

EBV 陽性がん維持に重要なウイルス遺伝子発現機構

愛知県がんセンター研究所

腫瘍ウイルス学部 部長 鶴見達也

要旨:

Epstein-Barr ウイルス (EBV) の重要なウイルス癌遺伝子である LMP1 は、II 型および III 型の潜伏感染において発現する膜タンパク質である。TNFR ファミリーメンバーである CD40 を模倣し、リガンド非依存的に、NF- κ B、MAPK、JAK/STAT 経路などと言った CD40 からの細胞内シグナル伝達を恒常的に活性化することで、宿主細胞の増殖、不死化、浸潤転移の促進、アポトーシスの抑制をもたらす。これまでに、III 型の潜伏感染で発現する EBNA2 によって LMP1 が転写制御されるという報告は多くなされているが、EBV 感染癌の多くは EBNA2 を発現していない。そこで、本研究では EBNA2 非依存的な LMP1 発現の分子機構を明らかにするために、新規転写因子の同定を試み、同定された因子の解析を行った。

2 万個以上のクローンを精査した結果、新規転写因子として C/EBP ϵ を同定した。まずレポーターアッセイを行い、C/EBP $\alpha,\beta,\gamma,\epsilon,\zeta$ のうち C/EBP α,β,ϵ が特に強力的に LMP1 プロモーターを活性化した。EBV 感染細胞に C/EBP α,β,ϵ を過剰発現させると、LMP1 タンパク質の発現量が増強した。また、LMP1 には近位(ED-L1)、遠位(TR-L1)の二つのプロモーターが存在するが、C/EBP は近位のプロモーター上の特定部位に結合し、近位と遠位の両プロモーターを活性化することがわかった。そこで、同定した C/EBP 結合部位に変異を加えた組換えウイルスを作製した。C/EBP 結合部位に変異を加えた組換えウイルスでは LMP1 の発現量が転写レベルでもタンパク質レベルでも減少した。さらに、内在性 C/EBP の LMP1 への効果について調べるために、shRNA を用いて C/EBP をノックダウンさせると、LMP1 タンパク質の発現量が減少することが分かった。

以上の結果から、EBNA2 非依存的な LMP1 発現には C/EBP が関与しており、C/EBP が近位のプロモーター上の1ヶ所に結合することで近位と遠位の双方のプロモーターを活性化しているということを明らかにした。

【背景】

Epstein-Barr ウイルス (EBV) は、最初に発見されたヒト癌ウイルスであり、 γ ヘルペスウイルス亜科に分類され、長さ約 172kb の二本鎖 DNA をゲノムとして持つ。EBV には、潜伏感染とウイルス産生感染の2つの生活様式がある。EBV 陽性がんは潜伏感染状態にあり、ウイルス遺伝子の発現パターンにより、3つのタイプに分けられる。その中でも、上咽頭癌を含む、多くの EBV 関連癌の発がんにおける重要なウイルス癌

遺伝子である LMP1 は、II 型および III 型の潜伏感染に発現する。LMP1 は、CD40 を模倣し、リガンド非依存的に、NF- κ B、c-Jun N-terminal protein kinase/AP1、Janus kinase/STAT 経路などと言った CD40 からの細胞内シグナル伝達を恒常的に活性化する。これらのシグナル経路を通して、宿主細胞の増殖、不死化、浸潤転移の促進、アポトーシスの抑制をもたらす(図 1)。LMP1 の転写には、二つの転写開始点が存在し、それぞれ近位(ED-L1)または遠位(TR-L1)のプロモーターが関与する。ED-L1 は、主に B リンパ球細胞で用いられるプロモーターであり、EBNA2 依存的に RBP-J κ 、PU.1、POU-box、AP2 および NF- κ B を介して転写を活性化することが知られているが、STAT や IRF7、ATF4 のような転写因子は EBNA2 非依存的に活性化する。一方、TR-L1 は主に上咽頭癌細胞(NPC)で用いられる TATA-less プロモーターである。TR-L1 プロモーターの制御に関する報告は少なく、不明な点が多いが、細胞内因子である STAT や Sp1、XBP-1 によって EBNA2 非依存的に活性化されることが知られている。

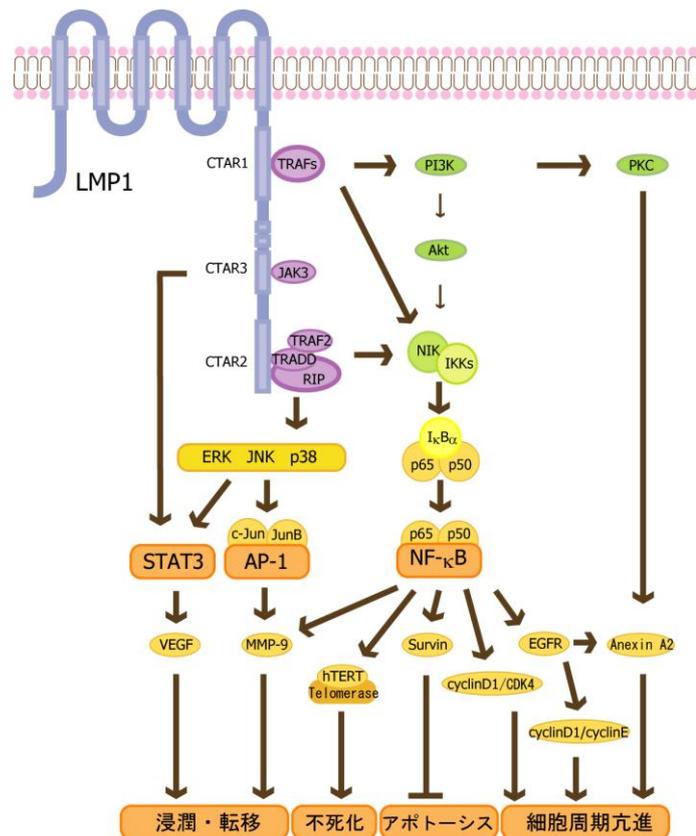


図 1 .LMP1 によるシグナル伝達

これまで、EBNA2 による LMP1 の転写制御について多くの報告がなされているが、EBV 感染癌の多くは EBNA2 を発現していない。そこで、本研究では EBNA2 非依存的な LMP1 発現の分子機構を詳細に明らかにすることを目的とし、新規転写因子の同定を試み、同定された因子の解析を行った。

【実験材料および実験方法】

本研究では LMP1 転写を制御する宿主因子を網羅的に同定するために、cDNA 発現ライブラリーを用いたスクリーニングを遂行し、LMP1 プロモーターを活性化する宿主因子の探索を行った。スクリーニングには、骨髄由来の cDNA 発現ベクターライブラリー、細胞は HEK293T 細胞を用いた。レポーターとして LMP1 プロモーターを Firefly luciferase 遺伝子の上流に配したプラスミド、コントロールとして CMV プロモーターで Renilla luciferase 遺伝子の発現をドライブするプラスミド (pCMV-RL) を使用した。C/EBP ファミリーが LMP1 タンパク質発現に及ぼす影響についてはウェスタン・ブロットによって検討した。また転写に及ぼす影響については RT-PCR によって確認した。LMP1 プロモーター上における C/EBPa の結合領域は、レポーターアッセイを用いて特定した。

【結果・考察】

これまでに 2 万個以上のクローンを精査し、15 のヒットを得た。これらから偽陽性をのぞくとほとんどは転写因子であった。ヒットの中には、LMP1 プロモーターを制御することが知られている Pu.1 など Ets ファミリー転写因子も重複して得られてきたことから、この系の信頼性の高さも確認できた。ヒットの中に転写因子 C/EBPe の cDNA 全長がコードされているものがあり、LMP1 を制御する因子としては新規であったため、C/EBP ファミリーについて解析を開始した。

