

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K07511

研究課題名（和文）単純ヘルペスウイルス遺伝子発現移行と再活性化機構の解析

研究課題名（英文）Analysis of the Gene Expression and Reactivation Mechanisms in Herpes Simplex Virus

研究代表者

丸鶴 雄平（Maruzuru, Yuhei）

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：50825750

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：単純ヘルペスウイルス(HSV)は宿主細胞に侵入後、前初期遺伝子、初期遺伝子、後期遺伝子という3つの遺伝子群をカスケード状に発現するが、この遺伝子発現移行機構に関しては不明な点が多い。申請者が過去に実施したHSV感染細胞の1細胞シーケンス解析により、特定の細胞内金属イオンがHSVの遺伝子発現移行に関与することが示唆されていた為、本研究はこの細胞内金属イオンのHSV遺伝子発現、及び再活性化における役割の解明を試みた。その結果、当該金属イオンはHSVがコードする遺伝子発現活性化因子の機能制御を介して、HSVの遺伝子発現移行に寄与する事が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

申請者の研究対象である単純ヘルペスウイルス(HSV)は代表的なDNAウイルスであり、ヒトに脳炎、性器ヘルペス、皮膚疾患、眼疾患など、多様な病態を引き起こす。アシクロビルが開発された今日においても、脳炎患者の70%は社会復帰できないか死亡する。本研究では特定の細胞内金属イオンがウイルス転写因子の機能を活性化することにより、HSV遺伝子発現移行に寄与することを明らかにした。従って、本研究成果はこの遺伝子発現機構をターゲットとした新たなHSV感染症の治療法の確立に繋がる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Herpes simplex virus (HSV) has more than 100 different genes, which can be categorized into three major classes-immediate early, early, and late-whose expressions are regulated coordinately and ordered sequentially in a cascade fashion. However, much remains unclear regarding the mechanisms underlying this gene expression cascade. Our previous single-cell sequencing analyses of HSV-infected cells suggested that specific intracellular metal ions are involved in the regulated viral gene expression. Therefore, this study aimed to elucidate the role of these metal ions in HSV gene expression and reactivation. The results obtained in this study indicated that these ions contribute to regulated HSV gene expression by controlling the function of a viral transcription factor.

研究分野：ウイルス学

キーワード：HSV-1

## 1. 研究開始当初の背景

申請者の研究対象である単純ヘルペスウイルス(HSV)は代表的な DNA ウイルスであり、ヒトに脳炎、性器ヘルペス、皮膚疾患、眼疾患など、多様な病態を引き起こす。アシクロビルが開発された今日においても、脳炎患者の 70%は社会復帰できないか死亡する。また、HSVの特徴は、一度感染するとヒトの神経に潜伏し、再活性化を繰り返す事によって終生に渡りヒトに疾患を引き起こす事である。HSV は宿主細胞に侵入後核内で、前初期遺伝子、初期遺伝子、後期遺伝子という 3 種の遺伝子群をカスケード状に発現する。前初期遺伝子の発現は HSV のウイルス粒子中に含まれる VP16 が前初期遺伝子群のプロモーターに結合し、活性化することによって引き起こされる。その一方で、前初期遺伝子から初期遺伝子以降の発現への移行機構については不明な点が多い。

HSV を培養細胞に高 MOI で感染させ、固定後、間接蛍光抗体法によって前初期遺伝子産物と後期遺伝子産物を共染色すると、それぞれの感染細胞における HSV の遺伝子発現カスケードの移行が不均一であることが明確であった。これらの知見から、感染細胞によって遺伝子発現カスケードの移行の状態に“バラつき”が生じていることが考えられた。そこで申請者らは HSV 感染細胞の 1 細胞トランスクリプトーム解析を実施した結果、HSV 遺伝子発現移行に、宿主蛋白質である IBP の発現の多寡が関与することが示唆された。IBP は細胞内の特定の金属イオンと結合し、相互作用する様々な蛋白質の活性を制御する。これまでの申請者らの解析によって実際に、(1) IBP ノックアウト(KO)細胞において HSV の増殖が低下すること、(2) IBP-KO 細胞において HSV の前初期遺伝子の発現量は低下しないが、初期遺伝子以降の発現が低下すること、(3) IBP が HSV の初期遺伝子以降の発現に必要な不可欠な転写因子である VTF と結合すること、(4) IBP-KO 細胞において転写因子の HSV ゲノムへの結合量が減少すること、が明らかになっている。IBP は細胞内の特定の金属イオン濃度依存的に、結合するタンパク質の機能を調節する。従って、申請者らの予備的知見と過去の報告から IBP は VTF と結合し、VTF の HSV ゲノムへの結合能を制御することによって、前初期遺伝子から、初期、及び後期遺伝子に発現を移行させることが示唆される。また、これらの知見は細胞内の特定の金属イオンが IBP と結合し、その IBP が VTF と結合することによって HSV 遺伝子発現カスケードの移行に寄与することを示唆するが、本仮説はこれまでに検証されていない。

## 2. 研究の目的

上述の背景を鑑みて、本研究は HSV の遺伝子発現移行に対する当該細胞内金属イオンの役割を解明することにより、金属イオン - IBP - VTF を軸とした HSV 遺伝子発現制御機構及び再活性化機構を解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

- (1) 当該金属イオンの HSV の遺伝子発現に対する影響を解析する為に、細胞内金属イオンキレーター処理時の HSV の前初期、初期、及び後期遺伝子の mRNA とタンパク質の発現を qPCR と Western blotting によって解析する。
- (2) (i) において HSV の初期遺伝子以降の発現がキレーター処理によって減少した場合、そ

の条件におけるVTFのHSVゲノムへの結合量をChIP assayによって解析し、細胞内の当該金属イオン濃度低下によるHSV遺伝子発現の低下の原因を解明する。

- (3) IBPへの結合に必要なVTF内のアミノ酸領域を決定し、VTFとIBPの結合のHSV遺伝子発現における意義を明らかにする。

#### 4. 研究成果

- (1) HSVを感染させる2時間前、もしくは4時間後に細胞を当該金属イオンのキレーターで処理し、前初期、初期、後期遺伝子産物のmRNA量をRT-qPCR法によって比較した結果、キレーター処理により全ての遺伝子産物の発現の減少が認められたが、その減少倍率はいずれの処理時間においても前初期遺伝子と比較して初期、及び後期遺伝子で特に大きかった。
- (2) VTF発現細胞にHSV-1VTF欠損株を感染後、キレーター処理、もしくは未処理時におけるVTF抗体を用いたChIP-qPCRによりVTFのHSV-1ゲノムへの結合量を解析した結果、キレーター処理によってVTFのHSV-1ゲノムへの結合量が減弱した。
- (3) 精製IBP及びVTFを用いたpull-down assayにより、IBPへの結合に必要なVTF内のアミノ酸領域を決定した。更に、IBPへの結合に必要なVTF内のアミノ酸領域を欠失させた組換えHSV-1を作成し、その性状解析を行った結果、VTF内のIBPへの結合に必要なアミノ酸領域の欠失はHSV-1の初期、及び後期遺伝子の発現、及びVTFのウイルスゲノムへの結合量を低下させた。

