

改良型遺伝子濃縮法によるヒトヘルペスウイルス6の前初期遺伝子 および新規潜伏感染特異的遺伝子の同定

小 川 智 生 川 嶋 公 成 清 水 昭 宏
小 林 伸 行 近 藤 一 博

東京慈恵会医科大学ウイルス学講座

(受付 平成 22 年 8 月 31 日)

IDENTIFICATION OF A NOVEL HUMAN HERPESVIRUS 6 LATENCY- ASSOCIATED TRANSCRIPT USING HYBRIDIZATION-BASED METHOD

Tomoo OGAWA, Kiminari KAWASHIMA, Akihiro SHIMIZU
Nobuyuki KOBAYASHI, Kazuhiro KONDO

Department of Virology, The Jikei University School of Medicine

A procedure for the construction of general complementary (c) DNA libraries and a cDNA selection method based on hybridization of cDNA fragments to virus-specific clones have been developed on the basis of the polymerase chain reaction (PCR) amplification method. The first cDNA strand was synthesized from the total RNA of infected cells by means of an oligo (CI)-containing primer. Then, the oligo (dG) tailing the total cDNA was amplified with the PCR and 2 primers complementary to oligo (dA) and the oligo (dA) end of the cDNA. The amplified cDNA was "selected" by hybridization with 51 biotinylated human herpesvirus (HHV)-6 Pst I clones. Then, hybridized cDNA was conjugated with immobilized avidin, and the selected cDNAs were recovered with the PCR; these steps were repeated 5 times. We examined the cDNA from cycloheximide-treated infected peripheral blood lymphocytes and the cDNA from latently infected macrophages. The amplified cDNA from cycloheximide-treated, infected cells and latently infected macrophages were hybridized with 51 Pst I clones. The cDNA from cycloheximide-treated cells was hybridized with 5 Pst I clones (pSTY03, pSTY9, pSTY15, pSTY34, pSTY45), and the cDNA from latently infected macrophages was hybridized with 1 Pst I clone (pSTY07). The cDNA from uninfected cells hybridized with no Pst I clone, and the HHV-6 DNA that was amplified and selected by the same methods hybridized with no Pst I clone. A library containing 106 clones was established from the amplified and selected cDNA from the infected cells and sequenced. Five kinds of cDNA clones from cycloheximide-treated cells were analyzed with Northern blot hybridization, and all of them immediately hybridized early viral RNA. In the case of the transcript on the latently infected cells, no virus-specific RNA was detected with Northern blot hybridization. The results of Southern blot hybridization suggested that the cDNA from latently infected macrophages was in the direct repeat sequence of this virus.

(Tokyo Jikeikai Medical Journal 2011;126:1-10)

Key words: human herpesvirus 6, HHV-6, latency, immediate-early gene, PCR

I. 緒 言

ヒトのヘルペスウイルスは現在までに8種類が発見されており、いずれのウイルスも初感染時にウイルスが増殖した後に増殖を停止し、ウイルス

遺伝子が生涯保持される潜伏感染状態となる。この潜伏感染したウイルスは、何らかのきっかけで再び活動を開始し宿主の体内で増殖する。この現象を再活性化と呼び、ヘルペスウイルスの遺伝子活動によって自律的に行なわれる現象である。潜

伏感染状態をとるウイルスは、レトロウイルスやアデノ随伴ウイルスなど、ヘルペスウイルス以外にもあるが、自律的に再活性化を生じるのはヘルペスウイルスのみである。

ヘルペスウイルスは進化的な観点や生物学的性質から、神経節で潜伏感染を生じる α -ヘルペスウイルス、マクロファージ系細胞で潜伏感染する β -ヘルペスウイルス、B細胞で潜伏感染し発癌性を有する γ -ヘルペスウイルスの3つのグループに大別される。ヘルペスウイルスは、同じ科に属するとは思えないほど、遺伝子の大きさや構造が多様である。また、潜伏感染・再活性化の機構も、不明な点が多いものの、グループごとに別々の機序を持つことが判っている。遺伝子構造や潜伏感染の機序が異なるにもかかわらず、潜伏感染・再活性化という共通点を持つことは、この性質がヘルペスウイルスの生存にとって非常に重要であることを示している。

ヒトヘルペスウイルス (HHV-6) は、 β -ヘルペスウイルスに属し、ほとんどの人で1歳半までに初感染を生じ突発性発疹の原因となる¹⁾。マクロファージ²⁾と脳内において潜伏感染を生じ³⁾、小児期での再活性化は熱性痙攣の原因となる³⁾。また、臓器移植などの免疫抑制状態で再活性化を生じると重篤な合併症を起こすことがある⁴⁾。HHV-6は、脳内で潜伏感染する唯一のヘルペスウイルスであり³⁾さまざまな中枢神経疾患⁵⁻⁷⁾や慢性疲労症候群^{8,9)}との関係が指摘されている。HHV-6には世界中に広く分布し、突発性発疹の原因となるHHV-6 variant B (HHV-6B)と、最初のHHV-6として分離されてはいるが、疾患との関わりがいまだ確定しておらず、感染者の数もHHV-6Bより少数であるHHV-6 variant Aがある¹⁰⁾。本研究では、HHV-6Bを取り扱っており、とくに断らない限りHHV-6は、HHV-6Bのことを指す。

ヘルペスウイルスの潜伏感染の機構を明らかにするために重要であるのが、潜伏感染時に特異的に発現する遺伝子(潜伏感染遺伝子)を同定することである。ヘルペスウイルスのなかで潜伏感染研究がもっとも進んでいるのは、エプシュタイン・バーウイルス (EBV) であるが、これは、EBVが発癌性を持つため、EBVによって発癌や不死亡を起こした細胞から、容易に潜伏感染遺伝子を

同定することが可能であったためである。

このような背景に基づき、HHV-6の潜伏感染・再活性化機構の研究を押し進めるために、潜伏感染遺伝子を同定することを計画した。このために、遺伝子濃縮法の開発などを行ない、HHV-6潜伏感染遺伝子の同定を行なった。

II. 対象と方法

HHV-6の新規の潜伏感染特異的遺伝子を同定する目的で、ウイルス遺伝子濃縮法の開発と、HHV-6潜伏感染細胞で発現しているウイルスmRNAの同定を行なった。

ウイルス遺伝子濃縮法は、HHV-6のゲノムDNAクローンをビオチン化した後、ストレプトアビジン磁気ビーズに固定し、polymerase chain reaction (PCR) 法とhybridization法に基づいたcDNA選択法の開発を行なった。濃縮に使用したHHV-6のゲノムDNAクローンは、HHV-6ゲノムDNAを制限酵素Pst Iで消化後、pUC11ベクターに組み込んだもので、HHV-6ゲノムのほぼ全域をカバーしていた。具体的な方法は以下の様である。

1. 細胞とウイルス

HHV-6は、臨床分離株 (HST株) をヒト臍帯血細胞由来末梢血単核細胞 (CBMC) で培養したものを使用した。ウイルスの力価は、focus forming unit (f. f. u)/mlで表される¹¹⁾。

HHV-6の増殖性感染は、ヒト末梢血単核細胞 (PBMC) を用いて行なった。PBMCは、RPMI1640培地に10%の胎児牛血清、および0.1 Uの組み換えヒト・インターロイキン2に5 μ g/mlのphytohemagglutinin (PHA)を加えた培地で、37 $^{\circ}$ C 5%CO₂条件下で培養した。PBMCには、multiplicity of infection (MOI), 0.05で、HHV-6を感染させた。

前初期遺伝子発現用の細胞を得るためには、PBMCを200 μ g/mlのシクロヘキシミド (CH)で12時間前処理した後に、HHV-6を感染させた。

潜伏感染遺伝子発現を検討するためには、すでに報告した方法で得たHHV-6潜伏感染細胞を使用した。方法を簡単に述べると、潜伏感染細胞を成立させるヒトマクロファージを、PBMCからゼ

ラチンコートシャーレを用いて分離し、RPMI1640 培地と25%馬血清を用いて37℃ 5%CO₂条件下で培養した。1週間後にHHV-6をMOI 0.05で感染させた。その後、約1カ月の培養を行い、HHV-6潜伏感染細胞を得た。潜伏感染が成立しているかどうかは、polymerase chain reaction (PCR) 法によって細胞内にHHV-6遺伝子が存在していることを確認し、抗HHV-6モノクローナル抗体でHHV-6の増殖が見られないことを確認すること、12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) による再活性化が誘導できるかを確認することによって行なった。

2. RNA抽出とcDNA作成

細胞を滅菌したphosphate buffered saline (PBS) で洗浄した後、RNA抽出バッファー (4 M guanidium thiocyanate, 25 mM sodium citrate PH 7.0, 100 mM 2-mercaptoethanol, 0.5% sodium lauroyl sarcosinate)¹²⁾に溶解した。つぎに、水飽和フェノールとクロロホルムで処理した後、溶解液の2.7倍量のエタノールを加えて沈殿し、RNAを回収した。回収したRNAは、20 µg/mlのRNase-free DNase (Worthington社製) で処理し、DNAを分解した。さらに、フェノールとクロロホルムで処理を行い、DNaseの除去とRNAの純化を行なった。

RNAは、15 µl以下の組成のバッファー中で逆転写を行なった (50 mM Tris-Hot PH 8.3, 50 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 1mM EDTA, dNTP mixture (2 mM の各dNTP), 4mM sodium pyrophosphate)。プライマーは、以下の配列のoligo (CI) -primer 5' AACTGGAAGAATTCGCGGC CGCAGGAATTTTTTTTTTTTTTTTTT3' を、20 p mole加えた。逆転写酵素は、20 unitのAMV reverse transcriptase (RAV-2, Takara) を加え、1時間42℃で反応させた。

3. cDNAのPCR増幅

上記の方法で逆転写したcDNAは、まずoligo (dG) の付加を行なった後、以下の条件でPCR反応を行なった。バッファー条件は、50 µlの10 mM Tris (PH 8.3), 50 mM KCl, 4 mM MgCl₂, 0.01% (w/v) gelatin, dNTP mixture (0.5 mM of each dNTP, 2.5unit Taq polymerase (Perkon-Elmer社)) に10 p mole以下の配列のoligo (do) -contain-

ing primerを加えた。Primer 1: 5' - CGATTAG-GTGACACTATAGGAATTCCCCCCCCCC-3'; and cDNA-PCR Primer 2: 5'- AACTGGAAGAATTC-GCGGCCGAGGAA-3'。PCR反応は、denaturation 92℃ 1分, annealing 50℃ 2分, elongation 72℃ 5分で20サイクル行い、Primer 3: 5'-CGATTAGGTGACACTATAGGAATTC-3'を追加後、denaturation 92℃ 1分, annealing 62℃ 2分, elongation 72℃ 5分の条件でさらに20サイクルのPCR反応を行なった。

4. cDNAの選別

1) HHV-6 DNAクローンのビオチン標識

HHV-6のゲノムDNAクローンは、HHV-6ゲノムDNAを制限酵素Pst Iで消化後、pUC11ベクターに組み込んだもので、HHV-6ゲノムのほぼ全域をカバーする51種類のプラスミドクローンを使用した。これらのプラスミドを、PHOTO-PROBE Biotin (Vector Laboratories, Inc., U.S.A) を用いて供給元のプロトコールに従ってビオチン標識した。

2) cDNAのアフィニティー濃縮

約100 ngの上記の方法でPCR増幅したcDNAと1 µgのビオチン標識HHV-6プラスミドクローンを熱変性し、1M NaCl, 0.1M Tris-HCl (pH 8.0) 溶液内で、65℃ 5時間ハイブリダイゼーションを行なった。その後、0.1M Tris-HCl (pH 8.0) でNaClが0.15Mになるまで希釈、Streptavidin Dynabeads (Dynal) を加え、37℃ 30分間反応させた。Streptavidin Dynabeadsは、磁気粒子コンセントレータ (MPC-E) によって回収し、1 mlの洗浄溶液 (0.05のM NaCl, 0.01MのTris-HCl pH 8.0) で10分間ずつ3回転倒混和して洗浄した。回収したcDNAは、上記のPCR) 法によって増幅し、セファクリルS300を用いて、比較的分子量の大きなPCR産物のみ回収した。このアフィニティー濃縮とPCR増幅を5回繰り返し、HHV-6特異的なcDNAを濃縮した。アフィニティー濃縮したcDNAは、以下のcDNAライブラリーの作成とコロニーハイブリダイゼーション用のプローブとして用いた。

3) cDNAライブラリーの作成

上記の方法で濃縮したcDNAは、TA-cloning Kit (Invitrogen社) を用いて、製品のプロトコールに従ってプラスミドライブラリーを作成した。

5. HHV-6前初期遺伝子および潜伏感染遺伝子 ファージライブラリーの作成

前初期遺伝子および潜伏感染遺伝子のmRNAを上記の方法で取得、ランダムプライマー cDNA 合成キット (Stratagene 社) を用いて二重鎖DNAを作成した後、Lambda gt10クローニングキット (Stratagene 社) を用いてファージライブラリーを作成した。方法は、供給元のプロトコールに従って、cDNAの末端を平滑にした後、同キットに含まれるEco RIアダプターを結合し、Lambda gt10ベクターのEco RIサイトにcDNAを挿入した。ライゲーション反応後にLambda gt10ベクターを、Gigapack Gold Packaging Extract (Stratagene 社) を用いて、in vitroパッケージングを行なった。ファージプレートは、10 cmシャーレ1枚あたり、約1,000 プラークが出現する様に作成した。

6. 各種ハイブリダイゼーション法

1) ドットプロットハイブリダイゼーション

HHV-6ゲノムのほぼ全域をカバーする51種類のプラスミドクローンを、Filtration manifold (Bio-Lad社) を用いて、約100 ngずつ Hybond-N + membrane (Amersham 社) にアルカリプロット法で結合させた。

プラスミドクローンを結合させたメンブレンは、上記の方法でアフィニティー濃縮したcDNAをプローブとしてハイブリダイゼーションを行なった。プローブの標識とハイブリダイゼーション反応は、 α -32P標識dCTPを用い、rapid hybridization system multiprime (Amersham 社) のプロトコールに従って2時間反応させて行なった。メンブレンの洗浄は、2xSSPE、0.1% SDSを用いて10分ずつ室温で2回、2xSSPE、0.1% SDSで65℃ 20分1回、0.25xSSPE、0.1% SDSで65℃ 20分2回行なった。洗浄後メンブレンを乾燥し、レントゲンフィルムを-70℃にて約16時間感光させた。

2) ノーザンプロットハイブリダイゼーション

HHV-6の前初期遺伝子発現条件、潜伏感染条件、コントロールで得られた細胞から得たRNAを4.5 μ lのdiethyl pyrocarbonate (DEPC) 処理水に5倍のformamide gel-running buffer [100 mM 3-(N-morpholino) propanesulfonic acid (MOPS), 40 mM sodium acetate 5mM EDTA (pH 8.0)] 3.5 μ lと10 μ lホルムアルデヒドを混合した溶液で溶解

