

博士論文

単純ヘルペスウイルス 1 型の
小胞媒介性核外輸送に関する研究

竹島功高

博士論文

単純ヘルペスウイルス 1 型の
小胞媒介性核外輸送に関する研究

東京大学大学院医学系研究科

医学博士課程

病因・病理学専攻

指導教員 川口 寧 教授

竹島功高

目次

要旨	1
序文	2-22
実験方法	23-40
結果	41-77
考察	78-86
総括	87
謝辞	88
引用文献	89-94

単純ヘルペスウイルス 1 型

Nuclear Egress Complex における、カプシド結合部位の同定及び、
ウイルスの primary envelopment と増殖におけるその役割

K. Takeshima et al., Journal of Virology 93: e01290-19 (2019).

要旨

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12

単純ヘルペスウイルス 1 型(HSV-1)感染細胞の核内で形成されたヌクレオカプシドは、小胞媒介性核外輸送によって核内から細胞質に輸送される。この輸送は、HSV-1 がコードするタンパク質の複合体である nuclear egress complex (NEC)が主な実行因子と考えられている。小胞媒介性核外輸送において、NEC とヌクレオカプシドの結合は、重要な役割を担っていると考えられているが、本研究以前に本仮説を示す報告は存在しなかった。本研究では、NEC とヌクレオカプシドとの結合を検証可能な実験系を構築することで、NEC におけるヌクレオカプシドとの結合部位を特定し、ウイルスの増殖及び、小胞媒介性核外輸送における NEC とヌクレオカプシドとの結合の重要性を初めて示した。

序文

13

14

15 ヘルペスウイルス

16 ヘルペスウイルスは、直鎖状 2 本鎖 DNA のウイルスゲノムが収納された、正

17 二十面体構造をとるヌクレオカプシドを中心に構成される。ヘルペスウイルス

18 の宿主は、無脊椎動物からヒトに至るまで多岐にわたる。ヒトを自然宿主とする

19 ヘルペスウイルスは単純ヘルペスウイルス 1 型(HSV-1)、単純ヘルペスウイルス

20 2 型(HSV-2)、ヒトサイトメガロウイルス(HCMV)、水痘・帯状疱疹ウイルス(VZV)、

21 Epstein-Barr ウイルス(EBV)、ヒトヘルペスウイルス 6A、6B 及び、7 (HHV-6A、

22 HHV-6B 及び、HHV-7)、及び、カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス(KSHV)の 9 種

23 類が現在までに同定されており、それぞれのウイルスが人に多様な病態を引き

24 起こすことが知られている(1)。ヘルペスウイルス科はアルファヘルペスウイル

25 ス亜科、ベータヘルペスウイルス亜科または、ガンマヘルペスウイルス亜科の 3

26 つの亜科に分類される。アルファヘルペスウイルス亜科に属するヘルペスウイ

27 ルスは、宿主特異性が低く、培養細胞においてウイルス増殖サイクルが短いため、

28 効率よく細胞に伝播する(1)。ヒトを主要な宿主とするヘルペスウイルスでは、

29 HSV-1、HSV-2、VZV がアルファヘルペスウイルス亜科に分類される。ベータヘ

30 ルペスウイルス亜科に属するヘルペスウイルスは、宿主特異性が高い、また培養

31 細胞においてウイルス増殖サイクルが長く、感染細胞の肥大化を引き起こす(1)。
32 ヒトを主要な宿主とするヘルペスウイルスでは、HCMV、HHV-6A、HHV-6B、
33 HHV-7 がベータヘルペスウイルス亜科に分類される。ガンマヘルペスウイルス
34 亜科に属するヘルペスウイルスは高い宿主特異性を持ち、培養細胞においてリ
35 ンパ芽球様の細胞に感染し、生体内では T 細胞や B 細胞に特異的に感染する(1)。
36 本研究では、ヘルペスウイルスのプロトタイプであり、その研究成果が他のヘル
37 ペスウイルス研究に最も還元される可能性が高いアルファヘルペスウイルス亜
38 科に属する HSV-1 に焦点を当てた。

39

40 単純ヘルペスウイルス(Herpes Simplex Virus : HSV)

41 HSV はヒトに感染すると、口唇ヘルペス、性器ヘルペス、脳炎、角膜炎、小
42 児ヘルペスなど感染する部位によって、様々な病態を引き起こす(2)。HSV は初
43 感染時に、粘膜上皮細胞などの感染局所で増殖し、ウイルス粒子を産出する。産
44 出されたウイルス粒子は、神経軸索を上行し、三叉神経節や仙髄神経節を形成す
45 る神経細胞体に到達する(3)。さらに、神経細胞体において、ウイルス粒子中のウ
46 イルスゲノムが核内に注入され、エピゾーム構造を形成することで、HSV はウ
47 イルス粒子を産出しない潜伏感染へと移行する(3,4)。潜伏感染した HSV は度々、
48 ストレスや免疫抑制など、様々な要因によって再活性化し、再びウイルス粒子を

49 産出することで、局所に病態を引き起こすようになる(3, 4)。HSV は血清型によ
50 って HSV-1 と HSV-2 の二種類に分類される。HSV-1 は、一般的に脳炎や眼疾患
51 などの上半身の病態を、HSV-2 は性器ヘルペスなど下半身の病態を引き起こす
52 と考えられている(1, 5)。しかし、性器ヘルペスの病変部位で、HSV-1 が検出さ
53 れることもあり、HSV-1 と HSV-2 両者のすみわけは厳密ではないと考えられて
54 いる(1, 5)。

55 HSV 感染症には抗 HSV 剤のアシクロビルなどが存在するが、脳炎患者では、
56 ほとんどの場合治療効果がなく、約 70%の脳炎患者が社会復帰できないか死亡
57 する(1)。既存の抗 HSV 剤では HSV 感染症の治療薬として不十分であることから、
58 新たな HSV 治療薬の開発を行うために、より詳細な HSV の生活環を解析
59 する必要がある。

60

61 HSV-1 の粒子構造

62 HSV-1 の成熟した感染性ウイルス粒子は、他のヘルペスウイルスの成熟粒子
63 と同様に、80 以上のタンパク質をコードする約 150kbp の直鎖状 2 本鎖 DNA ゲ
64 ノムが収納されたヌクレオカプシドが中心となって構成される(1)。ヌクレオカ
65 プシドの外層にはヘルペスウイルスに特徴的なテグメント層が存在し、さらに、
66 テグメントの周囲は、宿主由来の脂質二重膜や、ウイルス糖タンパク質からなる

67 エンベロープにより覆われ、成熟粒子を形成している(1)。

68

69 **HSV-1 の生活環 (図 1)**

70 HSV-1 は、宿主細胞の表面に発現するレセプターと感染性ウイルス粒子に存

71 在するエンベロープ糖タンパク質が結合することによって細胞へ吸着し、侵入

72 する(2)。感染性ウイルス粒子の宿主細胞への吸着と侵入には、エンベロープ糖

73 タンパク質(glycoproteinB [gB]、gC、gD、gH 及び gL)の 5 つが関与している(2)。

74 感染性ウイルス粒子の細胞への吸着は主に gB 及び、gC と細胞膜表面に存在す

75 るへパラン硫酸群との結合によって引き起こされる(6, 7)。感染性ウイルス粒子

76 と細胞表面の吸着後は、エンベロープタンパク質である gB と NM-IIA (Non-

77 muscle myosinIIA)、PILR α (Pairedimmunogloblin-like type 2 receptor α)または、MAG

78 との結合及び、gD と、nectin、3-O 硫酸化転移酵素で硫酸基が付加されたへパラ

79 ン硫酸または、herpesvirus entry mediator との結合が、エンベロープと細胞膜との

80 融合に重要であるとされている(8-12)。感染性ウイルス粒子のエンベロープが細

81 胞膜と融合すると、感染性ウイルス粒子内からヌクレオカプシド及び、テグメン

82 トタンパク質が細胞内に放出される。テグメントタンパク質は、細胞内に放出さ

83 れると、感染細胞内を HSV-1 が増殖するのに適した環境に制御する(1)。テグメ

84 ントタンパク質である VHS (UL41 の遺伝子産物)は、RNase 活性を示し、宿主タ

85 タンパク質の mRNA を分解することで、HSV-1 の効率的な増殖に寄与する(13)。

86 また、VP16 も代表的なテグメントタンパク質であり、核内へ移行することで、

87 ウイルスタンパク質の発現に関与する(1)。細胞内へ侵入したヌクレオカプシド

88 は、核膜孔から核内へウイルス DNA を注入する。核内に注入されたウイルス

89 DNA は、環状化し、多様なウイルス遺伝子の発現が引き起こされる。HSV-1 が

90 保有する遺伝子は、細胞に感染した際の発現時期によって、前初期遺伝子

91 (immediate early: α 遺伝子)、初期遺伝子 (early: β 遺伝子)、後期遺伝子 (late: γ 遺伝

92 子) の 3 種類に分類される。これらの遺伝子群は $\alpha \rightarrow \beta \rightarrow \gamma$ 遺伝子の順に発現す

93 る。 α 遺伝子には、6 つの遺伝子が含まれており、その内 5 つが遺伝子発現制御

94 因子で、 α 遺伝子自身と β 及び、 γ 遺伝子の発現を制御する。 β 遺伝子には、ウ

95 イルス DNA 複製に必要なタンパク質がコードされており、DNA ポリメラーゼ

96 複合体、DNA プライマーゼ・ヘリカーゼ複合体や、チミジンキナーゼやリボヌ

97 クレオチド還元酵素などが含まれている。HSV-1 ウイルスゲノムの複製方式は、

98 ウイルスゲノムが複数つながった、コンカテマーDNA が形成されるローリング

99 サークル形式である。ウイルス DNA の新規合成に伴い、 γ 遺伝子の発現が促進

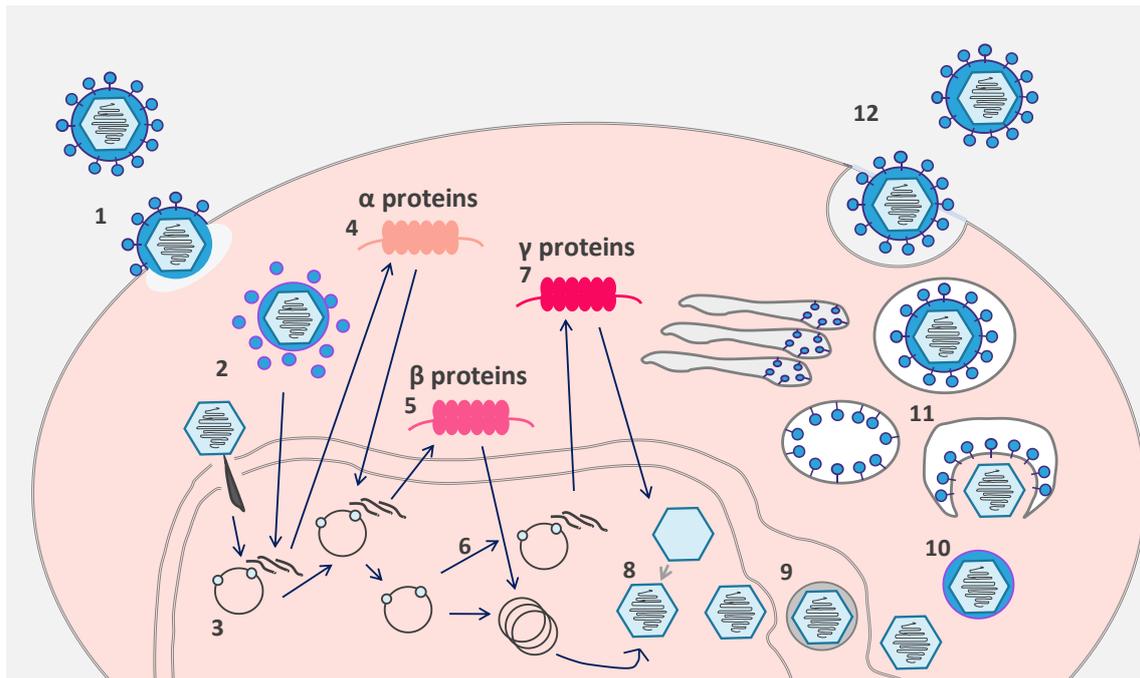
100 される。 γ 遺伝子内には、ウイルス粒子を構成するタンパク質である、エンベロ

101 ープ糖タンパク質、テグメントタンパク質、カプシドタンパク質などがコードさ

102 れている(1)。ヘルペスウイルスのカプシドは、核内で形成されると、コンカテマ

103 —DNA から 1 コピー分のウイルス DNA がカプシド内部にパッケージングされ
104 ヌクレオカプシドとなる(14-16)。その後、ヌクレオカプシドは、別項で詳しく述
105 べる小胞媒介性核外輸送によって、核内から細胞質に輸送される(17, 18)。細胞
106 質に輸送されたヌクレオカプシドは、テグメントを獲得し、細胞質内の膜オルガ
107 ネラ由来の小胞内に出芽することで、エンベロープ獲得後、感染性ウイルス粒子
108 となりエキソサイトーシスを介して細胞外へ放出される(1)。

109



110

111 図1 HSV-1 生活環 ((2)より改変)

112 1. HSV-1 は、宿主細胞のレセプターと感染性ウイルス粒子のエンベローブ糖タンパク質が結合することで宿主細胞に吸着・侵入する。2. 感染性ウイルス粒子内から、テグメントタンパク質及び、ヌクレオカプシドが放出され、ヌクレオカプシドは、核膜孔まで輸送される。3. 核膜孔まで輸送されたヌクレオカプシドは、核膜孔から核内にウイルス DNA を注入し、ウイルス DNA は、核内で環状化する。4. 放出されたテグメントに含まれる VP16 によって、 α 遺伝子の転写が活性化され、さらに α 遺伝子産物により β 遺伝子が活性化される。5. β 遺伝子産物によって、ウイルス DNA がローリングサークル形式で複製される。6. 新規ウイルス DNA 合成に伴い、 γ 遺伝子の転写が活性化される。7. γ 遺伝子産物によって、カプシドが形成される。8. コンカテマー DNA から 1 コピーのウイルス DNA がカプシド内にパッケージングされカプシドはヌクレオカプシドとなる。9. 核内のヌクレオカプシドは核膜を通過し、細胞質へ輸送される。10. 細胞質で、テグメントを獲得する。11. 細胞質内の膜オルガネラに出芽し、感染性ウイルス粒子となる。12. 感染性ウイルス粒子はエクソサイトーシスにより細胞外へ輸送される。

127

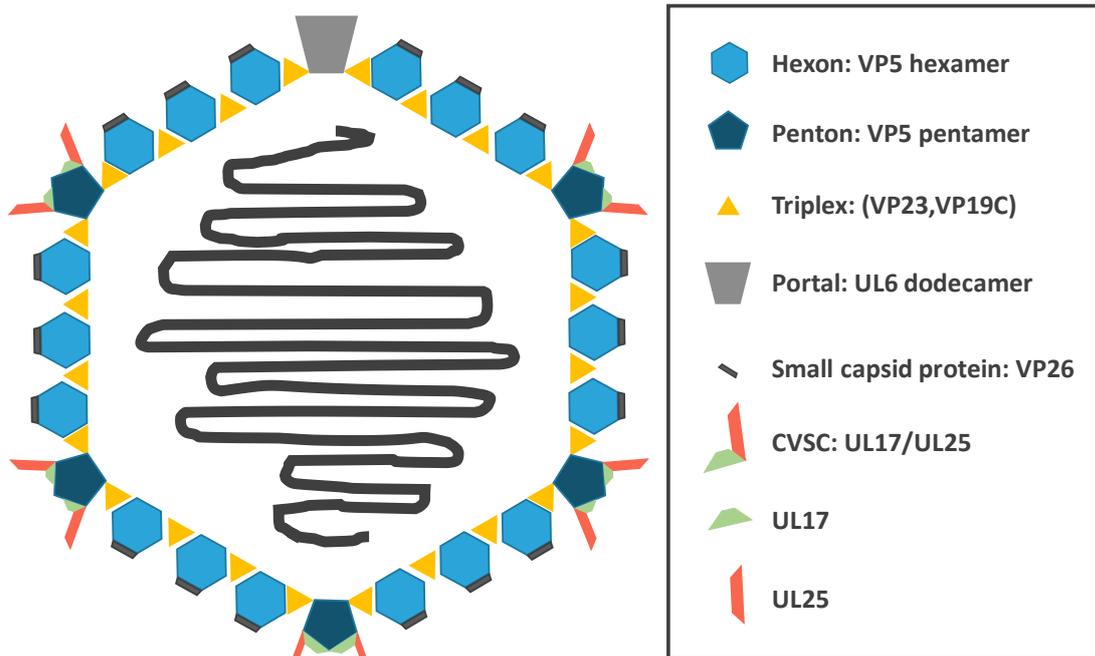
128

129 **HSV-1 のカプシド (図 2)**

130 HSV-1 のカプシドは、約 125nm の正二十面体構造をとる巨大なタンパク質複
131 合体であり、感染細胞の核内で構築される。すべてのヘルペスウイルスのカプシ
132 ドは、150 個の hexon 及び、11 個の penton の合計 161 個のカプソメアによって、
133 正二十面体構造を構成している。Hexon はカプシドの正二十面体構造の平面部
134 に位置しており、12 個ある頂点の内 11 個を penton が占めている。Penton が占
135 有していない残り 1 つの頂点は、portal と呼ばれ、ウイルス DNA がカプシド内
136 にパッケージングされる際や、脱殻する際のチャンネルとなる。カプソメア及び、
137 portal はそれぞれ 320 個の triplex によって連結される。Hexon の外側には、hexon
138 を構成するタンパク質に 1:1 の割合で small capsomere-interacting proteins (SCPs)
139 が結合している。一方で、正二十面体の頂点に存在する penton 及び、近傍の
140 triplex には、capsid vertex-specific components (CVSCs)が結合しており、カプシド
141 の最外殻に位置している(14-16, 19)。HSV-1 がコードするカプシドタンパク質で
142 は、(i) penton 及び、hexon は、5 個または 6 個の VP5 から、(ii) Triplex は、2 コ
143 ピーの VP23 と 1 コピーの VP19c から、(iii) Portal は、UL6 の 12 量体から、(iv)
144 SCPs は VP26 から、(v) CVSCs は 1 コピーの UL17 と 1 コピーの UL25 の複合体
145 から構成されている(14, 16, 19)。

146 HSV-1 のカプシドは感染細胞中において主に、A カプシド、B カプシド及び、
147 C カプシドの3種類が観察される(14)。A カプシドは、カプシド内部が空洞にな
148 っており、ウイルス DNA のパッケージングに失敗した形態であると考えられて
149 いる。B カプシドは、カプシド内部にウイルス DNA ではなく、足場タンパク質
150 が内包している。足場タンパク質は、カプシドが構築される際の裏打ちタンパク
151 質として利用される。このため、A 及び、B カプシドは、ウイルス DNA が内包
152 されておらず、未成熟なカプシドとして分類されている。一方で C カプシドは、
153 カプシド内部にウイルス DNA を内包する成熟したカプシドであり、感染性ウイ
154 ルス粒子中のカプシドと同様の構造を示す(14-16, 19, 20)。このため、C カプシド
155 は、一般的にヌクレオカプシドと呼ばれている。また、C カプシドの構造的特徴
156 としては、A 及び、B カプシドよりも CVSCs の存在量が多いことが知られてい
157 る(21-26)。

158



159

160 図2 カプシド及びカプシドタンパク質の簡略図((19)より改変)

161 HSV-1 カプシドは、直径約 150nm の正 20 面体構造で、161 のカプソメアと 1 つ
 162 の portal (UL6 の 12 量体)から構成される。161 のカプソメアは、150 個の hexon
 163 (VP5 の 6 量体)と 11 個の penton (VP5 の 5 量体)である。それぞれのカプソメア
 164 は 320 個の triplex (VP23×2, VP19C×1 の複合体)によってカプシドの内側から連
 165 結される。hexon はカプシドの正 20 面体構造平面部に位置し、penton は正 20 面
 166 体構造における 12 個ある頂点のうち 11 個を占める。残ったもう 1 つの頂点は、
 167 portal であり、ウイルス DNA がカプシドへパッケージングされる際や、脱殻す
 168 る際のチャネルとなる。VP26 は、hexon における VP5 の先端部と 1 対 1 で結合
 169 する。また、CVSC (UL17, UL25 複合体)は penton 周囲に結合しており、カプシ
 170 ドの最外殻に位置している。

171

172

173 **HSV-1 ヌクレオカプシドの小胞媒介性核外輸送 (Nuclear Egress) (図 3)**

174 HSV-1 を含め、すべてのヘルペスウイルスは、感染細胞の核内で、カプシドに
175 ウイルス DNA をパッケージングすることで、ヌクレオカプシドを形成する(14-
176 16)。核内のヌクレオカプシドは、感染性ウイルス粒子となるために、ウイルス
177 粒子が成熟する場である細胞質に輸送される必要がある。しかし、上述の通り、
178 カプシドの直径は約 125nm であり、核と細胞質の輸送を主に担っている核膜孔
179 のサイズ(直径約 50nm)を大きく超えている(17)。そのため、ヘルペスウイルスは、
180 小胞媒介性核外輸送(Nuclear Egress)と呼ばれる生物学的にとってもユニークな輸
181 送機構により、核内のヌクレオカプシドを細胞質へと輸送する(17, 18)。小胞媒
182 介性核外輸送では、核内のヌクレオカプシドが核内膜をエンベロップとして被
183 ることにより、核内膜と核外膜の間にある核膜間と呼ばれる部分に出芽し、エン
184 ベロップを纏ったヌクレオカプシドを形成する。この、核内のヌクレオカプシド
185 が核膜間へエンベロップを纏い、出芽するまでの過程は、primary envelopment と
186 呼ばれている(17, 18)。さらに、核膜間に存在するエンベロップを纏ったヌクレ
187 オカプシドは、エンベロップが核外膜と融合することで、核外へ放出される(17,
188 18)。核膜間に存在するエンベロップを纏ったヌクレオカプシドが、エンベロー
189 プを脱ぎ捨て、細胞外へ輸送されるまでの過程は、de-envelopment と呼ばれてい
190 る(17, 18)。HSV-1 では、この小胞媒介性核外輸送において UL31 および UL34 が

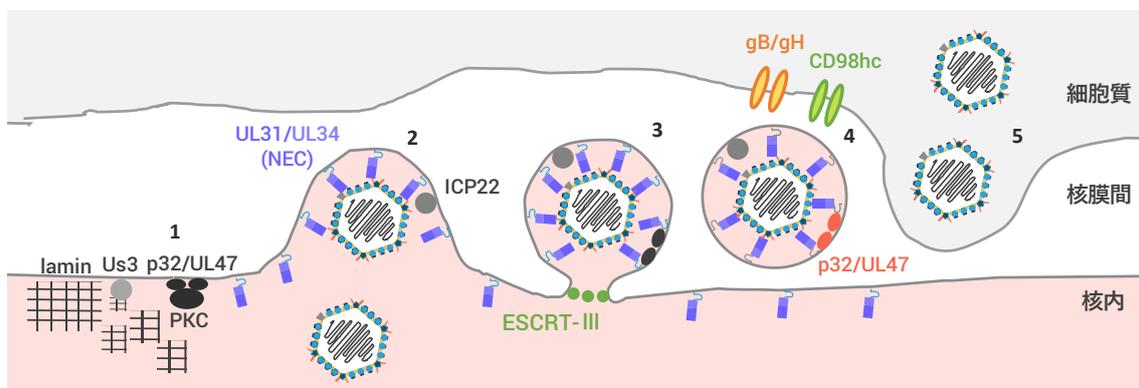
191 重要であると考えられており、これら 2 つのタンパク質はすべてのヘルペスウ
192 イルス亜科にホモログが保存されている(17, 18, 27-30)。核マトリックスタンパ
193 ク質である UL31 及び、II型の膜タンパク質である UL34 は、Nuclear Egress
194 Complex (NEC)と呼ばれるヘテロ二量体を形成し、核膜に局在する(30-34)。
195 Primary envelopment では、核内膜に存在するラミンの網目状構造の破壊が起るこ
196 とでヌクレオカプシドが核内膜に接近する。さらに、核内膜の変性が引き起こる
197 ことで、ヌクレオカプシドを包むように膜が彎曲し、核内膜の切断が起こり、核
198 膜間に粒子が形成されると考えられている(17, 18, 35)。上記のような primary
199 envelopment の過程で引き起こされる現象には、多岐にわたり、NEC が関与して
200 いると考えられている。ラミンの網目状構造の破壊は、NEC が宿主のプロテ
201 ンキナーゼ C を核内膜に誘導し、ラミンタンパク質がリン酸化されることで引
202 き起こされる(17, 18, 36, 37)。核内膜の変性は、試験管内で精製した UL31/UL34
203 複合体が人工脂質膜を彎曲させ、粒子を形成すること、形成された粒子中では、
204 UL31/UL34 複合体が六量体を形成し、六量体間同士で格子構造を構築すること
205 や、六量体同士の結合を阻害すると人工脂質膜・細胞内において、粒子形成が起
206 こらなくなることなどから、NEC の六量体間重合によって、膜変性が引き起こ
207 されると考えられている(31, 34, 38)。核内膜の切断は、HSV-1 感染細胞において、
208 宿主における膜切断に関与する因子である ESCRT-IIIタンパク質が核膜に局在す

