がんウイルスによる細胞膜の変換

小野寺 一 清

東京大学農学部農芸化学科 〒113 東京都文京区弥生1-1

昭和56年2月13日(金) 東京大学工学部5号館にて講演

Membrane Alteration by Tumor Viruses

Kazukiyo Onodera

Dept. of Agricultural Chem., Faculty of Agriculture, University of Tokyo, Tokyo, 113

It has become clear that tumor viruses have the genes (oncogene) which are directly involved in neoplastic transformation. From the viewpoint of membrane alterations by the tumor viruses, there are two aspects. One is that the membrane alteration has occurred as a consequent event of the gene expression of host chromosome caused by oncogene and the other is that the gene products of the oncogenes are intergrated into the membranes as in the case of the tumor specific transplantation antigens and membrane bound protein kinase. I want to summerize the recent development in the study of membrane biology of animal cells with respect to tumor viruses.

Key words : Membrane alterrations Tumor viruses ; Tumor specific transplantation antigens ; Tyrosine-protein kinase ; Fluidity of cell membrane.

只今、ご紹介いただきました東大農学部の小野寺でございます。本日は膜学会でお話する機会を与えられて光栄に存じます。「がんウイルスによる細胞膜の変換」という題でしばらくの間お話をさせていただきます。

がん細胞の膜といいましても、がん細胞はおもに繊維芽細胞というあまり膜に特殊な機能を持っていない細胞が対象になっております関係上、膜の機能という面では膜学会の皆様にご満足のいただけるお話をする自信はございません。しかし、がんウイルスのなかの発がん遺伝子からどのようにしてタンパク質が作られ、細胞膜に組み込まれていくかという、膜タンパクのできかたと細胞膜への組み込みという面では、他の分野に比べてかなり進んでいると思います。

がんウイルスによって細胞が一度がん化されると、そのがん細胞は子孫代々、がん細胞でありつづけます。すなわち、がん細胞であるという形質は遺伝するわけがあります。したがって、がんウイルスの発がん遺伝子は宿主細胞の遺伝子を制御しなければならないから、どうしても発がん遺伝子の作用点は細胞の核物質であるべきであると考えられていました。その結果、発がんウイルスによって細胞膜が変換するといっても、宿主細胞の遺

伝子に働いた結果、細胞膜が変わるのだと考えられていました。ところが、最近になりまして、がんウイルスの遺伝子のなかで、がん化に直接関与する遺伝子が同定されました。その結果、この発がん遺伝子の生産物であるタンパクが細胞膜のタンパクとして存在する場合があることが明らかになり、発がん遺伝子と細胞膜とは直接的な因果関係で結ばれていることが明らかになりました。

まず話を進めるにあたり、皆様になじみの薄いがんウイルスについて先にお話ししまして、それからがん細胞の細胞膜の話へと移ってゆきたいと思います。

がんウイルスには大きく分けて、DNA がんウイルスと RNA がんウイルスとがあります。DNA がんウイルスの代表的なものは、SV40、ポリオーマウイルスとよばれる小型 DNA ウイルスがあります。小型といいますが、DNA の分子量が小さいという意味で、遺伝情報量が最も小さいので、がん化のメカニズムも最も簡単な考え方で説明できるであろうと期待され、いわば、がん化の機構を考える上でのモデルと目されるものであります。いずれのウイルスにおいても、遺伝子はA、B、C、Dの遺伝子があり、円環構造の二重らせんのDNAからできております。発がん遺伝子はA遺伝子で他の遺伝子はウ

ウイルス自身の構成タンパクの遺伝子であります。これらのがんウイルスが、ウイルスの本来の宿主細胞、SV40の場合はサルの細胞、ポリオーマウイルスの場合はマウスの細胞に感染いたしますと、各々のウイルスは自己増殖をしウイルス粒子を生産し、宿主細胞は死んでしまいます。この場合はいわゆるウイルス感染症の場合でがん化は一般的にいて、起こりません。しかしながら、これらのウイルスが他の細胞、例えば SV40 がマウスやラットの細胞に感染したり、ポリオーマウイルスがハムスターの細胞に感染しますと、ウイルスの自己増殖は抑制され、そのかわり細胞のがん化が起こります。自己増殖の系で起こることは、ウイルスの遺伝子のすべてが発現され、すべての構成物を作り、新しいウイルス粒子となって細胞の外へ出てくると考え、がん化が起こる系では、ウイルスの遺伝子が宿主細胞の遺伝子に組み込まれ、発がん遺伝子だけが発現されているために細胞がん化の状態にあるのだと考えるわけであります。A 遺伝子のみが発現している状態が、細胞がん化していることに必要なわけです。古典的な考え方ですと遺伝子が1個ですと、それに対応するタンパクは1種類であると考えなければならず、たった1コのタンパク質に細胞をがん化したり、ウイルスが自己増殖したりするのに必要な機能が全部含まれているのだろうかという疑問がもたれておりました。

この疑問に対する答えは次の様な新しい発見によって解決されることになりました。発がん遺伝子の情報の担い手である DNA から、メッセンジャー RNA が読みとられるときに、DNA の一部をとばし読みにする機構、すなわち splicing という機構が存在することが明らかになりました (Fig. 1)。実はこの機構はガンウイルスの場合のみならず、真核細胞にひろく起こっている現象であることがわかってきています。とにかく、この様にしてがん化の遺伝子 A からポリオーマウイルスの場合、3種

Fig 1 SV40, ポリオーマウイルスの遺伝子からの mRNA の合成

Fig. 2 SV40, ポリオーマウイルスの遺伝子とその遺伝子生産物

類のタンパク質が作られることになりました。これらを分子量の小さい方から、small T, middle T, large T (ここで T とは Tumor 抗原という意味ですが、細かいことは省略するとして、単なるタンパク質につけられた名前と思っていただいても構いません)。分子量はそれぞれ、2.2万、5.5万、10万であります。詳しい遺伝解析から、細胞のがん化の維持に必要なのは middle T であることが明らかになってきました (Fig. 2)。この様に splicing という機構が発見されたことによって、がんウイルス研究は一段と飛躍的に発展することになったのです。

さて、middle T というタンパクをみますと、N 末端には疎水性のアミノ酸の多い、いわゆる hydrophobic な領域を形成しています。次に細胞内のどこに middle T が存在するかといいますと、plasma membrane (形質膜) に図にしめすようにして局在していることがわかってきました。更に驚くべきことは、この middle T には実はタンパク質をリン酸する作用である protein kinase の活性のあることも明らかになってきました。出来上っているタンパクに ATP からリン酸を転移し、タンパクの機能を modify する作用があるのです。この middle T に protein kinase 活性があることを見つけたわけですが、この見つけ方が非常にユニークであります。まずポ

Fig. 3 ポリオーマウィルスの middle T の細胞内局在性

リオーマウィルスによってがん化した細胞の抽出液を調製し, middle T に対する抗体との間に抗原-抗体コンプレックスを作らせ, これを遠心分離によって沈殿として回収し, この抗原-抗体コンプレックスの懸濁液に γ - ^{32}P ATP を加え, リン酸の転移を検出することに成功しました。

このようにウィルス発がんと細胞膜の問題というのは直接的に因果関係で結ばれることになりました。middle T である protein kinase が細胞膜のどのタンパクにリン酸を転移させるのか, またその結果膜の物性がどのように変化するのだろうかというようなことが, これからの興味を中心となると思います。膜にN末端を埋め込み, 細胞の内側に protein kinase 活性を露出させているわけですから, リン酸の受容体となるタンパクは膜タンパクだけとはかぎりません。細胞内の骨格構造を決定しているミクロチューブリンやアクチンの様なものも考えてよいと思われます。

さて, 以上が, がんウィルスの DNA 型のポリオーマウィルスを例にとって, 発がん遺伝子の話のあらましであります。では, つぎの問題として, 正常細胞とウィルスでがん化した細胞の細胞膜は一体どこが異なっているのかという話をいたします。細胞膜の脂質とタンパク質とから出来ておりますことはいうまでもありません。ウィルス発がんとの関係で問題になりますのは脂質では糖脂質(グリコリピッド)。タンパク質では糖タンパク質であります。いずれも, 複合糖質と生化学的にはいわれている物質群であります。代表的な膜糖タンパク質である赤血球から得られたグリコホリンを例にとって構造のお話をしましょう。

まず N 末端よりのペプチドには Fig. 4 のように多くの糖鎖が化学結合で結合している。この部分はこのため極度の親水性を示し, しかも細胞の外側に位置してい

Fig. 4 グリコフォリンの構造
 $\langle \rangle \langle \rangle \langle \rangle \langle \rangle \langle \rangle \dots$ 糖鎖

Fig. 5 細胞膜の基本構造

1. 存在性タンパク質
- 2, 3. 内因性タンパク質

Table 1 ウイルストランスフォーム細胞と正常細胞のリン脂質

Phospholipid	Percentage of ^{32}P c. p. m.: Total lipid ^{32}P c. p. m.			
	Normal cells		Transformed cells	
	Non-confluent (12)	Confluent (8)	Non-confluent (12)	Confluent (14)
Phosphatidylcholine	47.6 $\pm$ 0.5	48.3 $\pm$ 0.4	47.8 $\pm$ 0.7	46.8 $\pm$ 0.8
plasmalogen	0.6 $\pm$ 0.1	0.8 $\pm$ 0.1	0.5 $\pm$ 0.1	0.7 $\pm$ 0.1
Phosphatidylethanolamine	25.6 $\pm$ 1.0	25.4 $\pm$ 1.0	25.9 $\pm$ 2.2	24.8 $\pm$ 1.0
plasmalogen	10.1 $\pm$ 1.4	13.3 $\pm$ 0.8	9.6 $\pm$ 2.1	12.3 $\pm$ 1.7
non-plasmalogen	15.5 $\pm$ 0.7	12.1 $\pm$ 0.4	16.3 $\pm$ 1.0	12.5 $\pm$ 2.2
Sphingomyelin	8.6 $\pm$ 0.7	7.6 $\pm$ 0.5	7.8 $\pm$ 0.6	9.7 $\pm$ 1.0
Phosphatidylinositol	7.3 $\pm$ 0.6	7.0 $\pm$ 0.6	7.3 $\pm$ 0.5	6.1 $\pm$ 0.5
Phosphatidylserine	4.7 $\pm$ 0.3	5.5 $\pm$ 0.3	4.0 $\pm$ 0.6	5.4 $\pm$ 0.3
Cardiolipin	2.3 $\pm$ 0.1	2.1 $\pm$ 0.2	2.3 $\pm$ 0.2	2.3 $\pm$ 0.3
Phosphatidylglycerol	0.8 $\pm$ 0.1	1.0 $\pm$ 0.1	1.2 $\pm$ 0.5	1.4 $\pm$ 0.3
Lysophosphatidylcholine	1.2 $\pm$ 0.3	1.1 $\pm$ 0.4	1.1 $\pm$ 0.3	1.0 $\pm$ 0.1
Phosphatidic acid	0.3 $\pm$ 0.1	0.3 $\pm$ 0.1	0.3 $\pm$ 0.1	0.2 $\pm$ 0.0

Table 2 正常細胞とウイルスストランスフォーム細胞のガングリオシド

Cell Type	Ganglioside-Bound Sialic Acid in								
	Intact Cells					Purified Plasma Membrane			
	GM ₃	GM ₂	GM ₁	GD _{1a}	GD _{1b} to origin	GM ₃	GM ₂	GM ₁	GD _{1a}
3T3	47.5 $\pm$ 6.2	7.3 $\pm$ 0.2	18.8 $\pm$ 1.5	26.4 $\pm$ 4.9	nd*	58.6	5.8	15.0	20.6
3T3-SV-479	83.8 $\pm$ 1.0	16.2 $\pm$ 1.0	nd	nd	nd	74.2	20.5	5.3	nd
3T3-SV-Ce56	14.0 $\pm$ 0.9	3.9 $\pm$ 0.1	7.0 $\pm$ 0.5	65.7 $\pm$ 1.9	8.8 $\pm$ 1.0				
3T3-SV-A26	13.2	5.7	8.6	63.4	9.1				
3T3-Py	100.0	nd	nd	nd	nd				*nd : not detected

る。次に、疎水性アミノ酸に富んだペプチドがつづき、この部分で脂質二重層を貫通している。さらにC末端近くのペプチドは再び親水性を示し、細胞質内に存在し、この部分はスペクトリンのような細胞内の構造タンパクにまきついていてと考えられています (Fig. 5)。このように糖タンパクにははっきりと細胞膜をさかいにして内と外とのオリエンテーションがある。この細胞の外側に露出している糖鎖が、細胞と細胞との相互の認識、ウイルスに対するレセプター、細胞の表面の抗原性の決定基などとして働いているわけでありす。

次に、主成分であるリン脂質を調べますと、正常細胞とトランスフォーム細胞でほとんど差が見出されませんでした。これは予想に反していました (Table 1)。というのはトランスフォーム細胞の細胞膜の方が軟かい構造、流動性が高いことが知られていましたので、脂質特に主

成分であるリン脂質になんらかの変化が期待されたわけです。

しかし、糖を含んでいる脂質である糖脂質は正常細胞とトランスフォーム細胞では異なっており、特にシアル酸を持つ酸性糖脂質にその差が顕著でありました (Table 2)。一般に、トランスフォーム細胞の糖脂質は複雑な糖鎖をもつものが減少し、単純な糖鎖を持つものが蓄積しています。この現象は糖鎖不全といわれ、がんウイルスの種類を問わずかなり広く認められる事実であります。さて次に糖が付いているタンパクの方を調べてみます。グルコサミンで糖タンパクの糖鎖をラベルしておきます。細胞膜タンパクをとり、プロナーゼのようなタンパク分解酵素でペプチド部分をずたずたに切断し、糖鎖のみを“分子ふるい”で分画します。正常細胞とトランスフォーム細胞では異なっていることがわかります。ですから

Fig. 6 糖転移酵素による糖の付加反応

糖脂質であろうが、糖タンパクであろうが、糖鎖を付加しながら生合成をする系自身になんらかの変動が起こったことを示唆いたします。肝心なことは細胞膜の何か1つの特定の分子の構造が変わるのではなく、どの分子の糖鎖にも異変が起こっていることが推定されます。このような複合糖質の糖鎖の生合成は、DNA、RNA、タンパクのような高分子の生合成が鋳型をもとにして作られるのに反して、糖転移酵素が1つずつ働いて順次に糖鎖が伸びてゆく点が異なります (Fig. 6)。細かいメカニズ

(a) 正常細胞
(b) SV40 トランスフォーム細胞

Fig. 7

Fig. 8

は今日は省略させていただきますが、この様な糖転移酵素に変動が起こっているのだということが明らかになりました。

これら一連の糖転移酵素は細胞の内部にある膜系、ゴルジ膜に存在しておりますが、細胞の表面の形質膜にも存在しております。Roseman によりますと、これらの酵素が細胞の認識に関与する分子だということです。酵素と糖の受容分子との間に弱い結合が生じると考えるわけです。この仮説の真偽はともかくとしましても、この細胞表面に存在する糖転移酵素をプローブにして、正常細胞とトランスフォーム細胞の性質を区別することが可

能です。外から与えたサイクリック AMP (c-AMP) に対し、シアル酸転移酵素、ガラクトース転移酵素が正常細胞とウイルストラנסフォーム細胞において、異なった挙動を示すことがわかります (Fig. 7, 8)。

ここで DNA がんウイルスから RNA がんウイルスの場合に話を移しましょう。最も有名なラウス肉腫ウイルス (RSV) の遺伝子の構造が明らかになりました。gag 遺伝子、pol 遺伝子、env 遺伝子、src 遺伝子と RNA の 5' 末端から 3' 末端に向かって並んでおります。肉腫に関与する遺伝子は src 遺伝子で、この遺伝子が働くか働かないかによって細胞のがん化 (肉腫になるかならないか) が決ります。src の遺伝子生産物が最近になりまして、分子量約 6 万のプロテインキナーゼを持つタンパクであることがわかりました。この酵素もやはりポリオーマウイルスの middle T と同じ様に形質膜に組み込まれております。この酵素はタンパクのセリン、スレオニンの -OH 基にリン酸を転移するよりは、むしろ、チロシンの -OH にも転移する特異なプロテインキナーゼであることがわかりました。

middle T といい、src といいいずれもがんウイルスの発がん遺伝子の生産物が細胞膜タンパクとして存在しているときには、いずれの場合においても、プロテインキナーゼ作用を持っていることは大変興味深く、膜タンパクがリン酸化されたり、脱リン酸化されたりすることが、がん細胞の細胞膜の機能と密接に関連していることを暗示しています。最近次のような実験がなされました。

細胞を培養いたしまして、外側に ATP を加えると、 γ - ^{32}P -ATP から細胞の外側のタンパクにリン酸化が起こります。そうすると、Rb のようなカチオンに対して膜がリーキーになり、この時、分子量約 4.4 万のタンパクがリン酸化されているという報告であります。この様な実験は src のプロテインキナーゼによって膜タンパクのチロシンの -OH がリン酸化されることによって、膜の物性が大きく変わることがあり得ることを示しています。このようにがんウイルスと細胞膜の関係はひとつは膜のタンパクの糖鎖異常という面で、もうひとつは膜のタンパクのリン酸化をめぐる、細胞膜の構造と機能に以前考えられていたより、より強い因果関係のあることが明らかになってきました。

例えば、細胞の表面にあるインスリン受容タンパクが糖タンパクであることもわかってきました。そして糖鎖が重要な働きを持っていることも明らかにされました。ですから、糖タンパクの糖鎖に異常が起こることは、これら細胞の外側からの刺激を細胞の内部へ転達するインスリン受容タンパクの受容体としての効率に関係してくることになるわけであります。

以上、大変大雑把な話ですけれど、発がん遺伝子から直接コードされるタンパクが細胞膜タンパクである場合があることがわかり、がん化の原因と結果としての膜異常が、より直接的な因果関係で結ばれていることをお話して、本日の責任を果たしたいと思います。

人工膜——新しい高機能性膜の創造 (化学増刊92号)

星 猛 (東京大学医学部)・木村尚史 (東京大学生産研)・丹沢 宏 (株式会社東レ) 編集
B 5 判, 150 ページ, 定価 2300 円, 化学同人, 京都

膜への関心が高まりつつある昨今、膜に関する論文、雑誌、成書が多数出版されているが、新しい視点で人工膜の進歩とその基礎を解説する成書“人工膜——新しい高機能性膜の創造——”が化学同人から新たに出版された。化学増刊の No. 92 である。

内容の構成は大略次の 3 つに分けられている。

- 1) 膜における物質輸送
- 2) 膜分離技術の応用
- 3) 将来への夢としての膜

1) では、人工膜のお手本である生体膜の構造と機能をわかりやすく解説しており、人工膜の良い参考になる。さらに分離膜の製膜技術と構造の現状、選択透過性の原理とその評価法について述べている。

2) では、膜分離技術上共通の問題である膜の性能劣

化の解析法、さらに、アルコール発酵、血液浄化システムについて触れている。

3) では、能動輸送など生体類似の機能を人工膜に付与する方法、膜を利用したエネルギー変換の可能性、固定化酵素膜を用いたフローリアクターのモデルとしての消化器系について、膜に対する将来への夢ということで解説している。

以上、生体膜に迫る、より高度な機能を持つ人工膜の開発と、それらの種々の分野への応用の可能性などを、物質移動という基礎をふまえて膜の権威者によって解説されているというのが本書の特徴である。人工膜の利用に関心のある研究者、技術者を対象としており、膜および膜分離について十分な情報を与えてくれるはずである。

(早稲田大学理工学部 酒井 清孝)