

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25282230

研究課題名(和文) EBウイルスの潜伏感染の原因となる膜タンパク質LMP1の構造と機能相関の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the correlation between the structure of the membrane protein LMP1 derived from EB virus and its function of latent infection

研究代表者

井上 豪 (Inoue, Tsuyoshi)

大阪大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20263204

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：EBウイルス由来膜蛋白質LMP1及びLMP2Aの発現マウスを作製したところ、LMP2Aは胚中心B細胞の抗体産生細胞への分化を促進し、EBVの感染に寄与することが判った。また、全身性エリテマトーデス様症状が誘導され、自己免疫疾患と関連することが判明した。また、抗体を使い、T/NK細胞を減少させ、免疫を抑制したところ、胚中心B細胞でのLMP1とLMP2Aは互いに協調し、ホジキンリンパ腫などの増殖疾患を誘導することが分かった。また、LMP1のC末端領域でシグナル伝達に関わるCTAR1の結晶化に取り組んだところ、抗体とCTAR1の複合体結晶が得られ、1.9 Å分解能の回折強度データが得られた。

研究成果の概要(英文)：Mice expressing membrane proteins LMP1 and LMP2A derived from EV virus were prepared and their effects were investigated. It was found that LMP2A promotes the differentiation of germinal center B cells into antibody producing cells and contributes to infection of EBV by surviving low affinity B cells. In addition, systemic lupus erythematosus-like symptoms were induced and firstly proved to be associated with autoimmune diseases. In addition, T / NK cells were reduced by using its antibody, and the pathological condition of the mouse was analyzed in the state of immunosuppression. It was found that LMP1 and LMP2A cooperate with each other in germinal center B cells and induce proliferative diseases such as Hodgkin's lymphoma. The crystallization of the C-terminus region of CTAR1 involved in signal transduction in LMP1 was performed. The complex crystals between CTAR1 and its antibody of 11A1 up to 1.9 Å resolution were obtained and the structural analysis is now in progress.

研究分野：構造生物学、基礎医学、免疫学

キーワード：Epstein-Barr (EB) ウイルス 潜伏感染 不死化機構 LMP1 LMP2A 膜蛋白質 自己免疫疾患 リンパ腫

1. 研究開始当初の背景

Epstein-Barr virus (EBV)は90%以上のヒトが感染している一般的なヘルペスウイルスであるが、EBVはパーキットリンパ腫より分離されたウイルスであり、古くからリンパ腫などへの関与が知られてきた。エイズや組織移植時などの免疫抑制時に発症するリンパ球増殖疾患も、EBVが原因であることが多いことも知られている。実際にこれまでに様々な研究により癌の発症へのEBVの関与が示されてきたが、蓄積された多くの知見は *in vitro* での実験によるものであったり、適切なマウスモデルでの実験が必要であったりしたため、その分子機構は不明な点が多かった。

一方、近年ではEBVは全身性エリテマトーデスや多発性硬化症などの自己免疫疾患とも関連があるということが、主に疫学的な研究によって示唆されてきた。しかしながら、それを直接示した例はこれまでに報告されていなかった。

2. 研究の目的

EBVによるリンパ球増殖疾患や自己免疫疾患などの病態発現に関する分子の原子レベルでの反応機構を明らかにし、阻害剤開発のための構造基盤を構築することを目的とした。

これまでEBVの癌遺伝子として最も良く研究されているのが6回膜貫通型の膜タンパク質1 (Latent Membrane Protein 1、略称:LMP1)と、12回膜貫通型膜タンパク質2A (Latent Membrane Protein 2A; LMP2A)と呼ばれる膜タンパク質である。

LMP1は通常、生体内の免疫細胞で細胞の増殖やアポトーシスのシグナルを伝達するCD40と呼ばれる蛋白質を模倣し、恒常的にこのシグナル伝達経路を活性化させることで継続的に細胞増殖を促し、細胞を癌化へと導く。

本研究では癌因子であるLMP1、LMP2Aの立体構造を明らかとし、ヘルペスウイルスに起因する癌の治療薬の開発を目指す事を目的として、これら膜タンパク質の全長の大量精製および結晶化に挑戦した。また、LMP1はそのC末端にある細胞質ドメインに2カ所、tumor-necrosis-factor(

TNF)-receptor-associated factors (TRAF)ファミリー蛋白と結合し、NF- κ Bを活性化することによってB細胞の増殖やアポトーシスのシグナルに関連する領域があることが知られている。1つ目がTRAF結合配列(Pro-X-Glu-X-Thr; PXQXT)を有し、細胞増殖の開始シグナルを送る役割を果たすCTAR1と呼ばれる領域(aa. 187~231)と、TNF-receptor associated death domain (TRADD)を介してTRAF2分子と結合するCTAR2と呼ばれる領域(aa. 351~386)である。これらの領域によって不死化増殖のシグナルが伝達されることから、CTAR1およびCRAR2の構造基盤を確立する目的で、これら領域の大量精製および結晶化にも挑戦

した。

3. 研究の方法

EBV膜タンパクであるLMP1及びLMP2A

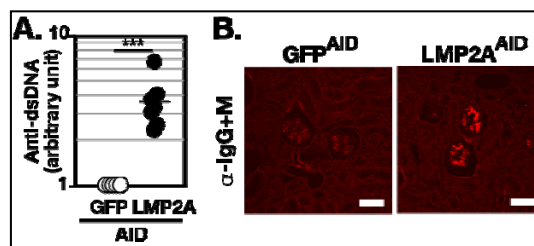


図1. LMP2A発現マウスにおける自己免疫疾患の発症

- A. 抗2本鎖DNA抗体の検出
- B. 腎糸球体への抗体複合体の沈着

発現マウスを作製した。LMP1及びLMP2A

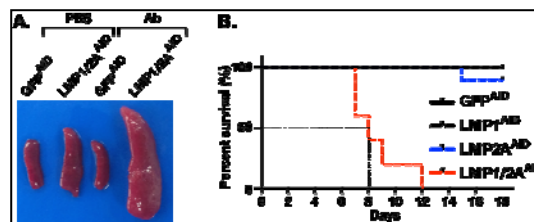


図2. 免疫抑制時のLMP1/2A発現マウスにおけるリンパ球増殖疾患の発症

- A. リンパ球異常増殖による脾臓肥大
- B. リンパ球増殖疾患による生存率の低下

はEBV感染時には胚中心B細胞で発現するが、これらのマウスでもSTOP配列を含むfloxedマウスをそれぞれ作製し、Aicda Creマウスと掛け合わせることで胚中心B細胞特異的に発現するように工夫した。これらのマウスを用いてLMP1やLMP2Aの発現による影響を解析した。

一方、原子レベルでの構造解析を目指した研究ではLMP1とCTAR1に集中することとした。LMP2Aは結晶構造解析がより高難度であることが予測され、実際、大量発現および精製を行ったところ、高純度サンプルを得る以前に多くが不溶化のために結晶化用サンプルを得ることができなかった。また、細胞増殖に係るCTAR1の阻害剤の開発が目標となるので、CTAR1の結晶化に集中した。

LMP1のfull lengthの発現・精製については、大腸菌、酵母、Sf9昆虫細胞といった多種多様な発現系を試すと同時に、新しい発現系としてCre/loxPシステムを用い、Cre recombinaseを導入し、Tat-Creリコンビナントタンパクを大腸菌内で発現させ、そのHis-tagを用いた目的タンパク質の精製を試

みた。得られた LMP1 の膜画分を様々な界面活性剤を用いることによって可溶化および精製を試みた。

また、LMP1 については GFP (Green Fluorescent Protein) とポリヒスチジンタグ (×8 HisTag) を融合させたタンパク質として発現させ、BL21 star(DE3)codonplus RIL 上で大量に発現させ、Ni-アフィニティーカラムクロマトグラフィーによる高純度精製を試みた。大量精製の途中、ゲルろ過のチャートからモノマーとダイマーの平衡があることも判明し、分子間での S-S 結合が生じ、精製系が複雑化することも判ったため、CTAR1 の C238S の変異体も作製し、モノマーでの精製方法の確立を目指した。

4. 研究成果

LMP2A 発現マウスを免疫学的に解析したところ、LMP2A は胚中心 B 細胞の抗体産生細胞への分化を促進することによって、低親和性 B 細胞の生存に寄与していることが明らかとなった。LMP2A はこの機能によって EBV 感染細胞の生存を促進し、EBV の感染成立に寄与していることが示唆された。また、LMP2A はこのマウスモデルにおいて、全身性エリテマトーデス様症状を誘導することが明らかとなり、EBV と自己免疫疾患との関連を世界で初めて証明した (図 1) (PNAS 112,11612,2015) (2015 年 9 月 14 日付科学新聞に掲載)。

また、LMP1 及び LMP2A 発現マウスに抗体を投与することによって T/NK 細胞を減少させ、免疫抑制状態にして解析したところ、LMP1 と LMP2A が協調的に作用し、リンパ球増殖疾患が誘導されることを証明した (図 2)。これらの増殖した B 細胞は LMP1 と LMP2A を発現する非常に活性化した形質芽細胞様の細胞であり、EBV 関連リンパ腫であるホジキンリンパ腫のマーカーである CD30 も発現していた。このことから、胚中心 B 細胞での LMP1 と LMP2A の発現は EBV によるリンパ腫形成に重要であることが示された。

(PNAS 114, 4751, 2017) (2017 年 4 月 19 日付日本経済新聞、産経新聞、4 月 21 日付薬事日報に掲載)。

これらの成果により、EBV 関連疾患の病態発現分子機構の一端を明らかにし、EBV 膜タンパクの LMP1 及び LMP2A が重要であることを示した。

一方、抗がん剤開発のための構造基盤を確立するための試みとして 6 回膜貫通型膜タンパク質 LMP1、およびその C 末端領域 CTAR1 の結晶化のための大量発現および大量精製に取り組んだ。

LMP1 については、Arg や界面活性剤、抗体も利用し、高純度サンプルの精製方法を確認したもの、得られるサンプルは僅かで、結晶化に必要な高濃度サンプル (1 mg/ml 以上) を得る際の濃縮の段階で多くが凝集し、沈殿となり、結晶化を行うことが出来なかつ

た。

一方、LMP1 細胞質ドメイン CTAR1 の変異体 C238S の精製では 1 回あたり 10~30μL の高純度精製サンプルを得ることに成功し、結晶化を繰り返した結果、22~25% PEG3350 を用いた条件で微結晶が得られた (下図)。



図. LMP1-CTAR1 (C238S) の結晶. 0.2M クエン酸アンモニウム (pH 7.5), 22% PEG3350 で得られた

さらに、安定的に結晶を得ることを目的に LMP1 の CTAR1 を認識する抗体 1D11 を用い、CTAR1-1D11 の Fab 化抗体複合体の高純度精製法を確立した (下図)。

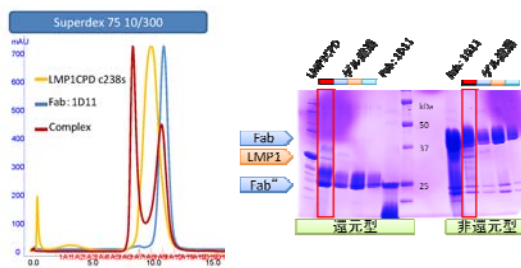
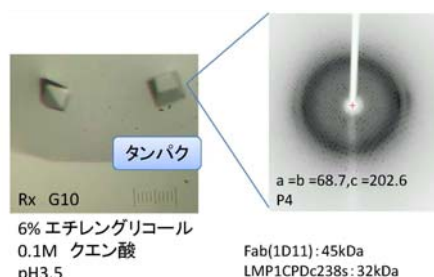


図. LMP1-CTAR1 (C238S, ca. 22 kD) と Fab 化抗体 1D11 (ca 50 kD) との複合体の精製. 高純度精製に成功した. 右はその電気泳動. 複合体と見られるサンプル (赤字) の還元型・非還元型で顕著に差が見られた。

CTAR1 と 1D11 抗体の複合体と考えられる結晶も複数の条件で得られた。タンパク質溶液 0.1 uL + リザーバー溶液 0.1 uL の計 0.2uL による Sitting Drop 法で、複数の条件で結晶が観察され、(1)6% ethylene glycol, 0.1 M citric acid (pH 3.5)、10% (w/v) PEG6K、(2) 0.2 M Tri-Ammonium citrate (pH 6.5-7.5)、22-25% PEG3350、(3)10-12% Tacsimate (pH6.0)、25-31% PEG3350 の 3 種類の条件で結晶が出る事も確認した。主に SPring-8 BL44XU における X 線回折実験を行い、(1)の条件で得られた結晶については 1.9Å 分解能の X 線回折強度データを収集することに成功した。現在、X 線構造解析を行っているところである。



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 20 件)

1. Mouse model of Epstein–Barr virus LMP1- and LMP2A-driven germinal center B-cell lymphoproliferative disease. Mouse model of Epstein–Barr virus LMP1- and LMP2A-driven germinal center B-cell lymphoproliferative disease. Minamitani T, Ma Y, Zhou H, Kida H, Tsai CY, Obana M, Okuzaki D, Fujio Y, Kumano A, Zhao B, Kikutani H, Kieff E, Gewurz BE, Yasui T. Proc Natl Acad Sci U S A. 2017 May 2;114(18):4751-4756.
2. A trimeric structural fusion of an antagonistic tumor necrosis factor- α mutant enhances molecular stability and enables facile modification. Inoue M, Ando D, Kamada H, Taki S, Niiyama M, Mukai Y, Tadokoro T, Maenaka K, Nakayama T, Kado Y, Inoue T, Tsutsumi Y and Tsunoda S J. Biol. Chem., 2017 Apr 21;292(16): 6438-6451
3. New molecular packing in a crystal of pseudoazurin from *Alcaligenes faecalis*: a double-helical arrangement of blue copper. Fukuda Y, Mizohata E and Inoue T Acta Cryst., 2017 Feb F73:159-166
4. A RuBisCO-mediated carbon metabolic pathway in methanogenic archaea. Kono T, Mehrotra S, Endo C, Kizu N, Matusda M, Kimura H, Mizohata E, Inoue T, Hasunuma T, Yokota A, Matsumura H & Ashida H. *Nature Communications* 2017 Jan 8: 14007
5. Ubiquitination of Lysine 867 of the Human SETDB1 Protein Upregulates Its Histone H3 Lysine 9 (H3K9) Methyltransferase Activity. Ishimoto K, Kawamata N, Uchihara Y, Okubo M, Fujimoto R, Gotoh E, Kakinouchi K, Mizohata E, Hino N, Okada Y, Mochizuki Y, Tanaka T, Hamakubo T, Sakai J, Kodama T, Inoue T, Tachibana K, Doi T PLOS ONE., 2016 Oct 11: e0165766
6. Promotion of protein crystal growth by actively switching crystal growth mode via femtosecond laser ablation. Tominaga Y, Maruyama M, Yoshimura M, Koizumi H, Tachibana M, Sugiyama S, Adachi H, K. Tsukamoto, Matsumura H, Takano K, Murakami S, Inoue T, Yoshikawa H.Y. and Mori Y Nature Photonics., 2016 Oct 10: 723-726
7. A crystallization technique for obtaining large protein crystals with increased mechanical stability using agarose gel combined with a stirring technique. Maruyama M, Hayashi Y, Yoshikawa H.Y, Okada S, Koizumi H, Tachibana M, Sugiyama S, Adachi H, Matsumura H, Inoue T, Takano K, Murakami S, Yoshimura M and Mori Y J. Crystal Growth., 2016 Oct 452: 172-178
8. Molecular Mechanism Underlying Promiscuous Polyamine Recognition by Spermidine Acetyltransferase. Sugiyama S, Ishikawa S, Tomitori H, Niiyama M, Hirose M, Miyazaki Y, Higashi K, Murata M, Adachi H, Takano K, Murakami S, Inoue T, Mori Y, Kashiwagi K, Igarashi K, Matsumura H Int J Biochem Cell B., 2016 Jul 76: 87-97
10. Redox-coupled structural changes in nitrite reductase revealed by serial femtosecond and microfocus crystallography. Fukuda Y, Man T. K., Susuki M, Diederichs K, Hirata K, Nakane T, Sugahara M, Nango E, Tono K, Joti Y, Kameshima T, Song C, Hatsui T, Yabashi M, Nureki O, Matsumura H, Inoue T, Iwata S, Mizohata E J. Biochem., 2016 May 159(5) :527-538
11. Redox-coupled proton transfer mechanism in nitrite reductase revealed by femtosecond crystallography. Fukuda Y, Tse K M, Nakane T, Nakatsu T, Suzuki M, Sugahara M, Inoue S, Masuda T, Yumoto F, Matsugaki N, Nango E, Tono K, Joti Y, Kameshima T, Song C, Hatsui T, Yabashi M, Nureki O, Murphy M E P, Inoue T, Iwata S, Mizohata E PNAS., 2016 Feb 113(11): 2928–2933
12. Epipegulin recognition mechanisms by anti-epiregulin antibody 9E5: Structural, functional and molecular dynamics simulation analyses. Kado Y, Mizohata E, Nagatoishi S, Iijima M, Shinoda K, Miyafusa T, Nakayama T, Yoshizumi T, Sugiyama A, Kawamura T, Lee Y, Matsumura H, Doi H, Fujitani H, Kodama T, Shibasaki Y, Tsumoto K and Inoue T. J. Biol. Chem., 2016 Jan 291: 2319-2330
13. Structure-based design and synthesis of a bivalent iminobiotin analogue showing strong affinity toward a low immunogenic streptavidin mutant. Kawato T, Mizohata E, Shimizu Y, Meshizuka M, Yamamoto T, Takasu N, Matsuoka M, Matsumura H, Kodama T, Kanai M, Doi H, Inoue T, Sugiyama A. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2015 Apr 79(4) : 640-642
14. The N-terminal acidic residue of the cytosolic helix 8 of an odorant receptor is responsible for different response dynamics via G-protein. Kawasaki T, Saka T, Mine S, Mizohata E, Inoue T, Matsumura H, and Sato T. FEBS Lett., 2015 Apr 589(10) : 1136-1142
15. Development of protein seed crystals reinforced by high-strength hydrogels. Sugiyama S, Shimizu N, Kakinouchi K, Hiraoka O, Matsumura H, Yoshikawa H. Y,

