

## 学位論文題名

## Molt-4 / HIV-1 細胞に導入されたウシ Protein Kinase C 分子種による HIV-1 ゲノム発現の促進

## 学位論文内容の要旨

## 1. 緒言

Protein kinase C (PKC) は哺乳類の組織に見出されるタンパク質リン酸化酵素の一種で、 $Ca^{2+}$ 、phosphatidylserine 及びdiacylglycerol の存在下でATP の $\gamma$ -リン酸基を serine 及びthreonine の水酸基へ転移する反応を触媒する。PKCの分子構造の解析が進んだ結果、PKC には構造的に類似した少なくとも10種類の分子種が存在することが知られている。この内、PKC $\alpha$ は殆ど全ての組織、細胞に普遍的に認められることから、細胞の生存、維持に必須の機能に関与していることが示唆される。PKC $\beta$ 1 及び $\beta$ 2 は脾臓及び多くの血球系の細胞株に存在が報告されている。一方、PKC $\gamma$ は中枢神経組織のみに発現しており、他の末梢組織や培養細胞ではその存在は報告されていない。また、各々の分子種の基本構造は動物種を越えて極めてよく保存されていることが判明している。即ち、何れのPKC分子種も各クローン間で互いに構造の保全された4領域(C1~C4) と、構造の異なる5領域(V1~V5) とから成る共通構造を持ち、この内、C1 及びC2 を含む領域が酵素活性の調節に關与する調節ドメインであり、C3 及びC4 を含む領域がタンパク質リン酸化酵素活性を持つprotein kinaseドメインであると考えられている。PKC の生理機能についてはこれまでに、細胞の成長や分化の調節の他、各種サイトカインの産生等に関与している可能性が報告されている。これらの報告はいずれもPKC群に対するactivator やinhibitor を使用した結果に基づいており、各々の分子種に特異的な挙動を観察したのではなく、種々の生体反応への各分子種の関与を特定することは困難であった。そこで今回は、PKC の各分子種が持つ特異的な生理活性の差異を検討することを目的として、まず3種のPKC分子種(PKC $\alpha$ 、 $\beta$ 1、 $\gamma$ ) を分離精製し、これをHIV-1感染リンパ球に導入した。次いでウイルスゲノム及び抗原の発現並びに各種サイトカイン産生をパラメーターとして、各PKC分子種の生理活性の差異について観察を行った。

## 2. 材料及び方法

## 1) PKC分子種の精製

ウシ脳より4℃下でポリトロンによるホモジネートを調製し、これを陰イオン交換カラムクロマトグラフィー、疎水性樹脂カラムクロマトグラフィー、分子ふるいカラムクロマトグラフィーの順に掛け、最後にL-threonine をリガンドとした10原子のスペーサー長をもち、500U/mlのPKC結合能を有するアフィニティーカラムクロマトグラフィーに掛けて、PKC分子種の分離精製を実施した。

## 2) HIV-1感染リンパ球へのPKC分子種の導入

受容細胞へのダメージの少なさ、目的物質を定量的に導入できること、装置の簡便さ及び技術的完成度といった観点から、赤血球ゴースト法を用いて実施した。HIV-1感染

リンパ球としてはMolt-4/HIV-1 を用いた。

### 3) PKC 導入後の観察項目

PKC を導入したMolt-4/HIV-1 の培養上清中の以下の項目について経時的に観察し、各々の観察項目と導入したPKC分子種の関連性について検討した。なお、PKC inhibitor であるstaurosporine 及び抗TNF- $\alpha$ 抗体を使用して、同様の観察を行った。

#### ①HIV-1 ゲノムの発現(cDNA titer の変動)

guanidiumthiocyanate 法により経時的にHIV-1 のRNA を抽出し、これより逆転写酵素によってcDNA を得た。このcDNA を3倍段階希釈してPCR に供し、HIV-1 由来のDNA が検出されたcDNA の最大希釈倍率(cDNA titer) をもって、その時点でのHIV-1量の指標とした。なお、この操作には、sence primer としてはSK29(LTR)、SK38(gag) 及びSK68(env) を、またantisence primer としてはSK30(LTR)、SK39(gag) 及びSK69(env) を使用した。

#### ②HIV-1 P24抗原の発現

経時的に採取した細胞培養上清より、ELISAキット(HIV抗原・EIAII「アボット」、DAINABOT Co., Tokyo) を用いてP24抗原の定量を行った。

#### ③TNF- $\alpha$ 及びIL-6 の産生

経時的に採取した細胞培養上清より、ELISA キット(TNF- $\alpha$  EASIA 及びIL-6 ELISA、TFB Co., Tokyo) を用いてTNF- $\alpha$  及びIL-6 の定量を行った。

## 3. 結果

### 1) PKC の精製

ウシ脳1個(約500g) より、PKC $\alpha/\beta$ 1 は5~10mg、またPKC $\gamma$ は1~3mg を精製した。比活性は精製前の各々75 及び115倍であった。一方、今回、PKC $\beta$ 2 は得られなかった。

### 2) PKC 導入後のMolt-4/HIV-1 上清中の各種パラメーターの変動と、PKC分子種の関連について

PKC $\alpha/\beta$ 1 を含む分画をMolt-4/HIV-1 に導入したところ、細胞培養上清中にTNF- $\alpha$  の産生を認め、これに引き続いてHIV-1 由来のP24抗原量及びcDNA titer の増加を観察したが、抗TNF- $\alpha$ 抗体処理により、これらの発現量は低下した。また、PKC活性阻害剤であるstaurosporine 処理により、TNF- $\alpha$ は検出限界以下のレベルにまで低下し、更にP24抗原量及びcDNA titer も低下した。一方、PKC $\gamma$ を含む分画ではTNF- $\alpha$ を始め、HIV-1産生を促進する効果は認めなかった。

なお、IL-6 の産生は、いずれの分画の融合時についても観察されなかった。

## 4. 考察

ウシ脳より精製したPKC分子種の内、 $\alpha$ または $\beta$ 1分子種にはTNF- $\alpha$ 産生を促すことにより、autocrine 的にHIV-1 の産生を促進する作用を有するが、 $\gamma$ 分子種はHIV-1産生促進には直接的には関与していないことが明らかとなった。また、今実験において、各PKC分子種をアフィニティークロマトグラフィー等によって分離精製し、これを受容細胞に導入してサイトカインを始めとした各種生理活性パラメーターを観察することにより、各分子種の生理的機能を特定するという手法が、PKC分子種の生理機能的差異の解明に有効であることが確認された。

## 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 皆 川 知 紀

副 査 教 授 生 田 和 良

副 査 教 授 菊 池 九二三 (理学研究科)

学 位 論 文 題 名

### Molt-4 / HIV-1 細胞に導入されたウシ Protein Kinase C 分子種による HIV-1 ゲノム発現の促進

Protein kinase C (PKC) は哺乳類の組織中に見出されるタンパク質リン酸化酵素の一種であり、 $\text{Ca}^{2+}$ 、phosphatidylserine 及びdiacylglycerol の存在下でATP の $\gamma$ -リン酸基をserine 及びthreonine の水酸基へ転移する反応を触媒する。PKC の遺伝子解析が進んだ結果、PKC には分子構造が類似した少なくとも11種類の分子種が存在し、更に、各々の分子種の基本構造は動物種を越えて極めてよく保存されていることが判明している。何れのPKC分子種もその基本構造として酵素活性の調節に関与する調節ドメイン及びタンパク質リン酸化酵素活性を持つprotein kinase ドメインを持つが、その組織内分布は分子種によって異なることが知られている。PKC の生理機能についてはこれまでに、細胞の成長や分化の調節の他、各種サイトカインの産生等に関与している可能性が報告されている。これらの報告はいずれもPKC分子種を単離することなく、activator 及びinhibitor を添加した際の結果に基づいており、各々の分子種に特異的な挙動を観察したものではなかった。そのため、種々の生体反応への各分子種の関与を特定することは困難であった。そこで今回は、PKC の各分子種が持つ特異的な生理活性の差異を検討することを目的として、まず3種のPKC分子種 (PKC $\alpha$ 、 $\beta$ 1 及び $\gamma$ ) を分離精製し、これをHIV-1感染リンパ球に導入した。次いでウイルスゲノム及び抗原の発現並びに各種サイトカイン産生をパラメーターとして、各PKC分子種の生理活性の差異について観察を行った。

