

Induction of Cellular fos and jun Related Genes by the Transcriptional Factor, tax Protein, of Human T Cell Leukemia Virus Type I

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8242

ヒトT細胞性白血病ウイルスI型 (HTLV-I) の 転写因子 tax 蛋白質による宿主細胞 fos, jun 関連遺伝子群の発現誘導

金沢大学医学部内科学第三講座 (主任: 松田 保教授)

仁 木 健 雄

(平成2年12月27日受付)

ヒトT細胞性白血病ウイルスI型 (human T cell leukemia virus type I, HTLV-I) の産生する tax 蛋白質はウイルス自身の遺伝子だけでなく宿主である細胞側の遺伝子の転写をも活性化する。そのため tax 蛋白質は成人型T細胞性白血病 (adult T cell leukemia, ATL) の発症に中心的役割を果たしていると考えられてきたがその作用機構はまだ十分解明されていない。今回この tax 蛋白質によって c-fos, fra-1, fra-2, c-jun, jun-B, jun-D, インターロイキン 2 受容体 α (interleukin 2 receptor α , IL-2R α), インターロイキン 2 受容体 β (interleukin 2 receptor β , IL-2R β) といった細胞増殖に係わりのある遺伝子の発現が誘導されるか否かをノーザンブロット法にて検討した。まず, HTLV-I 感染細胞株では非感染細胞株に比べて fra-2 を除くすべての遺伝子のメッセンジャー RNA (messenger RNA, mRNA) の増加が認められた。次にこれらの mRNA の増加が tax 蛋白質によって誘導されたものであるか否かを確認するため, Jurkat 細胞に tax 蛋白質産生プラスミドを形質導入した JPX-9 細胞を用いて検討したところ tax 蛋白質の発現とともに c-fos, fra-1, c-jun, jun-D 遺伝子の mRNA が迅速かつ一過性に, IL-2R α 遺伝子の mRNA がゆっくりかつ持続性に誘導された。一方 fra-2, jun-B, IL-2R β 遺伝子の mRNA は誘導されず, 感染細胞株でみられた jun-B, IL-2R β 遺伝子の mRNA の増加は HTLV-I 感染による細胞の二次的変化と思われた。tax 蛋白質によって c-fos, fra-1, c-jun, jun-D, IL-2R α 遺伝子の発現が誘導されたことは通常は抗原特異的な刺激によって誘導される T 細胞の増殖と機能発現が HTLV-I 感染により抗原刺激なしに誘導される可能性を示唆している。この T 細胞の増殖及び機能に関する異常は白血病発症の少なくとも初期過程に重要な役割を果たしていると考えられる。tax 蛋白質による c-fos, fra-1, c-jun, jun-D 遺伝子の誘導は一過性であったが, HTLV-I 感染細胞株においてこれらの遺伝子が持続的に発現していること, HTLV-I 感染から ATL 発症までに長い年月を要することから, 他のがん原遺伝子の活性化やがん抑制遺伝子の不活性化などさらに何段階かの異常が蓄積して始めてこれら細胞増殖に深く係わる遺伝子群の持続的活性化ひいては細胞のがん化が生ずるものと推測される。

Key words adult T cell leukemia, human T cell leukemia virus type I, tax

成人型 T 細胞性白血病 (adult T cell leukemia, ATL) を引き起こすヒト T 細胞性白血病ウイルス I 型

(human T cell leukemia virus type I, HTLV-I) はヒトで発見された最初のレトロウイルスであり¹⁾,

Abbreviations: ATL, adult T cell leukemia; cDNA, complementary DNA; CHX, cycloheximide; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid 2Na; GM-CSF, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; HTLV-I, human T cell leukemia virus type I; IL-2, interleukin 2; IL-2R α , interleukin 2 receptor α ; IL-2R β , interleukin 2 receptor β ;

またヒトで白血病との因果関係がはっきりしている数少ないウイルスでもある⁹⁾。この HTLV-I は通常の強発がん性レトロウイルスと異なりがん遺伝子を持たない。また白血病細胞でのプロウイルスの組み込み位置が患者ごとに異なるため、組み込み部分とは無関係にトランスに作用し腫瘍化に関与するウイルス性因子の存在が疑われた⁹⁾。一方、HTLV-I の全塩基配列が決定され、通常のレトロウイルスの有する gag, pol, env 遺伝子に加えて HTLV-I に特有な pX 領域が発見された⁹⁾。この領域には 40kD の転写因子である tax 蛋白質を発現するための tax 遺伝子が存在することが明らかになっている。この tax 蛋白質はウイルス自身の遺伝子だけでなく宿主である細胞側の遺伝子の転写をも促進することから、トランスに作用するウイルス性因子に相当することがわかってきた⁹⁾。

すなわち tax 蛋白質は T 細胞株においてその増殖に不可欠なインターロイキン 2 受容体 α 鎖 (interleukin 2 receptor α , IL-2R α) 及びインターロイキン 2 (interleukin 2, IL-2)⁹⁾ 遺伝子の転写を促進しそのメッセンジャー RNA (messenger RNA, mRNA) の発現を増加させる。しかし、tax 蛋白質は IL-2R α , IL-2 蛋白質を必要としない線維芽細胞を形質転換させ⁷⁾、tax 遺伝子を組み込んだトランスジェニックマウスでは IL-2R α , IL-2 蛋白質が発現していない神経組織に腫瘍が発生した⁸⁾。これらのことから tax 蛋白質による白血病の発症には IL-2R α , IL-2 蛋白質以外にもなんらかの細胞増殖に関係した宿主側の因子の活性化が関与していると考えられる。興味ある例として細胞の増殖シグナルによって制御される転写因子の一つである c-fos 遺伝子の発現が tax 蛋白質により誘導されることが既に報告されている⁹⁾。IL-2R α , IL-2 蛋白質が細胞膜内外で増殖刺激の伝達に係わっているのに対し、c-fos 蛋白質は増殖刺激が核内に到達することによって発現し、さらに他の遺伝子の転写を促進している。そこで tax 蛋白質が通常は血清などの増殖刺激によって制御される c-fos 遺伝子の転写を促し、こうして産生された c-fos 蛋白質がさらに別の遺伝子の転写を促すという機構が想定された。しかしこの c-fos 蛋白質は単独では転写因子として作用できず、別の転写因子である c-jun 蛋白質と複合体を形成して始めて活性を持つようになる¹⁰⁾。また最近になって構造的にそ

れぞれ c-fos, c-jun 蛋白質と類似した関連転写因子群として fra-1¹¹⁾, fra-2¹²⁾, jun-B¹³⁾, jun-D¹⁴⁾ 蛋白質が相次いで発見された。これらはいずれも特徴的なロイシンの繰り返し配列を持つ一群の転写因子に属する。

また近年 IL-2 受容体としてこれまで知られていた IL-2R α 蛋白質に加えてインターロイキン 2 受容体 β 鎖 (interleukin 2 receptor β , IL-2R β) 蛋白質が発見され、両者が複合体を形成して高親和性受容体となることが判明した¹⁵⁾。

そこで今回著者は HTLV-I 感染細胞株及び tax を遺伝子導入した T 細胞株の mRNA の発現をノーザンブロット法を用いて解析し、IL-2R α , c-fos 遺伝子に加えて新たに IL-2 β , c-jun, jun-B, jun-D, fra-1, fra-2 という細胞増殖に関係の深い遺伝子について tax 蛋白質による転写誘導の有無さらにその経時的な発現様式を検討した。

対象および方法

I. 細胞培養

1. 使用細胞とその培養条件

HTLV-I 非感染ヒト T 細胞株として Jurkat, Molt3, CCRF-CEM, Molt4 細胞を、HTLV-I 感染ヒト T 細胞株として Hut 102, MT-2, TL-BAR-MOR, MT-1 細胞をそれぞれ用いた。また tax 蛋白質のみを特異的かつ調節的に発現する T 細胞株として JPX-9 細胞 (東北大学医学部微生物学教室, 永田, 菅村両博士より供与¹⁶⁾) を用いた。これらの細胞は 10% 非動物ウシ胎児血清 (M.A. Bioproducts, Walkersville, USA) を含む RPMI 1640 培地 (日水, 東京) を培養液とし、炭酸ガス培養器にて 37°C, 5% CO₂ 存在化で培養した。

2. Jurkat 細胞の刺激条件

Jurkat 細胞が指数関数的に増殖している状態において 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate (TPA) (Sigma, St. Louis, USA) および phytohemagglutinin (PHA) (Sigma) をそれぞれ最終濃度が 50ng/ml, 4.8 μ g/ml となるように培養液に添加し、添加前, 添加 15, 30, 60, 120, 240 分後にそれぞれ培養細胞を採取した。

また Jurkat 細胞に cycloheximide (CHX) (Sigma) を 10 μ g/ml となるよう添加し 240 分後に細胞

mRNA, messenger RNA; MOPS, 3-N-Morpholino-propanesulfonic acid; PHA, phytohemagglutinin; PBS, phosphate-buffered saline; RNase, ribonuclease; SDS, dodecyl-sodium-sulfate; SSC, saline sodium citrate; TPA, 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate; TRE, TPA responsive element; Tris, Tris-hydroxymethyl-aminomethane

を採取した。さらに Jurkat 細胞に TPA, PHA, CHX をそれぞれ 50ng/ml, 4.8 μ g/ml, 10 μ g/ml となるように添加し240分後に細胞を採取した。

3. JPX-9 細胞の刺激条件

JPX-9 細胞は tax 遺伝子の翻訳領域をマウスのメタロチオネインプロモーターに接続しこれを Jurkat 細胞へ形質導入した後、核内の染色体に組み込まれて安定な発現を示すようになった細胞だけを抗生物質 G418 を用いて選択したものである。このため JPX-9 細胞は CdCl₂ (和光, 大阪: 以下, 試薬類で特に記載のないものは当社の製品を用いた) などの重金属刺激により tax 蛋白質を産生する。今回の実験では JPX-9 細胞が指数関数的に増殖している状態において CdCl₂ を最終濃度が 20 μ M/l となるように培養液に添加し添加前, 添加1.5, 3, 6, 9, 12時間後にそれぞれ培養細胞を採取した。なお CdCl₂ 自身により tax 蛋白質と無関係に細胞が刺激される可能性も考えられたため, 対照群として Jurkat 細胞に CdCl₂ を 20 μ M/l となるよう加え, JPX-9 細胞の場合と同様に時間ごとに細胞を採取した。

II. RNA の解析

1. 総 RNA の抽出

採取した細胞を 10mM リン酸緩衝食塩水 (phosphate-buffered saline, PBS) にて 2 回洗浄し, 細胞 1 \times 10⁷ 個あたり, 400 μ l の 0.14M NaCl, 1.5mM MgCl₂, 10mM Tris-hydroxymethyl-aminomethane (Tris)-HCl, pH8.0 を含む融解液と 25 μ l の 10% Non diet P40 (Sigma) にて細胞膜を破裂させた。直ちに 25 μ l の vanadyl complex (Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg, USA) を加えて細胞内のリボヌクレアーゼ (ribonuclease, RNase) を不活性化し水中で 5 分間放置した後, 遠心し核成分を沈殿除去し RNA を含む上清を回収した。次に 50mM エチレンジアミン四酢酸 ethylenediaminetetraacetic acid 2Na, EDTA, 4% ドデシル硫酸ナトリウム (dodecyl-sodium-sulfate, SDS) を含む 0.8M Tris-HCl, pH 9.0 65 μ l とプロテアーゼ K (Sigma) 10 μ l とを加え, 37°C で 30 分間消化した。続いて等量のフェノールおよび CIAA (クロロホルムとイソアミアルコールを 24:1 の割合で混合したもの) にて 2 回抽出した後, エタノール沈殿させた。こうして得られた総 RNA を 90 μ l の 10mM Tris, pH7.5, 0.1% SDS に溶解し, 260nm の吸光度を測定して総 RNA 濃度を求め, その一部を 0.7% アガロースゲルにて電気泳動して RNase による RNA の分解が生じていないことを確認した。

2. mRNA の抽出

90 μ l の総 RNA に対して 10 μ l の割合で 5M NaCl を加え, これを 6mg のオリゴ-dT セルロース (フナコシ, 東京) と混合し室温で 1 時間ゆっくり振盪して mRNA をセルロースに吸着させた。次に遠心して得られた沈殿を 0.1% SDS と 100mM NaCl を含む 10mM Tris-HCl, pH7.5 にて 4 回洗浄した後, 150mM Tris-HCl, 0.1% SDS に溶解し 37°C で 5 分間反応させて吸着している mRNA を溶出させた。最後に遠心してセルロースを除き, mRNA を含む上清を回収した。

3. ノーザンブロッティング法¹⁷⁾

1 検体につき総 RNA 20 μ g に相当する mRNA を用い, これを 50% のホルムアミド (ナカライテスク, 京都), 17.5% のホルマリンを含む 2% 3-N-Morpholino-propanesulfonic acid (MOPS) (pH7.5) に溶解し 65°C で 10 分間反応させて mRNA の高次構造を崩した後, 1.0% アガロースゲルにて 2% MOPS 中で電気泳動を行った。泳動終了後のゲルは 10 \times Saline sodium citrate (SSC) (組成は 3M NaCl, 0.3M Trisodium citrate) に浸し 15 分間室温でゆっくり振盪させた後, 20 \times SSC を使用してイモビロン N フィルター (Millipore, Bedford, USA) にトランスファーした。トランスファー後のフィルターは 10 \times SSC に 5 分間浸した後, UV ストラーターリンカー 1800 (フナコシ) を用いて波長 254nm の紫外線 1200 マイクロジュールを照射し mRNA を固定した。

4. プローブの作成

本実験で使用したプローブ用 DNA を含むプラスミッドのうち, c-fos, c-jun 遺伝子は Salk Institute (San Diego, USA) の Verma 博士より, fra-1, fra-2, jun-B, jun-D 遺伝子は日本獣医科大学分子腫瘍学教室の松井博士より, IL-2R α , IL-2R β 遺伝子は大阪大学細胞工学センターの谷口博士よりそれぞれ供与を受けた。

c-fos 遺伝子は制限酵素 ECOR I, BamH I (制限酵素類はすべて宝酒造, 京都を用いた) で切り出される 1.4 kb の相補的 DNA (complementary DNA, cDNA), c-jun 遺伝子は Pst I で切り出される 1.5 kb の cDNA, fra-1, fra-2, jun-B, jun-D 遺伝子はすべて ECOR I で切り出されるそれぞれ 1.4 kb, 1.1 kb, 1.8 kb, 1.6 kb の cDNA, tax 遺伝子は ECOR I, BamH I で切り出される 1.1 kb の cDNA, actin 遺伝子は ECOR I, HINDIII で切り出される 0.4 kb の cDNA でありいずれもアミノ酸翻訳領域をほぼ全長にわたって含んでいる。

