

	つばた ちかこ
氏 名	津 畑 千佳子
学 位	博 士 (医学)
学 位 記 番 号	新大院博(医)第157号
学位授与の日付	平成19年 3月22日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
博 士 論 文 名	PDZ domain-binding motif of human T-cell leukemia virus type 1 Tax oncoprotein is essential for the interleukin 2 independent growth induction of a T-cell line (ヒト T 細胞白血病ウイルス1型のがん蛋白である Tax の PDZ ドメイン蛋白結合配列は、T 細胞の IL-2 非依存性増殖において必須である)
論文審査委員	主査 教授 安 保 徹 副査 教授 藤 井 雅 寛 副査 教授 下 條 文 武

博士論文の要旨

ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型 (HTLV-1) とヒト T 細胞白血病ウイルス 2 型 (HTLV-2) は極めて類似したウイルスであるが、HTLV-1 が成人 T 細胞白血病 (ATL) の原因ウイルスであるのに対して、HTLV-2 は ATL やそれ以外の白血病の発症には関与しない。HTLV-1 と HTLV-2 はそれぞれトランスフォーミング遺伝子 Tax1 と Tax2 をコードし、これらは HTLV-1 と HTLV-2 によるヒト T 細胞のトランスフォーメーションに必須の役割を果たしている。また、Tax1 と Tax2 の活性の違いが ATL 発症の有無に深く関与していることが示唆されている。即ち、線維芽細胞株 (Rat-1) によるコロニー形成能を指標として Tax1 と Tax2 のトランスフォーム活性を比較すると、Tax1 の活性は Tax2 よりも著明に亢進している。Tax1 と Tax2 のキメラ遺伝子を用いた解析から、この活性の違いが Tax1 の C 末端のみに存在し、Tax2 には無い、PDZ ドメイン蛋白結合配列 (PDZ domain binding motif; PBM) によって決められていることが報告されている。

HTLV-1 は T 細胞に感染し、T 細胞の白血病を発症させることから、T 細胞に対するトランスフォーミング活性について、Tax1 PBM の役割を検討した。まず、Tax1 の C 末端にある PBM を欠損させた Tax1Δ 遺伝子、PBM として重要な 351 番目と 353 番目のアミノ酸をそれぞれアラニンに置換した Tax351A、Tax353A 遺伝子、Tax2B (HTLV-2b 由来の Tax2) に Tax1 の PBM を融合させた Tax2B+C 遺伝子を作成し、薬剤耐性遺伝子を共発現できる発現ベクターに組み込んだ。これらの Tax 発現プラスミドを IL-2 依存性の T 細胞株 (CTLL-2) に遺伝子導入し、薬剤選択により Tax 遺伝子導入細胞株を樹立した。抗 Tax1 抗体を用いたウエスタンブロットティング法により、Tax1Δ あるいは Tax1 を発現している細胞株をそれぞれ 2 株ずつ選別した。これらの発現細胞株を IL-2 非存在下で培養したところ、Tax1 を発現していないコントロール細胞株は 3 日間で死滅したが、Tax1 発現細胞株は 2 つとも 5 日間以上増殖を続け、その後 IL-2 非依存性細胞株が樹立された。この結果は、Tax1 が CTLL-2 の細胞増殖を IL-2 依存性から非依存性にトランスフォームできるという、これまでの報告と一致した。一方、Tax1Δ 発現細胞を IL-2 非存在下で培養したところ、2 つとも 2 日後には死滅した。同様に、Tax351A、Tax353A の発現細胞株も IL-2 非存在下では増殖しなかった。これらの結果は、Tax1 の PBM が Tax1 による IL-2 非依存性細胞増殖の誘導に必須であることを示していた。なお、Tax2B と Tax2B+C に関しては、安定細胞株の樹立を 3 度試みたが、IL-2 存在下でも樹立できなかった。このことから、Tax2B が CTLL-2 の細胞増殖を抑制する活性を持つことが示唆された。次に、CTLL-2 の IL-2 非依存性増殖

に対する PBM の役割を確認するために、Tax1、Tax2B あるいはそれぞれの変異プラスミドを CTLL-2 に遺伝子導入し、 1×10^4 個/well の細胞数で 96well プレートに撒き、IL-2 非存在下で 2 週間培養した。Tax1 を導入した CTLL-2 細胞を撒いた約 40% の well で細胞増殖が観察されたが、コントロールプラスミドの場合には、細胞増殖は観察されなかった。即ち、Tax1 により、CTLL-2 が IL-2 非依存性の増殖能を獲得していることが確認された。一方で、PBM に変異を持つ Tax1 プラスミド (Tax1 Δ 、Tax351A、Tax353 A) を導入した CTLL-2 は、形成コロニー数が少数であり、2 ヶ月間培養を継続したが、IL-2 非依存性細胞株は樹立できなかった。この結果から、PBM 機能を持たない Tax1 変異体は一過性の IL-2 非依存性増殖誘導活性を有するが、その活性は Tax1 よりも非常に低いことが示された。Tax2B、Tax2B+C を導入した CTLL-2 の場合、細胞増殖は一切観察されなかった。この結果は、Tax2B が IL-2 非依存性の増殖誘導活性を持たないことを示した。

以上より、HTLV-1 Tax1 が CTLL-2 の細胞増殖を IL-2 依存性から非依存性へと変換させる活性において、PBM が必須であることが示された。HTLV-2 Tax2 は IL-2 非依存性増殖を誘導せず、その原因は PBM だけでは説明できない、即ち Tax1 と Tax2 間に PBM 以外の違いがあることが示唆された。Tax1 と Tax2 に観察される、これらの活性の相違が、HTLV-1 感染のみが ATL を発症させることに関与している可能性がある。Tax1 は PBM を介して Dlg、MAGI-3 を含む、複数の PDZ ドメイン結合蛋白に結合することが知られている。本論文は、これらの PBM 結合蛋白が Tax1 による T 細胞のトランスフォーメーション、ひいては ATL 発症に関与することを示唆している。

(論文審査の要旨)

ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型 (HTLV-1) にはトランスフォーミング遺伝子の Tax1 がコードしている。HTLV-1 は T 細胞に感染し白血病を発症させ、HTLV-2 は発症させないことから、本研究では、T 細胞に対するトランスフォーミング活性について、Tax1 の C 末端にのみ存在する PDZ ドメイン蛋白結合配列 (PBM) の役割を検討した。PBM の変異遺伝子を IL-2 依存性の T 細胞株 (CTLL-2) に導入し、安定発現細胞株を樹立、IL-2 非存在下で培養したところ、PBM が Tax1 による IL-2 非依存性細胞増殖の誘導に必須であることがわかった。また、96well プレートを用いた培養結果からは、PBM 機能を持たない Tax1 変異体は一過性の IL-2 非依存性増殖誘導活性を有するが、その活性は Tax1 よりも非常に低いことが示された。また、HTLV-2 にコードする Tax2B が IL-2 非依存性の増殖誘導活性を持たないことも示された。

Tax1 は PBM を介して複数の PDZ ドメイン結合蛋白に結合することが知られている。本研究では、これらの PBM 結合蛋白が Tax1 による T 細胞のトランスフォーメーション、ひいては ATL 発症に関与する可能性を示した点に、学位論文としての価値を認める。