

機関番号：82603
 研究種目：若手B
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20790361
 研究課題名（和文）大腸菌内ウイルスゲノム改変系を利用したHSVウイルス制御因子の解析
 研究課題名（英文）Analysis of the regulatory proteins of HSV using the mutagenesis in E. coli
 研究代表者
 田中 道子（TANAKA MICHIKO）
 国立感染症研究所・感染病理部・主任研究官
 研究者番号：10356248

研究成果の概要（和文）：

本研究の成果は、これまでに申請者が開発してきた独自の大腸菌内における組換えウイルスゲノム改変法を利用し、HSVの様々な発現タンパク質の詳細な生物学的解析を行い、HSVの病原性の解明に近づくことである。また、単独発現系のMass解析の新たな導入により宿主因子側からもアプローチすべく方向性を広げた。これにより、新たな、HSV病原性に重要と思われるいくつかの宿主蛋白の候補も同定できており、今後更なる成果が期待される。

研究成果の概要（英文）：

Priority of these study is that, new and detail analysis of HSV proteins and reveal the pathogenesis of HSV-1 by using original HSV genome mutagenesis in E. coli. Moreover, combine of MASS analysis, more wide studies, can approach both of virus and host situations. Some candidate proteins are revealed already. More study and repots are expected.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
20年度	1,200,000	0	1,200,000
21年度	1,100,000	0	1,100,000
22年度	1,000,000	0	1,000,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	0	3,300,000

研究分野：ウイルス学

科研費の分科・細目：6912

キーワード：単純ヘルペスウイルス，大腸菌

1. 研究開始当初の背景

単純ヘルペスウイルス (HSV) は基礎研究の分

野で古くから勢力的に解析が行われ、また近年では遺伝子治療ベクターとして臨床研究の分野でも注目を集めている。いずれにおいても第1段階として組換えウイルスの作製が必須である。しかし、従来の組換えウイルス作製技術は煩雑でありかつ、かなりの長期間を要し、HSV 研究発展の大きな障害となっていた。

2. 研究の目的

HSV 研究においては動物実験系が確立されていることもあり、最終的には常に組換えウイルスを作製することが要求される。しかしながら従来の培養細胞を用いた組換えウイルス作製法は煩雑であり、純粋な組換え体を得るまでにはかなりの期間と熟練した技術が要求され、HSV 研究の大きな壁になっていた。本研究の目的は従来に比べ著しく簡便で迅速であり、更にどのような分野にも応用のきく組換えウイルス作製法の確立である。さらにこの系を駆使し、未だ明らかにされていない HSV の病原性に関与すると考えられる様々なウイルス因子の生物学的解析を行うことも目的とする。

3. 研究の方法

本研究の軸となる方法のものは、大腸菌内での組換えウイルス作製法のさらなる発展

系の確立である。申請者は既に、世界に先駆け、感染性HSV遺伝子全長を保持した大腸菌の作製に成功しており、既にいくつかの大腸菌内ウイルスゲノム改変系を樹立している。この、確立した新たな大腸菌内での組換え法のさらなる迅速化等の検討を行っていく。

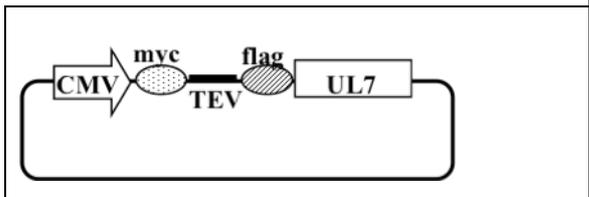
この方法を利用して、様々な HSV 病原性遺伝子の変異体の解析を行い、HSV 病原性解明を試みる。又、組換えウイルス作製と共に単独発現系も組み合わせ、ウイルス因子側からのみでなく宿主因子側の蛋白についても同定を試みる。それらと HSV 制御因子の相互作用のせ物学的機能の解析を行う。

4. 研究成果

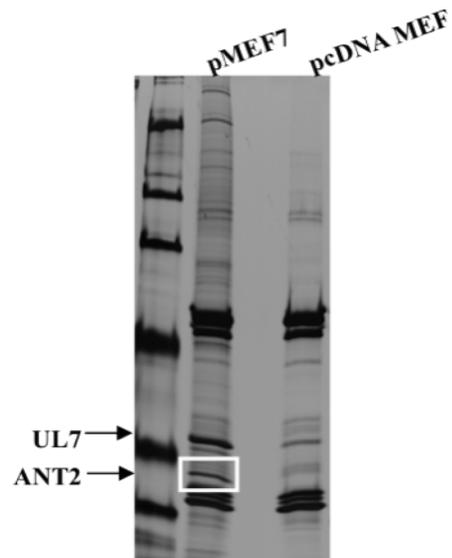
本研究において、申請者の既に確立した大腸菌内での組換え法のさらなる迅速化等の検討を行い、いくつかの新たな系の樹立にも成功した。具体的にはR6k γ というある薬剤存在かでしか複製できないoriのtransfer vectorへの応用や、Homing endonucleaseを応用した組換えの確実性の向上等である。さらにこれにトランスポゾンやgateway system, FRT/flip法を組み込んだ、より応用範囲の幅広い新たな組換え系の確立も試みている。更に温度感受性を持つ大

腸菌を利用して、あらゆる変異導入が可能な組換え系も確立した。この大腸菌を用いることで今まで時に困難であったrepairessウイルスの作成も容易になった。

これらの系を駆使し、更に、これとHSV因子の単独発現系を組み合わせる事により、従来HSV研究において主流であったウイルス側からの解析のみでなく、宿主側からのアプローチも現実にした。



具体的には、このようなmyc, TEV, flagという標識を付けた発現ベクターに、目的のHSV制御因子（図の場合はUL7）を導入し、強発現させる事でこのUL7と相互作用する宿主因子を免疫沈降法にて検出する。その後、MASS解析を行いHSV因子と共沈してきた宿主蛋白の同定を行う。



このような方法で申請者は、これまでHSV-1において解析報告のなかった、上記のUL7や、ウイルスプロテインキナーゼである事からも薬剤耐性等にも幅広く興味深いUs3等について新たな解析を行い、既に報告した。更に、現在はこのような系を実際の感染細胞で、つまり、より生体内に近い状態において再現できるように、先に述べた申請者のこれまで樹立してきた様々な大腸菌内での変異HSVゲノム作製法を応用して検討中である。

HSVはその基礎研究は古くから精力的に行われており、培養細胞でのHSV増殖への必要性についてはほぼ全遺伝子について解析が行われているが、未だに未知であったり祖の生物学的機能の明らかにされていない制御

因子はまだ多く残されている。申請者は、
現在もこのようにいくつかの制御因子を対
象に、新たな解析を続行中である。

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4件)

1 Tanaka M., Sata T., and Kawaguchi Y. The
product of the Herpes simplex virus 1 UL7
gene interacts with a mitochondrial protein,
adenine nucleotide translocator 2. Virology
Journal(5), 1-13, 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 Sugimoto K., Uema M., Sagara H., Tanaka
M., Sata T., Hashimoto Y., and Kawaguchi Y.
Simultaneous Tracking of Capsid, Tegument, and
Envelope Protein Localization in Living Cells

Infected with Triply Fluorescent Herpes Simplex
Virus 1. Journal of Virology(82), 5198-5211, 2008.
4 Morimoto T., Arie 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.

[学会発表] (計1件)

田中道子 HSV-1 VP22 の新規機能の解析、日
本ウイルス学会、2009

[産業財産権]

○取得状況 (計1件)

名称：組換え単純ヘルペスウイルス、大腸菌、及
びこれらを得る方法

発明者：川口 寧、田中道子、山梨祐司、香川弘
之

権利者：川口 寧、田中道子、山梨祐司、香川弘
之

種類：特願 2002-273215

番号：特願 2002-273215

取得年月日：平成14年 9月19日

国内外の別：国内

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織 国立感染症研究所

(1) 研究代表者 田中 道子 (TANAKA
MICHIKO)

国立感染症研究所、感染病理部, 主任研究官

研究者番号 : 1 0 3 5 6 2 4 8

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :

