

2. 非標準的ウイルス遺伝子解読法の確立による 新規ヘルペス脳炎制御因子の同定

加藤 哲久, 川口 寧

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

ウイルスは宿主細胞に感染後、そのゲノムより遺伝子産物を新規合成し、宿主細胞の環境を変化させる。すなわち、ウイルス感染現象や病態の理解、抗ウイルス剤およびワクチンの開発には、ウイルス遺伝子産物の包括的な同定が重要である。しかしながら、ウイルスは限られたゲノムサイズに、多様な遺伝情報を搭載するため、しばしば非標準的な翻訳エレメントを獲得している。これらのエレメントは一般的な塩基配列上の特徴を欠き、従来のアノテーション法によりウイルス遺伝子産物の全体像を同定することは困難である。最近、我々は、非標準的なウイルス遺伝子産物を包括的に解読する新たな方法を確立した。確立された新たな非標準的ウイルス遺伝子解読法は、様々なウイルスにおける遺伝情報の解読に広く応用される可能性があると期待される。

はじめに

ウイルスは宿主間の感染伝播のため、微小な粒子構造にゲノムを格納しなければならない。この物理的な制約のより、ウイルスゲノムは最少化されてきたと考えられる。一方で、ウイルスは宿主細胞機構を高度にハイジャックし、自身の増殖にとって最適な細胞内環境を生み出すため、ウイルスゲノムに多様な遺伝情報を充填する必要があったとも考えられる。このパラドクスを克服するため、ウイルスは、様々な戦略 (Ex. Leaky scanning, Internal ribosome entry site 等) により、非標準的な遺伝子産物を獲得してきた。これらの非標準的な翻訳エレメントには、明確に定義された配列上の特徴がないことも多く、塩基配列情報に基づく従来の手法では、翻訳領域の全体像を見出すことは困難である¹⁾。実際、エンテロウイルスは50年来に渡り、単一

のポリペプチドのみをコードすると信じられてきたが、upstream ORF (uORF) をコードすることが報告されている²⁾。したがって、長年にわたり精力的に解析されてきたウイルスでさえも、依然として未同定の遺伝子産物をコードしていることが容易に想像される。ワトソンとクリックによるDNA二重螺旋構造の発見を端とした逆遺伝学的解析が、生命科学研究の飛躍に著しい貢献をしてきたという事実を鑑みるに、ウイルス遺伝子産物の全体像の解読は、ウイルス感染現象のさらなる理解には不可欠といえる。また、既存の抗ウイルス剤やワクチンは、ほぼ全てウイルス遺伝子産物を標的とすることからも、ウイルスゲノム情報より遺伝情報を読み解くことの重要性は明らかである。

非標準的ウイルス遺伝子解読法の確立

近年、ウイルス遺伝子産物の全体像を把握する解析法として、リボソーム内に取り込まれているmRNAを次世代シーエンサーにより網羅的に同定することで、ゲノム上の翻訳領域を推定するリボソームプロファイリングが報告されている³⁻⁶⁾。しかしながら、原理上、リボソームプロファイリングにより同定された遺伝子産物は、細胞内で実際に安定発現し、生物学的意義を有しうのかどうかは全く不明である。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で、実際に細胞内で安定発現する遺伝子産物を同定することが理想的である。しかしなが

