

20000 926 ~ 0936

創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業

平成12年度

# 創薬等ヒューマンサイエンス研究

## 重点研究報告書

第1分野

先端的創薬技術の開発に関する研究

財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

平成12年度

# 創薬等ヒューマンサイエンス研究

## 重点研究報告書

### 第1分野

先端的創薬技術の開発に関する研究

# 目 次

## 課題番号

11011	脳梗塞動物モデルの開発と創薬研究への応用	柳本 広二	……	1
11037	免疫・脳神経系のゲノム恒常性維持に係る遺伝子発現制御機構の解明	葛西 正孝	……	7
11106	ヒト組織構築モデル動物の作製と応用に関する研究	藤本純一郎	……	12
11168	疾患モデルラットの調査とラットゲノムの基盤研究によるヒト疾患遺伝子の総合的探索研究	芹川 忠夫	……	19
11178	神経・筋疾患モデル動物の病態解析及び開発のための基礎研究	菊池 建機	……	25
11217	長寿命新規蛍光標識剤の開発および応用	嶋 秀明	……	30
12004	薬物及び生体分子の高感度高性能分析・解析技術の開発に関する研究	今井 一洋	……	38
12129	ゲノム情報に基づく骨疾患治療医薬品の開発に関する研究	瀬原 淳子	……	45
12259	白血球機能の新しい制御手法の開発に関する研究	鈴木 和博	……	50
12263	チャネルの開口を視る技術の開発研究	川西 徹	……	56
12271	正常ヒト上皮組織に由来する初代培養細胞の増殖制御機構の解析とその研究資源化に関する研究	林 真	……	66

## 免疫・脳神経系のゲノム恒常性維持に係る遺伝子発現 制御機構の解明

所属 国立感染症研究所 免疫部  
研究者 葛西正孝

### 分担研究者

第一製薬・東京研究開発センター  
創薬第三研究所  
高子 徹

### 要旨

主任研究者らは、DNA不安定性に起因する臨床例の解析からTranslin, RP58, Trax蛋白を発見し、それぞれのcDNAおよびゲノム遺伝子をクローニングすることに成功し、以下のような成果を得ることができた。(1)放射線やDNAに損傷を与える薬剤によって細胞質に大部分存在するTranslin蛋白の一部が、約6hrをピークとして核内に移行することを確認した。(2)一方、細胞核内への移行が、inducible nitric oxide synthase (iNOS)の特異的阻害剤によって打ち消されることから、nitric oxide (NOS)の関与が示唆された。(3)さらに、Translin蛋白を過剰発現する細胞株を樹立し、その発現が細胞周期に依存して細胞分裂やDNAの複製に影響を及ぼしていることを明らかにした。(4)また、米国のEdward H. Egelman博士との共同研究で、16オングストロームの解像度でTranslin蛋白の3次元構造イメージを中心にした研究に大きな進歩が認められた。

細胞の異常増殖を伴う疾病は、血管および気道平滑筋や関節滑膜の増生肥厚など、癌や免疫系のみならず炎症やアレルギーなど、広範な疾病にも及んでおり、そのメカニズムの解明が厚生行政の大きな課題の一つとして残されている。本研究事業で得られた成果は、組織の再生やゲノムの修復に関連した医療と創薬への応用を目指した研究へ大きく発展することが期待される。

### 1. 研究目的

細胞の分裂・増殖・分化など、生物の基本的機能に重要な役割を果たす遺伝子の多くは、染色体転座におけるDNA切断部位のクローニングによって発見されてきた。この事実は、癌や脳神経疾患などのDNA不安定性に起因する疾病の要因が、転座や欠失などの染色体異常部位近傍に位置する遺伝子の発現の攪乱によるものであることから合理的に理解することができる。しかし、なぜゲノム上でDNAの切断と融合を高頻度に繰り返す領域が存在し、その近傍に重要な機能を備えた遺伝子が位置するのかという基本的な疑問に対しては、ゲノムの高次構造に関する研究が十分になされていないので明快な答えは得られていない。

本研究では、癌や脳神経疾患などのDNA不安定性に起因する臨床例のゲノム構造を解析し、疾病の要因である転座や欠失などの染色体異常の分子機構を解明することを目的とする。この研究を推進するこ

とによって、ゲノム恒常性の維持機構とその破綻のメカニズムが明らかになるだけでなく、疾病の治療を志向した研究が大きく発展するものと期待される。

## 2. 研究方法

### リコンビナント蛋白の調製

クローニングした遺伝子(トランスリン及びTRAX)のOpen Reading Frame (ORF)をpQE9ベクターにサブクローニングし、M15大腸菌にトランスホームした。リコンビナント蛋白の精製は、トランスホームしたM15大腸菌をIPTGで誘導後、粗抽出液をNi アガロースカラムクロマトグラフィーに吸着させ、イミダゾールで溶出することによっておこなった。

### 免疫組織染色

PC12細胞を4%パラホルムアルデヒドで固定後、ウサギ抗トランスリン抗体とマウス抗ブロムデオキシウリジン(BrdU)抗体で二重染色した。更に、Alexa 546ヤギ抗ウサギIgG抗体とAlexa 488ヤギ抗マウスIgG抗体で一次抗体の結合を検出した。また、核染色はDAPIでおこなった。次に、ラット脳組織の染色は、Wistarラット (P2, P18, P56)を4%パラホルムアルデヒドと0.2%ピクリン酸で心臓灌後、脳組織の凍結切片をウサギ抗トランスリン抗体と反応させた。更に、ビオチン標識抗ウサギIgGとアビジン標識ペルオキシダーゼで反応させた後、0.05%ジアミノベンチジン(DAB)と0.01%過酸化水素水で発色させた。

### 核蛋白の抽出とWestern ブロットティング

培養細胞をHypotonic buffer (低調緩衝液)中でDounceホモジュナイザーによって破碎し、2,000 x gの遠心で核画分と細胞質画分に分離した。次に核画分からRocking buffer(高調緩衝液)で核蛋白を抽出した。更に、両画分蛋白抽出液から終濃度10%のトリクロル酢酸(TCA)で全蛋白を沈殿させ、アセトンで繰り返し洗浄後、SDS sample bufferに溶解した。Western ブロットティングは、サンプルを10% SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS)で分離し、PVDF膜に転写後、一次抗体およびペルオキシダーゼ標識二次抗体を反応させたenhanced chemiluminescence (ECL法)で特異的バンドを検出した。

### 抗ペプチド抗体の作製

Translin, RP58, TRAX各蛋白の抗原性部位によって決定されたN末端やC末端ペプチド等をキャリアー蛋白質(KLH)に結合後、NZWウサギに免疫して特異抗体を得た。抗体の精製は、抗原ペプチドのアフィニティーカラムクロマトグラフィーによっておこなった。

## 3. 研究成果

### 放射線によるDNA傷害とTranslin蛋白の核内輸送

細胞は、ゲノムDNAに傷害を及ぼす放射線や化学物質などの様々なストレスに対処するために、自らの分裂サイクルを停止してDNAの損傷個所を速やかに修復する機構を備えている。我々は、DNAに損傷を与える薬剤によってTranslin蛋白の細胞内局在が変化することを従来の研究で観察している。そこで、本研究では放射線によるDNA傷害がTranslin遺伝子の発現や細胞内局在にどのような影響を及ぼすという点に着目して研究を進めた。その結果、K562細胞を20-Gyの放射線処理した場合、照射24 hr後にTranslin蛋白の発現が減少することが観察された。更に、照射直後のTranslin蛋白の発現を核と細胞質で解析すると、細胞質に大部分存在するTranslin蛋白の一部が、約6hrをピークとして核内に移行することを確認した。一方、細胞核内への移行が、inducible nitric oxide synthase (iNOS)の特異的阻害剤によって打ち消されることから、nitric oxide (NOS)の関与が示唆された。

### 免疫・脳神経細胞の分裂とTranslin蛋白の発現

我々はTranslin蛋白の発現量と細胞増殖速度と間に正の相関にあることに注目し、脳神経系と免疫細胞系をモデルとして次のような研究をおこなった。ラット小脳におけるTranslin蛋白の発現量を調べてみると、胎生17日(E17)から生後18日(P18)まで徐々に減少することが判明した。哺乳類の小脳では、急速に分裂する神経前駆細胞はexternal germinal layer (EGL)に存在し、分化に伴ってinternal granular layer (IGL)に移行して細胞分裂を停止することが知られている。そこで、Translinの発現が、発生過程にある小脳の特定領域に局在しているのかどうかを明らかにするために免疫組織染色による解析をおこなった。その結果、Translin蛋白は、EGLの増殖の盛んな神経前駆細胞に強く発現しているが、生後急速に減少し、P18ではIGLにわずかに残るのみであった。更に、Translin蛋白の発現と神経前駆細胞の分裂増殖との関連を明らかにするために、NGF (nerve growth factor) によるPC12 (phenochromocytoma cell line) 細胞の分化との関連を調べたところ、PC12の神経細胞への分化に伴う細胞分裂の停止と一致してTranslin蛋白の発現が減少することが観察された。

以上の現象が免疫細胞系においても認められるかどうか確認するために、PMA (phorbol myristate acetate) によるK562細胞の巨核球への分化誘導との関連を調べた。その結果、PMAによるK562細胞の分化誘導と細胞分裂の停止に伴って、脳神経系の場合と同じようにTranslin蛋白の発現が減少することが観察された。

Ataxia telangiectasia 原因遺伝子、Atmを欠損したマウス、Atm(-/-)のリンパ球では、放射線照射後、p53, p21を介した細胞分裂の停止機構が作動しないことが知られているが、これと呼応するかのようにはTranslin蛋白の発現量にも変化が認められない。しかし、Atm(+/-)やAtm(+/-)マウスでは、細胞分裂が停止すると同時にTranslin蛋白の発現量が低下する。

以上の結果は、Translin蛋白の発現がAtm kinase を頂点とする細胞周期制御機構によって調節されており、広範な細胞種の分裂に極めて重要な役割を果たしていることを意味している。

### Translin蛋白の過剰発現による細胞分裂の誘導

Translin蛋白の発現量と細胞増殖速度の因果関係を明らかにするために、Doxycycline存在下でTranslin蛋白を過剰発現させることのできる細胞株を樹立した。その結果、Translin蛋白の過剰発現に伴って細胞分裂が誘導されることを明らかにした。このことは、Translin蛋白の発現が細胞増殖を制御する要因の一つとして機能していることを意味している。

### 細胞周期に依存したTranslin蛋白の発現

Translin蛋白の発現が細胞周期に依存しているかどうかをFACSで解析したところ、G0/G1期に低く、S期及びG2/M期に最も高く発現されていることが明らかとなった。この発現パターンは、Translin蛋白を過剰発現させた場合にも維持されているので、G0/G1期における抑制やS期及びG2/M期における活性化など、細胞周期に依存した制御機構によってTranslin蛋白の発現が厳密に調節されていることを示している。

### DNA複製におけるTranslin蛋白の役割

Translin蛋白の発現がS期及びG2/M期に最大となることは、DNA複製や染色体の分離にTranslinが深く関わっていることを示唆している。そこで、Translin蛋白を過剰発現させた細胞におけるDNA複製能をbromodeoxyuridine (BrdU)の取り込みで測定したところ、Translin蛋白の発現と一致してBrdUの高い取り込みが観察された。この結果は、Translin蛋白の過剰発現に伴って細胞分裂が誘導される事実と符号する。今後、Translin蛋白の過剰発現によるDNA合成の促進が、細胞のDNA複製機構に直接あるいは間接的に関与しているのかどうかという点を明らかにする予定である。

### Translin蛋白の3次元構造の解析

分子量27kDaのTranslin蛋白は、2箇所のシステイン残基で2量体を形成し、更にC末端のロイシンジッパー構造でリング状8量体構造を呈していることが従来のX線結晶解析研究で既に明らかにされた。一方、米国のEdward H. Egelman博士との共同研究で、16オングストロームの解像度でTranslin蛋白の3次元構造イメージの作成に成功し、リング状8量体構造とDNAの結合様式の詳細が明らかとなった。

#### 4. 考察

DNAの複製や修復に係わる研究は、細菌や酵母を中心として国内外で活発に研究されているが、ヒトの疾病に関連したゲノム恒常性維持機構とその破綻のメカニズムに係わる研究は遅れており、解明されなければならない多くの問題を含んでいる。また、細胞の異常増殖を伴う疾病は、癌や免疫系のみならず炎症やアレルギーなど、広範に及んでおり、そのメカニズムの解明は厚生行政の大きな課題の一つとして取り上げられねばならない。本研究の成果を要約すると以下の様である。

