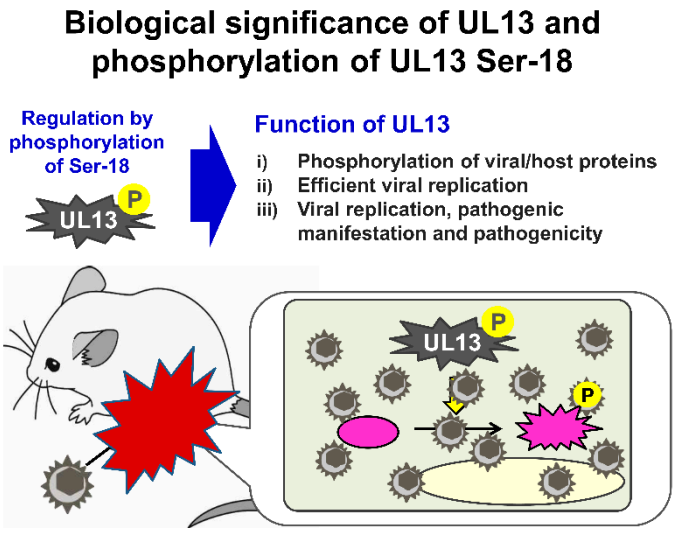
133　HSV感染モデルを用いた脳炎発症機構の解明	小柳　直人

【目的】単純ヘルペスウイルス（herpes simplex virus : HSV）はヒトに口唇ヘルペス、性器ヘルペス、皮膚疾患、眼疾患、脳炎、新生児ヘルペスなど多様な病態を引き起こす。世界市場における HSV 感染症の医療費は、年間数千億円と試算されており、医学的に非常に重要なウイルスである。これらの病態の中で、単純ヘルペス脳炎（herpes simplex encephalitis : HSE）は抗ヘルペス薬が開発された現在でも半数の患者は予後不良であることから新規治療法や早期診断法・予防法の開発が臨床上の急務である。筆者はこれまでに HSE に関与する HSV 因子として UL13 を同定した。UL13 は単純ヘルペスウイルス 1 型および 2 型（HSV-1 and HSV-2）がコードするプロテインキナーゼ（PK）の一つである。これまでに HSV-1 UL13 欠損株や UL13PK 活性消失株を用いた解析により、UL13 は細胞種依存的にウイルス増殖に寄与することやマウスへの病原性発現に寄与することが報告されている。しかし、HSV 感染細胞において UL13 の機能がいかにして制御されているかは不明であった。そこで、本研究では、タンパク質の機能制御を司る翻訳後修飾の一つであるリン酸化に着目し、HSV 感染における UL13 リン酸化の生物学的意義の解明を試み、HSE 発症制御機構を明らかにすることを目的とした。

【方法】1. HSV-2 感染細胞における UL13 のリン酸化部位を同定するために、高感度質量分析計を用いたリン酸化プロテオーム解析を実施した。2. 同定した UL13 リン酸化部位の一つである Ser-18 を Ala に置換したリン酸化消失変異株（UL13-S18A）を作製し、U2OS 細胞におけるウイルス増殖性および細胞間伝播への影響を解析した。3. リン酸化消失変異株（UL13-S18A）感染 U2OS 細胞において、UL13 によってリン酸化されることが知られている翻訳伸長因子 EF-1δ の Ser-133 リン酸化状態を評価した。4. リン酸化消失変異株（UL13-S18A）をマウスに経膣接種し、マウスの致死率、病態スコア、ウイルス量を評価した。5. リン酸化消失変異株（UL13-S18A）で認められた表現系が、Ser-18 を Asp に置換した恒常的リン酸化模倣株（UL13-S18D）において、野生体の表現系に回復するか評価した。

【結果】1. リン酸化プロテオーム解析の結果、6 ヶ所の UL13 リン酸化部位を同定した。2. リン酸化消失変異株（UL13-S18A）では、U2OS 細胞において、ウイルス増殖および細胞間伝播が UL13 欠損株および UL13PK 活性消失株と同程度まで低下した。3. リン酸化消失変異株（UL13-S18A）感染 U2OS 細胞では野生体感染 U2OS 細胞に比べて、EF-1δ Ser-133 のリン酸化が低下した。4. リン酸化消失変異株（UL13-S18A）では、経膣接種後のマウスの致死率、病態スコア、ウイルス量が低下した。5. 恒常的リン酸化模倣株（UL13-S18D）ではリン酸化消失変異株（UL13-S18A）で認められた表現系が野生体の表現系へと回復した。以上の結果から、UL13 Ser-18 のリン酸化は UL13 の機能を制御することでウイルス増殖や病原性発現に寄与することが示唆された。

