

	わたなべ あきこ
氏 名	渡 部 明 子
学 位	博 士 (医学)
学 位 記 番 号	新大院博(医)第169号
学位授与の日付	平成19年 3月22日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
博 士 論 文 名	A novel KRAB-Zinc finger protein interacts with latency-associated nuclear antigen of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus and activates transcription via terminal repeat sequences (新規 KRAB-Zinc finger 蛋白はカポジ肉腫関連ヘルペスウイル スの潜伏関連核抗原と相互作用し、反復配列を介し転写を活性 化する)
論文審査委員	主査 教授 木 南 凌 副査 教授 藤 井 雅 寛 副査 教授 五十嵐 道 弘

博士論文の要旨

(序論・緒言) カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス (KSHV/HHV-8: Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus/ human herpesvirus 8) は、カポジ肉腫の原因ウイルスとして 1996 年に分離同定された 8 番目のヒトヘルペスウイルスで、カポジ肉腫の他、PEL や MCD といった B 細胞増殖性疾患との関連が示唆されている。他のヘルペスウイルスと同様に、2 本鎖の環状 DNA として宿主内で持続的に潜伏感染するが、悪性腫瘍にもつながるこの潜伏感染機構には依然不明な点が数多く残されている。KSHV の潜伏感染核抗原 (LANA: latency associated nuclear antigen) はその潜伏時に発現する数少ないウイルス蛋白の 1 つであり、1) ウイルスゲノム末端の反復配列 (TR: terminal repeat sequences) に結合し、ゲノムの複製・維持に機能するほか、2) 様々な宿主因子と相互作用することで、ウイルスの潜伏感染維持に寄与する。しかし、KSHV の潜伏感染維持に必須な LANA 蛋白の機能は未だ完全には理解されていない。そこで申請者らは、新たに LANA と相互作用する宿主因子-新規ヒト蛋白 KZLP (KRAB-Zinc finger LANA interacting Protein) を同定し、潜伏感染における機能について解析を行った。本論文では、この解析を通して明らかにした内容を報告する。

(方法・結果) LANA をベイトとした酵母ツーハイブリッドスクリーニングにより、N 末を欠失した新規蛋白 KZLP (以下 ΔN) を分離・同定した。シーケンス解析およびデータベース解析の結果、推定される全長の KZLP は KRAB A/B box および 12 個の Zinc finger ドメインを有する蛋白であることが判明した。この KRAB-Zn finger 蛋白群は四足動物以降の高等生物に存在し、ヒトにおいてはこれまでに 400 種以上もの関連遺伝子が同定されている。しかし転写因子として機能すること以外、生体内機能に関する報告はほとんどなされていない。この KZLP と LANA を

一過性にヒト腎臓由来の細胞株 293T に共発現させ、免疫沈降を行った結果、ヒト細胞内においても両者は強く結合することが確認された。また、 ΔN と LANA との結合活性は全長のそれに比べ弱いことから、Zn finger 部位における LANA との結合は、KRAB ドメインを含む N 末によって補強されることが示唆された。さらに同様の条件で免疫染色を行い、それぞれの細胞内局在について調べた結果、全長の KZLP は主に核膜近傍に局在するのに対し、KRAB ドメインを欠失した ΔN は核内に一様にあるいはドット状に局在することが明らかになった。一方、LANA と共発現させた場合、 ΔN および全長の KZLP はいずれも LANA 単独で発現させた場合ときわめて類似した細胞内局在へとパターンを変え、LANA と共局在することが確認された。

ウイルスゲノム末端の反復配列 TR は KSHV の再活性化初期に発現する K1 遺伝子上流に 20-40 コピー存在する。293T 細胞におけるルシフェラーゼアッセイの結果、KZLP はこの K1 遺伝子プロモーターからの転写を TR コピー数依存的に活性化することが明らかになった。一方、 ΔN にはこうした活性は見られないことから、KRAB ドメインを含む N 末がこの転写活性化に強く関与することが示唆された。さらに LANA についても同様の実験を行ったところ、LANA は TR コピー数依存的に逆に転写を抑制するという KZLP とは全く対照的な機能を有するとともに、KZLP による転写活性化を完全に解除することが明らかとなった。

(考察・発展性) K1 タンパクは KSHV 再活性化初期に発現し、再活性化に関わる他の KSHV 遺伝子の発現および腫瘍形成に関与することが報告されている。本研究の成果は、(1) これまで不明であった K1 タンパク発現の制御機構にも LANA タンパクが直接関与する可能性、および (2) その制御は新規ヒト蛋白 KZLP との相互作用により、複製開始点としても機能する反復配列 TR のコピー数依存的に行われるという全く新しい発想を提供するものである。LANA は KZLP の Zn finger 部位に結合することから、現在、ヒト細胞において 400 種以上存在する他の KRAB-Zn finger タンパクについても、LANA との相互作用ならびに KSHV 潜伏感染維持に対するさまざまな機能への関与について解析を行っている。

(論文審査の要旨)

カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス (KSHV) はヒト細胞に持続潜伏感染し、悪性腫瘍の発症の起因となる。LANA はその潜伏に必須のウイルス蛋白であり、ウイルスゲノム末端の反復配列・TR に結合するほか、様々な宿主因子と相互作用することで潜伏感染維持に寄与すると考えられている。申請者は、LANA をベイトとする酵母ツーハイブリッド・スクリーニング法により LANA 蛋白に結合する新規 KZLP を分離し、この KZLP の詳細な解析により以下のような結果を報告している。KZLP は KRAB A/B box および 12 個の Zinc finger ドメインを有する KRAB-Zn finger 蛋白であり、KSHV 感染細胞を含む調査したすべてのヒト細胞株に発現していた。ウイルスゲノム末端の TR 反復配列は 20-40 コピー有り、KSHV 再活性化の初期に発現する K1 遺伝子上流に存在する。KZLP はこの K1 プロモーターからの転写を TR コピー数および KRAB ドメイン依存的に活性化した。一方、LANA は TR コピー数依存的に K1 プロモーターからの転写を抑制すると共に、KZLP による転写活性化を完全に解除した。

本研究の成果は (1) K1 ウイルス蛋白の発現制御にも LANA が直接関与する可能性、(2) その制御は KZLP との相互作用により、TR コピー数依存的に行われるという知見、を示したところにある。腫瘍形成能を有する K1 蛋白の発現制御機構はこれまでのところ不明であったが、上記のような新知見を提供した点に博士論文としての価値を認める。