

エイズ動物モデルとしてのSIV感染アカゲザルの有用性
高病原性 SIVmac239 と低病原性 Nef 遺伝子欠損変異 SIV 感染の比較解析から

分担研究者： 森 一泰 国立感染症研究所 主任研究官
研究協力者： 杉本智恵 国立感染症研究所 協力研究員

研究要旨：

Nef 遺伝子の *in vivo* における機能を探る目的で初期感染期のリンパ節における SIVmac239 感染と *nef* 遺伝子欠損ウイルス (*d-nef*) 感染様式について病理学的手法で解析した。SIVmac239 感染では大部分の SIV 感染細胞は傍皮質領域に存在した。対照的に *d-nef* 感染では傍皮質領域には少数の感染細胞しか見られず大部分の感染細胞は皮質領域または皮質領域と傍皮質領域の境界領域に存在した。初期感染における感染細胞分布の経時的な解析から SIVmac239 感染細胞が最初に検出されたのは感染後 7 日で感染細胞は皮質領域と傍皮質領域の境界領域に存在した。これらの結果から SIV 感染はまず皮質領域と傍皮質領域の境界領域で B 細胞の分化誘導の役割を持つヘルパー T 細胞で起こり、次に傍皮質領域に存在する多数の T 細胞において感染が起こるのではないかと推測された。宿主動物感染における Nef の役割は、リンパ組織の主要な T 細胞領域である傍皮質領域に存在する多数の resting T 細胞でのウイルスの感染増殖を促進することであると推測された。

A. 研究目的

Nef 遺伝子は霊長類レンチウイルス (SIV, HIV-1, HIV-2) に共通に見られる 27-34 kDa のタンパク質をコードする。Nef タンパクはウイルス複製過程の初期に発現され、翻訳後 myristylation, リン酸化され、感染細胞の細胞膜の内側に結合する。Nef 遺伝子の役割については培養細胞を用いた研究から多くの

機能が報告されている。T 細胞表面分子 (CD4, CD3, CD28, MHC I) の細胞表面からの減少、ウイルスの感染性の上昇、感染細胞のアポトーシスの抑制、T 細胞活性化など。サル感染モデルからはウイルス増殖、病原性に Nef 遺伝子が重要であることが明らかにされた。さらに、Nef 遺伝子欠損変異ウイルス感染ザルには高病原性 SIV に対する感染防御免疫が誘導されていることが明らかにされた。エ

イズウイルス感染は通常長期間の感染を経て免疫機能障害が種々の感染症、悪性腫瘍の発症を起こす。しかし免疫機能の障害は感染後早期から特にエイズウイルス特異的な細胞性免疫の成立に対して起こっていることが分かってきた。エイズウイルス感染による宿主免疫応答の障害は感染後数週にウイルス増殖のピークとして観察される初期感染において起こると考えられる。しかしエイズウイルスが免疫組織においてどのような感染を起こし、どのような免疫機能への影響が起こるのか解明されていない。そこで我々は高病原性の分子クローン SIVmac239 と低病原性で防御免疫を誘導する Nef 遺伝子欠損変異ウイルス (d-nef) を用い初期感染において感染組織であるリンパ節で両ウイルスがどのような感染を起こしているのかその違いは何か病理学的手法で解析した。

B. 研究方法

ウイルス SIVmac239 nef deletion &

SIVmac239 nef⁺ : それぞれのプロウイルス DNA を含むプラスミドを COS1 細胞に DEAE dextran 法によりトランスフェクションを行った。培養上清に含まれるウイルスを PHA により活性化したアカゲザルリンパ球に感染させ増殖しウイルスストックを作製した。TCID₅₀ は細胞株 CEMx174 を用い、p27 gag 抗原量は市販のキット (Coulter 社) を用い測定した。

サル 2-5才のアカゲザル(ミャンマー産); SIV, typeD retrovirus, B virus について抗体陰性の健常なサルで、末梢リンパ球培養において SIV 感染性に問題ない個体を用いた。1 群3頭にそれぞれ Nef 遺伝子欠損ウイルス(SIVmac239 nef del.)または SIVmac239

を 100 TCID₅₀ 静脈内接種した。

血しょうウイルス RNA 量の測定

血しょう中のウイルス RNA は Boehringer Mannheim 製キットを用い精製した。ウイルス RNA 量は SIV の gag 遺伝子配列から作成したプライマー: the gag primers, forward primer: 1224F (5'-AATGCAGAGCCCCAAGAAGAC-3'), reverse primer: 1326R (5'-GGACCAAGGCCTAAAAACCC-3') and TaqMan probe 1272T: (FAM-5'-ACCATGTTATGGCCAAATGCC CAGAC-3'-TAMRA)を用い、RT-PCR キット (TaqMan EZ RT-PCR kit)を用いてリアルタイム PCR 法により測定した。

末梢リンパ球の細胞表面タンパクの解析

血液から末梢リンパ球を分離し、蛍光ラベルされた種々のモノクローナル抗体を用いフローサイトメトリーにより解析した。

免疫染色

T 細胞、B細胞、マクロファージはそれぞれ CD3, CD20, CD68 に対する抗体、増殖細胞抗原:PCNA, 細胞障害細胞 (CTL, NK) 抗原:TIA-1 に対する抗体、SIV タンパクについては Gag, Env, Nef に対する抗体を用いた。抗原の染色は Tyramid signal amplification によるシグナル増強後蛍光物質を結合させる方法、または通常の DAB を用いる方法をも用いた。

C. 研究結果

血漿中ウイルス RNA 量

SIVmac239 nef deletion の血中ウイルス量

は、SIVmac239 nef+感染と同様に感染2週後に見られた。ピークは 10^6 - 10^7 copy/ml SIVmac239 nef+感染と比較して約 1/10 から 1/100 であった。感染後6週には検出限界以下に低下したが、その後2頭では 10^4 copy/ml 以下の持続感染が、1 頭では検出限界以下を維持した。SIVmac239 nef+感染では2頭はそれぞれ接種後 2, 2.5 年後にエイズを発症し死亡した。これらのサルでは初期感染後血中ウイルス量は感染後16週に 10^3 copy/ml まで低下したがその後上昇し 10^5 - 10^6 copy/ml レベルの持続感染が観察された。1頭では 26 週までに検出限界以下まで減少し、その後も 10^4 copy/ml 以下であった。感染後3年の観察期間中 CD4 レベルも正常で、長期無発症型の感染例と判断された。

初期感染リンパ節の病理組織像とSIV感染細胞

ウイルス接種後2週、初期感染のウイルス増殖がピーク時の表層リンパ節を生検し、病理組織像を HE 染色により解析した。両ウイルス感染組織には明らかな違いが見られた。皮質 (B 細胞領域) のろ胞形成が異なった。Wt SIV 感染では大部分が1次ろ胞であるのに対して d-nef 感染では明らかな2次ろ胞が多数存在した。この違いは免疫染色による CD20 陽性細胞、PCNA 陽性の増殖性細胞の染色でも確認された。CD20+、PCNA+細胞が d-nef 感染リンパ節により多く存在していた。SIV タンパク陽性細胞の分布も異なっていた。SIV 陽性細胞数は血漿ウイルス RNA 量と比例していた。Wt SIV 感染リンパ節には d-nef 感染と比べて多くの SIV 陽性細胞が存在した。Wt SIV 感染では大部分の感染細胞は T 細胞領域である傍皮質領域に存在したが、d-nef 感染では大部分の感染細胞は B 細胞領域に

