

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 18 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24501304

研究課題名(和文) HTLV-1 Rexによる宿主NMDハイジャックと細胞腫瘍化との関わり

研究課題名(英文) Implication of NMD inhibition by Rex to the host cell leukemogenesis

研究代表者

中野 和民 (Nakano, Kazumi)

東京大学・新領域創成科学研究科・助教

研究者番号：60549591

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：HTLV-1(Human T cell Leukemia Virus Type-1)はヒトT細胞に感染し悪性度の高い末梢血T細胞腫瘍、成人T細胞白血病(ATL)を引き起こす。我々はこれまでウイルスRNAの核外輸送を司るHTLV-1 Rexが宿主細胞のmRNA品質管理機構(NMD)を抑制しウイルスRNAを安定化することを見出した。本研究ではRexタンパク質のN末領域(X)が、NMD抑制に深い関わりを持つこと、Rexにより約9000個の遺伝子発現パターンが有意に変化することが分かった。これらの結果より、RexがX領域を介してNMDを抑制しつつ、様々な細胞内経路に影響を与えている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) is a conserved cellular mRNA quality control mechanism. RNA signals to express viral genes potentially initiate NMD, nevertheless it is not clear how viruses evade NMD. Human-T-cell Leukemia Virus type-1 (HTLV-1) is a retrovirus responsible for Adult T-cell Leukemia (ATL). Previously, we demonstrated that HTLV-1 Rex approves the stability of viral RNA by inhibiting NMD. In the present study, we focused on the molecular mechanism of NMD inhibition by Rex, and further clarified that the N-terminal region of Rex with unknown function (domain-X), was critical for effective suppression of NMD activity. We also showed that overexpression of Rex resulted in significant changes of more than 9,000 gene expression profiles in CEM human T cell line. Our results propose a possibility that Rex stabilizes the viral RNA by inhibition of NMD through the domain-X, and perturbs cellular mRNA metabolism and host cell homeostasis for its new function.

研究分野：ウイルス発がん

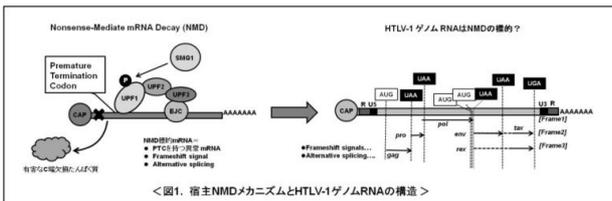
キーワード：HTLV-1 Rex NMD ATL

1. 研究開始当初の背景

1-1. HTLV-1 と ATL: 成人 T 細胞白血病 (ATL)は HTLV-1(Human T-cell Leukemia Virus Type1)の感染によって引き起こされる T 細胞性白血病である。50~60 年という長い潜伏期間に、HTLV-1 感染不死化 T 細胞に複数のゲノム異常が蓄積し腫瘍化する。現在日本では約 120 万人の HTLV-1 感染者がおり、毎年約 1000 人の感染者が ATL を発症すると報告されているが、医療の現場では薬剤耐性細胞の出現などにより再発を抑えることができず、予後は極めて不良であり、有効な治療法は未だ開発されていない⁽¹⁾。このような状況にあって、早期診断、発症予防、革新的治療法の早急な開発が望まれており、我々基礎研究に携わる者の役目として、未だ不明のままである HTLV-1 の感染および ATL の発症機序を明らかにし、その情報を医療現場にフィードバックすることは急務である。

レトロウイルスである HTLV-1 は感染後速やかにヒトゲノムに組み込まれ潜伏期に入る。そのために一度感染が成立すると、体内からウイルスを駆除することはほとんど不可能である。よって感染の防止、そして感染が成立する前にウイルスを駆除することが最も望ましいが、HTLV-1 は主に母乳によって母から新生児に母子感染し、新生児期より前の胎児期にすでに母体内で感染が起っている可能性も示唆されており、ワクチンや逆転写阻害剤などの服用により感染を予防することが難しい。加えてこのような感染の現場は実験室での再現が難しく、HTLV-1 の感染時に T 細胞内外で起る事象に関しては、ほとんど明らかにされていない。

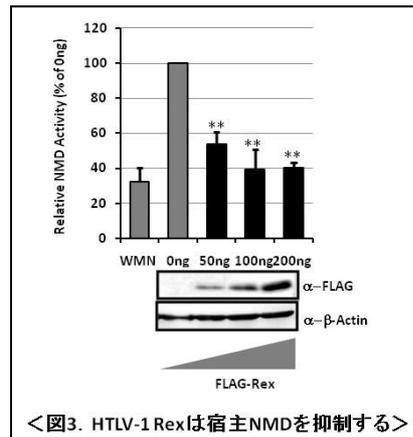
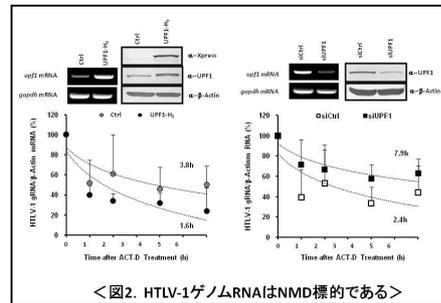
1-2. HTLV-1 と NMD: HTLV-1 という異物 RNA がヒト T 細胞に侵入する現象は、宿主細胞にとってもウイルスによっても異常事態に違いない。我々はこれまで、HTLV-1 の感染成立および感染細胞の腫瘍化の基盤となる宿主細胞内の恒常性の攪乱の一つとして、HTLV-1 感染による宿主 mRNA 品質管理機構、Nonsense-Mediated mRNA Decay (NMD)の機能不全に注目して研究を行ってきた。NMD は真核生物細胞に普遍的に存在し、細胞にとって有害となる異常 mRNA、特にナンセンスコドンを持つ mRNA を排除する機構である(図 1)。近年フレームシフトシグナルそのものが NMD の標的となること、そして alternative splicing form を持つ遺伝子の約 1/3 が NMD 標的であることが報告され、これらの内在性 mRNA も NMD によって正常な発現量が保たれている⁽²⁻⁷⁾。これらの内在性 NMD 標的には細胞周期や細胞増殖の調節



に関わるものが多く、NMD は細胞の恒常性と正常な機能の維持に不可欠である。

HTLV-1 を含むレトロウイルスゲノム RNA は、9kb 弱の短い領域に 10 を超えるウイルス構造タンパク質および機能タンパク質をコードしている。それは 3 つの reading frame と 2 回のスプライシングを組み合わせることで可能となるが、このような複雑な構造をした mRNA は真核細胞には本来存在しない。それにも関わらず、HTLV-1 RNA は排除されることなく宿主ゲノムに組み込まれるが、その分子機構は明らかになっていない。

1-3. これまでの研究成果: 以上のような背景をふまえ我々は宿主 NMD 機構と HTLV-1 の分子生物学的攻防を明らかにするための実験を行ってきた。これまで我々は、HTLV-1 感染細胞株と ATL 細胞株において NMD 活性が抑制されていることを見出し、これらの細胞において NMD に異常が起こっている可能性を見出した。また HTLV-1 ゲノム RNA が宿主 NMD の標的となっていることを確認し(図 2) それに対して HTLV-1 の機能タンパク質の一つである Rex が NMD の活性を抑制していることを発見した(図 3)。



2. 研究の目的

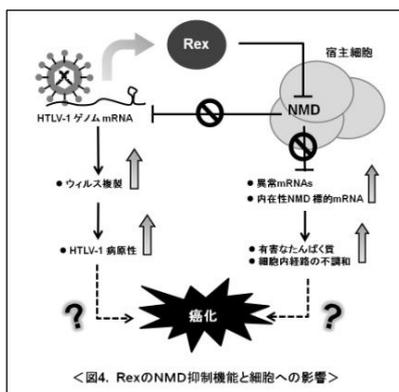
これまで我々は、宿主細胞 NMD が HTLV-1 RNA を標的とする一方で、ウイルス RNA の安定化と核外輸送を司るウイルスタンパク質 Rex が NMD を抑制し、自己のゲノム RNA を安定化すること、一方で NMD 抑制によって宿主細胞の細胞内環境が影響を受けていることを見出し、宿主細胞と HTLV-1 に NMD を介した新たな Host-Pathogen Interaction が存

在することを明らかにした。そこで本研究では、Rex 分子がどのように宿主細胞の NMD 因子と相互作用し、NMD を抑制し自己複製に適した環境を整備しているのか、その分子メカニズム明らかにすることを目的とした。一方で、このような Rex の作用によって感染 T 細胞にどのような傷跡が残り、がん化の引き金となっていくのか、宿主細胞への影響にも注目した。また、HTLV-1 感染実験系を確立し、ヒト T 細胞への感染の場を再現することによって、Rex をはじめとするウイルス因子の働きによって HTLV-1 の感染や潜伏がどのように成立するのか明らかにする。

NMD はこれまで細胞内の異常 mRNA を排除する細胞内機能であると捉えられてきたが、我々の研究室では、初めて外来 RNA に対する NMD の影響に目を向け研究を行ってきた。このような視点からの研究の継続が、細胞の defense response 機構の一部としての、NMD の新しい機能を見出すことに繋がると期待している。また新たな HTLV-1 ウイルス学的知見を積み重ねることにより、HTLV-1 感染を効果的に阻害する新たな分子標的を発見することにもつながると期待している。

3. 研究の方法

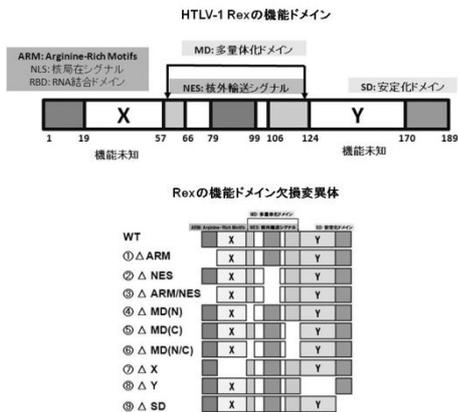
これまでの我々の研究より、HTLV-1 のゲノム RNA が NMD の標的として分解されること、それに対して HTLV-1 Rex が NMD を抑制し、自己の RNA を安定化していることが分かった。しかしながら Rex による NMD 抑制の分子機構、また NMD の抑制によって HTLV-1 の病原性および宿主細胞の恒常性にどのような変化が起こるのかは分かっていない(図 4)。そこで本研究ではこれらのことを明らかにすることを目標に、以下の研究計画にそって実験を行なった。



3-1. Rex の変異体を用いた NMD 抑制機構の

説明: Rex は約 27kDa の RNA 結合タンパク質である(図 5)。我々はまず、様々な機能ドメインを欠損した Rex 変異体を作成し、どのドメインが NMD 抑制に関わっているのか明らかにした。NMD 活性の測定には、 β -globin NMD 活性レポーター系 (Renilla-Luc-WT- β -globin と Firefly-Luc-PTC- β -globin の発現量の比を

dual-luciferase assay (にて求める)を用いた。



<図5. Rexの一次構造と変異体>

3-2. Rex のレトロウイルス発現系の構築と T

細胞株への導入: これまで、Rex の機能解析には Rex 発現プラスミドを HeLa などのヒト上皮細胞株に一過性過剰発現し実験を行ってきた。しかしながら HTLV-1 の感染標的であるヒト T 細胞に対して発現プラスミドの高効率のトランスフェクションは難しく、今後 T 細胞株での Rex の影響を検討していくためには、他の発現系を構築する必要がある。そこで本実験では、リコンビナント・レトロウイルスによる Rex の強制発現系を確立し、HTLV-1 非感染 T 細胞株 (Molt-4、CEM など) に Rex を強制発現し、これまで一過性の Rex 発現によって非 T 細胞株 (HeLa、293T など) で観察された NMD 活性の抑制が、実際の HTLV-1 の感染の場である T 細胞でも確認できるか観察した。さらに T 細胞株に対する Rex の影響を解析するため、CEM 細胞に Rex を過剰発現させ、マイクロアレイ解析によって、遺伝子発現プロファイルの変化を検討した。

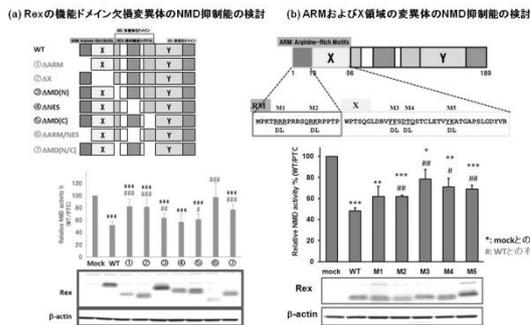
3-3. HTLV-1 の無細胞感染系の確立とヒト T

細胞株への感染実験: HTLV-1 の感染にはウイルス粒子を産生する感染細胞と被感染細胞の接触が必要であり、感染細胞から放出されるウイルス粒子のみでの感染は非常に効率が低いとされてきた。これまでの我々の実験でも、HTLV-1 感染 T 細胞株 MT-2 との共培養によって、被感染細胞株に HTLV-1 を感染させる手法を用いてきた。この方法のメリットは簡便かつ高効率に HTLV-1 の感染を成立させることができる点であるが、被感染細胞での感染後の経過を観察するためには、MT-2 を完全に除去する必要があり、そのためには被感染細胞株は HeLa などの上皮系張り細胞が望ましかった。しかし今後 HTLV-1 の現実的な感染の場を実験室で再現するためには、ヒト T 細胞への効率の良い無細胞感染系の構築が望まれる。そこで我々は、まず MT-2 培養上清から効率良く感染性を保った HTLV-1 ウイルスを単離する方法を検討した。次に HTLV-1 感染性クローン (pACH) を

293FT 細胞に導入し、HTLV-1 ウイルスを産出する系の確立を試みた。

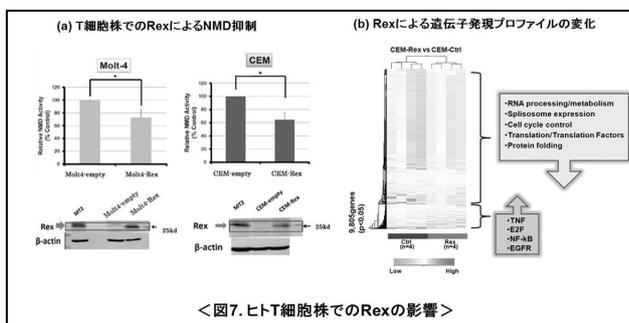
4. 研究成果

4-1. Rex の変異体を用いた NMD 抑制機構の解明: NMD 抑制に必要な Rex のドメインを検討するため、Rex の機能ドメイン (RNA binding/NLS、NES、多量体化、安定化、機能未知領域) をそれぞれ欠損させた変異体 Rex と野生型 Rex で、NMD 抑制能力を比較した。その結果、N 末の RNA 結合ドメインまたは 2 つの機能未知領域のうち N 末に近い領域 (X) を欠損している Rex 変異体では、NMD 抑制機能が減弱することが明らかとなり、これらの領域が NMD 抑制機能に必要であることが分かった (図 6)。そこで、RNA 結合ドメインと X 領域についてさらに詳しく検討するため、これらの領域中に 5 つのアミノ酸変異体を設計し、同様に NMD 抑制能力を比較した。その結果、特に X 領域中のアミノ酸変異によって NMD 抑制機能が減弱し、さらに X 領域の重要性が示唆された (図 6)。



<図6. Rex 変異体の NMD 抑制能力>

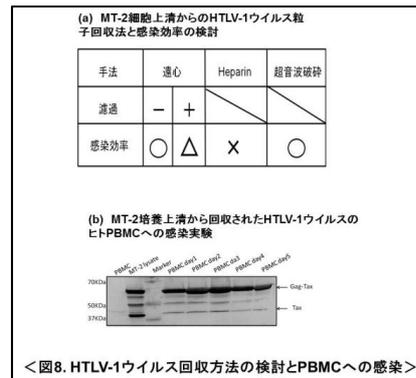
4-2. T 細胞株での Rex 強制発現系の構築: 我々はレトロウイルス発現系を構築し、Rex を安定的に発現する T 細胞株 (Molt-4、CEM) を樹立することに成功した。Rex を過剰発現させた細胞株における NMD 活性を測定したところ、有意に NMD 活性が抑制されており、HTLV-1 感染の場であるヒト T 細胞においても Rex が NMD を抑制していることが分かった (図 7)。次にヒト T 細胞株 CEM に Rex を過剰発現させ、遺伝子発現プロファイルの変化をマイクロアレイによって解析した。その結果、約 9,000 個の遺伝子発現パターンが、コントロール細胞に比べ有意に変化しており、そのうち約 85% の遺伝子発現が低下して



<図7. ヒト T 細胞株での Rex の影響>

いた。Rex による遺伝子発現プロファイルの変化を詳細に解析した結果、E2F 経路や炎症応答に関わる遺伝子が過剰発現し、RNA やタンパク質の発現調節に関わる遺伝子発現が低下していることが分かった (図 7)。このことから、これまでウイルス RNA の輸送が主な機能と考えられてきた Rex が、宿主細胞の恒常性に広範に影響を与えている様子が示唆された。

4-3. HTLV-1 の無細胞感染系の確立とヒト T 細胞への感染実験: MT-2 培養上清からの HTLV-1 ウイルス粒子の単離実験の結果を図 8 にまとめた。まず MT-2 培養上清から MT-2 を除去する方法として、1500rpm での遠心分離 5 分と、遠心および 0.44μm フィルターでの濾過を比較すると、濾過により HTLV-1 の感染性が著しく低下した。次に MT-2 細胞表面のバイオフィーム様構造からウイルス塊を効率良く分離する方法を検討した。HTLV-1 は、細胞表面の heparan sulfate proteoglycan (HSPG) への結合を足掛りに細胞内へ侵入する。よって細胞表面に付着した HTLV-1 を効率良く培養上清中に遊離させるため、Heparin による置き換え、または MT-2 細胞の超音波破碎を評価した。その結果 Heparin 処理ではウイルス粒子を効率的に回収出来ないことが判明した。一方温和な条件化での超音波破碎によって、感染力を維持したままの HTLV-1 が回収できることがわかった。超音



<図8. HTLV-1 ウイルス回収方法の検討と PBMC への感染>

波破碎によるウイルス液の回収では、生きたウイルス産生細胞混入の可能性が少なく、無細胞感染系の確立に適した方法といえる。そこで、超音波破碎によって得られた HTLV-1 ウイルス液を PBMC に添加し感染実験をおこなった結果、感染 1 日目から 5 日目で Tax の発現が見られ、感染成立が確認できた (図 8)。最後に HTLV-1 感染性プラスミド pACH を 293FT 細胞に導入し、HTLV-1 を構築する全タンパク質を強制発現させ、単一かつ完全な HTLV-1 ウイルス粒子の再構築と産生を試みた。pACH はリコンビネーションを起こしやすい不安定なプラスミドであることが分かり、現在大腸菌内で安定的に pACH を大量調整できる系を検討している。

4.4. 考察および今後の予定

4-4-1. Rex の変異体を用いた NMD 抑制機構

の解明：これまで主に Rex の N 末側の領域が、NMD の抑制機能に重要な働きをしていることが明らかになった。一方で Rex が NMD を抑制するメカニズムにおいて、どのような宿主細胞因子と相互作用しているのかは不明である。そこで今後は Rex と結合する宿主因子を同定することを目標に実験を行う。具体的には、His-Halo-Rex 発現プラスミドを作成し、293FT 細胞において強制発現し、生理的な条件下で His タグと Halo タグによる二重精製を行い、精製された Rex タンパク質と共沈してくる細胞内因子を MS 解析によって同定する。さらにこれまで作成した各種 Rex 欠損変異体についても同様の解析を行い、特に NMD 抑制に重要と考えられる N 末側の機能未知領域に結合する宿主因子を同定する。

4-4-2. T 細胞株での Rex 強制発現系の構築:

本実験において、Rex がヒト T 細胞でも NMD を抑制するばかりでなく、多くの遺伝子発現プロファイルを変化させ、細胞内の様々な経路に影響を与えていることが分かった。今後は Rex による遺伝子発現プロファイルの変化をより詳細に解析し、Rex が影響を及ぼす細胞内経路を絞り込む。次に Rex によってそれらの細胞内経路の活性がどのような影響を受けているか、そしてそれによって細胞表現形にどのような変化が現れるか、実験的に検証し、Rex の新たな機能と感染細胞への影響についてさらに知見を深める。

4-4-3. HTLV-1 の無細胞感染系の確立とヒト T 細胞への感染実験:

MT-2 培養上清からの HTLV-1 ウイルス粒子回収について様々な方法を検討した結果、温和な条件で細胞破碎を行うのが最適であることがわかった。HTLV-1 の感染にはウイルス粒子がバイオフィーム様の塊を形成することが必要であると考えられているが、温和な条件での超音波破碎ではこのバイオフィーム様ウイルス塊を大きく破壊することなく、感染に必要なウイルス集合体を維持した状態で回収できたためと考えられる。一方でウイルス液を濾過すると感染効率が顕著に低下したことから、HTLV-1 のエンベロープは非常に壊れやすく、フィルターの通過に耐えられないと考えられる。また MT-2 を Heparin 処理することによって、「ウイルス-HSPG 結合」を「ウイルス-Heparin 結合」に置換し、ウイルスを細胞表面から隔離する方法でも、感染効率の顕著な現象が見られた。これは、回収されたウイルスに Heparin が結合しており、ウイルスと細胞表面の HSPG との結合を阻害しているためと考えられる。

本実験で HTLV-1 感染プラスミド pACH からのウイルス産生を試みたが、pACH はリコンビネーションを起こしやすいため、今後は大腸菌での大量調整を安定的に行える系の確立を目指す。pACH の安定的大量調整が可能になったら、293FT 細胞に pACH を導入し

て HTLV-1 ウイルスを産生させ、前述の超音波破碎を用いてウイルス粒子を回収する。次に HTLV-1 感染の場である幼若 T 細胞への感染実験を行い、感染後の細胞内環境の変化、および長期培養したときの細胞の形態に現れる変化を明らかにする。

参考資料

1. 「HTLV-1 と疾患」渡邊、上平、山口編 (2007) 文光堂
2. Mendell *et al.* (2004) Nonsense surveillance regulates expression of diverse classes of mammalian transcripts and mutes genomic noise. *Nat.Gen.*36: 1073-1078.
3. Plant *et al.* (2004) A programmed -1 ribosomal frameshift signal can function as a *cis*-acting mRNA destabilizing element. *Nuc. Acid. Res.* 32: 784-790.
4. Lewis *et al.* (2003) Evidence for the widespread coupling of alternative splicing and nonsense-mediated mRNA decay in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **100**, 189-192.
5. Cuccurese *et al.* (2005) Alternative splicing and nonsense-mediated mRNA decay regulate mammalian ribosomal gene expression. *Nucleic Acids Res.*, **33**, 5965-5977.
6. McGlinchy and Smith (2008) Alternative splicing resulting in nonsense-mediated mRNA decay: what is the meaning of nonsense? *Trends Biochem Sci* **33**, 385-393.
7. Saltzman *et al.* (2008) Regulation of Multiple Core Spliceosomal Proteins by Alternative Splicing-Coupled Nonsense-Mediated mRNA Decay. *Mol Cell Biol* **28**, 4320-4330.

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 2 件)

1. Nakano K, Ando T, Yamagishi M, Yokoyama K, Ishida T, Ohsugi T, Tanaka Y, Brighty D-W, Watanabe T. (2013) Viral interference with host mRNA surveillance, the nonsense-mediated mRNA decay (NMD) pathway, through a new function of HTLV-1 Rex: implications for retroviral replication. **Microbes Infect** 15(6-7):491-505. (doi: 10.1016/j.micinf.2013.03.006) (査読有り)
2. Nakano K, Watanabe T. (2012). HTLV-1 Rex: the courier of viral messages, making use of the host vehicle. (Review Article) *Front Microbiol* 3:330. (doi: 10.3389/fmicb.2012.00330) (査読有り)

〔学会発表〕(計 6 件)

1. 唐澤伸明、**中野和民**、安東友美、橋爪大明、横山弘一、**渡邊俊樹**「宿主mRNA品質管理機構(NMD)抑制を司るHTLV-1 Rexの機能ドメインの解析」第36回日本分子生物学会年会(2013年12月5日)神戸ポートアイランド(神戸)
2. **中野和民**、宇都宮與、山口一成、内丸薫、**渡邊俊樹**「スプライシングとmRNA品質管理機構の二重不全によるATL細胞でのPTC含有異常転写産物の高発現とその影響」第72回日本癌学会学術総会(2013年10月5日)パシフィコ横浜(横浜)
3. **中野和民**、安東友美、山岸誠、横山弘一、唐澤伸明、橋爪大明、高橋隆太郎、高橋碧、石田尚臣、大杉剛生、田中勇悦、David W. Brighty、**渡邊俊樹**「ウイルス複製を有利にするHTLV-1 Rexの新たな機能の可能性と宿主細胞への影響」第2回ATLシンポジウム / 第6回HTLV-1研究会・シンポジウム(2013年8月24日)東京大学医科学研究所(東京)
4. 唐澤伸明、**中野和民**、安東友美、橋爪大明、横山弘一、**渡邊俊樹**「宿主mRNA品質管理機構(NMD)抑制を司るHTLV-1 Rexの機能ドメインの解明」第6回HTLV-1研究会・シンポジウム(2013年8月23日-8月25日)東京大学医科学研究所(東京)
5. 横山弘一、**中野和民**、安東友美、大杉剛生、田中勇悦、**渡邊俊樹**「HTLV-1 RexにおけるmRNA品質管理機構(NMD)の抑制及び宿主T細胞への影響」第35回日本分子生物学会年会(2012年12月12日)福岡国際会議場(福岡)
6. 横山弘一、**中野和民**、安東友美、大杉剛生、田中勇悦、**渡邊俊樹**「HTLV-1 Rexの宿主T細胞におけるmRNA品質管理機構(NMD)の抑制と宿主細胞への影響」第5回HTLV-1研究会・シンポジウム(2012年8月26日)東京大学医科学研究所(東京)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

中野 和民 (NAKANO, Kazumi)

東京大学大学院

新領域創成科学研究科

助教

研究者番号: 60549591

(2)研究分担者

渡邊 俊樹 (WATANABE, Toshiaki)

東京大学大学院

新領域創成科学研究科

教授

研究者番号: 30182934

(3)連携研究者

()

研究者番号: