

## 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：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790434

研究課題名(和文)リン酸化プロテオームを用いたヘルペスウイルス病原性発現機構の網羅的解析

研究課題名(英文)Comprehensive phosphoproteomics analysis of herpesvirus pathogenicity

## 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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：単純ヘルペスウイルスは、神経病原性を司るリン酸化酵素Us3と核酸代謝酵素vdUTPaseをコードする。我々は、Us3がvdUTPase Ser-187をリン酸化し、その酵素活性を制御することで、マウスモデルにおける神経病原性を司ることを解明した。宿主dUTPase活性の強弱と、vdUTPaseS187A変異ウイルスの病原性の強弱は相関した。そして、宿主dUTPaseの過剰発現により、vdUTPaseS187A変異ウイルスの弱毒化が回復した。本結果は、vdUTPaseがUs3によりリン酸化され、中枢神経系におけるdUTPase活性不足を補填し、効率的なウイルス増殖を促進することを示唆している。

研究成果の概要(英文)：Herpes simplex virus 1 (HSV-1) encodes Us3 protein kinase and a dUTPase (vdUTPase), which are both critical for neurovirulence in the central nerve system (CNS) of mice. We showed that Us3 phosphorylated vdUTPase to up-regulate its enzymatic activity. This phosphorylation was specifically required for neurovirulence in the CNS of mice, but not for pathogenic effects in mouse eyes and vaginas. Low endogenous cellular dUTPase activity in cell cultures and in vivo was linked to lower replication and virulence of a recombinant virus carrying a mutation that precluded phosphorylation of vdUTPase, and overexpression of cellular dUTPase restored HSV-1 neurovirulence in the CNS by the recombinant virus. Our results supported the hypothesis that CNS-specific neurovirulence of HSV-1 involved strict regulation of vdUTPase activity by Us3 phosphorylation, to compensate for the low cellular dUTPase activity in the CNS, to produce efficient viral replication.

研究分野：ウイルス学

キーワード：単純ヘルペスウイルス リン酸化プロテオーム解析 vdUTPase Us3 神経病原性

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、小児ヘルペスなど、多様な病態を引き起こす。単純ヘルペスウイルス感染症の医療費は、年間 30 億ドル (日本円にして 3,500 億円)と試算されており、HSV 研究の重要性は明らかであり、医学上極めて重要なウイルスである。

(2) 単純ヘルペスウイルス(HSV)がコードするプロテインキナーゼ(PK)である Us3 と UL13 は、ウイルス増殖や病態発現に極めて重要であるが、その作用発現機構の大部分は不明であった。そこで、申請者は、ウイルス PK の大量発現・精製系をベースにした信頼できる試験管内アッセイ系を確立し、複数のリン酸化基質を同定し、その生物学的意義を解明してきた。

(3) 申請者は、HSV 感染細胞におけるリン酸化現象の解析に精通しているが、これら従来の解析方法は、莫大な時間と労力を要した。そこで、高感度な質量分析計 (NanoLC ESI-MS/MS) と二酸化チタンカラムによるリン酸化ペプチドの特異的な濃縮法を併用した最先端技術であるリン酸化プロテオームを導入し、リン酸化現象の解析を High-Through-Put 化に成功していた。

2. 研究の目的

本研究は、申請者が世界に先駆けて確立したヘルペスウイルス PK 試験管内反応系と最先端技術である定量的リン酸化プロテオームを利用し、ウイルスの感染現象に大きな役割を果たすリン酸化による宿主細胞制御機構を網羅的に解析する。その結果、(i) ウイルスのリン酸化反応に基づく増殖機構および病原性発現機構の全体像の解明、(ii) 新しい抗ウイルス剤やワクチンの開発に向けての基礎データの蓄積、(iii) ワクチン候補株の検討を目標とする。

3. 研究の方法

既に、リン酸化プロテオーム解析により、リン酸化部位を同定済みであるウイルス基質および宿主細胞基質の生物学的意義の解明を試みる。ウイルス基質 [ 38 リン酸化部位 ] に関して、確立済みの組換えウイルス作製系である BAC-system を用いて、リン酸化部位特異的な変異ウイルスを作製し、細胞レベルおよび個体レベルの解析に供する。病原性の解析には、マウス脳炎モデル、マウス角膜炎モデルを駆使する。ワクチン能の解析には、マウス性器ヘルペスモデルに対する感染予防能を検討する。宿主細胞基質 [ 328 リン酸化部位 ] に関しては、確立済みの二酸化チタンカラム法に基づくリン酸化プロテオーム解析に加えて、Phos-tag 技術を応用した定量

的リン酸化プロテオーム解析系を導入し、ウイルス PK がハイジャックする宿主細胞基質の包括的データベースを作製後、ウイルス増殖におけるさらに本研究では、ウイルス PK 変異体と定量質量解析系である SILAC 法を組み合わせ、感染細胞内のウイルス PK の基質の網羅的解析を試みる。

4. 研究成果

(1) 超高感度リン酸化プロテオーム解析により、HSV-1 感染細胞におけるリン酸化情報を網羅的に解明した(下図 1 参照)。

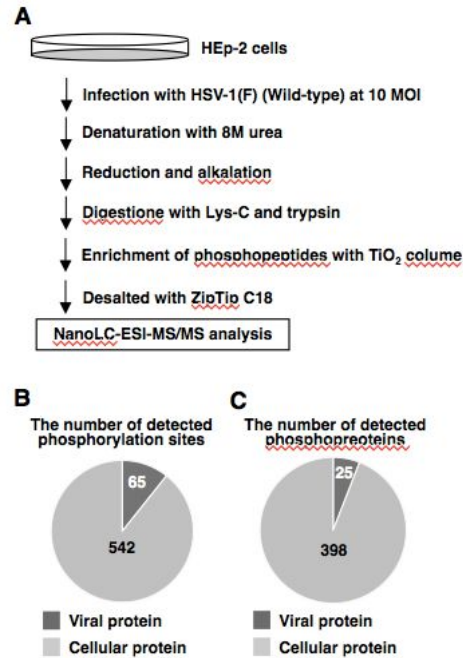


図 1 : 超高感度リン酸化プロテオーム解析の手技的な流れ。B and C: 超高感度リン酸化プロテオーム解析の結果

(2) 超高感度リン酸化プロテオーム解析結果を基盤とし、Us3 の新規ウイルス基質として、vdUTPase Ser-187 が同定された(次ページ図 2 参照)。

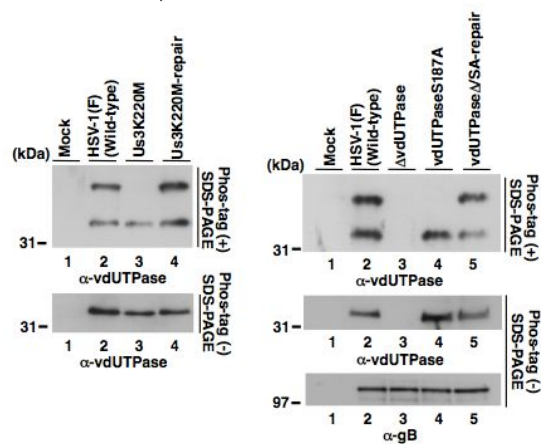


図 2 : Phos-tag SDS-PAGE 解析による HSV-1 感染細胞における vdUTPase Ser-187 のリン酸化の確認と、Us3PK 活性依存性の検証結果。

(3) vdUTPase Ser-187 のリン酸化は、至適な酵素活性に必要である(下図3参照)。

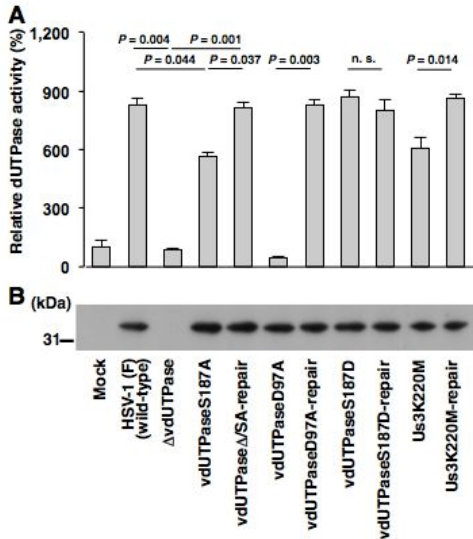


図3：HSV-1 感染細胞における dUTPase 活性と vdUTPase 発現量の解析結果。

(4) vdUTPase Ser-187 のリン酸化は、マウスモデルにおける効率的な神経病原性の発現に必要である(下図4参照)。

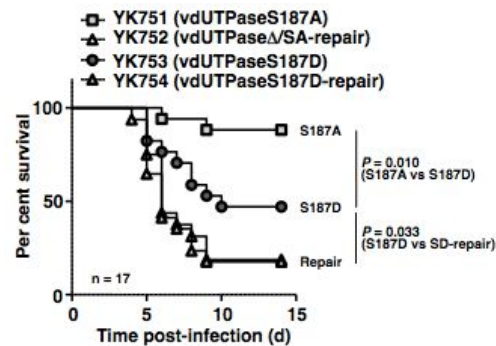


図4：脳内接種後の ICR マウスの生存率の解析結果。

(5) vdUTPase はマウスモデルにおける角膜炎や膺炎といった末梢(上皮系組織)における病態発現能に関与が認められた一方、vdUTPase Ser-187 のリン酸化は、マウスモデルにおける角膜炎や膺炎といった末梢(上皮系組織)における病態発現能には関与が認められなかった(下図5参照)。

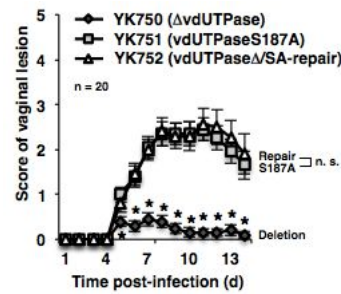
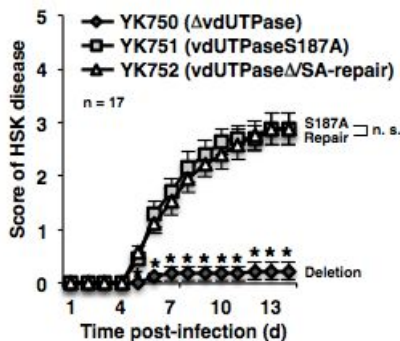


図5：角膜接種後あるいは膺内接種後の ICR マウスの角膜炎(上段)および膺炎スコア(下段)の解析結果。

(6) 宿主 dUTPase 発現抑制細胞において、vdUTPase Ser-187 のリン酸化は効率的なウイルス増殖に必要である(下図6)。

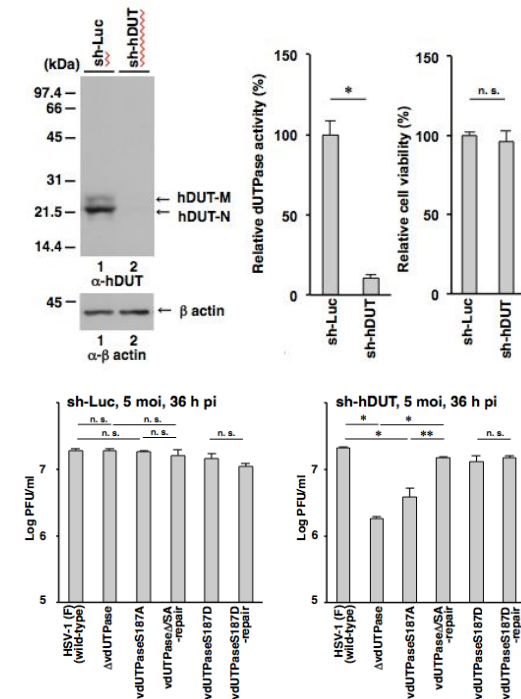
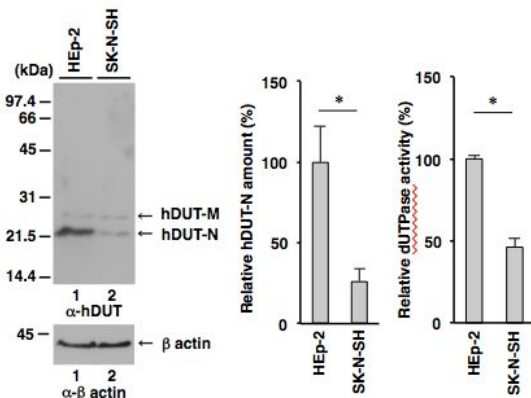


図6：宿主 dUTPase (hDUT) の発現を抑制した cell-line における発現抑制の確認と、dUTPase 活性と細胞毒性の測定結果(上段)。本細胞における HSV 増殖の解析結果(下段)。

(7) ヒト神経芽腫瘍細胞 SK-N-SH は、ヒト喉頭癌腫瘍細胞 HEP-2 細胞と比較し、宿主 dUTPase の発現・酵素活性が低い(下図7)。



7 : Immunoblot 法による hDUT 発現量の比較と、その定量結果およびこれらの細胞における dUTPase 活性の測定結果。

( 8 ) 宿主 dUTPase(hDUT) の過剰発現は、vdUTPaseS187A 変異ウイルスのヒト神経芽腫瘍細胞 SK-N-SH におけるウイルス増殖の抑制を回復させる(下図 8 )

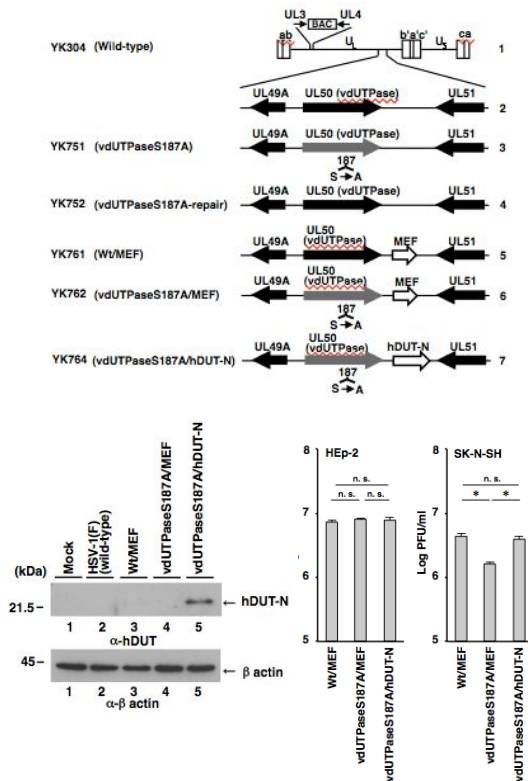


図 8 : 宿主 dUTPase(hDUT) の過剰発現ウイルスのゲノム、Immunoblot 法による hDUT 過剰発現の確認結果と、これらの組換えウイルスを用いた SK-N-SH 細胞における HSV 増殖の解析結果。

( 9 ) 宿主 dUTPase(hDUT) の過剰発現は、vdUTPaseS187A 変異ウイルスの神経病原性毛回復させる(下図 9 )

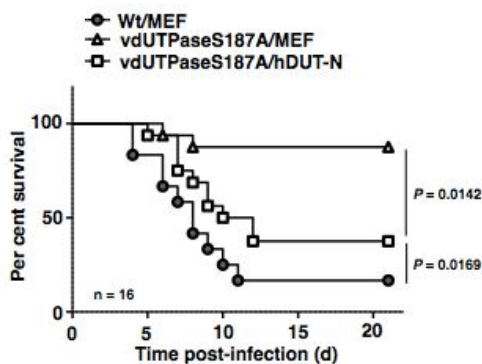


図 9 : 脳内接種後の ICR マウスの生存率の解析結果。

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 8 件 )

Fujii H, Kato A, Mugitani M, Kashima Y, Oyama M, Kozuka-Hata H, Arii J, Kawaguchi Y.

The UL12 protein of herpes simplex virus 1 is regulated by tyrosine phosphorylation.

査読あり

J Virol. 2014 Sep;88(18):10624-34. doi: 10.1128/JVI.01634-14.

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

Phosphorylation of herpes simplex virus 1 dUTPase upregulated 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.

Maruzuru Y, Shindo K, Liu Z, Oyama M, Kozuka-Hata H, Arii J, Kato A, Kawaguchi Y.

Role of herpes simplex virus 1 immediate early protein ICP22 in viral nuclear egress.

査読あり

J Virol. 2014 Jul;88(13):7445-54. doi: 10.1128/JVI.01057-14.

Liu Z, Kato A, Shindo K, Noda T, Sagara H, Kawaoka Y, Arii 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.

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, Tsuda S, Liu Z, Kozuka-Hata H, Oyama M, Kawaguchi Y.

Herpes simplex virus 1 protein kinase Us3 phosphorylates viral dUTPase and regulates its catalytic activity in infected cells.

査読あり

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

10.1128/JVI.02710-13. E  
Maruzuru Y, Fujii H, Oyama M,  
Kozuka-Hata H, Kato A, Kawaguchi Y.  
Roles of p53 in herpes simplex virus 1  
replication.

査読あり

J Virol. 2013 Aug;87(16):9323-32. doi:  
10.1128/JVI.01581-13.

Tanaka M, Kato A, Satoh Y, Ide T, Sagou  
K, Kimura K, Hasegawa H, Kawaguchi Y.  
Herpes simplex virus 1 VP22 regulates  
translocation of multiple viral and  
cellular proteins and promotes  
neurovirulence.

査読あり

J Virol. 2012 May;86(9):5264-77. doi:  
10.1128/JVI.06913-11. E

〔学会発表〕(計 10 件)

加藤哲久、単純ヘルペスウイルス 1 型  
プロテインキナーゼ Us3 による神経病性  
発現の分子機構、第 60 回日本ウイルス  
学会学術集会、2012 年 11 月 13 日-11  
月 15 日、グランキューブ大阪(大阪国  
際会議場)

Akihisa Kato, The catalytic activity  
of HSV-1 dUTPase and its regulation  
are specifically required for  
efficient viral replication and  
pathogenicity in the brain., 37th  
Annual International Herpesvirus  
Workshop(IHW), 2012.8.4.-8.9.,  
Calgary-Alberta, Canada.

加藤哲久、HSV PK Us3 が司る病態発現機  
構、第 27 回ヘルペスウイルス研究会、  
2012 年 6 月 7 日-9 日、愛知健康プラザ  
健康宿泊プラザホール

加藤哲久、単純ヘルペスウイルス Us3 プ  
ロテインキナーゼによる宿主細胞改変  
機構の解明、第 61 回日本ウイルス学会  
学術集会、2013 年 11 月 10 日-11 月 12  
日、神戸国際会議場

Akihisa Kato, Identification of an  
endosomal sorting protein SNX3 as a  
novel host cellular substrate of HSV-1  
Us3., 38th Annual International  
Herpesvirus Workshop(IHW),  
2013.7.20.-7.24., DeVos Place  
Convention Center(USA)

Akihisa Kato, The endosomal sorting  
protein SNX3 is phosphorylated by  
herpes simplex virus 1 protein kinase  
Us3 and plays a critical role in viral  
replication and pathogenesis., The  
12th Awaji International Forum on  
Infection and Immunity,  
2013.9.10.-9.13., Awaji Yumebutai  
International Conference  
Center(Japan)

加藤哲久、Us3 新規宿主細胞基質の同定  
とその生物学的意義の解明、第 28 回ヘ  
ルペスウイルス研究会、2013 年 5 月 30  
日-6 月 1 日、淡路夢舞台国際会議場  
Akihisa Kato, HSV-1 Us3  
phosphorylates sorting necxin 3 to  
inhibit the lysosomal degradation of  
glycoprotein D by promoting its  
interaction with  
phosphatidylinositol-3-phosphate.,  
39th Annual International Herpesvirus  
Workshop(IHW), 2012.7.19.-7.23.,  
Kobe International Exhibition Hall,  
Japan.

加藤哲久、HSV-1 感染現象における  
Endosomal sorting protein SNX3 リン酸  
化の生物学的意義の解明、第 62 回日本  
ウイルス学会学術集会、2014 年 11 月  
10 日-11 月 12 日、パシフィコ横浜会議  
センター

Akihisa Kato, Central nervous system  
specific virulence of herpes simplex  
virus involves phosphorylation of a  
viral dUTPase by a viral protein  
kinase., The International Symposium  
'Molecular basis of host cell  
competency in virus infection',  
2014.11.09. シフィコ横浜会議センタ  
ー

〔図書〕(計 1 件)

加藤哲久、他、日本臨牀社、日本臨牀「抗ウ  
イルス薬」、2012 年 4 月、p688-p694

〔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 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等  
東京大学医科学研究所 感染・免疫部門 ウイ

ルス病態制御分野(川口研究室)ホームページ

<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

研究者番号：

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：