

## 教室紹介

### 関西医科大学 微生物学講座

藤澤順一

〒570-8506 守口市文園町 10-15

E-mail: fujisawa@takii.kmu.ac.jp

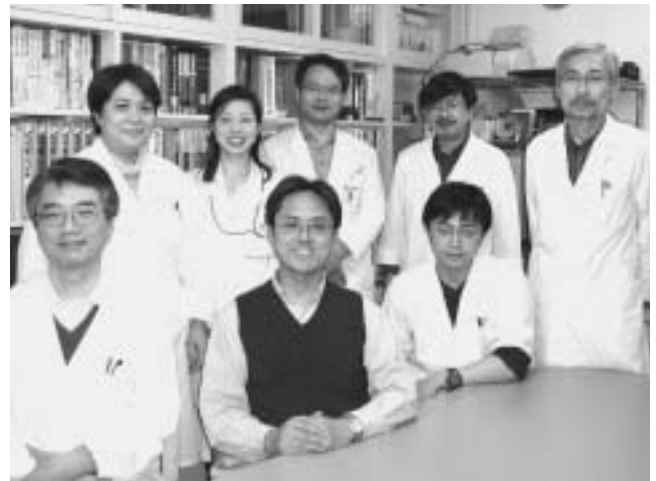
http://www3.kmu.ac.jp/microbiol/

#### はじめに

関西医科大学は、昭和3年に西日本で最初の女子医専として創設された大阪女子高等医学専門学校を前身としており、微生物学講座も大学と同等の古い歴史を持ちます。関西医科大学の大きな特徴の一つは、私立単科医科大学の中でも、とりわけ研究活動に力を入れていることです。限られた研究資源を有効に活用するため、古くから共同実験施設が設置され、研究者の共同管理の下、計画的に最新の先端研究機器が毎年拡充整備されています。これまでも、DNAシーケンサー、共焦点蛍光顕微鏡、TOF-MAS、FACS等々、それぞれの時期における最新の研究機器を専属技師のサポートのもと、自由に利用できる環境が確保されています。平成15年度に、文部科学省“21世紀COEプログラム”の医学分野において、COE研究教育拠点の一つに選ばれたのも、これら研究環境の賜物と考えています。

私は、平成6年から微生物学講座を担当しています。“講座”の名称も今では希少価値となっていますが、学生教育が主たる活動の一つである限り、却って明快な感覚かなとも感じています。ただ、スタッフは皆、ウイルス関連の研究に従事しているにもかかわらず、教育面では細菌学の講義・実習も担当します。また、私はこれまで、京都大学ウイルス研究所（大学院、川出由己教授）、チューリヒ大学（C. Weissmann教授）ではインターフェロンの研究、その後は（財）癌研究会癌研究所および東京大学医科学研究所（吉田光昭教授）でHTLV-1の研究と、ウイルス学、それもどちらかというと分子生物学の分野を中心に活動してきました。そのような私が、微生物学の講義など“おこがましい”限りなのですが、私自身にとりましては、ゲノム、細胞生物学、免疫学等々、幅広い領域において進歩が著しい、細菌学を含めた微生物学全般の“勉強”をすることは、生物学および医学としての新たな視点を獲得することが出来、研究の展開に少なからず役立っていると感謝しております。

研究は現在も、この20数年連れ添ったHTLV-1を中心に進めています。教室スタッフの専門にあわせ、HIV-1も含めたヒトレトロウイルスあるいはRNA動態制御を対象としたものに広がっています。研究手法はやはり分子生物学的なものが中心ですが、この数年、個体レベルでの解析を展開しており、マウスを使った実験も多くなってきて



います。

#### 主な研究テーマ

教室の研究テーマは大きくHTLV-1とHIV-1の2本柱で成り立っています。

HTLV-1の研究領域は、日本人研究者の貢献が非常に大きい分野です。また、本邦には120万人のHTLV-1感染者が存在し、5～10%の生涯発症率で悪性の白血病であるATLの発症に至っている現状を鑑みると、今後、ATLの発症予防と治療法確立に向けた研究を、この日本において推進していく必要があると考えています。そこで、近年は、個体レベルでのウイルスの制御を中心に研究を展開させようと努力しています。

