

平成30年6月1日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06827

研究課題名(和文) ウイルスRNAの侵入を防御する宿主NMDとHTLV-1 RNAを守るRexの攻防

研究課題名(英文) The role of the viral protein Rex in the host-pathogen interaction between HTLV-1 and T cells.

研究代表者

中野 和民 (Kazumi, Nakano)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・准教授

研究者番号：60549591

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：成人T細胞白血病(ATL)の原因となるHuman T-cell Leukemia Virus Type-1 (HTLV-1) がコードするRexは、ウイルスRNAの核外輸送や宿主nonsense-mediated mRNA Decay (NMD)の抑制により、ウイルス複製の量とタイミングを制御している。本研究では、正常なNMDの活性化に必要なUPF1-UPF2-UPF3B複合体形成で、RexがUPF3BとUPF3Aを置換しNMD活性を低下させている可能性を示し、Rexがヒト細胞において転写、スプライシング、mRNA代謝、翻訳など様々な経路に関わるタンパク質群81個と相互作用することを明らかにした。

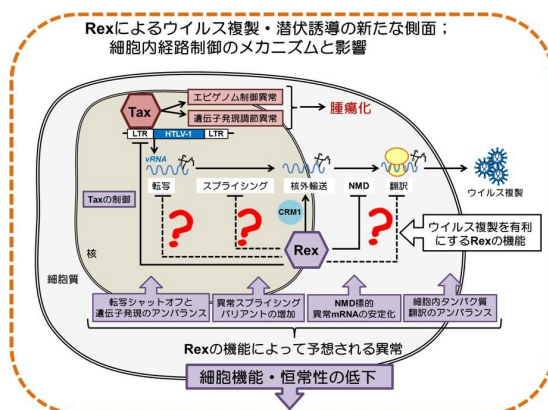
研究成果の概要(英文)：Human T-cell leukemia virus type-1 (HTLV-1) is responsible for development of adult T-cell leukemia (ATL). HTLV-1 encodes a viral RNA binding protein, Rex, which regulates the quantity and timing of viral replication through viral mRNA-specific nuclear-export and protection by inhibition of cellular nonsense mediated mRNA decay (NMD). Here we show a possibility that during the formation of UPF1-UPF2-UPF3B complex in the onset of NMD pathway, Rex may replace UPF3B with UPF3A to suppress the normal NMD activity. Also we demonstrate that Rex interacts with at least 81 human cellular proteins, which are enrolled in transcription, splicing, mRNA metabolism, and translation. These data propose a possibility that Rex may invade into these pathways to adjust the cellular environment beneficial for the viral replication. On the other hand, these unexpected functions of Rex may increase the risk of dysregulation in the function and homeostasis of the host cell.

研究分野：ウイルス発癌分野

キーワード：HTLV-1 ウイルスタンパク質 RNA輸送 NMD Rex インテラクトーム 遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

ATLはHTLV-1の感染によって引き起こされる予後不良のT細胞腫瘍である。母乳による感染後、50～60年の潜伏期間にHTLV-1感染不活化T細胞に起こるゲノム異常の蓄積が細胞の腫瘍化を引き起こすと考えられているが、腫瘍化の引き金となる遺伝子異常の実態は依然として明らかになっていない。腫瘍化は数十年に渡るが、始まりはHTLV-1の感染であることが明確なのが、ATLという疾患の特徴である。そのため、HTLV-1の感染によって細胞にもたらされる異常が、その後のがん化へのプロセスにどのように影響しているのか明らかにすることは、ATL発がん機構を理解する上で必須である。我々はこれまで、HTLV-1ウイルスタンパク質のうち、ウイルスゲノムRNAの核外輸送と安定化を担当するRexに注目し、HTLV-1感染による宿主T細胞への影響を解析してきた。これまでの研究から、HTLV-1 Rexは宿主細胞のmRNA品質管理機構、nonsense-mediated mRNA decay (NMD)を抑制し、ウイルスゲノムRNAの安定化を図っていること、そしてRexは遺伝子発現プロファイルに影響を与え、RNA輸送だけでなくさまざまな細胞内経路に関わっていることを示してきた。



< 図1. 本研究の背景と疑問点 >

2. 研究の目的

前述の背景情報から、Rexはどのような分子メカニズムでNMDを抑制しているのか、またRexが細胞の遺伝子発現プロファイルに影響を与えることから、Rexにはまだ知られていない機能が存在するのではないか、という疑問を持ち(図1)、本研究ではRexとNMD複合体タンパク質の相互作用を詳細に検討すること、そしてRexの新しい機能的側面を明らかにするため、Rexと相互作用する細胞内タンパク質を網羅的に同定し、Rexのインタラクトーム・データベースを整備すること、を目的に研究を行った。

3. 研究の方法

NMD抑制の分子メカニズム解明を目指したRexと宿主細胞内NMD複合体タンパク質の相互作用解析

NMDはUPF1、UPF2、UPF3、SMG1、SMG5、SMG6、SMG7などのNMDコア・タンパク質が正しいタイミングで複合体を形成し、調和的に働くことにより、異常mRNAの検出から、そのp-bodyでの分解までの経路が成り立っている。同時にスプライシング、翻訳、mRNA輸送などmRNAの代謝に関わるタンパク質も直接的・間接的に関わる複雑な経路である。我々はHTLV-1 RexがどのようにNMD活性を抑制しているのか、その分子メカニズムを明らかにするため、まずGST-Rex発現プラスミドを293FT細胞に導入し、GST-Rexと共沈降してくるNMD複合体タンパク質(UPF1、UPF2、UPF3A、UPFA3B、SMG1、SMG5、SMG6、SMG7)をウェスタン・ブロッティング法で同定した。293FT細胞を用いたのは、この細胞のNMDが正常に機能しており、NMD複合体タンパク質も正常であるためである。また、NMDはmRNA上でのUPF1-UPF2-UPF3B複合体形成により活性化するが、UPF3Bがマイナー・アイソフォームのUPF3Aに置き換わるとNMD活性が低下することが報告されている。先の実験でRexがUPF3Bと結合し、UPF3Aと結合しないことが明らかになったので、Rexの存在下でUPF2と結合するUPF3BとUPF3Aの量が変化するか検討した。具体的には、GST-UPF2発現プラスミドを293FT細胞に導入し、Rexの有無によってGST-UPF2と共沈降してくるUPF3BまたはUPF3Aの量をウェスタン・ブロッティング法で検出した。

Rexの新しい機能探索のためのRexインタラクトーム・データベースの整備と解析

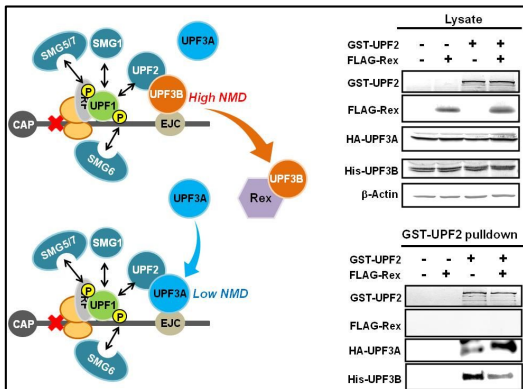
Rexによる細胞内経路への影響をより広範囲かつ網羅的に検討するため、質量分析によってRexと結合する宿主細胞内のタンパク質を網羅的に同定することを試みた。His-Halo-タンデムタグ付きRexを293FT細胞で過剰発現し、HisタグとHaloタグによる二重精製を行い、精製されたRexタンパク質と共沈してくる細胞内タンパク質をnanoLC-MS/MSシステムを用いて解析した。続いて、MS解析で得られたRexインタラクトーム・データベースをIngenuity Pathway Analysis (IPA, Qiagen)ソフトウェア

アを用いて解析し、Rex がどのような細胞内経路に関与しているか予想した。

4. 研究成果

NMD抑制の分子メカニズム解明を目指したRexと宿主細胞内NMD複合体タンパク質群の相互作用解析

NMD コア・タンパク質群と Rex の相互作用を、293FT 細胞抽出液中での GST-Rex との共沈降実験によって検討した。その結果、Rex は UPF1、UPF3B、SMG5、SMG7 など、NMD 経路において必須の役割を果たすタンパク質群と相互作用し、NMD 経路の中に含まれていることが分かった。また NMD は mRNA 上での UPF1-UPF2-UPF3B 複合体形成により活性化するが、UPF3B が UPF3A に置き換わると NMD 活性が低下することが知られている。先の実験から Rex は UPF3B とは結合するが UPF3A と結合しないことを見出した。そこで次に GST-UPF2 と共沈降して行く UPF3B と UPF3A の量を、Rex の有無によって比較した。すると Rex 存在下で UPF2 と結合する UPF3B 量が低下し、UPF3A 量が増加した。よって Rex が UPF3B と選択的に結合するため、代わりに UPF1-UPF2-UPF3A 複合体が形成されやすくなり、NMD 活性が低下する可能性が示唆された (図 2)。

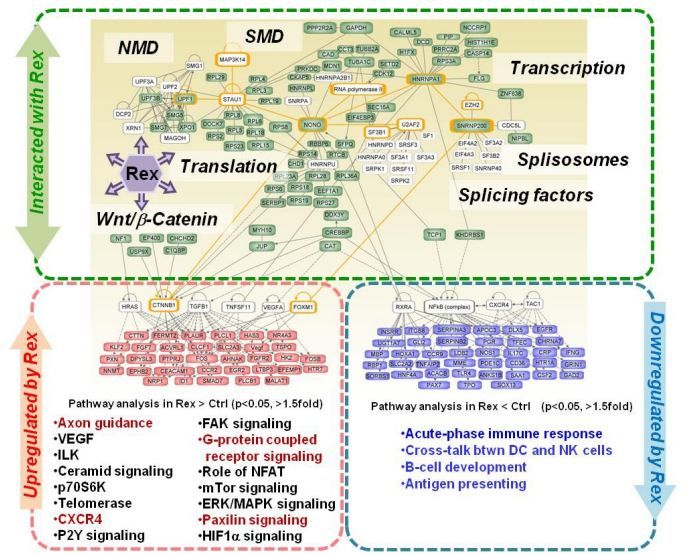


<図 2. Rex は UPF3B と UPF3A を置換し NMD 複合体活性を低下させる >

Rex の新しい機能探索のための Rex インテラクトーム・データベースの整備と解析

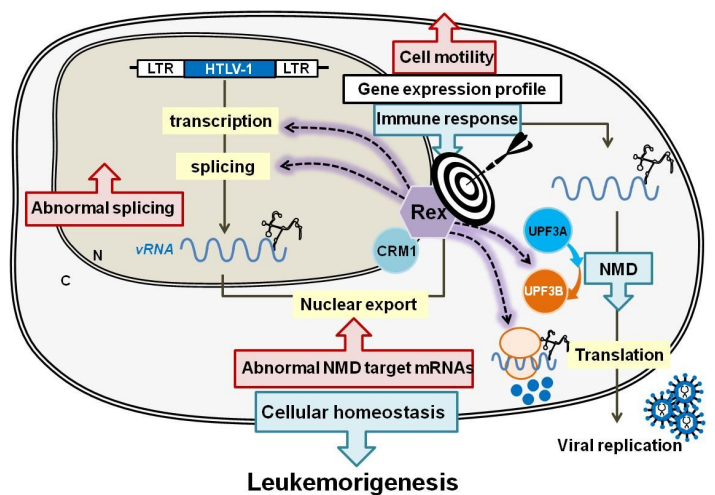
我々は Rex がウイルス mRNA 運搬の過程で様々な細胞内経路に関わり、ウイルス mRNA にとって不都合なプロセスを回避していると考え、その全体像を捉えるため Rex のインタラクトーム解析を試みた。その結果、Rex に特異的に結合するヒト・タ

ンパク質 81 個を同定した。この中には 40S・60S リボソームのサブユニットが多数含まれており、Rex がリボソーム自体と結合していることが予想された。前述したとおり NMD は翻訳と共役して起こる経路なので、Rex が翻訳の中心部分に相互作用している可能性は大変興味深い。さらに IPA software を用いてこの 81 個のタンパク質の機能解析と pathway 解析を行った (図 3)。



<図 3. Rex は細胞内の様々なタンパク質と相互作用し(緑)、遺伝子発現の上昇(赤)や減少(青)を引き起こす>

その結果 Rex は転写、スプライシング、mRNA 代謝、翻訳など様々な経路のタンパク質群と相互作用し、その機能の幅を広げるとともに、宿主細胞の機能や恒常性に影響を与えている可能性が示された (図 4)。



<図 4. Rex は細胞内経路に侵入しウイルス複製を有利にする一方で、細胞の機能・恒常性に影響を与えている >

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5件)

1. Tanabe A, Nakano K, Nakakido M, Nagatoishi S, Tanaka Y, Tsumoto K, Uchimar K, Watanabe T. (2018). Production and characterization of a novel site-specific-modifiable anti-OX40-receptor single-chain variable fragment for targeted drug delivery. *Biochem Biophys Res Commun*. 496: 614-620. (査読あり)