まず、ウシ脳を4℃下でホモジネートし、次にこれを陰イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、分子ふるいクロマトグラフィーの順に掛け、PKC $\alpha$ 、 $\beta$ 1、 $\beta$ 2 及び $\gamma$ を含む画分を得た。次に、更にPKC分子種を分離精製する目的でL-threonine をリガンドとした10原子のスペーサー長を持つ、アフィニティー担体の調製を実施した。このアフィニティー担体は500U/ml のPKC 結合能を有し、これを使用したクロマトグラフィーにより、PKC $\alpha$ 及び $\beta$ 1 を含有するPeak A 及びPKC $\gamma$ を含むPeak B を得た。ここまでの操作により、ウシ脳500g より、PKC $\alpha$ / $\beta$ 1 は5~10mg、またPKC $\gamma$ は1~3mg を精製した。比活性は精製前の各々75 及び115倍であった。一方、PKC $\beta$ 2 は元々の含有量が少量であったため、今回単離できなかった。

次に、Peak A 及びB を各々赤血球ゴースト法を用いてHIV-1感染リンパ球であるMolt-4 / HIV-1 に導入した後、細胞培養上清中のHIV-1 ゲノム (cDNA titer) 及びP24抗原の発現の他、TNF $\alpha$ の産生について経時的に観察した。その結果、PKC $\alpha$ / $\beta$ 1 を含む分画をMolt-4 / HIV-1 に導入した場合には、細胞培養上清中にまずTNF $\alpha$ の産生亢進を認め、これに引き続いてHIV-1 由来のP24抗原量及びcDNA titer の増加を観察した。また、PKC活性阻害剤であるstaurosporine を添加することにより、これらの発現量は低下した。更に、TNF $\alpha$ がHIV-1 産生に及ぼす影響を確認する目的で、細胞培養上清中に抗TNF $\alpha$ 抗体を添加す

ると、P24抗原量及びcDNA titer は低下した。一方、PKC $\gamma$ にはTNF $\alpha$ をはじめ、HIV-1 産生を促進する活性は認めなかった。

以上より、ウシ脳より精製したPKC分子種の内、 $\alpha$ または $\beta$ 1分子種にはTNF $\alpha$ 産生を促すことにより、autocrine 的にHIV-1 の産生を促進する作用を有するが、 $\gamma$ 分子種はHIV-1 産生促進には直接的には関与しないことが明らかとなった。また、PKC分子種の生理機能的差異の解明を行うに当たり、各PKC分子種をアフィニティークロマトグラフィー等によって分離精製し、次に、これを受容細胞に導入してサイトカインをはじめとした各種生理活性パラメーターを観察するという手法が有効であることを示し得た。

講演に際し、副査よりlatent な細胞系を選択しなかった理由、使用したPKC inhibitor 及び設定したコントロールの妥当性、PKC のクロマト精製操作の方法論及びPKC $\alpha/\beta$ 1 の HIV-1 産生への関与方式についての質問があった。これらの質問に対しては各々、latent な細胞系が内在するinhibition factor を排除して、導入したPKC 分子種の影響を評価する目的があったこと、staurosporine の $K_i$ 値はE7 の1/8,500 以下であり、他のkinase 類への影響を最小限に抑えることができること、コントロールの細胞中に含有されるPKC による影響は無視できることが確認されたこと、クロマト操作のピーク分画は更に密にすることで、より分離能の高いクロマト操作が可能となりうること、及びPKC $\alpha/\beta$ 1 はHIV-1 の産生速度を速める効果を有すること、等の回答を行った。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、また研究者として誠実かつ熱心であり、研究生としての研鑽等も併せ、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。