

機関番号：10101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590464

研究課題名（和文） EBウイルス蛋白質 EBNA3C による INK4a/ARF 発現抑制機構

研究課題名（英文） Suppression of INK4a/ARF expression by EBV protein EBNA3C

研究代表者

丸尾 聖爾 (MARUO SEIJI)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・准教授

研究者番号：70292018

研究成果の概要（和文）：EBNA3C が *INK4a/ARF* 発現を抑制するメカニズムを解析し、以下の点を明らかにした。(1) EBNA3C は *INK4a/ARF* プロモーター領域の DNA メチル化に影響を与えない。(2) EBNA3C は *p16(INK4a)* 領域のヒストン修飾をアクティブな状態からサイレントな状態に変化させる。(3) EBNA3C は DNA 結合蛋白質 RBP-Jkappa と結合して機能する。以上の結果から、EBNA3C は *INK4a/ARF* 領域のヒストン修飾をエピジェネティックに制御していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：In this study, the mechanism underlying EBNA3C suppression of the *INK4a/ARF* expression was analyzed. We clarified that (1) EBNA3C does not influence the DNA methylation status of the *INK4a/ARF* promoters. (2) EBNA3C changes histone modifications of the *p16(INK4a)* locus from active state to silent state. (3) EBNA3C association with RBP-Jkappa is essential for EBNA3C to function. These results suggest that EBNA3C regulates epigenetic histone modifications of the *INK4a/ARF* locus.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：ウイルス学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：EBウイルス、形質転換、不死化、がん抑制遺伝子、エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

(1) EBウイルスは人類に広く蔓延するウイルスで、成人の大部分は EB ウイルスの潜伏感染状態にある。EB ウイルスはヒト正常 B リンパ球を不死化（形質転換）して、無制限に増殖可能な Lymphoblastoid Cell Line (LCL) に変換する活性をもつ。このような EB ウイルスによる B リンパ球の増殖は生体内でも起こっており、健常人では免疫の働きによりその増殖が抑制されているが、臓器移植後など

の免疫機能の廃絶した状態では移植後リンパ増殖症（Post-Transplant Lymphoproliferative Disorder：PTLD）を発症する。PTLD は移植の成否を左右する重大な合併症のひとつであり、EB ウイルスによる B リンパ球不死化のメカニズムを明らかにすることは PTLD の発症機構の解明および治療法の開発に貢献する。

(2) B リンパ球の不死化には EBNA2、LMP1、EBNA3A、EBNA3C の4種類の EB ウイルス蛋白

質が必須で、いずれの1つが欠けても不死化は成立しないことから、これらのウイルス蛋白質は協同して働いてLCLの増殖を維持していると考えられている。4種類のEBウイルス蛋白質のうち、EBNA2とLMP1は宿主のプロトオンコジーンc-mycの発現を強力に誘導し、細胞増殖を開始させる。ところが通常、正常細胞にc-mycを強制発現させると細胞は増殖し始めるものの、やがてがん抑制遺伝子INK4a/ARFの発現が誘導されて premature senescence と呼ばれる細胞老化の状態に陥り、最終的に細胞増殖が停止してしまうことが知られている。一方、EBウイルスが感染した正常Bリンパ球はc-myc高発現であるにもかかわらず premature senescence に陥ることなく持続的に増殖することができる。このことから、EBウイルスは何らかの方法でc-myc高発現による細胞老化を回避させていることが示唆されていた。

(3) 研究代表者らのこれまでの研究から、ウイルス蛋白質EBNA3CがINK4a/ARF発現を抑制してLCLの細胞老化を阻止する活性を有することを明らかにしてきた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ウイルス蛋白質EBNA3CがいかなるメカニズムでINK4a/ARF発現を抑制するかを明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) コンディショナルにEBNA3Cの機能を制御しうるLCLを用いて解析を行った。本研究で用いたコンディショナルEBNA3CはEBNA3Cと4-ヒドロキシタモキシフェン(4HT)反応性エストロゲンレセプターとの融合蛋白質(E3C-HT)である。E3C-HTは本来のウイルスプロモーターの制御下にあるため生理的レベルで発現し、しかも、4HTを用いてEBNA3Cの機能のみをオンあるいはオフにすることが可能である。このコンディショナルEBNA3Cを用いることにより、正常Bリンパ球由来のLCLにおけるEBNA3Cの機能を明らかにすることが可能となる。

(2) EBNA3CオンあるいはEBNA3Cオフの状態に培養したLCLからそれぞれゲノムDNAを抽出し、メチル化特異的PCR法(MSP法)、バイサルファイトシーケンシング法を用いてINK4a/ARFのプロモーター領域のDNAメチル化を解析した。

(3) EBNA3CオンあるいはEBNA3Cオフの状態に培養したLCLからそれぞれクロマチンを調整し、クロマチンIP法を用いてp16(INK4a)のプロモーター領域のヒストンH3のアセチル化およびメチル化を解析した。

(4) 一連のEBNA3C欠失変異体、点変異体を作成してそれらの機能を解析することにより、LCL増殖維持に必須のEBNA3Cのアミノ酸

領域の詳細なマッピングを行うとともに、EBNA3CとRBP-Jkappaとの会合の重要性について検討した。

(5) マイクロアレイ法を用いてEBNA3Cによって発現が誘導される宿主遺伝子群、発現が抑制される宿主遺伝子群を同定した。

(6) EBNA3Cの兄弟遺伝子であるEBNA3Aの機能についても、コンディショナルにEBNA3Aの機能を制御しうるLCLを用いて検討を行った。

4. 研究成果

(1) INK4a/ARFのプロモーター領域のDNAメチル化の状態について解析をおこなった。EBNA3CオンあるいはEBNA3Cオフの状態に培養したLCLからそれぞれゲノムDNAを抽出し、メチル化特異的PCR法(MSP法)、バイサルファイトシーケンシング法を用いてp16(INK4a)のプロモーター領域のDNAメチル化を解析した。MSP法を用いた解析では、LCLのp16(INK4a)プロモーター領域はEBNA3Cオン、オフいずれにおいても低メチル化の状態であった。さらに、バイサルファイトシーケンシング法による解析を行った結果、LCLにおけるp16(INK4a)プロモーターのCpG部位のメチル化の程度はEBNA3Cオン、オフいずれにおいても約10%であり、メチル化のパターンにも明らかな違いは認められなかった(図1)。以上の結果から、EBNA3CによるINK4a/ARF発現抑制にDNAメチル化は主要な役割を演じていないものと考えられた。

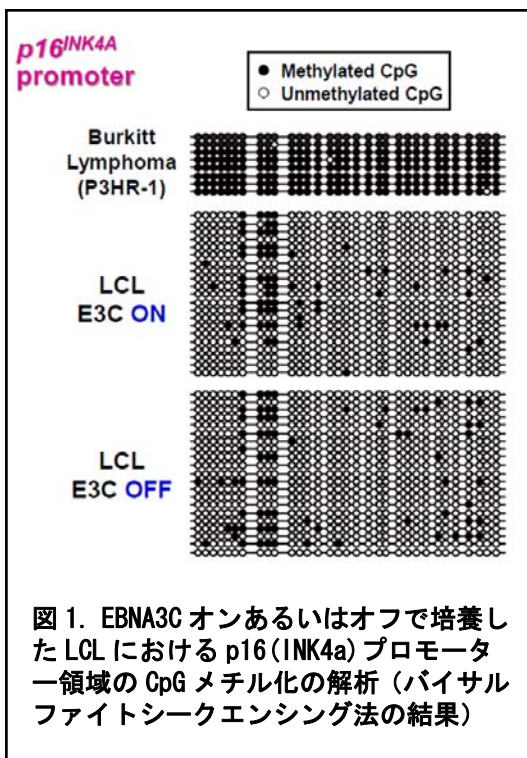
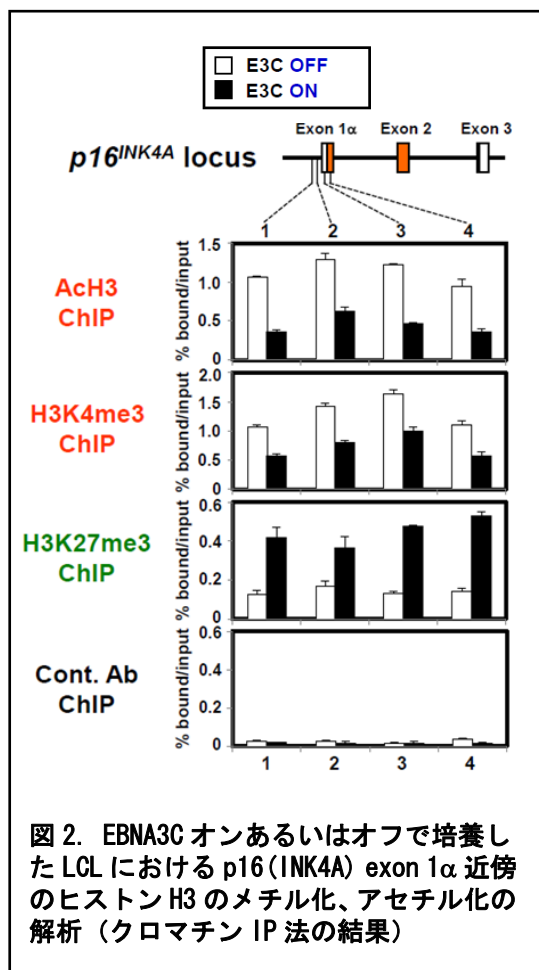


図1. EBNA3Cオンあるいはオフで培養したLCLにおけるp16(INK4a)プロモーター領域のCpGメチル化の解析(バイサルファイトシーケンシング法の結果)

(2) p16(INK4a)のプロモーター領域のヒストン修飾について解析をおこなった。EBNA3C オンあるいはEBNA3C オフの状態に培養したLCLからそれぞれクロマチンを調整し、クロマチン IP 法を用いて p16(INK4a)のプロモーター領域のヒストン H3 のアセチル化およびメチル化を解析した。EBNA3C をオフにすると、active クロマチンのマークであるヒストン H3 のアセチル化および H3K4 のメチル化が増加した (図 2)。一方、silent クロマチンのマークである H3K27 のメチル化は減少した (図 2)。すなわち、EBNA3C オフにより p16(INK4a)のプロモーター領域のクロマチンが active な状態に変化することが明らかになった。したがって、EBNA3C は何らかの方法で p16(INK4a)のプロモーター領域のクロマチンを silent な状態に保っているものと考えられる。ウイルス蛋白質によるヒストン修飾の制御についてはこれまであまり報告がなく、ウイルスによる宿主細胞の遺伝子発現のコントロールを考える上で重要な意義をもつと考えられる。



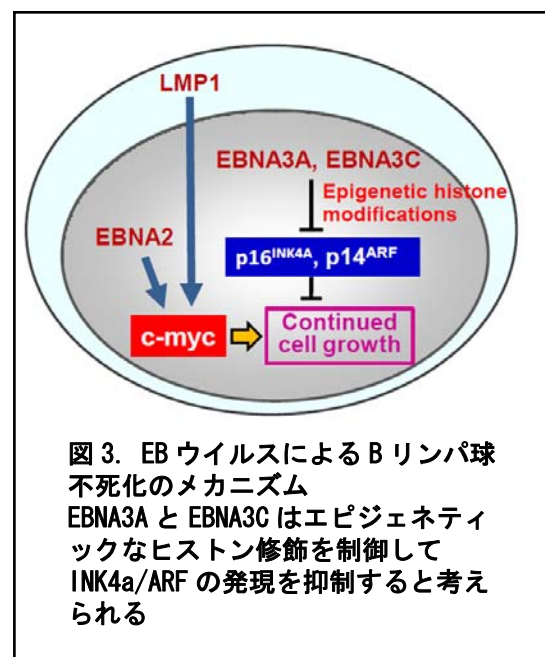
(3) 一連の EBNA3C 欠失変異体、点変異体を作成してそれらの機能を解析することによ

り、LCL 増殖維持に必須の EBNA3C のアミノ酸領域の詳細なマッピングを行った。EBNA3C と RBP-Jkappa との会合は EBNA3C の機能にとって必須であることが明らかになった。今回の EBNA3C 必須領域の同定は、EBNA3C の作用メカニズムを明らかにしていく上で重要な情報となる。

(4) RBP-Jkappa との結合が EBNA3C の機能発現に必須であることから、EBNA3C は転写制御因子として機能しているものと考えられている。そこで、マイクロアレイ法を用いて EBNA3C により発現誘導される宿主遺伝子、発現抑制される宿主遺伝子を同定した。

(5) EBNA3A 遺伝子と EBNA3C 遺伝子は同じ祖先遺伝子から遺伝子重複により生じたと考えられており、EBNA3C と同様に EBNA3A も不死化に必須のウイルスタンパク質である。EBNA3A の機能をコンディショナルに制御できる LCL を用いて EBNA3A 機能を解析した。その結果、EBNA3A も EBNA3C と同様に、がん抑制遺伝子 INK4a/ARF の発現を抑制することによって LCL の増殖維持に寄与していることが明らかとなった。EBNA3A と EBNA3C はお互いの機能を代替できないこともすでに報告しており、EBNA3A と EBNA3C は協力して働くことにより p16(INK4a)-pRb 腫瘍抑制経路および p14(ARF)-p53 腫瘍抑制経路を抑制していることが示唆された。

(6) したがって、EB ウイルスによる B リンパ球の不死化は、EBNA2 と LMP1 による宿主 c-myc の発現誘導と、EBNA3A および EBNA3A による p16(INK4a)および p14(ARF)の発現抑制により成し遂げられているものと考えられ、EBNA3C はエピジェネティックなヒストン修飾を制御することにより INK4a/ARF 発現を抑制することが示唆された (図 3)。



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7件)

- ① Maruo S, Zhao B, Johannsen E, Kieff E, Zou J, Takada K. Epstein-Barr virus nuclear antigens 3C and 3A maintain lymphoblastoid cell growth by repressing p16INK4A and p14ARF expression. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 108:1919-1924. (2011). 査読有.
- ② Zhao B, Mar JC, Maruo S, Lee S, Gewurz BE, Johannsen E, Holton K, Rubio R, Takada K, Quackenbush J, Kieff E. Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C regulated genes in lymphoblastoid cell lines. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 108:337-342. (2011). 査読有.
- ③ Watanabe A, Maruo S, Ito T, Ito M, Katsumura KR, Takada K. Epstein-Barr virus-encoded Bcl-2 homologue functions as a survival factor in Wp-restricted Burkitt lymphoma cell line P3HR-1. **J Virol**. 84:2893-2901. (2010). 査読有.
- ④ Garrido JL, Maruo S, Takada K, Rosendorff A. EBNA3C interacts with Gadd34 and counteracts the unfolded protein response. **Virol J**. 6:231. (2009). 査読有.
- ⑤ Lee S, Sakakibara S, Maruo S, Zhao B, Calderwood MA, Holthaus AM, Lai CY, Takada K, Kieff E, Johannsen E. Epstein-Barr virus nuclear protein 3C domains necessary for lymphoblastoid cell growth: interaction with RBP-Jkappa regulates TCL1. **J Virol**. 83:12368-12377. (2009). 査読有.
- ⑥ Katsumura KR, Maruo S, Wu Y, Kanda T, Takada K. Quantitative evaluation of the role of Epstein-Barr virus immediate-early protein BZLF1 in B-cell transformation. **J Gen Virol**. 90:2331-2341. (2009). 査読有.
- ⑦ Maruo S, Wu Y, Ito T, Kanda T, Kieff ED, Takada K. Epstein-Barr virus nuclear protein EBNA3C residues critical for maintaining lymphoblastoid cell growth. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 106:4419-4424. (2009). 査読有.

[学会発表] (計6件)

- ① Seiji Maruo, Epstein-Barr virus nuclear protein EBNA3C contributes to the growth of EBV-transformed B cells

through repressing p16(INK4A) and p14(ARF) expression, BMB2010、2010年12月9日、神戸ポートアイランド(神戸)

- ② 丸尾聖爾、EBウイルス核蛋白質 EBNA3Cによるエピジェネティックな p16(INK4A)の発現抑制機構、第58回日本ウイルス学会学術集会、2010年11月9日、あわぎんホール(徳島)
- ③ 渡邊 亜美、EBウイルスのコードする Bcl-2 ホモログはバーキットリンパ腫細胞株 P3HR-1 の生存に必須である、第57回日本ウイルス学会学術集会、2009年10月27日、都市センターホテル(東京)
- ④ Seiji Maruo、Roles of Epstein-Barr virus nuclear protein EBNA3C in B-cell growth transformation, 68th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, 2009年10月1日、パシフィコ横浜(横浜)
- ⑤ Seiji Maruo、EBNA3C transcriptional regulation through RBP-Jkappa is critical for growth maintenance of lymphoblastoid cells, 13th Biennial Conference of the International Association for Research on Epstein-Barr Virus And Associated Diseases, 2008年11月8日、Baiyun Conference center, Guangzhou, China
- ⑥ 丸尾 聖爾、EBウイルス核蛋白質 EBNA3Cは INK4A/ARF を抑制することにより LCL の増殖維持に寄与する、第56回日本ウイルス学会学術集会、2008年10月26日、岡山コンベンションセンター

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者
丸尾 聖爾 (MARUO SEIJI)
北海道大学・遺伝子病制御研究所・准教授
研究者番号: 70292018

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし