

20030574

厚生労働科学研究費補助金

エイズ対策研究事業

HIVによる新しい宿主免疫回避機構に関する基礎研究

平成15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 草野 秀一

平成16(2004)年 3月

目 次

I. 総括研究報告

HIV による新しい宿主免疫回避機構に関する基礎研究----- 1

草野秀一

II. 分担研究報告

1. HIV Tat と Phospholipid Scramblase との相互作用----- 9
に関する in vitro 研究

草野秀一

2. HIV Tat と Phospholipid Scramblase との相互作用----- 21
の in vivo 実験系の確立に関する研究

粕壁 隆

平成 15 年度厚生科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）

HIV による新しい宿主免疫回避機構に関する基礎研究

総括研究報告書

主任研究者：草野 秀一 聖マリアンナ医科大学医学部 助手

研究要旨

本研究は、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）Tat が宿主膜タンパク質である Phospholipid (PL)-Scramblase との相互作用を介して、宿主の免疫機構におよぼす影響を分子生物学的に解析することを目的として遂行した。培養細胞を用いた *in vitro* 解析によって、Tat と PL-Scramblase が細胞内で相互作用すること、その相互作用には Tat のアミノ末端の 11 アミノ酸残基が重要であること、また、この相互作用により PL-Scramblase の安定性および細胞内分布が変化することが明らかになった。また、PL-Scramblase の欠損により白血病を誘導するマウス細胞株である Mm-P にヒト PL-Scramblase cDNA を導入し、ヒト PL-Scramblase を恒常的に発現する細胞株を樹立した。この細胞株は、野生型の細胞と同様に白血病の誘導能が低下しており、本細胞に Tat cDNA を導入することにより、マウスを用いた *in vivo* 実験を開始することが可能であるという確信が得られた。そして、本研究を進める過程において、PL-Scramblase の発現は、培養細胞系において、様々な抗生物質の感受性を高めるという結果を得ることができた。この観察結果は、PL-Scramblase を介する薬剤の耐性機構に Tat が関与する可能性を強く示唆するものであり、新たな研究の方向性が得られたと考えられた。

分担研究者

粕壁 隆 埼玉県立がんセンター
主任研究員

の感染に必須なタンパク質である。PL-Scramblase は、がん、アポトーシス状態などの不要な細胞の細胞膜の非対称構造を破壊しフォスファチジルセリン (PS) を細胞表面に提示する酵素である。PL-Scramblase によって提示された PS は、マクロファージによる貪食の標的となり、

A. 研究目的

Tat は HIV 及び宿主細胞の遺伝子発現の調節や宿主細胞のアポトーシスの阻害などの機能をもつ、HIV

それら不要な細胞は生体内から排除されることになること示唆されている。我々は、Tat が PL-Scramblase と細胞内で特異的に複合体を形成することを他に先駆けて見いだした。持続的な感染を示す HIV のタンパク質である Tat が、生体内における不要な細胞の排除に関与する PL-Scramblase と相互作用することは非常に興味深く、HIV が感染細胞において PL-Scramblase の機能に影響をおよぼすことで、宿主の免疫機構を回避し、感染を持続させている可能性が示唆された。そこで、本研究では、HIV Tat タンパク質が PL-Scramblase との相互作用を介して、宿主の免疫機構に及ぼす影響を分子生物学的に解析することで、Tat による新しい宿主免疫回避機構を明確にし、エイズ発症機構の解明に貢献することを目的とする。

B. 研究方法

本研究は、主任研究者と 1 人の分担研究者によりおこなった。

1. 本研究に用いる Tat 発現プラスミドの構築

野生型及び変異体 HIV Tat タンパク質を発現させるために、野生型 (72 アミノ酸)、アミノ末端 11 アミノ酸欠失 (12-72 アミノ酸領域)、アミノ末端 21 アミノ酸欠失 (22-72 アミノ酸領域) Tat をコードする cDNA を PCR によって増幅させた。

それら cDNA をプラスミドベクター (IRES バイシストロニックベクター) およびレトロウイルスベクターに導入した。

作製したプラスミドベクターは、エレクトロポレーション法もしくはリポフェクション法により細胞に導入した。また、作製したレトロウイルスベクターは、パッケージング細胞である Amphopack293 から得られたレトロウイルスを細胞に感染させることによって細胞に導入した。

2. in vitro 実験

(1) Tat と PL-Scramblase との相互作用に必須な Tat 内のアミノ酸領域の同定

野生型 (72 アミノ酸)、アミノ末端 11 アミノ酸欠失 (12-72 アミノ酸領域)、アミノ末端 21 アミノ酸欠失 (22-72 アミノ酸領域) Tat をコードする cDNA を野生型の PL-Scramblase をコードする cDNA とともにヒト上皮細胞株である HEK-293 細胞株に形質移入し、免疫沈降法により細胞内における複合体形成能を検討した。

(2) Tat と PL-Scramblase との相互作用に必須な PL-Scramblase 内のアミノ酸領域の同定

野生型 (318 アミノ酸)、白血病誘導型 (119-318 アミノ酸領域)、システインに富む領域の欠失 (148-

154、181-189、214-240 アミノ酸領域を欠失させた 3 種)、カルボキシル末端の EF-hand 領域欠失 (1-271 アミノ酸領域) PL-Scramblase をコードする cDNA を野生型の Tat をコードする cDNA とともに細胞株に形質移入し、免疫沈降法により細胞内における複合体形成能を検討した。

(3) Tat が PL-Scramblase の細胞内分布及び安定性に与える影響の解析

野生型 Tat をコードする cDNA と野生型の PL-Scramblase をコードする cDNA を細胞株に形質移入した。細胞分画法により、細胞質、膜、核の各々の画分を CALBIOCHEM 社 Subcellular Proteome Extraction Kit を用いることによって調製した。そして、Tat と PL-Scramblase の細胞内分布および各画分における安定性をウェスタンブロットティング法により検討した。また、核画分のマーカータンパク質 (GAPDH-細胞質、Na⁺/K⁺-ATPase-膜、Histone H1-核) のウェスタンブロットティングにより、各画分の純度を検討した。

(4) PL-Scramblase が薬剤の感受性におよぼす影響の解析

野生型の PL-Scramblase が発現している Mm-S1 細胞および PL-Scramblase を欠損した Subline で

ある Mm-P、Mm-A 細胞の Hygromycin、Puromycin、G418 に対する感受性を増殖 100% 阻止濃度を求めることにより解析した。

3. in vivo 実験 (分担: 粕壁 隆、埼玉県立がんセンター研究室主任研究員、草野秀一、聖マリアンナ医科大学微生物学教室助手)

(1) PL-Scramblase の変異により白血病誘発性を獲得した Mm-P 細胞株への野生型 PL-Scramblase cDNA の導入および SL マウスへの移植

野生型 Tat をコードする cDNA を PL-Scramblase 欠損マウス Mm-P 細胞株に導入するための前段階として、ヒト野生型 PL-Scramblase cDNA を GFP との融合タンパク質として発現するようにプラスミドベクターに組み込んだ後、Mm-P 細胞株に導入し、薬剤耐性および GFP の発現を元に細胞のクローニングを行い、野生型ヒト PL-Scramblase を恒常的に発現するクローンを分離した。得られたヒト PL-Scramblase 発現 Mm-P 細胞クローンを SL マウスに移植し、野生型のヒト PL-Scramblase がマウスの in vivo 実験系において十分に機能するのかわかを解析した。

(2) ヒト PL-Scramblase 発現 Mm-P 細胞株への Tat cDNA の導

入

上記解析で、機能することが確認できたヒト PL-Scramblase 発現 Mm-P 細胞株に Tat cDNA をエレクトロポレーション法およびレトロウイルス法により導入し、Tat を恒常的に発現する細胞株の分離を試みた。

(倫理面への配慮)

マウスを用いた実験は、動物愛護の立場からの倫理的配慮を行い、研究を実施した。

C. 研究結果

(1) Tat と PL-Scramblase との相互作用に必須な Tat 内のアミノ酸領域の同定

免疫沈降実験の結果、Tat タンパク質のアミノ末端の 11 アミノ酸が PL-Scramblase との相互作用に重要であることが明らかになった。

(2) Tat と PL-Scramblase との相互作用に必須な PL-Scramblase 内のアミノ酸領域の同定

免疫沈降実験の結果、PL-Scramblase のアミノ末端の 118 アミノ酸領域、3 つのシステインに富んだ領域 (148-154、181-189、214-240)、カルボキシル末端の EF-hand 領域 (272-318) のいずれも Tat との相互作用に必須ではなく、この相互作用には特徴的な配列が関与しないことが明らかになった。

(3) Tat が PL-Scramblase の細胞内分布及び安定性に与える影響の解析

Tat の非存在下では、PL-Scramblase は細胞質および膜画分にのみ検出された。しかし、Tat の存在下では核画分に強いシグナルが検出され、且つ、細胞質画分において PL-Scramblase の分解が見られた。

(4) PL-Scramblase の変異により白血病誘発性を獲得した Mm-P 細胞株への野生型ヒト PL-Scramblase cDNA の導入および SL マウスにおける白血病誘導能の解析

薬剤による選択で複数個のヒト PL-Scramblase 発現クローンを得た。コントロールベクターおよびヒト PL-Scramblase 発現クローンを SL マウスに移植した。白血病誘導により SL マウスは死にいたるため、生存率を持って白血病誘導の指標とした。その結果、コントロールベクター導入 Mm-P 細胞を移植したマウスは、14 匹中 13 匹が移植後 20 日以内に死亡した。しかし、ヒト PL-Scramblase 導入 Mm-P 細胞を移植したマウスは 11 匹すべてが移植後 30 日生存し、移植後 70 日が経過しても 7 匹が生存しており、顕著に白血病誘導能が低下していた。

