

アデノウイルス感染における新規可溶性タンパク質 CAR-like Soluble Protein (CLSP) の役割

川端 健二

Role of a Novel Protein, CAR-like Soluble Protein (CLSP), in Adenovirus Infection

Kenji KAWABATA

Laboratory of Gene Transfer and Regulation, National Institute of Biomedical Innovation
7-6-8 Saito-Asagi, Ibaraki City, Osaka 567-0085, Japan

(Received April 16, 2007)

Coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR) is a member of the immunoglobulin superfamily and a component of epithelial tight junction. CAR also functions as a primary receptor for coxsackievirus B and adenovirus (Ad) infection. Recently, we have identified a novel protein, CAR-like soluble protein (CLSP), which is closely related to CAR. Mouse CLSP (mCLSP) was composed of 390 amino acids, including three Ig domains, and showed strong homology to the IgV domain of CAR. Interestingly, mCLSP lacks a transmembrane domain, indicating that this is a soluble protein. When mCLSP cDNA was introduced into CAR-positive cells, the infection with Ad vector was severely inhibited. On the other hand, mCLSP promoted the infection with Ad vector in CAR-negative cells. Furthermore, recombinant CLSP directly bound to Ad and inhibited the Ad vector-mediated transduction in CAR-positive cells. Computational analysis for a genome database showed that the CLSP gene is rodent-specific, and that human and bovine lack this gene. Here, I discuss the function of CLSP for Ad infection.

Key words—adenovirus; receptor; coxsackievirus and adenovirus receptor; gene therapy

1. はじめに

アデノウイルス (Ad) ベクターは高効率に遺伝子導入可能なベクターであり、簡便にベクターが調製できることから遺伝子治療や基礎研究に汎用されている。従来の 5 型 Ad ベクターは coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR) と呼ばれるイムノグロブリン (Ig) スーパーファミリーに属する細胞接着分子を受容体として感染する。このファミリーに属するタンパク質群の特徴として互いに相同性を有するものが多いことが挙げられる。そこで筆者らは、CAR の Ad 結合領域 (IgV 領域) と相同性を有する新規タンパク質を同定する目的で、CAR cDNA と相同性を有する cDNA 断片をマウス EST (expressed sequence tag) cDNA ライブラリーから探索した結果、CAR の IgV 領域と相同性を有する新

規タンパク質 CAR-like soluble protein (CLSP) を同定した。本稿では、CLSP の機能、特にその中でも Ad ベクター感染に及ぼす影響について概説する。

2. CLSP の同定とその構造

CAR はコックスサッキーウイルス及び Ad の受容体として 1997 年に同定された。¹⁻³⁾ CAR は Ig スーパーファミリーに属する一回膜貫通型のタンパク質であり、細胞外に 2 つの Ig 様領域を有する (Fig. 1)。⁴⁻⁶⁾ CAR は細胞接着分子としての機能だけでなく、上皮細胞間のタイトジャンクションの形成⁷⁻⁹⁾や癌細胞の増殖抑制活性^{10,11)}など種々の生理機能を有する。また、遺伝子欠損マウスの解析から CAR は胎児期の心形成にも必須であることが明らかになっている。^{12,13)} Ig スーパーファミリーに属するタンパク質は互いに相同性を有するものが多く、¹⁴⁾例えば CAR は CAR-like membrane protein (CLMP)¹⁵⁾や brain- and testis-specific immunoglobulin superfamily (BT-IgSF)、¹⁶⁾ endothelial cell-selective adhesion molecule (ESAM)¹⁷⁾などと構造的に類似性を有する。このファミリーに属するタンパク質

独医薬基盤研究所遺伝子導入制御プロジェクト (〒567-0085 茨木市彩都あさぎ 7-6-8)

e-mail: kawabata@nibio.go.jp

本総説は、平成 18 年度日本薬学会近畿支部奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

のもう1つの特徴として、膜貫通領域を欠いた可溶性分子を生成することが多いことが挙げられる。¹⁸⁾ 個々の可溶性分子は酵素による膜型分子の切断や転写時の選択的スプライシングにより生成される。¹⁹⁾ このようにして産生された可溶性分子は細胞外へ分泌され、ウイルス感染などの種々の疾患に関与していることが知られている。²⁰⁾ CARも選択的スプライシングにより可溶性が生成されることが知られており、可溶性CARはコックスサッキーウイルスの感染を阻害することが知られている。²¹⁾ また、腫瘍滲出液中の可溶性CARがAdベクターを用いた遺伝子治療の阻害要因となり得ることも報告されている。²²⁾

