

γ ヘルペスウイルス潜伏感染機構の解析とその制御法確立へのアプローチ

研究課題名：ウィルス潜伏感染機構の解明とその制御法確立の試み

大阪大学大学院医学系研究科 助教授
上田 啓次

● はじめに

ヘルペスウイルスは宿主細胞内に潜伏感染し感染後一生涯宿主に留まり、その間様々な病態をひき起こす。例えば α ヘルペスウイルスは神経節に潜伏感染し、時に急性発症して口唇ヘルペスや帯状疱疹などを一生の間何回となくひき起こす。 β ヘルペスウイルスの一つであるサイトメガロウイルスは様々な細胞に感染するが特に免疫不全状態において網膜症や移植拒絶など重大な病態をひき起こす。 γ ヘルペスウイルスであるEpstein-Barr virus (EBV)とKaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV)は、Bリンパ球に潜伏感染しやはりAIDSなどの免疫不全状態でBリンパ腫などの発癌に関わるとされる。そしてこの2つのヒトヘルペスウイルスだけが、*in vitro*において潜伏感染状態が維持継続されウイルス感染細胞株の増殖に大きな影響を与えている。潜伏感染状態ではウイルス遺伝子の発現は1~2領域の数個の遺伝子に限られ極めて厳密に制御されている。また潜伏感染を維持継続するには、ウイルス自身が宿主細胞周期に合わせて1回の複製・分配過程をウイルスゲノムのエピジェネティックな情報を保持しつつ完遂しなければならず、この過程には精緻な制御機構が存在していると思われる。私どもはこの制御の分子メカニズムを明らかにし、この分子を標的とした制御法を確立することにより、特に発癌に関係すると考えられているウイルスの排除を目指している。

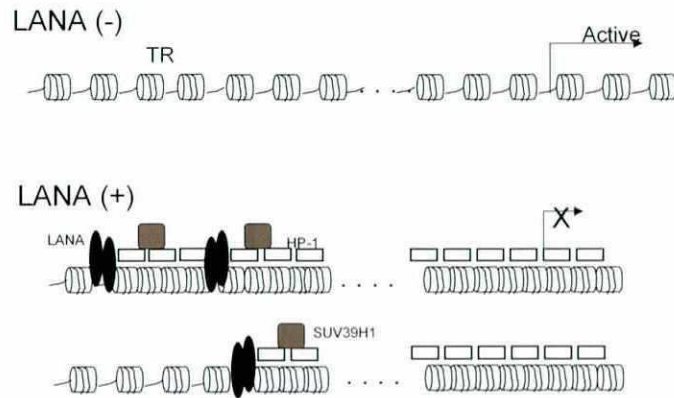
● 潜伏感染におけるウイルス遺伝子の発現制御機構

前述の如く潜伏感染ではウイルス遺伝子の発現は非常に限られたものであり、何らかの機構により厳密に制御され、KSHVの*in vitro*感染系ではいわゆるlytic cycleは起こらず、基本的に潜伏感染状態に陥る機構が存在すること、感染細胞株ではウイルスゲノムは細胞内でヘテロクロマチン領域に存在することが示唆されていたことから、我々は当初よりこの機構の本質は宿主因子とウイルス因子によってもたらされるエピジェネティックなものである可能性が高いと考えていた。

潜伏感染で発現するKSHV遺伝子はORF73 (LANA)、ORF72 (vCyc)、ORF71 (K13=vFLIP) (これら3つは同一のプロモーターから転写された転写産物のalternative splicingによって発現される。またvFLIPはvCycとのcotranscriptとして発現されIRESにより翻訳されると考えられている)、K12 (kaposin)とK10.5 (LANA2)のみである。前4者とLANA2はそれぞれ別の転写活性化領域を形成している。

