

# Mechanism of Transcriptional Regulation by Chimeric Protein Between Epstein-Barr virus Transcription Factor Z Protein and Cellular Fos 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	<a href="http://hdl.handle.net/2297/8299">http://hdl.handle.net/2297/8299</a>

## Epstein-Barr ウイルス転写調節因子 Z タンパクと 細胞性転写調節因子 Fos タンパクとの融合 タンパク ZFos による転写調節機構の解析

金沢大学医学部耳鼻咽喉科学講座 (主任: 古川 俊教授)

竹 下 元

(平成4年1月10日受付)

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ことができる。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が、AP-1 ファミリーに特徴的なロイシンジッパー構造を持たない。本研究では Z タンパクの構造と機能を Fos タンパクと比較検討するために、Z タンパクの DNA 結合配列を含む N 末端 198 アミノ酸と Fos タンパクのロイシンジッパー構造を含む C 末端 227 アミノ酸を結合させた ZFos 融合タンパク発現プラスミドを作製し、BZLF1 遺伝子あるいは c-jun, c-fos 遺伝子を同時に発現させることにより活性化されるウイルス BMRF1 プロモーターと、c-jun, c-fos 遺伝子の同時発現によってのみ活性化され、BZLF1 遺伝子発現では活性化されないコラゲナーゼプロモーターをレポータープラスミドとしてその転写活性化能を検討した。ZFos タンパクは Fos タンパクと異なり BMRF1 プロモーターの活性化には外因性の Jun タンパクを必要としなかったが、コラゲナーゼプロモーターの活性化には外因性 Jun タンパクの発現が必須であった。ZFos タンパクから Z タンパク由来の N 末端 133 アミノ酸を欠失するとその活性はいずれのレポーターに対しても優位に低下したが、この領域を Fos タンパク由来の 110 アミノ酸で置換すると活性を回復した。ZFos タンパクから Z タンパク由来の N 末端 170 アミノ酸を欠失すると外因性 Jun タンパクの発現下でのみ両プロモーターを活性化したが、この領域を Fos タンパク由来の 135 アミノ酸で置換しても外因性 Jun タンパク非発現下での活性は回復しなかった。ZFos タンパクの Z タンパク由来の DNA 結合領域に相当するアミノ酸 171 から 198 番目を Fos タンパク由来のものに置換しても外因性 Jun タンパク非発現下では活性を示さなかった。したがって ZFos タンパクが外因性の Jun タンパクの発現無しに BMRF1 プロモーターを活性化するには Z タンパク由来の DNA 結合領域とその N 末端側 37 アミノ酸が必須であった。ZFos 融合タンパクが外因性 Jun タンパクの発現無しに BMRF1 プロモーターからの転写を活性化する機構を解析するために、ZFos 発現細胞内における TPA 応答配列 (TPA responsive element, TRE) 結合タンパクをゲルシフトアッセイにより Z および Fos 発現細胞と比較検討したところ、ZFos タンパクは Z タンパクおよび Fos タンパクと異なり細胞内に AP-1 ファミリーの合成を誘導し異種二量体を形成することが明らかとなり、これが外因性 Jun タンパク非発現下での BMRF1 プロモーターの活性化に関与するものと推測された。以上のことから Z タンパクと Fos タンパクは DNA 結合領域より N 末端側ではアミノ酸配列に高い相同性を有し、Fos タンパクのこの領域は Z タンパクの対応する領域で完全に置換可能であるばかりでなく、同部を Z タンパクの対応する領域で置換した融合タンパクは、Fos タンパクと異なり外因性 Jun タンパクの非存在下に転写を活性化するという新しい機能を獲得した。

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

Epstein-Barr ウイルス (Epstein-Barr Virus, EBV) は、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腫瘍の発症にも深く関与している<sup>1)</sup>。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 が潜伏感染状態にあり 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<sup>2-4)</sup>。

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<sup>5)</sup>。前早期タンパクは現在少なくとも BZLF1, BRLF1 および BMRF1 遺伝子産物の三種類の存在が確認されているが、これらはいずれも EBV

Abbreviations: BES, N, N-bis [2-hydroxyethyl]-2-amino-ethanesulfonic acid; bp, base pair; CAT, chloramphenicol acetyl transferase; DMEM, Dulbecco modified Eagle's medium; DTT, dithiothreitol; EBV, Epstein-Barr virus; EDTA, ethylenediamine-tetraacetic acid 2Na; FCS, fetal calf serum; HEPES, N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethane sulfonic acid; mRNA, messenger RNA; PBS, phosphate buffered

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<sup>7)2)13)</sup>。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<sup>6)14)~18)</sup>。

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持ち、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<sup>19)20)</sup>。Fos タンパクは他の AP-1 ファミリーである Jun タンパクとロイジンジッパーとよばれる構造を介して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う<sup>12)~33)</sup>。Z タンパクは DNA 結合領域の C 末端側の領域により二量体を形成して TRE および Z 応答配列 (Z responsive element, ZRE) に結合し、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<sup>34)~44)</sup>。昨年吉崎は Z タンパクの二量体形成領域を、Fos タンパクの二量体形成領域であるロイジンジッパー構造を含む C 末端255アミノ酸と置換した ZFos 融合タンパク発現プラスミドを作製し、その転写活性化能を解析したところ、ZFos 融合タンパクは Fos タンパクと異なり Jun タンパクの発現を必要とせずウイルスプロモーターからの転写を活性化することを見いだした<sup>46)</sup>。本研究では Z タンパクの構造と機能をさらに詳細に Fos タンパクと比較検討するために ZFos 融合タンパクによる転写活性化機構の解析を行った。

#### 材料および方法

##### 1. 使用細胞

ヒト肝癌細胞由来 HepG2 細胞, マウス胎児細胞癌由来 F9

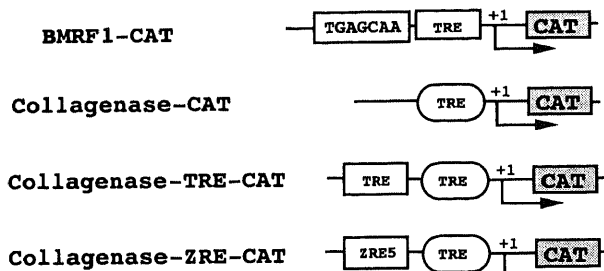


Fig. 1 Schematic representation of the construction of the promoter/CAT fusion plasmid series. The BMRF1 promoter has one TRE (TPA responsive element) and some TRE like DNA binding elements. The collagenase promoter has only one TRE. The collagenase-TRE and collagenase-ZRE reporter plasmids were made by ligating double strand oligonucleotide containing TRE and ZRE5 (Z responsive element 5) sequences, respectively, at the 5' end of the collagenase promoter.

saline; PCR, polymerase chain reaction; PMSF, phenylmethanesulfonyl fluoride; SDS, sodium dodecylsulfate; SDS-PAGE, SDS polyacrylamide gel electrophoresis; TE, Tris EDTA; TNE, Tris NaCl EDTA; TPA, 12-0-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate; TRE, TPA responsive element; Tris, Tris-hydroxymethyl-aminomethane; ZRE, Z responsive element

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, コラゲナーゼ (collagenase), collagenase-TRE および collagenase-ZRE 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, collagenase CAT, collagenase-TRE CAT およ

#### A

BZLF1 MM--DPNSTS ED--VKFTPD FYQVFPVQAF DQATRVYQDL<sup>36</sup>  
 Fos MMFSGFNADY EASSSRCSSA SPAGDLSLSSY HSPADSFSSM<sup>40</sup>

BZLF1 GGFSQAPLPC VLWVPLPEPL PQGQLTAYHV STAPTGSWF<sup>6</sup>  
 Fos GSPVNAQDFC TDLAVSS--- ANFIPTVTAI STSPDLQWLV<sup>77</sup>

BZLF1 APQPAPENAY QAYAAPQLFP VSDITQNOQT NQAGGEAPOP<sup>116</sup>  
 Fos QPALVSSVAP SQTRAPHPPFG VPAPSAGAYS R-AG-----

BZLF1 GDMSTVQTAA AVVFACPGAN QGQQLADIGV PQPAPVAAPA<sup>156</sup>  
 Fos -----VVK TMTGGRAQSI<sup>123</sup>

BZLF1 RRTRKPOQPE SLEECDSELE IKRYKNRVAS RKCRAKFKQL<sup>196</sup>  
 Fos GRRGKVEQ-L SPEEEK-RR IRRERNKMAA AKCRNRRL<sup>161</sup>

BZLF1 LQHYREVAAS KSENDRLRL LLKQMCPSLD VDSIIPRTPD<sup>236</sup>  
 Fos TDTLQAETDQ LEDEKSALQT EIANLLKEKE KLEFILAAHR<sup>201</sup>

BZLF1 VLHEDLLNF<sup>245</sup>

Fos PACKIPDDL<sup>210</sup> -----(390)

#### B

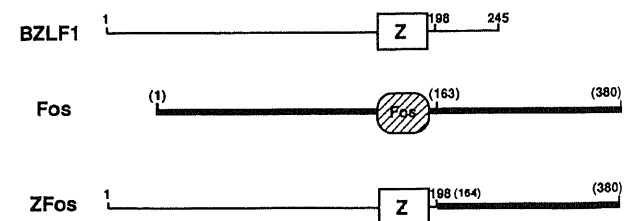


Fig. 2 Structure of Z, c-Fos and ZFos proteins. (A) Amino acid sequence of Z and c-Fos proteins. Conserved amino acids are marked by the dots. Basic regions are underlined. (B) Schematic representation of chimeras consisting of Z and c-Fos protein. Fine lines show Z protein, bold lines show c-Fos protein. Open boxes indicate basic region of Z protein, and striped box indicates basic region of c-Fos protein.

び collagenase-ZRE CAT プラスミド (図 1) 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 Fos タンパクの融合タンパク (ZFos) 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 ZFos 融合タンパク発現プラスミドを作製した (図 2A, B)。すなわち BZLF1 発現プラスミドを制限酵素 PstI および BamHI にて切断することにより Zタンパクの 198~245 アミノ酸をコードする領域を除去した後 Fos タンパクの 164~380 アミノ酸をコードする c-fos 遺伝子の DNA 配列を, polymerase chain reaction (PCR) で増幅し, この部位に挿入した。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)  $10 \mu\text{l}$ ,  $1.25\text{mM}$  deoxy nucleotide triphosphates (dNTP)  $16 \mu\text{l}$ ,  $20 \mu\text{M}$  3'プライマー  $5 \mu\text{l}$ ,  $20 \mu\text{M}$  5'プライマー  $5 \mu\text{l}$ , Taq ポリメラーゼ  $0.6 \mu\text{l}$ , 蒸留水  $64 \mu\text{l}$ , c-fos 遺伝子 DNA  $10\text{ng}$  を  $94^\circ\text{C}$  1分,  $45^\circ\text{C}$  1分,  $72^\circ\text{C}$  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 PstI, C 末端に BamHI の認識配列を持つものを 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  $260\text{nm}$  の吸光度を測定し,  $20 \mu\text{M}$  に調整した後使用した。

3. ZFos タンパク欠失変異体発現プラスミド

ZFos タンパク欠失変異体発現プラスミドを上記 2 に示したごとくプライマーを DNA 合成機にて合成し, PCR 反応にて作製した。

4. ZFos タンパクと Fos タンパクの融合タンパク発現プラスミド

3 のごとく作製したプラスミドの欠失した領域に対応する Fos タンパクの領域の DNA 配列を, 上記 2 に示したごとく PCR で増幅し, 3 で作製した ZFos タンパク欠失変異体発現プラスミドと結合させ作製した。

5. Zタンパク欠失変異体発現プラスミドおよびその欠失変異体と Fos タンパクとの融合タンパク発現プラスミド

Zタンパク欠失変異体発現プラスミドを上記 2 に示したごとくプライマーを DNA 合成機にて合成し, PCR 反応にて作製した。また融合タンパク発現プラスミドは, このように作製したプラスミド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 で増幅し, Zタンパク欠失変異体発現プラスミドと結合させ作製した。

### 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 HB101 株を  $2 \times \text{YT}$  培地 (トリプトン  $16\text{g}$ , イーストエキストラクト  $10\text{g}$ , NaCl  $5\text{g}$ , アンピシリン  $50\text{mg/l}$ , pH  $7.6$ )  $250\text{ml}$  にて 24 時間培養した。途中, 培養開始から約 8 時間後に  $34\text{mg/ml}$  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  $1.25\text{ml}$  ずつ加えた。培養終了後,  $5,000\text{rpm}$  10 分遠心により集菌した。菌体を  $10\text{ml}$  の  $25\%$  sucrose,  $50\text{mM}$  Tris-hydroxymethyl-aminomethane (Tris)-HCl 緩衝液 pH  $7.5$  に懸濁後, リゾチーム  $10\text{mg}$  加え, ゆるやかに混和した後 5 分水中に静置,  $0.25\text{M}$  ethylene-diamine-tetraacetic acid 2Na (EDTA)  $1\text{m}$  加え  $15\text{分}$  水中に静置,  $0.3\%$  triton,  $0.2\text{M}$  EDTA,  $0.15\text{M}$  NaCl  $10\text{ml}$  加え  $15\text{分}$  水中に静置した後,  $30,000\text{rpm}$  40 分遠心した。

上清に  $5\text{M}$  NaCl  $2.5\text{ml}$ ,  $10\%$  ドデシル硫酸ナトリウム (sodium dodecyl sulfate, SDS)  $0.25\text{ml}$ , フェノール CIAA  $25\text{ml}$  を加え, フェノール抽出およびエタノール沈澱を行った。沈澱を  $3\text{ml}$  の Tris-EDTA (TE) ( $10\text{mM}$  Tris-HCl pH  $8.0$ ,  $1\text{mM}$  EDTA  $1\text{mM}$  pH  $8.0$ ) に溶解後  $150 \mu\text{g}$  のリボスクレアーゼ (Sigma, St. Louis, USA) を加え  $37^\circ\text{C}$  30 分反応後, 塩化セシウム (CsCl, cesium chloride, BRL, Gaithersburg, USA)  $4.2\text{g}$ , エチジウムブロマイド  $4 \mu\text{g}$  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  $20^\circ\text{C}$ ,  $60,000\text{rpm}$  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。  $1.1\text{g/ml}$  塩化セシウム,  $0.54\text{mg/ml}$  エチジウムブロマイドを含む TE にて  $5.2\text{ml}$  に希釈後, 再び  $20^\circ\text{C}$   $65,000\text{rpm}$  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, エタノール沈澱後 TE にて  $1\text{ml/ml}$  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  $1.0 \times 10^6$  個/ml の濃度で  $5\%$  FCS 加 DMEM  $4\text{ml}$  にて  $37^\circ\text{C}$  24 時間培養後, リン酸カルシウム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  $1 \mu\text{g} \sim 2 \mu\text{g}$  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  $0.5 \mu\text{g} \sim 3 \mu\text{g}$  を,  $0.26\text{M}$  塩化カルシウム  $276 \mu\text{l}$  に混合し, その混合液を  $2 \times \text{HEPES}$  buffered saline (HBS) (NaCl  $280\text{mM}$ , HEPES 緩衝液 pH  $7.9$   $50\text{mM}$ , NaHPO<sub>4</sub>  $2.8\text{mM}$ ) (HEPES, N-2 hydroxyethyl-piperazine-N'-2-ethane sulfonic acid)  $288 \mu\text{l}$  に滴下しながら混合し, 室温にて 20 分静置した後, 上記培養細胞に加え 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  $4\text{ml}$  で  $37^\circ\text{C}$  24 時間培養した。

細胞核抽出液の調整に使用する細胞 F9 細胞は約  $1.0 \times 10^6$  個/ml の濃度で  $5\%$  FCS 加 DMEM  $8\text{ml}$  にて  $37^\circ\text{C}$  24 時間培養後, Chen & Okayama らのリン酸カルシウム法変法<sup>45)</sup>にて遺伝子導入を行った。すなわち, Zタンパク, Fos タンパク, Jun タンパク, ZFos タンパク発現プラスミド DNA および対象として pUC プラスミド DNA 計  $10 \mu\text{g}$  を,  $0.26\text{M}$  塩化カルシウム  $240 \mu\text{l}$  混合し, その混合液に  $2 \times \text{BES}$  buffered saline (BBS) (NaCl  $280\text{mM}$ , BES 緩衝液 pH  $7.9$   $50\text{mM}$ , Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  $2.8\text{mM}$ ) (BES, N, N-bis [2-hydroxyethyl]-2-amino-ethanesulfonic acid)  $250 \mu\text{l}$  を加え, 室温にて 15 分静置した後, 上記培養細胞に加え  $\text{CO}_2$  濃度  $3\%$  の条件下にて  $37^\circ\text{C}$  24 時間培養した。その後, ハンクス液にて洗滌し,  $5\%$  FCS 加 DMEM  $8\text{ml}$  で,  $37^\circ\text{C}$  24 時間培養した。

### V. CAT assay

IV. のごとく遺伝子導入した細胞を PBS で洗滌し Tris-NaCl-EDTA (TNE) (Tris-HCl pH  $8.0$   $40\text{mM}$ , NaCl  $150\text{mM}$ , EDTA  $1\text{mM}$ )  $1\text{ml}$  にて回収,  $10,000\text{rpm}$  10 分遠心し沈澱に  $0.25\text{M}$  Tris-HCl pH  $8.0$  を  $150 \mu\text{l}$  加え, 超音波ホモジナイザーで細胞を破壊, 続いて  $10,000\text{rpm}$  10 分遠心した後, 上清  $75 \mu\text{l}$  に  $1\text{M}$  Tris-HCl pH  $7.5$   $15 \mu\text{l}$ ,  $4\text{mg/ml}$  アセチル CoA (acetyl-coenzyme A, Sigma)  $20 \mu\text{l}$ ,  $^{14}\text{C}$ -クロラムフェニコール (D-threo [dichloroscetyl  $1\text{-}^{14}\text{C}$ ] chloramphenicol, アマジヤムジャパン, 東京)  $0.25 \mu\text{l}$ , 蒸留水  $40 \mu\text{l}$  を加え  $37^\circ\text{C}$  60 分インキュ

ベートした。そして、酢酸エチル(半井, 京都) 500  $\mu$ 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。残査を 12  $\mu$ 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た。

#### VI. 細胞核抽出液の調整

Nのごとく遺伝子導入した細胞をリン酸緩衝液(phosphate buffered saline, PBS, 和光純薬, 大阪)で洗浄し PBS 5mlにて回収, 1,500rpm 5分遠心し沈澱にA緩衝液(10mM HEPES (pH 7.9), 1.5mM 塩化マグネシウム, 10mM 塩化カリウム, 0.5mM ジチオスレイトール(dithiothreitol, DTT) 1ml 懸濁後10分間放置し, 2,000rpm 5分遠心し沈澱の量を測定した。そして沈澱量 100  $\mu$ l あたり MA 液(10mM HEPES (pH 7.9), 1.5mM 塩化マグネシウム, 10mM 塩化カリウム, 0.5mM DTT, 50  $\mu$ g ノニデッド P-40 (Nonidet P-40, NP40)) を 40  $\mu$ l 加え, 静かに攪拌の後水中に10分間静置した。その後静かに攪拌し, 15,000rpm 10分遠心し沈澱に沈澱量 100  $\mu$ l あたり 30  $\mu$ l のC緩衝液(20mM HEPES (pH 7.9), 25%グリセロール, 0.42M 塩化ナトリウム, 1.5mM 塩化マグネシウム, 0.2 mM EDTA, 0.5mM DTT, 0.5mM phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF), 10  $\mu$ g/ml アンチパイン)を加え懸濁した, 15分水中に静置の後静かに攪拌し 15,000rpm 10分遠心した後, 上清 100  $\mu$ l あたり 150  $\mu$ l の MD 液(20mM HEPES (pH 7.9), 20%グリセロール, 0.05M 塩化カリウム, 0.2mM EDTA, 0.5 mM DTT, 0.5mM PMSF, 10  $\mu$ g/ml アンチパイン)を加え, 核抽出液とした。

#### VI. ゲルシフトアッセイ

TRE DNA プローブは GATCTTCTAGACCGGATGAGT-CATAGCTTG の 30 base pair (bp), ZRE5 DNA プローブは GATCTTCTAGACCAAATGTGCAAAGGTGAG 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 pH 7.6, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 5mM dithiothreitol, 0.1mM spermidine, 0.1 mM EDTA, 100  $\mu$  Ci P-32 標識 Adenosine 5'-[ $\gamma$ -32P] triphosphate ( $\gamma$ -ATP), 20unit T4 ポリヌクレオチドキナーゼを含む反応液 50  $\mu$ 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 messenger RNA (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) により合成を行った。すなわち, 発現プラスミド DNA 2  $\mu$ g を鋳型として同キットにて 37°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  $\mu$ g を 20  $\mu$ l のウサギ網状赤血球ライゼート (Promega) と混合し 30°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  $\mu$ l, P-32 標識 DNA プローブ (10,000 count per minute) を DNA 結合緩衝液 (20mM HEPES 緩衝液 pH 7.9, 40mM KCl, 0.2M EDTA, 8mM MgCl<sub>2</sub>, 10% glycerol, 2% polyvinyl alcohol, 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。

#### VII. ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動

(sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophor-

esis, SDS-PAGE)

作製した遺伝子発現プラスミドにより目的とするタンパク質が合成されることを, SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動により確認した。まず試験管内 mRNA 合成をプラスミド内の 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) により合成を行った。すなわち, 発現プラスミド DNA 2  $\mu$ g 鋳型として同キットにて 37°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  $\mu$ g を 1  $\mu$  Ci の S-35 標識メチオニンを含む 20  $\mu$ l のウサギ網状赤血球ライゼート (Promega) と混合し 30°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  $\mu$ l を, SDS-PAGE にて分析した。