筆者らはCARのAd結合領域と相同性を有する新規タンパク質を探索しCLSPを同定した。CLSP cDNAは全長1567塩基であり、390アミノ酸からなるタンパク質をコードしていた。また、CLSPは3つのIg様領域を有していたが、膜貫通領域は存在せず、主に可溶性タンパク質として存在することが示された (Fig. 1)。さらに、CLSPの3つのIg

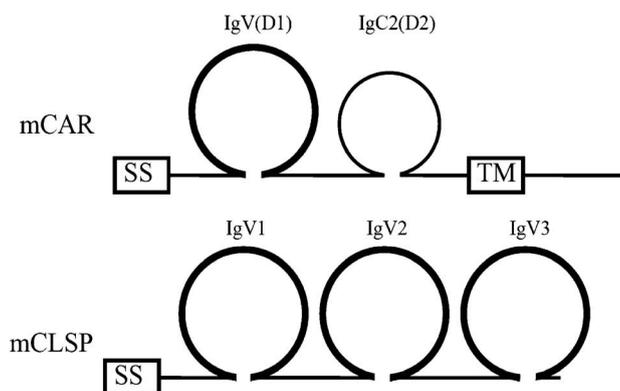


Fig. 1. The Structure of mCAR and mCLSP

Both proteins have the signal sequence (SS) at the amino-terminal. mCAR has an extracellular portion containing an immunoglobulin V- and C2-type domain (IgV and IgC2, respectively), a transmembrane region (TM), and a cytoplasmic tail. On the other hand, mCLSP has three IgV domains and no transmembrane region. Thick lines indicate the regions showing significant homology. Ad binds to IgV (D1) domain of CAR for infection.

様領域は互いに相同性を示し、CARのN末側のIg様領域、すなわちAd結合領域とも相同性を有していた (Fig. 1)。マウスのゲノムデータベースを探索した結果、CLSP遺伝子は9番染色体に位置しており、16番染色体に存在するCAR遺伝子とは別の遺伝子であることが明らかとなった。また、ラットもCLSP遺伝子を有しており、ラットCLSP (rCLSP) とマウスCLSP (mCLSP) はアミノ酸レベルで約85%の相同性を示した。

3. CLSPの発現部位

マウスにおけるCLSPとCAR mRNAの発現部位をRT-PCRにて検討した結果、CAR mRNAが広範囲の組織で発現がみられたのに対し、CLSP mRNAは組織特異的に発現しており、中でも脳と卵巣で強い発現がみられた (Table 1)。また、抗mCLSP抗体を用いたウエスタンブロットによりCLSPのタンパク質レベルでの発現部位も検討したが、調べたいずれの組織においても発現は確認されず、健常生体マウスにおけるCLSPの発現はわずかであるか、あるいは組織中のごく一部の細胞群だけがCLSPを発現している可能性が示唆された。

4. CLSPのAd感染に及ぼす影響

mCLSPはCARのAd結合領域と相同性を有する領域が3カ所存在しており、Ad感染に何らかの影響を及ぼす可能性が考えられた。そこで、mCLSP cDNAを過剰発現させた細胞を用いて、Adベクター感染に及ぼすCLSPの影響について検討した。SK HEP-1細胞はヒト肝細胞癌由来の細胞株であり、CARを高発現しているためAdベクターが効率よく感染することが知られている。^{23,24)} この細胞にmCLSP cDNAを安定発現させ、ルシフェラーゼ発現Adベクター (Ad-L) を作用させた結果、mCLSPを発現させたSK HEP-1細胞 (SK HEP-1-mCLSP細胞) ではルシフェラーゼ発現量が有意に低下し、mCLSPはAdベクターの感染を阻害することが明らかとなった (Fig. 2(A))。

Table 1. Expression of mCLSP and mCAR mRNA in Adult Female Mouse

| | Brain | Thymus | Lung | Heart | Liver | Spleen | Kidney | Uterus | Ovary |
|-------|-------|--------|------|-------|-------|--------|--------|--------|-------|
| mCLSP | + | - | + | + | - | - | + | + | + |
| mCAR | + | + | + | + | + | + | + | + | + |

- : not detected. + : low or medium level of expression. ++ : high level of expression.

