

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 30 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790498

研究課題名（和文） 新規 Tax1 結合因子を介した HTLV-1 発癌の悪性化機構

研究課題名（英文） The pathogenic mechanism of HTLV-1 leukemogenesis via novel binding protein of Tax1

研究代表者

高橋 雅彦（TAKAHASHI MASAHIKO）

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：80377192

研究成果の概要（和文）：

HTLV-1 Tax1 に結合する USP10 およびその結合蛋白 G3BP1 の機能解析を行った。G3BP1 は USP10 の抗酸化活性を阻害することにより定常状態における活性酸素種産生の維持に必要であった。一方、亜ヒ酸処理後では G3BP1 と USP10 がストレス顆粒の形成を促進することで、USP10 の抗酸化活性を解除することが明らかとなった。さらにこの USP10 の抗酸化活性には ATM のキナーゼ活性が必要であった。

研究成果の概要（英文）：

We examined functional roles of USP10 and its binding partner G3BP1. We found that G3BP1 elevates the steady-state ROS level by inhibiting the antioxidant activity of USP10. However, following exposure to arsenic, G3BP1 and USP10 induce the formation of stress granules, which uncovers the antioxidant activity of USP10. We also found that the antioxidant activity of USP10 requires the protein kinase activity of ATM.

交付決定額

（金額単位：円）

|       | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|-------|-----------|---------|-----------|
| 交付決定額 | 3,300,000 | 990,000 | 4,290,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：ウイルス学

キーワード：HTLV-1

## 1. 研究開始当初の背景

HTLV-1 感染は長い潜伏期間を経て ATL を発症することから、その発症にはウイルス感染細胞へのゲノム異常の蓄積が必須である。活性酸素種（Reactive oxygen species; ROS）の異常産生がゲノム不安定性を誘導し、様々な癌の発症に関与することが知られているが、ゲノム異常を HTLV-1 がいかにして誘導するのかについては不明のままであった。

## 2. 研究の目的

炎症あるいは環境ストレスに伴う ROS の異常産生がゲノム不安定性を誘導し、様々な癌の発症に関与することが知られている。また、抗酸化剤が ROS による DNA 損傷を抑制するとともに、癌の発症を抑えることが癌発症モデ

ル動物を用いて報告され、癌治療の観点からも ROS 産生機構は注目を集めている。興味深いことに、ROS 産生が HTLV-1 感染細胞においても昂進し、この産生誘導に HTLV-1 がコードする発がん蛋白 Tax1 が関与することが報告されている。我々はこれまでに、HTLV-1 がコードする発がん蛋白 Tax1 に結合する新規の宿主因子として USP10 を同定し、USP10 が酸化剤（亜ヒ酸）による ROS 産生の抑制因子として機能することを見出している。本研究では、USP10 がどのような分子機序により ROS の産生を抑制しているのか、さらには USP10 による ROS 産生制御が HTLV-1 による白血病発症にどのように関与するのかを明らかにすることを目的とした。

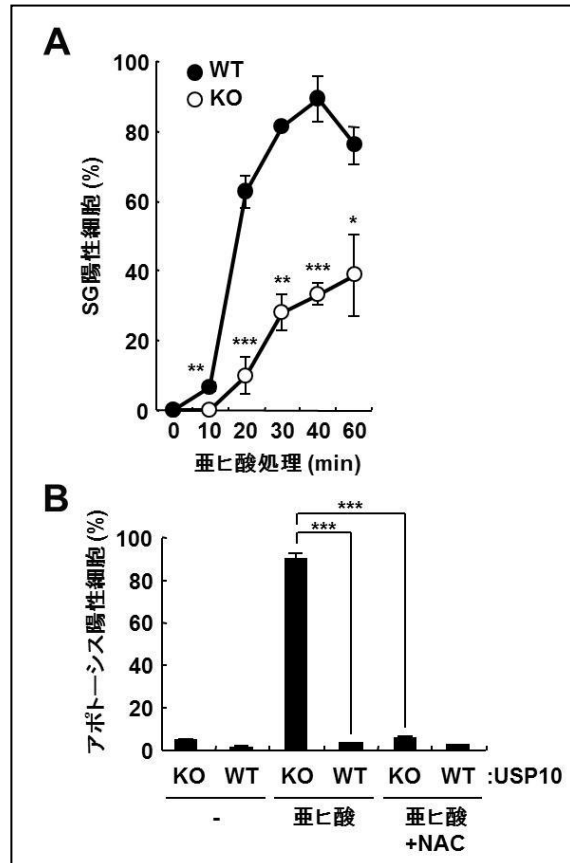
### 3. 研究の方法

USP10 欠損細胞では、亜ヒ酸処理（酸化ストレスの誘導剤）下において細胞質内に形成されるストレス顆粒（Stress granule; SG）形成能が野生型細胞よりも顕著に低下する。我々は USP10 に結合する宿主因子を複数同定しているが、これらの中には SG の形成に関わる G3BP1 が含まれていた。SG 形成は酸化ストレスが誘導するアポトーシスを抑制することから、ROS の産生を抑制する可能性がある。この仮説を検証するため、下記の実験を行った。

- (1) USP10 が SG に局在するのかを検討するため、ヒト胎児腎細胞 293T を亜ヒ酸処理後、USP10 とともに SG マーカー蛋白である G3BP1, PABP1 および RACK1 を免疫蛍光染色し、USP10 が SG マーカーと共局在するのかを調べた。
- (2) USP10 による SG 形成能の昂進が ROS 産生を抑制するのかを検証するため、抗酸化剤（NAC）が亜ヒ酸処理後に誘導されるアポトーシスを抑制するのかを調べた。
- (3) さらに USP10 による SG 形成能の昂進が ROS 産生を抑制するのかを検証するため、SG 形成能を欠いた USP10 変異体を USP10 欠損細胞に発現させ、亜ヒ酸処理による ROS 産生を野生型 USP10 と比較した。ROS の産生は細胞をカルボキシ H<sub>2</sub>DCFDA（ROS によって酸化すると蛍光を発する）でラベルすることにより測定した。
- (4) USP10 の SG 形成能獲得には SG 形成促進因子である G3BP1 との相互作用が必須である。そこで、G3BP1 の過剰発現およびノックダウン細胞株を作製し、ROS 産生にどのように影響するのかを調べた。さらに、USP10 の関与を明らかにするため、G3BP1 だけでなく USP10 も同時にノックダウンした場合における ROS 産生動態を調べた。
- (5) USP10 はストレス処理下において、ストレス応答に重要な役割を担う Ataxia telangiectasia mutated (ATM) と相互作用し、リン酸化修飾されることが知られている。このようなシグナル経路が USP10 による ROS 産生の抑制に関与するのかを調べた。具体的には、ATM 阻害剤が USP10 による ROS 産生の抑制を解除するのかを調べた。

### 4. 研究成果

- (1) USP10 は亜ヒ酸処理下において形成される SG に局在した。さらに、USP10 欠損細胞は野生型細胞よりも亜ヒ酸処理下における SG 形成能が低下しただけでなく（図 1 A）、その後に誘導される細胞死が昂進した。この USP10 欠損細胞における細胞死の昂進は抗酸化剤によって阻害された（図 1B）。よって、USP10 が SG 形成を促進することにより ROS 依存的なアポトーシスを抑制することがわかった。さらに SG 形成を誘導しない酸化剤（H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>）が誘導するアポトーシスは USP10 欠損細胞および野生型細胞において同程度に引き起こされること、SG 形成能を欠いた USP10 変異体は ROS 抑制活性を持たないことから、USP10 が SG 形成を介して ROS 誘導性アポトーシスを抑制することが示された。



**図 1 ; USP10 は SG 形成を促進することにより亜ヒ酸による ROS 誘導性アポトーシスを阻害する**

A. USP10 欠損 (KO) および野生型 (WT) を亜ヒ酸処理下において培養後、SG マーカー蛋白 G3BP1 および PABP1 を免疫蛍光染色することで SG 陽性細胞を検出した。  
B. USP10 欠損 (KO) および野生型 (WT) を抗酸化物質 N-アセチルシステイン (NAC) 存在下および非存在下において亜ヒ酸処理後、アポトーシス陽性細胞を検出した。

- (2) 我々はUSP10と相互作用する宿主因子を網羅的に検索する目的で質量分析を実施し、USP10と最も強く結合する因子としてG3BP1を同定している。まず、RNA干渉法によりG3BP1の発現をノックダウンしたところ、用いたすべての細胞株においてROS産生量の低下が認められた。さらにUSP10をノックダウンすると、G3BP1のノックダウンによるROS産生量の低下が部分的に解除されることから、G3BP1はUSP10の抗酸化活性を阻害することにより定常状態におけるROSの産生を維持していると考えられた。次に、293T細胞においてG3BP1を過剰発現させたところ、SG形成の誘導とともにROS産生の低下が認められた。さらに、USP10との結合活性を欠くG3BP1変異体はSG形成能並びにROS抑制能を共に消失した。以上の結果より、G3BP1とUSP10によりSGの形成が促進されると、USP10の抗酸化活性が解除されることが示唆された。
- (3) 酸化ストレス応答因子であるATMはUSP10をリン酸化することが知られている。そこでATMのリン酸化活性を阻害したところ、USP10によるROS抑制活性が低下した。よって、USP10の抗酸化活性にはATMのリン酸化活性が必須であることが示唆された。

以上の結果から、USP10がそのSG形成能を介して抗酸化活性を示すことが示された(図2)。亜ヒ酸を含む治療薬が一部のATLに対して有効であることが臨床研究において示されていることから、今後はUSP10を標的としたATL治療薬の開発を目指した解析を進めていく予定である。

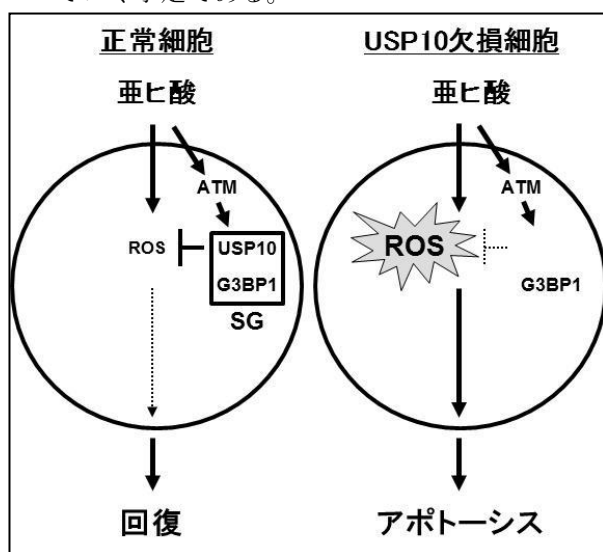


図2 ; ストレス応答におけるSG, USP10およびG3BP1の機能

定常状態では、G3BP1はUSP10の抗酸化活性を阻害することでROS産生を維持しているが、細胞が亜ヒ酸に曝されると、USP10がSG形成を促進し、ATMを介したUSP10の抗酸化作用が解除されて、細胞死を抑制する。一方で、USP10欠損細胞ではSG形成能が低下することにより亜ヒ酸によるROSの産生と細胞死が著明に高まる。

#### 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5件)

- (1) Takahashi M, Higuchi M, Matsuki H, Yoshita M, Ohsawa T, Oie M, Fujii M.; Stress granules inhibit apoptosis by reducing reactive oxygen species production. *Mol Cell Biol.*, 33(4), 815-829, 2013. doi: 10.1128/MCB.00763-12. 査読有
- (2) Matsuki H, Takahashi M, Higuchi M, Makokha GN, Oie M, Fujii M.; Both G3BP1 and G3BP2 contribute to stress granule formation. *Genes Cells*, 18(2), 135-146, 2013. doi: 10.1111/gtc.12023. 査読有
- (3) Makokha GN, Takahashi M, Higuchi M, Saito S, Tanaka Y, Fujii M.; Human T-cell leukemia virus type 1 Tax protein interacts with and mislocalizes the PDZ domain protein MAGI-1. *Cancer Sci.*, 104(3), 313-320, 2013. doi: 10.1111/cas.12087. 査読有
- (4) Imai M, Higuchi M, Kawamura H, Yoshita M, Takahashi M, Oie M, Matsuki H, Tanaka Y, Aoyagi Y, Fujii M.; Human T cell leukemia virus type 2 (HTLV-2) Tax2 has a dominant activity over HTLV-1 Tax1 to immortalize human CD4+ T cells. *Virus Genes*, 46(1):39-46. 2013. doi: 10.1007/s11262-012-0831-9. 査読有
- (5) Yoshita M, Higuchi M, Takahashi M, Oie M, Tanaka Y, Fujii M.; Activation of mTOR by human T-cell leukemia virus type 1 Tax is important for the transformation of mouse T cells to interleukin-2-independent growth. *Cancer Sci.*, 103(2):369-74. 2012. doi: 10.1111/j.1349-7006.2011.02123.x. 査読有

[学会発表] (計2件)

- (1) 高橋雅彦, Stress granules inhibit apoptosis by reducing ROS production,

and this is nullified by HTLV-1 Tax1、  
第71回日本癌学会学術集会、2012. 9. 19.  
札幌

- (2) **高橋雅彦**、USP10 は亜ヒ酸による HTLV-1  
感染細胞のアポトーシス感受性に関与  
する、第5回 HTLV 研究会およびシンポ  
ジウム、2012. 8. 25. 東京

〔その他〕  
ホームページ等  
なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高橋 雅彦 (TAKAHASHI MASAHIKO)  
新潟大学・医歯学系・助教  
研究者番号：80377192

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし