2. HIV-1 増殖における CK-II の生理的役割

大槻 健蔵, 前川 敏郎

(北里大学大学院・医療系研究科・分子生体情報学)

はじめに

ウイルスの増殖は、感染細胞の各種生理機能性因子（ゲノム複製の関連因子、転写の調節因子やタンパク質合成の調節因子など）の機能発現に依存している。レトロウイルスの生活環は、他のウイルス種よりも宿主細胞の高分子合成システムおよび代謝系の制御と密接に関係している。しかしながら、レトロウイルス遺伝子由来タンパク質の生理機能発現が細胞レベルでどのように制御されているのか必ずしも明確にされていない。セリン/スレオニン・プロテインキナーゼ（S/T-PKase）の一種であるカゼインキナーゼ II（CK-II）に関する最近の研究によって、CK-II は各種ウイルスの増殖に関与する細胞側の機能性因子とウイルスタンパク質の生理機能発現に重要な役割を演じていることが明らかにされつつある。本稿では、我々の *in vitro* での研究成果を中心に、（1）CK-II の酵素化学的特徴と細胞内調節因子、（2）HIV-1 Rev による CK-II の活性化作用、（3）グリチルリチン（GL）-affinity カラムを用いた HIV-1 タンパク質 [protease (PR), reverse transcriptase (RT) や Rev (regulator of expression of virion protein) など] の選択的精製、（4）CK-II による GL 結合性 HIV-1 タンパク質のリン酸化を介する活性化、さらに（5）CK-II による HIV-1 タンパク質のリン酸化を選択的に阻害する天然化学

物質の化学的特徴と抗 HIV-1 作用に関する研究情報などをまとめた。

1. CK-II の酸素化学的特徴

CK-II は、酵母から哺乳動物細胞そして植物細胞に至るまで広く生物界に分布し、その遺伝子は異なる生物種間でもよく保存されている^{1,2)}。CK-II は、 α -catalytic subunit (分子量 35-42 kDa) と β -regulatory subunit (分子量 24-28 kDa) のヘテロダイマー [$\alpha_2\beta_2$, $\alpha\alpha'\beta_2$ および $\alpha'\beta_2$ (分子量 120-150 kDa)] からなっている (α' -subunit 遺伝子は α -subunit 遺伝子と異なる)^{1,2)}。

CK-II は、（1）乳カゼイン、卵ホスビチンや熱ショックタンパク質-90 (Hsp-90) など分子内にアスパラギン酸やグルタミン酸の連続した配列を持つタンパク質を *in vitro* でよくリン酸化する；（2）ATP と同様に GTP もリン酸供与体となる；（3）ヒストン、プロタミン、poly-Arg や poly-Lys などの塩基性ポリペプチドの β -subunit への結合によって活性化される；（4）ヘパリンやデキストラン硫酸などの硫酸化合物や植物ポリフェノール化合物 [quercetin や epigallocatechin gallate (EGCG) など] の α -subunit への結合によって酵素活性が選択的に阻害されるなどの酵素化学的特徴を持っている（表 1）。これらの CK-II の酵素化学的特徴は、他の S/T-PKase (A-kinase や C-kinase など) のそれらから完全に区別される^{1,2)}。CK-I はカゼインをよくリン酸化することやヘパリンによって阻害されることなどから、CK-II とよく似た PKase として知られている。しかしながら、CK-I の遺伝子および生理的機能は、CK-II のそれらと全く区別されている¹⁻³⁾。

（1）CK-II の標的となる機能性タンパク質

CK-II は、確認されているだけでも 100 種以上もの細胞内機能性タンパク質（転写調節因子 [Ap-1, Sp

The physiological role of CK-II in the growth mechanism of HIV-1 as a host mediator

Kenzo Ohtsuki and Toshiro Maekawa

Laboratory of Genetical Biochemistry, Graduate School of Medical Sciences, Kitasato University

Kitasato 1-15-1, Sagami-hara 228-8555, Japan

〒228-8555 相模原市北里 1 丁目 15-1

TEL/FAX: 042-778-8863 (直通)

e-mail: ken@kitasato-u.ac.jp

表1 CK-IIの酵素化学的性質

1. 分類	2ndメッセンジャー非依存性S/T-PKase
2. 分子量とsubunit構造	130-150kDa ($\alpha_2\beta_2$, $\alpha\alpha'\beta_2$ もしくは $\alpha'\beta_2$) α -, α' -catalytic subunit (35-43 kDa) β -regulatory subunit (24-28 kDa)
3. 二価金属イオン要求性	Mg ²⁺ , Mn ²⁺
4. リン酸供与体	ATP, GTP
5. 活性化因子	Protamine, Histone, Polyamine, poly-Arg HIV-1 Rev, etc
6. 細胞内安定化因子	Hsp-90
7. 細胞内抑制因子	Actin
8. 阻害物質	Heparin, Dextran-sulfate, Quercetin NCS-chromophore, etc
9. <i>In vitro</i> での主なリン酸受容体	Casein, Phosvitin, Hsp-90, etc
10. 細胞内分布	核, 細胞質, 細胞膜

-1, cAMP response element (CRE)-binding protein, G box-binding protein (GBP) や serum response factor (SRF) など], DNA 合成関連酵素 [DNA 依存性 DNA-polymerase, DNA-ligase や DNA-topoisomerase など], その他の機能性因子 [各種タンパク質合成の調節因子 (合成開始因子と伸長因子), Hsp-90, インスリン受容体, スクレオリンや非ヒストンクロマチンタンパク質 (NHCP) など], がん遺伝子タンパク質 [cErbA, cMyb, cMyc, Max や Fos など] やがん抑制遺伝子タンパク質 [p53やRb など]) や各種代謝系酵素などのリン酸化部位 (S/T-X-X-E/D) を認識して特異的にリン酸化する (表2)^{1,2)}。このようなCK-IIの極めて幅広い基質特異性 (標的タンパク質種) は, 他のPKase [A-kinase, G-kinase やチロシンキナーゼ (Tyr-kinase) など] では認められない酵素化学的特徴である。CK-IIは細胞質や膜にも存在するが, 核局在性PKaseであるので多くの核移行性タンパク質をリン酸化する。

このようなCK-IIの酵素化学的特徴 (実に多くの細胞内機能性タンパク質をリン酸化する) から, ウイルス感染細胞やサイトカイン処理細胞での生化学的変化をCK-IIによるポリペプチドのリン酸化として検出することが可能である。

(2) CK-IIと複合体を形成している細胞内機能性因子

遺伝子発現の制御に関与する調節因子とCK-IIとの生理的関係を明らかにする目的で, 各種動物組織や培養細胞の核画分よりDNA-affinityカラムによりDNA結合性タンパク質を部分精製した。さらに, この画分をGL-affinityカラムによりCK-IIによって特

