

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：33916

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K17362

研究課題名(和文) 網羅的解析を用いたユビキチン様タンパク質の関わるKSHV溶解感染機構の解明

研究課題名(英文) The ubiquitin like proteins, FAT10, is involved in KSHV viral productions

研究代表者

阿部 温子(杉本温子)(Abe, Atsuko)

藤田医科大学・その他部局等・日本学術振興会特別研究員(PD)

研究者番号：70780774

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：エイズの死因の多くはカポジ肉腫関連ヘルペスウイルス(KSHV)によって引き起こされるカポジ肉腫等の日和見感染症である。潜伏感染したKSHVの一部は溶解感染へと移行し、細胞内で孫ウイルス産生を行う。KSHVは宿主因子なしには溶解感染を行うことができず、溶解感染の際に様々な宿主因子をハイジャックして自身のDNA複製やウイルス粒子形成に役立っていることが知られているため、重要な宿主因子を発見することが必要である。今回我々はユビキチン様タンパク質であるFAT10がKSHV溶解感染の際の粒子形成に重要であることを発見し、FAT10が修飾するウイルスタンパク質を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の目的は、KSHV溶解感染に中心的に働くUBLの同定とその溶解感染に果たす詳細な役割を明らかにすることである。これまでUBLとヘルペスウイルスの関連は全く指摘されておらず、今回申請者が指摘しているのが世界初となる。本研究では、スクリーニングに網羅的プロテオーム解析を用いている。KSHVは約90種類のタンパク質をコードしており、複雑な生活環をもつウイルスであるため、従来の方法とは異なる効率的なスクリーニング系が必要となってくる。ヘルペスウイルスの溶解感染機構は共通している部分も多く、本研究を応用することで他のヘルペスウイルスの溶解感染機構の研究も発展させることができると考えている。

研究成果の概要(英文)： After primary infection, KSHV persists lifelong as a chronic asymptomatic infection in its human host but establishes latency. Productive infection, which occurs spontaneously or can be induced artificially, lead to virus production. It is well established that herpesviruses hijack host machineries for their lytic replication but little is known which factors are involved in KSHV. Here, we performed proteomic analysis with KSHV lytic replication-induced cells to explore a new mechanism of KSHV lytic replication. E1 activating enzyme Ubiquitin-like modifier activating enzyme 6 (UBA6 or UBE1L2), which activates both ubiquitin and FAT10, were identified by proteome analysis. Knockout of UBE1L2 reduced KSHV viral productions. We also explored target proteins of FAT10ylation by immunoprecipitation-MS using FAT10 specific antibody and some viral proteins were identified. Our results suggested UBE1L2 is involved in KSHV viral productions by FAT10ylation of some viral proteins.

研究分野：ウイルス学

キーワード：カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス ユビキチン様タンパク質 FAT10

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

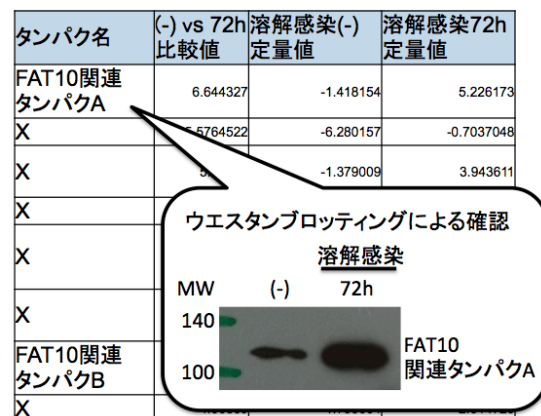
1. 研究開始当初の背景

年間死者数 300 万人に達するエイズの死因の多くはカポジ肉腫関連ヘルペスウイルス (KSHV) によって引き起こされるカポジ肉腫等の日和見感染症である。また、臓器移植に伴う KSHV 汚染臓器を介したレシピエントの新興感染とカポジ肉腫発症という新たな問題が生じている。ヒトヘルペスウイルスに対してアシクロビルは高い選択性と強い抗ウイルス活性を示すが、KSHV 感染症に関しては例外的に有効な治療薬がなく、全世界で特に深刻な問題となっている。

KSHV は健常者に感染すると深刻な疾患をおこさず潜伏感染する。そして潜伏感染者の免疫不全時に、KSHV はカポジ肉腫や B 細胞性リンパ腫 (PEL) を引き起こす。また、潜伏感染した KSHV の一部は溶解感染へと移行し、細胞内でウイルス新生に必要なタンパク質を発現し孫ウイルス産生を行う。特に KSHV の溶解感染機構は未だ解明されていない部分が多く、KSHV に有効な治療薬のターゲットは未だに提示されていないのが現状である。ヘルペスウイルスは宿主因子なしには溶解感染を行うことができず、溶解感染の際に様々な宿主因子をハイジャックして自身の DNA 複製やウイルス粒子形成に役立っていることが知られている。しかし、KSHV では溶解感染に関わる宿主因子はほぼ知られておらず、KSHV 溶解感染機構の解明のためには KSHV の溶解感染に中心的役割を果たす宿主因子を発見することが急務である。

申請者はこれまでの研究において、このように関連する宿主因子が同定されていないために KSHV 溶解感染機構が解明されていないという問題を解決すべく網羅的プロテオーム解析を行い、KSHV が溶解感染へ移行する際に発現量の変化する宿主因子を網羅的に探索した (図 1)。その結果、ユビキチン様タンパク質 (UBL) である FAT10 および ISG15 に関連するタンパク群が顕著に発現増加することを発見した。このことから FAT10、ISG15 をはじめとする UBL 群の中には KSHV の溶解感染に対して中心的に働くものが存在している可能性が非常に高いと考えている。

図1: 網羅的プロテオーム解析による宿主因子探索結果の1例



溶解感染誘導後、発現が増加する宿主因子上位7つを示している

2. 研究の目的

本研究の目的は、KSHV 溶解感染に中心的に働く UBL の同定とその溶解感染に果たす詳細な役割を明らかにすることで、KSHV 溶解感染機構を解明することである。

これまでのところ、UBL とヘルペスウイルスの関連は全く指摘されておらず、今回申請者が指摘しているのが世界初となる。さらに UBL 群の中には機能自体が不明なものも多数あり、ウイルス学的知見だけでなく、世界に先駆けて生化学的にも新たな知見を与えることができると考えている。さらに、本研究では、スクリーニングに網羅的プロテオーム解析を用いている。KSHV は約 90 種類のタンパク質をコードしており、非常に複雑な生活環をもつウイルスであるため、従来の方法とは異なる効率的なスクリーニング系が必要となってくる。今回用いた網羅的プロテオーム解析により、すでに新規宿主因子をピックアップすることに成功しており、網羅的プロテオーム解析は最適な系と言える。ヘルペスウイルスの溶解感染機構は共通している部分も多く、このように本研究を応用することで KSHV のみならず他のヘルペスウイルスの溶解感染機構の研究も発展させることができると考えている。

3. 研究の方法

1) KSHV の生活環に影響を与える UBL および関連タンパク質の同定

まず、UBL の中でもどれが KSHV の溶解感染に重要であるのか同定することが必要である。そこで、すでに明らかとなっている FAT10、ISG15 以外の KSHV の生活環に影響を与える UBL の探索、FAT10、ISG15 も含めた UBL が KSHV の生活環にどのような役割を果たすのか、解析を行った。

網羅的プロテオーム解析によって UBL・UBL 関連タンパク質についてスクリーニングを行った上で、各因子に関して定量的 PCR 法およびウエスタンブロット法を用いて KSHV 溶解感染時に発現が上昇しているものをピックアップし、候補因子とした。得られた候補因子について、CRISPR/Cas9 を用いてノックアウトを行い、KSHV の溶解感染のステージで特に重要なウイルス DNA 複製または粒子形成に影響を与えるものを絞り込んだ。なお、網羅的プロテオーム解析に関してはプロテオーム解析のプロフェッショナルである医薬基盤・健康・栄養研究所プロテオームリサーチプロジェクトと協力して実施した。

2) UBL が作用するターゲットタンパク質の探索

UBL は特定のターゲットタンパク質を修飾することでターゲットタンパク質の機能を調整していることが知られている。今回 1) で同定された UBL もターゲットタンパク質に作用することで KSHV の溶解感染に影響を与えている可能性が高いため、ターゲットタンパク質を同定することが非常に重要であると考えられる。1) で得られた KSHV の溶解感染に関わる UBL について、ターゲットタンパク質の探索を行った。具体的には、タグ標識された UBL の発現プラスミドを作製し、KSHV 溶解感染を誘導した細胞に導入した上で免疫沈降させ、沈降物について質量分析を行った。解析によって得られた候補因子について、免疫沈降およびウエスタンブロット法を用いて UBL と直接作用しているか確認を行った。

