

平成 21 年 5 月 20 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007 年度～2008 年度

課題番号：19590474

研究課題名（和文）EB ウイルス LMP 遺伝子による細胞形質転換機構の包括的解析

研究課題名（英文）The comprehensive analysis of molecular mechanism by which EB virus LMP1 gene induces cell growth transformation

研究代表者

安居 輝人（YASUI TERUHITO）

大阪大学・微生物病研究所・准教授

研究者番号：60283074

研究成果の概要：

本研究ではEBV発がんの分子機構を包括的に解明するために、EBV潜伏感染遺伝子Latent membrane protein (LMP1、LMP2a)のB細胞形質転換機構の分子作用メカニズムの解析を行った。1) LMP-LMP2a間タンパク相互作用の解析とハイスループット(HTS) 抗LMP作用薬剤スクリーニング法確立の試み、2) LMP 1 シグナルに関与する宿主因子の同定に焦点を絞り解析した。その結果、LMP両分子間の直接的相互作用を証明するために、Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC)法を行い、蛍光強度の発現を検討することによって、LMP1-LMP2a分子相互作用の有無を検討した。その結果、LMP1間、LMP2a間及びLMP1-LMP2a間相互作用が存在することが明らかとなった。一方、LMP下流シグナルに関与する可能性のある7分子を同定した。いずれの分子もLMPの発現により細胞内局在を変化させることが明らかとなった。特にLMP依存性B細胞形質転換作用に関与する細胞増殖・生存制御を司る推定分子としてp73結合分子Ranbp9がLMP下流シグナルに存在することが示唆された。1) 項のハイスループット(HTS) 抗LMP作用薬剤スクリーニング法確立の試みに関連して、B細胞生存に関与するTRAF3とLMP1との相互作用に焦点を当て、最終的にEBV阻害薬の候補薬剤を選別するシステムの基盤構築を試みた。LMP1は細胞膜表面上でTRAF3と恒常的に会合することが明らかとなっているが、申請者らはTRAF3の細胞内局在はN-末端側RINGフィンガードメインに規定されていることを明らかにした。

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
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：Epstein-Barr virus, Latent membrane protein, TNF family, Herpesvirus, Lymphoma

## 1. 研究開始当初の背景

現在、免疫細胞に感染する様々なウイルスが人類を脅かしている。EBV 及び近年ではカポジ肉腫ヘルペスウイルス(KSHV)等の $\gamma$ -ヘルペスウイルスや成人性 T 細胞リンパ腫ウイルス(HTLV)、AIDS ウイルス等免疫細胞感染性ウイルスが多数同定されている。免疫細胞感染性ウイルス関連疾患の治療戦略においては免疫細胞が治療標的となるため、治療時の免疫システムの破綻による二次感染症増悪の危険性を常にはらんでいる。従って、より厳密なウイルスの増殖、病原性発現の制御を特化した治療戦略が必要となり、このためには宿主免疫制御機構とウイルス病原性惹起における分子メカニズムの同時理解が必須である。ヘルペスウイルスの中で EBV は全世界人口の約 80%が保有するヒト B 細胞、上皮指向性ウイルスであり、伝染性単核球症、バーキットリンパ腫、ホジキン病及び、AIDS 誘導性リンパ腫や移植後リンパ球増殖疾患 (PTLD)、さらに、免疫抑制剤投与による関節リウマチおよび多発性筋炎患者での EBV 陽性リンパ腫等の免疫不全関連リンパ球増殖疾患の発症に深く関わっていることが知られている。したがって、高齢化社会、移植医療の充実、AIDS 感染拡大等、我が国の社会的背景を考慮すると、今後も EBV 関連リンパ球増殖疾患にかかる患者数の増加は必至である。申請者らはこれまで EBV の B 細胞形質転換機構に着目し、病原体-宿主分子相互作用を中心に解析してきた。その中でも EBV 潜伏感染遺伝子産物で膜タンパクである LMP1 が B 細胞機能制御に必須の CD40 シグナルを一部模倣し、B 細胞分化を修飾することを明らかにした。LMP1 はホジキンリンパ腫細胞、B リンパ芽球細胞株 (Lymphoblastoid cell lines; LCL) に強く発現し、その細胞表面上で自己凝集することによって、TNF レセプター共有会合分子である TRAF との会合を促進し、NF- $\kappa$ B、JNK 及び p38 MAP キナーゼを恒常的に活性化することが明らかとなってきた。近年、LMP1 トランスジェニックマウスを用いて、LMP1 が B 細胞初期分化を修飾すること、CD40,BAFFR 及び LMP1 会合分子である TRAF3 が B 細胞生存に必須の分子であることや B 細胞抗原レセプター(BCR)シグナルと協同的に作用することが申請者らによって明らかにされている。一方、EBV 由来蛋白 LMP2a は 12 回膜貫通ドメインを有しており、B 細胞の分化増殖

に必須な B 細胞抗原レセプター(BCR)を恒常的に活性化することが知られている。従って、EBV は両免疫賦活シグナルを利用して B 細胞分化修飾を行うことにより、EBV 感染を成立させていることが考えられる。また、ホジキンリンパ腫において LMP1、LMP2a の強い発現が認められること、両遺伝子における EBV 種間や KSHV とのゲノム配置の保存性、アミノ酸一次構造的特徴及び活性化様式の相同性が認められることから、これら 2 分子は同一遺伝子を祖先として分岐してきた遺伝子群であることが強く示唆されている。

## 2. 研究の目的

本研究は EBV 発がんの分子機構を解明するために、EBV 潜伏感染遺伝子 Latent membrane protein (LMP1、LMP2a)の B 細胞形質転換機構の分子作用メカニズムを解析する。さらに、それに基づいて免疫システムを保持したより安全な治療戦略の構築を目的として、LMP1、LMP2a 凝集活性を指標とした薬剤スクリーニング法の確立を試みる。

## 3. 研究の方法

### 1) LMP-LMP2a 間タンパク相互作用の解析とハイスループット(HTS) 抗 LMP 作用薬剤スクリーニング法確立の試み

EBV 膜蛋白 LMP1 と LMP2a の細胞膜領域を介した自己凝集能に着目し、その自己凝集活性を容易に検出できるシステムを構築するため、Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) 法を用いた LMP 蛋白の凝集活性を検討した。原理として緑色蛍光蛋白 (Green fluorescence protein: GFP) 分子を 2 分割することによって蛍光活性を消失した蛋白を、会合活性を有する 2 種類の蛋白にそれぞれ融合させる。2 つの GFP 融合蛋白は分子間距離が近接するため、擬似的に GFP 蛋白の立体構造配置をとることにより、蛍光活性を有するといった GFP 様の特性を獲得する。その蛍光活性を指標に融合した蛋白間の会合を検出することが可能である。

### 2) LMP 1 シグナルに関与する宿主因子の同定

LMP1 に会合する分子として TRAF3 が知られるが、我々のグループの研究成果により、TRAF3 が B 細胞生存に関与していることが明らかとなった。そこで LMP1/TRAF3 シグナル伝達経路の下流に存在する分子を同定するためにヒト cDNA ライブラリーを用いて Yeast Two-hybrid 法を行った。さらに TRAF3 の細胞

内局在が細胞生存に関与している知見が得られていることから、それを規定している TRAF3 タンパクのドメインの同定を試みた。

#### 4. 研究成果

##### 1) LMP-LMP2a 間タンパク相互作用の解析とハイスループット(HTS) 抗 LMP 作用薬剤スクリーニング法確立の試み

###### 【結果】

1. BiFC による LMP 間相互作用の検出  
FACS による解析結果を図 1 に示す。NmGFP および CmGFP を発現した HEK293 細胞(灰色分画、control) に対して融合蛋白 LMP2a\_NmGFP/ LMP2a\_CmGFP (a)、LMP1\_NmGFP/ LMP1\_CmGFP (b)、LMP1\_NmGFP/LMP2a\_CmGFP (c) (いずれも白抜き太実線) の発現により control より強い蛍光強度を示した。

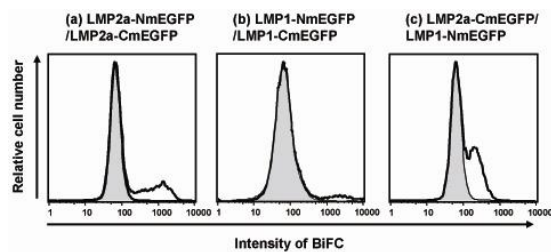


図 1. BiFC による LMP-LMP 相互作用の検出

##### 2. ドミナントネガティブ効果による LMP2a 間 BiFC の消失

FACS による解析結果を Figure 2 に示す。結果第一項と同様に NmGFP と CmGFP の同時発現させた HEK293 細胞 (図 2 中、灰色分画、control) と比較して、融合蛋白 LMP2a\_NmGFP/ LMP2a\_CmGFP を発現させた細胞は蛍光強度の増強が認められた。さらにそれらの LMP2a 融合蛋白による蛍光強度(図 2 中白抜き太実線)は GFP 蛋白を有していない LMP2a の発現によって、著しく阻害された (図 2 中、白抜き実線)。この結果より LMP2a 融合蛋白による蛍光強度の増強は LMP2 蛋白相互作用に依存した BiFC を検出していることが明らかとなった。

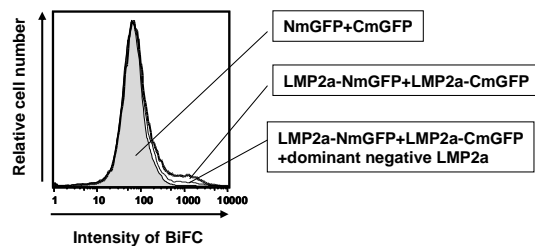


図 2. LMP2a の BiFC に対するドミナントネ

ガティブ効果

【結論】 EBVLMP 1、LMP2a の凝集能を BiFC によって可視化することに成功した。特に LMP1-LMP1、LMP2a-LMP2a の自己凝集能のみならず、LMP1-LMP2a 間の相互作用が存在することも明らかとなった。本実験で構築された BiFC のシステムは抗 EBV 薬探索のためにスクリーニング法として応用可能であり、現時点でのシステムとして最適であることが強く示唆された。

##### 2) LMP 1 シグナルに関与する宿主因子の同定

【結果】 Yeast Two-hybrid 法により LMP 下流シグナルに関与する可能性のある 7 分子を同定した。いずれの分子も LMP の発現により細胞内局在を変化させることが明らかとなった。特に LMP 依存性 B 細胞形質転換作用に関与する細胞増殖・生存制御を司る推定分子として p73 結合分子 Ranbp9 が LMP 1 下流シグナルに存在することが示唆された。現在、B 細胞生存への関与を検討するために Ranbp9 ノックアウトマウスを作成中である。また、EBV 依存性発がんにおける Ranbp9 の関与を明らかにするために、EBV 誘発ヒト Lymphoblastic Cell Line (LCL)を用いた Ranbp9 遺伝子ノックダウンによる細胞増殖活性の変化を検討している。

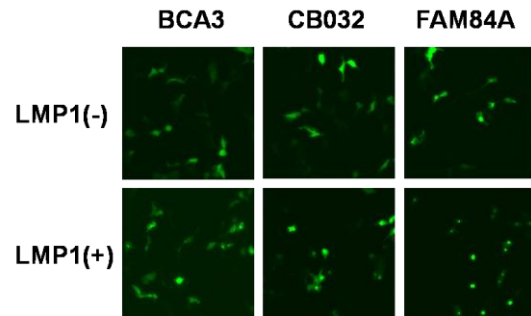


図 3 LMP1 発現による TRAF3 会合因子の細胞内局在変化

一方、LMP1 非存在下において TRAF3 は細胞質内広域に存在するが、RING フィンガードメインの点突然変異体は細胞内の細胞内オルガネラに局在し、細胞質内に拡散できないことが明らかとなった。

###### 【結論】

TRAF3 会合分子として Ranbp9 が同定されたことにより、LMP1 依存性細胞形質転換におけるアポトーシス誘導因子 p73 の制御を介

した分子機構の存在が示唆された。また、TRAF3が他のTRAFファミリーとRINGフィンガードメインを介した酵素活性に関して特異性を有していることより、LMP1-TRAF3 直接相互作用以外のTRAF3RING フィンガードメインと未知のタンパク相互作用を抑制した LMP1-TRAF3 相互作用頻度の低下をもたらすことによって抗 LMP1 作用を発揮できる可能性が示唆された。

#### 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5件)

- ① Ikeda O., Sekine Y, Mizushima Y, Oritani K, Yasui T, Fujimuro M, Muromoto R, Nanbo A, and Matsuda T. BS69 negatively regulates the canonical NF- $\kappa$ B activation induced by Epstein-Barr virus-derived LMP1., **FEBS Letter**. 583, 1567-1574, 2009, (査読有)
- ② Mizui M, Shikina T, Arase H, Suzuki K, Yasui T, Rennert PD, Kumanogoh A, Kikutani H. Bimodal regulation of T cell-mediated immune responses by TIM-4., *International Immunology*, 20,695-708, 2008, (査読有)
- ③ Ikeda O, Sekine Y, Yasui T, Oritani K, Sugiyma K, Muromoto R, Ohbayashi N, Yoshimura A, Matsuda T., STAP-2 negatively regulates both canonical and noncanonical NF-kappaB activation induced by Epstein-Barr virus-derived latent membrane protein 1. *Molecular Cellular Biology*, 28,5027-5042, 2008, (査読有)
- ④ Iguchi-Manaka A, Kai H, Yamashita Y, Shibata K, Tahara-Hanaoka S, Honda S, Yasui T, Kikutani H, Shibuya K, Shibuya A., Accelerated tumor growth in mice deficient in DNAM-1 receptor., *The Journal of Experimental Medicine*, 205, 2959-2964, 2008, (査読有)
- ⑤ Soni V, Yasui T, McFarland EC, Kieff E, LMP1 Transmembrane Domain1-2 FWLY mediates Intermolecular Interactions with 3-6 to activate NF-kB., *Journal of Virology*, 80,10787-10793, 2006, (査読有)

[学会発表] (計2件)

- ① 矢田佳織、安居輝人、多田智、丸尾聖爾、菊谷仁、EBVBAC を用いた感染可視化による EBV-宿主相互作用の

解析、第 56 回日本ウイルス学会学術集会、2008 年 10 月 26 日、岡山

- ② Yasui T, Yada K, Mosialos G, Kieff E, Kikutani H, PKN1, a member of the protein kinase C family controls B cell activation and the tolerance., 4th International Leukocyte Signal Transduction Workshop: Clinical implications of signaling pathways, June 3 - 8, 2007, Rhodes, Greece

[図書] (計1件)

安居輝人、EB ウイルス改訂第 2 版 (高田賢蔵監修、診断と治療社) ウイルスの構造と遺伝子 LMP、pp25-31(2008)

[産業財産権]

取得状況 (計1件)

名称: 抗 EB ウイルス薬の候補化合物のスクリーニング方法

発明者: 安居輝人、菊谷仁

権利者: 大阪大学

種類: 特許

番号: 2007-213266

出願年月日: 2007 年 8 月 20 日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

[http://www.biken.osaka-u.ac.jp/biken/molecular-imm/Molecular\\_Immunology/Welcome.html](http://www.biken.osaka-u.ac.jp/biken/molecular-imm/Molecular_Immunology/Welcome.html)

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

安居 輝人 (Teruhito YASUI)

大阪大学・微生物病研究所・准教授

研究者番号: 60283074

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

( )

研究者番号: