

The Mechanism of Epstein-Barr Virus(EBV) Promotor-specific Transactivation by Z Protein

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8492

Epstein-Barr ウイルス (EBV) 転写調節因子 Z タンパクの EBV プロモーター特異的活性化機構の解析

金沢大学医学部耳鼻咽喉科学講座 (主任: 古川 俊教授)

山 崎 芳 文

Epstein-Barr ウイルス (Epstein-Barr virus, EBV) 初期遺伝子 BZLF1 遺伝子にコードされる Z タンパクは、宿主細胞内に潜伏感染した EBV を複製サイクルに誘導する転写調節因子である。この Z タンパクは、細胞性転写調節因子である AP-1 ファミリーとりわけ Fos タンパクとの間にそのアミノ酸配列において高い相同性を有する。Z タンパクと AP-1 ファミリータンパクは共通の DNA 配列を認識・結合するにもかかわらず Z タンパクは、細胞性 AP-1 ファミリータンパクにより制御される細胞性遺伝子プロモーターを活性化することができない。本研究では Z タンパク EBV のプロモーター特異的活性化機構を検討するために、Fos タンパクとの融合タンパクを作製し、EBV の BMRF-1 および BHRF-1 遺伝子プロモーターと細胞由来の 92kDa-4 型コラゲナーゼ (92kDa-type IV collagenase) および組織特異的マトリックスメタロプロテナーゼ阻害物質 (tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 1, Timp) 遺伝子プロモーターからの転写活性化能を Z タンパクと比較検討した。Z タンパクによる EBV プロモーター活性化には、その 100-110 アミノ酸領域、とりわけ 102, 104, 105, 108 番目の 4 個のグルタミンが必須であり、また 108 番目のグルタミンを置換することにより Z タンパクの活性化できなかった 92kDa-4 コラゲナーゼ、Timp 遺伝子プロモーターを活性化できるようになった。一方 Z の DNA 結合領域の N 末端側に隣接する 162-169 アミノ酸領域を Fos タンパクの対応する領域と置換することによってもそのプロモーター特異性を変化させることができた。Z タンパクの転写活性化能およびプロモーター特異性は、Z タンパクと二両体を形成し得る欠変異体の発現によっても変化することから Z タンパクの二両体としての立体構造により決定されていることが示唆された。

Key words Epstein-Barr virus, BZLF1, c-fos, AP-1, TPA responsive element

Epstein-Barr ウイルス (Epstein-Barr virus, EBV) は、1964年に Epstein 等によって発見されたヘルペスウイルスで、伝染性単核球症の病原体であり、バーキットリンパ腫および上咽頭癌の発症にも深く関与している^{1,2)}。

EBV は試験管内で B リンパ球に感染し容易に不死化 (immortalization) するが、このように EBV により不死化されたリンパ芽球細胞株では EBV は潜伏感染状態にあり、ウイルス粒子の産生は起こらずウイルスの潜伏感染状態に必要な一部のウイルス遺伝子のみが発現している。この EBV 潜伏感染細胞を 12-O-テトラデカノイル フォルボル-13-酢酸 (12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate, TPA), 酪酸, イオノフォア, 抗免疫グロブリン抗体などで処理することにより、また P3HR1 あるいは NPC-KT 細胞からのウイルスを重感染することにより、EBV 複製サイクルを誘導することができる³⁻¹¹⁾。

EBV 複製サイクル誘導時には経時的に前早期タンパク、後早期タンパク、後期タンパクが誘導される⁷⁾。前早期タンパクは現在少なくとも BZLF1 および BMRF1 遺伝子産物の三種類の存在が確認されており、これらはいずれも EBV 遺伝子上の他のプロモーターに作用して遺伝子発現を調節する転写因子で

ある。サイクロヘキシミド、アミノマイシンなどタンパク合成阻害剤存在下で複製サイクルを誘導した場合には、このうち BZLF1, BRLF1 遺伝子産物のみが合成される^{7,12,13)}。しかし、これらの遺伝子を遺伝子導入により EBV 潜伏感染細胞に発現させた場合に、単独で EBV 複製サイクルを誘導可能なのは BZLF1 遺伝子のみである。これらのことから BZLF1 遺伝子発現が EBV 複製サイクル誘導の引金となっていると考えられている^{6,14-18)}。

BZLF1 遺伝子にコードされる Z タンパクは 245 アミノ酸からなり細胞転写調節因子である AP-1 ファミリーとりわけ c-fos 遺伝子産物 Fos タンパクと相同性をもち、特に 36-110 番目と DNA 結合領域を含む 153-196 番目の領域においてアミノ酸の相同性が高い (図 1)^{19,20)}。Fos タンパクは他の AP-1 ファミリーである Jun タンパクと異種二量体を形成し TPA 応答配列 (TPA responsive element, TRE) に結合することにより転写調節を行い、Z タンパクは同種二量体を形成して TRE および Z 応答配列 (Z responsive element, ZRE) に結合することによりこれらの配列を有するプロモーターからの転写を活性化する²¹⁻⁴⁴⁾。

平成 5 年 9 月 24 日受付, 平成 5 年 12 月 14 日受理

Abbreviations: bp, base pair; CAT, chloramphenicol acetyl transferase; DMEM, Dulbecco modified Eagle's medium; DTT, dithiothreitol; EA, early antigen; EBNA, EBV-determined nuclear antigen; EBV, Epstein-Barr virus; EDTA, ethylene-diamine-tetraacetic acid 2Na; FCS, fetal calf serum; PBS, phosphate buffer saline; PCR, polymerase chain reaction; SDS, sodium dodecyl sulfate; TE, Tris EDTA; Timp, tissue

佐藤らは Z タンパクの転写活性化には、プロモーター中に複数の Z タンパク結合配列である TRE あるいは ZRE が必要であることをみいだした⁴⁵⁾。細胞性の 92-kDa 4 型コラゲナーゼおよび組織特異的マトリックスメタロプロテナーゼ阻害物質 (tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 1, Timp) 遺伝子プロモーターは 1 個の TRE を含み、また EBV の BMRF1, BHRF1 および BZLF1 遺伝子プロモーターは複数の ZRE を含んでいる。本研究では Z タンパクのプロモーター特異性を規定する領域を Fos タンパクとの融合タンパクを作製することにより検討した。

材料および方法

1. 使用細胞

ヒト繊維肉腫由来の HT1080 細胞, サル腎由来 cos-1 細胞は 5% 牛胎児血清 (Fetal calf serum, FCS, Hyclone, Utah, USA) 加ダルベッコ変法イーグル培地 (Dulbecco modified

Eagle's medium, DMEM) (日水, 東京) にて 37°C で培養した。

II. プラスミドの構築

1. レポータープラスミド

EBV の BMRF1, BHRF1 および 92kDa-4 型コラゲナーゼ, Timp 遺伝子プロモーター領域の支配下にクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (chloramphenicol acetyl transferase, CAT) 遺伝子を組み込んだ BMRF1-CAT, BHRF1-CAT, 92kDa-4 型コラゲナーゼ CAT (92kDa-typeIV collagenase CAT, 92k-CAT) と Timp-CAT を用いた。プラスミドは金沢大学がん研究所ウイルス部佐藤博士から分与された。

2. Z タンパクと Z タンパクの欠失変異体発現プラスミド

BZLF1 遺伝子発現プラスミド, c-fos 発現プラスミドは各々ががん研ウイルス部佐藤博士および藤井雅寛博士より分与された。プラスミド pSG5 (東洋紡, 大阪) をベクターとして各々のプラスミドを作製した。Z 欠失変異体は, BZLF1 発現プラスミドコード領域の目的に必要な領域の DNA 配列を, ポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction, PCR) にて増幅した。PCR 反応は以下の条件で行った。すなわち, Taq ポリメラーゼ緩衝液 ($\times 10$ Taq polymerase buffer, Promega, Wisconsin, USA) 10 μ l, 1.25mM deoxy nucleotide triphosphates (dNTP) 16 μ l, 20mM 3' プライマー 5 μ l, 20mM 5' プライマー 5 μ l, Taq ポリメラーゼ 0.6 μ l, 蒸留水 64 μ l, c-fos 遺伝子 DNA 10ng を 94°C 1分, 45°C 1分, 72°C 1分, の順序で 20 サイクル施行した。ここで用いたプライマーは N 末端に EcoRI C 末端に BamHI の認識配列をもつものを DNA 合成機 (Model 391 DNA Synthesizer, ABI ジャパン, 東京) にて作成, 吸光度計にて 260nm の吸光度を測定し, 20 μ M に調整した後使用した。このようにして増幅された遺伝子を EcoRI, BamHI で切断しベクタープラスミドに挿入して Z 欠失変異体を作成した。挿入は, ベクタープラスミドを EcoRI, BamHI で切断後, 再結合を防ぐためアルカリフォスファターゼ (宝酒造, 京都), 0.25M Tris-HCl pH8.0 緩衝液中にて 56°C 1時間処理し切断端を脱リン酸化後フェノール抽出およびエタノール沈殿を行い, ベクター DNA および挿入遺伝子 DNA を各々 150ng をライゲーションキット (宝酒造) A 液 8 μ l に B 液 1 μ l を使用して結合して行った。

3. Z タンパクと Fos タンパクとの融合タンパク発現プラスミド

BZLF1 遺伝子発現プラスミドコード領域の融合体に必要な領域とその欠失した領域に対応する c-fos 遺伝子の DNA 配列を, 上記 2 に示したごとく PCR にて増幅して作成した。

4. Z タンパクの変異体発現プラスミド

BZLF1 遺伝子の目的とする部位に変異を起こすためその領域に対応する c-fos 遺伝子のアミノ酸配列をコードするプライマーを合成し上記 2 に示したごとく PCR にて増幅した。

5. Gal4 タンパク DNA 結合領域と Z および Fos タンパクとの融合タンパク発現プラスミド

Gal4 タンパク DNA 結合領域発現プラスミドはがん研ウイルス部藤井雅寛博士から分与された。このプラスミドの Gal4

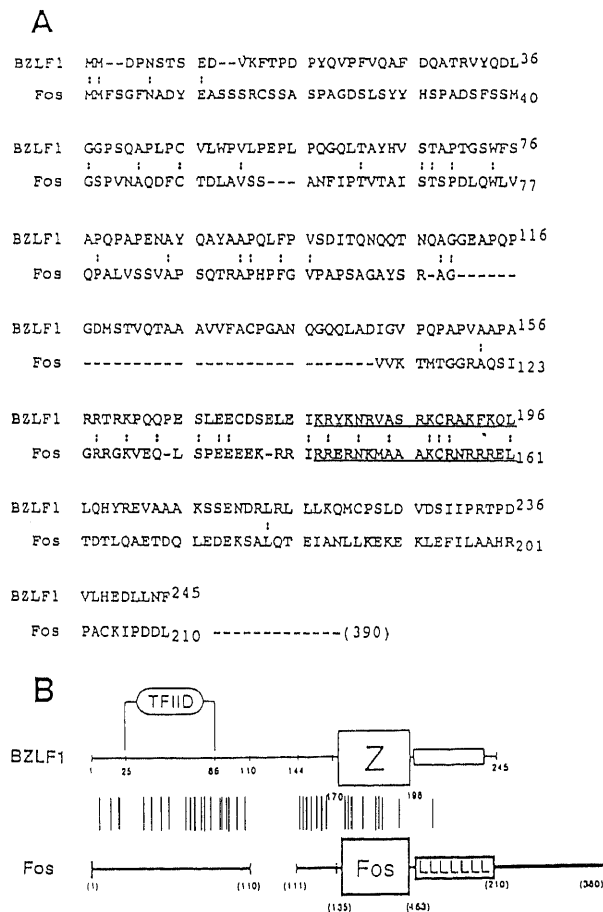


Fig. 1. Structures of Z and c-Fos proteins. (A) Amino acid sequences of Z and c-Fos proteins. Conserved amino acids are marked by the dots. Basic regions are underlined. (B) Schematic representation of Z and c-Fos proteins. Fine lines show the Z protein and bold lines show the c-Fos protein. Each open box indicates the basic region of Z or c-Fos proteins.

inhibitor of matrix metalloproteinase 1; TNE, Tris NaCl EDTA; TRE, TPA responsive element; TPA, 12-0-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate; VCA, viral capsid antigen; ZRE, Z responsive element; 92k-CAT, 92-kDa typeIV collagenase CAT

DNA 結合領域をコードする遺伝子の 3' 側の読みとり枠をあわせて BZLF1 および c-fos 遺伝子の欠失変異体を挿入した。

III. プラスミドの大量調整

上記のようにして得られたプラスミドで形質転換した大腸菌 HB 101 株を 2×YT 培地 (トリプトン 16g, イーストエキストラクト 10g, NaCl 5g, アンピシリン 50mg/l, pH 7.6) 250ml にて 24 時間培養した。途中、培養開始から約 8 時間後に 34mg/ml クロラムフェニコールのエタノール溶液を各培養瓶あたり 1.25ml ずつ加えた。培養終了後、5,000rpm 10 分遠心により集菌した。菌体を 10ml の 25% シュクロス, 50mM Tris-HCl 緩衝液 pH7.5 に懸濁後、リゾチーム 10mg 加え、ゆるやかに混和した後 5 分水中に静置、0.25M エチレンジアミン 4 酢酸 2 ナトリウム (0.25M ethylene-diamine-tetraacetic acid 2Na, EDTA) 1m 加え 15 分水中に静置、0.3% トライトン, 0.2M EDTA, 0.15M NaCl 10ml 加え 15 分水中に静置した後、30,000rpm 40 分遠心した。上清に 5M NaCl 2.5ml, 10% ドデシル硫酸ナトリウム (sodium dodecyl sulfate, SDS) 0.25ml, フェノールクロロホルムイソアミルアルコール (chloroform-isoamylalcohol, CIAA) 25ml を加え、フェノール抽出およびエタノール沈殿を行った。沈殿を 3ml の 1mM EDTA 加 10mM Tris-HCl (Tris-EDTA, TE) に溶解後 150 μ g のリボヌクレアーゼ (Sigma, St. Louis, USA) を加え 37°C 30 分反応後、塩化セシウム (CsCl) (BRL, Gaithersburg, USA) 4.2g, エチジウムブロマイド 4 μ g を加え、クイックシールチューブ (quick seal) (ベックマンジャパン, 東京) に注入密閉した。ベックマン VTi 65 垂直ローター (ベックマンジャパン) にて 20°C, 60,000rpm 10 時間超遠心後、プラスミドのバンドを注射器で回収した。1.1g/ml 塩化セシウム, 0.54mg/ml エチジウムブロマイドを含む TE にて 5.2ml に希釈後、再び 20°C 65,000rpm 5 時間超遠心した。プラスミドのバンドを回収しフェノール抽出、エタノール沈殿後 TE にて 1mg/ml の濃度に溶解した。

IV. 遺伝子導入

CAT アッセイに使用する細胞は約 1.0×10^5 個/ml の濃度で 5% FCS 加 DMEM 4ml にて 37°C 24 時間培養後、Chen & Okayama ら⁴⁹⁾ のリン酸カルシウム法変法にて遺伝子導入を行った。すなわち、各種プロモーター領域の支配下に CAT 遺伝子を組み込んだレポータープラスミド 1 μ g–2 μ g と、Zタンパク, Jun タンパク, Fos タンパクおよびそれらの欠失変異体タンパクや融合タンパクの発現プラスミドなどのエフェクタープラスミド 3 μ g–8 μ g を、0.26M 塩化カルシウム 240 μ l に混合し、その混合液に 2×BES 生食緩衝液 (2×BES buffered saline, BBS) (NaCl 280mM, N, N-ビス [2-ヒドロキシエチル] 2アミノエタンサルフォニックアシッド 50mM, Na₂PO₄, 2.8mM, pH 7.9) (N, N-bis[2-hydroxyethyl]-2-amino-ethane-sulfonic-acid, BES) 250 μ l を加え、室温にて 15 分静置した後、上記培養細胞に加え 37°C, CO₂ 濃度の 3% の条件下にて 6 時間培養した。その後、ハンクス液 (Hanks balanced salt solution, HBSS) にて洗滌し、5% FCS 加 DMEM 4ml で 37°C 24 時間培養した。

V. CAT アッセイ

IV. のごとく遺伝子導入した細胞を 0.8% 塩化ナトリウム, 0.02% 塩化カリウムを含む 10mM リン酸緩衝液 pH7.2 (phosphate-buffered saline, PBS) で洗滌し TNE (Tris-HCl pH8.0 40mM, NaCl 150mM, EDTA 1mM) 1ml にて回収、

10,000rpm 10 分遠心し沈殿に 0.25M Tris-HCl pH8.0 を 150 μ l 加え、超音波ホモジナイザーで細胞を破壊、続いて 10,000rpm 10 分遠心した後、上清 75 μ l に 1M Tris-HCl pH7.5 15 μ l, 4mg/ml アセチル CoA (acetyl-coenzyme A, Sigma) 20 μ l, ¹⁴C-クロラムフェニコール D-threo-[dichloroscetyl 1-¹⁴C] chloramphenicol, アマジヤムジャパン, 東京) 0.25 μ l, 蒸留水 40 μ l を加え 37°C 60 分インキュベートした。そして、酢酸エチル (半井, 京都) 500 μ l を加え激しく混和し、10,000rpm 1 分遠心、酢酸エチル層を回収、真空乾燥させた。残渣を 12 μ l の酢酸エチルにて溶解、シリカゲル薄層プレートにスポット後クロロホルム:メタノール 19:1 混合液を溶媒として展開を行った。イメージアナライザーにてアセチル化されたクロラムフェニコールの比率を定量し、コントロールのアセチル化されたクロラムフェニコールの比率を 1 とした時の各々のアセチル化の比率を転写活性とした。

VI. ゲルシフトアッセイ

TRE DNA プロローブは GATCTTCTAGACCGGATGAGT-CATAGCTTG の 30bp の DNA を DNA 合成機にて合成した。DNA の末端標識は以下のように行った。すなわち DNA 20ng, 50mM Tris-HCl pH7.6, 10mM MgCl₂, 5mM ジチオスレトール (dithiothreitol, DTT), 0.1mM スペルミジン, 0.1mM EDTA, 100 μ Ci P-32 標識 γ -ATP, 20unit T4 ポリヌクレオチド キナーゼを含む反応液 50 μ l を 37°C 1 時間反応後アガロースゲル電気泳動により P-32 標識 DNA を分離精製した。

試験管内 mRNA 合成はプラスミド内の T7 RNA ポリメラーゼプロモーターを利用し、RNA 合成キット (Promega) により

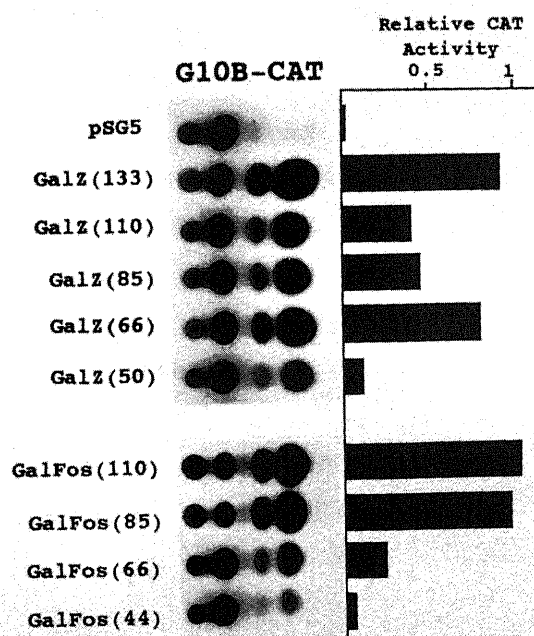


Fig. 2. Transcriptional activation by chimeras of the Gal4 DNA binding region and Z and c-Fos deletion mutants. pG10B-CAT plasmids were cotransfected as a reporter with expression vectors encoding various chimeras of the Gal4 DNA binding region and Z and c-Fos deletion mutants into cos-1 cells. The cells were harvested and CAT activity was analyzed 24 hour after transfection.

合成を行った。すなわち、発現プラスミド DNA 2 μ g を鋳型として同キットにて37 $^{\circ}$ C 1時間反応後、フェノール抽出エタノール沈澱により精製した。この RNA 1 μ g を 20 μ l のウサギ網状赤血球ライゼート (Promega) と混合し30 $^{\circ}$ C 1時間反応させタンパク合成を行った。タンパク合成終了後のウサギ網状赤血球ライゼート 1 μ l, P-32 標識 DNA プローブ (10,000cpm) を DNA 結合緩衝液 (20mM HEPES 緩衝液 pH7.9, 40mM KCl, 0.2M EDTA, 8mM MgCl₂, 10% グリセロール, 2% ポリビニルアルコール, 1mM DTT) 中で室温20分反応後, 4% ポリアクリルアミドゲル電気泳動, そしてオートラジオグラフィにより分析を行った。

成 績

I. Z および Fos タンパクの転写活性化領域の比較同定

Z と Fos タンパクのN末端側転写活性化領域を比較検討するために酵母転写因子 Gal 4 タンパクの DNA 結合領域との融合タンパクを作成し Gal 4 タンパク結合 DNA 配列を介した転写活性化能を測定した (図2)。

Z タンパクではN末端の66以上のアミノ酸を含む融合タンパク GalZ (133), GalZ (110), GalZ (85), GalZ (66) は有意な転写活性化能を示したが, それより短い領域を含む GalZ (50) は顕著な活性低下を示した。Fos タンパクではN末端66以上のアミノ酸を含む融合タンパク GalFos (110), GalFos (85), GalFos (66) は有意な転写活性化能を示したが, それより短い領域を含む GalFos (44) は顕著な活性低下を示した。以上の結果より Z および Fos タンパクのいずれもN末端66以上のアミノ酸を含む融合タンパクは有意な転写活性化能を示し, それより短い領域を含むものは顕著な活性低下を示したことから, Z および Fos タンパクのN末端66アミノ酸領域はいずれも転写活性化に重要な役割を果たしていることが示唆された。

II. FosZ 融合タンパクによる転写活性化能の検討

1. EBV 遺伝子プロモーターからの転写誘導

Gal 4 タンパクとの融合タンパクによる解析から Z タンパクのN末端66アミノ酸領域は転写活性化に重要な役割を果たすことが示唆された。そこで, Z タンパクのこの領域を欠失した変

異体を作製しその転写活性化能を測定した (図3)。

Z タンパクのN末端65および109アミノ酸を欠失した Z (66-245) および Z (110-245) 欠失変異体は, いずれもウィルスプロモーター BMRF1 および BHRF1 からの転写を活性化することができなかった。次に, Z タンパクのN末端領域に対応する Fos タンパクのN末端領域も Z タンパク同様転写活性化に重要な役割を果たすことが示唆されたので, Z タンパクの欠失した領域に対応する Fos タンパクの各領域を融合させた融合タンパク Fos (66) Z (66-245), Fos (88) Z (88-245), Fos (99) Z (99-245) および Fos (110) Z (110-245) 発現プラスミドを作製しその転写活性化能を測定した (図3)。

Fos (66) Z (66-245), Fos (88) Z (88-245) および Fos (99) Z (99-245) 融合タンパクは有意にウィルスプロモーターからの転写を活性化したのに対して Fos (110) Z (110-245) は活性化することができなかった。また Z タンパクのN末端65アミノ酸を Fos タンパクの110アミノ酸で置換した Fos (110) Z (66-245) は強い転写活性化能を示した。

以上の結果より Z タンパクのN末端99アミノ酸は EBV プロモーター BMRF1 および BHRF1 の活性化において Fos タンパクの対応する領域と置換可能であるが, 110アミノ酸は置換できないことが明らかとなった。

上で使用した発現プラスミドが実際に DNA 結合活性のある融合タンパクを発現することを確認するために, これらの発現

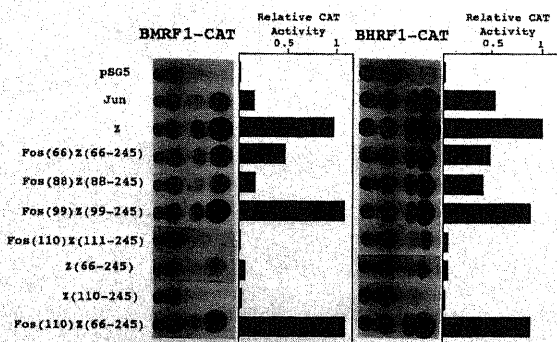


Fig. 3. Transcriptional activation of BMRF1 and BHRF1 viral genes by chimeras of Z deletion mutants and c-Fos deletion mutants. BMRF1-CAT or BHRF1-CAT plasmids were cotransfected as a reporter with expression vectors encoding various chimeras of Z deletion mutants and c-Fos deletion mutants into HT 1080 cells.

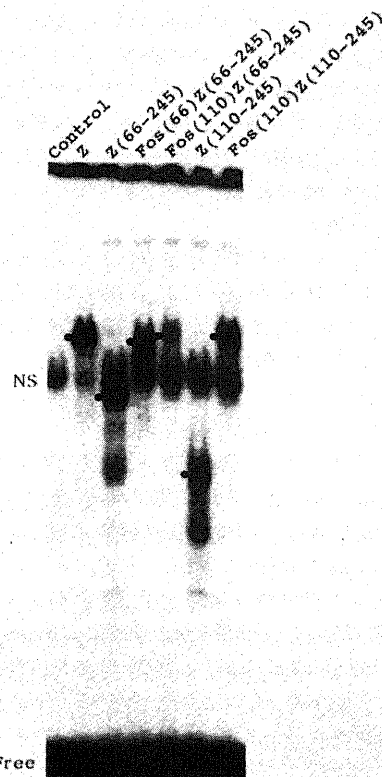


Fig. 4. Gel mobility shift assay for TRE binding of chimeras of Z protein deletion mutants and c-Fos deletion mutants. Chimeric proteins of Z deletion mutants and c-Fos deletion mutants are synthesized in vitro translation in a rabbit reticulocyte lysate. NS, Nonspecific binding activity.

プラスミドから試験管内で RNA を合成し、これらの RNA を用いて試験管内翻訳反応によりタンパク合成を行った。これらのタンパクに DNA 結合活性のあることをゲルシフトアッセイにより確認した (図 4)。いずれの反応産物も期待される移動度の TRE プローブとの複合体を形成したことからいずれの発現プラスミドも DNA 結合活性を有するタンパクを産生することが確認された。

2. Zタンパクおよびその変異体の細胞性遺伝子 92kDa-4 型コラゲナーゼ、Timp のプロモーターからの転写におよぼす影響

92kDa-4 型コラゲナーゼ、Timp 遺伝子プロモーターは、Jun および Fos タンパクなどの AP-1 ファミリータンパクにより遺伝子発現制御を受けることが知られている。Zタンパクおよびその変異体によりこれらの遺伝子プロモーターからの転写におよぼす影響を調べるためにこれらプロモーター領域の支配下に各々 CAT 遺伝子を組み込んだプラスミドをレポータープラスミドとして使用した (図 5)。

Jun タンパク発現プラスミドは、これらのプロモーターからの転写を促進したのに対して Zタンパクおよびその変異体は Fos (110) Z (110-245) を除きいずれもこれらの細胞性遺伝子プ

ロモーターからの転写を有意に活性化しなかった。一方、ウィルスプロモーターを活性化できなかった Fos (110) Z (110-245) 融合タンパクは非常に強く両プロモーターからの転写を活性化した。

Zタンパクの N末端66, 88および99アミノ酸領域を Fos タンパクの対応する領域と置換した融合タンパクはいずれも Zタンパクにより転写制御を受ける EBV プロモーター BMRF1, BHRF1 からの転写を活性化したが、細胞性 AP-1 ファミリー転写因子により制御される細胞性遺伝子 92kDa-4 型コラゲナーゼ、Timp のプロモーターは活性化しなかった。一方 N末端110アミノ酸領域を置換した Fos (110) Z (110-245) 融合タンパクは逆に EBV プロモーターを活性化できなかったが 92kDa-4 型コラゲナーゼ、Timp プロモーターを活性化した。

以上の結果より Zタンパクの EBV プロモーター特異的活性化は、100-110 アミノ酸領域により決定されていることが示唆された。

3. Zタンパクの 100-110 アミノ酸領域の検討

Zタンパクのプロモーター特異性を決定する領域をアミノ酸

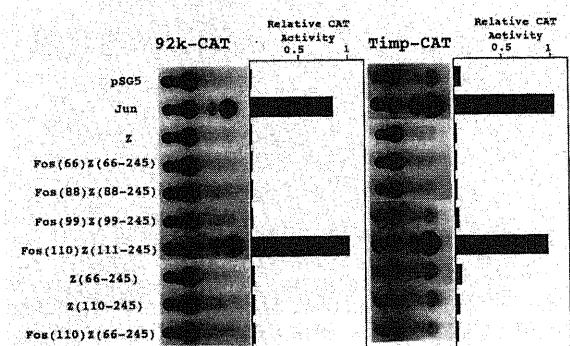


Fig. 5. Transcriptional activation of cellular 92k-Da type IV collagenase and Timp genes by chimeras of Z deletion mutants and c-Fos deletion mutants. 92k-Da type IV collagenase CAT (92k-CAT) or Timp-CAT plasmids were cotransfected as a reporter with expression vectors encoding various chimeras of Z deletion mutants and c-Fos deletion mutants into HT 1080 cells.

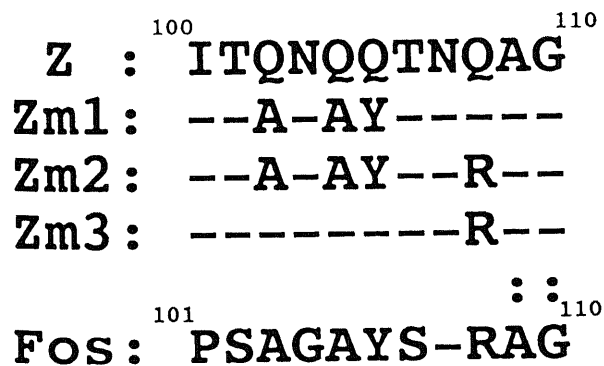


Fig. 6. Amino acid sequences of Z, c-Fos and Z point mutants. Conserved amino acids are marked by the dots.

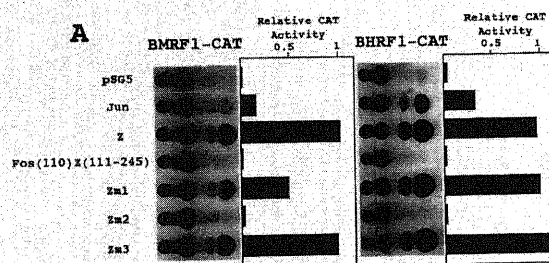


Fig. 7. Transcriptional activation of EBV viral genes by Z point mutants. BMRF1-CAT or BHRF1-CAT plasmids were cotransfected as a reporter with expression vectors encoding various Z point mutants into HT 1080 cells.

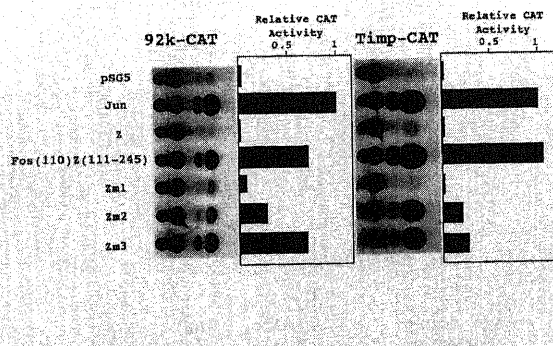


Fig. 8. Transcriptional activation of cellular genes by Z point mutants. 92k-CAT or Timp-CAT plasmids were cotransfected as a reporter with expression vectors encoding various Z point mutants into HT 1080 cells.

レベルで解明するためにZタンパクのN末端100-110アミノ酸をFosタンパクの対応する領域と比較したところ、Zタンパクに特徴的な配列としてこの11アミノ酸内に4個のグルタミン(Gln: 102, 104, 105, 108)が見いだされた(図6)。このうち3個のグルタミン(Gln: 102, 104, 105)を対応するFosタンパクのアラニン、アラニン、チロシンに置換したZm1, 108番目をアルギニンに置換し4個全てを置換したZm2, 108番目のみをアルギニンに置換したZm3発現プラスミドを作製し、それらの転写活性化能を比較した(図7, 8)。

Zm1, Zm3はウィルスプロモーターBMRF1, BHRF1を活性化したがZm2はしなかった。一方、細胞性プロモーターはZm2, Zm3により有意に転写が活性化された。

以上の結果より、Zタンパクはウィルスプロモーターの活性化にはZタンパク100-110アミノ酸内の4個のグルタミンを全て置換するとその活性を喪失すること、細胞性プロモーターの活性化には108番目のグルタミンをアルギニンに置換するだけでその活性を獲得することが明らかとなった。

Ⅲ. Fos(110)Z(110-245)融合タンパクとZおよびその欠失変異体タンパクとの相互作用

1. Fos(110)Z(110-245)融合タンパクの二量体形成能

Zタンパクとプロモーター特異性を異にするFos(110)Z(110-245)融合タンパクが、DNA結合能・二量体形成能には

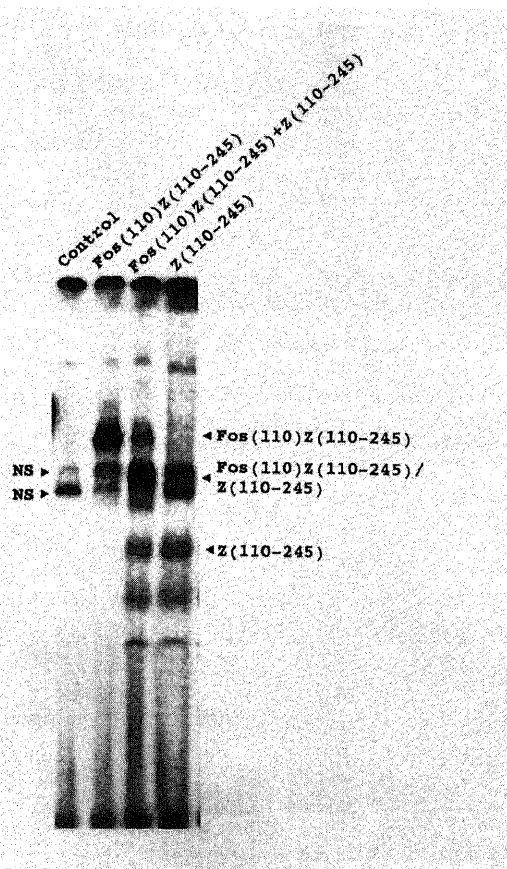


Fig. 9. Formation of heterodimers of Z(110-245) and Fos(110)Z(110-245). Z(110-245) and Fos(110)Z(110-245) proteins were synthesized in vitro translation in a rabbit reticulocyte lysate. NS, Nonspecific binding activity.

変化がないことを確認するためにゲルシフトアッセイを行った(図9)。移動度の差がもっとも著しくなるようにFos(110)Z(110-245)とZ(110-245)を用いた。両者を同一チューブ内で試験管内翻訳で合成しゲルシフトアッセイを行ったところ、Fos(110)Z(110-245)およびZ(110-245)複合体と中間の移動度を示す複合体が形成され、両者が異種二量体を形成することが示された。

2. Fos(110)Z(110-245)融合タンパクとZタンパクおよびその欠失変異体との相互作用

Zタンパクおよびその欠失変異体とFos(110)Z(110-245)融合タンパクとの相互作用を検討するためにこれらを同時に発現させその相互作用を検討した(図10, 11)。

Fos(110)Z(110-245)融合タンパクが転写活性化することができないBMRF1プロモーターに対してZタンパクと同時発現させるとZタンパク単独に比して約2倍の活性化を示した。また、転写活性化能を喪失したZ(66-245), Z(110-245)欠失変

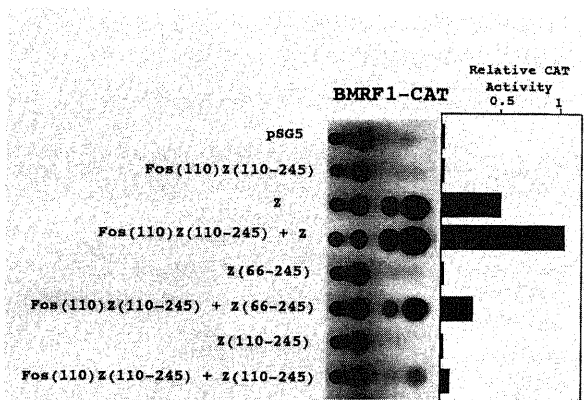


Fig. 10. Transcriptional activation of viral genes by heterodimers of Z deletion mutants and Fos(110)Z(110-245). BMRF1-CAT plasmids were cotransfected as a reporter with expression vectors encoding various Z deletion mutants and Fos(110)Z(110-245) into HT 1080 cells.

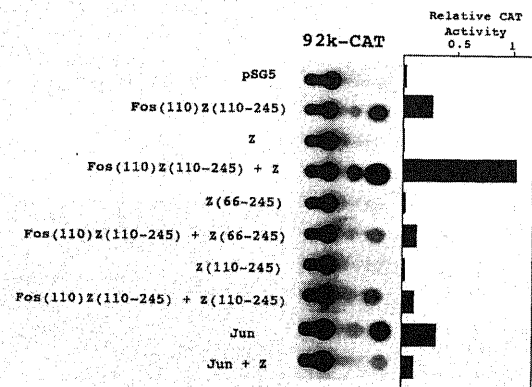


Fig. 11. Transcriptional activation of 92k-Da type IV collagenase genes by heterodimers of Z deletion mutants and Fos(110)Z(110-245). 92k-CAT plasmids were cotransfected as a reporter with expression vectors encoding various Z protein deletion mutants and Fos(110)Z(110-245) into HT 1080 cells.

異体との同時発現でも有意に BMRF1 プロモーターからの転写を誘導した。一方, Fos (110) Z (110-245) 融合タンパクが転写活性化可能な 92kDa-4 型コラゲナーゼプロモーターに対してこのプロモーターを活性化することができない Zタンパクとの同時発現では Fos (110) Z (110-245) 単独に比して約3倍の転写活性化を示した。しかし Zタンパクと同様にこのプロモーター転写活性化能をもたない欠失変異体 Z (66-245) および Z (110-245) は Fos (110) Z (110-245) による転写活性化を有意に抑制した。また, Jun タンパクによるこのプロモーターの転写活性化を Zタンパクは有意に抑制した。

IV. Zタンパクの 111-143 アミノ酸配列の検討

Zタンパクのアミノ酸配列111番めから143番めに相当する領域は Fos タンパクでは欠失している。そこで次に Zタンパクの144番めから168番めのアミノ酸領域を Fos タンパクの対応する領域のアミノ酸111番めから134番めと置換した融合タンパク ZFosZ1 を発現するプラスミドを作製しウィルスプロモーターおよび細胞性プロモーターに対する効果を検討した (図 12, 13, 14)。

1. ZFosZ 融合タンパクによる転写活性化能の検討

ZFosZ1 は Z と同様にウィルスプロモーター BMRF1, BHRF1 からの転写を活性化するとともに Z が活性化することができなかった細胞性プロモーター 92kDa-4 型コラゲナーゼ, Timp を活性化することができた。ZFosZ1 融合タンパク中の Fos タンパク領域 111-134 アミノ酸のうちどの領域が細胞性プロモーターの活性化に関わっているのかをみるために 111-123 アミノ酸領域のみを置換した ZFosZ2, 124-134 アミノ酸領域のみを置換した ZFosZ3, 129-134 アミノ酸領域のみを置換した ZFosZ4 融合タンパク発現プラスミドを作製し各プロモーターに対する効果を検討した。ZFosZ2 はウィルスプロモーターに対する効果を喪失したが細胞性プロモーターに対する効果を獲得した。ZFosZ3, ZFosZ4 はウィルスプロモーターに対する効果は保持しつつ細胞性プロモーター活性化能を ZFosZ1 に比較して弱いながらも獲得していた。

2. ZFosZ1 融合タンパクと Zタンパクおよびその欠失変異体との相互作用

ZFosZ1 融合タンパクは, Zタンパクおよびその欠失変異体にはない活性, すなわち細胞性プロモーター活性化能を獲得していた。そこで ZFosZ1 と Z およびその欠失変異体との機能を比較する目的で Z およびその欠失変異体 ZFosZ1 の細胞性プロ

```

140                                     172
Z   : QLADIGVPPAPVAAPARRTRKPPQPESLEECD
      :           :           :           :
Fos : SRAGVVKTMGTGGRAQSIGRRGKVEQ-LSPEEEE
107                                     138

ZFosZ1 : QLADVVKTMGTGGRAQSIGRRGKVEQ-LSPEECD
Z(143)Fos(111-134)Z(169-245)

ZFosZ2 : QLADVVKTMGTGGRAQSI RRRTRKPPQPESLEECD
Z(143)Fos(111-123)Z(157-245)

ZFosZ3 : QLADIGVPPAPVAAPAGRRGKVEQ-LSPEECD
Z(156)Fos(124-134)Z(169-245)

ZFosZ4 : QLADIGVPPAPVAAPARRTRKVEQ-LSPEECD
Z(161)Fos(129-134)Z(169-245)

```

Fig. 12. Amino acid sequences of Z, c-Fos and chimeras of Z and c-Fos deletion mutants. Conserved amino acids are marked by the dots.

モーター 92kDa-4 型コラゲナーゼに対する転写活性化に与える効果を検討した (図 15)。

Zとその欠失変異体 Z (66-245) および Z (110-245) はいずれも単独では細胞性プロモーターを活性化できなかったが, ZFosZ1 の細胞性プロモーターに対する効果を著しく上昇させた。特に欠失変異体の効果は大きかった。

3. ZFosZ1 融合タンパクの二量体形成能

ZFosZ1 と Z欠失変異体 Z (110-245) との直接的な相互作用をみるために試験管内翻訳反応により作製したタンパクを用いてゲルシフトアッセイを行った (図 16)。ZFosZ1 および Z (110-245) はいずれも DNA に結合して, タンパクの大きさに対応して異なる移動度の DNA との複合体を形成した。両者を同一試験管内で同時に翻訳したものでは, 各々単独の複合体と共にそれらの中間の移動度を示す複合体が形成された。これらの結果から ZFosZ1 は Z (110-245) と異種二量体を形成するこ

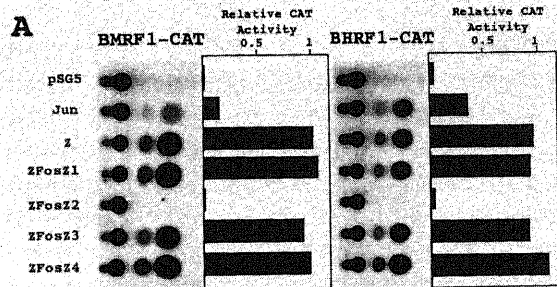


Fig. 13. Transcriptional activation of viral genes by chimeras of Z deletion mutants and c-Fos deletion mutants. BMRF1-CAT or BHRF1-CAT plasmids were cotransfected as a reporter with expression vectors encoding various chimeras of Z deletion mutants and c-Fos deletion mutants into HT 1080 cells.

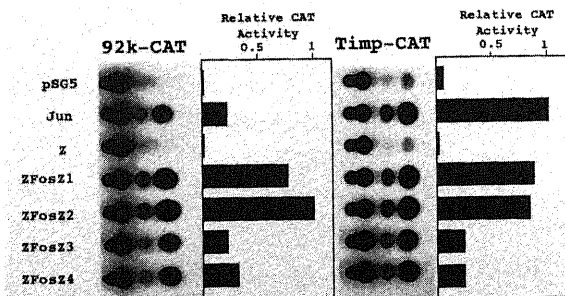


Fig. 14. Transcriptional activation of cellular genes by chimeras of Z deletion mutants and c-Fos deletion mutants. 92k-CAT or Timp-CAT plasmids were cotransfected as a reporter with expression vectors encoding various chimeras of Z deletion mutants and c-Fos deletion mutants into HT 1080 cells.

とが示唆された。

考 察

ウィルスが細胞由来の遺伝子、特に AP-1 ファミリーの転写制御因子を取り込んだ例としてレトロウィルスの v-jun, v-fos 遺伝子があるが、これらの遺伝子は癌遺伝子としてウィルス発癌の中心的役割を果たすことが知られている。これらの癌遺伝子産物は本来の細胞性転写因子のような転写制御の支配機構を逸脱しているために細胞を発癌に導くと考えられる¹⁹⁾。一方、EBV の Zタンパクはそのアミノ酸配列の相同性、イントロン-エクソン構造などから c-fos 遺伝子がウィルスに取り込まれたものと考えられる。したがって Zタンパクは AP-1 ファミリーの転写因子と共通の DNA 配列すなわち TRE 配列を認識する。しかしながら Zタンパクは AP-1 ファミリーの細胞性転写因子によって制御されるほとんどの細胞性遺伝子の発現を誘導することはできない。Sato によれば、Zタンパクの EBV プロモーター特異的活性化機構として Zタンパクは転写活性化には必ず複数の DNA 結合配列が連続して存在することが必要である⁴⁹⁾。したがってほとんどの細胞性遺伝子プロモーターのように TRE 結合配列を 1 個しか含まないプロモーターを Zタンパクは活性化することができない。したがって EBV 潜伏感染細胞内に Zタンパクが発現されると細胞性遺伝子プロモーターからの転写を誘導することなしにウィルスプロモーターを選択的に活性化しウィルス増殖サイクルを誘導する。

Zタンパクの 25-86 アミノ酸領域は転写基本因子である TFIIID と直接結合することが報告されている⁴⁹⁾。実際に Zタンパクのこの領域を含む部分を欠失させると Zタンパクは転写活性化能を喪失する。興味あることに、Zタンパクのこの領域を Fos タンパクの対応する領域と置換すると Zタンパクは転写活性化能を回復した。このことは Fos タンパクの N 末端領域も直接 TFIIID と結合するか又はそれに相当する活性を有する可能性を示唆している。Zタンパクの N 末端 99 アミノ酸までは Fos タンパクの対応する領域と置換してもその活性に顕著な差はみられなかったが、110 アミノ酸を置換するとウィルスプロモーターに対する活性を喪失するとともに細胞性プロモーターに対する転写活性化能を新たに獲得した。したがって Zタンパ

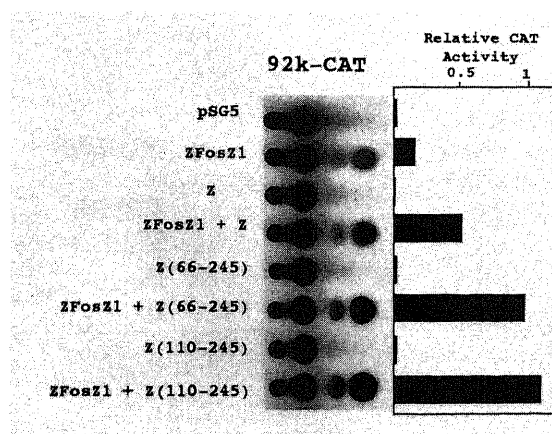


Fig. 15. Transcriptional activation of cellular genes by heterodimers of Z deletion mutants and ZFosZ1. 92 k-CAT plasmids were cotransfected as a reporter with expression vectors encoding various Z deletion mutants and ZFosZ1 into HT 1080 cells.

クの 110-110 アミノ酸領域にプロモーター特異性を決定する部分があると推測された。Zタンパクのこの領域に、特徴的なアミノ酸配列として 4 個のグルタミンが認められた。グルタミンに富んだ領域はしばしば転写活性化領域として働くことから、この領域が Zタンパクの転写になんらかの影響をもつことが予想された。実際にこの 4 個のグルタミン (Gln: 102, 104, 105, 108) に変異を導入するとウィルスプロモーター活性化能を喪失し、4 番目のグルタミン (Gln: 108) をアルギニンに置換すると細胞性プロモーター活性化能を獲得することが明らかとなった。

以上の結果より、Zタンパクと Fos タンパクは N 末端領域の非常によく対応する領域に転写基本因子 TFIIID 結合部位が存在し、Zタンパクのこの領域に隣接したアミノ酸 100-110 の部分が Zタンパクによる転写活性化のプロモーター特異性を規定していることが示された。

Zタンパクおよびその変異体は C 末端に位置する二両体形成領域を介して二両体形成することから 2 種のタンパクの同時発現では各々の同種二両体と共に異種二両体を形成する。したがって 2 種のタンパクの同時発現による効果が各々単独発現の相加的または平均的效果以上であれば、それは異種二両体の効果と推定される。またウィルスプロモーターのように Zタンパク結合配列が連続して繰り返されている場合には、各々の同種二両体と異種二両体の 3 種類の二両体が混合して DNA に結合する可能性もあり、そのような効果も考えられる。Zタンパク

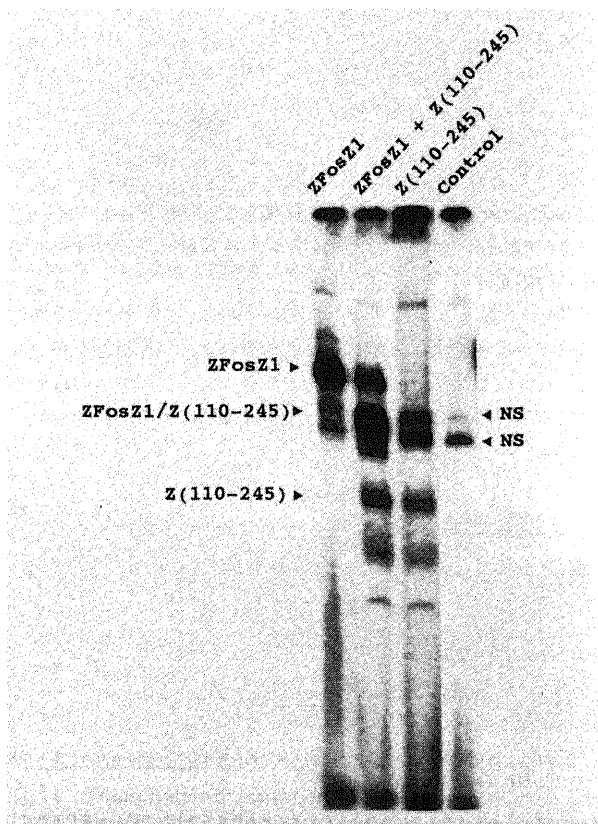


Fig. 16. Formation of heterodimers of Z (110-245) and ZFosZ1. Z (110-245) and ZFosZ1 proteins were synthesized in vitro translation in a rabbit reticulocyte lysate. NS, Nonspecific binding activity.

と Fos (110) Z (110-245) 融合タンパクを同時に発現させると Fos (110) Z (110-245) 融合タンパクは自分自身では活性化できないウィルスプロモーターに対して Zタンパクの活性を有意に増強した。また転写活性化領域を含むがウィルスプロモーター特異性を決定する領域を欠く Fos (110) Z (110-245) 融合タンパクと転写活性化領域を欠くがウィルスプロモーター特異性決定領域を含む Z (66-245) との同時発現ではウィルスプロモーターを活性化したのに対して、転写活性化領域とプロモーター特異性決定領域の両方を欠く Z (110-245) は Fos (110) Z (110-245) との同時発現では極めて弱い転写活性化能しか示さなかった。したがって、ウィルスプロモーターの活性化には両方の領域が必要であるが必ずしも両者が同一分子内になくともよいと推測された。

また、Zタンパクのプロモーター特異性は Zタンパクの 144-168 アミノ酸領域を置換することによっても変化させることができた。すなわちこの領域を Fos タンパクの対応するアミノ酸領域と置換するとウィルスプロモーターに対する活性を維持したままで新たに細胞性プロモーターに対する転写活性化能を獲得した。一方、この領域内の 144-156 アミノ酸のみを置換するとウィルスプロモーターに対する転写活性化能を喪失しながらも、細胞性プロモーターに対する活性化能を獲得した。162-168 アミノ酸を置換しても細胞性プロモーターに対する活性化能を獲得した。

以上のように、Zタンパクの複数の領域のいずれの領域を置換してもプロモーターに対する特異性を変化され得ることより、Zタンパクのプロモーター特異性は、特定の部位によってのみ決定されるというよりは全体の立体構造によるものであると推測された。異なる構造の Z およびその誘導体を同時に発現させた場合に各々を単独に発現された場合とは著しく異なった活性を示すことから、Zタンパクの二両体としての立体構造が大きく寄与していることが示された。

Zタンパクのプロモーター特異性の決定機構は、転写因子のなかでもきわめてユニークなものであり、転写制御機構の研究において重要なモデルの一つとなると考えられる。

結 論

EBV 転写因子 Zタンパクのウィルスプロモーター特異的活性化機構について解析を行い次の結果を得た。

1. Zタンパクは EBV の BMRF1, BHRF1 遺伝子プロモーターを活性化したが、AP-1 ファミリーにより制御される細胞性遺伝子 92kDa-4型コラゲナーゼおよび Timp プロモーターを活性化することができなかった。
2. Zタンパクの転写基本因子 TFIIID との結合領域を含む N末端99アミノ酸は転写活性化に必須の領域であったが、この領域は Fos タンパクの対応する領域と置換可能であった。したがってこの領域を転写活性化領域と同定した。
3. Zタンパクの N末端110アミノ酸領域を Fos タンパクの対応する領域と置換するとウィルスプロモーターに対する活性化能を喪失し、細胞性プロモーターに対する活性化能を新たに獲得した。したがって、この領域から転写活性化領域 N末端99アミノ酸を除いた 100-110 アミノ酸領域をプロモーター特異性決定領域と同定した。
4. Zタンパクのプロモーター特異性決定領域中の 4個のグルタミン中 4個とも置換するとウィルスプロモーターに対する

活性を喪失し、108番目のグルタミンを置換すると細胞性プロモーターに対する活性を獲得した。

5. Zタンパクのプロモーター特異性は、144-168 アミノ酸領域を Fos タンパクの対応する領域と置換することによっても変化させることが可能であった。

以上の結果より Zタンパクのプロモーター特異性が複数の領域により規定されていることが明らかとなった。このことは Zタンパクの立体構造がそのプロモーター特異性に重要である可能性を示唆している。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導と御校閲を賜りました恩師古川 俊教授に深甚なる謝意を表します。また、終始直接のご指導を賜りました金沢大学がん研究所ウイルス部佐藤 博博士に深謝致します。また、貴重な御助言を賜りましたがん研究所ウイルス部清水元治教授、藤井雅寛博士、病態生理部山本健一教授、さらに多大なるご協力を賜りました金沢大学医学部耳鼻咽喉科学教室ならびに金沢大学がん研究所ウイルス部の皆様に感謝いたします。

なお、本論文の一部は、第94回日本耳鼻咽喉科学会総会(1993年 京都)にて口演した。

文 献

- 1) Henle, G., Henle, W. & Diehl, V.: Relation of Burkitt's tumor associated herpes-type virus to infectious mononucleosis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 59, 94-101 (1968).
- 2) Henle, W., Henle, G. & Kwan, H. C.: Antibodies to Epstein-Barr virus related antigens in nasopharyngeal carcinoma. Comparison of active cases and long time survivals. J. Natl. Cancer Inst., 51, 1398-1412 (1973).
- 3) zur Hausen, H., O'Neal, F. J. & Freese, U. K.: Persisting oncogenic herpesvirus induced by the tumor promoter TPA. Nature, 272, 373-375 (1978).
- 4) Flemington, E. & Speck, S. H.: Identification of phorbol ester response elements in the promoter of Epstein-Barr virus putative lytic switch gene BZLF1. J. Virol., 64, 1217-1226 (1990).
- 5) Hinuma, Y., Kohn, M., Yamaguchi, J. T., Wudarski, D. J., Blakeslee, J. R. & Grance, J. T. Jr.: Immunofluorescence and herpes-type virus particles in the p3HR-1 Burkitt's lymphoma cell line. J. Virol., 1, 1045-1051 (1967).
- 6) Takada, K., Shimizu, N., Sakuma, S. & Ono, Y.: Transactivation of the latent Epstein-Barr virus (EBV) genome after transfection of the EBV DNA fragment. J. Virol., 57, 1016-1022 (1986).
- 7) Takada, K. & Ono, Y.: Synchronous and sequential activation of latently infected Epstein-Barr virus genomes. J. Virol., 62, 2274-2284 (1988).
- 8) Biggin, M., Bodescot, M., Perricident, M. & Farrell, P.: Epstein-Barr virus gene expression in p3HR-1 superinfected Raji cells. J. Virol., 61, 3120-3132 (1987).
- 9) Takimito, T., Ogura, H., Sato, H., Umeda, R. & Hatano, M.: Isolation of transforming and early antigen-inducing Epstein-Barr virus from nasopharyngeal carcinoma hybrid cells (NPC-KT).

- J. Natl. Cancer Inst., 74, 57-59 (1985).
- 10) Sato, H., Pagano, J. S. & Raab-Traub, N.: Amplification of Epstein-Barr virus (EBV) DNA by superinfection with a strain of EBV derived from nasopharyngeal carcinoma. *J. Virol.*, 62, 3288-3294 (1988).
 - 11) Sato, H., Takimoto, T., Ogura, H., Hatano, M. & Glaser, R.: Heterogeneity of Epstein-Barr virus derived from a nasopharyngeal carcinoma which has transforming and lytic properties. *J. Natl. Cancer Inst.*, 76, 1019-1024 (1986).
 - 12) Kenny, S., Kanine, J., Holly-Guthrie, E. & Pagano, J.: The Epstein-Barr virus BZLF1 immediately-early gene product differentially affects latent versus productive EBV promoters. *J. Virol.*, 63, 1729-1736 (1989).
 - 13) Sample, J., Lancz, G. & Nonoyama, M.: Mapping of genes in BamHI fragment M of Epstein-Barr virus DNA that may determine the fate of viral infection. *J. Virol.*, 57, 145-154 (1986).
 - 14) Hardwick, J. M., Lieberman, P. M. & Hayward, S. D.: A new Epstein-Barr virus transactivator, R, induces expression of a cytoplasmic early antigen. *J. Virol.*, 313-321 (1990).
 - 15) Cox, M. A., Leahy, J. & Hardwick, J. M.: An enhancer within the divergent promoter of Epstein-Barr virus responds synergistically to the R and Z transactivators. *J. Virol.*, 64, 313-321 (1990).
 - 16) Kenny, S., Kamine, J., Holley-Guthrie, E., Lin, J. C., Mar, E. C. & Pagano, J. S.: The Epstein-Barr virus (EBV) BZLF1 immediate-early gene product differentially affects latent versus productive EBV promoters. *J. Virol.*, 63, 1729-1736 (1989).
 - 17) Flemington, E. & Speck, S. H.: Identification of phorbol ester response elements in the promoter of Epstein-Barr virus putative lytic switch gene BZLF1. *J. Virol.*, 64, 1217-1226 (1990).
 - 18) Flemington, E. & Speck, S. H.: Autoregulation of Epstein-Barr virus putative lytic switch gene BZLF1. *J. Virol.*, 64, 1227-1232 (1990).
 - 19) Farrell, P. J., Rowe, D. T., Rooney, C. M. & Kouzarides, T.: Epstein-Barr virus BZLF1 transactivator specifically binds to a consensus AP-1 site and is related to c-fos. *EMBO J.*, 8, 127-132 (1989).
 - 20) Packham, G., Economou, A., Rooney, C., Rowe, D. T. & Farrell, P. J.: Structure and function of the Epstein-Barr virus BZLF1 protein. *J. Virol.*, 64, 2110-2116 (1990).
 - 21) Halazonetis, T. D., Georgopoulos, K., Greenberg, M. E. & Leder, P.: C-Jun dimerizes with itself and with c-fos forming complexes of different DNA binding affinities. *Cell*, 55, 917-924 (1988).
 - 22) Jones, N.: Transcriptional regulation by dimerization: Two sides to an incestuous relationship. *Cell*, 61, 9-11 (1990).
 - 23) Kouzarides, T. & Ziff, E.: The role of the leucine zipper in the Fos-Jun interaction. *Nature*, 336, 646-651 (1988).
 - 24) O'Shea, E. K., Rutkowski, R., Stafford III, W. F. & Kim, P. S.: Preferential heterodimer formation by isolated leucine zipper from Fos and Jun. *Science*, 245, 646-648 (1989).
 - 25) Gentz, R., Rauscher III, F. J., Abate, C. & Curran, T.: Parallel association of Fos and Jun leucine zippers juxtaposes DNA binding domain. *Science*, 243, 1695-1699 (1989).
 - 26) O'Shea, E. K., Rutkowski, R., Stafford III, W. F. & Kim, P. S.: Preferential heterodimer formation by isolated leucine zipper from Fos and Jun. *Science*, 245, 646-648 (1989).
 - 27) Curran, T. & Franza, B. R.: Fos and Jun: the AP-1 connection. *Cell*, 55, 395-397 (1988).
 - 28) Vinson, C. R., Sigler, P. B. & Mucknight, S. L.: Scissors-Grip model for DNA recognition by a family of leucine zipper protein. *Science*, 246, 911-916 (1989).
 - 29) Landschulz, W. H., Johnson, P. F. & Mucknight, S. H.: The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science*, 240, 1759-1764 (1988).
 - 30) Kouzarides, T. & Ziff, E.: The role of the leucine zipper in the Fos-Jun interaction. *Nature*, 336, 646-651 (1988).
 - 31) Gentz, R., Rauscher III, F. J., Abate, C. & Curran, T.: Parallel association of Fos and Jun leucine zippers juxtaposes DNA binding domain. *Science*, 243, 1695-1699 (1989).
 - 32) Turner, R. & Tjian, R.: Leucine repeats and an adjacent DNA binding domain mediate the formation of functional cFos-cJun heterodimers. *Science*, 243, 1689-1694 (1989).
 - 33) O'Shea, E. K., Rutkowski, R. & Kim, P. S.: Evidence that the leucine zipper is a coiled coil. *Science*, 243, 538-542 (1989).
 - 34) Flemington, E. & Speck, S. H.: Autoregulation of Epstein-Barr virus putative lytic switch gene BZLF1. *J. Virol.*, 64, 1227-1232 (1990).
 - 35) Liberman, P. M., Hardwick, J. M., Sample, J., Hayward, G. S. & Hayward, S. D.: The Zta transactivator involved in Epstein-Barr virus infected lymphocytes binds to both AP-1 and ZRE sites in target promoter and enhancer regions. *J. Virol.*, 1143-1155 (1990).
 - 36) Liverman, P. M. & Berk, A. J.: In vitro transcriptional activation, dimerization and DNA-binding specificity of the Epstein-Barr virus Zta protein. *J. Virol.*, 64, 2560-2568 (1990).
 - 37) Chang, Y. N., Dong, D. L., Hayward, G. S. & Hayward, S. D.: The Epstein-Barr virus Zta transactivator: a member of the bZIP family with unique DNA binding specificity and a dimerization domain that lacks the characteristic heptad leucine zipper motif. *J. Virol.*, 64, 3358-3369 (1990).
 - 38) Holley-Guthrie, E. A., Quinlivan, E. B., Mar, E. & Kenny, S.: The Epstein-Barr virus (EBV) BMRF1 promoter

for early antigen (EA-D) is regulated by the EBV transactivator, BRLF1 and BZLF1, in a cell-specific manner. *J. Virol.*, **64**, 3753-3759 (1990).

39) Kouzarides, T., Packham, G., Cook, A. & Farrel, P. J.: The BZLF1 protein of EBV has a coiled coil dimerization domain without a heptad leucine repeat but with homology to the C/EBP leucine zipper. *Oncogene*, **6**, 195-204 (1991).

40) Liberman, P. M. & Berk, A. J.: In vitro transcriptional activation, dimerization and DNA-binding specificity of the Epstein-Barr virus Zta protein. *J. Virol.*, **64**, 2560-2568 (1990).

41) Liverman, P. M., Hardwick, J. M., Sample, J., Hayward G. S. & Hayward, S. D.: The Zta transactivator involved in Epstein-Barr virus infected lymphocytes binds to both AP-1 and ZRE sites in target promoter and enhancer regions. *J. Virol.*, 1143-1155 (1990).

42) Packham, G., Economou, A., Rooney C., Rowe, D. T. & Farrel, P. J.: Structure and function of the Epstein-Barr virus BZLF1 protein. *J. Virol.*, **64**, 2110-2116 (1990).

43) Chang, Y. N., Dong, D. L., Hayward, G. S. &

Hayward, S. D.: The Epstein-Barr virus Zta transactivator: a member of the bZIP family with unique DNA binding specificity and a dimerization domain that lacks the characteristic heptad leucine zipper motif. *J. Virol.*, **64**, 3358-3369 (1990).

44) Farrell, P. J., Rowe, D. T., Rooney, C. M. & Kouzarides, T.: Epstein-Barr virus BZLF1 transactivator specifically binds to a consensus AP-1 site and is related to c-fos. *EMBO J.*, **8**, 127-132 (1989).

45) Sato, H., Takeshita, H., Furukawa, M. & Seiki, M.: Epstein-Barr virus BZLF1 transactivator is a negative regulator of Jun. *J. Virol.*, **66**, 4732-4736 (1992).

46) Chen, C. & Okayama, H.: High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol. Cell. Biol.*, **7**, 2745-2752 (1987).

47) Lieberman, P. M. & Berk, A. J.: The Zta transactivator protein stabilizes TFIIID association with promoter DNA by direct protein-protein interaction. *Genes Dev.*, **5**, 2441-2454 (1991).

The Mechanism of Epstein-Barr Virus (EBV) Promotor-specific Transactivation by Z Protein Yoshifumi Yamazaki, Department of Oto-Rhino-Laryngology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. *Juzen Med Soc.*, **102**, 857—867 (1993)

Key words Epstein-Barr virus, BZLF1, c-fos, AP-1, TPA responsive element

Abstract

Epstein-Barr virus (EBV) immediate early gene BZLF1 encodes a transcription factor Z protein which induces EBV lytic cycle in latently infected cells. The Z protein shows an amino acid sequence homology with the members of cellular AP-1 family transcription factors, especially Fos proteins. Both Z proteins and AP-1 family members recognize and bind to the same DNA sequence, but Z cannot activate transcription from promoters of cellular genes which are stimulated by cellular AP-1 family members. In an attempt to analyze the mechanism of EBV promotor-specific transactivation by Z, chimeric proteins of Z and Fos were constructed and examined for their transactivation ability using EBV BMRF1, BHRF1, cellular 92-kDa type IV collagenase and Timp gene promoters as reporters. The region from amino acid 100 to 110 of Z, especially 4 glutamine residues Gln 102, 104, 105 and 108 in this region, is essential for activation of viral promoters. Furthermore, Z proteins which had amino acid substitution of Gln 108 activated the transcription from 92-kDa type IV collagenase and Timp promoters which cannot be stimulated by the wild type Z. The promotor specificity of Z was also altered by substitution of the region from amino acid 162 to 169 adjacent to DNA binding domains with the corresponding region of Fos proteins. Formations of heterodimers of the wild type Z and chimeric proteins of deletion mutants affected transactivation ability and promotor specificity of them. These results suggest that the structure of dimer forms of Z proteins decides the transactivation ability and promotor specificity.