異的にリン酸化されるGL結合性タンパク質 (gbP) を精製した^{4,5)}。その結果, CK-IIによってリン酸化される3種のポリペプチド [p99 (pI 9.0とpI 7.3) およびp56] 画分中にCK-II活性が検出された, 特異抗体を用いた免疫学的実験およびN末端アミノ酸配列の解析から, p99 (pI 9.0) はグルココルチコイド受容体 (GR: 核内受容体ファミリーに属する転写調節因子), p99 (pI 7.3) はHsp-90, そしてp56はcalreticulinと同定された⁵⁾。これらの実験結果から, GRは, Hsp-90およびp56と複合体を形成していること, そしてCK-IIはHsp-90に結合していることなどが解った⁵⁾。Hsp-90分子内には, CK-IIに対するリン酸化サイト (S/T-X-X-E/D) が17個所も存在する。事実, カゼインと同様に *in vitro* でCK-IIのよい基質となる。しかしながら, CK-IIによってリン酸化される生理機能因子のアミノ酸配列上でのリン酸化サイト数とCK-IIに対する基質活性とは必ずしもパラレルでない。標的タンパク質の生理活性に直接関係するCK-IIに特異的なリン酸化サイトは, 標的タンパク質とCK-IIの α -subunitとの相互作用によって決まる。Hsp-90の場合は, CK-IIによってHsp-90とGRがリン酸化されると, Hsp-90からGRが解離して活性型となる。CK-IIは, Hsp-90と複合体を形成した状態で酵素化学的に安定であり⁶⁾, Hsp-90を含めた多くの標的タンパク質をリン酸化する⁷⁾。

CK-IIは, タンパク質合成の調節にも関与していることが知られている^{1,2)}。そこで, ブタ肝臓1.5M NaCl抽出画分中のCK-IIによってよくリン酸化されるポリペプチドを上述の転写調節因子の場合と同様にGL-affinityカラムで精製した。その結果, 精製60S acidic

表 2 CK-II によってリン酸化される主な細胞内機能性因子

1. DNA結合性酵素
RNAポリメラーゼ I と II
DNAトポイソメラーゼ I と II
DNAリガーゼ
HIV-1逆転写酵素
2. 転写調節因子
Ap-1
Sp-1
GCF (GC結合性因子)
SRF (血清誘導活性化因子)
UBF (Upstream結合性因子)
ステロイドホルモン受容体
3. がん遺伝子およびがん抑制遺伝子産物
cMyc
cMyb
SV40 large T抗原
p53
Rb
ポリオーマウイルスE7
アデノウイルスE1A
4. シグナル伝達系関連因子
C-キナーゼ
A-キナーゼ (調節 β -サブユニット)
p34 ^{cdc-2} -キナーゼ
インスリン受容体
IGF-II 受容体
リボプロテイン受容体
5. タンパク質合成調節因子
各種開始因子 (eIF-1 β , eIF-2 β , eIF-3, eIF-4BやeIF-5など)
各種伸長因子 (eEF-1, eEF-2やeEF-3など)
60S acidic ribosomal protein
6. 核局在性タンパク質
HMG1
HMG14
スクレオリン
p120
7. 代謝系酵素
グリコーゲン合成酵素
オルニチン脱炭酸酵素
リボキシゲナーゼ
ホスフォリパーゼA ₂
8. 他の機能性タンパク質
ミオシン
チューブリン
スペクトリン
トロポニン
免疫グロブリン
Hsp-70
Hsp-90

ribosomal protein 画分に CK-II 活性が認められた。CK-II β 抗体を用いた解析から、CK-II は60S acidic ribosomal protein (P0, P1と P2) と複合体を形成して

いることが解った^{6,9)}。この画分中の CK-II は、HIV-1 Rev, 精子プロタミンやヒストン H2B などの存在かで活性化されて、60S acidic ribosomal protein をよ

図1 合成 HIV-1 Rev フラグメントによる CK-II の活性化 (p99 と p56 のリン酸化)
ヒト T 細胞から部分精製した CK-II 画分を各種 CK-II 活性化フラグメントの存在および非存在下で 20 μ M [γ - 32 P] ATP と反応後、リン酸化された p99 と p56 を分析した。
[A] レーン 1, CK-II 画分 (対照); レーン 2, poly-Arg 1 μ g/ml; レーン 3, poly-Arg 3 μ g/ml; レーン 4, Rev フラグメント 0.1 μ g/ml; レーン 5, Rev フラグメント 0.3 μ g/ml; レーン 6, 1 μ g/ml; レーン 7, 3 μ g/ml; レーン 8, 10 μ g/ml; および レーン 9, 30 μ g/ml。
[B] 3 種の合成フラグメントによる濃度依存的な CK-II の活性化
Rev フラグメント (○); Tat フラグメント (□); および p120 フラグメント (△); poly-Arg (●と■)。

くリン酸化し、結果的にタンパク質合成を促進させる。これに対して、CK-II 阻害化合物 (後述) の添加によってタンパク質合成が濃度依存的に阻害される。

(3) CK-II の細胞内活性化因子と抑制因子

細胞内 CK-II の特異的活性化因子をウニ精子の高塩濃度 (1.5 M NaCl) 抽出画分から精製した。その結果、ウニ卵 CK-II の活性化因子としてウニ精子 H2B₂ と H2B₃ が同定された⁷⁾。ウニ精子ヒストンは、哺乳動物細胞のヒストンと異なり分子内にアルギニン (R) 7 残基からなるクラスターを保有している。R・クラスターを複数持つ DNA 結合性タンパク質として、精子プロタミン (ニジマスプロタミン 3a やサケサルミン A1 など) が知られている。分子内に R・クラスターを持つ DNA 結合性タンパク質として、ヒトアデノウイルスタンパク質である DNA-terminal protein (アミノ酸配列部位: 361-366) や EB ウイルスの C3-protein (アミノ酸配列部位: 74-80) などが存在する。さらに、HIV-1 Rev (アミノ酸配列部位: 35-50, RQARRNRNRWRERQR) と Tat (アミノ酸配列部位: 49-58, RKKRRQRRRP) および HTLV-1 Rex (アミノ酸配列部位: 3-15, KTRRRPRRSQRKR) などのレトロウイルスタンパク質中にも R を多く含むク

ラスターが存在する。これらのクラスター領域は、RNA および DNA との結合部位ともなっている。ヒト核小体 120 kDa ポリペプチド (p120) の核移行シグナル配列 (nuclear localization signal: NLS) の部位 (KRLSSRA-RKRAAKRRL) や SV-40 large T 抗原の NLS 部位 (PKKKRKV) そして転写調節因子である cFos (RPERNMAAAKCRNRRR) や cJun (KRMNRNRIA-ASKCRKRKI) などの NLS も HIV-1 Rev とそれとよく似た R と K を多く含む配列になっている。

HIV-1 Rev と Tat の NLS 部位と同じ配列を持つオリゴフラグメントを合成し、*in vitro* で CK-II 活性に対する促進効果を解析した¹⁰⁾。その結果、Rev の NLS 配列を持つオリゴフラグメントは、濃度依存的に CK-II 活性を促進させた (図 1)。しかしながら、HIV-1 Tat, SV-40 large T 抗原, p120 や転写調節因子 (cFos と cJun) などの NLS 部位のオリゴフラグメントでは、わずかしき CK-II 活性を促進させなかった¹⁰⁾。クラスター内にリジン (K) が存在すると、CK-II 活性はむしろ抑制された。K の存在は、クラスター領域と CK-II の β -subunit との立体的相互関係に微妙なズレを与えるものと考えられる。得られた実験結果を総合すると、分子内に R を多く含むクラスターを持つ HIV-1 Rev, SIV Rev や HTLV-1 Rex などが感染細胞内

