

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19790336

研究課題名 (和文) KSHV ゲノムの潜伏感染複製およびゲノム分配・維持機構の解明

研究課題名 (英文) Elucidation of the mechanisms of latent replication and genome maintenance in KSHV.

研究代表者

大崎 恵理子 (OHSAKI ERIKO)

浜松医科大学・医学部・特任研究員

研究者番号：50447801

研究成果の概要：

カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス (KSHV) は細胞周期に同調した複製と分裂時の均等なゲノム分配機構により潜伏感染を維持している。KSHV ゲノムの潜伏感染複製にはウイルス因子 LANA と複製開始起点 (ori-P) として Terminal repeat (TR) が必要であり、ORC, Cdc6, Cdt1 などの宿主複製開始因子 (pre-RC) を集結させて達成されると考えられる。

本研究では、LANA が難溶性分画 (核マトリックス分画) へ集積することを明らかにした。この結果は IFA による細胞内局在と一致した。さらに、TR 挿入プラスミドの複製には LANA の核マトリックス分画への局在が必要であった。細胞分画後の Ori-P 領域の局在を PCR により調べたところ、LANA の局在と同様に核マトリックス分画に局在が見られた。LANA は細胞周期を通じてこの分画に存在する一方、TR は G1 期特異的な局在であった。よって LANA 依存的に Ori-P 領域が核マトリックス上にリクルートされ、G1 期に pre-RC の形成が行なわれることで複製を開始し、複製後の DNA 領域は核マトリックス上から遊離することが示唆された。本結果は、LANA と pre-RC との相互作用を重要視したこれまでの見解について問題提起するものである。また、KSHV ゲノム内の TR 近傍に matrix-attachment region (K-MAR) の特徴を示す領域 (K-MAR) を見いだした。K-MAR を挿入した GFP 発現 G418 耐性プラスミドを導入した細胞は薬剤選択下で有意に高いコロニー形成能を示した。K-MAR は自立複製能力を持たないことから、薬剤耐性遺伝子のより安定な発現に関与していることが示唆された。Ori-P や K-MAR による複製・分配・維持機構や遺伝子安定発現機構を明らかにすることで、将来的には遺伝子治療用ベクター開発にも有用な情報が得られるものと考えられる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,900,000	0	1,900,000
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,300,000	420,000	3,720,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：分子

## 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、感染細胞内においてゲノムのコピー数が一定に維持されており、細胞周期に同調した複製と分裂時の均等なゲノム分配機構により潜伏感染を維持していると考えられる。KSHV ゲノムの潜伏感染複製にはウイルス因子の LANA と複製開始起点 (Ori-P) として Terminal repeat (TR) が必要であり ORC, Cdc6, Cdt1 などの宿主複製開始因子 (pre-RC) を集結させて達成されると考えられる。本研究では、LANA の欠失変異体を用いた細胞分画により、難溶性分画 (核マトリックス分画) への LANA の特異的な集積に N 末と C 末両方の領域が重要であることを明らかにした。さらにこの領域は、Ori-P である TR を含むプラスミドの複製にも必要であることが示唆された。また宿主ゲノム上に存在する matrix-attachment region (K-MAR) は自立複製維持を可能にする領域との報告が最近なされているが、我々は KSHV ゲノム内の TR の近傍に K-MAR の特徴を示す領域 (K-MAR) を見いだした。コロニーフォーメーションアッセイにより、K-MAR を挿入したプラスミドが、TR や TR 内の Ori-P 領域を挿入したプラスミドなどと比較して有意に高いコロニー形成能を示した。このことは、細胞内に導入したプラスミドがエピゾームとして複製、分配維持されるか、もしくは安定に薬剤耐性遺伝子を発現していることを示唆している。

## 2. 研究の目的

本研究は、KSHV の潜伏感染時における複製、分配、維持機構を明らかにすると同時に、KSHV の宿主因子依存性という特徴を生かして、宿主側のメカニズムを理解し情報を発信する研究である。KSHV は 1994 年に同定された最も新しいヘルペスウイルスであることから、これまでの研究は主に KSHV の遺伝子解析や病態発症機構の解析などが主流であった。しかし我々はヘルペスウイルスの特徴である潜伏感染機構に着目し、その宿主依存性という性質が宿主側の生命現象を解明する上で、非常に興味深いツールとなりうるのではないかと考えた。KSHV は潜伏感染時に、LANA と TR の存在下で宿主複製開始因子 (pre-RC) を利用して、宿主の細胞周

期と同調的にゲノム複製を行なっていると考えられる。KSHV ゲノムのような必要最小限のエレメントを用いた複製・分配機構を解析することで、これまでその複雑さ故に解析困難であったヒトのゲノム複製・分配機構のモデル構築に新たな道を拓くと考えている。

以上の背景をふまえて K-MAR と TR がウイルスゲノムにおいてどのような機能を果たしているのかを解析することによって、潜伏感染時におけるゲノム複製・分配・維持機構の解明を目指した。

## 3. 研究の方法

### I) KSHV ゲノムの潜伏感染複製と、複製起点決定機構の解明

GFP を融合させた ORC1 を作製し、感染細胞での安定発現株を樹立し、LANA、ウイルス複製起点 (TR) との相互作用、局在を細胞周期別に検討した。細胞分画法を用いて、核質/細胞質分画、クロマチン分画、ヒストン/DNA 分画、核マトリックス分画を精製して GFP-ORC1 のタンパクの局在を調べた。KSHV ゲノムの複製起点であると考えられている TR 領域が LANA や pre-RC とともに核マトリックスに存在しているかどうかを PCR により確認した。

### II) KSHV ゲノムの分配・維持機構の解明

KSHV ゲノム内に存在する K-MAR 領域のエピゾーム維持への関与の有無を検討する為に、K-MAR 領域をクローニングしたプラスミドを構築し、培養細胞へ導入した。K-MAR 導入プラスミドがエピゾーマルに維持されるかどうかを Hirt 法によってプラスミドを精製し DpnI 消化後、サザンブロットにより確認した。

KSHV の K-MAR 領域だけではプラスミドのエピゾーマル維持が出来ない可能性を考慮して、LANA の存在、非存在下での比較、また KSHV の複製起点である TR 領域を K-MAR とともに挿入したプラスミドを構築し、エピゾーマル維持において必要な要素を検討した。

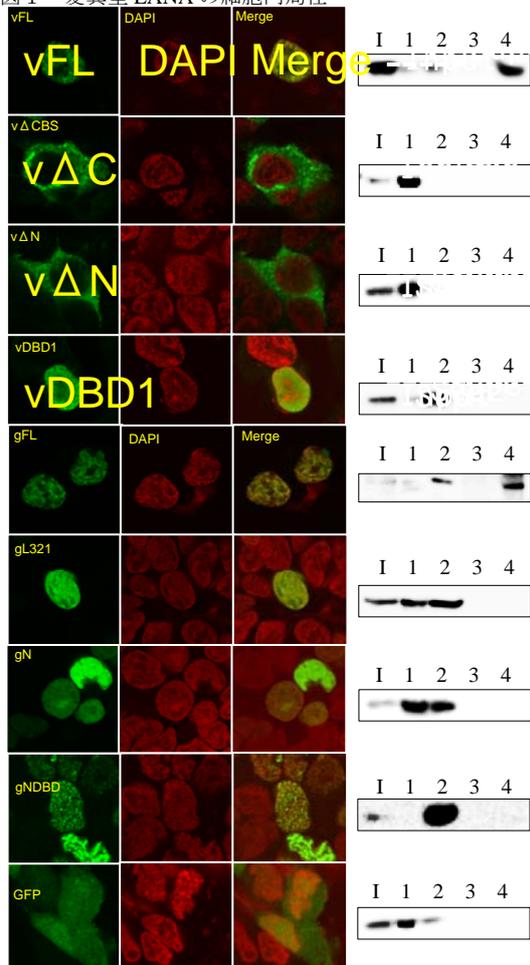
## 4. 研究成果

### I) KSHV ゲノムの潜伏感染複製と、複製起点決定機構の解明

KSHV 潜伏感染複製において LANA と

pre-RCs の相互作用を調べるために細胞分画を行なったところ、LANA は他のウイルス因子に依存せず細胞周期を通じて難溶性分画に位置した。欠失変異体では LANA の N 末領域から約 100a.a. を欠損した時点で LANA は難溶性分画から核質・細胞質分画へ局在が変化した (図 1, v $\Delta$ CBS, v $\Delta$ N)。同時にこれらの欠失変異体の細胞内局在を間接蛍光抗体法(IFA)により共焦点レーザー顕微鏡で観察した。N 末を欠失した LANA は IFA により細胞質に局在することが示された。C 末約 200a.a. のみの変異型 LANA (vDBD1) は IFA では核内に細かい顆粒様のドット状に局在が変化した。細胞分画法では難溶性分画から出てクロマチン分画に移動した。このことから、核内での顆粒状の局在はクロマチンとの相互作用による局在パターンであることが示唆された。N 末領域のみ (gL321, gN) の場合、核質・細胞質とクロマチン分画の両方に分画され、IFA では核内に一様に局在した。

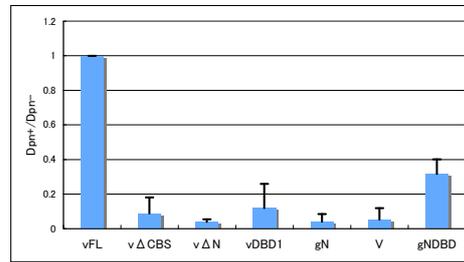
図 1 変異型 LANA の細胞内局在



I: input, 1: nucleo-cytoplasmic, 2: chromatin, 3: histones/DNA, 4: nuclear matrix

これらの変異型 LANA はいずれも著しく複製効率が落ちた。(図 2)

図 2 変異型 LANA における複製効率

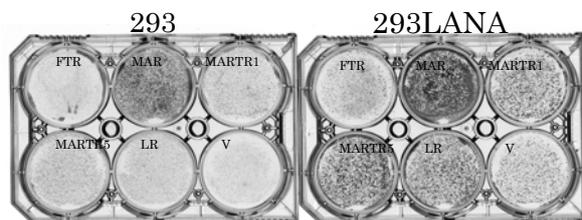


今回の生化学的な細胞分画法および IFA により、変異型 LANA の局在の変化とそれによる複製への影響が明らかになった。難溶性分画には染色体の構造維持や複製・転写制御に重要な役割を持つ核マトリックス構成因子が存在する。このような核マトリックス分画に pre-RCs と LANA が共局在することは非常に興味深く KSHV ori-P の LANA 結合領域だけでなくレプリケーターと呼ばれる 32bp の GC に富んだ配列が必要であることを部分的に説明する。LANA の核マトリックス分画への集積は一部のアミノ酸配列によるものではなく構造全体としての物理化学的性質や 3 次元的立体構造によるものと考えられた。

## II) KSHV ゲノムの分配・維持機構の解明

コロニーフォーメーションアッセイにより K-MAR を挿入した GFP 発現 G418 耐性プラスミドを導入した細胞は薬剤選択下で有意に高いコロニー形成能を示した。(図 3) 特に LANA 非存在下においては K-MAR 導入細胞の増殖率は顕著に高かった。

図 3. プラスミド導入 2 週間後のコロニー形成



ただし、薬剤選択下で 2 週間培養した細胞を回収し、サザンブロットによりプラスミドの維持能力を検証したところ、細胞内で Dpn I 耐性の新規合成された DNA は K-MAR 導入プラスミドにおいて検出されなかったのに対し、TR 導入細胞では LANA 存在下で新規合成 DNA を検出した。興味深いことに Dpn I 非存在下において K-MAR 導入プラスミドは他と比べて高いレベルで検出された。この

結果はコロニーフォーメーションアッセイの結果と一致する。したがって薬剤選択下において K-MAR 導入細胞は有意にプラスミドを維持し、増殖能力のある細胞が多いことが考えられた。K-MAR と TR を両方導入したプラスミドは TR のみのものと比べて DNA 複製効率は低下するが、薬剤選択下における細胞増殖率は TR のみのものよりも高かった。TR はヘテロクロマチンの集積に関与しており、近傍遺伝子の転写活性を抑制化へ向かわせると考えられるため、薬剤耐性遺伝子の発現抑制や、クロマチン構造の変化による K-MAR 自身の機能抑制の可能性が考えられた。そのために TR のみ導入したプラスミドは、安定な複製機能は持っているものの薬剤選択下における増殖効率は低いと考えられた。これらのことから、K-MAR 導入細胞のコロニー形成能が高い理由として、K-MAR が自立複製能力を持たないが薬剤耐性遺伝子のより安定な発現に関与している可能性、もしくはプラスミドの分配維持のみの限定的な機能を持つ可能性が示唆された。今後 K-MAR や TR における複製や遺伝子発現、ウイルスゲノムのエピゾーマル維持に必要な最小領域の同定、さらにはそこに介在する因子を同定することにより、プラスミドの安定発現やエピゾーマル維持における詳細なメカニズムを明らかにすることが出来ると考えられた。

#### 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 1 件)

Eriko Ohsaki, Tohru Suzuki, Masato Karayama, Keiji Ueda  
Virus Research  
Vol. 139, p74-84, 2009, 査読あり

[学会発表] (計 8 件)

##### 1) 大崎恵理子

「KSHV の潜伏感染因子 LANA の核マトリックス分画への局在はウイルスゲノム複製の機能に影響する」第 31 回日本分子生物学会年会、神戸、2008 年 12 月

##### 2) 大崎恵理子

「KSHV の潜伏感染因子 LANA の細胞内局在と複製の関係」第 56 回日本ウイルス学会学術集会、岡山、2008 年 10 月

##### 3) Eriko Ohsaki

「The localization of LANA to the nuclear

matrix fraction is linked to the KSHV genome replication」

The 11<sup>th</sup> international workshop on KSHV and related agents

Birmingham, UK, July, 2008

##### 4) 大崎恵理子

「カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス(KSHV)の潜伏感染因子 LANA の欠失変異による細胞内局在の変化と複製機能への影響」第 5 回 EB ウイルス研究会、米子、2008 年 7 月

##### 5) 大崎恵理子

「カポジ肉腫関連ヘルペスウイルスにおける潜伏感染複製因子の核マトリックス分画への集積」第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会  
神奈川、2007 年 12 月

##### 6) 大崎恵理子

「核マトリックス分画集積に必要な十分な LANA 領域の同定とカポジ肉腫関連ヘルペスウイルス潜伏感染複製との関係」第 55 回日本ウイルス学会学術集会  
北海道、2007 年 10 月

##### 7) Eriko Ohsaki

「Association of LANA, the viral replication origin (Ori-P), and cellular replication machinery with nuclear matrix」The 10<sup>th</sup> international workshop on Kaposi's sarcoma associated herpesvirus and related agents, Portland, USA, 2007 年 8 月

##### 8) 大崎恵理子

「宿主複製開始因子を用いたカポジ肉腫関連ヘルペスウイルス(KSHV)の潜伏感染複製と核マトリックスとの関係」第 4 回 EB ウイルス研究会、東京、2007 年 6 月

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

大崎 恵理子 (OHSAKI ERIKO)  
浜松医科大学・医学部・特任研究員  
研究者番号：50447801

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし