

論文の内容の要旨

論文題目 単純ヘルペスウイルス 1 型(HSV-1)感染細胞における
膜タンパク質輸送制御機構の解明と病態への関与

氏名 今井 孝彦

単純ヘルペスウイルス (HSV: herpes simplex virus) は、ヒトに口唇ヘルペス、性器ヘルペス、角膜炎、脳炎、新生児ヘルペスなど多様な疾患を引き起こす。HSV には 2 種類の型があり、口、手指等の上半身に感染するのは主に 1 型(HSV-1)、性器等の下半身に感染するのは主に 2 型(HSV-2)であるが、この棲み分けは厳密なものではなく、性器ヘルペスの病変からも、HSV-1 が多数分離される。脳炎は特に恐ろしく、無治療での致死率は 70~90%と非常に高い。ノーベル賞の受賞対象となった抗ヘルペスウイルス剤、アシクロビルの投与で致死率は 10%程度に低下するが、生存した患者の 2/3 には中および重度の後遺症が残る。また、性病としての HSV の重要性は高く、米国では年間約 50 万人が性器ヘルペスの初感染に罹り、約 1000 万人が再発性の性器ヘルペスで苦しむ。HSV 感染症の問題は、(i) 年間 5~6 回繰り返し再発し、それが十数年続く、すなわち根治が困難であるため、患者にとって精神的苦痛が大きい、(ii) 感染しても発症せず、無症状でウイルスを排出してしまう場合が多く、本人も疾患に気づかないまま次の相手に移してしまう、すなわち予防が困難である、の 2 点に集約される。米国における HSV 感染症の医療費は、年間約 30 億ドルとも試算されるほど、HSV 研究の重要性は明らかである。

本研究では、HSV-1 がコードしている遺伝子の中の一つである、プロテインキナーゼ Us3 に着目した。Us3 のキナーゼ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、Us3 欠損ウイルスおよびキナーゼ活性消失ウイルス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。また、Us3 は感染細胞のアポトーシスを阻害し、カプシドの核膜通過を促進するといった多彩な機能を有している。このように、Us3 は HSV-1 感染におい

て、効率的なウイルス増殖および病原性発現に様々な側面から寄与していることが明らかになりつつある。しかし数ある Us3 の機能のうち、ウイルス増殖や病原性に関与するものについては不明な点が多い。本研究では、Us3 が引き起こす多彩な感染現象のうち、膜タンパク質輸送制御という機能に着目し、この膜タンパク質輸送制御が、HSV-1 の病態や宿主免疫回避に及ぼす影響を検証した。

第一章 単純ヘルペスウイルスエンベロープ糖タンパク質 gB のリン酸化による細胞表面量制御機構の解明と病態への関与

筆者の研究室の先行研究により、単純ヘルペスウイルスエンベロープ糖タンパク質 gB (gB: glycoprotein B) は、HSV-1 プロテインキナーゼ Us3 によってリン酸化を受け、その細胞表面量が抑制されることが報告されている(A. Kato and J. Arii et al., 2009. J.Virol.)。この結果はウイルスプロテインキナーゼがリン酸化反応を介して、宿主細胞のメンブレントラフィックを制御するという、ウイルスプロテインキナーゼの全く新しい機能を示唆している。

本研究では、この gB リン酸化の生物学的意義と細胞表面量の制御機構の解明という二点に着目した。gB のリン酸化の生物学的意義の解明の項では、まずこのリン酸化の病態における意義を検証した。gB のリン酸化部位をアラニンに置換したウイルス(gB-T887A)をマウスに角膜に感染させ、角膜におけるウイルス増殖とヘルペス性角膜炎および眼周囲の皮膚炎の症状を調べたところ、このウイルスの病原性は復帰株と比して著しく低下していた。さらに、筆者らは gB-Thr887 のリン酸化を特異的に認識するモノクローナル抗体を作製し、感染細胞における Us3 による gB-Thr887 リン酸化の意義を検証した。リン酸化抗体を用いた蛍光抗体法により、gB リン酸化は感染細胞内においてその局在を制御していることが示唆され、特にリン酸化によって細胞膜への発現が阻害されていることが示唆された。

gB の細胞表面量の制御機構の解明の項では、gB リン酸化部位(gB-T887)とごく近傍に存在す

る二つのエンドサイトーシスマチーフ(gB-LL871 と gB-Y889)との関係性を検証した。これら三つの配列にあらゆる組み合わせで変異を導入したウイルスを作製し、gB 細胞表面量、gB 細胞内輸送、細胞内におけるウイルス増殖、またマウスにおける神経病原性を調べた。感染細胞において gB のエンドサイトーシス量の制御は、これら三つの配列によって協調的かつ厳密に行われていることが示唆され、この制御は gB の細胞表面量の制御にも寄与していることが示唆された。またこれら三つの配列のうち、Tyr-889 が最も gB の細胞内輸送、細胞表面量制御、また培養細胞におけるウイルス増殖に寄与しており、マウスにおける神経病原性にも重要であることが示唆された。

以上の結果は、HSV-1 がコードするプロテインキナーゼ Us3 による gB-Thr887 のスレオニンのリン酸化が、マウス角膜におけるウイルス増殖および病原性発現に寄与していることを示している。また、Us3 は gB-Thr887 をリン酸化し、エンドサイトーシスを促進することによって gB の細胞表面量を抑制していることが明らかとなった。さらに、HSV-1 は gB-Thr887 のリン酸化と二つのエンドサイトーシスマチーフという異なる三つの機構で gB の輸送を制御し細胞表面量を調節していることが示唆され、gB 輸送の厳密な制御が HSV-1 の病態に深く関係していることが示唆された。これらの結果は、ウイルスプロテインキナーゼが膜タンパク質の細胞表面量を制御することにより、ウイルスの病原性を制御するという全く新しい概念を提唱するものである。

第二章 Us3 による宿主免疫回避機構の解明

第一章で述べた通り、ウイルスプロテインキナーゼ Us3 が HSV-1 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(gB-Thr887)をリン酸化し、その細胞表面における発現量を抑制することが示された。本研究では、他の膜タンパク質も Us3 によるリン酸

化を受け、その細胞表面量が制御されるのではないかという仮説を立て、ウイルス感染時に細胞表面量が抑制されることが知られている MHC class I に着目した。

得られた結果は以下の通りである。(i) 野生型ウイルス感染細胞と比して YK511(Us3-K220M)感染細胞において、MHC class I の細胞表面量抑制が減弱した。(ii) Us3 による MHC class I の細胞表面量抑制により、*in vitro* において細胞傷害性 T 細胞(CTL)の活性化が抑制され、*in vivo* において CTL の誘導が阻害された。(iii) 復帰株と比べ、YK511(Us3-K220M)はマウスに感染 4 日後にウイルス増殖が著しく低下していたが、CD8 depletion によりこの増殖の低下が一部回復した。これらの結果は、HSV-1 が Us3 によって MHC class I の細胞表面量を抑制し、CTL から回避することによって、効率的なウイルス増殖を行っていることを示唆している。

YK511(Us3-K220M)はその病原性が著しく低下していることが示されており、上記の結果と合わせ、これらの性状は HSV-1 ワクチンを考える上で理想的であると考えられる。実際、マウスに YK511(Us3-K220M)を免疫し、そのワクチン効果を調べたところ以下の結果を得た。(i) 免疫したマウスの膺および角膜に野生型ウイルスを接種したところ、両接種経路において病態および致死率の著しい減弱が認められた。(ii) また、YK511(Us3-K220M)および復帰株をマウス角膜に接種し、30 日後の三叉神経節におけるウイルス DNA 量を調べたところ、YK511(Us3-K220M)は復帰株と比して著しく潜伏能が低下しており、ワクチンとしての利用を考えた際、YK511(Us3-K220M)は安全である可能性が示唆された。

以上の結果は、ウイルスの宿主免疫回避機構を解明し、その機能を解除したウイルスは高い免疫誘導能を有していることを示しており、このようなウイルスが新しいワクチン開発のプラットフォームとして利用できることを示唆している。