

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 4 月 20 日現在

機関番号：83901

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790448

研究課題名（和文）EB ウイルス再活性化制御因子の同定と解析

研究課題名（英文）Identification and characterization of factors that regulate EB virus reactivation from latency

研究代表者

村田 貴之（MURATA TAKAYUKI）

愛知県がんセンター（研究所）・腫瘍ウイルス学部・研究員

研究者番号：30470165

研究成果の概要（和文）：Epstein-Barr (EB) ウイルスは伝染性単核球症、バーキットリンパ腫、上咽頭癌、胃癌などの原因となりうる臨床的に重要な病原性ウイルスである。EB ウイルスの潜伏感染からの再活性化のような、感染様式の変化は病態とも深く関係しており、その解析は重要である。本研究ではこの EB ウイルスの再活性化を制御する転写因子や、それらによってもたらされるエピジェネティックヒストン修飾について詳細に解析し、報告した (Murata et al., JBC 2010, 2011, Murata et al., JV 2012)。

研究成果の概要（英文）：Epstein-Barr (EB) virus is a causative agent of serious diseases, including infectious mononucleosis, Burkitt's lymphoma, nasopharyngeal cancer, or gastric cancer. Changes of viral lifecycles, such as reactivation from latency, have been implicated in the severity or state of the diseases, and thus analyzing mechanisms of such transitions is of importance. We here newly identified transcription factors that regulate the virus reactivation, and observed epigenetic alterations mediated by those factors (Murata et al., JBC 2010, 2011, Murata et al., JV 2012).

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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、再活性化

1. 研究開始当初の背景

EB ウイルスは、伝染性単核球症、バーキットリンパ腫、上咽頭癌、胃癌、慢性活動性 EB ウイルス感染症などの原因となる臨床的に重要な病原性ウイルスである。EB ウイルスは主に B リンパ球内に潜伏し、一部が再活性化して溶解感染に至るが、実際にヒトの体

の中でどのようなことが引き金になって再活性化が誘導されるのか、その詳細なメカニズムについてはいまだ明らかでない。少なくとも培養細胞レベルでは、EB ウイルスが潜伏感染している B リンパ球を TPA、カルシウムイオノフォアなどで刺激するとウイルスの溶解感染を再現することができる。このよ

うな刺激を受けると、まずウイルスは前初期遺伝子を発現する。前初期遺伝子のひとつである BZLF1(別名 Zta、ZEBRA、EB1) は、bZip (basic leucine-zipper)モチーフをもつ転写活性化因子であり、ウイルスの初期遺伝子の転写を活性化する。EB ウイルスが潜伏感染している細胞に BZLF1 を発現させるだけで溶解感染を完全に再現できることから、BZLF1 の発現こそがウイルス再活性化のトリガーであると考えられている。

2. 研究の目的

本研究ではこの EB ウイルスの溶解感染からの再活性化を制御する因子を包括的かつ詳細に解析することを目的とした。具体的にはこれまでに我々がおこなった網羅的スクリーニングで明らかになってきた再活性化制御因子についてその制御の分子メカニズムを詳細に解析して生理的意義を明らかにする。

3. 研究の方法

網羅的スクリーニングにより、EB ウイルスの BZLF1 遺伝子の発現を制御する宿主因子、すなわち溶解感染からの再活性化を制御する宿主因子を同定した。これらの基本的な性状解析のため、レポーターアッセイ、免疫沈降、クロマチン免疫沈降(ChIP)、免疫染色などの分子生物学的解析をおこなった。さらに、実際のウイルスでの生理的意義を探るため、転写因子結合サイトに変異を加えた組み換えウイルスを作製し、挙動を解析した。

4. 研究成果

まず、EB ウイルスの再活性化の分子スイッチとなる BZLF1 が、SUMO 化という翻訳後修飾を受け、転写抑制にもはたらくということを報告した。免疫沈降法などで SUMO 化 BZLF1 と相互作用する因子を同定するなどして、転写に及ぼす影響を詳細に解析した(Murata et al., JBC 2010)。

また、BZLF1 の転写を抑制する宿主因子として、JDP2 を同定した。b-Zip 型転写抑制因子である JDP2 は、BZLF1 プロモーター上の ZII と呼ばれるシスエレメントに、CREB/ATF/AP-1 などの他の b-Zip 型転写因子と競合的に結合し、BZLF1 転写を抑制していた(Murata et al., JBC 2011)。

さらに BZLF1 プロモーターのエピジェネティックヒストン修飾について、再活性化前後で、包括的に比較観察した。結果、潜伏状態では、ヒストン低アセチル化、H3K9me2/3、H3K27me3、H4K20me3 などの抑制性修飾が観察され、再活性化に伴ってヒストン高アセチル化、H3K4me3 などの活性化マーカーが増強している様子が窺えた。この中で特に、阻害剤、ノックダウンの実験から、潜伏感染の維持に

おいて、H3K27me3、H4K20me3 の修飾が重要であることを報告した(Murata et al., JV 2012)。

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. Murata, T., Kondo, Y., Sugimoto, A., Kawashima, D., Saito, S., Isomura, H., Kanda, T., and Tsurumi, T. (2012). Epigenetic Histone Modification of Epstein-Barr Virus BZLF1 Promoter during Latency and Reactivation in Raji Cells. *J Virol* 86(9), 4752-61. PMID: 22357272 査読有り
2. Kanda, T., Shibata, S., Saito, S., Murata, T., Isomura, H., Yoshiyama, H., Takada, K., and Tsurumi, T. (2011). Unexpected Instability of Family of Repeats (FR), the Critical cis-Acting Sequence Required for EBV Latent Infection, in EBV-BAC Systems. *PLoS One* 6(11), e27758. PMID: 22114684 査読有り
3. Noda, C*., Murata, T. (*contributed equally), Kanda, T., Yoshiyama, H., Sugimoto, A., Kawashima, D., Saito, S., Isomura, H., and Tsurumi, T. (2011). Identification and Characterization of CCAAT Enhancer-binding Protein (C/EBP) as a Transcriptional Activator for Epstein-Barr Virus Oncogene Latent Membrane Protein 1. *J Biol Chem* 286(49), 42524-33. PMID: 22013073 査読有り
4. Murata, T., Noda, C., Saito, S., Kawashima, D., Sugimoto, A., Isomura, H., Kanda, T., Yokoyama, K. K., and Tsurumi, T. (2011). Involvement of Jun Dimerization Protein 2 (JDP2) in the

- Maintenance of Epstein-Barr Virus Latency. *J Biol Chem* 286(25), 22007-16. PMID: 21525011 査読有り
5. Isomura, H., Stinski, M. F., Murata, T., Yamashita, Y., Kanda, T., Toyokuni, S., and Tsurumi, T. (2011). The Human Cytomegalovirus Gene Products Essential for Late Viral Gene Expression Assemble into Prereplication Complexes before Viral DNA Replication. *J Virol* 85(13), 6629-44. PMID: 21507978 査読有り
 6. Sugimoto, A., Kanda, T., Yamashita, Y., Murata, T., Saito, S., Kawashima, D., Isomura, H., Nishiyama, Y., and Tsurumi, T. (2011). Spatiotemporally different DNA repair systems participate in epstein-barr virus genome maturation. *J Virol* 85(13), 6127-35. PMID: 21490093 査読有り
 7. Nakayama, S., Murata, T., Yasui, Y., Murayama, K., Isomura, H., Kanda, T., and Tsurumi, T. (2010). Tetrameric ring formation of Epstein-Barr virus polymerase processivity factor is crucial for viral replication. *J Virol* 84(24), 12589-98. PMID: 20926567 査読有り
 8. Isomura, H., Stinski, M. F., Murata, T., Nakayama, S., Chiba, S., Akatsuka, Y., Kanda, T., and Tsurumi, T. (2010). The human cytomegalovirus UL76 gene regulates the level of expression of the UL77 gene. *PLoS One* 5(7), e11901. PMID: 20689582 査読有り
 9. Murata, T., Hotta, N., Toyama, S., Nakayama, S., Chiba, S., Isomura, H., Ohshima, T., Kanda, T., and Tsurumi, T. (2010). Transcriptional repression by sumoylation of Epstein-Barr virus BZLF1 protein correlates with association of histone deacetylase. *J Biol Chem* 285(31), 23925-35. PMID: 20516063 査読有り
 10. Sato, Y., Shirata, N., Murata, T., Nakasu, S., Kudoh, A., Iwahori, S., Nakayama, S., Chiba, S., Isomura, H., Kanda, T., and Tsurumi, T. (2010). Transient increases in p53-responsible gene expression at early stages of Epstein-Barr virus productive replication. *Cell Cycle* 9(4), 807-14. PMID: 20139729 査読有り
- [学会発表] (計 6 件)
1. 村田貴之、鶴見達也. Involvement of Jun Dimerization Protein 2 (JDP2) in the Maintenance of Epstein-Barr virus Latency. 第 70 回日本癌学会学術総会. 名古屋 2011.10.04
 2. Murata T., Tsurumi T. Involvement of Jun Dimerization Protein 2 (JDP2) in the Maintenance of Epstein-Barr virus Latency. International Union of Microbiological Societies (IUMS) 2011, XV International Congress of Virology. 札幌 2011.09.12
 3. Murata T., Noda C, Kanda T, Tsurumi T. Identification and Characterization of a Novel Transcriptional Activator for EBV Oncogene LMP1 in Epithelial Cells. 5th International Symposium on Nasopharyngeal Carcinoma. Penang, Malaysia. 2011.06.23
 4. 村田貴之、鶴見達也. EBV 再活性化の分子メカニズム. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会. 徳島 2010.11.08
 5. Murata T., Tsurumi T. Screening of cellular factors that enhance reactivation of Epstein-Barr virus from latency. 第 69 回日本癌学会学術総会. 大阪 2010.09.12

6. Murata T, Tsurumi T. Screening of cellular factors that enhance reactivation from Epstein-Barr virus latency. 14th Biennial Conference of the International Association for Research on Epstein-Barr Virus and Associated Diseases, Birmingham, UK. 2010.09.07

[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

村田 貴之 (MURATA TAKAYUKI)

愛知県がんセンター (研究所)・腫瘍ウイルス学部・研究員

研究者番号：30470165