

## 4. Epstein-Barr ウイルスの増殖機構： ウイルスゲノム複製を中心として

鶴見 達也

Epstein-Barr virus (EBV) は伝染性単核球症の原因ウイルスとして知られているが、バーキットリンパ腫、上咽頭がん、T細胞白血病、胃がん、乳がん等との関連が指摘されているヒトがんウイルスである。バーキットリンパ腫の樹立細胞から EBV ゲノムが脱落すると腫瘍原性がなくなり再び EBV が感染し EBV ゲノムが導入されるとその細胞は腫瘍原性を獲得することから、細胞に EB ウイルスゲノムが複製保持されることが腫瘍原性に密接に関連していることが示唆される。従ってウイルスゲノム複製及び保持機構の解明は EBV 感染がん細胞の制御を考える上で重要な研究領域である。

DNA ウイルスである EBV は宿主細胞の核をゲノム複製の場とするが、潜伏感染状態とウイルス産生状態でウイルスゲノム複製機構が異なる。潜伏感染状態ではウイルスゲノムはヒストン蛋白質と結合したヌクレオゾームとして存在し染色体 DNA と同じように S 期に同調して 1 回複製される。このゲノム複製は細胞周期に依存した複製様式から染色体複製開始の制御に関わる宿主蛋白質が EBV ゲノムと相互作用をしていることが最近相次いで報告された。一方、ウイルス産生状態においては潜伏感染時とは異なる複製開始領域 oriLyt から複製が開始し少なくとも複製後期においてはローリングサークル型複製様式によりウイルスゲノムは複製される。ローリングサークル型複製フォークで働く DNA 合成装置は 6 種のウイルス由来複製蛋白質群 (DNA ポリメラーゼ複合体, 一本鎖 DNA 結合蛋白質, ヘリカーゼ/プライマーゼ複合体) から構成される。

本稿では①潜伏感染時の EBV ゲノム複製に関与することが明らかとなった Orc, CDC 6, MCM complex の細胞内動態についてのぞく②EBV 複製フォークで働くウイルス複製蛋白質の機能, 蛋白質間相互作用について我々がこれまでに得た知見を紹介し, EBV 複製フォークのモデルを提示すること, また対照となるバクテリオファージなどの原核生物, 真核生物複製系と比較検討する。

### はじめに

20世紀後半の真核生物ゲノム複製の研究は細胞核でゲノム複製をする DNA 型ウイルスをモデルとして進められた。パポウイルス (SV40, HPV) はゲノムサイズが小さいため限られたウイルス蛋白質のみを発現し宿主細胞の染色体複製機能を最大限利用して自己増殖する。従って複製開始領域結合蛋白質以外は宿主細胞染色体複製伸長装置により複製され, その研究は細胞複製伸長蛋白質群の同

愛知県がんセンター研究所腫瘍ウイルス学部 (〒464-8681 名古屋市千種区鹿子殿 1-1)

Molecular Mechanism of Epstein-Barr Virus DNA Replication.

Tatsuya Tsurumi

Division of Virology, Aichi Cancer Center Research Institute

1-1, Kanokoden, Chikusa-ku, Nagoya 464-8681, Japan

TEL & FAX : 052-764-2979

E-mail : ttsurumi@aichi-cc.jp

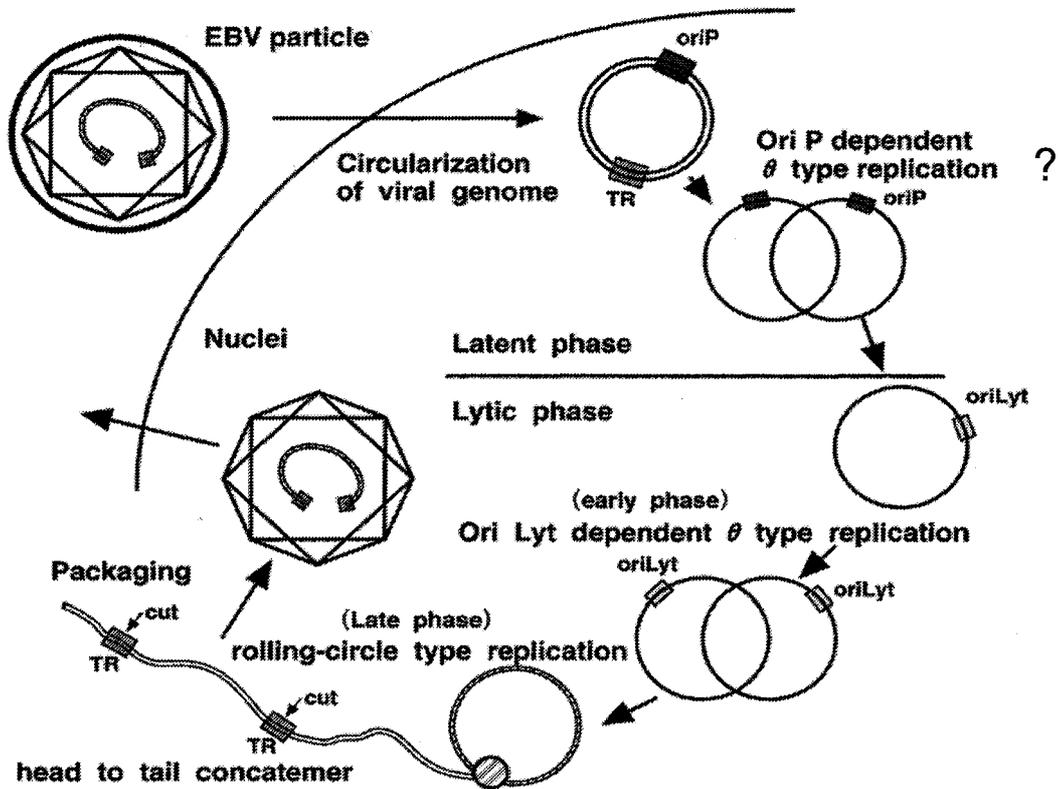


図1 Epstein-Barr ウイルスゲノム複製様式の模式図

定, 性状解析に大きく貢献した. 一方, ヘルペス属ウイルスは核で増殖する DNA ウイルスの中で最大長のゲノム (>150kbp) を有し, ウイルス独自の複製蛋白質群を感染細胞内に発現誘導し一部宿主細胞の複製因子の助けを借りながらゲノム複製を行なう. 従ってその研究は原核生物系における大腸菌に対するバクテリオファージのゲノム複製研究と対比されるものと位置付けられる.

EBV は人類の90%以上が成人に達するまでに感染し, 生涯を通じてヒトと共存するように進化したヘルペス属ウイルスである. EBV は静止期にある末梢血 B リンパ球に感染する. 感染 B リンパ球は芽球化し細胞周期が進むようになり分裂増殖をはじめ EBV は潜伏感染状態にはいる. ウイルスゲノムは染色体 DNA と同じように S 期に同調して1回だけ宿主細胞 DNA 複製装置によって複製される. この細胞周期に依存したゲノム複製は染色体複製開始の制御に関わる蛋白質 (Orc complex, MCM complex) が EBV ゲノムと相互作用をしていることが最近報告された. ウイルスゲノムと染色体複製開始蛋白質が関わり合うという初めての報告であり, 哺乳類の複製開始領域が特定されていない現在, 細胞染色体ゲノム複製開始機構研究のモデル系として今後重要性が増すことが予想される.

ウイルス産生状態は潜伏感染状態にある細胞で始まる. 従って潜伏感染状態のプラスミドレプリコンは溶解型ウイ

ルスゲノム複製を開始するための鋳型として働く. ウイルス産生状態においては7種のウイルス複製蛋白質が発現誘導され, 潜伏感染時とは異なる複製開始領域 *oriLyt* から複製が開始し, 少なくとも複製後期においてはローリングサークル型複製様式によりウイルスゲノムは複製される. head to tail に連結したコンカテマーの長い複製中間体が生成され, 核内でユニット長に切断されカプシド内にパッケージされる. ローリングサークル型複製フォークで働く DNA 合成装置は6種のウイルス由来複製蛋白質群 (BALF 5, BMRF 1, BALF 2, BBLF 4, BSLF 1, BBLF 2/3) および一部細胞複製因子から構成されることが考えられる.

