

T細胞の活性化およびヘルパーT細胞サブセットの分化を特異的に制御する手法の樹立

所 属	(財) 東京都医学研究機構 東京都臨床医学総合研究所 免疫研究部門
研究者	宮武昌一郎

研究分担者

- | | |
|--|------|
| (1) 東京大学医科学研究所・染色体制御部門 | 新井賢一 |
| (2) (財) 東京都医学研究機構・東京都臨床医学総合研究所・細胞生物学研究部門 | 正井久雄 |
| (3) (株) 医学生物学研究所・研究開発部 | 玉井克之 |

要旨

免疫系で機能するふたつの転写因子 NFAT と GATA3 に着目し、相互作用する分子の同定、結合親和性の詳細な解析、結合阻害分子の設計・探索をおこない、特異性が高く副作用の少ない免疫抑制剤やヘルパーT細胞分化制御剤の開発をおこなう。

1. 研究目的

感染症に対する免疫応答により、病原体が排除されても、同時に様々な組織障害が引き起こされ、場合によっては自己免疫疾患が発症すると考えられている。アレルギー性疾患は、本来腸管などに寄生する細胞外寄生性病原体を排除する免疫応答系が、過敏になり、反応する必要がない抗原に対して免疫応答をおこしてしまうという病態機序が考えられている。したがって免疫抑制をおこなうことは、様々な疾患の病態をコントロールし症状を改善するために非常に重要である。免疫系の制御には多くの転写因子が関与しているため、免疫系で機能する転写因子の分子間相互作用を標的とした免疫系を制御する薬剤の開発を本研究課題の目的とする。

免疫抑制剤に、移植医療の実現にかかすことができないシクロスポリンとタクロリムス (FK506) がある。これらの薬剤は、その細胞質内結合蛋白質であるシクロフィリンおよび FKBP にそれぞれ結合し、さらにカルシウム/カルモジュリン依存性フォスファターゼ、カルシニューリンに結合し、その活性を抑制する。その結果カルシニューリンの重要な標的である転写因子 NFAT の脱リン酸化による活性化が抑制され、サイトカインなどの免疫制御遺伝子の発現の誘導が抑制され、免疫応答が抑制される。しかしこれらの薬剤は、長期間投与が必要な薬剤であるにもかかわらず、腎毒性、高血圧、神経毒性、癌罹患率の増大など、多くの副作用がある。副作用の原因の

ひとつとして、カルシニューリンの NFAT 以外の標的分子の関与が考えられる。またカルシニューリンにより制御される NFAT サブタイプは 4 種類あり、特定のサブタイプが関係する可能性もある。そこでカルシニューリンと NFAT ファミリーの相互作用を詳細に解析し、ハイスループットスクリーニングが可能な解析システムを用いて、NFAT に特異的な、さらには NFAT の各サブタイプに特異的な抑制分子の探索と開発をおこなう。

T ヘルパーサブセットである Th1/Th2 は、産生するサイトカインの作用により、異なる免疫応答を制御している。多くの細菌感染、ウイルス感染に対する生体防御においては、Th1 細胞が産生する IFN γ 、TNF α といった炎症性サイトカインが重要である。一方 Th2 細胞が産生するサイトカインは、寄生虫感染において生体防御系の中心になると考えられるが、アレルギー性疾患の重要な原因のひとつとして注目されている。我々は転写因子 GATA3 が、ナイーブ CD4 陽性 T 細胞から Th2 細胞への分化過程において、マスターレギュレーターとして機能していることを明らかにしてきた。そこで、GATA3 と相互作用する蛋白質群を同定し、これらの蛋白質の機能解析をおこない、GATA3 との相互作用を阻害することで、Th2 分化を阻害する化合物の探索、開発を試みる。また GATA3 の標的配列の解析をおこない、GATA3 と標的配列との相互作用を阻害する分子の探索、開発をおこなう。

2. 研究方法

1. NFAT ファミリーを標的とする薬剤の開発

a. 各 NFAT サブクラスとカルシニューリンの結合領域のマッピングおよび結合特性の解析

各 NFAT サブタイプのカルシニューリン結合領域全体あるいは一部を、N 末側に GST タグを、C 末側に His タグを融合した蛋白質として、大腸菌で量産し、それぞれのタグに対するアフィニティーカラムで高純度に精製する。カルシニューリン A および B サブユニットも量産し、リコンビナント蛋白質として精製しビオチン化する。純化したこれらの蛋白質を用い、増幅ルミネッセンス近接ホモジニアスアッセイ法（パーキンエルマー社アルファスクリーンシステム）を用いて、結合親和性を解析する。これは、励起光により一重項酸素を産生するドナービーズと、一重項酸素による化学発光により励起光とは別の波長の光を発生するアクセプタービーズを用いて、分子間相互作用を簡単に短時間で測定する装置である。このシステムを利用することにより、結合阻害活性を持つ物質のハイスループットスクリーニングも可能となる。このシステムを用いて、各 NFAT サブクラスのすべてのカルシニューリン結合領域を同定し、その結合親和性および特異性を明らかにする。同定された結合領域のアミノ酸配列に基づき、

結合阻害ペプチドを作成し、その阻害効果を検討する。特に結合部位が複数存在する場合、そのひとつの結合部位の阻害を、複数の結合を阻害した場合と比較する。また特定のサブタイプに特異的な阻害活性を持つペプチドが得られるか検討する。カルシニューリンに欠失変異あるいは、アミノ酸置換変異を導入し、NFAT との結合に関与する領域を同定する。

b. NFAT / カルシニューリン結合阻害分子の生物活性の検定

同定された各サブタイプに特異性を持つペプチドおよび低分子化合物を、T 細胞に導入し、各種サイトカインやその他の遺伝子発現に対する影響、細胞増殖への影響、T ヘルパーサブセットの分化に対する影響などを検討する。特定の NFAT サブタイプ特異的な結合阻害活性がみられるペプチド、あるいは低分子化合物の生物活性

を検討する上で、比較のためにsiRNA法（RNA interference）を用いて、各NFATサブタイプの発現をノックダウンさせること、およびウイルスベクターを用いて各NFATサブタイプを過剰発現させることにより、NFATサブタイプ特異的な機能を解析する。すでに多くの遺伝子欠損マウスが報告されているが、発生過程での遺伝子欠損の影響が問題になる可能性があり、活性阻害物質の作用と比較する目的には、これらの実験法がより有効である。siRNAの発現には、RNAPolymerase III依存性プロモーターでループタイプのsiRNAを発現するプラスミドベクターシステムを用いエレクトロポレーションあるいはウイルスベクターにより導入する。

II、GATA3を標的とする薬剤の開発

a、GATA3 複合体の各ドメインの機能解析

GATA3 は、GATA ファミリーに属する転写因子であり、Zn フィンガーをふたつ持つ。またレポーターアッセイによる解析から、N 末側に転写活性化ドメインが存在することが知られている。マウス脾臓より分離した CD4 陽性ナイーブ T 細胞にレトロウイルスベクターを用いて、GATA3 遺伝子を導入することにより、Th1 サブセット分化を誘導する培養条件下においても、Th2 サブセット分化が誘導されることを報告してきた。この実験システムに種々の GATA3 変異体を導入し、Th2 サブセット分化の誘導に必要なドメインやアミノ酸残基を同定する。また GATA3 変異体の DNA 結合活性や認識配列を決定し、分化誘導活性と DNA 結合活性との関係を明らかにする。

b、GATA3 を含む複合体の分離・構成蛋白質の同定

GATA3 複合体分離をおこなう。GATA3 と相互作用する分子を生化学的に分離する方法には、いくつかのものがあるが、2 種類の方法を用いる。第一は、GATA3 蛋白質を結合したビーズを用いるもの、第二は、Flag タグなどを融合した GATA3 遺伝子を過剰発現させた細胞を準備し、その細胞抽出液からタグに対する抗体を結合したビーズで分離するものである。GATA3 複合体分離のための材料としては、Th2 細胞クローンおよびマウス胸腺腫細胞株 EL4 を用いる。これらの細胞に Flag タグを融合した GATA3 を継続的に産生するトランスフォーマントを樹立し、第二の分離法を適用する。第一の方法の場合、変異を導入した GATA3 ビーズを用いることで、Th2 サブセット分化に関与する分子とそれ以外の分子を区別することが可能となる。

GATA3 複合体の精製により分離された各蛋白質を質量分析による同定法などを駆使し同定する。同定された、各因子について、その機能を解析する。すでに報告されている、HAT、HDAC、クロマチンリモデリングファクター、メチルトランスフェラーゼ、コアクティベーターなど、染色体構造改変および転写制御に関与する因子や複合体については、抗体を用いた共沈殿実験や *in vitro* での GATA3 との再構成、GATA3 複合体における酵素活性の解析などをおこなう。機能が不明であるが、構造から機能が推定される分子については、推定される機能を検証する。また機能推定も困難な分子については、相互作用する分子の解析をおこない、RNAi を用いた遺伝子発現抑制による効果を検討する。さらに遺伝子欠損マウスの作成、T 細胞特異的な遺伝子欠損マウスの作成により解析する。

3、研究成果

I、NFATファミリーを標的とする薬剤の開発

全ての NFAT サブタイプについて、カルシニューリン結合領域全体、または免役沈降法により同定された N 末側の結合領域 (CNBR1) と C 末側の結合領域 (CNBR2) を、GST (N 末側) と His タグ (C 末側) に融合した蛋白質を高純度に精製したものを調製した。カルシニューリンはビオチン化したものを調製した。これらの試料を用いて、増幅ルミネッセンス近接ホモジニアスアッセイ法を用いて結合を解析した。カルシニューリン結合領域全体では、どのサブタイプも解離定数が数 nM の強い親和性を示したが、CNBR1 または CNBR2 単独では、ほとんど結合活性が認められなかった。これは、免役沈降法とウェスタンブロット法を組み合わせた解析結果と大きく異なる。CNBR1 と CNBR2 以外の領域が結合に重要であるのか、CNBR1 と CNBR2 の両者が存在して強い結合活性が得られるのか、さらに様々な欠失変異体を作製し解析する必要がある。

siRNA は、NFAT1、NFAT2 に対して数種類作製し、Jurkat 細胞を用いて、蛋白質量の測定と 2 種類のサイトカイン、IL-2 と TNF α の産生に対する効果を検討した。NFAT1 および NFAT2 に対する siRNA は、蛋白質量をおよそ半分程度に減少させた。ELISA による IL-2 と TNF α の解析では、IL-2 は NFAT1 および NFAT2 の両者でやや減弱したのに対して、TNF α は、NFAT1 の siRNA により、産生が増大した。一方レトロウイルスにより、過剰発現させる実験系に関しては、NFAT4 を CD4 陽性ナイーブ T 細胞に導入し、Th1 および Th2 に分化させ、サイトカイン産生に対する効果を検討した。Th1 サイトカインである IFN γ の産生は増大したが、Th2 サイトカインである IL-4 は減少した。これはトランスジェニックマウスを用いた解析結果と一致する。これらのノックダウンや過剰発現による解析は、NFAT サブタイプの特異的機能、またサイトカインの種類による差異があることを示している。

II、GATA3 を標的とする薬剤の開発

GATA3 蛋白質の転写活性化ドメインおよび C 末側の Zn フィンガーが、Th2 サブセット分化に必須であることが示された。GATA ファミリーと特異的に相互作用する Zn フィンガー蛋白質である FOG との結合に必要な、N 末側にある Zn フィンガーのバリンをアラニンにアミノ酸置換した変異体は、Th2 サブセット分化活性に影響がなく、FOG は Th2 サブセット分化に必要なことが示された。N 末側 Zn フィンガーは、クロマチン構造変換による Th2 サブセット分化には必要ないが、N 末側 Zn フィンガーを欠損した GATA3 により分化した細胞では、IL-13 の発現量が低下、また IL-5 の発現はほとんど見られず、これらのサイトカイン遺伝子の発現には、GATA3 が転写因子としても重要であり、その作用には N 末側 Zn フィンガーも必要であることが示された。DNA 結合活性を、IL-4/IL-13 遺伝子間領域の GATA 配列、IL-5 プロモーターにある GATA 配列、TCR α 鎖エンハンサーにある GATA 配列を用いて検討したところ、C 末側 Zn フィンガーは、すべての GATA 配列に対する結合に必須であった。一方 N 末側 Zn フィンガーは、IL-5 プロモーターおよび TCR α 鎖エンハンサーの GATA 配列への結合には必要であったが、IL-4/IL-13 遺伝子間領域の GATA 配列に対する結合には必要なかった。この GATA 配列に対する GATA3 の親和性は、C 末側 Zn フィンガーだけで結合しているためか、他の GATA 配列より低かった。

GATA3 複合体はゲル濾過カラムによる解析から、500kDa 以上の分子量を持つ。複合体を分離するための材料として、Flag タグを融合した GATA3 蛋白質を発現するトランスフォーマントを、EL4 細胞を用いて樹立し

ようとしたが、できなかった。GATA3 が過剰に発現すると、細胞になにか傷害がおこると考え、誘導的に発現するシステムの樹立をおこなった。ニワトリ β アクチンプロモーターと Flag-GATA3 の間に、loxP にはさまれた転写終結配列を持つプラスミド、および Cre リコンビナーゼをマウスエストロゲン受容体ホルモン結合ドメイン (Mer) で挟んだ MerCreMer という蛋白質を発現するプラスミドを導入した。このトランスフォーマントは、Mer に結合しているシャペロン蛋白質を解離させ、Cre を活性化させる 4 ヒドロキシタモキシフェンで処理すると、転写終結配列が除去され、Flag-GATA3 を発現した。この発現にともない、刺激依存性の Th2 サイトカイン、IL-4 および IL-5 の産生が増大した。これは Flag-GATA3 が内在性の Th2 サイトカイン遺伝子に対して作用を持つことを示している。GATA3 蛋白質全体を大腸菌あるいは昆虫細胞を用いて量産させることはできなかった。転写活性化ドメインは大腸菌で、ふたつの Zn フィンガー領域は昆虫細胞で量産し、精製した蛋白質を用いて、GATA3 カラムを作製した。

4. 考察

I、NFAT ファミリーを標的とする薬剤の開発

増幅ルミネッセンス近接ホモジニアスアッセイ法を用いて、NFAT とカルシニューリンの結合を定量的に測定した結果、免疫沈降法により同定されていた、ふたつの結合領域 (CNBR1、CNBR2) の結合親和性は、カルシニューリン結合領域全体の結合親和性に比べ非常に弱いことが明らかとなった。これは、ふたつの結合領域が相乗的に結合しているのか、これら以外の結合領域が存在するのか、ふたつの可能性を示唆する。カルシニューリン結合領域の様々な領域を用いてカルシニューリンとの結合を解析する必要がある、これら阻害活性を持つペプチドを設計するにあたり、単一の結合領域だけでは十分な抑制活性が得られないことも示唆する。複数の結合領域を持つペプチドも検討する必要がある。

siRNA を用いた NFAT サブタイプの発現抑制は、サイトカイン産生に対する効果があり、サブタイプ特異的な機能を解析する手段として、遺伝子欠損マウスの作成とともにその重要性が明らかとなった。短時間に解析ができ、有用である。NFAT1 の発現低下により、IL-2 は抑制されたが、TNF α の発現は増大した。これは TNF α に対して NFAT1 が負の制御因子であることを示しており、意外な結果である。NFAT1 欠損マウスにおいて TNF α の発現がどのようになるか解析する必要がある。NFAT4 欠損マウス由来の末梢 T 細胞ではサイトカイン産生に対する影響は見られなかったが、NFAT4 トランスジェニックマウスの解析やレトロウイルスによる NFAT4 の導入による解析で、IFN γ には正の制御因子として機能するが、IL-4 に対しては負の制御因子として機能することが明らかになった。負の制御因子として機能する場合には、その NFAT サブタイプの機能を抑制することにより、サイトカインの産生は増大する。したがって、サブタイプ特異的な抑制作用を持つ分子は、サイトカインの種類により効果が異なり、免疫応答に対してどのような効果を持つのか十分に検討する必要がある。またいくつかのサブタイプを同時に抑制した場合には、どのような効果があるのかについても検討する必要がある。

II、GATA3 を標的とする薬剤の開発

GATA3 の転写活性化ドメインが、Th2 サブセット分化に必須であることが示された。さらに細かい欠失変異あるいはアミノ酸置換変異を導入し、分化誘導活性に必要な領域を詳細に解析する。GATA3 結合蛋白質を分離・

同定するために、転写活性化ドメインを大腸菌で量産し、ビーズに結合させたカラムを作成した。Th2 分化誘導活性を持たない変異体を結合させたカラムも作成できれば、溶出される GATA3 結合蛋白質の中で機能的に重要な分子の同定が容易となる。

C 末側の Zn フィンガーが単独で認識する DNA 配列と、ふたつの Zn フィンガーが共同で認識する DNA 配列が異なり、前者はクロマチン構造変換に関与すること、後者は転写活性化に関与することが示唆された。これは GATA ファミリーの中で GATA3 にユニークな特徴である可能性が高い。両方の Zn フィンガーを持った蛋白質と C フィンガーのみを持つ蛋白質を、ランダムな配列を持つ DNA に結合させ、ゲルシフトアッセイを行い、結合できる配列を解析することで、結合のコンセンサス配列を決定する必要がある。これらの DNA 配列を持つ DNA 断片を細胞に導入することにより GATA3 の分化誘導能や転写活性化作用を阻害できる可能性があり、検討する予定である。増幅ルミネッセンス近接ホモジニアスアッセイ法を用いて GATA3 蛋白質と標的配列との結合親和性を解析するシステムを樹立し、結合活性の強い DNA 配列のスクリーニングも可能である。また 2 種類のコンセンサス配列がゲノム上にどのように分布しているのか解析し、GATA3 が関係する制御領域をスクリーニングできるのではないかと考えている。

MerCreMer を用いた Flag-GATA3 を誘導的に発現する T 細胞株のトランスフォーマントは、抗 Flag 抗体の結合したビーズを用いて、GATA3 複合体を分離する材料として有用である。Flag-GATA3 を誘導することで、Th2 サイトカインである IL-4 および IL-5 の産生量が数倍増大することから、Flag-GATA3 が転写因子として機能していることが確認できた。少なくとも転写因子として機能する GATA3 複合体はこの方法で分離できると考える。この複合体の構成分子を同定し、その情報に基づき Th2 分化にともなうクロマチン構造変換に関与する GATA3 複合体の解析も進める。

5. まとめ

NFAT とカルシニューリンの結合を解析する増幅ルミネッセンス近接ホモジニアスアッセイ法を用いたシステムを樹立した。このシステムにより、すでに報告されているカルシニューリン結合領域の結合親和性は非常に弱いことを示した。siRNA による NFAT の発現抑制、およびレトロウイルスベクターによる NFAT の過剰発現による、NFAT サブタイプ特異的機能解析をおこない、特定の NFAT サブタイプが特定のサイトカイン遺伝子に対して負の制御因子として機能する可能性があることを明らかにした。GATA3 の Th2 分化誘導活性および DNA 結合活性を担うドメインを同定した。GATA3 が認識する結合配列に 2 種類存在することを示した。GATA3 結合蛋白質を分離するための、GATA3 蛋白質が結合したビーズを調製した。誘導的にタグを融合した GATA3 蛋白質を発現する T 細胞株を樹立した。

6. 研究発表

1. Chen, J., Amasaki, Y., Kamogawa, Y., Nagoya, M., Arai, N., Arai, K. and Miyatake, S. Role of NFATx (NFAT4/NFATc3) in Expression of Immunoregulatory Genes in Murine Peripheral CD4⁺ T Cells. *J. Immunol.* 170, 3109-3117, 2003.

2. Yuyama, N., Davies, D.E., Akaiwa, M., Matsui, K., Hamasaki, Y., Suminami, Y., Yoshida, N.L., Maeda, M., Pabdit, A., Lordan, J.L., Kamogawa, Y., Arima, K., Nagumo, F., Sugimachi, M., Berger, A., Richards, I., Roberds, S.L., Yamashita, T., Kishi, F., Kato, H., Arai, K., Ohshima, K., Tadano, J., Hamasaki, N., Miyatake, S., Sugita, Y., Holgate, S.T. and Izuhaara, K. Analysis of novel disease-related genes in bronchial asthma. *Cytokine* 19; 287-296, 2002.
3. Takemoto, N., Arai, K. and Miyatake, S. Cutting Edge: The differential involvement of the N-finger of GATA-3 in chromatin remodeling and transactivation during Th2 development. *J. Immunol.* 169; 4103-7, 2002.
4. Yasuda, Y., Kaneko, A., Nishijima, I., Miyatake, S. and Arai, K. Interleukin-7 inhibits pre-T-cell differentiation induced by the pre-T-cell receptor signal and the effect is mimicked by hGM-CSF in hGM-CSF receptor transgenic mice. *Immunology* 106; 212-221, 2002.
5. Kaminuma, O., Elly, C., Tanaka, Y., Mori, A., Liu, Y.-C., Aitman, A. and Miyatake, S. Vav-induced activation of the human IFN-g gene promoter is mediated by upregulation of AP-1 activity. *FEBS Lett.* 514; 153-158, 2002.
6. Amasaki, Y., Adachi, S., Ishida, Y., Iwata, M., Arai, N., Arai, K. and Miyatake, S. A Constitutively Nuclear Form of NFAT κ Shows Efficient Transactivation Activity and Induces Differentiation of CD4⁺CD8⁺ T Cells. *J. Biol. Chem.* 277; 25640-25648, 2002.
7. Tanaka, T., Taniyama, C., Arai, K. and Masai, H. ATPase/helicase motif mutants of Escherichia coli PriA protein essential for recombination-dependent DNA replication. *Genes Cells* 8, 251-261, 2003.
8. Sato, N., Sato, M., Nakayama, M., Saitoh, R., Arai, K. and Masai, H. Cell cycle regulation of chromatin binding and nuclear localization of human Cdc7-ASK kinase complex. *Genes Cells* (in press).
9. Kim, J-M., Nakao, K., Nakamura, K., Saito, I., Katsuki, M., Arai, K. and Masai, H. Inactivation of Cdc7 kinase in mouse ES cells results in S phase arrest and p53-dependent cell death. *EMBO. J.* 21; 2168-2179, 2002.
10. Yamada, M., Sato, N., Taniyama, C., Ohtani, K., Arai, K. and Masai, H. A 63 base-pair DNA segment containing a Sp1 site but not a canonical E2F site can confer growth-dependent and E2F-mediated transcriptional stimulation of the human ASK gene encoding the regulatory subunit for human Cdc7-related kinase. *J. Biol. Chem.* 277; 27668-27681, 2002.
11. You, Z., Ishimi, Y., Masai, H. and Hanaoka, F. Roles of Mcm7 and Mcm4 subunits in the DNA helicase activity of the mouse Mcm4/6/7 complex. *J. Biol. Chem.* 277; 42471-42479, 2002.
12. Tanaka, T., Mizukoshi, T., Taniyama, C., Ohtani, K., Arai, K. and Masai, H. DNA Binding of PriA Protein Requires Cooperation of the N-terminal D-loop/Arrested- fork Binding and C-terminal Helicase Domains. *J. Biol. Chem.* 277; 38062-38071, 2002.
13. Masai, H. and Arai, K. Cdc7 kinase complex: A key regulator in the initiation of DNA replication. *J. Cell. Physiol.*, 190; 287-296, 2002.
14. Watanabe, S., Murakami, T., Nakamura, T., Morimoto, C. and Arai, K. Human GM-CSF induces HIV-1 LTR by multiple signalling pathways. *Biochimie* 84, 633-642, 2002.
15. Akagawa, E., Muto, A., Arai, K. and Watanabe, S. Analysis of the 5 promoters for human IL-3 and GM-CSF receptor genes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 300, 600-608, 2003.
16. Zeng, R., Aoki, Y., Yoshida, M., Arai, K. and Watanabe, S. Stat5b shuttles between cytoplasm and nucleus in a cytokine-dependent and independent manner. *The J. Immunol.*, 168; 4567-4575, 2002
17. Sugimoto, M., Martin, N., Wilks, D.P., Tamai, K., Huot, T.J., Pantoja, C., Okumura, K., Serrano, M. and Hara, E. Activation of cyclin D1-kinase in murine fibroblasts lacking both p21(Cip1) and p27(Kip1). *Oncogene.* 21; 8067-74, 2002.
18. Kobayashi, J., Tauchi, H., Sakamoto, S., Nakamura, A., Morishima, K., Matsuura, S., Kobayashi, T., Tamai, K., Tanimoto, K. and Komatsu, K. NBS1 localizes to gamma-H2AX foci through interaction with the FHA/BRCT domain. *Curr Biol.* 12; 1846-51, 2002.
19. Shimazaki, N., Yoshida, K., Kobayashi, T., Toji, S., Tamai, K. and Koiwai, O. Over-expression of human DNA polymerase lambda in E. coli and characterization of the recombinant enzyme. *Genes Cells.* 7; 639-651, 2002.
20. Leaman, D.W., Chawla-Sarkar, M., Vyas, K., Rehemian, M., Tamai, K., Toji, S. and Borden, E.C. Identification of X-linked inhibitor of apoptosis-associated factor-1(XAF1) as an interferon-stimulated gene that augments TRAIL (Apo2L)-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 277; 28504-11, 2002.

7. 知的所有権の取得状況

特になし