

- zation with cholera-toxin-immobilized polymeric nanospheres in mice. *J. Biomater. Sci. Polymer Edn.* **15**: 661-669 (2004).
7. Seto M, Aramaki Y, Okawa T, Miyamoto N, Aikawa K, Kanzaki N, Niwa S, Iizawa Y, Baba M, Shiraishi M. Orally active CCR5 antagonists as anti-HIV-1 agents: Synthesis and biological activity of 1-benzothiepine 1,1-dioxide and 1-benzazepine derivative containing a tertiary amine moiety. *Chem. Pharm. Bull.* **52**: 577-590 (2004).
 8. Miyake A, Akagi T, Enose Y, Ueno M, Kawamura M, Horiuchi R, Hiraishi K, Adachi M, Serizawa T, Narayan O, Akashi M, Baba M, Hayami M. Induction of HIV-specific antibody response and protection against vaginal SHIV transmission by intranasal immunization with inactivated SHIV-capturing nanospheres in macaques. *J. Med. Virol.* **73**: 368-377 (2004).
 9. Haraguchi K, Itoh Y, Takeda S, Honma Y, Tabaka H, Nitanda T, Baba M, Dutschman GE, Cheng Y-C. Synthesis and anti-HIV activity of 4'-cyano-2',3'-dideoxy-3'-deoxythymidine. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **23**: 647-654 (2004).
 10. Gunaga P, Baba M, Jeong LS. Asymmetric synthesis of novel thioiso dideoxynucleosides with exocyclic methylene as potential antiviral agents. *J. Org. Chem.* **69**: 3208-3211 (2004).
 11. Seto M, Aramaki Y, Imoto H, Aikawa K, Oda T, Kanzaki N, Iizawa Y, Baba M, Shiraishi M. Orally active CCR5 antagonists as anti-HIV-1 agents 2: Synthesis and biological activity of anilide derivatives containing a pyridine *N*-oxide moiety. *Chem. Pharm. Bull.* **52**: 818-829 (2004).
 12. Wang X, Nitanda T, Shi M, Okamoto M, Furukawa T, Sugimoto Y, Akiyama S, Baba M. Induction of cellular resistance to nucleoside reverse transcriptase inhibitors by the wild-type breast cancer resistance protein. *Biochem. Pharmacol.* **68**: 1363-1370 (2004).
 13. Seio K, Sasaki T, Yamagida K, Baba M, Sekine M. Synthesis of benzodithiol-2-yl substituted nucleoside derivatives as lead compounds having anti-bovine viral diarrhea virus activity. *J. Med. Chem.* **47**: 5265-5275 (2004).
 14. Haraguchi K, Takahashi H, Tanaka H, Hayakawa H, Ashida N, Nitanda T, Baba M. Synthesis and antiviral

- activities of 1'-carbon-substituted 4'-thiothymidines. *Bioorg. Med. Chem.* **12**:5309-5316 (2004).
15. Masuda N, Yamamoto O, Fujii M, Ohgami T, Fujiyasu J, Kotani T, Morimoto A, Orita M, Kurihara H, Koga H, Nakahara H, Kageyama S, Ohta M, Inoue H, Hatta T, Suzuki H, Sudo K, Shimizu Y, Kodama E, Matsuoka M, Fujiwara M, Yokota T, Shigeta S, Baba M. Studies of nonnucleoside HIV-1 reverse transcriptase inhibitors. Part 1: Design and synthesis of thiazolidene-benzensulfonamides. *Bioorg. Med. Chem.* **12**: 6171-6182 (2004).
 16. Yanagida K, Baba C, Baba M. Inhibition of bovine viral diarrhea virus (BVDV) by mizoribine: Synergistic effect of combination with interferon- α . *Antiviral Res.* **64**:195-201 (2004).
 17. Sawada H, Kawai Y, Kawase T, Inaba Y, Sugiya M, Baba M, Tomita T. Synthesis of fluoroalkyl end-capped oligomers containing pendant phosphinic and phosphonic acid segments - application to novel fluorinated bioactive polymers possessing antibacterial and anti-HIV-1 activities. *Int. J. Polym. Mater.* **54**:1-21 (2005).
 18. Seto M, Miyamoto N, Aikawa K, Aramaki Y, Kanzaki N, Iizawa Y, Baba M, Shiraishi M. Orally active CCR5 antagonists as anti-HIV-1 agents. Part 3: Synthesis and biological activities of 1-benzazepine derivatives containing a sulfoxide moiety. *Bioorg. Med. Chem.* **13**:363-386 (2005).
 19. Imamura S, Nishikawa Y, Ichikawa T, Hattori T, Matsushita Y, Hashiguchi S, Kanzaki N, Iizawa Y, Baba M, Sugihara Y. CCR5 antagonists as anti-HIV-1 agents. Part 3: Synthesis and biological evaluation of piperidine-4-carboxamide derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* **13**:397-416 (2005).
 20. Baba C, Yanagida K, Kanzaki T, Baba M. Colorimetric lactate dehydrogenase (LDH) assay for evaluation of antiviral activity against bovine viral diarrhea virus (BVDV) in vitro. *Antiviral Chem. Chemother.* **16**:33-39 (2005).
 21. Baba M. Cellular factors as targets for anti-HIV-1 chemotherapy. In: Butera ST (Ed), *HIV Chemotherapy: A Critical Review*, Horizon Scientific Press/Caister Academic Press, Norfolk, UK. in press.
 22. Wang X, Uto T, Sato K, Ide K, Akagi T, Okamoto M, Kaneko T,

