

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24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：2008～2011

課題番号：21590523

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の分子機構の解析

研究課題名（英文）Mechanism of host chromosome binding of latently infected Epstein-Barr virus episomes

研究代表者

神田 輝（KANDA TERU）

愛知県がんセンター研究所・腫瘍ウイルス学部・室長

研究者番号：50333472

研究成果の概要（和文）：潜伏感染した EB ウイルスゲノムは、ウイルスがコードする EBNA1 蛋白質を介して宿主細胞染色体上に付着することで安定に維持される。本研究では EBNA1 蛋白質と結合する細胞性蛋白質 p32 (TAP, gC1q-R) 蛋白質が、EBNA1 蛋白質の染色体付着へ関与するかどうかを調べた。EB ウイルス感染細胞を用いた p32 蛋白質の発現抑制実験の結果、EBNA1 蛋白質の染色体局在には特に変化を認めなかった。したがって p32 蛋白質が EBNA1 蛋白質の染色体局在において機能する可能性は低いと考えられた。

研究成果の概要（英文）：Latently-infected Epstein-Barr virus (EBV) genomes are stably maintained by attaching to host chromosomes via virally-encoded EBNA1 (Epstein-Barr virus Nuclear Antigen 1) protein. We examined whether cellular p32 (TAP, gC1q-R) protein, a major binding partner of EBNA1, plays any role in the chromosome binding of EBNA1. Suppression of p32 expression in EBV infected cells did not affect the chromosomal localization of EBNA1. The result argues against the possibility that p32 protein has any role in the chromosome binding of EBNA1.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011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：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：EB ウイルス、潜伏感染、EBNA1、リンパ芽球様細胞株、免疫沈降、質量分析

1. 研究開始当初の背景

EBウイルス(EBV)はヒトBリンパ球指向性に感染するヘルペスウイルスの一種である。EBVの主たる感染形態は潜伏感染であり、大多数の健常成人が無症候性に感染している。一方で、EBV感染は免疫不全時の日和見リンパ腫、バーキットリンパ腫、上咽頭がん、胃がんなど、様々な疾患の発症への関与が知られており、その感染機構および細胞内維持機構の解明は、これらの疾患制御という観点からも重要である。

潜伏感染EBVは、感染細胞核内において約170キロベースの二本鎖環状DNA(エピソード)として安定に維持される。EBNA1蛋白質は、ウイルス蛋白質中で唯一全ての潜伏感染細胞において発現が認められる。申請者らのグループを含む複数のグループによる解析結果から、EBNA1蛋白質のN末端寄りおよびC末端寄りには、それぞれ宿主染色体、ウイルスゲノム(*oriP*配列)と結合する機能ドメインが存在し、その結果、EBNA1蛋白質はEBVゲノムを染色体上につなぎとめて複製・分配させる機能を有することが明らかになった。

しかしながらEBNA1蛋白質がその染色体結合ドメインにより宿主染色体へ付着する分子機構は未だ不明である。EBNA1蛋白質の染色体結合ドメイン内にはATフックと呼ばれるDNA結合モチーフがあり、少なくとも*in vitro*においては、このモチーフを介してDNAに直接結合できることが報告されている(Sears J, J Virol, 78:11487, 2004)。しかし、実際にEBNA1蛋白質がATフックモチーフを介して染色体に付着しているという実験的証拠はない。一方で、それに代わる第二の仮説として、EBNA1蛋白質は、染色体上の細胞性因子をターゲットとして、蛋白・蛋白相互作用により染色体上に局在す

るという考え方もある。EBVと同様にエピソード状態での潜伏感染を行うウシパピローマウイルス、カポジ肉腫関連ヘルペスウイルスなどが、EBNA1蛋白質の機能ホモログ蛋白質をコードしており、これが細胞性因子と直接相互作用することで染色体上に局在すると報告されていることから、この第二の仮説はより有力な説として検証が進められている。

従来 yeast-two hybrid 法、EBNA1 アフィニティカラムによる精製などにより EBNA1 蛋白質と相互作用する細胞性因子の探索が行われている。こうして同定された細胞性因子の一つである EBP2 は、EBNA1 蛋白質の染色体上のターゲット分子であるとの報告があるものの、申請者(未発表データ)や他のグループは EBP2 蛋白質の局在が EBNA1 蛋白質のそれと一致しないという点で矛盾するデータを得ており、議論が割れている。

そこで申請者は、従来とは異なる実験系を用いて、EBNA1 蛋白質と相互作用する細胞性因子を探索することにより、EBNA1 蛋白質の染色体付着の分子メカニズムを明らかにしたいと考え、本研究計画を立案するに至った。そこでエピトープタグを付加した EBNA1 蛋白質を発現する組換え EBV 感染細胞を樹立した。この細胞を用いて EBNA1 蛋白質および EBV ゲノムの局在を同時に可視化して詳細な細胞生物学的な解析を行なった結果、EBNA1 蛋白質の染色体付着の重要性が一層明確となった。EBNA1 蛋白質と相互作用する細胞性因子を生化学的手法により同定する上で、このシステムは特異性に優れた抗エピトープタグ抗体を使えるという点できわめて有用である。

2. 研究の目的

本研究計画では、申請者らが樹立したエ

ピトープタグ付加 EBNA1 蛋白質を発現する組換え EBV 感染細胞を研究材料として、

(1) EBNA1 蛋白質と複合体を形成する細胞性因子を同定すること

(2) 同定した細胞性因子と EBNA1 蛋白質との間の相互作用の生理的な意義について機能阻害実験等により明らかにすること、を目的として研究を行なった。

3. 研究の方法

(1) EBNA1 蛋白質と相互作用する細胞性因子の同定

組換え EB ウイルスを用いて樹立した HA タグ付加 EBNA1 蛋白質、あるいは FLAG タグ付加 EBNA1 蛋白質を発現するリンパ芽球様細胞株より細胞抽出液を調製し、抗エピトープタグ抗体ビーズで免疫沈降した。免疫沈降物の電気泳動でみられた主要な共沈殿蛋白質バンドを切り出して質量分析法により解析した。

(2) EBNA1 蛋白質の染色体局在化における p32 蛋白質の役割の解析

EBNA1 蛋白質が染色体局在する上で、p32 蛋白質がどのように関与するかを調べるために、p32 発現を抑制する shRNA 発現レトロウイルスベクターを作製した。EB ウイルス潜伏感染細胞に shRNA 発現レトロウイルスを感染させて、p32 ノックダウンによる影響を調べた。

4. 研究成果

(1) EBNA1 蛋白質と相互作用する細胞性因子の同定

エピトープタグ付加 EBNA1 蛋白質を抗エピトープタグ抗体で免疫沈降して得られた免疫沈降物において、ウエスタンブロット法で解析したところ、EBNA1 蛋白質と特異的に相互作用すると報告されている ORC2 は免疫沈

降物中に存在しなかった。一方、免疫沈降物の一部を電気泳動して銀染色を行なったところ、サンプル細胞由来の免疫沈降物中に見られ、コントロール細胞(タグなし EBNA1 蛋白質を発現)由来の免疫沈降物中に見られない複数の蛋白質バンドが観察された。

そこでこれらのバンドを切り出して、質量分析法により解析したところ、主要な EBNA1 結合因子として、既に報告されている p32/TAP/gC1q-R を再同定した(協発酵キリン・大川克也先生との共同研究)。さらに免疫沈降物をショットガン法による網羅解析にかけたところ、p32 由来のペプチド断片は、抗 HA 抗体ビーズ、抗 FLAG 抗体ビーズによる免疫沈降物において共通して高いスコアで同定された。一方で別の既報告因子である HAUSP(USP7)は抗 HA ビーズを用いた免疫沈降実験でのみ同定された(北海道大学・小布施力史先生との共同研究)。

核抽出液を用いた免疫沈降・ウエスタン法により、EBNA1 蛋白質と p32 蛋白質の相互作用を確認した。p32 蛋白質と相互作用する領域を欠失した EBNA1 蛋白質変異体は、宿主染色体への付着が見られなかった。p32 蛋白質は、EB ウイルス潜伏感染の有無に関わりなく、主にミトコンドリアに、一部核内にドット状に局在した。一方 EBNA1 および p32 の両蛋白質を強制発現させると、EBNA1 蛋白質の核内発現にともなって、p32 蛋白質の核内局在の増強が見られた。

(2) EBNA1 蛋白質の染色体局在化における p32 蛋白質の役割の解析

胃癌細胞株である AGS 細胞に、EGFP 発現組換え EB ウイルスが潜伏感染した AGS/EGFP-EBV 細胞に対して、p32 をターゲットとする shRNA 発現レトロウイルスを感染させたところ、内在性 p32 の発現がほぼ

完全に抑制された。この p32 の発現がほぼ完全に抑制された状況下でも、EBNA1 蛋白質の染色体局在に変化は見られなかった。また p32 のウイルス産生における役割を調べるため、p32 発現抑制を抑制した細胞においてウイルス産生誘導をかけたが、感染性ウイルス産生には特に影響はみられなかった。以上の結果から、p32 が EBNA1 蛋白質の染色体局在化において機能するという仮説は否定的と考えられた。

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 4 件)

- ① Kanda T (corresponding author), 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.** 査読有 (in press)
- ② Kanda T (corresponding author), Shibata S, Saito S, Murata T, Isomura H, Yoshiyama H, Takada K, and Tsurumi T: Unexpected instability of Family of Repeats (FR), the critical cis-acting sequence required for EBV latent infection, in EBV-BAC systems. **PLoS One.** 査読有 6(11), e27758, 2011. DOI: 10.1371/journal.pone.0027758
- ③ Yasuda A., Noguchi K., Minoshima M., Kashiwazaki G., Kanda T., Katayama K., Mitsuhashi J., Bando T., Sugiyama H., Sugimoto Y.: A DNA ligand designed to antagonize EBNA1 represses Epstein-Barr virus-induced immortalization. **Cancer Sci.** 査読有 102(12), 2221-2230, 2011. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2011.02098.x
- ④ Ali A.K.M., Saito S., Shibata S., Takada K., and * Kanda T. (corresponding author): Distinctive effects of the Epstein-Barr virus family of repeats on viral latent gene promoter activity and B-lymphocyte transformation. **J Virol.** 査読有 83(18): 9163-9174, 2009. DOI: 10.1128/JVI.01979-08

[学会発表] (計 9 件)

- ① 神田輝、村田貴之、高田賢蔵、鶴見達也。FR (family of repeats) 1 次配列の EBV ウイルス株間における多様性とその意義：第 70 回日本癌学会学術総会、名古屋市、2011 年 10 月
- ② 神田輝、村田貴之、高田賢蔵、鶴見達也。Primary sequence heterogeneity of Family of Repeats (FR) of Epstein-Barr virus (EBV) results in strain-specific differences in the FR stability in BAC vectors : International Union of Microbiological Societies (IUMS) 2011, XV International Congress of Virology. 札幌市、2011 年 9 月
- ③ 神田輝、鶴見達也。Family of repeats (FR) 1 次配列の EBV 株間における多様性と共通点について：第 8 回 EB ウイルス研究会、大阪市、2010 年 7 月
- ④ 神田輝、村田貴之、高田賢蔵、鶴見達也。Primary sequence heterogeneity of Family of Repeats (FR) of Epstein-Barr virus (EBV) results in strain-specific differences in the FR stability in BAC vectors: 5th International Symposium on Nasopharyngeal Carcinoma. マレーシア Penang、2011 年 6 月
- ⑤ 神田輝、鶴見達也。EB ウイルス潜伏感染細胞内における EBNA1 蛋白質結合細胞性因子の解析：第 58 回日本ウイルス学会学

術集会、徳島市、2010年11月

- ⑥ 神田輝、鶴見達也. The impact of viral repetitive sequences on the biological properties of Epstein-Barr virus recombinants : 14th Biennial Conference of the International Association for Research on Epstein-Barr Virus and Associated Diseases. 英国 Birmingham、2010年9月
- ⑦ 神田輝、鶴見達也. 潜伏感染細胞中で EBNA1 蛋白質と相互作用する細胞性因子の解析 : 第7回EBウイルス研究会、第7回EBウイルス研究会、札幌市、2010年7月
- ⑧ 神田輝、鶴見達也. 潜伏感染EBウイルスエピゾームの宿主染色体付着機構の解析. 第25回ヘルペスウイルス研究会. 第25回ヘルペスウイルス研究会、浜松市、2010年5月
- ⑨ 神田輝. 潜伏感染EBウイルスエピゾームの宿主染色体付着に必要なシス塩基配列の解析 : 第27回染色体ワークショップ. 御殿場市、2010年1月

[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・腫瘍ウイルス学部・室長

研究者番号 : 50333472