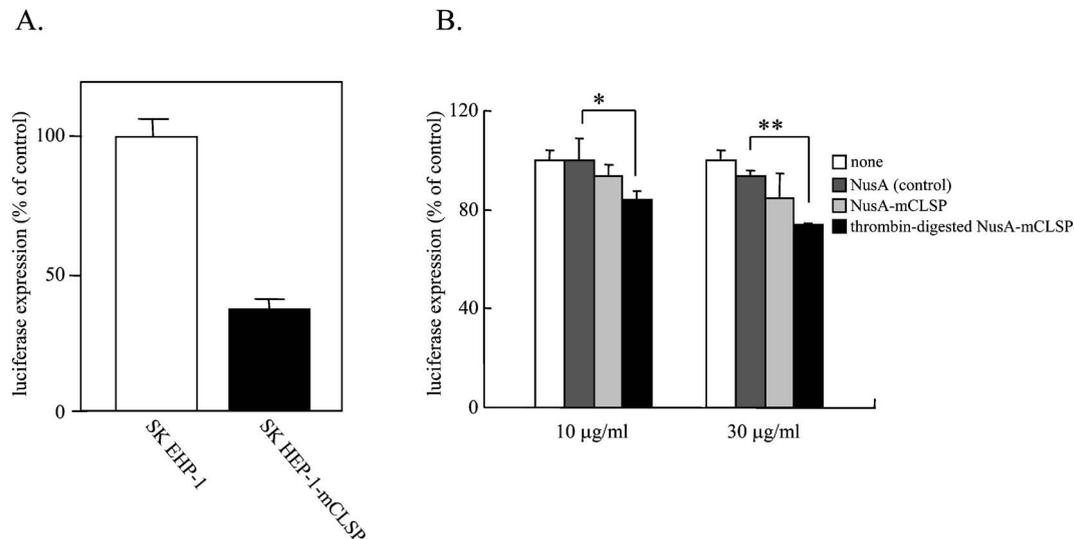


Fig. 2. mCLSP Inhibits the Infection with Ad Vector

(A) SK HEP-1 cells and SK HEP-1-mCLSP cells were infected with 100 VP/cell of Ad-L. Twenty-four hours later, the luciferase activities in the cells were measured. The luciferase activity in SK HEP-1 cells infected with Ad-L was taken as 100%. (B) Recombinant proteins synthesized in *E. coli*, i.e., NusA, NusA-mCLSP fusion protein, and thrombin-digested NusA-mCLSP, were added to the medium of wild-type SK HEP-1 cells. The white bar indicates cell medium with no added recombinant proteins. The cells were then infected with 300 VP/cell of Ad-L, and the luciferase activity in the cells was measured two days later. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

遺伝子治療用ベクターとして汎用されている Ad ベクターはサブグループ C に属する 5 型 Ad を基盤としている。また、サブグループ B に属する 35 型 Ad は従来の 5 型 Ad とは異なり、CAR ではなく CD46 を受容体として感染することが知られている。²⁵⁻²⁷⁾ そこで、35 型 Ad の感染が CLSP の発現に影響されるかどうかを調べるために、SK HEP-1 細胞を用いて同様の検討を行ったところ、CLSP は従来の 5 型 Ad ベクター (Ad-L) の感染は阻害するが、35 型 Ad ベクター (Ad35-L) の感染は阻害しないことが明らかとなった。したがって、CLSP は CAR と特異的に競合して 5 型 Ad の感染を阻害している可能性が示唆された。

CLSP は N 末にシグナル配列を有しかつ膜貫通領域を持たないことから液性タンパク質であると考えられたので、SK HEP-1-mCLSP 細胞の培養上清中の Ad 感染阻害活性について検討した。SK HEP-1-mCLSP 細胞の培養上清を野生型 SK HEP-1 細胞に添加しその後 Ad-L を作用させたところ、ルシフェラーゼ発現量が有意に減少した。しかしながら、SK HEP-1-mCLSP 細胞培養上清中の Ad 感染阻害活性は SK HEP-1-mCLSP 細胞に直接 Ad ベクターを感染させた場合と比較し低いものであった。この原因を明らかにするため、SK HEP-1-mCLSP 細胞

で産生された CLSP の局在について検討した。野生型 SK HEP-1 細胞及び SK HEP-1-mCLSP 細胞に対し、抗 mCLSP 抗体を用いてフローサイトメトリーにて解析した結果、SK HEP-1-mCLSP 細胞で産生された CLSP の大部分が細胞表面に局在していることが明らかとなった。すなわち、CLSP は産生・分泌されたのち何らかのメカニズムにより細胞表面に付着しており、この状態で Ad の感染を阻害していることが示された。CLSP が Ad の感染を阻害することをさらに確認するため、大腸菌を用いて遺伝子組み換え CLSP を作製し、組み換え CLSP の Ad ベクター感染に及ぼす影響について検討した。組み換え CLSP を SK HEP-1 細胞に添加し Ad-L を作用させたところ、CLSP の添加量依存的にルシフェラーゼの発現量は低下し、組み換え CLSP は Ad の感染を阻害していることが示された (Fig. 2(B)).

次に CLSP による Ad 感染阻害のメカニズムを明らかにするため、Ad ベクターと組み換え CLSP とが直接結合するかどうかについて ELISA による検討を行った。Ad ベクターをコートしたプレート上に CLSP を加え抗 CLSP 抗体にて検出したところ、CLSP を添加した場合に有意な発色が観察され、Ad ベクターと CLSP が物理的に直接結合している

ことが明らかとなった。

ある種の可溶性受容体はウイルス感染を促進することが知られている。^{28,29)} 例えば、ヘルペスウイルスは nectin 1 を受容体として感染するが、可溶性 nectin 1 を加えることによりヘルペスウイルスは nectin 1 陰性細胞へも感染可能となる。²⁹⁾ そこで筆者らは、CAR 陰性細胞への Ad 感染における CLSP の影響について検討した。マウス NIH3T3 線維芽細胞は CAR 陰性であり、Ad 感染に対して耐性である。³⁰⁾ NIH3T3 細胞に mCLSP cDNA を安定発現させ、先と同様の Ad-L 感染実験を行った結果、野生型 NIH3T3 細胞と比較し、mCLSP 発現株 (NIH3T3-mCLSP 細胞) ではルシフェラーゼ発現量の有意な上昇が観察された (Fig. 3)。また、それに伴い Ad ベクター DNA の取り込み量も有意に上昇していた。したがって、CAR 陽性細胞の場合と異なり、CLSP は CAR 陰性細胞では逆に Ad の感染を促進することが示された。CAR 陰性細胞では細胞表面の CLSP と結合した Ad はエンドサイトーシスなどのメカニズムにより、低効率ではあるが細胞内に取り込まれると考えられる。一方、CAR 陽性細胞では CAR 陰性細胞の場合と同様に Ad が低効率で侵入するルートは存在するものの、本来の感染ルートである CAR を介した経路が阻害されるために、結果的に感染効率は低下するものと考えられた (Fig. 4)。

マウス CLSP 遺伝子は 9 番染色体上に存在し、ラット CLSP 遺伝子は 8 番染色体上に存在する。しかしながら、マウス及びラット CLSP 遺伝子の近傍に存在する遺伝子を指標としてヒト及びウシで対応する染色体を調べたところ、これらの動物種には CLSP 遺伝子を見出すことはできなかった (Fig. 5)。また、ヒト EST データベース中にも CLSP cDNA に対応する cDNA 断片を見つけることができず、CLSP 遺伝子はげっ歯類特異的な遺伝子であると推察された。

5. おわりに

筆者らは CAR の Ad 結合領域と相同性を有する新規タンパク質 CLSP を同定した。CLSP は 3 つの Ig 様領域を有した可溶性タンパク質であり、CAR 陽性細胞では Ad の感染を阻害し、CAR 陰性細胞では逆に Ad の感染を促進させる。また、これらの作用は Ad が CLSP と直接結合することによって生

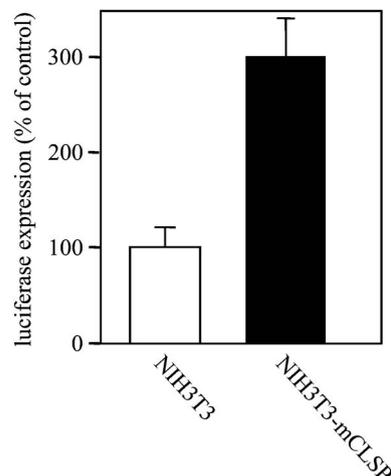


Fig. 3. Stably Expressed mCLSP Promotes the Infection with Ad Vector in NIH3T3 Cells

NIH3T3 cells and NIH3T3-mCLSP cells were infected with 300 VP/cell of Ad-L. Twenty-four hours later, the luciferase activities in the cells were measured. The luciferase activity in NIH3T3 cells infected with Ad-L is indicated as 100%.

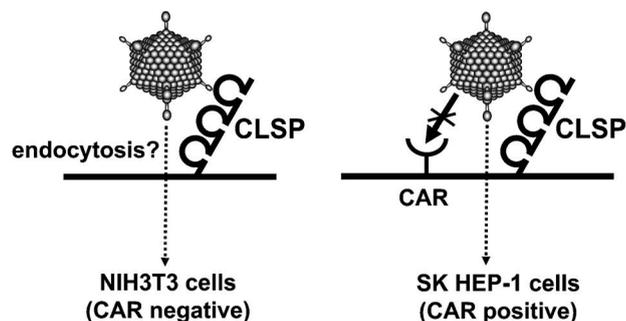


Fig. 4. Effect of CLSP on Ad Infection

CLSP promotes the infection with Ad in CAR-negative cells, whereas CLSP inhibits the infection with Ad in CAR-positive cells.

じる。CLSP 遺伝子はマウスやラットに特異的な遺伝子であることが明らかとなり、げっ歯類における抗ウイルスタンパク質として機能している可能性が考えられる。遺伝子治療研究において Ad ベクターを投与した場合、ヒトとマウスとでは投与後の Ad の動態や遺伝子発現部位に一部相違がみられることが知られているが、この現象に CLSP 遺伝子の有無が関連していることも考えられる。今後 *in vivo* での CLSP の生理機能と Ad 感染における役割を明らかにすることによって、遺伝子治療用 Ad ベクターの安全性・有効性を評価できる適切な動物モデルの作製なども可能になると考えられる。

謝辞 本稿で紹介した研究は、(独)医薬基盤研究

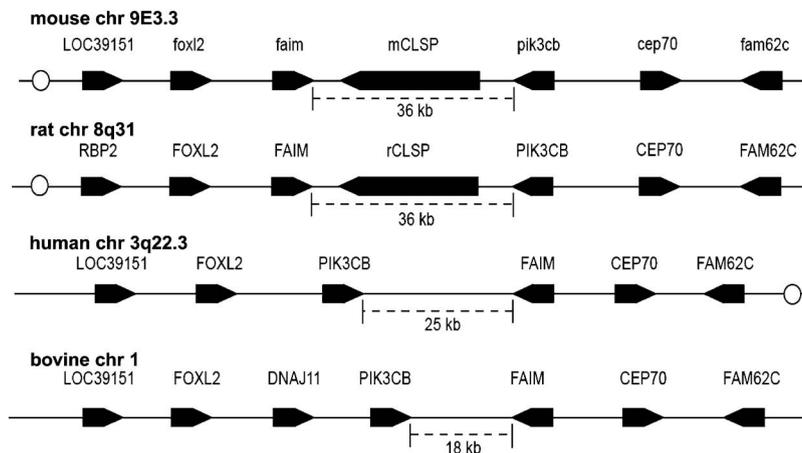


Fig. 5. Genomic Structures of the mCLSP Locus in Mammals

Horizontal lines, arrow-shaped boxes, and open circles indicate the intergenic regions, genic regions, and centromeres of the mouse, rat, human, and bovine genomes, respectively. The direction of the arrows corresponds to the direction of transcription. There were no gene-like sequences in the intergenic region of FAIM and PIK3CB of the human and bovine genomes. Note that the length of genic and intergenic regions in the figure is not proportional to the actual genomic distances.

所遺伝子導入制御プロジェクト及び国立医薬品食品衛生研究所遺伝子細胞医薬部において行われたものであり、多大なご協力をいただいた水口裕之プロジェクトリーダー、櫻井文教研究員、及び田代克久修士をはじめ関係者の皆様に深く感謝いたします。

