

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08494

研究課題名(和文) EBV未解明遺伝子の同定と機能解析

研究課題名(英文) Identification and characterization of EBV genes

研究代表者

村田 貴之 (MURATA, Takayuki)

藤田保健衛生大学・医学部・教授

研究者番号：30470165

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：Epstein-Barr virus (EBV) は初感染で伝染性単核症、のちにバーキットリンパ腫、ホジキンリンパ腫などのがんの原因となりうる。EBVは80を超える遺伝子をコードしており、これまでに同定されていない、あるいは機能が解明されていない遺伝子が数多く存在する。本研究では、このようなEBVの未同定、未解明遺伝子のうち、主にガンマヘルペスウイルスのみに保存されている遺伝子に着目し、これらの同定、機能解析を行うことで、ウイルスの基礎的な性状解析を行うことを目的とした。このような研究は基礎ウイルス学に寄与するばかりでなく、新規創薬ターゲットやワクチンターゲットの開発にも貢献する。

研究成果の概要(英文)：Epstein-Barr virus (EBV) is a causative agent of infectious mononucleosis and several cancers, such as Burkitt lymphoma and Hodgkin lymphoma. It encodes more than 80 genes, and significant number of the genes have not been identified and characterized yet. In this study we have focused on such unknown or uncharacterized genes that are conserved mainly in gammaherpesviruses. We are proud that we could successfully characterize EBV genes, including the BGLF3.5, BDLF4, BRRF2, BRRF1, BKRF4, and BGLF2 genes. Thorough identification and characterization of EBV genes, molecular mechanism of EBV replication can be elucidated. In addition, our research may contribute to development of novel anti-viral agents or vaccines.

研究分野：ウイルス学

キーワード：EBV tegument kinetics knockout

### 1. 研究開始当初の背景

EBV (Epstein-Barr virus) はガンマヘルペスウイルスに属し、普遍的に存在する病原性ウイルスである。唾液を介して感染し、初感染で伝染性単核症、のちにバーキットリンパ腫、ホジキンリンパ腫などのがんの原因となりうる。EBVは80を超える遺伝子をコードしており、これまでに同定されていない、あるいは機能が解明されていない遺伝子が数多く存在している。

### 2. 研究の目的

本研究では、このようなEBVの未同定、未解明遺伝子のうち、主にガンマヘルペスウイルスのみに保存されている遺伝子に着目し、これらの同定、機能解析を行うことで、ウイルスの基礎的な性状解析を行うことを目的とした。

### 3. 研究の方法

過剰発現、ノックダウン、免疫沈降、レポーターアッセイ、蛍光抗体法などの基本的な生化学、分子生物学的手法のほか、申請者が独自に確立した、大腸菌内遺伝子組換えの技術による欠損ウイルス作製法を駆使して研究を行った。また、新しくCRISPR/Cas9による画期的なウイルス欠損株作製法を確立し、応用した。CRISPR/Cas9による遺伝子編集自体は現在すでに一般的な手法になっているが、これをEBV溶解感染関連遺伝子のノックアウトに応用するには実際上幾多の困難があり、世界でも我々しか成功していない。

### 4. 研究成果

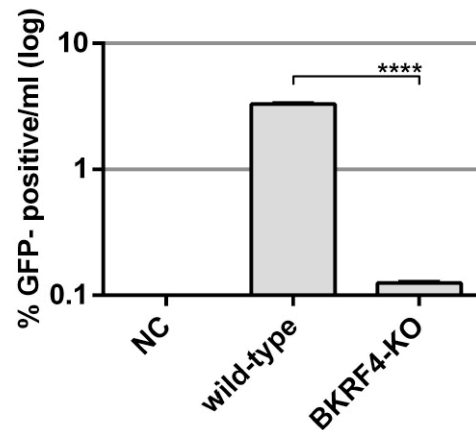
本研究においては、優秀な学生や同僚、施設等に恵まれて、極めて優れた業績を挙げ、日本の科学研究推進の一助となれたと自負している。必ずしも本科学研究費のみによっているのではないが、この課題の遂行期間(三年間)の間に、Journal of Virology 3報、Scientific Reports 2報、Frontiers in Microbiology 2報、Virology 2報を報告した。さらに最近、mSphereにも1報受理された。これらはいずれも申請者がコレスポンディングオーサーとなっている論文である。