#### 成績

#### I. Z, ZFos, Jun, Fos タンパクによる転写活性化

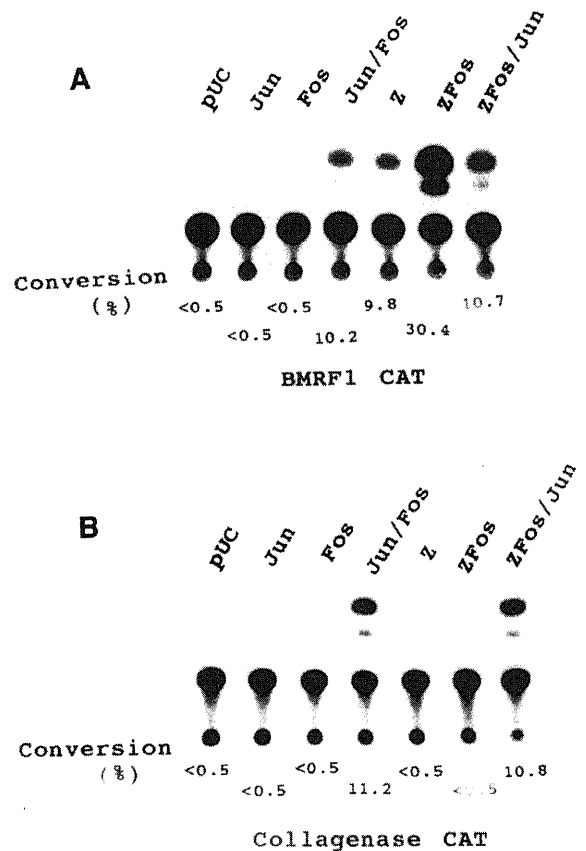


Fig. 3 CAT assay of transcriptional activation by c-jun, c-fos, c-jun+c-fos, BZLF1, ZFos and ZFos+c-jun (A) BMRF1 CAT plasmid DNA (2  $\mu$ g) was cotransfected as a reporter plasmid with c-jun, c-fos, c-jun+c-fos, BZLF1, ZFos and ZFos+c-jun plasmid DNA into HepG2 cell. Cells were harvested 30 hours after transfection and were assayed for CAT activity as described in the material and method. (B) Collagenase CAT plasmid DNA (2  $\mu$ g) was cotransfected as a reporter plasmid with c-jun, c-fos, c-jun+c-fos, BZLF1, ZFos and ZFos+c-jun plasmid DNA into HepG2 cell. Cells were harvested 30 hours after transfection and were assayed for CAT activity as described in the material and method.

Z, ZFos, Jun, Fos タンパクによる転写活性化を比較検討するために Z タンパクにより転写制御を受ける EBV BMRF1 遺伝子プロモーターと, Jun, Fos タンパクにより転写制御を受けるコラゲナーゼ遺伝子プロモーターを用いて解析を行った。

#### 1. EBV 遺伝子プロモーターからの転写誘導

Z タンパクにより転写制御を受ける EBV BMRF1 遺伝子プロモーター領域の支配下に CAT 遺伝子を組み込んだ BMRF1 CAT プラスミドをレポータープラスミドとして使用した。

コントロールである pUC プラスミド, Jun タンパク発現プラスミドおよび Fos タンパク発現プラスミドは単独では図 3A に示すように BMRF1 プロモーターからの転写を促進しなかった。しかし, Jun, Fos タンパク発現プラスミドを同時に遺伝子導入することによりこのプロモーターからの転写を促進した。Z タンパク発現プラスミドは単独で BMRF1 遺伝子プロモーターからの転写を促進した。ZFos タンパク発現プラスミドは単独で BMRF1 遺伝子プロモーターからの転写を, Z タン

パク発現プラスミドを遺伝子導入した場合と比較して約 3 倍促進した。ZFos タンパク発現プラスミドは Fos タンパク発現プラスミドのように Jun タンパク発現プラスミドによる転写活性化の促進を受けず, むしろ Jun タンパク発現プラスミドを同時に遺伝子導入することにより転写活性化は 3 分の 1 に抑制された。

#### 2. コラゲナーゼ遺伝子プロモーターからの転写誘導

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コラゲナーゼ遺伝子のプロモーター領域の支配下に 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。

Fos タンパク発現プラスミドは単独ではコラゲナーゼプロモーターからの転写を有意に促進せず, Jun タンパク発現プラスミドも転写活性化を示さなかったが, 両タンパク発現プラスミドを同時に遺伝子導入することによりこのプロモーターからの転写を促進した(図 3B)。一方 Z タンパクおよび ZFos タンパクは BMRF1 プロモーターと異なりこのプロモーターからの転写を有意に促進しなかった。しかしながらコラゲナーゼ遺伝子プロモーターからの転写は BMRF1 遺伝子プロモーターと異なり, Jun タンパク発現プラスミドを ZFos 融合タンパク発現プラスミドと同時に遺伝子導入することにより転写を促進した。

BMRF1 プロモーター, コラゲナーゼプロモーターに対して, Z, Jun, Fos, ZFos, タンパクは著しく異なる作用を示すことが明らかとなった。両プロモーターの構造上の一番の相違点は, コラゲナーゼプロモーターにはこれら転写因子の結合領域が TRE 1 個であるのに対して, BMRF1 プロモーターには TRE 以外に複数の Z タンパク結合配列が存在することである。そこで両プロモーターの相違がこの点に由来するのかわかぬかを検討するために, コラゲナーゼプロモーターに TRE および ZRE 配列を付加した Collagenase-TRE CAT, Collagenase-ZRE CAT プラスミドを作製し, Z, Jun, Fos, ZFos, タンパク発現プラスミドによる転写活性を調べた。

#### 3. Collagenase-TRE プロモーターからの転写誘導

図 1 に示したように, コラゲナーゼ遺伝子のプロモーター領域に DNA 合成機により作製した TRE 配列を結合させた collagenase-TRE CAT プラスミドをレポータープラスミドとして使用した。

図 4A に示したように, Z タンパク発現プラスミドを単独で遺伝子導入することにより, コントロールである pUC プラスミドを遺伝子導入した場合と比較して 18 倍このプロモーターからの転写を促進した。Jun, Fos, タンパク発現プラスミドはコントロールと比較して 42 倍このプロモーターからの転写を促進した。ZFos 融合タンパク発現プラスミドは単独でこのプロモーターからの転写をコントロールに比して 64 倍促進したが, Jun タンパク発現プラスミドにより転写活性は抑制された。

#### 4. Collagenase-ZRE プロモーターからの転写誘導

図 1 に示したように, コラゲナーゼ遺伝子のプロモーター領域に DNA 合成機により作製した ZRE 配列を結合させた collagenase-ZRE プロモータープラスミドをレポータープラスミドとして使用した。

図 4B に示したように, Jun, Fos タンパク発現プラスミドを同時に, また Z タンパク発現プラスミドを単独で遺伝子導入することによりこのプロモーターから両者とも同じ程度の転写活

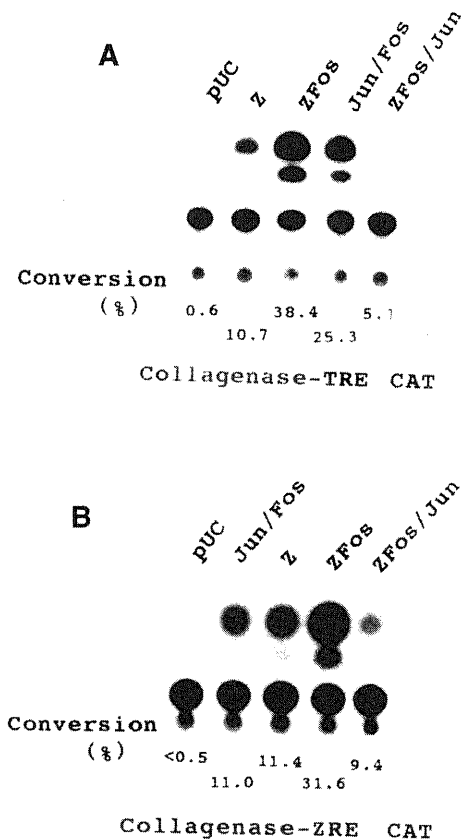


Fig. 4 CAT assay of transcriptional activation by c-jun+c-fos, BZLF1, ZFos and ZFos+c-jun. (A) Collagenase-TRE CAT plasmid DNA (2  $\mu$ g) was cotransfected as a reporter plasmid with c-jun+c-fos, BZLF1, ZFos and ZFos+c-jun plasmid DNA into HepG2 cell. Cells were harvested 30 hours after transfection and were assayed for CAT activity as described in the material and method. (B) Collagenase-ZRE CAT plasmid DNA was cotransfected as a reporter plasmid with c-jun+c-fos, BZLF1, ZFos and ZFos+c-jun plasmid DNA into HepG2 cell. Cells were harvested 30 hours after transfection and were assayed for CAT activity as described in the material and method.

性を示した。ZFos 融合タンパク発現プラスミドは単独でこのプロモーターからの転写を前二者と比較して約3倍促進したが、Jun タンパク発現プラスミドにより転写活性は前二者と同程度まで抑制された。

II. ZFos タンパクの転写活性化領域の同定

ZFos タンパクの転写活性化領域を同定するために、図5のごとく ZFos タンパクの変異体発現プラスミドを作製し、外因性 Jun タンパク存在、非存在下における BMRF1 プロモーターおよびコラゲナーゼプロモーターからの転写活性化能を調べた。

1. BMRF1 プロモーターからの転写誘導

Zタンパク、Fos タンパク、ZFos 融合タンパクおよびその変異体の BMRF1 プロモーター活性化能を ZFos 融合タンパクの活性化能を100とした相対値で表した。Zタンパク発現によるこのプロモーターの活性化には外因性 Jun タンパクの発現を必要とせず、ZFos タンパクの約30%の活性を示した。一方 Fos タンパクは単独では全く活性を示さず、Jun タンパク発現下において初めて Zタンパクと同程度に BMRF1 プロモーターからの転写を誘導した。ZFos タンパクは単独で高率に同プロモーターを活性化したが、Jun タンパク発現はこの活性をむしろ3分の1程度まで抑制した。

ZFos タンパクのN末端133アミノ酸を欠失した Z4Fos タンパクは単独では転写活性が3分の1に低下した(転写活性化能38.6)が、外因性 Jun タンパクはこの転写活性化能をさらに

10.3にまで抑制した。Z4Fos タンパクで欠失した ZタンパクのN末端133アミノ酸に対応する Fos タンパクのN末端110アミノ酸を Z4Fos タンパクのN末端側に接続させた FosZ4Fos タンパクは、転写活性化能が単独では98.4、外因性 Jun タンパクの存在下では39.2と転写活性化能が ZFos タンパクの活性化能まで回復した。ZFos タンパクのN末端170アミノ酸を欠失した Z5Fos タンパクは単独では転写活性化能を示さなかったが、外因性 Jun タンパクの存在下では転写活性化能は38.8であった。このN末端170アミノ酸を欠失した Z5Fos タンパクに、この欠失した170アミノ酸に対応する Fos タンパクのN末端135アミノ酸を接続させた FosZ5Fos タンパクも単独では転写を活性化しなかったが、外因性 Jun タンパクの存在下では転写活性をしめた(転写活性化能33.4)。

ZFos タンパクの DNA 結合領域を Fos タンパクの DNA 結合領域に置換した Z170Fos は、ZFos タンパクと異なり単独では転写を活性化せず、外因性 Jun タンパクの存在下でのみ転写を活性化した(転写活性化能40.1)。

Fos タンパクのC末端142アミノ酸を欠失した Fosdel1 タンパクは、Fos タンパク同様に単独では転写を活性化せず、外因性 Jun タンパクの存在下に転写活性化能を示した(転写活性化能10.7)。ZFos タンパクのC末端142アミノ酸を欠失した ZFos1 タンパクは、単独では転写活性化能66.7を示した。外因性 Jun タンパクは転写活性化能を24.4と抑制した。

2. コラゲナーゼプロモーターからの転写誘導

図1で示したように、Jun、Fos タンパクにて転写活性化され、Zタンパクにては転写活性化されないコラゲナーゼ遺伝子のプロモーターを用いて同様の実験を行い、Jun/Fos による転写活性化を100とした相対値で表した。

Zタンパクは外因性 Jun タンパクの有無に関わらず、コラゲナーゼプロモーターからの転写を活性化しなかった。ZFos タンパクも単独では転写活性化能を示さなかったが、外因性 Jun タンパクの存在下に Fos タンパクと同程度に転写を活性化した(転写活性化能95.4)。Z4Fos、FosZ4Fos、Z5Fos、FosZ5Fos などの変異体タンパクはいずれも単独では転写活性化能を示さなかったが、外因性 Jun タンパクの存在下では各々22.5、51.7、37.6、28.3の転写活性化能を示した。

3. ZFos 変異体タンパクの確認

ZFos 変異体遺伝子発現プラスミドから目的とする変異体タンパクが産生されることを確認するために、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て変異体遺伝子 RNA を合成し試験管内翻訳を行った後に、SDS-PAGE にて分析をおこなった(図6)。いずれの変異体についても期待される分子量のタンパクが合成されたことが確認された。

III. ゲルシフトアッセイ(図7)

ZFos 融合タンパクが BMRF1 プロモーターからの転写を活性化する機構を Zタンパクおよび Fos タンパクと比較解析するために、内因性の TRE 結合タンパクの量が少ないことが知られている F9 細胞を用いて Z、Fos、ZFos タンパク発現プラスミドを遺伝子導入し、核抽出液を調整した後、<sup>32</sup>P 標識した TRE 配列を含むオリゴ DNA をプローブとしてゲルシフトアッセイにより TRE 結合タンパクの変化を検討した。図6に示すようにコントロールである pUC プラスミドを導入した細胞では弱いバンドが認められたのに対して、Zタンパク発現細胞では強い TRE 結合活性が認められ、その複合体は試験管内

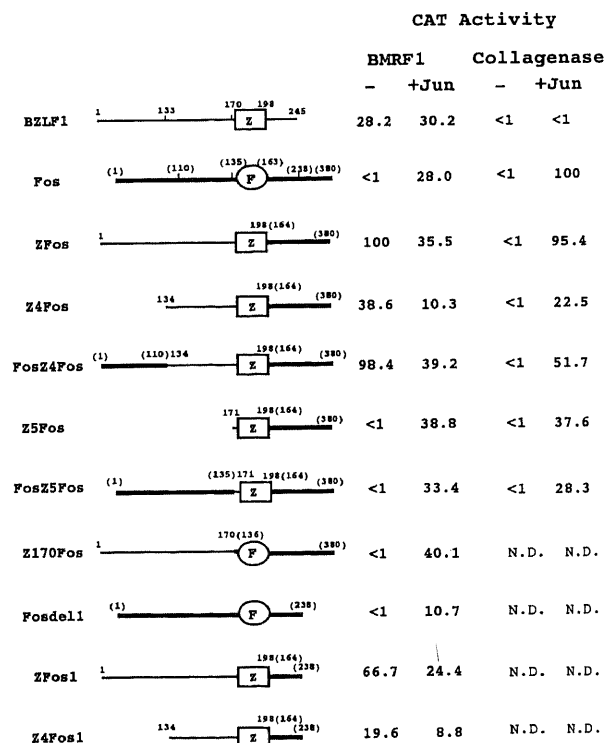


Fig. 5 Schematic representation of chimeras consisting of Z protein deletion mutants and c-Fos protein deletion mutants. Rectangle open boxes indicate basic region of Z protein, and ellipse open boxes indicate basic region of c-Fos protein. The level of CAT activity relative to that produced by BMRF1 CAT and collagenase CAT in the presence (+) or absence (-) of c-jun expression plasmid are given beside constructions.

