

令和 3 年 5 月 12 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04080

研究課題名(和文) 顧みられない単純ヘルペスウイルス因子の統合的in vivo解析

研究課題名(英文) Integrated in vivo analyses of neglected viral factors of herpes simplex virus

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) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：単純ヘルペスウイルス(HSV)がコードする非必須遺伝子である様々なウイルス因子に関して以下の結果を得た。(i)HSV UL13が細胞傷害性T細胞の応答を抑制する。(ii)UL13のSer-18のリン酸化がUL13のPK活性制御およびマウス経腔接種後のウイルス増殖および病原性発現に寄与する。(iii)HSV VP22が免疫炎症反応の誘起に重要なインフラマソームの活性化を迅速かつ極めて効率的に抑制する。(iv)HSV VP26が、ウイルスゲノムDNAのカプシドへの取り込みを促進する。(v)HSVがコードするプロテインキナーゼUs3によるUL7のリン酸化が、個体レベルでの病態発現に大きな役割を果たす。

研究成果の学術的意義や社会的意義

様々なHSV因子の新規機能を明らかにし、それらの知見を統合的に理解することは、HSVの増殖および病態発現機構の全体像の解明に寄与するだけでなく、HSVの新たな治療法や予防法の確立に繋がると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The following results were obtained for various viral factors that are non-essential genes encoded by HSV (herpes simplex virus). (i) HSV UL 13 down-regulates the response of cytotoxic T cells in vivo. (ii) Phosphorylation of UL13 at Ser-18 contributes to the regulation of the catalytic activity of UL13 and this regulation is important for efficient viral replication and pathogenesis in vivo. (iii) HSV VP22 efficiently inhibits the activation of the AIM2 inflammasome, which is important for inducing an immunoinflammatory response. (iv) HSV VP26 promotes the packaging of a viral genomic DNA into a capsid. (v) Phospho-regulation of HSV UL7 by an HSV protein kinase Us3 plays an important role in viral replication and pathogenesis in vivo.

研究分野：ウイルス学

キーワード：ウイルス HSV

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 単純ヘルペスウイルス(HSV)のゲノムには、約 80 種のウイルス因子がコードされており、これらのウイルス因子が生体内で様々な機能を発現する事により多彩な病態を引き起こす事が考えられるが、その病態発現機構の全体像は未だ明らかでない。HSV 研究の多くはウイルス因子の欠損株を培養細胞系で解析する事により行われてきた。しかし、研究代表者の先行研究において、欠損により培養細胞系におけるウイルス増殖に影響が無いにも関わらず、生体レベルにおける病態発現には極めて重要な複数のウイルス因子が存在する事が明らかとなってきた。従って、培養細胞におけるウイルス増殖に影響が無いことが原因でこれまで顧みられなかったウイルス因子の中に、HSV の病態発現に深く関与するものが存在する事が考えられた。

(2) 一方、これまでのマウス HSV 病態モデルを利用した病態発現解析では、各研究グループが使用するウイルス株、マウスストレインに統一性がなかった。HSV では、各標準株およびマウスストレインによって病原性が著しく異なることが知られている。つまり、既存の各研究グループの病態解析の知見は断片的であり、比較することができないゆえに、統合的な知見の蓄積に至っていない。病態発現解析の知見を HSV 病態発現機構の全体像の理解に繋げるためには、同じウイルス株とマウスストレインを使用した統合的な多因子解析を行う必要がある。

2. 研究の目的

(1) 本研究は「これまで顧みられなかったウイルス因子」の生物学的意義を主にマウス HSV 病態モデルを用いた統合的多因子解析により解明することを目的とする。培養細胞でのウイルス増殖への必要性が低いと判明した結果、その後の解析が行われず、その役割や機能が不明な HSV 因子に焦点を当て、マウス HSV 病態モデルを用いて統合的多因子解析を実施することによって、これら HSV 因子の機能を解明することを目指す。

