

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 1 日現在

機関番号：34306

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21590113

研究課題名（和文） ヘルペスウイルスが発現するリン酸化酵素の生理機能の解明

研究課題名（英文） functional analysis of human herpesvirus encoded kinases

研究代表者

藤室 雅弘 (FUJIMURO MASAHIRO)

研究者番号：20360927

研究成果の概要（和文）：本研究により、カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス (KSHV) がコードするリン酸化酵素 (ORF36) は E2F の転写活性化を行い、細胞周期の G1 期から S 期移行を促進していることを明らかにした。つまり、ORF36 は Rb をリン酸化し、このリン酸化は Rb からの E2F の遊離と E2F 活性化を誘導することが明らかにした。次に、KSHV がコードする ORF21、ORF36、ORF73 (LANA) の細胞内における分解と動態について解析を行った。その結果、ORF21、ORF36、ORF73 は全て短寿命であるが、ORF73 の C 末端側断片は非常に安定であり、ORF73 の C 末端側断片はミトコンドリア蛋白質である p32 前駆体と結合し、p32 のミトコンドリア内での成熟と機能（アポトーシス亢進活性）を阻害することを見いだした。また、KSHV の増殖抑制活性を有する化合物（抗 KSHV 化合物）の探索も実施した。

研究成果の概要（英文）：Kaposi's sarcoma associated herpesvirus (KSHV), also known as human herpesvirus 8, is associated with Kaposi's sarcoma (KS) and AIDS-related primary effusion lymphoma (PEL). Here we have elucidated functions and intracellular metabolisms of KSHV encoded proteins, such as ORF21, ORF36 and ORF73. ORF21 and ORF36 functions as nucleoside and protein kinase, respectively. Interestingly, ORF36 can phosphorylate Rb, resulting in activation of E2F and progression to S phase. It have been known that ORF73, latency-associated nuclear antigen (LANA) of KSHV is required for maintenance of KSHV DNA and is believed to play an important role in KSHV latency and tumorigenesis. We have studied the metabolisms and post-translational processing of LANA. We found that a relatively small number of full-length LANA proteins are cleaved at C-terminal region and produced C-terminal fragments of LANA, causing anti-apoptosis. Furthermore, we found several anti KSHV agents, which suppress the KSHV DNA replication.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 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：薬学・生物系薬学

キーワード：ウイルス、リン酸化、タンパク質分解、創薬、プロセッシング

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

### 1. 研究開始当初の背景

カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス (KSHV) は 1994 年に分離同定された最も新しいヘルペスウイルスで、Human herpes virus-8 (HHV8) とも呼ばれる。KSHV の潜伏感染者の割合はアフリカでは 90% 以上で、中東、北米では 10% 程度、日本では 2% 程度と報告されている。KSHV は健康者に感染すると深刻な疾患を起こさずに潜伏感染し、エイズや免疫抑制剤投薬下等の免疫不全時にカポジ肉腫や B 細胞性リンパ腫を引き起こす。しかし、KSHV は発見されてから 17 年しか経っていないため、その感染や発がんの仕組みなど不明な点が多い。また、有効な抗 KSHV 薬が無いため、その開発が期待されている。

KSHV により引き起こされるカポジ肉腫や B 細胞性リンパ腫は、発症者を死に至らせる悪性腫瘍である。また、医療先進国における臓器移植の増加に伴い、KSHV 感染ドナーによって提供される 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。ヒトに感染するヘルペスウイルスは現在 8 種類同定され、全てのヘルペスは感染者の免疫不全により日和見感染症を誘発する。臨床で用いられているアシクロビル (ACV) やガンシクロビル (GCV) は多くのヘルペスウイルスに対して、高い選択性を示す。しかし、有効な治療薬が開発されていない KSHV 感染症は、特に深刻な問題である。

