

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：83901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590567

研究課題名(和文) 潜伏感染EBウイルスゲノムの宿主染色体付着機構の解析

研究課題名(英文) Chromosome tethering mechanism of latently infected Epstein-Barr virus genome

研究代表者

神田 輝 (KANDA, Teru)

愛知県がんセンター(研究所)・感染腫瘍学部・室長

研究者番号：50333472

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)：潜伏感染EBウイルスゲノムは、感染細胞の核内において細胞染色体に組み込まれることなく二本鎖環状DNAとして安定に維持される。本研究では、ウイルスゲノムを染色体上につなぎとめる分子であるウイルス蛋白質EBNA1が宿主細胞染色体に付着する分子メカニズムの一端を解明した。またEBウイルスゲノム上にはマイクロRNAと呼ばれる小RNA分子が多数コードされている。こうしたウイルスマイクロRNAは感染上皮細胞において特定の細胞性因子の発現を強く抑制することを明らかにした。本研究成果は、EBウイルスの潜伏感染機構、さらにウイルス感染による発がん機構の解明に資するものである。

研究成果の概要(英文)：Epstein-Barr virus (EBV) genome is stably maintained in EBV-infected cells. EBV genomes are maintained as circular double-stranded DNA molecules without being integrated into cellular chromosomes. Our study revealed a molecular mechanism by which viral protein EBNA1, a key molecule required for the chromosome tethering of viral genomes, localizes onto host chromosomes. Furthermore, our study demonstrated that EBV-encoded microRNAs strongly suppress the expression of a cellular gene NDRG1, which is specifically expressed in epithelial cells. These results should contribute to further understand the mechanisms of EBV latent infection and viral carcinogenesis.

研究分野：ウイルス学

キーワード：EBウイルス 染色体 潜伏感染 蛍光蛋白質 マイクロRNA

1. 研究開始当初の背景

EBウイルスは、Bリンパ球および上皮細胞を主たる感染標的とするヒトヘルペスウイルスである。EBウイルス感染の特徴として、細胞に感染すると、多くの場合潜伏感染状態となる。EBウイルス関連腫瘍細胞内でも、ウイルスは潜伏感染状態となっており、発現するウイルス遺伝子産物が腫瘍細胞の増殖促進に寄与する。潜伏感染細胞内では、ウイルスゲノムは二本鎖環状DNA(エピゾーム)として感染細胞の核内に安定に維持される。EBNA1蛋白質は、EBウイルスによりコードされる核蛋白質で、一部を除くほぼすべての感染細胞において発現する。EBNA1蛋白質は環状EBウイルスゲノムを染色体上につなぎとめることで、その安定な細胞内維持に寄与する。EBNA1蛋白質は、大きくN末端側、C末端側と二つの機能ドメインが結合した構造を持つ。EBNA1蛋白質のN末端側には塩基性アミノ酸であるアルギニンに富む「染色体結合ドメイン」が二ヶ所に分かれて存在する(図1A)。

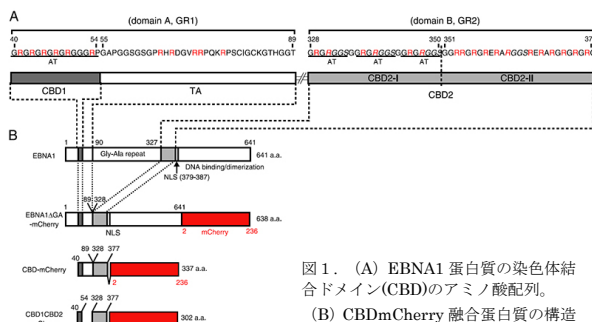


図1. (A) EBNA1蛋白質の染色体結合ドメイン(CBD)のアミノ酸配列。(B) CBDmCherry融合蛋白質の構造

EBNA1蛋白質の「染色体結合ドメイン」を介した宿主染色体局在機構にはいくつかの仮説が提唱されている。第一の仮説として、EBNA1蛋白質は染色体上に局在する細胞性因子をターゲットとして、蛋白質・蛋白質相互作用により染色体局在するという説がある。一方で第二の仮説として、EBNA1蛋白質の塩基性アミノ酸(アルギニン)に富み正電荷を帯びた染色体結合ドメインが、負電荷を帯びた染色体DNAに静電的に結合する可能性も考えられる。しかしながら、染色体結合ドメインへの変異導入による詳細な解析は報告がなく、この領域に多数存在する塩基性アミノ酸の意義は明らかではない。

2. 研究の目的

本研究では、まずEBNA1蛋白質の染色体結合ドメインの変異体解析により、宿主染色体局在化の分子機構の詳細を明らかにすることを目的とした。さらにEBNA1蛋白質変異体をコードする組換えEBウイルスの作製をめざして実験系の改良を行っている過程で、EBウイルスのコードするマイクロRNA群が宿主遺伝子の発現制御を行うという興味深い実験結果が得られたため、一部実験計画を変更し、潜伏感染細胞におけるウイルスマイクロRNAの機能解析も行った。

3. 研究の方法

(1) EBNA1蛋白質染色体結合ドメイン変異体(アラニン置換体)の細胞内局在の解析

EBNA1蛋白質にはN末端側に二ヶ所の染色体結合ドメイン(chromosome binding domain, CBD)があり、それぞれCBD1, CBD2と名付けた(図1A)。CBD1, CBD2にはそれぞれ6個, 18個のアルギニン残基(あわせて24個)が存在する。EBNA1蛋白質全長あるいはCBD1, CBD2領域を、赤色蛍光蛋白質mCherryとの融合蛋白質として発現するベクターを構築した(図1B)。さらに染色体結合ドメイン内の計24個のアルギニン残基を逐次中性アミノ酸であるアラニンに置換した変異体を作製した。これらの変異体をヒストンH2B-GFP発現HeLa細胞に一過性ないし安定発現させて生細胞で局在を観察した。

(2) EBNA1蛋白質染色体結合ドメイン変異体(リシン置換体)の細胞内局在の解析

CBD内の計24個のアルギニン残基に対して、これらと同じ塩基性アミノ酸であるリシンに置換した「リシン置換体」を作製した。この変異体をヒストンH2B-GFP発現HeLa細胞に一過性ないし安定発現させて生細胞で局在を観察した。これにより、EBNA1のCBDを介した染色体付着において、「アルギニン残基が重要なのか、それとも塩基性アミノ酸であることが重要なのか」を調べた。

(3) EBNA1変異体をコードするEBウイルスミニプラスミドの安定性の解析

野生型EBNA1、あるいはアラニン置換体ないしリシン置換体のEBNA1をコードするEBウイルスミニプラスミド(oriPプラスミド)を作製し、このプラスミドの細胞内における安定性を調べた。

(4) EBNA1蛋白質の染色体結合ドメインのヌクレオソーム結合能の解析

上記(1)および(2)において染色体局在を司ると予想されたペプチド配列(CBD1配列)を人工合成し、このペプチドと再構成ヌクレオソーム(ヌクレオソームDNAとヒストン8量体の複合体)との結合をゲルシフトアッセイにより調べた。

(5) EBNA1蛋白質の染色体付着を阻害する低分子化合物の予備的スクリーニング

ヒストンH2B-GFP融合蛋白質およびEBNA1の染色体結合ドメイン-mCherry融合蛋白質(CBD-mCherry)の両者を安定発現するHeLa細胞を用いて、機能既知の標準阻害剤セットの薬物の中でCBD-mCherry蛋白質の染色体結合を特異的に阻害し、H2B-GFP蛋白質の局在に影響しない低分子化合物を蛍光顕微鏡下でスクリーニングした。

(6) ウイルスマイクロRNA群の機能解析

EBウイルス関連上皮系がん(上咽頭がん、胃がん)細胞ではウイルスのBART(BamHI A Rightward Transcripts)と呼ばれる領域にコードされるウイルスマイクロRNA群が高レベルで発現し、こうしたマイクロRNA群

の発がんへの関与が注目されている。そこでウイルスマイクロ RNA 遺伝子群を欠損する、あるいはこれらを修復した組換えウイルス作製を作製し、両者の感染細胞における宿主遺伝子発現を調べることで、ウイルスマイクロ RNA 群による宿主遺伝子発現制御機構を解析した。

4. 研究成果

(1) EBNA1 蛋白質染色体結合ドメイン変異体 (アラニン置換体) の細胞内局在の解析

CBD-mCherry 融合蛋白質は EBNA1-mCherry 融合蛋白質と同様に、間期細胞核内および分裂期染色体上に局在した。CBD1、CBD2 のアルギニン残基を順次アラニン置換して影響を調べたところ、① CBD1 および CBD2 が協調して機能すること、② アラニン置換変異導入によりアルギニン残基の数を減少させると、それに比例して CBD-mCherry 融合蛋白質の核局在・染色体局在が減弱することが明らかになった。以上より CBD 内のアルギニン残基の染色体局在化における重要性を証明した。

(2) EBNA1 蛋白質染色体結合ドメイン変異体 (リシン置換体) の細胞内局在の解析

CBD 内の 24 個すべてのアルギニンをリシンに置換しても、EBNA1 蛋白質の染色体結合能は維持された。

(3) EBNA1 変異体をコードする EB ウイルスミニプラスミドの安定性の解析

「アラニン置換体」をコードする oriP ミニプラスミドは細胞から短期間のうちに脱落した。一方で「リシン置換体」をコードする oriP ミニプラスミドは、野生型 EBNA1 蛋白質 (ただし GA リピートは欠損するもの) をコードするプラスミドとほぼ同等の細胞内安定性を示した。したがって mCherry 融合蛋白質を用いて調べた染色体局在能と、oriP プラスミド維持能との間に相関が見られた (図 2)。

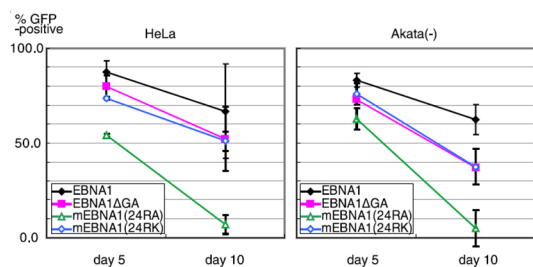


図 2. アラニン置換(RA)およびリシン置換(RK)した EBNA1 をコードする oriP プラスミド(GFP 遺伝子組み込み)の細胞内安定性を FACS 法で調べた。

(4) EBNA1 蛋白質の染色体結合ドメインのヌクレオソーム結合能の解析

野生型 EBNA1 由来のペプチドおよびリシン置換体由来のペプチドはヌクレオソーム結合能を示す一方で、アラニン置換体由来のペプチドは結合能を示さなかった (早稲田大学・胡桃坂仁志先生との共同研究)。

したがって EBNA1 蛋白質の染色体結合には、塩基性アミノ酸が集中する「塩基性ドメイン」と染色体ヌクレオソームとの間の静電的相

互作用が重要であると考えられた。

(5) EBNA1 蛋白質の染色体付着を阻害する低分子化合物の予備的スクリーニング

H2B-GFP と CBD-mCherry の両者を安定発現する HeLa 細胞を用いて、機能既知の標準阻害剤セットの添加による CBD-mCherry 融合蛋白質の局在変化を調べた。Hsp 阻害剤など複数の化合物が H2B-GFP および CBD-mCherry の染色体局在の両者を阻害した。しかしながら今回の解析では CBD-mCherry 融合蛋白質の染色体付着のみを特異的に阻害する薬剤の同定には至らなかった。

(6) ウイルスマイクロ RNA 群の機能解析

BART マイクロ RNA 群を欠損する組換えウイルス、および全ての BART マイクロ RNA 群を保持する組換えウイルスを作製し、両者がそれぞれ感染した上皮細胞を樹立した。樹立した細胞における宿主遺伝子発現を網羅的に解析し、BART マイクロ RNA 群の標的遺伝子として上皮細胞特異的に発現する NDRG1 遺伝子を同定した。さらに BART マイクロ RNA 群の複数のマイクロ RNA が協調して NDRG1 の発現抑制に関与すること、また EB ウイルス陽性上咽頭がん組織においても NDRG1 の発現抑制が認められることを明らかにした

(図 3、金沢大学頭頸部外科・吉崎智一先生との共同研究)。以上の結果より、EB ウイルスの上皮細胞感染時において、上皮細胞の分化特異的因子・転移抑制因子である NDRG1 蛋白質の発現を抑制し、上皮細胞の分化異常へ関与する、あるいは上咽頭がん細胞の転移の亢進に関与する可能性が示された。

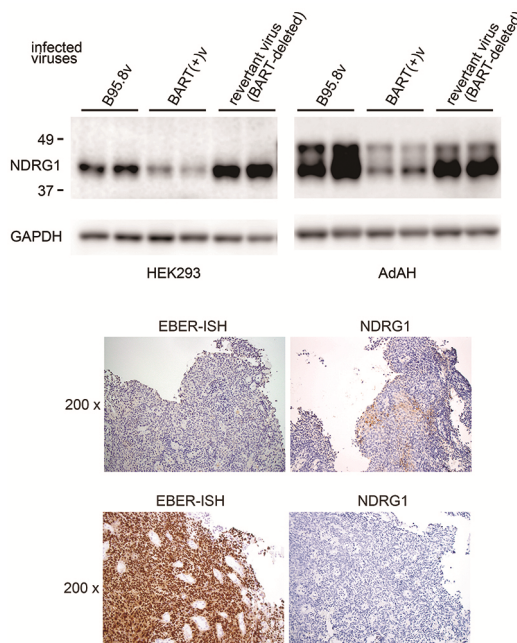


図 3. (上) 各種組換えウイルス感染細胞における NDRG1 蛋白質発現をウェスタン法により調べた。BART マイクロ RNA 群発現ウイルス [BART(+)] 感染上皮細胞において NDRG1 発現抑制が認められた。(中・下) EB ウイルス陰性(中)あるいは EB ウイルス陽性上咽頭がん細胞(下)におけるウイルス由来小 RNA (EBER) および NDRG1 の発現を調べた。EBER-in situ hybridization (ISH) 陽性細胞(下)において NDRG1 発現抑制が認められた。

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 3件)

- ① Kanda T, Miyata M, Kano M, Kondo S, Yoshizaki T, Iizasa H.: Clustered microRNAs of the Epstein-Barr virus cooperatively downregulate an epithelial cell-specific metastasis suppressor. *J Virol.* 89(5):2684-2697, 2015.
査読有.
DOI: 10.1128/JVI.03189-14.
- ② Kanda T, Horikoshi N, Murata T, Kawashima D, Sugimoto A, Narita Y, Kurumizaka H, and Tsurumi T: Interaction between basic residues of Epstein-Barr virus EBNA1 protein and cellular chromatin mediates viral plasmid maintenance. *J Biol Chem.* 288(33):24189-24199, 2013.
査読有.
DOI: 10.1074/jbc.M113.491167.
- ② Kanda T, Ochi T, Fujiwara H, Yasukawa M, Okamoto S, Mineno J, Kuzushima K, and Tsurumi T: HLA-restricted presentation of WT1 tumor antigen in B-lymphoblastoid cell lines established using a maxi-EBV system. *Cancer Gene Ther.* 19(8):566-571, 2012.
査読有.
DOI: 10.1038/cgt.2012.34.

[学会発表] (計 9件)

- ① 神田輝. 組換えウイルス作製による EB ウイルスがん遺伝子 LMP1 のウイルス株間における機能的差異の解析: 第 62 回日本ウイルス学会学術総会、パシフィコ横浜 (横浜市)、2014 年 11 月 10 日
- ② 神田輝. EB ウイルスマイクロ RNA 群による上皮細胞特異的転移抑制因子の発現制御: 第 73 回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜 (横浜市)、2014 年 9 月 25 日
- ③ 神田輝. Regulation of cellular gene expression by EBV-encoded miRNAs in epithelial cells: 39th Annual International Herpesvirus Workshop、神戸国際会議場 (神戸市)、2014 年 7 月 21 日
- ④ 神田輝、鶴見達也. EB ウイルス由来マイクロ RNA による上皮細胞特異的因子の発現制御: 第 61 回日本ウイルス学会学術総会、神戸国際会議場 (神戸市)、2013 年 11 月 12 日

- ⑤ 神田輝、鶴見達也. Roles of BART microRNAs in EBV-infected epithelial cells: 第 72 回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜 (横浜市)、2013 年 10 月 3 日
- ⑥ 神田輝、村田貴之、鶴見達也. Roles of BART microRNAs in EBV-infected epithelial cells: 6th International Symposium on Nasopharyngeal Carcinoma、ヒルトンイスタンブール (トルコ・イスタンブール)、2013 年 6 月 21 日
- ⑦ 神田輝、鶴見達也. EBNA1 蛋白質の宿主染色体付着メカニズムの解析: 第 60 回日本ウイルス学会学術総会、大阪国際会議場 (大阪市)、2012 年 11 月 15 日
- ⑧ 神田輝、村田貴之、鶴見達也. Mechanism of host chromosome binding of latently infected Epstein-Barr virus episomes: 第 71 回日本癌学会学術総会、ロイトン札幌 (札幌市)、2012 年 9 月 19 日
- ⑨ 神田輝、村田貴之、鶴見達也. Chromosome binding of Epstein-Barr virus EBNA1 protein is mediated by arginine residues within chromosome binding domains: International Congress on Oncogenic Herpesviruses and Associated Diseases、シェラトンフィラデルフィアダウンタウンホテル (米国・フィラデルフィア)、2012 年 8 月 2 日

[図書] (計 1件)

- ① Thirion M, Kanda T, Murakami Y, Ochiya T, Iizasa H.: MicroRNAs and oncogenic human viruses. In: Babashah S, editor. *MicroRNAs: Key Regulators of Oncogenesis*. Switzerland: Springer International Publishing; 155-182. 2014.
総ページ数 433 頁

[その他]

ホームページ等
http://www.pref.aichi.jp/cancer-center/ri/01bumon/06shuyo_uirusu/index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神田 輝 (KANDA Teru)
愛知県がんセンター (研究所)
感染腫瘍学部・室長
研究者番号: 50333472