



## がんウイルス産物の新たな分解制御機構の同定

### 研究成果のポイント

- ・ がんウイルス産物である潜伏感染膜蛋白質 1 (Latent Membrane Protein 1 : LMP1) を発現させると蛋白分解酵素カスパーゼ<sup>※1</sup>が活性化され, LMP1 蛋白の分解が誘導される。
- ・ がんウイルス産物 LMP1 蛋白分解酵素カスパーゼ発現を抑制すると転写因子 NF- $\kappa$ B<sup>※2</sup>の活性化並びに炎症性サイトカイン産生が促進される。
- ・ がんウイルス産物 LMP1 蛋白量調節機構を標的とした新たな抗ウイルス薬開発が期待できる。

### 研究成果の概要

がんウイルスとして知られるエプスタイン・バー (Epstein-Barr : EB) ウイルスはほとんどの成人に感染が認められるヘルペスウイルスで, 上咽頭がん, ホジキンリンパ腫, 胃がんなどへの関与が知られており, 発がんには EB ウイルス感染時に発現するウイルス産物が関与しています。

今回, 私たちは EB ウイルス産物のなかでも強い発がんへの関与が知られている潜伏感染膜蛋白質 1 (Latent Membrane Protein 1 : LMP1) の新たな分解制御機構を同定しました。カスパーゼ阻害剤処理や遺伝子ノックダウン<sup>※3</sup>をおこなった細胞では LMP1 の分解が阻害され, 炎症を担う NF- $\kappa$ B シグナルが増強されることもわかりました。LMP1 蛋白制御を標的とする新たなウイルス治療薬の開発が期待できます。

本研究は, 生化学分野の専門雑誌 FEBS Letters で 2016 年 2 月 27 日 (土) に公表されました。

### 論文発表の概要

研究論文名 : Caspase-dependent cleavage regulates protein levels of Epstein-Barr virus-derived latent membrane protein 1 (EB ウイルス産物 LMP1 蛋白はカスパーゼ依存的分解によって制御される)

著者 : 碓 澄仁<sup>1</sup>, 波田野陽介<sup>1</sup>, 室本竜太<sup>1</sup>, 川西絵理<sup>1</sup>, 池田 収<sup>1</sup>, 平島洗基<sup>1</sup>, 今 重之<sup>1</sup>, 鍛代悠一<sup>1</sup>, 安居輝人<sup>2</sup>, 織谷健司<sup>3</sup>, 松田 正<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>北海道大学大学院薬学研究院, <sup>2</sup>大阪大学微生物病研究所, <sup>3</sup>大阪大学大学院医学系研究科)

公表雑誌 : FEBS Letter (生化学分野の専門雑誌)

公表日 : 英国時間 2016 年 2 月 27 日 (土) (オンライン公開)

## 研究成果の概要

### (背景)

EB ウイルスは最初のヒトがんウイルスとして 1964 年にバーキットリンパ腫から分離されました。EB ウイルスはヒトに広く伝播しており、ほとんどの健常成人が感染しています (潜伏感染)。また EB ウイルスはヒトにおける種々の悪性腫瘍への関与が明らかにされており、上咽頭がん、ホジキンリンパ腫、胃がん、AIDS や臓器移植など免疫不全症に伴う慢性活動性 EB ウイルス感染症やリンパ腫などが含まれます (図 1)。これらのがん細胞において EB ウイルスは潜伏感染状態であり、発現するウイルス遺伝子産物の機能が発がんに関与しています。特に発がんとの関連が深いと考えられているのが、潜伏感染膜蛋白質 1 (Latent Membrane Protein 1: LMP1) です。LMP1 蛋白は 386 個のアミノ酸からなる膜蛋白で、短い N 末端ドメインとそれに続く 6 つの膜貫通ドメイン、さらに長い C 末端細胞質ドメインから構成されています (図 2)。C 末端細胞質ドメインには 3 つの機能領域 (CTAR1, CTAR2, CTAR3) が存在し、LMP1 蛋白はこれらの機能領域を介して感染細胞に対して細胞増殖や生存を誘導します。CTAR1 領域にはシグナル伝達分子 TRAF, CTAR2 にはシグナル伝達分子 TRADD や RIP などが結合して、細胞内シグナル伝達を惹起し、NF- $\kappa$ B などの転写因子群を恒常的に活性化します。恒常的な転写因子 NF- $\kappa$ B の活性化は炎症性サイトカインとして知られる IL-6 や抗アポトーシス因子 Bcl-2 などの遺伝子発現を誘導するとともに、感染細胞の増殖や生存には不可欠であることから、NF- $\kappa$ B は EB ウイルス産物 LMP1 蛋白によるがん細胞増殖機構において重要な役割を果たすことが知られています。この LMP1 蛋白は感染細胞によりますが 1.5~7 時間という短い半減期を示す蛋白で、これまでプロテアソーム蛋白分解系による LMP1 蛋白分解系の存在が報告されていますが、その他の LMP1 蛋白分解系の存在やその詳細については未だわかっていませんでした。私たちは LMP1 発現細胞に対して種々の蛋白分解酵素阻害剤処理や遺伝子ノックダウンをおこなうことにより、新たな LMP1 蛋白分解系の存在を検討しました。

### (研究成果)

LMP1 を発現させた子宮頸癌 HaLa 細胞において、種々の蛋白分解酵素阻害剤で細胞を処理することにより、LMP1 蛋白分解反応への影響を観察しました。プロテアソーム系分解酵素阻害剤やリソソーム分解酵素阻害剤での細胞処理に比べて、汎カスパーゼ蛋白分解阻害剤処理では有意に LMP1 蛋白の分解が抑制されました。次いで種々のカスパーゼ蛋白分解酵素阻害剤を用いて検討したところ、カスパーゼ 3 に対する阻害剤での細胞処理で有意に LMP1 蛋白の分解が抑制されました。さらにカスパーゼ 3 遺伝子ノックダウン処理した細胞でも有意に LMP1 蛋白の分解が抑制されました。これらの結果から、LMP1 を発現させた HaLa 細胞では、カスパーゼ 3 により LMP1 蛋白の分解が起こっていることがわかりました。興味深いことに HeLa 細胞への LMP1 蛋白発現誘導が細胞内のカスパーゼ 3 の活性化を誘導することもわかりました。実際に LMP1 蛋白分解抑制が感染細胞を模した LMP1 を発現させた HaLa 細胞にどのような影響を与えるかを LMP1 の標的である細胞内シグナル伝達系への影響を転写因子 NF- $\kappa$ B の活性化を指標に検討したところ、カスパーゼ蛋白分解阻害剤処理やカスパーゼ 3 遺伝子ノックダウン処理をおこなった LMP1 を発現させた HaLa 細胞では、LMP1 により誘導される NF- $\kappa$ B の活性化並びに炎症性サイトカインである IL-6 の産生が促進されていることもわかりました。最後に、LMP1 蛋白のどの部分がカスパーゼによる蛋白分解に関与するかを様々な LMP1 変異体を作成することにより検討しました。その結果、LMP1 蛋白の C 末端細胞質ドメインの 3 つの機能領域のうち、これまであまり機能が知られていなかった CTAR3 に存在する 4 つの反復する配列 DNTD 及び少し C 末側に存在する LMTD

が、LMP1 を発現させた HaLa 細胞でのカスパーゼによる LMP1 分解に関与することを示し、CTAR3 の LMP1 蛋白質調節における役割を初めて明らかにしました。

以上から、EB ウイルス感染、EB ウイルスによる発がんに大きく関係する LMP1 蛋白質は、LMP1 自身が活性化を誘導するカスパーゼ分解酵素による CTAR3 領域での限定分解で調節されること、また、カスパーゼ分解酵素は LMP1 による感染細胞の増殖や生存には不可欠な転写因子 NF- $\kappa$ B の活性化調節にも関係することが明らかになりました (図 2)。

