

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590537

研究課題名(和文) HTLV-1の発がん性を規定するPDZドメイン蛋白シグナル制御のメカニズム

研究課題名(英文) Mechanism of PDZ domain protein regulation for HTLV-1 tumorigenesis

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトT細胞白血病ウイルス1型(HTLV-1)は成人T細胞白血病の原因ウイルスである。HTLV-1がコードするTax1はPDZドメイン結合配列を介してさまざまなPDZ蛋白と結合し、それらの機能阻害により感染T細胞のがん化を引き起こす。我々は新たなTax1結合PDZドメイン蛋白としてMAGI-1を同定した。MAGI-1はTax1導入T細胞、HTLV-1感染T細胞での発現が低下していた。MAGI-1をノックダウンすると細胞内ROSが上昇し、過剰発現させるとROSが低下した。以上よりMAGI-1はROSの制御因子であり、Tax1によるMAGI-1阻害とROSの上昇ががん化に関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：HTLV-1 is a causative agent of adult T-cell leukemia. HTLV-1 encoded protein Tax1 interacts with various PDZ domain containing proteins, leading to their dysfunction and transformation of infected T cells. We identified MAGI-1 as a new Tax1 interacting PDZ domain containing protein. MAGI-1 expression was dramatically reduced in Tax1 transformed T cells and HTLV-1 infected T cells. Knockdown of MAGI-1 increased intracellular ROS. Conversely, overexpression of MAGI-1 reduced intracellular ROS. These results suggest that MAGI-1 is a regulator of ROS production and MAGI-1 inactivation by Tax1 and subsequent aberrant ROS production is involved in Tax1 mediated tumorigenesis.

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：HTLV-1 ATL PDZ ROS MAGI-1 Tax

1. 研究開始当初の背景

ATL は HTLV-1 の感染を原因とする極めて悪性の白血病である。しかしながら、近縁のウイルスである HTLV-2 の感染は、*in vitro* では HTLV-1 と同程度に感染 T 細胞を不死化するものの、感染者においては白血病を引き起こす事はない。この事実は、HTLV-1 が HTLV-2 にはない細胞がん化を促進する特異的な性質をもつことを意味する。申請者らは、HTLV-1 と HTLV-2 がもつトランスフォーミング蛋白 Tax1 と Tax2 に着目し、それぞれの Tax の機能の違いが病原性を規定するとの仮説のもとに解析を進めてきた。その結果、以下に示す知見を得た。

- ・ Tax1 は IL-2 依存性に増殖するマウス T 細胞株 CTLL-2 を IL-2 非依存性へとトランスフォームするが、Tax2 はその活性が顕著に低い。
- ・ Tax1 のみが C 末に PDZ ドメイン結合配列 (PDZ domain Binding Motif; PBM) を持ち、PBM を欠失した Tax1 変異体 (Tax1ΔC) は Tax2 と同程度までトランスフォーミング活性が低下する。
- ・ Tax1 は PBM を介して PDZ ドメイン蛋白、Dlg1、Scribble、MAGI3 と結合する。

これらの知見は、Tax1 特異的な PDZ ドメイン蛋白の機能制御が Tax1 のトランスフォーミング活性に重要であり、この活性の有無が HTLV-1 と HTLV-2 の病原性の違いを規定することを示唆している。Tax1 と結合する Dlg1、Scribble はショウジョウバエにおけるがん抑制遺伝子であり、哺乳類細胞においても細胞増殖を抑制する働きをもつ。また子宮頸がんの原因ウイルスである Human Papilloma Virus (HPV) のトランスフォーミング蛋白 E6 も C 末端に Tax1 と良く似た PBM をもち、Dlg1、Scribble、MAGI といった PDZ ドメイン蛋白と結合し、これらを分解することで感染細胞のがん化を促進する。しかしながら、PDZ ドメイン蛋白が、どのような分子メカニズムで、いかなるシグナル伝達経路を介して発がん抑制機能を発揮するのか？そして Tax1 と PDZ ドメイン蛋白の相互作用が、いかにして細胞がん化を促進するのか？その詳細は未だ不明のままである。

2. 研究の目的

以上の背景を踏まえ、本研究は Tax1 特異的な機能のうち、PDZ ドメイン蛋白の機能制御に着目し、この機能が Tax1 による細胞がん化にどのように寄与するのか、その分子メカニズムを明らかにすることを目指し、以下に掲げる項目を目的とした。

- (1) Tax1 の真の標的となる PDZ ドメイン蛋白の同定: CTLL-2 細胞において Dlg1 をノックダウンすると、Tax1 のトランスフォーミング活性は上昇するが、Tax1ΔC の活性はレスキューされない。つまり

Dlg1 以外の PDZ 蛋白が Tax1 の真の標的になっていると考えられる。そこで Tax1 特異的に結合する PDZ ドメイン蛋白を質量分析により探索した結果、Dlg1、Scribble 以外に、複数の PDZ ドメイン蛋白質が、Tax1 と結合することが明らかとなった。これらの蛋白のうち、どれが Tax1 による細胞がん化における標的となるのかを明らかにする。

- (2) Tax1 が制御する PDZ ドメイン蛋白シグナル伝達経路の解明: IL-2 存在下で樹立した Tax1 と Tax1ΔC の安定発現細胞を用いて、マイクロアレイにより両者で発現量の異なる遺伝子を複数同定した。このことから、Tax1 は PDZ ドメイン蛋白との結合により何らかのシグナル伝達経路が活性化していることが示唆された。Tax1 が PBM 依存的にどのようなシグナル伝達経路を活性化し、細胞のトランスフォーメーションを導くのか、生化学的解析により明らかにする。
- (3) Tax1 標的 PDZ ドメイン蛋白の分子ネットワークの同定と機能解析: Tax1 標的 PDZ ドメイン蛋白複合体を、正常 T 細胞および HTLV-1 感染細胞より精製し、LC-MS/MS 質量分析法により複合体の構成蛋白を網羅的に同定する。これにより、この PDZ ドメイン蛋白が、いかなる分子を介してシグナルを下流に伝えるのかを明らかにする。
- (4) 白血病発症モデルマウスを用いた PDZ ドメイン蛋白の発がんにおける役割の解明: ヒトの造血幹細胞に Tax1 を発現させ、免疫不全マウスに戻すことにより CD4T 細胞白血病を発症させることが可能である。この白血病発症モデルを用いて、Tax1 による PDZ ドメイン蛋白の制御が、*in vivo* におけるヒト T 細胞のがん化にどのように関わるのかを明らかにする。
- (5) 新規 Tax1 結合蛋白 Mpp ファミリーの生体内機能解析: Mpp7 は申請者が新規に同定した Tax1 結合性 PDZ ドメイン蛋白である。Mpp7 の生体内機能、特に T 細胞の増殖やアポトーシスにおける機能を、申請者がすでに作製した Mpp7 ノックアウトマウスの解析により明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) Tax1 の真の標的となる PDZ ドメイン蛋白の同定: Tax1ΔC 変異体も、非常に低い確率で CTLL-2 細胞を IL-2 非依存性へとトランスフォームできる。この細胞において、ウエスタンブロットまたはリアルタイム PCR により Tax1 結合性 PDZ ドメイン蛋白の定量を行い、発現が低下している蛋白を同定する。さらに RNAi により同定した蛋白のノックダウンを行い、Tax1ΔC のトランスフォーミング活性

がレスキューされるか検討する。

(2) Tax1 が制御する PDZ ドメイン蛋白シグナル伝達経路の解明：

各種シグナル伝達因子の抗リン酸化抗体によるウエスタンブロットや、各種キナーゼに対する阻害剤を用いた実験により、Tax1 標的 PDZ ドメイン蛋白質の制御するシグナル伝達経路を明らかにする。

(3) Tax1 標的 PDZ ドメイン蛋白の分子ネットワークの同定と機能解析：

Tax1 標的 PDZ ドメイン蛋白に対する抗体を用いて、正常 T 細胞および HTLV-1 感染 T 細胞より、免疫沈降にて PDZ ドメイン蛋白複合体を精製する。免疫沈降に使用可能な抗体がない場合は、この蛋白のノックダウン細胞を作製、さらにタグをつけた RNAi 抵抗性 mRNA を発現させ、抗タグ抗体による免疫沈降を行う。SDS-PAGE により蛋白を分離し、銀染色後、LC-MS/MS 解析により蛋白の同定を行う。

(4) Tax1 の *in vivo* 白血病発症モデルマウスを用いた、PDZ ドメイン蛋白の発がんにおける役割の解明：

ヒトの造血幹細胞に Tax1、Tax1ΔC をレンチウイルスにより発現させ、免疫不全マウスに移植することにより CD4T 細胞白血病を発症させる。Tax1 標的 PDZ ドメイン蛋白のノックダウンも同時に行い、白血病発症への関与を検討する。

(5) 新規 Tax1 結合蛋白 Mpp ファミリーの生体内機能解析：

申請者がすでに作製した Mpp7 ノックアウトマウスを用いて、特に T 細胞における Mpp7 の生体内機能を明らかにする。また理研マウスクリニックにマウスを送付し一般的な解析を行う。

4. 研究成果

(1) Tax1 の真の標的となる PDZ ドメイン蛋白の同定：

Tax1 特異的に結合する PDZ ドメイン蛋白を質量分析により探索した結果、Dlg1、Scribble 以外に、MAGI-1、Erbin、Syntrophinβ、MPP7 といった PDZ ドメイン蛋白質を、新たな Tax1 結合蛋白として同定した。このうち HTLV-1 感染細胞では MAGI-1 の発現が顕著に低下しており、さらに低分子領域に MAGI-1 の分解産物とみられるバンドが認められた。Tax1 の発現により MAGI-1 は可溶性画分から不溶性画分へと移行した。これらことから、Tax1 は MAGI-1 と PBM を介して結合することによりその局在を変え、その分解を促進していることが示唆された。加えて、Tax1 で IL-2 非依存性へとトランスフォームしたマウス T 細胞株 CTLL-2 においても、MAGI-1 の顕著な低下が認められた。

この CTLL-2 における発現低下は RNA レベルで起こっており、さらに Tax1ΔC でトランスフォームした CTLL-2 細胞でも同様の発現低下が認められた。また逆に Tax1 でトランスフォームした CTLL-2 に MAGI-1 を発現させると増殖が停止した。このことから MAGI-1 の発現低下は Tax1 による T 細胞のトランスフォーメーションに必須であり、MAGI-1 が Tax1 の真の標的 PDZ 蛋白であることが強く示唆された。

(2) Tax1 が制御する PDZ ドメイン蛋白シグナル伝達経路の解明：

次に MAGI-1 が制御するシグナル伝達経路を明らかにするため、MAGI-1 のノックダウンによる解析を行った。293T 細胞を用いて siRNA による MAGI-1 のノックダウンを行ったところ、細胞内活性酸素種 (ROS) の上昇が認められた。逆に MAGI-1 の発現がない U2OS 細胞に MAGI-1 を過剰発現させたところ細胞内 ROS は低下した。このことから、MAGI-1 は細胞内 ROS 産生の制御因子であることが明らかとなった。興味深いことに、Tax1 には細胞内 ROS を上昇させる活性があるが、Tax1ΔC ではその活性が低下する。したがって Tax1 による ROS の上昇は MAGI-1 の機能阻害を介して起こっていると考えられる。ROS は細胞にとって有害である反面、細胞増殖を促進する作用ももつ。また DNA 変異を誘導することで細胞がん化に直接に関わっている。実際に Tax1 でトランスフォームした CTLL-2 を抗酸化剤である NAC で処理すると、IL-2 非依存性の増殖が抑制された。このことから Tax1 による細胞のがん化には MAGI-1 の不活化による細胞内 ROS の上昇が関与していることが示唆された。

次に MAGI-1 ノックダウン細胞における各種シグナル伝達経路の活性化を検討した。その結果 ERK、JNK、p38 の MAP キナーゼがすべて活性化していた。しかしながら Akt の活性化は見られなかった。これらの MAP キナーゼが活性化することで ROS が上昇するのか、あるいは ROS の上昇が MAP キナーゼを活性化しているのかは今のところ不明であり、この点を明らかにすることは今後の課題のひとつである。

(3) Tax1 標的 PDZ ドメイン蛋白の分子ネットワークの同定と機能解析：

MAGI-1 は PDZ ドメイン、WW ドメイン、GUK ドメインからなる足場蛋白の一種であると考えられている。MAGI-1 の分子ネットワークを明らかにするため、まず MAGI-1 の ROS 制御に関わるドメインの同定を試みた。WW ドメイン、GUK ドメインの変異体でも、ROS の低下がみられたことから、PDZ ドメインが ROS 制御の機能ドメインであることがわかった。現在 MAGI-1 PDZ ドメインに結合する蛋白を同定する実験を進行中である。

(4) Tax1 の *in vivo* 白血病発症モデルマウスを用いた、PDZ ドメイン蛋白の発がんにおける役割の解明：
研究期間内に本研究に着手することはできなかった。

(5) 新規 Tax1 結合蛋白 Mpp ファミリーの生体内機能解析：
Mpp7 ノックアウトマウスは外見上正常であり組織学的にも全く異常がみられなかった。また理研マウスクリニックにて各種血液検査、行動検査等を行ったがほぼ正常であった。しかしメスのノックアウトマウスでは骨量の有意な減少が認められた。このことから Mpp7 は骨組織の形成ないしは維持に重要な機能をもつことが明らかとなった。また血球系細胞に関して FACS 解析を行ったが、分化、細胞数とも正常であった。しかし ConA による肝炎を誘導したところ、Mpp7 ノックアウトマウスは野生型マウスに比べ、肝炎の重症度が高い傾向がみられた。したがって Mpp7 は T 細胞依存性の免疫反応の制御に関わっていることが示唆された。

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 6 件)

- 1) Takahashi M, Higuchi M, Makokha GN, Matsuki H, Yoshita M, Tanaka Y, Fujii M. HTLV-1 Tax oncoprotein stimulates ROS production and apoptosis in T cells by interacting with USP10. *Blood* 122: 715-725 (2013) 査読有
- 2) Makokha GN, Takahashi M, Higuchi M, Saito S, Tanaka Y, Fujii M. Human T-cell leukemia virus type 1 Tax protein interacts with and mislocalizes the PDZ domain protein MAGI-1. *Cancer Sci.* 104: 313-320 (2013). 査読有
- 3) Takahashi M, Higuchi M, Matsuki H, Yoshita M, Ohsawa T, Oie M, Fujii M. Stress granules inhibit apoptosis by reducing ROS production. *Mol. Cell Biol.* 33: 815-829 (2013) 査読有
- 4) Matsuki H, Takahashi M, Higuchi M, Makokha GN, Oie M, Fujii M. Both G3BP1 and G3BP2 contribute to stress granule formation. *Genes Cells.* 18: 135-146 (2013) 査読有
- 5) Imai M, Higuchi M, Kawamura H, Yoshita M, Takahashi M, Oie M, Matsuki H, Tanaka Y, Aoyagi Y, Fujii M. Human T cell leukemia virus type 2 (HTLV-2) Tax2 has a dominant activity over HTLV-1

Tax1 to immortalize human CD4(+) T cells. *Virus Genes.* 46: 39-46 (2013) 査読有

- 6) Yoshita M, Higuchi M, Takahashi M, Oie M, Tanaka Y, Fujii M. Activation of mTOR by human T-cell leukemia virus type 1 Tax is important for the transformation of mouse T cells to interleukin-2-independent growth. *Cancer Science* 103: 369-374 (2012) 査読有

[学会発表](計 7 件)

- 1) 藤井雅寛、高橋雅彦、樋口雅也、Naswa Makokha Grace PDZ 蛋白 MAGI-1 の不活化は HTLV-1 の Tax による T 細胞のトランスフォーメーションに関与する。第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013.11.10-12: 神戸国際会議場
- 2) 高橋雅彦、樋口雅也、藤井雅寛 HTLV-1 の Tax 蛋白は USP10 を介して ROS 産生と ROS 依存性アポトーシスを誘導する。第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013.11.10-12: 神戸国際会議場
- 3) 高橋雅彦、樋口雅也、藤井雅寛 HTLV-1 Tax は USP10 と結合することにより T 細胞における ROS 産生とアポトーシスを誘導を活性化する。第 72 回日本癌学会学術総会、2013.10.3-5: パシフィコ横浜
- 4) Takahashi M, Higuchi M, Fujii M. Stress granules inhibit apoptosis by reducing ROS production, but this phenomenon is nullified by HTLV-1 Tax. 16th International Conference on Human Retrovirology HTLV and Related Viruses, June 26-30 2013 Montreal, Canada
- 5) 高橋雅彦、樋口雅也、藤井雅寛。ストレス顆粒は ROS 産生を抑制することによりアポトーシスを阻害するが、これを HTLV-1 の Tax1 は解除する。第 71 回日本癌学会学術総会、2012.9.19-21: 札幌市教育分化会館、北海道
- 6) Higuchi M, Fujii M. HTLV-1 Tax1 represses the proapoptotic protein Bim, which is crucial for T-cell transformation. 15th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses.

2011.6.4-8, Leuven, Belgium

- 7) 樋口雅也,高橋雅彦,藤井雅寛 .HTLV-1 Tax1 と HTLV-2 Tax2 の違いが病原性に寄与する 第70回日本癌学会学術総会, 2011.10.3-10.5:名古屋

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