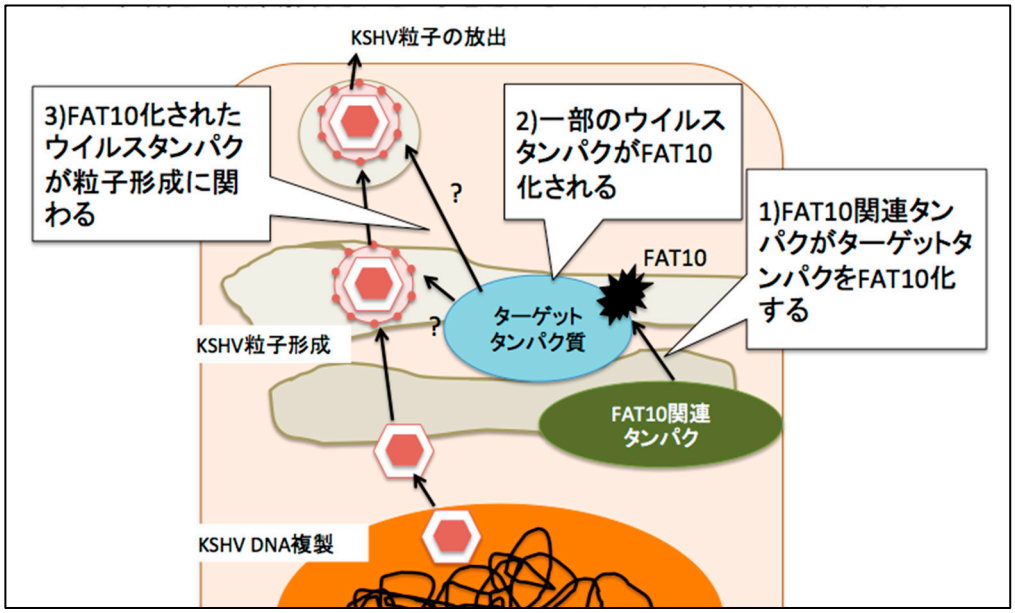
155　FAT10が関わるKSHV溶解感染機構の解明	杉本　温子

【目的】カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス（KSHV）の溶解感染機構は未だ解明されていない部分が大きく、KSHV に有効な治療薬のターゲットは未だに提示されていないのが現状である。ヘルペスウイルスは宿主因子なしには溶解感染を行うことができず、溶解感染の際に様々な宿主因子をハイジャックして自身の DNA 複製やウイルス粒子形成に役立てていることが知られている。しかし、KSHV では溶解感染に関わる宿主因子はほぼ知られておらず、KSHV 溶解感染機構の解明のためには KSHV の溶解感染に中心的役割を果たす宿主因子を発見することが急務である。これまでの研究で、プロテオーム解析を用いた結果、KSHV 溶解感染ではユビキチン様タンパクである FAT10 関連タンパク群の発現が上昇していることが明らかとなった。そこで本研究では、FAT10 関連タンパクの KSHV 溶解感染での機能解析を目的として研究を行った。

【方法】網羅的プロテオーム解析の結果、FAT10 関連タンパク群の発現が顕著に上昇していることがわかったため、ウエスタンブロット法を用いて確認を行った。また FAT10 についてもウエスタンブロット法および RT－定量的 PCR 法にて確認した。CRISPR/Cas9 を用いて FAT10 関連タンパクをノックアウトし KSHV の溶解感染に与える影響を解析した。また、超解像度顕微鏡を用いて FAT10 および関連タンパクの局在を確認した。さらに、免疫沈降–マス解析を用いて FAT10 化されるウイルスタンパクの探索を行った。

【結果】網羅的プロテオーム解析の結果、FAT10 関連タンパク群の発現が顕著に上昇していることがわかったため、ウエスタンブロット法を用いて確認を行ったところ、やはり発現が顕著に上昇していた。また FAT10 についてウエスタンブロット法および RT－定量的 PCR 法にて確認したところ、やはり KSHV 溶解感染において発現が顕著に上昇していたことが確認された。さらに CRISPR/Cas9 を用いて FAT10 関連タンパクをノックアウトしたところ、KSHV の粒子産生が顕著に低下した。これらの結果より、FAT10 系は KSHV の粒子形成に関わることが予測され、免疫沈降-マスを用いて FAT10 化されるウイルスタンパクの探索を行ったところ、やはりいくつかの KSHV 粒子形成に関わるとされるタンパクが FAT10 化される可能性が示唆された。

本研究から得られた FAT10 の関わる KSHV 溶解感染についてのモデル図



155. FAT10 が関わる KSHV 溶解感染機構の解明

杉本　温子

*京都薬科大学 大学院薬学研究科 細胞生物学分野

Key words : カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス（KSHV）, プロテオーム解析, 粒子形成, ユビキチン様タンパク, FAT10

緒　言

世界中のエイズによる年間死者は 300 万人に達し、収束する気配はない。その死因の多くはヒトヘルペスウイルスの一つであるカポジ肉腫関連ヘルペスウイルス（KSHV）によって引き起こされるカポジ肉腫等の日和見感染症である。また、臓器移植の増加に伴い、KSHV 感染ドナーが提供する 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。ヒトヘルペスウイルスに対してアシクロビルは高い選択性と強い抗ウイルス活性を示すが、KSHV 感染症に関しては例外的に有効な治療薬がなく、全世界で特に深刻な問題となっている。

KSHV は健常者に感染すると深刻な疾患をおこさずに潜伏感染する。そして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（PEL）を引き起こす。また、潜伏感染した KSHV の一部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タンパク質や、DNA の複製酵素等を発現し、孫ウイルス産生を行う。しかし、KSHV の溶解感染に関わる因子の多くは未だ同定されておらず、溶解感染機構は未だ解明されていない部分が大きい。KSHV の溶解感染を研究することは KSHV 感染症治療薬開発に必要となる有益な情報を与えられることから、社会的･臨床的な意義がある。本研究では KSHV の溶解感染機構を解明することを最終目標としている。

ヘルペスウイルスは宿主因子なしには溶解感染を行うことができず、溶解感染の際に様々な宿主因子をハイジャックして自身の DNA 複製やウイルス粒子形成に役立てていることが知られている。しかしながら、KSHV では溶解感染に関わる宿主因子はほぼ知られておらず、KSHV 溶解感染機構の解明のためには KSHV 溶解感染に中心的役割を果たす宿主因子を同定し、そのメカニズムを明らかにすることが必須である。このためには KSHV 溶解感染に関わる宿主因子を効率的にスクリーニングする手法が必要となってくる。今回網羅的プロテオーム解析を用いることで溶解感染時に発現が上昇している宿主因子を効率的にピックアップした。これまでの研究において、網羅的プロテオーム解析を行い、KSHV が溶解感染へ移行する際に発現量の変化する宿主因子を網羅的に探索した。その結果、KSHV 溶解感染においてユビキチン様タンパク質 FAT10 および FAT10 に関連するタンパク群が顕著に発現増加することを発見した。FAT10 をはじめとするユビキチン様タンパク質がヘルペスウイルス感染に促進的に働いているという報告は今まで全くなく、これは世界初の知見である。FAT10 は近年発見されたユビキチン様タンパク質で、特異的な活性化酵素、結合酵素、リガーゼを介してターゲットタンパク質に結合する［1］。FAT10 化されたターゲットタンパク質はプロテオソームを介して分解を受けるため FAT10 は生体内でターゲットタンパク質の恒常性を保つと予測されている。しかしながら FAT10 についても詳しい機能は解明されていない。FAT10 およびその関連タンパク質群は強力な薬剤ターゲットになりうると考えているが、機能未知である FAT10 とその関連タンパク質群が KSHV の溶解感染において果たす詳細な機能を解明することが必要である。そこで本研究の目的は、ユビキチン様タンパク質である FAT10 とその関連タンパク質群が KSHV の溶解感染に果たす詳細な役割を明らかにすることで、KSHV 溶解感染機構を明らかにすることである。この目的を達成するために、今回は、1. KSHV の溶解感染における FAT10 および FAT10 関連タンパクの機能解析、2. FAT10 が作用するターゲットタンパク質の探索を中心に研究を進めた。

*現在の所属：藤田医科大学 医学部 ウイルス・寄生虫学講座

方　法

1.　KSHV の溶解感染における FAT10 および FAT10 関連タンパクの機能解析

網羅的プロテオーム解析の結果、FAT10 関連タンパクの発現が顕著に上昇していることがわかったため、ウエスタンブロット法を用いて確認を行った。FAT10 についてもウエスタンブロット法および RT－定量的 PCR 法にて確認した。さらに CRISPR/Cas9 を用いて FAT10 関連タンパクをノックアウトし、KSHV 溶解感染に与える影響について解析を行った。また、超解像度顕微鏡を用いて FAT10 関連タンパクの局在を確認し局在からも FAT10 系の KSHV 溶解感染に与える役割について予測を行った。

2.　FAT10 が作用するターゲットタンパクの探索

UBL は特定のターゲットタンパク質を修飾することでターゲットタンパク質の機能を調整していることが知られている。今回初めて KSHV の溶解感染に関わることが示唆された FAT10 もターゲットタンパク質に作用することで KSHV の溶解感染に影響を与えている可能性が高いため、ターゲットタンパク質を同定することが非常に重要である。ターゲットタンパクを探索するために、抗 FAT10 抗体を用いて免疫沈降を行い沈降物に関して質量分析を行った。同時に、His タグ標識された FAT10 の発現プラスミドを作製し、KSHV 溶解感染を誘導した細胞に導入した上でプルダウンアッセイを行い、沈降物について質量分析を行った。これら 2 種類の質量分析で得られたデータを解析し、共通してヒットしてきた候補因子をピックアップした。得られた候補因子についてプラスミドを作製し、FAT10 との共局在を確認するとともにプルダウンアッセイを行い、FAT10 とこれらのタンパクの相互作用を確認した。

結果および考察

1.　KSHV の溶解感染における FAT10 および FAT10 関連タンパクの機能解析

網羅的プロテオーム解析の結果、FAT10 関連タンパクの発現が顕著に上昇していることがわかったため、ウエスタンブロット法を用いて確認を行ったところ、やはり発現が顕著に上昇しており、経時的に上昇していることがわかった（図 1A、B）。また、FAT10 の発現も上昇することが予測されたため FAT10 についてウエスタンブロット法および RT－定量的 PCR 法にて確認したところ、やはり KSHV 溶解感染において発現が顕著に上昇していたことが確認された（図 1D、図 2）。また、ウイルス由来の転写因子が FAT10 の転写に関わるか調べたところ、KSHV 由来転写因子をとランスフェクションした細胞において FAT10 の転写が上昇していることが確認された。さらに CRISPR/Cas9 を用いて FAT10 関連タンパクをノックアウトしたところ、溶解感染誘導後 48 時間および 72 時間において KSHV DNA 複製は低下していないが、KSHV の粒子産生が顕著に低下した（図 3）。そのため、FAT10 は KSHV の粒子形成に関わる可能性があることが示唆された。

また、超解像度顕微鏡を用いて FAT10 関連タンパクの局在を確認したところ、γヘルペスウイルスの粒子形成に関わると示唆されているゴルジ体に局在していることが確認された。このことからも FAT10 系は KSHV の粒子形成に関わることが考えられる。

これまでの結果をまとめると、FAT10 系の分子は KSHV 溶解感染時に発現するウイルス由来転写因子により発現が上昇し、ゴルジ体に局在し、KSHV の粒子形成に影響を与えていることが考えられる。

2. FAT10 が作用するターゲットタンパクの探索

このように FAT10 系が KSHV の溶解感染の特に粒子形成に影響を与えることが示唆されたが、FAT10 化されるターゲットを探索する必要がある。ターゲットタンパクを探索するために、抗 FAT10 抗体を用いて免疫沈降ーマスを行った。同時に、His タグ標識された FAT10 の発現プラスミドを作製し、KSHV 溶解感染を誘導した細胞に導入した上でプルダウンアッセイを行い、沈降物について質量分析を行った。これら 2 種類の質量分析で得られたデータを解析し、共通してヒットしてきた候補因子をピックアップした結果、数種類のウイルスタンパク質が得られた。さらにウイルスタンパクの機能と照らし合わせた結果、ヒットしたウイルス由来候補因子の中でウイルス粒子形成に関わるタンパクがほとんどであった。これらのウイルスタンパクと FAT10 の局在を確認したところ、細胞質で一部共局在していることが確認された。これらの結果を総合すると、FAT10 系は KSHV の粒子形成に関わるタンパクに作用し、一部のウイルスタンパクを FAT10 化することによってウイルス粒子形成に重要な役割を果たすことが考えられる。

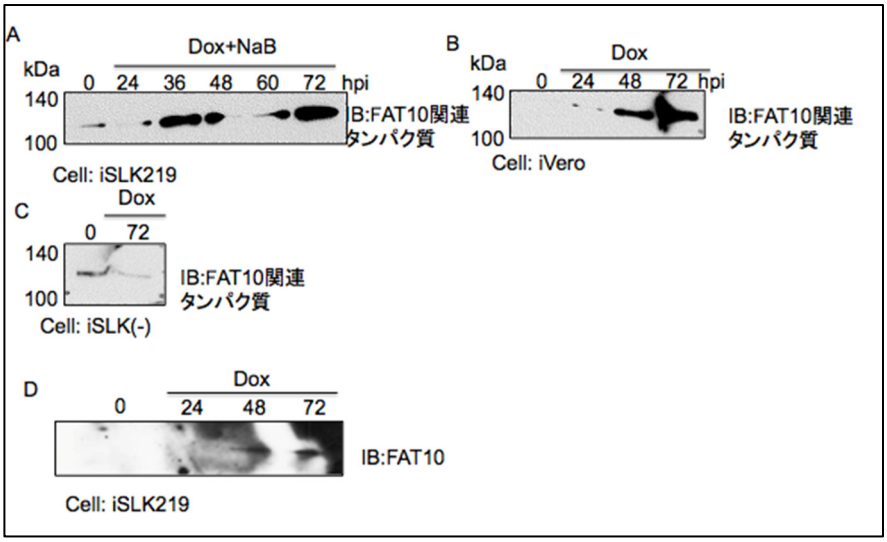


図 1. FAT10 関連タンパクおよび FAT10 は KSHV 溶解感染で発現が上昇する

KSHV が潜伏感染をしている iSLK219 細胞もしくは iVero 細胞を用いてドキシサイクリンによって溶解感染を誘導し、経時的に回収、FAT10 関連タンパクおよび FAT10 についてウエスタンブロット法を用いて確認を行った。

