

平成 23 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20611009

研究課題名 (和文) ヘルペスウイルスのコードする蛋白キナーゼの核輸送や活性を阻害する化合物の開発

研究課題名 (英文) Research of inhibitors for nuclear transport or enzyme activity of protein kinases encoded by human herpesviruses

研究代表者

伊勢川 裕二 (ISEGAWA YUJI)

大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：20184583

研究成果の概要 (和文) : HHV-6 のコードする U69 蛋白キナーゼと U38DNA ポリメラーゼに関して、ガンシクロビル(GCV)投与患者における変異を調べた結果、U38DNA ポリメラーゼに GCV 耐性に関連する変異を持つウイルスを発見した。さらに GCV 耐性ウイルスの検出法の開発、GCV 耐性変異の検出法の開発とその改良を行い、マルチスクリーニングにも耐えられる迅速検出法の開発を行ない、阻害剤の検索を開始した。U69 蛋白の核輸送機構の詳細を明らかにして、輸送阻害剤を用いての抗ウイルス剤の開発を行なう一方で、マルチスクリーニングにも耐えられる迅速検出法の開発を開始した。

研究成果の概要 (英文) : Human herpesvirus 6 (HHV-6) ganciclovir-resistant strain was obtained with amino acid substitutions associated with the death of a recipient after an allogeneic stem cell transplant recipient. The substitutions on U38 DNA polymerase of HHV-6 were associated with the ganciclovir-resistance of HHV-6. The assays to detect antiviral drug-resistance mutations of HHV-6 were developed. The assay has been developing the powerful detection system which is rapid and multi-screening method. The nuclear transport mechanism of U69 protein was cleared, and it is started that the multi-screening assay system is been developing to detect the inhibitors for the nuclear transport.

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：時限

科研費の分科・細目：ケミカルバイオロジー

キーワード：ヘルペスウイルス、GCV 耐性ウイルス、蛋白キナーゼ、核輸送、検査法、阻害剤

1. 研究開始当初の背景

全てのヘルペスウイルスは蛋白キナーゼをコードしており、ウイルス増殖には必要な酵

素である。また、これらの酵素は全て serine/threonine のリン酸化に関与しており、HSV-1 UL13 の研究から、自己リン酸化以

外にもウイルスのコードする発現調節遺伝子や糖蛋白のリン酸化に関与していることが明らかとなった。更に、細胞の蛋白合成や分裂に関与する EF-1・や CDC2 のリン酸化にも関与している。HSV-1 で明らかとなった機能は pseudorabiesvirus や HCMV や equine herpesvirus 2 等の他のヘルペスウイルスの蛋白キナーゼによって置き換えることが可能である。HHV-6 U69 は H2AX のリン酸化に関与していた。しかし、ウイルス増殖における蛋白キナーゼの必要性に関しては、十分な知見が得られていないのが現状で、さらなる研究成果を必要とし、個々のウイルスの特性との関連性に関しては全く着手されていない。

2. 研究の目的

(1) ヘルペスウイルスの感染には大きく分けて急性感染と潜伏感染があり、急性感染では宿主細胞の分裂は停止し、ウイルスが大量に複製される。それに対して、潜伏感染ではウイルスはあたかも細胞に一となったかのように宿主細胞と同調的に行動する。また、ウイルスの病原性は初感染時と再燃時に認められる。さらに、ベータヘルペスウイルス亜科のウイルスは移植医療に置ける術後感染症の問題として注目を集めている。

(2) 総べのヘルペスウイルスは蛋白キナーゼを少なくとも1つコードしており、この蛋白はウイルスの増殖にとって必須である。さらに、ヒトヘルペスウイルス6 (HHV-6) の U69 がコードする蛋白キナーゼは抗ウイルス剤であるガンシクロビル(GCV)をリン酸化し、そのリン酸化 GCV がウイルスの DNA 合成を阻害すること、U69 蛋白キナーゼの変異により GCV 抵抗性になることが知られている。

(3) 研究の全体構想は、ベータヘルペスウイルス亜科の1つである HHV-6 の急性感染あるいは再燃により、初期蛋白である U69 蛋白キナーゼが宿主細胞の分裂や蛋白合成の制御にどのように関与し、ウイルス増殖にどのように貢献しているのかを網羅的に明らかにし、U69 の核移行あるいは酵素活性を阻害する化合物を開発することである。まず、U69 蛋白キナーゼの機能部位とその局在機構を明らかにした。

(4) 本研究の目的は、U69 の核移行と U69 によるリン酸化シグナル伝達系の詳細なメカニズムを明らかとし、それらを阻害する化合物を開発することである。

3. 研究の方法

(1) HHV-6 U69 の NLS は bipartite-type で、核膜腔の輸送を classical pathway により運ばれることが明らかとなった。また、それに関与する importin-7/NPI2 で親和性の最も高いものは importin-7/NPI2 であった。決定された U69-NLS の内、重要なアミノ酸を決定する

