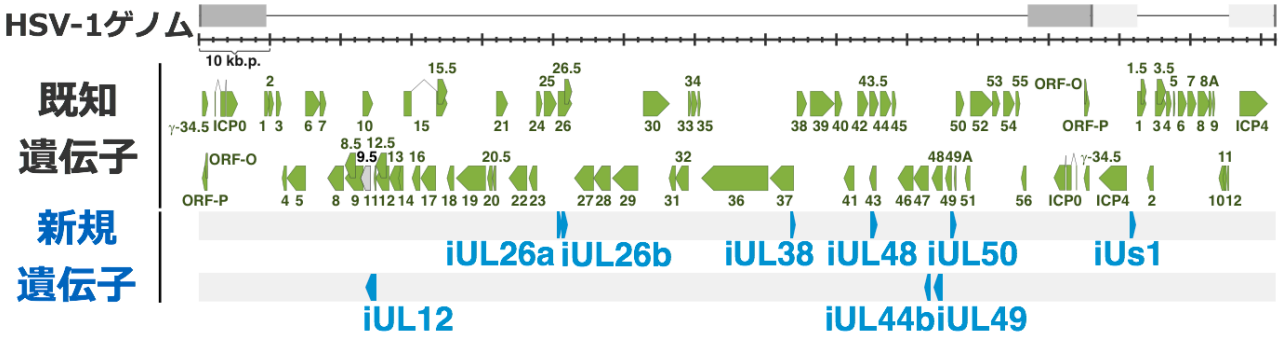
80　スパコンを用いた次世代型ウイルス感染制御機構の解明	川口　寧

【目的】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、様々な疾患を引き起こす。すなわち、ウイルス感染に伴う病態の理解には、ウイルス遺伝子産物の包括的な同定が不可欠である。進化の過程において、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、ノンカロニカル（非標準的）な翻訳エレメントを獲得してきた。しかしながら、これらの非標準的なエレメントは、一般的な塩基配列上の特徴を欠くため、従来のアノテーション法により同定することは困難である。そこで、本研究では、非標準的なウイルス遺伝子産物を直接的かつ包括的に検出する新たな手法の開発を試みた。

【方法】本研究では、新規合成蛋白質特異的な質量分析である BONCAT と高感度質量分析を融合させた chemical proteomics 解析を実施し、得られた質量情報の実測値とゲノム情報から構築された仮想質量情報を、高速計算機により比較解析することで、実際に細胞内で発現している未解読のウイルス遺伝子産物を包括的に同定した。

【結果】本研究により、我々は単純ヘルペスウイルス 1 型（HSV-1）がコードする 9 種類の新規遺伝子を同定した。興味深いことに、同定された新規遺伝子は、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。そして、同定した新規遺伝子の一つである iUL49 は、HSV-1 の神経病原子を司る病原因子であった。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。

新たなウイルス遺伝子産物解読法により同定された HSV-1 新規遺伝子に関する概要図



80. スパコンを用いた次世代型ウイルス感染制御機構の解明

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

Key words：単純ヘルペスウイルス 1 型（HSV-1），BONCAT 法，ウイルス遺伝子解読法

緒　言

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。この物理的な制約により、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。

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［3〜5］。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る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という特性を有している［6］。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［7］と高速計算機を用いたバイオインフォマティクス解析を併用し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）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。したがって、BONCAT 法と高感度質量分析を併用した chemical proteomics 後、得られたペプチド情報を高速計算機により解析することで、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 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けに同定されていた［5］。一連の報告により、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、本研究で確立した新たなウイルス遺伝子解読法により、さらに 9 種類の新規遺伝子の解読が可能であった［9］。

方　法

1. ウイルスと細胞

野生型 HSV-1 (F) 株および Simian kidney epithelial Vero 細胞はシカゴ大学の Bernard Roizman 教授から、human cervical epithelioid carcinoma HeLa 細胞は福島県立医科大学の北爪しのぶ教授から分与された。野生型 HSV-1（F）株は、Vero 細胞において調製し、Vero 細胞におけるプラークアッセイにより力価（PFU/ml）を決定し、実験に用いた。

2. Chemical proteomics

野生型 HSV-1（F）感染 HeLa 細胞を、メチオニン・フリーDMEM 培地（Sigma）により、メチオニン枯渇させた後、50μM AHA（Molecular Probes）含有メチオニン・フリーDMEM 培地にて、新規合成蛋白質を AHA 標識する。AHA 標識感染細胞を benzonase（Millipore）と protease inhibitor cocktail （Sigma）含有 8 M urea buffer（8 M urea, 200 mM Tris [pH 8.4], 4% CHAPS, 1 M NaCl）にて可溶化させ、Click-iT™ Protein Enrichment Kit（Thermo Fisher Scientific）のプトロコールに従い、AHA 標識蛋白質を alkyne-conjugating agarose resin（Thermo Fisher Scientific）に結合・精製し、SDS wash buffer（100 mM Tris [pH8.4], 1% SDS, 250 mM NaCl, 5 mM EDTA）にてエリュートし、ペプチド断片化後、C18 mono-spin column（GL Science）により精製後、LC-MS/MS 解析（Triple TOF 5600+; AB Sciex）に供した。

3. マウス病原性試験

1 群 6 匹の 3 週齢メスの ICR マウス（Charles River）に、10 倍希釈列の各種組換え HSV-1 50μl を脳内接種し、感染後 14 日までの生死を観察した。LD_{50}値は Behrens–Karber 法により算出した。

結果および考察

1. 質量解析とスパコンを用いた非標準的ウイルス遺伝子解読法

図 1a に示す通り、HSV-1 感染 HeLa 細胞を、AHA 標識した後、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 ペプチドが検出され、全ペプチドの 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（図 1b）。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うるという条件（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 株である HSV-1（17）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 1c）。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［4］。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。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、我々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 を用いたウイルス遺伝子解読法は、他の非標準的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。

2. 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。*piUL49* 欠損ウイルスの脳内接種、マウス 50%致死値（LD_{50}値）において、約 21.5 倍の上昇が認められた（図 2a）。そして、*VP22* 欠損時は、過去の報告［10］と同様に、LD_{50}値の大幅な上昇が認められた（図 2b）。

さらに、*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 LD_{50} 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 2c）。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。

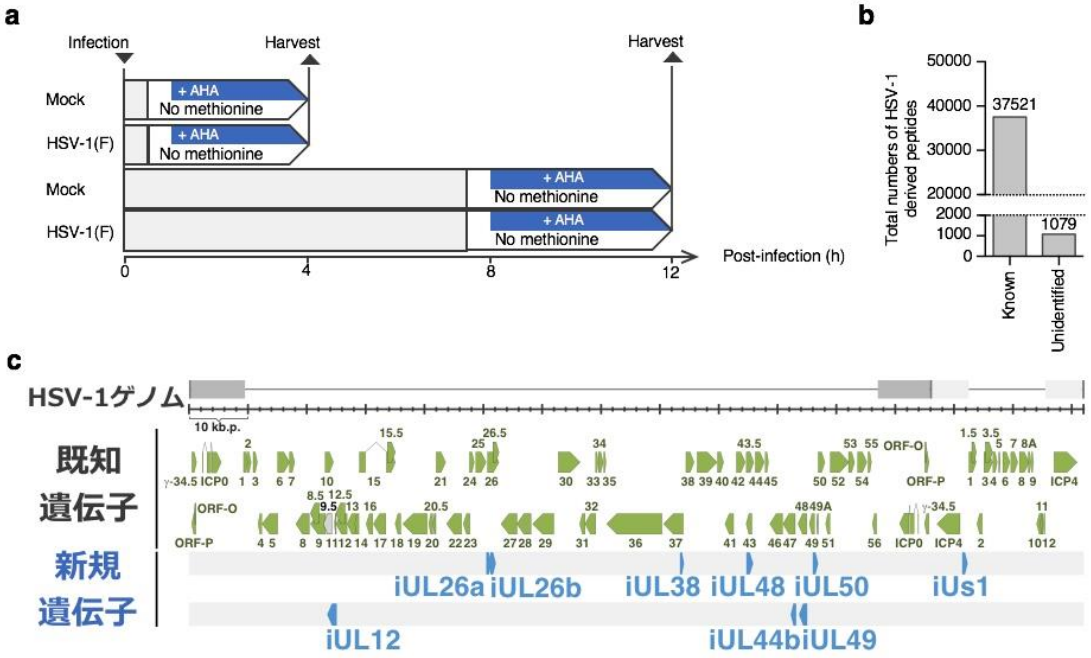


図 1. BONCAT 法を駆使した新規 HSV-1 遺伝子の解読

a）Chemical proteomics 解析に供した HSV-1 感染細胞サンプル調製のスキーム。

b）検出された既知遺伝子（Known）と新規遺伝子（Unidentified）由来のペプチド数。

c）HSV ゲノム上に mapping された新規遺伝子の見取り図。

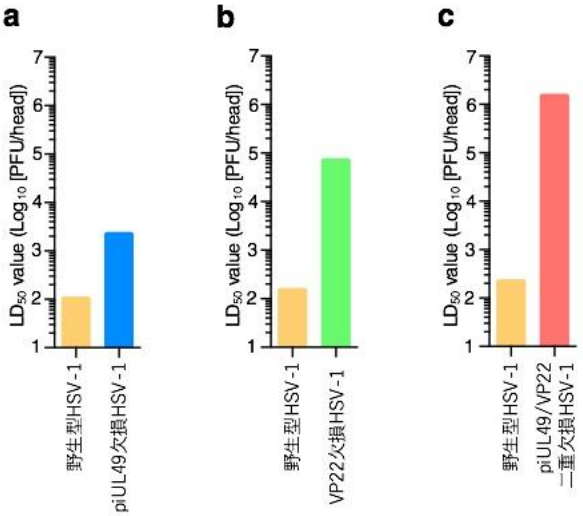


図 2. HSV-1 脳内接種時のマウスにおける HSV-1 神経病原試験の結果

a）野生型および *piUL49* 欠損 HSV-1 感染マウスにおける LD_{50} 値。

b）野生型および *VP22* 欠損 HSV-1 感染マウスにおける LD_{50} 値。

c）野生型および *piUL49*／*VP22* 二重欠損 HSV-1 感染マウスにおける LD_{50} 値。

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・免疫部門の加藤哲久等、国立研究開発法人産業技術総合研究所生命工学領域の足達俊吾、八田知久および夏目徹、電気通信大学大学院情報理工学研究科の川野秀一である。

文　献

1) Stern-Ginossar N, Ingolia NT. Ribosome Profiling as a Tool to Decipher Viral Complexity. Annu Rev Virol. 2015 Nov;2(1):335-49. doi: 10.1146/annurev-virology-100114-054854. Epub 2015 Jul 30. PMID: 26958919

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. 2019 Feb;4(2):280-292. doi: 10.1038/s41564-018-0297-1. Epub 2018 Nov 26. PMID: 30478287

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. The coding capacity of SARS-CoV-2. Nature. 2021 Jan;589(7840):125-130. doi: 10.1038/s41586-020-2739-1. Epub 2020 Sep 9. PMID: 32906143

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. Decoding human cytomegalovirus. Science. 2012 Nov 23;338(6110):1088-93. doi: 10.1126/science.1227919. PMID: 23180859

5) Whisnant AW, Jurges 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, Grasser F, Lehner PJ, Friedel CC, Erhard F, Dolken L. Integrative functional genomics decodes herpes simplex virus 1. Nat Commun. 2020 Apr 27;11(1):2038. doi: 10.1038/s41467-020-15992-5. PMID: 32341360

6) Depledge DP, Srinivas KP, Sadaoka T, Bready D, Mori Y, Placantonakis DG, Mohr I, Wilson AC. Direct RNA sequencing on nanopore arrays redefines the transcriptional complexity of a viral pathogen. Nat Commun. 2019 Feb 14;10(1):754. doi: 10.1038/s41467-019-08734-9. PMID: 30765700

7) Weber F, Haller O. Viral suppression of the interferon system. Biochimie. Jun-Jul 2007;89(6-7):836-42. doi: 10.1016/j.biochi.2007.01.005. Epub 2007 Jan 27. PMID: 17336442

8) Dieterich DC, Link AJ, Graumann J, Tirrell DA, Schuman EM. Selective identification of newly synthesized proteins in mammalian cells using bioorthogonal noncanonical amino acid tagging (BONCAT). Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Jun 20;103(25):9482-7. doi: 10.1073/pnas.0601637103. Epub 2006 Jun 12. PMID: 16769897

9) 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. Identification of a herpes simplex virus 1 gene encoding neurovirulence factor by chemical proteomics. Nat Commun.2020 Sep 29;11(1):4894. doi: 10.1038/s41467-020-18718-9. PMID: 32994400

10) Tanaka M, Kato A, Satoh Y, Ide T, Sagou K, Kimura K, Hasegawa H, Kawaguchi Y. Herpes simplex virus 1 VP22 regulates translocation of multiple viral and cellular proteins and promotes neurovirulence. J Virol. 2012 May;86(9):5264-77. doi: 10.1128/JVI.06913-11. Epub 2012 Feb 22. PMID: 22357273