した。このサンプルを65℃で15分間変成し、RNA泳動用のアガロースゲル (1.2% agarose, 1x formamide gel-running buffer, 2.2 M formaldehyde) と1x formaldehyde gel-running bufferを用いて3V/cmで45分間泳動した。分子量マーカーは、0.24-9.5 Kb Ladder (GIBCO BRL 社) を用いた。泳動したRNAは、Gene Screen Plus membrane (NEN Research Products 社) に転写した。転写用のバッファーは、10xSSPE (1.8 M-NaCl, 0.1 M-sodium phosphate, 0.01 M-EDTA PH 7.0) を用いて16時間行なった。転写後、メンブレンを2xSSPEで洗浄した後、80℃のパキュームオーブンで2時間焼き付けを行なった。ハイブリダイゼーションは、ドットプロットハイブリダイゼーションによって同定されたHHV-6プラスミドクローンをドットプロットハイブリダイゼーションと同様の方法を用いて、標識、ハイブリダイゼーション、洗浄、検出を行なった。

3) サザンプロットハイブリダイゼーション

ドットプロットハイブリダイゼーションにて陽性となったプラスミドを、制限酵素Bam HIで消化してアガロース電気泳動し、Hybond-N + membrane (Amersham 社) に0.4N NaOHによるアルカリプロット法を用いてトランスファーを行なった。ハイブリダイゼーションは、アフィニティー濃縮したcDNAをプローブとして使用し、ドットプロットハイブリダイゼーションと同様の方法で行なった。

4) プラークハイブリダイゼーション

プラークは、Hybond-N + membrane (Amersham 社) に写し取った後、0.4N NaOHによるアルカリ固定を1時間行なった。転写後、メンブレンを6xSSPEで中和した後、2xSSPEで洗浄し、80℃のパキュームオーブンで2時間焼き付けを行なった。ハイブリダイゼーションは、上記の方法で陽性であることが確認されたプラスミドクローンをプローブとして、ドットプロットハイブリダイゼーションと同様の方法で行なった。

7. 塩基配列解析

上記の方法で得たLambda gt10クローンは、Lambda gt10特異的プライマーでインサートをPCR増幅した後、同じプライマーを用いて塩基配列を解析した。塩基配列は、Sequenase™ DNA

Sequencing Kit (USB 社) を用いて行なった。反応後の産物は、ポリアクリルアミド電気泳動し、乾燥後、レントゲンフィルムに感光した後、塩基配列解析を行なった。

III. 結 果

1. HHV-6 前初期遺伝子発現部位の同定

新規潜伏感染遺伝子の同定を行なうための選択システムの動作確認を兼ねて、まず HHV-6 前初期遺伝子発現部位の同定を行なった。前初期遺伝子 mRNA は、CH 処理によって前初期遺伝子のみを発現するようにした、HHV-6 感染細胞から得た。cDNA を対象と方法の項で述べた方法で濃縮し、HHV-6 ゲノムのほぼ全域をカバーするプラスミドクローン (pSTY clones) (Fig. 1, 2) とハイブリダ

イゼーションしたところ、Fig. 2(a) に示すように、pSTY03, pSTY09, pSTY15, pSTY34, pSTY45 の 5 つのクローンが陽性となった。これらのクローンの HHV-6 ゲノム上の位置は、Fig. 1 に示す通りである。

2. ノーザンブロットハイブリダイゼーション法による確認

陽性クローンが前初期遺伝子発現部位を含むことを、ノーザンブロットハイブリダイゼーション法によって確認した。ノーザンブロットハイブリダイゼーションに使用した RNA は、CH 処理した PBMC から精製したので、HHV-6 感染細胞では前初期遺伝子のみが発現していると考えられる。ノーザンブロットハイブリダイゼーションの結果、pSTY03 は 約 4.0Kb, pSTY09 は 約 1.5Kb, pSTY15 は 約 4.5 Kb, 5.0 Kb, 3.0 Kb のバンドが

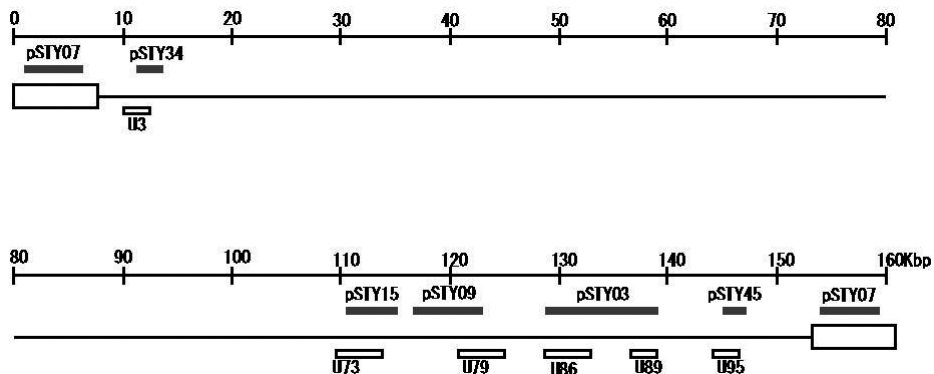


Fig. 1 Mapping of HHV-6 open reading frames and plasmid clones

Gene structure of HHV-6, open reading frames that are related to this study, and HHV-6 genomic plasmid clones are shown.

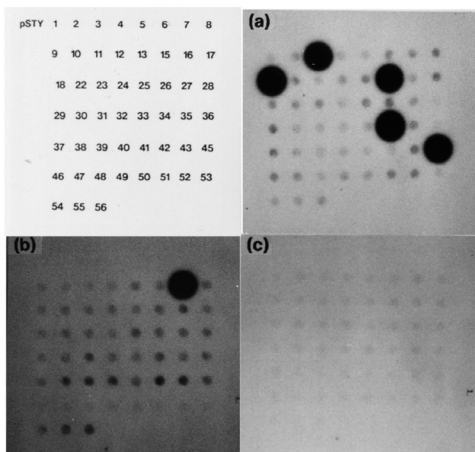


Fig. 2 Dot-blot hybridization using affinity purified cDNA. Position of HHV-6 genomic plasmid clones and results of dot-blot hybridization are shown. Cells were obtained from cycloheximide (CH) treated infected peripheral blood lymphocytes (a), latently infected macrophages (b), or uninfected peripheral blood lymphocytes.

検出された。pSTY34は約1.5 Kbと1.0 Kb, pSTY45では特異的なバンドは検出されなかった。非感染細胞からは、陽性のバンドは検出されなかった (Fig. 3)。このことは、少なくとも、陽性のバンドが得られたpSTY03, pSTY09, pSTY15, pSTY34の各クローンは、前初期遺伝子と相同な遺伝子部位を含むプラスミドであると考えられた。

3. cDNA クローンの塩基配列確認

HHV-6ゲノムに対するアフィニティー濃縮したcDNAから作成したLambda gt10ライブラリーを、同じくアフィニティー濃縮したcDNAに対してドットプロットハイブリダイゼーション陽性となったプラスミドクローンをプローブとしてブラークハイブリダイゼーションを行なった。それぞれ、約1,000個のブラークを選別した結果、Table. 1に示す数の陽性ブラークを得た。陽性ブラークから得たDNAを、Lambda gt10特異的プライマーを用いてPCR増幅し、代表的な大きさの

インサートを確認した。代表的なインサート解析結果を、Fig. 4に示す。

これらのLambda gt10 ファージクローンの塩基配列を決定したところ、pSTY03とのハイブリダイゼーションが、陽性となったクローンからは、HHV-6ゲノムのopen reading frame (ORF) U86とU89に相同な配列が検出された。同じく、pSTY09とハイブリダイゼーションするクローンからは、ORF U79と相同な配列が、pSTY15では、ORF U73と、pSTY34ではORF U3, pSTY45ではORF U95と、それぞれ相同な配列が検出された (Fig. 1)。これらは、後述する様に、前初期遺伝子と考えられるORFであった。

4. 潜伏感染遺伝子発現部位の同定

これまでの研究で、今回用いた方法が、HHV-6特異的なmRNAの同定に有用であることが判明したため、新規の潜伏感染遺伝子の同定への利用を試みた。HHV-6潜伏感染遺伝子を含むmRNAは、対象と方法に述べた方法で、潜伏感染

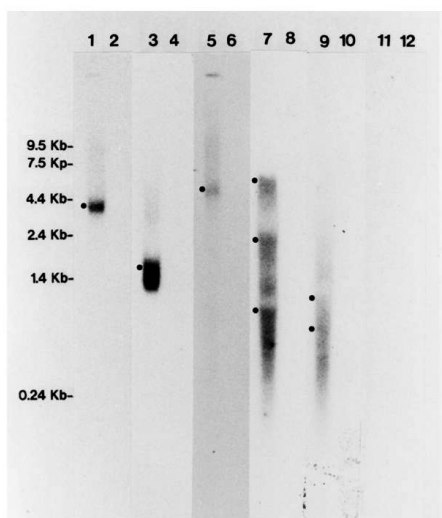


Fig. 3 Northern blot hybridization of CH treated HHV-6 infected cells

RNA was purified from CH treated HHV-6 infected peripheral blood lymphocytes, and Northern blot hybridization was performed using each HHV-6 genomic plasmid clones as probes. Lanes 1, 3, 5, 7, 9, and 11 represent infected cells, and lanes 2, 4, 6, 8, 10, 12 represent uninfected cells. Hybridization probes; lanes 1 and 2: pSTY03, 3 and 4: pSTY09, 5 and 6: pSTY15, 7 and 8: pSTY34, 9 and 10: pSTY45, 11 and 12: pUC11 plasmid.

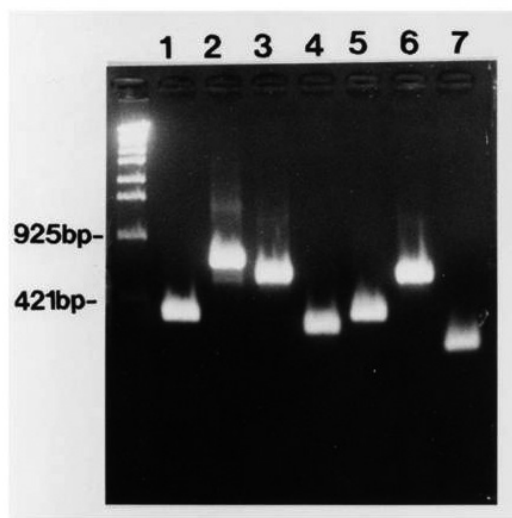


Fig. 4 PCR amplification of Lambda gt10 phage clones inserts

Inserted fragments of Lambda gt10 phage clones selected by plaque hybridization were amplified by PCR using phage specific primers. Representative cases were shown. Lanes 1 and 2: pSTY03, 3: pSTY09, 4: pSTY15, 5: pSTY34, 6: pSTY45, 7: pSTY07 (latency-associated transcript).

