

主論文の要旨

**The Epstein-Barr Virus BDLF4 Gene Is Required for
Efficient Expression of Viral Late Lytic Genes**

（ エプスタインバーウイルス遺伝子 BDLF4 は
ウイルス後期遺伝子の効率よい発現に必要である ）

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）

渡辺 崇広

【緒言】

Epstein-Barr ウイルス(以下、EBV)はガンマヘルペスウイルス亜科に属するヒト腫瘍ウイルスである。成人までに 9 割以上が感染し、初感染では伝染性単核症の原因となることがある。またバーキットリンパ腫、ホジキンリンパ腫、上咽頭癌、胃癌といったさまざまな悪性腫瘍と関連する。これら EBV 関連癌の多くは悪性度が高く、予後不良であることから医学上重要なウイルスである。EBV は潜伏感染と溶解感染の 2 つの感染様式を示し、潜伏感染から溶解感染が誘導されることを再活性化という。再活性化が起こると、最早期、早期、後期遺伝子の順にその関連遺伝子の発現が増加し、成熟したウイルス粒子が細胞外へ放出される。EBV 関連癌ではウイルス再活性化が検出される。溶解感染細胞では宿主細胞及びウイルス由来のサイトカインや増殖因子が放出され、癌の進展に寄与している。潜伏感染関連遺伝子については研究が集中的に展開されている一方、溶解感染関連遺伝子については未だ同定されていないもの、機能が明らかでないものも少なくない。本研究ではそのような遺伝子のひとつである BDLF4(BamHI-D fragment leftward open reading frame 4)に着目し、その同定および機能解析をおこなった。

【方法・結果】

まず BDLF4 抗体を作製し、TPA、酪酸などで溶解感染を誘導した EBV 陽性 B 細胞株 B95-8 細胞において約 20kDa の BDLF4 遺伝子産物を Western blotting 法で同定した(Fig1AB)。BDLF4 の kinetics を明らかにするために、培養上清に DNA 合成阻害薬 PAA を添加し、RT-PCR 法で遺伝子発現を解析した。PAA を添加しても発現に影響を及ぼさないことから、BDLF4 は早期遺伝子であることを明らかにした(Fig1C)。

大腸菌内遺伝子組み換えの手法を応用した BAC システムにより、一塩基除去によるフレームシフトのストラテジーで樹立した BDLF4 欠損ウイルスを作製した。作製した組み換えウイルスを HEK293 細胞に導入、安定細胞株を樹立した(Fig2AB)。溶解感染誘導遺伝子 BZLF1 を導入して溶解感染を誘導し、ウイルス蛋白発現への影響を Western blotting 法で検討した。ウイルス DNA 合成を検討するため、細胞内ウイルスゲノム量を Real time PCR 法で定量した。溶解感染誘導後 3 日目の培養上清を EBV 陰性 B 細胞株 Akata 細胞に感染させ、GFP 陽性率を FACS で解析することで感染性ウイルス粒子産生を検討した。欠損株において早期遺伝子 BMRF1、BALF2 の発現は影響を受けず、ウイルス DNA 合成も野生型と同程度であった(Fig3AC)。一方、後期遺伝子 BALF4(gB)、BRRF2 の発現が減少し、感染性ウイルス産生量は低下した(Fig3BC)。後期遺伝子 MCP、gp350、BALF4 の発現を RT-PCR 法で検討したところ、欠損株において有意に低下を認め(Fig3D)、BDLF4 発現ベクターを導入するとその発現は補完された(Fig4ABC)。さらに後期遺伝子発現制御に関わると思われる 5 つの因子 BGLF3、BcRF1、BGLF3、BVLF1、BDLF3.5 が BDLF4 と相互作用するかどうかを検討した。Myc-tag や HA-tag を付与したこれら遺伝子の発現ベクターを作製し、

Flag-BDLF4 発現ベクターと共に HEK293 細胞に導入し、免疫沈降法で検討した。BDLF4 はこれらの後期遺伝子制御因子と複合体を形成し、後期遺伝子の発現を制御していることが示唆された(Fig4D)。

【考察】

BDLF4 は溶解感染早期に発現する約 20kDa のタンパク質をコードしていることを同定した。BDLF4 は他の後期遺伝子制御因子と共同して、後期遺伝子の発現を制御していることが示唆された。BDLF4 はベータ及びガンマヘルペスウイルス亜科で保存されており、CMV UL92 と MHV-68 ORF31 は後期遺伝子発現制御に必須であるとの報告がなされた(Jia, J.Virol 2004, Omoto, J.Virol 2014)。今回の我々の結果では、BDLF4 は少なくとも培養細胞レベルでは必須でないということがわかった。

ベータおよびガンマヘルペスウイルスでは後期遺伝子発現制御機構が共通している。後期遺伝子のプロモーターに noncanonical TATA box TATT 配列が保存されており、この特異配列にウイルス由来の TATA Binding protein(TBP, BcRF1)が結合し、プロモーター活性を上昇させると考えられている(Serio, J.Virol 1998)。本研究により BDLF4 を含めた複数の後期遺伝子制御因子が TBP と共同して、後期遺伝子の転写活性を上昇させていることが示唆された。最近、TBP が宿主の RNA ポリメラーゼ II と複合体を形成し、後期遺伝子発現を増加させることが明らかにされ、宿主因子との関わりが注目されている(Wu, J.Virol 2009, Aubry, J.Virol 2014)。

【結論】

後期遺伝子制御複合体に関連した遺伝子をノックアウトした遺伝子改変ウイルスは弱毒生ワクチンへの応用が期待できると考えている。後期遺伝子発現制御のメカニズムを明らかにすることは、EBV 関連癌のみならず、KSHV、HCMV、HHV6/7 にも応用可能な抗ウイルス薬の開発に繋がる重要な課題である。今後、BDLF4 が他の後期遺伝子制御因子および宿主因子とどのように関わるか、さらに詳細な解析を進めたい。