

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：34306

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18925

研究課題名(和文)カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス複製におけるウイルス性前開始複合体の分子基盤の解明

研究課題名(英文)Molecular machinery of viral pre-initiation complex in KSHV replication

研究代表者

渡部 匡史(WATANABE, Tadashi)

京都薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：60634326

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)：ヒトを含む真核生物ではゲノムからRNAをつくりだす際に、TATAボックス結合タンパク質、基本転写因子群、RNAポリメラーゼIIなどからなる前開始複合体を形成し、転写を開始する。近年、カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス(KSHV)をはじめとした一部のヘルペスウイルスにて、前開始複合体と機能的相同性をもつウイルス性前開始複合体の存在が明らかになりつつある。本研究により、KSHVがコードするORF34ならびにORF66が、ウイルス性前開始複合体の構成因子として機能し、かつウイルス複製にきわめて重要であることを見出した。

研究成果の概要(英文)：In the cell of eukaryote including homo sapience, pre-initiation complex consists of TATA box binding protein, general transcription factors and RNA polymerase II initiates transcription for RNA production from its genome. Recently, It has been revealed that partial herpesviruses including Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) posses viral protein complex having functional homology to pre-initiation complex of eukaryote. The viral protein complex is called as "viral pre-initiation complex (vPIC)" and contributes to viral gene transcription. This study cleared that KSHV coding gene ORF34 and ORF66 are essential for efficient virus production via viral late gene expression. Furthermore, our results showed that both of them function as the component of vPIC.

研究分野：ウイルス学

キーワード：カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス ヘルペスウイルス 遺伝子発現制御 ウイルス性前開始複合体

## 1. 研究開始当初の背景

カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス(KSHV)は、がんウイルスであることが知られている。初感染後、健常人では生涯に渡り潜伏感染を維持し、腫瘍を発症することはない。しかしながら、感染者が極度な免疫低下状態(AIDS発症や臓器移植後の免疫抑制など)に陥った場合、KSHVは再活性化しカポジ肉腫をはじめとしたがんを発症させることが知られている。とくに本邦ではAIDS関連KSHV疾患が臨床的に問題となっている。また、アフリカ諸国ではKSHV関連腫瘍の発症率が高く、国際的に緊急に解決すべき感染症として認知されている。これらのことから、KSHV関連腫瘍の克服は、国内的にもまたグローバル・ヘルスへの貢献といった観点からもきわめて重要であるといえる。

ヘルペスウイルス属は、他のウイルスと比較しても多種多様な遺伝子を保持していることが知られており、とくにKSHVは90種以上のタンパク質やmiRNA、さらにはlncRNAをコードしていると考えられている。KSHVは感染後に、潜伏感染または感染性ウイルス産生を伴う溶解感染状態をとることが知られている。潜伏感染状態の維持は数種の潜伏感染遺伝子が担っている。一方で、溶解感染時には、KSHVゲノムのコードする90%以上の遺伝子の転写活性化が生じる。これら個々の遺伝子コード産物の機能や宿主因子との関わりを理解することが、未だ明らかとなっていない。KSHV複製・感染の分子基盤の解明さらには疾患克服には必要不可欠であると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究ではKSHV複製・感染機構を明らかにすることを目的とし、とくにヘルペスウイルス亜科(サイトメガロウイルスなど)やヘルペスウイルス亜科(KSHVやEBウイルスなど)のみに保存されている遺伝子群に着目した。これらの役割についてはながらく不明であったが、これらにコードされているウイルスタンパク質が複合体を形成し、さらにはその複合体がウイルス遺伝子転写開始時に、宿主の前転写開始複合体と機能的相同性を有していることが報告されつつあった。このウイルスタンパク質複合体は、ウイルス性前開始複合体(viral pre-initiation complex: vPIC)とも呼称されている。ウイルス性前開始複合体は、とくにウイルス構造タンパク質などをコードする後期遺伝子群の発現にとって必要不可欠であるとされている。

同時期に我々も、その遺伝子群のひとつであるKSHV ORF34が、ウイルス後期遺伝子転写に深く関与するという結果を得ていた。これを発展させるとともに、その他の遺伝子群でKSHVでの生理的意義が不明であったORF66ならびにORF23の機能解析を中心にとりくんだ。

## 3. 研究の方法

### (1)KSHV複製におけるORF34の機能解析

ORF34欠失変異体発現プラスミドをもちいて、ウイルス性前開始複合体を形成しうる因子それぞれとの会合に必須な領域の同定にとりくむとともに、ORF34欠損KSHV産生細胞への導入によりウイルス産生量が回復するかどうかについて検討した。

### (2)KSHV複製におけるORF66の機能解析

BAC改変系を用いてORF66欠損KSHV産生細胞を樹立し、ウイルス複製そのものや産生に至る各ステップについて、各種解析を実施した。また分子機能についても、KSHVゲノム上のウイルス遺伝子転写開始領域への結合能や、ウイルス性前開始複合体形成の責任領域の同定などにとりくんだ。

### (3)KSHV複製におけるKSHV ORF23の機能解析

上述のORF66と同様に、BAC改変系を用いてORF23欠損KSHVの性状解析を実施した。

## 4. 研究成果

### (1)KSHV複製におけるORF34の機能解析

各種ORF34欠失変異体とウイルス性前開始複合体を形成しうる因子それぞれとの会合について検討したところ、ORF34はその中央領域を中心にその他の因子と会合していた。しかし、TBPホモログとされるORF24との相互作用領域はC末端領域であった。このことは、ORF34のC末端領域がORF24へのアンカーとして働き、さらにORF34中央領域でその他の因子群をつなぎ留めていることが考察された。すなわちORF34はウイルス性前開始複合体のハブとしている可能性が示唆された。このことは、ウイルス産生量の回復との相関からも機能的な裏付けをとることができた。

### (2)KSHV複製におけるORF66の機能解析

ORF66欠損KSHV BACクローンを作出し、さらに細胞に導入することでORF66欠損KSHV産生細胞株を樹立した。ORF66欠損KSHV産生細胞からのウイルス産生量は、野生型KSHV産生細胞と比して約1/100-1/1000程度の顕著な低下をみとめた。一方で、細胞内でのKSHVゲノム複製への影響はみとめなかった。さらにRT-qPCRアレイによるKSHV遺伝子の半網羅的発現解析から、ORF66欠損KSHV産生細胞では野生型KSHV産生細胞と比較して、ウイルス後期遺伝子群の発現が低下していることを確認した。また、KSHVゲノム上のウイルス後期遺伝子遺伝子転写開始領域への結合能をChIPアッセイにより確認したところ、ウイルス複製時に有意にORF66がKSHVゲノムの当該領域と会合していることが明らかとなった。以上のことから、ORF66がウイルス性前開始複合体の形成を介して、ウイルス後期遺伝子群の発現制御を担っている

ことが強く示唆された。

次に、ORF66 がウイルス性前開始複合体中でどのように機能しているのかを明らかにするため、機能的ドメインの探索にとりくんだ。複合体形成に中心的役割を担うと我々が明らかにした ORF34 と ORF66 との結合領域を、ORF66 欠失変異体を用いた Pull-down アッセイにより検討したところ、ORF66 の複数の領域が重要であることが示唆された。さらに、上記領域中のヘルペスウイルスに保存されているアミノ酸残基について、アラニンスキャニングにより重要アミノ酸残基の同定をこころみたところ、数箇所の特定のアミノ酸モチーフ配列が重要だとの結果が得られた。同定したモチーフ配列保持領域のひとつは、前開始複合体構成因子である基本転写開始因子のドメインの一部と、類似相同構造を有する領域であった。

(2)KSHV 複製における KSHV ORF23 の機能解析

ORF23 欠損 KSHV BAC クローンを作出し、培養細胞への遺伝子導入により ORF23 欠損 KSHV 産生細胞株を樹立した。ORF23 欠損 KSHV 産生細胞からのウイルス産生量などについて、野生型 KSHV 産生細胞と比較検討したものの、現時点で顕著な表現型の差異はみとめていない。このことは、ORF23 がウイルス複製とは直接的には関与しないものの、感染細胞制御などのその他の機能を有している可能性を示唆するものであると考える。

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3件)

1. Mel Campbell, Tadashi Watanabe, Kazushi Nakano, Ryan R. Davis, Yuanzhi Lyu, Clifford G. Tepper, Blythe Durbin-Johnson, Masahiro Fujimuro, Yoshihiro Izumiya, “KSHV episomes reveal dynamic chromatin loop formation with domain-specific gene regulation”, *Nature Communications*, 9, 49, 2018. [査読有]  
DOI: 10.1038/s41467-017-02089-9

2. Yusuke Baba, Zenpei Shigemi, Naoko Hara, Misato Moriguchi, Marina Ikeda, Tadashi Watanabe, Fujimuro Masahiro, “Arctigenin induces the apoptosis of primary effusion lymphoma cells under conditions of glucose deprivation”, *International Journal of Oncology*, 52, 505-517, 2017. [査読有]  
DOI: 10.3892/ijo.2017.4215

3. Mayu Nishimura, Tadashi Watanabe, Syota Yagi, Takahiro Yamanaka, Masahiro Fujimuro, “Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus ORF34 is essential for late

gene expression and virus production”, *Scientific Reports*, 7, 329, 2017. [査読有]  
DOI: 10.1038/s41598-017-00401-7

[学会発表](計29件)

1. 渡部匡史, “カポジ肉腫関連ヘルペスウイルスの複製機構と創薬研究”, 日本薬学会第138年会, 2018年

2. 渡部匡史, 西村麻佑, 細川晃平, 橋本彩, 藤室雅弘, “カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス遺伝子 ORF66 は、ウイルス性後期遺伝子発現に必須である”, 日本薬学会第138年会, 2018年

3. 伊藤知恵, 渡部匡史, 藤室雅弘, “カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス複製におけるウイルス性タンパク質 ORF11 の機能解析”, 日本薬学会第138年会, 2018年

4. 鶴見さやか, 渡部匡史, 藤室雅弘, “カポジ肉腫関連ヘルペスウイルスのコードするウイルス性プロテアーゼ ORF17 はウイルス産生に必須である”, 日本薬学会第138年会, 2018年

5. 田中美和, 渡部匡史, 藤室雅弘, “カポジ肉腫関連ヘルペスウイルスのコードする ORF28 の機能解析”, 日本薬学会第138年会, 2018年

6. 前田佳子, 渡部匡史, 藤室雅弘, “カポジ肉腫関連ヘルペスウイルスにおけるウイルス性開始前複合体タンパク質の相互作用解析”, 日本薬学会第138年会, 2018年

7. Tadashi Watanabe, Mayu Nishimura, Aya Hashimoto, Kouhei Hosokawa, Mel Campbell, Ryan Davis, Clifford G Tepper, Yoshihiro Izumiya, Masahiro Fujimuro, “Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus ORF66 is essential for virus production”, 第40回日本分子生物学会年会, 2017年

8. Tadashi Watanabe, Mayu Nishimura, Aya Hashimoto, Kouhei Hosokawa, Mel Campbell, Ryan Davis, Clifford G. Tepper, Yoshihiro Izumiya, Masahiro Fujimuro, “カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス ORF66 はウイルス複製に必須である”, 第65回日本ウイルス学会学術集会, 2017年

9. Aya Hashimoto, Tadashi Watanabe, Atsuko Sugimoto, Yuichi Abe, Jun Adachi, Takeshi Tomonaga, Masahiro Fujimuro, “カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス遺伝子 ORF36(ウイルス性キナーゼ)の性状解析”, 第65回日本ウイルス学会学術集会, 2017年

10. Tatsuo Yamaguchi, Tadashi Watanabe,

Atsuko Sugimoto, Masahiro Fujimuro, “カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス(KSHV)複製におけるウイルスキナーゼ ORF21 の機能解析”, 第 65 回日本ウイルス学会学術集会, 2017 年

11. 伊藤知恵、渡部匡史、藤室雅弘, “カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス複製におけるウイルス性タンパク質 ORF11 の機能解析”, 第 67 回日本薬学会近畿支部総会・大会, 2017 年

12. 前田佳子、渡部匡史、藤室雅弘, “カポジ肉腫関連ヘルペスウイルスにおけるウイルス性開始前複合体タンパク質の相互作用解析”, 第 67 回日本薬学会近畿支部総会・大会, 2017 年

13. Tadashi Watanabe, Mayu Nishimura, Aya Hashimoto, Kouhei Hosokawa, Mei Campbell, Ryan Davis, Clifford G. Tepper, Yoshihiro Izumiya, Masahiro Fujimuro, “Kaposi’s sarcoma-associated herpesvirus ORF66 is essential for virus production”, 20th International Workshop on Kaposi’s Sarcoma Herpes Virus and Related Agents, 2017 年

14. Mel Campbell, Christopher Chen, Yuanzhi Lyu, Kazuhi Nakano, Chie Izumiya, Tadashi Watanabe, Yoshihiro Izumiya, “Spatiotemporal gene regulation and KSHV replication”, 20th International Workshop on Kaposi’s Sarcoma Herpes Virus and Related Agents, 2017 年

15. 渡部匡史、西村麻佑、橋本彩、細川晃平、藤室雅弘 “カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス遺伝子 ORF66 のウイルス複製における機能解析”, 第 14 回 EB ウイルス研究会, 2017 年

16. 杉本温子、渡部匡史、阿部雄一、足立淳、朝長毅、藤室雅弘, “網羅的解析を用いた KSHV 溶解感染に関連する宿主因子の探索”, 第 31 回ヘルペスウイルス研究会, 2017 年

17. 山口達生、渡部匡史、藤室雅弘, “カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス(KSHV)複製におけるウイルスキナーゼ ORF21 の機能解析”, 第 31 回ヘルペスウイルス研究会, 2017 年

18. 渡部匡史、西村麻佑、八木将太、橋本彩、藤室雅弘, “KSHV ORF34 はウイルス性前開始複合体形成を介して後期遺伝子発現制御に関与する”, 日本薬学会第 137 回年会, 2017 年

19. 橋本彩、渡部匡史、藤室雅弘, “カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス遺伝子 ORF36 (ウ

イルス性キナーゼ) の性状解析”, 日本薬学会第 137 回年会, 2017 年

20. 山口達生、渡部匡史、藤室雅弘, “カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス複製におけるウイルス性キナーゼ ORF21 の機能解析”, 日本薬学会第 137 回年会, 2017 年

21. 渡部匡史、西村麻佑、八木将太、橋本彩、藤室雅弘, “カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス ORF34 はウイルス性転写前開始複合体形成を介した後期遺伝子発現に関与する”, 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016 年

22. Tadashi Watanabe, Mayu Nishimura, Shouta Yagi, Aya Hashimoto, Takahiro Yamanaka, Masahiro Fujimuro, “KSHV ORF34 is essential for late gene expression and virus production”, 第 64 回日本ウイルス学会学術集会, 2016 年

23. 小松遙花、渡部匡史、藤室雅弘, “カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス(KSHV) ORF64 欠損株及び変異株の性状解析”, 第 66 日本薬学会近畿支部総会・大会, 2016 年

24. 橋本彩、渡部匡史、藤室雅弘, “カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス遺伝子 ORF36 (ウイルス性キナーゼ) の性状解析”, 第 66 日本薬学会近畿支部総会・大会, 2016 年

25. 山口達生、渡部匡史、藤室雅弘, “カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス複製におけるウイルス性キナーゼ ORF21 の機能解析”, 第 66 日本薬学会近畿支部総会・大会, 2016 年

26. 渡部匡史、西村麻佑、八木将太、橋本彩、山中崇裕、藤室雅弘, “KSHV ORF34 はウイルス性前開始複合体形成を介して後期遺伝子発現制御に関与する”, 第 13 回 EB ウイルス研究会, 2016 年

27. Tadashi Watanabe, Mayu Nishimura, Shota Yagi, Takahiro Yamanaka, Yoshihiro Izumiya, Masahiro Fujimuro, “Kaposi’s sarcoma-associated herpesvirus ORF34 is essential for late gene expression and virus production”, 19th International Workshop on Kaposi’s Sarcoma Herpesvirus (KSHV) and related Agents, 2016

28. Mel Campbell, Tadashi Watanabe, Kazushi Nakano, Christopher Chen, Ryan Davis, Clifford G. Tepper, Masahiro Fujimuro, Yoshihiro Izumiya, “KSHV chromatin looping facilitates effective gene expression; gene cluster activation via direct K-RTA binding at a viral chromatin hub”, 19th International

Workshop on Kaposi ' s Sarcoma Herpesvirus (KSHV) and related Agents, 2016

29. 渡部匡史、西村麻佑、八木将太、山中崇裕、橋本 彩、藤室雅弘, “ KSHV ORF34 は溶解感染後期遺伝子発現に必須である ”, 第30回ヘルペスウイルス研究会, 2016年

〔図書〕(計1件)

Tadashi Watanabe, Atsuko Sugimoto, Kouhei Hosokawa, Masahiro Fujimuro, “ Signal Transduction Pathways Associated with KSHV-Related Tumors ”, Ch15, pp.321-355, Human Herpesviruses (Eds. Kawaguchi Yasushi, Mori Yasuko, Kimura Hiroshi), Springer Singapore, 2018

〔その他〕

ホームページ等

(1) 京都薬科大学HP |細胞生物学分野の渡部匡史助教が「第39回分子生物学会年会」において優秀ポスター賞を受賞しました  
[https://www.kyoto-phu.ac.jp/news/index.php?c=topics\\_view&pk=274&icon=2](https://www.kyoto-phu.ac.jp/news/index.php?c=topics_view&pk=274&icon=2)

(2) 京都薬科大学HP | 「日本薬学会第138年会」において、本学の学生7名が学生優秀発表者賞を受賞しました  
[https://www.kyoto-phu.ac.jp/news/index.php?c=topics\\_view&pk=405&icon=2](https://www.kyoto-phu.ac.jp/news/index.php?c=topics_view&pk=405&icon=2)

(3) 京都薬科大学 細胞生物学分野HP  
<http://labo.kyoto-phu.ac.jp/cellbiology/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

渡部 匡史 (WATANABE, Tadashi)  
京都薬科大学・細胞生物学分野・助教  
研究者番号: 6 0 6 3 4 3 2 6

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号:

### (4) 研究協力者

藤室 雅弘 (FUJIMURO, Masahiro)  
京都薬科大学・細胞生物学分野・教授

泉屋吉宏 (IZUMIYA, Yoshihiro)

UC Davis Comprehensive Cancer Center・  
Dermatology・Associate Professor

伊藤昭博 (ITO, Akihiro)  
東京薬科大学・生命科学部・細胞情報学  
科学研究室・教授