

平成 21 年 4 月 30 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007-2008

課題番号：19590097

研究課題名（和文）KSHV がコードするリン酸化酵素の生理機能の解明と創薬への展開

研究課題名（英文）Analysis of the physiological function of the KSHV encoded kinases

研究代表者

藤室 雅弘（FUJIMURO MASAHIRO）

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・准教授

研究者番号：20360927

研究成果の概要：

カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス（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研究課題である。そこで、我々は、KSHV の発現するチミジンリン酸化酵素(ORF21)やリン酸基転移酵素(ORF36)の機能解析を行なった。その結果、KSHV の ORF21 は、抗ヘルペスウイルス薬 ACV や他のプリン・ヌクレオシド誘導体へのリン酸化効率は非常に低いことが明らかになった。一方で、ORF36 の機能解析により、ORF36 は複数の細胞性因子と KSHV のウイルス蛋白質をリン酸化し、NF- κ B 等の細胞内シグナル伝達の制御も行なっていることが明らかとなった。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目： 薬学・創薬化学

キーワード： ウイルス、感染症、ゲノム創薬

1. 研究開始当初の背景

世界中のエイズによる年間死者は三百万人に達し、収束する気配はない。その死因の多くはカリニ肺炎やカポジ肉腫等の日和見感染症である。カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス（KSHV）により引き起こされるカポジ肉腫は、発症者を死に至らせる悪性腫瘍である。また、米国・EU 等の先進国における臓器

移植の急激な増加に伴い、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。現在、日本においては HIV 感染者や臓器移植者が少数なため、KSHV 感染症についての議論は少ないが、今後、これらが深刻に問題視されるのは明らかである。本申請研究では KSHV が発現するチミジンリン酸化酵素(ORF21)やリン酸基転

移酵素 (ORF36) に焦点を当て、これらリン酸化酵素の生理機能の解明と創薬を目指したウイルスリン酸化酵素の基質特異性の解析を実施する。

KSHV は、感染すると深刻な疾患を起こさずに潜伏感染し、エピゾーム DNA として宿主核内で維持される。ごく少数 (1%以下) の感染細胞は増殖を停止し溶解感染へと移行する。エイズ発症や免疫抑制剤投薬等の免疫不全感染者において、KSHV はカポジ肉腫や B 細胞性リンパ腫を引き起こす。KSHV は潜伏感染時において、潜伏感染関連核抗原 (LANA) を発現し、LANA はウイルス DNA の複製・維持と、宿主細胞のがん化に関与する。一方、ごく少数 (1%以下) の KSHV 潜伏感染細胞はウイルス由来のスイッチ分子 RTA により、ウイルス新生に必要な構成タンパク質やチミジンリン酸化酵素 (ORF21) やリン酸基転移酵素 (ORF36) 等の DNA の合成・複製に関与する酵素群の発現を開始し、孫ウイルス産生を行なう。ウイルスの自己複製において、KSHV は宿主細胞をがん化させウイルス DNA のコピーを複製する機構と、溶解感染により孫ウイルス産生という二つの増殖機構を持つと考えられている。

2. 研究の目的

ヒトに感染するヘルペスウイルスは現在までに 8 種類同定され、全てのヘルペスウイルスが潜伏感染者の免疫不全により日和見感染症を引き起こすが、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。現在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) は多くのヒト・ヘルペスウイルス属に対して、高いウイルス選択性と強い抗ウイルス活性を示す。しかし、KSHV に対しては、これら抗ヘルペスウイルス薬は効果を持たない。

ACV、GCV はプロドラッグと呼ばれ、そのものは抗ウイルス活性を有していない。しかし、ウイルス感染細胞内においてのみウイルス DNA 伸長反応を阻害し、ウイルスの増殖を阻害する。ACV (または GCV) が薬理活性を持つには ACV の 5' OH がモノ→ジ→トリリン酸化される必要がある。ACV はトリリン酸化後、DNA 伸長反応に組み込まれるが、次の DNA の伸長に必須の 3' OH を欠いているためにウイルス DNA の伸長を停止させる。ウイルス感染細胞内において、ACV はウイルス由来のチミジンキナーゼ (TK) によりモノリン酸化を受け、その後細胞内のヒト由来のヌクレオチド・キナーゼによりジ・トリリン酸化される。しかし、基質特異性の高さからヒト TK は ACV や GCV をモノリン酸化しない。このため非感染細胞に取り込まれた ACV は薬効を持たず、

感染細胞のみ選択毒性を示す。

一方、我々は今までに、ヘルペスウイルス属に高い選択性を有する抗ヘルペスウイルス薬 ACV、GCV のグアニン塩基部と抗がん薬のハイブリッド化合物を開発し、KSHV 感染がん化 B 細胞に対して、高いウイルス選択性と殺細胞活性を有していることも明らかにしている。これら開発した薬物のウイルス選択性は KSHV の発現する ORF21 や ORF36 等のヌクレオシドキナーゼによるモノリン酸化効率と推測されるが、その真偽や作用機序は不明である。また、KSHV のヌクレオシドキナーゼの基質特異性が明らかになれば、それらの情報は抗 KSHV 薬設計や開発を行なうための有益な情報となる。

上述の通り抗ヘルペスウイルス薬開発において、KSHV が発現するチミジンリン酸化酵素 (ORF21) やリン酸基転移酵素 (ORF36) 等のヌクレオシドキナーゼはウイルス特異性を薬物が発揮するための絶好の標的分子となる。一方、KSHV のチミジンリン酸化酵素 (ORF21) は溶解感染移行後、宿主細胞内でウイルス DNA の合成に関与すると推測されているが、本酵素に関する基礎研究は皆無である。また、リン酸基転移酵素 (ORF36) は溶解感染移行後に宿主細胞内で発現し、蛋白質とヌクレオシドをリン酸化すると 1-2 報の論文が発表されているが、その生理機能や基質等の解析は殆どなされてされていない。よって KSHV の ORF21 や ORF36 の生理機能解析やヌクレオシド系抗ウイルス薬への基質特異性の解析等の研究成果は、KSHV の病原性や感染性の解明、さらに、抗 KSHV 薬の設計や開発に深く貢献することが可能となる。

以上の本研究の背景、目的より本研究では下記の 2 つの研究課題を実施した。

- (1) KSHV のチミジンリン酸化酵素とリン酸基転移酵素の生理機能の解析
- (2) 抗 KSHV 薬開発のための ORF21 と ORF36 の基質特異性の解析

3. 研究の方法

- (1) KSHV のチミジンリン酸化酵素とリン酸基転移酵素の生理機能の解析

KSHV の ORF21 と ORF36 がヌクレオシド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、ウイルス DNA 複製酵素複合体と相互作用することや、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可能性が非常に高い。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、ヌクレオシド誘導体 GCV

やACVをリン酸化するという報告も非常に少数だが存在する。

培養細胞で発現させた両リン酸化酵素をタグの抗体を利用した免疫沈降法で精製する。デオキシ(d)チミジンや、dリボヌクレオシドを骨格に持つ抗ウイルス薬等の各種dリボヌクレオシド類を用いて、ORF21とORF36がヌクレオシドリン酸化酵素か否かを決定する。反応はATPと基質、酵素と反応させ、逆送HPLC(C-30)で解析した。

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を基質に用い、精製ORF36やORF21と反応後SDS-PAGE、オートラジオグラフィで蛋白質のリン酸化能を解析した。なお、精製ORF36やORF21は、細胞発現用ベクターに組み込んだFlagタグ付きORF36とORF21のプラスミドをHeLa細胞にトランスフェクションし、細胞抽出液からFlag抗体・アフィニティーカラムを用いてORF36とORF21を単離・精製した。

ルシフェラーゼアッセイによるORF36やORF21の機能解析では、Flag-ORF36(または、Flag-ORF21)と、各レポーター遺伝子(pAP1-Luc, pE2F-Luc, pISRE-Luc, pNF- κ B-Luc, pE-cadherin-Lucレポーター遺伝子)1 μ gをHeLa細胞にリン酸カルシウム法によりトランスフェクションした。Passive Lysis Buffer 5X 100 μ lでHeLa cell extractを回収し、ルシフェラーゼアッセイを行った。

次に、GST融合ORF36とORF21を大腸菌で大量に発現させ、精製した後、抗原に用いてウサギポリクローナル抗体を作製する。primary effusion lymphomaから株化されたKSHV潜伏感染B細胞をホルボールエステル(TPA)処理で、溶解感染へとウイルスサイクルを移行させ、蛍光抗体細胞染色によりORF36とORF21の発現時期と細胞内局在を解析した。また、RT-PCRによる両遺伝子のmRNAレベルでの発現も解析した。

(2) 抗KSHV薬開発のためのORF21とORF36の基質特異性の解析

ウイルス性ヌクレオシドリン酸化酵素、すなわち、ORF36とORF21は抗KSHV薬の設計・開発において、ウイルス特異性を薬物が発揮するための絶好の標的分子となる。我々は過去に、新しい作用機序でDNA合成阻害活性を発揮する抗KSHV薬の開発を行ってきた。本薬物は、ACVと抗がん剤のハイブリッド核酸誘導体であり、ウイルス感染特異的な細胞毒性を有している。本化合物類の有するKSHV感染特異的な細胞毒性はKSHVの発現するチミジンリン酸化酵素ORF21(またはORF36)に選択的にモノリン酸化されるためだと考えられるが、その真偽は明らかではない。そこで、本申請研究ではORF21やORF36が

我々の開発したハイブリッド核酸誘導体をリン酸化するの否かを解析した。精製ORF21(ORF36)とハイブリッド核酸誘導体、ATPを反応させ、逆送HPLCにより、ハイブリッド核酸誘導体のリン酸化効率の解析を行った。

4. 研究成果・考察

(1) KSHVのチミジンリン酸化酵素とリン酸基転移酵素の生理機能の解析

上記の研究により、以下の研究結果を得た。

①ORF21はHSV1やCMVのチミジンキナーゼと比較して、デオキシ(d)チミジンやACVに対するリン酸化能が非常に低いことが確認された。

②ORF21, ORF36の蛋白質に対するリン酸化能の解析

ORF36が蛋白質をリン酸化することは報告されていたが、オートラジオグラフィによりORF21も、蛋白質をリン酸化することが確認された。さらに、ORF36の自己リン酸化能を解析した結果、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が確認された。

③ルシフェラーゼアッセイによるORF21, ORF36の機能解析

ルシフェラーゼアッセイを行った結果、ORF21では各種レポーター遺伝子の有意な活性の変化は見られなかったが、ORF36では、NF- κ B応答性のレポーター遺伝子の活性が有意に減少し、E2F応答性のレポーター遺伝子の活性が有意に上昇した。

④ORF36がリン酸化する基質蛋白質の探索

オートラジオグラフィにより、ORF36が、LANA, vCyclinDをリン酸化することが確認された。

⑤作成したORF21のウサギポリクローナル抗体による免疫染色を行ったところ、KSHV潜伏感染のBC3細胞において、ORF21の存在が確認できたことから、ウイルスの潜伏感染時においても、ORF21は発現していることが証明された。また、RT-PCRによるORF21遺伝子のmRNAレベルで発現を解析したところ、TPA処理後の溶解感染後には数倍発現量は増加したが、潜伏感染時にもORF21遺伝子のmRNAの発現が確認できた。

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 は合成途中の孫ウイルスのピリオン内（ウイルス外膜と核の間隙）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孫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 は複数の細胞性因子と KSHV のウイルス蛋白質をリン酸化し、NF- κ B 等の細胞内シグナル伝達の制御も行なっていることが明らかとなった。

(2) 抗 KSHV 薬開発のための ORF21 と ORF36 の基質特異性の解析

上記の研究により、以下の研究結果を得た。

我々の開発した核酸誘導体類の KSHV 感染がん細胞に対する増殖抑制活性を測定した結果、複数の化合物は、ウイルス非感染 B リンフォーマ細胞株の増殖には影響を与えず、KSHV 感染 B リンフォーマ細胞株に対して高い増殖抑制を示すが、この現象は、薬物添加により、KSHV 感染細胞の p21 と p27 増加による細胞周期の G1 期停止とアポトーシスの惹起が原因であることが明らかとなった。さらに、開発した核酸誘導体類は、細胞内のアデノシン・デアミナーゼにより、塩基部がプリン骨格に代謝されることも明らかになった。また、化合物の有する KSHV 感染選択的な殺細胞活性は、KSHV の ORF21 によるヌクレオシドに対するモノリン酸化作用に起因することも明らかになった。

ウイルス非感染の HeLa 細胞と NIH3T3 細胞に ORF21 遺伝子を恒常的に発現させた stable cell line を作成し、培養液に各核酸代謝拮抗薬物を添加してから 5 日後の生細胞数を、CCK-8 を用いて測定した。その結果、ORF21 を発現させた細胞では、非発現細胞と比較して、薬物処理による殺細胞活性の増加が確認できた。この結果より、核酸代謝拮抗薬物の PEL 特異的な殺細胞活性の発現に、ORF21 が関与することが示された。

現在臨床で用いられているアシクロビル (ACV) はヘルペスウイルスに対して、高い選択性と強い抗ウイルス活性を示すが、KSHV に対しては効果を持たない。我々は KSHV 感染がん化 B 細胞に対して、高いウイルス選択性と殺細胞活性を有するヌクレオシド誘導体類を開発している。これら核酸代謝拮抗薬の

ウイルス選択性は KSHV の発現するチミジンリン酸化酵素 (ORF21) によるモノリン酸化効率で決定されることが本研究により明らかになった。今後、さらに KSHV の ORF21 の基質特異性や発現機構が明らかになれば、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 9 件)

① Muromoto R, Ikeda O, Okabe K, Togi S, Kamitani S, Fujimuro M, Harada S, Oritani K, Matsuda T. Epstein-Barr virus-derived EBNA2 regulates STAT3 activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 378, 439-443, 2009 査読有

② 藤室雅弘, ウイルスによる分子海賊 : カボジ肉腫関連ヘルペスウイルスによるユビキチン経路とシグナル伝達の脱制御. *山梨医科学雑誌*, 印刷中 2009 査読無

③ Ikeda, O, Sekine Y, Mizushima A, Oritani K, Yasui T, Fujimuro M, Muromoto R, Nanbo A, and Matsuda T. BS69 negatively regulates the canonical NF- κ B activation induced by Epstein-Barr virus-derived LMP1. *FEBS Lett.* In press, 2009 査読有

④ Wakasaya Y, Watanabe M, Tomiyama M, Suzuki C, Jackson M, Fujimuro M, Kimura T, Seino Y, Kawarabayashi T, Yamamoto-Watanabe Y, Matsubara E, Shirahama I, Takamura A, Nakahata N, Shoji M. An unusual case of chronic relapsing tetanus associated with mandibular osteomyelitis. *Intern Med*, in press, 2009 査読有

⑤ Ikeda, O, Togi S, Kamitani S, Muromoto R, Sekine Y, Nanbo A, Fujimuro M, and Matsuda T. SMRT regulates enhanced activation of STAT3 by Epstein-Barr virus-derived EBNA2. *Biol. Pharm. Bull.* in press, 2009 査読有

⑥ Sawamura N, Ando T, Maruyama Y, Fujimuro M, Mochizuki H, Honjo K, Shimoda M, Toda H, Sawamura-Yamamoto T, Makuch LA, Hayashi A, Ishizuka K, Cascella NG, Kamiya A, Ishida N, Tomoda T, Hai T, Furukubo-Tokunaga K, Sawa A.

Nuclear DISC1 regulates CRE-mediated gene transcription and sleep homeostasis in the fruit fly. *Mol Psychiatry*. 13, 1138-1148, 2008 査読有

⑦ Ohtawa M, Ichikawa S, Teishikata Y, Fujimuro M, Yokosawa H, Matsuda A. 9-(2-C-Cyano-2-deoxy-beta-d-arabino-pentofuranosyl) guanine, a Potential Antitumor Agent against B-Lymphoma Infected with Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus. *J. Med. Chem.*, 50, 2007-2010, 2007 査読有

⑧ Ochiai H, Fujimuro H, Yokosawa H, Harashima H, Kamiya H. Transient activation of transgene expression by hydrodynamics-based injection may cause rapid decrease in plasmid DNA expression. *Gene Therapy*, 14, 1152-1159, 2007 査読有

⑨ Fujimuro M, Hayward SD, Yokosawa H. Molecular Piracy: Manipulation of the Ubiquitin System by Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus. *Rev. Med. Virol.* 17, 405-422, 2007 査読有

[学会発表] (計6件)

① 藤室雅弘、手石方康宏、平敬宏、横沢英良「カポジ肉腫関連ヘルペスウイルスによる細胞内蛋白質分解系の脱制御」日本薬学会第129年会、2009年3月26日-28日、京都国際会議場

② Masahiro Fujimuro and Hideyoshi Yokosawa, A viral mechanism for dysregulation of post-translational modification in Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latency. 17th Meeting of Methods in Protein Structure Analysis, 26th-29th Aug 2008, Sapporo,

③ 山田浩二、藤室雅弘、横沢英良、松田彰「KSHV 感染特異的抗がん薬 CNDAG の開発」第55回日本ウイルス学会年会 一般口演、2007年10月23日、札幌コンベンションセンター

④ 藤室雅弘、横沢英良「カポジ肉腫関連ヘルペスウイルスによる脱ユビキチン化酵素の制御機構」第55回日本ウイルス学会年会ワークショップ、2007年10月23日、札幌コンベンションセンター

⑤ 藤室雅弘「カポジ肉腫関連ヘルペスウイルスの発がん機構」第31回阿蘇シンポジ

ウム 招待講演、2007年7月27日、阿蘇リゾートヴィリオホテル

⑥ 山田浩二、藤室雅弘、手石方康弘、横沢英良、大多和正樹、市川聡、松田彰「KSHV 感染特異的抗がん薬 CNDAG の開発」第4回 EB ウイルス研究会 一般口演、2007年6月29日、東京大学医学部

[図書] (計1件)

① 藤室雅弘、横沢英良、プロテアソームと蛋白質分解 生物薬科学実験講座、印刷中

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤室 雅弘 (FUJIMURO MASAHIRO)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・准教授

研究者番号：20360927

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し