regions of the envelope gp120. 1991. Nature (London) 234, 167-169.
2. Tatsuo Shioda, Jay A. Levy, and Cecilia Cheng-Mayer. Small amino acid changes in the V3 hypervariable region of gp120 can affect T-cell line and macrophage tropisms of HIV-1. 1992. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89, 9434-9438.
3. Tatsuo Shioda, Shinichi Oka, Xiaomi Xin, Huanliang Liu, Rie Harukuni, Atsushi Kurotani, Masao Fukushima, Mohammad K. Hasan, Aikichi Iwamoto, and Yoshiyuki Nagai. In vivo sequence variability of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) envelope gp120: Association of V2 extension with slow disease progression. J. Virol. 71, 4871-4881, 1997.
4. Tatsuo Shioda, Hiroyuki Kato, Yukano Ohnishi, Kei Tashiro, Masaya Ikegawa, Emi E. Nakayama, Huiling Hu, Atsushi Kato, Yuko Sakai, Huanliang Liu, Tasuku Honjo, Akio Nomoto, Aikichi Iwamoto, Chikao Morimoto, and Yoshiyuki Nagai. Anti-HIV-1 and chemotactic activities of human SDF-1a and SDF-1b are abolished by CD26/dipeptidyl peptidase IV mediated cleavage. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95, 6331-6336, 1998.
5. Huanliang Liu, David Chao, Emi E. Nakayama, Hitomi Taguchi, Mieko Gotoh, Xiaomi Xin, Jun-ki Takamatsu, Hidehiko Saito, Yoshihide Ishikawa, Tatsuya Akaza, Takeo Juji, Yutaka Takebe, Takeshi Ohishi, Katsuyuki Fukutake, Yoshikazu Maruyama, Shinji Yashiki, Shunro Sonoda, Tetsuya Nakamura, Yoshiyuki Nagai, Aikichi Iwamoto and Tatsuo Shioda. Polymorphism in RANTES chemokine promoter affects HIV-1 disease progression. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. In press.



HIV-1 感染症の病態進行速度は感染者毎に大きく異なる。図には進行の著しく速い rapid progressor #2、緩やかだが確実に進行する slow progressor #20、全く進行の認められない non-progressor #63 の CD4 陽性細胞数 (白丸) と血清中 HIV-1 量 (黒丸) の推移を示す。

小児科医にできること

癌病態学研究部

附属病院小児細胞移植科 辻 浩一郎



略歴：

- 1978年 信州大学医学部卒業後、同小児科学教室に入局（赤羽太郎教授）
- 1985年 同小児科助手
- 1990年 米国サウスカロライナ医科大学内科実験血液学教室に留学（小川真紀雄教授）
- 1993年 信州大学医学部小児科講師
- 1994年 東京大学医科学研究所癌病態学研究部助教授、現在に至る

主たる研究領域：小児血液学

二足の草鞋

卒業後の2年間の小児科研修を終えた後は、小児科医であることと研究者であることの間を、振り子のように行ったり来りしながらやってきた。あるいは蝙蝠のようにと言い替えてもいいかもしれないが、とにかくもうしばらくは今のままの状況でやっていけることを願っている。ただ、どちらか一つを選ばなければならないとしたら、問題なく小児科医であることを選ぶと考えている。

小児科医として

最初に小児科医として研修した教室のテーマが、小児血液疾患、特に白血病であったため、その後は自分の気持ちとは係わりなく、多くの白血病の子ども達を診てきた。もちろんそれが嫌であったら決して続かなかっただろうが、大半は悲しい思い出であったように思う。それでも最近では、多くの人達の努力により小児白血病の長期生存率は飛躍的に向上した。しかし、無論小児白血病が難治性疾患であることに変わりはない。

研究について

自分には三人の師匠がいてと思っている。故赤羽太郎前信州大学医学部小児科教授、小川真紀雄サウスカロライナ医科大学教授、それに現在のボスである中畑龍俊癌病態学研究部教授の三人である。これらの先生方はいずれも血液学の世界的研究者であり、これらの三人の先生と巡り会ったことと、たまたま造血幹細胞移植が治療法として確立する時期に研究を始めたことから、造血幹細胞について研究してきた。意識してそうしてきたわけではないが、振り返ってみればほとんどそれしかやってこなかったとも言える。

これまでにやってきたことのほとんどは、コロニー形成法など細胞生物学的手法を中心としたもので、分子生物学のアプローチは共同研究者の方に依存してきた。こうした研究方法では結局は現象論にとどまってしまう、生物現象を本質的にとらえていないのではないかという忸怩たる思いがある。しかしその一方で、移植の現場ではそれで充分とは言わないまでも、ほぼ間にあっているならば、そこまでが自分の領分だという気がしないでもない。ただ、分子生物学を専らとしている人達にとって、常に優れた水先案内人でありたいとは願っている。

造血幹細胞について

我々の一生にわたる造血は、造血幹細胞という極めて少数の細胞集団により維持されている。造血幹細胞は、自分と同じ能力を有する細胞を複製する能力（自己複製能）と全ての血液細胞に分化し得る能力（多分化能）という二つの能力を併せ持つことにより、それを可能にしていると考えられている。この造血幹細胞を移植することにより、病的造血を廃絶した後正常造血を再構築することが、造血幹細胞移植の目的といえる。したがって、造血幹細胞の増殖分化機構を明らかにし、これを完全に制御できれば、より安全で有効な造血幹細胞移植が可能となると信じている。

現在の研究

現在研究部の多くの人達と一緒に以下の研究を行なっている。

- 1) 造血幹細胞の純化とその性状の解析（海老原、金子、松岡、吉野）
：嘗ては極めて概念的なものとして考えられてきた造血幹細胞も、FACSの導入によりその細胞表面形質や性状の解析が可能となった。我々は、造血幹細胞上のサイトカイン受容体やCD34等の分化抗原の発



図1：FACSによりsortingされたヒトCD34陽性細胞

現について検討している。

2) ヒト造血幹細胞の評価システムの確立(吉野、植田、馬) : ヒト造血幹細胞の造血再構築能を正しく評価するためには、当然のことながら異種移植によらざるを得ないわけだが、これまで満足すべきシステムは確立されていなかった。最近我々は、免疫不全マウスであるNOD-Scidマウスを用いたヒト造血幹細胞の評価システムを開発した。

3) ヒト造血幹細胞の体外増幅法や遺伝子導入法の開発(山田、植田、吉野、海老原) : 我々はこれまでもSCF、Flt3リガンド、thrombopoietin、IL-6/可溶性IL-6R複合体が未分化なヒト造血細胞の増殖を刺激することを報告してきたが、前記のヒト造血幹細胞の評価システムを用いて、これらのサイトカイン刺激による臨床応用可能なヒト造血幹細胞の体外増幅法や遺伝子導入法の開発を目指している。

4) 胎生期造血の解析(許、松岡、久川、杉山) : 臍帯血移植は新たな造血幹細胞移植法として最近注目されているが、我々は臍帯血造血幹細胞のモデル系として、マウス胎生期造血の解析を行なっている。

ここでは共同研究者の人達の敬称は省略させていただいたが、これらの人達の協力なくして現在の自分はいない。この場をお借りして、心からお礼を申し上げる次第である。

小児科医の戯言

誌面に少し余裕があるようなので、戯言を書かせていただく。僕は、造血幹細胞がまだ何のcommitment(運命付け)も受けていないあらゆる可能性を秘めた細胞であるということがとても気に入っている。全ての子供達が造血幹細胞のようであってくれたらと思う。現在、造血幹細胞の分化に関しては二つのモデルが提唱されている。非常に大雑把に言えば、ひとつは環境等の外的要因が造血幹細胞の分化を運命付けるとするもの(inductive model)であり、もうひとつは造血幹細胞の内的要因によりその分化が決定されるとするモデル(stochastic model)である。我々を含む幾つかのグループが、現象的にはstochastic modelを支持する報告をしているが、その分子基盤についてはほとんど解明されておらず、いずれのモデルが正しいのか最終的な決着はついていない。僕は、子供達は自らの力でその運命を切り開いていてもらいたいと考えており、環境は彼らの希望を適えられる程度に整備されていれば良いと思っているので、決定的な証拠が示されない限りstochastic modelの肩を持ち続けるのだらうと予感している(自分でも滅茶苦茶な話だと思うし、研究者としては失格と言わざるを得ないが、本気でそう思っているのだからどうしようもない)。

研究の最終目標

言葉にしてしまうと気恥ずかしいが、僕の最終目標は、白血病を含む種々の血液疾患に苦しむ子供達の完治以外にないと思っている。だからこれまでも、どんなこじつけでもいいから、自分の研究がそのような子供達の役にたつのだと信じようとしてきた。反面、現在のテーマでやっていく限り、多少周り道をすることはあっても、何とか目標に向かっていけるのではないかと楽観的に考えてもいる。

主要発表論文

- 1) Tsuji K, Lyman SD, Sudo T, Clark SC, Ogawa M: Enhancement of murine hematopoiesis by synergistic interactions between steel factor (ligand for c-kit), interleukin-11, and other early acting factors in culture. *Blood* 79:2855-2860, 1992.
- 2) Sui X, Tsuji K, Tajima S, Tanaka R, Muraoka K, Ebihara Y, Ikebuchi K, Yasukawa K, Taga T, Kishimoto T, Nakahata T: gp130 and c-Kit signalings synergize for ex vivo expansion of human primitive hemopoietic progenitor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:2859-2863, 1995.
- 3) Tajima S, Tsuji K, Ebihara Y, Sui X, Tanaka R, Muraoka K, Yoshida M, Yamada K, Yasukawa K, Taga T, Kishimoto T, Nakahata T: Analysis of IL-6 receptor and gp130 expressions and proliferative capability of human CD34⁺ cells. *J. Exp. Med.* 184:1357-1364, 1996.
- 4) Akasaka T, Tsuji K, Kawahira H, Kanno M, Harigaya K, Hu L, Ebihara Y, Nakahata T, Tetsu O, Taniguchi M, Koseki H: The role of mel-18, a mammalian homolog of Drosophila Polycomb group gene, during the IL-7-dependent proliferation of lymphocyte precursors. *Immunity* 7:135-146, 1997.
- 5) Xu M, Tsuji K, Ueda T, Mukoyama Y, Hara T, Matsuoka S, Ebihara T, Yang F-C, Manabe A, Kikuchi A, Ito M, Miyajima A, Nakahata T: Stimulation of mouse and human primitive hematopoiesis by murine embryonic aorta-gonad-mesonephros-derived stromal cell lines. *Blood* 92:2032-2040, 1998.

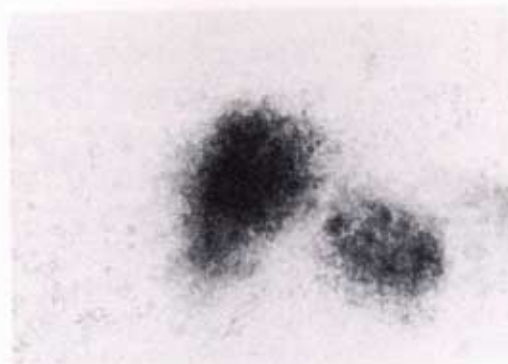


図2: 多能性造血幹細胞から形成された混合コロニー

自己紹介

谷 憲三郎



略歴：1955年3月7日生まれ

1979年3月 山口大学医学部医学科卒業

1980年4月 東京大学大学院第3種博士課程入学

1986年3月 同上 修了（医学博士）

職歴・研究歴

1979年4月 アメリカ海軍横須賀病院インターン

1982年12月 シティオブホープ医学研究所（アメリカ合衆国）

～1984年11月 リサーチフェロー

1986年4月 日本学術振興会特別研究員

1988年1月 東京大学医科学研究所病態薬理学研究部助手

1990年10月 東京大学医科学研究所附属病院内科講師（病棟医長併任）

1993年4月 京都大学ウイルス研究所非常勤講師併任

1995年2月 東京大学医科学研究所病態薬理学研究部ならびに附属病院内科助教授、現在に至る

自己紹介

山口大学医学部卒業後すぐに在日米軍横須賀病院でインターンとして1年間勤務し、幅広く臨床医の基礎を学んだ。その後、東京大学大学院に入学し東京大学医科学研究所、三輪史朗教授の指導の下、約6年間赤血球酵素異常による遺伝性溶血性貧血の病態解析を生化学的手法を用いて行った。うち約2年間は米国・シティオブホープ医学研究所（吉田昭博士）に留学し、分子生物学的手法による遺伝生化学研究の研鑽を積んだ。“常染色体性ヒトホスホグリセリン酸キナーゼプロセス遺伝子のクローニング及びその構造解析”研究により大学院博士号を取得した。その後、日本学術振興会・特別研究員となりヒトビルビン酸キナーゼ遺伝子を世界で初めてクローン化すると共に分子生物学的手法をもちいた血液疾患患者の病因解析を数多く行った。医科学研究所病態薬理学研究部助手に採用されてからは、高久史麿教授、続いて浅野茂隆教授の指導の下、造血因子を用いた白血病の病態解析ならびに遺伝子治療法の基礎研究を行い、ここで得た基礎知識を基に悪性腫瘍に対するサイトカイン遺伝子治療研究を進展させてきた。一方で、マウスや小型霊長類コモンマーモセット骨髓細胞への高効率遺伝子導入法を開発し、遺伝子導入造血幹細胞移植マウスならびにマーモセットでの造血再構築の研究を行ってきた。さらにこのコモンマーモセットを用いてヒト疾患モデル作製研究も開始しており、今後遺伝子治療ベクターのみならず、新規治療法の前臨床試験動物としての観点からの開発研究を行っている。東大医科研病院での診療にも終始従事し、病棟医長を1990年から1995年まで勤め、その間研修医、医員などの直接的指導にあたり、現在も副診療科長の立場でその任を果たしている。

現在の研究内容紹介

現在以下の3研究テーマについてわれわれのグループは研究を行っている。

1) 悪性腫瘍に対する免疫遺伝子治療法の臨床的開発：

ヒト顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）遺伝子導入腫瘍細胞の持つ抗腫瘍免疫誘導効果に着目し、1992年より米国との共同臨床研究を行っている。この中でも腎癌を対象とした免疫遺伝子治療研究は、国内数機関の協力と、病態薬理学研究部・東大医科研附属病院の基礎・臨床研究スタッフ全員の協力の下に、既に患者への遺伝子導入癌細胞の接種が1998年末より開始されており、本邦における初めての癌に対する遺伝子治療として、今後の展開が期待されている。すなわち患者体内に誘導される抗腫瘍免疫能の詳細な解析は、今後の癌治療に対する重要な情報を提供するであろう。また附属病院臨床細胞工芸室で実施している、腎癌細胞の大量培養・遺伝子導入操作、ならびに安全性検査の過程で得られる経験的知識も今後の遺伝子治療臨床研究の発展に極めて重要な情報を与えてくれるものと期待される。

2) 悪性腫瘍、白血病に対する遺伝子治療法の基礎的開発：

1) に関連した基礎研究としてこれまで、マウス肺癌や白血病細胞にレトロウイルスベクターで各種サイトカイン

やリガンド分子遺伝子を導入後、それら遺伝子導入腫瘍細胞の接種が同系マウス宿主において誘導する抗腫瘍免疫効果を *in vivo*ならびに *in vitro*系で検討してきた。この中でGM-CSF遺伝子導入腫瘍細胞には強力な抗腫瘍ワクチン作用があり、GM-CSF, B7-1 (CD80) の両遺伝子を導入した、マウス胸腺リンパ腫細胞 (EL-4 細胞) の抗腫瘍ワクチン誘導効果はGM-CSF単独遺伝子導入の場合に比べ、相乗的であることが明らかとなった。またマウス肺癌細胞 (Lewis 細胞) 系では、GM-CSF遺伝子導入細胞による上記と同様の抗腫瘍免疫誘導効果が明らかとなったことに加え、IL-12 遺伝子導入Lewis 肺癌細胞の抗腫瘍ワクチン誘導効果ならびに既存腫瘍への治療効果も明らかとなった。以上の免疫誘導遺伝子を用いた検討に加え、東大医科研・遺伝子解析施設でクローン化された新生血管増殖阻害因子 (brain specific angiogenesis inhibitor (BAI)-1) 遺伝子を用いた遺伝子治療法の前臨床試験研究なども併せて行っている。

3) 小型霊長類コモンマーモセットを用いたヒト疾患モデルの作製:

小型霊長類コモンマーモセット末梢血造血幹細胞 (PBSC) 中へレトロウイルスベクターを用い、*in vitro*で多剤耐性遺伝子 (MDR1) を高率に遺伝子導入できる系を確立した。この系を用いて作製したMDR1遺伝子導入 PBSCを、大量放射線照射後のマーモセットに移植し、臨床経過を観察してきた。現在移植後約 950日目であるが、末梢血好中球ならびにリンパ球中に導入されたMDR1遺伝子を検出し得ており、将来的に目的遺伝子を *in vivo*選択マーカーとしてのMDR1遺伝子とともに多能性造血幹細胞中に導入し得ることが示唆された。この研究成果をもとに血液疾患原因遺伝子を用いた遺伝子治療法の開発研究を行っている。またBCR/ABLならびにPML/RAR発現レトロウイルスベクターを用い、マーモセットPBSC中へ *in vitro*で遺伝子導入後、遺伝子導入細胞を造血幹細胞移植し、*in vivo*における白血病発症の有無を検討中である。一方、ウシコラーゲンを接種することでコモンマーモセットにもヒト型リウマチ様関節炎を発症させ得ることが判明し、現在この病態解析ならびに遺伝子治療用ベクターによる治療系の開発を行っている。



(文献)

- 1) Hsu, L. C., Tani, K., Fujiyoshi, T., Kurachi, K. & Yoshida, A. Cloning of cDNA for human aldehyde dehydrogenases 1 and 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 : 3771-3775, 1985.
- 2) Tani, K., Fujii, H., Nagata, S. & Miwa, S. Human liver type pyruvate kinase: Complete amino acid sequence and the expression in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:1792-1795 1988.
- 3) Tani, K., Ozawa, K., Ogura, H., Takahashi, T., Okano, A., Watari, K., Matsudaira, T., Tajika, K., Karasuyama, H., Nagata, S., Asano, S. and Takaku, F. Implantation of fibroblasts transfected with human granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) cDNA into mice as a model of cytokine supplement gene therapy. *Blood* 74:1274-1280, 1989.
- 4) Tani, K., Yoshikubo, T., Ikebuchi, K., Takahashi, K., Tsuchiya, T., Takahashi, S., Shimane, M., Ogura, H., Tojo, A., Ozawa, K., Takahara, Y., Nakauchi, H., Markowitz, D., Bank, A., Asano, S. Retrovirus-mediated gene transfer of human pyruvate kinase (PK) cDNA into murine hematopoietic cells: Implication for gene therapy of human PK deficiency. *Blood* 83:2305-2310, 1994.
- 5) Hibino, H., Tani, K., Ikebuchi, K., Wu, M-S., Sugiyama, H., Nakazaki, Y., Tanabe, T., Takahashi, S., Tojo, A., Suzuki, S., Tanioka, Y., Sugimoto, Y., Nakahata, T., and Asano, S. Common Marmoset as a Target Preclinical Primate for Cytokine and Gene Therapy Studies. *Blood* 93; 1999 (in press)

幹細胞より再生医学をめざして

幹細胞シグナル分子制御研究部 客員助教授 平家 俊男



略歴:

- 1979年 京都大学医学部卒業、同小児科学教室入局、免疫アレルギー学を専攻 (三河春樹教授)
- 1987-1989年 米国 DNAX 研究所留学
- 1990年 京都大学医学部小児科学教室助手
- 1995年 東京大学医科学研究所幹細胞シグナル分子制御研究部 客員助教授

研究の立脚点: 幹細胞は多分化能と自己複製をもつ細胞と定義され、組織の形成、維持に働く細胞である。幹細胞は成体では皮膚、血液組織等一部の組織にしか存在しないと考えられてきたが、最近では最も再生とは縁遠いと考えられていた神経組織にも幹細胞が存在することが明らかとなった。また、生殖医療のめざましい発展によりヒトにおいて、order-made の ES 細胞が作製可能となった。ES 細胞は多分化能をもちいかなる組織に分化し得る能力をもつ。このことは、in vivo, in vitro において order-made の種々の幹細胞の manipulation が現実のものとなったことを意味する。この幹細胞の応用により、遺伝子治療、移植医療に加えて再生医療という新しい柱が構築され、それらの融合によりより高度な医療が達成される状況となった。

研究の進め方: 我々は幹細胞の研究を進めるにあたり 3 種類の異なる素材を用いている。1) ES 細胞、2) 血液幹細胞、3) 神経幹細胞である。これらの細胞は、お互い独立した系を確立するとともに、相互変換が可能性を秘めている。ES 細胞をもとに全ての系列の細胞が分化してくることは周知の事実であるが、驚くべきことに (真偽の程は未だ追試の過程にあるが) 神経幹細胞より血液系の再構成が可能との報告もある。これらの幹細胞の自己複製の機構、および分化の機構を解明し、その共通性、相違性を把握し、それらを応用することにより組織、臓器の再生を行い、より高度な治療方法の確立をめざす。もちろんこの 3 種類の幹細胞より得られた知識は、さらに他の幹細胞 (肝臓、膵臓、腎臓、筋肉等) の理解、操作にも有効であると確信する。

最近の主な研究成果:

- 1) 我々は幹細胞の研究を行うにあたり、キメラレセプターの手法を 1 つのツールとして用いている。キメラレセプターは細胞外領域が human GM-CSFR (α or β)、細胞内領域が mouse LIFR (gp130 or LIFR β) よりなる。GM-CSF は種特異性をもつためマウスの細胞では内因性 GM-CSFR を活性化しない。このキメラレセプターは BaF 細胞において増殖のシグナルを hGM-CSF 依存性に導入できる。このシステムにより、内因性の LIFR を活性化することなく LIFR の機能解析が行える系を確立した。
- 2) ES 細胞の自己複製における LIFR の役割をキメラレセプターを用いて解析した。自己複製のシグナルは LIFR β ではなく gp130 より導入されることを明らかにした。種々の変異キメラレセプターを用いることにより ES 細胞の自己複製が Stat3 の活性化と密接な関連をもつことを明らかにした。
- 3) ES 細胞の自己複製において Stat3 の活性化が必要かつ十分であることを stat3-estrogen receptor の融合遺伝子を用いて明らかとした。
- 4) このキメラレセプターを普遍的に発現するトランスジェニックマウスを作製した。未熟血液細胞は gp130 および c-kit を介するシグナルの統合により効果的に増幅することが知られている。このキメラレセプターを介して未熟骨髄血液細胞を他のサイトカインの組み合わせと比較し有効に増幅させ得ることを確認した。
- 5) 成体型血液細胞は胎生 9.5 日の AGM (aorta-gonad-mesonephros) 領域より発生する。キメラレセプターはこの未熟な時期における AGM 領域細胞にも発現しており、キメラレセプターを介して未熟血液細胞の増幅が行えることを明らかとした。

6) 再生不可能と考えられていた成体中枢神経系において神経幹細胞が存在することが明らかとなった。神経幹細胞は EGF や bFGF の存在下で維持される。上記のトランスジェニックマウス由来の神経幹細胞を解析したところ、hGM-CSF 依存性に神経幹細胞が維持されることを明らかにした。

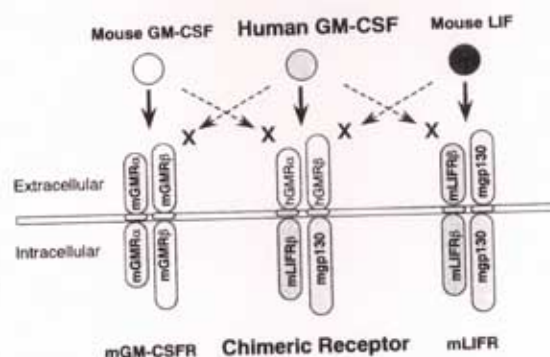
進行中の研究：

- 1) Stat3と血液幹細胞、神経幹細胞の自己複製、分化との関係をトランスジェニックマウス、ノックアウトマウスの手法を用いて解析中である。
- 2) ES 細胞の自己複製に必要な Stat3 の下流に位置し、自己複製に関与する遺伝子の探索が進行中である。subtraction, RDA (representational difference analysis), DD(differential display) 等を用い解析を行っている。
- 3) 血液幹細胞、神経幹細胞の自己複製、分化に係わる分子を SST (signal sequence trap)、subtraction, RDA、DD 等を用い探索を行っている。
- 4) 神経系細胞においては血液系細胞の場合と異なり、マーカー遺伝子の種類が少ない。特に、細胞表面のマーカーは極端に少なく、血液系細胞の様にソーティングによる細胞分取、解析が行えない。このため、神経幹細胞を含む種々の細胞を特異的に認識するモノクローナル抗体の作製を行い、自己複製、分化、機能解析のツールとしたい。

将来の方向性：幹細胞の研究分野は比較的新しい研究分野である。もちろん幹細胞という概念は以前より存在していた。しかし、幹細胞が分子生物学的手法を用いた解析の対象となったのは最近である。そのため、幹細胞領域にはまだまだ未知の分野が洋々として広がっている。

私自身の考えとしては、幹細胞研究の最終目的は再生医学への応用と考えている。種々の難病治療のため移植医療がさかんに行われているが、倫理的問題、社会風土の問題、安全性、ドナー不足等様々な問題を抱えている。ここに自家細胞を用いた組織再生はそれらを解決する有効な手段となる。今後、細胞レベルのみでなく、動物生体をもちいた内在性幹細胞の活性化、in vitro で幹細胞より作製した組織移植等にも果敢にチャレンジしていきたい。

Species-Specific Regulation of Chimeric Receptors



1. Nakamura, T., Arai, T., Takagi, M., Sawada, T., Matsuda, T., Yokota, T., and Heike, T.: A selective switch on system for differentiation inhibitory signals in embryonic stem cells using chimeric receptors. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 248:22-27, 1998
2. Tomita, M., Heike, T., and Yokota, T.: Cytoplasmic domains of the leukemia inhibitory factor receptor required for STAT3 activation, and inducing differentiation and growth arrest of myeloid leukemia cells. *Blood*, in press.
3. Matsuda, T., Nakamura, T., Arai, T., Heike, T., and Yokota, T.: STAT3 activation is sufficient for maintaining an undifferentiated state of embryonic stem cells. submitted.
4. Takagi, M., Nakamura, T., Sawada, T., Nozaki-Ukai, M., Nakahata, T., Yokota, T., and Heike, T.: Controlled expansion of primitive hematopoietic progenitors through chimeric granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF)-leukemia inhibitory factor (LIF) receptor expressed in transgenic mouse. submitted.
5. 高木峰生、平家俊男、横田崇：サイトカインレセプター遺伝子導入による血液幹細胞の増殖分化制御、蛋白質核酸酵素、41:1297-1305, 1996.
6. 平家俊男：再生医学とサイトカイン、*BIOclinica* 13:53-61, 1998. 北隆館

造血因子探索研究部：私達は何を探索するのか

客員助教授 北村 俊雄



略歴：1981年 東京大学医学部卒業。内研研修医を経て、1983年第3内科入局（高久史麿教授）
1983-85年 国立がんセンターウイルス部にてヒトレトロウイルス（HTLV-）の研究（三輪正直部長）。
1985-89年 東京大学第3内科。サイトカイン依存性白血病細胞株 TF-1 を樹立し、ヒトIL-3/GM-CSF および Epo レセプターの解析を行った。
1989-96年 米国DNAX分子生物学研究所に留学（宮島篤研究室）。IL-3 および GM-CSF レセプターの構造とシグナル伝達の研究。94年から独立、レトロウイルスを利用した発現クローニング法を開発した。
1996年 本研究所 造血因子探索研究部客員助教授。

研究の動機：20世紀の記憶

1990年10月17日、土曜の夕刻、γカウンターからプリントアウトされてくるデータは、IL-3とGM-CSFレセプターがβサブユニットを共有することを、はっきりと示していた。このβサブユニットが、サイトカインレセプター共有サブユニットの最初の例となった。あの土曜日の午後のことは、忘れることができない。研究の動機はひとそれぞれ違うと思うが、誰も知らないことを明らかにしたい、できればエレガントな方法で、と考えている。

当研究部では、2つのテーマを中心に研究を行っている。

サイトカインのシグナル伝達

- 1) 恒常的活性型シグナル伝達分子の解析：mutagenesis で同定した恒常的活性型転写因子STAT5が、細胞の増殖、分化、アポトーシス誘導など多彩な作用を持ちうることを明らかにし、メカニズムを解析中である（Onishi et al. MCB, 1998, Nosaka et al. 投稿中）。また最近、SH2ドメインの点突然変異により恒常的な活性化を示すSTAT5も同定し、解析した（有好、山田）。
- 2) 恒常的活性型STAT5およびMPLの白血病誘導能：恒常的活性型STAT5およびTpoレセプターMPLの、in vivoでの造腫瘍性をマウスBMTモデルにて検討中（有好）。予備的な実験で、BMT後のマウスは白血病様の症状を呈した。
- 3) サイトカインによって発現が誘導される新規分子の解析：サイトカイン刺激によって発現が誘導される遺伝子の、全長cDNAをクローニングし、解析を行っている。1つはヒトでSNAP23と呼ばれる分子で、SNARE complexの一部として細胞内小胞体輸送に重要な働きをしていることが知られており、我々はマウスのcDNA配列を報告した（Morikawa et al., Blood, 1998）。もう1つは未知のクルッペル型転写因子で、IL-3、Epo、G-CSFなど多くのサイトカインで発現が誘導される。現在、蛋白質を発現し機能を解析中である（敦賀）。

レトロウイルスを利用した発現クローニング

- 1) 膜蛋白質のcDNAの発見クローニング：これまでに、医科研内外の研究室との共同研究で、HIVのCo-receptor, zenotropic virusのレセプターなど6つの分子の同定に関与した（Shibuya et al. Immunity, 1996, Duan et al. BBRC, 1998, Mukasa et al. Int. Immunol. 1999, Yang et al. Nature Genetics, 1999）。
- 2) サイトカインのcDNAのクローニング：細胞増殖誘導活性を指標にして、骨髓ストローマ細胞由来のサイトカイン様の分子を同定し、解析している



(Tulin)。

- 3) 新しいシグナルシーケンストラップ法 (SST-REX) の開発: サイトカインあるいはレセプターをクローニングする目的で、レトロウイルス発現系を利用した効率の良い SST-REX法を開発した (小嶋)。現在、SST-REX法により種々の細胞から、新規の分泌蛋白質および膜蛋白質をクローニングすることを試みている。これまでにサイトカインレセプター様分子 (藤尾)、TNFレセプター様分子 (小嶋)、レンズ上皮細胞由来増殖因子様分子 (敦賀) を同定し、解析中である。
- 4) 細胞局在によりcDNAをクローニングする新しい方法、FL-REXの開発: この方法では、cDNA断片とGFPcDNAの融合ライブラリーを作製し、レトロウイルス感染によりNIH3T3細胞に発現することによって、GFPの細胞内局在を指標にcDNAをクローニングする。現在までに、胎児肝細胞のライブラリーから新規転写因子を同定し、解析中である (三沢)。
- 5) 効率の良いレトロウイルスベクターおよびパッケージング細胞の開発: LTRを変更することによってES細胞や造血幹細胞など未熟細胞で高発現が期待されるベクター、IRES配列を有するbi-cistronicなベクターなど、種々のベクターを作成した。また、293T細胞中で最も強力なプロモーターEF-1 α プロモーターを利用するなどの工夫を凝らした、レトロウイルスパッケージング細胞も作成した (森田)。
- 6) 細胞分化に関与する分子の同定: M1細胞はIL-6の刺激によってマクロファージに分化する。レトロウイルスの発現クローニングによって、分化を抑制する分子としてbcl-2ファミリーのA1を、分化を誘導する分子として新規GAP様遺伝子を同定し解析中 (川島)。

今後のこと: 21世紀への期待

分子のバイオロジーを考え、機能を指標として新しい遺伝子をクローニングし、新しい事実を発見する。私の場合、これが研究の大きな動機となってきた。一方では、ゲノム研究の進歩により、数年後には新しい遺伝子がなくなることが予想される。勿論、遺伝子配列が決定されても、分からないことは沢山ある。情報が増えれば、それだけ分からないことも増えるという一面もある。しかし時代の背景が変遷し、研究の方向性ととも研究に対する動機も、転換が必要な時期に来ていることを感じる。ただ、未知のことを探求し、面白いことをしたいという研究の動機は変わらないし、それを皆で一緒に楽しみながら、探していきたい。

主要発表論文

1. Kitamura, T., Tange, T., Terasawa, T., Chiba, S., Kuwaki, T., Miyagawa, K., Piao, Y.-F., Miyazono, K., Urabe, A. and Takaku, F. (1989) Establishment and characterization of a unique human cell line that proliferates dependently on GM-CSF, IL-3, or erythropoietin. *J. Cell. Physiol.* 140:323-334.
2. Kitamura, T., Hayashida, K., Sakamaki, K., Yokota, T., Arai, K. and Miyajima, A. (1991) Reconstitution of functional human granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF): evidence that AIC2B is a subunit of murine GM-CSF receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88:5082-5086.
3. Kitamura, T., Sato, N., Arai, K. and Miyajima, A. (1991) Expression cloning of the human IL-3 receptor cDNA reveals a shared beta subunit for the human IL-3 and GM-CSF receptors. *Cell* 66:1165-1174.
4. Kitamura, T., Onishi, M., Kinoshita, S., Shibuya, A., Miyajima, A., and Nolan, G.P. (1995) Efficient screening of retroviral cDNA expression libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92:9146-9150.
5. Onishi, M., Mui, A. L.-F., Morikawa, Y., Cho, L., Kinoshita, S., Nolan, G.P., Miyajima, A., and Kitamura, T. (1996) Identification of an oncogenic form of MPL using retrovirus-mediated gene transfer. *Blood* 88, 1399-1406.
6. Morikawa, Y., Nishida, H., Misawa, K., Nosaka, T., Miyajima, A., Senba, E. and Kitamura, T. (1998) Induction of synaptosomal-associated protein-23kd (SNAP-23) by various cytokines. *Blood* 92, 129-135.
7. Onishi, M., Nosaka, T., Misawa, K., Mui, A.L.-F., Gorman, D., McMahon, M., Miyajima, A., and Kitamura, T. (1998) Identification and characterization of a constitutive active STAT5 mutant that promotes cell proliferation. *Mol. Cell. Biol.* 18:3871-3879.
8. Kojima T. and Kitamura, T. (1999) A Novel signal sequence trap method using retrovirus-mediated gene transfer. *Nature Biotechnol* in press

ゲノム情報からの知識発見技術

ゲノム知識発見システム(日立)寄付研究部門 客員助教授 森下 真一



略歴：1983年 東京大学 理学部 情報科学科 卒業。
1985年 東京大学 大学院 理学系研究科 情報科学専攻 修士課程 修了。
同年 日本アイ・ビー・エム(株)就職。論理プログラミング、人工知能応用、スケジューリングエキスパートシステムの開発に従事。
1990年 理学博士(東京大学)。
1990-92年 米国スタンフォード大学計算機科学科 客員研究員。データベース問合せ最適化技術、演繹データベースシステムGlue-Nailの開発に従事(Jef frey D. Ullman 研究室に所属)。
1993-97年 日本アイ・ビー・エム(株)東京基礎研究所にてデータマイニングシステムの開発を担当。
1997年9月- 東京大学医科学研究所勤務。データマイニング技術をゲノム情報解析に応用。
主たる研究領域：ゲノム情報、データマイニング技術、データベース問合せ最適化。
趣味：ゲーム・ドライブ・カラオケ・晩酌などをしますが、やはり満足するまでアルゴリズムを設計改良し、プログラム動かしているときが最高です。

研究の立脚点：コンピュータサイエンスの出身なので、より大量のデータをより高速に処理するための技術開発、そしてユーザが操作しやすいようなインターフェース、例えば問合せ言語やGUIを設計することを得意とします。これら技術を背景にゲノム情報の解析に取り組んでいます。

研究素材：ゲノム情報から多くの研究素材をいただいて、解析用のソフトウェアを開発しています。現在、もっとも力を入れているのが以下の3点です。(1) 大阪大学細胞生体工学センターの大久保研究室から、ヒトおよびマウスの遺伝子の発現量に関するデータをいただき、解析用ソフトウェアを開発中。(2) やはり大阪大学大久保研究室から1万数千個のcDNA塩基列のデータベース(BODYMAP)をいただき、各遺伝子に固有の部分列を見出すソフトウェアを開発中。(3) 大塚製薬GEN研究所からOLETFラットのデータをいただき、表現型(体脂肪率、血糖値)と高い相関関係のある複数のローカスの組合せを探索するソフトウェアを開発中。

研究の進め方：我々の開発しているソフトウェアはデータを解析してはじめて価値があります。ですからまず医科学研究者の方からデータを頂戴し議論していただくことが研究の第1歩です。次に、既存のソフトウェアを使えば解けてしまうかどうかを考えます。新しいソフトウェアを構築する以外に現実には解けないと判断したときに、ソフトウェア開発を行う、というのが我々の研究の進め方です。