HSV-2 UL13 Ser-18 のリン酸は UL13 の機能を制御し、効率的なウイルス増殖・病原性発現に寄与する



133. HSV 感染モデルを用いた脳炎発症機構の解明

小柳　直人

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（HSV），UL13，リン酸化，病原性

緒　言

単純ヘルペスウイルス（herpes simplex virus：HSV）はヒトに口唇ヘルペス、性器ヘルペス、皮膚疾患、眼疾患、脳炎、新生児ヘルペスなど多様な病態を引き起こす。これらの病態の中で、単純ヘルペス脳炎（herpes simplex encephalitis：HSE）は予後が非常に悪いことから HSE 発症機序の解明は新規治療法や予防法の開発に重要である。本研究では、我々が以前に同定した HSE に関与する HSV 因子である UL13 に着目し、UL13 の機能制御機構の解析を通して HSE 発症機序の一端を明らかにすることを試みた。

方法および結果

1.　HSV-2 UL13 リン酸化部位の同定

HSV-2 UL13 の機能制御をリン酸化が司る可能性を検証した。まず、UL13 リン酸化部位を同定するために高感度質量分析計を用いたリン酸化プロテオーム解析を実施した。その結果、HSV-2 感染 U2OS 細胞において、6 ヶ所の UL13 リン酸化部位を同定し、本研究ではその中で UL13 Ser-18 のリン酸化に焦点を当てた解析を実施した。UL13 Ser-18 は HSV-1 および HSV-2 の UL13 で広く保存されていた（data not shown）。

2.　HSV-2 UL13 組換えウイルスの作出

本研究を実施するために、HSV-2 ゲノム編集法である BAC-system を用いて、UL13 欠損株 YK862（ΔUL13）、UL13 の Lys-176 を Met に置換することで PK 活性を消失したウイルスである UL13PK 活性消失株 YK864（UL13-K176M）、UL13 の Ser-18 を Ala に置換した UL13 Ser-18 リン酸化消失株 YK866（UL13-S18A）、および Asp に置換した UL13 Ser-18 恒常的リン酸化模倣株 YK867（UL13-S18D）を作出した。またそれぞれの変異復帰株も作出した。

各ウイルスを Vero 細胞に感染させ、細胞ライセートをウエスタンブロット解析に供した。その結果、野生体 HSV-2 および YK863（ΔUL13-repair）で認められた UL13 と考えられるバンドが YK862（ΔUL13）では消失することが認められた（図 1A）。また、野生体 HSV-2 および YK865（UL13-K176M-repair）で認められた UL13 と考えられるダブレットバンドのうちアッパーバンドが YK864（UL13-K176M）では消失することが認められた（図 1B）。次に UL13 Ser-18 変異の影響を解析した。野生体 HSV-2 および YK868（UL13-S18A/D-repair）で認められた UL13 と考えられるバンドはダブレットバンドとして検出された（図 1C）。一方で、YK866（UL13-S18A）では UL13 はダブレットバンドとして検出されたが、アッパーバンドの泳動速度は野生体 HSV-2 や YK868（UL13-S18A/D-repair）に比べて速いことが認められた（図 1C）。また、脱リン酸化酵素処理した野生体 UL13（186）において、UL13 のアッパーバンドが消失した（data not shown）。よって、この UL13 のアッパーバンドはリン酸化によるものであり、そのリン酸化の一部を Ser-18 が担っていることが示唆された。

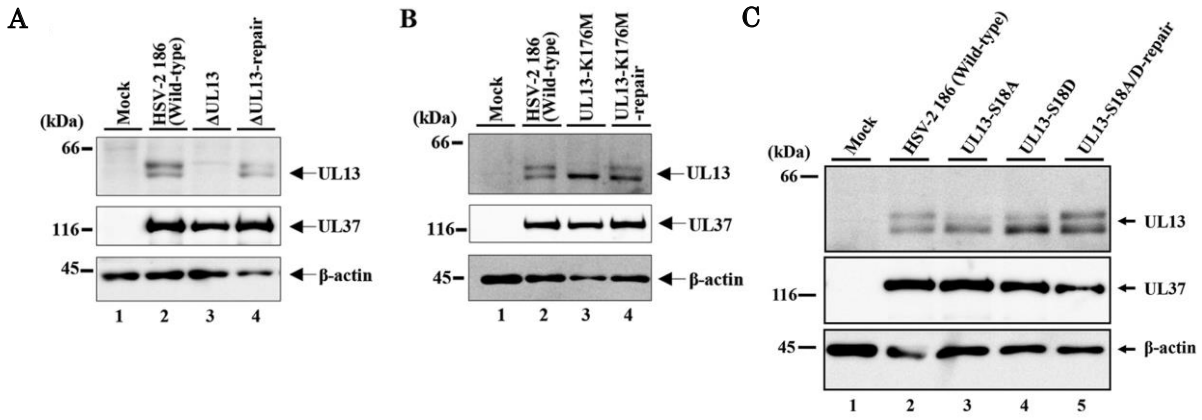


図 1. 各 UL13 組換えウイルス感染細胞における UL13 の発現

A) 非感染（Mock）、野生体 HSV-2、YK862（ΔUL13）、YK863（ΔUL13-repair）感染 Vero 細胞における UL13、UL37、β-actin のウエスタンブロットによる発現解析。

B) 非感染（Mock）、野生体 HSV-2、YK864（UL13-K176M）、YK865（UL13-K176M-repair）感染 Vero 細胞における UL13、UL37、β-actin のウエスタンブロットによる発現解析。

C) 非感染（Mock）、野生体 HSV-2、YK866（UL13-S18A）、YK867（UL13-S18D）、YK868（UL13-S18A/D-repair）感染 Vero 細胞における UL13、UL37、β-actin のウエスタンブロットによる発現解析。

3. UL13 および UL13 Ser-18 変異 HSV-2 の培養細胞におけるウイルス増殖性・細胞間伝播能

各ウイルスを Vero 細胞もしくは U2OS 細胞に MOI＝3 もしくは MOI＝0.01 で感染させ、それぞれ 12 時間後もしくは 24 時間後に回収し、感染性ウイルス量をプラークアッセイ法により測定した。その結果、Vero 細胞では各 UL13 変異体は野生体 HSV-2 およびそれぞれの復帰株との間でウイルス増殖性の違いは認められなかった（data not shown）。同様に、U2OS 細胞においても、MOI＝3、12 時間後ではウイルス増殖性の違いは認められなかった（data not shown）。一方、U2OS 細胞において、MOI＝0.01、24 時間後では YK862（ΔUL13）および YK864（UL13-K176M）は野生体 HSV-2 に比べてウイルス増殖性が約 15～20 倍低下した。また、リン酸化消失株である YK866（UL13-S18A）においても野生体 HSV-2 に比べてウイルス増殖性が約 20 倍低下し、リン酸化模倣株 である（UL13-S18D）におけるウイルス増殖性は野生体 HSV-2 と同様であった（図 2A）。次に、各ウイルスを Vero 細胞もしくは U2OS 細胞にプラークアッセイ法と同様の方法で感染させ、48 時間後のプラークサイズを測定した。その結果、Vero 細胞では各ウイルス間でプラークサイズに有意な差は認められなかった（data not shown）。一方、U2OS 細胞ではウイルス増殖性の結果と同様に YK866（UL13-S18A）のプラークサイズは野生体 HSV-2 に比べて有意に減少し、YK862（ΔUL13）および YK864（UL13-K176M）のプラークサイズと同様であった。一方で、YK867（UL13-S18D）のプラークサイズは野生体 HSV-2 と同様であった（図 2B）。以上の結果より、UL13 タンパク質、UL13 の PK 活性および UL13 Ser-18 のリン酸化は細胞腫および MOI 依存的に効率的なウイルス増殖および細胞間伝播に重要であることが示唆された。

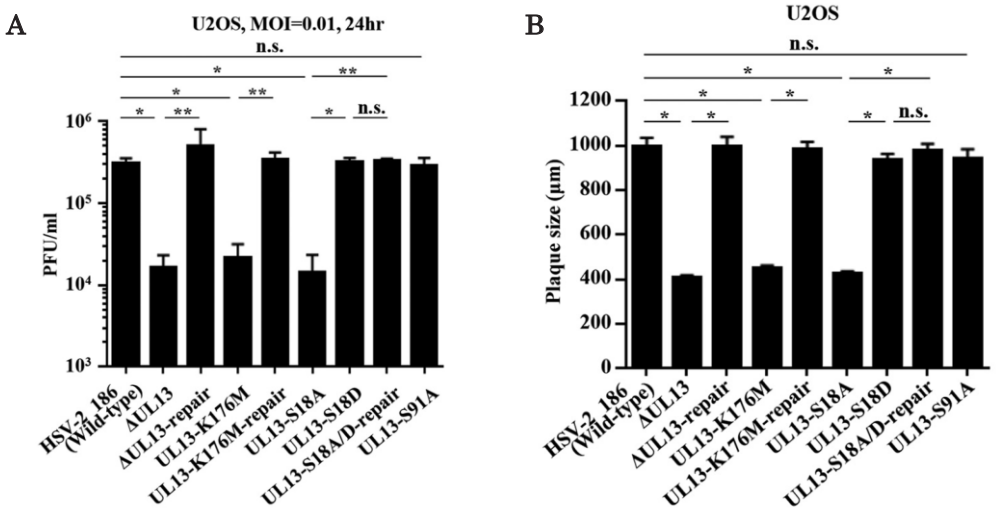


図 2. 各 UL13 変異によるウイルス増殖および細胞間伝播への影響

A) 野生体 HSV-2 および各 UL13 変異組換えウイルスを U2OS 細胞に MOI＝0.01 で感染させ、24 時間後のウイルス力価を Vero 細胞におけるプラークアッセイにより測定した。値は独立した 4 回の実験の平均値±標準誤差を用いた。P 値は ANOVA と tukey's test により算出した（*P<0.05、**P<0.01）。

B) 野生体 HSV-2 および各 UL13 変異組換えウイルスを U2OS 細胞に MOI＝0.0001 でプラークアッセイと同様に方法で感染させ、48 時間後のプラークサイズを測定した。各 20 個のプラークのサイズを測定し、値は平均値±標準誤差を用いた。P 値は ANOVA と tukey's test により算出した（*P<0.0001）。

4. UL13 Ser-18 リン酸化の翻訳伸長因子 EF-1δ Ser-133 リン酸化への影響

翻訳伸長因子 EF-1δ は HSV-1 UL13 の基質の一つとして知られており、HSV-1 UL13 は Ser-133 をリン酸化する［1, 2］。EF-1δ Ser-133 のリン酸化状態をより詳細に評価するために EF-1δ-S133^{P}リン酸化抗体を作製した。U2OS 細胞に各ウイルスを感染させ、細胞ライセートをウエスタンブロット解析に供した。その結果、HSV-1 の報告と同様に、野生体 HSV-2、復帰株感染細胞では非感染細胞に比べて EF-1δ S133^{P}のリン酸化の亢進が認められた（図 3A、B）。一方で、YK862（ΔUL13）および YK864（UL13-K176M）感染細胞では EF-1δ S133^{P}のリン酸化状態は非感染細胞と同様のレベルのシグナルが認められた（図 3A、B）。よって HSV-2 の UL13 も HSV-1 UL13 と同様に EF-1δ Ser-133 をリン酸化することが示唆された。

次に、UL13 Ser-18 のリン酸化が HSV-2 感染細胞において UL13 の機能に影響するかを評価するために EF-1δ Ser-133 のリン酸化状態を評価した。その結果、YK866（UL13-S18A）感染細胞では野生体 HSV-2 感染細胞に比べて EF-1δ Ser-133 のリン酸化の減少が認められた（図 3C、D）。一方で、YK867（UL13-S18D）感染細胞における EF-1δ Ser-133 のリン酸化レベルは野生体 HSV-2 感染細胞への回復が認められた（図 3C、D）。よって、UL13 Ser-18 のリン酸化は HSV-2 感染細胞における UL13 の機能発現に寄与することが示唆された。

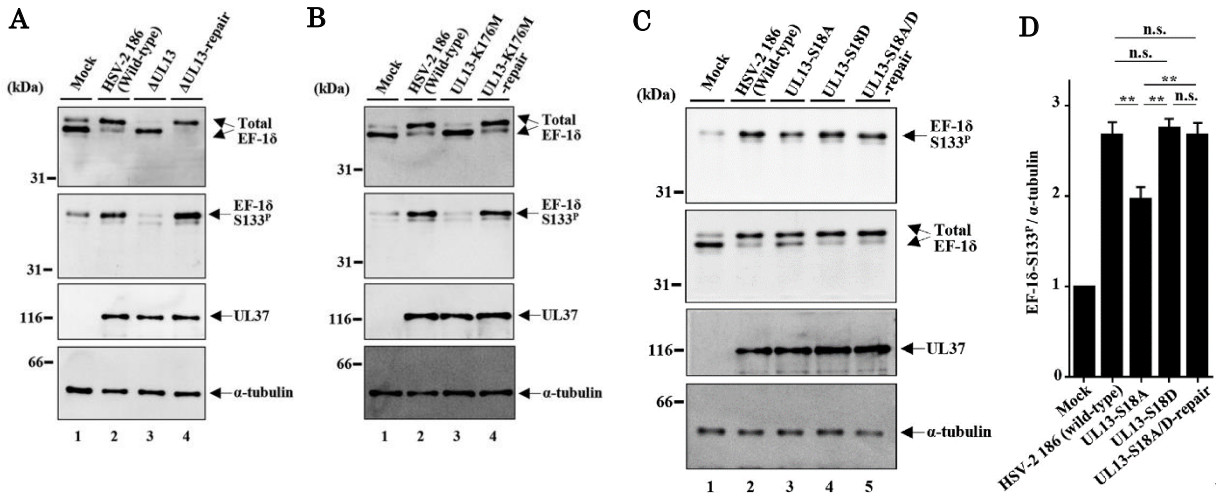


図 3. 各 UL13 組換えウイルス感染細胞における EF-1δ-Ser-133 リン酸化の発現

A) 非感染（Mock）、野生体 HSV-2、YK862（ΔUL13）、YK863（ΔUL13-repair）感染 U2OS 細胞における EF-1δ、EF-1δ-S133^{P}、UL37、α-tubulin のウエスタンブロットによる発現解析。

B) 非感染（Mock）、野生体 HSV-2、YK864（UL13-K176M）、YK865（UL13-K176M-repair）感染 U2OS 細胞における EF-1δ、EF-1δ-S133^{P}、UL37、α-tubulin のウエスタンブロットによる発現解析。

C) 非感染（Mock）、野生体 HSV-2、YK866（UL13-S18A）、YK867（UL13-S18D）、YK868（UL13-S18A/D-repair）感染 U2OS 細胞における EF-1δ、EF-1δ-S133^{P}、UL37、α-tubulin のウエスタンブロットによる発現解析。

D) C）の EF-1δ-S133^{P}とα-tubulin のバンド濃度の定量解析結果。値は、独立した 7 回の実験の平均値±標準誤差を用いた。P 値は ANOVA と tukey's test により算出した（*P<0.05）。

5. UL13 Ser-18 リン酸化のマウスにおけるウイルス増殖および病原性発現への影響

6 週齢のメス ICR マウスに 1×10^{4}pfu の各ウイルスを経膣接種し、1. 18 日間マウスの生死を観察、2. 感染 9 日後および 12 日後の病態スコア、3. 感染 2 日後および 4 日後の膣洗浄液中の感染性ウイルス量を評価した。その結果、YK862（ΔUL13）、YK864（UL13-K176M）、YK866（UL13-S18A）では各復帰株に比べて致死率および病態発現スコアの低下、感染性ウイルス量の減少が認められた（図 4A～I）。ただし、YK866（UL13-S18A）感染マウスの感染 4 日後の膣洗浄液中の感染性ウイルス量は YK868（UL13-S18A/D-repair）と有意な差は認められなかった（図 4I）。一方、YK867（UL13-S18D）感染マウスの病態スコアは YK868（UL13-S18A/D-repair）の病態スコアとの間に有意な差は認められず、マウス致死率および感染 2 日後の膣洗浄液中の感染性ウイルス量は YK866（UL13-S18A）感染マウスに比べて有意に増加することが認められた（図 4G～I）。以上の結果より、UL13 タンパク質、UL13 の PK 活性および UL13 Ser-18 のリン酸化はマウス経膣感染後の効率的なウイルス増殖および病原性発現に重要であることが示唆された。

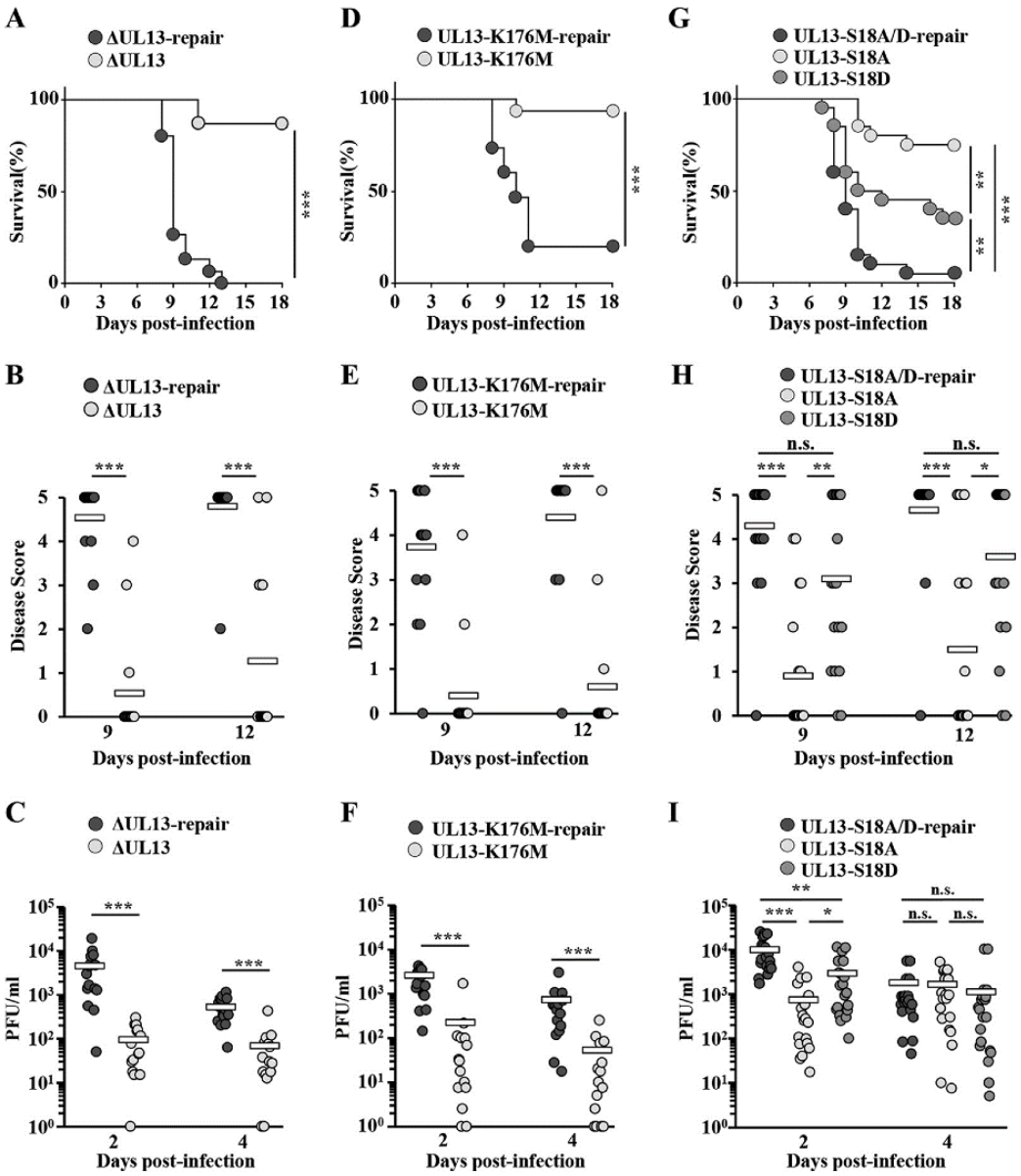


図 4. 各 UL13 変異のマウス経膣接種時における致死率、病態発現、ウイルス増殖への影響

6 週齢のメス ICR マウス（各 15 匹（図 4A～F）、各 20 匹（図 4G～I））に 1×10^4pfu の YK862（ΔUL13）もしくは YK863（ΔUL13-repair）（図 4A～C）、YK864（UL13-K176M）もしくは YK865（UL13-K176M-repair）（図 4D～F）、YK866（UL13-S18A）、YK867（UL13-S18D）もしくは YK868（UL13-S18A/D-repair）（図 4G～I）を経膣接種し、各マウスの致死率（図 4A、D、G）、病態発現スコア（図 4B、E、H）、膣洗浄液中の感染性ウイルス量（図 4C、F、I）を解析した。値は、独立した 3 回（図 4A～F）もしくは 4 回（図 4G～I）の実験により算出した。致死率の P 値は log rank test（図 4A、D）もしくは log-rank test と Bonferroni adjustment for the three comparison analyses（図 4G）により算出した。病態発現スコアは各マウスのスコアを点で示し、その平均値を bar で示した。P 値は Mann-Whitney U test（図 4B、E）もしくは Dunn's multiple comparisons test（図 4H）により算出した。膣洗浄液中の感染性ウイルス量は各マウスのウイルス量を点で示し、その平均値を bar で示した。P 値は Mann-Whitney U test（図 4C、F）もしくは Dunn's multiple comparisons test（図 4I）により算出した。（*P＜0.05、**P＜0.01、***P＜0.0001）。

