

論文内容の要旨

N-linked glycosylation dependent inhibition of retrovirus infection

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科生命薬科学専攻 吉居 廣朗

マウス白血病ウイルス (MLV) やヒト免疫不全ウイルス (HIV) はレトロウイルス科に属し、哺乳類細胞に慢性感染して腫瘍や免疫不全症を引き起こすことが知られている。また基礎研究領域では、標的細胞への特定遺伝子を導入するためのツールとしてレトロウイルスベクターが応用されている。

レトロウイルスの感染受容体の多くは、多重膜貫通型で N 結合型糖鎖が細胞外ドメインに結合している。Ecotropic-MLV は、マウスおよび数種のラットに発現する cationic amino acid transporter 1 (CAT1) の細胞外第 3 ループ領域 (ECL3) 中の YGE₂₃₅₋₂₃₇ 配列を認識して感染を成立させる。この領域中には N-結合型糖鎖付加部位が 2 ヶ所存在する。ラット F10 細胞および野生マウス *Mus dunni* 由来 MDTF 細胞で発現している CAT1 (順に rCAT1, dCAT1) は、マウス *Mus musculus* 由来 NIH 3T3 細胞の CAT1 (mCAT1) と比較しウイルス感受性は低い。しかし、糖鎖修飾阻害薬である tunicamycin で処理すると感受性が増加することが報告されている。mCAT1 は tunicamycin 処理をしても感染に影響しない。そこで我々は、糖鎖修飾に影響を及ぼすアミノ酸配列について解析をした。

また、ヒトのレトロウイルスである HIV-1 の感染は、1 回膜貫通型 CD4 と多重膜貫通型ケモカインレセプターの 2 種類を認識して感染する。ケモカインレセプター CXCR4 は HIV-1 の感染受容体であるが、N 末端に 1 ヶ所 N-結合型糖鎖付加部位が存在する。これまでに HIV-1 (CXCR4-tropic, X4-tropic) 感染への CXCR4 糖鎖の影響を解析した報告はあるが、結果は一致しておらず結論付けられてない。今回我々は、CD4 の発現に依存しない CD4-independent HIV-1 を用い、ウイルス感染に糖鎖がどれほど影響しているのか解析した。

1. Eco-MLV 感染受容体の糖鎖修飾による感染抑制

感染低感受性である rCAT1 および dCAT1 と、高感受性である mCAT1 の ECL3 のアミノ酸配列を比較し、各々の cDNA に変異を導入して Eco-MLV 感染への影響を検討した (Table 1)。

Table 1. Amino acid sequence alignments of ECL3 of mCAT1, rCAT1 and dCAT1

Species	Sequence
<i>Mus musculus</i> (mCAT1)	V K G S I K N W Q L T E K N F S - - - C N N N D T N V K <u>Y - G E</u> G G F M
Rat (rCAT1)	· · · · · E · · · · · · · · · · · K · S P L · G · · · · · · · · · · · · · · ·
<i>Mus dunni</i> (dCAT1)	· · · · V · · · · · · · · · · · · · · · - - - · · · · · · · · · · · G · · · · ·

Filled boxes, N-linked glycosylation sites; **Shaded box**, Mo-MLV Env-binding domain in mCAT1

rCAT1 mutant1 発現細胞 (rCAT1 の 3 アミノ酸 SPL₂₃₀₋₂₃₂ を削除し、mCAT1 タイプに変異させた) の Eco-MLV 感染感受性は、rCAT1 発現細胞よりも増加した (Fig. 1)。Tunicamycin による感染感受性の増加は見られず、これは mCAT1 の時と同じ結果であり、Eco-MLV 感染に糖鎖の影響が及ぼさないことが裏付けられた。さらに、ウイルスが結合する YGE₂₃₅₋₂₃₇ 配列に近い糖鎖付加部位を Asp に置換して糖鎖付加が起こらない rCAT1 mutant1G を作製した。rCAT1 mutant1G 発現細胞は、rCAT1 mutant1 発現細胞と比してウイルス感染感受性に影響は無かった。このことから、mCAT1 と比較して rCAT1 はウイルス結合部位がある ECL3 における、この 3 アミノ酸の挿入によりタンパク質の高次構造が変化し、ウイルス感染が糖鎖の影響を受けるようになったと考えられた。

また、mCAT1/insG (mCAT1 の 236 番目に Gly 挿入変異を入れ dCAT1 タイプにした) 発現細胞の Eco-MLV 感染感受性は mCAT1 発現細胞に比べ 10 分の 1 まで低下した。mCAT1/insG 発現細胞において tunicamycin 処理は感染感受性を約 4 倍回復させた (Fig. 2)。このことから、236 番目の Gly 挿入により感染が糖鎖の影響を受けるようになったことが示唆された。mCAT1/insG の Gly 挿入変異は、ウイルス結合配列中に存在するため、ウイルス結合能についても解析した。その結果、Eco-MLV と mCAT1/insG の結合は明らかに低下しており、糖鎖の影響とともに感染感受性低下の原因であることが示唆された。

