

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26460548

研究課題名(和文)単純ヘルペスウイルス感染現象におけるリン酸化制御機構のさらなる解析

研究課題名(英文)Further analysis of phosphorylation events in herpes simplex virus infection

研究代表者

加藤 哲久(Akihisa, Kato)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：40581187

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：単純ヘルペスウイルス(HSV)は、様々な疾患をヒトに引き起こす。HSVは自己の増殖に適した細胞内環境を生み出すため、リン酸化制御機構を利用してきた。しかしながら、我々の知識は限定的でしかなかった。本研究において、我々はリン酸化プロテオーム解析により、VP26とUs8Aのリン酸化部位を同定した。VP26 Thr-111のリン酸化は、VP26および結合相手であるVP5の細胞内局在を制御することで、SK-N-SH細胞における細胞間感染とHSV増殖、マウスモデルにおける神経病原性に必要であった。Us8A Ser-61のリン酸化は、末梢組織から中枢神経系へのウイルス侵入の制御に必要であった。

研究成果の概要(英文)：Herpes simplex virus type (HSV) causes a range of human diseases. HSV has evolved mechanisms to utilize the phosphorylation system for the regulation of their own viral proteins and to establish a cellular environment for efficient viral replication and virulence. However, our knowledge of them remains to be limited and fragmented. In this study, we identified novel phosphorylation sites of small capsid protein VP26 and putative membrane protein Us8A by mass spectrometry-based phosphoproteomic analysis of HSV-infected cells. Our study showed that (i) the phosphorylation of VP26 Thr-111 is required for both efficient HSV-1 replication and cell-cell spread in SK-N-SH cells and HSV-1 neurovirulence in mice by regulating localization of VP26 and its binding partner, the major capsid protein VP5, (ii) the Us3-mediated phosphorylation of Us8A Ser-61 regulates Us8A function for viral invasion into the CNS from peripheral sites.

研究分野：ウイルス学

キーワード：HSV VP26 Us8A 神経病原性 神経侵襲性 リン酸化プロテオーム解析

1. 研究開始当初の背景

(1) 単純ヘルペスウイルス(HSV)は代表的な DNA ウイルスであり、ヒトに脳炎、性器ヘルペス、皮膚疾患、眼疾患など、多様な病態を引き起こす。世界市場におけるヘルペス感染症の医療費は、年間数千億円と試算されている。したがって、HSV は医学上極めて重要なウイルスであり、HSV 研究の重要性は明らかである。

(2) 興味深いことに、HSV はプロテインキナーゼ(PK)をコードしている。増殖を宿主細胞に依存しているウイルスにとって、様々な細胞機構を制御する PK を保持することは好都合である。実際、ノックアウトウイルスを用いた解析より、ウイルス PK はウイルスの病態発現や増殖に大きな役割を果たしていることが報告されている。また、HSV は宿主 PK をハイジャックし、HSV 増殖を促進することも明らかとなりつつあり、ウイルス PK の阻害剤や宿主 PK の阻害剤の臨床応用も期待されている

(3) したがって、感染細胞におけるウイルス基質や宿主細胞基質のリン酸化制御は、ウイルス増殖機構や抗ウイルス戦略を考える上で非常に魅力的かつ重要な研究対象である。

(4) 申請者は、世界に先駆けて独自に開発した信頼できる HSV PK 試験管内リン酸化反応系を駆使し、HSV PK の基質を同定し、HSV PK のウイルス基質の1つである UL47 の Ser-77 が、UL47 の核移行を制御し、マウス角膜炎モデルにおける病態発現能を制御することを解明していた。本知見は試験管内実験系で得た知見が、培養細胞における制御機構の解明、さらには生体内で病態発現制御の解明にまで直結した事例であった。

(5) リン酸化部位の同定には半年以上の時間を要し、非効率であった。本問題を解消するため、申請者は高感度質量分析計と特異的リン酸化ペプチド濃縮法を併用した超高感度リン酸化プロテオーム解析を実施し、HSV 感染細胞におけるリン酸化部位を網羅的に同定していた。

