

ヒト白血病ウイルス PX 遺伝子による細胞癌遺伝子の発現調節機構

1. 目的

「がん遺伝子」はがんを起こす遺伝子として研究されてきたが、最近ではがんのみならず細胞の増殖と分化に中心的な役割を果たす遺伝子として注目されている。しかしながら、「がん遺伝子」がどのように働き、どのように細胞を癌化させるかは未だに明らかでない。本事業は、ウイルスによって起きるヒトがんの発症のメカニズムを直接研究し、ヒトの発症を分子レベルで解明しようとするものである。ヒト白血病ウイルス (HTLV-1) の特異遺伝子 PX がどのように働いて、細胞の遺伝子を活性化あるいは抑制するかについて解析し、ヒト白血病の発症メカニズムを明らかにすることを目的とする。また本白血病ウイルスに特異的な性質を利用し、ウイルス感染の予防や白血病の治療に貢献することも目的とする。

この研究はヒトがどのようにがんを発症するかを理解するうえに大きく貢献するだけでなく、遺伝子の活性化及び発現制御機構の一般的な理解にも重要な示唆を与えるものである。

2. 組織

昭和 63 年度～平成元年度

吉田光昭	癌研究会ウイルス腫瘍部	部長
藤沢順一	〃	研究員
渡辺俊樹	〃	〃
伊藤道恭	〃	嘱託研究員

平成 2 年度

吉田光昭	癌研究会ウイルス腫瘍部	嘱託部長
藤沢順一	東京大学医科学研究所 細胞化学研究部	助手
平井 洋	〃	〃

3. 計画及び材料と方法

従来の研究で、ヒト白血病ウイルス (HTLV-1) が成人 T 細胞白血病 (ATL) の原因であり、HTLV-1 遺伝子のうち PX 領域に存在する Tax 遺伝子がウイルスや細胞の遺伝子を活性化することを見出しているため、この遺伝子活性化機構について解析した。Tax 蛋白はウイルスの 21bp エンハンサーや NF- κ B 結合部位として知られるエンハンサーを活性化するが、エンハンサーには結合しない。そこでウイルスの 21bp エンハンサーに直接結合する因子について検討し、その遺伝子を分離しその性質と機能を解析した。続いてこのエンハンサー結合因子と Tax 蛋白の相互作用について検討した。エンハンサー結合因子の解析にはエンハンサー結合能を指標にした cDNA クローニングを行い、その構造と性質を解析し、その機能についても検討を加えた。またこれら DNA 結合因子と Tax 蛋白との相互作用については、複合体の DNA 結合能や免疫沈降法等を用いて検討した。

4. 成果

(1) エンハンサー結合因子 TREB の DNA クローニング

Tax 蛋白により遺伝子発現を活性化するには、ウイルスのエンハンサー21bpが必要である。この塩基配列に直接する蛋白性因子を同定する目的で、HTLV-1 感染細胞 HUT102 より λ gt11 を用いて cDNA を作成し、 ^{32}P 標識した 21bp エンハンサーに結合するクローンを検索した。その結果 11 個の cDNA クローンが分離されたが、これらはいずれも Tax 遺伝子ではなく、細胞由来の cDNA クローンであった。これらを相互のハイブリダイゼーションでグループ分けすると 4 種類のクローンに分類することができた。新しいクローン 3 種類を TREB (Tax Responsible Enhancer Binding Protein) と呼び TREB5、TREB7、TREB36 とした。1 種は既知の CREB であった。

(2) エンハンサー結合因子 TREB の構造

得られた 21bp 結合因子の cDNA について完全長の cDNA を分離したところ、TREB5 は 2.0kb、TREB7 は 4.3kb、TREB36 は 2.5kb であった。これらの各々は塩基性アミノ酸ドメインに続くロイシンジッパー構造を持ち、複数のリン酸化部位を持つ蛋白であることが示された。この構造的特徴から TREB は 2 量体を形成し、エンハンサーDNA に結合し、その活性は PKA、PKC、CK-II 等のリン酸化酵素によって調節される可能性が示唆された。しかし、これらは Tax により活性化されるとされる NF- κ B とは異なり、また既知のロイシンジッパー構造を持つ FOS や JUN とはホモロジーがなかった。

(3) TREB の発現と作用

TREB の作用を検討する基礎として、その発現をノーザン法により検討したところ、調べた限りすべての細胞株において構成的な mRNA の発現が観察され、その発現には細胞特異性がなかった。このことは Tax 蛋白による 21bp エンハンサーの活性化が多くの細胞株で観察されることと一致する。TREB 発現ベクターを細胞に導入し過剰発現させると、TREB5 の場合は 21bp エンハンサーを強力に活性化したが TREB36 は遺伝子発現を強く阻害した。しかしこれらの効果は細胞株特異的で、細胞によって異なる反応を示した。

(4) TREB 蛋白と Tax 蛋白の関係

エンハンサーに結合する TREB 蛋白群と Tax 蛋白が相互作用し、転写の活性化を行うことが想定されたので、TREB 蛋白と Tax 蛋白の相互作用を調べた。その目的で *in vitro* 翻訳系あるいは大腸菌で作成した各蛋白、あるいは細胞内に発現している各蛋白を用いて、DNA 結合能、抗体による共沈を指標に検討を加えているが、現在までのところ強い相互作用や複合体の形成は確認されない。

理化学研究所の石井俊輔博士との共同研究で、TREB7 は CREBP-1 と同じ蛋白であり、この蛋白がアデノウイルス E1A による遺伝子活性化にかかわることを証明したが、Tax による活性化には効果を示さなかった。

5. 考察

Tax による細胞及びウイルス遺伝子活性化の分子機構を、外来性のウイルスが細胞のがん化を引き起こす最初のステップとして研究を進めた。Tax の細胞側標的因子としてクローニングし、構造解析を行った 3 種の TREB はエンハンサー結合因子であり、転写活性化あるいは抑制因子であることを明らかにし、Tax の標的因子として充分考えられる特質を

確認した。しかし TREB は調べた限りの細胞株で構成的に発現しており、これらの作用を解析するには不都合な状況であることも明らかになった。TREB はロイシンジッパー蛋白で、Taxにより活性化されると考えられている NF- κ B とは全く異なる蛋白であることが示されたわけで、Tax の活性化には大別して 2 種以上のルートがあるらしいことが明らかになった。一方でこれらの因子 TREB は共通のエンハンサーに結合するにもかかわらず、細胞株特異的に遺伝子発現を活性化あるいは抑制することから、組織特異な転写因子として機能していることが考えられる。この点から考えれば HTLV-1 が T 細胞の白血病のみでなく神経の病気である HAM やリュウマチに類似する関節炎等全く異なる組織の病気にも関係することから興味を持たれる。しかしながら Tax とこれら TREB の転写因子との直接の相互作用を証明できなかったのは残念であるがこの点は現在も解析を進めている。

6. 発表

Fujisawa, J., Toita, M. and Yoshida, M. A unique enhancer element for the *trans*-activator (p40^{tax}) of human T-cell leukemia virus type I that is distinct from cyclic AMP- and 12-*O*-Tetradecanoylphorbol-13-acetate-responsive elements. *J. Virol.*, 63, 3234-3239 (1989).

Yoshida, M. and Seiki, M. Molecular biology of HTLV-1: Biological significance of viral genes in its replication and leukemogenesis. In "Retrovirus Biology and Human Disease" (ed. by Gallo, R.C. and Wong-Staal, F.) Marcel Dekker, Inc., New York and Basel, 161-186 (1990).

Yoshimura, T., Fujisawa, J. and Yoshida, M. Multiple cDNA clones encoding nuclear proteins that bind to the *tax*-dependent enhancer of HTLV-1: all contain a leucine zipper structure and basic amino acid domain. *EMBO J.*, 9, 2537-2542 (1990).

Yoshida, M., Inoue, J. and Fujisawa, J. Control of cellular and HTLV-1 gene expression by regulatory genes (*tax* and *rex*). *Human Retroviruses*, 119, 1-12 (1990).

Maekawa, T., Matsuda, S., Fujisawa, J.-I., Yoshida, M. and Ishii, S. Cyclic AMP response element-binding protein, CRE-BP1, mediates the E1A-induced but not the Tax induced *trans*-activation. *Oncogene*, 6, 627-632 (1991).

Fujisawa, J., Toita, M., Yoshimura, T. and Yoshida, M. The indirect association of human T-cell leukemia virus tax protein with DNA results in transcriptional activation. *J. Virol.*, 65, 4525-4528 (1991).