

博士論文

単純ヘルペスウイルス 1 型と 2 型間における
プロテインキナーゼ Us3 の差異の機能的解析

神道 慶子

目次

要旨	1
緒言	2
実験方法	13
結果	28
考察	50
総括	57
謝辞	59
参考文献	61
図表	70

要旨

筆者の研究室の Us3 酵素活性消失株を用いた先行研究により、Us3 が司る機能発現制御機構には HSV-1 と HSV-2 間で差異があることが示唆された(1)。本研究では、Us3 が司る機能発現制御機構における HSV-1 と HSV-2 間の差異の有無をより直接的に解明するために、HSV-1 の Us3 を HSV-2 Us3 に置換したキメラ株を作製した。

その結果、HSV-1 Us3 と HSV-2 Us3 では、ヌクレオカプシドの核膜通過の制御機構に差異が認められ、マウスモデルにおける神経病原性の制御も異なることが明らかになった。したがって、Us3 が司る機能発現制御機構には HSV-1 と HSV-2 間で差異があることが明らかになった。

緒言

ヘルペスウイルス

ヘルペスウイルスは牡蠣のような無脊椎動物からヒトに至るまで様々な生物を自然宿主として存在し、それぞれの種に固有のヘルペスウイルスが存在する(2)。ヘルペスウイルス科には 200 種類以上のウイルスが属しており、ウイルスの宿主範囲、自然宿主における持続性、感染細胞への影響などから、 α 、 β 、 γ の 3 つの亜科に分類される(3)。ヒトでは単純ヘルペスウイルス 1 型 (herpes simplex virus 1: HSV-1)、単純ヘルペスウイルス 2 型 (HSV-2)、水痘・帯状疱疹ウイルス (varicella-zoster virus: VZV)、EB ウイルス (Epstein-Barr virus: EBV)、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 herpesvirus-6: HHV-6)、ヒトヘルペスウイルス 7 (human herpesvirus-7: HHV-7)、カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus: KSHV) の 8 種類が同定されている(4)。 α ヘルペスウイルス亜科には HSV-1、HSV-2 および VZV が、 β ヘルペスウイルス亜科には HCMV、HHV-6 および HHV-7 が、 γ ヘルペスウイルス亜科には EBV および KSHV が含まれる(4)。いずれのウイルスも初感染後は宿主体内に潜伏感染し、宿主の免疫が低下した際に再活性化、増殖し、再び病態を引き起こす(3)。

単純ヘルペスウイルス (HSV)

HSV はヒトに感染すると、脳炎、口唇ヘルペス、性器ヘルペス (genital herpes: GH)、皮膚疾患、眼疾患、脳炎、全身性の新生児ヘルペスといった多様な疾患を引き起こす(5)。脳炎においては、無治療の場合の致死率は 70~90%に達し(6)、抗ヘルペスウイルス薬アシクロビルを使用しても致死率は 10~20%であり、3分の 2 には中および重度の後遺症が残る(7)。統計が比較的はっきりしているアメリカ合衆国においては、脳炎は年間約 1,500 万人が罹患するとされている。また、性感染症 (sexually transmitted disease: STD) としての HSV の重要性は高く、アメリカ合衆国では年間約 50 万人が性器ヘルペスに罹患し、約 1,000 万人が再発に苦しむ(8)。HSV 感染症の最大の問題は、(i) HSV が潜伏感染し、現時点ではウイルスの除去が不可能であるため、何年もの長期間にわたり再発を繰り返すこと、(ii) 有効なワクチンが存在しないため、予防が困難なことである。HSV 感染症にはアシクロビルをはじめとして効果的な抗ウイルス薬が開発されているにもかかわらず、上記のような理由から多くの HSV 感染症患者在問題になっており、HSV 研究の重要性は明らかである。

HSV 粒子は、直径約 200 nm の球状で、外側よりエンベロープ、テグメント、カプシドという 3 つの構造から成る(3)(図 1A)。エンベロープは宿主細胞の脂質

二重膜由来で、複数の糖タンパク質が埋め込まれて構成されている。テグメントはヘルペスウイルスに特徴的な、カプシドとエンベロープの間に介在するタンパク質層である。正 20 面体のカプシドに内包されているウイルスゲノムは、約 150 kbp の大型な直鎖状 2 本鎖 DNA であり、少なくとも 84 種類のウイルスタンパク質をコードしている(3)(図 1B)。

HSV の生活環 (図 2)

HSV は、エンベロープ糖タンパク質と宿主細胞表面に発現する複数のレセプターとの結合を介して細胞に吸着し、エンベロープと宿主細胞膜の融合により細胞へ侵入する(9)。ウイルスが細胞へ侵入すると、ウイルス粒子中のテグメントタンパク質である VHS (virion host shut off、UL41 遺伝子産物) および VP16 (別名 α TIF、UL48 遺伝子産物) が細胞質に放出される(3)。VHS は RNase 活性を有しており、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的な翻訳に寄与している。VP16 は核に移行し、ウイルス遺伝子の発現に大きな役割を果たす(3)。カプシドは核膜孔まで輸送され、核内にウイルスゲノムを注入する。ウイルスゲノムは核内で環状化し、遺伝子の転写が開始される。ウイルス遺伝子はその発現時期によって前初期 (α)、初

期 (β)、後期 (γ) の 3 群に大別される。 α 遺伝子群の転写は VP16 により活性化される(3)。 α 遺伝子群には、他のウイルス遺伝子の発現制御を行うタンパク質がコードされており、その多くが HSV 増殖感染において極めて重要な役割を果たす。核で転写された α 遺伝子群は細胞質へ運ばれ、 α タンパク質に翻訳される(3)。 α タンパク質は核に運ばれ、 β 、 γ 遺伝子の発現を制御する。 α タンパク質によって発現が活性化された β 遺伝子群から、 β タンパク質が生成される(3)。 β 遺伝子群は、DNA ポリメラーゼ複合体、DNA プライマーゼ・ヘリカーゼ複合体などのウイルスゲノム複製に必要なタンパク質や、チミジンキナーゼやリボヌクレオチド還元酵素などのデオキシリボヌクレオチド代謝に関与する酵素群をコードしている。これらの作用により、ウイルスゲノムはローリングサイクル機構により複製され、複製中間体として巨大なコンカテマーを形成する(10)。ウイルスゲノムの複製が行われると、 γ 遺伝子群が発現する。 γ 遺伝子群は、エンベロープ糖タンパク質、カプシドタンパク質、テグメントタンパク質といったウイルス粒子構造タンパク質をコードしている。 γ タンパク質により空のカプシドが生成され、カプシド生成後に複製中間体であるコンカテマーがウイルスゲノムの大きさに開裂し、ウイルスゲノムがカプシドへパッケージングされる(10)。ウイルスゲノムの複製、カプシドへのウイルスゲノムのパッケージングは、

replication compartment (RC) と呼ばれる核内の構造体にて行われると考えられている(3)。ウイルスゲノムを内包したカプシド (ヌクレオカプシド) は、核内から細胞質へ輸送される。その際、ヌクレオカプシドは直径約 100nm と大型であり、核膜孔を通過することができない。そのため、HSV を含めたヘルペスウイルスは、核内膜を一次エンベロープとして獲得し (primary envelopment) 、核内外膜間 (perinuclear space) へ出芽し、一次エンベロープと核外膜の融合により細胞質にヌクレオカプシドを輸送する (ヌクレオカプシドの核膜からの出芽)。この輸送機構は、大型なヘルペスウイルスの粒子形成に特有の現象である。細胞質に放出されたヌクレオカプシドは、テグメントを獲得し、感染細胞の細胞質内に形成されたウイルスエンベロープを有する膜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 or final envelopment) (3)。最終エンベロープを獲得した成熟ウイルス粒子は、エキソサイトーシスにより細胞外へ放出される(3)。局所で増殖した HSV は、末梢神経を上向して支配神経節 (三叉神経節または仙髄神経節) に到達し、潜伏感染へと移行する(3)。

単純ヘルペスウイルス 1 型 (HSV-1) および 2 型 (HSV-2)

HSV には 1 型 (HSV-1) と 2 型 (HSV-2) の 2 種類が存在する。HSV-1 は口腔、

上気道粘膜などを中心とした主に上半身に感染し、口唇ヘルペスや角膜炎などの病態を引き起こし、HSV-2 は性器などを中心とした主に下半身に感染して性器ヘルペスなどの病態を引き起こすとされている。しかし、近年では性器ヘルペスの病変から HSV-1 が分離されることが一般的となり、現在は HSV-1 も性器ヘルペスを引き起こす主要な原因と考えられている(11)。一方、HSV-2 が口唇ヘルペスやヘルペス性角膜炎の病変から分離されることはまれである。また、再発型の性器ヘルペスのほとんどは HSV-2 によることが知られており、HSV-1 と HSV-2 で病態に違いがあることは明らかである。

HSV-1 と HSV-2 は、ゲノム構造およびコードする遺伝子数は同様である(12)。両者の遺伝子の相同性は約 83%と、ヘルペスウイルス科の中では非常に保存されている(12)。HSV-1 と HSV-2 間で相同性が大きく異なる遺伝子としては、Us4 にコードされる glycoprotein G (gG) がよく知られている(13)。HSV-1 gG は 238 アミノ酸であるのに対し、HSV-2 gG は 699 アミノ酸とタンパク質の大きさがおよそ 3 倍異なる。gG はエンベロープ糖タンパク質のひとつであり、診断の際には、HSV-1 と HSV-2 は gG の抗原性の違いにより決定されている。HSV-1 と HSV-2 間で機能に差異の認められる遺伝子としては、最近、 α ヘルペスウイルス亜科で保存されるテグメントタンパク質である UL21 が、HSV-1 の培養細胞

におけるウイルス増殖には必須ではないが、HSV-2 では必須であることが報告された(14)。このように、HSV-1 と HSV-2 間で機能に差異が認められる遺伝子は他にも存在すると考えられる。

HSV プロテインキナーゼ Us3

HSV-1 および HSV-2 は、プロテインキナーゼ (protein kinase: PK) Us3 をコードしている(15-17)(図 3)。Us3 は α ヘルペスウイルス亜科に保存されるセリン/スレオニン PK であり、宿主のプロテインキナーゼ A (PKA) や Akt の標的配列と似通った標的配列を認識し、リン酸化する(18, 19)。HSV-1 と HSV-2 の Us3 はどちらも 481 アミノ酸から成り、アミノ酸の相同性は約 75%、遺伝子間の相同性は約 80%である。遺伝子配列には特別大きく異なる領域などは存在せず、図 3 に示した真核生物の PK で保存された subdomain I~VI (20) は、I と VI に 1 アミノ酸の置換が認められるが、約 96%保存されている (unpublished data)。一方、HSV-1 Us3 の自己リン酸化部位である 147 番目のセリンは、HSV-2 Us3 ではアスパラギン酸に置換されている。

HSV-1 Us3 および HSV-2 Us3 の酵素活性は生体内におけるウイルス増殖および病原性に関与しており、実際、Us3 欠損株または酵素活性消失株はマウス病態

モデルにおいてウイルス増殖および病原性が著しく低下する(1, 21-23)。しかしながら、Us3 は培養細胞における増殖には必須ではない。Us3 欠損株および酵素活性消失株は、Vero 細胞において野生株と同程度の増殖能を示すが(1, 23-25)、HEp-2 細胞など特定の細胞において増殖能は若干低下する (24, 26-28)。

Us3 欠損株および酵素活性消失株を用いた多くの研究から、感染細胞における Us3 の機能が徐々に解明されてきた。HSV-1 Us3 の感染細胞における機能としては (i) アポトーシスの抑制(18, 24, 29-34)、 (ii) ヌクレオカプシドの核膜からの出芽の促進(24, 26, 35-37)、 (iii) ヌクレオカプシドの核膜からの出芽に関するウイルス因子 UL31 と UL34 および宿主因子 Lamin A/C と Emerin のリン酸化およびそれによる局在の制御(35, 37-42)、 (iv) ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) のリン酸化およびそれにより生じるヒストン脱アセチル化の阻害による遺伝子発現の促進(43-45)、 (v) 細胞形態の制御(32, 46, 47)、 (vi) エンベロープ糖タンパク質 gB Thr-887 のリン酸化による gB エンドサイトーシスの促進およびそれによる gB 細胞表面発現量の抑制(48-50)、 (vii) Akt を模倣することによる mTORC1 の活性化およびそれによる mRNA 転写の促進(19)、 (viii) 主要テグメントタンパク質 UL47 Ser-77 のリン酸化および局在の制御(51)、 (ix) 宿主免疫系の修飾(28, 52-55)、 (x) HSV UL50 にコードされる dUTPase Ser-187 のリン酸化お

よび dUTPase 活性の制御(27, 56) などがある。これらのデータは、HSV-1 Us3 が数多くのウイルス因子または宿主因子をリン酸化することにより、ウイルス増殖において様々な役割を果たす多機能タンパク質であることを示唆している。

一方、HSV-2 Us3 は、上記の (ii) ヌクレオカプシドの核膜からの出芽の促進、および (vi) エンベロープ糖タンパク質 gB-T887 のリン酸化による gB エンドサイトシスの促進およびそれによる gB 細胞表面発現量の抑制に関与しないことが報告されている(1)。さらに、マウス脳内接種において、HSV-1 の Us3 欠損株および酵素活性消失株は、野生株に比べて LD₅₀ が 10,000 倍以上増加するのに対し(1, 21, 49)、HSV-2 の Us3 欠損株および酵素活性消失株は、野生株と比べて LD₅₀ は 10 倍程度の増加に留まる(1, 23)。これらの研究結果より、HSV-1 Us3 と HSV-2 Us3 では機能に差異があることが示唆されていた。

本研究の課題

本研究では、HSV-1 および HSV-2 がコードするプロテインキナーゼ Us3 に着目した。HSV-1 および HSV-2 の Us3 欠損株および酵素活性消失株を用いた解析により、感染細胞におけるアポトーシスや細胞形態変化の制御は、HSV-1 および HSV-2 の Us3 が同様の役割を果たしていることが明らかになっている。しか

し、マウス脳内接種における Us3 欠損株および酵素活性消失株と野生株との比較では、HSV-1 では著しく弱毒化しているのに対し(1, 21, 49)、HSV-2 ではその差は僅かである(1, 23)。さらに、HSV-1 Us3 は 147 番目のセリンの自己リン酸化により自身の活性の一部を制御しているが(22)、HSV-2 Us3 では 147 番目のアミノ酸がアスパラギン酸 (酸性アミノ酸) になっており、恒常的なリン酸化状態であるため制御機構は存在しない(1)。また、HSV-1 Us3 は gB の 887 番目のスレオニンをリン酸化し、エンドサイトーシスを促進することで gB の細胞表面発現量を制御しているが(48-50)、HSV-2 gB は 887 番目のアミノ酸がアラニンであるため、HSV-2 では Us3 による gB の細胞表面発現量の制御機構は存在しない(1)。このように、Us3 の感染細胞における機能や病原性発現への寄与は、HSV-1 と HSV-2 において異なることが示唆されていた。

本研究では、この HSV-1 Us3 と HSV-2 Us3 の差異に焦点を当て、これらの差異のウイルス増殖および病原性発現への寄与をさらに解析することを目的とした。これまでに報告されている HSV-1 および HSV-2 Us3 の機能は、それぞれの野生株と Us3 欠損株または酵素活性消失株の比較によって明らかにされたものである。しかしながら、HSV-1 と HSV-2 は培養細胞系における増殖速度や、マウス病態モデルにおける病原性が異なることから、HSV-1 Us3 変異株と HSV-2

Us3 変異株から得られた知見を単純に比較することはできず、真に HSV-1 と HSV-2 で Us3 の機能に差異があるかは不明であった。特に、HSV-1 Us3 のウイルス基質である Us3 や gB のように、HSV-1 でリン酸化部位であるセリンあるいはスレオニンが、HSV-2 では他のアミノ酸に置換されているケースでは、見かけ上の表現系には Us3 自身の機能の差異が反映されないことが考えられる。そこで、本研究では、HSV-1 の Us3 を HSV-2 Us3 に置換した組換えキメラ株を製作し、HSV-1 Us3 と HSV-2 Us3 の差異が直接反映される実験系での解析を試みた。

実験方法

細胞とウイルス

アフリカミドリザル腎細胞株 Vero は Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) に 5% calf serum (CS) 、 100 units/ml ペニシリン、 100 µg/ml ストレプトマイシンを加えた培地で培養した。 Rabbit skin cell (RSC) は DMEM に 5% fetal calf serum (FCS) 、 100 units/ml ペニシリン、 100 µg/ml ストレプトマイシンを加えた培地で培養した。 ヒト咽頭癌由来細胞株 HEp-2、 ヒト神経芽腫由来細胞株 SK-N-SH、 ヒト皮膚角化細胞株 HaCaT は DMEM に 10% FCS、 100 units/ml ペニシリン、 100 µg/ml ストレプトマイシンを加えた培地で培養した。 CS および FCS は 56°C で 30 分間非働化後に使用した。 ウイルス増殖には 199 培地に 1% FCS、 100 units/ml ペニシリン、 100 µg/ml ストレプトマイシンを加えたものを用いた。

HSV-1 野生株として HSV-1 (F) を用いた。 また、 HSV-2 野生株として HSV-2 (186) を用いた。 組換えウイルス YK511 (Us3K220M) 、 YK513 (Us3KM-repair) は筆者の研究室で過去に作製されたものを使用した(46)。 YK511 (Us3K220M) は HSV-1 Us3 の活性中心である 220 番目のリジンをメチオニンに置換した酵素活性消失株であり、 YK513 (Us3KM-repair) はその復帰株である。

全てのウイルスは Vero 細胞で力価測定を行った後、実験に使用した。

プラスミド

HSV-2 野生株である HSV-2 (186) 由来のウイルスゲノムを、BAC (Bacterial Artificial Chromosome) にクローニングした pYEbac356(1)より、HSV-2 Us3 の ORF を PCR で増幅し、pBluescript II KS (+) (Stratagene) の NotI-EcoRI サイトにクローニングし、pBS-HSV-2 Us3 を作製した。次に、プライマー 5'-GCCTGCAGC TGACACAGGCGCGCAGCCTAGGATGACGACGATAAGTAGGG-3'および 5'-G CCTGCAGGAGATCTTGGCCAGATGCACAACCAATTAACCAATTCTGATTA G-3'を用いて、pEPkan-S(46, 57)より I-SceI 配列およびカナマイシン耐性遺伝子を PCR で増幅し、HSV-2 Us3 の PstI サイトにクローニングし、pBS-HSV-2-Us3-PstI-I-SceI&KAN^R を作製した。

pBC1004(38)より HSV-1 UL31 の 50~306 アミノ酸を PCR で増幅して pMAL-c (New England Biolabs) の EcoRI-SalI サイトにクローニングし、pMAL-HSV-1 UL31-C を作製した。pYEbac356 より、HSV-2 UL31 の 60~183 アミノ酸および 184~305 アミノ酸を PCR で増幅して pMAL-c の EcoRI-SalI サイトにクローニングし、pMAL-HSV-2 UL31-P1 及び pMAL-HSV-2 UL31-P2 を作製した。

組換えウイルスの作製

組換えキメラ株 YK780 (Us3-chimera) は以下のように作製した。

pGEM-MEF(58)のカナマイシン耐性遺伝子と Myc-TEV-Flag (MEF) 配列を、表 1 のプライマーを用いて PCR で増幅し、HSV-1 野生株である HSV-1 (F) 由来のウイルスゲノムを BAC にクローニングした pYEBac102 を保持した大腸菌 GS1783 に導入した。32°Cで 1 時間培養後、20 µg/ml クロラムフェニコール、40 µg/ml カナマイシンを含む LB 寒天培地に植菌し、32°Cで一晩培養した。コロニーPCR で目的の部位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 µg/ml クロラムフェニコール、40 µg/ml カナマイシンを含む LB 液体培地に植菌し、32°Cで一晩培養した。培養液 100 µl を 20 µg/ml クロラムフェニコールを含む LB 培地 (2ml) に加え、32°Cで 2 時間半培養した。10% L-アラビノース (Wako) を 400 µl 添加し、32°Cで 1 時間培養することにより I-SceI の発現を誘導した。続いて 42°Cで 30 分インキュベートし、リコンビナーゼの発現を誘導した。さらに 32°Cで 1 時間半培養し、培養液を 20 µg/ml クロラムフェニコールを含む LB 寒天培地に植菌した。翌日、コロニーを 20 µg/ml クロラムフェニコール、40 µg/ml カナマイシンを含む LB 寒天培地と 20 µg/ml クロラムフェニコールのみを含む LB 寒天培地に植菌し、クロラムフェニコールでのみ生育するコロニーを選択し、

