

図4. 野生型 Tat (72 アミノ酸) を野生型ヒト PL-Scramblase とともに COS-1 細胞に発現させ、CALBIOCHEM 社 Proteome Subcellular Fractionation Kit により細胞質、膜、核に含まれるタンパク質を抽出し、ウエスタンブロッティングにより解析した結果である。

	Mm-S1 (PL-Scramblase+)	Mm-P (PL-Scramblase-)	Mm-A (PL-Scramblase-)
Puromycin	2.0 $\mu\text{g/ml}$	6.0 $\mu\text{g/ml}$	7.0 $\mu\text{g/ml}$
Hygromycin	400 $\mu\text{g/ml}$	800 $\mu\text{g/ml}$	900 $\mu\text{g/ml}$
Geneticin	400 $\mu\text{g/ml}$	600 $\mu\text{g/ml}$	700 $\mu\text{g/ml}$

表1. Mm-S1 (野生型 PL-Scramblase 発現細胞) および Mm-P、Mm-A (白血病誘導型 PL-Scramblase 発現細胞) の各種抗生物質に対する感受性 (表中の濃度は 100%増殖阻止濃度) を検討した結果である。

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

分担研究報告書

HIV Tat と PL-Scramblase との相互作用の in vivo 実験系の確立に関する研究

分担研究者：粕壁 隆 埼玉県立がんセンター 主任研究員

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。Tat と PL-Scramblase との相互作用を In vivo で解析するために、PL-Scramblase の N 末端欠損により白血病を誘導するマウス細胞株 Mm-P を用いた。この Mm-P 細胞にヒト 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 実験のモデル系が確立できるものと考えられた。

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/MmTRA1b 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

(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 と PL-Scramblase との相互作用を *in vivo* で検討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 の発現を指標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かどうかを解析した。

(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) 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 (図 1)。

(2) 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

Tat は、HIV のゲノムの複製に必須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、未だに不明な点が多い。

PL-Scramblase は、細胞膜に存在する宿主タンパク質であり、細胞膜リン脂質の非対称構造の破壊に関与していると示唆されている。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。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ものと考えられる。

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、特に、この分担研究では、in vivo での HIV の Tat タンパク質と PL-Scramblase との相互作用を解析する実験系を開発することを目的とした。

PL-Scramblase の発現はマウス単球様細胞 Mm-P の in vivo での移植性と強く関連している、野生型 PL-Scramblase を発現せず N 末端が欠損している PL-Scramblase のみを発現している Mm-P 細胞は強い移植性を示す。本年度の研究成果により、この Mm-P 細胞に野生型 PL-Scramblase を強制発現させることによって Mm-P の移植性は顕著に減少することが明らかになった。このことは in vivo で Tat タンパク質と PL-Scramblase との相互作用を解析する実験系を確立するための第一段階が達成されたものと考えられる。第二段階として、この PL-Scramblase

強制発現 Mm-P 細胞に Tat を導入し、その in vivo での移植性が低下するかどうかを現在検討中である。

E. 結論

Tat と PS-Scramblase との相互作用を in vivo で解析するために、PL-Scramblase の N 末端欠損により白血病を誘導するマウス細胞株 Mm-P を用いた。この Mm-P 細胞にヒト野生型 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 実験のモデル系が確立できるものと考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

本年度、本研究に関する発表はない。

2. 学会発表

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。

参考文献

1. Yokoyama, A, Yamashita, T, Shiozawa, E, Nagasawa, A, Okabe-Kado, J, Nakamaki, T, Tomoyasu, S, Kimura, F, Motoyoshi, K, Honma, Y, Kasukabe, T. MmTRA1b/phospholipid scramblase 1 gene expression is a new pro

gnostic factor for acute myelogenous leukemia. *Leukemia Res*, 28:149-157, 2004.

2. Nakamaki, T, Okabe-Kado, J, Yamamoto-Yamaguchi, Y, Hino, K, Tomoyasu, S, Honma, Y, Kasukabe, T.

Role of MmTRA1b/phospholipid scramblase 1 gene expression in the induction of differentiation of human myeloid leukemia cells into granulocytes. *Exp. Hematol*, 30: 421-429, 2002.

3. Kasukabe, T, Kobayashi, H, Kaneko, Y, Okabe-Kado, Honma, Y. Identity of human normal counterpart

(MmTRA1b) of mouse leukemogenesis-associated gene (MmTRA1a) product as plasma membrane phospholipid scramblase and chromosome mapping of the human MmTRA1b/phospholipid scramblase

gene. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 249: 449-455, 1998.

4. Kasukabe, T, Okabe-Kado, J, Honma, Y. TRA1, a novel mRNA highly expressed in leukemogenic mouse monocytic sublines but not in nonleukemogenic sublines. *Blood*, 89: 2975-2985, 1997.

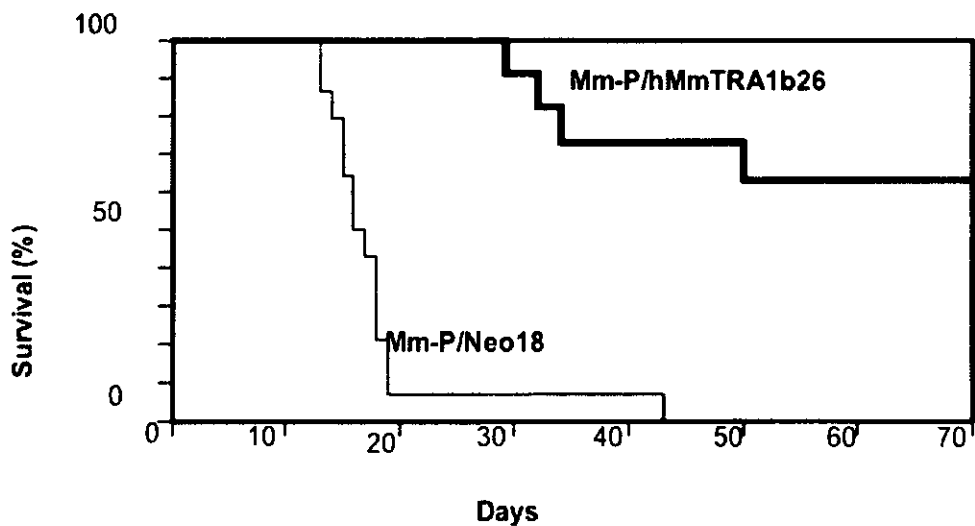


図1 ヒトPL-Scramblaseを強制発現させたMm-P細胞(Mm-P/hMmTRA1b26)とコントロールベクターのみを発現させたMm-P細胞(Mm-P/Neo18)を同系のSLマウスの腹腔に移植した (1.5×10^7 cells/mouse) 後の、生存日数の結果である。