

平成 22 年 5 月 6 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20790362

研究課題名（和文）EB ウイルス再活性化分子メカニズムの網羅的解析

研究課題名（英文）Exhaustive analysis of molecular mechanism of EB virus reactivation

研究代表者

村田 貴之（MURATA TAKAYUKI）

愛知県がんセンター（研究所）・腫瘍ウイルス学部・研究員

研究者番号：30470165

研究成果の概要（和文）：本研究では、伝染性単核球症を引き起こし、バーキットリンパ腫、胃癌などの癌の原因にもなる Epstein-Barr virus (EB ウイルス) のライフサイクル解明のため、特にウイルスの潜伏感染からの再活性化のメカニズムに焦点をおいて研究を開始した。このような詳細なウイルスライフサイクルの解明はウイルス拡散防止に役立つ点で意義深い研究である。研究は順調に進行した。我々が新規に見いだした遺伝子による再活性化調節についてすでに学術雑誌に報告した(Murata et al., JBC (2009) 284:8033-41)ほか、cDNA ライブラリを用いたファンクショナルスクリーニングとその後の詳細な検証の結果、非常にインパクトのある因子を明らかにし、現在投稿準備中である。

研究成果の概要（英文）：In order to elucidate the life cycle of Epstein-Barr virus (EBV), which causes infectious mononucleosis, Burkitt's lymphoma, or gastric cancer, we here focused on the reactivation of the virus from latency. Research like this is of significant importance since it may help control spreading of the virus. Our project has progressed very well. We already have reported about a factor that is crucial for the reactivation (Murata et al., JBC (2009) 284:8033-41). Other factors with great interest have been identified by our cDNA library screen, followed by detailed investigation, and we are now preparing to submit those data to scientific journals.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：EB ウイルス、再活性化

1. 研究開始当初の背景

EB ウイルスは、伝染性単核球症、バーキットリンパ腫、上咽頭癌、胃癌、慢性活動性EB ウイルス感染症などの原因となる臨床的に重要な病原性ウイルスである。EB ウイルスは主に B リンパ球内に潜伏し、一部が再活性化して溶解感染に至るが、実際にヒトの体の中でどのようなことが引き金になって再活性化が誘導されるのか、その詳細なメカニズムについてはいまだ明らかでない。少なくとも培養細胞レベルでは、EB ウイルスが潜伏感染している B リンパ球を TPA、カルシウムイオノフォアなどで刺激するとウイルスの溶解感染を再現することができる。このような刺激を受けると、まずウイルスは前初期遺伝子を発現する。前初期遺伝子のひとつである BZLF1(別名 Zta、ZEBRA、EB1) は、bZip (basic leucine-zipper)モチーフをもつ転写活性化因子であり、ウイルスの初期遺伝子の転写を活性化する。EB ウイルスが潜伏感染している細胞に BZLF1 を発現させるだけで溶解感染を完全に再現できることから、BZLF1 の発現こそがウイルス再活性化のトリガーであると考えられている。

2. 研究の目的

本研究では、BZLF1 遺伝子発現を指標とし、cDNA ライブラリを用いた網羅的解析を遂行することで、EB ウイルスの潜伏感染から溶解感染への再活性化の分子メカニズムを包括的かつ詳細に解析することを目的とする。EB ウイルス再活性化のメカニズムを解析することはウイルスの感染拡大を防ぐことにつながり、意義深い。

3. 研究の方法

BZLF1 プロモーターをレポーター遺伝子上流に配したコンストラクトを作成し、cDNA ライブラリを外来性に発現させ、レポーターの発現を比較検討することで網羅的スクリーニングを行った(右図参照)。同定されたものは大部分は転写因子、転写補助因子などで

あった。プロモーターのミュートジェネシス、RTPCR、ウェスタンブロッティング、クロマチン免疫沈降などの分子生物学的常法を用いて解析を行った。

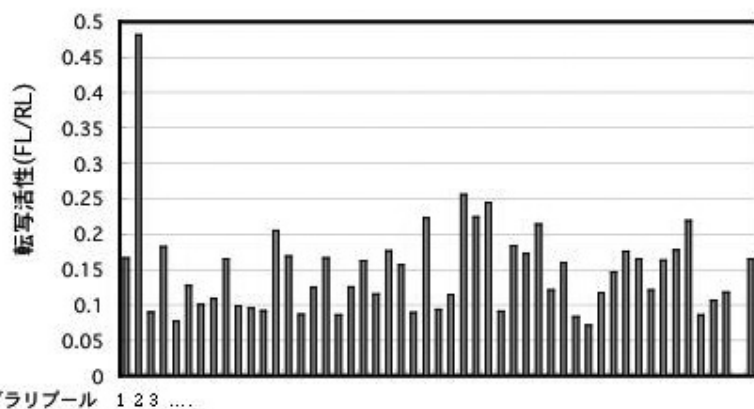
4. 研究成果

(1)網羅的解析(下図参照):1次スクリーニングは cDNA ライブラリを数十個ずつまとめて DNA 精製してライブラリプールとし、レポーターアッセイに供した(1次スクリーニング、上グラフ)。一番右のバーがコントロールの値を示す。この時は2番のプールが高い活性を示したため、そこから cDNA をひとつずつ拾い、2次スクリーニングを行った(下)。結果、クローン6が非常に強くプロモーターを活性化するポジティブクローンとして同定された。このようにしてこれまでに2万を超えるクローンについて精査を完了した。

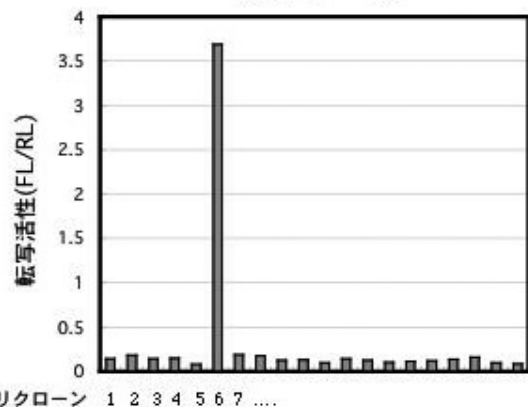
(2)TORC2によるEBウイルス再活性化制御:CREB依存性の転写補助因子であるTORC2がEBウイルス再活性化に重要な役割を果たしていることを見だし、報告した(Murata et al., JBC (2009) 284:8033-41)。

(3)BAC(bacterial artificial chromosome)を用いた遺伝子組み換えEBウイルス作製技術

1次スクリーニング



2次スクリーニング



の構築：EB ウイルスの分子生物学的解析においては組み換えウイルスの作製が強力なツールとなるが、これまでは世界的にもごく限られた研究室でしか成功していなかった。今回我々はこの技術の開発に成功し報告した (Murata et al., Virology 2009 389:75-81)。

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 9 件)

(1) **Sato Y, Shirata N, Murata T, Nakasu S, Kudoh A, Iwahori S, Nakayama S, Chiba S, Isomura H, Kanda T, Tsurumi T.** Transient increases in p53-responsible gene expression at early stages of Epstein-Barr virus productive replication. *Cell Cycle*. 2010 Feb;9(4):807-14. 査読有り

(2) **Sato Y, Kamura T, Shirata N, Murata T, Kudoh A, Iwahori S, Nakayama S, Isomura H, Nishiyama Y, Tsurumi T.** Degradation of phosphorylated p53 by viral protein-ECS E3 ligase complex. *PLoS Pathog*. 2009 Jul;5(7), in press 査読有り

(3) **Nakayama S, Murata T, Murayama K, Yasui Y, Sato Y, Kudoh A, Iwahori S, Isomura H, Kanda T, Tsurumi T.** Epstein-Barr virus polymerase processivity factor enhances BALF2 promoter transcription as a coactivator for the BZLF1 immediate-early protein. *J Biol Chem*. 2009 Aug 7;284(32):21557-68. 査読有り

(4) **Iwahori S, Murata T, Kudoh A, Sato Y, Nakayama S, Isomura H, Kanda T, Tsurumi T.** Phosphorylation of p27Kip1 by Epstein-Barr virus protein kinase induces its degradation through SCFSkp2 ubiquitin ligase actions during viral lytic replication. *J Biol Chem*. 2009 Jul 10;284(28):18923-31. 査読有り

(5) **Murata T, Isomura H, Yamashita Y, Toyama S, Sato Y, Nakayama S, Kudoh A, Iwahori S, Kanda T, Tsurumi T.** Efficient production of infectious viruses requires enzymatic activity of Epstein-Barr virus protein kinase. *Virology*. 2009 Jun 20;389(1-2):75-81. 査読有り

(6) **Kudoh A, Iwahori S, Sato Y, Nakayama S, Isomura H, Murata T, Tsurumi T.** Homologous recombinational

repair factors are recruited and loaded onto the viral DNA genome in Epstein-Barr virus replication compartments. *J Virol*. 2009 Jul;83(13):6641-51. 査読有り

(7) **Murata T, Sato Y, Nakayama S, Kudoh A, Iwahori S, Isomura H, Tajima M, Hishiki T, Ohshima T, Hijikata M, Shimotohno K, Tsurumi T.** TORC2, a coactivator of cAMP-response element-binding protein, promotes Epstein-Barr virus reactivation from latency through interaction with viral BZLF1 protein. *J Biol Chem*. 2009 Mar 20;284(12):8033-41. 査読有り

[学会発表] (計 7 件)

(1) **村田貴之, 鶴見達也.** EB ウイルスの再活性化-EB ウイルス BZLF1 遺伝子は SUMO 化によりその転写活性を抑制される. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会. 2009 年 10 月 27 日. 東京

(2) **村田貴之, 鶴見達也.** EB ウイルスの再活性化-TOR2 は BZLF1 遺伝子と共同して EB ウイルスの再活性化を促進する. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会. 2009 年 10 月 26 日. 東京

(3) **村田貴之, 鶴見達也.** Epstein-Barr ウイルス BZLF1 遺伝子産物は SUMO 化によりその転写活性を強く抑制される. 第 68 回日本癌学会学術総会. 2009 年 10 月 1 日. 横浜

(4) **Murata T & Tsurumi T.** TORC2 promotes EBV reactivation from latency through interaction with viral BZLF1 protein. 第四回上咽頭がん国際シンポジウム. 2009 年 6 月 19 日. マラケシュ (モロッコ)

(5) **村田貴之, 鶴見達也.** TOR2 は BZLF1 と共同して EB ウイルスの再活性化を促進する. 第 67 回日本癌学会学術集会. 2009 年 10 月 29 日. 名古屋

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.pref.aichi.jp/cancer-center/400/420/421/421-06.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村田 貴之 (MURATA TAKAYUKI)
愛知県がんセンター（研究所）・腫瘍ウイ
ルス学部・研究員
研究者番号：30470165

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：