

平成 30 年 5 月 22 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26293102

研究課題名(和文)単純ヘルペスウイルスの統一的多因子機能解析

研究課題名(英文)Unifying functional analyses of multiple herpes simplex virus proteins

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) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：HSV因子ICP22、gB、ICP0が、HSV因子複合体UL31/UL34、宿主因子NMHC-IIB、宿主転写因子RanBP10とそれぞれ相互作用し、HSVカプシドの核外輸送、細胞侵入、遺伝子発現を制御することを明らかにした。また、HSVがコードするDNA分解酵素UL12の酵素活性が、リン酸化で制御され、その制御がHSVの病態発現に極めて重要であることを明らかにした。さらに、機能が未知のHSV因子Us8Aが、末梢から中枢神経系への神経侵襲性に大きな役割を果たしており、その機能発現にはUs8Aのリン酸化が必須であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this study, we found that (i) an HSV regulatory protein ICP22 interacts with viral nuclear egress complex UL34/UL31 and regulates nuclear export of viral capsids, (ii) an HSV envelope protein gB interacts with a host protein non-muscle-myosin IIB and promotes viral entry, and (iii) an HSV regulatory protein ICP0 interacts with a host transcription factor RanBP10 and regulates viral gene expression at the transcriptional level. We also showed that the functions of an HSV nuclease UL12 is regulated by its phosphorylation at tyrosine 371 and this regulation is critical for viral pathogenicity in vivo. Furthermore, we demonstrated that an HSV protein Us8A plays an important role in viral invasion into the central nervous system from peripheral sites and this Us8A function requires its phosphorylation at serine 61.

研究分野：ウイルス学

キーワード：ウイルス HSV VP26 カプシド成熟

## 1. 研究開始当初の背景

(1) HSV は、ヒトに脳炎、口唇ヘルペス、性器ヘルペス、皮膚疾患、眼疾患、新生児ヘルペスといった多様な疾患を引き起こす。本感染症の統計が明らかであるアメリカ合衆国では、年間 50 万人が性器ヘルペスに初感染し約 1,000 万人が再発性の性器ヘルペスに罹患する。また、角膜ヘルペスには年間 30 万人が罹患し、口唇ヘルペスに関しては、初感染が年間 50 万人、再発口唇ヘルペス患者は 9,800 万人に達する。HSV 感染症の医療費は年間数千億円だと試算され、HSV 感染症は、医学上極めて重要なウイルス感染症の 1 つである。

(2) HSV は古くから精力的に研究が行われてきたが、その増殖機構や病態発現機構には不明な点が多い。その理由の 1 つとして、HSV が約 80 種類と多くのウイルス因子をコードしていることが挙げられる。これら 80 種類以上あるウイルス因子機能の総和として引き起こされる HSV の増殖や病原性発現のメカニズムを解明するためには、各々のウイルス因子の統一的な機能解析に加え、それらの知見を体系的に統合し、理解することが必須である。しかし、従来、ほとんどの研究グループは極めて限定されたウイルス因子や 1 つの感染現象（例えば、侵入やゲノム複製等）を集中的に解析してきた。その上、各研究グループが使用するウイルス株、動物モデル、実験系に統一性がなかった。HSV では、各標準株および各動物モデル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、HSV の増殖機構および病原発現機構の全体像解明に必須な、統一的な多因子解析に基づく統合的な HSV 因子の機能発現機構の理解には全く至っていないのが現状であった。

(3) 研究代表者は研究対象の HSV ウイルス因子の解析において多くの知見を報告するだけでなく、HSV ウイルス因子機能の統合的な理解に向け、着実に新しい技術基盤の創出や、より幅広い HSV 感染現象の解明に成功しつつあった。また十分な設備を有する新しい研究室を 2012 年に立ち上げ、研究室員の増加を機に多くの HSV ウイルス因子の統一的解析が実行可能な環境が整ったと判断し、本研究提案の着想に至った。