- Akashi M, Baba M. Potent activation of antigen-specific T cells by antigen-loaded nanospheres. *Immunol. Lett.* in press.
23. Masuda N, Yamamoto O, Fujii M, Ohgami T, Fujiyasu J, Kotani T, Morimoto A, Orita M, Kurihara H, Koga H, Nakahara H, Kageyama S, Ohta M, Inoue H, Hatta T, Shintani M, Suzuki H, Sudo K, Shimizu Y, Kodama E, Matsuoka M, Fujiwara M, Yokota T, Shigeta S, Baba M. Studies of nonnucleoside HIV-1 reverse transcriptase inhibitors. Part 2: Synthesis and structure-activity relationship of 2-cyano and 2-hydroxy thiazolidenebenzenesulfonamide derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* in press.
 24. Kawamura M, Wang X, Uto T, Sato K, Ueno M, Akagi T, Hiraishi K, Matsuyama T, Akashi M, Baba M. Induction of dendritic cell-mediated immune responses against HIV-1 by antigen-capturing nanospheres in mice. *J. Med. Virol.* in press.
 25. Sato K, Nakaoka T, Yamashima N, Yagita H, Kawasaki H, Morimoto C, Baba M, Matsuyama T. TRAIL-transduced dendritic cells protect mice from acute graft-versus-host disease and leukemia relapse. *J. Immunol.* in press.
2. 学会発表 (招待講演・シンポジウムのみ)
 1. Baba M. Studies of protein-based anti-HIV vaccines using nanospheres. *Symposium on Protective Immunity against HIV/SIV and Development of MHC-defined Macaques*, July 2004, Miyazaki, Japan.
 2. Baba M. Development and current status of antiviral chemotherapy. *The Japan-Korea Basic Scientific Cooperation Program "Recent Status and Future Prospects of Antiviral Chemotherapy"*, November 2004, Kagoshima, Japan.
 3. 馬場昌範. ナノ粒子を用いた抗レトロウイルスワクチンの開発研究. 第2回南九州地区合同皮膚科地方会・第16回鹿児島地区皮膚病態治療研究会, 2004年7月, 鹿児島.
 4. 馬場昌範. 医歯学と工学の融合に基づくBMTハイブリッドの事業展開. 九州地域バイオベンチャーフォーラム 2004, 2004年7月, 久留米.
 5. 馬場昌範. TAK-779 から新規CCR5拮抗薬への展開. 第7回白馬シンポジウム「最新エイズ研究」, 2004年10月, 札幌.

6. 馬場昌範. 抗ウイルス化学療法における分子標的. 第15回フォーラム・イン・ドージン「ウイルス―飛び回る遺伝子―の分子病理学」, 2004年11月, 熊本.

H. 知的財産権の出願・登録状況

今年度, 本研究に関するものでは, 出願および取得特許はない。

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

エイズ脳症と indoleamine-2,3-dioxygenase(IDO)との関連について：
マウスエイズ脳症モデルを用いた解析

研究分担者	清島 満	岐阜大学大学院医学研究科 教授
研究協力者	斉藤 邦明	岐阜大学大学院医学研究科 助教授
研究協力者	藤垣 英嗣	岐阜大学大学院医学研究科

研究要旨：

(1) 脳症が発症することが確認されている LP-BM5 ウイルス感染マウスでは、感染後 10 週後の肺および脳の IDO 活性は著明に増加し、さらにその代謝産物であるキノリン酸合成は著しく増加した。IDO の誘導あるいは脳内でのキノリン酸の合成が脳症に関与するかどうかについて検討するため、IDO の阻害剤である 1 メチルトリプトファンを感染後 10 週より 1 週間連続経口投与し、その際の代謝産物を測定した。その結果、LP-BM5 感染により著明に増加し代謝産物は、1 メチルトリプトファンの投与により、その上昇が有意に抑制されていることが明らかとなった。

(2) 生体内での IDO の意義を解明するため、2 次元 LC/MS/MS を用いて、IDO タンパクの翻訳後修飾と活性との関係について検討した。サイトカインにより誘導された IDO およびリコンビナントタンパクによる解析結果より、IDO は peroxynitrite によりニトロ化による修飾を受け、酵素活性が阻害されることが明らかとなった。さらに 2 次元 LC/MS/MS システムにより解析した結果、IDO タンパク中の 3 カ所のチロシン残基でニトロ化が確認された。

A. 研究目的

TNF- α がエイズ脳症の発症に関与していることを、TNF- α 遺伝子欠損マウスならびに TNF- α 阻害剤を用いた研究協力者らの研究により明らかとなった。TNF- α 阻害剤は、すでに一部の自己免疫疾患等で臨床応用されているが、感染症の発症時に使用することは副作用など問題点

もある。したがって、TNF- α の関与が示唆される複数の痴呆発症原因物質を薬剤により選択的に抑制することは重要である。今年度は、TNF- α などのサイトカインによって誘導され、エイズ脳症発症の重要な原因物質の 1 つと考えられているキノリン酸について、生成の律速酵素である indoleamine-2,3-

dioxygenase(IDO)とエイズ脳症について、IDOの阻害剤をマウス脳症モデルに投与し、その効果について検討した。さらに生体内でのIDOの意義を解明するため、2次元LC/MS/MSを用いて、IDOタンパクの翻訳後修飾と活性との関係について検討した。

B. 研究方法

(1) エイズ脳症マウスを用いた病体解析：マウスにLP-BM5ウイルスを感染させ、感染10週後より1週間IDOの阻害剤である1メチルトリプトファンを経口投与し、その効果について血中および組織のキノリン酸他の関連代謝産物をHPLCにより定量した。

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検出法により定量した。

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 adenylyltransferase(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。

(2) IDOとNOとの関係ならびにIDO翻訳後修飾の解析

NOによるIDO酵素活性の抑制：ヒト末梢血中単球細胞を分離し、サイトカインとNOの供与体である sodium nitroprusside で処理後、細胞を回収し、細胞抽出液中のIDO酵素活性を測定してNO供与体によるIDO活性への影響を調べた。

免疫沈降法による細胞内からのIDOの精製：細胞抽出液からのIDOの精製には、マグネットビーズ-Protein G-抗ヒトIDO抗体複合体を用いて精製した。すなわち、マグネットビーズ-Protein G担体に抗ヒトIDO抗体をカップリングさせ、細胞抽出液と混和し、マグネットを利用して細胞抽出液中のIDOを分離し、洗浄後、IDOタンパクのみをマグネットビーズ複合体から単離した。

リコンビナントIDOの精製：ヒト

IDO cDNA を Amersham 社の pGEX Vector に組み込み、GST 融合体として大腸菌内でリコンビナントタンパクを発現させた。GST とグルタチオンの親和性を利用して大腸菌溶解液から GST-IDO 融合体を単離し、洗浄後、特異的なアミノ酸配列を認識するプロテアーゼを用いて IDO を溶出した。

