



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	HTLV-1gag蛋白発現に対するインターフェロンの効果
Author(s)	谷敷, 輝夫; 藤井, 暢弘; 小熊, 恵二
Citation	北海道大学医療技術短期大学部紀要, 4, 73-77
Issue Date	1991-12
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/37528
Type	departmental bulletin paper
File Information	4_73-78.pdf



HTLV-1 gag 蛋白発現に対するインターフェロンの効果

谷敷 輝夫・藤井 暢弘*・小熊 恵二*

Effect of Interferon on Expression of gag protein of HTLV-1

Teruo Yashiki, Nobuhiro Fujii* and Keiji Oguma*

Abstract

Persistent infection in human T-lymphoid cell lines with HTLV-I has been reported by several laboratories. More than half the cell lines transformed by HTLV-I produce IFN- γ spontaneously. These cell lines also differ in sensitivity to IFN functions including antiviral and antiproliferative functions. In this paper, we investigated the effect of IFN- α on the expression of HTLV-I specific proteins (gag-proteins) in four cell lines persistently infected with HTLV-I (MT-2, SMT-1, HUT 102 and OKM-2). The former three cell lines (MT-2, SMT-1, and HUT 102) are able to produce IFN- γ spontaneously, and the last one (OKM-2) is non-producer cell line of IFN- γ . All of the cell lines produced p19 and p53 of HTLV-I gag protein. However, production of p28 and p24 was different between these cell lines. Both the proteins were detected in MT-2, but not in HUT 102. Protein p24 but not p28 was found in SMT-1 and OKM-2. Endogenous IFN- γ did not affect the expression of gag-proteins in MT-2, SMT-1 and HUT 102. Furthermore, the expression of these virus specific proteins in all the cell lines was also hardly affected by treatment with IFN- α for 5–10 days.

要 旨

ヒト成人T細胞白血病(ATL)の原因ウイルスと考えられている HTLV-1 (human T-cell leukemia virus-1) を感染させた培養細胞には、インターフェロン- γ (IFN- γ) を自発的に産生する株と、産生しない株が存在する。これらの培養細胞は IFN の示す抗ウイルス作用や、細胞増殖抑制作用に対してそれぞれ異なる感受性を

示すが、一般的には IFN- γ や IFN- β による治療が ATL に有効であるとの報告がなされている。

我々は IFN- γ 産生株として MT-2, SMT-1, HUT 102 の 3 株, IFN- γ 非産生株として OKM-2 の 1 株の培養細胞を用いて IFN- α を投与し, HTLV-1 特異蛋白 (gag 蛋白) の産生に対する効果を検討した。

いずれの株においても P 53, および P 19 の

北海道大学医療技術短期大学部衛生技術学科

* 札幌医科大学微生物学講座

Department of Laboratory Technology, College of Medical Technology, Hokkaido University

* Department of Microbiology, Sapporo Medical College

発現が認められた。しかし、P 28 と P 24 の発現は株によって異なり、MT-2 では両者を検出できるが、SMT-1 と OKM-2 では P 24 のみ、HUT 102 では両者とも検出できなかった。HUT 102 における P 53 と P 19 の発現量は他の株の約 1/10 程度であった。IFN- γ 産生株と非産生株の gag 蛋白発現の比較から、IFN- γ の自発的産生は、HTLV-1 の gag 蛋白の発現に影響を与えないと推測された。また、IFN- γ 産生株および非産生株を IFN- α で 5～10 日間処理しても、gag 蛋白の発現はほとんど抑制されなかった。

はじめに

インターフェロン (IFN) は多面的作用を持つ生理活性物質である¹⁾。特に抗ウイルス作用に関しては数多くの研究がなされており、その作用機構も解明されつつある²⁾。レトロウイルス以外のウイルスに対する IFN の効果には、2', 5'-オリゴアデニル酸 (2-5 A) システム、Protein Kinase (PK) システムなどの誘導が関連していることが明らかになっている。しかし、レトロウイルスの増殖や感染伝播に対する IFN の効果には不明の点が多い。

成人 T 細胞白血病 (ATL) は、ヒトレトロウイルスである HTLV-1 の感染によって発症すると考えられている疾患である。ATL は IFN- α 、IFN- β の治療に対して感受性を示すことが報告されているが³⁾、IFN がいかなる機序によって治療効果を発現するかは、現在のところ明らかになっていない。特に HTLV-1 感染細胞 (培養細胞) は、抗ウイルス効果の発現や細胞増殖抑制などの面で、IFN に対する感受性が細胞間で異なるばかりでなく^{4),5)}、IFN- γ の自発的産生能の面においても、異なることが知られている^{4),5),6),7)}。したがって、それぞれの ATL における IFN 治療においても、HTLV-1 感染細胞がどのような性質を示すかを検討する必要があると思われる。

内在 HTLV-1 特異蛋白 (gag 蛋白) の発現に対する IFN の作用効果も、それぞれの細胞において異なることが予想されたので、今回、我々は IFN- γ 自発的産生株と非産生株における gag 蛋白の発現に対する IFN の効果について検討した。

材料と方法

細胞：HTLV-1 持続感染 T 細胞として、MT-2, SMT-1, HUT 102, OKM-2, ヒト白血病由来 T 細胞として、TALL-1, CCRF-CEM を使用した。これらの細胞はいずれも CD4 抗原陽性である。10% 牛胎児血清を含む RPMI 1640 培地で、5% CO₂, 37℃ の条件で培養した。IFN- α は日本赤十字社製、Lot 02-31 の製品を使用した。

ウェスタンブロット：それぞれの細胞を種々の濃度に調整した IFN を含む培地で培養した後、3000 rpm, 5 分間遠心して細胞を集め、0.5% NP lysis buffer (20 mmol/l HEPES-KOH, pH 7.5, 5 mmol/l MgCl₂, 120 mmol/l KCl, 1 mmol/l DTT, 10% Glycerol, 0.5% Nonidet-P 40) で可溶化した。可溶化したサンプルを 12000 rpm, 4℃, 10 分間遠心し、その上清について SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。その後ニトロセルロースメンブレン (ニトロ膜) に転写し、引き続き酵素免疫染色を行った。gag 特異蛋白を検出した。

分離用 SDS-ポリアクリルアミドゲル濃度は、1.5 mmol/l トリス-塩酸緩衝液, pH 8.8 で 12.5% に調整し、30 mA の定電流で約 2 時間半泳動分画した。転写用緩衝液は 7 mmol/l トリス-192 mmol/l グリシン緩衝液 (20% メタノール), pH 8.3 を用い、2 時間、0.22 μ m のニトロ膜に転写した。そのニトロ膜を次のように酵素免疫染色を行った。ニトロ膜を T-TBS (20 mmol/l トリス-HCl 緩衝液, pH 7.5, 500 mmol/l NaCl, 0.05% Tween 20) で洗浄し、1% BSA (0.01 mol/l PBS, pH 7.2) でブロッ

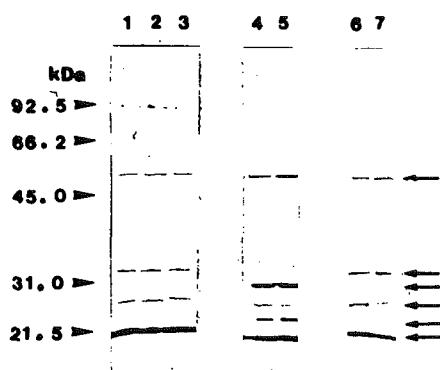
キングする。T-TBS で洗浄後 1 次抗体である HTLV-1 と反応, T-TBS で洗浄, 2 次抗体であるアルカリホスファターゼ結合抗マウス IgG 抗体を反応させる。T-TBS で洗浄, アルカリホスファターゼ基質緩衝液 (100 mmol/l トリス-HCl 緩衝液, pH 9.5, 100 mmol/l NaCl, 5 mmol/l MgCl₂, NTB(プロメガ) 132 μ l, BCIP (プロメガ) 66 μ l) で酵素反応を行った後, 反応停止。特異蛋白(gag 蛋白)の染色バンドが検出される。

結果と考察

IFN- γ 自発産生株である MT-2, SMT-1,

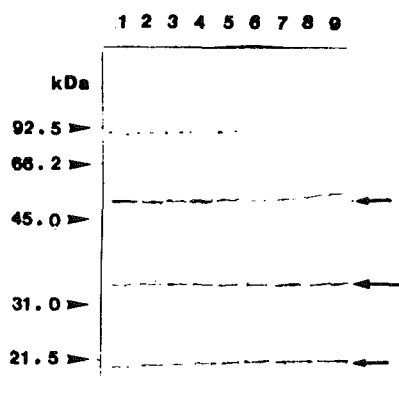
HUT 102 培養細胞は, IFN- γ を産生しているにもかかわらず, gag 蛋白の発現が認められた。しかも, その発現の程度は IFN- γ 非産生株である OKM-2 培養細胞と同程度か, あるいは, それ以上であった(図 1)。このことより, 自発的に産生されている IFN- γ は gag 蛋白の発現を抑制していないことが示唆された。一方, gag 蛋白の種類について比較すると, P 53 と P 19 の発現はいずれの株においても認められたが, P 28 と P 24 の発現は株によって異なっていた。すなわち, MT-2 では P 28 と P 24 の両者, SMT-1 では P 24 のみの発現が認められた。HUT 102 においては, P 28 と P 24 の両者の発

A



1. SMT-1 IFN 0
2. SMT-1 IFN 10^3 u/ml (1 day)
3. SMT-1 IFN 10^3 u/ml (5 days)
4. MT-2 IFN 0
5. MT-2 IFN 10^3 u/ml (10 days)
6. OKM-2 IFN 10^3 u/ml (10 days)
7. OKM-2 IFN 0

B



1. IFN 0
2. IFN 10^2 u/ml (1 day)
3. IFN 10^3 u/ml (1 day)
4. IFN 10^4 u/ml (1 day)
5. IFN 10^3 u/ml (5 days)
6. IFN 10^3 u/ml (10 days)
7. IFN 10^3 u/ml (15 days)
8. IFN 10^3 u/ml (20 days)
9. IFN 10^3 u/ml (30 days)

図 1 HTLV-1 感染細胞である SMT-1(A), MT-2(A), OKM-2(A), HUT 102 (B) における gag 蛋白発現に対する IFN の影響。それぞれの細胞は $10^2 \sim 10^4$ U/ml 濃度の IFN によって培養した後, 可溶化し, ウェスタンブロット法によって gag 蛋白の発現を検討した。

現と共に認められなかった。また、HUT 102 における P 53 と P 19 の発現量は、MT-2, SMT-1, OKM-2 に比べて少なかった。

OKM-2 と SMT-1 との相違点は、前者が IFN- γ 非産生株であり後者は IFN- γ 産生株であること、および、IFN- α によって前者では抗ウイルス状態が誘導されるのに対し、後者では誘導され難いことである。しかし、これら両培養細胞における gag 蛋白の発現パターンは同一であったことから (図 1 A lane 1 と 7), gag 蛋白の発現は IFN- γ の自発的産生能および IFN- α による抗ウイルス状態の誘導のいずれにも関連していないものと考えられる。一方、SMT-1 と OKM-2 の共通点は IFN- α によって細胞増殖が抑制されるので、この細胞増殖抑制作用と、両株における gag 蛋白発現パターンの同一性との関係には興味深いものがあり、今後の検討課題である。