一方, egr-1, egr-2 遺伝子は DNA 合成機 (ABI

ジャパン, 東京) および PC700 (アステック社, 福岡) を用い, polymerase chain reaction 法¹⁰ にて *egr-1* 遺伝子アミノ酸翻訳領域の C 末端側 0.5kb と *egr-2* 遺伝子アミノ酸翻訳領域の N 末端側 0.2kb とを合成して使用した。

これらの DNA はそれぞれ 25ng ずつをマルチプライム・ラベリング¹⁰・キット (アマシャム・ジャパン, 東京) を用いて [α -³²P] デオキシ CTP (アマシャム・ジャパン) を用いて標識し 2.0–5.0cpm/ μ g の比活性を持つプローブを得た。

5. ハイブリダイゼーション

mRNA を固定したフィルターを 50%ホルムアミド, 4×SSC, 5×デンハルト液 (組成は 1%フィコール, 1%ポリビニールピロリドン, 1%ウシアルブミン), 0.1%SDS, 20 μ g/ml 変性サケ精子 DNA (ペーリンガー・マンハイム山之内, 東京), 200 μ g/ml polyA (コスモ・バイオ, 東京) から成るプレハイブリダイゼーション液 5ml と共にプラスチックバッグに入れ, 42°C で 4 時間反応させた。続いてこのプレハイブリダイゼーション液を捨て, 1ml のハイブリダイゼーション液 (プレハイブリダイゼーション液に標識したプローブ 10ng を加えたもの) を入れ, 42°C で 16 時間反応させた。

反応の終了したフィルターはまず 1×SSC にて室温 15 分間で洗浄し, さらに 0.2×SSC にて 68°C で 30 分間, 2 回洗浄した。洗浄後のそれぞれのフィルターの放射活性に準じて -80°C で 3 時間から 240 時間のオートラジオグラフィーを施行した。なお検出される断片の大きさの評価はアガロース電気泳動の際に, HindIII で切断し [α -³²P] デオキシ CTP にて標識した λ DNA 約 100ng を標準として同時に泳動しその位置から計算した。

成 績

I. HTLV-I 感染細胞株における mRNA の発現

図 1 に示すように HTLV-I 感染細胞株である Hut102, MT-2, TL-BAR-MOR 細胞では tax 遺伝子を含む HTLV-I の mRNA が大量に発現していたが, 感染細胞株でも MT-1 細胞ではほとんど発現しておらず, 非感染細胞株では全く発現していなかった。なお HTLV-I ではまずウイルスゲノムが全長にわたって転写され, この mRNA が 2 回スプライシングを受けてから tax 蛋白質が産生される⁹。したがってこの実験では tax 遺伝子をプローブとして用いたが感染細胞株では tax 遺伝子だけでなく gag, pol, env, rex 遺伝子など HTLV-I のコードするすべての

mRNA が検出されている。c-fos, fra-1, c-jun, jun-B, jun-D, IL-2R α , IL-2R β 遺伝子の mRNA はいずれも非感染細胞株に比して感染細胞株で多量に発現していたものの, 必ずしも HTLV-I の mRNA の発現量と比例しているわけではなく例えば jun-B や IL-2R α 遺伝子の mRNA は MT-1 細胞でも大量に発現していた。一方 fra-2 遺伝子の mRNA のみは非感染細胞株・感染細胞株間で有意差が認められなかった。なお各検体の mRNA 量が均一になっていることの確認として同時に actin 遺伝子の mRNA も対照として測定した。

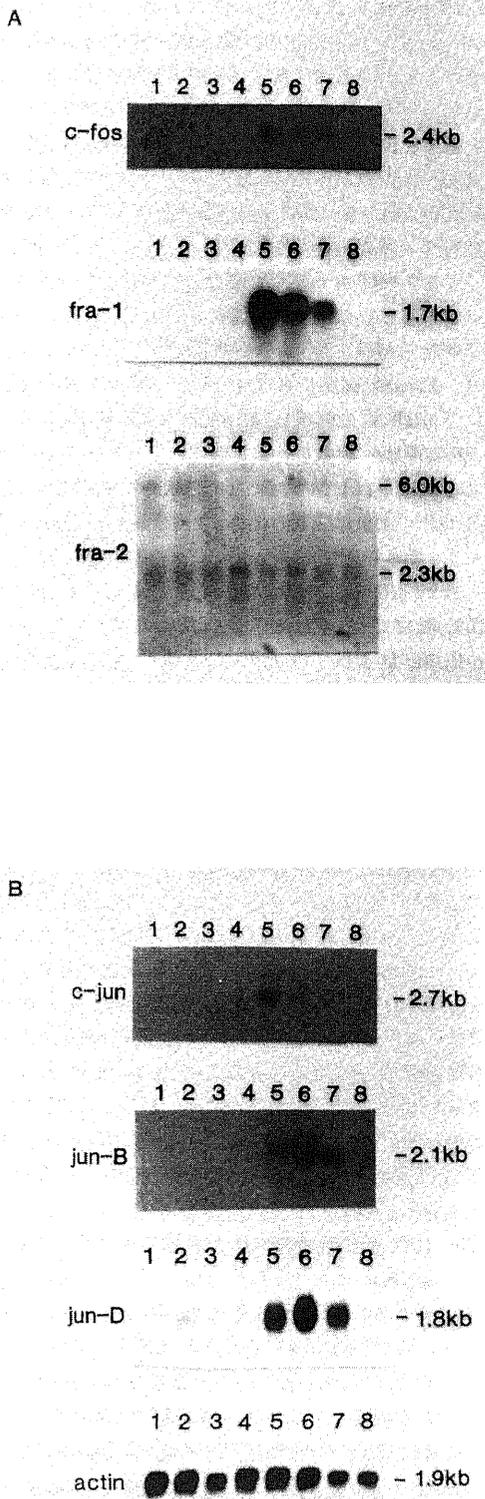
II. Jurkat 細胞における TPA, PHA 刺激による mRNA の発現

TPA, PHA 刺激を行うと図 2 のように刺激前はほとんど検出されなかった c-fos 遺伝子の mRNA は刺激後 30 分で大量に発現し始め, 240 分後には著しく減少した。fra-1 遺伝子の mRNA もこれに似た発現を示したが c-fos 遺伝子に比してやや遅く 60 分後から 240 分後にかけて大量に検出された。一方 c-jun, jun-B, jun-D 遺伝子の mRNA は刺激前から一定量の発現を示したが, 刺激 60 分後から 240 分後にかけてさらに著しい増加が認められた。また IL-2R α 遺伝子の mRNA は刺激 240 分後になって始めて検出された。なお fra-2 遺伝子の mRNA は刺激前後で有意な変化を示さず, IL-2R β 遺伝子の mRNA は検出できなかった。

