

## 21. サイトメガロウイルス：CMV はいかにして 宿主細胞を征服するか

渡辺 慎哉

### 1. はじめに

ここでは、各種サイトメガロウイルスのなかからヒトサイトメガロウイルス (HCMV) を選び、最近のトピックスから宿主・寄生体関係を中心に概説する。

HCMV はきわめて種特異性の高いウイルスであり、ヒト以外には感染しない。培養細胞レベルで HCMV が効率よく複製できるのはヒト正常線維芽細胞に限られる。一方、ヒトの個体レベルでは、ほとんどの臓器・組織に HCMV の感染を観察することができる。これら HCMV に特徴的な種特異性と汎臓器向性 (トロピズム) は宿主細胞側のさまざまな因子によって規定されるといえる。

HCMV 感染を規定する因子は、HCMV の宿主細胞への吸着・侵入からウイルスゲノム DNA 複製・ウイルス粒子形成、さらに細胞外への放出までのさまざまな段階に関与している可能性がある。これらの宿主側因子にはウイルス側因子との相互作用が当然あるだろうし、ヒト正常線維芽細胞における HCMV 感染ではその両者の相互作用があらゆる段階でウイルスの増殖にとって都合よく機能していると考えることができる。

HCMV 感染に関与する宿主側因子 (遺伝子) はレセプターをはじめとしてほとんど同定されていない。しかしながら、HCMV の全ゲノム配列の決定から宿主のヒトゲノムの解明に至って遺伝子の情報的基盤は十分な状況になり、さらに、ゲノムプロジェクトから生み出されたテクノロジーで遺伝子の網羅的解析が可能となって方法論的基盤も揃いつつある。これらを総合的に駆使してウイルスの感染に関与する宿主因子・遺伝子を体系的にあきらかにすることが期待できる時代となった。今回は、その端緒として、HCMV が許容細胞であるヒト正常線維芽細胞に感染して

最終的に支配下におくまでの網羅的ヒト遺伝子転写プログラムを紹介する。

### 2. ウイルス研究ツールとしてのマイクロアレイ

ポストシーケンス時代のゲノムサイエンスにおける重要なツールとして期待を集めているのが DNA マイクロアレイである。これは、数千種類以上の遺伝子断片をガラス等の基板の上に微小なスポットとして配列させたもので、この遺伝子断片がのっている領域で標識した核酸サンプルをハイブリダイズさせることにより、のっている遺伝子について、そのサンプルにおける発現レベルを一度に調べる事ができる技術である。異なる蛍光色素で標識した2種類のサンプルを混合してハイブリダイズさせることにより、各遺伝子の発現レベルのサンプル間相対比を計測する事が可能で、より正確に遺伝子発現レベル比を求めるためにはこの方法が用いられる。

現在、いくつかの異なる方式で作製された各種アレイがあるが、筆者らは、合成 DNA をスライドガラスに直接貼付ける方法で作製している (合成 DNA マイクロアレイ)。今のところ、筆者の研究室では、ヒト既知遺伝子 (NCBI RefSeq) として1万種類以上、および、ヘルペスウイルスを中心として500以上のウイルス遺伝子が同一スライドガラス上で利用できる。ヒト遺伝子マイクロアレイを使用することにより、ウイルスが感染することによって引き起こされる細胞応答を宿主遺伝子の発現レベルの変化として全体を一度にとらえること (トランスクリプトーム解析) が可能である。さらに、筆者らが作製している宿主側遺伝子と寄生体 (ウイルス) 側遺伝子を同時にみることができ、マイクロアレイを用いることにより、寄生体と宿主の関係 (相互作用) をそれぞれの遺伝子発現プロファイルとして解析することができる。今回は、宿主遺伝子アレイの結果についてのみ紹介する。

### 3. HCMV 感染によって引き起こされる遺伝子 発現変化のプロファイリング

HCMV および UV 不活化 HCMV 感染後 4, 8, 24, 48, 72

東京大学医科学研究所 (〒108-8639 東京都港区白金台  
4-6-1)

Cytomegalovirus : strategy for conquering host cells  
Shinya Watanabe

The Institute of Medical Science, The University of Tokyo

4-6-1 Shirokanedai Minato-ku Tokyo 108-8639

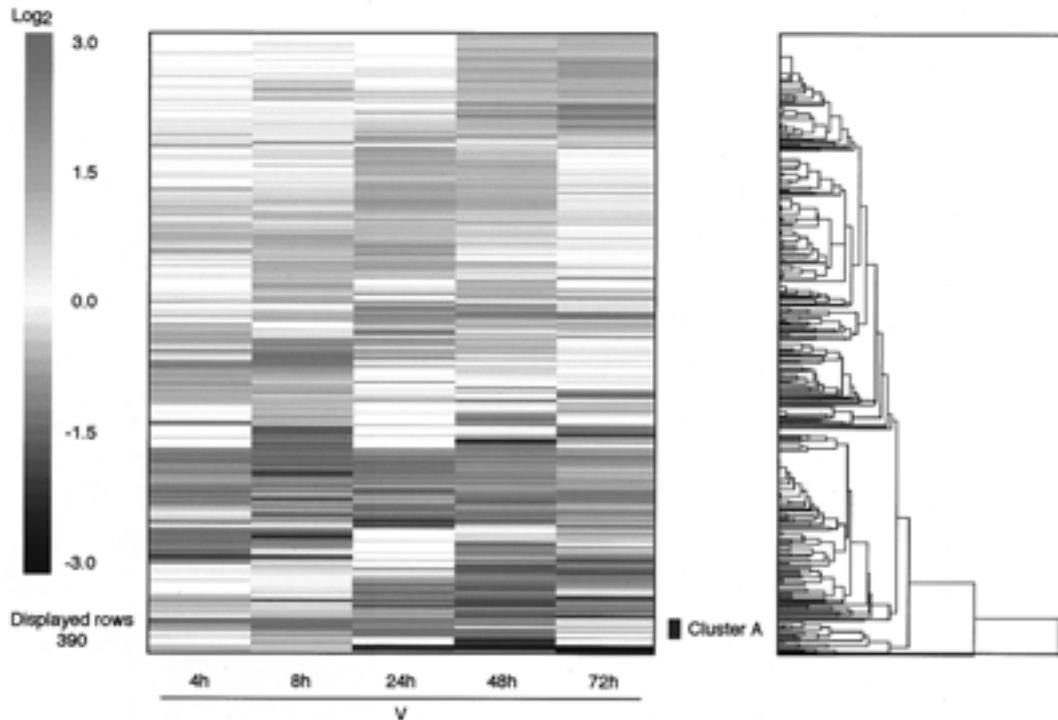


図1 HCMV感染による宿主細胞の遺伝子発現変化のクラスタ分析。

HCMV AD169株をヒト正常線維芽細胞に感染させ (MOI=10), 4時間・8時間・24時間・48時間・72時間後にRNAを回収した。各感染細胞サンプルをCy5, 非感染細胞サンプルをCy3で標識した後, 混合して合成DNAマイクロアレイにハイブリダイズさせた。少なくとも1タイムポイントで発現レベルの比 (感染/非感染細胞) が2を超した遺伝子をすべて抽出し, クラスタ分析した。

時間のヒト正常線維芽細胞からmRNAを抽出し, 作製した合成DNAマイクロアレイとハイブリダイズさせ, 遺伝子発現プロファイルを取得した。さらに, HCMVおよびUV不活化HCMV感染後24時間の培養上清からウイルス粒子を除いたものを培地として24時間培養した正常線維芽細胞から同様にして遺伝子発現プロファイルを得た。UV不活化HCMV感染では, ウイルス粒子の細胞への吸着・侵入はおきるが, 前初期遺伝子を含めたウイルス遺伝子の新たな発現は起きない。さらに, 感染細胞の培養上清中には, 感染によって発現が誘導され細胞外に放出される各種因子が含まれている。

これらのプロファイルを集積してクラスタ解析を行った結果を図1~3に示す。図1は, 野生株HCMVを感染させたときの発現プロファイルのクラスタ解析の結果を, 図2は, 野生株HCMVを感染させたときの発現プロファイルにUV不活性化HCMVを感染させたときの発現プロファイルを追加して再度行ったクラスタ解析の結果をそれぞれ示す。また, 図3は, これらの発現プロファイルに, HCMVおよびUV不活化HCMV感染後24時間の培養上清からウイルス粒子を除いたものを培地として24時間培養した正常線維芽細胞の遺伝子発現プロファイルをさらに追加して行ったクラスタ解析の結果を示す。

これらの解析から, いくつかの特徴的な遺伝子クラスタ (A~F) を次のように定義した。クラスタA: 野生株HCMVの感染初期に発現が上昇, 感染後期になるにしたがって発現低下, UV不活化HCMV感染では初期から後期まで発現上昇が持続する遺伝子群; クラスタB: クラスタAと同様の時間経過を示すが, 変化の程度がクラスタAに比べて小さい遺伝子群; クラスタC: 野生株HCMV感染では初期には低かった発現レベルが後期になるにしたがって上昇していき, 不活化HCMV感染では発現レベルの変化がほとんどない遺伝子群; クラスタD: 野生株HCMVと不活化HCMV感染の両者で感染後に発現レベルが低下するけれども, 感染細胞の培養上清を加えた場合ではほとんど変化しない遺伝子群; クラスタE: 感染細胞の培養上清を加えただけで発現レベルが低下する遺伝子群; クラスタF: 野生株HCMVあるいは不活化HCMV感染後の少なくとも1時点で発現レベルが上昇するが, 感染細胞の培養上清を加えた場合ではほとんど変化しない遺伝子群。これらのクラスタに属するヒト遺伝子の代表的なものは次の通りであった。

クラスタA: IL-1, IL-6, IL-8, MCP-1, GM-CSF, junB, SOD2, TFPI2, IFN-inducible 15kD protein, matrix metalloproteinase 3

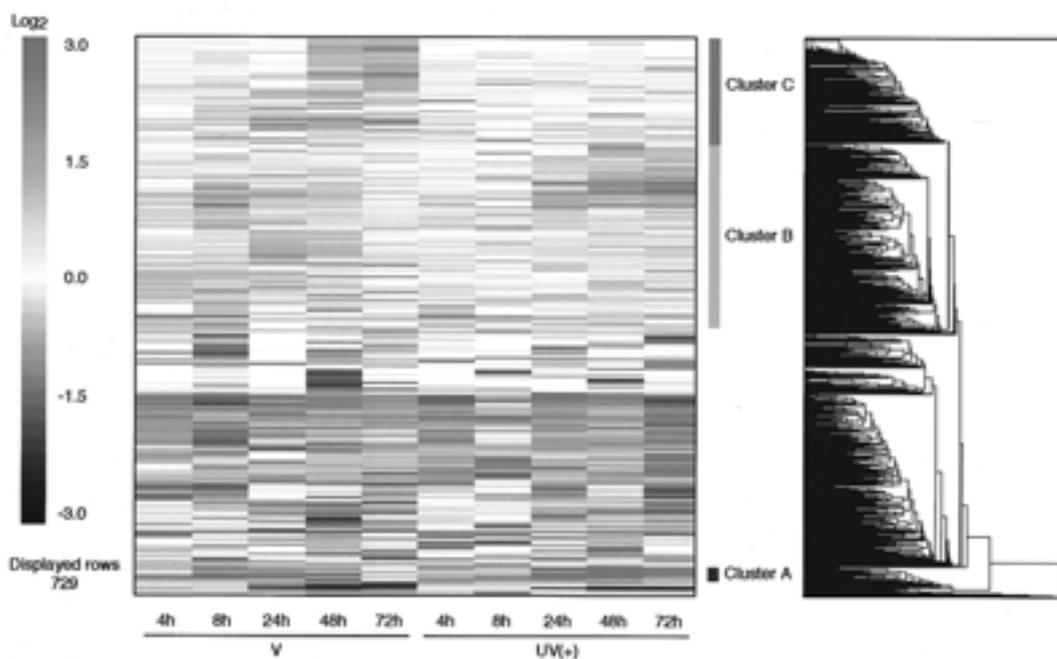


図2 UV不活化HCMV感染による宿主細胞の遺伝子発現変化のクラスタ分析。  
V: UV未照射の野生株ウイルスの感染; UV(+): UV照射により不活化したウイルスを感染させたサンプル。

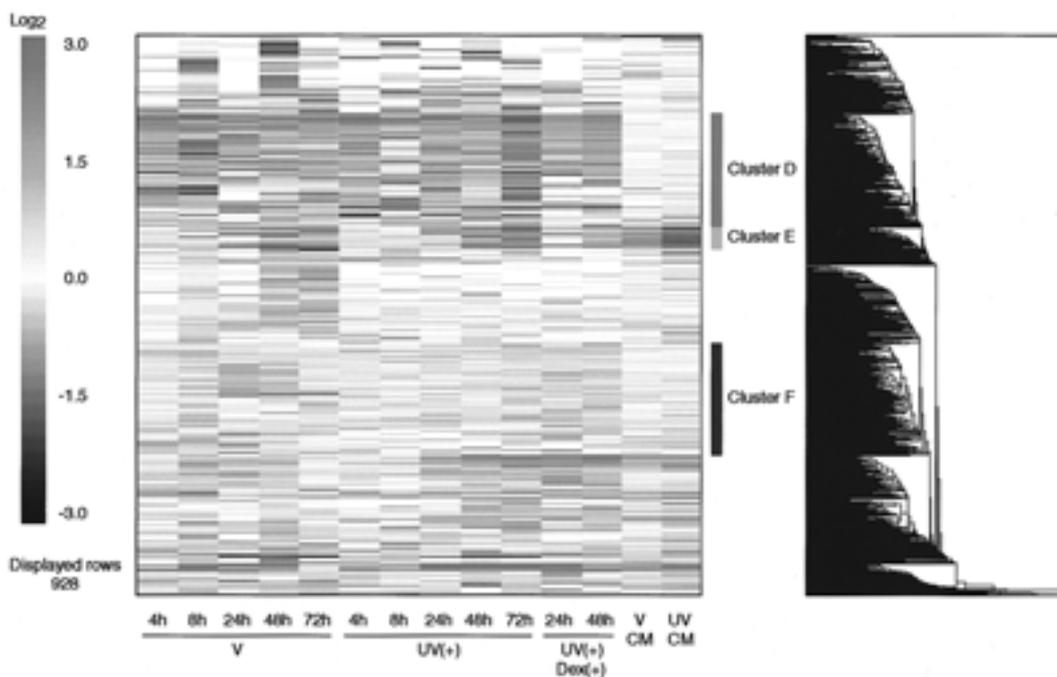


図3 感染細胞培養上清中による細胞遺伝子発現変化。  
HCMV (V) および UV 不活化 HCMV [UV(+)] 感染後 24 時間の培養上清からウイルス粒子を除いたものを培地として 24 時間培養した正常線維芽細胞の遺伝子発現プロファイルをさらに追加してクラスタ解析した。VCM: HCMV 感染後 24 時間の培養上清からウイルス粒子を除いたものを培地として 24 時間培養したもの; UVCM: UV 不活化 HCMV 感染後 24 時間の培養上清からウイルス粒子を除いたものを培地として 24 時間培養したもの。

クラスタ B: prostaglandin E synthetase, beta 2-microglobulin, GRO-2, TIMP 1, IL-11, FGF 2, ferritin heavy chain, matrix metalloproteinase 1, CD68, M-CSF, CD 97

クラスタ C: pyruvate dehydrogenase kinase, karyopherin alpha, protein phosphatase 2, NADH dehydrogenase, CD83, splicing factor arginine/serine-rich 8, cathepsin C, nucleoside phosphorylase, signal sequence receptor alpha

クラスタ D: osteomodulin, glypican 4, keratin 1, cadherin 5, centromere protein F, CDC-like kinase, G protein-coupled receptor 31, H 2 B histone family member S

クラスタ E: filamin A, actin gamma 1, collagen type I alpha 1, caveolin 1, mevalonate decarboxylase, laminin beta, ribosomal protein S20, vimentin 1, aldehyde dehydrogenase 1

クラスタ F: CD 3 G, prohibitin, chloride channel 6

#### 4. HCMV による宿主細胞征服のストラテジー

上記の遺伝子はそれぞれのクラスタのほんの一部であり、スペースの関係上そのすべてをここで紹介できない。これらの全容は近い将来ウェブサイト上に公開される予定である。ここでは、全体で1000を超す発現変動遺伝子群をおおまかに捉えることにより、かなり大胆に HCMV が宿主細胞を乗っ取っていくストラテジーを考察してみたい。

まず、上記のクラスタの中で突出して他の遺伝子群と異なる変化を示したのが、クラスタ A であった。このクラスタは、線維芽細胞が発現可能と思われるほとんどのサイトカイン (interleukin, chemokine, growth factor), インターフェロン誘導性因子群, 炎症関連因子群から構成される。これらの遺伝子は、HCMV の細胞への吸着・侵入に引き続いて短時間にその発現が非常に強く誘導されている。さらに、クラスタ B の構成遺伝子中にも、これらの細胞の急性応答に関与すると考えられるものが多数含まれている。特筆すべきは、これらの急性反応性遺伝子群の発現は、不活化 HCMV 感染の場合、感染後期になっても引き続き高いレベルを維持するのに対して、野生株 HCMV 感染では、感染直後からしばらくは高いレベルで発現されるものの、感染後期 (72h) では非感染細胞のレベルまで、あるいはそれ以下に低下するという点である。これらの発現変化の多くのもの (特にクラスタ A 遺伝子群) は、野生株 HCMV 感染細胞および不活化 HCMV 感染細胞の培養上清を非感染細胞に接種することによっても同様に観察される。以上のことから、次のようなストーリーが考えられる。HCMV 粒子の吸着・侵入により、ある刺激系統が活性化されて、サイトカイン群を中心とした因子が細胞外に放出される。これらの因子が細胞表面のレセプターを介し

て新たな刺激系統をオンにする。これらのシグナル伝達系統は、(ある特定の) ウイルス遺伝子が新たに感染細胞内で発現されてくると、そのウイルス遺伝子産物の直接的あるいは間接的な働きによって阻害され、最終的には感染前に近いレベルまで戻される。この段階に至るまでには、クラスタ D・E に属する遺伝子群の発現レベルが低下し、クラスタ C に属する遺伝子群の発現レベルが上昇している。クラスタ C の遺伝子群は、ウイルス遺伝子の発現があつてはじめてその発現が上昇する。すなわち、ウイルス粒子の刺激だけでは発現レベルが変化しない。このクラスタ C には、ミトコンドリアのエネルギー産生系およびユビキチン-プロテアソームタンパク分解系の構成因子が含まれている。また、種々の代謝系に属する酵素群も多数含まれており、これらは、ウイルスゲノムが複製し新たなウイルス粒子が産生されるために、ウイルス粒子構成成分およびエネルギーの生合成に必要な細胞の分解系および合成系を最大限に活用できるようになった結果を反映していると考えられる。さらに、クラスタ D・E には、線維芽細胞の特徴といえる多数の細胞外基質の構成要素および細胞表面タンパクが含まれている。これらは、おそらくウイルス粒子の産生には直接的に関係しないため、必要無いものとして、その産生が抑えられているようにも考えることができる。

ウイルス許容細胞は、ウイルスの感染によって、いわばウイルスの産生工場とかわられてしまうものということができる。ウイルス粒子の新たな産生のため、細胞の代謝系は至適化、すなわち、必要な系は増強・不必要な系は抑制される。HCMV 感染のトランスクリプトームは、このように解釈することが可能である。具体的にどの代謝系が必要であるか、あるいは不必要であるか、今後、さらに詳細なトランスクリプトーム解析によって次々とあきらかになってくると期待される。そのためには、非許容細胞 (すなわち、ウイルスが征服できない細胞) における遺伝子発現プロファイルの解析が重要な情報を提供するはずである。HCMV は許容細胞がきわめてわずかに限られており、多くの細胞は様々な程度で HCMV 非許容である。このことは、HCMV の増殖が非常に緩やかであるためにタイムコースを追うことが容易であることとあいまって、非許容細胞におけるウイルス感染のトランスクリプトーム解析にとって、HCMV がきわめて重要な先駆モデルを提供できることを意味している。

#### 5. おわりに

HCMV 粒子の細胞への結合・侵入が急速な宿主細胞応答をひき起こし、細胞外に放出される種々の宿主因子の遺伝子発現が上昇すること、さらにそれらの宿主反応はウイルス遺伝子の発現に従属して低下することが明らかとなった。これらの結果は、HCMV 遺伝子の発現によりそれに

先立っておきる宿主側の応答が抑制されることを示している。

HCMV 粒子の許容細胞表面への結合あるいは細胞内への侵入を契機として主として炎症に関与する多くの宿主遺伝子が発現される。そして、ウイルス遺伝子の発現および

複製サイクルの始動がない場合はそれらの高発現レベルが維持されることから、これらの宿主反応を抑制できるかが HCMV の許容性決定、すなわち、宿主細胞を征服できるかどうか、のひとつの指標となるのではないかと考える。