

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26840062

研究課題名(和文) HTLV-1 Taxによるユビキチン修飾を介したIKK複合体活性化機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of HTLV-1 Tax-induced IKK activation pathway

研究代表者

柴田 佑里 (SHIBATA, Yuri)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：20722573

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：成人T細胞白血病の原因ウイルスHTLV-1にコードされるTaxタンパク質は、転写因子NF- $\kappa$ Bの活性化を介して細胞不死化、がん化を誘導する。本研究では、Tax誘導性のNF- $\kappa$ B活性化機構の詳細な解析を行った。その結果、Taxは複数の結合様式が混在する混合型のポリユビキチン鎖を誘導すること、混合型ポリユビキチン鎖は高分子複合体形成を促進してIKK複合体活性化を誘導することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：HTLV-1 Tax-induced persistent activation of transcription factor NF- $\kappa$ B is crucial for cell immortalization and the onset of ATL. Here, we analyzed the precise mechanism underlying Tax-induced NF- $\kappa$ B activation pathway. We found that Tax induces hybrid ubiquitin chains, which enhance the formation of macromolecular complex of active IKK complex.

研究分野：生物科学

キーワード：HTLV-1 Tax ATL ユビキチン修飾 NF- $\kappa$ B

1. 研究開始当初の背景

成人T細胞白血病 (adult T-cell leukemia, ATL) は悪性度の高い白血病で、ヒトT細胞白血病ウイルス1型 (human T-cell leukemia virus type 1, HTLV-1) の感染により発症する。HTLV-1 にコードされる Tax タンパク質は宿主T細胞の転写因子 nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) の恒常的活性化を誘導し、T細胞のがん化を引き起こす。転写因子 NF- $\kappa$ B の活性化は抑制因子 inhibitor of NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B) のリン酸化、分解が引き金となって誘導されるが、これはキナーゼ活性を有する I $\kappa$ B kinase (IKK) と IKK、調節サブユニット NF- $\kappa$ B essential modulator (NEMO) から構成される IKK 複合体によって厳密に制御されている。Tax は NEMO に結合し、IKK 複合体の恒常的な活性化を誘導するが、その詳細な活性化機構は明らかとなっていなかった。

これまでに、我々は組換え Tax タンパク質と Jurkat 細胞質抽出液を用いて、*in vitro* において Tax 誘導性 IKK 複合体活性化を解析できる cell-free 反応系を確立した (図1)。さらに、組換え Tax 単独では精製した IKK 複合体を活性化できず、細胞質中に存在する因子がこの経路に必要であることが示唆されていた。その候補として、我々はユビキチン修飾系に注目した。ユビキチン修飾は、ユビキチン活性化酵素 (E1)、ユビキチン結合酵素 (E2)、ユビキチンリガーゼ (E3) の連続的な酵素反応により、ユビキチンが基質分子に付加される反応である。ポリユビキチン鎖はユビキチン同士が繰り返し結合することで形成されるが、生体内ではユビキチンの7個のリシン残基およびN末端メチオニン残基のアミノ基を介した計8種類の鎖型のポリユビキチン鎖が存在する (図2)。興味深いことに、近年、ポリユビキチン鎖はプロテアソーム分解の指標として機能するだけでなく、アダプターとしてシグナル伝達複合体形成に寄与することが明らかとなっている。特に、サイトカイン誘導性の NF- $\kappa$ B 活性化経路において、非分解性の K63 型および直鎖状ポリユビキチン鎖を介したシグナル伝達制御の解析が進んでいる。上述のように、ポリユビキチン鎖は鎖型の構造的多様性によりさまざまな機能を発揮するため、鎖型の解析は重

要である。また、E2 と E3 リガーゼがポリユビキチン鎖の型と基質を決定するため、これら酵素の同定も重要である。Tax 誘導性の IKK 複合体活性化経路に関して、ポリユビキチン鎖形成が IKK 複合体活性化に関与するという結果を得ていたが、必要とされるポリユビキチン鎖の型やユビキチンリガーゼ、またポリユビキチン鎖が IKK 複合体活性化を誘導するメカニズムの全容は不明であった。



(図2) ポリユビキチン鎖の型と機能について

2. 研究の目的

Tax 誘導性の IKK 複合体活性化に必要なポリユビキチン鎖の型、E2 および E3 リガーゼの同定、Tax 誘導性の IKK 複合体活性化機構におけるポリユビキチン鎖の役割の解析を行い、ATL 発症予防などの臨床応用に展開するための基盤研究を目的とした。

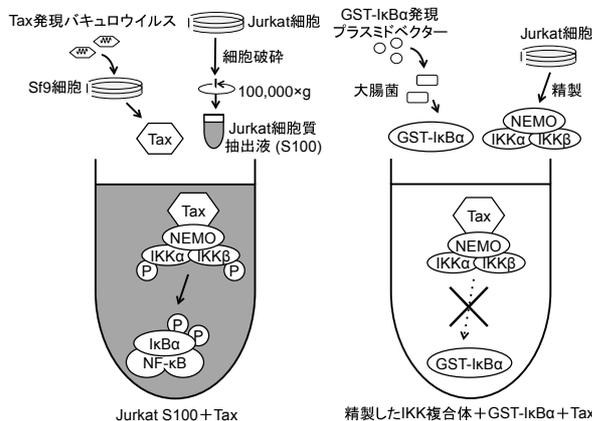
3. 研究の方法

(1) Tax 誘導性の IKK 複合体活性化に必要なポリユビキチン鎖の型の解析

ユビキチンに含まれる7個のリシン残基をそれぞれアルギニン残基に置換したユビキチン変異体 (K6R、K11R、K27R、K29R、K33R、K48R、K63R) を添加して cell-free 反応を行い、各ユビキチン変異体が Tax 誘導性の IKK 複合体活性化に影響を与えるか検討する。同時に、N末端に HA タグを付加したユビキチンを添加して、直鎖状のポリユビキチン鎖形成を抑制した際の Tax 誘導性 IKK 複合体活性化への影響も確認する。また、Tax-IKK 複合体に含まれるポリユビキチン鎖の型を、質量分析を用いた絶対定量法 (ユビキチン AQUA) により解析する。ポリユビキチン鎖はユビキチンのリシン残基と別のユビキチンのC末端間のイソペプチド結合により形成される。ユビキチンC末端の配列は RGG となっており、トリプシン消化により標的のリシン残基に GG が付加したペプチドが生じる。そのため、どのリシン残基にイソペプチド結合が形成されたかを質量分析により識別し、ユビキチン鎖の型を判別することができる。

(2) Tax 誘導性の IKK 複合体活性化経路に必要な E2 および E3 リガーゼの同定

活性中心に変異を導入した E2 ドミナントネガティブ変異体を作製し、この変異体を強制発現させた細胞の細胞質抽出液を用いて cell-free 反応を行う。E2 ドミナント変異体が Tax 誘導性の IKK 複合体活性化に影響を与えるかどうか検討を行う。上記実験により E2 の候補を決定した後、siRNA を用いて候補 E2



(図1) Cell-free反応系の概略図

の発現を抑制する。その細胞質抽出液を用いて cell-free を行い、候補 E2 が Tax 誘導性の IKK 複合体活性化に関与するかどうかを確認する。E3 リガーゼの同定に関しては、はじめに Tax が E3 リガーゼとして機能するかどうか検討を行う。ジンクフィンガードメインは E3 リガーゼ活性を持ち得ることから、N 末端にジンクフィンガーを有する Tax も E3 リガーゼとして機能する可能性がある。In vitro においてユビキチン化反応を行い、Tax がポリユビキチン鎖形成を誘導できるか検討を行う。また、(1)において決定したポリユビキチン鎖の型を誘導する E3 リガーゼの関与も検討する。

### (3) ポリユビキチン鎖が IKK 複合体活性化を誘導する機構の解析

ポリユビキチン鎖が IKK 複合体活性化を誘導する機構として、IKK 複合体を活性化するキナーゼがポリユビキチン鎖依存的にリクルートされる可能性、ポリユビキチン鎖依存的に IKK 複合体同士が巨大な複合体を形成してトランス自己リン酸化が誘導される可能性が考えられる。に関しては、cell-free 反応系において IKK 複合体活性化を誘導した後、免疫沈降法により Tax-IKK 複合体を精製する。この複合体に含まれるタンパク質を質量分析により網羅的に解析し、IKK 複合体活性化を誘導し得るキナーゼが含まれているか確認する。に関しては、cell-free 反応系において、Tax 依存的に高分子複合体が形成されるかどうか、またユビキチン変異体によってその形成が抑制されるかどうか検討を行う。

## 4. 研究成果

### (1) Tax 誘導性の IKK 複合体活性化に必要なポリユビキチン鎖の型の解析

ユビキチン変異体のうち、K6R、K11R、K29R、K33R、K48R は Tax 誘導性の IKK 複合体活性化に影響を与えなかった。一方、K27R、K63R および HA 付加ユビキチン添加により、Tax 誘導性の IKK 複合体活性化が顕著に抑制された。この結果から、この経路に K27 型、K63 型および直鎖状ポリユビキチン鎖が必要であることが示唆された。また、Tax により IKK 複合体を活性化した際に、Tax-IKK 複合体に含まれるポリユビキチン鎖の型を質量分析により解析した。Tax を添加せずに cell-free 反応を行ったものをコントロールとした。K6、K11、K27、K33 型のポリユビキチン鎖は、コントロールおよび活性化 IKK 複合体どちらにおいても検出できなかった。K48 型のポリユビキチン鎖は少量検出されたが、コントロールと Tax を添加した場合で差がなかったことから、バックグラウンドとして Tax 非依存的なポリユビキチン鎖を検出したと考えられる。コントロールにおいて、K63 型および直鎖状ポリユビキチン鎖は検出されなかったが、Tax により活性化した IKK 複合体には K63

型、直鎖状のポリユビキチン鎖が共に含まれていた。(1)の結果と反して K27 型ポリユビキチン鎖が検出できなかった理由として、K27 型のポリユビキチン鎖は質量分析で検出限界以下の量で十分に IKK 複合体活性化を誘導できる可能性、K27 型ポリユビキチン化タンパク質は Tax-IKK 複合体以外で誘導されている可能性、ユビキチン変異体の実験が人為的結果である可能性が考えられる。

### (2) Tax 誘導性の IKK 複合体活性化経路に必要な E2 および E3 リガーゼの同定

Tax のジンクフィンガードメインが E3 リガーゼ活性を有するのではないかと仮説を立て、ジンクフィンガードメインの点変異体を作製した。Tax ジンクフィンガードメイン変異体は、IKK 複合体活性化および NF- $\kappa$ B 活性化を誘導できなかった。次に、組換え Tax タンパク質を用いて in vitro においてユビキチン化反応を行った。E2 は UbcH5c、UbcH7、Ubc13/Uev1a を用いた。どの E2 を用いた場合においても、Tax はポリユビキチン鎖形成を誘導できなかった。Tax のジンクフィンガードメインは IKK 複合体活性化に必要なものの、E3 リガーゼ活性はないことが明らかになった。

(1)において、K63 型および直鎖状のポリユビキチン鎖が Tax 誘導性の IKK 複合体活性化に必要なことが示されたため、これらの型を誘導することが報告されている E3 リガーゼに注目した。K63 型を誘導する E3 リガーゼとして、TRAF6、TRAF2/5、cIAP1/2、TRIM25 および Riplet が知られている。そこで、これらの E3 リガーゼ欠損マウス胎児繊維芽細胞から細胞質抽出液を調製し、cell-free 反応を行った。Tax は野生型および E3 リガーゼ欠損細胞質抽出液どちらにおいても IKK 複合体活性化を誘導できたことから、既知の K63 型 E3 リガーゼはこの経路に関与しないことが示唆された。一方、直鎖状ポリユビキチン鎖を誘導する E3 リガーゼとして linear ubiquitin chain assembly complex (LUBAC) が知られている。LUBAC は E3 リガーゼ活性を有する HOIP と HOIL-1L、Sharpin で構成される。LUBAC 構成分子を欠損させたマウス胎児繊維芽細胞から細胞質抽出液を調製して cell-free 反応を行ったところ、LUBAC 構成分子欠損細胞質抽出液では Tax 誘導性の IKK 複合体活性化が消失した。免疫沈降実験により、LUBAC は Tax 依存的に IKK 複合体にリクルートされることも見いだした。さらに、Tax がどの LUBAC 構成分子と結合するのかを明らかにするために、in vitro における結合実験を行った。その結果、Tax は HOIL-1L および HOIP と結合した。HOIL-1L および HOIP のドメイン欠損変異体と Tax を強制発現させた細胞を用いて共免疫沈降実験を行い、HOIL-1L と HOIP の Tax 結合ドメインを決定した。

Tax 誘導性の IKK 複合体活性化は細胞質で起きるため、細胞質に局在する E2 を選定し

た。Ubc1、Ubc2、UbcH5a、UbcH5b、UbcH5c、Ubc6、UbcH7、Ubc9、Ubc13、Ubc17、E2G1、E2Q2 のドミナントネガティブ変異体を作製し、293T 細胞に強制発現させた。その細胞質抽出液を用いて cell-free 反応を行った結果、Ubc13 のドミナントネガティブ変異体を発現させた場合のみ、Tax 誘導性の IKK 複合体活性化が抑制された。さらに、Ubc13 欠損マウス胎児繊維芽細胞から細胞質抽出液を調製して cell-free 反応を行ったところ、Tax は IKK 複合体活性化を誘導することができなかった。以上の結果から、Tax 誘導性の IKK 複合体活性化に Ubc13 が必要であることが示された。LUBAC は *in vitro* のユビキチン化反応において、E2-25K、UbcH5a、UbcH5b、UbcH5c、および UbcH7 を E2 として用いた際にポリユビキチン鎖を形成することが示されている。そのため、直鎖状のポリユビキチン鎖形成を抑制するためには 1 種類の E2 ドミナントネガティブ変異体では不十分であり、組み合わせて発現させる必要があるのかもしれない。

### (3) ポリユビキチン鎖が IKK 複合体活性化を誘導する機構の解析

脱ユビキチン化酵素のなかには高い鎖型特異性を有するものがある。Otubain-1 は K48 型、AMSH は K63 型、OTULIN は直鎖状ポリユビキチン鎖を特異的に切断する。Cell-free 反応後に Tax-IKK 複合体を精製し、*in vitro* において脱ユビキチン化酵素反応を行った。Otubain-1 処理は Tax-IKK 複合体に含まれるポリユビキチン鎖を切断できなかったのに対し、AMSH 処理によりほぼ全てのポリユビキチン鎖が消失した。興味深いことに、OTULIN 処理により高分子量のポリユビキチン鎖は部分的に減少し、低分子量のポリユビキチン鎖が生じた。OTULIN 処理により生じたポリユビキチン鎖は、K63 型のポリユビキチン鎖と同じ電気泳動パターンを示したことから、Tax により誘導されるポリユビキチン鎖は K63 型と直鎖状が混在した混合鎖であることが示唆された。

Cell-free 反応を行った後、blue Native-PAGE により高分子複合体が形成されているか検討を行ったところ、Tax 依存的に 1000kDa 以上の高分子複合体が形成されること、また、ユビキチン変異体添加によりその複合体形成が抑制されることを明らかにした。さらに、質量分析により Tax-IKK 複合体に含まれるタンパク質を解析したところ、IKK 複合体を活性化し得るキナーゼは同定できなかった。ポリユビキチン鎖は IKK 複合体同士の巨大な複合体を形成してトランス自己リン酸化を誘導する可能性が高い。

本研究において、Tax 誘導性の IKK 複合体活性化に複数の型のポリユビキチン鎖が必要であることを明らかにした。Tax は H01L-1L および H01P と直接結合するため、これらの結合を阻害する低分子化合物は ATL 予防に繋

がる可能性がある。今後は、K27 型と K63 型ポリユビキチン鎖を誘導する E3 リガーゼの同定を行いたいと考えている。

## 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0件)

[学会発表](計6件)

Yuri Shibata and Jun-ichiro Inoue  
Analysis of HTLV-1 Tax-induced IKK activation pathway  
Keystone symposia, 2016/3/16, Whistler (Canada)

Yuri Shibata and Jun-ichiro Inoue  
The role of polyubiquitin chains in HTLV-1 Tax-induced IKK activation  
East Asia Joint Symposium, 2015/11/12, OIST (沖縄)

柴田 佑里、井上 純一郎

HTLV-1 Tax 誘導性の IKK 複合体活性化におけるポリユビキチン鎖の機能解析  
第2回日本HTLV-1学会学術集会, 2015/8/22, 東京大学医科学研究所 (東京・港区)

柴田 佑里、井上 純一郎

HTLV-1 Tax 誘導性の IKK 複合体活性化に必要なユビキチンリガーゼの同定  
第37回日本分子生物学会年会, 2014/11/26, パシフィコ横浜 (神奈川・横浜)

柴田 佑里、井上 純一郎

HTLV-1 Tax 誘導性の IKK 複合体活性化に必要なユビキチンリガーゼの同定  
第73回日本癌学会学術総会, 2014/9/25, パシフィコ横浜 (神奈川・横浜)

柴田 佑里、尾山 大明、秦 裕子、井上 純一郎

HTLV-1 Tax による IKK 複合体活性化に必要な因子の同定と解析  
第1回日本HTLV-1学会学術集会, 2014/8/24, 東京大学医科学研究所 (東京・港区)

[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]

ホームページ: <http://www.traf6.com>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

柴田 佑里 (SHIBATA, Yuri)

東京大学・医科学研究所・助教  
研究者番号：20722573