

- ⑥ Naito, T., Matsuura, A. and Ishikawa, F. Circular chromosome formation in a fission yeast mutant defective in two ATM-homologues. *Nature Genetics*, 20: 203-206 (1998).
- ⑦ Ishikawa, F. Research analysis: FISH goes with the flow. *Nature Biotechnology* 16: 723-724 (1998).
- ⑧ Hatakeyama, S., Fujita, K., Omine, M. and Ishikawa, F. The jumping translocation at 1q21 involves shortened telomeres. *Blood*, 91: 1514-1519 (1998).
- ⑨ Nakayama, J., Tahara, H., Tahara, E., Saito, M., Ito, K., Nakamura, H., Nakanishi, T., Tahara, E., Ide, T. and Ishikawa, F. Telomerase activation by the catalytic component gene TRT in

human primary fibroblasts and hepatocellular carcinomas. *Nature Genetics*, 18: 65-68 (1998).

2. 学会発表

本成果については、学会発表を行っていない。

G. 知的所有権の取得状況

8) 特許取得

なし

9) 実用新案登録

なし

10) その他

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業）
分担研究報告書

レトロウイルスを利用したシグナルシーケンストラップ法の開発に関する研究

分担研究者 北村 俊雄 東京大学・医科学研究所 助教授

研究要旨

レトロウイルスを利用した新規シグナルシーケンストラップ法を開発し、脂肪細胞分化に伴って発現する新規遺伝子群を同定した。

キーワード：レトロウイルス、シグナルシーケンス、遺伝子クローニング

A. 研究目的

ゲノムプロジェクトの進展に伴い、5年以内に5万から10万種類あるヒト遺伝子がすべてクローニングされることが予想される。次に重要になってくるのは、それぞれの遺伝子産物である蛋白質の機能を調べることである。未知の蛋白質の機能を知るためには、通常、既知の蛋白質との構造的類似性からある程度機能を類推し機能解析が行われる。しかしながら、新規分子で既知の蛋白質との相同性がまったくない場合には機能解析の手掛かりが少ない。そのような場合には、逆に目的とする蛋白質の機能を指標にして遺伝子を検索する方法が有効である。この戦略は、遺伝子から蛋白質を発現して、目的の機能を有する遺伝子を検索するため、一般に発現クローニング法と呼ばれる。

最初の発現クローニング法は、大腸菌内で蛋白質を発現し、抗体に対する反応を指

標に遺伝子をクローニングする方法であった。この方法の欠点は、大腸菌で産生した蛋白質には糖鎖が付加されないこと、スクリーニングの方法が限定されることであった。その後、アフリカツメガエルの卵細胞に mRNA を注入して蛋白質を作らせる方法、さらに COS 細胞と呼ばれるサル細胞にライブラリーを導入して、細胞上清に分泌される蛋白質の活性で遺伝子をスクリーニング方法が開発された。特に、COS 細胞を利用した方法は、哺乳動物細胞内でプラスミドベクターを増幅させることに初めて成功したもので画期的であった。その後、発現クローニング法には種々の改良が加えられ多くの遺伝子がクローニングされた。しかしながら、これらの方法の大きな欠点は、蛋白質の一過性の発現のみを扱うため、スクリーニングの方法が極端に制限されることであった。

我々が開発したレトロウイルスベクター

を利用した発現クローニング法 (Kitamura et al. Proc. Natl. Acad. Sci. 1995) は、従来の発現クローニング法における上述の欠点を解決した。遺伝子導入にレトロウイルスベクターを利用することによって、いろいろな細胞を標的細胞として利用できることに加え、一度ウイルス感染が成立するとウイルスベクターが運ぶ遺伝子はゲノムに挿入され、その発現は長期に亘って安定である。そのため、多様なアッセイ系による遺伝子スクリーニングが可能になった。後述するように、レトロウイルスを利用した発現クローニング法の応用範囲は広く、本研究では、さまざまな戦略で老年病や老化に関わる遺伝子の同定を目指している。

