様　式　C－19、F－19、Z－19　(共通)

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 27 年　 5 月 12 日現在

機関番号：３４３０６
研究種目：基盤研究(C)
研究期間：2012～2014
課題番号：２４５９０１０３

研究課題名（和文）細胞性およびウイルス性蛋白質の細胞内分解・成熟機構

研究課題名（英文）The degradation machinery of cellular and viral proteins

研究代表者
藤室　雅弘（fujimuro, masahiro）

京都薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：２０３６０９２７

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　4,100,000円

研究成果の概要（和文）：カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス(KSHV)は、感染者の免疫不全時にカポジ肉腫やB細胞性リンパ腫を引き起こす。KSHVは潜伏感染時に、潜伏感染関連核抗原（LANA)を発現する。LANAはウイルスDNAの維持を行うとともに、感染細胞の発がんに関与する。本研究により、LANAは脱ユビキチン化酵素(HAUSP)により安定化され、KSHVゲノムの維持・安定化を亢進させることを見出した。また、KSHV関連腫瘍を標的とした抗腫瘍化合物と抗KSHV化合物の探索を実施した結果、ジアシルトリスルフィドとC60フラーレン誘導体はKSHV感染B細胞性リンパ腫に対する抗腫瘍活性を有することを見出した。

研究成果の概要（英文）：Kaposi’s sarcoma-associated herpesvirus (KSHV; also known as HHV-8) is a rhadinovirus of the gamma-herpesvirus subfamily and the eighth human herpesvirus to be discovered. KSHV is the causative agent of Kaposi’s sarcoma and acquired immunodeficiency syndrome (AIDS)-related lymphoproliferative disorders, such as plasmablastic variant multicentric Castleman’s disease and primary effusion lymphoma (PEL). In this study, we demonstrated that KSHV-encoded the latency associated nuclear antigen (LANA) is stabilized by de-ubiquitinating enzyme (HSUSP), and enhances the replication and the maintenance of viral DNA. Forthermore, we found that the pyrrolidinium fullerene (C60) and an allyl sulfide have the antitumor activity against PEL cells, suggesting that fullerene and allyl sulfide may represent a novel therapy for the treatment of PEL.

研究分野：生物系薬学

キーワード：ウイルス　ヘルペスウイルス　リンパ腫　プロテアーゼ　シグナル伝達　抗腫瘍薬

１．研究開始当初の背景

世界中のエイズによる年間死者は三百万人に達し、収束する気配はない。その死因の多くはカリニ肺炎やカポジ肉腫等の日和見感染症である。カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス（KSHV）により引き起こされるカポジ肉腫は、発症者を死に至らせる悪性腫瘍である。また、医療先進国における臓器移植の増加に伴い、KSHV 感染ドナーによって提供される KSHV 汚染臓器を介したレシピエントの新興感染とカポジ肉腫発症という新たな問題が生じている。現在、日本においては HIV 感染者や臓器移植者が少数なため、KSHV 感染症についての議論は少ないが、今後、これらが深刻に問題視されるのは明らかである。

KSHV は、健常者に感染すると深刻な疾患を起こさずに潜伏感染し、潜伏感染関連核抗原（LANA)を発現してエピゾーム DNA として核内で維持される。潜伏感染者の免疫不全時に、KSHV はカポジ肉腫や B 細胞性リンパ腫を引き起こす。KSHV が潜伏感染時に発現する LANA はウイルス DNA の複製・維持と、がん化に関与する。一方で、ごく少数の潜伏感染した KSHV は、溶解感染へと移行し、細胞内でウイルス新生に必要な構造蛋白質や、DNA の複製酵素等を発現し、孫ウイルス産生を行なう。本研究では、蛋白質分解と LANA に焦点を当て、KSHV の感染細胞発がん機構を解明する。

２．研究の目的

カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス(KSHV)は感染者の免疫不全時に、カポジ肉腫や B 細胞性リンパ腫を引き起こす。KSHV は核内で潜伏期関連核抗原(LANA)を発現する。LANA はウイルス DNA の維持・複製を行なうと共に、NF-kB、Wnt シグナル等の細胞内シグナル伝達やユビキチン依存的な蛋白質分解系を利用または破綻させることで、感染細胞のがん化や感染維持を行なう。このようなウイルスによる細胞機能の乗っ取り行為を「分子海賊行為」という。本研究では、「蛋白質分解システム」を標的とした KSHV の分子海賊に焦点を当て、その解析により KSHV の「発がん機構」の解明を目指す。また、得られた研究成果を活用して KSHV 関連疾患を標的とした治療薬の探索と抗 KSHV 化合物の作用機序の解析も実施する。

３．研究の方法

(1) LANA の HAUSP による安定化の解析：

LANA は HAUSP を利用し、ポリユビキチン化を免れる。この制御機構と生理的意義を各種変異遺伝子や欠損遺伝子を用い分子生物学的に解明する。

(2) LANA のプロッセッシング機構の解：

LANA は核内で切断を受け、LANA-C を生成する。また、LANA-C はミトコンドリアタンパク質 p32 と結合するのでそれらの意義を各種変異遺伝子や欠損遺伝子を用い分子生物学的に解明する解明する。また、LANA 切断酵素の精製と同定を各種クロマトグラフィー用いた生化学的手法により、LANA のプロッセッシング機構を解明する。

(3) PEL を標的とした抗腫瘍化合物と抗 KSHV 化合物の探索：

PEL に対して細胞増殖抑制活性を持つ化合や KSHV に対してウイルス増殖抑制活性を持つ化合物の探索と作用機序解析を行う。なお、実験に使用する PEL 細胞株と KSHV 非感染 B 細胞株は下記の通り。

BC3：KSHV（+）/EBV(-)
BCBL1：KSHV（+）/EBV(-)
HBL6：KSHV（+）/EBV(+)
BC2：KSHV（+）/EBV(+)
Raji：KSHV（-）/EBV(+)
DG75：KSHV（-）/EBV(-)
Ramos: KSHV（-）/EBV(-)

細胞増殖アッセイには、各種化合物存在下 24 時間培養を行う。培養後、生存細胞数を測定するため、CCK-8 を添加し呈色反応後に 450 nm における吸光度を測定する。

ウイルス増殖抑制活性のアッセイには、BC3 細胞に、TPA を終濃度 20 ng/ml で添加しウイルスを産生させた。培養上清を DNase I 処理し、培養液に含まれるウイルス粒子からウイルス DNA を精製した。KSHV の ORF50 プライマー(5'-GATGACAAGGTAAAGATCGACCT-3' と 5'-GGTCAAGTACACCGAACACTTAA-3') を用いてリアルタイム PCR を行い、培養液に含まれる KSHV ゲノムのコピー数を算出した。

４．研究成果

(1) LANA の USP7 による安定化とプロテアソーム阻害機構の解析

我々は、LANA は脱ユビキチン化酵素(HAUSP)と結合し、HAUSP により脱ユビキチン化され安定化することを見出した。HAUSP は LANA の有する機能の一つである KSHV ゲノムの安定化を亢進させることを明らかにした。すなわち、HAUSP による脱ユビキチン化により、LANA はプロテアソームによる分解シグナルとなるポリユビキチン化を回避することで安定化し、KSHV ゲノムの維持と安定化に寄与したと考えられる。

(2) LANA のプロッセッシング機構の解

LANA は、細胞性プロテアーゼにより一箇所切断を受け 30kDa の安定な C 末端断片(LANA-C)を生成することを明らかにした。この LANA-C はミトコンドリア蛋白質の p32 前駆体と結合して p32 の成熟を阻害していた。p32 前駆体は N 末端部にミトコンドリア(Mt)移行シグナルを有し、Mt 内で、その移行シグナルが切断され成熟体 p32 となる。本研究において、p32 前駆体の Mt 内における移行シグ

ナルの２段階における切断様式と切断部位を明らかにし、LANA-C は p32 前駆体の移行シグナルの２段階目の切断を阻害することを見出した。さらに、LANA の切断を触媒する細胞性プロテアーゼ（プロセッシング酵素）の特徴付けと同定を実施した。LANA の切断部位を含む合成ペプチドを基質として用い、陰イオン交換クロマトグラフィーとゲル濾過により LANA 切断酵素の部分精製を行った結果、切断酵素は分子量 30kDa のセリンプロテアーゼであることが明らかになった。また、この LANA 切断酵素はアポトーシスにより活性化することも見出した。

(3) PEL を標的とした抗腫瘍化合物と抗 KSHV 化合物の探索

ER ストレス誘導剤のジアシルトリスルフィドは PEL 細胞内の NF-kB シグナルを阻害することで PEL 細胞にアポトーシスを誘導し、さらに PEL を移植した担癌マウスにおいても PEL 細胞の増殖を抑制したことから抗腫瘍活性を有していた。さらにジアシルトリスルフィドは KSHV に対してウイルス増殖抑制活性を有していることを見出した。ピロリジニュウム型 C60 フラーレン誘導体は PEL 細胞内の Erk シグナルを阻害することで PEL に対してにアポトーシスを誘導することを見出した。

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 6 件）

1. Watanabe T, Nakamura S, Ono T, Ui S, Yagi S, Kagawa H, Watanabe H, Ohe T, Mashino T, Fujimuro M. Pyrrolidinium fullerene induces apoptosis by activation of procaspase-9 via suppression of Akt in primary effusion lymphoma. Biochem. Biophys. Res. Commun., 451, 93-100. 2014
doi: 10.1016/j.bbrc.2014.07.068.

2. Wakao K, Watanabe T, Takadama T, Uia S, Shigemi Z, Kagawa H, Higashi C, Ohga R, Taira T, Fujimuro M, Sangivamycin induces apoptosis by suppressing Erk signaling in primary effusion lymphoma cells. Biochem. Biophys. Res. Commun., 444, 135-140, 2014.
doi: 10.1016/j.bbrc.2014.01.017.

3. Wakabayashi N, Skoko JJ, Chartoumpekis DV, Kimura S, Slocum SL, Noda K, Palliyaguru DL, Fujimuro M, Boley PA, Tanaka Y, Shigemura N, Biswal S, Yamamoto M, Kensler TW. Notch-Nrf2 axis: Regulation of Nrf2 gene expression and cytoprotection by Notch signaling. Mol. Cell. Biol., 34, 653-663. 2014
doi: 10.1128/MCB.01408-13.

4. Yamanokuchi R, Imada K, Miyazaki M, Kato H, Watanabe T, Fujimuro M, Saeki Y, Yoshinaga S, Terasawa H, Iwasaki N, Rotinsulu H, Losung F, Mangindaan E. P. R, Namikoshi M, de Voogd N.J, Yokosawa H, Tsukamoto S. Hyrtioreticulins A-E, indole alkaloids inhibiting the ubiquitin-activating enzyme from the marine sponge Hyrtios reticulates. Bioorg. Med. Chem., 20, 4437-4442, 2012
doi: 10.1016/j.bmc.2012.05.044.

5. Nakazawa T, Ohmae T, Fujimuro M, Ito M, Nishinaga T, Iyoda M, Syntheses, molecular structures, and antiviral activities of 1- and 2-(20-deoxy-D-ribofuranosyl)cyclohepta[d][1,2,3]triazol-6(1H)-ones and 1-(20-deoxy-D-ribofuranosyl)cyclohepta[b]pyrrol-8(1H)-one. Tetrahedron, 68, 5368-5374, 2012

6. Higashi C, Saji C, Yamada K, Kagawa H, Ohga R, Taira T, Fujimuro M. The effects of heat shock protein 90 inhibitors on apoptosis and viral replication in primary effusion lymphoma cells. Biol. Pharm. Bull., 35, 725-730, 2012

〔学会発表〕（計 5 件）

1. 渡部　匡史, 中村　成夫, 大江　知之, 増野　匡彦, 賀川　裕貴, 藤室　雅弘　カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス誘導性リンパ腫を標的とした化学療法の探索　第 134 年会 日本薬学会総会 熊本　2014 年 3 月 28 日

2. 石裏　悠希, 渡部　匡史, 梅山　遥, 賀川　裕貴, 真鍋　和樹, 藤室　雅弘 カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス（KSHV）感染 B 細胞性リンパ腫に対するスルフォラファンの抗腫瘍活性　第134年会　日本薬学会総会　熊本　2014 年 3 月 30 日

3. 渡部匡史、八木将太、山中崇裕、栗山和志、名原奈津紀、賀川裕貴、藤室雅弘　ヒトがんウイルス感染細胞における Hsp90 の挙動解析　第 64 回日本薬学会近畿支部総会・大会　京都　2014 年 10 月 11 日

4. 梅山 遥、重見 善平、原 尚子、賀川 裕貴、渡部 匡史、藤室 雅弘 K+/H+イオノフォアである Nigericin は癌ウイルス感染リンパ腫の Wnt シグナルを抑制する 第 37 回日本分子生物学会年会　横浜　2014 年 11 月 27 日

5. 松本 遼太郎、渡部 匡史、賀川 裕貴、藤室 雅弘　がんウイルスによる GSK3βを介した Snail の不安定化の抑制　日本薬学会第

135 年会 神戸　2015 年 3 月 27 日

〔図書〕（計 3 件）
1．藤室 雅弘：第3章 3-7タンパク質の品質管理と分解　新細胞生物学，竹鼻　眞、高橋悟、野尻　久雄 編，pp.90-95，廣川書店 2013

2．藤室 雅弘：第 6 章 6-1～6-4 細胞分裂と増殖　新細胞生物学，竹鼻　眞、高橋　悟、野尻　久雄 編，pp.151-184，廣川書店 2013

3．藤室雅弘：第 13 章　ウイルス発がん　がん増殖と悪性化の分子機構，宮澤 恵二、伊東 進 編，pp161-174，化学同人 2012

〔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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ
http://labo.kyoto-phu.ac.jp/cellbiology/

６．研究組織
(1)研究代表者
藤室　雅弘（FUJIMURO Masahiro）
京都薬科大学　細胞生物学分野・教授
研究者番号：20360927

(2)研究分担者
（　　　）

研究者番号：

(3)連携研究者
（　　　）

研究者番号：