

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	https://hdl.handle.net/11094/49931
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"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

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 22738 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 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 (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) 教授 菊谷 仁 (副査) 教授 生田 和良 教授 塩田 達雄

論文内容の要旨

〔 目的 〕

カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス (KSHV) は、カポジ肉腫 (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 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 HEY との関係を解析した。

溶解感染時に RTA は RBP-J κ や 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-J κ 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-J κ 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

カポジ肉腫や primary effusion lymphoma (PEL) に関与するカポ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*rtA*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。