(2) 生体レベルでの増殖や病態発現に寄与が認められた HSV 因子に関しては、その寄与度が高い順に、その機能発現機構の解明を順次試みる。

(3) ウイルス因子の機能発現が宿主因子と他のウイルス因子との相互作用ネットワークによって引き起こされていることに着目し、各 HSV 因子と相互作用するウイルス因子および宿主因子同定に基づく解析を行うことによって解明を目指す。

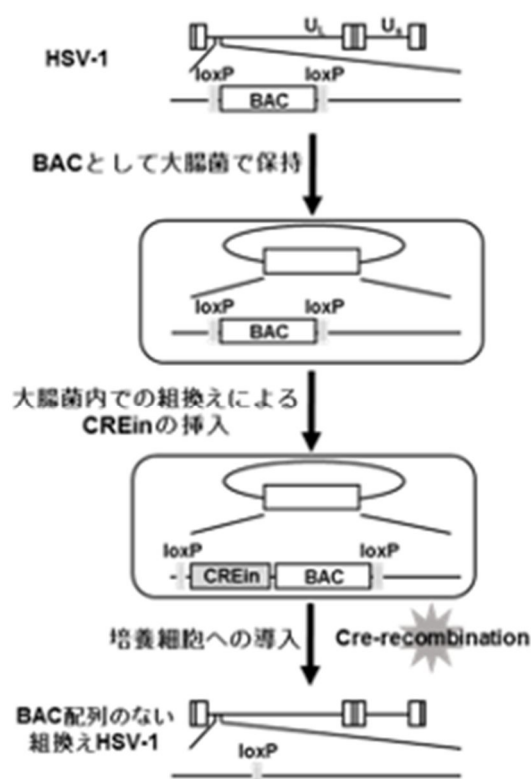
3. 研究の方法

(1) 顧みられない HSV 因子群の生体レベルにおけるウイルス増殖・病態発現への寄与の解析
図に示す新しい HSV 改変系を利用し、HSV 因子の変異組換えウイルスおよび各変異復帰組換えウイルスを作製する。これらの組換えウイルスを、マウス角膜炎モデル、マウス脳炎モデル、マウス膣炎モデルに供し、致死率、角膜炎または膣炎の病態スコア、眼球または膣、神経節、脳内のウイルス力価を測定する。以上の解析によって生体レベルでのウイルス増殖や病態発現に寄与している顧みられない HSV 因子を同定する。

(2) 生体レベルにおけるウイルス増殖や病態発現への寄与が確認された顧みられない HSV 因子の機能発現機構の解析

当該 HSV 因子に会合する HSV 因子および宿主因子のスクリーニング

対象 HSV 因子に Myc-TEV-Flag (MEF: Myc, Flag のタンデム tag の間に TEV protease の切断部位が存在) tag を付与し、二重免疫沈降で会合タンパク質を精製後、tag peptide で免疫沈降物を溶出し、超高感度質量解析装置(LC-MS/MS 法)に供することによって会合タンパク質を網羅的に同定する。HSV 因子と相互作用する宿主因子を同定する際は、対象 HSV 因子に MEF tag を付与したものを一過性過剰発現する 293T 細胞を用いてプロテオーム解析を行う。一方、HSV 因子と相互作用するウイルス因子の同定



の際には、MEF tag を付与した対象ウイルス因子を発現する組み換え HSV を作製し、ヒト株化細胞に感染後、プロテオーム解析を行う。そして、研究代表者がこれまで蓄積してきた HSV 因子と相互作用する因子同定解析における膨大な基盤データと常法のさらなる解析に基づき、解析する新規会合分子の絞り込みを行う。

新規会合因子の生物学的意義の解析

対象 HSV 因子における新規会合分子との会合部位をアミノ酸レベルでマッピングし、相互作用を阻害する最小変異を導入した組み換えウイルスを作製する。それらのマウス HSV 病態モデルでの表現系が、(1)での表現系と一致するかを確認する。同定された会合ウイルス因子および宿主因子の特性を考慮し、その相互作用のウイルス増殖における意義を解析する。

