

平成 21 年 4 月 17 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007 ～ 2008

課題番号：19790060

研究課題名 (和文) ウイルス感染に伴う宿主細胞膜上分子間相互作用の網羅的変動解析

研究課題名 (英文) Characterization of cell surface molecular interactions in virus-infected host cell.

研究代表者

小谷 典弘 (Kotani Norihiro)

高知大学・教育研究部医療学系・助教

研究者番号：90342782

研究成果の概要：細胞膜上分子間相互作用は、様々な生理現象に重要な役割を果たしていることが知られているが、ウイルス感染において宿主細胞にどのような細胞膜上分子間相互作用変化が起るかは知られていない。本研究では Epstein-Barr ウイルス感染ヒト B 細胞を用いて、1) 感染細胞には Thy1 分子が過剰発現している事、2) Thy1 の分子間相互作用は感染細胞と非感染細胞間で異なる事、3) 他の細胞膜上分子の分子間相互作用については、感染細胞と非感染細胞間で異なる場合と異なる場合がある事、を明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,900,000	0	1,900,000
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	360,000	3,460,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：ウイルス、細胞膜上分子間相互作用

## 1. 研究開始当初の背景

1972 年、Singer と Nicolson は動物細胞膜が脂質二重層から成り、その上には各種受容体など細胞機能にとって重要な役割を果たしている細胞膜上分子が多数存在すること、同時にこれら細胞膜上分子は脂質二重層の流動に伴って膜上で常にダイ

ナミックに運動していることを提唱した (Singer・Nicolson の流動モザイクモデル)。以来これら細胞膜上分子は個別に精製され、その性状・機能が入念に研究されてきた。しかし、この「細胞膜上分子運動」の生物学的な意義に焦点をあてた研究は当初ほとんどなされなかった。1990 年代に

ようやく細胞膜上分子運動について研究が進められるようになり、特定の細胞膜上分子同士が非常に短い一定時間内に膜上で集合、拡散を繰り返す「細胞膜上分子間相互作用」が確認された。この現象、とくに細胞膜上分子同士の集合状態（“膜マイクロドメイン”と呼ばれる）が細胞機能に極めて重要であることが明らかとなり、これを皮切りに「細胞膜上分子の運動とそれに伴う細胞膜上分子間相互作用」が注目されるようになった。

このような学術的な背景の中、研究代表者は膜マイクロドメイン、またタンパク質や糖脂質等を含めた細胞膜上分子間相互作用に興味を持ち研究を行ってきた。その過程において、研究代表者は全く新規で実用的な細胞膜上分子間相互作用解析法の開発に成功した（特許出願）。本法は細胞膜上分子間相互作用生化学的可視化法と呼ばれ、Enzyme-Mediated Activation of Radical Sources (EMARS) と名付けた反応を利用して行われる。本解析法が他法と比較して決定的に有利な点は、生理的条件下（細胞膜表面分子が運動している状態）において相互作用した細胞膜上分子を生化学的解析により網羅的に同定でき、なおかつそれらの相互作用頻度を数値化できることである。従って本法により得られた知見は様々な研究分野において大きなインパクトを与えるものと考えられる。また、本法は非常に簡便な方法であり特別な装置を必要とせず、低コストであるため多くのライフサイエンス系研究室で実施可能であるという利点がある。

## 2. 研究の目的

研究代表者はこの細胞膜上分子間相互作用生化学的可視化法を用いる事で、細胞の環境の変化（増殖、分化、感染、加齢、癌化等）により細胞膜上分子間相互作用が受ける影響を解析することを研究の大きな柱としている。その中で、本研究ではまずウイルス、ことに代表的ヒト癌ウイルスである Epstein-Barr ウイルス (EBV) に焦点を当て、これをモデルに EBV 感染という細胞にとって重大なイベントに伴って細胞膜上分子間相互作用がどのような影響を受けるかを明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

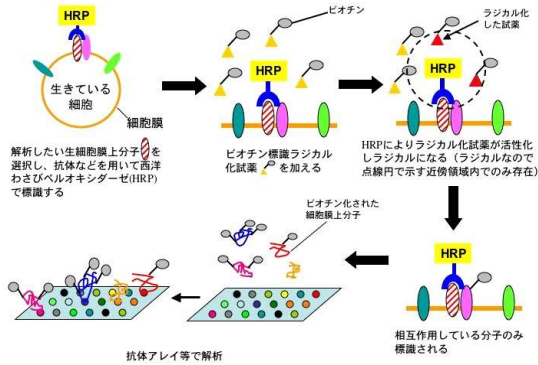
### (1) 感染細胞に過剰発現している細胞膜上分子の同定

EBV 感染 B 細胞株である Akata 細胞およびその細胞から EBV が脱離した Akata-細胞において各細胞間で遺伝子発現に差がある細胞膜上分子を DNA アレイを用いて解析した（理研、京大との共同研究）。用いたアレイは理化学研究所で開発された糖鎖関連遺伝子マイクロアレイである。EBV が感染している B 細胞リンパ腫細胞 Akata とその細胞から EBV が脱離した Akata-細胞から mRNA を精製し、それらの cDNA を得た。それをマイクロアレイに処理し、2 細胞間で発現量の異なる遺伝子を解析した。発現量の異なる遺伝子について RT-PCR および FACS 解析により再確認した。

### (2) 生化学的可視化法による分子間相互作用の解析

近年我々が開発した細胞膜上分子間相互作用生化学的可視化法 (Enzyme-Mediated Activation of Radical Sources (EMARS))

反応を用いた方法)により、上記2細胞間で発現に差があった分子および、その他の細胞膜上分子(インテグリン ganglioside GM3)の分子間相互作用を解析した(下記説明図参照)。



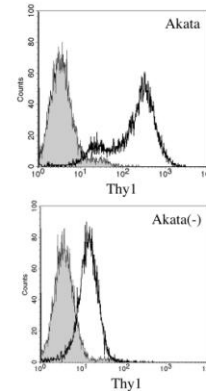
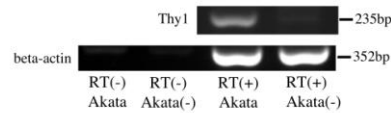
反応後の相互作用分子の同定については、R&D社から販売されている Receptor tyrosine kinase 及び Immunoreceptor 抗体アレイを用いた。

#### 4. 研究成果

##### (1) 感染細胞に過剰発現している細胞膜上分子の同定

2007年度は、まずEBV感染により発現レベルに変化が認められる宿主細胞膜上分子の分子間相互作用解析の研究を行った。第一にEBV感染B細胞株であるAkata細胞およびその細胞からEBVが脱離したAkata-細胞において各細胞間で遺伝子発現に差がある細胞膜上分子をDNAアレイを用いて解析した(理研、京大との共同研究)。その結果、これら細胞間においていくつかの細胞膜上分子の発現量が変化していた。中でも、GPIアンカー型細胞膜上分子であるThy-1(CD90)については、Akata-細胞と比較してAkata細胞において有意な発現上昇が見られたことから、EBVの感染に伴って発現上昇する分子である可能性が示唆された。

Thy-1は通常ヒトの場合はB細胞に発現しておらず、B細胞由来の培養細胞であるAkata細胞において発現誘導が起ることは極めて興味深い。次に、DNAアレイの結果を追試する目的でAkata細胞およびAkata-細胞からtotal RNAを抽出しRT-PCRを行った。その結果、同様にAkata細胞ではAkata-細胞と比較して有意にThy-1のmRNAレベルの上昇が見られた。さらに抗Thy-1抗体を用いて各細胞膜上のThy-1のタンパク質レベルでの発現量をFACSで測定した。その結果、Akata細胞ではAkata-細胞と比較して約1.8倍細胞表面に発現していることが分かった。

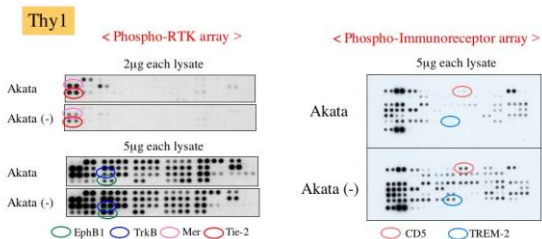


##### (2) 生化学的可視化法による分子間相互作用の解析

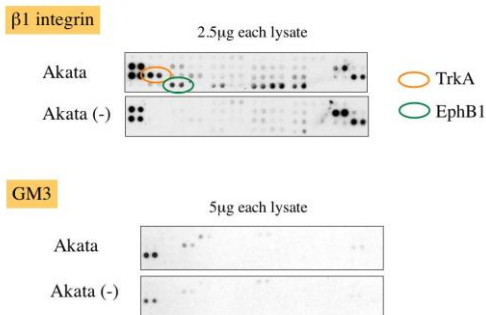
Thy-1は細胞内シグナル伝達機構のプラットフォームである脂質マイクロドメイン上にも存在することから、EBVの感染によるThy-1の細胞膜への発現が脂質マイクロドメインを含む宿主細胞膜上分子間相互作用の変化を誘起し宿主細胞内シグナル伝達機構の変化を誘導する可能性が示唆された。従って、Thy-1が相互作用する細胞表面分子を

我々が開発した細胞表面分子間相互作用生化学的可視化法（biochemical Visualization）を用いて解析した。

その結果、Receptor Tyrosine kinase 抗体アレイ（R&D 社製）を使用した解析では、i) Mer および Tie-2 受容体が EBV 非感染の Akata-細胞よりも EBV 感染細胞の Akata 細胞でより Thy1 と強く相互作用していた、ii) 逆に EphB1 および TrkB 受容体に関しては、Akata 細胞よりも Akata-細胞の方が Thy1 と強く相互作用する事が明らかになった。また、Immunoreceptor 抗体アレイ（R&D 社製）を用いて、同様の解析を行なったところ、Thy1 と CD5 および TREM-2 との相互作用が EBV 感染の有無で影響を受けていることが判明した。



次に、細胞接着に重要な分子である beta1 integrin と相互作用する分子を同様に解析すると TrkA 及び EphB1 との相互作用が EBV 感染の有無で影響を受けていることが分かった。しかし、同じ条件で細胞膜表面分子 ganglioside GM3 の相互作用分子を解析した結果、Thy1 および beta1 integrin の相互作用解析で見られた EBV 感染による相互作用変化は観察されなかった。



これらの結果から、EBV 感染によって宿主細胞膜上分子の発現が変化すると同時に、様々な宿主細胞膜上分子間相互作用が変化している可能性が示唆された。特に、EBV 感染により相互作用が減弱する分子群が存在することが明らかになり、EBV がこの現象を通じて宿主細胞のシグナル伝達系を抑制している可能性が示唆された。

## 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）

〔学会発表〕（計 1 件）

小谷典弘、石浦嘉人、山本晴美、小堤保則、本家孝一

「EB ウイルス陽性 B 細胞リンパ腫における糖鎖関連遺伝子の発現」  
BMB2008 日本生化学会、分子生物学会合同年会、2008 年 12 月 9 日

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小谷 典弘 (Kotani Norihiro)

高知大学・教育研究部医療学系・助教  
研究者番号：90342782