

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 25 年 6 月 8 日現在

機関番号：36102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22501000

研究課題名（和文） ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型由来のゲノム産物による宿主転写ネットワークの攪乱

研究課題名（英文） Disruption of transcription network of cellular genes by human T-cell leukemia virus type-1.

研究代表者 大島 隆幸 (TAKAYUKI OHSHIMA)

徳島文理大学・香川薬学部・准教授

研究者番号：10397557

研究成果の概要（和文）：

ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型 (HTLV-1) は成人 T 細胞白血病 (ATL) の原因ウイルスである。特にウイルスのマイナス鎖にコードされる basic leucine-zipper factor (HBZ) による宿主転写ネットワークの攪乱が ATL 発症と深く関わっていると考えられている。今回我々は、HBZ はインターフェロン産生で中心的な役割を果たす IRF-1 の機能を顕著に抑制し、IRF-1 によるアポトーシスを顕著に抑制することを見出した。また HBZ は核内外をシャトルすること、そして細胞質において GADD34 と相互作用し、mTOR 依存的な細胞自食であるオートファジーを抑制することを見出した。

研究成果の概要（英文）：

Human T-cell leukemia virus type-1 (HTLV-1) infection causes adult T-cell leukemia (ATL). Modulation of the transcriptional control of cellular genes by HTLV-1 is thought to be associated with the development of ATL. The viral protein HTLV-1 basic leucine-zipper factor (HBZ) has been shown to dysregulate the activity of cellular transcription factors. We evidence that HBZ reduced both IRF-1 DNA-binding activity and stability via a proteasome-dependent pathway. In addition, IRF-1-mediated apoptosis is significantly reduced by ectopic production of the HBZ. Also, we demonstrate that HBZ is exported from the nucleus to the cytoplasm, where it activates the mTOR signaling pathway through an association with growth arrest and DNA damage gene 34 (GADD34). Starvation-induced autophagy is significantly suppressed by the overexpression of HBZ.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
2012 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：総合生物

科研費の分科・細目：腫瘍学・発がん

キーワード：ウイルス、HTLV-1、転写制御、HBZ、発がん、オートファジー、細胞死

1. 研究開始当初の背景

ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型 (HTLV-1) は、成人 T 細胞白血病 (ATL) や HTLV-1 関連脊髄症／熱帯性瘧疾性麻痺 (HAM/TSP) の原因となるレトロウイルスであり、感染者は世界で約 2000 万人、日本では約 120 万人と推定されている。特に ATL は極めて悪性度の高い白血病であり、潜伏期間約 60 年を経て発症し、約 1 年後には半数が死亡する難治性の疾患である。HTLV-1 の主な感染経路は、母乳を介した母子感染であり、生後 1 年以内にキャリアとなり発がんのプロモーションがスタートすると考えることができる。その後、推定 5 つ以上の遺伝的変異を経て悪性化すると考えられており、実際にキャリアの約 5% 程度が ATL を発症する。この長い潜伏期間から急性の悪性腫瘍への転換は、子宮頸がんの原因であるパピローマウイルスや肝がんの原因である C 型肝炎ウイルスでも認められ、ATL の研究がウイルス性発がんのみでなく、一般的な多段階発がんの解明においても有用なモデルであると考えている。しかし、HTLV-1 が発見されてから約 35 年になるが、未だ ATL 発症に関する確証的な分子メカニズムは不明であり、効果的な治療法や予防法も確立されていない。

近年、ATL 発症とウイルスゲノムのマイナス鎖にコードされる HBZ (HTLV-1 basic leucine zipper factor) タンパク質との関連が注目されている。HBZ は N 末端に転写活性化領域、C 末端に bZIP 構造を有するタンパク質として 2003 年に同定された。HTLV-1 由来の他の遺伝子産物は、DNA のメチル化や欠損などにより ATL 患者由来の T 細胞での発現は必ずしも認められないが、HBZ に関しては例外なく発現が認められることから、HBZ が ATL 発症に必須な因子であると推測されているがその細胞内での機能はほとんど明らかにされていない。

2. 研究の目的

こうした背景をもとに、HBZ の細胞内での機能を明らかにすることを目的に以下の方法で研究を行った。

3. 研究の方法

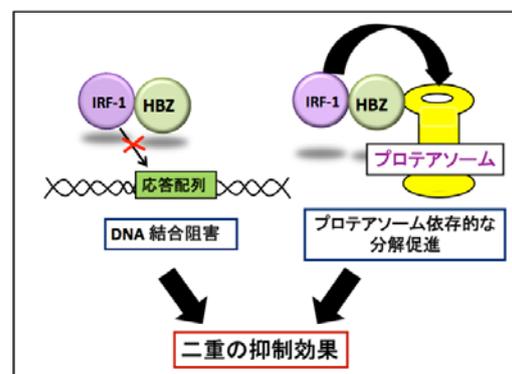
- (1), 酵母ツーハイブリッド法による HBZ と相互作用する宿主因子の同定
- (2), 得られた因子との動物細胞内での相互作用の検討
- (3), それぞれの相互作用する領域の決定と細胞内局在の解析
- (4), 得られた因子に対する HBZ の作用を解析

4. 研究成果

(1), ヒト脾臓由来の cDNA ライブラリーから、約 2.5×10^6 の独立したクローンをスクリーニングした結果、現在までに HBZ との相互作用が報告されている Jun ファミリーや ATF ファミリーなどの転写因子に加え、多数の宿主因子が同定された。その中から、抗ウイルス効果や免疫増強作用で中心的な役割を果たすインターフェロンの産生を担う転写因子 IRF-1 と HBZ との相互作用に着目して研究を行った。

(2) および (3), まずお互いの相互作用する領域を決定するために、それぞれの欠損変異体を作製した。そして動物内での相互作用を共免疫沈降法で検討した。その結果、IRF-1 側の結合領域の決定は出来なかったが、HBZ 側の相互作用する領域はアミノ末端 30 アミノ酸であることを明らかにした。またそれぞれの細胞内局在を解析した結果、双方共に核内に局在した。

(4), HBZ と IRF-1 の相互作用の意義を明らかにするために、IRF-1 の転写活性に対する HBZ の影響をルシフェラーゼアッセイによって検討した。その結果、HBZ は IRF-1 の転写活性を顕著に抑制することが明らかとなった。さらにこの抑制メカニズムを明らかにするために、IRF-1 の DNA 結合能への影響を DNA 沈降法によって検討した。また IRF-1 タンパク質の半減期をパルスチェイス法によって検討した。その結果、HBZ は IRF-1 の DNA への結合を阻害するとともに、ユビキチン化亢進を伴うプロテアソームによる分解を促進させ、その転写活性を顕著に抑制することを明らかにした。さらに HBZ は IRF-1 依存的なアポトーシスを強力に抑制することを見出した(下図)。

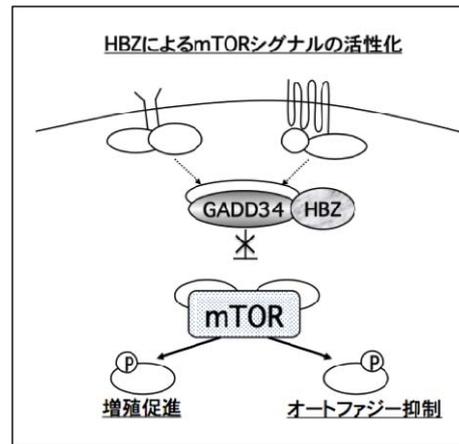


(1)、また、酵母ツーハイブリッド法によって得られた他の宿主因子の中で、特に DNA 損傷や飢餓状態によって発現が誘導される GADD34 との相互作用に着目し解析した。

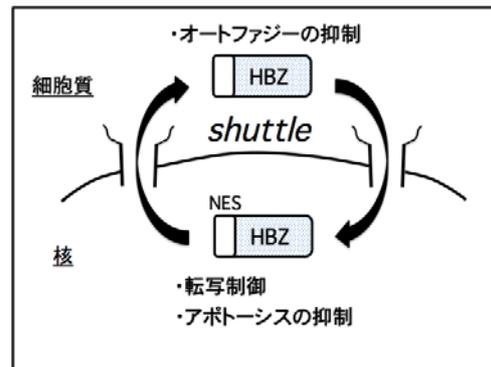
(2)および(3)、まず GADD34 と HBZ は動物細胞内で相互作用することを共免疫沈降法によって明らかにした。さらにそれぞれの結合最小領域を解析した結果、GADD34 のカルボキシル末端約 30 アミノ酸と HBZ のアミノ末端約 30 アミノ酸が相互作用することを明らかにした。さらにそれぞれの細胞内局在を検討した結果、通常核内に存在する HBZ は、GADD34 の共発現によりその局在を核から細胞質へと変化させることを見出した。また細胞をアルキル化剤の一つである MMS で処理することで、内在性の GADD34 を細胞内に発現させると、HBZ の局在が核から細胞質へシフトすることを明らかにした。これら結果から、HBZ には NLS に加え NES が存在することを示唆するものであり、さらに詳細に解析を行った。そして、HBZ はアミノ末端にロイシン残基に富んだ NES を 2 カ所有することを明らかにした。さらにこの NES 配列をアラニン残基に置換した変異体 HBZ は、核外輸送能が消失するばかりでなく、GADD34 との相互作用も認められなかった。この結果から、HBZ が GADD34 と相互作用するためには、HBZ の核外輸送が必要不可欠であることを明らかにした。

(4)、HBZ と GADD34 の相互作用の意義を明らかにするために、GADD34 の mTOR 活性の調節に着目して解析を行った。まず GADD34 の mTOR 活性の抑制能への影響を、mTOR の下流因子である S6K タンパク質のリン酸化状態をウェスタンブロッティング法によって検討した。その結果、HBZ の発現により mTOR の活性は顕著に促進した。この活性は、核外輸送シグナル欠損変異体 HBZ では認められなかったことから、HBZ は細胞質において GADD34 と相互作用し、mTOR のシグナルを恒常的に活性化していることが強く示唆された。

さらに mTOR の活性抑制は細胞の自食であるオートファジーを誘導するため、HBZ による GADD34 の抑制を介したオートファジーの抑制の可能性について検討した。その結果、HBZ は飢餓状態で誘導される GADD34→mTOR 抑制→オートファジーの経路を抑制することを明らかにした。これらの結果は、マウス繊維芽細胞のみでなく、ヒト T 細胞由来の Jurkat 細胞、および実際に ATL 患者由来のがん細胞から樹立された細胞株でも認められた (右図)。



以上の結果をまとめると、HBZ は核内においてアポトーシスや抗ウイルス活性に重要な宿主転写因子の活性を阻害すること、また細胞質においてはオートファジーを抑制することを明らかにした (下図)。



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 5 件)

1, Risa Mukai, and Takayuki Ohshima. HTLV-1 HBZ positively regulates the mTOR signaling pathway via inhibition of GADD34 activity in the cytoplasm. *Oncogene* in press.

2, Kazuo Torikoshi, Hideharu Abe, Takeshi Matsubara, Takahiro Hirano, Takayuki Ohshima, Taichi Murakami, Makoto Araki, Akira Mima, Noriyuki Iehara, Atsushi Fukatsu, Toru Kita, Hideyuki Arai, and Toshio Doi.

Protein inhibitor of activated STAT, PIASy regulates alpha-smooth muscle actin expression by interacting with E12 in

mesangial cells.
PLoS One (2012) 7, e41186-41199.

3, Risa Mukai, and Takayuki Ohshima.
Dual effects of HTLV-1 bZIP factor in suppression of interferon regulatory factor 1.
Biochem. Biophys. Res. Commun. (2011) 409, 328-332.

4, Takayuki Ohshima, Risa Mukai, Norie Nakahara, Jun Matsumoto, Osamu Isono, Yusuke Kobayashi, Satoru Takahashi, and Kunitada Shimotohno.
HTLV-1 basic leucine-zipper factor, HBZ, interacts with MafB and suppresses transcription through a Maf recognition element.
J. Cell. Biochem. (2010) 111, 187-194.

5, Takayuki Murata, Naoe Hotta, Shigenori Toyama, Sanae Nakayama, Shigeru Chiba, Hiroki Isomura, Takayuki Ohshima, Teru Kanda, and Tatsuya Tsurumi.
Transcriptional repression by sumoylation of Epstein-Barr virus BZLF1 protein correlates with association of histone deacetylase.
J. Biol. Chem. (2010) 285, 23925-23935.

[学会発表] (計 5 件)

1, Risa Mukai, and Takayuki Ohshima.
「HTLV-1 HBZ activates mTOR signaling pathway via inhibition of GADD34」、『15th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related viruses』、Belgium, June, 2011.

2, Risa Mukai, and Takayuki Ohshima.
「Ubiquitination-mediated degradation and DNA-binding impairment of IRF-1 were induced by HTLV-1 HBZ」、『International Union of Microbiological Societies 2011 Congress』、Sapporo, September, 2011.

3, 向井理紗、大島隆幸 「HTLV-1 HBZ は転写因子 large Maf ファミリーと相互作用して Maf の活性を抑制する」、『第 9 回 次世代を担う若手ファーマ・バイオフィオーラム 2010』、京都、2010 年 10 月

4, 向井理紗、大島隆幸 「HTLV-1 HBZ タンパク質による mTOR シグナルの活性制御機構」、『第 58 回 日本ウイルス学会学術集会』、徳島、2010 年 11 月

5, 向井理紗、大島隆幸 「mTOR シグナルの活

性化における HTLV-1 HBZ タンパク質の役割」、『第 33 回 日本分子生物学会年会 第 83 回 日本生化学会大会 合同大会』、神戸、2010 年 12 月

[その他]
ホームページ等

http://kp.bunri-u.ac.jp/course/yakuji_k.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大島隆幸 (TAKAYUKI OHSHIMA)
徳島文理大学香川薬学部・准教授
研究者番号：10397557