

氏名	かいだあつし 改田厚
学位(専攻分野)	博士(薬学)
学位記番号	薬博第511号
学位授与の日付	平成15年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	薬学研究科生命薬科学専攻
学位論文題目	ヒトT細胞白血病ウイルス Tax による転写制御機構の解析

論文調査委員 (主査) 教授 下遠野邦忠 教授 河合明彦 教授 川寄敏祐

論文内容の要旨

ヒトT細胞白血病ウイルス (HTLV-1) は、ヒトの末梢血 CD4 陽性 T 細胞に感染し、成人 T 細胞白血病 (ATL) を引き起こす原因ウイルスとして知られている。疫学的な知見より HTLV-1 と ATL との関連が明らかにされたが、ウイルス感染に伴う細胞がん化の詳細な分子機構は未だ明らかでない。HTLV-1 にコードされる Tax は、ヒト正常 T 細胞を不死化する能力がある。Tax により感染宿主細胞内の様々な標的遺伝子が影響を受け、その結果、遺伝子変異が蓄積して細胞がん化するものと推定される。HTLV-1 のキャリアは、日本国内で約100万人前後と推定されており、1年間に500人前後が ATL を発症している。本研究は、HTLV-1 感染による発がんの分子機構の解明を目的とし、Tax が宿主細胞に及ぼす影響を転写制御の観点より解析を進め、現在までに以下の新たな知見を得た。

第一章 HTLV-1 Tax による p53 ファミリータンパク質 p73, p51 の転写活性化能の抑制

我々の研究室では、Tax ががん抑制遺伝子である p53 の転写活性化能を抑制することを既に報告している。Tax による p53 の機能抑制が細胞がん化を引き起こす要因の一つであると考えられる。p53 とアミノ酸レベルにおいて高度な相同性を有する p73, p51 が1999年に相次いで報告され、p53 とファミリーを形成している。培養細胞に p73, p51 を過剰発現した結果、細胞周期の停止、アポトーシス誘導能など p53 類似の機能を多く示すことが報告されている。著者は、Tax がこれら p53 ファミリータンパク質の機能の一つである転写活性化能にどのような影響を与えるかを検討した。培養細胞に p73, p51, Tax の発現プラスミドとともにレポータープラスミドを遺伝子導入し、ルシフェラーゼの値を指標として Tax による p73, p51 の転写活性化能に与える影響を検討した。その結果、Tax は、p53 同様、p73, p51 においても転写活性化能を抑制した。Gal4 DNA 結合領域と p73, p51 の転写活性化領域の融合タンパク質を作製し、同様にルシフェラーゼアッセイを行った結果、Tax による転写抑制が見られたことから Tax は、p73, p51 の転写活性化領域に作用することが示唆された。免疫沈降実験の結果より、Tax は、p73, p51 とは直接結合しないことが示唆され、転写活性化領域に作用する他の因子を介して抑制する可能性が考えられた。転写コアクチベーターである CBP/p300 は、転写因子に結合し、転写活性化能を増強させることが知られている。Tax は、CBP/p300 に結合することが報告されており、結合能を欠いた Tax 変異体 (K88A) を用いて解析した結果、野生型で抑制された p73, p51 の転写活性化能がほぼ回復したことから Tax と CBP/p300 の相互作用が転写活性化能の抑制に重要な役割を果たしていることが示唆された。

第二章 転写コアクチベーター CBP/p300 に相互作用する新規細胞性因子の探索

CBP/p300 は、種々の細胞性因子と結合し、転写制御を行う。Tax は、CBP/p300 の KIX 領域に結合するが、KIX には他の細胞側因子も結合する。この KIX 領域に結合する新規細胞性因子の探索を行った。CBP/p300 の KIX 領域を含むドメインと Glutathione S-transferase (GST) との融合タンパク質を大腸菌で作製し、放射性同位体で代謝標識した T 細胞由来細胞株 Jurkat 細胞抽出液を用いて GST-pull down assay を行った。その結果、p300 特異的に結合する細胞性因子が検出された。二次元電気泳動による分離後、質量解析を行った結果、標的タンパク質は、核酸合成に関与する phosphor-

ibosyl pyrophosphate synthetase 1 (PRS1) であることが判明した。間接免疫蛍光法の結果、PRS1は、主に細胞質に局在していることが示唆された。一方、p300は、主に核に局在しているが、MEKK1刺激下においては、一部、細胞質にスポット状に存在することが報告されている。MEKK1強制発現下における免疫沈降実験において、PRS1とp300との結合が示唆されたことから、MEKK1を介した経路の活性化がPRS1とp300との相互作用に重要であることが示唆された。PRS1を培養細胞に過剰発現させると、basal promoterを活性化することからp300の転写コアクチベーター能に影響を与える可能性が考えられた。

以上、著者は、HTLV-1 Taxがp53ファミリータンパク質であるp73、p51の転写活性化能を抑制することを見出した。その分子機構は、Taxが転写コアクチベーターであるCBP/p300相互作用する結果であることが示唆された。p300のTax結合領域であるKIX領域に相互作用する新たな細胞性因子を探索した結果、核酸生合成に関与するPRS1が同定され、Taxが宿主細胞内で核酸生合成およびPRS1を介したp300の機能制御に影響を与えている可能性が示唆された。最近、CBP/p300は、がん抑制遺伝子として提唱されつつあり、遺伝子変異や機能喪失と発がんとの関連の報告も多い。本研究の成果は、Taxが宿主細胞の転写に及ぼす新たな知見であるとともに、細胞がん化の機能解明の新たな基礎的知見を提供するものである。

論文審査の結果の要旨

ヒトT細胞白血病ウイルス (HTLV-1) は、ヒトの末梢血CD4陽性T細胞に感染し、成人T細胞白血病 (ATL) を引き起こす原因ウイルスとして知られている。疫学的な知見よりHTLV-1とATLとの関連が明らかにされたが、ウイルス感染に伴う細胞がん化の詳細な分子機構は未だ明らかでない。HTLV-1にコードされるTaxは、ヒト正常T細胞を不死化する能力がある。Taxにより感染宿主細胞内の様々な標的遺伝子が影響を受け、その結果、遺伝子変異が蓄積して細胞ががん化するものと推定される。本論文は、HTLV-1感染による発がんの分子機構の解明を目的とし、Taxが宿主細胞に及ぼす影響を転写制御の観点より解析をおこなったものであり、得られた成果は、以下の通りである。

Taxは、がん抑制遺伝子であるp53の転写活性化能を抑制することが報告されており、Taxによるp53の機能抑制が細胞がん化を引き起こす要因の一つであると考えられる。p53とアミノ酸レベルにおいて高度な相同性を有するp73、p51が1997年、1998年に相次いで報告され、p53とファミリーを形成している。培養細胞にp73、p51を過剰発現した結果、細胞周期の停止、アポトーシス誘導能などp53類似の機能を多く示すことが報告されている。著者は、Taxがこれらp53ファミリータンパク質の機能の一つである転写活性化能にどのような影響を与えるかを検討した。培養細胞にp73、p51、Taxの発現プラスミドとともにレポータープラスミドを遺伝子導入し、ルシフェラーゼの値を指標としてTaxによるp73、p51の転写活性化能に与える影響を検討した。その結果、Taxは、p53同様、p73、p51においても転写活性化能を抑制した。Gal4 DNA結合領域とp73、p51の転写活性化領域の融合タンパク質を作製し、同様にルシフェラーゼアッセイを行った結果、Taxによる転写抑制が見られたことからTaxは、p73、p51の転写活性化領域に作用することが示唆された。免疫沈降実験の結果より、Taxは、p73、p51とは直接結合せず、転写活性化に関与する他の因子を介して抑制する可能性が考えられた。転写コアクチベーターであるCBP/p300は、転写因子に結合し、転写活性化能を増強させることが知られている。Taxは、CBP/p300に結合することが報告されており、結合能を欠いたTax変異体 (K88A) を用いた場合、野生型でみられたp73、p51の転写活性抑制能が観察されなかったことからTaxとCBP/p300の相互作用が転写活性化能の抑制に重要な役割を果たしていることが示唆された。

CBP/p300は、種々の細胞性因子と結合し、転写制御を行う。Taxは、CBP/p300のKIX領域に結合する。この領域はTax以外にも種々の転写因子などが結合するhot spotのひとつである。一方、CBPとp300のKIX領域のアミノ酸配列の相同性は高いものの完全に一致はしていない。KIX領域が種々のタンパク質と相互作用すること、CBPとp300とでこの領域のアミノ酸配列に違いがあることを考えると、CBPあるいはp300のKIX領域を特異的に認識して結合するタンパク質の存在が予想された。そこで、このKIX領域に相互作用する新規細胞性因子の探索を目的にCBP/p300のKIX領域を含むペプチドをGlutathione S-transferase (GST) と融合させたタンパク質を作製し、GST-pull down assayにより結合する細胞性タンパク質のスクリーニングをおこなった。放射性同位体 [³⁵S] で代謝標識したT細胞由来細胞株Jurkat細胞

抽出液を用いて GST-pull down assay を行った結果、p300 特異的に結合する細胞性因子が検出された。本因子を二次元電気泳動法にて分離後、MALDI-TOF MS および Q-TOF で質量解析をおこない、タンパク質を同定した。その結果、標的タンパク質は、核酸合成に関与する phosphoribosyl pyrophosphate synthetase 1 (PRS1) であることが判明した。*in vitro* における結合実験の結果、p300 は、PRS1 との結合に567番目から652番目のアミノ酸領域が重要であること、一方、PRS1 は、p300 (KIX) 領域との会合に170番目から190番目までのアミノ酸領域が重要であることが示唆された。全長 p300 と PRS1 との結合能を培養細胞内における two hybrid system を用いて解析し、PRS1 と全長 p300 の特異的結合が示唆された。

以上の研究は、細胞内における Tax の新たな機能を報告すると共に、Tax による細胞がん化の分子機構に新たな可能性を提唱するものである。また、PRS1 との結合性の違いは、転写コアクチベーター CBP/p300 の細胞内における機能の違いを生化学的にも解析することが可能であることを示しており、細胞生物学において新たな知見を提供するものと考えられる。

よって、本論文は博士（薬学）の論文として価値あるものと認める。

更に、平成15年2月24日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。