本シンポジウムでは潜伏感染時の EBV ゲノム複製に関与することが明らかとなった Orc, CDC 6, MCM complex の細胞内動態について我々がこれまでに得た知見を紹介し, さらにウイルス産生状態においては EBV 複製フォークで働くウイルス複製蛋白質の機能, 蛋白質間相互作用の検討から EBV 複製フォークのモデルを提示すること, また対照となるバクテリオファージなどの原核生物, 真核生物複製系と比較検討することを試みた.

1. EBV の感染とそのゲノム複製様式の概要

EBV ゲノム複製様式の概要を図1に示す. EBV はヘルペスウイルス科 (*Herpesviridae*) に属し,  $\gamma$ ヘルペスウイ

ルスに分類されている。ウイルス粒子内には直鎖状で約170 Kbp におよぶ2本鎖DNAを有し、約90の蛋白質をコードしている<sup>2)</sup>。EBVの感染はこれまで唾液中のEBV粒子が咽頭上皮に感染し、溶解感染したあと progeny ウイルスがBリンパ球に感染すると思われてきたが、最近EBV粒子は扁桃陰窩に存在するBリンパ球に直接感染すると考えられるようになった<sup>7)</sup>。EBV粒子はウイルス蛋白質gp350/220とgH/gL/gp42複合体を介しB細胞表面に存在するCD21とHLAclass II分子と結合し静止期状態にある末梢血Bリンパ球に感染侵入する<sup>22)</sup>。ウイルスゲノムは細胞の核に移送され、その両末端に存在する末端反復配列(terminal repeat)を介して環状化する。細胞あたり数個から数十コピーまで増幅複製され、潜伏感染状態に入るがその増幅機構は不明である。感染細胞はリンパ芽球化し細胞周期が廻るようになる。この潜伏感染状態においてはウイルス産生はなく9種のウイルス蛋白質(EBNA-1, EBNA-2, EBNA-3A, EBNA-3B, EBNA-3C, EBNA-LP, LMP-1, LMP-2A, LMP-2B)と3種のウイルスRNA(EBER1, EBER2, BARF0)が発現している<sup>8)</sup>。各々の蛋白質の機能については詳しく解析されているが、その内LMP1はBcl-2, A20など抗アポトーシス蛋白質の発現誘導も起こす為、アポトーシスを抑制し、さらにcyclin D蛋白質, Rb蛋白質のリン酸化を誘導する為、細胞周期は回転し細胞は分裂増殖を続けるようになる。生体ではEBVが感染するとこのEBV感染Bリンパ芽球を特異的に認識するCD8陽性Tリンパ球が急速に増殖をはじめ、最盛期にはT細胞の実に50%以上をEBV特異的Tリンパ球が占めることになる<sup>17)</sup>。このEBV特異的Tリンパ球とEBV感染Bリンパ球との戦いが伝染性単核球症の症状となって出現する。EBV既感染健康人ではCD8陽性T細胞の1%がEBV特異的であり<sup>21)</sup>、それが時々EBVの再活性化Bリンパ球の増殖を押さえ込んでいると考えられる。

環状dsDNAとなったEBVゲノムはヒストン蛋白質が結合し、ヌクレオソーム状態でEBNA1蛋白質を介し染色体に結合し、染色体外遺伝子として宿主細胞の核で複製維持される。潜伏感染中は宿主染色体DNAと同様ウイルスゲノムは宿主染色体複製装置によりS期に同調して細胞周期あたり一回複製される<sup>1,28,41)</sup>。

EBV産生状態への移行はBZLF1蛋白質の発現により引き起こされるが、生体内において何が引き金となってBZLF1蛋白質の発現が起こっているのか明確にはわかっていない。培養細胞実験レベルでは潜伏感染状態のBリンパ球をホルボルエステル、カルシウムイオノフォアなどで処理するとシグナル伝達系を介してBZLF1蛋白質を発現させウイルス産生状態を誘導することができる。BZLF1蛋白質は転写活性化因子であり、自分自身、BRLF1蛋白質、BMLF1蛋白質を発現誘導する。この3者は転写因子として働き、Early蛋白質群の発現(ウイルス複製蛋白

質群、核酸代謝に関与するウイルス蛋白質群が含まれる)を誘導する。続いてウイルスDNA合成が始まり、その後Late蛋白質群(ウイルス粒子構成蛋白質をふくむ)の転写が誘導される<sup>31)</sup>。

ウイルス複製感染(Lytic cycle)は潜伏感染時のウイルスゲノム複製とは大きく異なる。潜伏感染時のウイルスゲノム複製はEBNA1蛋白質以外は細胞の染色体複製装置を使用しているが、ウイルス産生時は7種のウイルス複製蛋白質(Early蛋白質群)が発現誘導されウイルス複製装置によりウイルスゲノムは100から1000倍まで増幅生産される。ウイルスゲノムはローリングサークル型複製により中間産物として長いhead to tail concatemerができるが、ユニットサイズに切断され核内でキャプシド内へパッケージされる。EBVDNAの両末端は538bpの繰り返し構造(TRs)からなり、cis-elementとして切断/パッケージングに重要な役割を担っていると考えられる。さらに両末端は同じ11bpの塩基で終っており左末端はプラントエンドだが、右末端は3'エンドが1塩基突出した形で終る。又TRを一つもつプラスミドも切断/パッケージングを受けることからEBVゲノム末端形成は単なるTerminaseによる切断ではなくDNA組み換え現象が関与していると考えられている<sup>44)</sup>。

## 2. 潜伏感染状態のEBウイルスゲノム複製

潜伏感染細胞の核内ではウイルスゲノムは環状化し、ヒストン蛋白質に覆われたエピゾーム(染色体外遺伝子)として存在する。核内で安定にプラスミド状態を維持するにはウイルス蛋白質であるEBNA1が必要で、EBNA1は複製開始領域ori-P(DS領域に4カ所、FR領域に20カ所)を認識結合する。EBVは分裂増殖するBリンパ球において娘細胞へウイルスゲノムを伝達維持する必要性からS期に同調してウイルスゲノムを複製させる。SV40の場合もS期にウイルスゲノムは複製されるが、SV40の複製開始領域からは何度も複製が開始されウイルスゲノムの大幅な増幅がみられる。一方EBV潜伏感染状態においてはS期に一回しか複製が開始しないことが知られていた<sup>41)</sup>。この観察からEBVの潜伏感染におけるゲノム複製は染色体複製と同じ機構でS期に一度だけ複製されると考えられていた。昨年(2001年8月)この仮説を支持する3報の論文が同時に現れた<sup>3,6,27)</sup>。染色体複製開始に関与するORC蛋白質群、MCM蛋白質群に特異的な抗体で免疫沈降(chromatin immunoprecipitation, CHIP法)を行うとEBV-VoriPとくにDS領域が検出されるという報告であった。またEBNA1とORC蛋白質群と相互作用しているというdataも出された。我々の研究グループもこの問題に取り組んできたがウイルスゲノムと染色体複製開始関連蛋白質群との直接の関係は見出せないままだった。この分野は酵母、アフリカツメガエルの系ではよく進んでいるが、哺乳

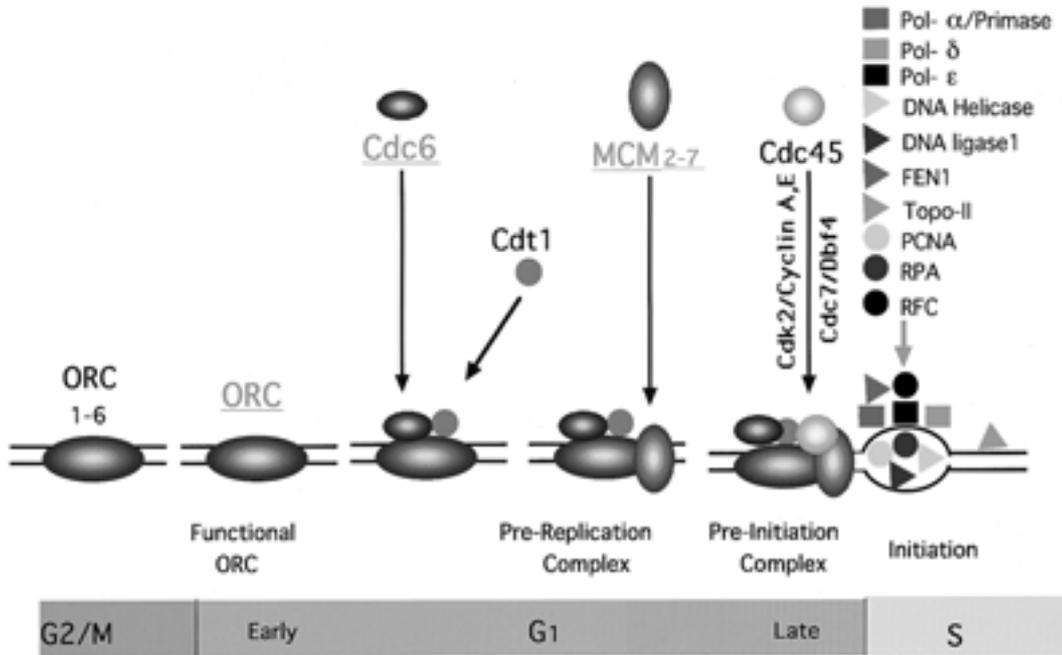


図2 酵母の系から想定されている染色体複製開始の概念図

動物ではあまり解析が進んでいなかったため、我々はヒト染色体複製開始関連蛋白質群（ORC, CDC 6, MCM 蛋白質群）の細胞内の動態、その役割について主に研究してきた。

### 1) G1期における染色体複製開始の概念

酵母系の研究から現在考えられている染色体複製開始の概念を図2に示す。複製開始領域認識複合体ORCはORC 1～6までの6量体と考えられ細胞周期を通じて自立複製配列（ARS）に結合している。G1期にORCは他の複製制御蛋白質（CDC 6, MCM 複合体など）がARS上に集積するための基礎となる。CDC 6及びCdt1がORCに結合するとMCM複合体（MCM 2～7）が複製開始領域近傍にもたらされ、複製前複合体を形成する。MCM複合体はcdk2/cyclin EあるいはCdc7/Dbf4のリン酸化反応によりCdc45の複製前複合体への結合が促進される。Cdc45はDNAPol $\alpha$ と相互作用し細胞の複製伸長装置を複製開始領域に呼び込むことにより複製開始前複合体が形成され、複製が開始されると考えられている。

### 2) ヒト細胞におけるORC 1, CDC 6, MCM蛋白質の細胞内局在, 修飾, 及びその動態

ヒト細胞の核で細胞周期のG1, S, G2/MにおいてORC 1, CDC 6, MCM蛋白質が何処に局在するのかこれまで不明であった。ORCはORC 1～6の6つのサブユニットから構成され、ORC 2～6の発現は増殖と関係なく静止期の細胞でも発現している<sup>4,5,29</sup>。細胞が増殖サイク

ルに入るとORC 1が誘導され複製に必要な完全なORCが形成されるようである。我々はヒトORC 1はS期にプロテアゾーム依存的に分解されることを見いだした<sup>11</sup>。ORC 1およびCDC 6はクロマチンではない核構造（non-chromatin structure）に結合しnuclear fociを形成することを明らかにした<sup>11</sup>。分裂酵母のCDC 6ホモログであるCdc18はS期cyclin/CDKによりリン酸化され、リン酸化依存性に分解されるが、ヒトCDC 6はS期に細胞質に移行する（分解されない）ことがわかった<sup>12</sup>。この移行はcyclin A/CDK 2によるリン酸化に依存している<sup>23</sup>。この場合、核内CDC 6のすべてが細胞質に移動するわけではなく、機能していると考えられる核構造結合型CDC 6の量は変化しない。これらの機構はS期におけるゲノム再複製の抑制機構の一部に寄与していると考えている。

MCM複合体はMCM 2～7の6つのサブユニットから構成されるヘテロ6量体であり間期を通して核内に存在している<sup>20</sup>。核MCMは生化学的に非イオン性界面活性剤（Triton X-100）可溶性と不溶性画分に分けられる。不溶性画分はDNase処理により遊離されクロマチンに結合していると考えられる<sup>13</sup>。これはORCやCDC 6と対照的である。核MCMの総量は細胞周期を通してほぼ一定であるが、クロマチン結合型MCMはS期の進行につれてクロマチンから遊離していく<sup>13,20</sup>。Triton X-100可溶性MCMはcell cycleを通して6量体を形成しているが<sup>13</sup>、やや不安定でMCM 3-5とMCM 4-6-7に分解されやすい。MCM 4-6-7はヘリカーゼ活性を示す事が報告されているが<sup>18</sup>、我々はこの複合体を細胞から分離する事に成功し

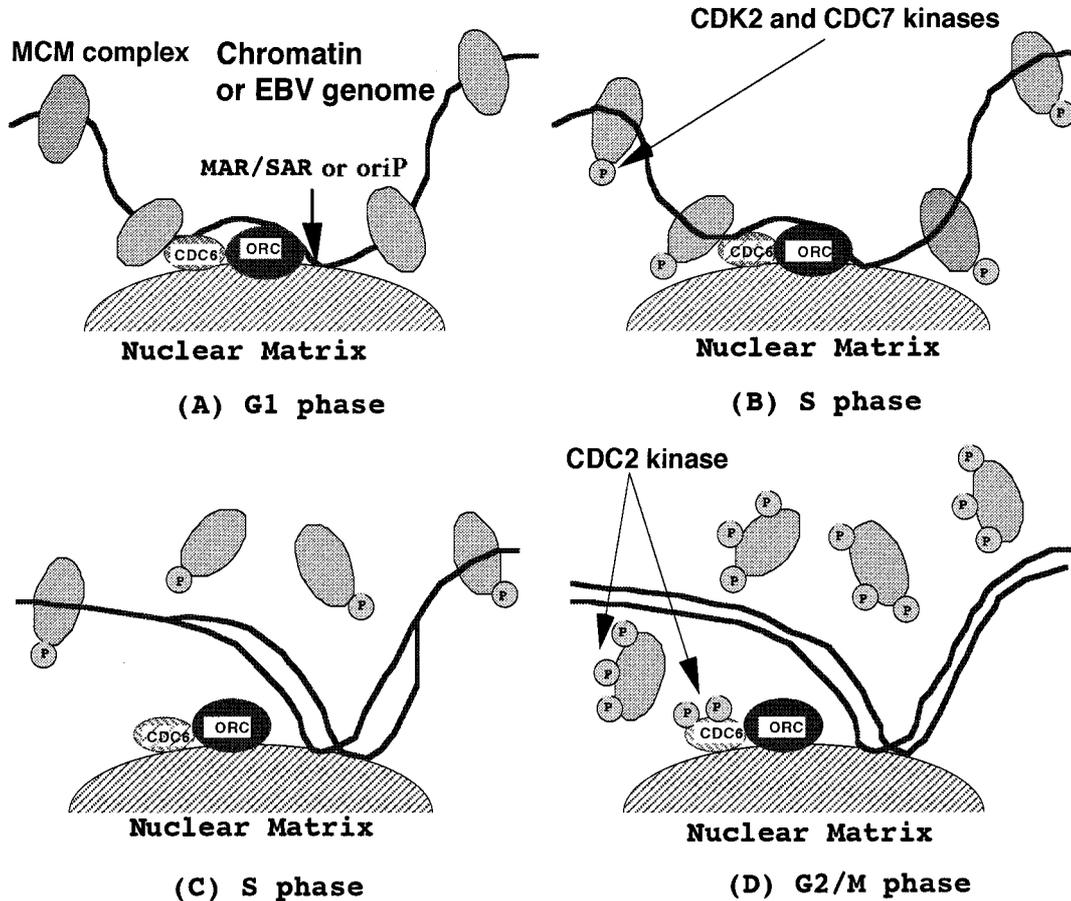


図3 EBV 潜伏感染ウイルスゲノム複製に関する染色体複製蛋白質の細胞周期仮説モデル

ていない。この小複合体が細胞内に存在しヘリカーゼとして機能しているのかどうかは今のところ明らかではない。クロマチン結合型 MCM は 6 量体として存在するが、MCM 自身に強い DNA 結合活性は認められない。MCM 複合体は PCNA のように DNA を囲むようにクランプとして働いているのかもしれない。MCM のクロマチンへの結合は ATP によって安定化する事をみいだいた<sup>13)</sup>。

MCM 6 量体は細胞周期を通して複雑なリン酸化をうける。S 期には Cdk 2/CyclinE および Cdc 7/Dbf 4 により MCM 2 と 4 がリン酸化される。さらに G 2/M 期には MCM 2 と 4 が高リン酸化され、MCM 複合体のクロマチンへの再結合を抑制していることも見いだした。MCM 複合体は S 期の進行とともにクロマチンから遊離し G 2/M 期にはほとんど結合していない。Cdc 2 の温度感受性変異株 FT210 細胞で Cdc 2 を不活化させると MCM 複合体はクロマチンに結合したままであることがわかった<sup>13)</sup>。さらに Cdc 2 が MCM 複合体の MCM 2 及び MCM 4 を高リン酸化し、そのうえヒト CDC 6 も高リン酸化していることがわかった<sup>13)</sup>。これらの結果から、Cdc 2 は MCM と CDC 6 のリン酸化を通して、MCM 複合体のクロマチンへの再

結合を抑制していると考えられる。おそらくリン酸化による高次構造の変化が MCM 複合体の機能を抑制していると思われる。

### 3) 染色体複製開始蛋白質の潜伏感染 EBV ゲノム複製の細胞周期調節仮説モデル

染色体複製開始関連蛋白質の研究を踏まえ、潜伏感染 EBV ゲノム複製の仮説モデルとして図式化した (図 3)。

ORC がどのような認識機構のもとにクロマチンと相互作用しているのかは不明であるが、これまでに同定されているクロマチン複製開始領域近傍には、しばしば核マトリックス結合領域が認められ、核マトリックスに結合している ORC と相互作用しているのかも知れない。EBV の場合 oriP を含む領域は核マトリックスに結合することが報告されており<sup>19)</sup>、EBNA 1 を介して ORC と相互作用することが想定される。CDC 6 も核マトリックスへ結合し、ORC と核マトリックス上で相互作用しているのかもしれない。G 1 期に ORC と CDC 6 さらに Cdt 1 により MCM 6 量体が、おそらく dsDNA を取り囲むような型でクロマチンあるいは EBV ゲノムに結合される。MCM 6 量体の一部は

ORC/CDC 6 の近傍に結合するが、全体的にはもっと広がりを持ってクロマチン上、あるいはEBV ゲノム上に分布しているのではないかと考えられる。S 期になるとゲノム結合型 MCM は CDC 7/Dbf 4 あるいは Cdk 2/cyclin E or A によるリン酸化により活性化されるのであろう。活性化された MCM は必須の役割を演じた後、複製の進行と共にクロマチンあるいはEBV ゲノムから遊離していくのであろう。一旦遊離した MCM 複合体のゲノムへの再結合は MCM や CDC 6 のリン酸化を介して抑制されていると想像される。S 期ではこのリン酸化は Cdk 2 が行い、G 2/M 期では Cdc 2/cyclin B が担うことが示されている。これらの機構により再複製は抑制され、M 期の脱出と共に Cdc 2 キナーゼ活性は抑制され、G 1 にはいると次の複製前複合体が形成されというサイクルを繰り返すという仕組みにより、EBV ゲノム及び染色体 DNA は S 期に一度のみ複製されると考えられる。

### 3. 溶解感染時の EB ウイルスゲノム複製

#### 1) ウイルスゲノム複製開始

ウイルス産生状態のウイルスゲノム複製は ori-P とは別の複製開始領域である ori-Lyt から始まる<sup>16)</sup>。ori-Lyt はプロトタイプの EBV ゲノムには 2 コピー（重複配列 DS-R と DS-L 内）存在するが、1 コピーでも lytic-phase の DNA 複製はおきる。ori-Lyt (DS-L) は BHLF 1 および BHRF 1 のプロモーター領域を両末端にもつ。EBV ori-Lyt は HSV-1 ori とは異なり複雑な構造であるが、二つのコア領域（upstream region : 321bp, downstream region : 374bp）とその周辺の付随領域（複製を促進する）から構成されている<sup>26)</sup>。upstream region は ori-Lyt からの複製及び RNA の転写に必須であり、BHLF 1 プロモーター領域とほぼ一致し TATA box, CCAAT box, 及び BZLF 1 蛋白質結合部位 (ZRE) 2 ヶ所が存在する。BZLF 1 蛋白質は AP-1 ファミリーの c-Fos とホモロジーをもつ転写因子であり、ホモダイマーとして特異的な塩基配列に結合する。転写因子としての BZLF 1 蛋白質は BHLF 1 プロモーター内の TATA box に結合する TFIID 転写因子と相互作用し、さらに TFIID 付随因子とも作用して安定な転写開始複合体を形成すると考えられている。同時に BZLF 1 蛋白質は ori-Lyt-dependent DNA 複製に必須の因子でもある<sup>9)</sup>。ori Lyt 内には全部で 7 ヶ所 BZLF 1 蛋白質結合部位が存在するが、BZLF 1 蛋白質のこれらへの結合（特に ZRE 1~4）が複製開始に必要となる<sup>25)</sup>。BZLF 1 蛋白質結合さらには細胞因子結合による ori-Lyt の高次構造の変化が複製開始の引き金になるのかもしれない。downstream region も複製に必須で、エンハンサー領域を含み R エンハンサーエレメントあるいは Sp 1 を含むいくつかの細胞蛋白質が結合することが報告されている<sup>15)</sup>。また ori-Lyt 内には 2 ヶ所の AT-rich なパルンドローム構造が存

在し複製の始まる開口部と推定されている。lytic phase 初期の複製中間産物はコンカテマーではなく裸のプラスミドであることが報告され複製初期には ori-Lyt dependent  $\theta$  型 DNA 複製をしている可能性がある<sup>24)</sup>。しかし少なくとも複製後期のローリングサークル型 DNA 複製は主に EBV がコードする一連の複製蛋白質群（EBV ゲノム複製装置）によって行なわれ複製中間産物が head-to-tail concatemer の巨大分子である<sup>16)</sup>ことからいくつかのバクテリオファージで提唱されているローリングサークル型複製をしていると考えられている。

#### 2) EBV ローリングサークル型 DNA 複製

EBV lytic-phase のローリングサークル型 DNA 複製に必須なウイルス遺伝子産物は Hayward のグループにより transient replication assay を用いて決定された<sup>9)</sup>（図 4）。彼等は ori-Lyt を含むプラスミドと EBV DNA 断片のセットを同時に細胞内へ導入することによりどの DNA 断片の組み合わせがプラスミド複製に必須であるのかを明らかにした。近年数多くのヘルペス属ウイルスの全 DNA 塩基配列が決定され、また先行する単純ヘルペスウイルスの DNA 複製の研究からこれらヘルペス属ウイルスに共通するウイルス複製蛋白質群が明らかにされてきた。染色体 DNA 複製フォークで働く複製蛋白質の役者はまだ不明な部分が残されているが、EBV の場合は上記 6 種のウイルス蛋白質から構成されるので各々の相互作用を検討することによって染色体 DNA 複製フォークのモデルとなることが期待できる。EBV 増殖の分子機構を明らかにすることは真核生物 DNA 複製研究のモデルとしての意義があると同時に、EBV 感染を制御する上で、その治療法及び予防法を開発する上で非常に重要な情報となる。

#### 3) EBV 複製蛋白質の機能

我々は 7 種のウイルス複製蛋白質を各々発現する組み換えバキュロウイルス、及び特異抗体を準備し、各々の蛋白質について酵素学的解析を行ってきた。まず EB ウイルス産生状態時に誘導される 7 種のウイルス複製蛋白質のうちこれまで EBV DNA ポリメラーゼ複合体及び EBV 一本鎖 DNA 結合蛋白質 (EBVSSB) について感染細胞あるいは組み換えバキュロウイルス感染細胞から精製しその性状、機能の解析を進めてきた。

a) EBV DNA ポリメラーゼ複合体: EBV DNA ポリメラーゼ複合体は BALF 5 Pol 触媒サブユニット及び BMRF 1 Pol 付随蛋白質から構成され、非常に高い polymerase processivity を持つこと、又校正機能を担う 3'-5' エクソヌクレアーゼ活性が付随する<sup>30,32,34)</sup>。EBV DNA ポリメラーゼ複合体を構成するサブユニットを単独に発現する組み換えバキュロウイルスを作製し BALF 5 遺伝子産物が酵素活性を担うこと、BMRF 1 遺伝子産物は dsDNA 結合活

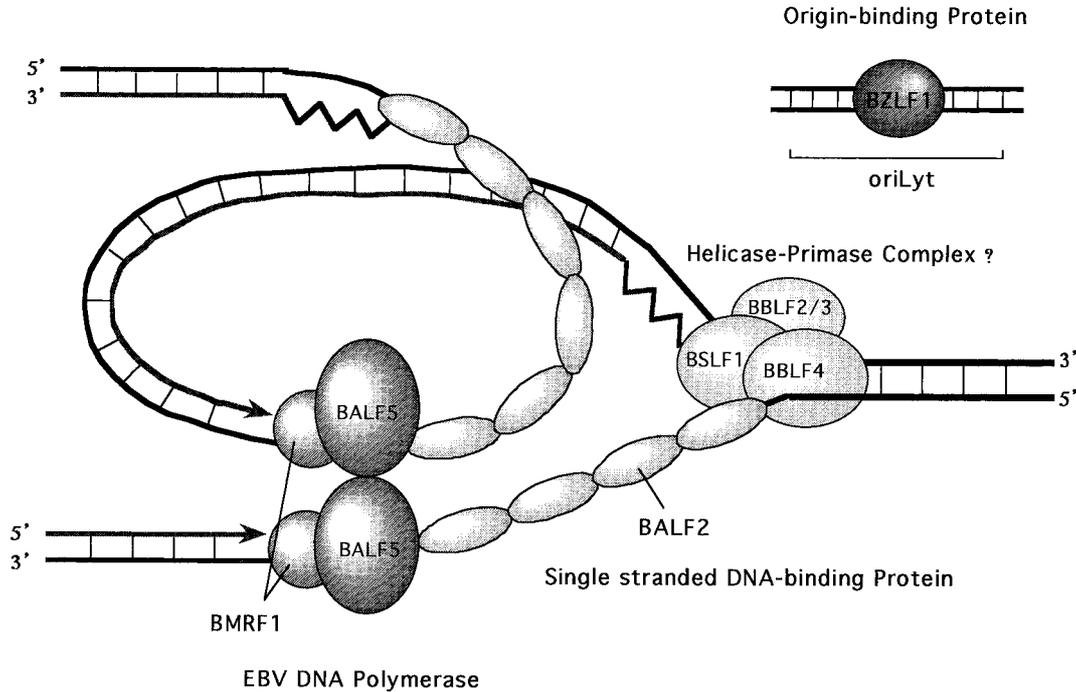


図4 溶解感染 EBV 複製蛋白質

性を持つことを明らかにした<sup>33, 35, 38</sup>。さらに各サブユニットの相互作用を検討し BMRF1 蛋白質は BALF5 蛋白質の示す polymerase processivity 及び 3'-5' ds exonuclease 活性を著しく促進させることを見いだした<sup>36</sup>。ウイルス複製蛋白質の内、BMRF1 蛋白質は EBVDNA ポリメラーゼ触媒酵素のポリメラーゼプロセシビティを劇的に上げることから機能的相互作用があることが示されていたが、複合体を形成している直接的証明はなかった。ショ糖密度勾配遠心法で生理的塩濃度条件下で両者は複合体（ヘテロダイマー）を形成していることが分かったが、この複合体形成は高塩濃度に感受性であり両者の結合は弱いことが明らかとなった。またこの複合体形成は再構成可能であった。また上記ショ糖密度勾配遠心法でヘテロダイマーが二つからなる複合体も検出された。複製フォークではリーディング鎖とラギング鎖上のポリメラーゼが一体となって両鎖合成に働いていることが想定される (Sugaya Y and Tsurumi T : in preparation)。

**b) EBV 一本鎖 DNA 結合蛋白質:** EBV 感染リンパ球より EBVSSB を精製し ssDNA に特異的に結合すること、さらに ssDNA 自身のとる二次構造を解消することによって DNA ポリメラーゼ活性を促進することを明らかにした<sup>39</sup>。EBVSSB を単独に発現する組み換えバキュロウイルスを作製し BALF2 遺伝子産物が helix-destabilizing (unwinding) 活性をもつこと、そしてこれが ssDNA 自身のとる二次構造を解消することを見出した<sup>37</sup>。この unwinding 活性は抗 BALF2 蛋白質抗体により阻害された。

最大活性は BALF2 蛋白質が DNA 基質を飽和する以上の濃度で得られた。BALF2 蛋白質による unwinding は cooperative であり且つ非常に早く又 unwinding 活性に方向性は見られなかった。primed M13 ssDNA をもちいたポリメラーゼアッセイ系に BALF2 蛋白質を添加すると BALF5 Pol catalytic サブユニットの示すポリメラーゼ活性を著しく促進した。複製産物の解析から ssDNA 上の二次構造をとると推定される領域で EBVSSB 非存在下ではポリメラーゼ反応が止まったが、EBVSSB 添加により一時停止することが解消された。BALF2 蛋白質の helix-destabilizing 活性が ssDNA 上の二次構造を解消することにより EBVDNA ポリメラーゼの動きを促進すると考えられる。またある条件下では EBVDNA ポリメラーゼ複合体自身に strand displacement DNA 合成活性が付随することを見出した<sup>40</sup>。この活性は試験管内で catalytic サブユニットと accessory サブユニットを再構成することにより再現する。さらにこの strand displacement DNA 合成活性は EBVSSB を加えることにより特異的に増強されることを見出している<sup>40</sup>。

**c) BBLF4-BSLF1-BBLF2/3 複合体:** DNA ヘリカーゼ、DNA プライマーゼ活性を担うと考えられる BBLF4 蛋白質、BSLF1 蛋白質、BBLF2/3 蛋白質のバキュロウイルス発現系を各々樹立した<sup>42</sup>。3種の組み換えバキュロウイルスは感染細胞中に各々90, 89, 及び76kの蛋白質を発現し、各抗体を用いたウエスタンブロットにより各遺伝子産物であることが同定された。3種の組み換えバキュロ

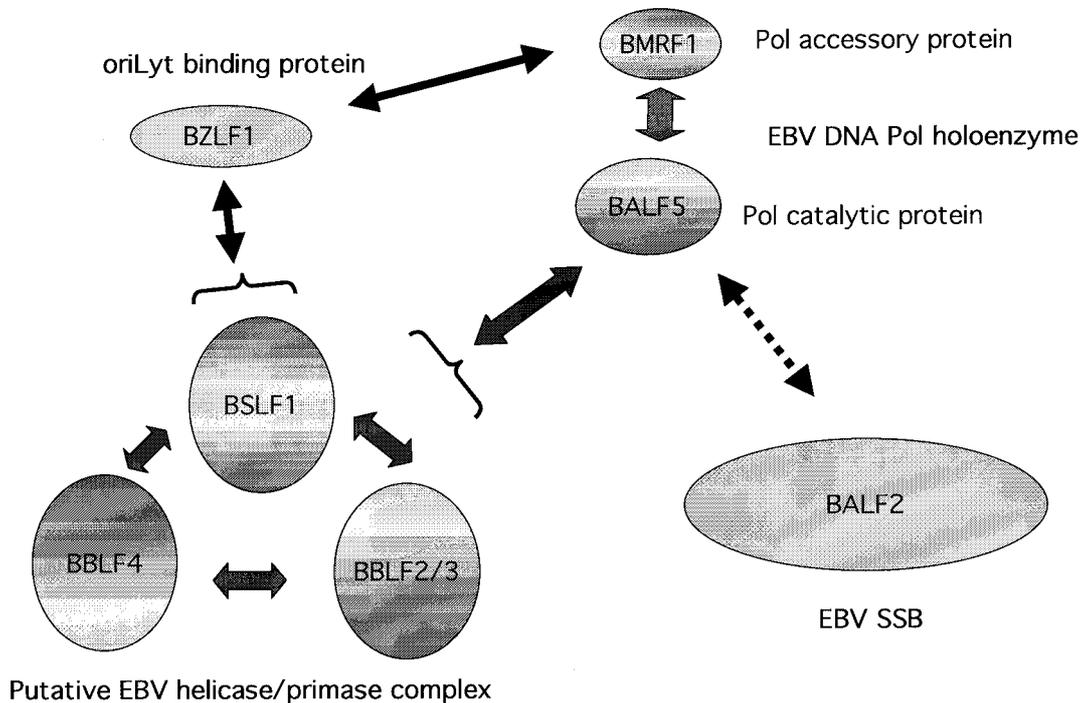


図5 EBV複製蛋白質間物理的相互作用の相関図

ウイルスを同時に感染させ抗 BSLF 1 抗体で免疫沈降させると BSLF 1, BBLF 4, BBLF 2/3 蛋白質すべてを沈降させた。ショ糖密度勾配超遠心法で 3 者複合体が 250k に相当する位置に移動することから感染細胞内で 3 者は 1 : 1 : 1 の比で複合体を形成している。さらに BBLF 4 蛋白質/BSLF 1 蛋白質間, 及び BBLF 2/3 蛋白質/BSLF 1 蛋白質間, 及び BBLF 4 蛋白質と BBLF 2/3 蛋白質間でも複合体形成をすることが確認できた。BSLF 1, BBLF 4 及び BBLF 2/3 蛋白質は互いに相互作用しながら 3 者の複合体を形成することが示唆された。

**d) 複製蛋白質間相互作用:** ローリングサークル複製フォークでは各複製蛋白質が相互作用しながら機能していると考えられているが, 三者複合体と BALF 5 ポリメラーゼ触媒サブユニットと物理的相互作用する結果を得た<sup>10)</sup>。まず薬剤によりウイルス産生状態にした B95-8 細胞抽出液に対して抗 BSLF 1 抗体を用いて免疫沈降反応を行なったところ BSLF 1, BBLF 4, BBLF 2/3 蛋白質と共に BALF 5 蛋白質が共沈した。また抗 BBLF 2/3 抗体による免疫沈降反応においても同様の結果を得た。さらにこのとき BMRF 1 も共沈することがわかった。しかし, BALF 2 一本鎖 DNA 結合蛋白質は共沈しなかった。このことから EBV DNA ポリメラーゼホロ酵素は BBLF 4-BSLF 1-BBLF 2/3 と複合体を形成することが示唆された。次にこれらの相互作用を詳しく検討するため, それぞれの蛋白質を組換えバキュロウイルスにより昆虫細胞内で発現させた細胞抽出液に対して同様の免疫沈降反応を行なった。そ

の結果から BMRF 1 ではなく BALF 5 蛋白質が, BBLF 4-BSLF 1-BBLF 2/3 複合体と直接相互作用すること, さらに BALF 5 蛋白質は三者複合体の各構成蛋白質である, BBLF 4, BSLF 1, BBLF 2/3, すべてと相互作用することが明らかとなった<sup>10)</sup>。BBLF 4-BSLF 1-BBLF 2/3 複合体はまだその酵素活性は検出されていないが, そのアミノ酸配列からヘリケース/プライメース複合体と考えられている。以上のことから EBV 複製フォークで EBV DNA ポリメラーゼ複合体は BALF 5 ポリメラーゼ触媒酵素を介して BBLF 4-BSLF 1-BBLF 2/3 複合体が相互作用しながら DNA 合成していると現在考えている。

これまでに知られているウイルス複製蛋白質間の物理的相互作用を図 5 に模式化した。BZLF 1 蛋白質は BMRF 1 ポリメラーゼ付随蛋白質と相互作用する<sup>43)</sup>。また BBLF 4-BSLF 1-BBLF 2/3 複合体とも相互作用することも報告された<sup>14)</sup>。これらは我々も確認している。BZLF 1 蛋白質は oriLyt に結合しこれら複製蛋白質を oriLyt にリクルートすると思われる。

上記ウイルス複製蛋白質間の物理的相互作用から想定した EBV 複製フォークのモデルを図 6 に示す<sup>31)</sup>。

#### 4. EBV 複製開始及び伸長に関わる蛋白質群の他生物種複製蛋白質との比較

最後に大腸菌, T4 ファージ, T7 ファージ, SV40, 出芽酵母とで複製開始, 伸長反応に関わる蛋白質群を表 1 にまとめた。素過程に対応してグループ分けしたが, 各酵素

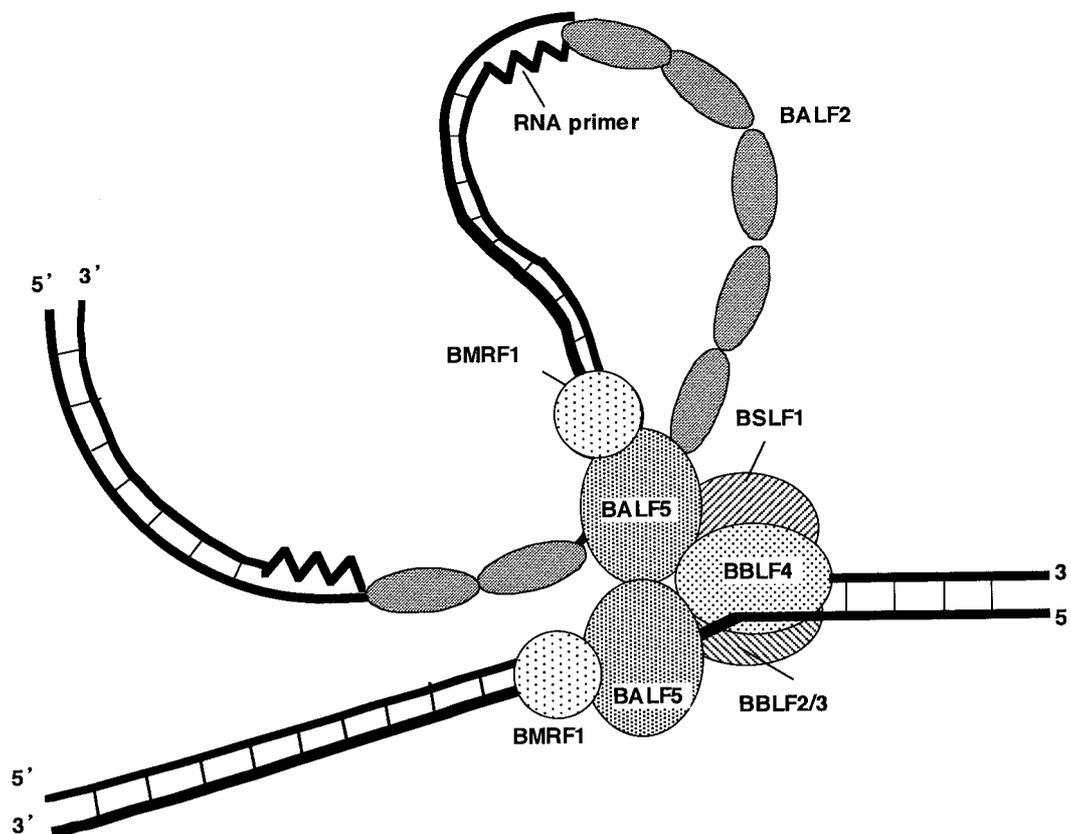


図6 ウイルス複製伸長蛋白質のEBV複製フォークモデル

表1 原核生物及び真核生物複製蛋白質群の相互比較

	<i>E. coli</i>	Phage T 4	Phage T 7	EBV		SV40	<i>S. cerevisiae</i>
				latent phase	lytic phase		
Origin-binding protein	Dna A	(.....)	(.....)	ORC ?	BZLF 1 protein	Large T	ORC
Helicase-Primase loading protein	Dna C	gp59	(.....)	Cdc 6 protein ?	BBLF 2 / 3 ( ? )	Large T	Cdc 6 protein ?
Replicative Helicase	Dna B	gp41	gp 4	MCM proteins ?	BSLF 1 + BBLF 4 + BBLF2/3 ( ? )	Large T	MCM proteins ?
Primase	Dna G	gp61	gp 4	Pol $\alpha$ -primase	BSLF 1 + BBLF 4 + BBLF2/3 ( ? )	Pol $\alpha$ -primase	Pol $\alpha$ -primase
DNA Polymerase catalytic subunit	Pol III core ( $\alpha \epsilon \theta$ )	gp43	gp 5	Pol $\alpha$ / Pol $\delta$ / Pol $\epsilon$ ?	BALF 5 protein	Pol $\alpha$ / Pol $\delta$	Pol $\alpha$ / Pol $\delta$ / Pol $\epsilon$
DNA Pol clamp	$\beta$ subunit	gp45	thioredoxin	PCNA	BMRF 1 protein	PCNA	PCNA
DNA Pol clamp loader	$\gamma$ complex ( $\gamma\delta\psi\chi$ )	gp44/62	(.....)	RF-C	(.....)	RF-C	RF-C
Single-stranded DNA binding protein	SSB	gp32	gp2.5	RP-A	BALF 2 protein	RP-A	RP-A
RNase H	RNase H	gp33.2	gp 6	RNase H 1	?	RNase H 1	RNase H 1
5'-3' exonuclease	Pol I	gp33.2	gp 6	FEN-1	?	FEN-1	FEN-1

は複製フォークで複合体を形成し機能していると考えられる。

Origin binding protein は *E. coli* Dna A や SV40 Large T のように複製開始領域に結合するだけでなくそれ自身が二重鎖を一本鎖に unwinding する能力もあれば ORC や BZLF 1 蛋白質のように複製開始領域に結合することによって他の複製蛋白質をリクルートする役割を持つものもある。

MCM が Replicative Helicase かどうかは疑問の余地はあるが、複製開始領域が開口し primase が RNA primer を合成しそこから Replicative DNA polymerase が DNA を合成していくと考えられる。DNA polymerase は processivity を高く維持するため Pol clamp が必要であるが、それを primer 末端に乗せる clamp loader を備えている場合もある。一本鎖結合蛋白質はそれぞれの系で備えられてお

り他の複製蛋白質との特異的蛋白質間相互作用の元に協調的に複製フォークで一本鎖DNAが形成する二次構造を解消していると考えられる。ラギング鎖の完結にはRNase Hと5'-3' exonucleaseが必要となるが、EBV溶解感染時に宿主のRnase H1とFEN-1が働いているかどうかはまだ未知である。

### 謝 辞

ここで紹介した研究は、愛知県がんセンター研究所腫瘍ウイルス学部及び名古屋大学医学部付属病態制御研究施設ウイルス感染部門で行なったもので、藤田雅俊、横山直明、藤井健、菅谷豊諸氏、西山幸廣名古屋大学教授との共同研究であり、ここに深く感謝する。

### 文 献

- 1) Aiyar, A., C. Tyree, and B. Sugden. 1998. The plasmid replicon of EBV consists of multiple cis-acting elements that facilitate DNA synthesis by the cell and a viral maintenance element. *Embo J* **17** : 6394-6403.
- 2) Baer, R., A. T. Bankier, M. D. Biggin, P. L. Deininger, P. J. Farrell, T. J. Gibson, G. Hatfull, G. S. Hudson, S. C. Satchwell, C. Seguin, and et al. 1984. DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein-Barr virus genome. *Nature* **310** : 207-211.
- 3) Chaudhuri, B., H. Xu, I. Todorov, A. Dutta, and J. L. Yates. 2001. Human DNA replication initiation factors, ORC and MCM, associate with oriP of Epstein-Barr virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98** : 10085-10089.
- 4) Dhar, S. K., L. Delmolino, and A. Dutta. 2001. Architecture of the human origin recognition complex. *J Biol Chem* **276** : 29067-29071.
- 5) Dhar, S. K., and A. Dutta. 2000. Identification and characterization of the human ORC 6 homolog. *J Biol Chem* **275** : 34983-34988.
- 6) Dhar, S. K., K. Yoshida, Y. Machida, P. Khaira, B. Chaudhuri, J. A. Wohlschlegel, M. Leffak, J. Yates, and A. Dutta. 2001. Replication from oriP of Epstein-Barr virus requires human ORC and is inhibited by geminin. *Cell* **106** : 287-296.
- 7) Faulkner, G. C., A. S. Krajewski, and D. H. Crawford. 2000. The ins and outs of EBV infection. *Trends Microbiol* **8** : 185-189.
- 8) Fields, B. N., D. M. Knipe, P. M. Howley, D. E. Griffin, and Lippincott Williams & Wilkins. 2002. *Fields virology*, fourth edition. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.
- 9) Fixman, E. D., G. S. Hayward, and S. D. Hayward. 1995. Replication of Epstein-Barr virus oriLyt : lack of a dedicated virally encoded origin-binding protein and dependence on Zta in cotransfection assays. *J Virol* **69** : 2998-3006.
- 10) Fujii, K., N. Yokoyama, T. Kiyono, K. Kuzushima, M. Homma, Y. Nishiyama, M. Fujita, and T. Tsurumi. 2000. The Epstein-Barr virus pol catalytic subunit physically interacts with the BBLF 4-BSLF 1-BBLF 2/3 complex. *J Virol* **74** : 2550-2557.
- 11) Fujita, M., Y. Ishimi, H. Nakamura, T. Kiyono, and T. Tsurumi. 2002. Nuclear organization of DNA replication initiation proteins in Mammalian cells. *J Biol Chem* **277** : 10354-10361.
- 12) Fujita, M., C. Yamada, H. Goto, N. Yokoyama, K. Kuzushima, M. Inagaki, and T. Tsurumi. 1999. Cell cycle regulation of human CDC 6 protein. Intracellular localization, interaction with the human mcm complex, and CDC 2 kinase-mediated hyperphosphorylation. *J Biol Chem* **274** : 25927-25932.
- 13) Fujita, M., C. Yamada, T. Tsurumi, F. Hanaoka, K. Matsuzawa, and M. Inagaki. 1998. Cell cycle- and chromatin binding state-dependent phosphorylation of human MCM heterohexameric complexes. A role for cdc 2 kinase. *J Biol Chem* **273** : 17095-17101.
- 14) Gao, Z., A. Krithivas, J. E. Finan, O. J. Semmes, S. Zhou, Y. Wang, and S. D. Hayward. 1998. The Epstein-Barr virus lytic transactivator Zta interacts with the helicase-primase replication proteins. *J Virol* **72** : 8559-8567.
- 15) Gruffat, H., O. Renner, D. Pich, and W. Hammerschmidt. 1995. Cellular proteins bind to the downstream component of the lytic origin of DNA replication of Epstein-Barr virus. *J Virol* **69** : 1878-1886.
- 16) Hammerschmidt, W., and B. Sugden. 1988. Identification and characterization of oriLyt, a lytic origin of DNA replication of Epstein-Barr virus. *Cell* **55** : 427-433.
- 17) Hoshino, Y., T. Morishima, H. Kimura, K. Nishikawa, T. Tsurumi, and K. Kuzushima. 1999. Antigen-driven expansion and contraction of CD 8 + -activated T cells in primary EBV infection. *J Immunol* **163** : 5735-5740.
- 18) Ishimi, Y. 1997. A DNA helicase activity is associated with an MCM 4-, 6-, and 7 protein complex. *J Biol Chem* **272** : 24508-24513.
- 19) Jankelevich, S., J. L. Kolman, J. W. Bodnar, and G. Miller. 1992. A nuclear matrix attachment region organizes the Epstein-Barr viral plasmid in Raji cells into a single DNA domain. *Embo J* **11** : 1165-1176.
- 20) Kimura, H., N. Nozaki, and K. Sugimoto. 1994. DNA polymerase alpha associated protein P 1, a murine homolog of yeast MCM 3, changes its intranuclear distribution during the DNA synthetic period. *Embo J* **13** : 4311-4320.
- 21) Kuzushima, K., Y. Hoshino, K. Fujii, N. Yokoyama, M. Fujita, T. Kiyono, H. Kimura, T. Morishima, Y. Morishima, and T. Tsurumi. 1999. Rapid determination of Epstein-Barr virus-specific CD 8 (+) T-cell frequencies by flow cytometry. *Blood* **94** : 3094-3100.
- 22) Li, Q., M. K. Spriggs, S. Kovats, S. M. Turk, M. R. Comeau, B. Nepom, and L. M. Hutt-Fletcher. 1997. Epstein-Barr virus uses HLA class II as a cofactor for infection of B lymphocytes. *J Virol* **71** : 4657-4662.
- 23) Petersen, B. O., J. Lukas, C. S. Sorensen, J. Bartek, and K. Helin. 1999. Phosphorylation of mammalian CDC 6 by cyclin A/CDK 2 regulates its subcellular localization. *Embo J* **18** : 396-410.

