

平成 21 年 5 月 25 日現在

研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19591118
 研究課題名(和文) レセプター型チロシンキナーゼが細胞内小器官に局在化する機構と意義
 研究課題名(英文) Mechanism and significance of the localization of receptor-type tyrosine kinases to cellular organelle
 研究代表者
 鈴 伸也(SUZU SHINYA)
 熊本大学・エイズ学研究センター・准教授
 研究者番号：80363513

研究成果の概要：エイズや白血病は未だ人類が克服出来ない疾患であり、その治療法が開発され続けている。一方で、これら疾患の発症機構についても未だ完全に解明されていない。本研究ではこの点に迫るため、細胞レベルでどのような異常が起きるか、特に細胞内のゴルジ体という生命にとって必須の器官でどのような異常が起きるかを着目した。その結果、特にエイズ原因ウイルスである HIV-1 の病原性蛋白質 Nef がゴルジ体の機能異常を引き起こす事を明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：エイズ、白血病

1. 研究開始当初の背景

エイズや白血病は血液および免疫細胞の異常によって起こり、そして人類が未だ克服出来ない疾患である。このため現在、その治療薬の開発が精力的になされ、多くの有効な薬剤が開発されてきた。しかし、現状では根絶までには至っていない。特に、既存の薬剤に対する耐性獲得などは重大な問題となっている。これまで、エイズの場合はこのウイルスの複製を直接的に阻害する薬剤、例えばウイルス自身が持つ酵素タンパク質を標的にした薬剤が中心的に開発されてきた。また、

白血病の場合は、それぞれの原因となる異常タンパク質、例えば酵素活性の制御が異常になったタンパク質を標的にした薬剤が中心的に開発されてきた。しかし、多くの場合、これら標的タンパク質はこれら低分子化合物に対する抵抗性を獲得したり、あるいはバイパスして別の形で異常を引き起こす。従って、これら疾患の根絶に向けてはやはり、なぜこれら疾患が起こるかの詳細な解明が重要である。これが次の、そして新たな機序での薬剤開発に繋がるのは言うまでもない。

2. 研究の目的

私達の研究グループは、なぜ HIV-1 感染でエイズを発症するか、特にこのウイルス自身が持つタンパク質 Nef に着目してきた。なぜなら、この Nef タンパク質がエイズ発症に必須である事が様々な角度の研究から明らかにされて来たからである。しかしながら、どのように Nef がエイズ発症を規定しているかについては意外なほど分かっていない。Nef 自身、特別な酵素活性を持っておらず、そのため、宿主細胞、特に T 細胞やマクロファージの中にあるタンパク質を利用して病原性を発揮すると予想はされる。

一方、私達の体の中に中にあるマクロファージなどの細胞の機能はサイトカインと呼ばれるホルモン様のタンパク質によって調節・維持されている。そしてサイトカインの作用は細胞表面上にあるレセプタータンパク質を介して発揮される。従って、これらサイトカインとレセプターシステムの異常は細胞レベルそして生体レベルでの異常に直結する。良く知られた例の一つは、慢性骨髄性白血病での Flt3 と呼ばれるレセプターの遺伝子異常である。この例では、異常 Flt3 はそれに対する特異的なサイトカインに関係なく常に酵素活性が活性化しており、それが白血病発症の直接的な原因である事が証明されている。ただ興味深い事は、この異常 Flt3 は通常あるべき場所、つまり細胞表面上にはなく、細胞内の小胞体やゴルジ体と呼ばれる器官に集まって存在する。しかし、その意味は分かっていない。私達は、前述の HIV-1 Nef タンパク質について、この異常 Flt3 の細胞内局在異常と非常に良く似た現象を見出して来た (Suzu S, Harada H, Matsumoto T, Okada S. HIV-1 Nef interferes with M-CSF receptor signaling through Hck activation and inhibits M-CSF bioactivities. Blood 2005 105:3230-3237)。Nef はマクロファージの機能制御に最も重要であるサイトカイン M-CSF のレセプター Fms の細胞表面上への輸送を阻害し、そのため、マクロファージの M-CSF への反応性、つまり機能恒常性を著しく阻害する事を見出した。そしてこの輸送阻害の結果、Fms は細胞内のゴルジ体に多く留まって存在していた。

これら 2 つの例が何を意味するのか。これまでは疾患を説明する細胞レベルでの異常はどのような制御不能のシグナルが発生するかに焦点が絞られてきた。しかし、それだけでは疾患成立の全てが解明された訳では無い。全く別の要因がある事が想定されている。そしてそれが「シグナル異常が、実は起こる場所の異常も伴う」事である可能性がこれらの例から示唆される。そこで本研究では、HIV-1 Nef と Fms を例に、その機構を詳細に解析する事を試みた。

3. 研究の方法

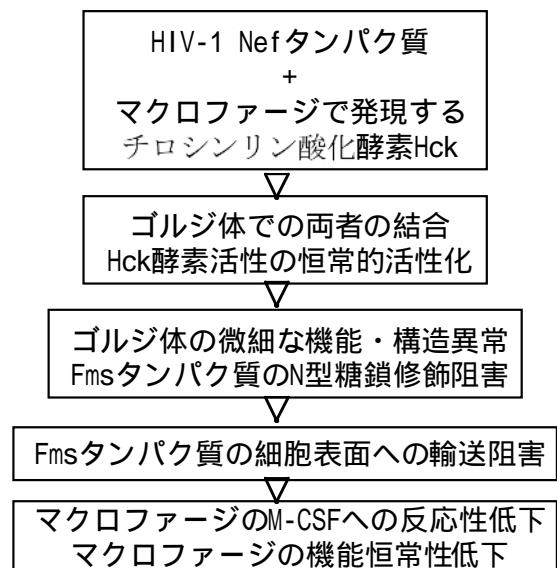
(1)材料として、Fms タンパク質を発現するヒト白血病細胞株 TF-1-fms、あるいはヒト末梢単球を M-CSF で培養して得られたマクロファージ、またモデル細胞としてヒト 293T 細胞を用いた。

(2)方法として、細胞への遺伝子導入そして分子細胞生物、生化学および免疫化学的手法を駆使した。マクロファージへの遺伝子導入としては nucleofection、293T 細胞へは lipid 法を用いた。解析法としては、フローサイトメトリー、ウェスタンブロット、免疫染色法などを用いた。

4. 研究成果

研究成果は主に、既に掲載された論文 (Hiyoshi M, Suzu S, Yoshidomi Y, Hassan R, Harada H, Sakashita N, Akari H, Motoyoshi K, Okada S. Interaction between Hck and HIV-1 Nef negatively regulates cell surface expression of M-CSF receptor. Blood 2008 111:243-250)、および投稿中の論文 (HassanR, Suzu S, Hiyoshi M, Takahashi-MakiseN, Ueno T, Agatsuma T, Akari H, Komano J, Takebe Y, Motoyoshi K Okada S. Dys-regulated activation of a Src tyrosine kinase Hck at the Golgidisturbs N-glycosylation of a cytokine receptor Fms. J Cell Physiol, under review) の 2 つにまとめた。以下に、結果の概念図を添付し、次ページに詳細に記述した。

研究成果の概念図



HIV-1 Nef がエイズ発症を規定する要因として、感染マクロファージのサイトカイン M-CSF への反応性低下を見出して来た。これはエイズ患者でしばしば認められるマクロファージの機能異常（食能の低下やサイトカイン産生異常など）を合理的に説明出来るものである。そこで本研究ではその詳細な機構を明らかにしたものである。

まず、特異性について検討した。Fms 以外にも多くのサイトカインレセプターはあるが、代表的な例として GM-CSF レセプターを用いた。その結果、Fms とは違い、GM-CSF レセプターは HIV-1 Nef で何らの異常は認められなかった。そしてこの違いは、Fms の場合は、糖鎖が十分に付加しないと細胞表面へと輸送されない事、一方で、GM-CSF レセプターの場合は、糖鎖付加と輸送が必ずしもリンクしない事と良く一致していた。この事から、HIV-1 Nef は糖鎖付加の過程を障害する可能性を考えた。

次にその機構を明らかにする目的で、293T 細胞を用いた発現実験を行った。興味深いのは Nef 単独では Fms の糖鎖付加異常は起こらず、マクロファージに特異的発現するチロシンリン酸化酵素 Hck が存在する場合にのみ、そのような異常が起きる事がウェスタンブロット法などの生化学的実験の結果、初めて明らかとなった。そしてこの異常は、Hck の酵素活性の恒常的活性化を必要とする事（変異体を用いた実験から）、そして重要な事は、それらが細胞内のゴルジ体で起きている事も免疫染色などの実験から初めて発見した。

最後に、HIV-1 Nef による Hck のゴルジ体の活性化がなぜ Fms の糖鎖付加異常に至るのかを明らかにする事を試みた。その過程で、しばしばゴルジ体に特異的なタンパク質の免疫染色像が、Nef と Hck 強制発現細胞では正常と異なる事を見出した。この事は、ゴルジ体の構造異常が起きている事を示唆した。

本研究では、エイズなどの疾患の成立機構を包括的に理解するために、これまでに無い、ゴルジ体の機能異常との関連という新たな視点から研究を行った。その結果、HIV-1 病原性タンパク質 Nef がもたらす宿主のタンパク質 Hck のゴルジ体での活性化異常がゴルジ体の機能異常に至る、という興味深い知見を得た。この結果は、未解明のエイズ発症機構の理解に少なからず貢献すると期待される。そして、冒頭に述べた様に、慢性骨髄性白血病でもゴルジ体や小胞体の機能異常を示唆する報告がなされており、この様な細胞内小器官に着目した病態解明研究は今後、更に重要であろう。

本研究は、疾患研究だけでなく、私達の体の基本構成成分である細胞の中で小器官の機能がそもそも如何に維持されているかの、基礎細胞生物学上でも重要なヒントを与え

てくれる。つまり、ゴルジ体の構造や機能はリン酸化という反応で制御されているという事を私達の結果は端的に示した。この考え方はほんのこの数年で認知されるようになった、全く新たな概念である。従って、本研究の成果は、疾患研究および基礎生物の両面から有益な情報を提供するものである。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕(計 7 件)

1. Takahashi-Makise N, Suzu S, Hiyoshi M, Ohsugi T, Katano H, Umezawa K, Okada S. Biscolaurine alkaloid cepharanthine inhibits the growth of primary effusion lymphoma *in vitro* and *in vivo* and induces via suppression of the NF- κ B pathway. *Int J Cancer*, *in press* 査読有り
2. Murakami T, Harada H, Suico MA, Suzu S, Kai H, Okada S. Ephedrae herba, a component of Japanese herbal medicine Mao-to efficiently activates the replication of latent human immunodeficiency virus type 1(HIV-1) in a monocytic cell line. *Biol Pharma Bull* 2008 31:2334-2337 査読有り
3. Okada S, Harada H, Ito T, Saito T, Suzu S. Early development of human hematopoietic and acquired immune systems in new born NOD/Scid/Jak3null mice intrahepatic engrafted with cord blood-derived CD34+ cells. *Int J Hematol* 2008 88:476-482 査読有り
4. Hiyoshi M, Suzu S, Yoshidomi Y, Hassan R, Harada H, Sakashita N, Akari H, Motoyoshi K, Okada S. Interaction between Hck and HIV-1 Nef negatively regulates cell surface expression of M-CSF receptor. *Blood* 2008 111:243-250 査読有り
5. Yamamoto K, Suzu S, Yoshidomi Y, Hiyoshi M, Harada H, Okada S. Erythroblasts highly express the ABC transporter Bcrp1/ABCG2 but do not show the side population (SP) phenotype. *Immunol Lett* 2007 114:52-58 査読有り
6. Harada H, Goto Y, Ohno T, Suzu S, Okada S. Proliferative activation up-regulates expression of CD4 and HIV-1 co-receptor on NK cells and induces their infection with HIV-1. *Eur J Immunol* 2007 37:2148-2155 査読有り

7. Suzu S, Hiyoshi M, Yoshidomi Y, Harada H, Takeya M, Kimura F, Motoyoshi K, Okada S. M-CSF-mediated macrophage differentiation but not proliferation is correlated with increased and prolonged ERK activation. J Cell Physiol 2007 212:519-525 査読有り

(3)連携研究者
該当無し

〔学会発表〕(計 6 件)

1. Ranya Hassan、鈴伸也、日吉真照、岡田誠治 Hierarchical actions of HIV-1 Nef on Hck determine maturation arrest of cytokine receptor Fms. 第22回日本エイズ学会 2008年11月26日 大阪
2. 服部真一郎、井出一彦、中田浩智、原田英樹、鈴伸也、向後悟、芦田則之、早川弘之、満屋裕明、岡田誠治 hu-PBMC-NOD/SCID/Jak-3-KO マウスを用いた核酸系逆転写酵素阻害剤、4'-Ehhyanyl-Fluoro-2'-Deoxyadenosine による抗 HIV-1 効果の検討 第22回日本エイズ学会 2008年11月27日 大阪
3. 日吉真照、鈴伸也、岡田誠治 HIV-1 Nef のマクロファージにおける新たなゴルジ体機能の阻害機構 第56回日本ウイルス学会 2008年10月28日 岡山
4. 吉富友香、鈴伸也、日吉真照、岡田誠治 HIV-1 Nef タンパク質のゴルジ体における機能 第21回日本エイズ学会 2007年11月28日 広島
5. 日吉真照、鈴伸也、吉富友香、岡田誠治 HIV-1 Nef の宿主細胞内チロシンキナーゼに対する影響 第55回日本ウイルス学会 2007年10月22日 札幌
6. 鈴伸也、日吉真照、吉富友香、元吉和夫、岡田誠治 Src キナーゼ Hck による M-CSF レセプター輸送・成熟過程の負の制御 第69回日本血液学会 2007年10月12日 横浜

〔図書〕(計 2 件)

1. 鈴伸也 日本医学館 今日の移植 2009年 326-329
2. 鈴伸也、岡田誠治 科学評論社 血液腫瘍科 2008年 326-329

6. 研究組織

(1)研究代表者

鈴伸也 (SUZU SHINYA)

熊本大学・エイズ学研究センター・准教授
研究者番号：80363513

(2)研究分担者

岡田誠治 (OKADA SEIJI)

熊本大学・エイズ学研究センター・教授
研究者番号：50282455