

平成19年2月

# 大橋 誠 学位論文審査要旨

主 査 林 一 彦  
副主査 日 野 茂 男  
同 西連寺 剛

## 主論文

Accumulation of Epstein-Barr virus (EBV) BRF1 protein EA-D during latent EBV activation of Burkitt's lymphoma cell line Raji

(バーキットリンパ腫細胞株Rajiの細胞内潜伏Epstein-Barrウイルス(EBV)の活性化におけるBRF1蛋白質EA-Dの蓄積)

(著者：大橋 誠、堀江和峰、星川淑子、長田佳子、尾崎充彦、井藤久雄、西連寺 剛)

平成19年2月 Microbes and Infection 掲載予定

# 学 位 論 文 要 旨

## Accumulation of Epstein-Barr virus (EBV) BMRF1 protein EA-D during latent EBV activation of Burkitt's lymphoma cell line Raji

### (バーキットリンパ腫細胞株Rajiの細胞内潜伏Epstein-Barrウイルス (EBV) の活性化におけるBMRF1蛋白質EA-Dの蓄積)

バーキットリンパ腫細胞株Raji、P3HR-1、及びAkata細胞内に潜伏感染している Epstein-Barr virus (EBV) が活性化 (lytic cycle) において誘導される、初期遺伝子BMRF1 蛋白質 (EA-D) の細胞内発現の動態及び機能的役割を解析することを目的とし本研究を行った。

## 方 法

EBV活性化誘導系として、BZLF1誘導発現系 (Tet-Onシステム) を導入したRaji細胞、33°C 培養条件下のP3HR-1細胞、抗IgG抗体処理をしたAkata細胞を用いた。EBV活性化の指標としてlytic cycleにおける前初期遺伝子BZLF1の遺伝子産物ZEBRA、初期遺伝子BMRF1の遺伝子産物EA-Dとこれらに対するモノクローナル抗体を用い、ウエスタンブロッティング法および蛍光抗体法により解析した。細胞死の検出にはTUNEL法を用い、形体的観察には走査電子顕微鏡を用いた。細胞の分画はPercoll密度勾配法を用いた。リン酸化の解析にはλプロテインホスファターゼ (脱リン酸化酵素) 及び、ホスファターゼ阻害剤 (脱リン酸化阻害剤) であるオカダ酸を用いた。

## 結 果

Tet-Onシステムとはドキシサイクリン添加により目的遺伝子の発現が誘導される系である。しかし、本BZLF1誘導発現系を導入したRaji細胞においては、ドキシサイクリン添加に依存することなくBZLF1発現が誘導された。BZLF1発現Raji細胞において、EA-Dの極めて多量の細胞内蓄積を見出し、その発現の動態を解析した。培養時間経過と共にEA-D蛍光陽性細胞の割合及び、蛍光強度が増大し、EA-D発現は、小型細胞や細胞内及び培養液中の小粒子構造体に局限して見られた。EA-D発現の早期に58 kDa、50 kDa EA-D分子が出現し、後期に48 kDa、44 kDaのEA-D分子の蓄積が見られた。TUNEL法により、EA-D陽性細胞は死細胞であることが明らかとなった。EA-D陽性の小型細胞及び小粒子構造体はPercollの最も比重の高い層に分画でき、主に48 kDa、44 kDa EA-D分子であることが明らかとなった。EA抗体を

用いて染色した結果、EA-D陽性の細胞内外の粒子状構造は、33℃培養P3HR-1細胞においても観察された。走査電子顕微鏡による観察により、細胞外の粒子構造体は表面に膜構造で包まれ、大きさは1-3  $\mu\text{m}$ であった。EA-D分子の発現の動態は、33℃培養P3HR-1細胞及び、抗IgG抗体処理したAkata細胞においても観察された。EA-D分子のリン酸化をプロテインホスファターゼ及び、オカダ酸で解析した結果、58 kDaおよび、50 kDaは $\lambda$ プロテインホスファターゼ処理により48 kDa、44 kDaへ変換し、その変換はオカダ酸により阻害された。

## 考 察

EA-Dの機能は転写活性因子及び、EBV DNAポリメラーゼ・プロセッシング因子として知られている。本研究からEA-Dは58、50、48、44 kDaの分子として細胞内発現が見られ、58 kDa、50 kDa分子はリン酸化EA-Dであり、48 kDa、44 kDa分子は脱リン酸化EA-Dであることが明らかになった。58 kDa分子が50 kDa分子より早期に出現することから58 kDa分子は転写因子として機能し、50 kDa分子はDNAポリメラーゼとして機能し、共にEBV DNA合成に参与していることが示唆された。48 kDa、44 kDa分子は死細胞内に蓄積することより、これらのEA-DはEBV DNA複製には関与しないと推測された。

## 結 論

EBV活性化の早期にリン酸化EA-Dである58 kDa、50 kDa分子が発現され、後期には脱リン酸化された48 kDa、44 kDa分子が死細胞内に蓄積することが明らかとなった。