ヘルペスウイルス特異酵素とその阻害剤

西山 幸 廣

名古屋大学医学部 病態制御研究施設ウイルス感染部門

(受付 昭和62年 3 月16日)

DNA ウイルスの誘導する主要な蛋白質は、機能的な側面から、i) 転写とその制御に関わるもの、ii) DNA 合成に関与するもの、iii) ウイルス粒子を構成する蛋白質の3群に大別することができよう。数種の遺伝子からなる小型のウイルスでは、粒子構成蛋白質の遺伝子が中心となり、ゲノムの複製は宿主細胞の DNA 複製機構¹⁾にほぼ全面的に依存している。しかし、アデノ、ヘルペス、ポックスといった中型、大型の DNA ウイルスになると数十種以上の遺伝子から構成され、ウイルス DNA 合成に関与する蛋白質もウイルス固有のものが相当数誘導される。

ヘルペス科ウイルスは細胞核内で複製を行なう DNA ウイルスの中では最大のゲノムをもち、DNA ポリメラーゼ、アルカリヌクレアーゼ、主要 DNA 結合蛋白質などのウイルス DNA 複製に直接関与する蛋白質に加え、DNA 前駆体の代謝に関わる一連の酵素をも誘導する(表1)。後者は、ウイルス増殖に必須ではないが、ヘルペスウイルスの病原性を理解する上で重要な意味をもっている。また、これらのヘルペス特異酵素は、対応する細胞の酵素とは性状を異にし、抗ヘルペス剤の標的としての重要性をもっている。

近年、単純ヘルペスウイルス (HSV) の誘導する諸酵素については、遺伝子の同定、一次構造の決定が相ついで行なわれ、酵素の構造と機能との関係を論ずることも可能となってきた。本稿では、HSV での知見を中心に、ヘルペスウイルス特異酵素の i) 生化学的性状、ii) ウイルス増殖における役割、iii) 阻害剤などについて現時点での知識を整理してみた。

I. HSV 特異酵素の誘導とデオキシリボヌクレオチド代謝

HSV のゲノムは約70種類の遺伝子から構成され、それらは厳密な制御のもとに順次発現される^{1,2)}。酵素活性を有するウイルス蛋白質の多くはデオキシリボヌクレオチド代謝及びゲノムの複製に関与するもので、ウイルス DNA 合成に先立ち、いわゆる β 群(初期)蛋白質として合成される。図1に HSV 遺伝子の発現様式を模式的に示したが、以下簡単に説明する。

脱殻後、直ちに宿主細胞の RNA ポリメラーゼ II によって転写が行なわれ、5種類の mRNA が作られる。その産物である α 群(早期)蛋白質はすべて、ウイルス遺伝子の転写制御に関わる調節蛋白質の役割を担っている。転写制御因子として、その機能が最もよくわかっているのは $\alpha 4$ 遺伝子産物(分子量 175 K)で、 β 群、 γ 群遺伝子の発現に対しては促進的に、 α 群遺伝子に対しては抑制的に作用する。各群遺伝子の上流に位置する転写制御領域には $\alpha 4$ 蛋白質の結合部位が存在し、特異的な塩基配列が認められる^{3,4,5)}。 $\alpha 22$ 、 $\alpha 27$ 蛋白質は γ 群(後期)遺伝子の発現に必要な⁶⁾が、前者は宿主細胞の因子によって代用することが可能である⁶⁾。

α 群蛋白質の合成に続き、 β 群遺伝子の発現が始まり、 α 群遺伝子からの転写は抑制される。 α 群遺伝子発現の抑制には、 $\alpha 4$ 蛋白質に加えて $\beta 8$ 遺伝子産物(主要 DNA 結合蛋白質)が関与しているようである^{4,7)}。人胎児線維芽細胞を宿主として HSV 2型を感染させた場合には、感染後1時間で既に β 群蛋白質の合成が認められる。ウイルス DNA ポリメラーゼ活性は2時間後には検出可能で、ウイルス DNA 合成は感染後4~5時間で最大となる⁸⁾。DNA ポリメラーゼと同様な時間的経過でチミジンキナーゼ、アルカリヌクレアーゼ活性などが出現する。

Herpesvirus-induced enzymes and their inhibitors. Laboratory of Virology, Research Institute for Disease Mechanism and Control, Nagoya University School of Medicine, Nagoya 466, Japan.

〒 466名古屋市長和区鶴舞町65

表1 ヘルペスウイルス誘導酵素の主な特徴

酵 素*	誘導するウイルス			主な特徴**	文 献
	α	β	γ		
リボヌクレオチド還元酵素	HSV VZV	—	EBV	136 K, 38 Kの大小サブユニットからなる。 dTTPによるアロステリック制御をうけない。	14), 15), 18~20) 128)
チミジンキナーゼ	HSV VZV	—	EBV	45Kの二量体。デオキシチジンキナーゼ活性, dTMP キナーゼ活性をも示す。	28~35) 43), 125)
dUTP ase	HSV VZV	—	—	39K。1型と2型で細胞内の局在性に著しい差が認められる。	47~50)
dTMP 合成酵素	VZV	—	HVS	33.5K。人の dTMP 合成酵素と高い homologyを示す。	51), 52)
ウラシル DNA グリコシラーゼ(?)	HSV	—	—	塩に抵抗性。抗 HSV 抗体で中和される。	46)
DNA ポリメラーゼ	HSV VZV	HCMV	EBV	136 K。3'→5' エキソヌクレアーゼ活性が付随し、高濃度の塩で活性が増強される。	58~66) 68~77)
アルカリヌクレアーゼ	HSV VZV	—	EBV	80K。エキソヌクレアーゼ, エンドヌクレアーゼの両活性をもつ。	89~93)
トポイソメラーゼ I(?)	HSV	—	—	粒子に付随し, ATP, Mg ⁺⁺ 非要求性である。	126), 127)
プロテインキナーゼ	HSV VZV	HCMV	EBV	cAMP 非依存性で, セリン, スレオニン残基をリン酸化する。	102~108) 129)

* ここに挙げた酵素の中には、その由来がまだはっきりしないものも含まれている。
遺伝子の同定がされていないものには(?)をつけた。
* * HSV 誘導酵素の特徴を示す。

図1 単純ヘルペスウイルス誘導蛋白質の合成とその制御

ウイルス DNA 合成に伴ない粒子構成蛋白質を中心とする γ 群蛋白質合成が始まる。 γ 群はその産生様式によって、ウイルス DNA 合成を必ずしも要求しない γ_1 と、ウイルス DNA 合成に厳密に依存する γ_2 の 2 群に分けることができる^{9, 10)}。 粒子構成蛋白質の中には、分子量55Kの蛋白質 (α -trans-inducing factor と名付けられた) のように、 α 群遺伝子の転写を促進する作用をもつものがある¹¹⁾。 プロテインキナーゼは β 群、 γ 群蛋白質として誘導されるが、粒子内に含まれるプロテインキナーゼとの異同は明らかになっていない。

感染細胞内の macromolecule 合成の変動に伴ない、DNA 前駆体の代謝過程にも大きな変化が認められる。

HSV の感染による dNTP プールの変動については、Jamieson ら¹²⁾ により詳細に調べられた (表 2)。 宿主細胞として用いられた BHK 細胞の dNTP プールのサイズは細胞周期によって変動するが、4 種のヌクレオシド三リン酸の比はほぼ一定で、C > T > A > G の順である。しかし、HSV の感染により、構成比は T > C > G > A と変化した、また全体としてのプールサイズは約 5 倍大きくなった。 dTTP 量の変化は最も著しく、感染後 6 時間では非感染時の 20 倍に達する。 一方、dATP プールは低下する。 dTTP プールが増大し、dNTP プール全体の 90% 近くを占めるため、dGTP + dCTP の比率は感染前に比べ約 1/5 に低下している。 このような dNTP

表 2 HSV 感染細胞における dNTP プールの変動 (文献¹²⁾ より)

細胞	HSV 1 型 (m. o. i. 10)	dNTP プール (pmol/ μ g DNA)			
		dCTP	dTTP	dATP	dGTP
休止期 BHK 細胞	感染前	2.0	1.25	0.55	0.24
	感染後 *	3.5 (1.8倍)	18 (14倍)	0.3 (0.5倍)	0.6 (2.5倍)
増殖期 BHK 細胞	感染前	11	6	4.1	0.75
	感染後	19 (1.7倍)	146 (24倍)	0.7 (0.2倍)	2.8 (3.7倍)
増殖期 BHK 細胞 (TK ⁻ , dCyK ⁻)	感染前	16	5	3.0	1.05
	感染後	33 (2.1倍)	62 (12倍)	1.8 (0.6倍)	1.65 (1.6倍)

*HSV 1 型を m. o. i. 10 で感染後 6 時間での比較

プールの変動は、ウイルス DNA 合成を支えるために必要なのであろうが、dTTP プールの突出した増大がどうして生ずるのか、その意味付けは現在のところ不明である。

HSV 感染細胞では、ヒトサイトメガロウイルス(HCMV)や Epstein-Barr ウイルス (EBV) の場合と異なり、宿主側の macromolecule 合成は急激な shut-off を受ける¹⁾。従って、感染後に生ずる dNTP プールの変動はウイルスの誘導する酵素群に起因するものであろう (図 2 参照)。なかでも、後述する如くリボヌクレオチド還元酵素、チミジンキナーゼの誘導が第一義的な重要性をもっていると推定される。