連絡先

〒108-8639

東京都港区白金台4-6-1

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

TEL: 03-6409-2071

FAX: 03-6409-2070

E-mail: akihisak@g.ecc.u-tokyo.ac.jp

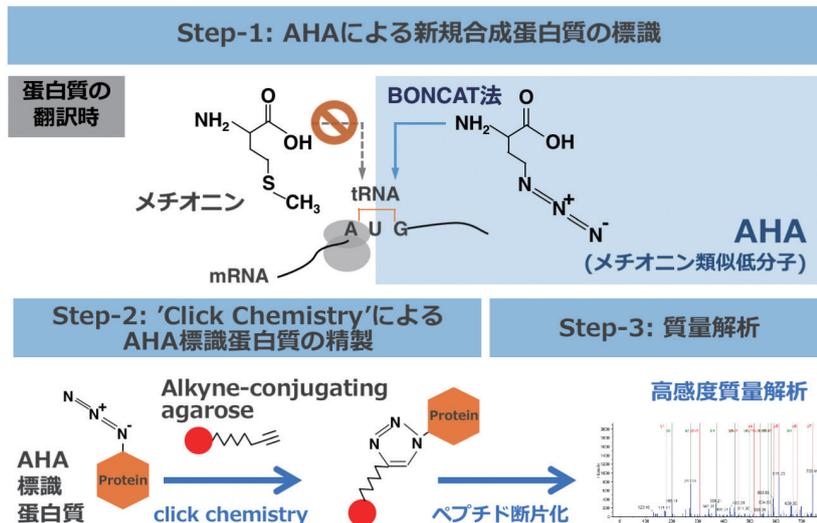


図1 非標準的ウイルス遺伝子解読法の概要

Step-1: メチオニンを枯渇させた培養条件下にて、メチオニン類似低分子であるアジドホモアラニン (AHA) を添加することで、新規合成蛋白質に AHA を取り込ませる。Step-2: アジド基の高い反応性を利用し、AHA 標識蛋白質をアルキン結合アガロースビーズに共有結合させることで、AHA 標識蛋白質を精製する。Step-3: ビーズ上で、精製蛋白質をペプチド断片化後、高感度質量解析に供し、ウイルス感染に伴う新規合成蛋白質を包括的に同定する。

ら、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。

周知の通り、大部分のウイルスは、宿主蛋白質の翻訳を抑制する活性 (shut-off 活性) を有し、ウイルス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^{7,8)}。そこで、我々は bioorthogonal noncanonical amino acid tagging (BONCAT) とよばれる新規合成蛋白質精製法⁹⁾を用いたウイルス遺伝子解読法の確立を試みた。図1に示す通り、BONCAT 法では、メチオニンを枯渇させた培地中に、メチオニン類似低分子であるアジドホモアラニン (AHA) を添加することで、新規合成蛋白質を AHA 標識した後、AHA 内のアジド基とアルキン接合ビーズを結合させることで、新規合成蛋白質と、それ以前から細胞内に存在していた蛋白質を、簡便かつ敏速に分離することが可能である⁹⁾。したがって、BONCAT 法と高感度質量分析を併用した chemical proteomics 解析により、ウイルス遺伝子産物の包括的な解読が可能ではないかと期待された。

単純ヘルペスウイルス1型 (HSV-1) は、DNA ウイルス研究のプロトタイプであり、少なくとも84個の遺伝子をコードしていると長年考えられてきたが、2019年以降、リボソームプロファイリング等を駆使した統合的オミックス解析により、10種類以上の新規遺伝子が立て続きに同定されていた^{6,10)}。これらの報告により、おおよそ HSV-1 がコードする非標準的遺伝子産物の解読も完了したとも考え

られたが、HSV-1 感染細胞を chemical proteomics 解析に供したところ、HSV-1 ゲノム由来と考えられる 38,600 ペプチド中の 2.8% にあたる 1,079 ペプチドが未報告の非標準的遺伝子産物に由来していた。通常、質量解析におけるペプチド同定の際には、1% 以内の偽陽性率が含まれるという条件 (FDR < 1%) が採用されるが、本解析では非感染細胞でも同様の解析を実施し、非特異的な HSV-1 ゲノム由来のペプチド同定が完全に排除された条件 (FDR < 0.44%) を採用した。さらに、我々は、(i) 該当 coding sequence (CDS) 内に少なくとも2種類以上のペプチドが検出されていること、(ii) 他の代表的な HSV-1 株に該当 CDS が保存されていること、以上の2点を新規 HSV-1 遺伝子同定のクライテリアすることで、さらなる偽陽性の排除を試み、9種類の新規 HSV-1 遺伝子を同定した (図2)。興味深いことに、同定された新規 HSV-1 遺伝子は、いずれも既知の遺伝子に内包される形でコードされる internal ORF (iORF) と呼ばれる非標準的な遺伝子産物であった。また、我々の確立した非標準的ウイルス遺伝子解読法では、ヴェルツブルク大学のグループが、本年の4月に報告した新規 HSV-1 遺伝子 RL2A (iICP0) と同一の遺伝子も検出された (図2)^{6,11)}。そして、2015年に世界初の腫瘍溶解性ウイルスとして、米国食品医薬品局 (FDA) に認可された Lmlygic において RL2A (iICP0) は欠損していることから、RL2A (iICP0) と腫瘍溶解能の相関関係に関しては、さらなる解析が待たれている⁶⁾。

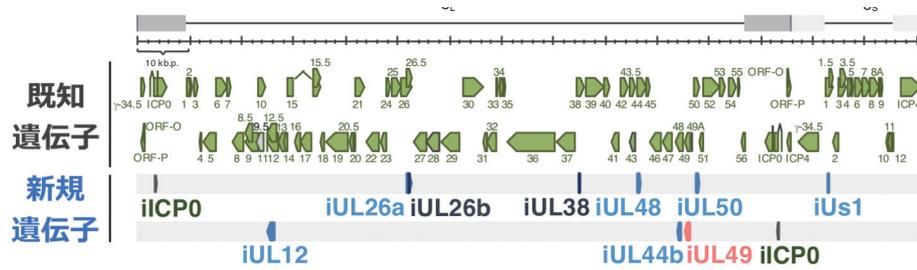


図2 解読された新規 HSV-1 遺伝子

非標準のウイルス遺伝子解読法により、HSV-1 がコードする 9 つの新規遺伝子 (iUL12, iUL26a, iUL26b, iUL38, iUL44b, iUL48, iUL49, iUL50, iUs1) を同定した。(文献 12 より改)

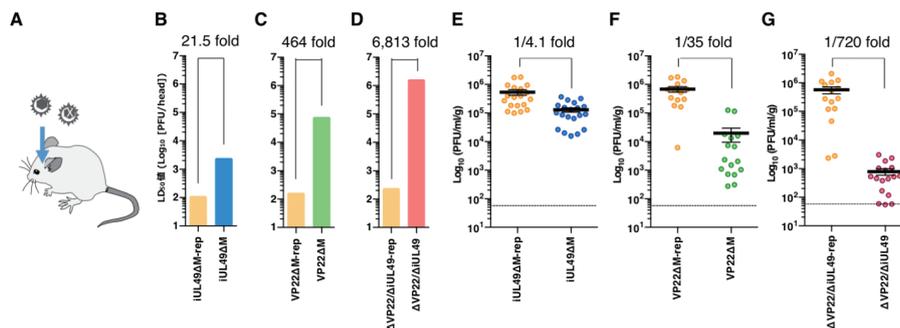


図3 piUL49 は、VP22 とは独立に機能する HSV-1 神経病原性因子である

(A) piUL49 単独欠損 HSV-1 (iUL49ΔM), VP22 単独欠損 HSV-1 (VP22ΔM), piUL49 と VP22 を共に欠損した HSV-1 (ΔVP22/ΔiUL49) および、これらを野生型に復帰させた組換え HSV-1 (iUL49ΔM-rep, VP22ΔM-rep, ΔVP22/ΔiUL49-rep) を、マウスに脳内接種した。(B to D) 感染 14 日後の生死より、マウス LD₅₀ 値を算出したところ、piUL49 欠損、VP22 欠損のいずれも LD₅₀ 値が上昇し、二重欠損時にはさらなる LD₅₀ 値の上昇が認められた。(E to G) また、これらのマウスの感染 3 日後のマウス脳内におけるウイルス力価も解析したところ、piUL49 欠損、VP22 欠損のいずれもウイルス力価を低下させ、二重欠損時にはさらなるウイルス力価の低下が認められた。(文献 12 より改)