A）iLSK219 細胞で、KSHV 溶解感染誘導とともに FAT10 関連タンパクの発現が上昇する

B）iVero 細胞で、KSHV 溶解感染誘導とともに FAT10 関連タンパクの発現が上昇する

C）KSHV が潜伏感染していない iSLK（-）細胞ではドキシサイクリン添加でも FAT10 関連タンパクの発現が上昇しない

D）iLSK219 細胞で、KSHV 溶解感染誘導とともに FAT10 の発現が上昇する

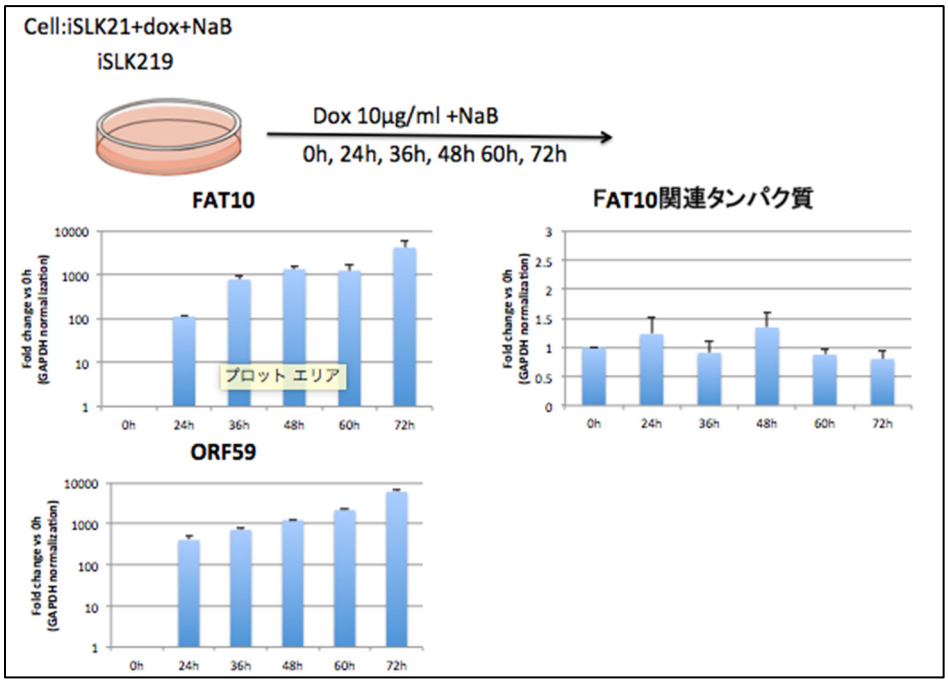


図 2.　FAT10 は KSHV 溶解感染で転写が活性化される

KSHV が潜伏感染をしている iSLK219 細胞もしくは iVero 細胞を用いてドキシサイクリンによって溶解感染を誘導し、経時的に回収、RNA 抽出後 FAT10、FAT10 関連タンパク、KSHV 溶解感染の指標である ORF59 について RT－定量的 PCR を行った。

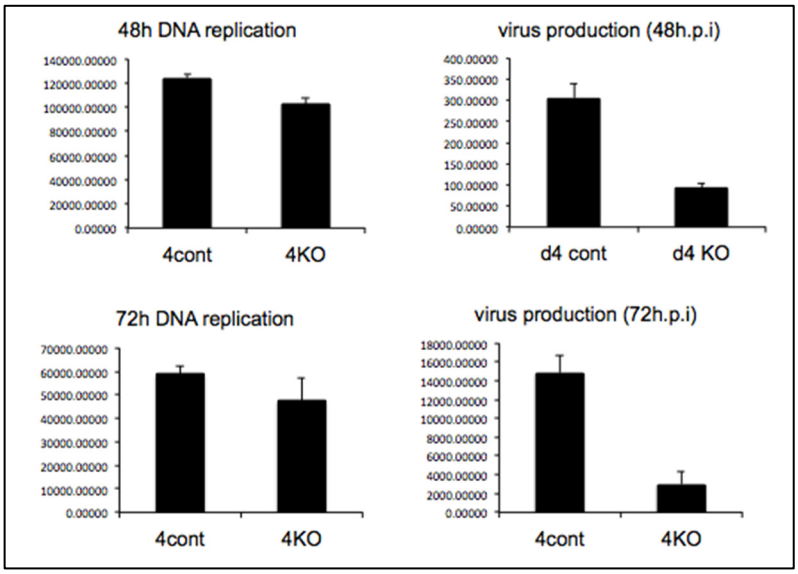


図 3.　FAT10 関連タンパクのノックアウトで KSHV 粒子形成が顕著に低下する

KSHV が潜伏感染をしている iSLK219 細胞において CRISPR/Cas9 システムを用いて FAT10 関連タンパクをノックアウトした。CRISPR/Cas9 導入後 4 日目で溶解感染誘導を行い、溶解感染誘導後 48 時間もしくは 72 時間で回収し、ウイルス DNA 複製およびウイルス粒子形成を確認した。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、医薬基盤研プロテオームリサーチプロジェクト足立淳プロジェクトリーダー、阿部雄一研究員である。

文　献

1）　A MHC-encoded ubiquitin-like protein (FAT10) binds noncovalently to the spindle assembly checkpoint protein MAD2. Liu YC, Pan J, Zhang C, Fan W, Collinge M, Bender JR, Weissman SM. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Apr 13;96(8):4313-8. doi: 10.1073/pnas.96.8.4313