

令和 3 年 10 月 8 日現在

機関番号：23701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10185

研究課題名(和文)先天性サイトメガロウイルス感染症の予防を目的としたワクチン開発の基礎研究

研究課題名(英文)The research on vaccine development for prevention of congenital cytomegalovirus infection

研究代表者

腰塚 哲朗 (Koshizuka, Tetsuo)

岐阜薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：20416267

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトサイトメガロウイルス(HCMV) UL42はC末端アンカー型の膜タンパク質であり、N末端側細胞質部分でNedd4ファミリーであるItchと相互作用する。HCMVに固有の遺伝子と考えられていたが、検討の結果、他のヘルペスウイルスも同じ機能を持つ分子を持つことが分かった。また、UL42の発現は転写調節因子c-Junのリン酸化およびその上流のJNKのリン酸化を促進することが分かった。一方でUL42を欠損したHCMVを感染させた線維芽細胞ではc-Junリン酸化に大きな変化はなく、他のHCMV遺伝子による影響が大きいと推測された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によりHCMV UL42が水痘ワクチン株で大きな変異のある水痘・帯状疱疹ウイルス(VZV) ORF0の相同分子であり、細胞内シグナル伝達を制御する機能を持つことが分かった。UL42もORF0も宿主ユビキチンリガーゼの活性を制御する能力を持ち、細胞内や体内におけるウイルス増殖に関わると考えられる。VZV ORF0が水痘ワクチン株の弱毒化に関わるのであれば、同様の変異を他のヘルペスウイルスに導入することで新たなワクチンの開発に繋がる可能性がある。今後、これらの分子がウイルスの病原性に与える影響を調べる予定である。

研究成果の概要(英文)：Human cytomegalovirus (HCMV) UL42 is a C-terminal anchored membrane protein which interacts with the Nedd4 family Itch at the N-terminal cytoplasmic domain. Although UL42 was thought to be a unique gene of HCMV, we identified the molecules having the same function in other herpesviruses. The expression of UL42 induced the phosphorylation of c-Jun, a transcriptional factor and JNK. On the other hand, c-Jun phosphorylation was not significantly changed in fibroblasts infected with UL42 deficient HCMV, suggesting that the other HCMV genes was important to c-Jun phosphorylation.

研究分野：ウイルス学

キーワード：ヒトサイトメガロウイルス ヘルペスウイルス ユビキチンリガーゼ Nedd4

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒトサイトメガロウイルス (CMV) は TORCH 症候群の病原体のひとつであり、胎児・新生児に発達障害を引き起こす。抗体を持たない妊婦が感染した場合、CMV は胎盤を通して胎児に感染する。先天性 CMV 感染症の臨床像は多様であり、出生する児の 1 割には出生時に小頭症などの明らかな先天異常を認める。出生時に無症候性であった児の 1 割は、成長に伴い難聴や精神発達遅滞を発症する。現在、先天的に CMV 感染を受けていることが分かった場合には、抗ウイルス薬による治療や発症予防を行うが、抗ウイルス薬の効果は限定的であり、症状が改善しない場合も多い。つまり先天性 CMV 感染症の根本的な解決にはワクチンが必要である。

ヒトに病原性を示すヘルペスウイルスの中でワクチンが実用化されているのは水痘・帯状疱疹ウイルス (VZV) のみである。VZV ワクチンは臨床分離株を培養細胞で継代することにより弱毒化に成功した弱毒生ワクチンである。ワクチン株における変異箇所のうち、弱毒化に重要と考えられているのは転写調節因子である IE62 における変異と膜タンパク質である ORF0 における変異である。申請者らは、ORF0 の変異はストップコドンの位置に生じており、その結果ワクチン株ではウイルス粒子表面に ORF0 C 末端の新たなドメインが露出していることを明らかにした (Koshizuka et al., *Virology* 2010, 405 280-8)。また、VZV ORF0 と共通の 1 次構造を持つ分子をすべてのヘルペスウイルスが持つ可能性を示した。すなわち、C 末端に膜貫通ドメインを持ち、N 末端側には Nedd4 ファミリーという宿主ユビキチンリガーゼと相互作用できるドメインを持つ点で相同である。CMV では UL42 という分子がこれにあたり、Nedd4 ファミリーの一つである Itch との相互作用を報告した (Koshizuka et al., *J.Gen.Virol.* 2016, 97 196-208)。タンパク質のユビキチン化は標的分子の安定性変化や細胞内輸送を変化させ、その結果、転写調節や細胞生存など多様な生命現象に影響を与える。したがってユビキチン化の制御はウイルスの増殖や弱毒化に重大な影響を与えると考えられる。これらの知見を踏まえ、申請者らは VZV ORF0 と CMV UL42 の機能的な相同性を明らかにすることで、CMV ワクチン開発への糸口になると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、(1) CMV UL42 と VZV ORF0 を含めた相同分子の機能的な共通性を示すこと、(2) CMV UL42 が持つ機能の詳細を明らかにすることを通して、UL42 がウイルスの増殖や病原性発現に与える影響を解明し、新規ワクチン開発の基礎的な情報を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

ウイルスゲノム上の構造およびアミノ酸配列情報から、CMV UL42 や VZV ORF0 と類似構造を持つ他のウイルス分子を同定した。これらのウイルス分子の発現ベクターを構築し、培養細胞内で Itch の局在、安定性に与える影響を調べた。過去の報告により、ヒトヘルペスウイルス 6 (HHV-6) U24 が Jurkat 細胞内で CD3ε の down regulation に関わることが示されていたため、他の相同分子が同様の機能を持つか否かをフローサイトメーターにより調べた。

Itch は転写調節因子である c-Jun の negative regulator であることが報告されていたため、UL42 の存在下で c-Jun タンパク量、局在、転写調節活性の変化を調べた。

4. 研究成果

(1) CMV UL42 の相同分子の探索とその機能的評価

CMV UL42 の特徴を、「Pro-Pro-Xaa-Tyr 配列 (PY モチーフ) を持つ」、「C 末端に膜貫通

ドメインとして機能しうる疎水性領域を一つ持つ」と定義し、ヒトを自然宿主とするすべてのヘルペスウイルスのゲノム情報からこの特徴を持つ分子を検索した。その結果、単純ヘルペスウイルス 1 型 (HSV-1) UL56、HSV-2 UL56、水痘・帯状疱疹ウイルス (VZV) ORF0、ヒトヘルペスウイルス 6 (HHV-6) U24、HHV-7 U24 がこの特徴に合致したことから、CMV UL42 と類似の機能を持つと推測した。しかしながら、これらの分子の相同性は非常に低く、一般的な相同性検索では同定できなかった。 γ ヘルペスウイルス亜科に属するカボジ肉腫ウイルス (KSHV) では、[Fig. 1](#) の指標に完全に合致する分子は同定されなかったが、ORF16 が PY モチーフに類似の Leu-Pro-Xaa-Tyr 配列を持つ膜タンパク質であったことから、候補分子として解析を行った。同様に、エプスタイン・バーウイルス (EBV) では過去に 12 回膜貫通タンパク質である LMP2A が PY モチーフを持ち Nedd4 ファミリーと相互作用することが報告されていたが、[Fig. 1](#) の指標に合致する分子は同定されなかった。このため、HSV-1 UL56、VZV ORF0、CMV UL42、HHV-6 U24、KSHV ORF16 について以下の検討を行った。

これらの分子の N 末端に HA タグを付加した後、真核発現プラスミドにクローニングした。各分子について、PY モチーフのチロシンをアラニン置換した変異体 (PA) を作製した。これらのプラスミドについて、FLAG タグを付加した Itch と共に HeLa 細胞へ発現させ、免疫沈降法および細胞内における Itch との局在を比較した。その結果、HSV-1 UL56、VZV ORF0、CMV UL42、HHV-6 U24 は Itch と共沈し、ゴルジ体や細胞質小胞と思われる領域で共局在した。各分子の PA 変異体は Itch との相互作用能を失った。一方、KSHV ORF16 は野生型であっても Itch と相互作用しなかった。HSV-1 UL56、VZV ORF0、CMV UL42、HHV-6 U24 発現により Itch はユビキチン化が強く誘導され、Itch 量の減少が認められたことから、これらは Itch などの Nedd4 ファミリー分子と相互作用することが分かった。これらの分子はウイルスが持つ Nedd4 制御分子であることから viral Nedd4 adaptors と呼ぶことができる。続いて、HHV-6 U24 は Jurkat 細胞において CD3 ϵ を down regulation することが報告されており、この機能が他の分子について保存されているか否かを調べた。その結果、CD3 ϵ を down regulate できるのは U24 のみであり、他の分子にその活性は認められなかった。以上のことから、viral Nedd4 adaptors において、PY モチーフに依存する Nedd4 ファミリー分子との相互作用は保存されているが、個々の機能には差異があることが分かった。この点は分子間の相同性が低いことから推測できる。

本成果については、国際学術誌である Scientific Reports に掲載された (Koshizuka et al., Sci Rep. 2018 8(1):4447)。

(2) CMV UL42 の機能解析

Itch は c-Jun/JNK シグナルの negative regulator であることが報告されている。この点を踏まえ、UL42 が c-Jun/JNK シグナルに与える影響を検討したところ、UL42 の発現は転写調節因子 AP-1 を活性化し、その構成要素である c-Jun の核内移行およびリン酸化を誘導した。Itch との相互作用を失う PA 変異体は、予想に反して UL42WT 発現時と同程度に c-Jun/JNK シグナルを活性化した。各種の UL42 部分欠損発現系による検討の結果、UL42 の C 末端近傍領域が c-Jun/JNK シグナルの活性化に重要であること、N 末端側に制御領域があることが分かった。一方で、CMV 感染細胞では UL42 欠損による c-Jun のリン酸化状態の変化は認められなかった。c-Jun/JNK シグナルの制御はウイルス感染にとって重要なイベントであり、CMV はこれを制御するために複数の分子を持つことが報告されている。このため、UL42 の単独欠損では目立った変化が認められなかった可能性がある。

本成果については、国際学術誌である PLoS One に掲載された (Koshizuka et al., PLoS One. 2020,

本研究により、UL42 を含めた viral Nedd4 adaptors のヘルペスウイルス科における共通性と、UL42 の機能の一端を明らかにした。UL42 は HCMV が病原性を発揮する過程のいずれかの細胞種においてシグナル伝達系に影響を与える可能性がある。他の viral Nedd4 adaptors が転写調節因子の活性に影響をあたえるかどうかは今後の検討課題である。viral Nedd4 adaptors は多数のヘルペスウイルス科ウイルスに共通していることから、ウイルスの病原性発現に重要な役割を果たしている可能性が高く、これらの分子の解析はヘルペスウイルス科の進化やウイルスの病原性の理解に加え、新規ワクチン開発に有用である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Koshizuka T, Kobayashi T, Ishioka K, Suzutani T.	4. 巻 8(1)
2. 論文標題 Herpesviruses possess conserved proteins for interaction with Nedd4 family ubiquitin E3 ligases.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 4447
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-22682-2.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Koshizuka T, Inoue N.	4. 巻 15
2. 論文標題 Activation of c-Jun by Human Cytomegalovirus UL42 Through JNK Activation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0232635
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0232635	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 腰塚哲朗、小林敬広、森康子、錫谷達夫
2. 発表標題 The ubiquitin ligase regulation mechanism conserved among herpesviruses
3. 学会等名 日本ウイルス学会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------