

平成21年 4月30日現在

研究種目：基盤研究(B)
研究期間：2007～2008
課題番号：19390132
研究課題名（和文） 単純ヘルペスウイルスの成熟と核外輸送・細胞外排出機構についての研究
研究課題名（英文） Studies on the mechanism of maturation and egress of herpes simplex virus.
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

研究成果の概要：

ヘルペスウイルスのカプシドは核内で形成された後、核外へと輸送されてポストゴルジの小胞で出芽しエンベロープを獲得する。これは他の動物ウイルスにはないユニークな増殖様式であり、その分子機構には不明な点が多い。本研究では、ヘルペスウイルスのプロトタイプである単純ヘルペスウイルスの成熟、細胞外排出機構に関わるウイルス側、細胞側の諸要因について解析した。その結果、HSVの感染によって核骨格構造にダイナミックな変化が誘導されること、ウイルス粒子の成熟・排出過程に関わると考えられる UL14、UL56、US3 などの機能と役割について新たな知見を得た。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	5,700,000	1,710,000	7,410,000
2008年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
総計	10,900,000	3,270,000	14,170,000

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、増殖機構、核マトリックス、核外輸送

1. 研究開始当初の背景

ヘルペスウイルスは2本鎖DNAをゲノムとする大型の動物ウイルスであり、魚類から哺乳動物に至るまで幅広く分布する。あらゆる脊椎動物には種固有のヘルペスウイルスが存在すると推定され、ヒトからも8種類のヘルペスウイルスが発見されている。いずれも多彩な疾患を起し、病原ウイルスとして重要な位置を占める。その中

で、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基礎研究が推進され、増殖機構についての理解が最も進んでいる。しかし、感染後期におけるウイルス粒子の成熟から細胞外へ放出に至る過程はいまだ不明な点が多い。

ヘルペスウイルスのカプシドは核内で形成された後、核外へと輸送されてポストゴルジの小胞で出芽しエンベロープを獲得す

る。これは他の動物ウイルスにはないユニークな増殖様式である。また、カプシドとエンベロープの間にはテグメントと名付けられた電子密度の高い領域があり、多種類の蛋白質で構成される。このテグメントは20種近いウイルス蛋白質から構成されるが、それらの機能、テグメントに存在する意味等についてはよくわかっていないものが多い。

我々は、ここ10年間 HSV の全遺伝子産物(約74種)のカタログ作りを当面の目標に、当時ほとんど手つかずであった約25種の遺伝子について、それらの基本的性状(分子量、修飾、発現時期、細胞内分布など)を明らかにしてきた。その結果、HSV 全遺伝子産物の全体像をとりあえず描くことが可能となったが、予想以上の数の蛋白質がウイルス感染後期過程、カプシドの形成から放出過程に関わっているらしいこと、テグメントに存在することが明らかになってきた (Rev. Med. Virol 14:33-46, 2004)。一方、ヘルペスウイルス粒子の成熟から放出に至る機構の解析は、欧米においてもヘルペスウイルス研究の焦点の一つになっており、急速な展開をみせている。とくにカプシドの核外への輸送機構には大きな関心が寄せられ、その機構に関わる UL34, UL31, そして US3 プロテインキナーゼ(PK)の役割の解明が進められてきた。しかし、相矛盾した報告も提出され結着した状況にはまだない。

我々は、UL34 が C 末端アンカー型 type II 膜蛋白質であること (J Gen Virol 81: 2397-2405 (2000))、核マトリックス結合蛋白質 UL31 と UL34 は複合体を形成して初めて核内膜に分布しうることを示した (J Gen Virol 82:1423-1428 (2001))。また、UL51 はゴルジ装置に集蓄するパルミチン酸化蛋白質であり (J Gen Virol 79: 3027-3031 (1998), J Virol 77: 3204-3216 (2003))、粒子の成熟、放出過程に極めて重要な役割をもつこと (J Virol 79: 6947-6956 (2005))、UL14 は分子シャペロン機能をもち (J Cell Sci 115:2517-2527 (2002))、やはり成熟過程に関与していること (J Gen Virol 80: 2423-2431 (1999), J Gen Virol 82: 321-330 (2001))、UL56 は細胞質小胞に分布する C 末端アンカー型 type II 膜蛋白質で UL11 や軸索輸送に関わる K1F1A と相互作用することなどを初めて明らかにした (J Virol 76:6718-6728 (2002), J Gen Virol 86: 527-533 (2005))。さらには、US3PK が UL34, UL31 を基質としてリン酸化することを明確にするとともに (J Virol 79:9325-31 (2005))、テグメント蛋白質 UL46 の安定化、粒子内取り込みに重要であることを示すなど (J Gen Virol 86: 1979-1985 (2005))、この領域では

