



|              |                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title        | KSHV RTA induces a transcriptional repressor, HEY1 that represses rta promoter                                                                                                                                                                                                      |
| Author(s)    | 矢田, 佳織                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| Citation     | 大阪大学, 2009, 博士論文                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| Version Type |                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/49931">https://hdl.handle.net/11094/49931</a>                                                                                                                                                                                                 |
| rights       |                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| Note         | 著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"&gt;https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> >大阪大学の博士論文について <a>&lt;/a&gt;</a> をご参照ください。 |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

|               |                                                                                                                                             |
|---------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏 名           | 矢 田 佳 織                                                                                                                                     |
| 博士の専攻分野の名称    | 博 士 (医 学)                                                                                                                                   |
| 学 位 記 番 号     | 第 2 2 7 3 8 号                                                                                                                               |
| 学 位 授 与 年 月 日 | 平成 21 年 3 月 24 日                                                                                                                            |
| 学 位 授 与 の 要 件 | 学位規則第 4 条第 1 項該当<br>医学系研究科予防環境医学専攻                                                                                                          |
| 学 位 論 文 名     | KSHV RTA induces a transcriptional repressor, HEY1 that represses <i>rta</i> promoter<br>(KSHV RTAは <i>rta</i> プロモーターを抑制する転写抑制因子、HEY1を誘導する) |
| 論 文 審 査 委 員   | (主査)<br>教 授 菊 谷 仁<br>(副査)<br>教 授 生 田 和 良 教 授 塩 田 達 雄                                                                                        |

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 〔 目 的 〕

カボジ肉腫関連ヘルペスウイルス (KSHV) は、カボジ肉腫 (KS) やprimary effusion lymphoma (PEL)、Multicentric Castleman's disease (MCD) の発症に深く関与するヘルペスウイルスとして発見された。一般にヘルペスウイルスの生活環は潜伏感染期とウイルス粒子産生期である溶解複製/再活性期に分類でき、ウイルス遺伝子の発現は厳密に制御されている。潜伏感染期では限られたウイルス遺伝子のみが発現し、ウイルスゲノムの維持や腫瘍形成に関与している。一方、溶解複製/再活性期はimmediate-early (IE), Early (E), Late (L) 期に分けられ、カスケード様に制御されたウイルス遺伝子発現の結果、娘ウイルスが産生される。TPA (12-O-Tetradecanoylphorbol 13-acetate) 刺激による潜伏感染期からのKSHVの溶解複製は、IE遺伝子産物であるRTA (Replication and Transactivation Activator) によって開始する。しかし、このウイルス再活性化に重要な転写因子であるRTAの発現は持続せず、何らかの機構によって制御されていることが考えられた。

申請者は、転写因子RTAの標的遺伝子の検索から、転写抑制因子*hey1*を発見し、さらに、*rta*自身の発現調節への関与を検討した。

### 〔 方法並びに成績 〕

ヒト胎児腎由来293細胞を用いてRTA発現誘導細胞株 (293pIND/RTA) を作成し、RTA発現時に誘導される宿主因子をDNAマイクロアレイによって検索した。RTA発現細胞で、*hey1*, *chemokine receptor 4* (*CXCR4*), *neurofilament light polypeptide*等の発現上昇が認められた。これらのうち、*hey1*, *CXCR4*と*rta*それぞれのmRNAの発現変化を確かめた。293pIND/RTAとKSHV感染細胞であるBC3にRTA発現を誘導し、定量性RT-PCR

にて*hey1*と*CXCR4*の発現を調べたところ、*rta* mRNA発現後に*hey1*と*CXCR4*の発現が確認できた。免疫染色を用いて検討したところ、RTA発現後にHEY1の発現が観察され、RTA非発現細胞ではHEY1の発現が観察されなかった。このことから、HEY1はRTAによって発現が誘導されていることが示唆された。HEY (Hairy/enhancer of split-related protein) family はbHLHドメインを有する転写抑制因子であり、Notchレセプター下で発現誘導されたのち標的遺伝子の発現を抑制することが知られている。このことからRTAとHEY1が互いに発現調節を行っていることが考えられたため、RTAとHEY1との関係を解析した。

溶解感染時にRTAはRBP-JκとOct-1と会合することによってウイルス遺伝子や宿主因子の発現を誘導することが報告されている。HEY1の発現にはNotch intra-cellular domain (Notch ICD) が*hey1*プロモーター上のRBP-Jκに結合し、それによってHEY1の発現が誘導されることが報告されている。*hey1*プロモーターには2か所のRBP-Jκと1か所のOct-1結合部位が存在しているため、ルシフェラーゼレポーターアッセイを用いてRTAによる*hey1*プロモーター (pHEY1) 活性を解析した。BC3, COS7, NIH3T3細胞にpHEY1、コントロールプロモーター、RTAを共発現させたところ、*hey1*プロモーターは、RTA発現時にどの細胞系を用いた条件下でも活性化されていることが明らかとなった。

次に、HEY1によるRTA発現調節をレポーターアッセイにて解析した。*rta*プロモーターを一定間隔で削除した変異プロモーターを作成しその活性を調べたところ、HEY1発現下で*rta*プロモーター活性が抑制され、さらに-238bpから-163bp領域でHEY1による*rta*プロモーターへの抑制機構が存在することが示された。この領域を40bp程度の3つの領域 (RE1, 2, 3) に分けHEY1による抑制効果を調べたところ、RE3領域で*rta*プロモーターへの高い抑制機構が存在することが示された。

HEY1はbHLHドメインを有することから、*rta*プロモーターに直接結合することによってRTA発現を調節していることが予測されたため、ゲルシフトアッセイを行ったがHEY1が直接*rta*プロモーターに結合するという結果は得られなかった。一方で、クロマチン免疫沈降法より、HEY1が何らかの複合体を介してRE3領域に会合していることが示された。

### 〔 総括 〕

これらの結果よりRTAによってHEY1の発現が誘導される。発現したHEY1は、転写抑制複合体を形成してネガティブフィードバック効果を*rta*プロモーターにもたらすことが示唆された。KSHVの初感染では、ウイルスの溶解複製は進行せず、潜伏感染を引き起こす。このとき、溶解複製を誘導するRTAは、HEY1を利用することによって自己の発現を抑制し、潜伏感染を誘導し、さらには、潜伏感染を保持することに寄与していると考えられる。

## 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

カボジ肉腫やprimary effusion lymphoma (PEL)に関与するカボジ肉腫関連ヘルペスウイルス (KSHV) の転写因子RTAは、ウイルス再活性化時に発現しウイルス遺伝子の発現とウイルス複製に必要な因子である。しかしRTAと宿主因子との関連はほとんど明らかとされていいため、RTAによって発現が誘導される宿主因子を探索した。その結果、転写抑制因子であるHEY1の発現上昇が認められた。*Hey1*プロモーターの活性化を調べたところ、RTAは*Hey1*プロモーターの活性化を誘導する一方で、発現を促

したHEY1によって $rt\alpha$ のプロモーター活性が抑制されることが明らかとなった。これらの結果から、RTAの誘導する宿主因子HEY1はRTAを抑制することでウイルス産生に対して負の制御効果をもたらす、このことがKSHV腫瘍形成期である潜伏感染期の成立に貢献していることが考えられる。潜伏感染期の成立と細胞溶解複製期におけるウイルスと宿主因子との関係を明らかにすることはKSHVによる腫瘍形成の解明の一端に関与することであり、学位の授与に値すると考えられる。