

## 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 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22790442

研究課題名（和文） ヘルペスウイルス免疫回避分子MIRによる免疫受容体認識の分子基盤

研究課題名（英文） The molecular basis of substrate recognition by KSHV MIR

研究代表者

梶川 瑞穂 (KAJIKAWA MIZUHO)

独立行政法人理化学研究所・感染免疫応答研究チーム・基礎科学特別研究員

研究者番号：00464389

研究成果の概要（和文）：カポジ肉腫関連ヘルペスウイルスの膜型ユビキチンリガーゼMIRは、免疫受容体をユビキチン化しリソソーム分解へと誘導する免疫回避分子である。本研究ではMIRによる免疫受容体認識の詳細な解明を試み、MIRが膜貫通領域および細胞外領域の二点で免疫受容体を認識することを発見した。分子基盤を解明するため、NMRによる構造決定を目的としたMIRの膜貫通領域および細胞外領域の大腸菌発現系構築と精製・可溶化法の開発を行った。

研究成果の概要（英文）：MIR is a membrane associated ubiquitin ligase family encoded in KSHV. MIR is an immune evasion molecule because it induces the lysosomal degradation of immunoreceptors by ubiquitination. In this study, I found that both transmembrane and extracellular region of MIR play a crucial role in immunoreceptor recognition. To clarify the molecular basis of this recognition, I developed a recombinant MIR expression system and a purification/solubilization method for NMR analysis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：ウイルス，免疫回避，免疫受容体，膜タンパク質，ユビキチンリガーゼ

## 1. 研究開始当初の背景

ヘルペスウイルスの一種であるカポジ肉腫関連ヘルペスウイルス（Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus: KSHV、別名 HHV-8）はヒトを宿主として潜伏感染し、後天性免疫不全症候群（Acquired immune deficiency syndrome: AIDS）発症や臓器移植時の免疫抑制剤投与などによる宿主免疫の著しい低下時に再活性化し、重篤な腫瘍を

発症する。KSHV にコードされている初期遺伝子産物 MIR（Modulator of immune recognition）は、MIR1（別名 K3）および MIR2（別名 K5）をメンバーとする膜型 E3 ユビキチンリガーゼファミリーであり、溶解感染時に発現して宿主細胞表面に発現する各種免疫受容体をユビキチン化する。MIR ファミリーには基質特異性が存在し、MIR1 は主要組織的合成複合体クラス I（MHC-I）を、MIR2 は

MHC-I、B7-2、ICAM-1を基質とすることがわかっている。MIRファミリーによってユビキチン化された免疫受容体は分解されるため、細胞表面の免疫受容体が減少することになる。通常、MHC-IやB7-2などの免疫受容体の細胞表面発現はウイルス感染に伴って亢進し、免疫担当細胞であるTリンパ球に対して活性化を促進する刺激を与えることで、感染細胞は活性化Tリンパ球によって排除される。しかしながらKSHVはMIRを発現するため、ユビキチン化によって感染細胞の表面からこれらの免疫受容体を減少させてしまい、Tリンパ球の活性化を阻害する(図1)。以上のことからMIRはKSHVの免疫回避分子として機能すると考えられ、この働きはKSHV再活性化時の溶解感染にとって重要であると考えられている。そのため、MIRの機能を理解することは、KSHV溶解感染の制御やカポジ肉腫治療法の開発のために重要なポイントである。

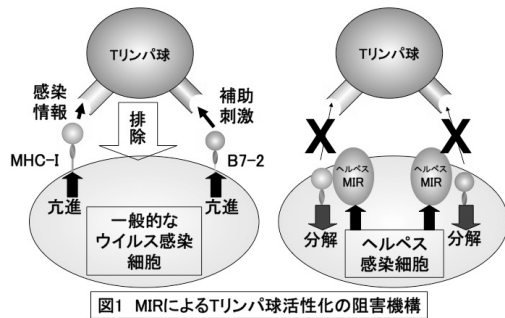


図1 MIRによるTリンパ球活性化の阻害機構

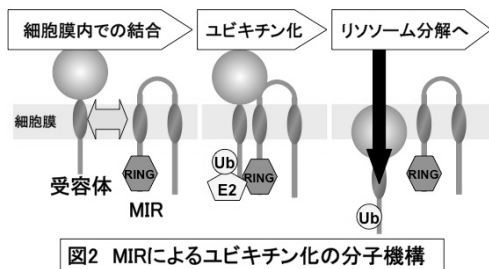


図2 MIRによるユビキチン化の分子機構

MIRによる免疫受容体のユビキチン化の分子機構を図2に示した。二回膜貫通型の膜タンパク質であるMIRは、細胞質領域にユビキチン結合酵素E2と結合するRINGドメインを有している。MIRは膜貫通領域をもって免疫受容体に結合すると考えられている。結合に引き続いてRINGドメインがE2と結合することで、免疫受容体の細胞質領域にE2およびそれに結合するユビキチンがリクルートされ、リジン残基もしくはシステイン残基にユビキチンが付加される。ユビキチン化された免疫受容体はエンドサイトーシスされ、最終

的にリソソームに送られて分解される。以上がMIRによる免疫受容体分解の分子機構であるが、MIRが膜結合型のユビキチンリガーゼであること、免疫受容体を膜貫通領域内で認識することは、既知のE3ユビキチンリガーゼ群とは全く異なるMIR独自の性状である。MIRによる免疫受容体認識を特異的に阻害する方法を開発すれば、KSHVの溶解感染を収束させ腫瘍形成を制御することが可能になると期待できるが、免疫受容体認識の分子基盤は未だ不明であり、現段階では阻害剤の設計は困難である。

## 2. 研究の目的

KSHV MIRの働きを人為的に抑制することで腫瘍形成を制御する方法を開発するため、本研究はMIRによる免疫受容体認識の分子基盤について、生化学および構造生物学によって明らかにすることを目的とする。

(1) 先行研究によって、MIRは膜貫通領域によってのみ免疫受容体を認識するものとされているが、詳細な解析がなされていない。そこでMIRによる免疫受容体の認識領域を正しく特定することを目指す。

(2) MIRによる免疫受容体認識の分子基盤を原子レベルで詳細に明らかにするため、X線結晶構造解析およびNMR解析を軸とした構造生物学的手法によって、MIRと免疫受容体間の相互作用を詳細に解明することを目指す。

## 3. 研究の方法

(1) 免疫受容体を「細胞外領域」「膜貫通領域」「細胞質領域」に区分けし、ヒト免疫受容体B7-2をモデル基質として、基質とならない別の免疫受容体(ヒトCD8 $\alpha$ )との領域ごとのキメラ分子を設計した。これらをコードする発現ベクターを構築し、MIRファミリーメンバーであるMIR2の発現ベクターと共にエレクトロポレーションすることで培養細胞へと一過性導入した。それぞれのキメラ分子がMIR2の基質となるかどうかについて、キメラ分子の細胞表面発現を指標としてフローサイトメトリーにより解析した。MIR2についても「細胞外領域」「膜貫通領域」「細胞内領域」の三つの領域で捉え、B7-2を基質としないMIR1とのキメラ解析によってB7-2認識に必要なとされる領域の特定を行った。特定された領域について網羅的な変異体解析を行い、認識の分子基盤を推定した。

(2) MIRと基質の結合状態でのX線結晶構造解析を行うため、MIRと基質をポリペプチドレベルで連結した単一ポリペプチド鎖

(Single Chain: SC)を設計し、SCの大量発現・精製・可溶化を試みた。また、NMRによ

る構造決定と相互作用解析を行うため、MIR 膜貫通領域および細胞外領域のみの発現系を構築し、大腸菌を宿主とした大量発現、変性状態での精製、および界面活性剤による可溶化を行った。

#### 4. 研究成果

(1) ヒト B7-2 とヒト CD8 のキメラ分子について MIR2 による分解の有無を調べ、B7-2 は膜貫通領域および細胞外領域のいずれかが存在すれば MIR2 により認識されて分解を受けることを明らかにした。MIR による免疫受容体細胞外領域の認識は本研究によって初めて明らかにされたものであり、B7-2 細胞外領域の更なる分割によるキメラ解析および変異体解析の結果、B7-2 細胞外領域の中でも特に膜に近い Asp244 を中心とした膜近傍領域が MIR2 による認識に重要であることが明らかになった。さらに、MIR2 側の変異解析により、MIR2 の二本の膜貫通領域をつなぐ 10 アミノ酸残基からなる短い細胞外領域が B7-2 膜近傍領域を認識することが判明した。アラニンスキャンニングの結果、その働きには MIR2 細胞外領域上の Phe119 および Ser120 が必須であることが明らかになった。加えて、MIR2 の Phe119 をチロシンに変更しても B7-2 膜近傍領域依存的に分解が起きること、Ser120 をスレオニンに変更しても同様であることから、Phe119 側鎖の芳香環および Ser120 側鎖の水酸基が B7-2 認識に必須であることが示唆された。以上の成果をまとめ、MIR によるヒト免疫受容体の二価の認識機構として Journal of Virology 誌に報告した(図 3)。

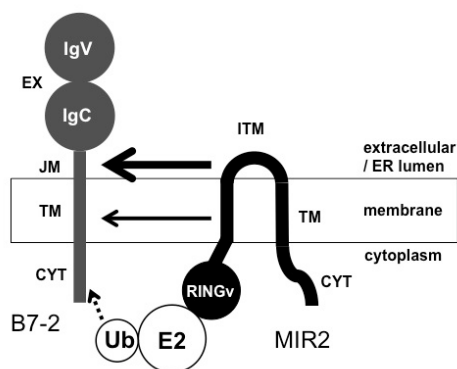


図3 KSHV MIR2によるB7-2認識機構

(2) MIR による免疫受容体認識に必要とされる細胞外領域および膜貫通領域について、認識の詳細な分子基盤を明らかにする為に、MIR と免疫受容体の複合体状態での X 線結晶構造解析を試みた。MIR 全長と免疫受容体全

長を連結した SC の発現ベクターを作製し、ヒト培養細胞および昆虫培養細胞に導入することで SC を発現させることに成功したが、構造解析に耐えうる安定な可溶性・精製条件の決定には至らなかった。そこで溶液 NMR による界面活性剤ミセル中での構造決定および基質との相互作用解析を目的とし、MIR の膜貫通領域および細胞外領域部分のみについての発現ベクターを作製し、大腸菌を宿主とした発現系の構築と精製法および可溶化法の開発と最適化を行った。組換え MIR (膜貫通領域+細胞外領域) は大腸菌で封入体として十分量発現し、単離した封入体をグアニジンによって可溶化したものを二段階のクロマトグラフィーにより高純度に精製した。精製産物について質量分析を行い、精製産物が目的の組換え MIR であることを確認した。変性状態の精製産物は各種界面活性剤で溶解し、円偏光二色性測定によって二次構造含量を測定することで巻き戻しの正否を判断した。さらに NMR を用いて  $^1\text{H}-^{15}\text{N}$  HSQC 測定を行い、凝集形成の有無を HSQC スペクトルから判断し、構造決定に耐えうる可溶化条件の最適化に成功した。

#### 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 1 件)

- ① Mizuho Kajikawa, Pai-Chi Li, Eiji Goto, Naoyuki Miyashita, Masami Aoki-Kawasumi, Mari Mito-Yoshida, Mika Ikegaya, Yuji Sugita, Satoshi Ishido  
The inter-transmembrane region of KSHV MIR2 contributes to B7-2 downregulation.  
*Journal of Virology*, 86, 5288-5296, 2012, 査読有り

[学会発表] (計 2 件)

- ① Mizuho Kajikawa, Eiji Goto, Pai-Chi Li, Naoyuki Miyashita, Masami Aoki-Kawasumi, Mari Mito-Yoshida, Yuji Sugita, Satoshi Ishido  
Molecular basis for immunoreceptor recognition by MIR2 ubiquitin ligase of KSHV.  
International Unions of Microbiological Societies 2011 Congress, the XV Congress of Virology, 2011 年 9 月 15 日, 札幌
- ② 梶川瑞穂, 後藤栄治, Li Pai-Chi, 宮下尚之, 青木-川住雅美, 水戸-吉田麻理, 杉田有治, 石戸聡  
カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス免疫回

避分子 MIR2 による B7-2 認識の分子基盤  
第 11 回日本蛋白質科学会年会, 2011 年 6  
月 8 日, 吹田

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

梶川 瑞穂 (KAJIKAWA MIZUHO)

独立行政法人理化学研究所・感染免疫応答研  
究チーム・基礎科学特別研究員

研究者番号: 00464389