多くの成果を挙げてきた。

2. 研究の目的

本研究では、感染後期におけるカプシドの核内、細胞質内の移動と最終的なエンベロープの獲得に至る過程に焦点を絞り、この現象の背景にある分子機構を細胞側の変化を含め明らかにすることを目標とする。研究開始当初の具体的研究課題としては以下のものを考えた。

(1) HSV 感染後期における核の変化及びカプシドの動態を生化学的、形態学的に解析し、ウイルス DNA を含んだカプシド形成部位から核内膜へ、さらに核内膜への出芽を経て細胞質へと輸送されてゆく過程でどのような核構造の変化が起こっているのかを明らかにする。とくに核骨格構造を構成する NuMA 蛋白質と核内膜の裏打ちをなす核ラミンに注目して、それらの変化(切断、修飾、局在性など)の解明とカプシドの局在との関連を明らかにする。

(2) 核外へ輸送されたカプシドは、微小管形成中心 (MTOC) に集結し、アグリゾーム様の構造体を形成する。この構造体はテグメントが付着する重要な場所の一つとなっている可能性がある。このアグリゾーム様構造の粒子形成における意義を明らかにする。

(3) 多くのエンベロープ蛋白質の出芽過程にユビキチン修飾が関与していることが知られている。HSV 感染後期の出芽、小胞輸送にユビキチン修飾が関与している可能性がある。関与の有無をはっきりさせるとともに、それに関わるウイルス側、細胞側の因子を明らかにする。

4) 我々の研究から、また他の研究者から、既に成熟から放出に至る過程での関与が示唆されている遺伝子産物 (US3, UL14, UL51, UL56, US2 など) についてさらに詳細な情報を得るため、既にある特定遺伝子を欠損した HSV 変異株を用いて解析を行い、この過程における個々の遺伝子の役割を明確にする。

3. 研究の方法

(1) HSV 感染後期の核の変化とカプシドの動態についての解析

① HSV-1 感染時に生ずる NuMA の切断がアポトーシス誘導時に認められる切断とどのように異なるのか? どの部位が切断されるのかについて検討する。既に NuMA の N 末、C 末に GFP を結合させた発現プラスミドを保有しており、トランスフェクトした GFP-NuMA 発現に細胞への感染系を用いて解析を行う。異なるエピトープを認識す

る抗体も保有している。本実験でおおよその切断部位は推定できよう。

②. NuMA 切断に関わる酵素の同定を行う。アポトーシス誘導時にみられる切断はカススペース 3 が主体であることが知られている。各種プロテアーゼ阻害剤を用いてまず検討を行う。また、この切断がウイルス DNA 合成依存的であることから、カプシドへのウイルス DNA のパッケージングと連動している可能性があり、ウイルス由来のプロテアーゼが関与している可能性も考慮する必要がある。

③. NuMA の分布、核ラミン(A/C 及び B)の分布、及び各種ウイルス蛋白質 (カプシド蛋白質、足場蛋白質など) の分布を HSV-1 野生株感染後、経時的に共焦点レーザー顕微鏡にて詳細に観察する。NuMA に関しては、GFP-NuMA 発現体を保有しているのでリアルタイムに観察することも考えている。

④. HSV-1 と HSV-2 では感染細胞における核の変化、NuMA の動態が異なることを既に観察している。また、US3 欠損ウイルスでも野生株とは異なる動きをすることも判明している。この差異について、まず経時的な変化を形態学的及びウエスタンブロット法にて検討する。

(2) アグリゾーム様構造体形成、及び VICE 構造体形成の役割についての解析

細胞質アグリゾーム様構造体の微細構造を電子顕微鏡、共焦点レーザー顕微鏡を用いて検討する。各種ウイルス抗体及び細胞蛋白質の抗体を用いて免疫電顕も行う。細胞側の蛋白質としては Hsp 群、ユビキチン・プロテアソーム系因子にとりあえず焦点をあて解析する。

(3) ウイルス粒子の成熟・細胞外への排出過程におけるユビキチン・プロテアソーム系の関与についての解析

①. HSV 感染細胞におけるモノユビキチン化、ポリユビキチン化について経時的に検討する。また、手持ちの特定遺伝子欠損ウイルス感染細胞においても検討し、野生株と比較する。

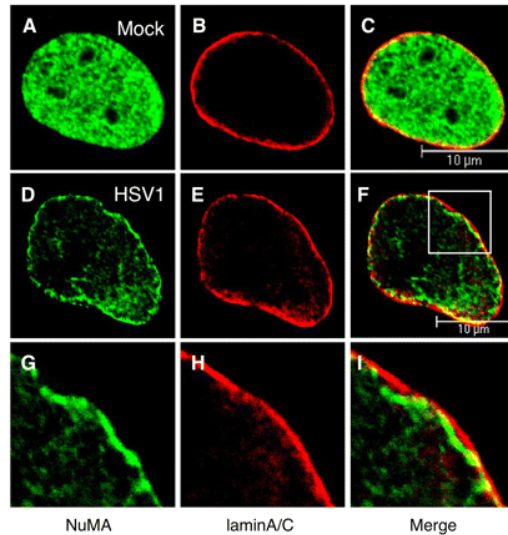
②. 既に特定した NEDD4 ファミリーと相互作用するウイルス蛋白質について、その動態 (細胞内分布、修飾などの変化)、ユビキチン化の様態について解析を行う。

4. 研究成果

(1) 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。そこで核構造タンパク質のひとつである NuMA に着目し感染におけるダイナミックな動態の解析を行った。NuMA は HSV 感染により、分子量にシフトアップが見られた。非感染細胞では核小体をのぞく細胞核にほぼ

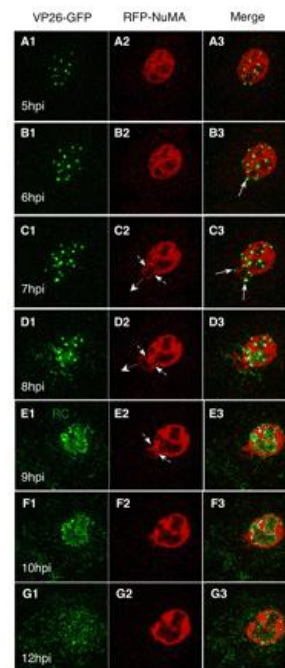
均一に存在するが、感染が進みにつれ核中央の密度が減少し、核内膜直下 (ラミンの内側) に不溶性成分として蓄積または残存することが分かった (図 1)。

図 1



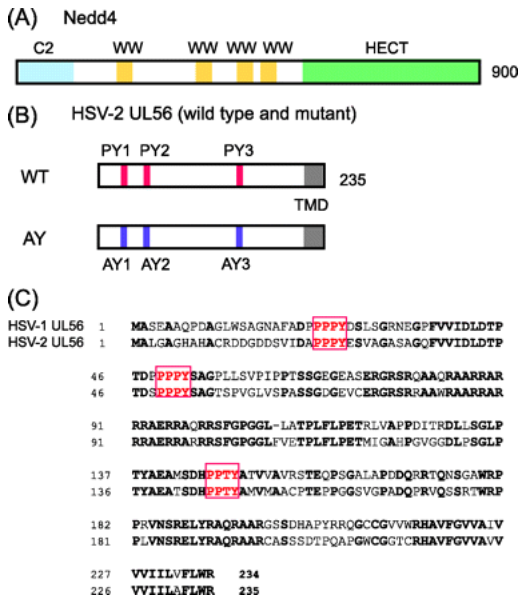
この変化は PAA によって阻害され、また NuMA の Cdk1/cyclinB リン酸化サイトの欠損は影響しなかった。RFP 融合 NuMA を用いた生細胞イメージング解析により、NuMA の蛍光が増殖とともに虫食い状に減弱していく様子が大半の感染細胞で観察された (図 2)。また、siRNA によって NuMA の発現を抑制した細胞では、ウイルス増殖が抑制されることが分かった。

図 2



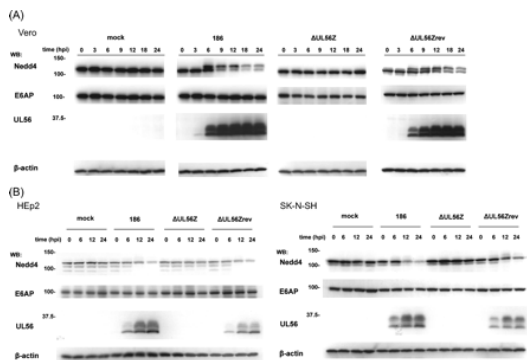
(2) HSV-2 後期遺伝子 UL56 は病原性、特に中枢神経侵襲性への関与が示されているアクセサリ遺伝子であるが、UL56 と相互作用する細胞宿主因子としてユビキチンリガーゼ Nedd4 を見出し、両者の相互作用および HSV-2 感染細胞での Nedd4 の動態について検討を行った (図 3)。

図 3



共発現細胞で両者は共局在し、UL56 との共発現により外因性 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 蛋白の相互作用予測配列への変異導入により抑制された。感染 Vero 細胞では、Nedd4 の経時的減少が見かけ上の分子量の増大とともに認められたが、UL56 欠損株ではみられなかった (図 4)。

