

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：13701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26660228

研究課題名(和文)ヘルペスウイルスゲノム非コード領域のウイルス増殖における機能解明

研究課題名(英文)Studies on the function of the long noncoding region in herpesvirus replication

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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ウイルスゲノムは一般に効率的な遺伝子配置が見られる。しかし、ヘルペスウイルスゲノムでは部分的に長い非コード領域が存在する。この研究ではウマヘルペスウイルス1型(EHV-1)をモデルとし、ウイルス増殖における非コード領域の機能解明を目的とした。その結果、この非コード領域から1028塩基長(IncRNA-X1)及び679塩基長(IncRNA-X2)の長鎖非コードRNAが転写されていることを明らかにした。IncRNA-X1/X2非発現EHV-1は神経細胞増殖において一部の遺伝子発現が低下していることがわかり、IncRNAはEHV-1の神経細胞増殖において何らかの役割を担っていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Virus genes are efficiently arranged on the genome. However, the herpesvirus genomes have long non-coding regions on their genomes. The purpose of the present study is to reveal functions of the long non-coding regions in viral replication using equine herpesvirus 1 (EHV-1) as a model virus. Two long non-coding RNA, 1028 bps (IncRNA-X1) and 679 bps (IncRNA-X2), were found as transcripts. It was found that several gene expressions were under detection limits in murine cultivated neuronal cell infected by a mutant EHV-1 lacking IncRNA-X1 and IncRNA-X2. The results indicated that the IncRNAs might have roles for EHV-1 replication in neuronal cells.

研究分野：獣医ウイルス学

キーワード：ヘルペスウイルス ロングノンコーディングRNA 遺伝子発現調節

1. 研究開始当初の背景

ゲノム解析は真核生物ゲノムの大半が遺伝子がコードされない非コード領域 (nc 領域) であることを明らかにした。その後、網羅的な転写解析がなされ、nc 領域から蛋白質に翻訳されない RNA (ノンコーディング RNA, nc RNA) が転写されることが明らかになってきた (Kornienko et al., 2013)。この nc RNA のうち 200 塩基長以上のものはロングノンコーディング RNA (lnc RNA) と呼ばれる。この lnc RNA の機能は不明であるが、真核細胞において発生や腫瘍形成などで何らかの役割を担っていることが次第に明らかになり、一例として X 染色体の不活性化があげられるが、他にも様々な機能を担うことが示唆されている。しかしながら、nc 領域の機能は未だ不明な点が多い。

真核細胞を宿主とする大型の DNA ウイルスのうち、ヘルペスウイルスは 120kbs から 240kbs のゲノムを有し 80 から 166 の遺伝子をコードしている。これら遺伝子はウイルスゲノム上に密に配置されているが、部分的に大きな nc 領域が存在する。我々はウマヘルペスウイルス 1 型 (EHV-1) の網羅的転写開始領域解析を行い、nc 領域からも大量の RNA が転写されていることを見いだした (図 1)。一方、我々の以前の研究において、蛍光蛋白質発現ウイルスを構築する目的で nc 領域の一部を蛍光蛋白質発現遺伝子 DNA 断片で置き換えた組換えウイルス (Ab4p-GFP) はハムスターに対する神経病原性が低下していた (Ibrahim et al., 2004)。これらのことから EHV-1 の nc 領域は病原性発現に何らかの役割を担っていると推測した。また、ウイルスの nc 領域の機能解明は真核生物ゲノムにおける nc 領域の機能解明の糸口なるのではないかと考えた。

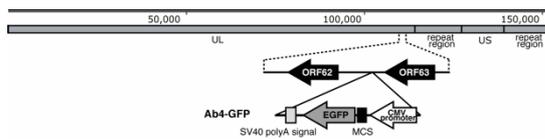


図 1: EHV-1 ゲノムおよび Ab4-GFP の模式図

EHV-1 のゲノムは約 150 kbp で、80 の Open Reading Frames (ORFs) をコードしている。ORF62 と ORF63 の間是非コード領域であり、この領域に GFP を挿入して蛍光タンパク質発現ウイルス Ab4-GFP を構築した。CMV プロモーターにより GFP が感染細胞内で発現する。

2. 研究の目的

本研究では、ウイルスがコードする lnc 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、nc 領域の機能を解明することを目的としている。nc 領域を改変したウイルスとして上記 Ab4p-GFP を用い、未分化

培養細胞および培養神経細胞における増殖を転写レベルで解析する。nc 領域の機能として lnc RNA 発現に着目し、ウイルス lnc RNA を強制的に培養細胞で発現させ、その効果を観察する。次世代シーケンサーを応用し、感染細胞における転写開始領域の動態に与える影響として解明することにより、ウイルス遺伝子および宿主遺伝子発現への影響も併せて網羅的な解明を行う。

真核生物ゲノムにおける nc 領域の機能解明は不明な点が多い。そこで、ウイルスゲノムにおける nc 領域をモデルとし、真核生物における nc 領域の機能を明らかにできることが期待される。本研究では、ウイルスゲノムにおける非コード領域の機能の一つは lnc RNA の発現であり、この lnc RNA が他のウイルス蛋白質や宿主細胞因子と相互作用し、ウイルス増殖を調節しているという仮説に基づき、実験を行う。特に lnc RNA の機能解明は単にウイルス遺伝子発現のみならず、真核細胞における遺伝子発現に新たな機構が存在することを明らかにできる可能性がある。

3. 研究の方法

(1) ウイルスゲノムから mRNA および lncRNA が転写開始される時期および転写開始点を明らかにするため、EHV-1 感染馬胎子腎臓細胞 (FHK) における継時的な網羅的転写開始点解析を行った。感染細胞から total RNA を抽出し、Cap Analysis of Gene Expression (CAGE) 法を用いて cDNA の 5'末端末を選別した (Proc. Natl. Acad. Sci. 100(26): 15776-15781, 2003)。選別された 5'末端配列を次世代シーケンサーで決定し、EHV-1 ゲノムにマッピングした。

(2) Ab4-GFP では、GFP 挿入部位近辺の転写産物が消失しているのか調べた。すなわち、親ウイルスである Ab4p および Ab4-GFP 感染細胞における ORF62-63 間の nc 領域からの転写産物の発現の有無を確認した。

(3) Ab4p ORF62-63 間の lncRNA の大きさを明らかにするため、5'および 3' RACE PCR により転写開始点およびポリ A 鎖付加部位の同定を行った。

(4) Ab4-GFP はマウスモデルでの神経病原性の低下が認められたことから、神経細胞における Ab4-GFP の特性解析として、マウス胎仔初代神経細胞 (CX (M) 細胞) における EHV-1 遺伝子発現パターン解析を行った。すなわち、感染細胞における EHV-1 全 76 遺伝子の転写量を quantitative reverse transcription PCR (RT-qPCR) によって定量した。この際、GAPDH を内部標準遺伝子とし、それぞれの遺伝子の定量値を補正した。FHK 細胞での転写動態も同様に調べ、遺伝子の発現パターンを CX (M) 細胞のものと比較した。

(5) lncRNA-X1 および X2 の発現量を感染細胞内で定量的に評価するため、strand-specific RT-qPCR による検出系の構築を試みた。

4. 研究成果

(1) 網羅的転写開始点解析

網羅的転写開始点解析により、感染時期に依存して転写開始点の場所が変化している ORF が複数見つかった。さらに、Ab4-GFP 作製時に GFP を挿入した ORF62 と ORF63 の間にある nc 領域にも転写開始点が認められた (図 2)。これらの転写産物は、sense long ncRNA (lncRNA-X1) と anti-sense (lncRNA-X2) の二種類あることが予測された。

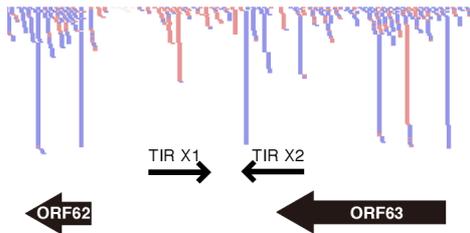


図 2：非コード領域からの転写産物

感染 8 時間後の細胞では、ORF62 と ORF63 の間からも転写開始点が複数認められた。

(2) lncRNA 発現確認

(1)の結果を踏まえ TIR X1 と TIR X2 の間を増幅する特異的なプライマーを設計し、PCR により発現の有無を確認した(図 3)。Ab4p 感染細胞では予想通り 566 bp のバンドが認められた(図 3 レーン 1)が、Ab4-GFP 感染細胞では認められなかった(図 3 レーン 2)。Ab4-GFP では、GFP 遺伝子の挿入によって、nc 領域からの転写産物の転写が阻害されたと考えられた。

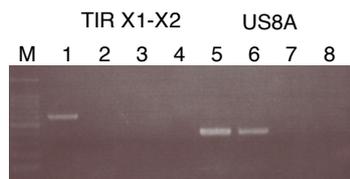


図 3：lncRNA 発現確認

M: 100 bp マーカー

1, 5: Ab4p cDNA; 2, 6: Ab4-GFP cDNA;

3, 7: Ab4p RNA; 4, 8: Ab4-GFP RNA

1 から 4: TIR X1-X2 primers

5 から 8: US8A primers

(3) 5'および 3'-末端配列解析

(1)の結果を踏まえ lncRNA 特異的プライマーを設計し、5'および 3'-RACE PCR を行った。5'-RACE PCR については、(1)とほぼ同等な結果を得られたが、(1)では認められなかった転写開始点が複数存在することが明らかとなった。3'-RACE PCR により両 lncRNA についてポリ A 鎖付加部位も明らかにした。網羅的転写開始点解析および 5'-RACE PCR の結果を踏まえ、それぞれの lncRNA の転写開始点

を決定した。lncRNA-X1 は 1028 塩基長、lncRNA-X2 は 679 塩基長だった。

(4) EHV-1 感染細胞における EHV-1 遺伝子発現パターン解析

FHK 細胞におけるウイルス遺伝子発現パターンは、Ab4p と Ab4-GFP 間で違いが認められなかった(図 4)。一方、CX (M)細胞では、Ab4-GFP 感染細胞において ORF42, 62 および 64 の発現が減少ないしは検出限界以下だった。

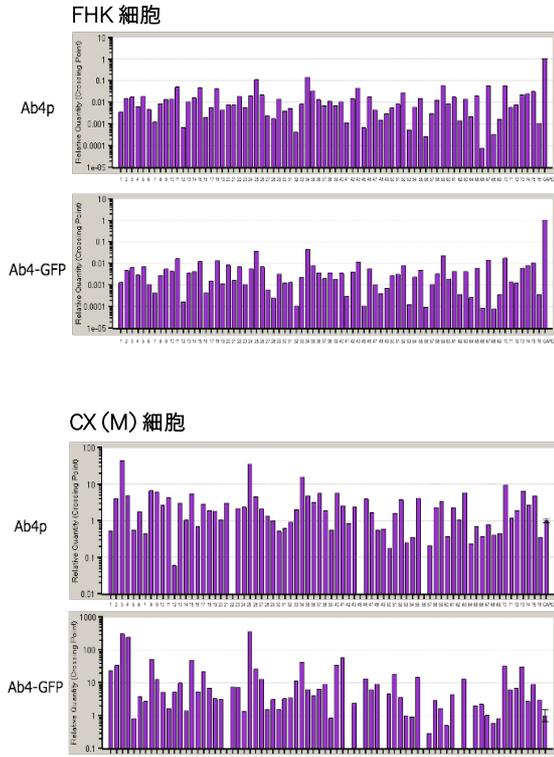


図 4：EHV-1 遺伝子発現パターン

EHV-1 の 70 個の ORF の転写量を定量した。上が FHK 細胞感染時、下が CX (M)細胞感染時。FHK 細胞感染時には各 ORF 発現量にウイルス差が認められないが、CX (M)細胞では、いくつかの遺伝子の発現量が減少ないしは検出限界以下になった。

(5) lncRNA 特異的 RT-qPCR 系の構築

in vitro transcription 反応もしくは EHV-1 感染細胞から抽出した RNA を用い、strand-specific RT-qPCR に用いるプライマーの特異性を評価した。in vitro transcription 反応によって得られた陽性もしくは陰性コントロールにも非特異的な増幅反応が認められたことから、プライマーの設計もしくは逆転写反応の条件検討が必要である。

<引用文献>

- ① Ibrahim, el S.M., Pagmajav, O., Yamaguchi, T., Matsumura, T., Fukushi, H. Growth and virulence alterations of equine herpesvirus 1 by insertion of a green fluorescence protein gene in the intergenic region between ORFs 62 and 63. Microbiology and Immunology, vol.

48, No.11, 2004, 831-842.

- ② Kornienko, A.E., Guenzl, P.M., Barlow, D. P., and Pauler, F. M. Gene regulation by the act of long non-coding RNA transcription, BMC Biology, 2013, DOI: 10.1186/1741-7007-11-59.

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 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)

○取得状況 (計 0 件)

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：1 0 1 5 6 7 6 3

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：