様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９、Ｚ－１９　（共通）

科研費 KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２６ 年　 ６ 月　 ４ 日現在

機関番号：８３９０１
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2012～2013
課題番号：２４６５９２１３
研究課題名（和文）ＥＢウイルス複製ファクトリー内部構造の可視化と機能との連関

研究課題名（英文）Architecture and Function of the Epstein-Barr virus Replication Compartment

研究代表者
鶴見　達也（Tsurumi, Tatsuya）

愛知県がんセンター（研究所）・腫瘍ウイルス学部・部長

研究者番号：９０１７２０７２

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　3,000,000円、（間接経費）　900,000円

研究成果の概要（和文）：EBV溶解感染においては、核内の局在した部位が複製の場（RC)となっている。1) RCの内部にBMRF1コアがあること、2) ウイルスゲノムは、合成後BMRF1コアの内部に移行することを明らかにした。さらに1)EBVのプロカプシドの組み立てはBMRF1-coreの局在とは無関係に起こる。2)組み立てられたEBVプロカプシドはBMRF1-coreの内部のウイルスDNA貯蔵の場に輸送される。3)ウイルスDNAの貯蔵の場でプロカプシド内にウイルスDNAがパッケージングされ、成熟したカプシド粒子ができる。４）ウイルスの早期転写はBMRF1コアの周囲でおこり、後期転写はコアの中でおきることを見いだした。

研究成果の概要（英文）：Productive replication of the Epstein-Barr virus (EBV) occurs in discrete sites in nuclei, called replication compartments, where viral genome DNA synthesis, transcription, and encapsidation take place. The replication compartments include subnuclear domains, designated BMRF1 cores, which are highly enriched in the BMRF1 protein. During viral lytic replication, newly synthesized viral DNA genomes are organized around and then stored inside BMRF1 cores. We determined spatial distribution of viral early and late gene mRNAs within replication compartments. EBV early mRNAs were mainly located outside the BMRF1 cores, while viral late mRNAs were identified inside, corresponding well with the fact that late gene transcription is dependent on viral DNA replication. Further, the encapsidation occurs inside in innermost areas of BMRF1-cores.

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：複製　ウイルス　転写　アセンブリー

１．研究開始当初の背景

Epstein-Barr ウイルス（EBV）は、ヘルペスウイルス科に属するヒトがん DNA ウイルスである。EBV は、潜伏感染と溶解感染（ウイルス産生感染）という 2 つのライフサイクルを持つ。潜伏感染ではウイルス産生はないのに対し、ウイルス産生感染状態の細胞ではウイルスゲノム複製装置によりウイルスゲノムが大量に合成され、感染性ウイルス粒子が産生される。我々は replication compartment (RC) と呼ばれる核内の局在した部位に７種のウイルス複製蛋白質がリクルートされ、EBV ゲノム複製の場となっていることを以前報告した（Daikoku et al. *J Virol.* 2005)。その後、RC には、Homologous recombinational repair（HRR）及び Mismatch repair（MMR）といった DNA 修復に関わる宿主因子群も集積し、ウイルスゲノムの複製に関わっていることをそれぞれ報告してきた（Kudoh et al. *J Virol.* 2009; Daikoku et al.*J Biol Chem.* 2006)。当時は EBV ゲノム複製は RC 内のどこで起きているのか、複製されたゲノムはどこに貯蔵加工されるのか、HRR 及び MMR の宿主因子は複製のどの時点で関わってくるのかなどといった疑問に対する明確な解答は得られていなかった。我々は最近、共焦点レーザー顕微鏡とコンピューターを用いた isosurface 三次元構造の再構築により EBV　RC の構造を精査したところ、RC の内部にウイルス複製蛋白質の一つである BMRF1 蛋白質により作られる殻構造を発見し、これを BMRF1 コアと名付けた。パルスチェイス実験によりウイルスゲノムの大部分は BMRF1 コアの外側に位置する多数のドット状の部位で合成され、時間経過と共に BMRF1 コア内部に移行することがわかった。複製フォークで働くと考えられるウイルス複製蛋白質及び相同組換え修復に関与する HRR 因子群は BMRF1 コアの外側でドット状に位置し、誤って取り込んだヌクレオチドを修復除去する MMR 因子群は BMRF1 コアの内部に局在することがわかった(Sugimoto et al. J.Virol. 2011)。これらの世界に先駆けた我々の発見から、ウイルスゲノムは BMRF1 コアの外側でウイルス複製装置と HRR とカップリングして合成され、その後 BMRF1 コアの内部に移動し MMR 因子によるミスマッチ修復を受け完成度の高いウイルスゲノムとなるというモデルを提唱した。しかし、ウイルスゲノムの複製・転写・ウイルスカプシドの組み立て、カプシドへのパッケージング、ヌクレオチド供給の場、DNA 損傷応答の場等の各イベント及びそれらに付随する過程が RC 内のいつ、どこで行われているのか明らかでない。

２．研究の目的

BMRF1 コアの存在の発見により EBV のゲノム複製の場および成熟の場を区分けすることができたが、本研究ではさらにそれを発展させ、RC 内にある BMRF1 コアに対して最早期、早期, 及び後期転写の場、カプシド組み立て、カプシドへのパッケージングの場、ヌクレオチドプール代謝に関与するリボヌクレオリダクターゼ、チミジンキナーゼ、dUTPase がどこで働いているのか、MRN 複合体・ATM 等の DNA 損傷センサー因子が RC 内のどこを認識し活性化されているのかを明らかにし、RC における各種イベントの時間的・空間的位置関係とこれまで蓄積しているウイルスゲノムの複製・転写・ヌクレオカプシド組み立ての情報の体系化を目指す。

３．研究の方法

共焦点レーザー顕微鏡とコンピューターを用いた isosurface 三次元再構築により EBV　複製ファクトリー(RC)の内部構造を可視化する。ウイルスゲノム複製の場、前初期、初期、後期遺伝子がそれぞれ転写される場、ウイルスカプシドの組み立ての場、カプシドへのパッケージングの場、ヌクレオチド供給の場、DNA 損傷応答の場を標的蛋白質を標識することにより可視化し、ウイルスゲノム、BMRF1 コアとの空間的相対位置関係、複製・転写・カプシドアッセンブリー・パッケージングに関与するウイルス因子との相互の位置関係を明らかにする。さらに目的ウイルス蛋白質を蛍光標識した組換えウイルスを作成し、タイムラプス法により時間経過に伴う変化を観察することにより、ウイルスゲノム複製ファクトリー内の構造との時間的空間的機能相関を明らかにする。

(1) EBV の転写の場の同定

　　前初期、初期、後期遺伝子の各転写がおきる部位は RC 内の同じ場所なのか、あるいは異なるのかを明らかにする。

①　Tet-BZLF1/B95-8 細胞を用いて Doxycyclin 添加によりウイルス産生感染を誘導後、前初期遺伝子(BZLF1,BRLF1)、初期遺伝子(BALF5, BMRF1, BALF2 等)、後期遺伝子(BLLF1, BALF4, BDRF1 等)の代表的な遺伝子の mRNA 量を定量 RT-PCR 法にて測定し、溶解感染誘導後どの時期にそれぞれの遺伝子の転写がおきているのか決定する。

②前初期、初期、後期遺伝子のそれぞれの発現ピーク時期に mRNA 特異的 FISH 法により個々の mRNA が RC 内のどこに局在するのかを BMRF1-コアとの共染色で空間的位置関係を明らかにする。良好な染色像を得るために、FISH 法の条件検討も行う必要が有る。

③宿主細胞由来の RNA ポリメラーゼⅡおよび TATA 結合蛋白質についても溶解感染誘導後の時間の変化に伴う局在の変化を解析する。

(2)　EBV カプシド構成蛋白質と BMRF1-コア

との位置関係の解析　RC内のウイルスカプシド組立ての場を明らかにする。
BFRF3,BcLF1,BdRF1,BVRF1,BORF1,BDLF1 遺伝子はウイルスカプシドを構成する蛋白質をコードしている。各カプシド構成タンパクにタグを付加した発現プラスミドおよび Bacterial artificial chromosome (BAC) システムを用い、標的蛋白質にタグ標識した組み換えウイルスを作製する。作製したプラスミドおよび組み換えウイルスを用いて、BMRF1-コアとの共染色を行い、ウイルスカプシドがどこで組立てられるのかを検討する。

(3)　EBV パッケージング関連蛋白質とBMRF1-コア及びウイルスゲノムとの位置関係
　ウイルスカプシドが組み立てられた後にパッケージング関連蛋白質がウイルスゲノムを注入すると考えられるが、相互の位置関係を明らかにする。
BBRF1, BDRF1/BGRF1, BALF3, BALF1, BVRF1, BGLF1, BFRF1A, BGLF5がウイルスゲノムのパッケージングに関与する蛋白質をコードすると考えられているので、各カプシド構成蛋白質にタグを付加した発現プラスミドおよび Bacterial artificial chromosome (BAC) システムを用い、標的蛋白質にタグ標識した組み換えウイルスを作製する。作製したプラスミドおよび組み換えウイルスを用いて、BMRF1 コア及び CldU でパルスラベルしたウイルスゲノムあるいはパルス後６０分チェースしBMRF1 コア内に移動させたウイルスゲノムとの共染色を行い、ウイルスゲノム及びカプシド蛋白質との空間的相対関係を明らかにする。

４．研究成果

EB ウイルスカプシド形成・DNA packaging の場の構造解析
　EBVは、潜伏感染と溶解感染という2つのライフサイクルを持っている。EBV陽性がんの大部分は潜伏感染状態にあるが、一部は溶解感染状態にあり、そこから分泌されるサイトカインによりEBV潜伏感染細胞の増殖を促進している。そのため、EBV感染制御のためには、溶解感染を理解することが必須といえる。これまでの研究で、EBV溶解感染の際には、replication compartment (RC) と呼ばれる核内の局在した部位にウイルス由来の複製タンパクや宿主タンパクがリクルートされ、複製の場となっていることがわかっている。さらに我々はこれまでの研究によって、1) RCの内部に二本鎖DNA結合能を持つウイルスタンパクであるBMRF1で構成される構造物（BMRF1-coreと名付けた）があること2) BMRF1-coreの外部に局在するウイルスゲノムは、経時的にBMRF1-coreの内部に移行することを明らかにしてきた。今回我々はEBVのカプシドの形成の場を明らかにする目的で、EBVのカプシド形成に関わるタンパク（カプシド構造タンパクおよびDNA packagingタンパク）とBMRF1-coreの位置関係を免疫蛍光染色と3次元再構築を組み合わせた観察法で観察した。その結果、DNA packagingタンパクはBMRF1-coreの内部で貯蔵されているウイルスDNAの内部に局在していることが明らかとなった。一方、カプシド構造タンパクはBMRF1-coreの外側および内側に局在していた。以上の研究結果から、我々はEBVカプシド形成に関して、以下に示す新しいモデルを提案した。1)EBVのプロカプシドの組み立てはBMRF1-coreの局在とは無関係に起こる。2)組み立てられたEBVプロカプシドはBMRF1-coreの内部のウイルスDNA貯蔵の場に輸送される。3)ウイルスDNAの貯蔵の場でプロカプシド内にウイルスDNAがパッケージングされ、成熟したカプシド粒子ができる。さらにウイルスの転写は感染の時間経過に従って最早期、早期,後期に分類されている。早期転写はBMRF1コアの周囲でおこり，後期転写はコアの中でおきることを見いだした。

５．主な発表論文等
（研究代表者に下線）

〔雑誌論文〕（計　12件）すべて査読有り

1. Murata T, Kondo Y, Sugimoto A, Kawashima D, Saito S, Isomura H, Kanda T, <u>Tsurumi T</u>. Epigenetic Histone Modification of Epstein-Barr Virus BZLF1 Promoter during Latency and Reactivation in Raji Cells. *J Virol.* 86: 4752-4761. 2012

2. Tanaka K, Tamiya-Koizumi K, Hagiwara K, Ito H, Takagi A, Kojima T, Suzuki M, Iwaki S, Fujii S, Nakamura M, Banno Y, Kannagi R, <u>Tsurumi T</u>, Kyogashima M, Murate T. Role of down-regulated neutral ceramidase during all-trans retinoic acid induced neuronal differentiation in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *J Biochem.* 151: 611-620. 2012

3. Kanda T, Ochi T, Fujiwara H, Yasukawa M, Okamoto S, Mineno J, Kuzushima K, <u>Tsurumi T</u>. HLA-restricted presentation of WT1 tumor antigen in B-lymphoblastoid cell lines established using a maxi-EBV system. *Cancer Gene Ther.* 19: 566-571. 2012

4. Narita Y, Murata T, Ryo A, Kawashima D, Sugimoto A, Kanda T, Kimura H, <u>Tsurumi T</u>. Pin1 interacts with the Epstein-Barr virus DNA polymerase catalytic subunit and

regulates viral DNA replication. *J Virol.* 87: 2120-2127. 2013

5. Sato Y, Tsurumi T. Genome guardian p53 and viral infections. *Rev Med Virol.* 23: 213-220. 2013

6. Saito S, Murata T, Kanda T, Isomura H, Narita Y, Sugimoto A, Kawashima D, Tsurumi T. Epstein-Barr virus deubiquitinase downregulates TRAF6-mediated NF-κB signaling during productive replication. *J Virol.* 87: 4060-4070. 2013

7. Kawashima D, Kanda T, Murata T, Saito S, Sugimoto A, Narita Y, Tsurumi T. Nuclear Transport of Epstein-Barr Virus DNA Polymerase is dependent on the BMRF1 Polymerase Processivity Factor and Molecular Chaperone Hsp90. *J Virol.* 87: 6482-6491. 2013

8. Sugimoto A, Sato Y, Kanda T, Murata T, Narita Y, Kawashima D, Kimura H, Tsurumi T. Different Distributions of Epstein-Barr Virus Early and Late Gene Transcripts within Viral Replication Compartments. *J Virol.* 87: 6693-6699. 2013

9. Murata T, Tsurumi T. Epigenetic modification of the Epstein-Barr virus BZLF1 promoter regulates viral reactivation from latency. *Front Genet.* 4: 53. 2013

10. Murata T, Iwata S, Alam Siddiquey M, Kanazawa T, Goshima F, Kimura H, Tsurumi T. Heat Shock Protein 90 Inhibitors Repress Latent Membrane Protein 1 (LMP1) Expression and Proliferation of Epstein-Barr virus-Positive Natural Killer Cell Lymphoma. *PLoS One.* 8: e63566. 2013

11. Kanda T, Horikoshi N, Murata T, Kawashima D, Sugimoto A, Narita Y, Kurumizaka H, Tsurumi T. Interaction between Basic Residues of Epstein-Barr Virus EBNA1 Protein and Cellular Chromatin Mediates Viral Plasmid Maintenance. *J Biol Chem.* 288:24189-24199. 2013

12. Murata T, Narita Y, Sugimoto A, Kawashima D, Kanda T, Tsurumi T. Contribution of Myocyte Enhancer Factor 2 (MEF2) Family Transcription Factors to BZLF1 Expression in Epstein-Barr virus Reactivation from Latency. *J Virol.* 87:10148-10162. 2013

〔学会発表〕（計 10 件）

1. 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, 2012, (Philadelphia, USA),
2. Sugimoto A, Kimura H, Tsurumi T.: Epstein-Barr virus genome packaging factors converge at inner part of viral genome storeroom of the BMRF1 core within viral replication compartment. International Congress on Oncogenic Herpesviruses and Associated Diseases, 2012, (Philadelphia, USA),
3. Kanda T, Murata T, Tsurumi T.: 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, 2012, (Philadelphia, USA),
4. Kawashima D, Tsurumi T.: Involvement of Hsp90 in Epstein-Barr Virus Lytic Replication. The 11th International Congress of Hyperthermic Oncology (ICHO) & The 29th Japanese Congress of Thermal Medicine (JCTM), 2012, (Kyoto),
5. Tsurumi T, Sugimoto A.: Epstein-Barr virus Genome Packaging Factors converge in inner Genome Storerooms of BMRF1 cores within Viral Replication Compartments. The 4th EMBO meeting, 2012, (Nice, France),
6. Tsurumi T.: Epstein-Barr virus Replication Factory. The 11th Awaji International Forum on Infection and Immnity, 2012, (Awaji),
7. Tsurumi T.: Epstein-Barr virus Genome Packaging Factors converge in inner Genome Storerooms of BMRF1 cores within Viral Replication Compartments. SGM spring meeting, 2013, (Manchester, UK),
8. Tsurumi T, Kawashima D.: Nuclear Transport of Epstein-Barr Virus DNA Polymerase is dependent on the BMRF1 Polymerase Processivity Factor and Molecular Chaperone Hsp90. The Biology of Molecular Chaperones: From molecules, organelles and cells to misfolding diseases, 2013, (Santa Margherita di Pula, Italy),
9. Kanda T, Murata T, Tsurumi T.: Roles of BART microRNAs in EBV-infected epithelial cells. 6th International Symposium

on Nasopharyngeal Carcinoma, 2013, (Istanbul, Turkey),

10. Murata T, Noda C, Kanda T, Tsurumi T.: Induction of EBV Oncogene LMP1 by AP-2 in NPC Cells. 6th International Symposium on Nasopharyngeal Carcinoma, 2013, (Istanbul, Turkey),

６．研究組織

(1)研究代表者

鶴見　達也（TSURUMI Tatsuya）
愛知県がんセンター（研究所）・腫瘍ウイルス学部・　部長
研究者番号：研究者番号：90172072

(2)研究分担者

無し

(3)連携研究者

無し