以上の結果から、当該金属イオンはIBPと結合し、活性化したIBPはVTFと結合することによりHSV-1の初期遺伝子以降の発現に寄与することが示唆される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計14件（うち査読付論文 13件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Fukui Ayano, Maruzuru Yuhei, Ohno Shiho, Nobe Moeka, Iwata Shuji, Takeshima Kosuke, Koyanagi Naoto, Kato Akihisa, Kitazume Shinobu, Yamaguchi Yoshiki, Kawaguchi Yasushi	4. 巻 -
2. 論文標題 Dual impacts of a glycan shield on the envelope glycoprotein B of HSV-1: evasion from human antibodies <i>in vivo</i> and neurovirulence	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 mBio	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/mbio.00992-23	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nobe Moeka, Maruzuru Yuhei, Takeshima Kosuke, Koyanagi Naoto, Kato Akihisa, Kawaguchi Yasushi	4. 巻 68
2. 論文標題 MYBBP1A is required for efficient replication and gene expression of herpes simplex virus 1	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Microbiology and Immunology	6. 最初と最後の頁 148 ~ 154
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1348-0421.13120	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Maeda Fumio, Kato Akihisa, Takeshima Kosuke, Shibasaki Misato, Sato Ryota, Shibata Takuma, Miyake Kensuke, Kozuka-Hata Hiroko, Oyama Masaaki, Shimizu Eigo, Imoto Seiya, Miyano Satoru, Adachi Shungo, Natsume Tohru, Takeuchi Koh, Maruzuru Yuhei, Koyanagi Naoto, Jun Ariei, Yasushi Kawaguchi	4. 巻 96
2. 論文標題 Role of the Orphan Transporter SLC35E1 in the Nuclear Egress of Herpes Simplex Virus 1	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/jvi.00306-22	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takeshima Kosuke, Maruzuru Yuhei, Koyanagi Naoto, Kato Akihisa, Kawaguchi Yasushi	4. 巻 96
2. 論文標題 Redundant and Specific Roles of A-Type Lamins and Lamin B Receptor in Herpes Simplex Virus 1 Infection	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/jvi.01429-22	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fukui Ayano, Maruzuru Yuhei, Takeshima Kosuke, Koyanagi Naoto, Kato Akihisa, Kawaguchi Yasushi	4. 巻 67
2. 論文標題 Establishment of a system to quantify wild type herpes simplex virus-induced cell-cell fusion reveals a role of N glycosylation of HSV 1 envelope glycoprotein B in cell-cell fusion	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Microbiology and Immunology	6. 最初と最後の頁 114 ~ 119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1348-0421.13050	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Arii Jun, Takeshima Kosuke, Maruzuru Yuhei, Koyanagi Naoto, Nakayama Yoshitaka, Kato Akihisa, Mori Yasuko, Kawaguchi Yasushi	4. 巻 96
2. 論文標題 Role of the Arginine Cluster in the Disordered Domain of Herpes Simplex Virus 1 UL34 for the Recruitment of ESCRT-III for Viral Primary Envelopment	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 e01704-21
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JVI.01704-21	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 F. Maeda, A. Kato, K. Takeshima, M. Shibasaki, R. Sato, T. Shibata, K. Miyake, H. Kozuka-Hata, M. Oyama, E. Shimizu, S. Imoto, S. Miyano, S. Adachi, T. Natsume, K. Takeuchi, Y. Maruzuru, N. Koyanagi, J. Arii, Y. Kawaguchi	4. 巻 -
2. 論文標題 Role of the orphan transporter SLC35E1 in the nuclear egress of herpes simplex virus 1	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Maruzuru Yuhei, Koyanagi Naoto, Kato Akihisa, Kawaguchi Yasushi	4. 巻 95
2. 論文標題 Role of the DNA Binding Activity of Herpes Simplex Virus 1 VP22 in Evading AIM2-Dependent Inflammasome Activation Induced by the Virus	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JVI.02172-20	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Watanabe Mizuki, Arii Jun, Takeshima Kosuke, Fukui Ayano, Shimojima Masayuki, Kozuka-Hata Hiroko, Oyama Masaaki, Minamitani Takeharu, Yasui Teruhito, Kubota Yuji, Takekawa Mutsuhiro, Kosugi Isao, Maruzuru Yuhei, Koyanagi Naoto, Kato Akihisa, Mori Yasuko, Kawaguchi Yasushi	4. 巻 95
2. 論文標題 Prohibitin-1 Contributes to Cell-to-Cell Transmission of Herpes Simplex Virus 1 via the MAPK/ERK Signaling Pathway	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JVI.01413-20	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Arii Jun, Maeda Fumio, Maruzuru Yuhei, Koyanagi Naoto, Kato Akihisa, Mori Yasuko, Kawaguchi Yasushi	4. 巻 10
2. 論文標題 ESCRT-III controls nuclear envelope deformation induced by progerin	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-75852-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Arii Jun, Fukui Ayano, Shimanaka Yuta, Kono Nozomu, Arai Hiroyuki, Maruzuru Yuhei, Koyanagi Naoto, Kato Akihisa, Mori Yasuko, Kawaguchi Yasushi	4. 巻 94
2. 論文標題 Role of Phosphatidylethanolamine Biosynthesis in Herpes Simplex Virus 1-Infected Cells in Progeny Virus Morphogenesis in the Cytoplasm and in Viral Pathogenicity In Vivo	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JVI.01572-20	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kato Akihisa, Adachi Shungo, Kawano Shuichi, Takeshima Kousuke, Watanabe Mizuki, Kitazume Shinobu, Sato Ryota, Kusano Hideo, Koyanagi Naoto, Maruzuru Yuhei, Arii Jun, Hatta Tomohisa, Natsume Tohru, Kawaguchi Yasushi	4. 巻 11
2. 論文標題 Identification of a herpes simplex virus 1 gene encoding neurovirulence factor by chemical proteomics	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-18718-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Shibazaki Misato, Kato Akihisa, Takeshima Kosuke, Ito Jumpei, Suganami Mai, Koyanagi Naoto, Maruzuru Yuhei, Sato Kei, Kawaguchi Yasushi	4. 巻 94
2. 論文標題 Phosphoregulation of a Conserved Herpesvirus Tegument Protein by a Virally Encoded Protein Kinase in Viral Pathogenicity and Potential Linkage between Its Evolution and Viral Phylogeny	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JVI.01055-20	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Moriyama Miyu, Nagai Minami, Maruzuru Yuhei, Koshiba Takumi, Kawaguchi Yasushi, Ichinohe Takeshi	4. 巻 23
2. 論文標題 Influenza Virus-Induced Oxidized DNA Activates Inflammasomes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 101270 ~ 101270
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2020.101270	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Moeka Nobe, Yuhei Maruzuru, Shungo Adachi, Fumio Maeda, Hideo Kusano, Kosuke Takeshima, Naoto Koyanagi, Akihisa Kato, Tohru Natsume, Yasushi Kawaguchi
2. 発表標題 Direct Relationship between Protein Expression Levels and Progeny Yield of HSV-1 Unveils a Rate-Limiting Step for Virus Production
3. 学会等名 47th International Herpesvirus Workshop (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ayano Fukui, Yuhei Maruzuru, Shiho Ohno, Moeka Nobe, Shuji Iwata, Kosuke Takeshima, Naoto Koyanagi, Akihisa Kato, Shinobu Kitazume, Yoshiki Yamaguchi, Yasushi Kawaguchi
2. 発表標題 Dual Impacts of a Glycan Shield on the Envelope Glycoprotein B of HSV-1: Evasion from Human Antibodies In Vivo and Neurovirulence
3. 学会等名 47th International Herpesvirus Workshop (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 丸鶴 雄平, 野邊 萌香, 福井 文望, 竹島 功高, 小柳 直人, 加藤 哲久, 川口 寧
2. 発表標題 1 細胞から生体レベルの統合的解析によるHSV-1の新規遺伝子発現制御機構と創薬標的の解明
3. 学会等名 第70回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 丸鶴雄平、竹島功高、小柳直人、加藤哲久、鈴木稜、川口寧
2. 発表標題 HSV-1の感染不均一性を司る要因の解明
3. 学会等名 第69回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 丸鶴 雄平、小柳 直人、加藤 哲久、川口 寧
2. 発表標題 単純ヘルペスウイルスVP22によるAIM2インフラマソーム阻害機構の解析
3. 学会等名 第34回ヘルペスウイルス研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 丸鶴 雄平、小柳 直人、加藤 哲久、川口 寧
2. 発表標題 単純ヘルペスウイルスVP22のDNA結合能はウイルス感染によって誘導されるAIM2 inflammasome活性化からの回避に必須である
3. 学会等名 第68回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 ヘルペスウイルスの感染に起因する疾患の予防又は治療のための医薬組成物	発明者 川口寧、丸鶴雄平	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2023-103446	出願年 2023年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------