

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月22日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590524

研究課題名（和文）

ヘルペスウイルスのウイルスゲノム複製依存的転写制御機構

研究課題名（英文）

Transcriptional regulation of herpesviruses dependent on the viral DNA replication

研究代表者

磯村寛樹（ISOMURA HIROKI）

群馬大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：20294415

研究成果の概要（和文）：

ヘルペスウイルスの転写制御はまず、主として宿主の転写因子によって活性化される前初期遺伝子が活性化される。そして、その前初期遺伝子がウイルスのDNA複製に必要な初期遺伝子を活性化し、DNA複製が開始される。そして、DNA複製に依存してウイルスの構造蛋白の産生に必要な後期遺伝子が活性化される。ヘルペスウイルスの転写はこうした厳密なカスケードによって制御されている。しかし、どうして前初期遺伝子は初期遺伝子のみを活性化し、後期遺伝子は前初期遺伝子のみでは活性化されないのか、ヘルペスウイルスの後期遺伝子の転写活性化がウイルスDNAの複製依存的に起こるのか、その分子機構は全く不明である。本研究は組換えヒトサイトメガロウイルス（HCMV）を用いてその分子機構を明らかにし、ヘルペスウイルスの遺伝子カスケードの制御機構の一端を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

The regulation of human cytomegalovirus (HCMV) late gene expression by viral proteins is poorly understood. HCMV open reading frames (ORFs) UL79, -87, and -95 encode proteins with homology to late gene transcription factors of murine gammaherpesvirus 68 ORFs 18, 24, and 34, respectively. To determine whether these HCMV proteins are also essential for late gene transcription of a betaherpesvirus, we mutated HCMV ORFs UL79, -87, and -95. Cells were infected with the recombinant viruses at high and low multiplicities of infection (MOIs). While viral DNA was detected with the recombinant viruses, infectious virus was not detected unless the wild-type viral proteins were expressed in trans. At a high MOI, mutation of ORF UL79, -87, or -95 had no effect on the level of major immediate-early (MIE) gene expression or viral DNA replication, but late viral gene expression from the UL44, -75, and -99 ORFs was not detected. At a low MOI, preexpression of UL79 or -87, but not UL95, in human fibroblast cells negatively affected the level of MIE viral gene expression and viral DNA replication. The products of ORFs UL79, -87, and -95 were expressed as early viral proteins and recruited to prereplication complexes (pre-RCs), along with UL44, before the initiation of viral DNA replication. All three HCMV ORFs are indispensable for late viral gene expression and viral growth.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：ウイルス学

科研費の分科・細目：ウイルス学・基礎医学

キーワード： ヒトサイトメガロウイルス

## 1. 研究開始当初の背景

我々はすでに組換えウイルスを用いた網羅的解析から以下のことを明らかにしていた。

1. ヒトサイトメガロウイルス (HCMV) UL79 遺伝子はウイルス増殖に必須で、UL79欠損ウイルスを用いた解析からUL79遺伝子は後期遺伝子プロモーターを特異的に活性化する後期遺伝子特異的な転写活性化因子である (未発表data)。

2. 後期遺伝子プロモーターの転写活性化には、ウイルスDNAポリメラーゼ付随タンパク質であるUL44蛋白が、ウイルス複製に対する作用とは独立して後期遺伝子の効率的な転写に必要である (Isomura et al., J. Virol., 2007)。そのUL44遺伝子プロモーターには3つのTATA boxが存在し、その中間位に存在するTATA boxは感染後期に活性化される。その後期プロモーターのTATA配列は他のUL44 初期プロモーターと異なり、noncanonical な配列 5' -GCTGTATTATTAGA-3' である。これを canonical な配列 5' -GCTGTATataaAGA-3' (小文字は変異部位)に変更すると、感染初期にDNA複製非依存的に活性化される (Isomura et al., J. Virol., 2008b)。

## 2. 研究の目的

ヘルペスウイルスは細胞に感染すると、主として宿主の転写因子によってウイルスの前初期遺伝子が活性化される。そして、その前初期遺伝子がウイルス遺伝子の転写活性化因子としてウイルスの DNA 複製に必要な初期遺伝子を活性化し、DNA 複製が開始される。そして、DNA 複製に依存してウイルスの構造蛋白の産生に必要な後期遺伝子が活性化される。ヘルペスウイルスの DNA 複製と遺伝子の転写は厳密に共役しながら、ウイルスの増殖のために最適化されている。そして、これらの厳密にコーディネートされたウイルスの DNA 複製と転写はいわゆる “Replication Compartments (RCs)” と呼ばれる核内の特定の場所で行われる。ヘルペスウイルスの DNA 複製はローリングサークル型であり、RCs の場の形成はウイルスの爆発的な増加に必須で

あると考えられる。しかし、RCs を介してウイルス DNA の複製と後期遺伝子の転写の共役がどのように制御されているのか、その分子機構は不明である。

そこで、その分子寄稿を明らかにすることを目的とした。

その詳細として、

1. UL79 蛋白は、UL44 蛋白やその他のウイルスや宿主蛋白 (前初期遺伝子産物等) と相互作用して後期遺伝子プロモーターを活性化するのか。

2. ほかの後期遺伝子プロモーターもすべてではないにしろ多くがその TATA 配列は noncanonical な配列である。従って、後期遺伝子プロモーターにおける noncanonical な配列が UL79 蛋白の後期遺伝子プロモーターの特異的転写活性化になんらかの役割をはたしているのではないか。noncanonical な TATA 配列は canonical な TATA 配列と比較して TBP, TBP-TFIIB, TBP-TFIIA 複合体の結合力が弱い (Stewart J. J., J. Biol. Chem 22665-73, 2006) ことから、UL79 蛋白が転写複合体の形成を安定化するのではないか。という仮説を検証する。

## 3. 研究の方法

### 1. UL79 遺伝子のウイルス後期プロモーター特異的活性化

① UL79 欠損 HCMV 組換え HCMV BAC DNA を HCMV 全長がクローニングされた HCMV BAC DNA を用いて作成する。UL79 遺伝子はウイルス増殖に必須のため、UL79 遺伝子欠損ウイルスはウイルス増殖ができない。従って組換えウイルスを作成するためには HCMV 感染許容細胞であるヒト繊維芽 (HFF) 細胞に UL79 遺伝子を恒常的に発現する細胞が必要である。

② レトロウイルスベクターを用いて GFP を carboxy terminus に融合した UL79 発現 HFF 細胞を作製する。

③ UL79 欠損組換え HCMV を HFF 細胞及び上記で作成した UL79 発現 HFF 細胞に感染させて組換え HCMV のウイルス DNA 複製、及びウイルス前初期、初期、及び後期遺伝子の発現

を調べる。

以上は実際にはすでに作成済みであり、UL79を発現しない HFF 細胞に UL79 欠損ウイルスを感染させると、ウイルス DNA 複製は UL79 発現細胞と全く同程度であったにもかかわらず、ウイルス増殖は認められなかった。そこで、ウイルス遺伝子の発現を調べると、ウイルスの前初期及び初期遺伝子は同程度発現したにも関わらず、糖蛋白やテグメント蛋白等のウイルス構造蛋白をコードする後期遺伝子の発現は全く認められなかった(未発表 data)。以上の結果から **UL79 遺伝子は後期遺伝子に特異的な転写活性化因子**であると考えられた。

## 2. UL79 蛋白と相互作用する蛋白の検索

UL79 の amino terminus に flag epitope を融合させた組換え HCMV (RflagUL79HCMV) を作成し、flagUL79HCMV を実際に感染させた細胞で UL79 蛋白と相互作用するウイルス及び宿主蛋白を抗 flag 抗体を用いた免疫沈降で検索する。その際にウイルス DNA ポリメラーゼ付随蛋白 UL44、前初期蛋白 IE2 (IE86)、さらに TBP, TFIIIB, TFIIA 等の蛋白との相互作用をこれらの蛋白に対する抗体を用いて検索する。

## 3. 感染細胞での UL79 蛋白複合体の後期遺伝子プロモーター活性化に果たす役割

上記で確認した UL79 蛋白の相互作用部位を欠損した UL79 発現 HFF 細胞をレトロウイルスベクターを用いて作製し、その欠損 UL79 蛋白を発現する HFF 細胞での UL79 欠損組換え HCMV の増殖及び後期遺伝子の発現を検索する。そして、UL79 蛋白複合体の実際の感染細胞での後期遺伝子プロモーターに果たす役割を調べる。

## 4. UL79 蛋白の後期遺伝子プロモーターの結合活性の検索

大腸菌で affinity 精製した UL79 蛋白の gH 及び UL99 (pp28) 後期プロモーターへの結合を electrophoretic mobility shift assay (EMSA) 及び foot printing で検索する。

## 4. 研究成果

### 1. 組換え部位以外のいかなる余分な配列を含まない HCMV 組換えウイルスの作成-2 回組換え法の確立

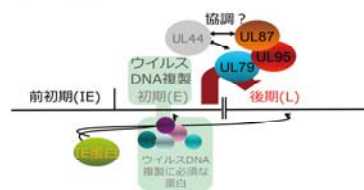
約 200kb HCMV ウイルスゲノム全長がクローニングされた BAC DNA を bacteriophage lamda の recombination 蛋白 exo, beta, 及