新規 HSV-1 病原性因子 piUL49 の同定

我々は、chemical proteomics 解析により同定した新規 HSV-1 遺伝子産物の 1 つである piUL49 に関する詳細な解析を試みた。質量解析情報より、piUL49 は、266 アミノ酸の遺伝子産物であり、HSV-1 の極めて強力な神経病原性因子である VP22 (13) の ORF に完全に内包される形でコードされていることが想像された。また、piUL49 は、解析時、NCBI 上に登録されていた全ての HSV-1 ゲノム情報に ORF が保存されていたことから、HSV 生活環になんらかの重要な役割を担っていることが期待された。

まず、piUL49 の推定 C 末端ドメインに対するポリクローナル抗体を作出し、複数の HSV-1 株の感染細胞における piUL49 の発現確認を試みたところ、piUL49 の推定分子量と一致する特異的なバンドが検出された。また、piUL49 の推定開始点を破壊することで、本バンドの消失も確認された。一方、VP22 の開始点を破壊した際、piUL49 の発現が著しく上昇したことから、次世代シーケンサーを用いた近年の大規模トランスクリプトーム解析においても piUL49

特有の mRNA は検出されなかったこと¹³⁾ から、piUL49 はポリシストロン性の mRNA から翻訳されていることが示唆された。

piUL49 欠損ウイルスの Vero 細胞におけるウイルス増殖は、野生型 HSV-1 と同程度であったが、脳内接種時のマウス 50% 致死値 (LD₅₀ 値) は、約 21.5 倍の上昇が認められた。また、piUL49 と遺伝子領域が重複している VP22 との 2 重欠損時、マウス脳内接種時のマウス LD₅₀ 値は、piUL49 欠損あるいは VP22 欠損時のいずれと比較しても、明確に上昇した (図 3)。さらに、脳内における HSV-1 増殖もまた、piUL49 および VP22 欠損のいずれにおいても低下し、2 重欠損時にはさらに低下した (図 3)。一連の知見より、piUL49 と VP22 は独立に機能する HSV-1 神経病原性因子であることが示唆された。

piUL49 が HSV-1 病原性を制御する分子メカニズムの解明

HSV-1 感染細胞における piUL49 の細胞内局在を解析したところ、piUL49 は主に核内の辺縁部に局在し、HSV-1 がコードする核酸代謝酵素である vdUTPase と共局在する

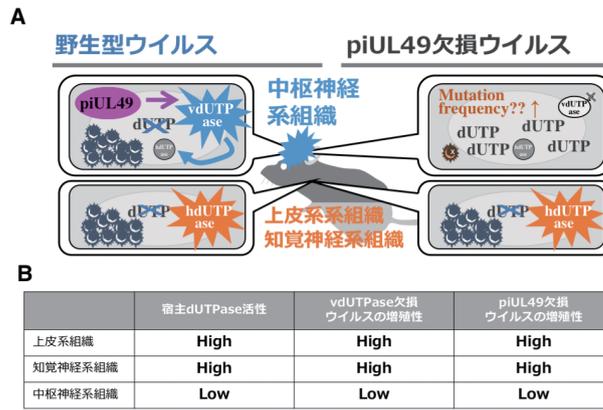


図4 piUL49は中枢神経系特異的なHSV-1病原性因子である

(A) piUL49はvdUTPaseを活性化し、中枢神経系組織における宿主dUTPase活性を補填することで、効率的な神経病原性の発揮に参与する。一方、上皮系および知覚神経系組織では、HSV-1増殖に必要なdUTPase活性は、宿主dUTPaseから十分に供給される。(B) HSV-1の主要標的組織における宿主dUTPase活性とvdUTPase欠損およびpiUL49欠損ウイルスの増殖性は正の相関が認められる。

ことが明らかとなった。また、近接ライゲーションアッセイから、両分子が細胞内で十分に近接していることが確認され、twin-strep-tagと融合した形のvdUTPaseを発現する組換えHSV-1の感染細胞を、ストレプトタクチンを用いたpull-down assayに供したところ、vdUTPaseとpiUL49が効率的に共沈降されたことから、piUL49とvdUTPaseは感染細胞内において複合体を形成していることも示唆された。さらに、精製蛋白質同士を用いたGST pull-down assayにおいても、piUL49はvdUTPaseの酵素ドメインの一部との直接結合が認められた。これらの知見に加え、piUL49の83番目のアルギニンをロイシンに置換(R83L)することで、VP22のアミノ酸配列を保持したまま、piUL49とvdUTPase間の結合が阻害されることも確認された。したがって、piUL49はvdUTPaseと結合していることが示唆された。

vdUTPaseは、宿主dUTPaseのホモログであり、最も一般的な非標準的ヌクレオシド三リン酸であるdUTPを、dUMPとピロリン酸に加水分解し、複製時dUTPのゲノムへの誤混入を阻害することで、遺伝情報の正確な維持に参与する¹⁴⁻¹⁶⁾。我々は、piUL49とvdUTPaseの結合がdUTPase活性に及ぼす影響の解析を試み、精製piUL49の添加により、精製vdUTPaseによるdUTPの加水分解反応効率が有意に上昇するという知見を得た。また、反応速度解析において、piUL49の添加はvdUTPaseの最大反応速度(V_{max})や代謝回転数(K_{cat})のみならず、および酵素と基質の親和性を示すミカエリス定数(K_m)も有意に上昇させた。上述の通り、dUTPaseは細胞内のdUTP濃度の上昇を阻害することから、piUL49がdUTP濃度の高い環境において、vdUTPaseを効率的に活性化する性質を有することは合理的であると考えられた。そして、piUL49欠

損およびvdUTPaseとの結合を阻害するR83L変異時、感染細胞におけるvdUTPase活性が有意に低下した。さらに、R83L変異ウイルスの脳内接種時のマウスLD₅₀値は、piUL49欠損時と同程度まで上昇していた。これらの知見より、piUL49はvdUTPaseを活性化することで、HSV-1神経病原性に貢献していると考えられた。

piUL49は中枢神経系特異的なHSV-1病原性制御因子である

宿主がコードするdUTPase活性の低い環境において、ウイルスゲノムにコードされるvdUTPaseはdUTPase活性を供給し、ウイルスゲノムの遺伝情報維持に参与することで、効率的なウイルス増殖を促進することが、HSV-1や猫免疫不全ウイルス(FIV)のvdUTPase研究において報告されている^{15,17,18)}。そこで、vdUTPaseの制御因子であるpiUL49欠損ウイルスも同一の性状を示すのか解析を試みた。培養細胞系において、shRNAを用い宿主dUTPaseの発現を抑制すると、piUL49欠損によりHSV-1増殖が有意に低下した。また、宿主dUTPase活性の低い神経芽腫瘍細胞においても、piUL49欠損によりHSV-1増殖が有意に低下した。これらの知見より、piUL49欠損により、vdUTPaseによる宿主dUTPase活性不足時の酵素活性の補填が阻害されることで、vdUTPase欠損と同一の表現系が得られることが示唆された(図4)。

生体におけるHSV-1の主要標的組織は、粘膜疾患発症の場である上皮系組織(Ex. 角膜上皮)、潜伏感染の場である知覚神経系組織(Ex. 三叉神経節)致死的な脳炎発症の場である中枢神経組織(Ex. 脳)と考えられている。これらのマウス組織における宿主dUTPase活性とpiUL49欠損ウイルスの増殖性を比較解析したところ、上皮系組織