(6) 申請者は、リン酸化プロテオーム解析により得られたデータベースを基盤とし、vdUTPase Ser-187 のリン酸化制御が HSV の神経病原性を特異的に司るという従来のノックアウトウイルスの解析では得られなかったユニークな病態制御機構を解明していた。

2. 研究の目的

申請者は未解析のリン酸化部位の重要性を解明するため、25 種類のリン酸化部位変異組換えウイルスを作製し、順次、マウス病態

モデルに供した。その結果、機能的なリン酸化部位を複数、申請者は見い出していた。そこで、本研究では、一連のリン酸化研究を継続することで、HSV 病態発現能を制御するリン酸化現象のさらなる解明を試みることを目標とした。

具体的には、small capsid protein VP26 Thr-111 のリン酸化、推定 2 型膜蛋白質 Us8A Ser-61 のリン酸化の培養細胞系およびマウス病態発現モデルにおける生物学的意義の解明を試みた。

3. 研究の方法

(1) 確立済みの HSV ゲノム編集法を用いて、VP26 Thr-111 および Us8A Ser-61 を、それぞれ alanine 置換することで、リン酸化を消失させた変異 HSV、酸性アミノ酸置換することで、恒常的にリン酸化を模倣させた変異 HSV を作出する。

(2) 培養細胞系におけるウイルス増殖と細胞間伝播能を、常法に従い解析する。VP26 変異体の解析には、ヒト神経芽腫瘍細胞 SH-N-SH 細胞を、Us8A 変異体の解析には、HSV 学において多用させるアフリカミドリザル腎臓上皮細胞 Vero 細胞を用いた。

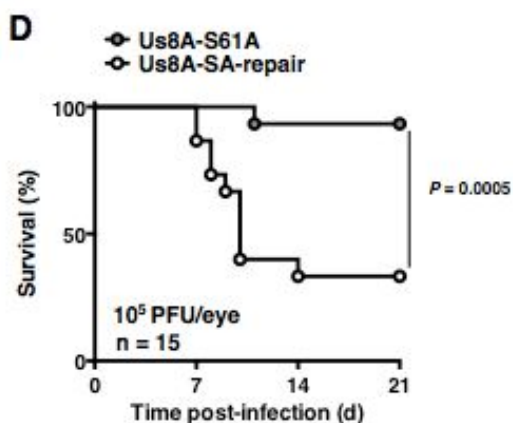
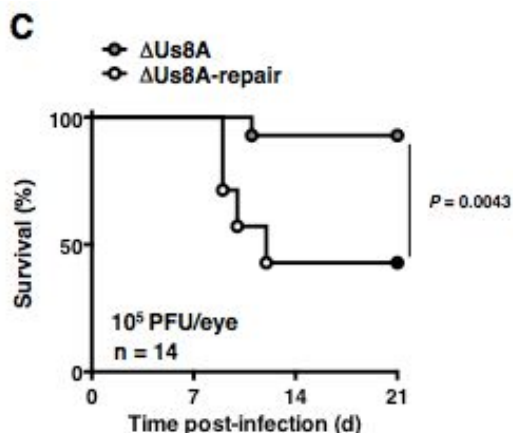
(3) 培養細胞系における VP26 の発現量、細胞内局在の解析には、所属研究室において作成済みであった VP26 rabbit polyclonal 抗体を用いた。一方、Us8A の抗体は、本研究のため、新たに作出した。具体的には、大腸菌内にて、Us8A ペプチドを MBP と融合した形で発現させ、アミロースレジンにて精製した後、マウスに接種し、マウス血清を抗 Us8A 抗体として用いた。なお、本抗体は、Us8A の発現量解析には使用可能であったが、細胞内局在の解析には使用できなかった。

(4) 作出した組換えウイルスの神経病原性を解析するため、ICR マウス、3 週齢に、各ウイルスの 10 倍希釈液、50 ul を脳内接種し、マウスの致死能、マウス脳内における子孫ウイルスの産生量を解析した。