マクロファージから精製した。精製したmRNAは、前初期遺伝子の際と同じ方法でcDNAに逆転写し、同様の方法でHHV-6ゲノムに対するアフィニティー濃縮を行なった。

この結果、Fig. 2 (b) に示す様に、pSTY07にドットプロットハイブリダイゼーションで陽性のシグナルが得られた。この潜伏感染遺伝子候補の位置を検討するために、pSTY07プラスミドクローンを制限酵素でさらに消化し、どの断片がアフィニティー濃縮したcDNAとハイブリダイゼーションを成立させるかを検討した。その結果、pSTY07プラスミドクローンを制限酵素Bam HIで消化した時に生じる約1.5 Kbpの断片が候補となることが判った (Fig. 5)。この遺伝子断片のHHV-6ゲノム上の位置は、Fig. 6に示す位置であることが判った。つぎに、HHV-6潜伏感染細胞mRNAから得られたアフィニティー濃縮cDNAからLambda gt10ファージライブラリーを作成し、プ

ラクハイブリダイゼーションによって陽性クローンを得た (Fig. 4, 第7レーン)。このクローンの塩基配列解析を行なったところ、十分な大きさのORFは存在していなかった。また、通常のスプライシングのアクセプター・ドナー配列も見出せなかった。その大きさは、インサート部分のみでは、100 bp程度であった。

IV. 考 察

HHV-6の潜伏感染遺伝子を同定するために、改良型の遺伝子アフィニティー濃縮法を開発することに成功した。この方法は、試行錯誤の結果、cDNAライブラリーより、ウイルス特異的なクローンをpolymerase chain reaction (PCR) 法とhybridization法に基づいたcDNA選択法となった。1st strand cDNAは、HHV-6感染細胞全RNAからoligo (dT) -containing primerを用いて作成した。

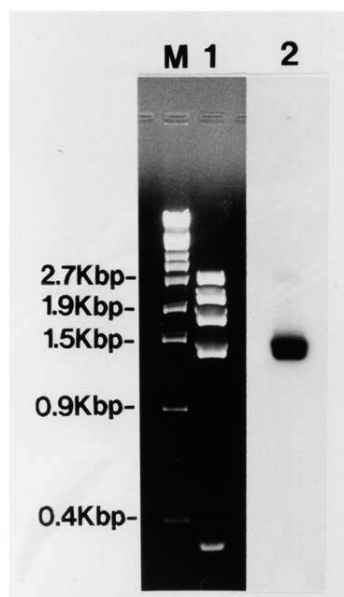


Fig. 5 Southern blot analysis of pSTY07 plasmid clone
pSTY07 plasmid clone was digested with restriction enzyme Bam HI, and Southern blot hybridization was performed using affinity purified cDNA.

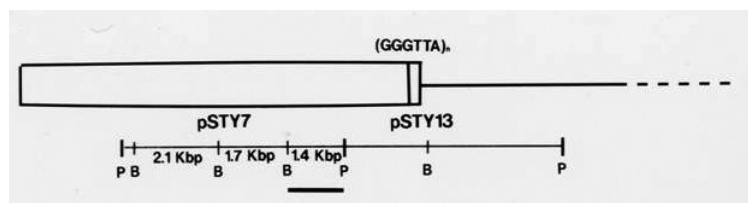


Fig. 6 Mapping of HHV-6 latency-associated transcript coding region
Fine mapping of the HHV-6 DNA fragment that hybridized with cDNA from latently infected macrophages is shown. (GGGTTA)_n represents the telomeric region in HHV-6 genome.

Table. 1. Plaque hybridization of Lambda gt10 library established from affinity purified cDNA

Lambda gt10 library was established from affinity purified cDNA. Plaque hybridization was performed using each pSTY clones shown in the table. The number of the hybridization positive plaques in the dish that contained approximately 1,000 plaques was counted.

DNA probe	pSTY03	pSTY09	pSTY15	pSTY34	pSTY45
positive plaques (/1,000 plaques)	32	120	78	38	99

作成した 1st strand cDNA は、oligo (dC) を付加したのち、ビオチン化した HHV-6 遺伝子の 51 種類の Pst I クローンと hybridization を行なった。この hybridization 物を、固相化したビオチンによって選別し、oligo (dA)-containing primer と oligo (dG)-containing primer を用いて PCR 法によって増幅した。このステップを 5 回繰り返すことにより、HHV-6 特異的な cDNA 遺伝子クローンを選択的に得ることができた (Fig. 2)。

この方法を用いて、HHV-6 の感染調節遺伝子である前初期遺伝子 (IE) と、潜伏感染特異的遺伝子の同定を試みた。IE 遺伝子の同定には、IE 遺伝子のみを発現すると考えられる cycloheximide 存在化における HHV-6 培養を、潜伏感染特異的遺伝子の同定には、HHV-6 が潜伏感染しているマクロファージを、それぞれ用いた。