次に IFN- α によって、これらの培養細胞を経目的に処理した場合の、gag 蛋白の発現について検討した。図 1 に示すように、いずれの培養細胞においても、gag 蛋白の発現は IFN- α の処理によってほとんど変化しなかった。特に MT-2 や OKM-2 株でも変化しなかったことは、レトロウイルスに対する IFN- α の抑制効果が、通常のウイルスに対する抗ウイルス作用とは異なる系で行われることを示唆している。MT-2 株などでは高力価の IFN- α によって、細胞増殖抑制が認められたり⁸⁾、2-5 AS が誘導されるという報告⁹⁾もあり、高力価の IFN- α を用いた検討も必要と思われる。

HUT 102 株においては IFN- α , 10^3 IU/ml で 30 日間 passage を行った場合に、gag 蛋白の発現量に変化が認められた。図 1 B に示すように、IFN- α , 10 日間処理時から徐々に P 53 の発現量が減少するとともに P 19 の発現量が増加する傾向が認められた。これは、IFN- α によって gag 蛋白の processing の段階に変化が生じたか、あるいは P 53 の合成が抑制されると

同時に、P 53 から P 19 への processing が促進されたためと考えられる。

以上 IFN に対する感受性の異なる培養細胞株を用いて、IFN(- α) の gag 蛋白発現に対する影響を検討したが、IFN は gag 蛋白発現にほとんど影響を与えないことが判明した。今後は envelope 蛋白である gP 48, gP 36 および gP 12 などの発現や、抗ウイルス状態成立に関与する 2-5 A 合成酵素の誘導などと IFN との関連性を検討してゆきたい。

REFERENCES

1. S. Pestka, J. A. Langer, K. C. Zoon, and C. E., Samuel : Interferon and their action, *Ann. Rev. Biochem.* 56 : 727-777, 1987.
2. P. Staeheli : Interferon-induced protein and the antiviral state, *Advances in Virus Res.* 38 : 147-200, 1990.
3. K. Saigo, S. Shinozawa, J. Wakuya, K. Ueda, N. Yamaguchi, H. Shibata and T. Masaoka : Alpha-interferon treatment for adult T-cell leukemia : low levels of circulating alphainterferon and its clinical effectiveness, *Blut.* 56 : 83-86, 1988.
4. J. Le, W. Prenskey, D. Henriksen, and J. Vilcek : Synthesis of alpha and gamma interferons by a human cutaneous lymphoma with helper T-cell phenotype, *Cellular Immunol.*, 72 : 157-165, 1982.
5. M. Matsuyama, K. Sugamura, and Y. Hinuma : Constitutive production and characterization of interferongamma in a human T-lymphoblastoid cell line transformed by a human retrovirus, *Microbiol. Immunol.*, 28 : 1333-1343, 1984.
6. M. Matsuyama, K. Sugamura, and Y. Hinuma : Human T-lymphoblastoid cell lines with high and low abilities to produce interferon-gamma constitutively and their susceptibilities to interferon, *Microbiol. Immunol.*, 31 : 541-550, 1987.
7. N. Fujii, K. W. Kwon, E. Isogai, H. Isogai, T. Indoh, T. Murakami, K. Kimura, S. Seki-

- guchi, and K. Oguma : Effect of interferon on cells persistently infected with human T cell leukemia virus (HTLV-I), Tumor Res. 25 : 1-6, 1990.
8. T. Oka, T. Ohtsuki, H. Sonobe, M. Furihata, and I. Miyosi : Suppressive effects of interferons on the production and release of human T-lymphotropic virus type-I (HTLV-I), Arch. Virol. 115 : 63-73, 1990.
9. 印藤智一, 谷敷輝夫, 村上忠之, 木村浩一, 藤井暢弘, 小熊恵二, 松本憲一 : ヒト成人T細胞白血病ウイルス (HTLV-1) 感染細胞におけるオリゴ-2', 5'-アデニル酸合成酵素の変動, 第65回北海道臨床衛生検査学会講演集, p 50, 1991.