

主論文の要旨

**Degradation of Phosphorylated p53
by Viral Protein-ECS E3 Ligase Complex**

ウイルス蛋白質-ECS ユビキチン E3 リガーゼ複合体によるリン酸化 p53 の分解

名古屋大学大学院 医学系研究科 分子総合医学専攻
微生物・免疫学講座 ウイルス学分野
(指導：木村 宏 教授)

佐藤 好隆

[要約]

ウイルスは宿主の細胞内環境を自身の増殖に有利に整えるため、p53 シグナル経路を調節している。バーキットリンパ腫、上咽頭がん、T細胞白血病、胃がん等との関連が指摘されているヒトがんウイルス Epstein-Barr virus (EBV)も、ウイルス産生のために溶解感染に移行すると宿主 DNA 損傷チェックポイントシグナルが活性化され、p53 はリン酸化されるにもかかわらず、p53 の下流にこのシグナルは伝達されないことから、EBV 溶解感染期において活性化された p53 を不活化する機構の存在が示唆されてきた。本研究により、潜伏感染期では p53 が MDM2 により量的に制御されるのに対し、溶解感染を誘導すると p53 は MDM2 非依存的にユビキチン-プロテアソーム系で分解されることを明らかにした。EBV 前初期遺伝子産物 BZLF1 蛋白質が ECS (Elongin B/C-Cul2/5-SOCS-box protein) ユビキチン E3 リガーゼ複合体のアダプター蛋白質として機能し、この p53 の分解に関与していることが解った。EBV 溶解感染細胞において、p53 を強制発現させるといくつかのウイルス遺伝子の発現やウイルスゲノム複製が抑制され、ウイルス増殖における p53 の不活性化の重要性が確認された。さらに、宿主 DNA 損傷チェックポイントの活性化に伴う p53 の C 末のリン酸化が、BZLF1 蛋白質との結合を増強した。BZLF1-ECS 複合体を精製し試験管内ユビキチン化反応を行うと、リン酸化ミミック変異体 p53 のほうが野生型に比べ、よりユビキチン化され、このユビキチン化反応は基質のリン酸化により制御されていることが示唆された。以上の結果より、EBV 溶解感染期でのリン酸化された p53 の制御における BZLF1 protein-associated ECS E3 リガーゼ複合体の役割が明らかとなった。

[結果]

EBV 陽性 Tet-BZLF1/B95-8 細胞に Doxycycline の添加により溶解感染を誘導すると、宿主 DNA 損傷チェックポイントシグナルの活性化に伴う p53 のリン酸化は増加するが、p53 自体は溶解感染の進行とともに減少することがわかった(Fig.1A)。プロテアソーム阻害剤 MG132 処理によって溶解感染期での p53 の減少は見られなくなったため、p53 はユビキチン化依存的に分解されることが明らかとなった(Fig.1B and C)。

溶解感染細胞内での p53 と BZLF1 タンパク質との相互作用は MG132 存在下においてのみ検出された(Fig.2A)。ユビキチンリガーゼ複合体との結合はそのターゲット蛋白質を急速に分解させてしまうと考えられるため、p53 が BZLF1 を含む E3 ユビキチンリガーゼ複合体の基質であると考えられる。そこで、次に BZLF1 蛋白質が p53 の量をプロテアソーム依存的に制御しているかどうかを解析した。p53 欠損 SaOS-2 細胞株に p53 と BZLF1 蛋白質を強制発現させると p53 の量は減少するが、MG132 処理によりこの減少が回復し(Fig.2B)、BZLF1 蛋白質により p53 はポリユビキチン化され(Fig.2C)、BZLF1 蛋白質はユビキチン依存的な p53 のプロテアソームでの分解を引き起こすことが明らかとなった。レポーターアッセイを行うと、BZLF1 蛋白質は p53 の特

異的な転写を抑制し、p53 と相互作用できない BZLF1 変異体 d200-227 ではこの抑制が見られないことから、BZLF1 蛋白質は p53 の分解を介して p53 特異的な転写を抑制することが示唆された(Fig.2D)。一方、BZLF1 蛋白質は CMV プロモーターによる外因性の p53 の発現には影響を及ぼさない(Fig.2E)。

通常 p53 は MDM2 により量的制御を受けているため、BZLF1 蛋白質による p53 の分解への MDM2 の関与についても検討した。MDM2 と p53 のダブルノックアウトマウスから得られた MEF においても BZLF1 蛋白質は、p53 の減少を伴う p53 特異的なレポーターの抑制が見られたことから(Fig. 3A)、BZLF1 蛋白質による p53 の分解には MDM2 は関係しないと考えられる。さらに、EBV 感染細胞に p53 と MDM2 との相互作用阻害剤 Nutlin-3 処理を行うと、潜伏感染期では p53 の量が増加するが、溶解感染期では p53 の量に変化がなかった(Fig.3B)。よって、潜伏感染期では p53 が MDM2 により量的に制御されているのに対し、溶解感染を誘導すると p53 は MDM2 非依存的にユビキチン-プロテアソーム系で分解されることが明らかとなった。

溶解感染期における BZLF1 蛋白質依存的な p53 分解機構を解明するため、Bioinformatic search を行ったところ、BZLF1 蛋白質の N 末端にユビキチン E3 リガーゼと知られている Cul2 及び Cul5 の結合モチーフである Cul2-box、Cul5-box を見出した(Fig.4A)。Cul2 及び Cul5 の BZLF1 蛋白質との結合を検討したところ、それぞれ結合モチーフ特異的に BZLF1 蛋白質と結合することが明らかとなった(Fig.4B)。また、EBV 溶解感染細胞内においても、それらの結合は確認された(Fig.4C)。また、Cul2 及び Cul5-box 欠損 BZLF1M3 変異体では、野生型で見られる p53 の減少は観察されなかった(Fig.4D)。さらに siRNA により Cul2 と Cul5 の両者をノックダウンすると p53 の減少が観察されなくなったことより感染細胞内において実際に BZLF1-Cul2/Cul5 複合体が p53 の制御に関与することが判明した(Fig.4E)。p53 の減少がはっきりと確認できる溶解感染中-後期に p53 を強制発現させ p53 の量を補うと、ウイルスゲノム複製が阻害された(Fig.4F)。効率的なウイルスの増殖には、p53 の不活性化が必要であることが示唆された。

さらに、これらの蛋白質を、バキュロウイルス発現系を用いて精製し、*in vitro* でユビキチン化反応を再構成したところ、BZLF1-Cul2/Cul5 複合体による p53 のユビキチン化が確認できた(Fig.5A-F)。また、p53 と結合できない BZLF1 蛋白質の変異体を用いると p53 のユビキチン化は大幅に減少した(Fig.5G and H)。よって、BZLF1 蛋白質は Cul2/5 複合体中で、基質である p53 を認識するアダプターとして機能することがわかった。

BZLF1 蛋白質と p53 との相互作用の調節を解析する中で、p53 は溶解感染期に高度にリン酸化されることが明らかとなり(Fig.6B)、p53 の C 末端がリン酸化されると BZLF1 蛋白質との結合が強まることが解った(Fig.6C)。これは p53 のリン酸化により、p53 のコンフォメーションが変化したためと考えられ、試験管内ユビキチン化反応においても、リン酸化ミミック p53 変異体のほうが野生型に比べ、よりユビキチン化された(Fig.6D and E)。これらの結果より、このユビキ

チン化反応は基質のリン酸化により制御されていると考えられる。

[考察]

本研究により、EBV の潜伏感染と溶解感染では p53 の量的制御が異なることがわかった(Fig.7)。潜伏感染では通常の制御と同様に MDM2 によって p53 は制御されているが、溶解感染に移行すると宿主 DNA 損傷チェックポイント経路が活性化され、ATM や Chk2 により p53 の N 末がリン酸化されることで、p53 は MDM2 の制御下から外れる。しかし、続けて起きる Chk2 による p53 の C 末のリン酸化によって、p53 は BZLF1 蛋白質と強固に結合し、ECS ユビキチンリガーゼ複合体がリクルートされ、ユビキチン化依存的分解を受ける。そのため、溶解感染では p53 の量は低く保たれ、ウイルスの増殖・複製に適した細胞内環境が保たれることが示唆された。

p53 の E3 リガーゼは現在までにいくつか知られているが、リン酸化された p53 をユビキチン化できるリガーゼは CARPs 以外に報告がないので、p53 分解の新しい分子機構として非常に興味深い。

[結語]

Epstein-Barr virus 溶解感染での p53 不活化機構として、前初期遺伝子産物 BZLF1 蛋白質と Cul2/Cul5 などからなる ECS ユビキチン E3 リガーゼ複合体による p53 のユビキチン-プロテアソーム系での分解を同定した。また、本研究から溶解感染における p53 の不活性化の重要性が示された。