合成により得られた Z タンパクによる複合体の移動度と同じであった。ZFos タンパク発現細胞ではコントロールである pUC プラスミドを導入した場合に比べて広く、強い複合体が認められた。Fos タンパク発現細胞では、コントロールである pUC プラスミドを導入した場合に比べて特に顕著な差は認められなかった。そこに試験管内で合成した Jun タンパクを導入すると試験管内で合成した Jun タンパクおよび Fos タンパクの複合体と同じ位置に Jun/Fos 複合体が認められた。Fos タンパク発現細胞の核抽出物に、試験管内で合成した Fos タンパクを導入してもコントロールに比べて特に顕著な差は認められなかった。Z 発現細胞の核抽出物に、試験管内で合成した Jun タンパクを加えると Jun/Fos 複合体が新たに認められた。ZFos 発現細胞に試験管内で合成した Jun タンパクあるいは Fos タン

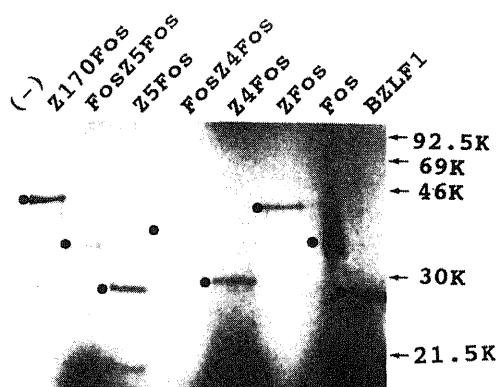


Fig. 6 SDS-PAGE analysis of in vitro synthesized ZFos and its mutant proteins. ZFos and its mutant proteins synthesized in a rabbit reticulocyte lysate containing  $^{35}\text{S}$ -methionine were analyzed on a 7.5% polyacrylamide-sodium dodecyl sulfate gel and visualized by autoradiography. The major bands are indicated by dots.

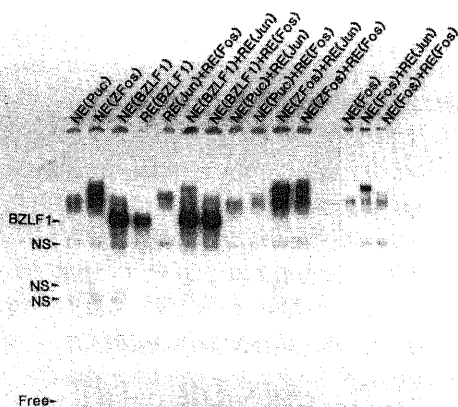


Fig. 7 Gel mobility shift assay for TRE binding of Jun, Fos, Z, ZFos proteins. RE (Jun), RE (Fos), RE (Z) and RE (ZFos) are proteins synthesized in vitro translation in a rabbit reticulocyte lysate. NE (Jun), NE (Fos), NE (Z) and NE (ZFos) are nuclear extract samples prepared from F9 cells transfected with each expression plasmids.; NS, Nonspecific binding activity.

ンパクを加えても特に変化はなかった。

#### IV. Z タンパクおよび Fos タンパクの転写活性化領域の比較検討

Z タンパクおよび Fos タンパク転写活性化領域の互換性を検討するために、Z タンパクの欠失変異体タンパクおよびその Fos タンパクとの融合タンパクを作製し、BMRF1 プロモーターからの転写活性化能を調べた結果は Z タンパクの転写活性化能を100として現した。

図8に示すようにZタンパクのN末端65アミノ酸を欠失した Zde13 タンパクは BMRF1 プロモーターからの転写活性化能を喪失したが、Zde13 タンパクで欠失した Z タンパクの N 末端 65 アミノ酸に対応する Fos タンパクの N 末端 66 アミノ酸を Zde13 タンパクの N 末端側に接続させた FosZde13 タンパクは、転写活性化能が97と Z タンパクの活性化能まで回復した。Z タンパクの N 末端 170 アミノ酸を欠失した Zde15 タンパクは BMRF1 プロモーターからの転写活性化能は示さなかった。Zde15 タンパクで欠失した Z タンパクの N 末端 170 アミノ酸に対応する Fos タンパクの N 末端 135 アミノ酸を Zde15 タンパクの N 末端側に接続させた FosZde15 タンパクも転写活性化能を回復しなかった。しかし Z タンパクの DNA 結合領域を Fos タンパクの DNA 結合領域に置換した ZFosZ は転写活性化能が26を示した。

#### 考 察

試験管内で合成した ZFos 融合タンパクは、Fos タンパクと

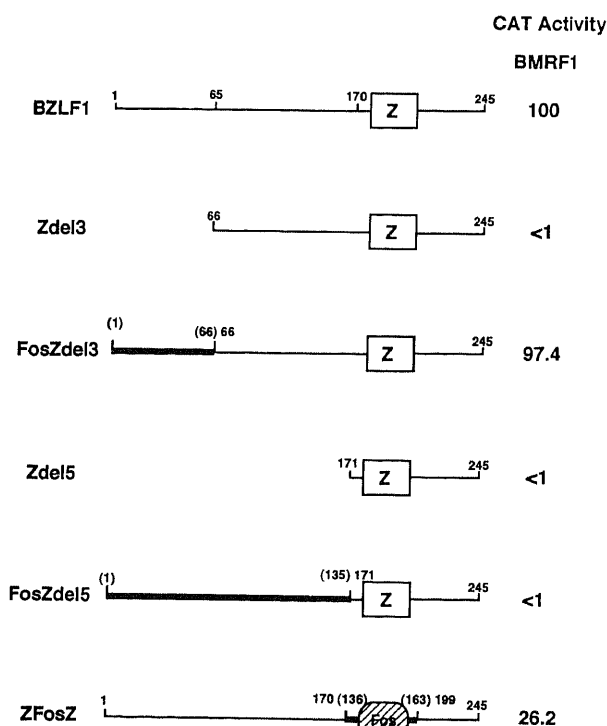


Fig. 8 Schematic representation of chimeras consist of Z protein deletion mutants and c-Fos protein deletion mutants. Open boxes indicate basic region of Z protein and striped box indicates basic region of c-Fos protein. The level of CAT activity relative to that produced by BMRF1 CAT are given beside constructions.



同様に Jun タンパクと異種二量体を形成することにより, Jun, Fos タンパク異種二量体と同程度の親和性で TRE 配列と Zタンパクのみが結合可能な ZRE5 配列にも結合する<sup>46)</sup>. しかし ZFos タンパクは Fos タンパクと異なり EBV の BMRF1, BHRF1, BZLF1 プロモーターの転写活性化には外因性 Jun タンパクの発現を必要とせず, その転写活性化機構は不明であった. そこで ZFos 遺伝子発現による転写活性化機構を Z および Fos タンパクと比較検討するために ZFos 発現細胞の核抽出物を用いてゲルシフトアッセイを行ったところ ZFos 発現細胞において強い TRE 結合活性が認められた. ZFos タンパクは単独では強く DNA に結合できないことから, 細胞内に ZFos タンパクと異種二量体を形成するような因子例えば Jun タンパクファミリーを誘導すると推測された. しかし Fos タンパク発現細胞では新たな TRE 結合活性は観察されなかった. 一方 Z タンパク発現細胞においても, Z タンパク以外の新たな TRE 結合因子は認められなかったが, Z 発現細胞の核抽出物に, 試験管内で合成した Jun タンパクを加えることにより新たな複合体が認められた. このことは Z タンパクにより Jun タンパクと複合体を形成するような Fos タンパクあるいは Fos 関連タンパクの合成が誘導されたものと考えられた. Z タンパク発現により Fos タンパク合成が誘導されるという現象は, Z タンパクが Fos タンパクのプロモーターを活性化するという報告と一致する<sup>47)</sup>.

このように ZFos タンパクは Fos タンパク, Z タンパクと異なり細胞内に ZFos タンパクと異種二量体を形成して TRE 配列に結合可能な因子を誘導することが明らかとなったが, これらが外因性 Jun タンパクの発現無しに BMRF1, BHRF1, BZLF1 プロモーターの活性化に関与するものと推測された. しかしながらこのような ZFos タンパクも TRE 配列 1 個をエンハンサーとして含み Jun, Fos タンパクにより転写が活性化されるコラゲナーゼプロモーターを活性化することができなかった. Z タンパクもまたコラゲナーゼプロモーターを活性化することができず, むしろ Jun, Fos タンパクによるこのプロモーターの活性化を抑制した(未発表). ウイルス BMRF1, BHRF1, BZLF1 プロモーターとコラゲナーゼプロモーターの大きな違いはこれらウイルスプロモーターには複数の Z タンパク結合配列があることである. したがって, Z タンパクと同様に ZFos タンパクが転写を活性化するためには複数の結合配列が必要と推測された. 実際にコラゲナーゼプロモーターに TRE または ZRE5 配列を追加することにより, Z タンパクおよび ZFos タンパクにより転写活性化を受けるようになり, この考えは支持された. このように ZFos タンパクが collagenase-ZRE CAT を転写活性化したことは, ZFos タンパクが直接転写活性化に関与していることを示唆している.

Z タンパクと Fos タンパクのアミノ酸配列を図 2A のごとく対応させると Fos タンパクの DNA 結合領域の N 末端側に 33 アミノ酸を欠失した領域が認められるが, この領域を含む 37 アミノ酸は ZFos が外因性 Jun タンパクの非発現下に BMRF1 プロモーターの転写を活性化するためには必須であった. しかし ZFos タンパクの Z タンパク由来の N 末端 133 アミノ酸は Fos タンパクの対応する N 末端 110 アミノ酸で置換することが可能であった. また Z タンパクの DNA 結合領域は Fos タンパクのそれに比べて, 幅広い DNA 配列親和性を有することが知られているが<sup>48)</sup>, この領域も外因性 Jun タンパクの非発現下にお

ける ZFos 転写活性化には Z タンパク由来のものが必要であった. 一方 ZFos タンパクも外因性 Jun タンパク存在下ではコラゲナーゼプロモーターを活性化することが可能であった. ZFos タンパクの N 末端 170 アミノ酸を欠失した変異体も, ZFos の DNA 結合領域を Fos タンパク由来のものに置換した Z170Fos も外因性 Jun タンパクの発現下における BMRF1 プロモーターからの活性化能は維持していた. この結果は Fos タンパクの DNA 結合領域より N 末端側を欠失した Fos 変異体が外因性 Jun タンパク存在下において転写活性化能を示すという報告と矛盾しない<sup>49)</sup>. これらの結果より ZFos タンパクは外因性 Jun タンパク過剰発現下では Jun タンパクと異種二量体を形成して Fos タンパクと同様の機能を果たすものと推測された. したがって ZFos 発現細胞に誘導される TRE 結合因子には Jun タンパクは含まれないと結論された. この考えは Jun タンパク発現下では ZFos タンパクによる BMRF1 プロモーターは活性化が Fos タンパクレベルまで低下するという結果とも一致する.

Fos および ZFos タンパクの C 末端 142 アミノ酸を欠失することにより有意に転写活性化能を喪失したが, このことは Fos タンパクの C 末端 142 アミノ酸領域にも転写活性化に寄与する領域が存在するとした吉崎の報告と一致する<sup>49)</sup>.

Z タンパクの N 末端 65 アミノ酸を欠失したところ BMRF1 プロモーターからの転写活性化能はほぼ完全に喪失したが, Z タンパクの 65 アミノ酸に対応する Fos タンパクの N 末端 66 アミノ酸で置換したところその活性は回復した. このことは Z タンパク, Fos タンパクともにその領域に転写活性化領域が存在するという吉崎の報告と一致し<sup>49)</sup>, Z タンパクの N 末端 65 アミノ酸と Fos タンパクの N 末端 66 アミノ酸は転写活性化機能に関して互換性があることを示している. Z タンパクの N 末端 170 アミノ酸を欠失した Zdel5 および Z タンパクの 170 アミノ酸に対応する Fos タンパクの N 末端 135 アミノ酸でこの領域を置換した FosZdel5 はともに BMRF1 プロモーターからの転写活性化能は有しなかった. ZFos 融合タンパクにおいて外因性 Jun タンパク非存在下の転写活性化に必須とされた Z タンパクの DNA 結合領域の N 末端側 37 アミノ酸は Z タンパクにとっても不可欠であった. Z タンパクの DNA 結合領域 (N 末端 171~198) を Fos タンパクの DNA 結合領域 (N 末端 136~163) と置換した ZFos (136~163) Z は BMRF1 プロモーターからの転写活性化能が Z タンパクによる転写活性化能の 4 分の 1 に低下したが, これは BMRF1 プロモーター内に Z タンパクは認識できるが, Fos タンパク由来の DNA 結合領域では認識できない配列があるためと推測された.

以上, Z タンパクと Fos タンパクの融合タンパクを作製することにより両タンパクの各領域についてその機能上の比較を行った結果, Fos タンパクには欠失している 33 アミノ酸領域を含む Z タンパクの DNA 結合領域の N 末端側 37 アミノ酸は, 転写活性化に関し Z タンパクにとっては必須な領域であり, この領域と広い DNA 結合親和性を持つ Z タンパクの DNA 結合領域を Fos タンパクに付加した ZFos タンパクは従来の細胞性転写因子には無い活性を獲得することが明らかとなった. 今後, ZFos タンパクにより誘導された TRE 結合因子をノーザンハイブリダイゼーションなどにより同定すること, およびその誘導機構を分子レベルで解明する必要がある. 本研究で作製した Z タンパクと Fos タンパクの融合タンパクおよびその変異体

は、ウイルス転写因子である Z タンパクの研究のみならず、細胞性転写因子である AP-1 ファミリー全体の転写制御機構を解明する上で極めて有効な手段と考えられる。

### 結 論

アミノ酸配列に高い相同性をもつ EBV BZLF1 遺伝子産物 Z タンパクおよび c-fos 遺伝子産物 Fos タンパクの融合タンパクである ZFos タンパクについて以下の結果を得た。

1. ZFos タンパクは Z タンパクおよび Fos タンパクと異なり細胞内に ZFos タンパクと異種二量体を形成し転写活性化能を有する細胞性因子の合成を誘導することにより、外因性 Jun タンパク非存在下にウイルスプロモーターからの転写を活性化した。