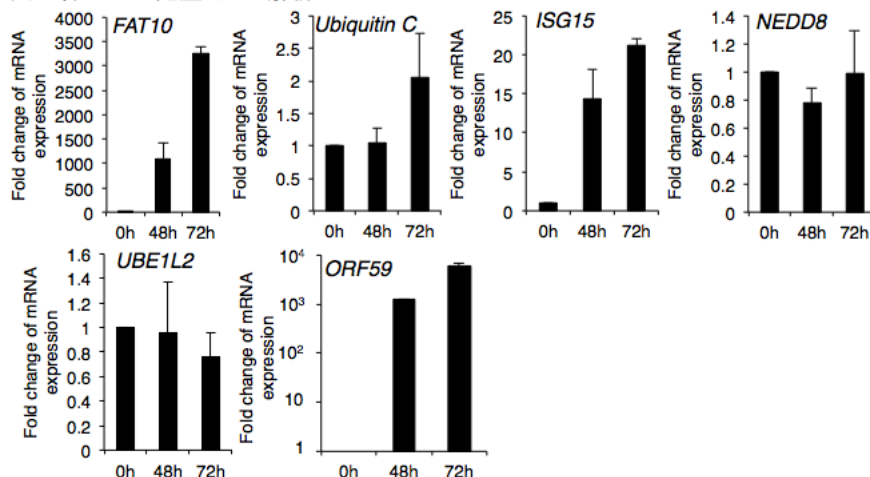
このように、KSHV 溶解感染に関わる UBL とターゲットタンパク質の相互作用を明らかにすることで、最終的には KSHV 溶解感染機構を明らかにする。

4. 研究成果

1) KSHV の生活環に影響を与える UBL および関連タンパク質の同定

KSHV の溶解感染に重要であるのか UBL を同定するために、定量的 PCR 法を用いて妖怪感染誘導後の各

図2: 各UBLsの定量的PCR解析

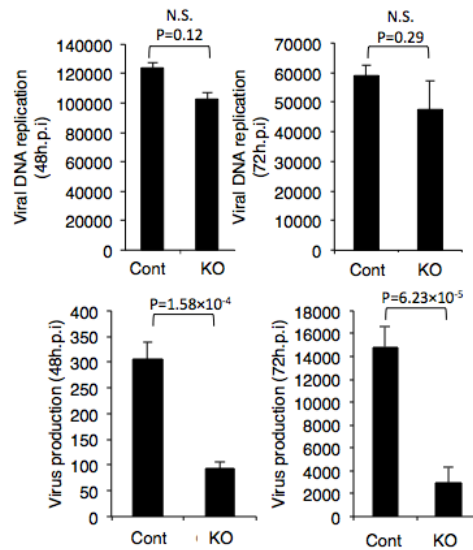


UBL の mRNA の発現レベルを解析した(図 2)。その結果、FAT10 と ISG15 は発現レベルが

上昇していたため、KSHV の溶解感染に関わる可能性があると考えた。一方、ユビキチン、NEDD8 などに関しては発現レベルがほぼ変わらないかわずかであったため、今回は解析しない。

FAT10 の KSHV 溶解感染における役割を解析するために、FAT10 の E1 酵素である UBE1L2 を CRISPR/Cas9 システムにてノックアウトし、溶解感染誘導 48 時間、72 時間後のウイルス粒子産生及びウイルス DNA 合成レベルを解析した。その結果、UBE1L2 ノックアウトではコントロールに比べて、ウイルス DNA 合成レベルはほぼ低下していなかったのに対し(図 3 上段)、ウイルス粒子産生レベルは 48 時間後 72 時間後ともに顕著に低下していた(図 3 下段)。また、超解像度顕微鏡を用いて UBE1L2 の局在を確認したところ、ウイルス粒子形成に関わるゴルジ体に局在することが確認された。このことから、UBE1L2-FAT10 系は KSHV 溶解感染において重要な因子であり、特に粒子形成に関わると推察される。

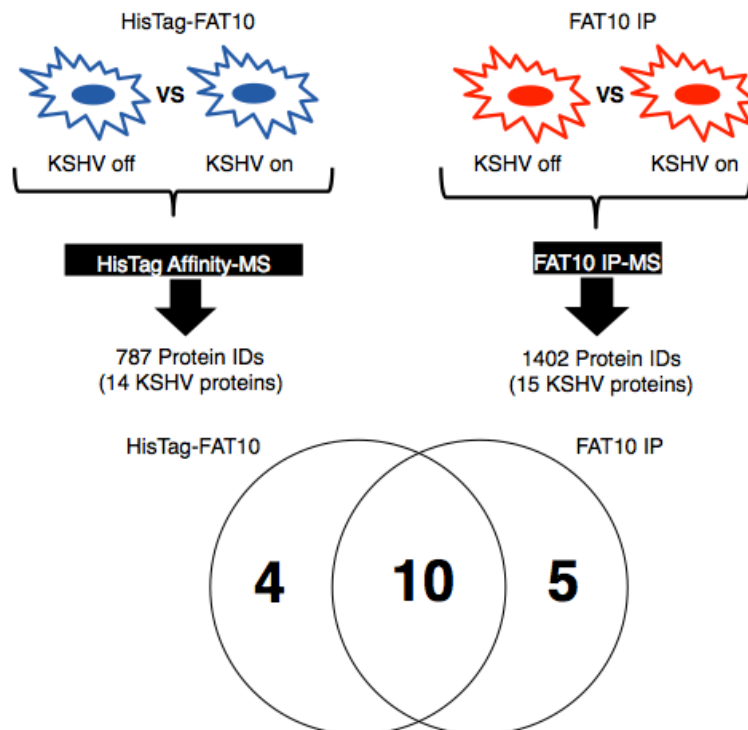
図3: UBE1L2ノックアウトではウイルス粒子産生が低下する



2) UBL が作用するターゲットタンパク質の探索

FAT10 は特定のターゲットタンパク質を修飾することでターゲットタンパク質の機能を調整していることが知られているため、ターゲットタンパク質を探索することが重要である。今回ターゲットタンパク質を探索するために、His-tag を付加した FAT10 を KSHV が潜伏感染している細胞に導入後、溶解感染を誘導し His-tag アフィニティビーズでプルダウンを行なった。沈降物につ

図4: FAT10 化修飾のターゲット解析



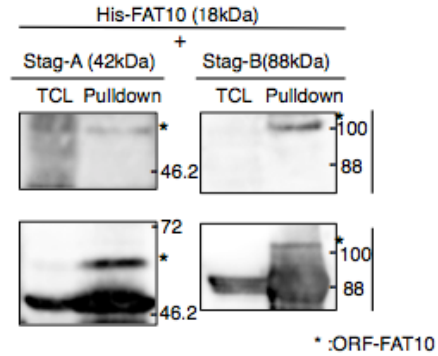
いて MS 解析を行い、787 種類のタンパク質を同定した。また、この中で KSHV 由来のものは 14 種類であった(図 4 左側)。同時に、FAT10 に対する特異的抗体を用いて溶解感染を誘導した KSHV 感染細胞について免疫沈降を行った。同様に沈降物について MS 解析を行い、1402 種類のタンパク質を同定した。この中で KSHV 由来のものは 15 種類であった(図 4 右側)。さらに、これら 2 種類の解析でヒットした KSHV 由来のものを解析した結果、His-tag 付加 FAT10

を用いたプルダウンと、抗 FAT10 特異抗体を用いた免疫沈降でオーバーラップしているものは 10 種類であった(図 4 下側)。これらのことから、この 10 種類の KSHV 由来タンパク質について、詳細な解析を進めた。

KSHV 由来 FAT10 化ターゲット候補タンパク質のうちウイルスタンパク質 A とウイルスタンパク質 B について、S-tag を付加し、His-tag 付加 FAT10 と共発現させプルダウンを行なった結果、FAT10 との相互作用が確認された(図 5)。

一方、これ以外の候補タンパク質もプルダウンを試みた結果、相互作用が弱いまたは確認することができなかった。これらのことから、少なくともこの 2 種類のウイルスタンパク質は FAT10 化修飾を受けることで溶解感染機構の一端を担っていることが考えられる。

図5:KSHV由来タンパク質のFAT10修飾のターゲット解析



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sugimoto Atsuko, Yamashita Yoriko, Kanda Teru, Murata Takayuki, Tsurumi Tatsuya	4. 巻 14
2. 論文標題 Epstein-Barr virus genome packaging factors accumulate in BMRF1-cores within viral replication compartments	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 222519
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0222519	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ishimaru Hanako, Hosokawa Kohei, Sugimoto Atsuko, Tanaka Riho Watanabe Tadashi and Fujimuro Masahiro.	4. 巻 -
2. 論文標題 MG132 exerts anti-viral activity againstHSV-1 by overcoming virus-mediated suppression of the ERK signaling pathway	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Repots	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 杉本温子、阿部雄一、渡部匡史、足立淳、村田貴之、藤室雅弘
2. 発表標題 FAT10-UBE1L2はKSHV粒子形成に関わる
3. 学会等名 第33回ヘルペスウイルス研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 杉本温子、阿部雄一、渡部匡史、足立淳、藤室雅弘
2. 発表標題 カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス潜伏感染時に抑制されるDNA損傷応答の解析
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 杉本温子、渡部匡史、阿部雄一、足立淳、朝長毅、藤室雅弘
2. 発表標題 Functional analysis of the ubiquitin like protein, FAT10 during the KSHV lytic replication
3. 学会等名 第67回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 杉本温子、阿部雄一、渡部匡史、足立淳、藤室雅弘
2. 発表標題 Functional analysis of the ubiquitin like protein, FAT10 during the KSHV lytic replication
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Tadashi Watanabe, Atsuko Sugimoto, Kohei Hosokawa and Masahiro Fujimuro	4. 発行年 2018年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 501
3. 書名 Human Herpesviruses	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考