- Takahashi Y, Maruyama M, Yoshimura M, Adachi H, Takano K, Murakami S, Inoue T, Murata M, and Mori Y. CrystEngComm, 2015 Jun 17 : 8064-8071
16. Insights into unknown foreign ligand in copper nitrite reductase. Fukuda Y, Man Tse Ka, Kado Y, Mizohata E, Matsumura H, Inoue T. Biochem. Biophys. Res. Commun., 2015 Aug 464(2) : 622-628
17. Evasion of affinity-based selection in germinal centers by Epstein-Barr virus LMP2A. Minamitani T, Yasui T, Ma Y, Zhou H, Okuzaki D, Tsai CY, Sakakibara S, Gewurz BE, Kieff E, Kikutani H. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015 Sep 15;112(37):11612-7.
18. A novel approach for protein crystallization by a synthetic hydrogel with thermoreversible gelation polymer. Sugiyama S, Shimizu N, Sazaki G, Hirose M, Takahashi Y, Maruyama M, Matsumura H, Adachi H, Takano K, Murakami S, Inoue T, and Mori Y. Cryst. Growth Des., 2014 Apr 13(5) : 1899-1904
19. Laser ablation for protein crystal nucleation and seeding. Yoshikawa Y. H, Murai R, Adachi H, Sugiyama S, Maruyama M, Takahashi Y, Takano Y, Matsumura H, Inoue T, Murakami S, Masuhara H, and Mori Y. Chem. Soc. Rev. 2014 Apr 43: 2147-2158
20. A new practical technique for high quality protein crystallization with the solution stirring technique at the interface between high-concentrated hydrogel and solution. Aoki Y, Maruyama M, Takahashi Y, Yoshimura M, Yoshikawa Y H, Sugiyama S, Adachi H, Takano K, Murakami S, Matsumura H, Inoue T and Mori Y. Jpn. J. Appl. Phys., 2014 Jun 53(6): 065502

[学会発表] (計 4 件)

1. Structural Bioinorganic Chemistry of Copper Enzymes. (招待講演) Fukuda Y, Mizohata E, Inoue T
新学術領域「感応性化学種が拓く新物質科学」第4回若手国際シンポジウム
(The 4th International Symposium for Young Chemists on Stimuli-Responsive Chemical Species for the Creation of Functional Molecules)
大阪大学吹田キャンパス 工学研究科 C3 棟 5 階 サントリーメモリアルホール、大阪、
2016年12月12日～13日
2. 造血器型プロスタグランジン D 合成酵素変異体 V187I の熱安定性 (ポスター)
門 祐示、Pojchanun Kanitthamniyom、中村 努、Sun Xin、中山 泰亮、福田 庸太、溝

- 端 栄一、裏出 良博、井上 豪
日本結晶学会平成 28 年度年会
茨城県立県民文化センター、2016年1
1月17日～18日
3. New Hot Topics on Copper Nitrite Reductases (Session 6 Lecture: Enzyme Mechanism and Allostery) .
Yohta Fukuda
5th International Symposium on Diffraction Structural Biology (ISDSB2016)
Hilton Downtown Knoxville, TN, US、2016年8月7日～10日
4. SACLA が解明した銅含有亜硝酸還元酵素の常温無損傷構造 (ワークショップ)
Damage-free, room-temperature structures of copper-containing nitrite reductase revealed by SACLA
溝端 栄一 (Eiichi Mizohata)
第16回日本蛋白質科学会年会
福岡国際会議場 (福岡)、2016年6
月7日～9日

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

井上 豪 (Tsuyoshi Inoue)
大阪大学大学院工学研究科・教授
研究者番号 : 20263204

(2)研究分担者

安居 輝人 (Teruhito Yasui)
医薬基盤・健康・栄養研究所
感染症制御プロジェクト・プロジェクトリ
ーダー
研究者番号 : 60283074