EBVがコードする多くのウイルス遺伝子のうち、未解明のもの、ガンマヘルペスウイルスに特徴的なものを中心に、タンパク質の同定、発現キネティクス解析、機能解析を行った。

この中で、BGLF3.5とBRRF1と呼ばれる遺伝子については、ノックアウト株と野生株との間でウイルス増殖やB細胞不死化効率などに違いを見いだせず、少なくともHEK293細胞においては明らかな機能を有していないという結論となった。しかし、BGLF3.5については、下流のBGLF4という有名なEBVのプロテインキナーゼの翻訳制御に関わっている部分があること、BRRF1については、レポーターアッセイの結果、P53依存性の転写など

一部のシグナル経路依存性の転写を活性化していることを見だし、論文としてまとめることができた (Watanabe et al., 2015 Virology, Yoshida et al., 2017 Sci Rep)。

BDLF4という遺伝子については、ウイルスの後期遺伝子の転写に重要な役割を果たしていることを見いだした (Watanabe et al., 2015 J Virol)。このような遺伝子を阻害するような薬剤があれば、ウイルスは増殖できなくなるため、創薬のターゲットとして有望である。現在、スクリーニングを終え、候補阻害剤を得たところである。

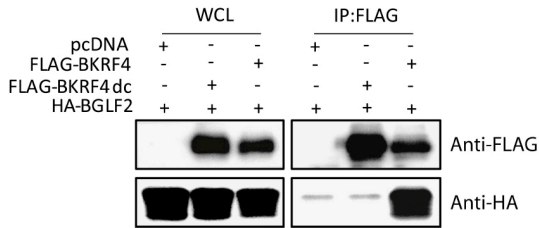


BKRf4 遺伝子欠損株 (BKRf4-KO) は、野生型 (wild-type) に比較して、感染性ウイルス粒子の産生が有意に低かった。

BRRF2、BKRf4、BGLF2という遺伝子はいずれも、ウイルスのテグメントと呼ばれる、エンベロープとヌクレオカプシドの間隙に取り込まれるタンパク質をコードしている。テグメントは複製に必ずしも必須ではないが、ウイルスの粒子形成や細胞内輸送、出芽、新しく感染した細胞でのウイルス感染性増強などの重要な働きをしている。実際これらの遺伝子は、ウイルス粒子形成や細胞内輸送、感染性増強に大きく貢献していることを明らかにすることができた (Watanabe et al., 2015 Virology, Watanabe et al., 2017 Front Microbiol, Masud et al., 2017 J Virol, Konishi et al., mSphere in press)。また、BGLF2とBKRf4は相互作用しており、この相互作用がテグメントとしての機能に重要であることも明らかになった。このような遺伝子は、欠損させると弱毒化するが、ウイルス糖タンパク質を含めほぼ全てのウイルス遺伝子を発現して、抗原として提示することができるので、ワクチンの弱毒化の標的として適していると考えられる。今後はこのような観点からも研究を進めていきたい。

さらに、BKRf4遺伝子の解析の中においては、これまで困難であった、CRISPR/Cas9システムを用いた遺伝子編集による欠損ウイルス作製および性状解析に成功した。EBVは宿主特異性や再活性化誘導の困難さなど多

くの課題を有しており、このシステムの確立



は容易ではなかった。世界中の研究者たちも

BKRF4とBGLF2の相互作用を免疫沈降法により観察した。

同様のシステムを立ち上げようとしたら非常に苦勞するであろう。独自性が極めて高いことを示しており、これまで主に用いてきた大腸菌内遺伝子組換えと併せて、このCRISPR/Cas9の技術により、当面は当該分野（EBV未解明遺伝子の機能解析）の世界一であることができるであろう。

#### 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10件）

- 1) Konishi N, Narita T, Hijioka F, Masud HMAA, Sato Y, Kimura H, Murata T. BGLF2 increases infectivity of Epstein-Barr virus by activating AP-1 upon de novo infection. *mSphere*. In press. 査読有り
- 2) Yoshida M, Murata T, Ashio K, Narita Y, Watanabe T, Masud HMAA, Sato Y, Goshima F, Kimura H. Characterization of a Suppressive Cis-acting Element in the Epstein-Barr Virus LMP1 Promoter. *Front Microbiol*. 2017 Nov 22;8:2302. 査読有り
- 3) Masud HMAA, Watanabe T, Yoshida M, Sato Y, Goshima F, Kimura H, Murata T. Epstein-Barr Virus BKRF4 Gene Product Is Required for Efficient Progeny Production. *J Virol*. 2017 Nov 14;91(23). pii: e00975-17. 査読有り
- 4) Yoshida M, Watanabe T, Narita Y, Sato Y, Goshima F, Kimura H, Murata T. The

Epstein-Barr Virus BRRF1 Gene Is Dispensable for Viral Replication in HEK293 cells and Transformation. *Sci Rep*. 2017 Jul 20;7(1):6044. 査読有り

- 5) Watanabe T, Sakaida K, Yoshida M, Masud HMAA, Sato Y, Goshima F, Kimura H, Murata T. The C-Terminus of Epstein-Barr Virus BRRF2 Is Required for its Proper Localization and Efficient Virus Production. *Front Microbiol*. 2017 Jan 31;8:125. 査読有り
- 6) Murata T, Noda C, Narita Y, Watanabe T, Yoshida M, Ashio K, Sato Y, Goshima F, Kanda T, Yoshiyama H, Tsurumi T, Kimura H. Induction of Epstein-Barr Virus Oncoprotein LMP1 by Transcription Factors AP-2 and Early B Cell Factor. *J Virol*. 2016 Mar 28;90(8):3873-3889. 査読有り
- 7) Watanabe T, Narita Y, Yoshida M, Sato Y, Goshima F, Kimura H, Murata T. The Epstein-Barr Virus BDLF4 Gene Is Required for Efficient Expression of Viral Late Lytic Genes. *J Virol*. 2015 Oct;89(19):10120-4. 査読有り
- 8) Narita Y, Sugimoto A, Kawashima D, Watanabe T, Kanda T, Kimura H, Tsurumi T, Murata T. A Herpesvirus Specific Motif of Epstein-Barr Virus DNA Polymerase Is Required for the Efficient Lytic Genome Synthesis. *Sci Rep*. 2015 Jun 30;5:11767. 査読有り
- 9) Watanabe T, Tsuruoka M, Narita Y, Katsuya R, Goshima F, Kimura H, Murata T. The Epstein-Barr virus BRRF2 gene product is involved in viral progeny production. *Virology*. 2015 Oct;484:33-40. 査読有り

10) Watanabe T, Fuse K, Takano T, Narita Y, Goshima F, Kimura H, **Murata T**. Roles of Epstein-Barr virus BGLF3.5 gene and two upstream open reading frames in lytic viral replication in HEK293 cells. **Virology**. 2015 Sep;483:44-53. 査読有り

[学会発表] (計 3 件)

- 1) Yoshida M, Sato Y, Goshima F, Kimura H, **Murata T**. Suppressive cis-acting element in the Epstein-Barr virus LMP1 promoter. 第 65 回日本ウイルス学会学術集会. 2017 年
- 2) **Murata T**, Sato Y, Goshima F, Kanda T, Yoshiyama H, Kimura H. Induction of EBV LMP1 by transcription factors AP-2 and EBF. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会. 2017 年
- 3) **Murata T**, Kimura H. Epstein-Barr virus: replication and pathogenesis. 第 63 回日本ウイルス学会学術集会. 2017 年

[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 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

村田 貴之 (MURATA, Takayuki)  
藤田保健衛生大学・医学部・教授  
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：

(4) 研究協力者 ( )