#### (今後への期待)

EB ウイルスに対する新しい抗ウイルス薬の開発を行う際に、カスパーゼ分解酵素系による LMP1 蛋白質調節機構の人為的操作は非常に重要な標的となり得ると考えられます。

#### お問い合わせ先

所属・職・氏名：北海道大学大学院薬学研究院 教授 松田 正 (まつだ ただし)

TEL: 011-706-3243 FAX: 011-706-4990 E-mail: tmatsuda@pharm.hokudai.ac.jp

ホームページ: <http://www.pharm.hokudai.ac.jp/eisei/index.html>

#### [用語説明]

1. カスパーゼ：カスパーゼは細胞死として知られるアポトーシスを主導する因子群で、活性中心にシステインを有するシステインプロテアーゼで基質蛋白のアスパラギン酸残基 (D) の C 末側を切断する活性を有している。さらに哺乳動物では 14 種類存在することが知られており、なかでもアポトーシス誘導初期にはカスパーゼ-8 や-9 などが主に働き、アポトーシス実行にはカスパーゼ-3 や-7 などが主に働くことも知られている。

2. 転写因子 NF- $\kappa$ B：B 細胞で選択的に発現する免疫グロブリンの  $\kappa$  軽鎖のエンハンサーに結合する転写因子 (核内因子  $\kappa$ B, nuclear factor- $\kappa$ B) として同定されたが、後にほとんど全ての細胞に発現していることが明らかとなり、さらに高等生物に限らずショウジョウバエやウニなどの無脊椎動物の細胞においても NF- $\kappa$ B は発現している。特に哺乳動物において NF- $\kappa$ B ファミリー (Rel ファミリーとも呼ばれる) に属する分子は 5 種類が知られている。NF- $\kappa$ B は炎症性サイトカインや抗アポトーシス因子の発現を誘導するなど、免疫応答や細胞の生存など多彩な生命現象に関与している。また、炎症・自己免疫疾患、がんなどでその活性が亢進していることから、種々の疾患治療の標的分子としても注目されている。

3. 遺伝子ノックダウン：ここでは siRNA を用いた遺伝子ノックダウンを指す。siRNA (small interfering RNA) とは 21-23 塩基対から成る低分子二本鎖 RNA で、RNA 干渉 (RNAi) と呼ばれる現象に関与している。RNA 干渉においては mRNA の破壊によって配列特異的に遺伝子の発現が抑制される。そのため、特定の遺伝子の転写量を減少させ、遺伝子の機能を大きく減弱させることができる。現在、この siRNA を用いた RNA 干渉は遺伝子をノックダウンする方法として生物学及び医薬分野の基礎研究に応用されているとともに、臨床への応用も期待されている。

【参考図】

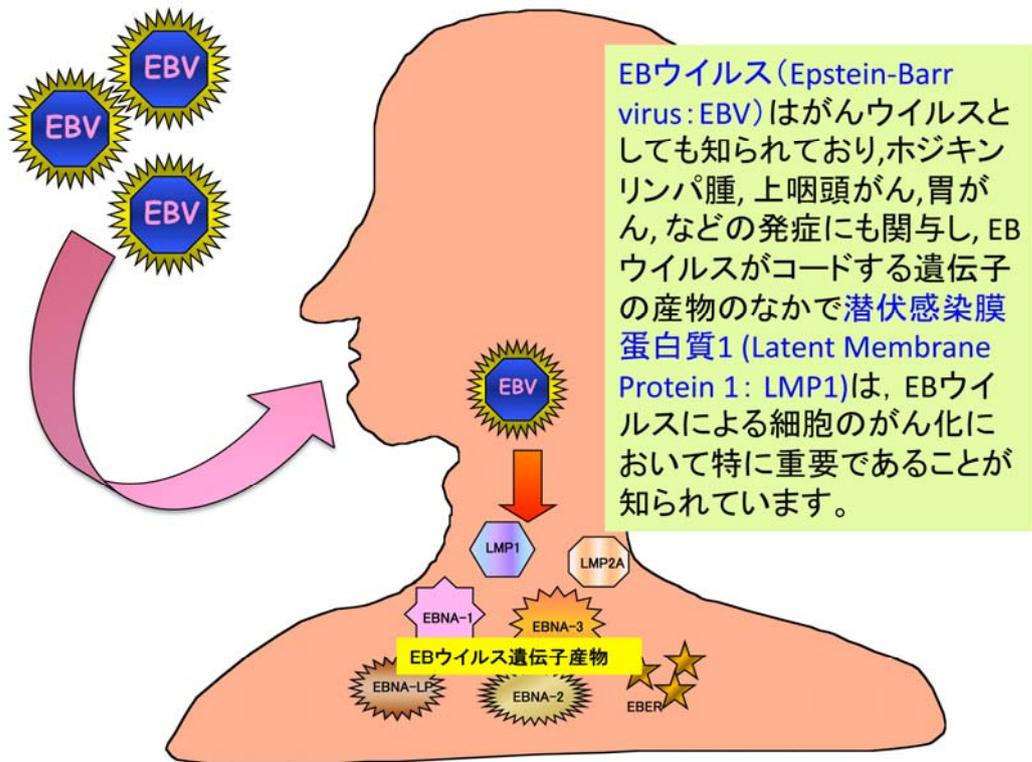


図1 EBウイルス感染と疾患

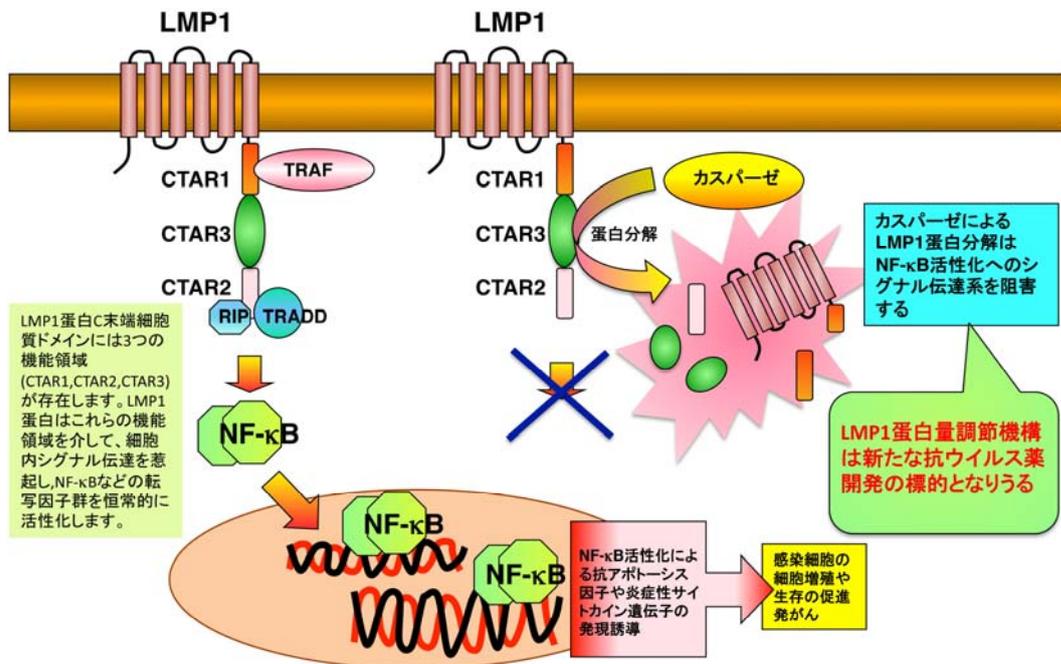


図2 EBウイルス産物LMP1の機能と蛋白質分解制御機構