

学位論文題名

アダプタータンパク質 STAP-2 及び核タンパク質
BS69 による Epstein-Barr ウイルス遺伝子産物 LMP1 の
活性制御機構の解析

学位論文内容の要旨

Epstein-Barr ウイルス (EB ウイルス) はヒトγヘルペスウイルス科に属する二重鎖 DNA ウイルスである。EB ウイルスは B 細胞と上皮細胞に感染し、成人の 90%以上が感染している。感染者の大半は無症候だが、時として上咽癌、胃癌、バーキットリンパ腫、ホジキンリンパ腫といった悪性腫瘍や、宿主免疫機能低下時におけるリンパ球増殖性疾患の原因となる。EB ウイルス感染細胞ではウイルス遺伝子にコードされた数種のタンパク質を発現しているが、その病態発症には EB ウイルス遺伝子産物の中でも、特に潜在膜蛋白 LMP1 が重要な役割を果たす。LMP1 は細胞の生存、増殖に必須の転写因子 NF- κ B を恒常的に活性化することで感染細胞を不死化し、細胞癌化へと導く。

LMP1 は TRAF や TRADD, RIP といった宿主アダプター分子を NF- κ B 活性化に利用していることが明らかとなっている。一方、TRAF ファミリーのうち TRAF3 が LMP1 による NF- κ B 活性化を負に制御することが最近報告されたが、LMP1 による NF- κ B 活性化を負に制御する宿主アダプター分子の研究はまだ緒に就いたばかりである。本研究では新たに LMP1 の活性化を負に制御する宿主アダプタータンパク質 STAP-2 と核タンパク質 BS69 を見出し、その機能解析を行った。

STAP-2 (Signal-transducing adaptor protein-2) は N 末端側から PH ドメイン^o, SH2-like ドメイン, C 末端側にプロリンリッチ領域といった多くのアダプター分子に共通したドメイン構造を有する。STAP-2 の発現は種々の組織において認められており、様々なシグナル伝達系への関与が考えられている。2006 年には、マクロファージ細胞において TLR4 を介した NF- κ B シグナル活性化を増強し、自然免疫における生体防御反応誘導を正に制御することが明らかとなった。そこで、同様にその活性化に NF- κ B シグナルを利用する EB ウイルス遺伝子産物 LMP1 に着目し、LMP1/NF- κ B シグナル活性化に対する STAP-2 の機能解析を行った。

STAP-2 が LMP1 による NF- κ B 活性化に関与するか否かを検討するため、ヒト子宮頸癌細胞株 HeLa 細胞を用いて NF- κ B 応答配列を含む NF- κ B-Luc コンストラクトを用いたレポーター遺伝子アッセイを行った。その結果、LMP1 による NF- κ B の転写活性化が STAP-2 の発現量依存的に抑制された。さらに、siRNA により内在性の STAP-2 の発現を抑制して同様に解析したところ、STAP-2 ノックダウンにより LMP1 による NF- κ B の転写活性化が有意に増強した。また、LMP1 によって誘導される NF- κ B の標的遺伝子 IL-6 の mRNA 発現誘導も STAP-2 の発現により抑制された。この結果より STAP-2 は

LMP1/NF- κ B シグナルを負に制御していることが示唆された。

次に内在性のLMP1とSTAP-2がEBウイルス陽性ヒトB細胞内で会合しうるかどうかを検討した。その結果、EBウイルス陽性ヒトB細胞内で両者が結合し、これより、STAP-2はLMP1と直接相互作用することでNF- κ Bの転写活性化を抑制していることが示唆された。

STAP-2によるLMP1/NF- κ Bシグナル抑制機構を考える上で、LMP1下流でシグナル伝達を担うアダプター分子TRAFファミリー、TRADDに注目した。STAP-2と各TRAFファミリー分子との結合を検討したところ、TRAF3と特異的に強く結合することが明らかとなった。また、STAP-2の発現によりLMP1とTRAF3との結合の増強が観察された。さらに、TRADDとSTAP-2、LMP1の相互作用に着目し、293T細胞において免疫沈降法により3分子間の相互作用を解析した結果、LMP1とTRADDとの結合がSTAP-2の発現により減弱した。

以上の結果から、STAP-2はLMP1とTRAF3との複合体形成増強、LMP1とTRADDの結合阻害という2つの機能により、LMP1の活性を抑制していることが明らかとなった。

また、ヒトB細胞においてLMP1の発現量依存的なSTAP-2 mRNAの発現が誘導され、EBウイルス感染細胞内でSTAP-2の発現量が上昇している可能性が示唆された。さらに、STAP-2はヒトB細胞においてLMP1誘導性細胞増殖を抑制した。

BS69はAdenoviral early region 1A (E1A) 結合分子として同定された、主に核に局在するタンパク質で、E1Aの転写活性を負に制御することが明らかとなっている。PHD, Bromo, PWWP, MYNDドメインなどの遺伝子の転写調節に関与する種々のドメイン構造を有しており、C末端MYNDドメインはE1AやEBウイルス由来の核抗原EBNA2などのウイルス由来抗原との相互作用も報告されている。さらに2006年には、BS69がLMP1と直接相互作用し、TRAF6を介したJNK活性化に必須のアダプター分子として機能することが明らかとなった。しかし、BS69が細胞癌化と密接なつながりのあるNF- κ B活性化を制御しているかどうかは不明であった。そこで、LMP1/NF- κ Bシグナル活性化に対するBS69の機能解析を行った。

BS69がLMP1によるNF- κ B活性化に関与するか否かを検討するため、HeLa細胞を用いてNF- κ B-Lucを用いたレポーター遺伝子アッセイを行った。その結果、LMP1によるNF- κ Bの活性化がBS69の発現量依存的に抑制された。さらに、siRNAにより内在性BS69の発現を抑制して解析したところ、BS69ノックダウンによりLMP1によるNF- κ Bの活性化が有意に増強した。また、LMP1によって誘導されるNF- κ Bの標的遺伝子IL-6のmRNA発現量もBS69ノックダウンにより有意に増強した。以上の結果よりBS69はLMP1/NF- κ Bシグナルを負に制御していることが示唆された。

また、BS69はSTAP-2と同様にLMP1とTRADDの結合を阻害したことから、LMP1とTRADDとの結合を阻害することによりNF- κ B活性化を抑制していると考えられる。また、興味深いことに、LMP1との結合においてBS69とSTAP-2は競合しないことが明らかとなった。

さらに、BS69はTRAF3と相互作用することでLMP1によるNF- κ B活性化を抑制していることが示唆されるデータが得られている。

最後に、本研究により、宿主アダプタータンパク質STAP-2及び核タンパク質BS69がLMP1の活性化を抑制することが明らかとなり、新たな宿主因子によるLMP1の活性制御の分子機構が示された。また、TRAF3とLMP1との結合及びTRADDとLMP1の結合阻害が新たな創薬標的となり得ること

が示された. 今後はこれら分子間の詳細な相互作用を明らかにし,LMP1 の活性を阻害する治療薬開発の手掛かりを得ることを期待する.

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 松 田 正

副 査 准教授 紙 谷 浩 之

副 査 准教授 安 居 輝 人 (大阪大学

微生物病研究所)

副 査 講 師 南 保 明日香

学 位 論 文 題 名

アダプタータンパク質 STAP-2 及び核タンパク質 BS69 による Epstein-Barr ウイルス遺伝子産物 LMP1 の 活性制御機構の解析

Epstein-Barr ウイルス (EB ウイルス) はヒトヘルペスウイルス科に属する二重鎖 DNA ウイルスで、B 細胞と上皮細胞に感染する。EB ウイルスは成人の 90%以上が感染しており、感染者の大半は無症候だが、時として上咽喉癌、胃癌、バーキットリンパ腫、ホジキンリンパ腫といった悪性腫瘍発症の原因となる。EB ウイルス感染細胞ではウイルス遺伝子にコードされた数種のタンパク質を発現しているが、その病態発症には EB ウイルス遺伝子産物の中でも、特に潜在膜蛋白 LMP1 が重要な役割を果たす。LMP1 は細胞の生存、増殖に必須の転写因子 NF- κ B を恒常的に活性化することで感染細胞を不死化し、細胞癌化へと導く。LMP1 は TRAF や TRADD、RIP といった宿主アダプター分子を自身の NF- κ B 活性化に利用していることが明らかとなっているが、LMP1 による NF- κ B 活性化を負に制御する宿主アダプター分子の研究はまだ緒に就いたばかりである。本研究では新たに LMP1 の活性化を負に制御する宿主アダプタータンパク質 STAP-2 と核タンパク質 BS69 を見出し、その機能解析を行った。

STAP-2 (Signal-transducing adaptor protein-2) は N 末端側から PH ドメイン、SH2-like ドメイン、C 末端側にプロリンリッチ領域といった多くのアダプター分子に共通したドメイン構造を有する。STAP-2 の発現は種々の組織において認められており、様々なシグナル伝達系への関与が考えられている。2006 年には、マクロファージ細胞において TLR4 を介した NF- κ B シグナル活性化を増強し、自然免疫における生体防御反応誘導を正に制御することが明らかとなった。そこで、同様にその活性化に NF- κ B シグナルを利用する EB ウイルス遺伝子産物 LMP1 に着目し、LMP1/NF- κ B シグナル活性化に対する STAP-2 の機能解析を行った。

STAP-2 が LMP1 による NF- κ B 活性化に関与するか否かを検討するため、ヒト子宮頸癌細胞株 HeLa 細胞を用いて NF- κ B 応答配列を含む NF- κ B-Luc コンストラクトを用いたレポーター遺伝子アッセイを行った。その結果、LMP1 による NF- κ B の転写活性化が STAP-2 の発現量依存的に抑制された。さらに、siRNA により内在性の STAP-2 の発現を抑制して同様に解析したところ、STAP-2 ノックダウン

により LMP1 による NF- κ B の転写活性化が有意に増強した。また、LMP1 によって誘導される NF- κ B の標的遺伝子 IL-6 の mRNA 発現誘導も STAP-2 の発現により抑制された。この結果より STAP-2 は LMP1/NF- κ B シグナルを負に制御していることが示唆された。さらに内在性の LMP1 と STAP-2 は EB ウイルス陽性ヒト B 細胞内で結合しており、STAP-2 は LMP1 と直接相互作用することで NF- κ B の転写活性化を抑制していることが示唆された。

STAP-2 による LMP1/NF- κ B シグナル抑制機構を考える上で、LMP1 下流でシグナル伝達を担うアダプター分子 TRAF と TRADD に着目した。STAP-2 と各 TRAF ファミリー分子との結合を検討したところ、TRAF3 と特異的に強く結合することが明らかとなった。また、STAP-2 の発現により LMP1 と TRAF3 との結合の増強が観察された。さらに、TRADD と STAP-2、LMP1 の相互作用に着目し、293T 細胞において免疫沈降法により 3 分子間の相互作用を解析した結果、LMP1 と TRADD との結合が STAP-2 の発現により減弱した。

以上の結果から、STAP-2 は LMP1 と TRAF3 との複合体形成増強、LMP1 と TRADD の結合阻害という 2 つの機能により、LMP1 の活性を抑制していることが明らかとなった。

また、ヒト B 細胞において LMP1 の発現量依存的な STAP-2 mRNA の発現が誘導され、EB ウイルス感染細胞内で STAP-2 の発現量が上昇している可能性が示唆された。さらに、STAP-2 はヒト B 細胞において LMP1 誘導性細胞増殖を抑制した。

BS69 は Adenoviral early region 1A (E1A) 結合分子として同定され、主に核に局在するタンパク質で E1A の転写活性を負に制御することが明らかとなっている。PHD、Bromo、PWWP、MYND ドメインなどの遺伝子の転写調節に関与する種々のドメイン構造を有しており、C 末端 MYND ドメインは E1A や EB ウイルス由来の核抗原 EBNA2 などのウイルス由来抗原との相互作用も報告されている。さらに 2006 年には、BS69 が LMP1 と直接相互作用し、TRAF6 を介した JNK 活性化に必須のアダプター分子として機能することが明らかとなった。しかし、BS69 が細胞癌化と密接なつながりのある NF- κ B 活性化を制御しているかどうかは不明であった。そこで、LMP1/NF- κ B シグナル活性化に対する BS69 の機能解析を行った。

BS69 が LMP1 による NF- κ B 活性化に関与するか否かを検討するため、NF- κ B-Luc を用いたレポーター遺伝子アッセイを行った。その結果、LMP1 による NF- κ B の活性化が BS69 の発現量依存的に抑制された。さらに、siRNA により内在性 BS69 の発現を抑制して解析したところ、BS69 ノックダウンにより LMP1 による NF- κ B の活性化が有意に増強した。また、LMP1 によって誘導される NF- κ B の標的遺伝子 IL-6 の mRNA 発現量も BS69 ノックダウンにより有意に増強した。以上の結果より BS69 は LMP1/NF- κ B シグナルを負に制御していることが示唆された。さらに、BS69 は STAP-2 と同様に LMP1 と TRADD の結合を阻害することにより NF- κ B 活性化を抑制していることが示された。

本研究により、宿主アダプタータンパク質 STAP-2 及び核タンパク質 BS69 が LMP1 の活性化を抑制することが明らかとなり、LMP1 の活性制御を担う新たな分子の存在が示された。また、TRAF3 と LMP1 との結合及び TRADD と LMP1 の結合阻害の詳細な分子機構の解析は新たな創薬標的となり得ることが示された。