

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

白血球機能の新しい制御手法の開発に関する研究

所 属 国立医薬品食品衛生研究所 代謝生化学部
研究者 鈴木 和博

分担研究者

山本 一夫	東京大学大学院 新領域創成科学研究科
武内 恒成	名古屋大学大学院 理学研究科生命理学
楠井 薫	国立医薬品食品衛生研究所 代謝生化学部
安達 玲子	国立医薬品食品衛生研究所 代謝生化学部

【要旨】

ファージディスプレイライブラリを利用して、コフィリンに結合するタンパク質を検出するとともに、NK 受容体結合活性のあるペプチドを複数見だし、そのペプチド間にアミノ酸の共通配列があることを明らかにした。さらに、コロニンが p40phox と結合することを明らかにするとともに、白血球の活性酸素産生機構について情報伝達系と細胞骨格系がリンクしている新しい分子機構を提示した。

1. 研究目的

エイズや遺伝性疾患の慢性肉芽腫症（CGD）等の例をあげるまでもなく、重篤な感染症をひきおこす難治性疾患は数多くあり、その原因は殺菌等の生体防御機能の低下にある。その生体防御においては、白血球が中心的な役割を果たしている。白血球の機能発現は、生物学的には、様々な側面をもつ。すなわち、①活性酸素の産生、②貪食、③遊走、④接着、⑤顆粒酵素放出、などである。今日では、検査方法も進んで、それぞれに対応した欠損症が明らかになっており、例えば、①に対してはCGD、②には Chediak-東症候群、③には Lazy Leukocyte 症候群、④にはアンカー病、⑤にはMPO欠損症や特殊顆粒欠損症、といった具合である。どの機能も重要であることは疑いないが、症例数の関係から、(II)の活性酸素産生が重要視されてきた。とくに、本来の“殺菌”という機能ばかりでなく、その鋭い毒性故、生体自身の場合によっては傷害的に働くことが分かってきた活性酸素については、その厳密なコントロールが必要であると理解されるようになってきた。すなわち、必要な殺菌時には十分量産生されねばならないが、心筋梗塞や手術時などによく起こる虚血再還流時の活性酸素産生などは、生体膜等への傷害が大きく、抑える方法が切望されている。このことは、医療関係者だけでなく、最近の移植医療の問題点として、また、発癌や老化とも深く関連していることとして、一般にも広く知られるところとなっている。活性酸素産生は、白血球のうち主として好中球が担っているが、Natural Killer 細胞（NK 細胞）も時には生体自身に傷害的に働くことが明らかにされてきた。すなわち、NK 細胞は Cytotoxic T 細胞と並んで、細胞障害機能を担う最も代表的な免疫担当細胞であるが、自己組織・器官の破壊も起こすなど、多くの免疫不全症候群の原因となっている。

本研究は、我々が研究実績を蓄積してきた情報伝達機構・細胞骨格系制御系に関する新知見を生かして、白血球の機能調節を可能にする新しい医薬の創製に資する新しい手法を開発することを目的とする。

2. 研究方法

1) ファージディスプレイ法を用いたコフィリン結合タンパク質の探索

本年度は、昨年度に確立した Novagen 社の human brain cDNA ライブラリー（T7 ファージ由来）を用いた実験系により、コフィリン結合タンパク質の解析を行った。

昨年度の報告書に記した方法により、候補となるクローンについてファージのインサート部分の塩基配列を決定し、BLAST 検索より塩基配列由来のタンパク質を同定した。全部で45個のクローンについて塩基配列を解析し、そのうちファージに組み込まれた際のタンパク質の読み取りフレームと元来のタンパク質のフレームが一致していたクローン（7種）について、ネガティブコントロールのクローンとともに同数のファージの数（ 5×10^8 pfu）を用いてそれぞれコフィリンプレートへのバイオパニングを行い、コフィリンと特異的に結合するクローンを同定した。

2) コフィリンとリボゾームタンパク質の結合実験

コフィリンと2種類のリボゾームタンパク質との結合を別の面から確認するために、リコンビナントコフィリン（昨年度作製）と今年度作製した His-tag 付リコンビナントリボゾームタンパク質 S18 及び L15 との結合実験を行った。

具体的な方法は、まず、IPTG で誘導後の大腸菌の ppt. を 6M グアニジン塩酸、pH8.0 で可溶化してそ

の上清を調製した。こうして調製した上清と Ni-NTA agarose (QIAGEN) のビーズとを室温で一時間反応させて His-tag 付リコンビナントリボゾームタンパク質 S18, L15 を固定化した後、このビーズを 8M Urea, pH8.0、4M Urea, pH8.0、2M Urea, pH8.0 で順次洗浄して、グアニジンを除去するとともに Urea 濃度を下げた。さらに洗浄後に 2M Urea, pH8.0 中でリコンビナントコフィリンとバッチ法にて室温 3 時間反応させた。反応後は、2M Urea, pH6.3 で再びビーズを洗浄し、最終的に 2M Urea, pH4.5 で溶出を行った。溶出液については、ウェスタンブロッティング分析を行い、タンパク質の組成を検討した。タンパク質の検出は、anti-cofilin antibody (MAB22) と Ni-NTA-HRP の 2 種で行った。

3) 可溶型マウス NK 細胞受容体 Ly49A の作成

大腸菌の発現ベクター pET-3c に、ビオチン化配列ならびに Ly49A 細胞外領域をコードする遺伝子を組み込んだ組換体プラスミドを作成した。これを大腸菌 BL21(DE3) にトランスフォームし、IPTG 存在下で発現誘導を行った。この組換体の可溶型 Ly49A (sLy49A) は封入体として回収されたため、グアニジンで可溶化後、さまざまな条件で透析しリフォールディングを行った。イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過を組み合わせて、最終的にリガンドである H-2Dd との結合活性を持った sLy49A を得た。

4) マウス NK 細胞受容体 Ly49A に結合するファージクローンのバイオパニング

昨年度、NK 細胞受容体を発現させた細胞を用いてパニングを試みたが、その後更なる検討を加えた結果、sLy49A をストレプトアビジンアガロースビーズに固相化しパニングに用いた際に非特異的な吸着を最小限に防げることがわかり、この系でスクリーニングを行うことにした。また、NK 細胞受容体 Ly49A に結合したファージの回収は、0.2M Glycine/HCl, pH2.2, 1 mg/ml BSA を用いることにした。

7mer のランダムペプチドの両端にシステインを含むペプチドライブラリーを提示した Phage Peptide Library (Ph.D.-C7C, New England Biolab) からパニングによって sLy49A に結合するファージクローンの濃縮を行った。パニングを 4 回繰り返した結果、ファージの回収は 2 回目に 0.2%、3, 4 回目で 0.45, 0.5% であり、2 回でも十分に効率よく選別されていることが判った。この結果は、前回の細胞を用いたパニングに比べ、はるかに優れたものであった。その他の変更点は、0.5% BSA-TBS でブロッキングすることと、wash を丁寧に 10 回繰り返して行う点であり、これらも効率良いパニングを行うのに重要であることが判った。

得られたクローンから 32 個のクローンをランダムに拾い、その塩基配列の決定を行った。

5) Ly49D とファージクローンの結合特異性

マウス NK 細胞レセプター Ly49 には A から I までの 8 種類が知られているが、このうち Ly49A とリガンドを同じにする Ly49G2 との交差性を調べた。Ly49A と同様に Ly49G2 の cDNA を取得し、最終的に可溶型ビオチン化 Ly49G2 を取得した。これをプレートに固定化し、上記で得られた個々のファージクローンとの結合を調べた。ファージ数の同定は、抗 M13 ファージ (pIII) 抗体および FITC 標識-抗マウス Ig により行った。

6) 可溶型ヒト NK 細胞受容体 CD94/NKG2A の作成とこれに結合するファージクローンのバイオパニング

マウス NK 細胞受容体 Ly49A と同様に、ヒト NK 細胞受容体 CD94/NKG2A の可溶型を得るために、ビオチン化タグ付き CD94 並びに His タグ付き NKG2A の発現を大腸菌で行った。Ly49A はホモダイマーであったのに対し CD94/NKG2A はヘテロダイマーであるため、イオン交換クロマトグラフィーによって CD94 ダイマーと分離し sCD94/NKG2A を得た。この sCD94/NKG2A はリガンドである HLA-E に結合することを FACS によって確認し、以下の実験に用いた。

sCD94/NKG2A をプレートに固定化し、Ph.D.-C7C Phage Peptide Library からパニングによって sCD94/NKG2A に特異的に結合するクローンを単離した。2~3 回のパニング後、独立した 36 クローンの塩基配列を解析し、各ファージクローンの提示するペプチドのアミノ酸配列を決定した。

7) コロニン制御蛋白の探索

我々は新規細胞内骨格制御因子を探索し、昨年度本研究において、細胞性粘菌で同定されているコロニン分子のヒトホモログを見いだした。コロニンは細胞性粘菌では、アクチン結合能を持ち、細胞体の移動、分裂、細胞内小胞の分配などに関わる非常に重要なアクチン結合分子であることが知られている。さらには酵母等でも解析が進められており、アクチン結合と細胞内アクチン線維形成に関わる重要な分子であることのみならず、本研究の代表研究者・鈴木らが解析を進めている骨格制御因子コフィリンとの機能相関も示唆されている。しかし、ヒトを含めた哺乳類でのホモログ分子の解析はほとんど進んでいなかった。我々はまず、ヒト・マウスでのコロニンホモログファミリーの全容解析とその機能解析を進めた。さらに抗体を作成し、細胞内と組織局在を解析するとともに、その結合分子の同定を生化学的に進めるとともに、細胞内情報伝達機能における役割の解析を試みた。また、この分子のアンチセンス法による発現制御システムの確立を行い、分子機能解析を進めるとともに、核酸医薬品としてのアンチセンスオリゴの構築も進めた。

3. 研究成果

1) ファージディスプレイ法を用いたコフィリン結合タンパク質の探索

ヒトリボゾームタンパク質 L15、ヒトリボゾームタンパク質 S18 及び human synaptosomal-associated protein, 25kD (SNAP25) の 3 種類のタンパク質がコフィリンと特異的に結合することが判明した。

2) コフィリンとリボゾームタンパク質の結合実験

ウェスタンブロッティングの結果より、リボゾームタンパク質 S18 については、Ni-NTA agarose のビーズからの溶出液にはコフィリンとリボゾームタンパク質 S18 が共存することが判明し、コフィリンはリボゾームタンパク質 S18 と結合してともに溶出されたことが明らかになった。

3) マウス NK 細胞受容体 Ly49A に結合するファージクローンのバイオパニング

得られたクローンから 32 個のクローンをランダムに拾い、その塩基配列の決定を行った。Ly49A に結合する活性を持ったものは同一のものを除くと最終的に 7 種類のクローンが得られた。これらはアミノ酸配列の相同性から 2 つに分類され、CXFXLPWLC という共通配列を持つ C1 (CLFNLPWLC), C19 (CLFDLPWLC), C21 (CMFNLPWLC)、並びに CXFXLPWC という共通配列を持つ C2 (CSFKHLPWC), C8 (CPFHLPWC), C11 (CPFQYLPWC), C14 (CPFQFLPWC)、C26 (CPFSELPWC) であった。これらを以下に Type I, II とそれぞれ分類した。

4) sLy49A とファージクローンの結合に対する抗 Ly49A 抗体による阻害

上記で得られたペプチドは Type I, II いずれも類似の配列を持っていたことから、Ly49A 上の同一部位に結合するか否かについて、sLy49A とファージクローンの結合に対する抗 Ly49A 抗体による影響について比較した。用いた抗体は抗 Ly49A 抗体である A1, JR9, YE1/32, YE1/48 の 4 種類である。Type I のクローン C19 は抗 Ly49A 抗体 A1 によってほぼ完全に結合が阻害されるのに対して、YE1/32 では 45%、JR9 で 30%、YE1/48 で 10% まで阻害された。C1, C21 も同様であった。一方、Type II のクローン C14 は、抗 Ly49A 抗体 A1 では 40% 程度にしか阻害されず、JR9, YE1/32, YE1/48 ではほぼ 20% まで阻害された。他の C2, 8, 11, 26 のクローンも同様であった。これらの結果は、Type I, II のグループ内では同じエピトープに結合していること、しかしながら Type I と II では異なる部位に結合していることが予想された。また Ly49A を強制発現させた C1498 細胞に対する個々のファージクローンの結合を FACS を用いて調べた。この結果に関しても Type I, II 同士では同様の結果を示し、Type I では比較的結合数が少ないのに対して、Type II ではかなり強く結合することが判った。

5) Ly49D とファージクローンの結合特異性

Type I のクローンおよび Type II クローン C8, C11 はいずれも Ly49A に特異的であったのに対し、Type II クローンのうち C2, C14, C26 は Ly49G2 にも結合することが示された。特に C2 は Ly49A より Ly49G2 により強く結合した。

6) 可溶性ヒト NK 細胞受容体 CD94/NKG2A の作成とこれに結合するファージクローンのバイオパニング

CD94/NKG2A に特異的に結合するクローンは 36 クローン中 16 あり、CHLPFARLC (CNBP1) が 14, CHLPFKRLC (CNBP2) が 1, CHLPFLRLC (CNBP3) が 1 クローン、それぞれ得られた。これらは 6 番目のアミノ酸残基以外は全て同じであった。

7) CD94/NKG2A 結合性ファージクローンの特異性

得られた 3 種類のファージクローンに関して、その結合特異性を調べた。まず、CD94/NKG2A あるいは CD94 dimer との結合を調べたところ、いずれも CD94/NKG2A に特異的であり CD94 dimer には結合しなかった。また、これらの結合は、いずれも抗 NKG2A 抗体でほぼ完全に阻害されたのに対し、抗 CD94 抗体では全く阻害されなかった。

8) 我々はまず、ヒト脳の均一化ライブラリー中からでのコロニンホモログの単離に成功し、ClipinC (クリッピン: Colonin-like-protein から由来) と我々は命名した。この分子の単離・クローニング過程で、ヒトではコロニン類縁分子は少なくとも 4 つあり、血球系に特異的なものをクリッピン A、我々がまず単離した神経系特異的な分子をクリッピン C、それ以外の組織に発現が認められるものをクリッピン B, D と呼んだ。これらは抗体を用いた解析、in situ ハイブリダイゼーションから、それぞれが組織特異的に住み分けた発現をしていることを昨年明らかにした。昨年末になって、別の研究グループから新規ファミリー分子がヒトから単離され、COL01C と呼ばれている。我々は、この結果も踏まえて、さらに新規分子をヒト・マウスから検索し、6 番目の新規分子クリッピン E を同定した。ヒトゲノムプロジェクトによる現在までの解析結果、EST 解析データベース検索からは、我々はこれが哺乳類クリッピン・コロニンファミリーの最後の分子であると結論づけている。クリッピン E は、興味深いことに今までのファミリー分子群とは異なり、オルタネーティブスプライシングによるバリエーションが 3 種類存在することが解った。これら分子は細胞内では、細胞膜-細胞骨格の制御因子として実際に細胞骨格上、細胞-基質間接着部位に局在していることが、免疫化学、分子発現実験から明らかになっている。また、これら分子の機能解析を目的に特に神経系のクリッピン C 結合分子の同定を進め、細胞-基質間接着構造タンパク質ビンキュリンやパキシリンと、また、活性酸素産生を担う p40phox と結合していることが明らか

となった。p40phox は食細胞 NADPH オキシダーゼ活性化分子群であるが、これら NADPH オキシダーゼ分子群の神経系における発現は全く解っていない。そこで、p40phox をはじめとして p47, p67phox の発現を神経系で詳細に解析したところ、すべての分子が広範に神経にも発現していることが解った。これらの分子群は、第一次免疫応答反応のみならず、出芽酵母における類似分子の比較から細胞極性決定などにもアダプター分子として関わるということが示唆される。クリッピンは、細胞内骨格系とこれら分子群の広範な機能相関に重要な役割を果たすものと考えられる。

カエルでのコロニンの解析から、我々の分子群は細胞内情報伝達系において低分子量 G 蛋白質の下流に位置し機能していることが示唆されている。そこで、クリッピン C の細胞内強制発現、ドミナントアクティブ型低分子量 G 蛋白質群との共発現系による解析を進めた。クリッピンの単独発現では、細胞のラフリング膜形成を引き起こし、それは Rac と相関を持っていることが明らかとなった。結果、クリッピンは低分子量 G 蛋白質 Rac の下流に位置し、細胞骨格アクチンの制御をしていることが解った。クリッピンには直接 Rac の結合は見られなかったことから、すでに知られている p67phox と Rac の結合によるものと考え、コンプレックスの共沈実験を行った。Rac は p67phox と結合し、p40・p67phox は常にコンプレックスを形成しており、Rac のシグナルはこれらコンプレックスを介してクリッピンに伝わるということが示唆された。分子機能を探るにあたってその分子の発現抑制系は非常に大きな情報をもたらす。我々は、このクリッピンのアンチセンス法による発現抑制系の確立を進め、培養細胞において 70%程度の抑制に成功した。神経細胞においては、突起伸長の領域を失い、球形の形状に留まる細胞形態を示した。

