

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 19 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590566

研究課題名(和文)EBVの潜伏と再活性化を制御するシス・トランスエレメントとエピジェネティクス

研究課題名(英文)Cis/Trans-acting elements that regulate EBV reactivation from latency and epigenetics

研究代表者

村田 貴之(Murata, Takayuki)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：30470165

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、EBウイルスの再活性化の分子メカニズムの解析を目的とした。EBウイルスの再活性化は、ウイルスの拡散に寄与するのみならず、EBウイルス陽性がんの発生、維持、進展にも関与しており、その制御機構の解析は意義が大きい。

EBウイルスの再活性化には、ウイルスの前初期遺伝子であるBZLF1の発現が必須であることが知られている。そこで本研究では、このBZLF1のプロモーター領域を解析した。網羅的なファンクショナルスクリーニングにより、EBウイルスの再活性化を誘導するような宿主因子の同定に成功し、さらにそれらによる再活性化に伴うエピジェネティクスについても解析した。

研究成果の概要(英文)：We here analyzed the molecular mechanisms that govern reactivation of Epstein-Barr virus (EBV) from latency. Research like this is of significance, because EBV reactivation contributes not only to virus spreading but also to pathogenesis of EBV-related cancers.

Reactivation of EBV is dependent on the expression of viral immediate-early gene, BZLF1. We thus analyzed the promoter region of BZLF1 gene. Through exhaustive functional cloning, we here identified host factors that can induce EBV reactivation, and even more, we observed epigenetic modification of the promoter that associates with reactivation.

研究分野：ウイルス学

キーワード：再活性化

1. 研究開始当初の背景

Epstein-barr (EB) ウイルスは、ガンマヘルペスウイルスに分類されているヒト病原性ウイルスである。単純ヘルペスウイルス (HSV)、ヒトサイトメガロウイルス (HCMV) など他のヘルペスウイルスと同様、ユビキタスに存在するウイルスであり、成人までに 90%以上が既感染となっている。乳幼児期に初感染した場合は無症候性であることが多いが、思春期以降では伝染性単核症を発症する可能性が高くなる。伝染性単核症では、長期にわたって持続する発熱、リンパ腫脹、倦怠、さらには脾腫、肝腫などの症状を呈する。初感染時の症状の有無に関わらず、その後ウイルスは主に宿主のメモリーB細胞に潜伏感染し、生涯にわたって排除されないで維持される。さらに EB ウイルスは、パーキットリンパ腫、ホジキンリンパ腫、T/NK細胞リンパ腫、上咽頭癌、胃癌などのがんの原因ともなり得る、がんウイルスである。

EB ウイルスは一旦メモリーB細胞等で潜伏感染を成立させたのち、しばしば再活性化し、溶解感染という感染様式をとるようになる。溶解感染においてウイルスは 80 を超える全ての遺伝子を発現し、強力なウイルスゲノム DNA 複製を経て、子孫ウイルスを産生、放出する。このため、溶解感染はウイルス産生感染とも呼ばれる。EB ウイルスの再活性化は、ウイルスの産生、拡散のみならず、伝染性単核症や EB ウイルス陽性がんの病理に深く関与しており、その切り替えの分子メカニズムを明らかにすることは重要である。

2. 研究の目的

本研究においては、EB ウイルスの再活性化の分子メカニズムを詳細に解明することを目的とした。

EB ウイルスの潜伏状態からの再活性化には、ウイルスの前初期遺伝子である BZLF1 (別名 Zta, ZEBRA, IE1) の発現が必須であり、再活性化のボトルネックとなっている。そこで本研究では、この BZLF1 遺伝子のプロモーターを活性化しうる宿主因子を網羅的に探索し、さらに詳細な解析を遂行した。

3. 研究の方法

BZLF1 プロモーターを活性化する宿主因子の網羅的スクリーニング

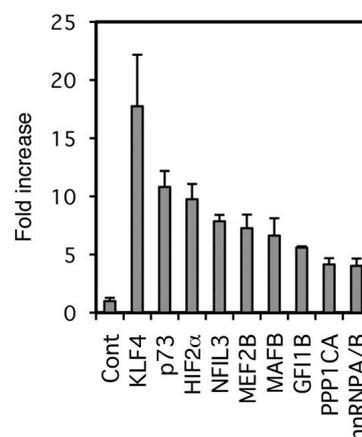
まず、BZLF1 プロモーターを pGL4.10 ベクターに挿入し、BZLF1 プロモーターの活性化によってファイアフライルシフェラーゼを発現するプラスミドを作製した (pZp-Fluc)。

次に、骨髄細胞の cDNA ライブラリ発現ベクターを入手し、ジャンクの配列を除く処理をおこなったあと、プラスミド DNA を増幅し、トランスフェクションに使用できるレベルに精製した。

