

令和 3 年 5 月 25 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2020

課題番号：18H06141・19K21256

研究課題名（和文）単純ヘルペスウイルスの感染不均一性を司る要因解明

研究課題名（英文）Analysis of heterogeneity of Herpes Simplex Virus infection

研究代表者

丸鶴 雄平（Maruzuru, Yuhei）

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：50825750

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では(i)Fluidigm社のC1 systemを用いてHSV感染細胞の1細胞トランスクリプトームのデータを取得した。(ii)取得した1細胞トランスクリプトームデータの統計解析によってHSVの感染不均一性に関わる可能性のある複数の候補遺伝子を同定した。(iii)CRISPR-Cas9によってそれらの候補遺伝子のノックアウト細胞を複数作出し、ウイルス増殖、及びウイルスの遺伝子発現を制御する宿主遺伝子を同定した。(iv)同定した宿主遺伝子はウイルスの転写因子と結合することによってHSVの遺伝子発現移行を制御することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

単純ヘルペスウイルス(HSV)溶解感染時の遺伝子発現制御機構に関する研究はウイルス増殖の制御法だけでなく、再活性化機構の理解とその制御法の開発に繋がる極めて重要なテーマの一つである。本研究ではHSV感染の細胞毎のバラツキの原因をscRNA-seqによって解析することによりウイルスの新規遺伝子発現制御機構を解明することができた。本研究によって得られた知見は、HSVが引き起こす病態の理解やウイルス再活性化の制御法の基盤的な知見に成り得る。

研究成果の概要（英文）：The results obtained from this study are following. (i) We obtained single-cell transcriptome data of HSV-infected cells using Fluidigm C1 system. (ii) By statistical analysis of the obtained single-cell transcriptome data, we identified several candidate genes that may be involved in heterogeneity of HSV infection. (iii) We generated several knockout cells of these candidate genes by CRISPR-Cas9 and identified host genes that regulate viral replication and gene expression. (iv) The identified host gene regulated the HSV gene expression by binding to viral transcription factor.

研究分野：ウイルス学

キーワード：ウイルス シングルセル解析

## 1 . 研究開始当初の背景

単純ヘルペスウイルス(HSV)はヒトに口唇ヘルペス、性器ヘルペス、脳炎といった多様な疾患を引き起こす医学上重要なウイルスの一つである。近年の1細胞解析技術の発達によって、これまで細胞集団の総体を解析することによって解明されてきた様々な現象が、1細胞レベルでは不均一な現象の結果であることが明らかとなりつつある。ウイルスの感染現象も例外ではなく、培養細胞に高 MOI でウイルスを感染させても感染の進行が細胞毎に不均一であることが HIV やインフルエンザウイルス等で報告されている。

研究代表者が研究開始当初までに行ってきた HSV 感染細胞におけるウイルス蛋白質の局在解析から、培養細胞に対する HSV の高 MOI 感染時においてもウイルスの遺伝子発現が不均一であることは明確であった。この不均一性の原因解明はウイルスの増殖機構の理解、及びウイルス増殖の制御法に繋がることが期待されるが、研究開始当初までに「何が HSV の遺伝子発現の不均一性を司るのか？」という問いの答えは明らかになっていなかった。

## 2 . 研究の目的

従来法として、FACS 解析によっても細胞の不均一性を定量的に検出することは可能であった。しかし、FACS 解析では、原理的に測定項目数は見分けられる蛍光の種類に依存し、不均一性の原因を解析するに足るデータは得られない。本研究は FACS 解析と比較し、測定項目数が格段に多い1細胞トランスクリプトーム解析によって、HSV の遺伝子発現の不均一性の原因を解明することによって、HSV の新規遺伝子発現制御機構を明らかにすることを目的とする。また、これらの解析によって、HSV 増殖に必要な宿主蛋白質、もしくはシグナル伝達経路を同定し、HSV 感染症の新たな制御法に関する基盤的な知見を得ることを目的とする。

## 3 . 研究の方法

- (1) HSV 感染細胞の1細胞トランスクリプトームデータを取得
- (2) 1細胞トランスクリプトームのデータの統計解析により HSV 感染の不均一性に関与する候補遺伝子を同定
- (3) (2)で同定された候補遺伝子のノックアウト細胞を作製
- (4) (3)で作製したノックアウト細胞に HSV を感染させ、ウイルス増殖効率、ウイルス遺伝子発現効率を野生型細胞と比較することで HSV の遺伝子発現を制御する宿主遺伝子を同定
- (5) 同定した宿主遺伝子のウイルス遺伝子発現制御機構を解明

## 4 . 研究成果

- (1) 高 MOI で HSV を感染させた HeLa 細胞から1細胞シーケンサー用のライブラリを Fluidigm 社の C1 system を用いて作製し、次世代シーケンサーによって解析することで、100細胞程度のトランスクリプトームデータを取得した。
- (2) (1)で得られたデータの統計解析によって HSV 感染の不均一性に関与する可能性のある候補遺伝子を複数同定した。

- (3) (2)で同定したそれぞれの宿主遺伝子のノックアウト細胞を CRISPR-Cas9 によって作製し、HSV を感染させ、ウイルス増殖効率と遺伝子発現効率を野生型細胞と比較することで、ウイルス増殖、及びウイルス遺伝子発現に關与する宿主遺伝子を同定した。
- (4) (3)で同定した宿主遺伝子産物とウイルス遺伝子発現を制御する複数の HSV 遺伝子産物の相互作用解析を行うことによって同定した宿主遺伝子が HSV の転写因子と結合することによって HSV の遺伝子発現を制御することが明らかになった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takeshima Kosuke, Arii Jun, Maruzuru Yuhei, Koyanagi Naoto, Kato Akihisa, Kawaguchi Yasushi	4. 巻 93
2. 論文標題 Identification of the Capsid Binding Site in the Herpes Simplex Virus 1 Nuclear Egress Complex and Its Role in Viral Primary Envelopment and Replication	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 e01290-19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/JVI.01290-19	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Arii Jun, Takeshima Kosuke, Maruzuru Yuhei, Koyanagi Naoto, Kato Akihisa, Kawaguchi Yasushi	4. 巻 93
2. 論文標題 Roles of the Interhexamer Contact Site for Hexagonal Lattice Formation of the Herpes Simplex Virus 1 Nuclear Egress Complex in Viral Primary Envelopment and Replication	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 e00498-19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/JVI.00498-19	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Arii Jun, Watanabe Mizuki, Maeda Fumio, Tokai-Nishizumi Noriko, Chihara Takahiro, Miura Masayuki, Maruzuru Yuhei, Koyanagi Naoto, Kato Akihisa, Kawaguchi Yasushi	4. 巻 9
2. 論文標題 ESCRT-III mediates budding across the inner nuclear membrane and regulates its integrity	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 3379(2018)
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-018-05889-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kato Akihisa, Oda Shinya, Watanabe Mizuki, Oyama Masaaki, Kozuka-Hata Hiroko, Koyanagi Naoto, Maruzuru Yuhei, Arii Jun, Kawaguchi Yasushi	4. 巻 92
2. 論文標題 Roles of the Phosphorylation of Herpes Simplex Virus 1 UL51 at a Specific Site in Viral Replication and Pathogenicity	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 e01035-18
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/JVI.01035-18	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Koyanagi Naoto, Kato Akihisa, Takeshima Kosuke, Maruzuru Yuhei, Kozuka-Hata Hiroko, Oyama Masaaki, Arie Jun, Kawaguchi Yasushi	4. 巻 92
2. 論文標題 Regulation of Herpes Simplex Virus 2 Protein Kinase UL13 by Phosphorylation and Its Role in Viral Pathogenesis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 e00807-18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JVI.00807-18	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takeshima Kosuke, Arie Jun, Maruzuru Yuhei, Koyanagi Naoto, Kato Akihisa, Kawaguchi Yasushi	4. 巻 93
2. 論文標題 Identification of the Capsid Binding Site in the Herpes Simplex Virus 1 Nuclear Egress Complex and Its Role in Viral Primary Envelopment and Replication	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 e01290-19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JVI.01290-19	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Arie Jun, Takeshima Kosuke, Maruzuru Yuhei, Koyanagi Naoto, Kato Akihisa, Kawaguchi Yasushi	4. 巻 93
2. 論文標題 Roles of the Interhexamer Contact Site for Hexagonal Lattice Formation of the Herpes Simplex Virus 1 Nuclear Egress Complex in Viral Primary Envelopment and Replication	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 e00498-19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JVI.00498-19	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

#### 6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

#### 7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------