

2. HSV が利用する自然免疫分子

佐藤 毅史^{1,2)}, 荒瀬 尚^{1,2,3)}

1) 大阪大学微生物病研究所免疫化学分野

2) 大阪大学免疫学フロンティア研究センター免疫化学

3) 科学技術振興機構 SORST

潜伏感染や持続感染をするウイルスの中には、抑制化免疫レセプターのリガンドを発現し、免疫応答を抑制するウイルスが存在する。我々は、免疫系の細胞が単純ヘルペスウイルス1型(HSV-1)感染細胞を認識する抑制化レセプターを探索するために、様々な抑制化レセプターの Ig fusion protein を用いて、HSV-1 感染細胞と相互作用を示すレセプターのスクリーニングを行った。その結果、抑制化レセプターの一つである PILR α の Ig fusion protein(PILR α -Ig)が HSV-1 感染細胞を認識した。そこで PILR α が HSV-1 感染細胞のどの分子を認識しているかの解析を行ったところ、PILR α は HSV-1 の envelope protein の一つである glycoprotein B (gB)を認識することが明らかになった。gB は HSV-1 が細胞へ感染する過程において必須の分子であり、感染時の膜融合に関与しているが、細胞側のレセプター分子は明らかでなかった。興味深いことに PILR α の HSV-1 感染における機能解析を行った結果、HSV-1 に対し感染抵抗性である CHO-K1 細胞に PILR α を発現させると、HSV-1 に対し感染感受性となることが判明した。さらに、PILR α 発現細胞に対する感染は、抗 PILR α 抗体により阻害された。

また、PILR α 及び HSV-1 の glycoprotein D (gD) 特異的レセプターである HVEM を発現しているヒト末梢血単球は、HSV-1 に感染感受性であるが、HVEM のみを発現しているリンパ球は HSV-1 に感染抵抗性であった。さらに単球に対する HSV-1 の感染は、抗 PILR α 抗体及び抗 HVEM 抗体により阻害された。以上より、gD と HVEM 等のレセプターとの相互作用だけでは、HSV-1 の感染に十分でなく、gB が PILR α と結合することが、HSV-1 の感染に必須であることが明らかになり、PILR α は HSV-1 の エントリー-共レセプターであると考えられた。

はじめに

単純ヘルペスウイルス1型 (Herpes Simplex Virus type-1, HSV-1) は、約 80 種類の遺伝子をコードする約 150kb の 2 本鎖 DNA をゲノムとして持ち、エンベロープ

を有するウイルスである。日本人の大部分の人々は、成人までに HSV-1 に初感染し、大半は不顕性で終わるが、一部では顕性感染となり、口唇ヘルペス、角膜ヘルペス、性器ヘルペス、ヘルペス脳炎、新生児ヘルペスなど、さまざまな感染症を引き起こす。また HSV-1 は、初感染後、神経節に潜伏し、宿主の免疫力の低下などにより再発するため、生体からの排除が非常に困難なウイルスである²³⁾。

HSV-1 の細胞への感染の機構は、(i)細胞表面への吸着、(ii)ウイルス受容体との会合、(iii)細胞膜とウイルスエンベロープの膜融合の3過程からなり、それぞれの過程は、ウイルス表面に存在するエンベロープタンパク質と細胞表面に存在する分子が会合することにより引き起こされる。ウイルス表面には十数個のエンベロープタンパク質が存在

連絡先

〒565-0871 大阪府吹田市山田丘3-1
大阪大学 微生物病研究所 免疫化学分野
TEL : 06-6879-8291
FAX : 06-6879-8290
E-mail : arase@biken.osaka-u.ac.jp

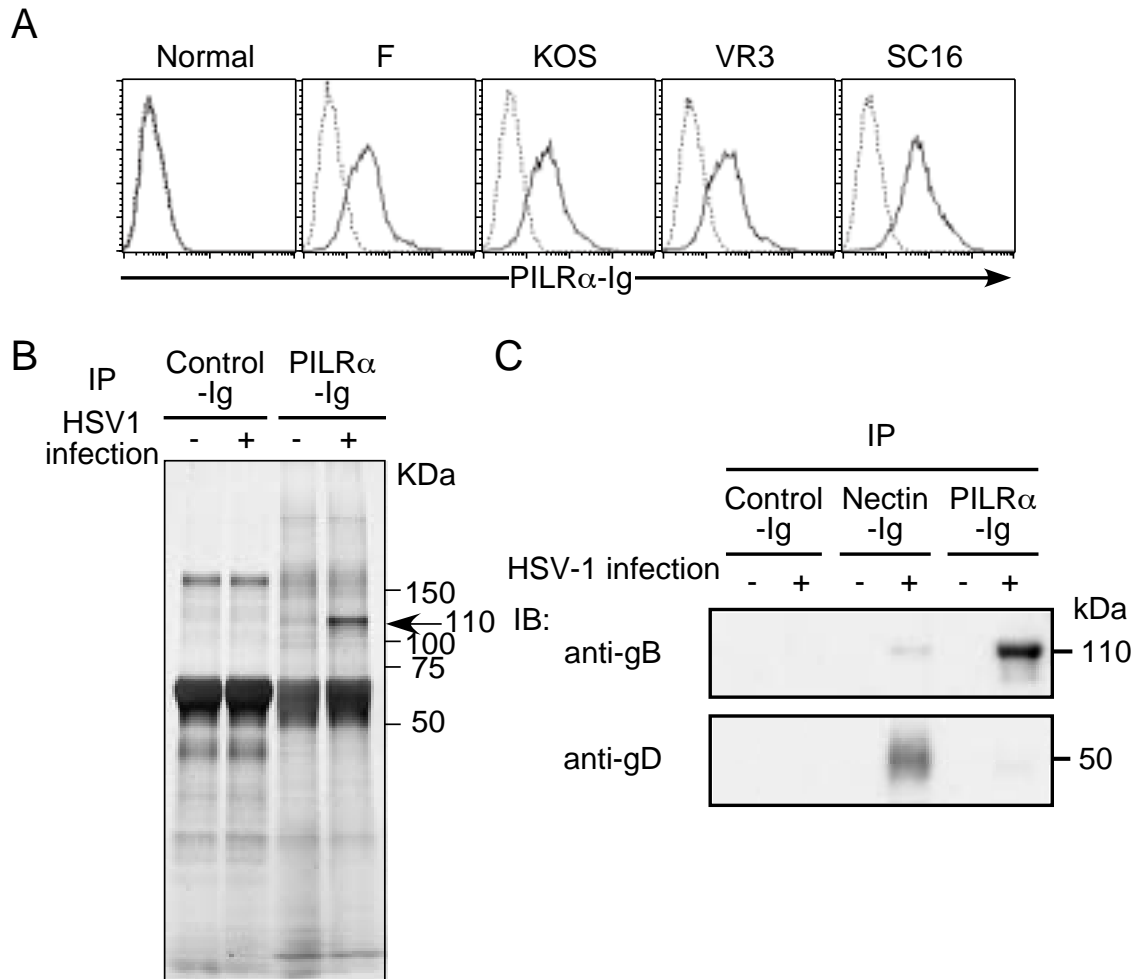


図1 HSV-1 感染細胞上に発現する PILR α リガンドは gB である

(A) HSV-1 感染細胞における PILR α リガンドの発現. 非感染 293T 細胞または HSV-1 (F, KOS, VR3, SC16 株) 感染細胞をヒト PILR α -Ig (実線) または Control Ig-fusion protein (CD200-Ig, 点線) で染色し, フローサイトメトリーで解析した.

(B) HSV-1 感染細胞からの PILR α リガンドの免疫沈降. HSV-1 感染細胞, 非感染細胞の Lysate から Control-Ig (CD200-Ig), PILR α -Ig で免疫沈降後, SDS-PAGE で分離し, 銀染色を行った.

(C) HSV-1 感染細胞上に発現する PILR α リガンドの Western blot 解析. HSV-1 感染細胞, 非感染細胞の Lysate から Control-Ig (CD200-Ig), Nectin1-Ig, PILR α -Ig により免疫沈降後, SDS-PAGE で分離し, 抗 gB 抗体または抗 gD 抗体で Western blot を行った. (文献(6)より改稿)

するが, これらのうち, gB, gD, gH, gL の 4 種類の糖タンパク質が細胞への感染に必須である²⁰⁾. gD は, (ii) ウイルス受容体への結合の過程に関わっており¹⁹⁾, TNF 受容体ファミリーの一種である Herpesvirus Entry Mediator (HVEM), イムノグロブリンスーパーファミリーの一種である Nectin-1, 3-O-sulfated heparan sulfate 等に会合する^{8, 14, 18, 22)}. また, gD には, 膜融合に関わるタンパク質に見られる特有の配列等は存在しないため, 膜融合の過程に直接関与はしていない可能性が高い. しかし, ウイルス粒子を細胞表面に強固に結合させるだけではなく, gB や gH 等のエンベロップタンパク質と相互作用し, 膜融合の過程の促進する

重要な役割を担っていると考えられる¹²⁾. また gB は, gH/gL のヘテロダイマーと共に, (iii) 細胞膜とウイルスエンベロップの膜融合において重要な役割を果たしている^{5, 6, 21)}. 一般的にエンベロップのあるウイルスには, 膜融合の過程を担う fusion protein が存在するが, そのタンパク質の N 末端側の「fusion peptide」と呼ばれる疎水性のペプチド鎖が細胞膜に直接突き刺さり, エンベロップと細胞膜を引き寄せる. gB や gH は, fusion protein と構造的に類似しているが, 他のウイルスの fusion protein でみられるような典型的な fusion peptide を持たない. 最近, これらのタンパク質に, fusion peptide に類似した配列が

存在し、それらが同様の機能を果たしている可能性が報告されたが^{9, 10)}、現在のところその配列の機能は明らかになっていない。一方、gBが細胞表面の分子と会合することにより膜融合を引き起こすという可能性が示唆され、その会合分子の候補として Heparan sulfate が挙げられた¹¹⁾。しかし、Heparan sulfate を欠損した細胞に対しても HSV-1 は依然として感染が可能であり³⁾、また、Heparan sulfate への結合部位を欠損させた gB を持つ HSV-1 も感染能を保持していた¹³⁾。また、可溶性の gB は、Heparan sulfate 欠損細胞にも結合することができ、しかも、HSV-1 の感染自体も阻害しうる事が明らかとなった⁴⁾。以上より、gB は、Heparan sulfate 以外の他の分子と会合し、細胞膜とエンベロープの膜融合、そして、HSV-1 の細胞への感染の成立に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。最近、我々は、免疫系の細胞に発現し、その細胞の免疫応答を制御するペア型レセプターの一つである PILR (Paired Immunoglobulin-Like type 2 Receptor) α が、gB と会合し、HSV-1 の感染に関与している事を明らかにした¹⁶⁾。本稿では HSV-1 の細胞への感染における PILR α の役割について概説する。

HSV-1 感染細胞における PILR α 会合分子の同定

ペア型レセプターは、細胞外領域において高い相同性を示す活性化型および抑制化型レセプターからなるレセプター群で、主に免疫系の細胞に発現し、それらの細胞の活性化を制御している。我々は、ペア型レセプターが様々な病原体に対する免疫応答と深く関わっている可能性を示してきた^{1, 2)}。特に持続感染を引き起こすようなウイルスには、宿主の免疫系からの逃避機構が認められ、この機序の一つとして抑制化ペア型レセプターを介した宿主免疫応答の制御の関与が示唆されていた。我々が明らかにしてきた PILR は抑制化型の PILR α と活性化型の PILR β からなるペア型レセプターの一つであり、宿主リガンドである CD99 を認識する^{7, 15, 17)}。興味深いことに PILR 遺伝子は、ほとんどの哺乳類において保存されており、免疫系の自己に対する応答制御および病原体に対する免疫応答において重要な役割を果たしているものと考えられる²⁴⁾。一方、HSV-1 は他の持続感染するウイルスにも見られるように、MHC 分子の発現低下やサイトカイン産生抑制などにより宿主免疫系から逃避していることは知られていたが、抑制化レセプターを介した免疫逃避機構については知られていなかった。そこで、我々は、HSV-1 感染における抑制化ペア型レセプターの一つである PILR α の関与について解析を行った。

まず我々は、HSV-1 感染細胞が PILR α リガンドを発現しているかを解析するために、PILR α の細胞外領域の Ig-fusion protein (PILR α -Ig) を作製し、HSV-1 感染細胞に結合するかどうかを調べた。293T 細胞に HSV-1 を感染後、CPE が確認された時点で細胞を回収し、PILR α -Ig による

染色を行った。すると、PILR α -Ig は HSV-1 感染細胞を特異的に認識した (図 1A)。この結果より、HSV-1 感染細胞は、HSV-1 由来の PILR α リガンドが細胞表面に発現、または、細胞由来の PILR α リガンドが HSV-1 感染により発現誘導された可能性が考えられた。そこで、HSV-1 感染細胞の発現する PILR リガンドを同定するため、PILR α -Ig を用いた免疫沈降を行うと、感染細胞特異的に約 110kDa のタンパク質が PILR α -Ig と共に免疫沈降された。そこで、この 110kDa の分子を質量分析により解析すると、HSV-1 のエンベロープタンパク質の一つである glycoprotein B (gB) であることが明らかになった (図 1B)。

PILR α は gB に特異的に会合する

次に、PILR α -Ig が gB を特異的に認識すること証明するため、Control-Ig, gD と会合するウイルス受容体 Nectin-1 の Ig-fusion protein (Nectin-Ig), PILR α -Ig により共に免疫沈降されたものを、抗 gB, gD 抗体を用いた Western blot 法により解析を行った。PILR α -Ig により免疫沈降されたものは、抗 gB 抗体で 110kDa の位置にバンドが検出されたが、抗 gD 抗体ではバンドが検出されなかった。一方、Nectin-Ig で免疫沈降されたものでは、抗 gD 抗体で 50kDa 付近にバンドが検出され、抗 gB 抗体でもわずかながらバンドが検出された。Control-Ig で免疫沈降されたものは、抗 gB, gD 抗体共にバンドは検出されなかった (図 1C)。以上より、gB は PILR α -Ig と共に特異的に免疫沈降されることが明らかとなった。

次に、細胞表面に発現する gB に対し、PILR α が特異的に会合するかを調べるため、HSV-1 の感染に必須なエンベロープタンパク質、gB, gD, gH/gL をそれぞれ 293T 細胞にトランスフェクションし、PILR α -Ig, Nectin-Ig による染色を行った。すると、PILR α -Ig は、gB トランスフェクタントに対してのみ結合が認められ、gD, gH/gL トランスフェクタントでは結合が認められなかった。一方、Nectin-Ig は、gD トランスフェクタントに対する結合は認められたが、その他のトランスフェクタントに対して結合は認められなかった (図 2A)。以上より、PILR α は、細胞表面上に存在する gB を認識することが明らかになった。

さらに我々は、gB 欠損ウイルスを作成し、このウイルスの感染細胞に対して PILR α -Ig の染色を行った。gB は、細胞への感染に必須なエンベロープタンパク質であるため、gB 欠損ウイルスは、細胞に感染できなくなる。しかし、HSV-1 感染により gB の発現が誘導されるような細胞でウイルスを産生させると、ウイルスゲノム上では gB 遺伝子が欠損しているが、エンベロープ上には gB を持つウイルスを作成することができ、このウイルスは、一度だけ細胞に感染することができる。このウイルスを 293T 細胞に感染させると、細胞表面上の gB の発現が欠失しており、PILR α -Ig の結合も認められなかった。一方、この gB 欠損