- (1) Translin蛋白が細胞周期に依存して制御され、S期とG2/M期に最も強く発現される。
- (2) Translin蛋白の発現量と細胞増殖速度が正の相関を示すことに着目し、Translin蛋白を過剰発現する細胞株を樹立して詳細な解析をおこなった。その結果、この蛋白の過剰発現に伴ってDNA複製と細胞分裂が誘導されることを明らかにした。
- (3) 米国のEdward H. Egelman博士との共同研究で、16オングストロームの解像度でTranslin蛋白の3次元構造イメージの作成に成功し、リング状8量体構造とDNAの結合様式の詳細を明らかにした。

以上の結果を基盤にして、蛋白の構造と機能を中心にした詳細な解析を行うことにより、組織の再生やゲノムの修復に関連した医療と創薬への応用を目指した研究へ大きく発展することが期待される。

#### 5. 結論

本研究事業において、主任研究者らは、DNA不安定性に起因する臨床例の解析からTranslin, RP58, Trax蛋白を発見し、それぞれのcDNAおよびゲノム遺伝子をクローニングすることに成功した。さらに、Translin蛋白を過剰発現する細胞株を樹立し、その発現が細胞周期に依存して細胞分裂やDNAの複製に影響を及ぼしていることを明らかにした。細胞の異常増殖を伴う疾病は、血管および気道平滑筋や関節滑膜の増生肥厚など、癌や免疫系のみならず炎症やアレルギーなど、広範な疾病にも及んでおり、そのメカニズムの解明が厚生行政の大きな課題の一つとして残されている。蛋白質の3次元構造と機能解析における進展を含めた本研究事業で得られた成果は、組織の再生やゲノムの修復に関連した医療と創薬への応用を目指した研究へ大きく発展することが期待される。

#### 6. 研究発表

Hosaka T, Kanoe H, Nakayama T, Murakami H, Yamamoto H, Nakamata T, Tsuboyama T, Oka M, Kasai M, Sasaki MS, Nakamura T, Toguchida J.

Translin binds to the sequences adjacent to the breakpoints of the TLS and CHOP genes in liposarcomas with translocation t(12;6).

Oncogene 19 2000 5821-5825

Meng G, Aoki K, Tokura K, Nakahara K, Inazawa J, Kasai M.

Genomic structure and chromosomal localization of the gene encoding TRAX, a Translin-associated factor X.

J. Hum. Genet. 45 2000 305-308

Meng G, Inazawa J, Ishida R, Tokura K, Nakahara K, Aoki K, Kasai M.

Structural analysis of the gene encoding RP58, a sequence-specific transrepressor associated

with heterochromatin.  
Gene 242 2000 59-64

Aoki, K., Suzuki, K., Ishida, R., and Kasai, M.  
The DNA binding activity of Translin is mediated by a basic region in the ring-shaped structure conserved in evolution  
FEBS Letters 443,363-366 (1999)

Aoki, K., Meng, G., Suzuki, K., Takashi, T., Kameoka, Y., Nakahara, K., Ishida, R., and Kasai, M.  
RP58 associates with condensed chromatin and mediates a sequence-specific transcriptional repression  
J. Biol. Chem. 273, 26698-26704 (1998)

Aoki, K., Inazawa, J., Takahashi, T. and Kasai, M.  
Chromosomal localization of the gene encoding a recombination hotspot binding protein, Translin.  
Genomics., 43, 237-241 (1997)

Kasai, M., Matsuzaki, T., Katayanagi, K., Omori, A., Maziarz, R. T., Strominger, J. L., Aoki, K., and Suzuki, K.  
The Translin ring specifically recognizes DNA ends at recombination hotspots in the human genome. J. Biol. Chem., 272, 11402-11407 (1997)

Aoki, K., Ishida, R. and Kasai, M.  
Isolation and characterization of a cDNA encoding a Translin-like protein, TRAX.  
FEBS Letters, 401, 109-112 (1997)

Aoki, K., Suzuki, K., Sugano, T., Nakahara, K., Kuge, O., and Kasai, M.  
A novel gene, *Translin*, encodes a Recombination Hotspot Binding Protein associated with Chromosomal Translocations in Human Lymphoid Neoplasms.  
Nature Genetics 10, 167-174 (1995)

---

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究  
重点研究報告書

第1分野

先端的創薬技術の開発に関する研究

平成13年11月30日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号

共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

---

印刷 株式会社 ソーラン社