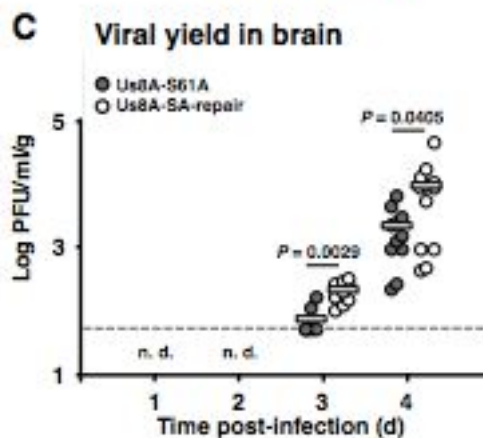
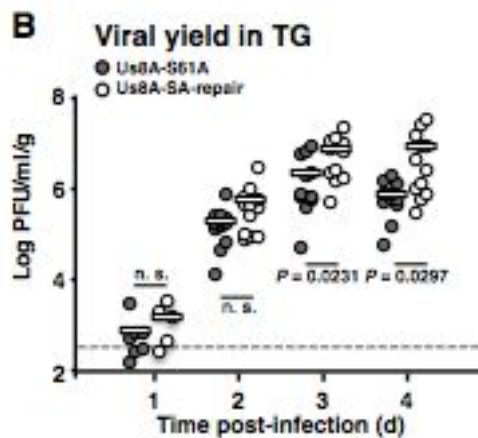
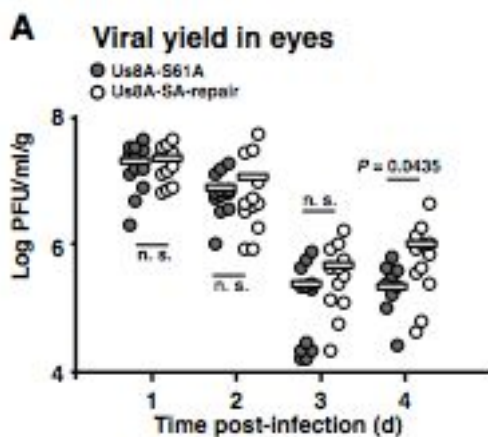
(5) 作出した組換えウイルスの神経侵襲性を解析するため、ICR マウス、4 週齢に、各ウイルス、4ul を角膜接種し、マウスの致死率および角膜炎スコアを解析した。

(6) 神経侵襲性の律速点を解析するため、ICR マウス、4 週齢に、各ウイルス、4ul を角膜接種した後、経時的に、眼球、三叉神経節、脳を解剖により抽出し、各組織における子孫ウイルス産生量を測定する。なお、解剖後、各組織の湿重量も測定することで、組織重量あたりの子孫ウイルス産生量も算出する。

(6) Us8A 欠損と Us8A Ser-61 のリン酸化は、HSV 角膜接種マウスモデルにおける効率的なマウス致死能に必要であった。



(7) Us8A Ser-61 のリン酸化は、眼球における一過的なウイルス増殖 (Day 1~3) には関与が認められなかった。一方、三叉神経節より、眼球に子孫ウイルスが戻ってくる段階 (Day 4) におけるウイルス増殖には関与が認められた。Us8A Ser-61 のリン酸化は、三叉神経節における効率的なウイルス増殖に関与が認められた。また、三叉神経節におけるウイルス増殖低下を反映し、Us8A Ser-61 のリン酸化は、脳におけるウイルス増殖にも関与が認められた。



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 9 件)

Kato A, Hirohata Y, Arie J, and Kawaguchi Y.

Phosphorylation of Herpes Simplex Virus 1 dUTPase Up-regulated Viral dUTPase Activity to Compensate for Low Cellular dUTPase Activity for Efficient Viral Replication.

査読あり

J Virol. 2014 Jan;88(1):655-66.

doi: 10.1128/JVI.02710-13.

Kato A, Shindo K, Maruzuru Y, Kawaguchi Y.

Phosphorylation of a herpes simplex virus 1 dUTPase by a viral protein kinase Us3 dictates viral pathogenicity in the central nervous system but not at the periphery.

査読あり

J Virol. 2014 Mar;88(5):2775-85.

doi: 10.1128/JVI.03300-13.

Kato A, Hirohata Y, Arie J, Kawaguchi Y.

Phosphorylation of Herpes Simplex Virus 1 dUTPase Up-regulated Viral dUTPase Activity to Compensate for Low Cellular dUTPase Activity for Efficient Viral Replication.

査読あり

J Virol. 2014 Jul;88(14):7776-85.
doi: 10.1128/JVI.00603-14.

Kato A, Ariei J, Koyanagi N, Kawaguchi Y.

Phosphorylation of Herpes Simplex Virus 1 dUTPase Regulates Viral Virulence and Genome Integrity by Compensating for Low Cellular dUTPase Activity in the Central Nervous System.

査読あり

J Virol. 2015 Jan;89(1):241-8.
doi: 10.1128/JVI.02497-14.

Liu Z, Kato A, Shindo K, Noda T, Sagara H, Kawaoka Y, Ariei J, Kawaguchi Y.
Herpes simplex virus 1 UL47 interacts with viral nuclear egress factors UL31, UL34 and Us3, and regulates viral nuclear egress.

査読あり

J Virol. 2014 May;88(9):4657-67. doi: 10.1128/JVI.00137-14.

Liu Z, Kato A, Oyama M, Kozuka-Hata H, Ariei J, Kawaguchi Y.

Role of Host Cell p32 in Herpes Simplex Virus 1 De-envelopment During Viral Nuclear Egress.

査読あり

J Virol. 2015 Sep;89(17):8982-98.

Kobayashi R, Kato A, Oda S, Koyanagi N1, Oyama M, Kozuka-Hata H, Ariei J, Kawaguchi Y.

Function of the Herpes Simplex Virus 1 Small Capsid Protein VP26 is Regulated by Phosphorylation at a Specific Site.

査読あり

J Virol. 2015 Jun;89(11):6141-7.
doi: 10.1128/JVI.00547-15

Shindo K, Kato A, Koyanagi N, Sagara H, Ariei J, Kawaguchi Y.

Characterization of a Herpes Simplex Virus 1 (HSV-1) Chimera in Which the Us3 Protein Kinase Gene Is Replaced with the HSV-2 Us3 Gene.

査読あり

J Virol. 2015 Oct 21;90(1):457-73.
doi: 10.1128/JVI.02376-15..

Kato A, Ando T, Oda S, Watanabe M, Koyanagi N, Ariei J, Kawaguchi Y.

Roles of Us8A and its Phosphorylation Mediated by Us3 in Herpes Simplex Virus 1 Pathogenesis.

査読あり

J Virol. 2016 May 27;90(12):5622-5635.
doi: 10.1128/JVI.00446-16.

〔学会発表〕(計 2 件)

Akihisa Kato, The catalytic activity of HSV-1 dUTPase and its regulation are specifically required for efficient viral replication and pathogenicity in the brain, 39th Annual International Herpesvirus Workshop(IHW), 2014.7.19.-7.23., Kobe, Japan.

Akihisa Kato, Phosphorylation of a HSV-1 Us8A promotes viral pathogenicity by regulating the ability of the virus to invade the CNS from peripheral sites、第 63 回日本ウイルス学会学術集会、2015 年 11 月 22 日-11 月 24 日、福岡国際会議場

〔図書〕(計 1 件)

加藤哲久, 他、医薬ジャーナル社、化学療法の領域「単純ヘルペスウイルスの潜伏と回帰発症の機構」2015 年 9 月、p1795-1806.

〔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

加藤 哲久 (KATO AKIHISA)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：40581187

(2)研究分担者

川口 寧 (Yasuhi Kawaguchi)

東京大学・医科学研究所・教授

研究者番号：60292984

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()