

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：36102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430128

研究課題名(和文) HTLV-1 HBZタンパク質によるストレス応答シグナルの攪乱

研究課題名(英文) Disruption of signaling responded to stress by HTLV-1 bZIP factor

研究代表者

大島 隆幸 (TAKAYUKI, OHSHIMA)

徳島文理大学・薬学部・准教授

研究者番号：10397557

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

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HBZはATL発症に深く関与することが示唆されている。今回我々は、HBZの細胞内での機能に着目し、以下の2点について明らかにした。1)、HBZは染色体分配に重要なCENP-Bと互いの中央領域を介して相互作用し、CENP-Bの機能を阻害することを見出した。2)、HBZとcullin型E3ユビキチンリガーゼ複合体の構成因子であるCullin 1(CUL1)と相互作用し、基質タンパク質の安定化に寄与することを明らかにした。

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). The viral protein HTLV-1 HBZ is thought to be associated with the development of ATL. We focused to cellular function of HBZ and defined the following two 2 points. 1), HBZ and CENP-B associate with their central regions in cells. Furthermore, overexpression of HBZ abrogated the DNA-binding activity of CENP-B to the -satellite DNA region containing the CENP-B box motif, which in turn inhibited the CENP-B-mediated trimethylation of histone H3K9 in T-cells. 2), HBZ interacted with cullin 1 (CUL1) through a head-to-tail and the expression of HBZ in cells stabilized MCL1 protein expression.

研究分野：細胞分子生物学

キーワード：ウイルス HTLV-1 HBZ 発がん 翻訳後修飾 転写制御 細胞死 ユビキチン

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/熱帯性痲痺 (HAM/TSP) の原因となるレトロウイルスであり、その感染者は世界で約2000万人、日本では約100万人と推定されている。HTLV-1の感染が原因となる疾患の中で、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、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、多数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、子宮がんの原因であるパピロームウイルスや肝がんの原因である肝炎ウイルスでも認められ、ATLの研究がHTLV-1のみでなく、ウイルス性の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40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。HBZ以外のHTLV-1由来の他の遺伝子産物は、そのプロモーター領域のメチル化や欠損などにより約半数のATL患者由来のT細胞では遺伝子の発現は認められないが、HBZに関しては例外なく発現が認められることから、HBZこそがATL発症に必要な不可欠な因子であると推測されているが、その細胞内での生理学的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、ATL発症機序を明らかにするために、まず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

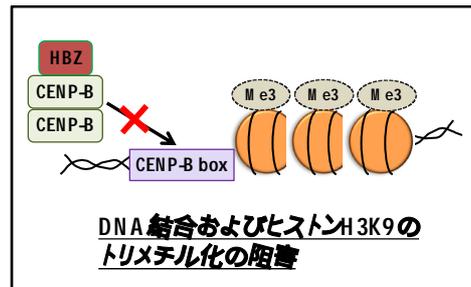
- (1), 酵母ツーハイブリッド法によるHBZと相互作用する宿主因子の同定
- (2), 得られた因子との動物細胞内での相互作用の検討
- (3), それぞれの相互作用する領域の決定と細胞内局在の解析
- (4), 得られた因子に対するHBZの作用を解析
- (5), ATL患者由来の細胞株を用いた生理学的意義の解析

4. 研究成果

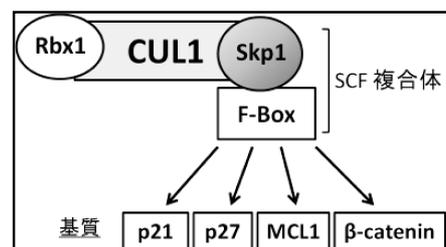
(1), これまでにヒト脾臓由来のcDNAライブラリーから、約 2.5×10^6 の独立したクローンをスクリーニングした結果、HBZとの相互作用が報告されているJunファミリーやATFファミリーなどの転写因子に加え、多数の宿主因子が同定された。その中から、染色体のキネトコア構成因子の1つであり、染色体分配に関与するとされるcentromere protein B (CENP-B)とHBZとの相互作用に着目して研究を行った。

(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、HBZとCENP-Bは互いの中央領域を介して相互作用す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CENP-Bの相互作用の意義を明らかにするために、CENP-Bのセントロメア領域のDNA結合能に対するHBZの影響をDNA沈降法によって検討した。その結果、HBZはCENP-Bの二量体形成には影響を与えないが、DNA結合を顕著に抑制することが明らかとなった。さらにCENP-B依存的なヒストンH3K9のトリメチル化に対する影響をウエスタンブロット法およびChipアッセイにより解析した。その結果、HBZはCENP-B依存的なヒストンH3K9のトリメチル化修飾を阻害することを明らかにした(下図)。

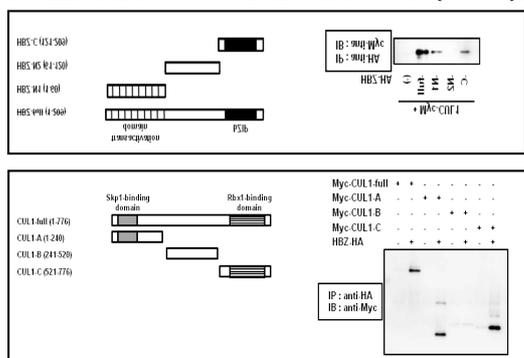


(1), また、酵母ツーハイブリッド法によって得られた他の宿主因子の中で、特にcullin型E3ユビキチンリガーゼ複合体の構成因子であるCullin1 (CUL1)との相互作用に着目して解析した。



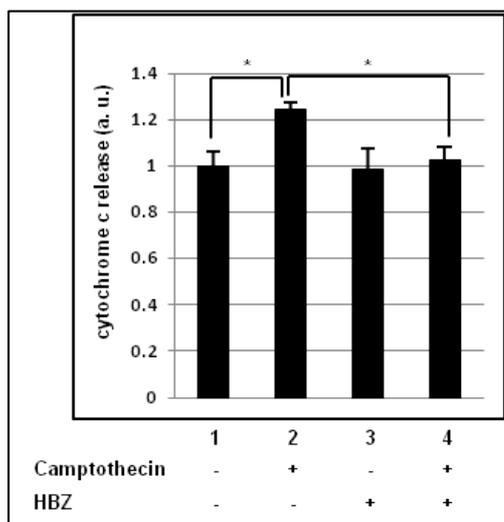
(2)および(3), まずCUL1とHBZは動物細胞内で相互作用することを共免疫沈降法によ

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、互いに head to tail で相互作用することを明らかにした(下図)。

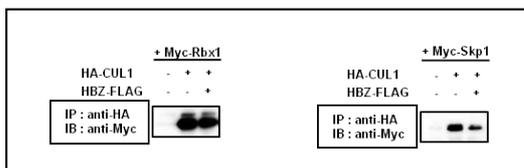


(4), HBZ を細胞内に過剰発現させた場合、CUL1 の基質である MCL1 および p27 のポリユビキチン化は顕著に抑制されたため、HBZ はこれらのタンパク質の安定化に寄与することが示唆された。

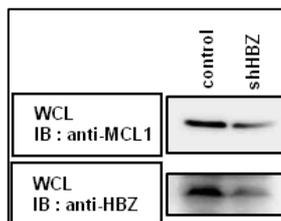
また MCL1 のアポトーシス促進活性の指標として、ミトコンドリアからのチトクローム c の放出を測定したところ、HBZ の発現によって抑制されることを明らかにした。



この CUL1 の機能障害の詳細を解析した結果、HBZ は複合体アダプタータンパク質として機能する Skp1 の複合体へのリクルートを阻害することが明らかになった。



(5), さらに実際の ATL 患者由来の細胞株を用い、shRNA によって HBZ をノックダウンした場合、MCL1 の細胞内発現量は顕著に減少することを見出した。



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)

1, Risa Mukai, and Takayuki Ohshima.

Enhanced stabilization of MCL1 by HTLV-1 bZIP factor is modulated by blocking the recruitment of Cullin1 to the SCF complex. *Mol. Cell. Biol.* (2016) **36**, 3075-3085.

2, Mukai, R., Ohshima, T. HTLV-1 bZIP factor suppresses the centrosome protein B (CENP-B)-mediated trimethylation of histone H3K9 through the abrogation of DNA binding ability of CENP-B. *J. Gen. Virol.* (2015) **96**, 159-164.

[学会発表](計 件)

1, 18th International Conference on Human Retrovirology, March 7-10, 2017 Tokyo

2, 向井理紗、大島隆幸「平成 27 年度 がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動 公開シンポジウム」2016 年 2 月、東京

3, Risa Mukai, Yukari Tan, Yuya Tanaka, Takayuki Ohshima. 第 63 回 日本ウイルス学会学術総会、2015 年 11 月、福岡

4, 向井理紗、丹由香里、田中雄也、大島隆幸 第 2 回 日本 HTLV-1 学会学術集会、2015 年 8 月 東京

[その他]

ホームページ等

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

新聞報道等

1, 向井理紗, 2016 年 3 月 15 日, 愛媛新聞

2, 向井理紗, 2016 年 3 月 15 日, 読売新聞

3, 向井理紗, 2016 年 3 月 25 日, 科学新聞社

4, 向井理紗, 2016 年 4 月 6 日, 産経新聞

5, 向井理紗, 2016 年 4 月 14 日, 毎日新聞

6, 向井理紗, 2016 年 4 月 21 日, 四国新聞

7, 向井理紗, 2016 年 6 月 16 日, 週刊新潮

8, 向井理紗, 2016 年 6 月 24 日, FM 香川

9, 向井理紗, 2016年7月5日, News ZERO, 日本テレビ

10, 向井理紗, 2016年11月26日, 四国新聞

11, 向井理紗, 2017年2月20日, 香川こまち 3月号

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

(2) 研究分担者

向井理紗 (RISA MUKAI)
徳島文理大学香川薬学部・博士研究員
研究者番号: 90607996