HIV-1の研究に関しては、これまで、木村富紀助教授を中心としたRevの機能解析から出発し、現在ではRNAの核外輸送の細胞生物学へと広がりを見せています。また、以前我々の手により、HTLV-1感染細胞内の過剰なチロシンリン酸化の標的として同定したRNA結合蛋白Sam68がRev機能を相補する役割を持つことが報告されました。そこで、RNA動態制御を介したヒトレトロウイルス複製調節と細胞機能の調節との接点に注目し、講師の伊藤道恭がSam68の機能解析を進めています。一方、助手の古田里佳（現・日赤血液センター）と西川正雄が始めたHIV-1侵入阻害剤の作用機序の解析は、現在、蛍光共振エネルギー転移（FRET）の原理を応用した、HIV-1の細胞侵入過程のリアルタイム解析へと展開しています。

#### 1. 個体レベルでのHTLV-1遺伝子発現抑制機構の解析

HTLV-1は主に母乳を介して乳幼児期に感染し、感染者は数十年の潜伏期を経て5～10%の確立でATLを発症し

ます。このATL発症にHTLV-1のTax遺伝子が関与していることは、*in vitro*での細胞トランスフォーメーション能等、かなりのレベルで例証されていますが、実際のHTLV-1感染者の体内においては、ウイルスの発現は抑制されています。ところが、感染細胞を体外に取り出し*ex vivo*での培養に移すと、数時間以内にウイルスの発現が再開されることから、個体内においては何らかの一過的な発現抑制機構が働いていると、以前より考えられていました。

一方、HTLV-1感染細胞に対するCTLの多くが、Taxを標的としていることが明らかとなっています。これらの事実は、HTLV-1感染非発症者の個体内においては、ウイルスの発現と抗Tax CTLを中心とした宿主免疫機構とのバランスが成立しており、これがATL発症に至るまでの長い潜伏期を説明すると考えられます。この個体内におけるウイルスの発現制御を解析する目的で、私たちは、マウスTリンパ腫細胞であるEL4にHTLV-1の転写調節下にTaxを発現するレトロウイルスを組み込ませ、これをマウスに移植する系を開発しました。

この系を用いてこれまでに、(1) Tax発現プラスミドが抗Tax CTLを誘導するDNAワクチンとして作用し得ること、(2) マウス個体内においてもヒト感染個体内と同様に、ウイルス遺伝子の一過的な発現抑制が観察されること、(3) CD8 (+) T細胞やNK細胞を除去、あるいは、種々のサイトカインやこれらに対する抗体の投与においても、ウイルス遺伝子の発現抑制に変化が認められないこと、が明らかになっています。

現在、個体内の低酸素状態がウイルス遺伝子の発現抑制に関与していることを示す結果を得ており、ウイルスの潜伏感染における低酸素シグナルの役割という、新しいパラダイムの展開に意欲を燃やしています。また、転写調節の機構に関しても、転写因子→ヒストン修飾→転写活性化という単純なschemeでは説明できない実態が明らかとなっており、今後の解析が期待されています。

## 2. HTLV-1 感染モデルマウスの開発

Tax発現EL4細胞を用いた系は、あくまでマウスの免疫系を背景にしたものであり、また、感染性のHTLV-1を標的としたものでもありません。そこで、実験系を出来るだけヒト感染個体に近づけるため、現在、免疫不全(SCID)マウスの骨髄内にヒト臍帯血由来CD34 (+)細胞を移植することで、80%以上の効率でヒト血球細胞が定着したマウス(SCID-hu)を作製し、これにHTLV-1を感染させる試みをおこなっています。これまでに、SCID-huへのHTLV-1の感染を確認しており、今後、感染の定量化やクローナリティの解析を進め、抗Tax DNAワクチン等、ウイルス感染細胞数の抑制を介したATLの発症予防法の開発に結びつけたいと考えています。

一方、免疫抑制等の方法で、このSCID-hu感染系において感染細胞数を逆に増加させることが出来た場合、現在、

ATLの治療法として有望視されている骨髄移植による治療における最大の課題であるGVHDの克服に、実験動物系として利用できる可能性を期待しています。

## 3. RNA 結合蛋白 Sam68 の機能解析

HTLV-1感染細胞で亢進しているチロシンリン酸化の標的蛋白を解析したところ、RNA結合蛋白Sam68が同定されました。そこで、トリDT40細胞を用いてトリSam68遺伝子のknock-outをおこなうと、細胞周期のG2期の延長が観察され、Sam68のRNA結合活性を介した細胞増殖制御の可能性が示唆されました。また、Sam68が結合するRNAの探索では、がん細胞での発現異常が知られるhnRNP A2/B1や $\beta$ -actinのmRNAが標的RNAとして同定されました。一方、海外の他のグループからは、Sam68がHIV-1のRev機能を相補するという報告がなされ、ヒトレトロウイルスの複製調節と細胞の増殖調節の接点にSam68が位置する可能性に興味が持たれています。現在、これまでに同定した標的mRNAの発現調節を軸に解析を進めています。

## 4. HIV-1 Rev によるウイルス RNA 核外輸送機構の解析

RevによるHIV-1 gag mRNAの核外輸送を形態学的に追跡したところ、gag mRNAが核内において線状に分布することを見いだしました。さらにこのgag mRNAは、Rev依存的に形成された核内アクチン繊維束に、Rev/CRM1/Ranとともに局在していたことから、アクチン重合阻害剤を添加したところ、gag mRNAの核外輸送が停止しました。現在、アクチン繊維束を介したRNA輸送という新しいパラダイムの確立に大変期待をしています。

また、Rev機能解析の過程で観察していた、Rev過剰発現によるルシフェラーゼベクターの発現抑制を手がかりに、 $\alpha$ -インターフェロンmRNAの核外輸送がRevにより抑制されることを見いだしました。さらに、 $\alpha$ -インターフェロンmRNAの核外輸送も、gag mRNAと同様、CRM1依存的であることが明らかとなり、同輸送系の一般性と共に、宿主の抗ウイルス作用に対抗するRevの役割に関しても興味を持たれます。

## 5. HIV-1 細胞侵入過程のリアルタイム解析

HIV-1の標的細胞への侵入には、Envタンパク質の標的細胞表面CD4およびケモカイン受容体への段階的な結合と、その構造変化が必要と考えられています。そこで、ケモカイン受容体CCR5の点突然変異体とルシフェラーゼ発現組換えHIV-1レンチウイルスベクターを用いて、CCR5の膜貫通領域がウイルスの侵入に重要な役割を果たすこと、およびHIV-1侵入阻害剤がこれら膜貫通領域に作用することを明らかにしました。

一方、それぞれ異なった蛍光蛋白を融合させたCD4およびCCR5を発現させた細胞とEnv発現細胞との融合過程を、蛍光共振エネルギー転移(FRET)の原理を用いて、経時的に解析する系の構築に成功しました。今後、種々の

CCR5 点突然変異体と FRET の系を用いて、HIV-1 の細胞への侵入に必要な CCR5 の構造変化過程の解明および必要なアミノ酸配列の同定を進め、新たな標的構造を持つ侵入阻害剤の開発に有用な知見を提供していく予定にしています。

#### おわりに

本学は私立単科医科大学であり、卒業生のほとんどが臨

床医を志しています。さらに周辺には数多くの一流大学院大学が存在し、基礎医学系大学院生の確保が大変難しい状況にあります。限られたスタッフで、研究の大きな展開を図るには、他の研究グループと連携していく以外、方策はないと考えております。従って今後とも、少しでも我々の研究と接点をお持ちの研究者の方々との議論や共同研究を、積極的に進めていきたいと考えています。