

機関番号：13901

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 pathogenesis of herpes simplex virus

研究代表者

西山 幸廣（ NISHIYAMA YUKIHIRO ）

名古屋大学・医学系研究科・教授

研究者番号：60115615

研究成果の概要（和文）：

ヒトの病原体として重要な単純ヘルペスウイルスの増殖機構、病原性発現機構を明らかにするため、ウイルスの保有する遺伝子産物の機能解析を行い、それらがアポトーシス制御、蛋白質分解系制御、細胞内輸送系制御に関わっていることを明らかにした。また、細胞因子として INSM1、Tankylase1 がウイルス増殖に関与していることを示した。これらの基礎研究はワクチンや腫瘍溶解性ウイルスの開発に有用であった。

研究成果の概要（英文）：

The purpose of this study is to understand the molecular mechanism of the replication and pathogenesis of an important human pathogen, herpes simplex virus (HSV). The present studies have revealed the novel functions and roles of HSV gene products. Moreover, cellular proteins, INSM1 and tankylase 1 have been shown to play important roles in the replication of HSV. These observations were useful for developing vaccines and oncolytic viruses.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	18,800,000	0	18,800,000
2007年度	18,800,000	0	18,800,000
2008年度	18,800,000	0	18,800,000
2009年度	18,800,000	0	18,800,000
2010年度	18,800,000	0	18,800,000
総計	94,000,000	0	94,000,000

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：単純ヘルペスウイルス、DNA ウイルス、ウイルス遺伝子機能、ウイルス病原性、ウイルス増殖機構

1. 研究開始当初の背景

ヘルペスウイルスは多様性に富む大型の DNA ウイルスで、あらゆる脊椎動物には種に固有なヘルペスウイルスが存在すると考えられている。ヒトからも8種類のヘルペスウイルスが発見されており、多彩な疾患を起こす重要な病原体として知られる。その中で

単純ヘルペスウイルスはヘルペスウイルス科のプロトタイプとして基礎研究が集中的になされてきており、原核系における“T4 ファージ”に相当する位置を占める。従って、欧米では基礎生物学の立場から研究するものも多い。我々は、HSV の増殖、病原性発現の分子機構を明らかにするためにはウイル

ス遺伝子の側からの地道なアプローチが最終的には欠かせないとこの立場から、研究を行ってきた。

2. 研究の目的

単純ヘルペスウイルス(HSV)は少なくとも74種の遺伝子をコードする。本研究はHSVの増殖、病原性発現におけるHSV遺伝子産物の機能、役割を明らかにすることを目的とする。これはワクチン、ウイルスベクター、腫瘍溶解ウイルス(oncolytic virus)、抗ウイルス剤の開発にも有用である。

3. 研究の方法

HSV-1, HSV-2の各種野生株、及び特定の遺伝子を欠損させた各種変異ウイルスを用いて培養細胞やマウス感染系(接種経路は皮下腹腔内、角膜、脳内など)において増殖速度や病原性(virulence)について検討した。また、個々のHSV遺伝子産物に対する抗体を用いてWestern blot法、免疫沈降法、コンフォーカルレーザー顕微鏡などを用いてウイルス蛋白質の動態、局在性について解析を行った。

4. 研究成果

(1) UL14遺伝子はすべてのヘルペスウイルスがホモログを有するコア遺伝子の一つである。我々はこれまでにUL14蛋白質が分子シャペロン様機能、抗アポトーシス活性をもつことを明らかにしてきた。本研究では、UL14遺伝子欠損ウイルス(Δ UL14)や、転写制御機能をもつ主要テグメント蛋白質VP16にGFPを融合させたVP16-GFP発現ウイルス(14D-VP16G)を用いて増殖過程におけるUL14の役割を明らかにすることを試みた。その結果、 Δ UL14では感染2時間後のIE遺伝子の発現が有意に低いことが判明した。さらに、14D-VP16Gを用いて検討した結果、感染初期のVP16-GFPの核内蓄積、カプシドの核周囲への到達が有意に遅延していることがわかった。以上の観察から、UL14は侵入直後のヌクレオカプシド、及び主要テグメントタンパク質VP16の核への輸送に重要な役割を果たしていることが示された。また、UL14欠損が感染後期のウイルス蛋白質、及び宿主細胞に与える影響についても検討を行った。その結果、VP16(Y364A)はVP16(wt)と同様にUL14との共発現により双方が核内に移行すること、UL14欠損-VP16G株では感染後8時間程度で細胞の形態が球状に変化し始め、VP16GFPはperinuclear領域に蓄積、その周囲にvimentin cageの形成とHsp70が集積するこ

とがわかった。以上のことから、VP16の核内移行には、HCF-1よりもむしろUL14が主要な因子である事が示唆されるとともに、UL14は翻訳後のVP16GFPのfoldingに関与している可能性が示された。また、感染後期の核及び細胞の形態維持にUL14が関わっていることが示された。

(2) UL56遺伝子は α ヘルペス亜科に特有な遺伝子で典型的なアクセサリ遺伝子の一つである。我々はこれまでにUL56遺伝子産物がウイルス粒子に含まれるC末端アンカー型typeII膜蛋白質であり、神経特異的キネシンKIFIA及びウイルス粒子の成熟・放出に重要なUL11と相互作用することを明らかにしてきた。本研究では、UL56と相互作用する細胞宿主因子としてユビキチンリガーゼNedd4を見出したので、HSV感染細胞におけるNedd4の動態について検討した。共発現細胞で両者は共局在し、UL56との共発現によりNedd4の発現量は有意に減少した。この減少はUL56発現量依存性であり、UL56のPY配列への変異導入によって抑制された。感染細胞では、Nedd4の減少が見かけ上の分子量の増大とともに認められたが、このような変化は Δ UL56感染株ではみられなかった。また、UL56との共発現により、Nedd4のユビキチン化パターンに変化が認められた。また、近年HSVを含む複数のウイルス感染系において宿主ユビキチンシステムの積極的な利用・制御が報告されていることから、他のユビキチンリガーゼのHSV感染による変化、及びその過程におけるUL56の役割についても検討した。その結果、複数の細胞株においてHSV-1、HSV-2や成果部の感染によりItchの検出量が経時的に減少し、感染12時間後にはほぼ消失することが判明した。この変化はUL56欠損株感染細胞ではみられなかった。また、EGFP-UL56発現細胞においてもItchの検出量が顕著に減少していた。一方、WWP2についてはHSV感染による明らかな変化は検出されなかった。HSV感染による変化は限られたユビキチンリガーゼだけに見られることが明らかとなった。Nedd4に加え、ItchもHSV感染によりUL56依存的に変化したことは、UL56の機能解析の点からも、HSVとユビキチンシステムとの関わりの点からも興味深い所見と考えられる。

(3) US3はプロテインキナーゼ(PK)をコードするアクセサリ遺伝子で、カプシドの核外輸送、アポトーシス抑制、細胞骨格系制御、免疫機構からの回避など多面的な作用をもつ。HSV-1型およびHSV-2型の野生株およ

び US3 欠損株 (Δ US3) の感染による宿主遺伝子 (約 5 万 4 千) の発現の変化を網羅的に解析した。その結果、HEp2 細胞、ヒトケラチノサイト (NHEK) における HSV-1 と HSV-2、野生株と Δ US3 の感染細胞間で遺伝子発現プロファイルが有意に異なること、 Δ US3 感染で特異的に発現量が上昇する宿主遺伝子があることが判明した。

