

In another report [19], vitamin D (1,25-dihydroxyvitamin D₃) receptor (VDR) (NM_01466), caspase 3 (NM_004346), activating transcription factor 6 (ATF6) (NM_005171) and presenilin 1 (Alzheimer disease 3) (PSEN1) (NM_007319) were expressed in the PEL cells more highly than in pre-B cells, GC B cells mostly including BL cell lines, and post-GC B cells. Our results, however, do not necessarily prove that the expression of these four genes expression was the higher in the PEL cells; i.e., VDR and caspase 3 were indeed expressed more highly in the PEL cells but ATF6 was expressed at lower levels and PSEN1 were equivalent (Fig. 3A).

Another report [29] has shown that the expression of angiopoietin 2 (*ang-2*) (NM_001147), chemokine (C-C motif) ligand 5 (CCL5) (NM_002985), chemokine (C-C motif) receptor 5 (CCR5) (NM_000579) and so on were up-regulated in the Kaposi's sarcoma (KS) [4], but such genes were not characteristically expressed in the KSHV-infected PEL cell lines in our analysis (data not shown), suggesting that the difference in cell origin affected the gene expression profile, even though both KS and PEL were usually infected with KSHV.

3.3. Angiopoietin 1 (*Ang-1*) (NM_001146) is expressed more highly in the PEL cell lines

Ang-1, which is an angiogenic secretory protein and has about 60% amino acid sequence similarity to Ang-2 (NM_001147) [18,30,31], appeared to be expressed more highly in the PEL cell lines than in the TCL or BL cell lines (Figs. 2A and 3B). The level of Ang-2 expression in the PEL cell lines was almost the same as in the normal PBMCs (Fig. 3B). Ang-1 shares a receptor, Tie2 (also called Tek1) (NM_005424) with Ang-2 [30,32]. Ang-1 acts as a paracrine agonist inducing Tie-2 phosphorylation and subsequent vessel stabilization. On the other hand, Ang-2 acts as an autocrine antagonist of Ang-1-mediated Tie-2 activation [33]. The outcome via the ligand-receptor mediated signaling is different, the reason for which remains unclear. It is still unclear how each factor signals to target cells. It has been reported that Ang-2 was expressed well in the KS, in which KSHV-mediated activation of AP-1 and Ets-1 responsive elements seemed to have the functional roles [29,34]. Another report showed that Tie1 as well as Tie2, and angiopoietins 1, 2, and 4 were expressed highly in the KS lesions [35]. Furthermore, it has been reported that KSHV reprogrammed the gene expression profile of blood vascular endothelial cells upon infecting them [29,36,37]. Thus, *ang-1* could be more favorable for expression in the PEL cell environment, though there has been no report investigating their expression in PELs. We confirmed that *ang-1* was surely expressed at higher levels in the PEL cell lines than in the T-cell lymphoma or BL cell lines by RT-PCR (Fig. 3C). On the other hand, expression of the receptor, Tie2 expression was higher rather in the BL cell lines (Fig. 3B), suggesting that an autocrine mechanism should not be effective for PEL cells as noted for the role of Ang-2 [33], even if Ang-1 may function as a real positive growth factor for endothelial cells.

3.4. Genes expressed either lower or higher in the all tumor cell lines except normal PBMC

We mined our data to find genes expressed either at lower or higher levels in all the tumor cell lines examined in this analysis, since genes expressed in common in various kinds of cell lines might reflect general tumor or immortalized phenotype. We found that there were many repressed genes (data not shown) and a limited number of activated genes compared with normal PBMCs (data not shown). The information was indeed informative in terms of characteristic features of these kinds of blood cell cancers, but we are currently unable to specify the function of these genes

or the meanings of each gene to form tumor phenotype and further investigation will be needed to answer these questions.

In conclusion, three types of cell lines showed distinct gene expression profiles. The function and significance of higher or lower expressing genes in typical cell lines should be clarified to understand mechanism of cancer formation and effect of viral infection.

References

- [1] Y. Chang, E. Cesarman, M.S. Pessin, F. Lee, J. Culpepper, D.M. Knowles, P.S. Moore, Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma, *Science* 266 (1994) 1865–1869.
- [2] C. Boshoff, R.A. Weiss, Epidemiology and pathogenesis of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 356 (2001) 517–534.
- [3] E. Cesarman, Y. Chang, P.S. Moore, J.W. Said, D.M. Knowles, Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-related body-cavity-based lymphomas, *N. Engl. J. Med.* 332 (1995) 1186–1191.
- [4] J. Soulier, L. Grollet, E. Oksenhendler, P. Cacoub, D. Cazals-Hatem, P. Babinet, M.F. d'Agay, J.P. Clauvel, M. Raphael, L. Degos, et al., Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like DNA sequences in multicentric Castlemans disease, *Blood* 86 (1995) 1276–1280.
- [5] E. Cesarman, D.M. Knowles, The role of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV/HHV-8) in lymphoproliferative diseases, *Semin. Cancer Biol.* 9 (1999) 165–174.
- [6] D. Shibata, L.M. Weiss, Epstein-Barr virus-associated gastric adenocarcinoma, *Am. J. Pathol.* 140 (1992) 769–774.
- [7] E.D. Kieff, A.B. Rickinson, Epstein-Barr Virus and its Replication, Lippincott Williams and Wilkins, a Wolters Kluwer Business, Philadelphia, 2007.
- [8] R.G. Jenner, C. Boshoff, The molecular pathology of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus, *Biochim. Biophys. Acta* 1602 (2002) 1–22.
- [9] J. Yuan, E. Cahir-McFarland, B. Zhao, E. Kieff, Virus and cell RNAs expressed during Epstein-Barr virus replication, *J. Virol.* 80 (2006) 2548–2565.
- [10] H. Katano, Y. Hoshino, Y. Morishita, T. Nakamura, H. Satoh, A. Iwamoto, B. Herndier, S. Mori, Establishing and characterizing a CD30-positive cell line harboring HHV-8 from a primary effusion lymphoma, *J. Med. Virol.* 58 (1999) 394–401.
- [11] R. Renne, W. Zhong, B. Herndier, M. McGrath, N. Abbey, D. Kedes, D. Ganem, Lytic growth of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) in culture, *Nat. Med.* 2 (1996) 342–346.
- [12] K. Nishimura, K. Ueda, S. Sakakibara, K. Ishikawa, J. Chen, T. Okuno, K. Yamanishi, Functional analysis of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus RTA in an RTA-depressed cell line, *J. Hum. Virol.* 4 (2001) 296–305.
- [13] L. Arvanitakis, E.A. Mesri, R.G. Nador, J.W. Said, A.S. Asch, D.M. Knowles, E. Cesarman, Establishment and characterization of a primary effusion (body cavity-based) lymphoma cell line (BC-3) harboring Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV/HHV-8) in the absence of Epstein-Barr virus, *Blood* 88 (1996) 2648–2654.
- [14] E. Cesarman, P.S. Moore, P.H. Rao, G. Inghirami, D.M. Knowles, Y. Chang, In vitro establishment and characterization of two acquired immunodeficiency syndrome-related lymphoma cell lines (BC-1 and BC-2) containing Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like (KSHV) DNA sequences, *Blood* 86 (1995) 2708–2714.
- [15] K. Takada, K. Horinouchi, Y. Ono, T. Aya, T. Osato, M. Takahashi, S. Hayasaka, An Epstein-Barr virus-producer line Akata: establishment of the cell line and analysis of viral DNA, *Virus Genes* 5 (1991) 147–156.
- [16] G.W. Bornkamm, J. Hudewentz, U.K. Freese, U. Zimmer, Deletion of the nontransforming Epstein-Barr virus strain P3HR-1 causes fusion of the large internal repeat to the DSL region, *J. Virol.* 43 (1982) 952–968.
- [17] G. Hatfull, A.T. Bankier, B.G. Barrell, P.J. Farrell, Sequence analysis of Raji Epstein-Barr virus DNA, *Virology* 164 (1988) 334–340.
- [18] C. Suri, P.F. Jones, S. Patan, S. Bartunkova, P.C. Maisonnier, S. Davis, T.N. Sato, G.D. Yancopoulos, Requirement for angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis, *Cell* 87 (1996) 1171–1180.
- [19] R.G. Jenner, K. Maillard, N. Cattini, R.A. Weiss, C. Boshoff, R. Wooster, P. Kellam, Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-infected primary effusion lymphoma has a plasma cell gene expression profile, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100 (2003) 10399–10404.
- [20] C. Boshoff, S.J. Gao, L.E. Healy, S. Matthews, A.J. Thomas, L. Coignet, R.A. Warnke, J.A. Strauchen, E. Matutes, O.W. Kamel, P.S. Moore, R.A. Weiss, Y. Chang, Establishing a KSHV+ cell line (BCP-1) from peripheral blood and characterizing its growth in Nod/SCID mice, *Blood* 91 (1998) 1671–1679.
- [21] A. Carbone, A.M. Cilia, A. Ghoghini, D. Capello, M. Todesco, S. Quattrone, R. Volpe, G. Gaidano, Establishment and characterization of EBV-positive and EBV-negative primary effusion lymphoma cell lines harbouring human herpesvirus type-8, *Br. J. Haematol.* 102 (1998) 1081–1089.
- [22] G. Gaidano, D. Capello, A.M. Cilia, A. Ghoghini, T. Perin, S. Quattrone, A. Migliazza, F. Lo Coco, G. Saglio, V. Ascoli, A. Carbone, Genetic characterization of HHV-8/KSHV-positive primary effusion lymphoma reveals frequent mutations of BCL6: implications for disease pathogenesis and histogenesis, *Genes Chromosomes Cancer* 24 (1999) 16–23.

- [23] J.W. Said, T. Tasaka, S. Takeuchi, H. Asou, S. de Vos, E. Cesarman, D.M. Knowles, H.P. Koeffler, Primary effusion lymphoma in women: report of two cases of Kaposi's sarcoma herpes virus-associated effusion-based lymphoma in human immunodeficiency virus-negative women, *Blood* 88 (1996) 3124–3128.
- [24] R. Sarid, O. Flore, R.A. Bohenzky, Y. Chang, P.S. Moore, Transcription mapping of the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) genome in a body cavity-based lymphoma cell line (BC-1), *J. Virol.* 72 (1998) 1005–1012.
- [25] R.G. Jenner, M.M. Alba, C. Boshoff, P. Kellam, Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latent and lytic gene expression as revealed by DNA arrays, *J. Virol.* 75 (2001) 891–902.
- [26] M. Paulose-Murphy, N.K. Ha, C. Xiang, Y. Chen, L. Gillim, R. Yarchoan, P. Meltzer, M. Bittner, J. Trent, S. Zeichner, Transcription program of human herpesvirus 8 (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus), *J. Virol.* 75 (2001) 4843–4853.
- [27] R. Hamoudi, T.C. Diss, E. Oksenhendler, L. Pan, A. Carbone, V. Ascoli, C. Boshoff, P. Isaacson, M.Q. Du, Distinct cellular origins of primary effusion lymphoma with and without EBV infection, *Leuk. Res.* 28 (2004) 333–338.
- [28] A. Matolcsy, R.G. Nador, E. Cesarman, D.M. Knowles, Immunoglobulin VH gene mutational analysis suggests that primary effusion lymphomas derive from different stages of B cell maturation, *Am. J. Pathol.* 153 (1998) 1609–1614.
- [29] Y.F. Wang, Y.F. Hsieh, C.L. Lin, J.L. Lin, C.Y. Chen, Y.H. Chiou, M.C. Chou, Staurosporine-induced G2/M arrest in primary effusion lymphoma BCBL-1 cells, *Ann. Hematol.* 83 (2004) 739–744.
- [30] L. Eklund, B.R. Olsen, Tie receptors and their angiopoietin ligands are context-dependent regulators of vascular remodeling, *Exp. Cell Res.* 312 (2006) 630–641.
- [31] S. Davis, T.H. Aldrich, P.F. Jones, A. Acheson, D.L. Compton, V. Jain, T.E. Ryan, J. Bruno, C. Radziejewski, P.C. Maisonpierre, G.D. Yancopoulos, Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning, *Cell* 87 (1996) 1161–1169.
- [32] K.T. Kim, H.H. Choi, M.O. Steinmetz, B. Maco, R.A. Kammerer, S.Y. Ahn, H.Z. Kim, G.M. Lee, G.Y. Koh, Oligomerization and multimerization are critical for angiopoietin-1 to bind and phosphorylate Tie2, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 20126–20131.
- [33] M. Thomas, H.G. Augustin, The role of the angiopoietins in vascular morphogenesis, *Angiogenesis* 12 (2009) 125–137.
- [34] F.C. Ye, D.J. Blackbourn, M. Mengel, J.P. Xie, L.W. Qian, W. Greene, I.T. Yeh, D. Graham, S.J. Gao, Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus promotes angiogenesis by inducing angiopoietin-2 expression via AP-1 and Ets1, *J. Virol.* 81 (2007) 3980–3991.
- [35] L.F. Brown, B.J. Dezube, K. Tognazzi, H.F. Dvorak, G.D. Yancopoulos, Expression of Tie1, Tie2, and angiopoietins 1, 2, and 4 in Kaposi's sarcoma and cutaneous angiosarcoma, *Am. J. Pathol.* 156 (2000) 2179–2183.
- [36] Y.K. Hong, K. Foreman, J.W. Shin, S. Hirakawa, C.L. Curry, D.R. Sage, T. Libermann, B.J. Dezube, J.D. Fingerth, M. Detmar, Lymphatic reprogramming of blood vascular endothelium by Kaposi sarcoma-associated herpesvirus, *Nat. Genet.* 36 (2004) 683–685.
- [37] H.W. Wang, M.W. Trotter, D. Lagos, D. Bourboulia, S. Henderson, T. Makinen, S. Elliman, A.M. Flanagan, K. Alitalo, C. Boshoff, Kaposi sarcoma herpesvirus-induced cellular reprogramming contributes to the lymphatic endothelial gene expression in Kaposi sarcoma, *Nat. Genet.* 36 (2004) 687–693.



Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded LANA positively affects on ubiquitylation of p53

Tohru Suzuki^{a,b,*}, Tomoyasu Isobe^c, Masatoshi Kitagawa^c, Keiji Ueda^{b,d}

^a Research Team for Viral Diseases, National Institute of Animal Health, 3-1-5 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-0856, Japan

^b Department of Infectious Diseases, Hamamatsu University School of Medicine, 1-20-1 Handayama, Hamamatsu, Shizuoka 431-3192, Japan

^c Department of Biochemistry 1, Hamamatsu University School of Medicine, 1-20-1 Handayama, Hamamatsu, Shizuoka 431-3192, Japan

^d Department of Microbiology and Immunology, Osaka University Graduate School of Medicine, 2-2 Yamada-oka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 October 2010

Available online 5 November 2010

Keywords:

KSHV

LANA

Stable transfectants

p53

Ubiquitylation

ABSTRACT

We established a series of stable transfectants expressing wild-type and three mutant LANA; amino terminus, carboxyl terminus and amino terminus plus DNA binding domain, as a new strategy to assess systematically the interactions and binding domains with cellular proteins. Using the system, we reported that LANA specifically bound to p53 via DNA binding domain. As for LANA function in the regulation of p53 through the interaction, we showed that polyubiquitylation of p53 in the presence of LANA was obviously increased. LANA also associated with Cullin 5 and Rbx1, active subunit of E3 ubiquitin ligase complex. Taken together, the present study suggests that LANA induce enhancement of p53 ubiquitylation and degradation into proteasome, consequently contributing to latent persistence.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

The Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV), known as human herpesvirus 8 (HHV8), is a double-strand DNA virus that classified as a γ -herpesvirus and the most recently discovered human tumor virus [1]. KSHV is associated with Kaposi's sarcoma and two B cell lymphoproliferative diseases: primary effusion lymphoma and some forms of multicentric Castleman's disease [2]. Most tumor cells derived from these malignancies are latently infected with KSHV, and hence latent infection is thought to play an important role in the development of KSHV-associated neoplasms [3].

In latent infection, viral gene expression is restricted to a small number of genes, one of which is latency-associated nuclear antigen (LANA), encoded by open reading frame 73 (ORF73). LANA specifically binds to an origin sequence within the viral terminal repeats (TRs) through its carboxyl (C)-terminal DNA binding domain (DBD), contributing to latent episome replication using host DNA synthesis machinery [4,5]. LANA also tethers viral episomes to host chromosomes through its amino (N) terminus, thereby ensuring efficient segregation of viral genome during mitosis [6]. Furthermore, LANA has known to be involved in the regulation of cellular processes, as viral and cellular gene expression and proliferation, by interacting with a variety of host cellular proteins via its N- or C-domains [7]. Notably, LANA is thought to specifically bind to tumor suppressor proteins, as retinoblastoma protein (pRb) and p53, thereby promoting cell cycle progression, chromosome instability and cell immortalization [8,9].

Selective protein degradation pathways seem to be utilized by viruses to establish an environment which suitable for their propagation and tumorigenesis. Surprisingly, many DNA tumor viruses such as Human papillomavirus (HPV), adenovirus and Epstein–Barr virus (EBV) have evolved strategies to control the selective protein degradation which targeting tumor-associated proteins by mimicking and blocking the activity of ubiquitin–proteasome system [10–12]. E6 protein of HPV type 16, which is associated with a high risk of malignant progression, has abilities to bind and enhance p53 degradation by the ubiquitin-directed system [13]. Two products of early regions 1B and 4 encoded by adenovirus, E1B55K and E4orf6, collaborate to target p53 for degradation throughout the Cullin-based E3 ubiquitin ligase complex composed of their proteins [14]. By contrast, Epstein–Barr virus nuclear antigen 1 (EBNA1) of EBV directly interacts with ubiquitin-specific protease (USP7/HAUSP) where interfering with the stabilization of p53 by USP7, resulting in the increased ubiquitination and destabilization of p53 [15].

LANA of KSHV physically interacted with p53, thus it suggests that LANA might involve in the regulation of p53 [9]. Recently, LANA associates with Elongin BC and Cullin 5 (Cul5) via suppressor of cytokine signaling box-like motif, and hence LANA is shown to form ECS E3 ubiquitin ligase complex [16]. On the other hand,

* Corresponding author at: Research Team for Viral Diseases, National Institute of Animal Health, 3-1-5 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-0856, Japan. Fax: +81 29 838 7844.

E-mail address: tohru_suzuki@affrc.go.jp (T. Suzuki).

LANA has structural and functional similarities with EBNA1 of EBV, which belongs to subfamily γ -herpesvirus as KSHV [17]. Therefore, it still remains a possibility that KSHV has similar machinery to other herpesvirus in the control of p53 [18]. In the present study, we established a new system to screen the interactions between LANA and cellular proteins, and tried to verify the mechanism regulating p53 by LANA using our system.

2. Materials and methods

2.1. Cell culture, plasmids and transfection

Two hundred ninety-three cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serum and antibiotics. Constructs expressing amino-terminal enhanced green fluorescent protein (EGFP)-fused full-length LANA (LANA-FL, 1–1162), N terminus (LANA-N, 1–280), C terminus (LANA-C, 280–1162) and N terminus plus DNA binding domain (LANA-NDBD, 1–280 921–1162) were inserted into retroviral vectors. After transfection those vectors with 293 cells, stable transfectants were isolated by limiting dilution and screening through the observation of GFP expression level. Expression plasmids, pCGN-HA-ubiquitin and FLAG-p53 were described in our previous reports [19]. Plasmid transfections were performed using the calcium phosphate method.

2.2. Immunoprecipitation, immunoblot and in vivo ubiquitylation assays

Cells were lysed in lysis buffer (50 mM Tris-HCl [pH 7.2], 250 mM NaCl, 10% glycerol, 0.1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 10 mM 2-mercaptoethanol, protease inhibitor cocktail [Sigma]). The cell lysates were homogenized in Dounce homogenizer (30

strokes) at 4 °C for 30 min, followed by centrifugation and overnight incubation supernatant with anti-GFP antibody. The antibody complex was precipitated after gentle rotation (4 °C for 1 h) with Protein G-Sepharose beads (GE Healthcare). After the beads were washed three times in lysis buffer, proteins were eluted in Laemmli's sample buffer and loaded onto 4–12% Bis-Tris gels (Bio-Rad Laboratories) for subsequent immunoblotting.

For in vivo ubiquitylation assays, cell lysates were denatured by treatment with 2% SDS and 5% 2-mercaptoethanol at 100 °C to dissociate non-covalent protein associations prior to immunoprecipitation.

2.3. Immunofluorescence assay

Cells grown on coverslips were washed in phosphate-buffered saline (PBS), and fixed in 4% paraformaldehyde–PBS for 30 min at room temperature. After fixation, the cells were permeabilized in PBS containing 0.1% Tween 20 for 15 min. Cellular DNA was stained with 0.5 μ M DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole). The slides were visualized by Fluorescence confocal microscopy system (FluoView FV1000; Olympus).

3. Results and discussion

We firstly attempted to establish a set of stable transfectants expressing EGFP-fused LANA-FL and three different truncated forms of LANA; LANA-N, LANA-C and LANA-NDBD, in order to systematically investigate the interaction and binding domain between LANA and cellular proteins. The expression of LANA in four types of stable transfectants was confirmed by immunofluorescence assay (IFA) and by immunoprecipitation (IP) and immunoblot (IB) assays targeting GFP. By confocal microscopy, GFP expression in the control was observed uniformly throughout cell

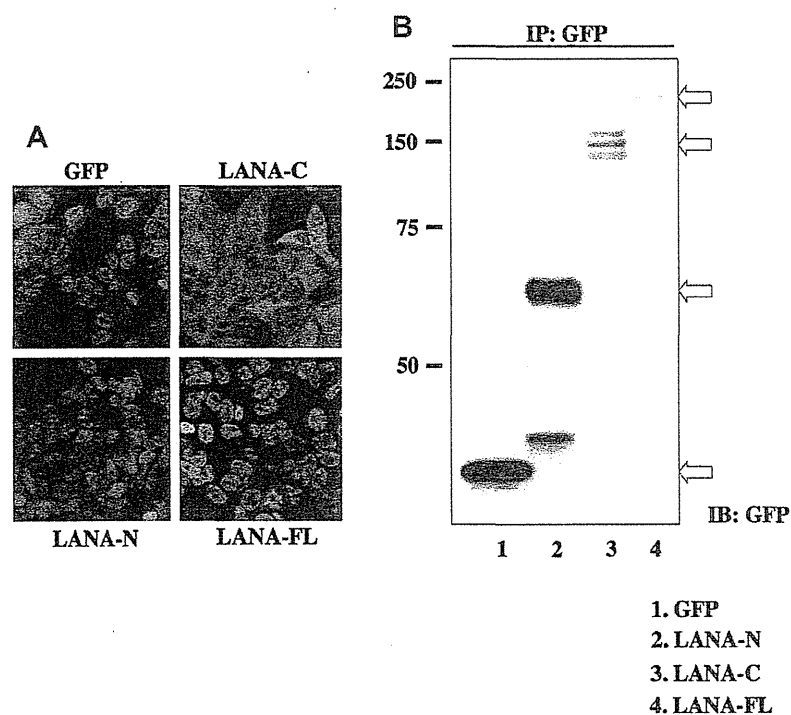


Fig. 1. Expressions of control GFP and three types of LANA. After 293 cells were transfected with retroviral vectors derived from GFP, full-length (LANA-FL) and two truncated LANA (LANA-N and LANA-C), some stable transfectants were obtained by limiting dilution and screening through the observation of GFP expression. (A) A representation of stable transfectant was confirmed the level of GFP expression by immunofluorescence assay. DNA in the nucleus was counterstained with 0.5 μ M DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole). Original magnification, 20 \times . (B) The cells were harvested, lysed and immunoprecipitated with anti-GFP antibody (Nacalai tesque, Inc.), and then immunoblotted with anti-GFP antibody (Nacalai tesque, Inc.).

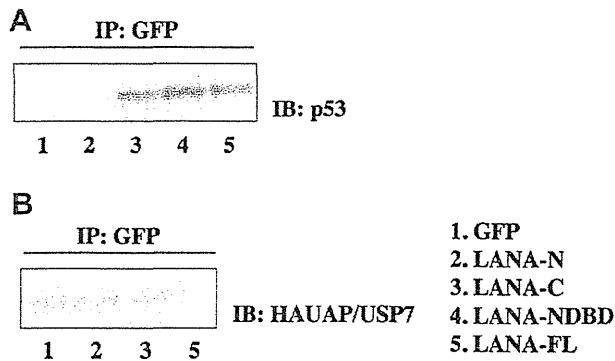


Fig. 2. LANA interacts with p53, but not USP7 *in vivo*. (A) Equal amount of whole cell extracts were immunoprecipitated with anti-GFP antibody and immunoblotted with anti-p53 DO-1 antibody (Santa Cruz Biotechnology). (B) Equal amount of whole cell extracts were immunoprecipitated with anti-GFP antibody and immunoblotted with anti-USP7 antibody (Cell Signaling Technology).

(Fig. 1A). The pattern of GFP expression in LANA-N, LANA-FL and LANA-NDBD (data not shown) localized to the nucleus, because there was nuclear localization site (NLS) in N terminal domain of LANA [20]. By contrast, GFP expression in LANA-C was mainly restricted within cytoplasm. In the IP and IB assays, cell lysate from LANA-FL expressed the band of molecular size of approximate 230 kDa (Fig. 1B). Moreover, lysates from control and two mutant types of LANA exhibited the bands of molecular size to be estimated from deletion of amino acids, respectively.

Using the series of stable transfectants, we investigated the interactions of p53 with LANA by IP and IB assays (Fig. 2A). LANA specifically interacted with p53 via C-terminal domain as previously reported [9]. In addition, this study notably demonstrated that the DBD domain was responsible for binding to p53 as similar as the domain interacting p53 with herpesvirus saimiri (HVS) ORF73, a homologue of KSHV-encoded LANA [21]. p53 is a transcriptional regulator of cell growth whose induction leads either to cell-cycle arrest or apoptosis [22]. LANA is a multi-functional factor activating or repressing viral and cellular processes through interactions with several host cellular proteins [23]. Therefore,

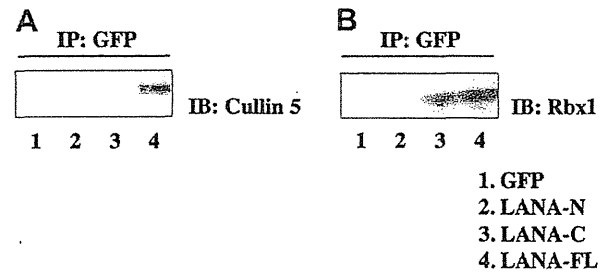


Fig. 4. LANA interacts with Cul5 and Rbx1. (A) Equal amount of cell lysates from each transfectants were immunoprecipitated with anti-GFP antibody and immunoblotted with anti-Cullin5 antibody (Millipore). (B) Equal amount of cell lysates from each transfectants were immunoprecipitated with anti-GFP antibody and immunoblotted with anti-Rbx1 antibody (Invitrogen).

these data suggest the possibility that LANA might control p53 function to maintain in a latent infection.

As a result of IP and IB assay targeting USP7, there was no specific interactions between LANA and USP7 (Fig. 2B). Thus, the fact suggests that LANA might function in the regulation of p53 by a different way from EBNA-1 which directly interact with USP7, and thereby induce p53 destabilization.

To assess the hypothesis that LANA can mediate p53 repression, we observed and compared levels of ubiquitylation of p53 with or without LANA. Two hundred ninety-three cells were co-transfected with different combinations of Flag-p53, HA (hemagglutinin)-ubiquitin and GFP-LANA as indicated in Fig. 3. At 48 h post-transfection, the transfected cells were harvested, lysed and protein normalized. Subsequently, equal amounts of whole cell extracts were subjected to denature, and then immunoprecipitated and analyzed by IB assay with antibody against Flag. The IB data by Flag antibody showed that equal total protein after treated with IP following denaturation was loaded onto SDS-PAGE (Fig. 3A). Although the transfection efficiency of GFP-LANA was less than that of GFP, polyubiquitylation of p53 was obviously enhanced in the presence of LANA (Fig. 3A and B). Therefore, these data suggest that LANA induces the degradation of p53.

As for potential mechanism for LANA-mediated regulation of p53 function, Robertson's group reported that LANA functions as

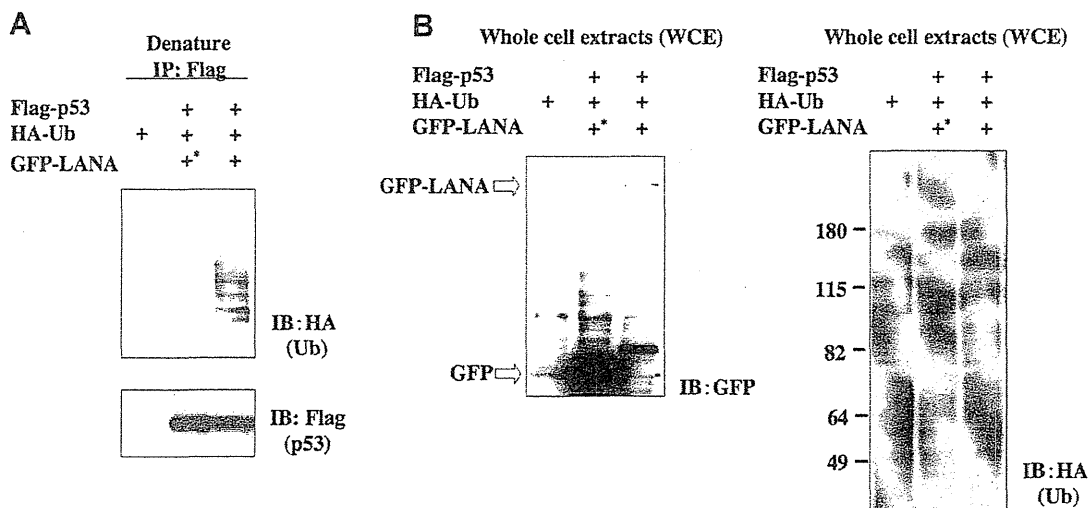


Fig. 3. LANA enhances polyubiquitylation of p53. Two hundred ninety-three cells were co-transfected with the indicated plasmids. After 48 h, the cells were harvested following 20 μ M MG-132 treatment. (A) Cells were lysed and denatured with Laemmli's sample buffer containing SDS and 2-mercaptoethanol to dissociate proteins non-covalently associated with p53. The samples were diluted, and subsequently immunoprecipitated with anti-FLAG antibody (M2; Sigma). Immunoprecipitates were immunoblotted with HA (3F10; Roche Applied Science) and FLAG antibodies. (B) Whole cell extracts prior to immunoprecipitation were subjected to immunoblotting against GFP and HA antibodies. The asterisks (*) indicate the cells was transfected with control GFP plasmid, instead of GFP-LANA plasmid.

a subunit of the E3 ubiquitin ligase complex composed of Elongin BC and Cul5/Rbx [16]. To confirm whether LANA interacted with Cul5 and Rbx1, an active subunit of E3 ubiquitin ligase complex, we investigated those interactions using the set of stable transfectants again. LANA associated with Cul5 and Rbx1, in particular via C-terminal domain (Fig. 4A and B). Therefore, these findings support that LANA form E3 ubiquitin ligase complex. Taken together, it suggests that LANA functions as a p53 recognition subunit of E3 ubiquitin ligase composed of Elongin BC, Cullin 5 and Rbx1, and hence ubiquitylation of p53 in the presence of LANA was dramatically increased. The polyubiquitylated p53 are targeted for degradation into proteasome. Loss of p53 function can induce cell growth control to favor viral replication and cell transformation. Consequently, LANA would contribute to viral persistence through its ability to prompt cell survival by modulating p53 function.

Acknowledgments

We thank Dr. Eriko Ohsaki for technical advice and helpful discussion, and also thank Ms. Naoko Okamoto for technical assistance.

References

- [1] P.S. Moore, Y. Chang, Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus immunoevasion and tumorigenesis: two sides of the same coin?, *Annu Rev. Microbiol.* 57 (2003) 609–639.
- [2] Y. Chang, E. Cesarman, M.S. Pessin, F. Lee, J. Culpepper, D.M. Knowles, P.S. Moore, Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma, *Science* 266 (1994) 1865–1869.
- [3] C. Boshoff, T.F. Schulz, M.M. Kennedy, A.K. Graham, C. Fisher, A. Thomas, J.O. McGee, R.A. Weiss, J.J. O'Leary, Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infects endothelial and spindle cells, *Nat. Med.* 1 (1995) 1274–1278.
- [4] M.E. Ballestas, K.M. Kaye, Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latency-associated nuclear antigen 1 mediates episome persistence through *cis*-acting terminal repeat (TR) sequence and specifically binds TR DNA, *J. Virol.* 75 (2001) 3250–3258.
- [5] G. Fejer, M.M. Medveczky, E. Horvath, B. Lane, Y. Chang, P.G. Medveczky, The latency-associated nuclear antigen of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus interacts preferentially with the terminal repeats of the genome *in vivo* and this complex is sufficient for episomal DNA replication, *J. Gen. Virol.* 84 (2003) 1451–1462.
- [6] M.E. Ballestas, P.A. Chatis, K.M. Kaye, Efficient persistence of extrachromosomal KSHV DNA mediated by latency-associated nuclear antigen, *Science* 284 (1999) 254–264.
- [7] R. Kaul, S.C. Verma, E.S. Robertson, Protein complexes associated with the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded LANA, *Virology* 364 (2007) 317–329.
- [8] S.A. Radkov, P. Kellam, C. Boshoff, The latent nuclear antigen of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus targets the retinoblastoma–E2F pathway and with the oncogene Hras transforms primary rat cells, *Nat. Med.* 6 (2000) 1121–1127.
- [9] J.J. Friborg, W. Kong, M.O. Hottiger, G.J. Nabel, p53 inhibition by the LANA protein of KSHV protects against cell death, *Nature* 402 (1999) 889–894.
- [10] B.A. Werness, A.J. Levine, P.M. Howley, Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53, *Science* 248 (1990) 76–79.
- [11] E. Querido, M. Morrison, H. Chu-Pham-Dang, S.W. Thirlwell, D. Boivin, P.E. Branton, Identification of three functions of the adenovirus E4orf6 protein that mediated p53 degradation by the E4orf6–E1B55K complex, *J. Virol.* 75 (2001) 699–709.
- [12] M.N. Holowaty, M. Zeghouf, H. Wu, J. Tellam, A. Athanasopoulos, J. Greenblatt, L. Frappier, Protein profiling with Epstein–Barr nuclear antigen 1 reveals an interaction with the herpesvirus-associated ubiquitin-specific protease HAUSP/USP7, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 29987–29994.
- [13] M. Scheffner, J.M. Huibregtse, R.D. Vierstra, P.M. Howley, The HPV–E6 and E6–AP complex function as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53, *Cell* 75 (1993) 495–505.
- [14] E. Querido, P. Blanchette, Q. Yan, T. Kamura, M. Morrison, D. Boivin, W.G. Kaelin, R.C. Conaway, J.W. Conaway, P.E. Branton, Degradation of p53 by adenovirus E4orf6 and E1B55K proteins occurs via a novel mechanism involving a Cullin-containing complex, *Gene Dev.* 15 (2001) 3104–3117.
- [15] V. Saridakis, Y. Sheng, F. Sarkari, M.N. Holowaty, K. Shire, T. Nguyen, R.G. Zhang, J. Liao, W. Lee, A.M. Edwards, C.H. Arrowsmith, L. Frappier, Structure of the p53 binding domain of HAUSP/USP7 bound to Epstein–Barr nuclear antigen 1: implication for EBV-mediated immortalization, *Mol. Cell* 18 (2005) 25–36.
- [16] Q. Cai, S.K. Knight, S.C. Verma, P. Zald, E.S. Robertson, E3 ubiquitin complex is recruited by KSHV latent antigen LANA for degradation of the *VHL* and p53 tumor suppressors, *PLoS Pathog.* 2 (2006) 1002–1012.
- [17] D.R. Schwam, R.L. Luciano, S.S. Mahajan, L. Wong, A.C. Wilson, Carboxy terminus of human herpesvirus 8 latency-associated nuclear antigen mediates dimerization, transcriptional repression, and targeting to nuclear bodies, *J. Virol.* 74 (2000) 8532–8540.
- [18] M.N. Holowaty, Y. Sheng, T. Nguyen, C. Arrowsmith, L. Frappier, Protein interaction domains of the ubiquitin-specific protease, USP7/HAUSP, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 47753–47761.
- [19] C. Uchida, S. Miwa, K. Kitagawa, T. Hattori, T. Isobe, S. Otani, T. Oda, H. Sugimura, T. Kamijo, K. Ookawa, H. Yasuda, M. Kitagawa, Enhanced Mdm2 activity inhibits pRB function via ubiquitin-dependent degradation, *EMBO J.* 24 (2005) 160–169.
- [20] T. Piolot, M. Tramier, M. Coppey, J. Nicolas, V. Marechal, Close but distinct regions of human herpesvirus 8 latency-associated nuclear antigen 1 are responsible for nuclear targeting and binding to human mitotic chromosomes, *J. Virol.* 75 (2001) 3948–3959.
- [21] S. Borah, S.C. Verma, E.S. Robertson, ORF73 of herpesvirus saimiri, a viral homolog of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus, modulates the two cellular tumor suppressor proteins p53 and pRb, *J. Virol.* 78 (2004) 10336–10347.
- [22] A.J. Levine, p53, the cellular gatekeeper for growth and division, *Cell* 88 (1997) 323–331.
- [23] S.C. Verma, K. Lan, E. Robertson, Structure and function of latency-associated nuclear antigen, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 312 (2007) 101–136.

ヘルペスウイルス学のエッセンス

上田 啓次*¹⁾ 中野 和司*²⁾ 大崎 恵理子*³⁾

現在8つのヒトヘルペスウイルスが同定されているが、最初に分離された単純疱疹ヘルペスウイルスから考えると、その研究の歴史は90年に及ぶ。その結果、慢性感染症に関わる本ウイルスの実態が少しずつ分かりつつある。ひとたびヒトに侵入すると、潜伏感染状態を樹立し、感染細胞内でゲノムの一部として振る舞い、子孫存続の機会を待ち続ける。その過程で宿主との相互作用の結果、多彩な病態に関与している。どのような機構でそれぞれの病態が惹起されるのか、いまだ不明の点も多く、今後の研究展開が期待される。そして研究成果に基づいた、より効果的なウイルス制御法が開発されることを願う。

Key Words: ヘルペスウイルス, 潜伏感染, α ヘルペスウイルス, β ヘルペスウイルス, γ ヘルペスウイルス

I はじめに

“Herpes”とはギリシャ語で“這う”を意味する言葉で、這うようにして広がる皮膚疾患に用いられていたと思われる。口唇ヘルペスの疾患としての認識は紀元前100年くらいにはあったと思われるが、20世紀初期に口唇ヘルペスからウイルスが分離され、ヘルペスウイルス属の確立に至った。この時点で研究が開始されたと考え、ヘルペスウイルス研究は90年の歴史を持つ。

ヘルペスウイルスはヒトに潜伏感染するDNAウイルスの代表格である。ヒト染色体には組み込まれないepisome(ウイルスに特化してviromeという言い方も使われ始めている)として機能し、水平感染によってヒト界に伝播・維持されている。本稿では8つのヘルペスウイルス¹⁾について、その特徴を総論的に解説したい。

II 疫学

ヒトに感染するヘルペスウイルスの感染率は地域性・民族により若干の差があるものと考えられ

るが、本ウイルスの感染率は群を抜いて高い。水疱瘡ウイルス(varicella zoster virus: VZV)²⁾、ヒトヘルペスウイルス6(human herpesvirus 6: HHV-6)³⁾、ヒトヘルペスウイルス7(human herpesvirus 7: HHV-7)³⁾、サイトメガロウイルス(cytomegalovirus: CMV)⁴⁾やエプスタイン・バーウイルス(Epstein-Barr virus: EBV)⁵⁾は、ヒト成人での感染率は80%以上であると考えられている。単純疱疹ヘルペスウイルス1型(herpes simplex virus: HSV-1)⁶⁾で50~70%、単純疱疹ヘルペスウイルス2型(herpes simplex virus 2: HSV-2)⁶⁾が20~50%、カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス(Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus: KSHV)⁷⁾が2~60%と言われている。KSHVの感染率は地域差が大きいと思われるが、ポリオーマBK(polyoma virus BK, 72~98%)、ポリオーマJC(polyoma JC, 72~98%)、アデノ随伴ウイルス(adenovirus-associated virus: AAV, 60~90%)を除くと、ヘルペスウイルスはヒト界に広く蔓延し潜伏感染状態を樹立する代表格で、潜伏感染した細胞

The essence of herpesvirology

*大阪大学大学院医学系研究科・ウイルス学 ¹⁾教授 Keiji Ueda ²⁾助教 Kazushi Nakano ³⁾Eriko Ohsaki

においてゲノムの一部として振る舞うことによる⁹⁾。

III 感染経路・様式

8つのヘルペスウイルスの感染様式にはそれぞれ違いはなく、基本的には salivary shedding (唾液拡散), 感染局所との粘膜接触感染がおもな感染様式であると思われる。HSV-1, CMV, EBV, HHV-6 および HHV-7, KSHV は唾液発散による感染が主流で、幼少期に、特に両親との緊密な接触により感染が成立するものと思われる。この時期の感染はほとんど不顕性で、そのまま潜伏感染状態となりウイルス保因者となる。

一方、VZV は一般に幼児期の流行時期に感染を受ける。HSV-2 はウイルス学的には HSV-1 に酷似するが、感染組織は性器を中心とすることが多く、また KSHV も男性同性愛者にカポジ肉腫 (Kaposi's sarcoma : KS) が多くみられることから、性行為感染症としての側面も持つ。

IV 潜伏感染と溶解感染

ヘルペスウイルスの最大の特徴のひとつは潜伏感染を樹立することであり、慢性感染症を惹き起こす多くのウイルスが持続感染状態になることと対比される。潜伏感染と持続感染の違いは、ウイルスを産生し続けているかどうかである。個体の中でウイルスを産生し続けながら感染状態を維持する持続感染では、免疫監視機構をいかに調節して回避するかが感染存続の鍵となる。一方、潜伏感染はウイルス自体がその遺伝子発現を極限状態まで落として、いわばステルス (stealth) 状態にな

ることで免疫監視機構を回避し、娘ウイルスを産生して子孫を残す機会を待っていると考えられる。

潜伏感染を樹立する組織・細胞は各ヘルペスウイルスにより異なる。一般的には、 α ヘルペスウイルス (HSV-1 および HSV-2, VZV) は感覚神経系の神経節神経細胞に、 β ヘルペスウイルス (CMV, HHV-6 および HHV-7) は血球系に、 γ ヘルペスウイルス (EBV, KSHV) は B リンパ球に潜伏感染するとされている。

娘ウイルスを産生する生活環を溶解感染と呼ぶ。本生活環では 100 個前後存在するウイルス遺伝子すべてが順序よく発現して、最終的には爆発的な娘ウイルス産生に至る。潜伏感染状態に何らかの刺激が入ると、溶解感染が誘導 (再活性化) されることがある。HSV-1 では日光 (UV) など、EBV では IgG (免疫グロブリン G) の結合、KSHV ではある種のサイトカインやフォルボールエステルなど、薬剤が誘導の起因になる。

V ウイルス粒子構造・ウイルスゲノム・遺伝子

ヘルペスウイルス粒子は、外側に脂質二重膜からなる膜粒子 (envelope : 120nm 前後)、内部にキャプシッド (capsid : 70nm 前後) を内包し、その内部にゲノムがある。粒子としての最大の特徴は、膜粒子とキャプシッドのあいだにテグメント (tegument) という構造があることである。

ヘルペスウイルスは 120 ~ 230kb の直鎖状二本鎖 DNA ゲノムを持つ。直鎖状のゲノムは感染後に末端で結合し、環状ゲノムとなる。基本的なエレメントとしては、ユニーク領域、反復配列領

域、溶解感染の複製 origin として機能する配列 (ori-Lyt) などがある。潜伏感染で機能する複製 origin (ori-P) は細胞分裂に呼応して、複製・分配・維持する機構を持つ γ ヘルペスウイルスだけに知られている。

ヘルペスウイルスの基本的なエレメントのひとつであるユニーク領域にある 100 ~ 150 個ほどの遺伝子は、前初期 (immediate early : IE, α) 遺伝子, 初期 (early : E, β) 遺伝子, 後期 (late : L, γ) 遺伝子に大別される。IE 系遺伝子の多くは転写制御系遺伝子であり、HSV-1 では、 $\alpha 4$ (ICP4), *US4* (ICP27), $\alpha 47$ (ICP47) など複数の遺伝子が IE とされている。EBV や KSHV では真の IE 遺伝子はひとつ (それぞれ *zta* と *rtta*) であり、それが発現すると溶解感染の回路が始動する。E 系遺伝子群は複製に直接関わるポリメラーゼなどの遺伝子が含まれる。複製に直接関わらないものの、溶解感染の完遂を助ける多くの副遺伝子 (accessory gene) もこの中に含まれることが多い。KSHV では、*v-bcl-2*, *v-il-6*, *v-mip*, *v-gpcr*, *v-irf* や *kl1*, *kl5* などの宿主から取り込んだと思われる機能性遺伝子や、トランスフォーメーションに関わるとされる遺伝子がこの中に含まれている⁹⁾。L 系遺伝子群は粒子構成タンパク遺伝子をコードしている。

VI 潜伏感染における遺伝子発現制御と複製機構

潜伏感染と溶解感染ではまったく異なった遺伝子発現制御機構が働いているものと考えられる。HSV-1 潜伏感染ではごく限られた領域のみが活性化して、LAP (LAT promoter) を利用して 8.3kb 超、2.0kb とその 1.45kb の3つの LAT (latency-associated transcript) 遺伝子のみが発現する。ただ、LAT 遺伝子が潜伏感染にどのように機能しているのかについては報告がまちまちで、一定の見解がない。この領域の欠損変異株も

潜伏感染を樹立できるという報告もある。また、タンパクをコードしているのかもどうか未解決の問題のひとつである。

限局した領域のみが活性化していることは KSHV にも当てはまる。KSHV の潜伏感染では、*lana*, *v-cylin*, *v-flip*, *kl2* 遺伝子と、*lana-2* と呼ばれる *v-irf* ホモログのひとつが発現している。前者4遺伝子はひとつの発現領域を形成して、17 個の miRNA もこの領域で発現している。ヘルペスウイルスゲノム内のひしめく遺伝子の中でみられるこのような制御はきわめて緻密である。

EBV では少し状況が異なっている。EBV には3つの基本的な潜伏感染の型 (latency I (パーキットリンパ腫), latency II (鼻咽頭がん), latency III (lymphoblastoid cell line : LCL と一部のパーキットリンパ腫)) があり、発現している遺伝子に若干の違いがある。共通しているのは、*EBNA1*, *EBERs* と *BARTs* である。*EBNA1* の発現に関わるプロモーターが、latency I と latency II では Qp, III では Wp と Cp といった違いもあるが、ゲノムの半分~それを越えた領域で転写が行われている。

潜伏感染におけるウイルスゲノム複製については、EBV と KSHV で研究が進んでいる。EBV の ori-P は family of repeats (FR) と dyad symmetry (DS) から構成され、ウイルス側因子 EBNA1 の結合配列が存在している。DS が複製の開始に、FR は複製したゲノムの分配維持に機能していると考えられている¹⁰⁾。KSHV の ori-P はゲノムの末端反復配列 (terminal repeats : TR) 内にあり、ウイルス因子 LANA の結合配列とそれに続く 32bp の GC に富んだ配列で構成される¹¹⁾。EBNA1 や LANA が細胞周期依存性に、宿主複製開始前複合体 (pre-replication complex : pre-RC) を複製開始領域に呼び寄せる機構が提唱されている¹²⁾。

VZV (varicella zoster virus)	HHV-6 (human herpesvirus 6 ; ヒトヘルペスウイルス6)
HHV-7 (human herpesvirus 7 ; ヒトヘルペスウイルス7)	
CMV (cytomegalovirus ; サイトメガトウイルス)	
EBV (Epstein-Barr virus ; エプスタイン・バーウイルス)	
HSV-1 (herpes simplex virus ; 単純疱疹ヘルペスウイルス1型)	
HSV-2 (herpes simplex virus 2 ; 単純疱疹ヘルペスウイルス2型)	
KSHV (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus ; カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス)	
AAV (ade- η -associated virus ; アデノ随伴ウイルス)	KS (Kaposi's sarcoma ; カポジ肉腫)
IgG (免疫グロブリンG)	

LCL (lymphoblastoid cell line)	FR (family of repeats)
DS (dyad symmetry)	TR (terminal repeats ; 末端反復配列)
pre-RC (pre-replication complex ; 宿主複製開始前複合体)	

Ⅶ 疾患特性

HSV-1 および HSV-2 の関わる疾患はそれぞれ、頭頸部（三叉神経領域）、臀部～会陰部（仙骨神経領域）を中心とする水疱様疾患として、カポ

ジ水痘様発疹症、口唇ヘルペス、顔面ヘルペス、性器ヘルペスが、初感染、再感染、再活性化により発症する。また、HSV は神経細胞に親和性・増幅性が高く、中枢神経系に侵入し脳炎などを起こすと、多くの場合、生命に関わるほど重症化する。

表 ヒトヘルペスウイルスの特徴

ウイルス	α β γ	ゲノム サイズ (kb)	ウイルス 保有率 (%)	潜伏感染場所 (臓器/組織・ 細胞)	急性病態	慢性病態	
						正常人	免疫不全者
herpes simplex virus 1 (HSV-1)	α	152	50～70	感覚神経節 神経細胞	咽頭炎 角膜炎 脳炎	口唇ヘルペス 角膜炎 脳炎	左記疾患の重症化 肺炎 肝炎
herpes simplex virus 2 (HSV-2)	α	155	20～50	感覚神経節 神経細胞	性器 ヘルペス	性器ヘルペス 脳炎	左記疾患の重症化
varicella zoster virus (VZV)	α	125	> 90	感覚神経節 神経細胞・星状 細胞・リンパ球	水痘	带状疱疹	左記疾患の重症化 (全身性) 肺炎 肝炎
Epstein-Barr virus (EBV)	γ	172	80～90	咽頭粘膜細胞 Bリンパ球	伝染性単核症	バーキットリンパ腫 非ホジキンリンパ腫 鼻咽頭がん 胃癌	左記疾患に準ずる リンパ球増殖症
cytomegalovirus (CMV)	β	230/236	80～90	骨髄単核球	伝染性単核症	まれ	血管炎 肺炎 網膜炎 肝炎・胃腸炎 髄膜炎
human herpesvirus 6 (HHV-6A, HHV-6B)	β	A: 159/170 B: 162/168	> 90	リンパ球?	突発性発疹	?	髄膜炎?
human herpesvirus 7 (HHV-7)	β	145	> 90	リンパ球?	突発性発疹	?	?
Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV)	γ	170/210	2～60	内皮細胞 Bリンパ球	?	カポジ肉腫 キャッスルマン病	カポジ肉腫 キャッスルマン病 原発性滲出性リンパ腫

(文献8より一部改変)

IM (infectious mononucleosis; 伝染性単核症)

PTLD (posttransplant lymphoproliferative disease; 移植後リンパ球増殖症)

PEL (primary effusion lymphoma)

MCD (multicentric Castleman's disease; 多中心性キャッスルマン病)

ACV (acyclovir; アシクロビル)

VCV (valacyclovir; バラシクロビル)

GCV (gancyclovir; ガンシクロビル)

VZV の関わる疾患は水痘と带状疱疹である。水痘は初感染で带状疱疹は再活性化で発症する。

EBV の感染は幼少期に不顕性感染で終わることが多いが、思春期以降の初感染は伝染性単核症 (infectious mononucleosis: IM) として顕性化することがある。潜伏感染から発症する疾患として重要なものは、バーキットリンパ腫、鼻咽頭がんなど腫瘍性疾患で、近年、胃癌の発生にも関わっていることが報告されている。移植後リンパ球増殖症 (posttransplant lymphoproliferative disease: PTLD) にも深く関わっているとされる。KSHV もカポジ肉腫 (KS), primary effusion lymphoma (PEL) といった腫瘍や、多中心性キャッスルマン病 (multicentric Castleman's disease: MCD) という腫瘍性疾患とわきまて深く関わっている。ただ、バーキットリンパ腫や鼻咽頭がんでは地域性が異なったり、発症年齢に差があったり、EBV 単独の疾患ではないのかもしれない。KSHV が関わる腫瘍・腫瘍性疾患は AIDS (acquired immunodeficiency syndrome) 病態下で発症することが多く、本ウイルスの腫瘍発生能力は免疫監視機構から免れることが重要であると思われる。

CMV でもっとも問題になるのは、妊娠初期の母親の初感染で聴力障害 (~17%) が報告されている。思春期以降の水平・初感染で単核症が発症することがあるが、EBV による IM に比し、症状は軽く発熱・倦怠感で終わることが多い。免疫不全状態では網膜炎や間質性肺炎など多彩な病態に絡んでいると考えられている。

HHV-6 と HHV-7 は初感染で突発性発疹の原因ウイルスとして知られる。唾液を介した親からの乳児期の感染によると思われるが、詳細は不明である。

Ⅷ 治療法

抗ヘルペスウイルス剤としては Ara-A, IDU などの核酸アナログが用いられてきたが、ヘルペスウイルス感染症の治療を本質的に変えたのはアシクロビル (acyclovir: ACV) の出現である。ACV はグアノシンの核酸アナログで、ヘルペスウイル

スのコードするチミジンキナーゼでモノリン酸化が起こることで活性化され、GMP キナーゼ、NDP キナーゼにより最終的に三リン酸化されてウイルスの DNA ポリメラーゼによる DNA 合成に利用され、DNA 鎖合成終結核酸として機能する感染細胞特異的に作用するプロドラッグである¹⁹⁾。その誘導体のバラシクロビル (valacyclovir: VCV) も使用されている。CMV 感染症に対しては最近、ガンシクロビル (gancyclovir: GCV) が使用されているが、他のヘルペスウイルスに臨床効果の確認された薬剤はまだない。

Ⅸ おわりに

ヒトに感染する8つのヘルペスウイルスのこれまでの研究の成果をもとに概説し、それぞれのヘルペスウイルスの特徴を表にまとめた。限られた紙面でヘルペスウイルス学を論ずるのはいささか無理な感があるが、ヒト体内に潜んでいる本ウイルスが細胞形質や疾患発生にどのように絡んでいるのか謎は多い。これからさらに研究が進み、共通点や相違点が明確となり、治療法の開発に応用されることを願っている。

文献

- 1) Pellet PE, Roizman B: The Family: Herpesviridae A Brief Introduction. In "Fields Virology" 5th ed (Knipe DM, Howley PM, editors-in-chief). Lippincott-Williams-Wilkins: p2479-2500, 2007
- 2) Cohen JI, Straus SE: Varicella-Zoster Virus. In "Fields Virology" 5th ed (Knipe DM, Howley PM, editors-in-chief). Lippincott-Williams-Wilkins: p2773-2818, 2007
- 3) Yamanishi K, Mōri Y, Pellet PE: Human Herpesvirus 6 and 7. In "Fields Virology" 5th ed (Knipe DM, Howley PM, editors-in-chief). Lippincott-Williams-Wilkins: p2819-2846, 2007
- 4) Mocarski ES Jr, Shenk T: Cytomegaloviruses. In "Fields Virology" 5th ed (Knipe DM, Howley PM, editors-in-chief). Lippincott-Williams-Wilkins: p2701-2772, 2007

- 5) Rickinson AB, Kieff E : Epstein-Barr Virus. In "Fields Virology" 5th ed (Knipe DM, Howley PM, editors-in-chief). Lippincott-Williams-Wilkins : p2655-2700, 2007
- 6) Roizman B, Knipe DM, Whitley RJ : Herpes Simplex Viruses. In "Fields Virology" 5th ed. (Knipe DM, Howley PM, editors-in-chief). Lippincott-Williams-Wilkins : p2501-2602, 2007
- 7) Ganem D : Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus. In "Fields Virology" 5th ed (Knipe DM, Howley PM, editors-in-chief). Lippincott-Williams-Wilkins : p2847-2888, 2007
- 8) Virgin HW, Wherry EJ, Ahmed R : Redefining Chronic Viral Infection. *Cell* **138** : 30-50, 2009
- 9) Damania B, Jung JU : Comparative Analysis of the Transforming Mechanisms of Epstein-Barr Virus, Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus, and Herpesvirus Saimiri. *Adv Cancer Res* **80** : 51-82, 2001
- 10) Mack AA, Sugden B : The Plasmid Replicon of EBV : An Element That Underlies EBV's Transforming Functions. In "EPSTEIN-BARR VIRUS". (Robertson ES, Ed) : p379-402, 2005
- 11) Renne R, Hu J : Characterization of the Minimal Replicator of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Latent Origin. *J Virol* **79** : 2637-2642, 2005
- 12) Stedman W, Deng Z, Lu F, et al : ORC, MCM, and Histone Hyperacetylation at the Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Latent Replication Origin. *J Virol* **78** : 12566-12575, 2004
- 13) Flin SJ, Equist LW, Racaniello VR, et al : "Antiviral Drugs" In "Principles of Virology" (3rd ed.) : p278-298, 2009

序

- STEALTHING, PERSISTING ウイルスの謎 -

上田 啓次*

再生医療など最先端医療が実際に行われる時代に至って、我々人類は、感染症のコントロールにいまだに苦勞している。特に感染後潜伏あるいは持続感染の状態、長く生体内に留まり種々の病態発症にかかわるウイルス、細菌の生態は不明な点が多い。生体との攻防の中で、ウイルスや細菌は子孫を残すためのひとつの戦略としてこのようなプロセスを進化させてきたと考えられるが、その精緻なメカニズムを完璧に理解しなければ、最先端医療が展開する中で感染症の制御はままならないであろう。本特集では、潜伏感染や持続感染を持続する代表的なウイルス、細菌に焦点を当て、感染症制御に向けた今後の展開の一助としたい。

Key Words : stealthing ウイルス / persisting ウイルス / 慢性感染症

I はじめに

多くのウイルスは生体に侵入後、ただちに爆発的に娘ウイルスを産生する過程に入る。このような過程は感染標的の集まる場所で一定の流行を生み、その流行が治まった後も、どこかで感染をくり返しながらいずれの種を維持し、より標的に適応した進化を遂げていっているものと考えられる。RNA ポリメラーゼは DNA ポリメラーゼに比べ校正能力は低いとされ、それが逆に、標的に適応した子孫を残していくことに成功しているとも考えられる。

RNA は生命発生の起源の分子とされ、現存するウイルスを含めた生物もその姿に太古の営みを垣間見ることができる。つまり、大腸菌などの単細胞下等生命体では1本のRNAからいくつかのタンパクを翻訳したり、ポリプロテインとして翻訳後、プロセスする機能を備えているが、そ

ういうた装備は多くの場合、RNA ウイルスにみられる戦略である。

II ウイルスの潜伏戦略

一方、DNA ウイルスや組み込み過程をその生活史にもつレトロウイルスは、その子孫残存をほぼ完全に宿主細胞の機能に依存する。すなわち、宿主と共存する戦略を進化させてきたと考えられる。もちろん、DNA ウイルスの中にも RNA ウイルスに似た溶解感染のみに生活史を営むウイルスも存在するが、ヘルペスウイルスは極端に宿主と共存する潜伏感染という戦略を獲得した。ヘルペスウイルス潜伏感染では、ウイルスゲノムは宿主ゲノムの一部のごとく存在するが、その遺伝子発現は厳密に制御されている。しかし、このまま潜伏し続けると、ウイルスの生活史は dead-end であり、ウイルスは絶滅の危機にさらされかねない。つまりウイルスとしては、子孫残存のために

溶解感染の機会を用意周到に待っている必要がある。一体、どのような機構で潜伏感染を樹立し、また、溶解感染への相転移（再活性化）の機会を伺っているのか？ 確かに多くの研究報告はあるが、きわめて謎の多いプロセスである。

8つのヘルペスウイルス、もしくは α 、 β 、 γ ヘルペスウイルスで多少戦略は異なるものと思われるが、ヘルペスウイルスの潜伏感染と溶解感染との相転移メカニズムと疾患との関連について最新の情報を得るべく、国内の代表的な研究者に執筆を依頼した。

ヒトに感染するレトロウイルスは、human T-lymphotropic (or T-cell leukemia) virus type 1 (HTLV-1) と human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) である。ウイルスの産生状態はヘルペスウイルスの潜伏感染とは少し異なり、完全にウイルスを産生しなくなる相はなく、また、HTLV-1 と HIV-1 でも違いがあるものと思われるが、これらのウイルスはヒトゲノムに入り込み、まさしくヒトのゲノムの一部となって感染細胞に留まり続け、多彩な病態発症にかかわっている。組み込み、ウイルス産生、ウイルス遺伝子発現と病態発症とがどのような関連にあるのか、きわめて興味深い問題であり、その最新事情の解説をこの分野の最先端で進む2人の代表的研究者にお願いした。

B型肝炎ウイルス (HBV) と C型肝炎ウイルス (HCV) の事情は、先のヘルペスウイルスやヒトレトロウイルスとはさらに異なる。両者はともに肝実質細胞をおもな標的とし、そこで持続感染状態を樹立する。すなわち、ウイルスは常時産生され続けながら、宿主個体の免疫監視機構をくぐり抜け、慢性肝炎や肝がんの発症に関与するとされる。肝実質細胞に感染する両者は、DNA ウイルスと RNA ウイルスというウイルス学的には決定的な違いがあるが、免疫監視機構を完全な排除に向かわさない程度にくすぶり続けさせるという点で、共通点があるものと思われる。この機構は宿主の影響か、ウイルスの影響か、あるいは両者の微妙な絡み合いによってもたらされるのか？ だとしたらどのような絡み合い、バランスがその方

向性を決定しているのか？ 難問であることは明らかだが、解決すべき非常に興味深い問題である。その解説を最新の研究成果を持ち合わせる代表的な研究者にお願いした。

ポルナウイルスやヒトポリオマウイルスはともに痴呆に関連するウイルスと考えられるが、その生態は不明な点が多い。ポルナウイルスは RNA ウイルスであるが、最近、そのゲノムの痕跡が哺乳類ゲノムにみられることが報告された。また、特殊な状況を除いて、ヒトへの病原性とかかわりがないと考えられてきたヒトポリオマウイルスと、ヒトがんとの関連が報告され、話題を呼んでいる。これまで述べたウイルスとは多少趣きは異なるが、重要な話題として本特集に組み込ませていただき、最先端の2人の研究者に解説を依頼した。

III 潜伏する細菌

忘れてならないのが、結核をはじめとする細菌の潜伏感染、持続感染である。抗生物質発見以来、我々人類は、細菌感染症を克服したかのように錯覚していた。今なお、最新医療の最大の課題は細菌による感染症の克服であり、結核に至っては患者数の増加が報告され、有効な抗生物質の開発はほとんど進展していない。本来、結核菌の生態はやはり謎が多く、どのような生活史をとるのかまったく分かっておらず、潜伏する細菌といった側面をもっていると言ってよいのではないかと思う。また、生ワクチン全般に言えることかもしれないが、BCG (Bacille de Calmette et Guerin) がどのように生体でワクチンとして機能するのか、まったく不明と言っていいだろう。結核菌を中心として最近の潜伏と病態発症との関連の解説を第一線の研究者のお願いした。

IV おわりに

特集タイトルである「潜伏感染と再活性化」からはやや逸脱した話題も取り上げたが、本特集で取り上げたテーマは、がん、慢性炎症、免疫不全等にかかわる現代感染症のもっとも重要な問題と考えている。少しでも、読者の今後の研究や医療の参考になれば幸いである。

6. カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス (KSHV) の潜伏感染, 再活性化と病態

上田 啓次*

KSHV は、カポジ肉腫 (Kaposi's sarcoma: KS), まれな B 細胞腫の一種である primary effusion lymphoma (PEL), 多中心性キャスルマン病 (multicentric Castleman's disease: MCD) の発症に密接に関連する DNA 腫瘍ウイルスである。これらの病態における感染形態はいずれも潜伏感染であるが、KSHV のがん遺伝子が溶解感染遺伝子であることを考えると、この一面を単純に解釈し、潜伏感染→発がんとするには問題がある。潜伏感染から再活性化し、溶解感染へ相転移が完遂されない過程で発がん傾向ポイントがあると予測するが、本機構はまったく不明で、解明が望まれる。

Key Words: KSHV / γヘルペスウイルス / 潜伏感染 / 再活性化 / がん発生

I はじめに

KSHV (カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス) は元々何らかの感染症の結果として発症すると考えられていた KS (Kaposi's sarcoma) から、Moore, Changらによって 1994 年によって発見された 8 番目のヒトヘルペスウイルスである¹⁾。塩基配列の解明の結果、Epstein-Barr virus (EBV) や herpesvirus saimiri (HVS) との相同性が高いことから、腫瘍発生と密接な関連をもつと考えられる γヘルペスウイルスの一種であると位置づけられた²⁾。関連する 3 つの腫瘍あるいは腫瘍様病態では KSHV は潜伏感染状態にある³⁾。

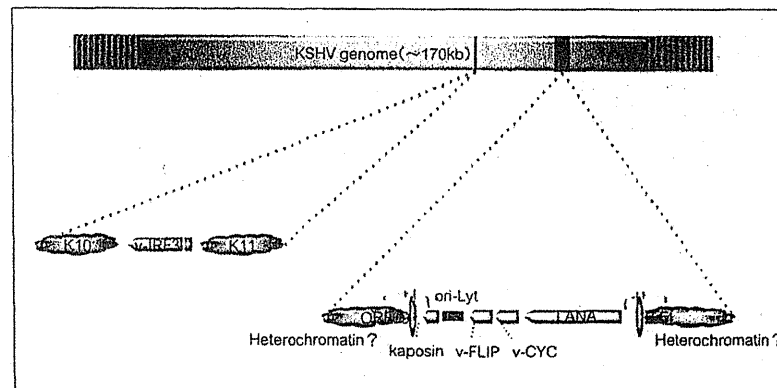
しかし、EBV のウイルス保有者が一般成人健康人の 80% に及び、KSHV のウイルス保有者はこれに比べるとかなり低く、2~3% にとどまるものの (地域差があることが報告されている)、これらすべてのウイルス保有者ががんが高率に発症するとは到底考えられないことを考慮すると、単純

に、潜伏感染→発がんの図式は成り立たないと思われる。では、一体どのような機構で KSHV 感染は発がんをもたらすのであろうか? この命題の解明は、潜伏感染、溶解感染および潜伏感染から溶解感染への相転移機構、すなわち再活性化の機構を詳細に解明することにほかならないと思う。もちろん、潜伏感染は発がんの発生源地を与えている重要な感染形態であることは言うまでもなく、潜伏感染で発現・機能しているウイルス遺伝子も一定の発がんポテンシャルをもっていると想定されている。本稿では、現在までに報告された潜伏感染や再活性化のメカニズム、KSHV ががん遺伝子の機能について総説し、筆者の持論を交えながら、今後の研究展開を模索していきたいと思う。

II KSHV の潜伏感染機構

1. KSHV 潜伏感染における遺伝子発現動態

KSHV 潜伏感染状態においては、ウイルス遺伝子の発現は最小限に制御され、80 余あるウイル



protein]-binding protein), mSin3A や MeCP2 など、種々の転写修飾因子をウイルスゲノム上へリクルートしてウイルス遺伝子の発現を制御すると同時に、宿主染色体ゲノム内にも結合し、宿主遺伝子の発現制御にもかかわっていることが想定される。v-CYC は細胞周期の進行を促進し⁹⁾、v-FLIP は NF-κB (nuclear factor kappa B) を活性化⁷⁾、kaposin は MAPK (mitogen-activated protein kinase) システムを活性化する⁸⁾ などして、多くの宿主遺伝子の発現プロファイル制御にかかわっていると思われる。KSHV 感染 PEL 細胞で、発現が亢進するものも低下するものもあるが、前者を中心に興味深い遺伝子を取り上げ、その発現亢進の機構とその遺伝子の機能について解析を進めている。

2. KSHV の潜伏感染維持機構

KSHV の潜伏感染維持に必須の因子は LANA (latency-associated nuclear antigen) である。LANA はさまざまな宿主因子と相互作用して多彩な機能を発揮していると考えられるが、もっとも重要な機能は、ウイルスゲノムの複製・分配・維持にある。LANA は宿主複製前複合体 (pre-replication complex : pre-RC) の構成因子である origin recognition complexes (ORCs) と相互作用し、ウイルスゲノム上の ori-P にリクルートすることで、ウイルスゲノムの潜伏感染における複製開始反応を担っていると報告されている。しかしながら、ori-P は LBS だけでなく、それに続く 32bp のきわめて GC に富んだ配列も必要で、この機構では、なぜ、どのようにこの GC rich segment が必要なのかを十分説明しきれていない。また我々の解析では、LANA と ORCs との相互作用は再現されていない。

我々は、潜伏感染における KSHV ゲノムの複製の場の重要性、すなわち、LANA が KSHV の ori-P を、核マトリックスという場に引き込むことが重要であるという仮説を唱えている⁹⁾。核マト

リックスには ORCs が細胞周期依存性に集積してくるので、LANA-ori-P 複合体がむしろその場に居合わせる事が重要であり、pre-RC はその場で GC rich segment 上に形成されると考えている。本仮説は、GC rich segment 必要性に直接回答したのではなく、証明すべき疑問が残されているが、核内の場における複製理論には興味深いものがある (図2)。

一般に、ヘルペスウイルスは *in vitro* 感染系においては溶解感染の感染様式をとるが、EBV や KSHV などの γヘルペスウイルスは *in vitro* 感染でも潜伏感染状態へ傾く、すなわち、増殖状態にある培養細胞系においても潜伏感染の形態をとる能力があると考えられている。KSHV の溶解感染開始因子である RTA (replication and transcription activator) は感染初期段階で発現し、一次的に溶解感染の様相を示すが、溶解感染を完遂できない abortive 感染で終結されると考えられている。このような状態にある理由のひとつが、潜伏感染遺伝子 LANA の機能によるものと想定されている¹⁰⁾。

LANA は本来、潜伏感染遺伝子で、宿主ヘテロクロマチン因子と相互作用してウイルスゲノムをヘテロクロマチン化、もしくはヘテロクロマチン様に変換し、ウイルス遺伝子発現を抑制する機能をもっている¹¹⁾。一方で RTA による活性化も受けて、*in vitro* 感染系において溶解感染を遂行しようとする機構が LANA の発現を誘導して、結果的に潜伏感染の方向に傾けると考えられる。実際、LANA のノックダウンや欠失変異ウイルスの複製実験では、*in vitro* 感染系で溶解感染の効率が上昇することが報告されている¹²⁾。

一方で、NF-κB の活性化が潜伏感染の維持に働いているという報告がある。潜伏感染で発現している v-flip は、FADD/TRADD (Fas associated death domain/TNF (tumor necrosis-factor)-R1 associated death domain) /pro-caspase 8

NF-κB (nuclear factor kappa B)
LANA (latency-associated nuclear antigen)
ORCs (origin recognition complexes)

MAPK (mitogen-activated protein kinase)
pre-RC (pre-replication complex ; 宿主複製前複合体)
RTA (replication and transcription activator)

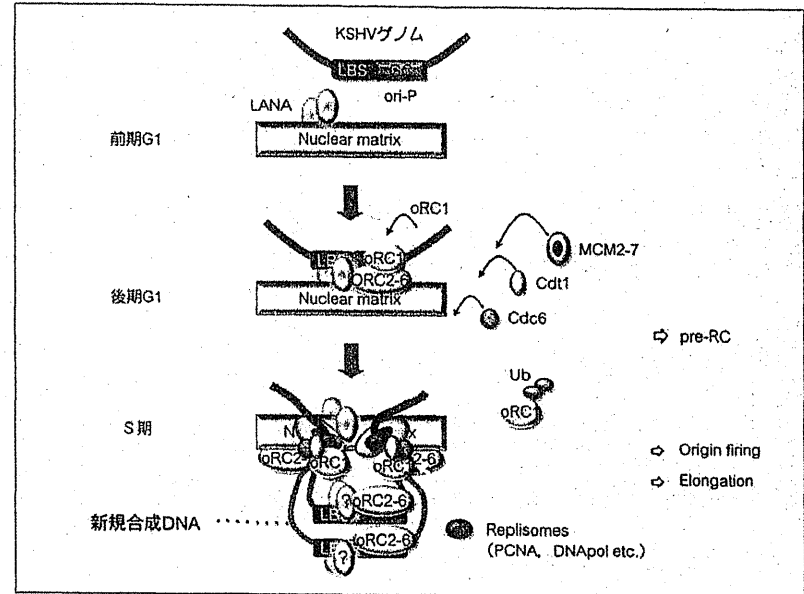


図2 KSHV 潜伏感染における複製モデル

KSHV 潜伏感染複製では、核マトリックスがきわめて重要な機能的な場を提供していると考えている。LANA は細胞周期を通じて核マトリックスに存在し、初期 G1 期から後期 G1 期にかけて、その LBS への結合活性により ori-P をたぐり寄せ、核マトリックス上へ位置させる。ORC_{2,6} は細胞周期非依存性に ori-P 上に集合していると考えられているが、ORC1 は細胞周期依存性に後期 G1 に ORC_{2,6} に会合し、最終的に pre-RC を完成させ、核マトリックス上に複製因子である PCNA や DNA ポリメラーゼ (DNApol) を取込んでレプリゾームを形成し、複製を開始する。新規に合成された DNA はすみやかに核マトリックス上から離れる。すなわち、核マトリックス上では合成のみが進行するものと思われる。

KSHV : カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス, LANA : latency-associated nuclear antigen
ORC : origin recognition complex, MCM : minichromosome maintenance
pre-RC : pre-replication complex, PCNA : proliferating cell nuclear antigen

(文献9より改変)

複合体がそのリガンドを受けて pro-caspase 8 から活性化型の caspase 8 になり、アポトーシスを誘導するカスケードを妨害すると同時に、NF-κB の活性化状態を保つことで潜伏感染を維持している¹³⁾。NF-κB の機能阻害は、KSHV 感染 PEL 細胞にアポトーシスを誘導する¹⁴⁾。また、NF-κB

の活性化状態は RTA の発現誘導を抑制する¹⁵⁾。さらに最近の報告では、潜伏感染で活性化している潜伏感染遺伝子領域 (LANA 等を含む一領域4遺伝子域を指す) 内で発現している 17 個の KSHV micro RNA のうちの miR-K1 が IκBα の 3'UTR (untranslated region) を標的にしてその発現量

FADD (Fas associated death domain)
TRADD (TNF (tumor necrosis-factor)-R1 associated death domain)

を下げることで、NF-κB の活性化に寄与しているとの報告があった¹⁶⁾。リンパ球系の腫瘍細胞では、HTLV-1 が関与する成人型 T 細胞白血病等で、NF-κB の活性化状態がその腫瘍細胞の生存維持に重要であるとされ¹⁷⁾、同様に、KSHV 潜伏感染の維持に効いている。NF-κB の活性化は通常、遺伝子発現の直接の標的遺伝子を正に制御することが通例で、負に制御する標的遺伝子があることは興味深い現象である。v-FLIP が NF-κB を活性化することで、AP-1 (activating protein-1) 経路を逆に不活化するモデルが提唱されている¹⁶⁾。

III KSHV 潜伏感染からの再活性化機構

1. 前初期遺伝子の活性化と溶解感染誘導

KSHV が潜伏感染状態から再活性化する上で、RTA の発現が重要であることには異論はない。通常、KSHV 感染 PEL 細胞を用いた系では、TPA (12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate) や sodium butylate 等の薬剤を用いて再活性化を誘導しているが、感染個体においてどのようなシグナルが RTA の活性化にかかわっているのかはあまりよく分かっていない。つまり、生体内において効率よく RTA の活性化にかかわる因子はまだ同定されていない。その中で、Notch シグナリングの標的遺伝子制御領域に存在する RBP-Jκ の結合配列と RBP-Jκ がかかっていると報告がある¹⁸⁾。しかしながら、その報告では、通常のコンディションでは遺伝子発現を抑制する RBP-Jκ が RTA と相互作用することによって、RTA そのものや RTA の標的遺伝子を活性化に導くこと、すなわち、RTA の自己活性化機構が示されているのみで、Notch リガンドで RTA が活性化するかどうかは示されていない。

RTA の自己活性化機構にはもうひとつあって、それには OCT-1 (octamer binding protein-1) が関与している¹⁹⁾。RTA の制御領域には OCT-1 が結合する、いわゆる octamer binding 配列があ

り、RBP-Jκ と同様、本来、転写活性化領域をもたず、直接的 / 単独には転写活性化を起こさない OCT-1 と RTA の相互作用により、あるいは RTA が transacting に働いて RTA を自己活性化することが想定される (図 3)。OCT-1 を介する系は、herpes simplex virus type 1 (HSV-1) の VP-16 と OCT-1 の相互作用による転写誘導に相似の機構で興味深い。

RTA は前述のごとく、KSHV 溶解感染の鍵因子で、この因子が発現するとその標的遺伝子がカスケード状に順次発現して、溶解感染を完遂させる方向へ動く。RTA の一次標的遺伝子は、K-bZIP, ORF57 (K-MTA), PAN, v-IRF など、溶解感染で発現する機能性遺伝子が当然のことながら多く含まれる。基本的には、初期遺伝子のほとんどが RTA の標的遺伝子になっていると言っても過言ではない。これらの遺伝子制御領域には、RTA に直接結合する配列をもつもの、あるいは RBP-Jκ 結合配列をもつもの、両者をもつものが存在する。RTA の転写誘導能は強力であるが、結合配列に結合して特異的に転写を活性化するというよりむしろ、promiscuous 的と筆者は考えている。こういった活性は、遺伝子発現制御領域に比較的頻繁にみられる RBP-Jκ 結合配列に依存しているのかもしれない。

K-bZIP は EBV の ZTA に相当する遺伝子で、発現タンパクの構造上も塩基性アミノ酸配列-ロイシンジッパーの領域を有するため、溶解複製 origin (ori-Lyt) など、何らかの配列に特異的に結合し、転写活性を正に誘導するものと想定されたが、実際には、ori-Lyt に結合する活性は C/EBP (CCAAT/enhancer-binding protein) を介した間接的なものであり、転写的にはまったく反対の方向へ誘導する。RTA の機能と K-bZIP の機能がどのように絡まって溶解感染を効率的に遂行するのか、ori-Lyt の認識機構も含めて、まだ解決すべき謎も多い。K-bZIP は転写的には負に制御し、

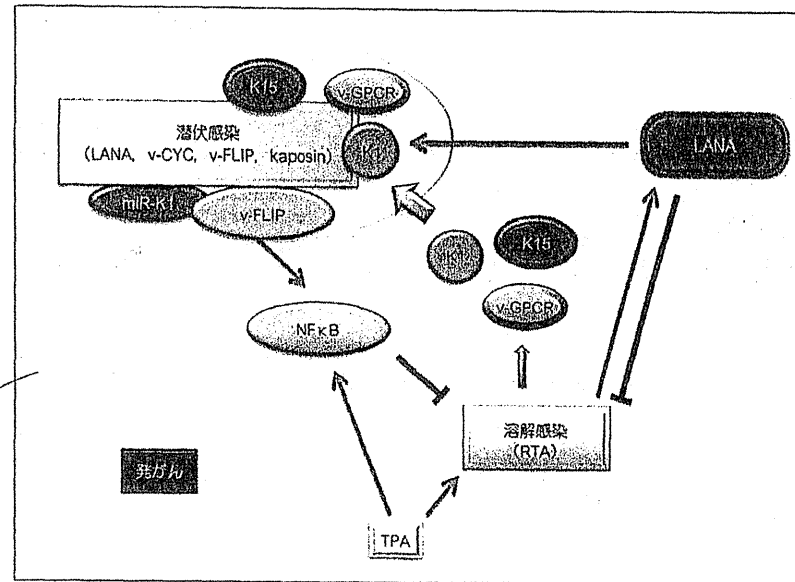


図 3 KSHV の再活性化制御と病態発生

KSHV は基本的に潜伏感染を維持していくように仕組みられている。潜伏感染で発現している micro RNA のうち、miR-K1 や発現遺伝子産物である v-FLIP、LANA が潜伏感染を維持する方向で機能している。特に、miR-K1 と v-FLIP は NF-κB を活性化することで再活性化因子 RTA の発現を抑制して、再活性化を防いでいる。一旦、再活性化が起こると、K1, v-GPCR, K15 などの KSHV 発がん遺伝子が発現してくる。一方で、LANA も再活性化でさらに発現誘導されることから量的に維持され、逆に潜伏感染を誘導する方向で機能するものと考えられる。こういった潜伏感染誘導機構により溶解感染が完遂される効率は低くなり、abortive/nonpermissive な状況が生じる中で、KSHV 発がん遺伝子の発がん機能が潜伏感染遺伝子群とともに働いて、発がんに傾くと想定している。

KSHV: カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス, LANA: latency-associated nuclear antigen
NF-κB: nuclear factor kappa B, RTA: replication and transcription activator
TPA: 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate

(筆者作成)

細胞周期を G1-S の境界領域で止めるという考え方が今のところ妥当であろう。K-bZIP には SUMO 配列があり、SUMO 化を受けることでこれらの活性を出すものと考えられている。

一方で、RTA は潜伏感染を誘導する活性をもつ LANA もこの標的に含める。溶解複製を効率よく遂行するには、潜伏感染を誘導する活性をもつウイルス遺伝子を活性化することは一見矛盾してい

るように思える。なぜ、KSHV はこのような機構をもっているのかその詳細な解明が待たれる。

IV 再活性化と病態発症

ヘルペスウイルスの再活性化はしばしば回帰感染としてヒトの疾患に関与している。αヘルペスウイルスに分類される HSV-1 の口唇ヘルペスや、水痘ウイルス (varicella zoster virus: VZV)

UTR (untranslated region)

TPA (12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate)

HSV-1 (herpes simplex virus type 1)

AP-1 (activating protein-1)

OCT-1 (octamer binding protein-1)

C/EBP (CCAAT/enhancer-binding protein)

の帯状疱疹などはもっともよい例であるが、 β 系や γ 系ヘルペスウイルスの再感染は、一般には極端な免疫不全状態に陥らないと顕正化しない、逆に言えば、通常的环境下での再活性化によるウイルス産生もしくはウイルス遺伝子発現は、生体の免疫を中心とした監視機構により厳密に排除される仕組みになっているものと考えられる。KSHVの場合、れっきとした初期感染による病態発症や、再活性化に基づく病態との関連は報告されていない。

KSHVが関連する病態は、human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) による AIDS という母体環境における KS, PEL, MCD (multicentric castlemans disease) などの腫瘍もしくは腫瘍様疾患である (ただし、いわゆる classical KS の発症に AIDS は関与しない)。KSHV の本来の病原性ウイルスとしての活性は、このような環境におかれて初めて発揮されるものと思われる。また、これらの病態は基本的には潜伏感染の感染形態をとっているため、潜伏感染→発がんの構図が想定される。

しかし、冒頭に述べたように、KSHV にしても EBV にしても、感染患者もしくはウイルス保有者全体で考えると発がん率が高い訳ではなく、ウイルスをもっていれば、がんができるということではない。たとえ潜伏感染から関連するがんが発症するにしても、発症に至る経緯はそう単純ではないと思われる。

潜伏感染関連遺伝子では v-CYC は細胞周期 (S 期) を促進し、一方で、染色体不分離現象を誘発する活性がある。v-FLIP は DEATH シグナルを遮断してアポトーシスを抑制したり、NF- κ B を活性化したりする。Kaposin には MAPK を活性化する機能があり、細胞を基本的には増殖に傾けているものと予測される。潜伏感染におけるウイルスゲノムの複製・分配・維持など、潜伏感染の維持にかかわる基本的なところで重要な働きをしている LANA を、293 細胞等で単独発現させると

核の不分離現象などが比較的良好に観察されるようになる (私信)。

LANA は p53 と相互作用する活性があるので²⁰⁾、このことは一見、LANA が発がんに関与しているような印象を与えるが、細胞増殖にとって本現象は不利な状態であり、LANA を発現して多核となった細胞増殖が効率よく増殖してくるわけではない (私信)。実際、293 は KSHV に感染し潜伏感染様になるとされるが、その細胞がトランスフォームしてヌードマウス等で造腫瘍性をもつようになったという報告は見当たらない。我々が *in vitro* 感染系において潜伏感染状態を再現したり、あるいは潜伏感染発現遺伝子を発現させて偽潜伏感染状態を作成したりしても、基本的には KSHV の発がん能は観察されない (私信)。Trans-acting factor による発がんのように、数十年といったオーダーを考慮した実験系のデザインが必要であるが、いずれにせよ $10^7 \sim 10^8$ に 1 個、がんが発生する確率であるとは考えにくい。

そもそも KSHV がもつ、KI, v-GPCR, K15 など、発がんポテンシャル遺伝子はすべて溶解感染遺伝子である。これらの遺伝子産物のトランスフォーム能は抽出系では確認されている。したがって、KSHV 発がん過程で一定の役割を担っていると想定され、この意味で、潜伏感染から再活性化し溶解感染遺伝子が発現することに、かなり重要な意味があるものと考えている。しかし、そのまま溶解感染を完遂すると細胞は破壊死滅してしまうので、発がんに傾ける、あるいはその効率を上昇させる溶解感染遮断ポイントがあるものと予測している。この考えは、SV40 (simian virus 40) などのポリオマ系ウイルスやアデノウイルスによるトランスフォーミング能が、non-permissive 細胞においてみられるという考えとまったく同じであるが、ヘルペスウイルスのように比較的大型のウイルスで、多くの遺伝子をもつウイルスにおいて、どのような機構が発がんに傾けているのか、今後の研究の発展が望まれる (図 3)。

V おわりに

潜伏感染状態を維持し続けることは、ウイルスの種存続の観点で考えるとよいこととは言い難い。もちろん、溶解感染が効率よく進行するためには、適応した細胞内環境が必要であり、溶解感染の効率のよい細胞とそうでないものがあるものと思われ、潜伏感染はむしろ溶解感染の機会を待ち受ける状態と位置づけた方が考えやすい。しかしながら、KSHV では再活性化が誘導されても、一方で潜伏感染を再度誘導する機構を働かせ、むしろ、溶解感染がある確率で進行しないような abortive な再活性化を行っている。この活性が母体にとっては、発がんという疾患で表出されるわけであるが、再活性化を dead-end で終わらせる戦略は、本当に KSHV が活用する存続戦略になりえるのであろうか？

文献

- 1) Chang Y, et al: Identification of human herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science* 266: 1865-1869, 1994
- 2) Russo JJ, et al: Nucleotide sequence of the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (HHV8). *Proc Natl Aca Sci USA* 93: 14862-14867, 1996
- 3) Sarid R, et al: Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus: epidemiology, virology, and molecular biology. *Adv Virus Res* 52: 139-232, 1999
- 4) Ueda K, et al: KSHV-infected PEL cell lines exhibit a distinct gene expression profile. *Biochem Biophys Res Com* 394: 482-487, 2010
- 5) Garber AC, et al: DNA binding and modulation of gene expression by the latency-associated nuclear antigen of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J Virol* 75: 7882-7892, 2001
- 6) Verschuren EW, et al: The oncogenic potential of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus cyclin is exposed by p53 loss *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Cell* 2: 229-241, 2002
- 7) Ye F-C, et al: Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latent gene vFLIP inhibits viral lytic replication through NF- κ B-mediated suppression of the AP-1 pathway: a novel mechanism of virus control of latency. *J Virol* 82: 4235-4249, 2008
- 8) McCormick C, Ganem D: The Kaposin B protein of KSHV activates the p38/MK2 pathway and stabilizes cytokine mRNAs. *Science* 307: 739-741, 2005
- 9) Ohsaki E, et al: Accumulation of LANA at nuclear matrix fraction is important for Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus replication in latency. *Virus Res* 139: 74-84, 2009
- 10) Garber AC, et al: Latency-associated Nuclear Antigen (LANA) Cooperatively Binds to Two Sites within the Terminal Repeat, and Both Sites Contribute to the Ability of LANA to Suppress Transcription and to Facilitate DNA Replication. *J Biol Chem* 277: 27401-27411, 2002
- 11) Sakakibara S, et al: Accumulation of Heterochromatin Components on the Terminal Repeat Sequence of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Mediated by the Latency-Associated Nuclear Antigen. *J Virol* 78: 7299-7310, 2004
- 12) Li Q, et al: Genetic disruption of KSHV major latent nuclear antigen LANA enhances viral lytic transcriptional program 379: 234, 2008
- 13) Thureau M, et al: Viral Inhibitor of Apoptosis vFLIP/K13 Protects Endothelial Cells against Superoxide-Induced Cell Death. *J Virol* 83: 598-611, 2009
- 14) Keller SA, et al: NF- κ B is essential for the progression of KSHV- and EBV-infected lymphomas *in vivo*. *Blood* 107: 3295-3302, 2006
- 15) Brown HJ, et al: NF- κ B Inhibits Gammaherpesvirus Lytic Replication. *J Virol* 77: 8532-8540, 2003
- 16) Lei X, et al: Regulation of NF- κ B inhibitor I κ B α and viral replication by a KSHV microRNA. *Nat Cell Biol* 12: v193-199, 2010
- 17) Mori N, et al: Bay 11-7082 inhibits transcrip-

- tion factor NF- κ B and induces apoptosis of HTLV-1-infected T-cell lines and primary adult T-cell leukemia cells. *Blood* **100** : 1828-1834, 2002
- 18) Liang Y, et al: The lytic switch protein of KSHV activates gene expression via functional interaction with RBP-J κ (CSL), the target of the Notch signaling pathway. *Genes Dev* **16** : 1977-1989, 2002
- 19) Sakakibara S, et al: Octamer-Binding Sequence Is a Key Element for the Autoregulation of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus ORF50/Lyta Gene Expression. *J Virol* **75** : 6894-6900, 2001
- 20) Chen W, et al: Distinct p53, p53 : LANA, and LANA Complexes in Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Lymphomas. *J Virol* **84** : 3898-3908, 2010

B型肝炎ウイルスレセプターの謎

上田 啓次 大阪大学大学院医学系研究科 感染免疫医学講座ウイルス学教授

BlumbergがAustralia抗原としてB型肝炎ウイルス (hepatitis B virus: HBV) の存在を示したのは1963年のことであるから、このウイルスの発見からかれこれ半世紀になろうとしている。その後の分子生物学的手法を用いた研究は、HBVのウイルス学的性状を次々明らかにし、抗ウイルス薬を用いた治療法も一定の効果を挙げているように見えるが、根本的に重要な問題が解決されていない。それはHBVの感染受容体(レセプター)である。HBV感染受容体の同定は、培養細胞系のみならず、特に個体レベルにおける感染系の樹立と、それを用いた病態の解明、治療法の開発にはどうしても解決しなければならない問題であるが、ウイルスの発見から50年も経とうとしているにもかかわらず、どうしていまだに解明されない問題として残っているのだろうか？

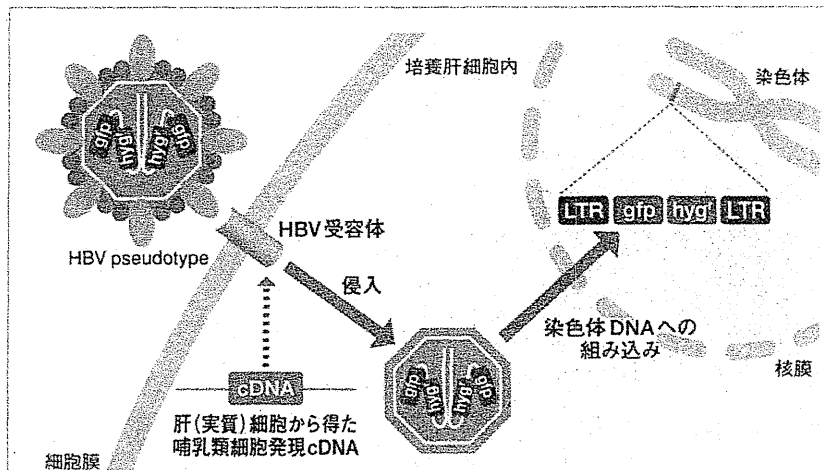
もちろん、同定されないことに関しては種々の理由があるものとは思われる。最も重要なのは、そもそも*in vitro*感染系が存在しないことであるが、現在われわれが持つ肝癌由来の培養細胞株では、HBV DNAの導入により、その遺伝子発現、複製、粒子形成を観察することは可能である。つまり、これらの細胞は、このウイルスが付着・侵入のステップを通過さえできれば、完璧に感染許容細胞となり得る。多くのウイルスが、*in vitro*では生体におけるバリアーの存在しない培養細胞系においては、本来感染しない組織由来の細胞株にすら感染できるのとは大きな違いである。肝癌という脱分化や、組織構築のない培養細胞系がもたらす遺伝子発現の変化の影響なのか？ しかし、同族ウイルスである duck hep-

atitis B virus (DHBV)を用いた初代アヒル培養肝細胞を用いてもうまくいかなかったのは、なぜだろうか？ 謎は深まるばかりである。

一体どうすれば、このウイルスのレセプターの同定に迫ることができようか？ 私どもが、この問題に取り組んでいた約20年前とは、技術的にはかなり進歩したように思える。現代分子・細胞・生化学技術をもってすれば一気に解決できる問題か？

今、取り得るこれまで試みられていない方法—HBV pseudotypeによる感染性を指標にしたHBVレセプターの分離・同定を目指している(図)。ウイルス学が教えるところによれば、付着・侵入にかかわるウイルス側因子(リガンド)と感染細胞が提供するレセプターは必ず存在するはずである。

図 HBV pseudotypeを用いたHBV感染レセプター同定戦略



HBVの外殻(エンベロープ)に置き換えたレトロウイルスに、標識として2つの遺伝子マーカー(gfp, hyg^r)を組み込んだ“HBV pseudotype”を作成した。肝(实质)細胞から得た哺乳類細胞発現cDNAライブラリーを培養肝細胞へ導入し、そのcDNAからHBV受容体が発現、もしくはHBV受容体の活性や発現に影響する遺伝子が導入されて機能するようになった場合、HBV pseudotypeが受容体に結合し、培養肝細胞内に侵入する。その後、HBV pseudotypeのゲノムは逆転写されてDNAとなり、培養肝細胞の染色体DNAに組み込まれ、gfpとhyg^rの遺伝子が発現する。導入されたcDNAをPCRなどで同定することで、HBV感染受容体もしくはその活性に影響を与える遺伝子の同定・分離が可能になる。

gfp: 緑色蛍光蛋白質の遺伝子 hyg^r: ハイグロマイシン耐性遺伝子 LTR: long terminal repeat

ウイルス肝炎のすべて

Ⅲ 血液感染するウイルス肝炎

1. B型肝炎

(1) B型肝炎のウイルス学

上田 啓次*

1960年代に Blumberg がオーストラリア抗原と肝炎との関連を示してから半世紀が迫ろうとしている。この抗原こそが B 型肝炎ウイルス (hepatitis B virus : HBV) の遺伝子産物であった。分子生物学の発展とともに、HBV の塩基配列の決定、遺伝子同定、遺伝子機能の解析は進み、ワクチンの開発にも成功した。しかしながら、簡便な感染系が存在しないことから HBV のウイルス学はまったく進展しておらず、HBV の真のライフサイクルのみならず、急性あるいは慢性肝炎、肝硬変、肝がんといった深刻な病態の発症機構は不明な点が多い。問題解決には HBV 感染受容体を分離・同定し、確固とした、かつ簡便な感染系を樹立することが不可欠である。ウイルス学最大の難問を解決する糸口を模索する。

Key Words : hepatitis B virus, HBV, 逆転写, 感染受容体, 感染系

はじめに

Blumberg が白血病患者血清中に新規の抗原 (オーストラリア抗原) を発見し報告したのは 1965 年¹⁾、その後、数年で輸血後の血清肝炎との関連が確立された²⁾。この感染性因子が B 型肝炎ウイルス (hepatitis B virus : HBV) である。わが国では大河内らが最初に、日本人における本抗原の保有率を報告している³⁾。疾患概念の確立は、慢性 B 型肝炎から肝硬変、肝がんへの病態進行や母体からの垂

直感染の存在を明らかにした。

1970 年代後半～80 年代前半にかけて、分子生物学的研究手法の確立と相まって、次々とウイルスゲノムのクローニングと塩基配列が決定され、げっ歯類のウッドチャック (woodchuck hepatitis virus : WHV) や地リス (ground squirrel hepatitis virus : GSHV)、鳥類ではアヒル (duck hepatitis B virus : DHBV) や鷺 (heron hepatitis B virus) にも同族のウイルスが存在することが明らかにされた。哺乳類では類人猿であるチ

Virology of the hepatitis B virus

*大阪大学大学院医学系研究科感染免疫医学講座ウイルス学 教授 Keiji Ueda

III 血液感染するウイルス肝炎

ンパンジー (chimpanzee hepatitis B virus) やオランウータン (orangutan hepatitis B virus) などにも同様のヘパドナウイルスが蔓延していることが知られている^{4) 5)}。

また、HBVは従来、サブタイプとして adr, adw, ayw のように分類されていたが、最近ではゲノタイプ A ~ H として分類されている⁴⁾。

ヘパドナウイルスの特徴は、ゲノムサイズがきわめて小さく、およそ 3.2kb 前後の部分的 2 本鎖の環状 DNA ウィルスであること、遺伝子はだまかに言って、コア遺伝子、pol 遺伝子、S 遺伝子と X 遺伝子のたった 4 つである (鳥類のヘパドナウイルスには X 遺伝子は存在しないとされている) ことや、DNA ウィルスでありながら複製に逆転写過程が存在することである^{4) 5)}。

分子生物学的手法により各遺伝子の機能や複製機構、組み込み体の解析から肝がん発生との関連が研究されてきた。しかしながら、ヘパドナウイルス学を論じる上で解決されていない決定的な問題が 2 つあり、その問題が解決されない限り、ヘパドナウイルスの真のウィルス学、病態論やウィルスの本質に則した治療法の開発はないものと考えている。その問題点とは、有用かつ簡便な感染系が存在しないこと、ヘパドナウイルス複製酵素 pol の *in vitro* アッセイ系が存在しないことである。

本稿では HBV を概説した後、前述の解決されない主要 2 問題について概説したい。

II HBV 粒子構造, ゲノム, 遺伝子, 転写産物

HBV の感染性粒子は Dane 粒子と呼ばれる膜粒子とその内部のコア粒子 (キャプシド) で構成され、キャプシド内にウィルスゲノムを内在する (図 1A)。前述のごとく、HBV のゲノムはきわめてコンパクトに組織されてい

る。また、単純な 2 本鎖 DNA ゲノムではなく、部分的に 2 本鎖の環状 DNA である。さらに、⊖ 鎖 DNA の 5' 端に末端タンパクが付着し、⊕ 鎖 DNA の 5' にはプライマー RNA がついているという独特の構造をしている (図 1B)。また、レトロウィルスゲノム末端の非翻訳領域 (untranslated region : UTR) に機能的に相同と考えられる direct repeat 1 および 2 (DR1, DR2) 配列がある。DR1 はプレゲノム RNA の 5' に、3' には DR2 および DR1 が存在している⁴⁾。

このきわめてコンパクトなゲノムにウィルスとしての営みに必要な最小限の遺伝子がコードされている。それらの遺伝子は、コア (C)、pol、S と X 遺伝子の 4 つである。コア遺伝子と S 遺伝子は読み取り枠の違いにより、コア遺伝子は preC-C と C の 2 つに、また、S 遺伝子は large S (LS)、middle S (MS)、small S (SS) の 3 つに分けられる (図 1)。

III preC-C (プレコア-コア) 遺伝子

ウィルスのキャプシド形成にかかわる構造遺伝子産物を供給する。2 つの in-frame 翻訳コドンにより、preC (29 アミノ酸 (aa))-C (185aa) の読み取り枠となるか、C のみの読み取り枠となるかが決定される。PreC-C あるいは C 遺伝子に固有の転写産物はないが、preC-C の読み取り枠になるには preC-C 翻訳開始コドン ATG より上流から転写が開始される必要がある。また、C の翻訳にかかわる転写産物は、いわゆるプレゲノム RNA と考えられる (図 2A)。

PreC-C 産物は N 末に疎水性アミノ酸配列からなる分泌シグナルがあり、また、C 末のアルギニンに富む領域の前で切断されて HBe 抗原として分泌される⁴⁾。HBe 抗原産生のウィルスにとっての生理的な意義はよくわからないが、C 遺伝子産物とほとんどオー

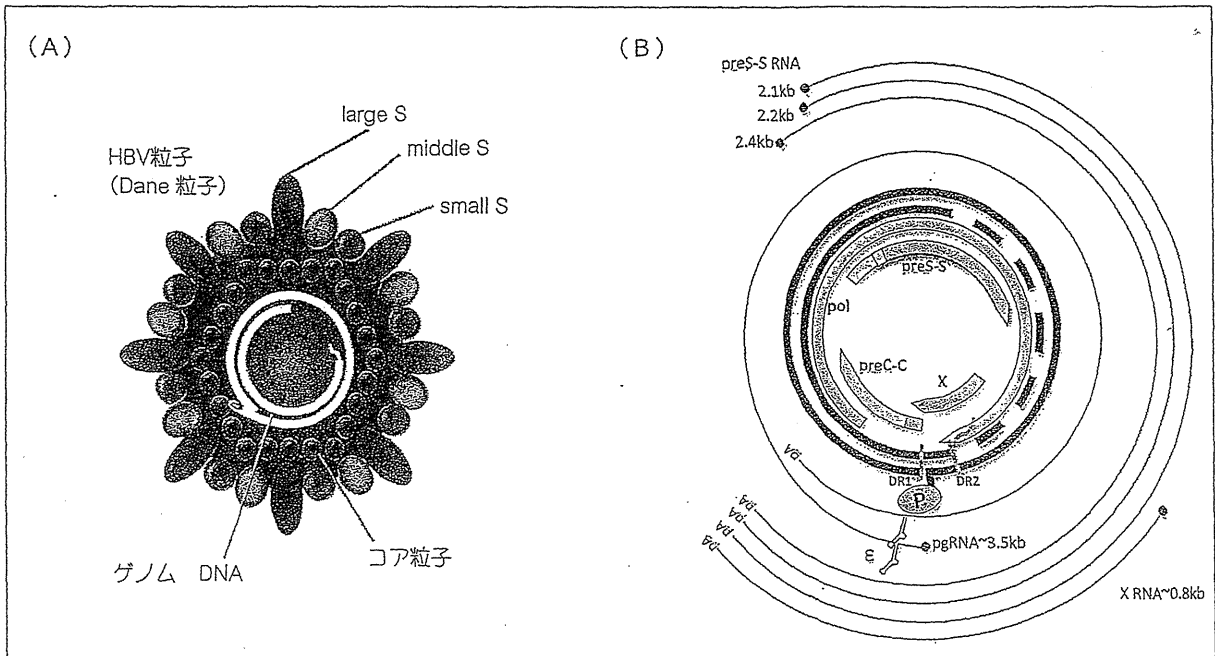


図1 HBV 粒子とゲノム構造

(A) HBV の感染性粒子構造。HBV は部分 2 重鎖 DNA 環状構造をもつゲノムを内在するコア粒子 (キャプシド) と、それを被う外膜構造をもつ。外膜は、LS, MS, SS で構成される。(B) HBV ゲノム (太い実線, 部分 2 重鎖は破線) の構造, 関連転写産物 (外枠: 細い実線), 遺伝子 (タンパク読み取り枠) (内側: ブロック矢印) を示す。ゲノムは 5' 鎖に末端タンパク (P) (HBV pol) が付着している。複製に重要な DR (direct repeat) 1, DR2 の位置が示されている。転写産物の 5' は cap 構造を取り (●) ポリ A で終わる。3.5kb mRNA は正確には preC-C 産生にかかわる preC ATG を含むものと, 含まないプレゲノム RNA (pgRNA) に分けられる。pgRNA についてのみ, ε の位置, 構造を示してある。preS-S 産生にかかわる mRNA は, 2.4kb (LS), 2.2kb (MS), 2.1kb (SS) である。また, 0.8kb mRNA は X 遺伝子固有の mRNA である。

HBV: B型肝炎ウイルス

(文献4より)

オーバーラップしていることから, キャリア化や慢性肝炎化などの持続性 HBV 感染に起因している可能性があると思われる。

血中 HBe 抗原の量は HBV 慢性肝炎の活動性ともよく関連し, HBV 増殖状況をよく反映している。HBe 抗原陰性化と HBe 抗体の陽性化という seroconversion に preC 領域内の終始コドンへの変異をともなうことが知られており, これにともない, 肝炎も鎮静化することが多い⁶⁾。

C 遺伝子産物は HBV のコア粒子形成に不可欠なタンパク因子である。2量体が集合して最終的なコア粒子を形成すると考えられている。単一構成因子であるため, T (T; triangulation number) = 1 のもっとも単純な正二十面体キャプシドを形成すると予測され

るが, cryoelectronmicroscopy による粒子結晶構造解析では T = 3 ~ 4 で, 約 180 ~ 240 分子からなる正二十面体構造をとっていることがわかっている⁷⁾。

コア粒子の形成過程でパッケージングシグナル ε を介してプレゲノム RNA が粒子に取り込まれ, あるいはコアタンパクの分子集合に付随しつつ, プレゲノム RNA から逆転写により 5' 鎖 DNA 合成, そして 3' 鎖 DNA 合成が進行するものと考えられる⁸⁾。コアタンパクが核内に存在することは報告されているが, コア粒子そのものがどこで形成され, どのような過程で膜粒子に取込まれるかなど, ウイルス粒子形成のダイナミックな分子集合プロセスには不明な点が多い。