

氏 名（本籍） 井 出 佳 宏

学 位 の 種 類 博 士（医 学）

学 位 記 番 号 医 第 2 5 3 8 号

学 位 授 与 年 月 日 平 成 5 年 2 月 24 日

学 位 授 与 の 条 件 学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当

最 終 学 歴 昭 和 61 年 3 月 25 日
東 北 大 学 医 学 部 医 学 科 卒 業

学 位 論 文 題 目 Association of the Transactivator p40^{tax} of
Human T-Cell Leukemia Virus Type I with
Human Heat Shock Protein 60.

（ヒト成人 T 細胞性白血病ウイルス I 型の転写
活性化因子 p40^{tax} とヒト熱刺激蛋白60との結合に
関する研究）

（主 査）

論 文 審 査 委 員 教 授 矢 嶋 聰 教 授 成 澤 邦 明

教 授 今 野 多 助

論文内容要旨

【目 的】

HTLV-I は Adult T-cell leukemia (ATL), HTLV-I associated myelopathy (HAM), tropical spastic paraparesis (TSP) の原因ウイルスとして知られている。その HTLV-I pX の遺伝子産物である p40^{tax} は転写活性促進作用を有し、ATL の発症に深く関与していると考えられているが、DNA との直接の結合が証明されないことから細胞側因子との何らかの相互作用を介してその機能を発揮していると考えられている。前研究では p40^{tax} 発現細胞を用いて 2 つの細胞蛋白 (p60, p95) を見だし、その一つがヒト Heat shock protein 60 (HSP 60 ; Chaperonin) であることを示したが、p40^{tax} に対する抗体を使用した免疫沈降では HSP 60 が観察されたのに対して、HSP 60 抗血清による免疫沈降では p40^{tax} と HSP 60 との結合が確認できなかった。これは抗体に原因があるとも考えられたため、本研究では新たな抗体、すなわち HSP 60 に対するモノクローナル抗体を作成した。更に p40^{tax}-HSP 60 複合体形成を確認するため、p40^{tax} と HSP 60 を合成し、p40^{tax}-HSP 60 複合体形成を確認した。

【実 験 方 法】

① p40^{tax} に対するモノクローナル抗体である Lt-4 を用いて免疫沈降を行い (Cell ; TL-Mor 4.5×10⁹)、その免疫沈降物の SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) のゲルを 4 M 酢酸ナトリウムにてバンドを可視化した後 p60 のバンドを切り出し、蛋白を電気泳動的に抽出して p60 蛋白を得た。この蛋白を 4 分割し、2 週間おきに計 4 回マウスに免疫した。免疫後のマウス脾細胞と Sp/0-2 Ag myeloma 細胞とを 50% polyethylenglycol 4000 存在下に 3 : 1 の割合で融合させてハイブリドーマを作成し、HAT 培地による選別の後、蛍光抗体法、ウェスタン・ブロット法によってスクリーニングした。得られた抗体 (pk-1) の認識する蛋白が HSP 60 であることを確認するため、TL-Mor 細胞溶解液に対する免疫沈降と V8 Protease による Peptide mapping を行った。抗体のサブクラス決定は Amersham の Isotyping kit によって行った。

② Jindal らの HSP 60 cDNA 配列をもとに二カ所にプローブを設定し、CLONETEC Human T cell λgt10 cDNA library に対してスクリーニングを行い HSP 60 cDNA をクローニングした。得られた cDNA は nested delution kit (TAKARA), Sequonase kit (US Biochemical) を用いてその塩基配列を確認した。更に、New England Biorabs 社のキットを用い、HSP 60 cDNA を Maltose binding protein との fusion protein を発現するプラスミド (pPR734) に組み込み、これを大腸菌に導入して Maltose binding protein と HSP 60 との fusion protein を合成させた

後 Factor Xa にて処理し HSP 60 蛋白を得た。p40^{max} は Rabbit reticulocyte lysate を用いた in vitro の転写・翻訳系 (Promega) を用いて合成した (この際 [³⁵S]-methionine にてラベルした)。この両者を混合し pk-1 にて免疫沈降をおこない、その沈降物を SDS-PAGE, Autoradiography にて観察した。

【実験結果】

①モノクローナル抗体 pk-1 を得た。そのサブクラスは IgG_{2b} であった。この抗体の認識する蛋白は peptide mapping による分析で Lt-4 により p40^{max} と共沈する p60, 及び p60 抗血清の認識する蛋白と同一パターンを示し、pk-1 が HSP 60 を認識することが確認された。しかし、pk-1 による免疫沈降では p40^{max} は HSP 60 とは共沈しなかった。また、pk-1 は大腸菌 GroEL とは反応しなかったが、マウスの 60kDa の蛋白と反応した。② 2.5kbp の HSP 60cDNA がクローニングされたが、その塩基配列は Jindal らのものとは一カ所で異なっていた (nt631-C→T) がアミノ酸配列は同一であったため、そのまま以下の実験に使用した。cDNA より人工的に合成した p40^{max}, HSP 60 蛋白は、それぞれ Lt-4, pk-1 と反応した。この合成した p40^{max} と HSP 60 との混合溶液を pk-1 にて免疫沈降したが、HSP 60 非存在下のコントロールレーンでは p40^{max} が沈降しないのに対し、HSP 60 存在下では p40^{max} が沈降し、p40^{max} と HSP 60 との結合が確認された。

【結論】

① HSP 60 Chaperonin には (i)細胞内、特にミトコンドリアに大量に存在する。(ii)種族を越えて保存される。(iii)熱刺激で発現が亢進する。(iv) 7又は14量体を形成し、マグネシウムイオン及び ATP の存在下で可逆的に解離する。(v) ATPase 活性を持つ。(vi) 蛋白質の正しい折りたたみや多量体の形成に一種の触媒として関与し、その機能発現や細胞内器官への移送に重要な役割を果たす。という性質がある。pk-1 を用いて細胞溶解液に対して行った免疫沈降で p40^{max} が共沈しなかったのは、(i)の理由により HSP 60 の量が極端に多かったためと考えられた。また、pk-1 はマウス HSP 60 と反応し、大腸菌 GroEL とは反応しなかったが、これは各蛋白間の homology の差によるものと考えられた。② HSP 60 は (vi) の性質により p40^{max} の機能発現に重要な役割を果たしているものと考えられた。

審査結果の要旨

HTLV-I は Adult T-cell leukemia (ATL), HTLV-I associated myelopathy (HAM), tropical spastic paraparesis (TSP) の原因ウイルスとして知られている。その HTLV-I px の遺伝子産物である p40^{tax} は転写活性促進作用を有し、ATL の発症に深く関与していると考えられているが、DNA との直接の結合が証明されないことから細胞側因子との何らかの相互作用を介してその機能を発揮していると考えられている。これまでに 2 つの細胞蛋白 (p60, p95) が見いだされ、その一つがヒト Heat shock protein 60 (HSP60 ; Chaperonin) であることが示されているが、p40^{tax} と HSP60 との直接の結合は証明されていない。

本研究は p40^{tax} と HSP60 をそれぞれの cDNA より合成し、HSP60 に対するモノクローナル抗体を用いた免疫沈降法によって *in vitro* での p40^{tax}-HSP60 複合体形成を確認したものである。

本研究では、まず p40^{tax} に対するモノクローナル抗体である Lt-4 を用いて TL-Mor 細胞溶解液に対して免疫沈降・SDS-PAGE を行い、そのゲルより p60 蛋白を電気泳動的に抽出し、更にマウスに免疫してモノクローナル抗体 pk-1 を得ている。pk-1 が HSP60 を認識することは、Peptide mapping で確認された。また、pk-1 は大腸菌 GroEL とは反応しなかったが、マウスの 60kDa の蛋白と反応した。これは、HSP60 は種族を越えて保存されているがその程度には種族間で差があるためである。

次に、Jindal らの HSP60 cDNA 配列をもとにプローブを設定して Human T cell λ gt10 cDNA library に対してスクリーニングを行い HSP60 cDNA をクローニングし、この cDNA を Maltose binding protein との fusion protein を発現するプラスミド (pPR734) に組み込み、これを大腸菌に導入して Maltose binding protein と Hsp60 との fusion protein を合成させた後に Factor Xa で処理して HSP60 蛋白を得ている。一方 p40^{tax} は Rabbit reticulocyte lysate を用いた *in vitro* の転写・翻訳系を用いて合成し (この際 [³⁵S] methionine にてラベルしている)、この両者を混合し pk-1 にて免疫沈降を行っている。その沈降物を SDS-PAGE, Autoradiography にて観察したところ、HSP60 非存在下のコントロールレーンでは p40^{tax} が沈降しないのに対し、HSP60 存在下では p40^{tax} が沈降し、p40^{tax}-HSP60 複合体の形成が確認された。HSP60 には蛋白質の正しい折りたたみや多量体の形成に一種の触媒として関与し、その機能発現や細胞内器官への移送に重要な役割を果たすという性質が知られており、p40^{tax}-HSP60 複合体形成は HSP60 が p40^{tax} の機能発現に重要な役割を果たしていることを示唆するものである。

以上、本研究はそれぞれの cDNA より直接 p40^{tax}・HSP60 蛋白を合成して両者の結合を確認し、ATL の発症に HSP60 が関与している可能性を示したものであり、その研究意義は大きく、学位論文に十分値するものと考えられる。