

研究課題別評価

1 研究課題名:

新しいウイルスゲノム改変系を利用した難治性ウイルスの病原機構の解明

2 研究者氏名: 川口 寧

研究員: 野沢直樹 (研究期間 H.15.4.1~H.16.4.30)

3 研究のねらい:

ヒトヘルペスウイルス群は現在までに8種類が同定され、それぞれのウイルスがヒトに多様な病態を引き起こす。単純ヘルペスウイルス(HSV: herpes simplex virus)は、ヘルペスウイルスのプロトタイプであり、ヒトに口唇ヘルペス、性器ヘルペス、脳炎、眼疾患、皮膚疾患、小児ヘルペス等を引き起こす。アメリカ合衆国では、年間1,000万人以上が再発性の性器ヘルペスに罹患し、HSV感染症単独の医療費でも、年間30億ドル(約3,500億円)であると試算されている。本研究では、HSVをモデルとし、ヘルペスウイルス研究における新しいテクノロジーの開発を試みた。また、それらを効率的に利用することによってウイルスの増殖機構および病原性発現機構を解明することを目的とした。

4 研究成果:

1. 大腸菌遺伝学とウイルス学の融合: 新しいヘルペスウイルス改変系の確立

ウイルス研究においてウイルス改変系は極めて重要な技術となる。ウイルスの増殖機構や病原性発現機構の解析には、標的ウイルス因子に改変を施した変異ウイルスの作製が必須となる。しかし、150kbp以上の巨大ゲノムを有するヘルペスウイルスの改変過程は煩雑であり、変異体の作製には熟練と長期間を要した。我々は、野生体の性状(培養細胞での増殖能、マウスでの病原性)を有した完全長のHSV感染性クローンを大腸菌に保持させることに成功した。また、様々な大腸菌のジェネティクスを利用することによって、簡便かつ迅速にウイルスゲノムに変異を導入することが可能であった。本系の確立によって、従来1~2ヶ月要した組み換えウイルスの作製が、最短1週間程度で作製することが可能になった。野生体の性状を保持した感染性HSVクローンをを用いた本改変系は、「全ての組み換え変異ウイルスおよび遺伝子治療ベクターは野生体に由来する」という事実を鑑むと、如何なるHSV研究にも利用可能であると考えられる。本系は、既に国内外30近くの研究室に分与され、HSVの基礎研究、ベクター開発に貢献している。

2. 新しいヘルペスウイルス改変系を利用したウイルス増殖機構の解明

(i) UL51 遺伝子産物

確立されたHSV改変系を利用して、機能が未同定なUL51遺伝子のノックアウトウイルスを作製・解析した。その結果、UL51ノックアウトウイルスの核内でのウイルス粒子形成は野生体と同等であったのに対し、細胞質や細胞外でのウイルス粒子形成は、野生体と比して著しく低下していた。よって、UL51遺伝子産物が、核外におけるウイルス粒子成熟過程に大きな役割を果たしていることが明らかになった。

(ii) UL13 遺伝子産物

UL13はHSVがコードするプロテインキナーゼ(PK: protein kinase)である。UL13ノックアウトウイルスの解析から、UL13はウイルス遺伝子の発現制御をしていることが報告されていた。しかし、UL13はウイルス粒子構成因子としても機能していることより、UL13ノックアウトウイルスの表現型が、PK活性によるものか、PK以外の機能によるものかは不明であった。本研究で確立したHSV改変系を利用することによって、UL13のタンパク質は発現するが、そのPK活性は消失している組み換えHSVを作製した。作製された組み換えウイルスは、ウイルス増殖能に関してはUL13ノックアウトウイルスと同様な表現系を示したが、ウイルス遺伝子発現制御に関しては異なる表現系を示した。以上の結果は、UL13のPK活性はウイルスの増殖に寄与しているが、ウイルス遺伝子の発現制御には関与していないことを示している。UL13は、PK以外の未同定な機能を有し、その機能がウイルス遺伝子の発現制御をしていることが明らかになった。