IE 遺伝子の同定では、Fig. 1 に示される pSTY03, pSTY09, pSTY15, pSTY34, pSTY45 のクローンの部位に、前初期遺伝子を発現する部位が重なっていることが示された (Fig. 2)^{10) 13) 14)}。ノーザンブロットハイブリダイゼーションの結果、pSTY45 のクローン以外の 4 クローンをプローブとして用いた際に、前初期遺伝子として発現する RNA が検出されることが判った (Fig. 3)。また、これらのプラスミドがハイブリダイゼーションを生じる cDNA を Lambda gt10 ファージライブラリーを作成し、ハイブリダイゼーションを生じるクローンの塩基配列を決定したところ、pSTY03 とのハイブリダイゼーションが、陽性となったクローンからは、HHV-6 ゲノムの open reading frame (ORF) U86 と U89 に相同な配列が、pSTY09 とハイブリダイゼーションするクローンからは、ORF U79 と相同な配列が、pSTY15 では、ORF U73 と、pSTY34 では ORF U3, pSTY45 では ORF U95 と、それぞれ相同な配列が検出された (Fig. 1, 4)。

この実験を行なった当時は、HHV-6 の前初期遺伝子に関する情報は、HHV-6 variant A に関して、U86 と U89 が IE であるという情報しかなかった。現在でも、実は、HHV-6 の前初期遺伝子に関する情報は完全には整理されていない。しかし、幸いなことに、本実験で前初期遺伝子であると同定した、U3, U73, U79, U95 は、その後の研究によって、前初期遺伝子であるという証拠が挙げ

られている^{15) -17)}。このことから、本研究で開発した遺伝子同定法が非常に能力の高い方法であることが示されていると考えられる。

遺伝子同定法が確立できたので、この方法を用いて HHV-6 潜伏感染遺伝子の同定を試みた。方法は、前初期遺伝子の際と同じく、潜伏感染遺伝子が発現している細胞から、HHV-6 の遺伝子 mRNA のみを濃縮した。潜伏感染遺伝子を発現する細胞は、我々が確立した *in vitro* の潜伏感染系である潜伏感染マクロファージを用いた。潜伏感染が成立しているかどうかは、PCR 法によって細胞が高頻度に HHV-6 DNA を持つことと、RT-PCR 法によって HHV-6 増殖感染の指標となる、前初期遺伝子 IE1/IE2 の mRNA が検出されないことによって判断した。

濃縮の結果、pSTY07 と相同性を持つ遺伝子が濃縮された (Fig. 2)。濃縮した潜伏感染遺伝子 cDNA から Lambda gt10 ファージライブラリーを作成し、pSTY07 プラスミドをプローブとしてブラークハイブリダイゼーションによって cDNA 断片をクローニングすることが出来た (Fig. 4)。しかし、このクローンの塩基配列解析を行なったところ、十分な大きさの ORF は存在しておらず、通常のスプライシングのアクセプター・ドナー配列も見出せなかった。また、その大きさは、インサート部分のみでは、100 bp 程度であった (Fig. 4)。このため、この実験で見出された潜伏感染遺伝子は、タンパクをコードしない低分子量の RNA であると考えられたが、それ以上の機能解析は行なわなかった。この実験を行なった当時は、まだ small interference RNA (siRNA) や micro RNA (miRNA) などの干渉 RNA は発見されておらず、低分子量 RNA に関する周辺情報が非常に乏しかった。このため、この実験で見出された 100 bp 程度の RNA と比較できる性質の RNA に関する情報も見出せなかった。

最近、HHV-6 と同じヘルペスウイルスに属する単純ヘルペスウイルス 1 型 (HSV-1) の潜伏感染遺伝子である latency-associated transcript (LAT) が、干渉 RNA である miRNA として機能することが報告された^{18) 19)}。このことから、この実験で発見した潜伏感染遺伝子候補も、miRNA であった可能性が考えられる。

その後我々は、HHV-6の潜伏感染遺伝子HHV-6 latency-associated transcripts (H6LTs) を発見した²⁰⁾。このH6LTは、HHV-6前初期遺伝子IE1/IE2のORFをコードし、その5'-非翻訳領域に潜伏感染特異的な翻訳調節領域を持つ。この遺伝子は、HHV-6と近縁のサイトメガロウイルスで、我々が同定した潜伏感染遺伝子と類似の構造を持つため、HHV-6の属する β -ヘルペスウイルス亜科のヘルペスウイルスの潜伏感染において本質的な役割を演じると考えられる²¹⁾。また、この潜伏感染遺伝子は、再活性化の際にmRNAが増加して、HHV-6の再活性化に関与する²²⁾。この実験によってH6LTが発見できなかった原因としては、この実験で用いた潜伏感染細胞をIE1/IE2の発現がないことで選択したために、潜伏感染の状態が非常に深い状態であった可能性が考えられる。また、前初期遺伝子を発現していないことを潜伏感染の条件としたために、H6LT発現細胞を除いてしまった可能性もある。このことは、本実験では、あえて発現量の比較的多いH6LTではなく、同定が困難な潜伏感染遺伝子を最初から探しに行ったとも言える。今後は、この実験で詳細にマッピングした潜伏感染遺伝子発現部位を利用して、miRNAなどの潜伏感染遺伝子を同定することが可能になると考えられる (Fig. 6)。

なお、この研究におけるデータは、近藤が大阪大学微生物病研究所において行なった実験で得たものを含む。

V. 結 語

ウイルス特異的なmRNAを濃縮、クローニングする方法を開発することにより、HHV-6の前初期遺伝子と潜伏感染遺伝子を同定することに成功した。潜伏感染遺伝子は、ヘルペスウイルスの病原性の解明に非常に重要な因子となる。今回同定した潜伏感染遺伝子は、これまでに同定されたものとは異なるものであり、HHV-6によって生じる疾患の病態の解明への貢献が期待される。

文 献

- 1) Yamanishi K, Okuno T, Shiraki K, Takahashi M, Kondo T, Asano Y, et al. Identification of human herpesvirus-6 as a causal agent for exanthem subitum. *Lancet* 1988 ; 1 : 1065-7.
- 2) Kondo K, Kondo T, Okuno T, Takahashi M, Yamanishi K. Latent human herpesvirus 6 infection of human monocytes/macrophages. *J Gen Virol* 1991 ; 72 : 1401-8.
- 3) Kondo K, Nagafuji H, Hata A, Tomomori C, Yamanishi K. Association of human herpesvirus 6 infection of the central nervous system with recurrence of febrile convulsions. *J Infect Dis* 1993; 167:1197-1200.
- 4) Carrigan DR, Drobyski WR, Russler SK, Tapper MA, Knox KK, Ash RC. Interstitial pneumonitis associated with human herpesvirus-6 infection after marrow transplantation. *Lancet* 1991; 338:147-9.
- 5) Caserta MT, Hall CB, Schnabel K, McIntyre K, Long C, Costanzo M, et al. Neuroinvasion and persistence of human herpesvirus 6 in children. *J Infect Dis* 1994; 170:1586-9.
- 6) Challoner PB, Smith KT, Parker JD, MacLeod DL, Coulter SN, Rose TM, et al. Plaque-associated expression of human herpesvirus 6 in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995 ; 92:7440-4.
- 7) Giraudon P, Bernard A. Chronic viral infections of the central nervous system: Aspects specific to multiple sclerosis. *Rev Neurol (Paris)* 2009 ; 165 : 789-95.
- 8) Barnes DM. Mystery disease at Lake Tahoe challenges virologists and clinicians. *Science* 1986; 234:541-2.
- 9) Soto NE, Straus SE. Chronic Fatigue Syndrome and Herpesviruses : the Fading Evidence. *Herpes* 2000; 7:46-50.
- 10) Isegawa Y, Mukai T, Nakano K, Kagawa M, Chen J, Mori Y, et al. Comparison of the complete DNA sequences of human herpesvirus 6 variants A and B. *J Virol* 1999 ; 73 : 8053-63.
- 11) Asada H, Yalcin S, Balachandra K, Higashi K, Yamanishi K. Establishment of titration system for human herpesvirus 6 and evaluation of neutralizing antibody response to the virus. *J Clin Microbiol* 1989; 27:2204-7.
- 12) Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162:156-9.
- 13) Gompels UA, Nicholas J, Lawrence G, Jones M, Thomson BJ, Martin ME, Efstathiou S, Craxton M, Macaulay HA. The DNA sequence of human herpesvirus-6: structure, coding content, and genome evolution. *Virology* 1995; 209:29-51.

- 14) Dominguez G, Dambaugh TR, Stamey FR, Dewhurst S, Inoue N, Pellett PE. Human herpesvirus 6B genome sequence: coding content and comparison with human herpesvirus 6A. *J Virol* 1999; 73:8040-52.
- 15) Mori Y, Yagi H, Shimamoto T, Isegawa Y, Sunagawa T, Inagi R, et al. Analysis of human herpesvirus 6 U3 gene, which is a positional homolog of human cytomegalovirus UL 24 gene. *Virology* 1998; 249:129-39.
- 16) Mirandola P, Menegazzi P, Merighi S, Ravaioli T, Cassai E, Di Luca D. Temporal mapping of transcripts in herpesvirus 6 variants. *J Virol* 1998; 72:3837-44.
- 17) Tsao EH, Kellam P, Sin CS, Rasaiyaah J, Griffiths PD, Clark DA. Microarray-based determination of the lytic cascade of human herpesvirus 6B. *J Gen Virol* 2009; 90:2581-91.
- 18) Gupta A, Gartner JJ, Sethupathy P, Hatzigeorgiou AG, Fraser NW. Anti-apoptotic function of a microRNA encoded by the HSV-1 latency-associated transcript. *Nature* 2006; 442:82-5.
- 19) Umbach JL, Kramer MF, Jurak I, Karnowski HW, Coen DM, Cullen BR. MicroRNAs expressed by herpes simplex virus 1 during latent infection regulate viral mRNAs. *Nature* 2008; 454:780-3.
- 20) Kondo K. Identification of human herpesvirus 6 latency-associated transcripts. *J Virol* 2002; 76:4145-51.
- 21) Kondo K, Xu J, Mocarski ES. Human cytomegalovirus latent gene expression in granulocyte-macrophage progenitors in culture and in seropositive individuals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93:11137-42.
- 22) Kondo K, Sashihara J, Shimada K, Takemoto M, Amo K, Miyagawa H, Yamanishi K. Recognition of a Novel Stage of Beta-Herpesvirus Latency in Human Herpesvirus 6. *J Virol* 2003; 77:2258-64.