

1. 単純ヘルペスウイルス 1 型 Us3 プロテインキナーゼによる 病態発現機構の解明

加藤 哲久

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

単純ヘルペスウイルス 1 型 (Herpes simplex virus type-1; HSV-1) は、軽度で合併症を伴わない粘膜感染から致死的な感染により、広範囲のヒト病態を引き起こす。HSV-1 Us3 遺伝子は、 α -ヘルペスウイルスに広く保存されるセリン・スレオニンリン酸化酵素をコードしている。次々と蓄積される知見が、Us3 は HSV-1 感染の極めて重要な制御因子であることを示唆している。しかしながら、Us3 が司る HSV-1 病態発現能の分子メカニズムは不明なままであった。本稿では、特に生体レベルにおける Us3 の重要性に注目し、HSV-1 Us3 の役割に関する現在の知見を概略する。

はじめに

ヘルペスウイルス感染症に関する最古の記録は、古代ギリシャ時代に遡るといわれている¹⁾。そして、世界保健機構 (World health organization; WHO) は、今日も地球の人口の約 90% が 9 つのヒトヘルペスウイルス (Human herpesvirus; HHV) のいずれかに感染しているのではないかと報告している。HHV は、 α 、 β 、 γ -亜科に大分され、単純ヘルペスウイルス 1 型および 2 型 (Herpes simplex virus type-1 および -2; HSV-1 および -2) は、 α -ヘルペス亜科に属する²⁾。HSV は、角膜炎、口唇ヘルペス、性器ヘルペスや脳炎といった多様なヒト病態の原因ウイルスである²⁾。抗ヘルペスウイルス剤であるアシクロビルが開発された今日でも、脳炎患者の 70% は社会復帰できないか死亡する。性感染症としても HSV の重要性は高く、日本国内の女性における性感染症報告数ではクラミジアに続く第 2 位である。さらに、HSV は一度感染すると宿主に終生潜伏感染し、頻繁に再活性化し病態を呈する²⁾。したがっ

て、性器ヘルペスは、他の性感染症と異なり現状では根治が不能であり、今日も患者は「水平感染や垂直感染の不安」といった精神的苦痛と直面している³⁾。

HSV 粒子は、ほぼ球状で、外部よりウイルス糖蛋白質と宿主由来の脂質 2 重膜から形成されるエンベロープ、ウイルスゲノムが格納された正 20 面体のカプシド、エンベロープとカプシドの中間に位置するテグメントと呼ばれるヘルペスウイルスに特徴的な蛋白質群の 3 層から形成される²⁾。HSV ゲノムは、約 150kbp の 2 本鎖 DNA であり、約 80 種類のウイルス遺伝子がコードされる²⁾。HSV は、マウス等の小動物において、ヒト病態が再現可能な数少ないウイルスの 1 つである²⁾。HSV-1 は、HHV 研究のプロトタイプであり、今日までにはほぼ全ての HSV-1 遺伝子の欠損体が作出された結果、病原性因子の大部分が解明されている。しかしながら、如何なる分子メカニズムで病態発現能を司るのか不明な病原性因子も少なくない。本稿では、これらの中から我々が注目している HSV-1 Us3 セリン・スレオニンリン酸化酵素 (Protein kinase; PK) に関して解説する。

Us3 リン酸化酵素研究の歴史

Us3 リン酸化酵素に関する研究の歴史は古く、1980 年代に HSV-1 感染により感染細胞のリン酸化蛋白質量や PK 活性が著しく上昇するという知見から、ウイルス誘導 PK (Virus-induced protein kinase; ViPK) の存在が予見されたことが始まりであると考えられる^{4,5)}。ViPK は、宿主細胞由来の PK か、ウイルス由来の PK か不明であったが、感染細胞内のリン酸化状態を激変させることから、なんらか

連絡先

〒108-8639
東京都港区白金台 4-6-1
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
TEL: 03-6409-2071
FAX: 03-6409-2072
E-mail: akihisak@ims.u-tokyo.ac.jp

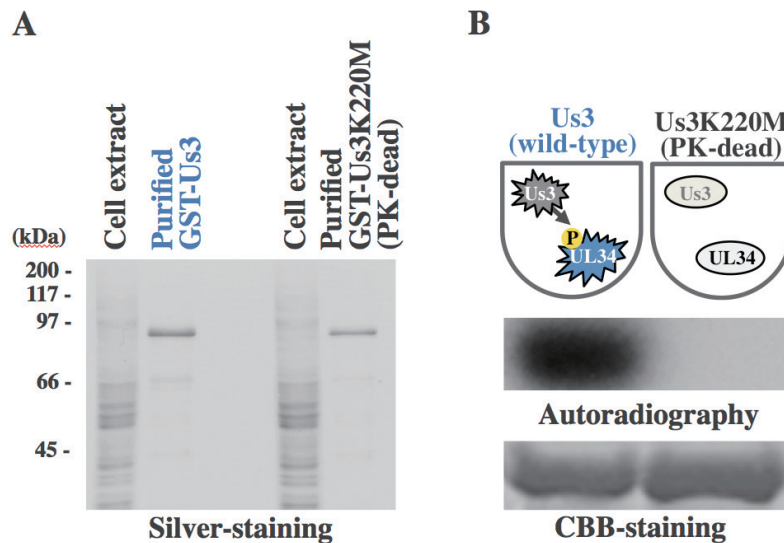


図1 信頼できる Us3 試験管内リン酸化反応系の確立

(A) バキュロウイルス発現系より精製した野生型 GST-Us3 と陰性コントロールである GST-Us3K220M を、SDS-PAGE 展開後に、銀染色に供した。(B) 確立した信頼できる Us3 試験管内リン酸化反応系において、推定基質がリン酸化されるか検証した。野生型 GST-Us3 により、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ 標識され autoradiography においてバンドが検出された UL34 は、Us3 のリン酸化基質となりうることを意味する。(文献 20 より改)

の基質をリン酸化し、その機能発現を制御することで、HSV-1 増殖や病態発現能に重要や役割を担うのではないかと、当初より想像されていた^{4,5)}。そして、1986年には HSV-1 ゲノムにコードされる Us3 遺伝子が、宿主 PK と似通った遺伝子配列を有すること⁶⁾、翌年には、ViPK の活性本体が Us3 遺伝子産物であること⁷⁾、Us3 欠損ウイルスの基礎的な性状⁸⁾ が報告された。さらに、シカゴ大の Bernard Roizman 教授らは、Us3 欠損ウイルスはマウスモデルにおける HSV-1 の中枢神経破壊能、すなわち神経病原性、さらには再活性化能が著しく低いことも明らかとした⁹⁾。すなわち、Us3 が HSV-1 感染の極めて重要な制御因子であることは、古くから知られていたと言える。そして、今日までに Us3 および近縁ウイルスの Us3 ホモログ分子の欠損ウイルスが、日米欧中の複数グループにより作出され、Us3 やホモログ分子が核内で形成された HSV-1 カプシドの小胞性媒介核外輸送¹⁰⁾、HSV-1 感染細胞におけるアポトーシス抵抗性の獲得¹¹⁾ や感染細胞の形態制御能¹²⁾ に関与することが次々と明らかにされた。しかしながら、Us3 がこれらの細胞現象や HSV-1 の病態発現能を司る分子メカニズムは、長年、不明なままであった。

Us3 試験管内リン酸化反応系の確立

周知の通り、PK による蛋白質のリン酸化は、最も一般的かつ効率的な翻訳後修飾であり、多種多様な細胞現象を司る^{13,14,15)}。PK が司る細胞現象の分子メカニズムを解明するためには、PK の基質とそのリン酸化部位の同定が不

可欠である。一般的に、PK の基質を同定するには、(i) 細胞内のリン酸化反応を再構築した試験管内リン酸化反応系において、精製 PK による推定基質が直接リン酸化されるかどうか、(ii) 細胞内における PK 活性の抑制や活性化により、推定基質のリン酸化状態が減少あるいは増加するかどうか、少なくともこの2点を検証する必要がある¹⁶⁾。前項に記載した通り、Us3 欠損ウイルスが作出されていたことから、Us3 研究において(ii)の検証は比較的容易であった。一方、HSV-1 感染細胞における Us3 の発現量は極めて限定的であり、精製 Us3 を用いた試験管内リン酸化反応系は、宿主 PK の混入による擬陽性の危険性と常に隣り合わせであった。信頼できる Us3 試験管内リン酸化反応系の確立には、Us3 を何らかの発現系で大量発現させることが望まれていた。しかしながら、ヘルペスウイルスがコードする PK の組換え蛋白質は、あらゆる発現系において発現が困難であった^{17,18)}。そのため、信頼できる Us3 試験管内リン酸化反応系は未構築であり、Us3 基質やそのリン酸化部位は混沌としていた。

これらの問題を解決するため、我々はバキュロウイルス発現系の感染条件を最適化することで、GST と融合した形の野生型 Us3 (GST-Us3-Wt) のみならず、PK の活性中心に保存させる invariant lysine¹⁹⁾ を破壊した陰性コントロールである Us3K220M (GST-Us3K220M) の大量発現系を構築し、Us3 の PK 活性による特異的なリン酸化反応を検証可能な信頼できる Us3 試験管内リン酸化反応系を確立した²⁰⁾。我々は Us3 試験管内リン酸化反応系を駆

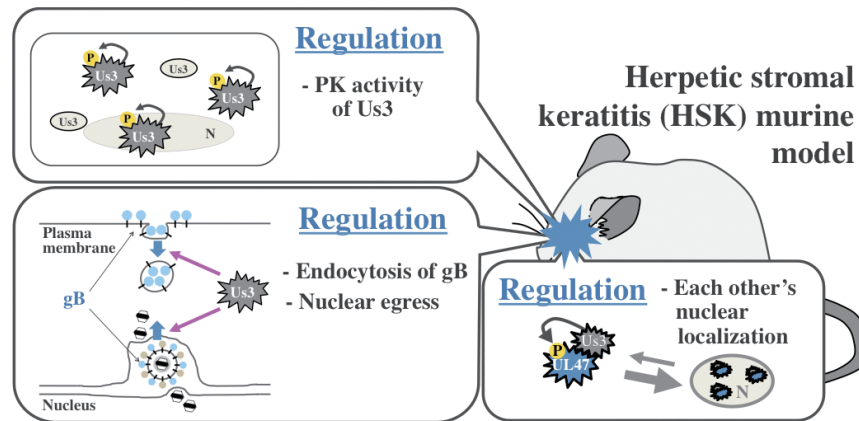


図2 Us3 基質のリン酸化制御機構と末梢組織における HSV-1 の病態発現機構

Us3 試験管内リン酸化反応系により同定された Us3 基質である gB, UL47 や Us3 自身は, 細胞内でのリン酸化制御を介して, マウスモデルにおける効率的な HSV-1 角膜炎野発症に関与していた。

使し, (i) 先行研究により Us3 推定基質と考えられていた HSV-1 カプシドの小胞性媒介核外輸送に必須の HSV-1 蛋白質である UL34²¹⁾ やアポトーシス促進性の宿主蛋白質である BAD²²⁾ が, Us3 により直接リン酸化されること, (ii) UL34 のリン酸化部位や新規 Us3 基質の同定が可能であることを報告した²⁰⁾. 我々が同定した新規 Us3 基質である UL31 は, 上述の UL34 とヘテロ複合体を形成し, HSV-1 カプシドの小胞媒介性核外輸送に必須となるウイルス蛋白質である^{23,24,25)}. 当初, Us3 は UL34 をリン酸化制御することで, HSV-1 カプシドの小胞媒介性核外輸送を制御するのではないかと考えられていたが, 実際には Us3 による UL34 のリン酸化ではなく, 我々が同定した UL31 のリン酸化が, HSV-1 カプシドの小胞媒介性核外輸送に関与することが, 今日では明らかとなっている^{26,27)}. Us3 試験管内リン酸化反応系は, Us3 研究の強力なツールとして, 今日我々の研究基盤となっている。

Us3 試験管内リン酸化反応系による Us3 病態発現機構の解明

我々は, Us3 試験管内リン酸化反応系を駆使し, HSV-1 がコードする主要エンベロップ糖蛋白質 B (Glycoprotein B; gB) Thr-887 が, Us3 によりリン酸化させることを見出した²⁸⁾. HSV-1 は子孫ウイルスの産生時, 細胞内で gB 等のウイルス糖蛋白質を富む小胞に出芽し, エンベロップを獲得した後に細胞外へと放出される²⁾. したがって, 子孫ウイルスの細胞外放出に伴い, gB は細胞表面に蓄積する. 細胞表面に蓄積した gB は, 抗体依存的にエフェクター細胞を活性化させる, いわゆる ADCC 活性を介して, HSV-1 感染細胞の排除機構を増強させると考えられている^{29,30)}. すなわち, 子孫ウイルスの産生が活発な感染細胞ほどは, 宿主免疫機構により排除されやすいことが予想

される. 興味深いことに, Us3 による gB Thr-887 のリン酸化は, gB のエンドサイトーシスを促進することで, gB の細胞表面発現量を低下させることが明らかとなった (図 2)^{28,31)}. すなわち, 我々は Us3 が宿主免疫機構の回避のため, gB の細胞表面における蓄積を阻害するのではないかと考えている. また, 我々はオレゴン健康科学大学 David Johnson 教授らと共同研究により, gB Thr-887 のリン酸化が, HSV-1 カプシドの小胞媒介性核外輸送における核外膜との融合段階に関与することも明らかとしている³²⁾. このように, Us3 による gB Thr-887 のリン酸化は, 宿主免疫機構の回避や効率的な子孫ウイルスの産生への関与が示唆されたことから, HSV-1 病態発現能への影響も解析された. その結果, gB Thr-887 のリン酸化は効率的なヘルペス性角膜炎の発症に関与することも明らかとなっている (図 2)³³⁾.

同様に, 我々は Us3 試験管内リン酸化反応系を駆使し, Us3 が主要テグメント蛋白質 UL47 Ser-77 のリン酸化を司ることも見出した³⁴⁾. UL47 Ser-77 は核移行シグナルに近接しており, 本部位のリン酸化は UL47 の効率的な核局在に必要であった (図 2)³⁴⁾. また, UL47 は Us3 と安定な複合体を形成し, Us3 の核局在にも関与していた³⁴⁾. UL47 はテグメント蛋白質であることから, 細胞質における子孫ウイルスの粒子形成への関与は容易に想像されるが, 核内における機能は全く不明であった. 我々は Us3 PK 活性消失変異型 HSV-1 感染細胞において, HSV-1 カプシドの小胞媒介性核外輸送に必須の UL34 および UL31 と同様, UL47 が核膜上で foci を形成したこと³⁵⁾ から, UL47 欠損 HSV-1 感染細胞におけるカプシドの小胞媒介性核外輸送の効率を解析した. その結果, UL47 は HSV-1 カプシドの小胞媒介性核外輸送における核内膜との融合段階に関与することが明らかとなった³⁵⁾. すなわち, Us3 は

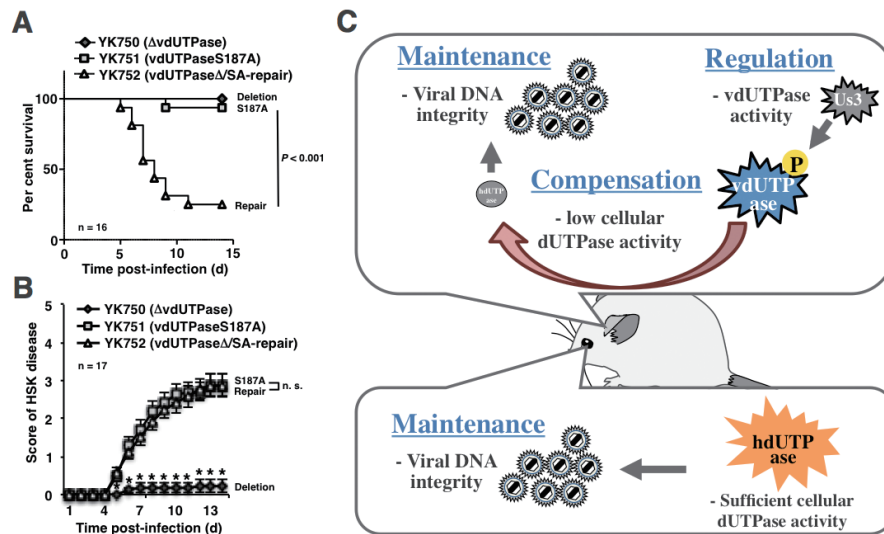


図3 Us3によるvdUTPaseリン酸化制御を介したHSV-1の神経病原性発現機構

(A) リン酸化プロテオーム解析により同定されたUs3基質であるvdUTPaseのリン酸化は、脳内接種後マウスの致死率を有意に低下させた。(B) 一方、vdUTPaseのリン酸化は、角膜接種後マウスの病態発現能には関与が認められなかった。(C) 一連の解析より、vdUTPaseはUs3によりリン酸化されることで活性化し、中枢神経系組織における宿主dUTPase活性の不足を補填することで、HSV-1の正確なゲノム複製を促進することを介して、マウスモデルにおける効率的なHSV-1神経病原性の発症に関与していた。(文献45より改)

UL31, gBやUL47等の複数のUs3基質のリン酸化を介して、多段階的にHSV-1カプシドの小胞媒介性核外輸送を制御していることが示唆される。そして、gB Thr-887のリン酸化と同様、UL47 Ser-77のリン酸化もまた、マウスモデルにおける効率的なHSV-1角膜炎の発症に必要であった(図2)³⁴⁾。

我々はUs3試験管内リン酸化反応系を駆使し、Us3はSer-147の自己リン酸化によってPK活性が亢進することも解明した(図2)^{36, 37)}。Us3 Ser-147の自己リン酸化は、細胞内のごく一部のUs3においてのみ検出されるため、細胞全体から得られるUs3のPK活性には、ほぼ影響が認められなかった³⁶⁾。それに関わらず、本リン酸化はUs3が司るHSV-1感染細胞の形態制御には極めて重要であり、マウスモデルにおける効率的なHSV-1角膜炎の発症への関与も認められた(図2)³⁷⁾。

一連の知見は、Us3が司るHSV-1病態発現メカニズムの一端を明らかとした知見であると同時に、試験管内の再構築系で得られた知見が、培養細胞系のみならず、*in vivo*における生物学的意義の解明にまで及んだという観点から、意義深いものであったと我々は考えている。

リン酸化プロテオーム解析によるUs3病態発現機構の解明

HSV-1は、上皮系組織において角膜炎、膣炎や皮膚炎を、中枢神経系組織において致死的な脳炎等の病態を引き起こす^{1,2)}。前述の通り、マウスモデルにおいて、これらのヒ

ト病態は再現が可能である。我々は、Us3のPK活性が末梢組織における病態発現能のみならず、中枢神経系組織の破壊能、すなわち神経病原性にも極めて重要な役割を担うことを明らかとしていた^{37,38)}。前項に記載した通り、Us3試験管内リン酸化反応系による基質探索の結果、Us3が角膜等の末梢組織において病態発現能を司るリン酸化基質は明らかとなってきたが、神経病原性を司るリン酸化基質は不明なままであった。近年、質量分析技術の飛躍的な進歩により、高精度かつ網羅的に蛋白質のリン酸化部位を探索することが可能となりつつある³⁹⁾。我々は二酸化チタンカラムを用いた特異的リン酸化ペプチド濃縮法と高感度質量分析計を駆使した超高感度リン酸化プロテオーム解析を実施し、HSV-1感染細胞におけるリン酸化部位を網羅的に同定した^{40,41)}。同定した608ヶ所のリン酸化部位の内23ヶ所が、試験管内において精製Us3が効率的にリン酸化するアミノ酸配列に位置していた⁴⁰⁾。これら推定Us3基質の中から、我々はviral dUTPase (vdUTPase) Ser-187のリン酸化に注目した。vdUTPaseは、HSV-1 UL50にコードされ、HHVに保存される宿主dUTPaseのホモログ分子である²⁾。また、HHVのみならずDNAウイルスの大部分やレトロウイルスの一部が、vdUTPaseをコードすることから、vdUTPaseは多様なウイルスの生活環に広く寄与しているであろうことが想像された。dUTPaseは、dUTPをdUMPとピロリン酸に加水分解し、新規合成DNAへのdUTPの取り込みを阻害することで、DNA変異

を抑制する核酸代謝酵素である⁴²⁾。我々は、Us3によるvdUTPase Ser-187のリン酸化は、vdUTPaseの酵素活性を活性化し、中枢神経系組織における宿主dUTPase活性の不足を補充することで、正確なHSVゲノムの複製を維持し、マウスモデルにおける脳内におけるHSV-1増殖や神経病原性を促進することを解明した(図3)^{40,43,44)}。興味深いことに、Us3によるvdUTPaseのリン酸化制御は、マウスモデルにおける角膜炎や髄膜炎といった末梢組織における病態発現能には関与が認められなかった(図3)⁴⁵⁾。末梢組織における宿主dUTPase活性は、HSV-1増殖には十分な活性を有し、vdUTPaseによる補填を必要としないことを示唆する知見も得られた(図3)⁴³⁾。我々の知る限り神経病原性に関与するHSV-1遺伝子やドメインは、ほぼ全て末梢組織における病態発現能にも関与する^{2, 45)}。したがって、Us3によるvdUTPaseのリン酸化制御は中枢神経系特異的なHSV-1の増殖調節機構であり、極めてユニークな知見である。中枢神経系特異的なHSV弱毒化機構の解明は、脳炎のリスクを低下させたHSV-1ベクターや弱毒生ワクチンの開発、さらには癌細胞に対するウイルス療法への応用等が期待される重要な基礎的知見であると考えられている⁴⁶⁾。

おわりに

本稿では、Us3がHSV-1の病態発現能を司る分子メカニズムに関する知見の概要を紹介した。Us3は最も精力的に解析されているHSV-1遺伝子産物の1つであり、その知見は着実に蓄積しつつあるが、解析の進展とともに、我々はいくつかの疑問に直面している。例えば、リン酸化制御機構の一部は、リン酸化部位を酸性アミノ酸に置換することで、恒常的なリン酸化状態の模倣が可能であることが知られている。大部分のUs3基質におけるリン酸化部位もまた、酸性アミノ酸に置換することで、野生型の表現型を模倣することが可能であった。一見、Us3によるリン酸化制御機構の存在を支持する喜ぶべき知見とも思いがちであるが、「はじめから酸性アミノ酸をコードすればよいのではないのか?」という違和感も残る。ヒトとウイルスの平衡関係を維持するため、HSV-1は子孫ウイルスの増殖効率のみを求めるのではなく、Us3による制御機構を獲得することで、子孫ウイルスの増殖を調節しているのではないかという御指摘を頂くこともあるが、少なくとも現在までに、この仮説を指示する知見は得られておらず、「Us3の本質的な役割とはなんなのだろうか?」と感じさせられることもある。また、Us3は細胞死の制御¹¹⁾や宿主免疫の抑制⁴⁷⁾といった宿主細胞機能の制御能も有するが、その制御メカニズムには不明な点も多く、さらなる解析が必要である。このようにUs3研究への興味は尽きず、課題はまだ山積みである。今後も精力的な解析を継続していきたい。

謝辞

本研究は、名古屋大学の西山幸廣先生、東京大学医科学研究所の川口寧先生のもと実施されて頂きました研究です。特に、川口寧先生からは10年以上に渡り、一貫した御指導を賜りましたことに感謝致します。また、本稿の執筆にあたり、我々が報告した論文を紐解くと、実に43名もの共著者の皆様の御支援があったことを改めて気がつかされました。未発表だったモノクローナル抗体を分与して下さった大阪大学微生物病研究所の荒瀬尚先生、生体組織の取り扱いに不慣れな我々に詳細なプロトコールをお送り下さった京都大学ウイルス研究所の小柳義夫先生、挙げれば切りがないほど多くの皆様の御指導・御協力によって、一連の研究が遂行されたものであることを痛感しております。あらためてここに御礼を申し上げます。そして最後に、名誉ある日本ウイルス学会杉浦奨励賞に御推挙下さいました神戸大学の森康子先生、東京大学医科学研究所の河岡義裕先生、阪大微生物病研究会の山西弘一先生に深謝いたします。

本稿に関連し、開示すべき利益相反状態にある企業等はありません。

引用

- 1) Whitley RJ, Roizman B. Herpes simplex virus infections. *Lancet*. 357: 1513-8, 2011.
- 2) Roizman B., Knipe DM., Whitley RJ. Herpes simplex viruses, p. 1823-1897. *In* Knipe DM, Howley PM, Cohen JI, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Racaniello VR, Roizman B (ed.), *Fields virology*, 6th ed. Lippincott-Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, 2013.
- 3) Cohen J. Immunology. Painful failure of promising genital herpes vaccine. *Science* 330: 304, 2010.
- 4) Stevely WS., Katan M., Stirling V., Smith G., Leader DP. Protein kinase activities associated with the virions of pseudorabies and herpes simplex virus. *J Gen Virol*. 66: 661-73, 1985.
- 5) Purves FC., Katan M., Stevely WS., Leader DP. Characteristics of the induction of a new protein kinase in cells infected with herpesviruses. *J Gen Virol*. 67: 1049-57, 1986.
- 6) McGeoch DJ., Davison AJ. Alphaherpesviruses possess a gene homologous to the protein kinase gene family of eukaryotes and retroviruses. *Nucleic Acids Res*. 14: 1765-77, 1986.
- 7) Frame MC., Purves FC., McGeoch DJ., Marsden HS., Leader DP. Identification of the herpes simplex virus protein kinase as the product of viral gene US3. *J Gen Virol*. 68: 2699-704, 1987.
- 8) Purves FC., Longnecker RM., Leader DP., Roizman B. Herpes simplex virus 1 protein kinase is encoded by open reading frame US3 which is not essential for virus growth in cell culture. *J Virol*. 61: 2896-901, 1987.

- 9) Meignier B., Longnecker R., Mavromara-Nazos P., Sears AE., Roizman B. Virulence of and establishment of latency by genetically engineered deletion mutants of herpes simplex virus 1. *Virology*. 162: 251-4, 1988.
- 10) Reynolds AE., Wills EG., Roller RJ., Ryckman BJ., Baines JD. Ultrastructural localization of the herpes simplex virus type 1 UL31, UL34, and US3 proteins suggests specific roles in primary envelopment and egress of nucleocapsids. *J Virol*. 76: 8939-52, 2002.
- 11) Leopardi R., Van Sant C., Roizman B. The herpes simplex virus 1 protein kinase US3 is required for protection from apoptosis induced by the virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 7891-6, 1997.
- 12) Van Minnebruggen G., Favoreel HW., Jacobs L., Nauwynck HJ. Pseudorabies virus US3 protein kinase mediates actin stress fiber breakdown. *J Virol*. 77: 9074-80, 2003.
- 13) Kawaguchi Y., Kato K. Protein kinases conserved in herpesviruses potentially share a function mimicking the cellular protein kinase cdc2. *Rev Med Virol*. 13: 331-40, 2003.
- 14) Tuccinardi T., Martinelli A. Protein kinase homology models: recent developments and results. *Curr Med Chem* 18: 2848-2853, 2011.
- 15) Manning G., Whyte DB., Martinez R., Hunter T., Sudarsanam S. The protein kinase complement of the human genome. *Science* 298: 1912-1934, 2002.
- 16) Brazil DP., Yang ZZ., Hemmings BA. Advances in protein kinase B signalling: AKTion on multiple fronts. *Trends Biochem Sci*. 29: 233-42, 2004.
- 17) Kenyon TK., Lynch J., Hay J., Ruyechan W., Grose C. Varicella-zoster virus ORF47 protein serine kinase: characterization of a cloned, biologically active phosphotransferase and two viral substrates, ORF62 and ORF63. *J Virol*. 75: 8854-8, 2001.
- 18) Ng TI., Talarico C., Burnette TC., Biron K., Roizman B. Partial substitution of the functions of the herpes simplex virus 1 U(L)13 gene by the human cytomegalovirus U(L)97 gene. *Virology* 225: 347-58, 1996.
- 19) Hanks SK., Quinn AM., Hunter T. The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* 241: 42-52, 1988.
- 20) Kato A., Yamamoto M., Ohno T., Kodaira H., Nishiyama Y., Kawaguchi Y. Identification of proteins phosphorylated directly by the Us3 protein kinase encoded by herpes simplex virus 1. *J Virol*. 79: 9325-31, 2005.
- 21) Purves FC., Spector D., Roizman B. The herpes simplex virus 1 protein kinase encoded by the US3 gene mediates posttranslational modification of the phosphoprotein encoded by the UL34 gene. *J Virol*. 65: 5757-64, 1991.
- 22) Munger J., Roizman B. The US3 protein kinase of herpes simplex virus 1 mediates the posttranslational modification of BAD and prevents BAD-induced programmed cell death in the absence of other viral proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98: 10410-5, 2001.
- 23) Reynolds AE., Ryckman BJ., Baines JD., Zhou Y., Liang L., Roller RJ. U(L)31 and U(L)34 proteins of herpes simplex virus type 1 form a complex that accumulates at the nuclear rim and is required for envelopment of nucleocapsids. *J Virol*. 75:8803-17, 2001.
- 24) Bigalke JM., Heuser T., Nicastro D., Heldwein EE. Membrane deformation and scission by the HSV-1 nuclear egress complex. *Nat Commun*. 5: 4131, 2014.
- 25) Hagen C., Dent KC., Zeev-Ben-Mordehai T., Grange M., Bosse JB., Whittle C., Klupp BG., Siebert CA., Vasishtan D., Bäuerlein FJ., Chelieski J., Werner S., Guttmann P., Rehbein S., Henzler K., Demmerle J., Adler B., Koszinowski U., Schermelleh L., Schneider G., Enquist LW., Plitzko JM., Mettenleiter TC., Grünewald K. Structural Basis of Vesicle Formation at the Inner Nuclear Membrane. *Cell*. 163: 1692-701, 2015.
- 26) Bjerke SL., Roller RJ. Roles for herpes simplex virus type 1 UL34 and US3 proteins in disrupting the nuclear lamina during herpes simplex virus type 1 egress. *Virology* 347: 261-76, 2006.
- 27) Mou F., Wills E., Baines JD. Phosphorylation of the U(L)31 protein of herpes simplex virus 1 by the U(S)3-encoded kinase regulates localization of the nuclear envelopment complex and egress of nucleocapsids. *J Virol*. 83: 5181-91, 2009.
- 28) Kato A., Ariei J., Shiratori I., Akashi H., Arase H., Kawaguchi Y. Herpes simplex virus 1 protein kinase Us3 phosphorylates viral envelope glycoprotein B and regulates its expression on the cell surface. *J Virol*. 83: 250-61, 2009.
- 29) Bishop GA., Glorioso JC., Schwartz SA. Relationship between expression of herpes simplex virus glycoproteins and susceptibility of target cells to human natural killer activity. *J Exp Med*. 157: 1544-61, 1983.
- 30) Kohl S., Strynadka NC., Hodges RS., Pereira L. Analysis of the role of antibody-dependent cellular cytotoxic antibody activity in murine neonatal herpes simplex virus infection with antibodies to synthetic peptides of glycoprotein D and monoclonal antibodies to glycoprotein B. *J Clin Invest*. 86: 273-8, 1990.
- 31) Imai T., Ariei J., Minowa A., Kakimoto A., Koyanagi N., Kato A., Kawaguchi Y. Role of the herpes simplex virus 1 Us3 kinase phosphorylation site and endocytosis motifs in the intracellular transport and neurovirulence of envelope glycoprotein B. *J Virol*. 85: 5003-15, 2011.
- 32) Wisner TW., Wright CC., Kato A., Kawaguchi Y., Mou F., Baines JD., Roller RJ., Johnson DC. Herpesvirus gB-induced fusion between the virion envelope and outer nuclear membrane during virus egress is regulated by the viral US3 kinase. *J Virol*. 83: 3115-26, 2009.
- 33) Imai T., Sagou K., Ariei J., Kawaguchi Y. Effects of phosphorylation of herpes simplex virus 1 envelope glycoprotein B by Us3 kinase in vivo and in vitro. *J Virol*. 84: 153-62, 2010.
- 34) Kato A., Liu Z., Minowa A., Imai T., Tanaka M., Sugimoto K., Nishiyama Y., Ariei J., Kawaguchi Y. Herpes simplex virus 1 protein kinase Us3 and major tegument protein UL47 reciprocally regulate their subcellular localization in infected cells. *J Virol*. 85: 9599-613, 2011.
- 35) Liu Z., Kato A., Shindo K., Noda T., Sagara H., Kawao-

- ka Y., Arii J., Kawaguchi Y. Herpes simplex virus 1 UL47 interacts with viral nuclear egress factors UL31, UL34, and Us3 and regulates viral nuclear egress. *J Virol.* 88: 4657-67, 2014.
- 36) Kato A., Tanaka M., Yamamoto M., Asai R., Sata T., Nishiyama Y., Kawaguchi Y. Identification of a physiological phosphorylation site of the herpes simplex virus 1-encoded protein kinase Us3 which regulates its optimal catalytic activity in vitro and influences its function in infected cells. *J Virol.* 82: 6172-89, 2008.
 - 37) Sagou K., Imai T., Sagara H., Uema M., Kawaguchi Y. Regulation of the catalytic activity of herpes simplex virus 1 protein kinase Us3 by autophosphorylation and its role in pathogenesis. *J Virol.* 83: 5773-83, 2009.
 - 38) Morimoto T., Arii J., Tanaka M., Sata T., Akashi H., Yamada M., Nishiyama Y., Uema M., Kawaguchi Y. Differences in the regulatory and functional effects of the Us3 protein kinase activities of herpes simplex virus 1 and 2. *J Virol.* 83: 11624-34, 2009.
 - 39) Macek B., Mann M., Olsen JV. Global and site-specific quantitative phosphoproteomics: principles and applications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 49: 199-221, 2009.
 - 40) Kato A., Tsuda S., Liu Z., Kozuka-Hata H., Oyama M., Kawaguchi Y. Herpes simplex virus 1 protein kinase Us3 phosphorylates viral dUTPase and regulates its catalytic activity in infected cells. *J Virol.* 88: 655-66, 2014.
 - 41) Kobayashi R., Kato A., Oda S., Koyanagi N., Oyama M., Kozuka-Hata H., Arii J., Kawaguchi Y. Function of the Herpes Simplex Virus 1 Small Capsid Protein VP26 Is Regulated by Phosphorylation at a Specific Site. *J Virol.* 89: 6141-7, 2015.
 - 42) Vertessy BG., Toth J. Keeping uracil out of DNA: physiological role, structure and catalytic mechanism of dUTPases. *Acc Chem Res* 42: 97-106, 2009.
 - 43) Kato A., Hirohata Y., Arii J., Kawaguchi Y. Phosphorylation of herpes simplex virus 1 dUTPase upregulated viral dUTPase activity to compensate for low cellular dUTPase activity for efficient viral replication. *J Virol.* 88: 7776-85, 2014.
 - 44) Kato A., Arii J., Koyanagi Y., Kawaguchi Y. Phosphorylation of herpes simplex virus 1 dUTPase regulates viral virulence and genome integrity by compensating for low cellular dUTPase activity in the central nervous system. *J Virol.* 89: 241-8, 2015.
 - 45) Kato A., Shindo K., Maruzuru Y., Kawaguchi Y. Phosphorylation of a herpes simplex virus 1 dUTPase by a viral protein kinase, Us3, dictates viral pathogenicity in the central nervous system but not at the periphery. *J Virol.* 88:2775-85, 2014.
 - 46) Peters C., Rabkin SD. Designing Herpes Viruses as Oncolytics. *Mol Ther Oncolytics.* pii: 15010, 2015.
 - 47) Imai T., Koyanagi N., Ogawa R., Shindo K., Suenaga T., Sato A., Arii J., Kato A., Kiyono H., Arase H., Kawaguchi Y. Us3 kinase encoded by herpes simplex virus 1 mediates downregulation of cell surface major histocompatibility complex class I and evasion of CD8+ T cells. *PLoS One.* 8: e72050, 2013.

Molecular mechanism by which Us3 protein kinase regulates the pathogenicity of herpes simplex virus type-1

Akihisa KATO

Division of Molecular Virology, Department of Microbiology and Immunology, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo, Minato-ku, Tokyo 108-8639, Japan

Herpes simplex virus type-1 (HSV-1) causes a range of human diseases, from mild uncomplicated mucocutaneous infection to life-threatening ones. The Us3 gene of HSV-1 encodes a serine/threonine protein kinase that is highly conserved among alphaherpesviruses. Accumulating evidence suggests that Us3 is a critical regulator of HSV-1 infection; however, the molecular mechanism by which Us3 regulates HSV-1 pathogenicity remains to be elucidated. This article presents a brief summary of the present knowledge on the roles of HSV-1 Us3, with a special focus on its relevancy *in vivo*.