図 4



HSV-2 感染による Nedd4 の減少は HEp-2 細

胞 (ヒト咽頭癌)、SK-N-SH 細胞 (ヒト神経芽細胞腫) においても観察され、プロテアソーム阻害剤依存下では抑制された。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。Nedd4 が感染の進行に伴い核周囲に偏在する像が 186 感染細胞では観察されたが、ΔUL56Z 感染細胞では見られなかった。単独発現系では、Nedd4 は細胞質全体に分布し、UL56 および変異 UL56 は小胞様に細胞質内を移動する像が観察された。Nedd4 は UL56 との共発現により一部が小胞様分布をとるようになり両者は共局在したが、変異 UL56 との共発現ではこの変化は見られなかった。また、CD63 と UL56 および Nedd4 との共局在は感染系、発現系ともに明らかではなかった。一段増殖実験では、感染後 12、24 時間の培養上清中 ΔUL56Z の感染価は 186 および ΔUL56Zr の約 1/10 であった。Nedd4 の細胞内局在に UL56 が影響することが感染系および共発現系で明らかになった。また、UL56 が細胞内小胞輸送に関与する可能性が生細胞イメージングで改めて示された。増殖実験の結果からは、UL56 が感染性ウイルス粒子の放出過程に何らかの関与をしていることが示唆された。

(3) UL14 欠損ウイルスでは感染直後におけるウイルスカプシドと主要テグメント蛋白質の核への輸送が野生株に比べて有意に遅延することを示し、テグメントに含まれる UL14 の役割を明らかにした。一方、感染後期の UL14 の役割についてはほとんど明らかになっていない。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。14D 感染細胞における VP16-GFP はビメンチンで周囲を囲まれたアグリゾーム様構造を形成し、UL14 欠損下では効率の良い粒子成熟が阻害されていることが示唆された。

(4) 野生株および US3 欠損株の WB 解析により、US3 欠損株感染細胞では、UL46 タンパク質の安定性が、野生株の場合より低下していることを示唆する結果が 1 型、2 型の両方で得られた。また、LSM 解析により R7041 感染細胞内における UL46 タンパク質の局在パターンが、野生株とは著しく異なることが明らかとなった。すなわち、UL46 タンパク質が、野生株感染細胞では主に細胞質中に細かな顆粒状として観察されたのに対し、US3 欠損株では細胞質辺縁により大きな斑状・桿状構造物として観察された。野生株感染細胞では UL46 タンパ

ク質は3本のバンドとして検出されるが、λ-phosphatase 処理により、90kDa、100kDaのバンドが消失し、80kDaのみとなった。ウイルスのタンパク質キナーゼ US3によりリン酸化を受けた UL46 タンパク質は細胞内でより安定かつ均一な局在性を示すことが明らかになった。このことは、US3がUL46の機能制御に関与していることを示している。今回の結果から、UL46およびUS3が、感染細胞におけるウイルス粒子(カプシド)の細胞質内動態に、直接的、間接的に関与していることが示唆された。

(5) 経鼻接種モデルの感染後6日目の親株と UL56Δ を比較すると、HSVの逆行性輸送に関わる三叉神経経路では両者の中枢神経侵襲性に大きな相違はなかったが、順行性輸送に関わる嗅神経経路で UL56Δ の侵襲性に顕著な限局が見られた。これは UL56 遺伝子産物の中枢神経侵襲性及び軸索内順行性輸送への関与を支持するものと考えられる。また、同遺伝子に加え5種のアクセサリ遺伝子(UL43、UL49.5、UL55、UL56、LAT)を欠損した HF10 においても、UL56Δ よりさらに感染伝播部位が限局していることが観察された。US2Δ では、半数で嗅球僧帽細胞層にウイルス抗原を検出した他は UL56Δ と類似した感染動態を示した。US3Δ は HSV-2 欠損ウイルスの中では最も限局された広がりを示した。嗅球接種モデルにおける UL56Δ では、親株より生存日数が延長し、親株では見られた左嗅球の感染が皆無であった。同遺伝子産物の中枢神経侵襲性への関与の可能性をより裏付けする結果である。この場合逆行性輸送の方向となる鼻腔嗅神経上皮では三者共に全てウイルス抗原が検出され、経鼻接種モデルの結果と合わせると、これらの欠損遺伝子産物の逆行性輸送への関連はないと推測される。

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 13 件) (全て査読有)

1) Yamauchi, Y., Kiriyama, 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) 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).

3) 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).

4) Yamauchi Y, Kiriyama 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).

5) Kagimoto, T., 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).

6) 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).

7) Watanabe, D., Goshima, F., Mori, I., Tanada, Y., Matsumoto, Y., Nishiyama, Y. Oncolytic viral therapy for malignant melanoma with herpes simplex virus type 1 mutant HF10. **Journal of Dermatological Science** 50: 185-196 (2008).

8) 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).

9) 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).

10) 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. **Microb Infect**, 9 (2):142-149 (2007).

11) 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).

12) 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).

13) 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).

[その他]

ホームページ情報

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

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