

認められるのに対し (表1, 感作後2-4週以降), 一方, $Cftr^{\Delta F508/\Delta F508}$ マウスでは, 同時期において全く発症しない (表1). このことは, $Cftr^{\Delta F508/\Delta F508}$ マウスにおける皮膚炎が, 既存の自然発症型モデルマウスと異なり, ダニ感染による搔痒感をきっかけに itch-scratch cycle から皮膚炎病態を誘発する新規モデルマウスである可能性を示唆している (図2). Nc/Nga と同様に自然発症型であることから, 入手の利便性や再現性に問題が残るが, $Cftr^{\Delta F508/\Delta F508}$ マウスは, ADの多様な症状の中で, 搔痒感誘発性皮膚炎症状を解析するための有用なモデルになるかもしれない.

5. おわりに

これまで, ADの病態形成において重要な役割を担う搔痒感の誘発においては, 図1に示すさまざまな因子 (ヒスタミン・プロテアーゼ・IL-1・TNF α ・ECP・MBP・活性酸素・サブスタンスP・NGFなど)が同定されてきたが¹⁵⁾, 著者らは, CFTRがこれらの上流の制御因子の一つである可能性を示した. 今後, どのようにCFTRがNGF発現を制御するのか, ヒト皮膚におけるCFTRがマウスと同様に搔痒感誘発に関わるのか, また, CFTR機能の活性化が, 病態の改善に貢献するかなど, 解決すべきことは多く残されている. 幸いにもCFTRを標的とする活性化剤や阻害剤は, 欧米で盛んに行われているCF治療研究から多く見いだされており, 入手が可能となってきた. 今後, これらのツールを用いた搔痒誘発性皮膚炎に対する研究展開により, 既存薬が功を奏しない難治性のAD患者に対する新規治療法が開発できる日もくるかもしれない.

謝辞

本研究の遂行において, 多大なる御助力を賜った甲斐広文教授を始め, 共同研究者の皆様は厚くお礼を申し上げます.

- 1) Wahlgren, C.F. (1999) *J. Dermatol.*, 26, 770-779.
- 2) Murota, H. & Katayama, I. (2011) *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.*, 11, 428-437.
- 3) Jin, H., He, R., Oyoshi, M., & Geha, R.S. (2009) *J. Invest. Dermatol.*, 129, 31-40.
- 4) Ratjen, F. & Doring, G. (2003) *Lancet*, 361, 681-689.
- 5) Shuto, T., Furuta, T., Oba, M., Xu, H., Li, J.D., Cheung, J., Gruenert, D.C., Uehara, A., Suico, M.A., Okiyoneda, T., & Kai, H. (2006) *FASEB J.*, 20, 782-784.
- 6) Furuta, T., Shuto, T., Shimasaki, S., Ohira, Y., Suico, M.A., Gruenert, D.C., & Kai, H. (2008) *BMC Mol. Biol.*, 9, 39.
- 7) Ntimbane, T., Comte, B., Mailhot, G., Berthiaume, Y., Poutout, V., Prentki, M., Rabasa-Lhoret, R., & Levy, E. (2009) *Clin.*

Biochem. Rev., 30, 153-177.

- 8) Freedman, S.D., Blanco, P.G., Zaman, M.M., Shea, J.C., Ollero, M., Hopper, I.K., Weed, D.A., Gelrud, A., Regan, M.M., Laposata, M., Alvarez, J.G., & O'Sullivan, B.P. (2004) *N. Engl. J. Med.*, 350, 560-569.
- 9) Sato, F., Soos, G., Link, C., & Sato, K. (2002) *J. Invest. Dermatol.*, 119, 1224-1230.
- 10) Hashimoto, Y., Shuto, T., Mizunoe, S., Tomita, A., Koga, T., Sato, T., Takeya, M., Suico, M.A., Niibori, A., Sugahara, T., Shimasaki, S., Sugiyama, T., Scholte, B., & Kai, H. (2011) *Lab. Invest.*, 91, 509-518.
- 11) Matsuda, H., Watanabe, N., Geba, G.P., Sperl, J., Tsudzuki, M., Hiroi, J., Matsumoto, M., Ushio, H., Saito, S., Askenase, P.W., & Ra, C. (1997) *Int. Immunol.*, 9, 461-466.
- 12) Takano, N., Arai, I., & Kurachi, M. (2006) *Br. J. Dermatol.*, 154, 426-430.
- 13) Horiuchi, Y., Bae, S., & Katayama, I. (2005) *J. Dermatol. Sci.*, 39, 56-58.
- 14) Takano, N., Sakurai, T., Ohashi, Y., & Kurachi, M. (2007) *Br. J. Dermatol.*, 156, 241-246.
- 15) 高森建二 (2009) 医学のあゆみ, 228, 25-30.

首藤 剛

(熊本大学大学院生命科学研究部 (薬学教育部)
遺伝子機能応用学分野)

The novel spontaneous mouse model of mite-induced itch symptoms
Tsuyoshi Shuto (Department of Molecular Medicine, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kumamoto University, 5-1 Oe-Honmachi, Kumamoto 862-0973, Japan)

鋳型非依存的 RNA 合成酵素の特異性の分子基盤

細胞内の多くの mRNA は DNA から転写された後, その 3' 末端に, 鋳型 DNA 上にコードされていないポリ A 配列がポリ A 付加酵素と呼ばれる鋳型非依存的 RNA 合成酵素によって合成付加される. mRNA の 3' 末端に付加されたポリ A 配列は, その mRNA の安定性や翻訳促進などに関わっており, 遺伝子発現に重要な役割を果たしている¹⁾. また, 最近では鋳型非依存的に RNA の 3' 末端に余分なヌクレオチド配列を合成付加する鋳型非依存的 RNA 合成酵素群が RNA の積極的な分解による遺伝子発現制御に関与していることが報告されてきている²⁾.

大腸菌のような真正細菌ではポリ A 付加酵素によってその mRNA の 3' 末端にポリ A 配列が付加され, 細胞内では付加されたポリ A 配列は RNA 分解のシグナルとして働

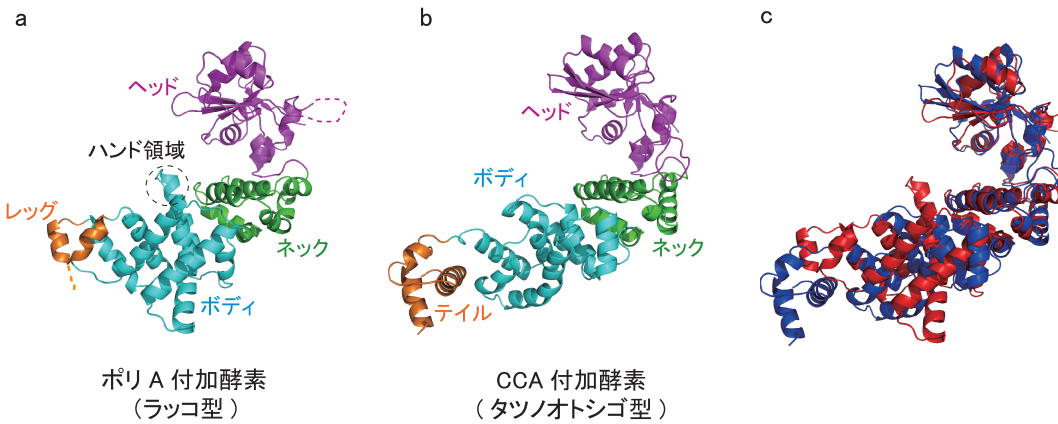


図1 真正細菌のポリ A 付加酵素の全体構造

a. 真正細菌ポリ A 付加酵素全体構造. ヘッド, およびレッグドメイン内の点線は不定形構造を有する領域を示す. b. 真正細菌 CCA 付加酵素全体構造⁷⁾. c. ポリ A 付加酵素 (赤) と CCA 付加酵素の構造の重ね合わせ.

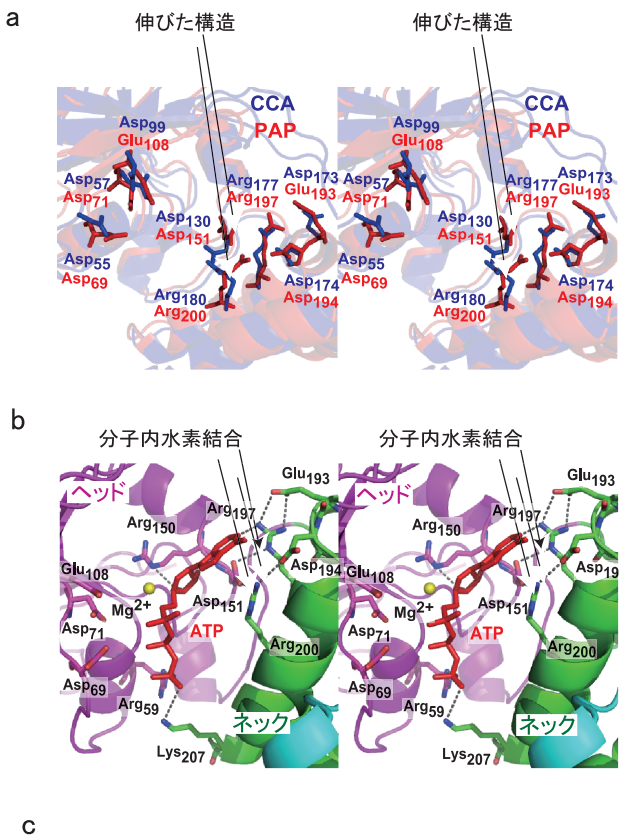


図2 ポリ A 付加酵素のヌクレオチド結合ポケット構造

a. ポリ A 付加酵素 (PAP: 赤) と CCA 付加酵素 (CCA: 青) のヌクレオチド結合ポケットの重ね合わせ. CCA 付加酵素のアミノ酸残基番号は *Thermotoga maritima* のアミノ酸残基番号.

b. ポリ A 付加酵素による ATP 認識

c. ポリ A 付加酵素 (左) と CCA 付加酵素 (右) のヌクレオチド認識の違い.

ポリ A 付加酵素による ATP 認識

CCA 付加酵素による ATP/CTP 認識

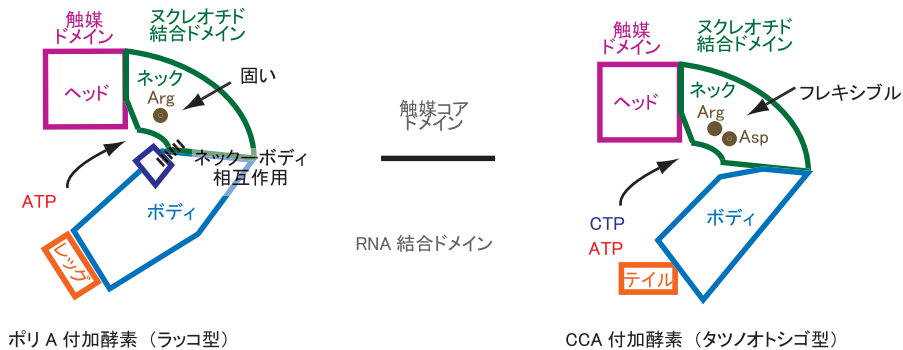


図3 ポリ A 付加酵素と CCA 付加酵素の基質認識の違い
a. ポリ A 付加酵素. b. CCA 付加酵素.

くことが知られている³⁾. 真正細菌のポリ A 付加酵素は tRNA の 3' 末端に普遍的に存在する CCA 配列を鋳型非依存的に合成する CCA 付加酵素とアミノ酸 1 次配列の相同性は高いことが知られている⁴⁾. 特に, アミノ末端側の 25 kDa 領域の相同性の高さは顕著であり, アミノ酸 1 次配列の比較からではそれらの活性を予想することは困難である. 真正細菌の CCA 付加酵素のヌクレオチドあるいは tRNA との複合体の X 線結晶構造はこれまでに報告されており, CTP あるいは ATP との複合体の解析から, 両方の塩基は保存されたふたつのアミノ酸残基, Arg と Asp によって Watson-Crick 様水素対合で認識されていることが明らかにされている⁵⁻⁷⁾. しかしながら, この鍵となるふたつのアミノ酸残基は真正細菌のポリ A 付加酵素でも保存されており, なぜ, ポリ A 付加酵素では ATP のみを特異的に認識し, ポリ A 鎖のみを RNA へ付加するかは不明であった. また, CCA 付加酵素が tRNA 特異的に CCA 配列を合成付加するのに対し, ポリ A 付加酵素が, あらゆる RNA にポリ A 配列を合成付加する理由も未解明であった.

本稿では, 筆者らが決定した真正細菌のポリ A 付加酵素の X 線結晶構造に基づく基質特異性, および CCA 付加酵素構造との比較から導き出された, 真正細菌由来のポリ A 付加酵素と CCA 付加酵素の特異性の分子基盤について紹介する⁸⁾.

真正細菌由来ポリ A 付加酵素の全体構造

筆者らは大腸菌由来のポリ A 付加酵素, およびその ATP 複合体の X 線結晶構造を決定した⁸⁾. その結果, ポリ A 付加酵素の全体構造は, ヘッド, ネック, ボディ, レッグの四つのドメインからなるラッコ (Sea-otter) 様の構造をとっていた (図 1a). この構造は, 同じ化学反応を触媒

する真核生物由来のポリ A 付加酵素^{9,10)}が U 字型構造をとるのとは対照的であった. また, 全体構造がタツノオトシゴ (Sea horse) 様である真正細菌由来の CCA 付加酵素の構造とも異なっていた⁵⁾ (図 1b). しかし, ポリ A 付加酵素は活性触媒部位やヌクレオチド結合部位を含むヘッド, ネックドメインにおいて, CCA 付加酵素と非常によく似ていた (図 1c). これは, 真正細菌のポリ A 付加酵素と CCA 付加酵素のアミノ末端側の 25 kDa 領域の高い相同性を反映している. 一方ポリ A 付加酵素のカルボキシ末端側のボディ, レッグドメインは CCA 付加酵素のボディ, テールドメインの構造とは大きく異なっていた. 特に, ポリ A 付加酵素では α ヘリックスが束ねられた構造をとっているボディドメインの一つのヘリックス (ハンド領域) がネックドメインの方向に突き出し, ネックドメインと相互作用している構造をとっていた (図 1a).

ポリ A 付加酵素の活性ポケット構造と ATP 認識

ポリ A 付加酵素の活性触媒ドメイン, ヌクレオチド結合部位を含むヘッド, ネックドメインの構造は CCA 付加酵素のそれらの構造と非常に似ていたが, ヌクレオチド塩基結合部位, ネックドメイン内のいくつかのアミノ酸のコンフォメーションが異なっていた (図 2a). ポリ A 付加酵素の Asp151 と Arg200 (赤) は伸びたコンフォメーションをとっているが, CCA 付加酵素のこれらのアミノ酸に相当する残基 (青: Asp130, Arg180) は折れ曲がった構造をしている (図 2a). ポリ A 付加酵素では, Asp151 と Arg200 はそれぞれ, ヌクレオチド認識に関わる保存されたアミノ酸 (Arg197, Asp194) と分子内水素結合を形成し, また, Asp151 と Arg200 も水素結合を形成していた. その結果, ヌクレオチド塩基結合部位が固い構造をとっていた. ATP との複合体構造解析から, ヌクレオチド結合ポ

ケットの形と大きさがATPのみに適したものになっており、CCA付加酵素ではCTPとATPの両方の認識に関与している保存されたふたつのアミノ酸のうちひとつのアミノ酸(Arg)のみがヌクレオチドの塩基認識に用いられており、もうひとつのアミノ酸(Asp)はヌクレオチドの結合ポケットを形成する足場の役割を果たしていることが明らかになった(図2b)。

当初、ポリA付加酵素と、CCA付加酵素は同じ機構でATPを認識するものと予想されていたが、今回の構造解析から、両者のATPの認識機構は大きく異なることが判明した(図2c)。

ポリA付加酵素とCCA付加酵素のヌクレオチド認識

ポリA付加酵素とCCA付加酵素の全体構造の比較から、ヌクレオチド結合部位を含む、ボディ、およびネックドメインを含むアミノ末端側の全体構造は非常に似通っているにも関わらず、ヌクレオチド結合ポケットの構造が異なるのは何故であろうか？

ポリA付加酵素のカルボキシル末端部分、ボディー、レッグドメインの構造はCCA付加酵素の、ボディ、テイルドメインとは異なる。前述したように、ポリA付加酵素では、RNA認識に関わるボディドメインが、ネックドメインと相互作用している(図1, 図3)。今後の詳細な解析をまつ必要があるが、ポリA付加酵素では、このボディとネックドメインのハンド領域を介した相互作用が、ヌクレオチド塩基結合部位ポケットの構造を固い形で固定化していると想定される。一方、CCA付加酵素では、ポリA付加酵素とは異なり、ボディードメインとネックドメイン間の相互作用は見られない。その結果、CCA付加酵素ではヌクレオチドの結合ポケットの塩基認識に関わるアミノ酸は、ポリA付加酵素とは異なり、分子内水素結合を形成せず、フレキシブルな構造をとる(図3)。このことによって、これらのアミノ酸残基を用いて、反応ステージに依存して、CTPとATPを認識して、CCA配列を合成することができることが示唆された。

ポリA付加酵素のプライマーRNA認識

ポリA付加酵素の表面電荷分布から、RNAプライマーはボディー、レッグドメインに結合し、RNAの3'末端はヘッド、ネックドメインの間に入り込むと考えられる。レッグドメインのカルボキシル末端のおよそ30アミノ酸は塩基性アミノ酸が多く、さらに適切な構造をとらないことが幾つかの二次構造予測プログラムで示唆された。実際、

筆者らが決定した全長のポリA付加酵素の構造では、このカルボキシル末端部分は電子密度がはっきりせず、不定形構造をとることが示唆された。

CCA付加酵素のカルボキシル末端領域のテイルドメインは、tRNA分子のT Ψ Cループを認識し、CCA付加反応の途中でtRNAプライマーが酵素から解離してしまうのを防ぐ、アンカーの役割を果たしている⁶⁾。一方、ポリA付加酵素では、全てのRNAへポリAを付加する。したがって、CCA付加酵素にみられるtRNAのテイルドメインのようなアンカーは必要ではないと考えられる。ポリA付加酵素のレッグドメインのカルボキシル末端領域を欠失させると、*in vitro*で、ポリA付加酵素のポリA付加反応のプロセビティが損なわれることが示された⁸⁾。したがって、ポリA付加酵素のカルボキシル末端領域はポリA付加反応において、ポリAが付加されたRNAプライマーの酵素上での転移、移動を促進して、連続的に長いポリA配列をRNAプライマーへ付加するために必要な領域であることが示唆された。

最 後 に

今回の真正細菌由来のポリA付加酵素のATPとの複合体構造解析およびCCA付加酵素の構造との比較から、両者の酵素のATP認識機構が異なっていることが明らかになった。ポリA付加酵素では、ヌクレオチド塩基結合部位の形と大きさがATPに適したものになっており、一つのアミノ酸のみがATPの塩基と水素結合を形成していた。ポリA付加酵素とCCA付加酵素のヌクレオチド結合部位を形成するアミノ酸の1次配列の相同性は高いが、ヌクレオチド結合ポケットの構造は異なっており、活性触媒ドメインとは別のドメインによって、これらの鑄型を用いないRNA合成酵素のヌクレオチドの特異性が変化していることは興味深い¹¹⁾。また、CCA付加酵素は反応ステージに依存して、RNAの末端と酵素の複合体によって特異性をCTPからATPへと変換するが、ポリA付加酵素では、ヌクレオチドの特異性が酵素自身に存在する。このことは、ポリA付加酵素はCCA付加酵素から進化してきたことを示唆すると考えられる。

- 1) Wahle, E. & Rügsegger, U. (1999) *FEMS Microbiol. Rev.*, **23**, 277–295.
- 2) Régnier, P. & Hajnsdorf, E. (2009) *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.*, **85**, 137–185.
- 3) Carposis, A.J., Vanzo, N.F., & Raynal, L.C. (1999) *Trends Genet.*, **15**, 24–28.

- 4) Yue, D., Maizels, N., & Weiner, A.M. (1996) *RNA*, 2, 895-908.
- 5) Li, F., Xiong, Y., Wang, J., Cho, H.D., Tomita, K., Weiner, A. M., & Steitz, T.A. (2002) *Cell*, 111, 815-824.
- 6) Tomita, K., Fukai, S., Ishitani, R., Ueda, T., Takeuchi, N., Vassilyev, D.G., & Nureki, O. (2004) *Nature*, 430, 700-704.
- 7) Toh, Y., Takeshita, D., Numata, T., Fukai, S., Nureki, O., & Tomita, K. (2009) *EMBO J.*, 28, 3353-3365.
- 8) Toh, Y., Takeshita, D., Nagaike, T., Numata, T., & Tomita, K. (2011) *Structure*, 19, 232-243.
- 9) Bard, J., Zhelkovsky, A.M., Helmling, S., Earnest, T.N., Moore, C.L., & Bohm, A. (2000) *Science*, 289, 1346-1349.
- 10) Martin, G., Keller, W., & Doublié, S.C. (2000) *EMBO J.*, 19, 4193-4203.
- 11) Betat, H., Rammelt, C., Martin, G., & Mörl, M. (2004) *Mol. Cell*, 15, 389-398.

富田 耕造

((独)産業技術総合研究所バイオメディカル研究部門)

Mechanism of template-independent RNA polymerization
Kozo Tomita (Biomedical Research Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), 1-1-1, Higashi, Tsukuba, Ibaraki 305-8566, Japan)

細胞内シグナル伝達の可視化技術と分子標的治療薬の耐性判定への応用

はじめに

下村脩博士によって、*Aequorea victoria* の発光器官から緑色蛍光タンパク質 GFP (green fluorescent protein) が発見され、1992年にそのcDNAが単離されて以来、生細胞イメージングは生物学研究の必須ツールになっている。シグナル伝達のネットワークにおいては、構成要素であるタンパク質の局在のみならず、他のタンパク質との相互作用、リン酸化をはじめとする翻訳後修飾、構造変化や酵素活性など質的变化がダイナミックに生じている。これらの動的イベントの可視化を可能にする技術の一つが、フェルスターの蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET, Förster/fluorescence resonance energy transfer) である。本稿では、これら蛍光イメージングを用いたイメージングの基礎と、最近我々が開発した FRET バイオセンサーを用いた体外診断試薬の臨床検査手法としての適応や有用性について紹介したい。

1. 細胞内シグナル伝達の可視化技術

(1) 緑色蛍光タンパク質 (green fluorescent protein, GFP)

今さら改めて紹介するまでもないが、下村脩博士によってオワンクラゲの発光器官から単離された蛍光タンパク質であり¹⁾、下村博士はその功績により Roger Y. Tsien, Martin Chalfie と共に 2008 年ノーベル化学賞を受賞した。GFP がこれほどまでに普及した契機は、1992 年の cDNA 単離であり²⁾、以来 GFP と解析したい分子との融合タンパク質をコードする発現ベクターを遺伝子導入するだけで細胞を「染め上げる」ことが可能となった。過剰発現系の実験ではあるが、生理的環境下での生きた細胞の観察が可能であり、ダイナミックなタンパク質動態や環境変化の可視化に汎用されている。現在多くの変異体やクラゲ以外の刺胞動物由来の蛍光タンパク質が開発され、カラーバリエーションが非常に豊富となり、選択可能な波長域も広がった。短波長・長波長側の端的な例として、北海道大学の永井健治博士らによって開発され、15年ぶりに蛍光タンパク質の最短波長記録更新となった群青色蛍光タンパク質 Sirius (励起波長: 355 nm; 蛍光波長: 424 nm)³⁾ から、近赤外の蛍光タンパク質⁴⁾等があげられる。

(2) フェルスターの蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET)

共鳴エネルギー移動現象自体は発光物質等でも生じるが、ここでは蛍光タンパク質を用いた FRET に限定する。FRET はドナー (エネルギー供与体) からアクセプター (エネルギー受容体) へと励起エネルギーが移動する現象である^{5,6)}。GFP を用いた FRET ではシアン色と黄色の蛍光タンパク質のペア (CFP と YFP) が使用される場合が多く、両者が近接した時のみドナーである CFP の励起エネルギーがアクセプターである YFP へと遷移し FRET が観察される (図 1A)。会合状態を調べたい 2 分子をそれぞれ CFP と YFP との融合タンパク質として発現させると、相互作用時のみ FRET を観察する系ができ、これは分子間 FRET (または二分子 FRET) と呼ばれる (図 1B)。この二分子をさらに融合させ、一つの分子で FRET を生じさせる系も構築可能で、分子内 FRET (または一分子 FRET) と呼ぶ (図 1C)。

GFP を用いた FRET バイオセンサーを最初に開発したのは当時 Tsien 研究室にいた宮脇敦史博士であり、カルシウムセンサー Cameleon はあまりに有名でもはや説明は不要であろう⁷⁾。それに引き続き多数の FRET バイオセンサー分子が開発され、様々なシグナル伝達分子のイメージング