

研究種目：特定領域研究

研究期間：2006～2010

課題番号：18073007

研究課題名（和文） 単純ヘルペスウイルスの増殖と病原性発現の分子基盤

研究課題名（英文） Molecular basis of replication and pathogenicity of herpes simplex viruses

研究代表者

西山 幸廣（Yukihiro Nishiyama）

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：60115615

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：DNAウイルス、単純ヘルペスウイルス、ウイルス遺伝子機能、ウイルス病原性

1. 研究計画の概要

本研究は「ウイルス研究マトリックス」の視点から、DNAウイルスの中でもヘルペスウイルスを取り上げて研究を推進する。単純ヘルペスウイルス(HSV)はヘルペスウイルス科のプロトタイプとして最も分子的理解が進んでいるが、増殖、病原性発現機構ともに不明な点が数多く残されている。また、HSVは少なくとも74個の遺伝子を保有するが、半数以上の遺伝子機能については未だよくわかっていないのが現状である。本研究の目的は、ウイルスの増殖機構、病原性発現機構にこれらの遺伝子がどのような役割を果たしているのかを明らかにすることである。

2. 研究の進捗状況

1) UL14蛋白質が、感染初期のカプシドの核への輸送、及び転写制御機能をもつ主要テグメント蛋白質VP16の核内輸送に重要な役割を果たしていることを見つけた。アミノ酸残基を置換したUL14変異ウイルス14(P3)、14(K51M)を作製し、UL14完全欠損(14D)及び復帰ウイルスと種々の性状について比較した結果、UL14が感染後期におけるVP16の動態にも影響を与えること、HSV粒子の成熟過程にも関与していることを明らかにした。2) UL56蛋白質が宿主細胞ユビキチンリガーゼNedd4と相互作用すること、この結果、Nedd4自身がユビキチン化され不安定化すること、従ってUL56が感染細胞中においてユビキチン・プロテアソーム蛋白質制御をする機能をもつことを明らかにした。Nedd4-GFP発現細胞において、野生株、UL56欠損株(dUL56Z)、復帰株(dUL56Zr)を感染させリアルタイムイ

メージングにて動態を観察した。その結果、UL56がNedd4の局在性に著しい影響を与えることが明確に示された。3) US3蛋白質キナーゼ(PK)の有無は、感染細胞中での遺伝子発現に極めて大きな影響を与えることをマイクロアレイ解析によって明らかにするとともに、新たな基質としてUL46、UL31を同定し、US3PKのHSV増殖における多彩な役割について明らかにした。4) HSV-1およびHSV-2の野生株およびUS3欠損株感染マウスを用いて、様々な組織におけるアポトーシス誘導の有無について改めて総合的な評価を行った。その結果、US3の有無にかかわらずアポトーシスが強く誘導される細胞群(組織)があることが判明した。5) 感染細胞における核骨格構成蛋白質NuMAの動態を明らかにし、HSV増殖におけるNuMAの関与を初めて示した。

3. 現在までの達成度

②おおむね順調に進展している。単純ヘルペスウイルスの遺伝子機能と役割について、いくつかの新たな知見を見出し、ウイルス増殖と病原性発現についての分子基盤の確立に貢献をした。また、この情報は単純ヘルペスウイルスを用いたがん治療法やワクチンの開発に有用であった。

4. 今後の研究の推進方策

これまで行ってきたウイルス遺伝子機能の解析を下記の観点からさらに推進する。

1) HSVの増殖機構、とくにカプシドの細胞内、核外輸送機構の解析

①感染初期におけるカプシド輸送、VP16の核内輸送における分子機構を明らかにするため、UL14の部分的欠失蛋白質、及びアミノ酸置換変異体をもつHSVを作製し、その性状を解析する。

②HSVの感染が進行するにつれNuMAの分布に大きな変化が生じるが、この意義について解析する。

③HSV-1、HSV-2感染細胞のmRNAの動態をマイクロアレイ法を用いて検討した結果、mRNA量が著しく上昇する細胞側遺伝子をいくつか同定した。その意義と役割について解析を行う。

④テグメント蛋白質US2及びUL21について、それらと相互作用する蛋白質を同定するためにYeast two hybrid法で検討したところ、数種類の細胞蛋白質が有力な候補としてあがってきたので、相互作用の確認とその意義を明らかにする。

2) HSVの軸索内輸送機構、神経病原性発現機構の解析

①樹立神経細胞株を、非分化、あるいは分化させた状態で種々のアクセサリ遺伝子欠損HSVを感染させ、ウイルス蛋白質の細胞内分布、特に神経細胞突起での分布についてさらに詳細な検討を行う。

②マウス感染系では用いる接種系、接種法によって中枢神経系侵襲機構に関わる要因が異なる。少なくとも3種の接種系において、変異ウイルスと野生株の中枢神経系侵襲性、中枢神経内伝播、アポトーシス誘導などについてさらに比較検討を進める。

5. 代表的な研究成果

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件) (全て査読有)

1. Yamauchi, Y., Kiriya, K., Kimura, H. and Nishiyama, Y. Herpes simplex virus induces extensive modification and dynamic relocalisation of the nuclear mitotic apparatus protein (NuMA) in interphase cells **Journal of Cell Science** 121: 2087-2096: (2008).

2. Ushijima Y, Koshizuka T, Goshima F, Kimura H, Nishiyama Y. Herpes simplex virus type 2 UL56 interacts with the ubiquitin ligase nedd4 and increases its ubiquitination. **Journal of Virology** 82: 5220-5233 (2008).

3. Yamauchi Y, Kiriya K, Kubota N, Kimura H, Usukura J, Nishiyama Y. The UL14 tegument protein of herpes simplex virus type 1 (HSV-1) is

required for efficient nuclear transport of the alpha transducing factor VP16 and viral capsids. **Journal of Virology**, 82: 1094-1106 (2008).

4. Kamakura, M., Nawa, A., Ushijima, Y., Goshima, F., Kawaguchi, Y., Kikkawa, F., Nishiyama, Y. Microarray analysis of transcriptional responses to infection by herpes simplex virus types 1 and 2 and their US3-deficient mutants **Microbes and Infection** 10:405-413 (2008).

5. Kohno, S., Luo, C., Nawa, A., Fujimoto, Y., Waranabe, D., Goshima, F., Tsurumi, T. and Nishiyama, Y. Oncolytic virotherapy with an HSV amplicon vector expressing granulocyte-macrophage colony-stimulating factor using the replication-competent HSV type 1 mutant HF10 as a helper. **Cancer Gene Therapy**, 14 : 918-926 (2007).

6. Ushijima Y, Luo C, Goshima F, Yamauchi Y, Kimura H, Nishiyama Y. Determination and analysis of the DNA sequence of highly attenuated herpes simplex virus type 1 mutant HF10, a potential oncolytic virus. **Microbes and Infection**, 9 (2):142-149 (2007).

7. Kasuya, H., Nishiyama, Y., Nomoto, S., Goshima, F., Takeda, S., Watanabe, I., Nomura, N., Shikano, T., Fujii, T., Kanazumi, N. and Nakao, A. Suitability of a US3-inactivated HSV mutant(L1BR1) as an oncolytic-virus for pancreatic cancer therapy. **Cancer Gene Therapy**, 14: 533-542 (2007).

8. Mori, I., Goshima, F., Watanabe, D., Ito, H., Koide, N., Yoshida, T., Liu, B., Kimura, Y., Yokochi, T. and Nishiyama, Y. Herpes simplex virus US3 protein kinase regulates virus-induced apoptosis in olfactory and vomeronasal chemosensory neurons in vivo. **Microbes and infection** 8:1806-1812 (2006).

[その他]

ホームページ情報

<http://www.med.nagoya-u.ac.jp/virus>