

令和 6 年 5 月 17 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19370

研究課題名（和文）ウイルスキナーゼから紐解くリン酸化の新たな基質特異性制御システム

研究課題名（英文）Regulatory system of serine/threonine kinase phosphorylation receptor specificity revealed by viral kinase

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） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）： プロテインキナーゼ(PK)は、標的分子のヒドロキシル基(-OH基)をリン酸化修飾することで、細胞機能の90%以上を司る。一般的に、セリン・スレオニンPKのみが2種類のアミノ酸残基の-OH基をリン酸化するにも関わらず、なぜ2種類のアミノ酸を標的とするのかは全く不明なままであった。本研究において、我々はDNAウイルスがコードするPK(以下、vPK)の特定部位のリン酸化により、vPKのセリンおよびスレオニンのリン酸化効率(Ser/Thr選択性)が変化することを見出した。そして、この制御システムは、ウイルスの神経病原性に重要であることも示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

一部の例外を除き、PKの中でセリン・スレオニンPKのみが2種類のアミノ酸残基の-OH基をリン酸化するという知見は、ほぼ全ての生化学の教科書に記載されている基本原理であるにも関わらず、なぜ2種類のアミノ酸を標的とするのかはこれまで全く不明なままであった。このような状況下、本研究は、2種類のアミノ酸を標的とするセリン・スレオニンPKが、リン酸化によりSer/Thr選択性を変化させることで得られる生物学的意義をはじめて明らかとした研究であると考えられる。したがって、この生物学における基本原理の解明を試みた本研究は、ウイルス学のみならず、多様な生物学研究に波及効果を発揮することが期待される。

研究成果の概要（英文）： Protein kinases (PKs) regulate more than 90% of cellular functions by phosphorylating hydroxyl groups (-OH groups) of their target molecules. In general, serine-threonine PKs phosphorylate the -OH group of two different amino acid residues. However, why they target the two types of amino acids has remained completely unclear. In this study, we found serine-threonine kinase phosphoacceptor specificity is converted by phosphorylation of a specific site of DNA virus-encoded PK (hereafter referred to as vPK). We also showed that this regulatory system is important for the neurovirulence of the virus.

研究分野：ウイルス学

キーワード：ウイルスプロテインキナーゼ Ser/Thr選択性 リン酸化

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞機能の 90%以上を制御するプロテインキナーゼ(PK)は、基質の特定の標的アミノ酸をリン酸化修飾する。PK は標的アミノ酸により、主にチロシン PK やセリン・スレオニン PK に分類され、一般的に、セリン・スレオニン PK のみが 2 種類のアミノ酸をリン酸化する。セリン・スレオニン PK の標的アミノ酸の選択性(Ser/Thr 選択性)に関しては、2014 年、イエール大学の Turk 教授らが、「(i) セリン・スレオニン PK は、セリンをリン酸化しやすいセリン選択型 PK、スレオニンをリン酸化しやすいスレオニン選択型 PK、セリンとスレオニンのリン酸化効率が同程度の非選択型 PK に分類されること、(ii) これらの分類は PK の活性中心近傍のアミノ酸側鎖によって決定されること」を報告している。しかしながら、これらの Ser/Thr 選択性は、各 PK の固有な性質(不可逆的)であり、可逆的に Ser/Thr 選択性が変化するという制御機構の報告は、我々の知る限り、皆無であった。

最近、我々は DNA ウイルスがコードする PK(以下、vPK)の特定部位のリン酸化により、Ser/Thr 選択性が変化するというユニークな予備的な知見を見出した。そこで、本申請課題では、vPK リン酸化の生物学的意義の解明というウイルス学 연구를突破口に、セリン・スレオニン PK が 2 種類のアミノ酸を標的とするという生物の基本原理に潜む、セリン・スレオニン PK の全く新しい生物学的意義の解明を目標とした。

2. 研究の目的

上述の通り、最近、我々は DNA ウイルスがコードする PK(以下、vPK)の特定部位のリン酸化により、vPK の Ser/Thr 選択性が変化するというユニークな予備的な知見を見出した。そこで、本申請課題では、HSV PK リン酸化の生物学的意義の解明というウイルス学 연구를突破口に、「セリン・スレオニン PK が 2 種類のアミノ酸を標的とする」という生物の基本原理に潜む、セリン・スレオニン PK の全く新しい生物学的意義の解明を目標とする。

3. 研究の方法

- (1) Construction of recombinant DNA viruses : 先行研究に従い、解析対象のリン酸化部位の阻害(フェニルアラニン置換)および恒常的模倣(グルタミン酸置換)変異を導入した組換え DNA ウイルス(vPK F-mutant および vPK E-mutant)を作出した。また、作出した組換え DNA ウイルスの vPK に Strep-tag を融合させた組換え DNA ウイルスも作出した(Strep-vPK F-mutant および Strep-vPK E-mutant)。さらに、解析対象のリン酸化部位の恒常的模倣(グルタミン酸置換)変異を導入した組換え DNA ウイルス(vPK E-mutant および Strep-vPK E-mutant)を親株として、リン酸化部位がスレオニンの vPK 基質に関して、リン酸化部位をセリンに置換した組換え DNA ウイルスを作成した(vPK E-mutant/TS および strep-vPK E-mutant/TS)。
- (2) vPK in vitro kinase assay : vPK に Strep-tag を融合させた組換え DNA ウイルスの感染細胞より、ストレプトタクチビーズにより、vPK を簡便かつ敏速に精製するシステムを構築後、試験管内リン酸化反応系(in vitro kinase assay)を用いることで、解析対象のリン酸化部位の阻害(フェニルアラニン置換)および恒常的模倣(グルタミン酸置換)変異による vPK 基質のリン酸化レベルを測定した。
- (3) Animal test: メス ICR マウスを三種混合麻酔処理した後、2 段針を用いて頭蓋内に 50ul のウイルスを接種し、14 日間生死を観察した。また、感染 3 日後のマウス脳を回収し、ソニケーションおよび凍結融解後、脳内に含まれるウイルス力価も標準的なプラークアッセイ法により算出した。

4. 研究成果

- (1) まず、vPK の解析対象のリン酸化部位をフェニルアラニンおよびグルタミン酸置換した組換えウイルス(vPK F-mutant および vPK E-mutant)を培養細胞に感染させ、vPK の基質蛋白質に対する抗リン酸化抗体を用いた Immunoblotting および Phos-tag-SDS-PAGE 解析により、感染細胞における vPK 基質リン酸化の解析を実施した。リン酸化部位の恒常的模倣(グルタミン酸置換)変異時、リン酸化部位がスレオニンの vPK 基質ではリン酸化レベルが有意に低下した一方、リン酸化部位がセリンの vPK 基質のリン酸化レベルは野生型 DNA ウイルスと同様であった。なお、リン酸化部位の阻害(フェニルアラニン置換)変異時には、リン酸化部位がセリンおよびスレオニンの vPK 基質におけるリン酸化レベルは、ともに野生型ウイルスと同様であった。これらの知見より、vPK のリン酸化模倣時、Ser/Thr 選択性が変化し、スレオニンのリン酸化効率が低下することが示唆された。
- (2) 次に、作出した組換えウイルスの vPK に、Strep-tag を融合させた組換え DNA ウイルス(Strep-

vPK F-mutant および Strep-vPK E-mutant) を培養細胞に感染させ、可溶化させた後、ストレプトタクチビーズにより精製 vPK を調製した。また、大腸菌発現・精製系とマルトースビーズを用いて、精製 vPK 基質も調製した。精製 vPK と精製 vPK 基質を用いた試験管内リン酸化反応系(vPK in vitro kinase assay)を実施したところ、培養細胞系における vPK 基質リン酸化レベルと同様に、リン酸化部位の恒常的模倣(グルタミン酸置換)変異 vPK は、リン酸化部位がスレオニンの vPK 基質リン酸化レベルが、野生型 vPK と比較して有意に低かった。一方、リン酸化部位がセリンの vPK 基質のリン酸化レベルは野生型 vPK と同様であった。なお、リン酸化部位の阻害(フェニルアラニン置換)変異 vPK は、リン酸化部位がセリンおよびスレオニンに関わらず、vPK 基質リン酸化レベルは、ともに野生型 vPK と同様であった。これらの知見より、vPK のリン酸化模倣時、Ser/Thr 選択性が変化し、スレオニンのリン酸化効率が低下するという知見が、さらに示唆された。

- (3) 解析対象のリン酸化部位の恒常的模倣(グルタミン酸置換)変異を導入した組換え DNA ウィルス(vPK E-mutant および Strep-vPK E-mutant)を親株として、リン酸化部位がスレオニンの vPK 基質に関して、リン酸化部位をセリンに置換した組換え DNA ウィルス(vPK E-mutant/TS および Strep-vPK E-mutant/TS)を用いて、感染細胞および試験管内リン酸化反応系(vPK in vitro kinase assay)における変異 vPK による当該セリンのリン酸化レベルを解析したところ、野生型 vPK と同程度であったことから、vPK のリン酸化模倣時、Ser/Thr 選択性が変化し、スレオニンのみのリン酸化効率が低下すると考えられた。
- (4) vPK におけるリン酸化部位の恒常的模倣によるスレオニン・リン酸化効率の低下は、培養細胞系で観察される vPK が司る機能の一部のみに有意な影響を与え、大部分の vPK 機能は維持されていた。
- (5) 可逆的な vPK Ser/Thr 選択性を阻害した組換え DNA ウィルス(vPK E-mutant)を、脳内接種したマウスの生存率と脳内におけるウイルス増殖を解析することで、vPK Ser/Thr 選択性が神経病原性に貢献していることが明らかとなった。

以上の解析より、vPK Ser/Thr 選択性のリン酸化による可逆的な変化は、ウイルスの神経病原性に重要であることが示唆された。本知見は、2 種類のアミノ酸を標的とするセリン・スレオニン PK が、リン酸化により Ser/Thr 選択性を変化させることで得られる初の生物学的意義と考えられる。本研究が突破口となり、今後、宿主を含む他の PK に関しても、vPK と同様に、Ser/Thr 選択性のリン酸化による可逆的な変化が紐解かれることが期待される。

周知の通り、一部の例外を除き、PK の中でセリン・スレオニン PK のみが 2 種類のアミノ酸残基の-OH 基をリン酸化するという知見は、ほぼ全ての生化学の教科書に記載されている基本原理であるにも関わらず、なぜ 2 種類のアミノ酸を標的とするのかはこれまで全く不明なままであった。したがって、この生物学における基本原理の解明を試みた本研究は、ウイルス学のみならず、多様な生物学研究に波及効果を発揮することが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Fukui Ayano, Maruzuru Yuhei, Ohno Shiho, Nobe Moeka, Iwata Shuji, Takeshima Kosuke, Koyanagi Naoto, Kato Akihisa, Kitazume Shinobu, Yamaguchi Yoshiki, Kawaguchi Yasushi	4. 巻 14
2. 論文標題 Dual impacts of a glycan shield on the envelope glycoprotein B of HSV-1: evasion from human antibodies in vivo and neurovirulence	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 mBio	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/mbio.00992-23	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 Nobe Moeka, Maruzuru Yuhei, Takeshima Kosuke, Koyanagi Naoto, Kato Akihisa, Kawaguchi Yasushi	4. 巻 68
2. 論文標題 MYBBP1A is required for efficient replication and gene expression of herpes simplex virus 1	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Microbiology and Immunology	6. 最初と最後の頁 148 ~ 154
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1348-0421.13120	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 Takeshima Kosuke, Maruzuru Yuhei, Koyanagi Naoto, Kato Akihisa, Kawaguchi Yasushi	4. 巻 96
2. 論文標題 Redundant and Specific Roles of A-Type Lamins and Lamin B Receptor in Herpes Simplex Virus 1 Infection	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/jvi.01429-22	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 Maeda Fumio, Kato Akihisa, Takeshima Kosuke, Shibazaki Misato, Sato Ryota, Shibata Takuma, Miyake Kensuke, Kozuka-Hata Hiroko, Oyama Masaaki, Shimizu Eigo, Imoto Seiya, Miyano Satoru, Adachi Shungo, Natsume Tohru, Takeuchi Koh, Maruzuru Yuhei, Koyanagi Naoto, Jun Ariei, Yasushi Kawaguchi	4. 巻 96
2. 論文標題 Role of the Orphan Transporter SLC35E1 in the Nuclear Egress of Herpes Simplex Virus 1	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/jvi.00306-22	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 Arii Jun, Takeshima Kosuke, Maruzuru Yuhei, Koyanagi Naoto, Nakayama Yoshitaka, Kato Akihisa, Mori Yasuko, Kawaguchi Yasushi	4. 巻 96
2. 論文標題 Role of the Arginine Cluster in the Disordered Domain of Herpes Simplex Virus 1 UL34 for the Recruitment of ESCRT-III for Viral Primary Envelopment	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JVI.01704-21	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12件(うち招待講演 4件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 淡中崇徳, 竹島功高, 岩崎亮二, 丸鶴雄平, 小柳直人, 加藤哲久, 川口寧
2. 発表標題 HSV-1 UL7の根幹的機能発現を司るリン酸化制御機構の生物学的意義
3. 学会等名 第36回ヘルペスウイルス研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岩田修治, 小柳直人, 加藤哲久, 岩崎亮二, 淡中崇徳, 竹島功高, 丸鶴雄平, 川口寧
2. 発表標題 リン酸化によるHSV-1 UL41 RNase活性の適切な制御はin vivoにおける効率的なウイルス増殖および病原性発現に重要である
3. 学会等名 第70回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Naoto Koyanagi, Akihisa Kato, Kosuke Takeshima, Yuhei Maruzuru, Yasushi Kawauchi
2. 発表標題 Regulatory mimicry of cyclin-dependent kinases by conserved herpesvirus protein kinases
3. 学会等名 International Herpesvirus Workshop 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 竹島功高, 岩田修治, 江藤由佳, 有井潤, 丸鶴雄平, 小柳直人, 加藤哲久, 川口寧
2. 発表標題 Lamin A/Cは単純ヘルペスウイルス1型のウイルス増殖を制御する
3. 学会等名 第35回ヘルペスウイルス研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 前田史雄, 加藤哲久, 竹島功高, 柴崎美里, 丸鶴雄平, 小柳直人, 有井潤, 川口寧
2. 発表標題 HSV-1 De-envelopmentにおけるトランスポーター-SLC35E1の役割
3. 学会等名 第35回ヘルペスウイルス研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 竹島功高, 岩田修治, 江藤由佳, 有井潤, 丸鶴雄平, 小柳直人, 加藤哲久, 川口寧
2. 発表標題 Hela細胞における単純ヘルペスウイルス1型のウイルス増殖に関するLamin A/Cの役割
3. 学会等名 第69回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川口 寧
2. 発表標題 単純ヘルペスウイルス感染の分子基盤
3. 学会等名 大阪大学微生物病研究所アドバンスセミナー（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川口 寧
2. 発表標題 単純ヘルペスウイルス脳炎の分子基盤
3. 学会等名 第26回日本神経感染症学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川口 寧
2. 発表標題 ウイルス感染には細胞生物学の非標準が潜んでいる！？
3. 学会等名 第8回タタバイオ分子クラブ（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 川口 寧
2. 発表標題 ウイルス感染の不均一性を制御する宿主因子の同定と抗ウイルス戦略への応用
3. 学会等名 令和4年度「感染・免疫・がん・炎症」全国共同研究拠点シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小柳直人，加藤哲久，竹島功高，丸鶴雄平，川口寧
2. 発表標題 アミノ酸保存性に基づいて見出されたHSV-2 UL13キナーゼの新規活性制御機構の解明
3. 学会等名 第68回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Naoto Koyanagi, Akihisa Kato, Kosuke Takeshima, Yuhei Maruzuru, Yasushi Kawaguchi
2. 発表標題 Elucidation of a novel mechanism for negative regulation of Herpes Simplex Virus 2 UL13
3. 学会等名 第19回あわじ感染と免疫国際フォーラム / The Neo-Virology Symposium (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

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

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