表3 CK-IIによってリン酸化される主なウイルスタンパク質と生理機能

ウイルス種	リン酸化されるタンパク質	生理機能	文献
Adenovirus	E1A, E1B	活性化	13, 14
Borna disease virus (BDV)	P protein	活性化	15
Bovine papilloma virus (BPV)	E1 protein	複製開始 (Unwinding)	16
Canine distemper virus (CDV)	P protein	活性化	17
Epstein-Barr virus (EBV)	ZEBRA protein	活性化	18, 19
	SM protein	活性化	20
Human cytomegalovirus (HCMV)	Glycoprotein B (gB)	Translocation	21, 22
HIV-1	Reverse transcriptase (RT)	活性化	23, 24
	Protease (PR)	活性化	25
Herpes simplex virus type 1 (HSV-1)	Regulatory protein ICP27	ゲノム複製	26, 27
	VP22 (tegument protein)	粒子形成	28
	UL13 protein	複製の開始調節	29
Polyoma virus	VP1	活性化	30
SV-40	Large T antigen	Rbとの結合調節	31, 32
	Importin	T抗原 NLSの親和性の促進	33
Vesicular stomatitis virus (VSV)	P-protein	転写活性の促進 (polymerase活性の促進)	34-36
Varicella-zoster virus (VZV)	Glycoprotein gE	ウイルス放出と二次感染	37

で十分に蓄積されると近傍に存在する CK-II が活性化され、その結果として HIV-1 の後期遺伝子発現の誘導や HIV-1 ゲノムの複製などが効率的に促進されるものと考えられる。

CK-II の特異的な細胞内抑制因子を哺乳動物細胞から分離精製したところ、筋肉の構成タンパク質であるアクチンが同定された¹¹⁾。しかも、抗アクチン抗体による免疫沈降実験から、細胞内の CK-II はアクチンとも複合体を形成していることが解った。アクチン自身は細胞内に大量に存在することから、細胞質遊離の CK-II はアクチンによって完全に抑制されているものと考えられる。この抑制は、各種アクチンキナーゼ(分子量37 kDa の CK-I 様キナーゼ、A-kinase や actin-fragmin kinase など) によるリン酸化を介して調節されている¹²⁾。

2. ウイルス増殖における CK-II の生理的役割

(1) CK-II によってリン酸化されるウイルスタンパク質

近年報告された CK-II によって特異的にリン酸化される主なウイルスタンパク質とその生理的役割を表3にまとめた¹³⁻³⁷⁾。ウイルス種によって CK-II の標的となるタンパク質の生理機能が異なるが、CK-II は (1) ウイルスゲノムの複製 (replication), (2) ウイルスゲノムからの発現 (transcription), (3) ウイルスタンパク質の合成 (translation), (4) 遺伝子産

物の細胞質から核内への移行 (translocation), (5) 宿主細胞の転写および翻訳に関与する各種調節因子の活性化および protein-protein 相互作用の調節, そして (6) ウイルス粒子の放出などのプロセスに直接関与するウイルスタンパク質をリン酸化して調節している。これらの CK-II の標的タンパク質の生理機能(表3)と CK-II によってリン酸化される細胞内の機能性因子(表2)とを考え合わせると、CK-II はウイルスの感染からウイルス粒子の放出に至るまでのプロセスと密接に係わる宿主因子 (host mediator) の一つと言える。

(2) rRT と rPR の選択的精製法

大腸菌の培養系で生産されたりコンピナント HIV-1 逆転写酵素 (rRT) と protease (rPR) は、GL-affinity カラムによって選択的に精製される (図2と図3)^{23, 24)}。GL 分子は rRT と rPR に直接結合するが、*in vitro* で rRT と rPR の活性をさほど阻害しない。このような結果は、GL が rRT と rPR の活性中心と異なる部位に結合することを示している。rRT と rPR 以外にも rRev や rTat など GL-affinity カラムにより選択的に精製される。これらの結果から、(1) HIV-1 タンパク質 (RT, PR, Rev や Tat など) の精製には GL-affinity カラムが極めて有効であること、そして (2) GL 分子は複数の HIV-1 タンパク質に直接結合することなどが明らかになった。

図2 部分精製画分から rRT の GL-affinity カラムによる精製

[A] rRT の RDDP 活性 (●)

[B] SDS-PAGE による rRT (p66 と p51) の検出

[C] Western blotting による rRT (p66 と p51) の同定

(3) CK-II による HIV-1 タンパク質のリン酸化

アミノ酸配列のデータベースによるモチーフ検索から、主な HIV-1 タンパク質 (RT, PR, Rev や Tat など) に対する CK-II のリン酸化サイト (S/T-X-X-D/E) が多数存在する (図 4) ことが解った。そこで、HIV-1 感染 T 細胞と非感染 T 細胞から部分精製した CK-II 画分を $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP と直接反応させて、CK-II によってリン酸化されるポリペプチドを解析した。その結果、少なくとも 6 種のポリペプチド (120, 51, 41, 34, 28 および 23 kDa など) が HIV-1 感染 T 細胞より調製した CK-II 画分で検出された (図 5 A)¹⁰。これらの結果は、HIV-1 粒子 lysate を用いた解析結果 (図 5 A) と基本的に一致した。さらに、HIV-1 構成ポリペプチドに対する特異抗体を用いた実験か

ら、p120, p51, p41 および p24 は、それぞれ HIV-1 gp120, RT (p66 と p51), gp41 および Gag (p24) と同定された¹⁰。さらに、HIV-1 Rev も *in vitro* と *in vivo* で CK-II によりリン酸化される^{10, 38}。CK-II により Rev の N 末端領域にあるセリン残基がリン酸化されることによって、Rev の生理活性発現に必要なループ構造を取るようになると考えられている³⁸。これらの実験結果や報告から、HIV-1 感染細胞内で HIV-1 遺伝子から発現される多くのタンパク質が CK-II によってリン酸化されることが明らかになった。

(4) CK-II による RT および PR の活性化

CK-II による rRT と rPR のリン酸化の生理的意味について *in vitro* で解析した。その結果、(1) rRT (p66

図3 部分精製画分からrPRのGL-affinityカラムによる精製

[A] rPRのRDPP活性(○)

[B] SDS-PAGEによるrPR(p11)の検出

[C] Western blottingによるrPR(p11)の同定

と p51) と rPR は CK-II によってリン酸化されること、(2) リン酸化された rRT では 3 つの酵素活性 (RNA 依存性 DNA polymerase, DNA 依存性 DNA polymerase および RNase H 活性) が、そして rPR の protease 活性が有意に促進されること、さらに (3) グリチルレチン酸誘導体 (oGA), quercetin や EGCG など、そして放線菌から分離した 8-chloro-3', 4', 5, 7-tetrahydroxyisoflavone (8-chloro-3', 4', 5, 7-THI) やネオカルチノスタチン (NCS)-chromophore などの CK-II 阻害剤 (図 6) は、RT と PR の酵素活性を全く阻害しない濃度で CK-II による RT と PR の活性化を選択的に阻害した²⁵⁾。これらの実験結果から、rRT (図 7) と rPR (図 8) は CK-II によるリン酸化を

介して活性化されることが解った。

CK-II によって特異的にリン酸化されて活性化される酵素として、DNA-ligase³⁹⁾, DNA-topoisomerase⁴⁰⁾, DNA 依存性 RNA polymerase⁴¹⁾, lipoxygenase 3⁴²⁾ や phospholipase A₂⁴³⁾ などが知られている。CK-II によるリン酸化を介して生理機能が抑制される DNA 結合性因子として、SV-40 large T 抗原^{31,32)} や Egr-1 (growth response gene protein 1)⁴⁴⁾ などが知られている。HIV-1 感染細胞において、HIV-1 Rev が細胞内で十分に蓄積されると細胞内の CK-II が活性化されて各種転写調節因子、代謝系酵素や HIV-1 タンパク質などがリン酸化される。その結果として、HIV-1 遺伝子の複製、転写や翻訳などのプロセスがより効果的に進行

Potential site of CK-II: S/T-X-X-D/E

図4 gbp と同定された HIV-1 遺伝子産物の CK-II のリン酸化サイト (S/T-X-X-D/E)

図5 [A] HIV-1 感染および非感染 T 細胞より調製した CK-II 画分中のリン酸化ポリペプチドの検出

レーン 1 と 2, HIV-1 非感染細胞; レーン 3 と 4, HIV-1 感染細胞。

CK-II 活性化因子 (poly-Arg) 存在下 (レーン 2 と 4) と非存在下 (レーン 1 と 3) でのリン酸化反応。

[B] HIV-1 粒子 lysate での CK-II によるリン酸化ポリペプチドの検出

レーン 1, HIV-1 lysate のみ; レーン 2, HIV-1 lysate + CK-II; レーン 3, レーン 2 + CK-II 活性化因子 (poly-Arg); レーン 4, レーン 3 + CK-II 阻害剤 (quercetin); レーン 5, レーン 3 + CK-II 阻害剤 (oGA); および レーン 6, レーン 3 + CK-II 阻害剤 (NCS-chrom)。

図 6 *In vitro* で CK-II 活性を選択的に阻害する主な天然化合物

するものと理解される。しかしながら、ウイルス種によっては HIV-1 Rev や EBV EBNA-3 C のような CK-II の活性化因子がウイルス感染後に必ずしも供給されるとは限らない。このような場合、CK-II を活性化する間接的な機構が考えられる：(1) アクチンなどの細胞内 CK-II 抑制因子による抑制の解除；(2) ヒストン（主に H2B）のように細胞内に存在する CK-II 活性化因子の関与；(3) 細胞内の protease によって切断されて生じる塩基性フラグメントの提供；(4) 他の関連性 PKase [可能性として cdc-2-like kinase (clk-kinase) や CK-I など] による CK-II の活性化；さらに、(5) 標的タンパク質側の変化（他の PKase によるリン酸化もしくは protein phosphatase による脱リン酸化など）などの可能性が考えられる

が、推測の域を脱しえない。

上述のように CK-II は、ウイルスの生活環に重要な宿主因子の一つとしての生理的役割を演じている。事実、フラボノイド化合物の一種 chrysin や 5, 6-dichloro-1- β -D-ribofuranosyl-benzimidazole (DRD) は、CK-II の α -subunit に直接結合して HIV-1 遺伝子の発現に必要な転写調節因子の活性化を選択的に阻害して HIV-1 の増殖を阻害する⁴⁵⁾。後で述べるようにスラミンや evans blue などの硫酸化合物や分子内に多価フェノール基を持つ化合物 (catechin, EGCG や quercetin など) などは、CK-II に対する選択的な阻害作用を有し、抗 HIV-1 作用を示す。当然のことながら、ウイルスの生活環には細胞の多くの高分子合成系や代謝系だけでなく、ウイルスタンパク質の生理

図 7 CK-II によるリン酸化を介する HIV-1 RT の活性化
CK-II による rRT のリン酸化後, 3 種の酵素活性 (RNA 依存性 DNA polymerase, DNA 依存性 DNA polymerase 活性および RNase H) を測定した。

図 8 CK-II によるリン酸化を介する rPR の活性化
CK-II による rPR のリン酸化後, HIV-1 Gag(p55) を基質にして protease 活性を測定した。

機能発現を調節する CK-II 以外の PKase (A-kinase^{24, 46~48}, C-kinase^{17, 24, 48~50}, cdc-2-kinase^{51, 52} や cJun-kinase^{53, 54} など) の関与についても解析されている。

(5) CK-II による PR のリン酸化サイト

CK-II に対する PR のリン酸化サイトは, 2 ヲ所 (²⁶TGAD と ³¹TVLE) 存在する。そこで, 26 番目と 31 番目のスレニオン (T) をアラニン (A) に置換した rPR を調製し, *in vitro* で CK-II によってリン酸化して PR の活性促進を相互に比較した。その結果, (1) 31 番目の T を A に換えた rPR では PR 活性は認めら

れたが, CK-II によってリン酸化されなかったこと, (2) 26 番目の T を S に換えた rPR では CK-II によってリン酸化されたが, PR の活性促進は認められなかった。さらに, (3) 26 番目の T を A に換えた rPR では PR 活性は認められなかった。これらの実験結果から, CK-II に対する HIV-1 PR のリン酸化サイトは 31 番目のスレニオンと推定された⁵⁵。また, 26 番目のスレニオンは PR の活性中心 (²⁵DTG)^{56, 57} と密接に関係しているものと考えられた。これまでに AIDS 患者から分離された HIV-1 株に²⁶TGAD と ³¹TVLE の変異種が認められないことから, このリン酸化サイトは

表 4 *In vitro* で CK-II 活性を阻害する各種化合物

化合物名	50%阻害濃度 (μ M)
1. 硫酸化化合物	
Heparin	0.1 μ g/ml
Dextran sulfate	0.1 μ g/ml
Suramin	1
Evans blue	0.15
Naphthalenedisulfonic acid (NDS)	10
Glycyrrhizin-sulfate	2
2. ポリフェノール化合物	
Quercetin	1.0
Chrysin	2
Catechin	2
Epigallocatechin gallate (EGCG)	5
8C-3', 4', 5, 7-THI*	0.1
3. タンニン	
AC trimer	2
Eugenin	2
Galloyl pedunculagin	0.5
Procyanidin B-2	2
4. GLとGA誘導体	
Glycyrrhizin (GL)	30
Glycyrrhetic acid derivative (oGA)	1
5. エンジン系化合物	
NCS-chromophore	0.06
6. PKase阻害剤	
H-7	10
Staurosporine	20
K-252a	30
NS-9	10

*8-Chloro-3', 4', 5, 7-tetrahydroxyisoflavone

HIV-1 PR の活性調節に極めて重要と考えられる。

3. CK-II 阻害物質の抗 HIV-1 作用

(1) CK-II 阻害物質とその特徴

ヘパリン、デキストラン硫酸、スラミンや evans blue などの硫酸化化合物は、CK-II 活性を選択的に阻害する (表 4)。我々は、*in vitro* の assay 系で CK-II による HIV-1 タンパク質のリン酸化を選択的に阻害する化合物を検索した。その結果、トリテルペノイド系サボニンの 1 種であるグリチルレチン酸 (GA) 誘導体 (oGA) や硫酸化化合物 (スラミン, evans blue や GL-sulfate など) が低濃度で CK-II 活性を選択的に阻害した。天然フラボノイド系化合物 (quercetin や EGCG など) やイソフラボノイド系化合物 (8-chloro-3', 4', 5, 7-THI) (図 6), そしてタンニン (AC-trimer, eugenin, galloyl pedunculagin や procyanidin B-2 など) などは CK-II の標的タンパク質種に無関係に低

