

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月6日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790387

研究課題名（和文）p53 誘導因子によるウイルス感染防御の分子機構

研究課題名（英文）Anti-virus protection by p53 inducible factor

研究代表者

新屋 政春（Masaharu Shin-Ya）

京都府立医科大学・医学部・プロジェクト研究員

研究者番号：10405277

研究成果の概要（和文）：

p53 はがん抑制遺伝子として重要であるが、ウイルス感染防御における役割についてはよく解っていない。我々は、p53 が Fbw7 β を誘導してウイルス感染防御にはたらく事を見いだした。Fbw7 には3つのアイソフォームが存在するが、Fbw7 β が強力にウイルス感染防御に作用することを明らかにした。本研究の成果は、新たな抗ウイルス剤の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：

p53 is a important for tumor suppressor gene, while it's contribution of anti-virus protection remains unclear. We found that p53 induced Fbw7 β worked to anti-virus protection. Although three isoforms existed in Fbw7, it was shown that Fbw7 β strongly acts on anti-virus protection. These present results may lead to development of a novel antiviral drug.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：p53

1. 研究開始当初の背景

我々は、細胞内インターフェロンのシグナル伝達経路に関する研究の過程でインターフェロンにより転写誘導された p53 がウイルス感染の抑制に関与していることを明らかにした。さらに、p53 に誘導されるウイルス感染防御はユビキチン・プロテアソーム阻害剤の添加によりキャンセルされた。

ユビキチン・プロテアソーム系は、細胞周期、シグナル伝達、DNA 修復、アポトーシスの制御等に関与しており、その以上により様々な疾患が生じることも明らかになっている。ウイルス感染においては、ウイルスはそのライフサイクルの複数のプロセスで宿主細胞のユビキチン・プロテアソーム系を利用している。よく知られているところでは、レトロウイルス、ラプトウイルス、フィロウイルスなどが、ウイルスの出芽にユビキチン・プロテアソーム系を利用していることが挙げられ、ユビキチン・プロテアソーム系はウイルスが効率よく子孫を増幅するために必要な仕組みの1つであると考えられる。一方、我々が見いだした現象は、ユビキチン・プロテアソーム系が宿主細胞の何らかの機構を動かして、ウイルスの増幅を抑制している。このようなユビキチン・プロテアソーム系が、ウイルスの増幅を抑制する仕組みはこれまでほとんど知られておらず、ウイルス感染におけるユビキチン・プロテアソーム系の役割に新たな概念を提唱するものと思われる。

p53 により誘導されるユビキチン・リガーゼとして Fbw7 β が知られている。Fbw7 は SCF ユビキチンリガーゼ複合体の基質認識サブユニットとして機能する F ボックスタンパク質である。Fbw7 遺伝子の変異あるいは欠失が多くのがんにおいてみつまっている

ことや、Fbw7 の基質(サイクリン E、c-Myc、c-Jun、Notch、mTOR など) が細胞増殖に関係することからがん抑制遺伝子としての重要性が注目されている。最近では、がん抑制機能だけでなく幹細胞の維持、脂質代謝の調節など、その多彩な機能が報告されており、新たな生物学的機能の解明および新たな基質分子の同定はがんをはじめとするさまざまな疾患に対する分子標的療法における標的タンパク質の同定という観点からも重要な意味をもつと考えられている。

2. 研究の目的

p53 によるウイルス感染防御には Fbw7 β が必須であるが、その下流にある標的分子については明らかになっていない。本研究では、Fbw7 β により誘導されるウイルス感染防御の機構の解明と、その分子基盤を検討する。

3. 研究の方法

1) p53 誘導性ウイルス感染防御における Fbw7 の役割について。

Fbw7 欠損細胞株である HCT116 Fbw7 $^{+/-}$ に p53 もしくは、Fbw7 β 遺伝子を導入した細胞に HSV-1 および VSV を感染させ、細胞の増殖を細胞変性効果で、培養上清中のウイルス量をプラーク法で、細胞内でウイルス増幅をリアルタイム PCR (遺伝子レベル) とウエスタンブロット・ティング (タンパクレベル) にて評価した。

2) ウイルス感染防御における Fbw7 アイソフォームの役割について。

HCT116 Fbw7 $^{+/-}$ に Fbw7 の各アイソフォームの遺伝子 (Fbw7 α 、Fbw7 β 、Fbw7 γ) を導入した細胞に HSV-1 および VSV を感染させ、細胞の増殖を細胞変性効果で、培養上清中のウイルス量をプラーク法で、細胞内でウイルス増幅をリアルタイム PCR (遺伝子レ

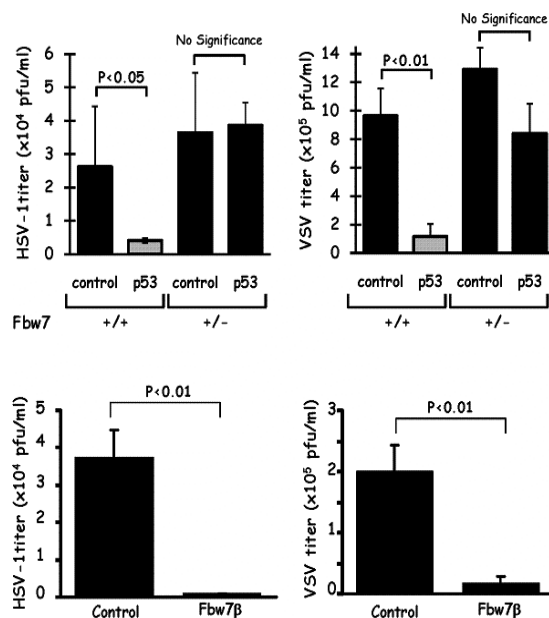
ベル) とウェスタンブロー・ティング (タンパクレベル) にて評価した。

3) Fbw7 β によるウイルス感染防御の分子機構の解明について。

Fbw7 β による抗ウイルス感染防御機構を理解するために、HaloTagを付加したFbw7 β を293T細胞に強制発現させ、Fbw7 β と相互作用する因子をHaloTagビーズでプルダウンし、LCMSを行い、候補分子を評価した。

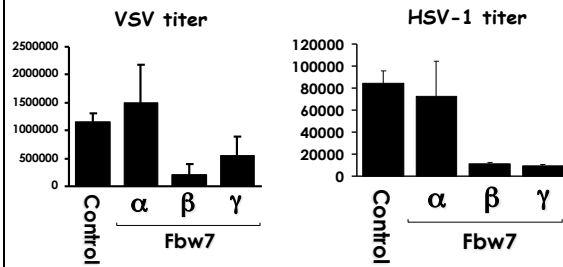
4. 研究成果

HCT116 Fbw7 $+/+$ にp53遺伝子を導入した細胞にHSV-1およびVSVを感染させ、感染防御能を検討したところ、p53により誘導される抗ウイルス作用が、Fbw7機能欠損細胞では全く認められなかった(左図上段)。次いで、p53の代わりにFbw7 β の発現ベクターをFbw7機能欠損細胞に導入し、Fbw7 β が抗ウイルス作用を有するか否かについて検討した。p53遺伝子導入では認められなかったウイルス増幅の抑制が、Fbw7 β 遺伝子導入により認められた(左図下段)。



したがって、p53によるウイルスの増幅抑制には、p53により転写誘導されるFbw7 β が必須に機能していることがあきらかにな

った。



Fbw7により誘導される抗ウイルス作用が、Fbw7 β だけが有する機能か否について検討するために、Fbw7の各アイソフォームの発現ベクターをFbw7機能欠損細胞に導入し、HSV-1およびVSVを感染させた。Fbw7によるウイルス感染防御効果は、他のアイソフォームに比べてFbw7 β で強く見られた(右上図)。Fbw7 β はp53によるウイルス感染防御において重要なはたらきをしていることが示唆されるが、他のFbw7に比べて細胞内局在が異なることや発現量が極めてひくいことなどから、Fbw7 β 特異的な生物学的活性については十分にわかっていない。そこで、我々はFbw7 β による抗ウイルス感染防御の分子基盤を明らかにするために、HaloTagを付加したFbw7 β を293T細胞に強制発現させ、Fbw7 β と相互作用する因子をHaloTagビーズでプルダウンし、LCMSを行い、いくつかの候補分子を同定した。感染防御効果については現在検討中である。

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3件)

1) Yoshimoto K, T. Kishida, H. Nakano, M. Matsui, M. Shin-Ya, T. Shimada, S. Nakai, J. Imanishi, M. Takeuchi, Y. Hisa & O. Mazda: Interleukin-28B (IL-28B) acts synergistically with cisplatin to suppress the growth of head and neck

squamous cell carcinoma. J Immunother. 34(2):139-48、2011、査読有

2) Honjo K, KA. Takahashi, O. Mazda, T. Kishida, M. Shinya, D. Tokunaga, Y. Arai, A. Inoue, N. Hiraoka, J. Imanishi & T. Kubo: MDR1a/1b gene silencing enhances drug sensitivity in rat fibroblast-like synoviocytes. J Gene Med. 12(2):219-27、2010、査読有

3) Shinoda M, M. Shin-Ya, Y. Naito, T. Kishida, R. Ito, N. Suzuki, H. Yasuda, J. Sakagami, J. Imanishi, K. Kataoka, O. Mazda & Yoshikawa T: Early-stage blocking of Notch signaling inhibits the depletion of goblet cells in dextran sodium sulfate-induced colitis in mice. J Gastroenterol. 45(6):608-17、2010、査読有

[学会発表] (計 1 件)

1) Kishida T, Nakai N, Matsui M, Yoshimoto K, Nakano H, Shin-Ya M, Shimada T, Nakai S, Hisa Y, Katoh N, Mazda O. Gain-of-function and loss of function analyses in vivo of transcriptional factor and cytokine genes using Epstein-Barr virus-based episomal vectors, and their implication to novel strategies of gene therapy and regenerative medicine. 2010 International Symposium on Micro-Nano Mechatronics and Human Science (From Micro & Nano Scale Systems to Robotics & Mechatronics Systems) (Nagoya), Nov 8-9, 2010

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新屋 政春 (Masaharu Shin-YA)

京都府立医科大学・医学部・プロジェクト研

究員

研究者番号 : 10405277

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :