

平成 21 年 5 月 20 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007-2008
 課題番号：19590487
 研究課題名(和文)ヘルペスウイルスのウイルスゲノム複製依存的後期遺伝子発現のタイムキーパーは何か
 研究課題名(英文)What is a timekeeper of the herpesvirus late gene transcription dependent on the viral DNA replication?
 研究代表者
 磯村 寛樹 (ISOMURA HIROKI)
 愛知県がんセンター(研究所)、腫瘍ウイルス学部、主任研究員
 研究者番号：20294415

研究成果の概要：

ヘルペスウイルスの転写制御はまず、主として宿主の転写因子によって活性化される前初期遺伝子が活性化される。そして、その前初期遺伝子がウイルスの DNA 複製に必要な初期遺伝子を活性化し、DNA 複製が開始される。そして、DNA 複製に依存してウイルスの構造蛋白の産生に必要な後期遺伝子が活性化される。ヘルペスウイルスの転写はこうした厳密なカスケードによって制御されている。しかし、どうしてヘルペスウイルスの後期遺伝子の転写がウイルス DNA の複製依存的に起こるのか、その分子機構は全く不明である。そこで、本研究は組換えヒトサイトメガロウイルス(HCMV)を用いてその分子機構を明らかにすることを目的とし、以下のことを明らかにした。

(1) 後期遺伝子プロモーターの活性化には、前初期遺伝子産物の他にウイルス DNA ポリメラーゼ付随タンパク質である UL44 蛋白が、ウイルス複製に対する作用とは独立して必要であることを明らかにした。

(2) その UL44 遺伝子プロモーターには 3 つの TATA box が存在し、その中間位に存在する TATA box は感染後期に活性化される。その後期プロモーターの TATA 配列は他の UL44 初期プロモーターと異なり、noncanonical な配列 5'-GCTGTATTATTAGA-3' である。これを canonical な配列 5'-GCTGTATataaAGA-3' (小文字は変異部位) に変更すると、感染初期に DNA 複製非依存的に活性化されるようになった。これまでは遺伝子の特異的発現制御はエンハンサーが担い、TATA 配列を含むプロモーターは基本転写を維持すると考えられてきたが、ヘルペスウイルスの時間依存的遺伝子発現制御はプロモーターの TATA 配列の違いがその役割を担っている可能性が考えられる。

交付額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|-----------|-----------|
| 2007 年度 | 1,800,000 | 540,000 | 2,340,000 |
| 2008 年度 | 1,700,000 | 510,000 | 2,210,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

研究分野：ウイルス学

科研費の分科・細目：ウイルス学

キーワード：ヘルペスウイルス、転写、後期遺伝子

1. 研究開始当初の背景

HCMVは通常幼児期に不顕性に感染し、その後終生潜伏感染し特に問題にはならない。しかし、癌の化学療法後や造血幹細胞移植後ではヒトの免疫能が著明に低下し、体内に潜伏感染していたHCMVが再活性化して肺炎、骨髄抑制等の重篤な合併症を引き起こすことが重大な問題となっており、その解決が求められている。

一方、わが国の妊婦のHCMV抗体保有率は毎年1.1%ずつ低下し、初感染が幼児期ではなく妊婦に起こり、胎児に発育不全、難聴等のいわゆるTORCH症候群を引き起こすことが問題になっている。また、近年では原因不明の難聴の中にはHCMV感染症がその原因である場合が存在することが、聾学校からのレトロスペクティブな調査からも分かってきている（創薬等ヒューマンサイエンス総合事業、国立感染症研究所井上班）。そこで、HCMVの学童期におけるワクチン接種の必要性が考えられており、米国では野生株と実験室株のキメラウイルスを用いた臨床試験が始まり、その有効性が報告されている。そこで、私達はHCMVの転写制御機構を明らかにし、その分子基盤をもとに弱毒HCMVワクチン株の作成及びその作成方法を提示することにより、HCMV感染症の克服をその最終目標とする。

2. 研究の目的

ヘルペスウイルスの転写制御はまず、主として宿主の転写因子によって活性化される前初期遺伝子が活性化される。そして、その前初期遺伝子がウイルスのDNA複製に必要な初期遺伝子を活性化し、DNA複製が開始される。そして、DNA複製に依存してウイルスの構造蛋白の産生に必要な後期遺伝子が活性化される。ヘルペスウイルスの転写はこうした厳密なカスケードによって制御されている。しかし、どうしてヘルペスウイルスの後期遺伝子の転写がウイルスDNAの複製依存的に起こるのか、その分子機構は全く不明である。本研究は組換え

ヒトサイトメガロウイルス(HCMV)を用いてその分子機構を明らかにすることを目的とする。

転写活性化因子 UL123 遺伝子産物 IE2 蛋白は *in vitro* のレポーター遺伝子アッセイではウイルス DNA 複製に必須な初期遺伝子と、DNA 複製に依存して活性化される後期遺伝子のプロモーターを共にウイルスの他の遺伝子の発現を必要とせずに活性化することができる。どうして後期遺伝子プロモーターは *in vitro* では IE2 遺伝子単独で活性化することができるにも関わらず、実際の HCMV 感染細胞では phosphonoacetic acid (PAA) やアシクロビルでウイルス DNA 複製を止めると、IE2 蛋白は発現しているにも関わらずウイルス後期遺伝子は発現しないのであろうか。本研究はこの理由を明らかにすることで実際の感染細胞での後期遺伝子発現制御機構の分子基盤を解明し、後期遺伝子の発現が低下し、ウイルス粒子の産生が低下した弱毒ウイルスワクチン株の作成を試みる。

3. 研究の方法

約 200kb HCMV ウイルスゲノム全長がクローニングされた BAC(bacterial artificial chromosome) DNA (Dr. Liu F より供与、University of California, Berkeley) を bacteriophage lamda の recombination proteins, *exo*, *beta*, and *gam* が lac repressor 存在下に発現する E. coli(Dr. Court より供与、NIH)に遺伝子導入することにより、大腸菌内で HCMV 200kb DNA を PCR 法で増幅した 50 base pair の相同領域を含む 2 本鎖 DNA と部位特異的に組換え、大腸菌内で組換えた HCMV BAC DNA を HCMV 感染許容細胞に

遺伝子導入することにより、組換えウイルスを迅速に作成する方法を開発した。(*Isomura H et al, J. Virol., 2004 and 2005, 2007, 2008a and 2008b*) (下図参照)。

4 . 研究成果

(1) 後期遺伝子プロモーターの活性化には、前初期遺伝子産物の他にウイルス DNA ポリメラーゼ付随タンパク質である UL44 蛋白が、ウイルス複製に対する作用とは独立して必要であることを明らかにした。

(2) その UL44 遺伝子プロモーターには 3 つの TATA box が存在し、その中間位に存在する TATA box は感染後期に活性化される。その後期プロモーターの TATA 配列は他の UL44 初期プロモータ

ー と異なり、 noncanonical な配列 5'-GCTGTATTATTAGA-3'である。これを canonical な配列 5'-GCTGTATataaAGA-3' (小文字は変異部位) に変更すると、感染初期に DNA 複製非依存的に活性化されるようになった。これまでは遺伝子の特異的発現制御はエンハンサーが担い、TATA 配列を含むプロモーターは基本転写を維持すると考えられてきたが、ヘルペスウイルスの時間依存的遺伝子発現制御はプロモーターの TATA 配列の違いがその役割を担っている可能性が考えられる。

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. **Isomura H, Stinski MF, Kudoh A, Nakayama S, Iwahori S, Sato Y, Tsurumi T. The late promoter of the human cytomegalovirus viral DNA polymerase processivity factor has an impact on delayed early and late viral gene products but not on viral DNA synthesis. *J. Virol.*, **81: 6241-6247, 2007****

2. **Isomura, H., Stinski, MF., Kudoh, A., Nakayama, S., Murata, T., Sato, Y., Iwahori, S. and Tsurumi, T.: A cis element between the TATA Box and the transcription start site of the major immediate-early promoter of human cytomegalovirus determines efficiency of viral replication. *J Virol*, **82: 849-858, 2008****

3. **Isomura, H., Stinski, MF., Kudoh, A., Murata, T., Nakayama, S., Sato, Y., Iwahori, S. and Tsurumi, T.: Noncanonical TATA Sequence in the UL44 Late Promoter of Human Cytomegalovirus is required for the**

accumulation of late viral transcripts. **J Virol**, **82:1638-1646. 2008**

〔学会発表〕(計6件)

国際学会

1. Isomura H, Stinski M.F., Kudoh A, Nakayama S, Iwahori S, Sato Y, Tsurumi T: The late promoter of the human Cytomegalovirus viral DNA polymerase processivity factor has an impact on late viral gene products but not on viral DNA synthesis. 32nd International Herpesvirus Workshop, Asheville, North Carolina, 2007
2. Isomura H, Stinski M.F., Kumimoto H, Tsurumi T: Open reading frame 76 of cytomegalovirus contains an internal ribosome entry site. 33rd International Herpesvirus Workshop, Estoril, Portugal, 2008

国内学会

1. 磯村寛樹, 鶴見達也: Dual effects of DNA polymerase processivity factor in the Human Cytomegalovirus on viral replication, 第66回日本癌学会学術総会, 横浜, 2007
2. 磯村寛樹, 鶴見達也: ヒトサイトメガロウイルス DNA ポリメラーゼ付随タンパク質のウイルス増殖に果たす2つの役割, 第55回

日本ウイルス学会学術集会, 札幌, 2007

3. 磯村寛樹, 鶴見達也: ヒトサイトメガロウイルスの UL44 後期発現遺伝子プロモーターの non-canonical な TATA 配列がウイルス後期遺伝子発現に必要である, 第67回日本癌学会学術総会, 名古屋, 2008
4. 磯村寛樹, 鶴見達也: ヒトサイトメガロウイルス UL44 遺伝子後期発現プロモーターの non-canonical TATA 配列の役割, 第56回日本ウイルス学会学術集会, 岡山, 2008

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計2件)

1. ヒトサイトメガロウイルスの複製制御、
発明者: 磯村寛樹、鶴見達也、出願番号: 特願 2005-069561 特開 2006-246814

2. 弱毒化組換えヒトサイトメガロウイルス、
発明者: 磯村寛樹、鶴見達也、出願番号: 特願 2006-277793 特開 2008-092854
〔その他〕

6. 研究組織
(1)研究代表者

磯村寛樹 (ISOMURA HIROKI)
愛知県がんセンター(研究所) 腫瘍ウイルス学部、主任研究員、研究者番号 20294415

(2)研究分担者

鶴見達也 (TSURUMI TATSUYA)
愛知県がんセンター(研究所) 腫瘍ウイルス学部、部長、研究者番号 90172072

(3)連携研究者
Mark F. Stinski