### 2. 研究の目的

KSHV ゲノムがコードするウイルス性リン酸化酵素の基質特異性や生理機能の解析は、KSHV の病原性の解明と抗 KSHV 薬の分子設計に必要な不可欠な研究課題である。また、抗ウイルス薬開発における薬物のウイルス特異性の向上性の獲得には、ウイルスが発現する核酸リン酸化酵素は薬物の絶好の標的分子となる。そこで、本研究では KSHV ゲノムがコードするウイルス性リン酸化酵素 (ORF21 および ORF36) に焦点をあて、(1) KSHV リン酸化酵素の生理機能、(2) KSHV の ORF21、ORF36、ORF73 (LANA) の細胞内における分解と動態、(3) KSHV の増殖抑制活性を有する化合物 (抗 KSHV 化合物) の探索を実施した。

### 3. 研究の方法

#### (1) KSHV のリン酸化酵素の生理機能

##### ・リン酸化アッセイ

KSHV の ORF21 と ORF36 がヌクレオシドリリン酸化酵素なのか、または、蛋白質リン酸化酵素なのかを決定し、その生理的基質を同定する。ORF21 はチミジンリン酸化酵素と呼ばれるよ

うに、ACV や GCV をモノリン酸化することからヌクレオシドを基質としている。一方、ORF36 は EB ウイルスのホモログである BGLF4 が蛋白質リン酸化酵素であるため、蛋白質をリン酸化する可能性が高いが、ヌクレオシドもリン酸化するという報告もある。

そこで、KSHV の ORF21 と ORF36 の精製酵素を調製して、両者のヌクレオシドと蛋白質に対するリン酸化活性を測定した。培養細胞で発現させた Flag タグを付加した両リン酸化酵素をタグの抗体ビーズ (M2 抗体-アガロースビーズ) を利用した免疫沈降法で精製し、ORF21 と ORF36 の精製酵素を調製した。デオキシ (d) チミジンを基質として用い、ORF21 と ORF36 がヌクレオシドリリン酸化酵素か否かを逆送 HPLC にて解析した。蛋白質に対するリン酸化反応については、熱処理により内在性リン酸化酵素類を失活させた細胞抽出液やタグ融合 pRb を基質に用い、精製 ORF36 (または ORF21) と  $\gamma$  32P-ATP と反応後オートラジオグラフィーで蛋白質のリン酸化を解析した。

##### ・ルシフェラーゼアッセイ

ORF36 の細胞内シグナル伝達に与える影響を解析するため、ルシフェラーゼアッセイを行った。Flag-ORF36 と、各レポーター遺伝子 (pAP1-Luc, pE2F-Luc, pISRE-Luc, pNF- $\kappa$ B-Luc, pE-cadherin-Luc 遺伝子) を HeLa 細胞にトランスフェクションし、ORF36 の各転写因子に与える影響を解析した。

#### (2) KSHV の ORF21、ORF36、ORF73 (LANA) の細胞内における分解と動態

KSHV がコードするウイルス蛋白質 ORF21、ORF36、ORF73 (LANA) の細胞内における安定性を解析した。また、LANA については、その N 末端と C 末端に T7 タグと S タグを付加した DNA を構築し、LANA の N 末端側領域と C 末端側領域の安定性・分解を解析した。

#### (3) KSHV の増殖抑制活性を有する化合物 (抗 KSHV 化合物) の探索

プロテアソーム阻害薬、および、HSP90 阻害剤が KSHV のウイルス増殖抑制活性を有するか否か、リアルタイム PCR を用いたウイルス定量法により解析した。KSHV 感染 PEL 細胞株 (BC3, BCBL1 細胞) を 20 ng/ml の TPA 処理し、溶解感染へと移行させ、培地中に放出される孫ウイルス DNA 量をリアルタイム PCR により解析した。4 $\times$ 10<sup>5</sup> cells/well の濃度で調製した BC3 細胞に 20 ng/ml の TPA 処理および候補薬物を同時に添加し、培養液の上清 300  $\mu$ l を回収した。培養液上清を 5 units の DNase I で 37°C 40 分間処理し、死滅した細胞

