

論文内容の要旨

論文題目

EB ウイルスプロテインキナーゼ BGLF4 によるウイルス及び、
宿主細胞転写因子の制御

(Regulation of viral and cellular transcription factors by
Epstein-Barr virus protein kinase BGLF4)

氏名

浅井 理沙

Epstein-Barr Virus (EBV; human herpes virus 4; 成人の 95%以上に無症候性に感染している大型で二本鎖 DNA ウイルス) は、ヘルペスウイルス科ガンマヘルペスウイルス亜科に属し、伝染性単核球症の原因ウイルスであるだけでなく、バーキットリンパ腫、上咽頭癌、日和見リンパ腫、ホジキン病、胃癌などの様々なヒト腫瘍性疾患に関与している。EBV を *in vitro* においてヒト B 細胞に感染させると、感染性粒子を産生せずウイルスは潜伏感染状態となり細胞は不死化する。一方、(再)活性化への刺激を与えると、ウイルスは溶解感染期へと移行し、感染性粒子を産生する。

EBV を含むヘルペスウイルスは、protein kinase (PK) をコードしている。PK によるタンパク質のリン酸化は、標的タンパク質の活性制御を司る最も一般的な修飾であり、様々な細胞機構 (転写、翻訳、細胞周期、タンパク分解系、アポトーシス、etc.) がリン酸化によって制御されている。その増殖や生存を大きく宿主細胞機構に依存しているウイルスが、様々な細胞機構を制御しうる PK を保持していることは、宿主細胞を制御するためには好都合である。つまり、ウイルスは自身の PK によってウイルス因子や宿主細胞因子をリン酸化し、それらの活性を制御することによって、ウイルスの増殖や生存に有利な環境を創り出していることが想像される。実際に他のヘルペスウイルスの PK は様々な感染現象を制御することが報告されている。

EBV がコードする PK BGLF4 は、全ヘルペスウイルスに保存されており、溶解感染初期に核内に発現することが報告されていた。しかしながら、BGLF4 に関する知見は限られており、その機能発現機構は全く不明であった。そこで本研究では、BGLF4 の機能発現機構を解明することを目的とし、(1) BGLF4 のウイルス粒子への

取り込みとその意義、(2) BGLF4 の新規標的ウイルス因子の同定とその生物学的意義の解明、(3) BGLF4 の新規標的宿主因子の同定とその生物学的意義の解明に焦点をあてて解析を試みた。

(1) BGLF4 のウイルス粒子への取り込みとその意義

EBV 粒子は、ウイルスゲノムを包むようにカプシド (capsid) があり、その周りをエンベロープ (envelope) が包み、中間にテグメント (tegument) が存在する。一般的に、ヘルペスウイルス粒子が細胞に感染・侵入するとテグメントがリリース(拡散)され、ウイルスによる宿主細胞機構の制御が引き起こされる。BGLF4 が EBV のウイルス粒子構成因子であるのか?、また、BGLF4 がテグメント蛋白質であり、感染直後にリリースされるかを解析した。

(i) 精製ウイルスをショ糖密度勾配遠心法に供したところ、BGLF4 はカプシド蛋白質 BcLF1 と全く同じ分画(ショ糖密度 40~50%)に検出されたことより、BGLF4 はウイルス粒子構成蛋白質であることが明らかになった。(ii) 精製ウイルス粒子より、BGLF4 特異抗体を用いた免疫沈降法によって、ウイルス粒子中の BGLF4 を精製し、*in vitro* kinase assay に供したところ、ウイルス粒子にパッケージングされている BGLF4 は、キナーゼ活性を保持していることが明らかになった。(iii) *in vitro* tegument release assay を行ったところ、生理学的条件で効率的に BGLF4 のウイルス粒子からのリリースが起きることが明らかになった。(iv) ATP および $MgCl_2$ を添加すると BGLF4 のカプシドからのリリースは増強し、興味深いことにフォスファターゼ処理をすることにより BGLF4 リリースが著しく減少した。これより、BGLF4 のウイルス粒子からのリリースがリン酸化依存的であることが明らかになった。以上の結果より、BGLF4 がウイルス粒子構成因子であり、感染直後に細胞内へリリースされることが明らかとなった。本知見は、溶解感染期にのみ機能すると考えられていた BGLF4 が、感染直後、すなわち潜伏感染およびこれに伴う細胞の不活化の初期段階に機能しうることを示したものであり、BGLF4 が潜伏感染や細胞の不活化過程に関与することが示唆された。(Asai R et al., *J. Virol.* 80: 5125-5134 (2006))

(2) BGLF4 の新規標的ウイルス因子 BZLF1 の同定とその機能解析

PK である BGLF4 の機能発現機構の解明の第 1 ステップは、BGLF4 の基質を同定することである。まず新規標的ウイルス因子の同定を行った。確立済みの *in vitro* kinase assay を用い、種々のウイルス因子をスクリーニングしたところ、BGLF4 新規標的ウイルス因子として BZLF1 を同定した。BZLF1 は、溶解感染前初期に発現し、潜伏感染から溶解感染へのスイッチングに主要な役割を果たす重要なウイルス制御因子である。また、BZLF1 は、自身のプロモーター (Zp) や他の EBV 遺伝子プロモーターを活性化する機能を備え、ウイルス遺伝子の発現制御やウイルス DNA の複製制御に関与していることが知られている。

(i) 二次元電気泳動法にて解析したところ、細胞レベルにおいても BGLF4 が BZLF1 をリン酸化するということが明らかとなった。(ii) 過剰発現系・感染細胞において BGLF4 と BZLF1 が安定的な複合体を形成することが免疫沈降法により明らかとなった。(iii) 感染細胞における局在を蛍光抗体法で調べたところ、核ドメインで両者が共局在しているのが観察された。過去に、BZLF1 は replication compartment

様構造に局在するとの報告があるので、マーカーである EA-D 抗体を用いて解析したところ、BGLF4 は EA-D と核ドメインで共局在していた。つまり、BGLF4 は replication compartment 様構造で BZLF1 と共局在することが明らかとなった。(iv) BGLF4 による BZLF1 のリン酸化の生物学的意義を探索するために、BGLF4 による BZLF1 のリン酸化部位の同定を行った。BZLF1 変異体を用いて BGLF4 in vitro kinase assay を利用して行ったところ、BZLF1 の 209 番目のセリン(Ser-209) がリン酸化部位として同定された。(v) Ser-209 アラニン置換体(リン酸化を阻害する変異体：S209A) を作製し、免疫沈降法による解析を行ったところ、BGLF4 と BZLF1 は BZLF1 Ser-209 リン酸化依存的に安定な複合体を形成していることが明らかになった。(vi) BGLF4 による BZLF1 の転写活性制御能を調べるため、ルシフェラーゼアッセイに供した。BZLF1 と BGLF4 を共発現させると、BZLF1 自身のプロモーターを活性化する auto-transactivation activity は抑制された。また、BGLF4 による BZLF1 の auto-transactivation activity の抑制は、BZLF1 Ser-209 リン酸化依存的であることが明らかになった。以上の結果より、BGLF4 は BZLF1 の auto-transactivation activity を抑制することによって、BZLF1 の遺伝子発現を制御することが示唆された。

次に、感染細胞において、BGLF4 が BZLF1 の遺伝子発現に関与しているかを調べるために、感染細胞における BZLF1-mRNA 発現量と BGLF4 蛋白質発現量との相関を検討した。Real-Time PCR 法を用い BZLF1-mRNA を測定したところ、過去の報告通り、再活性化 1.5 時間から BZLF1-mRNA が発現し、3~6 時間でピークを迎え、6 時間以降は発現が抑制されていた。この時の BGLF4 蛋白質発現レベルを WB 法により比較すると、BZLF1-mRNA が抑制され始める 6~9 時間より発現してくるのが観察された。従って、感染細胞における BZLF1-mRNA 発現抑制と BGLF4 蛋白質発現には相関関係が有ることが示唆された。さらに、より直接的に感染細胞における BGLF4 の遺伝子制御能を調査するために BGLF4 欠損ウイルスを作製し、BGLF4 欠損細胞中の BZLF1-mRNA の発現を野生体と比較した。その結果、BGLF4 欠損ウイルスでは、野生体で見られた BZLF1-mRNA の抑制はみられなかった。以上のことより、感染細胞においても BGLF4 は BZLF1 の遺伝子発現制御に関与することが示唆された。

BGLF4 が BZLF1 をリン酸化することによって安定な複合体を形成し、BZLF1 の転写活性化機構を制御することでウイルス遺伝子発現制御に関与していることが明らかとなった。

(3) BGLF4 の新規標的宿主因子 Fra-2 の同定とその生物学的意義の解明

BGLF4 の新規標的宿主因子の網羅的な同定を行うため、BGLF4 in vitro kinase assay と Invitrogen 社の 'ProtoArray human protein microarray kinase substrate identification kit(vol3.0)' を併用し、大規模なスクリーニングを実施した。上記キットは、約 5000 種類のタンパク質がプロットされたプロテインチップを用いて目的の PK の基質をスクリーニングする系である。今回、スクリーニングによって、83 個の BGLF4 新規標的宿主因子候補が得られた。本研究では、そのうちの一つである Fra-2 (Fos-related antigen-2) について詳細な解析を行った。Fra-2 は転写遺伝子群 AP1 (Jun family、Fos family、ATF family からなる二量体により構成され、DNA の

AP-1 結合部位に結合して転写を促進する転写因子群) に属し、leucine zipper 構造 (bZIP: basic region leucine zipper) をもつ。BZLF1 もこの bZIP family であり、同属に分類される。

(i) *in vitro* において、Fra-2 は確かに BGLF4 によってリン酸化されることを確認した。(ii) 過剰発現系において、Fra-2 と BGLF4 を共発現させると、シフトしたバンドが見られ、キナーゼ活性を消失させた変異体 BGLF4-K102I 共存在下では Fra-2 単独と同様なアイソフォームが観察された。また、これらの差異はフォスファターゼ感受性であった。以上より、細胞レベルにおいても BGLF4 は Fra-2 をリン酸化することが確認された。(iii) 過剰発現および感染細胞において免疫沈降法に供したところ、BGLF4 と Fra-2 は安定な複合体を形成し、その複合体形成はリン酸化依存的であることが明らかとなった。(iv) 感染細胞において溶解感染期を誘導すると、Fra-2 の発現が誘導され、その発現時期は BGLF4 の発現とほぼ一致していた。(v) BGLF4 が Fra-2 の転写活性に与える影響を調べるため、ルシフェラーゼアッセイを行ったところ、BZLF1 の結果とは反して、Fra-2 と BGLF4 を共発現させると転写活性が増強し、キナーゼ活性を消失させた変異体 BGLF4-K102I では変化しなかった。以上より、BGLF4 は Fra-2 依存的な転写活性を活性化することが示唆された。(vi) Fos family c-fos についても同様な実験を実施したところ、*in vitro* において c-fos が BGLF4 によりリン酸化され、BGLF4 は c-fos 依存的な転写活性を活性化していることが明らかとなった。

BGLF4 が宿主細胞転写因子 Fra-2 をリン酸化することによって安定な複合体を形成し、Fra-2 依存的な転写活性を制御することが明らかになった。