(5) ヒト PL-Scramblase 発現 Mm-P 細胞株への Tat cDNA の導入

エレクトロポレーション法により Tat cDNA の導入を試みたが、Tat 発現クローンを分離することができなかった。そこで、レトロウイルスベクターを感染させ、Tat 発現クローンの分離を試みている。

(6) PL-Scramblase が薬剤の感受性におよぼす影響の解析

Tat を恒常的に発現するクローンを選択する際に、野生型の PL-Scramblase が発現している Mm-S1 細胞および PL-Scramblase を欠損した Subline である Mm-P 細胞において、選択に用いる薬剤である Puromycin の感受性が異なることがわかったので、Hygromycin、G418 という薬剤に関しても感受性の差を調べてみた。その結果、野生型の PL-Scramblase が発現している Mm-S1 細胞は、すべての薬剤に対して感受性が高いことが明らかになった。

D. 考察

PL-Scramblase は、細胞膜に存在する宿主タンパク質であり、細胞膜の非対称構造の破壊に関与していると示唆されている。細胞膜は、外膜と内膜の 2 層の膜によって構成されており、これらの膜に存在するリ

ン脂質の成分は通常異なっている。しかし、アポトーシス状態やがん化した細胞などの生体内で不要となった細胞では、この非対称構造が破壊され、本来、内膜にのみ存在する PS が細胞表面に提示されることになる。その後、表面に提示された PS はマクロファージの食食の標的になり、これらの不要な細胞は、生体内から排除されることになる。この細胞膜の非対称構造の破壊に関与すると考えられている宿主膜タンパク質が PL-Scramblase であると考えられており、PL-Scramblase は生体内で不要な細胞を積極的に排除する機構に重要であると思われる。また、この PL-Scramblase の mRNA は、細胞のインターフェロン処理およびウイルス感染により顕著に増加するという報告もあり、PL-Scramblase は、ウイルス感染の際の宿主側の防御機構に重要な役割を演じていると示唆される。

Tat は、HIV のゲノムの複製に必要なタンパク質であり、HIV ゲノムのみならず宿主遺伝子の発現調節にも関与していることが知られているが、それ以外の機能に関しては、未だに不明な点が未だに多い。

本研究は、HIV の Tat タンパク質が PL-Scramblase との相互作用を介することで、その機能に影響をおよぼし、マクロファージによる食食を回避することで、持続感染の維持

を行っている可能性を明確にすることを目的とし開始された。

本研究により、Tat と PL-Scramblase は細胞内で複合体を形成することが明らかになった。そして、この相互作用には、プロリンに富んだ Tat のアミノ末端側の 11 アミノ酸領域が非常に重要であった。この領域は、Tat による HIV ゲノムの複製にとっても重要な領域であり、この相互作用は、Tat の基本機能である HIV ゲノムの複製に影響を与える可能性が示唆された。

PL-Scramblase の変異体を用いた解析から、アミノ末端の白血病誘導能に関与する領域、カルボキシル末端の EF-hand 領域およびシステインに富んだ 4 つの領域共に、この Tat と PL-Scramblase との相互作用に必須でないことが明らかとなり。この相互作用に必須と考えられる PL-Scramblase 側の領域は、アミノ酸配列からは特徴的なアミノ酸配列を含まないことが示唆された。また、これらの領域は、他の PL-Scramblase (2~4) において高く保存されている領域であり、Tat はすべての PL-Scramblase と相互作用することが示唆された。

Tat および PL-Scramblase を発現させた上皮細胞を用いた細胞分画実験により、Tat 非存在下では、PL-Scramblase は細胞質および膜分画に検出された。しかし、Tat 存

在下において、細胞質画分における PL-Scramblase の量は著しく低下し、且つ、核画分に多量に存在することが明らかになった。また、細胞質画分においては、PL-Scramblase の分解産物と思われるバンドが検出され、Tat は PL-Scramblase の核移行を促進し、且つ、細胞質においてその分解を促進する機能があることが明らかになった。PS を細胞表面に提示し、マクロファージによる貪食を促進させるという PL-Scramblase の基本機能を発現するためには、PL-Scramblase は細胞膜に存在することが必須であると考えられ、この Tat による PL-Scramblase の細胞内局在および安定性の変化は、少なくとも PL-Scramblase の機能を抑制するという可能性を強く示唆した。今後は、HIV 感染により宿主細胞においても、同様の変化が起こっているのかどうかを詳細に解析したいと考える。

本研究の大きな特色の一つは、PL-Scramblase を欠損することにより、白血病誘導能を獲得した Mm-P 細胞株を用いることで、in vitro 実験系によって解析の不可能な、PL-Scramblase を介した宿主免疫による排除機構におよぼす Tat の影響を解析することであり、この Mm-P 細胞を用いる実験系は、世界でもわれわれ研究グループのみが保持するものである。その解析を行う

