

Structural and Functional Analysis of Epstein-Barr Virus (EBV) BZLF1 Gene and Transcriptional Regulatory Gene c-fos

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/2297/8246

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

金沢大学医学部耳鼻咽喉科学講座 (主任: 古川 昶教授)

吉 崎 智 一

(平成3年1月10日受付)

Epstein-Barr ウイルス初期遺伝子 BZLF1 遺伝子にコードされる Z タンパクは、細胞転写調節因子である AP-1 ファミリーとりわけ c-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。本研究では転写調節因子としての Z タンパクの構造と機能を明らかにするために Z タンパクの種々の変異体を作製し DNA 結合能、転写活性化能を検討した。また、酵母 Gal4 タンパクとの融合タンパクを作製することにより Z タンパクの転写活性化領域を c-Fos タンパク転写活性化領域と比較検討した。Z タンパクは同種二量体として DNA の 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) 応答配列および Z 応答配列に結合した。Z タンパクの N 末端 65 アミノ酸または C 末端 47 アミノ酸を欠失することにより DNA 結合能が著しく低下し、転写活性化能を喪失した。また、C 末端 47 アミノ酸を欠失した変異体に c-Fos タンパクのこの部分に対応する C 末端 216 アミノ酸を融合した ZFos タンパクは単独では弱く、c-Jun と異種二量体を形成すると強く TPA 応答配列に結合するとともに、転写活性化能を回復した。また、c-Jun ZFos 異種二量体は c-Jun c-Fos 異種二量体が結合できず Z タンパクのみが特異的に結合しうる Z 応答配列にも結合することから、c-Jun c-Fos 異種二量体の DNA 結合の特異性は c-Fos タンパク側の DNA 結合領域によっても規定されることが明らかとなった。Z タンパクの転写活性化領域は N 末端 133 アミノ酸、C 末端 88 アミノ酸に、転写抑制領域は 134-157 アミノ酸にあり、c-Fos タンパクの転写活性化領域および転写抑制領域も Z タンパクに対応するアミノ酸領域に認められた。

Key words Epstein-Barr virus, BZLF1, c-fos, leucine zipper, activation domain

Epstein-Barr ウイルス (Epstein-Barr Virus, EBV) は、1964年 Epstein によってパーキットリンパ腫から発見されたヘルペスウイルス¹⁾であり、現在ではパーキットリンパ腫、伝染性単核症、上咽頭痛発生への関与が示唆されている²⁾、EBV はヒト B 細胞をトランスフォーム (不死化, immortalization) する活性を持つ³⁾、また、マーマセットに感染しリンパ腫を引き起こす⁴⁾。

EBV は初感染に引き続いて特定の宿主細胞内に潜伏感染し、各種の宿主側の要因によって複製サイクル

に入る。潜伏感染状態ではウイルス粒子の産生は起こらず、ウイルスの潜伏感染持続に必要な一部のウイルス遺伝子のみが発現している。

EBV 潜伏感染細胞を 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、EBV 複製サイクルを誘導することができる⁵⁻⁹⁾。ウイルス複製サイクル誘導時に確認された messenger RNA (mRNA) は、BZLF1, BRLF1 および BMLF1 遺伝子プロモーターから転写されたものであるが、これらの遺伝

Abbreviations: bp, base pair; CAT, chloramphenicol acetyl transferase; DMEM, Dulbecco modified Eagle's medium; EBV, Epstein-Barr virus; EDTA, ethylene-diamine-tetraacetic acid 2Na; FCS, fetal calf serum; HEPES, N-2-hydroxyethyl-piperazine-N'-2-

子産物は他の EBV 遺伝子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。さらにサイクロヘキシミド アニソ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 mRNA のみが合成される¹⁰⁻¹²。しかし、これらの遺伝子を遺伝子導入により EBV 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^{9,10,14}。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 c-fos 遺伝子産物 c-Fos タンパクと相同性を持ち、特に36-110番目と153-196番目のアミノ酸の相同性が高い^{15,16}。さらに Zタンパクはいくつかの特異的な DNA 配列と結合するが、c-Fos, c-Jun タンパクなどの細胞転写調節因子 AP-1 ファミリーが結合可能な DNA 配列である TPA 応答配列にも結合する¹⁷⁻²⁰。そこで、本研究では、BZLF1 遺伝子および c-fos 遺伝子とそれらの欠失変異体発現プラスミドを用いて両タンパクの DNA 結合様式およびそれに必要な領域を検討した。さらに Zタンパク、c-Fos およびそれらの欠失変異体と酵母転写因子 Gal4 タンパクの DNA 結合領域との融合タンパクを作製することにより Zタンパクおよび c-Fos タンパクの転写活性化領域の比較同定を行った。

材料および方法

I. 使用細胞

マウス線維芽細胞由来 NIH 3T3 細胞およびサル腎由来 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 (図1)

プラスミド pSG6 (東洋紡, 大阪) をベクターとして各種融合タンパク発現遺伝子を作製した。EBV の BMRF1, BHRF1 および BZLF1 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, BZLF1 CAT プラスミドは金沢大学がん研究ウ

イルス部佐藤 博博士から分与された。

2. BZLF1 遺伝子およびその欠失変異体発現プラスミド (図2)

BZLF1 遺伝子発現プラスミドは佐藤 博博士から分与された。

BZLF1 発現プラスミドを図2に示す制限酵素認識部位で切断し、0.7%アガロース (Sigma, St. Louis, USA) ゲル電気泳動にて、目的とする DNA 断片を分離し、DEAE ペーパーにて回収した。DEAE ペーパーを100mM NaCl 溶液にて洗滌後、2M NaCl 溶液にて DNA 断片を溶出した。溶出液を等量のフェノールおよび CIAA (クロロホルムとイソアミアルコールを24:1の割合で混合したもの) にて抽出後、エタノール沈澱を行った。ベクタープラスミドは BZLF1 遺伝子 DNA 切断の際に用いた制限酵素にて切断後、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), 0.25 M Tris-hydroxymethyl-aminomethane

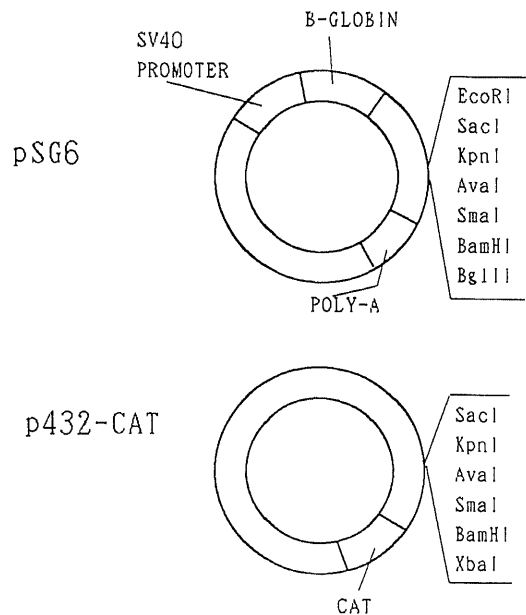


Fig. 1. Schematic representation of vector plasmids and their multiple cloning sites. pSG6 was used as the vector of effector plasmid. p432 was used as the vector of reporter plasmid. A series of EBV promoters were inserted into between SmaI and BamHI sites of p432.

ethane sulfonic acid; mRNA, messenger RNA; PBS, phosphate buffer saline; SDS, sodium dodecyl sulfate; TE, Tris EDTA; TNE, Tris NaCl EDTA; TPA, 12-0-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate; Tris, Tris-hydroxymethyl-amino-methane

(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澱を行った。ベクター DNA および挿入遺伝子 DNA 各 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 を使用して結合させた。

3. BZLF1 と c-fos の融合遺伝子発現プラスミド (図 3)

c-fos および c-jun 発現プラスミドはがん研ウイルス部藤井雅寛博士より分与された。c-Fos 164-380 アミノ酸をコードする c-fos 遺伝子の DNA 配列を、PCR (polymerase chain reaction) で増幅した。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 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 260nm の吸光度を測定し、20mM に調整したあとを使用した。このようにして増幅された遺伝子を PstI, BamHI で切断し Z タンパクの 198-245 アミノ酸をコードする BZLF1 遺伝子の DNA 領域と置換した。

4. Gal4 タンパク DNA 結合領域と Z および c-Fos タンパクとの融合タンパク発現プラスミド (図 4, 5)

Gal4 タンパク DNA 結合領域発現プラスミドはが

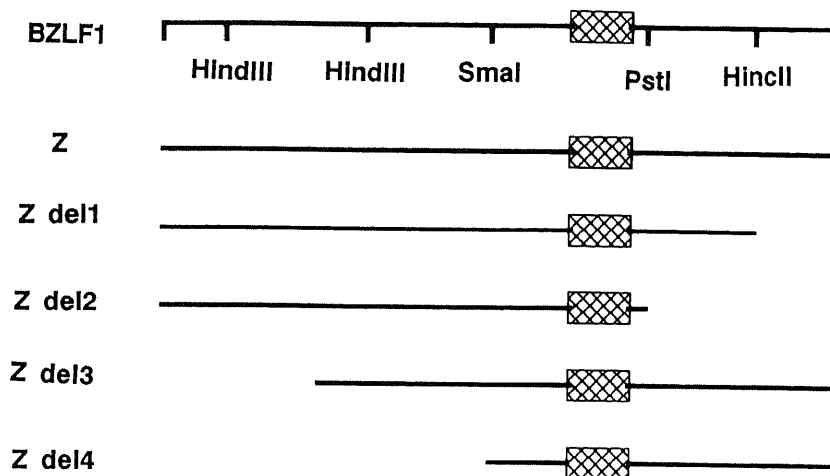


Fig. 2. Schematic representation of BZLF1 deletion mutants. Cross line boxes indicate basic region of Z protein. These mutants were inserted into the cloning sites of pSG6 plasmid.

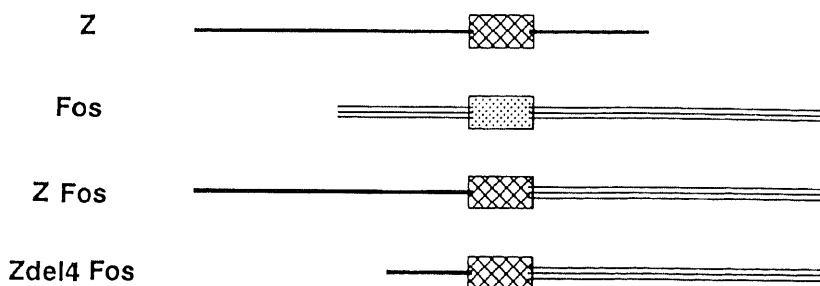


Fig. 3. Schematic representation of chimeras consist of Z and c-Fos protein. Single lines show Z protein, triple lines show c-Fos protein. Cross line boxes indicate basic region of Z protein, and dot boxes indicate basic region of c-Fos protein.

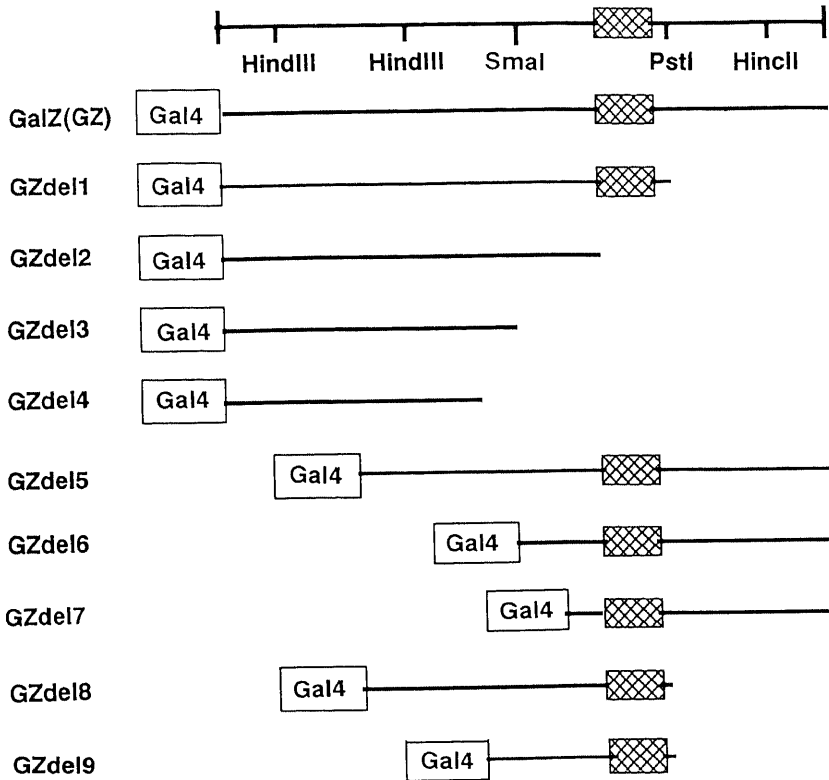


Fig. 4. Schematic representation of chimeras consist of DNA binding region of Gal4 protein and Z protein deletion mutants. Z protein deletion mutants were inserted downstream of Gal4 protein. Cross line boxes indicate basic region of Z protein.

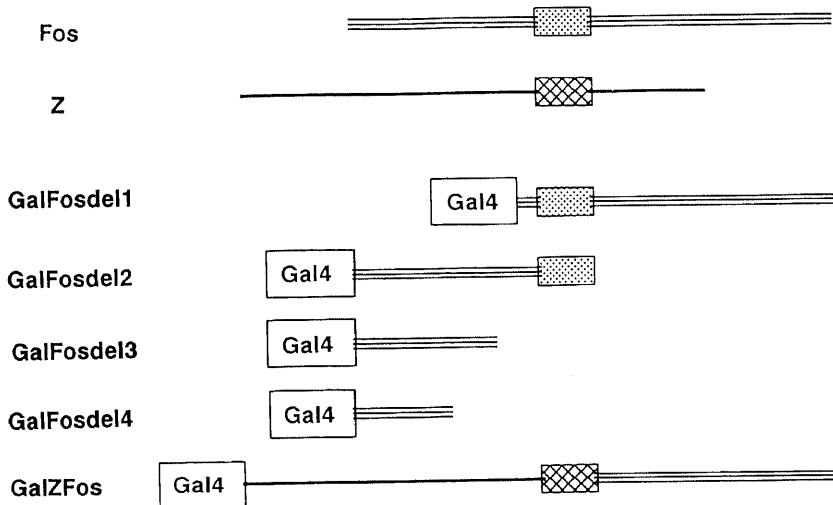


Fig. 5. Schematic representation of chimeras consist of DNA binding region of Gal4 protein and c-Fos protein deletion mutants and Z protein deletion mutants. Cross line boxes indicate basic region of Z protein, dot boxes indicate basic region of c-Fos protein.

