

平成 21 年 5 月 14 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19590469

研究課題名（和文） シグナル伝達による EB ウイルス EBNA1 の機能制御

研究課題名（英文） Regulation of Epstein-Barr virus EBNA1 by signal transduction

研究代表者

白形 正樹 (SHIRAKATA MASAKI)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教

研究者番号：70251551

研究成果の概要：

Epstein-Barr ウイルスの EBNA1 は GSK-3 $\beta$  キナーゼによるリン酸化修飾を受けていた。これらのアミノ酸は EBNA1 の転写因子としての機能に重要であり、GSK-3 $\beta$  を介するシグナル伝達によってウイルスの遺伝子発現が制御されていることが明らかになった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：

## 1. 研究開始当初の背景

Epstein-Barr (EB) ウイルスはヒトヘルペスウイルスに属し、伝染性単核症や慢性活動性 EBV 感染症 (CAEBV) の原因であるとともに、バーキットリンパ腫、上咽頭がんとの関連があり DNA 腫瘍ウイルスでもある。これらの癌は日本においてはその症例が少ないものの予後が非常に悪いことが知られている。また CAEBV でも多くの症例で悪性の T 細胞がんに行進しその予後は悪い。さらに多発性硬化症、リウマチやシェーグレン症候群などの自己免疫疾患との関連も指

摘されている。健常人において EB ウイルスは不顕性感染した後に宿主に深く潜伏することが知られているが、この健常人においてほとんど無害であるウイルスがどのように難治性疾患の原因となるか十分には理解されていない。健常人における EB ウイルスのライフサイクルは粘膜上皮細胞と免疫 B 細胞の分化に密接に関連している。そこで、EB ウイルスが関連する疾患ではウイルスは正常のライフサイクルから逸脱していると考え、その原因を追究することが疾患の理解と治療法の開発に重要になる。

EB ウイルスの EBNA1 は複製起点 oriP に

結合して ORC などの宿主細胞複製因子をウイルスゲノムに結合させてウイルスゲノムを複製させる重要な複製因子である。さらに、ウイルス染色体の分配、遺伝子転写制御、さらに p53 に依存したアポトーシスに関連することが判明しており、潜伏感染時における最も重要なウイルス因子のひとつである。この重要性を考えると、EB ウイルスのライフサイクルに於いて EBNA1 の機能がシグナル伝達によって制御されている可能性が十分あり、その詳細な検討が EB ウイルス関連疾患の解明に重要である。

当初、我々はこの問題にウイルス複製の観点から取り組み、複製起点 oriP が p38 MAP キナーゼを介して抑制的に制御されていることを発見した。さらに、Bリンパ腫細胞では p38 MAP キナーゼの恒常的活性が起きていることを発見して、従来からの我々の仮説であった「腫瘍細胞では複製起点 oriP の活性が抑制されている」ことが説明できた。この p38 MAP キナーゼの恒常的活性化は癌遺伝子の発現が原因であると過去の報告から推測されるが、複製の抑制機構に関しては全く不明であった。

一方、EBNA1 は以前よりリン酸化修飾を受けていることは知られていたが、修飾を受けるアミノ酸及びその機能との関連は全く不明であった。

## 2. 研究の目的

シグナル伝達による EB ウイルス EBNA1 の各活性を制御する機構を解明する。EBNA1 の機能としてはウイルス複製、ウイルス染色体分配、遺伝子発現制御、アポトーシス制御等がある。EBNA1 を制御する細胞膜受容体から複製機構までのシグナル伝達経路を同定する。癌などの EB ウイルス関連疾患における EBNA1 への制御機構の破綻あるいは変異を検討する。

## 3. 研究の方法

EBNA1 に於けるリン酸化アミノ酸の同定をウイルス感染細胞から精製した EBNA1 を用いて行う。変異 EBNA1 を発現する遺伝子を構築し、リン酸化アミノ酸を確認する。リン酸化を受けないような変異 EBNA1 を用いて、変異が EBNA1 機能に及ぼす影響を検討する。変異 EBNA1 遺伝子を持つ組み換え EB ウイルスを作製する。組み換え EB ウイルスを細胞に感染させて、基本的なウイルス感染効率、ウイルス産生、ウイルス遺伝子発現、ウイルス染色体の安定性、感染細胞の不死化効率、抗アポトーシス活性、宿主細胞因子によるウイルス複製制御を野生型 EB ウイルスと比較検討する。野生型と変異型で有意な差や異常が発見

された場合、EBNA1 機能との関連やリン酸化による制御を詳細に検討する。EBNA1 を制御する細胞膜受容体から複製機構までのシグナル伝達経路を同定する。リン酸化アミノ酸とその周辺の配列から EBNA1 を修飾するキナーゼを推測し、各種阻害剤を利用してリン酸化に関与するシグナル伝達経路を明らかにする。siRNA によるキナーゼ発現の阻害および in vitro におけるリン酸化反応によって各キナーゼが EBNA1 を基質とするか検討する。キナーゼが同定された場合、その上流のシグナル経路はこれまでの報告から推定できる。感染細胞を用いて EBNA1 のリン酸化までのシグナル経路の確認を行う。癌などの EB ウイルス関連疾患における EBNA1 への制御機構の破綻を検討する。各疾患由来のウイルス感染細胞におけるシグナル経路と EBNA1 のリン酸化の状態を詳細に解析して、EBNA1 機能の異常の有無を検討する。何らかの異常が発見された場合、疾患との関連を検討する。

## 4. 研究成果

EB ウイルスが潜伏感染している LCL 細胞を [32P]リン酸で標識して、EBNA1 を精製したところ細胞内でリン酸化修飾を受けていること確認した。リン酸化を受けているアミノ酸は主にセリンであり、リン酸化トレオニンとリン酸化チロシンは検出されなかった。トリプシンを用いたペプチドマップ法によると主に修飾されているペプチドは 1 種類であった。バーキットリンパ腫細胞 Raji、MutuI 細胞を用いて同様の実験を行ったが、リン酸化アミノ酸の種類及びリン酸化の程度に顕著な差はなかった。LCL と Raji は潜伏感染状態が III 型である、MutuI は I 型である。従って潜伏感染状態の違いは EBNA1 のリン酸化に影響していないことが判明した。

リン酸化修飾を受けているアミノ酸を同定するために、EBNA1 をヒト由来の細胞株である 293T 細胞に発現させて詳細に検討した。まず 293T 細胞に発現した EBNA1 のリン酸化アミノ酸種類とペプチドマップは感染細胞と顕著な差が無いことを確認した。その上で EBNA1 の欠損変異体を発現させ、リン酸化を検討したところ 8 個のセリンを含む Ser383 から Ser393 の領域が強くリン酸化されていることが判明した。さらに、この 8 個のセリンをそれぞれ、あるいは複数まとめて変異させて詳細に検討した。その結果、最も強くリン酸化されているのは Ser383 と Ser393 であった。Ser385、Ser386、Ser388 と Ser389 はリン酸化を受けているがその程度は前述のセリンより低かった。Ser390 と Ser391 に関してはリン酸化程度が非常に低いかあるいは全く修飾を受けていないことが判明した。複数箇所を同時に変異した場合と比較して、

1カ所単独に変異を導入した場合の効果が大きく、これらアミノ酸のリン酸化が相互に関連していることが示唆された。

EBNA1の機能とリン酸化の関連を検討するために、リン酸化部位をアラニンに置換した変異体を培養細胞に発現させ、野生型と活性を比較検討した。EBNA1は転写制御因子の機能を有することが知られている。潜伏感染時に発現するウイルス遺伝子産物EBNA1、EBNA2、EBNA3A、EBNA3B、EBNA3C、EBNA-LPはウイルスゲノムBamHI断片Cに存在するCpプロモーターから転写される非常に長いRNAから選択的スプライシングによって各mRNAが合成されて発現する。Cpプロモーターは比較的活性の低いものである。その上流には複製起点として機能するoriP配列が位置している。EBNA1はoriPに20以上存在する特異的部位に結合して、ウイルスの複製に重要な役割をはたすと同時に、Cpプロモーターを強く活性化する転写活性化因子として機能する。全てのEBNAが発現している潜伏感染III型の状態でEBNA1の発現量は比較的高く、CpプロモーターはEBNA1によって非常に強く活性化されている。EBNAを発現するプロモーターはBamHI断片Qにも存在している。このQpプロモーターからはEBNA1だけが発現される。Qpプロモーターは活性の高いものであるが、潜伏感染III型ではほとんど活性が無い。一方、EBNA1の発現が比較的低い潜伏感染I型の細胞で主に機能している。EBNA1はQpプロモーターの転写開始点の下流側に位置するEBNA1結合部位を介して、Qpプロモーターの活性を抑制することが知られている。EBNA1はCpに関しては転写促進因子として、Qpには転写抑制因子として機能している。そこでoriP-CpとQp領域をそれぞれルシフェラーゼ遺伝子上流に結合した転写活性のリポーター遺伝子を構築して、EBNA1またはその変異体を発現するプラスミドとともにBリンパ腫細胞BJABに導入して、EBNA1の転写制御活性を検討した。その結果、リン酸化を受けないEBNA1はQpプロモーターの抑制に関しては野生型と変わらない活性を保持していたが、Cpプロモーターの活性化能に関してはその機能が著しく低下していることが判明した。したがって、EBNA1のリン酸化はCpプロモーターからの遺伝子発現制御に関与していることが明らかになった。

最も強くリン酸化されているSer383とSer393はともにC末端側にプロリンが続く配列になっている。データベースを用いたタンパク質リン酸化酵素(キナーゼ)の予測ではMAPキナーゼ型の酵素や一群のサイクリン依存キナーゼ(CDK)によるリン酸化の可能性が示唆された。一方、この二つのセリンの間に位置する4つの比較的弱くリン酸化されるセリンは同様の解析によるとglucose

synthase キナーゼ-3 $\beta$ (GSK-3 $\beta$ )あるいはカゼインキナーゼ1(CK1)によるリン酸化が示唆された。そこで、まず代表的なシグナル伝達系の阻害剤でLCLを処理し、リン酸化への影響を検討した。これらにはRas-MAPK、p38MAPK、JNK、PI3K、mTORの各シグナル経路の阻害剤を含んでいるが、いずれの経路の阻害もリン酸化に影響しなかった。また細胞周期の制御に深く関与するCDKに関しては、Cdk1、Cdk2及びCdk4に対する複数種類の阻害剤を用いて検討したが顕著な影響は観察されなかった。CK1に関しても同様の結果であった。使用した阻害剤の中で唯一影響の確認できたのはGSK-3 $\beta$ の阻害剤であった。LCLを25 $\mu$ MのGSK-3 $\beta$ 阻害剤I(IDZD8)で24時間処理すると、SDS電気泳動に於けるEBNA1の移動度が低リン酸化型の方向にシフトした。ファオスファターゼで完全に脱リン酸化したEBNA1と比較すると、リン酸化型との中間に位置しており、GSK-3 $\beta$ の阻害によってEBNA1のリン酸化の多くが抑制されたことが分かった。したがって、EBNA1はGSK-3 $\beta$ あるいはシグナル経路でその下流に位置するキナーゼがEBNA1をリン酸化していることが示唆された。またこの発見と同時に、GSK-3 $\beta$ の阻害がLCLの細胞死を誘導することも発見した。同様の処理でRajiやMutuI細胞でも細胞死が起きることを確認している。EBNA1の機能としてp53に依存した細胞死を抑制する働きが報告されている。したがって、GSK-3 $\beta$ の阻害によるEBNA1の脱リン酸化が細胞死を誘導する可能性もあり、今後の研究課題となった。

潜伏感染I型の感染細胞では低レベルのEBNA1発現がQpプロモーターの抑制と低い活性のCpプロモーターによって定常的に維持されている。一方、潜伏感染III型の感染細胞では高いレベルのEBNA1発現がCpの自己活性化によって維持されている。この二つの定常状態はある一定のEBNA1の発現量を境に相転移すると推測される。したがって、EBNA1のリン酸化はこの潜伏感染状態の転移に深く関連していると考えている。EBウイルスの潜伏感染状態が体内で転移することは知られているが、この結果を基に転移の機構が解明され、さらに人為的にコントロールする方法が明らかになることが期待出来る。そのような研究によってウイルス感染症を制御する新たな手段が得られる可能性がある。

リン酸化を受けないEBNA1を発現する組換えEBウイルスの構築を行ったが、完成には至っていない。今後も継続して研究を行い完成を目指している。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕（計0件）

〔学会発表〕（計3件）

Shou Waga, EBNA1 regulates ORC binding to oriP plasmids in vitro、Cold Spring Harbor Symposium, 2007 Cold Spring Harbor Laboratory Meeting: Eukaryotic DNA Replication & Genome Maintenance, Sep 5-9, 2007, Cold Spring Harbor, NY, USA

和賀 祥、EBNA1 regulates ORC binding to oriP plasmids in vitro、第30回日本分子生物学会年会、第80回日本生化学会大会合同大会、2007年12月11-15日、横浜

和賀 祥、RNA 結合因子および RNA の真核生物 DNA 複製開始への関与の可能性、第31回日本分子生物学会年会、第81回日本生化学会大会合同大会、2008年12月9-12日、神戸

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

なし

6. 研究組織  
(1)研究代表者

白形 正樹  
東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし