

令和 6 年 5 月 17 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03492

研究課題名(和文)単純ヘルペスウイルス新規遺伝子のさらなる再解釈とin depth解析

研究課題名(英文)Further decoding and in depth analysis of newly identified herpes simplex virus genes

研究代表者

加藤 哲久(Kato, Akihisa)

東京大学・医科学研究所・准教授

研究者番号：40581187

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：最近、申請者は、実際に細胞内で安定発現する新規遺伝子を効率的に同定可能なウイルス遺伝子decoding法を開発し、単純ヘルペスウイルス1型(HSV-1)にコードされ、ヘルペス脳炎の発症を司る非標準的翻訳産物を同定した。本研究では、本技術を基盤に、HSV-1リピート領域にコードされる2種類の新規遺伝子を同定し、その性状解析を完了した。また、HSV-1リピート領域外にコードされる2種類の新規遺伝子も追加同定し、1種類の新規遺伝子UL31.6が効率的なHSV-1の神経病原性の発揮に関与することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

リボソーム内のmRNAを網羅同定し、ゲノム上の翻訳領域を同定するリボソーム・プロファイリング(Ribo-seq)は、翻訳産物の全体像を把握する画期的な手法である。近年、Ribo-seqは、ウイルスがコードする遺伝子産物の解読に使用されているが、Ribo-seqで同定された新規遺伝子が、本当に生物学的意義を有するのかが、不透明であり、さらなる解析が必要であった。このような研究動向のなか、申請者らは独自に確立したウイルス遺伝子解読法を突破口とし、新たなHSV-1神経病原性因子を同定した。一連の知見は、他のウイルス研究にも波及効果が期待できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Recently, we have developed a viral gene decoding method that can efficiently select novel genes stably expressed in cells, and identified a non-canonical translation product encoded by herpes simplex virus type 1 (HSV-1) that is responsible for encephalitis. In this study, based on this technology, we identified two genes encoded in the HSV-1 repeat region and performed in-depth functional analysis of these genes. We also identified two novel genes encoded outside the HSV-1 repeat region, and found that one novel gene, UL31.6, is involved in the efficient neurovirulence of HSV-1.

研究分野：ウイルス学

キーワード：単純ヘルペスウイルス 非標準的遺伝子 新規遺伝子 UL31.6

## 1. 研究開始当初の背景

単純ヘルペスウイルス 1 型及び 2 型(HSV-1 及び-2)は代表的な DNA ウイルスであり、ヒトに脳炎、性器ヘルペス、眼疾患など、多様な病態を引き起こす。抗 HSV 剤が開発された今日も、脳炎患者の 70%は社会復帰できないか死亡する。また、国内の性感染症報告数において、性器ヘルペスは第 2 位である上、根治不能のため、今日も患者は水平・垂直感染の不安に直面している。さらに、世界市場における HSV 感染症の医療費は、年間数千億円と試算されている。したがって、HSV は医学上極めて重要なウイルスであり、HSV 研究の重要性は明らかである。

長年、HSV ゲノムは約 154kbp の 2 本鎖 DNA に、少なくとも 84 種類のウイルス遺伝子をコードすると記述されてきたが、近年、PacBio 等による大規模転写産物の解析やリボソーム・プロファイリングより、HSV ゲノムは従来の知見よりも遙かに多様な mRNA を産生し、それらがリボソームにおいて少なくとも翻訳されていることが明らかとなった。既存の抗ウイルス剤、ワクチンは、ほぼ全てウイルス蛋白質を標的とすることからも、遺伝子情報の全体像を読み解く重要性は明らかである。

近年の国際ヘルペスウイルス・ワークショップ(IHW)においても、HSV がコードする新規遺伝子の実態に注目が集まっている。しかしながら、トランスクリプトームやリボソーム・プロファイリング解析により、mRNA の存在や翻訳が確認された遺伝子が、細胞内で安定発現し、生物学的意義を有するのかがどうかは全く不明である。実際、一連の手法で存在が示唆されたヘルペスウイルス新規遺伝子産物の増殖性や病態発現機構への関与を示す報告は皆無であることも指摘されている。本来、機能的なウイルス遺伝子産物の全体像を把握するには、mRNA に着目するのではなく、ウイルス蛋白質を直接検出することが理想的であるが、単純な質量解析では、数千種類の宿主蛋白質がバックグラウンドとなり、ウイルス蛋白質の全体像を検出することは困難を極める。

一連の問題を克服するため、我々はウイルスが宿主蛋白質の翻訳を抑制する活性 (Shut-off 活性)を有し、「感染細胞における新規合成蛋白質の大部分はウイルス蛋白質となる」という特性に着目し、Click-chemistry を用いた新規合成蛋白質精製法と質量解析を融合させた Chemical Proteomics に着手した。そして、新規合成蛋白質に関する質量情報(実測値)を収集後、HSV-1 ゲノム情報よりコンピューター上で再構築した仮想 HSV-1 新規遺伝子データベース(理論値)に照会することで、申請者は、細胞内で安定発現する新規 HSV-1 遺伝子産物を複数同定した。しかしながら、HSV-1 ゲノムの約 17%を占めるリピート領域は、polymerase による増幅が極めて困難であるため、polymerase に依存する従来のシークエンス技術では、塩基配列の決定が極めて困難であった。それ故、リピート領域の大部分は、質量解析後のペプチド・マッピングも不能である。実際、我々が実施したウイルス遺伝子 decoding 法においても、リピート領域由来と推定されるペプチドが多数検出されたが、シークエンス情報不足のため、信頼のあるペプチド・アッセンブリーには至らず、新規遺伝子の解読には至らなかった。リピート領域には、LAT や ICPO といった HSV の潜伏感染・再活性化制御に重要な遺伝情報がコードされていることから、HSV 生活環のさらなる解明には、正確なシークエンス情報を取得し、ウイルス遺伝子 decoding 法によりリピート領域内を含む HSV-1 遺伝子の全体像をさらに解読することが望ましいと考えられる。

## 2. 研究の目的

上述の背景を鑑み、本研究は、ウイルス遺伝子 decoding 法によりリピート領域内を含む HSV-1 遺伝子の全体像をさらに解読し、HSV-1 新規遺伝子の HSV-1 病態発現機構における役割の解明を目的とする。

## 3. 研究の方法

- (1) Polymerase を使用しない NanoPore シークエンサーと従来型の NGS シークエンサーにより、従来のシークエンス技術では塩基配列の決定が困難であった HSV-1 の「リピート領域」の塩基配列を完全決定する。
- (2) (1)の情報を基盤として、リピート領域のペプチド・マッピングが可能な質量解析データベースを作出後、新規ウイルス遺伝子 decoding 解析法の生データを再解析する。また、新規ウイルス遺伝子 decoding 解析法の生データに関して、新規遺伝子同定の基準を複数種類試すことで、リピート領域外に関しても、さらなる新規遺伝子を同定する。
- (3) 同定した新規 HSV-1 遺伝子に関して、HSV-1 ゲノム編集法を用いて、蛍光蛋白質 Venus を挿入した組換え HSV-1 を作出する。
- (4) Anti-GFP 抗体を用いた immunoblotting 法により、リピート領域内および外に位置する新規 HSV-1 蛋白質の安定発現を検証する。
- (5) 新規遺伝子を、pMAL-c ベクターにクローニングした後、大腸菌発現系を用いて、MBP 融合

新規蛋白質を発現・精製し、Balb/c マウスに接種することで、新規遺伝子に対する抗体を作出する。

- (6) (5)で作出した新規遺伝子に対する抗体を用いた immunoblotting 法により、リピート領域内および外に位置する新規 HSV-1 蛋白質の安定発現を検証する。
- (7) 新規発現が確認された新規遺伝子の推定開始コドン、HSV-1 ゲノム編集法により、周辺遺伝子への影響が最小となる形(Silent mutation 等)で破壊し、新規 HSV-1 遺伝子欠損ウイルスを作出する。
- (8) (7)で作出した変異ウイルスを、マウスに脳内接種あるいは角膜接種することで、HSV-1 病態発現における新規遺伝子の役割を解析する。
- (9) (8)において、重要な病原性因子であることが判明した新規遺伝子に関して、アフリカミドリザル腎上皮細胞である Vero 細胞、ヒト肺基底上皮腺癌細胞である A549 細胞、ヒト喉頭癌である HEP-2 細胞、ヒト神経芽腫瘍細胞である SK-N-SH 細胞、ヒト神経芽腫瘍細胞である CHP134 細胞、マウス胎児線維芽細胞である NIH-3T3 細胞、マウス神経芽腫瘍細胞である Neuro-2a 細胞におけるウイルス増殖およびプラークサイズを解析することで、細胞腫依存的なウイルス増殖や細胞間伝播における新規遺伝子の枠割りを解析する。
- (10) ウイルス DNA 合成阻害剤(PAA)を事前投与した Vero 細胞に、野生型 HSV-1 を感染させた後、immediate early 遺伝子である ICP4、early 遺伝子である vdUTPase、leaky-late 遺伝子である VP16、ture-late 遺伝子である pUs11 および新規遺伝子がコードする pUL31.6 に対する抗体を用いた immunoblotting 法により、新規遺伝子 UL31.6 の発現クラスを推定する。
- (11) 野生型 HSV-1 感染 Vero 細胞の上清より、密度勾配遠心法により HSV-1 成熟粒子を精製し、immunoblotting 法により、新規遺伝子がコードする pUL31.6 が、HSV-1 成熟粒子のコンポーネントであるか解析する。また、コンポーネントであった場合、精製 HSV-1 成熟粒子を、以下に記載するテグメント・リリース・アッセイに供することで、pUL31.6 が HSV-1 成熟粒子のどの領域に存在するのか解析する。具体的には、精製 HSV-1 成熟粒子を、界面活性剤処理することで、まずエンベロープ蛋白質の層を剥離し、その後、KCl の有無により塩濃度を変化させることで、テグメント蛋白質の層をカプシドからリリースさせる。35%スクロースクッションを用いた遠心分離法により、エンベロープ・テグメント・カプシドの層を分離後、immunoblotting 法に供する。

#### 4. 研究成果

- (1) 感染細胞内よりカプシドにパッケージングされたウイルスゲノムを精製後、ショートリードおよびロングリード(NanoPore)型の次世代シーケンサー解析を試み、HSV-1 の信頼できる全塩基配列情報(リピート領域を含む)を取得した。
- (2) HSV-1 リピート領域内にコードされる 2 種類の新規遺伝子を同定し、新規遺伝子がコードすると想定される新規蛋白質に対する抗体の作出あるいは蛍光蛋白質 Venus と新規遺伝子が融合した組換え HSV-1 の作出により、HSV-1 感染細胞における新規蛋白質の発現を確認した。
- (3) HSV-1 ゲノム 編集法により、HSV-1 リピート領域内にコードされる 2 種類の新規遺伝子の発現を特異的に消失させた組換え HSV-1 を作出し、培養細胞系およびマウスモデルにおける増殖あるいは病態発現機構の解析を実施した。しかしながら、これらの組換え HSV-1 と野生型ウイルス間のウイルス増殖性や病態発現に有意な差を見出すことはできなかった。
- (4) HSV-1 リピート領域外にコードされる 2 種類の新規遺伝子も同定し、新規遺伝子がコードすると想定される新規蛋白質に対する抗体の作出あるいは蛍光蛋白質 Venus と新規遺伝子が融合した組換え HSV-1 の作出により、HSV-1 感染細胞における新規蛋白質の発現を確認した。
- (5) HSV-1 ゲノム 編集法により、HSV-1 リピート領域外にコードされる 2 種類の新規遺伝子の発現を特異的に消失させた組換え HSV-1 を作出し、培養細胞系およびマウスモデルにおける増殖あるいは病態発現機構の解析を実施した。既知遺伝子 UL32 領域内に、逆方向にコードされる新規遺伝子 UL31.6 は、効率的な HSV の神経病原性の発揮に必要であった。
- (6) ウイルス DNA 合成阻害剤(PAA)を用いた薬理的解析より、UL31.6 は、HSV-1 遺伝子発現カスケードのうち、leaky late gene と呼ばれる後期遺伝子の一部に属することが示唆された。
- (7) テグメント・リリース・アッセイとよばれる生化学的な解析より、UL31.6 にコードされる新規蛋白質 pUL31.6 は、HSV-1 粒子のカプシドとエンベロープの中間層に位置するテグメント蛋白質であることが明らかとなった。
- (8) UL31.6 は、神経系細胞におけるウイルスの細胞間伝播に関与することが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 10件）

1. 著者名 A. Kato, R. Iwasaki, K. Takeshima, Y. Maruzuru, N. Koyanagi, T. Natsume, H. Kusano, S. Adachi, S. Kawano, Y. Kawaguchi.	4. 巻 -
2. 論文標題 Identification of a novel neurovirulence factor encoded by the cryptic orphan gene UL31.6 of herpes simplex virus 1.	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 J. Virol.	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 A. Fukui, Y. Maruzuru, S. Ohno, M. Nobe, S. Iwata, K. Takeshima, N. Koyanagi, A. Kato, S. Kitazume, Y. Yamaguchi, Y. Kawaguchi.	4. 巻 14
2. 論文標題 Dual impacts of a glycan shield on the envelope glycoprotein B of HSV-1: evasion from human antibodies in vivo and neurovirulence.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 mBio.	6. 最初と最後の頁 e00992-23.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/mbio.00992-23	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 K. Kuchitsu, K. Mukai, R. Uematsu, Y. Takaada, A. Shinojima, R. Shindo, T. Shoji, S. Hamano, E. Ogawa, R. Sato, K. Miyake, A. Kato, Y. Kawaguchi, M. Nishitani-Isa, K. Izawa, R. Nishikomori, T. Yasumi, T. Suzuki, N. Dohmae, T. Uemura, GN. Barber, H. Arai, S. Waguri and T. Taguchi.	4. 巻 25
2. 論文標題 STING signalling is terminated through ESCRT-dependent microautophagy of vesicles originating from recycling endosomes	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nat Cell Biol.	6. 最初と最後の頁 453-466.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41556-023-01098-9.	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 該当する
1. 著者名 K. Takeshima, Y. Maruzuru, N. Koyanagi, A. Kato, Y. Kawaguchi.	4. 巻 96
2. 論文標題 Redundant and specific roles of A-type lamins and lamin B receptor in herpes simplex virus 1 infection.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J. Virol.	6. 最初と最後の頁 e0142922.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/jvi.01429-22.	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 F. Maeda, A. Kato, K. Takeshima, M. Shibasaki, R. Sato, T. Shibata, K. Miyake, H. Kozuka-Hata, M. Oyama, E. Shimizu, S. Imoto, S. Miyano, S. Adachi, T. Natsume, K. Takeuchi, Y. Maruzuru, N. Koyanagi, J. Arii, Y. Kawaguchi.	4. 巻 96
2. 論文標題 Role of the orphan transporter SLC35E1 in the nuclear egress of herpes simplex virus 1.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J. Virol.	6. 最初と最後の頁 e00306-22.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/jvi.00306-22.	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 J. Arii, K. Takeshima, Y. Maruzuru, N. Koyanagi, Y. Nakayama, A. Kato, Y. Mori and Y. Kawaguchi.	4. 巻 96
2. 論文標題 Role of the arginine cluster in the disordered domain of Herpes Simplex Virus 1 UL34 for the recruitment of ESCRT-III for viral primary envelopment.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J. Virol.	6. 最初と最後の頁 e01704-21.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JVI.01704-21.	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 M. Watanabe, J. Arii, K. Takeshima, A. Fukui, M. Shimojima, H. Kozuka-Hata, M. Oyama, T. Minamitani, T. Yasui, Y. Kubota, M. Takekawa, I. Kosugi, Y. Maruzuru, N. Koyanagi, A. Kato, Y. Mori, and Y. Kawaguchi.	4. 巻 95
2. 論文標題 Prohibitin-1 contributes to the cell-to-cell transmission of herpes simplex virus 1 via the MAPK/ERK signaling pathway.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J. Virol.	6. 最初と最後の頁 e01413-20.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JVI.01413-20	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 Maruzuru Yuhei, Koyanagi Naoto, Kato Akihisa, Kawaguchi Yasushi	4. 巻 95
2. 論文標題 Role of the DNA Binding Activity of Herpes Simplex Virus 1 VP22 in Evading AIM2-Dependent Inflammasome Activation Induced by the Virus	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J. Virol.	6. 最初と最後の頁 e02172-20.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JVI.02172-20	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 A. Kato, S. Adachi, S. Kawano, K. Takeshima, M. Watanabe, S. Kitazume, R. Sato, H. Kusano, N. Koyanagi, Y. Maruzuru, J. Arii, T. Hatta, T. Natsume, and Y. Kawaguchi.	4. 巻 11
2. 論文標題 Identification of a herpes simplex virus 1 gene encoding neurovirulence factor by chemical proteomics	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nat. Commun.	6. 最初と最後の頁 4894
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-18718-9	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 J. Arii, A. Fukui, Y. Shimanaka, N. Kono, H. Arai, Y. Maruzuru, N. Koyanagi, A. Kato, Y. Mori and Y. Kawaguchi.	4. 巻 94
2. 論文標題 Role of Phosphatidylethanolamine Biosynthesis in Herpes Simplex Virus 1-Infected Cells in Progeny Virus Morphogenesis in the Cytoplasm and in Viral Pathogenicity In Vivo	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J. Virol.	6. 最初と最後の頁 e01572-20.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JVI.01572-20	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 J. Arii, F. Maeda, Y. Maruzuru, N. Koyanagi, A. Kato, Y. Mori and Y. Kawaguchi.	4. 巻 10
2. 論文標題 ESCRT-III controls nuclear envelope deformation induced by progerin	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 18877
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-75852-6	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 M. Shibasaki, A. Kato, K. Takeshima, J. Ito, M. Suganami, N. Koyanagi, Y. Maruzuru, K. Sato and Y. Kawaguchi.	4. 巻 94
2. 論文標題 Phosphoregulation of a Conserved Herpesvirus Tegument Protein by a Virally Encoded Protein Kinase in Viral Pathogenicity and Potential Linkage between Its Evolution and Viral Phylogeny	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J. Virol.	6. 最初と最後の頁 e01055-20.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JVI.01055-20.	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 加藤哲久, 岩崎亮二, 竹島功高, 中山佳尚, 淡中崇徳, 丸鶴雄平, 小柳直人, 川野秀一, 川口寧
2. 発表標題 HSV-1非標準的遺伝子のさらなる解読と新規virion構成因子UL31.6の性状解析
3. 学会等名 第35回ヘルペスウイルス研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 加藤哲久, 岩崎亮二, 竹島功高, 中山佳尚, 淡中崇徳, 丸鶴雄平, 小柳直人, 川野 秀一, 川口寧
2. 発表標題 ケミカル・プロテオミクスによる単純ヘルペスウイルス1型がコードする新規神経病原性因子のさらなる同定
3. 学会等名 第69回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<a href="https://www.ims.u-tokyo.ac.jp/Kawaguchi-lab/KawaguchiLabTop.html">https://www.ims.u-tokyo.ac.jp/Kawaguchi-lab/KawaguchiLabTop.html</a> 東京大学医科学研究所 感染・免疫部門 ウイルス病態制御分野
--

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
研究協力者	川口 寧  (Kawaguchi Yasushi)  (60292984)	東京大学・医科学研究所・教授    (12601)	

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
---------	---------