や知覚神経系組織と比較し、中枢神経系組織では有意に dUTPase 活性が低く、piUL49 欠損ウイルスの増殖性も低いことが明らかとなった (図 4)。これらの知見は、vdUTPase の欠損ウイルスは、知覚神経系組織では野生型 HSV-1 と同程度に増殖する一方、中枢神経系組織では増殖性が有意に低下するという過去の報告と矛盾のない知見であった¹⁹⁾。さらに、piUL49 欠損ウイルスに宿主 dUTPase の過剰発現カセットを搭載した遺伝子組換え HSV-1 では、マウス脳内での子孫ウイルス産生量が有意に回復し、脳内接種時のマウス LD₅₀ 値も野生型 HSV-1 に近づいた。一連の知見より、piUL49 による vdUTPase の活性制御は、中枢神経系組織における HSV-1 増殖に重要であり、piUL49 は中枢神経系特異的な HSV-1 病原性因子であることが明らかとなった (図 4)。

おわりに

近年、リボソームプロファイリング等の統合的オミックス解析を駆使し、欧米の複数グループが HSV-1 ゲノムの再解読を試みていたが、iORF の解読は不完全であったことが本研究より明らかとなった¹¹⁾。従来の手法はいずれも「核酸」を検出対象とするため、1 塩基単位の差異の判別が必要な iORF の同定は不得手である一方、申請者らが独自に確立したウイルス遺伝子解読法は、「蛋白質」を直接的に解析対象とするため、iORF を高感度に同定できるという利点があったのではないかと想像された。また、上述の通り、大部分のウイルスが shut-off 活性を有することから、chemical proteomics 解析を用いた非標準的なウイルス遺伝子解読法は、他のウイルス遺伝子の解読にも水平展開可能ではないか期待される。そして、立て続けに発見された新規 HSV-1 遺伝子のウイルス生活環における役割は、piUL49 を除き、ほとんど明らかになっておらず、今後のさらなる解析が待たれる。

謝辞

本稿の執筆の機会を与えてくださった荊和宏明 編集委員長に厚く御礼申し上げます。また、本研究の遂行をご支援くださった産業技術総合研究所生命工学領域細胞分子工学研究部門の足達俊吾先生および夏目徹先生、電気通信大学、大学院情報理工学研究科の川野秀一先生に深くお礼申し上げます。

本稿に関連し、開示すべき利益相反状態にある企業等はありません。

参考文献

- 1) Stern-Ginossar N, Ingolia NT. 2015. Ribosome Profiling as a Tool to Decipher Viral Complexity. *Annu Rev Virol* 2:335-49.
- 2) Lulla V, Dinan AM, Hosmillo M, Chaudhry Y, Sherry L, Irigoyen N, Nayak KM, Stonehouse NJ, Zilbauer M, Goodfellow I, Firth AE. 2019. An upstream protein-coding region in enteroviruses modulates virus infection in gut epithelial cells. *Nat Microbiol* 4:280-292.
- 3) Finkel Y, Mizrahi O, Nachshon A, Weingarten-Gabbay S, Morgenstern D, Yahalom-Ronen Y, Tamir H, Achdout H, Stein D, Israeli O, Beth-Din A, Melamed S, Weiss S, Israely T, Paran N, Schwartz M, Stern-Ginossar N. 2020. The coding capacity of SARS-CoV-2. *Nature* doi:10.1038/s41586-020-2739-1.
- 4) Stern-Ginossar N, Weisburd B, Michalski A, Le VT, Hein MY, Huang SX, Ma M, Shen B, Qian SB, Hengel H, Mann M, Ingolia NT, Weissman JS. 2012. Decoding human cytomegalovirus. *Science* 338:1088-93.
- 5) Ingolia NT, Lareau LF, Weissman JS. 2011. Ribosome profiling of mouse embryonic stem cells reveals the complexity and dynamics of mammalian proteomes. *Cell* 147:789-802.
- 6) Whisnant AW, Jurgens CS, Hennig T, Wyler E, Prusty B, Rutkowski AJ, L'Hernault A, Djakovic L, Gobel M, Doring K, Menegatti J, Antrobus R, Matheson NJ, Kunzig FWH, Mastrobuoni G, Bielow C, Kempa S, Liang C, Dandekar T, Zimmer R, Landthaler M, Grassler F, Lehner PJ, Friedel CC, Erhard F, Dolken L. 2020. Integrative functional genomics decodes herpes simplex virus 1. *Nat Commun* 11:2038.
- 7) Weber F, Haller O. 2007. Viral suppression of the interferon system. *Biochimie* 89:836-42.
- 8) Sydiskis RJ, Roizman B. 1966. Polysomes and protein synthesis in cells infected with a DNA virus. *Science* 153:76-8.
- 9) Dieterich DC, Link AJ, Graumann J, Tirrell DA, Schuman EM. 2006. Selective identification of newly synthesized proteins in mammalian cells using bioorthogonal noncanonical amino acid tagging (BONCAT). *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:9482-7.
- 10) Depledge DP, Srinivas KP, Sadaoka T, Bready D, Mori Y, Placantonakis DG, Mohr I, Wilson AC. 2019. Direct RNA sequencing on nanopore arrays redefines the transcriptional complexity of a viral pathogen. *Nat Commun* 10:754.
- 11) Kato A, Adachi S, Kawano S, Takeshima K, Watanabe M, Kitazume S, Sato R, Kusano H, Koyanagi N, Maruzuru Y, Arii J, Hatta T, Natsume T, Kawaguchi Y. 2020. Identification of a herpes simplex virus 1 gene encoding neurovirulence factor by chemical proteomics. *Nat Commun* 11:4894.
- 12) Tanaka M, Kato A, Satoh Y, Ide T, Sagou K, Kimura K, Hasegawa H, Kawaguchi Y. 2012. Herpes simplex virus 1 VP22 regulates translocation of multiple viral and cellular proteins and promotes neurovirulence. *J Virol* 86:5264-77.
- 13) Tombacz D, Csabai Z, Szucs A, Balazs Z, Moldovan N,

- Sharon D, Snyder M, Boldogkoi Z. 2017. Long-Read Isoform Sequencing Reveals a Hidden Complexity of the Transcriptional Landscape of Herpes Simplex Virus Type 1. *Front Microbiol* 8:1079.
- 14) Kerepesi C, Szabo JE, Papp-Kadar V, Dobay O, Szabo D, Grolmusz V, Vertessy BG. 2016. Life without dUTPase. *Front Microbiol* 7:1768.
- 15) Kato A, Arii J, Koyanagi Y, Kawaguchi Y. 2015. Phosphorylation of herpes simplex virus 1 dUTPase regulates viral virulence and genome integrity by compensating for low cellular dUTPase activity in the central nervous system. *J Virol* 89:241-8.
- 16) Vertessy BG, Toth J. 2009. Keeping uracil out of DNA: physiological role, structure and catalytic mechanism of dUTPases. *Acc Chem Res* 42:97-106.
- 17) Kato A, Hirohata Y, Arii J, Kawaguchi Y. 2014. Phosphorylation of herpes simplex virus 1 dUTPase upregulated viral dUTPase activity to compensate for low cellular dUTPase activity for efficient viral replication. *J Virol* 88:7776-85.
- 18) Lerner DL, Wagaman PC, Phillips TR, Prospero-Garcia O, Henriksen SJ, Fox HS, Bloom FE, Elder JH. 1995. Increased mutation frequency of feline immunodeficiency virus lacking functional deoxyuridine-triphosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:7480-4.
- 19) Pyles RB, Sawtell NM, Thompson RL. 1992. Herpes simplex virus type 1 dUTPase mutants are attenuated for neurovirulence, neuroinvasiveness, and reactivation from latency. *J Virol* 66:6706-13.