2. Nakano K, Uchimar K, Utsunomiya A, Yamaguchi K, Watanabe T. (2016). Dysregulation of c-Myb pathway by aberrant expression of proto-oncogene MYB provides the basis for malignancy in adult T-cell leukemia/lymphoma cells. *Clin Cancer Res*. 22: 5915-5928. (査読あり)

3. Nakano K. and Watanabe T. (2016). HTLV-1 Rex tunes the cellular environment favorable for viral replication. *Viruses* 8: 58. doi:10.3390/v8030058. (査読あり)

4. Fujikawa D, Nakagawa S, Hori M, Kurokawa N, Soejima A, Nakano K, Yamochi T, Nakashima M, Kobayashi S, Tanaka Y, Iwanaga M, Utsunomiya A, Uchimar K, Yamagishi M, Watanabe T. (2016). Polycomb-dependent epigenetic landscape in adult T-cell leukemia. *Blood* 127: 1790-1802. (査読あり)

5. Yamagishi M, Katano H, Hishima T, Shimoyama T, Ota Y, Nakano K, Ishida I, Okada S, Watanabe T. (2015). Coordinated loss of microRNA group causes defenseless signaling in malignant lymphoma. *Sci. Rep.* 5: 17868. (査読あり)

[学会発表](計11件)

1. Nakano K. The molecular basis of ATL leukemogenesis caused by infection of HTLV-1 oncovirus. 4th Workshop in Biosciences, (2018), Lyon, France.

2. Nakano K. et al., Exploring new functional aspects of HTLV-1 Rex to manipulate host-cellular pathways for viral replication. 18th Conference on Human Retrovirology; HTLV-1 and Related Viruses. (2017) Tokyo, JAPAN

3. Nakano K. Synergistic-loop between FoxM1 and c-Myb is responsible for proliferative/invasive phenotypes of ATL cells. Universith of Tokyo-Zhejiang University Joint Symposium. (2017) Chiba, JAPAN

4. 中野 和民、野田 奈津美、渡邊 俊樹、内丸 薫「ATL細胞の組織特異的遊走メカニズムの探索」第76回日本癌学会学術総会(2017)・横浜

5. 中野 和民、横山 弘一、慎 秀一、唐澤 伸明、渡邊 俊樹、内丸 薫「ウイルス複製に有利な細胞内環境整備を可能にする HTLV-1 Rex の新たな機能的側面の探索」第4回日本 HTLV-1 学会学術集会(2017)・大阪

6. 中野 和民、西田 亜季、中木戸 誠、千原 庸平、小林 誠一郎、田中 勇悦、宇都宮 與、津本 浩平、内丸 薫、渡邊 俊樹「FoxM1 と c-Myb 間の相乗的活性化ループが ATL 細胞の悪性化形質を規定する」、第75回日本癌学会学術総会(2016)・横浜

7. 中野 和民、千原 庸平、小林 誠一郎、内丸 薫、渡邊 俊樹「ATL 細胞における Wnt5a の量的・質的異常」第78回日本血液学会学術集会(2016)・横浜

8. 中野 和民、宇都宮 與、山口 一成、内丸 薫、渡邊 俊樹「Proto-oncogene MYB 発現異常による c-Myb 経路攪乱が ATL 細胞悪性化形質を規定する」第3回日本 HTLV-1 学会学術集会(2016)・鹿児島

9. 中野 和民、千原 庸平、小林 誠一郎、石垣 知寛、西田 亜季、内丸 薫、渡邊 俊樹「慢性型から急性型 ATL 細胞への形質変化は Wnt5a によって引き起こされるのか?」第77回日本血液学会学術集会(2015)・金沢

10. 中野 和民、西田 亜季、千原 庸平、小林 誠一郎、石垣 知寛、田中 勇悦、宇都宮 與、内丸 薫、渡邊 俊樹「造腫瘍および細胞増殖の立役者 FoxM1: ATL の新たな治療標的として」第74回日本癌学会学術総会(2015)・名古屋

11. 中野 和民、西田 亜季、千原 庸平、小林 誠一郎、石垣 知寛、田中 勇悦、宇都宮 與、内丸 薫、渡邊 俊樹「造腫瘍および細胞増殖の立役者 FoxM1: ATL の新たな治療標的として」第2回日本 HTLV-1 学会学術集会(2015)・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:

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・
准教授

研究者番号: 60549591

(2)研究分担者

渡邊 俊樹 (WATANABE, Toshiki)

聖マリアンナ医科大学・医学研究科・
特任教授

研究者番号: 30182934

(3)連携研究者

()

研究者番号:

(4)研究協力者

()