

認された (図 8 右)。

9) gp120 は Fas 依存的な細胞死を Brain MVEC (ヒト脳微小血管内皮細胞) で誘導する。

gp120 による MVEC の細胞死誘導効果を MTT アッセイにて定量的に測定したところ、図 9 左の如く gp120 は MVEC 細胞で細胞死を誘導した。その際、gp120 による MVEC 細胞に対する death ligands 誘導効果を調べたところ、gp120 は Fas ligand の著しい誘導を引き起こす事が判明した (図 9 右)。

10) gp120 は MVEC 細胞内で caspase-8 と Bid の活性化を引き起こす。

gp120 で MVEC 細胞を 24 時間処理し、caspase-8 と Bid の特異抗体を用いてその活性化に与える影響を検討した。図 10 左に示す様に、gp120 はその濃度依存的に caspase-8 の活性化型への分解を引き起こした。さらにその下流で機能し、細胞死機序におけるミトコンドリア経路との橋渡し分子と考えられている Bid に与える影響を検討した。その結果、gp120 は Bid を効果的に分解し活性化する事が明らかになった (図 10, 右)。

11) 14-3-3 τ, ζ は、MVEC 細胞内で gp120 依存的に Bid と結合している。

gp120 による MVEC の細胞死誘発過程で活性化される Bid と 14-3-3 蛋白質との相互作用について検討した。14-3-3 蛋白質のアイソマー共通認識抗体で免疫沈降したものを Bid の抗体で Western immunoblotting したところ、14-3-3 蛋白質と Bid との gp120 依存的な結合が認められた (図 11 左)。

さらに 14-3-3 のアイソフォーム特異性を検定した所、14-3-3 蛋白質のなかの τ, β が特異的に gp120 依存的に Bid に結合している事が判明した (図 11 右)。

2. 14-3-3 のストレス蛋白としての性質、その発現誘導機序と細胞死制御に果たす役割

gp120 に対し細胞は 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く。これには最近我々が見出した 14-3-3 のストレス蛋白としての性質が深く関与していると考えられる。我々は、14-3-3 蛋白質がストレス蛋白 (分子シャペロン) とし、実際どの様に細胞死に関わっているのかを検証する事で、HIV 脳症における 14-3-3 蛋白の役割解明を目指した。今回、代表的なストレスでありアポトーシスを誘導する事が知られている熱ストレス条件下で、細胞死誘導因子として重要な cytochrome c に対する 14-3-3 蛋白質の新しい機能を見出したので報告する。

1) 14-3-3 ζ は熱ストレスで発現増強され、その発現は転写レベルで調節されている (図 12)。

S2 細胞に 37°C で 1 時間の熱ストレスを加え、27°C に戻して各々の時間で 14-3-3 蛋白の発現量を比較検討した。熱ストレスで 14-3-3 ζ の発現量の著しい増強が認められた (A)。この発現増強に対する actinomycinD の効果を調べた所、B に示された様に actinomycinD は、熱ストレスでの 14-3-3 ζ の発現誘導を抑制した事からその転写レベルでの調節が示唆された。さらにこれを検証するため、通常熱ショック蛋白

の発現誘導を制御している HSF (熱ショック因子) の発現量を RNAi で抑制すると 14-3-3 ζ の熱発現誘導が認められなかった (D)。

2) 14-3-3 ζ は熱ストレスにより細胞質内で apocytochrome c と結合している (図 13)。

免疫蛍光染色にて細胞内での cytochrome c の局在を検定した所、holocytochrome c は熱ストレスの如何に関わらずミトコンドリアに局在していた(A)。apocytochrome c は通常その急速なミトコンドリアへの取り込みのため染色が困難であるが、熱ストレスを加えた細胞では明らかに細胞質内に留まって染色されてくる事がわかった (B)。14-3-3 ζ は細胞質に限局していた。14-3-3 ζ と apocytochrome c の特異認識抗体で共染色したところ、熱ストレス下において 14-3-3 ζ と apocytochrome c との共局在が認められた。

3) 14-3-3 ζ の RNAi による発現抑制は、熱凝集した apocytochrome c の脱凝集を著しく阻害する (図 14)。

ストレス蛋白 14-3-3 の細胞死での役割を解析するため、アポトーシスの引き金を引く cytochrome C に対する 14-3-3 の熱凝集抑制効果から検討した。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て cytochrome C の発現を検討した。A に示すように、14-3-3 蛋白質は 1 時間の熱ストレスによって生じた cytochrome C の凝集を、27°C で可溶性にした。しかし 14-3-3 ζ の RNAi では、cytochrome C の脱凝集効果は著明に抑制された。HSP83 RNAi では脱凝集が認

められた。免疫蛍光染色で apocytochrome c の局在を調べた結果、14-3-3 ζ 欠損細胞では 14-3-3 ζ 発現細胞と比較して明らかに熱ストレス後 27°C に戻し 3 時間おいても、apocytochrome c の細胞質局在が認められ (B)、これは A の結果と合わせると 14-3-3 ζ 欠損細胞での apocytochrome c の細胞質内での凝集集積を示唆している。HSP83 RNAi 細胞では正常細胞と同じく apocytochrome c の凝集は認められなかった。

4) 14-3-3 ζ 蛋白質は、熱凝集した apocytochrome c を可溶化(脱凝集)する (図 15)。

14-3-3 ζ 蛋白質の apocytochrome c に対する脱凝集機能が、直接的なものかどうか検証するため、リコンビナント 14-3-3 ζ の効果を検討した。14-3-3 ζ RNAi で処理した細胞内で形成された熱不溶性画分に、14-3-3 ζ を加えて apocytochrome 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、apocytochrome 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 (A)。

さらに遠心法にてその脱凝集能を解析した所、14-3-3 ζ は ATP 依存的に apocytochrome c を脱凝集した (B)。

5) 14-3-3 ζ 蛋白質の熱凝集 apocytochrome c に対する試験管内での抗凝集並びに脱凝集効果 (図 16)。

精製 apocytochrome c に 14-3-3 ζ か Hsp90 を加え、48 °C での light scattering(320nm)を測定した。A に示す如

く 14-3-3 ζ はその濃度に依存して apocytochrome c の熱凝集を抑制した。これらシャペロンの脱凝集能を調べるため、あらかじめ 48°C で 5 分熱凝集させた apo-cytochrome c を、14-3-3 ζ か Hsp90 を含むバッファー内に加え 25°C での light scattering の減少を調べた。14-3-3 ζ は効果的に熱凝集した apocytochrome c を脱凝集した (C)。Hsp90 存在か、もしくはシャペロン無しの条件ではその効果が認められなかった (B,D)。

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 蛋白質の果たす役割を図 17 に示した。14-3-3 蛋白質による制御 step 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 による神経細胞死は、少なくとも考えられる 1 つの経路として 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 ζ 蛋白質はリン酸化 Bad と結合する事で細胞死を抑制している。
- B) 血液脳間門の形成に最も重要と考えられている脳微小血管内皮細胞に gp120 は細胞死を誘導した。この際、Fas ligand の発現増強が認められ、gp120 依存的に 14-3-3 β , τ 蛋白質と細胞死実行因子である Bid との相互作用が認められた。14-3-3 蛋白質は gp120 による古典的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 のストレス蛋白質としての性質

は、細胞死の postmitochondria step で、アポトーシス誘導因子である cytochrome c の働きを抑えて抗アポトーシス作用を荷っているかも知れない。

E. 考察

従来より 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。さらに最近、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と、それに果たす 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 による細胞死は、Bad を介した経路が重要であり、14-3-3 蛋白質はリン酸化 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、恐らく、CXCR4 を介して入った gp120 によるアポトーシス刺激の主なシグナルは、上記経路で伝達制御されている可能性を示している。また、以前より HIV 脳症の病因として神経細胞死の他、血液脳間門の最も重要な構成成分考えられている脳微小血管内皮細胞の細胞死も注目されてきた。一方、これまで 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細胞死の古典的経路の関与が示唆されてきた。今回、ヒト脳微小血管内皮細胞を用いた実験で、gp120 によるアポトーシス刺激で 14-3-3 蛋白質は gp120 依存的に Bid と結合した事から、細胞死の古典的経路でも 14-3-3 蛋白質が機能している可能性を示しており、現在その役割の解析を行っている。このように、14-3-3 蛋白質は細胞死の分子メカニズムの中でも特に premitochondria step のおいて重要な役割を果たすと考えられるが、今回我々は、アポトーシス誘導因子である cytochrome c との相互作用を介して、postmitochondria step における 14-3-3 蛋白質の役割の重要性をも明らかにした。これは 14-3-3 のストレス蛋白としての性質と深く結びついており、恐らく gp120 という外的なストレスにさらされる事により、14-3-3 蛋白質は反応性にその発現を増強させる事で上記メカニズムを介して細胞死を抑制する事が考えられた。これらの結果は、HIV 脳症の重要な病因と考えられている神経及び脳血管内皮細胞死の発症機序において、14-3-3 蛋白質が包括的な制御因子として機能している可能性を示唆しており、今後その役割解明が期待される。

