

氏名 (生年月日) やまぐち たつお
山口 達生 (1995年1月14日)

学位の種類 博士 (薬学)

学位記番号 博薬 第229号

学位授与の日付 2023年3月18日

学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当

学位論文題目 カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス ORF21 のシグナル伝達を介した感染性
ウイルス産生機構の解析

論文審査委員 (主査) 教授 藤室 雅弘

(副査) 教授 中山 祐治

(副査) 教授 高田 和幸

論文内容の要旨

序章

カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus; KSHV) は、 γ -ヘルペスウイルス亜科に分類される二本鎖DNAウイルスであり、8番目に発見されたヒトヘルペスウイルスのためヒトヘルペスウイルス8型 (HHV-8) とも呼ばれる。感染者の免疫不全時に KSHV はカポジ肉腫や原発性体腔リンパ腫などの腫瘍を引き起こす。また、 α -ヘルペスウイルス亜科 (HSV-1/2, 水痘帯状疱疹ウイルス) や β -ヘルペスウイルス亜科 (HHV-6/7, CMV) を標的としたアシクロビルやガンシクロビルなどの有効な抗ウイルス薬は既に臨床使用されているが、 γ -ヘルペスウイルス亜科、すなわち EBV と KSHV に対する有効な抗ウイルス薬は未だ開発されていない。KSHV がコードする ORF21 はウイルス粒子内に存在するテグメントタンパク質であり、リン酸化酵素である。また、アミノ酸配列の相同性により KSHV の ORF21 は HSV-1/2 がコードするウイルス性チミジンキナーゼ (vTK) のオーソログであることが知られている。HSV の vTK はアシクロビルのモノリン酸化 (活性化) やウイルスゲノムの複製に必須であるが、 γ -ヘルペスウイルス亜科の vTK (KSHV の ORF21 と EBV の BXLF1) はチミジンやアシクロビルに対するリン酸化能が弱く、ウイルスのゲノム複製への関与が極めて低いことが報告されている。つまり、KSHV の ORF21 のウイルス学的機能については不明な点が多い。そこで、BAC (bacterial artificial chromosome) 改変法と呼ばれるウイルスゲノムを一塩基単位で改変可能な遺伝子改変手法を用いて ORF21 変異 KSHV とその保持細胞 (感染細胞) を作製し、それらのウイルス複製や子孫ウイルスの感染性、および宿主細胞に与える影響を解析した。

第1章 ORF21 はウイルス複製には関与しないが、子孫ウイルスの感染に寄与する

KSHV がコードする ORF21 のウイルス学的な機能解析のため、任意の箇所での遺伝子改変が可能な KSHV-BAC16 ゲノムに相同組換えを用いて ORF21 遺伝子領域に変異を導入した遺伝子組換え KSHV-BAC16 を2種類作製した。一つは、ORF21 のキナーゼ機能が欠損した Kinase Dead -BAC16 (21KD-BAC16)、もう一つは、ORF21 の開始コドン直下に終止コドン挿入した ORF21 Deletion-BAC16 (21del-BAC16) を作製した。野生型 BAC16 (WT-BAC16)、21KD-BAC16、21del-BAC16 のそれぞれを

iVero (および iSLK) 細胞にトランスフェクションし、BAC16 定常保持細胞をクローン化して、iVero-WT、iVero-21KD、iVero-21del 細胞 (iSLK-WT、iSLK-21KD、iSLK-21del 細胞) と名付けた。iVero および iSLK 細胞は、培地へのドキシサイクリン (Dox) 添加により溶解感染誘導転写因子 ORF50/K-Rta が発現し、BAC16 保持細胞が溶解感染 (ウイルス複製サイクル) 状態へ移行する細胞株である。ORF21 の発現時期について、iSLK-WT 細胞に Dox 処理を行い溶解感染誘導後の ORF21 の発現を ORF21 ポリクローナル抗体によるウエスタンブロット法で解析した。その結果、ORF21 は溶解感染誘導後 30~36 時間に発現した。次に ORF21 変異がウイルスゲノム複製、ウイルスゲノム発現、ウイルス産生へ及ぼす影響を解析するため、溶解感染誘導した各 BAC 保持細胞を qPCR 法および RT-qPCR 法にて評価した。iVero-WT、iVero-21KD、iVero-21del 細胞の三者間でウイルス複製、ウイルスゲノム発現、およびウイルス産生に対する影響は検出されなかった。次に ORF21 変異による子孫ウイルスの新規感染への影響を解析するため、溶解感染誘導した iVero-WT、iVero-21KD、iVero-21del 細胞の培地へ放出された子孫ウイルスの 293T 細胞、Vero 細胞への感染性を解析した。その結果、iVero-21del 細胞から産生された子孫ウイルスの感染性は WT と 21KD の感染性の 15% にまで低下した。同様の結果が、BAC 保持 iSLK 細胞でも得られ、さらに iSLK-21del 細胞から産生されたウイルスの感染性低下は、iSLK-21del 細胞への野生型 ORF21 の一過性発現により回復した。以上より ORF21 のキナーゼ機能以外の ORF21 分子依存的機能が子孫ウイルスの新規感染に必要であることが示唆された。

第 2 章 ORF21 分子は宿主細胞内の MEK シグナルを活性化する

次に、ORF21 の宿主細胞に対する生物学的影響について解析した。先行研究において、ORF21 プラスミドの一過的に発現させた場合、外来性 ORF21 は細胞質に局在し、また細胞を縮小させることが報告されている。そこで、溶解感染誘導をかけた iSLK-WT を用い、内在的に発現した ORF21 の局在と細胞の形状変化を解析した。先行研究と一致して、ORF21 は細胞質に局在し、溶解感染誘導した iSLK-WT 細胞は誘導前に比べ細胞縮小が観察された。また、溶解感染誘導した iSLK-21KD と iSLK-WT 細胞を比較すると、iSLK-21KD では細胞面積の増大が観察された。KSHV は新規感染時に宿主となる標的細胞の幾つかのシグナル伝達を活性化 (または不活性化) することが報告されている。そこで、野生型 ORF21 プラスミド (p21WT) またはキナーゼ機能欠損 ORF21 プラスミド (p21KD) を HeLa 細胞に一過性発現させ、細胞内のシグナル伝達におよぼす影響を解析した。その結果、p21WT と p21KD 発現細胞では MEK のリン酸化が亢進した。また p21WT と p21KD 発現細胞では足場非依存的な細胞増殖が非発現細胞に比べ約 3-4 倍亢進した。これらの結果よりキナーゼ機能以外の ORF21 分子依存的機能により、MEK シグナルが活性化し細胞増殖が亢進することが示唆された。また、溶解感染誘導した iSLK-21KD と iSLK-WT 細胞におけるリン酸化 MEK を比較したが、溶解感染移行細胞ではリン酸化 MEK だけでなく EGF レセプターの顕著な減少が見られた。最後に、ORF21 が誘導する MEK シグナル活性化とウイルス産生の関係を明らかにするため、MEK 阻害剤 (U0126) 処理した溶解感染誘導細胞における子孫ウイルス産生量と、MEK 阻害剤処理した標的細胞への子孫ウイルス感染効率を解析した。その結果、MEK 阻害剤 U0126 は、溶解感染誘導細胞でのウイルス産生と標的細胞へのウイルス感染の両者を有意に減少させた。

総括

本研究により ORF21 はウイルスゲノムの複製、溶解感染遺伝子の転写、ウイルス粒子の産生に影響を与えないことが明らかになった。また、子孫ウイルスの感染には、ORF21 のキナーゼ機能以外の ORF21 分子依存的な機能が関与していることが明らかとなった。一方、ORF21 は細胞内のリン酸化 MEK を増加し足場非依存的な細胞増殖を促進させた。さらに、MEK シグナルの活性化は溶解感染期

の細胞内での子孫ウイルス産生と標的細胞への子孫ウイルス感染に必要であることが明らかになった。以上の研究成果により、ORF21 の感染性ウイルス産生と新規感染に関わる重要な機能が見出された。ORF21 分子依存的な機能を標的とした選択的阻害剤が有効な抗 KSHV 薬開発につながると予想される。今後、ORF21 分子機能の全貌解明と ORF21 機能阻害剤の開発が期待される。

審査の結果の要旨

《緒言》

カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus; KSHV) はヒトヘルペスウイルスに分類され、二本鎖 DNA をゲノムにもつ腫瘍ウイルスである。KSHV 感染者の免疫不全時に KSHV はカポジ肉腫や原発性体腔リンパ腫を引き起こす。KSHV がコードする ORF21 はウイルス粒子内に存在するテグメントタンパク質でウイルス性リン酸化酵素である。アミノ酸配列の相同性により KSHV の ORF21 は単純ヘルペスウイルス(HSV)がコードするウイルス性チミジンキナーゼ (vTK) のオーソログであることが知られている。HSV の vTK はアシクロビルのモノリン酸化やウイルスゲノムの複製に必須であるが、KSHV の ORF21 はチミジンやアシクロビルに対するリン酸化能が弱く、ウイルスのゲノム複製への関与しないことが報告されている。つまり、KSHV の ORF21 のウイルス学的機能については不明な点が多い。そこで、BAC (bacterial artificial chromosome) 改変法と呼ばれるウイルスゲノムの遺伝子改変手法を用いて ORF21 変異 KSHV とその保持細胞を作製し、それらのウイルス複製や感染性、および宿主細胞に与える影響を解析した。

《審査結果の要旨》

第1章では、ORF21 はウイルス複製には関与しないが、子孫ウイルスの感染に寄与することを見出した。ORF21 のウイルス学的な機能解析のため、KSHV-BAC16 ゲノムに相同組換えを用いて ORF21 遺伝子領域に変異を導入した遺伝子組換え KSHV-BAC16 を2種類 (ORF21 のキナーゼ機能が欠損した 21KD-BAC16、さらに ORF21 の開始コドン直下に終止コドン挿入した 21del-BAC16) 作製した。また、野生型 BAC16、21KD-BAC16、21del-BAC16 を iVero (および iSLK) 細胞にトランスフェクションし、BAC16 定常保持細胞をクローン化して、iVero-WT、iVero-21KD、iVero-21del 細胞を樹立した。はじめに、ORF21 変異がウイルスゲノム複製、ウイルスゲノム発現、ウイルス産生へ及ぼす影響を解析した。iVero-WT、iVero-21KD、iVero-21del 細胞の三者間でウイルス複製・産生、ゲノム発現の全てに影響を与えなかった。次に ORF21 変異による子孫ウイルスの新規感染への影響を解析した。その結果、iVero-21del 細胞から産生された子孫ウイルスの感染性は WT と 21KD の感染性の 15% にまで低下した。以上より、ORF21 分子依存的機能が子孫ウイルスの新規感染に必要であることが示された。

第2章では、ORF21 分子は宿主細胞内の MEK シグナルを活性化することを見出した。

野生型 ORF21 プラスミド (p21WT) またはキナーゼ機能欠損 ORF21 プラスミド (p21KD) を HeLa 細胞に発現させ、細胞内のシグナル伝達におよぼす影響を解析した。その結果、p21WT と p21KD 発現細胞では MEK のリン酸化が約2倍に増加した。また p21WT と p21KD 発現細胞では足場非依存的な細胞増殖が非発現細胞に比べ約2.5倍亢進した。結果よりキナーゼ機能以外の ORF21 分子依存的機能

により、MEK シグナルが活性化し細胞増殖が亢進することが示された。また、ORF21 が誘導する MEK シグナル活性化とウイルス産生の関係を明らかにするため、MEK 阻害剤(U0126)処理した溶解感染誘導細胞における子孫ウイルス産生量と、MEK 阻害剤処理した標的細胞への子孫ウイルス感染効率を解析した。その結果、U0126 処理は、溶解感染誘導細胞でのウイルス産生と標的細胞へのウイルス感染の両者を有意に減少させた。

なお、副査と主査からのコメントと質疑に対して、申請者は本論文に補足説明や新たな考察を加える、図表の訂正、適切な表現への訂正、過大解釈や過大表現の訂正、詳細な実験条件を追記する等により、本論文を適切に修正した。

《審査の結論》

本研究により、ORF21 はウイルスゲノムの複製、溶解感染遺伝子の転写、ウイルス粒子の産生に影響を与えないが、子孫ウイルスの感染には ORF21 のキナーゼ機能以外の ORF21 分子依存的な機能が関与していることが明らかとなった。ORF21 は細胞内のリン酸化 MEK を増加し足場非依存的な細胞増殖を促進させた。さらに、MEK シグナルの活性化は溶解感染期の細胞内での子孫ウイルス産生と標的細胞への子孫ウイルス感染に必要であることが明らかになった。本研究により ORF21 分子依存的な機能を標的とした選択的阻害剤が有効な抗 KSHV 薬開発につながると予想され、臨床的にも意義のある研究成果だと言える。

学位論文とその基礎となる報文の内容を審査した結果、本論文は博士（薬学）の学位論文としての価値を有するものと判断する。