3. ウイルスプロテインキナーゼの試験管内アッセイ系の確立と機能発現機構の解明

(i) 全てのヘルペスウイルスで保存されているPKの機能: 宿主細胞PKcdc2の模倣

周知のように、PKによるタンパク質のリン酸化は、標的タンパク質の活性制御を司る最も一般的な修飾であり、様々な細胞機構(転写、翻訳、細胞周期、タンパク質分解系、アポトーシス、etc.)がリン酸化によって制御されている。増殖過程の大部分を宿主細胞に依存しているウイルスにとって、様々な細胞機構を制御するPKを保

持っていることは、好都合であると考えられる。また、ウイルス PK はウイルス特異酵素であることより、新しい抗ウイルス剤の理想的な標的であるともいえる。このように、ウイルス PK はウイルス増殖機構や抗ウイルス戦略を考える上で魅力的な研究対象であるにも関わらず、その機能発現機構は不明な点が多かった。我々は、従来困難であると考えられていた HSV PK UL13 の試験管内アッセイ系を確立し、UL13 の標的因子およびそのリン酸化部位を解析した。その結果、UL13 と宿主細胞 PK cdc2 が、標的因子の同一部位をリン酸化することが明らかになった。また、UL13 は全てのヘルペスウイルスで保存されているが、他のヘルペスウイルスの UL13 ホモログも標的因子の cdc2 認識部位をリン酸化した。つまり、ヘルペスウイルスで保存されている PK の存在意義が宿主 PK cdc2 の模倣であることが明らかになった。Cdc2 は、転写、翻訳、細胞骨格、核膜、クロマチンといった様々な細胞機構を制御している。Cdc2 様の活性をもつ PK をウイルスが保持することは、「宿主細胞機構をのっつる」というウイルスの目的遂行のためには、大きなメリットであると考えられる。また、確立された UL13 試験管内アッセイ系は、そのまま抗ヘルペスウイルス剤のスクリーニング系に応用可能である。

(ii) HSV PK Us3 の試験管内アッセイ系の確立

Us3 は HSV がコードする PK であり、UL13 と同様に古くから精力的に解析されてきたウイルス因子である。Us3 は、感染細胞におけるアポトーシスの制御、ウイルス粒子の核膜からの出芽、感染細胞における細胞骨格の制御に関与することが報告されてきた。しかし、UL13 同様に、試験管内アッセイ系の確立が困難であったために、標的基質の同定ができず、Us3 の機能発現機構は不明な点が多かった。我々は、Us3 の試験管内アッセイ系の確立に成功し、Us3 の基質を複数同定した。本アッセイ系は、今後の Us3 の機能発現機構の解明に大きく貢献するだけでなく、抗ヘルペスウイルス剤のスクリーニング系にも応用可能であると考えられる。

(iii) HSV PK UL13 と Us3 のクロストーク: UL13 は Us3 をリン酸化し、Us3 の下流で作用するウイルス粒子出芽因子を制御する。

感染細胞においてウイルス PK の活性がどのような機構で制御されているかはほとんど解明されていない。多くの PK は他の PK によってリン酸化されることによってその活性が制御されていることが知られている。Us3 をリン酸化する PK の同定を試みたところ、HSV UL13 が Us3 をリン酸化することが明らかになった。さらに、UL13 が Us3 の下流で作用し、ウイルス粒子の核膜からの出芽に関与しているウイルス因子 UL31 および UL34 の局在を制御していることが明らかになった。これらウイルス出芽因子の局在が、UL13 による Us3 のリン酸化によって制御される、すなわち、UL13 によるリン酸化によって Us3 の機能発現が制御されているかは仮説の域をでない。しかし、UL13 の新たな機能として、ウイルス粒子の核膜からの出芽を制御していることが明らかになった。

4. 光学顕微鏡によるウイルス粒子の可視化: 生細胞におけるリアルタイムイメージング系の確立

ウイルス粒子は微量であることより、電子顕微鏡での観察が必要であった。しかし、ダイナミックな挙動を示す HSV ウイルス因子の研究において、固定された試料を用いた解析から得られる情報は限られている。よって、同一の生細胞をリアルタイムで連続的に観察するといった動態解析が必要であった。我々は、HSV 粒子の各コンポーネントをそれぞれ異なる蛍光タンパク質で標識した組み換えウイルスを作製することにより、(i) 生きた感染細胞におけるウイルス粒子を光学顕微鏡で観察すること、(ii) 生きた感染細胞におけるウイルス粒子成熟過程の一部を可視化することに成功した。本系を利用して、テグメントタンパク質 UL47 の挙動を観察した結果、核全体に局在していた UL47 タンパク質が、カプシドタンパク質が局在する核内の点状凝集塊に集合することが明らかになった。さらに、ウイルス粒子レベルにおいても UL47 はカプシドタンパク質と核内で共局在していた。従来、HSV は主に細胞質でテグメントを獲得すると考えられていた。本研究の結果より、HSV 粒子は細胞質のみでテグメントを獲得するのではなく、核内で一部のテグメントをカプシドに付着させた後、核外へ移動し、細胞質でさらにテグメントを獲得すると考えられた。今後、生きた感染細胞におけるリアルタイムイメージングをさらに発展させることにより、あらゆるウイルスの生活環(細胞への侵入、ウイルス粒子の輸送、テグメントおよびエンベロープの獲得、出芽)の可視化が可能となると考えられる。また、リアルタイムイメージングと我々が本研究で確立したウイルス改変系を組み合わせることによって、ウイルス生活環における各イベントを制御するウイルス因子の同定も可能になると考えられる。

5 自己評価:

ヘルペスウイルス研究における新しいテクノロジーの開発に関しては、(i) 多目的に利用可能かつ簡便な新しい HSV 改変系の確立、(ii) 従来困難とされていた HSV PK UL13 および Us3 の試験管内アッセイ系の確立、(iii) 多色の蛍光タンパク質を利用した生細胞におけるウイルス粒子成熟過程の可視化といった複数の系の確立に成功した。いずれも世界に先駆けて確立したものであり、ヘルペスウイルス研究における新たなパラダイムの構築に繋がるものと考えられる。これらの系は、HSV の基礎研究だけでなく、新しい抗 HSV 戦略の構築にも貢献しうると考えられる。具体的には、(i) の HSV 改変系は、組み換えワクチンウイルスや遺伝子治療ベクター

開発の基礎となりうること、(ii)のウイルス特異 PK の試験管内アッセイ系の確立は、新たな抗ウイルス剤スクリーニングに応用可能であること、(iii) のウイルス粒子成熟過程の可視化は、抗ウイルス剤の作用機序の解明に利用可能であることなどが挙げられる。

本研究では、確立されたテクノロジーを効率的に利用して、HSV の増殖機構および病原性発現機構の一端を解明した。特に、ヘルペスウイルス PK が宿主細胞 PK を模倣するというコンセプトは、我々以外のヘルペスウイルス研究グループにも受け入れられ、これらコンセプトを支持する論文が複数報告されている。

以上、本研究においては、研究開始当初の目標に対して十分な成果を挙げたと考える。しかし、予想されたことではあるが、研究期間の約3年間で、80種類以上のウイルス因子をコードする HSV の増殖機構・病原性発現機構の全貌を明らかにすることはかなわなかった。今後は、より多面的な研究を、さらなる時間をかけて遂行する必要がある。本さきがけ研究で確立した新しいテクノロジーやコンセプトが、今後の我々の研究に大いに貢献することを信じている。

6 研究総括の見解:

本研究は単純ヘルペスウイルスをモデルとして、ヘルペスウイルス研究の為に新しいテクノロジーを開発し、それを効率的に利用することによってヘルペスウイルスの増殖機構および病原性発現機構を解明することを目的として行われた。その結果、野生株の性状を持った完全長の単純ヘルペスウイルスの感染性クローンを大腸菌に保持させることに成功した。この新しいヘルペスウイルス改変系を利用して、ウイルスの増殖機構と機能発現機構を解明した。さらに光学顕微鏡によってウイルス粒子を観察することに成功し、生きた細胞におけるウイルスのリアルタイムイメージング系を確立した。これらの成果は、当初の研究計画をはるかに超えるものであり、特に従来電子顕微鏡下で固定した試料でしか観察できなかったウイルスを光学顕微鏡下で可視化し、しかもウイルスの動きを観察できるようにした技術開発は、関連領域に極めて大きいインパクトを与えるものである。

7 主な論文等:

[論文]

1. A. Kato, M. Yamamoto, T. Ohno, M. Tanaka, T. Sata, Y. Nishiyama, and Y. Kawaguchi. (2006) Herpes Simplex Virus 1-Encoded Protein Kinase UL13 Phosphorylates the Viral Us3 Protein Kinase and Regulates Nuclear Localization of Viral Envelopment Factors UL34 and UL31. *J. Virol.* 80: 1476-1486.
2. A. Kato, M. Yamamoto, T. Ohno, H. Kodaira, Y. Nishiyama, and Y. Kawaguchi. (2005) Identification of proteins phosphorylated directly by the Us3 protein kinase encoded by herpes simplex virus 1. *J. Virol.* 79: 9325-9331.
3. N. Nozawa, Y. Kawaguchi, M. Tanaka, A. Kato, A. Kato, H. Kimura, and Y. Nishiyama. (2005) Herpes Simplex Virus Type 1 UL51 Protein Is Involved in Maturation and Egress of Virus Particles. *J. Virol.* 79: 6947-6956.
4. M. Kanamori, S. Watanabe, R. Honma, M. Kuroda, S. Imai, K. Takada, N. Yamamoto, Y. Nishiyama, and Y. Kawaguchi. (2004) Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen Leader Protein Induces Expression of Thymus and Activation-Regulated Chemokine in B Cells. *J. Virol.* 78: 3984-3993.
5. Y. Kawaguchi, K. Kato, M. Tanaka, M. Kanamori, Y. Nishiyama, and Y. Yamanashi. (2003) Conserved Protein Kinases Encoded by Herpesviruses and a Cellular Protein Kinase Cdc2 Target the Same Phosphorylation Site In Eukaryotic Elongation Factor 1 δ . *J. Virol.* 77: 2359-2368.

[招待講演]

1. Y. Kawaguchi: *In vitro* assay systems to analyze the activity of viral protein kinases encoded by HSV-1 tell us their direct substrates and role of the protein kinase activity in infected cells. 12th International Conference on Immunology and Prophylaxis of Human Herpesvirus Infections. October 6-8, 2005, Osaka, Japan.
2. Y. Kawaguchi: Tactics of Epstein-Barr virus latent infection proteins to modify host cellular environment. シンポジウム(ウイルス感染症の病態生化学)、第 77 回日本生化学会大会、2004 年 10 月 13-16 日、横浜
3. 川口 寧: BAC システム:ヘルペスウイルスの医学的利用を加速しうる新しいウイルスゲノム改変法 ワークショップ(ウイルスの増殖戦略を利用したウイルス治療法、遺伝子治療法(ベクター)の開発と応用)、第 27 回日本分子生物学会年会、2004 年 12 月 8-11 日、神戸
4. 川口 寧: Epstein-Barr ウイルス潜伏関連因子による B 細胞の不死化機構、ワークショップ(見えてきたウイルス発がん)、第 137 回日本獣医学会学術集会、2004 年 4 月 2-4 日、藤沢
5. Y. Kawaguchi: Conserved protein kinases encoded by herpesviruses potentially share a function mimicking the cellular protein kinase cdc2. 11th International Conference on Immunology and Prophylaxis of Human