ウエスタンブロットによるニトロチロシンの検出：IDO 中のニトロチロシンの検出には、抗ニトロチロシン抗体を用いたウエスタンブロットで検出した。リコンビナント IDO を SDS-PAGE で分離後、PVDF メンブレンに転写し、一次抗体に抗ニトロチロシン抗体または抗ヒト IDO 抗体を用い、二次抗体には抗マウス IgG-HRP 標識抗体を用い、化学発光させ、X 線フィルムに露光した。

LC-MS/MS による IDO 中のニトロチロシンの同定：ペルオキシナイトライトで処理したリコンビナント IDO をトリプシン消化しペプチド化した後、LC-MS/MS で IDO 中のどのチロシン残基がニトロ化されているかを検討した。質量分析計で得られた結果の解析は、マトリックサイエンス社の Mascot Search データ解析ソフトを用いて解析し、ニトロ化部位を同定した。

C. 研究結果

(1) エイズ脳症マウスを用いた病体解析：
マウスが LP-BM5 感染することにより、脳症が発症することが確認さ

れている感染後 10 週後の肺および脳の IDO 活性は著明に増加し、その代謝産物であるキノリン酸合成は著しく増加した (Figure 1)。IDO の誘導あるいは脳内でのキノリン酸の合成が脳症に関与するかどうかについて検討するため、IDO の阻害剤である 1 メチルトリプトファンを感染後 10 週より 1 週間連続経口投与し、その際の代謝産物を測定した。その結果、LP-BM5 感染することにより著明に増加し代謝産物は、1 メチルトリプトファンの投与により、その上昇が有意に抑制されていることが明らかとなった (Figure 2)。

(2) IDO と NO との関係ならびに IDO 翻訳後修飾の解析

サイトカインにより誘導された IDO およびリコンビナントタンパクによる解析結果から、IDO は peroxynitrite によりニトロ化による修飾を受け、酵素活性が阻害されることが明らかとなった。さらに 2 次元 LC/MS/MS システムにより解析した結果、IDO タンパク中の 3 カ所のチロシン残基でニトロ化が確認された。

細胞内 IDO の NO による活性阻害：
ヒト末梢血中単球細胞をインターフェロン γ (IFN- γ)で刺激すると IDO の発現がウエスタンブロットにより確認された。ここに、NO 供与体である sodium nitroprusside を加えた場合も同様の IDO の発現が確認された (Figure 3A)。しかし、そのときの IDO 酵素活性を測定すると、IFN- γ のみの時に比べ IFN- γ と sodium

nitroprusside を加えると IDO 酵素活性が低下していることが確認された (Figure3B)。すなわち、IDO タンパク量は両者で同じにもかかわらず、NO が増加している状態では酵素活性は低下していた。このことから、NO または NO 由来産物であるペルオキシナイトライトにより IDO が何らかの翻訳後修飾を受けていることが示唆された。

ペルオキシナイトライトによる IDO 活性の抑制とニトロ化：リコンビナント IDO を各濃度のペルオキシナイトライトで処理した時の IDO 中のニトロチロシンをウエスタンブロットにより確認したところ、全ての濃度のペルオキシナイトライトで処理した IDO からニトロチロシンが検出された (Figure4A)。また、IDO 酵素活性はペルオキシナイトライトの濃度に依存して抑制されていた (Figure4B)。このことから、IDO はペルオキシナイトライトによりニトロ化され、酵素活性が抑制されることが明らかになった。

さらに、ペルオキシナイトライトにより IDO タンパク中のどのアミノ酸残基がニトロ化されているかを調べるため、ペルオキシナイトライトで処理した IDO をトリプシンで消化し、ペプチドに断片化した後、LC-MS/MS で解析した。Figure5 に示すように、3つのペプチド由来の MS/MS スペクトラからニトロチロシンが同定され、そのペプチドは 15 番目、345 番目、353 番目のチロシンを含むペプチドであった。

D. 考察

マウス脳症モデルを用いた本研究結果から明らかなように、IDO を阻害することによって、エイズ脳症発症の重要な原因物質の1つと考えられているキノリン酸合成を阻害できることが明らかとなった。さらに、サイトカインにより誘導された IDO およびリコンビナントタンパクによる解析結果より、IDO は peroxynitrite によりニトロ化による修飾を受け、酵素活性が阻害されることが明らかとなった。

IDO は iNOS と同様に主な発現細胞は活性化マクロファージとされている。活性化したマクロファージは各種フリーラジカルを生産し、酸化障害を引き起こす。iNOS によって生産された NO はその後スーパーオキシド ($\cdot O_2^-$) と結合し、ペルオキシナイトライト ($ONOO^-$) に変換される。このペルオキシナイトライトは非常に強い酸化作用を持ち、直接微生物や細胞を破壊する。一方で、ペルオキシナイトライトは細胞中のタンパク質に作用し、タンパク中のチロシン残基にニトロ基 (NO_2) を付加して、タンパクのニトロ化という翻訳後修飾を引き起こす作用を持つことが知られている。ニトロ化されたタンパクは細菌またはウイルス感染、神経変性疾患など多くの疾患で検出されており、ニトロ化されたタンパクは、その酵素活性の低下やタンパク構造の変化などが起こり、細胞骨格の変化や細胞内シグナル伝達の不活性化または活性化などを引き起こす。本研究から、NO による

IDO 活性の抑制メカニズムの一部が明らかになったと考えている。IDO 活性を調節することがエイズ脳症発症にどのように関与するかさらなる検討を行うことにより、新薬開発を視野に入れた脳症発症メカニズムの解明が期待される。

E. 結論

経口投与で IDO 活性阻害剤を用いることにより、マウス脳症モデルのキノリン酸合成を抑制できることが明らかとなった。今後、行動薬理的検討を加えることで、IDO ならびにその代謝産物とエイズ痴呆との関係を明らかにできる。さらに、IDO 酵素活性の調節にニトロ化が関係していることが明らかとなり、IDO とニトロ化さらに脳症との関係について明らかになると考えている。

F. 研究発表

1. 論文発表

[原著]

Role of tumor necrosis factor-alpha in methamphetamine-induced drug dependence and neurotoxicity.