存在した。

SIV 感染細胞の同定

SIV 感染細胞を同定するために抗 CD3 抗体、抗 CD68 抗体を用いて2重染色した。どちらの場合も CD3 陽性の T 細胞が感染していた。

SIV 感染細胞のリンパ節での分布

Wt-SIV 感染の3頭、d-nef 感染の3頭における SIV 感染細胞数を傍皮質領域、皮質領域、両者の境界領域に分けて測定した。d-nef 感染では 90%以上の SIV 感染細胞は皮質領域、または境界領域に存在した。この感染の分布をさらに感染初期について調べた。Wt-SIV 感染の 2 頭で感染後4日、7日 11 日、14 日のリンパ節を調べた。感染後4日のリンパ節は小さく皮質の活性化は見られなかった。また SIV 感染細胞を同定することはできなかった。感染後7日のリンパ節には感染細胞が存在し、皮質領域と傍皮質領域の境界領域に存在した。感染後、11 日、14 日リンパ節には多数感染細胞が存在し、大部分は傍皮質領域に存在した。

D. 考察

Nef 遺伝子の役割はリンパ節傍皮質領域に存在する T 細胞でのウイルス感染に重要であることが明らかとなった。d-nef が感染する B 細胞領域には抗体産生に対するヘルパー機能 CD4+ T 細胞が存在することが知られている。この細胞は CD69+, CD45RO+ であることから容易に HIV/SIV が感染増殖すると推測される。これに対して傍皮質領域の T 細胞の多くが naive T 細胞、あるいは resting memory T

細胞であることから HIV/SIV の増殖性感染は難しいと推測される。ウイルス感染が可能となる T 細胞の活性化には APC を介した抗原刺激が必要とされる。推測される Nef の機能としては通常の APC を介した抗原刺激以外の機序での T 細胞の活性化が考えられる。他の Nef の機能を含め傍皮質領域の T 細胞感染の機序について今後の解析が必要である。傍皮質には活性化前のヘルパー T 細胞の resting memory T 細胞が存在する。HIV/SIV 感染による初期感染後の HIV/SIV 特異的な細胞性免疫の障害がこれらの細胞の感染による消失によることが推測される。

E. 結論

感染宿主における Nef の役割はリンパ組織 T 細胞領域に存在する多数の resting T 細胞でのウイルスの感染増殖を促進することであると推測された。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. F. Villinger, R. Miller, K. Mori, A. E. Mayne, P. Bostik, J. B. Sundstrom, C. Sugimoto and A. A. Ansari. 2003. IL-15 is superior to IL-2 in the generation of long-lived antigen specific memory CD4 and CD8 T cells in rhesus macaques. Vaccines (In press).

2. C. Sugimoto, K. Tadakuma, I. Otani,

T. Moritoyo , H. Akari, F. Ono , Y. Yoshikawa, T. Sata, S. Izumo, and K. Mori. *Nef* gene is required for robust productive infection of Simian Immunodeficiency Virus in T-cell-rich paracortex in lymph nodes. J Virol. 77. 4169-4180. 2003

3. H. Q. Xing, T. Moritoyo², K. Mori, K. Tadakuma, C. Sugimoto, F. Ono, H. Hayakawa, S. Izumo Simian immunodeficiency virus encephalitis in the white matter and degeneration of the cerebral cortex occur independently in simian immunodeficiency virus-infected monkey. J. Neurovirol. 9. 508-518. 2003.

4. Villinger, F., Mayne A. F., Bostik P., Mori K., Jensen P. E., Ahmed R. and Ansari, A. Evidence for antibody mediated enhancement of SIVgag antigen processing and cross presentation in SIV infected rhesus macaques. J Virol. 77. 10-24. 2003

5. 森一泰、永井美之. 糖鎖と AIDS ウィルス. Molecular Medicine. 9: 1062-1069. 2003.

2. 学会発表

1. C. Sugimoto, T. Shioda, Y. Yasutomi, N. Yamamoto, Y. Nagai, and K. Mori. Properties of a quintuple deglycosylated SIVmac239 mutant as a novel attenuated SIV. 21th annual symposium

on nonhuman primate models for AIDS,
October, 2003, Seattle, USA.

2. C. Sugimoto, S. Ohgimoto, S. Kusakawa, Y. Takebe, T. Shioda, Y. Nagai, and K. Mori. Influence of Deglycosylation on efficacy of Env based vaccine. 21th annual symposium on nonhuman primate models for AIDS, October, 2003, Seattle, USA.

3. 糖鎖欠損変異 SIV の新規 attenuated virus としての性質 杉本智恵、保富康宏、塩田達雄、山本直樹、永井美之、森 一泰、日本エイズ学会、2003 年、神戸

4. Env エイズワクチンにおける糖鎖の重要性、森 一泰、杉本智恵、中山英美、塩田達雄、草川茂、武部豊、保富康宏、永井美之、日本エイズ学会、2003 年、神戸

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
2. 実用新案特許 なし

その他 なし

厚生科学研究補助金（エイズ対策研究事業）
分担研究報告書

HIV 脳症に関する発症原因物質およびバイオマーカーについて：
TNF- α を中心として

研究分担者	清島 満	岐阜大学医学部教授
研究協力者	斉藤 邦明	岐阜大学医学部講師
研究協力者	鍋島 俊隆	名古屋大学医学部教授

研究要旨：

(1) Wild type(WT)マウスで HIV 脳症発症原因物質の一部と考えられる脳内キノリン酸、TNF- α 、PAF 濃度は、LP-BM5 ウイルス感染により有意に上昇していた。それに対し、TNF- α 遺伝子欠損マウスでは、LP-BM5 ウイルス感染により脳内キノリン酸濃度は有意な上昇が見られたが、PAF 濃度は、非感染群に比べ有意な上昇は認められなかった。その際の Probe test 等行動薬理的解析の結果は、WT マウスのウイルス感染群で明らかなマウスの記憶障害を示したが、TNF- α 遺伝子欠損マウスでは、ウイルス感染群でも行動薬理的異常は何ら観察されなかった。脳症発症のメカニズムとして TNF- α が神経細胞に直接およぼす影響と、TNF- α によって産生される PAF など種々脳内生理活性物質の 2 次的変動のいずれか、あるいはその両方が関与する可能性が考えられた。

(2) HIV 脳症のバイオマーカーとして蛍光検出器を用いたキノリン酸高感度微量定量法を新たに開発した。この測定系を用いて LPS 等で刺激した培養細胞上清のキノリン酸濃度を測定した結果、ヒト血中モノサイト/マクロファージ培養上清に加え、活性化されたマイクログリアからもキノリン酸が産生されることが明らかとなった。研究分担者らが開発したキノリン酸高感度微量定量法は、その感度ならびに特異性に関しても優れており、培養上清のみならず、髄液および血清などに応用でき、HIV 脳症など種々神経疾患のバイオマーカーとして有用であると考えられた。

A. 研究目的

HIV 脳症の発症に何らかのメカニズムで TNF- α が関与していること、さらに薬剤投与により脳の TNF- α 抑制することで HIV 脳症が改善できる可能性を研究分担者らが用いたマウス脳症モデルにより明らかにした。TNF- α がサイトカインで良く見られ

る生体防御と破壊という両面性を有している事を考慮すると、TNF- α を抑制する治療法は、投与のタイミングならびに種々生理活性物質の変動など細心の注意が必要である。さらに、TNF- α が神経細胞に直接およぼす影響と、TNF- α によって産生されるキノリン酸など種々脳内生理活性

物質の変動による神経細胞への影響の両方を考慮する必要がある。本研究は(1) マウス脳症モデルとして確立した LP-BM5 ウイルス感染モデルで、脳症の発症に関係すると考えられる種々生理活性物質の変動について解析する。(2) さらに、HIV 脳症のバイオマーカーとして有用と考えられるキノリン酸の測定について、リコンビナント酵素を用いた研究分担者が考案した従来の方法をさらに高感度化する。すなわち、HPLC 蛍光検出器を用いたキノリン酸高感度微量定量法を開発検討する。

B. 研究方法

(1) TNF- α 欠損マウスを用いた病体解析：TNF- α 欠損マウスに LP-BM5 ウイルスを感染させ、感染 10 週後より行動薬理的指標として Y-maze test, Probetest 等を実施し、さらに行動薬理試験終了後の脳内 TNF 発現量、痴呆発症原因物質としてキノリン酸、血小板活性化因子 (PAF)などを定量解析した。

行動薬理的検索：Wild type のマウスは 8-10 週後にマウスは HIV 脳症に類似した記憶障害を呈する。その評価法として Y-maze test, Water maze test 等を実施した。Y-maze 自発交替行動の測定は、Sarter (1988)らの方法に準じて以下の手順で行った。マウスを Y 字迷路のいずれかの arm の先端に置き、8 分間にわたって迷路内を自由に探索させ、マウスが移動した arm の位置を選択した順に記録する。マウスが測定時間内に各 arm に移動した回数をカウントし

これを total arm entries とする。つぎに、この中で連続して異なる 3 つの arm を選択した組み合わせを調べ、この数を number of alternation とする。Number of alternation を total arm entries から 2 を引いた数で割り、それに 100 を掛けて求めた値を percent alternation とし、これを自発的交替行動の指標とした。Water maze) Visible target trial 1 日 3 回訓練試行を行う。platform の位置は固定し、start 位置を毎回変化させる。start してから platform に到達するまでの時間を測定する。一回の試行は最大 60 秒までとし、この間に動物が platform に到達出来ない場合は手で platform まで誘導する。platform 上には約 30 秒間滞在させる。この操作を 2 日間行う。2) Reference memory 1 日 3 回訓練試行を行う。platform 上の位置は固定し、start 位置を毎回変化させる。1 回の試行は最大 60 秒までとし、この間に動物が platform に到達出来ない場合は手で platform まで誘導する。platform 上には約 30 秒間滞在させる。1 日 3 回の訓練試行終了後に probe test を行う。この操作を第 1 週目は連続 4 日間繰り返し行う(訓練試行 12 回、probe test 4 回)。第 1 週目の最終試行の 5 日後に retention test を 1 回行う。Retention test 終了後に訓練試行を 2 回行い、その後 probe test を行った。

種々脳内生理活性物質の定量：脳内 TNF 発現量、キノリン酸、PAF などは、研究分担者らがすでに報告した方法に従った。

(3) HIV 脳症の指標としての髄液中キノリン酸高感度定量法：リコンビナント酵素を用いた蛍光標識による HPLC 検出法

研究分担者らが開発したディスプレイブルカラムを用いたキノリン酸簡易迅速測定法をさらに改良し、蛍光ラベルした補酵素を使用することにより、HPLC 蛍光高感度検出法を構築した。

キノリン酸は Quinolinic acid phosphoribosyl-transferase (QPRT) と phosphoribosylpyrophosphate (PRPP) によって nicotinic acid mononucleotide(NAMN)に合成される。さらに、その NAMN を基質として nicotinic acid mononucleotide adenytransferase(NMAT) により desamido-nicotinamide adenine dinucleotide(d-NAD)に合成される。この際、NMAT によるアデニル化の過程で蛍光ラベルした ATP を使用することにより、蛍光ラベル d-NAD が生成される。両方の酵素反応において副産物として pyrophosphate が生成されるが、これは inorganic pyrophosphatase(IPP)を添加することにより完全に分解されるため、反応中の NAMN や蛍光ラベルされた NAD は十分な生成が得られる。

すなわちこの反応において蛍光 NAD の量は基質である濃度を反映していた。この蛍光標識された NAD を HPLC で測定することにより、キノリン酸濃度を算出する。使用したリコンビナント QPRT(rQPRT)および NMAT(rNMAT)は QIAGEN 社の QIAexpress タンパク精製 System に

より精製した。

C. 研究結果

(1) マウス LP-BM5 ウイルス感染モデルを用いた脳症の発症に関係すると考えられる種々生理活性物質の変動について解析

LP-BM5 ウイルス感染により脳内での TNF- α の合成はコントロールに比べ著明な増加が見られた(Figure 1)。その際の Probe test 等行動薬理学的指標の結果は、ウイルス感染群で明らかなマウスの記憶障害を示した。それに対し、TNF- α 遺伝子欠損マウスでは、ウイルス感染群でも行動薬理学的異常は観察されなかった。Figure.1 に示す通り、Wild type(WT)マウスで脳内キノリン酸、PAF 濃度は、非感染群に比べ有意に上昇していた。しかし、TNF- α 遺伝子欠損マウスでは、LP-BM5 ウイルス感染により脳内キノリン酸濃度は有意な上昇が見られたが、PAF 濃度は、非感染群に比べ有意な上昇は認められなかった。

(2) 蛍光検出器を用いたキノリン酸高感度微量定量法について
HPLC 蛍光検出器を用いたキノリン酸測定法の最小感度は、1-5nM 程度で健常人の髄液測定が十分可能であった。また、従来法よりさらに高感度化され簡易に再現性よく定量できることが判明した。

この測定法を用いて、初代培養人血中モノサイト、砂ネズミモノサイト、マ

イクログリアおよびアストロサイトの LPS 刺激によるキノリン酸産生能を調べた。その結果、LPS 刺激によって、人モノサイト、砂ネズミモノサイト、マクログリアでは多量のキノリ

ン酸産生が見られたが、アストロサイトなどマクロファージ系以外の細胞では、ほとんどの細胞においてトリプトファンからキノリン酸を産生しないことが明らかとなった。

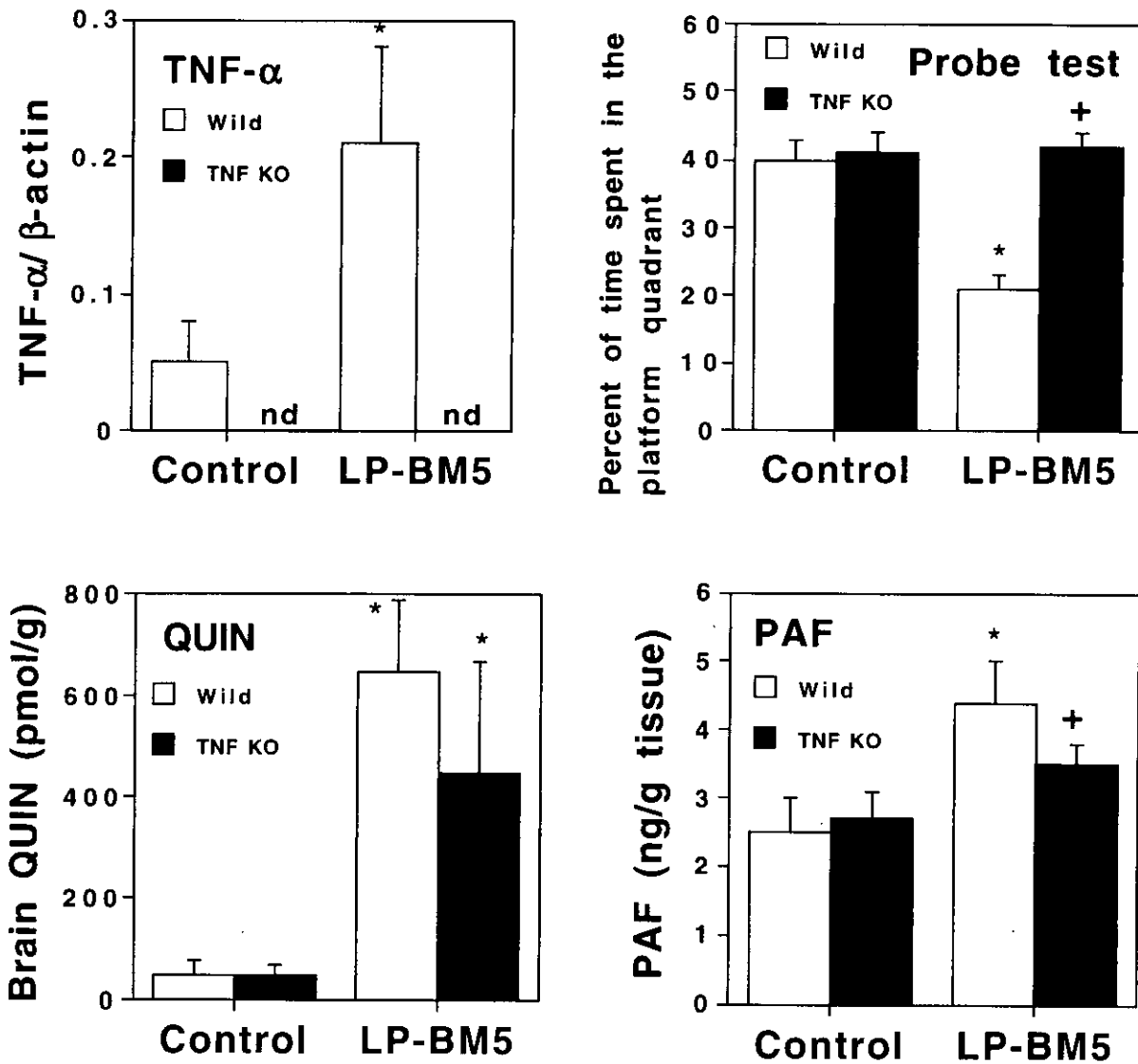


Figure 1. 脳症発症関連生理活性物質の変動における TNF- α の役割：
マウス LP-BM5 ウイルス感染モデルを用いた解析

D. 考察

HIV 脳症発症のメカニズムは、非常に複雑であると考えられるが、アルツハイマー病などの神経変性疾患とは異なり、可逆的な神経障害である。今回のマウスモデルを用いた研究分担者らの研究結果は、TNF- α がウイルス感染群で見られる記憶障害発症と深く関係し、さらに2次的に産生されることが考えられる脳内キノリン酸、グルタミン酸、PAF 濃度との関連を示唆するものであった。脳症発症のメカニズムとして今後 TNF- α が神経細胞に直接およぼす影響と、TNF- α によって産生される PAF など種々脳内生理活性物質の2次的変動のいずれか、あるいはその両方を考慮することと必要が考えられた。いずれにせよ、治療の観点から TNF- α は1つのターゲットとして HIV 脳症を含めた種々免疫性神経疾患でさらに今後注目されるものと考えられた。また、HIV 脳症のバイオマーカーとして研究分担者らは蛍光検出器を用いたキノリン酸高感度微量定量法を新たに開発した。この測定系を用いて LPS 等で刺激した培養細胞上清のキノリン酸濃度を測定し、ヒト血中モノサイト/マクロファージ培養上清に加え、活性化されたマイクログリアからもキノリン酸が産生することを証明した。今後、さらに髄液などを用いた種々脳神経疾患における病体解析を加えることにより、バイオマーカーとして臨床応用することが充分可能であると考えられた。すなわち、研究分担者らが開発したキノリン酸高感度微量定量法は、その感度ならびに特異性に関しても優れており、

培養上清のみならず、髄液などおよび血清などに応用できると考えられた。

E. 結論

脳内で産生する TNF- α がウイルス感染群で見られる記憶障害発症と深く関係しており、今回の研究から2次的に産生されることが考えられる脳内キノリン酸、グルタミン酸、PAF 濃度の有意な上昇がマウス LP-BM5 ウイルス感染群で認められた。今後 TNF レセプター遺伝子欠損マウスを用いた解析を加えることにより、LP-BM5 ウイルス感染群で見られる記憶障害の詳細なメカニズムが解明されることが期待される。すなわち神経細胞での TNF- α レセプターを介したシグナルを介するものか、あるいは TNF- α によって産生される種々脳内生理活性物質の変動による神経細胞への影響によるいずれかあるいはその両方が重要であるか明らかとなる。さらに、分担研究者らが今回開発したキノリン酸蛍光 HPLC 定量法は、感度、再現性ともに優れており、HIV 脳症の指標として利用できると考えられ、今後関連諸施設からのサンプルを測定し臨床的有用性を確立することが期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

[原著]

1. Iwasaki M, Saito K, Takemura M, Sekikawa K, Yamada Y, Wada H,

Mizuta K, Seishima M, Y. Ito
J Allergy Clin Immunol 112(1):134-40
(2003).

2. Role of V α 14 NKT cells in the development of impaired liver regeneration in vivo.

Ito H, Ando K, Nakayama T, Taniguchi M, Ezaki T, Saito K, Takemura M, Sekikawa K, Imawari M, Seishima M, Moriwaki H.

Hepatology. 38(5):1116-24 (2003)

3. Genotyping of hepatitis C virus by melting curve analysis with SYBR green I.

Fujigaki H, Takemura M, Takahashi K, Yamada Y, Fujii H, Wada H, Saito K, Ohnishi H, Seishima M.

Ann Clin Biochem, (in press)

4. Tumor necrosis factor- α from bone marrow-derived cells is not essential for the expression of adhesion molecules in lipopolysaccharide-induced nasal inflammation.

Iwasaki M, Saito K, Sekikawa K, Yamada Y, Wada H, Mizuta K, Ito Y, Seishima M.

Cytokine. 21(3):129-36. (2003).

5. Lack of Interleukin-1 beta Decreases the Severity of Atherosclerosis in ApoE-Deficient Mice.

Kirii H, Niwa T, Yamada Y, Wada H, Saito K, Iwakura Y, Asano M, Moriwaki H, Seishima M.

Arterioscler Thromb Vasc Biol 23: 656-

660 (2003)

6. Lack of tumor necrosis factor α induces impaired proliferation of hepatitis B virus-specific cytotoxic T lymphocytes.

Kasahara S, Ando K, Saito K, Sekikawa K, Ito H, Ishikawa T, Ohnishi H, Seishima M, Kakumu S, Moriwaki H.

J Virol. 77(4):2469-2476 (2003)

2. 学会発表

Role of V α 14 NKT cells in the development of impaired liver regeneration in vivo.

Ito H, Ando K, Nakayama T, Taniguchi M, Ezaki T, Takemura M, Sekikawa K, Imawari M, Seishima M, Moriwaki H.

第 33 回日本免疫学会総会, 博多, 2003. 12. 8-10

Proteome 解析手法を用いて同定した LPS 刺激 macrophage 細胞内の MxA 発現

藤井秀比古, 斉藤邦明, 清島 満, Markey SP.

第 15 回日本アレルギー学会春季臨床大会, 横浜, 2003. 5. 11

Mice lacking TNF- α display symptoms of high-fat diet-induced insulin resistance and altered levels of PKC- ζ/λ , - ϵ , and Akt/PKB in adipocytes.

Suzuki M, Yamamoto M, Wada H, Mune T, Sakuma H, Kojima T, Maruyama T, Yamada Y, Fujii H, Saito K, Yasuda K, Seishima M.

American Diabetes Association 63rd

scientific sessions, New Orleans, Louisiana, U.S.A., 2003.6.13-17

TNF- α contributes to the development of allergic rhinitis in mice.

Iwasaki M, Saito K, Fujii H, Takemura M, Sekikawa K, Wada H, Mizuta K, Seishima M, Ito Y.

World Allergy Organization Congress XVIII ICACI, Vancouver, Canada 2003. 9.7-12

Deficiency of interferon- γ produced by bone marrow-derived cells accelerates atherosclerotic lesions in low density lipoprotein receptor-deficient mice.

Niwa T, Wada H, Ohashi H, Iwamoto N, Kirii H, Fujii H, Saito K, Seishima M.

13th International Symposium on Atherosclerosis, Kyoto, 2003.9.28-10.2

Proteomic analyses of cerebrospinal fluid using two-dimensional nanoscale HPLC/MS with molecular cut-off pre-fractionation.

Masuda J, Saito K, Yang X, Nishimura M, Ueda T, Kowalak JA, Markey SP.

The 20th Moutreux LC/MS Symposium, Savannah, GA, USA, 2003.10.15

マウス鼻炎モデルにおける TNF- α の役割

岩崎聖雄, 水田啓介, 伊藤八次, 藤井秀比古, 和田久泰, 竹村正男, 清

島 満.

第 53 回日本アレルギー学会総会, 岐阜市, 2003. 10. 23-25

質量分析を用いた新規髄液バイオマーカーの開発—基礎検討—

藤井秀比古, 斉藤邦明, 増田潤一, 西村雅之, 竹村正男, 和田久泰, 佐藤正夫, Martin Brian, Markey Sanfoud, 清島 満.

第 50 回日本臨床検査医学会総会, 広島市, 2003. 10. 29-31

Increases in TNF- α level following transient global ischemia may not contribute to histological changes in mice hippocampus.

Murakami Y, Saito K, Hara A, Zhu Y, Niwa M, Ishiguro H, Fujii H, Wada H, Mori H, Seishima M.

Neuroscience 2003, New Orleans, U.S.A., 2003.11.8-12

Interferon- γ produced by bone marrow-derived cells inhibits atherosclerotic lesion formation in low density lipoprotein receptor-deficient mice.

Niwa T, Wada H, Ohashi H, Iwamoto N, Fujii H, Saito K, Seishima M.

American Heart Association Scientific Sessions 2003,

Orlando, Florida, U. S. A., 2003. 11. 9-12

厚生科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）

分担研究報告書

エイズ脳症の発症病態と治療法に関する研究

—HIV 感染に伴う中枢神経障害：14-3-3 蛋白質の機能と神経細胞障害の考察—

分担研究者 木戸 博 徳島大学分子酵素学研究センター

研究協力者 矢野 仁康、中牟田 信一

研究要旨：HIV-1 感染による中枢神経障害の診断、治療マーカーとして、これまで患者髄液中の 14-3-3 蛋白質の検出の意義と有用性について報告してきた。実際、HIV 脳症患者における 14-3-3 蛋白質の髄液中への漏出は、血中の CD4 レベルが極度に低下している場合に高頻度に観察され、破壊された神経細胞から逸脱してくるものと考えられるが、病理所見では破壊された神経細胞内での 14-3-3 蛋白質の激しい減少とは対照的に、病像周囲では 14-3-3 蛋白質の発現増強が認められた。14-3-3 蛋白質は抗アポトーシス蛋白としても位置付けられている。そこで本年度は HIV gp120/gp160 によるアポトーシスの誘導時における 14-3-3 蛋白質の役割に焦点を絞り解析をおこなった。その結果、HIV-1 gp120/gp160 によって引き起こされる細胞死は、pro-apoptotic 蛋白質を介するミトコンドリア経路で制御されており、14-3-3 蛋白質は Bad, Bid と結合してこれを不活化する事で、アポトーシスに対して抑制的に作用することが明らかとなった。さらに今回、postmitochondria step における細胞死制御メカニズムとして、アポトーシス誘導物質である cytochrome c に対する 14-3-3 蛋白質の新たな役割を見出したので報告する。

A. 研究目的

我々はこれまで、14-3-3 蛋白質が AIDS Dementia Complex (ADC)患者の脳脊髄液中にアイソマー特異的に検出されてくることから、ADC 患者における脳内病変の進行状況を的確に把握できる Real time marker として有用であることを提唱してきた。この際、14-3-3 蛋白質は障害部位周辺の神経細胞で特にその発現増強が認められるが、病状、炎症の進行と共に細胞外に遊離され、最終的に髄液中に漏出されてくると考えられた。このことより脳脊髄液中の 14-3-3 蛋白質は、神経細胞障害の程度を

