

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20390130

研究課題名（和文）リアルタイムイメージングを利用したヘルペスウイルス感染細胞の時空間的解析

研究課題名（英文）Analyses of herpesvirus-infected cells by real time imaging

研究代表者

川口 寧（KAWAGUCHI YASUSHI）

東京大学・医科学研究所・准教授

研究者番号：60292984

研究成果の概要（和文）：リアルタイムイメージングを利用して、単純ヘルペスウイルス 1 型 (HSV-1: herpes simplex virus-1) 粒子の最終成熟の場がトランスゴルジネットワークであることを明らかにした。また、リアルタイムイメージングを利用して、カプシドの核膜通過に關与していると考えられている UL12 と相互作用する宿主細胞因子としてヌクレオリンを同定し、ヌクレオリンがカプシドの効率的な核膜通過に必要であることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Using the real-time imaging system, we identified the site of HSV-1 final envelopment as trans-Golgi network. Moreover, we identified a binding partner of UL12, which is involved in nuclear egress pathway, as nucleolin and showed that nucleolin was required for efficient nuclear egress of HSV-1 capsids.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
2009年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
2010年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
年度			
年度			
総計	15,100,000	4,530,000	19,630,000

研究分野：ウイルス学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：HSV、リアルタイムイメージング

1. 研究開始当初の背景

ウイルスは非常に微小なので、その可視化には電子顕微鏡による解析が必要であった。電子顕微鏡による解析では感染細胞を固定する必要がある。しかし、極めてダイナミックな挙動を示すウイルス因子が担うウイルス粒子成熟過程の解析では、固定された細胞から得られる情報は限られている。そこで、不明な点が多いウイルス粒子成熟過程を明らかにするためには、同一の生きた細胞内のウイルス粒子の動態を連続的に観察するリアルタイムイメージングによる解析が必要であった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、医学上重要な単純ヘルペスウイルス 1 型 (HSV-1: herpes simplex virus-1) の多段階のウイルス粒子成熟過程の解析が可能なリアルタイムイメージング系を確立し、その系を利用することによって、従来の研究手法では解明することができない新しい感染現象の同定とその生物学的意義の解明を目的とした。

3. 研究の方法

我々が過去に確立したウイルス改変法を

利用した。また、リアルタイムイメージングは、共焦点レーザー顕微鏡を用いて行った。

4. 研究成果

1) HSV-1 粒子の3つのコンポーネント(カプシド、テグメント、エンベロープ)を異なる蛍光蛋白質で標識した組み換えウイルス YK608 の作製に成功した。YK608 を利用すれば、カプシド形成、テグメント獲得、最終エンベロープの獲得といった多段階の HSV-1 ウイルス粒子成熟過程が可視化可能である。

2) YK608 感染細胞のリアルタイムイメージングの結果、カプシド、テグメント、エンベロープが集積する複数の細胞質ドメインが細胞基底面に誘導されることを発見し、ウイルス粒子の最終成熟の場を意味する 'assembly sites' と命名した。

3) 'assembly sites' にはトランスゴルジネットワークのマーカーが特異的に集積することが判明し、HSV ウイルス粒子の最終成熟の場がトランスゴルジネットワークであることが明らかとなった。本知見は HSV アッセムブリーの最大の焦点だったウイルス粒子最終成熟の場を同定したことが評価され、ウイルス学において最も評価の高い学術専門誌である Journal of Virology に掲載され、'SpotLight' として掲載号の巻頭で紹介された。今後、不明な点が多い HSV のウイルス粒子成熟過程が、YK608 を利用したリアルタイムイメージングによって明らかにされることが期待される。

4) HSV がコードする DNAase UL12 は、カプシドの核外への出芽に関与していることが知られている。UL12 のリアルタイムイメージング解析から、UL12 が核小体に局在し、さらに、UL12 が核小体のマーカーであるヌクレオリンと複合体を形成することを明らかにした。また、ヌクレオリンをノックダウンするとカプシドの核からの出芽が阻害された。よって、UL12 はヌクレオリンと相互作用することによってカプシドの核外への出芽を制御していることが示唆された。

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 27 件)

1. T. Imai, J. Ariei, A. Minowa, A. Kakimoto, N. Koyanagi, A. Kato and Y. Kawaguchi. Role of the Herpes Simplex Virus 1 Us3 Kinase Phosphorylation Site and Endocytosis Motifs in Envelope

Glycoprotein B in Its Intracellular Transport and Neurovirulence. **J. Virol.** (in press)

2. T. W. Wisner, K. Sugimoto, P. Howard, Y. Kawaguchi and D. C. Johnson. Anterograde transport of herpes simplex virus capsids in neurons by Separate and Married mechanisms. **J. Virol.** (in press)
3. J. Ariei, H. Goto, T. Suenaga, M. Oyama, H. Kozuka-Hata, T. Imai, A. Minowa, H. Akashi, H. Arase, Y. Kawaoka, and Y. Kawaguchi. (2010) Non-muscle myosin IIA is a functional entry receptor for herpes simplex virus 1. **Nature** 467: 859-862
4. J. Ariei, J. Wang, T. Morimoto, T. Suenaga, H. Akashi, H. Arase, and Y. Kawaguchi. (2010) A Single Amino Acid Substitution in Herpes simplex virus 1 Envelope Glycoprotein B at a Site Required for Binding to the Paired Immunoglobulin-like Type 2 Receptor α (PILR α) Abrogates PILR α -dependent Viral Entry and Reduces Pathogenesis. **J. Virol.** 84: 10773-10783.
5. K. Sagou, M. Uema and Y. Kawaguchi. (2010) Nucleolin is required for efficient nuclear egress of herpes simplex virus 1 nucleocapsids. **J. Virol.** 84: 2110-2121.
6. T. Imai, K. Sagou, J. Ariei and Y. Kawaguchi. (2010) Effects of Phosphorylation of Herpes Simplex Virus 1 Envelope Glycoprotein B by Us3 Kinase In Vivo and In Vitro. **J. Virol.** 84: 153-162.
7. K. Gotoh, Y. Tanaka, A. Nishikimi, R. Nakamura, H. Yamada, N. Maeda, T. Ishikawa, K. Hoshino, T. Uruno, Q. Cao, S. Higashi, Y. Kawaguchi, M. Enjoji, R. Takayanagi, T. Kaisho, Y. Yoshikai, and Y. Fukui. (2010) Selective control of type I IFN induction by the Rac activator DOCK2 during TLR-mediated plasmacytoid dendritic cell activation. **J. Exp. Med.** 207: 721-730.

8. T. Suenaga, T. Satoh, P. Somboonthum, Y. Kawaguchi, Y. Mori, and H. Arase (2010) Myelin-associated glycoprotein mediates membrane fusion and entry of neurotropic herpesviruses. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 107: 866-871.
9. W. Azab, K. Tsujimura, K. Kato, J. Ariei, T. Morimoto, Y. Kawaguchi, Y. Tohya, T. Matsumura and H. Akashi. (2010) Characterization of a thymidine kinase-deficient mutant of equine herpesvirus 4 and in vitro susceptibility of the virus to antiviral agents. **Antiviral Res.** 85: 389-395.
10. J. Wang, F. Fan, T. Satoh, J. Ariei, L. L. Lanier, P. G. Spear, Y. Kawaguchi, H. Arase. (2009) Binding of herpes simplex virus glycoprotein B (gB) to PILR α depends on specific sialylated O-linked glycans on gB. **J. Virol.** 83: 13042-13045.
11. T. Morimoto, J. Ariei, M. Tanaka, T. Sata, H. Akashi, M. Yamada, Y. Nishiyama, M. Uema and Y. Kawaguchi. (2009) Differences in the Regulatory and Functional Effects of the Us3 Protein Kinase Activities of Herpes Simplex Virus 1 and 2. **J. Virol.** 83: 11624-11634.
12. T. Nojima, T. Oshiro-Ideue, H. Nakanoya, H. Kawamura, T. Morimoto, Y. Kawaguchi, N. Kataoka, M. Hagiwara. (2009) Herpesvirus protein ICP27 switches PML isoform by altering mRNA splicing. **Nucleic Acids Res.** 37: 6515-6527.
13. J. Ariei, K. Kato, Y. Kawaguchi, Y. Tohya, H. Akashi. (2009) Analysis of herpesvirus host specificity determinants using herpesvirus genomes as bacterial artificial chromosomes. **Microbiol. Immunol.** 53: 433-441.
14. H. Konno, T. Yamamoto, K. Yamazaki, J. Gohda, T. Akiyama, K. Semba, H. Goto, A. Kato, T. Yujiri, T. Imai, Y. Kawaguchi, B. Su, O. Takeuchi, S. Akira, Y. Tsunetsugu-Yokota, and J. Inoue. (2009) TRAF6 establishes innate immune responses by activating NF-kB and IRF7 upon sensing cytosolic viral RNA and DNA. **PLoS ONE** 4: e5674.
15. R. Asai, A. Kato and Y. Kawaguchi. (2009) Epstein-Barr virus protein kinase BGLF4 interacts with viral transactivator BZLF1 and regulates its transactivation activity. **J. Gen. Virol.** 90: 1575-1581.
16. K. Sagou, T. Imai, H. Sagara, M. Uema, and Y. Kawaguchi. (2009) Regulation of the Catalytic Activity of Herpes Simplex Virus 1 Protein Kinase Us3 by Auto-Phosphorylation and Its Role in Pathogenesis. **J. Virol.** 83: 5773-5783.
17. J. Ariei, M. Uema, T. Morimoto, H. Sagara, H. Akashi, E. Ono, H. Arase, and Y. Kawaguchi. (2009) Entry of herpes simplex virus 1 and other alphaherpesviruses via the paired immunoglobulin-like type 2 receptor α . **J. Virol.** 83: 4520-4527.
18. T. W. Wisner, C. C. Wright, A. Kato, Y. Kawaguchi, F. Mou, J. D. Baines, R. J. Roller, and D. C. Johnson. (2009) Herpesvirus gB-induced fusion between the virion envelope and outer nuclear membrane during virus egress is regulated by the viral US3 kinase. **J. Virol.** 83: 3115-3126.
19. T. Morimoto, J. Ariei, H. Akashi and Y. Kawaguchi. (2009) Identification of multiple sites in herpes simplex virus genomes suitable for insertion of foreign genes. **Microbiol. Immunol.** 53: 155-161.
20. A. Kato, J. Ariei, I. Shiratori, H. Akashi, H. Arase and Y. Kawaguchi. (2009) Herpes simplex virus 1 protein kinase Us3 phosphorylates viral envelope glycoprotein B and regulates its expression on the cell surface. **J. Virol.** 83: 250-261.

