

ーシス関連分子および小胞輸送系の重要性が明らかとなった。

F. 健康危険情報
特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1-1. 論文発表 (英文査読誌掲載論文)

1. Niinuma, A., Higuchi, M., Takahashi, M., Oie, M., Tanaka, Y., Gejyo, F., Tanaka, N., Sugamura, K., Xie, L., Green, PL. and Fujii, M.

Aberrant activation of the interleukin-2 autocrine loop through the nuclear factor of activated T cells by nonleukemogenic human T-cell leukemia virus type 2 but not by leukemogenic type 1 virus. *J. Virol.*, 79, 11925-34, 2005.

2. Hendriks, J., Xiao, Y., Rossen, J.W.A., van der Sluijs, K.F., Sugamura, K., Ishii, N. and Borst, J. During viral infection of the respiratory tract, CD27, 4-1BB, and OX40 collectively determine formation of CD8+ memory T cells and their capacity for secondary expansion. *J. Immunol.*, 175, 1665-1676, 2005.

3. Wang, X., Ria, M., Kelmenson, P.M., Eriksson, P., Higgins, D.C., Samnegård, A., Petros, 3. C., Rollins, J., Bennet, A.M., Wiman, B., de Faire, U., Wennberg, C., Olsson, P.G., Ishii, N., Sugamura, K., Hamsten, A., Forsman-Semb, K., Lagercrantz, J. and Paigen, B. Positional identification of TNFSF4, encoding OX40 ligand, as a gene that influences atherosclerosis susceptibility. *Nature Genet.*, 37, 365-372, 2005.

4. Kobayashi, H., Tanaka, N., Asao, H., Miura, S., Kyuuma, M., Semura, K., Ishii, N. and Sugamura K. Hrs, a mammalian master molecule in vesicular transport and protein-sorting, suppresses the degradation of ESCRT proteins STAM1 and STAM2. *J. Biol. Chem.*, 280, 10468-77, 2005.

1-2. 論文発表 (和文査読誌掲載論文)

【菅村和夫 主任研究者】

なし

1-3. 論文発表 (総説・プロシーディング・その他)

【菅村和夫 主任研究者】

なし

1-4. 論文発表 (著書)

【菅村和夫 主任研究者】

なし

2. 学会発表

2-1. 海外学会発表(口頭・ポスター発表)

【菅村和夫 主任研究者】

US-Japan 23rd Annual Immunology Board Meeting

(Seattle, Jul.26-27, 2005)

Roles for a T cell Costimulatory Molecule OX40 in Survival of Effector Memory CD4+ T cells

【田中伸幸 研究協力者】

なし

2-2. 国内学会発表(口頭・ポスター発表)

【菅村和夫 主任研究者】

なし

【田中伸幸 研究協力者】

1. 田中伸幸

「小胞輸送関連蛋白質複合体STAMs/Hrsによる免疫細胞機能制御」

文部科学省科学研究費補助金特定領域研究公開シンポジウム

「メンブレントラフィック - 分子機構から高次機能への展開-」2005年12月21日(東京)

2. 第78回 日本細菌学会総会シンポジウム

2005年4月21日(埼玉)

サイトカインシグナル伝達と小胞輸送

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

Protein AMSH and cDNA thereof
米国特許(United States Patent)
Kazuo Sugamura and Nobuyuki Tanaka
US6,838,551 B2
Date of Patent: Jan. 4, 2005.

2 .PROTEIN AMSH AND cDNA THEREOF
Sugamura, K and Tanaka, N.
豪州特許
Austrian patent No.: 773, 717.
Date of Patent: Sept.16, 2004.

3. 特許庁特許
特許日:平成18年1月27日
タンパク質 AMSH とその DNA
特許第3764286号
菅村和夫、田中伸幸

海洋微生物抽出エキスからの抗 SARS 因子探索

分担研究者 石坂幸人 国立国際医療センター研究所 難治性疾患研究部

研究要旨：SARS ウイルスの ACE2 を介した感染を阻害する因子を海洋微生物抽出エキスから探索する。平成17年度は、S 蛋白質とそのレセプターである ACE-2 との結合阻害、S または Ace2 蛋白質に対する結合性のモニタリング、シュードタイプウイルスを用いたウイルス感染に対する阻害効果の検定、の3つのシステムを立ち上げた。そして、現時点で3次スクリーニングをクリアした検体を10個得ており、構造決定に向けた試みを行っている。本研究により、抗 SARS 因子が同定されるばかりでなく、今後の新興・再興感染症に対する特効薬探索ソースとしての可能性も明らかになることが期待される。

A. 研究目的

SARS コロナウイルスが感染する際、ウイルスのスパイク蛋白質(S-蛋白質)と標的細胞のアンギオテンシン転換酵素-2(angiotensin converting enzyme-2 以下 ACE-2)の結合が必須であることが証明された。本研究では、この結合を阻害する化合物を海洋エキスからスクリーニングし、同定することを目的としている。開始サンプルは海洋バイオテクノロジーから供与される約5万種類の海洋生物抽出エキスを用いる。ヒットが認められた場合は、精製・構造を行い、合成品を作成して、抗ウイルス活性を調べる。

これまでの解析からS蛋白質がACE-2に結合するために必要な最小必要領域としてアミノ酸318-510が同定されている。平成16年度に構築したS蛋白質-ACE-2蛋白質結合モニターシステムをスタートラインとして実験を開始した。

B. 研究方法

a. S 蛋白質及び ACE-2 蛋白質を用いた結合のモニター

S 蛋白質は、バクテリアによる発現システムを使用し、ニッケルカラムで精製した。ACE-2 は C 末側に存在する膜貫通領域を除く形でヒスタグのカセットを挿入した変異体を作成した。野生型と変異型の2種類のcDNAをpcDNA3.1に組み込み、293FS システムで発現させた。培養上清を透析後、DEAE カラムに

アプライし、部分精製した。

精製した S 蛋白質を炭酸バッファー (pH 8.5) 中で ELISA プレートに結合させた。部分精製した ACE-2 を作用させた後、蛍光標識した抗 ACE-2 抗体を作用させ、蛍光プレートリーダーを用いて結合性をモニターした。コントロールとして、ヒスタグ付き GAPDH を用いた。

b. ビアコアを用いた結合性の検討

S または ACE-2 蛋白質をセンサーチップに結合させ、ビアコア (Biacore J) を用いて候補化合物エキス中の結合性を解析した。

c. シュードタイプウイルスを用いた感染阻害効果の検定

レンチウイルスを用いた感染システムを立ちあげた(インビトロジェン社製)。S 蛋白質は米国 NIH の Gabel 博士から供与を受けた。HIV-1 遺伝子である gag-pol、Rev、S 蛋白質及び VSV-G 発現プラスミド DNA とルシフェラーゼ遺伝子発現プラスミド DNA を 293T 細胞に導入し、ウイルスを調整した。ウイルス価は、Gag 蛋白質由来 p24 を ELISA に測定することより、検定した。50 及び 100 ng/ml に相当するウイルスを ACE-2 発現細胞に感染させ、2 日後にルシフェラーゼ活性を測定し、蛋白質量で補正した。レンチウイルスはエタノールに感受性を示す一方、抽出エキスは 60%エタノール中に溶解されていることから、希釈倍率を変化させることにより、ルシフェ

ラーゼ活性に影響を与えない濃度として1000倍に希釈して検索することとした。

d. ACE-2 活性測定システムの導入
海洋エキス中の ACE-2 活性を測定する目的で、活性測定システムを導入した。これは、ACE-2 活性により、分解を受けると蛍光が出現する基質を用いて測定するシステムで、基質としては、MCA-YVADAPK (Dnp)-OH を使用する。リジンの N 末側でペプチドが切断されるとそれまでクエンチングされていた MCA の蛍光が出現する。この蛍光強度をサファイア蛍光スペクトロフォトメーターで測定し、ACE-2 活性とした。

C. 研究結果

4500 種類のエキスをスクリーニングした。陽性検体は、現時点で以下のようにになっている。

〈スクリーニング結果〉

固相法陽性検体数	550 個
Biacore 陽性検体数	45 個
抗ウイルス活性陽性検体数	10 個
構造決定中検体数	1 個

a. ACE-2 活性陽性・抗 SARS 因子

三次スクリーニング陽性の 10 検体のうち、5 個に ACE-2 活性が認められている。

D. 考察

合計 4500 種類の海洋エキスライブラリーから、10 個の候補化合物がスクリーニングアウトされた。海洋微生物ライブラリーから候補化合物を同定するための重要なポイントとして、再現性良く活性を示す微生物を使用することと、その微生物から活性を引き出すための最適な培養条件を整える必要性が挙げられる。二次・三次スクリーニングまで陽性を示しながら、培養上清中の抗ウイルス活性の再現性が確認出来ないために、その後のスクリーニングを行うことが出来ない候補エキスが少なからず認められた。培養法の一層の改良が望まれる。

現在、一検体について、逆相クロマトグラフィーを用いた精製を試みている。クロマトグラフィー後の精製パターンで得られるピークに一致して抗ウイルス活性が認められている。この検体について、年度内に構造に

関する情報を得、合成を試みることを目指す。

SARS ウイルス感染による ACE-2 活性阻害と本ウイルス感染症の重症化との密な関連性が提唱されている。抗ウイルス活性を示す一方で、ACE-2 活性を上昇させる化合物は、本プロジェクトでの最適な候補化合物と考え、ACE-2 活性誘導能を示す検体を最優先しながらスクリーニングを進める。

E. 結論

海洋微生物抽出エキス 4500 種類から 10 個の抗 SARS 因子候補を得た。可及的速やかに、候補エキス中の構造を決定し、合成標品の合成、さらにはコロナウイルスの感染阻害効果について、検定を行いたい。

この試みを通して、海洋微生物ライブラリーの持つ潜在能力を証明することは大変重要である。即ち、本ライブラリーが新たな医薬品開発のための肝要なツールになることが示されれば、今後の我が国における医薬品探索研究において、重要な役割を担うツールになることが期待される。

F. 健康危険情報 特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tachiwana, T., Shimura, M., Nakai-Murakami, C., Tokunaga, K., Takizawa, Y., Sata, T., Kurumizaka H., and Ishizaka, Y. HIV-1 Vpr induces DNA double-strand breaks. *Cancer Res.*, 66, 627-631, 2006.
2. Mizoguchi, I., Ooe, Y., Hoshino, S., Shimura, M., Kasahara, T., Ohta, T., Kano, S., Takaku, F., Nakayama, Y., and Ishizaka, Y. Improved gene expression in resting macrophages using an oligopeptide derived from Vpr of human immunodeficiency virus type-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 338, 1499-1506, 2005.
3. Shimura M., Tokunaga, K., Konishi, M., Sato, Y., Kobayashi, C., Sata, T., and Ishizaka, Y. Premature sister chromatid separation in HIV-1-infected peripheral blood lymphocytes. *AIDS* 19, 1434-1438, 2005.

2. 学会発表

2. 大沢宜明、芳賀しおり、石坂幸人 SARS
ウイルスに対する分子標的治療法の開
発 題 28 回 日本分子生物学会年回 神戸、
平成 17 年 12 月.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

発明の名称：遺伝子ベクター

出願番号 特 2005-320952

出願人；国立国際医療センター、国立循
環器病センター、ブリジストン株式会社

出願日：2005, 11, 4

2. 実用新案登録 無

3. その他 無

厚生労働省科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

桂皮および丁子エキスによる SARS-CoV の侵入阻止効果

分担研究者：服部 俊夫 東北大学大学院医学系研究科教授

研究要旨：Severe acute respiratory syndrome (SARS-CoV) に対しては有効な薬剤が存在しない。このウイルスは表面抗原S蛋白を用いて細胞に感染し、その際標的細胞膜上のACE2を受容体として利用する。昨年度我々は①S蛋白およびルシフェラーゼ遺伝子を組み込んでいるレンチウイルスベクターを293T細胞に共導入することにより偽ウイルスを作成し、②偽ウイルスをHepG2細胞に感染させることによりウイルス侵入を測定できることを報告した。本年度はこの系を用い漢方薬エキスの抗SARSウイルス効果を検定した。効果のあったエキスに関してエタノール分画法により精製を行った。その結果、対象とした12種類の漢方薬エキスのうち、桂皮樹皮エキス（CCE）と丁子エキス（CFE）の2種類がHIV/SARS-S偽ウイルスに対して特異的な抑制効果を示し、桂皮樹皮エキスのBuOH画分が強力な抑制効果を示した。これにより、桂皮樹皮エキスと丁子エキスは、SARSウイルスの細胞内への侵入を抑制する成分を含むことが示唆された。

■ 研究協力者

肖 鵬

東北大学大学院医学系研究科
大学院生

庄 敏

ヒューマン・サイエンス振興財団
リサーチ・レジデント

A. 研究目的

重症急性呼吸器症候群（SARS）は感染性のある異型肺炎を臨床像とし、死亡率も高いことが報告されている。原因として、コロナウイルスの一種であるSARSウイルスが同定された。SARSウイルスの主要な感染経路は飛沫感染、接触感染とされている。体内に侵入したSARSウイルスは、循環リンパ球、モノサイト、リンパ組織、マクロファージ、気道上皮組織、腸の粘膜、腎臓上皮組織、脳内神経細胞などに感染することが知られている。これらの細胞表面にはACE2が発現していることから、SARSウイルスの細胞への侵入に際してACE2が受容体としての役割を果たしていることが指摘されている。

我々は、昨年度までに、SARSウイルス

の細胞への侵入過程を明らかにするために、偽ウイルス感染系と細胞膜融合系という2つの実験系の開発を行った。本年度の目的は、この実験系を用いSARSウイルスの感染機序を明らかにすることと、そのプロセスを阻害する因子の探索を行うことである。

前者のためには細胞膜融合系を用い、スパイク蛋白と標的細胞表面のACE2との結合の過程を観察した。後者のために偽ウイルス系を用い漢方薬エキスの感染抑制効果の検討を行った。さらに新たな試みとして、偽ウイルス系の代わりにSARS野生株ウイルスを用いた感染実験も行い、漢方薬エキスの感染抑制効果を検証した。

B. 材料・方法

細胞株： 実験には、Vero E6（アフリカミドリザル腎上皮細胞由来）、HepG2（ヒト肝細胞癌由来）、Hela（ヒト子宮頸部上皮癌由来）を用いた。これらは以下の細胞株についてスクリーニングを行い、HIV/SARS偽ウイルスへの感受性を持つものを選別したものである。（ ）は細胞の由来、【 】は細胞株の入手先を示す。

Vero E6

（アフリカミドリザル腎上皮細胞）

【国立衛生研究所】

Huh7 (ヒト高分化型肝細胞癌)
 HepG2 (ヒト肝細胞癌)
 Sq-1 (ヒト肺扁平上皮細胞癌)
 LU65 (人肺扁平上皮細胞癌)
 86-2 (ヒト肺大細胞癌)
 LK-2 (JURB) (ヒト扁平上皮細胞癌)
 OBA-LK-1 (ヒト肺大細胞癌)
 S2 (ヒト肺小細胞癌)
 11-18 (ヒト肺腺癌)
 293T (ヒト胚腎細胞)
 Hela (ヒト子宮頸部上皮癌)
 Hep2(ヒト咽頭扁平上皮癌)

【以上東北大学】

偽ウイルスの作成：HIV/SARS あるいは、HIV-luc/VSVG 偽ウイルスを作成するために、7 μ g の pCMV Δ R8.2 と 7 μ g の pHR'CMV-Luc、400ng の pCNV/R-SARS-S (米国 Nabel 博士) または 6 μ g の pMDG を 293T 細胞に共導入した。

5 \times 10⁶ の 293T 細胞を 10cm のプラスチックプレート上で 24 時間培養の後、リポフェクタミンを用いてこれらのプラスミドのトランスフェクションを行った。48 時間後に上清を採取して 0.45 μ m 径のフィルタで濾過後 -80 $^{\circ}$ C で保管した。HIV-1 p24 抗原分析キットを用いてウイルスストックごとに p24Gag 抗原レベルを測定した。HIV/SARS における S 蛋白質の発現は抗 S モノクロナル抗体を用いたウエスタン・ブロット法によって検出した。

漢方薬とその精製：漢方薬は以下の 12 種類を用いた。漢方薬は株式会社ツムラから提供された。

桂皮樹皮 (ケイヒ)
 丁子 (チョウジ)
 連翹 (レンギョウ)
 黄芩 (オウゴン)
 黄耆 (オウギ)
 柴胡 (サイコ)
 甘草 (カンゾウ)
 葛根湯 (カクコントウ)
 柴胡桂枝湯 (サイコケイシトウ)
 小青竜湯 (ショウセイリユウトウ)
 補中益湯 (ホチュウエキトウ)
 清心蓮子飲 (セイシンレンシイン)

漢方薬エキスはジメチルスルホキシドで溶解し 100mg/ml になるように濃度調整し、DMEM で希釈した。まず偽ウイルス感染系を用いて漢方薬エキスのスクリーニングを行った。12 種類の候補のうち 9 種類が HIV/SARS と HIV/VSV の両方に対して抑制効果を示した。これらのうち桂皮樹皮と丁子のエキスが細胞毒性を示さなかった。

有効因子を同定するためにエキスの精製を以下の手順で行った。桂皮樹皮は、50% アルコールで 2 時間還流した。抽出物は減圧下で濃縮しこれを第 1 画分とした。これを純水で溶解しエチルアセテートおよび n-ブタノールで抽出した。エチルアセテート層、n-ブタノール層、アルコール層は濃縮を行い、それぞれ第 4 画分、第 2 画分、第 3 画分とした。レンギョウ、オウゴンも同様の手順で精製を行った。

桂皮樹皮エキスに含まれる化合物のうちエピカテキンは第 2 画分に、トランスシナミック酸とケイヒアルデヒドは第 4 画分に分離された。

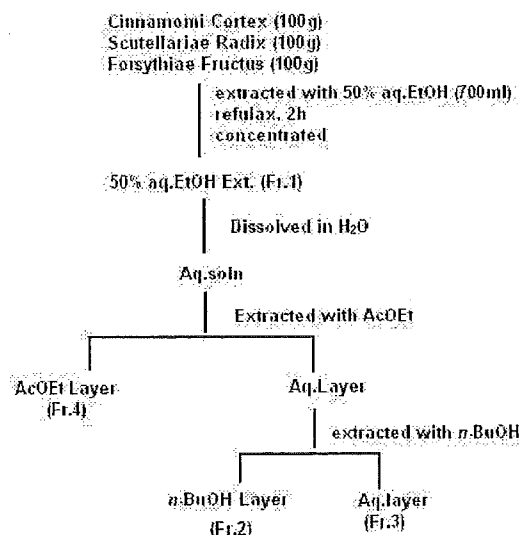


Fig1. 漢方薬エキスの精製過程

細胞毒性分析：細胞毒性の検討は、偽ウイルス感染実験と同じ条件で行った。HepG2 細胞 1 \times 10⁴ 個を 96 ウェル plate で培養し、24 時間後に漢方薬エキスを加えた。14 時間培養の後、細胞洗浄を行い、DMEM を加えた。CCK-8 試薬を加えた後に 4 時間後 OD450 を読み取り 50% 成長抑制の濃度を決定した。

細胞膜融合抑制分析：ACE2 発現 ApQACE2 プラスミドをハーバード大学のコーエン博士から得た。5×10⁶ 個の 293T 細胞には 5 μg の pCMV/SARS-S プラスミドをトランスフェクトし Hela 細胞には pQACE2 プラスミドを導入した。24 時間後 293T 細胞は calceinAM でラベルし上記の Hela 細胞と 37°C で 60 分間共培養した。洗浄の後、倒立型蛍光顕微鏡(×200)で膜融合によって染色された Hela 細胞の数を数え、30 領域の平均を算出した。

膜融合抑制の実験では、10 μg/ml の α-ACE2 を抑制の陽性コントロールとして用いた。エキスを投与の上、抑制の程度を顕微鏡下に観察した。

SARS ウイルス野生株の抑制分析：SARS ウイルス野生株ウイルスである PUMC01 F5 を実験に供した。ウイルス滴定は Vero E6 細胞へ感染の 3 から 4 日後の 50% 細胞変成終末点 (TCID50) により決定した。

感染の手順は以下のとおり。SARS ウイルス野生株の TCID50 と漢方薬を 37°C で 30 分間混合した。混合液を Vero E6 細胞と共にウェルに移植した。1 時間ウイルスを吸着させ、DMEM で洗浄した。5%CO₂ 存在下で 37°C の加湿インキュベータで 2 時間培養した。

抑制効果の確認は CPE 観察、50% ウイルス抑制効果の確認は Reed-Muench 法によった。

プラークリダクション分析では、SARS ウイルス野生株の 100TCID50 を漢方薬エキスと共に 37°C で 30 分培養した後、Vero E6 細胞を入れた 6 ウェルのプレートに移した。1 時間の培養後、細胞を DMEM で洗浄しアガロスを細胞表面に加え、0.05%ニューラルレッドを加えた 2%二次アガロスを培養 3 日目に追加した。24 時間で生ずるプラークの数を数えた。

C. 結果

HIV/SARS 感染抑制分析：桂皮樹皮エキス (CCE) の IC50s は HIV/SARS に対しては 0.03mg/ml、HIV/VSV に対しては 0.04mg/ml であり、この濃度では細胞毒性は認められなかった。丁子エキス (CFE) も同様に両方の偽ウイルスに対して低濃度で抑制効果を示した (IC50s は 0.058mg/ml)。桂皮樹皮エキスの CC50 は

0.2mg/ml、丁子エキスのそれは 0.75mg/ml であった。従って、選択的指標 (SI) は HIV/SARS については 6.67 と 12.93 であった。桂皮樹皮エキスは標的細胞を前処理することで感染を抑制したが、丁子エキスにはそのような効果は見られなかった。

桂皮樹皮エキスの 4ethanol-aqueous fractions を検討した。BuOH の分画と AcOE の画分は低濃度で明らかな抑制を示した。しかしながら、後者の分画は強い細胞毒性を示した。BuOH の分画の HIV/SARS に対する SI は 4 であった。BuOH の分画は S 蛋白質と ACE2 受容体との融合を濃度依存的に抑制し、その濃度は 0.1mg/ml で細胞の融合を完全に抑制した。

TABLE 1. Inhibitory effects of Chinese herb extracts against infection of HIV/SARS pseudotyped virus

Chinese herb extracts	MW	IC50	CC50	SI
Cinnamomi Cortex extract (CCE)		0.03 mg/ml	0.2 mg/ml	6.67
Aq. ExOH Ext of CCE (Fr.1)		0.024mg/ml	0.2 mg/ml	2.38
BuOH fraction of CCE (Fr.2)		0.03 mg/ml	0.15 mg/ml	5
Trans-cinnamic acid	146.16	4 mM	22 mM	5.5
Caryophylli Flos extract (CFE)		0.058 mg/ml	0.75mg/ml	12.93

Table1.IC50 (ルシフェラーゼ活性を半減させる薬剤濃度)、CC50 (細胞の半数を死滅させる薬剤濃度)、これらの数値は 3 回の実験の平均値。SI は選択的指標で CC50/IC50 により求めた。

293T-S と Hela-ACE2 を用いた細胞膜融合抑制分析：桂皮樹皮エキスと丁子エキスおよびそれらの画分を細胞膜融合系において検討した。桂皮樹皮エキスの BuOH 画分が強力な抑制効果を示した。さらに濃度依存的に S 蛋白質と ACE2 受容体の結合を阻害した。0.1mg/ml で細胞膜融合をほぼ完全に抑制した。桂皮樹皮エキスのそのほかの画分は異なる濃度で感染抑制効果を示した。

生ウイルスに対する薬剤の抑制効果分析：偽ウイルス系での実験で感染抑制効果を示した 7 種類の漢方薬エキスについて、SARS 生ウイルスへの効果を検証した結果、桂皮樹皮エキス、丁子エキスに感染抑制効果を認めた。

それらの精製画分についての検討も行った結果、桂皮樹皮エキスの Aq.EtOH 画分と BuOH 画分が感染を強力に抑制することが示された。

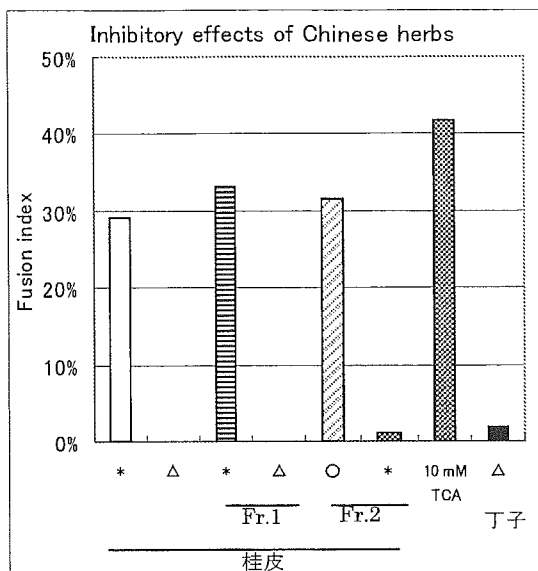


Fig2. 漢方薬エキスの細胞融合系とHela-ACE2 pCMVR-SARS-S をトランスフェクトした細胞を calcein AM で染色し、pQACE2 プラスミドをトランスフェクトした Hela 細胞と共培養した。そこに漢方薬エキスを投与した。1 時間後に洗浄し細胞数を計測した。数値は 3 回行った実験の平均値。Fusion index は融合した Hela 細胞数をエキス非投与時の細胞数で割った商。

D. 考察

本年度の成果

偽ウイルス感染系と細胞膜融合系を用いて、桂皮樹皮エキスと丁子エキスが SARS ウイルスの感染を抑制することを明らかにした。これらの感染系は、ウイルスのスパイク蛋白と標的細胞膜上の ACE2 との結合を検出するものであることから、桂皮樹皮および丁子エキスは SARS ウイルスが標的細胞に侵入する過程を阻害するものであると考えられる。桂皮エキスで細胞を前処理した場合感染が阻止され、丁子エキスにはそのような効果が見られなかったことから、その作用機序が異なることが示唆された。

さらに、それらの精製画分についての検討を行い、桂皮樹皮エキスの BuOH 画分に感染を強力かつ有効に抑制する因子が含まれることを示した。

臨床応用の可能性を探るために、生ウイルスに対する抑制効果の検討も行い、桂皮樹皮エキスの有効性を確認した。

今後の展望

動物モデルで SARS ウイルスの感染抑制

効果の検証を行い、治療に有効な薬剤の開発につなげるとともに、漢方薬エキスがどのようなメカニズムで SARS ウイルスの感染を抑制しているのかを明らかにし、ウイルス感染機序の解明に貢献することを目指す。

E. 結論

昨年度の研究成果である偽ウイルス感染系と細胞膜融合系を効果的に用いて、SARS ウイルス感染抑制効果を持つ因子の探索を行った。初年度の研究成果を十分に活用できたといえる。

感染抑制因子を発見したことは、本研究課題全体の究極目標である、SARS ウイルス感染阻害薬の開発への大きな貢献であり、最終年度となる次年度の研究に弾みをつけるものであるといえる。

F. 健康危険情報

該当事項なし。

G. 研究発表

論文

- Li, D., Gu, H., Zhang, S., Zhong, Z., Zhuang, M., and Hattori, T. YMDD mutations and genotypes of HBV in Northern China. *J. J. Infectious Diseases*. 2006, 59:42-45.
- Usami, O., Xiao, P., Ling, H. and Hattori, T. Competitive study of monoclonal antibodies against the HIV-1 gp41 core structure. *Microbiology & immunology*. 2006 50:131-34.
- Haizhou, Z., Yan, L., Hong, L., Yangcheng, L., Bingcheng, H. and Hattori, T. Cloning and analysis of HIV-1 envelope CHNHLJ03009 isolated from an infected individual in Heilongjiang province. *Chinese Microbiology and Immunology*. In press
- Ashino, J., Ashino, Y., Guio, H., Saitoh, H., Mizusawa, M. and Hattori, T. Low antibody response against tuberculous glycolipid (TBGL) in elderly gastrectomized tuberculosis patients. *The Int. J. Tb. Lung Dis.*, 2005, 9:1052-3.0
- Usami, O., Xiao, P., Ling, H., Lui, I., Naksone, T. and Hattori, T. Properties of anti-gp41 core structure antibodies, which compete with sera of HIV-1 infected patients. *Microbes and Infection*, 2005, 4: 650-7.

国際学会発表

1. Toshio Hattori, X Peng;H Ling;M Zhuang
The inhibitory effect of Chinese herb on
SARS pseudotyped virus infection. Lipid
rafts and cell function. March 23-28, 2006.
Steamboat, Keystone symposium.

口頭発表

庄敏 第 14 回感染症呼吸器疾患セミナー
The inhibitory effect of Chinese herb on
SARS-CoV entry. 1st July, 2005. 仙台

ポスターセッション

庄敏 The inhibitory effect of Chinese herb
on SARS-CoV entry. 20-22nd, Nov. 2005. 第
53 回日本ウイルス学会 パシフィコ横浜

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者名	題名	編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル	発表誌名	巻号	ページ	出版年
(菅村分)					
Niinuma, A., Higuchi, M., Takahashi, M., Oie, M., Tanaka, Y., Gejyo, F., Tanaka, N., Sugamura, K. , Xie, L., Green, PL. and Fujii, M.	Aberrant activation of the interleukin-2 autocrine loop through the nuclear factor of activated T cells by nonleukemogenic human T-cell leukemia virus type 2 but not by leukemogenic type 1 virus.	<i>J. Virol.</i>	79	11925-34	2005
Hendriks, J., Xiao, Y., Rossen, J.W.A., van der Sluijs, K.F., Sugamura, K. , Ishii, N. and Borst, J.	During viral infection of the respiratory tract, CD27, 4-1BB, and OX40 collectively determine formation of CD8 ⁺ memory T cells and their capacity for secondary expansion.	<i>J. Immunol.</i>	175	1665-1676	2005

Wang, X., Ria, M., Kelmenson, P.M., Eriksson, P., Higgins, D.C., Samnegård, A., Petros, C., Rollins, J., Bennet, A.M., Wiman, B., de Faire, U., Wennberg, C., Olsson, P.G., Ishii, N., Sugamura, K. , Hamsten, A., Forsman-Semb, K., Lagercrantz, J. and Paigen, B.	Positional identification of <i>TNFSF4</i> , encoding OX40 ligand, as a gene that influences atherosclerosis susceptibility.	<i>Nature Genet.</i>	37	365-372	2005
Kobayashi, H., Tanaka, N., Asao, H., Miura, S., Kyuuma, M., Semura, K., Ishii, N. and Sugamura K.	Hrs, a mammalian master molecule in vesicular transport and protein-sorting, suppresses the degradation of ESCRT proteins STAM1 and STAM2.	<i>J. Biol. Chem.</i>	280	10468-10477	2005
(石坂分)					
Tachiwana, T., Shimura, M., Nakai-Murakami, C., Tokunaga, K., Takizawa, Y., Sata, T., Kurumizaka H., and Ishizaka, Y.	HIV-1 Vpr induces DNA double-strand breaks.	<i>Cancer Res.</i>	66	627-631	2006
Mizoguchi, I., Ooe, Y., Hoshino, S., Shimura, M., Kasahara, T., Ohta, T., Kano, S., Takaku, F., Nakayama, Y., and	Improved gene expression in resting macrophages using an oligopeptide derived from Vpr of human	<i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i>	338	1499-1506	2005

<u>Ishizaka, Y.</u>	immunodeficiency virus type-1.				
Shimura, M., Tokunaga, K., Konishi, M., Sato, Y., Kobayashi, C., Sata, T., and <u>Ishizaka, Y.</u>	Premature sister chromatid separation in HIV-1-infected peripheral blood lymphocytes.	<i>AIDS</i>	19	1434-1438	2005
(服部分)					
Li, D., Gu, H., Zhang, S., Zhong, Z., Zhuang, M., and <u>Hattori, T.</u>	YMDD mutations and genotypes of HBV in Northern China.	<i>J. J. Infectious Diseases.</i>	59	42-45	
Usami, O., Xiao, P., Ling, H. and <u>Hattori, T.</u>	Competitive study of monoclonal antibodies against the HIV-1 gp41 core structure.	<i>Microbiology & immunology</i>	50	131-134	2006
Haizhou, Z., Yan, L., Hong, L., Yangcheng, L., Bingcheng, H. and <u>Hattori, T.</u>	Cloning and analysis of HIV-1 envelope CHNHLJ03009 isolated from an infected individual in Heilongjiang province.	<i>Chinese Microbiology and Immunology</i>	In press		
Ashino, J., Ashino, Y., Guio, H., Saitoh, H., Mizusawa, M. and <u>Hattori, T.</u>	Low antibody response against tuberculous glycolipid (TBGL) in elderly gastrectomized tuberculosis patients.	<i>The Int. J. Tb. Lung Dis.</i>	9	1052-1053	2005
Usami, O., Xiao, P., Ling, H., Lui, I., Naksone, T. and <u>Hattori, T.</u>	Properties of anti- gp41 core structure antibodies, which compete with sera of HIV-1 infected patients.	<i>Microbes and Infection</i>	4	650-657	2005

IV. 研究成果の刊行物・別刷

Aberrant Activation of the Interleukin-2 Autocrine Loop through the Nuclear Factor of Activated T Cells by Nonleukemogenic Human T-Cell Leukemia Virus Type 2 but Not by Leukemogenic Type 1 Virus

Akiko Niinuma,^{1,2†} Masaya Higuchi,^{1†} Masahiko Takahashi,¹ Masayasu Oie,¹ Yuetsu Tanaka,³ Fumitake Gejyo,² Nobuyuki Tanaka,⁴ Kazuo Sugamura,⁴ Li Xie,⁵ Patrick L. Green,⁵ and Masahiro Fujii^{1*}

Division of Virology¹ and Division of Clinical Infection Control and Prevention,² Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences, 1-757 Asahimachi-Dori, Niigata, Japan; Department of Infectious Disease and Immunology, Okinawa-Asia Research Center of Medical Science, Faculty of Medicine, University of the Ryukyus, Okinawa³; Department of Microbiology and Immunology, Tohoku University Graduate School of Medicine, Sendai, Japan⁴; and Department of Veterinary Biosciences, Ohio State University, Columbus, Ohio⁵

Received 28 December 2004/Accepted 3 June 2005

Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) but not HTLV-2 is associated with adult T-cell leukemia. We found that HTLV-2 Tax2 protein stimulated reporter gene expression regulated by the interleukin (IL)-2 promoter through the nuclear factor of activated T cells (NFAT) in a human T-cell line (Jurkat). However, the activity of HTLV-1 Tax1 was minimal in this system. T-cell lines immortalized by HTLV-2 but not HTLV-1 constitutively exhibited activated NFAT in the nucleus and constitutively expressed IL-2 mRNA. Cyclosporine A, an inhibitor of NFAT activation, abrogated the induction of IL-2 mRNA in HTLV-2-immortalized T-cell lines and concomitantly inhibited cell growth. This growth inhibition was rescued by the addition of IL-2 to the culture. Furthermore, anti-IL-2 receptor antibodies significantly reduced the proliferation of HTLV-2-infected T-cell lines but not that of HTLV-1-infected cells. Our results suggest that Tax2 activates an IL-2 autocrine loop mediated through NFAT that supports the growth of HTLV-2-infected cells under low-IL-2 conditions. This mechanism would be especially important *in vivo*, where this autocrine mechanism establishes a non-leukemogenic life-long HTLV-2 infection. The results also suggest that differences in long-term cytokine production between HTLV-1 and HTLV-2 infection are another factor for the differences in pathogenesis.

Adult T-cell leukemia is an aggressive form of leukemia characterized by monoclonal proliferation of T cells infected with human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) (15, 25, 30, 38). HTLV-1 is transmitted mainly from infected mothers to children through breast milk, however, the average age of adult T-cell leukemia patients is approximately 60 years (4), suggesting a long latency period. Furthermore, only a fraction (approximately 5%) of HTLV-1-infected individuals develop adult T-cell leukemia. Thus, HTLV-1-infection in and of itself is not sufficient for the development of adult T-cell leukemia, indicating that host factors have a critical role in the development of adult T-cell leukemia. Although not completely understood, there likely are at least two host factors involved in adult T-cell leukemia development: genetic and/or epigenetic changes in HTLV-1-infected T cells; and deterioration of host immune competence probably resulting from HTLV-1 infection itself (20, 25).

HTLV-2 is genetically and biologically similar to HTLV-1 (7, 34). Both HTLV-1 and HTLV-2 immortalize primary hu-

man T cells with similar efficiency *in vitro* (8, 27, 41), and like HTLV-1, HTLV-2 also establishes a life-long persistent infection in humans. However, unlike HTLV-1, HTLV-2 is not associated with the development of adult T-cell leukemia or other malignancies. Thus, it appears that HTLV-2 is unable to promote a certain step(s) in adult T-cell leukemia leukemogenesis. Which step(s) in adult T-cell leukemia development differs between HTLV-1 and HTLV-2 infections has not been defined, nor have the differences in mechanisms been elucidated.

HTLV-1 and HTLV-2 encode nine genes, including *gag*, *pol*, and *env*, but only a few viral genes are expressed in infected peripheral blood mononuclear cells (33). HTLV-1 *tax1* and HTLV-2 *tax2* are important regulatory genes, and accumulating evidence has shown that Tax1 and Tax2 expression plays a central role in immortalization of T cells and maintenance of persistent infections. For instance, mutant HTLV-1 and HTLV-2 viruses carrying inactive *tax1* and *tax2* genes, respectively, cannot immortalize primary human T cells (31, 32). The *tax1* gene by itself has been shown to immortalize primary human T cells in the presence of interleukin-2 (IL-2) (2, 12). Tax1 has multiple functions in T cells, including the activation of cellular genes through transcription factors NF- κ B, CREB/ATF, and AP-1 (10, 11, 17, 24, 42). Furthermore, Tax1 inactivates several tumor suppressor gene products, such as p53,

* Corresponding author. Mailing address: Division of Virology, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences, 1-757 Asahimachi-Dori, Niigata 951-8510, Japan. Phone: 81 (25) 227-2115. Fax: 81 (25) 227-0763. E-mail: fujimas@med.niigata-u.ac.jp.

† The first two authors contributed equally to this study.

MAD1, and p16INK4A (1, 19, 29, 35). Taken together, Tax1 and Tax2 should be key elements in the distinct pathogenic activities of these two viruses.

Tax1 and Tax2 share approximately 75% identity at the amino acid level and the two proteins exhibit indistinguishable activity with similar potency *in vitro*. Therefore, why Tax1 and Tax 2, sharing 75% amino acid identity and *in vitro* activity, are associated with distinct disease outcomes is still unclear.

Inducible and transient expression of cytokines, including IL-2, is crucial for antigen-induced differentiation and proliferation of T cells during immune responses. Such organized expression of cytokines in T cells is regulated by several transcription factors, including the nuclear factor of activated T cells (NFAT), AP-1, and NF- κ B (40). In this study, we found that HTLV-2 Tax2 induces the expression of IL-2 through NFAT and that IL-2 promoted the proliferation of HTLV-2-infected T-cell lines. This result was specific to HTLV-2, since HTLV-1-infected T-cell lines did not produce IL-2. Thus, the results strongly suggest that aberrant activation of an IL-2 autocrine loop by Tax2 mediates life-long HTLV-2 infection. This autocrine immortalization mechanism allows establishment of a nonleukemogenic persistent infection, which is defective in promoting a certain step(s) of adult T-cell leukemia development. We will also discuss the long-term distinct gene expression through NFAT between HTLV-1 and HTLV-2 infection in terms of their distinct pathogenesis.

MATERIALS AND METHODS

Cells and culture conditions. The human T-cell lines used in the present experiments have been characterized previously (18). Jurkat is an HTLV-1-negative human T-cell line. HUT102, SLB-1, and ILT-Koy are HTLV-1-positive human T-cell lines. Ton1, MoT, PBL01, and PBL2 are HTLV-2-positive human T-cell lines. Jurkat, HUT102, SLB-1, Ton1, and MoT were cultured in RPMI 1640 supplemented with 10% or 20% fetal bovine serum (FBS), 4 mM glutamine, penicillin (50 U/ml), and streptomycin (50 μ g/ml) (RPMI/10% FBS). ILT-Koy, PBL01, and PBL2 are IL-2-dependent cells and therefore, they are cultured in RPMI/fetal bovine serum containing 1 nM of recombinant human IL-2.

Plasmids. The *tax1*, *tax2A*, and *tax2B* genes and their chimeric genes were cloned into pHBPr-1-neo, which has a β -actin promoter for protein expression in mammalian cells and a neomycin resistance gene as a selection marker. All plasmids have been described previously (16). pNFAT-Luc is a luciferase expression plasmid regulated by three copies of the NFAT site (-286 to -249 of human IL-2) and the human IL-2 promoter (-64 to +47) (21, 28). pIL2Luc was constructed by insertion of the human IL-2 promoter (-541 to +57) into the pGL3-basic vector (4, 21). κ B-Luc is a luciferase expression plasmid regulated by the κ B element of the IL-2 receptor α -chain gene and the minimal HTLV-1 promoter. pGK/ β -gal expresses β -galactosidase under the control of the phosphoglycerate kinase promoter and is used to normalize the transfection efficiency.

Transient transfection and luciferase assays. Jurkat cells in RPMI 1640 medium without serum were seeded at 4×10^5 cells/well in a 24-well plate. The cells then were cotransfected with the Tax expression plasmid together with κ B-Luc by using X-treamGENE Q2 (Roche Applied Science) or TransFectin (Bio-Rad Technologies) according to the manufacturer's instructions. Cell lysates were prepared from transfected cells, and the luciferase activity as well as β -galactosidase activity were determined using a luminometer (LUMAT LB9507, Berthold). The activity of luciferase was normalized to that of β -galactosidase. The assay was carried out three times to confirm reproducibility.