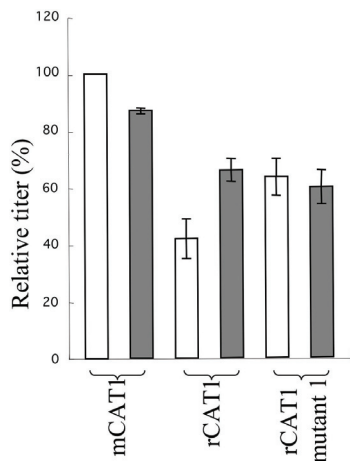


Fig. 1. Effect of tunicamycin on transduction efficiency by Eco-MLV. Transduction titers in tunicamycin-treated (100 ng/ml) (gray bar) or untreated (open bar) were measured.

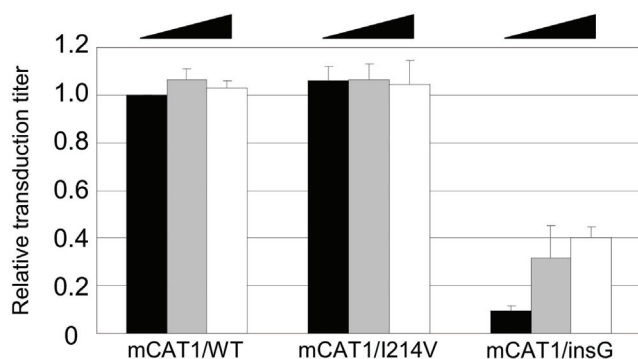


Fig. 2. Relative susceptibility of each mCAT1 mutant-expressing cell pool to Eco-MLV infection. Transduction titers are shown for untreated cells (filled bar) and for cells treated with 400 ng (gray bar) or 800 ng (open bar) tunicamycin/ml.

2. HIV 感染受容体の糖鎖修飾による感染抑制

CXCR4 の糖鎖付加部位を Ala に置換した変異体 N11A を作製した。HIV-1 ベクターは、CD4-dependent HIV-1, NDK 株または HXB2 株と、CD4-independent variant である mNDK 株または IIIB/8x 株を使用した。

作製した CXCR4 N11A mutant の細胞表面発現は wild-type CXCR4 に比べ 2-10 倍低かったものの、CD4-independent 感染に対する感受性は CXCR4 N11A 発現細胞の方が wild-type CXCR4 発現細胞よりも 1.5-5.0 倍高かった (Fig. 3)。

次に、CD4 と CXCR4 の共発現下で CXCR4 の糖鎖が感染に影響を及ぼすか検討した。その結果、CD4-dependent 感染に対する感受性は、CXCR4 N11A mutant 発現細胞と wild-type CXCR4 発現細胞において同程度であった。これらの結果より、HIV-1 のエンベロープが最初に接触する CD4 が存在すると CXCR4 の糖鎖の影響を受けにくくなることが示唆された。

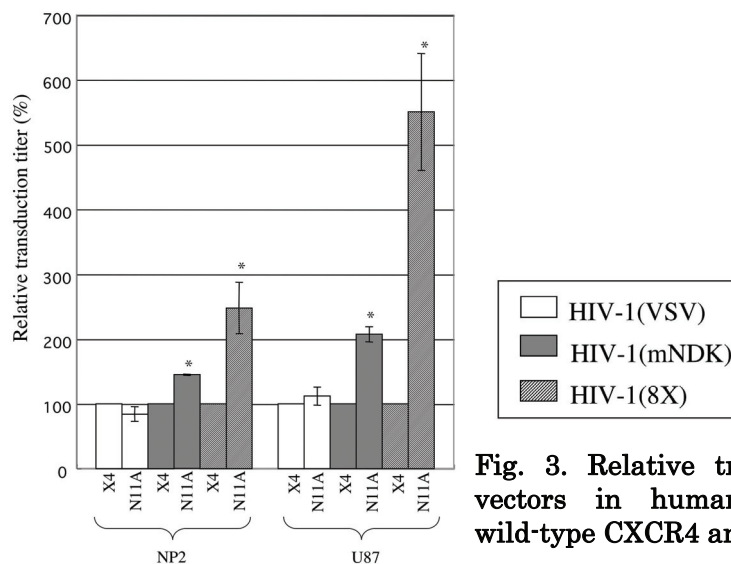


Fig. 3. Relative transduction titers of the vectors in human cell lines expressing wild-type CXCR4 and CXCR4 N11A mutant.

[考察]

本研究より、レトロウイルスの感染は感染受容体に結合する糖鎖によって阻害されることがわかった。これは、感染受容体が進化の過程で得た自然免疫の一部を担っているのかもしれない。また、多糖類が感染を抑制するという報告もあることから、抗ウイルス薬としての候補になり得るものと期待する。