

平成 21 年 5 月 28 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19500308
 研究課題名 (和文) エイズ脳症とプリオン病の進行を調節する脳内分子シャペロン 14-3-3 の役割解析
 研究課題名 (英文) The role of brain molecular chaperone 14-3-3 protein, which regulates the progress of HIV-1 encephalopathy and prion disease
 研究代表者
 矢野 仁康 (YANO MIHIRO)
 徳島大学・疾患酵素学研究センター・准教授
 研究者番号：40304555

研究成果の概要：エイズ脳症発症のメカニズムを明らかにするため、ヒト脳微小血管内皮細胞 (HBMEC) 培養系の簡易血液脳関門 (BBB) モデルを用いて、HIV-1gp120 による BBB 破綻とその制御機構について解析を行った。その結果、14-3-3 τ が、gp120 による ZO-1 等のタイトジャンクション (TJ) 構成蛋白質のプロテアソームによる分解を防ぐ事で、TJ の崩壊に抑制的に機能している事を明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経解剖学・神経病理学

キーワード：エイズ脳症, 14-3-3 蛋白質

1. 研究開始当初の背景

HIV脳症は、エイズ感染末期に高頻度に認められる中枢神経障害を伴う重篤な合併症で、エイズ治療、対策の中で未だに具体的な治療法が明らかにされていない重要な研究課題である。我々は、分子シャペロン14-3-3蛋白質が 1) エイズ脳症患者脳の神経細胞内でその発現が増強する事、2) 脳症の進行に伴い神経細胞が破壊されると脳脊髄液中に漏出して来る事から脳症発症におけるその役割に着目した。

2. 研究の目的

HIV 感染による中枢神経障害は、ウイルス自身か、ウイルスに感染したマクロファージ等の炎症性細胞が、血液脳関門 (BBB) を介して脳内に侵入し、これによって引き起こされる神経細胞死がその主な原因と考えられているが、その詳細なメカニズムは分かっていない。我々の研究目的は、エイズ脳症発症に重要なこの2つのプロセスでの14-3-3蛋白質の役割解析を行う事でそのメカニズムの詳細を明らかにする事にある。

3. 研究の方法

HIV 感染による中枢神経障害は、ウイルス自身か、ウイルスに感染したモノサイトやマクロファージ等の炎症性細胞が血液脳関門 (BBB) を介して脳内に侵入する事がその発症に不可欠と考えられている。そのため、HIV 感染による BBB の障害機構を明らかにする事は、エイズ脳症の病態解明やその治療法を確立する上で極めて重要な意味を持つ。BBB は主に脳血管内皮細胞と正常神経膠細胞から構成されているが、中でも脳血管内皮細胞間で形成されるタイトジャンクション(TJ)は、BBB のバリアー機能に重要である。最近、HIV-1 のウイルス蛋白である gp120 や Tat が、直接この TJ を障害し BBB の破綻を引き起こす事が報告されている。これらの知見を踏まえ、我々は先ず、ヒト脳微小血管内皮細胞 (HBMEC) 培養系の簡易 BBB モデルを作成し、gp120 による脳血管内皮細胞間の TJ 構築障害と、14-3-3 蛋白質によるその制御機構について解析を始めた。ヒト脳血管内皮細胞と神経膠細胞を内孔付のゼラチンコートの組織培養用インサートを挟んで培養、BBB の in vitro モデルを作成した。リコンビナント gp120 による BBB の破綻はインサートの透過性の亢進と免疫組織染色による形態学的変化から評価を行った。より生体に近い BBB モデルで解析する事で、14-3-3 蛋白質依存的な血管内皮細胞間の TJ 障害が実際の血液脳関門破綻にどの様に関与しているかを検討した。一方、これら血液脳関門の破綻によって脳内に侵入した HIV-1 ウイルスから切り出された gp120 は、神経細胞膜上のケモカインレセプターを介して神経細胞死を誘導する事が、エイズ脳症発症に重要である事がわかっている。今回の研究では、CXCR4 (α -ケモカインレセプター) を介して、gp120 が細胞死を引き起こす事が知られている HUVEC を神経細胞死評価のモデル細胞に用いて解析を行った。これまで我々は、gp120 によって細胞死誘導因子 Bad が脱リン酸化され細胞死が促進される事、14-3-3 蛋白質は、gp120 による Bad の脱リン酸化を抑制しこれと結合する事で gp120 による細胞死に抑制的に機能している事を明らかにしてきた。今回の研究では、gp120 による Bad の脱リン酸化メカニズムと、14-3-3 蛋白質によるその制御機構について解析を行った。

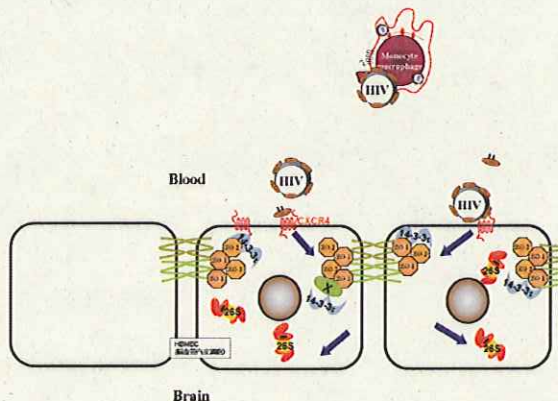
4. 研究成果

(1) HIV-1 gp120 による脳微小血管内皮細胞間のタイトジャンクション構築障害と 14-3-3 蛋白質の役割解析について。

gp120 による、血液脳関門を構成する脳微小血管内皮細胞間のタイトジャンクション構

築障害では、14-3-3 蛋白質が発現増強し、ZO-1, ZO-2 等のタイトジャンクション構成蛋白質のプロテアソームによる分解を阻害する事で、タイトジャンクションの崩壊を抑制している事を明らかにした。ヒト脳微小血管内皮細胞 (HBMEC) を gp120 で処理し、ZO-1, ZO-2 の発現量に与える影響をウェスタンブロットング並びに免疫蛍光染色で確認した。その結果、gp120 によって HBMEC 内の ZO-1, ZO-2 の著明な発現減少が認められた。一方、RT-PCR によるメッセンジャー RNA レベルではこれら分子の発現レベルに変化が認められなかった事から、蛋白の発現低下は転写レベルでの発現抑制ではなく分解亢進によるものが考えられた。そこで、あらかじめ HBMEC をプロテアソームの阻害剤で処理しておく、gp120 による ZO-1, ZO-2 の発現低下が認められなかった事から、gp120 はこれら TJ 構成蛋白質のプロテアソームによる分解を誘導する事で TJ 崩壊を引き起こしている可能性が考えられた。免疫組織染色による解析では興味深い事に、プロテアソームの阻害剤を処理すると、これら TJ 構成蛋白質の膜から細胞質の局在化が認められた。さらに、これらのプロセスの中で 14-3-3 蛋白質は、ZO-1, ZO-2 の膜への局在化に不可欠な分子であり、14-3-3 蛋白質の機能が損なわれると、gp120 によってこれらタイトジャンクション構成蛋白質は安定化を失い、膜から細胞質に移行し最終的にプロテアソームによって分解される事を明らかにした。今回得られた研究成果は、論文 (Journal of NeuroVirology, 2008)、学会等を通じて随時報告してきた。以上の成果を下記モデル図 1 に示す。

図 1

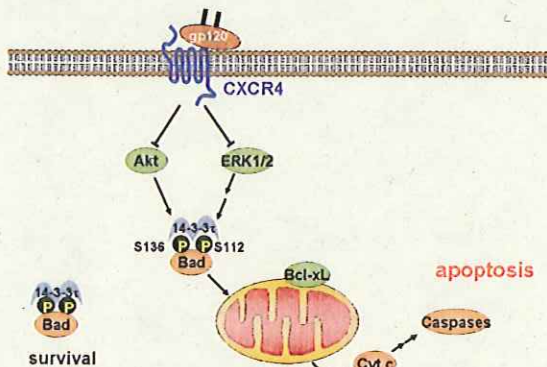


(2) gp120 による神経細胞死誘導メカニズムについての解析: gp120 による細胞死誘導因子 Bad の脱リン酸化と 14-3-3 蛋白質によるその制御機構の解析。

我々はこれまで、HIV-1 gp120 による神経細胞死誘導メカニズムは、gp120 によって Bad が脱リン酸化される事で、14-3-3 蛋白質から解離しミトコンドリアへ移行する事が重要である事を報告してきた。今回の研究では、gp120 による Bad の脱リン酸化機構と、14-3-3 蛋白質によるその制御機構の解明に焦点をあて解析を行った。

その結果、HIV-1 gp120 は Bad のセリン 112 番と 136 番目の脱リン酸化を引き起こすが、これは、gp120 による各々のセリン残基をリン酸化するリン酸化キナーゼ (136 番目は、PI3K, Akt, 112 番目は、Raf-1, ERK, P90RSK) の不活性化によるものである事が明らかとなった。14-3-3 蛋白質の役割はこれらキナーゼに直接的、もしくは間接的に作用する事でこれらキナーゼの活性を維持し、Bad のリン酸化を促進する事で gp120 による神経細胞死に抑制的に機能している事を新たに見出した。今回得られた、gp120 によるタイトジャンクションの構築障害と神経細胞死誘導の詳細は、今後エイズ脳症発症機序解明の重要な手掛かりとなる事が期待される。以上の成果を下記モデル図 2 に示す。

図 2



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 1 件)

Shinichi Nakamuta, Hiroshi Endo, Youichiro Higashi, Aoi Kousaka, Hiroshi Yamada, Mihiro Yano and Hiroshi Kido.
HIV-1 immunodeficiency virus type1 gp120-

mediated disruption of tight junction proteins by induction of proteasome-mediated degradation of zonula occludens-1 and -2 in human brain microvascular endothelial cells

Journal of NeuroVirology 14, pp186-195, 2008.
査読有

[学会発表] (計 4 件)

① 矢野仁康、遠藤弘史、木戸 博

Ibuprofen Increases Cisplatin-induced Apoptosis in Lung Adenocarcinoma By Suppressing Hsp70.

第 31 回日本分子生物学会年会、第 81 回日本生化学会大会合同大会、2008 年 12 月 12 日、神戸

② Mihiro Yano.

The biological functions of 14-3-3 as a stress protein

Gordon Research Conferences, 2008 年 2 月 26 日、米国、Ventura

③ Hiroshi Endo, Mihiro Yano, Hiroshi Kido.

Diclofenac exerts anti-tumor activity via 14-3-3 proteins-dependent activation of mitochondrial apoptosis pathway

Gordon Research Conferences, 2008 年 2 月 25 日、米国、Ventura

④ 遠藤弘史、矢野仁康 木戸 博

Diclofenac exerts anti-tumor activity via 14-3-3 proteins-dependent activation of mitochondrial apoptosis pathway.

第 30 回日本分子生物学会年会、第 80 回日本生化学会大会合同大会、2007 年 12 月 11 日、横浜

[図書] (計 1 件)

① Mihiro Yano et al.

The Molecular Chaperones in the Ubiquitin-Proteasome System.

The Ubiquitin Proteasome System in the Central Nervous System, From Physiology to Pathology.

Mario DiNapoli, Cezary Wojcik

Nova Biomedical Books.

Nova Science Publishers, Inc.

pp207-226, 2007.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

矢野 仁康(YANO MIHIRO)

徳島大学・疾患酵素学研究センター・准教授

研究者番号：40304555