

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23790511

研究課題名(和文)独自の組換えウイルス作製法を駆使した、単純ヘルペスウイルス病原性機構の解析

研究課題名(英文) analysis of pathogeny of Herpes simplex virus 1 using original methods of recombination for virus genome

研究代表者

田中 道子(Tanaka, Michiko)

国立感染症研究所・その他部局等・研究員

研究者番号：10356248

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：HSVウイルスはウイルス学の基礎研究分野においてそのプロトタイプとして古くから精力的に研究が進められてきているが、近年遺伝子治療ベクターとしても注目を集めているが、その遺伝子組み換えの煩雑性のため嫌煙されがちであった。本研究ではウイルス遺伝子を大腸菌内で簡便に改変する方法を確立し、その手法を利用してHSV病原性機構の解析を行った。

研究成果の概要(英文)：Recombination of HSV genome is complicate and is an obstacle for manufacture for gene therapy vector. In this study, we established new method for virus genome recombination and using this methods, analyze the HSV pathogenicity.

研究分野：ウイルス学

キーワード：大腸菌 HSV

1. 研究開始当初の背景

単純ヘルペスウイルス(HSV)は世界中に広く蔓延しており、脳炎や性器ヘルペス等多様な病原性を示す。一度感染したウイルスは終生潜伏感染し宿主の免疫低下やストレスにより、口内炎、顔面水泡等の再活性化を繰り返し、様々な症状で宿主を精神的にも苦しめる。更に、様々な中枢神経系疾患との関係も示唆する報告もされている。HSVは古くから基礎研究が勢力的に行われ現在までにかかなりの病原性ウイルス因子などが同定されてきているが、未だに未知の遺伝子、機能の不明な遺伝子も存在しその制圧は困難であり、巨大なウイルス遺伝子には未知の機能の存在が強く予想される。一方、近年ではHSVの強い中枢神経指向性が着目され、中枢神経系に遺伝子をデリバリーする、または、腫瘍細胞のみを特異的に破壊する増殖性遺伝子治療ベクターとして注目されている。また、HSVは現在ではヘルペスウイルスのプロトタイプとされており、その知見は効率的に他のヘルペスウイルス研究にフィードバックされている。以上よりHSV研究の重要度、必要性はウイルス学の基礎分野および臨床分野、更に遺伝子治療分野といった幅広い分野において今後さらに高まると考えられる。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し、*vivo*における病原性の検討が要求される。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。特に遺伝子治療分野では組換えHSVベクター作製の困難さがベクター普及の大きな妨げになっている理由の1つであることは否定できない。

2. 研究の目的

本研究の第一目的は、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。第二の目的は、これらの改変系を駆使しHSVの再活性化に関与する、または薬剤のターゲットとなりうる、さらにその生物学的機能が未知のウイルス制御因子の研究を行い、HSVの病原性やその巧妙な宿主との共存、また活性時の増殖機構の解明を試みることである。

3. 研究の方法

申請者がこれまでに確立してきた様々な大腸菌内での組換えウイルスゲノム改変法の更なる改良、迅速性、簡便性を追求する。その系を利用し、現在までにHSV病原性との関与が示唆されながらもその機能が解明されていないHSV因子の解析を行う。更に、HSVウイルス因子の単独発現系も組み合わせ、ウイルス側からのみでなく、宿主側からもHSV病原性に関与する因子の解析を行う。この系に関しても、申請者の改変系を利用し、目的HSV因子にtagを付加したウイルスを作製し、感染細胞でのMASS解析法の確立も試みる。申請者の独自の組換え系を駆使することで、ウイルス因子欠損変異体のみでなく点変異等の組換え体作製も効率的に作成可能であり、この事はHSV病原性解明への近道になると確信している。以上のような研究の流れで、HSVにおいては現在までに20種以上が報告され、その重要性が示唆されるテグメント蛋白を中心に、様々なHSV因子に関して、*vitro*からその病原性の検討までを試みる。

4. 研究成果

申請者はまず、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を試みた。

近年、ヘルペスウイルス分野ではBacterial artificial chromosome(BAC) systemを用いたウイルスゲノムの大腸菌への保持及び大腸菌内でのウイルスゲノム改変系が注目さ

れてきているが、そのいずれも応用の幅が限られたものである。我々は、世界に先駆け、完全長の感染性 HSV ゲノムの大腸菌への保持に成功した。(Tanaka M. et al. Journal of Virology 77(2):1382-1391, 2003.特許第4 2 2 6 2 9 4号)。HSV 遺伝子全長を保持させることで、この大腸菌は基礎分野のみでなく臨床研究にも幅広く応用がきき、非常に貢献度が高いと言える。本研究の具体的な目的は、この大腸菌を元に確実に簡便な組換えウイルス作製法を確立させ遺伝子治療ベクターの開発および基礎研究分野に応用していくことである。現在までに我々は RecA 法を改良した Transient RecA 法やこれと RecET 法、更に FRT/flp 法などの相同組換え技術を組み合わせさせた系を融合させ、如何なる変異(点変異、挿入、欠損)も導入可能な組換えウイルス遺伝子作製系を確立した(Tanaka. M. et al. Virology 341: 301-312)。また、従来利用されてきた大腸菌内ウイルスゲノム改変系では常にリコンビネース等を発現誘導するベクターが必要であったが、ごく最近では大腸菌ゲノム自体に改変が加えられ温度制御等のみでリコンビネースが発現可能な系も報告され、このような系も独自の改変系に組み込む事に成功した。

そして、これらの改変系を駆使し HSV の再活性化に關与する、または薬剤のターゲットとなりうる、さらにその生物学的機能が未知のウイルス制御因子の研究を行い、HSV の病原性やその巧妙な宿主との共存、また活性時の増殖機構の解明を試みた。

更に、大腸菌内組換え系と共に単独発現系も組み合わせ、MASS 解析を利用することで変異ウイルスの解析のみでなく、その相互作用する宿主因子の同定も試みた。様々な HSV 因子に関して解析を進めたが、その中でも HSV の神経移行において重要と示唆されている Us9、非常に豊富なテグメントタンパクでありながらその機能はほとんど知られて

いない VP22 に焦点を当て、現在までにいくつかの相互作用する宿主因子を候補に挙げている。

VP22 に関しては、相互作用する宿主因子の解析のみでなく VP 2 2 の新たな機能として、他の HSV 因子に関してその蛋白発現および VP22 との相互作用、ウイルス粒子取り込み、感染細胞における局在までもを制御する知見を得ることが出来た。

また、VP22KO ウイルスのみでなく、vitro の実験から示唆されている VP22 の生物学的機能に重要と思われるアミノ酸の変異体も数種類、申請者の改変系で作製し、VP22KO ウイルスで得られた知見の多くがこのアミノ酸変異体でも再現される事から、このアミノ酸部位が VP22 の生物学的機能において非常に重要である高い可能性を見いだした。更に、動物実験も行う事で実際に生体への HSV 病原性にも非常に重要である事を明らかにした。VP22 にはこのようなアミノ酸部位が 2カ所報告されており、今後は作製した 2つの VP22 アミノ酸変異体の解析を更に進める事で、どちらがより HSV 病原性に重要であるか突き止めるべく解析を続けていくつもりである。

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2件)

1. Tanaka M., Kato A., Satoh Y., Ide T., Sagou K., Kimura K., Hasegawa H., and Kawaguchi Y.. Herpes simplex virus 1 VP22 regulates translocation of multiple viral and cellular proteins and promotes neurovirulence. Journal of Virology 86:5264~5277, 2012.

2. Kato A., Liu Z., Minowa A., Imai T., Tanaka M., Sugimoto K., Nishiyama Y., Ariei J., and Kawaguchi Y.. Herpes Simplex Virus 1 Protein Kinase Us3 and Major Tegument Protein UL47

Reciprocally Regulate Their Subcellular
Localization in Infected Cells. Journal of
Virology 85: 9599-9613, 2011.

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

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、山梨裕司

権利者：川口 寧、田中道子、山梨裕司

種類：

番号：特許第 4 2 2 6 2 9 4

取得年月日：平成 2 0 年 1 2 月 5 日

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

田中道子 (国立感染症研究所、感染病理
部、主任研究官)

研究者番号：10356248

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：