

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 6 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22890039

研究課題名（和文） ヘルペスウイルスプロテインキナーゼの性状解析

研究課題名（英文） The characterization of herpesvirus protein kinase.

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

研究成果の概要（和文）：単純ヘルペスウイルス 1 型(HSV-1)は少なくとも 2 つのウイルスプロテインキナーゼ、Us3 と UL13 をコードしている。本研究では、Us3 の試験管内アッセイ系を利用し、Us3 がウイルスタンパク質である UL47 Ser-77 および dUTPase Ser-187 をリン酸化することを明らかとした。興味深いことに、UL47 Ser-77 の Alanine 置換は、マウス角膜におけるウイルス増殖や HSV 角膜炎の発症を減少させた。一方、vdUTPase Ser-187 の Alanine 置換は、マウスにおける HSV の神経病原性を低下させた。

研究成果の概要（英文）：Herpes simplex virus-1 (HSV-1) encodes at least two protein kinases, Us3 and UL13. In this study, Us3 in vitro kinase assay system shown that Us3 phosphorylates viral protein UL47 at Ser-77 and dUTPase at Ser-187. Interestingly, replacement of UL47 Ser-77 by alanine reduced viral replication in the mouse cornea and the development of herpes stromal keratitis in mice. In contrast, replacement of dUTPase Ser-187 by alanine reduced the HSV-1 neurovirulence.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,260,000	378,000	1,638,000
2011 年度	1,160,000	348,000	1,508,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,420,000	726,000	3,146,000

研究分野：ウイルス学

科研費の分科・細目：ウイルス学

キーワード：単純ヘルペスウイルス、リン酸化、病態発現

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。この様にヘルペスウイルス PK 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にも関わらず、その機能発現機構は不明な点が多かった。それは、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の確立が困難であったことが要因の一つであると考えられた。

(3) 申請者らはこの問題を克服するために、HSV PK の一つである Us3 の試験管内アッセイ系を確立済みであり、Us3 の基質同定が可能となっていた。

2. 研究の目的

ヘルペスウイルス PK(HSV UL13 および Us3)の標的ウイルス基質および標的宿主細胞基質を同定し、それらリン酸化の感染細胞およびマウス病態モデルにおける生物学的意義を解析する。これらの解析を通じて、ウイルス PK による宿主細胞制御機構およびそれに基づくウイルス増殖調節機構を明らかにすることが本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) Us3 の試験管内アッセイ系を利用し、標的ウイルス基質および標的宿主細胞基質を同定する。

(2) 質量解析系を用いて、同定した基質のリン酸化部位を探索する。

(3) 同定したウイルス基質に関して、確立済みの組換えウイルス作製系である BAC システムを用いて、リン酸化部位特異的な変異体を作製し、細胞レベル及び個体レベルでの個々のリン酸化の生物学的意義の解明を試みる。個体レベルの解析には、マウス角膜感染モデル、マウス経膈感染モデル等の HSV 病態モデルを駆使する。

4. 研究成果

(1) Us3 のウイルス基質として、UL47 Ser-77 を同定した(下図 1 参照)。

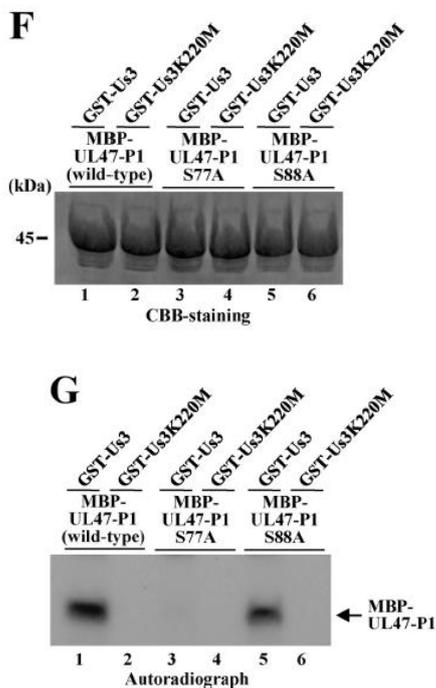


図 1:Us3 試験管内アッセイ系において、UL47 の Ser-77 はリン酸化される。

(2) Ser-77 のリン酸化は、UL47 の核移行を促進し(下図 2 参照)、マウス角膜炎モデルにおける効率的な病態発現に必要なこと(下図 3 参照)が明らかとなった。