PCR で Us3 を欠損していることを確認した。以上の方法で、HSV-1 Us3 を MEF に置換することで Us3 を欠損した HSV-1 ゲノムを有した大腸菌を作製した。次に、トランスファーベクター pBS-HSV-2-Us3-PstI-I-SceI&KAN^R のカナマイシン耐性遺伝子を含む HSV-2 Us3 配列を、表 1 のプライマーを用いて PCR で増幅し、Us3 を欠損した HSV-1 ゲノムを有した大腸菌に導入した。32°C で 1 時間培養後、20 µg/ml クロラムフェニコール、40 µg/ml カナマイシンを含む LB 寒天培地に植菌し 32°C で一晩培養した。コロニー PCR で目的の部位にカナマイシン耐性遺伝子を含む全長の HSV-2 Us3 が挿入されたことを確認後、20 µg/ml クロラムフェニコール、40 µg/ml カナマイシンを含む LB 液体培地に植菌し、32°C で一晩培養した。培養液 100 µl を 20 µg/ml クロラムフェニコールを含む LB 培地 (2ml) に加え、32°C で 2 時間半培養した。10% L-アラビノース (Wako) を 400 µl 添加し、32°C で 1 時間培養することにより I-SceI の発現を誘導した。続いて 42°C で 30 分インキュベートし、リコンビナーゼの発現を誘導した。さらに 32°C で 1 時間半培養し、培養液を 20 µg/ml クロラムフェニコールを含む LB 寒天培地に植菌した。翌日、コロニーを 20 µg/ml クロラムフェニコール、40 µg/ml カナマイシンを含む LB 寒天培地と 20 µg/ml クロラムフェニコールのみを含む LB 寒天培地に植菌し、クロラムフェニコールでのみ生育するコロニーを選択した。PCR 産

物でシーケンスを解析し、変異のない完全長の HSV-2 Us3 を有していることを確認した。

YK780 (Us3-chimera) の復帰株である YK781 (Us3-repair) は、YK780 ゲノムを有する大腸菌を用いて以下のように作製した。まず、YK780 と同様の方法で Us3 を欠損した YK780 ゲノムを有した大腸菌を作製した。次に、YK513 (Us3KM-repair) を作製した際に用いた pYEbac512 (Us3-I-SceI&KAN^R)(46) を保持した大腸菌からゲノムを精製し、カナマイシン耐性遺伝子を含む HSV-1 Us3 配列を、表 1 のプライマーを用いて PCR で増幅し、Us3 を欠損した YK780 ゲノムを有した大腸菌に導入した。32°C で 1 時間培養後、20 µg/ml クロラムフェニコール、40 µg/ml カナマイシンを含む LB 寒天培地に植菌し、32°C で一晩培養した。コロニー PCR で目的の部位にカナマイシン耐性遺伝子を含む全長の HSV-1 Us3 が挿入されたことを確認後、20 µg/ml クロラムフェニコール、40 µg/ml カナマイシンを含む LB 液体培地に植菌し、32°C で一晩培養した。この培養液 100 µl を 20 µg/ml クロラムフェニコールを含む LB 培地 (2ml) に加え、32°C で 2 時間半培養した。10% L-アラビノース (Wako) を 400 µl 添加し、32°C で 1 時間培養することで I-SceI の発現を誘導した。続いて 42°C で 30 分インキュベートし、リコンビナーゼの発現を誘導した。さらに 32°C で 1 時間半培養し、培養液を 20 µg/ml クロラ

ムフェニコールを含む LB 寒天培地に植菌した。翌日、コロニーを 20 µg/ml クロラムフェニコール、40 µg/ml カナマイシンを含む LB 寒天培地と 20 µg/ml クロラムフェニコールのみを含む LB 寒天培地に植菌し、クロラムフェニコールのみ生育するコロニーを選択した。PCR 産物でシーケンスを解析し、変異のない完全長の HSV-1 Us3 を有していることを確認した。

選択した大腸菌クローンからウイルスゲノムを抽出し、リン酸カルシウム法により RSC 細胞に遺伝子導入することで、YK780 (Us3-chimera) および YK781 (Us3-repair) を構築した。

リン酸カルシウム法による遺伝子導入

RSC細胞をT-25フラスコに播種し、2時間後に、滅菌水 250µl、ウイルスDNA、2.2mM CaCl₂ 35µl、2×Hepes buffered saline (pH7.05) (0.14mM NaCl、2.7mM KCl、1mM Na₂HPO₄ · 2H₂O、50mM HEPES、1mM dextrose) 250µlを混合し、室温で20分間インキュベートした。その間に、RSC細胞をDEAE dextranを含むPBSで10分間処理した後、TEN (0.1M NaCl、10mM Tris-HCl (pH8.0)、1mM EDTA) で1回洗浄し、培地を加えた。DEAE dextran 処理したRSC細胞にウイルスDNA混合液を添加し、37°Cで6時間培養後、新しい培地に交換し、ウイルスが構築されるまで

培養した。

大腸菌発現系での MBP 融合タンパク質の発現、精製および容出

アンピシリンを添加した LB 培地で pMAL-HSV-1 UL31-C、pMAL-HSV-2 UL31-P1 および pMAL-HSV-2 UL31-P2 を導入した大腸菌を培養し、培養液の光学密度 (O.D.600) が 0.3~0.4 になった時点で IPTG (isopropyl-1-thio- β -galactoside) を終濃度 3mM となるように添加した。37°C でさらに 2 時間培養し、MBP 融合タンパク質を発現させた。大腸菌を回収し、終濃度 1% の Tween20 を含む PBS に懸濁し、超音波破碎処理後、4°C、15,000rpm で 20 分遠心した。上清に amylose resin ビーズ (New England Biolabs) を加え、4°C で 2 時間転倒混和した。ビーズを PBS で洗浄し、MBP-HSV-1 UL31-C、MBP-HSV-2 UL31-P1 および MBP-UL31-P2 を得た。精製後のビーズに Elution Buffer (50mM Tris-HCl (pH8.0)、10mM D-(+)-Maltose monohydrate、25mM EGTA (pH8.0)) を加え、4°C で 30 分間転倒混和して容出した。可溶性画分を回収し、HSV-1 UL31-C、HSV-2 UL31-P1 および HSV-2 UL31-P2 を得た。容出は 4 回程度繰り返す、得られた可溶性画分は -80°C で保存した。

抗体

UL31 を特異的に検出するマウスポリクローナル抗体を以下のように作製した。大腸菌に発現させ amylose resin ビーズにより精製した HSV-1 UL31-C、HSV-2 UL31-P1 および HSV-2 UL31-P2 を抗原として用いた。各種抗原を 100 µg になるように調製し、TiterMax Gold (フナコシ) と混合したものを、4 週齢のメス Balb/c マウス (Charles River) に腹腔接種した。その後、一ヶ月置きに採血し、ウェスタンブロットおよび蛍光抗体法にて血清の UL31 への反応性を確認した。UL31 に特異的に反応したマウスについては全採血し、UL31 を特異的に認識するマウス抗体として用いた。また、MBL に委託し、HSV-2 UL31-P2 を抗原として、UL31 を特異的に認識するウサギポリクローナル抗体も作製した。

Us3(46)、Us2(59)、UL12(60)、UL34(61)、UL50(27)に対するウサギポリクローナル抗体および HSV-1 gB の Thr-887 のリン酸化 (gB-T887^P) を特異的に認識するマウスモノクローナル抗体(49)は以前に報告した通りである (Us3、Us2 および UL34 の抗体は Dr. Y. Nishiyama より分与)。VP5 (3B6)、Us4 (7F5) および gB (H1817) に対するマウスモノクローナル抗体は Virusys Corporation から購入した。β-actin (AC15)、Emerin (4G5)、LaminA/C (636) に対するマウスモノクローナル抗体はそれぞれ Sigma、Lab Vision Corporation、Santa Cruz Biotechnology

から購入した。Histone deacetylase 2 (HDAC-2) 、LaminB1 に対するウサギポリクローナル抗体はそれぞれ Sigma、Abcam から購入した。ウサギモノクローナル抗体である phospho-PKA substrate 抗体 (100G7) は Cell signaling technology から購入した。

ウイルスの力価測定 (プラークアッセイ)

ウイルス液を 10^2 から 10^8 倍に段階希釈し、そのうち 10^3 から 10^8 倍のウイルス希釈液を Vero 細胞に感染させた。1 時間吸着させた後、ヒト γ -グロブリンを含む新しい 199 培地に変え、 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で染色後、実体顕微鏡 Stemi DV4 (Carl Zeiss) により well ごとのプラーク数をカウントし、ウイルスの力価を算出した。

プラークサイズの測定

Vero 細胞または HaCaT 細胞を 6 well プレートに播種し、100 PFU になるように希釈した各ウイルス液を感染させた。1 時間吸着させた後、ヒト γ -グロブリンを含む新しい 199 培地に変えた。 37°C で 48 時間培養した後、倒立型リサーチ顕微鏡 IX71 (Olympus) にてプラークサイズを測定した。

増殖曲線

Vero 細胞、HEp-2 細胞、SK-N-SH 細胞、HaCaT 細胞に各ウイルスを MOI 0.01 と MOI 3 で感染させた。37°C で 1 時間吸着させた後、199 培地で細胞を洗浄し、37°C で培養し、経時的に回収した。回収した細胞は 3 回凍結融解した後、Vero 細胞を用いて感染性ウイルス力価を測定した。HaCaT 細胞では、3 回凍結融解した後、セルスクレイパーで細胞をはがし、超音波処理後、同様に感染性ウイルス力価を測定した。

マウス脳内接種

体重 4g 幅の 3 週齢のメス ICR マウス (Charles River) をペントバルビタールの腹腔接種により麻酔後、10 倍段階希釈したウイルス液を二段針により脳内に接種した。ウイルス接種後 1 日から 14 日まで観察し、マウスの生死を記録した。

Behrens-Karber 法を用いて、50% lethal dose (LD₅₀) を算出した。

Caspase 3/7 活性の測定

SK-N-SH 細胞に MOI 5 で各ウイルスを感染させた。37°C で 1 時間吸着させた後、10% FCS を含む DMEM 培地に置換した。感染 18 時間後、さらに Sorbitol

培地 (1M Sorbitol、1% FCS を含む DMEM 培地) に置換し、37°Cで2時間インキュベートすることで浸透圧ショックによるアポトーシスを誘導させた。培地で細胞を洗浄し、1% FCS を含む DMEM 培地を加えて 37°Cで5時間インキュベートした。PBS で細胞を洗浄した後、Cell Culture Lysis Reagent (promega) で細胞を溶解し、1回凍結融解し、遠心上清をアッセイに供した。Caspase 3/7 活性の測定には Caspase-Glo 3/7 Assay kit (Promega) を用いた。

細胞表面および細胞内の gB 発現量の測定

Vero 細胞に MOI 3 でウイルスを感染させ、6時間後に 0.02% EDTA を含む PBS で回収した。細胞内 gB の測定の場合には、細胞を 4% paraformaldehyde で固定し、0.1% Triton X-100 で透過した。2% FCS を含む PBS (FACS buffer) で洗浄後、gB 抗体を氷上で30分反応させ、洗浄後、2次抗体として anti-mouse IgG conjugated to Alexa Fluor 488 (Invitrogen) を氷上で20分反応させた。細胞を洗浄後、蛍光強度を FACSVerse と FACSuite software (Becton Dickinson) で解析した。

免疫蛍光抗体法

Vero 細胞または HaCaT 細胞を 35 mm ガラスボトムディッシュ (Matsunami)

で培養し、各ウイルスを MOI 3 で感染させ 12 時間または 18 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 を含む PBS を加え室温で 15 分間静置し、PBS で洗浄後、ブロッキング液 (10% ヒト血清を含む 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希釈し、室温で 2 時間反応させた。PBS で洗浄後、2 次抗体 Alexa-Fluor 抗体液 (invitrogen) をブロッキング液で希釈し、室温で 1 時間反応させた。PBS で洗浄後、LSM5 PASCAL 蛍光顕微鏡 (Carl Zeiss) と 63×1.4 倍 Plan-APOCHROMAT または 100×1.45 倍 αPlan-FLUAR 対物レンズで観察した。なお、リン酸化抗体を使用する際は Can Get Signal Immunostain solution A (TOYOBO) で希釈した。

LSM5 での観察には、Argon laser (458 nm、488 nm、514 nm) と HeNe laser (543 nm、633 nm) (Carl Zeiss) を使用した。Alexa Fluor 488 (invitrogen) の蛍光は 488 nm で励起し、BP515-545 emission filter で観察した。Alexa Fluor 546 (invitrogen) の蛍光は 543 nm で励起し、LP620 emission filter で観察した。

電子顕微鏡による解析

Vero 細胞または HaCaT 細胞に MOI 3 でウイルスを感染させ、37°C で培養した。

感染 18 時間後、培地を除去し、PBS で洗浄した後、アルデヒド固定液 (2% paraformaldehyde, 2% glutaraldehyde in 0.1M phosphate buffer (pH7.4)) を加え室温で 10 分間固定した。セルスクレイパーで細胞を回収し、遠心後、新しいアルデヒド固定液に入れ替え、室温で 2 時間固定した。3% sucrose in 0.1M phosphate buffer (pH7.4) で洗浄した後、オスミウム固定液 (1% osmium tetroxide in 0.1M phosphate buffer (pH7.4)) を加え氷上で 2 時間固定した。水洗し、30%、50%、70%、90%、99.5% Ethanol、Propylene oxide (PO) の順に置換して脱水した後、Epon 812 resin mixture (TAAB Laboratories Equipment Ltd., Berks, England) で包埋した。超薄切片は、Reichert Ultracut N Ultramicrotome (Reichert) を用いて作製した。超薄切片は、2% uranyl acetate in 70% Ethanol と Reynolds' 鉛染色液 (pH12) で染色し、透過型電子顕微鏡 (Hitachi H-7500) で観察した。

Mn²⁺-Phos-tag (+) SDS-PAGE 解析

Wako Chemicals の標準プロトコールに従い、Mn²⁺-Phos-tag (+) SDS-PAGE 解析を実施した。解析には、50 μM Phos-tag アクリルアミド (Wako) および 100 μM MnCl₂ を含む分離ゲルを用いて SDS-PAGE を行った。なお、UL34 の解析には 57 μM Phos-tag アクリルアミドおよび 114 μM MnCl₂ を含む分離ゲルを用いた。

ウェスタンブロッティング

ウイルス感染細胞から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、transfer buffer (Tris 12.1 g、glycine 14.4g、メタノール 200 ml、H₂O 800 ml) に浸したろ紙でゲルおよびニトロセルロースメンブレン (BIORAD) をはさみ、タンパク質をメンブレンに転写した。転写後のメンブレンは、5% スキムミルクを含む PBS-T (0.1%Tween20 を含む PBS) を用いて室温で 1 時間ブロッキングした後、1 次抗体を 1% BSA を含む PBS-T で希釈し、室温で 2 時間反応させた。PBS-T で洗浄後、2 次抗体である Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-mouse もしくは anti-rabbit 抗体 (GE Healthcare) を 3%スキムミルク in PBS-T で希釈し、室温で 1 時間反応させた。PBS-T で洗浄後、Enhanced chemiluminescence (GE Healthcare) で反応後、X 線フィルム (FUJIFILM) または ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare) により目的のバンドを検出した。リン酸化抗体を用いたリン酸化タンパク質の検出の際は、PVDF メンブレン (Millipore) を用い、2% BSA in PBS-T でブロッキングし、抗体の希釈には Can get signal solution (TOYOBO) を使用した。また、Mn²⁺-Phos-tag SDS-PAGE の場合は、泳動後のゲルを 1mM EDTA を含む transfer buffer に浸

し 10 分間振とうさせ、ゲルに含まれる Mn^{2+} を除去後、通常の transfer buffer で 10 分間振とうし、PVDF メンブレンに転写した。

脱リン酸化処理

Vero 細胞にウイルスを感染させ、感染 18 時間後に回収した。2-Mercaptoethanol および BPB (bromophenol blue) を含まない 1×sample buffer で溶解し、超音波処理後、100°C で 10 分間処理し、5 μ l の Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (CIP) (New England Biolab) を加えた。37°C で 2 時間インキュベートした後、SDS-PAGE に供した。

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。

結果

HSV-2 Us3 をコードする HSV-1 の基礎性状解析

Us3 以外のウイルス因子が同一の条件下で、HSV-1 Us3 と HSV-2 Us3 の機能の差異を解析するために、HSV-1 Us3 の代わりに HSV-2 Us3 をコードするキメラ株 YK780 (Us3-chimera) およびその復帰株 YK781 (Us3-repair) を作製した (図 4)。Us3 が HSV-2 由来のものであることは、Us3 全長のシーケンスにより確認した。さらに、Vero 細胞に HSV-1 野生株、YK780 (Us3-chimera)、YK781 (Us3-repair) および HSV-2 野生株を MOI (multiplicity of infection) 3 で感染させ、感染 12 時間後の Us3 の発現量をウェスタンブロッティングにより確認した。我々の保有する Us3 抗体は HSV-1 と HSV-2 で反応性が異なるため、これらのウイルス感染細胞における Us3 発現量の比較解析はできないが、YK780 (Us3-chimera) 感染細胞では Us3 抗体の反応性が HSV-2 野生株感染細胞と同様であったことから、YK780 (Us3-chimera) が HSV-2 Us3 を発現していることが示唆された (図 5A)。また、Us3 遺伝子内には Us3 の 3'末端側に位置する Us2 および Us3 の 5'末端側に位置する Us4 のプロモーター領域が存在する(62)。そこで、Vero 細胞に HSV-1 野生株、YK780 (Us3-chimera) および YK781 (Us3-repair) を MOI 3 で感染させ、感染 12 時間後の Us2 と Us4 の発現量をウェスタンブロッテ

イングにより確認した。その結果、Us3 の差し替えによる Us2 および Us4 の発現量への影響はほとんどみられなかった (図 5B)。

次に、YK780 (Us3-chimera) および YK781 (Us3-repair) の培養細胞における増殖能およびマウス病態モデルにおける病態発現能を明らかにするため、以下の 3 つの実験を実施した。

1 つ目の実験として、Vero 細胞、HEp-2 細胞、SK-N-SH 細胞および HaCaT 細胞に、HSV-1 野生株、YK511 (Us3K220M) 、YK513 (Us3KM-repair) 、YK780 (Us3-chimera) 、YK781 (Us3-repair) を、MOI 3 または MOI 0.01 で感染させて経時的に培養上清と細胞を回収し、各タイムポイントにおけるウイルス力価を解析した。過去に報告されているように(1, 23-25)、Vero 細胞において YK511 (Us3K220M) は野生株および YK513 (Us3KM-repair) とほぼ同程度の増殖能を示した (図 6A,B) 。YK780 (Us3-chimera) および YK781 (Us3-repair) も HSV-1 野生株と同等の増殖能を示した。HEp-2 細胞では YK511 (Us3K220M) の増殖が MOI 3 において HSV-1 野生株、YK513 (Us3KM-repair) と比べ 15 倍程度低下し (図 6C) 、MOI 0.01 では HSV-1 野生株と比べ 50 倍程度、YK513 (Us3KM-repair) と比べ 20 倍程度低下した (図 6D) 。この結果は過去の報告と一致している(24, 26)。一方、YK780 (Us3-chimera) および YK781 (Us3-repair) は MOI 3 で HSV-1 野生

株と比較し3倍程度の低下が認められたが(図6C)、MOI 0.01では同等の増殖能を示した(図6D)。また、神経芽腫細胞であるSK-N-SH細胞では、YK511(Us3K220M)の増殖がMOI 3においてHSV-1野生株と比べ7倍程度、YK513(Us3KM-repair)と比べ4倍程度低下し(図6E)、MOI 0.01ではHSV-1野生株、YK513(Us3KM-repair)と比べ10~15倍程度低下した(図6F)。一方、YK780(Us3-chimera)およびYK781(Us3-repair)はMOI 3とMOI 0.01のどちらもHSV-1野生株と比較し3~4倍、YK513(Us3KM-repair)と比べ2倍程度低下した(図6E, F)。さらに、HaCaT細胞ではYK511(Us3K220M)の増殖がMOI 3においてHSV-1野生株と比べ100倍程度、YK513(Us3KM-repair)と比べ50倍程度低下し(図6G)、MOI 0.01ではHSV-1野生株と比べ150倍程度、YK513(Us3KM-repair)と比べ100倍程度低下した(図6H)。一方、YK780(Us3-chimera)およびYK781(Us3-repair)はHSV-1野生株と比較してMOI 3で3~4倍、MOI 0.01で2倍程度の低下が認められたが、YK513(Us3KM-repair)とはほぼ同等の増殖能を示した(図6G, H)。以上の結果より、YK780(Us3-chimera)およびYK781(Us3-repair)はHSV-1野生株とほぼ同等の増殖能を有していた。したがって、HSV-2 Us3は、培養細胞におけるウイルスの増殖能において、HSV-1 Us3の機能を代替できることが示された。

2 つ目の実験として、Vero 細胞または HaCaT 細胞に HSV-1 野生株、YK511 (Us3K220M) 、YK513 (Us3KM-repair) 、YK780 (Us3-chimera) 、YK781 (Us3-repair) を 100 PFU (plaque forming unit) で感染させ、感染 48 時間後にプラークサイズを測定した。Vero 細胞と HaCaT 細胞のどちらにおいても、YK511 (Us3K220M) 感染細胞では、HSV-1 野生株と比べてプラークサイズが著しく低下した (図 7A, B) 。さらに、YK780 (Us3-chimera) 感染細胞も、YK511 (Us3K220M) 感染細胞ほどではないが、HSV-1 野生株、YK513 (Us3KM-repair) および YK781 (Us3-repair) 感染細胞と比較して、プラークサイズが有意に低下した。プラークサイズはウイルスの細胞間伝播を反映する表現系である。すなわち、HSV-2 Us3 は、効率的なウイルスの細胞間伝播の制御において、HSV-1 Us3 の機能を完全には代替できないことが示された。

3 つ目の実験として、YK780 (Us3-chimera) および YK781 (Us3-repair) のマウス病態モデルにおける病態発現能を解析した。HSV のマウス脳炎モデルでは、ウイルスを脳内接種することでウイルスの中枢神経系での増殖性 (神経病原性) を知ることができる。体重 4g 幅の 3 週齢のメス ICR マウスに、10 倍段階希釈した YK511 (Us3K220M) 、YK513 (Us3KM-repair) 、YK780 (Us3-chimera) 、YK781 (Us3-repair) を脳内接種後 14 日間観察し、各ウイルスの LD₅₀ を算出した。

YK511 (Us3K220M) はその復帰株 YK513 (Us3KM-repair) と比べ、LD₅₀が 1,000 倍以上増加した (表 2)。この結果は、著者らの研究グループの過去の報告と一致する(1, 49)。また、YK780 (Us3-chimera) は、YK513 (Us3KM-repair) と比べて LD₅₀が 33 倍増加し、YK781 (Us3-repair) と比べても LD₅₀が 9 倍増加しており、弱毒化していることが明らかになった。したがって、マウス脳内接種時の病態発現制御能において、HSV-2 Us3 は HSV-1 Us3 の機能を完全には代替できないことが示された。

これらの結果より、HSV-2 Us3 と HSV-1 Us3 は一部の機能が異なることが示唆された。

感染細胞における Us3 のアポトーシス制御能

Us3 は主要な機能として、感染細胞におけるアポトーシス抑制能を有することが知られている(24, 29-33)。アポトーシス抑制能に関しては、HSV-1 および HSV-2 の Us3 が同様の役割を果たしていることが明らかになっている(63, 64)。SK-N-SH 細胞に HSV-1 野生株、YK511 (Us3K220M) 、 YK513 (Us3KM-repair) 、 YK780 (Us3-chimera) 、 YK781 (Us3-repair) を MOI 5 で感染させ、感染 18 時間後にソルビトールを 2 時間処理し、浸透圧ショックを与えることによりアポト-

シスを誘導させた。さらに 5 時間培養した後、細胞を回収し、Caspase 3/7 活性を測定した。Caspase 3/7 活性の増加はアポトーシスの誘導を示している。YK511 (Us3K220M) 感染細胞は HSV-1 野生株および YK513 (Us3KM-repair) 感染細胞と比べ、活性が 8.5 倍増加した (図 8)。この結果は、著者らの研究グループの過去の報告と一致する(22, 65)。一方で、YK780 (Us3-chimera) 感染細胞は HSV-1 野生株、YK513 (Us3KM-repair) および YK781 (Us3-repair) 感染細胞と同程度の活性を示した。したがって、HSV-2 Us3 は感染細胞におけるアポトーシスの制御において、HSV-1 Us3 の機能を代替できることが示された。

感染細胞における Us3 の細胞形態制御能

アポトーシスの抑制と同様に、Us3 の主要な機能として細胞形態変化の促進がある (32, 46, 47)。この機能も HSV-1 および HSV-2 の Us3 が同様の役割を果たしていることが報告されている(1)。Vero 細胞に HSV-1 野生株、YK511 (Us3K220M)、YK513 (Us3KM-repair)、YK780 (Us3-chimera)、YK781 (Us3-repair) を MOI 3 で感染させ、感染 24 時間後に細胞形態の変化を観察した。著者らの研究グループが過去に報告したように、YK511 (Us3K220M) 感染細胞は HSV-1 野生株および YK513 (Us3KM-repair) 感染細胞と比べ、細胞形態の変化が小さかつ

た(46)(図 9)。一方で、YK780 (Us3-chimera) 感染細胞は HSV-1 野生株および YK781 (Us3-repair) 感染細胞と同様に細胞形態変化の促進が認められた。したがって、HSV-2 Us3 は感染細胞の形態制御においても、HSV-1 Us3 の機能を代替できることが示された。

感染細胞における Us3 の gB 細胞表面量制御能

HSV-1 Us3 はエンベロープ糖タンパク質である glycoprotein B (gB) の 887 番目のスレオニン (Thr-887) をリン酸化することで、感染細胞表面の gB の発現量を抑制する(46)。HSV-1 gB と HSV-2 gB はどちらも 904 アミノ酸から成り、アミノ酸および遺伝子の相同性は約 87%である。HSV-1 と HSV-2 間で遺伝子配列には特別大きく異なる領域などは存在しないが、HSV-2 gB では HSV-1 gB において Us3 のリン酸化部位である 887 番目のアミノ酸がアラニンに置換されており、Us3 のリン酸化による制御を受けないと考えられる。これに起因するように、HSV-2 野生株および Us3 酵素活性消失株感染細胞では gB 細胞表面発現量に差はみられず、HSV-2 では Us3 の酵素活性が gB 細胞表面発現量の制御に関与していないことが明らかになっている(1)。Vero 細胞に HSV-1 野生株、YK511 (Us3 K220M)、YK513 (Us3KM-repair)、YK780 (Us3-chimera)、YK781 (Us3-repair) を

MOI 3 で感染させ、感染 6 時間後に細胞を回収し、gB 細胞表面発現量をフローサイトメーターにて解析した。過去の報告通り、YK511 (Us3K220M) 感染細胞の gB 細胞表面発現量は、HSV-1 野生株感染細胞と比較して有意に増加した(48)(図 10)。一方、YK780 (Us3-chimera) 感染細胞の gB 細胞表面発現量は HSV-1 野生株および YK781 (Us3-repair) 感染細胞と同程度であった。したがって、HSV-2 Us3 は、感染細胞での gB 細胞表面発現量の制御においても、HSV-1 Us3 の機能を代替できることが示された。

感染細胞における Us3 の HDAC-2 のリン酸化

HSV-1 Us3 は、感染細胞における生理学的意義は不明であるが、ヒストン脱アセチル化酵素 2 (HDAC-2: histone deacetylase 2) のリン酸化状態を制御することが報告されている(43-46)。また、HSV-2 Us3 も、HSV-1 Us3 と同様に HDAC-2 のリン酸化状態を制御することが明らかになっている(1)。Vero 細胞に HSV-1 野生株、YK511 (Us3K220M)、YK513 (Us3KM-repair)、YK780 (Us3-chimera)、YK781 (Us3-repair) を MOI 3 で感染させ、感染 18 時間後に細胞を回収し、SDS-PAGE 後、HDAC-2 に対する抗体を用いたウェスタンブロッティングに供した。過去の報告と同様に(1, 46)、HSV-1 野生株感染細胞では、HDAC-2 は 2 本

のバンドとして検出された (図 11 lane 2)。泳動度の小さいバンドはリン酸化状態、泳動度の大きいバンドは非リン酸化状態の HDAC-2 に由来する(43)。一方、YK511 (Us3K220M) 感染細胞ではリン酸化状態のバンドが消失した (図 11 lane 3)。また、YK780 (Us3-chimera) 感染細胞では、リン酸化状態のバンドは認められたものの、HSV-1 野生株および YK781 (Us3-repair) 感染細胞と比較すると明らかにそのシグナルが減弱していた (図 11 lane 5)。この結果から、HSV-2 Us3 は、HDAC-2 のリン酸化状態を制御できるものの、HSV-1 Us3 の機能を完全には代替できないことが示唆された。

感染細胞における UL31、UL34 および Emerin の細胞内局在

核マトリックス結合タンパク質 UL31 および膜タンパク質 UL34 は、HSV 感染細胞では複合体を形成して核膜に局在し、ヌクレオカプシドの核膜からの出芽の促進に寄与することが報告されている(26, 35, 66, 67)。また、HSV-1 では感染細胞において Us3 依存的に、リン酸化状態およびその局在が制御されることも報告されている(5, 65)。一方、HSV-2 Us3 は UL31 および UL34 の局在を制御する機能を保持していないことを示す報告がある(1)。UL31 は、HSV-1 は 306 アミノ酸、HSV-2 は 305 アミノ酸から成り、相同性は約 89%である (unpublished

data)。また、UL34 は、HSV-1 は 275 アミノ酸、HSV-2 は 276 アミノ酸から成り、相同性は約 77%である (unpublished data)。UL34 は HSV-1 と HSV-2 で膜貫通領域の配列が大きく異なるが、機能の違いなどは報告されていない。YK780 (Us3-chimera) 感染細胞における UL31 および UL34 の局在を調べるため、Vero 細胞に、HSV-1 野生株、YK511 (Us3K220M)、YK513 (Us3KM-repair)、YK780 (Us3-chimera)、YK781 (Us3-repair) を MOI 3 で感染させ、感染 12 時間後に細胞を固定し、蛍光抗体法により細胞を染色した。Vero 細胞では、過去の報告通り、HSV-1 野生株感染細胞で UL31、UL34 とともに核膜に smooth に局在したのに対し (図 12A, B)、YK511 (Us3K220M) 感染細胞では核膜上で punctate 状の局在を示した(65)(図 12D, E)。一方、YK780 (Us3-chimera) 感染細胞は、HSV-1 野生株感染細胞および YK511 (Us3K220M) 感染細胞のどちらとも異なり、核膜上で punctate 構造が密に連なった局在を示した (図 12G, H, J, K)。YK511 (Us3K220M) 感染細胞と比較して punctate 構造が小さく、punctate 構造どうしの間隔が狭いため、低倍率では smooth とみられる局在も多く観察された。復帰株である YK781 (Us3-repair) 感染細胞は HSV-1 野生株および YK513 (Us3KM-repair) 感染細胞と同様の局在を示した (図 12M, N)。また、HaCaT 細胞でも同様に、UL31 および UL34 抗体を用いて蛍光抗体法を行った結果、HSV-1 野生株、YK513

(Us3KM-repair) および YK781 (Us3-repair) 感染細胞でも punctate 状の局在を示す細胞が増加する傾向がみられたが、各ウイルスの主な局在は Vero 細胞と同様であった (図 13)。さらに、ヌクレオカプシドの核膜からの出芽に関与することが知られている宿主因子である Emerin についても局在を観察した。Emerin は核内膜に存在する核膜裏打ちタンパク質であり、HSV-1 感染細胞では UL34 と結合し、Us3 依存的なリン酸化により、その局在が制御されることが報告されている(39)。抗 Emerin 抗体を用いた蛍光抗体法の結果、Emerin は UL34 および UL31 と同様に、HSV-1 野生株感染細胞では核膜に smooth に局在し (図 14B)、YK511 (Us3K220M) 感染細胞では核膜上で punctate 状の局在を示した (図 14E)。一方、YK780 (Us3-chimera) 感染細胞は、HSV-1 野生株感染細胞および YK511 (Us3K220M) 感染細胞のどちらとも異なり、核膜上で punctate 構造が密に連なった局在を示した (図 14K)。これらの結果から、HSV-2 Us3 は、UL31、UL34 および Emerin の局在の制御において、HSV-1 Us3 の機能を完全には代替できないことが示唆された。

感染細胞における gB-T887^p の細胞内局在

Vero 細胞に HSV-1 野生株、YK780 (Us3-chimera)、YK781 (Us3-repair) を MOI

3 で感染させ、感染後 18 時間に細胞を固定し、蛍光抗体法により細胞を染色した。HSV-1 野生株および YK781 (Us3-repair) 感染細胞において、gB は細胞膜、核膜、小胞体などに局在し、核膜では核膜のマーカーとして用いた LaminB1 と共局在した (図 15A c, i)。また、HSV-1 gB T-887 のリン酸化 (gB-T887^p) を特異的に認識する抗体を用いて検出したリン酸化状態の gB は、核膜および小胞体に局在し、こちらも核膜では LaminB1 と共局在した (図 15B c, i)。これらの結果は過去の報告と一致している(49)。YK780 (Us3-chimera) 感染細胞では、gB は細胞膜、核膜、小胞体などに局在しており、HSV-1 野生株および YK781 (Us3-repair) 感染細胞と同様の局在を示した (図 15A b)。一方、リン酸化状態の gB は HSV-1 野生株および YK781 (Us3-repair) 感染細胞とは異なり、LaminB1 と共局在を示さず、核膜および小胞体に局在していなかった (図 15B b)。これらの結果から、HSV-2 Us3 は、HSV-1 Us3 と同様に gB-T887 をリン酸化するが、HSV-1 Us3 のリン酸化状態の gB の局在制御能は完全には代替できないことが示唆された。

感染細胞における Us3 のヌクレオカプシドの核膜からの出芽の制御

HSV-1 Us3 欠損株または酵素活性消失株感染細胞を電子顕微鏡で観察すると、

感染細胞の核内に一次エンベロープを獲得したウイルス粒子が蓄積した核内陥入構造体が認められる(1, 22, 24, 26, 68)。本構造体は、ヌクレオカプシドの核外膜からの出芽が阻害された結果として誘導されると考えられている。一方、HSV-2 Us3 酵素活性消失株感染細胞では、このような構造体はほとんど認められない(1)。Vero 細胞または HaCaT 細胞に HSV-1 野生株、YK511 (Us3K220M)、YK513 (Us3KM-repair)、YK780 (Us3-chimera)、YK781 (Us3-repair) を MOI 3 で感染させ、18 時間後に細胞を固定して超薄切片を作製し、電子顕微鏡で観察した。過去の報告通り(1)、YK511 (Us3K220M) 感染細胞ではウイルス粒子が観察される細胞では、ほぼ全てで核内陥入構造体が認められた (図 16B)。また、YK780 (Us3-chimera) 感染細胞においても一部の細胞で核内陥入構造体が誘導されていた (図 16Ea)。さらに、YK780 (Us3-chimera) 感染細胞には、核内外膜腔内 (perinuclear space) に一次エンベロープを獲得したウイルス粒子が著しく蓄積している細胞も認められた (図 16Eb)。一方、HaCaT 細胞では、どのウイルス感染細胞においても、Vero 細胞に比べ多くの核内陥入構造体が観察された (図 17)。YK780 (Us3-chimera) 感染細胞では、Vero 細胞で観察された perinuclear space に一次エンベロープを獲得したウイルス粒子が蓄積している細胞は認められなかったが、YK780 (Us3-chimera) 感染 Vero 細胞、および HSV-1 野生株、YK513

(Us3KM-repair) 、 YK781 (Us3-repair) 感染 HaCaT 細胞に比べ非常に多くの核内
陥入構造体が認められた。そこで、感染細胞の核内、perinuclear space、細胞質、
細胞外の各領域におけるエンベロープを獲得したウイルス粒子数を定量し、エ
ンベロープを獲得したウイルス粒子の総数から、各領域でのウイルス粒子の割
合を算出した (表 3, 4) 。核内のエンベロープを獲得したウイルス粒子数とは、
核内陥入構造体内に含まれるウイルス粒子数のことを示している。核内および
perinuclear space のウイルス粒子は一次エンベロープを獲得したウイルス粒子、
細胞質及び細胞外のエンベロープを獲得したウイルス粒子は成熟ウイルス粒子
である。その結果、Vero 細胞と HaCaT 細胞のどちらにおいても、YK511
(Us3K220M) および YK780 (Us3-chimera) 感染細胞は HSV-1 野生株および自身
の復帰株ウイルス感染細胞と比較し、核内のウイルス粒子数が有意に増加して
いた (図 18) 。また、細胞質および細胞外のウイルス粒子の割合も、YK780
(Us3-chimera) 感染細胞は YK511 (Us3K220M) 感染細胞と同様の傾向を示した
(表 3, 4) 。一方、perinuclear space のウイルス粒子の割合は、YK511 (Us3K220M)
感染細胞は Vero 細胞と HaCaT 細胞どちらでも低下しているのに対し、YK780
(Us3-chimera) 感染細胞は Vero 細胞では HSV-1 野生株、YK513 (Us3KM-repair)
および YK781 (Us3-repair) 感染細胞と比較してウイルス粒子数が増加する傾向

にあり、HaCaT 細胞では HSV-1 野生株、YK513 (Us3KM-repair) および YK781 (Us3-repair) 感染細胞と同程度であった。

これらの結果から、HSV-2 Us3 は、感染細胞におけるヌクレオカプシドの核膜からの出芽促進能を有するものの、HSV-1 Us3 の機能を完全には代替できないことが示唆された。

感染細胞における Us3 のリン酸化能

Us3 と宿主細胞の PKA のリン酸化部位は似通っており(15, 16, 18, 42, 46)、PKA のリン酸化標的配列に対するリン酸化抗体を用いて、感染細胞における Us3 基質のリン酸化状態を網羅的に可視化可能であると報告されている(18, 69)。そこで、Vero 細胞に HSV-1 野生株、YK511 (Us3K220M) 、YK513 (Us3KM-repair) 、YK780 (Us3-chimera) 、YK781 (Us3-repair) を MOI 3 で感染させ、感染 18 時間後に細胞を回収し、PKA のリン酸化標的配列に対するリン酸化抗体である抗 phospho-PKA substrate 抗体を用いたウェスタンブロットに供した。HSV-1 野生株感染細胞で検出され、YK511 (Us3K220M) 感染細胞で検出されなかったバンドは、Us3 依存的にリン酸化状態が制御されていると考えられる (図 19 lane 2, 3) 。一方、YK780 (Us3-chimera) 感染細胞のバンドパターンは、HSV-1 野生株および

YK781 (Us3-repair) 感染細胞と同様であった (図 19 lane 5)。この結果は、HSV-2 Us3 が、PKA のリン酸化標的配列に対するリン酸化抗体を用いて検出される HSV-1 感染細胞における Us3 基質のリン酸化の制御において、HSV-1 Us3 の機能を代替できることを示していると考えられる。

次に、HSV-2 Us3 が、HSV-1 感染細胞における個々の Us3 基質のリン酸化状態を制御できるかどうか解析を試みた。

1 つ目の実験として、リン酸化抗体を用いて、gB-T887 のリン酸化状態を解析した。Us3 による gB-T887 のリン酸化は、HSV-1 において gB の細胞表面発現量の制御のほか、ヌクレオカプシドの核膜からの出芽、マウス病態モデルにおける病原性発現にも寄与していることが明らかになっている(36, 48, 50)。Vero 細胞に各ウイルスを MOI 3 で感染させ、感染 18 時間後に回収したサンプルを抗 gB-T887^p 抗体を用いたウェスタンブロッティングに供した。過去の報告通り(50)、YK511 (Us3K220M) 感染細胞では gB-T887 のリン酸化は全く検出されなかった (図 20 lane 3)。一方、YK780 (Us3-chimera) 感染細胞では、gB-T887 のリン酸化は検出されたが、HSV-1 野生株および YK781 (Us3-repair) 感染細胞では認められないバンドが検出された (図 20 lane 5)。したがって、HSV-2 Us3 は、HSV-1 Us3 の gB-T887 のリン酸化能は代替できるが、リン酸化による制御機構は完全

には代替できない可能性が示された。

2 つ目の実験として、核膜に局在してヌクレオカプシドの核膜からの出芽に関与し、HSV-1 Us3 によってリン酸化状態が制御されることが報告されている UL31、UL34、および LaminA/C の YK780 (Us3-chimera) 感染細胞におけるリン酸化状態を調べるため、Vero 細胞に HSV-1 野生株、YK511 (Us3K220M) 、YK513 (Us3KM-repair) 、YK780 (Us3-chimera) 、YK781 (Us3-repair) を MOI 3 で感染させ、感染 18 時間後に細胞を回収し、 Mn^{2+} -Phos-tag (+) SDS-PAGE に供した。

Phos-tag は、セリン、スレオニン、チロシンのすべてのリン酸化体を捕捉する機能性低分子である(70)。アクリルアミド結合型 Phos-tag を共重合させたゲルを用いる Mn^{2+} -Phos-tag (+) SDS-PAGE 解析では、リン酸化タンパク質はゲル中の Mn^{2+} -Phos-tag にトラップされながら泳動が進行するため、リン酸化タンパク質は非リン酸化タンパク質よりも泳動が遅くなり、ゲルシフトバンドとして検出される(70)。また、複数のリン酸化部位が存在し、様々なリン酸化状態が混在するタンパク質については、その状態の違いを泳動度の異なるバンドとして検出することが可能である(70)。

HSV-1 UL31 は N 末端側に Us3 リン酸化標的配列に適合する 6 つのセリン (Ser-11, 24, 26, 27, 40, 43) が存在しており、Us3 依存的にリン酸化状態が制御さ

れることが報告されている (37, 38)。また、これら 6 つのセリンをアラニンに置換した変異株を用いた解析から、これらのセリンが UL31 の局在制御に重要であることが報告されている(37)。一方、HSV-2 UL31 では、6 つのセリンのうち 5 つは保存されているが、Ser-26 はフェニルアラニンに置換されている (unpublished data)。しかし、この違いが HSV-1 と HSV-2 での UL31 の局在の差異に関与しているかは不明である。Mn²⁺-Phos-tag (+) SDS-PAGE 解析において、HSV-1 野生株、YK513 (Us3KM-repair) および YK781 (Us3-repair) 感染細胞由来の UL31 は、少なくとも 8 つの泳動度の異なるバンドとして検出された (図 21A lane 2, 4, 6)。YK511 (Us3K220M) 感染細胞由来の UL31 は、泳動度の小さい 3 つのバンドが検出されず、その次に泳動度の小さい 3 つのバンドのシグナルが減弱した (図 21A lane 3)。また、HSV-1 野生株および YK780 (Us3-chimera) 感染細胞由来の UL31 は、脱リン酸化酵素である CIP の処理により、泳動度の大きい 2 本のバンドのみとなった (図 21B)。したがって、検出された泳動度の小さい 6 つのゲルシフトバンドはリン酸化状態の UL31 由来であり、且つ、Us3 によりリン酸化された UL31 に由来することが示唆された。YK780 (Us3-chimera) 感染細胞では、泳動度が最も小さく、最も高度にリン酸化されている状態の UL31 由来と考えられるバンドのシグナルの強度が HSV-1 野生株および YK781

(Us3-repair) 感染細胞に比べ減弱していた (図 21A lane 5)。この結果から、HSV-2 Us3 は HSV-1 Us3 と同様に、UL31 のリン酸化状態を制御するものの、そのリン酸化能を完全には代替できないことが示唆された。

HSV-1 UL34 は Thr-195 および Ser-198 が Us3 によってリン酸化されることが報告されている(38)。HSV-2 UL34 では Ser-198 は保存されているが、Thr-195 はセリンに置換されており (unpublished data)、HSV-2 で Us3 依存的なリン酸化を受けるかは不明である。UL31 と同様に、UL34 に関しても Phos-tag (+) SDS-PAGE 解析を行った結果、HSV-1 野生株、YK513 (Us3KM-repair)、YK780 (Us3-chimera) および YK781 (Us3-repair) 感染細胞では 3 つの泳動度の異なるバンドが検出され (図 22A lane 2, 4, 6)、泳動度の小さい 2 本のバンドは CIP 処理により消失した (図 22B)。したがって、泳動度の小さい 2 本のバンドがリン酸化状態の UL34 由来であることが示唆された。一方、YK511 (Us3K220M) 感染細胞では最も泳動度が小さいリン酸化状態のバンドは検出されず、泳動度が大きいリン酸化状態のバンドはシグナルが減弱し、非リン酸化状態のバンドのシグナルが著しく増加していた (図 22A lane 3)。したがって、2 本のリン酸化バンドは、Us3 によりリン酸化された UL34 に由来することが示唆された。YK780 (Us3-chimera) 感染細胞では、HSV-1 野生株感染細胞と同様に 3 つのバンドが検出されたが、

泳動度が小さいリン酸化状態のバンドのシグナルが僅かに減弱し、非リン酸化状態の UL34 由来のバンドのシグナルが明確に増強していた (図 22A lane 5)。

この結果から、HSV-2 Us3 は HSV-1 Us3 と同様に、UL34 のリン酸化状態を制御するものの、そのリン酸化能は完全には代替できないことが示唆された。

次に、UL31、UL34 と同様に、Us3 の基質でありヌクレオカプシドの核膜からの出芽に関わることが知られている宿主因子 LaminA/C のリン酸化状態を、Mn²⁺-Phos-tag (+) SDS-PAGE 解析により検証した。非感染細胞および各ウイルス感染細胞全てで、少なくとも 6 本の泳動度の異なるバンドが検出され (図 23A lane 2, 4, 6)、CIP 処理により 4 本のバンドが消失した (図 23B)。したがって、これらの 4 本のバンドはリン酸化状態の LaminA/C であることが示唆された。さらに、HSV-1 野生株および YK513 (Us3KM-repair) 感染細胞と比べて、YK511 (Us3K220M) 感染細胞においてリン酸化状態のバンドのシグナルが著しく減弱し、非リン酸化状態のバンドのシグナルが増強していた (図 23A lane 3)。

YK780 (Us3-chimera) 感染細胞でも同様に、リン酸化状態のバンドのシグナルの源弱と非リン酸化状態のバンドのシグナルの増強が認められたが、YK511 (Us3K220M) 感染細胞と比較し、その変化率は小さかった (図 23A lane 5)。この結果から、HSV-2 Us3 は HSV-1 Us3 と同様に、LaminA/C のリン酸化状態を制

御するものの、そのリン酸化能は完全には代替できないことが示唆された。

3 つ目の実験として、UL31、UL34 と同様に局在変化が観察された Emerin のリン酸化状態を調べた。Emerin は HSV 感染細胞において非常に高度にリン酸化されており、通常の SDS-PAGE でもリン酸化状態が可視化できることが報告されている(40)。Vero 細胞に HSV-1 野生株、YK511 (Us3K220M) 、YK513 (Us3KM-repair) 、YK780 (Us3-chimera) 、YK781 (Us3-repair) を MOI 3 で感染させ、感染 18 時間後に細胞を回収し、SDS-PAGE 後、Emerin に対する抗体を用いたウェスタンブロッティングに供した。HSV-1 野生株および YK781 (Us3-repair) 感染細胞では、少なくとも 5 本のバンドが検出され (図 24A lane 2, 6) 、YK511 (Us3K220M) 感染細胞または CIP 処理した HSV-1 野生株および YK780 (Us3-chimera) 感染細胞において、最も泳動度の大きいバンドのみとなった (図 24A lane 3, 図 24B) 。したがって、泳動度の小さい 4 本のバンドは Us3 依存的なリン酸化状態の Emerin 由来であることが示唆された。また、YK780 (Us3-chimera) 感染細胞では泳動度の大きい 2 本のバンドのみが検出された (図 24A lane 5) 。この結果から、HSV-2 Us3 は HSV-1 Us3 と同様に、Emerin のリン酸化状態を制御するものの、そのリン酸化能は完全には代替できないことが示唆された。

4つ目の実験として、ヌクレオカプシドの核膜からの出芽に関わることが報告されていない Us3 の基質のリン酸化状態を調べた。筆者らの研究グループは、最近、HSV-1 において、viral dUTPase (vdUTPase) をコードする UL50 の Ser-187 が Us3 依存的にリン酸化され、Phos-tag (+) SDS-PAGE 解析により可視化可能であることを報告した(27)。先行報告と同様に(27)、Phos-tag (+) SDS-PAGE 解析において、HSV-1 野生株感染細胞では UL50 Ser-187 のリン酸化状態を示す1本のゲルシフトバンドが検出され、そのバンドは YK511 (Us3K220M) 感染細胞で消失した (図 25A lane 2)。一方、YK780 (Us3-chimera) 感染細胞では HSV-1 野生株および YK781 (Us3-repair) 感染細胞と同様に、UL50 Ser-187 のリン酸化状態を示すバンドが検出された (図 25A lane 3, 4)。この結果から、HSV-2 Us3 は UL50 のリン酸化状態の制御において、HSV-1 Us3 の機能を代替できることが示された。

以上の実験より、HSV-2 Us3 は、HSV-1 感染細胞において、複数の HSV-1 Us3 基質のリン酸化状態の制御能を代替できるが、ヌクレオカプシドの核膜からの出芽に関わる基質のリン酸化状態の制御能は完全には代替できないことが示唆された。

考察

筆者の研究室の先行研究により、ウイルス増殖および病態発現において、HSV-1 Us3 と HSV-2 Us3 の機能に差異があることが示唆されていた(1)。しかしながら、HSV-1 と HSV-2 は培養細胞系における増殖速度や、マウス病態モデルにおける病原性が明確に異なることから、HSV-1 Us3 変異株と HSV-2 Us3 変異株から得られた知見を単純に比較することはできなかった。本研究では、HSV-1 Us3 と HSV-2 Us3 の機能をより直接的に比較するため、HSV-1 の Us3 を HSV-2 Us3 に置換した組換えキメラ株 YK780 (Us3-chimera) およびその復帰株 YK781 (Us3-repair) を作製し、HSV-1 Us3 の代わりに HSV-2 Us3 を発現する HSV-1 は、HSV-1 Us3 の機能を代替できるかを解析した。HSV-1 野生株を HSV-1 Us3 のコントロール、YK511 (Us3K220M) および YK513 (Us3KM-repair) を HSV-1 Us3 の酵素活性のコントロールとして用い、YK780 (Us3-chimera) と YK781 (Us3-repair) を比較した結果、(i) HSV-2 Us3 は、マウス脳内接種時の病態発現の制御において、HSV-1 Us3 の機能を完全には代替できないこと、(ii) HSV-2 Us3 は、感染細胞において HSV-1 Us3 の機能の大部分は代替できるが、ヌクレオカプシドの核膜からの出芽の促進機能は完全には代替できないことが明らかになった。本知見は、(i) HSV-1 の Us3 欠損株または酵素活性消失株は HSV-1 野生株とし比較

して神経病原性が 1,000 倍以上弱毒化する(1, 21, 49)のに対し、HSV-2 では 10 倍程度の弱毒化に留まるということ(1, 23)、(ii) HSV-1 の Us3 欠損株または酵素活性消失株感染細胞の電子顕微鏡像では、核内陥入構造体が観察されるが(1, 22, 24, 26, 68)、HSV-2 Us3 酵素活性消失株感染細胞ではこの構造体はほとんど認められないということを示した過去の報告に一致していた(1)。

HSV-1 Us3 は、ヌクレオカプシドの核膜からの出芽に関するウイルス因子である UL34、UL31 および gB、宿主因子である LaminA/C および Emerin のリン酸化状態を制御し、ヌクレオカプシドの核膜通過を促進することが報告されている(35-42)。本研究において、YK780 (Us3-chimera) 感染細胞で認められた (i) UL31、UL34 および Emerin の局在変化、(ii) 核内陥入構造体の誘導、(iii) UL31、UL34、Emerin および LaminA/C の Us3 によるリン酸化状態の変化は、Us3 酵素活性消失株である YK511 (Us3K220M) 感染細胞で認められる表現系に類似していた。この結果からは、HSV-2 Us3 は、HSV-1 Us3 と比較し、ヌクレオカプシドの核膜からの出芽に関する因子のリン酸化状態を制御する機能が一部低下、または欠如している可能性が考えられる。興味深いことに、HSV-2 Us3 酵素活性消失株感染細胞では、HSV-1 Us3 酵素活性消失株感染細胞で認められるようなヌクレオカプシドの核膜からの出芽の阻害は認められない(1)。したがって、

HSV-2 では HSV-1 Us3 の有する機能の一部を別のウイルス因子が代替している可能性が考えられる。実際、HSV-2 では HSV がコードするもう 1 つの PK である UL13 が、試験管内において LaminA/C および LaminB1 をリン酸化し、LaminA/C および LaminB1 の局在変化を誘導することが報告されている(71)。一方、HSV-1 においては、Us3 が LaminA/C をリン酸化し、その局在変化を誘導するが(41)、UL13 の関与は報告されていない。

HSV-1 野生株感染細胞では、Us3 が gB-T887 をリン酸化することで、gB のエンドサイトーシスが促進され、それにより細胞表面の gB 発現量が抑制されるよう厳密に制御されている(50)。さらに、HSV-1 野生株感染細胞ではリン酸化状態の gB は細胞表面に発現していないことから、リン酸化を受けた gB はすぐに細胞内に取り込まれることが示唆される(49)。しかし、YK780 (Us3-chimera) 感染細胞では、gB の細胞表面量は HSV-1 野生株と同様に制御されていたが、リン酸化状態の gB は核膜および小胞体に局在していなかった。さらに、YK780 (Us3-chimera) 感染細胞では gB-T887 のリン酸化を特異的に検出することのできるリン酸化抗体を用いたウェスタンブロット解析において、HSV-1 野生株感染細胞および YK513 (Us3KM-repair) 感染細胞では認められないバンドが検出された。YK780 (Us3-chimera) 感染細胞にリン酸化抗体が反応したことは、HSV-2 Us3

が gB T-887 をリン酸化できることを示唆している。一方、ウェスタンブロット解析で HSV-1 感染細胞では認められないバンドが検出されたこと、リン酸化された gB の局在が HSV-1 感染細胞とは異なっていたことから、HSV-1 Us3 と HSV-2 Us3 ではリン酸化による制御機構が異なるということが可能性のひとつとして考えられる。したがって、YK780 (Us3-chimera) 感染細胞では、HSV-2 Us3 独自の制御機構により gB T-887 がリン酸化されても gB が細胞内へと取り込まれなかったのかもしれない。

一方、gB-T887 のリン酸化はヌクレオカプシドの核膜からの効率的な出芽に寄与する(36)。Wisner らは、gB-T887A/gH 欠損株に感染した HaCaT 細胞では、YK511 (Us3K220M) 感染細胞で観察される核内陥入構造体が誘導されることから、一次エンベロープを獲得したウイルス粒子が核外膜から細胞質に出す際に、Us3 によりリン酸化を受けた gB が関与することを示している(36)。さらに、gB 欠損/gH 欠損株を用いた研究で、Vero 細胞で perinuclear space に一次エンベロープを獲得したウイルス粒子の蓄積として現れる表現系が、HaCaT 細胞では核内陥入構造体として現れるという報告がある(72)。この表現系は、YK780 (Us3-chimera) 感染細胞の電子顕微鏡観察で得られた結果と非常によく似ている。これらの報告より、YK780 (Us3-chimera) 感染細胞で認められたリン酸化状態の gB の変化

が、電子顕微鏡観察で得られた表現系の一部に関与していることが強く示唆される。さらに、Us3 による gB-T887 のリン酸化は perinuclear space の一次エンベロープを獲得したウイルス粒子が核外膜と融合する際に影響を与えること(36)、gB の膜融合に必須の fusion loop に変異を導入したウイルスでは、プラークサイズの縮小と核内陥入構造体の誘導が認められること(73)が報告されている。これらの報告を考慮すると、YK780 (Us3-chimera) では gB-T887 のリン酸化状態の変化および核内陥入構造体が認められることから、プラークサイズが小さくなるという結果には整合性がある。さらに、核内のエンベロープを獲得したウイルス粒子の割合 (核内陥入構造体の誘導率に相当) とプラークサイズにおいて、YK511 (Us3K220M) と YK780 (Us3-chimera) との間に統計学的有意差が認められたことから整合性のある結果であることが示唆される。

一方、我々の保有する Us3 抗体は HSV-1 と HSV-2 で反応性が異なり Us3 の発現量を比較することができないため、これらの Us3 の機能の差異が Us3 自身の発現量の違いによりもたらされたという可能性は排除できなかった。しかしながら、Us3 基質のリン酸化部位を認識し、感染細胞での Us3 によるリン酸化状態を網羅的に可視化可能であるとされる抗 phospho-PKA substrate 抗体を用いたウェスタンブロット解析の結果、YK780 (Us3-chimera) 感染細胞の Us3 によるリン

酸化状態が HSV-1 野生株感染細胞と同様であったことは、細胞内における酵素活性が同等であることを示唆している。したがって、HSV-1 と HSV-2 Us3 の機能を比較することは可能であると考えられる。

また、我々の保有する Us3 抗体は蛍光抗体法で使用することができないため、HSV-1 野生株感染細胞と YK780 (Us3-chimera) 感染細胞で Us3 の局在が同様であるかは不明である。よって、HSV-1 野生株感染細胞および YK780 (Us3-chimera) 感染細胞における Us3 の局在がヌクレオカプシドの核膜からの出芽制御に影響しうるかは、今後検討する必要がある。

さらに、ヌクレオカプシドの核膜からの出芽への関与が報告されていない Us3 の基質である UL50 のリン酸化状態が、HSV-1 野生株感染細胞と YK780 (Us3-Chimera) 感染細胞で同様であったことは、HSV-2 Us3 の機能がヌクレオカプシドの核膜からの出芽促進能に特異的に、HSV-1 Us3 と異なるという可能性を支持する結果である。また、ヌクレオカプシドの核膜からの出芽との関連が報告されていない機能で、HSV-1 野生株感染細胞と YK780 (Us3-chimera) 感染細胞で差異が認められた機能に、HDAC-2 のリン酸化制御がある。HSV の近縁ウイルスである VZV (varicella- zoster virus) および PRV (pseudorabies virus) では、Us3 による HDAC-2 のリン酸化制御がプラーク形成能に関与することが報告さ

れているが(45)、HSV-1 ではその機能は認められない(45)。したがって、HSV において、Us3 による HDAC-2 のリン酸化制御に生理学的意義が存在するかは不明である。

これらの知見より、HSV-1 と HSV-2 は進化の過程において、Us3 の機能のヌクレオカプシドの核膜からの出芽制御機構、およびヌクレオカプシドの核膜からの出芽に関わる基質のリン酸化状態やその局在の制御能に差異が生じたという可能性が考えられる。

総括

HSV-1 Us3 と HSV-2 Us3 の機能に差異があるかを調べるため、HSV-1 Us3 の代わりに HSV-2 Us3 を発現する HSV-1 を用いた解析により得られた知見は以下の通りである。

- (i) 培養細胞でのウイルス増殖において、HSV-2 Us3 は HSV-1 Us3 の機能を代替できた。
- (ii) マウス病態モデルにおける神経病原性発現の制御において、HSV-2 Us3 は HSV-1 Us3 の機能を完全には代替できなかった。
- (iii) 感染細胞におけるアポトーシスおよび細胞形態の制御において、HSV-2 Us3 は HSV-1 Us3 の機能を代替できた。
- (iv) 感染細胞における gB 表面発現量の制御において、HSV-2 Us3 は HSV-1 Us3 の機能を代替できた。
- (v) 感染細胞におけるヌクレオカプシドの核膜からの出芽の制御において、HSV-2 Us3 は HSV-1 Us3 の機能を完全には代替できなかった。
- (vi) ヌクレオカプシドの核膜からの出芽に関与する、Us3 のウイルス基質および宿主細胞基質のリン酸化状態やその局在の制御において、HSV-2 Us3 は HSV-1 Us3 の機能を完全には代替できなかった。

- (vii) ヌクレオカプシドの核膜からの出芽に関与するという報告のない
UL50 のリン酸化、および PKA のリン酸化標的配列に対するリン酸化
抗体を用いて評価した感染細胞での Us3 による複数のリン酸化の制御
において、HSV-2 Us3 は HSV-1 Us3 の機能を代替できた。

以上の結果から、HSV-1 Us3 と HSV-2 Us3 の機能は、大部分は同様であるが、
ヌクレオカプシドの核膜からの出芽促進能、およびヌクレオカプシドの核膜か
らの出芽に関わる基質のリン酸化状態やその局在の制御能が異なることが明ら
かになった。本研究は、HSV-1 Us3 と HSV-2 Us3 の機能に差異があることを直
接的に示した初めての報告である。

謝辞

本研究は東京大学 医科学研究所 感染症国際研究センター 感染制御系 ウィルス学分野 (現 東京大学 医科学研究所 感染・免疫部門 ウィルス病態制御分野) にて行われた。

本研究を遂行するにあたり、これ以上無い研究環境を与えてくださり、日々適切なお助言、ご指導を賜りました東京大学医科学研究所ウィルス病態制御分野 川口 寧 教授に深く感謝と敬意を表します。

ウィルス病態制御分野 加藤哲久 助教、有井 潤 助教には、学生に近い立場から日頃の実験から学会発表に至るまで、多くの場面で有益なお指導とお助言を頂きましたことに深く感謝致します。

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 相良 洋 助教には、電子顕微鏡観察のための試料作成から観察、電子顕微鏡の取扱いにおいて、細部にわたり丁寧なお指導を賜りました。深く感謝致します。

現 国立医薬品食品衛生研究所第四室主任研究官 上間 匡 博士には、研究室所属当初、共焦点顕微鏡および電子顕微鏡観察をはじめとし、多くの場面で丁寧なお指導と温かいお助言を頂きました。深く感謝致します。

ウィルス病態制御分野の 小山志保子 氏、安藤朋子 氏には、研究生生活を送る

上で多岐にわたって細やかな配慮、ご協力を頂きましたことに、深く感謝致します。

ウイルス病態制御分野の先輩方、とりわけ 今井孝彦 博士、小柳直人 氏には、実験のご指導のみならず、研究生活を送る上で多岐にわたって惜しみないご指導、ご協力を頂きました。心より感謝致します。

ウイルス病態制御分野の同期・後輩の皆様には、終始有意義な議論から多くの知識や示唆を与えて頂きましたことに、深く感謝致します。

参考文献

1. **Morimoto T, Arii J, Tanaka M, Sata T, Akashi H, Yamada M, Nishiyama Y, Uema M, Kawaguchi Y.** 2009. Differences in the regulatory and functional effects of the Us3 protein kinase activities of herpes simplex virus 1 and 2. *Journal of virology* **83**:11624-11634.
2. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/fs_herpe.htm.
3. **Roizman B, Knipe D. M., and Whitley R. J.** 2013. Herpes simplex viruses. *In* Knipe D. M. HPM, Cohen J. I., Griffin D. E., Lamb R. A., Martin M. A., Racaniello V. R., and Roizman B. (ed.), *Fields Virology*, 6th ed. Lippincott-Williams & Wilkins, Philadelphia, P. A.
4. **Davison AJ.** 2002. Evolution of the herpesviruses. *Veterinary microbiology* **86**:69-88.
5. **Koelle DM, Corey L.** 2008. Herpes simplex: insights on pathogenesis and possible vaccines. *Annual review of medicine* **59**:381-395.
6. **Skoldenberg B.** 1996. Herpes simplex encephalitis. *Scandinavian journal of infectious diseases. Supplementum* **100**:8-13.
7. **Skoldenberg B, Forsgren M.** 1985. Acyclovir versus vidarabine in herpes simplex encephalitis. *Scandinavian journal of infectious diseases. Supplementum* **47**:89-96.
8. **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 infectious diseases* **1**:5.
9. **Spear PG, Longnecker R.** 2003. Herpesvirus entry: an update. *Journal of virology* **77**:10179-10185.
10. **Lehman IR, Boehmer PE.** 1999. Replication of herpes simplex virus DNA. *The Journal of biological chemistry* **274**:28059-28062.
11. **Norberg P.** 2010. Divergence and genotyping of human alpha-herpesviruses: an overview. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* **10**:14-25.
12. **Dolan A, Jamieson FE, Cunningham C, Barnett BC, McGeoch DJ.** 1998. The genome sequence of herpes simplex virus type 2. *Journal of virology* **72**:2010-2021.

13. **McGeoch DJ, Moss HW, McNab D, Frame MC.** 1987. DNA sequence and genetic content of the HindIII 1 region in the short unique component of the herpes simplex virus type 2 genome: identification of the gene encoding glycoprotein G, and evolutionary comparisons. *The Journal of general virology* **68 (Pt 1):**19-38.
14. **Le Sage V, Jung M, Alter JD, Wills EG, Johnston SM, Kawaguchi Y, Baines JD, Banfield BW.** 2013. The herpes simplex virus 2 UL21 protein is essential for virus propagation. *Journal of virology* **87:**5904-5915.
15. **McGeoch DJ, Davison AJ.** 1986. Alphaherpesviruses possess a gene homologous to the protein kinase gene family of eukaryotes and retroviruses. *Nucleic acids research* **14:**1765-1777.
16. **Frame MC, Purves FC, McGeoch DJ, Marsden HS, Leader DP.** 1987. Identification of the herpes simplex virus protein kinase as the product of viral gene US3. *The Journal of general virology* **68 (Pt 10):**2699-2704.
17. **Purves FC, Longnecker RM, Leader DP, Roizman B.** 1987. Herpes simplex virus 1 protein kinase is encoded by open reading frame US3 which is not essential for virus growth in cell culture. *Journal of virology* **61:**2896-2901.
18. **Benetti L, Roizman B.** 2004. Herpes simplex virus protein kinase US3 activates and functionally overlaps protein kinase A to block apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101:**9411-9416.
19. **Chuluunbaatar U, Roller R, Feldman ME, Brown S, Shokat KM, Mohr I.** 2010. Constitutive mTORC1 activation by a herpesvirus Akt surrogate stimulates mRNA translation and viral replication. *Genes & development* **24:**2627-2639.
20. **Smith RF, Smith TF.** 1989. Identification of new protein kinase-related genes in three herpesviruses, herpes simplex virus, varicella-zoster virus, and Epstein-Barr virus. *Journal of virology* **63:**450-455.
21. **Meignier B, Longnecker R, Mavromara-Nazos P, Sears AE, Roizman B.** 1988. Virulence of and establishment of latency by genetically engineered deletion mutants of herpes simplex virus 1. *Virology* **162:**251-254.
22. **Sagou K, Imai T, Sagara H, Uema M, Kawaguchi Y.** 2009. Regulation of the catalytic activity of herpes simplex virus 1 protein kinase Us3 by

- autophosphorylation and its role in pathogenesis. *Journal of virology* **83**:5773-5783.
23. **Nishiyama Y, Yamada Y, Kurachi R, Daikoku T.** 1992. Construction of a US3 lacZ insertion mutant of herpes simplex virus type 2 and characterization of its phenotype in vitro and in vivo. *Virology* **190**:256-268.
 24. **Ryckman BJ, Roller RJ.** 2004. Herpes simplex virus type 1 primary envelopment: UL34 protein modification and the US3-UL34 catalytic relationship. *Journal of virology* **78**:399-412.
 25. **Longnecker R, Roizman B.** 1987. Clustering of genes dispensable for growth in culture in the S component of the HSV-1 genome. *Science* **236**:573-576.
 26. **Reynolds AE, Wills EG, Roller RJ, Ryckman BJ, Baines JD.** 2002. Ultrastructural localization of the herpes simplex virus type 1 UL31, UL34, and US3 proteins suggests specific roles in primary envelopment and egress of nucleocapsids. *Journal of virology* **76**:8939-8952.
 27. **Kato A, Tsuda S, Liu Z, Kozuka-Hata H, Oyama M, Kawaguchi Y.** 2013. Herpes Simplex Virus 1 Protein Kinase Us3 Phosphorylates Viral dUTPase and Regulates Its Catalytic Activity in Infected Cells. *Journal of virology*.
 28. **Imai T, Koyanagi N, Ogawa R, Shindo K, Suenaga T, Sato A, Arii J, Kato A, Kiyono H, Arase H, Kawaguchi Y.** 2013. Us3 kinase encoded by herpes simplex virus 1 mediates downregulation of cell surface major histocompatibility complex class I and evasion of CD8+ T cells. *PloS one* **8**:e72050.
 29. **Asano S, Honda T, Goshima F, Watanabe D, Miyake Y, Sugiura Y, Nishiyama Y.** 1999. US3 protein kinase of herpes simplex virus type 2 plays a role in protecting corneal epithelial cells from apoptosis in infected mice. *The Journal of general virology* **80 (Pt 1)**:51-56.
 30. **Leopardi R, Van Sant C, Roizman B.** 1997. The herpes simplex virus 1 protein kinase US3 is required for protection from apoptosis induced by the virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**:7891-7896.
 31. **Munger J, Chee AV, Roizman B.** 2001. The U(S)3 protein kinase blocks apoptosis induced by the d120 mutant of herpes simplex virus 1 at a premitochondrial stage. *Journal of virology* **75**:5491-5497.

32. **Munger J, Roizman B.** 2001. The US3 protein kinase of herpes simplex virus 1 mediates the posttranslational modification of BAD and prevents BAD-induced programmed cell death in the absence of other viral proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**:10410-10415.
33. **Ogg PD, McDonnell PJ, Ryckman BJ, Knudson CM, Roller RJ.** 2004. The HSV-1 Us3 protein kinase is sufficient to block apoptosis induced by overexpression of a variety of Bcl-2 family members. *Virology* **319**:212-224.
34. **Wang X, Patenode C, Roizman B.** 2011. US3 protein kinase of HSV-1 cycles between the cytoplasm and nucleus and interacts with programmed cell death protein 4 (PDCD4) to block apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**:14632-14636.
35. **Reynolds AE, Ryckman BJ, Baines JD, Zhou Y, Liang L, Roller RJ.** 2001. U(L)31 and U(L)34 proteins of herpes simplex virus type 1 form a complex that accumulates at the nuclear rim and is required for envelopment of nucleocapsids. *Journal of virology* **75**:8803-8817.
36. **Wisner TW, Wright CC, Kato A, Kawaguchi Y, Mou F, Baines JD, Roller RJ, Johnson DC.** 2009. Herpesvirus gB-induced fusion between the virion envelope and outer nuclear membrane during virus egress is regulated by the viral US3 kinase. *Journal of virology* **83**:3115-3126.
37. **Mou F, Wills E, Baines JD.** 2009. Phosphorylation of the U(L)31 protein of herpes simplex virus 1 by the U(S)3-encoded kinase regulates localization of the nuclear envelopment complex and egress of nucleocapsids. *Journal of virology* **83**:5181-5191.
38. **Kato A, Yamamoto M, Ohno T, Kodaira H, Nishiyama Y, Kawaguchi Y.** 2005. Identification of proteins phosphorylated directly by the Us3 protein kinase encoded by herpes simplex virus 1. *Journal of virology* **79**:9325-9331.
39. **Leach N, Bjerke SL, Christensen DK, Bouchard JM, Mou F, Park R, Baines J, Haraguchi T, Roller RJ.** 2007. Emerin is hyperphosphorylated and redistributed in herpes simplex virus type 1-infected cells in a manner dependent on both UL34 and US3. *Journal of virology* **81**:10792-10803.
40. **Morris JB, Hofemeister H, O'Hare P.** 2007. Herpes simplex virus infection induces phosphorylation and delocalization of emerin, a key inner nuclear

- membrane protein. *Journal of virology* **81**:4429-4437.
41. **Mou F, Forest T, Baines JD.** 2007. US3 of herpes simplex virus type 1 encodes a promiscuous protein kinase that phosphorylates and alters localization of lamin A/C in infected cells. *Journal of virology* **81**:6459-6470.
 42. **Purves FC, Spector D, Roizman B.** 1991. The herpes simplex virus 1 protein kinase encoded by the US3 gene mediates posttranslational modification of the phosphoprotein encoded by the UL34 gene. *Journal of virology* **65**:5757-5764.
 43. **Poon AP, Liang Y, Roizman B.** 2003. Herpes simplex virus 1 gene expression is accelerated by inhibitors of histone deacetylases in rabbit skin cells infected with a mutant carrying a cDNA copy of the infected-cell protein no. 0. *Journal of virology* **77**:12671-12678.
 44. **Poon AP, Gu H, Roizman B.** 2006. ICP0 and the US3 protein kinase of herpes simplex virus 1 independently block histone deacetylation to enable gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**:9993-9998.
 45. **Walters MS, Kinchington PR, Banfield BW, Silverstein S.** 2010. Hyperphosphorylation of histone deacetylase 2 by alphaherpesvirus US3 kinases. *Journal of virology* **84**:9666-9676.
 46. **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. *Journal of virology* **82**:6172-6189.
 47. **Naghavi MH, Gundersen GG, Walsh D.** 2013. Plus-end tracking proteins, CLASPs, and a viral Akt mimic regulate herpesvirus-induced stable microtubule formation and virus spread. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
 48. **Kato A, Ariei J, Shiratori I, Akashi H, Arase H, Kawaguchi Y.** 2009. Herpes simplex virus 1 protein kinase Us3 phosphorylates viral envelope glycoprotein B and regulates its expression on the cell surface. *Journal of virology* **83**:250-261.
 49. **Imai T, Sagou K, Ariei J, Kawaguchi Y.** 2010. Effects of phosphorylation of herpes simplex virus 1 envelope glycoprotein B by Us3 kinase in vivo and in vitro. *Journal of virology* **84**:153-162.

50. **Imai T, Arii J, Minowa A, Kakimoto A, Koyanagi N, Kato A, Kawaguchi Y.** 2011. Role of the herpes simplex virus 1 Us3 kinase phosphorylation site and endocytosis motifs in the intracellular transport and neurovirulence of envelope glycoprotein B. *Journal of virology* **85**:5003-5015.
51. **Kato A, Liu Z, Minowa A, Imai T, Tanaka M, Sugimoto K, Nishiyama Y, Arii J, Kawaguchi Y.** 2011. Herpes simplex virus 1 protein kinase Us3 and major tegument protein UL47 reciprocally regulate their subcellular localization in infected cells. *Journal of virology* **85**:9599-9613.
52. **Cartier A, Broberg E, Komai T, Henriksson M, Masucci MG.** 2003. The herpes simplex virus-1 Us3 protein kinase blocks CD8T cell lysis by preventing the cleavage of Bid by granzyme B. *Cell death and differentiation* **10**:1320-1328.
53. **Cartier A, Masucci MG.** 2004. Differential regulation of MHC class-I-restricted and unrestricted cytotoxicity by the Us3 protein kinase of herpes simplex virus-1. *Scandinavian journal of immunology* **60**:592-599.
54. **Sloan DD, Zahariadis G, Posavad CM, Pate NT, Kussick SJ, Jerome KR.** 2003. CTL are inactivated by herpes simplex virus-infected cells expressing a viral protein kinase. *Journal of immunology* **171**:6733-6741.
55. **Rao P, Pham HT, Kulkarni A, Yang Y, Liu X, Knipe DM, Cresswell P, Yuan W.** 2011. Herpes simplex virus 1 glycoprotein B and US3 collaborate to inhibit CD1d antigen presentation and NKT cell function. *Journal of virology* **85**:8093-8104.
56. **Kato A, Shindo K, Maruzuru Y, Kawaguchi Y.** 2013. Phosphorylation of a herpes simplex virus 1 dUTPase by a viral protein kinase Us3 dictates viral pathogenicity in the central nervous system but not at the periphery. *Journal of virology*.
57. **Tischer BK, von Einem J, Kaufer B, Osterrieder N.** 2006. Two-step red-mediated recombination for versatile high-efficiency markerless DNA manipulation in *Escherichia coli*. *BioTechniques* **40**:191-197.
58. **Arii J, Goto H, Suenaga T, Oyama M, Kozuka-Hata H, Imai T, Minowa A, Akashi H, Arase H, Kawaoka Y, Kawaguchi Y.** 2010. Non-muscle myosin IIA is a functional entry receptor for herpes simplex virus-1. *Nature* **467**:859-862.

59. **Jiang YM, Yamada H, Goshima F, Daikoku T, Oshima S, Wada K, Nishiyama Y.** 1998. Characterization of the herpes simplex virus type 2 (HSV-2) US2 gene product and a US2-deficient HSV-2 mutant. *The Journal of general virology* **79 (Pt 11):2777-2784.**
60. **Fujii H, Mugitani M, Koyanagi N, Liu Z, Tsuda S, Arie J, Kato A, Kawaguchi Y.** 2013. Role of the Nuclease Activities Encoded by Herpes Simplex Virus 1 UL12 in Viral Replication and Neurovirulence. *Journal of virology.*
61. **Shiba C, Daikoku T, Goshima F, Takakuwa H, Yamauchi Y, Koiwai O, Nishiyama Y.** 2000. The UL34 gene product of herpes simplex virus type 2 is a tail-anchored type II membrane protein that is significant for virus envelopment. *The Journal of general virology* **81:2397-2405.**
62. **McGeoch DJ, Dolan A, Donald S, Rixon FJ.** 1985. Sequence determination and genetic content of the short unique region in the genome of herpes simplex virus type 1. *Journal of molecular biology* **181:1-13.**
63. **Murata T, Goshima F, Yamauchi Y, Koshizuka T, Takakuwa H, Nishiyama Y.** 2002. Herpes simplex virus type 2 US3 blocks apoptosis induced by sorbitol treatment. *Microbes and infection / Institut Pasteur* **4:707-712.**
64. **Nishiyama Y, Murata T.** 2002. Anti-apoptotic protein kinase of herpes simplex virus. *Trends in microbiology* **10:105-107.**
65. **Kato A, Yamamoto M, Ohno T, Tanaka M, Sata T, Nishiyama Y, Kawaguchi Y.** 2006. Herpes simplex virus 1-encoded protein kinase UL13 phosphorylates viral Us3 protein kinase and regulates nuclear localization of viral envelopment factors UL34 and UL31. *Journal of virology* **80:1476-1486.**
66. **Mettenleiter TC, Muller F, Granzow H, Klupp BG.** 2013. The way out: what we know and do not know about herpesvirus nuclear egress. *Cellular microbiology* **15:170-178.**
67. **Johnson DC, Baines JD.** 2011. Herpesviruses remodel host membranes for virus egress. *Nature reviews. Microbiology* **9:382-394.**
68. **Poon AP, Benetti L, Roizman B.** 2006. U(S)3 and U(S)3.5 protein kinases of herpes simplex virus 1 differ with respect to their functions in blocking apoptosis and in virion maturation and egress. *Journal of virology* **80:3752-3764.**

69. **Finnen RL, Roy BB, Zhang H, Banfield BW.** 2010. Analysis of filamentous process induction and nuclear localization properties of the HSV-2 serine/threonine kinase Us3. *Virology* **397**:23-33.
70. **Kinoshita E, Kinoshita-Kikuta E, Takiyama K, Koike T.** 2006. Phosphate-binding tag, a new tool to visualize phosphorylated proteins. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **5**:749-757.
71. **Cano-Monreal GL, Wylie KM, Cao F, Tavis JE, Morrison LA.** 2009. Herpes simplex virus 2 UL13 protein kinase disrupts nuclear lamins. *Virology* **392**:137-147.
72. **Farnsworth A, Wisner TW, Webb M, Roller R, Cohen G, Eisenberg R, Johnson DC.** 2007. Herpes simplex virus glycoproteins gB and gH function in fusion between the virion envelope and the outer nuclear membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**:10187-10192.
73. **Wright CC, Wisner TW, Hannah BP, Eisenberg RJ, Cohen GH, Johnson DC.** 2009. Fusion between perinuclear virions and the outer nuclear membrane requires the fusogenic activity of herpes simplex virus gB. *Journal of virology* **83**:11847-11856.

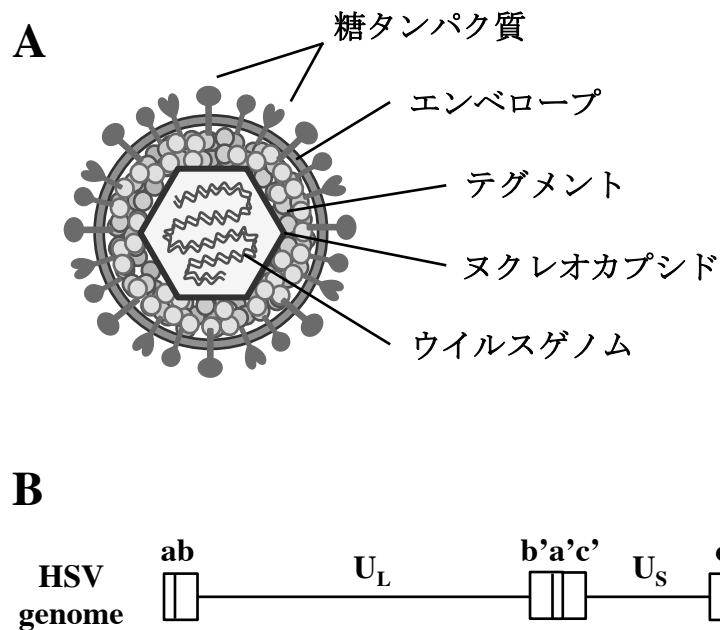


図 1. 単純ヘルペスウイルスの構造

(A) 成熟ウイルス粒子の模式図

粒子はほぼ球状で、外側よりエンベロープ、テグメント、カプシドという 3 つの構造から成る。エンベロープは宿主細胞の脂質二重膜由来で、複数の糖タンパク質が埋め込まれて構成されている。ウイルスゲノムはカプシドに内包されている。

(B) HSV ゲノム DNA の模式図

a, b, c, a', b', c': 倒置反復配列。 U_L , U_S : ユニーク配列。ユニークな塩基配列 U_L , U_S を挟んでそれぞれ倒置反復配列 ab と a'b' および ac と a'c' が存在する。

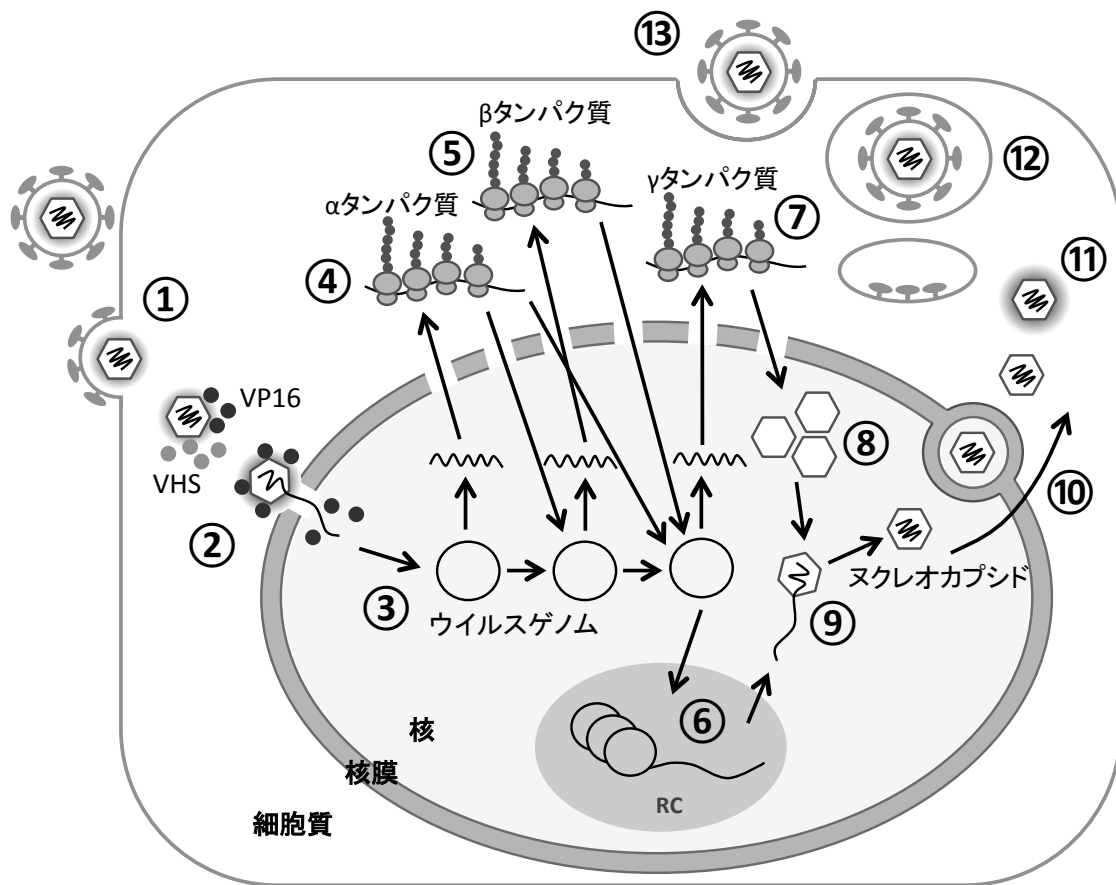


図 2. 単純ヘルペスウイルスの生活環の模式図

① 宿主細胞への吸着および侵入。② カプシドの核へ輸送。③ ウイルスゲノムの核への注入および環状化。④ α タンパク質の生成。⑤ β タンパク質の生成。⑥ ウイルスゲノムの複製。⑦ γ タンパク質の生成。⑧ カプシドの生成。⑨ ウイルスゲノムのパッケージング。⑩ ヌクレオカプシドの核膜からの出芽。⑪ テグメント獲得。⑫ エンベロープ獲得。⑬ 成熟ウイルス粒子の出芽。

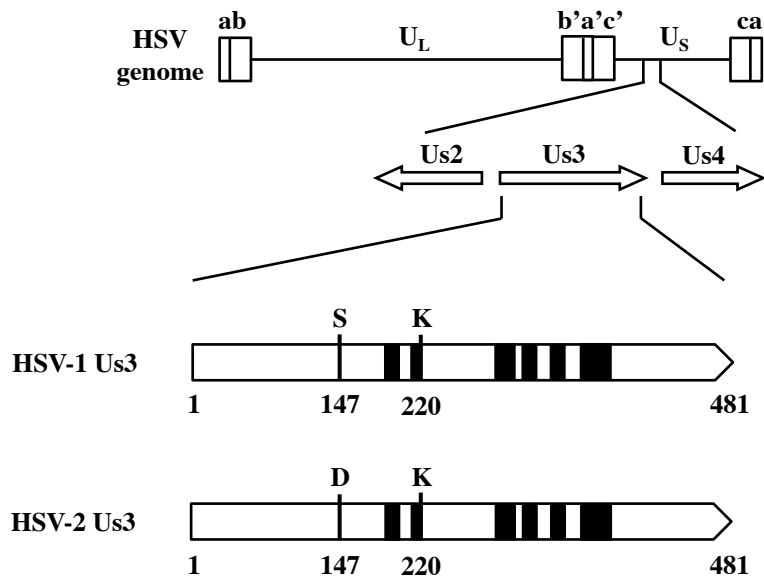


図 3. HSV-1 Us3 および HSV-2 Us3 の模式図

HSV-1 および HSV-2 の Us3 はどちらも 481 アミノ酸から成る。K220: Us3 の活性中心。HSV-1 S147: 自己リン酸化部位であり Us3 の活性の一部を制御している。HSV-2 D147: 恒常的なリン酸化状態であり制御機構は存在しない。Shaded areas: 真核生物の PK で保存された subdomain I~VI (20)。

表 1. 組換えウイルス作製に使用したプライマー配列

Mutation	Sequence
HSV-1 Δ Us3	5'-CGGGGCCCGTCGTTTCGGGGTGCTCGTTGGTTGGCACTCACGGT GCGGCGAATGGAGCAAAAGCTCATTTTC-3' 5'-TCGGGGTCTTTTTGTGCCAACCCGCAAACAGCACCGCCCCCAG GGGGCGGTCATTTGTCATCGTCGCCT-3'
Us3-chimera	5'-GGCCCGTCGTTTCGGGGTGCTCGTTGGTTGGCACTCACGGTGCG GCGAATGGCCTGTCGTAAGTTCTGTGG-3' 5'-TCGGGGTCTTTTTGTGCCAACCCGCAAACAGCACCGCCCCCTG GGGGCGGTCACCTAGGGTGAAATAGCG-3'
Us3-repair	5'-GGCCCGTCGTTTCGGGGTGCTCGTTGGTTGGCACTCACGGTGCG GCGAATGGCCTGTCGTAAGTTTTGTCG-3' 5'-TCGGGGTCTTTTTGTGCCAACCCGCAAACAGCACCGCCCCCTG GGGGCGGTCATTTCTGTTGAAACAGCG-3'

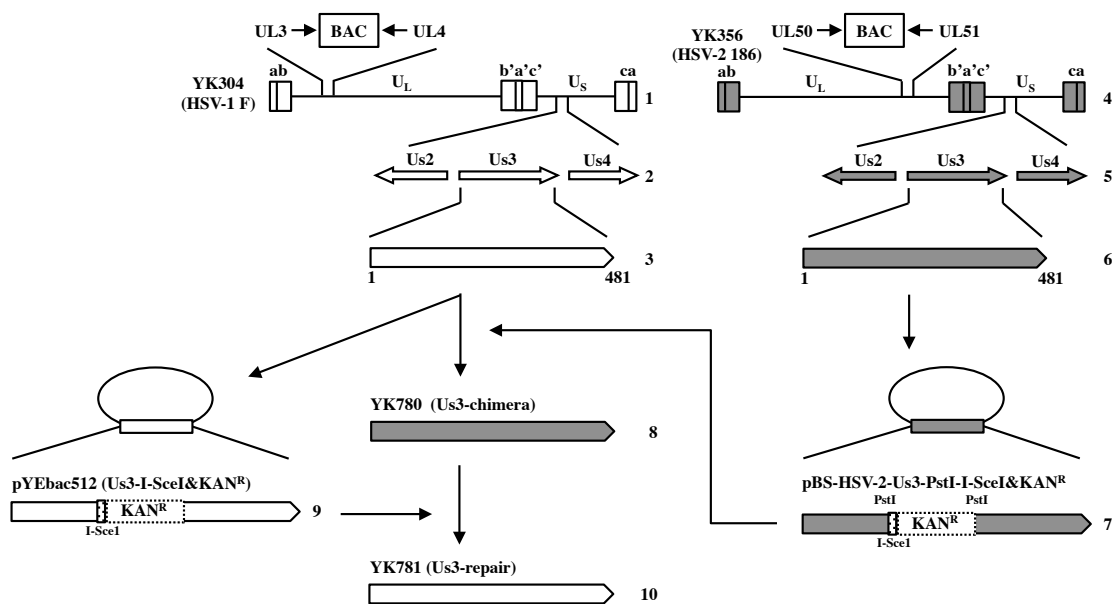


図 4. 本研究で使用した組換えウイルス

YK304 を親株とし、HSV-1 Us3 を HSV-2 Us3 に置換したウイルス YK780 (Us3-chimera) および、その復帰株 YK781 (Us3-repair) の模式図を示す。unique 配列は unique long (UL) と unique short (Us) ドメインとして表した。YK304 ゲノムは UL3 と UL4 の遺伝子間、YK356 ゲノムは UL50 と UL51 の遺伝子間に bacterial artificial chromosome (BAC) が挿入されている。

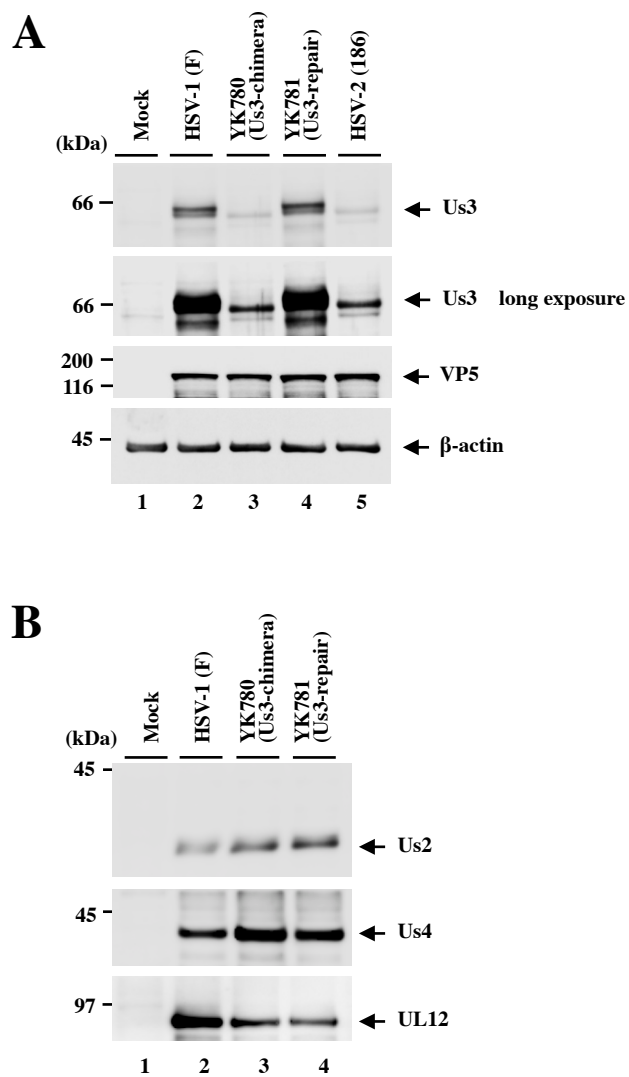


図 5. 組換えウイルスの Us3 および Us2、Us4 の発現の確認

各ウイルスを Vero 細胞に MOI 3 で感染させ、感染 12 時間後に細胞を回収し、Us3、VP5、および β -actin (A)、Us2、Us4 および UL12 (B) に対する抗体を用いたウェスタンブロッティングにより解析した。

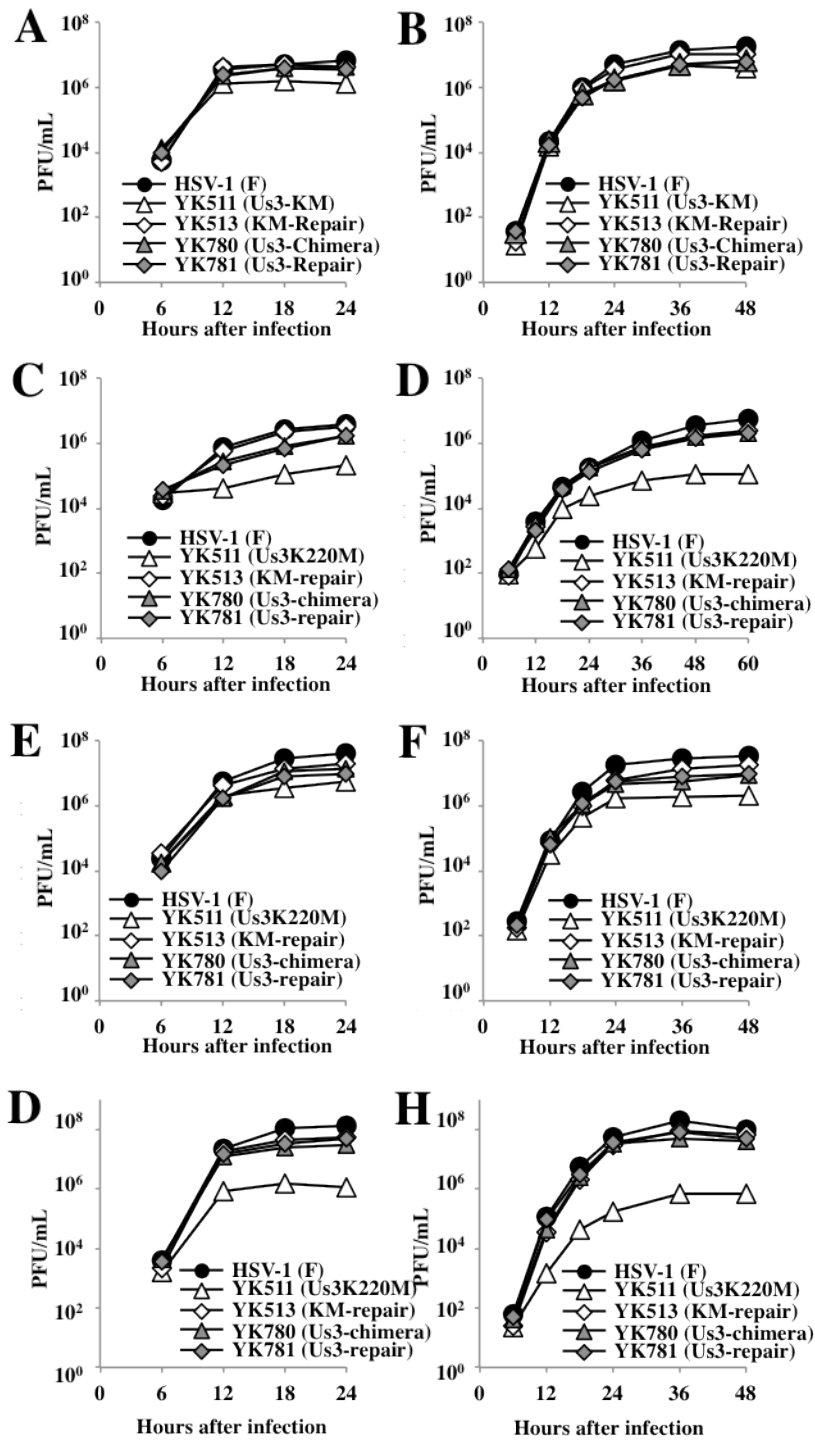


図 6. 組換えウイルスの増殖能

(A-H) Vero 細胞 (A, B)、HEp-2 細胞 (C, D)、SK-N-SH 細胞 (E, F) および HaCaT 細胞 (G, H) に、MOI 3 (left figures) および MOI 0.01 (right figures) で各ウイルスを感染させ、各タイムポイントにおけるウイルス力価を測定した。

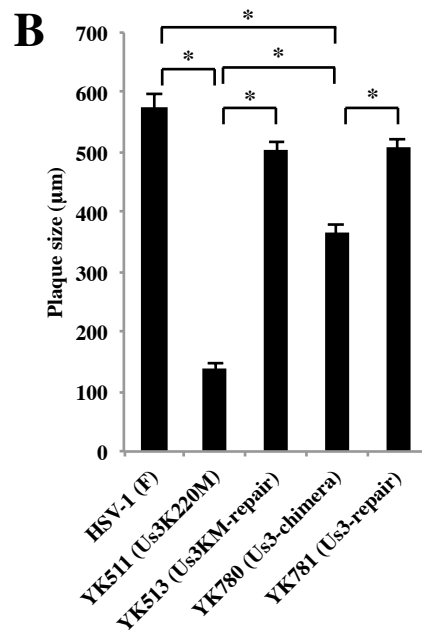
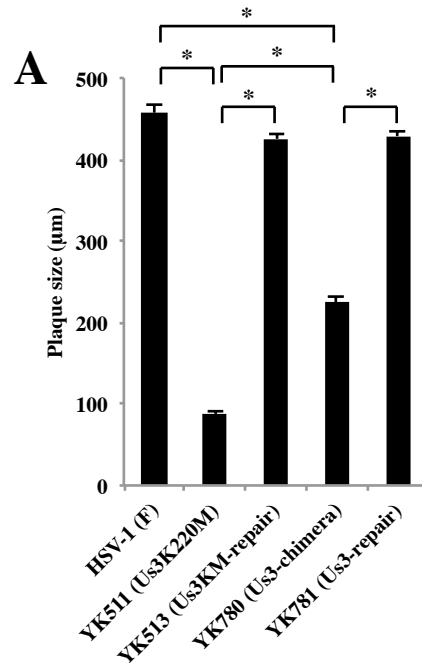


図 7. 組換えウイルス感染細胞のプラークサイズ

各ウイルスを Vero 細胞 (A) または HaCaT 細胞 (B) に 100 PFU で感染させ、感染 48 時間後にプラークサイズを測定した。グラフには、n=30 の実験で得られた結果の平均値と標準誤差を示した (*, $P < 1 \times 10^{-8}$)。

表 2. マウス脳内接種後の各組換えウイルスの LD₅₀ 値

Virus	LD ₅₀ (PFU)
YK511 (Us3K220M)	141,316
YK513 (Us3KM-repair)	52
YK780 (Us3-chimera).....	1,739
YK781 (Us3-repair)	185

体重 4g 幅の 3 週齢メス ICR マウスに 10 倍段階希釈した各ウイルスを各濃度 6 匹ずつ接種し、14 日後の生存数を計数した。LD₅₀ 値は Behrens-Karber 法にて算出した。同様の試験を独立して 3 回行い、その平均値を示した。

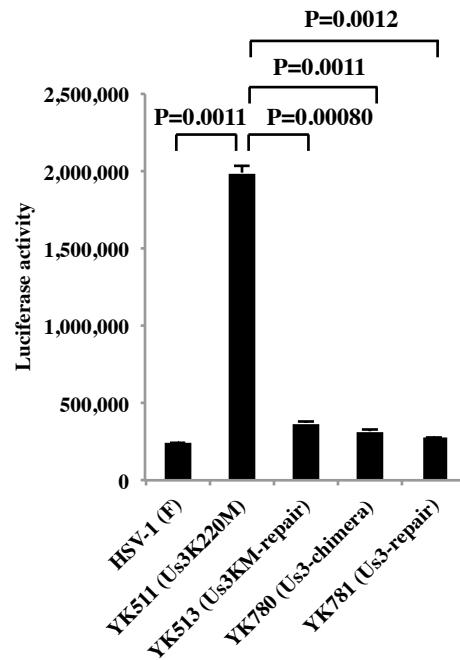


図 8. 組換えウイルス感染細胞におけるアポトーシスの制御

各ウイルスを SK-SN-SH 細胞に MOI 5 で感染させ、18 時間後にソルビトール処理によりアポトーシスを誘導し、5 時間後に細胞を回収して Caspase 3/7 活性を測定した。グラフには triplicate の実験の平均値と標準誤差を示した。

なお、実験は独立に 3 回行い、グラフには代表的な値を示した。

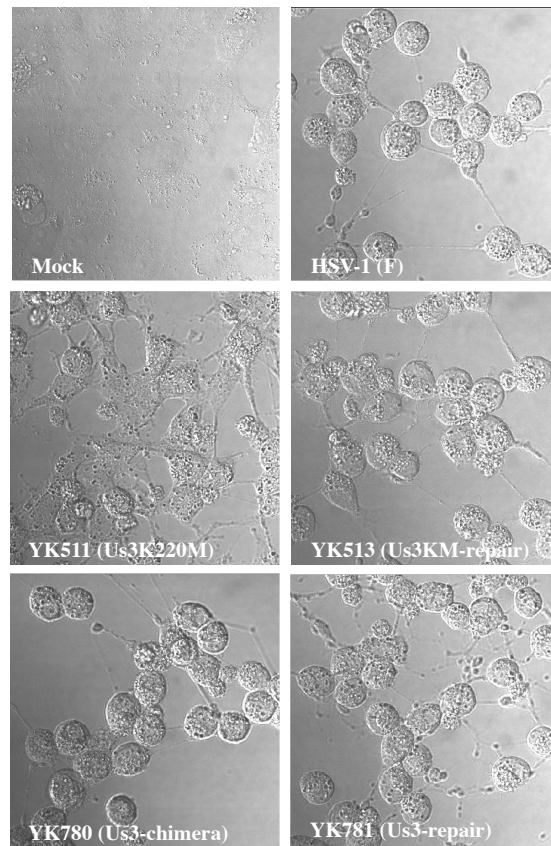


図 9. 組換えウイルス感染細胞の形態変化

各ウイルスを Vero 細胞に MOI 3 で感染させ、感染 24 時間後に共焦点顕微鏡で観察した。

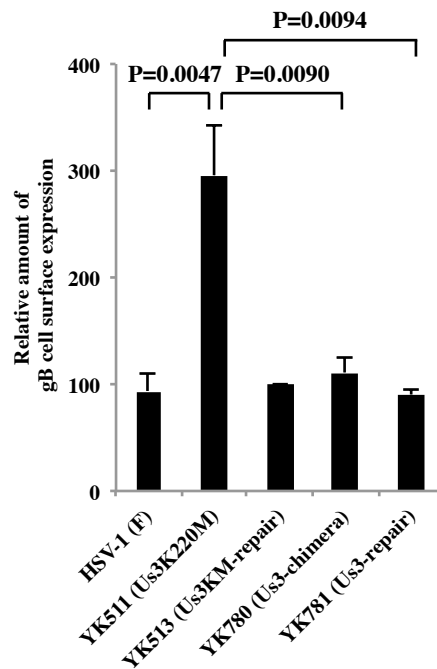


図 10. 組換えウイルス感染細胞における gB 細胞表面発現量

各ウイルスを Vero 細胞に MOI 3 で感染させ、感染 6 時間後に細胞を回収し、gB の細胞表面量を抗 gB 抗体を用いたフローサイトメトリーにて測定した。

データは YK513 (Us3-KM-Repair) を 100 とした gB の細胞表面量の相対値を表している。グラフには独立した 3 回の実験で得られた結果の平均値と標準誤差を示した。

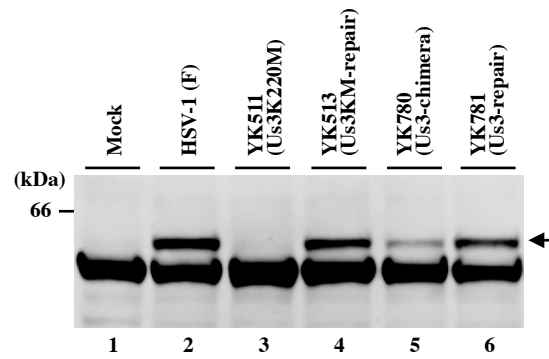


図 11. HDAC-2 のリン酸化

各ウイルスを SK-SN-SH 細胞に MOI 3 で感染させ、感染 18 時間後に回収し、HDAC2 に対する抗体を用いたウェスタンブロッティングにより検出した。

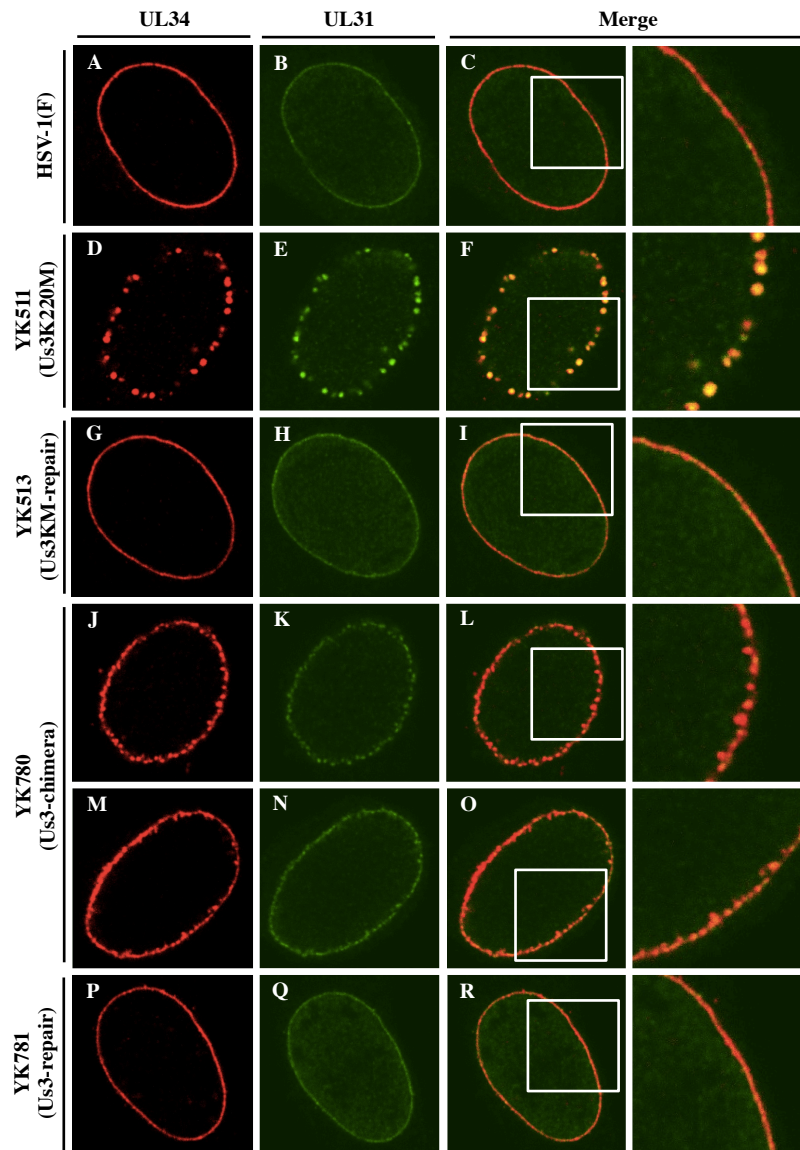


図 12. Vero 細胞における UL31 および UL34 の局在

各ウイルスを Vero 細胞に MOI 3 で感染させ、感染 18 時間後に固定し、UL31 および UL34 に対する抗体を用いた蛍光抗体法により共染色後、共焦点顕微鏡で観察した。

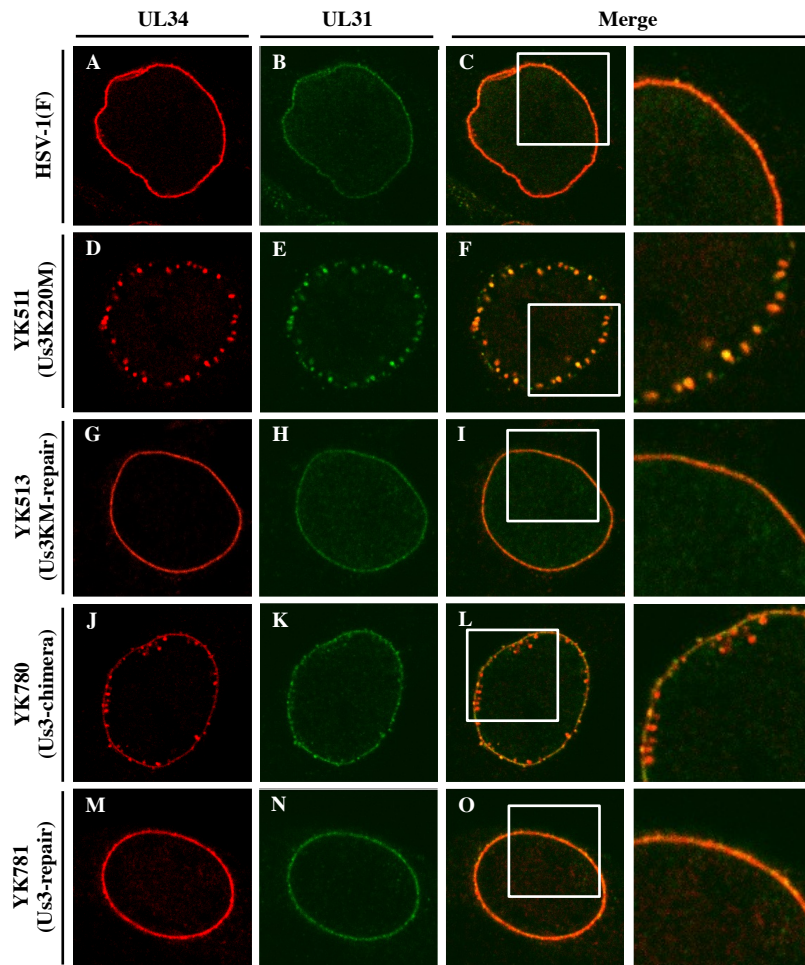


図 13. HaCaT 細胞における UL31 および UL34 の局在

各ウイルスを Vero 細胞に MOI 3 で感染させ、感染 18 時間後に固定し、UL31 および UL34 に対する抗体を用いた蛍光抗体法により共染色後、共焦点顕微鏡で観察した。

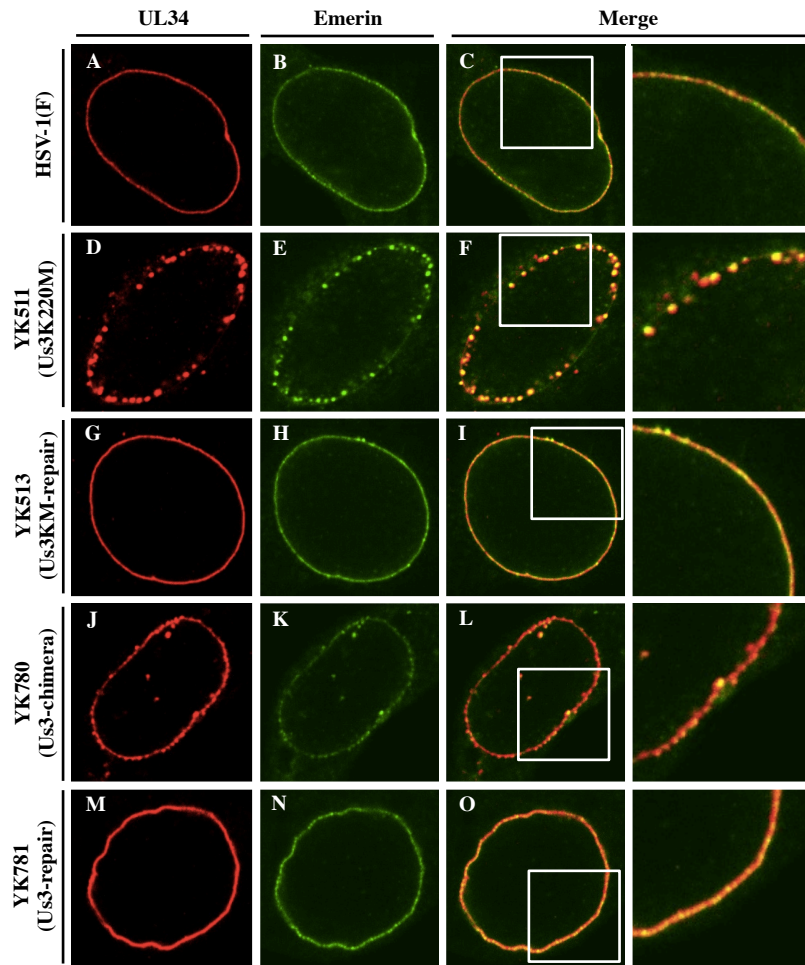


図 14. Emerin および UL34 の局在

各ウイルスを Vero 細胞に MOI 3 で感染させ、感染 18 時間後に固定し、Emerin および UL34 に対する抗体を用いた蛍光抗体法により共染色後、共焦点顕微鏡で観察した。

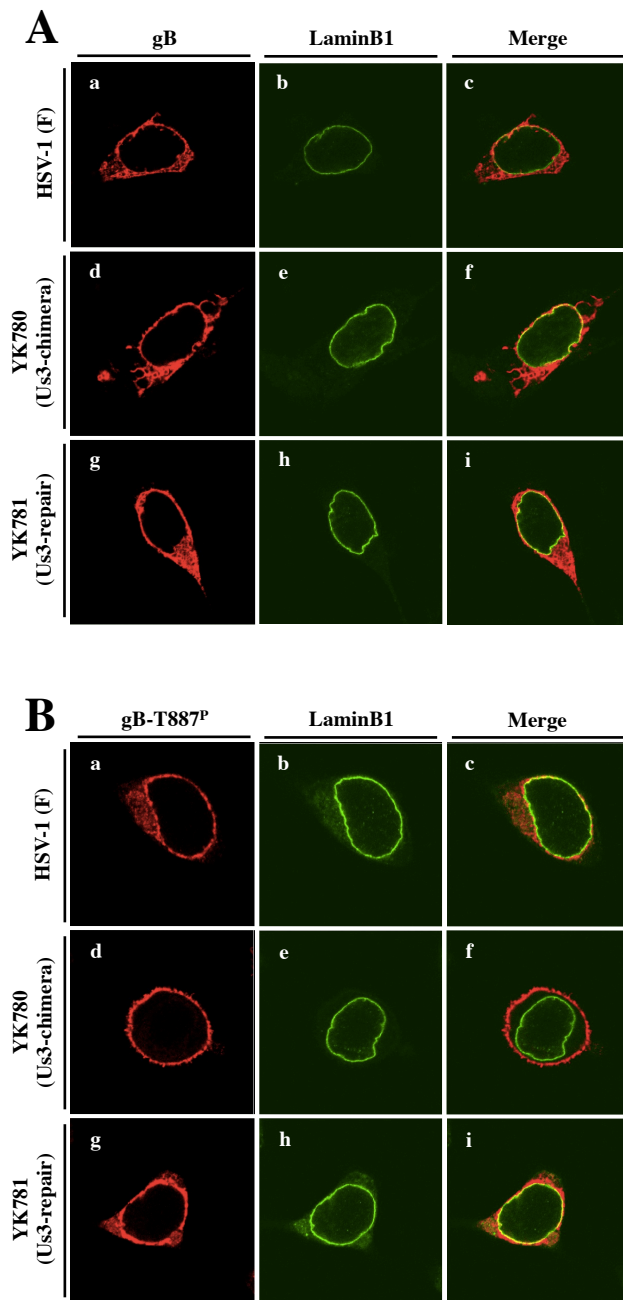


図 15. gB および gB-T887^p と LaminB1 の局在

各ウイルスを Vero 細胞に MOI 3 で感染させ、感染 18 時間後に固定し、gB と LaminB1 (A) または gB-T887 のリン酸化を特異的に認識する抗体 (gB-T887^p) および LaminB1 に対する抗体 (B) を用いた蛍光抗体法により共染色後、共焦点顕微鏡で観察した。

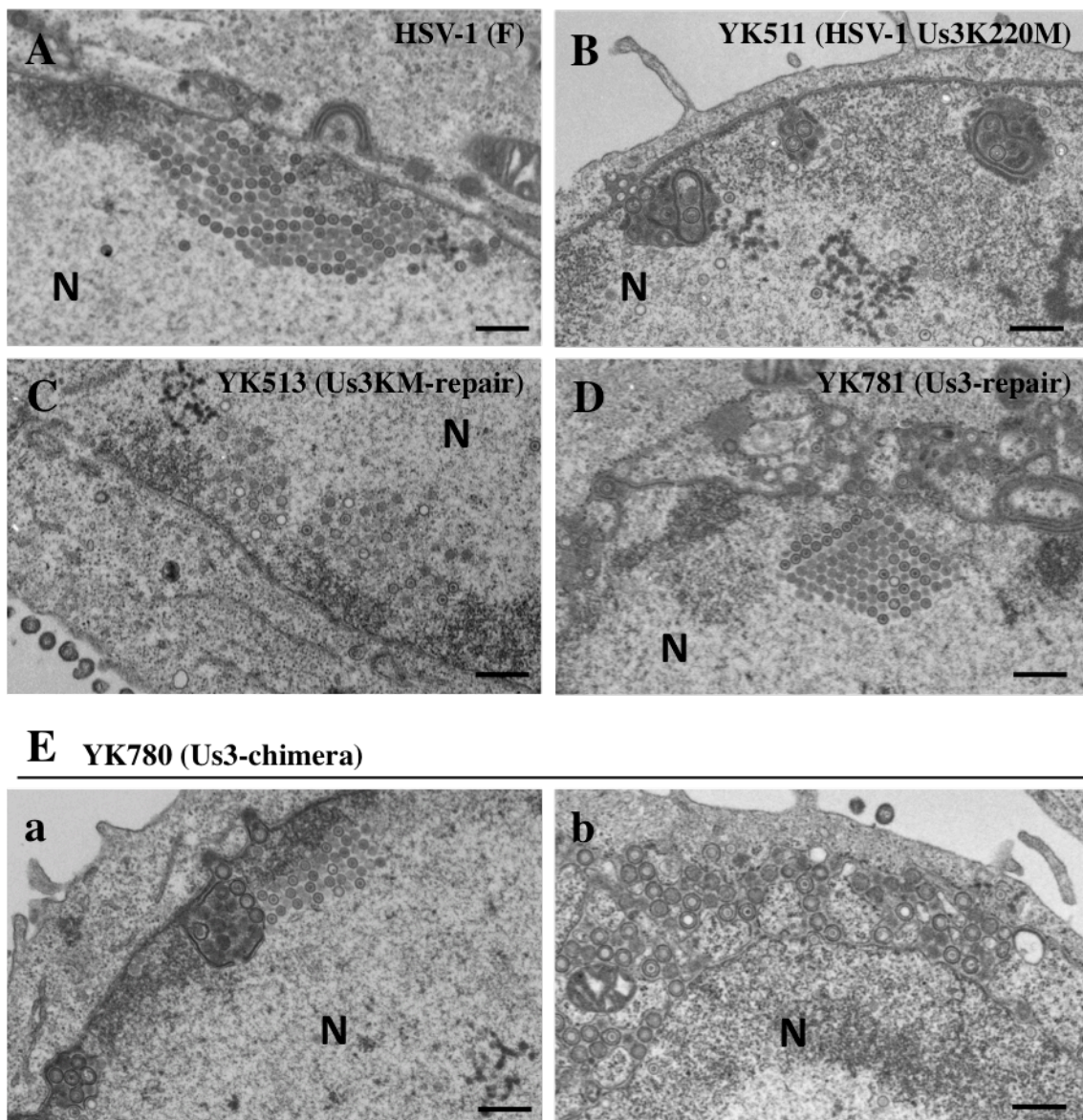


図 16. 組換えウイルス感染細胞の電子顕微鏡像

各ウイルスを Vero 細胞に MOI 3 で感染させ、感染 18 時間後に細胞を固定し、電子顕微鏡により観察した。

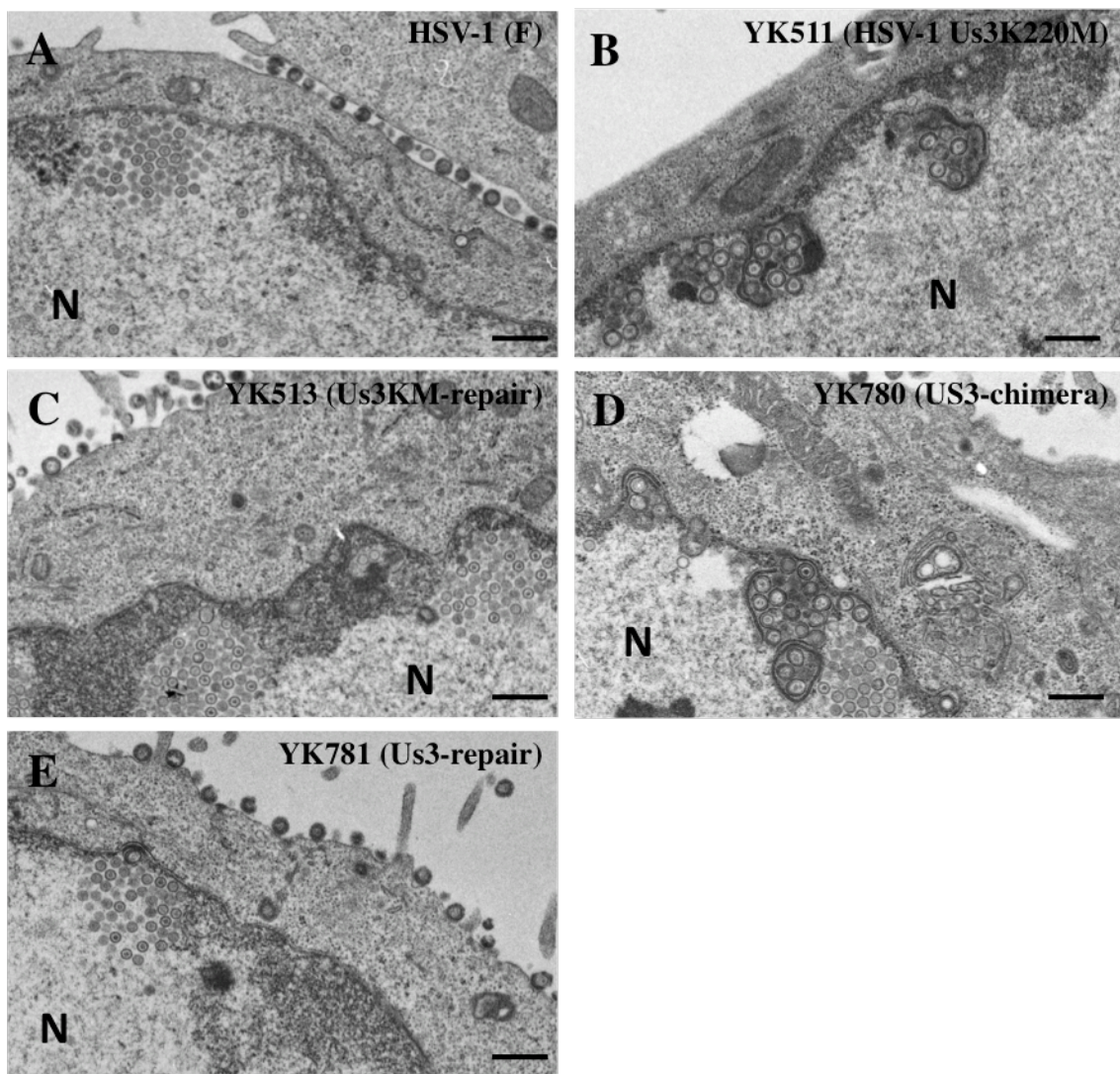


図 17. 組換えウイルス感染細胞の電子顕微鏡像

各ウイルスを HaCaT 細胞に MOI 3 で感染させ、感染 18 時間後に細胞を固定し、電子顕微鏡により観察した。

表 3. Vero 細胞の超薄切片における各領域のエンベロープを獲得したウイルス粒子の割合

Virus ^a	% of enveloped virus particles in compartment ^b				Total counted (particles/cells) ^c
	Nucleus	Perinuclear area	Cytoplasm	Extracellular	
HSV-1 (F)	1.3	27.3	22.8	48.7	902 /15
YK511 (Us3K220M)	66.8	4.2	3.0	26.0	664 /15
YK513 (Us3KM-repair)	4.1	23.7	17.2	55.0	615 /15
YK780 (Us3-chimera)	17.2	43.0	12.5	27.3	834 /15
YK781 (Us3-repair)	2.4	34.4	19.3	43.8	642 /15

^a 各ウイルスを Vero 細胞に MOI 3 で感染させ、感染 18 時間後に固定して超薄切片を作製した。

^b 各ウイルスにつき、1 切片あたり 15 個の細胞をランダムに選んで核、核膜腔内、細胞質および細胞外のエンベロープを獲得したウイルス粒子数をカウントし、エンベロープを獲得した全ウイルス粒子中の各領域におけるウイルス粒子の割合を算出した。同様の実験を独立して 3 回行い、3 回の割合の平均値を示した。

^c 15 個の細胞でカウントされたエンベロープを獲得したウイルス粒子の総数の、独立した 3 回の実験の平均値を示した。

表 4. HaCaT 細胞の超薄切片における各領域のエンベロープを獲得したウイルス粒子の割合

Virus ^a	% of enveloped virus particles in compartment ^b				Total counted (particles/cells) ^c
	Nucleus	Perinuclear area	Cytoplasm	Extracellular	
HSV-1 (F)	10.4	8.0	13.6	68.0	1,934 /15
YK511 (Us3K220M)	58.8	1.9	3.6	35.6	1,188 /15
YK513 (Us3KM-repair)	10.1	8.7	16.9	64.3	1,952 /15
YK780 (Us3-chimera)	38.5	8.0	6.2	47.3	1,681 /15
YK781 (Us3-repair)	14.0	8.9	16.9	60.2	1,935 /15

^a 各ウイルスを Vero 細胞に MOI 3 で感染させ、感染 18 時間後に固定して超薄切片を作製した。

^b 各ウイルスにつき、1 切片あたり 15 個の細胞をランダムに選んで核、核膜腔内、細胞質および細胞外のエンベロープを獲得したウイルス粒子数をカウントし、エンベロープを獲得した全ウイルス粒子中の各領域におけるウイルス粒子の割合を算出した。同様の実験を独立して 3 回行い、3 回の割合の平均値を示した。

^c 15 個の細胞でカウントされたエンベロープを獲得したウイルス粒子の総数の、独立した 3 回の実験の平均値を示した。

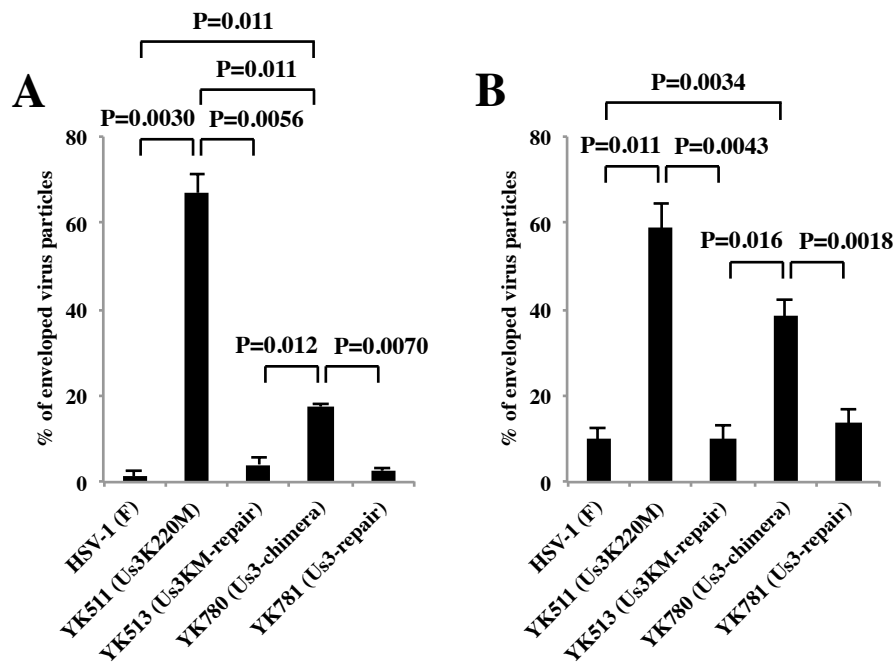


図 18. 組換えウイルス感染細胞の核内におけるエンベロープを獲得したウイルス粒子の割合

各ウイルスを Vero 細胞 (A) または HaCaT 細胞 (B) に MOI 3 で感染させ、感染 18 時間後に細胞を固定し、超薄切片を作製した。電子顕微鏡像を観察し、各ウイルスにつき、1 切片あたり 15 個の細胞をランダムに選んで核、核膜腔内、細胞質および細胞外のエンベロープを獲得したウイルス粒子数をカウントし、エンベロープを獲得した全ウイルス粒子中の核内のウイルス粒子の割合を算出した。グラフには同様の実験を独立して 3 回行い、得られた結果の平均値と標準誤差を示した。

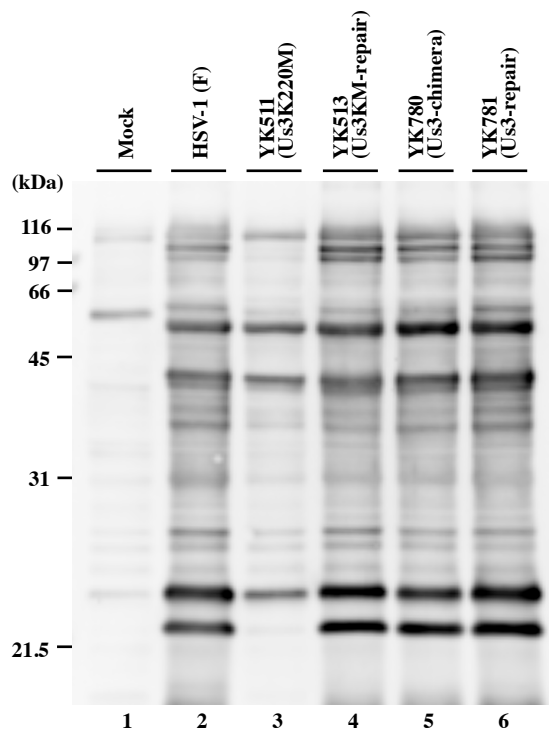


図 19. 感染細胞における Us3 によるリン酸化

各ウイルスを Vero 細胞に MOI 3 で感染させ、感染 18 時間後に回収し、Us3 のリン酸化部位を認識しうる とされる phospho-PKA substrate 抗体を用いたウェスタンブロッティングにて解析した。

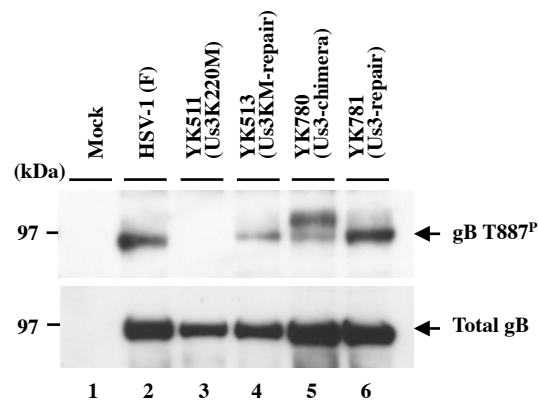


図 20. 組換えウイルス感染細胞における gB-T887 のリン酸化

各ウイルスを Vero 細胞に MOI 3 で感染させ、感染 18 時間後に回収し、gB-T887 のリン酸化を特異的に認識する gB-T887^P 抗体 (upper panel) および gB 抗体 (lower panel) を用いたウェスタンブロッティングにて解析した。

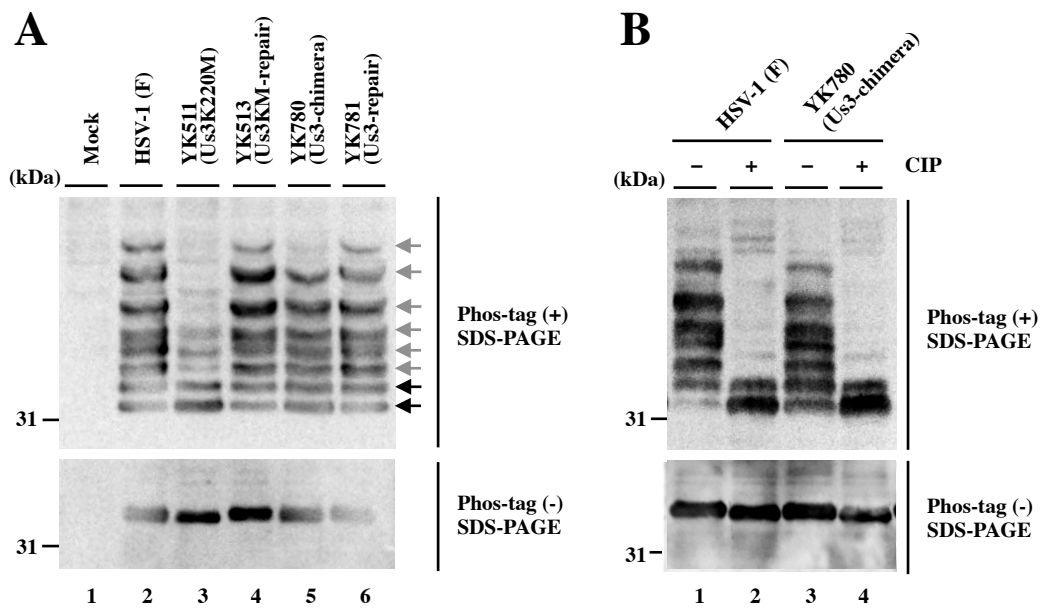


図 21. 組換えウイルス感染細胞における UL31 のリン酸化

各ウイルスを Vero 細胞に MOI 3 で感染させ、感染 18 時間後に回収した。

(A) Phos-tag (+) SDS-PAGE (upper panel) または Phos-tag (-) SDS-PAGE (lower panel) 後、UL31 に対する抗体を用いたウェスタンブロッティングにて解析した。非リン酸化バンドを black arrow、リン酸化バンドを gray arrow で示した。

(B) HSV-1 野生株感染細胞および YK780 (Us3-Chimera) 感染細胞を CIP で未処理 (lane 1, 3) または処理し (lane 2, 4)、Phos-tag (+) SDS-PAGE (upper panel) または Phos-tag (-) SDS-PAGE (lower panel) 後、UL31 に対する抗体を用いたウェスタンブロッティングにて解析した。

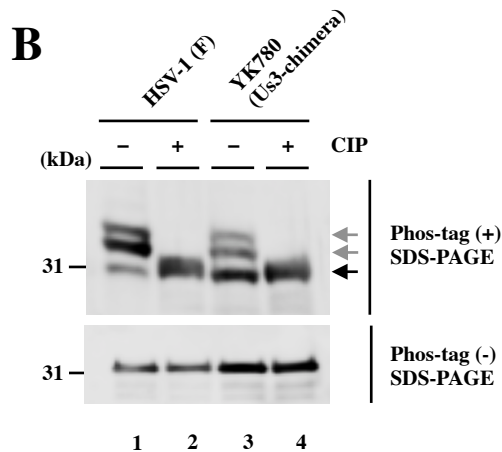
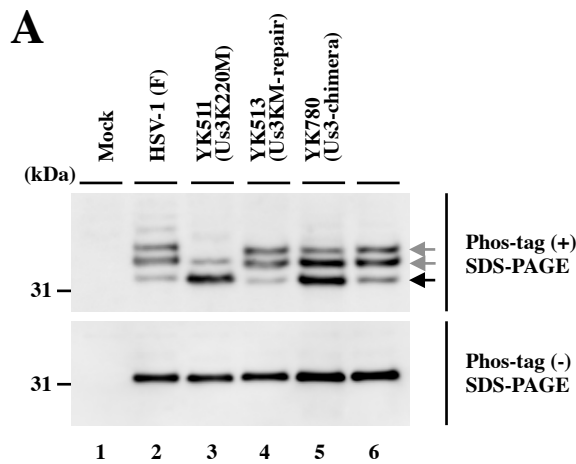


図 22. 組換えウイルス感染細胞における UL34 のリン酸化

各ウイルスを Vero 細胞に MOI 3 で感染させ、感染 18 時間後に回収した。

(A) Phos-tag (+) SDS-PAGE (upper panel) または Phos-tag (-) SDS-PAGE (lower panel) 後、UL34 に対する抗体を用いたウェスタンブロッティングにて解析した。非リン酸化バンドを black arrow、リン酸化バンドを gray arrow で示した。

(B) HSV-1 野生株感染細胞および YK780 (Us3-Chimera) 感染細胞を CIP で未処理 (lane 1, 3) または処理し (lane 2, 4)、Phos-tag (+) SDS-PAGE (upper panel) または Phos-tag (-) SDS-PAGE (lower panel) 後、UL34 に対する抗体を用いたウェスタンブロッティングにて解析した。

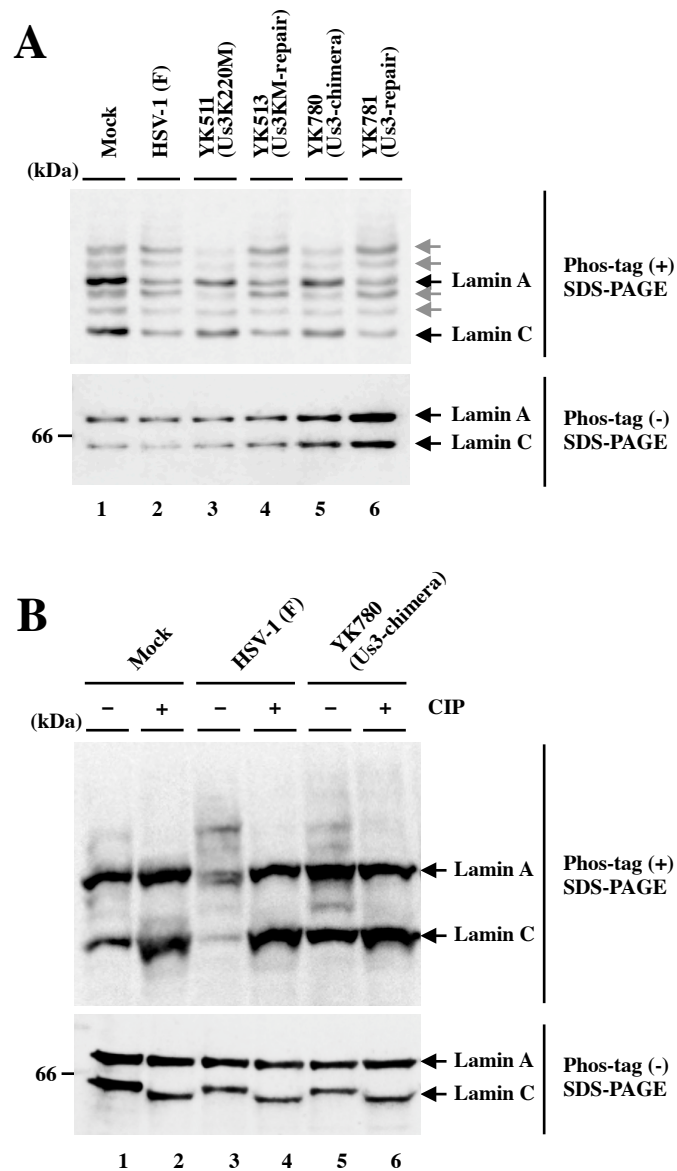


図 23. 組換えウイルス感染細胞における LaminA/C のリン酸化

各ウイルスを Vero 細胞に MOI 3 で感染させ、感染 18 時間後に回収した。

(A) Phos-tag (+) SDS-PAGE (upper panel) または Phos-tag (-) SDS-PAGE (lower panel) 後、LaminA/C に対する抗体を用いたウェスタンブロッティングにて解析した。非リン酸化バンドを black arrow、リン酸化バンドを gray arrow で示した。

(B) 非感染細胞 (Mock)、HSV-1 野生株感染細胞、YK780 (Us3-Chimera) 感染細胞を CIP で未処理 (lane 1, 3, 5) または処理し (lane 2, 4, 6)、Phos-tag (+) SDS-PAGE (upper panel) または Phos-tag (-) SDS-PAGE (lower panel) 後、LaminA/C に対する抗体を用いたウェスタンブロッティングにて解析した。

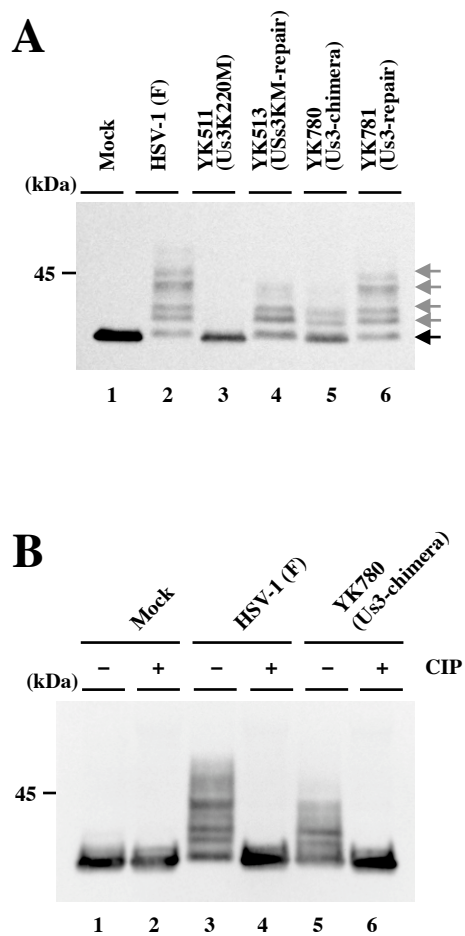


図 24. 組換えウイルス感染細胞における Emerin のリン酸化

各ウイルスを Vero 細胞に MOI 3 で感染させ、感染 18 時間後に回収した。

(A) SDS-PAGE 後、Emerin に対する抗体を用いたウェスタンブロッティングにて解析した。非リン酸化バンドを black arrow、リン酸化バンドを gray arrow で示した。

(B) 非感染細胞 (Mock)、HSV-1 野生株感染細胞、YK780 (Us3-Chimera) 感染細胞を CIP で未処理 (lane 1, 3, 5) または処理し (lane 2, 4, 6)、SDS-PAGE 後、Emerin に対する抗体を用いたウェスタンブロッティングにて解析した。

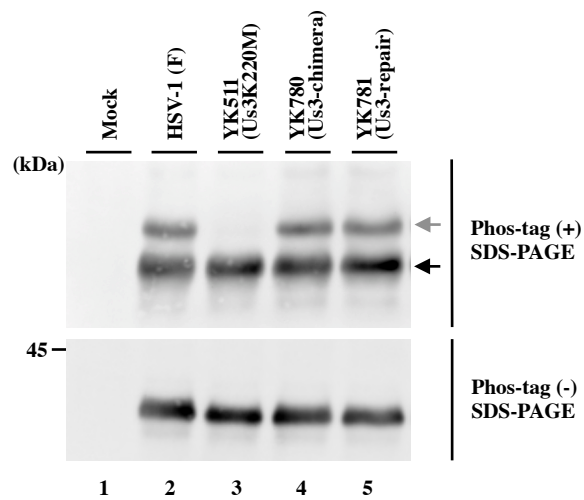


図 25. 組換えウイルス感染細胞における UL50 のリン酸化

各ウイルスを Vero 細胞に MOI 3 で感染させ、感染 18 時間後に回収し、Phos-tag (+) SDS-PAGE (upper panel) または Phos-tag (-) SDS-PAGE (lower panel) 後、UL50 に対する抗体を用いたウェスタンブロッティングにて解析した。非リン酸化バンドを black arrow、リン酸化バンドを gray arrow で示した。

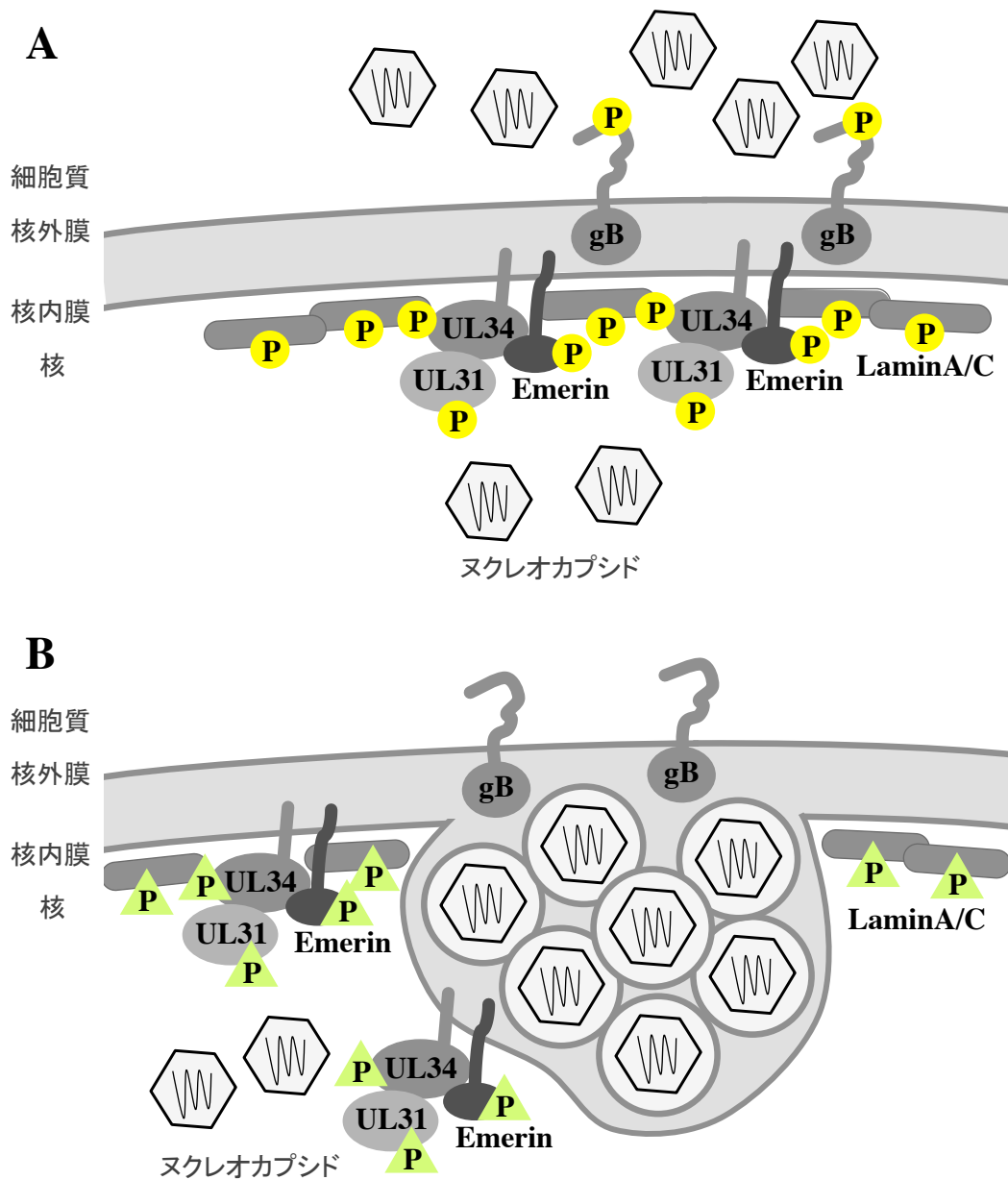


図 26. HSV-1 Us3 と HSV-2 Us3 のヌクレオカプシドの核膜からの出芽促進能の差異の模式図 (モデル図)

(A) HSV-1 Us3 によるヌクレオカプシドの核膜からの出芽の制御

(B) HSV-2 Us3 によるヌクレオカプシドの核膜からの出芽の制御

P: リン酸