濃度でリン酸化を阻害する (表 5)^{8, 24, 25)}。さらに、制がん性抗生物質であるネオカルチノスタチン (NCS) に結合している非ポリペプチド性物質 (chromophore, 分子量 695) は、極めて高い DNA 切断活性を有する天然化合物である⁵⁸⁾。NCS-chromophore の活性部位に関する解析から、ナフタレンカルボン酸 (NA) 部位が CK-II の α -subunit (CK-II α) に直接結合してリン酸化活性を阻害する (50%阻害濃度 = 約 60nM)⁵⁹⁾。しかしながら、極めて選択性の高い CK-II 活性阻害剤は、各種高分子合成系 (DNA, RNA やタンパク質など) や各種代謝系の調節機能の全てを阻害することになり、細胞毒性を生じる。細胞毒性を示さないでウイルス増殖のみを選択的に阻害するには、CK-II の標的となるウイルスタンパク質の活性化や生理活性のみを選択的に阻害することが絶対条件となる。このような特性をウイルス感染細胞内で発揮する阻害化合物は、CK-II の標的となるウイルスタンパ

ク質に選択的に結合することが必須である。

(2) GLの抗ウイルス作用

グリチルレチン酸 (GA) に抗ウイルス作用があることを最初に報告したのが、イタリア・Cagliari 大の Pompei らである⁶⁰⁾。彼等は、(1) 数種のウイルスを感受性細胞に感染させた直後に比較的高い濃度 (8 mM GA) で細胞を処理すると、ヘルペスウイルス 1 型 (HSV-1), NDV や VSV などの増殖が有意に抑制されること、(2) *in vitro* で GA とウイルス粒子を直接混合した後感受性細胞に感染させると、HSV-1 の感染力が著しく低下することなどを明らかにした。しかしながら、GA はポリオウイルスやワクシニアウイルスの増殖に対して全く効果を示さなかった。その後、varicellazoster ウイルス (VZV) も GL によって直接不活化されることが Baba らによって報告された⁶¹⁾。

山梨医科大学の Ito らは⁶²⁾、GL が HIV-1 感染 MOLT 細胞における HIV-1 の増殖を抑制することを最初に報告した。GL は、HIV-1 を直接不活化しないこと、また C-kinase 阻害剤 (H-7) によって HIV-1 の増殖が抑制されることなどから、GL の抗 HIV-1 作用には C-kinase の抑制が関与していることを明らかにした⁶³⁾。Hirabayashi ら⁶⁴⁾によって、GA 誘導体 (oGA, 図 6) が *in vitro* で GL よりはるかに低い濃度で HIV-1 の増殖を抑制することが報告された。さらに、HIV-1 感染 AIDS 患者への GL の投与が臨床的に有効であること⁶⁵⁾。HVI-1 感染者に対する GL の経口療法による臨床的効果があること⁶⁶⁾などが報告されている。

(3) GLの抗 HIV-1 作用の特徴

これまでに同定された GL 結合性タンパク質 (gbP) は、2 つのタイプに大別される。タイプ I (gbP-I) に属する gbP としては、ヒストン (特に H2A と H2B)⁶⁷⁾、ステロイドホルモン受容体⁶⁾、HIV-1 Rev⁹⁾、HIV-1 RT²⁴⁾ や HIV-1 PR²⁵⁾ などである。これらの機能性タンパク質は、分子内に塩基性アミノ酸を多く含む配列を持ち、GL の GA 部位と結合する。これに対して、タイプ II (gbP-II) に属する lipoxigenase⁴²⁾、hyaluronidase⁶⁸⁾、CK-II^{6,9,11)} や A-kinase^{69,70)} などとは、GL のグルクロン酸部位で結合する。

HIV-1 タンパク質と HIV-1 の増殖に関与する細胞内の機能性因子で gbP と同定されたタンパク質の CK-II によるリン酸化に関する解析から、GL の抗 HIV-1 作用は、3 つの阻害[(1) gbP の生理活性に対する

直接的阻害、(2) CK-II のリン酸化を介する活性化の阻害 (間接的作用)、そして (3) gbP である Rev や Tat の細胞内結合性因子 (signal 伝達系および転写の調節因子など) との protein-protein 相互作用の阻害など] に集約される。HIV-1 遺伝子由来の gbP (RT, PR, Rev や Tat など) は、細胞内の多くの機能性因子と共役することによって HIV-1 の生活環に重要な生理的役割を演じている。従って、GL の抗 HIV-1 作用は、HIV-1 の増殖にとって必須な RT や PR を主な分子標的として抗 HIV-1 作用を発揮するものと考えられる。このような GL の抗 HIV-1 作用メカニズムは、RT による DNA 合成の競合阻害剤 [azidothymidine (AZT), didanosine (ddI) や lamivudine (3TC) など]^{69,72)} および PR 阻害剤 [saquinavir (SQV), indinavir (IDV), zidovudine (ZDV), zalcitabine (ZC) など]⁷³⁾ などの AIDS 治療剤のそれらと本質的に異なる。実際に AIDS 患者の治療に用いられている RT の競合阻害剤や PR 阻害剤と比較して、GL は HIV-1 遺伝子産物 (protein) の合成や生理機能発現を阻止する濃度が高いことが難点である。GL の化学的特徴 (CK-II, RT, PR, Rev や Tat などへの結合) を温存させながら、これらの gbP の生理活性および CK-II のリン酸化を介する活性化を低濃度で選択的に阻害する誘導体の合成が求められている。GL には核内転写調節因子 (ステロイドホルモン受容体) に結合して IFN γ 遺伝子の活性化作用、T 細胞や NK 細胞の活性化作用などがあるので、GL の投与は結果的に HIV-1 を含めた各種ウイルス感染に対する生体の防御機構を促進させる。従って、ウイルス増殖に優れた選択性を発揮する GL 誘導体の開発は、HIV-1、肝炎ウイルスやインフルエンザウイルスなどの有効な治療薬となる。

最近、Lazaro らは HIV-1 の AZT 耐性化と CK-II による RT のリン酸化による活性調節との関係について解析した⁷⁴⁾。彼らの報告によれば、AZT 耐性化変異株の RT は野生株の RT に比較して CK-II によるリン酸化能が有為に低いこと、CK-II によってリン酸化される AZT 耐性化変異株 RT のリン酸化セリンとリン酸化スレオニンとの比率が野生株 RT のそれよりも僅かに低いという。しかしながら、CK-II によるリン酸化による AZT 耐性化変異株と野生株の RT 活性 (DNA 合成能) に顕著な差が認められなかった。この結果は、HIV-1 の AZT 耐性化に CK-II による RT のリン酸化サイトの変異が関係している可能性を示している⁷⁴⁾。

まとめと今後の展望

これまでに明らかにされた CK-II の酵素化学的性質と生理機能（遺伝子発現，転写や代謝調節など）などを中心に，HIV-1 の生活環における宿主因子として CK-II の生理的役割をまとめた。CK-II は，HIV-1 タンパク質（RT や PR など）のリン酸化を介して活性化することが実験的に確かめられた。細胞内で Rev が大量に産生されることによって CK-II が活性化されて後期遺伝子発現の誘導，ウイルスゲノムの複製や宿主細胞ゲノムへの組み込みなどのプロセスが有意に促進させるものと考えられる。さらに，CK-II によるリン酸化を介する HIV-1 タンパク質の活性化を選択的に阻害する天然化合物は抗 HIV-1 作用を示すことから，CK-II の選択的阻害はこれら化合物の primary action と考えられる。

他の HIV-1 遺伝子産物（Tat, integrase, Nef, Vpr, Vpu や Vpx など）にも CK-II のリン酸化サイトがあり，実際にウイルス感染細胞内の CK-II によってリン酸化される。特に，Rev, Tat や Vpx などは，宿主細胞の機能性因子との protein-protein 相互作用によってその生理機能が発現されるので，CK-II およびウイルスの増殖に関与する他の PKase (C-kinase, cdc-2-kinase, CaM-kinase や cJun-kinase など) によるリン酸化がその活性調節に重要である。これらの調節機構に関する詳細な解析によって，HIV-1 の増殖における CK-II のより本質的な生理的役割が明らかになると考えられる。さらに，CK-II の標的となる HIV-1 タンパク質にのみより高い選択性を発揮する特徴を持つ新しい抗 HIV-1 剤は，AIDS を含む多くのウイルス感染症の有効な新しい治療薬となる。

謝 辞

本総説での CK-II の生理機能に関する大部分の研究は，文部省科学研究費および北里大学大学院医療系研究科プロジェクト研究費の助成を受けて行われた。また，執筆の機会を与えて下さった京都大学ウイルス研究所・下遠野邦忠教授に深謝致します。

文 献

- 1) Pinna, L. A. (1990) Casein kinase 2 : an "eminence grise" in cellular regulation. *Biochim. Biophys. Acta*, **1054**, 267-284.
- 2) Allende, J. E., and Allende, C. C. (1995) Protein kinases. 4. Protein kinase CK 2 : an enzyme with multiple substrates and a puzzling regulation. *FASEB J.*, **9**, 313-323.
- 3) Tuazon, P. T., and Traugh, J. A. (1991) Casein kinase I and II-multipotential serine protein kinases : structure, function, and regulation. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res.*, **23**, 123-64.
- 4) Ohtsuki, K., Ohishi, M., Karino, A., Kanekatsu, M., and Shamsa, F. (1994) Purification and characterization of a 100 kDa glycyrrhizin (GL)-binding protein (gp100) as an effective phosphate acceptor for CK-II and the effect of GL on the phosphorylation of gp100 by CK-II *in vitro*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **198**, 1090-1098.
- 5) Harada, S., Karino, A., Shimoyama, Y., and Ohtsuki, K. (1996) Identification of glycyrrhizin-binding protein kinase as casein kinase II and characterization of its associated phosphate acceptors in mouse liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **227**, 102-109 (1996).
- 6) Miyata, Y., and Yahara, I. (1995) Interaction between casein kinase II and the 90-kDa stress protein, HSP-90. *Biochemistry*, **34**, 8123-8129.
- 7) Ohtsuki, K., Nishikawa, Y., Saito, H., Munakata, H., and Kato, T. (1996) DNA-binding sperm proteins with oligo-arginine clusters function as potent activators for egg CK-II. *FEBS Letts.*, **378**, 115-120.
- 8) Maekawa, T., Kosuge, S., Sakamoto, S., Komiyama, K., Funayama, S., and Ohtsuki, K. (1999) Biochemical characterization of 60S acidic ribosomal P proteins associated with CK-II from bamboo shoots and potent inhibitors of their phosphorylation *in vitro*. *Biol. Pharm. Bull.*, **22**, 667-673.
- 9) Maekawa, T., Kosuge, S., Karino, A., Okano, T., Ito, J., Munakata, H., and Ohtsuki, K. (2000) Biochemical characterization of 60S acidic ribosomal P proteins from porcine liver and the inhibition of their immunocomplex formation with sera from Systemic lupus erythematosus (SLE) patients by glycyrrhizin *in vitro*. *Biol. Pharm. Bull.*, **23**, 27-32.
- 10) Ohtsuki, K., Maekawa, T., Harada, S., Karino, A., Morikawa, Y., and Ito, M. (1998) Biochemical characterization of HIV-1 Rev as a potent activator of casein kinase II *in vitro*. *FEBS Letts.*, **428**, 235-240.
- 11) Karino, A., Tanoue, S., Fukuda, M., Nakamura, T., and Ohtsuki, K. (1996) An inhibitory effect of actin on casein kinase II activity *in vitro*. *FEBS Letts.*, **398**, 317-321.
- 12) Karino, A., Okano, M., Hatomi, M., Nakamura, T., and Ohtsuki, K. (1999) Biochemical characteriza-

- 1) Pinna, L. A. (1990) Casein kinase 2 : an "eminence grise" in cellular regulation. *Biochim. Biophys. Acta*, **1054**, 267-284.
- 2) Allende, J. E., and Allende, C. C. (1995) Protein kinases. 4. Protein kinase CK 2 : an enzyme with multiple substrates and a puzzling regula-

- tion of a casein kinase I-like actin-kinase responsible for the actin-induced suppression of CK-II activity *in vitro*. *Biochim. Biophys. Acta*, **1472**, 603-616.
- 13) Teodoro, J. G., Halliday, T., Whalen, S. G., Takayesu, D., Graham, F. L., and Branton, P. E. (1994) Phosphorylation at the carboxy terminus of the 55 kDa adenovirus type 5E1B protein regulates transforming activity. *J. Virol.*, **68**, 776-786.
 - 14) Massimi, P., Pim, D., Storey, A., and Banks, L. (1996) HPV-16 E 7 and adenovirus E 1 a complex formation with TATA box binding protein is enhanced by CK-II phosphorylation. *Oncogene*, **12**, 2325-2330.
 - 15) Schwemmle, M., De, B., Shi, L., Banerjee, A., and Lipkin, W. I. (1997) Borna disease virus P-protein is phosphorylated by protein kinase C epsilon and casein kinase II. *J. Biol. Chem.*, **272**, 21818-21823.
 - 16) McShan, G. D., and Wilson, V. G. (1997) Casein kinase II phosphorylates bovine papillomavirus type 1 E 1 *in vitro* at a conserved motif. *J. Gen. Virol.*, **78** (Pt 1), 171-177.
 - 17) Liu, Z., Huntley, C. C., De, B. P., Das, T., Banerjee, A. K., and Oglesbee, M. J. (1997) Phosphorylation of canine distemper virus P protein by protein kinase C-zeta and casein kinase II. *Virology*, **232**, 198-206.
 - 18) Grasser, F. A., Gottel, S., Haiss, P., Boldyreff, B., Issinger, O. G., and Mueller-Lantzsch, N. (1992) Phosphorylation of the Epstein-Barr virus nuclear antigen 2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **14**, 1694-1701.
 - 19) Kolman, J. L., Taylor, N., Marshak, D. R., and Miller, G. (1993) Serine-173 of the Epstein-Barr virus ZEBRA protein is required for DNA-binding and is a target for CK-II phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **90**, 10115-10119.
 - 20) Cook, I. D., Shanahan, F., and Farrell, P. J. (1994) Epstein-Barr virus SM protein. *Virology*, **15**, 217-227.
 - 21) Bogner, E., Anheier, B., Offner, F., Smuda, C., Reschke, M., Eickmann, M., and Radsak, K. (1997) Nuclear translocation of mutagenized forms of human cytomegalovirus glycoprotein B (gpUL 55). *J. Gen. Virol.*, **78**, 11647-11651.
 - 22) Fish, K.N., Soderberg-Naucler, C., and Nelson, J. A. (1998) Steady-state plasma membrane expression of human cytomegalovirus gB is determined by the phosphorylation state of Ser-900. *J. Virol.*, **72**, 6657-6664.
 - 23) Harada, S., Maekawa, T., Haneda, E., Morikawa, Y., Nagata, N., and Ohtsuki, K. (1998) Biochemical characterization of recombinant HIV-1 reverse transcriptase (rRT) as a glycyrrhizin-binding protein and the CK-II-mediated stimulation of rRT activity potentially inhibited by glycyrrhetic acid derivative. *Biol. Pharm. Bull.*, **21**, 1282-1285.
 - 24) Harada, S., Haneda, E., Maekawa, T., Morikawa, Y., Funayama, S., Nagata, N., and Ohtsuki, K. (1999) CK-II-mediated stimulation of HIV-1 reverse transcriptase activity and characterization of its selective inhibitors *in vitro*. *Biol. Pharm. Bull.*, **22**, 1122-1126.
 - 25) Haneda, E., Furuya, T., Asai, S., Morikawa, Y., and Ohtsuki, K. (2000) Biochemical characterization of casein kinase II as a protein kinase responsible for stimulation of HIV-1 protease *in vitro*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **275**, 434-439.
 - 26) Wadd, S., Bryant, H., Filhol, O., Scott, J. E., Hsieh, T. Y., Everett, R. D., and Clements, J. B. (1999) The multifunctional herpes simplex virus IE-63 protein interacts with heterogenous ribonucleoprotein K and with casein kinase 2. *J. Biol. Chem.*, **274**, 28991-28998.
 - 27) Zhi, Y., and Sandri-Goldin, R. M. (1999) Analysis of the phosphorylation sites of herpes simplex virus type 1 regulatory protein ICP-27. *J. Virol.*, **73**, 3246-3257.
 - 28) Elliott, G., O'Reilly, D., and O'Hare, P. (1996) Phosphorylation of the herpes simplex virus type 1 tegument protein VP-22. *Virology*, **226**, 140-145.
 - 29) Morrison, E. E., Wang, Y. F., and Meredith, D. M. (1998) Phosphorylation of structural components promotes dissociation of the herpes simplex virus type 1 tegument. *J. Virol.*, **72**, 7108-7114.
 - 30) Li, M., Lyon, M. K., and Garcea, R. L. (1995) *In vitro* phosphorylation of the polyomavirus major capsid protein VP-1 on serine 66 by casein kinase II. *J. Biol. Chem.*, **270**, 26006-26011.
 - 31) Grasser, F. A., Scheidtmann, K. H., Tuazon, P. T., Traugh, J. A., and Walter, G. (1988) *In vitro* phosphorylation of SV-40 large T antigen. *Virology*, **165**, 13-22.
 - 32) Barbosa, M. S., Edmonds, C., Fisher, C., Schiller, J. T., Lowy, D. R., and Vousden, K. H. (1990) The region of the HPV E 7 oncoprotein homologous to adenovirus E1 a and SV-40 large T antigen contains separate domains for Rb binding and casein kinase II phosphorylation. *EMBO J.*, **9**, 153-160.
 - 33) Hubner, S., Xiao, C. Y., and Jans, D. A. (1997) The protein kinase CK-2 site (Ser111/112) enhances recognition of the simian virus 40 large T-antigen nuclear localization sequence by importin. *J. Biol. Chem.*, **272**, 17191-17195.
 - 34) Ikeuchi, T., Yokoyama, M., and Ohtsuki, K.

- (1988) Characterization of a polypeptide-dependent membrane protein kinase that specifically phosphorylates NS protein of vesicular stomatitis virus *in vitro*. *Tohoku J. Exp. Med.*, **155**, 41-56.
- 35) Chen, J. L., Das, T., and Banerjee, A. K. (1997) Phosphorylated states of vesicular stomatitis virus P protein *in vitro* and *in vivo*. *Virology*, **228**, 200-212.
 - 36) De, B. P., Das, T., and Banerjee, A. K. (1997) Role of cellular kinases in the gene expression of non-segmented negative strand RNA viruses. *J. Biol. Chem.*, **378**, 489-493.
 - 37) Olson, J. K., Bishop, G. A., and Grose, C. (1977) Varicella-zoster virus Fc receptor gE glycoprotein : serine/threonine and tyrosine phosphorylation of monomeric and dimeric forms. *J. Virol.*, **71**, 110-119.
 - 38) Marin, O., Sarno, S., Boschetti, M., Pagano, M. A., Meggio, F., Ciminale, V., D'Agostino, D. M., Pinna, L. A. (2000) Unique features of HIV-1 Rev protein phosphorylation by protein kinase CK2 (casein kinase 2). *FEBS Letts.*, **481**, 63-67.
 - 39) Prigent, C., Lasko, D. D., Kodama, K., Woodgett, J. R., and Lindahl, T. (1992) Activation of mammalian DNA ligase I through phosphorylation by casein kinase II. *EMBO J.*, **11**, 2925-2933.
 - 40) Dang, Q., Alghisi, G. C., and Gasser, S. M. (1994) Phosphorylation of the C-terminal domain of yeast topoisomerase II by casein kinase II affects DNA-protein interaction. *J. Mol. Biol.*, **243**, 10-24.
 - 41) Cochet, C., and Chambaz, E. M. (1983) Polyamine-mediated protein phosphorylations : a possible target for intracellular polyamine action. *Mol. Cell Endocrinol.*, **30**, 247-66.
 - 42) Shimoyama, Y., Ohtaka, H., Nagata, N., Munakata, H., Hayashi, N., and Ohtsuki, K. (1996) Physiological correlation between glycyrrhizin, glycyrrhizin-binding lipoxigenase and casein kinase II. *FEBS Letts.*, **391**, 238-242.
 - 43) Ohtsuki, K., Abe, Y., Shimoyama, Y., Furuya, T., Munakata, H., and Takasaki, C. (1998) Separation of phospholipase A2 in *Habu* snake venom by glycyrrhizin (GL)-affinity column chromatography and identification of a GL-sensitive enzyme. *Biol. Phram. Bull.*, **21**, 574-578.
 - 44) Jain, N., Mahendran, R., Philp, R., Guy, G. R., Tan, Y. H., and Cao, X. (1996) Casein kinase II associates with Egr-1 and acts as a negative modulator of its DNA binding and transcription activities in NIH 3T3 cells. *J. Biol. Chem.*, **271**, 13530-13536.
 - 45) Critchfield, J. W., Coligan, J. E., Folks, T. M., and Butera, S. T. (1997) Casein kinase II is a selective target of HIV-1 transcriptional inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **94**, 6110-6115.
 - 46) Kadison, P., Poteat, H. T., Klein, K. M., and Faller, D. V. (1990) Role of protein kinase A in tax transactivation of the human T-cell leukemia virus type I long terminal repeat. *J. Virol.*, **64**, 2141-2148.
 - 47) Xia, K., Knipe, D. M., and DeLuca, N. A. (1996) Role of protein kinase A and the serine-rich region of herpes simplex virus type 1 ICP4 in viral replication. *J. Virol.*, **70**, 1050-1060.
 - 48) Kagnoff, M. F., and Roebuck, K. A. (1999) Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection and expression in intestinal cells : role of protein kinase A and C pathways in HIV-1 transcription. *J. Infect. Dis.*, **179**, S444-447.
 - 49) Coates, K., Cooke, S. J., Mann, D. A., and Harris, M. P. G. (1997) Protein kinase C-mediated phosphorylation of HIV-1 nef in human cell lines. *J. Biol. Chem.*, **272**, 12289-12294.
 - 50) Carl, S., Iafrate, A. J., Lang, S. M., Stahl-Hennig, C., Kuhn, E. M., Fuchs, D., Matz-Rensing, K., ten Haaf, P., Heeney, J. L., Skowronski, J., and Kirchhoff, F. (1999) The acidic region and conserved putative protein kinase C phosphorylation site in Nef are important for SIV replication in rhesus macaques. *Virology*, **257**, 138-155.
 - 51) Advani, S. J., Brandimarti, R., Weichselbaum, R. R., and Roizman, B. (2000) The disappearance of cyclins A and B and increase in activity of the G (2)/M-phase cellular kinase cdc 2 in herpes simplex virus 1-infected cells require expression of the alpha 22/U (S) 1.5 and U (L) 13 viral genes. *J. Virol.*, **74**, 8-15.
 - 52) Advani, S. J., Weichselbaum, R. R., and Roizman, B. (2000) The role of cdc 2 in the expression of herpes simplex virus genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **97**, 10996-11001.
 - 53) Eliopoulos, A. G., and Young, L. S. (1998) Activation of the cJUN N-terminal kinase (JNK) pathway by the Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 (LMP1). *OncoGene*, **16**, 1731-1742.
 - 54) McLean, T. I., and Bachenheimer, S. L. (1999) Activation of cJUN N-terminal kinase by herpes simplex virus type 1 enhances viral replication. *J. Virol.*, **73**, 8415-8426.
 - 55) Furuya, T., Morikawa, Y., and Ohtsuki, K. : unpublished results.
 - 56) Rose, J. R., Babe, L. M., and Craik, C. S. (1995) Defining the level of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) protease activity required for HIV-1 particle maturation and infectivity. *J. Vi-*

- rol. **69**, 2751-2758.
- 57) Konvalinka, J., Litterst, M. A., Welker, R., Kottler, H., Rippmann, F., Heuser, A. M., and Krausslich, H. G. (1995) An active-site mutation in the human immunodeficiency virus type 1 proteinase (PR) causes reduced PR activity and loss of PR-mediated cytotoxicity without apparent effect on virus maturation and infectivity. *J. Virol.* **69**, 7180-7186.
 - 58) Ohtsuki, K., and Ono, Y. (1997) The biochemical mechanisms involved in the biological effects induced by neocarzinostatin (NCS) and the NCS-chromophore. in *Neocarzinostatin* (Maeda, H., Edo, K. and Ishida, N., eds.) pp. 129-154, Springer-Verlag, Tokyo.
 - 59) Tanoue, S., Karino, A., Nayuki, Y., and Ohtsuki, K. (1998) Neocarzinostatin-chromophore : a potent inhibitor of casein kinase II *in vitro*. *J. Antibiotics*, **51**, 95-98.
 - 60) Pompei, R., Flore, O., Marccialis, M. A., Pani, A., and Loddo, B. (1979) Glycyrrhizic acid inhibits virus growth and inactivates virus particles. *Nature*, **281**, 689-690.
 - 61) Baba, M., and Shigeta, S. (1987) Antiviral activity of glycyrrhizin against varicella-zoster virus *in vitro*. *Antiviral Res.*, **7**, 99-107.
 - 62) Ito, M., Nakashima, H., Baba, M., Pauwels, R., De Clercq, E., Shigeta, S., and Yamamoto, N. (1987) Inhibitory effect of glycyrrhizin on the *in vitro* infectivity and cytopathic activity of the human immunodeficiency virus [HIV (HTLV-III/LAV)]. *Antiviral Res.*, **7**, 127-137.
 - 63) Ito, M., Sato, A., Hirabayashi, K., Tanabe, F., Shigeta, S., Baba, M., De Clercq, E., Nakashima, H., and Yamamoto, N. (1988) Mechanism of inhibitory effect of glycyrrhizin on replication of human immunodeficiency virus (HIV). *Antiviral Res.*, **10**, 289-298.
 - 64) Hirabayashi, K., Iwata, S., Matsumoto, H., Mori, T., Shibata, S., Baba, M., Ito, M., Shigeta, S., Nakashima, H., and Yamamoto, N. (1991) Antiviral activities of glycyrrhizin and its modified compounds against human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and herpes simplex virus type 1 (HSV-1) *in vitro*. *Chem. Pharm. Bull.*, **39**, 112-115.
 - 65) Hattori, T., Ikematsu, S., Koito, A., Matsushita, S., Maeda, Y., Hada, M., Fujimaki, M., and Takatsuki, K. (1989) Preliminary evidence for inhibitory effect of glycyrrhizin on HIV replication in patients with AIDS. *Antiviral Res.*, **11**, 225-261.
 - 66) Ikegami, N., *et al.* (1998) Evaluation of early therapy with glycyron tablets on HIV-1 carriers and of late combination therapy with anti-HIV-1 drugs. The 12 th World AIDS Conference (Bologna, Italy). pp355-359.
 - 67) Shamsa, F., Iwasa, T., Saito, H., Nagata, N., and Ohtsuki, K. (1994) The biological significance of glycyrrhizin- and glycyrrhetic acid derivative-induced selective phosphorylation of histones H 2 A and H 2 B by A-kinase *in vitro*. *Tohoku J. Exp. Med.*, **172**, 123-132.
 - 68) Furuya, T., Yamagata, S., Shimoyama, Y., Fujihara, M., Morishima, N., and Ohtsuki, K. (1997) Biochemical characterization of glycyrrhizin as an effective inhibitor for hyaluronidases from bovine testis. *Biol. Pharm. Bull.*, **20**, 973-977.
 - 69) Shamsa, F., Nagata, N., Oh-Ishi, M., and Ohtsuki, K. (1991) The *in vitro* effects of glycyrrhizin and the derivatives of glycyrrhetic acid on the activity of cAMP-dependent protein kinase and phosphorylation of cellular polypeptides by the kinase from Ehrlich ascites tumor cells. *Tohoku J. Exp. Med.*, **165**, 305-318 (1991).
 - 70) Ohtsuki, K., Oh-Ishi, M., and Nagata, N. (1992) The stimulatory and inhibitory effects of glycyrrhizin and a glycyrrhetic acid derivative on phosphorylation of lipocortin I by A-kinase *in vitro*. *Biochem. International*, **28**, 1045-1053.
 - 71) Gao, W. Y., Agbaria, R., Driscoll, J.S., and Mitsuya, H. (1994) Divergent anti-human immunodeficiency virus activity and anabolic phosphorylation of 2', 3'-dideoxynucleoside analogs in resting and activated human cells. *J. Biol. Chem.*, **269**, 12633-12638.
 - 72) De Clercq, E. (2000) Reverse transcriptase inhibitors as anti-HIV drugs. in *Antivirals against AIDS* (Unger, R. E. Kreuter J., and Rubsamen-Waigmann, H., eds.) pp. 107-150, Marcel Dekker, Inc., New York.
 - 73) Redshaw, S., and Thomas, G. J. (2000) Inhibitors of HIV protease. in *Antivirals against AIDS* (Unger, R. E., Kreuter J., and Rubsamen-Waigmann, H., eds.) pp. 151-180, Marcel Dekker, Inc., New York.
 - 74) Lazaro J. B., Boretto, J., Selmi, B., Capony, J. P., Canard, B. (2000) Phosphorylation of AZT-resistant human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase by casein kinase II *in vitro* : Effects on inhibitor sensitivity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **275**, 26-32.