最近の研究結果：(1) 大久保研究室からは、具体的には、各遺伝子が臓器や細胞でどのぐらいいつ発現しているかというデータをもたらしています。その量の比をとり、比率が近いか遠いかに基づいて遺伝子をグループ化(クラスタリング)してゆくソフトウェアを開発し、すでに遺伝子のクラスタリングに利用しています。(2) BODYMAPデータに関しては、ホームページ公開を準備中です。(3) 表現型と高い相関関係のある複数のローカスの組合せを探索する問題は計算機科学の観点からも興味深い問題です。我々はこの計算をするための複雑度を考察し、効率的計算方法の構成が困難(コンピュータサイエンスではNP困難といいます)であることを示しました(文献6)。しかしこれは効率的な計算方法を考えることが本質的に難しいことを示した結果であり、現実的解法を示したことはありません。そこで分岐限定法を使った探索手法を開発し、現実には大幅に探索空間を圧縮できることを実験的に示しました。さらに並列計算機により並列化することを試み、探索した点を保持して管理する従来型の方法とは異なる新手法を開発し、並列化の効果を大きく引き出すことに成功しました(現在投稿中)。

進行中の研究：(1) 大久保研究室とともに遺伝子を発現量に基づきクラスタリングする研究を続行する予定です。研究のロードマップとしては、まず機能的に未知の遺伝子と既知の遺伝子を同時にクラスタリングします。つぎに同

一のクラスターを吟味し、機能が既知の遺伝子から、機能が未知の遺伝子の振る舞いを予測することを試みます。予測精度が上がるように、クラスタリング手法を工夫することが大きな課題です。(2) BODYMAPのように各遺伝子に固有の部分列を提供するデータベースは、遺伝子の発現量を観測する際に、各遺伝子からどの部分列を切り出して観測すればよいかについて有用な情報を提供するはずで、医科学研究者の研究をサポートする上で、ホームページ機能を充実させる研究を進めたいと考えています。(3) 複数ローカスを推測するソフトウェアは、一般にはアソシエーションルール発見ソフトウェアと呼ばれ、より広範囲な応用が可能です。様々な応用例を開拓したいと考えています。

問題点、および研究の方向について：(1) 遺伝子の発現量解析は多くの研究者が取り組んでおり、とても面白いテーマなのでここ数年続けたいと考えています。(2) アソシエーションルール発見問題は、コンピュータサイエンスでは脚光を浴びている分野ですが、医療情報解析ではあまり知られておらず、今後数多くの応用例を模索したいと思っています。(3) 講座が発足して1年半がたちました。研究環境を整備するのに多くの時間が割かれていましたが、最近ようやく研究環境も安定してきました。人数が少ない研究室ですので、テーマを絞って成果をあげたいと思っています。

主な発表論文：

文献6以外は、森下が医科学研究所に移る前にコンピュータサイエンス分野で行った研究に関する文献です。

1. Shinichi Morishita: "Avoiding Cartesian Products for Multiple Joins," *Journal of the ACM*, Volume 44, Number 1, pp. 57-85, January 1997.
2. Shinichi Morishita: "An Extension of Van Gelder's Alternating Fixpoint to Magic Programs" (Invited Paper), *Journal of Computer and System Sciences - Special Issue on the 12th ACM SIGACT-SIGMOD-SIGART Symposium on Principles of Database Systems*, Academic Press, Volume 52, Number 3, pp. 506-521, June 1996.
3. Marcia A. Derr, Shinichi Morishita, and Geoffrey Phipps: "Design and Implementation of the Glue-Nail Database System", *Proceedings of the 1993 ACM SIGMOD International Conference on Management of Data*, pages 147-156, May 1993.
4. Takeshi Fukuda, Yasuhiko Morimoto, Shinichi Morishita, and Takeshi Tokuyama: "Data Mining Using Two-Dimensional Optimized Association Rules: Scheme, Algorithms, and Visualization" *Proceedings of the 1996 ACM SIGMOD International Conference on Management of Data (SIGMOD '96)*, pp. 13-23, Montreal, Canada, June 1996.
5. Yasuhiko Morimoto, Hiromu Ishii, and Shinichi Morishita: "Efficient Construction of Regression Trees with Range and Region Splitting" *Proceedings of VLDB '97*, pages 166-175, Athens, Greece, August 1997.
6. Shinichi Morishita: "On Classification and Regression", (Invited Paper) In *Proceedings of Discovery Science, Lecture Notes in Artificial Intelligence*, Vol.1532, pages 40-57, Dec. 1998.

HIV感染症の臨床と研究—From Apoptosis to Immune Reconstitution—

感染免疫内科助教授 中村 哲也



略歴

- 1958年 福井県敦賀市に生まれる。
- 1982年 東京大学医学部卒業。2年間内科研修を行った後、第1内科に入局し血液内科学を専攻。
- 1987年 順天堂大学免疫学教室（奥村 康先生）でリンパ球の接着分子の研究を行う。
- 1990年 米国アラバマ州立大学バーミングハム校 発達・臨床免疫学教室（Max Cooper先生）へ留学し、Bリンパ球の抗原リセプターに関する研究を開始。
- 1993年 東京大学医学部第1内科に戻り、血液内科の診療と免疫学の研究に従事。
- 1996年 医科研 感染免疫内科に講師として赴任、HIV感染症の診療と研究を行う。

1. これまでの研究歴

私は医学部卒業後は臨床医の道を選んだわけですが、診療の合間にまた一時期は基礎の教室で行ってきた研究活動は一貫して免疫学の分野でした。私が免疫の世界に興味を覚えたのは、生体を駆けめぐるリンパ球が構築する免疫監視機構の巧みに惹かれてのことでした。例えば、NK細胞や細胞障害性Tリンパ球は自分が殺すべき標的細胞を見つけてそれに接着しパーフォリンを放出します。彼らはどのようにして自分が殺すべき細胞をそうでない細胞から見分けるのでしょうか？また、我々に牛のアルブミンを注射すれば牛アルブミンに対して抗体が産生されますが、ヒトアルブミンを注射しても抗体産生は起こりません。Bリンパ球はヒトと牛のアルブミンのアミノ酸配列を見分けることが出来るのでしょうか？こういった疑問に対する答えを知りたくて免疫の世界に入って行きました。

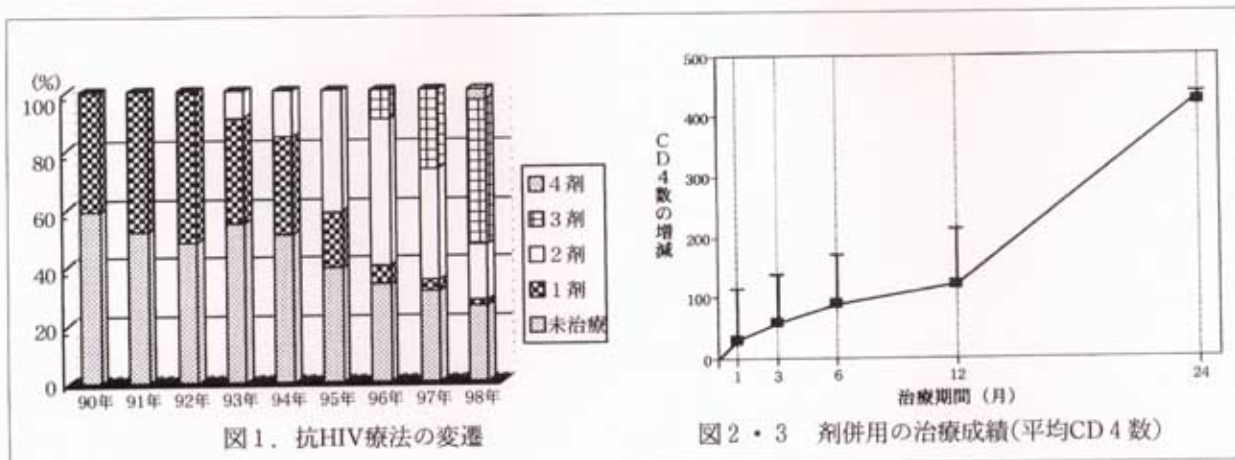
ここ数年はBリンパ球の抗原リセプターに焦点を絞り、B細胞リセプターを介した刺激がいかんして免疫学的寛容を誘導するかについて研究をしてきました。B細胞リセプターは膜型の免疫グロブリンとCD79a/CD79bヘテロダイマーからなる複合体で、膜型免疫グロブリンに結合した抗原刺激がCD79a/CD79bヘテロダイマーを介して細胞質内に伝達されます。マウスの系で、このCD79bに対するモノクローナル抗体を作成して*in vivo*投与を行い免疫学的寛容の誘導を試みたりしておりました。医科研に赴任してからこの方面の仕事を続けておりましたが、最近HIV関係の臨床研究に比重を移しつつあります。

2. HIV診療について

1) 医科研でのHIV診療

私が医科研でHIV診療に携わるようになったのは医科研に赴任した1996年からです。HIV診療はちょうどこの時期を境に大きな変化を見せ始めていました。皆様も新聞報道等でご存じと思いますが、年々増加していたエイズ死亡者がこの頃を境に減少に転じたのです。これは、抗HIV薬の進歩の結果で、それまで回復不可能であったHIV感染者の細胞性免疫が、強力な抗HIV療法によって回復させることが出来るようになったためでした。

このような変化をもたらした抗HIV療法とは、異なる作用機序の抗HIV薬を同時に使用する3剤併用療法でした。臨床応用された最初の抗HIV薬はzidovudine (AZT)と言う薬剤で、1980年代の終わりに導入されました。その後次々に新しい薬剤が開発され、初期の単剤療法から2剤併用を経て、1996年頃から3剤併用が行われるようになったわけです。図1に医科研に通っているHIV感染者の方にどのような治療が行われてきたかを経時的に示します。単剤→2剤→3剤と治療が推移しているのがおわかりになると思います。現在の主流になっている3剤併用療法でHIV感染者の細胞性免疫がどの程度回復するかを見たのが図2になります。これは末梢血中のCD4陽性Tリンパ球数（CD4数）の増加を経時的に見たものですが、治療開始後1年で平均約100/mm³増加することがわかります。免疫不全に基づく合併症のほとんどはCD4数が100/mm³以下になってから起こってきますので、3剤併用によりCD4数が100/mm³上昇すると患者さんはこれらの合併症を免れることが出来ます。



2) 今後進むべき方向

強力な抗HIV療法はHIV感染者の細胞性免疫をある程度回復させることが出来るようになりました。数年前まではHIVに感染すると何故CD4陽性Tリンパ球がapoptosisを起こすのかというのが研究者の間で盛んに議論されたものですが、現在では抗HIV療法後に再構築される免疫機能がどの程度HIV感染前の状態に戻るかということに焦点が移っています。すなわち、表題にも書いたとおり研究者・臨床医の興味はapoptosisからimmune reconstitutionに移りつつあり、私共でも、抗HIV療法施行後にHIV特異的なCTLおよびhelper T細胞がどの程度維持されるかについての解析を進めております。

しかしながら、HIV感染者の日和見疾患がなくなったわけではありません。抗HIV薬に耐性になった症例ではCD4陽性Tリンパ球が回復せず日和見疾患を繰り返す方もありますし、日和見疾患を発症して始めてHIV感染に気づくという場合もあります。したがって、HIV診療の専門機関を標榜するからには日和見疾患の診療についても最先端の医療を行えるべきであると考えており、活性化自己リンパ球輸注の臨床試験等の試みを行っております。

3. 今後の抱負

欧米の先進国では年間の新規HIV感染者数は減少傾向を示していますが、日本では逆に年々増加する傾向にあります。当然ながら総患者数は直線的かやや右肩上がりに増加しているわけで、本邦におけるHIV診療の重要性がご理解いただけたと思います。私どもは感染症研究部という基礎研究部門を併せ持つ組織になっており、また医科研他の免疫学、ウイルス学関係の研究部とも容易に共同研究を行える環境にあります。したがって、我々に科せられた使命は単なるHIV診療を行う臨床科としての機能ではなく、研究所病院として日本でのHIV診療をより高度なものにしていくことであると考えています。基礎研究で得られた成果を臨床の場に応用することや、臨床の場で遭遇する問題点を基礎研究レベルで解析することこそが私どもの役割になります。このような観点から感染免疫内科のスタッフ一団力を合わせて前進をし、本邦におけるHIV診療をリードし、患者さんの生命予後の改善に努力をしていきたいと思っております。

1. Hoshino, Y., Nagata Y., Gatanaga, H., Hosono, O., Morimoto, C., Tachikawa, N., Nomura K., Wakanayashi, T., Oka, S., Nakamura, T. and Iwamoto A. CMV retinitis and CMV antigenemia as a clue to impaired adrenocortical function in patients with AIDS. *AIDS* 11:1719-24, 1997.
2. Nagata, K., Nakamura, T., Kitamura, F., Kuramochi, S., Taki, S., Campbell, K. S., and Karasuyama, H. The Ig α /Ig β heterodimers on μ -negative proB cells is competent for transducing signals to induce early B cell differentiation. *Immunity*. 7: 559-70, 1997.
3. Hertz, M., Kouskoff, V., Nakamura, T., and Nemazee, D. V(D)J recombinase induction in splenic B lymphocytes is inhibited by antigen-receptor signalling. *Nature* 394: 292, 1998.
4. Taguchi, H., Takahashi, T., Nakamura, T., and Iwamoto, A. Pentamidine-induced hemolytic anemia in an AIDS patient. *Ann. Pharmacotherapy*, in press.
5. Fujii, T., Taguchi H., Katano, H., Mori, S., Nakamura T., Nojiri N., Nakajima, K., Tadokoro, K., Juji, T. and Iwamoto, A. Seroprevalence of HHV8 in HIV-1 positive and negative populations in Japan. *Med. Virol.* in press.

好中球分化の制御機構の研究から白血病の治療へ

検査部助教授 佐藤 典治



略歴 1973年 東京大学医学部卒業。

2年の研修の後、東京大学医学部第三内科入局。

しばらくベツトを持ちながら研究を続け、1983年同内科助手。1984年UCLA留学。

1984年6月より、防衛医科大学第三内科講師。

1988年より、東京大学医科学研究所附属病院検査部長。現在に至る。

主たる研究領域 血液内科学

研究テーマ：好中球の分化成熟の調節機構。

研究の出発点から現在に至るまでの経過について。

私が医局に入局した当時、CMLはまだPh⁺染色体が決め手となる時代で、bcr-ablのキメラ遺伝子を用いた遺伝子診断の到来まで、もう少し待たねばならなかった。CMLの診断は幼若球も含めた好中球系の細胞の増加、アルカリフォスファターゼ（NAP）スコアの低値、好塩基球の増加等を手がかりに鑑別診断を進め、最終的にはPh⁺染色体を検出することにより診断していた。奇妙なことにCMLにおけるNAPスコアの低値は、CMLが急性転化すると高値になるということが教科書に記載されていた。このことがなんとなく私の頭の中に不思議なことだという意識となって引っかかっていた。そんな時、赤血球系の増加をみる真性多血症（PV）において、血中エリスロポイエチン（EPO）が著減しているとの報告が目についた。詳しい腫瘍化のメカニズムは不明だが、PVとCMLは慢性骨髄増殖性疾患という一群の疾患に属し、それぞれ最終的に増加する細胞は赤血球と好中球という違いがあるものの、病態にかなりの類似性があると思われていた。PVにおいて赤血球系が自律的に増加することが赤血球産生刺激因子であるEPOの低下を招いているなら、CMLにおいても好中球系産生因子の低下が起こっているのではないかと考えた。この好中球系産生因子がNAPを調節している可能性があるのではないかと、当時好中球系産生因子の一番の候補と考えられていた、CSFのNAPに対する影響を検討することにした。はじめは好中球を集めCSFをかけてみたが、何の影響も出なかった。その後、骨髓由来好中球を使うことを考え、同じことを試みたがだめだった。何回目かの実験のとき、たまたま研究室の大先輩が来て、そのお相手のため予定より大幅に細胞をあげる時間が遅れることがあった。この結果が陽性と出たのである。

NAPは好中球の成熟度のマーカーと考えられている。CSFは骨髄のcommitted progenitor cellの分化・増殖を刺激するものと考えられていた当時、これが成熟の最終段階にある細胞を刺激するという実験結果は面白いものであった。これをきっかけに好中球の分化成熟の機構という観点から、NAPの研究を始めることとした。これまでにG-CSF及びレチノイン酸がNAPの誘導を起すことを明らかにした。また様々なサイトカインのうち、GM-CSF、インターフェロンがG-CSFの作用を抑制することが明らかとなり、これらの抑制作用はレチノイン酸を併存させることにより解除できることが明らかとなった。

最近の研究成果及び進行中の研究。

現在はNAP誘導現象を分子生物学的に解明することを目指して研究を行っている。G-CSFはNAPのmRNAの増加を介してNAP蛋白の誘導を行うことが明らかになっているが（Sato et al, Eur J Haematol 1991）、G-CSFのシグナルがどのようにして核に伝えられ、これがNAP mRNAの増加を起しているのかは依然として不明である。成熟した好中球ではJakが働いていないとの報告もあり、NAPのプロモーターおよびその上流領域にはStatのconsensus binding siteは見つからない。NAP遺伝子は1986年にクローニングされたliver/bone/kidney-type alkaline phosphataseであり、好中球に限らず多くの組織で発現している。しかしながら血液細胞では好中球系にその発現が限られるようである。この遺伝子にはnon-coding exon Iが2こあり、したがってプロモーターが2こ存在する。好中球系でのNAPの発現がどちらのプロモーターにより制御されているかを検討し、上流に存在する骨型のプロモーターが使われていることを明らかにした（Sato et al, Blood 1994）。NAPのプロモーターおよびその上流領

域をレポーター遺伝子につなぎ、種々の細胞株に入れると、転写開始点の上流-220bpまでに強いプロモーター活性が認められた。このプロモーター活性は調べた細胞ではlineageによらず、サイトカインの刺激にもよらない活性で、basalなものと考えられた。このbasal promoter活性を刺激している転写因子の検討を行ったところ、EMSAでのスーパーシフト及びサウスウエスタン法でSp1ファミリーのSp3が見つかった。Sp1ファミリーを欠いているDrosophilaの細胞にcotransfectionしたところ、Sp3のほかにSp1にも転写活性があることが見つかった。つまり血液細胞に見られるbasal promoter活性はSp3（もしくはSp1）により刺激されているものと考えられた（Yusa et al, 投稿中）。cotransfectionした細胞は内因性のアルカリフォスファターゼは発現していないにもかかわらず、外来性のレポーター遺伝子を発現する現象はどのように説明すれば良いのだろうか？ 遺伝子発現抑制にはsilencerのようなcis-acting領域の関与の他に、プロモーター領域近傍のメチレクションにより抑制を受ける場合がある。内因性のNAP陽性細胞と陰性の細胞とで同遺伝子上流領域のメチレクションの状態をメチレクションsensitiveな酵素で切断して検討してみると、NAPを発現している細胞ではメチレクションを受けていないのに対し、同酵素が発現しない細胞では強力なメチレクションを受けていることが判明した（Yusa et al, 投稿中）。

現在はこのメチレクションが分化段階のどのあたりからなくなるのかを検討するため、メチレクション特異的PCR法を用いて検索中である（遊佐）。更にG-CSFにより誘導される転写因子を検討する目的でG-CSFにより分化するC2M細胞でNAPプロモーターのG-CSF反応性の領域を検討すると、転写開始点より上流-440-329bpの領域が見つかった。ここに作用する転写因子の検討を現在行っている（遊佐）。好中球をG-CSFで刺激すると、様々な分子が磷酸化を受けることが知られている。これらの中の少なくとも一つはNAP発現につながっているはずである。実際にいくつかの阻害剤存在下でNAP誘導を見てみると、完全に抑制する薬剤はherbimycin Aのみで、genistein, staurosporine, rapamycin, wortmannin, PD98059 などでは強い抑制が起こらない。現在Lynの下流と思われる細胞内因子が見つかり、NAP発現のシグナル伝達に関与しているのではとの期待を持ちながら研究を進めている（吉田）。

NAPは好中球の成熟過程の最終段階で発現されるGPIアンカー型の酵素であるが、その役割は何だろうか？ NAPをinducibleなプロモーターの下で発現するよう工夫して、幼若細胞株に発現するようにした。この細胞を親株と比較して、どのような変化が起こっているか、機能的にどのような違いが見られるかを現在検討中である（吉田）。

問題点、将来の方向

なんといっても我々の研究室が狭いことが第一の問題である。3-4人入れれば一杯で、どこかのテレビでやっているコマーシャルのように生活動線の調査の有無に関係なく、いつもあっちでぶつかり、こっちでぶつかりしている。同じくらい深刻なのが習慣性金欠病である。スペース的に余裕ができて、お金もあれば、もう少し人を集め、集中してやれるのだからと考えている。近年、白血病を分化障害と捕らえ、分化を誘導するという治療法が急性前骨髄性白血病で臨床応用され、成果を上げている。しかしながら、病因も異なる他の多くの白血病にも分化誘導療法を試みるためには、未解決の問題があまりにも多い。血液細胞の分化・増殖の研究が必要とされる所以である。

主要発表論文

- 1) Sato N, Mori M, Oshimura M, Ueyama Y, Miwa T, Ohsawa N, Kosaka K, Asano S; Factor(s) responsible for the increase in alkaline phosphatase activity of postmitotic granulocytes from normal individuals and patients with chronic myeloid leukemia. *Blood* 1982; 59; 41-147
- 2) Sato N, Asano S, Koeffler HP, Yoshida S, Takaku F, Takatani O; Identification of neutrophil alkaline phosphatase-inducing factor in cystic fluid of a human squamous cell carcinoma as granulocyte colony-stimulating factor. *J Cell Physiol* 1988; 137; 272-27
- 3) Sato N, Mizukami H, Tani K, Asano S; Regulation of mRNA levels of alkaline phosphatase gene in neutrophilic granulocytes by granulocyte colony-stimulating factor and retinoic acid. *Eur J Haematol* 1991; 46; 07-111
- 4) Mizukami H, Sato N; Retinoic acid acts to neutralize the inhibitory effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) on alkaline phosphatase activity of neutrophils that is induced by granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF). *Exp Hematol* 1992; 20; 482-485
- 5) Sato N, Takahashi Y, Asano S; Preferential usage of the bone-type leader sequence for the transcripts of liver/bone/kidney-type alkaline phosphatase gene in neutrophilic granulocytes. *Blood* 1994; 83: 1093-1101

先端医療の開発に向けて

プロジェクト診療部助教授 山下 直秀



略歴：1977年 東京大学医学部卒業。
1987年－1989年、米国カリフォルニア州立大学生理学教室に留学
内分泌細胞の情報伝達の研究に従事
1989年 東京大学講師
1996年 東京大学医学部第4内科助教授
1998年 東京大学医科学研究所助教授（プロジェクト診療部）
主たる研究領域：内分泌代謝疾患、遺伝子治療

平成10年9月より東大分院内科から医科研病院に移り勤務している。病院ではプロジェクト診療部を標榜し、内科臨床と先端医療の開発に努めている。遺伝子治療をはじめとした新しい医療が世界では急速に進歩しているが、日本は遅れをとっているのが現状である。有効な治療法がない患者さんは新たな治療を望んでいるにもかかわらず、それを受けられないというジレンマがある。このような問題を解決すべく、世界に遅れをとらず、また先駆けて先端的な医療が日本で行えるようにするのが目的である。

医科研病院に移るまでは、内分泌系細胞の情報伝達、顆粒分泌、下垂体腫瘍の病態と遺伝子異常について研究を行っていた。医科研病院に来てからは遺伝子治療の臨床研究を分担するとともに、遺伝子治療の基礎的研究も始めている。医科研に来るまでに臨床医として患者さんの診療にあたり、またその間に研究を行ってきた。以下にその概要を示す。

「臨床研究」

- (1) 肝臓癌のp53 遺伝子肝動注を用いた遺伝子治療：外科の武藤教授が総括責任者であるが、私は副総括責任者として江里口先生とともに準備を進めている。文部省、厚生省には申請手続きを行っており、認可がおり次第、治療を開始する予定である。医科研病院で腎臓癌に次いで行う癌の遺伝子治療であるが、腎臓癌とは異なる機序の遺伝子治療である。既に患者さんから多くの問い合わせがあり、治療法がない癌の患者さんがいかに困っているかをあらためて実感する次第である。
- (2) 樹状細胞を用いた悪性黒色腫に対する腫瘍免疫療法：総括責任者としてプロトコルを治験審査委員会に提出し認可を得ている。患者さんの末梢から分離した単球から樹状細胞を作製し、樹状細胞に腫瘍抗原を呈示させるよう細工して体に戻し、腫瘍を攻撃する治療である。現在のプロトコルは遺伝子治療ではないが、将来はこの樹状細胞療法を用いた遺伝子治療を行えるような計画を考えている。

「基礎研究」

- (1) 成長ホルモン欠損症に対する遺伝子治療：小児の成長ホルモン（GH）欠損症に対する治療はGHの皮下注射であるが、医療費に占める割合が高く医療経済にとって大きな問題となっている。また連日の注射という小児の患者の負担も大きい。このでは、GH遺伝子を組み込んだ皮膚線維芽細胞や骨髄間質細胞による遺伝子治療の基礎的検討を行うことを目的としている。ヒトGH 遺伝子を組み込んだシュード型レトロウイルスを線維芽細胞などに感染させ、in vitroでは十分な量のGHが産生される結果を得ている。現在、小型霊長類であるマーマセットにGHが発現されるかを検討するとともに、遺伝子発現に日内変動を持たせるようにグルココルチコイドによる制御の研究も行っている。
- (2) 下垂体細胞における顆粒分泌とカルシウムイオン、cAMPの影響：単一細胞におけるホルモンの顆粒分泌、イオンチャンネルの変化、細胞内カルシウム、cAMPの関連を検索するため、2位相ロックアンプを用いて検索を行った。細胞はヒト成長ホルモン産生下垂体腺腫細胞を用いた。顆粒分泌は細胞膜容量（Cm）の変化として捉えた。電位固定法下で膜を電位依存性カルシウムチャンネル（VDCC）の閾値以上に脱分極させるとCmが増加した。Cmの増加は脱分極の程度と持続時間に依存しており、VDCC阻害剤の投与でその増加が抑制された。よってCmの増加は細胞内へのカルシウムイオンに依存していると結論された。VDCCの閾値以下の電位でホルモン分泌刺激物質であるGHRHや8Br-cAMPを投与してもCmは増加せず、閾値以上の電位でCmのさらなる増加が見られた。以上の結

果より細胞内cAMPはそれ自身ではホルモン分泌増加作用が無く、細胞内カルシウム濃度の増加が必要であると結論された。

- (3) 下垂体濾胞星状細胞における細胞増殖とカリウムチャンネルとの関連：下垂体濾胞星状細胞（FS細胞）は下垂体前葉の分泌細胞を取り囲むように存在し、その性質は神経系のグリア細胞に類似している。これまでにFS細胞には K^+ チャンネルが存在し、細胞接触と K^+ チャンネルの発現とに相関があることを報告してきた。FS細胞の K^+ チャンネルはTEAや4APに感受性があるが、TEAの添加により増殖が抑制された。フローサイトメトリーで細胞周期を解析するとTEAによりG0/G1 arrestがおこり、これが細胞増殖抑制と関連していることが明らかとなった。他の K^+ チャンネル抑制物質は細胞増殖を抑制しなかった。以上の結果から単に K^+ チャンネルを抑制することが細胞増殖抑制をおこすわけではなく、TEAが K^+ チャンネルの特異的な場所に結合すること、あるいはそれ以外の機序でG0/G1 arrestをおこすと考えられた。
- (4) ヒトGH産生下垂体腺腫におけるgsp oncogeneと病態との関連：ヒトGH産生下垂体腫瘍にはGs蛋白 α サブユニットの点変異が高率にみられることが報告されている。この点変異が腫瘍の病態とどの様に関わっているかを検索するため、樹立細胞であるラットGH3細胞、MtT/S細胞、マウスAtT/20細胞にレトロウイルスベクターを用いてGs蛋白の点変異を導入し、いかなる変化がおこるかを研究中である。既に点変異を導入した細胞は作製しており、これを用いて、細胞増殖、細胞内cAMP濃度、刺激物質（GHRH、VIP、CRH、8Br-cAMPなど）投与時の情報伝達の変化、抑制物質（ソマトスタチン）の反応の増強の有無などを検索する予定である。

主要業績

1. Yasufuku-T, J. & Yamashita N., et al. (1998). Identification of a subset of human GH-secreting pituitary adenomas with abnormal GHRH signal transduction other than gsp mutations. *Endocrinology*, in press
2. Yamasaki, T., Fujita, H., Inoue, K., Fujita, T. & Yamashita, N. (1997). Regulation of K^+ channels by cell contact in a cloned folliculo-stellate cell (TtT/GF). *Endocrinology*, 138:4346-4350
3. Takei, T., Takano, K., Yasufuku-Takano, J., Fujita, T. & Yamashita, N. (1996). Enhancement of Ca^{2+} currents by GHRH and its relation to PKA and $[Ca^{2+}]_i$ in human GH-secreting adenoma cells. *American Journal of Physiology*, 271:E801-E807.
4. Takano, K., Yamashita N. & Fujita, T. (1996). Proadrenomedullin N-terminal 20 peptide inhibits the voltage-gated Ca^{2+} channel current through a pertussis toxin-sensitive G protein in rat pheochromocytoma-derived PC12 cells. *Journal of Clinical Investigation*, 98:14-17.
5. Yamashita, N., Shibuya, N. & Ogata, E. (1988). Requirement of GTP on somatostatin-induced K^+ current in human pituitary tumor cells. *Proceedings of National Academy of Science, USA* 85:4924-4928.
6. Yamashita, N., Shibuya, N. & Ogata, E. (1986). Hyperpolarization of the membrane potential caused by somatostatin in dissociated human pituitary adenoma cells that secrete growth hormone. *Proceedings of National Academy of Science, USA* 83:6198-6202.

ウイルスベクター・発現制御技術の開発と展望

遺伝子解析施設助教授 斎藤 泉



略歴：1978年 東京大学医学部卒業。医師免許取得するも臨床経験はありません。
1982年 医学系博士課程を医科研ウイルス研究部・下條寛人教授の指導の下に修了し医学博士号取得（アデノウイルスの遺伝子発現の研究）。
東大医学部細菌学教室助手としてアデノウイルスベクター開発を開始。
1984～86年 英国Imperial Cancer Research Fund (G. Stark博士) へ留学。
遺伝子増幅、クローン化ベクターの開発に従事。
1987年 国立予防衛生研究所管内ウイルス部主任研究官、B型C型肝炎ウイルスの分子ウイルス学的研究と肝臓発症機構。
1991年 医科研遺伝子解析施設助教授・施設長（現職）。
主たる研究領域：ウイルス学。特にウイルスベクターを利用した新技術の開発。
趣味・特技：複雑なプラズミド・コスミドの構築。

ウイルス研究の面白さ：アデノウイルスはSV40と並んで1980年頃に精力的に研究されたウイルスの1つで、その研究の中からスプライシングの発見や最初の転写活性化蛋白（E1A）の発見が生まれてきました。大学院生の時このウイルスに出会った私は、小さなウイルスが極めて巧妙にしかも驚異的な効率で感染・遺伝子発現・自己複製を行うことに畏敬の念（？）を覚えました。トランスフェクションなど人間が考えた遺伝子導入法より数十倍・数百倍も高い効率でウイルスは太古の昔から自らが生き延びるために超高効率の遺伝子導入と発現を行っていたのです。例えば遺伝子発現だけを調べてもどのウイルスでもその巧妙さはまさに人知を越えていると思います。一方でこのすばらしいウイルスの能力を少しでも人間が利用させてもらえたら、まさに人知を越える方法やベクターが開発できるはず。こんな考えに基づいて、私の研究室ではまずその特性が驚異的だと感動できる生物素材（ウイルスも含む）を探し、それを自らの目と手で納得のいくまで研究しその応用を図るという方針で研究を進めています。ウイルスベクターの開発と言っても、遺伝子治療の目的のためにウイルスベクターを人間の都合に合うように変えるのではなく、逆にウイルスの驚異的な特性をまず深く知りそれを多くの人が利用できるようにと仕事を進める方が研究としてはるかに面白くまた実際に応用範囲の広い信頼できる基礎技術を生み出せると思っています。

医科研に来るまでの研究（～1990）：当所の大学院生だった1981年、プラズミドにクローン化されたE1A遺伝子に変異を導入しこの配列をウイルスに戻した変異アデノウイルスを初めて作り出し、組換えウイルスとの出会いが始まった。次いで独自のアデノウイルスベクター作製法を開発しこの方法でB型肝炎ウイルス（HBV）遺伝子を発現する組換えアデノウイルスの作製に成功した（Saito et al., J.Virol., 1985）。このウイルスから発現するHBV mRNAとしてHBVのX遺伝子mRNAを初めて見出した（Saito et al., J.Virol. 1986）。英国留学中に遺伝子増幅に伴うゲノムDNA構造をcosmid walkingで解析し、新たなクローン化ベクターcharomidを開発してクローン化を行った結果、遺伝子増幅に伴う逆向き重複構造を見出した（Saito and Stark, PNAS, 1986）。このcharomidベクターはMolecular Cloningの教科書にも紹介されており、現在ニッポンジーン社から市販されている。国立予研では宮村達男博士とともにHBVの新規spliced RNAを発見し、次いで新たに見出されたC型肝炎ウイルス（HCV）の研究に転じた。血清疫学によりこのウイルスが肝臓発症に相関することを記載し（Saito et al., PNAS, 1990）、当時新技術だったRT-PCR法による初めてのHCV cDNAを分離し、これを用いてHCVのcore、E1、E2蛋白の発現同定を行いcore蛋白が血清診断に極めて有用であることを示した。これらの一連の仕事は現在のHCV血清診断法の確立に役立ったと思われる。

医科研でのこれまでの研究（1991～）：組換えアデノウイルス作製法を改良し、従来の方法よりも約100倍の高い効率で作製できる方法（COS-TPC法）を開発した（Miyake et al., PNAS, 1996）。1990年頃には組換えアデノウイルスを作製できる技術をもつ所は世界に10カ所程度しかなかったが、遺伝子治療が米国で開始されアデノウイルスベクターが注目された時期と重なって当研究室の方法は国内で100カ所以上へ送付されて普及し、遺伝子治療研究やいろいろな基礎研究で利用されるに至った。1998年にはこの方法は宝酒造からキット化され世界的に市販されている。次いでCre/loxP系を用いた遺伝子発現のON/OFF制御系を開発した。この技術では組換え酵素Creを発現するアデノウイルスを「分子のスイッチ」として用いた結果、培養細胞染色体やアデノウイルスゲノムあるいはマウス染色体へ

予め導入したconditional発現ユニットをCre酵素で効率的に発現ONまたはノックアウトすることができるようになった。この方法により、何らかの細胞増殖阻害作用のため持続的発現細胞株やトランスジェニックマウスがとれないような遺伝子、あるいはノックアウトするとマウスが致死的となり解析できなかった遺伝子が解析可能となった。これらの研究材料はすべて理研遺伝子バンクから配布されており、国内外で広く使われつつある。またこのような技術を更に応用し、組織特異的プロモーターの特異性を保ちながら発現量を格段に(10~50倍)増強する「二重感染法」を開発した。この方法は肝癌・胃癌をはじめとして各種の癌の特異的遺伝子治療に新たな展開をもたらしつつあるだけでなく、神経系細胞の機能研究など基礎研究でも利用が広がっている。最近、組換え酵素Creが欠失導入だけではなく遺伝子置換反応をおこすことに着目し、この反応に最適な変異loxPのスクリーニングを行い新規の変異loxPを同定した(Lee and Saito, Gene, 1998)。この新規変異loxPを用いた「遺伝子置換法」という新技術はin vitroで解析する方法を確立して調べると10%ものDNAを置換できるほど高率に起こる反応であった。そこで遺伝子置換法を用いて、プラスミド上の目的遺伝子を複製中のアデノウイルスゲノム上に直接置換するという新しい戦略による「迅速組換えアデノウイルス作製法」を昨年開発した。



今後の研究の展望: 遺伝子置換法を応用した組換えウイルス作製法は今後のベクター開発に大きな進展をもたらすと考えられる。この技術を応用した迅速組換えウイルス作製法はほぼ確立されたので、これからは10種類位の組換えアデノウイルスを一度に作製することが普通に行われるようになると期待される。またこの技術を更に応用し、アデノウイルスゲノムのほぼ全長36キロベースまでのDNAが挿入できる効率的ベクター作製法の開発を現在行っている。これらの技術によりアデノウイルスベクターでcDNA発現ライブラリーやgenomic DNA発現ライブラリーが作製できるようになり、機能選択法の開発により遺伝子の機能研究やゲノム科学での利用が推進できるであろう。更に遺伝子置換法によるベクター作製法はこれまでベクターとして利用できなかったウイルスのベクター化、例えばB細胞特異的EBウイルスベクターや潜伏持続発現型サイトメガロウイルスベクターの開発を加速するであろう。また遺伝子置換法により細胞染色体上の遺伝子を効率よく置換する技術の開発も開始した。この技術により高発現細胞株をスクリーニングなしで確実に得る技術の開発、遺伝子置換ノックインマウスの効率的作製法、高力価レトロウイルス産生細胞株を確実に得る技術などを当研究室単独あるいは共同研究で開発してゆこうと考えている。発現ライブラリー作製用ウイルスベクターや新規DNAウイルスベクター系の開発には研究用P3実験室が必須であり、この点をいかに解決するかが重要な課題である。これまで私を含めてわずか4人程度の小人数でテーマを厳選してマーカー遺伝子だけを用いて研究を行うスタイルをとってきたが、今後はこのようなコアグループに加えて、医学や生物学のそれぞれの分野からの問題意識をもった若い人達に各論的研究をやっていただけるようなグループを新たに作れたら面白いのではと考えている。今後ともウイルスの能力をさらに引き出して「不可能を可能にする技術の開発」に挑戦を続けていきたい。