まずレポーターアッセイを行い、C/EBPa,b,g,e,z のうち C/EBPa が特に LMP1 プロモーターを活性化することを明らかにした。C/EBPa を過剰発現すると、II 型、III 型いずれの EBV 感染細胞株でも LMP1 の発現が増強した。次に LMP1 プロモーターを段階的に欠損させた欠損レポータープラスミドおよび部分的に変異を加えた変異レポータープラスミドを用いたレポーターアッセイにより、LMP1/ED-L1 プロモーター上における C/EBPa の結合領域 () を特定した。

LMP1 の近位(ED-L1)、遠位(TR-L1)の 2 つのプロモーターの内、C/EBPa による転写活性化は TR-L1 プロモーターからより強く誘導されることが分かった。そこで、LMP1/TR-L1 プロモーター上における C/EBPa の結合領域を特定するために、TR-L1 プロモーター領域を含むプラスミドを用いて、レポーターアッセイを行ったが、C/EBPa の過剰発現による TR-L1 プロモーター活性が全く見られなかった。TR-L1 プロモーター領域と更に ED-L1 プロモーター上の C/EBPa 結合領域までを含むレポータープラスミドおよびこのプラスミドの C/EBPa 結合領域に変異を加えたレポータープラスミドを構築し、再度レポーターアッセイを行った。前者では C/EBPa の過剰発現による TR-L1 プロモーター活性の促進が観られたが、後者ではプロモーター活性の促進が観られなかった。以上から、C/EBPa は LMP1/ED-L1 プロモーター上の C/EBPa 結合領域に直接結合することで、結合領域より更に上流にある LMP1/TR-L1 プロモーターを活性化させ、LMP1 の発現を増強させることが示唆された(図 2)。

C/EBP 結合部位に変異を加えた組換えウイルスでは LMP1 の発現量が転写レベルでもタンパク質レベルでも減少した。さらに、内在性 C/EBP の LMP1 への効果について調べるために、shRNA を用いて C/EBP をノックダウンさせると、LMP1 タンパク質の発現量が減少することが分かった。

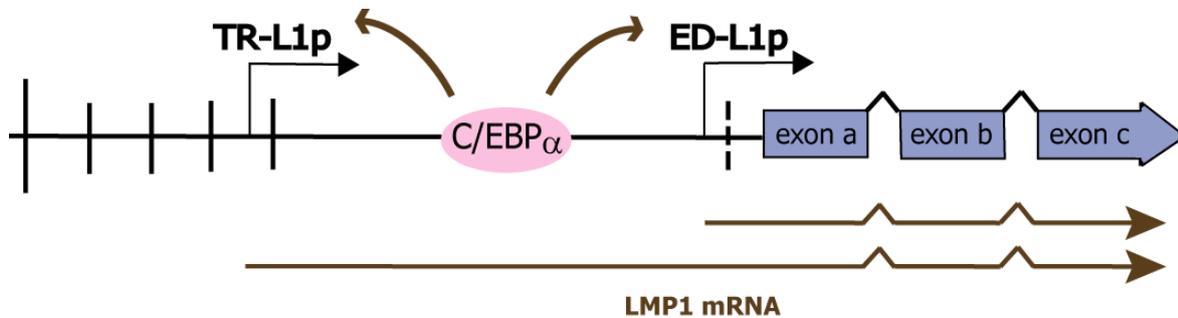


図2 LMP1 転写プロモーターは ED-L1p と TR-L1p が存在し、C/EBP は LMP1 の近位(ED-L1)プロモーター上の一か所のモチーフに結合し、近位(ED-L1)と遠位(TR-L1) 双方のプロモーターを活性化している。

【文献】

- 1) Noda C, Murata T, Kanda T, Yoshiyama H, Sugimoto A, Kawashima D, Saito S, Isomura H, Tsurumi T. 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. 286:42524-42533. 2011