

平成 22 年 5 月 13 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20790353
 研究課題名（和文） ヘルペスウイルス感染による宿主選択的スプライシング制御と免疫回避機構
 研究課題名（英文） Regulation of host-alternative splicing in herpesvirus-infected cells
 研究代表者
 野島 孝之（NOJIMA TAKAYUKI）
 東京医科歯科大学・大学院疾患生命科学研究所・特任助教
 研究者番号：80431956

研究成果の概要（和文）：単純ヘルペスウイルス 2 型（HSV-2; Herpes Simplex Virus type-2）は世界中に広く伝播している DNA ウイルスで、細胞核内でゲノム複製を行う。本研究では、HSV-2 がどのように HSV-2 自身のゲノム複製に最適な環境を作り出しているのかを調べた。その結果、HSV-2 が持つタンパク質が宿主であるヒトの mRNA 成熟段階に干渉していたことがわかり、その干渉がウイルス増殖に対して重要な働きをしていることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：Herpes simplex virus type-2 (HSV-2) is one of DNA viruses, which is spread world-wide and replicates own virus genome in host-cell nucleus. In this study, I examined how HSV-2 replicates own genome in the nucleus. Here I showed that HSV-2 virus protein interfered with the step of host mRNA processing. I further showed that this interference played important role of virus replication.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2008 年度 | 1,700,000 | 510,000 | 2,210,000 |
| 2009 年度 | 1,600,000 | 480,000 | 2,080,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,300,000 | 990,000 | 4,290,000 |

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：単純ヘルペスウイルス、選択的スプライシング、前骨髄球性白血病（PML）遺伝子、ICP27、Pre-mRNA、スプライシングアイソフォーム、ミニ遺伝子

1. 研究開始当初の背景

単純ヘルペスウイルス 2 型（HSV-2; Herpes Simplex Virus type-2）は世界中に広く伝播している DNA ウイルスで、性器ヘルペスを主症状とする。HSV-2 のウイルスゲノム

複製は宿主細胞の核内で行われるが、HSV-2 ゲノムは宿主染色体には組み込まれず、リング状となり、PML (promyelocytic leukemia protein, TRIM19) を主成分とするドット状の核内構造体 PML ボディに取り

込まれる。PMLは抗ウイルス作用を持つ遺伝子群 TRIM (tripartite motif)タンパク質ファミリーの一員であり、PMLはHSV-2に対してウイルス増殖抑制作用を有する。PMLボディはHSV-2複製を抑制する場と考えられるが、その形状は感染が進むにつれて変化し、PMLボディ様の核内構造体が構成され、その場でウイルスゲノムの複製が行われるようになる。PMLボディがウイルス複製という事象に何らかの重要な役割を果たしているのは明らかであり、ウイルス感染によってPMLボディの性状が変化することから、申請者はPMLタンパク質の性質がHSV-2感染によって変わるのではないかと考えた。申請者は、PML遺伝子から合成されるpre-mRNAが選択的スプライシングを受け、少なくとも7種類のスプライシングバリエーションが産生されることに注目し、HSV-2感染によってPML選択的スプライシングが制御されている可能性を調べた。その結果、非感染状態の細胞ではI型とII型PMLを主に発現しているが、HSV-2感染細胞ではV型が主に発現するようになった。現在までのPMLの機能研究はI型について行われており、II型やV型PMLの機能についてはほとんど明らかではない。申請者はHSV-2をモデルウイルスとして、ウイルスが宿主のRNA選択的スプライシングに影響を与えることを初めて明らかにしたため、その制御機構や制御することの生理的な意義について解析することにした。

2. 研究の目的

申請者は、HSV-2がPML遺伝子の選択的スプライシング機構に干渉していることを突き止めていた。そこで、以下の点について詳細に解析することにした。

(1) スプライシングで変化するPMLアイソフォームの生理的意義：

PML遺伝子から産生される複数のスプライシングアイソフォームのHSV-2ウイルス増殖に対する生理的意義を解析し、なぜHSV-2がPML選択的スプライシングを制御する必要があるのかについて調べる。

(2) PML選択的スプライシングのHSV-2による分子制御機構：

PML選択的スプライシングを制御する因子をスクリーニングによって明らかにし、その因子がどのように選択的スプライシングを制御しているのか、分子機構を解明する。

(3) 選択的スプライシングを標的とした抗ウイルス剤開発：

申請者は、選択スプライシングを蛍光タンセすることでPML選択的スプライシングを可視化できるレポーターを作成した。この

パク質によってリアルタイムにモニターできるようなアッセイ系を開発する。この系を用いてPML選択的スプライシングを制御する薬剤をスクリーニングし、新しい抗ウイルス薬としての可能性を追求する。

3. 研究の方法

本研究では、PML選択的スプライシング制御の生理的意義を、培養細胞を用いて解析した。また、蛍光タンパク質レポーターを構築することで、PML選択的スプライシングを制御しているウイルスタンパク質を探索し、スプライシング制御機構について詳細に解析した。

(1) PMLアイソフォームの機能解析：

PMLはアポトーシスを引き起こす作用や抗ウイルス作用が報告されているが、機能のほとんどがI型PMLを用いて解析されてきた。それ故に、I型以外のPMLスプライシングアイソフォームの生理的意義についてはほとんど解析されていない。本研究では、HSV-2感染によってPMLのII型からV型へと変化することを見出したため、II型とV型の機能をウイルス増殖抵抗性の点について調べた。本研究で用いたHeLa細胞には、複数のPMLスプライシングアイソフォームが発現していた。そのため、申請者は全ての種類のPMLスプライシングアイソフォームを標的とするようなsiRNAを設計し、内在性のPMLスプライシングアイソフォームを全てノックダウンした。その状況下において、siRNA耐性にした個々のPMLスプライシングアイソフォームcDNAをトランスフェクションすることで、PMLスプライシングアイソフォームをそれぞれ1種類のみ発現するHeLa細胞を作り出した。これらのHeLa細胞にHSV-2を感染させ、産生されたウイルス量をプラークアッセイによって調べた。

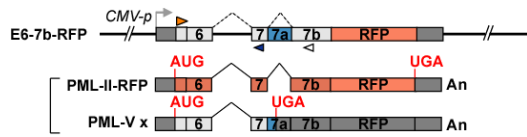
(2) PML選択的スプライシングのHSV-2による分子制御機構の解析：

① PMLスプライシングレポーターの構築：

PMLは非感染細胞ではI型とII型mRNAが主に発現しているが、HSV-2感染条件下ではI型とII型が減少し、V型が選択されるようになった。申請者はII型からV型への切り換えが選択的スプライシングによって制御されていることを突き止めた。II型からV型への切り換えは、エクソン7aを含むか取り除くかで決まり、エクソン7aが含まれた場合にはV型、取り除かれた場合にはII型となる。そこで、申請者はエクソン6から7bまでの遺伝子領域をクローニングし、下流にRFPのコード領域を連結させ、PMLスプライシングレポーターはII型を選択した場合のみ、RFPが発現するように

設計されている (図1)。

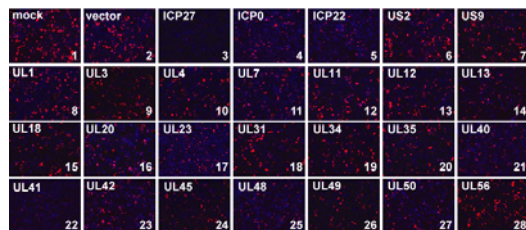
図1. *PML* スプライシングレポーター



② *PML* 選択的スプライシングの制御因子の探索:

PML スプライシングレポーターと HSV-2 がコードするウイルスタンパク質の cDNA を同時にトランスフェクションし、RFP の発現を調べることで制御因子の探索を行った (図2)。RFP の発現を抑制した因子については、RT-PCR 法で *PML* RNA のスプライシングパターンを調べた。その結果、 α 期 (感染初期) タンパク質である ICP27 (infected cell protein 27) が単独で II 型から V 型への *PML* 選択的スプライシングを制御していることが明らかになった。

図2. *PML* スプライシング制御因子の探索



③ ICP27 タンパク質の *PML* 選択的スプライシング制御機構の解析:

PML 選択的スプライシング制御機構を詳細に調べるために、ICP27 変異体を複数作成し、*PML* のスプライシングパターンを変化させることができるかどうかを RT-PCR 法にて調べた。また、*PML* スプライシングレポーターに対しても変異体を作成し、どの遺伝子領域が ICP27 タンパク質によるスプライシング制御に重要であるかを調べた。直接的なスプライシング制御を証明するために *in vitro* スプライシングによって調べた。

(3) 選択的スプライシングを標的とした抗ウイルス剤の探索:

スプライシングを変化させることができる低分子化合物は今までに数種類報告されている。そのため、*PML* 選択的スプライシングを変化させ、ウイルス増殖を抑制する低分子化合物を獲得できる可能性がある。そこで、申請者は *PML* スプライシングレポーターを安定的に発現している細胞株の樹立を試みた。*PML* レポーター安定発現細胞の作成には、invitrogen 社の

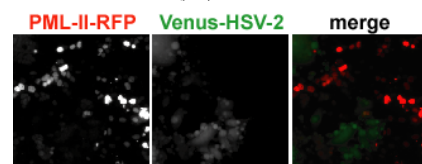
Jump-In システムを用いた。このシステムを用いて、*PML* レポーターの発現がテトラサイクリンで誘導可能な HEK293 細胞を作成することができた。

4. 研究成果

本研究では、HSV-2 がどのように HSV-2 自身のゲノム複製に最適な環境を作り出しているのかを調べた。申請者は、*PML* 遺伝子から合成される pre-mRNA が選択的スプライシングを受け、複数のスプライシングバリエーションが産生されることに注目し、HSV-2 感染下における *PML* アイソフォームの機能を調べた。その結果、*PML*-II 型アイソフォーム (*PML*-II) が HSV-2 増殖促進に関わることが明らかになった。興味深いことに、HSV-2 感染細胞での *PML* アイソフォームの発現を調べた結果、*PML*-II の発現は抑制され、*PML*-V の発現が促進していた。*PML*-II から *PML*-V への切り替えは選択的スプライシングによる制御である。申請者は、このスプライシング制御因子を明らかにするために、蛍光タンパク質のコード領域を連結させた *PML* ミニ遺伝子を作成し、制御因子のスクリーニングを行った。その結果、制御因子としてウイルスタンパク質である ICP27 (infected cell protein 27) を同定することができ (図2)、ウイルスタンパク質のスプライシング制御機構を解き明かすことができた。以上の結果から、宿主細胞は ICP27 を認識することにより、効率的な HSV-2 複製に必要な *PML*-II 発現をスプライシングによって抑制することが示唆された。

本研究の成果は、ウイルス増殖に関わる遺伝子の一部をミニ遺伝子化することで、ウイルス感染下でのスプライシングパターンの可視化が可能になったことを示している (図3)。

図3. ウイルス感染下での *PML* 選択的スプライシング可視化



また、このミニ遺伝子は遺伝子発現の分子メカニズム解明だけでなく、抗ウイルス剤のスクリーニングや診断にも応用可能であると期待している。現在、*PML* 選択的スプライシングをリアルタイムでモニターできるレポーター安定発現細胞株を樹立しており、保有している化合物ライブラ

リー (20,000 種類以上) を用いてスクリーニングを始める準備をしているところである。

なし

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)

Nojima T, Oshiro-Ideue T, Nakanoya T, Kawamura H, Morimoto T, Kawaguchi Y, Kataoka N and Hagiwara M., Herpesvirus protein ICP27 switches PML isoform by altering mRNA splicing, Nucleic Acids Research, 査読有, 37, 2009, 6515-6527

[学会発表] (計 3 件)

野島孝之、ウイルス感染が引き起こす PML アイソフォームの切り換え、第 10 回 日本 RNA ミーティング、2008 年 7 月 23 日、札幌コンベンションセンター

Takayuki Nojima, Herpesvirus protein ICP27 switches PML isoform by altering mRNA Splicing, RNA meeting 2009, 2009 年 5 月 26 日、Wisconsin University, USA

野島孝之、HSV-2 増殖に関わる PML アイソフォーム発現制御、第 82 回日本生化学会、2009 年 10 月 21 日、神戸ポートアイランド

[図書] (計 2 件)

野島孝之, 萩原正敏、羊土社 (実験医学)、ウイルスによるスプライシング暗号の利用と攪乱、2009、6 ページ

野島孝之, 萩原正敏、秀潤社 (細胞工学)、RNA スプライシングの可視化による創薬スクリーニング、2010、7 ページ

[その他]

ホームページ等

<http://www.tmd.ac.jp/mri/mri-end/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野島 孝之 (NOJIMA TAKAYUKI)

東京医科歯科大学・大学院疾患生命科学
研究部・特任助教

研究者番号：80431956

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

