

主論文の要旨

**A Herpesvirus Specific Motif of Epstein-Barr Virus  
DNA Polymerase Is Required for  
the Efficient Lytic Genome Synthesis**

〔 Epstein-Barr ウイルスの DNA ポリメラーゼにあるヘルペスウイルス  
特異的なアミノ酸モチーフは効率的なウイルスゲノム合成に必要である 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻  
微生物・免疫学講座 ウイルス学分野

(指導：木村 宏 教授)

成田 洋平

## 【緒言】

Epstein-Barr virus (以下 EBV) は主に B 細胞へ感染するヒト  $\gamma$  ヘルペスウイルスで、一度感染すると生涯にわたり体内に維持される DNA ウイルスである。EBV は初感染時にとくに伝染性単核症の原因となる他、バーキットリンパ腫や上咽頭癌を引き起こすウイルスである。

EBV が感染細胞内でウイルスを産生する溶解感染時にはウイルスがコードする複製タンパク質; BZLF1(oriLyt 結合タンパク質)、BALF5(DNA ポリメラーゼ)、BMRF1 (ポリメラーゼ付随タンパク質)等が中心となってウイルスゲノムを約 100 から 1000 倍にまで増幅する。

ヘルペスウイルスの DNA ポリメラーゼは、その C 末端側に DNA ポリメラーゼ活性やエキソヌクレアーゼ活性があることが明らかにされていたが、N 末端側の機能に関しては詳しく解析されていなかった。最近、単純ヘルペスウイルス 1 型 (HSV-1) の DNA ポリメラーゼ UL30 の pre-NH<sub>2</sub> 領域にあるアミノ酸モチーフ FYNPYL がウイルスゲノム複製やウイルス産生に重要であると報告された。このアミノ酸モチーフはヘルペスウイルスの DNA ポリメラーゼのみで高度に保存されているという特徴を有していることから、EBV やその他のヘルペスウイルスの DNA ポリメラーゼでも同様に重要な役割を持っているのではないかと考えた。本研究では EBV のゲノム複製においてこのヘルペスウイルス特異的なアミノ酸モチーフ (以下、保存モチーフ) が果たす役割を明らかにすることを目的とした。

## 【方法】

### ① 細胞培養

HEK293 細胞および HEK293 EBV bacterial artificial chromosome (BAC) BALF5 欠損細胞は 10%FBS を添加した DMEM で培養した。HEK293 EBV-BAC BALF5 欠損細胞の培養はさらに 150 $\mu$ g/ml の hygromycin B を添加した。

### ② ヘルペスウイルス特異的なアミノ酸モチーフの変異が EBV ゲノム複製に与える影響

pcDNA3.1(-)-BALF5 を鋳型として保存モチーフ(FYNPFL)に変異を入れた発現プラスミドを作製した。これらのプラスミドを HEK293 EBV-BAC BALF5 欠損細胞へ BZLF1 発現プラスミドと同時にエレクトロポレーション法により導入しウイルスゲノム複製量を定時的にリアルタイム PCR により定量した。

### ③ In vitro polymerase assay

BALF5 (野生型と変異型) およびBMRF1タンパク質をウサギ網状赤血球ライセート *in vitro* 転写・翻訳系を用いてそれぞれ合成し、等量をDNase I処理をした仔ウシ胸腺由来DNA (鋳型DNA) を含んだポリメラーゼ反応溶液に加え、37°Cでインキュベートし鋳型DNAへのヌクレオチドの取り込みをBAS-2500(Fuji Film)により定量した。

#### ④ 免疫沈降・免疫染色

Flag-BALF5(野生型と変異型)発現ベクターをBZLF1発現ベクターと共にHEK293 EBV-BAC BALF5欠損細胞へ導入し、36時間後に細胞を溶解し、さらにBenzonaseを250unit加えDNAを消化した。プレクリアしたライセートにFLAG-M2 agaroseを加え3時間4°Cで反応させた。免疫染色では溶解感染誘導36時間後の細胞を裸核化し固定した。目的抗原に対する一次抗体を4°Cで一晩反応させ、二次抗体で染色した後共焦点レーザー顕微鏡LSM510 Meta(Zeiss)で撮影した。

#### **【結果】**

##### 1. BALF5 の pre-NH<sub>2</sub> 領域にある保存モチーフはウイルスゲノム複製に関与する。

ヒトヘルペスウイルス DNA ポリメラーゼの pre-NH<sub>2</sub> 領域に共通に保存されているアミノ酸モチーフ (Fig.1a) の EBV ゲノム複製における重要性を確認するために変異型 BALF5 発現ベクターを作製 (Fig.1b) し、HEK293 EBV-BAC BALF5 欠損細胞内でウイルスゲノム複製量を定量した。BALF5 の発現量に関して野生型と変異型で差異はみられなかったが、変異型でのみウイルスゲノム複製量が著しく抑制された (Fig.1c, d)。

##### 2. 特にアスパラギン残基が重要である。

保存モチーフのアミノ酸をそれぞれ Ala に置換した変異 BALF5 発現ベクターを作製 (Fig.1e) し、そのウイルスゲノム複製に与える影響を検討し Asn が重要なアミノ酸であると同定した (Fig.1f,g)。

##### 3. 保存モチーフの変異は *in vitro* ではポリメラーゼ活性に影響を与えない。

BALF5 の保存モチーフの変異がポリメラーゼ活性に直接影響しているかを *in vitro* polymerase assay で確認した。ウサギ網状赤血球ライセートを用いて *in vitro* で合成した BALF5 と BMRF1 タンパク質を合成した (Fig.2a,c)。*In vitro* で鋳型 DNA へのヌクレオチドの取り込み量を定量した結果、野生型と変異型のどちらもポリメラーゼ活性を保持していた (Fig.2b,d)。

##### 4. Replication compartment の形成は BALF5 6A 変異型の場合、阻害される。

*In vitro* でポリメラーゼ活性があるにも関わらず、BALF5 の pre-NH<sub>2</sub> 領域の保存モチーフに変異があると感染細胞内での複製が阻害されたことから、核内でのウイルス複製因子の局在を確認した。この結果、野生型では、BMRF1 による replication compartment の形成が確認され、宿主ゲノムが核膜周辺に偏倚したが、変異型ではどちらも確認されなかった (Fig.3)。

##### 5. BALF5 6A 変異型は EBV 複製タンパク質と相互作用する。

Flag-tag を付した BALF5 野生型・変異型を HEK293 EBV-BAC BALF5 欠損細胞へ導入し、DNase 処理を施した溶解感染誘導 36 時間後のライセートを用いて免疫沈降を行った。この結果、野生型・変異型の間で複製タンパク質との相互作用に顕著な差は見られなかった (Fig.4)。

## 【考察】

本研究では EBV BALF5 の保存モチーフ FYNPFL がウイルスゲノム複製に寄与し、さらにモチーフを構成する Asn が特に重要であることを明らかにした。この Asn は他のヒトヘルペスウイルスや動物ヘルペスウイルスの DNA ポリメラーゼでもモチーフ内の同じ位置に保存されている。

HSV-1 UL30 FYNPYL モチーフの変異で示されているデータと比べて、EBV BALF5 の保存モチーフの変異は著しくウイルスゲノム複製量を抑制した。この差の原因として、EBV と HSV-1 の溶解感染の誘導方法や、それぞれのウイルスの亜科の違いなどが考えられる。

ウイルスの複製タンパク質は複製起点 oriLyt に結合する BZLF1 の元へ集結し pre-replication 複合体を形成する。しかし、BZLF1 に関してこれまでに DNA 巻き戻し活性やヘリカーゼ活性が報告されておらず、また、どのようにして複製起点に集まった pre-replication 複合体が BZLF1 から切り離され DNA 伸長反応が起きるのかについても分かっていない。したがって、直接的な証拠はないものの、本研究で着目した保存モチーフはゲノム複製の開始に重要な役割を担っているのではないかと考えられる。

ヒトヘルペスウイルスのみならず動物ヘルペスウイルス DNA ポリメラーゼも pre-NH<sub>2</sub> 領域にモチーフを保存している。従って、未知因子が保存モチーフと相互作用しウイルスゲノム複製を増長するならば、この因子 X はヒト・動物もしくはウイルスのどちらかに共通して保存されているものであると考えられる。

## 【結論】

本研究は EBV の DNA ポリメラーゼの pre-NH<sub>2</sub> 領域にあるヘルペスウイルス特異的なアミノ酸モチーフがウイルスゲノム複製に重要な役割を果たしていること示し、さらに、ゲノム複製に最も寄与しているアミノ酸が Asn であると同定した。これらの発見は、ウイルスゲノム複製の分子メカニズムの解明や新規抗ヘルペスウイルス薬開発の手助けとなると考えられる。