

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 MAKOKHA Grace Naswa
学位 博士 (医学)
学位記番号 新大院博 (医) 第 566 号
学位授与の日付 平成 25 年 9 月 20 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 Human T-cell leukemia virus type 1 Tax protein interacts with and mislocalizes the PDZ domain protein MAGI-1
(HTLV-1 の Tax1 蛋白は PDZ ドメインを持つ MAGI-1 と結合し、MAGI-1 の細胞内局在を変える)
論文審査委員 主査 西條 康夫
副査 藤井 雅寛
副査 齋藤 昭彦

博士論文の要旨

(背景と目的)

ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型 (HTLV-1) は成人 T 細胞性白血病 (ATL) の原因ウイルスである。HTLV-1 の持つ非構造遺伝子 Tax1 は HTLV-1 の転写を強力に活性化するなど、ウイルスの生活環を制御する重要な因子である。Tax1 は、さらに、ヒト T 細胞の不死化、HTLV-1 の持続感染、炎症および白血病の発症にも関与する。

これら Tax1 の多岐にわたる機能は様々な宿主因子との相互作用によると考えられている。例えば、Tax1 は多数の PDZ ドメインを持つ細胞蛋白質と結合する。また、この結合は Tax1 の C 末端に存在する PDZ 結合領域 (PBM) を介している。この Tax1PBM はラット線維芽細胞株やマウス T 細胞株 (CTLL-2) の Tax1 による形質転換に必須であることが示されている。さらには、PBM 欠損 HTLV-1 ウイルスをウサギへ感染させても、抗 HTLV-1 抗体と HTLV-1 プロウイルスがほとんど検出されないことから、PBM 欠損 HTLV-1 はラビットで持続感染できないことが報告されている。

Tax1 は PDZ ドメインを持つ Dlg1 および Scribble に結合する。これらの中でも Dlg1 は細胞増殖シグナルや腫瘍形成の抑制に関与する癌抑制遺伝子である。申請者が所属する研究室は、Dlg1 の不活化が Tax1 の形質転換活性 (CTLL-2 細胞の IL-2 要求性増殖から IL-2 非要求性増殖への形質転換) を増強するが、PBM 欠損 Tax1 変異体の活性を増強できないことを見出した。この結果から、Dlg1 以外の未知の PDZ ドメイン蛋白が Tax1 による CTLL-2 の形質転換を抑制していること、この未同定の PBM 蛋白を不活化することが CTLL-2 の Tax1 による形質転換に必須であると考えた。今回、申請者らは、HTLV-1 の Tax1 に結合する PDZ ドメイン蛋白として MAGI-1 を同定し、その Tax1 形質転換能における役割を解析した。

(方法)

1. GST プルダウンアッセイによる Tax1 結合蛋白の同定: GST (glutathione S-transferase) を融合させた Tax1 (GST-Tax1) あるいは PBM 欠損 Tax1 変異体 (GST-Tax1 Δ C) を大腸菌で発現し、精製した。これら

の融合蛋白と T 細胞株(CTLL-2)の細胞抽出液を混合し、洗浄後、GST-Tax1 に結合し、GST-Tax1 ΔC に結合しない蛋白を質量分析法により同定した。

2. 免疫沈降法と細胞分画解析 : 293T 細胞株、HTLV-1 感染細胞株 (SLB-1) および HTLV-1 非感染 T 細胞株 (Jurkat) を用いて、Tax1 と MAGI-1 との結合を免疫沈降法により解析した。また、免疫蛍光法を用いて MAGI-1 と Tax1 の細胞内局在を可視化した。
3. MAGI-1 と Tax1 の定量 : CTLL-2/Tax1 と HTLV-1 感染細胞株における MAGI-1 と Tax1 の発現量は、ウェスタンブロット法および RT-PCR 法により定量した。

<結果>

T 細胞株 CTLL-2 の細胞抽出液から Tax1 の PBM に結合する蛋白として MAGI-1 を同定した。MAGI-1 は MAGUK 関連分子に属し、5つの PDZ ドメインを有していた。293T 細胞に Tax1 と MAGI-1 発現プラスミドを導入し、それぞれの抗体で免疫沈降を行ったところ、両者の結合が確認された。この結合は Tax1 ΔC では観察されず、PBM に依存していた。また、Tax1 を 293T 細胞に発現すると、MAGI-1 の細胞内局在が界面活性剤可溶性分画から不溶性分画へと移行した。この移行も Tax1 ΔC では観察されなかった。HTLV-1 感染 T 細胞株においても、MAGI-1 の一部は界面活性剤不溶性分画に検出されたが、HTLV-1 非感染細胞株では、界面活性剤可溶性分画のみに検出された。

Tax1 を発現するレンチウイルスによりヒト T 細胞を不死化すると、不死化 T 細胞における MAGI-1 蛋白の発現量は末梢血単核球と比較して著明に低下していた。さらに、Tax1 によって IL-2 非要求性に形質転換した CTLL-2 (CTLL-2/Tax1) においても、MAGI-1 の発現は CTLL-2 よりも著明に低く、この発現低下は主として RNA レベルで起こっていた。また、CTLL-2/Tax1 に IL-2 を再添加しても、CTLL-2/Tax1 の MAGI-1 発現は増加せず、この発現低下は不可逆的であった。さらに、Tax1 ΔC で形質転換した CTLL-2 でも MAGI-1 の発現が RNA レベルで低下しており、CTLL-2 の Tax1 による IL-2 非要求性形質転換には MAGI-1 が不活化されることが必要であることが示唆された。興味深いことに、白血病を発症させない HTLV-2 の Tax2 によってヒト T 細胞を不活化しても、MAGI-1 の発現は低下しなかった。

(考察と結論)

本研究で、申請者は、PDZ 蛋白 MAGI-1 が HTLV-1 癌蛋白 Tax1 の標的蛋白であり、その機能が、二つの異なる機序を介して、Tax1 によって不活化されていることを見いだした。一つは MAGI-1 の細胞内局在の変化であり、これは Tax1 PBM に依存していた。もう一つは PBM に依存しない MAGI-1 RNA の発現低下であった。興味深いことに、HTLV-2 の Tax2 は MAGI-1 の発現量を低下させなかった。MAGI-1 の発現は様々な癌で低下しており、癌抑制因子として機能することが示唆されている。Tax1 以外の高発がん性ウイルスの癌蛋白も MAGI-1 の発現を低下させることが示されている。従って、本研究は、MAGI-1 の不活化が HTLV-1 による T 細胞の不死化および白血病の発症に関わることを示唆している。

審査結果の要旨

HTLV-1 の Tax1 は T 細胞の不死化、HTLV-1 の持続感染、炎症および白血病の発症に関与する。今回、HTLV-1 の Tax1 に結合する PDZ ドメイン蛋白として MAGI-1 を同定し、その Tax1 形質転換能における役割を解析した。Tax1 を 293T 細胞に発現すると、MAGI-1 の細胞内局在が界面活性剤可溶性分画から不溶性分画へと移行した。Tax1 でヒト T 細胞を不死化すると、MAGI-1 蛋白の発現量は末梢血単核球と比較して著明に低下していた。さらに、Tax1 によって形質転換した CTLL-2 においても、発現低下が確認され RNA レベルで起こっていた。また、この発現低下は不可逆的であった。白血病を発症させない HTLV-2

の Tax2 によるヒト T 細胞の不活化では、MAGI-1 の発現は低下しなかった。本研究で、申請者は、PDZ 蛋白 MAGI-1 が HTLV-1 癌蛋白 Tax1 の標的蛋白であり、二つの異なる機序を介して、Tax1 によって不活化されていることを見いだした。1 つは MAGI-1 の細胞内局在の変化であり、MAGI-1 の発現は様々な癌で低下しており、癌抑制因子として機能することが示唆されている。Tax1 以外の高発がん性ウイルスの癌蛋白も MAGI-1 の発現を低下させることが示されている。従って、本研究は、MAGI-1 の不活化が HTLV-1 による T 細胞の不活化および白血病の発症に関わることを示唆している。