- 24) Pfuller, R., and W. Hammerschmidt. 1996. Plasmid-like replicative intermediates of the Epstein–Barr virus lytic origin of DNA replication. *J Virol* **70** : 3423–3431.
- 25) Schepers, A., D. Pich, and W. Hammerschmidt. 1996. Activation of oriLyt, the lytic origin of DNA replication of Epstein–Barr virus, by BZLF 1. *Virology* **220** : 367–376.
- 26) Schepers, A., D. Pich, J. Mankertz, and W. Hammerschmidt. 1993. cis-acting elements in the lytic origin of DNA replication of Epstein–Barr virus. *J Virol* **67** : 4237–4245.
- 27) Schepers, A., M. Ritzi, K. Bousset, E. Kremmer, J. L. Yates, J. Harwood, J. F. Diffley, and W. Hammerschmidt. 2001. Human origin recognition complex binds to the region of the latent origin of DNA replication of Epstein–Barr virus. *Embo J* **20** : 4588–4602.
- 28) Shire, K., D. F. Ceccarelli, T. M. Avolio–Hunter, and L. Frappier. 1999. EBP 2, a human protein that interacts with sequences of the Epstein–Barr virus nuclear antigen 1 important for plasmid maintenance. *J Virol* **73** : 2587–2595.
- 29) Thome, K. C., S. K. Dhar, D. G. Quintana, L. Delmolino, A. Shahsafaei, and A. Dutta. 2000. Subsets of human origin recognition complex (ORC) subunits are expressed in non-proliferating cells and associate with non-ORC proteins. *J Biol Chem* **275** : 35233–35241.
- 30) Tsurumi, T. 1991. Characterization of 3′-to-5′-exonuclease activity associated with Epstein–Barr virus DNA polymerase. *Virology* **182** : 376–381.
- 31) Tsurumi, T. 2001. EBV replication enzymes. *Curr Top Microbiol Immunol* **258** : 65–87.
- 32) Tsurumi, T. 1991. Primer terminus recognition and highly processive replication by Epstein–Barr virus DNA polymerase. *Biochem J* **280**(Pt 3) : 703–708.
- 33) Tsurumi, T. 1993. Purification and characterization of the DNA-binding activity of the Epstein–Barr virus DNA polymerase accessory protein BMRF 1 gene products, as expressed in insect cells by using the baculovirus system. *J Virol* **67** : 1681–1687.
- 34) Tsurumi, T. 1992. Selective inhibition of the 3′-to-5′ exonuclease activity associated with Epstein–Barr virus DNA polymerase by ribonucleoside 5′-monophosphates. *Virology* **189** : 803–807.
- 35) Tsurumi, T., T. Daikoku, R. Kurachi, and Y. Nishiyama. 1993. Functional interaction between Epstein–Barr virus DNA polymerase catalytic subunit and its accessory subunit *in vitro*. *J Virol* **67** : 7648–7653.
- 36) Tsurumi, T., T. Daikoku, and Y. Nishiyama. 1994. Further characterization of the interaction between the Epstein–Barr virus DNA polymerase catalytic subunit and its accessory subunit with regard to the 3′-to-5′ exonucleolytic activity and stability of initiation complex at primer terminus. *J Virol* **68** : 3354–3363.
- 37) Tsurumi, T., J. Kishore, N. Yokoyama, M. Fujita, T. Daikoku, H. Yamada, Y. Yamashita, and Y. Nishiyama. 1998. Overexpression, purification and helix-destabilizing properties of Epstein–Barr virus ssDNA-binding protein. *J Gen Virol* **79**(Pt 5) : 1257–1264.
- 38) Tsurumi, T., A. Kobayashi, K. Tamai, T. Daikoku, R. Kurachi, and Y. Nishiyama. 1993. Functional expression and characterization of the Epstein–Barr virus DNA polymerase catalytic subunit. *J Virol* **67** : 4651–4658.
- 39) Tsurumi, T., A. Kobayashi, K. Tamai, H. Yamada, T. Daikoku, Y. Yamashita, and Y. Nishiyama. 1996. Epstein–Barr virus single-stranded DNA-binding protein: purification, characterization, and action on DNA synthesis by the viral DNA polymerase. *Virology* **222** : 352–364.
- 40) Tsurumi, T., H. Yamada, T. Daikoku, Y. Yamashita, and Y. Nishiyama. 1997. Strand displacement associated DNA synthesis catalyzed by the Epstein–Barr virus DNA polymerase. *Biochem Biophys Res Commun* **238** : 33–38.
- 41) Yates, J. L., and N. Guan. 1991. Epstein–Barr virus-derived plasmids replicate only once per cell cycle and are not amplified after entry into cells. *J Virol* **65** : 483–488.
- 42) Yokoyama, N., K. Fujii, M. Hirata, K. Tamai, T. Kiyono, K. Kuzushima, Y. Nishiyama, M. Fujita, and T. Tsurumi. 1999. Assembly of the Epstein–Barr virus BBLF 4, BSLF 1 and BBLF 2 / 3 proteins and their interactive properties. *J Gen Virol* **80**(Pt11) : 2879–2887.
- 43) Zhang, Q., Y. Hong, D. Dorsky, E. Holley–Guthrie, S. Zalani, N. A. Elshiekh, A. Kiehl, T. Le, and S. Kenney. 1996. Functional and physical interactions between the Epstein–Barr virus (EBV) proteins BZLF 1 and BMRF 1 : Effects on EBV transcription and lytic replication. *J Virol* **70** : 5131–5142.
- 44) Zimmermann, J., and W. Hammerschmidt. 1995. Structure and role of the terminal repeats of Epstein–Barr virus in processing and packaging of virion DNA. *J Virol* **69** : 3147–3155.