ん研ウイルス部藤井雅寛博士から分与を受けた。このプラスミドの Gal4 DNA 結合領域をコードする遺伝子の 3' 側に読み取り枠を合わせて BZLF1, c-fos 遺伝子およびそれら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 HB101 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 1.25 ml 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% sucrose, 50mM Tris-HCl 緩衝液 pH7.5 に懸濁後、リゾチーム 10 mg 加え、ゆるやかに混和し 5 分水中に静置、0.25M ethylene-diamine-tetraacetic-acid 2Na (EDTA) 1ml 加え、15 分水中に静置、0.3% triton, 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 2.5 ml, 10%ドデシル硫酸ナトリウム (sodium dodecyl sulfate, SDS) 0.25ml, フェノール CIAA 25ml 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 3ml の TE (10mM Tris-HCl pH8.0, 1 mM EDTA pH8.0) に溶解後 150 μg のリボヌクレアーゼ (Sigma) を加え 37°C 30 分反応後、塩化セシウム (CsCl, cesium chloride, BRL, Gaithersburg, USA) 4.2g, エチジウム ブロマイド 4 μg 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、エタノール沈澱後 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、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 6 μg と、BZLF1, c-fos およびそれらの欠失変異体や Gal4 DNA 結合領域との融合遺伝子発現プラスミドなどのエフェクタープラスミド 0.5 μg - 3 μg を、0.26M 塩化カルシウム 276 μl に混合し、その混合液を 2 ×

HBS (NaCl 280mM, HEPES 緩衝液 pH7.9 50mM, NaHPO₄ 2.8mM) (HEPES, N-2 hydroxyethyl-piperazine-N'-2-ethane sulfonic acid) 288 μl 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、COS-1 は 5% FCS 加 DMEM 4ml で、NIH 3T3 は 0.5% FCS 加 DMEM 4ml で 37°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 phosphate buffer saline (PBS) で洗滌し TNE (Tris-HCl pH 8.0 40mM, NaCl 150mM, EDTA 1mM) 1ml にて回収、10,000rpm 10 秒遠心し沈澱に 0.25M Tris-HCl pH8.0 を 150 μl 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 μl に 1M Tris-HCl pH7.5 15 μl, 4mg/ml アセチル CoA (acetyl coenzyme A, Sigma) 20 μl, ¹⁴C-クロラムフェニコール (D-threo-[dichloroacetyl 1-¹⁴C] chloramphenicol, アマシャムジャパン, 東京) 0.25 μl, 蒸留水 40 μl 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 μl 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 μl 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

TPA 応答配列 DNA プロローブは GATCTTCTA-GACCGGATGAGTCATAGCTTG の 30 base pair (bp), Z 応答配列 DNA プロローブは GATCTTCTA-GACCAATGTGCAAAGGTGAG の 30 bp 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 dithiothreitol, 0.1mM spermidine, 0.1mM EDTA, 100 μCi 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 μl 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 T7RNA 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 μg 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 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°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 (10,000 count per minute) を DNA 結合緩衝液 (20mM HEPES 緩衝液 pH7.9, 40mM KCl, 0.2M EDTA, 8mM MgCl₂, 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ーにより分析を行った。

成 績

I. EBV 遺伝子プロモーターからの転写誘導

1. Zタンパクおよびその欠失変異体による転写活性化

Zタンパクの構造と機能を明らかにするために Zタンパク欠失変異体の発現プラスミドを作製しその転写活性化能を検討した。EBV BRF1 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 BRF1 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 1)。

735塩基対の DNA 配列からなる BZLF1 読み取り枠は 245アミノ酸からなる Zタンパクをコードする。BZLF1 発現プラスミドを BRF1 CAT プラスミドと同時に NIH 3T3 細胞に遺伝子導入すると, コントロールである pUC プラスミドを BRF1 CAT と同時に導入した場合に比して 11 倍 BRF1 プロモーターからの転写を促進した。Zタンパク C 末端 18アミノ酸を欠失した Zdel1 (Z: 1-227) では 6.4 倍の転写活性

化を示したのに対して, C 末端 47アミノ酸を欠失した Zdel2 (Z: 1-198), N 末端 65アミノ酸および 133アミノ酸を欠失した Zdel3 (Z: 66-245), Zdel4 (Z: 134-245) は, いずれも有意な転写活性化能を示さなかった (図 6)。

2. c-Jun, c-Fos および ZFos 融合タンパクによる転写活性化

Zタンパクと c-Fos タンパクには N 末端から DNA 結合領域にかけて高い相同性が認められる一方, その C 末端側の構造は著しく異なっている。そこで両タンパクのこの C 末端領域の構造と機能を比較するために Zタンパクの N 末端から DNA 結合領域すなわち 1-198アミノ酸と c-Fos タンパクの DNA 結合領域より C 末端側 164-380アミノ酸を組み合わせた融合タンパク ZFos の発現プラスミドおよび Z 134-198アミノ酸と c-Fos 164-380アミノ酸を組み合わせた融合タンパク Zdel4Fos を作製し転写活性化能を検討した (図 3)。

c-fos 遺伝子発現プラスミドは単独では BRF1 プロモーターからの転写を有意に促進せず (コントロールの 0.5 倍) c-jun 遺伝子発現プラスミドも単独では弱い転写活性化能しか示さなかった (コントロールの 2.2 倍)。c-jun, c-fos 遺伝子発現プラスミドを同時に遺伝子導入することにより相乗的にこのプロモーターからの転写を促進した。 (コントロールの 5.8 倍), 一方, 上記のように Zタンパク DNA 結合領域より C 末端側を欠失した Zdel2 では転写活性化能が消失したが, これに c-Fos タンパク C 末端 217アミノ酸を組み合わせた ZFos 融合タンパクは単独で BRF1 遺伝子プロ

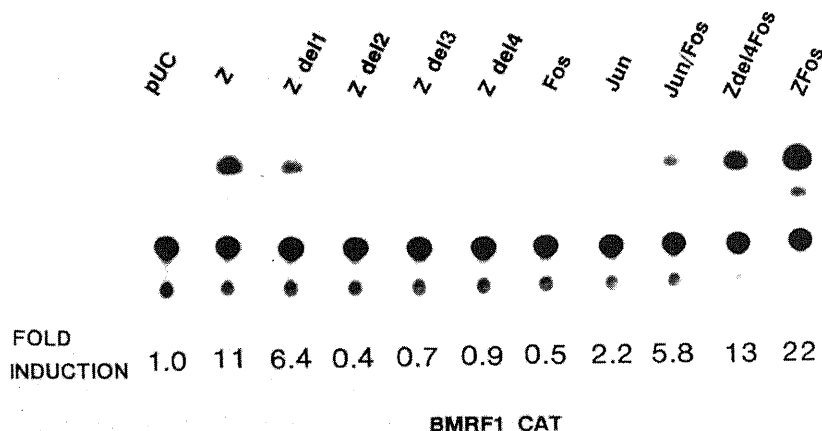


Fig. 6. CAT assay of transcriptional activation by BZLF1 deletion mutants. BRF1 CAT plasmid DNA was cotransfected as a reporter plasmid.

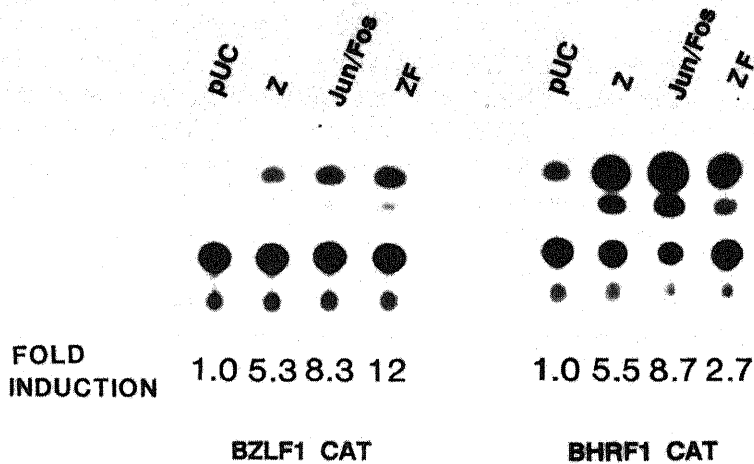


Fig. 7. CAT assay of transcriptional activation by BZLF1, c-jun+c-fos and ZFos. BZLF1 CAT, or BHRF1 CAT plasmid DNA was cotransfected as a reporter plasmid.

モーターからの転写をコントロールに比して22倍促進した。また、Zdel4Fosも単独でコントロールに比して13倍促進した(図6)。さらにBZLF1遺伝子自身のプロモーターおよびBHRF1遺伝子プロモーターの支配下にCAT遺伝子を組み込んだレポータープラスミド(BZLF1 CAT, BHRF1 CAT)を用いて同様の実験を行った。ZタンパクはBZLF1, BHRF1遺伝子プロモーターからの転写をコントロールに比して各々5.3倍, 5.5倍促進した。c-jun, c-fosを同時に遺伝子導入した場合には両遺伝子プロモーターからの転写を各々8.3倍, 8.7倍促進した。一方ZFosは両遺伝子プロモーターからの転写を各々12.2倍, 2.7倍促進した(図7)。

II. ゲルシフトアッセイ

1. ZタンパクのDNA結合様式

まずZタンパクのDNA結合様式を検討するためにZタンパクとN末端側65アミノ酸を欠失したZdel3タンパクを用い、TPA応答配列を含むDNAをプローブとしてゲルシフトアッセイを行った。

Z, Zdel3タンパク共にTPA応答配列に結合したが(レーンBZLF1およびDel3), Zdel3タンパクのTPA応答配列への結合は著しく弱くまた移動度はZタンパクに比して大きかった。両タンパクを別々のチューブで合成後に混合しTPA応答配列プローブと反応させた場合にはZ, Zdel3タンパクそれぞれのDNA複合体が見られたのに対し(レーンBZLF1+

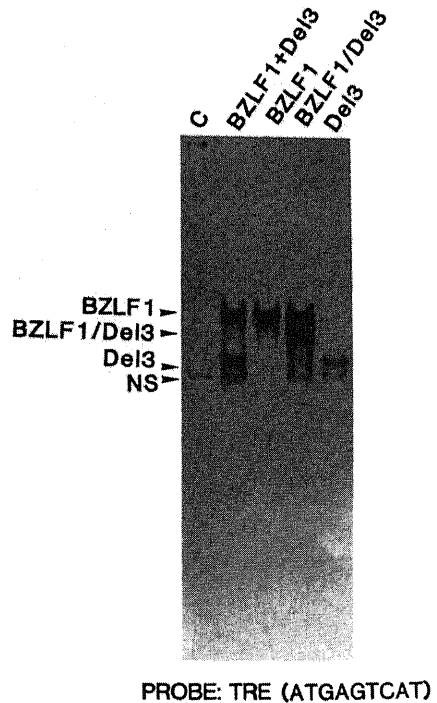


Fig. 8. Gel mobility shift assay for TRE binding of Z and Zdel3 proteins. BZLF1+Del3, ZmRNA and Zdel3mRNA were separately translated; BZLF1/Del3, ZmRNA and Zdel3mRNA were cotranslated; NS, Nonspecific binding activity.

De13), ZmRNA, Zdel3mRNA を同一のチューブで翻訳後に TPA 応答配列プロープと反応させた場合には Zタンパク DNA 複合体, 非常に弱い Zdel3 タンパク DNA 複合体に加えて新たなタンパク DNA 複合体が認められた (レーン BZLF1/De13) (図 8), この複合体の移動度が両者のほぼ中間であることから, これは Zタンパクと Zdel3 タンパクとの異種二量体と考えられた. よって Zタンパクは DNA に二量体として結合すると結論された, また別々に合成した Z, Zdel3 タンパク間では異種二量体形成が見られなかったことから, DNA に結合していない状態で Zタンパクおよび Zdel3 タンパクはすでに二量体を形成していると考えられた. 一方, 同一チューブ内で翻訳した Zタンパクおよび Zdel3 タンパクは Zタンパク同種二量体, Z Zdel3 タンパク異種二量体に比して Zdel3 タンパク同種二量体が著しく微量であったことは, Zdel3 タンパクの同種二量体形成能あるいは DNA 結合能が弱いことを示唆している.

2. ZFos 融合タンパクの DNA 結合能

c-Fos タンパクは単独では TPA 応答配列プロープ

に結合し得なかったが c-Jun タンパクと異種二量体を形成して TPA 応答配列プロープに強く結合した. c-Jun タンパクは単独で弱く結合した (図 9), Z の C 末端47アミノ酸を欠失した Zdel2 タンパクは DNA 結合能を喪失した (未発表). この Zdel2 タンパクに c-Fos タンパクの C 末端の 168-380アミノ酸を組み合わせた ZFos 融合タンパクは c-Jun タンパクと異種二量体を形成することにより, c-Jun c-Fos タンパク異種二量体と同等もしくはそれ以上の親和性で TPA 応答配列プロープに結合した (図 9). また, プロープとして Zタンパクのみが特異的に結合するとされている Z 応答配列を有する DNA をプロープとして用いると c-Jun, c-Fos タンパクおよびそれらの異種二量体も結合し得ないのに対し, ZFos タンパクは単独では Z 応答配列プロープに結合しなかったが c-Jun タンパクの存在下では異種二量体を形成して Z 応答配列プロープに結合した (図 10). 次に c-Jun c-Fos タンパク異種二量体, c-Jun ZFos タンパク異種二量体および ZFos タンパク同種二量体の DNA への結合の特異性を検討するために拮抗阻害実験を行った. c-Jun



Fig. 9. Gel mobility shift assay for TRE binding of Z, ZFos, c-Jun and c-Fos proteins. NS, Nonspecific binding activity.

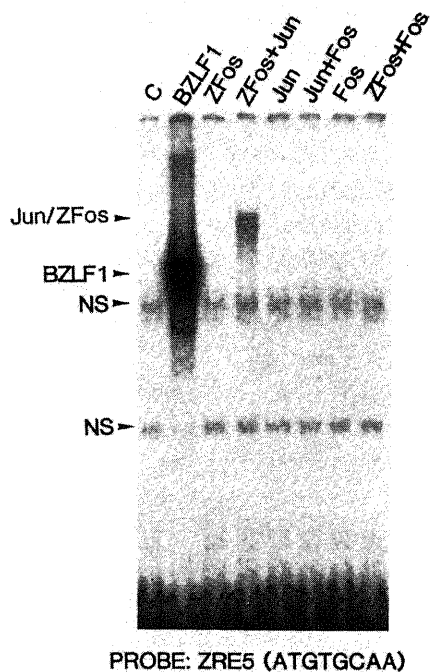


Fig.10. Gel mobility shift assay for ZRE binding of Z, ZFos, c-Jun and c-Fos proteins. NS, Nonspecific binding activity.

c-Fos タンパク異種二量体の TPA 応答配列プロープへの結合は、標識されていない TPA 応答配列 DNA を過剰に入れることにより拮抗阻害されたが、Z 応答配列 DNA では阻害されなかった。c-Jun ZFos タンパク異種二量体の TPA 応答配列プロープへの結合、ZFos タンパク同種二量体の TPA 応答配列プロープへの結合についても同様の結果が得られた。ところで c-Jun ZFos タンパク異種二量体の Z 応答配列プロープへの結合は、標識されていない TPA 応答配列 DNA および標識されていない Z 応答配列 DNA のいずれを過剰に入れた場合にも阻害された(図11)。すなわち c-Jun c-Fos タンパク異種二量体、ZFos タンパク同種二量体の TPA 応答配列への結合および c-Jun ZFos タンパク異種二量体の TPA 応答配列、Z 応答配列への結合は各々 DNA 配列特異的であるという結果が得られた。

III. Z および c-Fos タンパクの転写活性化領域の同定

転写調節に係わるタンパクには、DNA に結合する領域と転写複合体に作用して転写を促進する領域がある。この転写活性化領域を検索するために DNA 結合領域、転写活性化領域の構造がすでに明らかな酵母転写調節因子である Gal4 タンパクの DNA 結合領域を用いて Z および c-Fos タンパクとの融合タンパクを作製し、両タンパクの転写活性化領域の同定を試みた。

1. Z タンパクの転写活性化領域

Gal4 タンパクの転写活性化領域を除いた DNA 結合領域の C 末端側に Z タンパクを含む融合タンパク GalZ (Z: 2-245) は Gal4 タンパクにより転写誘導が可能なプロモーターからの転写を促進しなかった。GalZ の Z タンパクの C 末端 47 アミノ酸を欠失した GalZdel1 (Z: 2-198), Z タンパクの DNA 結合領域を含む C 末端 68 アミノ酸を欠失した GalZdel2 (Z: 2-177) も転写を促進しなかった。しかし、GalZ の C 末端から 112 アミノ酸を欠失した GalZdel3 (Z: 2-133) はコントロールに比して 62 倍と著しく転写を促進した。

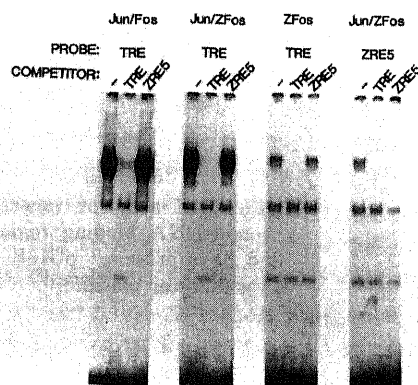


Fig.11. Competition assay for TRE binding affinity of c-Jun c-Fos proteins heterodimer, c-Jun ZFos proteins heterodimer and ZFos protein homodimer and for ZRE binding affinity of c-Jun ZFos proteins heterodimer.

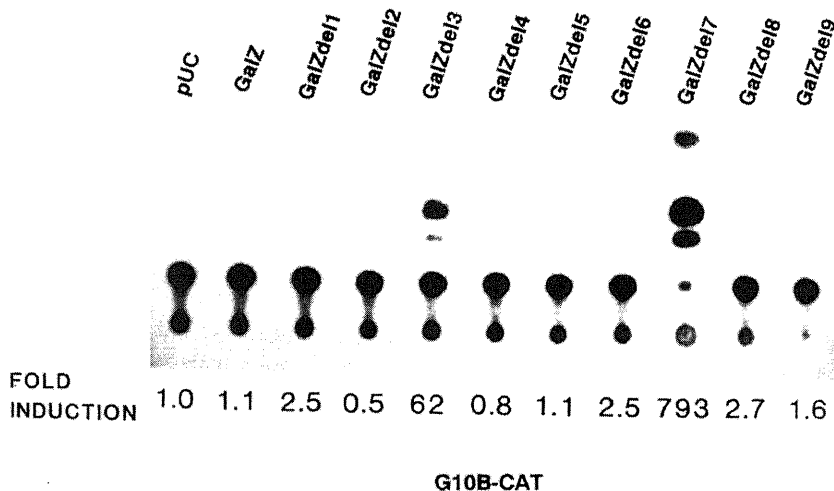


Fig.12. CAT assay of transcriptional activation by chimeras of Gal4 protein DNA binding region and Z protein deletion mutants. pG10B CAT plasmid was cotransfected as a reporter plasmid.

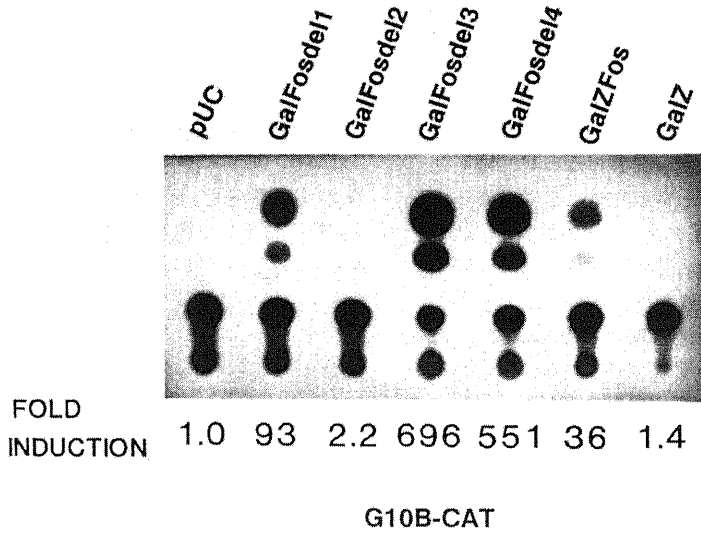


Fig.13. CAT assay of transcriptional activation by chimeras of Gal4 protein DNA binding region and c-Fos protein deletion mutants and ZFos protein. pG10B CAT plasmid DNA was cotransfected as a reporter plasmid.

BZLF1	MM--DPNSTS	ED--VKFTPD	PYQVPFVQAF	DQATRVYQDL	GGPSQAPLPC	46
	**	*			* * *	
C-Fos	MMFSGFMADY	EASSSRCSSA	SPAGDSLSYY	HSPADSFSSM	GSPVMAQDFC	50
BZLF1	VLWVLPPEPL	PQGQLTAYHV	STAPTGSWFS	APQPAPENAY	QAYAAPQLFP	96
	*	*	** * *	*	* * *	
C-Fos	TDLAVSS---	ANFIPTVTAI	STSPDLQWLV	QPALVSSVAP	SQTRAPHPPG	97
BZLF1	VSDITQNQQT	NQAGGEAPQP	GDNSTVQTAA	AVVFACPGAM	QGQQLADIGV	146
	*	**				
C-Fos	VPAPSAGAYS	R-AG-----	-----	-----	-----VVK	113
BZLF1	PQPAPVAAPA	RRTRKPQQPE	SLEECDSELE	IKRYKMRVAS	RKCRAKFKQL	196
	*	* * *	* * *	* * * *	* * * *	
C-Fos	TMTGGRAQSI	GRRGKVEQ-L	SPEEEK-RR	<u>IRRERNKMAA</u>	<u>AKCRNRRREL</u>	161
BZLF1	LQHYREVAAA	KSENDRLRL	LLKQMCPSLD	VDSIIPRTPD	VLHEDLLNF	245
		* *		*		
C-Fos	TDTLQAETDQ	LEDEKSALQT	EIAMLLKEKE	KLEFILAAHR	PACKIPDDL...	210

Fig.14. Amino acid sequence of Z and c-Fos protein. Conserved amino acids are marked by the star. Basic regions are indicated by the solid underline.

しかし GalZ の C 末端から 135 アミノ酸を欠失した GalZdel4 (Z; 2-110) は転写活性化を示さなかった。一方 Z タンパクの N 末端 65 アミノ酸を欠失した変異体を Gal4 DNA 結合領域の C 末端に組み込んだ GalZdel5 (Z; 66-245)、Z タンパクの N 末端 133 アミノ酸を欠失した GalZdel6 (Z; 134-245) はいずれも転写活性化を示さなかったが、Z タンパクの N 末端 157 アミノ酸を欠失した変異体を Gal4 タンパク DNA 結合領域の C 末端に組み込んだ GalZdel7 (Z; 158-245) はコントロールに比して 793 倍と著しい転写活性化を示した (図 12)。

2. c-Fos タンパクの転写活性化領域

Gal4 タンパク DNA 結合領域の C 末端に c-Fos タンパクの DNA 結合領域を含む C 末端 256 アミノ酸を組み込んだ融合タンパク GalFosdel1 (Fos; 125-380) はコントロールに比して 93 倍の転写活性化を示した。同様にして c-Fos タンパクの C 末端 217 アミノ酸を欠失した変異体を Gal4 タンパクの DNA 結合領域の C 末端に組み込んだ GalFosdel2 (Fos; 2-163) は有意な転写活性化を示さなかったが c-Fos タンパクの C 末端 270 アミノ酸を欠失した変異体を組み込んだ GalFosdel3 (Fos; 2-110) は 696 倍と著しく転写を促進した。さらに C 末端のアミノ酸を 25 個削除し、合計 295 アミノ酸を欠失した GalFosdel4 (Fos; 2-85) も 551 倍と著しい転写活性化を示した。一方、Z と c-Fos の融合タンパク ZFos を Gal4 DNA 結合領域に融合させた GalZFos もコントロールに比して有意に転写活性化を示した (図 13)。

考 察

EBV の BZLF1 遺伝子がコードする Z タンパクは、EBV 潜伏感染細胞を TPA、ホーホルエステル、イオノフォア、ヨードデオキシウリジン、抗ヒト免疫グロブリン抗体などで処理した際に新たなタンパク合成を必要とせずその mRNA 合成が起こるウイルス初期抗原の一つであり、それに引き続いてウイルス早期、後期遺伝子の発現が起こる¹⁰⁻¹²。また、BZLF1 遺伝子のみを EBV 潜伏感染細胞に発現させることによりウイルス複製サイクルが開始されることから BZLF1 遺伝子発現がウイルス複製サイクル誘導の引金となっている^{9,12,13}。

一方、Z タンパクのアミノ酸配列は、細胞内転写調節因子である AP-1 ファミリー、とりわけ c-fos 遺伝子がコードする c-Fos タンパクとそのアミノ酸配列において高い相同性を有する^{15,16}。c-Fos タンパクは細胞転写因子 c-Jun タンパクと異種二量体を形成し DNA に結合する。一般に細胞内転写因子は同種もし

くは異種二量体を形成して DNA に結合するが、二量体形成は 7 アミノ酸ごとにロイシンもしくは他の疎水性アミノ酸が繰り返して配列するロイシンジッパーと呼ばれる構造を介して起こる²²⁻²⁶。また DNA 結合領域は塩基性アミノ酸に富み、Z タンパクおよび AP-1 ファミリー間でそのアミノ酸配列が特によく保存されている。Z タンパクは 245 アミノ酸から構成されており N 末端 178 番目から 196 番目の間に c-Fos タンパクと非常に相同性の高い DNA 結合領域を持つが、典型的なロイシンジッパー構造を持たない。今回の実験において Z タンパクは典型的なロイシンジッパー構造を有しないにもかかわらず、DNA 結合、非結合いずれの状態においても安定な同種二量体として存在することが明らかとなった。このことは Lieberman ら¹⁷⁻¹⁹、および Chang ら²⁰が Z タンパクと他のタンパクとの融合タンパクを用いて行った結果とよく一致する。Z タンパクの C 末端 65 アミノ酸を欠失した変異体は BMRF1 プロモーターからの転写活性化能を喪失したがこれは DNA 結合能を失ったためであった (未発表)。Chang らは c-Fos タンパクの 1-161 アミノ酸と Z タンパクの 197-245 アミノ酸を融合させた FosZ 融合タンパクが二量体を形成して TPA 応答配列に結合することから、Z タンパクの DNA 結合領域から C 末端が二量体形成に必須であると報告している²⁰が、このことは本結果と矛盾しない。c-Fos タンパクは単独では BMRF1 プロモーターからの転写をまったく活性化しなかったが、c-Jun タンパクではわずかに活性化が検出された。しかしこれは、細胞内因性の c-Fos タンパクまたは c-Fos 関連タンパクとの協調作用と考えられた^{30,31}。一方、c-Fos タンパクの DNA 結合領域より C 末端側 (ロイシンジッパー構造を構成する部分) と Z タンパクの DNA 結合領域から N 末端側を融合させた ZFos 融合タンパクは、c-Fos タンパクと異なり単独でも弱く DNA に結合し、さらに c-Jun タンパクと異種二量体を形成することにより、c-Jun c-Fos タンパク異種二量体と同程度の親和性で TPA 応答配列に結合した。また Z 応答配列に Z タンパクは結合可能で c-Jun c-Fos タンパク異種二量体は結合しなかったが、この Z 応答配列に ZFos タンパクは c-Jun タンパクと異種二量体を形成することにより低親和性ではあるが結合可能であった。このことから、c-Jun c-Fos タンパク異種二量体の DNA への結合に際して、c-Fos タンパクの DNA 結合領域の特異性が c-Jun c-Fos タンパク異種二量体の DNA 結合性に影響を与えていることを強く示唆している。本結果は、Nakabeppu らの c-Jun c-Fos タンパク異種二量体の

DNA 結合性は c-Jun タンパクの DNA 結合領域と同程度に c-Fos タンパクの DNA 結合領域により規定されるという実験結果をより明確にした³⁹⁻³⁹。また ZFos タンパクは単独で BMRF1 プロモーターからの転写を活性化したが、ゲルシフトアッセイの結果からも細胞内因性の c-Jun タンパクまたはその関連タンパクと相互作用をしていると考えられる一方、c-Fos タンパクは同じ条件下で単独では転写活性化能を示さないことから、ZFos タンパクが c-Jun またはその関連タンパクとは異なる細胞内因子と相互作用している可能性も否定できない。

Kakidani らは Gal4 タンパクの DNA 結合領域とヘルペスウイルスの転写因子 VP-16 との融合タンパクを用いて VP-16 の転写活性化能についての検索を行っている³⁹⁻⁴¹。今回、本研究でも Gal4 タンパクの DNA 結合領域との融合タンパクを用いて転写活性化領域を検索した結果、Gal4 タンパク DNA 結合領域に完全長の Z タンパク、198番目以降、178番目以後を欠失した Z タンパクを融合した GalZ、GalZdel1、GalZdel2 はいずれも転写活性化能を示さなかったが、134番目以後を欠失した GalZdel3 が、初めて高い活性化能を示した。しかし、111番目以後を欠失した GalZdel4 では再び活性化能を喪失した。一方、Z タンパクと c-Fos タンパクのアミノ酸配列を図 1 のごとく対応させた場合に GalZdel1 に対応する Gal4 と c-Fos との融合タンパク GalFosdel2 は GalZdel1 同様転写活性化能を示さなかったが、GalZdel4 に対応する GalFosdel3 および、さらに C 末端側 25 アミノ酸を欠失した GalFosdel4 では高い転写活性化能が認められた。同様に今度は Z タンパクの N 末端 65 アミノ酸、133 アミノ酸を欠失した融合タンパクでは GalZ 同様に転写活性化能を示さず 157 アミノ酸を欠失した GalZdel7 で初めて著しい転写活性化能を示した。c-Fos タンパクの N 末端のアミノ酸を Z タンパクの 157 アミノ酸に対応するように削除した融合タンパク GalFosdel1 はやはり著しい転写活性化を示した。以上 245 アミノ酸からなる Z タンパクは、その N 末端 133 アミノ酸および N 末端から 158 番目以降の 88 アミノ酸に転写活性化領域が存在し、一方 380 アミノ酸からなる c-Fos タンパクでは N 末端 85 アミノ酸および N 末端から 125 番目以降の 256 アミノ酸に転写活性化領域が存在することが示唆された。このように Z タンパクおよび c-Fos タンパクは非常によく対応する部分に転写活性化領域が同定された。また、Z タンパクの 134-157 アミノ酸を含む融合タンパクはいずれも転写活性化能を示さず、この領域が転写誘導に対し抑制的に作用す

ることを示唆している。一方 c-Fos タンパクは Gal4 タンパク DNA 結合領域に融合させた場合に、1-110 アミノ酸が転写活性化能を持ち 1-163 アミノ酸では転写活性化能を喪失すること、さらに、125-380 アミノ酸は転写活性化を持つことから 111-125 アミノ酸領域に転写誘導に対し抑制的に作用する領域が存在することが示唆された。Z タンパクおよび c-Fos タンパクのこれらの領域は DNA 結合領域付近の N 末端側にあり、やはりほぼ対応する領域に存在していると考えられる。

一般に活性化領域は酸性アミノ酸に富むとされる⁴²⁻⁴⁴。Kim らは酵母の転写因子 HAP1 について DNA 結合領域の塩基性アミノ酸は活性化領域の酸性アミノ酸に対して影響を及ぼすが DNA に結合することによりこの影響を受けなくなり、活性化領域がその機能を発揮すると報告している⁴⁶⁻⁴⁷。本研究では Z タンパクおよび c-Fos タンパクの DNA 結合領域のすぐ N 末端側に転写を抑制している領域が存在することが示唆されたが、この領域は DNA と非結合状態では転写因子の活性化領域を不活性化しており DNA 結合領域が特異的 DNA 配列を認識して結合することによりこの抑制領域が不活性化され転写活性化を示すと推測される。Z タンパクの DNA 結合領域より C 末端側の活性化領域の正確な存在部位の同定および Z タンパクの負の転写調節領域の性質について今後さらに検討する必要がある。

結 論

アミノ酸配列に高い相同性を持つ EBV BZLF1 遺伝子産物 Z タンパクおよび c-fos 遺伝子産物 c-Fos タンパクについて以下の結論を得た。

1. Z タンパクは二量体を形成して TPA 応答配列および Z 応答配列に結合し転写活性化能を示す。
2. Z タンパクは明確なロイシンジッパー構造を持たないが DNA 結合領域の C 末端側の領域が二量体形成に必須である。
3. Z タンパクの転写活性化領域は N 末端 133 アミノ酸および C 末端 88 アミノ酸内に存在し、c-Fos タンパクの転写活性化領域は N 末端 85 アミノ酸および C 末端 255 アミノ酸内に存在する。
4. Z タンパクおよび c-Fos タンパクの DNA 結合領域の N 末端側に隣接する領域は転写活性化を負に調節する領域と推測される。

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 仍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、がん研究所病態生理部山本健一教授、耳鼻咽喉科学講師滝元 徹博士に感謝いたします。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。

文 献

- 1) Epstein, M. A., Achong, B. G. & Barr, Y. M.: Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *Lancet*, **1**, 702-703 (1964).
- 2) 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).
- 3) 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).
- 4) Pope, J. H., Horne, M. K. & Scott, W.: Transformation of fetal human leukocytes in vitro in filtrates of a human leukemic cell line containing herpes-like virus. *Int. J. Cancer*, **3**, 857-866 (1968).
- 5) Shope, T., Dechairo, D. & Miller, G.: Malignant lymphoma in cotton-top marmosets after inoculation with Epstein-Barr virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **70**, 2487-2491 (1973).
- 6) zur Hausen, H., O'Neal, F. J. & Freese, U. K.: Persisting oncogenic herpesvirus induced by the tumour promoter TPA. *Nature*, **272**, 373-375 (1978).
- 7) 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).
- 8) Hinuma, Y., Kohn, M., Yamaguchi, J., Wudarski, D. J., Blakeslee, J. R. & Grace, J. T. Jr.: Immunofluorescence and herpes-type virus particles in the P3HR-1 Burkitt's lymphoma cell line. *J. Virol.*, **1**, 1045-1051, (1967).
- 9) 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).
- 10) 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).
- 11) 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).
- 12) Takada, K. & Ono, Y.: Synchronous and sequential activation of latently infected Epstein-Barr virus genomes. *J. Virol.*, **63**, 445-449 (1989).
- 13) 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.*, **62**, 2274-2284 (1988).
- 14) 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).
- 15) 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).
- 16) 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).
- 17) Flemington, E. & Speck, S. H.: Autoregulation of Epstein-Barr virus putative lytic switch gene BZLF1. *J. Virol.*, **64**, 1227-1232 (1990).
- 18) Lieberman, 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.*, **64**, 1143-1155 (1990).
- 19) 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).
- 20) 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).