REFERENCES

- Bergelson J. M., Cunningham J. A., Droguett G., Kurt-Jones E. A., Krithivas A., Hong J. S., Horwitz M. S., Crowell R. L., Finberg R. W., *Science*, **275**, 1320–1323 (1997).
- Tomko R. P., Xu R., Philipson L., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **94**, 3352–3356 (1997).
- Roelvink P. W., Lizonova A., Lee J. G., Li Y., Bergelson J. M., Finberg R. W., Brough D. E., Kovesdi I., Wickham T. J., *J. Virol.*, **72**, 7909–7915 (1998).
- Bergelson J. M., Krithivas A., Celi L., Droguett G., Horwitz M. S., Wickham T., Crowell R. L., Finberg R. W., *J. Virol.*, **72**, 415–419 (1998).
- van Raaij M. J., Chouin E., van der Zandt H., Bergelson J. M., Cusack S., *Structure*, **8**, 1147–1155 (2000).
- Howitt J., Bewley M. C., Graziano V., Flanagan J. M., Freimuth P., *J. Biol. Chem.*, **278**, 26208–26215 (2003).
- Cohen C. J., Shieh J. T., Pickles R. J., Okegawa T., Hsieh J. T., Bergelson J. M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **98**, 15191–15196 (2001).
- Walters R. W., Freimuth P., Moninger T. O., Ganske I., Zabner J., Welsh M. J., *Cell*, **110**, 789–799 (2002).
- Coyne C. B., Bergelson J. M., *Cell*, **124**, 119–131 (2006).
- Okegawa T., Pong R. C., Li Y., Bergelson J. M., Sagalowsky A. I., Hsieh J. T., *Cancer Res.*, **61**, 6592–6600 (2001).
- Huang K. C., Altinoz M., Wosik K., Laroche N., Koty Z., Zhu L., Holland P. C., Nalbantoglu J., *Int. J. Cancer*, **113**, 738–745 (2005).
- Asher D. R., Cerny A.M., Weiler S. R., Horner J. W., Keeler M. L., Neptune M. A., Jones S. N., Bronson R. T., Depinho R. A., Finberg R. W., *Genesis*, **42**, 77–85 (2005).
- Dorner A. A., Wegmann F., Butz S., Wolburg-Buchholz K., Wolburg H., Mack A., Nasdala I., August B., Westermann J., Rathjen F. G., Vestweber D., *J. Cell Sci.*, **118**, 3509–3521 (2005).
- Williams A. F., Barclay A. N., *Annu. Rev. Immunol.*, **6**, 381–405 (1988).
- Raschperger E., Engstrom U., Pettersson R. F., Fuxe J., *J. Biol. Chem.*, **279**, 796–804 (2004).
- Suzu S., Hayashi Y., Harumi T., Nomaguchi K., Yamada M., Hayasawa H., Motoyoshi K., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **296**, 1215–

- 1221 (2002).
- 17) Hirata K., Ishida T., Penta K., Rezaee M., Yang E., Wohlgemuth J., Quertermous T., *J. Biol. Chem.*, **276**, 16223–16231 (2001).
- 18) Fernandez-Botran R., Chilton P.M., Ma Y., *Adv. Immunol.*, **63**, 269–336 (1996).
- 19) Jones S. A., Horiuchi S., Topley N., Yamamoto N., Fuller G. M., *FASEB J.*, **15**, 43–58 (2001).
- 20) Soldan S. S., Fogdell-Hahn A., Brennan M. B., Mittleman B. B., Ballerini C., Massacesi L., Seya T., McFarland H. F., Jacobson S., *Ann. Neurol.*, **50**, 486–493 (2001).
- 21) Dorner A., Xiong D., Couch K., Yajima T., Knowlton K. U., *J. Biol. Chem.*, **279**, 18497–18503 (2004).
- 22) Bernal R. M., Sharma S., Gardner B. K., Douglas J. T., Bergelson J. M., Dubinett S. M., Batra R. K., *Clin. Cancer Res.*, **8**, 1915–1923 (2002).
- 23) Mizuguchi H., Koizumi N., Hosono T., Utoguchi N., Watanabe Y., Kay M. A., Hayakawa T., *Gene Ther.*, **8**, 730–735 (2001).
- 24) Nelson J. E., Kay M. A., *J. Virol.*, **71**, 8902–8907 (1997).
- 25) Segerman A., Atkinson J. P., Marttila M., Dennerquist V., Wadell G., Arnberg N., *J. Virol.*, **77**, 9183–9191 (2003).
- 26) Gaggar A., Shayakhmetov D. M., Lieber A., *Nat. Med.*, **9**, 1408–1412 (2003).
- 27) Sirena D., Lilienfeld B., Eisenhut M., Kalin S., Boucke K., Beerli R. R., Vogt L., Ruedl C., Bachmann M. F., Greber U. F., Hemmi S., *J. Virol.*, **78**, 4454–4462 (2004).
- 28) Damico R., Bates P., *J. Virol.*, **74**, 6469–6475 (2000).
- 29) Lopez M., Cocchi F., Avitabile E., Leclerc A., Adelaide J., Campadelli-Fiume G., Dubreuil P., *J. Virol.*, **75**, 5684–5691 (2001).
- 30) Koizumi N., Mizuguchi H., Hosono T., Ishii-Watabe A., Uchida E., Utoguchi N., Watanabe Y., Hayakawa T., *Biochem. Biophys. Acta*, **1568**, 13–20 (2001).