

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：13701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24658256

研究課題名(和文)ヘルペスウイルス増殖におけるアンチセンスRNAによる新規遺伝子発現調節機構の解明

研究課題名(英文)Studies on novel gene expression regulation system by anti-sense RNA in herpesvirus multiplication

研究代表者

福士 秀人(Fukushi, Hideto)

岐阜大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：10156763

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝情報はDNAからmRNAに写し取られる。しかし、mRNAとは反対側のDNA情報もRNAとして転写され、アンチセンスRNAと呼ばれる。本研究では、ウマヘルペスウイルス1型の転写動態解析において見いだされたアンチセンス鎖RNAの機能と意義を明らかにしようとした。感染細胞ではウイルスゲノムに由来するmiRNAがほとんど発現していないことがわかった。一方、宿主由来miRNAは感染後、ウイルス増殖にともなって増減がみられた。ウイルス感染細胞における網羅的な転写開始点解析を実施し、アンチセンス鎖の転写開始点を同定した。感染細胞から2本鎖RNAを抽出したが、塩基配列解読が課題として残された。

研究成果の概要(英文)：Genetic information is transcribed from DNA to RNA as mRNA. And the RNA called anti-sense RNA is transcribed from the antisense strand of DNA. The purpose of this study was to clarify the function of the anti-sense RNA found in equine herpesvirus infected cells. The miRNA was investigated and found that expression of viral miRNA was almost nothing. On the other hand, miRNA derived from the host genome showed variation of expression level according to the infection of virus. Transcription initiation sites were identified including the anti-sense RNAs. Double stranded RNA was extracted from the infected cells but their nucleotide sequences were not determined in the present study.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 応用獣医学

キーワード：アンチセンス鎖 ヘルペスウイルス 遺伝子発現制御

1. 研究開始当初の背景

アンチセンス RNA による調節機構としてマイクロ RNA (miRNA) が解析されてきた。一方、ポリアデニル鎖を 3'末に保有する RNA であるが、miRNA とは異なるアンチセンス鎖 RNA がサイトメガロヘルペスウイルス感染細胞で報告されている (Zhang et al., 2007)。ウマヘルペスウイルスにおいても mRNA や miRNA とは異なる RNA が IR3 として報告されている (Ahn et al., 2010)。これらのアンチセンス RNA は cDNA ラブラリーや古典的な Northern blotting などによりみいだされてきた。これらアンチセンス鎖 RNA による調節が miRNA の他にもあるのか、また、アンチセンス鎖 RNA による調節がヘルペスウイルスに普遍的に存在するかどうかは不明である。我々は強い神経病原性を示すウマヘルペスウイルス 9 型の網羅的な転写産物解析 (トランスクリプトーム解析) において、特定の領域に由来するアンチセンス転写産物を見いだした。この成績はアンチセンス RNA が従来のタンパク質合成の鋳型としての mRNA として機能する以外の何らかの機能を担っている可能性を示す。

2. 研究の目的

ウイルスの病原性発現を考える際に遺伝子発現調節は重要な意味を持つ。少なくともヘルペスウイルスでは感染後の発現時期が感染直後に発現する immediate early 遺伝子、immediate early 遺伝子により誘導される early 遺伝子群、early 遺伝子により誘導される late 遺伝子群の 3 段階になっている。これらの発現調節はこれまでプロモーター認識によると考えられていた。しかし、近年、miRNA による mRNA の調節がサイトメガロウイルスなどいくつかのヘルペスウイルスで見いだされた (Steitz et al., 2011)。また、ヒト単純ヘルペスウイルス (HSV-1) では潜伏感染に関連した転写産物 (latent-associated transcript) が知られているが、その機能や効果メカニズムは明らかではない。

本研究では、このポリアデニル鎖保有アンチセンス RNA および非遺伝子領域に由来するポリアデニル鎖保有 RNA のウイルス感染における役割を明らかにすることにより、新しい遺伝子発現機構を解明することを目的としている。はじめに我々が見いだしたウマヘルペスウイルス 1 型感染細胞におけるポリアデニル鎖保有アンチセンス RNA と miRNA の関係を明らかにする。併せて、miRNA 以外の可能性としてアンチセンス鎖が mRNA の安定化により正の調節に関与しているという仮説にもとづき、アンチセンス鎖の機能を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 用いたウイルスはウマヘルペスウイルス 1 型 (Equine Herpesvirus type 1; EHV-1)

Ab4p 株および 01c1 株である。ウイルス増殖にはウマ胎児腎臓 (fetal equine kidney; FEK) 細胞を用いた。

(2) EHV-1 感染細胞より感染 8 時間後に全 RNA を抽出し、miRNA 解析を行った。また、感染後 0, 2, 4 および 8 時間後に全 RNA を抽出し転写開始点解析に用いた。

miRNA 解析は Dragon Genomics に依頼した。TruSeq Small RNA Sample Prep Kit を用い、ライブラリーを作製した。HiSeq によりシーケンシングした。転写開始点解析は CAGE 法により理研に依頼した。

(3) EHV-1 感染細胞より全 RNA を抽出し、S1-nuclease により一本鎖 RNA を消化した。消化されなかった RNA を二本鎖 RNA として抽出し、アガロースゲル電気泳動により解析した。

4. 研究成果

(1) miRNA 解析

感染細胞および非感染細胞から得られた small RNA 配列をウマヘルペスウイルスゲノムに Bowtie プログラムによりマッピングした。その結果、ORF64、ORF66 の上流配列および ORF67 のアンチセンス鎖に small RNA がマッピングされた (図 1)。これらはリード数は少ないが、非感染細胞でもみられた。感染 8 時間目の細胞からウイルス特異的と考えられる miRNA は検出されなかった。

(2) 転写開始点解析

転写開始点解析を CAGE 法により行った。感染後 4 時間において ORF39 では sense mRNA に加え、anti-sense RNA が転写されていることがわかった (図 2)。

(3) double stranded RNA 解析

感染 4 時間後の細胞から RNA を抽出し、S1-nuclease で処理したところ、約 500 bps および 800 bps の大きさの dsRNA が検出された (図 3)。この dsRNA の塩基配列解読には至らなかった。

(4) まとめ

今回の研究により EHV-1 は miRNA をほとんどコードしていないことが明らかとなった。これは他のアルファヘルペスウイルスにおける結果と大きく異なっている。一方、転写開始点解析により ORF39 について感染 4 時間後に sense mRNA および antisense RNA が同時に転写されていることがわかった。ORF39 はエンベロープ糖タンパク質 H (gH) をコードしている。gH は EHV-1 の侵入時に機能するとされている。今回はこの anti gH mRNA の機能を同定することはできなかった。

アンチセンス RNA が mRNA の安定化に関与しているという仮説に基づき、dsRNA の検出を試みたところ、二種類の dsRNA が検出された。その大きさはおよそ 500 bps および 800 bps であり、mRNA との dsRNA 形成をすると仮定しても部分的であると考えられた。これらの dsRNA がウイルスゲノムの

どの部分に対応するかが今後の課題として残された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況(計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

福士 秀人 (FUKUSHI, Hideto)

岐阜大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：10156763

(2)研究分担者

大屋 賢司 (OHYA, Kenji)

岐阜大学・応用生物科学部・准教授

研究者番号：50402219

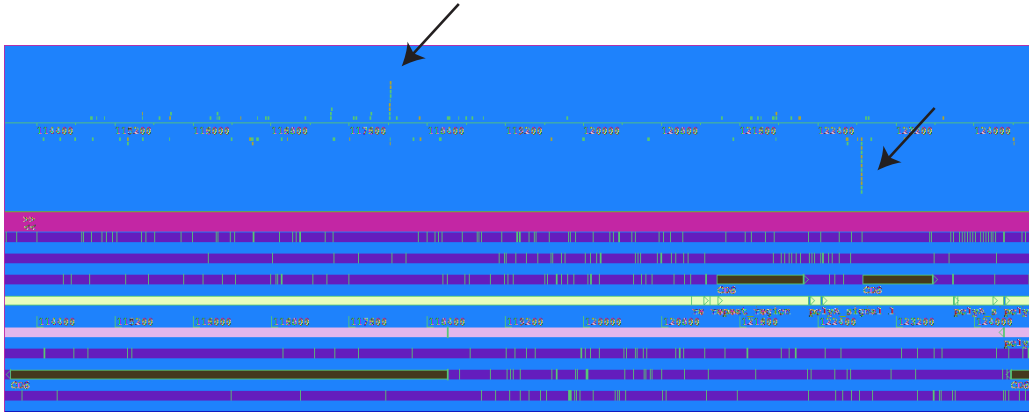
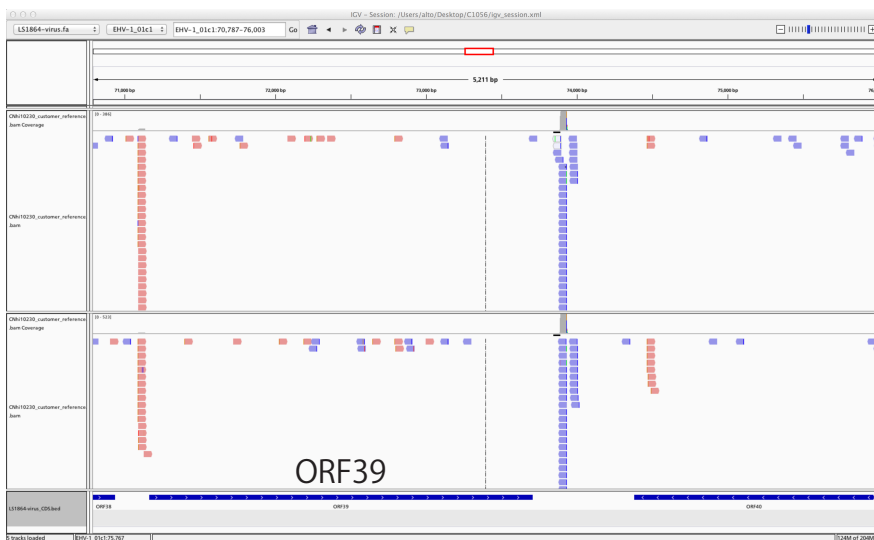


図1 ORF64 および ORF66 に small RNA がマップされた (矢印).



マッピングされたリード

マッピングされたリード

EHV-1 ORF マップ

図2 ORF39 において sense 鎖の転写開始点 (赤) および anti-sense 鎖の転写開始点 (青) が同定された. 2 回のサンプルの結果を示している.

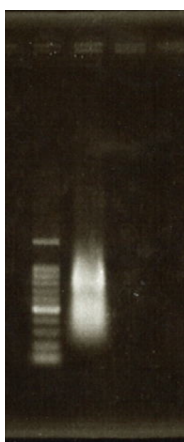


図3 感染細胞から抽出した RNA を S1-nuclease 処理し, アガロースゲル電気泳動したところ, 500 bps および 800 bps の dsRNA が検出された. レーン左は 100 bps ラダー, 右は S1-nuclease 処理 RNA.