示す重要なファクターと考えている。元来、AIDS 患者において特徴づけられる免疫不全は、HIV 感染に伴う CD4⁺ T 細胞産生が著しく障害されことに基づいている。しかし、この T 細胞の欠如を説明する分子メカニズムとして、ウイルス感染そのものによる cytopathic なもの以外に、アポトーシスが重要な役割を果たしている事が最近明らかになりつつある。事実、ウイルスが侵入することなしに生じるの非感染細胞のおびただしい障害は、このアポトーシスによる障害である。アポトーシスを誘導する因子として、中でもウイルス膜蛋白質 gp120

と gp160 はその主要な誘導物質と考えられている。一方、14-3-3 蛋白質はこれまで抗アポトーシス作用を有する重要な分子として注目されてきた。今年度は、14-3-3 蛋白質の HIV 脳症に果たす役割を明らかにするため、神経細胞死プロセスにおける gp120 の primary target と考えられている α -ケモカインレセプター(CXCR4)を発現し、gp120 によってアポトーシスが誘導される HUVEC(ヒト臍帯静脈内皮細胞)をモデル細胞として、14-3-3 蛋白質の抗アポトーシス作用の検討を行った。

B. 研究方法

①実験材料

HUVEC(正常ヒト臍帯静脈内皮細胞)は CAMBREX 社より購入した。Drosophila Schneider 2 (S2) cell は Invitrogen より購入。gp120 は Immuno Diagnostics 社から購入した。各 14-3-3 アイソマー及び、14-3-3 蛋白質 共通認識抗体は我々と免疫生物学研究所が共同開発したものを用了。Hsp90、Actin 抗体は sigma より購入。Bad 抗体は Cell Signaling, Santa Cruz biotechnology, BD Transduction, Bax 抗体は MBL, Santa Cruz biotechnology、Bid 抗体は MBL より購入した。モノクローナル cytochrome-c (Apo, Holo)抗体は pharMingen より購入。ProteinG sepharose は Zymed より購入。Silencer™siRNA Construction Kit、MEGAscript transcription kit は Ambion より購入。

②Cell culture

HUVEC は EGM-2 supplemented with hFGF-B, VEGF, R3-IGF-1, Heparin, 2% FCS で 37 °C で培養を行った。gp120

(1~10 nM)を加えた後 24 時間培養を行い、MTT 及び LDH 法を用いて定量的に細胞死を測定した。S2 細胞は drosophila Schneider medium (10% fetal calf serum) で 27°C で培養を行った。37 °C で 1 時間培養後、再び 27°C に戻すことで heat stress 処理とした。

③Human siRNA の作製

siRNA は Silencer™siRNA Construction Kit を用いて in vitro transcription 法にて合成した。各々の siRNA design を示す。Bad; Genepeptide accession no. BC001901, Sense 5'-AACGCAGATGCGGCAAAGCTC-3', Antisense 5'-AAGAGCTTTGCCGCATCTGCG-3', Bax; accession no. NM-138764, Sense 5'-AACATGGAGCTGCAGAGGATG-3', Antisense 5'-AACATCCTCTGCAAGCTCCATG-3', 14-3-3 τ ; accession no. X56468.1, Sense 5'-AAGTTGCAGCTGATTAAGGAC-3 ATTAAGGAC-3' Antisense 5'-AAGTCCTTAATCAGCTGCAAC, 14-3-3 ζ ; accession no. Sense 5'- AACATTGGATAATTCAGCTCC-3', Antisense 5'-AAGGAGCTGAATTATCCAATG-3', 14-3-3 ϵ ; accession no. Sense 5'-AACCCACATCCATCCCTGCTAC-3', Antisense 5'-AAGTAGCAGGGATGGA-TGTGG-3', 各々の 3' 端に T7 promoter 相補配列(CCTGTCTC)を付加したオリゴヌクレオチド template を作製して siRNA 合成を行った。

⑤Drosophila dsRNA の作製

S2 cell より total RNA を抽出後、drosophila 14-3-3 ζ , Hsp90 の primer を用いて

RT-PCR で各々の鋳型 DNA を増幅後、MEGAscript transcription kit で dsRNA を合成した。各々の鋳型 DNA fragment がほぼ 500bp になるように primer を設定し RT-PCR を行った。各々の primer sequence を示す。14-3-3ζ; GenePeptide accession no. AE003831, forward-primer (F-P) 5'-GTCATCGTGGC GTGTCATCT-3', reverse-primer (R-P) 5'-TCAACAGCTGCATGA-TGAGTG-3', Hsp83; accession no. AE003477, (F-P) 5'-GGCTGATGATGAGAAGAAGGA-3', (R-P) 5'-CTCAATCAGCTCCATGGTCTT-3', 各々の 5' 端に T7 RNA polymerase-binding site (TTAATACGACTCACT-ATAGGGAGA) を付加した primer を用いて、RT-PCR (28 cycle, annealing temp 58 °C) を行った。dsRNA 合成は Dixon lab protocol に従って行った。精製鋳型 DNA を各々 1 μg MEGA script kit にて転写後、アニーリング反応のため 65°C 50 分処理後ゆっくりと室温にもどした。

⑥ RNAi の調整

Human RNAi は、各々の siRNA (1~10 nM) を調整しオリゴフェクタミン法にて 2 回トランスフェクションを行い、48~72 時間培養を行った。S2 cell は drosophila serum free medium で final con を 1×10^6 cells/ml になるように調整後、各 dsRNA を final con 37 nM になるように直接 medium に追加した。27 °C で 1 時間培養後、drosophila Schneider medium を 2 ml 追加し 72 時間培養を行った。RNAi の効果は各々の特異抗体を用いた Western-blotting 並びに、RT-PCR による

mRNA の発現量の比較から検定を行った。

⑦ MTT 及び LDH assay.

MTT assay は各々の HUVEC 細胞培養液に、MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] 5 mg/ml を 1/10 量加え 37 °C で 4 時間培養を行い、反応停止後 spectrometer にて 570 nm における吸光度を測定し細胞死の定量を行った。LDH 法は、遠心で回収された細胞培養上清 (細胞死により細胞から漏出した LDH)、並びに 0.1% Triton-X100 処理で溶解した細胞画分 (生細胞における LDH) における LDH の酵素活性を、560 nm における吸光度から測定し細胞死の定量を行った。

⑧ Whole cell lysate の調整、及び Western-blotting

細胞を PBS で洗浄し RIPA buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% NP40, 0.1 % SDS, 0.5 % deoxycholate, 0.4 mM EDTA and 10 % glycerol) で溶解した。lysate は laemmli sample buffer を加え SDS-PAGE を行い各々の抗体を用いた western-blotting にて解析した。

⑨ S2 cell の可溶性 or 不溶性 (aggregation) 画分の調整

Control S2 cell 及び各々の RNAi S2 cell を 27 °C で 72 時間培養後、37 °C で 1 時間熱処理を行った。27 °C に戻し各々 0, 1, 2, 3 時間培養した。非熱処理細胞を含む各細胞は PBS で洗浄後、Lysis buffer (100 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM KCl, 2 mM EDTA

and 15 % sucrose) で溶解し sonication (Branson cell disruptor 250, 50 % duty, 3 cycles)を行った。2000g, 15 min の遠心で未破砕細胞を取り除いた後、15000g, 20 min 遠心を行い上清を soluble fraction として回収した。沈殿は RIPA buffer で溶解後 (4 °C, 30 min) insoluble (aggregation) fraction として回収した。各 soluble or insoluble fraction は電気泳動後、anti-cytochrome-c の抗体を用いて Western-blotting を行った。

⑩免疫沈降

免疫沈降法は standard method に準じ行った。各々の cell extracts に protein G sepharose を加え非特異的結合を除いた後、上清に、protein G に続いて抗 Bad, Bax, cytochrome-c(Apo, Holo)抗体を加え共沈 (4 °C, 90 min) , 洗浄後各々の抗体を用いて Western-blotting を行った。

⑪免疫蛍光染色

S2 細胞を 4%パラホルムアルデヒドで固定後、0.1% Triton-X100 で細胞の permeabilization を行った。1% BSA でブロッキングを行い、抗 cytochrome c (Apo 並びに Holo)抗体と 14-3-3 抗体にて共染色を行った。終了後、FITC or Texas red conjugated 2 次抗体で培養後、共焦点レーザー顕微鏡にて解析を行った。

⑫Proteinase K 感受性アッセイ

14-3-3RNAi S2 細胞を 37 °C で 1 時間熱処理後、不溶性画分を回収しリコンビナント 14-3-3 蛋白質を加え室温で 0~2 時間培養を

行った。10 µg/ml の PK を加え氷柱で 10 分処理を行った後に PMSF にて反応を停止し、Western-blotting にて解析を行った。

C. 研究結果

1. HIV gp120 による細胞死における 14-3-3 蛋白質の役割解析

1) HIV-1 膜蛋白 gp120/160 は HUVEC の細胞死を誘導する。

まず、HIV 脳症の分子メカニズムを明らかにするため、神経細胞死プロセスにおける gp120 の primary target と考えられている CXCR4 を有する HUVEC を用いて、実際に HIV-1 膜蛋白 gp120/160 によってアポトーシスが引き起こされるか否かを検証した。図 1 に示されたごとく、MTT アッセイ及び LDH リークの測定による細胞死の定量により、リコンビナント gp120/160 蛋白質は、濃度依存的に HUVEC に細胞死を誘導する事が明らかとなった。

2) gp120/160 蛋白質による、14-3-3 τ 及び Bad の発現増強。

次に gp120/160 によってアポトーシスが起きている時、アポトーシスのプロモーターである pro-apoptotic 蛋白やその制御因子である 14-3-3 蛋白質がどのように変化しているかを検証した。興味深い事に、gp120/160 によるアポトーシスで、14-3-3 τ が特異的に発現増強している事が判明した (図 2A)。一方、これまでの報告で gp120/160 によるアポトーシスでは、pro-apoptotic 蛋白のなかの Bax の発現がわずかに誘導されその役割が示唆されてき

た。しかしながら、我々が検証では、図 2B のごとく gp120/160 による Bax の発現増強は認められず、変わって Bad の著しい発現増強が認められた。

3) gp120 によって引き起こされるアポトーシスでは、14-3-3 τ と pro-apoptotic 蛋白質との特異的な結合が認められた。

図 3 は、pro-apoptotic 蛋白質である、Bad, Bax, Bid の特異抗体を用いた免疫沈降物を、14-3-3 蛋白質アイソマーを認識する特異抗体でウエスタンブロットした結果である。図 3 に示すように、gp120 刺激でその発現が増強してくる 14-3-3 τ アイソマーと Bad が特異的に結合し、Bax との結合は認められなかった。さらに他の pro-apoptotic 蛋白質である Bid と 14-3-3 蛋白質との相互作用を検証したところ、gp120 刺激で 14-3-3 β , γ アイソマーと Bid との相互作用が認められた。

4) Bad RNAi は、gp120 によって引き起こされる細胞死を抑制した。

次に、pro-apoptotic 蛋白質が、gp120 による細胞死に関与しているかを検証するため、Bax, Bad の発現を RNAi 法により特異的にノックダウンさせ、gp120 による細胞死に与える影響を検討した。その結果、図 4 のごとく、Bad のノックダウンでは明らかに gp120 による細胞死が抑制されているが、Bax のノックダウンでは gp120 よるアポトーシスを防いでいない事が明らかになった。これらの結果から gp120 によって誘導される細胞死は、Bad を介するカスケー

ドで制御されていると考えられた。尚、Bad, Bax RNAi によるノックダウンの有効性を図右に示した。

5) 14-3-3 τ RNAi は、gp120 によって引き起こされる細胞死を増強した。

同様に、gp120 によって誘導される細胞死に与える 14-3-3 蛋白質の影響を検討した。図 5 に示すごとく、gp120 刺激によってその発現が増強し特異的に Bad と結合する 14-3-3 τ アイソマーのノックダウンでは、他の 14-3-3 アイソマーと比較して、gp120 による細胞死が増強した。これらの結果から、14-3-3 τ は gp120 による細胞死に抑制的に働いていることが示唆された。尚、各々の 14-3-3 アイソマー RNAi によるノックダウンの有効性を図右に示す。

2. 14-3-3 蛋白質と cytochrome c (アポトーシス誘導因子) との相互作用の解析

アポトーシス刺激でミトコンドリアから放出された cytochrome c は、Apaf-1 や procaspase9 と結合して apoptosome を形成し、これがトリガーとなり下流の caspase が活性化されアポトーシスが実行される。この経路において最近、cytochrome c の前駆体である apo-cytochrome c が、cytochrome c の apoptosome 形成を競合的に阻害してアポトーシスを抑制する事が報告された。一方、14-3-3 蛋白質は、ミトコンドリアの前駆体蛋白質をミトコンドリアに運搬する分子シャペロンとしても知られている。さらに、14-3-3 蛋白質が分子シャペロンの HSP70 と同様、Nucleoside

Diphosphate Kinase 活性のあることを報告している。最近ではこれらの事実以外に、14-3-3 蛋白質自身が虚血や組織障害でその発現が誘導されるストレス蛋白である事が明らかとなっている。そこで、アポトーシスを誘導することの知られている熱ストレスを用いて、14-3-3 蛋白質と cytochrome c との相互作用について検討した。

我々は前回の報告で、14-3-3 蛋白質は熱ショック蛋白質であり、その熱発現誘導は転写レベル(Heat Shock Transcription Factor)で調節されている事を明らかにしてきた。そこで今回、このストレス蛋白としての性質が、分子シャペロンとしていかに機能しているのか、さらに、アポトーシスにおいてどのような役割を果たしているのかを検証するため、cytochrome c を標的に 14-3-3 アイソマーの分子種の少ない S2 cell を用いて解析を行った。

1) 熱ストレス下の細胞では、14-3-3 ζ と Apo型 cytochrome c の相互作用が認められる。

初めに cytochrome c との相互作用について検証した。今回、Holo 型と Apo 型 cytochrome c をそれぞれ特異的に認識する抗体を用いて、14-3-3 ζ 抗体との共染色を行った。図 6 に示すように、熱ストレスで細胞の形態学変化を伴った細胞では、14-3-3 ζ も cytochrome c も核周囲に集積してくることが明らかとなった。この際、熱ストレス下において Apo 型 cytochrome c と 14-3-3 ζ との共存状態が観察されたが、Holo 型 cytochrome c との共存は認められなかった。

2) 14-3-3 ζ 蛋白質のノックダウン条件下では、熱ストレス時に形成される Apo 型 cytochrome c の熱変性凝集塊の可溶化が遅延する。

熱ストレス前、後 (27 °C の条件下 0-3 時間可溶化を行い) で、細胞から可溶性および不溶性画分を調整し、不溶性画分の Apo 型 cytochrome c の量を検討した。図 7A に示すように、細胞は 1 時間の熱ストレスによって多量に生じた Apo 型 cytochrome C の不溶性凝集塊を 27°C の条件下で可溶性に変化させ、細胞機能の恒常性を維持している。しかし 14-3-3 ζ RNAi 処理による 14-3-3 ζ 蛋白質のノックダウン条件下では、Apo 型 cytochrome C の熱変性凝集塊の可溶化は著明に抑制された。しかし Hsp83 のノックダウン条件下では、熱変性凝集塊可溶化の抑制は認められなかった。この際、cytochrome c oxidase の酵素活性を測定した所、熱ストレスにおいては Holo 型 cytochrome c には変化が無く (図 7B)、不溶性凝集塊は Apo 型 cytochrome c に由来していると推定された。

4) 14-3-3 ζ 蛋白質は熱変性 Apo 型 cytochrome c と結合する。

図 8 に示すように、細胞内で熱変性により凝集した Apo 型 cytochrome c のみに 14-3-3 蛋白質が検出され、可溶性分画の Apo 型 cytochrome c には 14-3-3 蛋白質は検出できなかった。このことから 14-3-3 蛋白質は、熱変性凝集塊 Apo 型 cytochrome c とのみに特異的に結合することが明らかとなった。

5) 熱凝集した Apo 型 cytochrome c に結合した 14-3-3 ζ 蛋白質は、凝集塊を解きほぐす。

14-3-3 ζ 蛋白質の Apo 型 cytochrome c への結合がどのような意味を持つかを検証するため、Apo 型 cytochrome c の熱凝集塊にリコンビナント 14-3-3 ζ を試験管内で添加してその効果を判定した。14-3-3 ζ RNAi の処理で細胞内で形成された熱不溶性画分に、14-3-3 ζ を加え0~2 時間室温で反応させた後、Apo 型 cytochrome c の PK に対する感受性を調べた。何も加えない場合及び Hsp90 を加えた際には、Apo 型 cytochrome c の凝集を反映して PK に対する抵抗性を示したが、14-3-3 ζ を加えた場合、PK に対する感受性を獲得した。これらの事実から、14-3-3 ζ は直接熱凝集した Apo 型 cytochrome c を解きほぐして蛋白質を可溶化する事が示唆された (図 9)。なお PK は可溶化した蛋白質を分解するが、凝集した蛋白質は分解しない。

D. 結論

以上、今回得られた結果を基に、gp120 による細胞死のメカニズム並びに 14-3-3 蛋白質の果たすやく役割を図 10 に示した。14-3-3 蛋白質による制御点を赤丸で示す。

A) HIV 脳症を引き起こすメカニズムとして最も有力な、gp120/160 を介する神経細胞死は、proapoptotic factor である Bad を介したミトコンドリア pathway で制御されている。この時、14-3-3 τ アイソマー蛋白質は Bad と結合する事

で細胞死を抑制している。

B) 14-3-3 β , γ アイソマー蛋白質と Bid との相互作用が認められた事から、これらの 14-3-3 蛋白質は、gp120 を介した TNF- α や Fas ligand の発現増強による神経細胞死経路にも関与している可能性が考えられた。

C) 14-3-3 蛋白質の分子シャペロンとしての性質は、細胞死の postmitochondria step で Apo 型 cytochrome c の凝集を防ぎ、アポトーシス誘導因子である cytochrome c の働きを競合的に抑制して抗アポトーシス作用を促進する可能性が示唆された。

E. 考察

14-3-3 蛋白質は、神経細胞に特に多く含まれ、リン酸化蛋白質のアダプター、もしくは足場蛋白として、細胞内シグナル伝達に重要な役割を果たしている事が知られてきた。最近、この分子が細胞死に関わる様々な分子と結合する事で抗アポトーシス作用を示す事が注目されている。我々は 14-3-3 蛋白質が特に脳の神経細胞に多く発現している事、HIV 脳症において細胞障害の明らかな部位では 14-3-3 が細胞外に遊離してほとんど見られなくなっているが、障害部位の周囲では逆に 14-3-3 の発現増加が見られる事から、HIV 感染によって引き起こされる神経細胞死における 14-3-3 蛋白質の役割に注目し解析を行った。RNAi による特異的遺伝子ノックダウン法を用いた解析により、gp120 によって誘導されるアポトーシスには Bad を介した経路が重要であり、

14-3-3 τ 蛋白質は Bad との相互作用を通じて細胞死を抑制している事が明らかとなった。今回実験に用いた HUVEC は、gp120 のレセプターである CXCR4 を発現しており、CXCR4 を介する gp120 のアポトーシスシグナルは、上記経路で伝達制御されている可能性が考えられる。またこれ以外の経路として、gp120 は TNF- α や Fas ligand やそのレセプターの発現を誘導する事から death ligand, caspase8 を介する細胞死の古典的経路の関与が示唆されてきた。今回、gp120 によるアポトーシス刺激で 14-3-3 β , γ アイソマー蛋白質が Bid と結合した事から、細胞死の古典的経路においても 14-3-3 蛋白質が機能していることを示唆しており、現在その役割の解析を行っている。このように、14-3-3 蛋白質はアポトーシスの分子メカニズムの中でも特に premitochondria step のにおいて重要な役割を果たすと考えられるが、postmitochondria step においても 14-3-3 蛋白質の関与が推定された。則ち 14-3-3 ζ 蛋白質は、Apo 型 cytochrome c の熱凝塊の形成を抑制して、結果としてアポトーシス誘導因子である cytochrome c の作用を競合阻害し、アポトーシスを抑制した。これらの結果は、神経細胞死を含むアポトーシスにおいて、14-3-3 蛋白質がより包括的にその制御を荷っている事を示唆するものであり、今後その役割解明が期待される。

いない。

F. 健康危険情報

本研究によって得られた成果の中で、健康危険情報に該当する事項は特に含まれて