に先立ち、ヒト PL-Scramblase が Mm-P 細胞においてマウス PL-Scramblase と同様に機能することを確認する必要があり、ヒト PL-Scramblase を恒常的に発現する Mm-P 細胞株の樹立を行い、得られたクローンを SL マウスに移植し、その白血病誘導能を解析したところ、ヒト PL-Scramblase はマウス細胞においても十分に機能することが確認できた。今後は、得られたヒト PL-Scramblase 発現 Mm-P 細胞株に、速やかに Tat cDNA を導入し、in vivo における宿主免疫機構に Tat がおよぼす影響を解析したいと思う。また、本研究において、Tat 発現細胞株を樹立する過程で、選択に用いる抗生物質である G418、Hygromycin、Puromycin に対する感受性が、野生型 PL-Scramblase を発現している Mm-S1 細胞では、PL-Scramblase が欠損している Mm-P、Mm-A 細胞と比較して優位に高いことがわかった。PL-Scramblase は、細胞膜の外膜-内膜間の脂質の移動を促進する酵素であることから、薬剤の取り込みに影響を与えることが十分に想像される。もし、この仮説が正しいとすると、Tat は PL-Scramblase との相互作用を介して、ある種の抗ウイルス薬の感受性を低下させる可能性が浮上してくる。今後は、この新たに浮上してきた問題に関しても研究を続け

て生きたいと考えている。

E. 結論

本研究から得られた結論は以下のとおりである。

(1) HIV Tat タンパク質は、PL-Scramblase と細胞内で複合体を形成する。この相互作用には、プロリンに富んだ Tat のアミノ末端の 11 アミノ酸が重要であったが、PL-Scramblase に関しては特徴的なアミノ酸配列を要求しなかった。

(2) この相互作用は、PL-Scramblase を核画分へと移行させ、且つ、細胞質内における安定性に影響を与えた。このことは、Tat が PL-Scramblase の機能を負に調節する可能性を強く示唆した。

(3) ヒト野生型 PL-Scramblase を恒常的に発現する Mm-P 細胞株を樹立し、その中の 1 つのクローンを SL マウスに移植した結果、有意に白血病誘導能が低下していた。これらの細胞株は、Tat による PL-Scramblase を介した免疫回避機構の解析に有用であることが再確認された。

(4) PL-Scramblase は、ある種の抗生物質に対する感受性を高める働きがあることがわかった。この結果は、PL-Scramblase の発現が抗 HIV 薬の感受性にも影響を与えることが示唆された。

これらの観察結果は、他のどのグ

ループからも報告されてはおらず、われわれ独自のものである。今後は、本研究で得られた観察結果および研究材料を利用して、速やかに Tat が PL-Scramblase との相互作用を介して宿主免疫から逃れる機構が明らかにできると思われた。

F.健康危険情報

該当するものはなかった。

G.研究発表

1. 論文発表

本研究に関して発表した論文はなかった。

2. 学会発表

1) 草野秀一、粕壁 隆、齋藤 晋。HIV Tat タンパク質は細胞内で Phospholipid-Scramblase と特異的に相互作用する。第 51 回日本ウイルス学会学術集会、2003 年、京都。

H.知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

該当するものはなかった。

平成 15 年度厚生科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）

HIV による新しい宿主免疫回避機構に関する in vitro 研究

分担研究報告書

主任研究者：草野 秀一 聖マリアンナ医科大学医学部 助手

研究要旨

本研究は、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）Tat が宿主膜タンパク質である Phospholipid (PL)-Scramblase との相互作用を介して、宿主の免疫機構におよぼす影響を分子生物学的に解析することを目的として遂行した。培養細胞を用いた in vitro 解析によって、Tat と PL-Scramblase が細胞内で相互作用すること、その相互作用には Tat のアミノ末端の 11 アミノ酸残基が重要であること、また、この相互作用により PL-Scramblase の安定性および細胞内分布が変化することが明らかになった。そして、本研究を進める過程において、PL-Scramblase の発現は、培養細胞系において、様々な抗生物質の感受性を高めるという結果を得ることができた。この観察結果は、PL-Scramblase を介する薬剤の耐性機構に Tat が関与する可能性を強く示唆するものであり、新たな研究の方向性が得られたと考えられた。

A. 研究目的

Tat は HIV 及び宿主細胞の遺伝子発現の調節や宿主細胞のアポトーシスの阻害などの機能をもつ、HIV の感染に必須なタンパク質である。PL-Scramblase は、がん、アポトーシス状態などの不要な細胞の細胞膜の非対称構造を破壊しフォスファチジルセリン（PS）を細胞表面に提示する酵素である。PL-Scramblase によって提示された PS は、マクロファージによる貪食の標的となり、それら不要な細胞は生体内から排除される

ことになると思われている。我々は、Tat が PL-Scramblase と細胞内で特異的に複合体を形成することを他に先駆けて見いだした。持続的な感染を示す HIV のタンパク質である Tat が、生体内における不要な細胞の排除に関与する PL-Scramblase と相互作用することは非常に興味深く、HIV が感染細胞において PL-Scramblase の機能に影響をおよぼすことで、宿主の免疫機構を回避し、感染を持続させている可能性が示唆された。そこで、本研究では、HIV Tat

タンパク質が PL-Scramblase との相互作用を介して、宿主の免疫機構に及ぼす影響を分子生物学的に解析することで、Tat による新しい宿主免疫回避機構を明確にし、エイズ発症機構の解明に貢献することを目的とする。

B. 研究方法

1. 本研究に用いる Tat および PL-Scramblase 発現プラスミドの構築

野生型及び変異体 HIV Tat タンパク質を発現させるために、野生型 (72 アミノ酸)、アミノ末端 11 アミノ酸欠失 (12-72 アミノ酸領域)、アミノ末端 21 アミノ酸欠失 (22-72 アミノ酸領域) Tat をコードする cDNA を PCR によって増幅させた。それら cDNA をプラスミドベクターおよびレトロウイルスベクターに導入した。

作製したプラスミドベクターは、エレクトロポレーション法もしくはリポフェクション法により細胞に導入した。また、作製したレトロウイルスベクターは、パッケージング細胞である Amphotpack293 から得られたレトロウイルスを細胞に感染させることによって細胞に導入した。

2. Tat と PL-Scramblase との相互作用に必要な Tat 内のアミノ酸領域の同定

野生型 (72 アミノ酸)、アミノ末端 11 アミノ酸欠失 (12-72 アミノ酸

領域)、アミノ末端 21 アミノ酸欠失 (22-72 アミノ酸領域) Tat をコードする cDNA を野生型のヒト PL-Scramblase をコードする cDNA とともに COS-1 細胞株に形質移入し、免疫沈降法、イムノブロットング法により細胞内における複合体形成能を検討した。

3. Tat と PL-Scramblase との相互作用に必要な PL-Scramblase 内のアミノ酸領域の同定

野生型 (318 アミノ酸)、白血病誘導型 (119-318 アミノ酸領域)、システインに富む領域の欠失 (148-154、181-189、214-240 アミノ酸領域を欠失させた 3 種)、カルボキシル末端の EF-hand 領域欠失 (1-271 アミノ酸領域) ヒト PL-Scramblase をコードする cDNA を野生型の Tat をコードする cDNA とともに COS-1 細胞株に形質移入し、免疫沈降法、イムノブロットング法により細胞内における複合体形成能を検討した。

4. Tat が PL-Scramblase の細胞内分布及び安定性に与える影響の解析

野生型 Tat をコードする cDNA と野生型のヒト PL-Scramblase をコードする cDNA を細胞株に形質移入した。CALBIOCHEM 社 Proteome Subcellular Fractionation Kit を用いた細胞分画法により、細胞質、膜、核の各々の画分の細胞溶解液を作製

し、Tat および PL-Scramblase の細胞内分布および各画分における安定性をウェスタンブロッティング法により検討した。

5. PL-Scramblase が薬剤の感受性におよぼす影響の解析

野生型の PL-Scramblase が発現している Mm-S1 細胞および PL-Scramblase を欠損した Subline である Mm-P および Mm-A 細胞の Hygromycin、Puromycin、G418 に対する感受性を 100%増殖阻止濃度を求めることによって解析した。

5. ヒト PL-Scramblase 発現 Mm-P 細胞株への Tat cDNA の導入

樹立したヒト PL-Scramblase 発現 Mm-P 細胞株に Tat cDNA をエレクトロポレーション法およびレトロウイルス法により導入し、Tat を恒常的に発現する細胞株の分離を試みた。

C. 研究結果

1. Tat と PL-Scramblase との相互作用に必須な Tat 内のアミノ酸領域の同定

図 1 に示すように、免疫沈降実験の結果、野生型 Tat は、ヒト PL-Scramblase と複合体を形成することができたが、アミノ末端の 11 アミノ酸を欠落させた Tat は、ヒト PL-Scramblase と複合体を形成することができなかった。このことから、

Tat のアミノ末端の 11 アミノ酸が相互作用に重要であった。

2. Tat と PL-Scramblase との相互作用に必須な PL-Scramblase 内のアミノ酸領域の同定

図 2、3 に示すように、免疫沈降実験の結果、PL-Scramblase のアミノ末端の 118 アミノ酸領域、3 つのシステインに富んだ領域 (148-154、181-189、214-240)、カルボキシル末端の EF-hand 領域 (272-318) のいずれを欠損させた変異体共に Tat と相互作用することができた。このことから、PL-Scramblase と Tat との相互作用には特徴的な配列が関与しないことが明らかになった。

3. Tat が PL-Scramblase の細胞内分布及び安定性に与える影響の解析

図 4 に示すように、Tat の非存在下では、ヒト PL-Scramblase は細胞質および膜画分にのみ検出された。しかし、Tat の存在下では核画分に強いシグナルが検出され、且つ、細胞質画分において PL-Scramblase の分解が見られた。また、各画分のマーカータンパク質 (細胞質-GAPDH、膜- Na^+/K^+ -ATPase、核-Histone H1) のウェスタンブロッティングによる解析は、これらの画分間でのコンタミネーションはないことを示した。

4. PL-Scramblase が薬剤の感受性におよぼす影響の解析

Tat を恒常的に発現するクローンを選択する際に、野生型の PL-Scramblase が発現している Mm-S1 細胞および PL-Scramblase を欠損した Subline である Mm-P 細胞において、選択に用いる薬剤である Puromycin の感受性が異なることがわかったので、Hygromycin、G418 という薬剤に関しても感受性の差を調べてみた。その結果、表 1 に示すように、野生型の PL-Scramblase が発現している Mm-S1 細胞は、すべての薬剤に対して Mm-P、Mm-A よりも感受性が高いことが明らかになった。

5. ヒト PL-Scramblase 発現 Mm-P 細胞株への Tat cDNA の導入

エレクトロポレーション法により Tat cDNA の導入を試みたが、Tat 発現クローンを分離することができなかった。そこで、レトロウイルスベクターを感染させ、Tat 発現クローンの分離を試みている。

D. 考察

PL-Scramblase は、細胞膜に存在する宿主タンパク質であり、細胞膜の非対称構造の破壊に関与していると示唆されている。細胞膜は、外膜と内膜の 2 層の膜によって構成されており、これらの膜に存在するリン

脂質の成分は通常異なっている。しかし、アポトーシス状態やがん化した細胞などの生体内で不要となった細胞では、この非対称構造が破壊され、本来、内膜にのみ存在する PS が細胞表面に提示されることになる。その後、表面に提示された PS はマクロファージの貪食の標的になり、これらの不要な細胞は、生体内から排除されることになる。この細胞膜の非対称構造の破壊に関与すると考えられている宿主膜タンパク質が PL-Scramblase であると考えられており、PL-Scramblase は生体内で不要な細胞を積極的に排除する機構に重要であると思われる。また、この PL-Scramblase の mRNA は、細胞のインターフェロン処理およびウイルス感染により顕著に増加するという報告もあり、PL-Scramblase は、ウイルス感染の際の宿主側の防御機構に重要な役割を演じていると示唆される。

Tat は、HIV のゲノムの複製に必要なタンパク質であり、HIV ゲノムのみならず宿主遺伝子の発現調節にも関与していることが知られているが、それ以外の機能に関しては、未だに不明な点が未だに多い。

本研究は、HIV の Tat タンパク質が PL-Scramblase との相互作用を介することで、その機能に影響をおよぼし、マクロファージによる貪食を回避することで、持続感染の維持を

行っている可能性を明確にすることを目的とし開始された。

本研究により、Tat と PL-Scramblase は細胞内で複合体を形成することが明らかになった。そして、この相互作用には、プロリンに富んだ Tat のアミノ末端側の 11 アミノ酸領域が非常に重要であった。この領域は、Tat による HIV ゲノムの複製にとっても重要な領域であり、この相互作用は、Tat の基本機能である HIV ゲノムの複製に影響を与える可能性が示唆された。

PL-Scramblase の変異体を用いた解析から、アミノ末端の白血病誘発能に関与する領域、カルボキシル末端の EF-hand 領域およびシステインに富んだ 4 つの領域共に、この Tat と PL-Scramblase との相互作用に必須でないことが明らかとなり。この相互作用に必須と考えられる PL-Scramblase 側の領域は、アミノ酸配列からは特徴的なアミノ酸配列を含まないことが示唆された。また、これらの領域は、他の PL-Scramblase (2~4) において高く保存されている領域であり、Tat はすべての PL-Scramblase と相互作用することが示唆された。

Tat および PL-Scramblase を発現させた上皮細胞を用いた細胞分画実験により、Tat 非存在下では、PL-Scramblase は細胞質および膜画分に検出された。しかし、Tat 存在下

において、細胞質画分における PL-Scramblase の量は著しく低下し、且つ、核画分に多量に存在することが明らかになった。また、細胞質画分においては、PL-Scramblase の分解産物と思われるバンドが検出され、Tat は PL-Scramblase の核移行を促進し、且つ、細胞質においてその分解を促進する機能があることが明らかになった。PS を細胞表面に提示し、マクロファージによる貪食を促進させるという PL-Scramblase の基本機能を発現するためには、PL-Scramblase は細胞膜に存在することが必須であると考えられ、この Tat による PL-Scramblase の細胞内局在および安定性の変化は、少なくとも PL-Scramblase の機能を抑制するという可能性を強く示唆した。今後は、HIV 感染により宿主細胞においても、同様の変化が起こっているのかどうかを詳細に解析したいと考える。

本研究の大きな特色の一つは、PL-Scramblase を欠損することにより、白血病誘導能を獲得した Mm-P 細胞株を用いることで、*in vitro* 実験系によって解析の不可能な、PL-Scramblase を介した宿主免疫による排除機構におよぼす Tat の影響を解析することであり、この Mm-P 細胞を用いる実験系は、世界でもわれわれ研究グループのみが保持するものである。今後は、得られたヒト PL-Scramblase 発現 Mm-P 細胞株

に、速やかに Tat cDNA を導入し、in vivo における宿主免疫機構に Tat がおよぼす影響を解析したいと思う。また、本研究において、Tat 発現細胞株を樹立する過程で、選択に用いる抗生物質である G418、Hygromycin、Puromycin に対する感受性が、野生型 PL-Scramblase を発現している Mm-S1 細胞では、PL-Scramblase が欠損している Mm-P、Mm-A 細胞と比較して優位に高いことがわかった。PL-Scramblase は、細胞膜の外膜-内膜間の脂質の移動を促進する酵素であることから、薬剤の取り込みに影響を与えることが十分に想像される。もし、この仮説が正しいとすると、Tat は PL-Scramblase との相互作用を介して、ある種の抗ウイルス薬の感受性を低下させる可能性が浮上してくる。今後は、この新たに浮上してきた問題に関しても研究を続けて生きたいと考えている。

E. 結論

本研究から得られた結論は以下のとおりである。

(1) HIV Tat タンパク質は、PL-Scramblase と細胞内で複合体を形成する。この相互作用には、プロリンに富んだ Tat のアミノ末端の 11 アミノ酸が重要であったが、PL-Scramblase に関しては特徴的なアミノ酸配列を要求しなかった。

(2) この相互作用は、PL-Scramblase を核画分へと移行させ、且つ、細胞質内における安定性に影響を与えた。このことは、Tat が PL-Scramblase の機能を負に調節する可能性を強く示唆した。

(3) PL-Scramblase は、ある種の抗生物質に対する感受性を高める働きがあることがわかった。この結果は、PL-Scramblase の発現が抗 HIV 薬の感受性にも影響を与えることが示唆された。

これらの観察結果は、他のどのグループからも報告されてはおらず、われわれ独自のものである。今後は、本研究で得られた観察結果および研究材料を利用して、速やかに Tat が PL-Scramblase との相互作用を介して宿主免疫から逃れる機構が明らかにできると思われた。

F.健康危険情報

該当するものはなかった。

G.研究発表

1. 論文発表

本研究に関して発表した論文はなかった。

2. 学会発表

1) 草野秀一、粕壁 隆、齋藤 晋。
HIV Tat タンパク質は細胞内で Phospholipid-Scramblase と特異的に相互作用する。第 51 回日本ウイルス学会学術集会、2003 年、京都。

H.知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

該当するものはなかった。

参考文献

1. Kusano S., and N. Raab-Traub. I-mfa Domain Proteins Interact with Axin and Affect Its Regulation of the Wnt and c-Jun N-Terminal Kinase Signaling Pathways. **Mol. Cell. Biol.** **22**: 6393-6405, 2002.
2. Kusano S., and N. Raab-Traub. An Epstein-Barr Virus Protein Interacts with Notch. **J. Virol.** **75**: 384-395, 2001.
3. Kusano S., K. Tamada, H. Senpuku, S. Harada, S. Ito, and K. Yanagi. Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen-I-Dependent and -Independent *oriP*-Binding Cellular Proteins. **Intervirology** **44**: 283-290, 2001.
4. Fujita T., M. Ikeda, S. Kusano, M. Yamazaki, S. Ito, M. Obayashi, and K. Yanagi. Amino Acid Substitution Analyses of the DNA Contact Region, Two Amphipathic alpha-Helices and a Recognition-Helix-Like Helix outside the Dimeric beta-Barrel of Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen 1. **Intervirology** **44**: 271-282, 2001.

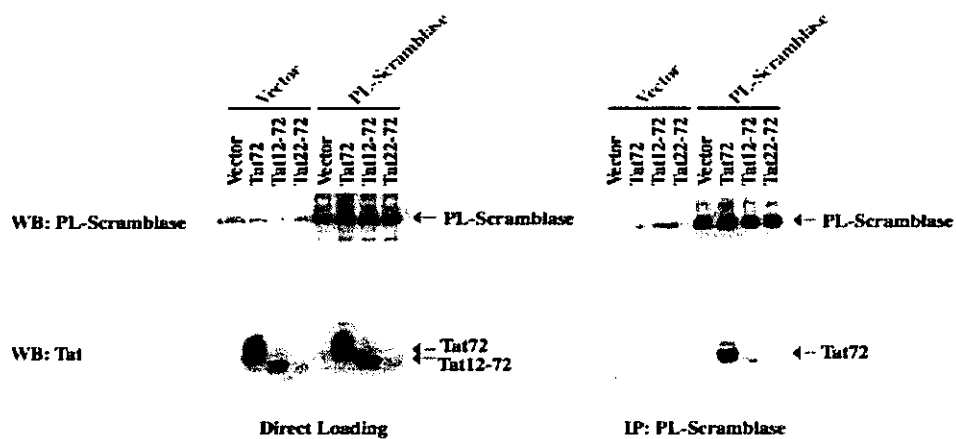


図1. 野生型 Tat (72 アミノ酸) およびアミノ末端欠落変異体 Tat (12-72 および 22-72 アミノ酸領域) をヒト PL-Scramblase とともに COS-I 細胞に発現させ、ヒト PL-Scramblase に対して免疫沈降を行い、ウエスタンブロッティングにより解析した結果である。

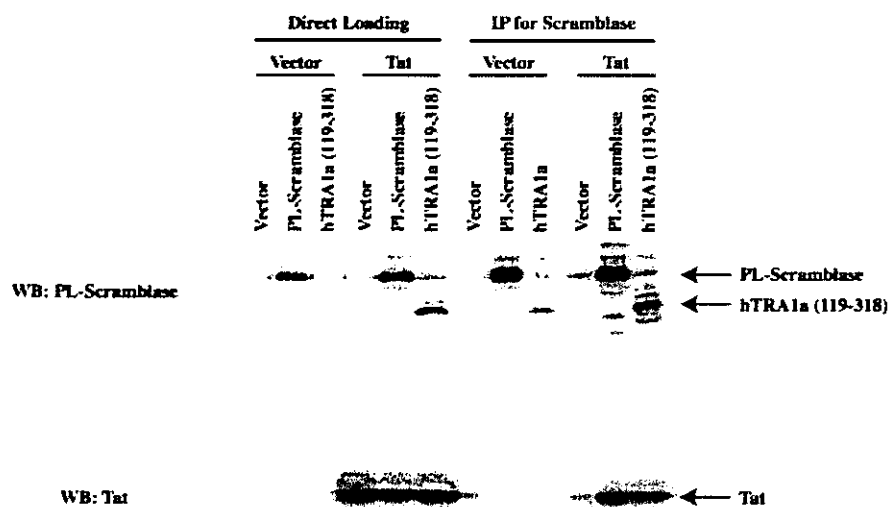


図2. 野生型 Tat (72 アミノ酸) を野生型ヒト PL-Scramblase もしくは白血病誘導性変異体 (119-318 アミノ酸領域) とともに COS-1 細胞に発現させ、ヒト PL-Scramblase に対して免疫沈降を行い、ウエスタンブロッティングにより解析した結果である。

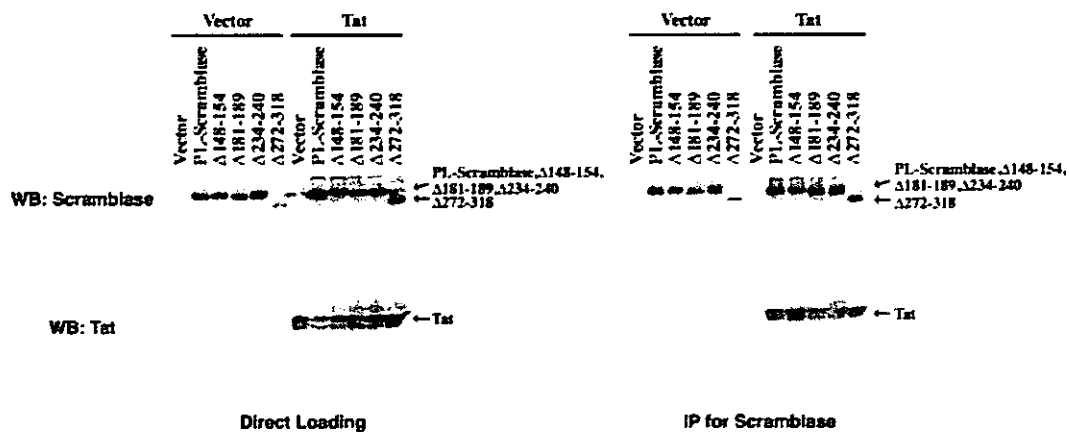


図3. 野生型 Tat (72 アミノ酸) を野生型ヒト PL-Scramblase およびその変異体 (148-154 アミノ酸領域、181-189 アミノ酸領域、234-240 アミノ酸領域、272-318 アミノ酸領域欠損) とともに COS-1 細胞に発現させ、ヒト PL-Scramblase に対して免疫沈降を行い、ウエスタンブロッティングにより解析した結果である。