

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460558

研究課題名(和文)ヘルペスウイルスの遺伝子発現スイッチ機構の解明

研究課題名(英文)Herpesvirus switching mechanism of gene regulation.

研究代表者

大野 真治 (Ohno, Shinji)

琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：50419529

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ガンマヘルペスウイルスの遺伝子発現制御について検討した。ウイルスの増殖に必須とされていたORF35タンパク質が遺伝子制御に関わるか検討したが、これまでの知見と異なり、ウイルス増殖の効率や潜伏感染からの再活性化に関与していることが分かった。

ORF31タンパク質は、遺伝子発現の制御に関与し、機能部位を同定した。また、ORF31と結合し、ウイルス増殖に関与する細胞タンパク質の候補を探索し、候補タンパク質について検討を進めている。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the viral gene regulation of gammaherpesvirus. The open reading frame (ORF) 35 protein was considered to be essential for the viral growth. However, we revealed that the protein was not essential, but plays an important role for the efficiency of the viral replication. In addition, ORF35 protein was necessary for reactivation from latent infection.

We also analyzed the function of ORF31 protein. And the protein was revealed to regulate viral gene expression and we identified functional domain of ORF31. Host proteins which bind to ORF31 and regulate viral replication was searched, and we found candidates. We are currently studying about these proteins.

研究分野：ウイルス学

キーワード：ヘルペスウイルス ガンマヘルペスウイルス 後期遺伝子 遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

Epstein-Barr (EB) ウイルスは世界中に分布しており、成人の 90%以上が感染している普遍的なウイルスである。リンパ腫やがんなどの悪性腫瘍との関連があり、がんウイルスとしても知られている。そのほか、自己免疫疾患や特発性肺線維症などの難治性疾患との関連も疫学的に示されている、重要な病原体である。しかし、EB ウイルスは一部の高位霊長類にしか感染しないため、これらの疾患の発症メカニズムの解析は困難なままである。そこで、マウスガンマヘルペスウイルス (MHV) 68 に注目した。このウイルスは EB ウイルスの近縁ウイルスであり、マウスに感染し、EB ウイルスとよく似た病態をマウスに対して引き起こす。また、細胞での増殖性が不良な EB ウイルスと異なり、増殖性も良いウイルスである。

ヘルペスウイルス蛋白質の発現は、感染後の時間経過による発現パターンにより前初期、初期、後期タンパク質の 3 つに大別される。後期タンパク質は主にウイルス粒子の形成に必要なタンパク質群である。これらのウイルスタンパク質の発現は、ウイルスと細胞それぞれのタンパク質の協調作用により制御されているが、その制御についての詳細は明らかでなかった。ヘルペスウイルスは 100 個近くのウイルス遺伝子を持つことが知られており、機能が未解明のものもまだ多い。申請者の研究を含めたこれまでの研究から、MHV68 の ORF18、ORF24、ORF30、ORF31、ORF34 タンパク質が後期タンパク質の発現に関与することが分かっていた。

また、ヘルペスウイルスがヒトに感染すると免疫反応が起こり、ウイルス粒子は体内から排除される。これらの免疫応答は主にウイルス粒子を構成するタンパク質を標的としておこる。にもかかわらず、一部のウイルスは排除をまぬがれ、潜伏状態のままヒトに終生寄生する性質を持ち、いったん潜伏状態が成立してしまうと現在の医療技術では体内からの完全排除は不可能である。潜伏状態にあるウイルスは、ストレスなどをきっかけに再び感染性ウイルス粒子を産生し、別のヒトに感染を拡大する性質も持っている。

2. 研究の目的

申請者らは、「潜伏状態にあるウイルスから感染性ウイルス粒子を産生させずに、後期タンパク質だけを発現させることができれば、免疫応答により潜伏状態のウイルスも排除できるのではないか」という仮説を立てた。この仮説を証明するためには、後期タンパク質の発現制御メカニズムを解明する必要がある。これまでの研究から、後期タンパク質の発現に関わるウイルスタンパク質が 5 種類同定されていた。また、機能不明なウイルス遺伝子の中にも同様の機能を持つものがこのされている可能性がある。そこで、本研究では、(1) これまでにウイルスの増殖に必須

であることが報告されている ORF35 が後期タンパク質の発現に関与するかどうか。(2) これまでに報告があるタンパク質がお互いの機能を補完できるか。(3) ORF31 タンパク質と結合する細胞タンパク質の探索とウイルス増殖への影響などについて検討した。

3. 研究の方法

(1) ORF35 タンパク質の機能について

ORF35 遺伝子欠損ウイルスを作成し、増殖性について調べる：定法を用いて遺伝子改変ウイルスを作成し、細胞での増殖について検討する。

ORF35 タンパク質の細胞内局在について調べる：FLAG エピトープタグを付加した ORF35 発現プラスミドを細胞に導入し、免疫染色法を用いて細胞内局在について検討する。

ORF35 遺伝子欠損ウイルスのマウスへの病原性について調べる：で作成した遺伝子改変ウイルスをマウスに接種し、感染性ウイルスの産生、潜伏感染について評価する。

(2) 後期タンパク質の制御タンパク質の相互補完能について

ORF18、ORF24、ORF30、ORF31、ORF34 をそれぞれ欠損する組み換えウイルスを作成し、増殖性を調べる：定法を用いて遺伝子改変ウイルスを作成し、細胞での増殖性を検討する。

ORF18、ORF24、ORF30、ORF31、ORF34 の相互補完能を調べる：各タンパク質の発現プラスミドを作成し、遺伝子改変ウイルスの増殖を補完できるかについて検討する。

(3) ORF31 と結合するタンパク質のウイルス増殖への影響について

ORF31 の機能部位を明らかにする：ORF31 タンパク質の N 末端側、C 末端側を短縮した変異体が、ORF31 欠損ウイルスの増殖を補完できるかについて検討する。機能部位に変異を導入した遺伝子改変ウイルスを作成し、細胞での増殖について検討する。

ORF31 と結合する細胞タンパク質を同定する：FLAG エピトープを付加した ORF31 タンパク質を細胞に発現させ、免疫沈降法とプロテオミクス解析を行うことで同定する。

同定した細胞タンパク質のウイルス増殖への影響を調べる：同定した細胞タンパク質を CRISPR/Cas9 法でノックアウトし、ウイルスの増殖性について評価する。

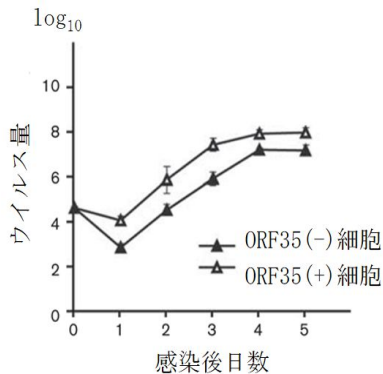
4. 研究成果

(1) ORF35 タンパク質の機能について

ORF35 遺伝子欠損ウイルスを作成し、増殖性について調べる：定法を用いて ORF35 欠損ウイルスを作成し、細胞での増殖について検討した。既報と異なり、

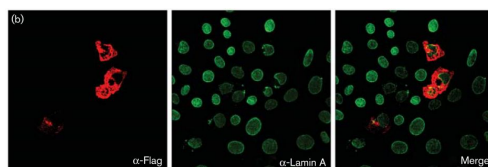
ORF35 欠損ウイルスは効率が低下していたものの増殖性は保たれていた。ORF35 安定発現細胞で ORF35 欠損ウイルスの増殖性が改善したことから、ORF35 はウイルスの効率的な増殖に関与することが分かった (図 1)。