蛋白合成阻害剤である CHX を加え 240 分後に mRNA を測定したところ CHX 単独では大きな変化は見られなかったが, TPA, PHA 刺激と併用すると c-fos, fra-1, c-jun, jun-B, jun-D 遺伝子のいずれの mRNA も著しい増加を示し, TPA, PHA 刺激または CHX 単独投与では変化のなかった fra-2 遺伝子の mRNA にも増加が認められた。しかし, IL-2R α の mRNA は TPA, PHA, CHX の 3 者併用によっても TPA, PHA 刺激の場合と有意差が認められなかった。

III. JPX-9 細胞における tax 蛋白質の産生による mRNA の発現

図 3 のように JPX-9 細胞に 20 μ M/l の CdCl₂ を加えると 1.5 時間後に tax 遺伝子の mRNA が発現し, その発現量は 24 時間後にいたるまでほぼ一定であった。これに対応して c-fos, fra-1 遺伝子の mRNA も 1.5 時間後に著明な増加を認めたが, 3 時間後には添加前と同じ量まで減少した。c-jun, jun-D 遺伝子の mRNA も同様に 1.5 時間後に最大量を示したが経時的な変化は c-fos, fra-1 遺伝子に比べてあまり著明で



はなかった. 一方, *egr-1*, *egr-2* 遺伝子の mRNA は 1.5時間後より徐々に増加して 9 時間後に最大量に達し 24 時間後もほぼ不変であった. また *IL-2R α* 遺伝子の mRNA は 12 時間後から検出され 24 時間後もほぼ同じであった. これに対し *fra-2*, *jun-B* 遺伝子の mRNA の発現量は CdCl_2 添加の前後で有意な変化を認めず, *IL-2R α* 遺伝子の mRNA は検出できなかった.

なお対照群の Jurkat 細胞ではいずれの遺伝子の mRNA も CdCl_2 添加前後で変化が見られず, 前述した JPX-9 細胞で見られた変化はすべて tax 蛋白質によるものと思われた.

考 察

細胞は様々な外界刺激に反応して分化・増殖を行な

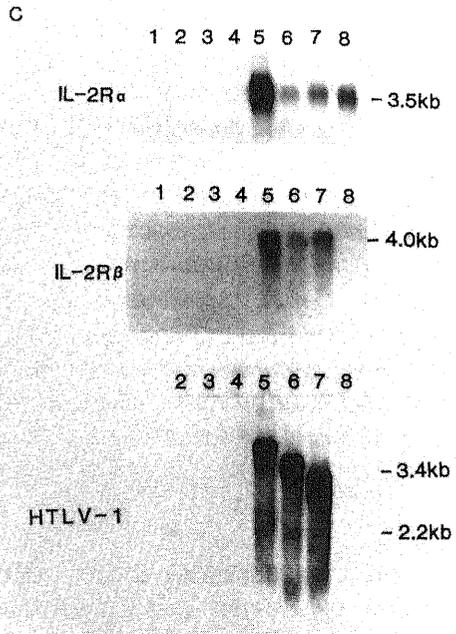
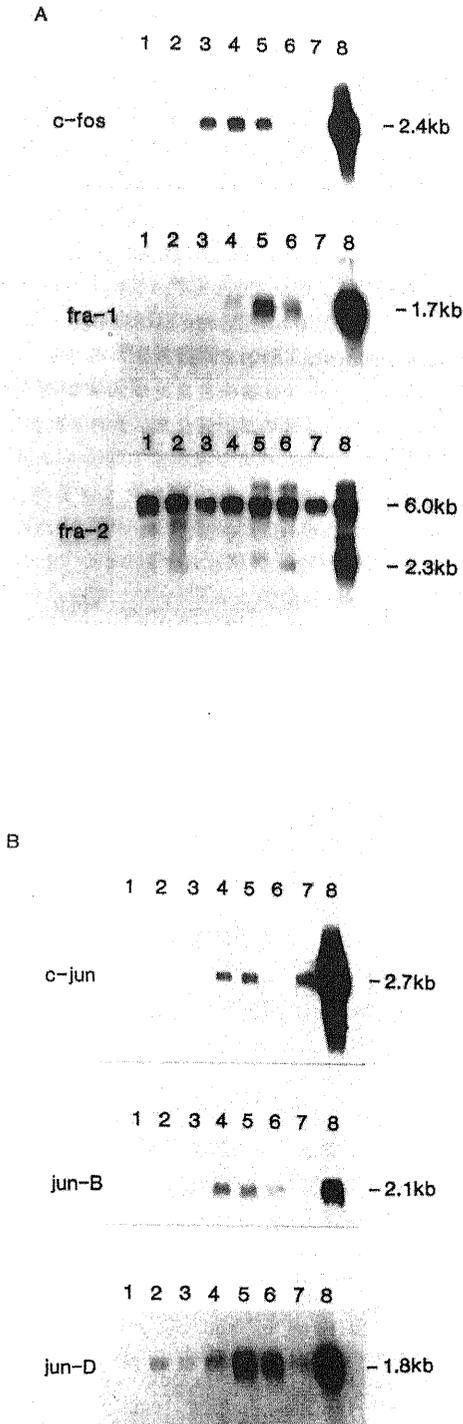


Fig.1. Northern blot analysis of mRNAs isolated from HTLV-I-negative and positive cells. Negative cells were Jurkat (lane 1), Molt3 (lane 2), CCRF-CEM (lane 3), and Molt4 (lane 4). Positive cells were Hut102 (lane 5), MT-2 (lane 6), TL-BAR-MOR (lane 7), and MT-1 (lane 8). Probes were cDNAs of human *c-fos*, *fra-1*, and *fra-2* (A); *c-jun*, *jun-B*, *jun-D*, and *actin* (B); *IL-2R α* , *IL-2R β* , and *tax* genes (C). Sizes of mRNAs were calculated from migration distance of Hind III-digested λ -DNA marker.



うが、この際にかん原遺伝子の産物が重要な役割を果たしている。これらががん原遺伝子のコードする蛋白質は大きく3つの群に分類することができる。すなわち、成長因子とその受容体、細胞内情報伝達因子、核内遺伝子転写調節因子である。c-fos及びc-jun蛋白質は核内転写因子に属するがその遺伝子はほとんどすべての細胞において血清・TPAなど様々な刺激に反応し極めて早期にかつ一過性に発現することが知られている²⁰⁾。そのため、こうして細胞外の刺激が核内に達するとともに最初に産生されるc-fos, c-jun蛋白質はこれに続く他の多くの遺伝子の転写を包括的に制御し