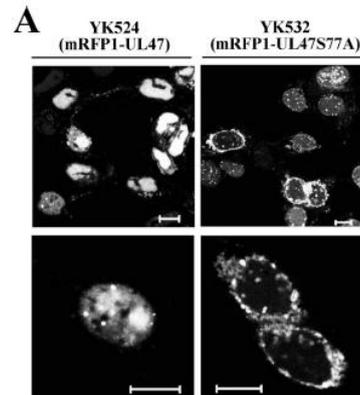


図 2:Ser-77 は UL47 の核移行を促進する

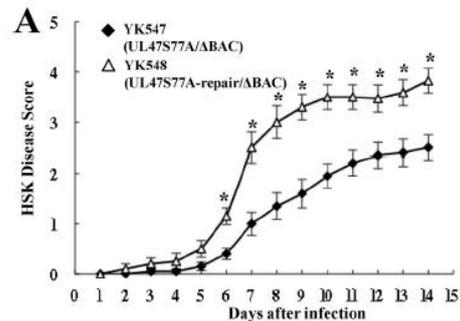
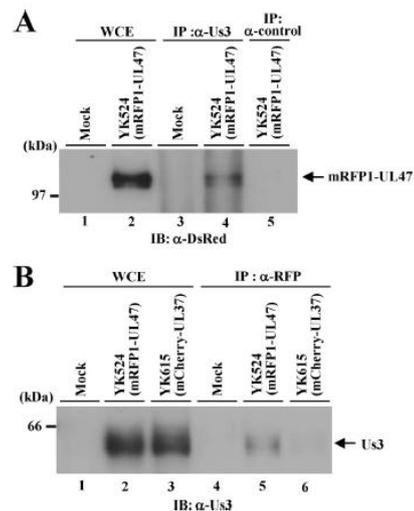
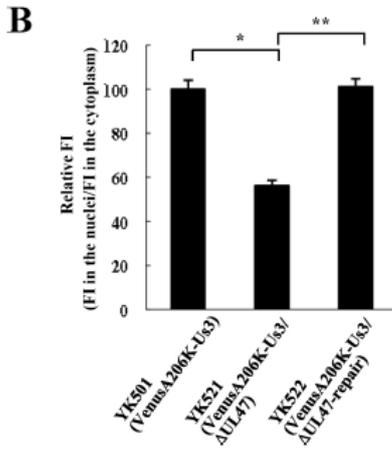


図 3:Ser-77 は、角膜炎の発症に必要なである

(3) また、Us3 と UL47 は安定な複合体を形成し(下図 4 参照)、互いの核移行を協調的に制御し合っていること(下図 5 参照)も明らかとなった。



下図4:Us3とUL47は安定な複合体を形成する



下図4:UL47欠損変異体におけるUs3局在の核と細胞質の割合を示す図

(3) さらに、高感度質量分析計を駆使したリン酸化プロテオーム解析により、HSV-1感染細胞における大希望なリン酸化情報に関するデータベースを構築した。また、本解析では、ウイルス基質だけではなく、宿主細胞基質の感染細胞中におけるリン酸化状態も包括的に明らかとするに至った。ウイルス感染細胞におけるリン酸化情報の知見としては、我々の知る限り、最大のものである。

(4) (3)で構築したリン酸化に関するデータベースとUs3試験管内アッセイ系の併用により、Us3のもう一つのウイルス基質として、dUTPase Ser-187が同定された(下図5参照)。

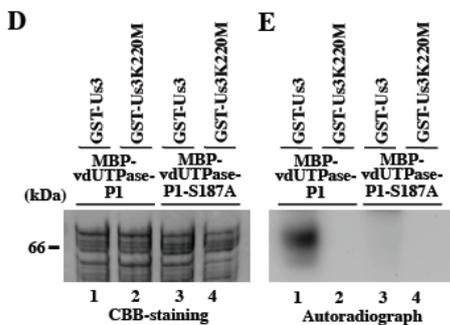


図5:Us3試験管内アッセイ系において、dUTPaseのSer-187はリン酸化される。

(5) dUTPase Ser-187のリン酸化は、マウス病態モデルを用いた解析より、角膜炎や瞳炎といった末梢における病態発現能には関与が認められなかった一方で、HSVの神経病原性を特異的に司るというユニークな性状を有していた。本知見は、HSVのワクチン開発の視点から極めて重要な基礎的知見となりうる可能性を秘めており、その分子機構の解明を含めて、さらなる研究を継続中である。

(4) dUTPase Ser-187リン酸化における神経病原性の解析を共同研究に水平展開することで、HSV-1 UL49にコードされるVP22が、強力な神経病原性因子であること(下図3参照)も明らかとなった。また、VP22変異体では神経病原性の低下に伴い、ウイルス抗原の分布も脳内において低下していることが確認された(下図4参照)

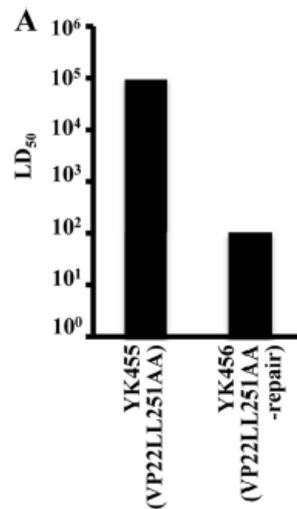


図3:VP22変異体における神経病原性の強度を示す値のグラフ(LD50)

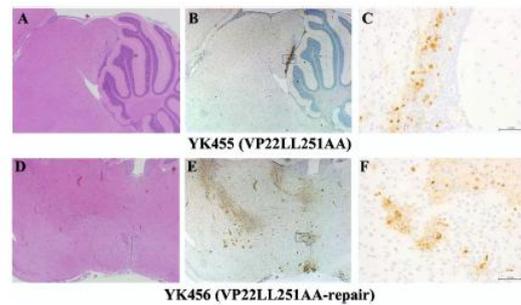


図4:VP22変異体における脳内のウイルス抗原は減少していることを示す病理像

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 3 件)

- ① Kato A, Liu Z, Minowa A, Imai T, Tanaka M, Sugimoto K, Nishiyama Y, Ariei J, Kawaguchi Y.
Herpes simplex virus 1 protein kinase Us3 and major tegument protein UL47 reciprocally regulate their subcellular localization in infected cells.
査読あり
J Virol. 2011 Sep;85(18):9599-613.
doi: 10.1128/JVI.00845-11.
- ② Imai T, Ariei J, Minowa A, Kakimoto A, Koyanagi N, Kato A, Kawaguchi Y.
Role of the herpes simplex virus 1 Us3 kinase phosphorylation site and endocytosis motifs in the intracellular transport and neurovirulence of envelope glycoprotein B.
査読あり
J Virol. 2011 May;85(10):5003-15.
doi: 10.1128/JVI.02314-10.
- ③ 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

〔学会発表〕 (計 5 件)

- ① 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)
- ② 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.
- ③ 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

- ④ Akihisa Kato, Phosphoproteomic analysis reveals an HSV-1 kinase-mediated phosphorylation event involved specifically in the regulation of viral neurovirulence., 36th Annual International Herpesvirus Workshop(IHW), 2011. 7. 24-28., Gdansk, Poland.
- ⑤ 加藤哲久、リン酸化プロテオミクスによる HSV 感染細胞における蛋白質リン酸化状態の包括的解析とそれに基づく神経特異的病態発現機構の解明、第 26 回ヘルペスウイルス研究会、2011 年 6 月 2 日-4 日、大阪アカデミア グランドホール

〔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

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/Kawaguchi-lab/publications.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

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：