図 1 : ORF35 欠損ウイルスの増殖



ORF35 タンパク質の細胞内局在について調べる: FLAG エピトープタグを付加した ORF35 タンパク質を細胞に発現させ、免疫染色法を用いて細胞内局在について検討したところ、ORF35 タンパク質は主に細胞質に分布するタンパク質であることが分かった (図 2)。遺伝子の発現調節に関わるタンパク質は一般的に核内に存在することから、ORF35 タンパク質は異なる機能を持つことが示唆され、の結果を支持するものであった。

図 2 : ORF35 タンパク質の細胞内局在



赤が ORF35 タンパク質を示す。

ORF35 遺伝子欠損ウイルスのマウスへの病原性について調べる: 作成した遺伝子改変ウイルスをマウスに経鼻接種し、肺での感染性ウイルスの産生、脾臓での潜伏感染について評価した。感染 3 日目と 6 日目の肺における感染性ウイルス量は ORF35 欠損ウイルスで明らかに低下していた (図 3)。感染 17 日と 24 日後の脾臓での潜伏感染状態のウイルス量も同様の結果であった。また、潜伏感染状態からの感染性ウイルスの産生についても検討した結果、欠損ウイルスでは検出不可能であった (図 4)。これらのことから、ORF35 は病原性や潜伏状態からの再活性化に関与することが示唆された。

ORF35 に関するこれらのデータは学術誌に発表した。

図 3 : 肺でのウイルス増殖

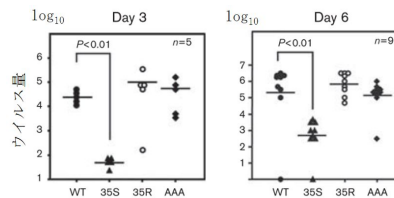
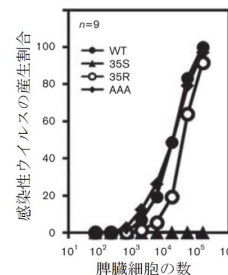


図 4 : ウイルスの再活性化



注: 図 3、図 4 の 35S が ORF35 欠損ウイルスに該当する。右肩上がりするとき、ウイルスの再活性化を示す。

(2) 後期タンパク質の制御タンパク質の相互補完能について

ORF18、ORF24、ORF30、ORF31、ORF34 をそれぞれ欠損する組み換えウイルスを作成し、増殖性を調べる: 定法を用いて遺伝子改変ウイルスを作成し、細胞での増殖性を検討した。それぞれの欠損ウイルスを培養細胞に感染させても増殖できないことが分かった。また、欠損したタンパク質を細胞に発現させることによって増殖能が回復したことから、作成した欠損ウイルスは条件が調べば増殖可能であることを確認した。

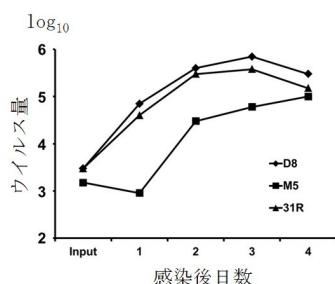
ORF18、ORF24、ORF30、ORF31、ORF34 の相互補完能を調べる: 各タンパク質の発現プラスミドを作成し、遺伝子改変ウイルスの増殖を補完できるかについて検討した。ORF18 欠損ウイルスを ORF24、ORF30、ORF31、ORF34 を発現する細胞に感染させたが、増殖不能であった。同様の検討をそれぞれのタンパク質の欠損ウイルスに対して行ったが、いずれの欠損ウイルスも増殖不能であった。このことから、ORF18 の機能は他のタンパク質で補完できず、ORF24、ORF30、ORF31、ORF34 についても同様であることが分かった。

(3) ORF31 と結合するタンパク質のウイルス増殖への影響について

ORF31 の機能部位を明らかにする: ORF31 タンパク質の N 末端側、C 末端側を短縮した変異体が、ORF31 欠損ウイルスの増殖を補完できるかについて検討した。その結果、N 末端側の 10 番目から 20 番目

のアミノ酸が機能に重要であることが分かった。C末端側を30アミノ酸短縮したORF31タンパク質でもウイルスの増殖を補完することが可能であったため、C末端側はそれほど重要でないと考えられた。次に機能部位に変異を導入した遺伝子改変ウイルスを作成し、細胞での増殖について検討した。N末端側の機能部位が存在すると思われる部位に変異を導入した遺伝子改変ウイルスの増殖能が低下していたことから、当該部位に機能領域が存在することが強く示唆された(図5)。C末端側の欠損ウイルスを作成し、細胞での増殖を評価したところ、増殖不能であった。その後の検討から、C末端側はタンパク質の安定性に関与することが示唆された。

図5：変異ウイルスの増殖

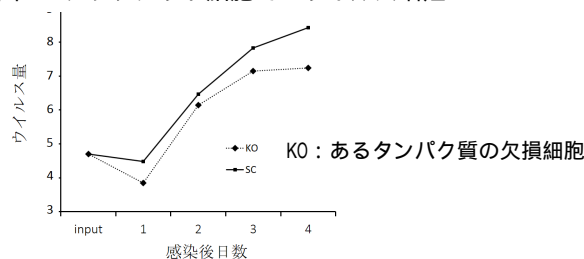


注：M5が変異ウイルスを示す

ORF31と結合する細胞タンパク質を同定する：FLAGエピトープを付加したORF31タンパク質を細胞に発現させ、免疫沈降法とプロテオミクス解析を行った。その結果、100を超える細胞タンパクが検出された。プロテオミクス解析で得られた統計データを参考に10個の細胞タンパク質を選定し、ORF31への結合性について確認試験を行い、検討するタンパク質を3つに絞り込んだ。

同定した細胞タンパク質のウイルス増殖への影響を調べる：同定した細胞タンパク質をCRISPR/Cas9法でノックアウトし、ウエスタンブロット法で確認した。次に、ウイルスの増殖性について評価した。検討した三つの細胞タンパク質のうち、一つで(未発表データのため遺伝子名は伏せたままにする)ウイルスの増殖効率が10分の1に低下していることが分かった(図6)。ウイルスが増殖可能であることから後期タンパク質の発現制御に関わっていない可能性もあるが、そのメカニズムについては今後の検討課題である。

図6：ノックアウト細胞でのウイルス増殖



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 1件)

Hikita S, Yanagi Y, Ohno S., Murine gammaherpesvirus 68 ORF35 is required for efficient lytic replication and latency., *J Gen Virol.*, (査読有), 96, 3624-3634, 2015

[学会発表](計 5件)

Shinji Ohno, Yusuke Yanagi, Identification of a cellular protein contributing to the efficient growth of Murine gammaherpesvirus 68, 第63回日本ウイルス学会学術集会、福岡県福岡市、福岡国際会議場、2015年11月22-24

大野 真治、柳 雄介、マウスガンマヘルペスウイルス68のORF31蛋白質と結合する宿主因子の解析、第29回ヘルペスウイルス研究会、長崎にっしょうかん、長崎県長崎市、2015年6月4-6日

大野 真治、柳 雄介、マウスガンマヘルペスウイルス68のORF31の機能に重要なアミノ酸の同定、第62回日本ウイルス学会学術集会、パシフィコ横浜、神奈川県横浜市、2014年11月10-12日

疋田 伸一、柳 雄介、大野 真治、Murine gammaherpesvirus 68のORF35蛋白質はウイルスの効率的な増殖や潜伏感染の成立に必要である、第62回日本ウイルス学会学術集会、パシフィコ横浜、神奈川県横浜市、2014年11月10-12日

Shinji Ohno, Yusuke Yanagi, Murine gammaherpesvirus 68 open reading frame 31 protein plays an important role in late gene expression. The 39th Annual international Herpes Workshop, Kobe international Exhibition Hall, Kobe city, Hyogo prefecture, Japan, 2014 July 19-23.

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況（計0件）

〔その他〕

特記なし。

6．研究組織

(1)研究代表者

大野 真治（SHINJI OHNO）

琉球大学，大学院医学研究科・教授

研究者番号：50419529