

147. 細胞内イオンによる HSV 遺伝子発現制御機構の解明

丸鶴 雄平

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

Key words : ウイルス, HSV, 遺伝子発現

緒言

単純ヘルペスウイルス (HSV : herpes simplex virus) は代表的な DNA ウイルスであり、ヒトに脳炎、性器ヘルペス、皮膚疾患、眼疾患など、多様な病態を引き起こす。特に HSV 脳炎は最も頻度の高い散発性脳炎であり、その致死率は無治療で 70%、抗 HSV 薬によって治療した場合でも 20%とされ、治療により生存した場合でも 70%に後遺症が残る [1]。HSV の特徴は、一度感染するとヒトの神経に潜伏し、再活性化を繰り返すことによって終身に渡りヒトに疾患を引き起こすことである。HSV は初感染時、皮膚や粘膜部に感染後、感染局所で増殖し、その後、それぞれの領域を支配する知覚神経末端に感染し、神経軸索を逆行性輸送されることによって三叉神経節、もしくは仙髄神経節に到達し潜伏状態となる。HSV が潜伏感染した神経細胞ではウイルスゲノムはエピソーム状で存在し、ウイルスタンパク質をコードする遺伝子の発現は極めて低いレベルに保たれているが、再活性化時にはそれらの遺伝子の発現が活性化し、感染性のウイルス粒子が産生される。一方、実験室内で株化された培養細胞 (HeLa 細胞、Vero 細胞、等) に HSV を感染させると、新たなウイルス粒子が 24 時間以内に産生される「溶解感染」の状態となる。HSV の再活性化時と溶解感染時のウイルスの遺伝子発現機構は共通する機構も多く [2~4]、HSV の溶解感染時の遺伝子発現制御機構に関する研究は溶解感染時における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重要な研究課題である。HSV は宿主細胞に侵入後、核内で、前初期遺伝子、初期遺伝子、後期遺伝子という 3 種の遺伝子群をカスケード状に発現する。前初期遺伝子の発現は HSV のウイルス粒子中に含まれる VP16 が前初期遺伝子群のプロモーターに結合し、それらの転写を活性化することによって引き起こされる。そして、前初期遺伝子がコードする ICP0、ICP4、ICP22 及び ICP27 はその後に発現する初期遺伝子、及び後期遺伝子の効率的な発現に必要であることが知られている [5]。しかし、前初期遺伝子から初期遺伝子、及び後期遺伝子へ発現が移行する為に必要な宿主因子やそのメカニズム (遺伝子発現移行機構) に関しては不明な点が多い。そこで本研究は、HSV 感染細胞における細胞内イオンに着目し、その遺伝子発現移行機構における役割を明らかにすることを目的とした。

方法および結果

1. HSV 遺伝子発現移行における細胞内イオンの役割

研究者らの未発表データ (data not shown) により HSV の遺伝子発現の移行に、様々な蛋白質の機能を制御する特定の細胞内イオンが関与することが示唆されていた。そこで、このイオンの特異的キレーターである CX 処理による HSV の遺伝子発現の影響を解析する為に、HSV を感染させる 2 時間前、もしくは感染後 4 時間後に CX を処理し、感染後 9 時間で感染細胞を回収後、前初期遺伝子である ICP27、初期遺伝子である ICP8、後期遺伝子である UL49 の mRNA 量を qPCR 法によって比較した。図 1 に示した通り、CX を感染 2 時間前に処理した場合は、前初期遺伝子である ICP27 の mRNA 量 1.9 倍、初期遺伝子である ICP8 の mRNA 量は 4.7 倍、後期遺伝子である UL49 は 9.3 倍の減少が認められ、いずれも DMSO 処理と比較して有意に低下していた。また、感染 4 時間後の CX 処理においても、ICP27 の mRNA 量は 1.3 倍、ICP8 は 2.6 倍、UL49 は 3.1 倍の減少が認

められ、いずれも DMSO 処理と比較して有意に低下していた。これらの結果は、本研究で着目した細胞内イオンは HSV の前初期、初期、後期遺伝子を正に制御し、特に、初期、及び後期遺伝子発現の要求性が高いことを示唆する。

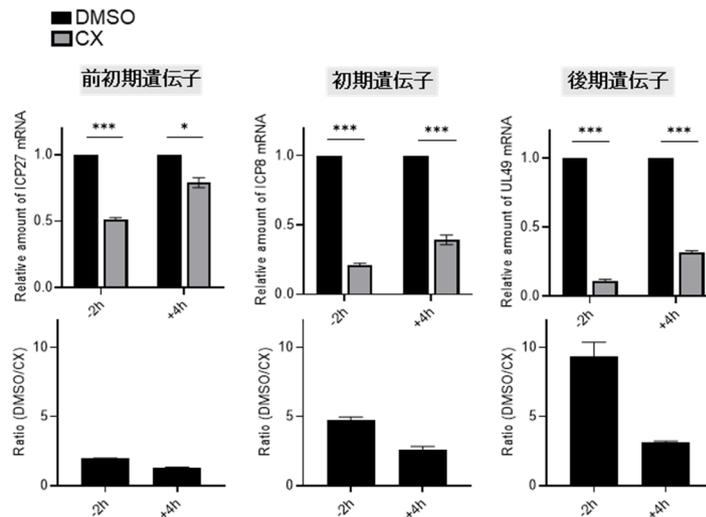


図 1. CX は HSV-1 の遺伝子発現を抑制する

HSV-1 の感染 2 時間前 (-2h)、もしくは感染後 4 時間 (+4h) で培地に CX を添加し、感染後 9 時間で qPCR 法により HSV-1 由来の各 mRNA 量を測定した。

