

ヘルペスウイルスの新しい改変系・可視化系の確立と ウイルス病原性発現機構の解明

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

川口 寧

東京大学医科学研究所 附属感染症国際研究センター 感染制御部門 助教授

はじめに

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、眼疾患、小児ヘルペス等の多様な病態を引き起こす。アメリカ合衆国においては、年間1,000万人以上が再発性の性器ヘルペスに罹患し、性器ヘルペスを含みHSV感染症の総医療費は、年間30億ドル(3,500億円)と試算されている。

テクノロジーの進歩が研究の進展を後押しすることがよく知られている。本研究において我々は、ヘルペスウイルス研究における「効率的な研究遂行」や「新たなパラダイムの構築」を可能とする新しいテクノロジーの開発を試みた。さらに、開発したテクノロジーを利用して、HSVの増殖機構の一端を解明することを試みた。ウイルスの増殖機構を理解できれば、おのずとその増殖を阻害する、つまり、HSVを含むヘルペスウイルス感染症を制圧する方法が見えてくるものと我々は考えている。

研究結果と考察

(i) 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。また、本系を利用して、HSV 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、細胞質や細胞外でのウイルス粒子形成が著しく阻害されていた。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) 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(図1)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(図2)。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粒子は細胞質でのみ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。

図 1

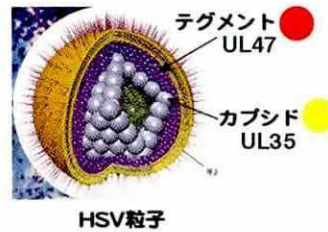
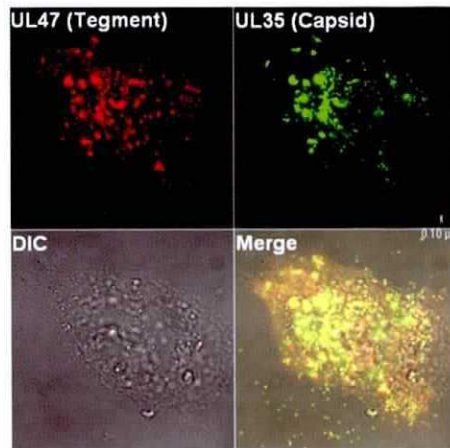


図 2



(iii) 全てのヘルペスウイルスで保存されているプロテインキナーゼ (PK: protein kinase) の機能：

宿主細胞 PK cdc2 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しうるPKを保持していることは、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とる」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。

今後の展望

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）の可視化を試みたい。また、リアルタイムイメージングとウイルス改変系を組み合わせることによって、ウイルスPKを含む様々なウイルス因子が、ウイルス生活環における各イベントをどのように制御しているかも解明していきたい。本研究で確立した新しいテクノロジーを利用し、ウイルス研究における新たなパラダイムの構築に繋げることができればと思う。

主要論文リスト

1. A. Kato, M. Yamamoto, T. Ohno, M. Tanaka, T. Sata, Y. Nishiyama, and Y. Kawaguchi. 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.** (in press).
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. M. Tanaka, Y. Nishiyama, T. Sata, and Y. Kawaguchi. (2005) The role of protein kinase activity expressed by the UL13 gene of herpes simplex virus 1: The activity is not essential for optimal expression of ICP0 and UL41. **Virology** 341: 301-312.
4. 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.
5. T. Koshizuka, Y. Kawaguchi, and Y. Nishiyama. (2005) The HSV-2 membrane protein UL56 associates with the kinesin motor protein KIF1A. **J. Gen. Virol.** 86: 527-533.
6. 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.
7. M. Tanaka, H. Kodaira, Y. Nishiyama, T. Sata and Y. Kawaguchi. (2004) Construction of recombinant herpes simplex virus type 1 expressing green fluorescence protein without loss of any viral genes. **Microbes and Infection** 6: 485-493.
8. 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 1δ. **J. Virol.** 77: 2359-2368.
9. Y. Kawaguchi and K. Kato. (2003) Protein kinases conserved in herpesviruses potentially share a function mimicking the cellular protein kinase cdc2. **Rev. Med. Virol.** 13: 331-340.
10. K. Kato, A. Yokoyama, Y. Tohya, H. Akashi, Y. Nishiyama, and Y. Kawaguchi. (2003) Identification of protein kinases responsible for phosphorylation of Epstein-Barr virus nuclear antigen leader protein at serine 35 that regulates its coactivator function. **J. Gen. Virol.** 84: 3381-3392.