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いない。

G. 研究発表

I. 論文発表 (脳障害と分子シャペロン)

1. Wu X., Yano M., Washida H and Kido H. The second metal-binding site of 70KDa heat-shock protein is essential for ADP binding, ATP hydrolysis and ATP synthesis. *Biochem. J.* 378, 793-799 (2004)
2. Wojcik C., Yano M and DeMartino G. RNA interference of valosin-containing protein (VCP/97) reveals multiple cellular roles linked to ubiquitin/proteasome-dependent proteolysis. *J. Cell. Sci.* 117,281-292 (2004)
3. Yano M., Koumoto Y., Kanasaki Y., Wu X and Kido H. 20S proteasome prevents aggregation of heat-denatured proteins without PA700 regulatory subcomplex like a molecular chaperone. *Biomacromolecules.* 5(4), 1465-1469 (2004)
4. Yao D., Chen Y., Kuwajima M., Shiota M and Kido H. Accumulation of mini-plasmin in the cerebral capillaries causes vascular invasion of the murine brain by a pneumotropic influenza A virus: implication for influenza-associated encephalopathy. *Biol. Chem.* 385(6), 487-492 (2004)

II. 学会発表

1. HIV-1/gp120 のアポトーシス誘導および 14-3-3 蛋白質によるその制御機構の解析
矢野仁康、中牟田信一、木戸博
第 45 回日本生化学会中国、四国支部例会
2004, 5.14-15
2. HIV-1 gp120-mediated apoptosis and 14-3-3 protein as an anti-apoptotic factor
Yano M., Nakamuta S and Kido H
第 77 回日本生化学会大会 2004, 10.13-16

図1

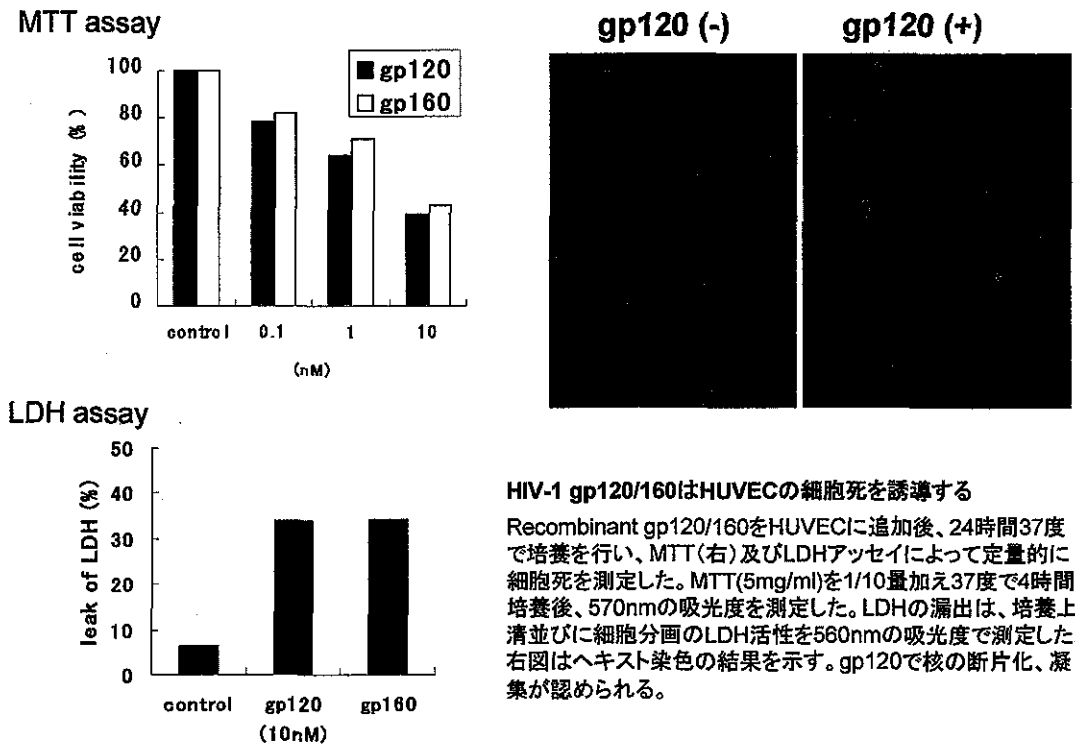
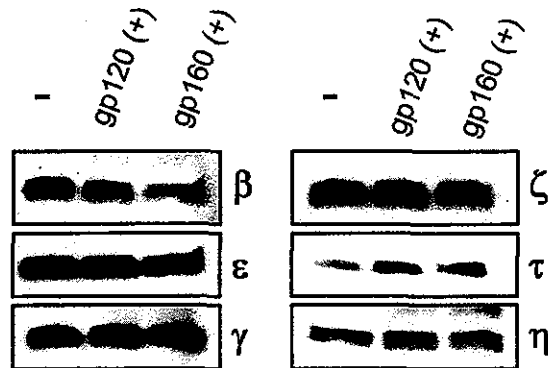


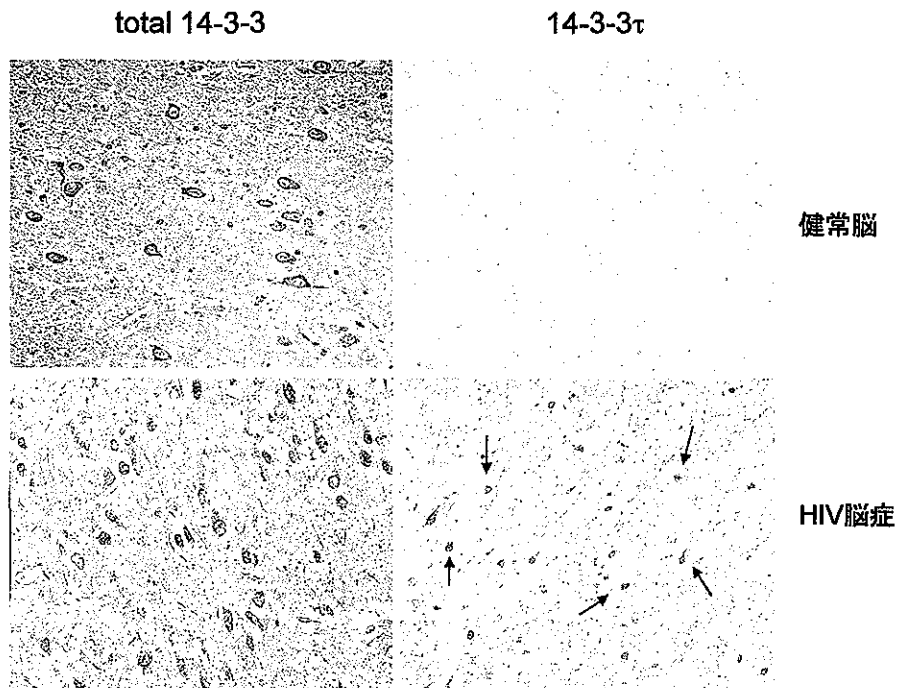
図2



gp120/160は14-3-3 τ 発現量を増加させる。

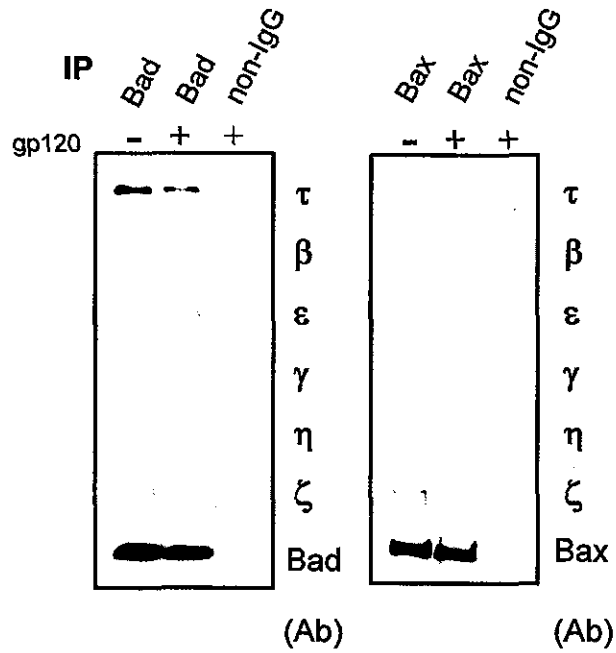
HUVECを10nMのgp120/160で刺激後、cell lysateを調整後各々の特異抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った。