* $P < 0.05$ 、*** $P < 0.001$ (One sample t-test)。

2. HSV 遺伝子発現移行における IBP の役割

研究者らの未発表データ (data not shown) から、本研究で着目している細胞内イオンは IBP1 という哺乳類に広く保存された細胞内イオン結合蛋白質を介して HSV の遺伝子発現に寄与することが示唆されていた。そこで本研究では CRISPR-Cas9 を用いて IBP1 の低発現 HeLa 細胞 (HeLa/IBP_{low}) を作製した。次に HeLa/WT、もしくは HeLa/IBP_{low} に HSV-1 を感染させ、感染 6 時間後における、初期遺伝子、及び後期遺伝子の mRNA 量を qPCR 法によって解析した。図 2 に示した通り、HeLa/IBP_{low} では初期遺伝子である ICP8、及び後期遺伝子である UL49 の mRNA 量は HeLa/IBP_{low} で有意な低下が認められた。これらの結果は IBP1 が HSV-1 の初期、及び後期遺伝子の効率的な発現に必要であることを示唆する。

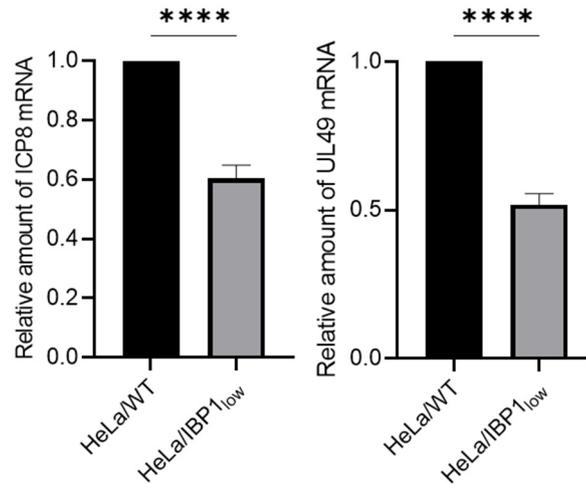


図 2. IBP1 は HSV-1 の効率的な遺伝子発現に必要である
 HeLa/WT もしくは HeLa/IBP1_{low} に HSV-1 を感染させ、感染後 6 時間で qPCR 法により HSV-1 由来の各 mRNA 量を測定した。****P < 0.0001 (One sample t-test)。

考 察

HSV は宿主細胞に侵入後、核内で、前初期遺伝子、初期遺伝子、後期遺伝子をカスケード状に発現する。ウイルス粒子中に含まれる VP16 による前初期遺伝子発現の活性化により発現した、ICP0、ICP4、ICP22、及び ICP27 は初期、及び後期遺伝子の発現に必要である。本研究によって特定の細胞内イオンと、このイオンに結合する IBP1 が HSV の初期、及び後期遺伝子の効率的な発現に必要であることが明らかになった。即ち、本研究で着目した細胞内イオンと IBP1 は初期、及び後期遺伝子の発現に必要とされるこれらの前初期遺伝子 (ICP0、ICP4、ICP22、及び ICP27) の機能発現に必要とされる可能性がある。従って、今後は、本研究で着目した細胞内イオンと IBP1 とこれらの前初期遺伝子産物の相互作用に着目し、HSV の遺伝子発現制御機構の詳細をより深く明らかにしたい。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、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の野邊萌香、竹島功高研究員、小柳直人先生、加藤哲久先生、および川口寧先生である。最後に、本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝致します。

文 献

- 1) Whitley RJ, Gnann JW. Viral encephalitis: familiar infections and emerging pathogens. *Lancet*. 2002;359(9305):507-13. Epub 2002/02/21. doi: 10.1016/S0140-6736(02)07681-X. PubMed PMID: 11853816.
- 2) Arbuckle JH, Vogel JL, Efstathiou S, Kristie TM. Deletion of the Transcriptional Coactivator HCF-1 In Vivo Impairs the Removal of Repressive Heterochromatin from Latent HSV Genomes and Suppresses the Initiation of Viral Reactivation. *mBio*. 2023;14(1):e0354222. Epub 2023/01/25. doi: 10.1128/mbio.03542-22. PubMed PMID: 36692302; PubMed Central PMCID: PMC9973298.

- 3) Liang Y, Vogel JL, Narayanan A, Peng H, Kristie TM. Inhibition of the histone demethylase LSD1 blocks alpha-herpesvirus lytic replication and reactivation from latency. *Nat Med.* 2009;15(11):1312-7. Epub 2009/10/27. doi: 10.1038/nm.2051. PubMed PMID: 19855399; PubMed Central PMCID: PMCPMC2783573.
- 4) Liang Y, Vogel JL, Arbuckle JH, Rai G, Jadhav A, Simeonov A, et al. Targeting the JMJD2 histone demethylases to epigenetically control herpesvirus infection and reactivation from latency. *Sci Transl Med.* 2013;5(167):167ra5. Epub 2013/01/11. doi: 10.1126/scitranslmed.3005145. PubMed PMID: 23303604; PubMed Central PMCID: PMCPMC4778723.
- 5) Roizman B, Knipe DM, Whitley RJ. Herpes simplex viruses. In: Knipe DM, Howley PM, Cohen JI, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, et al., editors. *Fields virology*. 6th ed. Philadelphia, PA: Lippincott-Williams &Wilkins; 2013. p. 1823-97.