本年度は、レトロウイルスベクターを利用した新しいシグナルシーケンストラップ法の開発をおこない (Kojima and Kitamura, Nature Biotechnology 印刷中)、脂肪細胞分化に伴い脂肪細胞から分泌される蛋白質をクローニングすることを試みた。この研究は、老化に伴う体内における脂肪細胞の増大のメカニズムを解明し、動脈硬化、高血圧、糖尿病などを防ぐことを最終目標にしている。脂肪組織は体内最大の臓器といえるが、従来は脂肪およびエネルギーの蓄積場所として以外の生理的な役割はあまり考えられていなかった。しかしながら 1994 年に遺伝的肥満マウス (ob/ob) の責任遺伝子としてクローニングされたレプチンが脂肪細胞から産生されるサイトカインであることが判明して以来、脂肪組織はサイトカインの産生部位として新たな注目を集めている。脂肪細胞から産

生されたレプチンは、中枢神経系の視床下部付近に作用して食欲を抑制し脂肪の蓄積を妨げるというフィードバック機構を介して、生体のホメオスターシスを保つ役割を果たす。レプチン遺伝子が欠損する ob/ob マウスではこのフィードバックが消失することが病的肥満の原因となる。栄養摂取過多などにより脂肪組織が増大するときには、レプチンのような食欲抑制を介した調節を司る因子以外に、直接脂質代謝系を改善するような作用を有するサイトカインも重要な働きをする可能性がある。一方、ヒトの病的肥満では、レプチン遺伝子が欠損しているという報告はほとんどなく、レプチン様の作用を持つ他のサイトカインが存在するかも知れない。これら脂肪組織のホメオスターシスを保つ作用を有する一群の分泌蛋白質を脂肪細胞からクローニングできれば、病的肥満や種々の脂質代謝異常の病態の解明および治療に役立つことが期待できる。本研究では、我々が最近開発したレトロウイルス発現系を利用したシグナルシーケンストラップ法によって、脂肪細胞から分泌されるサイトカインなど細胞外に分泌される蛋白質の cDNA をクローニングし、これらの分泌蛋白質の脂質代謝における生理作用および種々の病態における脂質代謝異常への関与を調べる。

一方、同じく分担研究者である東京工業大学石川冬木教授との共同研究で、疾病に関与する劣性遺伝子のレトロウイルスを利用した機能的スクリーニング系の開発を行った (分担研究者石川冬木教授の報告書に記載)。

B. 研究方法

我々はこれまでに効率の良いレトロウイルスベクター系を開発し、レトロウイルスによる発現クローニング法を樹立してきた。更に PCR による任意突然変異導入とレトロウイルス発現スクリーニング系を組み合わせることによって、サイトカインレセプター MPL と転写因子 STAT5 の活性型変異体を同定した (Onishi et al. Blood, 1996; Onishi et al. M.C.B., 1998)。我々は最近、レトロウイルス発現系と活性型 MPL を利用した新しいシグナルシーケンストラップ法 (SST-REX 法) の開発に成功し、分泌蛋白質や膜蛋白質などシグナル配列を有する蛋白質の cDNA スクリーニングを各種細胞で開始した。SST-REX 法は、以下の原理で行う。

C. 膜貫通部位の点突然変異によって、リガンド非存在下でもホモダイマーを形成して増殖シグナルを伝達する活性型レセプター MPL* の細胞外部位欠失変異体 (Δ MPL*) を作成する。

2) Δ MPL* と cDNA 断片融合 cDNA ライブラリーを作成し、ウイルス感染により IL-3 依存性細胞 Ba/F3 に導入する。

3) cDNA の断片がシグナル配列を含んでいる場合には、シグナル配列により cDNA- Δ MPL* 融合蛋白質が細胞膜上に発現され、Ba/F3 細胞に自律増殖能を賦与する。

SST-REX 法は、従来のシグナルシーケンストラップ法に比べ、ソーティングのかわりに細胞増殖という簡便なアッセイ系を使うので簡単に実験が行える。またクローニングした cDNA のうち 99% 以上の

ものがシグナル配列を含んでおり従来の方法に比べ実験精度においても大変優れている。

本年度は、脂肪細胞への分化誘導が可能な前脂肪細胞株 3T3-L1 の分化誘導後の SST-REX 用の cDNA ライブラリーを作成し、脂肪細胞特異的な分泌蛋白質あるいは膜蛋白質を同定し、解析した。

C. 研究結果

脂肪細胞分化のモデル系として前脂肪細胞株 3T3-L1 を選んだ。実験では、Insulin で分化誘導した 3T3-L1 細胞から SST-REX 用の cDNA ライブラリーを作成し、Ba/F3 細胞の IL-3 非依存性増殖を指標にしてシグナルシーケンストラップを行った。取得した 102 クローンのうち 95 クローンが解析可能であった。うち 12 クローン 10 種類が未知の遺伝子であった。なお取得した既知の遺伝子は、1 クローンを除きすべてシグナルペプチドを有する分泌蛋白質あるいは膜蛋白質で、実験系が正確に動いていることが確認できた。取得した既知のクローンの一部を以下に列挙する。

1. Adipocyte complement-related protein
2. Collagens
3. Osteonectin
4. Sulphated glycoprotein Spg1
5. Amyloid precursor-like protein
6. Syndecan
7. Cystein rich glycoprotein SPARC
8. FK506-binding protein FKBP23

- 9. Cak receptor kinase
- 10. Extracellular matrix associated protein
- 11. frizzled 7 (transmembrane receptor)

一方、取得した未知の遺伝子のうち3種類は免疫グロブリンスーパーファミリーに属する新規遺伝子で、1種類はレンズ表皮由来増殖因子に相同性を有する遺伝子、残りの6種類は既知の遺伝子に全く相同性を持たない遺伝子であった。これら10種類の未知遺伝子について Northern Blot 解析を行ったところ、8つの遺伝子の発現は脂肪細胞分化に従って誘導あるいは増強することが判明した。現在、これらのクローンの全長 cDNA をクローニングして解析中である。

D. 考察

本年度は、レトロウイルスを利用した新しいシグナルシーケンスストラップ法を確立した。この方法により、3T3-L1 細胞の脂肪細胞分化に伴って発現が誘導あるいは増強する未知の遺伝子を10種類同定し解析中である。今後、これらの新規遺伝子の発現が、in vivo においても脂肪細胞特異的であるか、あるいは同じ脂肪細胞のなかでも、皮下脂肪や内臓脂肪などで発現分布が異なるかを検討し、動脈硬化、高血圧、糖尿病などの疾患との関連などを調べていく予定である。また、スクリーニングをさらに継続すること、さらにヒト内臓脂肪からも cDNA ライブラリーを作成し同様のスクリーニングを行うことを予定している。

同定しえた分泌蛋白質は精製してマウスに投与することによって脂肪代謝系にどのような影響があるかを調べたい。

今後は、レトロウイルスによる発現クローニング法において、スクリーニング法を工夫することによって、老化や DNA 修復に関与する遺伝子とその機能を利用して同定する実験も併せて行いたいと考えている。

E. 結論

レトロウイルスベクターを利用した新規シグナルシーケンス法によって、脂肪細胞に発現する分泌蛋白質および膜蛋白質が効率よくクローニングできた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- ① Yang, Y-L., Lei, G., Xu, S., Holland, C.A., Kitamura, T., Hunter, K. and Cunningham, J.M. (1999) Receptors for polytropic and xenotropic murine leukemia viruses encoded by a single gene at Rmc1. *Nature Genetics* 21, 216-219.
- ② Nosaka, T., Onishi, M., Kawashima, T., Yamada, K., Misawa, K., Ariyoshi, K., Towatari, K., Saito, H., Tani, K., Asano, S., Miyajima, A., and Kitamura, T. (1999) Identification and characterization of constitutively active STAT5. *Molecular Biology of Hematopoiesis*. in press.
- ③ Kitamura, T. and Morikawa, Y. (1999)

- Isolation of cDNAs for T cell antigens by retrovirus-mediated expression cloning. *Methods in Molecular Biology*. in press.
- ④ Mukasa, R., Homma, T., Ohtsuki, T., Hosono, O., Souta, A., Kitamura, T., Fukuda, M., Watanabe, S., and Morimoto, C. (1999) Core 2-containing O-glycans on CD43 are preferentially expressed in the memory subset of human CD4 T cells. *Int. Immunol.* in press.
- ⑤ Matsumura, I., Kitamura, T., Wakao, H., Hashimoto, K., Albanese, C., Pestell, R.G., and Kanakura, Y. (1999) Involvement of cyclin D1 in STAT5-mediated cell growth. *EMBO J.* in press.
- ⑥ Kojima, T., and Kitamura, T. (1999) A novel signal sequence trap method using retrovirus-mediated gene transfer. *Nature Biotechnol.* in press.
- ⑦ Yagisawa, M., Saeki, K., Okuma, E., Kitamura, T., Kitagawa, S., Hirai, H., Yazaki, Y., Takaku, F., and Yuo, A. (1999) Signal transduction pathways in normal human monocytes stimulated by cytokines and mediators: comparative study with normal human neutrophils or transformed cells and the putative roles in functionality and cell biology. *Exp. Hematol.* in press.
- ⑧ Onishi, M., Nosaka, T., and Kitamura, T. (1998) Cytokine receptors: Structures and signal transduction. *Int. Rev. Immunol.* 16: 617-634.
- ⑨ Kitamura, T. (1998) New experimental approaches in retrovirus-mediated expression screening. *Int. J. Hematol.* 67:351-359.
- ⑩ Hata, D., Kawakami, Y., Inagaki, N., Lantz, C.S., Kitamura, T., Khan, W.N., Tashiro, M., Maeda-Yamamoto, M., Miura, T., Han, W., Hartman, S.E., Yao, L., Nagai, H., Goldfeld, A.E., Alt, F.W., Galli, S.J., Witte, O.N., Kawakami, T. (1998) Involvement of Bruton's tyrosine kinase in FcεRI-dependent mast cell degranulation and cytokine production. *J. Exp. Med.* 187: 1235-1247.
- ⑪ 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.
- ⑫ 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.

- ⑬ Jinno, A., Shimizu, N., Soda, Y., Haraguchi, Y., Kitamura, T., and Hoshino, H. (1998) Identification of the chemokine receptor TER1/CCR8 expressed in brain-derived cells and T-cells as a new coreceptor for HIV-1 infection. *Biophys. Biochem. Res. Commun.* 243:497-502.
- ⑭ Kawashima, T., Kawasaki, H., Kitamura, T., Nojima, Y., and Morimoto, C. (1998) Interleukin-12 induces tyrosine phosphorylation of an 85-kDa protein associated with the interleukin-12 receptor b1 subunit. *Cell. Immunol.* 186:39-44.
- ⑮ Kitamura, T., Onishi, M., Yahata, T., Kanakura, Y., and Asano, S. Activating mutations of the transmembrane domain of MPL in vitro and in vivo: Incorrect sequence of MPL-K, an alternative spliced form of MPL. (1998) *Blood* 92:2596-2597.
- ⑯ Dairaghi, D.J., Premack, B.A., Kitamura, T., Soo, K.S., Bacon, K.B., and Schall, T.J. (1998) RANTES-induced activation correlates with CD3 expression. *J. Immunol.* 168: 426- 433.
- ⑰ Duan, Y., Naruse, T., Kawashiam, T.,

Morikawa, Y., Yamaguchi, Y., Nakamura, M., Kitamura, T., and Suda, T. (1998) Expression and functional analysis of a hemopoietic progenitor antigen, NJ-1 (114/A10), in a megakaryocytic lineage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 253: 401-406.

2. 学会発表

- ① IL-3-independent cell proliferation and IL-3-induced apoptosis through a constitutive active STAT5. Kitamura, T. and Nosaka, T. (11th Symposium for Molecular Biology of hematopoiesis, Bormio, Italy 1998).
- ② A novel expression cloning method FL-REX that is designed to screen cDNA libraries based on the localization of the cDNA products. Misawa, K., Morita, S., Nosaka, T., Kaneko, T., Nakahata, T., and Kitamura, T. (27th Internal Society for Experimental Hematology, Vancouver, August 1998).
- ③ IL-3 induced apoptosis through constitutive active STAT5. Nosaka, T. and Kitamura, T. (27th Internal Society for Experimental Hematology, Vancouver, August 1998).
- ④ New approaches in hematopoiesis research using retrovirus-mediated expression screening. (2nd International

Symposium for Stem Cell Regulation,
Tokyo, October 1998)

⑤ SST-REX: 恒常的活性型受容体を用いた新規 Signal Sequence Trap 法
小嶋哲郎、北村俊雄 (第 21 回 日本分子生物学会、横浜、平成 10 年 12 月)

G. 知的所有権の取得状況

1 1) 特許取得

なし

1 2) 実用新案登録

なし

1 3) その他

シグナルシーケンスストラップ法
(発明者：小嶋哲郎、北村俊雄)

新規 TNF 受容体様タンパク質
(発明者：小嶋哲郎、北村俊雄)

新規サイトカイン受容体様タンパク質
(発明者：藤尾圭志、北村俊雄)

以上特許出願中