

氏名(本籍) 清 水 則 夫
学位の種類 医学博士
学位記番号 医 第 2137 号
学位授与年月日 平成元年9月27日
学位授与の要件 学位規則第5条第2項該当
最終学歴 昭和56年3月
北里大学衛生学部産業衛生学科卒業

学位論文題目 Three Epstein-Barr virus (EBV)-determined
nuclear antigens induced by the BamHI E
region of EBV DNA
(Epstein-Barrウイルス(EBV) DNA BamHI E
領域により誘導される3種類のEBV特異核内抗
原について)

(主査)
論文審査委員 教授 菅村和夫 教授 岩崎祐三
教授 帯刀益夫

論文内容要旨

Epstein-Barr virus (EBV) は、1964年に、EpsteinとBarrらによりバーキットリンパ腫由来培養細胞中に発見されたヘルペスウイルス科に属するウイルスである。成人に達するまでに世界中の大部分のヒトがEBVの感染をうけ、ウイルスは終生潜伏感染状態となる。EBVの初感染に際しては伝染性単核症を発症することがある。腫瘍細胞におけるウイルスゲノムの存在や血清疫学的研究結果から、アフリカやニューギニアに発生するバーキットリンパ腫および中国南部に多発する上咽頭癌の発症に、EBVが密接に関与していると考えられている。EBVを*in vitro*でヒトのBリンパ球に感染させると、細胞はトランスフォーム（無限増殖化）し、ウイルスは持続感染状態となる。トランスフォーム細胞およびバーキットリンパ腫、上咽頭癌の腫瘍細胞中には、例外なくEBV特異核内抗原（EBNA）が発現していることから、EBNAはEBVによるトランスフォーメーション、発がん、およびウイルスの持続感染に重要な働きをしていると考えられている。EBNAは単一の抗原ではなく、複数の抗原からなる事が明かとなっており、EBNAのコンポーネントとして現在までにEBV DNA BamHI K断片にコードされるEBNA-1、BamHI WYH領域にコードされるEBNA-2が知られている。本研究では、DNAトランスフェクションにより*in vitro*でのEBV DNAの発現系を確立し、新たなEBV関連抗原の検出を試みた。はじめにEBV DNAの発現系を確立するために、mRNA転写のプロモーター、エンハンサーとして働くことが知られているレトロウイルス（トリの骨髄球症ウイルス）由来のLTR配列を組み込んだ発現ベクターpLTRを構築した。このベクターにEBV DNA BamHI K断片を挿入したクローンpLTR-BamHI Kを分離し、ハムスター由来BHK細胞にリン酸カルシウム共沈法によりトランスフェクトしたところ、20-30%の細胞核にEBNA-1が蛍光抗体間接法により検出された。一方、コントロールとしてBamHI K断片をpBR322ベクターに挿入したクローンpBR-BamHI Kをトランスフェクトした細胞からは1%以下の頻度でしかEBNA-1が検出されず、発現ベクターpLTRの有用性が明らかとなった。この発見ベクターpLTRに、各種EBV DNA BamHI断片を挿入した一連のクローンを分離した。それぞれのクローンをBHK細胞にトランスフェクトし、新たなEBV関連抗原の検出を行なったところ、BamHI E断片を挿入したクローンpLTR-BamHI EをトランスフェクトしたBHK細胞の核に、血清学的にEBNAに分類される抗原が蛍光抗体間接法により検出された。この抗原についてさらに詳細に検討するために、BamHI E断片中のオープンリーディングフレームBERF 1、BERF 2b、BERF 4を含む領域をそれぞれpLTRに挿入した。得られたDNAクローン（pLTR-BERF 1、pLTR-BERF 2 b pLTR-BERF 4）をそれぞれBHK細胞にトランスフェクトしたところ、pLTR-BERF 2 bをトランスフェクトした細胞の核にpLTR-

BamHI Eをトランスフェクトしたときに誘導される抗原と同一の抗原性をもつ抗原が誘導された。さらにpLTR-BERF 1, pLTR-BERF 4をトランスフェクトした細胞の核にもpLTR-BamHI Eにより誘導される抗原とは抗原性が異なるがやはり血清学的にEBNAに分類される抗原が誘導された。BERF 2 bにコードされる抗原はイムノブロットングによる解析の結果, 145キロダルトン (145kD) の分子量をもつ物質だった。いっぽう, B95-8株EBV感染細胞の核中に発現するEBNAをイムノブロット法により解析した結果, EBNA 1, EBNA 2のほかに136kD, 142kDそして147kDの3種類のEBNA抗体陽性血清と特異的に反応する抗原が検出された。147kDの抗原は, BEERF 2 bにコードされる145kDの抗原とイムノブロットングにおける血清との反応性が同じだった。また, 蛍光抗体間接法による血清学的解析の結果, 136kDの抗原がBERF 1に, 142kDの抗原がBERF 4にそれぞれコードされる抗原と同じ抗原性を持つことが明らかとなった。以上の結果より, B95-8株EBV感染細胞核中には, EBNA 1, EBNA 2以外に136kD, 142kDそして147kDの分子量を持ち血清学的にEBNAに分類される抗原が発現していることが明らかとなり, それらがそれぞれオープンリーディングフレームBERF 1, BERF 2 b, BERF 4にコードされている事が示唆された。本研究により, pLTRベクターを用いたEBV DNAのin vitroでの発現系が確立され, EBV DNAにコードされる種々の抗原の同定およびそれらの機能を解析するうえで有用である。また, 新たに3種類のEBNAのコンポーネントとそのコーディングフレームを同定したことは, EBNAが細胞のトランスフォーメーションや発がんにはたす役割を理解するうえで重要な知見であると思われる。

審査結果の要旨

本論文は、ヒトのヘルペスウイルス科に属するEpstein-Barr virus (EBV) 遺伝子の培養細胞中での発現系の確立、および確立された系を用いた新たなEBV関連核内抗原 (EBNA) の構成分子の同定に関する論文である。

EBVは世界中のヒトに広く伝播しているウイルスで、初感染時に一部のヒトは伝染性単核症を発症する。感染後ウイルスは潜伏感染状態となり、感染者はウイルスを生産保持し続ける。EBVをin vitroでヒトのBリンパ球に感染させると細胞はトランスフォーム (不死化) し、ウイルス遺伝子は持続感染状態となる。またEBVは、バーキットリンパ腫、上咽頭がんの発症に密接に関係していると考えられている。従ってEBVの研究は、ウイルス発がんおよびヘルペスウイルス科の特徴である潜伏感染機構の解明のために重要である。本論文では特に以下の2つの課題を中心にEBVの研究を行っている。1. EBVにはin vitroでの有効なウイルス産生系が無いため、ウイルス変異株を分離することが難しい。従ってEBVにコードされる個々の抗原の同定やその機能を研究するために、EBV DNA断片を培養細胞中で効率良く発現させる系の開発を行う。2. バーキットリンパ腫、上咽頭がんの腫瘍細胞およびEBVトランスフォーム細胞中で共通に発現している抗原はEBNAだけであり、EBVの潜伏感染や発がんへの関与が示唆されている。上記実験系を用いてEBNAの解析を行う。

これらの研究成果として、1. EBV DNA断片の培養細胞中での発現系が確立された。レトロウイルス由来のLTR配列を組み込んだpLTRベクターを発現ベクターに用い、ハムスター由来BHK細胞にリン酸カルシウム法でトランスフェクトすることにより、非常に効率よくEBV遺伝子を発現させることが可能となった。2. この方法によりEBV DNA BamHI断片中にコードされる抗原を解析したところ、BamHIE断片中のオープンリーディングフレームBERF 1, BERF 2, BERF 4がいずれも血清学的にEBNAに分類される抗原をコードしていることが明らかとなった。3. B95-8株EBV感染細胞の核抽出物中に、従来より知られていたEBNA-1 (78キロダルトン; KD), EBNA-2 (82KD) のほかに、それぞれ136KD, 142KD, 147KDの分子量の3種類のEBNAが検出された。血清学的解析の結果、136KDの抗原がBERF 1に142KDの抗原がBERF 4に147KDの抗原がBERF-2にそれぞれコードされることが示唆された。以上の点が明らかにされた。

EBV遺伝子の培養細胞中での発現系を確立したことは、EBV研究全体に大きく寄与すると考えられる。またEBVによる発がん、EBVの潜伏感染に重要な働きをしていると考えられているEBNAの新しい構成分子を発見し、そのコード領域を同定したことは、EBNAの機能解明のために重要な発見である。従って、本論文は博士号授与に値する研究とみなす。