

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2分野

生体機能調節等の解明に関する研究

目 次

文献No	課題番号			
20000937A	21008	血管壁細胞の抗血栓性機能の制御機構の解明と新規抗血栓薬の開発	加藤 久雄	1
938A	21019	組織内脂肪蓄積の予防及びGLUT4の発現増加を目指したインスリン抵抗性治療法の研究	江崎 治	14
939A	21045	慢性呼吸器疾患の発症機構の解明と医療への応用	斎藤 博久	18
940A	21052	閉経後骨粗鬆症の発症機構の解明とその予防と治療薬に関する研究	宮浦 千里	25
942A	21067	細菌感染に關与する病原遺伝子の発現機構の解明とその制御法の開発	渡辺 治雄	33
943A	21073	脳循環障害による神経細胞死の発症機序の解析と治療法の開発	内村 英幸	38
944A	21079	疾患モデルマウスを用いたβ-ガラクトシドシスの病態解析と治療への応用	松田潤一郎	46
945A	21081	精神疾患の分子メカニズムの解明と新しい診断・治療法の開発への応用	西川 徹	53
946A	21086	新しい生体防御調節物質の機能と作用の解析	鈴木 和男	60
948A	21089	感染症が誘発する自己免疫疾患病態の解明とその医療への応用に関する研究	大川原明子	68
949A	21092	生体膜脂質を介する細胞機能調節機構の解明とその医療への応用	西島 正弘	80
950A	21096	免疫・内分泌系による神経系の障害機構の解明とその制御	田平 武	88
951A	21102	移植免疫寛容とマイクロキメリズムに関する基礎的研究	木村 廣光	92
952A	21104	G蛋白質共役型受容体の個体レベルでのゲノム機能評価	辻本 豪三	98
953A	21107	難治性腎疾患の病態解明と医療への応用に関する研究	藤本純一郎	111
954A	21110	食細胞による感染防御機構の解明と医療への応用	綱脇 祥子	118
955A	21121	抗酸化機能調節に及ぼす運動と栄養の影響に関する研究	樋口 満	126
956A	21130	神経変性疾患における神経細胞死の分子機構の解析	桃井 隆	134
957A	21142	C型肝炎ウイルスに対するインターフェロン(IFN)の治療効果を増強する新薬の開発研究	小長谷昌功	144
958A	21150	グリア細胞の機能調節による神経疾患治療法の開発	高坂 新一	149
959A	21166	新規破骨細胞形成抑制因子(OCIF)とそのリガンドである破骨細胞分化因子(ODF)の生理的役割の解明と医療への応用	高橋 直之	160
960A	21177	コレステロール代謝・動脈硬化関連遺伝子の発現調節因子の検索	松本 明世	167
961A	21179	血圧調節物質・動脈硬化起因物質などに関する分子生物学的、生化学的研究	南野 直人	178
964A	21215	アトピー性皮膚炎自然発症(NC)マウスを用いた皮膚搔痒症の発症機序の解明と新規治療薬の創製	廣田 直美	183
965A	21224	ヒト血液細胞情報伝達の解明とオリゴヌクレオチドを用いた治療法の開発	湯尾 明	193
966A	21225	癌化とウイルス感染を制御する細胞内情報伝達分子を標的とする薬剤の探索	松田 道行	200

20000969A	21228	細胞内シグナル伝達の解明による創薬シーズの探索	上原 至雅	……	204
968A	21234	スフィンゴ脂質の情報伝達の研究と抗血栓症薬開発	望月 直樹	……	208
969A	21279	中枢神経系におけるATP受容体の機能の解析と医療への応用	井上 和秀	……	213
941A	22055	宿主の防御機能動態と感染機構の解明と医療への応用	高津 聖志	……	221
949A	22088	ビタミンE欠乏性脊髄小脳失調症の病態解明と治療法の確立に関する研究	水澤 英洋	……	228
962A	22183	炎症・アレルギー性疾患の発症機構の解明と医療への応用	清水 孝雄	……	233
963A	22194	コレステロール代謝を標的とした抗動脈硬化薬開発のための基盤研究	新井 洋由	……	237