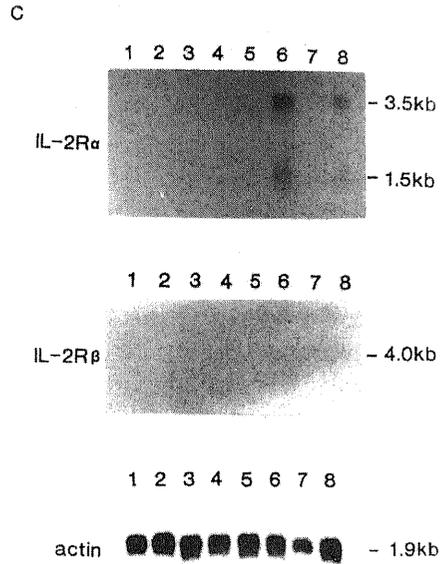
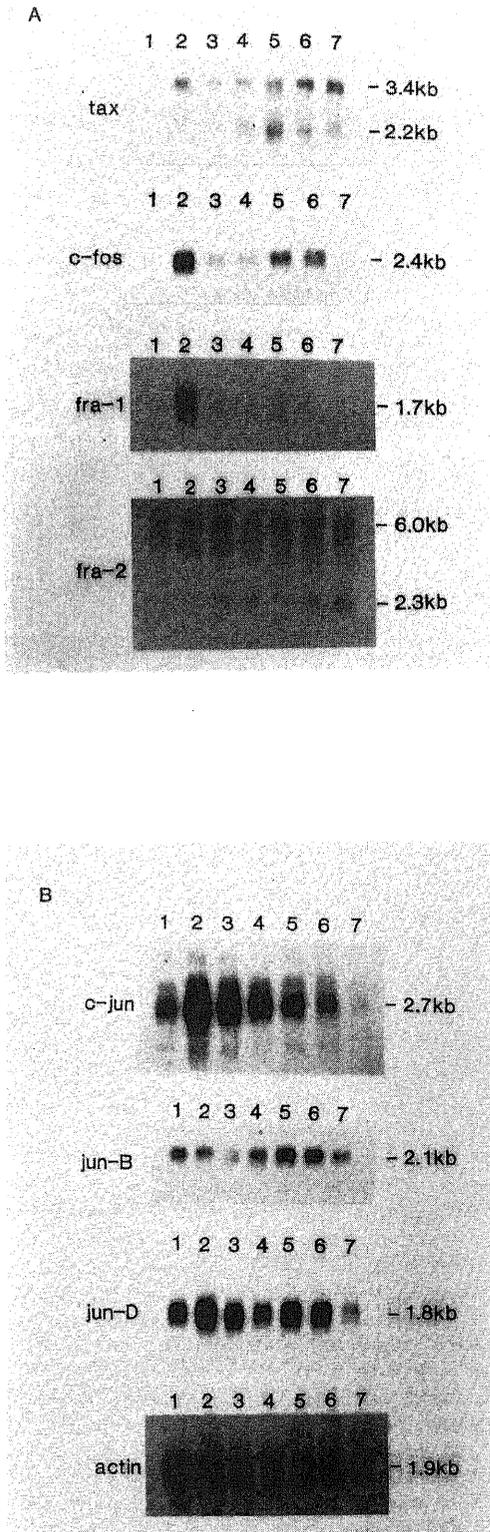


Fig.2. Northern blot analysis of mRNAs isolated from Jurkat cells after TPA and PHA stimulation. Jurkat cells were stimulated with TPA (50ng/ml) and PHA (4.8 μ g/ml) for 0 (lane 1), 15 (lane 2), 30 (lane 3), 60 (lane 4), 120 (lane 5), and 240 minutes (lane 6); or with CHX (10 μ g/ml) alone for 240 minutes (lane 7); or with TPA, PHA and CHX for 240 minutes (lane 8). Probes were cDNAs of human c-fos, fra-1, and fra-2 (A); c-jun, jun-B, and jun-D (B); IL-2R α , IL-2R β , and actin genes (C). Size of mRNAs were calculated from migration distance of HindIII-digested λ -DNA marker.



ているものと考えられ、注目を浴びてきた。

しかし果たして c-fos 及び c-jun 蛋白質だけでこのような多様な制御を行うことができるかどうか疑問視されていたところ、fos 関連遺伝子群として fra-1, fra-2 遺伝子が、jun 関連遺伝子群として jun-B, jun-D 遺伝子が相次いで発見された。これらの遺伝子間では fos/jun 蛋白質複合体を形成するためのロイシンジッパー領域と DNA 結合のための塩基性アミノ酸領域とがよく保存されており¹⁹⁻²¹、実際に c-fos, fra-1, fra 2 蛋白質は c-jun, jun-B, jun-D 蛋白質のいずれとも複合体を形成できるし²¹、どの組み合わせの複合体も同じ DNA 配列 TGACTCA (TPA responsive element, TRE) を認識する²²。しかしながら転写活性化能を持つ領域はあまり相同性が高くな

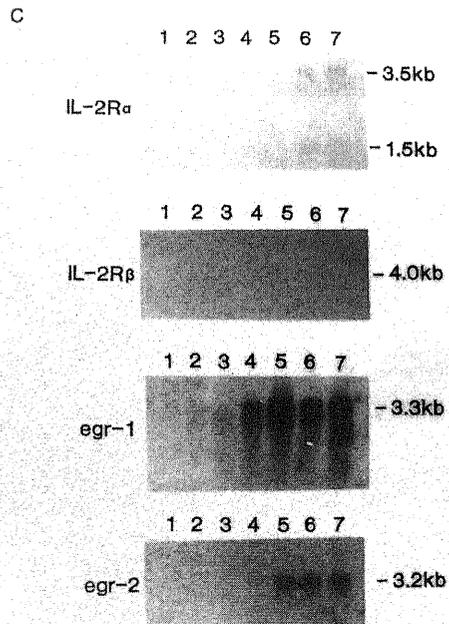


Fig. 3. Northern blot analysis of mRNAs from JPX-9 cells after CdCl₂ stimulation. JPX-9 cells were stimulated with CdCl₂ (20 μ M) for 0 (lane 1), 1.5 (lane 2), 3 (lane 3), 6 (lane 4), 9 (lane 5), 12 (lane 6), and 24 hours (lane 7). Probes were cDNAs of human tax, c-fos, fra-1, and fra-2 (A); c-jun, jun-B, jun-D, and actin (B); IL-2R α , IL-2R β , egr-1, and egr-2 genes (C). Size of mRNAs were calculated from migration distance of HindIII-digested λ -DNA marker.

く、その作用も異なると推測される^{29)~30)}。

また c-fos 遺伝子を除きこれらの遺伝子のプロモーター領域はよく解明されていないが、血清刺激に対する経時的な mRNA の発現様式が多少異なることや各臓器によって mRNA の相対的な発現量が異なる (例えば脳では jun-B, jun-D 遺伝子が多く、肺では c-jun 遺伝子が多い) ことから、これらの遺伝子は異なる調節を受けて発現するものと考えられる^{11)~14)}。今回の実験でも Jurkat 細胞を TPA, PHA で刺激することにより、c-fos, fra-1, c-jun, jun-B, jun-D 遺伝子の mRNA が迅速にかつ一過性に発現しているがその経時的な発現様式には多少の違いが見られる。CHX 存在下でも mRNA が観察されることからこれらの遺伝子の発現は新たな蛋白合成を介さずに誘導されることが確認された。また発現量の著しい増加はこれらの mRNA を分解する酵素や負の調節因子が産生されなかったためと考えられる。なお、fra-2 遺伝子の mRNA は TPA, PHA 刺激では有意な変化を示さなかったが、TPA, PHA, CHX の併用刺激では CHX 単独投与に比べて mRNA の増加が認められやはり微量ながら TPA, PHA 刺激でも増加している可能性がある。ところで線維芽細胞である NIH3T3, CEF 細胞を使った以前の報告では血清刺激により fra-2 遺伝子の mRNA が増加し jun-D 遺伝子の mRNA は不変であったとされており、今回の実験結果と異なる¹⁴⁾²⁰⁾。これは恐らく使用した細胞株及び刺激物質の違いによるものと考えられ、これらの遺伝子の発現形式が臓器によって異なるという事実にも合致する。

このようにこれらの遺伝子は血清にも TPA, PHA にも反応して発現するとはいえその発現形式には違いが見られる。TPA はプロテインキナーゼCを活性化する物質としてまた PHA は抗原代替物質として知られており生理的な血清刺激とは異なっているも不思議ではない。ではヒトのT細胞に感染し、その一部をがん化させる HTLV-I はどのように作用するのか。HTLV-I 感染細胞株では非感染細胞株に比べて c-fos, fra-1, c-jun, jun-B, jun-D, IL-2R α , IL-2R β 遺伝子の mRNA の増加が見られる。ところで感染細胞株のうち HUT102, MT-2, TL-BAR-MOR 細胞の3株は tax 遺伝子を始めとするウイルス自身の mRNA を大量に発現しているが MT-1 細胞では細胞に組み込まれたプロウイルスはほとんど発現していない。この MT-1 細胞では他の3細胞株と比べて fra-1, c-jun, jun-D, IL-2R β 遺伝子の mRNA の量は少ないが c-fos, jun-B, IL-2R α 遺伝子の mRNA には有意差を認めない。この解釈として fra-1, c-jun, jun-D,

IL-2R β 遺伝子の転写は tax 蛋白質により活性化されその効果は tax 蛋白質の量に比例するが、c-fos, jun-B, IL-2R α 遺伝子の転写活性化は少量の tax 蛋白質で飽和状態となるかあるいは直接 tax 蛋白質とは関係なく HTLV-I 感染による細胞の二次的変化として生ずるなどの考え方ができる。

次に感染細胞株で見られたこれらの mRNA の増加が tax 蛋白質によるものであるかどうかを検討するため JPX-9 細胞を用いた。この細胞株は通常の状態では tax 蛋白質を産生しないが CdCl₂を加えると1.5時間以内に tax 蛋白質が産生され始め24時間後も持続する。これに対応して c-fos, fra-1, c-jun, jun-D 遺伝子の mRNA も1.5時間後には増加したが、c-fos, fra-1, jun-D 遺伝子の mRNA は3時間後には再び CdCl₂添加前の状態に戻り、c-jun 遺伝子の mRNA は3時間後より次第に減少し始め24時間後に添加前の状態に戻った。対照群の Jurkat 細胞に CdCl₂を加えた場合には全く変化しなかったのでこれら4つの遺伝子の転写は tax 蛋白質によって活性化されるといえる。また c-fos 遺伝子についてははっきりしないが fra-1, c-jun, jun-D 遺伝子の mRNA は感染細胞株でも tax 蛋白質の量にある程度相関して増加しており JPX-9 細胞で見られた結果と合致する。

fra-2 遺伝子の mRNA は JPX-9 細胞でも感染細胞株でも増加しておらず、tax 蛋白質をはじめとする HTLV-I の影響を受けないものと思われる。ただし TPA, PHA 刺激の際にも CHX を併用すると fra-2 遺伝子の mRNA の増加が認められており、JPX-9 細胞の場合も微量ながら増加している可能性は否定できない。しかし CHX を投与すると tax 蛋白質まで合成が阻害されるためこの可能性については検討できなかった。jun-B 遺伝子の mRNA は感染細胞株で増加していたものの JPX-9 細胞では変化がなかった。tax 蛋白質とは無関係に HTLV-I 感染による二次的変化として jun-B 遺伝子の mRNA が増加する可能性が考えられる。

IL-2R α 遺伝子の mRNA はかなり遅れて CdCl₂添加12時間後に増加し始めている。tax 蛋白質は直接 IL-2R α 遺伝子のプロモーターに作用するのではなく、NF- κ B という転写因子蛋白質を介して IL-2R α 遺伝子の発現を誘導することが知られている²⁷⁾²⁸⁾。TPA, PHA 刺激による IL-2R α 遺伝子の発現誘導の際にも同様に NF- κ B 蛋白質を介するとされているが²⁹⁾³⁰⁾、TPA, PHA による IL-2R α 遺伝子の発現が一過性であるのに対し tax 蛋白質による発現は構成的であること¹⁵⁾、また TPA, PHA と tax 蛋白質の場合

とで IL-2R α 遺伝子の発現を誘導する際に必要な因子やその結合部位が完全に一致していないことから実際の作用機構はもっと複雑であると思われる。なお IL-2R β 遺伝子についてはまだほとんど解明されておらず、今回の実験でも感染細胞株では tax 蛋白質の量に比例して IL-2R β 遺伝子の mRNA が検出されたものの JPX-9 細胞では検出できなかった。これは JPX-9 細胞では感染細胞に比べて tax 蛋白質の産生量が少ないため IL-2R β 遺伝子の mRNA が検出できるほど産生されなかったか、あるいは IL-2R β 遺伝子の mRNA の増加は直接 tax 蛋白質とは関係のない HTLV-I 感染による二次的変化によるものと推測される。

さて今回の実験から tax 蛋白質は c-fos, fra-1, c-jun, jun-D, IL-2R α 遺伝子の転写を促進することがわかったが、実際にどのようにして作用するのか、つまり直接にあるいは別の転写因子を介しておこなわれるのか、介するとすればそれは何か、そしてこれらの遺伝子のプロモーターのどの領域と反応するのかは前述した IL-2R α 遺伝子の場合を除きほとんどわかっていない。c-fos, fra-1, c-jun, jun-D 遺伝子のうちプロモーターが十分研究されているのは c-fos 遺伝子だけである³¹⁾。ところで HTLV-I 感染細胞株では c-fos, c-jun 遺伝子関連転写因子群だけでなく、亜鉛元素結合性の転写因子である 225 遺伝子の mRNA の発現も増加している³²⁾。この群に属する egr-1, egr-2 遺伝子の mRNA 遺伝子はそれぞれプロモーターが既に解析されている^{33,34)}。そこで tax 蛋白質による egr-1, egr-2 遺伝子の誘導を検討したところ図 3 のように両者の mRNA の増加が認められた。現在、c-fos, egr-1, egr-2 遺伝子を中心にこれらのプロモーターをさらに詳細に検討中である。

tax 蛋白質はこの他にも顆粒球-マクロファージコロニー形成刺激因子 (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF), IL-3, IL-4 遺伝子の発現を促進することがわかっている^{35,36)}。また tax 蛋白質は逆に転写を抑制することもあり、この例としては β -ポリメラーゼ遺伝子が唯一報告されている³⁷⁾。このように tax 蛋白質は非常に多様な作用をもっており、その機構を一口に説明することは困難である。しかし、今回の実験から c-fos, fra-1, c-jun, jun-D 蛋白質といった血清などの増殖刺激によって最初に産生される転写因子が細胞内の tax 蛋白質によっても同様に産生されることが証明され、これらの転写因子が tax 蛋白質の多彩な作用の担い手になっている可能性が示された。またこれらの転写因子の過