4. 研究成果

(1) HSV がコードする非必須遺伝子である UL13、VP22 および VP26 に関して解析を行った。具体的には、HSV がコードするプロテインキナーゼ UL13 が細胞傷害性 T 細胞の応答を抑制すること、また、HSV の粒子タンパク質である VP22 が免疫炎症反応の誘起に重要なインフラマソームの活性化を迅速かつ極めて効率的に抑制することによって、マウス脳内における HSV 増殖や脳炎発症に貢献していることが明らかになった。さらに、小型カプシドタンパク質である VP26 が、ウイルスゲノム DNA のカプシドへの取り込みを促進していることが明らかとなった。

(2) HSV がコードする非必須遺伝子である UL13 および UL51 に関して解析を行った。具体的には、HSV がコードするプロテインキナーゼ UL13 の Ser-18 のリン酸化が UL13 の PK 活性制御およびマウス経腔接種後のウイルス増殖および病原性発現に寄与すること、また、HSV の粒子タンパク質である UL51 の Ser-184 のリン酸化が細胞種依存的にヌクレオカプシドの小胞媒介性核外輸送制御およびマウス角膜接種後の病原性発現に寄与することが明らかになった。

(3) HSV-2 がコードする非必須遺伝子である UL7 および Us3 に関して解析を行った。具体的には、HSV-2 がコードするプロテインキナーゼ Us3 がビリオン構成タンパク質である UL7 をリン酸化すること、また、Us3 による UL7 のリン酸化が、個体レベルでの病態発現に大きな役割を果たすことが明らかになった。

(4) Us3 による UL7 のリン酸化は HSV の血清型特異的な現象であり、HSV が属するシンプレックス属の中では、系統樹における同じクレードに属する HSV-2 とチンパンジーヘルペスウイルス (CHHV) のみが Us3 による UL7 のリン酸化部位を獲得していた。祖先ウイルスの UL7 をインシリコで予想し、HSV-2 と CHHV の祖先の UL7 のリン酸化部位を獲得していたのに対し、HSV-2, CHHV, HSV-1 の共通祖先の UL7 はリン酸化部位を獲得していなかった。さらに、UL7 のリン酸化部位を獲得していない HSV-1 UL7 に人工的にリン酸化部位を導入しても、HSV-2 UL7 の場合と異なり、当該リン酸化は個体レベルでの病態発現やウイルス増殖に寄与していなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 13件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 13件）

1. 著者名 Maruzuru Yuhei, Koyanagi Naoto, Kato Akihisa, Kawaguchi Yasushi	4. 巻 95
2. 論文標題 Role of the DNA Binding Activity of Herpes Simplex Virus 1 VP22 in Evading AIM2-Dependent Inflammasome Activation Induced by the Virus	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JVI.02172-20	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Watanabe Mizuki, Arii Jun, Takeshima Kosuke, Fukui Ayano, Shimojima Masayuki, Kozuka-Hata Hiroko, Oyama Masaaki, Minamitani Takeharu, Yasui Teruhito, Kubota Yuji, Takekawa Mutsuhiro, Kosugi Isao, Maruzuru Yuhei, Koyanagi Naoto, Kato Akihisa, Mori Yasuko, Kawaguchi Yasushi	4. 巻 95
2. 論文標題 Prohibitin-1 Contributes to Cell-to-Cell Transmission of Herpes Simplex Virus 1 via the MAPK/ERK Signaling Pathway	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JVI.01413-20	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kato Akihisa, Adachi Shungo, Kawano Shuichi, Takeshima Kousuke, Watanabe Mizuki, Kitazume Shinobu, Sato Ryota, Kusano Hideo, Koyanagi Naoto, Maruzuru Yuhei, Arii Jun, Hatta Tomohisa, Natsume Tohru, Kawaguchi Yasushi	4. 巻 11
2. 論文標題 Identification of a herpes simplex virus 1 gene encoding neurovirulence factor by chemical proteomics	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-18718-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Arii Jun, Fukui Ayano, Shimanaka Yuta, Kono Nozomu, Arai Hiroyuki, Maruzuru Yuhei, Koyanagi Naoto, Kato Akihisa, Mori Yasuko, Kawaguchi Yasushi	4. 巻 94
2. 論文標題 Role of Phosphatidylethanolamine Biosynthesis in Herpes Simplex Virus 1-Infected Cells in Progeny Virus Morphogenesis in the Cytoplasm and in Viral Pathogenicity In Vivo	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JVI.01572-20	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Shibazaki Misato, Kato Akihisa, Takeshima Kosuke, Ito Jumpei, Suganami Mai, Koyanagi Naoto, Maruzuru Yuhei, Sato Kei, Kawaguchi Yasushi	4. 巻 94
2. 論文標題 Phosphoregulation of a Conserved Herpesvirus Tegument Protein by a Virally Encoded Protein Kinase in Viral Pathogenicity and Potential Linkage between Its Evolution and Viral Phylogeny	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JVI.01055-20	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Arii Jun, Maeda Fumio, Maruzuru Yuhei, Koyanagi Naoto, Kato Akihisa, Mori Yasuko, Kawaguchi Yasushi	4. 巻 10
2. 論文標題 ESCRT-III controls nuclear envelope deformation induced by progerin	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-75852-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takeshima Kosuke, Arii Jun, Maruzuru Yuhei, Koyanagi Naoto, Kato Akihisa, Kawaguchi Yasushi	4. 巻 93
2. 論文標題 Identification of the Capsid Binding Site in the Herpes Simplex Virus 1 Nuclear Egress Complex and Its Role in Viral Primary Envelopment and Replication	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JVI.01290-19	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Joo Sunyi, Suwanto Aldina, Sato Ayuko, Nakahashi-Ouchida Rika, Mori Hiromi, Uchida Yohei, Sato Shintaro, Kurashima Yosuke, Yuki Yoshikazu, Fujihashi Kohtarō, Kawaguchi Yasushi, Kiyono Hiroshi	4. 巻 12
2. 論文標題 A role for the CCR5?CCL5 interaction in the preferential migration of HSV-2-specific effector cells to the vaginal mucosa upon nasal immunization	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Mucosal Immunology	6. 最初と最後の頁 1391-1403
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41385-019-0203-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Arii Jun, Takeshima Kosuke, Maruzuru Yuhei, Koyanagi Naoto, Kato Akihisa, Kawaguchi Yasushi	4. 巻 93
2. 論文標題 Roles of the Interhexamer Contact Site for Hexagonal Lattice Formation of the Herpes Simplex Virus 1 Nuclear Egress Complex in Viral Primary Envelopment and Replication	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JVI.00498-19	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 R. Sato, A. Kato, T. Chimura, S.-I. Saitoh, T. Shibata, Y. Murakami, R. Fukui, K. Liu, Y. Zhang, J. Arii, G.-H. Sun-Wada, Y. Wada, T. Ikenoue, G. N. Barber, T. Manabe, Y. Kawaguchi, and K. Miyake.	4. 巻 19
2. 論文標題 Combating herpesvirus encephalitis by potentiating a TLR3-mTORC2 axis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Immunology	6. 最初と最後の頁 1071-1082
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41590-018-0203-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 A. Kato, S. Oda, M. Watanabe, M. Oyama, H. Kozuka-Hata, N. Koyanagi, Y. Maruzuru, J. Arii, and Y. Kawaguchi	4. 巻 92
2. 論文標題 Roles of the Phosphorylation of Herpes Simplex Virus 1 UL51 at a Specific Site in Viral Replication and Pathogenicity	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JVI.01035-18	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 N. Koyanagi, A. Kato, K. Takeshima, Y. Maruzuru, H. Kozuka-Hata, M. Oyama, J. Arii, and Y. Kawaguchi	4. 巻 92
2. 論文標題 Regulation of Herpes Simplex Virus 2 Protein Kinase UL13 by Phosphorylation and Its Role in Viral Pathogenesis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JVI.00807-18	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 J. Arii, M. Watanabe, F. Maeda, N. Tokai-Nishizumi, T. Chihara, M. Miura, Y. Maruzuru, N. Koyanagi, A. Kato and Y. Kawaguchi	4. 巻 9
2. 論文標題 ESCRT-III mediates budding across the inner nuclear membrane and regulates its integrity	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-018-05889-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計12件(うち招待講演 4件/うち国際学会 3件)

1. 発表者名 川口 寧
2. 発表標題 単純ヘルペスウイルス感染の分子機構
3. 学会等名 第50回日本皮膚免疫アレルギー学会総会学術大会(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 加藤哲久, 竹島功高, 丸鶴雄平, 小柳直人, 有井潤, 川口寧, 足達俊吾, 八田知久, 夏目徹
2. 発表標題 新規HSV-1 遺伝子の機能解析
3. 学会等名 第33回ヘルペスウイルス研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 有井潤, 川口寧
2. 発表標題 単純ヘルペスウイルスによる核膜の再構築
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Jun Arii, Ayano Fukui, Yuhei Maruzuru, Naoto Koyanagi, Akihisa Kato, Yasushi Kawaguchi
2. 発表標題 The roles of glycerophospholipids in HSV-1 replication
3. 学会等名 第67回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yasushi Kawaguchi
2. 発表標題 Novel Evasion Mechanisms against Innate and Adaptive Immune Responses by Herpes Simplex Virus
3. 学会等名 第48回日本免疫学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川口 寧
2. 発表標題 単純ヘルペスウイルスの病原性発現機構
3. 学会等名 第3回HZ・Sフォーラム (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yasushi Kawaguchi
2. 発表標題 Molecular Mechanisms of Herpes Simplex Virus Replication and Pathogenicity
3. 学会等名 International Joint Forum on Infectious Disease Research 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 柴崎美里, 加藤哲久, 竹島功高, 丸鶴雄平, 小柳直人, 有井潤, 川口寧
2. 発表標題 ヘルペスウイルスの進化とUs3リン酸化部位の獲得
3. 学会等名 第32回ヘルペスウイルス研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 加藤哲久, 竹島功高, 丸鶴雄平, 小柳直人, 有井潤, 川口寧, 川野秀一, 足達俊吾, 八田知久, 夏目徹
2. 発表標題 新規HSV-1遺伝子の同定
3. 学会等名 第32回ヘルペスウイルス研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Misato Shibazaki, Akihisa Kato, Kosuke Takeshima, Naoto Koyanagi, Yuhei Maruzuru, Jun Arie, Yasushi Kawaguchi
2. 発表標題 HSV type-specific phosphorylation mediated by Us3 kinase: its role in viral pathogenesis and implication in evolution of herpesviruses
3. 学会等名 第66回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Misato Shibazaki, Akihisa Kato, Naoto Koyanagi, Yuhei Maruzuru, Jun Arie, Yasushi Kawaguchi
2. 発表標題 A HSV-2 specific phosphorylation event mediated by Us3 kinase is involved in viral pathogenicity in mice following vaginal infection
3. 学会等名 43rd Annual International Herpesvirus Workshop (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yasushi Kawaguchi
2. 発表標題 Sensing of herpes simplex virus by the host immunity and immune evasion by the virus
3. 学会等名 KAI International Meeting 2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東京大学医科学研究所 感染・免疫部門 ウイルス病態制御分野 http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/Kawaguchi-lab/KawaguchiLabTop.html
--

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------