び gam が lac repressor 存在下に発現する E. coli に遺伝子導入することにより、大腸菌内で HCMV BAC DNA を PCR 法で薬剤耐性遺伝子+ストレプトマイシン感受性遺伝子 (Gene Bridges 社, GmbH) を増幅した 50 base pair の相同領域を含む 2 本鎖 DNA と部位特異的に相同組換えを行う。さらにストレプトマイシン感受性遺伝子を用いて組換えを行い、薬剤耐性遺伝子を取り除く (Isomura, et al, J. Virol., 2007, 2008a, and 2008b)。大腸菌内で組換えた BAC DNA を HCMV 感染許容細胞に遺伝子導入することにより、組換えウイルスを迅速に作成する。

## 2. 後期遺伝子発現に必須のウイルス蛋白の同定

HCMV がコードする UL79, 87 及び 95 がウイルス DNA の複製には影響を及ぼさないにもかかわらず、ウイルスの後期遺伝子発現に必須な転写活性化因子であることを明らかにしてきた。さらにウイルス感染後、これらのウイルスがコードする後期遺伝子の転写に特異的な転写活性化因子が pre-RCs、及び RCs (それぞれ 2 ページ図中央、及び右) にリクルートされ、ウイルス DNA ポリメラーゼ付随因子である UL44 と共局在することを示した (Isomura et. al., J. Virol., 2011)。

後期遺伝子発現の“タイムキーパー”はなにか



後期遺伝子が後期に正確に発現するために、DNAポリメラーゼ補助因子UL44とUL79, 87,及び95はどのように調整しているのか。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

1. Isomura H, Stinski MF, Murata T, Yamashita Y, Kanda T, Toyokuni S, Tsurumi T. The human cytomegalovirus gene products essential for late viral gene expression assemble into pre-replication complexes before viral DNA replication. J Virol., 2011 85:6629-6644 査読有
2. Isomura H, Stinski MF, Murata T, Nakayama S, Chiba S, Akatsuka Y, Kanda T, Tsurumi T.: The human cytomegalovirus UL76 gene regulates the level of expression of the UL77

gene. *PLoS One*, 2010; 5: e11901. 査読有

[学会発表] (計4件)

1. Isomura H. and Tsurumi T. The human cytomegalovirus gene products essential for late viral gene expression assemble into pre-replication complexes before viral DNA replication. International Union of Microbiological Societies Congress (IUMS), Sapporo, Japan, 2011. 9. 15
2. Isomura H., Stinski M.F., Murata T., Kanda T., and Tsurumi T. Human Cytomegalovirus Late Transactivators Recruited to the Replication Compartments. 35th International Herpesvirus Workshop, Salt Lake City, Utah, USA, 2010. 7. 24
3. Isomura H. and Tsurumi T. Human cytomegalovirus genes required for late viral gene expression and assembly into pre-replication complexes before viral DNA replication. 13th CMV / BetaHerpesvirus Workshop, Nuremberg, Germany, 2011. 5. 16
4. Isomura H., Stinski M.F., Nakayama S., Chiba S., Akatsuka Y., Kanda T., and Tsurumi T. Human cytomegalovirus UL76 gene regulates the level of expression of the UL77 gene. 14th International Conferences on the Immunobiology and Prophylaxis of Human Herpesvirus Infections, Kobe, Japan, 2009. 10. 6

[図書] (計2件)

1. Isomura H. DNA polymerase processivity factor of human cytomegalovirus may be a key molecule for molecular coupling of viral DNA replication to transcription. Edited by Jelena Kusic, DNA Replication/Book 2, ISBN: 978-953-307-259-3, Croatia, InTech - Open Access Publisher, *in press*
2. 磯村寛樹. ヒトサイトメガロウイルス. 松島綱治編, 分子予防環境医学, 東京: 本の泉社, 2010: 218-224.

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

1. 名称: ヒトの体内では増殖不可能な弱毒性ヒトサイトメガロウイルス株の作成  
発明者: 磯村寛樹、鶴見達也  
権利者: 愛知県  
番号: 2011-14548  
種類: 特願  
出願年月日: 2011年1月26日  
内外の別: 国内

○取得状況 (計1件)

1. 名称: ヒトサイトメガロウイルスの複製制御  
発明者: 磯村寛樹、鶴見達也  
権利者: 愛知県  
種類: 特許  
番号: 第441640号  
取得年月日: 2010年1月22日  
国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.gunma-u.ac.jp/med-organization/envmed/envmed-defense/153.html/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

磯村寛樹 (ISOMURA HIROKI)  
群馬大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号: 20294415

(2) 研究分担者 ( )

研究者番号:

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号: