

**第41回 日本生化学会北海道支部例会
プログラム及び抄録集**

日時：平成16年7月9日（金）午前10時より

場所：北海道大学百年記念会館・大会議室

第 4 1 回 日本生化学会北海道支部例会プログラム

< 午前の部 >

10:00-10:05 開会の辞 田中一馬 (例会長)

座長：山本隆晴 (北大・遺制研)

10:05-10:20 ユビキチン結合蛋白質の生殖細胞形成における新しい機能

< 一般講演 1 > 嶋田益弥、兼松健二、川原裕之、横沢英良 (北大院・薬・生化学)

10:20-10:35 ERK によるリン酸化を介した MKP-7 の分解制御機構

< 一般講演 2 > 片桐千秋、増田公平、島 礼、菊池九二三 (北大・遺制研・情報調節)

10:35-10:50 非対称な単リン酸化平滑筋ヘビームロミオシン

< 一般講演 3 > 竹谷浩介¹、高橋正行¹、加藤剛志²、矢沢道生¹ (1 北大院・理・化学、
2 旭川医大・生化学)

座長：田中 勲 (北大院・理)

10:50-11:50 昆虫成長因子 GBP の NMR による立体構造解析と生理活性

< 特別講演 1 > 河野敬一¹、相沢智康¹、水口峰之²、出村 誠¹、新田勝利¹、早川洋一³
(1 北大院・理・生物科学、2 富山医薬大・薬、3 佐賀大・農・応用生物科学)

< 午後の部 >

13:00-13:15 総会 議長：横沢英良 (支部長)

座長：島 礼 (北大・遺制研)

13:15-13:30 出芽酵母の細胞極性を制御する CDC50 ファミリーは、リン脂質トランスロケース
< 一般講演 4 > の機能的なサブユニットである

斉藤康二¹、鎌田 (藤村) このみ¹、古田信道¹、加藤詩子²、梅田真郷²、
田中一馬¹ (1 北大・遺制研・分子間情報、2 京大・化研・生体分子情報)

13:30-13:45 *lac* repressor を利用した誘導的 RNA 干渉による細胞内タンパク質の可逆的
< 一般講演 5 > 発現抑制

堤 良平、樋口 恵、東 秀明、畠山昌則 (北大・遺制研・分子腫瘍)

13:45-14:00 B リンパ球の増殖抑制に関与する Daxx の新規結合分子同定と解析

< 一般講演 6 > 室本竜太、松田 正 (北大院・薬・衛生化学)

14:00-14:15 PIASy による TGF-β/Smad3 シグナル伝達系の制御

< 一般講演 7 > 井本世祐、松田 正 (北大院・薬・衛生化学)

座長：横沢英良 (北大院・薬)

14:15-15:15 神経変性疾患を制御するユビキチン - プロテアソームシステム

< 特別講演 2 > 畠山鎮次 (北大院・医・分子医化学)

15:15-15:45 休憩

座長：矢澤道生 (北大院・理)

15:45-16:10 大規模オリゴ DNA チップを用いた海産動物ホヤの網羅的遺伝子発現解析

< 総説講演 1 > 安住 薫 (北大・創成科学・流動、北大院・薬・生化学)

座長：川原裕之 (北大院・薬)

16:10-16:35 神経細胞の発達・機能と神経特異的遺伝子 BRINP ファミリーの役割

< 総説講演 2 > 松岡一郎、中谷俊幸、森 卓哉、上野 哲、小林三和子 (北大・創成科学・流動、北大院・薬・神経科学)

座長：松田 正 (北大院・薬)

16:35-17:35 ヒト Toll 様受容体による I 型インターフェロン誘導の分子機構

< 特別講演 3 > 瀬谷 司 (北大院・医・感染症制御)

17:35-17:40 閉会の辞 横沢英良 (支部長)

18:00- 懇親会 北海道大学百年記念会館・きゃら亭

講演について

- ・ 一般講演 15 分（講演 12 分，質疑応答 3 分） 総説講演 25 分（講演 20 分，質疑応答 5 分）
特別講演 1 時間（講演 50 分，質疑応答 10 分）とします。
- ・ 講演終了予定時間で 1 回，質疑応答終了予定時刻で 2 回ベルが鳴ります。
- ・ 演壇にマイクとポインターを用意します。