(4) UL11 遺伝子産物は N 末がミリスチル化、パルミトイル化を受ける膜蛋白質でエンベロープ獲得過程に重要な役割を果たす。この UL11 と、2 種の膜結合テグメント蛋白質、UL56 (C 末端アンカー型 typeII 膜蛋白質) と UL51 (N 端がパルミトイル化される膜蛋白質で粒子の成熟過程に重要) との結合について検討した。この結果、UL11 と UL56 は感染後期に複合体を形成するが、UL51 とは相互作用が認められないことがわかった。

(5) HSV は感染によって核・核膜構造をリモデリングしていると考えられる。我々は核構造タンパク質のひとつである NuMA に着目し感染後の動態解析を行った。NuMA は非感染細胞では核小体をのぞく核内にほぼ均一に存在するが、感染が進むにつれ核中央の密度が著しく減少し核内膜直下 (ラミンの内側) に不溶性成分として残存すること、感染によってリン酸化されることを見出した。この変化は PAA によって阻害され、また NuMA の発現を抑制した細胞では、ウイルス増殖が抑制されることが分かった。従って、NuMA の可溶化はカプシドの核内移動に関与していると考えられた。

(6) HSV 感染細胞では ICP27 によるシャットオフ反応の抑制や UL41 による shutoff 作用によって、宿主細胞の mRNA やタンパク質合成が強く抑制されることが知られている。これまでに宿主遺伝子発現におよぼす HSV 感染の影響について DNA マイクロアレイを用いて網羅的解析を行ってきた。その結果、発現量の増加する宿主遺伝子が予想以上に多数存在することがわかった。本研究では感染細胞において発現量が著しく増加した宿主遺伝子の一つとして INSM1 に着目した。INSM1 は 5 つの zinc finger motif をもつ転写因子で、早期胚の神経発生に重要な働きをするとともに細胞周期や分化にも関与していることが知られている。また INSM1 遺伝子は GC-rich かつイントロンを欠く。この点で HSV 遺伝子の大多数とよく似ている。RT-PCR の結果、樹立細胞株だけでなく NHEK (ヒトケラチノサイト) など様々な感染細胞において INSM1 mRNA 量の顕著な増加が確認された。INSM1

promoter を用いたリポーターアッセイでは、感染後経時的にその活性が著しく上昇することが示された。しかし、UV 処理したウイルスではみられなかった。INSM1 発現系で HSV 感染による局在の変化を観察したところ、感染により核内の局在が replication compartment 様に変化した。既に報告のある INSM1 結合配列に関して HSV ゲノム内で検索したところ、ICP0 promoter 領域に多数の類似配列が認められた。ICP0 promoter を用いたリポーターアッセイでは VP16 の存在下で INSM1 は促進的に作用することが判明した。さらに ChIP アッセイで ICP0 promoter 領域への INSM1 の結合が確認された。INSM1 の誘導は HSV 増殖に促進的に作用しているようである。

(7) 単純ヘルペスウイルス (HSV) 感染における Tankyrase 1 の動態と役割について検討した。内在性 Tankyrase 1 は殆ど細胞質に存在するが、感染により核内にリクルートされることがわかった。感染初期に Tankyrase1 は ICP0 蛋白質と共局在し、その後 replication compartment 内に認められた。さらに、ウイルスの DNA 合成は Tankyrase 1 の修飾と HEp-2 細胞内の relocalization に必要ではないことがわかった。XAV939 を用いて Tankyrase の活性を抑制すると、HSV の増殖も有意に抑えられた。以上の結果は、INSM1、Tankyrase 1 が HSV の増殖に重要な役割を果たしていることを示唆するものである。

(8) ウイルスはアポトーシスを正負に制御する遺伝子を保有している。単純ヘルペスウイルス (HSV) では US3、UL39、US5、US11、UL14、LAT、 γ 34.5 などがアポトーシス制御に関与していると報告されているが、その分子機序については不明な点が多い。また HSV のアポトーシスの誘導・抑制能については細胞の種類、ウイルスの型、株による相違が指摘され、かなり混乱した状況にある。そこで本研究ではこれまでの報告で用いられてきた代表的なウイルス株にき、様々なマウス感染モデルを用いて同時に検討した。副腎では、R7041 (US3 欠損 HSV-1)、186 (HSV-2 野生株)、L1BR1 (US3 欠損 HSV-2) はいずれも感染巣に一致してアポトーシスが検出された。角膜上皮では、F (HSV-1 野生株)、186 は感染領域の一部で、R7041、L1BR1 は大半でアポトーシスが検出された。網膜では光受容体細胞に感染し、感染細胞の周囲でアポトーシスを検出した。F、186 は三叉神経節に強く感染したが、アポトーシスは検出されなかった。大脳では F、186 に比して、

R7041、L1BR1、R3616 は TUNEL 陽性 HSV 抗原陽性神経細胞が有意に多かった。副腎の感染巣では HSV 野生株、変異株とも活性化 caspase-8、p53、pJNK が検出された。HSV 感染によるアポトーシス反応は細胞により異なり、大きく 4 群に分類できると考えられた。副腎では caspase-8 を経由してアポトーシスを誘導すること、大脳では US3 が JNK を介してアポトーシスを抑制していることが示唆された。マウス鼻腔感染系を用いて UL56 欠損ウイルス(UL56 Δ)の中枢神経侵襲性について検討した。その結果、UL56 Δ は親株と異なり、三叉神経節経路では中枢に達するにも関わらず、嗅神経経路では嗅球の僧帽細胞にも達しないことがわかった。

5. 主な発表論文等

(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 58 件) (すべて査読有)

1) Ohta A, Nishiyama Y.

Mitochondria and viruses.

Mitochondrion. 11(1):1-12. (2011)

2) Esaki, S., Goshima, F., Katsumi, S., Watanabe, D., Ozaki, N., Murakami, S., Nishiyama, Y.
Apoptosis induction after herpes simplex virus infection differs according to cell type in vivo.

Archives of Virology, 155: 1235-1245 (2010).

3) Fujiwara, S., Nawa, A., Luo, CH., Kamakura, M., Goshima, F., Kondo, C., Kiyono, T., Kikkawa, F., Nishiyama, Y.

Carrier cell-based delivery of replication-competent HSV-1 mutants enhances antitumor effect for ovarian cancer.

Cancer Gene Therapy, 18: 77-86 (2010).

4) Ushijima Y, Luo C, Kamakura M, Goshima F, Kimura H, Nishiyama Y.

Herpes simplex virus UL56 interacts with and regulates the Nedd4-family ubiquitin ligase Itch.

Virology Journal. 2010 Aug 3;7(1):179.

5) Sato, Y., Kamura, T., Shirata, N., Murata, T., Kudoh, A., Iwahori, S., Nakayama, S., Isomura, H., Nishiyama, Y., and Tsurumi, T.

Degradation of phosphorylated p53 by viral protein-ECS E3 ligase complex.

PLoS Pathogens 7:e1000530 (2009).

6) Ushijima, Y., Goshima, F., Kimura, H., and Nishiyama, Y.

Herpes simplex virus type 2 tegument protein UL56 relocalizes ubiquitin ligase Nedd4 and has a role in transport and/or release of virions.

Virology Journal 6:168 (2009).

7) Morimoto, T., Arai, J., Tanaka, M., Sata, T., Akashi, H., Yamada, M., Nishiyama, Y., Uema, M., and Kawaguchi, Y.

Differences in the regulatory and functional effects of the US3 protein kinase activities of herpes simplex virus 1 and 2.

Journal of Virology 83: 11624-11634 (2009).

8) Ishikawa, T., Yamada, H., Oyamada, A., Goshima, F., Nishiyama, Y., and Yoshikai, Y. Protective role of Fas-FasL signaling in lethal infection with herpes simplex virus type 2 in mice.

Journal of Virology 83: 11777-11783 (2009).

9) Kagimoto, Y., Yamada, H., Ishikawa, T., Maeda, N., Goshima, F., Nishiyama, Y., Furue, M., Yoshikai, Y. A regulatory role of interleukin 15 in wound healing and mucosal infection in mice.

Journal of Leukocyte Biology, 83: 165-172 (2008).

10) Yamauchi Y, Kiriyaama 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 Transactivating Factor VP16 and Viral Capsids.

Journal of Virology, 82: 1094-1106 (2008).

11) 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).

12) 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).

13) Yamauchi, Y., Kiriyaama, 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).

14) Kato, A., Tanaka, M., Yamamoto, M., Asai, R., Sata, T., Nishiyama, Y. and Kawaguchi, Y.

Identification of a physiological phosphorylation site of the Herpes simplex virus 1-encoded protein kinase Us3 which regulates its optimal catalytic activity in vitro and influences its function in infected cells.

Journal of Virology 82: 6172-6189 (2008).

15) Nawa A, Luo C, Zhang L, Ushijima Y, Ishida D, Kamakura M, Fujimoto Y, Goshima F, Kikkawa F, Nishiyama Y.

Non-engineered, naturally oncolytic herpes simplex virus HSV1 HF-10: applications for cancer gene therapy.

Curr Gene Therapy 8: 208-221 (2008).

16) Luo, C., Nawa, A., Yamauchi, Y., Kohno, S., Ushijima, Y., Goshima, F. and Nishiyama, Y.

Intercellular trafficking and cytotoxicity of recombinant HSV-1 thymidine kinase fused with HSV-2 US11 RXP repeat peptide.

Virus Genes, 34: 263-272 (2007).

17) 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).

18) 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).

19) 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 I mutant HF10 as a helper

Cancer Gene Therapy, 14 : 918-926 (2007).

20) Koshizuka, T., Kawaguchi, Y., Nozawa, N.,

Mori, I. and Nishiyama, Y. Herpes simplex virus protein UL11 but not UL51 is associated with lipid rafts.

Virus Genes, 35 : 571-575 (2007).

21) Luo, C., Mori, I., Goshima, F., Ushijima, Y., Nawa, A., Kimura, H., Nishiyama, Y.

Replication-competent, oncolytic herpes simplex virus type 1 mutants induce a bystander effect following ganciclovir treatment.

Journal of Gene Medicine, 9: 875-883(2007).

22) 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).

23) Kato, A., Yamamoto, M., Ohno, T., Tanaka, M., Sata, T., Nishiyama, Y., and Kawaguchi, Y.

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.

Journal of Virology 80:1476-1486 (2006).

24) Koshizuka, T., Kawaguchi, Y., Goshima, F., Mori, I. and Nishiyama, Y.

Association of two membrane proteins encoded by herpes simplex virus type2, UL11 and UL56.

Virus Genes 32, 153-163 (2006).

25) Mori, I. and Nishiyama, Y.

Accessory genes define the relationship between the herpes simplex virus and its host.

Microbes and Infection 8: 2556-2562 (2006).

26) Mori, I. and Nishiyama, Y.

Replication-competent herpes simplex virus: a novel and promising modality for cancer therapy.

Current Topics in Virology 5 : 21-30 (2006).

[学会発表] (計 31 件)

1. 太田茜、山内洋平、武藤義文、西山幸廣
単純ヘルペス 1 型感染後期における UL14 の
遺伝子産物の役割

第 5 7 回日本ウイルス学会学術集会、東京、
2009. 10. 25

2. 牛島洋子、駱晨虹、鎌倉真紀、五島典、
西山幸廣

HSV-2 感染による Nedd4 ファミリーユビキチン
ンリガーゼの変化と UL56 遺伝子産物の役割
第 5 7 回日本ウイルス学会学術集会、東京、
2009. 10. 25

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西山幸廣 (NISHIYAMA YUKIHIRO)
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：60115615

(2) 研究分担者

研究分担者なし ()

(3) 連携研究者

連携研究者なし ()