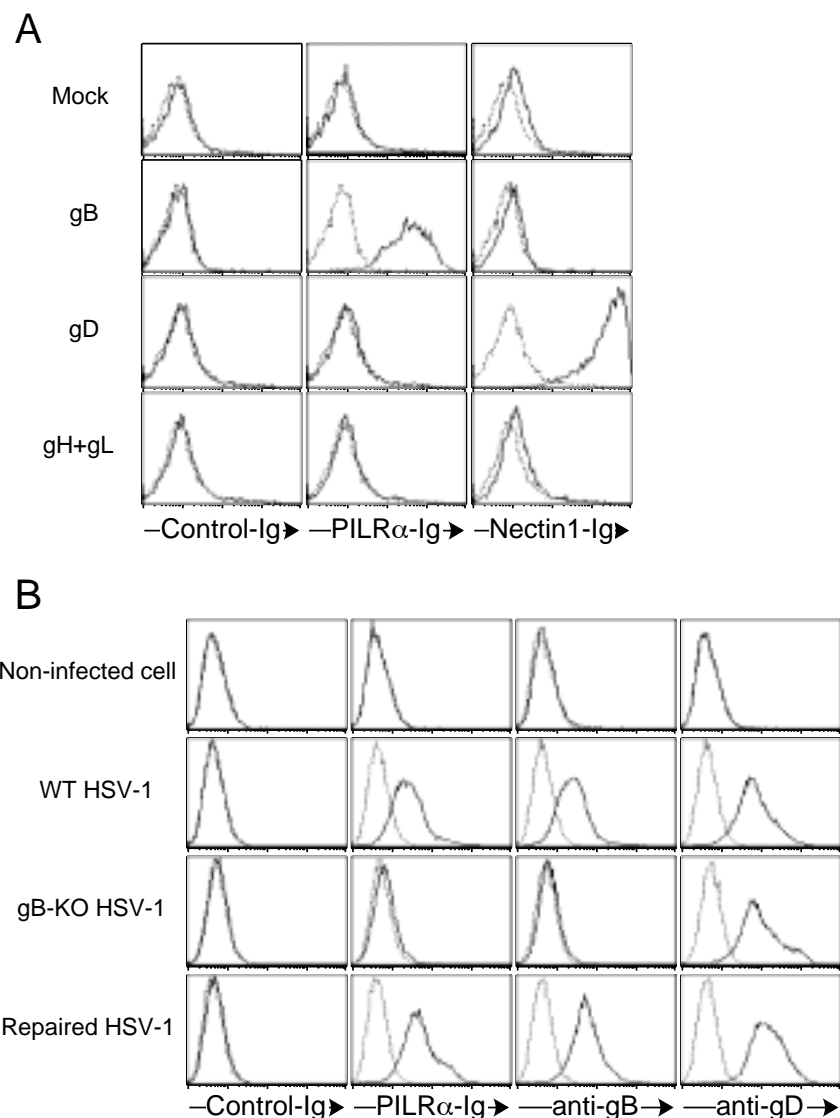


図2 PILR α は gB を特異的に認識する

(A) PILR α の gB に対する特異的な結合。細胞表面に効率的に発現するように C 末端側 40 アミノ酸を欠損させた gB, または gD, gH/gL をそれぞれ GFP と共に 293T 細胞にトランスフェクションし, Control-Ig (CD200-Ig), PILR α -Ig, Nectin1-Ig (実線) および、二次抗体のみで染色し (点線) フローサイトメトリーで解析した。GFP 陽性細胞におけるこれらの Ig-fusion protein, の染色パターンを图示した。

(B) gB 欠損 HSV-1 感染細胞は PILR α -Ig に認識されない。非感染 293T 細胞, Wild-type, gB-KO, Repaired HSV-1 感染 293T 細胞を Control-Ig (CD200-Ig), PILR α -Ig (実線) および、二次抗体のみ (点線) で染色した。(文献(6)より改編)

ウイルスに gB 遺伝子を戻した Repaired virus を感染させた細胞では、細胞表面上での gB の発現および PILR α -Ig による結合の回復が認められた (図 2B)。以上より、PILR α が gB に特異的に会合することが明らかとなった。

PILR α トランスフェクタントは HSV-1 感染感受性になる

gB は、すべてのヘルペスウイルス属において保存されて

おり、また、HSV-1 の感染に必要なエンベロープタンパク質である。gB レセプターの存在の可能性については、これまで示唆されてきたが、細胞表面のどのような分子と会合するのか現在まで明らかになっていなかった。上記のように、PILR α が gB と会合することから、PILR α は gB と会合することにより HSV-1 の感染時の膜融合に関与している可能性が考えられた。そこで、HSV-1 に感染抵抗性である CHO-K1 細胞に PILR α を遺伝子導入し、HSV-1 の感染性

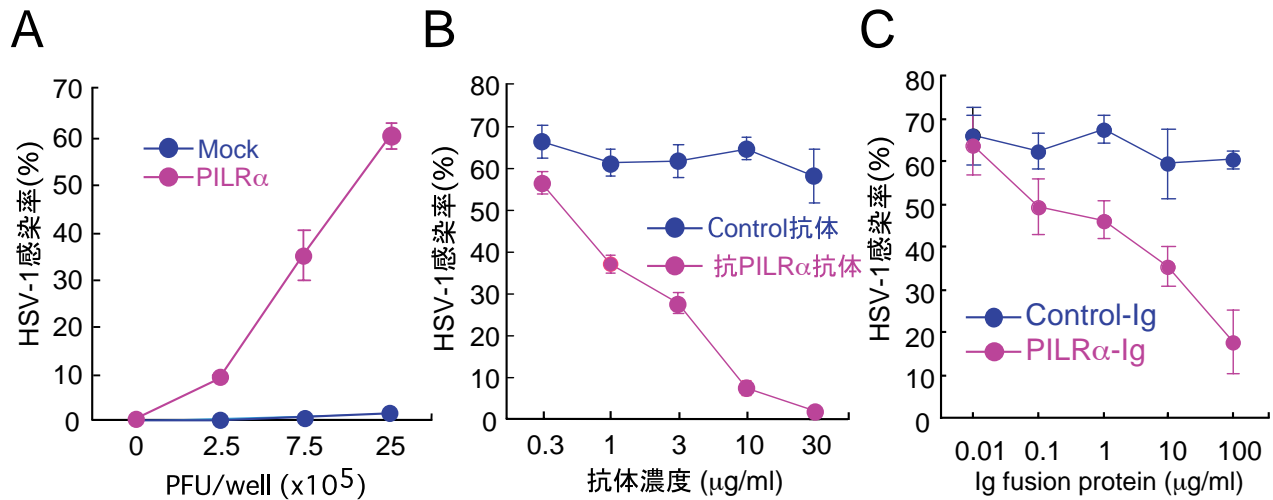


図3 CHO-K1 PILR α トランスフェクタントに対するHSV-1感染

(A) CHO-K1細胞にPILR α 遺伝子を含むpMXs-IRES-DsRedを一過性にトランスフェクションした後、GFPをコードするHSV-1 (HSV-1-GFP)を感染させた。DsRed陽性細胞 (PILR α 陽性)中のGFP陽性細胞 (HSV-1感染細胞)の割合をフローサイトメトリーで解析した。

(B) 抗PILR α 抗体によるHSV-1感染阻害。PILR α を一過性に発現させたCHO-K1細胞に、抗PILR α 抗体、コントロール抗体存在下でHSV-1-GFPを感染させ、HSV-1感染細胞の割合を測定した。

(C) PILR α -IgによるHSV-1感染阻害。PILR α を一過性に発現させたCHO-K1細胞に、PILR α -Ig、Control-Ig存在下でHSV-1-GFPを感染させ、HSV-1感染細胞の割合を測定した。(文献(6)より改編)

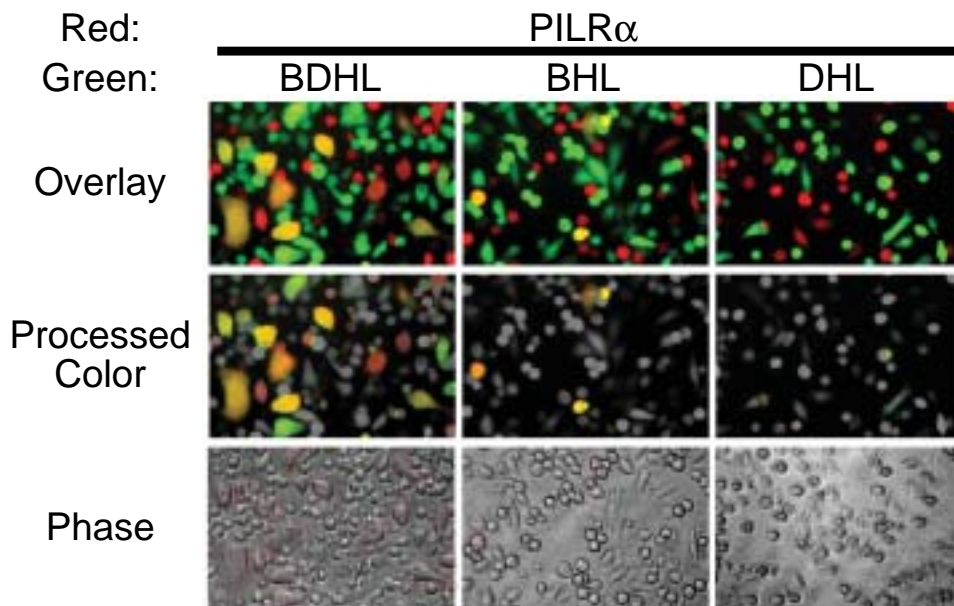


図4 gB-PILR α の相互作用を介したCell fusion

HSV-1のエンベロプタンパク質を発現させた細胞とPILR α を発現させた細胞を共培養し、Cell fusion assayを行った。gB, gD, gH, gL (BDHL), gB, gH, gL (BHL), gD, gH, gL (DHL)をGFPと共にトランスフェクションしたCHO-K1細胞と、PILR α をRFPと共にトランスフェクションしたCHO-K1細胞から、GFPまたはRFP陽性細胞をCell sorterで分離し、共培養した。8時間後、蛍光顕微鏡により観察した。細胞融合を起こした細胞は、Overlayで黄色細胞として検出された(上段)。また、緑、赤の非融合細胞を灰色に、融合細胞(黄色細胞)のみ着色された図になるように色彩変換した(中段, Processed Color)。また、可視光による写真を下段に表示した(Phase)。(文献(6)より改編)

を解析した。その結果, Mock トランスフェクタントでは, HSV-1 の感染が認められないのに対し, PILR α トランスフェクタントは HSV-1 に感染することが明らかになった (図 3A)。この結果より, PILR α の発現が HSV-1 の感染性に参与している可能性が示唆された。また, HSV-1 感染時に PILR α と gB の結合を阻害する抗 PILR α モノクローナル抗体や, PILR α -Ig を添加すると, PILR α 発現細胞に対する HSV-1 の感染が阻害された (図 3B,C)。以上より, PILR α 発現細胞に対する HSV-1 の感染には PILR α と gB の会合が重要であることが明らかになった。

PILR α -gB の会合は膜融合に関与している

gB は, gH, gL と共に細胞膜とウイルスエンベロープの膜癒合を引き起こす機構を担っている。そこで, PILR α と gB との会合が, 膜融合に関与しているかどうか明らかにするため, Cell-fusion assay を行った。CHO-K1 細胞に HSV-1 の gB, gD, gH, gL を GFP と共に発現させた細胞と, PILR α と RFP を共に発現させた細胞を共培養すると, これらの細胞同士の膜融合の様子を顕微鏡により観察した。すると, かなりの数の細胞において, GFP と RFP が共に発現している融合細胞が認められた (図 4)。一方, gB, gD, gH, gL を発現する細胞と, PILR α を発現していない Mock 細胞では細胞の融合は認められなかった¹⁶⁾。この結果より, PILR α と gB の会合は HSV-1 感染の際の細胞膜とウイルスのエンベロープとの膜融合に関わっていることが判明した。

Monocyte への感染においても gB と PILR α の会合が必須である

次に, PILR α を発現している primary 細胞においても PILR α が, HSV-1 感染に関与しているかどうかを明らかにするため, 末梢血単核球細胞 (PBMC) を用い HSV-1 感染実験を行った。PBMC では, PILR α の発現は, CD14 陽性細胞の単球に認められるが, CD14 陰性のリンパ球には認められない。一方, gD の受容体である HVEM は, CD14 陽性細胞, 陰性細胞ともに同程度に発現していた (図 5A)。そこで, PBMC を CD14 陽性, 陰性細胞に分離し, それぞれの細胞に HSV-1 を感染させると, HVEM のみを発現している CD14 陰性細胞では HSV-1 の感染が認められないのに対し, PILR α および HVEM を発現する CD14 陽性細胞では, HSV-1 の感染が認められた (図 5B)。さらに, 感染時に抗 PILR α 抗体, もしくは, 抗 HVEM 抗体を加えると, HSV-1 感染が顕著に阻害された (図 5C)。以上より, primary 細胞の HSV-1 の感染においても PILR α が重要な役割を担っていることが明らかになった。特に抗 PILR α 抗体, 抗 HVEM 抗体のどちらによっても感染が阻害されたことから, HSV-1 の感染には gB および gD それぞれが細胞表面の受容体に結合することが必須であることが明らか

になった (図 5D)。

おわりに

以上のように, 今までは, HSV-1 の感染には gD のレセプターのみが重要な機能を担っていると考えられてきたが, 我々の研究により, gD のレセプターのみでは十分でなく, gB が細胞表面上の特異的なレセプターと会合することが HSV-1 の感染に重要であることが初めて明らかになった。現在, HSV-1 感染症の治療にはアシクロビルが多用されているが, アシクロビルは感染細胞に殺傷的に作用するため, 感染そのものを阻害することはできない。特に神経組織等の再生能が無い組織での感染では, 感染の広がりを迅速に阻害することが予後を良くする上で重要と思われる。PILR α と gB の相互作用を阻害することにより HSV-1 の感染そのものを阻害することができるため, PILR α と gB の相互作用を阻害するような薬剤は, アシクロビルとは異なる作用機序を持つ抗ウイルス薬として有効であると考えられる。

文 献

- 1) Arase H, Mocarski ES, Campbell AE, Hill AB, Lanier LL. Direct recognition of cytomegalovirus by activating and inhibitory NK cell receptors. *Science*. 296: 1323-1326, 2002.
- 2) Arase H, Lanier LL. Specific recognition of virus-infected cells by paired NK receptors. *Rev Med Virol*. 14: 83-93, 2004.
- 3) Banfield BW, Leduc Y, Esford L, Schubert K, Tufaro F. Sequential isolation of proteoglycan synthesis mutants by using herpes simplex virus as a selective agent: evidence for a proteoglycan-independent virus entry pathway. *J Virol*. 69: 3290-3298, 1995.
- 4) Bender FC, Whitbeck JC, Lou H, Cohen GH, Eisenberg RJ. Herpes simplex virus glycoprotein B binds to cell surfaces independently of heparan sulfate and blocks virus entry. *J Virol*. 79: 11588-11597, 2005.
- 5) Cai WH, Gu B, Person S. Role of glycoprotein B of herpes simplex virus type 1 in viral entry and cell fusion. *J Virol*. 62: 2596-2604, 1988.
- 6) Forrester A, Farrell H, Wilkinson G, Kaye J, Davis-Poynter N, Minson T. Construction and properties of a mutant of herpes simplex virus type 1 with glycoprotein H coding sequences deleted. *J Virol*. 66: 341-348, 1992.
- 7) Fournier N, Chalus L, Durand I, Garcia E, Pin JJ, Churakova T, Patel S, Zlot C, Gorman D, Zurawski S, Abrams J, Bates EE, Garrone P. FDF03, a novel inhibitory receptor of the immunoglobulin superfamily, is expressed by human dendritic and myeloid cells. *J Immunol*. 165: 1197-1209, 2000.
- 8) Geraghty RJ, Krummenacher C, Cohen GH, Eisenberg RJ, Spear PG. Entry of alphaherpesviruses mediated by poliovirus receptor-related protein 1 and poliovirus receptor. *Science*. 280: 1618-1620, 1998.
- 9) Gianni T, Martelli PL, Casadio R, Campadelli-Fiume G. The ectodomain of herpes simplex virus glycopro-

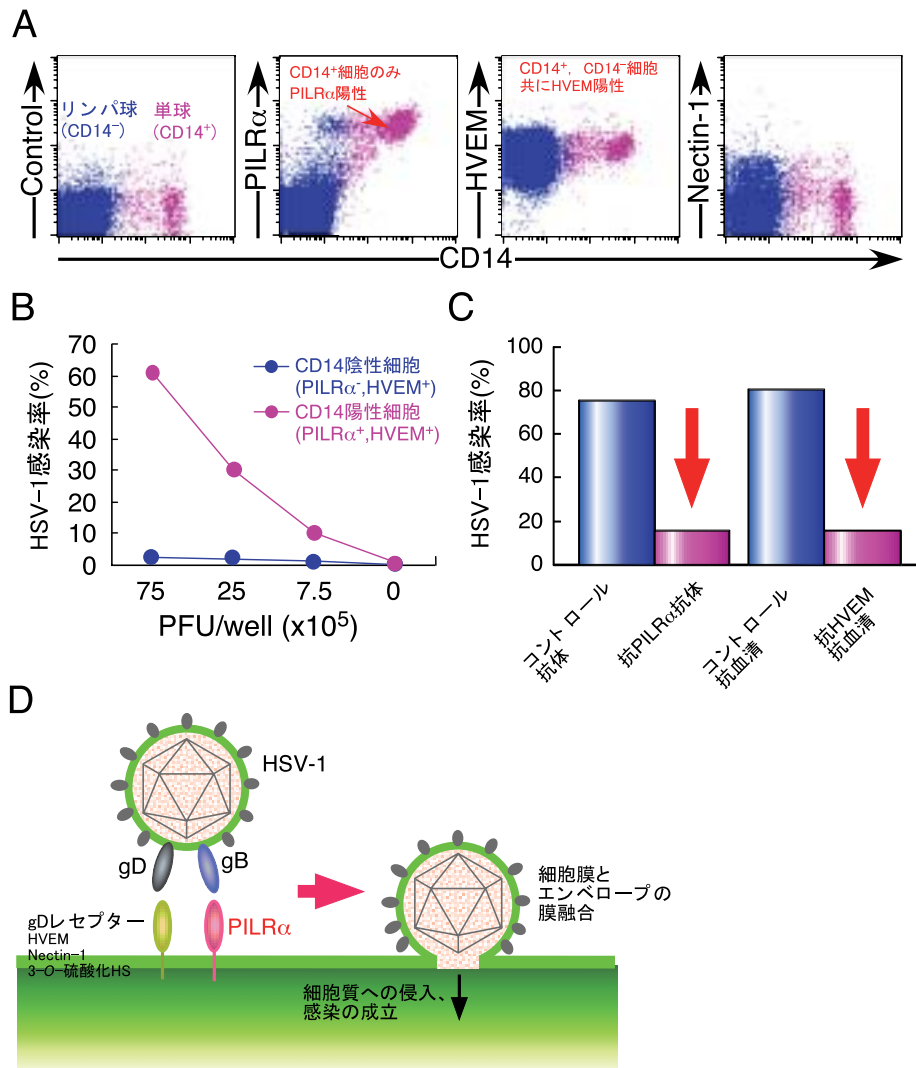


図5 Primary細胞に対するPILRαを介したHSV-1感染

(A) ヒトPBMCにおけるPILRα, HVEM, Nectin-1の発現. PBMCを抗CD14抗体(横軸)と共に, 抗PILRα抗体, 抗HVEM抗体または抗Nectin-1抗体(縦軸)と2重染色し, フローサイトメトリーで解析した.

(B) CD14陽性細胞へのHSV-1の感染. PBMCをCD14陰性とCD14陽性細胞に分離し, HSV-1-GFPを感染させた. GFP陽性細胞(HSV-1感染細胞)の割合をフローサイトメトリーで解析した.

(C) 抗PILRα抗体, 抗HVEM抗血清によるHSV-1感染阻害. 抗PILRα抗体(10mg/ml), 抗HVEM抗血清(100倍希釈)存在下で, CD14陽性細胞にHSV-1-GFPを感染させ, 感染細胞の割合を測定した. (以上文献(6)より改編)

(D) gB-PILRαの相互作用によるHSV-1感染. これまで, gDとウイルス受容体(HVEM, Nectin-1, 3-O-sulfated Heparan sulfate)の会合のみが細胞への感染に必須であると考えられてきたが, 本研究により, gB, gDがそれぞれの受容体と会合することがHSV-1感染の成立に重要であることが明らかになった.

tein H contains a membrane alpha-helix with attributes of an internal fusion peptide, positionally conserved in the herpesviridae family. *J Virol.* 79: 2931-2940, 2005.

- 10) Heldwein EE, Lou H, Bender FC, Cohen GH, Eisenberg RJ, Harrison SC. Crystal structure of glycoprotein B from herpes simplex virus 1. *Science.* 313: 217-220, 2006.
- 11) Herold BC, Visalli RJ, Susmarski N, Brandt CR, Spear

PG. Glycoprotein C-independent binding of herpes simplex virus to cells requires cell surface heparan sulphate and glycoprotein B. *J Gen Virol.* 75 (Pt 6): 1211-1222, 1994.

- 12) Krummenacher C, Supekar VM, Whitbeck JC, Lazear E, Connolly SA, Eisenberg RJ, Cohen GH, Wiley DC, Carfi A. Structure of unliganded HSV gD reveals a mechanism for receptor-mediated activation of virus entry. *Embo J.* 24: 4144-4153, 2005.

- 13) Laquerre S, Argnani R, Anderson DB, Zucchini S, Manservigi R, Glorioso JC. Heparan sulfate proteoglycan binding by herpes simplex virus type 1 glycoproteins B and C, which differ in their contributions to virus attachment, penetration, and cell-to-cell spread. *J Virol.* 72: 6119-6130, 1998.
- 14) Montgomery RI, Warner MS, Lum BJ, Spear PG. Herpes simplex virus-1 entry into cells mediated by a novel member of the TNF/NGF receptor family. *Cell.* 87: 427-436, 1996.
- 15) Mousseau DD, Banville D, L'Abbe D, Bouchard P, Shen SH. PILR α , a novel immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif-bearing protein, recruits SHP-1 upon tyrosine phosphorylation and is paired with the truncated counterpart PILRbeta. *J Biol Chem.* 275: 4467-4474, 2000.
- 16) Satoh T, Aii J, Suenaga T, Wang J, Kogure A, Uehori J, Arase N, Shiratori I, Tanaka S, Kawaguchi Y, Spear PG, Lanier LL, Arase H. PILR α is a herpes simplex virus-1 entry coreceptor that associates with glycoprotein B. *Cell.* 132: 935-944, 2008.
- 17) Shiratori I, Ogasawara K, Saito T, Lanier LL, Arase H. Activation of natural killer cells and dendritic cells upon recognition of a novel CD99-like ligand by paired immunoglobulin-like type 2 receptor. *J Exp Med.* 199: 525-533, 2004.
- 18) Shukla D, Liu J, Blaiklock P, Shworak NW, Bai X, Esko JD, Cohen GH, Eisenberg RJ, Rosenberg RD, Spear PG. A novel role for 3-O-sulfated heparan sulfate in herpes simplex virus 1 entry. *Cell.* 99: 13-22, 1999.
- 19) Spear PG, Eisenberg RJ, Cohen GH. Three classes of cell surface receptors for alphaherpesvirus entry. *Virology.* 275: 1-8, 2000.
- 20) Spear PG. Herpes simplex virus: receptors and ligands for cell entry. *Cell Microbiol.* 6: 401-410, 2004.
- 21) Turner A, Bruun B, Minson T, Browne H. Glycoproteins gB, gD, and gHgL of herpes simplex virus type 1 are necessary and sufficient to mediate membrane fusion in a Cos cell transfection system. *J Virol.* 72: 873-875, 1998.
- 22) Warner MS, Geraghty RJ, Martinez WM, Montgomery RI, Whitbeck JC, Xu R, Eisenberg RJ, Cohen GH, Spear PG. A cell surface protein with herpesvirus entry activity (HveB) confers susceptibility to infection by mutants of herpes simplex virus type 1, herpes simplex virus type 2, and pseudorabies virus. *Virology.* 246: 179-189, 1998.
- 23) Whitley RJ, Roizman B. Herpes simplex virus infections. *Lancet.* 357: 1513-1518, 2001.
- 24) Wilson MD, Cheung J, Martindale DW, Scherer SW, Koop BF. Comparative analysis of the paired immunoglobulin-like receptor (PILR) locus in six mammalian genomes: duplication, conversion, and the birth of new genes. *Physiol Genomics.* 27: 201-218, 2006.

HSV-1 infection through inhibitory receptor, PILR α

Takeshi SATOH, Ph.D^{1,2}, and Hisashi ARASE, M.D., Ph.D.^{1,2,3}

1 Department of Immunochemistry, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University

2 WPI Immunology Frontier Research Center, Osaka University

3 SORST, Japan Science and Technology Agency

3-1 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

E-mail: arase@biken.osaka-u.ac.jp

Paired receptors that consist of highly related activating and inhibitory receptors are widely involved in the regulation of immune response. Several viruses that persistently infect hosts possess genes that encode ligands for inhibitory receptors in order to escape from host immune system. Herpes simplex virus type 1 (HSV-1) is one of the viruses that cause persistent infection. Here, we found that HSV-1-infected cells express a ligand for paired immunoglobulin like-type 2 receptor (PILR) α , one of paired inhibitory receptors mainly expressed on myeloid cells such as monocytes, macrophages and dendritic cells. Furthermore, we have identified that glycoprotein B (gB), an envelope protein of HSV-1, is a ligand for PILR α by mass spectrometry analysis. Because gB is essential for HSV-1 to infect cells, we analyzed function of PILR α in HSV-1 infection. When PILR α was transfected into CHO-K1 cells, which is resistant to HSV-1 infection, the PILR α -transfected CHO-K1 cells became permissive to HSV-1 infection. We further addressed whether PILR α is involved in the HSV-1 infection of primary human cells. CD14-positive monocytes that express both PILR α and HVEM, a glycoprotein D receptor, were susceptible to HSV-1 infection. In contrast, HSV-1 did not infect CD14-negative lymphocytes that express HVEM but not PILR α . Furthermore, HSV-1 infection of monocyte was blocked by both anti-PILR α mAb and anti-HVEM antiserum. These findings indicated that both gB and gD receptors play an important role in HSV-1 infection. We have shown, for the first time, that viruses use an inhibitory immune receptor to enter a cell. Invasion into hematopoietic cells by using inhibitory receptors should be beneficial to the virus because binding to inhibitory receptors may not only provide entry, but also trigger the inhibitory receptor to suppress the immune functions of the infected cell.