ために、PCR を用いて U69-NLS のアミノ酸の点変異遺伝子を作製する。これまでの研究と同様に pEF-BOS-HA3-EGFP と pGEX6P-3 に挿入して、HeLa 細胞を用いたマイクロインジェクション法で確認する。溶液結合アッセイにより、精製 GST 融合蛋白と NPI2 との親和性を測定し、U69-NLS のキーとなるアミノ酸を決定する。

(2) 臨床検体から GCV 耐性ウイルスを単離し、変異部位を塩基配列と変異と GCV 耐性との関係を生物学的アッセイ法から決定する。

(3) GCV 耐性ウイルスの簡易検出法。GCV 耐性変異の迅速簡易検出法。

4. 研究成果

(1) 臓器移植における HHV-6 が引き起こす問題点の一つを明らかにするために、Allogeneic stem cell 移植(SCT) 患児の症例について検討した。SCT 患児は、先制の抗ヘルペス剤である GCV 治療を行ったが、移植後 2, 3 ヶ月で HHV-6 の増殖が起こり、HHV-6 による症状(熱、下痢、網膜症、肝炎、腎炎等)が現れ、遂にはカビによる敗血症ショックで亡くなった(Fig. 1)。この患児から得られた

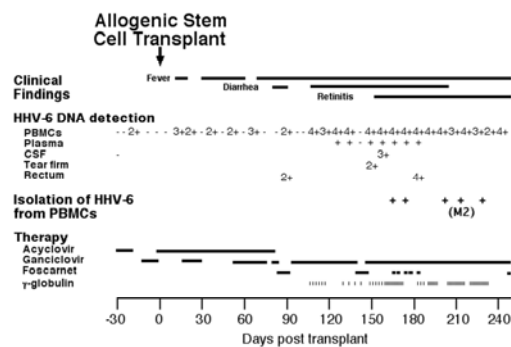


Fig. 1. Time course of treatment, clinical findings, and viral detection.

HHV-6 M2 は HST 株に比べ 100 倍以上 GCV に対して耐性になっていた。このウイルス遺伝子から見つかった変異はこれまでに報告のなかったもので、U38 (P462S と A565V) と U69 (L202I と L213I) であった。これらの変異が GCV 耐性に関与しているかどうかを U69 は baculovirus を用いて行った結果、U69 の変異は直接には GCV 耐性に関与していない可能性が示された。ホモログな遺伝子の検索結果から U38 の変異 P462S が GCV 耐性に関与している可能性が示された(Fig. 2)。

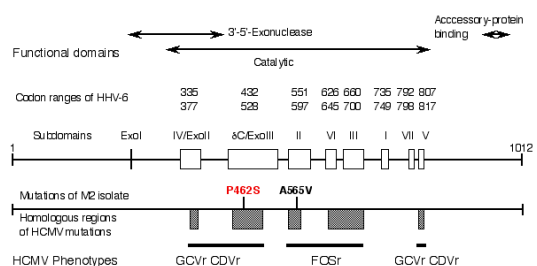


Fig.2. GCV-resistant mutation in U38 DNA polymerase of HHV-6.

これらの変異は SCT 後、直ちに行われた GCV 治療により誘導されたものと考えられたので、ウイルス学会と JCV に報告した。

(2) HHV-6 における塩基配列のバリエーションがどの程度存在するのかを明らかにするために、まずは 36 株の U83 と U69 遺伝子について検討した。その結果、HHV-6B の U83 遺伝子では基本的な違いは認められなかったが、移植患者と突発性発疹患児においてわずかな違いが認められたので、ウイルス学会と AV に報告した。

(3) 一方、HHV-6B の U69 遺伝子には全くバリエーションが認められず、同一の配列を有していた。以上のことから、本研究の目的でもある GCV に代わるうる抗ウイルス剤の開発と早期診断法の確立が急務であることが明らかとなった。HCMV の GCV 耐性株の変異から予測される U69 変異株を作成し、baculovirus を用いて GCV 耐性試験を行った結果、6 種類の U69 変異が GCV 耐性に関与している可能性が示された。そこで、dHPLC を用いて single nucleotide polymorphism (SNP) の診断を行う方法を確立し、ウイルス学会と JVM に報告した。

(4) 続いて、U69 変異株のクエンチングプローブ-PCR(QP-PCR) (Fig. 3) を用いての High Through-put Screening が可能な迅速診断法の確立を行い、細菌学会と MCP に報告した。

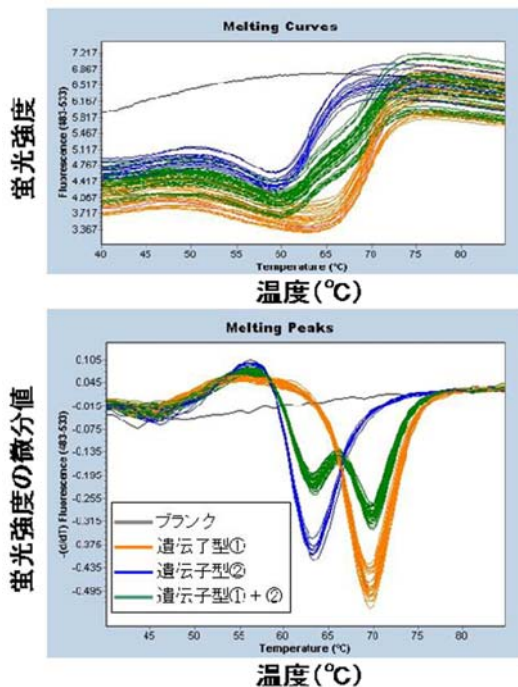


Fig. 3. QP 法による SNP タイピング

(5) さらに、U69NLS と NPI2 の結合に関与するアミノ酸を明らかにするため、U69NLS の変

異株と NPI2 の結合定数をピアコアを用いて測定すると同時に核輸送されるかどうかと核輸送効率を検討して、U69NLS における機能的に重要なアミノ酸についてウイルス学会に報告し、JV への投稿論文を準備中である。(6) U69 と NPI2 の結合をそれぞれに結合させた DsRed と EGFP 間における FLET により解析することが可能となり、High Through-put Screening が可能な迅速診断法の確立が可能となった。

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 4 件)

- ① Y. Isegawa, C. Matsumoto, K. Nishinaka, K. Nakano, T. Tanaka, N. Sugimoto, A. Ohshima (2010) PCR with quenching probes enables the rapid detection and identification of ganciclovir-resistance-causing U69 gene mutations in human herpesvirus 6. *Molecular and Cellular Probes* **24**:167-177. 査読有り
- ② K. Nakano, K. Nishinaka, T. Tanaka, A. Ohshima, N. Sugimoto, Y. Isegawa (2009) Detection and identification of U69 gene mutations encoded by ganciclovir-resistant human herpesvirus 6 using denaturing high-performance liquid chromatography. *Journal of Virological Methods* **161**:223-230. 査読有り
- ③ R. Sjahril, Y. Isegawa, T. Tanaka, K. Nakano, T. Yoshikawa, Y. Asano, A. Ohshima, K. Yamanishi, N. Sugimoto (2009) Relationship between U83 gene variation in human herpesvirus 6 and secretion of the U83 gene product. *Archives of Virology* **154**:273-283. 査読有り
- ④ Y. Isegawa, J. Hara, K. Amo, Y. Osugi, M. Takemoto, K. Yamanishi, R. Fukunaga, M. Shibata, A. Ohshima, Y. Horiguchi, N. Sugimoto (2009) Human herpesvirus 6 ganciclovir-resistant strain with amino acid substitutions associated with the death of a recipient after an allogeneic stem cell transplant recipient. *Journal of Clinical Virology* **44**:15-19. 査読有り

[学会発表] (計 5 件)

- ① 伊勢川裕二、松本智紗、西中和子、中野

- 和司、大島淳、杉本央、ヒトヘルペスウイルス6のガンシクロビル耐性変異株のQP-PCRを用いた迅速検出法の開発、日本細菌学会関西支部会総会、大阪府立大学りんくうキャンパス、(2009年11月14日)
- ② 中野和司、安田善也、伊勢川裕二、HHV-6 U69の核移行シグナルの機能解析、日本ウイルス学会学術集会、都市センターホテル、東京都(2009年10月26日)
- ③ R. Sjahril, Y. Isegawa, T. Tanaka, K. Nakano, T. Yoshikawa, Y. Asano, A. Ohshima, K. Yamanishi, N. Sugimoto, U83 gene Variations Among Human Herpesvirus 6 from Exanthem Subitum patients, Transplant Recipients, and Healthy Donors. 日本ウイルス学会学術集会、岡山コンベンションセンター、(2008年10月27日)
- ④ 中野 和司、西中和子、大島淳、伊勢川裕二、dHPLCを用いたガンシクロビル耐性HHV-6 U69 遺伝子の変異検出法の確立、日本ウイルス学会学術集会、岡山コンベンションセンター、(2008年10月27日)
- ⑤ 伊勢川裕二、天羽清子、武本眞清、山西弘一、柴田真理、大島淳、Allogeneic stem cell 移植患児の死に関連したHHV-6 ガンシクロビル耐性株のアミノ酸置換、日本ウイルス学会学術集会、岡山コンベンションセンター、(2008年10月27日)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊勢川 裕二 (ISEGAWA YUJI)
大阪大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：20184583

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし