

博士論文

単純ヘルペスウイルスの増殖および病原性発現における

UL12の機能解析

藤井 ひかる

目次

<u>序文</u>	3
<u>実験方法</u>	14
第一章 『感染細胞及び病原性発現における UL12 のヌクレアーゼ活性の意義 の解明』	
1-1 要旨	28
1-2 結果	29
1-3 考察	36
第二章 『UL12 のリン酸化の生物学的意義の解明』	
2-1 要旨	46
2-2 結果	47
2-3 考察	61
<u>総括</u>	78
<u>謝辞</u>	79
<u>参考文献</u>	81

序文

ヘルペスウイルス

ヘルペスウイルスは、牡蠣をはじめとする無脊椎動物から魚類、鳥類、哺乳類などを含む脊椎動物に至るまで広範囲な動物種を自然宿主としており、現在までに 350 種以上が同定されているが、それぞれの種に固有のヘルペスウイルスが存在する(1, 2)。そして、ウイルスの宿主域、自然宿主における持続性、感染細胞への影響などをもとに、 α 、 β 、 γ の 3 つの亜科に分類される(1)。ヒトにおいてはこれまでに、 α -ヘルペスウイルス亜科に属するものでは、単純ヘルペスウイルス 1 型 (herpes simplex virus type 1, HSV-1)、HSV-2 および水痘・帯状疱疹ウイルス (varicella-zoster virus, VZV) が、 β -ヘルペスウイルス亜科に属するものでは、ヒトサイトメガロウイルス (human cytomegalovirus, HCMV)、ヒトヘルペスウイルス-6 (human herpes virus-6, HHV-6) および HHV-7 が、 γ -ヘルペスウイルス亜科に属するものでは、EB ウイルス (Epstein-Barr virus, EBV) および HHV-8 が同定されている(1)。これらのウイルスは神経疾患、粘膜性疾患、皮膚疾患、腫瘍性疾患といった様々な病態を引き起こすが、宿主免疫機構などによりウイルス増殖が抑制されると、いずれのウイルスについても初感染後体内に潜伏感染し、宿主の免疫が低下した際にウイルスが再活性化し、様々な症状を呈する(1)。

単純ヘルペスウイルス(HSV)

HSV はヒトヘルペスウイルスの中でも研究の歴史が最も古く、ウイルスの増殖環、病態発現のメカニズム、抗ウイルス剤やワクチンの開発の研究等が盛んにおこなわれている(3)。HSV のウイルスゲノムは約 152 kbp の直鎖二本鎖 DNA であり、これが 80 以上のウイルスタンパクをコードしている(1)。このウイルス DNA は正二十面体のカプシドの中に存在しており、カプシドはウイルスの外層膜であるエンベロープに覆われている (図 1) (1)。これらの間にはテグメントと呼ばれる構造物が存在する (図 1) (1)。

本ウイルスはヒトに口唇ヘルペス、性器ヘルペス、角膜炎、脳炎、新生児ヘルペスなど多様な疾患を引き起こす(4)。HSV には 2 種類の型があり、口、手指などの上半身に感染するものは主に 1 型 (HSV-1)、性器などの下半身に感染するものは主に 2 型 (HSV-2) であるが、この棲み分けは厳密なものではなく、性器ヘルペスの病変から HSV-1 が分離された例やまたその逆の例も報告されている(5, 6)。ヘルペスウイルス疾患の中でも脳炎は特に深刻であり、無治療での致死率は 70-90%と非常に高い(7, 8)。抗ヘルペスウイルス剤であるアシクロビルの投与により脳炎による致死率は 10%程度に低下するものの、生存した患者の約 2/3 については、中度から高度の後遺症が生じまとう(1, 9)。また、性感染症

としての HSV の重要性は高く、現在日本においては、性感染症の原因としてクラミジア、淋菌について 3 番目に多く、また米国においては、年間約 50 万人が性器ヘルペスに初感染し、約 1000 万人が再発性の性器ヘルペスに苦しんでいる(5, 10, 11)。HSV 感染症における問題点は、i)根本的治療法がないため、感染者は年間 5~6 回繰り返し再発し、それが数十年持続する、すなわち医療費の額や患者への精神的苦痛が大きいこと、ii)感染しても発症せず、無症状でウイルスを排出してしまう場合が多く、本人も感染に気がつかないまま次の相手へ移してしまう、すなわち予防が困難であることの 2 点に集約される。米国における HSV 感染症の医療費は、年間約三十億ドルと試算されることが示すように、HSV 研究の重要性は明らかである(10, 11)。

単純ヘルペスウイルスの増殖環

HSV の細胞内における増殖環は図 2 へ示した通りである。HSV はレセプターを介して宿主細胞に侵入する(12)。侵入後、ウイルス粒子内のテグメントタンパク質である VHS (UL41 遺伝子産物)および VP16 (UL48 遺伝子産物)が細胞質に放出される(1)。VHS は宿主の mRNA を分解することにより、宿主タンパク質の合成を阻害し、ウイルスタンパク質の効率の良い翻訳に寄与する(13)。一方 VP16 は、核内に運ばれウイルス遺伝子群の転写活性に寄与する(1)。テグメントと同

時に細胞質に放出されたカプシドは核膜孔まで運ばれ、ウイルス DNA を核内に放出し、核内でウイルス DNA は環状化する(1)。ウイルスの遺伝子は、その発現時期により 3 群 (α 、 β 、 γ) に大別され、先に述べた VP16 はこの中の α 遺伝子群の転写を活性化する(1)。 α 遺伝子群には、他のウイルス遺伝子の発現を制御するウイルスタンパクがコードされており、核において転写された α 遺伝子群は細胞質へ運ばれ、 α タンパクに翻訳される(1)。 α タンパクはその後核内へ運ばれ、 β 、 γ 遺伝子の発現を制御する(1)。 α タンパクによって転写が活性化された β 遺伝子群は同様に細胞質へ運ばれ、 β タンパクに翻訳される。 β タンパクはウイルス DNA の複製に関与するタンパクを多く含む(1)。これらの作用により、先に環状化したウイルス DNA はローリングサイクル機構により複製され、中間体として巨大なコンカテマーを形成する(14)。ウイルス DNA の複製が行われると、 γ 遺伝子群が発現する(1)。 γ タンパクは主にウイルス粒子を構成するタンパクが含まれ、これにより空のカプシドが生成され、カプシド生成後にウイルスゲノム中間体であるコンカテマーがウイルスゲノムのサイズへ切断され、カプシド内へパッケージングされる(1, 14)。ウイルス DNA の複製、カプシドのウイルス DNA へのパッケージングは replication compartment と呼ばれる核内の構造にて行われると考えられている(1)。ウイルス DNA を含むカプシドは、核内膜でエンベロープを獲得し(primary envelopment)、核内外膜間(perinuclear space)

を通過して細胞質へ輸送される(1)。この際テグメントを獲得し、細胞質の膜のオルガネラに出芽することにより、最終エンベロープを獲得する(secondary envelopment)(1)。エンベロープを獲得したウイルス粒子はエキソサイトーシスにより細胞外へと放出される(1)。

一方、in vivo において HSV は宿主の皮膚、粘膜に感染した後、上皮組織で増殖し、顕性もしくは不顕性感染をおこす(1)。HSV は神経指向性があるため、局所で増殖した HSV は感覚神経の神経終末から軸索内に侵入し、逆行性輸送により中枢へ運ばれ、三叉神経節または脊髄後根神経節へ潜伏する(15)。この時稀に神経行性に脳へ侵入し、致命的な脳炎の原因となることがある(8)。潜伏感染したウイルスは宿主の免疫が低下した際に再活性化し、神経を下向し、再び上皮組織で増殖し、様々な症状を呈す(1)。

本研究の課題

HSV-1 UL12 は 626 アミノ酸から構成され、エンドヌクレアーゼおよびエキソヌクレアーゼ活性を持つ(1)。また、HSV-1 UL12 のアミノ酸配列はヘルペスウイルス科において保存性が高いモチーフ配列を持つことが知られている (図 3) (16, 17)。本タンパクは感染時におけるウイルス DNA 複製中間体のプロセッシングに関与し、in vitro でのウイルス増殖において非常に重要な役割を果たしている

と考えられている(16, 18-20)。実際に、UL12 欠損ウイルスにおいてウイルス増殖性が野生株と比較して約 0.1~1%に低下することが報告されている(21, 22)。

また、同欠損ウイルスにおいて、DNA 含有カプシドは産生されるものの、その核から細胞質への移行が阻害されることから、UL12 はカプシドの核内から細胞質への移行に関与することが示唆されている(21)。更に、UL12 欠損ウイルス感染時に野生型 UL12 発現ベクターをトランスフェクションした際には UL12 欠損ウイルスの増殖性は野生株と同程度に復帰するが、ヌクレアーゼ活性消失 UL12 発現ベクターをトランスフェクションした際には UL12 欠損ウイルスの増殖性が復帰しなかったことから、UL12 のヌクレアーゼ活性が *in vitro* におけるウイルスの増殖性に重要であることが示唆されている(16)。しかし、実際に UL12 のヌクレアーゼ活性を消失させた組み換えウイルスを用いて、ウイルス増殖や病原性発現における UL12 ヌクレアーゼ活性の重要性についての検証はなされていない。これまで UL12 のヌクレアーゼ活性の意義を検証するにあたり用いられてきた欠損ウイルスに対し発現ベクターを用いて補完するアッセイにおいては、野生型の UL12 発現ベクターを用いてトランスフェクションした際にも欠損株における増殖性は野生株と比較して劣ることから、本アッセイ系においては感染細胞と環境が異なる可能性があること、*in vivo* における感染実験が不可能であることといった問題点がある。そこで、第一章においては UL12 ヌクレア

一ゼ活性消失変異体ウイルスを実際に作製し、UL12 欠損株とその表現系を比較することで UL12ヌクレアーゼ活性の感染細胞及び *in vivo* における重要性を検証することを目的とした。また、UL12 のウイルス増殖における役割については徐々に解明されつつあるものの、その制御機構については全く研究がなされていない。そこで、第二章においてはウイルス感染時における UL12 の制御機構についての解析をそのリン酸化に着目し行った。

UL12 遺伝子は UL12 のみでなく UL12 の 127 番目のアミノ酸から始まる UL12.5 というウイルスタンパクについてもコードしていることが知られている (図 4、図 12) (17, 23, 24)。本研究において作製した変異体ウイルスの中には UL12 と共に UL12.5 領域にも変異が入るものも存在するため (図 4、図 12)、これによる UL12.5 の機能への影響についても考慮する必要がある。変異体ウイルスを用いた表現系解析の際に UL12.5 の影響を省くために、我々は UL12.5 をコードしない UL12 領域を標的とする UL12 特異的抗体を作製し、発現や細胞内局在については確認を行った。また、先行研究にて UL12 (-) /UL12.5 (-) ウイルスと比較して UL12 (-) /UL12.5 (+) ウイルスにおいてウイルス増殖性やプラークサイズ、ヌクレアーゼ活性が同程度に低下したことから、UL12.5 はウイルス増殖、プラーク形成及びヌクレアーゼ活性に重要ではないため、これらのアッセイについても UL12.5 の影響は省くことができる(17)。しかし、UL12 及び UL12.5

の in vivo における感染実験による病原性発現への影響を検証した先行研究は存在しないため、本研究で行ったマウスを用いた神経病原性試験については UL12.5 へ変異が入ることへの影響を考慮する必要があることを最初に記しておく。

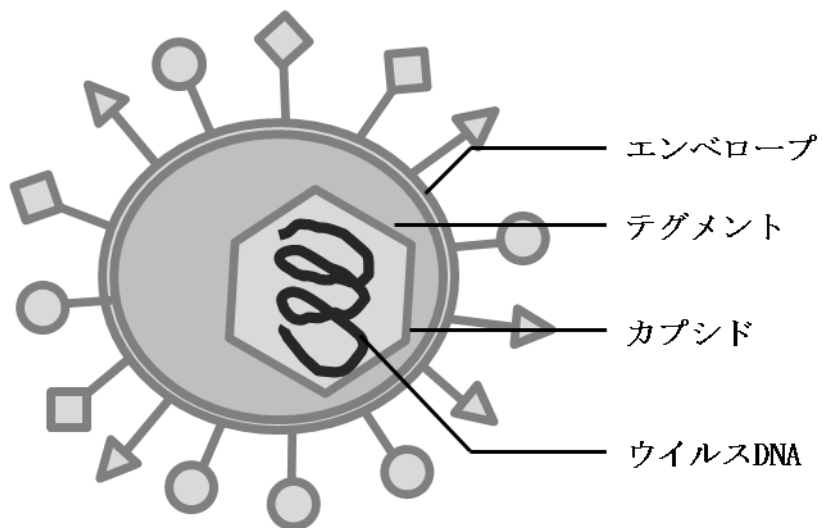


図 1 : ヘルペスウイルス粒子構造

外側よりエンベロープ、テグメント、カプシド、ウイルス DNA により構成される。

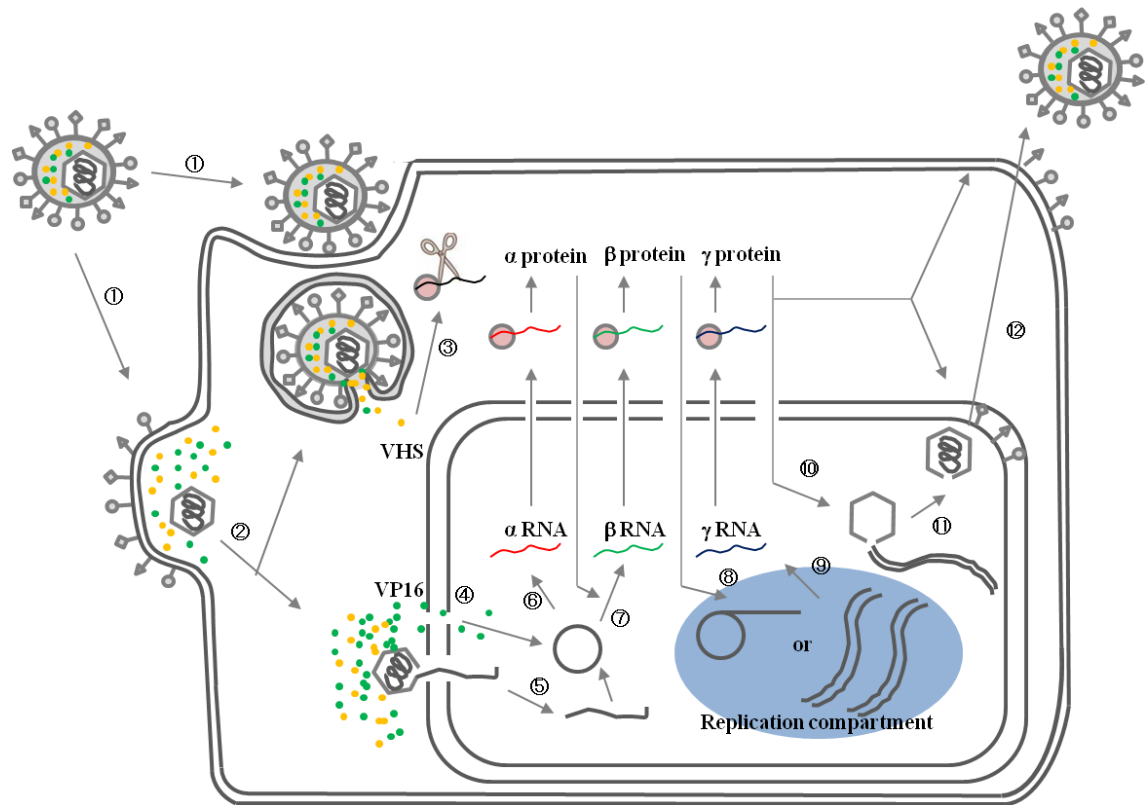


図 2：細胞内における単純ヘルペスウイルスの増殖環

宿主細胞へ侵入後 (①)、テグメントタンパクである VHS、VP16 が細胞質に放出される(②)。VHS は宿主の mRNA を分解することにより、宿主タンパク質の合成を阻害し、ウイルスタンパク質の効率の良い翻訳に寄与する(③)。VP16 は核内に運ばれウイルス遺伝子群の転写活性に寄与する(④)。テグメントと同時に細胞質に放出されたカプシドは核膜孔まで運ばれ、ウイルス DNA を核内に放出し、核内でウイルス DNA は環状化する(⑤)。まず核において転写された α 遺伝子群が細胞質へ運ばれ、 α タンパクに翻訳される(⑥)。 α タンパクはその後核内へ運ばれ、 β 遺伝子群の転写を活性化し、これは同様に細胞質へ運ばれ β タンパクに翻訳される (⑦)。 β タンパクの作用により、環状ウイルス DNA はローリングサイクル機構により複製される(⑧)。ウイルス DNA の複製が行われると、 γ 遺伝子群が発現する(⑨)。 γ タンパクにより空のカプシドが生成され(⑩)、カプシド生成後にウイルスゲノム中間体であるコンカテマーがウイルスゲノムのサイズへ切断され、カプシド内へパッケージングされる(⑪)。ウイルス DNA を含むカプシドは、核内膜でエンベロープを獲得し、細胞質へ輸送される際にテグメントを獲得し、細胞質の膜のオルガネラに出芽することにより、最終エンベロープを獲得し、細胞外へ放出される(⑫)。