我々はまず何故ここまでウイルス遺伝子の発現が抑制されているのかについて検討した。前述のごとくKSHVは感染にKSの起源細胞とされる血管内非細胞や主な潜伏感染感染の場と考えられるBリンパ球に感染した場合default機構として潜伏感染状態に陥るものと思われる。潜伏感染発現する遺伝子のうち特にLANAは転写抑制活性を有し様々なプロモーターを抑制する活性を有しているため、遺伝子発現状態を抑制方向へ誘導するためには有効な遺伝子産物である。ウイルスゲノムがヘテロクロマチン領域に局在することやゲノム全体に及んだ遺伝子発現抑制はゲノム自体のヘテロクロマチン化と関係があるものと考えた。そこでLANAと宿主ヘテロクロマチン因子との関連を検討した。LANAは感染細胞内では独特のspeckleを形成しそこにウイルスゲノムが存在すると考えられている。免疫染色の結果LANAと宿主ヘテロクロマチン因子HP1の共局在が観察された。このことはそこに存在するウイルスゲノムのヘテロクロマチン化を示唆する。HP1はヒストンH3の9番目のリジン (K9)がメチル化されるとこれを認識して結合する。抗LANA抗体による免疫沈降-ウェスタンブロット法による解析ではLANAとHP1との相互作用はそれほど強いものではなかったため、我々はむしろLANAとヒストンをメチル化する酵素との相互作用によりこのメチル化酵素をウイルスゲノム上に呼び込むことでゲノムのクロマチンを形成するヒストンH3のK9をメチル化し、それを認識するHP1が呼び込まれるというプロセスを考えた。HP1とメチル化酵素との相互作用は報告されているため以後はウイルスゲノム上で播種状にヘテロクロマチン化が進むと考えられる。解析の結果、ヘテロクロマチン蛋白 (HP1) を呼び込むための初期過程にはたらく、ヒストンH3をメチル化するSUV39H1という宿主遺伝子産物と相互作用することが明らかとなった (図1)。

図1



ではなぜLANA領域の遺伝子は発現可能なのであろうか？insulator、matrix attachmentなどとの関連を現在検討中である。

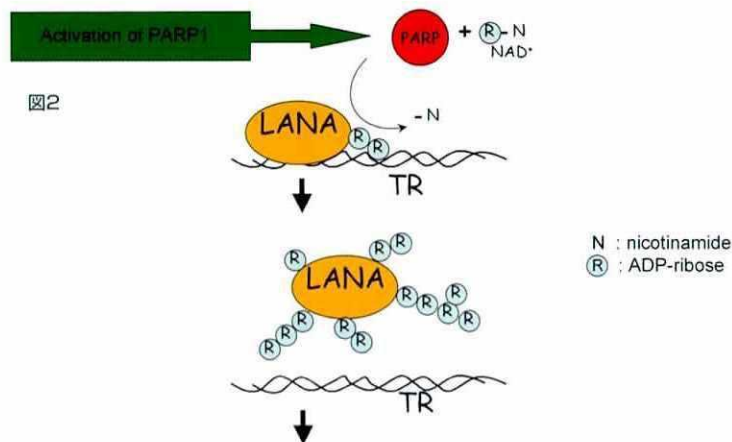
● 末端反覆配列 (terminal repeat, TR) 結合する宿主因子。

TRは潜伏感染のウイルス複製originを含む配列であり、またLANAが結合することが知られている。従って、潜伏感染の複製・維持機構はこの配列とLANAを主要因子として機能している可能性が高いものと思われる。そこでこの配列に介在する宿主及び・ウイルス因子の同定を試みた。

全長801bpのTRを活性化CNBr-Sepharose®に結合させ、TR(+)Sepharoseを作製し、KSHV感染細胞であるBC3細胞抽出液と非感染細胞であるBJAB細胞抽出液をそれぞれ結合させ、その結合分画を比較解析した。またこのような解析は非特異的な結合が問題となるため、KSHVのlytic replication originの共通配列 (K-oriLyt CS: 2ヶ所あるoriLytに共通にみられる配列) への結合分画パターンも検討した。その結果、BC3に比較的特異的なパターンが得られたため、SDS-PAGEで分離可能で解析に足るバンドをMALDI-TOF/MSにより同定を試み、Mut S homologue (MSH)6、MSH3、MSH2 XP-group E complementing protein、poly(ADP-ribose) polymerase 1(PARP1、EC2.4.2.30)を同定した。MSH6とPARP1について、感染細胞に特異的ではないにせよTRには特異的であり、TR内の2つの5'-TCGNT-3'を含む領域 (PARP1結合配列との報告がある) のうちの一方を含む領域に結合することが明らかとなった。

PARP1は種々の蛋白をリボシル化しその機能に影響を与えている。ゲノム上ではこれら2つの結合配列は約180bpしか離れておらず (ヌクレオゾーム一個強)、LANAがPARP1の酵素活性を受ける可能性は十分あるものと思われた。in vitroリボシル化アッセイでLANAのリボシル化が証明された。

PARPにはその活性を特異的に上昇或は減少させる薬剤が知られている。前者にはhydorxyurea (HU) が、後者にはniacinamide (NA) や3-aminobenzamide (3AB) がある。感染細胞をこれらの薬剤で処理することにより、一細胞当りのウイルスゲノムのコピー数がHUでは減少し、NAや3ABでは上昇することが示された。この結果は、PARPの活性がウイルスのゲノム維持に密接に関わっていることを示す。LANAがPARP1によりリボシル化されることを考えあわせると、PARP1によるLANAのリボシル化がウイルスゲノムの維持に直接関わっていると考えられる。従ってより毒性の少ないPARP活性を上昇させる薬剤は、primary effusion lymphoma (PEL) などのKSHVの潜伏感染がその病態発症に強く関わっている疾患の治療に役立つものと思われる (図2)。



N : nicotinamide
 (R) : ADP-ribose

しかしながら生体内ではPARPの活性はその逆の反応を進行させるpoly(ADP-ribose) glycohydrolase (PARG)によって微妙に調節されている。HUの短期投与では潜伏感染ウイルス量を減少させることは可能であるが長期投与では再びウイルス量が回復してくる可能性が高い。PARP1活性を上昇させ、一方でPARG活性を抑制する薬剤投与計画により効果的に潜伏感染ウイルスを減少させることが可能ではないかと思われる（検討中）。

● おわりに

潜伏感染ウイルスゲノムの維持機構の一端がみえた気もするが、実際の複製・分配に関わる因子とその作用機序について記述するにはなお一層の解析が必要である。今後さらにTR結合因子の同定とその機能分析や潜伏感染に必須の因子と考えられるLANA結合因子の分離・同定などを通じてその詳細を明らかにし、治療法確立へと繋げたいと思う。

主要業績リスト

1. Ohsaki, E., Ueda, K., Sakakibara, S., Do, E., Yada, K. and Yamanishi, K. PARP1 (poly(ADP-ribose) polymerase 1) Binds with Kaposi's sarcoma-Associated Herpesvirus (KSHV) Terminal Repeat Sequence and Modulates KSHV Replication in Latency. *J. Virol.* 78(18): 9936-9946, 2004.
2. Nishimura, K., Ueda, K., Guwanan, E., Sakakibara, S., Do, E., Osaki, E., Yada, K., Okuno, T. and Yamanishi, K. A Posttranscriptional Regulator of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Interacts with RNA-binding Protein PCBP1 and Controls Gene Expression through the IRES. *Virology* 325: 364-378, 2004.
3. Ohkawa, K., Ishida, H., Nakanishi, F., Hosui, A., Ueda, K., Takehara, T., Hori, M., Hayashi, N. Hepatitis C virus core functions as a suppressor of cyclin-dependent kinase-activating kinase and impairs cell cycle progression. *J. Biol. Chem.* 279: 11719-11726, 2004.
4. Sakakibara, S., Ueda, K., Nishimura, K., Ohsaki, E., Do, E. and Yamanishi, K. Accumulation of heterochromatin components on the terminal repeat sequence of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus mediated by the latency-associated nuclear antigen. *J. Virol.* 78(14): 7299-7310, 2004.
5. Hosui, A., Ohkawa, K., Ishida, H., Sato, A., Nakanishi, F., Ueda, K., Takehara, T., Kasahara, A., Sasaki, Y., Hori, M., and Hayashi, N. Hepatitis C virus core protein differently regulates the Jak-STAT signaling pathway under interleukin-6 and interferon- γ stimuli. *J. Biol. Chem.* 278: 28562-28571, 2003.
6. Nishimura, K., Ueda, K., Sakakibara, S., Do, E., Ohsaki, E., Okuno, T., and Yamanishi, K. A Viral transcriptional activator of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) induces apoptosis, which is blocked in KSHV-infected cells. *Virology* 316: 64-74, 2003.