21. A. Kato, M. Tanaka, M. Yamamoto, R. Asai, T. Sata, Y. Nishiyama and Y. Kawaguchi. (2008) Identification of a physiological phosphorylation site of the Herpes simplex virus 1-encoded protein kinase Us3 which regulates its optimal catalytic activity in vitro and influences its function in infected cells. **J. Virol.** 82: 6172-6189.
22. K. Sugimoto, M. Uema, H. Sagara, M. Tanaka, T. Sata, Y. Hashimoto and Y. Kawaguchi. (2008) Simultaneous tracking of capsid, tegument, and envelop protein localization in living cells infected with thriple fluorescent herpes simplex virus 1. **J. Virol.** 82: 5198-5211.
23. T. Satoh, J. Arii, T. Suemaga, J. Wang, A. Kogure, J. Uehori, N. Arase, I. Shiratori, S. Tanaka, T. Satoh, J. Arii, T. Suemaga, J. Wang, A. Kogure, J. Uehori, N. Arase, I. Shiratori, S. Tanaka, Y. Kawaguchi, P. G. Spear, L. L. Lanier and H. Arase. (2008) PILRa is a herpes simplex-1 entry co-receptor that associates with glycoprotein B. **Cell** 132: 1-10.
24. Kamakura, M., Nawa, A., Ushijima, Y., Goshima, F., Kawaguchi, Y., Kikkawa, F., Nishiyama, Y. (2008) Microarray analysis of transcriptional responses to infection by herpes simplex virus types 1 and 2 and their US3-deficient mutants. **Microbes and Infection** 10: 405-413.
25. Y. Orihara, H. Hamamoto, H. Kasuga, T. Shimada, Y. Kawaguchi and K. Shekimizu. (2008) Evaluation of therapeutic effects of antiviral agents using a silkworm baculovirus infection model. **J. Gen. Virol.** 89: 188-194.
26. Y. Ando, H. Kitamura, Y. Kawaguchi and Y. Koyanagi. (2008) Primary target cells of herpes simplex virus type 1 in the hippocampus. **Microbes and Infection** . 10: 1514-1523.
27. M. Tanaka, T. Sata and Y. Kawaguchi. (2008) The Product of UL7 gene of Herpes simplex virus type 1 interacts with a Mitochondria protein, Adenine nucleotide translocator 2. **Virology J.** 5: 125-137.
- [学会発表] (計 6 7 件)
- 以下、全て口頭発表。
1. 川口 寧 ヘルペスウイルスの新規受容体の同定 2010年12月 平成22年度筆界同大学遺伝子病制御研究所共同研究集会「感染・炎症・発癌」札幌 (招待講演)
 2. Yasushi Kawaguchi. Non-muscle myosin IIA is a functional entry receptor for herpes simplex virus 1. October 2010, The 7th China-Japan Joint Laboratory Workshop – Pathogenesis, Gene Regulation and Signal Transduction – Beijing, China.
 3. T. Imai, J. Arii, A. Kato, K. Sagou, and Y. Kawaguchi. Role of Us3 phosphorylation on HSV-1 gB in its endocytosis and pathogenesis. July 2010, 35th International Herpesvirus Workshop, Salt Lake City, USA.
 4. 川口 寧 たった1アミノ酸のリン酸化によるウイルス病態発現の分子機構 2010年6月 第10回日本蛋白質科学会年会 札幌 (招待講演)
 5. Y. Kawaguchi. Regulatory and functional effects of protein kinases encoded by herpesviruses on host cells. February, 2010, Seminar in Reprogramming of host cells by microbial effectors in Institut für Klinische und Molekulare Virologie Universität Erlangen-Nürnberg Erlangen, Germany (招待講演)
 6. 川口 寧 ウイルスプロテインキナーゼの機能と病態への関与 2010年1月 平成22年度筆界同大学遺伝子病制御研究所共同研究集会「感染・炎症・発癌」札幌 (招待講演)
 7. Y. Kawaguchi. Regulation and functions of HSV Us3 protein kinases. October, 2010, 14th International Conference on Immunology and Prophylaxis of Human Herpesvirus Infections. Kobe, Japan (招待講演)
 8. K. Sagou, T. Morimoto, J. Arii, T. Imai, M. Tanaka, Y. Nishiyama, M. Uema

- and Y. Kawaguchi. Regulation of the catalytic activity of HSV protein kinase Us3 and its role in pathogenesis. July 2009, 34th International Herpesvirus Workshop Ithaca, USA.
9. J. Arii, J. Wang, M. Uema, T. Morimoto, H. Sagara, H. Akashi, E. Ono, H. Arase and Y. Kawaguchi. Entry of herpes simplex virus 1 and other alphaherpesviruses via the paired immunoglobulin-like type 2 receptor α . July 2009, 34th International Herpesvirus Workshop Ithaca, USA.
10. Yasushi Kawaguchi. Regulation of the catalytic activity of HSVUs3 protein kinases in infected cells. May 2009, A Scientific Symposium for Dr. Bernard Roizman: Honoring six decades of scientific research, teaching and service. Chicago, USA.
11. Y. Kawaguchi. Molecular mechanisms of viral replication and pathogenesis unveiled by fluorescent herpes simplex viruses. September 2008, 8th Awaji International Forum on Infection and Immunity. Awaji, Japan (招待講演)
12. Y. Kawaguchi. Herpesvirus vectors-How to generate the vectors. Educational Semminar 2008年6月第14回日本遺伝子治療学会 札幌 (招待講演)
13. 川口 寧 ヘルペスウイルス生活環の可視化—そのインパクトと臨床応用シンポジウム (Bench to Bed side) 2008年6月 第49回日本臨床ウイルス学会 犬山 (招待講演)

[産業財産権]

○出願状況 (計2件)

名称：組換えウイルス、これを保持する大腸菌およびその製造法

発明者：川口 寧、森本智美

権利者：国立大学法人東京大学

種類：

番号：特願 2008-142662

出願年月日：平成 20 年 5 月 30 日

国内外の別：国内

[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・准教授

研究者番号：60292984

(2) 研究分担者

上間 匡 (UEMA MASASHI)

東京大学医科学研究所・特任研究員

研究者番号：70456193

(3) 連携研究者

なし