剰産生が細胞増殖を引き起こし最終的にがん化させるという仮説も考えられる。しかし今回の実験では IL-2R α 遺伝子が持続的に発現しているのに対し、c-fos, fra-1, c-jun, jun-D 遺伝子の mRNA は tax 蛋白質が存在しているにもかかわらず時間と共に減少しており正常な刺激に対する反応と大きな刺激は見られない。これは感染細胞株におけるこれら遺伝子の持続的な発現と矛盾するが、HTLV-I 感染から ATL 発症までには長い年月を要すること³⁸⁾と合わせてがん化にいたるには他のがん原遺伝子の活性化やがん抑制遺伝子の不活性化などさらに何段階かの異常の蓄積を必要としこれらの二次的変化が c-fos, fra-1, c-jun, jun-D 遺伝子を持続的に発現させるものと推測される。これらの問題に対し今後さらに他のがん原遺伝子やがん抑制遺伝子についても tax 蛋白質を始めとする HTLV-I の影響を検討して取り組みたい。

結 論

1. HTLV-I 感染細胞株では非感染細胞株に比べて c-fos, fra-1, c-jun, jun-B, jun-D, IL-2R α , IL-2R β 遺伝子の mRNA の増加が認められた。このうち fra-1, jun-D, IL-2R β 遺伝子の mRNA 量は HTLV-I の mRNA 量と相関していたが、c-fos, jun-B, IL-2R α 遺伝子の mRNA 量は相関が見られなかった。一方、fra-2 遺伝子の mRNA は感染・非感染細胞株間で有意差を認めなかった。

2. tax 蛋白質のみを発現する JPX-9 細胞を用い、c-fos, fra-1, c-jun, jun-D 遺伝子の mRNA が tax 蛋白質によって迅速かつ一過性に発現誘導されることが証明された。一方、IL-2R α 遺伝子の mRNA は tax 蛋白質によってゆっくり誘導され持続性であった。このように tax 蛋白質による遺伝子の経時的な発現誘導には多様性が見られた。これに対し、fra-2, jun-B, IL-2R β 遺伝子の mRNA は誘導されず、感染細胞株でみられた jun-B, IL-2R β 遺伝子の mRNA の増加は tax 蛋白質との関係を証明できなかった。

3. tax 蛋白質により血清、抗原、TPA/PHA などの刺激なしに T 細胞において c-fos, fra-1, c-jun, jun-D, IL-2R α 遺伝子の mRNA が誘導され、これらが HTLV-I 感染による T 細胞の増殖及び機能異常に重要な役割を果たしていると考えられる。

謝 辞

稿を終るにあたり、御指導と御校閲を賜りました恩師松田 保教授に深甚なる謝意を表します。また終始直接の御指導を頂きました金沢大学がん研究所ウイルス部門の清水元治

教授、藤井雅寛助手に心から感謝致します。また多大なる御協力を頂いた金沢大学医学部第三内科学教室並びに金沢大学がん研究所ウイルス部門の皆様には深謝致します。

文 献

- 1) Hinuma, Y., Nagata, K. & Hanaoka, M.: Adult T cell leukemia: antigen in an ATL cell line and detection of antibodies to the antigen in human sera. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 6476-6480 (1981).
- 2) Yoshida, M., Seiki, M. & Yamaguchi, K.: Monoclonal integration of human T cell leukemia provirus in all primary tumors of adult T cell leukemia suggests causative role of human T cell leukemia virus in the disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 2534-2537 (1984).
- 3) Seiki, M., Roger, E., Thomas, B. S. & Yoshida, M.: Non specific integration of the HTLV provirus genome into adult T cell leukemia cells. *Nature*, **309**, 640-642 (1984).
- 4) Seiki, M., Hattori, S., Hirayama, Y. & Yoshida, M.: Human adult T-cell leukemia virus: Complete nucleotide sequence of the provirus genome integrated in leukemia cell DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 3618-3622 (1983).
- 5) Seiki, M., Hikikoshi, A., Taniguchi, T. & Yoshida, M.: Expression of the pX gene of HTLV-I: general splicing mechanism in the HTLV family. *Science*, **228**, 1532-1534 (1985).
- 6) Inoue, J., Seiki, M., Taniguchi, T., Tsuru, S. & Yoshida, M.: Induction of interleukin 2 receptor gene expression by p40^x encoded by human T-cell leukemia virus type I. *EMBO J.*, **5**, 28-83-2888 (1986).
- 7) Tanaka, A., Takahashi, C., Yamaoka, S., Nosaka, T., Maki, M. & Hatanaka, M.: Oncogenic transformation by the tax gene of human T-cell leukemia virus type I in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 1071-1075 (1990).
- 8) Hinrichs, S. M., Nerenberg, M., Reynolds, R. K., Khoury, G. & Jay, G.: A transgenic mouse model for human neurofibromatosis. *Science*, **237**, 1340-1343 (1987).
- 9) Fujii, M., Sanssone-Corsi, P. & Verma, I., M.: C-fos promoter trans-activation by the tax protein of human T-cell leukemia virus type I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 8526-8530 (1988).
- 10) Sassone-Corsi, P., Lamph, W. W., Kamps, M. & Verma, I. M.: Fos associated cellular p39 is related to nuclear transcription factor AP-1. *Cell*, **54**, 553-560 (1988).
- 11) Cohen, D. R. & Curran, T.: Fra-1: a serum inducible, cellular immediate-early gene that encodes a fos-related antigen. *Mol. Cell. Biol.*, **8**, 2063-2069 (1988).
- 12) Matsui, M., Tokuhara, M., Konuma, Y., Nomura, N. & Isizaki, R.: Isolation of human fos related genes and their expression during monocyte-macrophage differentiation. *Oncogene*, **5**, 249-255 (1990).
- 13) Ryder, K., Lau, L. F. & Nathans, D.: A gene activated by growth factors is related to the oncogene v-jun. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 1487-1491 (1988).
- 14) Hirai, S. I., Ryseck, R. P., Mechta, F., Bravo, R. & Yaniv, M.: Characterization of junD: a new member of the jun protooncogene family. *EMBO J.*, **8**, 1433-1439 (1989).
- 15) Hatakeyama, M., Tsudo, M., Minamoto, S., Kono, T., Doi, T., Miyata, T., Miyasaka, M. & Taniguchi, T.: Interleukin-2 receptor β chain gene: Generation of three receptor forms by cloned human α and β chain cDNA's. *Science*, **244**, 551-556 (1989).
- 16) Nagata, K., Ohtani, K., Nakamura, M. & Sugamura, K.: Activation of endogeneous c-fos proto-oncogene expression by human T cell leukemia virus type I-encoded p40^{tax} protein in the human T-cell line, Jurkat. *J. Virol.*, **63**, 3320-3326 (1989).
- 17) Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T.: *Molecular Cloning*, 2nd ed., p7. 43-7. 50, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.
- 18) Erlich, H. A., Gelfand, D. H. & Saiki, R. K.: Specific DNA amplification. *Nature*, **331**, 461-462 (1988).
- 19) Feinberg, A. P. & Vogelstein, B.: A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.*, **132**, 6-13 (1983).

- 20) Greenberg, M. E. & Ziff, E. B.: Stimulation of 3T3 cells induces transcription of the c-fos proto-oncogene. *Nature*, **311**, 433-438 (1984).
- 21) Muller, R., Brabo, R., Burckhardt, J. & Curran, T.: Induction of c-fos gene and protein by growth factors precedes activation of c-myc. *Nature*, **312**, 716-720 (1984).
- 22) Rauscher III, F. J., Voulalas, P. J., Franza Jr. B. R. & Curran, T.: Fos and Jun bind cooperatively to the AP-1 site: reconstitution in vitro. *Genes & Dev.*, **2**, 1687-1699 (1988).
- 23) Nakabeppu, Y., Ryder, K. & Nathans, D.: DNA binding activities of three murine jun proteins: stimulation by fos. *Cell*, **55**, 907-915 (1988).
- 24) Chiu, R., Angel, P. & Karin, M.: Jun-B differs in its biological properties from, and is a negative regulator of, c-jun. *Cell*, **59**, 979-986 (1989).
- 25) Schutte, J., Viallet, J., Nau, M., Segel, S., Fedorko, J. & Minna, J.: Jun-B inhibits and c-fos stimulates the transforming and transactivating activities of c-jun. *Cell*, **59**, 987-997 (1989).
- 26) Nishina, H., Sato, H., Suzuki, T., Sato, M. & Iba, H.: Isolation and characterization of fra-2, an additional member of the fos gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 3619-3623 (1990).
- 27) Leung, K. & Nabel, G. J.: HTLV-I transactivator induces interleukin-2 receptor expression through an NF- κ B like factor. *Nature*, **333**, 776-778 (1988).
- 28) Ballard, D. W., Bohnlein, E., Lowenthal, J. W., Wano, Y., Franza, B. R. & Greene, W. C.: HTLV-I tax induces cellular proteins that activate the κ B element in the IL-2 receptor α gene. *Science*, **241**, 1652-1655 (1988).
- 29) Lowenthal, J. W., Bohnlein, E., Ballard, D. W. & Greene, W. C.: Regulation of interleukin 2 receptor α subunit (Tac or CD25 antigen) gene expression: binding of inducible nuclear proteins to discrete promoter sequences correlates with transcriptional activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 4468-4472.
- 30) Cross, S. L., Halden, N. F., Lenardo, M. J. & Leonard, W. J.: Functionally distinct NF- κ B binding sites in the immunoglobulin κ and IL-2 receptor α chain genes. *Science*, **244**, 466-469 (1989).
- 31) Sumayah, J. & Ziff, E.: Transactivation of c-fos and β -actin genes by raf as step in early response to transmembrane signals. *Nature*, **344**, 463-466 (1990).
- 32) Wright, J. J., Gunter, K. C., Mituya, H., Irving, S. G., Kelly, K. & Siebenlist, U.: Expression of a zinc finger gene in HTLV-I and HTLV-II transformed cells. *Science*, **248**, 588-591 (1990).
- 33) Tsai-Morris, C. H., Cao, X. & Sukhatme, V. P.: 5' flanking sequence and genomic structure of egr-1, a murine mitogen inducible zinc finger encoding gene. *Nucleic. Acids Res.*, **16**, 8835-8846 (1988).
- 34) Rangnekar, V., Aplin, A. C. & Sukhatme, V. P.: The serum and TPA responsive promoter and intron-exon structure of egr-2, a human early growth response gene encoding a zinc finger protein. *Nucleic. Acids Res.*, **18**, 2749-2757 (1990).
- 35) Miyatake, S., Seiki, M., Yoshida, M. & Arai, K.: T-cell activation signals and human T-cell leukemia virus type I encoded p40^x protein activate the mouse granulocyte-macrophage colony stimulating factor gene through a common DNA element. *Mol. Cell. Biol.*, **8**, 5581-5587 (1988).
- 36) Miyatake, S., Seiki, M., Malefijt, R. D., Heike, T., Fujisawa, J., Takebe, Y., Nishida, J., Shlomai, J., Yokota, T., Yoshida, M., Arai, K. & Arai, N.: Activation of T cell-derived lymphokine genes in T cells and fibroblasts: effects of human T cell leukemia virus type I p40^x protein and bovine papilloma virus encoded E2 protein. *Nucleic. Acids Res.*, **16**, 6547-6566 (1988).
- 37) Jeang, K. T., Widen, S. G., Semmes IV, O. J. & Wilson, S. H.: HTLV-I transactivator protein, tax, is a trans-repressor of the human β -polymerase gene. *Science*, **247**, 1082-1084 (1990).
- 38) Okamoto, T., Ohno, Y., Tsugane, S., Watanabe, S., Shimoyama, M., Tajima, K., Miwa, M. & Shimotohno, K.: Multi-step carcinogenesis model for adult T cell leukemia. *Jpn. J. Cancer Res.*, **80**, 191-195 (1989).

Induction of Cellular fos and jun Related Genes by the Transcriptional Factor, tax Protein, of Human T Cell Leukemia Virus Type I Takeo Niki, Department of Internal Medicine (III), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920 - J. J. J. Med. Soc., **100**, 14 - 25 (1991)

Key words adult T cell leukemia, human T cell leukemia virus type I, tax

Abstract

Human T cell leukemia virus type I (HTLV-I)-encoded tax protein, functions as a trans-acting transcriptional activator not only for its own viral genes but also cellular genes. Therefore, tax protein has been thought to play an important role in the onset of adult T cell leukemia (ATL). However, the mechanisms by which tax protein induces the leukemogenesis of T cell are still unclear. In this paper the author examined whether tax protein can induce the cellular genes responsible for cell proliferation, such as c-fos, fra-1, fra-2, c-jun, jun-B, jun-D, interleukin 2 receptor α (IL-2R α), and interleukin 2 receptor β (IL-2R β) by using Northern blot analysis. The results show that messenger RNAs (mRNAs) of the all genes except for fra-2 were increased in the HTLV- I positive cells compared to the negative cells. Furthermore, JPX-9 cells which were Jurkat cells stably transfected with tax protein expression plasmid, were used to confirm that the increase of mRNA was induced by tax protein. In the JPX-9 cells following the expression of tax protein, mRNAs of c-fos, fra-1, c-jun, and jun-D genes were induced immediately and transiently, and mRNA of IL-2R α gene was induced slowly and constitutively. On the other hand, mRNAs of fra-2, jun-B, and IL-2R β genes were not induced. Therefore, the elevation of mRNAs of jun-B and IL-2R β genes in the HTLV- I positive cells seemed to be a multifactorial result of transformation by HTLV- I. The findings that tax protein could induce expression of c-fos, fra-1, c-jun, jun-D, and IL-2R α genes in T cell line without any other stimulation indicate that tax protein may replace antigen-specific stimulation and induce proliferation and activation of the T cell, and consequently play an important role, at least in the early stage of leukemogenesis. In the present experiments, expression of c-fos, fra-1, c-jun, and jun-D genes by tax protein were transient. However, these genes are expressed constitutively in the HTLV- I -positive cells and ATL occurs long time after HTLV- I infection. Therefore, still more abnormal changes by HTLV- I may be necessary, such as activation of other proto-oncogenes or inactivation of tumor suppressor genes, to activate these genes constitutively and ultimately result in cell transformation.