

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590383

研究課題名(和文) 癌抑制遺伝子 drs による感染防御作用とそのメカニズムの解明

研究課題名(英文) Role of drs tumor suppressor gene on host defense mechanism against infection

研究代表者

旦部 幸博 (TAMBE YUKIHIRO)

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号：50283560

研究成果の概要(和文)：癌抑制遺伝子 drs の正常細胞での生理機能解明のため、微生物感染防御における役割と作用メカニズムを解析した。drs ノックアウトマウス由来の細胞では、水泡性口内炎ウイルス(VSV)などのウイルス増殖が、野生型細胞よりも亢進していた。drs はストレス応答遺伝子 GADD34 や TSC2 と結合して、mTOR シグナル伝達経路を調整し、感染細胞でのタンパク合成を抑制することで、細胞の抗ウイルス機構に寄与していることを見出した。

研究成果の概要(英文)：To clarify the physiological function of drs tumor suppressor in non-malignant cells, the role on host defense against infection was investigated. The replication of the viruses including VSV in drs deficient cells, derived from drs knockout mice, was increased compared with that in wild-type cells. drs was associated with stress-inducible GADD34 and TSC2, and regulated mTOR signaling pathway to suppress the viral protein synthesis in the infected cells. It was suggested that drs is involved in the host defense mechanism against viral infection.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：drs 遺伝子、感染防御、自然免疫、mTOR、GADD34

1. 研究開始当初の背景

Drs は、ウイルス癌遺伝子 v-src による初代培養細胞の癌化を抑制するものとして我々が新規に分離した癌抑制遺伝子である。Drs mRNA は、ほぼすべての組織において恒常的に発現しているが、v-src や HTLV-I tax などのウイルス癌遺伝子や、活性型 H-ras、β-カテニンなどの癌遺伝子によってその発現が抑制され、ウイルス発癌を含む癌発生の過程で重要な役割を果たしていると考えられ

る。我々はヒト癌細胞における Drs 遺伝子の機能を解析してゆく過程で、Drs が小胞体においてアポトーシス誘導因子 ASY/NogoB と結合し、caspase-12、-9、-3 を活性化する新規の経路で様々なヒト癌細胞株に対してアポトーシスを誘導することを明らかにした。

また我々が作製した Drs ノックアウト(KO)マウスでは、その約30%にT細胞リンパ腫、肺腺癌、肝癌などの悪性腫瘍が発生した。この DrsKO マウスに生じた肺癌由来の癌細胞株

に Drs をウイルスベクターで再導入することによって、*in vivo* 腫瘍形成が顕著に抑制された。また、この Drs 導入癌細胞株は低血清培養条件下でアポトーシスを誘導し、発癌の過程においては、Drs が環境ストレスに応答してアポトーシスを誘導することが癌化抑制に関わっている可能性が高いと考えられた。

さらに正常細胞における Drs 本来の生理機能について明らかにするため、DrsKO マウスから胎児線維芽細胞 (MEF) を調整して各種ストレス条件下における細胞応答を検討した。その結果、DrsKO MEF が SV40 large T 抗原や *v-src* などのウイルス癌遺伝子に対して感受性が亢進していることのみならず、水泡性口内炎ウイルス (VSV) の感染に対する感受性も亢進しており、DrsKO MEF では野生型 (WT) MEF と比較して、ウイルス感染に対する抵抗性が低下している可能性を見いだした。

2. 研究の目的

本研究の目的は、細菌およびウイルス感染時における Drs の機能について、以下に列記した内容に関する解析を行い、その感染防御分子としての役割を明らかにすることである。

(1) 癌抑制分子 Drs は感染防御分子として、どのように機能するのか？

- ① DrsKO 細胞は、WT と比較して細菌やウイルス感染に対して感受性になるのか。
- ② Drs 遺伝子の高発現や KO 細胞への再導入は、感染に対する抵抗性を亢進させるのか。
- ③ どのような病原体に対して有効なのか。

(2) Drs による感染防御のメカニズムは？ (Drs 下流の分子機構の解明)

- ① 新奇感染防御機構である GADD34/mTOR 経路と Drs の関わりは？
- ② Drs は癌細胞だけでなく感染細胞にもアポトーシスを誘導するのか。
- ③ Drs は低血清誘導オートファジーだけでなく、感染誘導オートファジーも制御するのか。

(3) 病原体の認識機構と Drs の連携は？ (Drs 上流の分子機構の解明)

- ① Drs は病原体感染を直接認識するセンサー分子なのか、他の分子が介在するのか。
- ② 感染により誘導される GADD34 は、Drs による感染防御にどう影響するのか。
- ③ Drs と相互作用する宿主細胞側の感染防御分子が GADD34 以外にも存在するのか。

3. 研究の方法

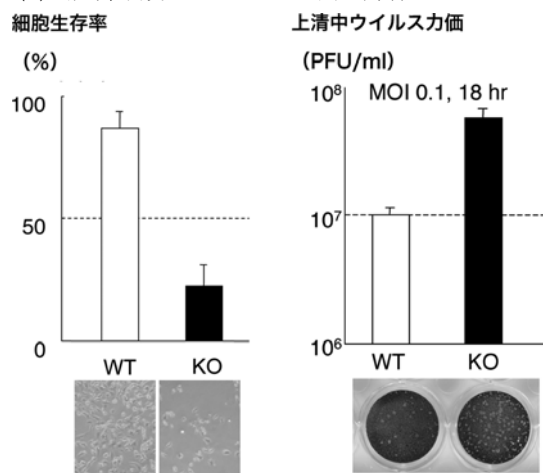
(1) DrsKO MEF に、各種のウイルスや細菌を *in vitro* で感染させ、これらの病原体の増殖を、WT MEF と比較する。また DrsKO 細胞に、Drs 遺伝子をレトロウイルスベクターを用いて再導入して、同様の感染実験を行う。

(2) ウイルスを感染させた WT および DrsKO 細胞における総タンパク合成ならびにウイルスタンパク合成を、35S 取り込み実験、ウエスタンブロッティング、蛍光抗体法にて検討する。また感染時のタンパク合成調節に関わる eIF2 α や、リボソーム S6、S6K、RSK などの分子の関与を、リン酸化特異抗体を用いたウエスタンブロッティングや、各種阻害剤を用いて検討する。

(3) GADD34/mTOR 経路の制御に関わる、GADD34 ならびに TSC1/2 と Drs の相互作用について、免疫沈降法を用いて解析する。またこのとき、mTOR の調節に関わる TSC2 のリン酸化についてリン酸化特異的抗体を用いたウエスタンブロッティングによって検討を行う。

4. 研究成果

(1) 癌抑制分子 Drs の感染防御作用



① DrsKO MEF と WT MEF にそれぞれ同じ条件 (MOI 0.1, 18 時間) で、VSV を感染させたとき、DrsKO MEF では WT MEF よりも多くの細胞が細胞死 (アポトーシス) を生じた (図 1 左)。このとき、細胞培養上清中の VSV 量 (感染価) も DrsKO MEF の方が有意に上昇しており (図 1 右)、DrsKO MEF では WT MEF に比べて、VSV の増殖が亢進していることを確認した。

② RNA ウイルスである VSV 以外の病原体に対しても同様の現象が見られるかを明らかにするため、単純ヘルペスウイルス (HSV、DNA ウイルスの一種)、マウスラウス肉腫ウイルス (MRSV、RNA ウイルスでレトロウイルスの一種)、化膿レンサ球菌 (細胞内に寄生する細菌) について、同様の実験を行った。そ

の結果、HSV と MRSV の増殖は VSV と同様に、DrsKO MEF において有意に亢進した。化膿レンサ球菌については、DrsKO MEF と WT MEF で顕著な違いは認められなかった。

③ DrsKO MEF と WT MEF でのウイルス増殖の違いが、Drs 遺伝子の有無によるものであることを確認するため、DrsKO MEF にレトロウイルスベクターを用いて Drs 遺伝子を再導入した細胞株 (DrsKO-*pcx*Drs) を作製し、VSV 増殖能を検討した。DrsKO-*pcx*Drs では、ベクターのみを導入した細胞株と比べて VSV 増殖能が低下した。癌抑制遺伝子 Drs が、ウイルス増殖を抑制する感染防御作用もあわせ持つ生体防御遺伝子であることが示唆された。

(2) Drs による感染防御のメカニズム

上記(1)の結果から、DrsKO MEF と WT MEF に VSV を感染させる実験系を用いて、Drs がどのようにして感染防御に関与するかを検討した (Drs 下流のメカニズムの解明)

① DrsKO MEF での VSV 増殖の亢進が、細胞への感染効率が增加することによるものなのか、細胞内での増殖効率が增加することによるものかを、特異抗体による蛍光染色法によって検討した。VSV 感染後 6 時間の DrsKO MEF と WT MEF では、VSV タンパク質陽性細胞の割合には違いがなかったが、DrsKO MEF では WT MEF に比べて、細胞あたりの VSV タンパク質の発現量が上昇する傾向を見出した。そこでウェスタンブロッティングにより定量的な解析を行い、DrsKO MEF では VSV の感染効率は WT MEF と同程度だが、ウイルスタンパク質合成が亢進していることを確認した。

② 一般に、ウイルス感染細胞ではインターフェロン経路が活性化され、宿主細胞全体でタンパク質合成が抑制されることが知られている。そこで ³⁵S メチオニンの取込みによるパルス追跡実験によって、VSV 感染時の総タンパク質合成を検討した。しかし DrsKO MEF では WT MEF に比べて VSV タンパク質合成が亢進する一方で、細胞の総タンパク合成はむしろ抑制されるという結果が得られた。またインターフェロン経路の活性化に関与する eIF2 α のリン酸化の結果からも同様の知見が得られ、Drs はウイルス感染時に、宿主細胞の総タンパク合成を低下させることなく、ウイルスタンパク質合成の特異的な抑制に関与することが示唆された。

③ Drs によるウイルス特異的なタンパク質合成抑制のメカニズムを明らかにするため、インターフェロン経路以外で、ウイルス感染時のタンパク質合成を調節することが知られている mTOR 経路 (mTOR-S6K-S6 経路) の関

与について検討した。WT MEF では、mTOR 経路下流の標的分子であるリボソーム S6 タンパク質のリン酸化が VSV 感染後に抑制されたのに対して、DrsKO MEF では抑制されておらず、S6 を介するタンパク質合成が亢進したままの状態であることが示唆された。このとき、S6 上流のリン酸化酵素 S6K も同様の挙動を示し、また mTOR の選択的阻害剤であるラパマイシンが、DrsKO MEF でのウイルス増殖亢進を抑制したことから、Drs は mTOR の上流でこの経路を抑制的に調節していることが示唆された。

④ S6 のリン酸化は mTOR 経路下流分子である S6K だけではなく、p38 経路や Erk 経路の下流分子である RSK によっても行われることが知られている。そこで RSK、p38、Erk の各分子についても VSV 感染時のリン酸化の変化と、阻害剤による影響を検討した。その結果、DrsKO MEF では WT MEF に比べて、VSV 感染時の RSK と p38 のリン酸化が亢進していた。また RSK、p38、Erk の阻害剤は DrsKO MEF でのウイルス増殖亢進に抑制的に作用した。これらの結果から、Drs が mTOR 経路以外のシグナル伝達経路の調節に関与している可能性も示唆された。

(3) 病原体の認識機構と Drs の連携

上記(2)の結果から、ウイルス感染応答の制御に関与する GADD34 などの mTOR 経路上流の分子と Drs の相互作用について検討した (Drs 上流のメカニズムの解明)

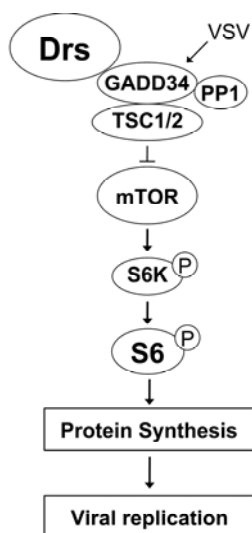
① GADD34 と Drs がタンパク質相互作用しうるかどうかを明らかにするため、293T 細胞に GADD34 と Drs それぞれの発現プラスミドを遺伝子導入して免疫沈降法を行った。その結果、Drs と GADD34 の両者が結合しうることを見出した。また Drs 遺伝子の一部を欠失させたミュータントを用いて解析を行い、Drs 遺伝子のうち、sushi モチーフを含んだ N 端側の領域が GADD34 との結合に必要であることを明らかにした。

② 申請者らはこれまで、ウイルス感染によって誘導される GADD34 が、mTOR を抑制的に調節する TSC1/2 および脱リン酸化酵素 PP1 と結合して複合体を形成し、TSC2 を脱リン酸化することを明らかにしてきた。そこで Drs がこの機構に関与するかどうかを、293T 細胞への遺伝子導入実験で検討した。その結果、Drs は GADD34 依存的に TSC2 と結合し、TSC2 脱リン酸化を増強することを見出した。

③ また申請者らは GADD34 がウイルス感染時だけでなく、グルコース飢餓などの生理的ストレス時にも誘導され、mTOR 経路を介してタ

ンパク質合成の制御に関与することを明らかにしてきた。そこで DrsKO MEF と WT MEF を用いて、グルコース飢餓時における細胞応答の違いを検討した。その結果 DrsKO MEF は WT MEF に比べてグルコース飢餓に対する感受性が増加し、アポトーシスを起こしやすくなっていることを見出した。この性質は GADD34 KO MEF と WT MEF との違いでも見られたものであり、Drs が GADD34 を介して mTOR 経路の制御に関わることを補強する知見が得られた。

