

感染防御学部門

Department of Molecular Immunology

当部門では、ヒト及び動物における免疫系の分化および免疫応答の機構を、分子レベル及び細胞レベルさらには個体レベルで解析することにより、免疫細胞の分化および免疫反応の制御機構を解明する。さらにその破綻の結果生じる感染症、免疫病の解明と治療法の確立を目指す。また、免疫学的方法による癌の診断と治療法の開発、および免疫系と関わりの深い神経系の分化と神経変性疾患についても鋭意、研究を進めている。すなわち、免疫系の発生分化、免疫応答機構の解明と、その異常によって生ずるアレルギー病、自己免疫病、免疫不全症の解明を、免疫学的、分子生物学的、発生工学的手法を駆使して行っている。さらにこれらの疾病の治療法の開発に向けての研究を行っている。また、癌の免疫療法についても新たな視点から研究を推進しており、特に免疫監視機構からの癌の逸脱（Escape）機構に関わる我々が見い出した新しい分子、RCAS1、の機能の解明に向けて鋭意研究を行っている。免疫細胞の増殖、分化、細胞死の制御機構および神経細胞の分化・細胞死・細胞周期に関与する分子、遺伝子の同定および機能解析を通してその制御機構の解明を行っている。1998年（平成10年）度は、(1)昨年に引き続き、抗原受容体からシグナル伝達機構と遺伝子発現制御およびその異常によって発症する自己免疫病の解析にむけての研究、(2)免疫細胞初期分化の制御の分子機構、(3)当部門で見いだされた新しいフォルミン関連遺伝子、Frl 遺伝子産物 FRL の免疫細胞活性化における機能の解析、(4)AIDS など感染症に対する効果的な人工ヒト抗体の構築、(5)癌抗原の分子生物学的遺伝子学的研究および癌の免疫監視機構からの逸脱に関わる分子、RCAS1 の解明、(6)遺伝子標的（ジーンターゲット）等の発生工学的手法の免疫学研究への応用、(7)細胞死の制御に関与する分子の同定と作用機構および神経細胞分化における Rb とその関連分子の機能の解析、等を主な研究テーマとして研究を進めた。

1998年（平成10年）4月1日から1999年（平成11年）3月末までの主な人事異動は次のとおりである。平成10年10月から、助手の王君が、請われて千葉県ガンセンター研究所病理部に転勤した。助教授の本山昇君が、平成11年2月から国立長寿研究所に転出した。平成11年3月には、末松佐知子さんが留学先の米国から新たに、助手として赴任した。助手の谷内一郎君は引き続き、ニューヨーク大学医学部のダン・リットマン教授の研究室で研究に従事している。大学院生では、平成10年3月に、竹下弘道君、加藤純君、勝田 仁君、呉暁牧君、増田啓次君（歯学部大学院）の5名が大学院を修了し、学位を取得した。竹下弘道君、加藤純君はそれぞれの臨床教室にもどり、呉暁牧君は九州大学医学部神経内科にて臨床研究生となった。勝田仁君は非常勤研究員（ポストドク）として平成10年4月より当部門で引き続き研究を行っている。増田啓次君は平成9年10月より、米国アラバマ大学バーミングハム校のクーパー、カーニー

両教授のもとに留学した。平成11年3月に大学院生である土井俊郎君、ヤスミン・バヌーさんの両名は学位取得の上、大学院を修了した。土井俊郎君は整形外科学教室にもどり、ヤスミン・バヌーさんは神奈川県ガンセンター研究所に就職の予定である。平成7年度からの渡辺裕美さん、平成8年度からの山本真理さん、大屋和之君、相川義勝君、越智博文君、平成9年度からのナスリン・バヌーさん、平成10年度からの久原尚子さんは大学院生として研究を続けている。また、徳永暁憲君が理学部修士課程大学院生として研究を修了し、大阪大学医学系大学院博士課程に進む予定である。昨年から引き続き第一内科研究生である近藤しおりさんが研究を行い、平成9年より小河一彦君、平成10年から酒井由美子さんが同じく第一内科研究生として研究を開始した。平成9年4月から研究に加わっていた名古屋市立大学医学部分子医学研究所の細川雅人君は名古屋市立大学にもどった。

A. B細胞の分化と選択に關与するシグナル伝達機構の解析

a. B細胞表面抗原受容体(BCR)からのシグナル異常と自己免疫病

B細胞表面抗原受容体(BCR)からのシグナルはB細胞の分化、活性化、増殖あるいはアポトーシスを誘導に重要な役割を演じている。B細胞抗原受容体を抗原で刺激すると速やかに、受容体と会合する Lyn, Fyn, Blk, 等の Src 型のチロシンキナーゼ及び Syk/ZAP70チロシンキナーゼあるいは Btk キナーゼが活性化され、さらに多くの細胞内蛋白がチロシンリン酸化される。これらの分子が抗原刺激後の反応を誘導する初期シグナルとして中心的な役割を担っていると考えられている。我々は、Lyn チロシンキナーゼ欠損マウスを遺伝子標的法を用いて確立し、これまでに Lyn 欠損マウスでは、末梢リンパ組織におけるB細胞の減少に反して、各種クラスの血清 Ig (特に IgM) は高値を示し、週令を経るにつれ、脾臓及びリンパ節の腫大が認められた。組織学的検索により、Lyn 欠損マウスの脾臓では形質細胞様のリンパ芽球化細胞の増殖が認められ、これが血清 Ig 高値、脾腫大の原因と考えられた。重要な事は、Lyn 欠損マウスでは自己抗体である抗 DNA 抗体の産生が観察され、自己免疫病変である糸球体腎炎も認められたことである。この様に、Lyn 欠損マウスでは、B細胞が正常に分化、増殖せず、しかしながら何らかの原因により形質細胞様のリンパ芽球化細胞が大量に蓄積することが、自己免疫病変を呈する原因の一つと考えられた。Lyn を介したシグナルがB細胞の細胞死の制御および抗体産生細胞への分化に深く関わっていることが示唆された。また、Lyn 欠損マウスで見られる糸球体腎炎は、ヒトの自己免疫病である SLE で見られる糸球体腎炎と組織学上類似していることから、SLE の原因の一つとして Lyn の異常が關与するのかといった問題も重要な課題である。Lyn 欠損マウスと Btk 異常をもつ xid マウスを掛け合わせ、Lyn キナーゼ、Btk キナーゼの両方を欠損するマウスを作成した。このようなマウスでは末梢の成熟B細胞数の減少と血清 IgM の減少が見られるが、B1細胞の出現、脾腫大および自己免疫病変は全く消失する。この結果から、Lyn キナーゼは B2細胞のみならず、B1細胞の活性化にも重要な制御をしていること

が示唆された。このような異常は、Lyn キナーゼによる CD22 受容体、FcγRIIB、PIR-B などの ITIM モチーフのチロシンリン酸化と SH2 フォスファターゼ (SHP1, SHIP) のリクルートメントが障害されたためと考えられ、Lyn キナーゼの BCR からのシグナル伝達系に対する負の制御の重要性が示された。

自己赤血球に対する自己抗体をコードする H 鎖遺伝子、L 鎖遺伝子を導入した抗自己赤血抗体産生性トランスジェニックマウスでは、自己赤血球反応性 B1 細胞は体内に存在するが、無反応状態 (アナジー) にある。このマウスを Lyn 欠損マウスと掛け合わせて、Lyn 欠損抗自己赤血球抗体産生性トランスジェニックマウスを作成した。このような動物において、B1 細胞における無反応性 (または自己寛容) は破れて強力な自己抗体産生が引き起こされ、動物は重症の自己免疫性溶血性貧血に陥った。以上の結果は、Lyn キナーゼが BCR からのシグナル伝達において強い負の制御を行っており、Lyn キナーゼによる抗原に対する閾値の制御は自己反応性 B 細胞の自己寛容維持に重要な役割を果たしている事が示唆された。

b. 三量体型 G-タンパクからのシグナルによる抗原受容体情報伝達の制御

ヒスタミン H1 受容体は 7 回膜貫通部位を持ち、三量体型 G-タンパクが共役している受容体である。その受容体には特に G α タンパクとして G α q サブファミリーが会合していることが報告されている。我々は、以前から、アレルギー反応の分子機序および活性アミンの免疫反応への影響を調べる目的で、ヒスタミン受容体欠損マウスの作成とその解析を行ってきた。そこでこのような個体における免疫能を解析した。ヒスタミン H1 受容体欠損マウスの T 細胞あるいは B 細胞をそれぞれ、抗 CD3 ϵ 抗体あるいは抗 IgM 抗体で架橋して細胞増殖を誘導させると、wild マウスのそれに比べて細胞増殖反応の低下が見られた。そのような増殖反応の低下はマイトゲンや種々のサイトカイン (IL2, IL4, IL7) や CD40L などの刺激では見られず、抗原受容体からの情報伝達に特異的であった。さらに正常脾細胞よりマスト細胞を除去した後に、抗 CD3 ϵ 又は抗 IgM で刺激して生ずる細胞増殖反応はヒスタミンの添加により増強された。H1R 欠損マウスの脾細胞ではそのような増強作用は見られなかった。以上の結果は、三量体型 G-タンパクからのシグナルが抗原受容体からのシグナル伝達に対して正の制御を行っていることを示唆している。本研究は、三量体型 G-タンパクからのシグナルが抗原受容体からの免疫反応に重要な制御機構を発揮していることを初めて証明したものである。

c. BCR からのシグナルと未熟 B 細胞のアポトーシス

マウス B 細胞株 WEHI-231 を抗 IgM 抗体で架橋すると 24 時間以降にアポトーシスに陥る。この場合、カスパーゼの活性化と DNA の切断が誘導及び細胞膜透過性の亢進を引き起こす。カスパーゼ阻害剤 Z-VAD は核の分画化、DNA 切断を完全に阻止するが、細胞膜透過性の亢進は阻止しない。WEHI-231 細胞では BCR 刺激後、膜透過性の亢進に先立って、ミトコンドリア膜

電位の変化および活性酸素の増加が生ずることを見出した。即ち、BCR からの Death signal はまずミトコンドリアに伝達され、その後にカスパーゼの活性化と DNA 切断及び膜透過性の亢進が生ずると考えられた。即ち、自己反応性未熟 B 細胞では、抗原受容体からのシグナルはまずミトコンドリアを標的して伝達され、その後にアポトーシス及びネクロシスの反応が引き起こされると考えられた。現在、抗原受容体からどのようなシグナルが、どのような分子の活性化あるいは新たな蛋白の合成を誘導し、どのような機構によって、ミトコンドリアをアタックするのかについて、新たな分子の探索も含めて研究中である。

d. PEST 配列を持つ HAX-1 の機能解析

我々の単離した血球系細胞特異的に発現する遺伝子 HS1 の産物は Src 型チロシンキナーゼの SH2 ドメインと会合し、抗原受容体刺激直後にチロシンリン酸化される。HS1 蛋白は細胞質のみならず核にも存在し、刺激後リン酸化された HS1 蛋白は核に増加してくる。さらに HS1 蛋白は N 末端側に DNA 結合ドメイン様構造を、C 末端側に多くのシグナル伝達分子が持つ SH3 ドメイン及び酸性 α ヘリックスを有することにより、細胞内シグナル伝達及び転写調節に関与することが示唆される。Yeast two hybrid 法を用いて HS1 分子に会合するタンパク分子、HAX-1、を単離した。HAX-1 は 35Kda の分子量を有し、細胞内のミトコンドリア膜、核膜、粗面小胞体膜などに存在する。HS1 と HAX-1 は非刺激状態の B 細胞内で既に会合しており、HS1 のリン酸化はその会合に必要としない。HAX-1 タンパクを過剰発現させたヒト T 細胞株は血清除去により誘導されるアポトーシスに抵抗性を示した。また、HAX-1 は Bcl-2 タンパクファミリーに見いだされている BH モチーフを持つことから、細胞死の制御に関係した分子である可能性が示唆された。そこで、HAX-1 遺伝子に CD2 プロモーターをつないで HAX-1 のトランスジェニックマウスを作成した。現在、このマウスにおけるアポトーシスの状態を検索中である。

e. IBAP-1 (B 細胞抗原受容体複合体 Ig β 会合分子) の機能解析

プレ B 細胞受容体は免疫グロブリン膜型重鎖と代替軽鎖の複合体が Ig α / β ヘテロダイマーと会合した構造を持つ。B 細胞分化初期においてはそのシグナル伝達は Ig β が重要な役割を担っていることが示されている。しかし Ig β とどのような分子が特異的に会合し、シグナルを伝えているかは充分には明らかになっていない。本研究では、プレ B 細胞期に Ig β と会合し、プレ B 細胞受容体からのシグナル伝達に関与すると考えられる新たな分子である「IBAP-1」の同定及びその分子の機能の解析を試みた。マウスプレ B 細胞株 (1xN2B) の cDNA ライブラリーからイースト two-hybrid 法により Ig β との結合活性が高い 2 つのクローンについて cDNA 全長の塩基配列の決定を行った。これらの遺伝子は未知のものであり、そのコードする蛋白についてホモロジー検索を行ったところ、1 つは粘菌の分化に係るキナーゼに、もう 1 つはプロ T 細胞性 leukemia に関与することが示唆されている分子に、部分的にホモロジー

を有していた。前者を「IBAP-1」と命名しさらに解析を行った。IBAP-1の cDNA は653アミノ酸残基をコードし、その N 末端にはプロリンに富むモチーフが存在し、これは Wicott-Aldrich 症候群タンパクの SH3ドメインに結合すると考えられている領域と高い相同性を有する。また、N末には PH ドメインと思われる領域が存在する。IBAP-1タンパクの分子量は約80kDaであった。イースト two-hybrid 法では、Ig β の C 末端と IBAP-1タンパクのチロシン、グリシンを多く含む領域とが会合することがわかった。本年も B 細胞における Ig β 分子との会合、B 細胞内での局在、その機能について解析中であるが未だ明確な結論は得られていない。

f. Vav タンパクに異常が見られた SLE 患者の解析

SLE をはじめとする全身性の自己免疫疾患患者の B 細胞での主なシグナル伝達関連分子を検索している過程で、リンパ球内に Short form の Vav タンパクを含むが正常の Vav タンパクが減少している症例を見出した。この truncated form の Vav は分子量約50kDa で、N 末側の PH ドメイン、DH (Dbl homology) ドメインは完全に保存されているが、C 末の SH3、SH2などのドメインが欠失している。特に B 細胞では truncated Vav の量が intact の Vav より多いと思われた。本症例では、末梢血 B 細胞の減少が見られ、種々の自己抗体産生が見られた。一方、CD5⁺、CD19⁺のいわゆる B1細胞と思われる細胞は健常人に比べて増加していた。この truncated Vav タンパクの存在が B 細胞におよぼす影響を調べるため、truncated Vav をコードする cDNA をヒト B 細胞株 Daudi に導入し、安定形質転換細胞を得た。Daudi 細胞を抗 IgM 抗体で架橋すると細胞死 (アポトーシス) が誘導されるが、truncated Vav を導入した Daudi 細胞では細胞死が誘導されなかった。さらに、抗 IgM 抗体による架橋後の細胞質タンパクのチロシンリン酸化に両細胞間で大きな相違が見られた。

現在、トランスジェニックマウスの確立を行っており、この truncated Vav 分子の出現が免疫系にどのような影響を及ぼすかについて検討を行う予定である。

B. リンパ組織特異的 Formin 関連遺伝子 *Frl* の機能解析

我々が単離したマウス Formin 関連遺伝子 *Frl* (Formin related gene in lymphocytes) は、リンパ組織に発現が認められた最初の Formin family 遺伝子である。proline rich domain (Formin homology 1: FH1) と、Formin family で保存されている FH2領域を有している。FH1領域より N 末側では、Formin family の一つである yeast BNI1蛋白と相同性を有するが、FH1、FH2以外の領域では他の Formin family とは殆ど相同性を有しない。*Frl* cDNA 5'側をプローブとした、マウス組織由来の RNA を用いたノーザンブロットでは、胸腺、脾臓、腎臓、大脳に発現を認め、組織によりその大きさが異なるため、alternative splicing が示唆された。細胞株を用いたノーザンブロットでは、マクロファージ系の細胞株で強い発現が認められた。マウス *Frl* genome 遺伝子は20Kb以上の大きさであり、少なくとも21個以上の exon より構成

されていた。Frl cDNA をヒト腎細胞株293細胞に導入して得られた細胞の免疫染色において、Frl タンパクは核に存在するのが認められた。また、マウス chromosomal mapping では、Frl 遺伝子は11番染色体の遠位部に存在し、リンパ節形成不全マウスの原因とされる aly 遺伝子座の1cM 以内の近傍に位置することが分かった。Frl 遺伝子の異常が aly マウスのリンパ臓器欠損の原因となっているかどうか現在検討中である。Formin family 遺伝子は、細胞の極性や、cytokinesis、発生や分化に重要な役割を果たしている。Frl リンパ組織における機能解析のため、現在、ノックアウトマウスの作成を行っており、ヘテロマウスを得ている。また、抗体によるタンパクの解析、マクロファージ系細胞株の inducible transfectants の作成等を進めている。

C. 細胞内シグナル伝達における新規の膜結合型ホスファチジルイノシトール (PI) 輸送タンパク (PITPnm) の機能解析 (続き)

ホスファチジルイノシトール (PI) はシグナル伝達のセカンドメッセンジャーとして、また細胞内のノシトール代謝系の制御に重要な役割を果たしている。我々は上述の抗原受容体からのシグナル伝達の研究の過程で、細胞の変性の原因となる分子に興味をもち、ヒトの脳より神経変性に関わる遺伝子のクローニングを行った。

その結果、哺乳類では新規の膜結合型ホスファチジルイノシトール (PI) 輸送タンパク (PITPnm) の遺伝子を同定した。遺伝子の全長は4122bp で1242アミノ酸残基をコードし、マウスでは第19番染色体上にマッピングされた。ノーザンブロットの結果、特に脳および免疫系での発現が顕著に高かった。PITPnm は(1)ショウジョウバエの変異体において光刺激による網膜変性の原因遺伝子である rdgB (retinal degeneration B) と36%以上の相同性を有し、そのN末端側196アミノ酸残基ではマウスの可溶性のPI輸送タンパクと36%以上の相同性がある、(2)分子サイズは約170KDaで、細胞分画後では膜画分に検出される、(3)細胞内局在を免疫電顕にて調べたところ、PITPnm 分子はゴルジ膜、粗面小胞体膜、細胞膜 coated pits に局在化していた、(4)N末端側196-297a.a 領域内はPIおよびホスファチジルコリン (PC) と特異的に結合する、(5)網膜においては光受容体において発現していた、などの諸性質を示した。さらに我々は、PITPnm が胎生後期段階にその発現量が顕著に増加し、特に脳や脊髄を含めた中枢神経系での発現が高いことを明らかにしている。胚性がん細胞である P19細胞はレチノイン酸処理後に神経様に変化するが知られているが、興味深いことには、P19細胞がレチノイン酸処理によってニューロンへの分化を誘導するに従い、PITPnm の発現量が顕著に増加した。以上から我々が見い出した新規の分子 PITPnm は、細胞内での膜輸送、細胞分化、および細胞内PIシグナル伝達におけるPIターンオーバーなどの制御に重要な役割を果たすことが示唆された。本研究ではPITPnm 分子の生理活性を解明している。さらに、神経細胞のみならず、免疫系、造血系における役割についても今後、検討していく予定である。

D. 新しい癌関連抗原（RCAS-1抗原）の機能の解析

我々が単離した新たな癌関連抗原，RCAS1は，その発現が癌細胞に比較的特異的であること，癌の進展とその発現がパラレルであること，RCAS1陽性の癌ではその予後が陰性の場合に比べて悪いこと等が少しずつ解ってきた。

癌の免疫学的診断，経過観察，治療等において，癌抗原あるいは癌関連抗原を特異的に認識するモノクローナル抗体は，有用な役割を担うことが期待される。我々は，ヒト子宮頸癌細胞株 SiSo を樹立した事を以前に報告した。ヒト子宮頸部腺癌細胞株（SiSo）を免疫原として用い，IgM 型マウスモノクローナル抗体（22-1-1）を作製した。この抗体の認識抗原（22-1-1抗原）は主として細胞質内に分布し一部細胞表面に存在しており，細胞外にも分泌されている。この抗原は免疫沈降法により，SDS-PAGE による解析では78KDの分子量を有していた。免疫組織染色法にて22-1-1抗原は子宮頸部腺癌以外にも子宮頸部扁平上皮癌，卵巣癌，胃癌，大腸癌等にも高率（70－80%陽性率）に発現しており，正常組織では腺上皮細胞のみが僅かに染色されるのみであった。このように22-1-1抗原は広く癌組織に発現している。さらに腫瘍細胞の進達度とその発現の強さが関連していること，本抗原の発現と生存率の関係において抗原陽性例が抗原陰性例と比べて有意に低いこと，さらに臨床的に癌細胞と識別が困難な異形成細胞においてはその発現が認められない点において，この抗原が癌関連抗原分子として非常に興味を持たれる。これらの結果から，22-1-1抗体はヒトの癌細胞の同定に非常に有用な新しいモノクローナル抗体である事が示された。

この新しい癌関連抗原分子の機能の解析を目的として，本抗原分子をコードする遺伝子を単離し，その蛋白構造および生物学的活性について検討した。単離された cDNA 断片は，約1.1 Kbで，コザック配列を有した642bpよりなる ORF が認められ，213個のアミノ酸より成る23～24kDaのコア蛋白分子（RCAS-1）をコードしていた。BLASTによる検索にて未知の分子であり，アミノ酸配列の検討において，N末端側に膜貫通部（N-terminal transmembran segment），C末端側に coiled-coil 構造が存在する II 型膜蛋白であることが示唆された。この抗原分子の生物学的な機能解析の為に GST 融合蛋白発現システムを用いて，N末端に GST を融合させた全抗原分子（GST-RCAS-1）を精製した。SDS-PAGE による解析にて，GST-RCAS-1分子はすくなくとも homo-trimer 以上の複合体を形成していることが示唆された。さらに，各種ヒト培養細胞株をもちいて22-1-1抗体および GST-RCAS-1にて染色性を検討したところ，一方にのみ染色性が認められた。以上より RCAS-1分子に結合する細胞表面分子（受容体）の存在が確認された。さらに，正常ヒトリンパ球においても一部の細胞に受容体の存在が確認された。また，結合分子陽性細胞の一つである K562細胞を GST-RCAS-1とともに培養したところ，細胞死が誘導された。このように，癌細胞に特異的に強く発現している抗原分子である RCAS-1 は，その受容体分子を発現しているリンパ球系細胞に細胞死を誘導すること事が示された。このことは，癌細胞の免疫系細胞からの逸脱において RCAS-1抗原が重要な作用を担っている可

能性を示唆している。現在、この細胞死誘導機構の解明を目的として、受容体遺伝子の単離を試みている。

さらに、最近、マウスの RCAS1 cDNA の単離にも成功した。マウス RCAS1 cDNA をプローブとしてノーザンブロットを行ったところ、胎生初期（7－8日）に強い発現が見られることがわかった。マウスの系を用いて RCAS1 の発生分化における役割についても検討を加える予定である。また、ジーンターゲットングのために、マウスゲノム遺伝子の単離も行った。

E. アポトーシスの制御に関わる分子についての研究

a. 赤血球分化における Bcl-x の機能解析

多細胞生物の恒常性は細胞増殖・細胞分化・細胞死（アポトーシス）のバランスによって保たれている。アポトーシスは、増殖因子や Bcl-2 を代表とする Bcl-2 ファミリーによって制御されている。Bcl-2 ファミリーの一員である Bcl-x のノックアウトマウスは、胎生 13 日頃に死亡する。胎仔の発達中の脳・脊椎の未成熟神経細胞および肝臓の未成熟造血細胞にアポトーシスが認められた。そこで、造血細胞の分化における Bcl-x の機能を解析するために、Bcl-x 欠損胚性幹（ES）細胞を樹立し、C57BL/6 由来の blastocyst に注入して、Bcl-x 欠損体細胞変異キメラマウスを作成した。末梢血の赤血球を解析した結果、Bcl-x 欠損 ES 細胞由来の赤血球は存在しないことが明らかになった。赤血球分化のどの段階に異常が生じるかを検討するために、M-CSF 欠損ストローマ細胞株 OP9 上での ES 細胞の分化システムを用い、Bcl-x 欠損 ES 細胞の赤血球分化を解析した結果、Bcl-x は primitive erythrocytes, definitive erythrocytes の終末分化の時の細胞の生存維持に必須であることが明らかになった。（大阪大学・微生物病研究所・仲野徹氏との共同研究）

b. Bcl-2 結合因子 Nip3 ファミリーによるアポトーシス制御機構の解析

遺伝的にプログラムされた能動的細胞死と定義されるアポトーシス機構は、線虫から哺乳類までよく保存されている機構の一つであり、また、多細胞生物を宿主とするウイルスにも機能的に似た機構を持つものがある。特にアデノウイルスはその機構がよく知られており、E1A, E1B と呼ばれる遺伝子が動物細胞の不死化、癌化、そしてアポトーシスに関わっている。このうち、E1B19K は Bcl-2 ファミリーと機能的に相同性のある分子であり、E1B19K は E1A 誘導アポトーシス、及び TNF, 抗 Fas 抗体で誘導されるアポトーシスを抑制する。この為、ウイルス産物である E1B19K は、生体内で Bcl-2 結合分子等と何らかの相互作用を及ぼし、調節機構に働いている可能性が示唆されてきた。この可能性から、イースト Two hybrid 法を用いた遺伝子クローニングが行われ、アポトーシス抑制因子 E1B19K に結合する未知の因子「B5」が単離された。B5 は、Bcl-2 及び E1B19K との結合が認められている Nip3 と、DNA・アミノ酸の両レベルで非常に高い相同性を示した。B5, Nip3 は N 末に疎水性の領域を持ち、核膜、ミトコンド

リア膜に局在している。イースト Two hybrid 法では B5 と Nip3 が強く結合することから、ダイマーを形成して働いていることが示唆された。遺伝子の転写産物は、約 1.5K であり、多くの組織において発現が認められた。現在、B5 と Bcl-2 ファミリーとの関与、及び B5 の細胞内機能を解析しており、また、発生工学的手法により B5 遺伝子欠損マウスを作製し、発生、分化、アポトーシスにおける B5 の生理学的機構を解析している（東京理大・中島琢磨氏、小田鈞一郎氏との共同研究）。

F. 神経分化時における Rb の細胞周期停止および細胞死に対する機能の解析

ほとんどの中枢神経細胞は、胎児期に最後の細胞分裂を終えると細胞周期を停止し、G0 期にとどまり、その後、分裂することはない。Retinoblastoma Protein (Rb) は、この細胞周期の停止において、重要な役割を果たしている。胎児期の中枢神経系において Rb の発現は、神経の成熟にしたがって不活性型の高リン酸化型から、活性型の低リン酸化型へと変化する。Rb 欠損マウスの神経系では、細胞周期の停止が起こらず、未熟神経細胞がアポトーシスによって、死滅する。そこで、神経細胞分化における Rb のリン酸化と細胞周期停止、細胞死について、胚性癌細胞株である P19 を用いて解析している。P19 は、レチノイン酸 (RA) 存在下で培養すると、マウス胎児の中枢神経様に分化誘導される。この細胞株において、Rb は神経分化誘導に伴い発現が高まり、高リン酸化型から、低リン酸化型へと変化した。P19 細胞の分化段階と Rb タンパクのリン酸化部位、その他の細胞周期関連蛋白の発現、リン酸化や Bcl-2 ファミリーについて解析中である（細胞学部門、北川助教授との共同研究）。

G. HIV 感染細胞を破壊するヒト型 IgM クラス抗体の作成と応用

正常人の約 2% の血清は、HIV 感染細胞を特異的に強く傷害する活性を持つ。これは HIV 感染細胞に出現する糖鎖抗原に対するヒト型 IgM 抗体が自然抗体として血清中に存在すると補体を活性化して細胞傷害活性反応を起こすためである事が明らかになった。本研究は、HIV 感染細胞に出現する糖鎖抗原または HIV ウイルス膜抗原に対するヒト型 IgM 抗体を組み換え DNA 法で産生し、HIV 感染の治療に使用する事を目標としている。リコンビナント IgM 抗体を産生株を効率よく作成する手段として、HIV 関連抗原反応性抗体 (IgM または IgG 型) を産生しているヒトリンパ球や EB ウイルス変異細胞株より免疫グロブリン遺伝子の H 鎖、L 鎖の V 領域をコードする cDNA を単離したのち、ヒト IgM 型発現ベクターに導入する。遺伝子導入した細胞の中から HIV 感染細胞に効率よく反応する IgM 抗体を安定して産生する細胞株を樹立する方法を取った。IgM 型抗 GM2 抗体を産生するヒト B 細胞株よりその抗体分子の H 鎖、L 鎖の V 領域をコードする遺伝子を単離し、これらを Cm, Ck 遺伝子をあらかじめ組み込んだヒト IgM 型抗体発現ベクターに導入し、これらのベクターを CHO 細胞発現させ、J 鎖をもつ IgM 抗体、J 鎖をもたない IgM 抗体をそれぞれ発現する安定形質転換細胞を作成し、IgM 抗

体タンパクを特に高産生しているクローンを単離した。その結果、IgM.J (+), IgM.J (-) のそれぞれのクラスのヒト抗 GM2抗体を得ることが出来た。J 鎖をもつ IgM 抗体と J 鎖をもたない IgM 抗体のそれぞれについて、HIV 感染細胞に対する細胞傷害活性を調べた。その結果、J 鎖をもたない IgM 型の抗体は、J (+) の抗体より傷害活性がはるかに強く、作成した IgM ヒト型抗 GM2抗体は低温～37℃において安定であり、温度によってその結合活性は影響を受けなかった。この研究により、発現ベクターの有用性、ヒト IgM 型抗体の HIV 感染細胞への傷害能、抗体の大量生産の方法等について十分な検討が出来た（名古屋市大・岡田秀親氏のグループと共同研究）。

業 績 目 録

原著論文

1. Banu, Y. and Watanabe, T. 1999.
Augmentation of antigen receptor-mediated responses by histamine H1 receptor signaling.
J. Exp. Med. 189 : 673-682.
2. Morohashi, K., Tsuboi-Asai, H., Matsushita, S., Suda, M., Nakashima, M., Sasano, H., Hatada, Y., Li, C-L, Fukuda, J., Irie, J., Watanabe, T., Nagura, H. and Li, E. 1999.
Structural and functional abnormalities in the spleen of *mFtz-F1* gene disrupted mouse.
Blood 93 : 1586-1594.
3. Wang, J. and Watanabe, T. 1999.
Expression and function of Fas during differentiation and activation of B cells.
International Review of Immunology.
4. Hutchcroft, J.E., Stavik, J.M., Lin, H., Watanabe, T. and Bierer, B.E. 1998.
Uncoupling activation-dependent Hs1 phosphorylation from NFAT transcriptional activation in Jurkat T cells : differential signaling through CD3 and the costimulatory receptors CD2 and CD28.
J. Immunol. 161 : 4506-4512.
5. He, H., Watanabe, T., Zhan, X., Huang, C., Schuurin, E., Fukami, K., Takenawa, T., Kumar, C., Shimpson, R. and Maruta, H. 1998.
Role of phosphatidylinositol 4, 5 biophosphate in Ras/Rac-induced disruption of the cortactin-actomyosin II complex and malignant transformation.
Mol. Cell. Biol. 18 : 3829-3837.

6. Sonoda, K., Kaku, T., Kamura, T., Nakashima, M., Watanabe, T. and Nakano, H. 1998.
Tumor-associated antigen 22-1-1 expression in the uterine cervical squamous neoplasia.
Clinical Cancer Research. 4 : 1517-1520.
7. Lin, Q., Taniuchi, I., Kitamura, D., Wang, J., Watanabe, T. and Cooper, M.D. 1998.
Aminopeptidase A-deficient mice have normal T and B cell development.
J. Immunol. 160 : 4681-4687.
8. Kato, J., Motoyama, N., Taniuchi, I., Takeshita, H., Toyoda, M., Masuda, K. and Watanabe, T. 1998.
Affinity maturation in Lyn-deficient mice with defective germinal center formation.
J. Immunol. 160 : 4788-4795.
9. Takeshita, H., Taniuchi, I., Kato, J. and Watanabe, T. 1998.
Abrogation of autoimmune disease in Lyn-deficient mice by the mutation of Btk gene.
International Immunol. 10 : 435-444.
10. Wu, X-M., Nakashima, M. and Watanabe, T. 1998.
Selective suppression of antigen specific Th2 cells by continuous micro-dose oral tolerance.
Eur. J. Immunol. 28 : 134-142, 1998.
11. Akashi, T., Kitamura, D., Nagafuchi, S., Anzai, K., Wang, J., Taniuchi, I., Niho, Y. and Watanabe, T. 1998.
Suppression of lymphoproliferation in B cell-deficient C57BL/6 lpr mice.
Immunology. 93 : 238-248.
12. Katsuta, H., Tsuji, S., Niho, Y., Kurosaki, T. and Kitamura, D. 1998.
Lyn-mediated down-regulation of B cell antigen receptor signaling : inhibition of protein kinase C activation by Lyn in a kinase-independent fashion.
J. Immunol. 160 : 1547-1551.