Nakajima A, Yamada K, Nagai T, Uchiyama T, Miyamoto Y, Mamiya T, He J, Nitta A, Mizuno M, Tran MH, Seto A, Yoshimura M, Kitaichi K, Hasegawa T, Saito K, Yamada Y, Seishima M, Sekikawa K, Kim HC, Nabeshima T.

J Neurosci, 24 (9): 2212-2225, 2004.3

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, 41 (Pt2): 130-132, 2004.3

Changes in quinolinic acid production and its related enzymes following D-garactosamine and lipopolysaccharide-induced hepatic injury.

Ohashi H, Saito K, Fujii H, Wada H, Furuta N, Takemura M, Maeda S, Seishima M.

Arch Biochem Biophys, 428 (2): 154-159, 2004.8

二次元 HPLC の開発と人髄液プロテオームへの応用”

増田潤一, 斉藤邦明, 清島 満, 西村雅之, Kowalak J. A., Markey S. P., 上田輝久.

島津評論, 61 (1・2): 31-40, 2004. 10

Differential effects of dietary fatty acids on rat liver alpha-amino-beta-carboxymuconate-epsilon-semialdehyde decarboxylase activity and gene expression.

Egashira Y, Murotani G, Tanabe A, Saito K, Uehara K, Morise A, Sato M, Sanada H.

Biochim Biophys Acta, 1686 (1-2): 118-124, 2004. 11

Lack of tumor necrosis factor receptor

type 1 inhibits liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in mice.

Sudo K, Ymada Y, Moriwaki H, Saito K, Seishima M.
Cytokine, (in press)

Disruption of tumor necrosis factor- α gene diminishes the development of atherosclerosis in apoE-deficient mice.

Ohta H, Wada H, Niwa T, Kirii H, Iwamoto N, Fujii H, Saito K, Sekikawa K, Seishima M.
Atherosclerosis, (in press)

Increases in TNF- α following transient global cerebral ischemia do not contribute to neuron death in mouse hippocampus

Murakami Y, Saito K, Hara A, Zhu Y, Sudo K, Niwa M, Fujii H, Wada H, Ishiguro H, Mori H, Seishima M
J. Neurochem, (in press)

2. 学会発表

【特別講演など】

Proteomic Analysis of cytokine-induced nitrated proteins using the automated 2D LCMS System.

Saito K
Korea/Japan Neuroscience Seminar

Series,
Pharmaceutical Institute, Kangwon National University, Chunchon 200-701,
Korea, 2004.11.15

【学会発表：ワークショップなど】

ワークショップ：酵素阻害
Peroxynitrite-induced nitration of indoleamine 2,3-dioxygenase
Fujigaki H, Saito K, Masuda J, Markey S. P., Takikawa O, Seishima M.
第77回日本生化学会大会, 横浜市, 2004.10.13-16

ワークショップ：サイトカインレセプター
Hbs transgenic / TNF- α knockout mouse を用いた急性肝障害の検討
伊藤弘康, 安藤量基, 石川哲也, 奥村明彦, 各務伸一, 斉藤邦明, 森脇久隆, 横地高志.
第34回日本免疫学会総会・学術集会, 札幌市, 2004.12.1-3

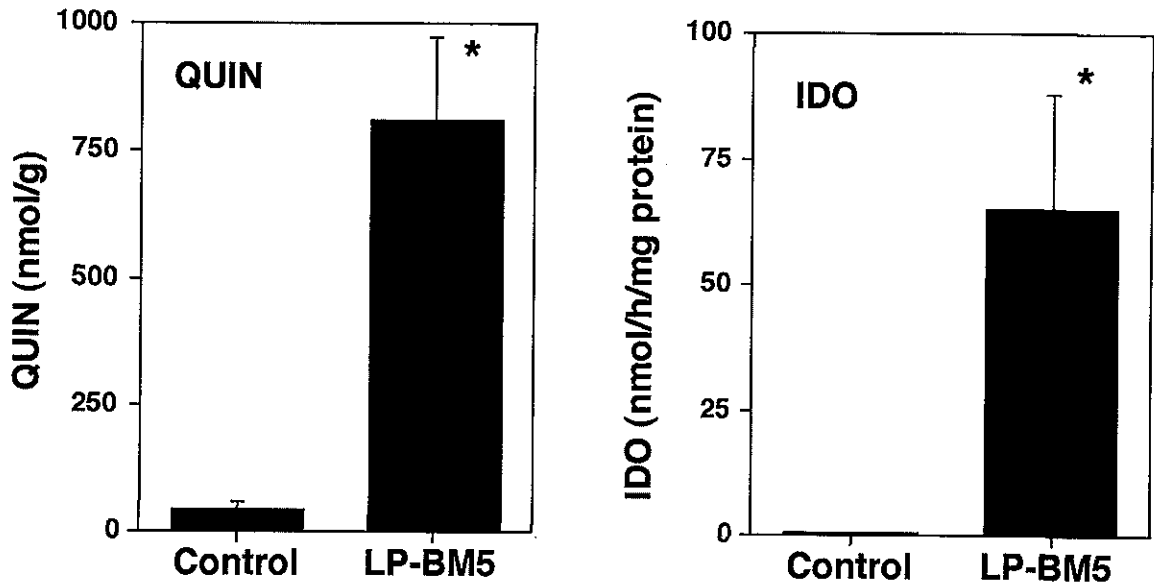


Figure 1. マウスエイズの脳症モデルにおける脳内キノリン酸およびIDO活性

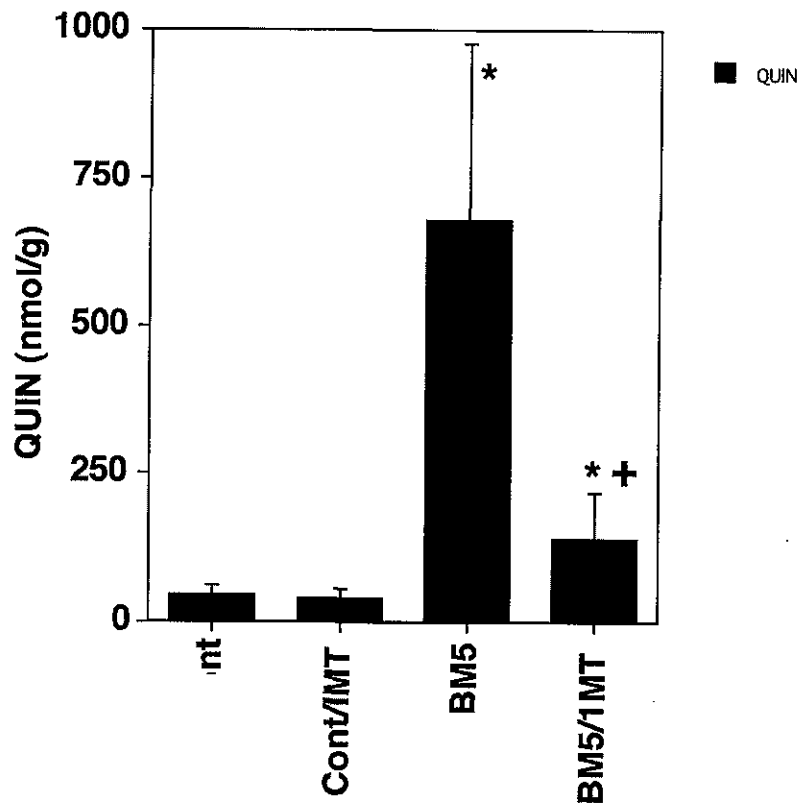


Figure 2. マウスエイズの脳症モデルにおいてIDO阻害剤が脳内キノリン酸濃度に及ぼす影響

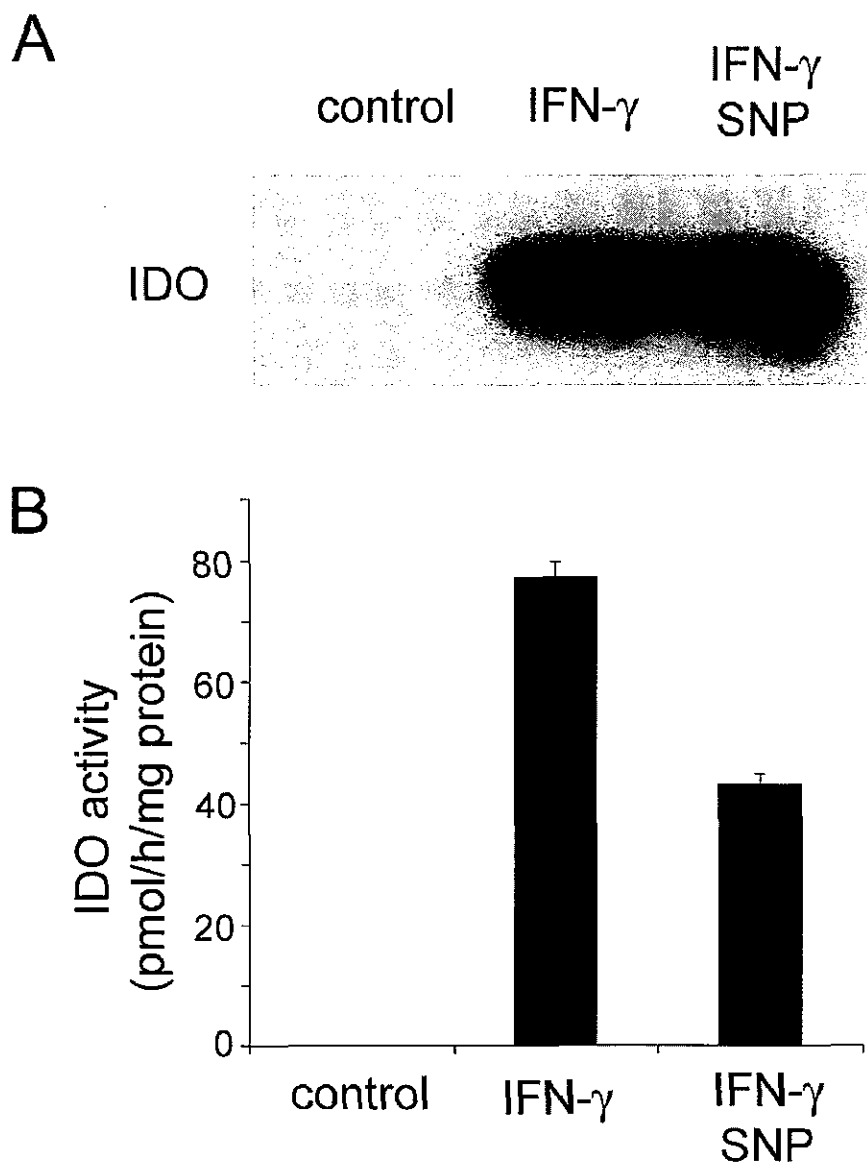


Figure 3. 細胞内 IDO の NO による活性阻害

peroxynitrite (mM) 0 0.01 0.1 0.25 0.5 0.75 1 decomp

A IDO

B Nitrotyrosine

C

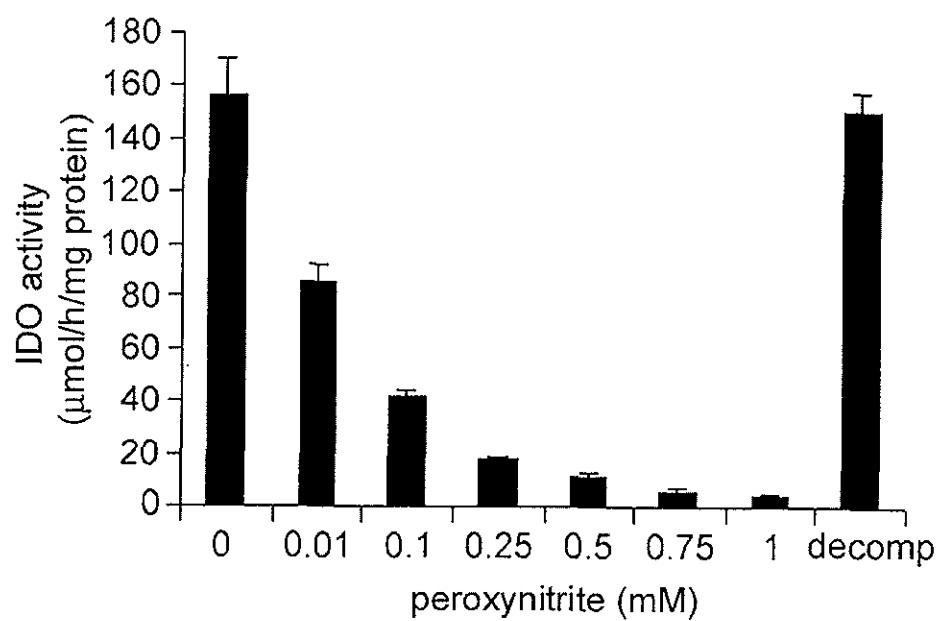


Figure 4. ペルオキシナイトライトによるIDO活性の抑制とニトロ化

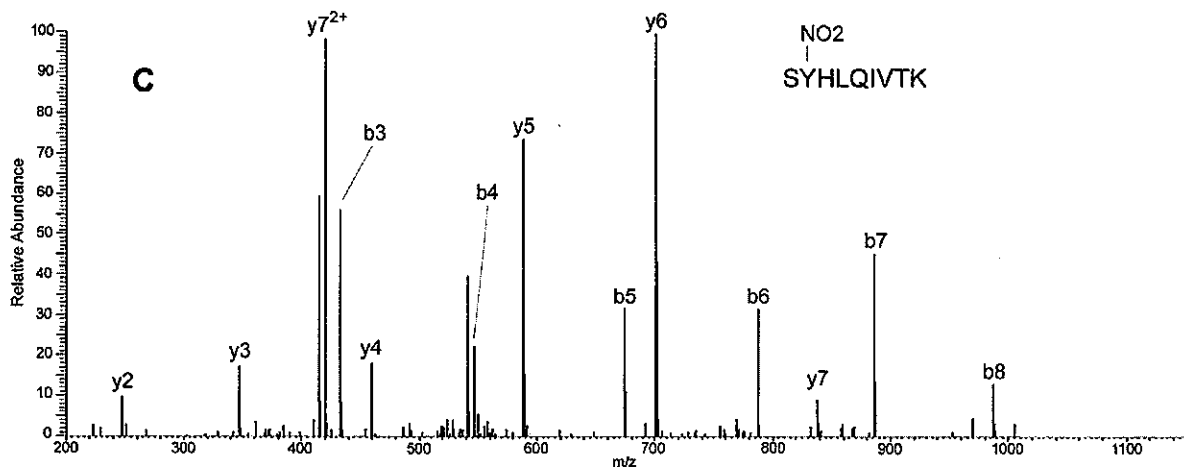
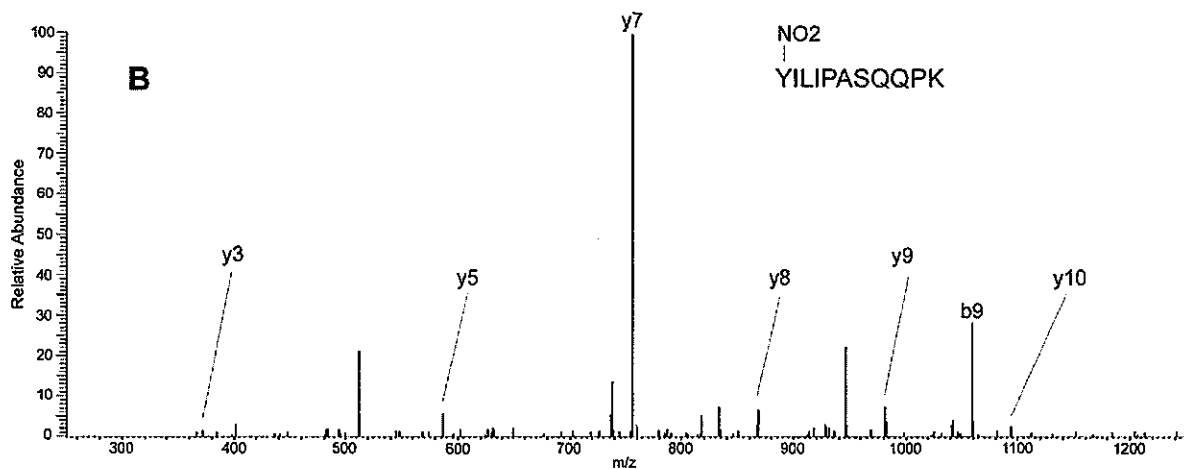
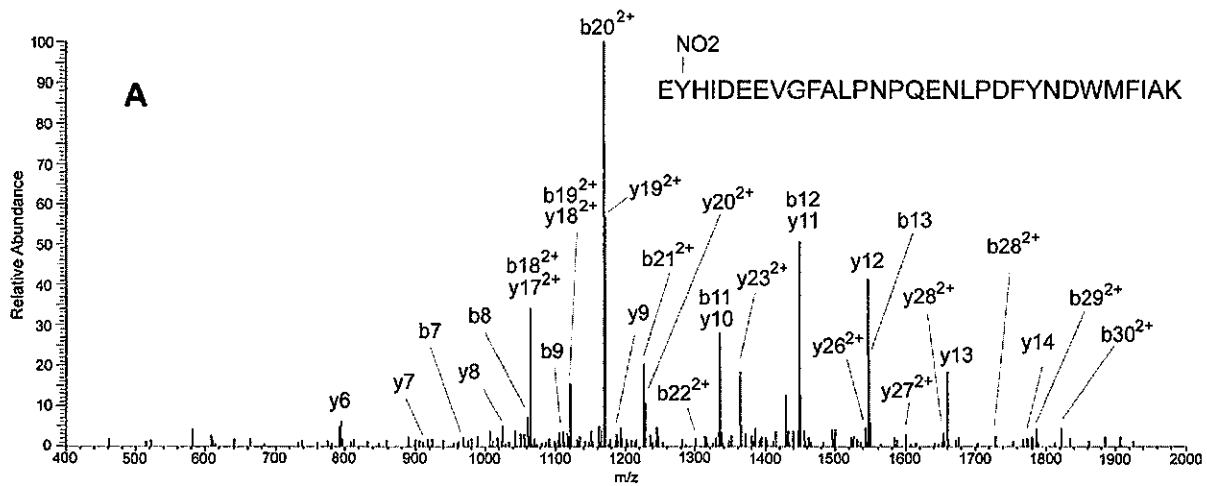


