

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 17 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790441

研究課題名(和文) 宿主因子を利用した腫瘍ウイルスのゲノム複製・分配・維持機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of DNA replication, distribution and maintenance mechanisms of oncogenic virus by using cellular factors

研究代表者

大崎 恵理子(Ohsaki, Eriko)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：50447801

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス(KSHV)はLANA 依存的にDNA複製起点であるori-P領域へ宿主複製因子をリクルートすることでゲノム複製を行なうことが知られている。本研究はゲノム複製における核マトリックスの重要性に着目し、核マトリックスタンパクであるNuMAとLANAのori-P結合領域(DBD)のキメラタンパク(NuMA-DBD)を作製し、ori-Pの複製活性を検討した。その結果、NuMA-DBDは核マトリックスに局在可能であり、全長LANAと同等のori-P結合活性、複製活性を示した。以上の結果から核マトリックスへのori-PのリクルートがDNA複製活性に重要であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Latency-associated nuclear antigen (LANA) recruits cellular DNA replication factors to the DNA origin (ori-P) in Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. To investigate the functional significance of the nuclear matrix in viral DNA replication, we constructed the chimeric protein of DBD fused to NuMA, which is one of the nuclear matrix proteins, and tested its DNA replication activity. Here we demonstrated that the NuMA-DBD localized in the nuclear matrix fraction, and it bound to the ori-P region, and showed high replication activity, which is similar to the full length of LANA. These results suggest that the recruitment of ori-P to the nuclear matrix is important for viral DNA replication.

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：カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス 潜伏感染 DNA複製 核マトリックス LANA ori-P

1. 研究開始当初の背景

カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス (KSHV) は、他のヘルペスウイルスと同様に感染細胞内でゲノムのみの状態でウイルス粒子を産生することなく、いわゆる潜伏感染と呼ばれる感染様式をとって感染細胞内に潜んでいる。感染細胞株等による観察から、見かけ上ウイルスゲノムのコピー数は一定に維持されている事が知られている (50-100copies/cell) (2, 14)。したがって、ウイルスは感染細胞の細胞周期と同調してゲノムを複製し、かつ分裂時に各娘細胞にほぼ均等にゲノムを分配するメカニズムを持っていると考えられる。ウイルスゲノムは感染細胞内で環状二本鎖構造を取り、また宿主ゲノムと同様にヒストンに巻き付いたクロマチン構造をとることが知られている (12)。複製に際しては ORC や Cdc6, Cdt1 などの宿主の複製開始因子 (pre-replication complex, pre-RC) が、G1 期後期に KSHV ゲノムの複製起点 (ori-P) へ細胞周期依存的にリクルートされることが示唆されている (7, 11, 13)。このような宿主機構を巧みに利用した複製・分配・維持機構を持つウイルスは学術的にも非常に興味深い。また、KSHV は臓器移植後などの免疫抑制状態や HIV 感染後の AIDS 発症患者などにおいて高率にカポジ肉腫や Primary effusion lymphoma (PEL) などのリンパ腫を引き起こす腫瘍関連ウイルスである (4, 9)。医療の進歩により臓器移植は今後ますます増加することは確実であり、また先進国において唯一日本での HIV 感染者数は増加の一途をたどっている。このような背景を考慮すると、臨床的にも KSHV によるこれらの病態に対する治療法・ウイルスの制御法の開発は急務を要する。ウイルスによって引き起こされる腫瘍形成メカニズムについて基礎的な研究を進めることも学術的・臨床的意義は非常に大きい。

KSHV のゲノム複製・維持における必要最小限のウイルス側因子として、潜伏感染因子である Latency-associated nuclear antigen (LANA) と、ゲノム内に存在する複製起点 ori-P が同定されている。ori-P 配列は LANA-binding site (LBS) とその下流にある GC リッチな 32bp の配列 (LBS-32GC) から構成されている。興味深いことに、LANA の結合には LBS だけで十分であるにも関わらず、複製においては 32GC が必要不可欠である。これまでの研究から 32GC が pre-RC のリクルートに