由来のウイルス DNA を除去した。次に、98°C で7分間処理し DNase I を失活させた。

QIAamp® DNA Blood Mini Kit を用いて、上清から KSHV ウイルス DNA を溶出した。その後、KSHV の ORF50 増幅用のプライマーを用いてリアルタイム PCR を行い、Melting Curve より、KSHV ウイルス量を算出した。

#### 4. 研究成果

上記の研究により、以下の研究結果を得た。

##### (1) KSHV のリン酸化酵素の生理機能

KSHV のコードする ORF21 は蛋白質よりも核酸(d チミジン)や ACV に対するリン酸化能が強く、一方で、ORF36 は核酸よりも蛋白質に対するリン酸化能が強いことが明らかとなった。また、ORF36 は自己リン酸化能を持つと報告されていたが、ORF36 は、自己リン酸化能を持たず、細胞由来の他のリン酸化酵素によってリン酸化されることを明らかにした。

各種レポーター遺伝子を用いたルシフェラーゼアッセイを行った結果、ORF36 は、E2F 応答性のレポーター遺伝子の活性が有意に上昇させることを見いだした。ORF36 は E2F の転写活性化を行い、細胞周期の G1 期から S 期移行を促進していた。なお、転写因子である E2F は、がん抑制遺伝子産物 Rb に結合されると不活性化されているが、Rb が CDK/サイクリン複合体によりリン酸化されると、E2F は Rb から遊離し転写因子として機能する。今年度の研究において、ORF36 は Rb をリン酸化し、この ORF36 による Rb のリン酸化は Rb からの E2F の遊離と E2F 活性化を誘導することが明らかにされた。さらに、ORF36 は LANA、vCyclinD をも基質とし、これらウイルス蛋白質をリン酸化することが確認された。今後、ORF36 による LANA と vCyclinD のリン酸化の生理的意義を明らかにしていく。

KSHV がコードする ORF36 の EB ウイルスホモログ BGLF4 は自己リン酸化能を有し、細胞癌化に深く関与する潜伏期発現蛋白質 EBNA2 等のウイルス性蛋白質や細胞性蛋白質のリン酸化を行う。さらに、溶解感染時(ウイルス産生時)に、感染細胞中の BGLF4 は合成途中の新生ウイルスのビリオン内へと取り込まれる。宿主細胞を破壊し、血液中へと拡散したウイルスは新しい宿主へと吸着・感染するが、BGLF4 は新しい宿主細胞中にウイルス DNA と共に侵入する。新しい宿主細胞内で BGLF4 は細胞性リン酸化酵素 cdc2 のホモログとして機能し、感染細胞の細胞周期を停止させることが報告されている。しかし、KSHV の ORF36 に関する生理機能や基質に関する報告は皆無である。本研究による、KSHV の ORF36 の機能解析により、ORF36 は Rb を含む複数の細胞性因子と KSHV のウイルス蛋白質をリン酸化し、E2F 転写因子の活性化による細胞周

期の亢進も行なっていることが明らかとなった。

##### (2) KSHV の ORF21、ORF36、ORF73(LANA) の細胞内における分解と動態

KSHV がコードする ORF21、ORF36、ORF73(LANA) の細胞内における分解と動態について解析を行った。その結果、ORF21、ORF36、LANA は全て短寿命であり、細胞内のユビキチン・プロテアソーム系で分解されていた。しかし、LANA の C 末端側断片は非常に安定であり、LANA の C 末端側断片はミトコンドリア蛋白質である p32 前駆体と結合し、p32 のミトコンドリア内での成熟(プロセッシング)と機能(アポトーシス亢進活性)を阻害することを見いだした。KSHV が潜伏感染期に発現する LANA(潜伏感染関連核抗原)は KSHV のウイルス DNA の安定化と複製、さらに、感染細胞の発がんに関与する。LANA の細胞内における分解について詳細に解析した結果、LANA は、翻訳後にプロテアーゼにより C 末端側領域で切断を受け、安定な C 末端断片を生成することが明らかになった。30kDa の LANA-C 末端断片は、核に局在する全長の LANA とは異なり、細胞質に局在する。

p32 は、N 末端にミトコンドリア(Mt)移行シグナルを有し、翻訳後は未成熟体 p32 として Mt へと移行してシグナル配列が切断されることで成熟体となる。成熟体 p32 は、そのほとんどが Mt に局在するが、一部が核や細胞質へ移行する。興味深いことに、細胞質に局在する LANA-C 末端断片は、翻訳直後の未成熟 p32 と結合し、未成熟 p32 の Mt への移行とそれに伴う Mt 移行シグナルの切断を阻害した。さらに、LANA-C 末端断片は p32 の成熟体生成を阻害することで、p32 の生理的機能の一つアポトーシス亢進活性を抑制していた。このことから、LANA-C 末端断片は完全長の LANA と異なり、局在性を核から細胞質へと変化させ、p32 と結合して p32 の成熟体生成と p32 依存的なアポトーシスを阻害し、感染細胞のアポトーシス回避に関与することが推察された。

##### (3) KSHV の増殖抑制活性を有する化合物(抗 KSHV 化合物)の探索

プロテアソーム阻害薬、および、HSP90 阻害剤が KSHV のウイルス増殖抑制活性を有するか否か、リアルタイム PCR を用いたウイルス定量法により解析した。その結果、ガンシクロビル(GCV)、N-[(Phenylmethoxy)carbonyl]-L-isoleucyl-L- $\alpha$ -glutamyl-tert-butyl ester-N-[(1S)-1-formyl-3-methylbutyl]-L-alaninamide (PSI)、および、Geldanamycin (GA)、17AAG を抗 KSHV 化合物として同定した。GCV、PSI、GA、17AAG は、約 8.0 nM、4.0 nM、

0.6 nM, 1.5 nM で KSHV 複製を 50% 阻害した。また、BC3 を用いて GCV, PSI, GA, 17AAG の細胞毒性を解析した結果、CC50 はそれぞれ、55  $\mu$ M, 22 nM, 10.0 nM, 92 nM であった。

作用機序解析により、GCV はウイルス DNA 合成を、PSI はプロテアソーム活性と NF- $\kappa$ B シグナル活性を、GA, 17AAG は HSP90 を阻害することで、KSHV の溶解感染期におけるウイルス DNA 複製を阻害し、新規ウイルス産生を抑制していた。

次に、PSI, GA, 17AAG は、KSHV の複製のどの過程を阻害するのかを解析した。RT-real-time PCR により、全ての抗 KSHV 化合物は KSHV の IE(前初期)遺伝子 ORF50 mRNA 発現と初期遺伝子 K-bZIP の発現に影響を与えなかった。これらの結果より、HSP90 阻害剤とプロテアソーム阻害剤は KSHV 初期遺伝子の転写以降のウイルス複製過程を阻害することが明らかにされた。

現在、臨床使用されているアシクロビルは  $\alpha$  ヘルペスウイルス亜科に対して、また、ガンシクロビルは  $\beta$  ヘルペスウイルス亜科に抗ウイルス活性を示が、 $\gamma$  ヘルペスウイルス亜科の KSHV に対しては効果を持たない。本研究により、プロテアソーム阻害薬、および、HSP90 阻害剤が KSHV のウイルス増殖抑制活性を有していることが明らかになった。今後、さらに詳細な作用機序が明らかになれば、それらは抗 KSHV 薬設計や開発を行なうための有益な情報となると考えられる。

#### 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 8 件)

1. Nakazawa T, Ohmae T, Fujimuro M, Ito M, Nishinaga T, Iyoda M, Syntheses, molecular structures, and antiviral activities of 1- and

2-(20-deoxy-D-ribofuranosyl)cyclohepta[*d*][1,2,3]triazol-6(1H)-ones and 1-(20-deoxy-D-ribofuranosyl)cyclohepta[*b*]pyrrol-8(1H)-one. *Tetrahedron*, 2012 印刷中 査読あり

2. Higashi C, Saji C, Yamada K, Kagawa H, Ohga R, Taira T, Fujimuro M. The effects of heat shock protein 90 inhibitors on apoptosis and viral replication in primary effusion lymphoma cells. *Biol. Pharm. Bull.*, 35, 725-730, 2012 査読あり

3. Ashizawa A, Higashi C, Masuda K, Ohga R, Taira T and Fujimuro M, The ubiquitin system and Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Frontiers in Virology* 3, 66,

2012 査読あり

4. Saji C, Higashi C, Niinaka Y, Yamada K, Noguchi K, Fujimuro M. Proteasome inhibitors induce apoptosis and reduce viral replication in primary effusion lymphoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 415, 573-578, 2011 査読あり

5. Nishiya T, Matsumoto K, Maekawa S, Kajita E, Horinouchi T, Fujimuro M, Ogasawara K, Uehara T, Miwa S. Regulation of Inducible Nitric-oxide Synthase by the SPRY Domain- and SOCS Box-containing Proteins. *J Biol. Chem.*, 286, 9009-9019, 2011 査読あり

6. Niinaka Y, Harada K, Fujimuro M, Oda M, Haga A, Hosoki M, Uzawa N, Arai N, Yamaguchi S, Yamashiro M, and Raz A. Silencing of autocrine motility factor induces mesenchymal to epithelial transition and suppression of osteosarcoma pulmonary metastasis. *Cancer Res.*, 70, 9483-9493, 2010 査読あり

7. Yoshioka H, Noguchi K, Katayama K, Mitsuhashi J, Yamagoe S, Fujimuro M, Sugimoto Y. Functional availability of gamma-herpesvirus K-cyclin is regulated by cellular CDK6 and p16INK4a. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 394, 1000-1005 2010 査読あり

8. Ikeda O, Miyasaka Y, Yoshida R, Mizushima A, Oritani K, Sekine Y, Kuroda M, Yasui T, Fujimuro M, Muromoto R, Nanbo A, Matsuda T. BS69 cooperates with TRAF3 in the regulation of Epstein-Barr virus-derived LMP1/CTAR1-induced NF- $\kappa$ B activation. *FEBS Lett.* 584, 865-872, 2010 査読あり

[学会発表] (計 5 件)

1. Higashi Chizuka, Koji Yamada, Masahiro Fujimuro, Development of the novel strategy for the treatment of KSHV infection and KSHV-associated lymphomas. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress (IUMS2011) International Congress of Virology 札幌 2011 年 9 月 14 日 シンポジウム

2. Chie Suzuki, Masahiro Fujimuro, A viral mechanism for dysregulation of post-translational processing in Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus

latency. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress (IUMS2011) International Congress of Virology 札幌 2011年9月14日 シンポジウム

3. 藤室 雅弘 KSHV の発がんメカニズム 遺伝子病制御研究所 研究集会「感染と癌」 札幌 2010年1月18-19日

4. 藤室雅弘 「KSHV 感染を標的とした抗腫瘍・抗ウイルス化合物の開発」 第1回 山梨大学-星薬科大学 医薬連携シンポジウム 山梨 2010年9月6日

5. 藤室雅弘 「がんウイルスの生存戦略と人間によるウイルス制圧戦略：カポジ肉腫関連ヘルペスウイルスの発がん機構と抗ウイルス薬開発」 星薬科大学オープン・リサーチ・センター・シンポジウム 東京 2009年12月5日

[図書] (計2件)

1. 藤室雅弘, 横沢英良 (2010). プロテアソームとタンパク質分解. 生物薬科学実験講座「細胞の構造とオルガネラ」, pp. 117-131, 廣川書店, 東京.

2. 藤室雅弘. ウイルスによる分子海賊：カポジ肉腫関連ヘルペスウイルスによるユビキチンシステムとシグナル伝達の脱制御. 山梨医科学雑誌, Vol. 24, 39-53 2009

[その他]

ホームページ等

<http://www.kyoto-phu.ac.jp/labocellbiology/>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤室 雅弘 (FUJIMURO MASAHIRO)

研究者番号：20360927

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し