

平成21年 6月19日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007-2008
 課題番号：19590484
 研究課題名（和文） 脱ユビキチン化酵素 AMSH によるウイルス感染増殖機構の解明
 研究課題名（英文） Mechanism of virus infection and proliferation by an deubiquitination enzyme, AMSH
 研究代表者
 田中 伸幸 （TANAKA NOBUYUKI）
 宮城県立がんセンター（研究所）・免疫学部・部長
 研究者番号：60280872

研究成果の概要：ESCRT 複合体は小胞輸送に必須の役割を果たすことが知られている。我々は ESCRT (STAM) 会合分子を探索し、新規分子 AMSH,AMSH-LP を単離同定した。これらは輸送に関わるユビキチン修飾 (K63) 特異的な脱ユビキチン化酵素 (DUB) である。本研究では、AMSH による脱ユビキチン化と小胞輸送がウイルス増殖に関わる可能性を検証するため、サイトメガロウイルスおよび HIV の増殖制御機構への関与を調べた。その結果、サイトメガロウイルス感染において侵入と出芽を AMSH が制御することが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
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：基礎医学・ウイルス学

キーワード：酵素、蛋白質、ユビキチン、脱ユビキチン化

1. 研究開始当初の背景

真核生物に普遍的に存在するユビキチンは、標的蛋白に「ポリユビキチン鎖」を形成しプロテアソーム依存的蛋白分解に関与するのみならず、「モノユビキチン」修飾および「63位リジン結合性ユビキチン鎖 (K63)」修飾を介して、標的蛋白を小胞輸送系に誘導する。宿主のユビキチン修飾系および小胞輸送系は、ウイルスの細胞内侵入から最終的な成熟ウイルスの放出に至る一連のウイルス増殖においても密接に関与していることが推察されているが、その詳細は未だに不明の点が

多い。我々はサイトカインシグナル分子解析の途上で、シグナル制御分子 Hrs, STAM1, STAM2 を蛋白同定し、これらが複合体を形成し機能することを見出した。これら蛋白は、ESCRT 複合体 (Endosomal Sorting Complex Required for Transport) として、小胞輸送に必須の役割を果たすことが報告された。

ESCRT はウイルス感染増殖に密接に関与することが明らかとなった。レトロウイルス HIV は、出芽に際し Gag 蛋白の「L ドメイン」を介して ESCRT 構成分子 Tsg101 に結合し、

出芽する。しかしながら、出芽に関して、1) Tsg101 の上流に位置する STAM/Hrs 複合体の関与、2) gag のユビキチン化の関与、については明らかではない。一方、我々は ESCRT (STAM) 会合分子を探索し、新規分子 AMSH, AMSH-LP を単離同定した。最近になって、AMSH, AMSH-LP はいずれも輸送に関わるユビキチン修飾 (K63) 特異的な脱ユビキチン化酵素 (DUB) であることが判明した。これら脱ユビキチン化酵素を含む ESCRT 複合体によるウイルス感染増殖制御には不明の点が多い。

2. 研究の目的

ウイルス感染における「ユビキチン修飾-小胞輸送系」の関与は感染増殖に重要であると想定されるが詳細は不明である。そこで以下の3点に焦点を絞り明らかにする。第1に感染成立における機能である。マウスサイトメガロウイルスは受容体に結合した状態で細胞内小胞に取り込まれ、ESCRT 輸送系とともに細胞核近傍まで輸送される。そこで同ウイルス感染系を用い、感染成立の初期過程を解析し、ウイルスの細胞表面への吸着から細胞内小胞への取り込み、輸送、脱核から初期遺伝子転写に至る過程を調べる。第2に初期遺伝子産物の輸送・分解において、特に核-細胞質輸送における脱ユビキチン化の関与を明らかにする。第3の目的は、ウイルス粒子のアッセムブリーと出芽における脱ユビキチン化の関与である。サイトメガロウイルスの出芽との関係を解析する。さらに、HIV の出芽を gag ウイルス構造蛋白に注目しながら比較解析することにより、ウイルス出芽における脱ユビキチン化の機能と意義を明らかにする。解析にあたっては、もう一つの ESCRT 会合性脱ユビキチン化酵素 UBP-Y を比較検討対象とする。さらに、AMSH 結合蛋白を明らかにし、脱ユビキチン化酵素によるウイルス制御に関わる新規分子の同定を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

- (1) AMSH 欠損マウス胎仔 (*amsh*^{-/-}) および AMSH-LP 欠損胎仔 (*amsh*^{-/-}) 由来線維芽細胞に SV40 large T 遺伝子を安定導入し、遺伝子欠損細胞株、およびこれらの細胞に遺伝子発現させた細胞に対して MCMV を感染させ、ESCRT-0 分子欠損株 (STAM1/2 ダブル欠損株 (*stam1*^{-/-2})), Hrs 欠損株 (*hrs*^{-/-}) と比較する。
- (2) 293 T 細胞に対し AMSH-shRNA および AMSH-LP-shRNA を導入してノックダウンを行う。さらに HIV-gag あるいは HTLV-I-gag を導入し、ウイルス様粒子 (VLP) の出芽を ELISA 法あるいは

超遠心法-ウエスタンブロット法により検討する。解析にあたっては、細胞内の gag 蛋白量と比較する。

- (3) AMSH 会合蛋白を同定するために蛋白精製法を用いた解析を行う。Muldi-TOF-MS にて蛋白同定を行う

4. 研究成果

- (1) サイトメガロウイルス感染成立における機能・初期遺伝子発現に与える影響：マウスサイトメガロウイルスを用いた検討において AMSH 欠損細胞は感染増殖が有為に低下した。初期遺伝子の発現も同様に低下したがウイルス吸着には差異が認められなかった。したがって、少なくともサイトメガロウイルスの細胞内侵入過程に AMSH が機能していることが示唆された。
- (2) ウイルス粒子アッセムブリー・出芽における AMSH の働き：マウスサイトメガロウイルスの増殖は AMSH 欠損マウス由来線維芽細胞で有意に低下していたことから、出芽を正に制御している可能性があることが判明した。
- (3) HIV の出芽については、不活性型 AMSH の導入により VLP が軽度低下したが野生型では変化がなかった。また、shRNA の導入による VLP 低下は認められなかった。AMSH-LP (野生型、不活性型) の過剰発現では HIV-Gag 量に変化がなかった。AMSH-LP は HIV-VLP 形成に対する関与しない可能性が高い。
- (4) AMSH とは異なる脱ユビキチン化酵素である UBP-Y は VLP に与える影響がほとんど認められなかった。
- (5) AMSH と拮抗する C-CBL (野生型、不活性型) の過剰発現による Gag 量の変化は軽微であった。
- (6) 以上の結果から、脱ユビキチン化酵素 AMSH は HIV ウイルス粒子形成を正に制御する可能性があるものの必須ではないことが判明した。
- (7) AMSH 会合蛋白を探索し、CHMP3 を同定した。さらに、CHMP1A, CHMP1B, CHMP2 と会合することを確認した。さらに、新規会合分子 X の同定に成功し、現在解析している。

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 10 件)

- ① Tamai, K, Toyoshima, M, Tanaka, N*, Yamamoto, N, Owada, Y, Kiyonari, H, Murata K., Ueno Y., Ono M., Shimosegawa T., Yaegashi, N,

- Watanabe M, and Sugamura, K. Loss of Hrs in the Central Nervous System Causes Accumulation of Ubiquitinated Proteins and Neurodegeneration. *Am.J.Pathol.* 173: 1806-1817, 2008 査読有
- ② Tanaka Y, Tanaka N*, Saeki Y, Tanaka K, Murakami M, Hirano T, Ishii N, Sugamura K. c-Cbl-dependent Monoubiquitination and Lysosomal Degradation of gp130. *Mol. Cell. Biol.* 28: 4805-4818, 2008 査読有
- ③ Tanaka N*, Kyuuma M, Sugamura K. Endosomal sorting complex required for transport proteins in cancer pathogenesis, vesicular transport, and non-endosomal functions. *Cancer Sci.* 99: 1293-303, 2008 査読有
- ④ Duechting A, Tschöpe C, Kaiser H, Lamkemeyer T, Tanaka N, Aberle S, Lang F, Torresi J, Kandolf R, Bock CT. Human parvovirus B19 NS1 protein modulates inflammatory signaling by activation of STAT3/PIAS3 in human endothelial cells. *J Virol.* 82:7942-7952. 2008 査読有
- ⑤ Yamashita Y, Kojima K, Tsukahara T, Agawa H, Yamada K, Amano Y, Kurotori N, Tanaka N, Sugamura K, Takeshita T. Ubiquitin-independent binding of Hrs mediates endosomal sorting of the interleukin-2 receptor β -chain. *J. Cell. Sci.* 121: 1727-38, 2008 査読有
- ⑥ Onoda T, Rahman M, Nara H, Araki A, Makabe K, Tsumoto K, Kumagai I, Kudo T, Ishii N, Tanaka N, Sugamura K, Hayasaka K, Asao H. Human CD4+ central and effector memory T cells produce IL-21: effect on cytokine-driven proliferation of CD4+ T cell subsets. *Int Immunol.* 10:1191-9, 2007 査読有
- ⑦ Toyoshima M, Tanaka N, Aoki J, Tanaka Y, Murata K, Kyuuma M, Kobayashi H, Ishii N, Yaegashi N, Sugamura K. Inhibition of tumor growth and metastasis by depletion of vesicular sorting protein Hrs: its regulatory role on E-cadherin and beta-catenin. *Cancer Res.* 67:5162-71. 2007. 査読有
- ⑧ Tamai, K, Tanaka, N., Nara, A, Yamamoto, A Nakagawa, I., Yoshimori, T. Ueno, Shimosegawa, T, and Sugamura K. Role of Hrs in Maturation of Autophagosomes in Mammalian Cell. *Biochem Biophys Res Commun.* 360, 721-7, 2007. 査読有
- ⑨ Inoue Y, Tanaka N, Tanaka Y, Inoue S, Morita K, Min Z, Hattori T, Sugamura K. Clathrin-dependent Entry of SARS Coronavirus into Target Cells Expressing Cytoplasmic Tail-deleted ACE2. *J Virol.* 81, 8722-9, 2007. 査読有
- ⑩ Kyuuma M, Kikuchi K, Kojima K, Sugawara Y, Sato M, Mano N, Goto J, Takeshita T, Yamamoto A, Sugamura K, Tanaka N. AMSH, an ESCRT-III associated enzyme, deubiquitinates cargo on MVB/late endosomes. *Cell Struct Funct.* 31:159-72, 2007. 査読有
- [学会発表] (計 11 件)
- ① Tanaka, N., Sato, M., Semura, K. and Sugamura, K.: Hrs, a master regulator of endosomal sorting, controls HIV gag degradation, The Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, 2007.09
- ② Tanaka, N. and Sugamura, K.: Hrs, a master regulator of protein sorting, controls tumor growth and metastasis through E-Cadherin and β -catenin. Keystone Symposia, Wnt/ β -catenin signaling in Development and Disease. Keystone CO, USA, 2008.02
- ③ 井上雄喜、田中伸幸、田中義乃、井上真吾、森田公一、庄敏、服部俊夫、菅村和夫：ACE2 細胞内領域欠損受容体を介した SARS-CoV 感染機構，第 61 回日本細菌学会東北支部会，仙台、2007.08
- ④ 玉井恵一、田中伸幸、上野義之、下瀬川徹、菅村和夫：オートファジーを介した連鎖球菌の排除における Hrs の役割の検討，第 61 回日本細菌学会東北支部会，仙台、2007.08

- ⑤ 井草龍太郎、村田和子、田中伸幸、石井直人、貫和敏博、菅村和夫：STAM1 and STAM2 double knock out mice enhance inflammatory reaction. 第61回日本細菌学会東北支部会，仙台、2007.08
- ⑥ 村田和子、井草龍太郎、石井直人、田中伸幸、菅村和夫：Regulation of MHC class II function by ESCRT proteins, STAM1/2, 第61回日本細菌学会東北支部会，仙台、2007.08
- ⑦ プルシヨタム・プラサイ、田中義乃、久間昌尚、村田和子、浅尾裕信、田中伸幸、菅村和夫：Involvement of Hrs and Itch/AIP4 in the Endosomal Sorting and Degradation of TGF- β Receptor II. 第66回日本癌学会学術総会、横浜、2007.09
- ⑧ 井上雄喜、田中伸幸、田中義乃、井上真吾、森田公一、庄敏、服部俊夫、菅村和夫：ACE2細胞内領域欠損受容体を介したSARS-CoV感染機構，第55回日本ウイルス学会学術総会，札幌、2007.10
- ⑨ 田中義乃、田中伸幸、村上正晃、平野俊夫、菅村和夫 c-Cbl regulates IL-6 Signaling through gp130 ubiquitination, 第37回日本免疫学会学術総会、東京、2007.11
- ⑩ Tanaka, N and SugamuraK. : Negative regulation of IL-6 signaling: c-Cbl-dependent Monoubiquitination and Lysosomal Degradation of gp130 第8回あわじしま感染症免疫フォーラム、兵庫県淡路市夢舞台 2008.09
- ⑪ 井草龍太郎、村田和子、田中伸幸、石井直人、貫和敏博、菅村和夫：STAM1/2 regulate the innate immunity through TLR4 and TLR9 signaling. 第38回日本免疫学会学術総会、京都、2008.12

〔図書〕（計 1 件）

- ① 田中伸幸：「目でわかる免疫学（第4版）」
 (株)メディカル・サイエンス・インターナショナル，(ISBN978-4-89592-486-3) 2007.

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中伸幸 (TANAKA NOBUYUKI)
 宮城県立がんセンター（研究所）・免疫学部・部長
 研究者番号：60280872

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし