

1. ウイルス感染細胞のトランスクリプトーム解析

渡辺 慎哉

東京医科歯科大学臨床インフォマティクス講座

ヒトゲノムプロジェクトは、その成果として、かつては約10万と推定されていたヒト全遺伝子が3万数千~4万種類の遺伝子座から構成されることを明らかにした。さらに、塩基配列の解明そのものに加えて、初めて生命現象を全体として俯瞰・解析できるシステムの開発も促した。その代表がDNAマイクロアレイである。この技術を用いることにより、ほとんどすべての遺伝子の発現状態（トランスクリプトーム）を一度に解析すること（トランスクリプトーム解析）が可能となった。マイクロアレイで得られる知見は、極論すると、遺伝子発現レベルを唯一の指標とした、数値による生命現象の記載・記述である。これにより、我々ウイルス学者は、ウイルス感染細胞内でおきている現象の全体像を初めて探究できるツールを手にしたといえる。ここでは、各種ウイルスを代表してヒトサイトメガロウイルス（HCMV）を取り上げる。我々が独自に開発した合成DNAマイクロアレイシステムを用いて取得した、ウイルス感染細胞のウイルス遺伝子および宿主遺伝子の同時並行かつ包括的な発現プロファイルを例にウイルス感染細胞のトランスクリプトーム解析を紹介する。さらに、複数種類のウイルスと複数種類の細胞の組み合わせを同一プラットフォーム上で比較解析する「細胞応答の比較ウイルス学」を提案する。ある特定のウイルスを各種細胞に感染させるとき、あるいは、ある特定の細胞に各種ウイルスを感染させるとき、ウイルスによる違い・細胞による違いがあるのかないのか、あるとすればそれはどのようなものか、が明らかとなるはずである。

1. ポストゲノム時代：ウイルス学は ポストゲノム時代を先取りしている

2000年6月にヒトゲノムドラフト配列解読完了の宣言を受け、ポストゲノム時代（あるいはポストシーケンス時代）が始まった。しかしながら、ウイルス学領域では、すでにポストゲノム時代に突入して久しい。なぜならば、ヒトを含めた高等生物の巨大なゲノムの解読に約20年先んじて、まずSV40等の小型のウイルスのゲノム塩基配列が明らかになってきたからである¹⁾。それに各種ウイルスが引き続き、最後にヘルペスウイルス等の大型ウイルスのゲノムが明らかとなり、ウイルス学全領域にわたるポストゲノム時代が幕を開けた。HCMV（AD169株）の全ゲノム塩基配列が明らかになったのは、1990年であった²⁾。その登録番

号X17403は、筆者が唯一諳んじている遺伝子アクセションとなった。

HCMVを含む各種ウイルスの研究が辿った歴史を翻れば、ゲノムが解読されすべての遺伝子が推定されただけでは何ごとにも解決しないことは自明である。それは終わりではなく、まさに始まりのはじめだった。ゲノム配列決定後に出現したのは、個別の遺伝子の転写および翻訳産物（タンパク質）の機能を調べていくという、さらに広大な研究領域であった。

その意味で、今後のヒトゲノム研究の辿る道筋は、ウイルス学が辿ってきたその発展型であるといえる。ウイルス学は、より単純な系であることの利点を活かし、ヒトゲノム研究の先行モデル、すなわち道先案内的な役割をこれからも果たしていくと予想する。

2. トランスクリプトーム解析とはなにか

ゲノムプロジェクトは、上述したような新たな領域を開拓していくために、さまざまな技術の開発を誘発し、得られる膨大な情報をいかに使っていくかという情報学との新しい融合研究分野を生み出した。これらの方法論的な進歩

連絡先

〒113-8519 東京都文京区湯島1-5-45
TEL: 03-5414-6010
FAX: 03-5775-1352
E-mail: swata@mvc.biglobe.ne.jp

の代表が、DNA マイクロアレイ (DNA チップ) 技術である。これは、スタンフォード大学の P. O. Brown らによって、PCR で増幅した cDNA 断片をスライドガラスの上に微小なスポットとして貼付けて作製したものと、スタンフォード大学近郊にある Affymetrix 社によって、ガラス基板上にフォトリソグラフィ法を応用してヌクレオチドを直接合成・伸長させて作製したものが、ほぼ同時期に開発された。その後、技術開発・改良が競って行われた。筆者らも、80mer の長鎖合成 DNA をスライドガラスに張り付けるといふ、パイオニア 2 者の折衷版の技術を開発し、ようやく全システムが完備したところである。

この DNA マイクロアレイ技術が、全遺伝子の発現レベル・発現頻度解析を可能にした。遺伝子の転写産物 (トランスクリプト) の全体・全集合を、ゲノム (遺伝子の総体; gene + ome) にならって造語した (すわなち、transcript + ome) したのが、トランスクリプトームである。同様の造語が、現在流行のプロテオーム (protein + ome) ・メタボローム ・セローム ・フィジオーム 等々である。すべてそれぞれの次元 (対象) での総体を意味する。それらを取り扱う学問が、ics という接尾語を持つゲノミクスでありプロテオミクスである。これらでは、あるものを細分化しながら各構成要素へ到達しようとする従来の学問とは異なる考え方をとる。すなわち、すべての構成要素が寄集まってできた全部を、全体をみた時にどうなるか、何が言えるのかを問う。これを遺伝子の発現レベルだけに注目して (記述の際の唯一の指標・言語として) 問うのがトランスクリプトーム解析である (なぜか、トランスクリプトミクスという学問名は一般に使われていない)。

トランスクリプトーム解析は、ウイルス学において他の生物学領域と異なる特別な使い方を提供できる。ウイルス学における重要な命題のひとつは、「ウイルスのトロピズムはいかにして決定されるのか」である。さらにそれを発展させれば、「ウイルスと宿主はいかにして相互にかかわっているのか」ともいえる。すなわち、ウイルス学の理解には、ウイルスだけをみていたのでは不十分であり、宿主についてもウイルスと同様に深い知識の集積が必要である。ウイルス学者は、ポストゲノム時代に入って、ウイルスの全遺伝情報に加えて、宿主の全遺伝情報をも手にした。これらをいかに統合して活用することが今後の課題と考える。そのためには、ウイルス遺伝子と宿主遺伝子と同じ土俵で解析する、ウイルス学に至適化されたトランスクリプトーム解析の方法論的な確立が望まれる。

3. サイトメガロウイルス感染細胞のトランスクリプトーム解析

背景

本稿で代表例として取り上げる HCMV のポストゲノム的手法による研究は、他のウイルスに先駆けて行われてき

た歴史を持つ。また本稿で記述する宿主遺伝子とウイルス遺伝子の同時並行発現解析も、他のウイルスに先んじて行われているものである。

HCMV を含めたヘルペスウイルスは、ウイルスの中でも最大級のゲノムサイズおよび遺伝子数を有することから、その複雑さゆえに研究方法に種々の障害があった。ウイルスの分子生物学の歴史は SV40 等の小型 DNA ウイルスと RNA ウイルスによってまず進められてきた。これらはきわめてシンプルで精緻な解析に耐えうる実験材料であることがその最大の理由と考えられる。大型 DNA ウイルスの研究において、小型のシンプルなウイルスと同等の詳細な解析が可能になるには、マイクロアレイのように一度に大量の対象について網羅的に解析できる方法論の出現を待つ必要があったといえる。

HCMV 感染による宿主細胞の遺伝子発現変化に関する第 1 報は、あらゆるウイルスのなかで最も初期に公開された³⁾。それに引き続き、ポリオウイルス⁴⁾・HIV⁵⁾・インフルエンザウイルス⁶⁾・単純ヘルペスウイルス⁷⁾・カポジ肉腫ウイルス (HHV 8)⁸⁾ 等の感染細胞応答が次々と発表された。

HCMV での第 1 報は、Affymetrix 社の GeneChip を使用して正常ヒト線維芽細胞の細胞応答を記載した仕事であった³⁾。これを行ったグループは、引き続き同様の材料と手法により、GeneChip に搭載される遺伝子数が大きくなるとともに、ポストゲノム的基本路線を同一とするいくつかの続報を提出している⁹⁻¹³⁾。

さらに別グループは、同様に GeneChip を用いて、HCMV の感染が線維芽細胞に引き起こす一連の反応は、ウイルス粒子表面に存在する糖タンパク (gB) の結合によって始まり、さらに、それらはインターフェロンに対する細胞応答と類似していると報告した¹⁴⁾。

さらに別のグループが、マイクロアレイを用いて、HCMV 前初期タンパク IE86 が種々の細胞周期関連宿主遺伝子の発現誘導をおこすことを報告した。HCMV は感染細胞の細胞周期をさまざまに制御することが知られており、特異的ウイルスタンパクと宿主遺伝子発現の関係を網羅的に解析することにより、HCMV 細胞周期制御の機構が明らかになりつつある¹⁵⁾。

HCMV の領域では、ウイルス遺伝子をアレイ化して網羅的に解析する研究も他のウイルスに先駆けて行われた。その第 1 報として各種薬剤 (ウイルスのライフサイクルをいくつかのことなるステップで阻害するもの) を用いて、HCMV 遺伝子を発現動態の様式に従って包括的に分類することが試みられた¹⁶⁾。この研究は、ウイルス遺伝子に対応するオリゴヌクレオチドを基板上に固定した独自のマイクロアレイを作製して行われたものであった。

さらに、通常のプロットングに使用するメンブラン上に HCMV 遺伝子の DNA を配列させたマクロアレイを独自に作製し、そのマクロアレイに HCMV ビリオンから抽

出した RNA からアイソトープラベルしてハイブリダイゼーション・シグナルを検出するという方法により、ある種のウイルス遺伝子の転写産物が選択的に HCMV ビリオン中にパッケージングされることが明らかになった¹⁷⁾。全く同様の方法で、単純ヘルペスウイルスのビリオンでも同様にウイルス遺伝子転写産物が選択的に取り込まれることが引き続き報告された^{18,19)}。

HCMV 遺伝子アレイを用いる研究は、さらに進展し、血球系細胞における HCMV 潜伏感染状態のウイルス遺伝子発現を解析し、潜伏感染モデルに特異的なウイルス遺伝子の発現パターンの存在を明らかにした²⁰⁾。

しかしながら、ウイルス遺伝子と宿主遺伝子の並行解析および多様な細胞での比較解析はいまだに報告がない。そこで筆者らは 22,656 ヒト遺伝子と 173 HCMV 遺伝子を同一領域内に搭載したマイクロアレイを作製し、HCMV 遺伝子と宿主 (ヒト) 遺伝子の発現プロファイルを HEL を含めた各種細胞から取得し、細胞間の比較を基本として解析を行った。

各種細胞への HCMV 実験室株の感染と発現プロファイルの取得

HCMV の実験室株である AD169 株を正常ヒト線維芽細胞 (HF)・正常ヒト冠状動脈血管内皮細胞 (HCAEC)・正常ヒト冠状動脈平滑筋細胞 (CASMC)・正常ヒトメサンギウム細胞 (NHMC)・ヒト神経芽細胞腫細胞株 IMR32・ヒト骨肉腫細胞株 Saos 2・ヒト滑膜肉腫細胞株 SW982・パーキットリンパ腫細胞株 Raji・正常ヒト前駆脂肪細胞 (未分化) (HPA(-))・正常ヒト前駆脂肪細胞 (分化後) (HPA(+)) に感染 (moi=10) させ、経時的 (4 h・8 h・24 h・48 h・72 h) に感染細胞 RNA を抽出し、Cyanine-5 存在下で cDNA 合成を行って標識した。さらに、対照として、共通レファレンス RNA (由来組織の異なる 22 種類の各種細胞化細胞の mRNA を等量ずつ混合したものに HCMV 感染 72 時間後の HEL 細胞の mRNA をスパイクして作製) を Cyanine-3 存在下で同様に標識し、Cyanine-5 標識の各サンプルと等量ずつ混合し、それぞれマイクロアレイにハイブリダイズさせ、Cyanine-5 蛍光強度と Cyanine-3 蛍光強度を測定した。それらの蛍光強度から発現比 (Cyanine-5 蛍光強度/Cyanine-3 蛍光強度; 1 次発現レベル比) を算出した。さらに、1 次発現比を底が 2 の対数に変換した (2 次発現レベル比, あるいは、ログ比)。

データ集合体の解析

まず、10 種類の異なる各細胞につき 6 タイムポイント、計 60 種類のサンプルの共通レファレンスに対する 2 次発現レベル比 (直接比較データ) を一つの行列 (22,829 [遺伝子] 行 X 60 [サンプル] 列; 直接比較データ行列) とした。次に、その行列から、いずれかのサンプル (列) で共通レ

ファレンスに対して 2 倍以上 (ログ比の絶対値 > 1) の変化を示した遺伝子 (行) のみを抜き出した (9,916 遺伝子)。それらの遺伝子について、遺伝子方向 (行の間) でのクラスタ分析を行った。図 1A にその全体像を示す。一見して明らかであるが、この全体像は、それぞれの細胞でのみパターンが似ている。これは、共通レファレンスに対する相対比をとっているため、各細胞そのものの違い (細胞の background の違い) が、各細胞における HCMV 感染による変化よりも大きいこと (同一細胞のサンプル間では、感染の影響は各細胞の差よりも小さい) を示している。すなわち、共通レファレンスに対する直接比較データでは、各細胞の枠をこえて HCMV 感染の細胞応答を比較することは当然ながらできないことを意味する。

HCMV 感染特異的な遺伝子発現変動の全体像

そこで、各細胞の background をこえて、HCMV 感染の細胞応答だけを抽出して比較するために、2 次発現レベル比からなる直接比較データ行列に以下の操作を加えた。各細胞で、感染後 0 h (非感染細胞) に対する相対発現レベル比を算出した (3 次発現レベル比)。その 3 次発現レベル比を行列化した (相対比較データ行列)。この相対比較データ行列から、各列 (サンプル) で 1 回でも 3 次発現レベル比の絶対値が 1 以上となった行 (遺伝子) を抽出し (8,407 遺伝子)、行の間でのクラスタ分析をおこなって描画した (図 1B)。

図 1B が示すように、各細胞の background を差し引いたデータを用いて比較すると、10 種類の異なる細胞の中で、HCMV 感染の細胞応答が発現プロファイルとして似ているものと似ていないものが明らかとなる。すなわち、代表的な HCMV 許容細胞である HEL での発現変化の程度が大きく、それと CASMC・NHMC・HPA(-)・HPA(+) が、全体として見渡した場合 (8,407 遺伝子全体として比較)、かなり似ていた。一方、HCAEC・SW982・Saos 2 ではその順に発現変化した遺伝子はかなり少なくなり、さらに、IMR32・Raji では、きわめて少なくなってしまう状態であった。

HCMV 感染特異的な遺伝子発現変動の詳細

次に全体の各部分集合に解析対象を絞っていきながら、詳細を検討する。

まず各部分集合の最初の例として、HCMV 遺伝子の発現プロファイルに注目する。図 2 に、細胞とウイルスを合わせた全体の結果 (相対比較データ行列) からウイルス遺伝子のみを抽出して遺伝子間クラスタ分析した結果を示す。HCMV 遺伝子だけに注目した場合、上で述べた細胞の違いがさらに明瞭に差別化された。すなわち、HCMV 遺伝子の発現プロファイルは、HEL・CASMC・NHMC・HPA(-)・HPA(+) で酷似し、いずれもきわめて大きな

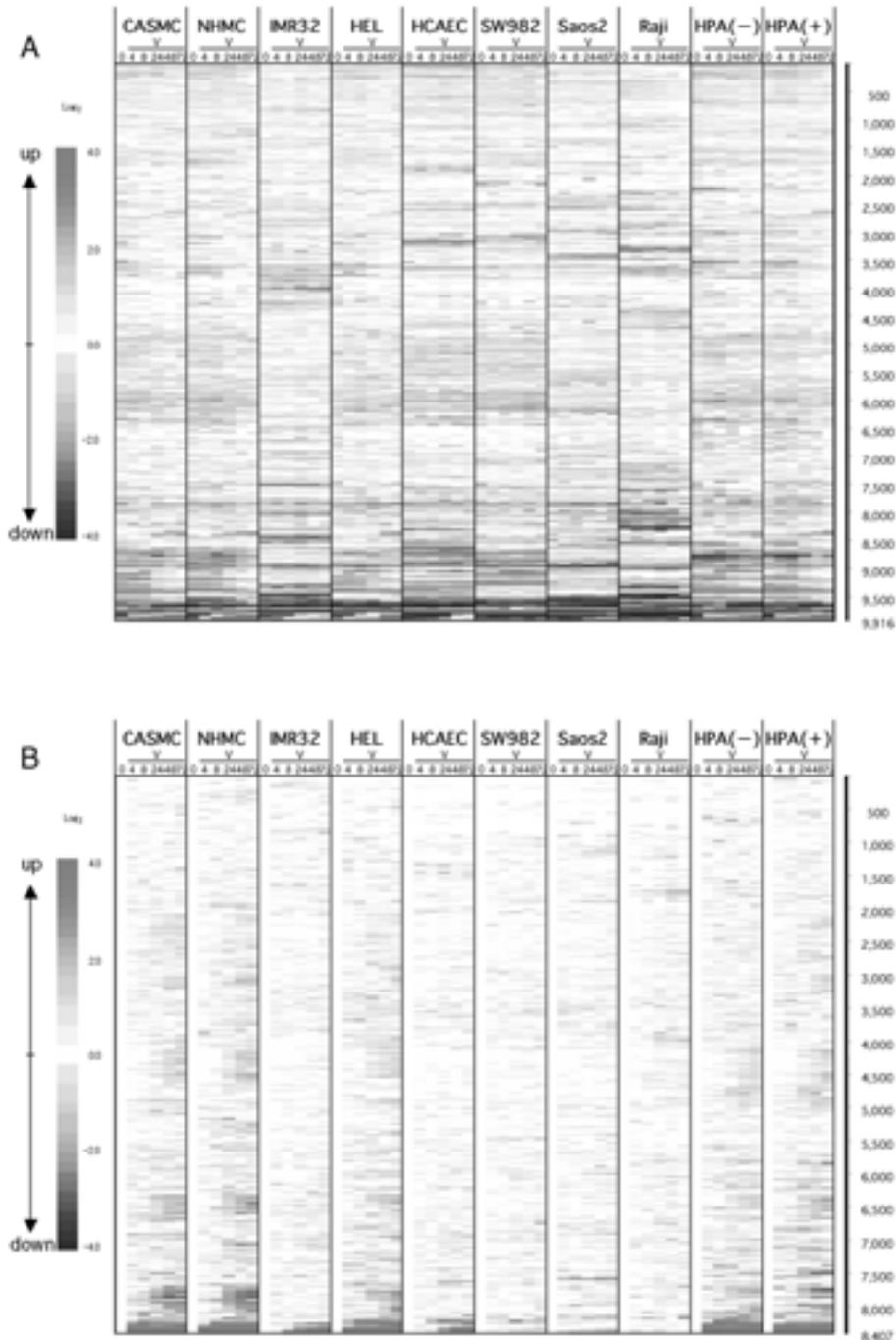


図1 HCMV感染各種細胞におけるウイルスおよび宿主遺伝子の発現プロファイル
 A 共通レファレンス RNA に対する発現レベル比の行列 (行, 遺伝子; 列, サンプル). 行 (ウイルスおよびヒト遺伝子; 両者の区別はしない) の間でクラスタ分析を行った. 各列は, 同一細胞ごとに, 左から右に非感染 (0h)・感染後 4h・8h・24h・48h・72h の順にならんでいる. 本来のデータでは, カラーで発現レベルが表示されている. 本誌では, 都合上白黒表示のため, 濃いものほど発現変化が大きいと解釈する.
 B 共通レファレンスに対する発現レベル比を, 各細胞の非感染細胞 (0h) のデータを基準にした相対比として計算しなおしたものを行列表示する.

変動をしていたことを示していた. これらの細胞は, すべて HCMV 感染後に激しい細胞変性効果を呈していた. また, IMR32・HCAEC では, この順に HCMV 遺伝子発現

の変動幅が小さくなっていったものの, 残りの 3 種類の細胞にくらべると依然強い発現変動を示した. IMR32では, HEL を含む上記 5 種類の細胞と同様に激しい細胞変性効

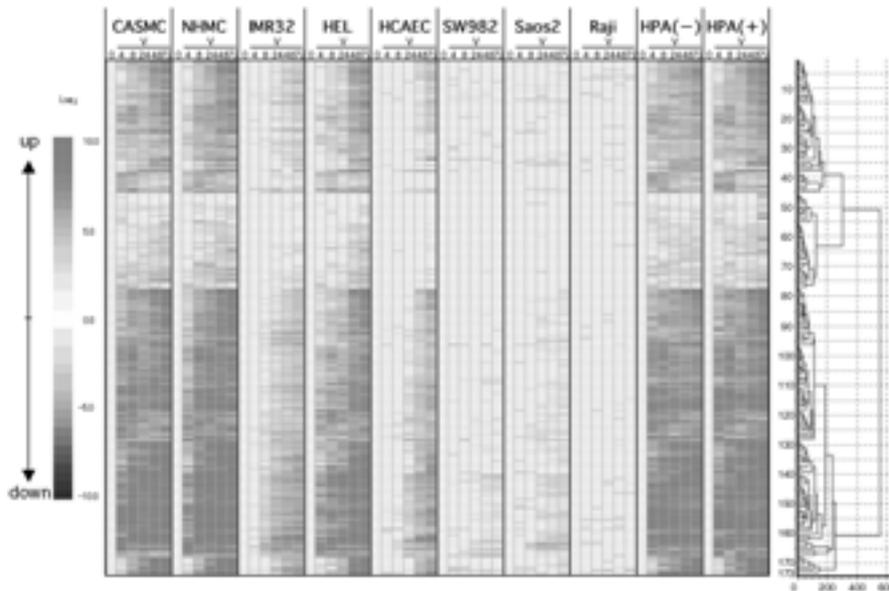


図2 HCMV 感染各種細胞におけるウイルス宿主遺伝子の発現プロファイル
 図1Bで示すデータ行列から、ウイルス遺伝子のみを抽出し、遺伝子間(行間)でクラスタ分析を行った結果を示す。

果を確認したが、HCAECではまったく観察できず、顕微鏡下の観察では非感染細胞との違いを見出すことはできなかった。さらに、SW982・Saos2では、上述の7種類の細胞に比べてその程度は極めて弱いながらも、広範な種類のHCMV遺伝子について確実に発現上昇を検出した。最後に、RajiについてはHCMV遺伝子の有為な変化はまったく検出できなかった。これら最後の3種類の細胞については、顕微鏡下で非感染細胞との違いをまったく観察できなかった。

次に宿主遺伝子の部分集合に注目して発現プロファイル上の各種細胞の相違を検討する。図3A~Hに、全体の結果から各種細胞で異なるパターンを示した遺伝子クラスタを抽出して示す。各々の遺伝子クラスタはその特徴を次のように記述できる：A, HEL・CASMC・NHMC・HPA(-)・HPA(+)の5種類の細胞で同様な発現変動パターン(感染の進行とともに上昇)を示した遺伝子クラスタ；B, HEL・CASMC・NHMC・HPA(-)・HPA(+)の5種類の細胞で同様な発現変動パターン(感染の進行とともに低下)を示した遺伝子クラスタ；C, SW98単独・HNMC単独・HNMCとSaos2に共通・IMR32とHELに共通・CASMCとNHMCとHELに共通・NHMC単独・HPA(+)単独、の各種パターンを示したクラスタの混在；D, HPA(-)単独・CASMC単独・Saos2単独・HCAECとSW982とHPA(+)に共通・HPA(-)とHPA(+)に共通・HELとSaos2に共通・HPA(+)単独、の各種パターンを示したクラスタの混在；E, HEL・CASMC・NHMC・HPA(-)・HPA(+)の5種類の細胞で同様な発現変動パターン(感染の進行

とともに低下)を示した遺伝子クラスタとHEL・CASMC・NHMCの3種類の細胞で同様な発現変動パターン(感染の進行とともに低下)を示した遺伝子クラスタの混在；F, NHMCとHELに共通・IMR32とHELに共通・HELとHCAECとSW982とHPA(-)で共通・HCAECとHPA(+)で共通、の各種パターンを示したクラスタの混在；G, HEL・CASMC・NHMC・HPA(-)・HPA(+)の5種類の細胞で同様な発現変動パターン(感染の進行とともに上昇、その程度がAよりも激しい)を示した遺伝子クラスタ；H, CASMCとNHMCとHELとHCAECとHPA(-)とHPA(+)で共通・HELとHCAECとSW982とHPA(-)で共通・HELとSW982とSaos2とHPA(-)とHPA(+)で共通、の各種パターンを示したクラスタの混在。ここで示した各種クラスタに含まれる遺伝子群は、それぞれのクラスタの特徴を形作るものであり、HCMV感染にともなってそれぞれの細胞内でおきている現象の記述・解釈に必須のものとして、公的データベースにそのすべてが公開される予定である。

HCMV 感染の宿主応答解析から導かれる知見

以上の結果から、いくつかの結論と解釈を導き出すことができる。

まず、細胞変性効果の有無およびその程度とウイルス遺伝子発現の程度は必ずしも一致しない。特に、細胞変性効果をまったく認めないから、さらに、感染成立の指標となる特定のウイルス遺伝子の発現が検出できないからといって、その細胞でウイルス遺伝子の発現がないという結論を

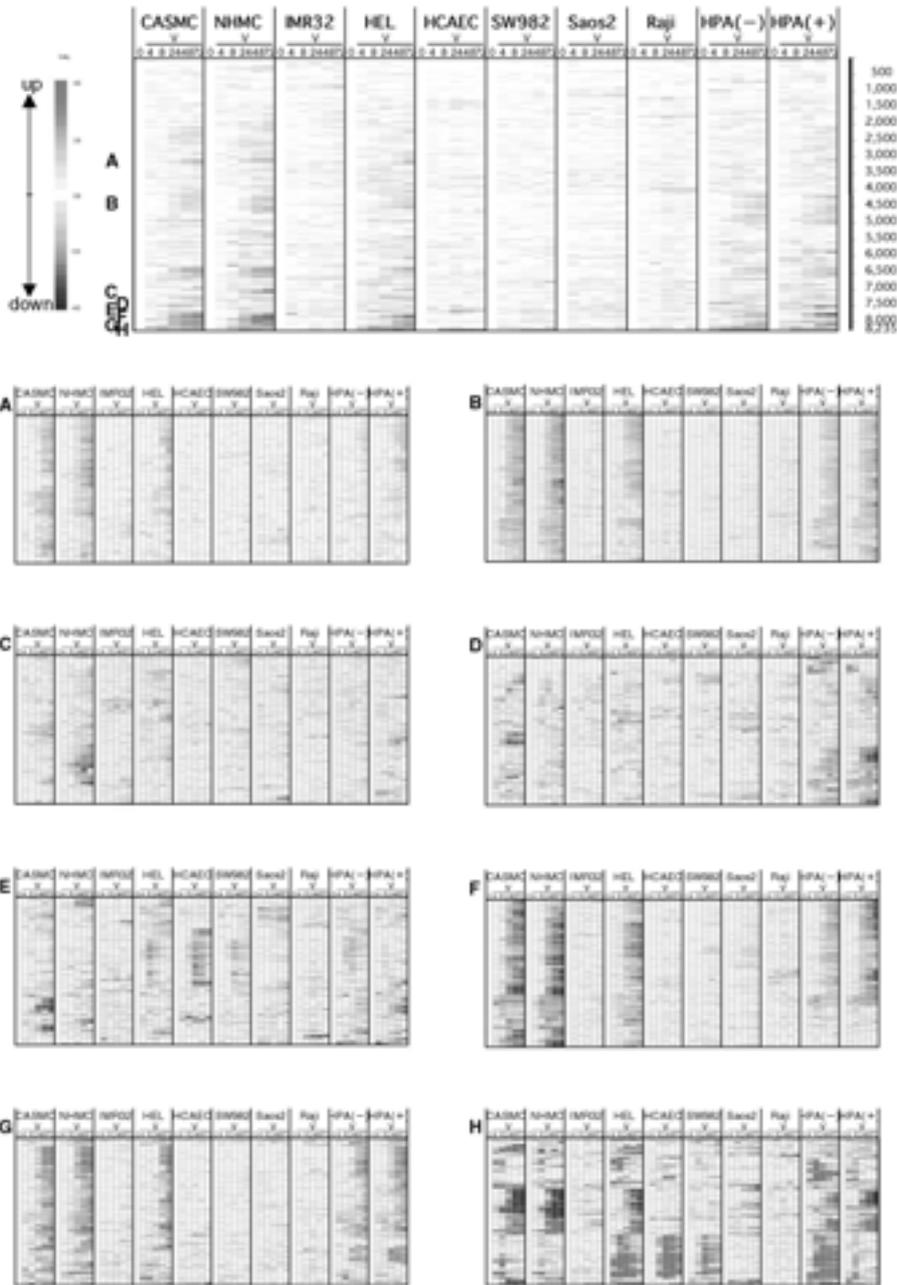


図3 HCMV 感染各種細胞における宿主遺伝子の発現プロファイル
 図1Bで示すデータ行列から、宿主遺伝子のみを抽出し、遺伝子間（行間）でクラスタ分析を行った結果を示す。さらに、その結果から、各種細胞で特徴的な変動パターンを示した遺伝子クラスタを適宜抜き出し、拡大して表示する（A~H）。

導くことには注意が必要である。ウイルス遺伝子を網羅的に、かつ、長時間にわたって調べてから結論しなければならない。本稿で示したHCAEC・SW982・Saos 2について、HCMV（特に実験室株）が十分量感染するという報告はこれまでにまったくなされていない。HCMVの効率よい感染および複製は、HEL等の正常線維芽細胞に限られるというのが一般的に受け入れられてきた知見である。筆者も永年にわたり、HCMVの感染にはHELだけを使用

し続けてきた。しかしながら、HEL以外でもいくつかの正常ヒト細胞を使用するとHELと同等にHCMV実験室株が感染しウイルス遺伝子発現パターン上区別できないほどであること、さらに、実験室株は通常の方法では極めてわずかにしか感染しないと報告されてきた正常ヒト血管内皮細胞でも、かなりの程度で広範なウイルス遺伝子の発現があり、あるヒト遺伝子群においては、調べたどの細胞よりも強い反応が発現レベル変化として検出されたことは驚き

であった。各種ウイルスの許容性について、過去の情報にとらわれず、数多くの細胞について虚心坦懐に感染実験をおこなって、ウイルス遺伝子について包括的な発現解析を試みれば、想像を越えた結論が出てくる可能性は十分にあると考える。

次に、本稿では、ウイルス感染に対する応答の違いを比較・記載することによって、解析対象の細胞そのものの違いを明らかにできることを一つのモデル系として示した。ここでは、10種類の細胞についてHCMVを感染させ、感染に対する細胞応答を網羅的に記載した。これら10種類の細胞のうち、HPA(-)とHPA(+)は、同一の由来をもつ細胞であり、十分量まで増殖させたのちに2分割し、一方はそのままの状態、すなわち、未分化の状態を維持する培養条件で、もう一方は、脂肪滴の蓄積が観察できるようになるまで、すなわち、脂肪細胞への分化誘導がかかる条件で培養したものであった。両者培養条件の違いは、分化用培地に含まれるいくつかの薬剤のみである。これら両細胞へHCMVを感染させた時、その細胞応答はかなり類似していたものの、両者間で明確に異なる発現変化を示した遺伝子群が存在していた。培地中に含まれる薬剤の有無とこれらの遺伝子群の発現調節の間には何らかの対応関係が存在するといえる。同様に、残りの8種類の細胞に対しても、対象細胞間で共通して発現変動した遺伝子群を抽出することによって、それらの遺伝子群の発現調節機構における共通項を浮かび上がらせることは可能と考える。現在、統計学的手法による異細胞間共通遺伝子群の絞り込みを行っている。

IMR32は、激しい細胞変性効果を示し、ウイルス遺伝子発現パターンも、HELよりはその変化程度が小さいものの、ほぼ類似したものであった。しかしながら、宿主遺伝子側の変化は、ウイルス遺伝子の発現変化を検出できなかったRajiと同様にきわめて小さかった。これは、HCMVの感染・複製に必要な因子は、非感染状態のIMR32にすでにすべて存在しており、ウイルスによってある種の遺伝子に対する発現誘導あるいは発現抑制の必要がないことを示している。しかしながら、IMR32のウイルス遺伝子発現プロファイルの変化強度がHEL等に比べて小さかったことが、この宿主遺伝子発現の変化の小ささに関係していると解釈することも可能である。すなわち、HELと同様のウイルス遺伝子発現パターンを示した4種類の正常細胞で共通して発現変化している宿主遺伝子群の変化がIMR32ではおきない故にウイルス遺伝子の発現強度が小さくなっていても考えられる。どちらの解釈が真実であるかは、今後のさらなる研究を待つ必要がある。

4. 感染細胞のトランスクリプトーム解析による「比較ウイルス学」の提案

本稿では、同一ウイルス(HCMV)を異なる細胞に感

染させてウイルス遺伝子と宿主遺伝子の発現レベルを同時並行解析することにより、細胞間の相違を記述した。同様の解析は、対象ウイルスを次々と変えて行うことが可能である。それによって得られる発現プロファイルをすべて統合して並行解析すれば、異なるウイルスの比較解析が可能となる。これを「宿主細胞応答の比較ウイルス学」のタイトルのもと各種ウイルスの専門家集団による共同研究事業として提案したい。

そのコンセプトは次のようなものである。統一した方法にて準備した各種ウイルス感染細胞(複数のウイルスと複数の細胞の組合せ)から、同一のトランスクリプトーム解析系(たとえば筆者らの開発した合成DNAマイクロアレイシステム)を用いて、全ゲノムワイドの包括的宿主遺伝子発現プロファイルを取得し、並列に比較解析することにより、同一細胞に対する異なるウイルスの与える影響、および同一ウイルスの異なる細胞に対する影響の差異、ならびに共通点がどのように(いかなる遺伝子群にいかなる程度)存在するのかを明らかにする。これにより、ウイルス感染の宿主細胞応答という生物学的現象に対して、個別ウイルスおよび個別細胞の枠を超えた統一的な原理が見出せるかどうか、挑む価値ありと考える。

現在までに、モデルケースとして、RNA型ウイルスの風疹ウイルスを取り上げ(国立感染症研究所 加藤宏幸博士らとの共同研究)、今回HCMV感染に用いたものと同じのHELへ感染させ、同様のトランスクリプトームを行ったところ、同一線維芽細胞に対するHCMVと風疹ウイルスの影響の共通点と相違点が明らかになった(投稿準備中)。対象ウイルスと細胞を順次増やして並行解析することによって、これまでまったく見えなかった新事実が次々と明らかになるのではないかと期待している。

5. 今後の展望

最後に、マイクロアレイを用いたウイルス学的研究の今後の展開について議論したい。ウイルス感染にともなう細胞応答の全体像を把握した後、マイクロアレイは個別ウイルス遺伝子の機能解析へ応用できる。各種遺伝子をノックアウトした、あるいは変異を導入した組換えウイルスの感染細胞のトランスクリプトームを比較解析することが今後ますます重要となるであろう。さらに、トランスクリプトーム解析は、基礎研究に留まらず、臨床検体の分析方法としてもきわめて有用である。臨床情報と各臨床検体のトランスクリプトームの対応関係付けがその要諦である。あるウイルスに感染して発症する人と発症しない人の違いは何か?その違いに対応して発現レベルに違いのある遺伝子群を特定することにより、発症阻止につながる因子の同定等ができる可能性がある。

トランスクリプトーム解析は、ある条件に対応する遺伝子群を特定することに最大の威力を発揮する。しかしなが

ら、現時点ではその歴史があまりに浅いために、網羅的なデータの取得と蓄積が不十分であり、特定した遺伝子群がさらにどのように機能しているのか、それを考える段階ですべてが停止してしまうようなことが往々にしておきているのが現実である。その最大の理由の一つは、各遺伝子の annotation があまりに未完成なことにある。機能がまったく推測できない記号だけが割りふられた遺伝子とその特定遺伝子群の大部分を占めていたりすることはしばしば遭遇する事態である。このような状況は、トランスクリプトーム情報とそれに連結される種々の生物学的情報の膨大な集積がある程度進まない限り、解消されないと考える。それまでは、明確な結論を導き出せない欲求不満状態を耐え忍び、正確な情報の積み上げをひたすら地道に飽くことなく継続しなければならない。

これからは、横並びで比較できる実験データの集積が最も要求され、そのときモデル系として威力を発揮するのが、体系的に遺伝子をノックアウトした変異ウイルスを感染させた各種細胞の遺伝子発現プロファイルである。体系的な知見の集積がポストゲノム時代のウイルス学の最重要課題であることを強調してこの稿を終える。

謝 辞

本稿で紹介した合成 DNA マイクロアレイによるトランスクリプトーム解析は、経済産業省/新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO) 委託研究費による「タンパク質機能解析・活用プロジェクト」の一環として、バイオ情報化コンソーシアム (JBIC)・(株) ニッポンジーン・東京医科歯科大学が「発現頻度解析 I チーム」として実施している研究開発の一部である。ここに示した成果は、東京医科歯科大学臨床インフォマティクス講座の諸君 (伊藤恵美・本間玲子・柳澤夕佳・中島早苗・今井順一) の数年にわたる努力の結晶であり、筆者はそれを単にまとめたに過ぎないことを申し添える。

文 献

- 1) Lebowitz P, Weissman SM. : Organization and transcription of the simian virus 40 genome. 1979, *Curr Top Microbiol Immunol*. **87** : 43-172.
- 2) Chee MS, Bankier AT, Beck S, Bohni R, Brown CM, Cerny R, Horsnell T, Hutchison CA 3rd, Kouzarides T, Martignetti JA, et al. : Analysis of the protein-coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD169. 1990, *Curr Top Microbiol Immunol*. **154** : 125-169.
- 3) Zhu H, Cong JP, Mamtora G, Gingeras T, Shenk T. : Cellular gene expression altered by human cytomegalovirus : global monitoring with oligonucleotide arrays. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95** : 14470-14475, 1998.
- 4) Johannes G, Carter MS, Eisen MB, Brown PO, Sarnow P. : Identification of eukaryotic mRNAs that are translated at reduced cap binding complex eIF 4 F concentrations using a cDNA microarray. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96** : 13118-13123, 1999.
- 5) Geiss GK, Bumgarner RE, An MC, Agy MB, van't Wout AB, Hammersmark E, Carter VS, Upchurch D, Mullins JL, Katze MG. : Large-scale monitoring of host cell gene expression during HIV-1 infection using cDNA microarrays. *Virology* **266** : 8-16, 2000.
- 6) Geiss GK, An MC, Bumgarner RE, Hammersmark E, Cunningham D, Katze MG. : Global impact of influenza virus on cellular pathways is mediated by both replication-dependent and-independent events. *J Virol*. **75** : 4321-4331, 2001.
- 7) Mossman KL, Macgregor PF, Rozmus JJ, Goryachev AB, Edwards AM, Smiley JR. : Herpes simplex virus triggers and then disarms a host antiviral response. *J Virol*. **75** : 750-758, 2001.
- 8) Renne R, Barry C, Dittmer D, Compitello N, Brown PO, Ganem D. : Modulation of cellular and viral gene expression by the latency-associated nuclear antigen of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J Virol*. **75** : 458-468, 2001.
- 9) Browne EP, Wing B, Coleman D, Shenk T. : Altered cellular mRNA levels in human cytomegalovirus-infected fibroblasts : viral block to the accumulation of antiviral mRNAs. *J Virol*. **75** : 12319-12330, 2001.
- 10) Rigoutsos I, Novotny J, Huynh T, Chin-Bow ST, Parida L, Platt D, Coleman D, Shenk T. : In silico pattern-based analysis of the human cytomegalovirus genome. *J Virol*. **77** : 4326-4344, 2003.
- 11) Browne EP, Shenk T. : Human cytomegalovirus UL 83-coded pp65 virion protein inhibits antiviral gene expression in infected cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100** : 11439-11444, 2003.
- 12) Murphy E, Rigoutsos I, Shibuya T, Shenk TE. : Re-evaluation of human cytomegalovirus coding potential. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100** : 13585-13590, 2003.
- 13) Challacombe JF, Rechtsteiner A, Gottardo R, Rocha LM, Browne EP, Shenk T, Altherr MR, Brettin TS. : Evaluation of the host transcriptional response to human cytomegalovirus infection. *Physiol Genomics* Apr 6 [Epub ahead of print] 2004.
- 14) Simmen KA, Singh J, Luukkonen BG, Lopper M, Bittner A, Miller NE, Jackson MR, Compton T, Fruh K. : Global modulation of cellular transcription by human cytomegalovirus is initiated by viral glycoprotein B. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98** : 7140-7145, 2001.
- 15) Song YJ, Stinski MF. : Effect of the human cytomegalovirus IE86 protein on expression of E 2 F-responsive genes : a DNA microarray analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99** : 2836-2841, 2002.
- 16) Chambers J, Angulo A, Amaratunga D, Guo H, Jiang Y, Wan JS, Bittner A, Fruh K, Jackson MR, Peterson PA, Erlander MG, Ghazal P. : DNA microarrays of the complex human cytomegalovirus genome : profiling kinetic class with drug sensitivity of viral gene expression. *J Virol*. **73** : 5757-5766, 1999.
- 17) Bresnahan WA, Shenk T. : A subset of viral transcripts packaged within human cytomegalovirus par-

- ticles. *Science* **288** : 2373–2376, 2000.
- 18) Khodarev NN, Advani SJ, Gupta N, Roizman B, Weichselbaum RR. : Accumulation of specific RNAs encoding transcriptional factors and stress response proteins against a background of severe depletion of cellular RNAs in cells infected with herpes simplex virus 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96** : 12062–12067, 1999.
- 19) Sciortino MT, Suzuki M, Taddeo B, Roizman B. : RNAs extracted from herpes simplex virus 1 virions : apparent selectivity of viral but not cellular RNAs packaged in virions. *J Virol.* **75** : 8105–8116, 2001.
- 20) Goodrum FD, Jordan CT, High K, Shenk T. : Human cytomegalovirus gene expression during infection of primary hematopoietic progenitor cells : a model for latency. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99** : 16255–16260, 2002.

Transcriptome analysis of virus–infected cells

Shinya Watanabe

Department of Clinical Informatics, Tokyo Medical and Dental University
1–5–45 Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo 113–8519, Japan
E-mail : swata@mvc.biglobe.ne.jp

Human genome project revealed that human genes are derived from 30,000~40,000 species of genetic loci, which had been estimated as approximately 100,000. The project also promoted devising novel tools that enable us to analyze biological phenomena comprehensively. Microarray technology is a representative of the novel tools in genomics and engages us to explore genome-wide expression levels of genes simultaneously (transcriptome analysis). Here we show transcriptomes obtained from 10 species of cells infected with human cytomegalovirus, as a model virus, by a synthetic DNA microarray system that we have established recently. Our system provides simultaneous and parallel description on alteration of expression of viral and host genes that are represented within a single area on a slide glass. Moreover, we propose a project entitled 'comparative virology on cellular responses of infected hosts' that consists of multiple acquisition and integration of transcriptomes from a combination of several cells and viruses as a panel on the identical platform. The attempt should extract a novel concept in virology from investigation on differences and similarities among influence of a virus on a variety of different cells and conversely among responses of a species of cells against a variety of different viruses.