



Ubiquitin-dependent degradation of adenovirusu E1A protein is inhibited by BS69

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2013-08-27 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 磯部, 智康 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/294

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 4 6 4 号	学位授与年月日	平成 1 8 年 3 月 1 5 日
氏 名	磯 部 智 康		
論文題目	<p>Ubiquitin-dependent degradation of adenovirusu E1A protein is inhibited by BS69 (ユビキチン-プロテアソーム系によるアデノウイルス E1A タンパク質の分解と BS69 によるその抑制)</p>		

博士(医学) 磯 部 智 康

論文題目

Ubiquitin-dependent degradation of adenovirus E1A protein is inhibited by BS69

(ユビキチン-プロテアソーム系によるアデノウイルスE1Aタンパク質の分解とBS69によるその抑制)

論文の内容の要旨

〔はじめに〕

アデノウイルスE1A (Early Region 1A) 遺伝子はアデノウイルス感染細胞で最初に発現する遺伝子で、ウイルスの増殖に必須であり、細胞の不死化やトランスフォーメーション、アポトーシスなどを誘導する。アデノウイルス感染細胞において、E1Aタンパク質は速やかに分解され、その半減期は数時間以内であるとされている。試験管内の無細胞系における分解実験で、E1AがATP加水分解のエネルギー依存的な能動的分解反応を受けることや、この分解がユビキチン化反応の阻害により抑制されることが示されているが、生細胞内においては、ユビキチン化修飾の有無を含め、E1Aがユビキチン-プロテアソーム系による分解を受けるかどうかについて明確にされていない。

一方、E1Aと相互作用をもつ細胞内因子の一つとして、BS69タンパク質が知られている。BS69はC末端のMYNDドメインを介してE1Aのほか、N-CoR、c-Myb、MGA、EMSYといった細胞内因子と相互作用をもつことが報告されており、転写制御に関与していると推測されているが、その詳細な機能は明らかにされていない。BS69の構造上のもう一つの特徴として、典型的なPHDドメインをもつことが挙げられる。近年、ユビキチンリガーゼのいくつかで、PHDドメインがその活性中心として機能することが報告されているが、BS69に同様の活性があるかどうかは不明である。

我々は、生細胞内でE1Aがユビキチン-プロテアソーム系を介した分解を受けることや、BS69がこの分解制御に寄与することを明らかにするため、以下のような検討を行った。

〔材料ならびに方法〕

- (1) シクロヘキシミド処理後の追跡実験により、ヒト肝癌細胞株HepG2細胞に一過性に発現させたE1Aタンパク質の分解速度を検討した。また、このときプロテアソーム阻害剤であるMG132処理と組み合わせることで、この分解のプロテアソーム依存性を検討した。さらに、E1Aタンパク質を構成的に発現するHEK293細胞で同様の実験を行い、その分解の速度およびプロテアソーム依存性を検討した。
- (2) HEK293細胞にE1Aおよびユビキチンを共発現させ、哺乳動物細胞内におけるE1Aタンパク質のユビキチン化修飾の有無を検討した。
- (3) HEK293細胞にユビキチンおよび野生型BS69、欠失変異型BS69 (PHDおよびMYNDドメイン) を共発現させ、自己ユビキチン化を指標にBS69のユビキチンリガーゼ活性を検討した。
- (4) HEK293細胞にE1Aおよび野生型BS69もしくは欠失変異型BS69を共発現させ、免疫沈降法により、両者の相互作用を検討した。
- (5) HEK293細胞にE1A、ユビキチン、野生型BS69もしくは欠失変異型BS69を共発現させ、E1Aのユビキチン化にBS69が与える影響を検討した。
- (6) HEK293細胞およびHepG2細胞に、E1A、BS69を共発現させ、E1Aの分解速度にBS69が与える影響を

検討した。

〔結果〕

- (1) 哺乳動物細胞内で、E1Aタンパク質は速やかに分解され、その生物学的半減期は数時間以内であることが確認できた。また、この分解はプロテアソーム阻害剤による抑制がみられ、E1Aがプロテアソーム依存的な分解反応を受けることが示された。
- (2) ユビキチンを共発現させることで、E1Aタンパク質のユビキチン化によるラダーが検出され、哺乳動物細胞内でE1Aタンパク質がユビキチン化修飾を受けることが示された。
- (3) ユビキチンを共発現させることで、野生型BS69タンパク質のユビキチン化によるラダーが検出され、ユビキチンリガーゼの活性中心と考えられるPHDドメインの欠失変異体では、このラダーはみられなかった。即ち、これはBS69の自己ユビキチン化であると考えられ、BS69がユビキチンリガーゼ活性をもつことが示唆された。
- (4) 生細胞内におけるBS69とE1Aの相互作用がみられ、また、この相互作用がBS69のMYNDドメインに依存することが確認された。この相互作用にBS69のPHDドメインの寄与は認められなかった。
- (5) 予想に反し、野生型BS69の共発現によりE1Aのユビキチン化の抑制がみられた。さらにこのユビキチン化抑制はMYNDドメイン依存的であることが判明した。
- (6) BS69の共発現により、E1Aタンパク質の哺乳動物細胞内での分解の遅延が見られた。

〔考察〕

これらのことから、哺乳動物細胞内において、E1Aタンパク質の少なくとも一部は、ユビキチン-プロテアソーム系を介した分解を受けており、宿主細胞内因子であるBS69タンパク質はE1Aのユビキチン化を阻害することにより、その生物学的半減期を延長させると考えられた。

論文審査の結果の要旨

アデノウイルスE1A遺伝子は、感染1～2時間後、他の初期遺伝子に先立って発現する。E1A遺伝子は13Sと12Sの2種のmRNAを合成し、細胞の不死化を示す一方でアポトーシスを誘導することが知られている。アデノウイルス感染細胞で、E1Aタンパク質は速やかに分解されることが知られている。この分解機序について、生細胞内ではユビキチン-プロテアソーム系が関与するかどうかは不明である。一方、E1Aと相互作用を示す細胞内因子としてBS69が知られている。BS69はMYND、PHDドメインなどを持つことが知られている。C末端のMYNDドメインはE1Aとの結合に関与する。また、PHDドメインはユビキチンリガーゼ活性を示す可能性がある。そこで、申請者らは、生細胞内でE1Aがユビキチン-プロテアソーム系を介した分解を受ける可能性、および、BS69がこの分解制御に関与する可能性について研究を行った。

得られた主な結果は以下の通りである。

- (1) ヒト細胞株にE1Aを強制発現させ、シクロヘキシミド処理により、E1Aタンパク質の分解速度を測定したところ、半減期は数時間以内であった。また、この分解はプロテアソーム阻害剤による抑制が認められた。

- (2) ユビキチンを共発現させることで、E1Aタンパク質のユビキチン化が電気泳動でラダーとして観察された。
- (3) BS69はユビキチンと共発現させることで、自己ユビキチン化を示した。しかし、BS69のPHDドメインの欠失変異体では、自己ユビキチン化が認められなかった。このため、BS69はPHDドメインによるユビキチンリガーゼ活性を持つことが証明された。
- (4) 生細胞内においてBS69とE1Aの相互作用が証明された。また、BS69の欠失変異体を用いることにより、BS69のMYNDドメインがE1Aとの相互作用に関与することが証明された。
- (5) 野生型BS69を共発現することで、予想外にもE1Aのユビキチン化の抑制が認められた。さらに、この抑制はBS69のMYNDドメイン依存的であった。
- (6) BS69の共発現により、E1Aタンパク質のヒト細胞株内における分解の遅延が認められた。

以上より、申請者らは、哺乳細胞内において、E1Aタンパク質の少なくとも一部は、ユビキチン-プロテアソーム系を介した分解を受けており、宿主細胞内由来のBS69タンパク質はE1Aのユビキチン化を阻害することにより、その半減期を遅延させると推察した。

審査委員会では、E1Aタンパク質が哺乳細胞内でユビキチン-プロテアソーム系を介した分解を受けることを初めて証明したこと、および、BS69タンパク質がその分解を阻害することを証明したことを高く評価した。

以上の研究に対し、審査委員会では以下の質疑を行った。

- 1) 齧歯類の細胞株は用いなかったか
- 2) E1Aの細胞内局在について
- 3) ウエスタンブロッティングでE1Aの複数のバンドが検出されるのは何故か
- 4) E1Aの分解速度は、他のユビキチン-プロテアソーム系で分解を受けるタンパク質に比して速いのか
- 5) 4×Flagの必要性について
- 6) 免疫沈降の条件について
- 7) BS69の細胞内局在について
- 8) PHD欠損BS69でも若干自己ユビキチン化が残っているのは何故か
- 9) 内在性BS69はウエスタンブロッティングで検出できないか
- 10) BS69によるE1Aのユビキチン化阻害の機序について
- 11) BS69はE1AとRBの結合を阻害する可能性について

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で判定した。

論文審査担当者	主査	小 出 幸 夫	
	副査	三 浦 直 行	副査 山 本 龍 夫