

氏 名	磯 野 修 いそ の おさむ
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学位記番号	薬 博 第 645 号
学位授与の日付	平 成 20 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	薬 学 研 究 科 生 命 薬 学 専 攻
学位論文題目	HTLV-1 HBZ蛋白質によるプロテアソーム依存的ユビキチン非依存的 c-Jun 分解促進機構の解析
論文調査委員	(主 査) 教 授 伊 藤 信 行 教 授 中 山 和 久 教 授 竹 島 浩

論 文 内 容 の 要 旨

ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型 (HTLV-1) は、成人 T 細胞白血病 (ATL) の原因となるレトロウイルスである。HTLV-1 の感染者は、日本では沖縄、九州を中心に 100-200 万人、世界中では 1000-2000 万人と推定されている。ATL は CD4 陽性リンパ球の悪性腫瘍であり、HTLV-1 感染者の約 4 % が平均 50 年以上という長い潜伏期間を経て発症する。現在のところ有効な治療法はなく非常に予後不良な疾患である。発症には、ウイルス蛋白質による宿主細胞の転写機構の破綻が重要であるとされ、その詳細を明らかにすることにより、新たな治療法開発における重要な知見が得られることが期待された。

近年、HTLV-1 プロウイルスゲノムのマイナス鎖にコードされる新規ウイルス蛋白質として HBZ (HTLV-1 bZIP factor) が同定された。HBZ は全ての ATL 症例において例外なく発現が確認されることから、ATL 発症において重要な役割を持つことが予想された。HBZ は N 末端に転写活性化領域、C 末端に bZIP 構造を持つ約 30kDa の核内蛋白質である。HBZ は、細胞内の様々な bZIP 型転写因子と相互作用し、それらの転写機能を調節していることが報告されている。当研究室では、HBZ が AP-1 ファミリー転写因子のひとつである c-Jun とヘテロダイマーを形成し、DNA 結合能を阻害することに加えて、プロテアソームによる分解を促進し発現量を低下させるという二重の抑制効果を持つことを明らかにしてきた。本研究においては、HBZ が c-Jun の分解を促進するメカニズムについて更に解析を進めると共に、HBZ による c-Jun の抑制機能が果たす生理的意義について検討を行った。

一般的に c-Jun のような転写因子がプロテアソームによる分解を受ける際には、ポリユビキチン鎖による修飾を受けることが知られている。すなわち、ユビキチンリガーゼと呼ばれる様々な酵素によってポリユビキチン化された後、そのポリユビキチン鎖が分解シグナルとしてプロテアソームに認識されることで分解へと導かれる。しかし興味深いことに、HBZ により c-Jun のユビキチン化は亢進されなかった。また HBZ は、温度感受性によりユビキチン化反応が阻害される細胞内においても c-Jun の分解を促進した。これらの結果より、HBZ はユビキチン非依存的にプロテアソームを介した c-Jun の分解を促進していることが示唆された。HBZ の欠失変異体を用いた解析の結果、この分解促進作用には c-Jun との結合に必要な bZIP 構造に加えて、N 末端 60 アミノ酸が重要であることが分かった。そこで HBZ の N 末端領域を用いた酵母ツーハイブリッドスクリーニングにより、c-Jun の分解促進に重要な細胞性因子の探索を試みた。その結果、プロテアソームを構成するサブユニットの 1 つが同定され、さらに免疫沈降法により HBZ の N 末端領域が直接プロテアソームに結合していることが確認された。すなわち、HBZ は c-Jun とプロテアソームの両者に直接結合し、橋渡し役として機能することで、あたかもユビキチンの機能を模倣していることが示唆された。

HTLV-1 感染細胞においては、ウイルス由来の Tax 蛋白質の働きにより c-Jun を含む AP-1 ファミリー転写因子の活性が亢進している。AP-1 の活性化は細胞増殖を促進させるが、一方で過剰な活性化は宿主に細胞死や炎症反応を誘発することが知られており、ウイルスにとって必ずしも好ましくない。実際 HTLV-1 感染細胞において RNA 干渉法により HBZ の発

現を抑制したところ、AP-1活性が有意に上昇し、それに伴い細胞死の亢進が認められた。すなわちHBZは感染細胞において、AP-1活性を調節することにより宿主の生存に重要な機能を果たしていることが示唆された。

近年、ユビキチン非依存的な蛋白分解の報告が相次ぎ、癌化への関与も指摘されているが、その詳細な分子機構は不明である。今回得られた結果は、ウイルスが進化させた巧妙な戦術を明らかにすると同時に、プロテアソームによる蛋白分解機構の解明において重要な知見を与えるものである。

論文審査の結果の要旨

ヒトT細胞白血病ウイルス1型（HTLV-1）は、成人T細胞白血病（ATL）の原因となるレトロウイルスである。HTLV-1の感染者は、日本では沖縄、九州を中心に100-200万人、世界中では1000-2000万人と推定されている。ATLはCD4陽性リンパ球の悪性腫瘍であり、HTLV-1感染者の約4%が平均50年以上という長い潜伏期間を経て発症する。現在のところ有効な治療法はなく非常に予後不良な疾患である。発症には、ウイルス蛋白質による宿主細胞の転写機構の破綻が重要であるとされ、その詳細を明らかにすることにより、新たな治療法開発における重要な知見が得られることが期待された。

近年、HTLV-1プロウイルスゲノムのマイナス鎖にコードされる新規ウイルス蛋白質としてHBZ（HTLV-1 bZIP factor）が同定された。HBZは全てのATL症例において例外なく発現が確認されることから、ATL発症において重要な役割を持つことが予想された。HBZはN末端に転写活性化領域、C末端にbZIP構造を持つ約30kDaの核内蛋白質である。HBZは、細胞内の様々なbZIP型転写因子と相互作用し、それらの転写機能を調節していることが報告されている。当研究室では、HBZがAP-1ファミリー転写因子のひとつであるc-Junとヘテロダイマーを形成し、DNA結合能を阻害することに加えて、プロテアソームによる分解を促進し発現量を低下させるという二重の抑制効果を持つことを明らかにしてきた。本研究においては、HBZがc-Junの分解を促進するメカニズムについて更に解析を進めると共に、HBZによるc-Junの抑制機能が果たす生理的意義について検討を行った。

一般的にc-Junのような転写因子がプロテアソームによる分解を受ける際には、ポリユビキチン鎖による修飾を受けることが知られている。すなわち、ユビキチンリガーゼと呼ばれる様々な酵素によってポリユビキチン化された後、そのポリユビキチン鎖が分解シグナルとしてプロテアソームに認識されることで分解へと導かれる。しかし興味深いことに、HBZによりc-Junのユビキチン化は亢進されなかった。またHBZは、温度感受性によりユビキチン化反応が阻害される細胞内においてもc-Junの分解を促進した。これらの結果より、HBZはユビキチン非依存的にプロテアソームを介したc-Junの分解を促進していることが示唆された。HBZの欠変異体を用いた解析の結果、この分解促進作用にはc-Junとの結合に必要なbZIP構造に加えて、N末端60アミノ酸が重要であることが分かった。そこでHBZのN末端領域を用いた酵母ツーハイブリッドスクリーニングにより、c-Junの分解促進に重要な細胞性因子の探索を試みた。その結果、プロテアソームを構成するサブユニットの1つが同定され、さらに免疫沈降法によりHBZのN末端領域が直接プロテアソームに結合していることが確認された。すなわち、HBZはc-Junとプロテアソームの両者に直接結合し、橋渡し役として機能することで、あたかもユビキチンの機能を模倣していることが示唆された。

HTLV-1感染細胞においては、ウイルス由来のTax蛋白質の働きによりc-Junを含むAP-1ファミリー転写因子の活性が亢進している。AP-1の活性化は細胞増殖を促進させるが、一方で過剰な活性化は宿主に細胞死や炎症反応を誘発することが知られており、ウイルスにとって必ずしも好ましくない。実際HTLV-1感染細胞においてRNA干渉法によりHBZの発現を抑制したところ、AP-1活性が有意に上昇し、それに伴い細胞死の亢進が認められた。すなわちHBZは感染細胞において、AP-1活性を調節することにより宿主の生存に重要な機能を果たしていることが明らかとなった。

近年、ユビキチン非依存的な蛋白分解の報告が相次ぎ、癌化への関与も指摘されているが、その詳細な分子機構は不明である。今回得られた結果は、ウイルスが進化させた巧妙な戦術を明らかにすると同時に、プロテアソームによる蛋白分解機構の解明に新規な知見を与えるものである。

よって本論文は博士（薬学）の学位論文として価値あるものと認める。

さらに、平成20年2月22日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。