II. ヘルペスウイルス特異酵素の諸性状

1. リボヌクレオチド還元酵素

リボヌクレオチド還元酵素は、4 種のリボヌクレオシドニリン酸 (NDP) を各々対応するデオキシリボヌクレオシドニリン酸 (dNDP) に変換する酵素で、DNA 前駆体の代謝経路の中で要の位置を占めている¹³⁾。すなわち、細胞のリボヌクレオチド還元酵素は、ATP や最終産物である dNTP によって正負のアロステリック制御を受け、dNTP プールの増減を調節することにより DNA 合成を律速している。しかし、HSV によって誘導される酵素は、活性の制御という点で細胞のものと著しく異なった性質をもっている^{14, 15)}。たとえば、細胞の酵素が 0.05mM の dTTP、あるいは dATP によって 50% 阻害されるのに対し、HSV 誘導酵素は 1mM の添加でもわずかに抑制されるにとどまる。また、前者は 3mM ATP の存在下で最大の活性を示し、二価イオンとして Mg⁺⁺ を必要とするのに対し、後者は ATP の添加で活性は強く阻害され、Mg⁺⁺ 非要求性である¹⁵⁾。以上のような酵素学的性状の相違が、感染細胞内でのデ

オキシリボヌクレオチド代謝の変化と密接に関わっているのはまちがいないと思われる。

培養液中に高濃度のチミジンを添加すると細胞の DNA 合成は強く阻害される。この過剰チミジンによる増殖阻害は、細胞リボヌクレオチド還元酵素が dTTP によるアロステリック制御を受け CDP, UDP の還元が抑えられる結果、dCTP プールの低下をきたすことによるものと考えられている¹³⁾。一方、HSV 感染細胞では、dTTP プールの急激な増大が認められるが、にもかかわらず dCTP プールにおいても上昇がみられる¹²⁾。これは、一つにはウイルスリボヌクレオチド還元酵素の dTTP によるアロステリック制御の欠除によって説明できよう。これとよく似た関係が、T 4 ファージとその宿主である大腸菌の酵素においても見られる。T 4 ファージ誘導酵素は dATP によるアロステリック制御を受けず、また活性には Mg⁺⁺ を必ずしも要求しない¹⁶⁾。

ヘルペスウイルスのリボヌクレオチド還元酵素は、大腸菌あるいは哺乳動物由来の酵素と同様、大小 2 つのサブユニットから構成される¹⁷⁾。HSV 由来のものは 140K と 38K^{18, 19)}、EBV では 93K と 34K²⁰⁾、マウス由来の酵素は 84K と 55K²¹⁾ のサブユニットからなる。これらの酵素については塩基配列の決定から、その一次構造が明らかにされている^{19, 20, 21)}。HSV 2 型の大サブユニットは、既知のものの中では最も分子量が大きく 1141 個のアミノ酸からなる。N 末からはほぼ 400 番目までの領域は親水性のアミノ酸に富み、他種の大サブユニットでは欠損している。HSV 1 型との比較でも、他の領域に比べアミノ酸置換が多く、ウイルス酵素固有の機能、たとえば小サブユニットや、ウイルス DNA 合成に関係した種々の蛋白質との会合に関与していることが予想される。この N 末領域を除けば、大腸菌、マウスの大サブユニットとは約 40% の homology が認められる。HSV の

図2 デオキシリボヌクレオチド代謝とヘルペスウイルス特異酵素

① リボヌクレオチド(NDP)還元酵素	⑥ チミジル酸(dTMP)合成酵素
② ヌクレオシドニリン酸(NDP)キナーゼ	⑦ チミジンキナーゼ
③ dUTPase	⑧ チミジル酸(dTMP)キナーゼ
④ ウリジル酸・シチジル酸キナーゼ	⑨ = ② ヌクレオシドニリン酸(NDP)キナーゼ
⑤ dCMP デアミナーゼ	⑩ DNA ポリメラーゼ

* ヘルペスウイルスが誘導する酵素(活性)は図中□で囲ってある。

* * HSV は①, ③, ⑦(⑧), ⑩の4種の酵素を誘導する(⑧の活性は⑦に担われている)。

大小両サブユニットは、共通の3'端をもつ各々5.0kb, 1.2kb mRNA から翻訳されるが、coding region に重複は認められない²²⁾。EBV の場合にも、両サブユニットの遺伝子は隣接して存在するが、mRNA に共通部分はない²⁰⁾。

温度に不安定な酵素を誘導する ts 変異株を用い、ウイルス DNA 合成における役割が検討された^{19, 23)}。休止期の細胞を宿主としウイルス酵素活性が検出されないような培養条件下(39.5℃)では、ウイルス DNA 合成は全く検出されなかったが、同様な条件下でも増殖期の細胞を宿主とした時には野生株の1/10程度の DNA 合成が認められた。この結果は、効率の良いウイルス DNA 合成を維持するためにはリボヌクレオチド還元酵素の誘導が必要であること、また神経細胞やG 0期の細胞では増殖に必須であることを示唆している。

細胞死を回避するかたちでウイルス酵素が発現されれば、dNTP プールの不均衡が生じる。その結果、自然突然変異の頻度が増し、トランスフォーメーションが誘発される可能性は十分に考えられる²⁴⁾。HSV 2型によるトランスフォーメーションに関係する領域として、隣接する Bgl II n, Bgl II c の両断片が同定されている^{25, 26)}。この領域にリボヌクレオチド還元酵素大小サブユニットの遺伝子が含まれていたために、上記の可能性が HSV によるトランスフォーメーションの機構として示唆されてきた。しかし、より詳細な mapping から、トラ

ンスフォーミング活性をもつ DNA 断片は、大サブユニット遺伝子の一部しか含まないことが明らかにされた。現在ではトランスフォーメーションにおける本酵素の関与については否定的である^{22, 27)}。

2. チミジンキナーゼ

ヘルペスウイルスの誘導するチミジンキナーゼが、ウイルス増殖におけるその重要性以上に研究者の興味をひきつけてきたのは主として次の理由による。第一に抗ヘルペス剤として有効なヌクレオシド誘導体の活性化に関与していること、第二には活性の測定が簡単であり、また TK⁻の変異株が細胞、ウイルスともに容易に得られるので生化学的、遺伝学的解析が行ないやすく、遺伝子発現の調節機構を明らかにするためのモデル系として有用であったことによる。

HSV のチミジンキナーゼは細胞の酵素と異なり、チミジンに加えてデオキシチジン、dTTP を基質とすることができる^{28, 29, 30)}。しかし、デオキシチジンに対する Km 値はチミジンに対する Km 値より100倍以上高く、基質となるのは高濃度に存在する場合に限られる。同一の二つのサブユニット(分子量45k)から構成され^{29, 31)}、反応には ATP, Mg⁺⁺が必要である。dTTP, dCTP により阻害されにくいのも細胞のチミジンキナーゼとは異なる点である。

Darby らは、変異酵素を誘導する TK⁺変異株を多数分離しその性状を検討してきた^{32~34)}。これらの変異株

表3 薬剤抵抗性 HSV の誘導するチミジンキナーゼの性質

薬剤抵抗性 変異株	Km		Ki		アミノ酸の変異部位
	Thymidine	ATP	BVdU	ACV	
B 3	1.5	1	45	1.1	168 番目 Ala → Thr
Tr 7	12.5	0.6	15	12.5	176 番目 Arg → Gln
S 1	50	50	50	11	336 番目 Cys → Tyr

*野生株(親ウイルス)の誘導するチミジンキナーゼのKm, Ki 値に対する比。

図3 HSV チミジンキナーゼのモデル (文献³⁵⁾ より)

は, TK⁻株と異なりマウスに対して野生株とかわらない病原性を示し, かつ抗ヘルペス剤に抵抗性になるので臨床的な面からも注目される。BVdU 耐性株 (B 3), ACV 耐性株 (Tr 7, S 1) の3株については, 塩基配列の決定により, 各々1ヶ所のアミノ酸に置換があることが明らかにされた (表3)³⁵⁾。B 3由来の酵素では, BVdU に対する Ki 値が上昇し, チミジン, ATP に対する Km には変化がない。Tr 7 では, ACV, BVdU に対する Ki 値がともに上昇し, チミジンに対する Km 値にも上昇が認められる。一方, S 1 の酵素は, Km, Ki 値いずれにおいても著しい上昇を示した^{33, 34)}。以上の結果を総合して, Darby らは HSV 誘導チミジンキナーゼの活性中心について図3のようなモデルを提出している³⁵⁾。

HSV 1 型, 2 型ともに376個のアミノ酸からなり, 両型間の homology は約73%である^{36, 37, 38)}。置換部位は全体に散在しているが, N 末から20~40番及び260~280番の2領域に比較的集中して認められる³⁸⁾。γ 群ヘルペスに属するマーモセットヘルペス (Mar HV) のチミジンキナーゼの場合, アミノ酸残基数は HSV と同じ376個であったが, homology は特定の領域を除きほとんど認められない³⁹⁾。ATP 結合部位と考えられる領域 (49~66番) とよく似た配列は, ミトコンドリア ATPase, アデニレートキナーゼ, ras 遺伝子産物, ホスホフルクトキナーゼなどの ATP 結合蛋白質にも認められる^{39, 40)}。

McKnight らは, HSV 1 型チミジンキナーゼ遺伝子

の転写制御領域に3ヶ所の転写シグナルを認めた^{41, 42)}。最初のシグナルは, mRNA の転写開始部位より上流-16~-32の部分にあり, いわゆる TATA box を含んでいる。第2の領域は-47~-61で, G-rich な配列 (5'-GGGGCGGCGCGG-3') からなる。そして, さらに上流-80~-105の領域には第3のシグナルが存在する。これらの領域の塩基配列は coding region に比して1, 2型間での相違が極めて少ない³⁸⁾。

チミジンキナーゼを誘導するかどうかで議論のあった EBV では, 最近, ウイルス固有の酵素の存在が明らかにされた⁴³⁾。ヒトサイトメガロウイルスにおいても, ある種のヌクレオシドキナーゼの存在を示唆する結果が報告されている⁴⁴⁾。

3. dUTP 分解酵素, dTMP 合成酵素

HSV 特異 dUTPase は, 感染細胞の核分画に加えたデオキシピリミジン三リン酸が非常に不安定であったことから, その存在が見い出された^{45, 46, 47)}。この酵素は, dUTP を dUMP とピロリン酸に分解する。dCTP, dTTP も基質となるが, Km 値は dUTP に比し10倍以上高い。1型と2型の dUTPase には細胞内の局在性に著しい差がある。1型 dUTPase は50%以上の活性が核分画に認められるが, 2型では99%以上が細胞質分画に見い出される。この性質の差と intertypic recombination を利用し, 遺伝子地図上0.67~0.68領域に位置づけられた^{48, 49)}。

dUTPase 欠損ウイルスが, insertional mutagenesis の手法によって作製された⁵⁰⁾。dUt⁻ mutant は, 増殖期, 休止期のどちらの細胞においてもよく増殖し野生株との差は認められなかった。従って, 培養細胞での増殖には dUTPase の誘導は必要ないといえる。一般的に dUTPase の役割としては, 1) dUTP 濃度を下げ, その濃度を DNA ポリメラーゼの Km 値以下に保つことによって, DNA 中への取り込みを減少させる, 2) dUMP を供給することによって dTMP への代謝系を維持する, の二者が考えられている。dUMP は, dCMP デアミネースを介して dCMP から供給されるので, 後者の役割はそれ程の重要性をもっていないと推定され

る。

Cheng らは、DNA 中に取り込まれたウラシルを除去する酵素、すなわち uracil-DNA glycosylase が、HSV 感染細胞に誘導されることを報告している⁴⁶⁾。この活性は、2 型感染細胞では感染前の40倍にも達し、また細胞の酵素とは示適塩濃度にはっきりした差があった。HSV 感染ウサギ血清によって中和されることから、この酵素もウイルス特異的なものであると推定されるが、その後の報告がなくまだ明らかになっていない。

最近、Herpes virus saimiri (HVS) が dTMP 合成酵素遺伝子を保有していることが明らかにされた^{51, 52)}。HVS は γ 群ヘルペスに属し、リスザルを自然宿主としているが、他の新世界ザルには悪性リンパ腫を起こす。この HVS でトランスフォームされた T 細胞中には、常にゲノムの Kpn D 断片から由来する 2.5kb の転写産物が見い出される⁵³⁾。ここには 294 個のアミノ酸からなる分子量 33.5K の蛋白質に対応する open reading frame が存在する。データバンクとの照合により、このアミノ酸配列はヒトの dTMP 合成酵素と 70% の homology をもっていることが明らかにされた^{21, 54)}。事実、HVS 感染細胞中には FdUMP 結合活性をもった分子量 28~32 K の蛋白質が誘導されることも確認された⁵¹⁾。HVS と似て AT rich なウイルスである帯状疱疹ウイルス (VZV) にも、dTMP 合成酵素と非常に高い homology をもった領域が存在していることが示された^{51, 55)}。一方、GC 含量の高い HSV, EBV, HCMV では homology のある領域、酵素活性ともに認められていない。VZV と HVS とはヘルペス群の中では分類学的に隔ったウイルスなので、ヒトの dTMP 合成酵素との高い homology を考え合せると、2 種のウイルスがこの遺伝子を獲得したのはヘルペスウイルスの進化上かなり後期になってからではないかと予想される。

4. DNA ポリメラーゼ

Kohnberg らが、大腸菌の抽出液中に一本鎖の DNA を鋳型としてデオキシリボスクレオチドを重合してゆく活性を見出したのは 1958 年のことであるが、その 5 年後には HSV 感染細胞中に宿主のものとは異なるポリメラーゼ活性が誘導されてくることが見い出された⁵⁶⁾。動物細胞の DNA ポリメラーゼは、複製に中心的な役割を担う α ポリメラーゼ、DNA 修復に関係している β ポリメラーゼ、主としてミトコンドリアに存在する γ ポリメラーゼの 3 種に分類されるが⁵⁷⁾、HSV DNA ポリメラーゼは、分子量や阻害剤に対する感受性などにおいて α ポリメラーゼと多くの類似点をもっている⁸⁾。主要サブユニットの分子量は約 140K で、ポリメラーゼ活性はこの蛋白質に担われている^{58, 59)}。アフィジコリンや SH 基阻害剤である NEM によって強く阻害されるが、

dd-TTP には抵抗性である。アフィジコリンに対する高感受性は、ホスホノ酢酸 (PAA) の場合と異なり、ヘルペス群に共通な特徴ではない。EBV 誘導 DNA ポリメラーゼではかなり感受性が劣る⁶⁰⁾。HSV DNA ポリメラーゼの processivity については、Cheng らが活性化 DNA を用いた実験から α ポリメラーゼとほぼ同じ 10 前後の値を報告していたが⁶¹⁾、最近、Lehman らは ϕ X の環状一本鎖 DNA を鋳型とした時には、5000 以上の極めて高い processivity をもつことを示した⁶²⁾。processivity の高い反応様式は、ローリングサークルモデルによる DNA 複製機構には適したものといえよう。

ヘルペスウイルス由来の DNA ポリメラーゼに共通して認められ、 α ポリメラーゼとは異なる特徴の一つは、塩に対する態度である⁸⁾。ヘルペス DNA ポリメラーゼは、100mM 硫酸、あるいは 200mM KCl の添加によって活性が促進されるが、逆に α ポリメラーゼ活性は著しく阻害される。ウイルスポリメラーゼの活性は、5mM 程度のポリアミンを加えることによっても促進される⁶³⁾。ヘルペス DNA ポリメラーゼに 3'→5' エキソヌクレアーゼ活性が付随していることも、 α ポリメラーゼとは異なっている^{59, 64)}。このエキソヌクレアーゼは、大腸菌の DNA ポリメラーゼに付随する 3'→5' エキソヌクレアーゼと同様、mismatched pair をつくっている 3' 端のスクレオチドを優先的に除去する活性、すなわち校正機能をもっている^{62, 65)}。アンバー突然変異をもつ ϕ X 174 の一本鎖 DNA を鋳型として用い試験管内で fidelity を測定すると、HSV DNA ポリメラーゼは、 α 、 β ポリメラーゼより有意に高い fidelity を示す。反応系の基質 (4 種の dNTPs) 濃度が同じ条件下での error rate は 1/650,000 であった⁶⁵⁾。このような高い fidelity は、付随する 3'→5' エキソヌクレアーゼ活性及び HSV ポリメラーゼの高い processivity によるものと推定される。

ウイルス DNA ポリメラーゼに変異をもつ突然変異株が多数分離されている。そのほとんどは、ウイルス DNA ポリメラーゼを標的とする阻害剤、すなわち PAA, ACV, アフィジコリン, Ara-A などに対する抵抗性株である^{66~69)}。これらの変異株を利用して遺伝子の mapping が行なわれ、遺伝子地図上 0.4~0.45 の領域に位置づけられた^{70, 71)}。この領域には 1235 個のアミノ酸をコードする open reading frame が存在し、その分子量 (136K) は精製分画に含まれる主要蛋白質のそれと一致する^{72, 73)}。1 型、2 型間のアミノ酸レベルでの homology は、約 91% で、チミジンキナーゼ (73%)、アルカリヌクレアーゼ (81%) などと比べ高い値を示す^{74, 75)}。アミノ酸変異部位の分布をみると、C

図4 HSV DNA ポリメラーゼの一次構造模式図

- 1) DNA ポリメラーゼを構成するアミノ酸残基数を示す。
- 2) 各種薬剤耐性マーカーが含まれる領域を示す。
矢印は、薬剤耐性変異が単一のアミノ酸変異として同定された部位を示す。
- 3) HSV 1 型, 2 型間でアミノ酸が異なる部位を示す。
- 4) HSV 1 型と50%以上の homology がある領域を示す。

□は、HSV, EBV, Vaccinia, AdV 2 の DNA ポリメラーゼに共通したアミノ酸配列 YGDTDS の位置を示す。EBV DNA ポリメラーゼは、HSV DNA ポリメラーゼと最も homology が高くなるように表示してあるので、断点がある。

末側に比べN末側に多いことがわかる(図4)。またN末から650~690番の領域に変異部位が集中していた⁷⁴⁾。この領域は、親水性のアミノ酸残基からなり、EBV DNA ポリメラーゼでは欠除している⁷⁶⁾。さらに、薬剤抵抗性に関係する突然変異部位は、詳細な mapping から、C末側の1/2に集中して存在することが明らかにされた^{72, 77)}。以上の結果は、活性中心の形成におけるC末側の重要性を示唆するものといえよう。最近、アデノウイルス、ワクシニアウイルスのDNAポリメラーゼのアミノ酸配列が明らかにされたが、homology の非常に高い領域がC末側に存在することがわかった^{78, 79)}。HSV DNA ポリメラーゼでは、884番から896番目までの13個のアミノ酸残基で、このうち6個の配列はどのウイルスDNAポリメラーゼでも完全に一致していた。

筆者らはHSV 2型野生株よりアフィジコリン抵抗性株を分離し、生化学的、遺伝学的な解析を行ってきた^{65, 69, 80, 81)}。このAph^r株は、PAAに対してhypersensitiveで、自然突然変異を起こす頻度が高いという性質(mutator)をもっている^{69, 80)}。そのDNAポリメラーゼは野生株のもの比べ、アフィジコリンに対するKi値が6倍上昇し、dCTP, dTTPに対するKm値が各々

1/7, 1/3に低下していた⁶⁹⁾。しかし、3'→5'エキソヌクレアーゼ/DNAポリメラーゼの活性比に有意の変化は認められなかった⁶⁵⁾。Marker transfer 実験及び塩基配列の比較から、Aph^r DNAポリメラーゼでは、701番目のチロシンがヒスチジンに変異していることがわかった⁸¹⁾。この左側には上述したように変異に富む親水性の領域が隣接しており、右側にはACV^rの変異部位が集中しているので、Aph^r変異部位は活性中心の上限となっているのかもしれない。

HSVゲノムの複製には、HSV DNAポリメラーゼに加えて、主要DNA結合蛋白質(130k)、アルカリスクリナーゼなどが関与している。しかし、HSV DNAの修復には宿主細胞の α , β ポリメラーゼが必要とされる^{82, 83)}。一方、潜在性EBVゲノムの複製にはEBV DNAポリメラーゼは必要なく、ウイルス側の因子としてはEBNA-1のみが関与している^{84, 84, 86)}。

精製したEBV, HCMVの粒子に、既知のものとは異なるDNAポリメラーゼ活性が付随しているとの報告がある^{87, 88)}。現在のところ、これらのポリメラーゼの由来、役割などは明らかになっていない。

5. アルカリスクリナーゼ

HSV 誘導アルカリスクレアーゼは、細胞の DNase が酸性を好むのに対し、最適 pH が 9 ~ 10 と高く、また、エキソヌクレアーゼとエンドヌクレアーゼの両活性をもっている⁸⁹⁻⁹¹⁾。2 価イオン要求性で、 Mg^{++} の場合、最適濃度は 2 ~ 12mM である。 Mn^{++} でもおきかえることができるが、1mM 以上ではエンドヌクレアーゼ活性だけが認められる。 Ca^{++} 、 Zn^{++} は阻害作用を示す。3'→5'5'→3' の両方向に活性を示すので、二重鎖 DNA を基質とした時、分解産物としては flush end をもった小さな DNA 鎖と 5'-dNMPs が生ずることになる⁹²⁾。一本鎖 DNA を基質とした場合にも最適 pH は変わらないので、アルカリ性を好むのは酵素自体の性質によるものであろう。

アルカリスクレアーゼは、HSV 感染後 2 時間で既に出現し、主要な蛋白質の一つとしてかなり大量に生産される。それでは、試験管内の反応系で上記のような活性をもっているこの酵素は、ウイルス増殖においてどのような役割を担っているのであろうか。ゲノムの複製過程に生ずるコンカテマーの processing,あるいは recombination に関与している可能性が示唆されているが、まだ明らかではない⁹²⁻⁹⁴⁾。EBV の場合では、感染によって細胞 DNA が分解されサルベージ経路を経てウイルス DNA に取り込まれることが知られており、この過程にアルカリスクレアーゼが作用している可能性も示唆されている^{95, 96)}。

遺伝子は、HSV ゲノム上 0.160 ~ 0.171 の領域に map された^{75, 97)}。この領域からは、共通の 3' 端をもつ 5 種類の mRNA (4.4kb, 3.9kb, 2.3kb, 1.9kb, 0.9kb) が転写されるが、in vitro translation の結果から、アルカリスクレアーゼは 2.3kb mRNA の翻訳産物であることが明らかになった。SDS-PAGE による分子量は 80 ~ 85K であったが、実際には、626 個のアミノ酸残基からなり分子量は 67k 前後と推定された。みかけ上の分子量が大きくなった原因の一つは、N 末のプロリン含量が高いことによるものと考えられている。プロリンに富む N 末の 20% には、変異が多く、1, 2 型間で 50% の homology しかないが、この部分を除けば 88% の homology がある。

6. プロテインキナーゼ

精製したウイルス粒子にプロテインキナーゼ活性が付随してくる例については、DNA 型 RNA 型を問わず多数の報告がある⁹⁸⁻¹⁰¹⁾。HSV 粒子は内部からカプシド、テグメント、エンベロープに大きく 3 区分することができるが、HSV 粒子に付随するプロテインキナーゼは、カプシドの表面、あるいはテグメントに存在している¹⁰²⁾。酵素は cAMP 非依存性、 Mg^{++} あるいは Mn^{++} 要求性で、ATP, GTP とともに基質として利用できる。リ

ン酸化される蛋白質は、主としてテグメントに含まれる粒子構成蛋白質で、反応系中に加えられたヒストンなどの細胞由来の蛋白質はリン酸化されなかった。プロテインキナーゼ活性は HSV 増殖過程の初期にも誘導されるが、その役割、粒子付随プロテインキナーゼとの異同など明らかではない^{103, 104)}。

HCMV 感染細胞に多量に誘導され、また主要な粒子構成成分ともなる 68 K major matrix protein がプロテインキナーゼ活性をもっていることが明らかにされた^{105, 106, 107)}。この蛋白質もやはりテグメントに相応する部分に存在し、 Mg^{++} 要求性、cAMP 非依存性で、粒子構成蛋白質を好んでリン酸化する。種々の DNA 型ウイルスに認められる酵素と同様、セリンとスレオニン残基をリン酸化し、チロシン残基は標的としない。この活性は、フラボノイドの一種であるケルセチンによって強く阻害される¹⁰⁸⁾。EBV の場合にも類似のプロテインキナーゼ活性が EBNA に付随していることが報告されている。

DNA ウイルスの誘導するプロテインキナーゼの役割に関しては、粒子の脱殻、DNA 複製あるいは転写の制御など、ウイルス増殖の様々な段階にかかわっている可能性が示唆されてきたが、はっきりしたものではなかった。しかし、昆虫ウイルスである Granulovirus で得られた結果は、粒子付随プロテインキナーゼが脱殻 (uncoating) に関与していることを強く示唆するものである¹⁰⁹⁾。この酵素は、ゲノムをとりまく VP-12 蛋白質を効率的にリン酸化し、リン酸化された VP-12 は DNA 結合能を失なう。実際、試験管内にてヌクレオカプシドをリン酸化反応条件下におくと、ゲノムが放出され空のカプシドを生じた。細胞内では核膜 (孔) との相互作用によってゲノムが核内へと放出されるのが観察された。ヘルペスウイルスも同様の過程を経て核内にゲノムが到達すると考えられるので、この放出過程に粒子付随のプロテインキナーゼが作用しているかもしれない。

Ⅲ. ヘルペスウイルス特異酵素の阻害剤

特定の酵素と選択的に結合して、その活性を特異的に抑制する阻害剤は、前述してきたように、酵素蛋白質の構造と機能を明らかにする上で大きな有用性をもつ。また、その薬物がウイルス増殖を選択的に抑制するものであれば、ウイルス感染症の治療薬としての可能性も期待できる。

ヘルペスウイルスはヒトの病原体として医学的な重要性をもっているため、ウイルスが独自の酵素群を誘導することが明らかになる以前から、ウイルス増殖の抑制を指標に多数の物質がスクリーニングにかけられてきた。こうして見いだされたウイルス増殖阻害物質の多くは、

表4 ヘルペスウイルス特異酵素を標的とする阻害剤*

標的となる酵素	薬 剤	文 献
DNA ポリメラーゼ	9- β -D-arabinofuranosyladenine (Ara-A, vidarabine)	68), 130)
	1- β -D-arabinofuranosylthymine (Ara-T)	113), 114)
	9-(2-hydroxyethoxymethyl) guanine (ACV, ACG)	117), 118)
	9-[(2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethoxy)methyl]guanine (DHPG, 2'-NDG)	44), 131)
	(E)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridine (BVdU)	110), 119)
	2'-deoxy-2'-fluoro- β -D-arabinofuranosyl-5-iodocytosine (FIAC)	132)
	1- β -D-arabinofuranosyl-5-fluorouracil (Ara-FU)	133), 134)
	phosphonoacetate (PAA)	119), 120)
	phosphonoformate (PFA)	121)
リボヌクレオチド還元酵素	2-acetylpyridine thiosemicarbazone とその誘導体	122), 123)
	BVdU, ara-A, FIAC	112), 135)
dTTP 合成酵素	5-trifluoromethyl-2'-deoxyuridine (Trifluridine)	51), 110)
	5-fluorodeoxyuridine (FdUR)	

* ウイルス酵素を選択的に阻害する薬物を中心に挙げた。

ヘルペスウイルス誘導 dTTP 合成酵素に対する選択的阻害剤は知られていない。

ウイルス DNA ポリメラーゼを標的とするものであった。表4には、ヘルペスウイルス特異酵素を標的とする代表的な阻害剤を列挙した。

ウイルス DNA ポリメラーゼの阻害剤は、その作用機序から、ヌクレオシド類似体とピロリン酸類似体に大別できる。ヌクレオシド類似体は、そのままの形では阻害作用はなく、活性形となるためにはキナーゼによってリン酸化される必要がある¹¹⁰⁾。Ara-A は1960 代の前半に HSV 増殖阻害作用が見い出され、臨床的にも用いられているが、活性形はリボヌクレオチド還元酵素をも阻害する^{111, 112)}。アラビノヌクレオシドの中では ara-T の選択性が最も高い。これはヘルペスウイルスの誘導するチミジンキナーゼの基質特異性によるもので、活性形である arm-TTP は細胞の α ポリメラーゼに対しても阻害作用をもつ^{113, 111)}。デオキシウリジンの C-5 置換体である BVdU 及びその類似体である IVdU なども、ara-T と同じくウイルスのチミジンキナーゼによって特異的にリン酸化される。BVdUTP は dTTP と拮抗的に作用して DNA ポリメラーゼを阻害する^{110, 115)}。

ACV (アシクロビア, アシクログアノシン(ACG)) は糖の位置に非環状の側鎖をもつデオキシグアノシン類似体であるが、HSV のチミジンキナーゼによってリン酸化され、ウイルス DNA ポリメラーゼを選択的に阻害する^{70, 116, 117)}。アシクロ-GTP は正常基質である dGTP と拮抗的に作用すると同時に、DNA 中にも取り込まれ DNA 鎖の伸長反応を停止させる。HSV DNA

ポリメラーゼは細胞 DNA ポリメラーゼに比べ10倍以上高受性が高い。ACV の類似体として、9-[(1, 3-dihydroxy-2-propoxy)methyl] guanine (DHPG, 2'-NDG) が開発されたが、これは HCMV に対しても高い抗ウイルス活性を示す¹¹⁸⁾。リン酸化には未知のキナーゼが関与しているようである⁴⁴⁾。

ピロリン酸類似体である PAA, PFA は細胞内で活性化される必要はなく直接 DNA ポリメラーゼを阻害する¹¹⁹⁻¹²¹⁾。阻害作用は、DNA ポリメラーゼのピロリン酸結合部位に結合し伸長反応を抑制することによる。PAA は、HSV DNA ポリメラーゼに付随する 3'→5' エキソヌクレアーゼ活性をも阻害する⁶²⁾。

抗マラリア薬として合成された 2-acetylpyridine thiosemicarbazone の誘導体が HSV に対して増殖抑制作用をもち、その標的がリボヌクレオチド還元酵素であることが示された¹²²⁾。検討された111種の誘導体の中では、N-4 のピコリル基置換体の選択性が高く、ウイルスと細胞由来の酵素では IC₅₀ 値で80倍以上の差が認められた¹²³⁾。基質である CDP とは非拮抗的で、酵素に可逆的に結合をするとみられるが、その阻害機構についての詳細は明らかではない。Spector らは、同じく誘導体の一つである 2-acetylpyridine 4-(2-morpholinoethyl) thiosemicarbazone (A723U) が、ACV と併用する時、HSV に対し相乗的な阻害作用をもつことを見いだした¹²⁴⁾。A723U 単独では阻害効果のみられない濃度で、ACV による増殖抑制作用を10倍近く増強

した。HSV 感染細胞内の dGTP プールは、A723U 添加によって減少し、逆にアシクロ-GTP プールは増大していた。そして、アシクロ-GTP/dGTP 比は、ACV 単独で用いた時に比べ最大80倍上昇していた。アシクロ-GTP/dGTP 比が大きくなれば HSV DNA ポリメラーゼに対するアシクロ-GTP の阻害作用は当然促進されるので、この点から A723U の相乗効果は説明できよう。ara-ATP, BVdUTP などヘルペスウイルス誘導リボヌクレオチド還元酵素に対して阻害作用をもつが、選択性については意見が一致していない^{111, 112)}。

抗癌剤として用いられている 5-fluorouracil(5-FU) の中間代謝産物である 5-FdUMP は、dTMP 合成酵素の dUMP 結合部位に共有結合し不可逆的に阻害する。この反応は前節 3 で述べたように、HVS 誘導酵素の存在を確かめるのにも利用されている⁵¹⁾。

単純ヘルペスウイルスの誘導する酵素については、以上の如く多くの知見が蓄積されてきたが、 β 群、 γ 群に属するウイルス、とくにサイトメガロウイルスに関しては利用できる情報が少なく、今後の課題として残されている。三群ウイルス間での比較は、個々の酵素の構造と機能、生物学的意義を明らかにする上でも必要である。反応様式、活性中心の構造、細胞酵素との相違などについて理解が深まれば、それをもとに抗ウイルス剤をデザインすることも可能になるであろう。

文 献

- 1) Roizman, B., and Batterson (1985). Herpesvirus and their replication. In Virology (ed. Fields, B. N.) pp 497-526, Raven Press, New York.
- 2) Wagner, E. K. (1985). Individual HSV transcripts: Characterization of specific genes. In The Herpesviruses, vol. 3, pp 45-104, Plenum Press, New York.
- 3) Mackem, S. and Roizman, B. (1982). Differentiation between promotor and regulator regions of herpes simplex virus I: The functional domains and sequence of a moveable α regulator. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **79**, 4917-4921
- 4) Mackem, S. and Roizman, B. (1982). Structural features of the gene 4, 0, and 27 promotor-regulatory sequence which confer α regulation of chimeric thymidine kinase genes. J. Virol. **44**, 939-949
- 5) Kristie, T. M. and Roizman, B. (1986). DNA-binding site of major regulatory protein α 4 specifically associated with promotor-regulatory domains of genes of herpes simplex virus type 1. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83**, 4700-4704
- 6) Post, L. E. and Roizman, B. (1981). A generalized technique for detection of specific genes in large genomes: α gene 22 of herpes simplex virus 1 is not essential for growth. Cell **25**, 227-232
- 7) Honess, R. W. and Roizman, B. (1975). Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis: Sequential transition of polypeptide synthesis requires functional virus polypeptides. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **72**, 1276-1280
- 8) 西山幸廣 (1985) 単純ヘルペスウイルス-ウイルス DNA ポリメラーゼを中心としてー蛋白質・核酸・酵素 **30**, 1081-1095
- 9) Honess, R. W. and Waston, D. H. (1977). Herpes simplex virus resistance and sensitivity to phosphonoacetic acid. J. Virol., **21**, 584-600
- 10) Costa, R. H., Devi, B. G., Anderson, K. P., Gaylord, B. H., and Wagner, E. K. (1981). Characterization of a major late herpes simplex virus type 1 mRNA. J. Virol. **38**, 483-496
- 11) Campbell, M. E. M., Palfreyman, J. W., and Preston, C. M. (1984). Identification of herpes simplex virus DNA sequences which encode a trans-acting polypeptide responsible for stimulation of immediate early transcription. J. Mol. Biol. **180**, 1-19
- 12) Jamieson, A. T., and Bjursell, G. (1976). Deoxyribonucleoside triphosphate pools in herpes simplex type 1 infected cells. J. Gen. Virol. **31**, 101-113
- 13) Thelander, L., and Reichard, P. (1979). Reduction of ribonucleotides. Annu. Rev. Biochem. **48**, 133-158
- 14) Ponce de Leon, M., Eisenberg, R. J., and Cohen, G. H. (1977). Ribonucleotide reductase from herpes simplex virus (type 1 and 2) infected and uninfected KB cells: Properties of the partially purified enzymes. J. Gen. Virol. **36**, 163-173
- 15) Huszar, D., and Bacchetti, S. (1981). Partial purification and characterization of the ribonucleotide reductase induced by herpes simplex virus infection of mammalian cells. J. Virol. **37**, 580-588
- 16) Berglund, O. (1972). Ribonucleoside diphosphate reductase induced by bacteriophage T 4. II. Allosteric regulation of substrate specificity and catalytic activity. J. Biol. Chem. **247**, 7276-7281
- 17) Reichard, P., and Ehrenberg, A. (1983). Ribonucleotide reductase: a radical enzyme. Science **221**, 514-519

- 18) Bacchetti, S., Eveleigh, M. J., Muirhead, B., Sartori, C. S., and Huszar, D. (1984). Immunological characterization of herpes simplex virus type 1 and 2 polypeptide (s) involved in viral ribonucleotide reductase activity. *J. Virol.* **49**, 591-593
- 19) Preston, V. G., Palfreyman, J. W., and Datia, B. M. (1984). Identification of a herpes simplex virus type 1 polypeptide which is a component of the virus-induced ribonucleotide reductase. *J. Gen. Virol.* **65**, 1457-1466
- 20) Gibson, T., Stockwell, P., Ginsberg, M., and Barrell, B. (1984). Homology between two EBV early genes and HSV ribonucleotide reductase and 38K genes. *Nucleic Acids Res.* **12**, 5087-5099
- 21) Caras, I. W., Levinson, B. B., Fabry, M., Williams, S. R., and Martin, D. W. (1985). Cloned mouse ribonucleotide reductase subunit M1 cDNA reveals amino acid sequence homology with *Escherichia coli* and herpesviruses ribonucleotide reductase. *J. Biol. Chem.* **260**, 7015-7022
- 22) Swain, M. A., and Galloway, D. A. (1986). Herpes simplex virus specifies two subunits of ribonucleotide reductase encoded by 3'-coterminally transcripts. *J. Virol.* **57**, 802-808
- 23) Dutia, B. M. (1983). Ribonucleotide reductase induced by herpes simplex virus has a virus-specified constituent. *J. Gen. Virol.* **64**, 513-521
- 24) Huszar, D., and Bacchetti, S. (1983). Is ribonucleotide reductase the transforming function of herpes simplex virus 2? *Nature (London)* **302**, 76-79
- 25) Jariwalla, R. J., Aurelian, L., and Ts' O, P. O. P. (1980). Tumorigenic transformation induced by a specific fragment of DNA from herpes simplex virus type 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 2279-2283
- 26) Galloway, D. A., and McDougall, J. K. (1981). Transformation of rodent cells a cloned DNA fragment of herpes simplex virus type 2. *J. Virol.* **38**, 749-760
- 27) Galloway, D. A., Nelson, J. A., and McDougall, J. K. (1984). Small fragments of herpesvirus DNA with transforming activity contain insertion sequence-like structures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 4736-4740
- 28) Kit, S., and Dubbs, D. R. (1965). Properties of deoxythymidine kinase partially purified from non-infected and virus-infected mouse fibroblast cells. *Virology* **26**, 16-27
- 29) Jamieson, A. T., and Subak-Sharpe, J. H. (1974). Biochemical studies on the herpes simplex virus-specified deoxypyrimidine kinase activity. *J. Gen. Virol.* **24**, 481-492
- 30) Chen, M. S., Summers, W. P., Walker, J., Summers, W. C., and Prusoff, W. H. (1979). Characterization of pyrimidine deoxyribonucleoside kinase (thymidine kinase) and thymidylate kinase as a multifunctional enzyme in cells transformed by herpes simplex virus type 1 and in cells infected with mutant strains of herpes simplex virus. *J. Virol.* **30**, 942-945
- 31) Chen, M. S., and Prusoff, W. H. (1978). Association of thymidylate kinase activity with pyrimidine deoxyribonucleoside kinase induced by herpes simplex virus. *J. Biol. Chem.* **253**, 1325-1327
- 32) Darby, G., Field, H. J., and Salisbury, S. A. (1981). Altered substrate specificity of herpes simplex virus thymidine kinase confers acyclovir-resistance. *Nature* **289**, 81-83
- 33) Larder, B. A., Cheng, Y.-C., and Darby, G. (1983). Characterization of abnormal thymidine kinases induced by drug-resistant strains of herpes simplex virus type 1. *J. Gen. Virol.* **64**, 523-532
- 34) Larder, B. A., Derse, D., Cheng, Y.-C., and Darby, G. (1983). Properties of purified enzymes induced by pathogenic drug-resistant mutants of herpes simplex virus. *J. Biol. Chem.* **258**, 2027-2033
- 35) Darby, G., Larder, B. A., and Inglis, M. M. (1986). Evidence that the active center of the herpes simplex virus thymidine kinase involves an interaction between three distinct regions of the polypeptide. *J. Gen. Virol.* **67**, 753-758
- 36) McKnight, S. L. (1980). The nucleotide sequence and transcript map of the herpes simplex virus thymidine kinase gene. *Nucleic Acids Res.* **8**, 5949-5964
- 37) Wagner, M. J., Sharp, J. A., and Summers, W. C. (1981). Nucleotide sequence of the thymidine kinase gene of herpes simplex virus type 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 1441-1445
- 38) Swain, M. A., and Galloway, D. A. (1983). Nucleotide sequence of the herpes simplex virus type 2 thymidine kinase gene. *J. Virol.* **46**, 1045-1050
- 39) Otsuka, H., and Kit, S. (1984). Nucleotide sequence of the marmoset herpesvirus thymidine kinase gene and the predicted amino acid sequence of thymidine kinase polypeptide. *Virology* **135**, 316-330
- 40) Gay, N. J., and Walker, J. E. (1983). Homology between human bladder carcinoma

- oncogene product and mitochondrial ATP-synthase. *Nature* **301**, 262-264
- 41) McKnight, S. L. (1982). Functional relationships between transcriptional control signals of the thymidine kinase gene of herpes simplex virus. *Cell* **31**, 355-365
 - 42) McKnight, S. L., and Kingsbury, R. (1982). Transcriptional control signals of a eukaryotic protein-coding sequence. *Science* **217**, 316-324
 - 43) de Turenne-Tessier, M., Ooka, T., de The, G., and Daillie, J. (1986). Characterization of an Epstein-Barr virus-induced thymidine kinase. *J. Virol.* **57**, 1105-1112
 - 44) Biron, K. K., Fyfe, J. A., Stanat, S. C., Leslie, L.K., Sorrell, J. B., Lambe, C. U., and Coen, D. M. (1986). A human cytomegalovirus mutant resistant to the nucleoside analog 9-[[2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethoxyl]guanine (BWB 759 U) induced reduced levels of BWB 75 U triphosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 8769-8773
 - 45) Wohlrab, F., and Francke, B. (1980). Deoxyribopyrimidine triphosphatase activity specific for cells infected with herpes simplex virus type 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 1872-1876
 - 46) Caradonna, S. J., and Cheng, Y-C. (1981). Induction of uracil-DNA glycosylase and dUTP nucleotidohydrolase activity in herpes simplex virus-infected human cells. *J. Biol. Chem.* **256**, 9834-9837
 - 47) Willams, M. V. (1984). Demonstration of a herpes simplex virus type 2-induced deoxyuridine triphosphate nucleotidohydrolase in infected KB cells and in biochemically transformed HeLa cells. *J. Gen. Virol.* **65**, 209-213
 - 48) Wohlrab, F., Garrett, B. K., and Francke, B. (1982). Control of expression of the herpes simplex virus-induced deoxypyrimidine triphosphatase in cells infected with mutants of herpes simplex virus type 1 and 2 and intertypic recombinants. *J. Virol.* **43**, 935-942
 - 49) Preston, V. G., and Fisher, F. B. (1984). Identification of the herpes simplex virus type 1 gene encoding the UTPase. *Virology* **138**, 58-68
 - 50) Fisher, F. B., and Preston, V. G. (1986). Isolation and characterisation of herpes simplex virus type 1 mutants which fail to induce dUTPase activity. *Virology* **148**, 190-197
 - 51) Honess, R. W., Bodemer, W., Cameron, K. R., Niller, H.-H., Fleckenstein, B., and Randall, R. E. (1986). The A + T - rich genome of herpesvirus saimiri contains a highly conserved gene for thymidylate synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 3604-3608
 - 52) Bodemer, W., Niller, H. H., Nitsche, N., Scholz, B., and Fleckenstein, B. (1986). Organization of the thymidylate synthase gene of herpesvirus saimiri. *J. Virol.* **60**, 114-123
 - 53) Knust, E., Dietrich, W., Fleckenstein, B., and Bodemer, W. (1983). Virus-specific transcription in a herpesvirus saimiri-transformed lymphoid tumor cell line. *J. Virol.* **48**, 377-383
 - 54) Takeishi, K., Kaneda, S., Ayusawa, D., Shimizu, K., Gotoh, O., and Seno, T. (1985). Nucleotide sequence of a functional cDNA for human thymidylate synthase. *Nucleic Acids Res.* **13**, 2035-2043
 - 55) Davison, A. J., and Scott, J. E. (1986). The complete DNA sequence of varicella-zoster virus. *J. Gen. Virol.* **67**, 1759-1816
 - 56) Keir, H. M., and Gold, E. (1963). Deoxyribonucleic acid nucleotidyltransferase and deoxyribonuclease from cultured cells infected with herpes simplex virus. *Biochim. Biophys. Acta* **72**, 263-276
 - 57) Weissbach, A. (1975). Vertebrate DNA polymerases. *Cell* **5**, 101-108
 - 58) Powell, K. L., and Purifoy, D. J. M. (1977). Nonstructural proteins of herpes simplex virus I. Purification of the induced DNA polymerase. *J. Virol.* **24**, 618-626
 - 59) Knopf, K. W. (1979). Properties of herpes simplex virus DNA polymerase and characterization of its associated exonuclease activity. *Eur. J. Biochem.* **98**, 231-244
 - 60) Ooka, T., Lenoir, G. M., Decaussin, G., Bornkamm, G. W., and Daillie, J. (1986). Epstein-Barr virus-specific DNA polymerase in virus-nonproducer Raji cells. *J. Virol.* **58**, 671-675
 - 61) Derse, D., Bastow, K. F., and Cheng, Y-C. (1982). Characterization of the DNA polymerases induced by a group of herpes simplex type 1 variants selected for growth in the presence of phosphonoformic acid. *J. Biol. Chem.* **297**, 10251-10260
 - 62) O'Donnell, M. E., Elias, P., and Lehman, I. R. (1987). Processive replication of single-stranded DNA templates by the herpes simplex virus-induced DNA polymerase. *J. Biol. Chem.*, in press.
 - 63) Ostrander, M., and Cheng, Y.-C. (1980). Properties of herpes simplex virus type 1

- and type 2 DNA polymerase. *Biochim. Biophys. Acta* **609**, 232-245
- 64) Nishiyama, Y., Maeno, K., and Yoshida, S. (1983). Characterization of human cytomegalovirus-induced DNA polymerase and the associated 3'-to-5' exonuclease. *Virology* **124**, 221-231
 - 65) Abbotts, J., Nishiyama, Y., Yoshida, S., and Loeb, L. A. (1987). On the fidelity of DNA replication: Herpes DNA polymerase and its associated exonuclease. *Nucleic Acids Res.* **15**, 1185-1198
 - 66) Hay, J., and Subak-Sharpe, J. (1976). Mutants of herpes simplex virus type 1 and 2 that are resistant to phosphonoacetic acid induce altered DNA polymerase activities in infected cells. *J. Gen. Virol.* **31**, 145-148
 - 67) Schnipper, L. E., and Crumpacker, C. S. (1980). Resistance of herpes simplex virus to acycloguanosine: role of viral thymidine kinase and DNA polymerase loci. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 2270-2273
 - 68) Coen, D. M., Furman, P. A., Gelep, P. T., and Schaffer, P. A. (1982). Mutations in the herpes simplex virus DNA polymerase gene can confer resistance to 9- β -D-arabinofuranosyladenine. *J. Virol.* **41**, 909-918
 - 69) Nishiyama, Y., Suzuki, S., Yamauchi, M., Maeno, K., and Yoshida, S. (1984). Characterization of an aphidicolin-resistant mutant of herpes simplex virus type 2 which induces an altered virus DNA polymerase. *Virology* **135**, 87-96
 - 70) Crumpacker, C. S., Kowalsky, P. N., Oliver, S. A., Schnipper, L. E., and Field, A. K. (1984). Resistance of herpes simplex virus to 9-[2-hydroxy-1-(hydroxymethyl) ethoxy] methyl] guanine: Physical mapping of drug synergism within the viral DNA polymerase locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 1556-1560
 - 71) Coen, D. M., Fleming, H. E., Leslie, L. K., and Retondo, M. J. (1985). Sensitivity of arabinosyladenine-resistant mutants of herpes simplex virus to other antiviral drugs and mapping of drug hypersensitivity mutations to the DNA polymerase locus. *J. Virol.* **53**, 477-488
 - 72) Gibbs, J. S., Chiou, H. C., Hall, J. D., Mount, D. W., Retondo, M. J., Weller, S. K., and Coen, D. M. (1985). Sequence and mapping analyses of the herpes simplex virus DNA polymerase gene predict a C-terminal substrate binding domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 7969-7973
 - 73) Quinn, J. P., and McGeoch, D. J. (1985). DNA sequence of the region in the genome of herpes simplex virus type 1 containing the genes for DNA polymerase and the major DNA binding protein. *Nucleic Acids Res.* **13**, 8143-8163
 - 74) Tsurumi, T., Maeno, K., and Nishiyama, Y. (1987). Nucleotide sequence of the DNA polymerase gene of herpes simplex virus type 2 and comparison with the type 1 counterpart. *Gene*, in press.
 - 75) Draper, K. G., Devi-Rao, G., Costa, R. H., Blair, E. D., Thompson, R. L., and Wagner, E. K. (1986). Characterization of the genes encoding herpes simplex virus type 1 and type 2 alkaline exonucleases and overlapping proteins. *J. Virol.* **57**, 1023-1036
 - 76) Baer, R., Bankier, A. T., Biggin, M. D., Deininger, P. L., Farrell, P. J., Gibson, T. J., Hatfull, G., Hudson, G. S., Satchwell, S. C., Seguin, C., Tuffnell, P. S., and Borell, B. G. (1984). DNA sequence and expression of the B 95-8 Epstein-Barr virus genome. *Nature* **310**, 207-211
 - 77) Larder, B. A., Kemp, S. D., and Darby, G. (1987). Related functional domain in virus DNA polymerase. *EMBO J.* **6**, 169-175
 - 78) Gingeras, T. R., Sciaky, D., Gelinis, R. E., Bing-Dong, J., Yen, C. E., Kelly, M. M., Bullock, P. A., Parsons, B. L., O'Neil, K. E., and Roberts, R. J. (1982). Nucleotide sequence from the adenovirus-2 genome. *J. Biol. Chem.* **257**, 13475-13491
 - 79) Earl, P. L., Jones, E. V., and Moss, B. (1986). Homology between DNA polymerase of poxviruses, herpesvirus, and adenovirus: Nucleotide sequence of the vaccinia virus DNA polymerase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 3659-3663
 - 80) Nishiyama, Y., Yoshida, S., Tsurumi, T., Yamamoto, N., and Maeno, K. (1985). Drug-resistant mutants of herpes simplex virus type 2 with a mutator or antimutator phenotype. *Microbiol. Immunol.* **29**, 377-381
 - 81) Tsurumi, T., Maeno, K., and Nishiyama, Y. (1987). A single-base change within the DNA polymerase locus of herpes simplex virus type 2 can confer resistance to aphidicolin. *J. Virol.* **61**, 388-394
 - 82) Nishiyama, Y., Tsurumi, T., Aoki, H., and Maeno, K. (1983). Identification of DNA polymerase (s) involved in the repair of viral and cellular DNA in herpes simplex virus type 2-infected cells. *Virology* **129**, 524-528
 - 83) Nishiyama, Y., Yoshida, S., and Maeno, K. (1984). Involvement of DNA polymerase in

- host cell reactivation of uv-irradiated herpes simplex virus. *J. Virol.* **49**, 598-600
- 84) Kroban, H., Schaffer, P., and Depamphillis, M. L. (1979). Involvement of eukaryotic deoxyribonucleic acid polymerase in the replication of cellular and virus deoxyribonucleic acid. *Biochemistry* **18**, 4431-4443
 - 85) Allaudeen, H. S., and Rani, G. (1982). Cellular and Epstein-Barr virus specific DNA polymerase in virus-producing Burkitt's lymphoma cell lines. *Nucleic Acids Res* **10**, 2453-2465
 - 86) Yates, J. L. Warren, N., and Sugden, B. (1985). Stable replication of plasmids derived from Epstein-Barr virus in various mammalian cells. *Nature* **313**, 812-815
 - 87) Goodman, S. R., Prezyna, C., and Benz, W. C. (1978). Two Epstein-Barr virus-associated DNA polymerase activities. *J. Biol. Chem.* **253**, 8617-8628
 - 88) Mar, E.-C., Patel, P. C., and Huang, E.-S. (1981). Human cytomegalovirus-associated DNA polymerase and protein kinase activities. *J. Gen. Virol.* **57**, 149-156
 - 89) Francke, B., Moss, H., Timbury, M. C., and Hay, J. (1978). Alkaline DNase activity in cells infected with a temperature-sensitive mutant of herpes simplex type 2. *J. Virol.* **26**, 209-213
 - 90) Hoffmann, P. J., and Cheng, Y.-C. (1979). DNase induced after infection of KB cells by herpes simplex virus type 1 or type 2. II. Characterization of an associated endonuclease activity. *J. Virol.* **32**, 449-457
 - 91) Strobel-Fidler, M., and Francke, B. (1980). Alkaline deoxyribonuclease induced by herpes simplex virus type 1: Composition and properties of the purified enzyme. *Virology* **103**, 493-501
 - 92) Hoffmann, P. J. (1981). Mechanism of degradation of duplex DNA by the DNase induced by herpes simplex virus. *J. Virol.* **38**, 1005-1014
 - 93) Francke, B., and Garrett, B. (1982). The effect of a temperature-sensitive lesion in the alkaline DNase of herpes simplex virus type 2 on the synthesis of virus DNA. *Virology* **116**, 116-127
 - 94) Moss, H. (1986). The herpes simplex virus type 2 alkaline DNase activity is essential for replication and growth. *J. Gen. Virol.* **67**, 1173-1178
 - 95) Clough, W. (1980). An endonuclease isolated from Epstein-Barr virus-producing human lymphoblastoid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 6194-6198
 - 96) Feighny, R. J., Henry II, B. E., and Pagano, J. S. (1981). Epstein-Barr virus-induced deoxynuclease and the reutilization of host-cell DNA degradation products in viral replication. *Virology* **115**, 395-400
 - 97) Costa, K., Draper, K., Banks, L., Powell, K., Cohen, G., Eisenberg, R., and Wagner, E. (1983). High resolution characterization of herpes simplex virus type 1 transcripts encoding alkaline exonuclease and a 50000-dalton protein tentatively identified as a capsid protein. *J. Virol.* **48**, 591-603
 - 98) Paoletti, E., and Moss, B. (1972). Protein kinase and specific phosphate acceptor proteins associated with vaccinia virus cores. *J. Virol.* **10**, 417-424
 - 99) Hatanaka, M., Twiddy, E., and Gilden, R. V. (1972). Protein kinase associated with RNA tumor viruses and other budding RNA viruses. *Virology* **47**, 536-538
 - 100) Silberstein, H., and August, J. T. (1973). Phosphorylation of animal virus proteins by a virion protein kinase. *J. Virol.* **12**, 511-522
 - 101) Albin, C., and Robinson, W. S. (1980). Protein kinase activity in hepatitis B virus. *J. Virol.* **34**, 297-302
 - 102) Lemaster, S., and Roizman, B. (1980). Herpes simplex virus phosphoproteins. II. Characterization of the virion protein kinase and the polypeptides phosphorylated in the virion. *J. Virol.* **35**, 798-811
 - 103) Blue, W., and Stobbs, D. G. (1981). Isolation of a protein kinase induced by herpes simplex virus type 1. *J. Virol.* **38**, 383-388
 - 104) Purves, F. C., Katan, M., Stevely, W. S., and Leader, D. P. (1986). Characteristics of the induction of a new protein kinase in cells infected with herpesviruses. *J. Gen. Virol.* **67**, 1049-1057
 - 105) Michelson, S., Tardy-Panit, M., and Barzu, O. (1984). Properties of a human cytomegalovirus-induced protein kinase. *Virology* **134**, 259-268
 - 106) Britt, W. J., and Auger, D. (1986). Human cytomegalovirus virion-associated protein with kinase activity. *J. Virol.* **59**, 185-188
 - 107) Roby, C., and Gibson, W. (1986). Characterization of phosphoproteins and protein kinase activity of virions, noninfectious enveloped particles, and dense bodies of human cytomegalovirus. *J. Virol.* **59**, 714-727
 - 108) Michelson, S., Tardy-Panit, M., and Barzu, O. (1985). Catalytic properties of a human cytomegalovirus-induced protein kinase. *Eur. J. Biochem.* **149**, 393-399

- 109) Wilson, M. E., and Consigli, R. A. (1985). Functions of a protein kinase activity associated with purified capsids of the granulosis virus infecting *Plodia interpunctella*. *Virology* **143**, 526-535
- 110) De Clercq (1982). Specific targets for antiviral drugs. *Biochem. J.* **205**, 1-13
- 111) Langelier, Y., and Buttin, G. (1981). Characterization of ribonucleotide reductase induction in BHK-21/C 13 Syrian hamster cell line upon infection by herpes simplex virus (HSV). *J. Gen. Virol.* **57**, 21-31
- 112) Averett, D. R., Lubbers, C., Elion, G. B., and Spector, T. (1983). Ribonucleotide reductase induced by herpes simplex type 1 virus: Characterization of a distinct enzyme. *J. Biol. Chem.* **258**, 9831-9838
- 113) Gentry, G. A., and Aswell, J. F. (1975). Inhibition of herpes simplex virus replication by arabinofuranosylthymine. *Virology* **65**, 294-296
- 114) Müller, W. E. G., Zahn, R. K., Arendes, J., and Falke, D. (1979). Phosphorylation of arabinofuranosylthymine in noninfected and herpes virus (TK⁺ and TK⁻)-infected cells. *J. Gen. Virol.* **43**, 261-271
- 115) Allaudeen, H. S., Kozarich, J. W., Bertino, J. R., and De Clercq, E. (1981). On the mechanism of selective inhibition of herpesvirus replication by (E)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 2698-2702
- 116) Elion, G. B., Furman, P. A., Fyfe, J. A., de Miranda, P., Beauchamp, L. and Schaeffer, H. J. (1977). Selectivity of action of an antiherpetic agent, 9-(2-hydroxyethoxymethyl) guanine. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **74**, 5716-5720
- 117) Derse, D., Cheng, Y-C., Furman, P. A., St. Clair, M. H., and Elion, G. B. (1981). Inhibition of purified human and herpes simplex virus-induced DNA polymerases by 9-(2-hydroxyethoxymethyl) guanine triphosphate. *J. Biol. Chem.* **356**, 11447-11451.
- 118) Field, A. K., Davies, M. E., Dewitt, C., Perry, H. C., Liou, R., Germershausen, J., Karkas, J. D., Ashton, W. T., Jonston, D. B. R., and Tolman, R. L. (1983). 9-[[2-Hydroxy-1-(hydroxymethyl) ethoxy] methyl]guanine: A selective inhibitor of herpes group virus replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 4139-4143
- 119) Mao, J. C.-H., and Robinshaw, E. E. (1975). Mode of inhibition of herpes simplex virus DNA polymerase by phosphonoacetate. *Biochemistry* **14**, 5475-5479
- 120) Leinback, S. S., Reno, J. M., Lee, L. F., Isbell, A. F., and Boezi, J. A. (1976). Mechanism of phosphonoacetate inhibition of herpesvirus-induced DNA polymerase. *Biochemistry* **15**, 426-430
- 121) Helgstrand, E., Eriksson, B., Johansson, N. G., Lannerö, B., Larson, A., Misiorny, A., Noren, J. O., Sjöberg, B., Shenberg, K., Stening, G., Stridh, S., Öberg, B., Alenius, S., and Philipson, L. (1978). Trisodium phosphonoformate, a new antiviral compound. *Science* **201**, 819-821
- 122) Shipman, C., Smith, S. H., Drach, J. C., and Klayman, D. L. (1981). Antiviral activity of 2-acetylpyridine thiosemicarbazones against herpes simplex virus. *Antimicrob. Agents Chemother.* **19**, 682-685
- 123) Turk, S. R., Shipman, C., and Drach, J. C. (1986). Selective inhibition of herpes simplex virus ribonucleoside diphosphate reductase by derivatives of 2-acetylpyridine thiosemicarbazone. *Biochem. Pharmacol.* **35**, 1539-1545
- 124) Spector, T., Averett, D. R., Nelson, D. J., Lambe, C. U., Morrison, R. W., St. Clair, M. H., and Furman, P. A. (1985). Potentiation of antiherpetic activity of acyclovir by ribonucleotide reductase inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 4254-4257
- 125) Sawyer, M. H., Ostrove, J. M., Felser, J. M., and Strauss, S. E. (1986). Mapping of the varicella zoster virus deoxypyrimidine kinase gene and preliminary identification of its transcript. *Virology* **149**, 1-9
- 126) Leary, K., and Francke, B. (1984). The interaction of a topoisomerase-like enzyme from herpes simplex virus type 1-infected cells with nonviral circular DNA. *J. Gen. Virol.* **65**, 1341-1350
- 127) Müller, M. K., Bolles, C. S., and Parris, D. S. (1985). Association of type 1 DNA topoisomerase with herpes simplex virus. *J. Gen. Virol.* **66**, 1565-1574
- 128) Henry, B. E., Glaser, R., Hewetson, J., and O'Callaghan, D. J. (1978). Expression of altered ribonucleotide reductase activity associated with the replication of the Epstein-Barr virus. *Virology* **89**, 262-271
- 129) Kamata, T., Takaki, K., Hinuma, Y., and Watanabe, Y. (1981). Protein kinase activity associated with Epstein-Barr virus-determined nuclear antigen. *Virology* **113**, 512-520
- 130) Müller, W. E. G., Zahn, R. K., Bittlingmayer, K., and Falke, D. (1977). Inhibition of herpes DNA synthesis by 9-β-D-arabinofuranosyladenine in cellular and cell-free

- systems. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **284**, 34-48
- 131) St. Clair, M. H., Miller, W. H., Miller, R. L., Lambe, C. U., and Furman, P. A. (1984). Inhibition of cellular α DNA polymerase and herpes simplex virus-induced DNA polymerase by the triphosphate of BW 759U. *Antimicrob. Agents Chemther.* **25**, 191-194
- 132) Allaudeen, H. S., Descamps, J., Sehagal, R. K., and Fox, J. J. (1982). Selective inhibition of DNA replication of herpes simplex virus infected cells by 1-(2'-deoxy-2' fluoro - β -D-arabinofuranosyl)-5-iodocytosine. *J. Biol. Chem.* **257**, 11879-11882
- 133) Suzuki, S., Saneyoshi, M., Nakayama, C., and Nishiyama, Y. (1985). Selective inhibition of human cytomegalovirus replication by 1- β -D-arabinofuranosyl-5-fluorouracil : A possible bi-functional antiviral agent. In *Herpes viruses and Virus Chemotherapy* (ed, Kono, R.) pp 229-232, Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
- 134) Suzuki, S., Saneyoshi, M., Nakayama, C., Nishiyama, Y., and Yoshida, S. (1985). Mechanism of selective inhibition of human cytomegalovirus replication by 1- β -D-arabinofuranosyl-5-fluorouracil. *Antimicrob. Agents Chemother.* **28**, 326-330
- 135) Nakayama, K., Ruth, J. L., and Cheng, Y.-C. (1982). Differential effect of nucleoside analog triphosphates on ribonucleotide reductases from uninfected and herpes simplex virus-infected HeLa cells. *J. Virol.* **43**, 325-327