

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590468

研究課題名(和文) ウイルス学的シナプスを介した HTLV-1 感染機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of virological synapse mediated HTLV-1 infection

研究代表者

樋口 雅也 (HIGUCHI MASAYA)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：50334678

研究成果の概要(和文)：HTLV-1はウイルス感染細胞と非感染標的細胞との緊密な接触、いわゆるウイルス学的シナプスを介して感染が成立する。我々は、このシナプスを介したHTLV-1細胞間感染において、細胞極性形成因子であるPDZドメイン蛋白Dlg1-MPP7複合体が重要な機能をもつことを見出した。またHTLV-1受容体であるGLUT-1はPDZドメイン蛋白との相互作用により受容体として機能していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：HTLV-1 infection is established through the tight interaction between HTLV-1 infected cells and target cells, so called the virological synapse. In this study, we found that PDZ domain containing cell polarity proteins Dlg1 and MPP7 play a crucial role in the HTLV-1 cell-to-cell infection. We also found that a HTLV-1 receptor GLUT-1 functions through its interaction with PDZ domain containing proteins.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：細胞、感染、シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

ヒトレトロウイルスであるHTLV-1は、CD4 T細胞の悪性増殖を特徴とする成人T細胞白血病(ATL)の原因ウイルスである。HTLV-1は主として母乳や血液を介して体内に侵入するが、ウイルス感染細胞と非感染標的細胞との緊密な接触、いわゆるウイルス学的シナプスを介して感染が成立する。このウイルス学的シナプスとは、抗原提示細胞とT細胞との接触による情報伝達システムである免疫学的シナプスとの類似性から、近年提唱された概念

である。

HTLV-1がウイルス学的シナプスを介して感染する際、シナプスにはウイルス粒子を形成するGag、Env蛋白およびウイルス受容体GLUT-1のシナプスへの集積がみられ、微小管形成中心(Microtubule Organizing Center; MTOC)がシナプス近傍へと移動する。このMTOCのシナプス近傍への移動は細胞の極性化を特徴づける現象であり、したがってウイルス学的シナプスを介したHTLV-1の細胞間感染には、細胞の極性化が重要な役割を担っ

ていることが考えられる。

免疫学的シナプスにおける細胞極性化の誘導および維持には、D1g1、Scribble を始めとする PDZ ドメイン蛋白が密接に関与している。したがって、このウイルス学的シナプス形成および維持においても、D1g1 や Scribble などの PDZ ドメイン蛋白が同様に機能している可能性が高い。

そこで我々は、HTLV-1 感染 T 細胞株 (MT-2) および非感染 T 細胞株 (MOLT4) を用いて D1g1 ノックダウン細胞を作製した。HTLV-1 感染細胞株と非感染細胞株とを混合培養すると、HTLV-1 細胞間感染により合胞体が形成され、巨大細胞が出現するが、D1g1 ノックダウン細胞ではこの合胞体形成が顕著に低下した。この結果は、D1g1 の機能が HTLV-1 の細胞間感染に重要であることを示唆している。本研究では、D1g1 をはじめとする細胞極性形成因子が、いかにウイルス学的シナプス形成およびウイルス粒子の標的細胞への伝播を遂行しているのか？その分子メカニズムの全貌を明らかにすることを旨とする。

2. 研究の目的

本研究では以下に掲げる項目を目的とした。

- (1) D1g1 の HTLV-1 細胞間感染における機能解明：D1g1 が HTLV-1 感染のいかなる過程において、すなわちウイルス学的シナプス形成から、ウイルス粒子の標的細胞への移動へと至る過程のどの段階で、どのように機能しているのかを明らかにする。
- (2) D1g1 を中心とした分子ネットワークの同定：ウイルス感染細胞および標的細胞より D1g1 蛋白複合体を精製し、LC-MS/MS を用いた質量分析により D1g1 結合蛋白を網羅的に同定する。これらの蛋白分子の HTLV-1 感染における役割を明らかにし、HTLV-1 感染における D1g1 を中心とした蛋白分子ネットワークを解明する。
- (3) HTLV-1 受容体 GLUT-1 の感染過程における機能解明：HTLV-1 受容体 GLUT-1 も C 末端に PDZ ドメイン結合配列 (PBM) をもつ。D1g1 分子ネットワークが GLUT-1 のウイルス学的シナプスへの局在、さらにウイルス結合・侵入の過程にどのように関わっているのかを解明する。
- (4) HTLV-1 感染過程の可視化：マウスレトロウイルス MLV の Gag、Env、およびその受容体を蛍光標識することにより、MLV の繊維芽細胞間の感染過程の可視化が可能である。このシステムを HTLV-1 細胞間感染系に応用することにより、HTLV-1 感染

過程の可視化を行い、生きた T 細胞間における HTLV-1 感染の動的過程を明らかにする。さらにこの系を用いて、ウイルス感染における D1g1 ネットワークの機能を可視化する。

3. 研究の方法

(1) D1g1 の HTLV-1 細胞間感染における機能解明：

- ① D1g1 ノックダウン細胞において Gag、Env、MTOC の局在を検討し、シナプス形成効率を定量化する。
- ② D1g1 のウイルス学的シナプスにおける局在を免疫染色により検討する。
- ③ D1g1 変異体を D1g1 ノックダウン細胞に戻し、ウイルス学的シナプス形成における D1g1 機能領域を同定する。

(2) D1g1 分子ネットワークの同定：

- ① D1g1 蛋白複合体を精製し LC-MS/MS により D1g1 結合蛋白を同定する。
- ② 同定した分子のノックダウンを行い、HTLV-1 細胞間感染効率を検討する。

(3) HTLV-1 受容体 GLUT-1 の感染過程における機能解明：

- ① GLUT-1 欠損細胞に GLUT-1 PDZ ドメイン結合領域欠損変異体を発現させ、この領域の HTLV-1 感染効率を検討する。
- ② GLUT-1 PDZ ドメイン結合領域に結合する蛋白分子を LC-MS/MS により同定する。

(4) HTLV-1 感染過程の可視化：

Gag または Env に蛍光蛋白を融合させた HTLV-1 遺伝子を作成し、ウイルス粒子を蛍光で可視化する。細胞間感染におけるウイルス粒子の 3 次元動的動態を検討する。

4. 研究成果

(1) D1g1 の HTLV-1 細胞間感染における機能解明：

HTLV-1 感染細胞 MT-2 と非感染細胞 MOLT4 を混合培養し、抗 HTLV-1 Gag 抗体または抗 HTLV-1 Env 抗体染色により、ウイルス学的シナプスの可視化を試みた。さまざまな条件を試したが、シナプス形成効率を定量化できるほど確実にシナプスを可視化することは困難であった。シナプスの形態学的観察には細胞株ではなく、実際の患者の末梢血細胞等を使用するなどの工夫が必要であるかもしれない。次に D1g1 のシナプスへの局在を検討したが、市販の抗 D1g1 抗体では良好な染色像が得ら

れず断念した。GFP-Dlg1 を細胞に発現させることも試みたが、Dlg1 自体に細胞毒性があるため、発現細胞を作製するのは困難であった。従って、テトラサイクリン発現誘導システムなどを使って Dlg1 を誘導的に発現させる系の構築などが必要であると考えられた。

(2) Dlg1 分子ネットワークの同定：

HTLV-1 のトランスフォーミング蛋白である Tax1 は C 末端に PDZ ドメイン結合配列 (PBM) もち、Dlg1 と強固に結合する。この性質を用い、抗 Dlg1 抗体の代わりに GST-Tax1 蛋白を用いて Dlg1 複合体を精製し、LC-MS/MS 解析により蛋白を同定した (図 1)。

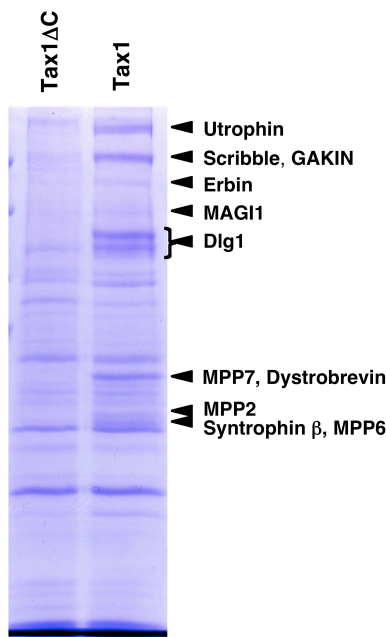
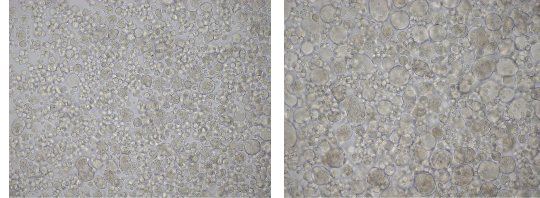


図 1 Dlg1 結合因子の同定

この結果、Dlg1 以外の Scribble、MAGI1、Syntrophin-beta、MPP7 などの PDZ ドメイン蛋白の他、既知の Dlg1 結合蛋白 GAKIN の同定に成功した。これらの蛋白のうち Scribble、MAGI1、Syntrophin-beta は Tax1 PBM 結合蛋白であったが、MPP7 と Tax1 の結合は確認できなかった。そこで MPP7 と Dlg1 の結合を免疫沈降法により検討したところ、両者の非常に強い結合が確認された。したがって、MPP7 は新規の Dlg1 結合蛋白であることが明らかとなった。HTLV-1 細胞間感染における MPP7 の機能を解析するため、HTLV-1 感染 T 細胞株 (C91/PL) およびターゲット細胞となる非感染 T 細胞株 (MOLT4) を用いて、MPP7 ノックダウン細胞を作製し解析を行った。両細胞を混合培養し、HTLV-1 感染による合胞体形成を見たところ、ターゲット細胞において MPP7

をノックダウンしたときのみ合胞体形成の顕著な低下が認められた (図 2)。このことから MPP7 は Dlg1 同様 HTLV-1 細胞間感染において重要な機能をもつこと、そしてその機能はターゲット細胞側で発揮されることが明らかとなった。



MPP7ノックダウン コントロール

図 2 MPP7 ノックダウンによる合胞体形成能の低下

したがって MPP7 は Dlg1 と協調し、ウイルス学的シナプス形成に寄与していると考えられる。HTLV-1 細胞間感染における MPP7 の機能領域を同定するため、ノックダウン細胞に MPP7 各種変異体を戻す実験を現在進行中である。一方 MPP7 は機能不明の新規分子であることから、その生体内機能を明らかにする目的で Mpp7 ノックアウトマウスを作成した。このマウスの解析により Mpp7 の新たな機能が解明されれば、HTLV-1 細胞間感染における MPP7 の機能解明にもフィードバックされうると考えている。マウスには目立った異常は認められないが、ある種の抗原刺激に対して T 細胞が過剰に反応する現象が見られている。現在その詳細なメカニズムについて解析中である。

(3) HTLV-1 受容体 GLUT-1 の感染過程における機能解明：

HTLV-1 はターゲット細胞表面に発現する GLUT-1 に吸着することにより感染するが、293T 細胞において GLUT-1 と Dlg1 の局在を検討したところ、両者は特に細胞接着面付近で共局在していた。GLUT-1 はその C 末端に PDZ ドメイン結合領域 (PBM) をもつ。PBM を欠失した GLUT-1 変異体 (GLUT1ΔC) を GLUT-1 発現のない MDBK 細胞に導入し、HTLV-1 感染細胞と混合培養することにより HTLV-1 感染効率を検討した。野生型 GLUT-1 導入細胞では HTLV-1 感染による合胞体形成が多数みられたが、変異 GLUT-1 ではこの活性は顕著に低下していた (図 3)。

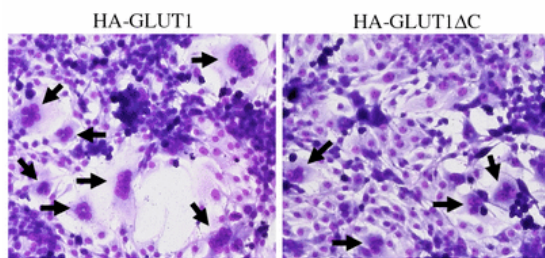


図3 GLUT-1 PBM 欠失変異体発現細胞における HTLV-1 感染効率の低下

GLUT-1 と Dlg1 が共局在を示すことから、Dlg1 は自身の PDZ ドメインを介して GLUT-1 と結合し、細胞間シナプスへの GLUT-1 の集積を促していることが予想されたが、免疫沈降およびプルダウン法においても GLUT-1 と Dlg1 の結合は認められなかった。さらに MPP7 と GLUT-1 との結合も検討したが、有意な結合は認められなかった。また、MPP7 ノックダウン細胞における GLUT-1 の局在を免疫蛍光染色で検討したところ、コントロール細胞との違いは認められなかった。さらに細胞表面における GLUT-1 の発現を、GLUT-1 に結合する HTLV-2 Env-GFP 融合蛋白を用いて FACS により検討したが、両者に発現量の違いは認められなかった。このことから、Dlg1-MPP7 複合体が GLUT-1 の局在を制御し、HTLV-1 の細胞間感染を促進している可能性は低いことが示唆された。ウイルス学的シナプスにはインテグリン分子などを介した、細胞間接着も重要な役割を果たすと考えられており、Dlg1-MPP7 複合体はこれらの接着分子の機能制御に関わっている可能性も考えられる。

(4) HTLV-1 感染過程の可視化:

研究期間内に本実験に着手することはできなかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

Yoshida S*, Higuchi M*, Shoji T, Yoshita M, Ishioka K, Takahashi M, Oie M, Tanaka Y, Uchiyama M, Fujii M. Knockdown of synapse-associated protein Dlg1 reduces syncytium formation induced by human T-cell leukemia virus type 1. *Virus Genes* 37: 9 -15 (2008) 査読有 *equally contributed

[学会発表] (計1件)

樋口雅也、藤井雅寛 新規 HTLV-1 Tax1 結合

蛋白 MPP7 の同定とその生体内機能解析、第 68 回日本癌学会学術総会、2009 年 10 月 1 日、パシフィコ横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

樋口 雅也 (HIGUCHI MASAYA)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：50334678