以上の結果から、ウイルス感染時に Drs は、感染応答分子 GADD34、TSC1/2 と複合体を形成して、TSC2 を脱リン酸化し、mTOR 経路を抑制することで、ウイルス特異的なタンパク質合成を抑制するという、新奇の宿主防御機構に関与する可能性を明らかにした(右図)。



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

① Chul Jang Kim, Kanami Sakamoto, Yukihiro Tambe, Hirokazu Inoue. Opposite regulation of epithelial to mesenchymal transition and cell invasiveness by periostin between prostate and bladder cancer cells. *Int J Oncol.* Vol.38, 1759-1766, 2011, 査読有

② Chul Jang Kim, Kayoko Nishi, Takahiro Isono, Yusuke Okuyama, Yukihiro Tambe, Yusaku Okada, Hirokazu Inoue. Cyclin D1b variant promotes cell invasiveness independent of binding to CDK in human bladder cancer cells. *Mol. Carcinog.*, Vol. 48, 953-964, 2009, 査読有

③ Yukihiro Tambe, Akitsugu Yamamoto, Takahiro Isono, Tokuhiro Chano, Mitsunori Fukuda, Hirokazu Inoue. The Drs tumor suppressor is involved in the maturation

process of autophagy induced by low serum. *Cancer Letters*, Vol.283, 74-83, 2009, 査読有

④ Chul Jang Kim, Takahiro Isono, Yukihiro Tambe, Tokuhiro Chano, Hidetoshi Okabe, Yusaku Okada, Hirokazu Inoue. Role of alternative splicing of periostin in human bladder carcinogenesis. *Int. J. Oncol.* Vol.32, 161-169, 2008, 査読有

[学会発表] (計 11 件)

① Hirokazu Inoue, Kanami Sakamoto, Yukihiro Tambe, Chul Jang Kim. Cell-type dependent regulation of EMT and cell invasiveness of human cancer cells by periostin, 第 33 回日本分子生物学会年会、2010 年 12 月 10 日、神戸

② 旦部 幸博, 奥山 直美, 中川 達也, 井上 寛一、癌抑制遺伝子 drs によるウイルス増殖抑制作用、第 33 回日本分子生物学会年会、2010 年 12 月 8 日、神戸

③ Yukihiro Tambe, Tokuhiro Chano, Hirokazu Inoue. The drs tumor suppressor is involved in the suppression of viral replication via p38-RSK1-S6 dependent pathway 第 69 回日本癌学会総会、2010 年 9 月 23 日、大阪

④ Chul Jang Kim, Yukihiro Tambe, Hirokazu Inoue. Cell-type dependent regulation of EMT and cell invasiveness of cancer cells by periostin 第 69 回日本癌学会総会、2010 年 9 月 22 日、大阪

⑤ Yukihiro Tambe, Takahiro Isono, Tokuhiro Chano, Hirokazu Inoue. Regulation of autophagy maturation by the interaction of Drs tumor suppressor and Rab24. 第 67 回日本癌学会総会、2009 年 10 月 28 日、名古屋

⑥ Hirokazu Inoue, Tokuhiro Chano, Yukihiro Tambe. Role of drs tumor suppressor gene in cell survival under energy depletion. 第 68 回日本癌学会総会、2009 年 10 月 3 日、横浜

⑦ Chul Jang Kim, Takahiro Isono, Yukihiro Tambe, Yusaku Okada, Hirokazu Inoue. Functional analysis of variant cyclin D1b on enhances cell invasiveness of human bladder cancer cells 第 68 回日本癌学会総会、2009 年 10 月 3 日、横浜

⑧ Yukihiro Tambe, Hirokazu Inoue.
Suppression of viral replication by the
drs tumor suppressor genes. 第68回日本
癌学会総会、2009年10月1日、横浜

⑨ 旦部幸博、前田理亜、山本章嗣、茶野徳
宏、井上寛一、エネルギー枯渇に対するスト
レス応答における癌抑制遺伝子 drs の役割、
第31回日本分子生物学会年会、2008年12月
11日、神戸

⑩井上寛一、西香代子、奥山雄介、旦部幸博、
岡田裕作、磯野高敬、金哲將、Splicing
variant cyclin D1b による膀胱癌細胞の悪性
化促進の解析、第31回日本分子生物学会年
会、2008年12月10日、神戸

⑪ Chul Jang Kim, Takahiro Isono, Yukihiro
Tambe, Yusaku Okada, Hirokazu Inoue.
Cyclin D1b variant enhances cell
invasiveness of human bladder cancer cells.
第67回日本癌学会総会、2009年10月28日、
名古屋

6. 研究組織

(1) 研究代表者

旦部 幸博 (TAMBE YUKIHIRO)

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号：50283560