

122. 単純ヘルペスウイルス潜伏感染能の制御

加藤 哲久

東京大学 医科学研究所 感染・免疫部門 ウイルス病態制御分野

Key words : 単純ヘルペスウイルス, 三叉神経節, Us8A, リン酸化

緒言

単純ヘルペスウイルス (HSV) は代表的な DNA ウイルスであり、ヒトに脳炎、性器ヘルペス、皮膚疾患、眼疾患、小児ヘルペスなど、多様な病態を引き起こす。性病としても HSV の重要性は高く、日本国内の女性における性感染症報告数ではクラミジアに続く第 2 位である。HSV は一度感染すると宿主の神経節に侵入・増殖の後、終生潜伏感染し、頻繁に再活性化し病態を呈する (回帰発症)。回帰発症の克服のため、ワクチン開発が渴望されている。理想的な弱毒生ワクチンの性状の 1 つとして、潜伏感染能を消失あるいは低下していることが挙げられる。本研究では、臨床分離株において、変異導入率が非常に低い、すなわち HSV の生活環において重要な役割を担っていることが期待される Us8A というウイルス遺伝子の解析を通して、HSV ワクチン開発の基盤構築を試みた。

方法および結果

1. Us8A 欠損および Us8A Ser-61 リン酸化消失変異 HSV-1 の作出

本研究のため、HSV-1 ゲノム編集法である BAC-system により、Us8A の Met-1 および-20 を Thr に置換することで Us8A 欠損ウイルスである YK5003 (Δ Us8A) を、Us8A の Ser-61 を Ala に置換 (Us8A-S61A 変異) することで Us8A Ser-61 リン酸化消失変異ウイルスである YK5005 (Us8A-S61A)、および変異部位を野生型に復帰させた YK5004 (Δ Us8A-repair) と YK5006 (Us8A-SA-repair) を作出した (図 1)。

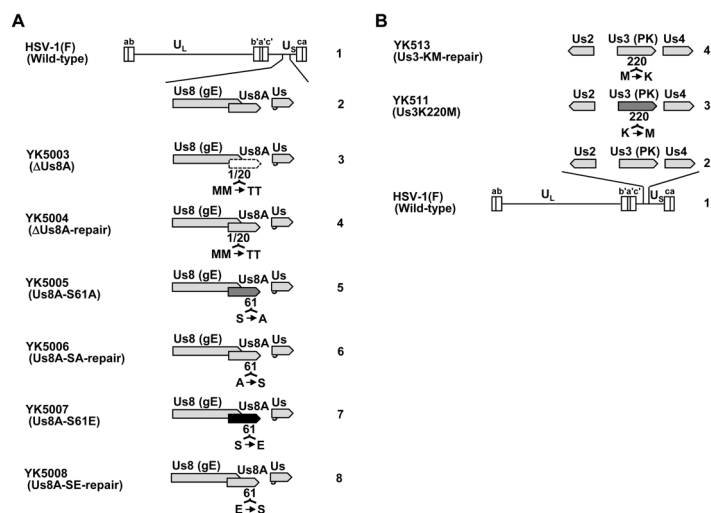


図 1. 本研究で用いた野生型 HSV-1(F) と遺伝子組換え HSV-1 の模式図

(A) レーン 1: 野生型 HSV-1(F) のゲノム図、レーン 2: 野生型 HSV-1(F) の Us8A 周辺 ORF 図、レーン 3~8: Us8A 変異 HSV-1 の模式図、(B) レーン 1: 野生型 HSV-1(F) のゲノム図、レーン 2: 野生型 HSV-1(F) の Us3 周辺 ORF 図、レーン 3~4: Us3 変異 HSV-1 の模式図。

野生型 HSV-1、YK5003 (Δ Us8A) および YK5004 (Δ Us8A-repair) を Vero 細胞に感染させた後、細胞ライセートを SDS 展開し、Us8A 抗体を用いたウエスタンブロット解析に供した。図 2-A に示す通り、YK5003 (Δ Us8A) では Us8A と考えられるバンドの消失が確認された。また、HSV-1 ゲノム上で、Us8A と隣接する Us8 (gE) や Us9 の発現量には、Us8A 欠損変異導入に伴う影響は認められなかった (図 2-B)。なお、Us8A 抗体は大腸菌内で MBP と融合した形の Us8A ドメインを大量発現・精製した 0.1 mg を、アジュバンドを混合し、マウスに腹腔接種することで作製した。これらの結果より、適切に Us8A 欠損ウイルスが得られたと考えられた。

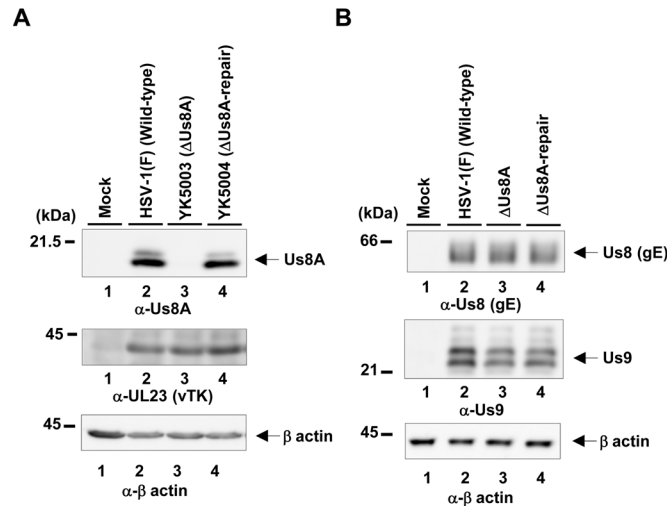


図 2. YK5003 は Us8A 発現を消失している

(A) 野生型 HSV-1(F)および Us8A 欠損 HSV-1 等の感染 Vero 細胞における Us8A (上段)、vTK (中段)、 β -actin (下段) のウエスタンブロットによる発現解析。(B) 野生型 HSV-1(F)および Us8A 欠損 HSV-1 等の感染 Vero 細胞における Us8 (上段)、Us9 (中段)、 β -actin (下段) のウエスタンブロットによる発現解析。

2. Us8A Ser-61 リン酸化の確認と上流キナーゼの同定

野生型 HSV-1、YK5005 (Us8A-S61A) および YK5006 (Us8A-SA-repair) を Vero 細胞に感染させた後、細胞ライセートを SDS 展開し、Us8A 抗体を用いたウエスタンブロット解析に供した。野生型の Us8A は、ダブルバンドとして検出された一方、S61A 変異型の Us8A は、アッパーバンドが消失しシングルバンドとして検出された (図 3-A)。さらに、脱リン酸化酵素処理した野生型 Us8A も、アッパーバンドが消失しシングルバンドとして検出された (図 3-B)。同様に、野生型 HSV-1、YK511 (Us3K220M) および YK513 (Us3KM-repair) を Vero 細胞に感染させた後、同様の解析に供した。Us8A は、アッパーバンドが有意に減少し、主としてシングルバンドとして検出された (図 3-C)。これらの知見より、Us8A Ser-61 がリン酸化部位であり、本リン酸化には主に Us3PK が必要であることが示唆された。

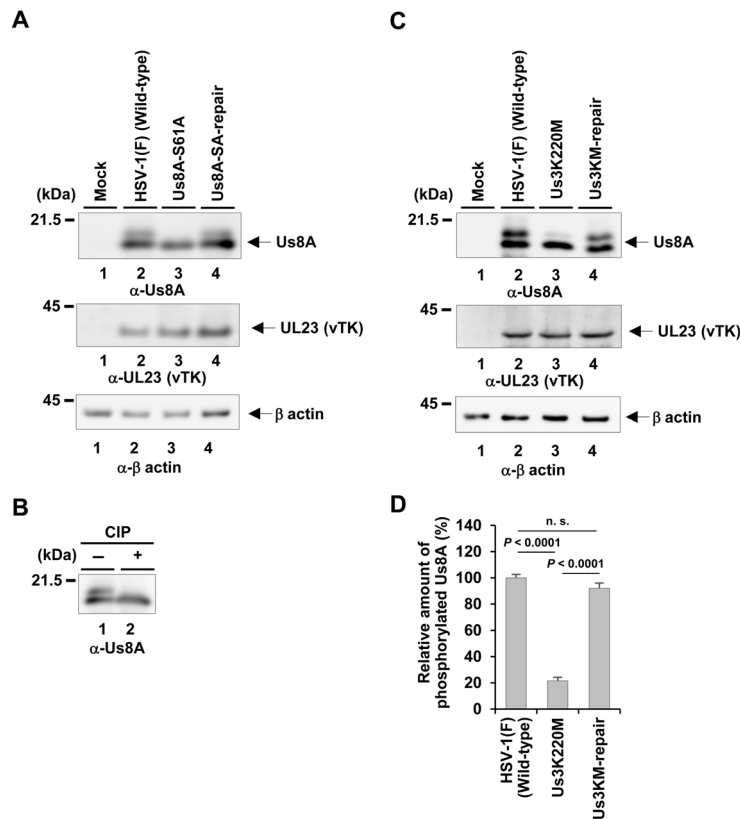


図3. Us8A Ser-61 はリン酸化部位であり、Us3 が本リン酸化には必要であった

(A) 野生型 HSV-1(F) および Us8A-S61A 変異 HSV-1 等の感染 Vero 細胞における Us8A (上段)、vTK (中段)、 β -actin (下段) のウェスタンブロットによる発現解析。(B) 脱リン酸化酵素処理をした野生型 HSV-1(F) の感染 Vero 細胞における Us8A のウェスタンブロットによる発現解析。(C) 野生型 HSV-1(F) および Us3PK 活性消失変異 HSV-1 等の感染 Vero 細胞における Us8A (上段)、vTK (中段)、 β -actin (下段) のウェスタンブロットによる発現解析。(D) (C) のバンドの濃さの定量解析結果。値は、独立した3回の実験の平均値 \pm 標準誤差を用いた。P 値は ANOVA と tukey's test により算出した。

3. Us8A および Us8A Ser-61 変異 HSV-1 の神経病原性

3 週齢のメス ICR マウスに、10 倍希釈濃度の YK5003 (Δ Us8A)、YK5004 (Δ Us8A-repair)、YK5005 (Us8A-S61A) および YK5006 (Us8A-SA-repair) を脳内接種し、14 日間生死をモニターリングした。表 1 に示す通り、YK5003 (Δ Us8A) に感染したマウスの LD₅₀ 値のみ、他と比較し約 10 倍増加した。本知見より、Us8A はマウスモデルにおける HSV-1 の中枢神経破壊能、すなわち神経侵襲性に関与するが、Us8A Ser-61 のリン酸化は関与しないことが示唆された。

表1. Us8A と Us8A Ser-61 のマウス脳内感染時の役割

Virus	LD ₅₀ (PFU) ^a
YK5003 (Δ Us8A)	464
YK5004 (Δ Us8A-repair)	46.4
YK5005 (Us8A-S61A)	46.4
YK5006 (Us8A-SA-repair)	68.1

Us8A 欠損 HSV-1 とその復帰株、Us8A-S61A 変異 HSV-1 とその復帰株を、10 倍希釈濃度にて、各群 6 匹の 3 週齢メス ICR マウスに頭蓋感染させて、マウスの生死を感染後 14 日観察した。LD₅₀ 値は Behrens-Karber 法により算出した。

4. Us8A および Us8A Ser-61 変異 HSV-1 の神経侵襲性

4 週齢のメス ICR マウスに、 10^5 PFU/eye 濃度の YK5003 (Δ Us8A)、YK5004 (Δ Us8A-repair)、YK5005 (Us8A-S61A) および YK5006 (Us8A-SA-repair) を角膜接種し、21 日間生死をモニターリングした。また、感染後 6 日に、ヘルペス性角膜炎 (HSK) の発症をスコア評価した。図 4-A および B に示す通り、神経侵襲性と同様に、YK5003 (Δ Us8A) に感染したマウスの HSK スコアのみ有意に低下した。一方、マウスの生存率は、Us8A 欠損のみならず Us8A-S61A 変異によっても、有意に増加した。なお、Us8A-S61A 変異により観察されたマウス生存率の増加は、リン酸化模倣変異 (Us8A-S61E) により回復が認められた (data not shown)。これらの知見は、Us8A は神経病原性に関与するのみならず、ヘルペス性角膜炎等の末梢組織における病態発現能にも関与する一方、Us8A Ser-61 のリン酸化は神経侵襲性や末梢組織における病態発現能には関与せず、末梢組織から中枢神経系に子孫ウイルスを送り込む神経侵襲性に関与することを示唆した。

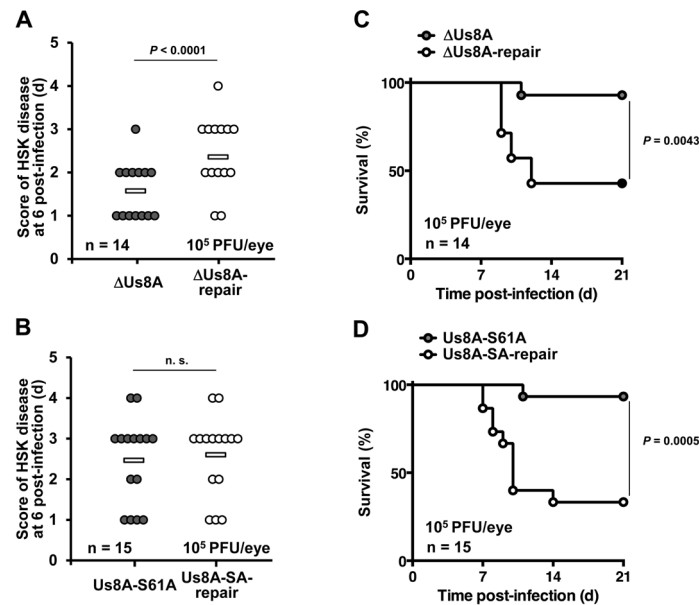


図 5. Us8A と Us8A Ser-61 のマウス角膜感染時の役割

(A) Us8A 欠損 HSV-1 とその復帰株を、 10^5 PFU/eye にて、14 匹の 4 週齢メス ICR マウスに感染させて、6 日後にヘルペス性角膜炎のスコアを解析した。値は、独立した 3 回の実験の平均値 \pm 標準誤差を用いた。P 値は f-test と two-tailed Student's t-test により算出した。(B) Us8A-S61A 変異 HSV-1 とその復帰株を、 10^5 PFU/eye にて、15 匹の 4 週齢メス ICR マウスに感染させて、6 日後にヘルペス性角膜炎のスコアを解析した。値は、独立した 3 回の実験の平均値 \pm 標準誤差を用いた。P 値は f-test と two-tailed Student's t-test により算出した。(C および D) (A) および (B) のマウスの生死を感染後 21 日観察した。P 値は log-rank test により算出した。

さらに、4 週齢のメス ICR マウスに、 10^5 PFU/eye 濃度の YK5005 (Us8A-S61A)、YK5006 (Us8A-SA-repair)、YK5007 (Us8A-S61E) および YK5008 (Us8A-SE-repair) を角膜接種し、感染後経時的に眼球、三叉神経節、脳を解剖により摘出し、各臓器における感染性ウイルス量を、Vero 細胞における標準的なプラークアッセイ法により測定した。Us8A Ser-61 の alanine 置換は、感染後 1~3 日の眼球および感染後 1~2 日の三叉神経節におけるウイルス力価には影響しなかった (図 5-A および B)。一方、Us8A S61A 変異により感染後 3~4 日の三叉神経節におけるウイルス力価は有意に低下した (図 5-B)。また、この低下に伴い、感染後 3~4 日の脳におけるウイルス力価も有意に低下した (図 5-C)。さらに、三叉神経節から逆行輸送により一過的に増加すると考えられる感染後 4 日後の眼球におけるウイルス力価も、Us8A S61A 変異により有意に低下した (図 5-A)。なお、Us8A-S61A 変異により観察された各ウイルス力価の低下は、リン酸化模倣変異 (Us8A-S61E) により回復が認められた。

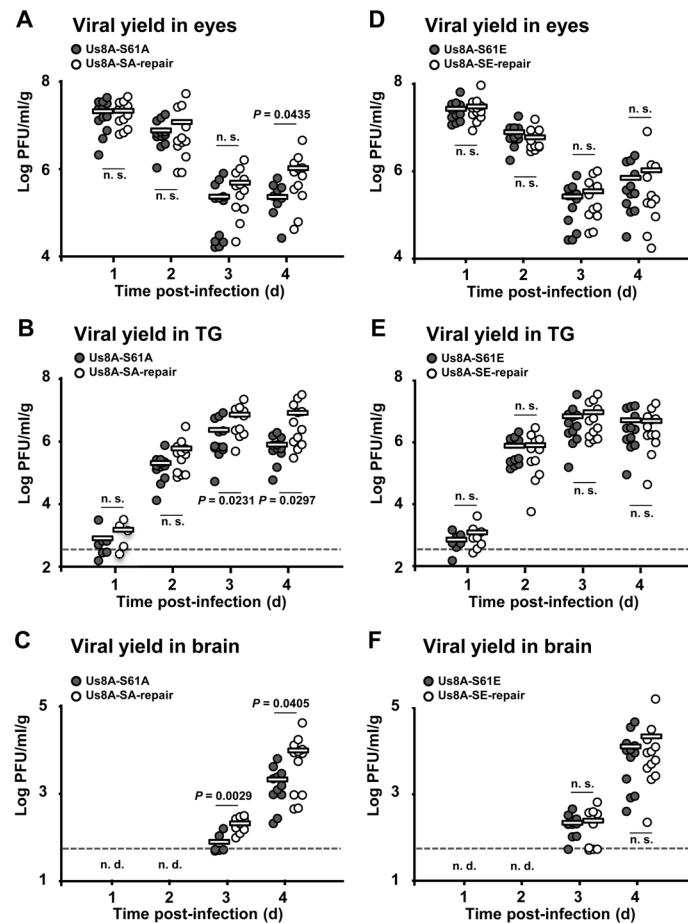


図6. Us8A Ser-61 リン酸化のマウス角膜感染時の各臓器におけるウイルス力価への影響

(A) ~ (C) Us8A-S61A 変異 HSV-1 とその復帰株を、 10^5 PFU/eye にて、12 匹の 4 週齢メス ICR マウスに感染させて、感染後 1~4 日後に眼球、三叉神経節および脳を摘出し、組織の湿重量を測定後、Vero 細胞におけるスタンダード・プラークアッセイにより子孫ウイルス力価を測定した。各点は、一個体の値を示す。P 値は f-test と two-tailed Student's t-test により算出した。(D) ~ (F) Us8A-S61E 変異 HSV-1 とその復帰株に関して、(A) ~ (C) と同様に解析した。

考 察

最近、ヘルペス性角膜炎患者より、複数の HSV-1 が分離され、次世代シーケンサー解析に供された¹⁾。その結果、これまで HSV-1 の病発現能における生物学的意義は全く不明であった Us8A は、非常に変異率が低いことが明らかとなった。また、我々は HSV-1 感染細胞のリン酸化プロテオーム解析の結果、Us8A の新規リン酸化部位を同定済みであった^{2,3)}。そこで、我々は HSV-1 が病態発現能において重要であると考え、詳細な解析を試みた。その結果、Us8A は中枢神経破壊能、末梢組織における病態発現能を司る一方、Us8A Ser-61 のリン酸化はこれらには関与せず、末梢組織から中枢神経系への HSV の侵入能、特に三叉神経節における HSV 増殖に関与することが明らかとなった。三叉神経節は、HSV の潜伏の場であり、本部位における HSV 増殖能の低下は、潜伏感染能や再活性化能の低下に直結すると考えられる。また、HSV-1 の実験室株として最も有名な株の 1 つである HSV-1 (KOS) は、中枢神経破壊能、末梢組織における病態発現能は他の株と同程度であるが、末梢組織から中枢神経系への HSV の侵入能が著しく低下することが知られていた⁴⁾。HSV-1 (KOS) の Us8A はフレームシフト変異を起こしている⁵⁾。本研究において、Us8A が末梢組織から中枢神経系への HSV の侵入能に関与することが明らかとなったことから、HSV-1 (KOS) の弱毒化のメカニズムの解明への糸口が得られた可能性もあり、非常に興味深い。前述の通り、HSV は一度感染すると宿主の神経節に侵入・増殖の後、終生潜伏感染し、頻繁に再活性化し繰り返し病態を呈する。この問題の克服のため、ワクチン開発が

渴望されている。Us8A Ser-61 のリン酸化を阻害した組換え HSV は、潜伏能の低下が予想されることから、今後 HSV 弱毒生ワクチンの開発のプラットフォームの1つとなることも期待される。我々は以上の知見を、Journal of Virology に報告した⁶⁾。

共同研究者

本研究の共同研究者は、東京大学医科学研究所 感染・免疫部門 ウイルス病態制御分野の安藤友子、尾田真也、渡辺瑞季、小柳直人研究員、有井潤先生および川口寧先生である。最後に、本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝致します。

文 献

- 1) Kolb AW, Adams M, Cabot EL, Craven M, Brandt CR. Multiplex sequencing of seven ocular herpes simplex virus type-1 genomes: phylogeny, sequence variability, and SNP distribution. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011 Nov 25;52(12):9061-73. doi: 10.1167/iovs.11-7812. PMID:22016062
- 2) Kato A, Tsuda S, Liu Z, Kozuka-Hata H, Oyama M, Kawaguchi Y. Herpes simplex virus 1 protein kinase Us3 phosphorylates viral dUTPase and regulates its catalytic activity in infected cells. *J Virol.* 2014 Jan; 88(1):655-66. doi: 10.1128/JVI.02710-13. PMID:24173231
- 3) Kobayashi R, Kato A, Oda S, Koyanagi N, Oyama M, Kozuka-Hata H, Arii J, Kawaguchi Y. Function of the Herpes Simplex Virus 1 Small Capsid Protein VP26 Is Regulated by Phosphorylation at a Specific Site. *J Virol.* 2015 Jun;89(11):6141-7. doi: 10.1128/JVI.00547-15. PMID:25810545
- 4) Thompson RL, Cook ML, Devi-Rao GB, Wagner EK, Stevens JG. Functional and molecular analyses of the avirulent wild-type herpes simplex virus type 1 strain KOS. *J Virol.* 1986 Apr;58(1):203-11. PMID:3005649
- 5) Negatsch A, Mettenleiter TC, Fuchs W. Herpes simplex virus type 1 strain KOS carries a defective US9 and a mutated US8A gene. *J Gen Virol.* 2011 Jan;92(Pt 1):167-72. doi: 10.1099/vir.0.026484-0. Epub 2010 Sep 22. PMID:20861322
- 6) Kato A, Tomoko A, Oda S, Watanabe M, Koyanagi N, Arii J, Kawaguchi Y. Roles of Us8A and its phosphorylation mediated by Us3 in herpes simplex virus 1 pathogenesis. *J Virol.* 2016 Mar 30. pii: JVI.00446-16. [Epub ahead of print] PMID:27030266