考　察

HSE は抗ヘルペス薬が開発された現在においても、3～5 割の患者が致死や重度の後遺症により社会復帰できないことから、HSE に対する新規治療薬や発症予防法の開発が強く望まれている。HSE 発症機序については、自然免疫関連の遺伝子異常により抗ウイルス応答が弱いために脳炎が発症するという報告があるが [3]、未だその発症機序には不明な点が多い。我々は以前に HSE に関与する HSV 遺伝子として UL13 を同定した。本研究では UL13 の機能制御機構を明らかにすることで、HSE の発症機序の一端を明らかにすることを目的とした。ヘルペスウイルスがコードする PK はウイルスのライフサイクルにおいて多様な機能を果たし、効率的なウイルス増殖や病原性発現、宿主細胞応答制御に寄与する。宿主 PK の研究によって PK の機能制御の重要性が明らかになっているが、ウイルス PK の感染細胞中における機能制御機構はほとんど分かっていなかった。そこで我々は、翻訳後修飾の一つであるリン酸化が多くの宿主 PK の機能制御を担うことから、本研究で焦点を当てた UL13 についてもリン酸化によって機能が制御されている可能性について詳細な解析を試みた。その結果、HSV-2 感染細胞を用いたリン酸化プロテオーム解析によって同定した UL13 Ser-18 のリン酸化は HSV-2 感染細胞中において UL13 の PK 活性制御に重要であることが明らかになった。我々は以上の知見を、Journal of Virology に報告した [4]。今後、UL13 Ser-18 のリン酸化を担うキナーゼが UL13 自身なのか、もしくは他のウイルスキナーゼや宿主キナーゼであるかを同定することによって、これらを標的とした HSE やその他の HSV 感染症に対する新規治療薬の開発に繋がることが期待できると考える。

共同研究者・謝辞

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加藤哲久先生、竹島功高博士、丸鶴雄平先生、有井潤先生、川口寧先生、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の秦裕子先生、尾山大明先生である。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) Kawaguchi Y, Van Sant C, Roizman B. Eukaryotic elongation factor 1delta is hyperphosphorylated by the protein kinase encoded by the U(L)13 gene of herpes simplex virus 1. J Virol. 1998 Mar;72(3):1731-6. PMID: 9499021

2) Kawaguchi Y, Kato K, Tanaka M, Kanamori M, Nishiyama Y, Yamanashi Y. Conserved protein kinases encoded by herpesviruses and cellular protein kinase cdc2 target the same phosphorylation site in eukaryotic elongation factor 1delta. J Virol. 2003 Feb;77(4):2359-68. PMID: 12551973 DOI: 10.1128/jvi.77.4.2359-2368.2003

3) Casrouge A, Zhang SY, Eidenschenk C, Jouanguy E, Puel A, Yang K, Alcais A, Picard C, Mahfoufi N, Nicolas N, Lorenzo L, Plancoulaine S, Sénéchal B, Geissmann F, Tabeta K, Hoebe K, Du X, Miller RL, Héron B, Mignot C, de Villemeur TB, Lebon P, Dulac O, Rozenberg F, Beutler B, Tardieu M, Abel L, Casanova JL. Herpes simplex virus encephalitis in human UNC-93B deficiency. Science. 2006 Oct 13;314(5797):308-12. PMID: 16973841 DOI: 10.1126/science.1128346

4) Koyanagi N, Kato A, Takeshima K, Maruzuru Y, Kozuka-Hata H, Oyama M, Arii J, Kawaguchi Y. Regulation of Herpes Simplex Virus 2 Protein Kinase UL13 by Phosphorylation and Its Role in Viral Pathogenesis. J Virol. 2018 Aug 16;92(17). pii: e00807-18. doi: 10.1128/JVI.00807-18.