

## 論文の内容の要旨

論文題目 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

単純ヘルペスウイルス (HSV) 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し、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。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。また、性感染症としての重要性も高く、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。ヘルペスウイルスは無症状で潜伏感染するため、予防が困難であり、根本的治療法も存在しない。予防法や治療法の開発にはヘルペスウイルスの増殖機構や病原性発現機構の解明が必須である。HSV は約 80 のタンパクをコードしているが、本研究ではヌクレアーゼ活性を有し、ウイルスの DNA 複製、粒子形成に重要であることが先行研究において示唆されている UL12 に着目し、その機能解析を行った。

第一章においては、UL12 ヌクレアーゼ活性の培養細胞におけるウイルス増殖及び病原性発現への寄与について検証を行った。先行研究において、UL12 欠損ウイルスを Vero 細胞へ接種し、野生型 UL12 発現ベクターをトランスフェクションした際はウイルス増殖性が回復したが、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 欠損株のウイルス増殖性は補完されなかったことから、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 UL12 の機能の中でも重要な位置を占めていることが示されている。また、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  $\lambda$  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おり、正常なウイルス DNA 複製に重要な役割を果たすと考えられてきた。しかし、先行研究における UL12 ヌクレアーゼ活性のウイルス増殖への意義の検証は、UL12 欠損株への発現ベクターによる補完を行った系のみであり、本実験系は野生型 UL12 発現ベクターをトランスフェクションした際にも UL12 欠損株の増殖性が野生株ほど回復しないことから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という問題点があった。そこで本研究においては実際に UL12 ヌクレアーゼ活性消失変異体ウイルスを作製し、UL12 ヌクレアーゼ活性のウイルス増殖および神経病原性発現への意義を検証した。UL12 ヌクレアーゼ活性消失変異体ウイルスを作製するにあたり、既出の論文にて報告のある UL12 グリシン 336 およびセリン 338 をそれぞれアラニンに置換することで UL12 ヌクレアーゼ活性消失株を作製した。また、UL12 欠損株についても作製し、これら変異体ウイルスについて Vero 細胞、A549 細胞、HEL 細胞を用いてウイルス増殖性を比較した。驚くべきことに、UL12 ヌクレアーゼ活性消失株においては過去の補完する系において得られた結果と矛盾し、Vero 細胞においては野生株や復帰株と比較すると増殖性は低下したものの 1/5 程度であり、UL12 欠損株においてその復帰株と比較して約 1/6000 に増殖性が低下したとと比較するとその低下の程度は弱いものであった。また、A549 細胞や HEL 細胞に至っては復帰株と比較して増殖性に大きな変化は見られなかった。すなわち、変異体ウイルスを用いた系で検証した結果、UL12 ヌクレアーゼ活性は細胞種依存的にウイルス増殖に寄与しているが、UL12 がウイルス増殖において担う機能のごく一部の機能にすぎないことが示唆され、またヌクレアーゼ活性以外の UL12 の機能が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ことが示唆された。このように培養細胞においては UL12 ヌクレアーゼ活性の重要性は細胞種依存的であり、その意義は不明瞭であるため、*in vivo*における UL12 ヌクレアーゼ活性の重要性を検証した。各変異体ウイルスをマウスの脳内へ接種し、接種 14 日後における半数致死量 (LD<sub>50</sub>) を算出した結果、UL12 欠損株は復帰株と比較して LD<sub>50</sub> が約 1,000 倍増加し、UL12 ヌクレアーゼ活性消失株はその復帰株と比較して約 100 倍増加した。すなわち、UL12 ヌクレアーゼ活性は培養細胞におけるウイルス増殖には重要ではないものの、病原性発現には重要であることが示唆された。以上の結果より、UL12 のヌクレアーゼ活性は創薬の標的となる可能性があると考えられる。

第二章においては、UL12 の制御機構についての解析を行った。既出の論文において UL12 は感染細胞においてリン酸化されることは示されているが、そのリン酸化部位やリン酸化が制御する機能については全く不明であった。本研究において、まず UL12 のリン酸化部位を質量解析により推定した。そして推定されたリン酸化部位についてリン酸化部位変異株を作製し、リン酸化の UL12 の機能における意義の検証を行ったところ、リン酸化が UL12 の機能の一部を制御していることが示唆された。

以上、本研究において、HSV がコードする UL12 のヌクレアーゼ活性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 のリン酸化

の役割を明らかにした。また、ヌクレアーゼ活性以外の **UL12** の機能の重要性を初めて示した。これらの知見は **UL12** の研究の方向性をこれまでとは違う方向に転換する新しい知見であり、今後さらなる基礎研究また抗ウイルス戦略への応用へつながると考えられる。