2. ZFos が外因性 Jun タンパク非存在下に転写を活性化するためにはプロモーター内にエンハンサーとして複数の TRE などの DNA 結合配列が必要であったが、外因性 Jun タンパク存在下では Fos タンパク同様 1 個の TRE のみを含むプロモーターからの転写を活性化した。

3. ZFos タンパクが外因性 Jun タンパクの非存在下にウイルスプロモーターを活性化するためには、Z タンパク DNA 結合領域の N 末端側 37 アミノ酸と Z タンパクの DNA 結合領域が必要であった。しかし外因性 Jun タンパク存在下には Fos タンパク同様 DNA 結合領域と二量体形成領域であるロイシンジッパー構造のみで転写を活性化し得た。

4. Z タンパクの DNA 結合領域の N 末端側 37 アミノ酸に相当する領域は Fos タンパクには欠失しているが、この領域は Z タンパクの転写活性化には必須であった。

以上の結果は Z タンパクの DNA 結合領域の N 末端側 37 アミノ酸は、Z タンパクが同種二量体を形成し転写を活性化するために必要な領域であること、およびこの領域を Fos タンパクに付加することにより Fos タンパクが外因性 Jun タンパクの非存在下に転写を活性化するという特殊な機能を獲得することを意味している。

### 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致します。

なお、本論文の一部は、第50回日本癌学会総会(1991年東京)、第38回日本ウイルス学会総会(1991年福岡)、にて口演した。

### 文 献

- 1) Henle, G., Henle, W. & Diehl, V.: Relation of Burkitt's tumour 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 Hauen, H., O'Neal, F. J. & Freese, U.K.:

Persisting oncogenic herpesvirus induced by the tumour promotor TPA. *Nature*, **272**, 373-375 (1978).

- 4) Flemington, E. & Speck, S. H.: Identification of phorbol ester response elements in the promotor 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., Perricudent, M. & Farrell, P.: Epstein-Barr virus gene expression in P3HR-1 superinfected Raji cells. *J. Virol.*, **61**, 3120-3132 (1987).
- 9) Takimoto, 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) Kenney, 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.*, **64**, 313-321 (1990).
- 15) Cox, M. A., Leahy, J. & Hardwick, J. M.: An enhancer within the divergent promotor 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 promotor 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 trans-activator 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. & Farrel, P. J.**: Structure and function of the Epstein-Barr virus BZLF1 protein. *J. Virol.*, **64**, 2110-2116 (1990).
  - 21) **Halazonetis, T. D., Gergopoulos, 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 domains. *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 zippers 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. & Mcknight, 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 leucine zipper in the Fos-Jun interaction. *Nature*, **336**, 645-651 (1988).
  - 31) **Gentz, R., Rauscher, III, F. J. & Curran, T.**: Parallel association of Fos and Jun leucine zippers juxtaposes DNA binding domains. *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 the 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) **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).
  - 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. & Kenney, S.**: The Epstein-Barr virus (EBV) BMRF1 promoter for early antigen (EA-D) is regulated by the EBV transactivators, 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) **Lieberman, 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) **Lieberman, P. M., Hardwick, J. M., Sample, J., Hayward, G. S. & Hayward, S. D.**: The Zta transactivator involved in induction of lytic cycle gene expression in Epstein-Barr virus infected lymphocytes binds to both AP-1 and ZRE sites in target promoter and enhanced region. *J. Virol.*, **64**, 1143-1155 (1990).
  - 42) **Packham, G., Economou, A., Rooney, C. M., Rowe, D. T. & Farrel, P. J.**: Structure and function of the Epstein-Barr virus BZLF1 protein. *J. Virol.*, **64**, 210-216 (1990).
  - 43) **Chang, Y. N., Dong, D. L. Y., Hayward, G. S. & Hayward, S. D.**: The Epstein-Barr virus Zta trans-activator: 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) **Farrel, P. J., Rowe, D. T., Rooney, C. M. & Kouzarides, T.**: Epstein-Barr virus BZLF1 trans-activator specifically binds to a consensus AP-1 site and is related to c-fos. *EMBO J.*, **8**, 127-132 (1989).
  - 45) **Chen, C. & Okayama, H.**: High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol. Cell. Biol.*, **7**, 2745-2752 (1987).

- 46) 吉崎智一: Epstein-Barr ウイルス転写調節因子 Z タンパクおよび細胞転写調節因子 c-fos タンパクの構造と機能解析. 十全医会誌, 100, 85-99 (1991).
- 47) Fiemington, E. & Speck, S. H.: Epstein-Barr virus BZLF1 trans-activator induces the promoter of a cellular cognate gene, c-fos. J. Virol., 64, 4549-4552 (1990).
- 48) Abate, C., Luk, D. & Curran, T.: Transcriptional regulation by Fos and Jun in vitro: Interaction among multiple activator and regulatory domains. Mol. Cell. Biol., 11, 3624-3632 (1991).

**Mechanism of Transcriptional Regulation by Chimeric Protein Between Epstein-Barr Virus Transcription Factor Z Protein and Cellular Fos Protein** Hajime Takeshita, Department of Oto-Rhino-Laryngology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med Soc., 101, 89—99 (1992)

**Key words** EBV, BZLF1, c-fos, AP-1, TRE

#### Abstract

The BZLF1 immediate-early gene of Epstein-Barr virus (EBV) encodes a transcriptional activator protein, Z, which mediates disruption of EBV latent infection. The Z protein has an amino acid sequence homologous to AP-1 family proteins, particularly Fos protein, but does not have the typical leucine zipper structure characteristic of AP-1 family proteins. To compare the functional domains of Z protein with those of Fos protein, I constructed an expression plasmid for a chimeric protein consisting of the N-terminal 198 amino acids of Z protein including DNA binding domain and C-terminal 227 amino acids of Fos protein including the leucine zipper (ZFos), and analysed its transcriptional activation ability. The reporter plasmids used were EBV BMRF1 promoter which can be stimulated by transfection with BZLF1 gene and by cotransfection with c-jun and c-fos genes, and collagenase promoter which can be transactivated by cotransfection with c-jun and c-fos genes but not by BZLF1 gene. Transfection with ZFos fusion gene alone, but not with c-fos gene alone, stimulated transcription from EBV BMRF1 promoter without cotransfection with c-jun gene. However, it failed to stimulate collagenase promoter. Collagenase promoter was stimulated by ZFos gene only when cotransfected with c-jun gene. Deletion of N-terminal 133 amino acids from ZFos fusion protein, which were derived from Z protein, resulted in a significant loss of transactivation ability, but the loss was recovered by adding corresponding 110 amino acids of Fos protein. A deletion mutant of ZFos fusion protein, lacking N-terminal 170 amino acids derived from Z protein, lost transactivation ability in the absence of Jun protein. The activity of the mutant was not recovered by the addition of corresponding 135 amino acids of Fos protein, although it was still functional in the presence of Jun protein. Thus, DNA binding domain and adjacent 37 amino acids derived from Z protein were essential for transactivation by ZFos fusion protein in the absence of Jun protein. Gel retardation assay, using a nuclear extract from F9 cells transfected with ZFos fusion gene, demonstrated that, unlike Fos and Z proteins, ZFos chimeric protein induced expression of cellular AP-1 family proteins which would form heterocomplex with ZFos fusion protein. This in turn may lead to the stimulation of transcription from BMRF1 promoter without cotransfection with the c-jun gene. These results indicate that N terminal 163 amino acids of Fos protein including DNA binding domain is replaceable by N terminal 198 amino acids of Z protein, and furthermore that this region of Z protein gives Fos protein a unique propensity to function in the absence of exogenous Jun protein.