

学 位 論 文 題 名

Epstein-Barr Virus transforming protein LMP1
plays a critical role in virus production

(EB ウイルストランスフォーム蛋白 LMP1の
ウイルス産生における役割に関する研究)

学位論文内容の要旨

EB ウイルス(Epstein-Barr virus)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。その感染は健康成人においては無症候性である一方で、バーキットリンパ腫、移植後 B リンパ腫、上咽頭癌、胃がんなど様々な疾患への関与が明らかにされている腫瘍ウイルスでもある。EB ウイルスは、試験管内でヒト末梢血 B リンパ球へ効率良く感染し、その後、潜伏感染状態となり、感染リンパ球はウイルス蛋白質の働きによりトランスフォームして不死化する。EB ウイルスが潜伏感染時に発現する膜蛋白質 LMP1(latent membrane protein 1)は、B リンパ球不死化に必須なウイルス蛋白質のひとつである。LMP1 は、感染細胞の細胞形質膜上において、恒常的に活性化した細胞増殖因子レセプター様の働きすることにより、感染リンパ球のトランスフォーメーション形質の維持に働く。

一方で、LMP1 蛋白質は、潜伏感染時のみならず、子ウイルス産生サイクルである溶解感染時にも強く発現誘導がかかることが以前より知られていた。例えば、EB ウイルス陽性 B95-8 細胞(EB ウイルス感染マーマセットリンパ球細胞株)において溶解感染を誘導すると、LMP1(全長 386 アミノ酸)の 129 番目のメチオニンから始まる ORF(open reading frame)にコードされる N 末端側欠損 LMP1 蛋白質 (258 アミノ酸) の強い発現誘導が起こる。一方で Akata 細胞 (ヒトバーキットリンパ腫由来 B 細胞株) 内の EB ウイルスの LMP1 遺伝子は、この 129 番目のメチオニンを欠き、溶解感染時には、潜伏感染時と同様の全長 LMP1 蛋白質が誘導発現する。しかしながら、こうした溶解感染時における LMP1 の誘導発現の生物学的意義は、従来全く不明であった。

そこで本研究は、EB ウイルスゲノムの LMP1 遺伝子に変異を導入した組換え EB ウイルスを産生し、その表現型を解析することで、LMP1 蛋白質の溶解感染産生時における機能を明らかにすることを目的とした。組換え EB ウイルスの作製方法として、われわれのグループが最近樹立した BAC(bacterial artificial chromosome)システムによる EB ウイルスゲノム改変法を採用した。すなわち Akata 細胞由来 EB ウイルスゲノム全長を含む BAC クローンに、GFP(green fluorescent protein)遺伝子を挿入したものを、出発材料として用いた。大腸菌内相同組換え法により、LMP1 蛋白質 ORF のコドン 9 番の下流にストップコドン挿入した。改変済みの BAC クローンを EB ウイルス陽性 Akata 細胞へ導入後、これを EB ウイルス陰性 Akata 細胞へ感染により移入すること

で、LMP1 ノックアウト EB ウイルス感染 Akata 細胞を樹立した。野生型 LMP1 遺伝子を持つ BAC クローンをもとに樹立した EB ウイルス感染 Akata 細胞を対照細胞として用いた。

これらの細胞を抗イムノグロブリン抗体処理して表面イムノグロブリン分子をクロスリンクすることにより溶解感染を誘導した。その結果、対照細胞では、LMP1 蛋白質の強い発現誘導が認められたが、LMP1 ノックアウト EB ウイルス感染細胞では、LMP1 の誘導発現が全く起こらなかった。一方、LMP1 の発現が認められないにもかかわらず、ウイルスゲノムのコピー数の増加、およびウイルスの後期遺伝子産物 (gp110、gp350) の発現は正常通りであることが判明した。さらに電子顕微鏡観察により、LMP1 の発現がなくても、細胞核内にはウイルス粒子の構成成分であるヌクレオキャプシドの産生が認められた。したがって、LMP1 蛋白質をノックアウトしても、ウイルスゲノムの増幅、ヌクレオキャプシドの形成、ウイルス後期遺伝子の発現など溶解感染に特徴的な事象はいずれも起こっていることが判明した。

続いて、溶解感染誘導後の細胞培養上清を用いた感染実験を行なった。すなわち LMP1 ノックアウト EB ウイルス感染細胞、および対照細胞を抗イムノグロブリン抗体処理した後の培養上清を用いて、EB ウイルス陰性 Akata 細胞への感染実験を行なった。上述のごとく GFP 遺伝子が挿入された EB ウイルスゲノムを実験に用いているため、GFP 陽性となった感染細胞の割合を FACS (fluorescence-activated cell sorting) により解析することで感染効率を定量化した。その結果、溶解感染移行に支障がないという上記実験結果とは対照的に、LMP1 ノックアウト EB ウイルス感染細胞の培養上清を用いた感染実験において、対照細胞のそれを用いた場合と比べて、有意に感染性が低下していることが明らかとなった。

そこで第一に、こうした培養上清の感染性の低下が実際に LMP1 遺伝子発現をノックアウトしたことに起因しているか否かを調べた。すなわち LMP1 ノックアウト EB ウイルス感染細胞に LMP1 蛋白質を恒常発現させることで感染性が回復するかを検証する相補実験を行った。相補実験には、B95-8 株において溶解感染時に誘導発現する N 末端側欠損 LMP1 遺伝子産物を用いた。N 末端側欠損 LMP1 蛋白質を、上記 LMP1 ノックアウト EB ウイルス感染細胞に恒常的に発現させたところ、細胞培養上清の感染性が対照のそれとほぼ同等のレベルまで回復することが明らかになった。したがって、LMP1 ノックアウト EB ウイルス感染細胞の培養上清が低い感染性を示したのは、実際に LMP1 をノックアウトしたことに起因することが証明された。

第二に、LMP1 のノックアウトにより培養上清中のウイルス粒子量に影響が出るか否かを、培養上清中のウイルス粒子を遠心・回収後、DNA を抽出してサザンブロット解析を行うことにより調べた。その結果、LMP1 ノックアウト EB ウイルス感染細胞の場合、溶解感染誘導後の培養上清中のウイルス粒子量が著明に減少していること、および N 末端側欠損 LMP1 蛋白質を恒常発現させた相補実験では、ウイルス粒子量が回復することを明らかにした。したがって LMP1 ノックアウトにより培養上清中に放出されるウイルス粒子量が減少し、培養上清の感染性が低下したと推定された。

さらに Akata 細胞で溶解感染時に発現する全長 LMP1 蛋白質を恒常発現させる相補実験も行なった。全長 LMP1 蛋白質の強発現は細胞増殖抑制効果を有するため、発現が弱い細胞クローンしか得られなかったものの、こうした全長 LMP1 発現クローンにおいても感染性が有意に回復することを確認した。

以上より、溶解感染時に誘導発現する LMP 蛋白質は、核内に産生したヌクレオキャプシドが、核膜、細胞質を経て、成熟したウイルス粒子として細胞外へ放出される過程で、重要な働きをしていることが初めて明らかになった。

何故に LMP1 蛋白質に対して、潜伏感染時の感染リンパ球トランスフォーメーション形質の維持、および溶解感染時のウイルス粒子の細胞外への放出という、2つの異なる重要な役割が与えられたのか、ウイルスの進化という点からも興味深い。今後、LMP1 がウイルス粒子の細胞外放出に関与する分子メカニズムを詳細に解析することが必要と考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 有 川 二 郎

副 査 教 授 長 嶋 和 郎

副 査 教 授 高 田 賢 蔵

学 位 論 文 題 名

Epstein-Barr Virus transforming protein LMP1 plays a critical role in virus production

(EB ウイルストランスフォーム蛋白 LMP1の
ウイルス産生における役割に関する研究)

EB ウイルスのコードする膜蛋白質 LMP1 (latent membrane protein 1) は、EB ウイルスによる感染 B リンパ球の不死化 (トランスフォーメーション) において、最も重要な働きをしているウイルス蛋白質である。申請者は、従来は潜伏感染遺伝子産物として分類されてきた LMP1 蛋白質が、ウイルス産生サイクルである溶解感染時にも強く発現誘導がかかることをまず説明し、本研究の目的が、溶解感染時における LMP1 蛋白質の機能の解析であることを説明した。ついで LMP1 ノックアウト EB ウイルスの作製方法として用いた BAC (bacterial artificial chromosome) システムについて簡潔に説明した後、LMP1 ノックアウトウイルスを保持した細胞株の樹立法、およびノックアウトウイルスの表現型の解析結果へと話を進めた。LMP1 ノックアウトウイルス感染細胞では、LMP1 の発現がないにもかかわらず、ウイルスゲノムのコピー数増加、後期蛋白質の発現、細胞核内におけるヌクレオキャプシドの形成など、溶解感染誘導時にみられる現象はすべて起こっていた。一方で、培養上清を用いた感染実験では、感染効率の著明な低下、および培養上清中のウイルス量の著明な減少を認めた。そこで LMP1 ノックアウトウイルス感染細胞において LMP1 蛋白質を恒常発現したところ、培養上清中のウイルス量と、感染効率が回復した。以上より、LMP1 蛋白質は、溶解感染時におけるウイルスの細胞核内から細胞外への放出過程を効率化する上で重要な役割を果たすと結論した。

質疑応答として、まず長嶋教授より、LMP1 ノックアウト EB ウイルス感染細胞において核内および細胞質内に存在するウイルス粒子の感染性の有無を調べたかという質問があった。それに対して申請者は、核内および細胞質のウイルス粒子を無傷の状態で回収することが困難であるため、それらの感染性の有無は現在のところ不明であると説明した。また LMP1 と相互作用する核膜蛋白質が知られているかとの質問に対しては、そのような蛋白質は知られていないとの回答であった。さらに長嶋教授は、本研究により同定されたような機能を LMP1 が発揮する際の細胞内作用部位、および考えられる分子メカニズムについて質問した。申請者は、ヘルペスウイルス粒子の

核から細胞外への放出過程のモデルを図示したスライドを示しつつ、電子顕微鏡観察により報告されている溶解感染時の LMP1 蛋白質の局在を説明し、核膜通過時、小胞体への取り込み、さらに細胞表面への小胞体輸送など様々なステップにおいて LMP1 が関与していることを説明した。

次に高田教授が、溶解感染時に LMP1 が機能を発揮するための最小機能ドメインについて質問した。これに対して申請者は、N 末端側欠損 LMP1 変異体が最小限必要である以上のデータはないことを説明した。さらに本研究で同定された LMP1 の機能の分子メカニズムを解明するためにはどのような実験が必要と考えられるかという質問に対して、申請者は、より詳細な LMP1 の変異体解析が重要であるとの見解を述べた。

最後に有川教授より、LMP1 蛋白質が、トランスフォーメーション形質の維持、および溶解感染時のウイルス粒子の細胞外放出という異なる二つの重要な機能を担っていることの進化的意味について質問があり、それに対して申請者は、進化的な意味を現時点で説明するのは困難であると述べた。さらにそれに関連する質問として、他のウイルスにおける LMP1 ホモログの有無について質問されたが、申請者は他のウイルスに LMP1 ホモログは同定されていないことを説明した。

本学位論文は、潜伏感染遺伝子産物である LMP1 蛋白質の溶解感染時における新しい機能を見出したものである。BAC システムを用いたノックアウトウイルスの作製、感染細胞株の樹立、その後の機能解析など、数多くの実験を着実にを行い、最終的に LMP1 の新しい機能を発見するに至った本研究は高く評価できる。溶解感染時に発現する LMP1 蛋白質がどのような分子メカニズムによりその機能を発揮するかという点については、今後の課題として残されているが、本研究で樹立したシステムはそのような研究においても多大な貢献をするものと考えられる。LMP1 の作用機序の分子メカニズムの解明を通じて、ウイルスと細胞の相互作用の新たな局面が明らかにされるものと期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院過程における研鑽や取得単位なども併せ、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。