図3



HIV脳症患者脳では、14-3-3蛋白質の発現増強を認める

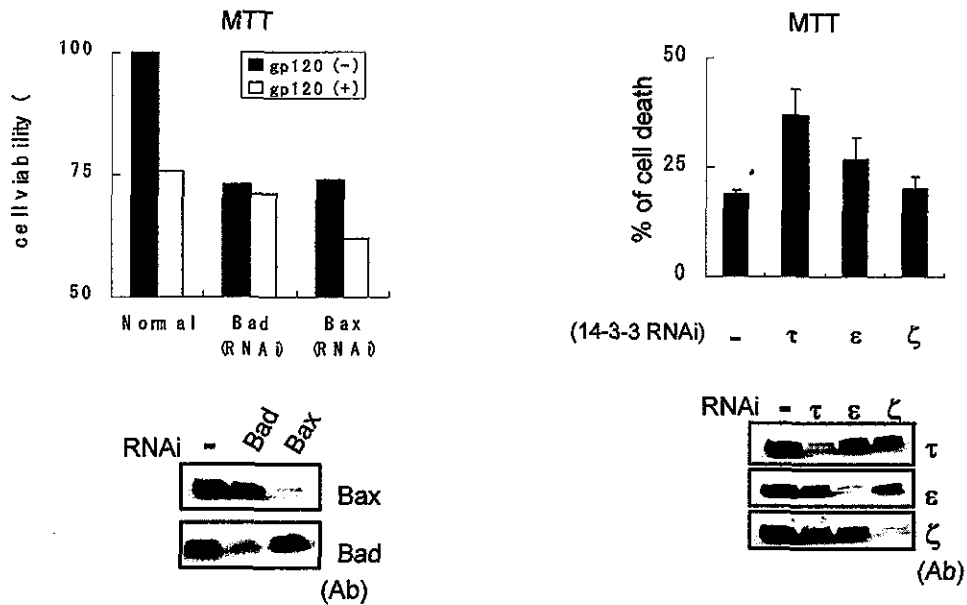
図4



14-3-3τはBadと細胞内で特異的に結合している

Bad, Bax認識抗体で免疫沈降後、各々の14-3-3アイソマー特異抗体にてWestern-blottingを行った。

図5



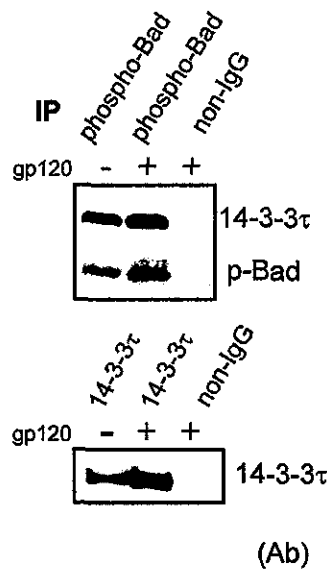
Bad RNAiは、gp120による細胞死を抑制する。

Bad 及び Bax 特異的siRNA(5nM)をトランスフェクション後、72時間培養を行った。10nM gp120を追加し24時間培養を行いMTTにて定量的に細胞死を測定した。siRNA未処理でgp120で刺激しないHUVECのcell viabilityを100%として計算した。図右は、各々のRNAiのノックダウン効果をウエスタンブロットングにて解析したもの。

14-3-3τRNAiは、gp120による細胞死を増強する。

14-3-3τ, ε, ζ 特異的siRNA(1nM)をトランスフェクション後、72時間培養を行った。10nM gp120を追加し24時間培養を行いMTTにて定量的に細胞死を測定した。図右は、各々のRNAiのノックダウン効果をウエスタンブロットングにて解析したもの。

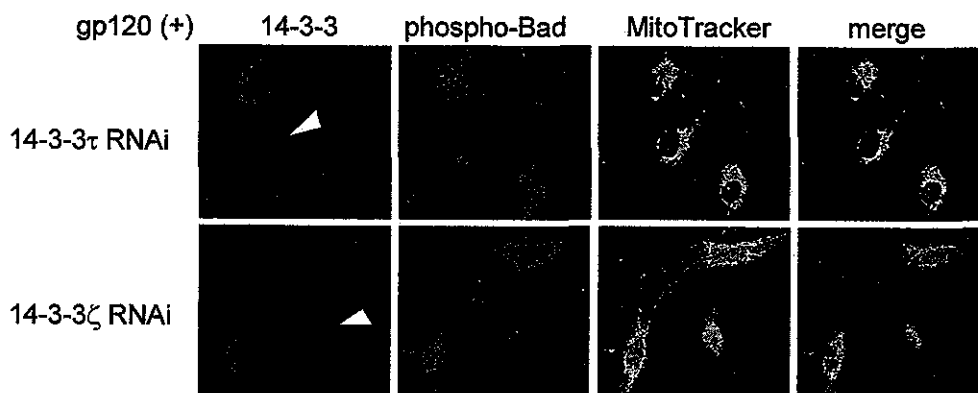
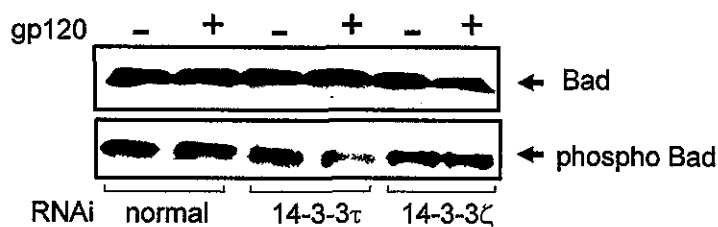
図6



14-3-3τは細胞内でリン酸化Badと結合している

リン酸化Bad認識抗体で免疫沈降後、14-3-3τ認識抗体でWestern-blottingを行った下は、14-3-3τ認識抗体で免疫沈降したものを14-3-3τ認識抗体でwesternしたもの

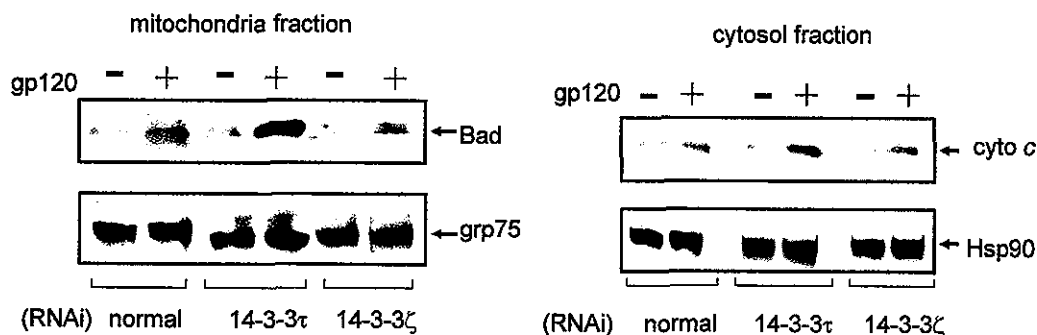
図7



14-3-3τRNAiはgp120によるBadの脱リン酸化を引き起こす

14-3-3τ, ζRNAi細胞をgp120(10nM)で24時間処理後lysateを調節し、リン酸化Bad認識抗体でwestern-blottingを行った。下図は免疫蛍光染色の結果を示す。14-3-3τ, リン酸化Bad, mitotrackerにて3重染色したものを共焦点レーザーにて解析した。

図8



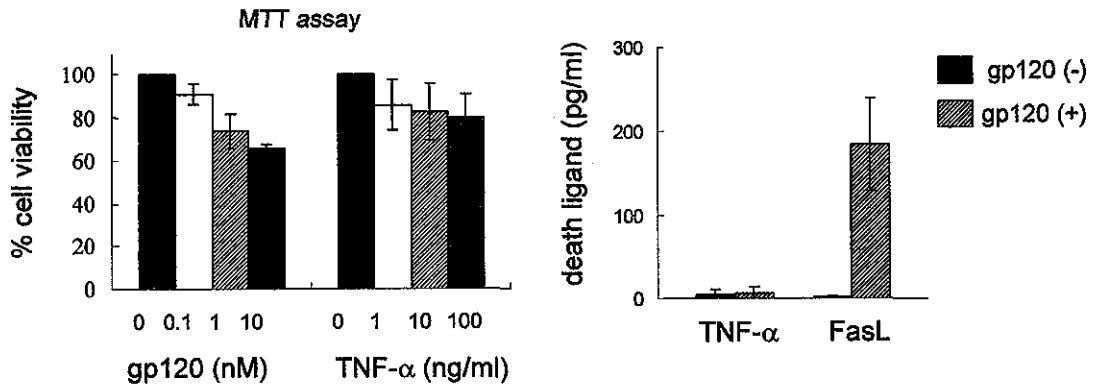
14-3-3τRNAiはgp120によるBadのミトコンドリア移行を増強する

14-3-3τ, ζ RNAi細胞をgp120(10nM)で24時間処理後ミトコンドリア分画を調整、Badのミトコンドリア移行をWestern-blottingにて解析した。ミトコンドリアのマーカー蛋白としてgrp75の発現量を比較した。

14-3-3τRNAiはgp120によるcytochrome cの細胞質への流出を増強する

14-3-3τ, ζ RNAi細胞をgp120(10nM)で24時間処理後細胞質分画を調整、cytochrome cの細胞質への流出をWestern-blottingにて解析した。細胞質のマーカー蛋白としてHsp90の発現量を比較した。

図9



gp120はBrain MVEC細胞のアポトーシスを誘導する

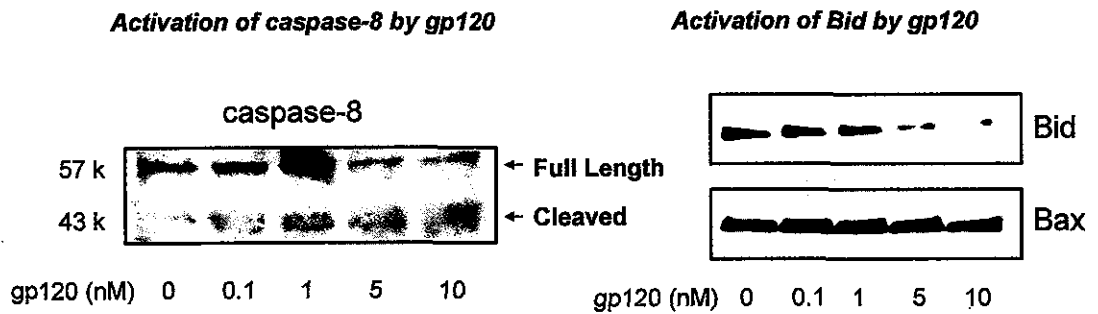
Recombinant gp120もしくはTNF-αをMVECに追加後、24時間37度で培養を行い、MTTアッセイによって定量的に細胞死を測定した。MTT(5mg/ml)を1/10量加え37度で4時間培養後、570nmの吸光度を測定した。

gp120はBrain MVEC細胞にFas ligandを誘導する

gp120でMVECを24時間処理後、細胞培養液中のTNF-α, Fas ligandをELISAを用いて定量的に測定した

Brain MVEC: Human Brain Microvascular Endothelial Cells

図10



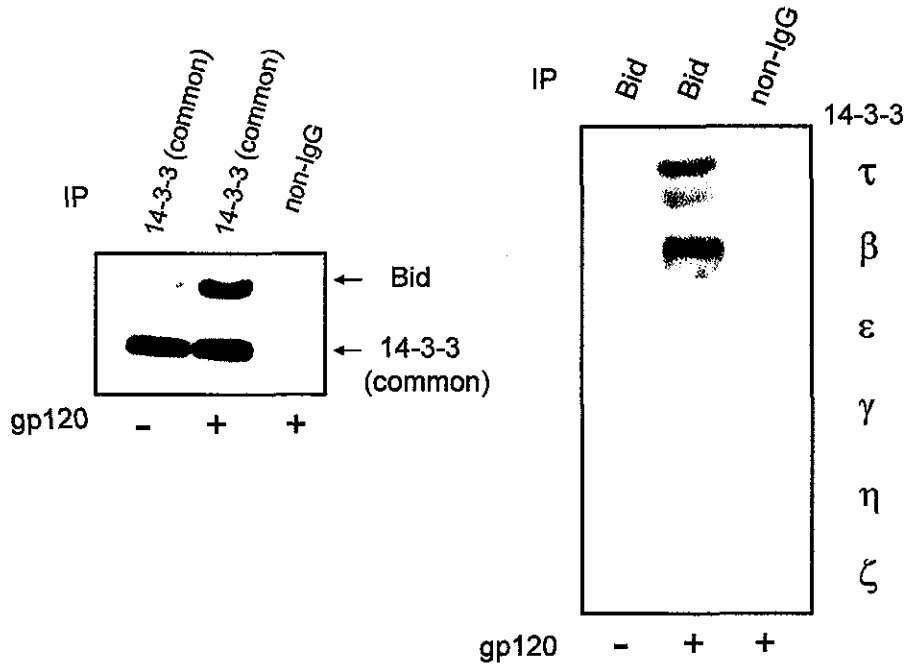
gp120はMVEC細胞内でcaspase-8を活性化する

gp120でMVEC細胞を24時間処理後、lysateを調整し caspase-8特異抗体にてwestern-blottingを行った。分解を受けた43Kのcaspase-8が活性型。

gp120はMVEC細胞内でBidを活性化する

gp120でMVEC細胞を24時間処理後、lysateを調整し Bid特異抗体にてwestern-blottingを行った。検出されたBidは分解を受けていない不活性型Bidを示す。

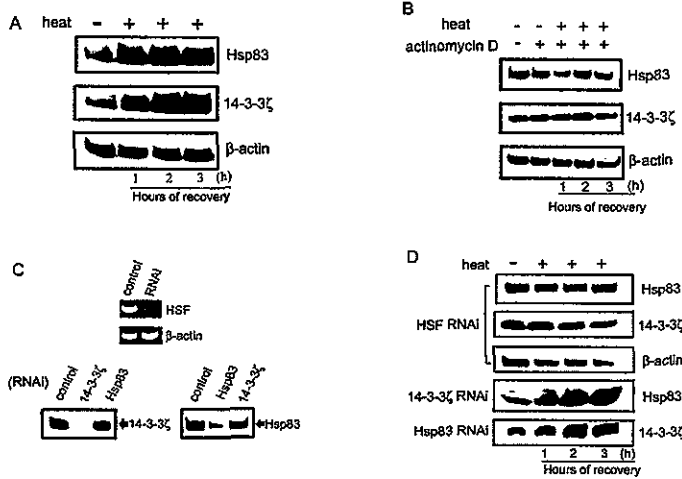
図11



14-3-3 τ , ζ は、細胞内でgp120依存的にBidと結合している

14-3-3アイソマー共通認識抗体で免疫沈降後、Bid 認識抗体でwestern-blottingを行った。右は、14-3-3アイソマー特異的結合を調べるためBid抗体で免疫沈降後、14-3-3のアイソマー特異抗体にてWestern-blottingを行った。gp120による効果は10nMで24時間処理したサンプルで検定した。

図12



14-3-3 ζ は熱ストレスで発現が増強され、その発現は転写レベルで調節されている

A. S2細胞を37°Cで1時間熱処理、終了後27°Cに戻し各々の時間でcell lysateを調整し14-3-3 ζ , Hsp83の発現量をWestern-blottingで解析した。B. S2細胞をactinomycin 5 μ g/mlで30min処理後、37°Cで1時間の熱ストレスを加え14-3-3 ζ , Hsp83の発現量をAと同様に検定した。C. RNAiのノックダウン効果を示す。D. HSF RNAiは14-3-3 ζ の熱誘導を抑制する。

図13

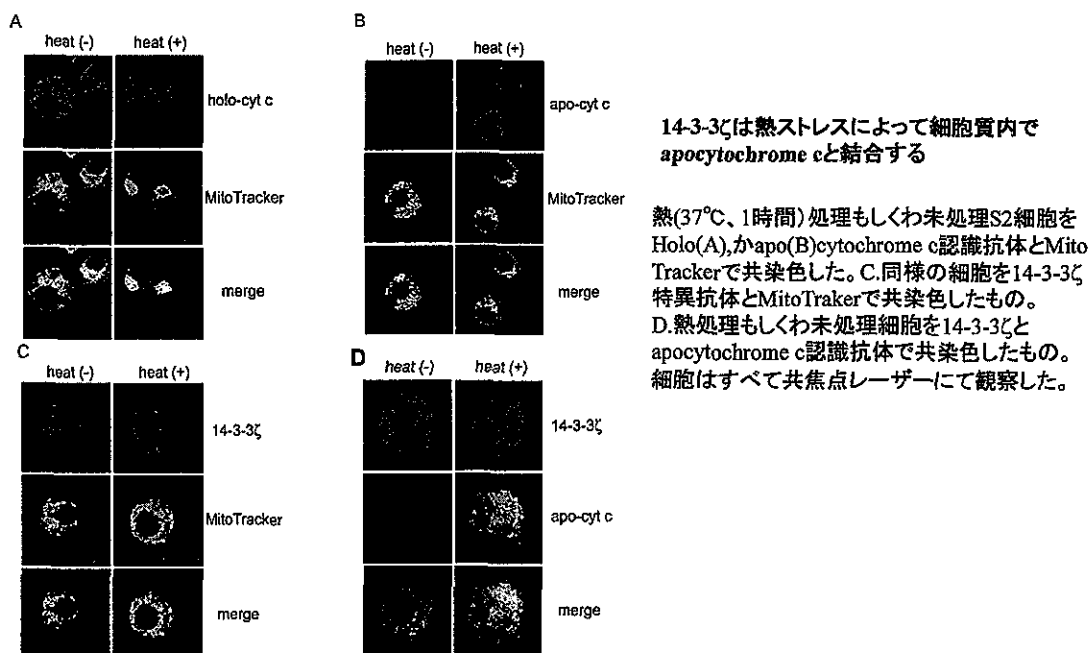


図14

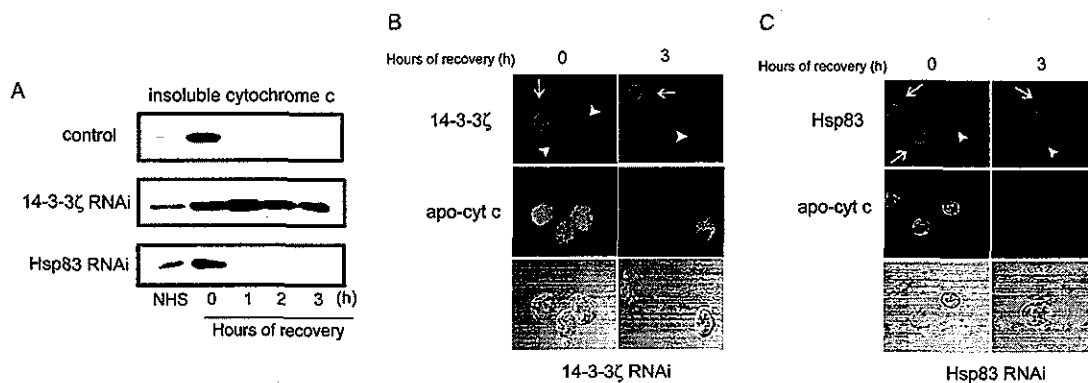
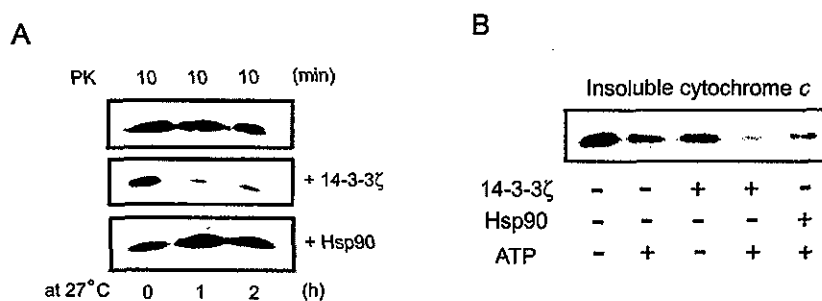


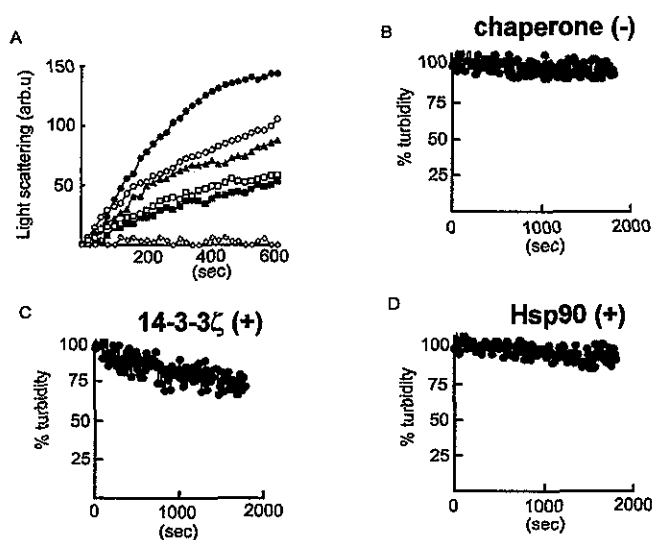
図15



14-3-3 ζ 蛋白質は、熱凝集したapocytochrome cを可溶化(脱凝集)する

A. 14-3-3 ζ RNAi細胞の熱不溶性分画を調整し、recombinant 14-3-3 ζ (10 μ g)を加えて0~2時間室温で培養後、Proteinase Kを10 μ g/mlで追加して氷柱で10分間反応させた。終了後western-blottingにてapocytochrome cの発現量を比較した。B. Aと同様の不溶性分画に、recombinant 14-3-3 ζ もしくはHsp90を加えATP存在下か非存在下に27°Cで4時間処理、終了後遠心し沈殿をapocytochrome cに対する抗体でwestern-blottingを行い脱凝集能を検定した。

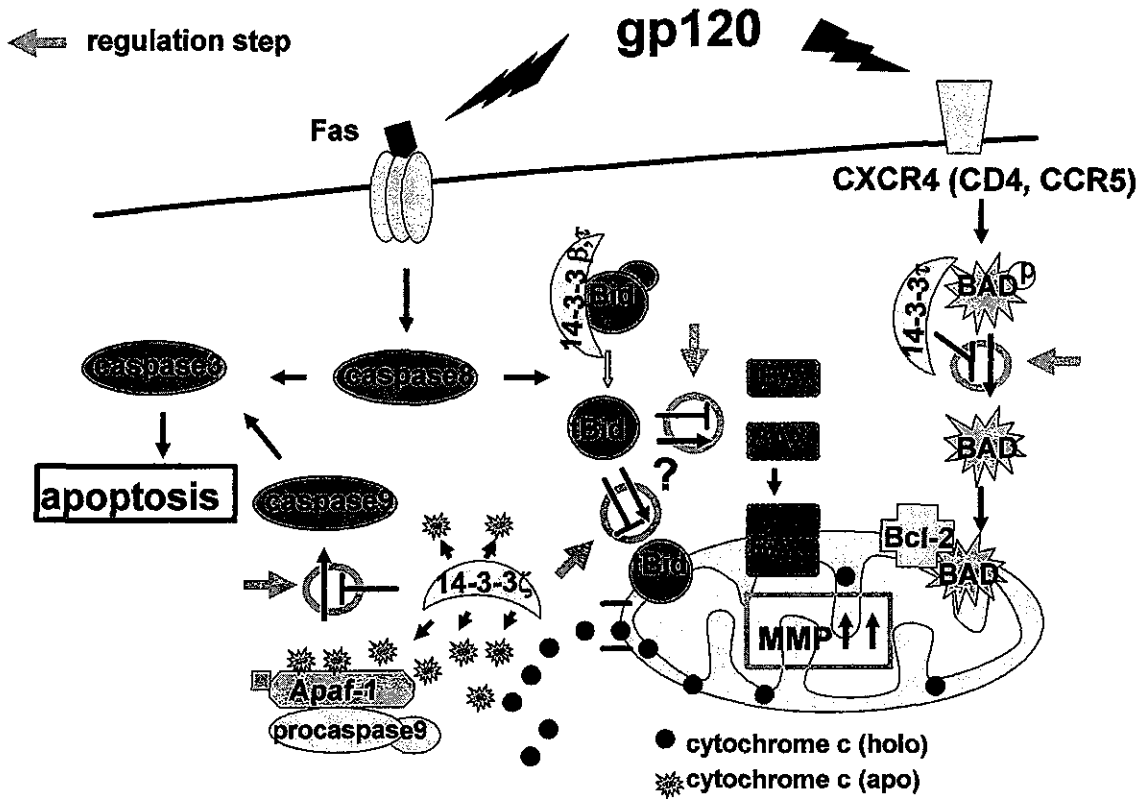
図16



14-3-3 ζ 蛋白質の熱凝集apocytochrome cに対する抗凝集並びに脱凝集機能

A. 14-3-3 ζ の熱凝集apocytochrome cに対する抗凝集活性。精製したapocytochrome cを14-3-3 ζ もしくはHsp90存在下か非存在下にキュベット内で48°C熱処理、320nmのlight scatteringの変化を測定する事で各々のシャペロンのapocytochrome cに対する抗凝集能を調べた。B-D. 熱凝集させたapocytochrome cに対する14-3-3 ζ (C), Hsp90(D)の脱凝集機能の検定。48°Cで5 min熱凝集させたapocytochrome cを、ATP存在下に各々のシャペロンを含むbuffer内に追加、320nmでのlight scatteringの減少を見る事でその脱凝集活性を測定した。

图 17



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

—*N*-Myristoyltransferase 阻害による HIV-1 複製、HIV 脳症制御の可能性—
分担研究者 高宗暢暁 熊本大学大学院医学薬学研究部・薬学生化学 助手

研究要旨：多くの細胞性タンパク質およびウイルス性タンパク質に存在するタンパク質の *N*-ミリストイル化は、それらタンパク質の活性発現に重要であり、*N*-myristoyltransferase (NMT)はその触媒酵素として知られている。*N*-ミリストイル化阻害剤によって Pr55^{gag} の *N*-ミリストイル化が阻害された結果、HIV-1 複製が抑制されることは周知の事実である。*N*-ミリストイル化阻害剤は疎水性の高い誘導体が多いことから、脳組織への移行が比較的容易であると予想され、脳内における HIV-1 複製阻害効果が期待される。しかしながら、宿主性タンパク質の *N*-ミリストイル化もまた同時に阻害されるため、細胞毒性が *N*-ミリストイル化阻害剤の問題点であった。近年、human NMT (hNMT)には2つの遺伝子(*hNMT1* および *hNMT2*)が存在し、細胞内で複数の isozyms で存在することが明らかとなった。そこで本研究では、hNMT isozyms 特異的な機能抑制が低毒性の HIV-1 複製阻害を可能にするかを検討した。hNMT isozyms 特異的な siRNA を用いた結果、hNMT1 の特異的な抑制による HIV-1 複製阻害が観察された。また各 isozyms シングルノックダウンによる細胞増殖抑制効果は各 isozyms ダブルノックダウンによるそれよりも低い結果となった。以上の結果から、hNMT isozyms 特異的な機能抑制は低毒性の HIV-1 複製阻害が達成できると期待される。このことから、各 hNMT isozyms 特異的な阻害剤の開発が重要であると考えられる。

A. 研究目的

はじめに：HIV-1 の複製を強力に抑制する多剤併用療法 (HAART) の導入により、HIV-1 感染症/エイズに対する薬物治療の効果が著しく向上し、それに伴い HIV 脳症発症率の低下が認められるようになった。しかしながら、生涯続けなければならない

と考えられている現行の HAART によって、今後、長期的にみて、この HIV 脳症発症率の低下が持続されるかは全く不明である。近年、痴呆を伴わない minor cognitive motor disorder (MCMD) と称される中枢神経症状が HAART 導入患者に認められることが報告されはじめている (*J. Neurovirology*, 9, 205-

221, 2003)。

髄液中の HIV-1 RNA 量と痴呆や神経生
理的障害が関連していることから
(*Neurology* 60, 1388-1390, 2003)、脳組
織における HIV-1 の複製を抑制することは
重要である。しかしながら、リンパ組織で
複製するウイルス集団から隔離された、脳
内で独自複製を続ける遺伝的に異なったウ
イルス集団の存在が知られている(*J Virol.*
79, 1772-1788, 2005)。このことは、現行
の HAART がリンパ組織における HIV-1 複
製阻害と同様に、脳内におけるそれを必ず
しも効果的にコントロールできていないこ
とを示唆する。これは現行の抗 HIV 薬の全
てが効率良く血液脳関門を透過できないこ
とが原因の一つと考えられる(*CNS Drugs*
16, 595-609, 2002)。このようなことから、
HIV-1 の感染に伴う中枢神経障害を予防す
ることを指向した、脳内 HIV-1 複製を阻害
する薬剤耐性株が出現しにくい抗 HIV 薬開
発、および脳内 HIV-1 複製によって引き起
こされる神経障害を抑制する薬剤開発が重
要になると考えられる。

N-myristoylation と HIV-1: 本研究では、
HIV 脳症発症制御を目指すにあたり、N-
myristoyltransferase (NMT)に着目した。
NMTは真核細胞以上に存在するタンパク質
のN-myristoylation (N-ミリスチル化)触
媒酵素である。N-ミリスチル化とは主に
タンパク質の生合成時に、開始Metが除去
された後のアミノ末端Gly残基の α アミノ基
にミリスチン酸が酸アミド結合する翻訳後

修飾の一つであり、この修飾によってその
タンパク質は細胞膜移行性、膜局在性を獲
得し活性を示すようになる。HIV-1におい
ては構造タンパク質であるPr55^{gag}がN-ミリ
スチル化を受けることが知られ、HIV-1
の感染性獲得に必須の修飾であることは周
知の事実である(HIV-1の調節タンパク質で
あるp27^{nef}もまたN-ミリスチル化を受け
ることが知られている)。N-ミリスチル
化のコンセンサス配列(N-ミリスチルモチ
ーフ)はGly-X-X-X-Se/Thr-であり、アミ
ノ末端のGlyは絶対的に要求される。HIV-1
のみならず近縁のレンチウイルスである
HIV-2やSIVのGAGタンパク質のアミノ末
端配列には、N-ミリスチルモチーフがほ
ぼ完全に保存されており (HIV sequence
database <http://www.hiv.lanl.gov>)、
これらレンチウイルスにおけるGAGタンパ
ク質のN-ミリスチル化の重要性が示唆さ
れる。また、N-ミリスチル化を受けない
GAGタンパク質からなるこれらウイルスが
複製能力を獲得するには、換言すればNMT
非依存性の変異ウイルスが出現するには、
通常薬剤耐性出現に伴う変異よりも遙か
に多くの変異の蓄積が必要になると予想さ
れ、N-ミリスチル阻害剤に対する耐性株
出現は極めて困難であることが予想される。
このことからPr55^{gag}のN-ミリスチル化阻
害は抗HIV戦略の一つとして提案されてい
る。

N-myristoylation と アポトーシス: HIV
脳症の原因の一つに神経細胞のアポトーシ

スが考えられている。ミトコンドリアを経由するアポトーシスシグナルの中で、BIDのN-ミリスチル化が必要とされることが報告されている (Science 290,1761-1765. 2000)。HIV 脳症における神経細胞のアポトーシスには TNFやTRAILなどの関与が示唆されていることから (PNAS. 100, 2777-2782. 2003)、BIDのN-ミリスチル化阻害はHIV脳症発症制御のための戦略の一つとなりうると考えられる。

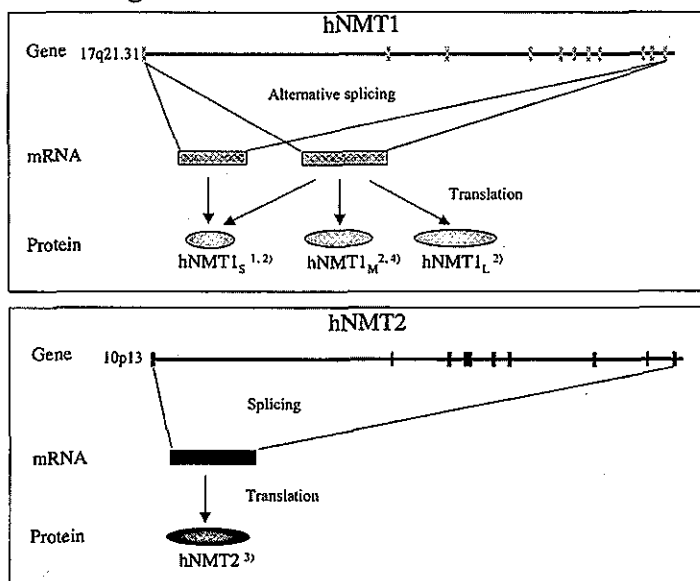
N-myristoylation阻害剤: 従来のN-ミリスチル化阻害剤には疎水性の高い化合物が多く、血液脳関門の透過性が高いことが期待される。脳内のHIV複製阻害やアポトーシス阻害にN-ミリスチル化阻害剤の有効性が期待される。

新しい N-myristoylation 阻害戦略の提案: しかしながら、残念ながら、これまでにヒトの NMT を標的とした N-ミリスチル化阻害戦略は必ずしも発展していない。その理由として、阻害剤の特異性の低さと、それに伴う副作用に問題があった。ところが、近年になり、ヒト NMT (hNMT)には、2つの遺伝子(hNMT1 および hNMT2)が存在し、細胞内で複数の isozymes で存在することが明らかとなった(PNAS 89, 4129-4133, 1992; Biochem. J. 333, 491-495, 1998; JBC. 273, 6595-6598, 1998; JBC. 272, 28680-28689,19979) (Fig. 1)。現在までにこれら isoyme 間の細胞内における役割の違いの存在について知られていない。

そこで我々は、細胞内において各 hNMT isozyme は固有の基質特異性を持ち役割分担をしながら機能していると仮定した。HIV-1 複製やアポトーシス誘導と密接に関連する NMT isozyme を同定できれば、その isozyme 特異阻害により副作用の軽減が期待できる。

本年度の研究では、HIV-1 複製中で Pr55^{gag} の N-ミリスチル化の過程を含む late stage に対して、hNMT1 と hNMT2 のいずれの isozyme が深く関与しているかを siRNA を利用して検討した。

Fig. 1 hNMTの遺伝子およびその産物



B. 研究方法

細胞

HEK293 cell line は 5 % FCS DMEM 培地で 37 °C, 5%CO₂ 条件下で培養した。HeLa-CD4-LTR-CCR5/β-gal (MAGIC-5) cell line (国立感染研、巽先生より分与) は

2.5% FCS DMEM 培地で 37 °C, 5%CO₂ 条件下で培養した。ヒト神経芽細胞種 SK-N-SH 細胞は 5 %FCS DMEM 培地で 37 °C, 5%CO₂ 条件下で培養した。また 10 μM の all-trans retinoic acid を 5 日間処理し、神経様細胞に分化させた後に実験に供した。

siRNA

hNMT1 および hNMT2 の遺伝子の exon 領域の DNA 配列の中で、各遺伝子特異的な配列を含む領域から siRNA の標的部位を選定した。化学合成 Double strand RNA および hairpin 型の siRNA を発現するベクターを構築し実験に用いた。コントロールとしてランダム化した RNA を用いた。

トランスフェクション

2.5 x 10⁵ cells の HEK293 細胞を 6 well plate に播種し一夜培養後、HIV-1 発現ベクター pNL4-3 を Lipofectamine2000 (Invitrogen, Carlsbad,CA) を用いてマニュアルに従いトランスフェクションした。さらに 12 時間または 48 時間後、hNMT1 または hNMT2 を標的とした siRNA 発現ベクターまたは siRNA を Lipofectamine 2000 を用いて同様にトランスフェクションした。さらに 48 時間培養後、培養上清と細胞を回収した。培養上清に含まれるウイルスの感染性を MAGIC-5 assay により評価した。

Real time PCR による RNA の定量

目的の細胞から ISOGEN (NIPPON

GENE, CO., Ltd., Tokyo, Japan)を用いてマニュアルに従い total RNA を抽出した。得られた total RNA を SuperScript™ III First-strand synthesis system for RT-PCR(Invitrogen, Carlsbad,CA)を用いてマニュアルに従い逆転写反応を行った。得られた cDNA を鋳型として real time-PCR を行い目的 RNA の定量を行った。

細胞毒性の評価

HEK293 細胞およびヒト神経芽細胞種 SK-N-SH に各 siRNA を処理し、48 時間後撮りパンプルー染色法および WST-1 assay により細胞毒性効果を調べた。

Western blot 分析

常法に従い SDS-PAGE を行い PVDF 膜に電氣的にタンパク質を転写後、1%スキムミルクでマスキングした。1次抗体として抗 NMT1 抗体、抗 NMT2 抗体、抗アクトン抗体、および HIV-1 positive plasma を用い、2次抗体として POD 標識抗マウス IgG 抗体、POD 標識抗ヒト IgG 抗体を用いた。chemiluminescence detection reagent plus (NEN Life Science Products, Boston, MA, USA)を用いて目的タンパク質の検出を行った。

MAGIC-5 assay

96-well plate に 0.75 - 1 x 10⁴ cells per well となるよう MAGI cell を播種し一夜培養後、ウイルスを含む培養上清を加え 48 時

間培養後 Emerman M ら (*J. Virol.* 66, 2232-2239, 1992) の方法に従い細胞を染色しカウントした。

In vitro NMT assay

In vitro NMT assay は、protein kinase A, pp60src, HIVPr55^{gag}, 及び HIV-1 p27^{nef}, 由来 peptide 基質をもちいて、Takamune らの方法 (*Anal Biochem.* 309, 137-142, 2002) に従って行った。

(倫理面への配慮)

本研究においては、動物実験を行わず、株化培養細胞を使用していることから、倫理面の問題はないと考えられる。

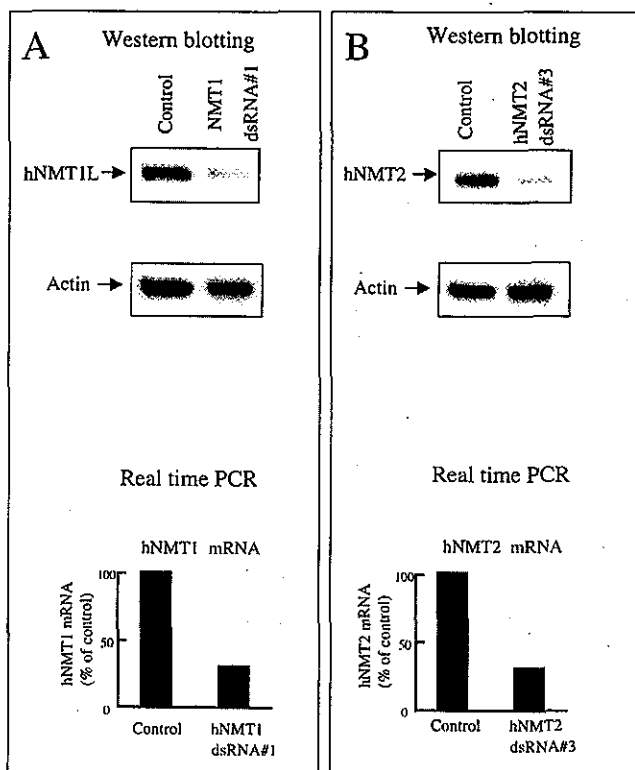
C. 研究結果

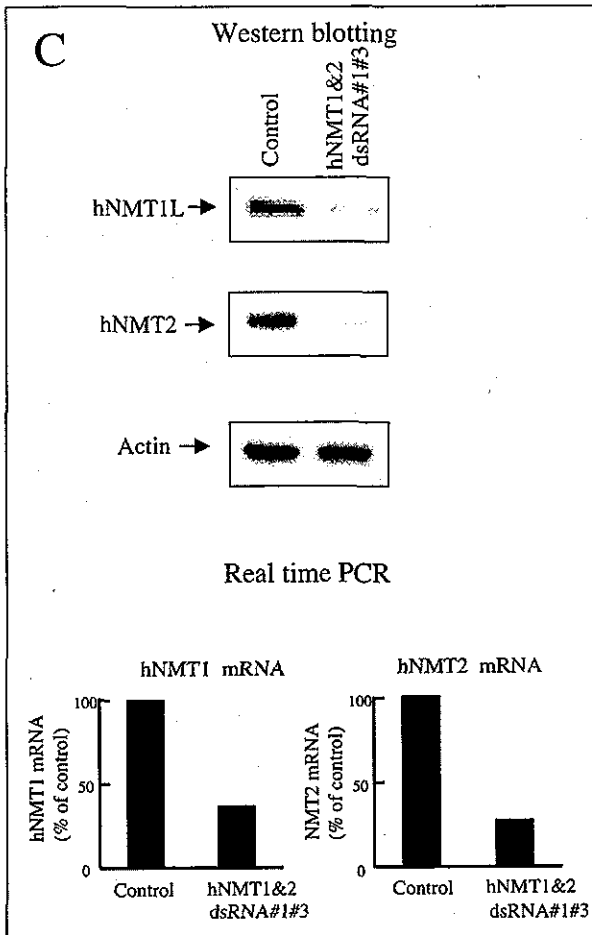
siRNA の hNMT1 および hNMT2 ノックダウン効果

用いた hNMT1 および hNMT2 を標的とした siRNA のノックダウン効果を、real-time PCR による目的 mRNA の定量および western blot 分析による目的タンパク質の検出を行うことにより評価した。HEK293 細胞に siRNA をトランスフェクション処理し、経日的に細胞から RNA とタンパク質を抽出したサンプルを各評価法に供した。その結果の一部を Fig 2 A, B, および C に示す。Fig 1 A では hNMT1 に対する siRNA を、Fig 1 B では hNMT2 に対する siRNA を、Fig 1 C では hNMT1 および

hNMT2 の両方に対する合成 siRNA をそれぞれトランスフェクションした細胞のサンプルの結果である。内部標準としてアクチン mRNA 量を用いた。その結果、siRNA の mRNA 抑制効果は処理 24 時間後から観察され (data not shown)、いずれの処理法においても、mRNA の低下はおよそコントロールサンプルの 30%程度にまで特異的に減少していることが観察された。Western blot 分析の結果、それぞれの mRNA の結果と相関してタンパク質の発現量の減少が観察された。以上の結果から、用いた各 siRNA は同等の各 isozyme の抑制効果を示すことから、各 isozyme の特異的な機能解析を行う実験系の使用に適していることが示された。

Fig. 2. hNMT1 and hNMT2 Knock Down with the siRNAs



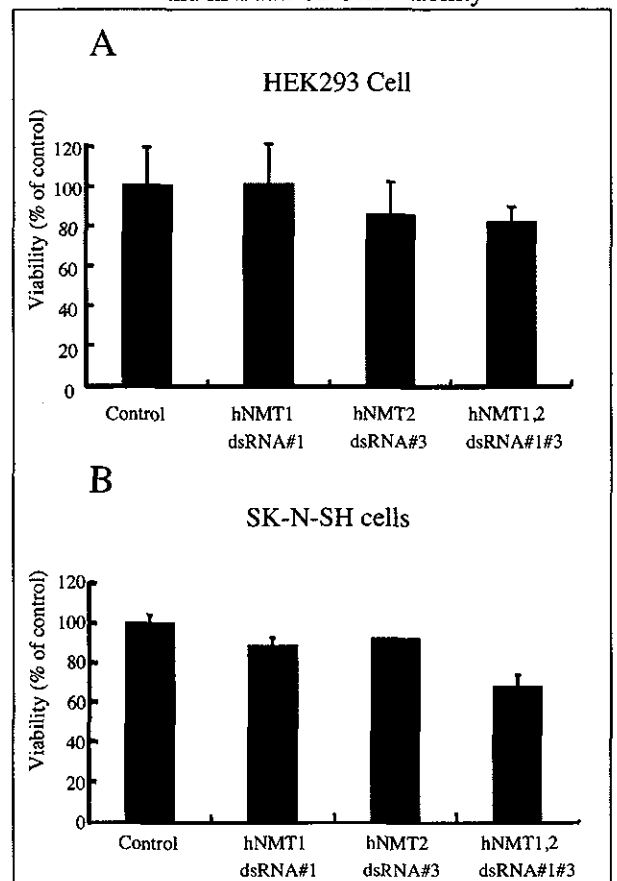


各 siRNA の細胞増殖に与える影響

HEK293 細胞およびヒト神経芽細胞種 SK-N-SH 細胞の細胞増殖に対する各合成 siRNA の影響を検討した。その結果、HEK293 細胞において、hNMT1 をノックダウンした細胞ではコントロール細胞と同等の生存率 (100%)、hNMT2 をノックダウンした細胞ではコントロール細胞の 85% 生存率の、hNMT1 および hNMT2 の両方をノックダウンした細胞ではコントロール細胞の 82% 生存率であった (Fig. 3A)。SK-N-SH 細胞において、hNMT1 をノックダウンした細胞ではコントロール細胞の 88% 生存率、hNMT2 をノックダウンした細胞ではコントロール細胞の 92% 生存率の、

hNMT1 および hNMT2 の両方をノックダウンした細胞ではコントロール細胞の 68% 生存率であった (Fig. 3B)。以上の結果から、用いたいずれの細胞株においても、hNMT シングルノックダウン細胞は hNMT ダブルノックダウン細胞よりも生存率が高いことが示された。

Fig.3 Effect of Knock Down of hNMT1 and hNMT2 on Cell Viability



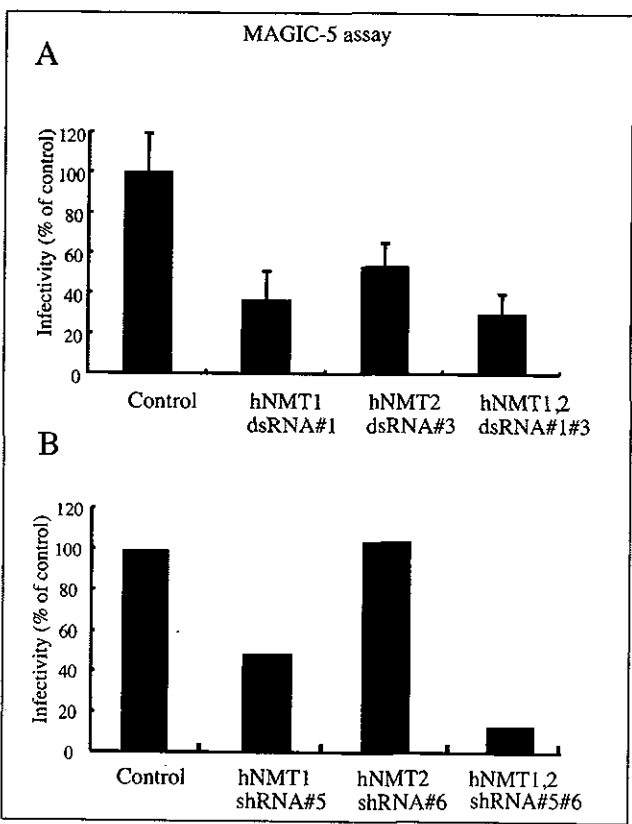
各 siRNA の HIV-1 の感染性に与える影響

HIV-1 発現ベクターをトランスフェクションした HEK293 細胞に各 siRNA を処理し、培養上清中に含まれる産生された HIV-1 の感染性を MAGIC-5 assay によって評価した。その結果、合成 siRNA を用いた場合、

hNMT1 をノックダウンした場合コントロールの 37%、hNMT2 をノックダウンした場合コントロールの 54%、hNMT1 および hNMT2 の両方をノックダウンした場合コントロールの 30%にまで産生された HIV-1 の感染性の低下が観察された(Fig. 4 A)。また hairpin 型の siRNA 発現ベクターを用いた場合、hNMT1 をノックダウンした場合コントロールの 50%、hNMT2 をノックダウンした場合コントロールの 100%、hNMT1 および hNMT2 の両方をノックダウンした場合コントロールの 9.8%にまで、産生された HIV-1 の感染性の低下が観察された(Fig. 4 B)。以上の結果から、hNMT1 のノックダウンの HIV-1 の感染性の低下に与える影響

が、hNMT2 のノックダウンによるそれよりも大きいことが示された。

Fig.4 Effect of Knock Down of hNMT1 and hNMT2 on HIV-1 infectivity



各 siRNA の HIV-1 Pr55^{gag} に与える影響
各 siRNA の HIV-1 の N-myristoyl タンパク質である Pr55^{gag} に与える影響を検討した。HIV-1 発現ベクターをトランスフェクションした HEK293 細胞に各化学合成 siRNA を処理し、得られた細胞を 0.1% Triton X100 で可溶化した。15000 rpm で遠心処理後得られた可溶化上清と不溶性の沈殿をそれぞれ soluble fraction、insoluble fraction とし、各 fraction に含まれる Pr55^{gag} を Western blot 分析により検出した。その結果、control 細胞および hNMT2 をノックダウンした細胞において、soluble fraction と insoluble fraction における Pr55^{gag} の検出比はおよそ 2:1 であった。一方、hNMT1 シングルノックダウンおよび hNMT1 と hNMT2 をダブルノックダウンした細胞において、いずれも soluble fraction の Pr55^{gag} の検出量の減少が観察され、soluble fraction と insoluble fraction における Pr55^{gag} 検出比はおよそ 1:1 の割合であった。以上の結果より、hNMT1 をノックダウン

Fig.5 Effect of Knock Down of hNMT1 and hNMT2 on Pr55^{gag}

