

令和 4 年 4 月 7 日現在

機関番号：32624

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07595

研究課題名（和文）ユビキチンリガーゼの基質特異性から解き明かすKSHVの新たな免疫回避戦略

研究課題名（英文）Identification of a novel immune evasion strategy of KSHV based on substrate specificity of ubiquitin ligase

研究代表者

梶川 瑞穂 (Kajikawa, Mizuho)

昭和薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：00464389

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：免疫不全の患者における重篤な腫瘍の原因となるカポジ肉腫関連ヘルペスウイルス（KSHV）は、宿主の免疫制御分子にユビキチン化依存的消失をもたらすユビキチンリガーゼK3およびK5を発現し、感染細胞の免疫回避を可能にしている。K3およびK5の基質は数多く発見されているが、未知の基質が残されている可能性もある。本研究では、これまでに蓄積したウイルスユビキチンリガーゼの基質特異性に関する知見をもとにデータベースを探索し、基質候補となり得る特徴を有する分子をピックアップした。そして本研究の実施により、白血球の循環等に関与するL-セレクトインがK3およびK5の基質であることを発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

KSHVユビキチンリガーゼにとっての新たな基質の発見により、これまでに明らかになっていなかった、KSHV感染病態と白血球循環との関連性が浮かび上がってきた。このことは、KSHVによる新たな病態の詳細な解明や、KSHV治療薬の開発等の足掛かりになるかもしれない。

研究成果の概要（英文）：Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) causes malignant tumors in immunocompromised individuals. KSHV expresses viral ubiquitin ligases K3 and K5. Since these ligases mediate ubiquitin-dependent endocytosis of host immunoregulatory molecules, KSHV-infected cells can escape from host immune surveillance. Many membrane proteins have been discovered as substrate for K3 and K5; however, some substrates may remain undiscovered. Based on our knowledge about the substrate specificity of these ligases, we focused several membrane proteins as novel substrate candidate. In this study, L-selectin was identified as novel substrate for K3 and K5.

研究分野：微生物学 タンパク質科学

キーワード：ウイルス ユビキチン ユビキチンリガーゼ 免疫回避 カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

(1) カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス (Kaposi's sarcoma associated herpesvirus : 以下 KSHV) は重度の免疫不全患者における悪性肉腫の発生に関連する DNA ウイルスである。KSHV は健常人では B 細胞に潜伏感染するが、著しい免疫力の低下時に再活性化して溶解感染に移行し、血管内皮細胞へと感染を広げる。KSHV に対する抗ウイルス薬はなく、治療には抗 HIV 薬や抗腫瘍薬を用いる。しかし抗 HIV 薬はエイズを原因とする免疫不全による肉腫患者以外への治療が困難であり、また抗腫瘍薬は副作用の問題があることから、抗 KSHV 薬の開発は重要な課題である。

(2) 溶解感染に移行した KSHV 感染細胞は免疫を回避することが知られている。KSHV は抗原提示分子 MHC クラス I (MHC-I) の細胞表面発現を消失させ、抗原提示を介して感染細胞を破壊するキラー T 細胞の攻撃を回避する (Ishido, *J Virol* 2000, 74:5300)。KSHV はさらに補助刺激分子 B7-2 および接着分子 ICAM1 の細胞表面発現も消失させ、MHC-I を失った場合のセーフティネットであるナチュラルキラー細胞による排除をも回避する (Ishido, *Immunity* 2000, 13:365)。このように、KSHV は宿主の免疫低下に加えて、さらなる免疫回避を実施することで病態を進行させることから、KSHV の溶解感染には免疫回避の実施が不可欠であると考えられる。すなわち KSHV による免疫回避の抑制は、抗 KSHV 薬開発の糸口となるとことが期待されるが、その全貌は未解明であり、未だ発見されていない免疫回避パスウェイが存在する可能性が残っている。

2. 研究の目的

KSHV が発現する MIR1 (別名 K3) および MIR2 (別名 K5) は、宿主免疫関連タンパク質を標的として認識し、ポリユビキチン鎖を付加することでユビキチン依存的なリソソーム分解へと誘導するユビキチンリガーゼである。すなわち MIR による基質選択は、KSHV の免疫回避にとって非常に重要なポイントである。MIR の基質は上述した MHC-I、B7-2、ICAM1 以外にも、CD1d、HFE、MICA、MICB、DC-SIGN、DC-SIGNR、IFN R1、PECAM、BST2 など多数報告されているが、網羅的な同定は不十分である。したがって、MIR には未知の基質が残存している可能性があるため、申請者は独自の視点をもとに MIR の新たな基質を探索し、KSHV による新たな宿主免疫回避機構の存在を見出すことを目的として本研究を実施した。

3. 研究の方法

(1) 申請者は MIR2 が基質の 1 つである B7-2 をユビキチン化するために、B7-2 の細胞外領域-膜貫通領域境界面に存在する荷電アミノ酸を認識することを発見した (Kajikawa, *J Virol* 2012, 86:5288)。この気づきをもとに、「細胞外領域の細胞膜表面近傍に“荷電アミノ酸”を有する膜タンパク質」を基質として識別している可能性を考え、NCBI データベースに登録されている免疫関連膜タンパク質から、そのような特徴を有する膜タンパク質を基質候補分子として抽出した。

(2) 抽出された基質候補分子群について、実際に MIR 依存的な細胞表面からの消失 (ダウンレギュレーション) を受けるかどうかを調べるため、各基質候補分子および KSHV MIR を発現するベクターを構築し、遺伝子導入により培養細胞に発現させて、フローサイトメトリーおよびウエスタンブロットングによって基質候補分子の消失の有無を観察した。

(3) MIR 依存的な消失が起きた基質候補分子について、その消失が MIR の媒介による基質候補分子のユビキチン化によるものかどうかを調べるため、基質候補分子および MIR の変異体を発現する発現ベクターを構築し、遺伝子導入により培養細胞に発現させて、フローサイトメトリーおよびウエスタンブロットングによって MIR 依存的な基質候補分子のユビキチン化を検出した。

4. 研究成果

(1) データベースから抽出した基質候補分子をコードする発現ベクターを構築した。構築した発現ベクターを、ヒト由来の培養細胞である HeLa 細胞に遺伝子導入し、細胞表面に発現させた。同時に、KSHV ユビキチンリガーゼ MIR1 および MIR2 の発現ベクターを導入して発現させたところ、基質候補分子群のいくつかにおいて MIR 依存的な細胞表面からの消失 (ダウンレギュレーション) が観察された。本研究ではこれらのうち、L-セレクトリンについて、さらなる解析を実施した。

(2) MIR の N 末端に存在する RINGv ドメインは、MIR1 および MIR2 分子に活性化ユビキチンを運ぶ E2 分子との相互作用を担う領域であり、MIR のユビキチンリガーゼ活性に必須である。L-セレクトリンのダウンレギュレーションは、MIR1 および MIR2 の RINGv ドメインの機能に依存することが明らかになった。また、基質の細胞質尾部に存在するリジンの側鎖は、MIR1 および MIR2 のはたらきでユビキチンが共有結合によって付加される部位であり、基質がユビキチン化を受け

るために必須である。L-セ렉チンのダウンレギュレーションは、L-セ렉チン自身の細胞質尾部に存在するリジンにも依存することが明らかになった。さらに、L-セ렉チンは、MIR 依存的にポリユビキチン鎖で修飾されること、L-セ렉チンが MIR1 および MIR2 と相互作用することも明らかになった。以上の結果は、L-セ렉チンの HeLa 細胞表面からのダウンレギュレーションは、L-セ렉チンが MIR1 および MIR2 によって認識され、ポリユビキチン化を受けて消失することを示すものである。すなわち L-セ렉チンは MIR1 および MIR2 の基質であるとの結論が導かれた。

(3) L-セ렉チンは細胞への刺激をきっかけに、細胞膜プロテアーゼにより膜近傍領域を切断され、細胞外領域が細胞膜上から放出されることが知られている。この現象は Shedding と呼ばれる。L-セ렉チンの Shedding が起きた細胞を本研究と同じ方法でフローサイトメトリーおよびウエスタンブロットング解析すると、L-セ렉チンの消失として観察され、ユビキチン化によるダウンレギュレーションによる消失と見分けがつきにくい。したがって、L-セ렉チンが MIR の基質であることを証明するためには、本研究において検出された L-セ렉チンのダウンレギュレーションが、Shedding によるものではないことを証明する必要がある。そこで L-セ렉チンのプロテアーゼ感受性部位に変異を導入した Shedding 不応答性の L-セ렉チンをコードする発現ベクターを作製し、培養細胞を用いてダウンレギュレーションの有無を観察したところ、Shedding 不応答性の L-セ렉チンは、野生型の L-セ렉チンと同様に MIR 依存的なダウンレギュレーションを受けることが明らかになった。以上のことから、本研究で観察された L-セ렉チンのダウンレギュレーションは、Shedding 誘発によるものではなく、MIR の基質としてユビキチン化を受けたことによるダウンレギュレーションであることが確認された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kajikawa Mizuho, Imaizumi Nanae, Machii Shiho, Nakamura Tomoka, Harigane Nana, Kimura Minako, Miyano Kei, Ishido Satoshi, Kanamoto Taisei	4. 巻 102
2. 論文標題 Kaposi 's sarcoma-associated herpesvirus ubiquitin ligases downregulate cell surface expression of L-selectin	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of General Virology	6. 最初と最後の頁 e001678
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1099/jgv.0.001678	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------