懇親会について

場所：北海道大学百年記念会館「きゃら亭」

時間：午後 6 時より

会費：一般 2,000 円

大学院生・研究生 500 円

（参加者は受付にてお申し込みください）

百年記念会館付近には、駐車スペースはございません。

自家用車等での入構はご遠慮ください。

一般講演(1)

ユビキチン結合蛋白質の生殖細胞形成における新しい機能

嶋田益弥、兼松健二、川原裕之、横沢英良(北大院・薬・生化学)

近年、細胞機能の制御において蛋白質の代謝的安定性の変化が決定的に重要であるとの認識が定着しつつあり、その制御にはプロテアソームに依存した蛋白質分解系が大きな役割を演じている。プロテアソームは主としてユビキチン化された標的蛋白質を選択的に認識する ATP 依存性プロテアーゼであり、総数 40 種以上のサブユニットから構成された巨大な多成分複合体である。これまでの研究からその基本的なサブユニット構成が明らかになりつつあるが、この巨大分子複合体の作用機構、特に基質識別の分子機構についてはまだ十分に解明されていない。近年、プロテアソームのユビキチンレセプター蛋白質が幾つか報告され、プロテアソームによる基質識別機構には複数の経路が存在することが明らかになってきた。一方、これらのユビキチンレセプター個々の生理機能と機能分担については現在でも不明な点が多い。我々は、ポストゲノム時代の遺伝学的研究材料として極めて優れた特長を有するモデル生物 *C.elegans* の配列情報を最大限に利用して、複数の関連遺伝子を同時に knock down 可能な多重 RNA 干渉法を利用し、これまで遺伝学的解析が困難であった機能重複遺伝子群の網羅的解析に取り組んできた。その結果、26S プロテアソームのユビキチンレセプターサブユニットの一つ、Rpn10 の機能阻害と合成的効果を示す興味深い遺伝子が幾つか見つかかり、それらは多細胞生物の生殖系列に欠損を示すものも含まれた。現在、Rpn10 蛋白質群の生物機能と構造に関する詳細な解析を進めており、それらの結果について議論したい。

一般講演(2)

ERK によるリン酸化を介した MKP-7 の分解制御機構

片桐千秋、増田公平、島 礼、菊池九二三(北大・遺制研・情報調節)

MAPK phosphatase (MKP) は、MAPK を脱リン酸化することで MAPK カスケードを負に調節している。しかしながら MKP の制御機構は未だ不明な点が多い。

MKP-7 は JNK に特異的な MKP である。MKP-7 は MKP ファミリーに共通なドメインに加え、C 末側に伸張領域 (C-Terminal stretch; CTS) を有している。この CTS には 2 つの核移行シグナル(NLS1/2)・核外移行シグナル(NES)・2 つの PEST 配列(PEST1/2)モチーフが存在し、MKP-7 の細胞内局在と安定性を規定することが予想された。これまでに、我々は NLS および NES の機能により MKP-7 が核-細胞質間をシャトルすること、さらに PEST2 配列内 446 番目の Ser が ERK によりリン酸化されることを報告した。

本研究ではリン酸化による MKP-7 の安定性への影響について検討した。³⁵S]-Met パルスラベルにより MKP-7 の半減期を求めたところ、MKP-7 野性型の半減期は約 90 分だった。一方、CTS 欠損変異体の半減期は約 7 時間で野性型の 4 倍以上に延長していた。また、プロテアソーム阻害剤により MKP-7 分解は抑制され、ポリユビキチン化 MKP-7 が確認できた。Ser446 の Asp 置換変異体の半減期は野性型の約 2 倍となった。以上の結果から、MKP-7 タンパクの寿命は CTS により制御されており、ERK によるリン酸化は MKP-7 の分解を抑制することが示唆された。

一般講演(3)

非対称な単リン酸化平滑筋ヘビームロミオシン

竹谷浩介¹、高橋正行¹、加藤剛志²、矢沢道生¹ (1 北大院・理・化学、2 旭川医大・生化学)

平滑筋ミオシンは二つの球状頭部と一本の長い尾部を持つモータータンパク質で、その活性は各頭部の付け根に結合している制御軽鎖(RLC)のリン酸化によって制御される。各頭部の RLC がリン酸化されると活性は上昇し、逆に脱リン酸化されると活性は著しく低下する。この脱リン酸化状態における活性の抑制には双頭構造が重要であることから、脱リン酸化状態には頭部間に活性を抑える阻害相互作用があると考えられている。ミオシンの二つの RLC のうち片方の RLC のみがリン酸化された単リン酸化状態はリン酸化による活性化機構を考える上で非常に興味深い。しかし、この単リン酸化状態における平滑筋ミオシンの性質は未だ十分に明らかにされていない。

本研究では単リン酸化ミオシンの構造的な性質を光架橋法を用いて調べた。RLC に光架橋プローブ(ベンゾフェノン)を導入したヘビームロミオシン(HMM)の架橋反応性はリン酸化状態によって異なることが報告されている。我々はベンゾフェノン標識した二種類の単リン酸化 HMM を調製し、その光架橋反応性を調べた。リン酸化 RLC をベンゾフェノン標識した単リン酸化 HMM と脱リン酸化 RLC をベンゾフェノン標識した単リン酸化 HMM の架橋反応性は、それぞれリン酸化型と脱リン酸化型であった。このことは単リン酸化状態では各頭部が非対称な構造をとっており、片方の頭部のリン酸化では両頭部を活性の高いリン酸化型の構造にするには不十分であることを示している。また、本研究で脱リン酸化状態では制御軽鎖とモータードメインとの間で架橋されることが明らかになった。この結果をふまえ、脱リン酸化状態と単リン酸化状態における両頭部の相互作用について考察した。

特別講演(1)

昆虫成長因子 GBP の NMR による立体構造解析と生理活性

河野敬一¹、相沢智康¹、水口峰之²、出村 誠¹、新田勝利¹、早川洋一³ (1 北大院・理・生物科学、2 富山医薬大・薬、3 佐賀大・農・応用生物科学)

NMR は X 線解析とならんでタンパク質の立体構造解析の重要な手法として位置付けられており、「たんぱく 3000 計画」では理研といくつかの大学において NMR により多数のタンパク質の立体構造が決定されている。X 線解析は巨大分子の解析において威力を発揮するが、NMR は小さなタンパク質、ペプチド、特に不安定な構造しかもたないものの解析を得意としている。また生体膜と類似した環境でのタンパク質・ペプチドの立体構造解析、さらにタンパク質・タンパク質間またはタンパク質・低分子間相互作用の解析においても優れている。演者は様々なタンパク質・ペプチドの立体構造解析と相互作用解析を手掛けているが、本講演では主として昆虫成長因子 GBP を取り上げ、NMR による立体構造解析と、得られた立体構造を基盤とした生理活性の発現機構解析について説明する。

Growth-blocking peptide (GBP) は早川らによってアワヨトウ幼虫から単離された 25 残基からなるペプチドであり、寄生蜂による寄生を受けたときや寒冷時のストレスによって宿主に誘導され、宿主の成長阻害を行う。GBP と相同性の高いペプチドが多種の鱗翅目昆虫から、麻痺活性、拍動の制御、血球細胞活性化活性、細胞増殖活性など様々な活性を指標に発見されたことから、GBP は多機能のサイトカインであると考えられている。GBP 骨格の立体構造では 1 組の 2 本鎖 シート構造と ターン構造が SS 結合で結ばれている。N 末端残基を欠損したものは血球細胞活性化活性は持たないが、アンタゴニスト活性を持つことが最近明らかになった。

その他として、カプトガニ血球中の抗菌活性ペプチドや、アミロイドを形成するヒト由来 transthyretin 変異体の立体構造と活性の関係についても述べたい。

一般講演(4)

出芽酵母の細胞極性を制御する *CDC50* ファミリーは、リン脂質トランスロケースの機能的なサブユニットである

齊藤康二¹、鎌田(藤村)このみ¹、古田信道¹、加藤詩子²、梅田真郷²、田中一馬¹(¹北大・遺制研・分子間情報、²京大・化研・生体分子情報)

真核細胞の生体膜を構成するリン脂質分子種は、脂質二重層の内外において非対称な分布をしている。アミノリン脂質トランスロケース(APT)は、生体膜上で能動的にリン脂質を外層から内層へ輸送する働きがあると考えられているが、APTによるリン脂質の膜非対称性の維持や制御の生物学的意義はほとんど分かっていない。一方、私達は最近出芽酵母の細胞極性形成に必要な遺伝子として*CDC50*を同定した。出芽酵母には*CDC50*と相同性の高い*LEM3*と*CRF1*が存在し(*CDC50*ファミリー)、*cdc50*欠損株は低温で、アクチンの極性異常およびCdc42pのエフェクターであるBni1pやGic1pの局在異常を示す。私達は、*CDC50*と遺伝的に相互作用する遺伝子を検索する過程で、出芽酵母APTファミリー(*DRS2*、*DNF1*、2、3、*NEO1*)に属する*NEO1*の高発現が*cdc50*株の低温感受性増殖を抑圧することを見出した。そこでCdc50pとAPTとの関連をさらに調べたところ、Cdc50pがDrs2pと複合体を形成し、Drs2pのゴルジ体への輸送に必須な役割を果たすことが明らかとなった。さらに、*drs2*欠損株も*cdc50*株と同様の細胞極性異常を示したことから、リン脂質の非対称性が細胞の極性形成に重要な働きをしていることが示唆された。またLem3pがDnf1pおよびDnf2pと、Crf1pがDnf3pとそれぞれ複合体を形成し、Neo1pは*CDC50*ファミリーとは複合体を形成しないことが明らかとなった。*CDC50*ファミリー蛋白質は広く動物細胞にまで保存されており、APTに特異的なサブユニット群を形成している可能性が高い。

一般講演(5)

lac repressor を利用した誘導的 RNA 干渉による細胞内タンパク質の可逆的発現抑制

堤 良平、樋口 恵、東 秀明、畠山昌則(北大・遺制研・分子腫瘍)

近年、siRNAを用いたRNA干渉は遺伝子機能解析において有効な手段として注目されている。しかし、細胞内に存在する遺伝子産物の多くは細胞の増殖や生存に関わっており、そのうち細胞の増殖や生存を正に制御する遺伝子を恒常的に発現抑制した細胞系の樹立は非常に困難であることが予想される。この問題は誘導的なsiRNA発現システムの構築により回避されうると考えられる。本研究ではsiRNAと同等の機能を有するshort hairpin RNA(shRNA)発現ベクターpSUPERを改変し、誘導的RNA干渉が可能なシステムを構築することを目的とした。

本研究で用いたpSUPERは、ヒトRNase P構成因子H1 RNAサブユニットの転写制御に関与するH1プロモーターによってRNA polymerase III依存的にshRNAを構成的に発現するベクターである。H1プロモーターにおいてTATAエレメントと転写開始点間の配列は転写活性への影響がないことが報告されている。そこで我々はpSUPERのH1プロモーター中の転写開始点上流配列をlac operator配列に置換することによりpSUPER/lacOを作成し、大腸菌由来lac repressor存在下でshRNA転写をIPTG依存的に制御することを可能とした。

ヒト胃上皮由来AGS細胞にlac repressor遺伝子を導入した後、細胞内チロシンホスファターゼSHP-2を標的として作成したpSUPER/lacO-SHP-2を導入し細胞株lacC9を樹立した。培養系へのIPTG添加によってlacC9における細胞内SHP-2の誘導的発現制御を試みたところ、IPTG依存的かつ可逆的なSHP-2の発現抑制、およびそれに伴う細胞生物学的機能の欠失が観察された。この手法は他の遺伝子にも応用可能であり、遺伝子機能解析の強力な手段となることが予想される。

一般講演(6)

B リンパ球の増殖抑制に關与する Daxx の新規結合分子同定と解析

室本竜太、松田正(北大院・薬・衛生化学)

タイプ I 型インターフェロン (IFN- γ) は B リンパ球前駆細胞にアポトーシス誘導蛋白として知られる Daxx 蛋白質誘導及びアポトーシスを誘導する。

このインターフェロンシグナル伝達系における Daxx の役割を明らかにするため、Daxx を標的とした酵母 two-hybrid 法により新規会合分子の同定、機能解析を行い、スクリーニングより得られた遺伝子を Daxx とともに 293T 細胞で発現させ、免疫沈降法により哺乳動物細胞内での会合を調べた。さらに、マウスプロ B 細胞株 BAF3 細胞をもとに我々が樹立した Fas/Daxx 依存的にアポトーシスを起こす細胞株、BAF/FD7 細胞を用い、アポトーシス誘導への影響を調べた。また、Daxx はグルココルチコイド受容体 (GR) の転写抑制蛋白としても知られることから GR とそのレポーター遺伝子である MMTV-LUC を 293T 細胞内で発現させる再構成系を用い、GR 活性を測定した。その結果、Daxx 会合分子の一つとして同定した DNMT1 associated protein (DMAP1) は培養細胞内においても Daxx と会合を示した。また、BAF/FD7 細胞への遺伝子発現ではアポトーシス誘導への影響は認められなかったが、293T 細胞での再構成系において、GR 活性を Daxx と共に抑制した。以上から DMAP1 は Daxx を介するアポトーシスに關与しないが、Daxx による転写抑制活性を増強することが示唆された。

一般講演(7)

PIASy による TGF- β /Smad3 シグナル伝達系の制御

井本世祐、松田正(北大院・薬・衛生化学)

TGF- β (Transforming growth factor- β) は細胞の分化・増殖抑制、アポトーシス、細胞外マトリックスの産生、免疫抑制など、きわめて多彩な生理活性を有する増殖因子である。TGF- β は細胞表面の 2 種類のセリン/スレオニンキナーゼ型受容体を介し、細胞内シグナル伝達分子 Smad をリン酸化する事により活性化し、そのシグナルを伝達する。活性化された Smad は複合体を形成して核内に移行し、標的遺伝子の転写活性化を誘導する。細胞増殖抑制作用や免疫抑制作用を示す TGF- β のシグナル伝達系の異常は、発癌や免疫疾患などの発症と深く關連するため、TGF- β シグナル伝達系の制御機構を明らかにする事は非常に重要である。本研究では TGF- β シグナル伝達分子 Smad に結合して、そのシグナル伝達を制御する分子の同定を目的として Yeast two-hybrid スクリーニングを試みた。その結果、新規 Smad 結合分子として PIASy を同定した。また、機能解析の結果より PIASy は TGF- β によって誘導され、Smad3 と結合して TGF- β シグナル伝達を抑制する事が明らかになった。よって、PIASy による新たな TGF- β シグナル伝達系の制御機構の存在が示された。

特別講演(2)

神経変性疾患を制御するユビキチン-プロテアソームシステム

畠山鎮次(北大院・医・分子医化学)

細胞内タンパク質分解は、細胞周期や転写調節やシグナル伝達などの生物学上重要な現象の調節に関与している。ユビキチン介在性タンパク質分解は、ユビキチン活性化酵素(E1)、ユビキチン結合酵素(E2)、ユビキチンリガーゼ(E3)の酵素カスケードによりユビキチンの基質へのイソペプチド結合と、その後のプロテアソームによる分解によって構成される。E3に基質特異性が担われており、現在まで HECT 型 E3 とリングフィンガー型 E3 の2種類の E3 群が発見されている。

我々は新たな E3 群として、U-ボックス型 E3 を同定した。U-ボックスタンパク質は、最初、オリゴユビキチン鎖を認識しさらにユビキチン鎖を伸長させる E4 (Ufd2)として、出芽酵母の遺伝学的解析から同定された。Ufd2 の C 末端に存在する約 70 アミノ酸配列(U-ボックスドメイン)を有するタンパク質は、酵母からヒトに至るまで複数存在することが判明し、ヒト及びマウスから U-ボックスドメインを含むタンパク質をクローニングし、その細胞生物学的役割を検討した。U-ボックスタンパク質は分子シャペロンと相互作用しており、異常タンパク質を認識し分解する細胞内品質管理にかかわる E3 であることが判明した。特に Ufd2 の哺乳類ホモログである UFD2a が、ポリグルタミン病で蓄積される異常タンパク質の認識及び分解に関与している可能性を見いだした。また、他の U-ボックスタンパク質である CHIP もパーキンソン病などの神経変性疾患に関与していることを明らかにした。現在、遺伝子治療的応用に向けて、U-ボックス型 E3 の機能および細胞生物学的解析を遂行中である。

総説講演(1)

大規模オリゴ DNA チップを用いた海産動物ホヤの網羅的遺伝子発現解析

安住 薫(北大・創成科学・流動、北大院・薬・生化学)

海産無脊椎動物ホヤは幼生期に脊索を持つことから原始的な脊索動物に分類され、ヒトを含む脊椎動物の進化を考える上で重要な動物である。最近、カタコウレイボヤのドラフトゲノムが解読され、ホヤのゲノムサイズは約 156Mbp、蛋白質をコードする遺伝子数は 15,852 個と推定された。これらの遺伝子の内、約 62%はハエ、ヒトとも共通の遺伝子、約 16%はハエにはなく、ホヤとヒトで共通の遺伝子であった(この中にはヒトの機能未知の遺伝子も多数含まれている)。一方、脊椎動物が有する獲得免疫系、ステロイドホルモン受容体やニューロン軸索形成に関与する遺伝子はホヤには存在しないことも明らかになった。我々はホヤの遺伝子の機能を解明する一手段として、カタコウレイボヤの全遺伝子の 85%をカバーする大規模オリゴ DNA チップ(22K)を作製し、遺伝子発現の網羅的な解析に着手した。現在、胚発生の各ステージにおける遺伝子発現の変動、加齢・老化あるいは日周期に伴う遺伝子発現変動の解析を行っている(CREST プロジェクト; 代表・京大佐藤矩行教授)。さらに応用研究として、ホヤが海産固着動物であることに着目し、海洋汚染物質や環境ホルモンに実験的に暴露したホヤの体内で生じる遺伝子発現プロファイルと世界各地に生息する野生ホヤの遺伝子発現プロファイルを比較することにより、ホヤの生息する海域の海洋汚染の有無を検出する方法を考案中である。本講演では、ホヤ大規模オリゴ DNA チップを用いてどのような解析が行えるのか、いくつかの解析例を紹介したい。

総説講演(2)

神経細胞の発達・機能と神経特異的遺伝子 BRINP ファミリーの役割

松岡一郎、中谷俊幸、森 卓哉、上野 哲、小林三和子(北大・創成科学・流動、北大院・薬・神経科学)

神経幹細胞より生じた神経細胞は、神経栄養因子などの作用により軸索伸張、シナプス形成などの形態・機能分化を経て複雑な神経回路網に組み込まれていく。また、終末分化した神経は、他の組織細胞と異なり、細胞分裂によりその数を増やすことはできない。このため神経細胞には細胞分裂を抑制するための特異的な機構が備わっていることが推定されるが、その実体は全く明らかになっていない。最近、我々は、神経系の分化に伴って神経細胞に特異的に発現する新規タンパク質ファミリー、BRINP (BMP/Retinoic acid-Inducible Neural specific Protein) を見いだした。BRINP ファミリーは、BRINP1, BRINP2, BRINP3 の3種からなり、既知のタンパク質と類似のモチーフをほとんど有しない全く新規のタンパク質である。興味深いことに BRINP 1 遺伝子は、膀胱ガンにおいて特異的に脱落が観察される第9染色体上の領域に存在している。我々は、これまでにいずれの BRINP も増殖性の株化細胞に異所的に発現させると細胞周期の移行抑制機能を有することを見いだした。すなわち BRINP が、終末分化した神経細胞において不要な細胞分裂の開始を防いでいると共に新規ガン抑制遺伝子として機能している可能性が高い。また BRINP 1 の発現パターン・調節機構の解析より、神経回路形成や学習・記憶等の脳高次機能における細胞周期制御と関連した役割も推定される。

特別講演(3)

ヒト Toll 様受容体による I 型インターフェロン誘導の分子機構

瀬谷 司(北大院・医・感染症制御)

ヒト Toll-like receptor (TLR) の細胞応答には抗ウイルスの I 型 interferon (IFN) 誘導があることを検証したので本講演のテーマとする。講演者らはヒト樹状細胞 (myeloid dendritic cell, mDC) の応答変調のメカニズムを解析し、dsRNA (polyI:C) が IFN-beta を mDC に誘起することを見出した。dsRNA はヒトになく、ウイルスに特異的な産物で TLR 認識性のパターン分子と推定された。ヒトには 10 種類の TLR のメンバーがある。各 TLR に対する抗体を作成し、蛋白発現を調べ阻害実験を試行したところ、上皮細胞表面に TLR3 が発現しており、抗 TLR3 抗体で IFN-beta 産生が阻害されることが判明した。HEK293 TLR3 ^{-/-} 細胞に TLR3 を強制発現させると dsRNA 依存性の IFN-beta promoter 活性化が検出された。以上から TLR3 が dsRNA のシグナル応答レセプターと判明した。ほぼ同時期に TLR3 KO mouse のマクロファージが dsRNA に不応答になることが報じられ、ヒト、マウスで同じ抗ウイルス産物の応答が起こることが判明した。

TLR3 が IFN を誘導する経路は当時不明であった。我々は yeast two-hybrid で TLR3 の細胞内ドメイン (Toll-IL-1 receptor homology domain, TIR) を bait に結合蛋白質を釣り上げた。TIR ドメインを持つ細胞内分子が TLR3 と特異結合することが判明した。この分子を TIR-containing adapter molecule (TICAM)-1 と名付けた。TICAM-1 は TLR3 に直接結合し、dsRNA-IRF3-IFN-beta の特異応答を司るシグナル系に参与することが判明した(図1)。また、樹状細胞 (mDC) の TLR4 をウイルス成分 (F-protein など) や LPS 刺激すると IRF3 の活性化に続く IFN-beta 誘導が観察された。TLR4 結合分子を同様の yeast two-hybrid で同定し、TICAM-2 と名付けた。TLR4 は TICAM-2 を介して TICAM-1 と会合し、結果として TLR3 とともに TICAM-1 依存性経路を活性化し、IRF3 活性化と IFN-beta 誘導に参与することが明らかとなった(図1)。TICAM-1 経路の特徴は interferon (IFN-) -inducible genes を誘導する樹状細胞の成熟化を指向することである。この特徴は genechip と cDNA subtraction によって検証された。

dsRNA の代表的人工産物の polyI:C は樹状細胞に働いて TICAM-1 経路を活性化する。TLR3 の細胞内局在を抗体染色で調べると上皮系と異なり細胞内のオルガネラに局在した。従ってウイルス複製の産物、dsRNA は細胞質からこの細胞内オルガネラに輸送される必要がある。この機構をラベルした polyI:C を使って検討中である。また、麻疹ウイルス産物は直接 TLR3 の下流分子を活性化する TICAM-1 のバイパス経路に携わる。TLR3 の IRF3 活性化経路とウイルスによる IRF3 直接活性化経路は TICAM-1 経路の下流、IRF-3 リン酸化の上流で収束した。この標的分子について virus-activated kinase と名付けられ、最近 IKKepsilon, TBK1 という kinases

に比定された。麻疹ウイルスの系でこの点を査定すると、株によって異なる細胞応答が得られた。また、IFN誘導には新たな分子の参入が必須であることが判明した。

結核菌アジュバントが細胞傷害性リンパ球（CTL）を誘導する機序は不明であった。我々は TLR2/4 の下流、MyD88 アダプターが CTL 誘導に必須であることを示してきた。IFN-beta は MyD88 に依存せず、TICAM-1 依存性に誘起する。さらに TICAM-1 経路は mDC による NK 活性化を強く誘導した。従って、mDC は MyD88, TICAM-1 のアダプター分子によって異なったシグナル分配に至り異なったエフェクターを活性化する。この点と新規アダプター分子 TICAM-1, TICAM-2 の構造、機能の関連について総説する。

