

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 12 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591384

研究課題名(和文) HTLV-1 発がん機序における脱ユビキチン化酵素 USP20・USP33 の役割

研究課題名(英文) The role of deubiquitinases USP20 and USP33 in oncogenesis by HTLV-1

研究代表者

安永 純一郎 (Yasunaga, Jun-ichirou)

京都大学・ウイルス研究所・講師

研究者番号：40362404

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000 円、(間接経費) 1,200,000 円

研究成果の概要(和文)：HTLV-1は成人T細胞白血病(ATL)の原因ウイルスである。宿主の脱ユビキチン化酵素USP20はNF- $\kappa$ B経路を抑制しATL細胞の増殖を阻害するが、ATL細胞では発現が低下している。したがってUSP20のATL発がんへの関与が示唆される。本研究ではUSP20および近縁分子USP33がp53と結合し、機能を活性化することを見出した。またHTLV-1のがん蛋白TaxとHBZは共に細胞内でユビキチン化され、活性が増強されることも判明した。USP20は両者のユビキチン化を減少させた。ATL細胞はUSP20の発現を抑制することにより、TaxとHBZのユビキチン化を維持していることも示唆される。

研究成果の概要(英文)：Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) is an etiological agent of adult T-cell leukemia (ATL). It has been reported that a cellular deubiquitinase USP20 is a negative regulator of the NF- $\kappa$ B signaling pathway, and suppresses proliferation of ATL cells, while its expression is down-regulated in ATL cells. Those observations suggest that USP20 is involved in leukemogenesis of ATL. In this project, we found that USP20 and its relative, USP33, could bind to p53 and activate its transcriptional activity. In addition, it was shown that two viral oncoproteins encoded in HTLV-1, Tax and HTLV-1 bZIP factor (HBZ), were ubiquitinated and their activity were enhanced by this modification. USP20 reduced their ubiquitination level. It was suggested that down-regulation of USP20 in ATL cells might have a role for maintenance of Tax and HBZ ubiquitination.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：血液腫瘍学 ウイルス発がん

## 1. 研究開始当初の背景

蛋白質のユビキチン修飾は細胞内シグナル伝達において重要な役割を担い、その修飾様式や制御メカニズムは多彩である。現在 NF- $\kappa$ B シグナル経路に関与する数多くの蛋白質がユビキチン化されていることが知られており、個々の分子はユビキチン修飾を介して様々な機序によりその機能を制御されている。ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型 (human T cell leukemia virus type 1: HTLV-1) は成人 T 細胞白血病の原因ウイルスであり、その発がん機序において HTLV-1 による NF- $\kappa$ B 活性化および制御異常が非常に重要だと考えられている。以前より HTLV-1 にコードされる強力なオンコプロテイン Tax が NF- $\kappa$ B 古典的経路 (canonical pathway)、非古典的経路 (non canonical pathway) の両方を活性化することが知られており、申請者は脱ユビキチン酵素 ubiquitin specific peptidase 20 (USP20) が Tax および TRAF6 を基質とし、NF- $\kappa$ B を抑制する分子であることを見出していた。しかしながら、USP20 の生理機能および発がんにおける役割は不明な点が多かった。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は USP20 とその近縁分子である USP33 に関して、その生理機能を解析し、HTLV-1 による発がんにおける意義を明らかにすることである。具体的には USP20 と USP33 が関与するシグナル経路およびその制御に関わる基質の同定を試みた。一方、ウイルス側因子である HBZ におけるユビキチン化修飾について解析し、Tax とともに修飾による機能変化について解析した。さらに同定した基質をいかに USP20/33 が制御するのか、またそれらの発がんにおける意義について明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### 1. 新規 USP20/33 結合蛋白の同定

一般的に脱ユビキチン化酵素は細胞内において基質と物理的に結合するため、USP20 もしくは USP33 との結合を指標にこれらの基質分子の同定を試みた。具体的には Flag タグを付加した USP20 もしくは USP33 の発現ベクターと候補遺伝子発現ベクターをヒト胎児腎細胞株の HEK293T 細胞にトランスフェクションし、2 日後に細胞溶解液と抗 Flag タグ抗体を用いて免疫沈降反応を行い、結合の有無を評価した。

### 2. USP20/33 が同定した結合蛋白の活性に与える影響

同定した USP20/USP33 結合蛋白の活性について検討した。同定した USP20/33 結合蛋白が転写因子であったため、ルシフェーラスアッセイを行い USP20/USP33 の強制発現、および内在性発現の RNAi によるノックダウンが、当該転写因子の活性に与える影響を解析した。

### 3. ノックアウトマウスによる USP20/33 の生理機能解析

USP20 および USP33 の生理機能を詳細に解析するために Usp20 および Usp33 のノックアウトマウスの樹立を試みた。Usp20 ノックアウトマウスは理研 CDB との共同研究にて作製し、Usp33 ノックアウトマウスは KOMP から入手した。共にコンディショナルノックアウトマウスであり、全身性に Cre を発現する CAG-Cre トランスジェニックマウスと各々を交配し、ノックアウトマウスを作製した。

### 4. HBZ 蛋白および Tax 蛋白のユビキチン修飾の解析

HBZ 蛋白が Tax 同様ユビキチン修飾を受けているかどうかについて解析した。具体的には HEK293T に HA タグ付加ユビキチン分子と myc タグ付加 HBZ の発現ベクターを導入し、抗 myc タグ抗体で免疫沈降後ウエスタンブロットを行い抗 HA 抗体にてユビキチン化 HBZ 蛋白の有無を検出した。さらに、HBZ にとってユビキチン修飾がどのように機能するのかについて、ルシフェーラスアッセイを用いて解析した。

## 4. 研究成果

### 1. 新規 USP20/33 結合蛋白の同定

USP20 もしくは USP33 との結合分子の同定を試み、USP20 および USP33 が p53 と結合することを見出した。p53 反応性レポーターベクターを用いてルシフェーラスアッセイを行い、USP20 と USP33 が p53 の転写能活性化に関与していると考えられた。一方、USP20 の脱ユビキチン化能欠失型変異体が p53 活性機能を保持していることが判明し、USP20 による p53 活性化は脱ユビキチン酵素活性に依存しない機序によると考えられた。USP20 および USP33 の生理機能についてより詳細に解析を行うため、Usp20 ノックアウトマウス、Usp33 ノックアウトマウスを作成した。これらは全て正常に生育し、肉眼的に明らかな異常を認めなかった。現在ダブルノックアウトマウスの表現型を解析中である。

### 2. HBZ 蛋白および Tax 蛋白のユビキチン修飾の解析

HBZ は細胞内でポリユビキチン化され、HBZ

のTGF-β/Smad 経路の活性化に関与することを見出した。ユビキチン分子内のリシンをアルギニンに置換した変異体を用いた解析から、HBZ に認められるポリユビキチン鎖はK48 および K63 以外の linkage によるものであることが判明した。さらに、USP20 が Tax のみならず HBZ のユビキチン化を減少させることが明らかとなった。

#### 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. Tanaka-Nakanishi A, Yasunaga J, Takai K, Matsuoka M. HTLV-1 bZIP Factor Suppresses Apoptosis by Attenuating the Function of FoxO3a and Altering Its Localization. **Cancer Res**, 74; 188-200, 2014.
2. Miura M, Yasunaga J, Tanabe J, Sugata K, Zhao T, Ma G, Miyazato P, Ohshima K, Kaneko A, Watanabe A, Saito A, Akari H, Matsuoka M. Characterization of simian T-cell leukemia virus type 1 in naturally infected Japanese macaques as a model of HTLV-1 infection. **Retrovirology**, 10; 118, 2013.
3. Matsuoka M and Yasunaga J. Human T-cell leukemia virus type 1: replication, proliferation and propagation by Tax and HTLV-1 bZIP factor. **Curr Opin Virol**, 3; 684-691, 2013.
4. Zane L, Yasunaga J, Mitagami Y, Yedavalli V, Tang SW, Chen CY, Ratner L, Lu X, Jeang KT. Wip1 and p53 contribute to HTLV-1 Tax-induced tumorigenesis. **Retrovirology**, 9; 114, 2012.
5. Ma G, Yasunaga J, Fan J, Yanagawa S, Matsuoka M. HTLV-1 bZIP factor dysregulates the Wnt pathways to support proliferation and migration of adult T-cell leukemia cells. **Oncogene**, 32; 4222-4230, 2013.
6. Sugata K, Satou Y, Yasunaga JI, Hara H, Ohshima K, Utsunomiya A, Mitsuyama M, Matsuoka M. HTLV-1 bZIP factor impairs cell-mediated immunity by suppressing production of Th1 cytokines. **Blood**, 119; 434-444, 2012.
7. Yasunaga J and Matsuoka M. Molecular mechanisms of HTLV-1 infection and pathogenesis. **Int. J. Hematol**, 94; 435-442, 2011.
8. Yasunaga J, Lin FC, Lu X, Jeang KT. Ubiquitin-specific peptidase 20 (USP20) targets TRAF6 and HTLV-1 Tax to negatively regulate NF- B signaling. **J Virol**, 85; 6212-6219, 2011.
9. Hagiya K, Yasunaga JI, Satou Y, Oshima K, Matsuoka M. ATF3, an HTLV-1 bZip factor binding protein, promotes proliferation of adult T-cell leukemia cells. **Retrovirology**, 8; 19, 2011.

[学会発表](計30件)

1. Miura Michi, Junko Tanabe, Kenji Sugata, Tiejun Zhao, Guangyong Ma, Paola Miyazato, Jun-ichiro Yasunaga, Masao Matsuoka: HTLV-1 infected Japanese macaque as a model of HTLV-1 infection: 16th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses 2013, Holiday Inn Montreal-Midtown, Montreal, Canada, June26-30, 2013.
2. Azusa Tanaka-Nakanishi, Jun-ichiro Yasunaga, Ken Takai, Masao Matsuoka: Molecular mechanisms of apoptosis suppression by HTLV-1 bZIP factor in HTLV-1 infected cells: 16th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses 2013, Holiday Inn Montreal-Midtown, Montreal, Canada, June26-30, 2013.
3. Guanyong Ma, Jun-ichiro Yasunaga, Jun fan, Shin-ichi Yanagawa, Masao Matsuoka: HTLV-1 mediated dysregulation of the Wnt pathways: Roles of Tax and HBZ: 16th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses 2013, Holiday Inn Montreal-Midtown, Montreal, Canada, June26-30, 2013.
4. Akihiro Kawatsuki, Jun-ichiro Yasunaga, Masao Matsuoka: HTLV-1 bZIP factor suppresses c-Fos transcription and impairs T cell activation: HTLV and Related Viruses 2013, Holiday Inn Montreal-Midtown, Montreal, Canada, June26-30, 2013.
5. 松岡雅雄、安永純一朗: ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型による発がん: Tax と HBZ の拮抗と協調: 第 61 回日本ウイルス学会 学術集会、神戸国際会議場(兵庫県) 2013 年 11 月 10-12 日
6. 安永純一朗: ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型による病原性発現メカニズム: 第 4 回ナ

- ノバイオ創薬研究シンポジウム、京都大学杉浦ホール、2013年3月9日
7. 安永純一郎：HTLV-1 がコードする二つのがん遺伝子 tax と HTLV-1 bZIP：第 15 回白馬シンポジウム in 名古屋、(独)国立病院機構名古屋医療センター(愛知) 2013年7月19-20日
  8. 田中梓、安永純一郎、高井健、松岡雅雄：HTLV-1 bZIP factor(HBZ) は転写因子 FoxO3a の機能を阻害することによりアポトーシスを抑制する：第 6 回 HTLV-1 研究会・シンポジウム(東京医科学研究所講堂) 2013年8月25-26日
  9. 田中梓、安永純一郎、松岡雅雄：HTLV-1 bZIP factor suppresses intrinsic and extrinsic apoptotic pathways by targeting FoxO3a:第 72 回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜(神奈川) 2013年10月3-5日
  10. 三浦未知、趙鉄軍、馬広勇、安永純一郎、松岡雅雄：Simian T-cell leukemia virus type 1-infected Japanese Macaques as a model for HTLV-1 research: 第 72 回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜(神奈川) 2013年10月3-5日
  11. Jun-Ichiro Yasunaga, Guangyong Ma, Jun Fan, Shin-Ichi Yanagawa, Masao Matsuoka: Perturbation of the Wnt pathway by HTLV-1 is important in viral replication and cell proliferation: 第 75 回日本血液学会学術集会、ロイトン札幌・さっぽろ芸文館・札幌市教育文化会館(北海道) 2013年10月11-13日
  12. 菅田謙治、安永純一郎、三浦未知、明里宏文、小柳義夫、小原道法、松岡雅雄：組換えウイルスを用いた抗 HTLV-1 ワクチンの作製と Macaque 属での応用：第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸国際会議場(兵庫県) 2013年11月10-12日
  13. 園直希、馬広勇、萩屋啓太、安永純一郎、松岡雅雄：FBXL11 は HTLV-1 bZIP factor と Tax の機能を共に増強し ATL 細胞の増殖を促進する：第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸国際会議場(兵庫県) 2013年11月10-12日
  14. 紀ノ定明香、安永純一郎、伊豫田智典、稲葉カヨ、松岡雅雄：HBZ による CD4 陽性 T 細胞増殖促進の免疫学的機序：第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸国際会議場(兵庫県) 2013年11月10-12日
  15. 安永純一郎、馬広勇、范珺、柳川伸一、松岡雅雄：HTLV-1 bZIP factor による non-canonical Wnt 活性化機構とその意義：第 5 回 HTLV-1 研究会・シンポジウム、東京大学医科学研究所(東京) 2012年8月25日
  16. 三浦未知、田邊順子、菅田謙治、趙鉄軍、安永純一郎、松岡雅雄：HTLV-1 感染動物モデルとしてのサル T 細胞白血病ウイルス 1 型感染ニホンザルの解析：第 5 回 HTLV-1 研究会、東京大学医科学研究所(東京) 2012年8月26日
  17. 安永純一郎、柳川伸一、松岡雅雄：Dysregulation of the Wnt pathways by HTLV-1 bZIP factor is involved in leukemogenesis of adult T-cell leukemia：第 71 回日本癌学会学術総会、ロイトン札幌(札幌) 2012年9月19-21日
  18. 園直希、萩屋啓太、安永純一郎、松岡雅雄：F-box and leucine-rich repeat protein 11 enhances the activity of two HTLV-1 proteins, HBZ and Tax：第 71 回日本癌学会学術総会、ロイトン札幌(札幌) 2012年9月19-21日
  19. 水戸部悠一、安永純一郎、佐藤賢文、中西梓、松岡雅雄：5'UTR of HTLV-1 bZIP factor gene is important for increased CD4+ T-cells in vivo: 第 71 回日本癌学会学術総会、ロイトン札幌(札幌) 2012年9月19-21日
  20. Jun-ichiro Yasunaga, Azusa Tanaka-Nakanishi, Ken Takai and Masao Matsuoka:HTLV -1 bZIP factor downregulates proapoptotic genes through perturbation of FoxO3a function. 第 74 回日本血液学会学術集会、国立京都国際会館(京都) 2012年10月19-21日
  21. 三浦未知、田邊順子、菅田謙治、Zhao Tiejun、齊藤暁、安永純一郎、明里宏文、松岡雅雄：サル T 細胞白血病ウイルス 1 型のウイルス学的解析と病原性：第 60 回日本ウイルス学会学術集会、グランキューブ大阪(大阪) 2012年11月13-15日
  22. 三田上侑生、安永純一郎、松岡雅雄：ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型感染細胞の増殖とウイルス複製機構における脱ユビキチン化酵素 USP20 の役割：第 60 回日本ウイルス学会学術集会、グランキューブ大阪(大阪) 2012年11月13-15日
  23. Junichiro Yasunaga, Guangyong Ma, Jun Fan, Shin-ichi Yanagawa and Masao Matsuoka. Noncanonical Wnt5a is induced by HTLV-1 bZIP factor, and supports proliferation and migration of adult T-cell leukemia cells :54th American Society of Hematology (ASH) Annual Meeting and Exposition, Georgia

- World Congress Center, Atlanta, U.S.A, December 7-11, 2012.
24. 川月章弘、安永純一郎、松岡雅雄：HTLV-1 bZIP Factor(HBZ) Interacts with Enhancer of Polycomb Homolog1(EPC1), and Suppresses c-fos Transcription：第35回日本分子生物学会年会、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡(福岡) 2012年12月11-14日
25. Sugata K, Satou Y, Yasunaga J, Nosaka K, Matsuoka M. HTLV-1 bZIP factor perturbs immune response to the pathogens in vivo by inhibiting IFN-gamma production: 15<sup>th</sup> INTERNATIONAL CONFERENCE ON HUMAN RETROVIROLOGY HTLV AND RELATED VIRUSES. Leuven, Belgium. 4-8 June, 2011
26. Yasunaga J, Lin FC, Lu X, Jeang KT. HTLV-1 Tax-induced NF-kB activation is negatively regulated by Ubiquitin-specific peptidase 20(USP20): 15<sup>th</sup> INTERNATIONAL CONFERENCE ON HUMAN RETROVIROLOGY HTLV AND RELATED VIRUSES. Leuven, Belgium. 4-8 June, 2011
27. Yasunaga J, Lin FC, Lu X, Jeang KT. Ubiquitin-specific peptidase 20(USP20) suppresses NF-kB pathway by targeting TRAF6 and HTLV-1 Tax: 2011 ASBMB Special Symposia Series. Guangzhou Baiyun International Convention Center, China. July 24-26, 2011
28. Yasunaga J, Lin FC, Lu X, Jeang KT. UBIQUITIN-SPECIFIC PEPTIDASE 20 TARGETS HTLV-1 TAX AND NEGATIVELY REGULATES NF-kB PATHWAY: International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. Sappaoro Convention Center, Japan. September 11-16, 2011
29. 安永純一郎：Ubiquitin-specific peptidase 20(USP20) suppresses NF-kB pathway by targeting TRAF6 and HTLV-1 Tax: 第70回日本癌学会学術総会、名古屋、2011年10月3-5日
30. Yasunaga J, Tiejun Zhao, Miyazato Paola, Satou Y, Matsuoka M. HTLV-1 bZIP factor (HBZ) induces functionally impaired regulatory T-cells in vivo: 第73回日本血液学会学術集会、名古屋、2011年10月14-16日

{ 図書 } (計 0 件)

{ 産業財産権 }  
出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

{ その他 }  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

安永 純一郎 (YASUNAGA Jun-ichirou)  
京都大学・ウイルス研究所・講師  
研究者番号：40362404

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：