宿主の防御機能動態と感染機構の解明と医療への応用

所属 東京大学医科学研究所
研究者 高津 聖志

分担研究者

(社)北里研究所 菊池 雄士

要 旨

結核菌由来 α 抗原ペプチド刺激により、 $CD4^+$ T細胞依存的な $CD8^+$ T細胞の生成と $IFN-\gamma$ の産生が認められた。エピトープ部位の変異で異なるMHC拘束Th1 応答を誘導できた。サルモネラ由来SpvBが宿主細胞のアクチンの脱重合とアポトーシスを誘導することを示した。

1. 研究目的

体内に浸襲する病原性微生物に対する生体防御機構は宿主の免疫応答と病原性微生物の固有の抗原、病原性因子の機能を結びつけて理解する必要がある。本研究は細胞内寄生菌の結核菌とサルモネラ (*Salmonella typhimurium*、ネズミチフス菌) に焦点を当て細菌感染症の制御法の開発を目的とした。本研究課題ではこれまでに結核菌蛋白抗原 α 抗原 (Ag85B, MPT59) のT細胞抗原エピトープが240-254番目の領域 (p240-254: Peptide-25) にあり、応答する $CD4$ 陽性T細胞の50%以上が $\nu\beta 11$ を発現しているTh1細胞であることを報告した。本年度は、BCGやヒト型結核菌H37Rv感染に対するより強い防御免疫の誘導の為に基礎的実験とTh1応答の誘導機構を細胞レベル、分子レベルで解明するためにpeptide-25を認識するT細胞の産生するサイトカインの解析、peptide-25の $CD8$ 陽性T細胞に対する作用の解析とpeptide-25のアミノ酸置換により異なるMHCを有する系統のマウスにも抗原性を発揮するかどうかの検討を行った。

*Salmonella Typhimurium*をはじめとする多くの非チフス性サルモネラは全身感染を惹起するのに重要な遺伝子群を含む巨大なビルレンスプラスミドを保持している。このプラスミドの大きさは血清型により異なるが、約 8 kb にわたる *spvR*、および *spvABCD* オペロンからなるビルレンス関連遺伝子群 (*Salmonella Plasmid Virulence ; spv*) は血清型に関わらず共通に存在している。これらの各 *spv* 遺伝子はサルモネラの宿主への感染過程において、主にサルモネラが腸管上皮細胞から侵入後のリンパ組織、および網内系組織におけるマクロファージ内での菌の増殖に関与することが報告されているが、サルモネラの病原性に*spvABCD* がどのような機能的役割を果たしているかについての知見はない。そこで、本研究ではサルモネラ感染症の制御法の開発を目的とし *in vivo* および *in vitro* における Spv 蛋白の宿主細胞に及ぼす影響について解析した。

2. 研究方法

(1) 結核菌由来抗原による感染防御機構の解析

免疫・細胞培養：C57BL/6マウス腰背部にPeptide-25 (1 μ g) と不完全フロイントアジュバント(ICFA)の懸濁液を皮下免疫し、7日後の鼠径部リンパ節細胞をPeptide-25 と共に3日間培養した。また、I-A^kおよびI-A^d結合モチーフを持つ変異 Peptide-25 をC3H/HeまたはBALB/cマウス腰背部にそれぞれICFAの懸濁液として皮下免疫し、3-4週後に2次免疫をおこなった。最終の免疫の7日後に鼠径部リンパ節細胞をそれぞれの変異 Peptide-25 と共に培養した。細胞の増殖応答は3日間培養終了前8時間の³H]チミジンの取り込みにより測定した。細胞の産生した培養上清中の $IFN-\gamma$ はELISA法により測定した。一部の実験では、 $CD4^+$ T細胞または $CD8^+$ T細胞を除去するため抗 $CD4$ 抗体 (GK1.5) または抗 $CD8$ 抗体 (53.6.72) および磁気ビーズによる細胞分離を行った。精製後の $CD4^+$ T細胞または $CD8^+$ T細胞の残存率はそれぞれ1.0%以下だった。

フローサイトメトリーによるサイトカイン産生細胞の検索：Peptide-25または変異Peptide-25 を免疫したマウスの鼠径リンパ節細胞をPeptide-25または変異Peptide-25 で4日間刺激した。個々のT細胞の細胞質内で産生されたサイトカインをゴルジ体に貯留させて検出しやすくするために最終の4時間GolgiStopを加えて培養し

た。細胞を回収後よく洗浄し、FITC標識したT細胞マーカーで細胞膜表面を染色し、同時に死細胞と生細胞を区別するために7-アミノ-アクチノマイシンD (7AAD 2 µg/ml)を加えて死細胞を染色した。細胞を洗浄後、4%パラホルムアルデヒド液で固定した。細胞膜に穴をあけるために0.1%サポニンを含んだ洗浄液で洗浄し、PE標識した抗サイトカイン抗体で細胞質内のサイトカインを染色してFACSCaliburで解析した。

Peptide-25反応性TCRの解析：Peptide-25反応性Vβ11陽性マウスT細胞クローンBP1よりTCRα鎖及びβ鎖を5'-RACE法を用いて単離し全長の塩基配列を解析した。さらにBP1以外のPeptide-25反応性Vβ11陽性T細胞クローン5種のTCRα鎖及びβ鎖の塩基配列をBP1のTCRα鎖及びβ鎖の配列を元にRT-PCR法を用いて解析した。

(2) サルモネラ感染実験と病態の解析

菌株および菌液の調整とマウス感染実験：野生株として *S. Typhimurium* SH100 (ATCC14028s ナリジクス酸耐性)を用いた。また、その各 *spv* 遺伝子の in-frame 欠失による非極性変異株 ($\Delta spvR$, $\Delta spvA$, $\Delta spvB$, $\Delta spvC$, $\Delta spvD$ 変異株)は、後藤英夫博士(北里大学薬学部)より供与いただいた。対数増殖期にある菌液を集菌した後、0.01%のゼラチンを含むリン酸緩衝生理食塩水 (phosphate buffered saline; PBS)(BSG)で投与菌液を調整した。マウス感染実験にはBALB/cメス7週齢(日本チャールズ・リバー)を用いた。マウスは6時間以上絶水絶食させた後、10%炭酸水素ナトリウム50µlを経口投与し、15分後に調節した菌液20 µl ($2-3 \times 10^8$ CFU)を経口投与した。

リコンビナントSpvB蛋白の機能解析：全長およびC末端側のADPRTの活性に必要とされている6個のドメイン構造のうち5個を欠失したC末端変異型SpvB(アミノ酸1-475番目)蛋白はGlutathione-S-transferase (GST)との融合蛋白として大腸菌で発現させ、Glutathione Sepharose4Bを用いて精製した。動物細胞での発現にはpCAGGSベクター(大阪大学医学部、宮崎純一博士より供与)を用い、Cos-7細胞にエレクトロポレーション法により遺伝子導入し、細胞の形態を光学顕微鏡で観察した。

spvB 導入細胞におけるアポトーシスの検出(TUNEL法)：各 *spvB* 導入細胞をPBSで洗浄し、スライドグラス上に貼り付け、*In Situ*細胞死検出キット(Roche)を用いて検出した。

アクチンフィラメントの染色：SpvB導入細胞をスライドグラス上に貼り付け4%パラホルムアルデヒドで固定した後、0.2%のTriton X-100を含むPBSを滴下し、室温で2分間インキュベートした。洗浄後、FITC標識あるいはAlexa594標識Phalloidinで染色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

ADP-ribosylation assay：GST融合SpvB蛋白およびそのC末端欠失変異型SpvBと質基(Cos-7細胞のlysate、あるいはウサギ骨格筋由来G-アクチン(α -アクチン)およびヒト血小板由来アクチン(β/γ -アクチン)を $[^{32}P]$ 標識ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド($[^{32}P]$ NAD)存在下、37°Cで1時間反応させた。反応終了後、StrataClean Resin (STRATAGENE)で蛋白を濃縮し、SDS-PAGEで展開後のゲルを乾燥後、パイオイメージングアナライザーでADP-ribosyl化された蛋白を検出した。

3. 研究成果

(1) 結核菌由来抗原による感染防御機構の解析

i) 結核菌に対する防御免疫の誘導にはCD4⁺T細胞だけでなくCD8⁺T細胞も重要な役割を果たしているという報告が近年増えてきている。そこでPeptide-25をICFAとともに皮下免疫したC57BL/6マウスのリンパ節細胞をPeptide-25と共に培養し個々のT細胞が産生するサイトカインを細胞内染色法により調べ、CD4⁺T細胞だけでなく、CD8⁺T細胞もIFN- γ を産生するか検討した。培養4日目にはCD4⁺T細胞だけでなく、CD8⁺T細胞によるIFN- γ の産生が確認されVβ11⁺CD8⁺T細胞でもIFN- γ 産生が認められた。Peptide-25の刺激によって生成してくるCD8⁺T細胞がMHC class I拘束性かMHC class II拘束性か調べるために、4日間培養中抗MHC class I抗体または抗MHC class II抗体存在下に培養してMHC拘束性を調べた。その結果、Peptide-25の刺激によるIFN- γ 産生CD8⁺T細胞の増殖は抗I-A^b抗体で阻止され、抗H-2D^b抗体では阻止されなかった。これらの結果からPeptide-25の刺激によってCD4⁺T細胞だけでなくCD8⁺T細胞も増殖しIFN- γ を産生する事が明らかとなった。CD8⁺T除去細胞群はPeptide-25の刺激に増殖応答を示したが、CD4⁺T除去細胞群は全く応答を示さなかった。CD4⁺T除去細胞群にCD8⁺T除去細胞群を加えるとCD8⁺T細胞も増殖しIFN- γ 産生も観察された。この結果からCD8⁺T細胞の生成にはCD4⁺T細胞が必要である事がわかった。

ii) Peptide-25のI-A^b結合部位のアミノ酸を置換した変異ペプチド247V (FQDAYNAVGGHNAVVF)、247V249A (FQDAYNAVGAHBAVF)、Peptide-25の247-249番目のアミノ酸残基をI-A^d分子との結合モチーフのアミノ酸に

置換した変異Peptide-25、1432 (FQDAYNAVHAHNAVF)、247-251番目のアミノ酸残基をI-A^d分子との結合モチーフのアミノ酸に置換した変異Peptide-25、1431 (FQDAYNAVHAAHAVF)をそれぞれ合成した。これらの変異ペプチド (2 µg/ml) をICFAと共にBALB/cおよびC57BL/6マウスにそれぞれ皮下免疫し、4-5週後に2次免疫 (40 µg/ml)した。さらに試験管内で再刺激 (1 µg/ml)して3日後にトリチウムチミジンの取込みを調べた。FACS解析による細胞内サイトカインの産生は培養4日後に調べた。C57BL/6マウスリンパ節細胞はこれらの変異ペプチドに対してTh1型の増殖応答を示した。本来Peptide-25には応答しないBALB/cマウスリンパ節細胞は1431 (FQDAYNAVHAAHAVF)にのみ増殖応答を示し、INF-γおよびTNF-αを産生したがIL-4とIL-5は産生しないTh1型の応答を示した (図1)。

(2) サルモネラ感染実験と病態の解析

i) *S. Typhimurium* の各 *spv* 遺伝子のうち、どの遺伝子が病原性に関与しているのかを解析する目的で、7週齢のBALB/cマウスに *S. Typhimurium* ATCC 14028s ナリジクス酸耐性株のSH100 (野生株)、およびその各 *spv* 遺伝子の非極性変異株を経口的に接種し、マウスの生存率を27日間にわたり観察した。実際に投与した菌数は、マウス1匹当たり野生株および *spvR*、*spvA* 欠失変異株は 5×10^5 CFU、*spvB*、*spvC*、*spvD* 欠失変異株は 4×10^5 CFU であった。その結果、野生株 (SH100) 接種群が感染15日目までに全マウスが死亡したのに対し、*spvR* 欠失変異株および *spvB* 欠失変異株接種群は感染27日目においても100%の生存率を示した。その他の *spvA*、*spvC*、*spvD* の各欠失変異株接種群の生存率は0~20%であった。これらの結果から、*spvB* がマウスに対する本菌の病原性に深く関与していることが示唆された。

ii) SpvBをGlutathione-S-transferase (GST)との融合蛋白として大腸菌に発現させ、精製SpvB蛋白のADPRT活性を測定したところ、SpvBが基質として用いた細胞の可溶性画分の約40kDaの蛋白をADP-ribosyl化することがわかった。SpvBによりADP-ribosyl化される蛋白の解析を行ったところ、β/γ-アクチンが効率よくADP-ribosyl化されることが明かとなった。また、C末端欠失変異型SpvB (aal-475)はADPRT活性を消失していることが確認できた。

iii) クローン化*spvB*遺伝子をmammalian発現ベクターのβアクチンプロモーターに連結し、付着性上皮細胞であるCos-7細胞に遺伝子導入した。いずれの細胞においても培養24~48時間後までに約50%の細胞が円形化、剥離し、培養液中に浮遊した。Western blot法による解析の結果、剥離した細胞は付着細胞に比べ、SpvB蛋白の発現量が多いことがわかった。また、剥離細胞では細胞骨格繊維であるアクチンの著明な破壊 (脱重合) とアポトーシス細胞が著しく増加していることが観察された。一方、ベクターのみあるいはSpvBのC末端欠失によりADPRT活性を喪失したSpvB (aal-475)を導入した細胞では、これらの細胞変化はまったく見られなかった。精製SpvB蛋白をマイクロインジェクション法により、NIH3T3細胞に導入した場合も同様に細胞の円形化と細胞内のアクチン繊維が顕著に破壊されているのが観察された (図2)。

4. 考察

これ迄の我々の解析で、C57BL/6マウスのヒト型結核菌に対する防御免疫はPeptide-25でも誘導できるがBCG生菌に比べ弱い事がわかった。Peptide-25によって生成してくるCD8⁺T細胞はCD4⁺T細胞依存性であり増殖の程度も弱かった。CD4⁺T細胞をより強力に誘導できるような免疫アジュバントを使用する事によってCD8⁺T細胞の増殖も促進され、C57BL/6マウスのヒト型結核菌に対する防御免疫を強くする事ができると考えられる。Peptide-25の置換ペプチドである244D247Vや1431によってC3H/HeNやBALB/cマウスにそれぞれ免疫ペプチド特異的なTh1応答を誘導できたが、その程度はPeptide-25のC57BL/6マウスに対するものよりも弱かった。Th2応答を誘導しやすいといわれているBALB/cマウスにもTh1応答を誘導できるペプチドを見出す事が出来た。今後はPeptide-25やその変異ペプチドに対しさらに強いTh1応答の誘導を可能にするためにCpGや他のアジュバントの有用性の検討、Peptide-25の修飾法の開発、Th1応答の選択的誘導機構の解明とTh1応答を誘導するワクチン開発を目指したい。また、抗原ペプチドがTh1、Th2細胞への分化方向を規定するという報告はほとんどなく、Peptide-25による選択的Th1分化及び活性化誘導の機序を解明することは新たなTh1、Th2分化調節機構を見出せる可能性を示唆している。現在、Vα5-Vβ11TCRトランスジェニックマウスの作成を行っており、今後そのマウスを用いTh1分化誘導機構の解析をおこなっていく予定である。

古くから非チフス性サルモネラの有するビルレンスプラスミド上に共通して存在する*spv*遺伝子はサルモネラの病原性に関与していることが報告されていたが、Spv蛋白の詳細な機能については未だ不明な点が多い。

S. Typhimurium 野生株と、その各spv遺伝子の非極性変異株を経口的に接種した本研究の結果から、本菌のマウスに対する致死性には spvB が深く関与していること、spvA、spvC、spvD は必ずしも病原性には必要ないことが示唆された。SpvB蛋白は、菌がストレス状態、すなわち *in vitro* においては増殖の定常期、*in vivo* においては栄養源（炭素源）の欠乏、低pH、鉄欠乏などいわゆる宿主細胞（マクロファージ）内に菌が侵入、あるいは貪食された状態の時に発現が開始される。SpvBは591個のアミノ酸からなる蛋白で、プロリンに富む領域（aa 366-374）を挟んでN末端側は食虫性の線虫の腸内に寄生している *Photobacterium luminescens* が産生する毒素の一つである TcaC のN末端側領域と47%の相同性を有している。また、C末端側領域はADP-ribosyltransferase（ADPRT）活性を有する細菌毒素に共通して存在する6つの β -sheetドメイン構造を有し、実際にADPRT活性を示す。今回の解析により、SpvBは *Clostridium botulinum* が産生するC2 toxin、*C. perfringens* が産生するiota toxin、*Bacillus cereus* が産生するVIP2などの細菌毒素と同様にアクチンをADP-ribosyl化することが明らかとなった。

遺伝子導入およびマイクロインジェクション実験により、SpvB蛋白が直接細胞に対する毒性を有し、宿主細胞の形態変化と細胞内のアクチンを破壊することが明らかとなった。感染細胞内のアクチンの重合は細胞内における membrane trafficking、食細胞におけるファゴリソソームの融合等に必要である。今回の結果からSpvBが細胞内のアクチンをADP-ribosyl化することにより宿主の免疫機構に影響を与え、感染を成立させている可能性が考えられる。spvBの導入により剥離した細胞ではアクチンが顕著に破壊されており、更にアポトーシスが誘導されているのはアクチンが破壊されている細胞であった。従って、細胞内で発現したSpvBの有する作用によりアクチンの脱重合とアポトーシスが共に起こっている可能性が示唆された。ADPRT活性部位を欠失したSpvB (aa1-475)を導入した細胞株ではベクターのみを導入した場合と同様に円形化、剥離した細胞は観察されず、アポトーシスおよびアクチンの脱重合も全く観察されなかったことから、SpvB蛋白の宿主細胞に対するアポトーシスの誘導およびアクチンの脱重合はSpvB蛋白の有するADP-ribosyltransferase活性に依存している可能性が示唆された。しかしながら、SpvB(aa1-475)は立体構造の変化を伴っていることも考えられる。今後は、ADPRT活性中心のアミノ酸変異体等を用いた解析とSpvBが細胞に対してアポトーシスを誘導する機構を分子レベルで詳しく解析し、更にADPRT活性との関連を解析する必要がある。

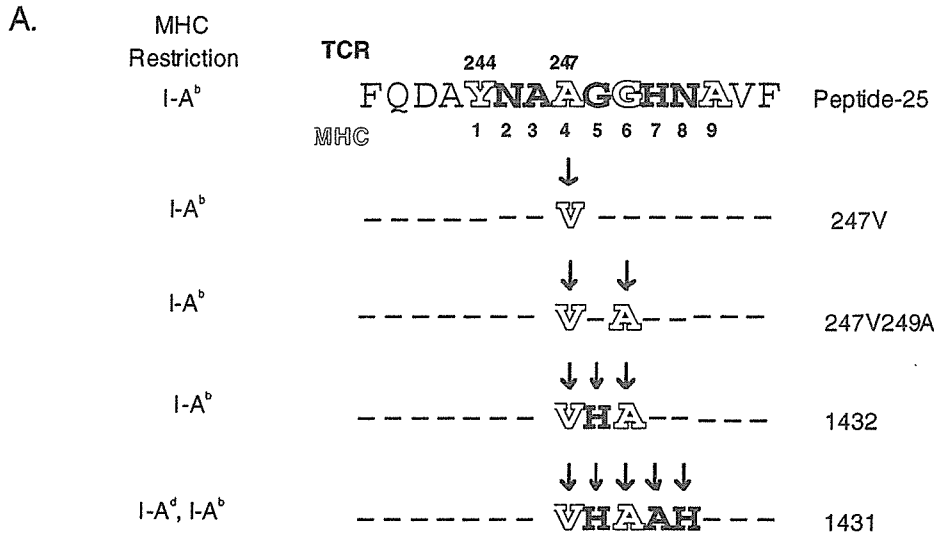
5. 結論

Peptide-25をICFAとともに皮下免疫したC57BL/6マウスのリンパ節細胞をPeptide-25と共に培養すると、CD4⁺T細胞だけでなく、CD8⁺T細胞によるIFN- γ の産生が確認されVB11⁺CD8⁺T細胞でもIFN- γ 産生が認められた。Peptide-25の刺激によるIFN- γ 産生CD8⁺T細胞の増殖は抗IA^b抗体で阻止され、抗H-2D^b抗体では阻止されなかったことからPeptide-25の刺激によってCD4⁺T細胞だけでなくCD8⁺T細胞も増殖しIFN- γ を産生する事が明らかとなり、生成してくるCD8⁺T細胞はclass-II拘束性であると考えられた。また、CD8⁺T細胞の生成にはCD4⁺T細胞が必要である事がわかった。結核菌に対する防御免疫の誘導にはCD4⁺T細胞だけでなくCD8⁺T細胞も重要な役割を果たしている可能性が示唆された。Peptide-25のIA^b結合部位のアミノ酸をIA^d分子との結合モチーフのアミノ酸に置換した変異Peptide-25, 1431をICFAと共にBALB/c皮下免疫したところ、本来Peptide-25には応答しないBALB/cマウスリンパ節細胞は増殖応答を示し、INF- γ およびTNF- α を産生したがIL-4とIL-5は産生しないTh1型の応答を示し、BALB/cマウスでもTh1応答を誘導できる変異Peptide-25を見出す事が出来た。

Salmonella Typhimurium の94 kb ビルレンスプラスミド上に存在するspvRABCD遺伝子群はサルモネラが全身感染を引き起こすために必要な遺伝子領域として知られている。今回、S. Typhimurium 野生株と、その各spv遺伝子の非極性変異株を経口的に接種した感染実験の結果から、本菌のマウスに対する致死性には spvB が深く関与していること、spvA、spvC、spvD は必ずしも病原性には必要ないことを明らかにした。また、精製SpvB蛋白が β/γ -アクチンをADP-ribosyl化することを示した。剥離細胞では細胞骨格繊維であるアクチンの著明な破壊（脱重合）とアポトーシス細胞が著しく増加していることが観察された。SpvBのC末端欠失によりADPRT活性を喪失した変異SpvBを導入した細胞では、これらの細胞変化はまったく見られなかったことから、SpvB蛋白の有するADPRT活性が宿主細胞に対してアクチンの脱重合およびアポトーシスの誘導に重要であることが強く示唆された。

6. 研究発表

- 1) Kagami, S., H. Nakajima, K. Kumano, K. Kotaro, K. Suzuki, A. Suto, K. Imada, H. W. Davey, Y. Saito, K. Takatsu, W. J. Leonard, and I. Iwamoto. Both Stat5a and Stat5b are required for antigen-induced eosinophil and T cell recruitment into the inflammatory tissue. *Blood*, 95: 1370-1377, 2000.
- 2) Tanaka H, N. Kawada, T. Yamada, K. Kawada, K. Takatsu, and H. Nagai. Allergen-induced airway inflammation and bronchial responsiveness in interleukin-5 receptor α chain deficient mice. *Clin. Exp. Allergy*, 30: 874-881, 2000.
- 3) Kikuchi, Y., M. Hirano, M. Seto, and K. Takatsu. Identification and characterization of a molecule, BAM11, that associates with the PH-domain of mouse Btk. *Int. Immunol.*, 12: 1397-1408, 2000.
- 4) Takaki, S., K. Sauer, B. M. Iritani, S. Chien, Y. Ebihara, K. Tsuji, K. Takatsu, and R. M. Perlmutter. Control of B cell production by the adaptor protein, Lnk, a negative regulator of tyrosine kinase. *Immunity*, 13: 599-609, 2000.
- 5) Matsui, H., Eguchi, M. and Kikuchi Y.: Use of confocal microscopy to detect *Salmonella typhimurium* within host cells associated with Spv-mediated intracellular proliferation. *Microb. Pathogen.*, 29:53-59, 2000
- 6) Shin, E. H., Y. Osada, H. Sagara, K. Takatsu, and S. Kojima. Involvement of complement and fibronectin in eosinophil-mediated damage to *Nippostrongylus brasiliensis* larvae. *Parasite Immunol.*, 23: 27-37, 2001.
- 7) Eguchi, M., Matsui, H. and Kikuchi Y.: Effect of Constitutively Expressed *phoP* gene on the localization of *Salmonella typhimurium* inside the Mac-1 positive phagocytes. *Microbiol. Immunol.*, 45:79-83, 2001
- 8) Kouro, T., K. Nagata, S. Takaki, S. Nisitani, M. Hirano, M. I. Wahl, O. N. Witte, H. Karasuyama, and K. Takatsu. Bruton's tyrosine kinase (Btk) is required for CD75b-mediated differentiation signal of pro-B to pre-B transition. *Int. Immunol.*, in press, 2001.
- 9) Takaki S., A. Yamada, F. B. Hayashi, K. Georgopoulos, R. M. Perlmutter, and K. Takatsu. Identification and characterization of a transcriptional regulator for the lck proximal promoter. *J. Biol. Chem.*, in press, 2001.



B.

Mouse strain	Peptide-25	247V	247V249A	1432	1431	None
BALB/c	1,580 ± 356	1,531 ± 25	1,934 ± 164	3,054 ± 127	15,334 ± 378	3,021 ± 237
C57BL/6	29,226 ± 2,726	28,822 ± 1,278	26,358 ± 2,028	ND	15,078 ± 944	3,971 ± 161

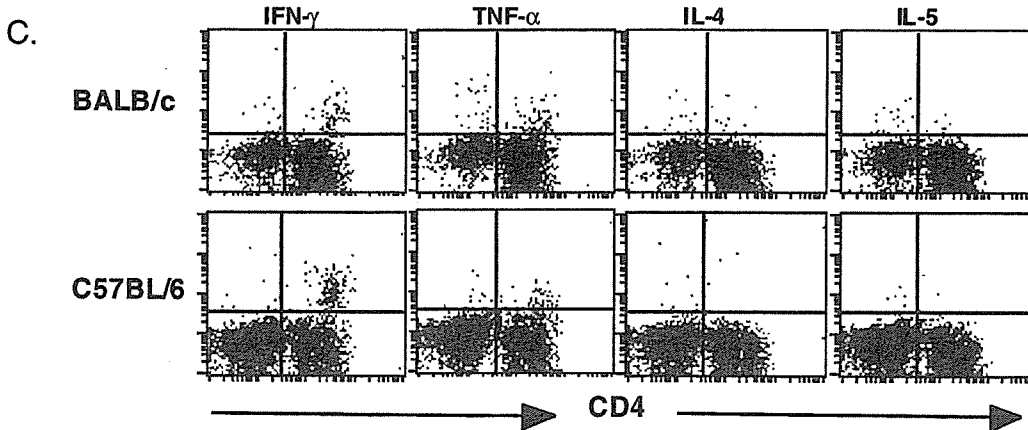
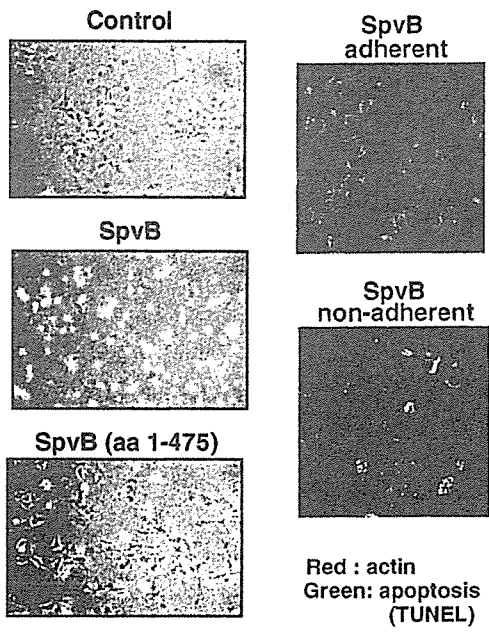


Figure 1: A) Peptide-25 and substitution mutants of Peptide-25. B) Lymph node cells from BALB/c or C57BL/6 mice which had been immunized with 2 µg of each peptide in incomplete Freund's adjuvant at the base of the tail and boosted 7 days before the experiments with 40 µg of each peptide were cultured with same peptide. After 3 days, proliferative response was determined by [3H]-thymidine incorporation. Results are expressed as mean [3H]-thymidine uptake ± SD. ND; Not determined. C) CD4⁺T cells in BALB/c and C57BL/6 mouse immunized with substitution mutant of Peptide-25, 1431 produce IFN-γ and TNF-α but not IL-4 and IL-5.

A. Transfection



B. Microinjection

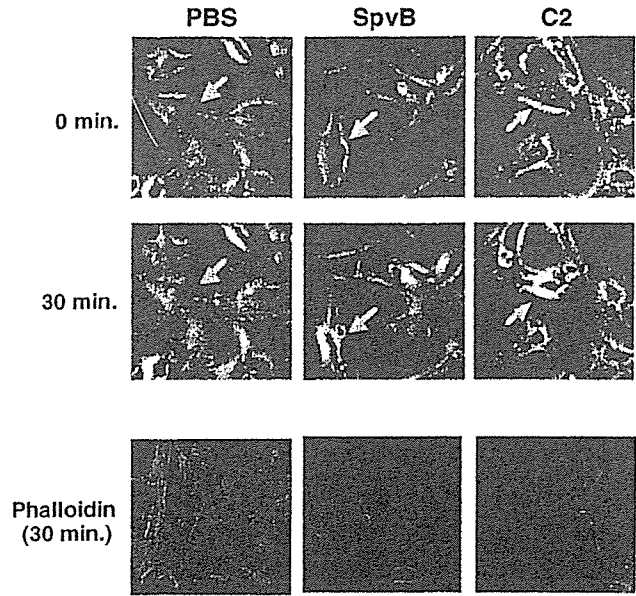


Figure 2 SpvB induces morphological changes, actin depolymerization and apoptosis in cultured epithelial cells

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2分野

生体機能調節等の解明に関する研究

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