

令和 2 年 5 月 28 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08848

研究課題名(和文)上皮細胞腫瘍化因子レトロウイルスエンベロープの構造と機能の相関性の解明

研究課題名(英文) Structure and function relationship of retrovirus envelope protein that induces epithelial cell transformation

研究代表者

前田 直良 (MAEDA, Naoyoshi)

北海道大学・薬学研究院・特任准教授

研究者番号：80444800

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：JSRVのエンベロープCT領域に結合するタンパク質としてビメンチンを同定し、免疫沈降により相互作用を確認した。また細胞膜上において両分子の共局在が見出された。さらにビメンチンに対する阻害剤は、エンベロープによるフォーカス形成を濃度依存的に阻害した。

エンベロープSUドメインを293T細胞外へ分泌発現させ、培養上清を精製し、各フラクションで単量体や多量体と想定される分子量のバンドを確認した。CDスペクトルでβ-シート34%、α-ヘリックス3.8%、ターン構造15%を見出した。また、透過型電子顕微鏡とクライオ電子顕微鏡で、ヘッド状部分とひも状部分から成るSUドメインの構造体を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エンベロープは本来、標的細胞への侵入の際に機能するウイルス膜タンパク質であるが、JSRV/ENTVエンベロープはがん遺伝子としても機能することで呼吸器系の上皮細胞を腫瘍化し、腺がんを発症させる極めてまれな題材であり、腫瘍ウイルス学の発展に寄与することができる学術的価値を有している。またJSRVとENTVのエンベロープは、GPIアンカー型分子Hyal-2を受容体として細胞侵入時に使用するにもかかわらず、ヒツジ個体で腫瘍発生器官を異にすることから、「ウイルス感染 細胞指向性 発がん」を研究する上で理想的なモデルになる。また、エンベロープの構造機能相関の解明は、有効な治療法やワクチン開発に繋がる。

研究成果の概要(英文)：JSRV Envelope (Env) functions as a dominant oncoprotein in transforming fibroblast and epithelial cells. Several candidates for interacting partners of the Env CT region have been found in MALDI-TOF MS analysis. One candidate is vimentin, a major intermediate filament protein. Their interaction was confirmed by multiple assays. Vimentin on the cell surface co-localized with Env in transformed cells. In addition, a vimentin inhibitor inhibited transformation by the JSRV Env in a dose-dependent manner.

The Env SU domain has been shown to form a complex consisting of several dimers or trimers. CD spectroscopic analysis revealed that the SU domain has about 34% beta-sheet, 3.8% alpha-helix, and 15% turn. Further, the structure of the SU domain has been observed by transmission electron microscopy and cryo-electron microscopy, which showed that the SU protein complex looks like a bunch of mushrooms, consisting of a head domain and a string domain.

研究分野：ウイルス学

キーワード：レトロウイルス JSRV ENTV トランスフォーメーション 腫瘍 タンパク質 構造解析 宿主因子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒツジ伝染性肺腺腫 ovine pulmonary adenocarcinoma(OPA)は、オーストラリアやニュージーランドを除いた国々(アメリカ、イギリス、カナダなど)で発生が認められる伝染性の肺腺癌である。II 型分泌上皮細胞の悪性腫瘍化を示し、近傍リンパ節への転移も見られる。感染群の隔離や、臨床症状を示した感染ヒツジの除去により、疾病の発生率を低減させることは可能であるが、いまだに有効な治療法やワクチンが存在しないことから、現時点で根絶は困難である(前田直良, 分担執筆, めん羊・山羊(ウイルス病)「羊肺腺腫」p.143, 動物の感染症<第四版>, 2019/3, 近代出版)。

OPA はヒツジレトロウイルス jaagsiekte sheep retrovirus(JSRV)感染に起因する。JSRV は既存の癌遺伝子をもたない単純ペーテレットロウイルスであるが、*env* 遺伝子領域にコードされる全長のエンベロープタンパク質(SUドメイン 378 アミノ酸+TMドメイン 237 アミノ酸=615 アミノ酸)が、マウスやラットの線維芽細胞をトランスフォームする、すなわちがん遺伝子として機能する(Maeda *N et al.*, PNAS 2001;98:4449-4454)。またマウス線維芽細胞やラット上皮細胞のトランスフォーメーションでは、Ras-MEK-MAPK、PI3k-Akt-mTOR、および p38 が活性化している(Maeda *N et al.*, J Virol. 2005;79:4440-4450)。

