

平成15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

創薬のための生体機能解析に関する研究

目 次

課題番号

20030895A KH21009	リン脂質代謝・機能の解明とその抗微生物薬開発への応用	西島正弘 …… 1
896A KH21010	低酸素センサーを介する虚血性および変性性神経疾患の機序解明と新規治療薬開発	芝崎 太 …… 6
897A KH21011	細胞内情報伝達分子を標的とした抗ウイルス剤および抗癌剤の開発	松田道行 …… 19
898A KH21012	抗動脈硬化性リポ蛋白質HDLの代謝制御機構	新井洋由 …… 25
899A KH21013	ゲノム修復と細胞分裂に関連する因子の構造機能解析と応用に関する研究	葛西正孝 …… 33
900A KH21014	難治性疼痛に関与するATP受容体の機能解析と医療への応用	井上和秀 …… 39
901A KH21015	動脈硬化症進展阻止のための血管内皮細胞特異的発現EDG受容体作働薬・拮抗薬の開発	望月直樹 …… 47
902A KH21016	天然物由来シグナル伝達制御物質の探索と創薬への応用に関する研究	上原至雅 …… 51
903A KH21017	肥満/糖尿病発症予防のためのターゲット遺伝子の同定と制御法の開発	江崎 治 …… 55
904A KH21018	ゲノム情報にもとづいた移植免疫抑制にかかわる遺伝子の検索と創薬への応用に関する研究	絵野沢 伸 …… 59
905A KH21019	神経・免疫・内分泌相関による生体防御機構の解明と創薬	田平 武 …… 62
906A KH21020	レクチン機能を利用した血管における生体防御システムの解明と創薬への応用	若宮伸隆 …… 67
907A KH21021	感染症に関連した免疫異常の解析と新規制御物質の開発	鈴木和男 …… 74
908A KH21022	自己免疫性膵炎発症に関連するIgG 4型抗体の認識する自己抗原の検索、ならびに特異的診断システムの開発	川 茂幸 …… 84
909A KH21024	動物細胞におけるラフト等の脂質膜ドメインを介した生体機能調節機構の解析と疾病関連因子探索への応用	北川隆之 …… 89
910A KH21025	新規サイトカインの炎症性疾患における役割の解析と創薬への応用	山越 智 …… 95
911A KH21026	マイクロアレイDNAチップを用いた各種病態関連発現遺伝子の解析	辻本豪三 …… 104
912A KH21027	細胞死をもたらすストレスシグナル伝達機構の解析および生体防御機構の解明	桃井 隆 …… 111
913A KH22071	ウイルスの侵入および発芽過程を標的とした次世代抗インフルエンザ薬の開発	鈴木康夫 …… 118
914A KH22072	サイトカインシグナル制御分子による慢性関節リウマチの治療薬の開発	吉村昭彦 …… 121
915A KH22073	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	宮武昌一郎 …… 125
916A KH22082	変異型HB-EGFノックインマウスによる循環器疾患の解析	目加田英輔 …… 133

ゲノム修復と細胞分裂に関連する因子の構造機能解析 と応用に関する研究

所属 国立感染症研究所 免疫部

研究者 葛 西 正 孝

研究要旨 細胞分裂時の染色体分配に関連するTranslin遺伝子を欠損するマウス(TSN-KO)を作製してその表現型を解析した。その結果、TSN-KOマウスでは幼年期における末梢血中の成熟白血球数が激減していた。この現象は造血幹細胞の分化増殖機構にTranslin蛋白が関与していることに依るものであった。

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

A. 研究目的

細胞分裂は、高度に組織化されたメカニズムによって調節された生命の基本現象であり、その制御機構の破綻は、癌のみならず細胞の異常増殖を伴う様々な疾病に及んでいる。例えば、動脈硬化の進展に伴う血管内皮細胞の増殖、慢性関節リウマチ(RA)における関節滑膜の異常増殖、喘息における平滑筋の増生肥厚による気道壁の肥厚など、その患者数は極めて多く、国民の保健医療を考える上で看過することはできない多くの疾病に及んでいる。一方、このような疾患における細胞の異常増殖機構については不明のことが多く、国内外にお

ける研究は立ち遅れているのが現状である。

我々は、DNA結合蛋白であるTranslinを発見し、その機能が細胞分裂時の染色体分配に深く関わっていることを指摘した。

本研究では、この蛋白の機能の詳細を明らかにするために、Translin遺伝子欠損マウス(TSN-KO)を作製してその表現型を解析した。その結果、TSN-KOマウスでは幼年期における末梢血中の成熟白血球数が激減していることを見いだした。さらに、上記研究結果を基盤にして、末梢血における造血幹細胞の分化増殖におけるTranslin蛋白の機能解析を目的とした詳細な解析を行った。本研究は再生医療の発展ために必要な新知見を含み、免疫不全症や白血病、再生不良性貧血等の治療や創薬開発にも大きく発展することが期待される。

B. 研究方法

Translin ノックアウトマウスの作製
Translin キメラマウス作製のために、Translin 遺伝子(11 kb)を含むターゲティング ベクターを 129 系統マウス由来 ES 細胞にエレクトロポレーション法で導入した。次に、遺伝子欠損 ES 細胞をマウス初期胚に導入し、偽妊娠マウスに移植した。作製されたキメラマウス雄と C57BL/6 マウス雌をかけた得られた F1 マウスから、導入した ES 細胞がキメラ個体内で生殖系列に分化したマウスを選択した。ホモ遺伝子欠損マウスは、F1 同士のかけあわせで得られた。

遺伝子組み換え体の解析は、Southern, Northern, Western ブロットティング法で確認した。なお、F2 マウスの遺伝子組み換え体のタイピングは、薬剤耐性遺伝子(Neo)と Translin 遺伝子の 3', 5' プライマーを用いた PCR 法で行った。

(倫理面への配慮)

研究対象者に対する人権擁護や研究方法による研究対象者に対する不利益、危険性の排除や説明と理解（インフォームドコンセント）に関わる状況においては十分な配慮をおこなう。

動物愛護上、実験動物に対しては苦痛を和らげる等、倫理面への十分な配慮をおこなう。

C. 研究結果

Translin 遺伝子欠損マウス末梢血における造血細胞の分裂増殖の停止

Translin 遺伝子の機能が細胞分裂と密接に係わっていることを示すデータが従来の研究で蓄積されているが、さらにその詳細を解析するために Translin 遺伝子欠損マウスを作製した。3, 4 週令の Translin 遺伝子欠損マウス、TSN(-/-)は野生マウス、TSN(+/-)と比較して極めて小さく、体重は約 50%に満たなかった。

この時期の末梢血の組成を調べてみると、赤血球や血小板に変化は見られなかったが、白血球が激減していた。FACS 解析によると、白血球の減少は末梢血 B リンパ球が未分化な状態で停止して増殖が著しく阻害されていることに起因するものであったが、同様な結果は骨髄や脾では観察されなかった。また、Translin 遺伝子が正常なマウスと比較して、遺伝子欠損マウスでは末梢血リンパ球における免疫グロブリン(Ig)遺伝子、D_H-J_Hの組み換えレベルが低下していた。興味深いことに、この現象は脾臓や骨髄では認められず、末梢血で最も顕著に観察された。

一方、生後一年を経過した遺伝子欠損マウスでは、正常マウスと比較して脾臓が約 30 倍に肥大化していた。病理学的解析によると、脾臓の肥大は白脾髄に

由来する未熟なリンパ球の異常増殖によるものであった。この時期の末梢血は3, 4週令時と同様、Ig 遺伝子、D_H-J_Hの組み換えレベルが低下しており、CD43⁺B220の表現型を示す未熟 B リンパ球で占められていた。末梢血に蓄積するような細胞と脾臓の肥大を引き起こす未熟なリンパ球との関連が今後の課題として残されている。

以上の結果は、Translin 蛋白の機能が Ig 遺伝子、D_H-J_Hの再構成に係わってリンパ球前駆細胞の分裂増殖を制御していることを示唆している。また、長期に渡る遺伝子の欠損は正常な細胞分裂の破綻を引き起こすことを意味している。本研究から、末梢血には造血幹細胞の自己複製と前駆細胞の分裂増殖に必要な造血微小環境が存在する可能性が指摘された。したがって、末梢血中でリンパ球前駆細胞の分裂増殖を制御する機構に Translin がどのように関与するのかを解明する予定である。今後、末梢血幹細胞を用いた遺伝子治療移植における多能性幹細胞から前駆細胞への分裂増殖機構が明らかになるものと期待される。

D. 考察

末梢血における造血幹細胞の分裂と造血前駆細胞の分化増殖の可能性

造血幹細胞の発生、分化、増殖に関する

研究は、遺伝子治療や再生医療の進歩に伴って大きな発展を遂げつつある。一次造血は、胎生期の卵黄嚢で開始されるが、胎児型の原始赤芽球のみが造られる一過性の造血である。一方、二次造血は胎生肝で発生した造血幹細胞が骨髄に移行して始まり、生後も成体における造血は全て骨髄で担われると考えられてきた。しかし、最近の知見によると、二次造血における造血幹細胞は大動脈、生殖器、腎臓が発生するAGM (Aorta Gonard Mesonephros)領域のヘマンジオブラストから発生し、胎生肝へ移行することが明らかになってきた。また、胎生肝と成体期の骨髄に存在する造血幹細胞には多くの相違点が指摘されており、発生過程における両者の因果関係にも新たな疑問点が浮上している。

本研究で得られた結果を総合すると、幼年期における造血には特殊な微細環境が存在し、骨髄のみならず末梢血も重要な役割を果たしていることを強く示唆している。この新知見は、前述した造血幹細胞が血液細胞と血管内皮細胞に共通の前駆細胞に由来するという事実や、実際に血管内皮細胞から血球が産生されたという最近の研究報告とも矛盾しないものと考えられる。今後、造血幹細胞の分裂や前駆細胞の分化増殖を制御する機構の解析を進めることによって、末梢血幹細胞を用いた遺伝子治療や

再生医療の基盤研究に本研究成果が大きく
貢献することが期待される。

E. 結論

Translin遺伝子を欠損するマウスを作製
してその表現型を解析した結果、末梢血に
おける造血幹細胞の分化増殖の重要性とTr
anslin蛋白の関与が明らかとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

主任研究者

Ishida, R., Okado, H., Sato, H.,
Shionoiri, C., Aoki, K., and Kasai, M.

A role for the octameric ring protein,
Translin, in mitotic cell division.

FEBS Lett. 525, 105 (2002)

VanLoock, M., Yu, X., Kasai, M., and
Egelman, E.

Electron Microscopic Studies of the
Translin Octomeric Ring

J. Struct. Biol. 135, 58-66 (2001)

Fuks, F., Burgers, W., Godin, N.,
Kasai, M., and Kouzarides T.

Dnmt3a binds deacetylases and is
recruited by a sequence-specific
repressor to silence transcription.

EMBO J 20, 2536-2544 (2001)

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, 5821-5825 (2000)

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

Genomic structure and chromosomal
localization of the gene encoding
TRAX,

a Translin-associated factor X.

J. Hum. Genet. 45, 305-308 (2000)

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, 59-64 (2000)

分担研究者

Endo J, Toyama-Sorimachi N, Taya C, Kuramochi-Miyagawa S, Nagata K, Kuida K, Takashi T, Yonekawa H, Yoshizawa Y, Miyasaka N, Karasuyama H
Deficiency of a STE20/PAK family kinase LOK leads to the acceleration of LFA-1 clustering and cell adhesion of activated lymphocytes. FEBS Lett 468, 234-238 (2000)

2. 学会発表

Okado,H., Kawano, H., Matsuda, J., Terashima, T., , and Kasai, M.

A POZ/zinc Finger Transcriptional Repressor, RP58, Is Required for Cortical Lamination and Reciprocal Connectivity between Cortex and Thalamus

Annual Meeting of Japanese Molecular Biology Society, Kobe, December, 2003

Kasai, M.

Structure and functional analysis of a regulatory factor for cell proliferation
Annual Conference of Molecular Target Therapy of Cancer, Tokyo, June, 2003

Sugiura, I, Sasaki, C, Hasegawa, T,

Kohno, T, Sugio, T, Moriyama, H, Kasai, M. and Matsuzaki, T.

Crystal structure of human Translin at 2.2Å resolution

International Symposium on Diffraction Structural Biology, Yokohama, June 2003

Okado,H, Kawano,H, Terashima,T, and Kasai,M.

Transcriptional repressor, RP58, is essential for development of subplate neurons and thalamocortical projections

Annual Meeting of Japanese Physiology Society, Fukuoka, March, 2003

石田 礼子、Edward H. Egelman, 青木克己、葛西 正孝： Translin 蛋白の 3次元構造と DNA 複製や細胞分裂における役割

第24回日本分子生物学会総会、横浜、平成13年12月。

G. 知的財産権の出願 登録状況

1. 特許取得

国際特許 特願 2002-096216

【発明の名称】

トランスリン結晶およびトランス

リンのセレノメチオニン誘導体結晶

国際特許 特願 2002-236139

【発明の名称】

トランスリンの3次元構造座標、及び
3次元構造座標の使用

平成15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

創薬のための生体機能解析に関する研究

平成16年9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