

令和 2 年 5 月 25 日現在

機関番号：33916

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06151・19K21264

研究課題名(和文) EBウイルス由来蛋白質キナーゼのリン酸化基質の網羅的解析とその機能的意義の解明

研究課題名(英文) Identifying novel substrates of Epstein-Barr virus-encoded protein kinase (EBV-PK)

研究代表者

岩堀 聡子 (IWAHORI, SATOKO)

藤田医科大学・医学部・講師

研究者番号：80416164

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：EBウイルス関連疾患治療の新たな標的としてEBV由来蛋白質キナーゼ(EBV-PK)に着目した。EBV-PKの新規リン酸化基質として、ヌクレオソーム再構築デアセチラーゼ複合体因子MTA1とスプライシング複合体因子SF3B1を同定し、そのリン酸化の機能的意義を解析した。まず、MTA1はEBV-PKのキナーゼ活性を介してユビキチン化されること、及びプロテアソーム依存的に分解されることを見出した。次にSF3B1はEBV-PKに加えて、そのホモログであるヒトサイトメガロウイルス由来UL97キナーゼによってもリン酸化された。SF3B1はヘルペスウイルス由来キナーゼに共通の基質である可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

EBV-PKによるリン酸化を細胞内の他のキナーゼによるリン酸化と区別する方法(chemical genetics approach)を開発し、質量分析法によりEBV-PKの直接的な標的因子として21因子(うち2つの既知標的因子を含む)を同定し、MTA1とSF3B1について特に解析した。EBV-PKは細胞由来cyclin-dependent kinase(CDK)の機能ホモログであり、本研究の成果はウイルス学に限らず、一般細胞生物学にも貢献することが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Epstein-Barr virus (EBV) is a human lymphotropic herpesvirus, which is causally associated with infectious mononucleosis as well as a variety of human cancers. The EBV-encoded protein kinase (EBV-PK) is a Ser/Thr protein kinase and a functional ortholog of cyclin-dependent kinases (CDKs), termed a viral CDK (v-CDK). In this study, metastasis-associated protein 1 (MTA1) and splicing factor 3B subunit 1 (SF3B1) were identified as novel EBV-PK substrates. Phosphorylation of MTA1 by EBV-PK induced degradation of MTA1 and this degradation was dependent on ubiquitin-proteasome pathways. The phosphorylation-dependent degradation of MTA1 might be a conserved function of cellular CDKs and could explain MTA1 levels during cancer metastasis. In the case of SF3B1, human cytomegalovirus v-CDK (UL97) as well as EBV-PK was shown to phosphorylate it. Whether phosphorylation affects the function of SF3B1 is under investigation.

研究分野：ウイルス学

キーワード：EBウイルス キナーゼ リン酸化 蛋白質分解 MTA1 SF3B1

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Epstein-Barr ウイルス(EB ウイルス)はほとんどの成人に感染している普遍的なウイルスである。EB ウイルスは乳幼児期に初感染し、多くは不顕性であるが、思春期以降に初感染した場合には伝染性単核球症を発症することが多い。その症状として、発熱、リンパ節腫脹、肝脾腫、異型リンパ球増加などを示し重症化することもある。EB ウイルスは初感染後、一生涯潜伏感染するが、免疫抑制状態で再活性化する。また、EB ウイルスはバーキットリンパ腫、ホジキンリンパ腫、上咽頭癌、胃癌など多様ながんに関連している。抗ヘルペスウイルス薬として知られるウイルス由来 DNA ポリメラーゼ阻害剤(ガンシクロビルなど)は EB ウイルスに対する効果の報告が少ないことに加えて、その副作用(骨髄毒性による白血球減少や血小板減少、貧血、骨髄形成不全)により使用に注意が必要である。ウイルスの耐性化を妨ぎ、そして効率よくウイルス増殖を制御するために、様々な作用機序の抗ウイルス薬の開発が望まれる。申請者らは HSP90 阻害剤(17-DMAG)が EB ウイルス由来蛋白質キナーゼ(EBV-PK)の発現量の低下を含む多彩な機序で EB ウイルスの増殖を抑制すること、および EBV-PK 欠損組換え EB ウイルスのウイルス産生量は 10 分の 1 に減少することを報告した(引用文献)、このことは EB ウイルス関連疾患の治療の新たな標的として EBV-PK が有用であることを強く示す。

2. 研究の目的

本研究では EBV-PK のリン酸化基質とリン酸化の機能的意義を生化学や分子生物学的手法を用いて包括的に理解することを目的とした。研究協力者と共に EBV-PK によるリン酸化を細胞内の他のキナーゼによるリン酸化と区別する方法(chemical genetics approach)を開発しており(引用文献)、得られた非常に有望な EBV-PK の新規標的因子群(表 1)のリン酸化の検証、リン酸化部位の特定、リン酸化が細胞機能及びウイルス増殖に与える影響を明らかにし、EBV 関連疾患の新たな治療法を探索する。

3. 研究の方法

Chemical genetics approach により 21 の EBV-PK 推定標的因子群をすでに得ている(引用文献 ; 表 1)。うち Retinoblastoma (RB1)と Lamin A/C (LMNA)は既知標的因子である。残りの因子のリン酸化の評価は、申請者がこれまでに常用してきた方法(候補因子と EBV-PK の共発現に伴う候補因子の SDS-PAGE 電気泳動上でのバンドシフト、リン酸基捕捉分子 Phos-tag を用いた電気泳動、リン酸化特異抗体やラムダホスファターゼの使用)で行なった。リン酸化アミノ酸部位の特定は候補となるセリン(Ser)、スレオニン(Thr)を非リン酸化型アミノ酸であるアラニン(Ala)に置換した組換え蛋白質発現ベクターを作製し、上記の方法を行なった。また、Metastasis-associated protein1 (MTA1)の蛋白質分解については、プロテアソーム阻害剤 MG132 処理やユビキチン化アッセイを行なった。

4. 研究成果

19 の EBV-PK 推定標的因子群のうち、2 年の研究期間中に MTA1, SF3B1, CHD4, CDC5L, HNRNPUL2, ZNF687 のリン酸化を検証した。

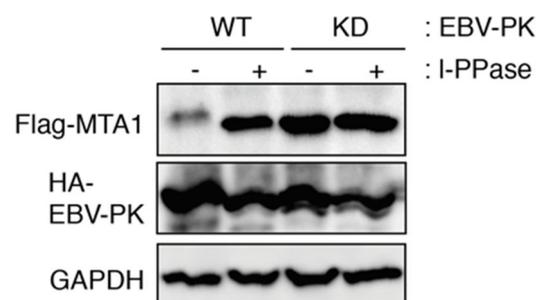
(1) MTA1

ヌクレオソーム再構築デアセチラーゼ複合体因子 MTA1 は培養細胞内で野生型 EBV-PK(WT)と共発現することによりバンドシフトが観察された。このバンドシフトはキナーゼ活性を失活した EBV-PK(KD)と共発現した場合には誘導されず、さらにラムダホスファターゼ(I-PPase)感受性であった(図 1)。このため、MTA1 が EBV-PK の真の標的因子であることが示された。野生型 EBV-PK との共発現時において、MTA1 は失活した EBV-PK との共発現時よりもその蓄積量が減少しており、プロテアソーム阻害剤 MG132 に感受性であった(図 2)。さらにユビキチン化アッセイにより、EBV-PK との共発現に伴う MTA1 のユビキチン化が示された。即ち、MTA1 は EBV-PK のキ

表 1: Chemical genetics approachにより得られたEBV-PKの推定標的因子

機能	推定標的因子	リン酸化部位
転写・ヌクレオソーム再構築	CHD4	T1646
	CHD8	T2051
	LMNA	S18, T19
	LMNB2	T34
	MTA1	T564
	RB1	S795, S888
	ZNF687	T503
RNAスプライシング	CDC5L	T424
	HNRNPUL2	T165
	SF3B1	T248, T278, T326
	SRRM2	T367, S2365, T2367, S2368, T2381
	THRAP3	S243
RNA核外移行	NUP133	S27, T28, S45
翻訳	EEF1A1	T240
	EIF4G3	T678
細胞骨格	AHNAK	S5110
	PHIP	S1479, T1480
微小管	MAP1B	T1788
	MAP7D1	S43
キナーゼ	PRKAR2A	T54
有糸分裂	NUMA1	T2106

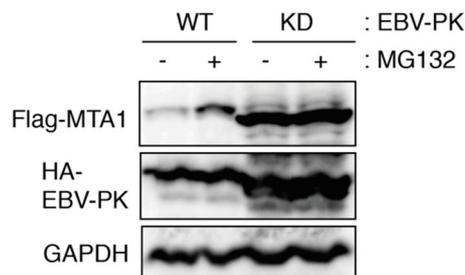
図 1: MTA1はEBV-PKによりリン酸化される



即ち、MTA1 は EBV-PK のキ

ナーゼ活性依存的にユビキチン化されること、及びプロテアソームによって分解されることが明らかになった。MTA1 配列中には EBV-PK が好んでリン酸化する Ser/Thr-Pro の配列が 6 つ存在する (Ser386, Ser449, Ser460, Ser522, Thr564, Thr576: Thr564 は質量分析により予測されたリン酸化部位)。これらの 6 つの Ser/Thr を非リン酸化型アミノ酸である Ala に置換したところ、EBV-PK による MTA1 の分解が一部抑えられたが、その量は完全には回復しなかった。EBV-PK によるリン酸化部位はこれらの 6 つの Ser/Thr 中にも含まれるがそれ以外にも存在すると考えられる。MTA1 配列中には 14 のリジン(Lys)残基があり、いずれかがユビキチン化されると考えられる。14 の Lys を N 末端近傍の 5 つ、中心部の 4 つ、C 末端近傍の 5 つに分け、アルギニン(Arg)に置換した 3 つの変異型 MTA1 はいずれも蛋白質分解を受けた。ユビキチン化 Lys は MTA1 の配列全体に分散して複数存在する可能性がある。MTA1 はこれまでに RFD2/COP1 ユビキチンリガーゼによるユビキチン化が報告されている。しかしながら、siRNA による RFD2/COP1 のノックダウンは EBV-PK によって誘導される MTA1 の分解を阻害しなかった。MTA1 の分解機構の詳細は今後さらに解析する必要がある。また、ウイルス増殖における MTA1 分解の意義についても今後の課題として残っている。MTA1 は非癌部より癌部で、さらに悪性度の高い転移部での発現が高いことが判明している転移関連因子である。EBV-PK は細胞由来 cyclin-dependent kinase(CDK)の機能ホモログであり、MTA1 のリン酸化によって誘導される分解機構が CDK を介した細胞機能として保存されているならば、非癌部と癌部における MTA1 量の変化を説明する可能性がある。

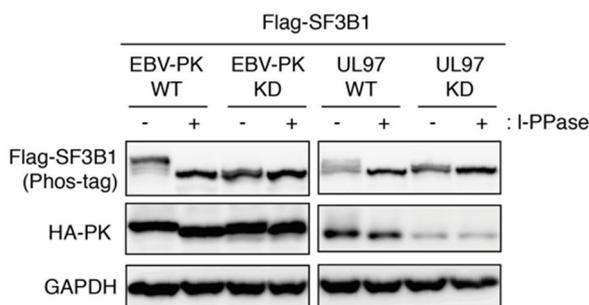
図 2:EBV-PKによるリン酸化はMTA1分解を誘導する



(2) SF3B1

スプライシング複合体因子 SF3B1 は、MTA1 と同様に、EBV-PK のキナーゼ活性に依存してラムダホスファターゼ感受性のバンドシフトが誘導された(図 3)。質量分析による予測リン酸化アミノ酸である Thr248, Thr278, Thr326 を Ala に置換した変異型 SF3B1 はまだ EBV-PK によりリン酸化された。また、市販のリン酸化特異抗体 (Ser129 あるいは Thr313) は EBV-PK によるリン酸化型 SF3B1 を認識しなかった。そのため、SF3B1 のリン酸化部位の同定には至らなかった。EBV-PK に加えて、そのホモログであるヒトサイトメガロウイルス由来 UL97 キナーゼによっても SF3B1 のリン酸化が誘導された(図 3)。SF3B1 はヘルペスウイルス由来蛋白質キナーゼに共通の基質である可能性がある。

図 3:EBV-PKおよびHCMV UL97によりSF3B1はリン酸化される



(3) CHD4, CDC5L, HNRNPUL2, ZNF687 については EBV-PK との共発現によるバンドシフトは認められなかった。ただし、リン酸化は必ずしもバンドシフトを起こすとは限らず、これらについては精製蛋白質と $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ を用いた *in vitro* kinase assay を行なった上で結論を出す必要がある。

<引用文献>

X. Sun, J.A. Bristol, **S. Iwahori**, S.R. Hagemeyer, Q. Meng, E.A. Barlow, J.D. Fingerroth, V.L. Tarakanova, R.F. Kalejta, and S.C. Kenney. Hsp90 inhibitor 17-DMAG decreases expression of conserved herpesvirus protein kinases and reduces virus production in Epstein-Barr virus-infected cells. *Journal of Virology* 87, 2013, 10126-10138.

T. Murata, H. Isomura, Y. Yamashita, S. Toyama, Y. Sato, S. Nakayama, A. Kudoh, **S. Iwahori**, T. Kanda, and T. Tsurumi. Efficient production of infectious viruses requires enzymatic activity of Epstein-Barr virus protein kinase. *Virology* 389, 2009, 75-81.

A.C. Umaña, **S. Iwahori**, and R.F. Kalejta. Direct substrate identification with an analog sensitive (AS) viral cyclin-dependent kinase (v-Cdk). *ACS Chem Biol* 13, 2018, 189-199.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岩堀聡子、Angie C. Uman-a、Robert F. Kalejta、村田貴之
2. 発表標題 ヒトサイトメガロウイルスUL97キナーゼは14-3-3ファミリーと相互作用する
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 Satoko Iwahori, Angie C. Uman-a, Robert F. Kalejta, Takayuki Murata
2. 発表標題 Human Cytomegalovirus v-CDK UL97 interacts with 14-3-3 proteins.
3. 学会等名 44th annual International Herpesvirus Workshop
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩堀聡子、村田貴之
2. 発表標題 ヒトサイトメガロウイルスUL97キナーゼは14-3-3ファミリーと相互作用する
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

〔図書〕 計0件

〔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
研究協力者	カレイラ ロバート (Kalejta Robert)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 協力 者	ウマーニャ アンジー (Umana Angie)		Umanaの「n」はスペイン語表記で「n~」にあたる。