

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：82609

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19108

研究課題名(和文)単純ヘルペスウイルス1型のエンベロープ形成効率を制御する宿主因子の研究

研究課題名(英文)Study of the host factor important for secondary envelopment of HSV-1

研究代表者

小林 郷介 (KOBAYASHI, Kyouzuke)

公益財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム医科学研究分野・主任研究員

研究者番号：80644989

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：翻訳後調節を担うmiRNAの一種であるmiR-199a-3pが様々なウイルスの増殖を抑制する報告があることから、miR-199a-3pが多くのウイルス感染に共通して重要となる宿主因子を標的にしている可能性が示唆された。代表者はこの様なmiRNAがウイルス増殖をどのように抑制するかを調べるために、単純ヘルペスウイルス1型(HSV-1)をモデルに研究を行った。その結果、miR-199a-5p、-3pがARHGAP21の発現を抑制しており、これによってゴルジ体の機能が制御されている可能性や、この制御がHSV-1の2次エンベロープ形成の場の維持に寄与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：miRNAs regulate gene expression post transcriptionally. MiR-199a-3p, a kind of miRNA, reportedly impairs replication of various viruses. These evidences suggested that miR-199a-3p targets host factors important for replication of various virus. We here aimed to identify such host factors targeted by miR-199a using Herpes simplex virus-1 (HSV-1) as a model system. We identified human ARHGAP21 as a target of both miR-199a-5p and miR-199a-3p. Our results suggested that this molecule regulate the function of the Golgi apparatus and secondary envelopment of HSV-1 at the trans cisternae of the Golgi apparatus.

研究分野：ウイルス学

キーワード：ヘルペスウイルス miRNA ゴルジ体 エンベロープ形成

### 1. 研究開始当初の背景

ウイルスは宿主細胞内で増殖するために様々な宿主因子を利用する。一方、宿主細胞はウイルスを排除するための防御機構を複数備えている。したがって宿主細胞のウイルス感受性は、宿主遺伝子の発現様式に大きく依存しているといえる。この発現調節を担う宿主因子として代表者が注目しているのは、転写後調節を担う miRNA である。miRNA は 20 塩基程度の一本鎖 RNA で、3'UTR に部分相補配列をもつ mRNA に結合し翻訳抑制や mRNA 分解を引き起こす。一つの miRNA は、100 前後の遺伝子を標的にすると考えられている。既に細胞増殖、分化、発癌などと密接に関わっていることが明らかになっており、ウイルスへの感受性を制御する宿主 miRNA が存在する可能性も十分に考えられる。

これまでに、miRNA 過剰発現及び活性抑制による網羅的スクリーニングによって、miR-199a-3p が、ヘルペスウイルス亜科に属するウイルスに対して強い阻害効果を示すことが報告された。この他にも、セムリキ森林ウイルス、B 型肝炎ウイルス (HBV) および C 型肝炎ウイルス (HCV) など、DNA ウイルスから RNA ウイルスまで多岐にわたって miR-199a-3p による増殖抑制が報告されている。このことから、miR-199a-3p が特定のウイルスの RNA genome やウイルス由来 mRNA を標的にしているのではなく、多くのウイルス感染に共通して重要となる宿主因子を標的にしている可能性が示唆される。

代表者の研究室では、miR-199a-3p および同一前駆体 (pre-miRNA) から生じる miR-199a-5p が、上皮カガン細胞の遺伝子発現様式を 2 群に切り換える「分子スイッチ」として機能することを明らかにしてきた (Cancer Res., 71:1680-9, 2010)。これは、両 miRNA が転写因子やエピジェネティカルな発現制御因子との間で強固な遺伝子制御ネットワークを形成することに起因する。また、このスイッチングが retrovirus の gene silencing と密接に関わっていることも、代表者の研究室で明らかにしている (J.Virol., 83:11569-80, 2009 & J.Bio.Chem., 277:15859-64, 2002)。

### 2. 研究の目的

代表者は miR-199a-3p および miR-199a-5p がウイルス増殖をどのように抑制するかを調べるために、単純ヘルペスウイルス 1 型 (HSV-1) をモデルに研究を行う。

### 3. 研究の方法

(1) Pre-miR-199a 過剰発現細胞内で HSV-1 の遺伝子発現動態や透過型電子顕微鏡による形態観察など多角的な解析を通して HSV-1 増殖サイクルのどの段階が阻害されているか調べる。

(2) miR-199a によって阻害されるステップと細胞機能との関連を推測し、miR-199a の標的遺伝子を同定することにより、HSV-1 粒子成熟効率に関わる宿主因子を同定することを目的として以下の実験を行う。実験は大まかに以下の 3 点に分けられる。

標的候補分子のリストアップ:

miR-199a の標的候補分子を複数のアルゴリズムを利用して予測し、その中から HSV-1 粒子成熟に関連しそうなものを選択する。

機能面からの絞り込み: 標的候補分子が実際に miR-199a の標的であるか確認すると同時に、標的候補分子が HSV-1 増殖効率と関連するか、shRNA によるノックダウンで確認する。

HSV-1 粒子成熟に関与する宿主因子の同定・解析: これまでの解析から絞り込んだ宿主因子や、そのシグナル経路が HSV-1 粒子形成にどのように寄与しているか明らかにする。

### 4. 研究成果

(1) miR-199a 存在下での HSV-1 遺伝子発現の経時的解析から、前初期、初期、および後期遺伝子群の発現抑制をウエスタンブロットティングおよび mRNA の定量 PCR 法によって調べたところ、miR-199a による抑制は認められないことから、増殖サイクルの後期が miR-199a の標的であることが示唆された。透過型電子顕微鏡解析によってウイルスカプシドの観察を行ったところ、細胞質内膜区画における 2 次エンベロープ形成が miR-199a によって阻害されていることが示唆された。

(2) 超解像顕微鏡 N-SIM を用いて、ウイルスカプシド (VP5) およびエンベロープタンパク質 (gD) の染色標本を観察することで、1 粒子レベルの観察が可能であることを利用して、各種細胞内小器官のマーカーと同時に染色することで 2 次エンベロープ形成部位の特定を試みたところ、ゴルジ体のトランス槽がその部位であることが示唆された。

(3) miR-199a-5p, miR-199a-3p の標的候補遺伝子を TargetScan や PicTar などのアルゴリズムを利用してリスト化し、その中からゴルジ体と関連する遺伝子をジーンオンロジーなどの情報を利用して 21 遺伝子まで候補を絞り込んだ。

(4) 候補分子の shRNA によるスクリーニングから、HSV-1 の増殖や 2 次エンベロープ形成に関わる分子として ARHGAP21 に着目した。ARHGAP21 が miR-199a-5p および miR-199a-3p 両者の標的分子であることが、3' 非翻訳領域を用いたルシフェラーゼレポート実験から明らかになった。

(5) miR-199a の発現量が高い細胞株 3 種

類と低い細胞株3種類における ARHGAP21 発現量をウエスタンブロッティングによって測定すると、miR-199a が高い細胞株では ARHGAP21 発現量が低く、miR-199a が低い細胞株では ARHGAP21 の発現量が高いことが分かった。また、これらの細胞株における HSV-1 の2次エンベロープ形成効率を透過型電子顕微鏡で調べると、miR-199a が高い細胞株ではエンベロープ形成効率が低く、miR-199a が低い細胞株ではエンベロープ形成効率が高いことが明らかになった。

(6) miR-199a 過剰発現や ARHGAP21 に対する shRNA の導入によって、ゴルジ体の細胞内分布が変化し、安定性が失われることが、N-SIM による解析から明らかになった。

(7) miR-199a 過剰発現や ARHGAP21 に対する shRNA の導入によって、HSV-1 感染時にゴルジ体のトランス槽に存在する分子の量が減少することが明らかになった。

以上の結果から、miR-199a が ARHGAP21 を介してゴルジ体の機能を制御している可能性や、この制御が HSV-1 の2次エンベロープ形成の場の維持に寄与している可能性が示唆された。

#### 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4件)

Hiramatsu H, Kobayashi K, Kobayashi K, Haraguchi T, Ino Y, Todo T, Iba H. The role of the SWI/SNF chromatin remodeling complex in maintaining the stemness of glioma initiating cells.、Sci. Rep.、査読有り、7、2017、889、DOI:10.1038/s41598-017-00982-3

Gong H, Kobayashi K, Sugi T, Takemae H, Horimoto T, Xuan X, Akashi H, Kato K. Pull-down method to access the cell surface receptor for *Toxoplasma gondii*.、Parasitol. Int.、査読有り、65(5 Pt B)、2016、pp.514-515、<https://doi.org/10.1016/j.parint.2016.08.013>

Kobayashi K, Kato K. Evaluating the use of heparin for synchronization of *in vitro* culture of *Plasmodium falciparum*.、Parasitol. Int.、65(5 Pt B)、2016、pp.549-551、<https://doi.org/10.1016/j.parint.2016.0>

9.002

Haraguchi T, Kondo M, Uchikawa R, Kobayashi K, Hiramatsu H, Kobayashi K, Chit UW, Shimizu T, Iba H. Dynamics and plasticity of the epithelial to mesenchymal transition induced by miR-200 family inhibition.、Sci.Rep.、6、2016、21117、DOI:10.1038/srep21117

〔学会発表〕(計4件)

小林郷介、MiR-199a inhibits secondary envelopment of HSV-1 by suppressing a Golgi-localized GAP for Cdc42、第63回日本ウイルス学会、2015年11月22日～24日、福岡国際会議場(福岡県福岡市)

小林郷介、Antiviral host miRNA, miR-199a, regulates Cdc42 activity on the Golgi to inhibit HSV-1 secondary envelopment、第14回あわじしま感染症・免疫フォーラム、2015年9月8日～11日、淡路夢舞台国際会議場(兵庫県淡路市)

小林郷介、HSV-1の2次エンベロープ形成を阻害する宿主 miRNA の標的因子の研究、第2回感染コンピテンシー若手研究会、2015年7月17日、マホロバマインズ三浦(神奈川県三浦市)

小林郷介、宿主 miRNA によるウイルス増殖阻害に関する研究、第12回ウイルス学キャンプ、2015年5月23日、ニューウェルシテイ湯河原(静岡県熱海市)

〔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：

6．研究組織

(1)研究代表者

小林 郷介 (KOBAYASHI, Kyouzuke)  
公益財団法人東京都医学総合研究所・ゲ  
ノム医科学研究分野・主任研究員  
研究者番号：80644989

(4)研究協力者

伊庭 英夫 (IBA, Hideo)  
千葉大学・真菌医学研究センター・教授

相良 洋 (SAGARA, Hiroshi)  
東京大学・医科学研究所・助教