Western blotting. Cell lysates (30 μ g) were prepared from human T-cell lines using radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer containing 25 mM Tris (pH 7.2), 150 mM NaCl, 1.0 mM EDTA, 1.0% NP-40, 0.5% deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulfate, 1.0 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 20 μ g/ml aprotinin, 1.0 mM Na_3VO_4 , and 1.0 mM NaF, and they were size-separated by electrophoresis under reducing conditions in 8% polyacrylamide gel with sodium dodecyl sulfate. The proteins in the gel were electrotransferred onto a polyvi-

nylidene difluoride membrane. The membrane was incubated with 5% skim milk for 1 h at room temperature to inhibit nonspecific binding and was further incubated with either anti-Tax1 mouse monoclonal antibody (Taxy-7) (37) or rabbit anti-Tax2B polyclonal serum (22). After being washed with TBS-T (20 mM Tris-HCl [pH 7.4], 150 mM NaCl, and 0.1% Tween 20), the membranes were incubated with either anti-mouse (for Tax1) or anti-rabbit (for Tax2B) immunoglobulin G conjugated with horseradish peroxidase (Bio-Rad Technologies). Protein bands in the membrane recognized by the antibodies were visualized using the ECL Western blotting detection system (Amersham Pharmacia Biotech). Yuetsu Tanaka (Ryukyuu University) and W. W. Hall (University College Dublin) kindly provided the Taxy-7 antibody and the anti-Tax2B polyclonal serum, respectively.

RT-PCR. Total RNA was isolated from human T-cell lines using ISOGEN (Nippon-gene), according to the manufacturer's instructions. Reverse transcription (RT)-PCR analysis for IL-2 mRNA was performed using 1 μ g of total RNA and Ready-To-Go RT-PCR Beads (Amersham Pharmacia Biotech). Oligo(dT) was used to prime the reverse transcription step. For the RT step, the samples were incubated at 42°C for 25 min followed by 95°C for 5 min. The samples were stored at 4°C until use. Conditions for the first round of the PCR were 95°C for 2 min, followed by 30 cycles of 95°C for 1 min, 55°C for 1 min, and 72°C for 1 min, and finally one cycle of 72°C for 7 min. A 2- μ l sample from the first round of PCR was added to a second PCR. The conditions for the second round of PCR were one cycle of 95°C for 2 min, followed by 20 cycles of 95°C for 1 min, 55°C for 1 min, and 72°C for 1 min, and one cycle of 72°C for 7 min.

The primers used for PCR were 5'-CATTGCACTAAGTCTTGCACCTTGTCA A-3' and 5'-CGTTGATATTGCTGATTAAGTCCCTC-3' for human IL-2. The β -actin-specific primers were purchased from Promega. The RT-PCR conditions for β -actin were 42°C for 25 min and 95°C for 5 min for RT, and one cycle of 95°C for 2 min, 20 cycles of 95°C for 1 min, 55°C for 1 min, and 72°C for 1 min, and finally one cycle of 72°C for 7 min for PCR. Thermal cycling was carried out using a GeneAmp PCR system 9700 (Applied Biosystems).

ELISA for quantitation of IL-2. The amount of IL-2 protein in the culture supernatants of T-cell lines was measured by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit under instructions provided by the supplier (human IL-2 ELISA kit II; BD Biosciences Pharmingen).

Electrophoretic mobility shift assay. To prepare nuclear extracts, human T-cell lines (5×10^6 to 10×10^6 cells) were washed with phosphate-buffered saline containing 1 mM Na_3VO_4 and 5 mM NaF and then treated with hypotonic buffer containing 0.2% NP-40, 20 mM HEPES (pH 7.9), 20 mM NaF, 1 mM Na_3VO_4 , 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM dithiothreitol, 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, leupeptin (1 μ g/ml), and aprotinin (1 μ g/ml). Cell lysates were centrifuged, and the pellets then were treated with high-salt buffer supplemented with 20 mM HEPES, 420 mM NaCl, 20 mM NaF, 1 mM Na_3VO_4 , 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM dithiothreitol, 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, leupeptin (1 μ g/ml), aprotinin (1 μ g/ml), and 20% glycerol at 4°C for 30 min. The lysates were mixed thoroughly by vortexing and incubated for 30 min at 4°C with rotation.

After centrifugation, the resultant supernatant was used as the nuclear extract in an electrophoretic mobility shift assay (EMSA). For EMSA, nuclear extract (15 μ g) was preincubated with 1 μ g of poly(dI:dC) in 20 μ l of binding buffer containing 13 mM HEPES (pH 7.9), 65 mM NaCl, 0.15 mM EDTA, 8% glycerol, and 1 mM dithiothreitol for 15 min on ice. The ^{32}P -labeled (5×10^4 cpm) double-stranded oligonucleotide probe was added to the reaction mixture and incubated for 15 min at room temperature. The complexes formed were separated from the unbound probe by electrophoresis in a 5% polyacrylamide gel containing 0.5x Tris-borate-EDTA and 2.5% glycerol. After separation, the gel was dried, and radioactivity in the dried gel was analyzed using a BAS5000 instrument (Fuji Film and Photo).

A ^{32}P -labeled double-stranded synthetic oligonucleotide probe corresponding to the NFAT element (gatcGGAGGAAAACCTGTTTCATA) from the IL-2 gene was used as the NFAT site probe. To determine specificity, mutant NFAT (NFATm in the figure) and an unrelated oligonucleotide, gatcGGACCTTAAA CTGTTTCATA and gatcGAAACTACGCGC, were used as competitors in EMSA. For the supershift assay, the nuclear extract was preincubated with anti-NFATp antibody (sc-7295; Santa Cruz Biotechnology) or control mouse immunoglobulin G2a (PP102; Chemicon) antibody for 30 min on ice before addition of the probe.

Cell growth inhibition by cyclosporine A or anti-IL-2R antibodies. For the cyclosporine A assay, human T-cell lines (5×10^4 /0.5 ml of RPMI/20% FBS with or without IL-2 in a 48-well plate) were cultured in the presence of 0.5 μ M of cyclosporine A (Sigma). For the antibody assay, cells were cultured in the presence of 5 μ g/ml of anti-IL-2 receptor (IL-2R) α -chain antibody (H31) and 5

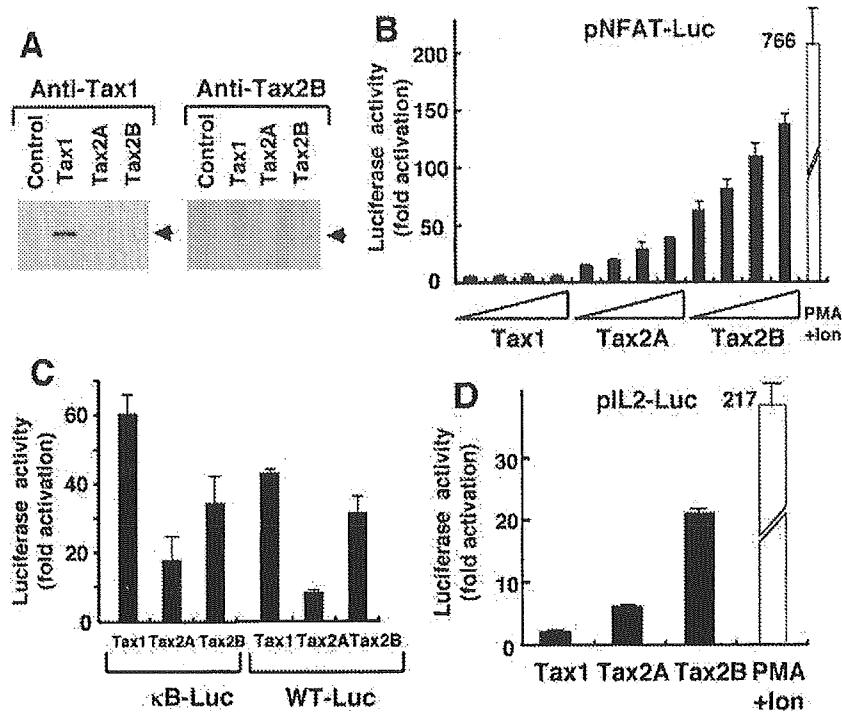


FIG. 1. Tax2 stimulates IL-2 promoter activity in a T-cell line. (A) Jurkat cells (4×10^5 cells/0.5 ml) were transfected with either *tax1*, *tax2A*, or *tax2B* plasmid (2 μ g). At 48 h after transfection, the cells were harvested, and the amount of Tax1 (left) or Tax2 (right) was measured by Western blot analysis. (B, C, and D) Jurkat cells were transfected with the indicated *tax* plasmid (0.01, 0.05, 0.1, and 0.5 μ g) and 0.1 μ g of pGK/ β -gal together with 1 μ g of either pNFAT-Luc (B), κ B-Luc, WT-Luc (HTLV-1 21 bp) (C), or pIL-2-Luc (D). At 48 h after transfection, the cells were harvested, and the luciferase and β -galactosidase activities in the cell lysates were measured. As a positive control, Jurkat cells were treated with 20 ng/ml of PMA and 2 μ M of ionomycin for 6 h before harvest. Luciferase activity was normalized to that of β -galactosidase. The fold activation represents the luciferase activity of cells transfected with the *tax* plasmid relative to that with the control plasmid. Error bars indicate standard deviations. Three independent experiments were carried out to confirm reproducibility.

μ g/ml of anti-IL-2R β -chain antibody (TU27) (36). Cell morphology and viability were assessed using trypan blue staining.

RESULTS

Tax2 stimulates NFAT-dependent gene expression in a human T-cell line. NFAT stimulates the expression of a number of cellular genes that are involved in T-cell activation and proliferation in response to antigen stimulation, such as IL-2, IL-3, IL-4, and Fas ligand (40). To gain insight into the distinct pathogenic activities of HTLV-1 and HTLV-2, we examined the effect of Tax1 and Tax2 protein expression on NFAT-dependent gene expression. For this purpose, plasmids encoding Tax1, Tax2B, or Tax2A were transiently transfected into Jurkat cells (human T-cell line) together with a luciferase reporter gene under the control of three copies of the NFAT binding site derived from the human IL-2 gene. Tax2B and Tax2A were derived from HTLV-2b and HTLV-2a subtypes, respectively. Forty-eight hours after transfection, the cells were harvested and luciferase activity was measured.

While Tax1 activated NFAT-dependent luciferase activity minimally (less than fivefold) relative to the control sample transfected with the p β neo control plasmid, Tax2B prominently (more than 100-fold) induced luciferase activity (Fig. 1B). Similarly, Tax2A induced luciferase expression mediated by NFAT, and the activity of Tax2A was less than that of Tax2B but more than that of Tax1. Tax1, but not Tax2A or

Tax2B, was detected in Jurkat cells by Western blot by anti-Tax1 antibody. On the other hand, Tax2B but not Tax2A or Tax1 was detected by anti-Tax2B antibody (Fig. 1A). Thus, Tax2 and Tax1 were expressed at a detectable level in Jurkat cells, although because the assay was not quantitative, it did not enable us to compare the expression levels between Tax1 and Tax2.

Treatment of Jurkat cells with phorbol myristate acetate (PMA) and ionomycin, which mimics antigen stimulation, induced luciferase expression that was sixfold greater than that of Tax2B. Tax2 also stimulated luciferase expression regulated by NF- κ B from the IL-2 receptor α -chain gene (κ B-Luc) or by a Tax-inducible 21-bp sequence in the HTLV-1 long-terminal repeat (WT-Luc) in Jurkat cells (Fig. 1C). However, the levels of activation obtained with Tax2A and Tax2B were less than that with Tax1, indicating that the augmented activity of Tax2 relative to Tax1 is specifically mediated by NFAT.

Next, we examined whether Tax2 can stimulate an IL-2 promoter containing an NFAT site, as used above. Tax2A and Tax2B efficiently activated the expression of luciferase regulated by the IL-2 promoter, and as observed above, the activity was much greater than that of Tax1 (Fig. 1D). These results indicate that in a human T-cell line, Tax2 efficiently activated IL-2 gene expression through the NFAT site to a much greater level than Tax1.

Identification of the region of Tax2 responsible for the augmented activation of NFAT. To delineate the region of Tax2

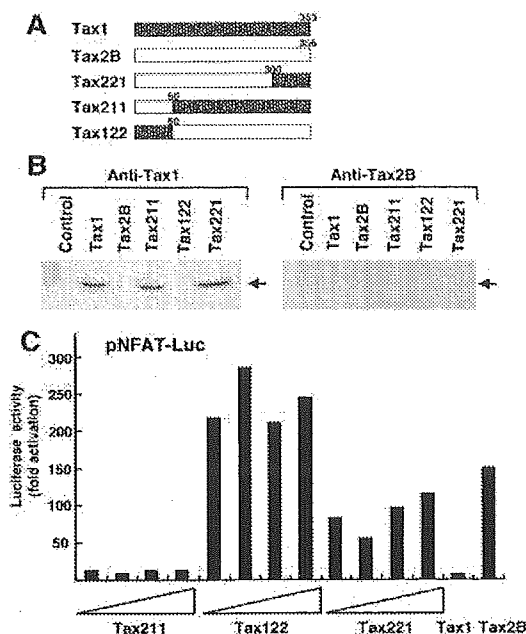


FIG. 2. Tax2 region is responsible for the activation of NFAT. (A) Structures of the chimeric genes and the position of the boundary between Tax1 and Tax2B are indicated. (B) Cell lysates were prepared from Jurkat cells transfected with the indicated plasmids (2 μ g), and the amount of Tax in each lysate was measured by Western blot analysis using an anti-Tax1 antibody (left) or an anti-Tax2B antibody (right). Arrows indicate the Tax proteins recognized by the antibodies. (C) Jurkat cells were transfected with the indicated Tax expression plasmid (0.01 to 0.5 μ g) together with the luciferase plasmid regulated by the NFAT element (pNFAT-Luc). Cell lysates were prepared from transfected cells, and luciferase activity was determined. Luciferase activity was normalized to that of β -galactosidase. The fold activation represents the luciferase activity of cells transfected with the *tax* plasmid relative to that with the control plasmid. Three independent experiments were carried out to confirm reproducibility.

responsible for its augmented NFAT activation relative to Tax1, we used chimeric *tax* constructs used previously (Fig. 2A). The result from the transient cotransfection study with pNFAT-Luc showed that the Tax122 and Tax221 proteins stimulated much greater luciferase expression mediated through NFAT than Tax1 and equivalent to Tax2B, whereas Tax211 was equivalent to Tax1 (Fig. 2C). These results indicated that the region between amino acids 60 and 300 of Tax2 contains the element required for NFAT activation that is distinct from Tax1. Western blot analysis showed that Tax211, Tax221, and Tax1 (detected with anti-Tax1 antibody), and Tax2B and Tax122 (detected with anti-Tax2B antibody) were expressed equivalently in Jurkat cells (Fig. 2B). Nevertheless, NFAT was activated by Tax221 significantly more than Tax1 and Tax211 were. Thus, Tax2B, Tax122, and Tax221 activate NFAT-dependent transcription more efficiently than Tax1.

Tax2, but not Tax1, induces the expression of IL-2 in human T-cell lines. The results from the transient transfection study above indicated that Tax2 stimulates the IL-2 promoter in the context of a plasmid transfection. In order to determine the biological relevance of this observation, we examined whether Tax2 can stimulate expression of the endogenous IL-2 gene. For this evaluation, plasmids encoding Tax2, Tax1, and their

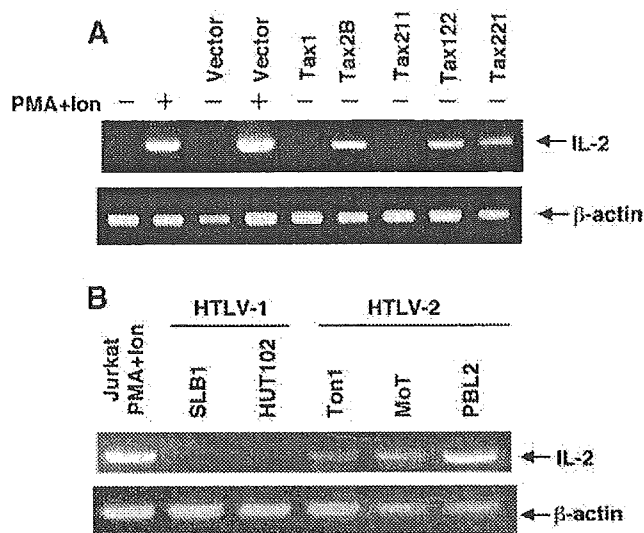


FIG. 3. Tax2 induces the expression of IL-2 mRNA in T-cell lines. (A) Jurkat cells were transfected with the indicated plasmids. At 42 h after transfection, the cells were treated with PMA and ionomycin or medium alone for 6 h. Then the cells were harvested, and total RNA was extracted. From the isolated total RNA, the RT-PCR products corresponding to IL-2 and β -actin mRNA were amplified, and the products were size-separated on a 2% agarose gel stained with ethidium bromide. (B) Total RNA was prepared from the indicated HTLV-1-infected T-cell lines and Jurkat cells treated with PMA and ionomycin for 6 h. The RT-PCR products amplified from the isolated total RNA were size-separated on a 2% agarose gel stained with ethidium bromide. The experiments were repeated three times to confirm reproducibility.

chimeric derivatives were transiently transfected into Jurkat cells. Forty-eight hours after transfection, total RNA was extracted from the cells by the Isogen method and reverse transcribed to obtain cDNA. IL-2 cDNA was amplified by PCR using primer sets corresponding to the human IL-2 gene.

The RT-PCR product specific to IL-2 was not detected in Jurkat cells transfected with the control plasmid, whereas it was detected in the cells transfected with the *tax2B* plasmid (Fig. 3A). Treatment of Jurkat cells with PMA and ionomycin induced expression of IL-2 mRNA that was greater than induction by Tax2. Consistent with the results from the luciferase assay, Tax1 and Tax211 did not induce the expression of IL-2 mRNA, whereas Tax122 and Tax221 did induce the expression (Fig. 3A), indicating that the activation of NFAT by Tax2 is responsible for the induction of endogenous IL-2 mRNA expression.

RT-PCR analysis also showed that three HTLV-2-infected T-cell lines (Ton1, MoT, and PBL2) but not two HTLV-1-infected cell lines (SLB1 and HUT102) constitutively expressed IL-2 mRNA (Fig. 3B). Among the three HTLV-2-positive cell lines, PBL2 cells expressed the highest level of IL-2 mRNA. Consistent with mRNA induction, an enzyme-linked immunosorbent assay for IL-2 protein showed that a transient transfection of the *tax2* plasmid into Jurkat cells induced IL-2 protein expression, whereas transfection of *tax1* did little (Fig. 4A). Moreover, two HTLV-2-infected T-cell lines but not an HTLV-1-infected one produced IL-2 in the absence of exogenous IL-2 in the culture supernatant, and the amounts

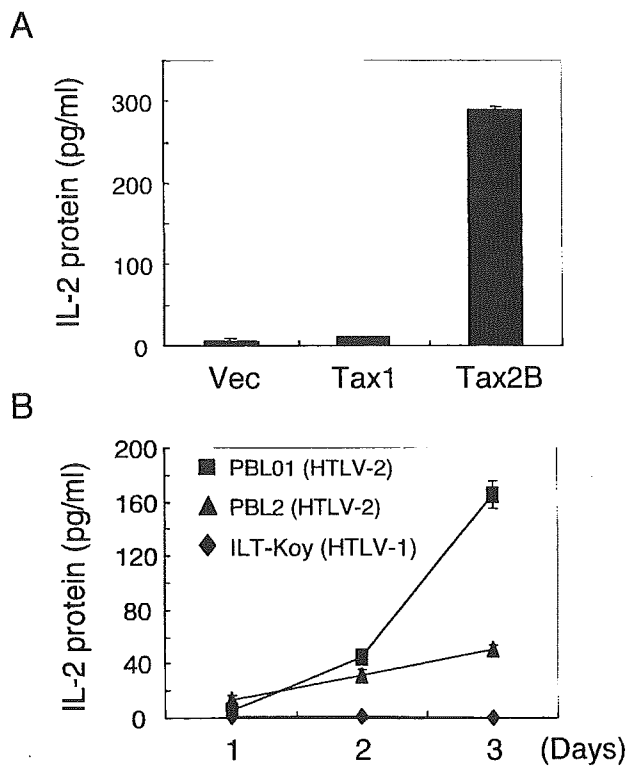


FIG. 4. Tax2 induces the expression of IL-2 protein in T-cell lines. (A) Jurkat cells were transfected with the indicated plasmids. At 48 h after transfection, the culture supernatant was collected, and the amount of IL-2 protein in the supernatant was measured by ELISA for IL-2. (B) The indicated HTLV-infected T-cell lines were cultured in the absence of IL-2. On the indicated days of culture, the culture supernatant was collected, and the amount of IL-2 protein in the supernatant was measured by ELISA for IL-2. The experiments were repeated twice to confirm reproducibility.

increased till day 3 of culture (Fig. 4B). Thus, these results showed that Tax2, but not Tax1, can constitutively stimulate the expression of endogenous IL-2 protein in HTLV-2-infected T-cell lines.

Activation of NFAT in HTLV-2-infected but not HTLV-1-infected T-cell lines. In resting T cells, NFAT is localized in the cytoplasm. Upon antigenic stimulation, NFATs translocate to the nucleus, bind NFAT response elements in cellular genes, and activate transcription. We next examined the amount of NFAT in the nucleus of various T-cell lines, by electrophoretic mobility shift assay (EMSA) using the NFAT binding site derived from the human IL-2 gene. Treatment of Jurkat cells with PMA and ionomycin induced a new complex that migrated slightly more slowly than the complex detected in untreated cells (Fig. 5A). The formation of this induced complex was selectively inhibited by an excess amount of homologous NFAT oligonucleotides, but not oligonucleotides containing mutations in the NFAT site or unrelated oligonucleotides (Fig. 5B).

Three unstimulated HTLV-2-infected T-cell lines (Ton1, MoT, and PBL2) gave a complex with the same migration pattern as the induced pattern in Jurkat cells, and this complex was also inhibited specifically by NFAT oligonucleotides (Fig.

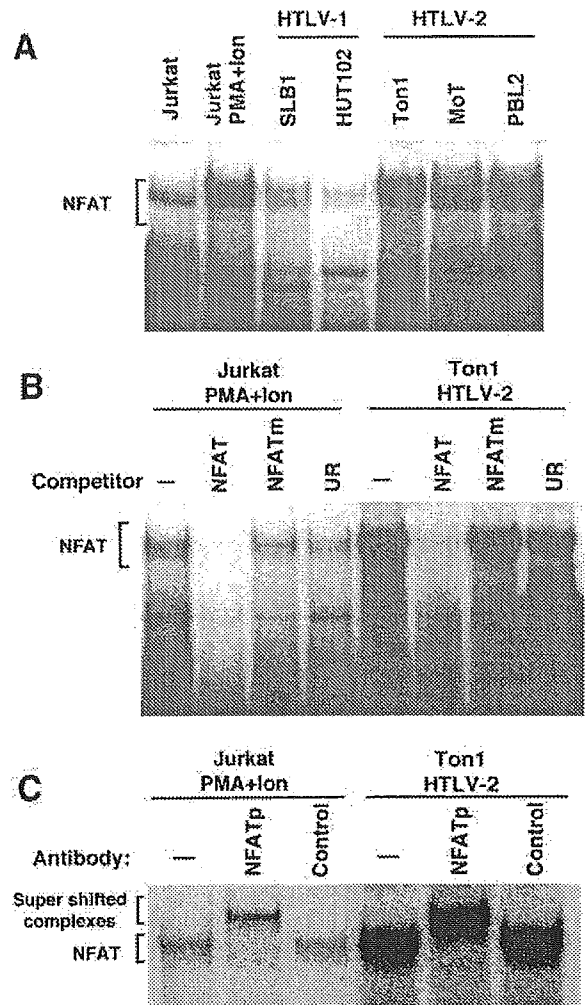


FIG. 5. HTLV-2-infected T-cell lines have constitutive NFAT activity. (A and B) Nuclear extracts prepared from the indicated T-cell lines and Jurkat cells treated with PMA and ionomycin were incubated with the NFAT site probe in the absence or presence of competitor. Binding to the NFAT site probe was measured by EMSA as described in Materials and Methods. The specific main complex with the NFAT element is indicated. Excess homologous NFAT oligonucleotides (NFAT), mutant NFAT oligonucleotides (NFATm), and unrelated oligonucleotides (UR) were used as competitors. (C) Nuclear extracts prepared from Ton1 cells or Jurkat cells treated with PMA and ionomycin were incubated with anti-NFATp antibody or the control antibody, followed by incubation with the NFAT site probe. The complex formed was analyzed by EMSA. The positions of the NFAT complex and the supershifted complex are indicated.

5A and 5B). NFAT is a family of transcription factors, including NFATp and NFATx (40). The supershift assay showed that the complex in an HTLV-2-infected T-cell line as well as in Jurkat cells treated with PMA and ionomycin contained NFATp protein, which is a dominant NFAT family member in activated T cells (Fig. 5C). Unlike HTLV-2 cell lines, two HTLV-1-infected T-cell lines had little NFAT activity localized to the nucleus. These results suggested that Tax2, but not Tax1, constitutively activated NFATp in HTLV-2-infected T-cell lines.