Figure 5. IDO ニトロ化ペプチドの検出

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

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、Mohammad Wadud Bhuiya、中牟田 信一

研究要旨：HIV 脳症は、HIV-1 ウイルスやそのウイルス蛋白質によって引き起こされる神経細胞死が中枢神経障害の主たる原因と考えられてきたが、その発症メカニズムについては未だ解明されていない。我々は以前より、神経細胞に多く発現して細胞内では足場蛋白として知られてきた 14-3-3 が、1)HIV 脳症初期患者脳の神経細胞内でその発現が増強している事、2)脳症の進行に伴い神経細胞が破壊されると脳脊髄液中に漏出してくる事から HIV 脳症における 14-3-3 蛋白質の重要性に着目してきた。HIV 脳症の神経細胞死では膜蛋白 gp120 が有力な誘導物質と考えられる事から、gp120 によるアポトーシス誘導機序とその課程に係わる 14-3-3 蛋白質の役割に焦点を絞り解析を行った。これまでの研究で我々は、14-3-3 蛋白質は gp120 による細胞死カスケードの ミトコンドリア経路 (internal pathway) において、Bad と結合して細胞死に抑制的に働く重要な制御因子である事を明らかにしており、引き続きその詳細な分子メカニズムの解析と 14-3-3 蛋白質の新たな役割を検討した。Bad は通常細胞質内ではリン酸化された状態で存在し、細胞が gp120 によって刺激されると Bad の脱リン酸化の誘導、Bad のミトコンドリア移行の後に細胞はアポトーシスに陥る。14-3-3 τ はリン酸化 Bad と結合して、gp120 による Bad の脱リン酸化を防ぐ事で Bad のミトコンドリア移行を抑制し細胞死を制御している事が判明した。また今回の解析で、gp120 による Fas 依存的な古典的経路においても、14-3-3 蛋白質は Bid の活性化を介して細胞死の新たな制御因子として機能している事が明らかとなった。HIV 感染に対し神経細胞は、14-3-3 蛋白質の発現を反応性に増強させ細胞死を回避しようと働いている事が推定された。これは 14-3-3 のストレス蛋白としての性質によると考えられるが、今回その発現誘導メカニズムと細胞死制御に関わる 14-3-3 蛋白質のストレス蛋白としての機能についても考察した。

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マーカーとして提唱してきた。この際 14-3-3 蛋白質は、中枢神経障害の初期において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、神経細胞の破壊の進行と共に細胞外に遊離

され髄液中に漏出されると考えられ、神経細胞障害の課程に係わる重要なファクターと考えられる。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細胞数が著しく低下することに基づいている。このT細胞の著しい低下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な障害以外に、間接的因子によるアポトーシスの誘導が重要な役割を果たしている。事実、合胞体形成によるこのアポトーシスの波及効果は、非感染細胞を巻き込んだリンパ球の障害やその欠如を証明してきた。HIV感染によって引き起こされるこのアポトーシスの原因には、ウイルス感染そのもの以外にHIV-1によってコードされる種々の蛋白質を原因とする。中でも、ウイルス膜蛋白のgp120はこの最も有力な誘導分子と考えられている。一方われわれが注目している14-3-3蛋白質は、抗アポトーシス作用を有する重要な細胞内因子としてこれまで注目されてきた。

そこでgp120のprimary targetと考えられているCXCR4を神経細胞と同様に発現し、gp120によって細胞死が誘導されるヒトの初代血管内皮細胞培養(HUVEC)をモデル細胞として、14-3-3蛋白質のgp120による細胞死に果たす役割を検討した。一方、HIV感染による免疫不全症候群の主たる原因となる細胞死は、一般的にHIV-1にアタックされたCD4⁺ T細胞表面に発現したFas等のデスリガンドによるexternal pathwayが重要である事がわかっている。今回この古典的細胞死誘導経路での14-3-3蛋白質の役割を、ヒト脳由来の初代血管内皮細胞で解

析し、gp120に係わる新たなアポトーシス過程とこれに係わる14-3-3の効果を新たに見出した。一方、14-3-3蛋白質はgp120によりその細胞内発現が著しく増強される。我々は今回、この誘導メカニズムと細胞死での意義を探る重要な手掛かりとして14-3-3質のストレス蛋白としての性質とその新しい機能について明らかにする事を試みた。これらの結果は、14-3-3蛋白質がHIV感染(gp120依存的)による細胞死においてより包括的にその抑制的制御を担っている事が示唆された。

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。Human Brain MVEC (ヒト脳微小血管内皮細胞) はApplied Cell Biology Research社より購入した。Drosophila Schneider 2 (S2) cell はInvitrogenより購入。gp120 (IIIB) はImmunoDiagnostics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より購入した。Bad及びりん酸化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より購入した。ProteinG sepharoseはZymedより購入した。SilencerTMsiRNA Construction Kit、MEGAscript transcription kitはAmbionより購入した。

② Cell culture

HUVEC は EGM-2 supplemented with hFGF-B, VEGF, R3-IGF-1, Heparin, 2%FCS で、MVEC は CS-C complete medium で 37°C で培養を行った。gp120 (1~10 nM) を追加後 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) を用い 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。

③ Human 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'-AAGAGCTTTGCCGCATC-TGCG-3', Bax; accession no. NM-138764, Sense 5'-AACATGGAGCTGCAGAGGATG-3', Antisense 5'-AACATCCTCTGCAAGC-TCCATG-3', 14-3-3 τ ; accession no. X56468.1, Sense 5'-AAGTTGCAGCTGATTAAGGAC-3 Antisense 5'-AAGTCCTTAATCAGCTGCAAC, 14-3-3 ζ ; accession no. MN-145690 Sense 5'-AACATTGGATAATTCAGCTCC-3'. Antisense 5'-AAGGAGCTGAAT TATCCAATG-3', 14-3-3 ϵ ; accession no U28936 Sense 5'-AAC-CACATCCATCCCTGCTAC-3', Antisense 5'-AAGTAGCAGGGATGGATG-TGG-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。

④ Drosophila 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。14-3-3 ζ ; GenePeptide accession no. AE003831, forward-primer (F-P) 5'-GTCATCGTGGCGT-GTCATCT-3', reverse-primer (R-P) 5'-TCA-ACAGCTGCATGATGAGTG-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 (TTAATACGACTCACTATAGGGAGA) 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 μ g MEGAscript 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。

⑤ RNAi の調整。

Human RNAi は、各々の siRNA (1~10nM) を調整しオリゴフェクタミン法にて HUVEC に 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 x 10⁶ cells/ml に調整後、各 dsRNA を final con 37n M 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。

⑥ 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。

⑦ Whole cell lysate (S2, HUVEC), mitochondria 並びに cytosol 画分(HUVEC)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。HUVEC を PBS で洗浄後、ダウンズ型ホモゲナイザーで細胞を破碎、3900 rpm, 7min 遠心、上清を回収しさらに 5600 rpm, 30 min 遠心を行い、沈殿をミトコンドリア画分とした。上清をさらに 50,000 rpm, 60 min で遠心、上清を細胞質画分として回収した。

⑧ 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 の遠心で未破碎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。

⑨ 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。

⑩ 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 もしくは Hsp90 抗体にて共染色を行った。終了後、Alexa Flour488 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。正常もしくは dsRNA 処理した HUVEC を 72 時間培養時点で gp120 (10 nM) を加え 24 時間培養後、MitoTracker 400 nM で 30 min 処理、続いて 4% パラホルムアルデヒドで 20 min 固

定後、0.1%Triton-X100 で細胞の permeabilization、2.5%のスキムミルクで固定した。14-3-3 抗体、リン酸化 Bad にて共染色を行った。2 次抗体は Alexa Flour488 と Alexa Flour647 を用いて培養、共焦点レーザー顕微鏡にて解析を行った。

⑩ Proteinase 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 を加え氷中で10 min 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。

⑪ 14-3-3 蛋白の変性基質に対する抗凝集並びに脱凝集活性の測定

<遠心法>S2 細胞の熱不溶性画分(凝集)に10 µg の 14-3-3 か Hsp90 を加え ATP 存在下に27°Cで4時間処理後、20000 g, 20 min で遠心、沈殿を凝集分画として回収し抗 cytochrome c 抗体にてウエスタンブロッティングを行った。

<light scattering 法> 基質の凝集状態を F-2000 fluorometer を用いて 320 nm の吸収波長で測定した。Holo 型から Fisher らの方法で精製した apo 型 cytochrome c に、14-3-3 蛋白を加え 48°C でその抗凝集活性を測定した。脱凝集能は、あらかじめ 48°C、5 min で熱凝集させた apocytochrome c を 14-3-3 か Hsp90 を含む 27°C の buffer に加え、ATP 存在下に 320 nm の light scattering から各々のシャペロンの脱凝集活性を測定した。

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 を発現している 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 リークによって細胞死を定量に測定したところ、リコンビナント gp120/160 蛋白質は、濃度依存的に HUVEC に細胞死を誘導した。又、ヘキスト染色で gp120 による核の凝集、断片化が確認された。

2) gp120/160 蛋白質による、14-3-3 τ 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検証した。興味深い事に、14-3-3 τ が特異的に gp120/160 によるアポトーシスでその発現が増強している事が判明した(図2)。

3) HIV 脳症患者脳での 14-3-3 蛋白質の発現増強

HIV 脳症患者脳及び健常脳から作製した脳組織切片を用いて 14-3-3 蛋白質の発現について比較検討を行った。14-3-3 蛋白はすべてのアイソフォームを認識する抗体と 14-3-3 τ を特異的に認識する抗体を用いて免

疫組織染色を行った。図3に示す如く、HIV脳症患者脳では健常脳に比べて有意な14-3-3蛋白質の発現増強を認めた。特に健常脳でほとんど検出される事のない14-3-3 τ のHIV脳症患者脳での著しい発現増強が認められる。

4) 14-3-3 τ はBadと細胞内で特異的に結合している。

図4は、pro-apoptotic蛋白質である、Bad, Bax,の特異抗体を用いて免疫沈降した後、14-3-3蛋白質を認識する各々のアイソフォーム認識特異抗体でウエスタンブロットした結果である。図に示すごとく、gp120刺激でその発現が増強してくる14-3-3 τ とBadの特異的な結合が認められた。

5) Bad RNAiは、gp120によって引き起こされる細胞死を抑制する。

次に、pro-apoptotic蛋白質が、gp120による細胞死にいか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て、gp120による細胞死に与える影響を検討した。その結果、図5のごとく、Badのノックダウンでは、Baxのノックダウンと比べて明らかにgp120による細胞死が抑制されており、HUVECの細胞死からのレスキュー効果が認められた。これらの結果からgp120による細胞死は、主としてBadによって制御されている事が考えられた。尚、Bad, Bax RNAiによるノックダウン効果を図下に示す。

6) 14-3-3 τ RNAiは、gp120によって引き起こされる細胞死を増強する。

同様に、14-3-3蛋白質のgp120による細胞死に与える影響を検討した。図5に示すごとく、gp120刺激によってその発現が増強し、しかも特異的にBadと結合する14-3-3 τ 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事が示唆された。尚、各々の14-3-3アイソマー RNAiによるノックダウン効果を図下に示す。

7) 14-3-3 τ は細胞内でリン酸化Badと結合し、gp120によるBadの脱リン酸化を防いでいる。

図6は、リン酸化Badの特異抗体を用いて免疫沈降した物を、各々の特異抗体でウエスタンブロットした結果である。図に示すごとく、14-3-3 τ とリン酸化Badの結合が認められた。次にBadのリン酸化に与える14-3-3 τ の影響を検討した。図7に示す如く、RNAiで14-3-3 τ の発現を抑えると、gp120による明らかなBadの脱リン酸化が認められた。下図はこの事を免疫蛍光染色で確認したものである。14-3-3 τ を欠如した細胞(矢印)では14-3-3 τ を発現した細胞と比べて明らかなBadの脱リン酸化が確認された。

8) 14-3-3 τ RNAiは、gp120によるBadのミトコンドリア移行とcytochrome cの細胞質流出を促進する。

図8左に示す様に、RNAiで14-3-3 τ の発現を抑えるとBadの著しいミトコンドリア移行が認められた。同様にcytochrome cの細胞質の流出を検定した所、14-3-3 τ RNAiで明らかなcytochrome cの細胞質流出が確