21) **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).

22) **Curran, T. & Franza, B. R.**: Fos and Jun: the AP-1 connection. *Cell*, **55**, 395-397 (1988).

23) **Vinson, C. R., Sigler, P. B. & Mcknight, S. L.**: Scissors-Grip model for DNA recognition by a family of leucine zipper protein. *Science*, **246**, 911-916 (1989).

24) **Rauscher, F. J., Cohen, D. R., Curran, T., Vokt, P. K. & Franza, B. R.**: Fos-associated protein p39 is the product of the Jun proto-oncogene. *Science*, **240**, 1010-1016 (1988).

25) **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).

26) **Kouzarides, T. & Ziff, E.**: The role of leucine zipper in the Fos-Jun interaction. *Nature*, **336**, 646-651 (1988).

27) **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).

28) **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).

29) **O'Shea, E. K., Rutkowski, R. & Kim, P. S.**: Evidence that the leucine zipper is a coiled coil. *Science*, **243**, 538-542 (1989).

30) **Perkins, K. K., Admon, A., Patel, N. & Tjian, R.**: The drosophila Fos-related AP-1 protein is a developmentally regulated transcription factor. *Genes & Dev.*, **4**, 822-834 (1990).

31) **Nisina, H., Sato, H., Suzuki, T., Sato, M. & Iba, H.**: Isolation and characterization of fra-2, an additional member of the fos gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 3619-3623 (1990).

32) **Corran, T. & Cohen, D. R.**: Analysis of dimerization and DNA binding functions in Fos and Jun by domain-swapping: involvement of residues outside the leucine zipper/basic region. *Oncogene*, **5**, 929-937 (1990).

33) **Neuberg, M., Schuermann, M., Hunter, J. B. & Müller, R.**: Two functionally different regions in Fos are required for the sequence-specific DNA interaction of the Fos/ Jun protein complex. *Nature*, **338**, 589-599 (1989).

34) **Abate, C., Patel, L., Rauscher III, F. J. & Curran, T.**: Redox regulation of Fos and Jun DNA-binding activity in vitro. *Science*, **249**, 1157-1161 (1990).

35) **Vingron, M., Nordheim, A. & Müller, R.**: Anatomy of Fos protein. *Oncogene Res.*, **3**, 1-7 (1988).

36) **Abate, C., Luk, D., Gagne, E., Roeder, R. G. & Curran, T.**: Fos and Jun cooperate in transcriptional regulation via heterologous activation domains. *Mol. Cell. Biol.*, **10**, 5532-5535 (1990).

37) **Nakabeppu, Y., Ryder, K. & Nathans, D.**: The DNA-binding activities of three murine Jun proteins: stimulation by Fos. *Cell*, **55**, 907-915 (1988).

38) **Nakabeppu, Y. & Nathans, D.**: The basic region of Fos mediates specific DNA binding. *EMBO J.*, **8**, 3833-3841 (1989).

39) **Ma, J. & Ptashne, M.**: Deletion analysis of GAL4 defines two transcriptional activating segments. *Cell*, **48**, 847-853 (1987).

40) **Kakidani, H. & Ptashne, M.**: GAL4 activates gene expression in mammalian cells. *Cell*, **52**, 161-167 (1988).

41) **Sadowski, H., Ma, J., Triezenberg, S. & Ptashne, M.**: GAL4-VP16 is an unusually potent transcriptional activator. *Nature*, **335**, 563-564 (1988).

42) **Ptashne, M. & Gann, A. A. F.**: Activators and Targets. *Nature*, **346**, 329-331 (1990).

43) **Urier, G., Buisson, M. & Sergeant, A.**: The Epstein-Barr virus early protein EB1 activates transcription from different responsive elements including AP-1 binding sites. *EMBO J.*, **8**, 1447-1453 (1989).

- 44) Ranson, L. J., Visvader, J., Wamsley, P. & Verma, I. M.: Trans-dominant negative mutants of Fos and Jun. *Pros. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 3806-3810 (1990).
- 45) Jackson, S. P., MacDonald, J. J., Lees-Miller, S. & Tjian, R.: GC box binding induces phosphorylation of Sp1 by a DNA-dependent protein kinase. *Cell*, **63**, 155-165 (1990).
- 46) Kim, K. W. & Guarente, L.: Mutation that alter transcriptional activation but not DNA binding in the zinc finger of yeast activator HAP1. *Nature*, **342**, 200-203 (1989).
- 47) O'Sea, 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).

Structural and Functional Analysis of Epstein-Barr Virus (EBV) BZLF1 Gene and Transcriptional Regulatory Gene c-fos Tomokazu Yoshizaki, Department of Oto-Rhino-Laryngology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920 - J. Juzen Med. Soc., **100**, 85 - 99 (1991)

Key words EBV, BZLF1, c-fos, leucine zipper, activation domain

Abstract

BZLF1, one of Epstein-Barr virus immediate early genes, encodes Z protein which has an amino acid sequence homologous to the cellular transcription factors of the AP-1 family, particularly to c-Fos protein. However, Z protein does not have a leucine zipper structure which is typical for the AP-1 family. To study the structure and function of Z protein as a transcriptional factor, the DNA binding and transactivation abilities of Z protein and its mutants were examined. Also, the region of Z and c-Fos proteins, involved in the transactivation, was identified by constructing a fusion protein with the DNA binding domain of yeast transcription factor Gal4. Z protein bound to the TPA responsive element (TRE) and Z responsive element (ZRE) as a homodimer. Deletion of aminoterminal 65 amino acids or carboxyterminal 47 amino acids, from Z protein resulted in a loss of DNA binding and transactivation abilities. ZFos fusion protein, in which Z protein deleted carboxyterminal 47 amino acids, was fused with carboxyterminal 217 amino acids of c-Fos protein, bound to TRE weakly by itself and strongly by forming heterodimer with c-Jun, thereby recovering its transactivability. c-Jun/ZFos heterodimer bound to ZRE, to which Z protein but not c-Jun/c-Fos heterodimer specifically bound. These results indicate that the DNA binding domain of c-Fos, contributes the specific DNA binding properties of c-Jun/c-Fos heterodimer. The activation domains of Z protein were identified in aminoterminal 133 amino acids and in carboxyterminal 88 amino acids. c-Fos protein, activation domains were also identified in comparable regions of Z protein. Moreover, the regions close to the aminoterminal side of the DNA binding domains of Z and c-Fos proteins may negatively regulate the transactivation ability.