

# 網羅的プロテオーム解析で解く EB ウイルス発癌の分子機構

名古屋大学大学院

医学系研究科ウイルス学 助教 渡辺 崇広

## 1. 研究の背景・目的

ヘルペスウイルス科に属する Epstein-Barr virus (EBV) は、成人の 90% が既感染である。EBV はさまざまな免疫機構から逃れながら感染を終生維持することができる。しかし、Methotrexate をはじめとする免疫抑制剤の投与を背景にウイルスが活動を再開し、免疫不全関連リンパ増殖性疾患 (MTX-LPD, PTLD など) を引き起こすことがある。

生体内のタンパク質は、その多くが他の生体分子と相互作用することにより機能を発揮する。EBV は約 80 の遺伝子を持ち、合成されたウイルス由来のタンパク質は組織的に複合体を形成し、さまざまな生物学的プロセスを制御する。これまでタンパク質間相互作用の解析は、Pull-down assay や共免疫沈降法のような *in vitro* における解析を中心に進められており、生理的条件下での解析は限定されていた<sup>1,2)</sup>。そのため、ウイルス感染細胞内で起こりうるタンパク質間相互作用の全貌は未だ明らかでない。

近年、深海エビ由来の分子量の小さいルシフェラーゼ NanoLuc (19kDa) の特性を生かした新しい相互作用の検出法 NanoBiT システムが開発された<sup>3)</sup>。NanoBiT システムでは、タンパク質を可溶化させる必要がなく、生細胞のまま相互作用を検出できる。本研究では、NanoBiT システムを用いてタンパク質間相互作用を網羅的に検出し、タンパク質間相互作用ネットワークを構築した。さらに、計算科学的手法によりハブタンパク質を検出し、そのタンパク質の生理学的意義について分子生物学的手法を用いて検証した。

## 2. 研究の対象ならびに方法

NanoBiT システムを用いて、ウイルスタンパク質同士の 5,041 組の組み合わせでスクリーニングを実施した。検出された輝度値から相互作用の候補を検出し、ソフトウェア Cytoscape を用いてタンパク質間相互作用ネットワークを構築した。媒介中心性や次数中心性の算出といった計算科学的手法により、ハブタンパク質の候補となりうる遺伝子を同定した。

### 3. 研究結果

#### (1) ハブタンパク質の候補を同定

スクリーニングにより 403 組の相互作用を検出し、EBV タンパク質間相互作用ネットワークを構築した。中心性解析から BLRF2 や BKRF4 といったガンマヘルペスウイルス独自に保存された遺伝子が、ハブタンパク質の候補として算出された。

#### (2) ハブタンパク質はウイルスの増殖に重要であることを証明

同定されたハブタンパク質の一つ BLRF2 に注目し、CRISPR/Cas9 システムを用いて当該遺伝子に変異を導入し、ノックアウトウイルスを作製した。作製したノックアウトウイルスは、ウイルスの増殖が著しく低下した。

### 4. 考察

本研究では、生細胞に近い条件でタンパク質間相互作用を検出可能なアッセイ系を利用し、EBV タンパク質間相互作用を網羅的に検出した。ネットワーク解析および中心性解析により導き出されたハブタンパク質は、ウイルス増殖に影響を及ぼすことが明らかとなった。本研究成果はウイルスタンパク質間相互作用の全容を見出す新知見であり、革新的な分子標的の開発に繋がる可能性を示唆している。

### 5. 文献

- 1) Even Fossum, Caroline C. Friedel, Seesandra V. Rajagopala, Björn Titz, Armin Baiker, Tina Schmidt, Theo Kraus, Thorsten Stellberger, Christiane Rutenberg, Silpa Suthram, Sourav Bandyopadhyay, Dietlind Rose, Albrecht von Brunn, Mareike Uhlmann, Christine Zeretzke, Yu-An Dong, Hélène Boulet, Manfred Koegl, Susanne M. Bailer, Ulrich Koszinowski, Trey Ideker, Peter Uetz, Ralf Zimmer, Jürgen Haas: Evolutionarily conserved herpesviral protein interaction networks. PLoS Pathog, 5(9):e1000570, 2009
- 2) Michael A. Calderwood, Kavitha Venkatesan, Li Xing, Michael R. Chase, Alexei Vazquez, Amy M. Holthaus, Alexandra E. Ewence, Ning Li, Tomoko Hirozane-Kishikawa, David E. Hill, Marc Vidal, Elliott Kieff, and Eric Johannsen: Epstein-Barr virus and virus human protein interaction maps. PNAS, 104(18):7606-7611, 2007

3) Mary P. Hall, James Unch, Brock F. Binkowski, Michael P. Valley, Braeden L. Butler, Monika G. Wood, Paul Otto, Kristopher Zimmerman, Gediminas Vidugiris, Thomas Machleidt, Matthew B. Robers, H el ene A. Benink, Christopher T. Eggers, Michael R. Slater, Poncho L. Meisenheimer, Dieter H. Klaubert, Frank Fan, Lance P. Encell, Keith V. Wood: Engineered luciferase reporter from a deep sea shrimp utilizing a novel imidazopyrazinone substrate. *ACS Chem Biol*, 7(11):1848-1857, 2012

## 6. 論文発表

### 1) 学会発表

(1) Epstein-Barr ウイルスのタンパク質間相互作用の網羅的解析, 渡辺 崇広<sup>1</sup>, 村田 貴之<sup>1,2</sup>, 吉田 全宏<sup>1</sup>, 原 優矢<sup>1</sup>, MASUD H. M. Abdullah Al<sup>1</sup>, 柳 裕介<sup>1</sup>, 五島 典<sup>1</sup>, 佐藤 好隆<sup>1</sup>, 木村 宏<sup>1</sup> (1. 名古屋大学大学院医学系研究科ウイルス学, 2. 藤田医科大学医学部ウイルス・寄生虫学), 第 33 回 ヘルペスウイルス研究会, 那覇, 2019 年 6 月 20-22 日

### 2) 論文発表

(1) Yusuke Yanagi, H. M. bdullah Al Masud, Takahiro Watanabe, Yoshitaka Sato, Fumi Goshima, Hiroshi Kimura and Takayuki Murata: Initial Characterization of the Epstein-Barr Virus BSRF1 Gene Product. *Viruses*, 21;11(3), 2019

(2) H. M. Abdullah H. M. bdullah Al Masud, Takahiro Watanabe, Yoshitaka Sato, Fumi Goshim, Hiroshi Kimura, Takayuki, Murata: The BOLF1 gene is necessary for effective Epstein-Barr viral infectivity. *Virology*, 23;531:114-125, 2019

(3) Takahiro Watanabe, Yoshitaka Sato, H.M. Abdullah Al Masud, Masahiro Takayama, Hiroki Matsuda, Yuya Hara, Yusuke Yanagi, Masahiro Yoshida, Fumi Goshima, Takayuki Murata, Hiroshi Kimura: Antitumor activity of CDK inhibitor alsterpaullone in Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorders. *Cancer Sci*, 111(1):279-287, 2020