重要な配列であることが示唆されているが、その詳細は全く不明である。

私たちはこれまでの研究により、LANA に依存した ori-P の複製において核内骨格構造 (核マトリックス) の重要性を示唆する結果を得ている (10)。具体的には、LANA の欠失変異体の複製能と核マトリックス分画への局在に相関が見られること、細胞周期依存的に、かつウイルス因子非依存的に pre-RC が核マトリックス分画へ局在すること、ori-P が細胞周期依存的に核マトリックス分画へ集積すること、間接蛍光抗体法により核マトリックス上で LANA と pre-RC 因子の共局在が見られることを示した。核マトリックスとは、間期細胞において DNA 複製や転写、修復などの核内イベントを遂行するための足場として機能する核内骨格構造体である (1, 3, 15)。いわゆる構造タンパクであり核内で網目状の格子構造をとるもの (例: NuMA) や、核膜の裏打ち構造をとるもの (例: Lamin) などがあるが、その性質として非常に難溶性のものが含まれることから従来の生化学的解析が困難であり、その存在自体が長らく議論されてきた。しかし、そもそも *in vitro* の系は可溶化された分画内でのみ観察される現象を解析しているに過ぎず、すべての生体内現象を忠実に再現している訳ではない。最近ではリアルタイムイメージング解析や ChIP 解析などでより *in vivo* に近い環境を再現しうる解析法が開発されたことで、このような難溶性因子の解析も可能になりつつある。また、核マトリックス因子は、間期 (G1/S/G2 期) における DNA 複製や転写などのほかに M 期 (分裂期) においてもその重要性が示唆されている (5, 8)。M 期に突入すると核膜崩壊がおこり、染色体凝縮が開始するなど劇的に細胞内環境が変わるが、凝縮染色体の分配において紡錘極の機能に關与する NuMA やキネトコアタンパクの構成因子となる Cenp-F (16, 17) などを含めて、間期において核マトリックスタンパクとしてふるまい、M 期にその局在や機能を劇的に変化させる因子が多数存在すると考えられる。したがって、間期において DNA 複製等の足場の役割を果たす核マトリックス因子が、M 期にゲノム分配に重要な機能を果たす可能性が考えられる。

【参考文献】

1. Adom et al. 1992. Biochim Biophys Acta 1171:187-97.
2. Ballestas et al. 1999. Science 284:641-4.
3. Brylawski et al. 1993. Cancer Res 53:3865-8.
4. Cesarman et al. 1995. Blood 86:2708-14.
5. Gehmlich et al. 2004. EMBO Rep 5:97-103.
6. Kitamura et al. 2006. Cell 125:1297-308.
7. Lim et al. 2002. J Virol 76:10320-31.
8. Merdes et al. 1996. Cell 87:447-58.
9. Moore et al. 1995. N Engl J Med 332:1181-5.
10. Ohsaki et al. 2009. Virus Res 139:74-84.
11. Ohsaki et al. 2004. J Virol 78:9936-46.
12. Sakakibara et al. 2004. J Virol 78:7299-310.
13. Stedman et al. 2004. J Virol 78:12566-75.
14. Ueda et al. 2006. Virus Res 122:85-94.
15. Velden et al. 1984. FEBS Lett 171:13-6.
16. Yang et al. 2003. Cell Res 13:275-83.
17. Zhou et al. 2005. J Biol Chem 280:13973-7.

2. 研究の目的

KSHV は DNA 腫瘍ウイルスの一つで、カポジ肉腫、primary effusion lymphoma (PEL) や multicentric Castleman 病 (MCD) など腫瘍関連病態に密接に関係する。これらの腫瘍は潜伏感染を発症母地とすることから、KSHV の潜伏感染機構を詳細に明らかにすることは臨床学的にも意義のあることである。KSHV ゲノムは潜伏感染において宿主の細胞周期に呼応して複製・分配・維持されるが、その機構の詳細については不明な点が多い。本研究では潜伏感染における KSHV ゲノムの複製・分配・維持機構を解明し、将来的には KSHV によって引き起こされる病態発症メカニズムの解明や治療法の開発に加えて、ゲノム維持に必要な最小単位を同定する事で、分裂細胞においても安定発現維持可能なベクターの開発・利用等を目指す。

3. 研究の方法

LANA 欠失変異体の細胞内局在解析および ori-P 複製活性の検討と核マトリックス移行シグナルの有無の確認

これまでに作製した欠失変異体に加えて新たな LANA 欠失変異体を GFP タグ付かつシリーズで作製し細胞内局在変化を確認し、細胞分画法により核マトリックス移行シグナルの有無を検討した。

局在解析と同時に、欠失変異体存在

下における ori-P の複製活性をサザンプロットにより解析した。

LANA の N 末約 100 アミノ酸を欠損した時点で局在が核内から細胞質へ移行した。そこで、欠失変異体の N 末に GAL4 の DNA 結合ドメイン (GAL4-BD) を付加することで核内への局在移行を復活させ、核マトリックス移行シグナルの同定を試みた。

ori-P の核マトリックスへの局在とゲノム複製の機能的関連についての解析

KSHV ゲノムが核マトリックス領域へリクルートされることが複製機能に重要であるならば、ori-P を人為的に核マトリックスへ移行させることで複製が可能になると想定した。そこで、核マトリックスタンパクと LANA の ori-P 結合領域を融合させたキメラタンパクを作製し、核マトリックスの骨組みの中に ori-P 結合領域を組み込むことで、核マトリックス上に ori-P がリクルートされ得る環境を構築した。

NuMA に LANA の DNA 結合領域 (DNA Binding Domain=BD) を N 末もしくは C 末に付加したタグ付き融合タンパク質 (NuMA-BD, BD-NuMA) を作製し、細胞分画法および IFA により細胞内局在を確認した。NuMA-BD 若しくは BD-NuMA が ori-P との結合能を持つかどうかについて ChIP アッセイによりコントロール (タグのみ, NuMA, BD) と比較検討し、ori-P を含むプラスミドと上記融合タンパク質発現プラスミドを導入した細胞を用いて複製能をサザンプロットにより検定した。

4. 研究成果

LANA 欠失変異体の細胞内局在解析および ori-P 複製活性の検討と核マトリックス移行シグナルの有無の確認

LANA は全長 1162 アミノ酸からなるタンパクであるが、N 末に NLS が存在するため、N 末約 100 アミノ酸を欠損した時点で局在が核内から細胞質へと移行した。さらに N 末を欠損していくと、C 末 922-1162 ドメインは核内へと局在が回復し、細胞分画法によりクロマチン分画への集積が見られた。この領域は DNA 結合活性を持つドメイン

であるが、LANA の他のドメインの立体構造等が原因となって核内局在や DNA 結合活性が機能的にマスクされており、922-1162 のドメインになった時点でこれらの活性が顕在化した可能性が示唆された。これらの変異体のうち、核内局在活性を示したのは DBD (922-1162) と N-DBD, Pst I, 1-1074, 1-981, 1-463, 1-273 であった。Pst I の複製活性は、全長 LANA の 70% の活性を示し、N-DBD は 40%、DBD は 20% であり、他は複製活性を示さなかった。N-DBD と DBD はクロマチン分画にのみ局在したが、PstI は核マトリックス分画に局在が見られた。これらの結果から核マトリックス分画への局在が ori-P 複製活性に重要であることが示唆された。N 末欠失変異体 273-1162 の N 末に NLS 活性を持つ GAL4-BD を付加したもの (BD273-1162) を細胞内で発現させ、局在を解析した。コントロールである GAL4-BD はクロマチン分画に局在するにも関わらず、BD273-1162 は細胞分画法により核質細胞質分画への集積が見られ、IFA により細胞質に局在することが確認された。このことから、LANA の立体構造等が原因となって BD の核移行活性が阻害された可能性が考えられた。

ori-P の核マトリックスへの局在とゲノム複製の機能的関連についての解析

Halo タグを付加した NuMA-DBD, DBD-NuMA は、コントロールである NuMA と同様に核マトリックス分画に局在可能であった。また、IFA により、核内で NuMA と同様の局在パターンを示した。このことから、NuMA-DBD, DBD-NuMA は核マトリックスに局在することが確認された。次に、免疫沈降アッセイ (ChIP) によりこれらのキメラタンパクが ori-P との結合活性を持つかどうかを調べたところ、NuMA-DBD は全長 LANA とほぼ同等であり、DBD-NuMA は 6.2 倍の活性を示した。ポジティブコントロールである Halo-DBD は全長 LANA と比較して約 50 倍の活性を示し、非常に強い DNA 結合活性を示した。この結果はこれまでの報告と矛盾はない。この結合活性が ori-P 配列特異的かどうかを確認するために、ori-P 挿入プラスミドのアンピシリン遺伝子領域における結合活性を

調べたところ、Halo-DBD は全長 LANA の約 70 倍であり、DBD-NuMA は約 4 倍、他はほぼ全長 LANA と同等に低かった。すなわち、DBD の DNA 結合活性は非特異的な結合活性であることが示唆された。NuMA-DBD の ori-P 複製活性は全長 LANA の 70% を示し、DBD-NuMA は約 35% 程度であった。Halo-DBD は 60% の複製活性を示したが、DNA 結合活性に対する複製活性はわずか 1% と非常に低いものに対して、NuMA-DBD は全長の 70% の活性を示し、複製効率の高さが示された。一方、DBD-NuMA の結合活性は NuMA-DBD と比べて高いにも関わらず、複製活性は低かった。この理由については、DBD-NuMA の DNA 結合活性の配列特異性が低い可能性や、本来 LANA における DBD の領域が C 末端に位置していることから、DBD-NuMA において NuMA の N 末に DBD が位置していることによって、複製機能にネガティブな影響を与えている可能性が考えられる。DBD は核内に局在し、ori-P との高い結合活性を示すにも関わらず DNA 複製効率が低いことと、NuMA-DBD が複製活性を示したことから、ori-P の複製活性において核マトリックスへの局在が重要であ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 3 件)

1. Ohsaki E., Ueda K. “Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Genome Replication, Partitioning, and Maintenance in Latency” *Frontiers in Microbiology, Frontiers Media*, 2012, Vol. 2, p1-12
2. Nakano K., Katano H., Tadagaki K., Sato Y., Ohsaki E., Mori Y., Yamanishi K., Ueda K. “Novel monoclonal antibodies for identification of multicentric Castleman's disease; Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded vMIP-I and vMIP-II”, *Virology, Elsevier*, 2012, Vol. 425, p95-102
3. Ueda K., Ito E., Karayama M., Ohsaki

E., Nakano K., Watanabe S. “Kaposi's sarcoma-associated virus governs gene expression profiles toward B cell transformation”, Herpesviridae, A Look Into This Unique Family of Viruses, Intech, 2012, p93-104

〔学会発表〕(計 4 件)

1. 大崎恵理子「カポジ肉腫関連ヘルペスウイルスのゲノム分配メカニズムについて」第28回ヘルペスウイルス研究会, 2013年5月30日-6月1日, 淡路
2. 大崎恵理子 「核マトリックス因子 NuMA と LANA のキメラタンパクによる ori-P 複製能の検討」第27回ヘルペスウイルス研究会, 2012年6月7-9日, 愛知
3. 大崎恵理子 「核マトリックス因子 NuMA と LANA のキメラタンパクによる ori-P 複製活性と LANA の核マトリックス分画局在に重要なドメインの検討」第9回 EB ウイルス研究会, 2012年7月6日, 鳥取
4. 大崎恵理子 「核マトリックス因子 NuMA と LANA のキメラタンパクによる ori-P 複製活性と LANA の核マトリックス分画局在に重要なドメインの検討」第60回日本ウイルス学会学術集会, 2012年11月13-15日, 大阪

〔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

6. 研究組織
(1)研究代表者

(大崎 恵理子)

研究者番号： 50447801

(2)研究分担者

(該当なし)

研究者番号：

(3)連携研究者

(該当なし)

研究者番号：