一方、ヒツジ・ヤギの伝染性地方病性鼻腔内腫瘍 enzootic nasal adenocarcinoma(ENA)は、病理組織学的には腺癌で分泌型上皮細胞に由来し、鼻腔内の篩骨鼻甲介部分から一側性、あるいは両側性に腫瘍が形成される。ENA はヒツジレトロウイルス enzootic nasal tumor virus(ENTV)感染により発症する。その ENTV エンベロープも線維芽細胞や上皮細胞をトランスフォームする活性がある、すなわち ENTV エンベロープもがん遺伝子として機能する。また ENTV エンベロープによるマウス線維芽細胞やラット上皮細胞のトランスフォーメーションでも、JSRV と同様に Ras-MEK-MAPK、PI3k-Akt-mTOR、p38 および Rac1 が関与している(Maeda *N et al.*, Virus Genes 2008;36:147-155)。

レトロウイルスのエンベロープががん遺伝子として機能する唯一の前例として、マウス Friend spleen focus-forming virus のエンベロープ gp55 があるが、細胞感染時には機能しない短縮型であるため JSRV、および ENTV エンベロープとは本質的に異なる(Maeda *N et al.*, Rev Med Virol. 2008;18:387-405)。JSRV、および ENTV それぞれのエンベロープがどのような分子と直接相互作用し、シグナル伝達経路の恒常的活性化を導くのか不明である。また JSRV と ENTV のエンベロープはどちらも GPI アンカー型分子 Hyal-2 をレセプターとして感染時に使用するにもかかわらず、なぜヒツジ・ヤギの異なる器官の上皮細胞を腫瘍化させるのかという点についても依然最大の謎である。

2. 研究の目的

本研究では、レトロウイルスエンベロープによる新しい発がん機構の全貌解明を目指しており、最終的な目標として、呼吸器系の上皮細胞が特異的に腫瘍化する謎を、生物学的機能と立体構造の両面から解明しようとしている点が最大の特色である。機能面では、JSRV、および ENTV それぞれのエンベロープ分子と直接相互作用する宿主細胞内分子を同定する。Ras-MEK-MAPK、PI3k-Akt-mTOR シグナル伝達経路の活性化を誘導する分子が、JSRV と ENTV で違うのではないかという仮説を検証し、明らかにする。また構造面では、感染時に使われるエンベロープと、発がんに関わるエンベロープの構造に違いがあるのではないかという疑問について、X 線結晶構造解析やクライオ電子顕微鏡を利用しながらアプローチする。以上より、レトロウイルスエンベロープによるヒツジ・ヤギ呼吸器系腫瘍発症機序の全貌解明に向けて、細胞トランスフォーメーションにおける JSRV、および ENTV エンベロープの構造と機能の相関性を明らかにすることを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1)機能解析：JSRV エンベロープ分子に相互作用し、腫瘍化・トランスフォーメーションに関与する宿主細胞内因子を同定することを目的として、これまでに JSRV エンベロープ分子の SU ドメイン、TM ドメイン、および CT 細胞内領域をそれぞれ GST との融合タンパク質として大腸菌で発現させる系を確立してきた。GST-CT 細胞内領域融合タンパク質を大腸菌で発現させ、ラット 208F 細胞溶解液と混合することにより、CT 細胞内領域と相互作用するタンパク質との複合体を *in vitro* で形成させ、グルタチオンビーズの添加によって複合体を pull-down し、SDS-PAGE で見られた特異的バンドを MALDI-TOF 型質量分析計により解析した。

(2)構造解析：JSRV エンベロープ SU ドメインの欠失もトランスフォーメーション効率を著しく減少させることから、SU ドメインの重要性が示唆されている。そこで SU ドメインの機能と構造の相関性を明らかにするために、SU ドメインのみを発現し構造解析することを試みた。pGEX プラスミドによる GST 融合タンパク質や、pET プラスミドによる His-tag 融合タンパク質として SU ドメインの大腸菌での発現を試みた。また His-tag を C 末端に付加した SU ドメインを 293T 細胞にトランスフェクションし、細胞外へ分泌発現させる哺乳類細胞発現実験系を構築した。

4. 研究成果

(1)機能解析：複数の候補因子の中から本研究ではビメンチンに着目した。208F細胞からビメンチン mRNA を単離し cDNA を調製後、ビメンチン発現プラスミドを構築した。ビメンチン発現プラスミドと JSRV エンベロープ-HA 発現プラスミドを 293T 細胞にトランスフェクションし、抗 HA 抗体により免疫沈降を行った。また、JSRV エンベロープ-HA でトランスフォームした 208F 細胞の溶解液に抗 HA 抗体を添加することで、同様に免疫沈降を行った結果、両分子の共免疫沈降が観察された。ビメンチン発現プラスミドと JSRV エンベロープ発現プラスミドを 293T 細胞にトランスフェクションし、共焦点レーザー顕微鏡で細胞内局在を検討した結果、細胞膜上において両分子の共同が見出された。さらに 208F 細胞を用いたトランスフォーメーションアッセイの際に、ビメンチンに対する阻害剤を添加した結果、JSRV エンベロープによるフォーカス形成に対して濃度依存的な阻害効果が観察された。(第 66 回日本ウイルス学会学術集会口演)

(2)構造解析：pGEX プラスミドによる GST 融合タンパク質や、pET プラスミドによる His-tag 融合タンパク質としての SU ドメインの発現は確認できたが、大部分は封入体として分画されたため、構造解析を行うために十分な量を回収することが困難であった。そこで、His-tag を C 末端に付加した SU ドメインを 293T 細胞にトランスフェクションし、細胞外へ分泌発現させる哺乳類細胞発現実験系を構築した。培養上清を回収し Ni-NTA、さらにゲルろ過を行い、精製した SU ドメインを Native-blue PAGE で確認したところ、各フラクションで単量体や多量体と想定される分子量のバンドを確認した。CD スペクトルで単量体、および多量体の 2 次構造を解析した結果、各フラクション間でほぼ同比率の α -シート 34%、 α -ヘリックス 3.8%、ターン構造 15%を見出した。また、多量体の SU ドメインを透過型電子顕微鏡、さらにクライオ電子顕微鏡で観察した結果、ヘッド状部分とひも状部分から成る構造体を確認した。(第 67 回日本ウイルス学会学術集会口演)

以上より、JSRV エンベロープと相互作用する分子の同定、および構造解析を行い、多くの成果を得ることができたので、これらの結果をもとに今後は ENTV エンベロープの構造と機能についても研究を発展させ、レトロウイルスエンベロープによるヒツジ・ヤギ呼吸器系腫瘍発症機序の全貌解明に向けて本研究内容を継続していく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Watanabe H, Kuroki K, Yamada C, Saburi Y, Maeda N, Maenaka K.	4. 巻 81
2. 論文標題 Therapeutic effects of soluble human leukocyte antigen G2 isoform in lupus-prone MRL/lpr mice.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Human Immunology	6. 最初と最後の頁 186-190
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.humimm.2019.11.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Maeda Naoyoshi, Maenaka Katsumi	4. 巻 18
2. 論文標題 The Roles of Matricellular Proteins in Oncogenic Virus-Induced Cancers and Their Potential Utilities as Therapeutic Targets	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2198 ~ 2198
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms18102198	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Furukawa Atsushi, Kakita Kosuke, Yamada Tomoki, Ishizuka Mikihiro, Sakamoto Jiro, Hatori Nanao, Maeda Naoyoshi, Ohsaka Fumina, Saitoh Takashi, Nomura Takao, Kuroki Kimiko, Nambu Hisanori, Arase Hisashi, Matsunaga Shigeki, Anada Masahiro, Ose Toyoyuki, Hashimoto Shunichi, Maenaka Katsumi	4. 巻 292
2. 論文標題 Structural and thermodynamic analyses reveal critical features of glycopeptide recognition by the human PILR immune cell receptor	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 21128 ~ 21136
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1074/jbc.M117.799239	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Maeda Naoyoshi, Yamada Chisato, Takahashi Ami, Kuroki Kimiko, Maenaka Katsumi	4. 巻 50
2. 論文標題 Therapeutic application of human leukocyte antigen-G1 improves atopic dermatitis-like skin lesions in mice	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 International Immunopharmacology	6. 最初と最後の頁 202 ~ 207
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.intimp.2017.06.026	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 前田直良, 猪島康雄, 前仲勝実
2. 発表標題 Structural analyses of jaagsiekte sheep retrovirus envelope protein
3. 学会等名 第67回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroshi Watanabe, Kimiko Kuroki, Chisato Yamada, Yukari Saburi, Naoyoshi Maeda, Katsumi Maenaka
2. 発表標題 Immunosuppressive function of HLA-G2 protein in vivo
3. 学会等名 第48回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 前田直良, 猪島康雄, 前仲勝実
2. 発表標題 Identification of cellular factors that interact with jaagsiekte sheep retrovirus envelope protein
3. 学会等名 第66回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 前田直良, 宮崎夏樹, 乙黒聡子, 吉満誠, 原博満, 前仲勝実
2. 発表標題 成人T細胞白血病細胞のNF- κ B恒常的活性化を阻害する低分子化合物の蛍光・発光アッセイによる探索
3. 学会等名 第65回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 前仲勝実、喜多俊介、古川敦、野村尚生、福原秀雄、前田直良	4. 発行年 2020年
2. 出版社 エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 624
3. 書名 膜タンパク質工学ハンドブック	

1. 著者名 前田直良ほか	4. 発行年 2019年
2. 出版社 近代出版	5. 総ページ数 352
3. 書名 動物の感染症 第四版	

1. 著者名 Maeda Naoyoshi、Maenaka Katsumi	4. 発行年 2018年
2. 出版社 Nova Science Publishers	5. 総ページ数 240
3. 書名 Horizons in Cancer Research	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考