## 2. 研究の目的

本研究課題では、全ての HSV ウイルス因子機能発現の統合的理解を最終目標とし、その第一歩として、HSV ウイルス因子の多因子統一解析システムを構築することを目的とする。具体的には、ウイルス因子の機能発現は、宿主因子と他のウイルス因子との相互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、最先端のプロテオーム解析を利用し、各 HSV 因子と相互作用するウイルス因子および宿主因子を網羅的に同定する。そして、

申請者が独自に開発し、蓄積してきた HSV 改変系やリアルタイムイメージング等の技術基盤や知見を利用して得られた相互作用の生物学的意義の解明を目指す。

## 3. 研究の方法

本研究では、様々な HSV 因子に焦点を当てる。そして、最先端プロテオーム解析による各ウイルス因子と相互作用するウイルス因子および宿主細胞因子の網羅的同定とその生物学的意義の解明、さらには、各ウイルス因子のリアルタイムイメージング解析系の確立に基づく生きた感染細胞における詳細な時空間的解析を行うことによって、各ウイルス因子の新規機能の解明を試みる。

## 4. 研究成果

(1) HSV 制御因子 ICP22 と相互作用する新規 HSV 因子として HSV カプシドの核外輸送に寄与する HSV 複合体 UL31/UL34 を同定し、ICP22 が HSV カプシドの核外輸送を制御することを明らかにした。また、HSV エンベロープ糖蛋白質 gB が宿主因子 NMHC-11B (non-muscle myosin 11B) と相互作用し、HSV の細胞侵入に寄与することを明らかにした。さらに、HSV のヌクレアーゼ UL12 の機能がタイロニン酸化で制御されていることを明らかにした。

(2) コピキチンリガーゼ活性を有し、ウイルスの複製、遺伝子発現、抗ウイルス活性の抑制能に関わる重要な多機能ウイルス因子 ICP0 に焦点を当て、ICP0 と相互作用する宿主転写因子として RanBP10 を新たに同定した。RanBP10 発現抑制および欠損時、ICP0 欠損時と同様に HSV-1 の増殖性の低下、様々なウイルス遺伝子の転写および蛋白質発現の低下、HSV-1 ゲノムのプロモーター領域における histone H3 occupancy の増加が認められた。また、これらの発現型は ICP0 欠損ウイルス感染時に野生型感染時と比較して極めて顕著だった。さらに、レポーター遺伝子アッセイにおいて RanPB10 は HSV-1 ゲノムのプロモーター領域に対する ICP0 の転写活性を著しく増強させた。本解析より、RanBP10 は ICP0 と同様に HSV-1 ゲノムのクロマチン構造をリモデリングすることで遺伝子発現を活性化し、効率的な HSV-1 増殖に関与することが明らかになった。また興味深いことに、本作用は ICP0 欠損時に著しく増強されたこと、RanBP10 の転写活性を強化したことから、RanBP10 は ICP0 と協調して働いているということが示唆された。

(3) その高い保存性から重要な機能が推測されていたウイルス遺伝子 Us8A に着目し、まず既に確立済みの HSV 感染遺伝子クローンをを用いたウイルス改変系を改良した。新たな HSV 遺伝子クローンを単離し、クローンからウイルスの再構築時に大腸菌でのクローン維持のために挿入している bacmid が除去さ

れる改変系を確立した。その結果、新しいクローンから再構築されたウイルスは、より野生体に近い病原性をマウスモデルにて呈することが明らかになった。また、Us8A が末梢から中枢神経系への神経侵襲性に大きな役割を果たしており、その機能発現には Us8A のリン酸化が必須であることを明らかにした。

(4) HSV のカプシド蛋白質 VP26 に焦点を当て、VP26 欠損ウイルスを用いた解析を行った結果、VP26 欠損ウイルスではウイルスゲノム DNA の切断とカプシドへのパッケージングがそれぞれ必須であり、カプシド熟成に関与する UL17 および UL25 の核内カプシドへの取り込みが野生体と比較して著しく低下していた。また、VP26 欠損ウイルスでは、ウイルス DNA のカプシドへのパッケージングが野生体と比較して有意に低下することが明らかとなった。以上の結果は、VP26 が UL17、UL25 のカプシドへの取り込みを促進することでウイルスゲノム DNA のカプシドへの効率的なパッケージングへ貢献していることを示唆している。今回、我々は VP26 が HSV カプシドの熟成に関与する新規制御因子であることを明らかにした。

## 5 . 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 2 件)

R. Kobayashi, A. Kato, H. Sagara, M. Watanabe, Y. Maruzuru, N. Koyanagi, J. Arii and Y. Kawaguchi. Herpes Simplex Virus 1 Small Capsomere-Interacting Protein VP26 Regulates Nucleocapsid Maturation. *J. Virol.*, 査読有, vol.91, 2017, e01068-17  
DOI: 10.1128/JVI.01068-17

F. Maeda, J. Arii, Y. Hirohata, Y. Maruzuru, N. Koyanagi, A. Kato and Y. Kawaguchi. Herpes Simplex Virus 1 UL34 Protein Regulates the Global Architecture of the Endoplasmic Reticulum in Infected Cells. *J. Virol.*, 査読有, vol.91, 2017, e00271-17  
DOI: 10.1128/JVI.00271-17

J. Arii, K. Shindo, N. Koyanagi, A. Kato and Y. Kawaguchi. Multiple Roles of the Cytoplasmic Domain of Herpes Simplex Virus 1 Envelope Glycoprotein D in Infected Cells. *J. Virol.*, 査読有, vol.90, 2016, 10170-10181  
DOI: 10.1128/JVI.01396-16

Kato, T. Ando, S. Oda, M. Watanabe, N. Koyanagi, J. Arii and Y. Kawaguchi. Roles of Us8A and its Phosphorylation Mediated by Us3 in Herpes Simplex

Virus 1 Pathogenesis. *J. Virol.*, 査読有, vol.90, 2016, 5622-5635  
DOI: 10.1128/JVI.00446-16

Y. Hirohata, J. Arii, Z. Liu, K. Shindo, M. Oyama, H. Kozuka-Hata, H. Sagara, A. Kato, and Y. Kawaguchi. Herpes simplex virus 1 recruits CD98 heavy chain and  $\alpha 1$  integrin to the nuclear membrane for viral de-envelopment. *J. Virol.*, 査読有, vol.89, 2015, 7799-7812  
DOI: 10.1128/JVI.00741-15

J. Arii, Y. Hirohata, A. Kato and Y. Kawaguchi. Nonmuscle Myosin Heavy Chain IIB Mediates Herpes Simplex Virus 1 Entry. *J. Virol.*, 査読有, vol.89, 2015, 1879-1888  
DOI: 10.1128/JVI.03079-14

H. Fujii, A. Kato, M. Mugitani, Y. Kashima, M. Oyama, H. Kozuka-Hata, J. Arii, and Y. Kawaguchi. The UL12 Protein of Herpes Simplex Virus 1 Is Regulated by Tyrosine Phosphorylation. *J. Virol.*, 査読有, vol.88, 2014, 10624-10634  
DOI: 10.1128/JVI.01634-14

Y. Maruzuru, K. Shindo, Z. Liu, M. Oyama, H. Kozuka-Hata, J. Arii, A. Kato and Y. Kawaguchi. The Role of Herpes Simplex Virus 1 Immediate-Early Protein ICP22 in Viral Nuclear Egress. *J. Virol.*, 査読有, vol.88, 2014, 7445-7454  
DOI: 10.1128/JVI.01057-14

### 〔学会発表〕(計 2 3 件)

Fumio Maeda. Herpes Simplex Virus 1(HSV-1) UL34 Protein Regulates the Global Architecture of the Endoplasmic Reticulum in Infected Cells. 24th East Asia Joint Symposium. 2017

Fumio Maeda, Jun Arii, Yuhei Maruzuru, Naoto Koyanagi, Akihisa Kato and Yasushi Kawaguchi. Herpes simplex 1 UL34 Protein Regulates the Global Architecture of the Endoplasmic Reticulum in Infected Cells. 42nd Annual International Herpesvirus Workshop. 2017

前田 史雄, 廣畑 吉崇, 有井 潤, 加藤 哲久, 川口 壺. 単純ヘルペスウイルス 1 型 UL34 は小胞体の形態制御を行い、ヌクレオカプシドの核出芽輸送制御因子

の核膜への集積に關与する. 第 31 回ヘルペスウイルス研究会. 2017

川口 寧. 単純ヘルペスウイルスの小胞媒介性核外輸送機構. 「感染、免疫、がん、炎症」研究集会. 2017

Jun Aarii, Fumio Maeda, Akihisa Kato, Yasushi Kawaguchi. Identification of host factors that mediate HSV-1 nuclear egress. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会. 2016

有井 潤, 前田 史雄, 加藤 哲久, 川口 寧. ヘルペスウイルス nuclear egress complex は、宿主因子を介して核内膜の切断を引き起こす. 第 159 回日本獣医学会学術集会. 2016

Akihisa Kato, Tomoko Ando, Jun Aarii, Yasushi Kawaguchi. Roles of Us8A and its Phosphorylation Mediated by Us3 in Herpes Simplex Virus 1 Pathogenesis. 41st Annual International Herpesvirus Workshop. 2016

有井 潤, 前田 史雄, 加藤 哲久, 川口 寧. HSV-1 nuclear egress complex は、宿主因子を介して核内膜の切断を引き起こす. 第 30 回ヘルペスウイルス研究会. 2016

Yuka Sato, Akihisa Kato, Yuhei Maruzuru, Yoshitaka Hirohata, Shumpei Tsuda, Jun Aarii, and Yasushi Kawaguchi. RanBP10 acts like HSV-1 ICP0 in regulation of viral gene expression in infected cells 宿主蛋白質 RanBP10 はヘルペスウイルス感染細胞において ICP0 と同様に遺伝子発現を制御する. 第 63 回日本ウイルス学会学術集会. 2015

Yuka Sato, Akihisa Kato, Yuhei Maruzuru, Yoshitaka Hirohata, Shumpei Tsuda, Jun Aarii, Yasushi Kawaguchi. RanBP10, a novel host cellular protein that interacts with a herpes simplex virus 1 (HSV-1) regulatory protein ICP0, regulates viral gene expression by acting like ICP0 in HSV-1-infected cells. The 14th Awaji International Forum on Infection and Immunity. 2015

Yuka Sato, Akihisa Kato, Yuhei Maruzuru, Yoshitaka Hirohata, Shumpei Tsuda, Jun Aarii and Yasushi Kawaguchi. Identification of a host cell protein, RanBP10, which acts like ICP0 in HSV-1-infected cells. 40th Annual International Herpesvirus Workshop.

2015

佐藤 由佳, 加藤 哲久, 丸鶴 雄平, 廣畑 吉崇, 津田 峻平, 有井 潤, 川口 寧. HSV-1 感染細胞において ICP0 と類似の機能をもつ宿主蛋白質 RanBP10 の同定. 第 29 回ヘルペスウイルス研究会. 2015

小林 亮介, 加藤 哲久, 有井 潤, 川口 寧. HSV-1 キャプシドタンパク質 VP26 のリン酸化はウイルス増殖および病態発現に寄与する. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会. 2014

尾田 真也, 有井 潤, 加藤 哲久, 川口 寧. ヘルペスウイルス科で保存されている HSV"1 テグメント蛋白質 UL51 と UL14 の協調的機能の解明. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会. 2014

Yoshitaka Hirohata, Jun Aarii, Keiko Shindo, Zhuoming Liu, Masaaki Oyama, Hiroko Kozuka-Hata, Hiroshi Sagara, Akihisa Kato, and Yasushi Kawaguchi. HSV-1 recruits CD98hc to the nuclear membrane for fusion between the viral envelope and the outer nuclear membrane. 39th Annual International Herpesvirus Workshop. 2014

Yuhei Maruzuru, Keiko Shindo, Zhuoming Liu, Masaaki Oyama, Hiroko Kozuka-Hata, Jun Aarii, Akihisa Kato and Yasushi Kawaguchi. The Role of Herpes Simplex Virus 1 Immediate-Early Protein ICP22 in Viral Nuclear Egress. 39th Annual International Herpesvirus Workshop. 2014

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/Kawaguchi-lab/KawaguchiLabTop.html>

## 6. 研究組織

### (1) 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