

令和元年6月17日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15280

研究課題名(和文) ゲノム編集法を利用したヘルペスウイルス増殖を司る宿主因子の網羅的同定

研究課題名(英文) Comprehensive identification of host factors which contribute to replication of herpes virus using genome editing

研究代表者

川口 寧 (Kawaguchi, Yasushi)

東京大学・医科学研究所・教授

研究者番号：60292984

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では(i)リポーター遺伝子産物がHSV粒子中に取り込まれるリポーターウイルスを作成することで、HSV増殖を司る宿主因子の効率的なスクリーニングのプラットフォームを構築した。(ii)(i)で作成したウイルスを用いてCRISPRゲノム編集法によるゲノムワイドスクリーニングを実施した結果、HSV増殖に貢献すると考えられる複数の宿主因子を同定した。また、これらの宿主因子がHSVの細胞内での輸送に極めて重要であることを明らかにした。(iii) ウイルス粒子産生機構に貢献する宿主因子の解析の結果、HSVの核内膜からの出芽に宿主のESCRT-III機構を利用する事を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、HSVの増殖に必要な宿主因子を効率的にスクリーニングするためのプラットフォームを構築し、HSV増殖に必要な宿主因子を複数同定しただけでなく、長年にわたり未解明であったHSVカプシドの核外輸送の分子機構を解明した点で、学術的に高い意義を有していると考えられる。また、本研究によって構築したスクリーニング法は、HSV感染症に対する宿主細胞因子を標的とした創薬への応用に繋がること期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, (i) we created platform for efficient screening of host factors responsible for HSV replication, by constructing reporter virus in which reporter gene products were incorporated into HSV virions. (ii) Using the reporter virus, several host factors which contribute to HSV replication were identified. Furthermore, we clarified that these host factors were important for intracellular transport of HSV. (iii) We demonstrated that host ESCRT-III machinery is used for HSV budding through the inner nuclear membrane, by analyzing host factors that contribute to viral particle formation.

研究分野：ウイルス学

キーワード：ウイルス

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

単純ヘルペスウイルス(HSV)は代表的な DNA ウイルスであり、ヒトに多様な病態を引き起こす。抗 HSV 剤アシクロビルが開発された今日においても、脳炎患者の 70%は社会復帰できないか死亡する。性病としても HSV の重要性は高く、国内の女性における性感染症報告数は、クラミジアに続き第 2 位である。また、性器ヘルペスは、他の性感染症と異なり現状では根治が不可能である。さらに、世界市場における HSV 感染症の医療費は、年間数千億円と膨大である。したがって、HSV は医学上極めて重要なウイルスであり、HSV 研究の重要性は明らかである。年 6 回以上の再発を繰り返す性器ヘルペス患者には、抗 HSV 剤を連日内服し、再発を抑制する再発抑制療法が必要となる。しかしながら、再発抑制療法下でも、しばしば無症候性の HSV 排泄は認められ、性器ヘルペス患者は今日も「水平感染や垂直感染の不安」と直面している。AiCuris 社が創成し、非臨床試験において超活性を示した HSV ヘリケース・プライマーゼ阻害剤(Pritelivir)は、臨床試験において、性器ヘルペス患者の病変部からの HSV 排泄量を著しく低下させた(N Engl J Med. 370:201-10, [2014])(N Engl J Med. 370:1663-4, [2014])。残念ながら、Pritelivir は毒性のため、臨床開発は中断されたが、AiCuris 社の臨床試験は、超活性を有する新規抗 HSV 剤の創成が、性器ヘルペス患者のアンメット・メディカルニーズである「水平感染や垂直感染の不安」の軽減に直結しうることを示した重要な一歩であった。一方、高頻度に HSV が再活性化する免疫抑制患者では、一定の確率で耐性ウイルスが出現する。よって、耐性ウイルスの出現の可能性が低い、宿主細胞因子を標的とした創薬が求められており、超活性を有する創薬標的分子となりうる「HSV 増殖に極めて重要(又は必須)、かつ細胞毒性の低い宿主細胞因子の同定」が、世界的に求められている。

### 2. 研究の目的

本研究は、CRISPR ゲノム編集法を駆使し、HSV 増殖に極めて重要かつ細胞増殖へ影響が認められない宿主因子を網羅的に同定し、申請者らがインターラクトーム解析により独自に蓄積してきた「HSV と宿主因子の相互作用情報」(ほぼ未公開)に照会することで、HSV が宿主因子を利用する決定的な分子機序の解明を試みる。これらの知見は、「抗 HSV 剤の創薬標的分子となりうる宿主細胞因子の同定」に直結することが期待される。

### 3. 研究の方法

本研究では CRISPR ゲノム編集法を最大限に活用し、HSV 増殖に極めて重要な宿主因子を網羅的に解明する。

- (1) 予備的検討で単離済みの HSV 耐性を示した細胞クローンにおける欠損宿主因子の確定
- (2) CRISPR ゲノム編集法に基づく真のゲノムワイド・スクリーニングの確立
- (3) (2)を駆使した HSV 増殖に極めて重要な宿主因子の網羅的な同定
- (4) (1)及び(3)で同定した HSV 増殖に極めて重要な宿主因子に関して、CRISPR ゲノム編集法による遺伝子欠損マウスの作出と HSV 病態発現機構への影響の解析

以上の 4 点の実施を試みる。

### 4. 研究成果

- (1) リポーター遺伝子産物が HSV 粒子中に取り込まれるリポーターウイルスを作成した。本ウイルスを利用すれば、ウイルス力価を極めて短時間で測定することが可能であり、効率的なスクリーニングに有用である。
- (2) 同ウイルスを用いて CRISPR ゲノム編集法を利用したゲノムワイドスクリーニングを実施した。その結果、HSV 増殖に重要な役割を果たすと考えられる宿主細胞因子を複数同定した。
- (3) スクリーニングで同定された一連の関連宿主細胞因子に関して解析を行い、これらの宿主細胞因子が HSV の細胞内での輸送に極めて重要な役割を果たしていることが明らかになった。
- (4) ウイルス粒子産生機構に貢献する宿主因子の解析を行い、HSV が宿主の ESCRT-III 機構を乗っ取り核内膜からの出芽を引き起こすことを明らかにした。ESCRT-III に関連するいくつかの因子を欠損すると、核内膜からのウイルスカプシドの出芽が阻害され、ウイルス増殖が著しく抑制されることが明らかとなった。HSV のウイルス粒子産生の分子機構には未解明の点が多かったが、今回その分子メカニズムの一旦を明らかにし、国際雑誌 Nature Communications において発表した。

### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 7 件)

J. Arii, M. Watanabe, F. Maeda, N. Tokai-Nishizumi, T. Chihara, M. Miura, Y. Maruzuru, N. Koyanagi, A. Kato and Y. Kawaguchi. ESCRT-III mediates budding across the inner nuclear membrane and regulates its integrity. Nat. Commun., 査読有, vol.9, 2018, 3379 DOI: 10.1038/s41467-018-05889-9

Y. Maruzuru, T. Ichinohe, R. Sato, K. Miyake, T. Okano, T. Suzuki, T. Koshiba, N. Koyanagi, S. Tsuda, M. Watanabe, J. Arii, A. Kato, and Y. Kawaguchi. Herpes Simplex

Virus 1 VP22 Inhibits AIM2-dependent Inflammasome Activation to Enable Efficient Viral Replication. *Cell Host & Microbe*, 査読有, vol.23, 2018, 254-265  
DOI: 10.1016/j.chom.2017.12.014

N. Koyanagi, T. Imai, K. Shindo, A. Sato, W. Fujii, T. Ichinohe, N. Takemura, S. Kakuta, S. Uematsu, H. Kiyono, Y. Maruzuru, J. Arie, A. Kato and Y. Kawaguchi. Herpes simplex virus-1 evasion of CD8+ T cell accumulation contributes to viral encephalitis. *J. Clin. Invest.*, 査読有, vol.127, 2017, 3784-3795  
DOI: 10.1172/JCI92931

Y. Inoue, T. Saga, T. Aikawa, M. Kumagai, A. Shimada, Y. Kawaguchi, K. Naruse, S. Morishita, A. Koga and H. Takeda. OPEN Complete fusion of a transposon and herpesvirus created the Teratorn mobile element in medaka fish. *Nat. Commun.*, 査読有, vol.8, 2017, 551  
DOI: 10.1038/s41467-017-00527-2

R. Kobayashi, A. Kato, H. Sagara, M. Watanabe, Y. Maruzuru, N. Koyanagi, J. Arie and Y. Kawaguchi. Herpes Simplex Virus 1 Small Capsomere-Interacting Protein VP26 Regulates Nucleocapsid Maturation. *J. Virol.*, 査読有, vol.91, 2017, e01068-17  
DOI: 10.1128/JVI.01068-17

F. Maeda, J. Arie, Y. Hirohata, Y. Maruzuru, N. Koyanagi, A. Kato and Y. Kawaguchi. Herpes Simplex Virus 1 UL34 Protein Regulates the Global Architecture of the Endoplasmic Reticulum in Infected Cells. *J. Virol.*, 査読有, vol.91, 2017, e00271-17  
DOI: 10.1128/JVI.00271-17

R. Akkina, H. Ellerbrok, W. Hall, H. Hasegawa, Y. Kawaguchi, H. Kleanthous, E. McSweeney, N. Mercer, V. Romanowski, H. Sawa, A. Vahlne. 2016 International meeting of the Global Virus Network. *Antiviral Res.*, 査読有, vol.142, 2017, 21-29  
DOI: 10.1016/j.antiviral.2017.03.005

[学会発表](計12件)

Jun Arie, Kosuke Takeshima, Yuhei Maruzuru, Naoto Koyanagi, Akihisa Kato, Yasushi Kawaguchi. A single amino acid substitution in HSV-1 UL31 at an inter-hexamer contact site abrogates primary envelopment and viral growth. 第66回日本ウイルス学会学術集会, 2018

Kosuke Takeshima, Jun Arie, Yuhei Maruzuru, Naoto Koyanagi, Akihisa Kato, Yasushi Kawaguchi. Residues in  $\alpha$ -helix 9 of HSV-1 UL31 is critical for interaction with UL25 and incorporation of capsid into vesicles in the perinuclear space. 第66回日本ウイルス学会学術集会, 2018

Jun Arie, Kosuke Takeshima, Yuhei Maruzuru, Naoto Koyanagi, Akihisa Kato, Yasushi Kawaguchi. A single amino acid substitution in herpes simplex virus 1 UL31 at an inter-hexamer contact site abrogates primary envelopment and viral growth. 43rd Annual International Herpesvirus Workshop, 2018

Kosuke Takeshima, Jun Arie, Yuhei Maruzuru, Naoto Koyanagi, Akihisa Kato, Yasushi Kawaguchi. Role of amino acid residues in the  $\alpha$ -helix 9 of HSV-1 UL31 in its interaction with capsid proteins and nuclear egress. 43rd Annual International Herpesvirus Workshop, 2018

Yasushi Kawaguchi, Novel Mechanisms for Immune Evasion by Herpes Simplex virus, International Joint Forum on Infectious Disease Research 2018, 2018

Yuhei Maruzuru, Takeshi Ichinohe, Naoto Koyanagi, Jun Arie, Akihisa Kato and Yasushi Kawaguchi. Inhibition of AIM2 inflammasome activation by an HSV-1 virion component enables efficient viral replication in vivo. 第31回ヘルペスウイルス研究会, 2017

Yuhei Maruzuru, Takeshi Ichinohe, Naoto Koyanagi, Zhuoming Liu, Tomoko Ando, Jun Arie, Akihisa Kato, Yasushi Kawaguchi. Evasion of AIM2-Dependent Inflammasome Activation by Herpes Simplex Virus 1 Virion Protein Enables Efficient Viral Replication In Vivo. 第65回日本ウイルス学会学術集会, 2017

川口 寧, 単純ヘルペスウイルスの宿主免疫回避機構, 日本生化学会北陸支部第35回大会, 2017

Yuhei Maruzuru, Takeshi Ichinohe, Naoto Koyanagi, Jun Arie, Akihisa Kato and Yasushi Kawaguchi. Inhibition of AIM2 inflammasome activation by an HSV-1 virion component enables efficient viral replication in vivo. 42nd Annual International Herpesvirus Workshop, 2017

Yasushi Kawaguchi, Novel Mechanisms for Immune Evasion by herpes simplex virus, 24th East Asia Joint Symposium, 2017

加藤哲久, 播磨勇人, 有井潤, 川口寧. Endosomal sorting protein SNX3 と HSV 膜蛋白質の相互作用に関する解析, 第30回ヘルペスウイルス研究会, 2016

Akihisa Kato, Hayato Harima, Jun Arie, Yasushi Kawaguchi. Investigation of a novel

interaction between the endosomal sorting protein SNX3 and HSV-1 membrane proteins.  
第 64 回日本ウイルス学会学術集会, 2016

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/Kawaguchilab/KawaguchiLabTop.html>

## 6 . 研究組織

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。