

ヘルペスウイルス遺伝子発現制御因子の 機能発現機構の解明

川口 寧

1. はじめに

ウイルス研究において、遺伝子発現制御機構の解析は、「ウイルスの増殖が如何に制御されているか?」といった根本的な問題を明らかにするものであり、研究の重要な位置を占める。また、現在、一部のウイルスは腫瘍性疾患や先天性遺伝子疾患に対するベクターとして遺伝子治療やウイルス療法の分野で幅広く利用されている。この点においても、効率的な外来遺伝子の発現制御を行うためにはウイルスの遺伝子発現機構を理解することが必須となってくる。

ヘルペスウイルス科は α , β , γ の3つの亜科より構成され、全ての脊椎動物から昆虫にいたるまで約130種類が分離されている⁴³。ヘルペスウイルスの最大の特徴は、潜伏感染を引き起こすという点にある。ヘルペスウイルスは初感染後も宿主体内に潜伏感染し、免疫抑制状態といった宿主の変化に伴って再活性化し、回帰発症を引き起こす⁴³。この潜伏感染するという性状ゆえに、その根本的な制圧が困難であり、医学・獣医学の両領域において重要な研究課題である。我々は、様々なヘルペスウイルスの遺伝子発現制御因子に焦点を当て、その機能発現機構を解析してきた。本稿では、筆者らがすすめてきた研究の中でも、特に、ヘルペスウイルスのプロトタイプである単純ヘルペスウイルス (herpes simplex virus: HSV) に関する解析について概説するとともに、最新の知見も合わせて紹介する。

2. HSV の遺伝子発現制御因子

HSVはヒトに、脳炎、性器ヘルペス、口唇ヘルペス、眼疾患等の多様な病態を引き起こす⁵²。HSV感染症に対するワクチンは未だ開発されておらず、HSV感染症の治療には、アシクロビルといった抗ヘルペスウイルス剤が使用されている。しかし、抗ヘルペスウイルス剤の効力は十分とは言えず、例えば、単純ヘルペス脳炎の致死率は10%に上り、生存者もその7割近くが中・重度の後遺症を残す。また、HSV感染症は、免疫抑制療法により免疫が低下している臓器移植患者やエイズ患者、癌などを基礎疾患にもつ患者などで、日和見感染症として問題となっている。例えば、骨髄移植患者では、HSV抗体が移植前に陽性だった場合、移植後5週間以内に80%がHSV感染症を発症する。近年の社会状況の変化(移植手術の増加、エイズ問題、性習慣の多様性、ストレス社会)に伴い、HSV研究の重要度は増しつつある。一方、HSVは強い神経指向性や殺腫瘍効果を有することより、遺伝子治療およびウイルス療法の分野でベクターとして利用されている⁵³。海外では、脳腫瘍に対するHSVのウイルス療法の臨床試験が行われており、現在、第II相の臨床試験段階にある⁴⁸。

HSVのウイルスゲノムは約150kbpの巨大な直鎖状二本鎖DNAであり、このウイルスDNAに80以上のウイルス蛋白質がコードされている⁴²。これらのウイルス蛋白質をコードするウイルス遺伝子はその発現時期によって3群(α , β , γ)に大別され、それぞれの発現はカスケード状に制御されている⁴²。最初に発現する α 遺伝子群には、 $\alpha 0$, $\alpha 4$, $\alpha 22$, $\alpha 27$, $\alpha 47$ が含まれ $\alpha 47$ を除く4つの遺伝子産物は遺伝子発現制御因子である¹⁶⁻¹⁸。 α 遺伝子産物以外の遺伝子発現制御因子としては、UL48遺伝子産物である α -TIF(別名VP-16)やウイルスがコードするプロテインキナーゼの1つであるUL13が挙げられる¹⁶⁻¹⁸。 $\alpha 4$ 遺伝子産物であるICP4や α -TIFはDNA結合能を有する転写制御因子である¹⁶⁻¹⁸。 $\alpha 27$ 遺伝子産物であるICP27はRNA結合能を有し、RNAの輸送や安定化に関与している¹⁶⁻¹⁸。また、 $\alpha 22$ 遺伝子産物であるICP22は、DNA結合

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・細胞制御学分野
(旧腫瘍ウイルス)(〒113-8510 東京都文京区湯島1-5-45)

Functional Analyses of Regulatory Proteins of Herpesviruses.

Yasushi Kawaguchi

Department of Cell Regulation (formerly Tumor Virology), Medical Research Institute, Tokyo Medical and Dental University.

1-5-45 Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8510, Japan.

TEL: 03-5803-5816, FAX: 03-5803-0241

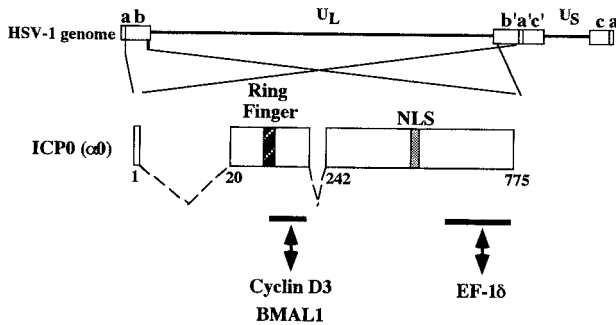


図1 酵母 two-hybrid 法を用いた ICP 0 と相互作用する宿主細胞因子の同定.

上段に HSV-1 ゲノムを, 中段に α0 遺伝子のゲノム構造を, 下段に two-hybrid 法における bait の位置とその領域と相互作用する宿主因子を示す.

能をもたないにも関わらず, ある特定のウイルス遺伝子の発現を制御している¹⁶⁻¹⁸⁾. 我々は, α0 遺伝子産物である ICP 0 とウイルスポロタンキナーゼである UL13 に焦点を当て, 解析を行った.

3. ICP 0 の多機能性の解明

ICP 0 は, 培養細胞系でのウイルスの増殖に必須ではないが, HSV の増殖期の遺伝子発現および潜伏感染からの再活性化の両方を制御し, かつ, *in vivo* における病原性にも関与している重要なウイルス因子である⁴⁾. ICP 0 は, transient transfection assay において様々なプロモーターを活性化することより, 古くから転写レベルで遺伝子発現を制御していると考えられてきた⁴⁾. しかし, 実際に ICP 0 が如何なる宿主細胞因子と相互作用し, 遺伝子発現を制御するのかは不明であった. 我々は, 酵母を用いた two-hybrid 法を用いて, ICP 0 と相互作用する宿主細胞因子の検索を行った.

(i) ICP 0 と細胞周期制御因子 cyclin D 3 との相互作用.

