

*Caenorhabditis elegans*  $\beta_{\text{pat-3}}$  (U19744), *Strongylocentrotus purpuratus*  $\beta_{\text{G}}$  (U77584),  $\beta_{\text{L}}$  (AF078802), and  $\beta_{\text{C}}$  (U77586) and *Lytechinus variegatus*  $\beta_{\text{C}}$  (AF059607). The evolutionary distances among  $\beta$  integrins in the clusters almost reflect the order of phylogenetic classification. It is known that vertebrate  $\beta$  integrins comprise subfamilies such as  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  and so on [1], and phylogenetic analyses have also demonstrated that vertebrate  $\beta$  integrins comprise a cluster consisting of sub-clusters of each subfamily, and that the cluster was apart from the above invertebrate one. Namely,  $\beta_{\text{CGH}}$  as well as other invertebrate  $\beta$  integrins are shown to be of the primeval type of all vertebrate  $\beta$  integrins [19].

Integrins are associated with two types of signaling, outside-in and inside-out. Outside-in signaling triggers intracellular events such as elevation of cytoplasmic pH and  $\text{Ca}^{2+}$  and activation of protein kinases, and results in morphological cell changes by integrin-ligand binding [1]. On the other hand, inside-out signaling regulates integrin activation and affinity towards ligands by involvement of three sites (the membrane proximal region and two NPXY motifs) in the cytoplasmic domain of  $\beta$  integrins [32–34].  $\beta_{\text{CGH}}$  also possessed a well conserved LBD and MIDAS in the extracellular domain, and a putative membrane proximal region sequence and two NPXY motifs in the cytoplasmic domain. The membrane proximal region motif (LlviXhDR) is thought to regulate the binding affinity states of integrins [34]. Although the putative membrane proximal region motif of  $\beta_{\text{CGH}}$  (LFTTISDK) was not in accordance with that of the known vertebrate consensus, this region likely plays a role in the regulation of binding affinity states of integrins because variety is commonly observed in other invertebrate  $\beta$  integrins. Taken together, it was assumed that  $\beta_{\text{CGH}}$  is involved in both outside-in and inside-out signaling and also controls the hemocyte physiology.

To characterize the role of integrins in *C. gigas* hemocytes, we first compared the expression levels of  $\beta_{\text{CGH}}$  mRNA among *C. gigas* hemocyte subpopulations. Generally, classifications of bivalve hemocytes broadly recognize two cell types, granulocytes and hyalinocytes (or agranulocytes) [13,14,37]. In addition, many investigators have also reported that at least three subcategories (subpopulations) of granulocytes and two subpopulations of hyalinocytes occur in the hemolymph of oyster species, including *C. gigas* [38,39], *Crassostrea virginica* [40,41], and *Ostrea edulis* [38,42]. The classification of subcategories is based on differences in cell morphology, cell size, and distinct types of cytoplasmic granules under light and electron microscopy. Moreover, flow cytometric analyses based

on cell size and cytoplasmic complexity have enabled us to categorize *C. gigas* [20,21], *C. virginica* [43–47] and *O. edulis* [48] hemocytes into three or four subpopulations. Thus, we used flow cytometry to prepare hemocyte subpopulations (granulocytes, hyalinocytes, and agranulocytes) for investigation of expression levels of  $\beta_{\text{CGH}}$  mRNA. As a result, the expression level within hyalinocytes was shown to be significantly higher than those in granulocytes and agranulocytes.

We then performed immunocytochemical staining and Western blotting of *C. gigas* hemocytes using anti-integrin  $\alpha_5\beta_1$  and anti-integrin and  $\beta_1$  antibodies, and showed that both of the antibodies had specific immuno-reactivity. Although there is no direct evidence concerning the identity of  $\beta_{\text{CGH}}$  and the integrin-like molecules detected by the antibodies,  $\beta_{\text{CGH}}$  would most possibly be the molecule recognized by the antibodies because the cloning data of  $\beta_{\text{CGH}}$  demonstrated that the structural features and similarity of  $\beta_{\text{CGH}}$  to human  $\beta_1$  integrin were well conserved and molecular mass (approximately 100 kDa) detected by both anti-integrin  $\alpha_5\beta_1$  and  $\beta_1$  antibodies was close to the expected molecular mass (approximately 107 kDa) of  $\beta_{\text{CGH}}$ . In addition, over 200 kDa protein was detected with anti-integrin  $\alpha_5\beta_1$  antibody. The protein may be a putative  $\alpha$  integrin expressed on *C. gigas* hemocytes.

We also investigated the functional role of integrins on phagocytosis among three *C. gigas* hemocyte subpopulations using anti-integrin  $\alpha_5\beta_1$  antibody. In this investigation, we found that the spreading shapes differed among subpopulations; granulocytes and, especially, hyalinocytes spread with well developed pseudopodia while agranulocytes were smaller round shaped expanding cells. Furthermore, we found that only a small number of agranulocytes attached to the glass slides, which does not agree with the ratio of agranulocytes to other hemocyte subpopulations in the hemolymph samples under flow cytometric analysis (data not shown). The adhesive ability of bivalve hemocytes is also considered crucial for wound repair because plugging of the injury site by hemocyte aggregation prevents hemolymph losses [12,13,17]. In *C. gigas*, Ruddell [49] reported that agranular amoebocytes migrated to a wound site and then plugged it during the early stages of the wounding response. Agranular amoebocytes can be regarded as the hyalinocytes designated in this study due to their similar morphology. Therefore, hyalinocytes might rapidly participate in wound repair due to their possible high expression of integrin compared with other hemocyte subpopulations.

When phagocytic ability was investigated, hyalinocytes were markedly blocked by pre-incubation with anti-integrin  $\alpha_5\beta_1$  antibody. In addition, hyalinocytes phagocytosed anti-integrin  $\alpha_5\beta_1$  antibody-conjugated microspheres more effectively than normal IgG-conjugated and non-conjugated microspheres. From these findings in hyalinocytes, it is suggested that the expression of phagocytic ability is mainly dependent on  $\alpha_5\beta_1$ -like integrins and is required for attachment to foreign particles. On the other hand, in granulocytes, their phagocytic ability seems almost independent of  $\alpha_5\beta_1$ -like integrins because the inhibitory effect of anti-integrin  $\alpha_5\beta_1$  antibody against zymosan particles was less marked and the reduced PR was still higher than the PR of control hyalinocytes. In addition, there was no effect of anti-integrin  $\alpha_5\beta_1$  antibody-conjugated microspheres on the enhancement of phagocytic ability of granulocytes. Agranulocytes essentially showed no or less phagocytic ability regardless of integrins. Such  $\alpha_5\beta_1$ -like integrin-dependent phagocytosis, especially shown in hyalinocytes, may be resulted in the expression level of  $\beta_{CGH}$  on hemocyte surface membranes, because the level of  $\alpha_5\beta_1$ -like integrin-dependent phagocytosis correlated to the expression level of  $\beta_{CGH}$  mRNA. The Western blotting results in this study also support this assumption; namely, that the antibody would at least recognize  $\beta_{CGH}$ .

Although functional analyses of integrins have rarely been undertaken at the hemocyte subpopulation level in invertebrate species, differences of phagocytic abilities among hemocyte subpopulations are well known in bivalves. In previous reports, bivalve granulocytes have exhibited high phagocytic abilities against various foreign particles [39,50,51]. On the other hand, bivalve agranulocytes have been shown to have no or less phagocytic ability compared to granulocytes in *Mytilus galloprovincialis* [52], *Tridacna crocea* [53], *C. virginica* [54], *Mercenaria mercenaria* [55], and *Mytilus edulis* [56]. Takahashi and Mori [39] examined the phagocytic ability of *C. gigas* granulocytes and agranulocytes against three different species of bacteria, formalinized erythrocytes, heat-killed yeast cells and latex beads. Granulocytes showed high phagocytic activity against all species of bacteria and yeast cells tested, whereas agranulocytes showed little phagocytosis against all these foreign particles. However, agranulocytes were more phagocytically active than the granulocytes against formalinized erythrocytes and latex beads. Tripp [55] also reported similar results in relation to phagocytosis by *M. mercenaria* hemocyte subpopulations. Most foreign particles, if not all, might therefore be more actively

phagocytosed by granulocytes than agranulocytes. Indeed, in this study, *C. gigas* granulocytes showed the highest PR against zymosan particles and agranulocytes showed low PR and PI. In addition, the PR of control hyalinocytes was much higher than that of agranulocytes, and the PI of control hyalinocytes was higher than those of granulocytes and agranulocytes. Therefore, hyalinocytes as well as granulocytes can be regarded as professional phagocytes. In addition to the involvement of integrins in phagocytosis, other molecules such as antigen-specific receptors and/or pattern-recognition molecules might also participate in phagocytosis of *C. gigas* hemocytes, especially through the actions of granulocytes. Further functional analyses of other molecules involved in immunoresponses, as well as integrins, are required in future studies.

### Acknowledgements

We thank the staff of the Education and Research Center of Marine Biosources at Onagawa, Tohoku University, for their help during our experiments. We are also grateful to Dr Masamichi Nakajima, Tohoku University, for his advice on sequencing. This study was supported by a Grant-in-Aid for scientific research (17380112) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan, and a Grant-in-Aid for the 2003 Multidisciplinary Research Project from MEXT in Japan.

### References

- [1] Hynes RO. Integrins: versatility modulation and signaling in cell adhesion. *Cell* 1992;69:11–25.
- [2] Ruoslahti E, Reed JC. Anchorage dependence, integrins, and apoptosis. *Cell* 1994;77:477–8.
- [3] Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 2002;110:673–87.
- [4] Johansson MW. Cell adhesion molecules in invertebrate immunity. *Dev Comp Immunol* 1999;23:303–15.
- [5] Davids BJ, Yoshino TP. Integrin-like RGD-dependent binding mechanism involved in the spreading response of circulating molluscan phagocytes. *Dev Comp Immunol* 1998;22:39–53.
- [6] Davids BJ, Wu X-J, Yoshino TP. Cloning of a  $\beta$  integrin subunit cDNA from an embryonic cell line derived from the freshwater mollusc, *Biomphalaria glabrata*. *Gene* 1999;228:213–23.
- [7] Ballarin L, Scanferla M, Cima F, Sabbadin A. Phagocyte spreading and phagocytosis in the compound ascidian *Botryllus schlosseri*: evidence for an integrin-like, RGD-dependent recognition mechanism. *Dev Comp Immunol* 2002;26:345–54.
- [8] Johansson MW, Söderhäll K. A peptide containing the cell adhesion sequence RGD can mediate degranulation and cell adhesion of crayfish granular haemocytes in vitro. *Insect Biochem* 1989;19:573–9.

- [9] Wittwer D, Wiesner A. RGDS peptide inhibits the fibronectin-enhanced phagocytosis of yeast cells by *Galleria mellonella* hemocytes in vitro. *J Invertebr Pathol* 1996;68:199–200.
- [10] Pech LL, Strand MR. Encapsulation of foreign targets by hemocytes of the moth *Pseudaletia includens* (Lepidoptera: Noctuidae) involved an RGD-dependent cell adhesion mechanism. *J Insect Physiol* 1995;41:481–8.
- [11] Miyazawa S, Azumi K, Nonaka M. Cloning and characterization of integrin  $\alpha$  subunits from the solitary ascidian, *Halocynthia roretzi*. *J Immunol* 2001;166:1710–5.
- [12] Cheng TC. Bivalves. In: Ratcliffe NA, Rowley AF, editors. *Invertebrate blood cells*. New York: Academic Press; 1981. p. 233–300.
- [13] Fisher WS. Structure and functions of oyster hemocytes. In: Brehélin M, editor. *Immunity in invertebrates*. Berlin: Springer; 1986. p. 25–35.
- [14] Terahara K, Takahashi KG, Mori K. Apoptosis by RGD-containing peptides observed in hemocytes of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Dev Comp Immunol* 2003;27:521–8.
- [15] Terahara K, Takahashi KG, Mori K. Fibronectin peptide induces apoptosis on adherent and spreading hemocytes of the giant Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Fish Sci* 2004;70:719–21.
- [16] Terahara K, Takahashi KG, Mori K. Pacific oyster hemocytes undergo apoptosis following cell-adhesion mediated by integrin-like molecules. *Comp Biochem Physiol A* 2005;141:215–22.
- [17] Cheng TC. Hemocytes: forms and functions. In: Kennedy VS, Newell RIE, Eble AF, editors. *The eastern oyster Crassostrea virginica*. College Park, MD: Maryland Sea Grand College; 1996. p. 299–333.
- [18] Cheng TC. Cellular defense mechanisms in oysters. In: Fingerhahn M, Nagabhushanam R, editors. *Recent advances in marine biotechnology. Immunobiology and pathology*, vol. 5. Enfield, NH: Science Publishers Inc.; 2000. p. 43–83.
- [19] Miyazawa S, Nonaka M. Characterization of novel ascidian  $\beta$  integrins as primitive complement receptor subunits. *Immunogenetics* 2004;55:836–44.
- [20] Lambert C, Soudant P, Choquet G, Paillard C. Measurement of *Crassostrea gigas* hemocyte oxidative metabolism by flow cytometry and the inhibiting capacity of pathogenic vibrios. *Fish Shellfish Immunol* 2003;15:225–40.
- [21] Labreuche Y, Soudant P, Goncalves M, Lambert C, Nicolas J-L. Effects of extracellular products from the pathogenic *Vibrio aestuarianus* strain 01/32 on lethality and cellular immune responses of the oyster *Crassostrea gigas*. *Dev Comp Immunol*; in press.
- [22] Wittner C. Rapid cycle real-time PCR: methods and applications. In: Meuer S, Wittner C, Nakagawa K, editors. *Rapid cycle real-time PCR: methods and applications*. Heidelberg, Germany: Springer; 2001. p. 1–8.
- [23] Takahashi KG, Mori K. Participation of reactive oxygen intermediates in the killing of ingested bacteria by *Crassostrea gigas* hemocytes. *Suisanzoshoku* 2001;49:389–96.
- [24] Ishikawa H, Takahashi KG, Mori K. Annual changes in maturation of the gonad and phagocytic activity in hemocytes of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in onagawa bay, miyagi prefecture. *Suisanzoshoku* 1999;47:519–25.
- [25] von Heijne G. A new method for predicting signal sequence cleavage sites. *Nucleic Acids Res* 1986;14:4683–90.
- [26] Bairoch A, Bucher P, Hofmann K. The PROSITE database, its status in 1997. *Nucleic Acids Res* 1997;25:217–21.
- [27] Jaspers M, de Strooper B, Spaepen M, van Leuven F, David G, van den Berghe H, et al. Post-translational modification of the  $\beta$ -subunit of the human fibronectin receptor. *FEBS Lett* 1988;231:402–6.
- [28] Hirokawa T, Boon-Chieng S, Mitaku S. SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins. *Bioinformatics* 1998;14:378–9.
- [29] Pytela R, Suzuki S, Breuss J, Erle DJ, Sheppard D. Polymerase chain reaction cloning with degenerate primers: homology-based identification of adhesion molecules. *Methods Enzymol* 1994;245:420–51.
- [30] Bergelson JM, Hemler ME. Do integrins use a 'MIDAS touch' to grasp an Asp? *Curr Biol* 1995;5:615–7.
- [31] Tozer EC, Liddington RC, Sutcliffe MJ, Smeeton AH, Loftus JC. Ligand binding to integrin  $\alpha_{\text{m}}\beta_3$  is dependent on a MIDAS-like domain in the  $\beta_3$  subunit. *J Biol Chem* 1996;271:21978–84.
- [32] Lewis JM, Schwartz MA. Mapping in vivo associations of cytoplasmic proteins with integrin  $\beta_1$  cytoplasmic domain mutants. *Mol Biol Cell* 1995;6:151–60.
- [33] O'Toole TE, Ylanne J, Culley J. Regulation of integrin affinity states through an NPXY motif in the  $\beta$  subunit cytoplasmic domain. *J Biol Chem* 1995;270:8553–8.
- [34] Hughes PE, O'Toole TE, Ylanne J, Shattil SJ, Ginsberg MH. The conserved membrane-proximal region of an integrin cytoplasmic domain specifies ligand binding affinity. *J Biol Chem* 1995;270:12411–7.
- [35] Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequences weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 1994;22:4673–80.
- [36] Takahashi KG, Yanai H, Muroga K, Mori K. Morphology and phagocytic activity of hemocytes from the Japanese rock oyster *Crassostrea nippona* and the Pacific oyster *C. gigas*. *Aquacult Sci* 2005;53–9.
- [37] Hine PM. The inter-relationship of bivalve haemocytes. *Fish Shellfish Immunol* 1999;9:367–85.
- [38] Chagot D. Caractérisation morphologique et fonctionnelle des hématocytes d'*Ostrea edulis* et de *Crassostrea gigas*, mollusques bivalves. Etude in vitro de leurs interactions avec le protozoaire *Bonamia ostreae* (ascetospora). PhD thesis, l'école pratique des hautes études, Paris; 1989.
- [39] Takahashi KG, Mori K. Functional profiles of hemocytes in the bio-defense process of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Tohoku J Agric Res* 2000;51:15–27.
- [40] Foley DA, Cheng TC. Quantitative study of phagocytosis by hemolymph cells of pelecypods *Crassostrea virginica* and *Mercenaria mercenaria*. *J Invertebr Pathol* 1975;25:189–97.
- [41] McCormick-Ray MG, Howard T. Morphology and mobility of oyster hemocytes: evidence for seasonal-variations. *J Invertebr Pathol* 1991;58:219–30.
- [42] Auffret M. Comparative study of the haemocytes of two oyster species: the European flat oyster, *Ostrea edulis*, Linnaeus, 1750 and the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793). *J Shellfish Res* 1989;8:367–73.
- [43] Fisher WS, Ford SE. Flow cytometry: a tool for cell research in bivalve pathology. In: Fisher WS, editor. *Disease processes in marine bivalve mollusks*, vol. 18. Bethesda, MD: American Fisheries Society, Special Publication; 1988. p. 286–92.
- [44] Ford SE, Ashton-Alcox KA, Kanaley SA. Comparative cytometric and microscopic analyses of oyster hemocytes. *J Invertebr Pathol* 1994;64:114–22.

- [45] Ashton-Alcox KA, Ford SE. Variability in molluscan hemocytes: a flow cytometric study. *Tissue Cell* 1998;30:195–204.
- [46] Allam B, Ashton-Alcox KA, Ford SE. Flow cytometric comparison of haemocytes from three species of bivalve mollusks. *Fish Shellfish Immunol* 2002;13:141–58.
- [47] Goedken M, De Guise S. Flow cytometry as a tool to quantify oyster defense mechanisms. *Fish Shellfish Immunol* 2004;16:539–52.
- [48] Xue Q-G, Renault T, Chilmonczyk S. Flow cytometric assessment of haemocyte sub-populations in the European flat oyster, *Ostrea edulis*, haemolymph. *Fish shellfish Immunol* 2001;11:557–67.
- [49] Ruddell CL. The fine structure of oyster agranular amebocytes from regenerating mantle wounds in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *J Invertebr Pathol* 1971;18:260–8.
- [50] Pipe RK. Generation of reactive oxygen metabolites by the haemocytes of the mussel *Mytilus edulis*. *Dev Comp Immunol* 1992;16:111–22.
- [51] Anderson RS. Hemocyte-derived reactive oxygen intermediate production in four bivalve mollusks. *Dev Comp Immunol* 1994;18:89–96.
- [52] Carballal MJ, López MC, Azevedo C, Villalba A. In vitro study of phagocytic ability of *Mytilus galloprovincialis* Lmk haemocytes. *Fish Shellfish Immunol* 1997;7:403–16.
- [53] Nakayama K, Nomoto AM, Nishijima M, Maruyama T. Morphological and functional characterization of hemocytes in the giant clam *Tridacna crocea*. *J Invertebr Pathol* 1997;69:105–11.
- [54] Renwranz LR, Yoshino TP, Cheng TC, Auld KR. Size determination of hemocytes from the American oyster, *Crassostrea virginica*, and the description of a phagocytosis mechanism. *Jahrb Zool Abt Physiol Zoomorph* 1979;83:1–12.
- [55] Tripp MR. Agglutinins in the hemolymph of the hard clam, *Mercenaria mercenaria*. *J Invertebr Pathol* 1992;59:228–34.
- [56] Pipe RK, Farley SR, Coles JA. The separation and characterisation of haemocytes from the mussel *Mytilus edulis*. *Cell Tissue Res* 1997;289:537–45.

# 花粉症対策—米国および日本における現状と将来

渡邊伸昌 清野 宏 廣井隆親

わたなべ のぶまさ, ひろい たかちか: 財団法人東京都医学研究機構 東京都臨床医学総合研究所 免疫・感染症研究分野 花粉症プロジェクト, きよの ひろし: 東京大学医科学研究所 感染・免疫部門・炎症免疫学分野

## ● はじめに

アレルギー性疾患は、本来は反応が抑制されるべき（免疫寛容が成立すべき）普遍的な外来抗原（食物、花粉、動物の毛や室内塵など）に対して不適切な免疫反応、とくに IgE 抗体を産生することによって引き起こされる。これは遺伝的要因と環境要因とによってその形質が規定される典型的な多因子疾患であり、花粉症をはじめとして気管支喘息、食物アレルギー、アトピー性皮膚炎、結膜炎などがその代表である。その多くは直接生命を脅かす疾患ではないが、日常生活や社会生活における活動範囲や程度が制限され、いわゆる生活の質（QOL）を低下させるという点で、その克服は重要な医学・社会的課題となっている。また、個々の QOL 低下の総体としての医療費を含めた社会的経済損失も莫大なものになるものと考えられており、その発症が都市化に伴う環境要因を含んでいることを考え合わせると、社会全体として取り組まなければならない重要な問題でもある。

とくに花粉症に関しては、近年、都市部を中心に患者数が年々増加しており、東京都が 2005 年に首都圏を対象に行ったアンケート調査では「医療機関でスギ花粉症と診断された」人が 21.3%、「自覚症状からスギ花粉症と思っている」人は 18.5% で、スギ花粉症の自覚症状のある人の割合は約 4 割に及ぶことが示された。同時に半数以上の人々がスギ花粉症の対策として「根本的な治療法の開発」を要望していることが報告されている。これを受けて、東京都

においては「花粉の少ない森づくり運動」を推進するとともに、施策の重点事業として花粉症の予防・治療対策を掲げている。そこで東京都臨床医学総合研究所では、スギ花粉症に対する根本的な治療法の一つである「舌下減感作療法」の実用化に向けた臨床研究を 2006 年度より開始している。本稿においては、日本における次期花粉症治療法として経粘膜ワクチンのコンセプトに基づいた「舌下減感作療法（sublingual immunotherapy: SLIT）」と「花粉症緩和剤」について解説する。

## ● 花粉症の発症機序

花粉症は発作性のくしゃみ、水様性鼻漏、鼻閉を三主徴とし、IgE 産生に依存した典型的な I 型過敏性アレルギーに分類される。また、花粉症の特徴として大量のアレルゲンに曝露されることによる他組織（眼、口腔、咽頭、皮膚など）における炎症や発熱、頭痛といった全身症状を合併することが多い。多くの場合、原因抗原（アレルゲン）の特定は可能であるが、他の多因子疾患と同様、個々においてその発症原因を分子レベルで特定し、説明することは非常に困難である。次に抗原曝露から症状の出現に至る過程を概説する（図 1）。

### 1 スギ花粉症のアレルゲン

花粉症の原因となるアレルゲンはその植物の植生により地域、国ごとに異なる。米国ではブタクサによる花粉症が多数を占めるのに対し、日本ではスギ花粉によるものが花粉症全体の

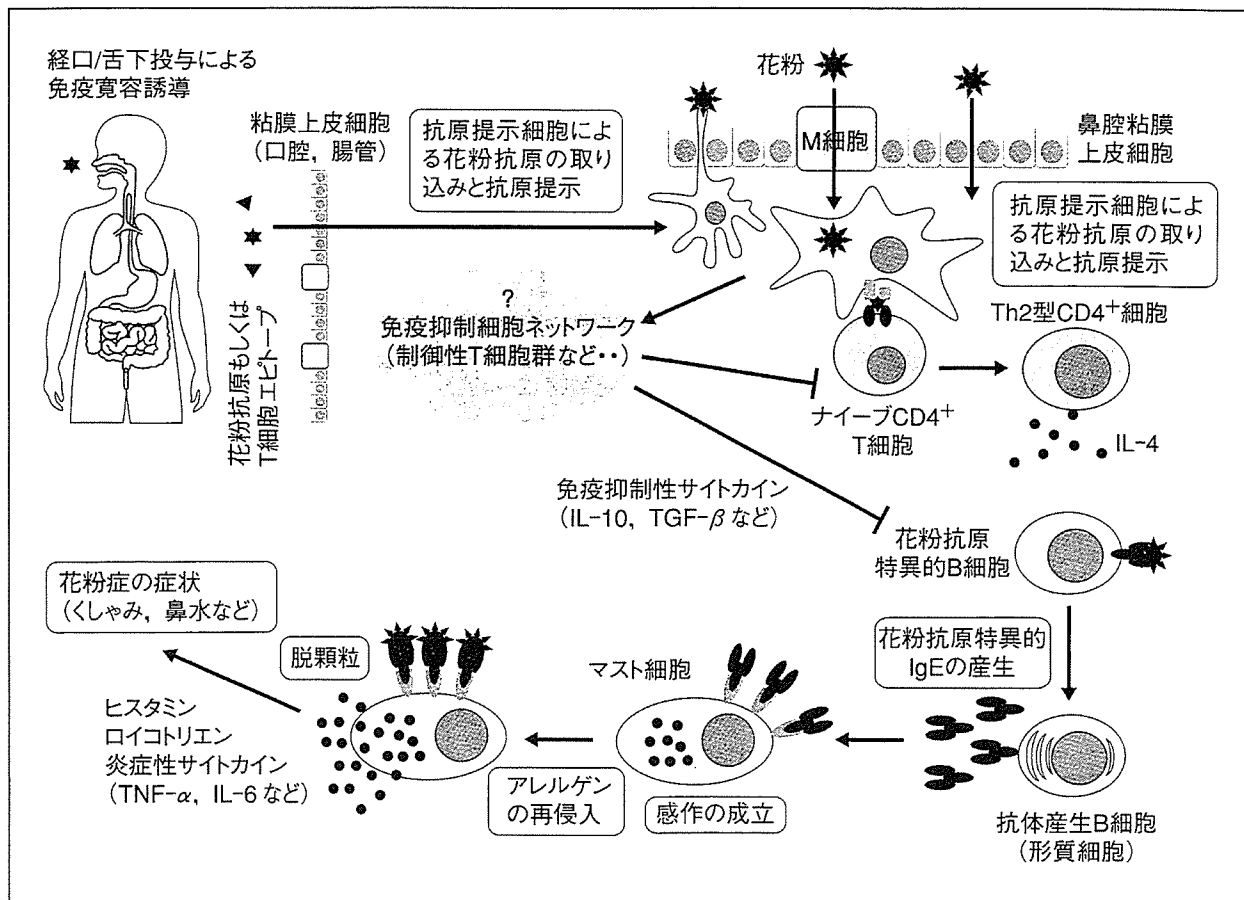


図 1 花粉症発症と免疫寛容成立の概略

約 8 割であると考えられている。スギ花粉に含まれるアレルゲンとして 5 種類の蛋白質が報告されているが、臨床的意義が示され、かつもっとも強力なアレルゲンとされるのが Cryj 1 と Cryj 2 であり、詳細な免疫・生化学的解析がなされている<sup>1,2)</sup>。

## 2 アレルゲンによる感作

主として鼻粘膜より吸入された花粉抗原（アレルゲン）は、樹状細胞やマクロファージなどの抗原提示細胞に取り込まれる。細胞内にて 10~20 アミノ酸程度にまで分解された抗原ペプチド(T 細胞エピトープ)が MHC クラス II 分子とともに細胞膜上に抗原複合体として提示される。その後、成熟過程を経て所属リンパ節へと移行する。抗原複合体を特異的に認識する CD4<sup>+</sup>T 細胞（ヘルパー T 細胞）は抗原提示細胞と相互作用することにより、細胞性免疫を担う Th1 もしくは抗体産生、すなわち液性免疫を促進する Th2 細胞へと分化する。その機能的分

化の方向性は、抗原の種類、抗原提示細胞の分化段階やそれらに基づくサイトカイン産生環境に依存していると考えられている。この分化の方向性、すなわちアレルゲン由来のエピトープを認識する CD4<sup>+</sup>T 細胞が IL-4 や IL-13 を産生する Th2 細胞へと分化することが、他の I 型アレルギー疾患と同様、花粉症においても病態発症へのもっとも重要なステップである。その結果、花粉抗原に対して親和性を有する B 細胞受容体をもった B 細胞が IgE を産生するようになる。産生された花粉抗原特異的 IgE はマスト細胞や好塩基球の細胞膜上の高親和性 IgE 受容体 (FcεRI) に結合し、感作が成立する。

## 3 発症

感作が成立した段階において再び花粉抗原が体内に侵入することにより細胞膜上の IgE が架橋され、細胞内顆粒に蓄積されていたヒスタミンをはじめとするケミカルメディエーターが放出されるとともに、ロイコトリエンなどの脂質

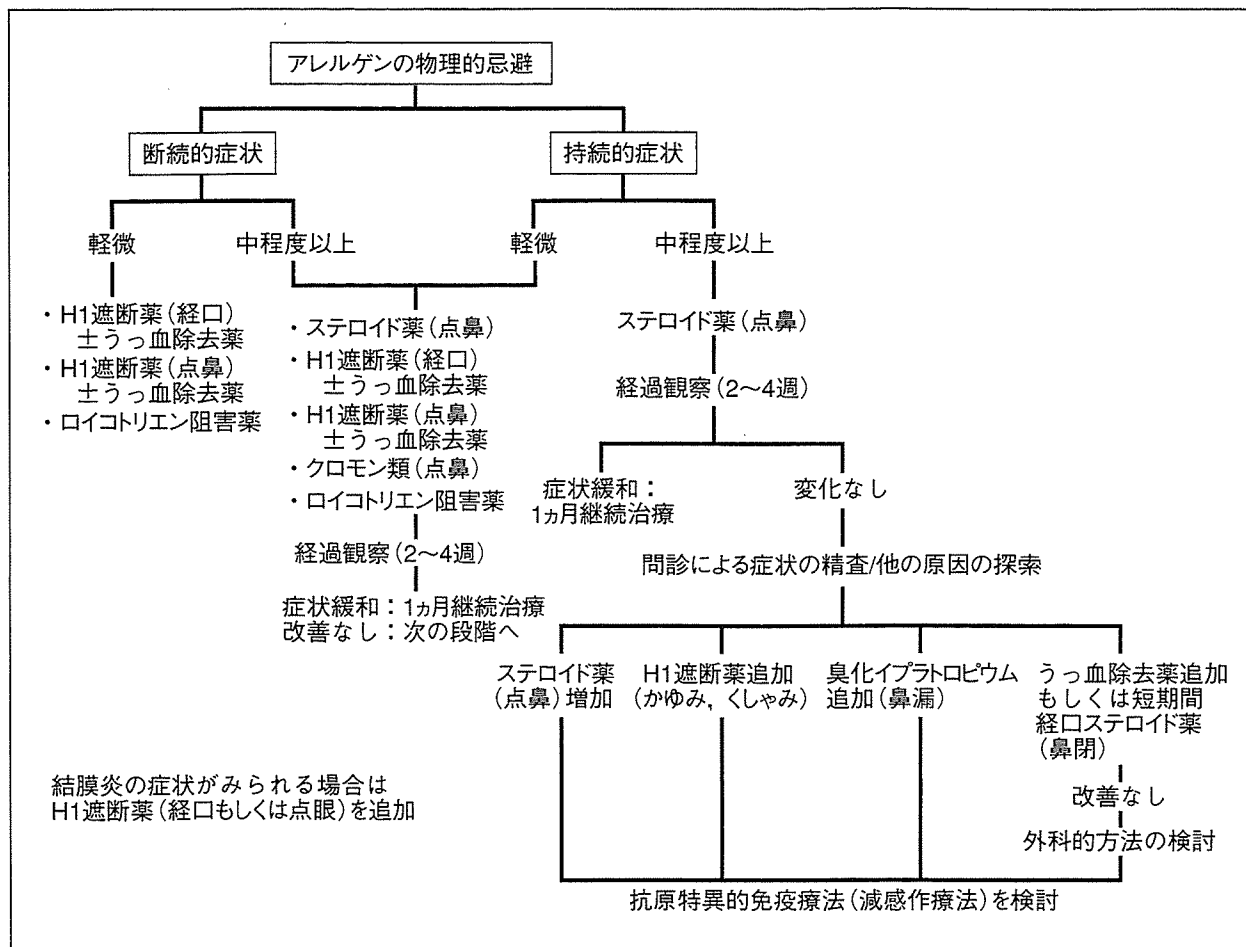


図 2 成人のアレルギー性鼻炎における段階的治療 (文献 3, 4 より引用)

メディエーターが産生され、種々のアレルギー症状を惹起する。

### ● 花粉症に対する治療法

花粉症に対する治療法としては、他のアレルギー疾患と同様、対症療法が中心に行われてきた。上述の花粉抗原吸入から発症に至るカスケードを遮断することを目的として、さまざまな分子を標的とした薬剤が考案されている。具体的には抗ヒスタミン薬や抗ロイコトリエン薬をはじめとして、抗IgE抗体やTh2優位に傾いた免疫反応をTh1優位に誘導するさまざまな方法が実施もしくは考えられている。一方、外科的方法も含めて物理的に花粉の侵入を阻止する方法も有効である。これらの方法は症状緩和という観点からは非常に優れており、とくに症状が軽微な場合には有効かつ十分であると考えられる。米国においても、図2にみられるよう

な症状の程度などに応じて段階的な対症療法がとられている<sup>3,4)</sup>。

一方、これらとは対照的に、アレルギーに対して免疫寛容を成立させることにより根本的な治療効果を有すると考えられているのが、抗原特異的な免疫療法である減感作療法である。その分子レベルでの作用機序に関しては不明な点が多く残されているが、その臨床的治療効果に関してはすでに認知されたものとなっている<sup>5)</sup>。しかしながら同じアレルギーに対して、副作用の一つであるアナフィラキシーショックなど重篤な場合を含めて過剰な免疫反応を惹起するか、もしくは免疫抑制、すなわち免疫学的寛容状態に導くかという、まったく正反対のアウトプットをもたらす機序に関しては不明であり、いかにその方向性を正確に臨床的コントロールするかがもっとも重要な課題といえる。実際、アレルギーの投与量、投与方法や部位によ

り治療効果が異なるとともに、個々人の年齢や体質による差異があることも報告されており、現在はより効率的かつ安全に免疫寛容を誘導する方法論の模索が精力的になされている。

### ● 舌下減感作療法：経口免疫寛容を利用したアレルギー治療<sup>6,7)</sup>

現在、減感作療法として日本で行われているのは注射を用いた皮下投与のみである。その効果に関しては認知されているが、実施できる専門医が限られているうえ、数年間にわたる通院が必要とされることから、より簡便で安全性の高い投与方法が望まれている。そのなかで、粘膜免疫組織の一つである、舌下より抗原を吸収することで免疫寛容を誘導する方法、舌下減感作療法が、ヨーロッパを中心に進められており、米国もそれに追従するかたちで臨床検討が行われている。現在、治験が行われてから20年ほど経過しているが、いまだアナフィラキシーなど重篤な副作用の報告はなく、ヨーロッパでは実用化に至っている。米国および日本においても、多くの症例に基づく治験の集積が進行中であり、安全性・効果に関して確立されつつある。しかしながら、実用化段階においてはコストに関する問題点、および多くのアレルギー性鼻炎が複数のアレルギーに対するものであり、かつ個々人において差異があることに起因する問題点が指摘されている<sup>8)</sup>。

われわれの研究室では2006年度より、舌下減感作療法によるスギ花粉症の治療効果における個人の差異が、どのようなメカニズムによって生まれるのかに関して検討を行っている。本方法の実用化に向けた課題の一つとして、個々人による効果の差異が指摘されており、いわゆる遺伝学的な体質に起因することが想定されている。したがって、その関連を明らかにすることにより、効率的な個々人に適した治療法の選択、いわゆるオーダーメイド治療が可能であると考えられる。さらに、その分子機序を知ることにより、減感作療法が適さない個人に対してもより高い効果が期待できるような投与方法の開発が期待される。

一方、減感作療法におけるアレルゲンの投与形態として、腸管における免疫寛容を利用することにより、経口で行おうとする方法が考案されている。病原性微生物に対する感染防御を目的とし、食物中に抗原蛋白質を蓄積させた「食べるワクチン」を、アレルギー疾患に対する減感作療法に応用したものである<sup>9)</sup>。ここでは最近開発されたスギ花粉症に対する「花粉症緩和米」に関して触れておく。

### ● スギ花粉症緩和米<sup>10)</sup>

前述のように花粉症を含むI型アレルギー疾患の発症においては、アレルゲン由来のT細胞エピトープを認識するCD4<sup>+</sup>T細胞がTh2型へと機能的分化することがもっとも重要なステップである。したがってどのような抗原蛋白質を発現させ、安全で、かつ効果的にCD4<sup>+</sup>T細胞に対して免疫寛容を成立させるかが非常に重要である。そこでスギ花粉症緩和米では、先に触れた強力なスギ花粉アレルゲンであるCryj1とCryj2蛋白質そのものではなく、それらアレルゲン由来のT細胞エピトープ(10~20アミノ酸)を用いている。したがって、B細胞エピトープを除去するのと同じくIgEに結合する可能性を排除し、アナフィラキシーなど副作用のない安全な抗原となる。しかしながら短いペプチドを効率的に発現させるのは困難であるゆえ、複数のCryj1とCryj2由来のT細胞エピトープを連結し、ダイズの貯蔵蛋白質であるグリシニンとの融合蛋白質として発現させることにより上記の課題を克服し、安定に発現・蓄積させることに成功している。また米のどこに多量に発現させるかも重要であるが、米の主要な貯蔵蛋白質であるグルテリンをコードする遺伝子のプロモーターを用いて米の蛋白質顆粒に蓄積させた。このようにして作製された米、スギ花粉症緩和米をマウスに1ヵ月経口投与した後、スギ花粉に対するアレルギー反応を検討した結果、血中の花粉抗原特異的なIgE産生、CD4<sup>+</sup>T細胞の増殖およびヒスタミン産生のいずれも抑制されているとともに、花粉症の主徴の一つである発作的なくしゃみの回数も強く軽減されていた。



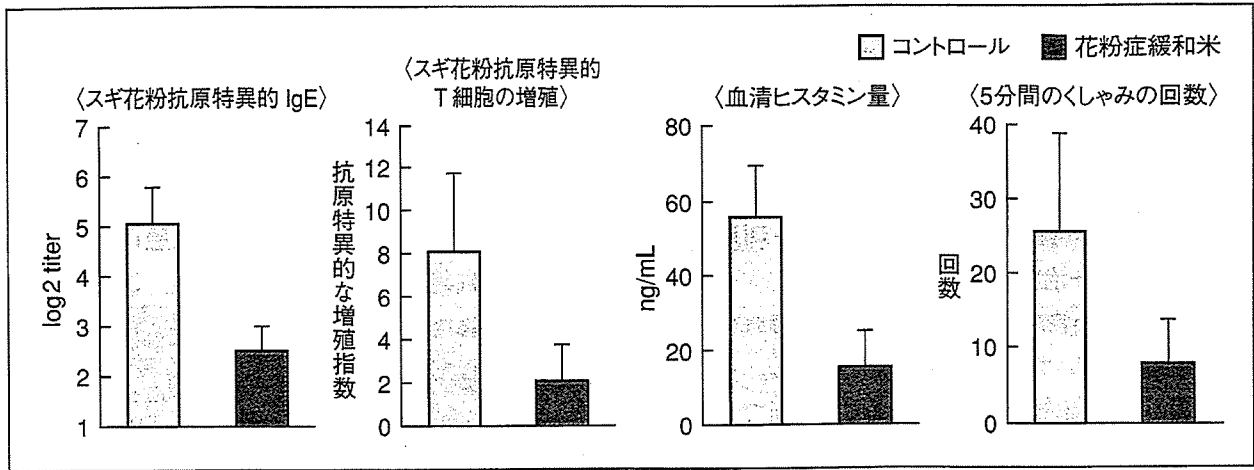


図 3 マウスにスギ花粉症緩和米を 1 カ月経口投与した花粉症症状の緩和効果

したがってモデルマウスを用いた実験において、スギ花粉症緩和米は花粉症の症状の緩和に予防的効果を有することが示された(図 3)。今後は、すでに花粉症に罹患しているモデルマウスに対する治療効果に関して検討を加えていかなければならない。

### ● おわりに

花粉症に対する治療としては抗ヒスタミン薬を代表とする対症療法が中心であり、症状緩和という点では非常に有効である。一方で免疫寛容、とくに粘膜免疫系を経由した減感作療法が次世代の根本的な治療法として注目されてくるものと思われる。その過程においてより効果的で安全な投与方法の開発とともに、免疫寛容成立の分子機序の解明も急務であると考えられる。今後の臨床的および基礎的研究の進展により、花粉症のみならず現代において拡大の一途をたどる種々のアレルギー疾患や自己免疫疾患を克服する有用な知見が得られるものと思われる。

### 文献

- 1) Hirahara K, Saito S, et al. J Allergy Clin Immunol 1998 ; 102 : 961-7.
- 2) Hirahara K, Tatsuta T, et al. J Allergy Clin Immunol 2001 ; 108 : 94-100.
- 3) Greiner AN, Meltzer EO. J Allergy Clin Immunol 2006 ; 118 : 985-96.
- 4) Greiner AN. Med Clin North Am 2006 ; 90 : 17-38.
- 5) Durham SR, Walker SM, et al. N Engl J Med 1999 ; 341 : 468-75.
- 6) Baena-Cagnani CE, Passalacqua G, et al. Curr Opin Allergy Clin Immunol 2005 ; 5 : 173-7.
- 7) Moingeon P, Batard T, et al. Allergy 2006 ; 61 : 151-65.
- 8) Cox LS, Linnemann DL, et al. J Allergy Clin Immunol 2006 ; 117 : 1021-35.
- 9) Ma JK, Drake PM, et al. Nat Rev Genet 2003 ; 4 : 794-805.
- 10) Takagi H, Hiroi T, et al. Proc Natl Acad Sci USA 2005 ; 102 : 17525-30.

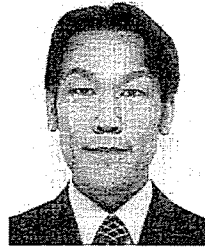
謝辞 本研究の一部は、2003 年度学術フロンティア助成金にて独立行政法人農業生物資源研究所、東京大学医科学研究所、および島根大学医学部との共同研究で行われたものであり、研究協力者の皆様に深謝いたします。

# 1 スギ花粉症緩和米による予防効果

Prevention of pollen allergy against Japanese cedar by rice based edible vaccine expressing multiple T cell epitopes.

- 1) (財) 東京都臨床医学総合研究所  
2) (独) 農業生物資源研究所  
3) (財) エイズ予防財団

よこやま せいじ すずき かずや  
横山 清司<sup>1, 3)</sup>, 鈴木 一矢<sup>1, 2)</sup>  
たかいわ ふみお ひろい たかちか  
高岩 文雄<sup>2)</sup>, 廣井 隆親<sup>1)</sup>



横山 清司  
1999年東京農工大学卒業。2001年大阪大学医学系研究科修士課程終了後、テキサス大学(UTSW)、オクラホマ大学(OUHSC)留学。東京大学医学研究所勤務を経て06年より東京都臨床医学総合研究所でエイズ予防財団リサーチレジデントとして勤務。現在のテーマは HIV 粘膜ワクチン、アレルギー、自己免疫疾患。

Key words : 花粉症緩和米, 減感作療法, 経口免疫寛容, 粘膜免疫, アレルギー

## Abstract

花粉症は日本の国民病と呼ばれるほど患者数の多いアレルギー疾患だが、現在の治療法は薬剤投与や外科手術等の対処療法がメインである。唯一根本的な治療法である皮下減感作療法も長期間抗原を注射する必要性とアナフィラキシーショックのリスク等から優先的な治療法にはなっていない。そこで我々は食べるワクチンのコンセプトを経口減感作療法に利用した「花粉症緩和米」を開発した。この米を与えたマウスでは通常の米を与えたマウスと比較して花粉抗原の感作時のアレルギー反応が顕著に抑制されていた。今後はモデル動物を用いた治療への展開が期待されている。

## 1. 背景

アレルギー疾患にはダニ、ハウスダスト、食物等、様々なものが知られているが、その中でも花粉症は日本において最も患者数の多

いアレルギー疾患である(全国民の15%から20%)。幼少期にアレルギー症状がなくても成人になってからある日突然発症することも多く、潜在的な花粉症患者は相当数存在すると予測されている。事実、花粉症は40年ほど前に初めてアレルギー症状が確認されて以来、その罹患数は年々増加の一途をたどっている。

花粉症を引き起こす抗原としては日本ではスギ花粉が最も多く、花粉症全体の約8割がスギ花粉に依るものと考えられている。そのほかにもヒノキ、ブタクサ、イネなど、ほぼ一年を通しさまざまな植物に対して花粉症の患者が確認されている。また、食生活の乱れ、不規則な生活、ストレス、大気汚染等も花粉症の発症に関与する要因であると考えられている。花粉症患者を悩ませるスギ花粉は、毎年2月上旬から飛散が始まり、3月中旬から4月にかけてピークを迎え、5月の初旬におさまってくる。この間の患者数は、約2,200万とも言われており、その症状によっては作業効率ならびに学習効率の低下、さらに国負担の医療費の高騰が社会的問題にな

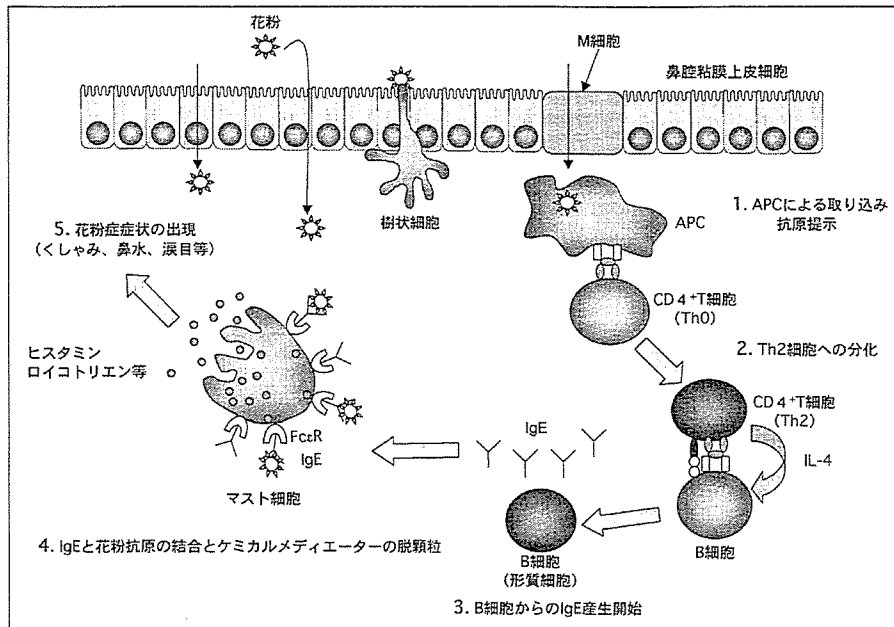


図1 花粉症発症のメカニズム

## 2. 花粉症発症のメカニズム

花粉症はアレルギー分類の中で1型過敏性アレルギー（IgE依存型）に属し、その発症の詳細なメカニズムは未だ不明な点が多いが、これまでの研究により以下の1→5の過程を経た花粉症発症モデルが提唱されている（図1）。

1) 鼻粘膜などから体内に取り込まれた花粉抗原が、マクロファージや樹状細胞

などの抗原提示細胞に取り込まれ細胞内でアミノ酸十数個にまで分解された物がT細胞エピトープとして細胞表面に抗原提示される。

2) 抗原提示細胞のMHC class IIに提示されたエピトープとT細胞受容体の結合によってナイーブT細胞は成熟したヘルパーT細胞（Th1またはTh2）に分化する。ナイーブT細胞からアレルギー反応を担うTh2細胞への分化誘導には、サイトカイン、抗原の構造やその濃度、副刺激分子の関与、微生物の影響等が報告されている。

3) 抗原特異的なTh2細胞の接触がB細胞を活性化し、Th2細胞から産生されるIL-4が抗体産生能力を獲得したB細胞にクラススイッチを起こさせIgE抗体を産生させる。また、IL-4はナイーブのT細胞にも作用してTh2細胞へ分化させ、さらなるIgE抗体の産生を促進する。

4) B細胞から分泌されたIgE抗体が肥満細胞や好塩基球上のFcεレセプターに結合し、そこに再び花粉が入ってくると脱顆粒が起こり

っている。これまでに花粉症対策として国や地方自治体において様々な対策が講じられ、また製薬会社による新規治療薬の研究開発も進められているが、依然として花粉症罹患数の減少が認められていない。

現行の花粉症対策としては、1.マスクなどによる抗原の吸引予防、2.抗アレルギー剤、抗ヒスタミン剤などに代表される薬剤投与、3.外科手術、4.抗原を長期に渡って皮下注射する免疫減感作療法等があげられる。しかし現在唯一の根本治療法である皮下減感作療法ですらおよそ3年以上の通院が必要であり、治療を受ける患者側に大きな負担ならびに苦痛を強いることになる。このことから治療にいたる簡便で効果的な治療法の確立が医療並びに社会的に急務であることは言うまでもない。

そこで本稿では、皮下減感作療法に代わる次世代のアレルギー治療法として、我々の開発している「スギ花粉症緩和米を用いた減感作療法」を解説する。

表 これまでに行われている花粉症の治療法

	種類	長所	短所
薬剤	抗ヒスタミン剤 抗アレルギー剤		短時間の効果
	ステロイド剤 血管収縮剤 抗コリン剤 等	簡便かつ即効性あり	薬剤に対する無反応、 耐性の誘導の可能性
外科手術	レーザー治療	比較的簡便 (手術時間数十分) x 数回	数年間で再発の可能性
	超音波メス治療		鼻以外の反応 (涙目等) は抑えられない
	ラジオ波治療 等	薬剤よりも長期間の効果	
減感作療法	希釈抗原の 皮下注射	根治可能	長期間の通院 注射による肉体的苦痛 アナフィラキシー ショックの危険性

ヒスタミンやロイコトリエンなどのケミカルメディエーターを放出する。

5) 各種ケミカルメディエーターは鼻粘膜など実行組織に作用して、炎症反応や花粉症に見られる各種アレルギー反応 (くしゃみ, 鼻水, 目の痒みなど) を引き起す。

以上の経過を経て花粉症が発症すると考えられており、現在それぞれのプロセスを抑制する治療薬の研究開発が精力的に進められている。

### 3. 現在の花粉症治療法

現在花粉症治療には薬剤の投与を中心に外科的処置や免疫減感作療法等が行われているが、各治療法にはそれぞれ一長一短がある (表)。抗ヒスタミン剤や抗アレルギー剤などの薬剤による治療は即効性がありアレルギー症状の緩和に有効だが、薬が代謝されるまでの一時的な効果しか期待できない。さらに投与量や投与回数によっては薬剤に対して耐性または無応答が誘導され、薬剤効果が次第に減少する可能性もある。一方、外科的手法としてレーザーなどで鼻粘膜の表層組織を焼くことで局所的なアレルギー反応を抑える方法

も行われている。しかしながらこの方法は鼻水・鼻づまりを押さえるには有効だが、1, 2年後には症状が再発する。現在のところ唯一の根本的な治療法として、皮下減感作療法が知られている<sup>1)</sup>。

これは少量の抗原を注射で反復投与することにより、過剰なアレルギー反応を徐々に抑制する方法である。しかしながらこの方法は、実施できる専門医が限られているうえ、

週に1, 2度、数年間にわたって希釈した抗原を注射する必要がある。またまれに抗原の注射によってアナフィラキシーショックを引き起こす危険性があるため、適切な医療管理のもとでのみ有効な花粉症の治療法として考えられている。このように現在施行されている花粉症対策はそれぞれ多くの問題を抱えているというのが現状である。

### 4. 経口免疫寛容

そこで我々は患者に負担の少ない新たな減感作療法として、食品を用いた花粉症治療法の開発を試みている。これは近年注目を集めている「粘膜免疫学」において研究が進んでいる「経口免疫寛容」を利用してスギ花粉抗原に対する寛容を誘導し、花粉症の予防、治療を試みようというものである。我々が毎日食べる食品に対して特殊な事情が無い限り免疫応答が起こらないことから理解できるように、経口で投与された食物 (抗原) が胃で消化され腸から取り込まれた場合、抗体産生などの抗原特異的な免疫反応 (正の免疫応答) を引き起こすよりも、抗原特異的な免疫の抑制や寛容 (負の免疫応答) を誘導するという

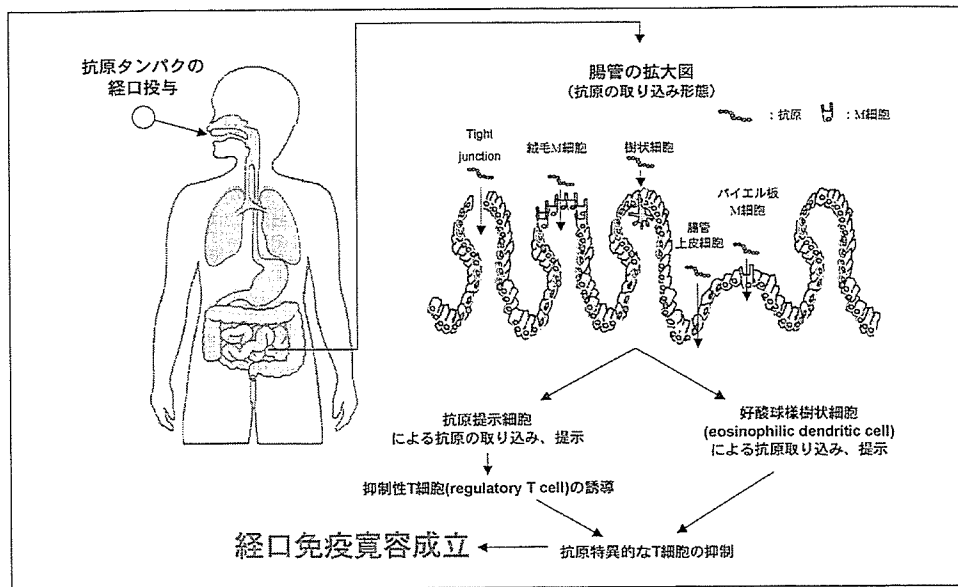


図2 経口免疫寛容誘導のモデル

現象が知られている<sup>2)</sup> (図2)。

通常食物タンパクは胃、膵臓、小腸などの分泌する消化酵素の働きでアミノ酸レベルまで分解されて、小腸の吸収上皮細胞の膜上に存在するアミノ酸トランスポーターの働きによって細胞内に取り込まれる。そして小腸の絨毛中に張り巡らされた毛細血管に運ばれ、栄養素として全身に運搬される。消化の不十分な4アミノ酸以上の結合物（ペプチド）の腸管への取り込みにはいくつかの経路が報告されている。その代表はM細胞という腸管のパイエル板上に存在する抗原取り込みに特化した細胞を介した経路である。M細胞から取り込まれた抗原は、その下部に存在するポケット構造に集まった樹状細胞に伝達される。また近年、パイエル板以外の絨毛上皮にもM細胞と細胞表面抗原の発現パターンの似た絨毛M細胞が存在し、抗原取り込みに関わっていることが示唆されている<sup>3)</sup>。またM細胞以外にも樹状細胞が直接上皮間から樹状突起を伸ばし抗原を取り込んだり、抗原が上皮細胞間のタイトジャンクションを溶かして侵入したり、上皮細胞がエンドサイトーシ

スとエクソサイトーシスによって抗原を通過させたりする現象も報告されている。粘膜バリアーである上皮から抗原が入ると、続いて樹状細胞などの抗原提示細胞が抗原を取り込み、種々の条件により免疫応答か、寛容かが決定される。経口免疫寛容の誘導に

重要な因子としては、抗原の量、抗原の形状、様々なサイトカインなどの液性因子、投与されるホストの遺伝的素因、年齢などが報告されているが詳細は不明な点が多い。経口免疫寛容はhigh-dose toleranceとlow-dose toleranceというメカニズムの異なる二種類に大別されることが知られている。大量の抗原投与で一度に免疫寛容が起こるhigh-dose toleranceでは抗原特異的T細胞に除去または抗原に対するT細胞の無反応が誘導され、少量の抗原の反復投与により寛容を誘導するlow-dose toleranceでは抗原特異的T細胞の増殖が抑制(suppression)されることが知られている<sup>4)</sup>。

この抗原特異的T細胞の抑制には、主に抑制性サイトカインであるIL-10やTGF- $\beta$ など産生する制御性T細胞(regulatory T cell)が重要と考えられているが、最近我々は小腸粘膜固有層に制御性T細胞の非存在下でも経口免疫寛容を誘導する能力を持った好酸球様樹状細胞を見出した(論文投稿中)。この細胞は全身性の寛容でも重要な役割を果たす制御性T細胞とは独立した、腸管免疫特異的な抑制システムと考えられる。

また最近の報告では、末梢で抗原を取り込んだある種の樹状細胞は末梢から胸腺に移動して胸腺内の抗原特異的T細胞をアポトーシスにより除去していることが報告された<sup>5)</sup>。このことは中枢性免疫寛容と末梢性免疫寛容が密接にリンクしていることを示唆しており興味深い。

## 5. 経口免疫寛容を用いたアレルギー治療の可能性

経口免疫寛容を用いたアレルギー治療には、皮下減感作療法と比較して、大量の抗原を摂取させることができ、かつアナフィラキシーショックの危険性が低いこと等の利点がある。さらに投与する抗原の安全性を高めるために、抗原タンパク質全長を使用するのではなく、抗原特異的なT細胞が認識するT細胞エピトープのみを経口投与する方法も試みられている。T細胞エピトープのみの投与であれば、抗原タンパク質に含まれるIgE抗体の結合領域を除くことが可能のため、Fcεレセプターに結合したIgEが抗原と結合できず、アレルギーの発症を抑制しながらの寛容の誘導が期待できる。

## 6. 遺伝子組み換え作物を用いた免疫療法

近年、食物中に細菌やウイルスの抗原タンパク質を蓄積させ、病原性微生物に対する感染防御の機能を持った「食べるワクチン」の開発が世界各国で行われている<sup>6, 7)</sup>。特にジャガイモ、トマト、トウモロコシといった作物に報告例が多い。最近では、トマトにB型肝炎ウイルスの表層抗原を発現させた物や、トウモロコシに病原性大腸菌の易熱性毒素の

Bサブユニットを発現させた例などが挙げられる<sup>8)</sup>。我々はこの食べるワクチンを負の応答である免疫寛容の誘導に応用しようと考えた。免疫寛容の誘導には摂取した抗原の総量(投与量×投与回数)と投与期間が重要である。よって、この経口免疫寛容を用いた花粉症の減感作療法には、その投与物が我々の日常生活において簡便に摂取できる食物であることが望ましい。そこで我々は日本人の主食であるイネにスギ花粉抗原のT細胞エピトープを蓄積させた「花粉症緩和米」を開発し、マウスに摂食させることでその効果を検証したので、以下に解説する<sup>9)</sup>。

## 7. スギ花粉症緩和米

我々がT細胞エピトープを摂取するための媒体としてイネを選んだ背景には次のような理由がある。

- 1.日本人の主食であること。
- 2.イネは長期間保存ができ、かつ安定であること(塊茎や果肉とは異なり、種子は低温施設無しで長期間安定であり、保存のコストが非常に安い)。
- 3.イネは形質転換の系が安定しており、外来遺伝子の部位特異的な発現、目的産物の蓄積が比較的容易であること。
- 4.イネは自家受粉植物であり、花粉の飛散距離は数メートル程度しかないため、遺伝子核酸防止措置が容易であること(同じ穀物であるトウモロコシでは花粉の飛散距離が大きい。ため、数年前にアメリカやオーストラリアで病害虫抵抗性の遺伝子組換えトウモロコシの花粉が周囲に飛散し社会問題にまで発展した事例もある。)等が挙げられる。以上の点を満たすイネは外来遺伝子の発現用植物として

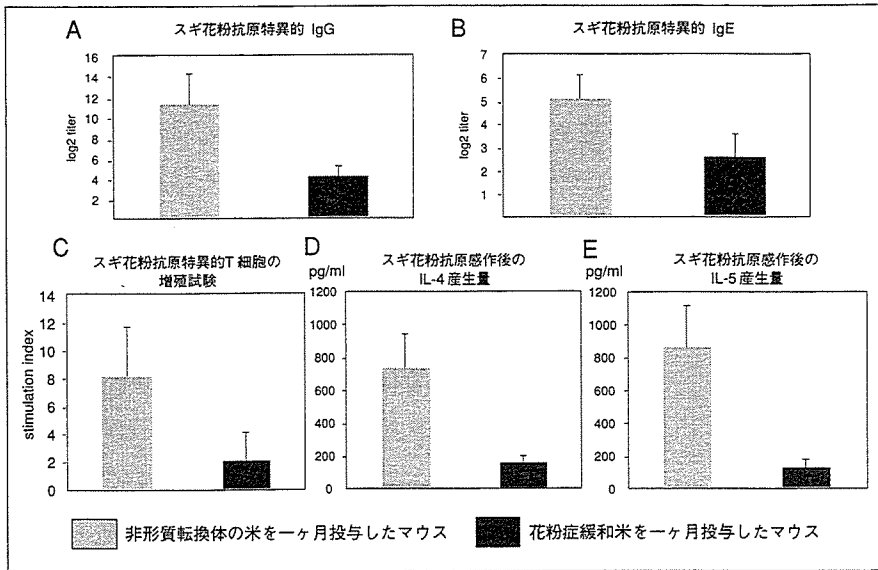


図3 花粉症緩和米による免疫応答抑制効果

優れていると言える。

スギ花粉中のアレルゲンタンパクは既に数種類同定されており、それぞれに存在するT細胞エピトープの解析結果も報告されている。我々はスギ花粉において最も強いアレルゲンタンパクとされているCryJIおよびCryJIIのT細胞エピトープをコードする遺伝子配列を人工合成した。その際に目的エピトープペプチドの細胞内での安定性を向上させるために、種子貯蔵タンパク質をコードする遺伝子配列を連結し融合タンパク質としてデザインした。また、目的遺伝子配列はイネ種子中で翻訳されやすいように、イネの種子貯蔵タンパク質によく用いられているコドンに合わせ最適化した。遺伝子の発現には、イネの種子に特異的かつ多量に集積している貯蔵タンパク質遺伝子のプロモーター領域を用いた。以上のDNA配列をアグロバクテリウムという土壌細菌を介してイネに組み込み、形質転換イネ（以下花粉症緩和米と表記）を得た。そして、得られた花粉症緩和米を収穫し、エピトープの蓄積量を算出した結果、種子貯蔵タンパク質の全量の約0.5～0.6%であった

（米1粒約20mg中に含まれるタンパク質は1.2～1.4mg、その中に蓄積したエピトープタンパク質は約7mgと算出）。

## 8. 投与方法とその効果

得られた花粉症緩和米、あるいはコントロールとして用いた非形質転換体のイネをマウスに一ヶ月間経口投与したのち、スギ花粉抽

出物と水酸化アルミニウムをアジュバントとしてマウスの腹腔に注射し、スギ花粉に感作された状態にする。一週間ごとに血液を採取して血清中に含まれるスギ花粉特異的なIgGおよびIgEの抗体価をELISA法により測定した。その結果、花粉症緩和米を経口投与したマウスでは、血清中のスギ花粉特異的なIgGおよびIgEの抗体価が非形質転換体のイネを投与したマウスに比べて顕著に抑制されていた（図3 A, B）。またそれに伴い、抗原特異的なCD4<sup>+</sup>T細胞の増殖、血中のTh2サイトカイン（IL-4,5ならびに13）やヒスタミンの産生も抑制されていた（図3 C, D, E）。

この結果は、代表的な二種類のアレルゲン（CryJIおよびCryJII）のT細胞エピトープを蓄積している花粉症緩和米を投与で、種々のタンパクの複合体であるスギ花粉が誘導するアレルギー反応を充分抑制できることを示している。さらに我々は島根大学医学部との共同研究によりアレルギー性鼻炎のモデルマウスを用いて、この花粉症緩和米による花粉症の臨床症状の軽減の可能性を検討した。この実験において感作前に花粉症緩和米を摂食さ

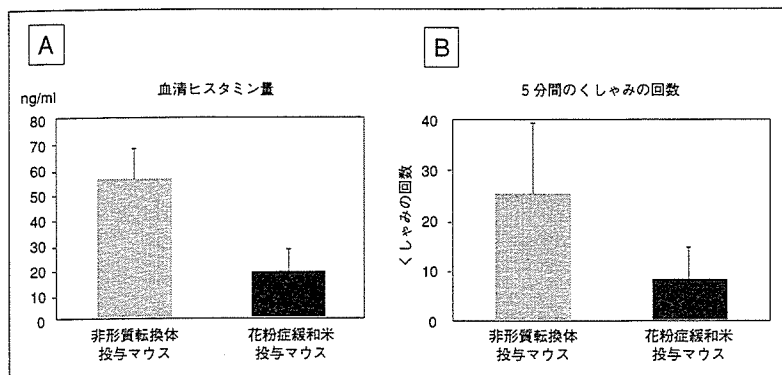


図4 花粉症緩和米によるアレルギー症状緩和効果

せておいたマウスでは、非形質転換体の米を摂食させたマウスと比較して1/4から1/5程度にくしゃみの回数が減少していた。このことから、花粉症緩和米の投与は、抗原特異的な抗体の産生やヒスタミンの放出を抑制するだけでなく、花粉症の主な症状のひとつであるくしゃみも抑制し、モデルマウスにおいて臨床症状様の生理反応の軽減にも効果があることが示された。(図4 A, B)

#### まとめと今後の課題

食物を媒体にしてワクチンや免疫寛容による治療法を試みる場合、遺伝子組換え食物の投与量を日常の摂食量内に調整する必要がある。今回我々がマウスにおいてスギ花粉抽出物に対して免疫寛容を誘導できた花粉症緩和米の投与量を体重をもとにヒトに換算すると、花粉症緩和米一合分で免疫寛容を誘導するために必要なT細胞エピートープを摂取できると概算された。従って、これは実際に摂取する量としては適切な量であり、実用化の面でも十分に期待できると考えられる。一方、この動物実験のデータでは花粉症緩和米によるアレルギー予防効果が実証されたが、今後は既に花粉症に罹患しているモデル動物に花粉症緩和米を摂食させて花粉症の症状を軽減

させるという治療に向けた展開が期待されている。

#### 謝辞

本研究の一部は、2003年度学術フロンティア助成金にて(独)農業生物資源研究所、東京大学医科学研究所、及び島根大学医学部との共同研究で行われたものであり、研究協力者の皆様に深謝いたします。

#### 文献

- 1) Cooke RA, Active immunization in hey fever. *Laryngoscope*. 25: 108-113, 1915.
- 2) Tomasi T B Jr. *Transplantation* 29: 353-356, 1980.
- 3) Myoung Ho Jang, Mi-Na Kweon, Koichi Iwatani, Masafumi Yamamoto, Kazutaka Terahara, Chihiro Sasakawa, Toshihiko Suzuki, Tomonori Nochi, Yoshifumi Yokota, Paul D. Rennert, Takachika Hiroi, Hiroshi Tamagawa, Hideki Iijima, Jun Kunisawa, Yoshikazu Yuki, and Hiroshi Kiyono, Intestinal villous M cells: An antigen entry site in the mucosal epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 101,(16) 6110-6115, 2004.
- 4) Mirna Chehade, Lloyd Mayer. Oral tolerance and its relation to food hypersensitivities *J Allergy Clin Immunol* 115(1):3-12, 2005.
- 5) Roberto Bonasio, M Lucila Scimone, Patrick Schaerli, Nir Grabie, Andrew H Lichtman & Ulrich H von Andrian. Clonal deletion of thymocytes by circulating dendritic cells homing to the thymus. *Nat.Immunol* 7(10): 1092-100, 2006.
- 6) Streatfield, S.I. Mucosal immunization using recombinant plant-based oral vaccines. *Methods*. 38,150-157, 2006.
- 7) Ma, JK. Drake, PM., Christou, P. The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nat. Rev. Genet* 4,794-805, 2003.
- 8) Karaman, S., Cunnick, J., Wang, K. Analysis of immune response in young and aged mice vaccinated with corn-derived antigen against *Escherichia coli* heat labile enterotoxin. *Mol. Biotechnol.* 32, 31-42, 2006.
- 9) Takagi,H., Hiroi,T., Yang,L., Tada,Y., Yuki,Y., Takamura,K., Ishimitsu,R., Kawauchi, H., Kiyono, H., Takaiwa, F. A rice-based edible vaccine expressing multiple T cell epitopes induces oral tolerance for inhibition oh Th2-mediated IgE responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 102,(48)17525-17530, 2005.



# Herpes Simplex Virus 1-Encoded Protein Kinase UL13 Phosphorylates Viral Us3 Protein Kinase and Regulates Nuclear Localization of Viral Envelopment Factors UL34 and UL31

Akihisa Kato,<sup>1,2†</sup> Mayuko Yamamoto,<sup>2†</sup> Takashi Ohno,<sup>1,2</sup> Michiko Tanaka,<sup>4</sup> Tetsutaro Sata,<sup>4</sup> Yukihiro Nishiyama,<sup>2</sup> and Yasushi Kawaguchi<sup>1,2,3\*</sup>

Department of Infectious Disease Control, International Research Center for Infectious Diseases, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo, Minato-ku, Tokyo 108-8639,<sup>1</sup> Department of Virology, Nagoya University Graduate School of Medicine, Showa-ku, Nagoya 466-8550,<sup>2</sup> PRESTO, Japan Science and Technology Agency, Kawaguchi, Saitama, 332-0012,<sup>3</sup> and Department of Pathology, National Institute of Infectious Disease, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8640,<sup>4</sup> Japan

Received 19 September 2005/Accepted 4 November 2005

**UL13 and Us3 are protein kinases encoded by herpes simplex virus 1. We report here that Us3 is a physiological substrate for UL13 in infected cells, based on the following observations. (i) The electrophoretic mobility, in denaturing gels, of Us3 isoforms from Vero cells infected with wild-type virus was slower than that of isoforms from cells infected with a UL13 deletion mutant virus ( $\Delta$ UL13). After treatment with phosphatase, the electrophoretic mobility of the Us3 isoforms from cells infected with wild-type virus changed, with one isoform migrating as fast as one of the Us3 isoforms from  $\Delta$ UL13-infected cells. (ii) A recombinant protein containing a domain of Us3 was phosphorylated by UL13 in vitro. (iii) The phenotype of  $\Delta$ UL13 resembles that of a recombinant virus lacking the Us3 gene ( $\Delta$ Us3) with respect to localization of the viral envelopment factors UL34 and UL31, whose localization has been shown to be regulated by Us3. UL34 and UL31 are localized in a smooth pattern throughout the nuclei of cells infected with wild-type virus, whereas their localization in  $\Delta$ UL13- and  $\Delta$ Us3-infected cells appeared as nuclear punctate patterns. These results indicate that UL13 phosphorylates Us3 in infected cells and regulates UL34 and UL31 localization, either by phosphorylating Us3 or by a Us3-independent mechanism.**

Herpes simplex virus 1 (HSV-1) encodes at least three protein kinases, UL13, Us3, and UL39 (63). This report presents studies of the interaction between UL13 and Us3. The background for these studies is as follows.

First, UL13 is a serine/threonine protein kinase that is packaged in the tegument, a virion structural component located between the nucleocapsid and the envelope (9, 12, 13, 29, 52, 68). UL13 plays a role in viral replication in cell cultures, since UL13 deletion mutants exhibit impaired replication in some cell lines, including rabbit skin cells and baby hamster kidney (BHK) cells (10, 45, 56, 57, 70). Although the mechanism by which UL13 acts in HSV-1-infected cells remains unclear, infection of rabbit skin cells and BHK cells with UL13 deletion mutants reduces the expression levels of the  $\alpha$  protein ICP0 and a subset of  $\gamma$  proteins, including UL26, UL26.5, UL38, UL41, and Us11 (56), suggesting that UL13 is involved in viral-gene expression in infected cells. UL13 would also be expected to function in early postinfection events, since tegument proteins are, in general, released into the cytoplasm of newly infected cells. In agreement with this possibility, phosphorylation of a tegument protein by UL13 has been implicated in promoting tegument disassembly in vitro (40).

Second, UL13 may function by phosphorylating specific viral and cellular proteins. Thus far, gI/gE, ICP0, ICP22, Us1.5, UL47, UL49, p60, elongation factor 1 $\delta$  (EF-1 $\delta$ ), casein kinase II $\beta$  subunit, and RNA polymerase II have been reported to be putative substrates for UL13 (4, 10, 20, 29, 32, 37, 44, 51, 57, 63). However, the biological significance of UL13-mediated phosphorylation in infected cells remains unclear. Since the UL13 amino acid sequence is conserved in all *Herpesviridae* subfamilies (9, 68), UL13 homologues may play a conserved role in herpesvirus replication by phosphorylating common host cellular targets and conserved herpesvirus gene products. The only substrate identified to date that is targeted by UL13 homologues from all *Herpesviridae* subfamilies is the cellular translation factor EF-1 $\delta$  (26, 29, 30, 32). An interesting feature of the interaction between UL13 homologues and EF-1 $\delta$  is that both cellular protein kinase cdc2 and UL13 homologues phosphorylate the same EF-1 $\delta$  amino acid residue (29). These observations suggest that UL13 homologues may share a function that mimics the cellular cdc2 protein kinase (28). This hypothesis is supported by data showing that HSV-1 UL13 phosphorylates the cdc2 site of the casein kinase II $\beta$  subunit in vitro (29). Moreover, reports that the Epstein-Barr virus (EBV) UL13 homologue BGLF4 and cdc2 phosphorylate the same sites of EBV regulatory proteins—EBNA-LP and EBNA-2, which are critical for the transcriptional activities of the proteins—both in vitro and in vivo are consistent with this hypothesis (27, 75, 76).

Third, Us3 is also a serine/threonine protein kinase and is packaged in the virion (18, 55, 62). In contrast to UL13, the

\* Corresponding author. Mailing address: Department of Infectious Disease Control, International Research Center for Infectious Diseases, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo, 4-6-1 Shirokanedai, Minato-ku, Tokyo 108-8639, Japan. Phone: 81-3-6409-2070. Fax: 81-3-6409-2072. E-mail: ykawagu@ims.u-tokyo.ac.jp.

† A.K. and M.Y. contributed equally to this work.

Us3 amino acid sequence is conserved only in the subfamily *Alphaherpesvirinae* (9, 39, 63, 68), and the function of Us3 as a virion component has not been elucidated yet. Us3 is a positive regulator of viral replication, based on studies showing that recombinant Us3 mutant viruses have impaired growth properties in cell cultures and mouse models (49, 62, 65). Increasing data indicate that Us3 plays a role in viral replication by regulating apoptosis. It has been reported that Us3 protein kinase can prevent apoptosis induced by proapoptotic cellular proteins, osmotic shock, and replication-incompetent mutant virus (2, 6, 7, 23, 36, 41–43, 50). Benetti and Roizman have recently shown that Us3 activates protein kinase A (PKA), a cellular cyclic-AMP-dependent protein kinase with phosphorylation target sequences resembling those of Us3, and that both Us3 and PKA phosphorylate the same target protein residues (3). Us3 may express its antiapoptotic activity through phosphorylation of PKA substrates, by activating PKA, and/or by mimicking this cellular protein kinase.

Fourth, Us3 is involved in the nuclear egress of progeny nucleocapsids based on several observations. (i) In cells infected with mutant virus lacking functional Us3, virions were found to accumulate in the perinuclear space in large invaginations of the inner nuclear membrane (62). Similar structures were reported in cells infected with a recombinant pseudorabies virus, a member of *Alphaherpesvirinae*, lacking a Us3-homologous gene (34, 71). (ii) Us3 phosphorylates UL34 and UL31 (25, 58, 65), both of which are critical regulators for primary envelopment of nucleocapsids at the nuclear membrane (61, 64, 74). (iii) Us3 protein kinase activity is required for proper localization of UL34 and UL31 at the nuclear membrane (61, 62, 65). Us3 may function in the nuclear egress pathway by direct or indirect interactions with UL34 and UL31.

We report here studies showing that UL13 phosphorylates Us3 in infected cells and examine some possible effects of this phosphorylation.

#### MATERIALS AND METHODS

**Cells and viruses.** Vero and *Spodoptera frugiperda* Sf9 cells were described previously (29, 69). A human neuroblastoma cell line (SK-N-SH cells) was kindly provided by B. Roizman (University of Chicago, Chicago, Ill.) and maintained in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) containing 10% fetal calf serum (FCS). The HSV-1 wild-type strain HSV-1(F) and UL13 deletion mutant virus R7356 were described previously (17, 29, 56, 69). The Us3 deletion mutant virus R7041 (55) was kindly provided by B. Roizman. The recombinant baculoviruses Bac-GST-UL13 and Bac-GST-UL13K176M were described previously (29).

**Plasmids.** pBluescript II KS(+) (Stratagene) was digested with HindIII, treated with T4 DNA polymerase, and religated to produce pBluescript II KS(+) without the HindIII site. The resultant plasmid was designated pBSΔHdIII. BglII O in pBSΔHdIII was generated by cloning the 5.4-kbp BglII O fragment of pBC1015 (32) into the BamHI site of pBSΔHdIII. pMAL-Us3-P1 and pMAL-Us3-P2 were constructed by amplifying the domains encoding Us3 codons 405 to 481 and codons 254 to 411, respectively, by PCR from pBC1013 (33) and cloning the DNA fragments into pMAL-c (New England BioLabs) in frame with maltose binding protein (MBP). pBC1013 and pBC1015 were kindly provided by B. Roizman.

**Generation of a recombinant virus.** To construct the recombinant virus R7356Rep with a repaired UL13 gene, the UL13 sequences deleted from R7356 were restored by cotransfecting rabbit skin cells with R7356 DNA and BglII O in pBSΔHdIII. Plaques were isolated, purified, and screened by PCR analysis for wild-type UL13 sequences. Restoration of the original sequence was confirmed by Southern blotting.

**Purification of GST fusion proteins from baculovirus-infected cells.** The glutathione S-transferase (GST)-UL13 and GST-UL13K176M proteins were purified

from Sf9 cells infected with Bac-GST-UL13 and Bac-GST-UL13K176M, respectively, as described previously (29).

**Production and purification of MBP fusion proteins.** MBP fusion proteins (MBP-Us3-P1, MBP-Us3-P2, and MBP-LacZ) were expressed in *Escherichia coli* that had been transformed with pMAL-Us3-P1, pMAL-Us3-P2, and pMAL-c, respectively, and purified as described previously (29).

**Antibodies.** Rabbit polyclonal antibodies to Us3, UL34, and UL31 were described previously (14, 21, 25, 66, 78). Chicken polyclonal antibody to UL34 (61) was kindly provided by R. Roller (University of Iowa). Mouse monoclonal antibody to nucleoporin p62 was purchased from Transduction Laboratories.

**In vitro kinase assays.** MBP fusion proteins were captured on amylose beads (New England BioLabs) and used as substrates in in vitro kinase assays with 2 μg of purified GST-UL13 and GST-UL13K176M, as described previously (29). The relative amounts of radioactivity in substrates phosphorylated by GST-UL13 were quantified with the aid of Dolphin Doc and the software Dolphin-1D (Wealtec).

**Immune complex kinase assays.** Vero cells were infected with either HSV-1(F), R7041, or R7356 at a multiplicity of infection (MOI) of 5 PFU per cell. Infected cells were harvested at 12 h postinfection and lysed in radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer (50 mM Tris-HCl [pH 7.5], 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40 [NP-40], 0.5% deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulfate) containing a protease inhibitor cocktail (Sigma). Supernatant fluids obtained after centrifugation of the cell lysate were precleared by incubation with protein A-Sepharose beads (Amersham-Pharmacia) at 4°C for 30 min and then reacted with rabbit polyclonal antibody to Us3 at 4°C for 2 h. Additional protein A-Sepharose beads were added, and the reaction continued for another 1.5 h. Immunoprecipitates were collected by a brief centrifugation; washed twice with high-salt buffer (1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl [pH 8.0], 0.2% NP-40), once with low-salt buffer (0.1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl [pH 8.0], 0.2% NP-40), six times with RIPA buffer, and twice with Us3 kinase buffer (50 mM Tris-HCl [pH 9.0], 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% NP-40, and 1 mM dithiothreitol) (25); and analyzed by in vitro kinase assays. For these assays, Us3 kinase buffer containing 10 μM ATP and 10 μCi [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP was added to the protein A-Sepharose beads (15 μl) containing immunoprecipitated Us3 protein kinase, and the samples were reacted at 30°C for 30 min. After incubation, the samples were washed twice with TNE buffer (20 mM Tris-HCl [pH 8.0], 100 mM NaCl, and 1 mM EDTA) and analyzed by electrophoresis in denaturing gels with or without phosphatase treatment. After electrophoresis, the separated proteins were transferred from the gels to nitrocellulose membranes (Bio-Rad), and the membranes were exposed to X-ray film and then immunoblotted with anti-Us3 antibody.

**Phosphatase treatment.** After the in vitro kinase assays, the MBP fusion proteins or immunoprecipitates were washed twice with TNE buffer and twice with lambda protein phosphatase (λ-PPase) reaction buffer supplemented with 2 mM MnCl<sub>2</sub> (New England BioLabs). Then, λ-PPase reaction buffer containing 2,000 U λ-PPase (New England BioLabs) was added to the beads, and the samples were incubated at 37°C for 30 min. For MBP fusion proteins, after electrophoresis in denaturing gels, the gel was stained with Coomassie brilliant blue (CBB) and exposed to X-ray film. For immunoprecipitates, the samples were electrophoretically separated and transferred to nitrocellulose membranes, and the membranes were exposed to X-ray film and then immunoblotted with anti-Us3 antibody. In other studies, infected cells were lysed in NP-40 buffer (10 mM Tris-HCl [pH 7.8], 0.15 M NaCl, 1 mM EDTA, and 1% NP-40) containing a protease inhibitor cocktail. The supernatants obtained after centrifugation of the cell lysates were incubated with 20 U alkaline phosphatase (CIP; New England BioLabs) for 2 h at 37°C, after which they were electrophoretically separated and then immunoblotted with anti-Us3 antibody.

**Southern blotting, immunoblotting, and immunofluorescence.** Southern blotting and immunoblotting were performed as described previously (24, 69). Indirect immunofluorescence assays were performed as described previously (31), except that anti-mouse or anti-rabbit immunoglobulin G (IgG) conjugated to Alexa Fluor 488, anti-rabbit IgG conjugated to Alexa Fluor 546, or anti-chicken IgG conjugated to fluorescein isothiocyanate (FITC) was used as a secondary antibody, in addition to anti-rabbit IgG conjugated to FITC, and samples were examined with a Zeiss LSM510 or LSM5 laser scanning microscope.

**Induction of apoptosis and measurement of caspase 3/7 activity.** SK-N-SH cells were mock infected or infected with HSV-1(F), R7041, or R7356 at an MOI of 5. After a 1-h virus adsorption, the virus inoculum was replaced with DMEM containing 10% FCS. At 12 h postinfection, the cell culture medium was removed and the cells were exposed to 1 M sorbitol in DMEM containing 1% FCS for 1 h to produce osmotic shock and induce apoptosis. After sorbitol treatment, the cells were washed with DMEM and incubated in DMEM containing 1% FCS for an additional 5 h. The cells were then harvested and assayed for caspase 3/7 activity using a Caspase-Glo 3/7 assay kit with a tetrapeptide (Z-DEVD)-conju-

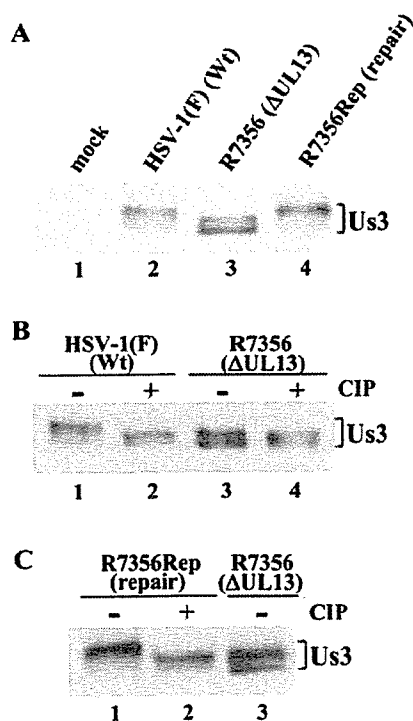


FIG. 1. (A) Immunoblot of electrophoretically separated lysates from Vero cells mock infected (lane 1) or infected with HSV-1(F) (lane 2), R7356 (lane 3), or R7356Rep (lane 4). Infected cells were harvested at 12 h postinfection and analyzed by immunoblotting with polyclonal antibody to Us3. Wt, wild type. (B) Immunoblots of electrophoretically separated lysates from Vero cells infected with HSV-1(F) (lanes 1 and 2) and R7356 (lanes 3 and 4). The infected cells were harvested at 12 h postinfection, solubilized, mock treated (lanes 1 and 3) or treated with CIP (lanes 2 and 4), and immunoblotted with antibody to Us3. (C) Immunoblots of electrophoretically separated lysates from Vero cells infected with R7356Rep (lanes 1 and 2) and R7356 (lane 3). The infected cells were harvested at 12 h postinfection, solubilized, mock treated (lanes 1 and 3) or treated with CIP (lane 2), and immunoblotted with antibody to Us3.

gated aminoluciferin substrate, according to the manufacturer's instructions (Promega).

## RESULTS

**UL13 mediates phosphorylation of Us3 in infected cells.** For these experiments, Vero cells were mock infected or infected with wild-type virus [HSV-1(F)], UL13 deletion mutant virus (R7356), or UL13-repaired R7356 virus (R7356Rep) at an MOI of 5; harvested at 12 h postinfection; solubilized; and analyzed by immunoblotting with polyclonal antibody to Us3. As reported previously (41), Us3 protein from HSV-1(F)-infected Vero cells was detected in a denaturing gel as doublet bands, with the more slowly migrating isoform predominating (Fig. 1A, lane 2). In R7356-infected Vero cells, the Us3 protein was also detected as doublet bands, but the amounts of Us3 in the two isoforms were more equal than in HSV-1(F)-infected cells, and both isoforms from R7356-infected cells appeared to migrate faster than those from HSV-1(F)-infected cells (Fig. 1A, lanes 2 and 3).

To verify that the phenotype observed in these studies was

due to the UL13 deletion, this deletion in the R7356 mutant virus was repaired to yield the UL13 repaired virus R7356Rep, as described in Materials and Methods. The genotype of R7356Rep was confirmed by Southern blotting when restricted with BglII and probed with the BglII O DNA fragment (data not shown). The electrophoretic pattern of Us3 isoforms from R7356Rep-infected cells could not be differentiated from that of Us3 isoforms from cells infected with wild-type virus (Fig. 1A, lanes 2 and 4). These results indicate that UL13 mediates posttranslational processing of Us3 in HSV-infected cells.

To examine whether the UL13-mediated posttranslational processing of Us3 is due to phosphorylation, the infected-cell lysates were phosphatase treated with CIP, solubilized, and analyzed by immunoblotting with polyclonal antibody to Us3. After CIP treatment, the electrophoretic mobilities of both Us3 isoforms from Vero cells infected with wild-type HSV-1(F) or UL13 repaired R7356Rep virus changed, with one of the Us3 isoforms migrating as fast as one from R7356-infected cells (Fig. 1B, lanes 1 to 3, and Fig. 1C, lanes 1 to 3). CIP treatment of lysate from cells infected with R7356 had little effect on the migration of the Us3 isoforms (Fig. 1B, lanes 3 and 4). These results indicate that UL13 mediates phosphorylation of Us3 in infected cells. Consistent with our observations, Poon and Roizman (54) recently reported that Us3 proteins produced by cells infected with the UL13 deletion mutant virus R7356 migrated in a denaturing gel faster than those produced by cells infected with wild-type virus. However, the study did not address whether the wild-type phenotype was restored in cells infected with a recombinant virus in which the UL13 sequence was repaired and whether the posttranslational modification of Us3 mediated by UL13 was due to phosphorylation (54).

**UL13 phosphorylates Us3 in vitro.** To investigate whether UL13 directly phosphorylates Us3, we generated and purified chimeric proteins consisting of MBP fused to peptides encoded by Us3 codons 254 to 411 (MBP-Us3-P2) and codons 405 to 481 (MBP-Us3-P1) (Fig. 2A). We also used MBP-LacZ protein (25) as a control. MBP-Us3-P1, MBP-Us3-P2, and MBP-LacZ contain 45, 56, and 47 serines/threonines, respectively. The MBP fusion proteins were captured on amylose beads and used as substrates in *in vitro* kinase assays with purified wild-type GST-UL13 or the kinase-negative mutant GST-UL13K176M. As shown in Fig. 2C, MBP-Us3-P1 was labeled with [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP in kinase assays using GST-UL13 (Fig. 2C, lane 3), while the MBP-Us3-P2 and MBP-LacZ proteins were not (Fig. 2C, lanes 1 and 5). When the gel was overexposed, the MBP-LacZ was labeled very faintly in the presence of GST-UL13 (data not shown). However, the relative amount of radioactivity in MBP-Us3-P1 was >100 higher than that in MBP-LacZ (data not shown). When the kinase-negative mutant GST-UL13K176M was used, none of the MBP fusion proteins were labeled (Fig. 2C, lanes 2, 4, and 6). To confirm that MBP-Us3-P1 labeling by GST-UL13 was due to phosphorylation, the labeled MBP-Us3-P1 was treated with  $\lambda$ -PPase. As shown in Fig. 2E, MBP-Us3-P1 labeling by GST-UL13 was eliminated by phosphatase treatment, indicating that MBP-Us3-P1 was labeled by phosphorylation. The presence of each MBP fusion protein and the radiolabeled MBP-Us3-P1 band was verified by CBB staining (Fig. 2B and D).

These results indicate that UL13 specifically and directly

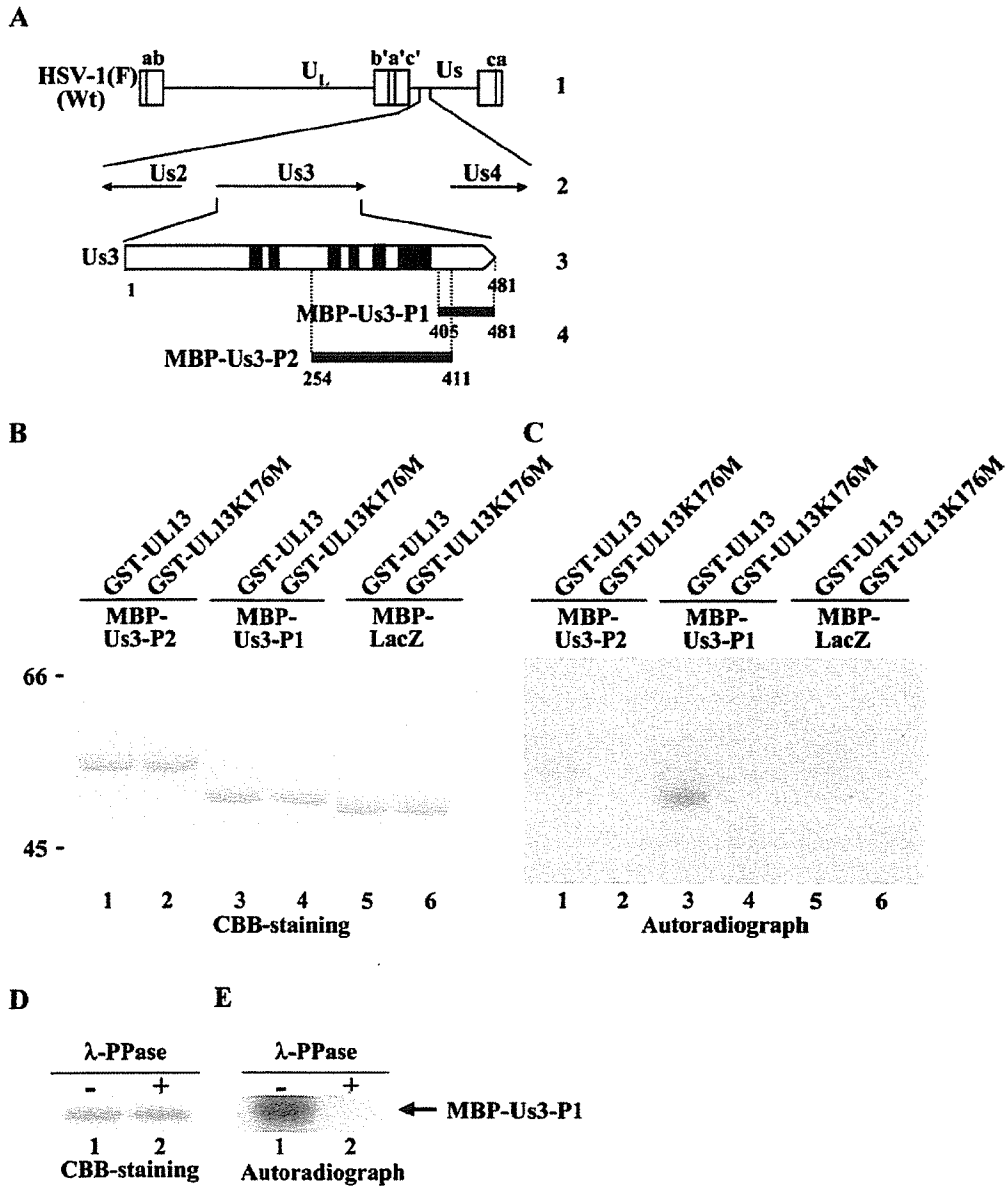


FIG. 2. (A) Schematic diagram of the genome structures of wild-type (Wt) virus HSV-1(F) and the location of the Us3 gene. Line 1, linear representation of the HSV-1(F) genome. The unique sequences are represented as unique long (U<sub>L</sub>) and short (U<sub>S</sub>) domains, and the terminal repeats flanking them are shown as open rectangles with the designation above each repeat. Line 2, structure of the genome domain containing the Us2, Us3, and Us4 open reading frames. Line 3, structure of the Us3 open reading frame. The shaded areas represent subdomains I to VI, which are conserved in eukaryotic protein kinases (68). Line 4, the domains of the Us3 gene used in these studies to generate MBP-U3 fusion proteins. (B) CBB-stained images of phosphorylated Us3. Purified MBP-U3-P2 (lanes 1 and 2), MBP-U3-P1 (lanes 3 and 4), and MBP-LacZ (lanes 5 and 6) incubated in kinase buffer containing [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP and purified GST-UL13 (lanes 1, 3, and 5) or GST-UL13K176M (lanes 2, 4, and 6), separated on a denaturing gel, and stained with CBB. Molecular masses (kDa) are shown on the left. (C) Autoradiograph of the gel in panel B. (D) Purified MBP-U3-P1 incubated in kinase buffer containing [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP and purified GST-UL13 and then either mock treated (lane 1) or treated with λ-PPase (lane 2), separated on a denaturing gel, and stained with CBB. (E) Autoradiograph of the gel in panel D.

phosphorylates the Us3 peptide encoded by codons 401 to 481 in vitro.

**UL13-mediated phosphorylation of Us3 does not affect Us3 protein kinase activity in infected cells.** Phosphorylation of a protein often leads to a change in function(s) of the target protein. The result, described above, showing that Us3 is phosphorylated by UL13 suggested three possible effects of this

modification: (i) UL13 may affect the intrinsic protein kinase activity of Us3, (ii) UL13 may affect the ability of Us3 to regulate apoptosis, and (iii) UL13 may affect the ability of Us3 to determine the localization of UL31 and UL34.

To test the first possibility, two series of experiments were done. In the first, Vero cells infected with HSV-1(F), R7041 (ΔUs3), or R7356 (ΔUL13) were harvested at 12 h postinfect-