4. 考察

1) コフィリン結合蛋白質関連

コフィリン結合タンパク質の探索において、T7 ファージ由来の human brain cDNA ライブラリーを用いてファージディスプレイ法を行ったところ、ヒトリボゾームタンパク質 L15、ヒトリボゾームタンパク質 S18 及び human synaptosomal-associated protein, 25kD (SNAP25) の 3 種類のタンパク質がコフィリンと特異的に結合することが判明した。

さらに、リコンビナントリボゾームタンパク質 (2 種) を作製し、リコンビナントコフィリンとの結合実験を行ったところ、リボゾームタンパク質 S18 については、コフィリンと結合する事が確認できた。

今後は、アクチンと結合させたコフィリンとリボゾームタンパク質 S18 との結合実験を行うことにより、コフィリンとの結合サイトがアクチンと同一か否かということも検討していきたいと考えている。

さらに、残りの 2 つのタンパク質 (リボゾームタンパク質 L15 及び human synaptosomal-associated protein, 25kD (SNAP25)) についてもコフィリンとの結合を確認することが重要であろう。

2) NK 受容体関連

今回、ヒトならびにマウス NK 細胞受容体の可溶型を大腸菌によって発現させることに成功した。これらを利用することによりビーズに固相化させパニングを行うことが可能になり、プレートなどに非特異的に吸着するファージを除外することでできたことから、スクリーニングに成功した。マウス NK 細胞受容体 Ly49A に結合するクローンは 7 クローンが得られたが、アミノ酸配列並びに 4 種の抗 Ly49A 抗体による阻害効果の違いから、これらのクローンがコードする環状ペプチドは CXF₂LPWLC, CXF₂LPWC という 2 種類に大別された。これらのペプチドがみな相同の配列を持っていることは意外であり、当初さまざまな種類のものが得られるものと考えていたのとは異なる結果であった。しかし、抗体の阻害スペクトルは両者で異なっており、配列が似ているからといって Ly49A 上の近傍に結合しているとは限らないことが示された。また、前者の配列を持つペプチドは同じリガンド (H-2Dd) を共有するレセプター Ly49G2 には結合せず、後者は Ly49G2 にも結合するものとししないものさらに 2 種類が存在したことも興味ある結果であった。これらは in vivo における NK 細胞活性化の制御を考えた場合に特に重要であり、異なる生理活性を示す可能性が十分に期待されるものである。合成ペプチドを用いた in vivo の効果については、さらに検討中である。

ヒト NK 細胞受容体 CD94/NKG2A に特異的に結合するファージクローンも、同様の方法によって単離することができた。このレセプターはヘテロ 2 量体であることもあり、その発現は難しく多くの試みを経て完成した苦心作である。これに関しても 3 種類のクローンが得られ相同の配列を持っていたこと、また CD94 ではなく NKG2A に結合していることは特筆すべきことである。

今回用いたファージライブラリーは 7mer のランダムペプチドの両端にシステインを含むもののほかに、直鎖状の 7mer, 12mer のものも同様にスクリーニングに用いた。これらのライブラリーからはマウス及びヒトの系で 12mer のペプチドクローンがそれぞれ一つ得られた。マウスの系で得られたペプチドはレセプターへの結合が弱いせいか、細胞への結合を FACS によって見るができなかった。一方、ヒトの系で得られたペプチドは、環状ペプチドに保存されていたアミノ酸配列をその中に持っており、異なるライブラリーから類似のペプチドが得られた点で注目に値する。短いペプチドはさまざまな構造を取り

やすく、それゆえ強い親和性を持つものを得にくいと考えられているが、シスチンで環を巻いた堅い構造のペプチドライブラリーの方が効率よくスクリーニングが可能であった点はこれを裏付けるものであった。

3) クリッピン (コロン) 関連

クリッピンファミリーは細胞骨格系制御、細胞接着等に細胞膜直下での多くの制御タンパク質と密接な関わりを持ちながら広範な重要な働きを持つ分子であることが想定される。また、それは今まで明らかではなかった別の新たなシステムを細胞内で果たしている分子である。これら分子群の解析を通して、白血球・神経系機能にとどまらない食食機能や走化性、細胞接着の細胞機能解析につながるものと考えられる。さらに、第一次免疫応答反応・食食機能に関わる p40phox などの NADPH オキシダーゼ活性化分子群はアダプター分子群として、細胞内情報伝達系の低分子量 G タンパク質 Rac や Phosphoinositide 等とも結合して、血球細胞に留まらない、細胞のさらに普遍的な機能や極性形成にも関与することが示唆される。クリッピン分子は、そのアンチセンス法による解析からも、単なる骨格制御だけでなく突起伸長部の極性決定に寄与していることが示唆された。クリッピンは低分子量 G 蛋白質 Rac の制御を受けつつ、細胞内骨格系と細胞極性決定機構の仲立ちをする分子としても機能し、それはまた phox 分子群の新しい細胞内機能に迫るものと考えている。アンチセンス法はまた、これらの知見に大きな糸口を見つけだす有用な方法であることも明らかとなった。

5. まとめ

コフィリン結合タンパク質の探索において、T7 フェージ由来の human brain cDNA ライブラリーを用いてフェージディスプレイ法を行ったところ、ヒトリボゾームタンパク質 L15、ヒトリボゾームタンパク質 S18 及び human synaptosomal-associated protein, 25kD (SNAP25) の 3 種類のタンパク質がコフィリンと特異的に結合することが判明した。

さらに、リコンビナントリボゾームタンパク質 (2 種) を作製し、リコンビナントコフィリンとの結合実験を行ったところ、リボゾームタンパク質 S18 については、コフィリンと結合する事が確認できた。

今後は、アクチンと結合させたコフィリンとリボゾームタンパク質 S18 との結合実験を行うことにより、コフィリンとの結合サイトがアクチンと同一か否かということも検討していきたいと考えている。

さらに、残りの 2 つのタンパク質 (リボゾームタンパク質 L15 及び human synaptosomal-associated protein, 25kD (SNAP25)) についてもコフィリンとの結合を確認することが重要である。

M13 フェージディスプレイペプチドライブラリーから、パニングによりマウス NK レセプター Ly49A 並びにヒト NK レセプター CD94/NKG2A に特異的に結合するフェージクローンを取得した。得られた種々のペプチドのアミノ酸配列にそれぞれ相同性が見られたことは、これらレセプターにも外側からアプローチしやすい部位とそうでない部位が存在することを示唆している。これらの部位が実際に細胞間認識に関わる部位 (リガンドである MHC 分子の結合部位など) と同一なのか否かについて検討する必要がある。これらのペプチドを実際に化学合成し、目的として掲げた NK 細胞の細胞障害活性に対してどのような効果があるかについては、今後更に詳細に検討して行く必要がある。また、ペプチド側の修飾 (多量体化、親水基の導入など) やさらにこれら共通の配列を保存し他のアミノ酸残基にランダム化するなどの試み、またペプチドの長さをより長いものにしたライブラリーのスクリーニングにより、さらに結合の強いもの、他の NK レセプターファミリーに対する特異性に違い (交差する、しない) を示すようなペプチドの更なるスクリーニングが必要である。今回検討したさまざまな実験的手法から得られたノウハウは、今後のアプローチをして行く上で大きな前進であり、必ずやこれらの目標を達成することを確信させるものである。

さらに、活性酸素産生や食食・走化性・接着といった機能に関わる新規機能タンパク質クリッピン分子群を同定した。疾患の人為的制御を可能にする基礎的な知見を蓄積できたと考えている。

6. 研究発表

1. Matsui, S., Adachi, R., Kusui, K., Yamaguchi, T., Kasahara, T., Hayakawa, T., Suzuki, K.: U73122 inhibits the dephosphorylation and translocation of cofilin in activated macrophage-like U937 cells. *Cell. Signalling* 13, 17-22 (2001)
2. Adachi, R., Matsui, S., Kinoshita, M., Nagaishi, K., Sasaki, H., Kasahara, T., Suzuki, K.: Nitric oxide induces chemotaxis of neutrophil-like HL60 cells and translocation of cofilin to plasma membranes *Int. J. Immunopharmacol.* 22, 855-864 (2000)
3. 安達玲子、楠井 薫、鈴木和博: 食細胞の機能発現におけるコフィリンの役割 炎症、20, 667-674 (2000)

4. K. Yamamoto, I. N. Maruyama, T. Osawa. : Cyborg lectins: Novel leguminous lectins having unique specificities. *J. Biochem.* 127, 137-142 (2000)
5. K. Yamamoto, Y. Konami, T. Osawa. : Chimeric lectin of *Bauhinia purpurea* lectin and *Lens culinaris* lectin recognizes unique carbohydrate structure. *J. Biochem.* 127, 129-135 (2000)
6. S. Torii, K. Yamane, T. Mashima, N. Haga, K. Yamamoto, J. W. Fox, M. Naito, T. Tsuruo. : Molecular cloning and functional analysis of Apoxin I, a snake venom derived apoptosis-inducing factor with L-amino acid oxidase activity. *Biochemistry* 39, 3197-3205 (2000)
7. S. Iida, H. Takeuchi, K. Kato, K. Yamamoto, T. Irimura. : Order and maximum incorporation of N-acetylgalactosamine into threonine residues of MUC2 core peptide with microsome fraction of human colon carcinoma LS174T cells. *Biochem. J.* 347, 535-542 (2000)
8. T. Kimura, T. Hosoi, K. Yamamoto, N. Suzuki, Y. Imai, T. Irimura. : Epitope mapping of monoclonal antibodies specific for macrophage lectin: a calcium-dependent epitope is in the carbohydrate recognition domain. *Mol. Immunol.* 37, 151-160 (2000)
9. N. Matsumoto, M. Mitsuki, K. Tajima, W. M. Yokoyama, K. Yamamoto. : The functional binding site for the c-type lectin-like NK cell receptor Ly49A spans three domains of its MHC class I ligand. *J. Exp. Med.* 193, 147-157 (2001)
10. N. Matsumoto, M. Mitsuki, K. Tajima, W. M. Yokoyama, K. Yamamoto. : The c-type lectin-like NK cell receptor Ly49A recognizes surface of MHC class I ligand composed of three domains. *Int. Immunol.* 13(5) in press (2001)
11. N. Matsumoto, W. M. Yokoyama, S. Kojima, K. Yamamoto. : The NK cell MHC class I receptor Ly49A detects mutations on H-2Dd inside and outside of the peptide binding groove. *J. Immunol.* 166(3) in press. (2001)
12. R. Tozawa, S. Ishibashi, J. Osuga, K. Yamamoto, H. Yagyu, K. Ohashi, Y. Tamura, N. Yahagi, Y. Iizuka, H. Okazaki, K. Harada, T. Gotoda, H. Shimano, S. Kimura, R. Nagai, N. Yamada. : Asialoglycoprotein receptor deficiency in mice lacking the major receptor subunit: Obligate requirement of HL-1 for the stable expression of oligomeric receptor. *J. Biol. Chem.* 276 in press (2001)
13. N. Matsumoto, M. Mitsuki, K. Tajima, W. M. Yokoyama, K. Yamamoto. : Identification of the functional recognition site on MHC class I for a NK cell lectin-like receptor. *CREST symposium proceeding.* in press. (2001)
14. K. Yamamoto, T. Tsuji, T. Osawa. : Affinity chromatography of oligosaccharides and glycopeptides with immobilized lectins. *Molecular Biotechnol.* in press (2001)
15. Takeuchi, K., Takezoe, H., Nakamura, T., Mori, N. and Takahashi, N. (2001)
Developmental expression and function of Clipin C/Colonin-B2 in fetal mouse brain. *Brain Res.* (in press)
16. Fujimori, K.E., Takeuchi, K., Yazaki, T., Uemura, K., Noijyo, Y. and Tamamaki, N.
Expression of L1 and Tag-1 in the corticospinal, callosal, and hippocampal commissural neurons in the developing rat telencephalon as revealed by retrograde and in situ hybridization double labelling. *J. Comp. Neuro.*, 417: 275-288 (2000)
17. Kasahara, K., Watanabe, K., Takeuchi, K., Kaneko, H., Oohira, A. and Sanai, Y.
Involvement of gangliosides in glycosylphosphatidylinositol-anchored neuronal cell adhesion molecule Tag-1 signaling in lipid rafts. *J. Biol. Chem.*, 275:34701-34709 (2000)

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

