

カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス ORF21 の  
シグナル伝達を介した感染性ウイルス産生機構の解析

2022 年度

京都薬科大学大学院 課程博士学位論文

【薬学】 細胞生物学分野

山口 達生



## 課程博士学位 論文内容の要旨

専攻・課程：薬学専攻博士課程

氏名（英字名）：山口達生 (Tatsuo YAMAGUCHI)

学位論文題目：カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス ORF21 のシグナル伝達を介した感染性ウイルス産生機構の解析

### 序章

カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus; KSHV) は、 $\gamma$ -ヘルペスウイルス亜科に分類される二本鎖 DNA ウイルスであり、8 番目に発見されたヒトヘルペスウイルスのためヒトヘルペスウイルス 8 型 (HHV-8) とも呼ばれる。感染者の免疫不全時に KSHV はカポジ肉腫や原発性体腔リンパ腫などの腫瘍を引き起こす。また、 $\alpha$ -ヘルペスウイルス亜科 (HSV-1/2, 水痘帯状疱疹ウイルス) や  $\beta$ -ヘルペスウイルス亜科 (HHV-6/7, CMV) を標的としたアシクロビルやガンシクロビルなどの有効な抗ウイルス薬は既に臨床使用されているが、 $\gamma$ -ヘルペスウイルス亜科、すなわち EBV と KSHV に対する有効な抗ウイルス薬は未だ開発されていない。KSHV がコードする ORF21 はウイルス粒子内に存在するテグメントタンパク質であり、リン酸化酵素である。また、アミノ酸配列の相同性により KSHV の ORF21 は HSV-1/2 がコードするウイルス性チミジンキナーゼ (vTK) のオーソログであることが知られている。HSV の vTK はアシクロビルのモノリン酸化 (活性化) やウイルスゲノムの複製に必須であるが、 $\gamma$ -ヘルペスウイルス亜科の vTK (KSHV の ORF21 と EBV の BXLF1) はチミジンやアシクロビルに対するリン酸化能が弱く、ウイルスのゲノム複製への関与が極めて低いことが報告されている。つまり、KSHV の ORF21 のウイルス学的機能については不明な点が多い。そこで、BAC (bacterial artificial chromosome) 改変法と呼ばれるウイルスゲノムを一塩基単位で改変可能な遺伝子改変手法を用いて ORF21 変異 KSHV とその保持細胞 (感染細胞) を作製し、それらのウイルス複製や子孫ウイルスの感染性、および宿主細胞に与える影響を解析した。

### 第 1 章 ORF21 はウイルス複製には関与しないが、子孫ウイルスの感染に寄与する

KSHV がコードする ORF21 のウイルス学的な機能解析のため、任意の箇所での遺伝子改変が可能な KSHV-BAC16 ゲノムに相同組換えを用いて ORF21 遺伝子領域に変異を導入した遺伝子組換え KSHV-BAC16 を 2 種類作製した。一つは、ORF21 のキナーゼ機能が欠損した Kinase Dead -BAC16 (21KD-BAC16)、もう一つは、ORF21 の開始コドン直下に終止コドンを入れた ORF21 Deletion-BAC16 (21del- BAC16) を作製した。野生型 BAC16 (WT- BAC16)、21KD-BAC16、21del- BAC16 のそれぞれを iVero (および iSLK) 細胞にトランスフェクションし、BAC16 定常保持細胞をクローン化して、iVero-WT、iVero-21KD、iVero-21del 細胞 (iSLK-WT、iSLK-21KD、iSLK-21del 細胞) と名付けた。iVero および iSLK 細胞は、培地へのドキシサイクリン (Dox) 添加により溶解感染誘導転写因子 ORF50/K-Rta が発現し、BAC16 保持細胞が溶解感染 (ウイルス複製サイクル) 状態へ移行する細胞株である。ORF21 の発現時期に

ついて、iSLK-WT 細胞に Dox 処理を行い溶解感染誘導後の ORF21 の発現を ORF21 ポリクローナル抗体によるウエスタンブロット法で解析した。その結果、ORF21 は溶解感染誘導後 30~36 時間に発現した。次に ORF21 変異がウイルスゲノム複製、ウイルスゲノム発現、ウイルス産生へ及ぼす影響を解析するため、溶解感染誘導した各 BAC 保持細胞を qPCR 法および RT-qPCR 法にて評価した。iVero-WT、iVero-21KD、iVero-21del 細胞の三者間でウイルス複製、ウイルスゲノム発現、およびウイルス産生に対する影響は検出されなかった。次に ORF21 変異による子孫ウイルスの新規感染への影響を解析するため、溶解感染誘導した iVero-WT、iVero-21KD、iVero-21del 細胞の培地へ放出された子孫ウイルスの 293T 細胞、Vero 細胞への感染性を解析した。その結果、iVero-21del 細胞から産生された子孫ウイルスの感染性は WT と 21KD の感染性の 15%にまで低下した。同様の結果が、BAC 保持 iSLK 細胞でも得られ、さらに iSLK-21del 細胞から産生されたウイルスの感染性低下は、iSLK-21del 細胞への野生型 ORF21 の一過性発現により回復した。以上より ORF21 のキナーゼ機能以外の ORF21 分子依存的機能が子孫ウイルスの新規感染に必要であることが示唆された。

## 第 2 章 ORF21 分子は宿主細胞内の MEK シグナルを活性化する

次に、ORF21 の宿主細胞に対する生物学的影響について解析した。先行研究において、ORF21 プラスミドの一過的に発現させた場合、外来性 ORF21 は細胞質に局在し、また細胞を縮小させることが報告されている。そこで、溶解感染誘導をかけた iSLK-WT を用い、内在的に発現した ORF21 の局在と細胞の形状変化を解析した。先行研究と一致して、ORF21 は細胞質に局在し、溶解感染誘導した iSLK-WT 細胞は誘導前に比べ細胞縮小が観察された。また、溶解感染誘導した iSLK-21KD と iSLK-WT 細胞を比較すると、iSLK-21KD では細胞面積の増大が観察された。KSHV は新規感染時に宿主となる標的細胞の幾つかのシグナル伝達を活性化(または不活性化)することが報告されている。そこで、野生型 ORF21 プラスミド (p21WT) またはキナーゼ機能欠損 ORF21 プラスミド (p21KD) を HeLa 細胞に一過性発現させ、細胞内のシグナル伝達におよぼす影響を解析した。その結果、p21WT と p21KD 発現細胞では MEK のリン酸化が亢進した。また p21WT と p21KD 発現細胞では足場非依存的な細胞増殖が非発現細胞に比べ約 3-4 倍亢進した。これらの結果よりキナーゼ機能以外の ORF21 分子依存的機能により、MEK シグナルが活性化し細胞増殖が亢進することが示唆された。また、溶解感染誘導した iSLK-21KD と iSLK-WT 細胞におけるリン酸化 MEK を比較したが、溶解感染移行細胞ではリン酸化 MEK だけでなく EGF レセプターの顕著な減少が見られた。最後に、ORF21 が誘導する MEK シグナル活性化とウイルス産生の関係を明らかにするため、MEK 阻害剤 (U0126) 処理した溶解感染誘導細胞における子孫ウイルス産生量と、MEK 阻害剤処理した標的細胞への子孫ウイルス感染効率を解析した。その結果、MEK 阻害剤 U0126 は、溶解感染誘導細胞でのウイルス産生と標的細胞へのウイルス感染の両者を有意に減少させた。

## 総括

本研究により ORF21 はウイルスゲノムの複製、溶解感染遺伝子の転写、ウイルス粒子の産生に影響を与えないことが明らかになった。また、子孫ウイルスの感染には、ORF21 のキナ

一ゼ機能以外の ORF21 分子依存的な機能が関与していることが明らかとなった。一方、ORF21 は細胞内のリン酸化 MEK を増加し足場非依存的な細胞増殖を促進させた。さらに、MEK シグナルの活性化は溶解感染期の細胞内での子孫ウイルス産生と標的細胞への子孫ウイルス感染に必要であることが明らかになった。以上の研究成果により、ORF21 の感染性ウイルス産生と新規感染に関わる重要な機能が見出された。ORF21 分子依存的な機能を標的とした選択的阻害剤が有効な抗 KSHV 薬開発につながると予想される。今後、ORF21 分子機能の全貌解明と ORF21 機能阻害剤の開発が期待される。

本論文は以下の論文の内容を総括したものである。

Yamaguchi T, Watanabe T, Iwaisako Y, Fujimuro M. Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus ORF21 Enhances the Phosphorylation of MEK and the Infectivity of Progeny Virus. *Int J Mol Sci.* 2023;24(2):1238. doi:10.3390/ijms24021238

## 略語

略語	正式名称
21del	ORF21 deletion mutant
21KD	ORF21 kinase dead mutant
293T	HEK293T
2-ME	$\beta$ -Mercaptoethanol
AIDS	acquired immunodeficiency syndrome
Ala/ A	Alanine
Amp	Ampicillin
AMP	Adenosine monophosphate
APS	Ammonium Peroxodisulfate
ATP	Adenosine TriPhosphate
BAC	Bacterial Artificial Chromosome
BBS	Borate buffered saline
BD	Becton Dickinson
BES	N, N-Bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethanesulfonic acid
cDNA	Complementary DNA
CIA	Chloroform/isoamyl alcohol
Cm	Chloramphenicol
Crk II	CT10 regulator of kinase II
CST	Cell Signalling Technology
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic acid
DNase	Deoxyribonuclease
dNTP	Deoxyribonucleoside 5 triphosphate
Dox	Doxycycline
DW	Distilled Water
E	Early
EBV	Epstein-Barr virus
ECL	Enhanced chemiluminescence

EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGFP	Enhanced green fluorescent protein
ERK	Extracellular signal regulated kinase
EtOH	Ethanol
FAK	Focal adhesion kinase
FBS	Fetal Bovine Serum
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
gB	Glycoprotein B
GFP	Green Fluorescent Protein
Gly	Glycine
gN	Glycoprotein N
HHV	Human herpesvirus
His	Histidine
HRP	Horseradish peroxidase
HSV-1	Herpes Simplex Virus type 1
HVS-2	Herpes Virus Saimiri-2
IDR	Intrinsically Disordered Region
IDT	Integrated DNA Technologies
IE	Immediate early
Ig	Immunoglobulin
IKK	Inhibitor of NF- $\kappa$ B kinase
iSLK	tetracycline/doxycycline (Dox) inducible RTA/ORF50 expressing SLK cell
iVero	tetracycline/doxycycline (Dox) inducible RTA/ORF50 expressing Vero cell
I $\kappa$ B	NF- $\kappa$ B inhibitor
Kan	Kanamycin
KSHV	Kaposi's Sarcoma (associated) Herpes Virus
L	Late
LC-MS/MS	Liquid chromatography-tandem mass spectrometry
IDDT	Local Distance Difference Test
LLPS	Liquid-Liquid Phase Separation
lncRNA	long non-coding RNA
Lys/ K	Lysine
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MBL	Medical & Biological Laboratories
Met/ M	Methionine



MHC	Major histocompatibility complex
Mini prep	Mini preparation
miRNA	micro RNA
MLC	Myosin light chain
MLCP	Myosin light chain phosphatase
MS	Mass spectrometry
N.S.	Not significance
NaB	Sodium n-Butyrate (酪酸ナトリウム)
NF- $\kappa$ B	Nuclear factor- $\kappa$ B
ORF	Open Reading Frame
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PAMPS	Pathogen-associated molecular patterns
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PCI	Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol
PCR	Polymerase Chain Reaction
PI3K	Phosphatidyl Inositol-3 Kinase
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride
PPi	Pyrophosphate
PRM	Proline Rich Motif
PYR-41	4[4-(5-nitro-furan-2-ylmethylene)-3,5-dioxo-pyrazolidin-1-yl]-benzoic acid ethyl ester
qPCR	Quantitative real-time PCR
rER	rough-surfaced endoplasmic reticulum
RMSD	Root Mean Squared Deviation
RNase	Ribonuclease
ROCK	Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase
RTA	replication and transcription activator
RT-qPCR	Reverse transcription-quantitative real-time PCR
S.E.	Standard Error
SC	Santa Cruz
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	SDS-polyacrylamide gel electrophoresis
SH2	Src homology 2 domain
SH3	Src homology 3 domain
TE	Tris EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylene-Diamine

TLR	Toll Like Receptor
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethane
Tween-20	Polyoxyethylene (20) Sorbitan Monolaurate
Val	Valine
vTK	viral Thymidine Kinase
WT	Wild Type
Y	Tyrosine

# 目次

序章.....	1
第 1 章.....	8
1-1. 緒言.....	8
1-2. 方法.....	11
1-2-1. 試料及び材料.....	11
1-2-2. プラスミド.....	12
1-2-3. ウェスタンブロット解析.....	17
1-2-4. KSHVBAC 作成.....	19
1-2-5. 遺伝子改変 KSHV BAC16 定常保持細胞株の樹立.....	24
1-2-6. 溶解感染誘導.....	25
1-2-7. ウイルス DNA 複製能測定.....	25
1-2-8. RT-qPCR.....	26
1-2-9. ウイルス産生量測定.....	27
1-2-10. ウイルス感染能測定.....	28
1-2-11. コンプリメントアッセイ.....	28
1-2-12. 統計解析.....	28
1-3. 結果.....	29
1-3-1. ORF21 キナーゼ機能欠失 KSHV (21KD-BAC16) と ORF21 分子欠損 KSHV (21del-BAC16) の作製.....	29
1-3-2. KSHV BAC16 定常保持細胞株の樹立.....	33
1-3-3. KSHV ORF21 は溶解感染開始後 30~36 時間で発現した.....	36
1-3-4. KSHV ORF21 はウイルス DNA 複製に寄与しない.....	36
1-3-5. KSHV ORF21 はウイルス mRNA 発現に寄与しない.....	37
1-3-6. KSHV ORF21 はウイルス産生に寄与しない.....	40
1-3-7. KSHV ORF21 はウイルス感染に必要である.....	41
1-4. 考察.....	45
1-5. 小括.....	46

第2章.....	47
2-1. 緒言.....	47
2-2. 方法.....	49
2-2-1. 試料及び材料.....	49
2-2-2. 培養細胞への遺伝子導入.....	49
2-2-3. ウェスタンブロット解析.....	50
2-2-4. RT-qPCR 解析.....	50
2-2-5. 蛍光抗体染色.....	51
2-2-6. 細胞収縮の評価.....	51
2-2-7. 軟寒天コロニー形成アッセイ.....	52
2-2-8. 細胞増殖アッセイ.....	52
2-2-9. U0126 処理時における iSLK-BAC 定常保持細胞株の産生ウイルス量の測定.....	52
2-2-10. U0126 処理時における子孫ウイルスの感染性の測定.....	52
2-2-11. 統計解析.....	52
2-3. 結果.....	53
2-3-1. 内在性 ORF21 の細胞内局在.....	53
2-3-2. BAC 由来の ORF21 分子の発現により細胞収縮が起こり、その細胞増殖にはリン酸化が関与する.....	54
2-3-3. 外来性 ORF21 分子は MEK1/2 のリン酸化に関与する.....	56
2-3-4. BAC 由来の ORF21 分子は MEK1/2 のリン酸化に関与する.....	58
2-3-5. ORF21 分子による足場非依存的な細胞増殖の亢進.....	60
2-3-6. 標的細胞への MEK 阻害による子孫ウイルス子孫感染の抑制.....	62
2-4. 考察.....	66
2-5. 小括.....	69
総括.....	70
結語.....	70
謝辞.....	71
参考文献.....	72

## 序論

カポジ肉腫ヘルペスウイルス (Kaposi's sarcoma herpesvirus; KSHV) は、8 番目に発見されたヒトヘルペスウイルスであるためヒトヘルペスウイルス 8 型 (HHV-8) とも呼ばれる<sup>1</sup>。ヘルペスウイルスは無脊椎動物から脊椎動物に至るまで幅広く分布している二本鎖 DNA ウイルスである。そのなかで、ヒトを宿主とするヒトヘルペスウイルス (Herpes simplex virus) は 3 つのサブファミリーに分類される(表 1)<sup>2</sup>。単純ヘルペスウイルス 1 型(Herpes simplex virus; HSV) -1、HSV-2、水痘帯状疱疹ウイルス (Varicella zoster virus; VZV) は  $\alpha$ -ヘルペスウイルス亜科に、ヒトサイトメガロウイルス (Human cytomegaro virus; HCMV)、HHV-6A、HHV-6B、HHV-7 は  $\beta$ -ヘルペスウイルス亜科に、エプスタイン・バーウイルス(Epstein-Barr virus) および KSHV は  $\gamma$ -ヘルペスウイルス亜科にそれぞれ分類される (表 1)<sup>2,3</sup>。

KSHV は、感染者の免疫不全時にカポジ肉腫や原発性体腔リンパ腫 (Primary effusion lymphoma; PEL)、キャッスルマン病 (Multicentric castelman disease; MCD) などの腫瘍を引き起こすことが知られている。KSHV の主な感染経路は、唾液感染、性感染である<sup>3</sup>。性的接触に起因する感染者の中でも、特に HIV-1 との共感染の可能性の高い MSM (Men who have sex with men) ではカポジ肉腫の発症率がきわめて高いことが報告されている<sup>4</sup>。

健常者における KSHV 既感染率は、アフリカ諸国では約 40~50%、イタリアなどの地中海沿岸では約 10% 程度、北米などの地域では 5% 以下であるとされている<sup>3,5-9</sup>。特にサハラ砂漠地域では KSHV 感染率が高く健常人の 6 割を超えるとされる<sup>5-8</sup>。また、日本においては日本本土においては約 1% 程度であるが<sup>10-12</sup>、Awazawa らの調査によると沖縄県宮古島、八重山地方では感染率が約 15% 程度であると報告されている<sup>13</sup>。さらに、日本国内で生じる KSHV 関連疾患は、ほとんどが HIV-1 感染者で発症するとされている<sup>9,14</sup>。

表1 ヒトヘルペスウイルスの分類と主な疾患

型	$\alpha/\beta/\gamma$	和名	英文名 (略語)	関連疾患	上：世界の陽性率 下：日本の陽性率
1	$\alpha$	単純ヘルペス ウイルス 1	Herpes simplex virus (HSV-1)	口唇 ヘルペス等	67% <sup>15</sup> 50-60% <sup>16,17</sup>
2	$\alpha$	単純ヘルペス ウイルス 2	HSV-2	性器ヘルペス	26.8% <sup>18</sup> 1.0-2.0% <sup>16,17</sup>
3	$\alpha$	水痘・帯状疱疹 ウイルス	Varicella- zoster virus (VZV)	水痘・帯状疱疹	> 40-90% <sup>19</sup> > 95% <sup>20</sup>
4	$\gamma$	エプシュタイン・ バー・ ウイルス	Epstein-Barr virus (EBV)	バーキット リンパ腫, ホジキン リンパ腫等	> 90% <sup>21</sup> > 90% <sup>20</sup>
5	$\beta$	サイトメガロ ウイルス	Human cytomegalo virus (HCMV)	肺炎, 網膜炎等	45-100% <sup>22</sup> 40-90% <sup>20</sup>
6	$\beta$	ヒトヘルペス ウイルス 6	HHV-6	突発性発疹	> 90% <sup>23,24</sup> > 90% <sup>20</sup>
7	$\beta$	ヒトヘルペス ウイルス 7	HHV-7	突発性発疹	> 90% <sup>25</sup> > 90% <sup>25</sup>
8	$\gamma$	ヒトヘルペスウイ ルス 8 (カポジ肉腫関連 ヘルペスウイルス)	Kaposi's sarcoma- (associated) Herpesvirus (KSHV)	カポジ肉腫 Primary effusion lymphoma	40-50% (アフリカ) <sup>3,5-8</sup> < 5% <sup>10-12</sup> (宮古島では約 15% <sup>13</sup> )

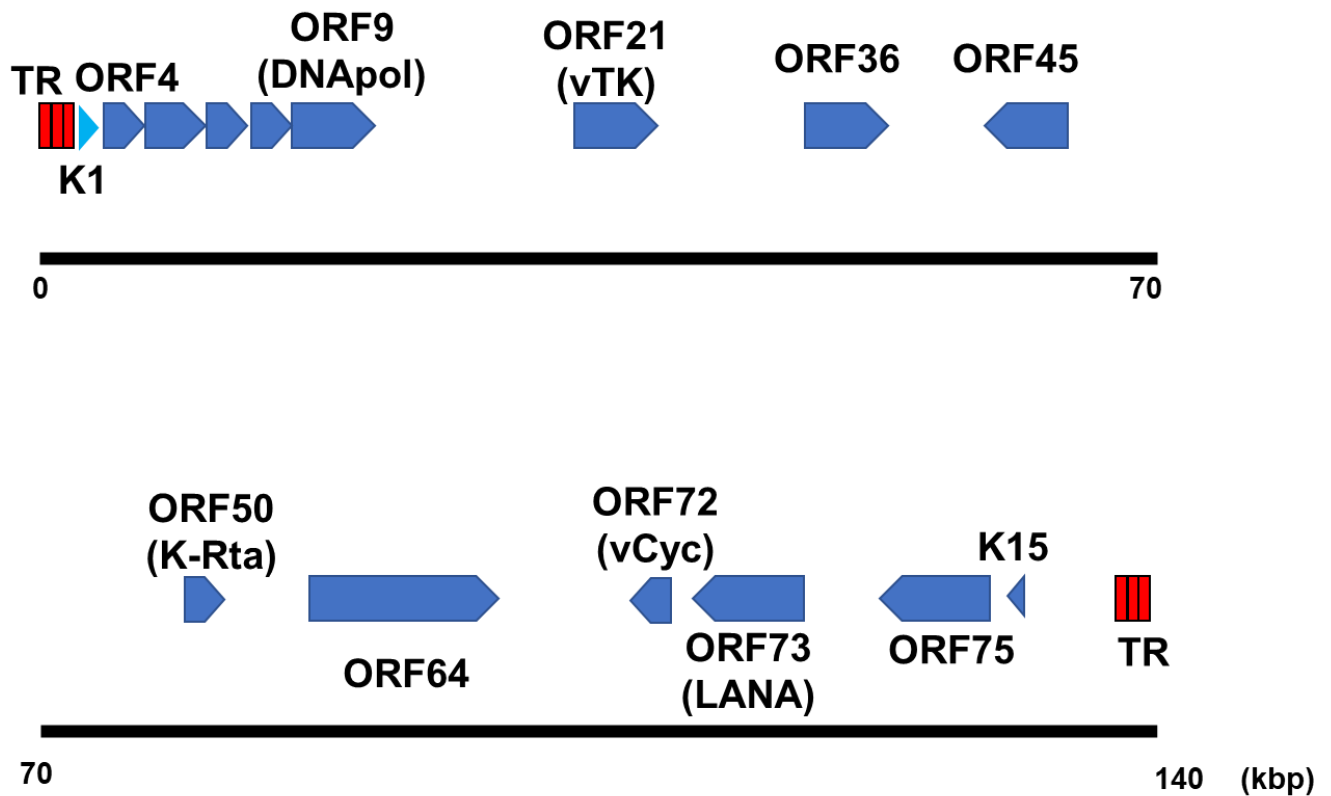


図 1 KSHV のゲノム情報

それぞれの ORF の配向性は矢印の方向で示されている。リスザルのヘルペスウイルス (*Herpesvirus saimiri*:HVS) と相同性を有する ORF はダークブルー、相同性がない ORF はライトブルーで示している。

KSHV ゲノムは全長約 170 kbp の長さを持つ 2 本鎖 DNA で、ウイルス粒子内では直線状で、感染細胞内では環状で存在する。KSHV ゲノムは約 90 種以上の Open Reading Frame (ORF) や、マイクロ RNA (miRNA; micro RNA) さらには長鎖非コード RNA (lncRNA; long non-coding RNA) をコードしている (図 1)<sup>3,26</sup>。

KSHV 粒子は、他のヘルペスウイルスと同様に、線状二本鎖 DNA ゲノムを含む正 20 面体のカプシドを中心に持ち、その周囲にテグメントタンパク質を含むテグメント、さらにその外側に宿主細胞のゴルジ体膜由来の脂質二重層とスパイクタンパク質を有している (図 2)。

KSHV の生活環に関して説明する。感染細胞内において KSHV は、潜伏感染 (latent

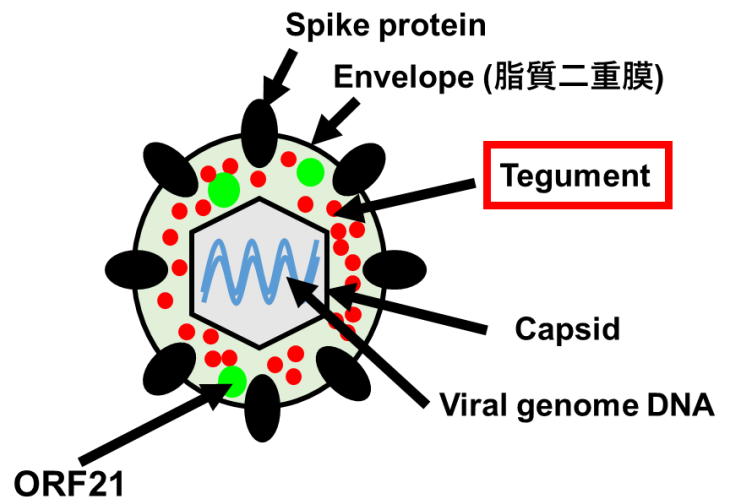


図 2 KSHV 粒子の構造

説明は本文を参照

infection) と呼ばれる不顕性感染状態と、溶解感染 (lytic infection) と呼ばれるウイルス産生が起きている状態の二つの感染状態をとる。KSHV は他のヘルペスウイルスと同様に初感染後は深刻な疾患を引き起こさず不顕性感染に終わるが、終生にわたり潜伏感染状態を維持する。感染者の AIDS 発症や免疫抑制剤投与下などの免疫不全状態において、KSHV はカポジ肉腫や PEL、MCD などのがんを引き起こす。

ウイルスの感染時、KSHV は自身のスパイクタンパク質を介した宿主細胞への吸着後に、エンドサイトーシスや、細胞膜とウイルスエンベロープとの直接的な膜融合により、宿主細胞質内へと侵入する。その際、ウイルスゲノムを内包するウイルスカプシドとエンベロープの間に存在しているテグメントタンパク質を感染細胞の細胞質内に放出する (図 3)。

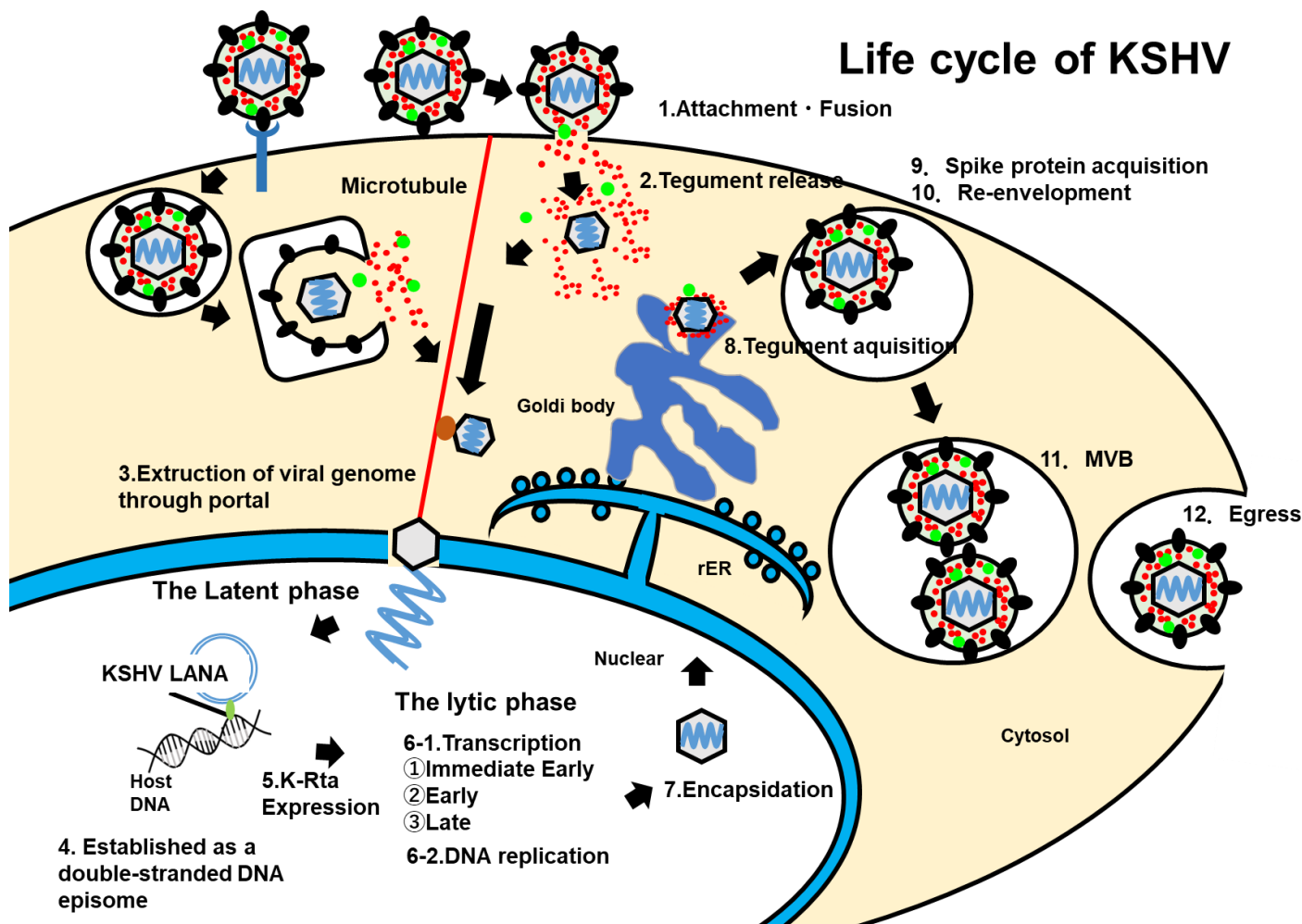


図 3 KSHV の生活環 (説明は本文を参照)

KSHV 侵入時に細胞内シグナル伝達が活性化されることで微小管がアセチル化され、安定化する。その後ウイルスカプシドに結合したテグメントタンパク質が Kinesin-2 と結合することで、ウイルスカプシドは微小管を介して核膜へ輸送される<sup>3,27-30</sup>。その後脱核しウイルスカプシドからウイルス DNA が核内に放出される<sup>3,27,28</sup>。ウイルスゲノムが核内侵入後、潜伏感染遺伝子、溶解感染遺伝子の両方の転写が活性化した状態になるが<sup>3,31,32</sup>、クロマチンがウイルス DNA に沈着し、ウイルス DNA がクロマチン修飾されることで、次第に溶解感染



遺伝子の発現低下が起こる。その一方で LANA (Latency-associated nuclear antigen) の発現量が 48~72 時間にかけて大幅に上昇し潜伏感染状態となる<sup>3,31,32</sup>。潜伏感染状態では KSHV ゲノムのターミナルリピートと呼ばれる領域と宿主のクロマチンを LANA が結合し、KSHV ゲノムはエピゾームと呼ばれる環状 2 本鎖 DNA の状態を形成する。潜伏感染時に KSHV はごく少数の微量の LANA を含む潜伏関連遺伝子産物やマイクロ RNA を発現して、細胞増殖の促進やアポトーシス抑制、さらに免疫回避を行うことが知られている。これにより、KSHV は長期潜伏感染状態を維持することが可能になっていると考えられている。

KSHV の感染細胞はそのほとんど (9 割以上と認識されている) が潜伏感染状態で存在しているが、一部の感染細胞は紫外線暴露や薬物、ホルモン変化によりウイルス再活性化 (reactivation) が起きウイルスの複製サイクルである溶解感染へと移行する (図 3)。溶解感染移行の際にはウイルス性の転写因子 K-Rta が溶解感染イニシエーションタンパク質として発現し、潜伏感染から溶解感染へと移行させる。溶解感染サイクルでは、Immediate Early (前初期)、Early (初期)、Late (後期) 遺伝子の順で溶解感染関連遺伝子が転写・翻訳される。K-Rta は前初期遺伝子産物であり、スパイクタンパク質やテグメントタンパク質、キャプシド蛋白質は初期または後期遺伝子として発現する。この後期遺伝子発現と並行し、ウイルスゲノム複製が行われる。その後、カプシドタンパク質が自己会合し正 20 面体構造カプシドを形成し、製されたウイルスゲノムがカプシド内にパッケージングされる。さらに細胞質でのテグメント獲得を経た後、ゴルジ体を経てスパイクタンパク質獲得、エンベロープ獲得などを経てウイルス粒子が組み立てられた後に、MVB (Multi vesicular body) を形成し、感染細胞から放出、つまり出芽される (図 3)。

本研究の研究対象である KSHV ORF21 は、溶解感染期に発現するリン酸化酵素である。HVS (Herpesvirus saimiri) との比較から、ORF21 は vTK (viral Thymidine kinase) オーソログと推定されている<sup>33</sup>。 $\alpha$ -ヘルペスウイルス亜科では HSV-1/2 の UL23、VZV の ORF36 が vTK に相当する (図 4)。 $\gamma$ -ヘルペスウイルス亜科では EBV の BXL1 が vTK に相当する。なお、 $\beta$ -ヘルペスウイルス亜科には vTK がコードされていない。細胞が発現する hTK (host Thymidine kinase) はヌクレオチド分解経路の中間体を利用して再びヌクレオチドを合成するサルベージ経路ではたらく酵素であり、二量体若しくは四量体の形でデオキシチミジン (dT) をモノリン酸化し dTMP に変換する<sup>34,35</sup>。hTK と同様に vTK は核酸をリン酸化する。vTK が核酸のリン酸化した結果、ウイルスゲノムの複製に寄与する。しかし hTK と異なり vTK は宿主特異性が低いため、デオキシシチジン (dC) やデオキシグアノシン (dG) をリン酸化する<sup>36</sup>。そのため抗ヘルペスウイルス薬のアシクロビルやバラシクロビルは、 $\alpha$ -ヘルペスウイルス亜科の vTK の低い宿主特異性を利用し、vTK のリン酸化を受けることで活性化体としてはたらく。

一方  $\gamma$ -ヘルペスウイルス亜科、すなわち、EBV と KSHV に対する有効な抗ウイルス薬は未だ開発されていない。それは  $\gamma$ -ヘルペスウイルス亜科にコードされる vTK (KSHV ORF21, EBV BXL1) はチミジンに対するリン酸化能が弱いことが原因の一つとしてあげられる<sup>37,38</sup>。Gustafson らによる先行研究では、チミジンに対する KSHV ORF21 のミカエリス定数  $K_m$  は UL23 の 60 倍、 $V_{Max}$  は UL23 の 1/340 である。このことは、HSV-1 vTK (UL23) と比較し

KSHV TK (ORF21)のキナーゼ活性が非常に低いことを意味している<sup>38</sup>。

HSV-1 と KSHV vTK の機能の違いの一つとして、アミノ酸配列の相同性の低さがあげられる。Cannon らは、KSHV vTK と HSV-1 UL23、EBV BXLF1、Equine gammaherpesvirus2 kinase ORF21、Saimiriine gamma herpesvirus 2 (HVS) thymidine kinase の相同性は 12%、28%、31%、32% と報告している<sup>37</sup>。表 2 は新たに BLAST 解析した結果であるが、Cannon らと値は異なるものの同様の傾向の結果が示された (表 2)。また、KSHV の遺伝子はチミジル酸合成酵素 (ORF70) をコードしている。de novo 経路においてチミジル酸合成酵素は dUMP から dTMP 変換する酵素であり、サルベージ経路ではたらく TK を介すること無く dTMP を生成することが可能である。従って、ORF21 はチミジンリン酸化ではなく他の機能を持つと考えられている<sup>39</sup>。

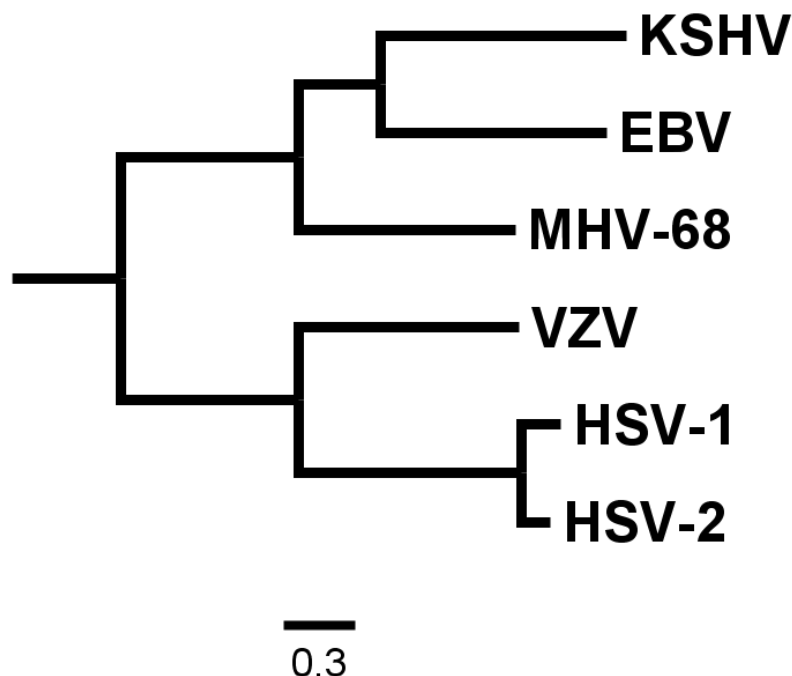


図 4 ヘルペスウイルスのコードする vTK の系統樹

$\alpha$ -ヘルペスウイルス亜科、 $\gamma$ -ヘルペスウイルス亜科の vTK の系統関係を示している。MAFFT-server<sup>40,41</sup>にて各 vTK のアミノ酸配列をアライメント後、IQ-TREE ソフトウェア<sup>42,43</sup>に実装された超高速ブートストラップ<sup>44</sup>を用いて最尤推定法 (LG+G4 model を使用) により系統樹を得た。系統樹推定に用いたアミノ酸配列は系統樹表示順の上から順に ACY00419.1 (KSHV)、ATO60488.1 (EBV)、AAF19286.121 (Murid gammaherpesvirus 4)、tr|G1K7Y3|G1K7Y3\_HHV3 (VZV)、tr|A0A2U9A5Y6|A0A2U9A5Y6\_HHV1 (HSV-1)、sp|P89446|KITH\_HHV2H (HSV-2)である (それぞれ NCBI データベース、UniProt から配列を取得した)。

表 2 KSHV ORF21 とオーソログ遺伝子との相同性

Species	subject acc.ver	% identity	alignment length	E-value	% positives
Colobine gamma herpesvirus 1	QDQ69229.1	52.158	533	0	66.6
Equid gamma herpesvirus 2	UTM04407.1	37.461	323	2.42E-77	57.59
Saimiriine gamma herpesvirus 2 (HVS)	NP_040223.1	35.602	382	2.89E-76	53.14
Human gamma herpesvirus (EBV)	ATO60488.1	34.181	354	3.49E-71	54.8
Murine gamma herpesvirus 4 (MHV-68)	AAF19286.1	30	320	7.61E-41	49.38
Human herpesvirus 2 (HSV-2)	sp P89446 KITH_HHV2H	22.727	176	3.91E-09	40.34
Human herpesvirus 1 (HSV-1)	A0A2U9A5Y6_HHV1	20.33	182	1.88E-07	41.21
Human herpesvirus 3 (VZV)	tr G1K7Y3 G1K7Y3_HHV3	24.519	208	0.003	37.5

KSHV ORF21 (ACY00419.1) とオーソログのウイルス性遺伝子との相同性を NCBI BLAST の PBLAST により計算した。BLAST に用いた比較群のアミノ酸配列の Accession number は 2 列目に示した (それぞれ NCBI データベース、UniProt から配列を取得した)。

2023 年 1 月現在、ORF21 に関する主な報告として以下が挙げられる。1 つ目はチミジンキナーゼ活性でなくチロシンキナーゼ活性を持ち、細胞収縮に関与している<sup>45</sup>との報告である。2 つ目は ORF21 の Kinase 機能はウイルスゲノム複製、ウイルス産生、新規感染に関与しない<sup>46</sup>という報告である。しかしながら、ORF21 分子そのものが KSHV の複製、感染などに与える影響について、その全容は明らかになっていない。

そこで本研究では ORF21 遺伝子改変 KSHV を作製し、ウイルス複製時またはウイルス感染時における ORF21 機能の解明を目的とした解析を実施した。本論文の第 1 章ではウイルス複製、ウイルス遺伝子発現、ウイルス産生、子孫ウイルスの感染性に与える KSHV ORF21 の影響について、第 2 章では KSHV ORF21 による宿主細胞中の細胞内シグナル伝達や機能形態への影響について、それぞれ解析した。

## 第1章 ORF21 分子はウイルス感染能の低下に関与する

### 1-1. 緒言

本研究では、ウイルス複製時及び感染時における ORF21 の機能や役割の解明が主な目的である。そのため、本章ではウイルス複製時に焦点をあて ORF21 遺伝子欠損 KSHV を作成し、その改変ウイルスや改変ウイルス感染細胞の生物学的性状やウイルス複製を解析した。

遺伝子改変ヘルペスウイルスを構築する手法の一つとして、ヘルペスウイルスゲノムの全長を BAC (Bacterial artificial chromosome) ベクターにクローニングし、遺伝子操作する手法が広く用いられている。野生型 KSHV ゲノム (JSC-1 株) を BAC クローン化した KSHV BAC16 を基に、ORF21 遺伝子改変 KSHV BAC16 を作製した。さらに、その ORF21 遺伝子改変 KSHV BAC16 を細胞に導入し定常保持細胞株を樹立することで、潜伏感染状態の ORF21 遺伝子改変 KSHV 感染細胞モデルを構築した。さらに、ORF21 遺伝子改変 KSHV 感染細胞を溶解感染 (ウイルス複製サイクル) へと誘導し、産生される ORF21 遺伝子改変 KSHV 粒子の複製効率や感染性を解析した。

ウイルスの生活環において、複数のウイルスタンパク質が協調して機能することで、ウイルス感染やウイルス複製、ウイルス粒子放出などの現象が達成される。これについてはヘルペスウイルスも例外ではない。一般的な分子生物学的手法として、研究対象の遺伝子を発現するプラスミドを一過性に細胞内に発現させ機能解析を行うことが多い。しかしながら、この手法を個々のウイルス遺伝子に適用しても、その他のウイルスタンパク質が発現・機能している感染状態を反映することにはならない。そのため、研究対象のウイルス遺伝子を欠損させたノックアウトウイルスなどを解析することが、ウイルス感染現象のさなかにおけるウイルス性遺伝子の実態解明に重要である。

ゲノムサイズの比較的小さい HIV-1 などは、ゲノムをプラスミドにクローニングすることで遺伝子改変が可能となった<sup>47</sup>。また、インフルエンザウイルスのような分節型ゲノムをもつウイルスの場合ではプラスミドを複数個組み合わせることで、変異ウイルス作製が可能である<sup>48,49</sup>。しかし、ヘルペスウイルス属はウイルスの中でも HCMV の 230 kbp を筆頭に、比較的大きなゲノムを有しているウイルスであるため、プラスミド上での改変は極めて困難であった。そこでヘルペスウイルスゲノムを保持出来る DNA ベクターとして、BAC 改変系が着目された。BAC は、大腸菌の性接合 F プラスミド (F plasmid) の菌内で 1~2 コピーである性質、F プラスミドが細胞周期特異的に複製される性質を利用している<sup>50,51</sup>。このことより、大腸菌内で BAC クローンを単一コピーで保持することが出来る。これを基に、大腸菌に 300 kbp までの大型 2 本鎖環状 DNA を安定して保持させ菌内で相同性組換えなどの遺伝子操作ができるように開発された<sup>52,53</sup>。BAC 改変系は、一般的にノックアウトマウスなどの作成時に、一部抽出したマウスゲノムに対する変異導入の際に使用されることが多かった。ヘルペスウイルスでは HSV-1 などが先行して BAC 改変系を導入し、遺伝子改変ウイルスを用いて個々のウイルス性遺伝子の機能解析、いわゆる逆遺伝学的アプローチによるウイルスの病原性発現機構や増殖機構などの基礎研究が行われてきた<sup>53</sup>。HSV-1 は増殖効率、感染性がともに高いことから、改変 BAC からの感染性ウイルスの調製にも技術的支障が少なかった一

方で、KSHVは増殖・感染能力がともに低いためBAC改変系の普及が立ち遅れていた。

これを解決したのが、Don GanemらによるTet-ON system導入細胞によるKSHV産生細胞の樹立<sup>54</sup>と、それに続くJae JungらによるBACmid (KSHV BAC16)の構築である<sup>55</sup>。Don Ganemらはウイルス産生を誘導するヒストンアセチル化誘導剤処理とともに溶解感染誘導ウイルス性遺伝子であるORF50/K-Rtaを発現誘導することで、高力価の感染性粒子を産生する細胞株(inducible-SLK細胞/iSLK細胞)の樹立に成功した。さらに、Jae Jungらの開発したKSHV BAC16は遺伝子操作時に欠損が生じにくいなどの高いゲノム安定性を示すとともに、Two-step Red recombination法とよばれる相同性組換え法と組み合わせることで、一塩基レベルでの改変操作を可能にした。KSHV BAC16は全KSHVゲノム、hygromycin、chloramphenicolなどの薬剤耐性遺伝子、緑色蛍光タンパク質(GFP)を含んでいる。よって、KSHV BAC16のトランスフェクション後に薬剤選択によりクローン化されたKSHV BAC16定常保持細胞株では恒常的にGFPが発現し、模擬的なKSHV潜伏感染状態として扱うことが可能である(図5)<sup>55</sup>。また、KSHV BAC16定常保持細胞から産生された子孫KSHV(KSHV BAC16をゲノムにもつ)が感染した細胞はGFP陽性となる。以上の利点から、iSLK細胞とKSHV BAC16を用いて種々のウイルス性遺伝子の解析が進展している。本研究でもこの改変系を利用した。

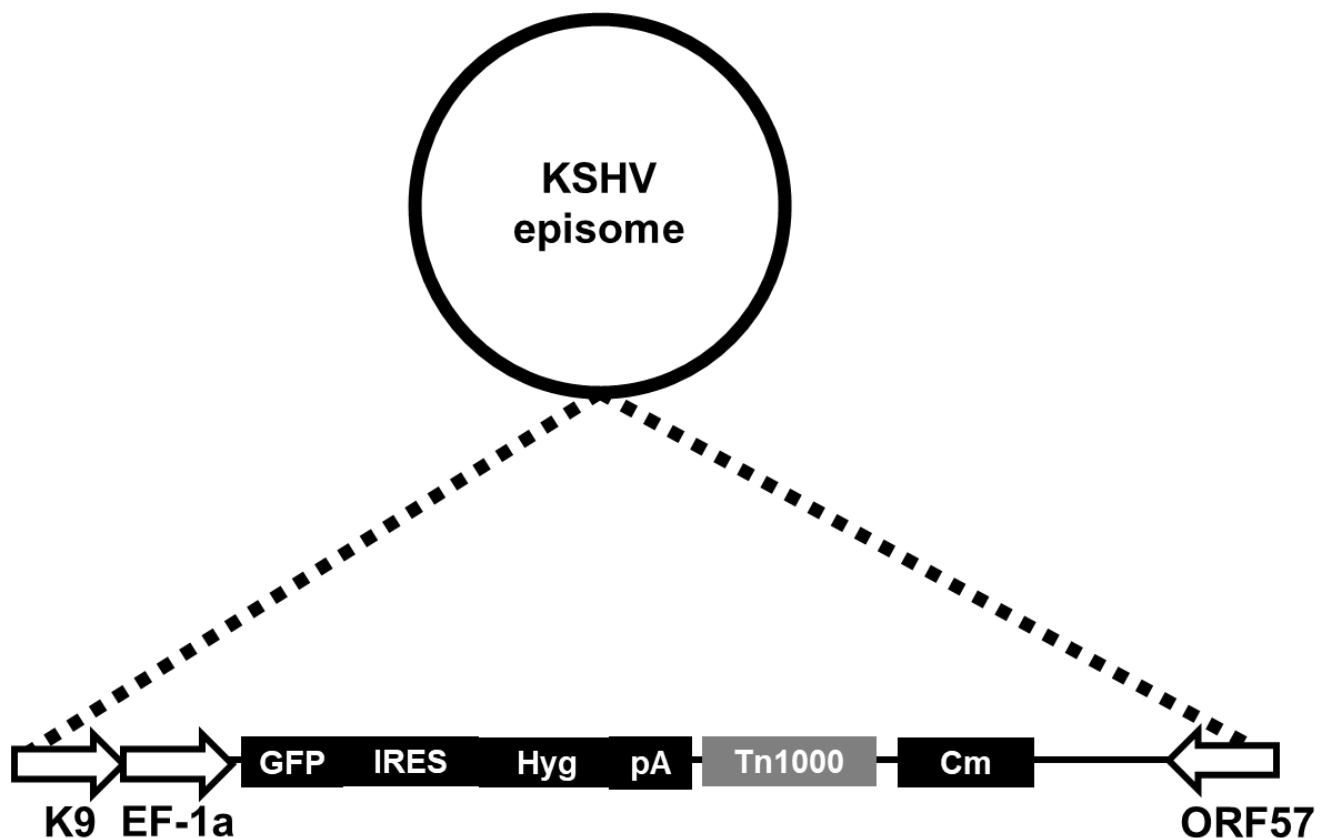


図5 KSHV BAC16の概要

KSHVが発現するORF21の持つチミジンキナーゼ活性は弱く、チロシンキナーゼ活性を持つことが報告されていることは序論で述べた通りである。一般的なプロテインキナーゼは、

活性化の調節に関与する activation-loop (A-loop)、catalytic-loop (C-loop)、リン酸の結合に関係するモチーフである phosphobinding-loop (P-loop) の部分に大別される<sup>56</sup>。P-loop は発見者の名前を取って Walker A motif と呼ばれる。ほとんど全てのキナーゼにおいて ATP の認識部位はほぼ保存されており、特に P-loop では共通アミノ酸配列として 'GXXXXGK[TS]' のドメインを有している<sup>56-58</sup>。P-loop の保存性が高いことに着目し、Gill<sup>45</sup>や Beauclair<sup>46</sup>らは ORF21 の P-loop 中の共通配列中の 3 つの Gly 残基を Val に置換しキナーゼ活性を喪失させることで ORF21 が有するキナーゼ機能の解析を行った。特に、Beauclair らは前述の KSHV BAC16 を用い ORF21 キナーゼ活性機能欠失 BAC を作製し、そのウイルスゲノム複製やウイルス産生、ウイルスの新規感染性について解析した<sup>46</sup>。その結果、彼らは ORF21 のキナーゼ機能はウイルスゲノム複製、ウイルス産生、ウイルスの新規感染に関与しないと結論づけた<sup>46</sup>。一方で KSHV の近縁種 ( $\gamma$ -ヘルペスウイルス亜科) である MHV-68 の ORF21 オースログ遺伝子の解析では、*in vitro*、*in vivo* 双方において、野生型ウイルスと比べ分子欠損ウイルスの感染性が低下したことが報告されている<sup>59-61</sup>。

そこで本章では ORF21 キナーゼ機能欠失-KSHV BAC だけでなく ORF21 分子欠損-KSHV BAC を構築し細胞に導入することで、ORF21 分子機能変異によるウイルスゲノム複製、ウイルス mRNA 発現、ウイルス産生、新規感染などに対する影響を解析した。

## 1-2. 方法

### 1-2-1. 試料及び材料

本章で使用した試薬及びメーカーを以下に示す。

表 3 本章で使用した試薬と試薬メーカー

試薬	社名
10x Loading buffer	タカラバイオ
Aprotinin	ナカライテスク
APS	ナカライテスク
BES	同仁化学研究所
Bovain serum albumin	Sigma-Aldrich
CaCl <sub>2</sub>	ナカライテスク
Can Get Signal® Immunoreaction Enhancer Solution	東洋紡
Chemi-Lumi One	ナカライテスク
Chemi-Lumi One Super	ナカライテスク
Chloramphenicol	富士フィルム和光純薬
Chloroform	ナカライテスク
DMEM	ナカライテスク
DMSO	富士フィルム和光純薬
DNase I	New England Biolabs
Doxycycline	LKT laboratories
ECL	Cytiva
EDTA	ナカライテスク
G418	ナカライテスク
Gel/PCR Extraction Kit	日本ジェネティクス
Go-Taq polymerase	プロメガ
HCl	富士フィルム和光純薬
Hygromycin B	富士フィルム和光純薬
Isoamyl Alcohol	富士フィルム和光純薬
Kanamycine	ナカライテスク
KOD-FX	東洋紡
KOD-Plus-Neo	東洋紡
Lactacystin	ペプチド研究所
LB 培地	ナカライテスク
Leupeptin	ナカライテスク
MG132	ペプチド研究所
NaCl	ナカライテスク
Na-n-Buthylate	東京化成
NaOH	ナカライテスク
NP-40	富士フィルム和光純薬
NucleoBond Xtra	MACHREY-NAGEL

Pepstatin	ナカライテスク
Phenol	富士フィルム和光純薬
PMSF	ナカライテスク
Polybrene	Sigma-Aldrich
PureLink™ HiPure Plasmid Midiprep Kit	Invitrogen
Puromycin	InvivoGen
QIAamp DNA Blood mini Kit	QIAGEN
ReverTra Ace qPCR RT Kit	東洋紡
RNA iso Plus	タカラバイオ
RNase A	Sigma-Aldrich
ScreenFect A plus	富士フィルム和光純薬
SDS	ナカライテスク
Sodium deoxycholate	富士フィルム和光純薬
TEMED	ナカライテスク
Tris	ナカライテスク
Trypsin	ナカライテスク
Tween-20	ナカライテスク
X線フィルム	富士フィルム
β-メルカプトエタノール	富士フィルム和光純薬
イソプロパノール	富士フィルム和光純薬
エタノール	ナカライテスク
臭化エチジウム	ナカライテスク
寒天末	ナカライテスク
クリアトランス®ニトロセルロースメンブレン 0.2 μm	富士フィルム和光純薬
グルコース	ナカライテスク
メタノール	富士フィルム和光純薬
酢酸	ナカライテスク
酢酸カリウム	ナカライテスク

#### 1-2-1-1. 試薬・試薬

試薬は表4の濃度で調製した。

表4 調製した試薬一覧

試薬名	濃度	溶媒
G418	50 mg/mL	MilliQ 滅菌水
Hygromycin B	100 mg/mL	MilliQ 滅菌水
Dox	10 mg/mL	MilliQ 滅菌水
NaB	1.5 mol/L	MilliQ 滅菌水
Kan	20 mg/mL	MilliQ 滅菌水



Cm	50 mg/mL	エタノール
Amp	50 mg/mL	MilliQ 滅菌水

<MilliQ 滅菌水>

MilliQ を 121°C、20 分間オートクレーブ滅菌した水。

本章で用いた抗体は以下に示す。

表 5 第 1 章で用いた抗体

抗体名	動物種	会社	カタログ番号	希釈倍率
anti-ORF21	ウサギ	当研究室 において作製		×3000
anti-GAPDH	マウス	SC	0411	×2000
anti-β-Actin	マウス	SC	sc-69879	×2000
HRP-conjugate anti-mouse IgG	ヒツジ	GE ヘルスケア	NXA931	×3000
HRP-conjugate anti-rabbit IgG	ロバ	GE ヘルスケア	NA934	×3000

#### 1-2-1-2. 細胞

Vero 細胞、HEK293T、iSLK 細胞、iVero 細胞は、5% FBS fetal bovine serum 含有 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM)、5% CO<sub>2</sub>、37°Cの環境下で培養した。また iVero 細胞は 2.5 μg/mL puromycin、iSLK 細胞は 1.0 μg/mL puromycin、0.25 μg/mL G418 となるよう最終濃度を調整した。

ここで実験に用いた細胞の由来について説明する。HEK293T 細胞はヒト女性胎児の腎臓由来の細胞株である HEK293 細胞に、SV40 Large T 抗原を発現させた細胞株である<sup>62,63</sup>。Vero 細胞はアフリカミドリゲザルのメスから摘出された腎臓上皮細胞であり、エスペラント語で「緑の腎臓」を意味する“Verda Reno”を縮めて命名された<sup>64-66</sup>。Vero 細胞は 12 番染色体の I 型インターフェロンの遺伝子クラスターが欠損しており、インターフェロンの産生能を有さない。そのため、ウイルスの感染効率が良いことが知られている<sup>64-66</sup>。

iVero 細胞は、前述の Vero 細胞に、pCW57.1 KSHV K-Rta/ORF50 をレンチウイルスにより導入し、puromycin で薬剤選択した細胞である<sup>67,68</sup>。pCW57.1 KSHV K-Rta/ORF50 導入により、テトラサイクリン系の薬剤を培地に添加することで KSHV の溶解感染イニシエーションタンパク質である K-Rta を誘導することが出来る。一方、iSLK 細胞はヒト血管内皮細胞由来といわれる SLK 細胞に、テトラサイクリントランス活性化因子(reverse tetracycline transactivator;rtTA) 発現ベクターである pRetroX-Tet-On Advanced (G418 で薬剤選択)、K-Rta/ORF50 をテトラサイクリン応答発現ベクターである RetroX-Tight-Pur に組み込んだベクター (puromycin で薬剤選択) を導入した細胞である<sup>54,55</sup>。

## 1-2-2. プラスミド

### 1-2-2-1. 鋳型としての利用や実験に使用したプラスミド

pCI-neo-3×Flag (空プラスミド) : Promega から購入

pCI-neo-KSHV ORF21 WT (p3F-21WT) : 当研究室で構築

pEP-KanS : Addgene plasmid #41017

pGEMTeasy-ORF11: 当研究室で構築

### 1-2-2-2. 点変異プラスミドの構築

点変異プラスミドは Quick Change™ 法を用いて構築した。ORF21 の P-loop 中の G260、263、265 を Val 置換した KD 変異プラスミド作製のために p3F-21WT を鋳型とし、KOD-Plus-Neo を用いた PCR を行った。この PCR 産物に含まれる鋳型プラスミドの形質導入を防ぐために DpnI (タカラバイオ) で 37°C、3 時間処理した後に形質導入を行った。作製したプラスミドは p3F-21KD である。使用したプライマーは Integrate DNA Technology 社から購入し、それぞれの配列は表 6 に示した。

#### <反応液の組成>

Template (p3F-ORF21)	1	μL
10×KOD-Plus-neo buffer	5	μL
2 mM dNTPs	5	μL
25 mM MgSO <sub>4</sub>	5	μL
10 μM Forward Primer	1.5	μL
10 μM Reverse Primer	1.5	μL
KOD-Plus-Neo Polymerase	1	μL
MilliQ 滅菌水	30	μL
Total	50	μL

#### <反応条件>

	分: 秒
94°C	2:00
98°C	0:10
68°C	4:30
	↓×16 cycle
12°C	∞

表 6 プラスミド構築に用いたプライマー配列

Primer name	5'→3'
ORF21 KD Forward	gtggactacaggaatggtttattgctttacttagagGTTgtaatgGTAgtgGTCaaatcaacgctggcaacgccg
ORF21 KD Reverse	cggcggttgaccagcgttgattGACcacTACcattacAACctctaagtaaagcaaataaacattcctgtagtccac

大文字は kinase dead 変異の挿入部位を示している。

### 1-2-2-3. DNA 精製

得られた大腸菌クローンについて、それぞれプラスミドを少量精製し変異導入を確認した。少量精製時はアルカリ-SDS 法に従ってプラスミド抽出を実施した。大腸菌培養液 2 mL を 4,000 rpm、5 分間遠心し大腸菌ペレットを形成した。上清除去後に 100  $\mu$ L の Solution I を加えボルテックスなどを用いて攪拌し、大腸菌ペレットをほぐした。その後、200  $\mu$ L の Solution II を加え、転倒混和し 5 分程度静置した。この溶液に 150  $\mu$ L の Solution III を加え中和した。さらに 10  $\mu$ L のクロロホルム添加し、15,000 rpm、1 分間、4°C で遠心してタンパク質、ゲノム DNA を沈殿させた。この上清に 500  $\mu$ L の isopropanol を加え混合し、15,000 rpm、1 分間、4°C で遠心しプラスミド DNA を含む沈殿物を得た。沈殿物を 70% エタノールで洗浄し上清を除去後、数分間風乾させ、100  $\mu$ g/mL RNase 含有精製水に沈殿物を溶解し、沈殿物中に含まれる RNA を分解した。37°C で 30 分間もしくは 4°C で一晩反応させた。また、DNA 配列解析のための PCR 反応の際に障害となる RNase およびタンパク質を除去する目的で、Gel/PCR Extraction Kit を用いてプラスミド DNA を精製した。プラスミド大量調製時は大腸菌培養液を 100~250 mL 用意し、PureLink™ HiPure Plasmid Midiprep Kit を用いてプラスミドを大量精製した。

#### <Solution I>

50 mM グルコース

25 mM Tris/HCl (pH8.0)

10 mM EDTA

#### <Solution II>

0.8% NaOH

1% SDS

#### <Solution III>

CH<sub>3</sub>COOK      73.625    g

CH<sub>3</sub>COOH      28.75     mL

MilliQ            X        mL

Total            500      mL

#### 1-2-2-4. DNA シーケンス解析

構築した変異体発現プラスミドの配列確認を行うため、精製プラスミド DNA を鋳型とした DNA シーケンス解析を行った。DNA シーケンス解析は本学の共通機器である ABI 3130 GeneticAnalyzer (Applied Biosystems) での解析、もしくは Eurofins Genomics 社への外注によりおこなった。本学で DNA シーケンス解析を実施する際には、BigDye® terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, CA, USA) で下記に示す条件下で PCR 反応を実施した。反応産物をエタノール沈殿し、HiDi™ ホルムアミド Applied Biosystems で溶出した。その後 ABI 3130 GeneticAnalyzer にて DNA 配列を解析した。解析結果は、ApE-A plasmid Editor (version 3.1.2) でアライメント解析し、変異の導入を確認した。使用したプライマーは Eurofins Genomics 社、IDT 社から購入した。それぞれの配列を表 7 示した。

#### <反応条件>

96°C	1:00
96°C	0:10
50°C	5:00
60°C	4:00
	↓ ×25 cycle
10°C	∞

表 7 プラスミドのシーケンス解析に用いたプライマー配列

Primer name	5'→3'
YI68-S_seq_pCIneo	GAGACAGAGAAGACTCTTG
YI69-As_seq_pCIneo	GCATTCTAGTTGTGGTTTG
YI182-ORF21 (BAC16) SQ Fw	ACTCAAGAGGACCCCAAAGG

#### 1-2-3. ウェスタンブロット解析

##### 1-2-3-1. サンプル調製

6 well もしくは 12 well プレート上の接着細胞を PBS で洗浄し 4xSDS サンプルバッファー (1% 2-mercaptoethanol, 0.1 mM NaF, 1 mM β-glycerophosphate, 1 μg/mL aprotinin, 1 μg/mL pepstatin, and 0.25 mM PMSF を含む) を処理し細胞を溶解させ、出力 22%、10 秒間超音波処

理した。その後、95°Cで5分間煮沸した。使用するまで-20°Cで保存した。

<4×SDS サンプルバッファー>

160 mM Tris/HCl (pH6.8)

4% SDS

40% Glycerol

0.02% Bromophenol

1-2-3-2. ウェスタンブロット

6~15% ポリアクリルアミドゲルに添加し、SDS 泳動バッファーを用いて 40~45 mA の定電流で SDS-PAGE を行なった。SDS-PAGE 後、トランスファーバッファーに浸したポリアクリルアミドゲルをセミドライ方式 (1.7 mA/cm<sup>2</sup> の定電流) で 90 分間、クリアトランス<sup>®</sup> ニトロセルロースメンブレン 0.2 μm へ転写した。このメンブレンを、2.5% スキムミルク含有 PBS に浸して、30~60 分間室温にて振盪した。その後メンブレンを 0.1% Tween-20 含有 PBS PBS-T を数回交換して振盪させて洗った後に、PBS-T で一次抗体を希釈し 4°C で 12~15 時間反応させた。メンブレンを PBS-T で振盪させて洗い、PBS-T で希釈した HRP 標識 2 次抗体を室温で 1.5 時間反応させた。再度、メンブレンを PBS-T で振盪させて洗った後、PBS で 3 回置換した。ECL 化学発光基質に浸し、化学発光させたメンブレンを X 線フィルムに最大 30 分間感光させた。蛍光強度が低い場合は、PBS-T の代わりに Can Get Signal<sup>®</sup> Immunoreaction Enhancer Solution で抗体希釈を、化学発光は Chemi-Lumi One、Chemi-Lumi One Super (ナカライテスク) を用いた。バンド強度を定量する場合は Fiji software (ver1.53.q, NIH, Bethesda, MD, USA)<sup>69</sup> を用いた。

<6-15% ポリアクリルアミドゲル>

<Separating gel>

試薬	用量
MilliQ	2.3-5.3 mL
30% acrylamide mixture	2.0-5.0 mL
1.5 M Tris-HCl (pH 8.8)	2.5 mL
10% SDS	0.1 mL
10% APS	0.1 mL
<u>TEMED</u>	<u>0.008 mL</u>
Total	10 mL

<Concentrating gel>

試薬	用量	
MilliQ	3.4	mL
30% acrylamide mixture	0.83	mL
0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)	0.63	mL
10% SDS	0.05	mL
10% APS	0.05	mL
<u>TEMED</u>	<u>0.005</u>	<u>mL</u>
Total	5	mL

<SDS 泳動バッファー>

25 mM Tris

192 mM Glycine

0.1% SDS

<トランスファーバッファー>

25 mM Tris

192 mM Glycine

20% メタノール

<PBS>

137 mM NaCl

2.7 mM KCl

4.3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

1.4 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

<PBS-T>

137 mM NaCl

2.7 mM KCl

4.3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

1.4 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

0.1% Tween-20

#### 1-2-4. KSHVBAC 作成

「A Two Step Markerless Red Recombination System」と呼ばれる相同性組換え法を用い、KSHV BAC16 にコードされている KSHV ORF21 に変異を導入した<sup>70</sup>。PCR で Kan 耐性遺伝子を含む DNA 産物を増幅させ (I)、大腸菌 GS1783 株に導入した。GS1783 株は Red system と I-Sce I 遺伝子を有しており、Red system は PCR 産物と BAC16 分子との間で相同性組換えを起こすことができる酵素群である<sup>70</sup>。一方 I-Sce I は、エンドヌクレアーゼとして DNA を切断する。Kan 耐性遺伝子の導入のための相同性組換え (II)、DNA 切断 (IV)、Kan 耐性遺伝子欠失のための相同性組換え (V)、3つの過程を経て変異導入 BAC16 (VI) を作製した。

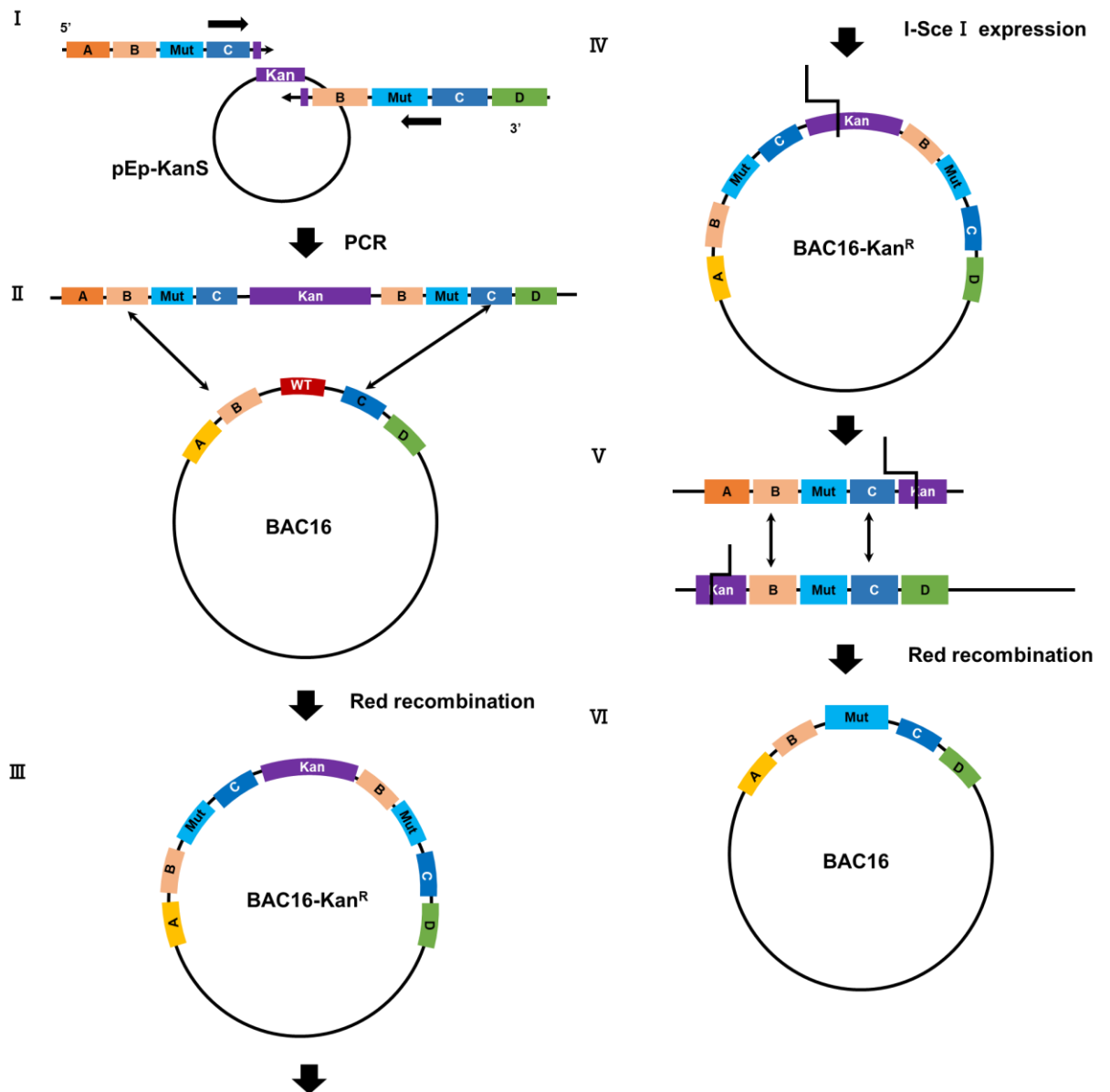


図 6 Two-step Red recombination 法の概要

#### 1-2-4-1. KOD-PCR

Brulois ら<sup>55</sup>や当研究室の Nishimura ら<sup>67</sup>の方法を参考に BAC 改変を行った。pEp-KanS 中のカナマイシン (Kan) 耐性配列とともに KOD-FX polymerase と表に示すプライマーセットによる PCR 法により増幅させた。1 サンプルあたりの組成及び反応時間は以下に示す。

pEp-KanS 中のカナマイシン (Kan) 耐性配列とともに KOD-FX polymerase (タカラバイオ) と表 8 に示すプライマーセットによる PCR 法により増幅させた。PCR 産物を含む溶液に 10x Loading buffer を加え臭化エチジウム含有 0.75% アガロースゲルで電気泳動した。

##### <反応液の組成>

pEp-KanS	1	μL
2×KOD-FX-Buffer	25	μL
10 mM dNTPs	2	μL
10 μM Forward primer	0.75	μL
10 μM Reverse primer	0.75	μL
KOD-FX Polymerase	1	μL
<u>MilliQ 滅菌水</u>	<u>19.5</u>	<u>μL</u>
Total	50	μL

##### <反応条件>

94°C	0:10
60°C	0:30
68°C	2:00
	↓ ×35 cycle
68°C	3:00
12°C	∞

表 8 21KD、21del の変異挿入のため KOD-PCR で用いた Primer 配列

Primer name	5'→3'
21KD Forward	accgtggactacaggaatgtttatttctttacttagag <u>GTTgtaatgGTAgTGTC</u> aatcaacgctggcaacgTAGGGA TAACAGGGTAATCGATTT
21KD Reverse	gggcaagatcccgcacacggcggtgaccagegttgatt <u>GACcacTACcattacAAC</u> cctctaagtaaagcaataaGCCA GTGTTACAACCAATTAACC
21del Forward	gtcagcgactgacgacgactcgggagactacgcgccaatgTAGTTAGATAGTgatcgcttcgctccagagTAGGG ATAACAGGGTAATCGATTT
21del Reverse	ggcgaccacacaccctggggctctggaaggcgaagcgatc <u>ACTATCTAACTA</u> cattggcgcgtagtctcccGCCAG TGTTACAACCAATTAACC

変異挿入部位の塩基を大文字と下線で示した。またプライマー配列最後の大文字は Template に用いた pEp-KanS と重なる配列で示した。



#### 1-2-4-2. ゲル抽出

1-2-1-1.のアガロースゲルから紫外線下で目的のバンドを切り出した。切り出したゲルの重量を測定し、Gel/PCR Extraction kit を用いてゲル抽出を行い、MilliQ 滅菌水 30  $\mu$ L を用いて PCR 産物を溶出した。その後吸光度を測定した。

#### 1-2-4-3. 遺伝子導入及び Kan 耐性遺伝子導入確認

大腸菌 GS1783 BAC16 株に 1-2-3-2.より得た DNA を 2  $\mu$ L 加え、エレクトロポレーション法 (1.5 kV, predef 25  $\mu$ F, preset 200  $\Omega$ ) により導入した。エレクトロポレーション後大腸菌液を 30°C で 1.5 時間培養後、3000 rpm、4 分間遠心した。その後沈殿物を培養上清 100  $\mu$ L に溶かし、Cm、Kan 含有 LB 寒天培地にて薬物選択を行った。

#### 1-2-4-4. BAC mini preparation

1-2-4-3.で薬物選択した大腸菌を振盪培養器にて 30°C、一晚培養した。大腸菌培養液 10 mL を 6000 rpm、4 分間遠心した。その後 500  $\mu$ L の Solution I を加え、攪拌し大腸菌ペレットをほぐした。Solution I でほぐした菌液に 1000  $\mu$ L の Solution II を加え、ゆっくり転倒混和した後、750  $\mu$ L の Solution III を加え、液を均一にした。その後、50  $\mu$ L クロロホルムを加えて転倒混和し、15,000 rpm、3 分間、4°C で遠心してタンパク質を沈殿させた。上清にイソプロパノール 2500  $\mu$ L 加え 15,000 rpm、5 分間、4°C で遠心し DNA を沈殿させた後、70% エタノールで洗浄し DNA を乾燥させた。その後 100  $\mu$ g/mL RNase 含有 MilliQ 滅菌水に DNA 沈殿物を溶解させ 37°C で 30 分間もしくは 4°C で保存した。その後、室温に戻した PCI 150  $\mu$ L と DNA 溶液を同量ずつ混合し液を均一にした。2 分間静置したのち、15,000 rpm、2 分間、室温で遠心しタンパク質を沈殿させた。次に上清に 3M 酢酸ナトリウム、100% EtOH を 1:0.1:2.5 の割合で混合し、15,000 rpm、3 分間、4°C で遠心し DNA を沈殿させた。70% EtOH で洗浄し DNA を乾燥させ、MilliQ 滅菌水に DNA 沈殿物を溶解した。

<1 $\times$ TE>

10 mM Tris/HCl (pH 8.0)

1 mM EDTA

<Phenol/TE>

	用量
Phenol	等量
1 $\times$ TE	等量

#### <CIA>

	容量比
クロロホルム	49
イソアミルアルコール	1

#### <PCI (Phenol Chroloform/Isoamyl Alcohol)>

	用量
Phenol/TE	等量
CIA	等量

#### 1-2-4-5. 制限酵素処理及びアガロース電気泳動

1-2-4-4.で得た DNA 溶液とバッファー、制限酵素、MilliQ 滅菌水を以下の用量で混合した。37°Cで6時間程度反応させた。

##### <反応液の組成>

DNA	10	μL
10×制限酵素 Buffer	2.5	μL
制限酵素	0.5	μL
<u>MilliQ 滅菌水</u>	<u>12</u>	<u>μL</u>
Total	25	μL

制限酵素処理物と 10×loading buffer を混合し、0.8% アガロースゲルにより約 16 時間程度電気泳動し、Kan 耐性遺伝子の挿入を確認した。また、Kan 耐性遺伝子が挿入されたコロニーは 50% グリセロールと混合し -80°Cにて保存した。

#### 1-2-4-6. Kan 耐性遺伝子の除去

Kan 耐性遺伝子が挿入された大腸菌を Cm 含有 LB 液体培地により一晩振盪培養した後、新しい Cm 含有 LB 液体培地にて 200 rpm、2 時間~3 時間、30°Cで培養した。フィルター滅菌した L-alabinose を大腸菌培養液に終濃度 2% (w/v) となるよう添加し、200 rpm、30°Cで1時間培養し、大腸菌内の制限酵素 I-SceIを発現誘導した。その後、42°C、30分恒温槽内で培養し、大腸菌内の組換え酵素である Red Recombinaseを発現誘導した。200 rpm、30°Cで1~2時間培養した。プレーティングにあたり、コロニーを Cm 含有 LB 寒天培地と Kan、Cm 含有 LB 寒天培地に番号を付けて対応させるように播いた。薬剤選択した大腸菌を 1-2-4-D BAC mini preparation の手順により DNA を抽出した。大腸菌内の Kan 耐性配列が欠損していることを 1-2-4-5.の電気泳動と同様の手順により確認した。

#### 1-2-4-7. Go-Taq PCR

1-2-4-6.で Kan 耐性配列が欠損を確認した大腸菌の DNA の濃度を測定した。その後その DNA とともに Taq ポリメラーゼを用いて PCR をおこなった。1 サンプルあたりの組成と反応時間は以下に記載した。Go-Taq PCR でプライマー配列は表 9 に記載した。

##### <反応液の組成>

DNA	1	μg
5×Taq polymerase Buffer	5	μL
25 mM MgCl <sub>2</sub>	3	μL
10 μM Forward primer	1.25	μL
10 μM Reverse primer	1.25	μL
10 mM dNTP	0.5	μL
Taq Polymerase	0.125	μL
MilliQ 滅菌水	X	μL
Total	25	μL

##### <反応条件>

95°C	2:00
	↓
95°C	0:30
56°C	0:30
72°C	0:45
	↓×30 cycle
72°C	5:00
12°C	∞

その後 1-2-2-2.と同様の手順で、PCR による増幅をアガロース電気泳動により確認した。確認後、1-2-2-2.と同様の手順で予想サイズのバンドを切り出し、Gel extraction kit によりカラム精製し、PCR 産物を精製した。

表 9 Go-Taq PCR に用いたプライマー配列

Primer name	5'→3'
21KD-TaqPCR ForWard	GGCTTTGCCTTTAGTCCCAG
21KD-TaqPCR Reverse	CGCTGACGTCTGCCAAAATA
21del-TaqPCR Forward	TACATATACGACGTGCCAC
21del-TaqPCR Reverse	CTTTGCCTTTAGTCCCAGGG

#### 1-2-4-8. シーケンス解析

1-2-2-4 の手順で行った。プライマーは Taq PCR で用いたプライマーと同様。

#### 1-2-4-9. BACmid 抽出

NucleoBond Xtra のプロトコルに従い 8 時間、30°C で前培養した後、300 mL の液体 LB (終濃度 50 µg/mL Cm+) を、170 rpm、30°C、一晩培養を行った。その後付属のカラムにて精製を行い、精製した BACmid の濃度を測定した。

#### 1-2-5. 遺伝子改変 KSHV BAC16 定常保持細胞株の樹立

iVero 細胞、iSLK 細胞を一定数に揃えて播種し一晩培養した。その後、Chen-Okayama 法<sup>71</sup> (リン酸カルシウム法) により下記の組成に従い混合し、前節で抽出した KSHV BAC16 WT (野生型)、ORF21 リン酸化能欠損 KSHV BAC16、及び ORF21 分子欠損 KSHV BAC16 のトランスフェクションを行った。その後、35°C、3.5% CO<sub>2</sub> の環境下で一晩培養した細胞の培地を交換し、トランスフェクションより 3 日後に細胞選択のために puromycin (終濃度 2.5 µg/ml)、hygromycin B (10 µg/ml) 含有培地で培養した。その後 BAC16 内に保持している GFP の発現を蛍光顕微鏡 (Olympus IX71) で観察しトランスフェクションの成立を確認した。この GFP 発現により、BAC16 導入細胞株の樹立と見なした。

##### <DNA 溶液組成>

BACmid	36	µg
MilliQ 滅菌水	X	µL
2.5 M CaCl <sub>2</sub>	48	µL
<u>2×BBS (pH6.69)</u>	<u>480</u>	<u>µL</u>
Total	960	µL

##### <2×BBS>

50 mM BES

280 mM NaCl

1.5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

#### 1-2-6. 溶解感染誘導

Nishimura らの先行報告<sup>67</sup>に従い、8 µg/mL ドキシサイクリン (Dox) 及び 1.5 mM 酪酸ナトリウム (NaB) 及び 5% FBS 含有 DMEM で培養することにより溶解感染誘導した。

NaB は KSHV 非感染細胞ではヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤であるが、EBV 感染細胞や KSHV 感染細胞では溶解感染に移行させる溶解感染誘導剤であることが知られている<sup>3,72,73</sup>。そのため 12-O-テトラデカノイルホルボル 13-アセタート (12-O-Tetradecanoylphorbol 13-acetate:TPA) とともに HDAC 阻害剤は、溶解感染誘導剤として用いられている<sup>3,72</sup>。また Dox 1 µg/mL 単独添加 iSLK 細胞では、誘導後 2 日目において溶解感染誘

導された細胞の割合が 10% 程度、6 日目では 45~50%であった一方、Dox 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、NaB 0.9 mM (一般的に HDAC 阻害で用いられる NaB の濃度は 0.5~5 mM である<sup>74-77</sup>) の両方を添加した細胞において溶解感染に移行する細胞の割合が 2 日目では 75%、6 日目では 95%であった<sup>54</sup>。このことから、Dox、NaB を両方添加することで、iVero 細胞、iSLK 細胞を Dox 単独添加に比べて効果的に溶解感染誘導することが可能となる。

#### 1-2-7. ウイルス DNA 複製能測定

iVero-BAC 及び iSLK-BAC 細胞を  $2 \times 10^5$  cells/well となるように播種し一晩培養した。さらに細胞を 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Dox 及び 1.5 mM 酪酸ナトリウム (NaB) 処理 5% FBS 含有 DMEM 培地、未処理 (5% FBS 含有 DMEM のみ) の群にそれぞれ分けて 48 時間培養した。その後細胞を QIAamp Blood Mini kit (Qiagen) を用いてキットのプロトコルに従って回収し DNA 精製を行った。DNA 精製後 DNA 濃度測定を行った。その後、試薬は SYBR<sup>®</sup> Green Realtime PCR Master Mix、Real-time PCR 用サーマルサイクラーMiniOpticon (BioRad) を用い、ORF11 の DNA 量を基準とした絶対定量法により real-time PCR を行った。1 サンプルあたりの組成及び反応時間は以下に示す。尚、ネガティブコントロールとして DNA の代わりに MilliQ 滅菌水を加えた。また、ORF11 標準曲線用プラスミド (pGEMEasy-ORF11) を  $1 \times 10^3 \sim 10^8$  copies/ $\mu\text{L}$  の間の 5 点を検量線に用いた。qPCR に用いた ORF11 のプライマー配列は表 10 に記載した。

#### <反応液の組成>

Temp DNA	2	$\mu\text{L}$
MilliQ 滅菌水	6.8	$\mu\text{L}$
1 $\mu\text{M}$ Forward Primer	0.6	$\mu\text{L}$
1 $\mu\text{M}$ Reverse Primer	0.6	$\mu\text{L}$
<u>SYBR<sup>®</sup> Green Realtime PCR Master Mix</u>	<u>10</u>	<u><math>\mu\text{L}</math></u>
Total	20	$\mu\text{L}$

#### <反応条件>

95°C	1:00
95°C	0:15
60°C	1:00
	↓×40 cycles
60°C	→ 95°C

表 10 ウイルス DNA 量の定量に用いたプライマー配列

Primer name	5'→3'
ORF11-qPCR Forward	TTGACAACACGCACCGCAAG
ORF11-qPCR Reverse	AAAAATCAGCACGCTCGAGGAG

## 1-2-8. RT-qPCR

### 1-2-8-1. サンプル調製

iVero-BAC 及び iSLK-BAC 細胞を  $2 \times 10^5$  cells/well となるように播種し一晩培養した後に、8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Dox 及び 1.5 mM NaB 処理、未処理の群にそれぞれ分けて 48 時間培養した。

### 1-2-8-2. Total RNA 抽出と逆転写反応

RNA 抽出は phenol 含有 RNA 抽出試薬 RNAiso Plus を、逆転写反応による cDNA 合成には ReverTra Ace qPCR RT Kit を使用した。PBS で 1 回洗浄した細胞を RNAiso plus 500  $\mu\text{L}$  と クロロホルム 100  $\mu\text{L}$  に溶解し、15000 rpm、4°C、15 分間遠心した。回収した上清に 2-propanol 400  $\mu\text{L}$  を加え、転倒混和した後、さらに 15000 rpm、4°C、15 分間遠心した。得られた RNA ペレットを 70% エタノールで洗浄し、乾燥させた後 MilliQ 滅菌水に溶解し濃度を測定した。その後 RNA を一定量に揃えて、ReverTra Ace qPCR RT Kit を用いて逆転写反応を行った。組成、反応時間は以下に示す。

#### <反応液組成>

RNA	0.1 or 0.2 $\mu\text{g}$ 分
RT-PCR 試薬 mix	
5 $\times$ RT buffer	2 $\mu\text{L}$
Primer mix	0.5 $\mu\text{L}$
Enzyme mix	0.5 $\mu\text{L}$
MilliQ 滅菌水	X $\mu\text{L}$
Total	10 $\mu\text{L}$

#### <反応条件>

37°C	15:00
98°C	5:00
↓ 1 cycle	
10°C	$\infty$

尚、コントロールである RT(-) には逆転写反応の酵素が入った mix の代わりに MilliQ 滅菌水を加えた。

### 1-2-8-3. リアルタイム PCR

1-2-9-B. で得た RNA を 10 倍希釈し、GAPDH と各目的のプライマー (表 11 に記載)、SYBR<sup>®</sup> Green Realtime PCR Master Mix を用いて RT-qPCR を行い、 $\Delta\Delta\text{Ct}$  法により解析を行った。

<反応液組成>

cDNA	2	μL
MilliQ 滅菌水	6.8	μL
1 μM Forward Primer	0.6	μL
1 μM Reverse Primer	0.6	μL
SYBR® Green Realtime PCR Master Mix	10	μL
Total	20	μL

尚、ネガティブコントロールとして DNA の代わりに MilliQ 滅菌水を用いた。反応時間はウイルスゲノム複製量の解析と同様である。

表 11 RT-qPCR で用いたプライマー配列

Primer name	5'→3'
GAPDH-qPCR Forward	TCGCTCTCTGCTCCTCCTGTTC
GAPDH-qPCR Reverse	CGCCCAATACGACCAAATCC
ORF16-qPCR Forward	ACCAGCTTGGGTTGAGCATG
ORF16-qPCR Reverse	GGCTCGCCCCAGTTC
ORF59-qPCR Forward	GCCCACATCCACCGACTTC
ORF59-qPCR Reverse	AGCCAGAAACCAAACCCGTT
ORFK8.1-qPCR Forward	ACAGATTCGCACAGAAATCCCT
ORFK8.1-qPCR Reverse	CGAACGATACGTGGGACAATTG

1-2-9. ウイルス産生量測定

ウイルス産生量測定については当研究室の Nishimura らの報告<sup>67</sup>、Brulois らの報告<sup>55</sup>を参考に行った。iVero-BAC 及び iSLK-BAC 細胞を  $2 \times 10^5$  cells/well に揃えて播種し一晚培養した後に、溶解感染誘導し 48 時間培養を行った。その後培養上清を回収した。さらに培養上清を 3,000 rpm、5 分間遠心した。その後上清を以下の組成で混合し、37°C で DNaseI 処理し 40~45 分間反応させた。反応後 95°C、5 分間サンプルを処理した後、よく混合し 15,000 rpm、5 分間遠心した。遠心後の上清 200 μL を新しい 1.5 mL チューブに移した。移した上清は QIAGEN Blood Mini kit により精製した。その後培養上清を回収し QIAGEN Blood Mini kit による DNA 精製の後に、BACmid 中にコードされている KSHV ORF11 核酸配列を増幅標的とした絶対定量法により qPCR を行った。1 サンプルあたりの組成及び反応時間はウイルスゲノム複製量のプロトコルと同様である。

<DNase 処理反応液の組成>

Supernatant	200	μL
10×DNase Buffer	20	μL
DNase I	4	Units

#### 1-2-10. ウイルス感染能測定

iVero-BAC、iSLK-BAC 細胞を  $1 \times 10^6$  cells/well 播種し一晩培養した後に、溶解感染誘導し 96 時間培養を行った。その後遠心及びフィルター濾過を行った後に 16,000 rpm、3 時間の超遠心によりウイルス濃縮を行った。ウイルス産生量のプロトコルに従いウイルス数を一定に揃えた。その後 Polybrene を終濃度  $8 \mu\text{g/mL}$  になるようウイルス濃縮液に添加し、Vero 細胞及び HEK293T 細胞に感染させた。一晩感染させた後に培地を交換し感染 48 時間後に細胞を回収し FACS-Calibar (Becton Dickinson) を用いフローサイトメトリー法を行い GFP 発現細胞の測定を行った。解析は Cell Quest Pro software (Becton Dickinson) で行った。

#### 1-2-11. コンプリメントアッセイ

##### 1-2-11-1. ウイルス回収

iSLK-BAC 細胞を  $1 \times 10^6$  cells/well に揃えて播種し一晩培養した後に、pCI-neo-3×Flag、及び pCI-neo-3F21WT を Screenfect A plus のプロトコルに従い一過性発現させ  $8 \mu\text{g/mL}$  Dox、 $1.5 \text{ mM NaB}$   $5\% \text{ FBS DMEM}$  培地中で  $37^\circ\text{C}$ 、 $5.0\% \text{ CO}_2$  インキュベーター内で 96 時間培養を行った。その後細胞ごと回収し、 $15,000 \text{ rpm}$ 、10 分の遠心後、 $-80^\circ\text{C}$  で凍結もしくはそのまま実験に用いた。

##### 1-2-11-2. ウイルス感染

HEK293T 細胞とウイルス溶液を混合し、12 well もしくは 24 well プレートに播種しプレートごと  $3000 \times g$ 、2 時間遠心ののち、Polybrene を終濃度  $8 \mu\text{g/mL}$  になるよう添加し、 $37^\circ\text{C}$ 、 $5.0\% \text{ CO}_2$  インキュベーター内で 24 時間培養した。その後細胞を回収し FACS-Calibar を用いフローサイトメトリー法を行い GFP 発現細胞の測定を行った。解析は CellQuest Pro software で行った。

#### 1-2-12. 統計解析

Microsoft Excel<sup>®</sup>、並びに統合開発環境である RStudio 上で統計解析ソフトウェア R (ver 4.2.1)<sup>78</sup> を実行し、2 群間の比較は Welch's t test を行った。また多重比較では Holm 補正、Dunnnett の方法により有意水準を 0.05 に設定し解析を行った。グラフは算術平均値と標準誤差を示した。



### 1-3. 結果

#### 1-3-1. ORF21 キナーゼ機能欠失 KSHV (21KD-BAC16)と ORF21 分子欠損 KSHV (21del-BAC16)の作製

ウイルス複製における ORF21 の役割を明らかにするため、リン酸化機能欠失 ORF21 を発現する組替え KSHV、および ORF21 欠損組替え KSHV を作製した。これらを野生型 KSHV と比較することで、キナーゼとしての ORF21 が複製過程でどのような生理的意義を有するのか、また、ORF21 のキナーゼ以外の機能が重要な意味を持つのか解明を試みた。KSHV BAC16 を基に、ORF21 キナーゼ機能欠失 (kinase dead)-BAC16 (21KD-BAC16)、ORF21 分子欠損-BAC16 (21del-BAC16) の2種類の改変 BACmid の構築を行った (図 7)。

21KD-BAC16 作製に関しては、KSHV BAC16 (野生型) を鋳型に用い、先行報告<sup>45,46</sup>と同様に ORF21 遺伝子内のリン酸基結合部位である P-loop (Phospho-binding loop) 中<sup>57</sup>の3つの Gly (Gly260、Gly263、Gly265) コドンを Val コドンに置換した<sup>45,46</sup>。この ORF21 変異体 (G260V/G263V/G265V) はリン酸基を分子内に保持できないため、キナーゼとしての機能は失われると報告されている<sup>45,46</sup>。

21del-BAC 作製に関しては、ORF21 遺伝子コード領域は、ORF20 コード領域と一部重複している。よって、ORF20 に変異をもたらさずに、21del-BAC16 を構築するため、Met123 をコードする4番目 Met コドンの直後に、リーディングフレームをずらしたストップコドンが配置されている 3-stop codon sequence (5'-TAGT-TAGA-TAGT -3') を挿入することとした (図 7)。

Two-step red recombination での BAC 改変時には、標的配列に変異をもたらす Kan カセットが挿入された中間 BACmid の他 (図 7-(I))、Kan カセットが除去され標的配列に変異が導入されている目的 BACmid が生じる (図 7-(II))。21KD-BAC16 および 21del-BAC16 に関して、それぞれ精製した BACmid とあわせて KSHV BAC16 を制限酵素 Hind III により切断処理し、アガロース電気泳動でバンドパターンを比較観察した。これにより、Kan カセットの挿入・除去、あわせて組替え操作時に BACmid 自体に欠損が生じていないことを確認した (図 8)。さらに BACmid 上の変異導入領域に関しては、サンガー法による DNA シーケンスにより塩基置換 (21KD-BAC16) (図 9 a)、および塩基配列挿入 (21del-BAC16)を確認した (図 9b)。

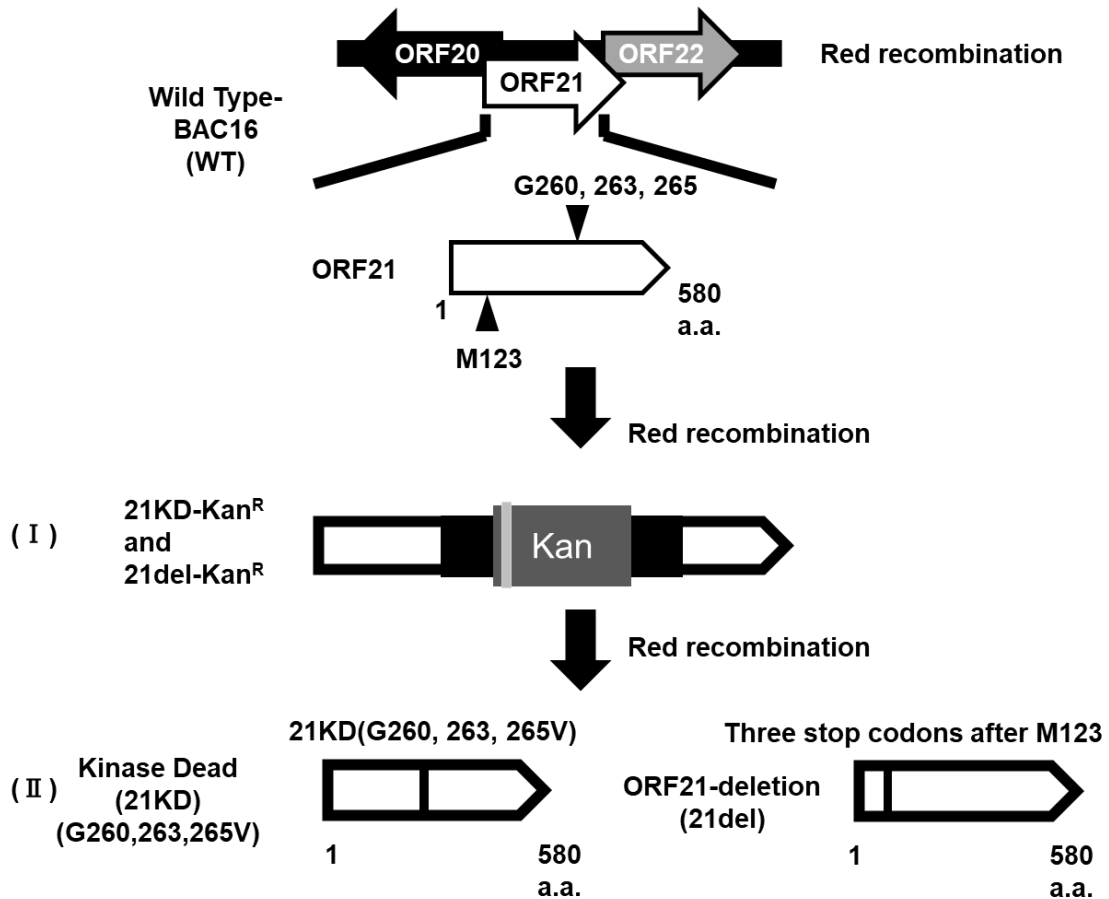
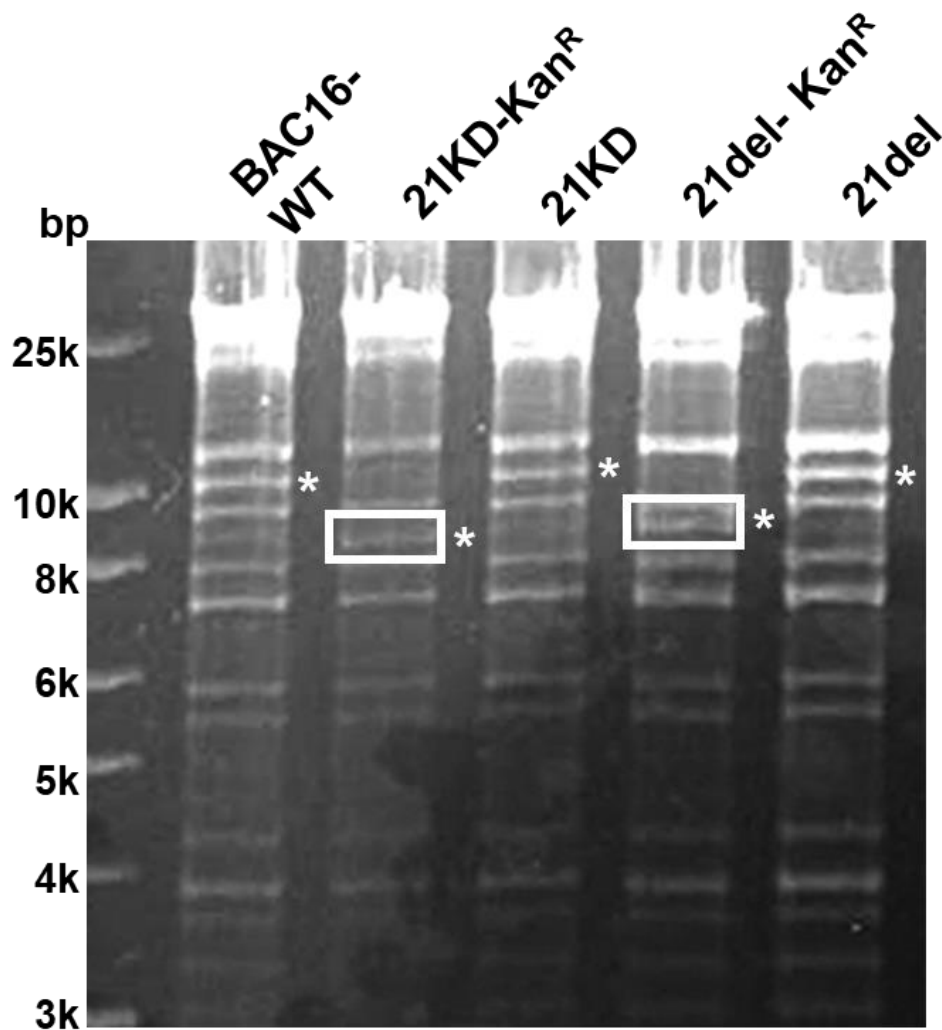


図 7 21KD-BAC16、及び 21del-BAC16 作製の概略図

Red Recombination 法により、Kan 耐性遺伝子 (Kan<sup>R</sup>)、ORF21 キナーゼ変異が導入された BAC16、21KD-Kan<sup>R</sup>-BAC16 を構築した (I)。その後、I-Sce I 処理、Red Recombination 法により Kan 耐性遺伝子を除去し、21KD-BAC16 を作製した (II)。キナーゼ活性を失活させるため、ORF21 遺伝子内のリン酸基結合部位である P-loop (Phospho-binding loop<sup>57</sup>) 中の 3 つの Gly (Gly260、Gly263、Gly265) コドンを Val コドンに置換した。この置換による ORF21 分子内の 3 つの Gly が Val に置換した変異 ORF21 (G260V/G263V/G265V) はリン酸基を分子内に保持できないため、キナーゼとしての機能は失われる<sup>45,46</sup>。

21del-BAC16 も同様に、Kan 耐性遺伝子、ORF21 ストップコドンが Met123 の直後に挿入された BAC16、21del-Kan<sup>R</sup>-BAC16 を構築後 (I)、Kan 耐性遺伝子を除去した 21del-BAC16 を作製した (II)。Yamaguchi T *et. al.*, *Int. J.Mol. Sci.* 2023 Fig.1a を改変。

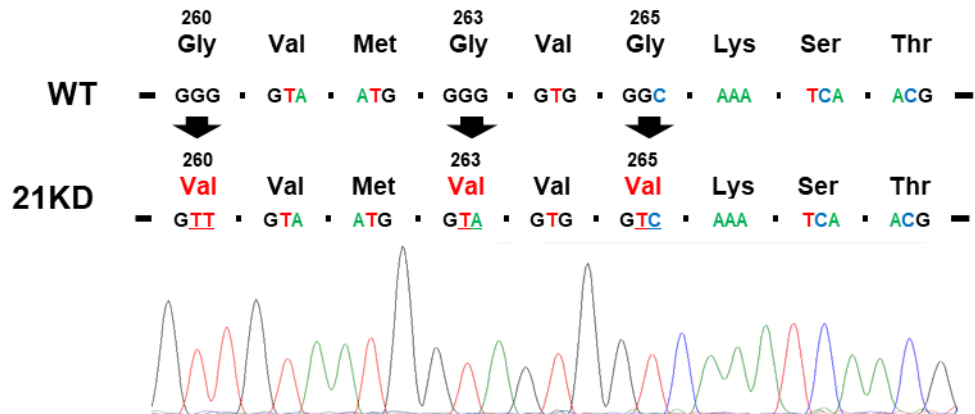


**\*:Kan耐性カセットの挿入と欠失**  
**白い四角：Kan配列の挿入**

図8 変異体のアガロースゲル電気泳動の結果

BAC16 クローンを Hind III で切断した。アスタリスク (\*) は各 BAC クローンにおける Kan 耐性カセットの挿入と欠失を示している。Kan 耐性遺伝子挿入により変動した部分を白い四角で示した。WT-BAC16、21KD、21del では 10 kbp 付近に存在している (\*) で示した DNA 断片が Kan 耐性遺伝子 (Kan<sup>R</sup>) 挿入により消失し、8 kbp 付近の白い四角で囲んだ部分にバンドが出現した (21KD-Kan<sup>R</sup>、21del-Kan<sup>R</sup>)。Yamaguchi T *et. al.*, *Int. J.Mol. Sci.* 2023 Fig.1b を改変。

(a)



(b)

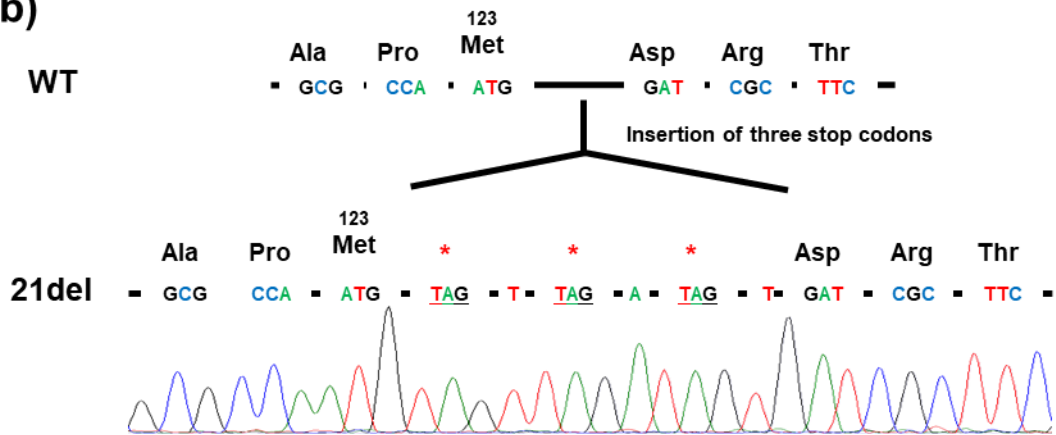


図 9 サンガーシーケンスによる 21KD-BAC16 および 21del-BAC16 変異挿入部位の確認  
(a, b) 21KD-BAC16 (a) と 21del-BAC16 (b) の変異箇所 DNA シーケンスの結果を示している。Yamaguchi T *et. al.*, *Int. J.Mol. Sci.* 2023 Fig.1c-d を改変。

### 1-3-2. KSHV BAC16 定常保持細胞株の樹立

前項 1-3-1 で構築した 21KD-BAC16、21del-BAC16 を iVero 細胞<sup>67,68</sup> および iSLK 細胞<sup>54</sup> にトランスフェクションし、Hygromycin による薬剤選択により、BAC 保持定常細胞株 iVero-21KD、iVero-21del、iSLK-21KD、iSLK-21del を樹立した。また野生型コントロールとして KSHV BAC16 を同様に iVero 細胞および iSLK 細胞へと導入し、薬剤選択することで iVero-WT、iSLK-WT を樹立した (図 1-6 b,c)。iVero および iSLK 細胞はそれぞれ Vero および SLK 細胞をもとに樹立された細胞株である。いずれも Tet-ON system により溶解感染誘導ウイルス性遺伝子である ORF50/K-Rta を発現誘導することができる。すなわち、ドキシサイクリン添加により KSHV 溶解感染を誘導できる細胞株群である。

これら iVero および iSLK 細胞内に環状二本鎖 DNA である KSHV BAC16 ならびに改変体を安定保持させることは、同じく環状二本鎖 DNA の形状をとる KSHV エピソームを保持した状態である潜伏感染状態とほぼ同様の状態となる。そのため、これら BAC 保持定常細胞株を用いることで、潜伏感染成立以降の KSHV 生活環を解析することが可能である。さらに遺伝子改変ウイルス粒子そのものも調製することが可能である。よって、今回樹立した細胞株におけるウイルス複製や産生されたウイルス粒子を比較することで、ORF21 のキナーゼとしてのリン酸化能や ORF21 分子全体のウイルス複製過程における役割を明らかにすることができる (図 10 b,c)。

定常細胞株の樹立は、KSHV BAC16 および改変体にコードされている GFP の発現により確認した (図 10a,b)。BACmid 上での GFP 遺伝子は EF-1a プロモータ支配下にあるため、細胞内に BAC が保持されている場合 GFP が定常的に発現し、導入または感染マーカーとして用いることができる。この結果、細胞に発現した GFP により iVero-WT、iVero-21KD、iVero-21del-BAC 定常保持細胞株、及び iSLK-BAC 定常保持細胞株の樹立を確認出来た (図 11 a,b)。21del-BAC16 また、21del-BAC16 保持細胞株群における ORF21 欠損を確認するため、それぞれの BAC 保持定常細胞株に対して、Dox を添加することで溶解感染誘導し、ORF21 発現の有無を W.B.法により確認した。その結果、KSHV BAC16 および 21KD-BAC16 保持定常細胞株群における ORF21 タンパク質発現を確認した。また、21del-BAC16 保持定常細胞株群における ORF21 の発現消失を確認した (図 11 a,b)。

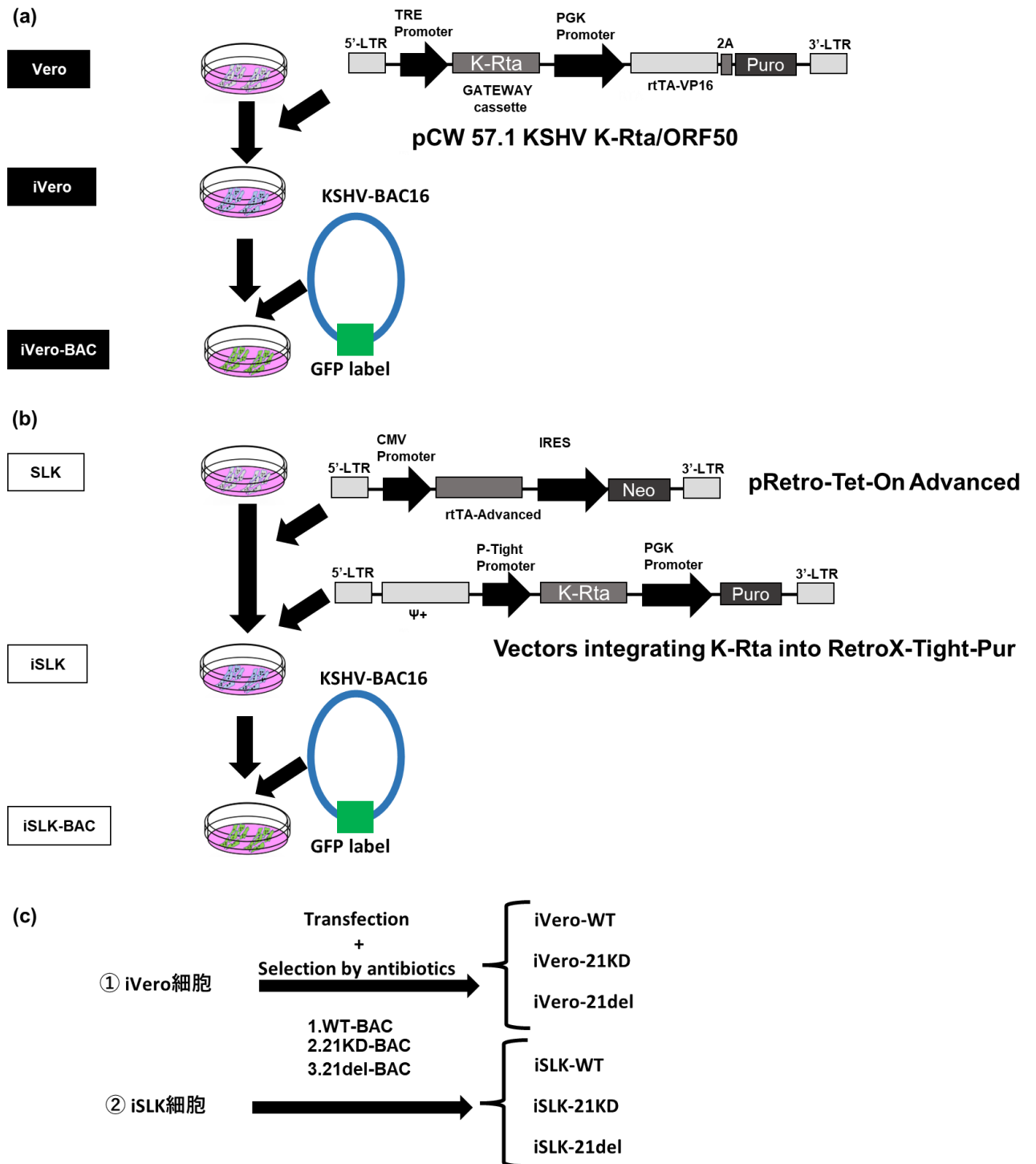


図 10 iVero-BAC 定常保持細胞株、iSLK-BAC 定常保持細胞株の樹立の概略図  
 (a-c) iVero 細胞と iSLK 細胞の樹立、及び BACmid 導入 (トランスフェクション) から iVero-BAC 定常保持細胞株と iSLK-BAC 定常保持細胞株の樹立までの流れを示した。(a) iVero 細胞と iVero-BAC 定常保持細胞の樹立。Vero 細胞に K-Rta と puromycin 耐性遺伝子をコードした pCW 57.1 KSHV K-Rta/ORF50 を導入し puromycin で薬剤選択した。その後 BAC を Chen-Okayama 法により導入し、Hygromycin により薬剤選択することで iVero-BAC 定常保持細胞株を得た。(b) iSLK 細胞と iSLK-BAC 定常保持細胞の樹立。SLK 細胞に K-Rta と puromycin

耐性遺伝子をコードした RetroX-Tight-Pur、テトラサイクリン活性化因子(rtTA)発現ベクターである pRetro-Tet-On Advanced を導入し、puromycin、G418 で薬剤選択した。さらに iVero-BAC 細胞と同様の手順で、BAC を導入し、Hygromycin により薬剤選択し、iSLK-BAC 定常保持細胞株を得た。(c)トランスフェクションした BAC の名称と樹立した iVero-BAC 定常保持細胞株及び iSLK-BAC 定常保持細胞株の名称。

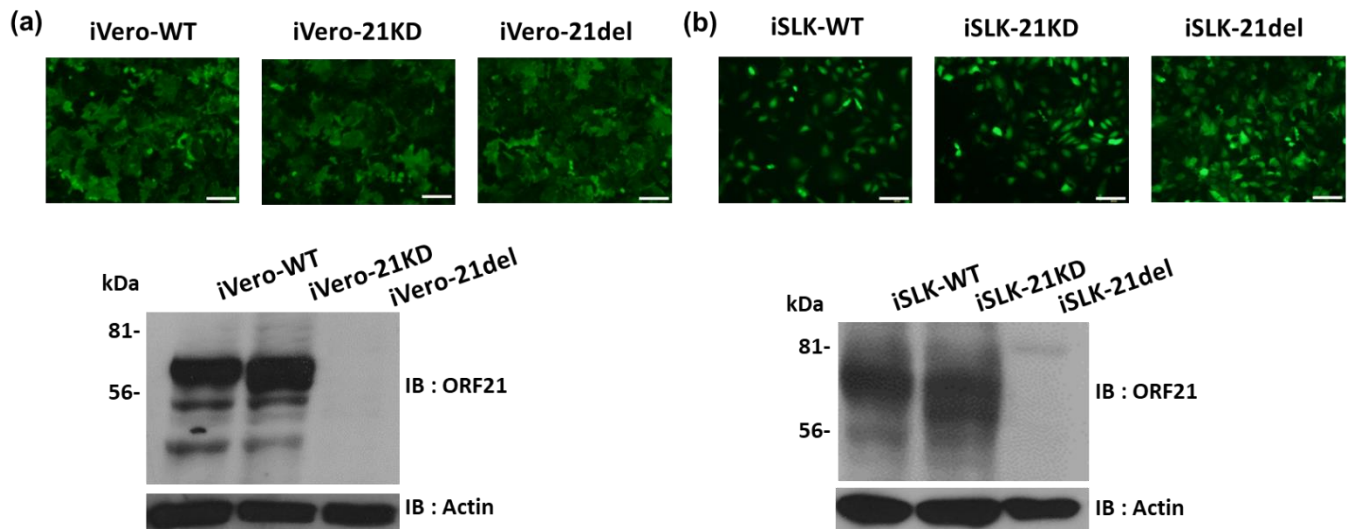


図 11 iVero-BAC 定常保持細胞株及び iSLK-BAC 定常保持細胞株の樹立

WT-BAC16、21KD-BAC16、21del-BAC16 をそれぞれ iVero、iSLK 細胞に安定的にトランスフェクションし薬剤選択することで、iVero-WT (or iSLK-WT)、iVero-21KD (or iSLK-21KD)、及び iVero-21del (or iSLK-21del)を樹立した。(a, b) 樹立した細胞内で保持された BAC16 にコードされる GFP 遺伝子由来の蛍光シグナル。その下には iVero-21del and iSLK-21del 細胞の溶解感染誘導後の ORF21 発現消失の W.B.のデータを示した。細胞は 1.5 mM NaB と 8  $\mu$ g/mL Dox 含有培地内で 48 時間処理した。ORF21 の発現は抗 ORF21 ポリクローナル抗体で検出した。(a) iVero-BAC 定常保持細胞株、(b) iSLK-BAC 定常保持細胞株。スケールバーは 50  $\mu$ m を表す。Yamaguchi T *et. al.*, *Int. J.Mol. Sci.* 2023 Fig.1e-h を改変。

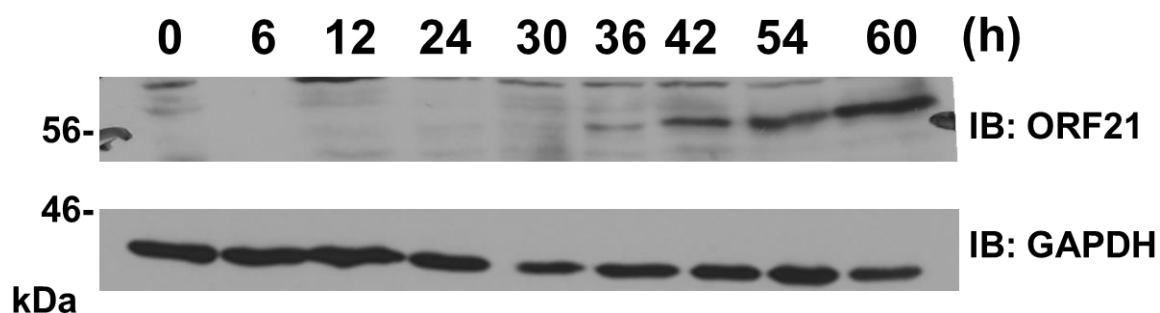


図 12 溶解感染誘導した iSLK-WT 細胞における KSHV ORF21 の発現

iSLK-WT 細胞株を 1.5 mM NaB と 8  $\mu$ g/mL Dox 処理により溶解感染誘導した。溶解感染誘導後 0~60 時間後の BAC 由来の ORF21 タンパク質の発現を、W.B 法により抗 ORF21 ポリクローナル抗体を用いて解析した。Yamaguchi T *et. al.*, *Int. J.Mol. Sci.* 2023 Fig.2a を改変

1-3-3. KSHV ORF21 は溶解感染開始後 30~36 時間で発現した。

ORF21 mRNA の発現時期はマイクロアレイ解析や RNA-seq などの解析により発現時期が推定されている<sup>79-82</sup>。ORF21 は KSHV 感染 B 細胞株である BC-3 細胞を用いた Jenner<sup>79</sup>らの報告では Primary lytic gene、Secondary lytic gene、Tertiary lytic gene の Tertiary lytic gene (溶解感染移行後 48-72 時間) に、iSLK-219 細胞を用いた Arias<sup>81</sup>らの論文では Late gene (溶解感染移行後 48-72 時間) と分類されている。一方で末梢血単核細胞 (PBMC) を用いた Jha ら<sup>82</sup>は ORF21 を Early gene と定義しており、2023 年現在発現時期についてはコンセンサスが得られていない。また、本実験系条件下での発現誘導時期は不明である。そこで、前項 1-3-2 で樹立した BAC 保持定常細胞株における ORF21 タンパク質の発現誘導時期を解析した。iVero-WT 細胞を Dox、NaB 添加により溶解感染誘導し、誘導 0-60 時間後の細胞を回収した。細胞内 ORF21 のタンパク質発現誘導時期について、抗 ORF21 ポリクローナル抗体を用いた W.B. 法により解析した。その結果、溶解感染誘導後 36 時間以降に ORF21 が発現することが確認された (図 12)。テトラサイクリン誘導タンパク質は、Dox 添加直後より発現して時間依存的に増加し<sup>83</sup>、誘導された K-Rta が ORF21 の転写を誘導したと考えられる

1-3-4. KSHV ORF21 はウイルス DNA 複製に寄与しない

KSHV 複製において ORF21 が関与するウイルス複製過程 (ウイルスゲノム複製、mRNA 発現、ウイルス産生) を同定するために、1-3-2. で樹立した各種定常細胞株群を用いて、ORF21 リン酸化能欠失および ORF21 分子欠損がウイルスゲノム複製に及ぼす影響を解析した。iVero-WT、iVero-21KD、および iVero-21del 細胞株を、Dox ならびに NaB 添加により溶解感染誘導し、48 時間後に細胞を回収した。回収した細胞から宿主およびウイルス DNA ゲノムを抽出し、細胞内ウイルスゲノム量を qPCR で定量した。その結果、iVero-21KD、iVero-21del 細胞の細胞内ウイルスゲノム量は iVero-WT 細胞株と比較して差異は認められなかった (図 13 a)。次に、KSHV BAC16 および改変 BAC を保持する iSLK 定常細胞株群につい



て同様に評価したところ、iVero 定常細胞株群と同様の結果が得られた (図 13 b)。以上より、ORF21 リン酸化能および ORF21 分子そのものは、ウイルス DNA 複製過程に寄与していないことが示唆された。

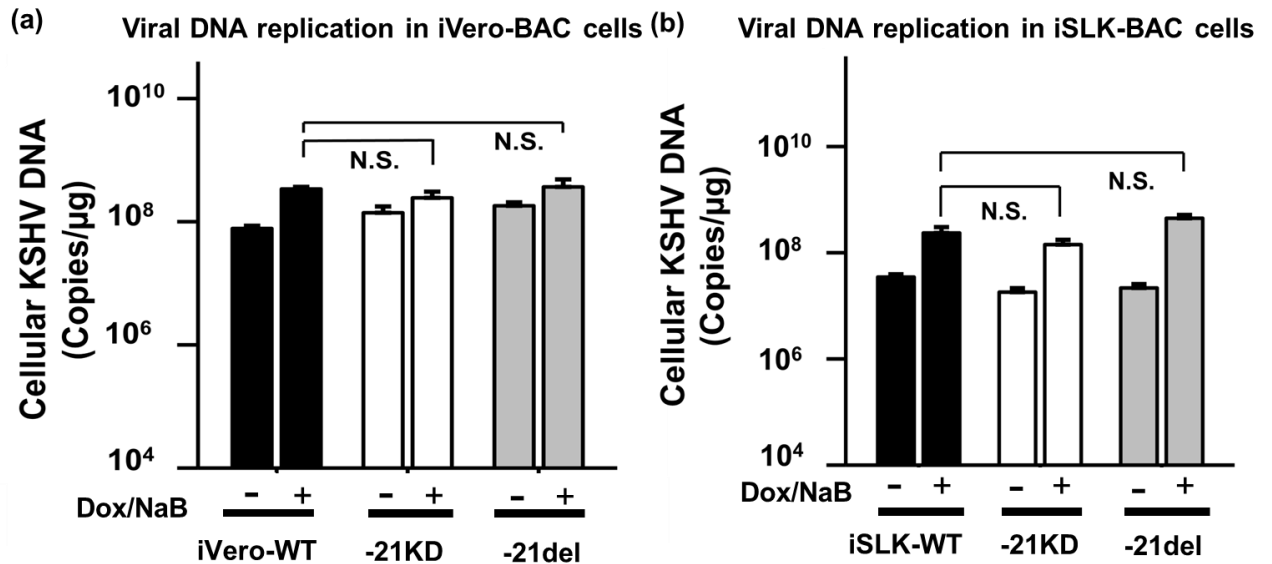


図 13 ウイルスゲノム複製における ORF21 分子及び ORF21 キナーゼ活性の効果

iVero-WT、iVero-21KD、iVero-21del、および、iSLK-WT、iSLK-21KD、iSLK-21del 細胞株を Dox、NaB により溶解感染誘導し、48 時間処理した。その後細胞中のウイルス DNA と細胞ゲノム DNA を精製し、ウイルス DNA を ORF11 プライマーを用い絶対定量法により測定した。N.S., not significant. Yamaguchi T *et. al.*, *Int. J.Mol. Sci.* 2023 Fig.3a-b を改変

### 1-3-5. KSHV ORF21 はウイルス mRNA 発現に寄与しない

ORF21 が関与するウイルス mRNA 発現を解析するために、ORF21 リン酸化能欠失および ORF21 分子欠損が KSHV 溶解遺伝子の mRNA 発現に及ぼす影響を解析した。溶解感染誘導下、iVero 定常細胞または iSLK-定常発現細胞における各種ウイルス遺伝子 mRNA 発現量を評価した。各細胞株を、Dox ならびに NaB 添加により溶解感染誘導し、48 時間後に細胞を回収した。回収した細胞から RNA を抽出し、各発現段階の溶解感染遺伝子 mRNA を RT-qPCR で評価した。評価した溶解感染遺伝子は、前初期遺伝子 (Immediate Early gene) として ORF16 (図 14 a,b)、初期遺伝子 (Early gene) として ORF59 (図 14 c,d)、後期遺伝子 (Late gene) として K8.1 (図 14 e,f) であった。

この結果、ORF21 リン酸化能欠失および ORF21 分子欠損 BAC 保持定常細胞株のいずれにおいても、野生型 KSHV BAC 保持定常細胞株の間で溶解感染遺伝子 mRNA 発現量の変化は認められなかった。iVero (図 14 a、c、e)、iSLK (図 14 b、d、f) いずれの細胞株においても、同様であった。これらのことから ORF21 リン酸化能および ORF21 分子全体のいずれも、溶解感染遺伝子発現調節に寄与していないことが示唆された。

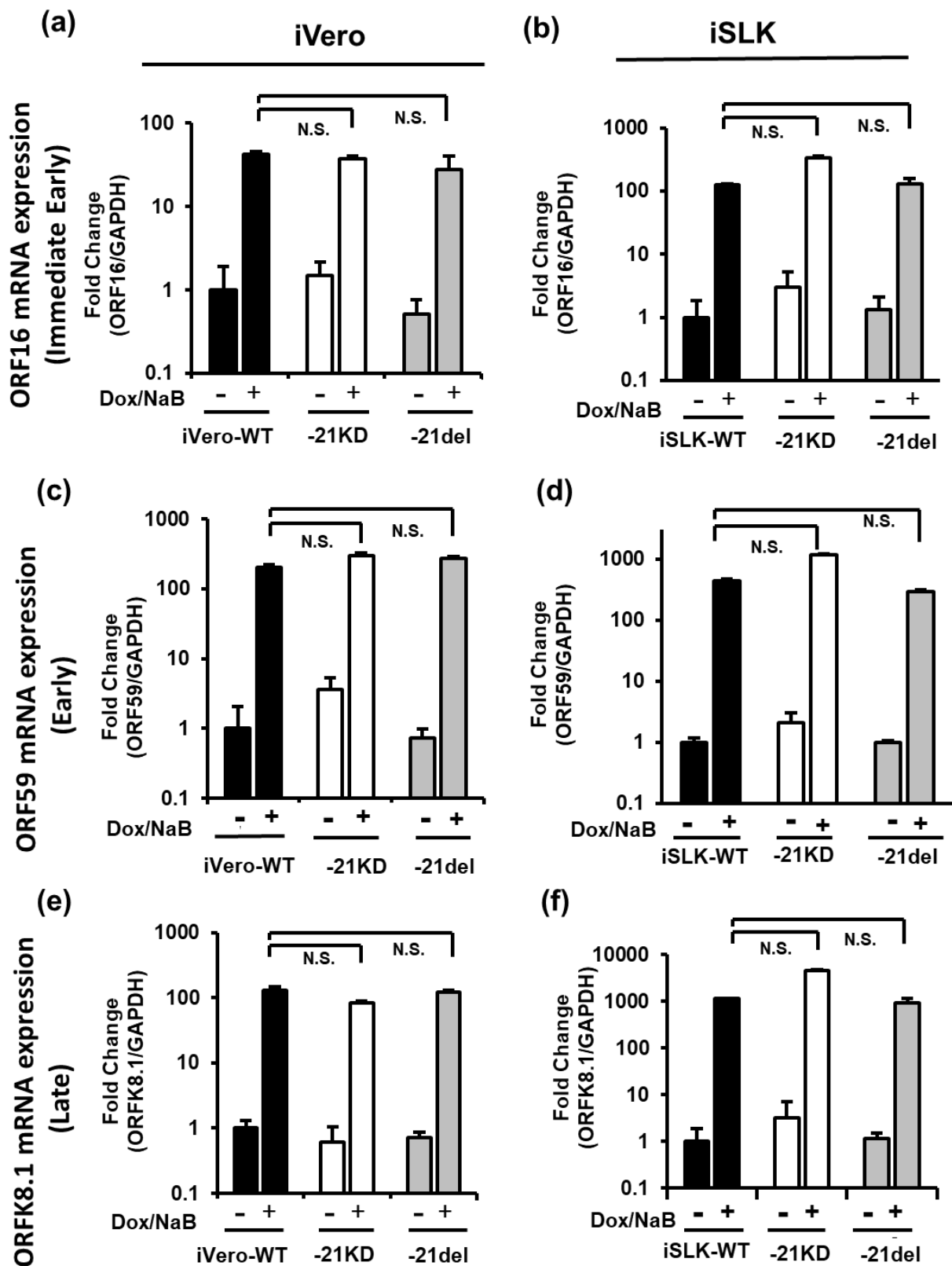


図 14 溶解感染遺伝子の転写における ORF21 分子と ORF21 キナーゼ活性の効果

iVero-WT、iVero-21KD、iVero-21del、および iSLK-WT、iSLK-21KD、iSLK-21del 細胞株

を Dox、NaB により溶解感染誘導し、48 時間処理した。培養細胞中のウイルス RNA を含んだ細胞性 total RNA を精製し、RT-qPCR 法により immediate-early gene: ORF16 (vBcl-2) (a,b)、early gene: ORF59 (DNA processivity factor) (c,d)、late gene: K8.1 (glycoprotein) (e,f) の mRNA 量を定量した。iVero-BAC 定常発現細胞株は左 (a,c,e)、iSLK-BAC 定常発現細胞株は右 (b,d,f) に示している。N.S., not significant. Yamaguchi T *et. al.*, *Int. J.Mol. Sci.* 2023 Fig.3c-h を改変

### 1-3-6. KSHV ORF21 はウイルス産生に寄与しない

ORF21 リン酸化能欠失および ORF21 分子欠損が KSHV ウイルス産生に及ぼす影響を解析した。溶解感染誘導下での各種 iVero 定常細胞株群または iSLK-定常発現細胞株群から培地中に放出されたウイルス粒子 (正確にはカプシド内包ウイルスゲノム) のコピー数を定量した。各細胞を Dox ならびに NaB 添加により溶解感染誘導し 48 時間後に培養上清を回収した。培養上清を DNase 処理にて培地中の DNA を消化後、DNase 処理培養上清からカプシド内包ウイルス DNA ゲノムを精製し、qPCR によりウイルス DNA 量を定量した。この結果、ORF21 リン酸化能欠失および ORF21 分子欠損 BAC 保持定常細胞株のいずれにおいても、野生型 KSHV BAC 保持定常細胞株との差異は認められなかった。iVero (図 15 a)、及び iSLK (図 15 b) のいずれの細胞株群においても、同様であった。

iVero-21KD、iSLK-21KD 細胞株の結果は、ORF21 のキナーゼ活性がウイルス産生に影響をおよぼさないことを示唆しており、これは Beauclair らの結果と一致している<sup>46</sup>。また ORF21 分子そのものもウイルス産生過程に影響しないことが示唆された。

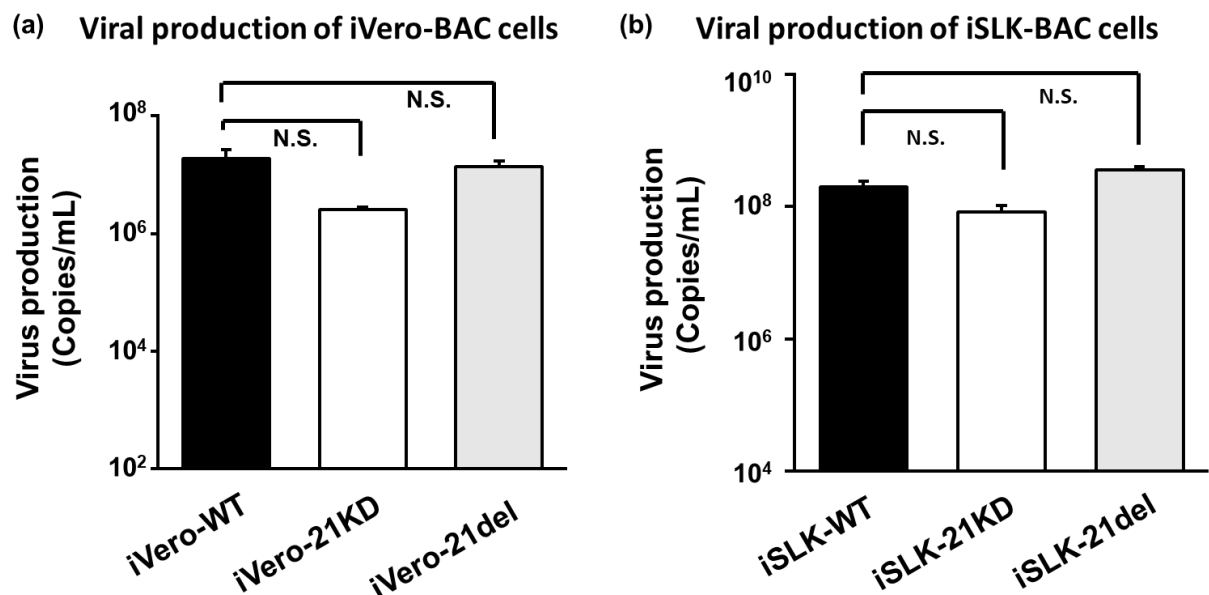


図 15 カプシド内ウイルス産生における ORF21 の影響

(a) 組換え BAC16 を有する iVero 細胞 (iVero-WT, iVero-21KD, iVero-21del) または (b) iSLK 細胞 (iSLK-WT, iSLK-21KD, iSLK-21del) を Dox、NaB を含む培地で 48 時間培養した後、培養上清を採取した。培養上清を回収した。KSHV ゲノムは、培養上清中の KSHV ゲノムを

封入したカプシドから精製した。精製したウイルス DNA 量を qPCR で定量した。N.S., not significant. Yamaguchi T *et. al.*, *Int. J.Mol. Sci.* 2023 Fig.4 を改変

#### 1-3-7. KSHV ORF21 はウイルス感染に必要である

ORF21 はウイルス複製過程 (ウイルスゲノム複製、mRNA 発現、ウイルス産生) には関与しなかったため、産生された子孫ウイルスの感染性を解析した。つまり、1-3-2.で樹立した各種定常細胞株群を用いて、ORF21 リン酸化能欠失および ORF21 分子欠損が KSHV ウイルス粒子新規感染能に及ぼす影響について調べた。溶解感染誘導により各種 iVero 定常細胞株群または iSLK-定常発現細胞株群から放出された子孫ウイルスを回収し、同等のウイルス粒子数を Vero または HEK293T 細胞に新規感染させたのちに、KSHV 感染陽性細胞率を比較した。

iVero-WT、iVero-21KD、iVero-21del、および iSLK-WT、iSLK-21KD、iSLK-21del 細胞株を、Dox ならびに NaB 添加により溶解感染誘導し、96 時間後に培養上清を回収・濃縮し、溶液中のカプシド内包ウイルス数を一定数に揃え、Vero 細胞および HEK293T 細胞に感染させた。感染 48 時間後に、感染細胞 (GFP 陽性) 率をフローサイトメトリー法により測定した。この結果、iVero 細胞株由来の子孫ウイルスについては、Vero 細胞ならびに HEK293T 細胞において野生型 KSHV (WT-KSHV)、21KD-BAC16 由来子孫ウイルス(21KD-KSHV)と比較した場合、21del-BAC16 由来子孫ウイルス(21del-KSHV)での有意な感染性低下が観察された (図 16 a-c)。同様に、iSLK 細胞株由来の子孫ウイルスでは、Vero 細胞において 21del-KSHV の感染性が有意に低下した (図 17 a-c)。ORF21 分子欠損により産生されたウイルスの感染能の低下が一連の実験から示唆された。また、ORF21 リン酸化能欠失ウイルスが野生型と比べて感染性が変化しないという結果については、Beaclair らによる報告と符合するものであった<sup>46</sup>。

ORF21 分子欠損によりウイルス新規感染能が低下するという実験結果を検証し補強するべく、さらに異なるアプローチにて解析を進めた。つまり、iSLK-21del 細胞株に野生型 ORF21 発現プラスミドを一過性導入し補完することで、子孫ウイルスの新規感染能が回復するか否か検討した。iSLK-WT および iSLK-21del 細胞株に、空プラスミドまたは FLAG タグ付加野生型 ORF21 発現プラスミドを一過性導入するとともに、Dox ならびに NaB 添加により溶解感染誘導し、96 時間後に培養上清を回収・濃縮し、293T 細胞に感染させた。感染 24 時間後に、感染細胞 (GFP 陽性) 率をフローサイトメトリー法により測定した。その結果、iSLK-21del/空プラスミド導入細胞株から得られた子孫ウイルスと比較し、iSLK-21del/ FLAG タグ付加野生型 ORF21 発現プラスミド導入細胞株から得られた子孫ウイルスではウイルス感染能が上昇し、iSLK-WT/空プラスミド導入細胞株から得られた子孫ウイルスとほぼ同等にまで回復していた (図 18)。以上のことから、21del-KSHV 細胞から産生された子孫ウイルスの感染性低下は ORF21 欠損によることに起因することが強く示唆された。これらのことから KSHV の新規感染能は、ORF21 分子そのものの発現に依存することが考えられた。

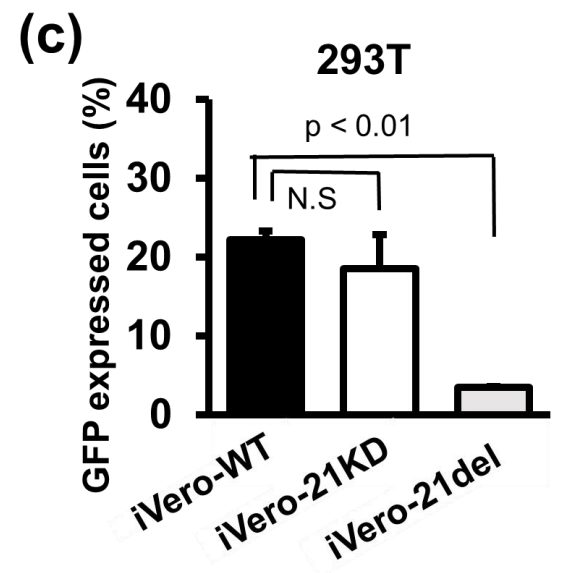
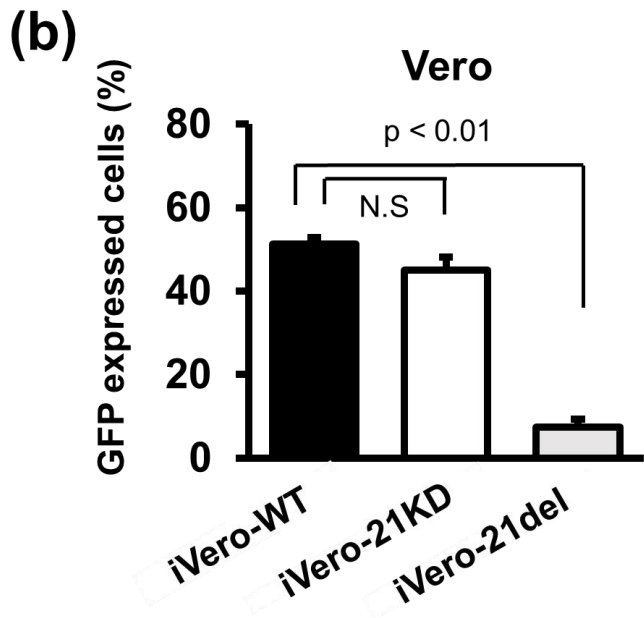
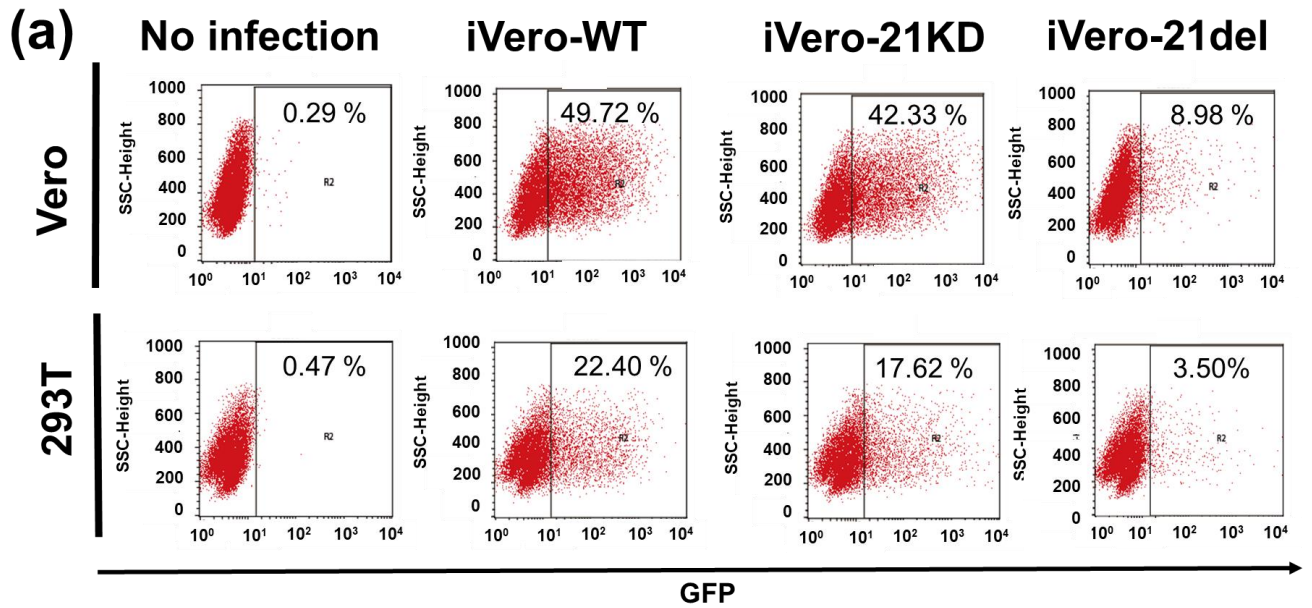


図 16 iVero 細胞における子孫ウイルスの新規感染能

iVero-遺伝子組換え BAC16 定常保持細胞株 (iVero-WT、iVero-21KD、iVero-21del)を用い、Dox ならびに NaB 処理を 96 時間行い溶解感染による子孫ウイルス産生を誘導した。培養上清を回収しウイルス粒子を超速心法により濃縮した後、ウイルス粒子数をそろえて、Vero 細胞または 293T 細胞に感染させた。感染 48 時間後の GFP 陽性細胞数をフローサイトメトリー法により測定し、この GFP 陽性細胞数を感染細胞数とみなした。フローサイトメトリーの結果 (a) を Vero 細胞 (b)、293T 細胞 (c) としてグラフ化した。N.S., not significant.  $p < 0.01$  は iVero-WT と比較した統計学的に有意差があることを示している。Yamaguchi T *et. al.*, *Int. J.Mol. Sci.* 2023 Fig.5a-c を改変

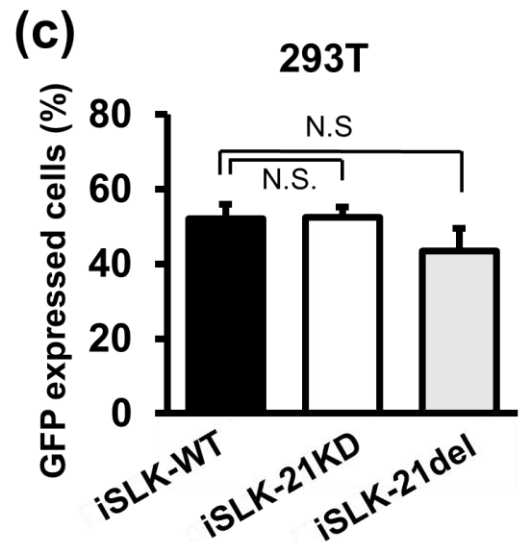
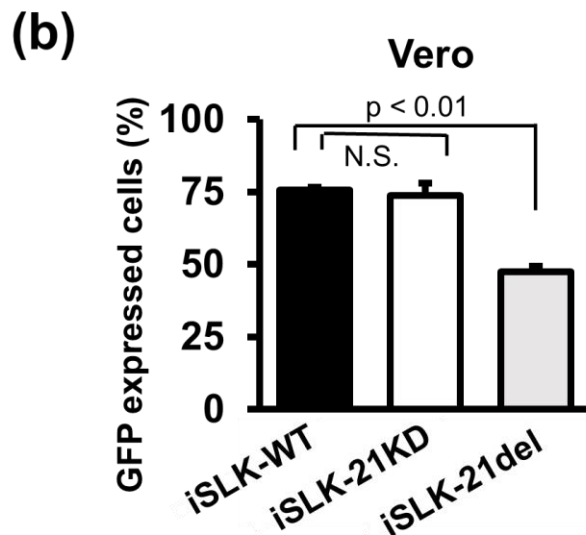
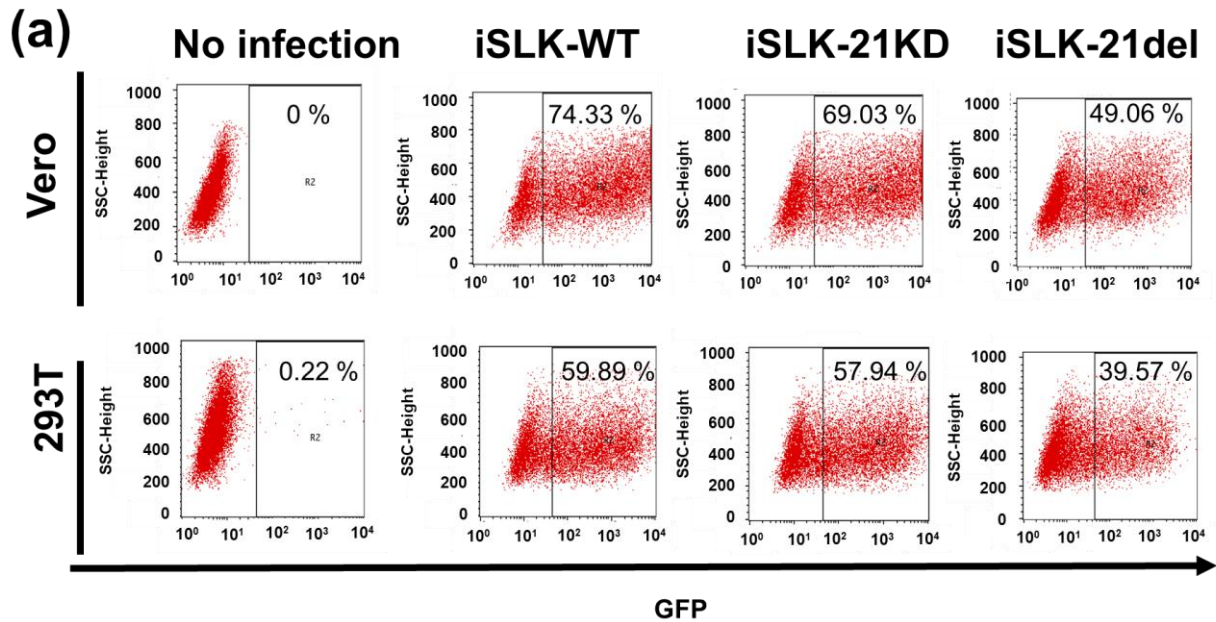


図 17 iSLK 細胞における子孫ウイルスの新規感染能

iSLK-遺伝子組換え BAC16 定常保持細胞株 (iSLK-WT, iSLK-21KD, and iSLK-21del) を用い、Dox ならびに NaB 処理を 96 時間行い溶解感染による子孫ウイルス産生を誘導した。培養上清を回収しウイルス粒子を超遠心法により濃縮した後、ウイルス粒子数をそろえて Vero 細胞 または 293T 細胞に感染させた。感染 48 時間後の GFP 陽性細胞数をフローサイトメトリー法により測定し、この GFP 陽性細胞数を感染細胞数とみなした。フローサイトメトリーの結果 (a) を Vero 細胞 (b)、293T 細胞 (c) としてグラフ化した。N.S., not significant.  $p < 0.01$  は iSLK-WT と比較した統計学的に有意差があることを示している。Yamaguchi T *et. al.*, *Int. J.Mol. Sci.* 2023 Fig.5d-f を改変

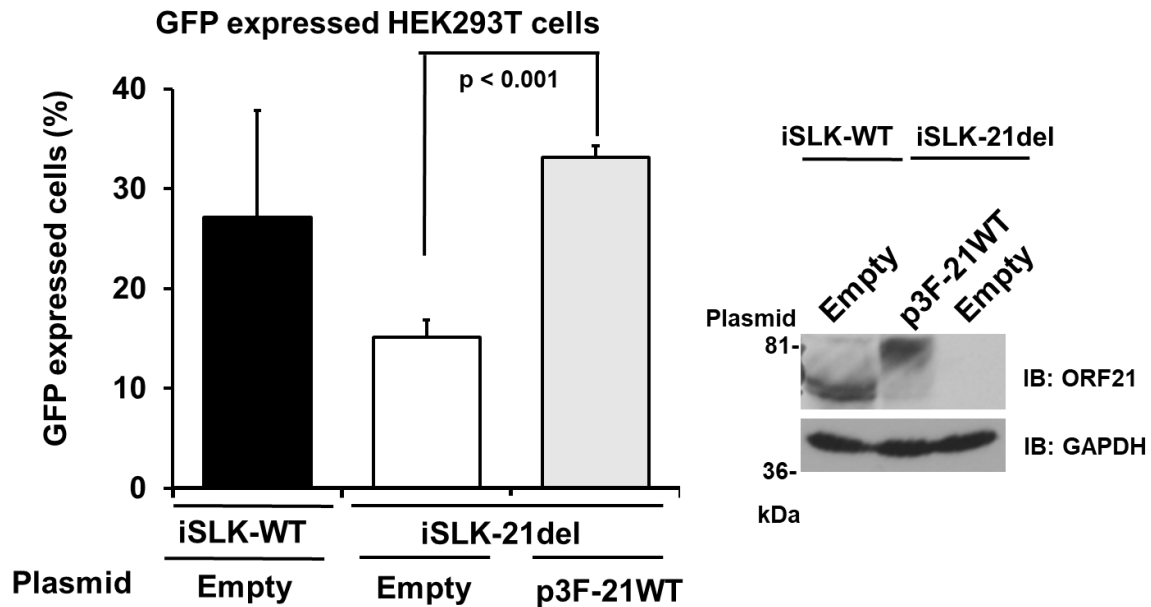


図 18 iSLK-21del 細胞における ORF21 過剰発現による  
感染性ウイルス粒子の新規感染効率回復の解析

iSLK-21del 細胞に 3×Flag-ORF21 野生型 (p3F-21WT) プラスミドを一過性に導入し、Dox および NaB で 96 時間処理して組換え KSHV を産生した。遠心した培養上清を HEK293T 細胞と混合しプレート上で遠心しながら吸着・感染させた。さらに、外来 ORF21 発現による子孫ウイルスの感染性の回復について解析した。感染細胞 (GFP 陽性細胞) をフローサイトメーターで解析し、組換えウイルスの感染力を棒グラフで示した。 $p < 0.001$  は、空プラスミド導入細胞と比較して統計学的に有意な差があることを示す。BAC 由来のまたは過剰発現の ORF21 の発現は、抗 ORF21 ポリクローナル抗体を用いた W.B.法により解析した。  
Yamaguchi T *et. al.*, *Int. J.Mol. Sci.* 2023 Fig.6 を改変

#### 1-4. 考察

本章では、野生型 KSHV 全長ゲノムを含んだ BAC クローンである KSHV BAC16 をもとに ORF21 リン酸化能を欠失させた 21KD-BAC16、ORF21 コーディング領域を欠損させた 21del-BAC16 の 2 種類の遺伝子改変 KSHV BACmid を構築した。これらを KSHV 産生に特化した細胞株 (iVero や iSLK) に導入することで、KSHV BAC 定常保持細胞株を樹立した。さらにこれらの細胞株を用いて、ウイルス生活環の各過程であるウイルスゲノム複製、mRNA 発現、ウイルス産生、子孫ウイルス新規感染能における ORF21 の寄与について評価した。その結果、メカニズムは不明であるものの ORF21 分子そのものが子孫ウイルスの新規感染能にとって重要であることが明らかとなった。

HSV-1 UL23 と異なり、KSHV ORF21 のチミジンキナーゼとしてのヌクレオシドリン酸化活性は極めて低いことが既に報告されている<sup>37,38</sup>。さらに、KSHV ORF21 はウイルスゲノム複製やウイルス産生に寄与しないことが、我々の結果より示された。このことは Gustafson らや、Beauclair らによる先行研究で示されている知見と合致し<sup>37,38,46</sup>、さらには EBV のオーソログである BXL1 のノックアウトウイルス解析により報告されている知見にも一致していた<sup>84</sup>。また KSHV と同じ  $\gamma$ -ヘルペスウイルス亜科 *Rhadinoviridae* 属に分類される Murine gammaherpesvirus (MHV-68) の ORF21 オーソログタンパク質に関する先行研究において、ORF21 分子欠損 MHV-68 感染細胞株では *in vitro* において野生型および復帰型のウイルスと比べて遜色なく複製・産生されているものの、感染性ウイルス量が低下していることが報告されている<sup>59-61</sup>。さらに ORF21 分子欠損 MHV-68 と野生型 MHV-68 をそれぞれマウスに感染させた場合、ORF21 分子欠損 MHV-68 感染マウスでは、ウイルスが標的組織には到達するものの、感染領域が縮小していたことが報告されている<sup>61</sup>。これらの知見と本章の結果をふまえると、KSHV ORF21 はウイルス粒子の感染性増強に寄与していることが考えられる。



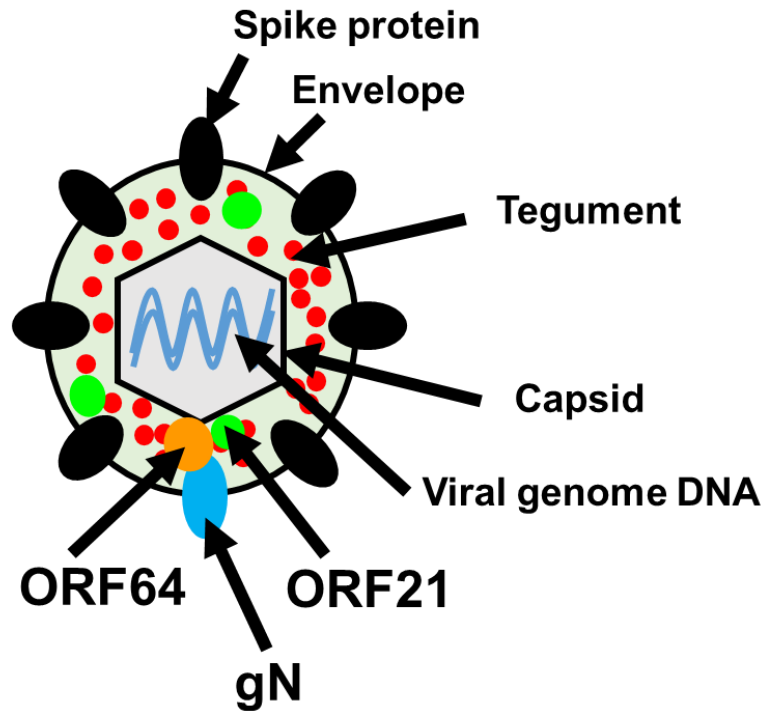


図 19 テグメントタンパク質 ORF21 のウイルス内局在と相互作用因子 (詳細は本文を参照)

KSHV ORF21 はウイルスカプシドとウイルスエンベロープの中間に存在するテグメントタンパク質であることが知られている (図 19)<sup>85</sup>。さらにプロテオーム解析の結果から、ORF21 は感染性ウイルス粒子内に存在すると報告されている<sup>85-87</sup>。しかし、感染性ウイルス粒子中の ORF21 が新規感染においてどのような機能を担っているのかは不明である。ORF21 は、他のテグメントタンパク質である KSHV ORF64 やスパイクタンパク質である KSHV gN (glycoprotein N) と複合体を形成することも報告されている。ORF21 を介したこれら分子との相互作用がこれらのウイルスタンパク質の機能に変化をもたらすのか、加えてその変化がウイルス粒子の吸着や侵入過程にどのような影響を与えうるのかについては、さらなる検証が必要である。一方で、ヘルペスウイルスのテグメントタンパク質やウイルス粒子形成時にとりこまれた宿主由来タンパク質や miRNA などが新規感染細胞中で放出され機能発現することで、感染成立しやすい細胞内環境を構築している可能性も示唆されている。そこで次章において、この可能性について解析した。

#### 1-5. 小括

本章では、ORF21 遺伝子に変異を導入した KSHV-BAC16、すなわち 21KD-BAC16、21del-BAC16 を作製した。NaB や Dox 処理により溶解感染誘導が可能な iVero、iSLK 細胞株にそれぞれ BAC を導入し BAC 定常保持細胞株を樹立した。その BAC 定常保持細胞株を用いて、ウイルスゲノム複製、mRNA 発現、ウイルス産生、子孫ウイルスの新規感染性を解析した。その結果、ORF21 のキナーゼ機能以外の ORF21 分子依存的機能が子孫ウイルスの新規感染に必要であることが示された。

## 第2章 ORF21 分子は MEK シグナルの活性化に關与する

### 2-1. 緒言

第 1 章では ORF21 のウイルスの生活環に与える影響に着目し解析した。その結果 ORF21 がウイルスの感染性を亢進していることが示唆された。そこで、ウイルス新規感染亢進との関連を明らかにするため、第 2 章では ORF21 が細胞形態やシグナル伝達など宿主細胞に与える影響について解析した。

現在までに明らかにされている KSHV 感染時での細胞内シグナル伝達と KSHV の相互作用について述べる。KSHV は新規感染時に、PI3K (Phosphatidyl Inositol-3 Kinase)、MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase)、Rho、NF- $\kappa$ B (Nuclear Factor- $\kappa$ B) など様々なシグナル伝達を亢進、または抑制し、新規感染を成立させる<sup>3,27,29,30</sup> (図 20)。初感染後に移行する潜伏感染状態では、KSHV 因子が Wnt や p53 経路と相互作用して持続感染の維持や発がんを誘導する<sup>3,88</sup>。さらに潜伏感染状態から溶解感染への移行時には、KSHV のウイルス性因子は PI3K、MAPK、NF- $\kappa$ B、Hippo シグナルと相互作用し、効率的なウイルス複製や溶解感染移行を達成する (図 20)<sup>3</sup>。

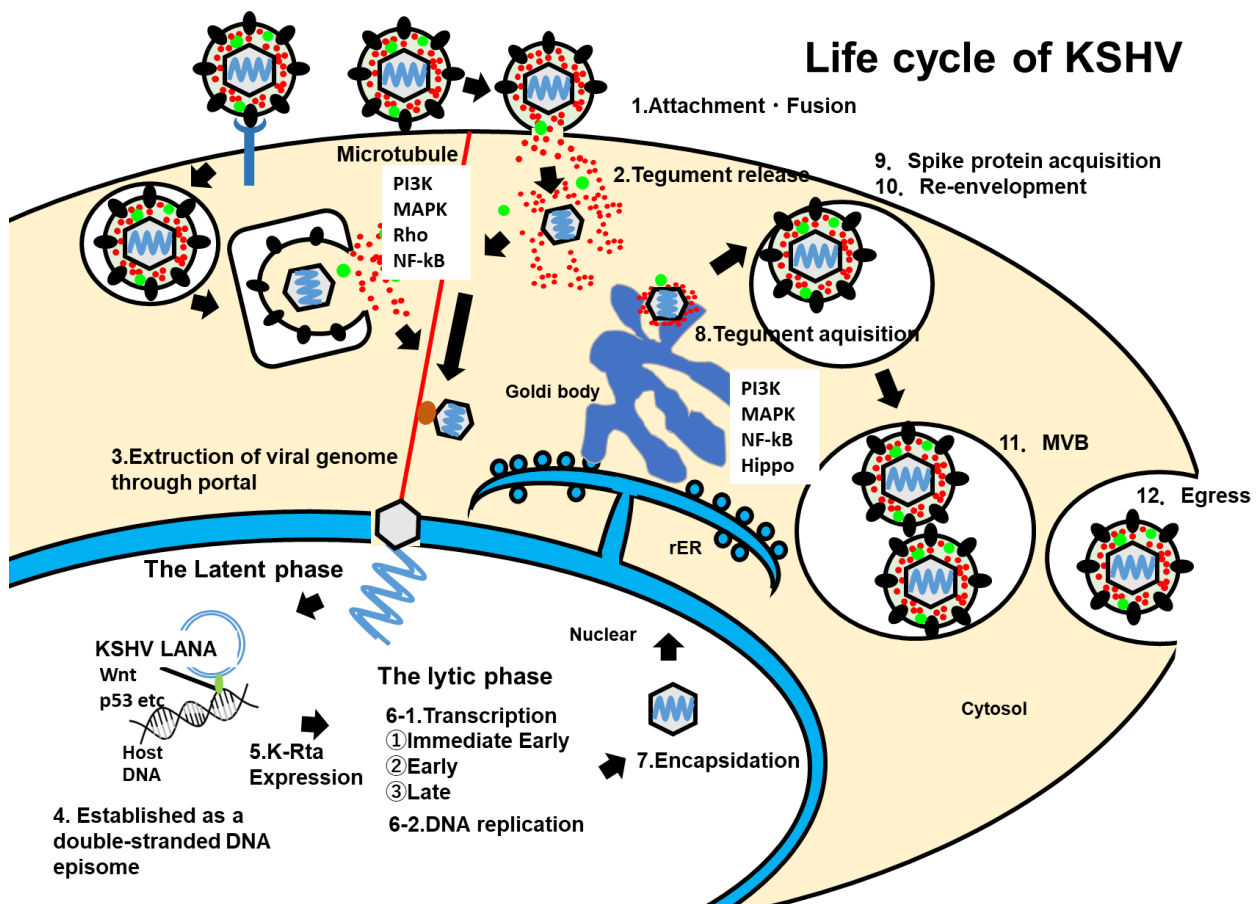


図 20 KSHV の生活環と各ウイルス感染期における細胞内シグナル伝達との関与 (説明は第 2 章緒言、及び序章に記載)

ORF21 がシグナル伝達や機能形態に与える影響について、以下のとおり報告されている。Gill らグループは、ORF21 は自身の C 末端側にキナーゼドメインを、N 末端側に Proline Rich Motif (PRM) を有しており、それらが ORF21 の機能発現に関与すると報告している<sup>45</sup>。なお、PRM の多くは SH2 もしくは SH3 ドメインを含んでおり、細胞骨格に関与する。事実、ORF21 の N 末端側の SH2 ドメイン内に自己リン酸化サイト (Y65、Y85、Y120) が存在し、ORF21 の N 末端側は Crk II (CT10 regulator of kinase II) や PI3K と相互作用する<sup>45,89</sup>。また、ORF21 の C 末端側は Rho シグナル活性化に必要とされ、Rho シグナル活性化による ORF21 が細胞収縮や小胞形成に関与することが明らかになっている (図 21)<sup>45,89</sup>。この RhoA のシグナルの活性化においては、Crk と ORF21 の相互作用により、RhoA を不活性化する Rap1 を不活性化することで、RhoA の活性化に関与すると考えられている<sup>45</sup>。さらにこの相互作用には ORF21 のリン酸化能が関与していると報告されている (図 21)<sup>45</sup>。

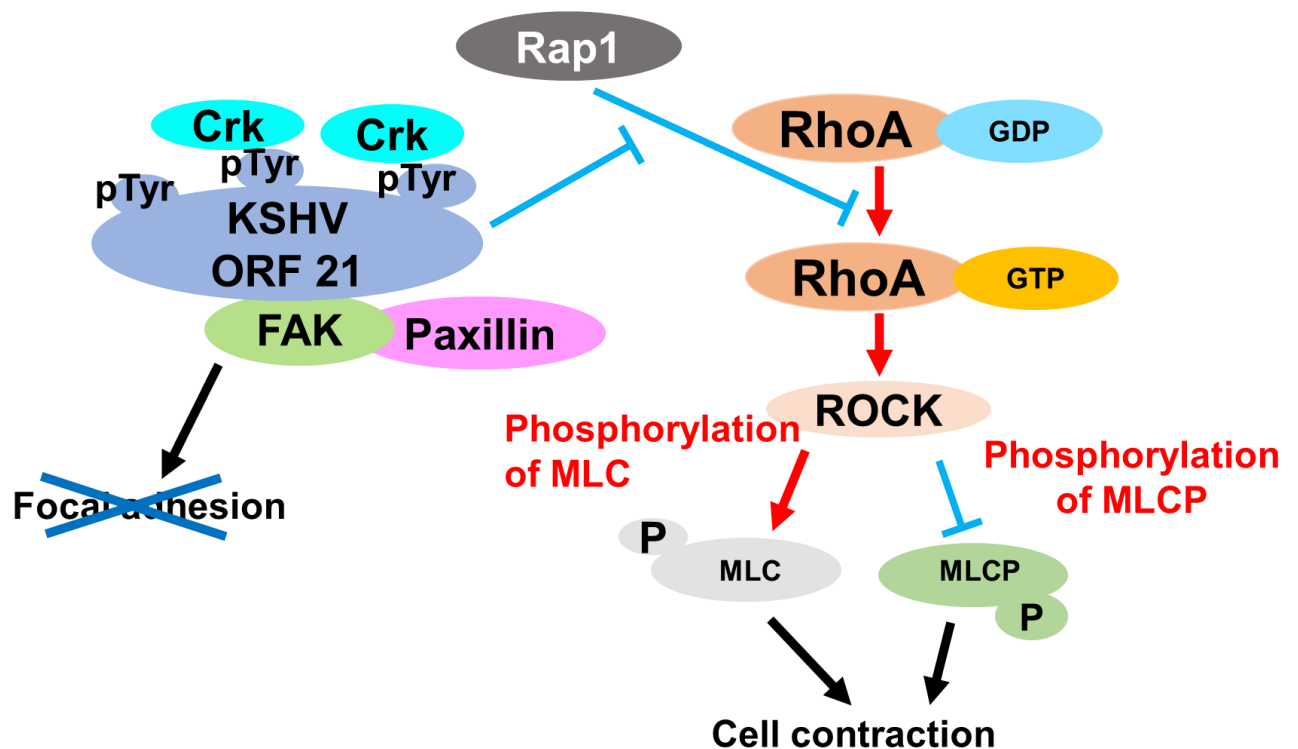


図 21 KSHV ORF21 による細胞収縮の分子機構

また ORF21 は Toll Like Receptor (TLR) 2 と TLR4 シグナル伝達を抑制すること、NF- $\kappa$ B シグナルを抑制することが報告されている<sup>90</sup>。このことから、ORF21 は炎症反応の抑制やチロシンキナーゼとして細胞収縮に寄与することで、ウイルス感染状態の維持やウイルス感染細胞の転移に関わると考えられる。

第 1 章において KSHVORF21 が子孫ウイルスの新規感染に関与していたことから、本章では感染細胞内において ORF21 がどのようにシグナル伝達に関与し、子孫ウイルスの新規感染性に影響を及ぼすのか解析した。まず、先行報告にある ORF21 による細胞の形態変化 (細

胞収縮)が起こるか BAC 定常保持細胞株を用いて評価を行った結果、先行報告の結果と一致する結果が得られたことから、本研究で用いる実験系の妥当性を確認した。さらに、先行研究では触れられていない ORF21 が子孫ウイルスの新規感染性に関与する細胞内シグナル伝達に与える影響について解析した。

## 2-2. 方法

### 2-2-1. 試料及び材料

第 1 章においても使用した試薬のメーカーについては第 1 章の 1-2-1 に記載した。また、本章のみで使用した試薬は表 12 に示した。

表 12 本章のみで用いた試薬の一覧と試薬メーカー

試薬	社名
Fluoro-KEEPER with DAPI	ナカライテスク
U0126	富士フィルム和光純薬
生細胞数測定 SF 試薬	ナカライテスク

U0126 は DMSO に溶解し-20°Cで保存した。Vero 細胞、iSLK 細胞、iVero 細胞、HEK293T 細胞は第 1 章の 1-2-1 で記した方法と同一の方法で培養した。

HeLa 細胞は Vero 細胞、HEK293T 細胞同様、5% FBS 含有 DMEM、5% CO<sub>2</sub>、37°Cの 環境下で培養した。

また、本章の W.B.解析で用いた抗体に関する情報を表 13 に示した。

表 13 本章で用いた抗体リスト

抗体	動物種	会社	カタログ番号	希釈倍率
anti-EGFR- antibody	ウサギ	CST	4267T	×1500
anti-p-MEK1/2 (S217/S221) - antibody	ウサギ	CST	#9154P	×1500
anti-MEK1-antibody	マウス	BD	51-9002016	×1500
anti-MEK2-antibody	マウス	BD	51-9002017	×1500
anti-p-Erk1/2 (T202/Y204) - antibody	マウス	CST	612359	×1500
anti-pan Erk-antibody	マウス	BD	51-9001961	×1500
anti-ORF21-antibody	ウサギ	当研究室において作製		×3000
anti-GAPDH	マウス	SC	0411	×2000
HRP-conjugate anti-mouse IgG	ヒツジ	GE ヘルスケア	NXA931	×3000
HRP-conjugate anti-rabbit IgG	ロバ	GE ヘルスケア	NA934	×3000

### 2-2-2. 培養細胞への遺伝子導入

HeLa 細胞への遺伝子導入は、第 1 章 1-2-5.と同様に Chen-Okayama 法<sup>71</sup>に従い実施した。

組成 (1 well (6 well dish)あたり)

Plasmid	6	μg
MilliQ 滅菌水	X	μL
2.5M CaCl <sub>2</sub>	8	μL
<u>2×BBS (pH6.69)</u>	<u>80</u>	<u>μL</u>
Total	160	μL

組成 ((1 well (12 well dish)あたり))

Plasmid	3	μg
MilliQ 滅菌水	X	μL
2.5M CaCl <sub>2</sub>	4	μL
<u>2×BBS (pH6.69)</u>	<u>40</u>	<u>μL</u>
Total	80	μL

#### 2-2-3. ウェスタンブロット解析

HeLa 細胞を 70~80% コンフルエントで播種し一晩培養後 2-2-2.で示した手順で遺伝子導入し、37°C、5.0% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 2 日間培養した。iSLK 細胞、iSLK-BAC16 定常保持細胞株を 6 well dish に播種し一晩培養した後、1-2-6.の手順に従い溶解感染誘導した細胞群、未処理群 (5% FBS 含有 DMEM のみ) に分け、48 時間培養した。

サンプル化、ウェスタンブロット解析は第 1 章の 1-2-3.と同様の方法で行った。用いた抗体は、2-2-1.の表 12 で示した。

#### 2-2-4. RT-qPCR 解析

RT-qPCR のサンプルは iSLK 細胞、iSLK-BAC16 定常保持細胞株を 12 well dish に  $2.0 \times 10^5$  cell/well で播種し一晩培養した。その後、1-2-6.と同様の手順で溶解感染誘導後 48 時間後にサンプルを回収した。サンプル回収、逆転写反応、RT-qPCR は 1-2-8.と同様の方法で行った。RT-qPCR の反応時間、反応条件も同様である。

今回用いたプライマーリストは表 14 に記載した。

表 14 RT-qPCR で用いたプライマー配列

Primer name	5'→3'
GAPDH-qPCR Forward	TCGCTCTCTGCTCCTCCTGTTC
GAPDH-qPCR Reverse	CGCCCAATACGACCAAATCC
EGFR-qPCR Forward	AACACCCTGTGGAAGTACG
EGFR-qPCR Reverse	TCGTTGGACAGCCTTCAAGACC

### 2-2-5. 蛍光抗体染色

当研究室の Sugimoto らの報告<sup>91</sup>、Ishimaru らの報告<sup>92</sup>の手順を改変し行った。iSLK 細胞および iSLK-BAC 定常保持細胞株を、カバーガラスを置いた 6 well dish に播種し一晚培養した。一晚培養後 1-2-6.の手順に従い溶解感染誘導し 37°C、5.0% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 48 時間培養した。

48 時間培養後、カバーガラス上へ播種された 60%コンフルエントの細胞を PBS で 2 回洗浄した。カバーガラスをパラフィルム上へ移し 4°Cに冷やした 4%パラホルムアルデヒドにより 10 分間室温で固定した後に、アセトンを含んだ MeOH により、10 分間、-20°Cで細胞を固定した。PBS で 2 回洗浄した後、カバーガラス上の固定細胞を 0.1% TritonX-100 を含む PBS で 15 分間室温にて透過処理した。PBS-T (0.5% FCS and 0.05% Tween 20 を含む PBS) で 3 回洗浄後、抗体の非特異反応を防ぐため 1.5% FBS を含む blocking PBS-T (0.05% Tween 20 を含む PBS) を加え 30 分間室温でブロッキングした。1 次抗体をカバーガラス上の固定細胞に一晚 4°Cで処理し、PBS-T で 3 回洗浄した。Alexa fluor 594 標識抗ラビット抗体 (Invitrogen) を二次抗体として使用し、PBS-T に希釈した抗体溶液を 1 次抗体処理した細胞に室温 1 時間で反応させた。PBS-T でそれぞれ 3 回洗浄した後、Fluoro-KEEPER with DAPI 1 滴をスライドガラス上へ添加し、カバーガラスをスライドガラス上へ封入した。染色した細胞を共焦点レーザー顕微鏡 (LSM800) で観察した。

### 2-2-6. 細胞収縮の評価

iSLK-WT または iSLK-21KD 細胞を、カバーガラスを置いた 6 well dish に播種し、37°C、5.0% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で一晚培養した。pCI-neo-3×Flag、及び pCI-neo-3F21WT を Screenfect A plus のプロトコルに従い一過性発現させ、8 µg/mL Dox、1.5 mM NaB 5% FBS DMEM 培地中で 37°C、5.0% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 48 時間培養を行った。一方 iSLK-WT のみを用いた実験ではカバーガラスを置いた 6 well dish に播種し一晚培養した後、1-2-6.で示した手順により溶解感染誘導した群、未処理群 (5% FBS 含有 DMEM のみ) の群に分け、37°C、5.0% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 48 時間培養した。

細胞を PBS で 2 回洗浄後、カバーガラスをパラフィルムへ移し 4°Cに冷やした 4%パラホルムアルデヒドにより 10 分間室温で細胞を固定した。固定した細胞を PBS で 2 回洗浄後、0.1% TritonX-100 を含む PBS で、15 分間室温で透過処理した。1.5% FBS を含む blocking PBS-T (0.05% Tween 20 を含む PBS) を加え、30 分間室温でブロッキングした。Wash バッファーで希釈した 1 次抗体(ORF21)をカバーガラス上の固定細胞に一晚 4°Cで処理し、PBS-T で 3 回洗浄した。Alexa fluor 594 標識抗ラビット抗体 (Invitrogen) を 2 次抗体として使用し、Phalloidin Cruz Fluor™ 633 Conjugate (Santa Cruz) を含む PBS-T に希釈した抗体溶液を 1 次抗体処理した細胞に室温で 1 時間反応させた。PBS-T でそれぞれ 3 回洗浄した後、Fluoro-KEEPER with DAPI 1 滴をスライドガラス上へ添加し、カバーガラスをスライドガラス上へ封入した。染色した細胞を蛍光顕微鏡(Olympus IX71)と共焦点レーザー顕微鏡 (LSM800)で観察した。細胞面積の評価は、GFP 陽性 (BAC 保持細胞) と Phalloidin 染色陽性の細胞を対象に染色エリア面積を算出した。ImageJ ソフトウェア(ver1.52a, NIH, Bethesda, MD, USA) と Fiji

(ver1.53.q, NIH, Bethesda, MD, USA) を用いて Phalloidin と GFP シグナルの縁を囲むことで計測した。定量した領域における細胞面積の度数分布を作成し、度数分布から得られた累積割合の上下 5% を削除して統計解析を行った。

#### 2-2-7. 軟寒天コロニー形成アッセイ

当研究室の Moriguchi らの手順<sup>93</sup>を改変し行った。10% 寒天溶液をオートクレーブにより溶解し、20% FBS 含有 DMEM 培地の添加により寒天濃度が 1% になるよう希釈して 55°C で保温した。12 well plate に下層として 0.5% 寒天に希釈した培地を流し入れ、固まるまで室温で静置した。その上層に、0.35% 寒天に希釈した培地に p3F-WT、p3F-KD と EGFP 発現プラスミドを 3:1 の割合で共トランスフェクションした HeLa 細胞を懸濁して流し入れ、4°C で 5 分静置した。その後 37°C、CO<sub>2</sub> インキュベーター内で培養した。8 日後、蛍光顕微鏡 (Olympus IX71) を用いて GFP 陽性コロニー数を計測した。

#### 2-2-8. 細胞増殖アッセイ

p3F-WT、または、p3F-KD をトランスフェクションした HeLa 細胞を 96 well プレートに播種し、5% FBS 含有 DMEM で 2 日間培養した。培養後の細胞を 10% (v/v) 生細胞数測定 SF 試薬と 5% FBS を含む DMEM 100  $\mu$ L で 1 時間インキュベートし、450 nm (参照波長 600 nm) における培地の吸光度を測定することで細胞増殖率を評価した。

#### 2-2-9. U0126 処理時における iSLK-BAC 定常保持細胞株の産生ウイルス量の測定

1-2-8. と同様の方法で行った。MEK 阻害剤 U0126 を終濃度 100  $\mu$ M になるよう培地に添加した。対照群には U0126 添加サンプルと等量の DMSO を添加し、それぞれ溶解感染誘導し、37°C、5.0% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 48 時間培養した。その後培養上清を精製し、上清中のカプシド内ウイルス DNA 量を測定した。U0126 処理した iSLK-BAC 定常保持細胞株を W.B. サンプル化した。

#### 2-2-10. U0126 処理時における子孫ウイルスの感染性の測定

1-2-9. と同様の方法で行った。HEK293T は感染 1 日前に、MEK 阻害剤 U0126 を終濃度 5  $\mu$ M になるよう培地に添加した。さらに、対照群には 5  $\mu$ M U0126 添加時と等量の DMSO を加え、それぞれ溶解感染誘導し、37°C、5.0% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 96 時間培養した。その後阻害剤を添加した培養上清を HEK293T 細胞に感染させた。

#### 2-2-11. 統計解析

1-2-11. と同様の手順で、Microsoft Excel<sup>®</sup>、並びに統合開発環境である RStudio 上で統計解析ソフトウェア R (ver 4.2.1)<sup>78</sup> を実行し、2 群間の比較は Welch's t test を行った。また多重比較では、Holm 補正、Tukey の方法、Dunnnett の方法により有意水準を 0.05 に設定し解析を行った。グラフは算術平均値と標準誤差を示した。



## 2-3. 結果

### 2-3-1. BAC 由来の ORF21 の細胞内局在

先行研究により、ORF21 発現プラスミドを用いて過剰発現させた ORF21 タンパク質は細胞質内に局在すると報告されている<sup>89</sup>。しかし、溶解感染移行においてウイルス感染細胞発現する ORF21 タンパク質の局在は不明である。そこで、溶解感染誘導した細胞で発現する ORF21 の細胞内局在について解析した。iSLK BAC16 を含まない iSLK (非感染コントロール細胞)、iSLK-WT (野生型 KSHV 感染細胞)、iSLK-21KD (ORF21-Kinase Dead KSHV 感染細胞)、および iSLK-21del 細胞 (ORF21 分子欠損 KSHV 感染細胞) を Dox および NaB で 48 時間処理して溶解感染による ORF21 発現を誘導した。溶解感染処理により発現した ORF21 の局在を共焦点蛍光顕微鏡で解析した結果、ORF21-WT と ORF21-KD タンパク質は細胞質に分布していることが明らかになった (図 22)。

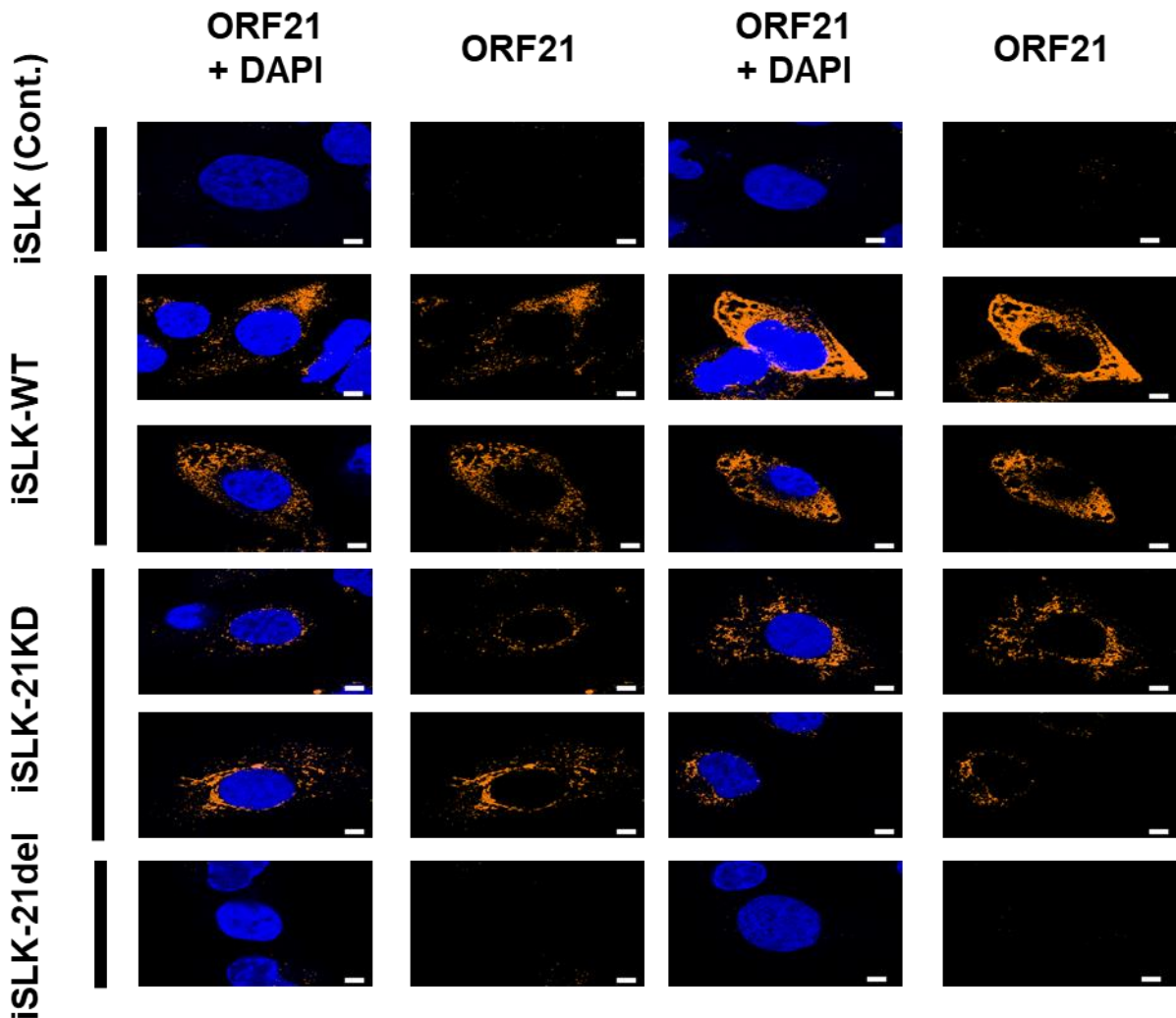


図 22 溶解感染細胞における BAC 由来の ORF21 タンパク質の局在

iSLK、iSLK-WT、iSLK-21KD、iSLK-21del 細胞を 1.5 mM NaB 及び 8 µg/mL Dox 含有 DMEM で 48 時間培養し、免疫染色法により解析した。それぞれ抗 ORF21 ポリクローナル

抗体と DAPI (DNA) を用いて染色した。ORF21 タンパク質 (橙色)、DAPI (青色) でそれぞれ示している。スケールバーは 5  $\mu\text{m}$  を表す。Yamaguchi T *et. al.*, *Int. J.Mol. Sci.* 2023 Fig.2b を改変。

### 2-3-2. BAC 由来 ORF21 分子の発現により細胞収縮が起こり、その細胞増殖にはリン酸化が関与する

KSHV BAC16 保持細胞の溶解感染移行による細胞の形態変化を解析、先行研究により報告されている ORF21 のリン酸化能依存性と ORF21 分子依存性に着目し、細胞収縮を解析した。

iSLK-WT 細胞を Dox および NaB で処理 (または未処理) し、BAC16 由来の GFP 蛍光を蛍光顕微鏡で分析した。その結果、溶解感染誘導した iSLK-WT 細胞の細胞面積は、誘導していない iSLK-WT 細胞と比較して減少していた (図 23)。

次に、iSLK-21KD 細胞に Flag タグ付き野生型 ORF21 プラスミド (p3F-21WT) あるいは空プラスミドを一過性導入した iSLK-WT 細胞の Phalloidin と GFP シグナルを蛍光顕微鏡で解析した。空プラスミド導入 iSLK-21KD 細胞の細胞面積と比較し、同じく空プラスミドを導入 iSLK-WT 細胞の細胞面積は Dox、NaB 処理により減少した。一方 iSLK-21KD 細胞において p3F-21WT プラスミドの導入は、空プラスミド導入よりも減少させた (図 24b)。これらのことから KSHV 溶解感染下で、キナーゼ活性を有する ORF21 が細胞収縮を誘導していることが示唆された。

以上より Gill らによる報告と同様に KSHV 感染細胞において ORF21 は、細胞質に分布し、ORF21 のキナーゼ機能が細胞収縮に関与することを確認した。<sup>45,89</sup> BAC 定常保持細胞株を用いた実験において、一過性に発現させた実験系と同様の結果が得られた場合、BAC 定常保持細胞株においても同様のシグナル伝達のはたらいていると考えられる。また他の KSHV タンパク質による影響を考慮できるため、BAC 定常保持細胞株を用いた実験系で変化が見られたシグナル伝達や形態変化が、ウイルス学的に重要であると考えられる。

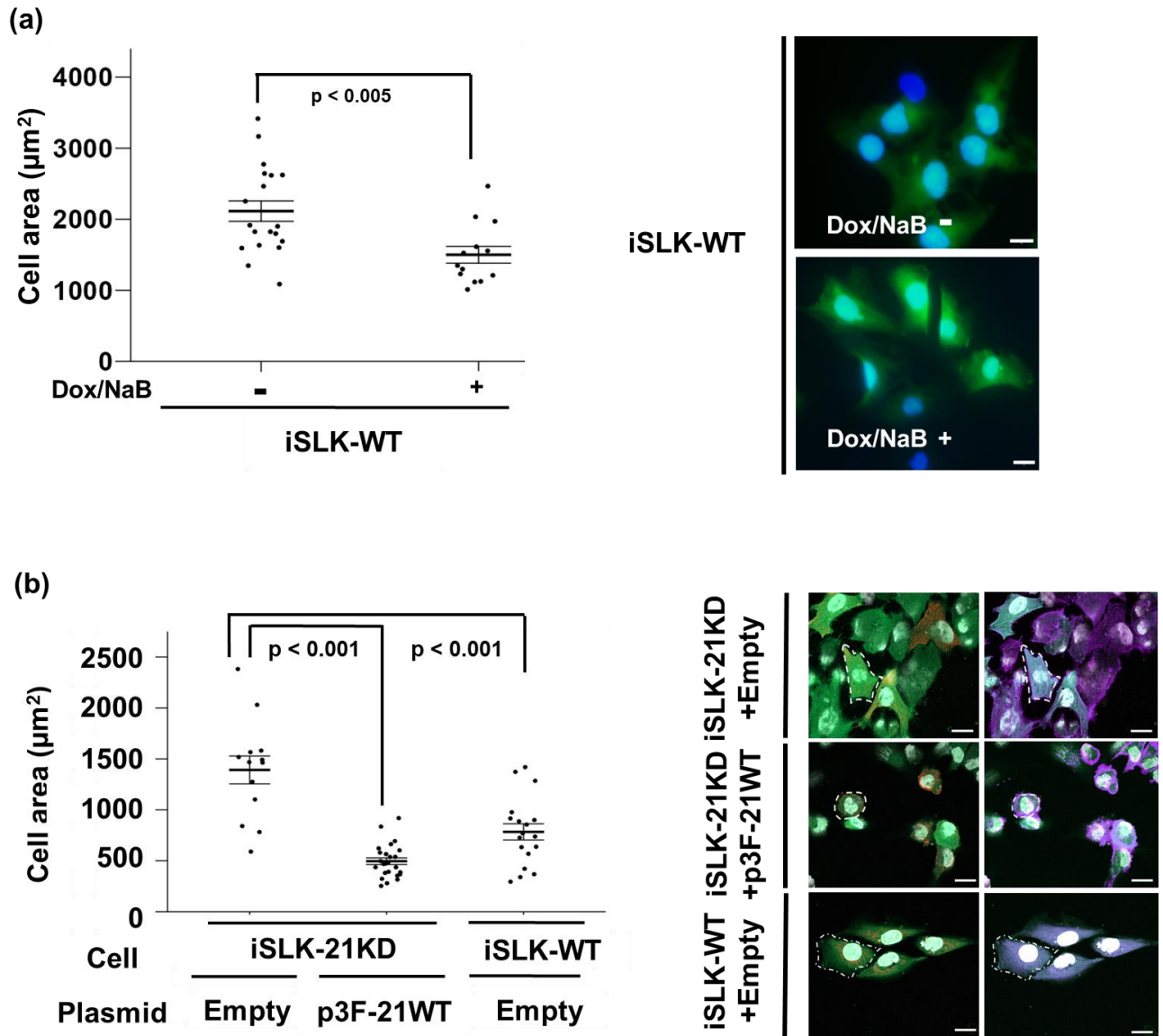


図 23 溶解感染誘導による細胞収縮と ORF21 発現の関与

(a) iSLK-WT 細胞を Dox と NaB で 48 時間処理し、蛍光顕微鏡により解析した。スケールバーは 20  $\mu\text{m}$  を表す。(b) iSLK-21KD 細胞に 3 $\times$ Flag-ORF21 野生型プラスミド (p3F-21WT) または空プラスミドを導入し、細胞を Dox および NaB 含有培地中で 48 時間培養し、細胞面積を測定した。右パネルは、Phalloidin シグナル (紫)、GFP シグナル (緑)、核 (白) であり、Phalloidin シグナル、GFP シグナルを用いて細胞の縁を囲った (点線部)。細胞を GFP と Phalloidin 陽性の細胞の面積を測定した。スケールバーは 20  $\mu\text{m}$  を表す。(a,b)  $p < 0.001$  および  $p < 0.005$  は、統計学的に有意な差を示す。Yamaguchi T *et. al.*, *Int. J.Mol. Sci.* 2023 Fig.2c-d を改変。

### 2-3-3. 外来性 ORF21 分子は MEK1/2 のリン酸化に関与する

溶解感染により産生された子孫ウイルスの感染力の増強に、ORF21 の分子依存的な機能が

関与することを第 1 章で明らかにした。さらに、第 2 章の 2-3-2.では、ORF21 は KSHV の溶解感染下で宿主細胞の収縮を誘導することを示した。また、先行研究では、KSHV は新規感染時に、標的細胞の MAPK や PI3K、Rho、NF- $\kappa$ B シグナル伝達を脱制御し感染を成立させることが報告されている<sup>3</sup>。さらに、KSHV は感染細胞のウイルス産生時 (つまり、溶解感染状態)、細胞の PI3K、MAPK、NF- $\kappa$ B、Hippo シグナルと相互作用してウイルスの複製を増強することも知られている<sup>3</sup>。その一方、ORF21 自身も免疫反応や細胞収縮、細胞移動に関わるシグナル伝達に影響を与えることが報告されている<sup>45,89,90,94</sup>。そこで、宿主細胞内における ORF21 の分子依存的な機能およびキナーゼ活性依存的な機能を解析するため、ORF21 一過性発現および BAC 由来の ORF21 発現によるシグナル伝達に与える影響について解析した。

初めに、ORF21 一過性発現の実験系を用いて、ウイルス感染に関与する細胞内シグナル伝達に与える影響について解析した。HeLa 細胞に Flag タグ付き野生型 ORF21 プラスミド (p3F-21WT)、もしくは Flag タグ付き ORF21-kinase dead プラスミド (p3F-21KD) を一過性発現させ、ウェスタンブロッティングを行った。その結果 ORF21 は MEK シグナルの活性化に関与していることが明らかになった (図 24)。MEK のリン酸化レベルは、p3F-21WT および p3F-21KD 一過性導入細胞で、空プラスミド一過性導入細胞と比較して顕著に増加した。さらに、MEK の下流基質である ERK のリン酸化は、p3F-21WT および p3F-21KD を導入した細胞でやや亢進していた。一方、EGFR の発現レベルは変化が観察されなかった。これらの結果より、外来性 ORF21 発現による ORF21 キナーゼ機能非依存的に MEK シグナルを活性化することが示唆された (図 24)。

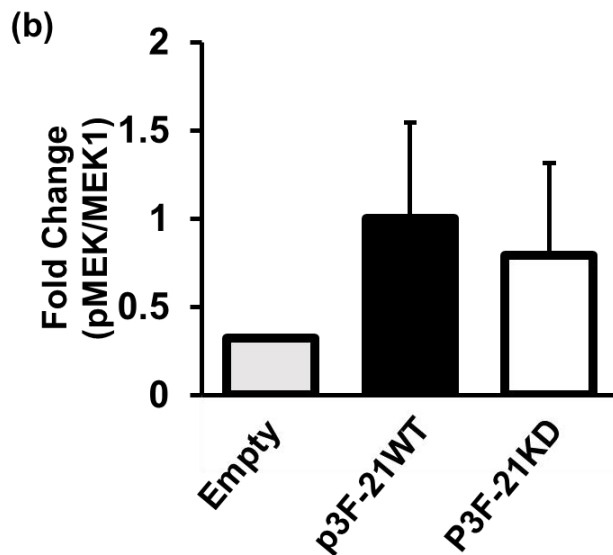
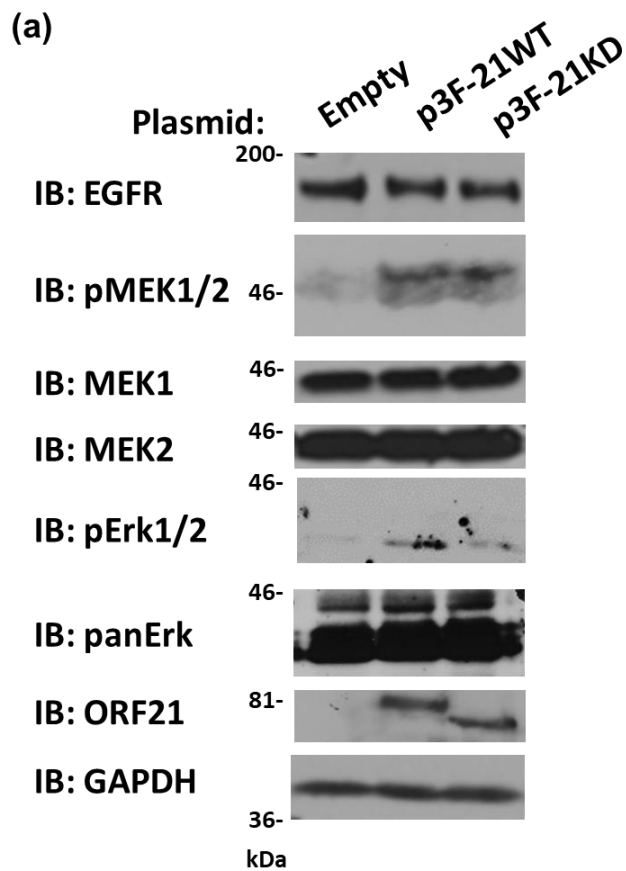


図 24 一過性発現させた ORF21 による MEK リン酸化の亢進

(a-b) HeLa 細胞に空、3×Flag-ORF21 野生型プラスミド (p3F-21WT)、または 3×Flag-ORF21-kinase dead プラスミド (p3F-21KD) を導入して 72 時間培養した。MEK リン酸化をウェスタンブロットにより解析した。(b) phospho-MEK のバンド強度は、Fiji ソフトウェアを用いて

算出した。データには示していないが、MEK2 のバンド強度に対する比も図 24.b に示したものと同様の傾向を示した。また図 24.a では、p3F-21WT と p3F-21KD の間で分子量が若干異なるが、これは ORF21 分子が自己リン酸化することにより生じたバンドシフトだと考えられる。Yamaguchi T *et. al.*, *Int. J.Mol. Sci.* 2023 Fig.7a を改変。

#### 2-3-4. BAC 由来の ORF21 分子は MEK1/2 のリン酸化に関与する

次に、溶解感染誘導時に KSHV-BAC16 から発現した ORF21 タンパク質が MEK シグナルに与える影響について解析するため、溶解感染誘導前後での iSLK-21WT と iSLK-21KD 細胞の MEK リン酸を解析した。iSLK-WT、iSLK-21KD、iSLK-21del 細胞を Dox および NaB 処理により溶解感染誘導し、リン酸化 MEK や MEK シグナルの上流レセプター EGFR の発現量を解析した。興味深いことに、溶解感染誘導されたすべての KSHV BAC-16 保持細胞で、EGFR タンパク質の発現量と MEK のリン酸化レベルが顕著に低下した。溶解感染期の KSHV 感染細胞では、60 種類以上の溶解感染関連ウイルスタンパク質が発現誘導される。したがって、これらの溶解感染タンパク質が iSLK-BAC 保持細胞の EGFR 発現と MEK のリン酸化を抑制すると推測している。特に EGFR はウイルス粒子の放出時、EGFR がウイルス粒子に伴い放出されることも、その原因の一つと考えられる。一方、iSLK-WT では、iSLK-21del 細胞と比較して、リン酸化 MEK が少量残存していた。これは、溶解感染誘導された iSLK 細胞では、内在的に発現した ORF21 により MEK のリン酸化が起こるため、わずかなリン酸化 MEK が検出されたと考えられる (図 25)。

次に、溶解感染移行による iSLK-BAC 保持細胞の EGFR の発現低下が転写によるものかどうかを調べるために、EGFR mRNA の発現レベルを解析した。溶解感染誘導 iSLK-WT、iSLK-21KD、iSLK-21del 細胞における EGFR mRNA 発現は、未処理の iSLK-BAC 定常保持細胞株と比較して減少していた (図 26)。このことは、溶解感染期にある KSHV 感染細胞では、EGFR の発現が転写レベルにおいて低下していることを示唆している。溶解感染 EGFR の mRNA レベルの低下は次のような機序で起こると考えられる。溶解感染状態では、ウイルス粒子複製が活性化される感染状態であるため、宿主性のプロモーター活性と比べウイルス性のプロモーター活性が亢進することでウイルス遺伝子の転写が活性化される。その結果 EGFR 遺伝子の転写レベルが低下し、EGFR のタンパク質の発現量が低下したと考えられる。その結果 mRNA レベル、タンパク質レベルで EGFR の発現が低下し、MEK のリン酸化が抑制したと推測される。

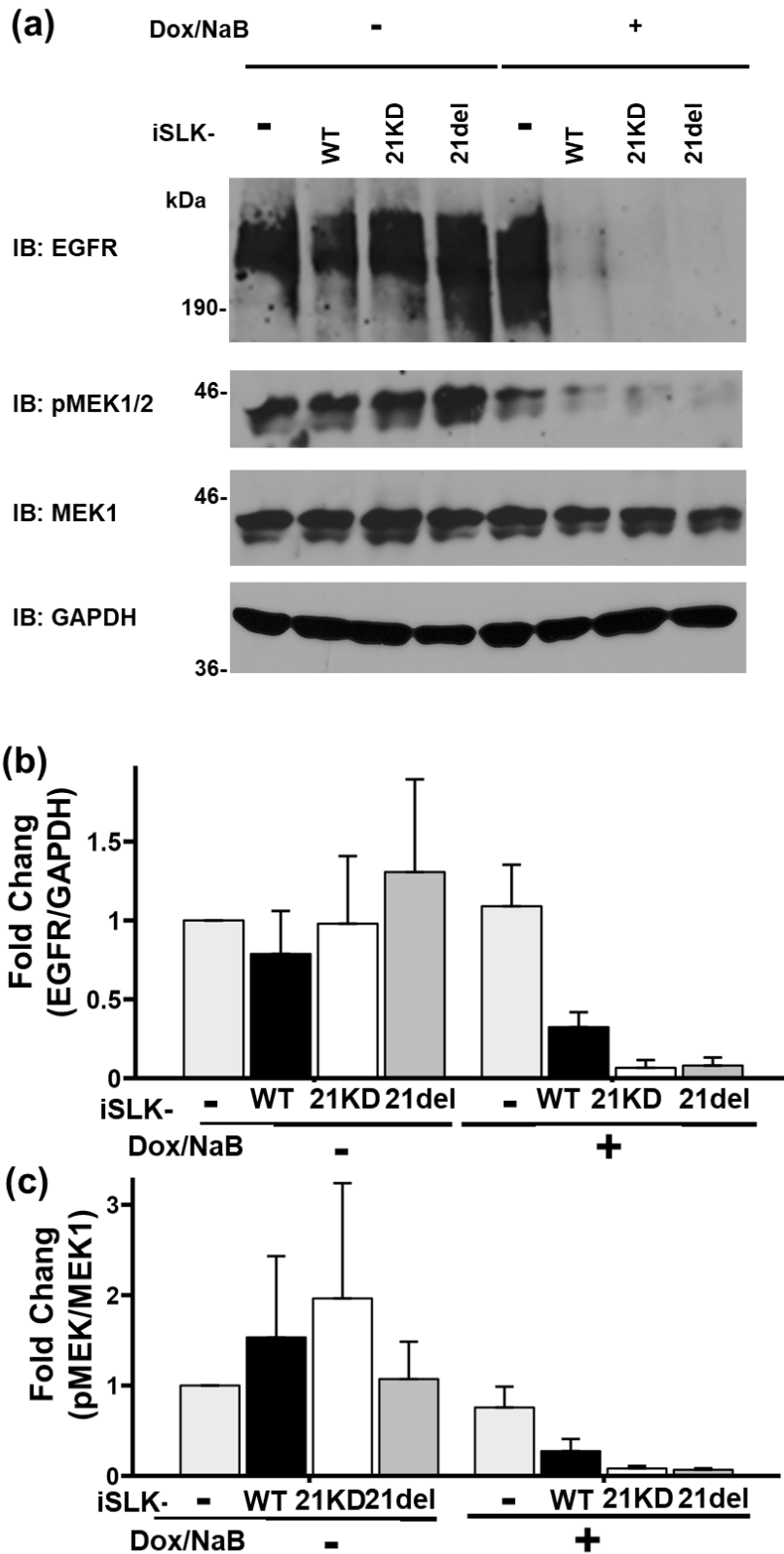


図 25 溶解感染誘導による MEK のリン酸化と EGFR の発現低下

(a-c) iSLK (BAC16 非導入)、iSLK-WT、iSLK-21KD、および iSLK-21del 細胞を、Dox および NaB 処理を 48 時間行い溶解感染関連ウイルスタンパク質の発現を誘導した。iSLK 細胞

(BAC16 非導入) は非感染コントロールとして用いた。(b, c) EGFR/GAPDH、およびリン酸化 MEK1/2/MEK1 の値を棒グラフとして示す。Dox-および NaB-未処理 iSLK 細胞の値を 1.0 とした。データには示していないが、MEK2 のバンド強度に対する比も図 25 に示したものと同様の傾向を示した。Yamaguchi T *et. al.*, *Int. J.Mol. Sci.* 2023 Fig.7d-f を改変。

#### 2-3-5. ORF21 分子による細胞増殖の亢進

MEK シグナルの細胞に与えるアウトプットとして細胞増殖促進が知られている。そこで、一過性 ORF21 発現が細胞増殖と足場非依存的増殖に及ぼす影響を解析した。空ベクター、p3F-21WT、または p3F-21KD プラスミドを一過性発現させた HeLa 細胞を 96 ウェルプラスチックプレート上で培養し、細胞増殖アッセイにより足場依存的な細胞増殖を測定した。同様に、一過性発現させた HeLa 細胞を DMEM 含有軟寒天培地で 8 日間培養し、形成されたコロニーを足場非依存的な細胞増殖を測定した。その結果、ORF21-WT および ORF21-KD の過剰発現は、細胞増殖 (図 27a)、さらに足場非依存的な細胞増殖の両方を促進した (図 27b)。

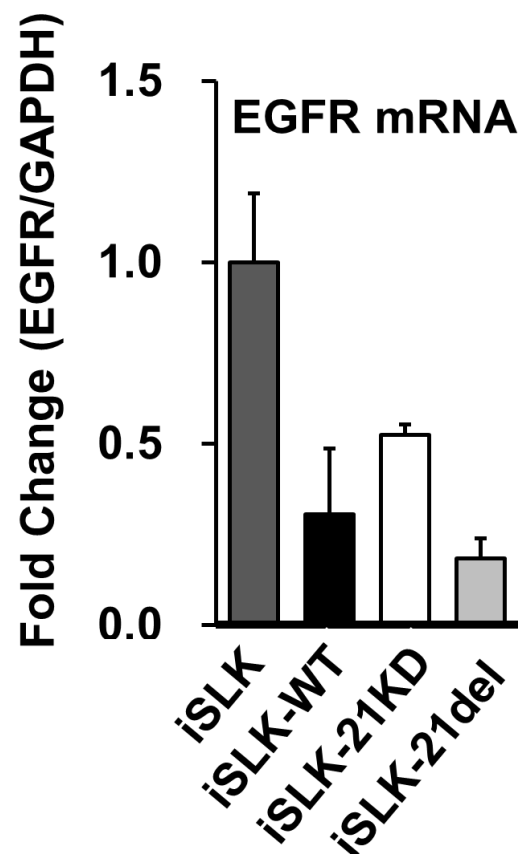


図 26 溶解感染誘導による EGFR mRNA の発現抑制

溶解誘導した iSLK-WT、iSLK-21KD、及び iSLK-21del 細胞における EGFR mRNA の発現を示した。細胞を Dox 及び NaB で 48 時間処理し、EGFR mRNA の発現を RT-qPCR で測定し、



GAPDH mRNA の発現で正規化した。Yamaguchi T *et. al.*, *Int. J.Mol. Sci.* 2023 Fig.7g を改変。

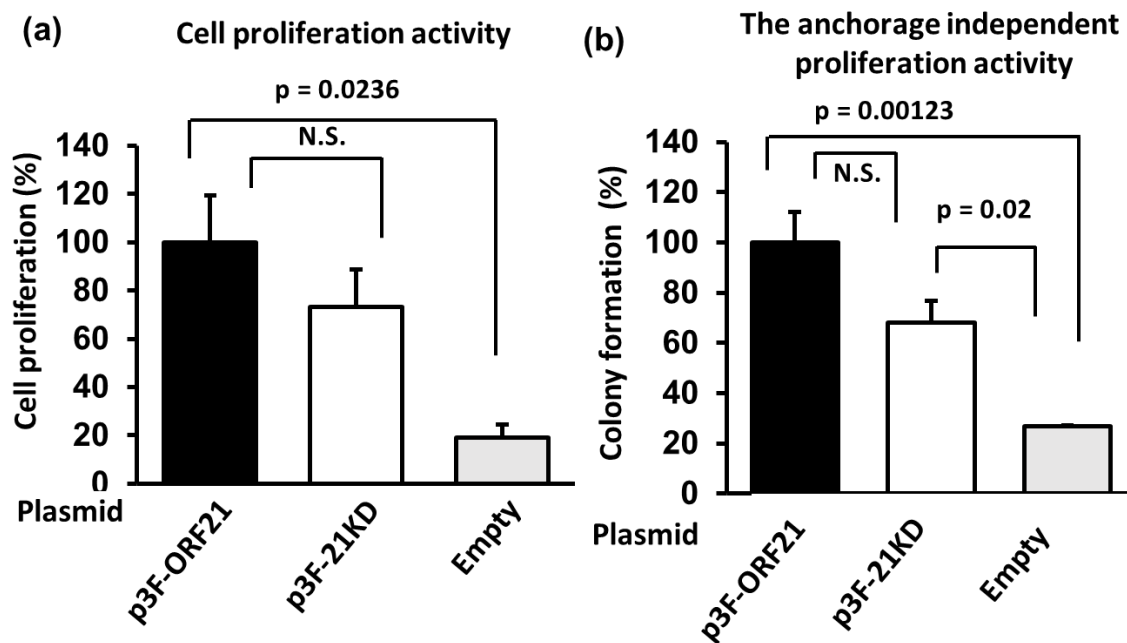


図 27 ORF21 分子による細胞増殖の亢進

(a) ORF21 による細胞増殖の亢進。(b) ORF21 による足場非依存的な細胞増殖の亢進。HeLa 細胞に空、3×Flag-ORF21 野生型 (p3F-21WT)、または 3×Flag-ORF21 Kinase Dead (p3F-21KD) プラスミドを導入して 72 時間培養し、(a) 細胞増殖アッセイ、(b) 軟寒天コロニー形成アッセイのいずれかを行った。21WT プラスミド導入細胞の平均値を 100 として示した。*p*-value は有意差を示す。N.S.は「not significant」を示す。Yamaguchi T *et. al.*, *Int. J.Mol. Sci.* 2023 Fig.7b-c を改変。

### 2-3-6. 標的細胞への MEK 阻害による子孫ウイルスの新規感染抑制

野生型 ORF21 (ORF21-WT) およびリン酸化能欠失 ORF21 (ORF21-Kinase Dead) は子孫ウイルスの感染性を高め、また MEK シグナルを上昇させることをここまで述べた。ORF21 はウイルス粒子のテグメントタンパク質としてウイルス膜とカプシドの間に局在する。したがって、ウイルス粒子が標的細胞 (すなわち宿主細胞) に吸着・侵入する過程において、ウイルス粒子からテグメントタンパク質として細胞内に放出された ORF21 が MEK シグナルの亢進を介して感染を促進すると仮説を立てた。そこで、MEK シグナル阻害剤 (U0126) が子孫ウイルスの HEK293T 細胞への感染に及ぼす影響を解析した。その結果、U0126 による MEK 阻害は、子孫ウイルス感染細胞数を抑制した (図 28 a)。これらのことから、ORF21 による MEK シグナル亢進がウイルスの感染性を高めることが示唆された。

一方溶解感染期タンパク質に分類され、溶解感染期に発現する ORF21 は、溶解感染期における細胞内のウイルスの産生を高めることも考えられた。そこで、MEK シグナルがウイルス産生に寄与しているかどうかを調べるために、溶解感染細胞におけるウイルス粒子の産生に対する U0126 の影響を分析した。WT-BAC16 保有 iSLK 細胞を 100  $\mu$ M U0126 存在下で Dox および NaB で溶解感染誘導し、培養上清中に産生されたウイルス量を qPCR 定量により定量した。この結果、U0126 処理によりウイルス産生量の著しい低下が観察された。このデータは、過去の先行研究の結果と一致した<sup>46,95</sup> (図 28 b)。この結果は、ORF21 による MEK シグナル亢進が溶解感染誘導細胞での子孫ウイルス産生も促進することを示唆している。この結果は第 1 章の図 15 のウイルス産生に影響がない結果と矛盾している。この矛盾については次のような理由が考えられる。それは、WT-BAC16 を保有する iSLK 細胞は U0126 に耐性であったため、iSLK 細胞の MEK シグナル阻害には 100  $\mu$ M の U0126 が必要であった。そのため、ORF21 による MEK の活性化の阻害以上に、他のリン酸化酵素や細胞機能も阻害された可能性を考慮する必要があると考えている。

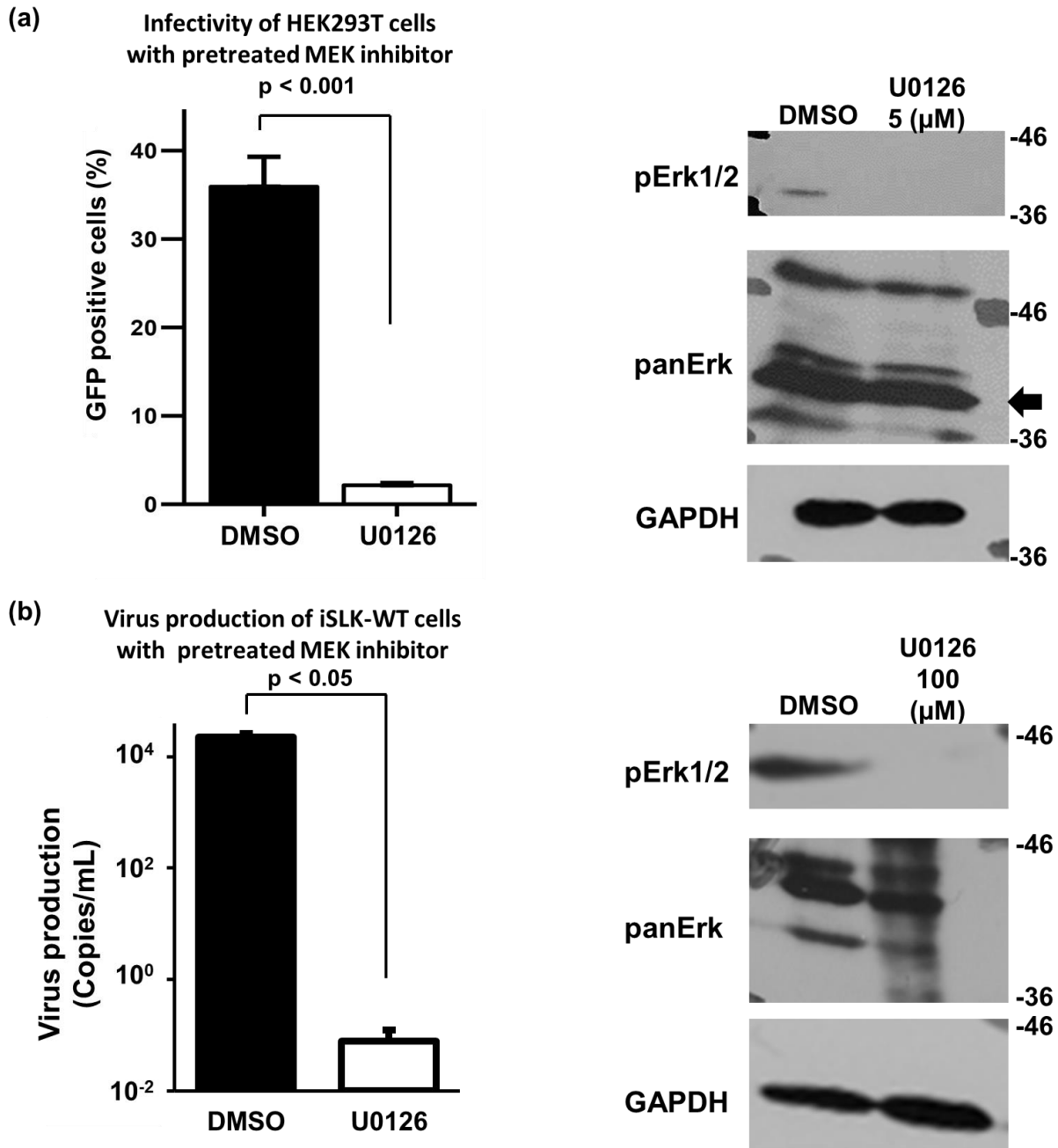


図 28 標的細胞への MEK 阻害による子孫ウイルス感染抑制と溶解感染細胞から子孫ウイルスの産生抑制

(a) 標的細胞への子孫ウイルスの新規感染に対する MEK シグナル阻害剤 (U0126) の効果。HEK293T 細胞を 5  $\mu$ M U0126 で 48 時間前処理し、WT-KSHV 粒子を U0126 前処理 293T 細胞に感染させた。感染細胞数 (GFP 陽性細胞) はフローサイトメトリーで解析した。阻害剤を処理した HEK293T 細胞における MEK シグナルの阻害は、W.B.法により検証した。(b) 溶解感染誘導した WT-BAC16 保有細胞におけるウイルス産生に対する U0126 の効果。iSLK-WT-BAC16 定常保持細胞を 100  $\mu$ M U0126 存在下で Dox および NaB で 48 時間処理し、培養上清を採取した。培養上清中の産生されたウイルス数を qPCR で測定した。阻害剤を処理した iSLK-WT-BAC16 定常保持細胞における MEK シグナルの阻害を W.B.法により検証した。  $p <$

0.05 および  $p < 0.001$  は、統計学的に有意な差を示す。Yamaguchi T *et. al.*, *Int. J.Mol. Sci.* 2023  
Fig.7h-i を改変。

## 2-4. 考察

本章では、BAC 保持細胞において溶解感染誘導により発現誘導した ORF21 が細胞質に局在すること、さらに、BAC 由来の ORF21 のキナーゼ機能 (溶解感染期)が細胞収縮に関与していたことを確認した。さらに、一過性 ORF21 発現はリン酸化 MEK 量を増加し、コロニー形成能も増加した。溶解感染状態の KSHV-BAC 保持細胞株ではリン酸化 MEK 及び EGFR の量が顕著に低下したが、ORF21 変異 (21KD および 21del) KSHV BAC 定常保持細胞と比較して WT-KSHVBAC 定常保持細胞では、若干の EGFR およびリン酸化 MEK が残存した。また、標的細胞の HEK293 への MEK 阻害剤処理は、MEK 阻害された HEK293T 細胞への子孫ウイルスの新規感染を抑制した。これらの結果により推測される ORF21 の機能について下記に図示した (図 29)。ORF21 はリン酸化能以外の未知の分子依存的な機能により MEK のリン酸化を誘導し、細胞増殖を亢進し KSHV の発がん性に寄与すると推測される。さらに、ORF21 は細胞内の MEK シグナルを活性化し、子孫ウイルスの新規感染成立に寄与すると推論できる。

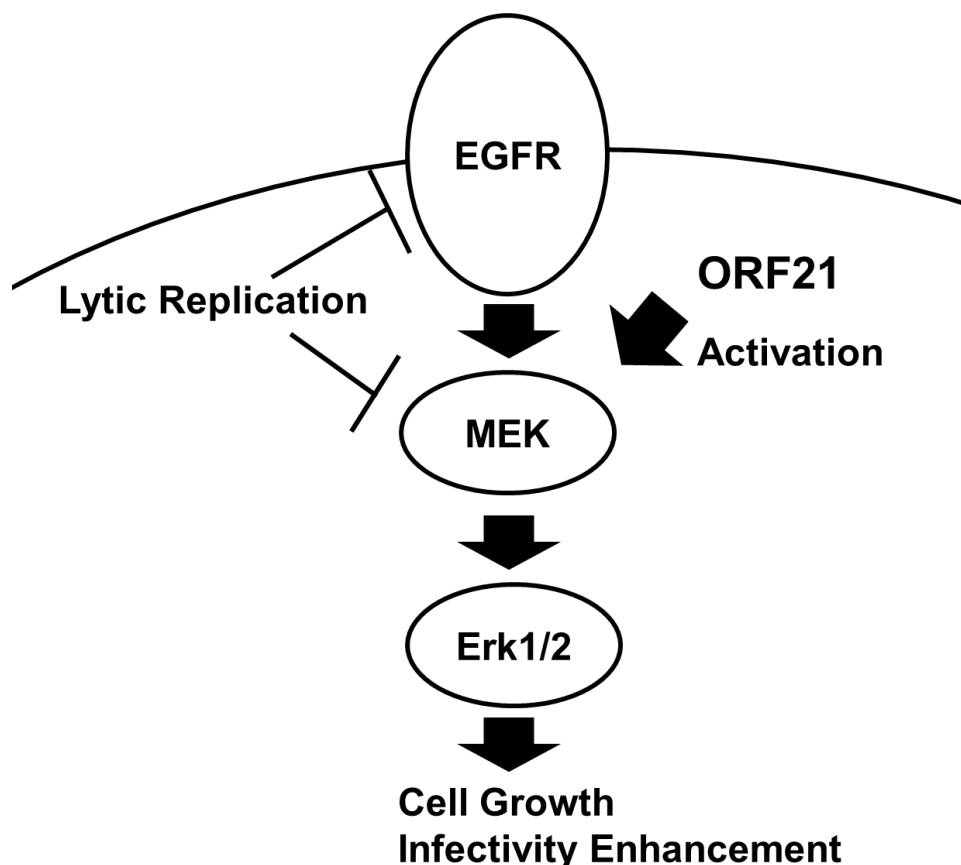


図 29 KSHV ORF21 により活性化される MEK シグナルと細胞機能との関係を表したモデル図

Yamaguchi T *et. al.*, *Int. J.Mol. Sci.* 2023 Fig.7j を改変。

ORF21 の新規感染成立への関与については、ウイルスが宿主細胞に結合した後、ヌクレオキャプシドとテグメントタンパク質がウイルス粒子から細胞内に放出される (図 30)。我々の結果より、テグメントタンパク質として放出された ORF21 が MEK シグナル伝達経路を亢進することで、効率的な感染が行われると推測される (図 30)。実際、新規の KSHV 感染では MEK シグナル伝達経路が亢進することが知られている<sup>96,97</sup>。さらに、KSHV 感染細胞である BCBL1 PEL 由来の野生型ウイルスがヒト包皮線維芽細胞に新規感染するだけでなく<sup>98</sup>、rKSHV.219 保持細胞での子孫ウイルス産生にも MEK 発現上昇が必要であることが報告されている<sup>95</sup>。また今回の BAC 由来の ORF21 発現および ORF21 一過性発現により、リン酸化 MEK の増加 (すなわち、MEK シグナルの亢進) が確認された。また、標的細胞に MEK 阻害剤 U0126 を前処理することで、標的細胞への子孫ウイルスの新たな感染が抑制された。このように、テグメントタンパク質の一つである ORF21 がウイルス粒子から放出され、宿主細胞における MEK のリン酸化の亢進を介して新規感染の成立に寄与している可能性が考えられる。

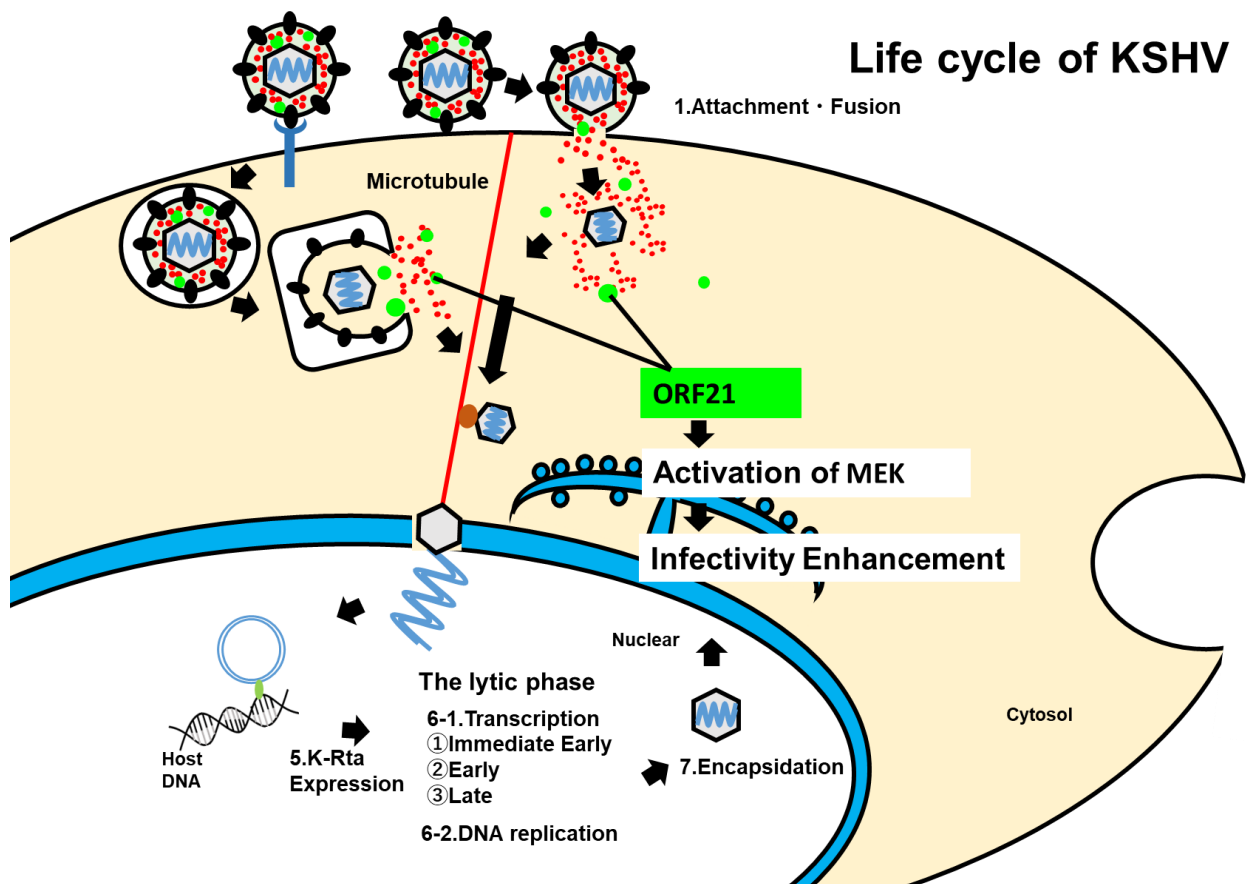


図 30 感染細胞内での ORF21 による MEK シグナルに対する関与

ORF21 分子は MEK のリン酸化を亢進することで、KSHV の新規感染能の増加に寄与すると考えられる。

ORF21 を介したウイルスの拡散については、ORF21 が RhoA-ROCK シグナルの活性化や細胞収縮に関与しており、Gill らは ORF21 が感染細胞の移動を促進することで KSHV 関連

腫瘍細胞の走化性亢進や KSHV 感染の拡散に寄与しているとの仮説を提唱した<sup>45</sup>。すなわち、ORF21 が KSHV 感染細胞の拡散を促進することにより、長距離感染や感染がん細胞の転移をもたらすという仮説である。また、感染細胞とともに移動したウイルス (またはウイルスゲノム) は、cell-to-cell 感染や cell-free 感染により、離れた場所で新たな感染を成立させることができる。本章におけるデータは、BAC 由来の ORF21 の細胞質への局在と ORF21 による細胞収縮を示し、これは以前の報告<sup>45,89</sup>と一致するものである。また、本章では ORF21 が MEK 経路の亢進と細胞増殖に関与することも明らかにした(図 30)。RhoA-ROCK シグナルが細胞移動を促進することはよく知られているが<sup>99,100</sup>、MEK 経路も細胞移動の促進に寄与していることが報告されている<sup>101-104</sup>。

ORF21 は TLR2、TLR4、NF- $\kappa$ B のシグナル伝達を抑制することが報告されている<sup>90</sup>。さらに、KSHV がコードするタンパク質と宿主細胞タンパク質との相互作用の網羅的解析において、ORF21 は RNA プロセッシングや RNA 代謝に関わるタンパク質と相互作用することが報告されている<sup>94</sup>。また、KSHV の ORF21 の他のウイルスオーソログでは、EBV の BXLF1 が中心体と相互作用することが報告されている<sup>105</sup>。BXLF1 は中心体に局在し、微小管非依存的にチューブリンリッチな中心核を取り囲んでいた。ウイルスのチミジンキナーゼを欠失させた MHV-68 は、脾臓や腹膜の細胞で正常にウイルス DNA を複製するが、変異 MHV-68 の感染力は WT と比較して著しく減少していた<sup>61</sup>。このように、ウイルス性チミジンキナーゼを欠失させた MHV-68 が新たな感染を確立できなかったことは、KSHV ORF21 の性質とよく一致しており、興味深いことである。これは、KSHV と MHV-68 が  $\gamma$ -ヘルペスウイルス亜科の同じ属に属しているためと考えられる。このウイルスのサブファミリーの間では、vTK の機能に違いがあるが、ヒトヘルペスウイルスの ORF21 オーソログが、細胞のシグナル伝達経路、細胞骨格系、細胞質タンパク質に影響を与え、結果としてウイルスの生活サイクルを制御し効果的に感染を成立させることが考えられる。

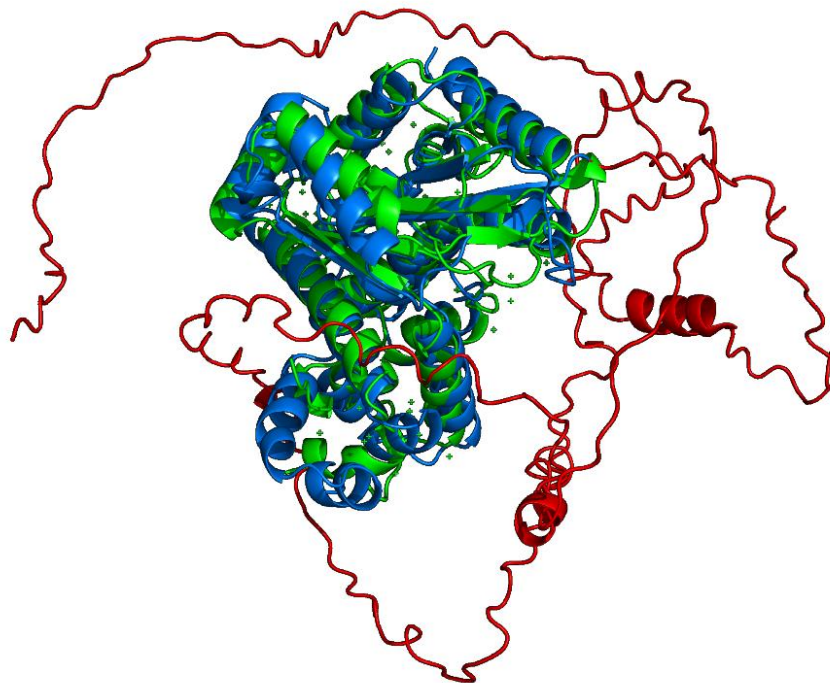


図 31 KSHV ORF21 と HSV-1 vTK (PDB DOI: 10.2210/pdb1VTK/pdb)を重ね合わせた立体構造

次に、得られた研究結果と ORF21 の分子モデルから立体構造的側面から ORF21 の機能について考察する。結晶構造解析により立体構造が解析されているタンパク質全てを学習させた ESM Fold を用いて ORF21 WT の立体構造を予測させた。分子描画ソフトウェアである Pymol<sup>106</sup> の Opensource 版を用いて、ORF21 WT 予測構造と HSV-1 vTK の立体構造を重ね合わせた (図 32)。ORF21 WT 予測構造と HSV-1 vTK の立体構造を重ね合わせると、タンパク質全体では低い Root Mean Square Deviation (RMSD) (1.6 Å) が得られた。RMSD とはタンパク質構造の非類似性や誤りを表す指標であり、RMSD が低いほどタンパク質構造が類似していることを示す。配列が 30% 以上一致の場合、RMSD は 2 Å 以下となる。つまり ORF21 と HSV-1 vTK の基本的な機能部位に関しては保存されている事を意味する。ORF21 と HSV-1 の vTK の構造に明確な違いがある部位は ORF21 の N 末端部位である。ORF21 の N 末端側から 248 a.a.までの領域は、モデル構造の信頼性を表す predicted Local Distance Difference Test (IDDT)<sup>107</sup> において、他の ORF21 の領域と比較し低い値を示した。また同様に、ドメイン間距離の予測指標である predicted Aligned Error において、ORF21 の N 末端側から 248 a.a. までの領域は、他の領域と比べ低い値を示した。このことから ORF21 の N 末端側は天然変性領域 (Intrinsically Disordered Region; IDR) の可能性が考えられる。IDR とは自由な立体構造を取り、リン酸化などの修飾を受け様々なタンパク質と相互作用し、機能発現をする領域である。

また今回の ESM-Fold で得た予測構造以外に、以下の 2 つの理由で ORF21 の N 末端側が IDR と推測することが出来る。理由の 1 つ目は、先行報告において ORF21 の N 末端側には



SH2 ドメインが含まれているとの報告である<sup>45</sup>。通常 IDR は SH2 ドメインを含んでおり<sup>108</sup>、このことから ORF21 の N 末端側は IDR であると考えられる。理由の 2 つ目は、IDR 予測サーバーである VSL2、PONDR-FIT において IDR との予測を得ることが出来なかったが、IDR において高いスコアを出力する Disorder 領域を予測する値が高い値を示していた。

以上の理由から ORF21 の N 末端側が IDR と考えられる。また前述したように、ORF21 と HSV-1 の vTK の構造に明確な違いがある部位は ORF21 の N 末端部位であったことから、ORF21 の N 末端側の IDR の変化が ORF21 の特徴的な機能発現に寄与していると考えられる。

昨今、生命科学の領域において生物学的相分離、液-液相分離 (LLPS) といった現象が注目されている<sup>109-112</sup>。細胞内においても核酸やタンパク質などの生体高分子が LLPS を形成し、細胞内リン酸化の制御など様々な機能を制御していると考えられており、この現象に着目して生命現象の解明が進められている<sup>113-115</sup>。また前述の IDR が LLPS を介した機能形成に重要であると考えられている<sup>108,116</sup>。今回の実験では ORF21 のキナーゼ機能が MEK シグナルの活性化に寄与すると予想された。しかしながら、実際に得られた結果としてはキナーゼによる寄与は大きくはない。そのため、ORF21 が足場タンパク質として細胞内の LLPS の制御に関与することで細胞内シグナルの活性化に関与するのではないかと考えられる。今後ウイルス感染状態における細胞機能の制御を解析する場合、LLPS の変化を解析することでウイルスの生活環に対する影響を解析出来るかもしれない。

## 2-5. 小括

ORF21 遺伝子改変 KSHV BAC16 定常保持細胞を用いて、BAC 由来の ORF21 の発現時期や細胞内局在を解析した。また、ORF21 の細胞内シグナル伝達に与える影響と MEK 阻害剤による子孫ウイルスの感染に与える影響について解析した。その結果、BAC 由来の ORF21 は細胞質に局在し、細胞収縮には ORF21 のリン酸化が関与していたことが明らかになった。また、ORF21 分子の過剰発現が MEK のリン酸化と足場の有無に関わらず細胞増殖を亢進させること、さらに、標的細胞への MEK シグナル阻害が KSHV の新規感染を減少させることが明らかになった。

## 総括

本研究では KSHV の溶解感染期に発現するテグメントタンパク質 ORF21 のウイルス学的機能解明を目的として、ORF21 遺伝子改変 KSHV を作製した。第 1 章ではウイルス複製、ウイルス遺伝子発現、ウイルス産生、子孫ウイルスの感染性に与える KSHV ORF21 の影響について解析した。遺伝子改変 KSHV、すなわち ORF21 リン酸化能欠失 KSHV (21KD-BAC16)、ORF21 分子欠損 KSHV (21del-BAC16) を作製し、それらを iVero 細胞と iSLK 細胞に安定的に遺伝子導入し、BAC16 定常保持細胞株を樹立した。これらの ORF21 変異導入 KSHV 定常発現細胞株を用いて、ウイルスゲノム複製、mRNA 発現、ウイルス産生、子孫ウイルスの新規感染性を比較した。その結果、ORF21 が分子依存的にウイルス新規感染に関与していることが明らかになった。以上より ORF21 のキナーゼ機能以外の ORF21 分子依存的機能が子孫ウイルスの新規感染に必要であることが示唆された

第 2 章では ORF21 による宿主細胞中の細胞内シグナル伝達や機能形態への影響について、それぞれ解析した。その結果、BAC 由来の ORF21 は細胞質全体に局在し、細胞収縮に関与していた。また ORF21 分子の過剰発現が細胞内の MEK リン酸化と細胞増殖を亢進させた。さらに、MEK 阻害は KSHV の子孫ウイルスの新規感染性を減少させることを明らかにした。

以上の研究成果より、ORF21 の感染性ウイルス産生と新規感染に関わる重要な知見が見出された。ORF21 分子依存的な機能を標的とした選択的阻害剤が有効な抗 KSHV 薬開発につながると予想される。今後、ORF21 分子機能の全貌解明と ORF21 機能阻害剤の開発が期待される。

## 結語

1. KSHV の溶解感染において、ORF21 はウイルスのゲノム複製や遺伝子発現には寄与しないが、産生された子孫ウイルスの感染性に必要である。
2. KSHV の ORF21 は細胞内の MEK シグナルを活性化し、MEK シグナルの活性化は子孫ウイルスの新規感染に必要である。

## 謝辞

終わりに臨み、本研究の遂行及び論文作成に至るまで、丁寧かつ的確な助言のみならず暖かく研究の遂行を見守って下さいました京都薬科大学大学院 薬学研究科 細胞生物学分野 藤室雅弘教授に深く感謝いたします。

また研究の基礎から本研究の遂行に至るまで、ご懇篤なる指導、ご鞭撻を賜りました京都薬科大学大学院 薬学研究科 細胞生物学分野 渡部匡史助教(現琉球大学 医学研究科 ウイルス学講座 講師)に心から御礼申し上げます。

副査として、本論文の査読ならびにご助言を賜りました京都薬科大学大学院 薬学研究科 生化学分野 中山祐治教授、統合薬科学系 高田和幸教授に深謝し、厚く御礼申し上げます。

本研究にあたり、実験の一部にご協力賜りました京都薬科大学大学院 薬学研究科 細胞生物学分野 祝迫佑紀氏に御礼申し上げます。

また在学中の経済的援助を賜りました、日本学術振興会特別研究員 (DC1) に採用頂いた独立行政法人日本学術振興会に心より感謝いたします。

最後に、本大学院への進学に理解および支援してくれた両親、並びに温かく見守って下さった細胞生物学分野の皆様、及び様々な相談に乗って下さいました関係者の皆様に心から深く感謝いたします。

## 参考文献

- (1) Chang, Y.; Cesarman, E.; Pessin, M. S.; LEE, F.; Culpepper, J.; Knowles, D. M.; Moore, P. S. Identification of Herpesvirus-like DNA Sequences in AIDS-Associated Kaposi's Sarcoma. *Science*. **1994**, *266* (5192), 1865–1869.  
<https://doi.org/10.1126/science.7997879>.
- (2) Krug, L. T.; Pellett, P. E. The Family Herpesviridae : A Brief Introduction. *Fields Virology*; Wolters Kluwer: Philadelphia, PA, USA, 2021; Vol. 2.
- (3) Damania, B.; Cesarman, E. Kaposi's Sarcoma Herpesvirus. *Fields Virology*; Howley, P. M., Knipe, D. M., Eds.; Damania, B., Cohen, J. I., Series Eds.; Wolters Kluwer: Philadelphia, PA, USA, 2021; Vol. 2.
- (4) Johnes, J., L.; Hanson, D., L.; Dworkin, M., S.; Alderton, D., L.; Fleming, P., L.; Kaplan, J., E.; Ward, J. Surveillance for AIDS-Defining Opportunistic Illnesses, 1992–1997. *MMWR CDC Surveill Summ*. **1999**, *48* (2), 1–22.
- (5) Betsem, E.; Cassar, O.; Afonso, P. V.; Fontanet, A.; Froment, A.; Gessain, A. Epidemiology and Genetic Variability of HHV-8/KSHV in Pygmy and Bantu Populations in Cameroon. *PLoS Negl Trop Dis*. **2014**, *8* (5), e2851.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002851>.
- (6) Etta, E.; Alayande, D.; Mavhandu-Ramarumo, L.; Gachara, G.; Bessong, P. HHV-8 Seroprevalence and Genotype Distribution in Africa, 1998–2017: A Systematic Review. *Viruses*. **2018**, *10* (9), 458. <https://doi.org/10.3390/v10090458>.
- (7) Mamimandjiami, A. I.; Mouinga-Ondémé, A.; Ramassamy, J.-L.; Djuicy, D. D.; Afonso, P. V.; Mahé, A.; Lekana-Douki, J.-B.; Cassar, O.; Gessain, A. Epidemiology and Genetic Variability of HHV-8/KSHV among Rural Populations and Kaposi's Sarcoma Patients in Gabon, Central Africa. Review of the Geographical Distribution of HHV-8 K1 Genotypes in Africa. *Viruses*. **2021**, *13* (2), 175. <https://doi.org/10.3390/v13020175>.
- (8) Pfeiffer, R. M.; Wheeler, W. A.; Mbisa, G.; Whitby, D.; Goedert, J. J.; de Thé, G.; Mbulaiteye, S. M. Geographic Heterogeneity of Prevalence of the Human Herpesvirus 8 in Sub-Saharan Africa: Clues About Etiology. *Ann Epidemiol*. **2010**, *20* (12), 958–963.  
<https://doi.org/10.1016/j.annepidem.2010.07.098>.
- (9) 渡部匡史; 藤室雅弘. カポジ肉腫関連ヘルペスウイルスの複製機構と創薬研究. *薬学雑誌*. **2019**, *139* (1), 69–73.
- (10) Fujii, T.; Taguchi, H.; Katano, H.; Mori, S.; Nakamura, T.; Nojiri, N.; Nakajima, K.; Tadokoro, K.; Juji, T.; Iwamoto, A. Seroprevalence of Human Herpesvirus 8 in Human Immunodeficiency Virus 1-Positive and Human Immunodeficiency Virus 1-Negative Populations in Japan. *J Med Virol*. **1999**, *57* (2), 159–162.

- [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9071\(199902\)57:2<159::AID-JMV12>3.0.CO;2-A](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9071(199902)57:2<159::AID-JMV12>3.0.CO;2-A).
- (11) Katano, H.; Iwasaki, T.; Baba, N.; Terai, M.; Mori, S.; Iwamoto, A.; Kurata, T.; Sata, T. Identification of Antigenic Proteins Encoded by Human Herpesvirus 8 and Seroprevalence in the General Population and among Patients with and without Kaposi's Sarcoma. *J Virol.* **2000**, *74* (8), 3478–3485.  
<https://doi.org/10.1128/JVI.74.8.3478-3485.2000>.
  - (12) Satoh, M.; Toma, H.; Satoh, Y.; Futenma, C.; Kiyuna, S.; Shiroma, Y.; Kokaze, A.; Sakurada, S.; Sata, T. Seroprevalence of Human Herpesvirus 8 in Okinawa, Japan. *Jpn J Infect Dis.* **2001**, *54* (3), 125–126.
  - (13) Awazawa, R.; Utsumi, D.; Katano, H.; Awazawa, T.; Miyagi, T.; Hayashi, K.; Matori, S.; Uezato, H.; Takahashi, K. High Prevalence of Distinct Human Herpesvirus 8 Contributes to the High Incidence of Non-Acquired Immune Deficiency Syndrome-Associated Kaposi's Sarcoma in Isolated Japanese Islands. *J Infect Dis.* **2017**, *216* (7), 850–858. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix424>.
  - (14) 今村顕史; 加藤博史; 照屋勝治; 上平朝子; 矢島敬史郎; 四本美保子; 岡田誠治; 片野晴隆. エイズに合併するカポジ肉腫などの HHV-8 関連疾患に対する治療の手引き. 日本エイズ学会誌. **2014**, *16* (1), 42–51.
  - (15) Looker, K. J.; Magaret, A. S.; May, M. T.; Turner, K. M. E.; Vickerman, P.; Gottlieb, S. L.; Newman, L. M. Global and Regional Estimates of Prevalent and Incident Herpes Simplex Virus Type 1 Infections in 2012. *PLoS ONE.* **2015**, *10* (10), e0140765.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140765>.
  - (16) Hashido, M.; Kawana, T.; Matsunaga, Y.; Inouye, S. Changes in Prevalence of Herpes Simplex Virus Type 1 and 2 Antibodies from 1973 to 1993 in the Rural Districts of Japan. *Microbiol Immunol.* **1999**, *43* (2), 177–180. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.1999.tb02390.x>.
  - (17) Doi, Y.; Ninomiya, T.; Hata, J.; Yonemoto, K.; Tanizaki, Y.; Arima, H.; Liu, Y.; Rahman, M.; Iida, M.; Kiyohara, Y. Seroprevalence of Herpes Simplex Virus 1 and 2 in a Population-Based Cohort in Japan. *J Epidemiol.* **2009**, *19* (2), 56–62.  
<https://doi.org/10.2188/jea.JE20080061>.
  - (18) Looker, K. J.; Welton, N. J.; Sabin, K. M.; Dalal, S.; Vickerman, P.; Turner, K. M. E.; Boily, M.-C.; Gottlieb, S. L. Global and Regional Estimates of the Contribution of Herpes Simplex Virus Type 2 Infection to HIV Incidence: A Population Attributable Fraction Analysis Using Published Epidemiological Data. *Lancet Infect Dis.* **2020**, *20* (2), 240–249. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(19\)30470-0](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(19)30470-0).
  - (19) Daulagala, S. W. P. L.; Noordeen, F. Epidemiology and Factors Influencing Varicella Infections in Tropical Countries Including Sri Lanka. *Virusdisease.* **2018**, *29* (3), 277–284. <https://doi.org/10.1007/s13337-018-0459-z>.
  - (20) 金廣優一; 飯笹久; 康宇婷; 丁丹; 上野詩織; 飯田慶治; 吉山裕規. ヘルペスウイルス

- ス感染症の特徴. 島根医学. **2019**, 39 (3), 1–8.
- (21) Gewurz, B. E.; Longnecker, R. M.; Cohen, J. I. Epstein-Barr Virus. *Fields Virology*; Wolters Kluwer: Philadelphia, PA, USA, 2021; Vol. 2.
- (22) Goodrum, F.; Britt, W.; Mocarski, Edward. S. Cytomegalovirus. *Fields Virology*; Wolters Kluwer: Philadelphia, PA, USA, 2021; Vol. 2.
- (23) Okuno, T.; Takahashi, K.; Balachandra, K.; Shiraki, K.; Yamanishi, K.; Takahashi, M.; Baba, K. Seroepidemiology of Human Herpesvirus 6 Infection in Normal Children and Adults. *J Clin Microbiol.* **1989**, 27 (4), 651–653. <https://doi.org/10.1128/jcm.27.4.651-653.1989>.
- (24) Zerr, D. M.; Meier, A. S.; Selke, S. S.; Frenkel, L. M.; Huang, M.-L.; Wald, A.; Rhoads, M. P.; Nguy, L.; Bornemann, R.; Morrow, R. A.; Corey, L. A Population-Based Study of Primary Human Herpesvirus 6 Infection. *N Engl J Med.* **2005**, 352 (8), 768–776. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa042207>.
- (25) Tanaka-Taya, K.; Kondo, T.; Mukai, T.; Miyoshi, H.; Yamamoto, Y.; Okada, S.; Yamanishi, K. Seroepidemiological Study of Human Herpesvirus-6 and -7 in Children of Different Ages and Detection of These Two Viruses in Throat Swabs by Polymerase Chain Reaction. *J Med Virol.* **1996**, 48 (1), 88–94. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9071\(199601\)48:1<88::AID-JMV14>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9071(199601)48:1<88::AID-JMV14>3.0.CO;2-2).
- (26) Russo, J. J.; Bohenzky, R. A.; Chien, M.-C.; Chen, J.; Yan, M.; Maddalena, D.; Parry, J. P.; Peruzzi, D.; Edelman, I. S.; Chang, Y.; Moore, P. S. Nucleotide Sequence of the Kaposi Sarcoma-Associated Herpesvirus (HHV8). *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1996**, 93 (25), 14862–14867. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.25.14862>.
- (27) Kumar, B.; Chandran, B. KSHV Entry and Trafficking in Target Cells—Hijacking of Cell Signal Pathways, Actin and Membrane Dynamics. *Viruses.* **2016**, 8 (11), 305. <https://doi.org/10.3390/v8110305>.
- (28) Kumar, B.; Roy, A.; Veettil, M. V.; Chandran, B. Insight into the Roles of E3 Ubiquitin Ligase C-Cbl, ESCRT Machinery, and Host Cell Signaling in Kaposi’s Sarcoma-Associated Herpesvirus Entry and Trafficking. *J Virol.* **2018**, 92 (4), e01376-17. <https://doi.org/10.1128/JVI.01376-17>.
- (29) Sathish, N.; Wang, X.; Yuan, Y. Tegument Proteins of Kaposi’s Sarcoma-Associated Herpesvirus and Related Gamma-Herpesviruses. *Front Microbiol.* **2012**, 3. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00098>.
- (30) Chakraborty, S.; Veettil, M. V.; Chandran, B. Kaposi’s Sarcoma Associated Herpesvirus Entry into Target Cells. *Front Microbiol.* **2012**, 3. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00006>.
- (31) Toth, Z.; Brulois, K.; Lee, H.-R.; Izumiya, Y.; Tepper, C.; Kung, H.-J.; Jung, J. U. Biphasic Euchromatin-to-Heterochromatin Transition on the KSHV Genome Following De Novo Infection. *PLoS Pathog.* **2013**, 9 (12), e1003813.

- <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003813>.
- (32) Jung, K. L.; Choi, U. Y.; Park, A.; Foo, S.-S.; Kim, S.; Lee, S.-A.; Jung, J. U. Single-Cell Analysis of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Infection in Three-Dimensional Air-Liquid Interface Culture Model. *PLoS Pathog.* **2022**, *18* (8), e1010775. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010775>.
- (33) Moore, P. S.; Gao, S.-J.; Dominguez, G.; Cesarman, E.; Lungu, O.; Knowles, D. M.; Garber, R.; Pellett, P. E.; McGeoch, D. J.; Chang, Y. Primary Characterization of a Herpesvirus Agent Associated with Kaposi's Sarcoma. *J Virol.* **1996**, *70* (1), 549–558.
- (34) Bitter, E. E.; Townsend, M. H.; Erickson, R.; Allen, C.; O'Neill, K. L. Thymidine Kinase 1 through the Ages: A Comprehensive Review. *Cell Biosci.* **2020**, *10* (1), 138. <https://doi.org/10.1186/s13578-020-00493-1>.
- (35) Sun, R.; Wang, L. Thymidine Kinase 2 Enzyme Kinetics Elucidate the Mechanism of Thymidine-Induced Mitochondrial DNA Depletion. *Biochemistry.* **2014**, *53* (39), 6142–6150. <https://doi.org/10.1021/bi5006877>.
- (36) Deville-Bonne, D.; El Amri, C.; Meyer, P.; Chen, Y.; Agrofoglio, L. A.; Janin, J. Human and Viral Nucleoside/Nucleotide Kinases Involved in Antiviral Drug Activation: Structural and Catalytic Properties. *Antiviral Res.* **2010**, *86* (1), 101–120. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2010.02.001>.
- (37) Cannon, J. S.; Hamzeh, F.; Moore, S.; Nicholas, J.; Ambinder, R. F. Human Herpesvirus 8-Encoded Thymidine Kinase and Phosphotransferase Homologues Confer Sensitivity to Ganciclovir. *J Virol.* **1999**, *73* (6), 4786–4793. <https://doi.org/10.1128/JVI.73.6.4786-4793.1999>.
- (38) Gustafson, E. A.; Schinazi, R. F.; Fingerroth, J. D. Human Herpesvirus 8 Open Reading Frame 21 Is a Thymidine and Thymidylate Kinase of Narrow Substrate Specificity That Efficiently Phosphorylates Zidovudine but Not Ganciclovir. *J Virol.* **2000**, *74* (2), 684–692. <https://doi.org/10.1128/JVI.74.2.684-692.2000>.
- (39) Gáspár, G.; De Clercq, E.; Neyts, J. Human Herpesvirus 8 Gene Encodes a Functional Thymidylate Synthase. *J Virol.* **2002**, *76* (20), 10530–10532. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.20.10530-10532.2002>.
- (40) Kuraku, S.; Zmasek, C. M.; Nishimura, O.; Katoh, K. ALeaves Facilitates On-Demand Exploration of Metazoan Gene Family Trees on MAFFT Sequence Alignment Server with Enhanced Interactivity. *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41* (W1), W22–W28. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt389>.
- (41) Katoh, K.; Rozewicki, J.; Yamada, K. D. MAFFT Online Service: Multiple Sequence Alignment, Interactive Sequence Choice and Visualization. *Brief Bioinform.* **2019**, *20* (4), 1160–1166. <https://doi.org/10.1093/bib/bbx108>.
- (42) Nguyen, L.-T.; Schmidt, H. A.; von Haeseler, A.; Minh, B. Q. IQ-TREE: A Fast and Effective Stochastic Algorithm for Estimating Maximum-Likelihood Phylogenies. *Mol*

- Biol Evol.* **2015**, *32* (1), 268–274. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu300>.
- (43) Minh, B. Q.; Schmidt, H. A.; Chernomor, O.; Schrempf, D.; Woodhams, M. D.; von Haeseler, A.; Lanfear, R. IQ-TREE 2: New Models and Efficient Methods for Phylogenetic Inference in the Genomic Era. *Mol Biol Evol.* **2020**, *37* (5), 1530–1534. <https://doi.org/10.1093/molbev/msaa015>.
- (44) Hoang, D. T.; Chernomor, O.; von Haeseler, A.; Minh, B. Q.; Vinh, L. S. UFBoot2: Improving the Ultrafast Bootstrap Approximation. *Mol Biol Evol.* **2018**, *35* (2), 518–522. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx281>.
- (45) Gill, M. B.; Turner, R.; Stevenson, P. G.; Way, M. KSHV TK Is a Tyrosine Kinase That Disrupts Focal Adhesions and Induces Rho-mediated Cell Contraction. *EMBO J.* **2015**, *34* (4), 448–465. <https://doi.org/10.15252/emj.201490358>.
- (46) Beauclair, G.; Naimo, E.; Dubich, T.; Rückert, J.; Koch, S.; Dhingra, A.; Wirth, D.; Schulz, T. F. Targeting Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus ORF21 Tyrosine Kinase and Viral Lytic Reactivation by Tyrosine Kinase Inhibitors Approved for Clinical Use. *J Virol.* **2020**, *94* (5), e01791-19. <https://doi.org/10.1128/JVI.01791-19>.
- (47) Mochizuki, H.; Schwartz, J. P.; Tanaka, K.; Brady, R. O.; Reiser, J. High-Titer Human Immunodeficiency Virus Type 1-Based Vector Systems for Gene Delivery into Nondividing Cells. *J Virol.* **1998**, *72* (11), 8873–8883. <https://doi.org/10.1128/JVI.72.11.8873-8883.1998>.
- (48) Neumann, G.; Watanabe, T.; Ito, H.; Watanabe, S.; Goto, H.; Gao, P.; Hughes, M.; Perez, D. R.; Donis, R.; Hoffmann, E.; Hobom, G.; Kawaoka, Y. Generation of Influenza A Viruses Entirely from Cloned cDNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1999**, *96* (16), 9345–9350. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.16.9345>.
- (49) Neumann, G.; Fujii, K.; Kino, Y.; Kawaoka, Y. An Improved Reverse Genetics System for Influenza A Virus Generation and Its Implications for Vaccine Production. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2005**, *102* (46), 16825–16829. <https://doi.org/10.1073/pnas.0505587102>.
- (50) Gordon, G. S.; Sitnikov, D.; Webb, C. D.; Teleman, A.; Straight, A.; Losick, R.; Murray, A. W.; Wright, A. Chromosome and Low Copy Plasmid Segregation in *E. Coli*: Visual Evidence for Distinct Mechanisms. *Cell.* **1997**, *90* (6), 1113–1121. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80377-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80377-3).
- (51) Cooper, S.; Keasling, J. D. Cycle-Specific Replication of Chromosomal and F-Plasmid Origins. *FEMS Microbiol.* **1998**, *163* (2), 217–222. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1998.tb13048.x>.
- (52) Brune, W.; Messerle, M.; Koszinowski, U. H. Forward with BACs. *Trends in Genet.* **2000**, *16* (6), 254–259. [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(00\)02015-1](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(00)02015-1).
- (53) 川口寧; 田中道子. BAC システム : 大腸菌遺伝学とウイルス学が融合した新しいヘルペスウイルスの遺伝子改変法. *ウイルス*. **2004**, *54* (2), 255–264.



- (54) Myoung, J.; Ganem, D. Generation of a Doxycycline-Inducible KSHV Producer Cell Line of Endothelial Origin: Maintenance of Tight Latency with Efficient Reactivation upon Induction. *J Virol Methods*. **2011**, *174* (1–2), 12–21.  
<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2011.03.012>.
- (55) Brulois, K. F.; Chang, H.; Lee, A. S.-Y.; Ensser, A.; Wong, L.-Y.; Toth, Z.; Lee, S. H.; Lee, H.-R.; Myoung, J.; Ganem, D.; Oh, T.-K.; Kim, J. F.; Gao, S.-J.; Jung, J. U. Construction and Manipulation of a New Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Bacterial Artificial Chromosome Clone. *J Virol*. **2012**, *86* (18), 9708–9720.  
<https://doi.org/10.1128/JVI.01019-12>.
- (56) 木下誉富. キナーゼを標的とした構造生物学および創薬の現状. 日本結晶学会誌. **2017**, *59* (4), 174–181.
- (57) Saraste, M.; Sibbald, Peter. R.; Wittinghofer, A. The P-Loop — a Common Motif in ATP- and GTP-Binding Proteins. *Trends Biochem*. **1990**, *15* (11), 430–434.  
[https://doi.org/10.1016/0968-0004\(90\)90281-F](https://doi.org/10.1016/0968-0004(90)90281-F).
- (58) Ramakrishnan, C.; Dani, V. S.; Ramasarma, T. A Conformational Analysis of Walker Motif A [GXXXXGKT (S)] in Nucleotide-Binding and Other Proteins. *Protein Eng*. **2002**, *15* (10), 783–798. <https://doi.org/10.1093/protein/15.10.783>.
- (59) Coleman, H. M.; Lima, B. de; Morton, V.; Stevenson, P. G. Murine Gammaherpesvirus 68 Lacking Thymidine Kinase Shows Severe Attenuation of Lytic Cycle Replication In Vivo but Still Establishes Latency. *J Virol*. **2003**, *77* (4), 2410–2417.  
<https://doi.org/10.1128/JVI.77.4.2410-2417.2003>.
- (60) Song, M. J.; Hwang, S.; Wong, W. H.; Wu, T.-T.; Lee, S.; Liao, H.-I.; Sun, R. Identification of Viral Genes Essential for Replication of Murine  $\gamma$ -Herpesvirus 68 Using Signature-Tagged Mutagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2005**, *102* (10), 3805–3810. <https://doi.org/10.1073/pnas.0404521102>.
- (61) Gill, M. B.; Wright, D. E.; Smith, C. M.; May, J. S.; Stevenson, P. G. Murid Herpesvirus-4 Lacking Thymidine Kinase Reveals Route-Dependent Requirements for Host Colonization. *J Gen Virol*. **2009**, *90* (6), 1461–1470.  
<https://doi.org/10.1099/vir.0.010603-0>.
- (62) Tan, E.; Chin, C. S. H.; Lim, Z. F. S.; Ng, S. K. HEK293 Cell Line as a Platform to Produce Recombinant Proteins and Viral Vectors. *Front. Bioeng. Biotechnol*. **2021**, *9*, 796991. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.796991>.
- (63) Graham, F. L.; Smiley, J.; Russell, W. C.; Nairn, R. Characteristics of a Human Cell Line Transformed by DNA from Human Adenovirus Type 5. *J. Gen. Virol*. **1977**, *36* (1), 59–72. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-36-1-59>.
- (64) Ammerman, N. C.; Beier-Sexton, M.; Azad, A. F. Growth and Maintenance of Vero Cell Lines. *Curr Protoc Microbiol*. **2008**, *11* (1).  
<https://doi.org/10.1002/9780471729259.mca04es11>.

- (65) Osada, N.; Kohara, A.; Yamaji, T.; Hirayama, N.; Kasai, F.; Sekizuka, T.; Kuroda, M.; Hanada, K. The Genome Landscape of the African Green Monkey Kidney-Derived Vero Cell Line. *DNA Res.* **2014**, *21* (6), 673–683. <https://doi.org/10.1093/dnares/dsu029>.
- (66) 花田賢太郎. *Vero 細胞の物語*. 国立感染症研究所. <https://www.niid.go.jp/niid/ja/chlamydia-pneumonia-m/818-biochem/5752-vero.html?showall=1>.
- (67) Nishimura, M.; Watanabe, T.; Yagi, S.; Yamanaka, T.; Fujimuro, M. Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus ORF34 Is Essential for Late Gene Expression and Virus Production. *Sci Rep.* **2017**, *7* (1), 329. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00401-7>.
- (68) Campbell, M.; Watanabe, T.; Nakano, K.; Davis, R. R.; Lyu, Y.; Tepper, C. G.; Durbin-Johnson, B.; Fujimuro, M.; Izumiya, Y. KSHV Episomes Reveal Dynamic Chromatin Loop Formation with Domain-Specific Gene Regulation. *Nat Commun.* **2018**, *9* (1), 49. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02089-9>.
- (69) Schindelin, J.; Arganda-Carreras, I.; Frise, E.; Kaynig, V.; Longair, M.; Pietzsch, T.; Preibisch, S.; Rueden, C.; Saalfeld, S.; Schmid, B.; Tinevez, J.-Y.; White, D. J.; Hartenstein, V.; Eliceiri, K.; Tomancak, P.; Cardona, A. Fiji: An Open-Source Platform for Biological-Image Analysis. *Nat Methods.* **2012**, *9* (7), 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>.
- (70) Tischer, B. K.; Smith, G. A.; Osterrieder, N. En Passant Mutagenesis: A Two Step Markerless Red Recombination System. *In Vitro Mutagenesis Protocols: Third Edition; Methods in Molecular Biology; Humana Press: To, 2010; Vol. 634, pp 421–430.*
- (71) Chen, C.; Okayama, H. High-Efficiency Transformation of Mammalian Cells by Plasmid DNA. *Mol Cell Biol.* **1987**, *7*, 8.
- (72) Miller, G.; El-Guindy, A.; Countryman, J.; Ye, J.; Gradoville, L. Lytic Cycle Switches of Oncogenic Human Gammaherpesviruses 1. In *Advances in Cancer Research*; Elsevier, 2007; Vol. 97, pp 81–109. [https://doi.org/10.1016/S0065-230X\(06\)97004-3](https://doi.org/10.1016/S0065-230X(06)97004-3).
- (73) Luka, J.; Kallin, B.; Klein, G. Induction of the Epstein-Barr Virus (EBV) Cycle in Latently Infected Cells by n-Butyrate. *Virology.* **1979**, *94* (1), 228–231. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(79\)90455-0](https://doi.org/10.1016/0042-6822(79)90455-0).
- (74) 富田智; 岡田康男; 又賀泉; 片桐正隆. ヒト口腔癌細胞株に対する酪酸ナトリウムの腫瘍増殖および浸潤抑制効果. 日本口腔外科学会雑誌. **2012**, *58* (9), 507–516.
- (75) 伊藤宣行. ヒトグリオーマ細胞に対する酪酸ナトリウム(sodium butyrate)の細胞増殖および浸潤能抑制効果について. 杏林医会誌. **1999**, *30* (4), 485–496.
- (76) Mu, D.; Gao, Z.; Guo, H.; Zhou, G.; Sun, B. Sodium Butyrate Induces Growth Inhibition and Apoptosis in Human Prostate Cancer DU145 Cells by Up-Regulation of the Expression of Annexin A1. *PLoS ONE.* **2013**, *8* (9), e74922. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074922>.
- (77) Siavoshian, S. Butyrate and Trichostatin A Effects on the Proliferation/Differentiation

- of Human Intestinal Epithelial Cells: Induction of Cyclin D3 and P21 Expression. *Gut*. **2000**, *46* (4), 507–514. <https://doi.org/10.1136/gut.46.4.507>.
- (78) R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing, 2022. <https://www.R-project.org/>.
- (79) Jenner, R. G.; Albà, M. M.; Boshoff, C.; Kellam, P. Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Latent and Lytic Gene Expression as Revealed by DNA Arrays. *J Virol*. **2001**, *75* (2), 891–902. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.2.891-902.2001>.
- (80) Lu, M.; Suen, J.; Frias, C.; Pfeiffer, R.; Tsai, M.-H.; Chuang, E.; Zeichner, S. L. Dissection of the Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Gene Expression Program by Using the Viral DNA Replication Inhibitor Cidofovir. *J Virol*. **2004**, *78* (24), 13637–13652. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.24.13637-13652.2004>.
- (81) Arias, C.; Weisburd, B.; Stern-Ginossar, N.; Mercier, A.; Madrid, A. S.; Bellare, P.; Holdorf, M.; Weissman, J. S.; Ganem, D. KSHV 2.0: A Comprehensive Annotation of the Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Genome Using Next-Generation Sequencing Reveals Novel Genomic and Functional Features. *PLoS Pathog*. **2014**, *10* (1), e1003847. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003847>.
- (82) Jha, H. C.; Lu, J.; Verma, S. C.; Banerjee, S.; Mehta, D.; Robertson, E. S. Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Genome Programming during the Early Stages of Primary Infection of Peripheral Blood Mononuclear Cells. *mBio*. **2014**, *5* (6), e02261-14. <https://doi.org/10.1128/mBio.02261-14>.
- (83) Clontech Laboratories, Inc. Tet-Off and Tet-On Gene Expression Systems User Manual, 2012. [https://www.takarabio.com/documents/User%20Manual/PT3001/PT3001-1\\_100912.pdf](https://www.takarabio.com/documents/User%20Manual/PT3001/PT3001-1_100912.pdf).
- (84) Meng, Q.; Hagemeyer, S. R.; Fingerroth, J. D.; Gershburg, E.; Pagano, J. S.; Kenney, S. C. The Epstein-Barr Virus (EBV)-Encoded Protein Kinase, EBV-PK, but Not the Thymidine Kinase (EBV-TK), Is Required for Ganciclovir and Acyclovir Inhibition of Lytic Viral Production. *J Virol*. **2010**, *84* (9), 4534–4542. <https://doi.org/10.1128/JVI.02487-09>.
- (85) Zhu, F. X.; Chong, J. M.; Wu, L.; Yuan, Y. Virion Proteins of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus. *J Virol*. **2005**, *79* (2), 800–811. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.2.800-811.2005>.
- (86) Bechtel, J. T.; Winant, R. C.; Ganem, D. Host and Viral Proteins in the Virion of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus. *J Virol*. **2005**, *79* (8), 4952–4964. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.8.4952-4964.2005>.
- (87) Nabiee, R.; Syed, B.; Ramirez Castano, J.; Lalani, R.; Totonchy, J. E. An Update of the Virion Proteome of Kaposi Sarcoma-Associated Herpesvirus. *Viruses*. **2020**, *12* (12), 1382. <https://doi.org/10.3390/v12121382>.
- (88) Fujimuro, M.; Hayward, S. D. The Latency-Associated Nuclear Antigen of Kaposi's

- Sarcoma-Associated Herpesvirus Manipulates the Activity of Glycogen Synthase Kinase-3 $\beta$ . *J Virol.* **2003**, *77* (14), 8019–8030. <https://doi.org/10.1128/JVI.77.14.8019-8030.2003>.
- (89) Gill, M. B.; Murphy, J.-E.; Fingerroth, J. D. Functional Divergence of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus and Related Gamma-2 Herpesvirus Thymidine Kinases: Novel Cytoplasmic Phosphoproteins That Alter Cellular Morphology and Disrupt Adhesion. *J Virol.* **2005**, *79* (23), 14647–14659. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.23.14647-14659.2005>.
- (90) Bussey, K. A.; Reimer, E.; Todt, H.; Denker, B.; Gallo, A.; Konrad, A.; Ottinger, M.; Adler, H.; Stürzl, M.; Brune, W.; Brinkmann, M. M. The Gammaherpesviruses Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus and Murine Gammaherpesvirus 68 Modulate the Toll-Like Receptor-Induced Proinflammatory Cytokine Response. *J Virol.* **2014**, *88* (16), 9245–9259. <https://doi.org/10.1128/JVI.00841-14>.
- (91) Sugimoto, A.; Abe, Y.; Watanabe, T.; Hosokawa, K.; Adachi, J.; Tomonaga, T.; Iwatani, Y.; Murata, T.; Fujimuro, M. The FAT10 Posttranslational Modification Is Involved in Lytic Replication of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus. *J Virol.* **2021**, *95* (10), e02194-20. <https://doi.org/10.1128/JVI.02194-20>.
- (92) Ishimaru, H.; Hosokawa, K.; Sugimoto, A.; Tanaka, R.; Watanabe, T.; Fujimuro, M. MG132 Exerts Anti-Viral Activity against HSV-1 by Overcoming Virus-Mediated Suppression of the ERK Signaling Pathway. *Sci Rep.* **2020**, *10* (1), 6671. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63438-1>.
- (93) Moriguchi, M.; Watanabe, T.; Kadota, A.; Fujimuro, M. Capsaicin Induces Apoptosis in KSHV-Positive Primary Effusion Lymphoma by Suppressing ERK and P38 MAPK Signaling and IL-6 Expression. *Front Oncol.* **2019**, *9*, 83. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00083>.
- (94) Davis, Z. H.; Verschueren, E.; Jang, G. M.; Kleffman, K.; Johnson, J. R.; Park, J.; Von Dollen, J.; Maher, M. C.; Johnson, T.; Newton, W.; Jäger, S.; Shales, M.; Horner, J.; Hernandez, R. D.; Krogan, N. J.; Glaunsinger, B. A. Global Mapping of Herpesvirus-Host Protein Complexes Reveals a Transcription Strategy for Late Genes. *Mol Cell.* **2015**, *57* (2), 349–360. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.11.026>.
- (95) Yu, F.; Harada, J. N.; Brown, H. J.; Deng, H.; Song, M. J.; Wu, T.-T.; Kato-Stankiewicz, J.; Nelson, C. G.; Vieira, J.; Tamanoi, F.; Chanda, S. K.; Sun, R. Systematic Identification of Cellular Signals Reactivating Kaposi Sarcoma-Associated Herpesvirus. *PLoS Pathog.* **2007**, *3* (3), e44. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030044>.
- (96) Wong, J. P.; Damania, B. Modulation of Oncogenic Signaling Networks by Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus. *Biol Chem.* **2017**, *398* (8), 911–918. <https://doi.org/10.1515/hsz-2017-0101>.

- (97) Bhatt, A. P.; Wong, J. P.; Weinberg, M. S.; Host, K. M.; Giffin, L. C.; Buijnk, J.; van Dijk, E.; Izumiya, Y.; Kung, H.; Temple, B. R. S.; Damania, B. A Viral Kinase Mimics S6 Kinase to Enhance Cell Proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2016**, *113* (28), 7876–7881. <https://doi.org/10.1073/pnas.1600587113>.
- (98) Sharma-Walia, N.; Krishnan, H. H.; Naranatt, P. P.; Zeng, L.; Smith, M. S.; Chandran, B. ERK1/2 and MEK1/2 Induced by Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus (Human Herpesvirus 8) Early during Infection of Target Cells Are Essential for Expression of Viral Genes and for Establishment of Infection. *J Virol*. **2005**, *79* (16), 10308–10329. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.16.10308-10329.2005>.
- (99) Riento, K.; Ridley, A. J. ROCKs: Multifunctional Kinases in Cell Behaviour. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **2003**, *4* (6), 446–456. <https://doi.org/10.1038/nrm1128>.
- (100) Amano, M.; Nakayama, M.; Kaibuchi, K. Rho-Kinase/ROCK: A Key Regulator of the Cytoskeleton and Cell Polarity. *Cytoskeleton (Hoboken)*. **2010**, *67* (9), 545–554. <https://doi.org/10.1002/cm.20472>.
- (101) Lavoie, H.; Gagnon, J.; Therrien, M. ERK Signalling: A Master Regulator of Cell Behaviour, Life and Fate. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **2020**, *21* (10), 607–632. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0255-7>.
- (102) Tanimura, S.; Takeda, K. ERK Signalling as a Regulator of Cell Motility. *J Biochem*. **2017**, *162* (3), 145–154. <https://doi.org/10.1093/jb/mvx048>.
- (103) Chen, Z.; Gibson, T. B.; Robinson, F.; Silvestro, L.; Pearson, G.; Xu, B.; Wright, A.; Vanderbilt, C.; Cobb, M. H. MAP Kinases. *Chem Rev*. **2001**, *101* (8), 2449–2476. <https://doi.org/10.1021/cr000241p>.
- (104) Samson, S. C.; Khan, A. M.; Mendoza, M. C. ERK Signaling for Cell Migration and Invasion. *Front Mol Biosci*. **2022**, *9*, 998475. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.998475>.
- (105) Gill, M. B.; Kutok, J. L.; Fingerroth, J. D. Epstein-Barr Virus Thymidine Kinase Is a Centrosomal Resident Precisely Localized to the Periphery of Centrioles. *J Virol*. **2007**, *81* (12), 6523–6535. <https://doi.org/10.1128/JVI.00147-07>.
- (106) Schrödinger, LLC. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.5, 2021.
- (107) Mariani, V.; Biasini, M.; Barbato, A.; Schwede, T. LDDT: A Local Superposition-Free Score for Comparing Protein Structures and Models Using Distance Difference Tests. *Bioinformatics*. **2013**, *29* (21), 2722–2728. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt473>.
- (108) 前田達哉. シグナル伝達と相分離. *相分離生物学の全貌*; 現代化学増刊 46; 東京化学同人: 東京, **2020**; pp 24–28.
- (109) 白木賢太郎編. *相分離生物学の全貌*; 現代化学増刊 46; 東京化学同人: 東京, **2020**.
- (110) Wang, B.; Zhang, L.; Dai, T.; Qin, Z.; Lu, H.; Zhang, L.; Zhou, F. Liquid–Liquid Phase Separation in Human Health and Diseases. *Sig Transduct Target Ther*. **2021**, *6* (1), 290.

- <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00678-1>.
- (111) Alberti, S.; Gladfelter, A.; Mittag, T. Considerations and Challenges in Studying Liquid-Liquid Phase Separation and Biomolecular Condensates. *Cell*. **2019**, *176* (3), 419–434. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.12.035>.
- (112) Hyman, A. A.; Weber, C. A.; Jülicher, F. Liquid-Liquid Phase Separation in Biology. *Annu Rev Cell Dev Biol*. **2014**, *30* (1), 39–58. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100913-013325>.
- (113) Case, L. B.; Ditlev, J. A.; Rosen, M. K. Regulation of Transmembrane Signaling by Phase Separation. *Annu Rev Biophys*. **2019**, *48* (1), 465–494. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-052118-115534>.
- (114) Peng, Q.; Wang, L.; Qin, Z.; Wang, J.; Zheng, X.; Wei, L.; Zhang, X.; Zhang, X.; Liu, C.; Li, Z.; Wu, Y.; Li, G.; Yan, Q.; Ma, J. Phase Separation of Epstein-Barr Virus EBNA2 and Its Coactivator EBNA1 Controls Gene Expression. *J Virol*. **2020**, *94* (7), e01771-19. <https://doi.org/10.1128/JVI.01771-19>.
- (115) Yang, Y.; Ye, X.; Dai, R.; Li, Z.; Zhang, Y.; Xue, W.; Zhu, Y.; Feng, D.; Qin, L.; Wang, X.; Lei, B.; Liao, S.; Hao, B. Phase Separation of Epstein-Barr Virus EBNA2 Protein Reorganizes Chromatin Topology for Epigenetic Regulation. *Commun Biol*. **2021**, *4* (1), 967. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02501-7>.
- (116) 廣明秀一. 天然変性タンパク質. *相分離生物学の全貌*; 現代化学増刊 46; 東京化学同人: 東京, **2020**; pp 124–128.