ICP 0 における既知の機能ドメインの 1 つ (Ring Finger motif を含む exon II の C 末端領域: 図 1) を bait とし, 宿主細胞のライブラリーとして EB ウイルス (Epstein-Barr virus: EBV) でトランスフォームされたヒト末梢血リンパ球の cDNA ライブラリーを用いて two-hybrid screening を行った. その結果, 強い β-gal 活性を示すコロニーを 31 個得た. その中の 1 つは細胞周期制御因子である cyclin D 3 をコードしている cDNA を保持していた. Two-hybrid 法における ICP 0 と cyclin D 3 の相互作用は, GST-pull down 法によって確認された. すなわち, GST-cyclin D 3 融合蛋白質は, 特異的に感染細胞抽出液中の ICP 0 を共沈した (図 2). また, ICP 0 は核ドメインである ND10 に局在することが知られているが, cyclin D 3 を過剰発現する組み換え HSV 感染細胞において, ND10

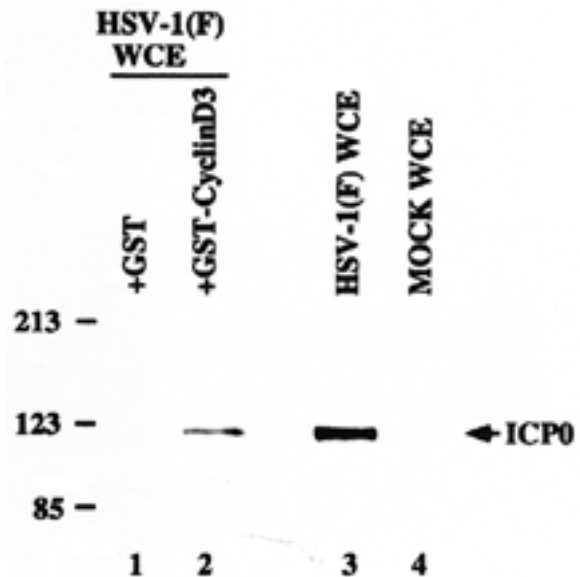


図 2 GST-pul down 法による ICP 0 と cyclin D 3 の相互作用の検出.

GST は ICP 0 と相互作用しないが (レーン 1), GST-cyclin D 3 融合蛋白質では特異的に ICP 0 と複合体を形成し, 共沈された (レーン 2). レーン 3 および 4 は, 感染および非感染細胞抽出液を ICP 0 抗体を用いたウエスタンブローディングに供したものの.

様構造で ICP 0 と cyclin D 3 が共局在することが明らかになった²⁴⁾.

cyclin D 3 は cdk 4 または cdk 6 と複合体を形成し, RB 蛋白質をリン酸化することによって細胞周期を G 0 / G 1 期から S 期へと進行させることが知られている^{44,45)}. また, cyclin D 3 は分解されやすい不安定な蛋白質であり, 細胞内での半減期は 30 分に満たない. 我々はこの点に注目し, ICP 0 ノックアウト HSV (7910) を用いて感染細胞中での cyclin D 3 の発現を検討した. その結果, 野生株感染細胞においては, 感染 8 時間後に cyclin D 3 の発現が確認できるのに対し, R7910 感染細胞中では cyclin D 3 を検出することができなかった (図 3). 以上の結果は, ICP 0 は cyclin D 3 と相互作用し, 本来不安定な cyclin D 3 の発現を安定化していることを示唆している²⁴⁾.

次に, ICP 0 と cyclin D 3 の相互作用がウイルスの増殖および病原性にどの様に関与しているかを検討した. 後述のように ICP 0 は様々な宿主因子と相互作用するので, ICP 0 における cyclin D 3 結合部位を 1 アミノ酸レベルで同定し, その部位にアミノ置換を導入することによって cyclin D 3 と特異的に相互作用不能な組み換え HSV の作製を試みた. その結果, 199 番目のアスパラギン酸をアラニンに置換すると cyclin D 3 との相互作用が消失することが明らかになった⁴⁹⁾. また, このアミノ酸置換を有する組み換え HSV (R7914) を作製したところ, R7914 は, ICP 0 欠損 HSV である R7910 と cyclin D 3 に関して同様な表

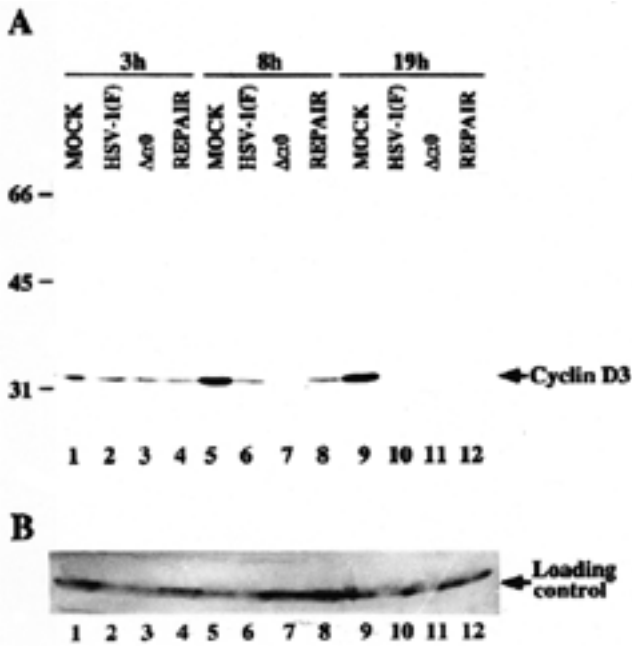


図3 HSV-1 感染細胞中での cyclin D3 の発現。
感染8時間後では野生株感染細胞中（レーン6）、ICP0の欠損を修復したRepair virus 感染細胞中（レーン8）で cyclin D3 の発現が検出されるのに対し、ICP0欠損ウイルス感染細胞中（レーン7）では cyclin D3 の発現が検出されない。

表1 HSV-1 (F), R7914, R7915の培養細胞レベルにおける増殖能の比較

Cells	MOI	Yield (24h p.i.)		
		HSV-1 (F)	R7914 (D199A)	R7915 (A199D)
Vero	0.05	6.8x10 ⁷	7.3x10 ⁷	ND
	5.0	3.0x10 ⁷	3.1x10 ⁷	ND
HLF (Serum starved)	0.05	6.4x10 ⁷	4.0x10 ⁶	5.6x10 ⁷
	0.05	1.8x10 ⁸	1.1x10 ⁷	1.7x10 ⁸

現型を示した⁴⁹⁾。R7914の性状を培養細胞およびマウス動物モデルを用いて解析したところ、R7914はVero細胞等の細胞株においては、野生株と同様な増殖能を示した(表1)。しかし、R7914は静止期のHLF細胞では野生株と比して、その増殖の著しい低下が観察された(表1)。また、R7914はマウス動物モデルにおける病原性も野生株に比して著しく低下していた(表2)。以上の結果は、ICP0がcyclin D3と相互作用し、cyclin D3の発現を安定化することが、ウイルスの静止期細胞における増殖および*in vivo*での病原性に関与していることを示唆している⁴⁹⁾。

(ii) ICP0 と宿主転写因子 BMAL1 との相互作用。

ICP0のexon IIのC末端領域をbaitとしたtwo-hybrid

表2 HSV-1 (F), R7914, R7915のマウスにおける病原性の比較

Virus	PFU ± SE/LD ₅₀ ^a
HSV-1 (F)	135 ± 66
R7914 (D199A)	>10,000
R7915 (A199D)	135 ± 71

^a5週令のマウスにウイルスを腹腔内接種し、30日間観察した。

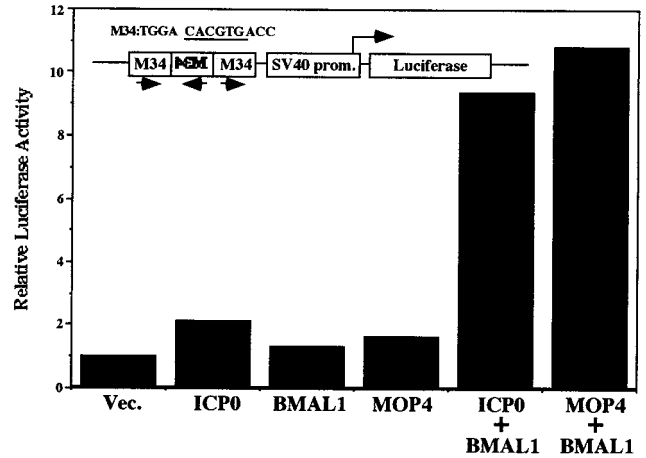


図4. ICP0はBMAL1と協調して転写を活性化する。

ルシフェラーゼ遺伝子の5'上流にSV40由来の基本的なプロモーターとBMAL1結合部位を挿入したレポータープラスミドを構築した。COS-7細胞に、レポータープラスミドと各蛋白質 (vector, ICP0, BMAL1, MOP4) 発現ベクターを導入し、ルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、ICP0はBMAL1と協調して転写を活性化した。その活性化は、BMAL1の本来のパートナーであるMOP4との活性化の度合いと同等であった。

screeningにおいて、ICP0と特異的に相互作用するcyclin D3以外の宿主細胞因子として、転写因子BMAL1を同定した。ICP0とBMAL1との相互作用は、GST-pull down法で確認され、ICP0と相互作用するBMAL1の領域は、PASドメインであることが明らかになった⁴⁹⁾。Baitとして用いたICP0の領域は、ICP0の転写制御能に必須であることが報告されている⁴⁾。また、BMAL1のPASドメインは他の蛋白質とのダイマー形成に重要であることが報告されている^{12,32,40)}。これらの知見は、ICP0とBMAL1との相互作用の妥当性を示唆している。次に、ICP0がBMAL1と相互作用し、実際に転写を制御するかをレポーター遺伝子を用いて解析した。その結果、ICP0はBMAL1と協調して転写を活性化することが明らかになった(図4)。BMAL1は、bHLH-PASファミリーに属する転写因子である¹³⁾。このファミリーに属する転写因子は、外部からのストレス応答に関与している転写因子が多く含まれている^{2,10,12,14,51)}。また、実際にBMAL1がストレス応答に関与する転写因子とダイマーを形成し、転写制御

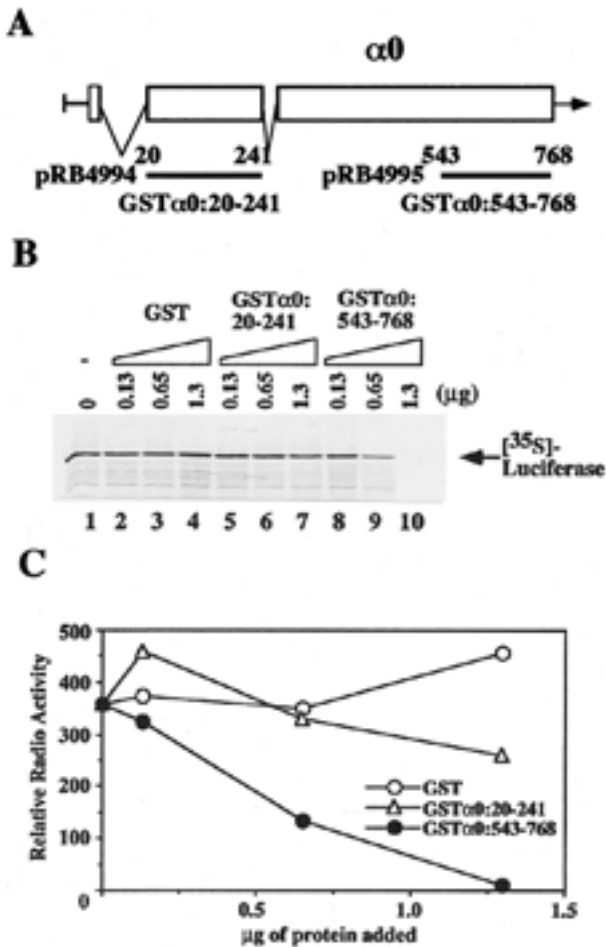


図5. EF-1δと相互作用するICP0のドメインは*in vitro*において翻訳活性を制御する。

(A)に示す、2つのICP0の領域をGSTと融合し大腸菌で発現・精製した。ウサギ赤血球抽出液に各GST蛋白質を加え、ルシフェラーゼのRNAを用いて*in vitro* translationを行った。その結果、GSTまたはEF-1δと相互作用しないICP0の領域とGSTとの融合蛋白質(GSTα0:20-241)は、翻訳活性に影響を及ぼさなかった。一方、EF-1δと相互作用するICP0の領域とGSTとの融合蛋白質(GSTα0:543-768)は、特異的に翻訳活性を阻害した。(B)は、*in vitro* translation後の産物をSDS-PAGEに供したもので、(C)は、(B)の各バンドの活性を定量化したものである。

を行っているという報告もある¹¹⁾。HSVはストレスによって再活性化される場合が多いが、その再活性化を制御しているICP0がストレス応答に関与しているBMAL1と機能的に相互作用するという本知見は、ICP0の転写制御能だけでなく、HSVの再活性化機構を考える上でも興味深い¹⁹⁾。

(iii) ICP0と翻訳因子EF-1δとの相互作用。

ICP0のもう1つの機能ドメインであるexonⅢのC末領域(図1)をbaitにし、同様にtwo-hybrid screeningを行った。その結果、ICP0と特異的に相互作用する宿主

因子として翻訳伸長因子EF-1δを同定した。EF-1δは、蛋白質翻訳時におけるペプチド伸長反応を制御する重要な翻訳因子である^{34,41)}。ICP0とEF-1δの相互作用は、GST-pull down法にて確認され、また、それまで核にのみ局在すると考えられていたICP0が、確かにEF-1δが局在する細胞質にも存在することが明らかになった²³⁾。次に、ICP0とEF-1δの相互作用の生物学的意義の解明を試みた。その結果、EF-1δと相互作用するICP0のドメインが、*in vitro*において特異的に翻訳活性を制御することが明らかになった(図5)。以上より、ICP0はEF-1δと相互作用し、少なくとも*in vitro*において翻訳活性を制御することが明らかになった²³⁾。興味深いことに、我々の報告後、エイズの原因ウイルスであるヒト免疫不全ウイルス(HIV)の制御因子であるtat蛋白質がEF-1δと相互作用し翻訳活性を制御することが報告された⁵⁴⁾。驚くべくことに、EF-1δと相互作用するICP0のC末領域には、HIV tatと相同性を示す部位が存在していた⁵⁴⁾。これら知見は、HSVのICP0とHIVのtatが同じ様な機構でEF-1δの活性を制御していることを示唆している。

(iv) まとめ。

HSV研究においてICP0は、その重要性ゆえに最も多くのグループが研究をすすめているウイルス因子の1つである。我々以外のグループからも様々な知見が報告されている。(i)ICP0が感染初期に核ドメインND10(別名PML-containing nuclear body)に局在し、その崩壊を引き起こす³³⁾。(ii)ICP0が様々な宿主細胞因子の分解を促進する。例えば、転写制御に関与していると考えられているDNA依存性プロテインキナーゼ³⁰⁾、アポトーシスや細胞の癌化との関連性が示唆され、ND10のコンポーネントであるPML⁵⁾、有糸分裂時に重要な役割を果たすセントロメアのコンポーネントであるCENP-C⁶⁾である。(iii)ICP0は蛋白質分解系の1つであるユビキチン系を制御する。最近、ICP0自身がユビキチン系の制御因子であるE3ユビキチンリガーゼであり、様々な宿主由来のE2ユビキチン結合酵素とともに標的蛋白質をユビキチン化しうることが明らかになった^{1,8,50)}。これは、標的蛋白質の分解を促進すると考えられる。一方、ICP0は、標的蛋白質よりユビキチンを除去し、標的蛋白質の安定化に関与する酵素であるユビキチン特異的プロテアーゼ(USP7)とも強固に結合することが報告されている⁷⁾。これらの知見は、ICP0が標的蛋白質の分解を促進したり、時には安定化したりと多様性を示す理由を説明しているかもしれない。この様に、ICP0はユビキチン系を制御することによって、感染細胞中における標的宿主因子の分解または安定化に関与し、ウイルス増殖や生存に適した環境をつくりだしていることが示唆されている。(iv)マイクロアレイ法を用いた解析より、ICP0は宿主の細胞周期制御に関与するp21等

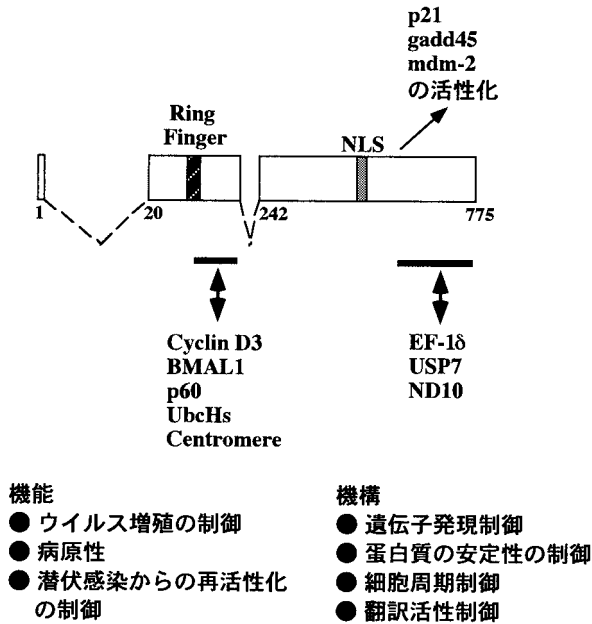


図6 ICP0は様々な宿主細胞機構を制御する多機能因子である。

の発現を特異的に誘導する⁹⁾。また、ICP0はG1/S期およびG2/M期における宿主細胞周期の進行を阻害する³¹⁾。G1/S期の阻害にはICP0によるp21の発現誘導が、G2/M期の阻害にはCENP-Cの分解が関与していることが示唆されている^{6,9)}。

以上、我々および他のグループの研究から、ICP0は古くから言われてきたような単なる転写制御因子ではなく、様々な宿主細胞因子と相互作用したり、または、それらの発現を制御することにより、蛋白質分解系、細胞周期、翻訳、転写といった多様な宿主細胞機構を制御する多機能因子であることが明らかになってきた(図6)。このことは、限られたゲノムしか持ちえないウイルスがそのハンディキャップを克服するために、各々のウイルス因子を多機能化させ、ウイルスとしてより多く機能を獲得するといったウイルスの巧みな生存戦略を示唆している。

4. HSVがコードするプロテインキナーゼUL13の標的宿主因子の同定

蛋白質のリン酸化は、蛋白質の活性制御の主要かつ効率的な手段であり、転写、翻訳、細胞周期、アポトーシスといった重要な細胞機構がリン酸化によって制御されている。HSVはそのゲノムにプロテインキナーゼをコードしていることが古くから知られていた。そして、これらウイルス特異的プロテインキナーゼがウイルス因子および宿主細胞因子をリン酸化し、各因子の活性を制御することによってウイルスの増殖や生存に寄与していると考えられてきた。しかし、ウイルス特異プロテインキナーゼの標的ウイ

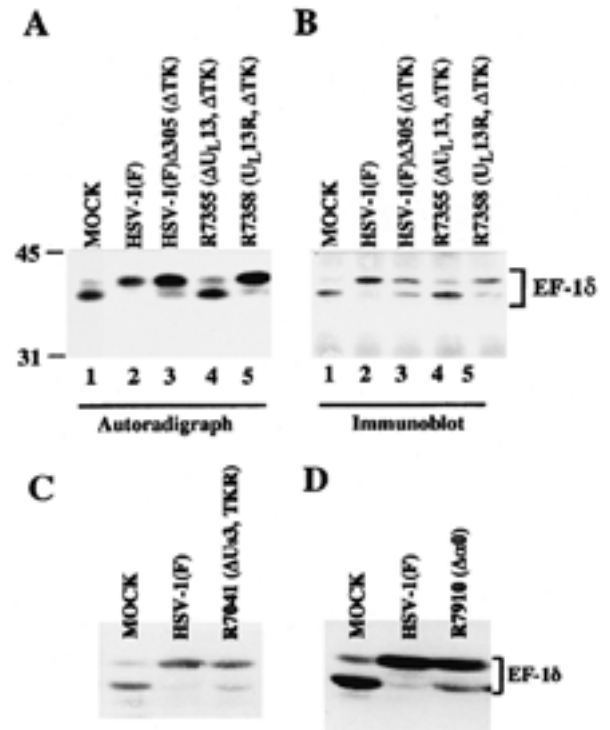


図7 UL13はHSV-1感染細胞中における過リン酸化型EF-1δの増加に関与する。

Vero細胞に各ウイルスを感染させ、Piで標識後、EF-1δ抗体にて免疫沈降した。(A)は、オートラジオグラフィを示す。野生株(レーン2)およびUL13を有する組み換えウイルス(レーン3, 5)感染細胞では、過リン酸化型EF-1δの増加が観察される。一方、UL13欠損ウイルス(レーン4)では、非感染細胞(レーン1)と相違なかった。(B)は、(A)をEF-1δ抗体を用いたウエスタンブロッティングに供したものである。(C)、(D)はUs3またはICP0欠損HSV感染細胞中でのEF-1δをウエスタンブロッティングで検出したもの。両欠損ウイルス共に野生株と同様な表現型を示したことより、過リン酸化型EF-1δの増加に関与していないことがわかる。

ルス因子に関する知見が蓄積していったのに対し、標的宿主因子に関する知見は皆無に等しかった。我々は、HSVがコードするプロテインキナーゼの1つであるUL13に焦点をあて、その標的宿主因子の同定を試みた。

(i) UL13

UL13は、培養細胞におけるウイルスの増殖には必須ではないが、特定のウイルス遺伝子(α0やUs11を含む一部のγ遺伝子)の発現制御に関与している遺伝子発現制御因子である^{38,39)}。HSVがコードする他のウイルスプロテインキナーゼがαヘルペスウイルス亜科でのみ保存されているのに対し、UL13は全てのヘルペスウイルス亜科で保存されている^{3,46)}。UL13は、ICP22, ICP0, gI/gE複合体(Fcレセプターホモログ)、といった様々なウイルス因子をリン酸化することが報告されている³⁶⁻³⁸⁾。特に、ICP

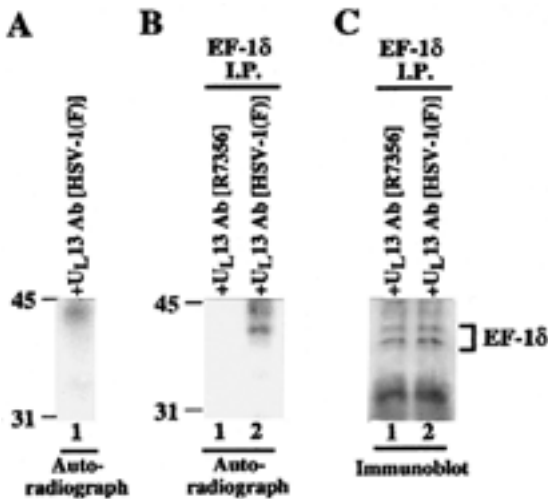


図8 UL13は *in vitro* において、EF-1 δ をリン酸化する。野生株感染細胞およびUL13欠損ウイルス (R7356) 感染細胞抽出液よりUL13抗体を用いた免疫沈降を行った。免疫沈降物を正常細胞から免疫沈降にて精製したEF-1 δ を混ぜ、*in vitro* kinase assayを行った。(B) UL13が存在しないR7356感染細胞からの免疫沈降物はEF-1 δ をリン酸化しなかったのに対し(レーン1)、UL13を含むと考えられる野生株感染細胞からの免疫沈降物は、特異的にEF-1 δ をリン酸化した(レーン2)。(C)は、(B)をEF-1 δ 抗体を用いたウエスタンブロッティングに供したものの。

22のリン酸化に関しては詳細に検討がなされており、UL13によるリン酸化がICP22の機能発現に必須であることが報告されている³⁸⁾。また、HSVと同じ α ヘルペスウイルス亜科に分類されている水痘・帯状疱疹ウイルス (Varicella-zoster virus: VZV) のUL13ホモログであるORF47は、VZVの組織特異的な感染に関与していることが報告されている³⁵⁾。

(ii) UL13は宿主翻訳因子EF-1 δ の過リン酸化に関与している。

前述のように、我々はHSVの多機能制御因子ICP0が宿主翻訳因子EF-1 δ と相互作用することを明らかにした²³⁾。その過程において、EF-1 δ の特異抗体を作製し、HSV感染細胞中でのEF-1 δ の動態を検討した。その結果、HSV感染後期では、過リン酸化型EF-1 δ の著しい増加が観察された²³⁾。そこで、様々なHSV遺伝子のノックアウトウイルスを用いて、過リン酸化型EF-1 δ の増加に関与するHSV責任遺伝子の同定を試みた。その結果、HSVがコードするプロテインキナーゼであるUL13が感染細胞中における過リン酸化型EF-1 δ の増加に関与していることが明らかになった(図7)。また、*in vitro* kinase assayの結果、感染細胞中より免疫沈降で精製されたUL13は、EF-1 δ を特異的にリン酸化した(図8)。以上の結果は、UL13の標的宿主因子の1つが翻訳因子EF-1 δ で

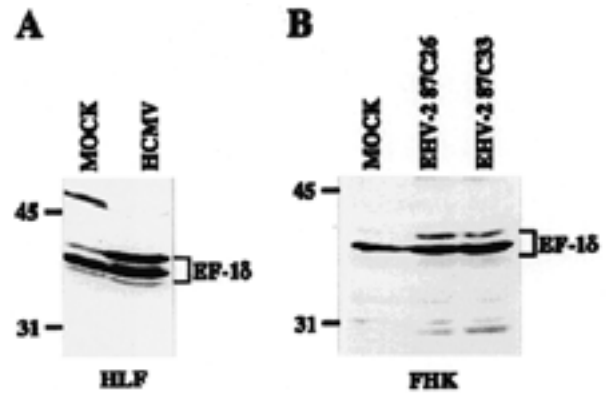


図9 HCMVおよびEHV-2感染細胞中でも過リン酸化型EF-1 δ の増加は引き起こされる。

(A)はHCMV感染HLF細胞を、(B)はEHV-2感染FHK細胞をEF-1 δ 抗体を用いたウエスタンブロッティングに供したもの。両ウイルス感染細胞共に、非感染細胞と比べて過リン酸化型EF-1 δ の増加が観察される。

あることを示している²²⁾。

(iii) 感染細胞中における過リン酸化型EF-1 δ の増加は全ての亜科のヘルペスウイルス感染によって普遍的に引き起こされ、そのリン酸化には全てのヘルペスウイルスで保存されているUL13ホモログが関与している。

次に我々は、UL13が全てのヘルペスウイルスにおいて保存されているという事実に着目し^{3,46)}、過リン酸化型EF-1 δ の増加がHSV以外のヘルペスウイルス感染においても保存されている現象であるかを検討した。その結果、HSVと同じ α ヘルペスウイルスに属するPseudorabivirus感染ブタ腎由来CPK細胞、Bovine herpesvirus type 1感染ウシ腎由来MDBK細胞、Feline herpesvirus type 1 (FHV-1)感染ネコ腎由来CRFK細胞において、過リン酸化型EF-1 δ の増加が観察された²¹⁾。また、 β ヘルペスウイルスであるヒトサイトメガロウイルス (human cytomegalovirus: HCMV) 感染ヒト肺由来HLF細胞および γ ヘルペスウイルスであるEquine herpesvirus type 2 (EHV-2) 感染ウマ腎由来FHK細胞においても同様の結果が得られた(図9)。以上の結果は、感染細胞中における過リン酸化型EF-1 δ の増加が、ヘルペスウイルス感染および宿主の種を越えて保存されている普遍的な現象であることを示している²¹⁾。次に我々は、ヘルペスウイルス感染において普遍的な現象である過リン酸化型EF-1 δ の増加に、ヘルペスウイルスで保存されているUL13ホモログが実際に関与しているかを検討した。実験には、HSVのUL13遺伝子をHCMVのUL13ホモログであるUL97と交換した組み換えHSVであるR4969を用いた。その結果、HCMV UL97を過剰発現するR4969感染細胞では過リ

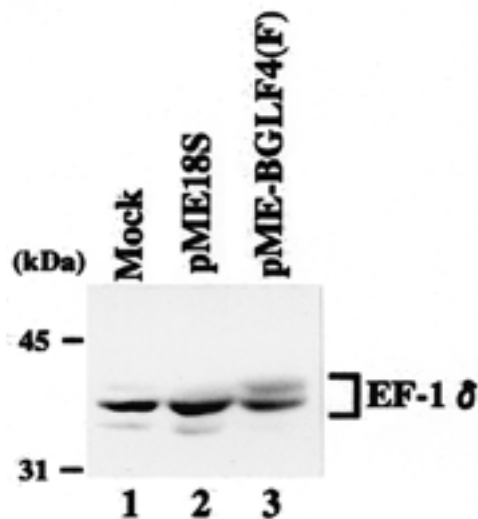


図10 EBV BGLF 4は過リン酸化型 EF-1 δ の増加に関与している。

COS-7細胞にBGLF 4発現ベクターを導入し、細胞抽出液をEF-1 δ 抗体を用いたウエスタンブロッティングに供したところ、BGLF 4を過剰発現させると過リン酸化型 EF-1 δ の増加が観察された(レーン3)。

ン酸化型 EF-1 δ の増加が観察された²¹⁾。また、 γ ヘルペスウイルスであるEBVのUL13ホモログであるBGLF 4を昆虫細胞においてヒトEF-1 δ と共発現させたところ、コントロールと比して過リン酸化型 EF-1 δ の増加が観察された¹⁵⁾。さらに、BGLF 4をCOS-7細胞で過剰発現した際、内在性の過リン酸化型 EF-1 δ の増加が観察された(図10)。以上の結果は、感染細胞中における過リン酸化型 EF-1 δ の増加には、全ヘルペスウイルスで保存されているUL13ホモログが普遍的に関与していることを示唆している^{15, 21)}。

(iv) まとめ。

近年の分子生物学的手法の進歩により、ウイルス因子と相互作用する宿主細胞因子が次々に同定されたが、それらの感染細胞中における生物学的意義や重要性は不明な点が多いのが現状である。我々が相互作用の重要性を判断する1つの指標として‘普遍性’が挙げられる。例えば、様々なウイルスの制御因子がある特定の宿主細胞因子と相互作用するといった知見や、1つの宿主細胞因子に同一ウイルスの複数のウイルス因子が相互作用するといった知見は、我々にそれらの重要性を示唆してくれる。

本研究において、我々は、ウイルスがコードするプロテインキナーゼUL13の標的宿主因子が翻訳因子EF-1 δ であることを明らかにした。本知見は、ウイルス学においてウイルス特異プロテインキナーゼの標的宿主因子を同定したはじめての報告となった。また、これらの知見は、HSVが進化上、EF-1 δ と相互作用する少なくとも2つのウイ

ルス因子(ICP 0, UL13)を獲得したことを示している。さらに、我々は、感染細胞中におけるEF-1 δ の過リン酸化が、全てのヘルペスウイルス感染によって普遍的に引き起こされ、そのリン酸化にはヘルペスウイルスで保存されているUL13ホモログが関与していることも明らかにした。これらの知見は、EF-1 δ のヘルペスウイルス感染における普遍性を支持するものであり、その重要性が示唆される。

5. おわりに

本稿は、平成13年度日本ウイルス学会杉浦奨励賞の受賞内容の一部を基に、国内外の最新の知見を加えて総説としたものである。杉浦賞の受賞内容としては、本稿で紹介したHSVに関する知見以外にも、EBV, FHV-1に関する研究が含まれている。しかし、紙面の都合上、また、総説として論点が分散しないように、EBVおよびFHV-1に関する研究は文献だけの紹介とさせていただいた^{20, 25~29, 47, 55, 56)}。筆者らはこれまで、主にヘルペスウイルスの制御因子の機能発現機構を宿主細胞機構との相互作用の観点より研究を行ってきた。名誉ある本賞の受賞は、筆者らの研究方向の妥当性を示唆するものであると信じ、今後も、「ヘルペスウイルスが如何に増え、如何に病原性を呈するのか?」といった単純な命題に取り組んでいきたい。また、今後は、基礎研究だけでなく、ヘルペスウイルス感染症制圧に向けての抗ウイルス剤およびワクチンの開発や遺伝子治療用ヘルペスウイルスベクターの開発といった応用研究にも積極的に取り組んでいきたい。

6. 謝 辞

受賞対象となった研究は、東京大学農学部獣医微生物学教室・見上 彪教授(現日本大学生物資源科学部), Marjorie B. Kovler Viral Oncology Laboratories, The University of Chicago・Prof. Bernard Roizman, 東京医科歯科大学難治疾患研究所腫瘍ウイルス分野・平井莞二教授のもとで行われました。平井教授は、受賞の約1年前に御逝去されました。平井教授に本稿を捧げると共に、あらためて、ご冥福をお祈りいたしますと存じます。また、杉浦奨励賞に御推挙いただいた、大阪大学医学部・山西弘一教授、名古屋大学医学部・西山幸廣教授、日本大学生物資源科学部・見上 彪教授に深謝いたします。本研究は、以下に挙げる多くの先生方、研究員および学生の御指導・御協力によって遂行されたものであり、あらためてここに御礼申し上げます。

東京大学農学部獣医微生物学教室：見上 彪先生、高橋英司先生、甲斐知恵子先生、遠矢幸伸先生、新倉昌浩先生、堀本泰介先生、乗峰潤三先生、宮沢孝幸先生、朝長啓造先生、小野 満先生、前田 健先生、Marjorie B. Kovler Viral Oncology Laboratories, The University of Chicago：

Prof. Bernard Roizman, Dr. Renato Bruni, Dr. Charles Van Sant, 東京医科歯科大学難治疾患研究所細胞制御学分野 (旧腫瘍ウイルス) : 平井莞二先生, 山梨裕司先生, 田中道子博士, 五十嵐美絵さん, 横山明彦博士, 松田 剛君, 加藤健太郎君, 金森美紀子さん, 森田朋子さん, 中嶋香織さん, 防衛医科大学 : 深澤昌史先生, JRA 競走馬研究所 : 松村富夫先生.

文 献

- 1) Boutell, C., Sadis, S., and Everett, R. D. (2002) Herpes Simplex Virus Type 1 Immediate-Early Protein ICP 0 and Its Isolated RING Finger Domain Act as Ubiquitin E 3 Ligases *In Vitro*. *J. Virol.* **76** : 841-850.
 - 2) Burbach, K. M., Poland, A., and Bradfield, C. A. (1992) Cloning of the Ah-receptor cDNA reveals a distinctive ligand-activated transcription factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* : **89** : 8185-8189.
 - 3) Chee, M. S., Lawrence, G. L. and Barrell, B. G. (1989). Alpha-, beta- and gammaherpesviruses encode a putative phosphotransferase. *J. Gen. Virol.* **70** : 1151-1160.
 - 4) Everett, R. D., Preston, C. M., and Stow, N. D. (1991) Functional and genetic analysis of the role of Vmw110 in herpes simplex virus replication. p. 50-76. In E. K. Wagner (ed), *Herpesvirus transcription and its regulation*. CRC press, Boston.
 - 5) Everett, R. D., Freemont, P., Saitoh, H., Dasso, M., Orr, A., Kathoria, M., and Parkinson, J. (1998) The disruption of ND10 during herpes simplex virus infection correlates with the Vmw110- and proteasome-dependent loss of several PML isoforms. *J. Virol.* **72** : 6581-6591.
 - 6) Everett, R. D., Earnshaw, W. C., Findlay, J., and Lomonte, P. (1999) Specific destruction of kinetochore protein CENP-C and disruption of cell division by herpes simplex virus immediate-early protein Vmw110. *EMBO J.* **18** : 1526-1538.
 - 7) Everett, R. D., Meredith, M., Orr, A., Cross, A., Kathoria, M., and Parkinson, J. (1997) A novel ubiquitin-specific protease is dynamically associated with the PML nuclear domain and binds to a herpesvirus regulatory protein. *EMBO J.* **7** : 1519-1530.
 - 8) Hagglund, R., Van Sant, C., Lopez, P., and Roizman, B. (2002) Herpes simplex virus 1-infected cell protein 0 contains two E 3 ubiquitin ligase sites specific for different E 2 ubiquitin-conjugating enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98** : 8815-8820. **99** : 631-636.
 - 9) Hobbs II WE, DeLuca NA : Perturbation of cell cycle progression and cellular gene expression as a function of herpes simplex virus ICP 0. *J. Virol.* **73** : 8245-8255, 1999.
 - 10) Hoffman, E. C., Reyes, H., Chu, F. F., Sander, F., Conley, L. H., Brooks, B. A., and Hankinson, O. (1991) Cloning of a factor required for activity of the Ah (dioxin) receptor. *Science* **252** : 954-958.
 - 11) Hogenesch, J. B. Gu, Y-Z., Jain, S., and Bradfield, C. A. (1998) The basic-helix-loop-helix-PAS orphan MOP 3 forms transcriptionally active complexes with circadian and hypoxia factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95** : 5474-5479.
 - 12) Huang, Z. J., Edery, I., and Rosbash, M. (1993) PAS is a dimerization domain common to Drosophila period and several transcription factors. *Nature (London)* **364** : 259-262.
 - 13) Ikeda, M., and Nomura, M. (1997) cDNA cloning and tissue-specific expression of a novel basic helix-loop-helix/PAS protein (BMAL 1) and identification of alternative spliced variants with alternative translation initiation site usage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **233** : 258-264.
 - 14) Jackson, F. R., Bargiello, T. A., Yun, S. H., and Young, M. W. (1986) Product of per locus of Drosophila shares homology with proteoglycans. *Nature (London)* **320** : 185-188.
 - 15) Kato, K., Kawaguchi, Y*, Tanaka, M., Igarashi, M., Yokoyama, A., Matsuda, G., Kanamori, M., Nakajima, K., Nishimura, Y., Shimojima, M., Phung, H. T. T. Takahashi, E., and Hirai, K. (2001) Epstein-Barr virus encoded-protein kinase BGLF mediates hyper-phosphorylation of cellular elongation factor 1 δ (EF-1 δ) : EF-1 δ is universally modified by conserved protein kinases of herpesviruses. *J. Gen. Virol.* **82** : 1457-1463.
- *Corresponding author
- 16) 川口 寧. (1997) 単純ヘルペスウイルスの遺伝子発現制御因子—ウイルス制御因子の驚くべき多機能性と宿主因子との相互作用. *実験医学 (増刊, ウイルス最前線)*, **15**, 2329-2335.
 - 17) 川口 寧 (1999) 単純ヘルペスウイルス感染における転写制御因子. *実験医学 (増刊, 転写因子研究 1999)*, **17**, 405-411.
 - 18) 川口 寧 (2000) α ヘルペスウイルス遺伝子関連事項 : 遺伝子発現制御機構. *日本臨床* **58** : 779-786.
 - 19) Kawaguchi, Y., Tanaka, M., Yokoyama, A., Matsuda, G., Kato, K., Kagawa, H., Hirai, K., and Roizman, B. (2001) Herpes simplex virus type 1 α regulatory protein ICP 0 functionally interacts with a cellular transcription factor BMAL 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98** : 1877-1882.
 - 20) Kawaguchi, Y., Nakajima, K., Igarashi, M., Morita, T., Tanaka, M., Suzuki, M., Yokoyama, A., Matsuda, G., Kato, K., Kanamori, M., and Hirai, K. (2000) Interaction of Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen Leader Protein (EBNA-LP) with HS 1-associated protein X-1 : Implication of cytoplasmic function of EBNA-LP. *J. Virol.* **74** : 10104-10111.
 - 21) Kawaguchi, Y., Matsumura, T., Roizman, B., and Hirai, K. (1999) Cellular elongation factor 1 δ is modified in cells infected with representative alpha-, beta-, or gammaherpesviruses. *J. Virol.*, **73** : 4456-4460.
 - 22) Kawaguchi, Y., Van Sant, C., and Roizman, B. (1998) Eukaryotic elongation factor 1 δ is hyperphosphorylated by the protein kinase encoded by the UL13 gene of herpes simplex virus 1. *J. Virol.*, **72**, 1731-1736.
 - 23) Kawaguchi, Y., Bruni, R., and Roizman, B. (1997) Interaction of herpes simplex virus 1 α regulatory protein

- ICP 0 with elongation factor 1 δ : ICP 0 affects translational machinery. *J. Virol.* **71**, 1019-1024.
- 24) Kawaguchi, Y., Van Sant, C., and Roizman, B. (1997) Herpes simplex virus 1 α regulatory protein ICP 0 interacts with and stabilizes the cell cycle regulator cyclin D 3. *J. Virol.* **71**, 7328-7336.
 - 25) Kawaguchi, Y., Tomonaga, K., Maeda, K., Ono, M., Miyazawa, T., Kohmoto, M., Tohya, Y., and Mikami, T. (1995) The C/EBP site in the feline immunodeficiency virus (FIV) long terminal repeat (LTR) is necessary for its efficient replication and is also involved in the inhibition of FIV LTR-directed gene expression by pseudorabies virus ICP 4. *Virology* **208** : 492-499.
 - 26) Kawaguchi, Y., Maeda, K., Miyazawa, T., Ono, M., Kai, C., and Mikami, T. (1994) Nucleotide sequence and characterization of the feline herpesvirus type 1 immediate early gene. *Virology* **204** : 430-435.
 - 27) Kawaguchi, Y., Maeda, K., Miyazawa, T., Ono, M., Tsubota, K., Tomonaga, K., and Mikami, T. (1994) Inhibition of feline immunodeficiency virus gene expression and replication by alphaherpesvirus ICP 4 homologues. *J. Gen. Virol.* **75** : 2783-2787.
 - 28) Kawaguchi, Y., Norimine, J., Miyazawa, T., Kai, C., and Mikami, T. (1992) Sequences within the feline immunodeficiency virus long terminal repeat that regulate gene expression and respond to activation by feline herpesvirus type 1. *Virology* **190** : 465-468.
 - 29) Kawaguchi, Y., Miyazawa, T., Horimoto, T., Itagaki, S., Fukasawa, M., Takahashi, E., and Mikami, T. (1991) Activation of feline immunodeficiency virus long terminal repeat by feline herpesvirus type 1. *Virology* **184** : 449-454.
 - 30) Lees-Miller, S. P., Long, M. C., Kilvert, M. A., Lam, V., Rice, S. A., and Spencer, C. A. (1996) Attenuation of DNA-dependent protein kinase activity and its catalytic subunit by the herpes simplex virus type 1 transactivator ICP 0. *J. Virol.* **70** : 7471-7477.
 - 31) Lomonte, P., and Everett, R. D. (1999) Herpes Simplex Virus Type 1 Immediate-Early Protein Vmw110 Inhibits Progression of Cells through Mitosis and from G 1 into S Phase of the Cell Cycle. *J. Virol.* **73** : 9456-9467.
 - 32) Matsushita, N., Sogawa, K., Ema, M., Yoshida, A., and Fujii-Kuriyama, Y. (1993) A factor binding to the xenobiotic responsive element (XRE) of P-450 A 1 gene consists of at least two helix-loop-helix proteins, Ah receptor and Arnt. *J. Biol. Chem.* **268** : 21002-21006.
 - 33) Maul, G. G., Guldner, H. H., and Spivack, J. G. (1993) Modification of discrete nuclear domains induced by herpes simplex virus type 1 immediate early gene 1 product (ICP 0). *J. Gen. Virol.* **74** : 2679-2690.
 - 34) Merrick, W. C. (1992). Mechanism and regulation of eukaryotic protein synthesis. *Microbiological Reviews* **56**, 291-315.
 - 35) Moffat, J. F., Zerboni, L., Sommer, M. H., Heineman, T. C., Cohen, J. I., Kaneshima, H., and Arvin, A. M. (1998) The ORF47 and ORF66 putative protein kinases of varicella-zoster virus determine tropism for human T cells and skin in the SCID-hu mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95** : 11969-11974.
 - 36) Ogle, W. O., Ng, T. I., Carter, K. L., and Roizman, B. (1997) The UL13 protein kinase and the infected cell type are determinants of posttranslational modification of ICP 0. *Virology* **235** : 406-413.
 - 37) Ng, T. I., Ogle, W. O., and Roizman, B. (1998) UL13 protein kinase of herpes simplex virus 1 complexes with glycoprotein E and mediates the phosphorylation of the viral Fc receptor : glycoproteins E and I. *Virology* **241** : 37-48.
 - 38) Purves, F. C. and Roizman, B. (1992). The UL13 gene of herpes simplex virus 1 encodes the functions for posttranslational processing associated with phosphorylation of the regulatory protein α 22. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89** : 7310-7314.
 - 39) Purves, F. C., Ogle, W. O. and Roizman, B. (1993). Processing of the herpes simplex virus regulatory protein α 22 mediated by the UL13 protein kinase determines the accumulation of a subset of α and γ mRNAs and proteins in infected cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90** : 6701-6705.
 - 40) Reyes, H., Reisz-Porszasz, S., and Hankinson, O. (1992) Identification of the Ah receptor nuclear translocator protein (Arnt) as a component of the DNA binding form of the Ah receptor. *Science* **256** : 1193-1195.
 - 41) Riis, B., Rattan, S. I. S., Clark, B. F. C., and Merick, W. C. (1990) Eukaryotic protein elongation factors. *Trends Biochem. Sci.* **15** : 420-424.
 - 42) Roizman B., and Knipe D. M. (2001) Herpes simplex viruses and their replication. p. 2399-22459. In D. M. Knipe, P. Howley, D. E. Griffin, R. A. Lamb, M. A. Martin, B. Roizman, S. E. Straus (ed), *Virology*, 4 th ed. Lip-picott Williams & Wilkins Press, Philadelphia.
 - 43) Roizman, B., and Pellett, P. E. (2001) The family Herpesviridae : a brief introduction. P. 2381-2397. In D. M. Knipe, P. Howley, D. E. Griffin, R. A. Lamb, M. A. Martin, B. Roizman, S. E. Straus (ed), *Virology*, 4 th ed. Lip-picott Williams & Wilkins Press, Philadelphia.
 - 44) Sherr, C. J. (1995) D-type cyclins. *Trends Biochem. Sci.* **20** : 187-190.
 - 45) Sherr, C. J. (1996) Cancer cell cycle. *Science* **274** : 1672-1677.
 - 46) Smith, R. F. and Smith, T. F. (1989). Identification of new protein kinase-related genes in three herpesviruses, herpes simplex virus, Varicella-Zoster virus, and Epstein-Barr virus. *J. Virol.* **63** : 450-455.
 - 47) Tanaka, M., Yokoyama, A., Igarashi, M., Matsuda, G., Kato, K., Kanamori, M., Hirai, K., Kawaguchi, Y*, and Yamanashi, Y. (2002) The Conserved region CR 2 of Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen Leader Protein Is a Multifunctional Domain that mediates Self-Association As Well As Nuclear Localization and Nuclear Matrix Association. *J. Virol.* **76** : 1025-1032.
- *Corresponding author.
- 48) 藤堂具紀 (2002) 腫瘍ウイルス療法 : 遺伝子組み換え単純ヘルペスウイルスの理論と実際. *実験医学* **20** : 868-875.

- 49) Van Sant, C, Kawaguchi, Y., and Roizman, B. (1999) A single amino acid substitution in the cyclin D binding domain of the infected cell protein No. 0 abrogates the neuroinvasiveness of herpes simplex virus without affecting its ability to replicate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96** : 8184-8189.
- 50) Van Sant, C., Hagglund, R., Lopez, P., and Roizman, B. (2001) The infected cell protein 0 of herpes simplex virus 1 dynamically interacts with proteasomes, binds and activates the cdc34 E 2 ubiquitin-conjugating enzyme, and possesses *in vitro* E 3 ubiquitin ligase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98** : 8815-8820.
- 51) Wang, G. L., Jiang, B. H., Rue, E. A., and Semenza, G. L. (1995) Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92** : 5510-5514.
- 52) Whitley, R. J. (2001) Herpes simplex viruses. p2461-2509. In D. M. Knipe, P. Howley, D. E. Griffin, R. A. Lamb, M. A. Martin, B. Roizman, S. E. Straus (ed), *Virology*, 4th ed. Lippicott Williams & Wilkins Press, Philadelphia.
- 53) Wolfe, D., Goins, W. F., Fink, D. J., Glorioso, J. C. (2000) Designing and use of herpes simplex viral vectors for gene therapy. p81-108. In : Templeton N. S., Lasic D. D. (ed), *Gene Therapy* Marcel Dekker, New York.
- 54) Xiao, H., Neuveut, C., Benkirane, M. & Jeang, K. T. (1998). Interaction of the second coding exon of Tat with human EF-1 delta delineates a mechanism for HIV-1 mediated shut-off of host mRNA translation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **244**, 384-389.
- 55) Yokoyama, A., Tanaka, M., Matsuda, G., Kato, K., Kanamori, M., Kawasaki, H., Hirano, H., Kitabayashi, I., Ohki, M., Hirai, K., and Kawaguchi, Y*. (2001) Identification of major phosphorylation sites of Epstein-Barr virus nuclear antigen leader protein (EBNA-LP) : The function of EBNA-LP to induce latent membrane protein 1 co-operatively with EBNA-2 is regulated by phosphorylation. *J. Virol.* **75** : 5119-5128.
- *Corresponding author.
- 56) Yokoyama, A., Kawaguchi, Y*., Kitabayashi, I., Ohki, M., and Hirai, K. (2001) The Conserved Domain CR 2 of Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen Leader Protein is Responsible Not Only for Nuclear Matrix Association But Also for Nuclear Localization. *Virology* **279** : 401-413.
- *Corresponding author.