主要発表論文

- 1) Saito, I., Miyamura, T. et al.: Hepatitis C virus infection is associated with the development of hepatocellular carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:6547-6549, 1990.
- 2) Kanegae, Y. et al.: Efficient gene activation in mammalian cells by using recombinant adenovirus expressing site-specific Cre recombinase. *Nucleic Acids Res.*, 23:3816-3821, 1995.
- 3) Miyake, S. et al.: Efficient generation of recombinant adenoviruses using adenovirus DNA-terminal protein complex and a cosmid containing full-length adenovirus genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:1320-1324, 1996.
- 4) Kanegae, Y. et al.: Efficient gene activation system on mammalian cell chromosomes using recombinant adenovirus producing Cre recombinase. *Gene*, 181:207-212, 1996.
- 5) Shibata, H., Noda, T. et al.: Rapid colorectal adenoma formation initiated by conditional targeting of the Apc gene. *Science*, 278:120-123, 1997.
- 6) Sato, Y. et al.: Enhanced and specific gene expression via tissue-specific production of Cre recombinase using adenovirus vector. *Biochem. Biophys. Res. Co.*, 244:455-462, 1998.
- 7) Lee, G. and Saito, I.: Role of nucleotide sequences of loxP spacer region in Cre-mediated recombination. *Gene*, 216:55-65, 1998.

ゲノム情報 —コンピュータによる遺伝子の解析

ヒトゲノム解析センター

DNA 情報解析分野助教授 阿久津 達也



略歴

- 1984年 東京大学工学部航空学科卒業。
- 1989年 東京大学大学院工学系研究科情報工学専攻博士課程修了（工学博士）。
- 1989年 通産省機械技術研究所入所。
ロボットのプランニングおよびアルゴリズム理論の研究を行う。
- 1994年 群馬大学工学部情報工学科助教授。
アルゴリズム理論およびゲノム情報の研究を行う。
- 1996年 本研究所助教授。ゲノム情報の研究に従事。

主たる研究領域：ゲノム情報、アルゴリズム理論。

趣味：へただがカラオケが好き。コンピュータが趣味だったが本職になってしまった。

コンピュータとゲノム情報：略歴のようにいくつかの分野を渡り歩いてきたが基本的にはコンピュータを使った研究をずっと行ってきた。もともとラジオ作りやマイコン作りを趣味としていたので、趣味が本職になってしまった。ロボットなどの研究をしていた時、ゲノムプロジェクトの存在を知り、この分野に携わりたいと思いゲノム情報の研究をはじめた。人間の設計図の解読に貢献することを目標に研究を行なっている。

研究の内容：DNA配列やタンパク質などを対象とした情報解析手法全般に興味がある。個々の事実の解明より一般的な手法を開発することに特に興味がある。具体的には、タンパク質立体構造比較、タンパク質立体構造予測、2次元電気泳動画像解析、遺伝子ネットワーク推定などのための情報処理技術を開発してきた。

研究のスタイル：コンピュータが中心ということで生物系・医学系とはかなり異なったスタイルで研究を行なっている。生物学的実験などは行う技術や設備は研究室にないので、ワークステーションと呼ばれるコンピュータを利用して研究を行っている。しかしながら、やみくもにプログラムを開発するのではなく、その前に数理的な考察を十分に行なったのちにプログラムを開発する。ある面で理論的考察が研究の中心ともいえる。たとえば、ある処理を行なうのに「どのくらいのデータがあれば十分良い推定が行なえるのか」とか「どこまで高速化することが可能であるか」などについて数理的考察を行なう。なお、最近、スーパーコンピュータシステムがヒトゲノム解析センターに入ったので、そちらも活用している。

最近の研究成果：

1. **タンパク質立体構造比較。**2つのタンパク質の3次元座標データから「2つのタンパクが似ているか」、さらに「どの部分が似ているか」といったことを検出するプログラム stralign/3 DALIGN を開発し、WWW上で公開している。より具体的には配列アラインメントをアミノ酸の類似度ではなく、3次元座標間の距離情報をもとに計算する立体構造アラインメントと呼ばれるプログラムを開発した。
2. **タンパク質立体構造予測。**アミノ酸配列はわかっているが立体構造がわかっていないタンパク質の立体構造をコンピュータにより推定しようという研究である。そのためにいくつかの手法の研究を行ってきた。この分野ではCASPと呼ばれる立体構造予測の国際コンテストがあり、平成10年に参加した。このコンテストは非常にフェアなコンテストであり、立体構造が半年くらい先くらいに決定する見込みのタンパクのアミノ酸配列データをWWW上で公開し、各研究者が予測結果を電子メールで送り、半年後に構造がわかった時点で、予測精度を比較するというものである。2年に一度の頻度で開催されており、平成10年度が3回目に当たる。今回は

我々にとって最初のチャレンジだったので、あまり下位にならないことを目標とした。結果として40グループぐらいのうち中位だったので、一応、目標はクリアした。しかしながら、上位グループとはかなりの差がついたので、まだまだ、頑張らなければならない。

3. 2次元電気泳動画像解析。DNAもしくはタンパク質の2次元電気泳動画像からスポットを抽出し、複数の画像を比較するシステムを開発している。画像比較のために、歪みに強いパターンマッチングアルゴリズムを開発し、それを組み込んだ画像解析システム DDGEL を開発した。現在、 α 版をWWW上で公開している。

進行中の研究：

1. 上記研究の進展。上に述べた研究は終了したわけではなく、その後も改良を続けている。特に2次元電気泳動画像解析は、まだまだ、改良しなければならない点が残されている。また、立体構造予測に関しても様々な研究テーマがあるが、構造予測の際に必要な「ポテンシャル関数」の生成法を中心に研究している。



開発した2次元電気泳動画像解析システム

2. 遺伝子ネットワーク推定。最近、DNAマイクロアレイなどの技術の進展により酵母などの微生物の（ほぼ）全遺伝子の発現パターンの時系列データが得られるようになってきた。そのデータを解析し、遺伝子間の制御関係を表すネットワークを推定する手法の研究を宮野教授らと進めている。今まではブーリアンネットワークモデルという0、1だけで遺伝子の発現パターンを表すモデルを用いて数値的研究を行ってきたが、現在はより現実的なモデルを開発中である。

今後の研究の方向性について：

1. 基本的にはゲノム情報解析のための手法(アルゴリズム)の開発という現在の路線を中心に進めていきたいと思っている。しかし、実データの解析を通して生物学的知識の発見なども行なえれば、と考えている。
2. 現在のところマンパワーがほとんどないので、研究したいことがあっても、その一部しか行なうことができない。そこで、興味の一一致する研究グループがあれば共同研究などを行なっていきたいと考えている。

主要発表論文

- 1) Akutsu T: Protein structure alignment using dynamic programming and iterative improvement, IEICE Trans. Information and Systems, 1996; E79-D: 1629-1636
- 2) Akutsu T: On determining the congruence of point sets in d dimensions, Computational Geometry. Theory and Applications 1998; 9: 247-256
- 3) Akutsu T, Yagiura M: On the complexity of deriving score functions from examples for problems in molecular biology, Lecture Notes in Computer Science 1998; 1443: 832-843
- 4) Akutsu T, Kuhara S, Maruyama O, Miyano S: Identification of gene regulatory networks by strategic gene disruptions and gene overexpressions, Proc. 9th ACM-SIAM Symp. Discrete Algorithms 1998; 695-702
- 5) Akutsu T, Miyano S: On the approximation of protein threading, Theoretical Computer Science 1999; 210: 261-275

さすらうRNAが残っていた遺伝病

ー福山型筋ジストロフィーー

ヒトゲノム解析センター・シーケンス技術開発分野 戸田 達史



略歴

昭和60年3月 東京大学医学部医学科卒業
昭和60年6月 東京大学医学部（脳研神経内科）
平成4年1月 癌研究会癌研究所（生化学部）
平成6年1月 東京大学大学院医学系研究科助手（人類遺伝学）
平成8年8月 東京大学医科学研究所助教授（ヒトゲノム解析センター）

はじめに

筋ジストロフィーは、筋線維の変性・壊死を主病変とし、進行性の筋力低下をみる10以上の遺伝性疾患群であり、世界中で多くの患者が苦しんでおり、その救済のため、日本を含め世界の多くの国で専門病院だけでなく、筋ジストロフィー協会などの支援団体がつくられている。中でも福山型先天性筋ジストロフィー（FCMD）は、生後間もなく発病し、起立・歩行機能を獲得すること無く、短い生涯を終える最重症型で、日本ではデュシェンヌ型に次いで患者数が多い。我々の80人に1人が保因者と言われている。本症は筋ジス以外に脳回の形成異常（小多脳回という、正常の6層構造を示さない）を伴う（図1）。我々は最近ゲノム解析を応用したポジショナルクローニング法により、福山型原因遺伝子を発見し、原因蛋白質をフクチンと命名した。

私の専攻した神経内科というのは、精神科と異なり神経系の器質的疾患（アルツハイマー病、パーキンソン病、脳血管障害など）を扱うが、そのトレーニングの一貫として筋ジストロフィー専門病院に勤務する機会を得た。患者さんは動けなくてかわいそうなんだけど皆とても明るかった。そういったことがきっかけになり今の研究が続いている。

1. 原因遺伝子座を第9番染色体長腕31-33領域に決定

本症の原因に関しては、遺伝病という事以外、長い間不明のままであった。しかし近年の分子遺伝学の進歩によって、原因遺伝子の局在部位を先ず決定し、遺伝子および原因蛋白質を単離することが可能になった。福山型では、染色体検査で見つかるような欠失や転座もなく、原因遺伝子は22対の常染色体のどこにあるか不明であったが、我々は、共同研究者の協力のもと1991年より症例を集め、近親婚を利用した解析法を用いて連鎖解析を行った。そして福山型遺伝子が第9番染色体長腕31-33領域に存在することを、1993年に報告した。

2. 福山型筋ジス原因遺伝子を発見

その後も我々は遺伝子の存在範囲を狭める解析を続けた。そして存在範囲を100kb以下と大幅に狭め、その領域内に患者に特異的なDNA挿入を見い出し、ついに福山型原因遺伝子を同定し、1998年に発表した。

正常の福山型遺伝子は、第9番染色体長腕31領域に存在し、mRNAとして約7000bpであり、本症の病変のある骨格筋、心筋、脳で優位に発現していた。

約100数10人の患者を調べたところ、患者染色体のほぼ90%には同一の変異が見られた。原因遺伝子内に約3000塩基対の挿入があって、正常なmRNAとしては正常な産物蛋白質の産生が妨げられていたのである。また残りの約1割の患者染色体には、福山型遺伝子に点突然変異が起こって産物蛋白質が短くなることが明らかになった。

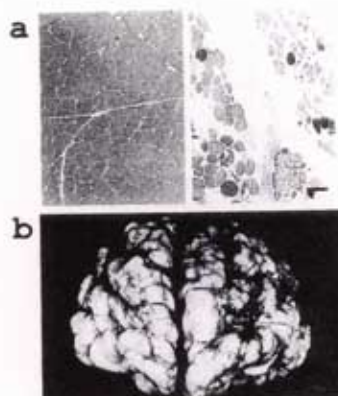


図1 福山型筋ジストロフィーの特徴（筋ジス（上右）と脳回形成異常（下））

我々は正常遺伝子の産物蛋白質にフクチン (fukutin) と名付けた。フクチンは461個のアミノ酸 (分子量 53.7 kD) からなる全く新しい今までに知られていない蛋白質であった。

3. レトロトランスポゾン—数千年の一祖先から

この挿入配列は、今から約100世代 (2000–2511年) 前の一人の祖先から今日の患者の大部分へと受け継がれたものと推定され、「利己的」な動く遺伝因子である「レトロトランスポゾン」であった (図2)。日本ではこの時代はちょうど縄文から弥生時代へと移行する頃である。古代から伝わったレトロトランスポゾンがヒトの遺伝病の原因であることがわかったのは初めてであり、日本人の一つのルーツ探しにも寄与するかもしれない。

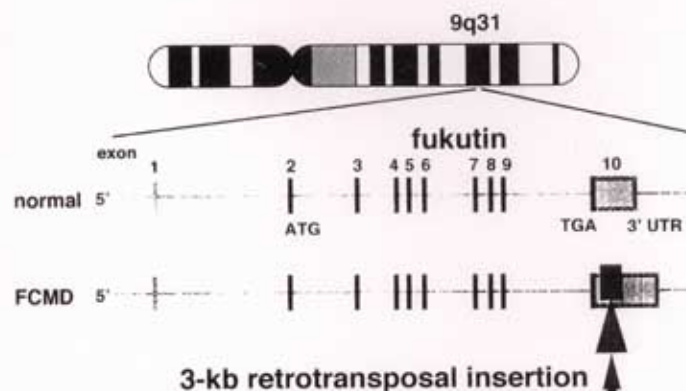


図2 福山型 (FCMD) 染色体には、レトロトランスポゾンの挿入変異がある。

今後は、フクチンは筋ジストロフィーという病気全体に共通するメカニズムの解明、または神経発生に重要な役割をもつと思われるのでその機能解析を行う。一方でその他の神経変性疾患 (例えばトリプレットリピート病やパーキンソン病) や正常の脳の高次機能にも興味をもっているので、ゲノム的な考えをベースにその方面の研究も展開していきたい。

文献 (主要なもの5点)

1. Kobayashi K, Nakahori Y, Miyake M, Matsumura K, Kondo-Iida E, Nomura Y, Segawa M, Yoshioka M, Saito K, Osawa M, Hamano K, Sakakihara Y, Nonaka I, Nakagome Y, Kanazawa I, Nakamura Y, Tokunaga K, Toda T. An ancient retrotransposal insertion causes Fukuyama-type congenital muscular dystrophy. *Nature* 394:388-392, 1998
2. Kobayashi K, Nakahori Y, Mizuno K, Miyake M, Kumagai T, Honma A, Nonaka I, Nakamura Y, Tokunaga K, Toda T. Founder-haplotype analysis in Fukuyama-type congenital muscular dystrophy (FCMD). *Hum Genet* 103:323-327, 1998
3. Toda T, Miyake M, Kobayashi K, Mizuno K, Saito K, Osawa M, Nakamura Y, Kanazawa I, Nakagome Y, Tokunaga K, Nakahori Y. Linkage-disequilibrium mapping narrows the Fukuyama-type congenital muscular dystrophy (FCMD) candidate region to <100 kb. *Am J Hum Genet* 59:1313-1320, 1996
4. Toda T, Ikegawa S, Okui K, Kondo E, Saito K, Fukuyama Y, Yoshioka M, Kumagai T, Suzumori K, Kanazawa I, Nakamura Y. Refined mapping of a gene responsible for Fukuyama type congenital muscular dystrophy; evidence for strong linkage disequilibrium. *Am J Hum Genet* 55:946-950, 1994
5. Toda T, Segawa M, Nomura Y, Nonaka I, Masuda K, Ishihara T, Sakai M, Tomita I, Origuchi Y, Ohno K, Misugi N, Sasaki Y, Takada K, Kawai M, Otani K, Murakami T, Saito K, Fukuyama Y, Shimizu T, Kanazawa I, Nakamura Y. Localization of a gene for Fukuyama type congenital muscular dystrophy to chromosome 9q31-33. *Nature Genet* 5:283-286, 1993

膠原病疾患モデルから臨床へー特異的診断法と治療法を求めて

ヒト疾患モデル研究センター

遺伝子機能研究分野助教授 金井 芳之



略歴：1968年 東京慈恵会医科大学卒業。民間病院を経て1972年 国立がんセンター研究所生化学部厚生技官、1974年東京大学医科学研究所助手、1983年同助教授、1980-1981年米国タフツ大学医学部招聘研究員、1990-1995年厚生省混合性結合組織病病因分科会長、1997-1998年日本リウマチ学会副編集長

主たる研究領域：リウマチ性疾患特に膠原病の基礎的研究ー病因究明と特異的診断

研究活動の抱負：膠原病モデルマウスからヒト、ヒトからマウスモデルへ両者に酷似した病態を定め、ヒト疾患の早期診断法、および治療法を目指す。

趣味：メジャーリーグ（野球）の観戦と情報；新聞、ジャーナル英語への挑戦；動物との対話

研究の立脚点：

膠原病モデルマウスの研究から病態を左右する新規物質を求め、それを応用して患者のQuality of Life (QOL) を向上させる。代表的膠原病で且つ全身性自己免疫病である全身性エリテマトーデス (SLE) 患者では多くの場合血清中の抗DNA抗体の著しい上昇がみられる。抗DNA抗体は1962年の発見以来SLEの診断上の王座を占めてきた。しかしSLE病態に関連する抗DNA抗体の産生を実験的に産生することが世界的に不可能であったことが背景にあり、小生はその産生を蛋白性のヘルパー因子に求めた。その結果その因子nucleo-bindin (Nuc)を発見したこと (K. Miura et al: B.B.R.C., 187:375-380, 1992) が現在の研究の源になっている。

研究素材：

免疫血清学的、免疫病理学的、免疫遺伝学的検索を特に自己免疫疾患モデルマウスの諸臓器、特に腎、血管、リンパ節、血清、免疫複合体について行なう。必要に応じて膠原病患者血清、またはその他の検体を用いることがある。

研究の進め方：

膠原病モデルマウスの病態を左右する新しい物質（パラメーター）の追究を行なう。例えば病巣からの抽出液、あるいは腎免疫複合体の化学的解析から新規物質を同定、病態形成上の意義を明らかにする。最終的にはそれを用いた診断法または特異的治療薬を開発する。

最近の主な研究成果：

1. 1986年に我々はMRL/lpr自己免疫マウスから、DNAの免疫では実験的に作製出来ない、二本鎖DNA特異的でA・Tを好むモノクローナル抗体（2C10）の産生に成功している。疾患誘発性抗DNA抗体の抗原エピトープの解析中2C10がハイドロキシラジカルによるDNAの切断を100倍も増強することを発見した (T. Kubota et al: J. Biol. Chem. 271, 6555-6561, 1996)。この事実は実験的レベルだけでなくSLE患者血中の抗DNA抗体にも同様の効果のあることをつきとめた (N. Watanabe et al: Lupus, 7, 108-112, 1998)。抗DNA抗体の以上のような作用はSLEの病因論上新しい概念を提起した。
2. 最近、糸球体腎炎の急速悪化と肺出血で急性死をもたらす原因疾患としての顕微鏡的多発血管炎 (microscopic polyangiitis, MPA) が注目されている。抗好中球細胞質抗体 (ANCA) 陽性で、半月体形成性腎炎 (CGN) を伴い、病理組織学的には古典的結節性多発動脈炎 (PN) に酷似する。MPAの研究に不可欠な動物モデルは、従来部分的にMPAに似ているMRL/lprマウスしか存在しなかったが、当該マウスのNuc遺伝子をノックアウト (KO) したところ、腎を主としたPN様および、CGNとANCAも高度に伴う、ヒトMPA様血管炎モデルの作出に至った (Y. Kanai et al: Arthritis Rheum. 40: S165, 1997)。Nuc-KOマウスの腎免疫複合体のSDS-PAGE, 二次元電気泳動、アミノ酸配列決定により新しい自己抗原としてargininosuccinate synthase (ASS)

を同定した。これに呼応して活動期の血管炎マウスでは血清抗ASS抗体の著しい上昇がみられた (Y.Kanai et al: *Arthritis Rheum.* 41: S176, 1998)。この抗原-抗体系はMPAの早期発見のよきパラメーターとしての期待がかかる。

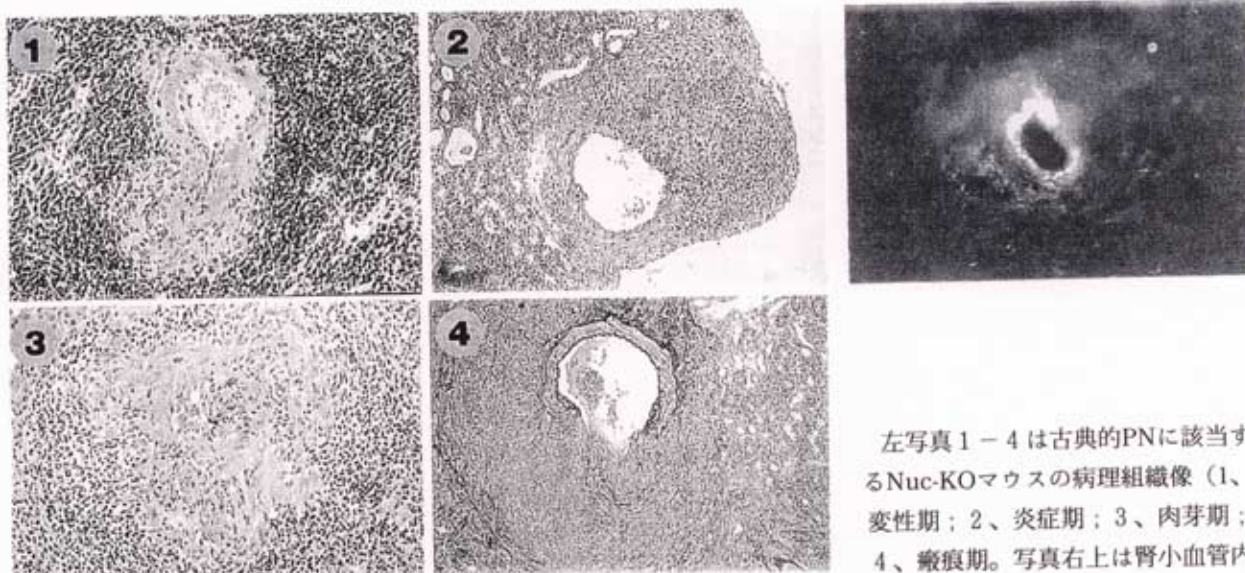
進行中の研究:

我々の発見した抗DNA抗体産生増強因子はクローニングの結果ロイシンジッパーと核移行シグナルをもつ転写因子様分子であるが、シグナルペプチド、Ca²⁺結合モチーフEF-handを二個有する点で転写因子とは異なる (K.Miura et al: *B. B. R. C.*, 199: 1388-1393, 1994)。またgenomic analysisによってhousekeeping遺伝子産物であることが分かった (K.Miura et al: *Genomics*, 34: 181-186, 1996)。組換え蛋白質 (rNuc) を正常マウスに単独投与を繰り返すと抗DNA抗体産生など自己免疫反応が誘起される (Y.Kanai et al: *Immunol Lett.*, 45: 35-42, 1995)。自己免疫誘導機序として血中Nucの上昇による胸腺細胞のアポトーシスが示唆されたが (Y.Kanai et al: *Immunol Lett.*, 46: 207-214, 1995)、最近のMRL/lprマウスの研究で加齢に伴ってCD4T細胞の過剰産生分泌したNuc (H.Iizuka et al: *Lupus*, 6: 365-370, 1997) をリンパ洞の樹状細胞、組織球が貪食しMHC拘束性にT細胞の増殖を促すことが分かってきた。どのようなDNAがどのように提示され最終的に病的抗DNA抗体が産生されるか、詳細な解析が待たれるが、以上の事実はその産生にDNA結合蛋白質が重要要因であることを強く示唆する結果である。

問題点および将来展望:

1. Nuc は抗DNA抗体を含む自己免疫反応を誘起する転写因子様物質である。しかし、Nuc 遺伝子をKOしたMRL/lpr マウスは自己免疫を基盤とした著しい腎・血管障害をおこす。この矛盾を解明することである。考えられることはNuc欠損による代替遺伝子発現、その結果機能上Nuc類似の蛋白質の出現である。課題はこの蛋白質NucXの同定である。今後Nuc-KOマウスとMRL/nマウスとの交配による血管炎又は腎炎誘発・促進責任遺伝子のマッピングとそれに対応する遺伝子産物の同定を考えている。
2. MPA/PNモデルマウスからヒト疾患に応用可能な多くの情報が得られる。本病態に関連して既に新しいDNA分解酵素を見だし、その遺伝子探索を開始した。

主要発表論文: 本文を参照されたし。



左写真1-4は古典的PNに該当するNuc-KOマウスの病理組織像 (1、変性期; 2、炎症期; 3、肉芽期; 4、瘢痕期。写真右上は腎小血管内膜に沈着した免疫複合体