精製したライブラリプラスミドを pZp-Fluc とともに HEK293 細胞に導入した。このとき、トランスフェクション効率をモニターするものとして、CMV プロモーターの下流にレニラルシフェラーゼを配した、pCMV-RL を同時にトランスフェクションした。なお、CMV プロモーターは、BZLF1 によって発現が左右されにくいことを確認している。

上記のサンプルをルシフェラーゼアッセイに供した。BZLF1 プロモーターを活性化する宿主因子がライブラリに含まれていた場合、ファイアフライルシフェラーゼの値がレニラルシフェラーゼの値に比して高くなる。このようにして、9 つの候補遺伝子が得られた (図 1)。

図 1



これらから、偽陽性のクローンを丁寧に除外したところ、少なくとも Kruppel-like factor 4 (KLF4)、myocyte enhancer factor 2B (MEF2B)、growth factor independent 1B (GFI1B)、MAFB が、確かに BZLF1 プロモーターを活性化することを同定した。

得られた真陽性クローンの結合サイトを同定した。

さらにその結合サイトに変異を導入したウイルスを作製し、その性状を解析した。

それらのウイルスについて、CpG メチル化やヒストン修飾などのエピジェネティックの様子についても比較検討をおこなった。

4. 研究成果

まず、KLF4 は SP1/KLF ファミリー転写因子のひとつで、SP1 同様 GC ボックスに結合する。BZLF1 プロモーター上に、この SP/KLF ファミリー転写因子結合サイトを三カ所同定した。この結合サイトを変異させたウイルスでは、バックグラウンドレベルの BZLF1 発現は野生型と同程度であったが、TPA などの化学物質によって人為的に再活性化を誘導したときの BZLF1 の発現が強力に抑制されていた。

MEF2Bは筋細胞分化に関わるMEF2ファミリーの転写因子であるが、B細胞にも発現している。BZLF1プロモーター上に三カ所のMEF2結合サイトを同定し、変異ウイルスを作製した。MEF2サイト変異ウイルスでは、バックグラウンドレベルのBZLF1の発現、およびTPAなどによる人為的誘導によっても、BZLF1の発現が強力に抑制されていた(図2, 3)。

図2

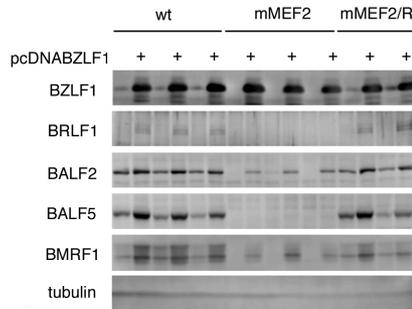
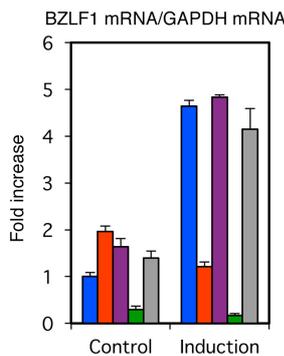


図3



GFI1BとMAFBはb-Zip型転写因子である。BZLF1プロモーター上に、GFI1BとMAFBだけでなく、cAMP-responsive element binding protein (CREB)、activating transcription factor (ATF)、activating protein 1 (AP1)、spliced form of X-box binding protein 1 (XBP1s)などの多くのb-Zip型転写因子の結合サイトを一カ所同定した。この結合サイトの変異ウイルスでは、再活性化を人為的に誘導したときのレスポンスが強力に抑制されていた。

以上から、EBV再活性化にはSP1/KLF、MEF2、b-Zip型転写因子が重要であり、特にMEF2ファミリー転写因子の重要性が高いことが明らかになった。

また、MEF2ファミリー転写因子の結合サイトを変異させたウイルスでは、ヒストンH3K27me3、H3K9me2/3、H4K20me3などの抑制性ヒストン修飾が野生株よりも増強していた(図4)。一方でCpG DNAメチル化の程度は、野生株と同程度であった(図5)。このことから、MEF2によるBZLF1プロモーターの制御には、H3K27me3、H3K9me2/3、H4K20me3などの抑制性ヒストン修飾が重要であるこ

とが明らかになった。

図4

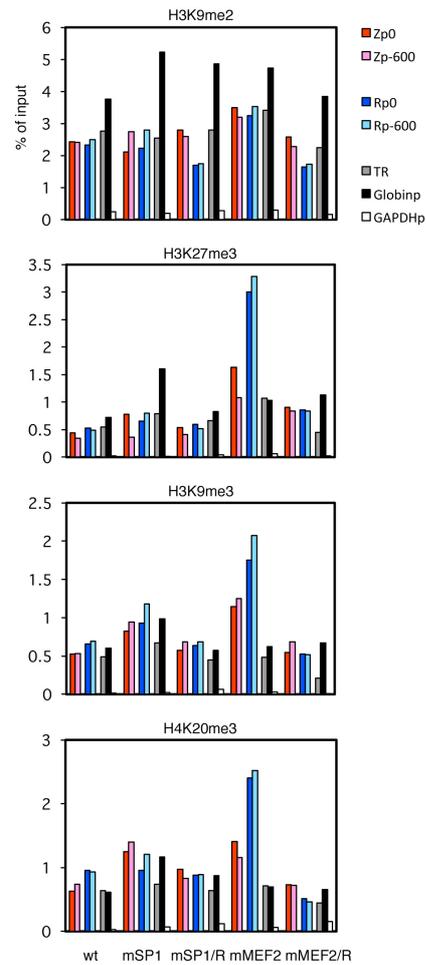
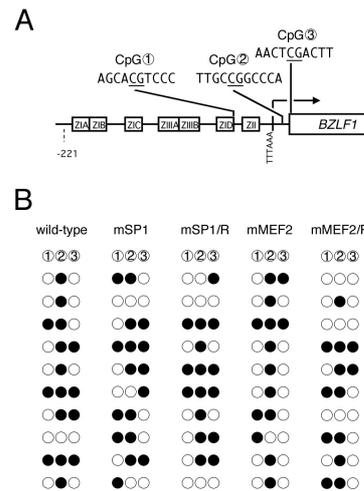


図5



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15件)

- ① Regulation of Epstein-Barr virus reactivation from latency.
Murata T.
Microbiol Immunol. 2014 Jun;58(6):307-17.
doi: 10.1111/1348-0421.12155.
査読有り
- ② Modes of infection and oncogenesis by the Epstein-Barr virus.
Murata T., Sato Y, Kimura H.
Rev Med Virol. 2014 Jul;24(4):242-53.
doi: 10.1002/rmv.1786.
査読有り
- ③ Lifecycles of EBV and Cancer.
Murata T.
ウイルス. 2014;64(1):95-104.
doi: 10.2222/jsv.64.95.
査読無し
- ④ Switching of EBV cycles between latent and lytic states.
Murata T., Tsurumi T.
Rev Med Virol. 2014 May;24(3):142-53.
doi: 10.1002/rmv.1780.
査読有り
- ⑤ Contribution of myocyte enhancer factor 2 family transcription factors to BZLF1 expression in Epstein-Barr virus reactivation from latency.
Murata T., Narita Y, Sugimoto A, Kawashima D, Kanda T, Tsurumi T.
J Virol. 2013 Sep;87(18):10148-62.
doi: 10.1128/JVI.01002-13.
査読有り
- ⑥ Epigenetic modification of the Epstein-Barr virus BZLF1 promoter regulates viral reactivation from latency.
Murata T., Tsurumi T.
Front Genet. 2013 Apr 9:4:53.
doi: 10.3389/fgene.2013.00053.
査読有り
- ⑦ Epstein-Barr virus deubiquitinase downregulates TRAF6-mediated NF- κ B signaling during productive replication.
Saito S, Murata T., Kanda T, Isomura H, Narita Y, Sugimoto A, Kawashima D, Tsurumi T.
J Virol. 2013 Apr;87(7):4060-70.
doi: 10.1128/JVI.02020-12.
査読有り
- ⑧ Pin1 interacts with the Epstein-Barr virus DNA polymerase catalytic subunit and regulates viral DNA replication.
Narita Y, Murata T., Ryo A, Kawashima D, Sugimoto A, Kanda T, Kimura H, Tsurumi T.
J Virol. 2013 Feb;87(4):2120-7.
doi: 10.1128/JVI.02634-12.
査読有り
- [学会発表] (計10件)
- ① 村田貴之、五島典、木村宏
EBV BGLF3.5 位電子欠損株の性状解析
第62回日本ウイルス学会学術集会
2014年11月10日
パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)
- ② Murata T., Kimura H, Tsurumi T.
Contribution of MEF2 transcription factors to BZLF1 expression in EBV reactivation from latency.
International Union of Microbiological Societies Congress
Montreal (Canada)
2014年7月29日
- ③ 村田貴之、木村宏、鶴見達也
EBV 潜伏/再活性化における MEF2 ファミリー転写因子の重要性
第61回日本ウイルス学会学術集会
2013年11月12日
大阪国際会議場 (大阪府大阪市)
- ④ 村田貴之
EBV 再活性化におけるエピジェネティックヒストン修飾
第60回日本ウイルス学会学術集会
2012年11月15日

大阪国際会議場（大阪府大阪市）

- ⑤ Murata T, Tsurumi T.
Cis- and trans-elements that affect
reactivation of Epstein-Barr virus
from latency.
International Congress on Oncogenic
Herpesviruses and Associated
Diseases
Philadelphia (USA)
2012年8月2日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村田 貴之 (MURATA, Takayuki)
名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：30470165

(2) 研究分担者

なし