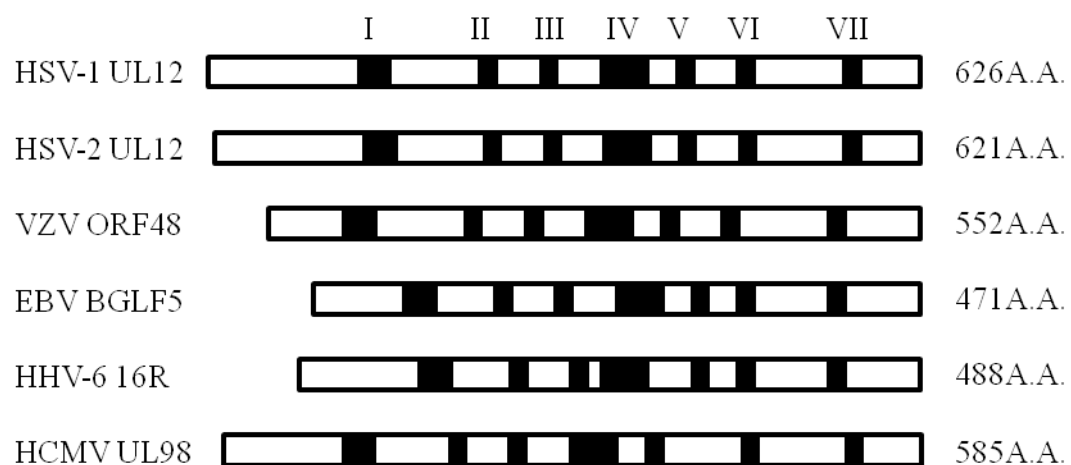


図 3 : UL12 ホモログと保存モチーフ

HSV-1 UL12 のホモログである HSV-2 UL12、VZV ORF48、EBV BGLF5、HHV-6 16R および HCMV UL98 において保存された 7 つの領域 (I-VII)。各アミノ酸配列の模式図の右側にアミノ酸数を示した。

実験方法

細胞

アフリカミドリザル腎細胞株である Vero 細胞は Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) に 5% calf serum (11)、100 units/ml ペニシリン、100 μ g/ml ストレプトマイシンを加えた培地、Rabbit skin 細胞は DMEM に 5% fetal calf serum (FCS)、100 units/ml ペニシリン、100 μ g/ml ストレプトマイシンを加えた培地にて培養した。ヒト胎児腎細胞由来である 293T 細胞、ヒト肺線維芽細胞である HEL 細胞、ヒト肺上皮細胞である A549 細胞は DMEM に 10% FCS、100 units/ml ペニシリン、100 μ g/ml ストレプトマイシンを加えた培地にて培養した。Vero 細胞へ UL12 を発現させて作製した 6-5 細胞(21)は Vero 細胞で用いた培地に 250 μ g/ml G418 を加えた培地にて培養した。CS、FCS は 56°C で 30 分間非働化したものを使用した。A549 細胞は河岡義裕教授より、6-5 細胞は Sandra Weller 教授より賜った。

ウイルス

作製した変異体ウイルスは図 4 および図 12 に示したとおりである。YK655 (Δ UL12)、YK660 (UL12Y371F)、YK665 (UL12G336A/S338A)は pYEbac102 (25)を保

持した大腸菌 GS1783(26)と表 1 および表 3 で示したプライマーを用いて、YK660 (UL12Y371F)および YK665 (UL12G336A/S338A)の復帰株および恒常的リン酸化模倣株は各変異を保持した大腸菌と表 1 および表 3 で示したプライマーを用いて以下のように作製した。カナマイシン耐性遺伝子を表 1 または表 3 のプライマーを用い PCR にて増幅し、これを大腸菌に形質転換した。32℃で 1 時間振盪培養後、20 μ g/ml クロラムフェニコール、40 μ g/ml カナマイシンを含む LB 寒天培地へ塗布し、32℃で培養した。コロニーPCR で目的の位置にカナマイシン耐性遺伝子が挿入されたことを確認後、20 μ g/ml クロラムフェニコール、40 μ g/ml カナマイシンを含む LB 液体培地へ該当コロニーを接種し、32℃で一晩培養した。本培養液 100 μ l を 20 μ g/ml クロラムフェニコールを含む LB 液体培地 2 ml に加え、32℃で 2 時間培養した。これに 10% L-アラビノース (Wako) を 400 μ l 添加し、32℃で 30 分振盪培養することにより I-SceI の発現を誘導した。これを更に 42℃で 30 分振盪培養することでリコンビナーゼの発現を誘導したものについて、32℃で 2 時間振盪培養し、本培養液を 20 μ g/ml クロラムフェニコールを含む LB 寒天培地へ塗布した。翌日生えたコロニーについて、20 μ g/ml クロラムフェニコール、40 μ g/ml カナマイシンを含む LB 寒天培地および 20 μ g/ml クロラムフェニコールのみを含む LB 寒天培地へ植菌し、クロラムフェニコールのみを含む LB 寒天培地でのみ生育したコロニーを選択し、PCR でシ

ークエンسを確認した。シークエンスが正しいことが確認されたものについて DNA を抽出し Rabbit skin 細胞へ以下に記したとおりにトランスフェクションした。YK656 (Δ UL12-repair)については、Vero 細胞へ pBS-UL12(以下に詳細記載)を Lipofectamine 2000 (Invitrogen)を用いてトランスフェクションしたものへ、トランスフェクション 6 時間後に YK655 (Δ UL12)を MOI 10 で感染させ、2 日後に回収、凍結融解を行った。本ウイルス液を階段希釈し Vero 細胞へ接種し、プラークサイズによってスクリーニング、3 回プラークピックした後選択したクローンについてウェスタンブロット法にて発現を確認し、更に PCR でシークエンスを確認した。

UL13 欠損ウイルスである R7356 については Bernard Roizman 教授より賜った。作製した変異体ウイルスおよび野生株の laboratory strain HSV-1 (F)は、6-5 細胞を用いてウイルス力価を測定した後、各実験に使用した。

トランスフェクション

変異体ウイルス作製時のトランスフェクションは以下のように行った。H₂O 250 μ l、ウイルス DNA 5 μ g、2.2 mM CaCl₂ 35 μ l、2 \times Hepes buffered saline (pH7.5) (0.14 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1 mM Na₂HPO₄•2H₂O、50 mM HEPES、1 mM dextrose) 250 μ l を混合し、室温で 15 分間放置した。T25 フラスコへ Rabbit skin 細胞を

継代して2時間後に DEAE dextran で10分間処理した後 TEN (0.1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH8.0, 1 mM EDTA)で洗浄後、上記で作製した DNA 混合液と培地を添加し、37℃で6時間培養した後に新しい培地に交換した。

質量解析または phos-tag SDS-PAGE 解析へ供したサンプルのトランスフェクションは以下のように行った。φ100 ディッシュ1枚当たりプラスミド DNA 1.5 μg、12 μg Polyethylenimine (PEI)、100 μl OPTI MEM (gibco)の割合で混ぜ合わせ、20分間室温で静置した後、培地と共に 293T 細胞へ添加し、37℃で6時間培養後新しい培地に交換した。

プラスミドの作製

YK656 (ΔUL12-repair)作製時に使用した pBC-UL12 は以下のように作製した。UL12 の一部およびその上流領域を含む約 1.9 kbp を pBC1012 (27)をテンプレートとし、5'- GCGCGGCCGCACGACCAAACCGACGTATTG -3' および 5'- GCCTCGAGGAGGCGGGTATGGTGGACCG -3'をプライマーとして PCR で増幅した。また、UL12 の一部およびその下流領域を含む約 1.6 kbp を pBC1012 (27)をテンプレートとし、5'- GCCTCGAGGACCACGGCCAGGGAACACA -3' および 5'- GCGGTACCCAACATCCGCGGCTTCATCG -3'をプライマーとして PCR で増幅した。これらの DNA 断片を pBluescript II KS(+) (Stratagene)へ順にクローニン

グした。

pMEF-UL12 (図 10A) は以下のように作製した。UL12 コード領域を pBC1012 (27)をテンプレートとし、5'-GCGAATTCATGGAGTCCACGGTAGGCCC-3' および 5'-GCGCGGCCGCTCAGCGAGACGACCTCCCCG-3'をプライマーとして PCR で増幅した。これについて EcoRI-NotI で切断し、pcDNA-MEF (27)へクローニングした。

pMEF-UL12 Y371F および pMEF-UL12 G336A/S338A については YK660 (UL12Y371F)および YK665 (UL12G336A/S338A)のウイルスゲノムをそれぞれテンプレートとし、以下 pMEF-UL12 と同様に作製した。

抗体

UL12 および UL13 特異的抗体は過去に研究室で作製したものをを用いた(28)。
UL12 抗体については、UL12 の UL12.5 との非共有アミノ酸領域である 2-126 の N 末へ maltose-binding protein (MBP)を結合させたものを大腸菌を用いて発現、精製し、これをウサギへ接種することで作製した。ICP8 モノクローナル抗体は ATCC より購入したハイブリドーマ 39-S (ATCC HB-8180)をマウスへ腹腔接種した後、腹水を回収し、作製した。VP22 抗体、UL11 抗体については名古屋大学旧西山研究室において作製されたものをを用いた(29, 30)。α-tubulin 抗体(DM1A)お

よび Flag マウスモノクローナル抗体(M2)は Sigma-Aldrich より、Myc マウスモノクローナル抗体(LP14)は MBL よりそれぞれ購入した。

ウェスタンブロット

ウイルス感染細胞もしくは免疫沈降によって得られたタンパク質を SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) にて分離した。SDS-PAGE 後にトランスファーバッファー(0.1 M Tris、0.2 M Glycine 、20% methanol)に浸した濾紙 2 枚ずつをもちいてゲル及びニトロセルロースメンブレン(BIORAD)または PVDF (Millipore)をはさみ、トランスファーした。その後、ブロッキング液(5% スキムミルク、0.1% Tween20 含有 PBS (PBS-T))を用いてブロッキングし、一次抗体を 1% BSA in PBS-T で希釈し、室温で 2 時間、UL13 抗体についてのみ一晚反応させた。PBS-T で洗浄後、二次抗体である Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated 抗マウスもしくは抗ウサギ抗体(GE Healthcare)を 3%スキムミルクを含有する PBS-T でそれぞれ 5000 倍、3000 倍に希釈し、室温で 1 時間反応させた。PBS-T で洗浄した後、Enhanced chemiluminescence (GE Healthcare)により目的のバンドを検出した。

スクレアーゼアッセイ

Vero 細胞、HEL 細胞、A549 細胞へ各変異体ウイルスを MOI 3 で 12 時間感染させ、NTM buffer (50 mM Tris-HCl [pH 7.5], 150 mM NaCl, 2 mM 2-mercaptoethanol)を用いて洗浄した後、同 buffer を加えスクレーパーを用いて回収した。500 g、10 分遠心しペレットを回収、5 mM 2-メルカプトエタノール含有 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) ヘプロテアーゼ阻害剤カクテル (ナカライ・テスク) を 150 μ l 加えサスペンド、超音波破碎を行った後、終濃度が 4 mM MgCl_2 、100 mM KCl となるよう各溶液を加え、1,500 g、15 分で遠心した上精をサンプルとした。

ヌクレアーゼアッセイの基質は以下のように作製した。HSV-1 UL41 領域の 1 kb について、pBC1007 (27) をテンプレートとし、プライマー 5'-GCGAATTCGGTTTGTTCGGGATGATGAA-3' および 5'-GCGGATCCCTTCGTATCCGCCGGCGATC-3'を用いて PCR により増幅し、この時、デオキシヌクレオシド三リン酸ミックスに ^{32}P dCTP を加えることでラベリングした。

ヌクレアーゼアッセイは上記で作製した 25 μ l のサンプル上精、100 ng の基質、100 ng M13mp18 single-stranded DNA (Takara)、20 mM Tris-HCl (pH 7.5)、40 mM NaCl, 1 mM MgCl_2 、1 mM dithiothreitol を計 100 μ l となるよう混合することで行った。本反応液を 37°C、10 分間インキュベートし、25 μ l の 3.5mg herring testes carrier DNA/ml と 125 μ l 20%トリクロロ酢酸を加えることで反応を停止させた。

これを 10 分間氷冷した後、14,000 g、10 分間遠心、上精 100 μ l についてシンチレーションカウンターを用いて放射線量を測定した。

ウイルス力価の測定

ウイルス液を 1% FCS 含有 199 培地を用いて 10^2 から 10^9 に希釈した。そのうち 10^4 から 10^9 のウイルス希釈液について、予め 6 well-plate へ播種しておいた 6-5 細胞へ感染させ、1 時間吸着させた後に 160 μ g/ml ヒト γ -グロブリン (G4386: Sigma-Aldrich)を加えた新しい 1% FCS 含有 199 培地へ変え、37°Cで 3 日間培養した。細胞をメタノール固定し、クリスタルバイオレットを用いて染色した後、ウェル毎にプラーク数を数え、ウイルス力価を算出した。

ウイルス増殖性

Vero 細胞、HEL 細胞、A549 細胞へ各ウイルスを MOI 0.01 または MOI 3 で感染させた。1 時間吸着させた後、培地で細胞を洗浄し、37°Cで培養した。MOI 0.01 で感染させたものについては感染後 48 時間後に、MOI 3 で感染させたものについては感染後 24 時間後にそれぞれ-80°Cにて凍結させ、3 回凍結融解した後に 6-5 細胞を用いてウイルス力価を測定した。

プラークサイズの測定

Vero 細胞、HEL 細胞、A549 細胞へ各変異体ウイルスをそれぞれ MOI 0.0001、MOI 0.001、MOI 0.00001 で感染、1 時間吸着させた後、160 μ g/ml ヒト γ -グロブリン含有培地に置換、これを 37°C で 48 時間培養した後にプラークの長径を測定した。

マウスにおける病原性試験

3 週齢メス ICR マウス(Charles River)へペントバルビタールを腹腔接種することとで麻酔し、10 倍階段希釈したウイルス液を脳内接種した。Behrens-Karbar 法を用いてウイルス接種後 14 日目の 50%致死量 (LD₅₀) を算出した。全ての動物実験は日本学術会議が定めるところの「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」に従って行った。また実験方法については東京大学医科学研究所の動物実験委員会のプロトコル番号 19-26 を採用した。

免疫蛍光抗体法

細胞をガラスボトムディッシュ(Matsunami)を用いて培養し、各ウイルスを MOI 10 で感染、12 時間後に 4% paraformaldehyde in PBS で 10 分間固定した。PBS で洗浄後、0.1% TritonX-100 を加え、室温で 10 分間静置し、PBS で洗浄後

10%ヒト血清含有 PBS を加え、室温で 1 時間ブロッキングした。その後、各種抗体をブロッキング液で 1000 倍希釈したものを室温 2 時間反応させた。2 時間後に PBS で洗浄、二次抗体 Alexa Fluor 抗体液(invitrogen)をブロッキング液で 1000 倍希釈したものを室温 1 時間反応させた。これを PBS で洗浄後、共焦点顕微鏡を用いて解析した。

共焦点顕微鏡による解析

LSM PASCAL 蛍光顕微鏡(Carl Zeiss)と 63x 1.4 倍 Plan-APOCHROMAT 対物レンズを用いて観察した。細胞は 35 mm ガラスボトムディッシュを用いて培養した。LSM での観察には Argon laser (458, 488 and 514 nm)と HeNe laser (543 and 633 nm) (Carl Zeiss)を使用した。免疫蛍光抗体法の際に用いる二次抗体 Alexa Fluor 488 (invitrogen)の蛍光は 488 nm で励起し、BP515-545 emission filter で観察した。同じく免疫蛍光抗体法の際に用いる二次抗体 Alexa Fluor 546 (invitrogen)の蛍光は 543 nm で励起し、LP620 emission filter で観察した。

質量解析

293T 細胞に上記の pMEF-UL12 を PEI 法によりトランスフェクトし、48 時間後に回収、0.5% NP-40 buffer (0.5% NP-40, 120mM NaCl, 50mM Tris-HCl (pH 8.0)

and 50 mM NaF) ヘプロテアーゼ阻害剤カクテル (ナカライ・テスク) を加えた可溶化 buffer にて溶解した。遠心分離の後、上清に Myc 抗体 (MBL) および Protein A-Sepharose ビーズ (GE Healthcare) を添加し、免疫沈降に供した。上記の可溶化 buffer にて洗浄後、さらに、AcTEV プロテアーゼ (Invitrogen) を添加し、室温 1 時間の処理により、UL12 複合体をビーズより遊離させた。再度、遠心分離の後、上清に M2 抗体 (Sigma) および Protein A-Sepharose ビーズ (GE Healthcare) を添加し、免疫沈降に供した。そして、SDS-PAGE 後、銀染色し、UL12 と考えられるバンド (図 10B) を切り出し、トリプシンを用いたゲル内消化法により、UL12 複合体をペプチド断片化した。本サンプルを Dina (KOA Technologies) にて分離を行いながらオンラインで Q-STAR Elite (AB SCIEX) に供し、各ペプチドの質量分析情報を取得した。LC-MS/MS 解析により得られたペプチド質量は National Center for Biotechnology Information (NCBI) のヒトタンパク質データベース上の 68,711 個のタンパク質配列と human herpesvirus 1 strain F のゲノム配列 (GenBank accession number GU734771) に基づいた 74 個のウイルスタンパク質配列を融合した形のデータベースに照らし合わせ、Mascot アルゴリズム (Matrix Science version 2.4.1) を用いてデータ処理を行った。この際の以下のパラメーターを採用した。Variable modifications, oxidation (Met)、protein N-terminal acetylation, pyroglutamination (Gln)、phosphorylation (Ser, Thr, and Tyr); maximum missed

cleavages 2; peptide mass tolerance 100 ppm; および MS-MS tolerance 0.5 Da。 $P < 0.05$ を満たす Mascot score の閾値を上回るペプチドが 1 種類以上存在した場合に、該当アミノ酸配列を含むタンパク質が検出されたとみなした。ペプチド上のリン酸化部位は MD スコアを用いて決定した。

Phos-tag SDS-PAGE 解析

293T 細胞へ pMEF-UL12 または pMEF-UL12 G336AS338A、pMEF-UL12 Y371F を上記に従いトランスフェクトし、48 時間後に回収、0.3% NP-40 λ -PPase バッファー[0.3% NP-40, 1X NEBuffer for Lambda PPase (#B0753S), 1X 20mM Mn Chloride for Lambda PPase (#B1753S)] へプロテアーゼ阻害剤カクテル (ナカライ・テスク) を加えたものへ溶解した。15,000 rpm, 4°C にて 15 分間遠心した後、上精を回収した。pMEF-UL12 のライセートについてはサンプルの半量について下記のようにフォスファターゼ処理を行った。各ライセートサンプルへ SDS-loading バッファーを加え、100°C、5 分間処理した後、290 μ M MnCl₂ および 145 μ M Phos-tag アクリルアミド(Wako Chemicals, Japan)含有または非含有 7.5% SDS ポリアクリルアミドゲル(31)へロードし、30mA にて 2 時間 SDS-PAGE を行った。SDS-PAGE の後、ゲルを Western transfer buffer (25 mM Tris, 192 mM glycine, 20% methanol) with 1 mM EDTA へ浸し、MnCl₂ を取り除いた後、ウェス

タンブロットへ供した。

フォスファターゼ処理

上記の phos-tag SDS-PAGE 解析で作製した pMEF-UL12 をトランスフェクトした細胞のライセートについて、等量の λ -PPase バッファーで希釈し、100°Cで 5 分間処理したもの 30 μ l へ、5 μ l λ -PPase (New England BioLabs)を加えた。そして 30°Cで一晩培養した後、SDS-loading バッファーを加え、100°C、5 分間処理し、phos-tag SDS-PAGE 解析で行った方法と同様に、phos-tag(+)または phos-tag (-)条件下での SDS-PAGE へ供した。

統計処理

エラーバーは各 n 数で行った実験の標準誤差を示した。有意性は Student の t 検定により評価した。

第一章

感染細胞及び病原性発現における UL12 の ヌクレアーゼ活性の意義の解明

1-1 要旨

これまで培養細胞にけるウイルス増殖において UL12 のヌクレアーゼ活性能は非常に重要であると考えられてきたが、本研究において実際に組み換えウイルスを作製し検証を行ったところ、本ヌクレアーゼ活性能は培養細胞におけるウイルス増殖への重要性は低く、UL12 のヌクレアーゼ以外の機能がこれに重要であることが明らかとなった。一方マウス脳内接種により神経病原性への UL12 ヌクレアーゼ活性能の寄与について検証を行ったところ、ヌクレアーゼ活性消失株の LD₅₀ はその復帰株と比較して約 100 倍増加したことから、UL12 ヌクレアーゼ能は *in vivo* における神経病原性発現には非常に重要な位置を占めていることが示唆された。

1-2 結果

作製した変異体ウイルス感染細胞における性状解析

作製した変異体ウイルス感染細胞において、UL12 およびその周辺配列がコードする UL11、UL13 の発現量について確認を行った。Vero 細胞へ各変異体ウイルスを MOI 3 にて感染させ、24 時間後に回収したものについて、SDS-PAGE、ウェスタンブロットを行った (図 5)。細胞量のコントロールとして α -tubulin、感染量のコントロールとして HSV タンパクである VP22 を示した (図 5)。

図 5 に示したように、mock 細胞および UL12 欠損株である YK655 (Δ UL12) 感染細胞においては UL12 は検出されず、一方、UL12 欠損復帰株である YK656 (Δ UL12-repair) や UL12 ヌクレアーゼ活性消失株である YK665 (UL12G336A/S338A)、その復帰株である YK666 (UL12G336A/S338A-repair) 感染細胞においては野生株である HSV-1 (F) 感染細胞と同レベルの UL12 の発現が観察された。本結果より、UL12 欠損株において UL12 が欠損していること及び UL12 ヌクレアーゼ活性は UL12 の発現レベルに影響しないことが確認された。また、これらの変異体ウイルス感染細胞において、UL12 に隣接する遺伝子が発現するタンパクである UL11 および UL13 の発現量についても確認を行ったところ、全ての UL12 変異体ウイルス感染細胞において、野生株である HSV-1 (F) 感

染細胞と同レベルの UL11 および UL13 の発現が観察された (図 5)。すなわち、これらの UL12 変異は隣接する遺伝子の発現に影響しないことが確認された。

また、作製した UL12 ヌクレアーゼ活性消失株について、実際にヌクレアーゼ活性が消失していることを確認した。ここで先行研究にて、UL12 (-) /UL12.5

(-) ウイルスと比較して UL12 (-) /UL12.5 (+)ウイルスにおいてヌクレアーゼ活性が同程度に低下したことから、UL12.5 のヌクレアーゼ活性の影響について

は省くことができる(17)。Vero 細胞へ各変異体ウイルスを MOI 3 で接種し、12 時間後に回収、可溶化したサンプルについて実験方法に従いヌクレアーゼ活性

を測定した (図 6A)。また、同ライセートを用いてウェスタンブロット法により、各ライセートの UL12 可溶化量が等しいことを確認した (図 6B)。野生株感

染細胞においては、mock 細胞や UL12 欠損株である YK655 (Δ UL12)感染細胞と比較して、顕著なヌクレアーゼ活性の上昇が認められた (図 6A)。UL12 ヌクレ

アーゼ活性消失株である YK665 (UL12G336A/S338A)感染細胞におけるヌクレアーゼ活性は、mock 細胞と同程度であることから、YK665 (UL12G336A/S338A)

感染細胞においてヌクレアーゼ活性が消失していることが確認された(図 6A)。

また、各変異体ウイルス復帰株感染細胞においてはヌクレアーゼ活性が野生株感染細胞と同程度に復帰していたことから (図 6A)、YK655 (Δ UL12)および

YK665 (UL12G336A/S338A)感染細胞におけるヌクレアーゼ活性の消失が、UL12

の欠損あるいは UL12G336A/S338A への変異によって引き起こされていると考えられる。

UL12 ヌクレアーゼ活性は細胞種依存的に培養細胞におけるウイルス増殖に寄与する

先行研究において、UL12 欠損ウイルス感染時に野生型の UL12 発現ベクターをトランスフェクションした際には増殖性が野生株と同程度に回復したものの、ヌクレアーゼ活性消失 UL12 発現ベクターをトランスフェクションした際は UL12 欠損ウイルスの増殖性が回復しなかったことから、UL12 のヌクレアーゼ活性が *in vitro* におけるウイルスの増殖性に重要であることが示唆されている(16)。しかし、ヌクレアーゼ活性消失ウイルスにおける検証はなされていないため、これについて検証を行った。先行研究において、UL12.5 は培養細胞におけるウイルス増殖には重要でないことが示されているため、本研究において UL12.5 の影響は省くことができる(17)。ここで、ヘルペスウイルスにおいてウイルス増殖環が 1 周するにあたり約 24 時間要することから(1)、1 周当たりのウイルスの増殖性を MOI 3 で感染させ 24 時間後に回収したサンプルを用いて、複数回ウイルス増殖環を経たウイルスの増殖性を MOI 0.01 で感染させ 48 時間後に回収したサンプルを用いて検証を行った。

Vero 細胞および HEL 細胞において MOI 0.01 で感染させた際は UL12 欠損株である YK655 (Δ UL12)は野生株と比較してそれぞれ約 1/14,000、1/11,000 に、復帰株である YK656 (Δ UL12-repair)と比較してそれぞれ約 1/5,600、1/12,000 にウイルス力価が低下した (図 7A、B)。同様に A549 細胞において MOI 0.01 で感染させた際は UL12 欠損株である YK655 (Δ UL12)は野生株、復帰株である YK656 (Δ UL12-repair)と比較してそれぞれ約 1/880、1/220 にウイルス力価が低下した (図 7C)。本結果は先行報告における結果と一致しており(21, 22)、UL12 が培養細胞におけるウイルス増殖性に非常に重要であることをさらに裏付ける結果である。

一方、HEL 細胞及び A549 細胞において UL12 ヌクレアーゼ活性消失株である YK665 (UL12G336A/S338A)を MOI 0.01 で感染させた際は野生株と比較してそれぞれ約 1/1.4、1/5.5 に、復帰株である YK666 (UL12G336A/S338A-repair)と比較してそれぞれ約 1/1.6、1/1.9 にウイルス力価が低下する程度であり、増殖性に大きな変化は見られなかった (図 7 B、C)。Vero 細胞においては同様の条件で UL12 ヌクレアーゼ活性消失株である YK665 (UL12G336A/S338A)は野生株及び復帰株である YK666 (UL12G336A/S338A-repair)と比較してそれぞれ約 1/13、1/5.5 にウイルス力価の低下が認められた (図 7A)。UL12 ヌクレアーゼ活性消失株である YK665 (UL12G336A/S338A)の Vero 細胞におけるウイルス力価の低下は HEL 細

胞や A549 細胞と比較して大きいものであったが、UL12 欠損株と比較すると約 1000 倍の増殖性を示した (図 7 A-C)。すなわち、培養細胞へウイルスを感染させた際に UL12 のヌクレアーゼ活性は細胞種依存的にウイルス増殖へある程度は寄与するものの、ヌクレアーゼ活性以外の UL12 の機能がウイルス増殖に大きな役割を果たしていることが示唆された。

また、同様の結果が MOI 3 にて感染させたサンプルにおいて観察された (図 7 D-F)。

UL12 のヌクレアーゼ活性は細胞種依存的に細胞間伝播に寄与する

各変異体ウイルスの増殖性を観察した Vero 細胞、HEL 細胞、A549 細胞について、プラークサイズを測定することで細胞間伝播における UL12 ヌクレアーゼ活性の意義を検証した。いずれの細胞に UL12 欠損株である YK655 (Δ UL12)を接種した際も野生株やその復帰株である YK656 (Δ UL12-repair)と比較して著しいプラークサイズの低下が認められた (図 8)。本結果は先行報告と一致したものである(17)。UL12 ヌクレアーゼ活性消失株である YK665 (UL12G336A/S338A)を接種した際は、HEL 細胞や A549 細胞においては野生株や復帰株である YK666 (UL12GA/SA-repair)と同程度のサイズのプラークを形成したが、Vero 細胞においては、UL12 欠損株である YK655 (Δ UL12)と比較すると大きいものの、野生株

やその復帰株である YK656 (Δ UL12-repair)と比較してプラークサイズは有意に縮小していた(図 8)。本結果は MOI 0.01 で感染させた際のウイルス増殖性の結果(図 7A-C)と一致するものである。

以上の結果より、UL12 のヌクレアーゼ活性の細胞間伝播における役割は殆どなく、UL12 のヌクレアーゼ活性以外の機能がウイルスの細胞間伝播に重要な役割を果たしていることが示唆された。

UL12 のヌクレアーゼ活性はマウスにおける神経病原性へ寄与する

これまでの結果より、培養細胞におけるウイルス増殖において、UL12 のヌクレアーゼ活性の重要性は細胞種依存的なものであり、また UL12 がそれに果たす役割のごく一部のみしか担っていないことが示唆された。特に同じ繊維芽細胞であるが、不死化細胞である Vero 細胞においてはヌクレアーゼ活性はウイルス増殖に重要であることが示唆されたが、より生体に近いと考えられる初代培養細胞である HEL 細胞においては、ヌクレアーゼ活性はウイルス増殖に重要でないことが示唆されたことから、生体内でのウイルス動態におけるヌクレアーゼ活性の重要性が疑問となる。そこで UL12 のヌクレアーゼ活性が実際に *in vivo* においてどの程度寄与するかについて検証を行った。

各変異体ウイルスを 10 倍階段希釈したものをマウスの脳内へ接種し、接種 14

日後に LD₅₀ を算出した (図 9)。UL12 欠損ウイルスである YK655 (Δ UL12)およびその復帰株である YK656 (Δ UL12-repair)接種時における LD₅₀ について算出したところ、それぞれ $10^{4.83}$ 、 $10^{1.67}$ と、YK655 (Δ UL12)は YK656 (Δ UL12-repair)に比して約 1000 倍 LD₅₀ が増加したことから、UL12 が培養細胞におけるウイルス増殖同様、マウスへの脳内接種時における病原性発現に重要であることが示唆された (図 9)。また、UL12 ヌクレアーゼ活性消失株である YK665 (UL12G336A/S336A)及びその復帰株である YK666 (UL12GA/SA-repair)接種時における LD₅₀ はそれぞれ $10^{3.5}$ 、 $10^{1.5}$ と、YK665 (UL12G336A/S336A)は YK666 (UL12GA/SA-repair)に比して 100 倍 LD₅₀ が増加した (図 9)。本結果より、UL12 のヌクレアーゼ活性はマウスへの脳内接種時における病原性発現に重要であることが示された。

1-3 考察

UL12 欠損ウイルスにおいて培養細胞におけるウイルス増殖性が野生株の 0.1-1%に低下すること(21, 22)、野生型の UL12 を発現ベクターを用いて補完した際には UL12 欠損ウイルスの増殖性は回復したがヌクレアーゼ活性消失 UL12 変異体 (G336A/S338A) を同様にして補完した際にはその増殖性に回復が見られなかったことから(16)、これまで UL12 のヌクレアーゼ活性は培養細胞におけるウイルス増殖において重要な役割を果たしていると考えられてきた。また、先行研究においてヌクレアーゼである UL12 は HSV-1 がコードする 1 本鎖 DNA 結合タンパクである ICP8 と相互作用し、バクテリオファージの λ Red リコンビナーゼのようにリコンビナーゼとして働くモデルが提示されている(32-36)。 λ Red リコンビナーゼはエキソヌクレアーゼであり UL12 と相同性を持つ Red α と 1 本鎖 DNA 結合タンパクである Red β の 2 つの構成因子からなる(36-38)。これは DNA 鎖交換や組み換えを触媒し、ウイルス DNA のコンカテマー形成に重要な役割をはたし、エンキャプシレーションや成熟ウイルス粒子の形成に重要であることが知られている(36, 39)。UL12 と ICP8 の相互作用が λ Red リコンビナーゼと同様に機能するというモデルは i) UL12 は ICP8 と感染細胞において相互作用すること(40)、ii) *in vitro* で UL12 と ICP8 を発現させた際に、染色体

DNA において二本鎖切断が起きた際の修復経路を用いて DNA 鎖交換や 1 本鎖 DNA のアニーリングを触媒する(34)という先行報告によっても裏付けられる。HSV-1 のウイルス増殖環においてウイルス DNA のコンカテマー形成は必須であるため(1)、UL12 と ICP8 は λ Red リコンビナーゼと同様にウイルス DNA コンカテマーの形成に重要な役割を果たすと考えられてきた。

このように、UL12 のウイルス増殖に関与する機能の大部分は UL12 のヌクレアーゼ活性が占めると考えられてきた。しかし、今回我々が実際に UL12 ヌクレアーゼ消失株を作製し、感染細胞において検証を行ったところ、UL12 のヌクレアーゼ活性は培養細胞におけるウイルス増殖において重要性が比較的低いことが明らかとなった。すなわち、UL12 のヌクレアーゼ活性以外の機能が培養細胞におけるウイルス増殖に大きな役割を果たしていると考えられるため、今後ヌクレアーゼ活性非依存的な UL12 の機能がウイルス増殖に如何に関与しているのかという研究を進める必要がある。また、これまでエンカプシデーションや複製されたウイルス DNA のプロセシングに UL12 のヌクレアーゼ活性が関与するとされてきた(34, 35, 41)。本研究で作製した UL12 ヌクレアーゼ活性消失株を用いることで、実際にヌクレアーゼ活性がこれらの機能を担っているか否かを検証することが可能である。

また、これまでに UL12 自身やそのヌクレアーゼ活性の *in vivo* における重

要性については全く不明であった。本研究において、UL12 欠損株はその復帰株と比較して LD₅₀ が約 1000 倍増加することから、UL12 は神経病原性発現に重要であることが初めて示唆された。また、UL12 ヌクレアーゼ活性消失株についても、その復帰株と比較して LD₅₀ が約 100 倍に増加したことから、神経病原性発現における UL12 のヌクレアーゼ活性能の重要性は非常に高いことについても初めて示唆された。しかし、本研究においては神経病原性発現に UL12 およびそのヌクレアーゼ活性がいかに関与しているかについては明らかにできていないため、今後本表現系が脳内におけるウイルス増殖が低下することに起因するものか、宿主免疫回避に起因するものか等の可能性を検証していく必要があり、そのためにはマウス脳内におけるウイルス量の測定、脳内のウイルス分布などを検証する必要がある。

UL12 遺伝子は UL12 のみでなく UL12 の 127 番目のアミノ酸から始まる UL12.5 というウイルスタンパクについてもコードしていることが知られている (図 4) (17, 23, 24)。感染細胞において UL12.5 のヌクレアーゼ活性は定量できないレベルであり、培養細胞におけるウイルス増殖性には関与しないことが先行研究により示されているが(17)、*in vivo* における感染実験を行った先行研究は存在しない。すなわち、本研究で行ったマウスを用いた神経病原性試験においては UL12.5 へ変異が入ることへの影響を考慮する必要がある。

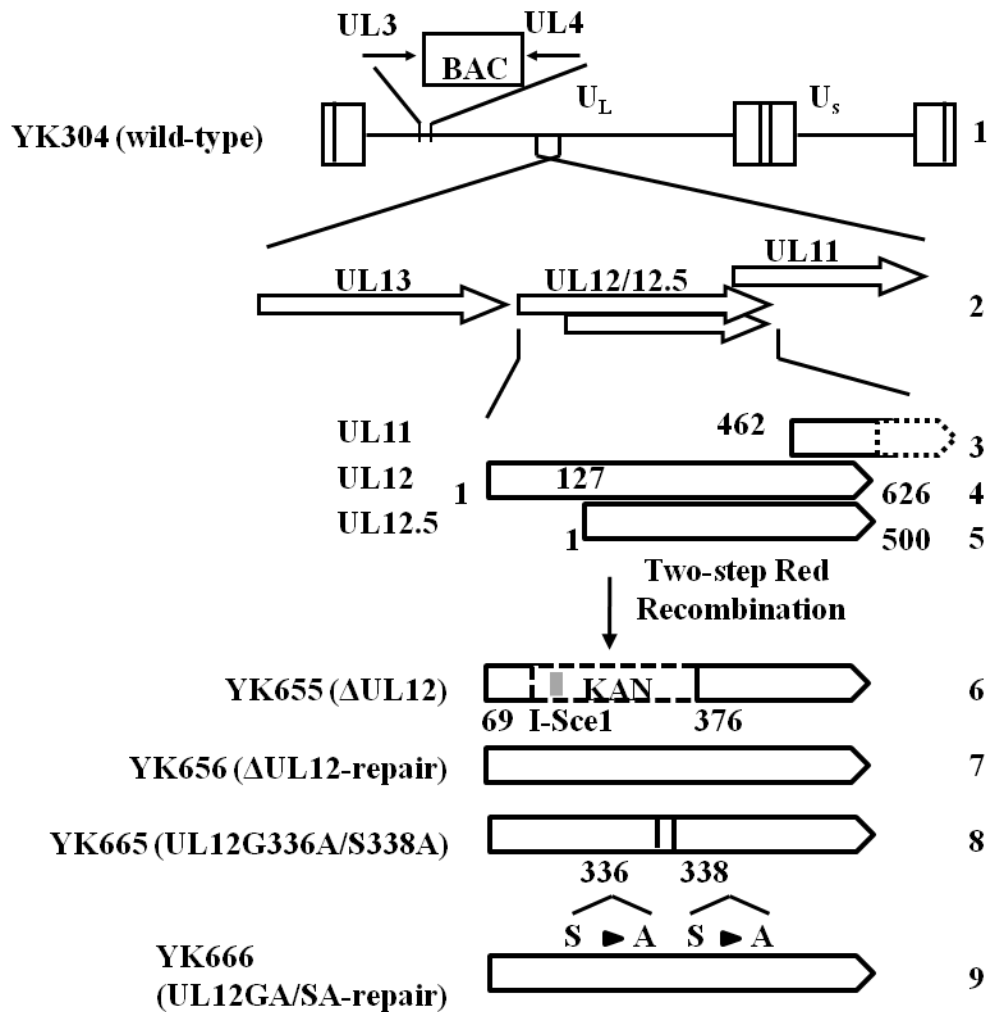


図 4：ウイルスゲノム構造と本研究で使したウイルス

YK304 (wild-type)ゲノム構造(1－5 行目)。Unique 配列は unique long (42)と unique short (Us)ドメインとして表した。YK304 ゲノムは bacmid (BAC)を UL3 と UL4 遺伝子間に挿入されている。YK304 を親株とした、UL12 70-375 を I-SceI が挿入された KAN に置換したウイルス YK655 (ΔUL12)とその復帰株 YK656 (ΔUL12-repair)、UL12-Gly336 および UL12-Ser338 をそれぞれアラニンに置換したウイルス YK665 (UL12G336A/S338A)とその復帰株 YK666 (UL12GA/SA-repair)の模式図 (6－9 行目)。

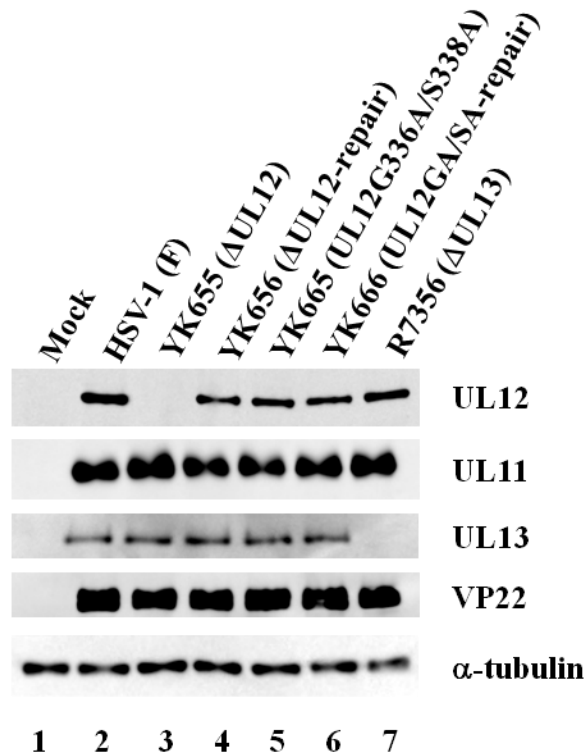


図 5：各変異体ウイルスにおけるウイルスタンパク発現量

mock（1 列目）もしくは HSV-1 (F)（2 行目）、YK655 (ΔUL12)（3 行目）、(ΔUL12-repair)（4 行目）、YK665 (UL12G336A/S338A)（5 行目）、YK666 (UL12GA/SA-repair)（6 行目）又は R7356 (ΔUL13)（7 行目）を MOI 3 で接種した Vero 細胞について、12 時間後に回収したものを SDS-PAGE 後、UL12、UL11、UL13、VP22 および α -tubulin 抗体を用いてウェスタンブロットにて検出した。

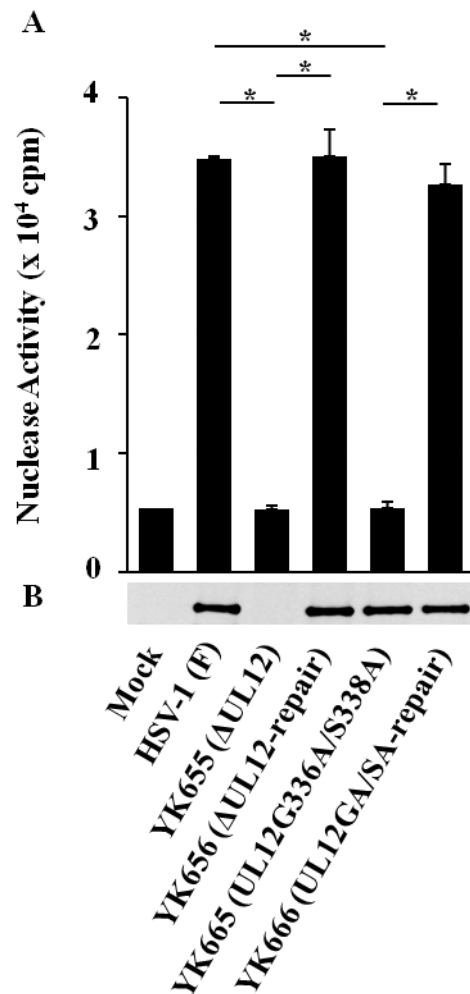


図 6：各変異体ウイルス感染 Vero 細胞におけるヌクレアーゼ活性

A：各変異体ウイルスにおけるヌクレアーゼ活性

mock または各変異体ウイルスを MOI 3 で接種した Vero 細胞について、12 時間後に回収し、可溶化したものについてヌクレアーゼ活性を測定した。グラフにはトリPLICATEで行った実験で得られた結果の平均値と標準誤差を示した。
(* ; p<0.01)

B：ヌクレアーゼ活性に供したサンプルにおける UL12 量

A でヌクレアーゼ活性用に供したサンプルについて SDS-PAGE 後、UL12 抗体を用いてウェスタンブロットにて検出した。図には各実験の代表的な結果を示した。

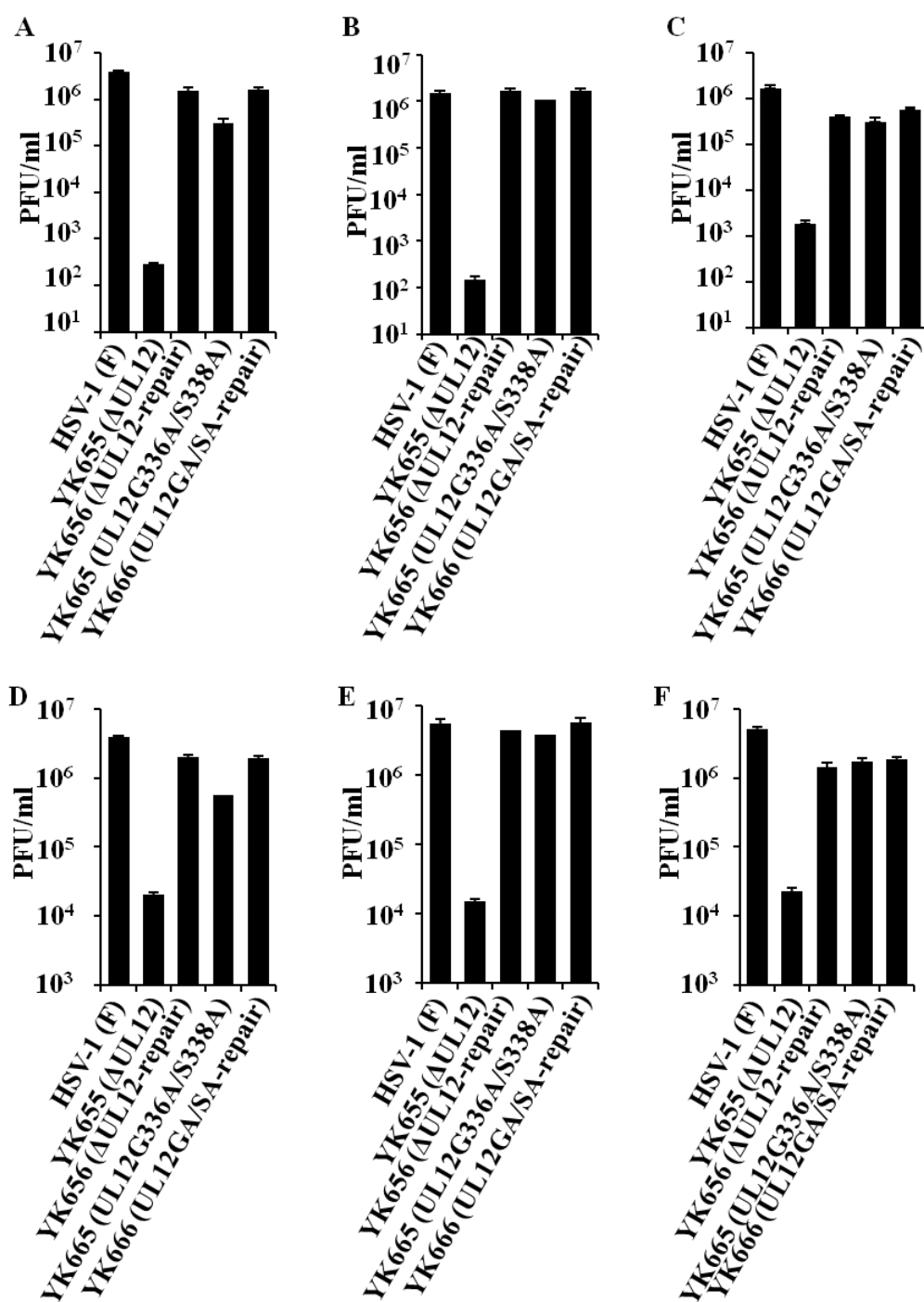


図 7：各変異体ウイルス感染細胞におけるウイルス産生量

各変異体ウイルスを Vero 細胞 (A、D)、HEL 細胞 (B、E) または A549 細胞 (C、F) へ MOI 0.01 (A-C) 又は MOI 3 (D-F) で接種し、それぞれ感染 48 時間後、24 時間後に回収したサンプルの細胞内外のウイルス量を 6-5 細胞を用いてプラークアッセイで測定した。グラフにはトリプリケートで行った実験で得られた結果の平均値と標準誤差を示した。

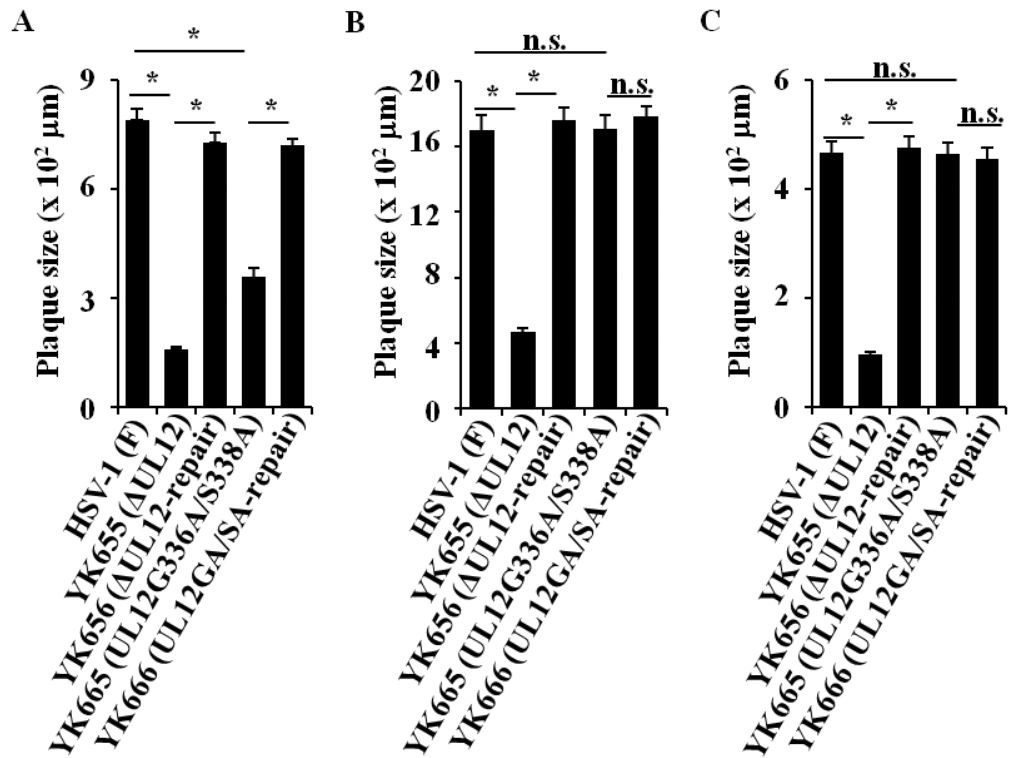


図 8 : 各ウイルス感染細胞におけるプラークサイズ

Vero 細胞 (A)、HEL 細胞 (B)、A549 細胞 (C)へ各変異体ウイルスをそれぞれ MOI 0.0001、MOI 0.001、MOI 0.00001 にて感染し、感染 48 時間後に各 25 個のプラークサイズを測定した。グラフには得られた結果の平均値と標準誤差を示した。(* ; $p < 10^{-8}$)

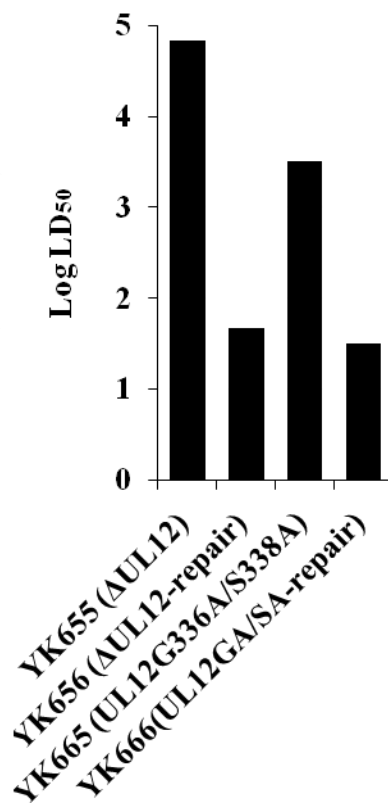


図 9：各変異体ウイルスをマウス脳内へ接種した際の LD₅₀

各変異体ウイルスを 10 倍階段希釈したものについて、6 匹の 3 週齢メスの ICR マウスへ脳内接種し、接種 14 日後の LD₅₀ 値を Behrens-Karbar 法を用いて算出した。

第 2 章

UL12 のリン酸化の生物学的意義の解明

2-1 要旨

質量解析と phos-tag SDS-PAGE 解析の結果 UL12 Y371 がリン酸化部位として同定された。本リン酸化は感染細胞において UL12 のヌクレアーゼ活性を制御していることが示唆された。また本リン酸化は感染細胞において、細胞種依存的に UL12 やその相互作用タンパクである ICP8 の局在や UL12 の発現量を制御し、ウイルス増殖についても制御していることが示唆された。

2-2 結果

UL12 リン酸化部位の同定

UL12 リン酸化部位の同定にあたり、LC-MS/MS を行った。その結果、表 2 に示したように 3 か所のリン酸化部位が同定された。この中で UL12 Y371 はアミノ酸配列が公表されている全てのヘルペスウイルスにおいて保存されていた。そこで、我々はこの UL12 Y371 のリン酸化に着目し、そのウイルス増殖における機能解析を行った。

まず、UL12 がリン酸化されることを phos-tag SDS-PAGE 解析により確認した。Phos-tag は二価の陽イオン存在時にリン酸化されたアミノ酸と選択的に複合体を形成するため、phos-tag SDS-PAGE 解析を行うとリン酸化状態のタンパクの移動度が小さくなり、リン酸化状態を検出できる(43)。リン酸化状態の UL12 が phos-tag SDS-PAGE 解析により検出できることを確認するために、293T 細胞に pMEF-UL12 をトランスフェクトしたものについて、λ フォスファターゼで処理したものと非処理のものを作製し、phos-tag SDS-PAGE 解析へ供した (図 11A)。結果、λ フォスファターゼ処理により白矢頭および灰色矢頭で示した泳動度の小さい 2 本のバンドの消失が観察され、かわりに黒矢頭のバンドの増強が観察された (図 11A)。すなわち、白矢頭および灰色矢頭で示した 2 本のバンドはリ

ン酸化状態の UL12 を、黒矢頭で示したバンドは非リン酸化状態の UL12 をそれぞれ表していると考えられ (図 11A)、本解析によりリン酸化状態の UL12 が検出できることが確認された。また、非リン酸化状態の UL12 バンドはλフォスファターゼ非処理時には微弱であったが、λフォスファターゼ処理により本バンドが顕著に増強したことから (図 11A、黒矢頭)、UL12 は細胞内において高度にリン酸化されていることが示唆された。

次に、UL12 Y371 が実際にリン酸化されていることの確認を行った。293T 細胞に pMEF-UL12 (野生体)、pMEF-UL12G336A/S338A (ヌクレアーゼ活性消失変異体)、pMEF-UL12Y371F (UL12 Y371 リン酸化部位変異体) をトランスフェクトしたものについて Phos-tag SDS-PAGE 解析を行った (図 11B)。結果、変異体のコントロールである pMEF-UL12G336A/S338A 導入細胞においては野生体である pMEF-UL12 導入細胞と同様のバンドパターンを示したが、リン酸化消失変異体である pMEF-UL12Y371F 導入細胞においては最も泳動度の小さい白矢頭で示したバンドの消失が確認された (図 11B)。すなわち、図 11B の白矢頭で示したバンドの消失は UL12 に変異を加えたことに起因するものではないことを示唆しており、更に本バンドは図 11A においてλフォスファターゼ処理により消失していることから、図 11B の白矢頭で示したバンドが UL12 Y371 のリン酸化状態を特異的に表したものであり、UL12 Y371 がリン酸化されるというこ

とが示唆された。

ここで、UL12.5 は UL12 のアミノ酸配列と一部重複しており、UL12 Y371 はこの中に含有されることから（図 12）（17, 23, 24）、UL12.5 のこの部位についてもリン酸化されている可能性があることを考慮する必要がある。

UL12 Y371 のリン酸化は細胞種依存的に UL12 発現量が変化する

HSV-1 感染時における UL12 Y371 のリン酸化の機能を解析するにあたり、UL12 Y371 のチロシンをフェニルアラニンに置換することで非リン酸化変異体ウイルスを作製した(図 12)。また、本ウイルスの復帰株、および本リン酸化部位をグルタミン酸に置換することで恒常的リン酸化模倣株についても作製した（図 12）。

これらの作製したウイルス感染細胞において、まず、UL12 の発現量について確認を行った。細胞量のコントロールとして α -tubulin、感染量のコントロールとして HSV がコードするウイルスタンパクである VP22 を認識する抗体をそれぞれ用いた（図 13）。Vero 細胞へ各変異体ウイルスを接種し、12 時間後にそれぞれのタンパク発現をウェスタンブロット法にて観察した。図 13 へ示したように、mock および UL12 欠損株である YK655 (Δ UL12)を感染させたものでは UL12 は検出されなかった。一方、リン酸化部位変異株である YK660 (UL12Y371F)感染

細胞では野生株である HSV-1(F)やその復帰株、YK661 (UL12Y371F-repair)感染細胞と同レベルの UL12 バンドが検出された (図 13)。また、恒常的リン酸化模倣株である YK662 (UL12Y371E)感染細胞についても同様の結果が得られた (図 13)。本結果より、UL12 Y371 のリン酸化は Vero 細胞における UL12 の発現レベルに影響しないことが示唆された。A549 細胞においても同様な結果が得られた (図 13)。

一方、HEL 細胞において、同様に各変異体ウイルス感染細胞について UL12 の発現量を確認したところ、リン酸化部位変異株 YK660 (UL12Y371F)感染細胞において、野生株である HSV-1 や復帰株 YK661 (UL12Y371F-repair)、恒常的リン酸化模倣株 YK662 (UL12Y371E)感染細胞と比較して、著しく UL12 の発現量が低下していることが観察された (図 13)。本結果より、UL12 Y371 のリン酸化は HEL 細胞において UL12 の発現量を制御していることが示唆された。

UL12 Y371 のリン酸化は UL12 のヌクレアーゼ活性を制御する

UL12 はヌクレアーゼ活性を持つため、UL12 Y371 のリン酸化によるヌクレアーゼ活性への影響を検証した。ここで、先行研究において UL12 (-) /UL12.5 (-) ウイルスと比較して UL12 (-) /UL12.5 (+) ウイルスにおいてヌクレアーゼ活性レベルが変化しなかったことから、UL12.5 のヌクレアーゼ活性への影響に

については省くことができる(17)。Vero 細胞へ各変異体ウイルスを MOI 3 で接種し、12 時間後に回収、可溶化したサンプルについて実験方法に従いヌクレアーゼ活性を測定した (図 14A)。また、同ライセートを用いてウェスタンブロット法により、各ライセートの UL12 可溶化量が同量であることを確認した(図 14B)。

図 14A へ示したように、リン酸化部位変異株である YK660 (UL12Y371F)感染細胞においては UL12 欠損株である YK655 (Δ UL12)および UL12 ヌクレアーゼ活性欠損株である YK665 (UL12G336A/S338A)感染細胞と同等にヌクレアーゼ活性が低下した。また、復帰株である YK661 (UL12Y371F-repair)や恒常的リン酸化模倣株である YK662 (UL12Y371E)感染細胞において野生株感染細胞と同レベルまでヌクレアーゼ活性が復帰した (図 14A)。以上の結果より、UL12 Y371 のリン酸化は、UL12 のヌクレアーゼ活性能を強く制御していることが示唆された。

A549 細胞においても同様の結果が得られた (図 14E、F)。一方 HEL 細胞においてもやはり、リン酸化部位変異株である YK660 (UL12Y371F)感染細胞においては UL12 欠損株である YK655 (Δ UL12)および UL12 ヌクレアーゼ活性欠損株である YK665 (UL12G336A/S338A)感染細胞と同等にヌクレアーゼ活性が低下し、また復帰株である YK661 (UL12Y371F-repair)や恒常的リン酸化模倣株である YK662 (UL12Y371E)感染細胞において野生株感染細胞と同レベルまでヌクレアーゼ活性が復帰したことから (図 14C)、UL12 Y371 のリン酸化は UL12 のヌク

レアーゼ活性能を強く制御していることが示唆された。しかし、同ライセートを用いてウェスタンブロット法により、各ライセートの UL12 可溶化量を確認したところ、図 13 における感染細胞における UL12 の発現量の結果と一致して、リン酸化部位変異株である YK660 (UL12Y371F)感染細胞においては復帰株である YK661 (UL12Y371F-repair)や野生株感染細胞と比較してライセート内の UL12 可溶化量が減少していた (図 14D)。

UL12 Y371 のリン酸化は UL12 およびその相互作用タンパク ICP8 の局在を制御する

Vero 細胞において、UL12 Y371 のリン酸化が UL12 の感染細胞における局在を制御するか否かについて免疫蛍光抗体法を用いて検証した (図 15)。また、ICP8 は UL12 と相互作用することでウイルス DNA 複製における相同性組み換えに働くことが示唆されていることから(32-35, 40)、ICP8 の局在についても同時に検証を行った (図 15)。野生株感染細胞においては先行報告通り、UL12 は核内に瀰漫性に局在し、ICP8 は核内で replication compartment 様の構造を形成していた(図 15 a-c)(44, 45)。興味深いことに、UL12 欠損ウイルスである YK655 (Δ UL12)感染細胞においては一部 replication compartment 様構造形成不全を起こしているものがあつた (図 15d-f)。この replication compartment 様構造形成不全は復帰株で

ある YK656 (Δ UL12-repair)感染細胞において消失したことより (図 15g-i)、UL12 は ICP8 の適切な局在および replication compartment 様構造の形成に必須ではないもののある程度寄与していることが示唆された。一方、リン酸化部位変異株である YK660 (UL12Y371F)感染細胞においては、UL12 は核内に局在するものの野生株とは著しく異なる局在を示し、また ICP8 の局在もそれに伴い変化し、UL12 が局所に粒状に局在している周辺へ ICP8 が集積している様子が観察された (図 15 j-l)。また、YK660 (UL12Y371F)感染細胞における UL12 および ICP8 の局在変化は、復帰株である YK661 (UL12Y371F-repair)や恒常的リン酸化模倣株である YK662 (UL12Y371E)感染細胞において認められなかったことから(図 15 m-r)、UL12 Y371 のリン酸化は UL12 の細胞内局在を制御しており、これに伴い ICP8 のそれについても制御していることが示唆された。ここで、UL12 ヌクレアーゼ活性消失株である YK665 (UL12G336A/S338A)感染細胞においては、UL12、ICP8 共に野生株やその復帰株である YK666 (UL12GA/SA-repair)と同様な局在を示したことから(図 15 a-c, s-x)、UL12 Y371 のリン酸化はヌクレアーゼ活性以外の機能についても制御していることが示唆された。

HEL 細胞においても同様の実験を行ったところ、野生株感染細胞や UL12 欠損ウイルスである YK655 (Δ UL12)感染細胞、UL12 ヌクレアーゼ活性消失株である YK665 (UL12G336A/S338A)感染細胞またこれらの復帰株感染細胞において

はそれぞれ Vero 細胞と同様の局在を示した(図 15 a-i, s-x、図 16 a-i, s-x)。一方、リン酸化部位変異株である YK660 (UL12Y371F)感染細胞においては、UL12 は野生株感染細胞と同様、核内に瀰漫性に局在するものの、その蛍光強度については減弱していた (図 16 j)。本表現系は図 13 において、リン酸化部位変異株である YK660 (UL12Y371F)を感染させた HEL 細胞において UL12 の発現量が低下したという結果と一致する。また、本変異体ウイルス感染細胞において ICP8 の局在については野生株と比較して変化は見られなかった (図 16 k)。また、これらの表現型は復帰株である YK661 (UL12Y371F-repair)や恒常的リン酸化模倣株である YK662 (UL12Y371E)感染細胞において復帰が見られた(図 16 m-r)。本結果より、HEL 細胞において UL12 Y371 のリン酸化は UL12 の発現量を制御していることが更に支持され、局在制御については関与していないことが示唆された。

また、A549 細胞において同様の実験を行ったところ、野生株感染細胞や UL12 欠損ウイルスである YK655 (Δ UL12)感染細胞、UL12 ヌクレアーゼ活性消失株である YK665 (UL12G336A/S338A)感染細胞またこれらの復帰株感染細胞においてはそれぞれ Vero 細胞と同様の局在を示した(図 15 a-i, s-x、図 17 a-i, s-x)。一方、リン酸化部位変異株である YK660 (UL12Y371F)を感染させた A549 細胞においては Vero 細胞で得られた表現系とは異なり、UL12 および ICP8 は野生株感染細胞と同様の局在を示した(図 15 j-l、図 17 j-l)。本結果より、A549 細胞におい

では UL12 Y371 のリン酸化は Vero 細胞とは異なり、UL12 および ICP8 の局在を制御しないことが示唆された。

以上の結果より、UL12 Y371 のリン酸化は細胞種依存的に UL12 およびその相互作用タンパクである ICP8 の局在を制御していることが示唆された。

UL12 Y371 のリン酸化は培養細胞におけるウイルス増殖に寄与する

ここまでの結果より、UL12 Y371 のリン酸化は Vero 細胞においては UL12 のヌクレアーゼ活性能及び UL12 とその相互作用タンパクである ICP8 の局在を制御していることが、HEL 細胞においては UL12 のヌクレアーゼ活性能および UL12 の発現量を制御していることが、A549 細胞においてはヌクレアーゼ活性能のみを制御していることがそれぞれ示唆された。そこで、これらの表現系が実際に培養細胞におけるウイルス増殖へ関与するかについて検証を行った。先行研究において、UL12.5 は培養細胞におけるウイルス増殖には重要でないことが示されているため、本研究において UL12.5 の影響は省くことができる(17)。ヘルペスウイルスにおいてウイルス増殖環が 1 周するにあたり約 24 時間要することから(1)、1 周当たりのウイルスの増殖性を MOI 3 で感染させ 24 時間後に回収したサンプルを用いて、複数回ウイルス増殖環を経たウイルスの増殖性を MOI 0.01 で感染させ 48 時間後に回収したサンプルを用いて検証を行った。

Vero 細胞において MOI 0.01 で感染させ 48 時間後に回収したサンプルにおいては、リン酸化部位変異株である YK660 (UL12Y371F)を感染させた場合は、野生株を感染させた場合と比較して約 1/130 に、復帰株である YK661 (UL12Y371F-repair)を感染させた場合と比較して約 1/30 にウイルス力価が低下した (図 18A)。また、本表現系は恒常的リン酸化模倣株である YK662 (UL12Y371E)において復帰が見られたことから (図 18A)、UL12 Y371 のリン酸化は Vero 細胞におけるウイルス増殖に寄与していることが示唆された。ここで、UL12 ヌクレアーゼ活性消失株である YK665 (UL12G336A/S338A)を感染させた場合は野生株を感染させた場合と比較して約 1/20 に、復帰株である YK666 (UL12G336A/S338A-repair)を感染させた場合と比較して 1/7 にウイルス力価が低下しており、本ウイルスの増殖性の減弱度はリン酸化部位変異株である YK660 (UL12Y371F)と比較して弱いものであった (図 18A)。本結果より、Vero 細胞において、UL12 Y371 のリン酸化はヌクレアーゼ活性以外の機能を制御していることが更に支持された。一方、MOI 3 で感染させ 24 時間後に回収したサンプルでは、リン酸化部位変異株である YK660 (UL12Y371F)を感染させた場合は野生株を感染させた場合と比較して約 1/10 に、復帰株である YK661 (UL12Y371F-repair)を感染させた場合と比較して約 1/7 にウイルス力価が低下した (図 18D)。ここで、UL12 ヌクレアーゼ活性消失株である YK665

(UL12G336A/S338A)を感染させた場合は野生株を感染させた場合と比較して約 1/10 に、復帰株である YK666 (UL12G336A/S338A-repair)を感染させた場合と比較して 1/7 にウイルス力価が低下しており、本ウイルスの増殖性の減弱度はリン酸化部位変異株である YK660 (UL12Y371F)と同等であった (図 18D)。

HEL 細胞において MOI 0.01 で感染させ 48 時間後に回収したサンプルにおいては、リン酸化部位変異株である YK660 (UL12Y371F)を感染させた場合は、野生株を感染させた場合と比較して約 1/8 に、復帰株である YK661 (UL12Y371F-repair)と比較して約 1/10 にウイルス力価が低下した (図 18B)。また、本表現系は恒常的リン酸化模倣株である YK662 (UL12Y371E)を感染させた際に復帰が見られたことから (図 18B)、UL12 Y371 のリン酸化は HEL 細胞におけるウイルス増殖に寄与していることが示唆された。また、MOI 3 で感染させ 24 時間後に回収したサンプルにおいても同様の結果が得られた (図 18E)。ここで、図 13 において HEL 細胞へリン酸化部位変異株である YK660 (UL12Y371F)を感染させた際に UL12 の発現が低下することが確認されている。HEL 細胞においても他の細胞と同様 UL12 欠損株においてウイルスの増殖性が著しく低下することから (図 18B、E)、HEL 細胞においてリン酸化部位変異株である YK660 (UL12Y371F)の増殖性が低下した原因は UL12 の発現量の低下によるものである可能性があると考えられる。

また、A549 細胞において MOI 0.01 で感染させ 48 時間後に回収したサンプルにおいては、YK660 (UL12Y371F)を感染させた場合は野生株を感染させた場合と比較して約 1/8 に、復帰株である YK666 (UL12G336A/S338A-repair)を感染させた場合と比較して 1/3 にウイルス力価が低下しているものの、これらの変化は微弱であった (図 18C)。MOI 3 で感染させ 24 時間後に回収したサンプルにおいても同様の結果が得られた (図 18F)。本結果より、A549 細胞においては UL12 Y371 のリン酸化のウイルス増殖への寄与は微小なものであることが示された。リン酸化部位変異株である YK660 (UL12Y371F)の増殖性が野生株と比較して顕著に低下した Vero 細胞においては UL12 や ICP8 の局在に変化が見られたが (図 15 j-i、図 18A, D)、増殖性にあまり変化が見られなかった A549 細胞においてはこれらの局在に変化が見られなかった (図 17j-i、図 18C, F)。本結果より、Vero 細胞においては UL12 Y371 のリン酸化が UL12 及びその相互作用タンパクである ICP8 の局在を制御することが培養細胞におけるウイルス増殖において重要である可能性が考えられる。

以上の結果より、UL12 Y371 のリン酸化は細胞種依存的にウイルス増殖を制御していることが示唆された。

UL12 Y371 のリン酸化は細胞間伝播に寄与する

先行研究において、UL12 欠損によりウイルスの細胞間伝播が阻害され、プラークサイズが減弱することが示されている(17)。

MOI 0.01 にてリン酸化部位変異株である YK660 (UL12Y371F)接種時に増殖に低下が見られた Vero 細胞において、YK660 (UL12Y371F)が形成するプラークサイズは野生株や復帰株である YK661 (UL12Y371F-repair)、恒常的リン酸化模倣株である YK662 (UL12Y371E)が形成するものと比較して約 1/2 に減弱した(図 18A、図 19A)。これらのウイルスの増殖性に顕著な変化が見られなかった A549 細胞ではプラークサイズにも変化が見られなかった(図 18C、図 19C)。一方、HEL 細胞では MOI 0.01 にて接種時にリン酸化部位変異株である YK660 (UL12Y371F)で増殖に低下が見られたにも拘らず、形成するプラークサイズは野生株や復帰株である YK661 (UL12Y371F-repair)が形成するものと同等であった(図 18B、図 19B)。また、図 19 における YK660 (UL12Y371F)接種時における各細胞で形成されたプラークサイズの結果は、図 18 における UL12 ヌクレアーゼ活性消失株である YK665 (UL12G336A/S338A)接種時のウイルス力価の結果と類似していた。ここで、YK660 (UL12Y371F)は YK665 (UL12G336A/S338A)と同等にヌクレアーゼ活性が消失していることから(図 14)、ヌクレアーゼ活性が細胞種依存的にウイルスの細胞間伝播に寄与している可能性が考えられる。

UL12 Y371 のリン酸化はマウスにおける神経病原性に寄与する

これまでの結果より、UL12 Y371 のリン酸化はヌクレアーゼ活性非依存的な機能についても制御しており、また細胞種依存的にウイルス増殖に寄与していることが示唆された(図 18)。そこで、実際に UL12 Y371 のリン酸化のマウスにおける病原性発現における意義の検証を行った。

各変異体ウイルスを 10 倍階段希釈したものをマウスの脳内へ接種し、接種 14 日後に LD₅₀ を算出した(図 20)。リン酸化部位変異株である YK660 (UL12Y371F)における LD₅₀ は野生株や復帰株である YK661 (UL12Y371F-repair)と比較して約 100 倍となり、更に本表現系は恒常的リン酸化模倣株である YK662 (Y371E)において復帰した(図 20)。本結果より、UL12 Y371 のリン酸化はマウスにおける神経病原性に寄与することが示唆された。

ここで、ヌクレアーゼ活性を制御していることが示唆されたリン酸化部位変異株である YK660 (UL12Y371F)と UL12 ヌクレアーゼ活性消失株である YK665 (UL12G336A/S338A)はそれぞれの復帰株と比較して LD₅₀ が同程度増加していることから (図 14、図 20)、リン酸化部位変異株である YK660 (UL12Y371F)をマウス脳内に接種した場合の病原性の低下には主にヌクレアーゼ活性の低下が寄与していると考えられた。

2-3 考察

これまでに UL12 は感染細胞においてリン酸化することは知られていたものの、具体的なリン酸化部位や、UL12 リン酸化の意義は全く未知であった(46)。本研究の phos-tag SDS-PAGE 解析において λ -PPase 非処理時に UL12 はほぼ全てがリン酸化状態のバンドとして検出されることから、UL12 は細胞内で高度にリン酸化されていることが示唆された。また、質量解析によりそのリン酸化部位を 3 か所同定した。そしてこの中でアミノ酸配列が公開されている全てのヘルペスウイルス UL12 ホモログにおいて保存されている UL12 Y371 におけるリン酸化が機能的リン酸化であることが示唆された。

また、本研究により UL12 Y371 のリン酸化はヌクレアーゼ活性を制御しており、更にヌクレアーゼ活性非依存的な機能についても制御していることが示唆された。これは Vero 細胞において UL12 及びその相互作用タンパクである ICP8 の局在は、UL12 ヌクレアーゼ活性消失株である YK665 (UL12G336A/S338A)感染時はその復帰株である YK666 (UL12G336A/S338A-repair)や野生株感染時と同様であるが、リン酸化部位変異株である YK660 (UL12Y371F)感染時はその復帰株である YK661 (UL12Y371F-repair)や野生株と著しく異なり、恒常的リン酸化模倣株である YK662 (UL12Y371E)感染時には本表現系が復帰すること、HEL 細胞

において UL12 の発現量は UL12 ヌクレアーゼ活性消失株である YK665 (UL12G336A/S338A) 感染時にはその復帰株である YK666 (UL12G336A/S338A-repair)や野生株感染時と同等だが、リン酸化部位変異株である YK660 (UL12Y371F)感染時にはその復帰株である YK661 (UL12Y371F-repair)や野生株と比較して低下しており、恒常的リン酸化模倣株である YK662 (UL12Y371E)感染時には本表現系が復帰することによって支持される。

更に、UL12 Y371 のリン酸化はマウスにおける神経病原性に寄与することも示唆された。そして、UL12 Y371 のリン酸化は解析したいずれの培養細胞においても UL12 ヌクレアーゼ活性を制御していたこと、マウス脳内接種時の LD₅₀ 増加の割合はリン酸化部位変異株である YK660 (UL12Y371F)接種時とヌクレアーゼ活性消失株である YK665 (UL12G336A/S338A)接種時とでそれぞれの復帰株と比較した時同程度であったことから、UL12 Y371 のリン酸化によるマウスにおける神経病原性発現の制御は UL12 Y371 のリン酸化がヌクレアーゼ活性を制御することに起因する可能性が考えられる。

本研究において UL12 のヌクレアーゼ活性や UL12 Y371 のリン酸化が神経病原性発現に寄与していることが示唆されたが、どのように寄与しているかについての解析が今後の課題となる。具体的には、病原性の低下が脳内におけるウイルス増殖性の低下に起因するためか宿主免疫誘導を抑制することに起因する

ためかななどを検証するために、UL12 欠損株である YK655 (Δ UL12) やヌクレアーゼ活性消失株である YK665 (UL12G336A/S338A)、リン酸化部位変異株である YK660 (UL12Y371F)接種時のマウス脳内におけるウイルス量や抗原の広がり、サイトカインの誘導量等を測定する必要がある。また、*In vivo* において HSV-1 は上皮や粘膜組織から感染し、局所で増殖したのち、神経軸索内を逆行性に輸送され、神経細胞体に潜伏し、場合によっては脳炎をひき起こす(1, 15, 47)。本研究で行った病原性試験においては「脳炎をひき起こす」という点については評価可能であるが、それ以外のステップについて評価することはできない。すなわち、本研究においては評価できていない末梢でのウイルス増殖性、末梢における病原性、中枢へ到達するまでの輸送経路、およびその間に誘導される宿主免疫回避などに関与している可能性があると考えられる。今後は、末梢におけるウイルス感染時に UL12 ヌクレアーゼ活性及びそれ以外の UL12 の機能が重要であるか、重要であるならばどの段階に働いているかについて検証を行っていく必要がある。

今回、UL12 Y371 のリン酸化はヌクレアーゼ活性についても制御していることが示唆された。この上流キナーゼを同定することでヌクレアーゼ活性およびそれ以外の UL12 の機能を制御する機構を解明することができると考えられる。UL12 Y371 はデータベースでアミノ酸配列が公開されている全ヘルペスウイル

スの UL12 ホモログにおいて保存されていることから、本リン酸化の上流キナーゼはヘルペスウイルスに普遍的な抗ウイルス薬の標的となる可能性がある。そのためには、本研究で使用した HSV-1 以外のヘルペスウイルスにおいて UL12 Y371 相当のアミノ酸が機能的リン酸化部位であることを検証し、更に上流キナーゼの同定を行うことが今後必要である。

UL12 遺伝子は UL12 のみでなく UL12 の 127 番目のアミノ酸から始まる UL12.5 というウイルスタンパクについてもコードしていることが知られている (図 12) (17, 23, 24)。今回リン酸化部位として同定された UL12 Y371 は UL12.5 においてもリン酸化されている可能性があり、今回作製した変異体が UL12.5 としての機能に影響を与える可能性があることを述べておく必要がある。感染細胞において UL12.5 のヌクレアーゼ活性は定量できないレベルであり、培養細胞におけるウイルス増殖性には関与しないことが先行研究により示されているが (17)、*in vivo* における感染実験を行った先行研究は存在しない。本研究で行ったマウスを用いた神経病原性試験においては UL12.5 へ変異が入ることへの影響を考慮する必要がある。

表 2：質量解析により同定されたリン酸化部位とそのペプチド及びスコア

同定リン酸化部位	ペプチド	スコア
Y371	pYAFDPMDPSDPTASAYEDLMAHR	65
T474	HpTISPVSWSSGDLVR	49
S604	pSPGPGPAAAETTSSSPTTGR	121

p 付のアミノ酸は同定されたリン酸化部位を表す。

統計的に有意な ($p < 0.05$) スコアは 37 以上のものである。

表 3：変異体ウイルス作製時に使用したプライマー配列

Mutation	Sequence
YK660 (Y371F)	5'-GACCCCCCTAGCCTTTTACGAGGTCAAATGCCGGGCCAAGTTCG
	CTTTCGACCCCATGGACCCAGGATGACGACGATAAGTAGGG-3'
	5'-CGGAGGCCGTGGGGTCGCTGGGGTCCATGGGGTCGAAAGCGAACTT GGCCCGGCATTTGACCTCAACCAATTAACCAATTCTGATTAG-3'
YK661 (Y371F- repair)	5'-GACCCCCCTAGCCTTTTACGAGGTCAAATGCCGGGCCAAGTACGC
	TTTCGACCCCATGGACCCAGGATGACGACGATAAGTAGGG-3'
	5'-CGGAGGCCGTGGGGTCGCTGGGGTCCATGGGGTCGAAAGCGTACTT GGCCCGGCATTTGACCTCAACCAATTAACCAATTCTGATTAG-3'
YK662 (Y371E)	5'-GACCCCCCTAGCCTTTTACGAGGTCAAATGCCGGGCCAAGGAGG
	CTTTCGACCCCATGGACCCAGGATGACGACGATAAGTAGGG-3'
	5'-CGGAGGCCGTGGGGTCGCTGGGGTCCATGGGGTCGAAAGCGTCCTT GGCCCGGCATTTGACCTCAACCAATTAACCAATTCTGATTAG-3'

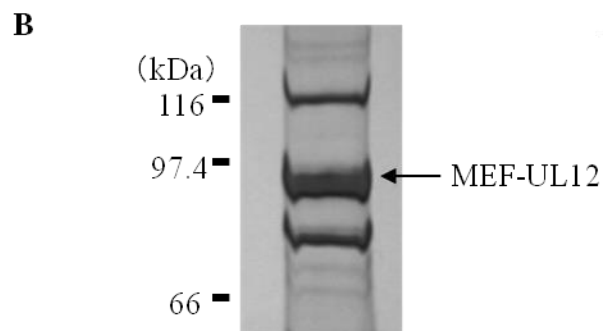
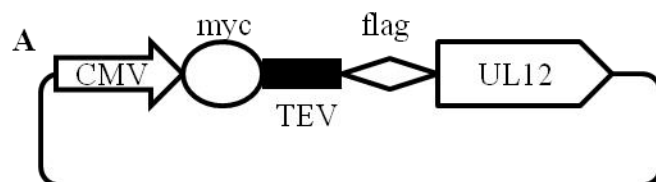


図 10：質量解析に用いたベクターおよびこれへ供したサンプルの銀染色像

A： pMEF-UL12 ベクター構造

B： pMEF-UL12 を 293T 細胞へトランスフェクション後 48 時間のライセートをタンデム免疫沈降、SDS-PAGE したものの銀染色像。矢印（MEF-UL12 に該当）を切り出し、質量解析へ供した。

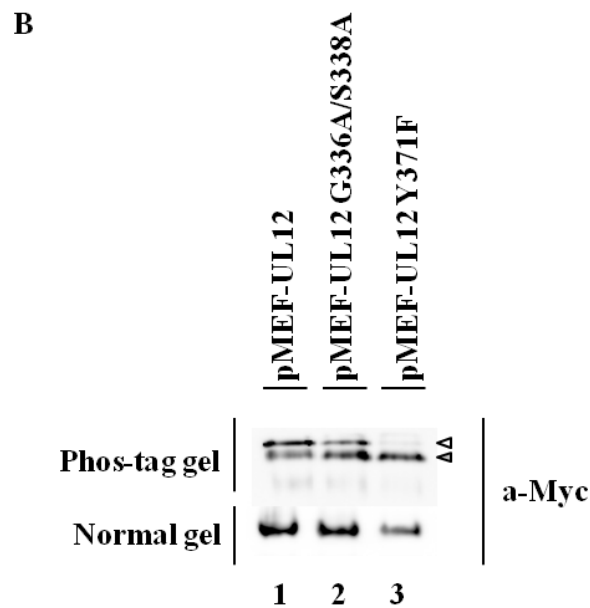
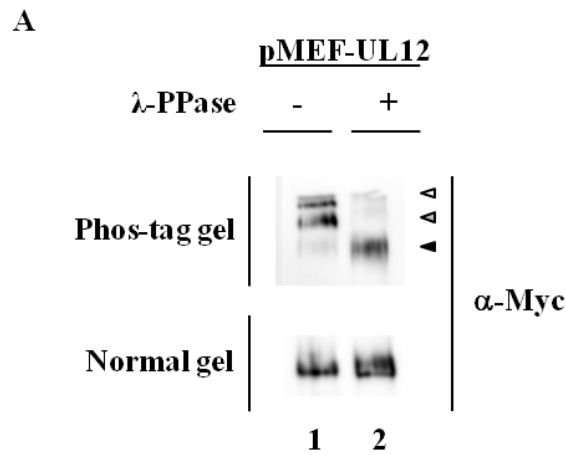


図 11 : MEF-UL12 トランスフェクション細胞における UL12 のリン酸化の検出

A. pMEF-UL12 を 293T 細胞へトランスフェクトし、ライセートについて phos-tag (+) SDS-PAGE (上段) または phos-tag (-) SDS-PAGE (下段) を行い、Myc 抗体でウェスタンブロットを行った。白矢頭および灰色矢頭は UL12 のリン酸化状態のバンドを表し、黒矢頭は UL12 の非リン酸化状態のバンドを表す。

B. pMEF-UL12 (1 列目)、pMEF-UL12 G336A/S338A (2 列目) または pMEF-UL12 Y371F (3 列目) を 293T 細胞へトランスフェクトし、ライセートについて phos-tag (+) SDS-PAGE (上段) または phos-tag (-) SDS-PAGE (下段) を行い、Myc 抗体でウェスタンブロットを行った。白矢頭は UL12 Y371 リン酸化バンドを表し、灰色矢頭は UL12 Y371 以外のリン酸化バンドを表す。

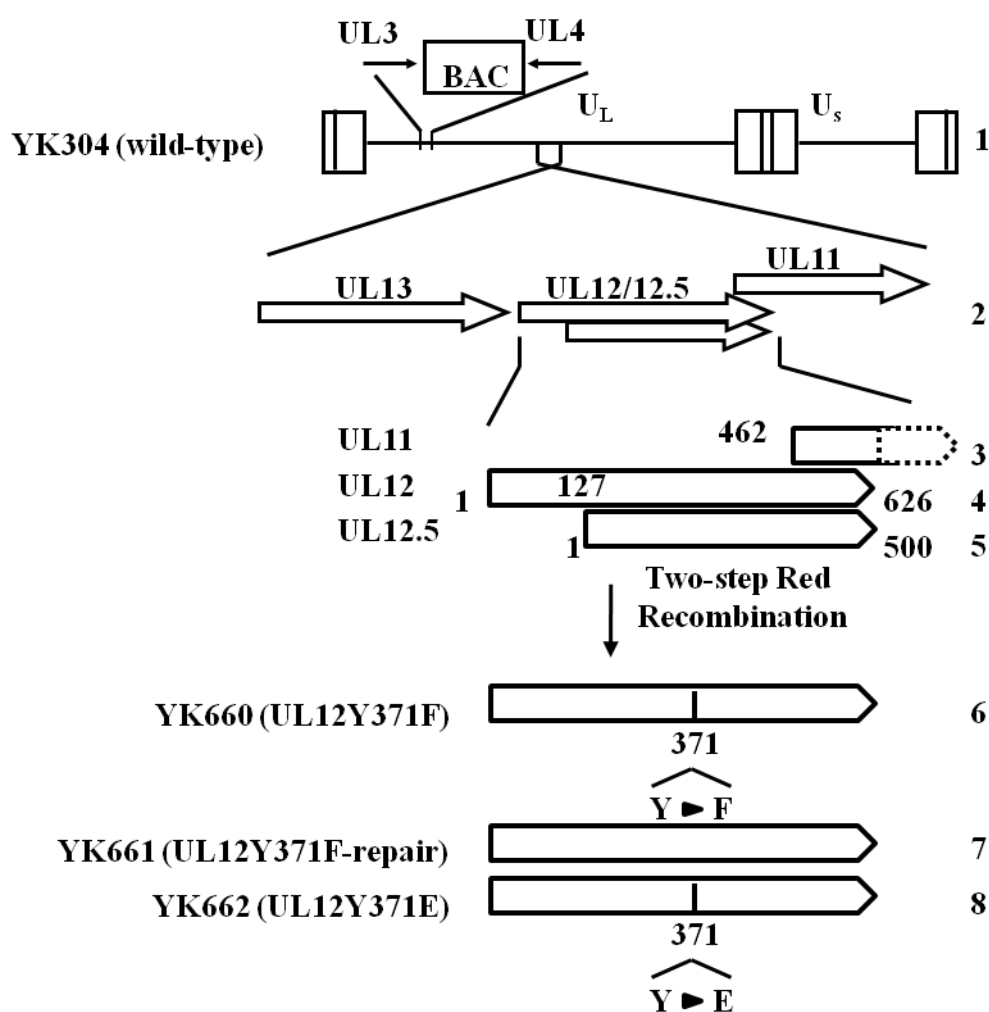


図 12：ウイルスゲノム構造と本研究で使したウイルス

YK304 (wild-type)ゲノム構造(1－5 行目)。Unique 配列は unique long (42)と unique short (Us)ドメインとして表した。YK304 ゲノムは bacmid (BAC)を UL3 と UL4 遺伝子間に挿入されている。YK304 を親株とした、UL12-Tyr371 をフェニルアラニン置換したウイルス YK660 (UL12Y371F)とその復帰株 YK661 (UL12Y371F-repair)および恒常的リン酸化模倣株 YK662 (UL12Y371E) の模式図(6－8 行目)。

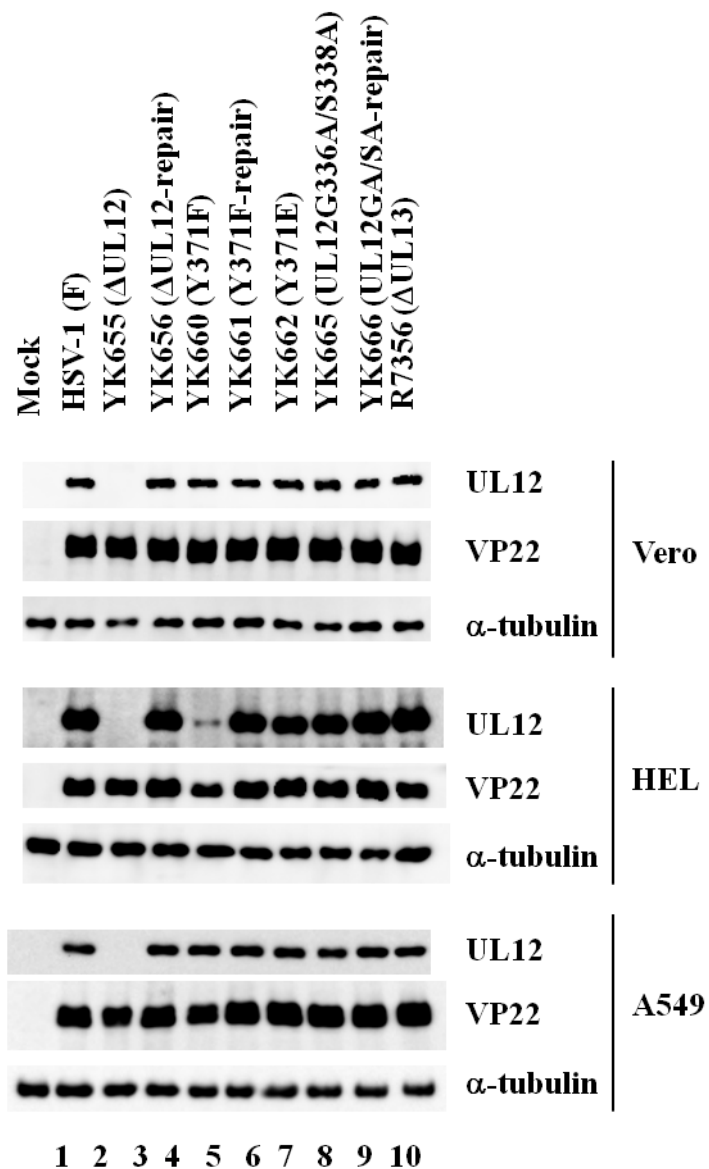


図 13：各変異体ウイルスにおけるウイルスタンパク発現量

mock (1 列目) もしくは HSV-1 (F) (2 行目)、YK655 (ΔUL12) (3 行目)、YK656 (ΔUL12-repair) (4 行目)、YK660 (UL12Y371F) (5 行目)、YK661 (UL12Y371F-repair) (6 行目)、YK662 (UL12Y371E) (7 行目)、YK665 (UL12G336A/S338A) (8 行目)、YK666 (UL12GA/SA-repair) (9 行目) 又は R7356 (ΔUL13) (10 行目) を MOI 3 で接種した Vero 細胞 (上段)、HEL 細胞 (中段)、A549 細胞 (下段) について、12 時間後に回収したものを SDS-PAGE 後、UL12、VP22 および α-tubulin 抗体を用いてウェスタンブロットにて検出した。

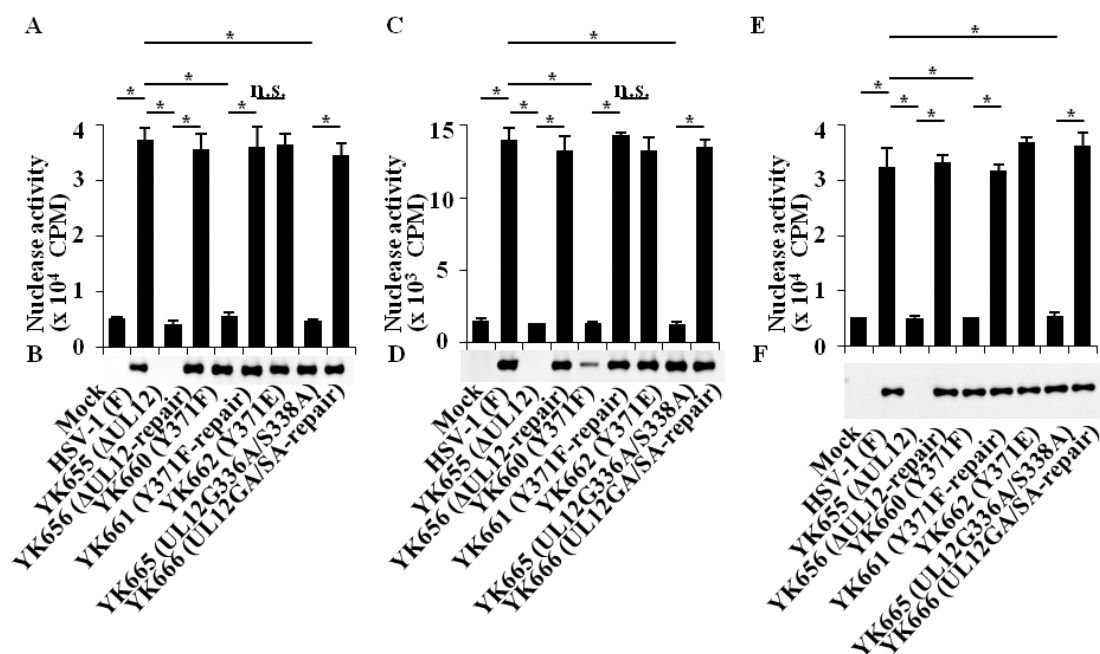


図 14：各変異体ウイルス感染細胞におけるヌクレアーゼ活性

A、C、E：各変異体ウイルスにおけるヌクレアーゼ活性

mock もしくは各変異体ウイルスを MOI 3 で接種した Vero 細胞 (A)、HEL 細胞 (B) または A549 細胞 (C) について、12 時間後に回収し、可溶化し、ヌクレアーゼ活性を測定した。

グラフにはトリPLICATEで行った実験で得られた結果の平均値と標準誤差を示した。(* ; p<0.01)

B、D、F：ヌクレアーゼ活性に供したサンプルにおける UL12 量

A、C、E でヌクレアーゼ活性用に供したサンプルについて SDS-PAGE 後、UL12 抗体を用いてウェスタンブロットにて検出した。図には各実験の代表的な結果を示した。

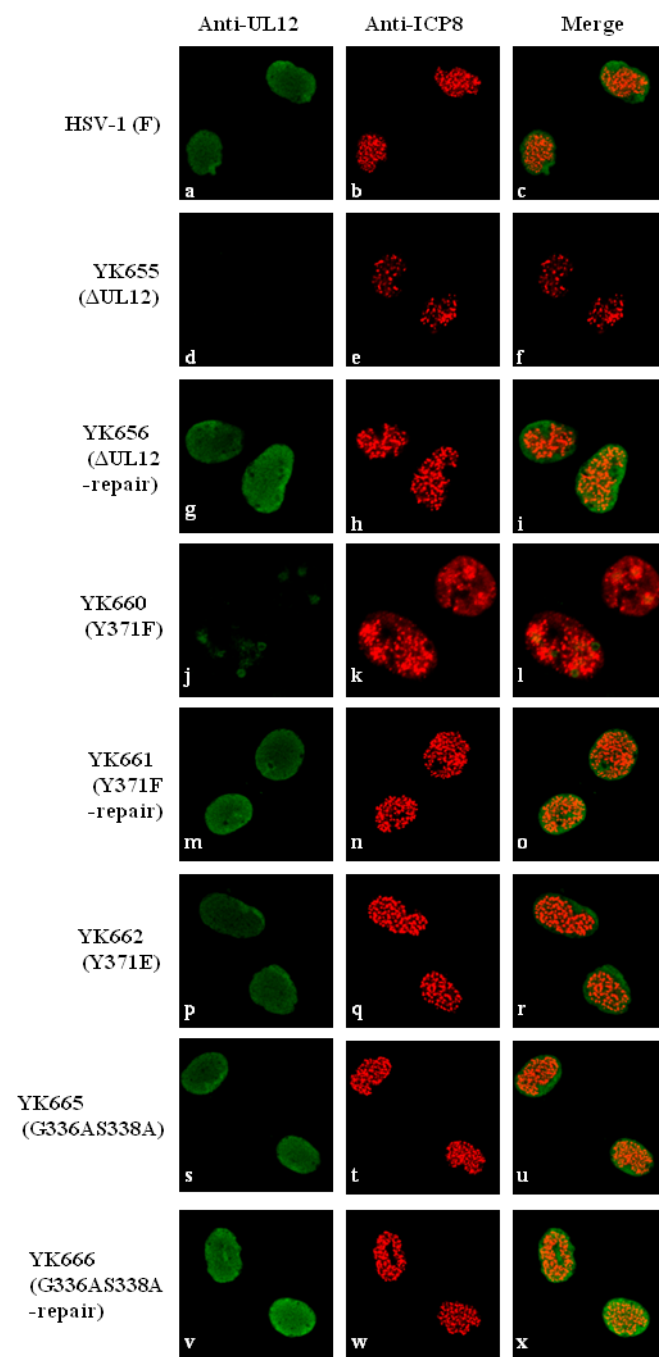


図 15：感染細胞における UL12 および ICP8 の局在

Vero 細胞へ各変異体ウイルスを MOI 10 で接種し、接種 12 時間後に固定した後、UL12 抗体および ICP8 抗体を用いた蛍光抗体法で染色し、共焦点顕微鏡で観察した。

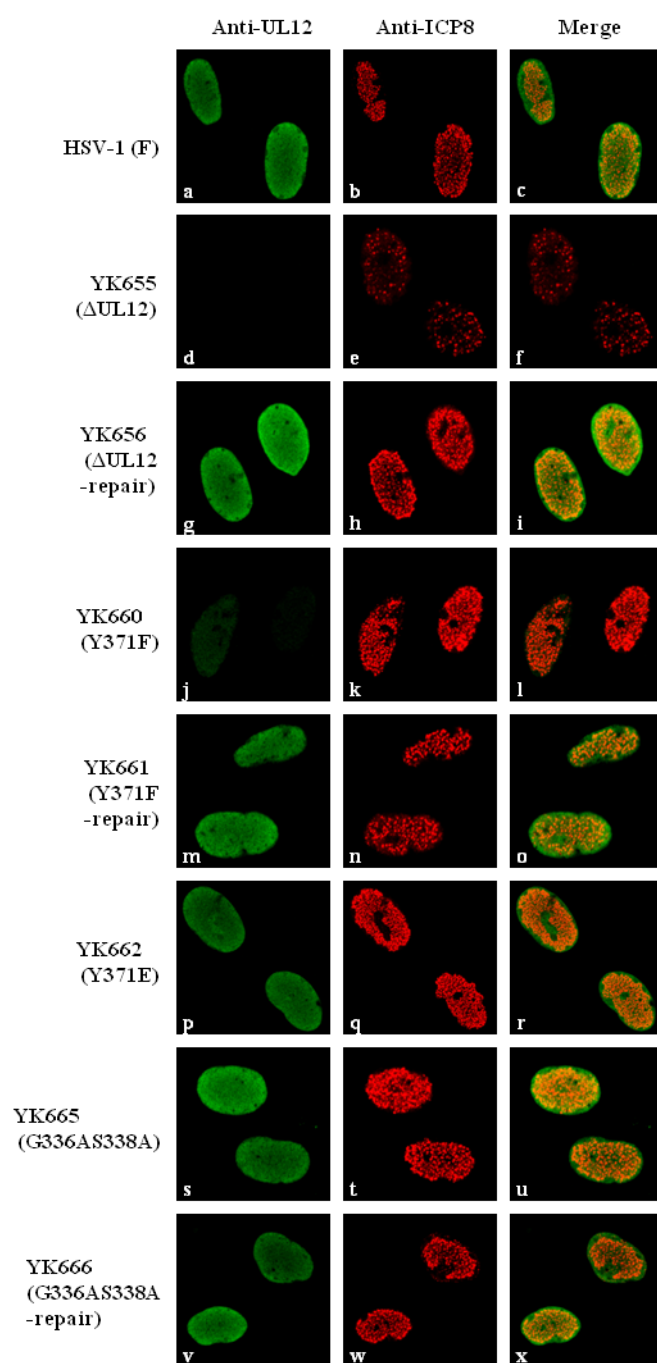


図 16：感染細胞における UL12 および ICP8 の局在

HEL 細胞へ各変異体ウイルスを MOI 10 で接種し、接種 12 時間後に固定した後、UL12 抗体および ICP8 抗体を用いた蛍光抗体法で染色し、共焦点顕微鏡で観察した。

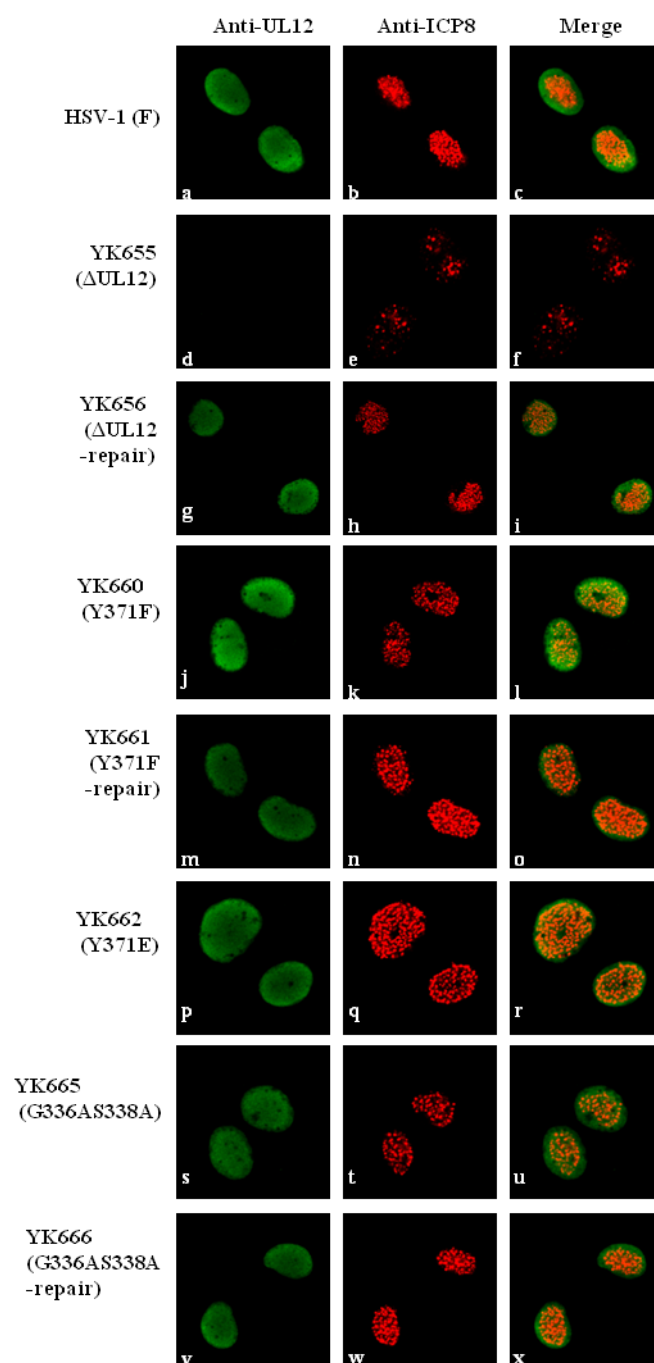


図 17：感染細胞における UL12 および ICP8 の局在

A549 細胞へ各変異体ウイルスを MOI 10 で接種し、接種 12 時間後に固定した後、UL12 抗体および ICP8 抗体を用いた蛍光抗体法で染色し、共焦点顕微鏡で観察した。

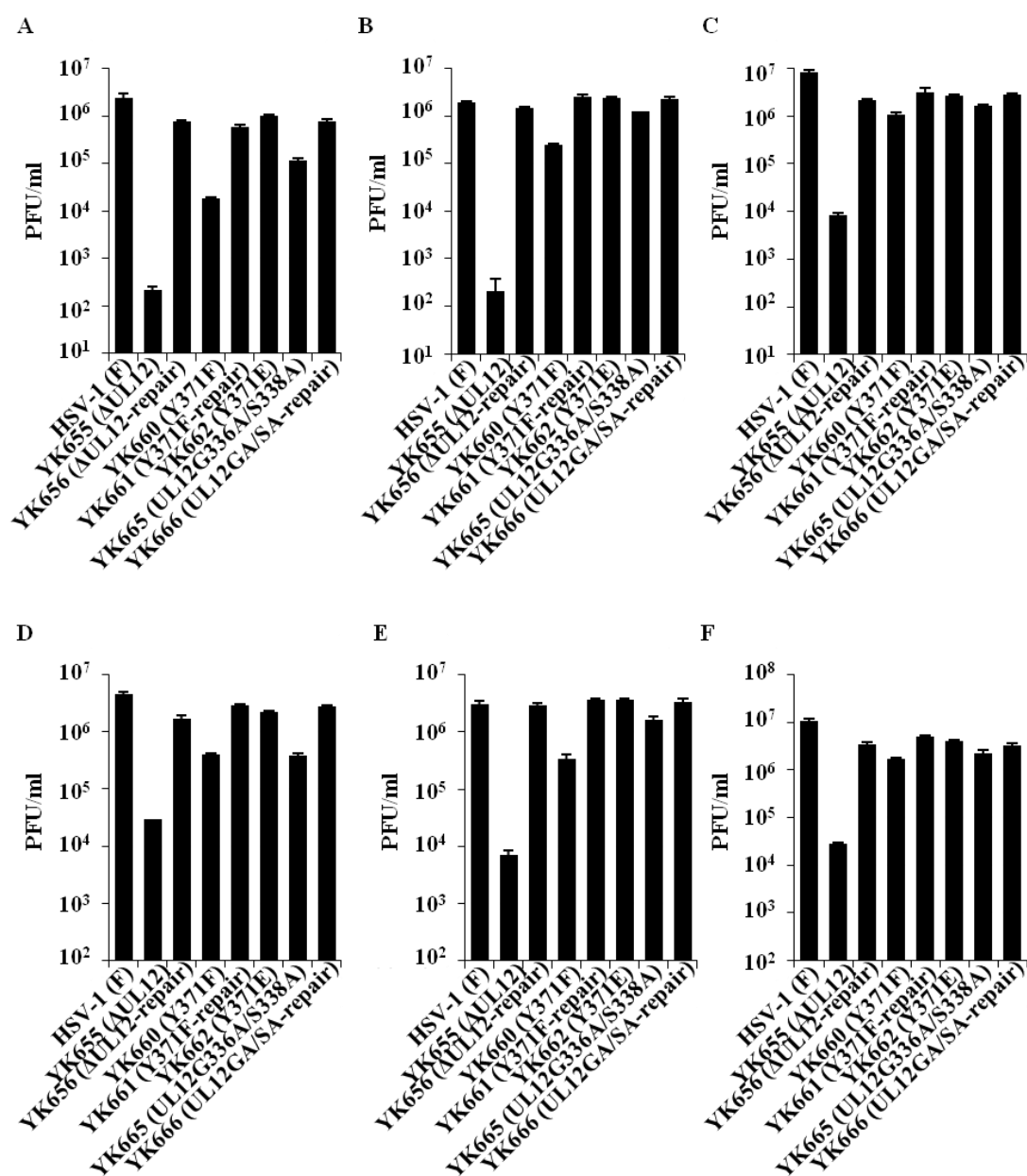


図 18：各変異体ウイルス感染細胞におけるウイルス産生量

各変異体ウイルスを Vero 細胞 (A、D)、HEL 細胞 (B、E) または A549 細胞 (C、F) へ MOI 0.01 (A、C、E) 又は MOI 3 (B、D、F) で接種し、それぞれ感染 48 時間後、24 時間後に回収したサンプルの細胞内外のウイルス量を 6-5 細胞を用いてプラークアッセイで測定した。グラフにはトリPLICATEで行った実験で得られた結果の平均値と標準誤差を示した。

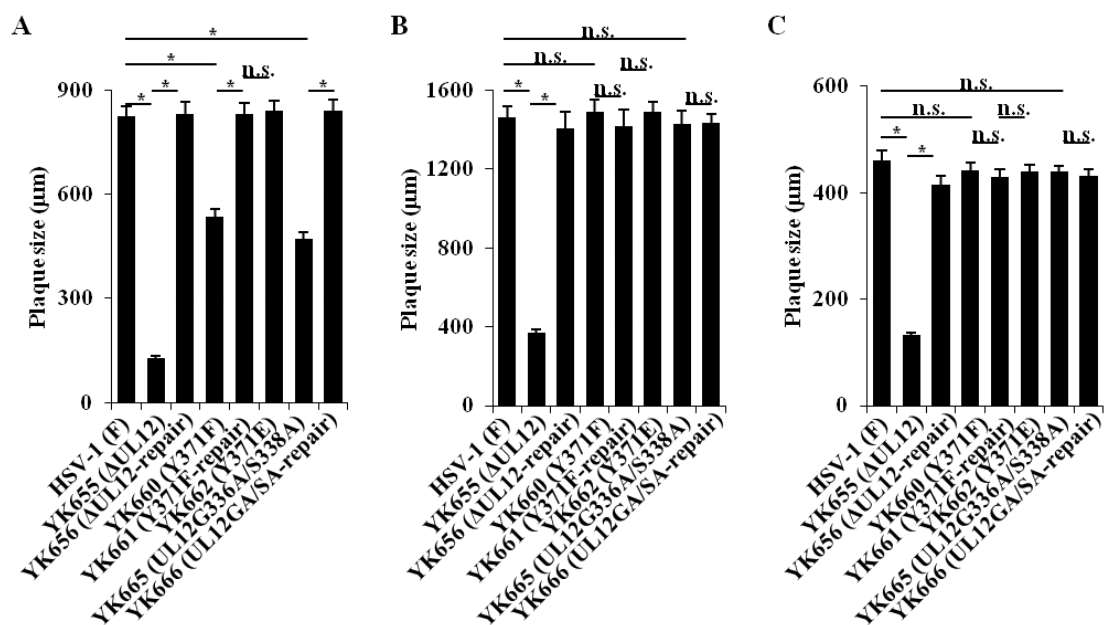


図 19：各ウイルス感染細胞におけるプラークサイズ

Vero 細胞 (A)、HEL 細胞 (B)、A549 細胞 (C)へ各変異体ウイルスをそれぞれ MOI 0.0001、MOI 0.001、MOI 0.00001 にて感染し、感染 48 時間後に各 25 個のプラークサイズを測定した。グラフには得られた結果の平均値と標準誤差を示した。(* ; $p < 10^{-6}$)

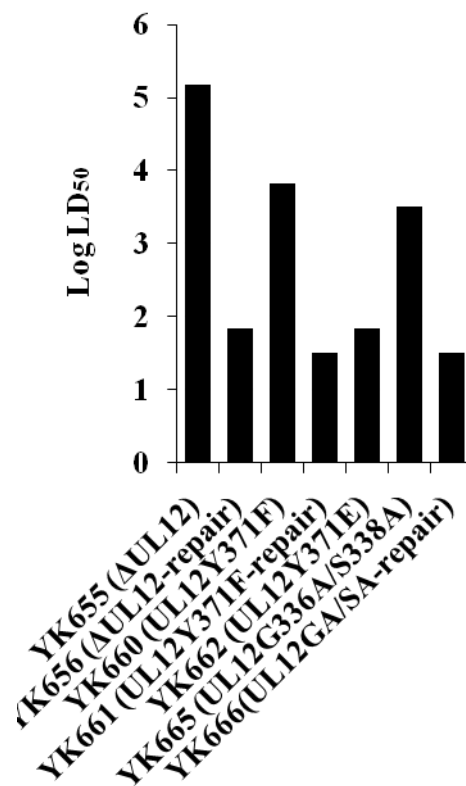


図 20：各変異体ウイルスをマウス脳内へ接種した際の LD₅₀

各変異体ウイルスを 10 倍階段希釈したものについて、3 匹の 3 週齢メスの ICR マウスへ脳内接種し、接種 14 日後の LD₅₀ 値を Behrens-Karbar 法を用いて算出した。

総括

第一章では、これまで培養細胞におけるウイルス増殖において、UL12 の機能の中でヌクレアーゼ活性が非常に重要な位置を占めてきていると考えられてきており、UL12 の機能はヌクレアーゼ活性に関連した機能の解析がなされてきた。しかし、本研究において実際に変異体ウイルスを作製し検証したところ、培養細胞におけるウイルス増殖において UL12 のヌクレアーゼ活性の重要性は低く、それ以外の UL12 の機能がこれに重要な役割を果たしていることが初めて示唆された。しかし、一方神経病原性については UL12 のヌクレアーゼ活性が強く関与していることが示唆された。

第二章では、UL12 のリン酸化部位として初めて UL12 Y371 を同定し、これが UL12 ヌクレアーゼ活性能および第一章でウイルス増殖への関与が示唆されたヌクレアーゼ活性以外の機能について制御していることが示唆された。

以上より、UL12 のヌクレアーゼ活性能がウイルス増殖及び病原性発現に果たす役割、および UL12 の機能制御機構の一つとして UL12 Y371 のリン酸化の役割を明らかにした。本結果は、UL12 ヌクレアーゼ活性能や UL12 Y371 リン酸化の上流キナーゼが創薬の標的となる可能性があることを示唆している。

謝辞

本論文作成にあたり、常に寛大に見守ると同時に叱咤激励下さった川口寧教授（東京大学医科学研究所ウイルス病態制御分野）に心より感謝申し上げます。

また、A549 細胞、6-5 細胞、R7356 をそれぞれ分与して下さった河岡義裕教授（東京大学医科学研究所ウイルス感染分野）、Sandra Weller 教授（Department of Molecular, Microbial and Structural Biology, University of Connecticut Health Center）、Bernard Roizman 教授（Viral Oncology Laboratories, The University of Chicago）には大変感謝いたします。また、実験上のみでなく人生上においても多くのアドバイスを下さった加藤哲久助教（東京大学医科学研究所ウイルス病態制御分野）、有井潤助教（東京大学医科学研究所ウイルス病態制御分野）へも深謝申し上げます。研究室での生活を支えて下さった小山志保子氏、安藤朋子氏にも深く感謝申し上げます。そして質量解析においては尾山大明准教授（東京大学医科学研究所疾患プロテオミクスラボラトリー）、秦裕子助教授（東京大学医科学研究所疾患プロテオミクスラボラトリー）には大変お世話になりました。厚く感謝いたします。また、実験のアドバイスを下さったり、私の未熟なディスカッションに付き合っ下さったりするだけではなく、研究生活における活力を与えて下さった、ラボを卒業された先輩方、そしてラボのメンバーに心より感謝

申し上げます。最後になりましたが、家族や友人にはあらゆる面でサポートしていただき、大変感謝しております。

参考文献

1. **Roizman B, Knipe DM, Whitley RJ.** 2013. Herpes simplex viruses. In Knipe DM, Howley PM, Cohen JI, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Racaniello VR, Roizman B (ed.). Fields virology, 6th ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, PA.
2. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/fs_herpes.htm.
3. **Kawaguchi Y.** 2002. ヘルペスウイルス遺伝子発現制御因子の機能発現機構の解明. ウイルス **52**:207-216.
4. **Koelle DM, Corey L.** 2008. Herpes simplex: insights on pathogenesis and possible vaccines. Annu Rev Med **59**:381-395.
5. **Kawana T.** 2006. 性器ヘルペスの疫学. Nippon Rinsho **64**:215-220.
6. **Manavi K, McMillan A, Ogilvie M.** 2004. Herpes simplex virus type 1 remains the principal cause of initial anogenital herpes in Edinburgh, Scotland. Sex Transm Dis **31**:322-324.
7. **Shoji H.** 2006. ヘルペス脳炎. Nippon Rinsho **64**:264-267.
8. **Skoldenberg B.** 1996. Herpes simplex encephalitis. Scand J Infect Dis Suppl **100**:8-13.

9. **Skoldenberg B, Forsgren M.** 1985. Acyclovir versus vidarabine in herpes simplex encephalitis. *Scand J Infect Dis Suppl* **47**:89-96.
10. **Beauman JG.** 2005. Genital herpes: a review. *Am Fam Physician* **72**:1527-1534.
11. **Szucs TD, Berger K, Fisman DN, Harbarth S.** 2001. The estimated economic burden of genital herpes in the United States. An analysis using two costing approaches. *BMC Infect Dis* **1**:5.
12. **Eisenberg RJ, Atanasiu D, Cairns TM, Gallagher JR, Krummenacher C, Cohen GH.** Herpes virus fusion and entry: a story with many characters. *Viruses* **4**:800-832.
13. **Matis J, Kudelova M.** 2001. Early shutoff of host protein synthesis in cells infected with herpes simplex viruses. *Acta Virol* **45**:269-277.
14. **Bortner C, Hernandez TR, Lehman IR, Griffith J.** 1993. Herpes simplex virus 1 single-strand DNA-binding protein (ICP8) will promote homologous pairing and strand transfer. *J Mol Biol* **231**:241-250.
15. **Diefenbach RJ, Miranda-Saksena M, Douglas MW, Cunningham AL.** 2008. Transport and egress of herpes simplex virus in neurons. *Rev Med Virol* **18**:35-51.

16. **Goldstein JN, Weller SK.** 1998. The exonuclease activity of HSV-1 UL12 is required for in vivo function. *Virology* **244**:442-457.
17. **Martinez R, Shao L, Bronstein JC, Weber PC, Weller SK.** 1996. The product of a 1.9-kb mRNA which overlaps the HSV-1 alkaline nuclease gene (UL12) cannot relieve the growth defects of a null mutant. *Virology* **215**:152-164.
18. **Henderson JO, Ball-Goodrich LJ, Parris DS.** 1998. Structure-function analysis of the herpes simplex virus type 1 UL12 gene: correlation of deoxyribonuclease activity in vitro with replication function. *Virology* **243**:247-259.
19. **Porter IM, Stow ND.** 2004. Virus particles produced by the herpes simplex virus type 1 alkaline nuclease null mutant ambUL12 contain abnormal genomes. *J Gen Virol* **85**:583-591.
20. **Martinez R, Sarisky RT, Weber PC, Weller SK.** 1996. Herpes simplex virus type 1 alkaline nuclease is required for efficient processing of viral DNA replication intermediates. *J Virol* **70**:2075-2085.
21. **Shao L, Rapp LM, Weller SK.** 1993. Herpes simplex virus 1 alkaline nuclease is required for efficient egress of capsids from the nucleus. *Virology* **196**:146-162.

22. **Weller SK, Seghatoleslami MR, Shao L, Rowse D, Carmichael EP.** 1990. The herpes simplex virus type 1 alkaline nuclease is not essential for viral DNA synthesis: isolation and characterization of a lacZ insertion mutant. *J Gen Virol* **71 (Pt 12):**2941-2952.
23. **Costa RH, Draper KG, Banks L, Powell KL, Cohen G, Eisenberg R, Wagner EK.** 1983. High-resolution characterization of herpes simplex virus type 1 transcripts encoding alkaline exonuclease and a 50,000-dalton protein tentatively identified as a capsid protein. *J Virol* **48:**591-603.
24. **Saffran HA, Pare JM, Corcoran JA, Weller SK, Smiley JR.** 2007. Herpes simplex virus eliminates host mitochondrial DNA. *EMBO Rep* **8:**188-193.
25. **Tanaka M, Kagawa H, Yamanashi Y, Sata T, Kawaguchi Y.** 2003. Construction of an excisable bacterial artificial chromosome containing a full-length infectious clone of herpes simplex virus type 1: viruses reconstituted from the clone exhibit wild-type properties in vitro and in vivo. *J Virol* **77:**1382-1391.
26. **Kato A, Tanaka M, Yamamoto M, Asai R, Sata T, Nishiyama Y, Kawaguchi Y.** 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.
27. **Kawaguchi Y, Van Sant C, Roizman B.** 1997. Herpes simplex virus 1 alpha regulatory protein ICP0 interacts with and stabilizes the cell cycle regulator cyclin D3. J Virol **71**:7328-7336.
 28. **Fujii H, Mugitani M, Koyanagi N, Liu Z, Tsuda S, Arie J, Kato A, Kawaguchi Y.** Role of the Nuclease Activities Encoded by Herpes Simplex Virus 1 UL12 in Viral Replication and Neurovirulence. J Virol.
 29. **Nozawa N, Kawaguchi Y, Tanaka M, Kato A, Kato A, Kimura H, Nishiyama Y.** 2005. Herpes simplex virus type 1 UL51 protein is involved in maturation and egress of virus particles. J Virol **79**:6947-6956.
 30. **Koshizuka T, Kawaguchi Y, Goshima F, Mori I, Nishiyama Y.** 2006. Association of two membrane proteins encoded by herpes simplex virus type 2, UL11 and UL56. Virus Genes **32**:153-163.
 31. **Yamada S, Nakamura H, Kinoshita E, Kinoshita-Kikuta E, Koike T, Shiro Y.** 2007. Separation of a phosphorylated histidine protein using phosphate affinity polyacrylamide gel electrophoresis. Anal Biochem **360**:160-162.
 32. **Thomas MS, Gao M, Knipe DM, Powell KL.** 1992. Association between the

- herpes simplex virus major DNA-binding protein and alkaline nuclease. *J Virol* **66**:1152-1161.
33. **Reuven NB, Willcox S, Griffith JD, Weller SK.** 2004. Catalysis of strand exchange by the HSV-1 UL12 and ICP8 proteins: potent ICP8 recombinase activity is revealed upon resection of dsDNA substrate by nuclease. *J Mol Biol* **342**:57-71.
 34. **Schumacher AJ, Mohni KN, Kan Y, Hendrickson EA, Stark JM, Weller SK.** 2012. The HSV-1 exonuclease, UL12, stimulates recombination by a single strand annealing mechanism. *PLoS Pathog* **8**:e1002862.
 35. **Reuven NB, Staire AE, Myers RS, Weller SK.** 2003. The herpes simplex virus type 1 alkaline nuclease and single-stranded DNA binding protein mediate strand exchange in vitro. *J Virol* **77**:7425-7433.
 36. **Kuzminov A.** 1999. Recombinational repair of DNA damage in *Escherichia coli* and bacteriophage lambda. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**:751-813, table of contents.
 37. **Stahl MM, Thomason L, Poteete AR, Tarkowski T, Kuzminov A, Stahl FW.** 1997. Annealing vs. invasion in phage lambda recombination. *Genetics* **147**:961-977.

38. **Bujnicki JM, Rychlewski L.** 2001. The herpesvirus alkaline exonuclease belongs to the restriction endonuclease PD-(D/E)XK superfamily: insight from molecular modeling and phylogenetic analysis. *Virus Genes* **22**:219-230.
39. **Lo Piano A, Martinez-Jimenez MI, Zecchi L, Ayora S.** 2011. Recombination-dependent concatemeric viral DNA replication. *Virus Res* **160**:1-14.
40. **Vaughan PJ, Banks LM, Purifoy DJ, Powell KL.** 1984. Interactions between herpes simplex virus DNA-binding proteins. *J Gen Virol* **65 (Pt 11)**:2033-2041.
41. **Goldstein JN, Weller SK.** 1998. In vitro processing of herpes simplex virus type 1 DNA replication intermediates by the viral alkaline nuclease, UL12. *J Virol* **72**:8772-8781.
42. **Bell C, Desjardins M, Thibault P, Radtke K.** 2013. Proteomics Analysis of Herpes Simplex Virus Type 1-Infected Cells Reveals Dynamic Changes of Viral Protein Expression, Ubiquitylation, and Phosphorylation. *J Proteome Res.*
43. **Kinoshita E, Kinoshita-Kikuta E, Takiyama K, Koike T.** 2006. Phosphate-binding tag, a new tool to visualize phosphorylated proteins. *Mol Cell Proteomics* **5**:749-757.
44. **Banks LM, Halliburton IW, Purifoy DJ, Killington RA, Powell KL.** 1985.

Studies on the herpes simplex virus alkaline nuclease: detection of type-common and type-specific epitopes on the enzyme. *J Gen Virol* **66 (Pt 1)**:1-14.

45. **Wilkinson DE, Weller SK.** 2004. Recruitment of cellular recombination and repair proteins to sites of herpes simplex virus type 1 DNA replication is dependent on the composition of viral proteins within prereplicative sites and correlates with the induction of the DNA damage response. *J Virol* **78**:4783-4796.
46. **Daikoku T, Yamashita Y, Tsurumi T, Nishiyama Y.** 1995. The US3 protein kinase of herpes simplex virus type 2 is associated with phosphorylation of the UL12 alkaline nuclease in vitro. *Arch Virol* **140**:1637-1644.
47. **Cunningham AL, Diefenbach RJ, Miranda-Saksena M, Bosnjak L, Kim M, Jones C, Douglas MW.** 2006. The cycle of human herpes simplex virus infection: virus transport and immune control. *J Infect Dis* **194 Suppl 1**:S11-18.