209 ること、UL31 あるいは、UL34 を欠損させたウイルス感染細胞では、ESCRT-III
210 タンパク質が核膜に局在しないことや、ESCRT-IIIタンパク質の発現を抑制した
211 細胞に HSV-1 を感染させると、感染細胞の核膜間に核内膜が未切断の被膜粒子
212 が観察されることなどから、NEC が宿主の膜切断因子である ESCRT-IIIタンパク
213 質を核内膜へ誘導することによって、primary envelopment の最終段階である核内
214 膜切断を引き起こすと考えられている(39)。また、これら以外にも NEC は HSV-
215 1 のセリンスレオニンプロテインキナーゼである Us3、HSV-1 のテグメントタン
216 パク質である UL47、HSV-1 複製の制御因子である ICP22 及び、宿主タンパク質
217 である p32 など様々なタンパク質と相互作用し primary envelopment に寄与する
218 ことが示唆されている(40-43)。

219 De-envelopment においても、多様なウイルス・宿主タンパク質の関与が報告さ
220 れており、ウイルスタンパク質では Us3 欠損変異体や Us3 リン酸化活性消失変
221 異ウイルス及び、エンベロープ糖タンパク質である gB 及び、gH の二重欠損ウ
222 イルス感染細胞の核膜間にウイルス粒子が蓄積することから、これらのウイル
223 スタンパク質が de-envelopment に関与すると考えられている(44-46)。さらに、宿
224 主タンパク質においても、p32、CD98 heavy chain (CD98hc)または、 β 1-integrin を
225 発現抑制した細胞に、HSV-1 を感染させると感染細胞中の核膜間にウイルス粒
226 子が蓄積することから、これらの宿主タンパク質も、de-envelopment に関与して

227 いると考えられている(43, 47)。

228



230

231 **図3 HSV-1** ヌクレオカプシドの小胞媒介性核外輸送

232 1. NECにより誘導された宿主タンパク質である protein kinase C (PKC)や p32 及
 233 び、ウイルスタンパク質である HSV-1 セリン・スレオニンキナーゼ Us 3 など
 234 により、ラミントタンパク質がリン酸化され、核ラミナの網目構造が分解される。2.
 235 核内膜に局在した NECにより核内膜が変性し、核膜間に核内膜をエンベロープ
 236 として纏ったヌクレオカプシドが核内から核膜間に出芽する。3.その後、核内膜
 237 を宿主 ESCRT-IIIタンパク質の作用により切断することで、核膜間にウイルス粒
 238 子を形成する。2 及び、3 の過程は primary envelopment と呼ばれている。4.核膜
 239 間のウイルス粒子は、核外膜と融合する。5. ヌクレオカプシドは核内膜で得た
 240 エンベロープを脱ぎ捨て、細胞質へ移行する。4 及び、5 の過程は、de-envelopment
 241 と呼ばれている。De-envelopment は、宿主タンパク質である CD98hc や p32 及
 242 び、ウイルスタンパク質である gB や gH などによって制御されていると考えら
 243 れている。

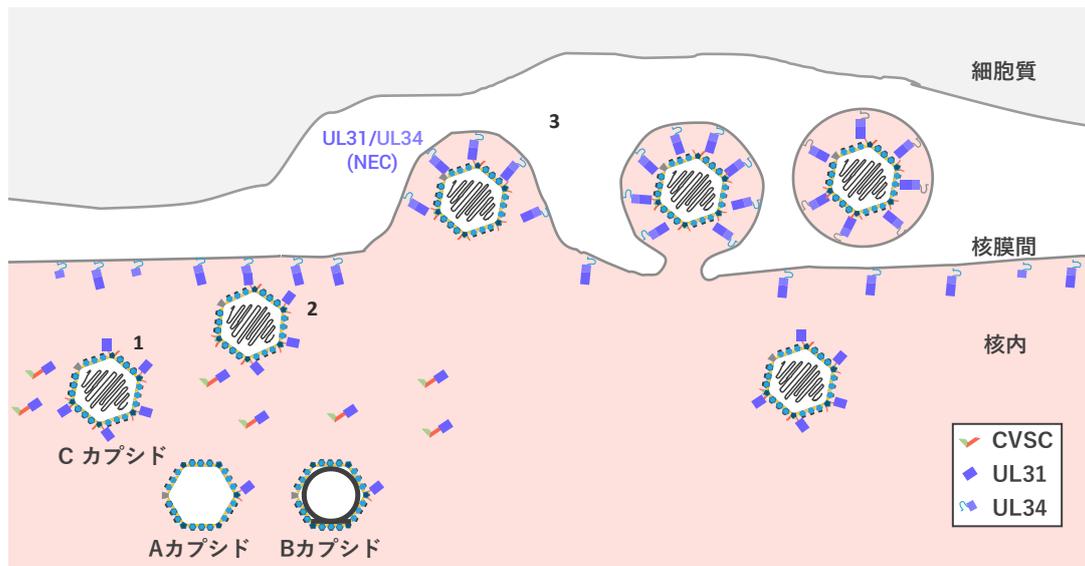
244

245 **HSV-1 NEC (UL31 及び、UL34)とカプシドとの関係性 (図 4)**

246 HSV-1 感染細胞中の核質に存在するヌクレオカプシドは、primary envelopment
247 において、核内膜から核膜間に出芽するために、核内膜まで輸送される必要があ
248 る。核質に存在するヌクレオカプシドの輸送に関しては、HSV-1 UL31 に、核へ
249 の局在や UL34 との結合を阻害する変異を導入すると核質のカプシドが核膜に
250 局在しなくなること、HSV-1 のカプシドを HSV-1 感染細胞からショ糖密度勾配
251 遠心分離法により精製すると UL31 が共に精製されることや、HSV-1 感染細胞に
252 において、UL31 に対して免疫沈降を行うとカプシドタンパク質が共沈降されるこ
253 とから、UL31 が核質に存在するヌクレオカプシドと結合することで、ヌクレオ
254 カプシドを核内膜へ誘導しているのではないかと考えられている(48-50)。非常
255 に興味深いことに、HSV-1 感染細胞の核内には上述したとおり、A カプシド、B
256 カプシド及び、C カプシドの合計 3 種のカプシドが存在している。しかし、実際
257 に primary envelopment によって、核内膜から核膜間に出芽するカプシドのほと
258 んどは成熟したカプシドであるヌクレオカプシド(C カプシド)と知られている
259 (17)。ヌクレオカプシドは、未成熟な他のカプシド 2 種と比較して、カプシドに
260 含まれる UL17 と UL25 の複合体である CVSCs の存在量が多い(21-26)。また、
261 UL31 とカプシドが相互作用するためには、カプシドに含まれる CVSCs 中の
262 UL25 が必要であると考えられており、HSV-1 感染細胞において、UL31 は、UL17

263 及び、UL25 と相互作用すると知られている(49,50)。さらに、クライオ電顕を用
264 い、HSV-1 感染細胞における primary envelopment によって生じた核膜間粒子を
265 観察すると、NEC が CVSCs を介して、ヌクレオカプシドと接していることが報
266 告されている(51)。これらの知見から、一般的に以下の様な仮説が考えられてい
267 る。(i)UL31 は、ヌクレオカプシドに豊富に存在するとされる CVSCs 中の UL25
268 または、カプシドに含まれる前の CVSCs 中の UL25 と結合し、UL25 を介するこ
269 とで、カプシド本体と結合する、(ii)UL31 は、UL31 と結合したカプシドを核内
270 膜へ誘導する、(iii) 核内膜へ誘導されたカプシドに結合している UL31 は、核内
271 膜に存在する UL34 と NEC を形成することで、核内膜の変性を引き起こし、ヌ
272 クレオカプシドを核内膜から核膜間へ出芽させ、ヌクレオカプシド選択的な
273 primary envelopment を引き起こす(図 4) (51, 52)。上述の通り、UL31 は、単体で
274 カプシド及び、UL25 と相互作用することがすでに報告されている(49,50)。しか
275 しながら、UL31 と UL34 の複合体である NEC が、カプシド及び、UL25 と相互
276 作用するといった報告は存在しない。さらには、NEC とカプシドまたは、NEC
277 と UL25 との相互作用が primary envelopment において、どのような意義がある
278 のか、未だ不明なままである。

279



280

281 図4 Primary envelopment における HSV-1 NEC とカプシドの関係性

282 HSV-1 感染細胞の核内には、未成熟なカプシドである A・B カプシド 2 種と成熟
 283 したカプシドである C カプシドが存在する。1. UL31 は、A・B カプシドと比較
 284 して、C カプシドに豊富に含まれている CVSC または、カプシドに含まれる前
 285 の CVSC を介することで、カプシド本体と結合する。2. UL31 は、UL31 と結合
 286 したカプシドを核内膜へ誘導する。3.核内膜へ誘導されたカプシドと結合した
 287 UL31 は、UL34 と NEC を形成することで、成熟したカプシドであるヌクレオカ
 288 プシドを核内膜から核膜間へと出芽させ、ヌクレオカプシド選択的な primary
 289 envelopment が引き起こされる。

290

291

292 HSV-1 NEC のカプシド結合予測部位

293 近年、HSV-1 および、豚を感染宿主とするアルファヘルペスウイルスである
294 pseudorabiesvirus (PRV)における NEC の結晶構造が示された(図 5A) (34)。NEC の
295 結晶構造から、NEC の膜結合部位を底辺とした時、頂点に位置する部位 (HSV-
296 1 においては、UL31 の 9 番目のヘリックス、PRV では、UL31 ホモログの 10 番
297 目のヘリックス) が NEC におけるカプシドとの結合部位ではないかと予測され
298 ている(図 5A) (34)。HSV-1 UL31 における 9 番目のヘリックスのアミノ酸配列
299 は、PRV の UL31 ホモログや、他のアルファヘルペスウイルスの UL31 ホモログ
300 などと共に、非常に保存性が高い(図 5B)。さらに、PRV においては、UL31 ホモ
301 ログの 10 番目のヘリックスに存在する 242 番目のリシンをアラニンに置換する
302 と、核膜間にヌクレオカプシドを含まない空の粒子が蓄積することが報告され
303 ている(53)。これらの結果から、PRV NEC の UL31 ホモログに存在する 242 番目
304 のリシンは、カプシド結合部位であり、primary envelopment において、核膜間粒
305 子内へのヌクレオカプシド取り込みに必要であると考えられている。しかしな
306 がら、この研究では、PRV UL31 ホモログの 242 番目のリシンに対する変異によ
307 って、PRV NEC とヌクレオカプシドの相互作用が低下しているのかは示されて
308 いない。そのため、primary envelopment において、ヌクレオカプシドが核膜間粒

309 子に取り込まれるためには、PRV NEC とヌクレオカプシドとの結合が実際に必
310 要であるのかは明らかになっていない。また、HSV-1 を含め他のアルファヘルペ
311 スウイルスにおいては、NEC における、核膜間粒子へのヌクレオカプシド取り
312 込みに必要な部位は特定されていない。

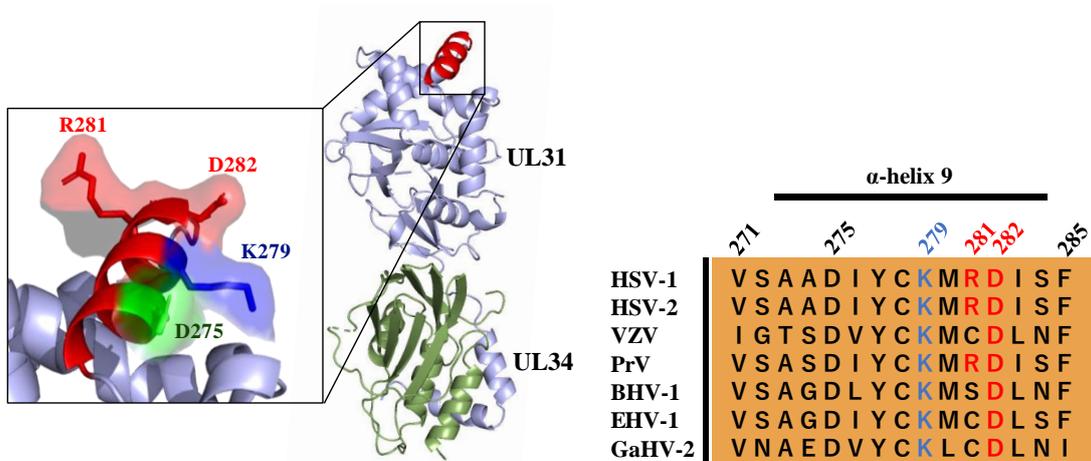
313 本研究では、ヘルペスウイルスの primary envelopment において、ヌクレオカ
314 プシドが核膜間粒子に取り込まれる機構の詳細な解明を試みた。HSV-1 UL31 の
315 9 番目のヘリックス内で、UL31 と UL34 の相互作用に關与せず、NEC とヌクレ
316 オカプシドとの相互作用や、ウイルスの primary envelopment 及び、増殖能に寄
317 与するアミノ酸の探索を行った。

318

319

320 A

B



321

322 **図 5 HSV-1 UL31 のカプシド結合予測部位及び、他のアルファヘルペスウィ**
 323 **ルス UL31 ホモログと HSV-1 UL31 9 番目のヘリックスのアミノ酸配列比較**

324 (A) NEC の構造を、ライトブルーが UL31、パールグリーンが UL34 及び、UL31
 325 の 9 番目のヘリックスを赤色で示した。四角で囲った領域は、HSV-1 UL31 の 9
 326 番目のヘリックスである。HSV-1 UL31 の 9 番目のヘリックス内に含まれるアミ
 327 ノ酸側鎖である UL31 の 275 番目のアスパラギン酸(D275)を緑で、279 番目のリ
 328 シン(K279)を青で、281 番目のアルギニン(R281)及び、アスパラギン酸(D282)を
 329 赤色で示した。(B) HSV-1 UL31 9 番目のヘリックス及び、それに対応した他のア
 330 ルファヘルペス UL31 ホモログ(HSV-1 (CAA32324); HSV-2, herpes simplex virus 2
 331 (CAB06756); VZV, varicella-zoster virus (NP_040150); PrV (AFI70796); BHV-1,
 332 bovine herpesvirus 1 (NP_045327); EHV-1, equine herpesvirus 1 (AAT67286); and
 333 GaHV-2, gallid herpesvirus 2 (AAF66766))のアミノ酸配列アライメントである。本
 334 研究では、赤色で示された、HSV-1 R281 及び D282 と HSV-1 K279 について解析
 335 した。

336

実験方法

337

338

339 細胞とウイルス

340 Vero 細胞 (アフリカミドリザル腎由来細胞株) は、Dulbecco's modified Eagle's

341 培地 (DMEM) に 5 % Calf serum (CS)、100 units/ml ペニシリン、100 µg/ml スト

342 レプトマイシン及び、約 0.075% NaHCO₃ を添加した培地で培養した(54)。Rabbit

343 skin cell (RSC)、293FT 細胞(ヒト胎児腎臓由来細胞株)及び、Plat-GP 細胞

344 (HEK293T 細胞由来のレトロウイルスベクター用パッケージング細胞株)は、

345 DMEM に 10% FCS、100 unit/ml ペニシリン及び、100 µg/ml ストレプトマイシ

346 ンを添加した培地で培養した(54-56)。UL31-CV-1 は DMEM に 10% FCS、100

347 unit/ml ペニシリン、100 µg/ml ストレプトマイシン及び、50µg/ml ハイグロマイ

348 シン B を添加した培地で培養した(57)。CS および FCS は、56°C、30 分間の非働

349 化処理後に使用した(47)。UL31-CV-1 細胞は Joel D.Baines 博士より分与して頂い

350 た(57)。HSV-1 の野生型として、laboratory strain HSV-1(F)を使用した(54)。UL31

351 の欠損体ウイルス YK720 (ΔUL31)と UL17 の C 末端に Myc タグが挿入され、

352 UL25 の 50 番目と 51 番目の間のアミノ酸領域に Flag タグが挿入されたウイル

353 ス YK497 (UL17-Myc/Flag-UL25)は、当研究室で過去に作製されたものを使用し

354 た(42, 58)。Vero 細胞、UL31-CV-1 細胞及び、本研究で作製した UL25-Vero 細胞

355 におけるウイルス増殖には 199V 培地に 1 %FCS、100 unit/ml ペニシリン及び、
356 100 µg/ml ストレプトマイシンを添加した培地を使用した。ウイルス力価は Vero
357 細胞における PFU (Plaque forming units) で表記する。MOI (Multiplicity of infection)
358 は、PFU/Cells の値を示した。

359

360 プラスミド

361 pcDNA3.1-Flag-VP5、pcDNA3.1-Flag-VP23、及び、pcDNA3.1-Flag-UL17 は、
362 YK497 (UL17-Myc/Flag-UL25) のウイルスゲノムより VP5、VP23 及び、UL17 の
363 ORF を、その N 末端に Flag タグを付加した形で PCR により増幅し、pcDNA3.1
364 (+) (Invitrogen) の *EcoRI-NotI* サイトに VP5 を、*BamHI-EcoRI* サイトに VP23 及び
365 UL17 をそれぞれ、クローニングした。pcDNA3.1-Flag-UL25 は、YK497 (UL17-
366 Myc/Flag-UL25) のウイルスゲノムより Flag-UL25 の全長を PCR により増幅し、
367 pcDNA3.1 (+) の *BamHI-NotI* サイトにクローニングした。pMXs-UL25 は、UL25
368 を、HSV-1(F)ゲノムより PCR で増幅し、pMXs-puro(59) の *BamHI-EcoRI* サイトに
369 クローニングした。pGEX-UL34₁₋₁₈₅ は pcDNA3.1-UL34 (60) から 1~185 番目のア
370 ミノ酸領域の遺伝子配列を PCR により増幅し、pGEX-4T-1 (GE Healthcare) の *NotI*-
371 *HindIII* サイトにクローニングした(図 7A)。pET-UL31_{Δ50} は、pcDNA3.1-UL31 (60)
372 から UL31 の 50~306 アミノ酸領域の遺伝子配列を PCR により増幅し、pET-24b

373 (Novagen)の *EcoRI-NotI* サイトにクローニングした(図 7A)。pET-UL31 Δ 50-K279A
374 は、UL31 の 279 番目のリシンをアラニン置換した HSV-1 のゲノムから変異 UL31
375 の 50~306 アミノ酸領域の遺伝子配列を PCR により増幅し、pET-24b の *EcoRI-*
376 *NotI* サイトにクローニングした(図 7A)。pET-UL31 Δ 50-R281A/D282A は、後述す
377 る、UL31 の 281 番目のアルギニンと 282 番目のアスパラギン酸をそれぞれ、ア
378 ラニンに置換したウイルスである YK731 (UL31-R281A/D282A)のゲノムから変
379 異 UL31 の 50~306 番目のアミノ酸領域の遺伝子配列を PCR により増幅し、pET-
380 24b の *EcoRI-NotI* サイトにクローニングした(図 7A)。

381

382 UL25 定常発現 Vero 細胞(UL25-Vero 細胞)の樹立

383 Plat-GP 細胞に pMXs-UL25 と Vesicular stomatitis virus のエンベロープ G タン
384 パク質を発現する pMDG (8)を co-transfection し、2 日後、培養上清を回収した。
385 Vero 細胞に回収した培養上清を加え、DMEM に 10% FCS、100 unit/ml ペニシリ
386 ン、100 μ g/ml ストレプトマイシン及び、5.0 μ g/ml ピューロマイシンを添加した
387 培地で培養した(8)。ピューロマイシンに耐性となったコロニーを回収し、ウェ
388 スタンプロットにて UL25 の発現が確認されたものを使用した。

389

390

391 組み換えウイルスの作製

392 組み換えウイルスの作製には、HSV-1 野生株である HSV-1(F)由来のウイルス
393 ゲノムがクローニングされた bacmid である pYEbac102Cre (61)を保持した大腸
394 菌である *E. coli* GS1783 での two-step Red-mediated mutagenesis 法を用いた(62,
395 63)。UL31 の 281 番目のアルギニンと 282 番目のアスパラギン酸をそれぞれア
396 ラニンに置換したウイルス YK731 (UL31-R281A/D282A)(図 6)を作製するために、
397 pEP-KanS をテンプレートとして使用し、プライマー 5'-
398 CCGACCGTGTCTGGCCGCAGACATTTATTGTAAAATGGCGGCCATCAGCTTCG
399 ACGGGGGGCAGGATGACGACGATAAGTAGGG-3' 及び、5'-
400 CCTTTGATACTCTAGCATGAGCCCCCGTCTGAAGCTGATGGCCGCCATTTTAC
401 AATAAATCAACCAATTAACCAATTCTGATTAG-3'を用いて PCR で増幅し、PCR
402 断片を、pYEbac102Cre を保持した大腸菌である *E. coli* GS1783 にエレクトロポ
403 レーション法を用いて導入した。YK731 (UL31-R281A/D282A)の復帰株である
404 YK732 (UL31-R281A/D282A-repair)(図 6)を作製するために、pEP-KanS をテンプ
405 レートとして使用し、プライマー 5'-
406 CCGACCGTGTCTGGCCGCAGACATTTATTGTAAAATGAGGGACATCAGCTTCG
407 ACGGGGGGCAGGATGACGACGATAAGTAGGG-3' 及び、5'-
408 CCTTTGATACTCTAGCATGAGCCCCCGTCTGAAGCTGATGTCCCTCATTTTAC

409 AATAAATCAACCAATTAACCAATTCTGATTAG-3'を用いて PCR で増幅し、PCR
410 断片を、YK731 (UL31-R281A/D282A)のゲノムを有する *E. coli* GS1783 にエレクトロ
411 トロポレーション法を用いて導入した。Vero 細胞に YK731 (UL31-R281A/D282A)
412 を MOI 5 で感染させ、24 時間培養後、ゲノム抽出液 (10 mM Tris-HCl [pH 7.5],
413 150 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.1% Nonidet P-40 [NP-40])で感染細胞を溶解した。
414 溶解液を超音波破碎処理し、β-メルカプトエタノール及び、EDTA を加え、フェ
415 ノクロ処理を行い、エタノールを用いて YK731 (UL31-R281A/D282A)感染細胞内
416 に含まれる DNA の精製を行った。精製した DNA を用いて、YK731 (UL31-
417 R281A/D282A)の UL31 及び、UL31 と相互作用する報告が存在する HSV-1 ウイ
418 ルスタンパク質である UL25、UL34、UL47、ICP22 及び、Us3 をコードする遺伝
419 子配列を親株である YK312(wild-type) (61)と比較し、意図しない変異が生じてな
420 いか確認した(30, 41, 42, 50)。UL34 の N 末端に Strep タグを付加したウイルス
421 YK735 (Strep-UL34) (図 6)を作製するために pEP-KanS をテンプレートとして使
422 用 し 、 プ ラ イ マ ー 5'-
423 CTCCCATCGCGGGCGCCATGTGGAGCCATCCGCAGTTTGAAAAGGCGGGACT
424 GGGCAAGCAGGATGACGACGATAAGTAGGG-3' 及 び 、 5'-
425 GGTTTACGCGGGCACGCACGCTCCCATCGCGGGCGCCATGTGGAGCCATCCG
426 CAGTTTGAAAAGGCGGGACTGGGCAAGCCCTAAGGATGACGACGATAAGTA

427 GGG -3'を用いて PCR で増幅し、PCR 断片を、pYEbac102Cre を保持した大腸菌
428 である GS1783 にエレクトロポレーション法を用いて導入した。YK731 (UL31-
429 R281A/D282A)の UL34 の N 末端に Strep タグを付加したウイルス YK736 (Strep-
430 UL34/UL31-R281A/D282A) (図 6)を作製するために、pEP-KanS をテンプレート
431 として使用し、YK735 (Strep-UL34)作製時に使用したプライマーを用いて、PCR
432 で増幅し、PCR 断片を、YK731 (UL31-R281A/D282A)のゲノムを有する *E. coli*
433 GS1783 にエレクトロポレーション法を用いて導入した。YK736 (Strep-
434 UL34/UL31-R281A/D282A) の 復 帰 株 である YK737 (Strep-UL34/UL31-
435 R281A/D282A-repair) (図 6)を作製するために、pEP-KanS をテンプレートとして
436 使用し、YK732 (UL31-R281A/D282A-repair) 作製時に使用したプライマーを用い
437 て、PCR で増幅し、PCR 断片を、YK736 (Strep-UL34/UL31-R281A/D282A) のゲ
438 ノムを有する *E. coli* GS1783 にエレクトロポレーション法を用いて導入した。
439 UL25 の 106 番目のコドンを終始コドンに置換したウイルス YK738 (Δ UL25) (図
440 6)を作製するために、pEP-KanS をテンプレートとして使用し、プライマー5'-
441 TCGCAGGCGCCCTGGAGGCGCTGGAGACGGCGGCCTAGCGCCGAAGAGGCG
442 GATGCCAGGATGACGACGATAAGTAGGG-3' 及 び 、 5'-
443 CGCCGGCTCATCCCCGCGCGCGGCATCCGCTAGCTCTTCGGCGGCCCGCCGTC
444 TCCAGCGCCTCCAACCAATTAACCAATTCTGATTAG -3' を用いて PCR で増幅

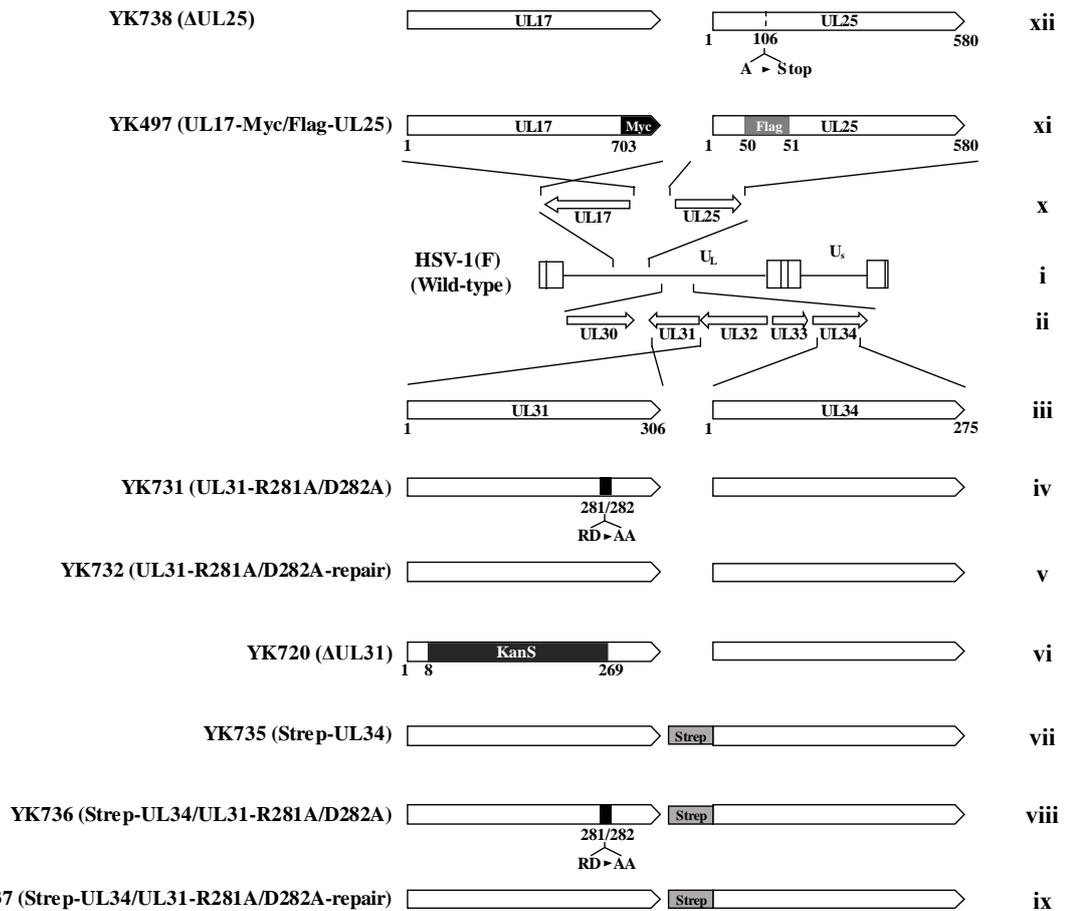
445 し、PCR 断片を、pYEbac102Cre を保持した大腸菌である *E. coli* GS1783 にエレ
446 クトロポレーション法を用いて導入した。

447 上述の形質転換した大腸菌は LB 寒天平板培地(40 μ /ml カナマイシン+20
448 μ g/ml クロラムフェニコール)に塗抹し、32°Cで1晩培養した。翌日、コロニーを
449 釣菌し、LB 寒天平板培地(40 μ /ml カナマイシン+20 μ g/ml クロラムフェニコー
450 ル)に塗抹し、32°Cで1晩培養し単コロニーを形成させ、純化を行った。目的部
451 位へのカナマイシン耐性遺伝子の挿入を得られた単コロニーを PCR することで
452 確認した後、LB 液体培地(40 μ /ml カナマイシン+20 μ g/ml クロラムフェニコー
453 ル)に植菌し、32°Cで一晩培養した。翌日、培養液 100 μ l を LB 液体培地(20 μ g/ml
454 クロラムフェニコール)に加えて 32°Cで3時間振盪培養し、10%L-アラビノース
455 を 400 μ l 加え、I-SceI 発現を誘導させ、1時間振盪培養を行った。その後、42°C
456 の恒温槽で30分間振盪培養することでリコンビナーゼの発現を誘導し、再び
457 32°Cで振盪培養した後、LB 寒天平板培地(20 μ g/ml クロラムフェニコール)に塗
458 抹し、32°Cで一晩培養した。翌日、コロニーを LB 寒天平板培地(40 μ /ml カナマ
459 イシン+20 μ g/ml クロラムフェニコール、または 20 μ g/ml クロラムフェニコー
460 ル培地に)塗布し、クロラムフェニコールにのみ耐性を示す株を選択した後、PCR
461 によりカナマイシン耐性遺伝子が欠損していることを確認した。最後に、シーク
462 エンス解析により、各目的部位に変異が導入されていることを確認し、作製した

463 大腸菌からそれぞれ、ウイルスゲノムを抽出した。YK731 (UL31-R281A/D282A)、
464 YK732 (UL31-R281A/D282A-repair) 、 YK735 (Strep-UL34) 、 YK736 (Strep-
465 UL34/UL31-R281A/D282A)及び、YK732 (Strep-UL34/UL31-R281A/D282A-repair)
466 に関しては、ウイルスゲノムをリン酸カルシウム法により RSC にそれぞれトラ
467 ンスフェクションし、ウイルスを再構築した。YK738 (Δ UL25)は、YK738 (Δ UL25)
468 のウイルスゲノム 10 μ /g と OPTI-MEM (Life Science)で洗浄した 1 \times 10⁶ 個の Vero
469 細胞をエレクトロポレーション用のキュベットに入れ、Super Electroporator
470 NEPA21 (NEPA GENE) を用いてトランスフェクションし、ウイルスを再構築し
471 た。エレクトロポレーションは、ポアーリングパルス (電圧:125V; パルス時間:
472 3.0msec; パルスインターバル時間: 50.0msec; パルス回数: 2 回; 減衰率: 10%;
473 極性切り替え: +/−)、トランスファーパルス (電圧:20V; パルス時間:50.0msec;
474 パルスインターバル時間: 50.0msec; パルス回数: 5 回; 減衰率: 40%; 極性切り
475 替え: +/−) のマルチパルス方式を採用した。本研究において、YK720 (Δ UL31)
476 と HSV-1(F)、YK731 (UL31-R281A/D282A)及び YK732 (UL31-R281A/D282A-
477 repair)を比較する場合すべてのウイルスは、UL31-CV1 細胞を用いて、ウイルス
478 増殖とウイルス力価測定を行った。同じく、YK738 (Δ UL25) と HSV-1(F)、YK731
479 (UL31-R281A/D282A)及び YK732 (UL31-R281A/D282A-repair)を比較する場合は
480 すべてのウイルスは UL25-Vero 細胞を用いて、ウイルス増殖とウイルス力価測

481 定を行った。

482



483

484 図 6 野生体 HSV-1(F)のウイルスゲノム構造と本研究で使用した変異ウイルス
 485 (i)野生体 HSV-1(F)のウイルスゲノム構造、(ii) UL30 から UL34 までの ORF、(iii)
 486 UL31 及び、UL34 のドメイン、(ivからvi) UL31 に変異を導入したウイルス、(vii)
 487 UL34 に Strep タグを付加した変異ウイルス、(viiiからix) UL34 に Strep タグを付
 488 加し、UL31 に変異を導入したウイルス、(x) UL17 及び、UL25 のドメイン、(xi)
 489 Myc タグを UL17 に付加し、Flag タグを UL25 に付加した変異ウイルス、(xii)
 490 UL25 の 106 番目のアラニンを終末コドンに置換したウイルス。

491

492

493 抗体

494 本研究においては、次のマウスモノクローナル抗体を用いた： α -tubulin (DM1A;
495 Sigma)、Flag (M2; Sigma)、Myc (PL14; MBL)、VP5 (3B6; Virusys)、ICP8 (10A3;
496 Millipore, HB-8180; ATCC)、Strep-tag (M211-3; MBL)、mouse IgG1 isotype control
497 (Sigma)。マウスポリクローナル抗体に関しては、過去に報告された抗体を用い
498 た：UL31 (64)、UL25 (58)。また、ラビットポリクローナル抗体は市販、または、
499 過去に報告がある次の抗体を用いた VP23 (CAC-CT-HSV-UL18; Cosmo Bio)、
500 UL31(41)、UL34(41)、vdUTPase (65)、VP16 (66)。

501

502 ウェスタンブロット

503 ウイルス感染細胞、免疫沈降、GST pull-down または、カプシド精製で得られ
504 た試料に含まれるタンパク質を、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動によっ
505 て分離した。電気泳動後ゲルを、Transfer Buffer (Tris (hydroxymethyl) aminomethane
506 12.1 g、Glycine 14.4 g、メタノール 200 ml、H₂O 800ml)に浸し PVDF (Millipore)と
507 共に濾紙にはさみ、セミドライトランスファー装置(ATTO)でゲル中のタンパク
508 質をメンブレンに転写した。転写後のメンブレンは 5% スキムミルク in PBS-T
509 (0.1% Tween20 を含む PBS)で 30 分ブロッキングし、1% BSA in PBS-T で希釈し

510 た 1 次抗体と 4°Cで一晩反応させた。その後、PBS-T で洗浄し、5% スキムミル
511 ク in PBS-T で希釈した 2 次抗体(Horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse、
512 anti-rabbit (GE Healthcare)と室温で 1 時間反応させた。2 次抗体反応終了後は、
513 PBS-T で洗浄し、Enhanced Chemiluminescence (GE Healthcare)を用い、ImageQuant
514 LAS 4000 (GE Healthcare)で検出を行った。

515

516 免疫蛍光抗体法

517 Vero 細胞を 35mm ガラスボトムディッシュ(Matsunami)で培養し、ウイルスを
518 MOI 5 で感染させ、37°Cで 18 時間培養した。その後、ウイルス感染細胞を 4%
519 paraformaldehyde in PBS で 10 分間固定し、0.1% TritonX-100 in PBS で 10 分間処
520 理した後、ブロッキング液(10% human serum in PBS)でブロッキングした。試料
521 はブロッキング液で希釈した各種抗体と室温で 2 時間反応させ、PBS で洗浄後、
522 ブロッキング液で希釈した 2 次抗体 Alexa-Fluor 抗体液(invitrogen)と室温で 1 時
523 間反応させた。その後、LSM800 (Zeiss)及び、付属の Airyscan (Zeiss)を用いて観
524 察を行った。画像の解析は ZEN2.3 software (Zeiss)を用いた。

525

526 GST 融合タンパク質の発現と精製

527 *E.coli* BL21 Star™ (DE3) (Thermo Fisher Scientific)に、以下に示す複数の組み合

528 わせで各種プラスミドを導入した。(i) pGEX-4T-1、(ii) pGEX-UL34₁₋₁₈₅ 及び、pET-
529 UL31_{Δ50}、(iii) pGEX-UL34₁₋₁₈₅ 及び、pET-UL31_{Δ50}-K279A、(iv) pGEX-UL34₁₋₁₈₅ 及
530 び、pET-UL31_{Δ50}-R281A/D282A、計 4 種類のプラスミドの組み合わせをそれぞれ
531 大腸菌に導入し、タンパク質の発現を行った。プラスミドを導入した大腸菌は、
532 それぞれ 37°C で、振盪培養し、培養液の光学密度(O.D.600)が 0.6~0.8 になった時
533 点で isopropyl-1-thio-β-galactoside1 (IPTG)を終濃度 0.1mM となるように添加し、
534 さらに、16°C で 18 時間振盪培養した。回収した大腸菌は lysis buffer (50 mM
535 HEPES [pH 7.0], 500 mM NaCl, 10 μM ZnSO₄, 0.5% NP-40)で懸濁後、氷上で超音
536 波破碎処理を行い、4°C、20,400×g にて 10 分間遠心した後、上清に glutathione-
537 Sepharose beads (GE Healthcare Bio-Sciences)を加え 4°C で 1 時間転倒混和した。そ
538 の後、反応させた glutathione-Sepharose beads を lysis buffer で 3 回洗浄し、精製
539 を行った。反応させた glutathione-Sepharose beads は、二つに分け SDS ポリアク
540 リルアミドゲル電気泳動より分離後、1 つは、ウェスタンブロットにより、もう
541 1 つを Coomassie brilliant blue (CBB)染色により解析を行った。

542

543 **GST pull-down**

544 GST、GST-NEC_{185-Δ50} 及び、GST-NEC_{185-Δ50}R281A/D282A₃₁ を上記の方法を用い、
545 glutathione-Sepharose beads に吸着させることで精製した。

546 5 μ g の pcDNA3.1-Flag-VP5、pcDNA3.1-Flag-VP23、pcDNA3.1-Flag-UL17 また
547 は、pcDNA3.1-Flag-UL25 を Polyethylenimine (PEI) Max (PSI) を用いて、 1×10^7 個
548 の 293FT 細胞にそれぞれトランスフェクションし、37°Cで 24 時間培養を行っ
549 た。その後、Protease Inhibitor Cocktail (Nacalai Tesque)を加えた lysis buffer (50 mM
550 HEPES [pH 7.0], 500 mM NaCl, 10 μ M ZnSO₄, 0.5% NP-40)で溶解し、4°C、20,400 \times g
551 にて 10 分間遠心した後、上清を回収し、Glutathion sepharose 4B を加えて 4°Cで
552 30 分間転倒混和し preclear した。4°C、500 \times g にて 1 分遠心した後、上清を回収
553 し、GST、GST-NEC_{185- Δ 50} 及び、GST-NEC_{185- Δ 50}R281A/D282A₃₁ を吸着させた
554 glutathione-Sepharose beads に加え、4°Cで 1 時間転倒混和し反応させた。その後、
555 lysis buffer で三回洗浄し、反応させた glutathione-Sepharose beads を二つに分け
556 SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動より分離後、1 つは、ウェスタンブロット
557 により、もう 1 つを Coomassie brilliant blue (CBB)染色により解析を行った。

558 Vero 細胞に YK497 (UL17-Myc/Flag-UL25)を MOI 5 で感染させ、37°Cで 18 時
559 間培養した。感染細胞を PBS で回収後、Protease Inhibitor Cocktail (Nacalai Tesque)
560 を加えた lysis buffer で溶解し、上記と同様の方法で、GST pull-down を行った。

561

562 HSV-1 感染細胞核内からのカプシド精製

563 先行報告に従いカプシドの精製を行った(58, 67, 68)。Vero 細胞に HSV-1(F)

564 または、YK497 (UL17-Myc/Flag-UL25)を MOI3 で感染させ、37°Cで 18 時間培養
565 した。感染細胞を PBS で回収後、hypotonic buffer (10 mM Tris-HCl [pH 7.5], 10 mM
566 KCl, 3 mM MgCl₂, 0.05% NP-40, 1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol [DTT], 10 mM NaF,
567 1% protease inhibitor cocktail)で懸濁し、氷上で 15 分静置した。4°C、250 × g にて
568 8 分遠心後、上清を除去し、ペレットを TNE buffer (500 mM NaCl, 1 mM EDTA,
569 20 mM Tris-HCl [pH 7.5])で再び懸濁し、氷上で 15 秒間 3 回の超音波破碎を行っ
570 た。4°C、2,200 × g にて 5 分遠心後上清を回収し、遠心チューブの底に 35%のシ
571 ョ糖溶液 in TNE buffer を加え、その上に回収した上清を重層し P40ST ロータ(日
572 立)を用いて、4°C、110,000 × g にて 1 時間遠心した。遠心後ペレットを再び TNE
573 buffer を用いて懸濁し、20%~50%シ ョ糖溶液 in TNE buffer の密度勾配で、P40ST
574 ロータ(日立)を用いて、4°C、110,000 × g にて 1 時間密度勾配遠心を行った。遠
575 心後上から、0.3ml ずつ溶液を回収し、フラクション得た。それぞれのフラクシ
576 ョンを二分割し、一方には、トリクロロ酢酸(TCA)を終濃度が 10%となるように
577 加え、4°Cで一晩静置し、4°C、21,000 × g にて 20 分遠心し 2 回エタノールで洗
578 浄後、沈殿物を sampling buffer で溶解し、ウェスタンブロット解析に供した。も
579 う一方は、ヌクレオカプシドが含まれたフラクションを GST、GST-NEC_{185-Δ50} 及
580 び、GST-NEC_{185-Δ50}R281A/D282A₃₁ を吸着させた glutathione-Sepharose beads を
581 wash buffer (20 mM Tris-HCl [pH 7.5], 500 mM NaCl, 10 μM ZnSO₄)によって洗浄し

582 た後に加え、4°Cで1時間転倒混和し反応させた。その後、wash buffer で三回洗
583 淨し、反応させた glutathione-Sepharose beads を二つに分け SDS ポリアクリルア
584 ミドゲル電気泳動より分離後、1つは、ウェスタンブロットにより、もう1つを
585 Coomassie brilliant blue (CBB)染色により解析を行った。

586

587 抗体による GST-NEC_{185-Δ50}とヌクレオカプシドの結合阻害作用の解析

588 上記の方法で回収したヌクレオカプシドを含んだフラクションに終濃度が 10
589 μg/ml になるように、IgG isotype control または、Flag 抗体を加え、4°Cで1時間
590 転倒混和し、GST 及び、GST-NEC_{185-Δ50} を吸着させた glutathione-Sepharose beads
591 を wash buffer によって洗淨した後に加え、4°Cで1時間転倒混和し反応させた。
592 その後、wash buffer で三回洗淨し、反応させた glutathione-Sepharose beads を二つ
593 に分け SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動より分離後、一方は、ウェスタン
594 ブロット、もう一方は Coomassie brilliant blue (CBB)染色により解析を行った。

595

596 免疫沈降法

597 Vero 細胞に YK735 (Strep-UL34)、YK736 (Strep-UL34/UL31-R281A/D282A)また
598 は、YK727(Strep-UL34/UL31-R281A/D282A-repair)を MOI 5 でそれぞれ感染させ、
599 37°Cで18時間培養した。感染細胞を PBS で回収した後、Protease Inhibitor Cocktail

600 (Nacalai Tesque)を加えた lysis buffer (50 mM HEPES [pH 7.0], 500 mM NaCl, 10 μ M
601 ZnSO₄, 0.5% NP-40)で溶解し、4°C、20,400×g にて 10 分間遠心した。遠心後上清
602 を StrepTactin Sepharose beads (IBA)に加え、4°Cで 1 時間転倒混和した。その後、
603 lysis buffer で 3 回洗浄し、反応させた glutathione-Sepharose beads を二つに分け
604 SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動より分離後、1 つは、ウェスタンブロット
605 により、もう 1 つを Coomassie brilliant blue (CBB)染色により解析を行った。

606

607 電子顕微鏡解析

608 Vero 細胞に HSV-1(F)、YK731 (UL31-R281A/D282A)、YK732 (UL31-
609 R281A/D282A-repair)、YK720 (Δ UL31)または、YK738 (Δ UL25) をそれぞれ、MOI
610 5 で感染させ 37°Cで 18 時間培養した。感染細胞から培地を除去後、常温の PBS
611 で洗浄し、アルデヒド固定液(2% paraformaldehyde、2% glutaraldehyde in 0.1M
612 phosphate buffer (19mM NaH₂PO₄、81mM Na₂HPO₄、[pH 7.4])を加え室温で 20 分
613 間固定した。固定後、セルスクレイパーで細胞を回収しペレット化させ、新しい
614 アルデヒド固定液に交換し室温で 3 時間固定した。その後、3% sucrose in 0.1M
615 phosphate buffer (pH 7.4)で 2 回洗浄し、オスミウム固定液(1% osmium tetroxide in
616 0.1M phosphate buffer [pH 7.4])を加えて氷上で 2 時間固定した後、水洗、30%、
617 50%、70%、90%、の順に置換し、さらに 99.5% Ethanol と Propylene oxide は 3 回

618 ずつ置換を行い脱水した。脱水後、Epon 812 resin mixture (TAAB Laboratories
619 Equipment Ltd., Berks, England) で包埋し、Reichert Ultracut N Ultramicrotome
620 (Reichert) を用いて超薄切片を作製した。超薄切片を 2% uranyl acetate in 70%
621 Ethanol と Reynolds' 鉛染色液(pH 12) で染色し、透過型電子顕微鏡(Hitachi H-7500)
622 を用いて観察した。また、電子顕微鏡を用いて、無作為に選んだウイルス感染細
623 胞中のウイルス粒子数を細胞分画ごとに分けて計測した。

624

625 統計処理

626 エラーバーは各 n 数における標準誤差を示す。有意差は Student の t 検定によ
627 り評価した。3 群間の比較では、p 値を $p < 0.0167 (0.05/3)$ 、 $< 0.025 (0.05/2)$ 及び、
628 $(0.05/1)$ とホルム法により設定した。4 群間の比較では、p 値を $p < 0.00833 (0.05/6)$ 、
629 $< 0.01 (0.05/5)$ 及び、 $(0.0125/4)$ とホルム法により設定した。

630

631

結果

632

633

634 試験管内において、HSV-1 NEC はカプシドタンパク質及び、

635 ヌクレオカプシドと結合する

636 NEC とヌクレオカプシドとの結合が、primary envelopment における、核膜間

637 粒子へのヌクレオカプシドの取り込みに寄与するのか解析するために、NEC と

638 ヌクレオカプシドまたは、NEC とカプシドタンパク質との結合を検討できる実

639 験系の構築を行った。初めに、UL31 断片の C 末端に 6×ヒスチジンタグが付加

640 されたタンパク質(UL31 Δ 50-His)と UL34 断片の N 末端に GST が付加されたタン

641 パク質(GST-UL34₁₋₁₈₅)を大腸菌内で共発現させ、glutathione-Sepharose beads を用

642 いて、GST-UL34₁₋₁₈₅ を精製した(図 7A)。UL31 Δ 50-His は UL31 の 51~306 番目の

643 アミノ酸から成り、カプシド結合予測部位とされる UL31 の 9 番目のヘリックス

644 が含まれている。GST-UL34₁₋₁₈₅ は UL34 の 1~185 番目のアミノ酸から成る(図

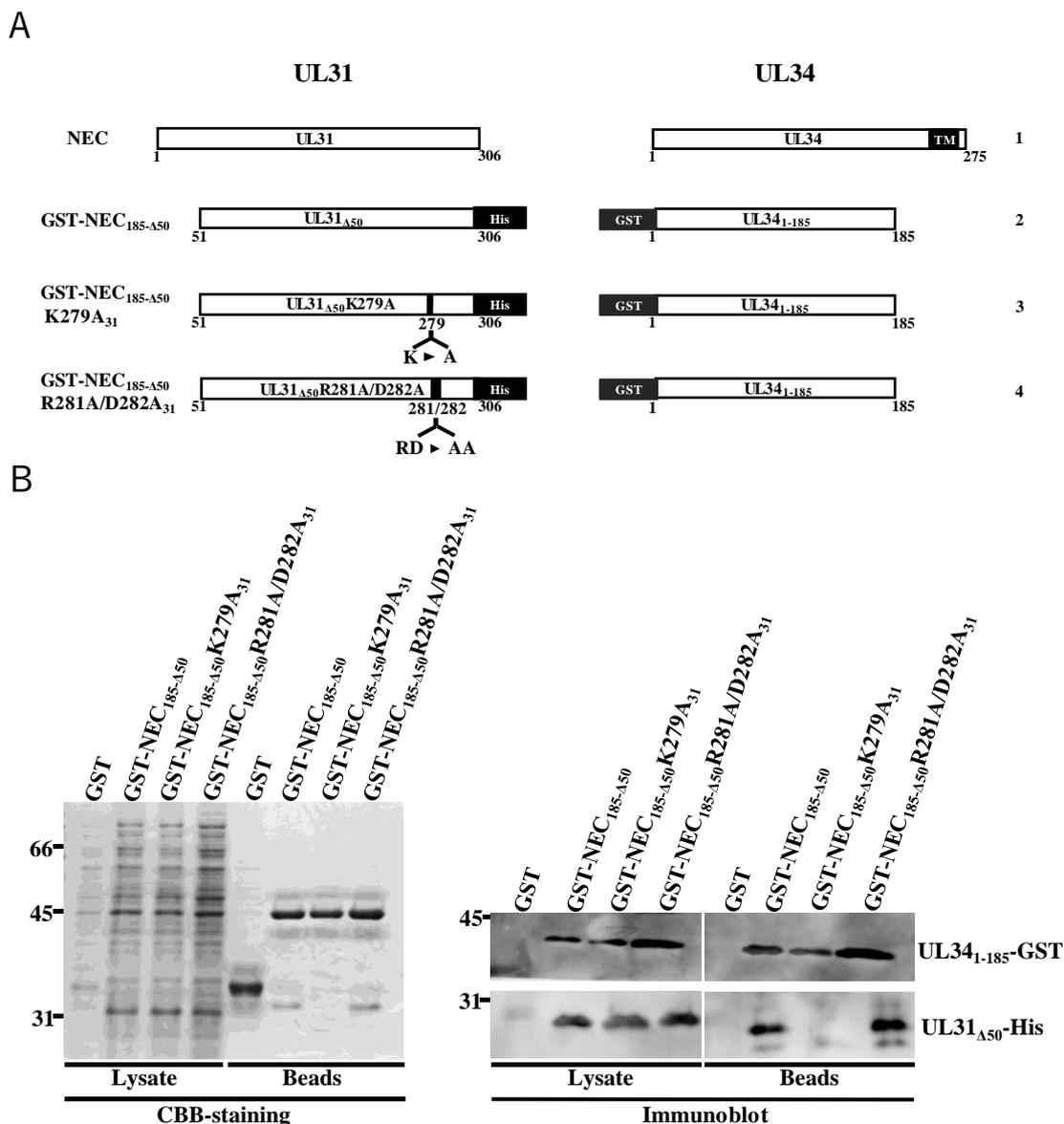
645 7A)。先行報告同様に、UL31 Δ 50-His は GST-UL34₁₋₁₈₅ と共精製されることから(31)、

646 これら 2 つのタンパク質は安定な複合体を形成していると考えられた(図 7B)。

647 この精製された UL31 Δ 50-His と GST-UL34₁₋₁₈₅ の複合体を、本論文では、GST-

648 NEC_{185- Δ 50} とする。精製した GST-NEC_{185- Δ 50} は以下に記載する GST pull-down に

649 用いた。



650

651 図7 精製した変異 NEC とその模式図

652 (A)本研究で使用した変異 HSV-1 UL31 及び、UL34 の模式図。野生体 HSV-1 NEC

653 (UL31 及び、UL34)(1 行目)。融合タンパクである GST-NEC_{185-Δ50}(2 行目)。GST-

654 NEC_{185-Δ50} の UL31 の 279 番目のリシンに変異を加えた NEC 及び、UL31 の 281

655 番目のアルギニン及び、282 番目のアスパラギン酸に変異を加えた NEC(3 及び、

656 4 行目)。(B) GST、GST-NEC_{185-Δ50} または、2 つの変異 GST-NEC_{185-Δ50} は、大腸菌

657 内でそれぞれ発現させ、溶解し、glutathione-Sepharose beads を用いて精製した。

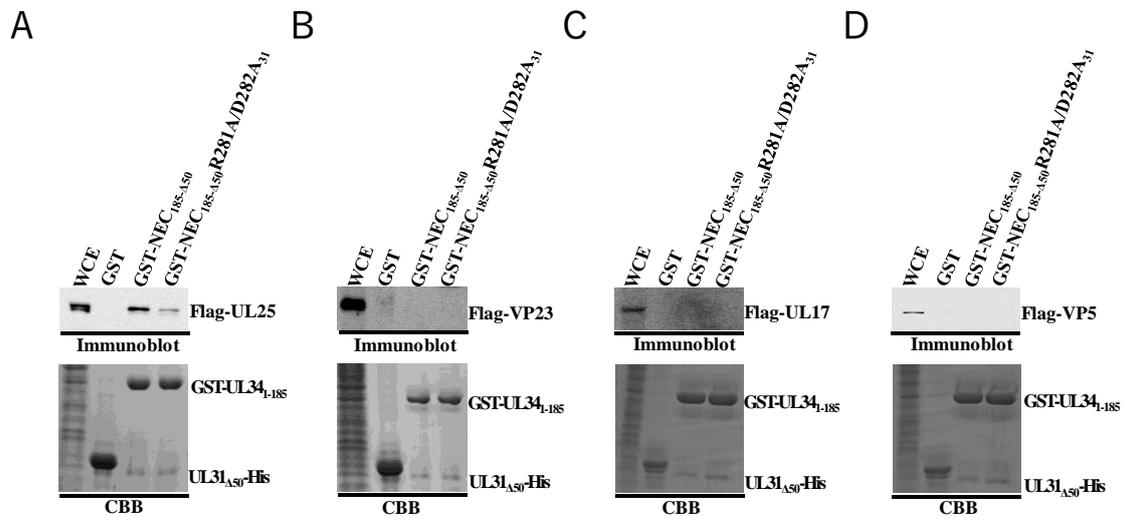
658 溶解液及び、洗浄した glutathione-Sepharose beads は、2 つに分け、それぞれ SDS

659 ポリアクリルアミドゲル電気泳動より分離後、一方は、UL31 及び、UL34 の抗

660 体を用いた ウェスタンブロット、もう一方は CBB 染色により解析を行った。

661 (i) Flag タグを付加したカプシドタンパク質である UL25 (Flag-UL25)、VP23
662 (Flag-VP23)、UL17 (Flag-UL17)または、VP5 (Flag-VP5)を個々に発現させた 293FT
663 細胞を lysis buffer で溶解し、glutathione-Sepharose beads に吸着させた GST-NEC₁₈₅₋
664 Δ ₅₀ とそれぞれ反応させた。その結果、GST-NEC₁₈₅₋ Δ ₅₀ では、Flag-UL25 との結合
665 が検出されたが、GST では、Flag-UL25 との結合が検出されなかった(図 8A)。さ
666 らに、GST-NEC₁₈₅₋ Δ ₅₀ 及び、GST の両方において、Flag-VP23、Flag-UL17 または、
667 Flag-VP5 との結合は検出されなかった(図 8B, C 及び D)。従って、本実験系を用
668 いることにより、GST-NEC₁₈₅₋ Δ ₅₀ が試験管内においてカプシドタンパク質の中で
669 も UL25 と特異的に相互作用することが示唆された。

670



671

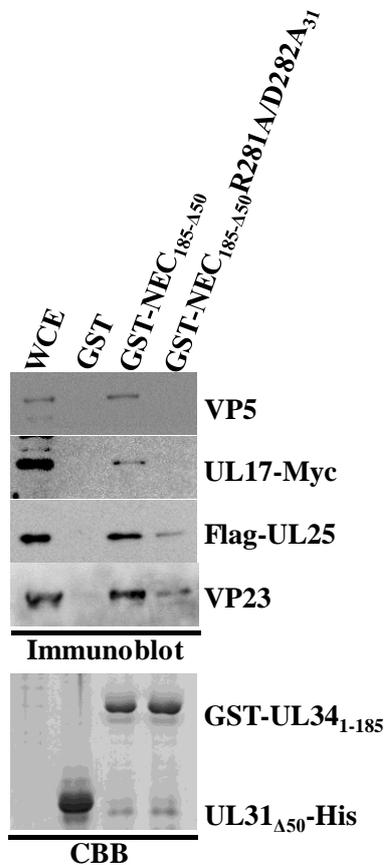
672 図 8 UL31 R281 及び UL31 D282 への変異がカプシドタンパク質単独発現細胞
 673 由来のカプシドタンパク質と NEC の結合に与える影響

674 (A から D) Flag-UL25 (A), Flag-VP23 (B), Flag-UL17 (C) 及び、Flag-VP5 (D)を発
 675 現するプラスミドをそれぞれ 293FT 細胞に導入した。プラスミドを導入し、24
 676 時間後に細胞を溶解して、glutathione-Sepharose beads に吸着させた GST、GST-
 677 NEC_{185-Δ50} または、GST-NEC_{185-Δ50}R281A/D282A₃₁ と 4°C で 1 時間それぞれ反応
 678 させた。glutathione-Sepharose beads は洗浄後 2 つに分け、それぞれ SDS ポリア
 679 クリルアミドゲル電気泳動より分離後、一方は、Flag 抗体を用いたウェスタンブ
 680 ロット、もう一方は CBB 染色により解析を行った。

681

682 (ii) glutathione-Sepharose beads に吸着させ、精製した GST-NEC_{185-Δ50} を Myc タグ
683 が付加された UL17 (UL17-Myc) と Flag タグが付加された UL25 (Flag-UL25) を発
684 現する YK497 (UL17-Myc/Flag-UL25) が感染した Vero 細胞の溶解液と反応させ
685 た。その結果、GST-NEC_{185-Δ50} では、カプシドタンパク質である VP5、UL17-Myc、
686 Flag-UL25 及び、VP23 との結合が検出されたが、GST では検出されなかった(図
687 9)。これらの結果および、(i)の結果から、GST-NEC_{185-Δ50} では、YK497 (UL17-
688 Myc/Flag-UL25)に感染した Vero 細胞の溶解液中に存在するカプシドに含まれる
689 UL25 と結合することで、間接的に VP5、UL17-Myc 及び、VP23 と結合してい
690 ることが示唆された。

691



692

693 図 9 UL31 R281 及び UL31 D282 への変異が HSV-1 感染細胞由来のカプシドタ
694 ンパク質と NEC の結合に与える影響

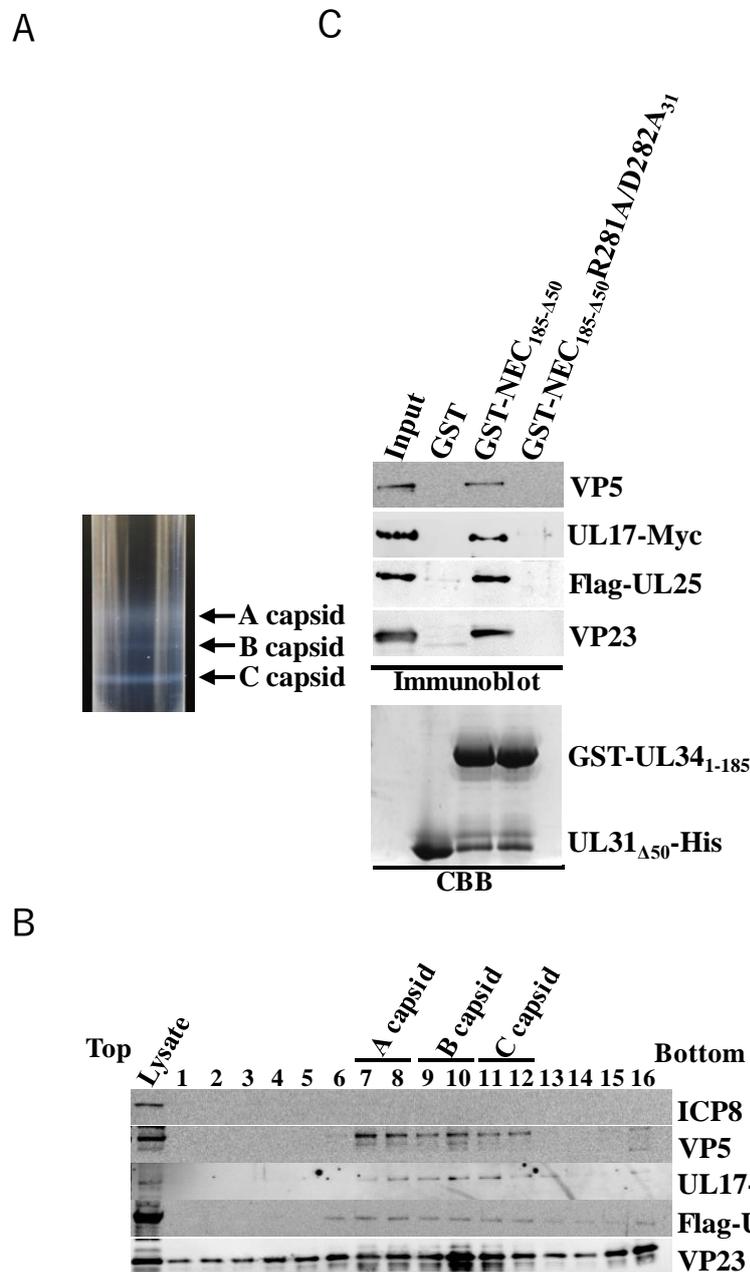
695 Vero 細胞に YK497 (UL17-Myc/Flag-UL25)を MOI 5 で感染させ 18 時間培養した
696 感染細胞の溶解液を glutathione-Sepharose beads に吸着させた GST、GST-NEC_{185-Δ50}
697 _{Δ50} または、GST-NEC_{185-Δ50}R281A/D282A₃₁ と 4°C で 1 時間それぞれ反応させた。
698 glutathione-Sepharose beads は洗浄後 2 つに分け、それぞれ SDS ポリアクリルア
699 ミドゲル電気泳動より分離後、一方は、VP5、Myc、Flag、及び、VP23 抗体を用
700 いたウェスタブロット、もう一方は CBB 染色により解析を行った。

701

702 (iii) YK497 (UL17-Myc/Flag-UL25)に感染した Vero 細胞から、核画分を精製し、
703 ショ糖密度勾配遠心分離法により核内のカプシドを精製した(図 10A 及び B)。
704 遠心後、成熟したカプシドである C カプシドのフラクションを得た。HSV-1
705 の核内タンパク質であり、ウイルス粒子内に取り込まれない ICP8 は、YK497
706 (UL17-Myc/Flag-UL25)に感染した Vero 細胞の核画分部分の溶解液から検出す
707 ることが可能であった(図 10B)。しかし、核画分部分の溶解液をショ糖密度勾
708 配遠心分離法により分離した場合、C カプシドを含んだフラクション部分には
709 ICP8 検出されなかった(図 10B)。一方で、カプシドタンパク質である VP5、
710 UL17-Myc、Flag-UL25 及び、VP23 は、核画分及び、C カプシドを含んだフラ
711 クション部分で検出可能であった(図 10B)。次に、glutathione-Sepharose beads に
712 吸着させ、精製した GST-NEC_{185-Δ50} を YK497 (UL17-Myc/Flag-UL25)に感染し
713 た Vero 細胞から得られた C カプシドを含んだフラクションと反応させた。そ
714 の結果(ii)の結果と同様に GST-NEC_{185-Δ50} では、VP5、UL17-Myc、Flag-UL25 及
715 び、VP23 との結合が検出されたが、GST では検出されなかった(図 10C)。
716

717

718



719

720 図 10 UL31 R281 及び UL31 D282 への変異がヌクレオカプシドと NEC の結合
721 に与える影響

722 (A) Vero 細胞に YK497 (UL17-Myc/Flag-UL25)を MOI 3 で感染させ 18 時間培養
723 後感染細胞を回収し核画分を精製した。核画分の溶解液を、20%~50%のショ糖
724 密度勾配溶液に上から重層し、超遠心によって分離した。矢印は、超遠心後のシ

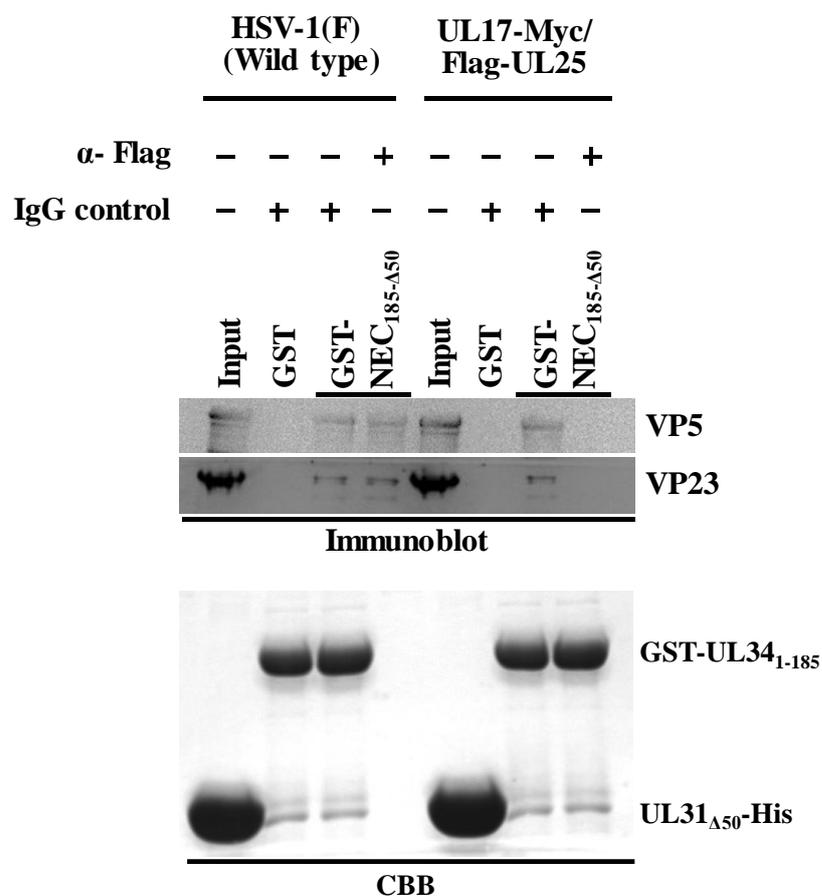
725 ヨ糖密度勾配液に観察される A、B または、C カプシドのバンドを示した。(B)
726 シヨ糖密度勾配溶液の各フラクションを分取後、(A)で示されている A、B また
727 は、C カプシドが含まれるフラクション内のタンパク質を ICP8、VP5、Myc、Flag
728 及び、VP23 に対する抗体を用いたウェスタンブロットによって解析した。(C)C
729 カプシドが含まれたフラクションと glutathione-Sepharose beads に吸着させた
730 GST、GST-NEC_{185-Δ50} または、GST-NEC_{185-Δ50}R281A/D282A₃₁ と 4°Cで 1 時間そ
731 れぞれ反応させた。glutathione-Sepharose beads は洗浄後 2 つに分け、それぞれ
732 SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動より分離後、一方は、VP5、Myc、Flag、
733 及び、VP23 抗体を用いたウェスタンブロット、もう一方は CBB 染色により解
734 析を行った。

735

736

737 さらに、Flag 抗体が Flag-UL25 を認識することで、GST-NEC_{185-Δ50} とヌクレオ
738 カプシドとの結合が阻害されるのか検討した。glutathione-Sepharose beads に吸着
739 させ、精製した GST-NEC_{185-Δ50} を HSV-1(F)または、YK497 (UL17-Myc/Flag-UL25)
740 に感染した Vero 細胞から得られた C カプシドを含んだフラクションと Flag 抗
741 体または、IgG isotype control が存在した状態でそれぞれ反応させた。その結果、
742 GST-NEC_{185-Δ50} は YK497 (UL17-Myc/Flag-UL25)由来の C カプシドを含んだフラ
743 クションからは、IgG isotype control 存在時にカプシドタンパク質である VP5 及
744 び、VP23 との結合が検出されたが、Flag 抗体存在時では、検出されなかった(図
745 11)。一方で、HSV-1(F)由来の C カプシドを含んだフラクションからは、IgG isotype
746 control または、Flag 抗体存在時共に、VP5 及び、VP23 との結合が検出された(図
747 11)。以上の結果から、この実験系を用いることで、GST-NEC_{185-Δ50} とヌクレオカ
748 プシドとの結合が検出することが可能であり、GST-NEC_{185-Δ50} とヌクレオカプシ
749 ドの結合は UL25 を介したものであることが示唆された。

750



751

752 図 11 ヌクレオカプシドと NEC 間結合の抗体による阻害

753 Vero 細胞に HSV-1(F)、または YK497 (UL17-Myc/Flag-UL25)を MOI 3 で感染さ
 754 せ 18 時間培養後、感染細胞を回収し図 10 と同様の方法で精製した C カプシド
 755 が含まれたフラクションと glutathione-Sepharose beads に吸着させた GST また
 756 は、GST-NEC_{185-Δ50} を Flag 抗体または、IgG isotype control 抗体の存在下で 4°C
 757 1 時間それぞれ反応させた。glutathione-Sepharose beads を洗浄後 2 つに分け、
 758 それぞれ SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動より分離後、一方は、VP5 及
 759 び、VP23 抗体を用いたウェスタンブロット、もう一方を CBB 染色により解析
 760 を行った。

761

762 HSV-1 NEC カプシド結合予測部位変異における NEC の UL25 及び、ヌクレオ
763 カプシドとの結合への影響

764 HSV-1 NEC の膜結合部位を底辺とした時、頂点に存在する部位 (UL31 の 9 番
765 目のヘリックス) がヌクレオカプシドとの結合部位であると予測されている(図
766 5) (34)。初めに、PRV において、PRV NEC におけるヌクレオカプシドとの結合
767 部位ではないかと報告されている PRV UL31 ホモログの 242 番目のリシンに対
768 応する、HSV-1 UL31 の 279 番目のリシン(UL31 K279)が NEC とヌクレオカプシ
769 ド及び、NEC と UL25 との結合に寄与するか検討した(図 5B)。PRV UL31 ホモロ
770 グの 242 番目のリシンに変異を導入すると、PRV 感染細胞において、核膜間粒
771 子内へのカプシド取り込みが阻害される(53)。しかし、変異を加えた PRV NEC
772 とカプシドとの結合が低下しているのかは、実際に、調べられてはいない。そこ
773 で、上述した実験系を用いることで、変異体 NEC とカプシドとの結合能の解析
774 を試みた。大腸菌内で、UL31 Δ 50-His の UL31 K279 をアラニンに置換した UL31 Δ 50-
775 His-K279A (図 7A)及び、GST-UL34₁₋₁₈₅ を共発現させた(図 7B)。大腸菌内におけ
776 る UL31 Δ 50-His-K279A 及び、GST-UL34₁₋₁₈₅ の発現は UL31 Δ 50-His 及び、GST-UL34₁₋
777 ₁₈₅ と同程度であった(図 7B)。しかし、UL31 Δ 50-His-K279A は GST-UL34₁₋₁₈₅ の共
778 に精製されなかった(図 7B)。これらの結果から、この実験系では、UL31 K279 を
779 アラニンに置換すると NEC の形成が阻害されることが考えられた。そのため、

780 HSV-1 UL31 K279 が NEC と UL25 との結合に寄与するのか検討できなかった。

781 HSV-1 及び PRV の NEC とヌクレオカプシドとの結合は静電的相互作用によ

782 るものであると考えられている(32)。HSV-1 UL31 の 9 番目のヘリックスには、

783 極性の電荷を持った側鎖のアミノ酸が UL31 K279 以外に、275 番目にアスパラ

784 ギン酸(UL31 D275)、281 番目にアルギニン(UL31 R281)さらに、282 番目にはア

785 スパラギン酸(UL31 D282)が存在する(図 5B)。この中から、構造上 NEC の表面

786 において UL31 D275 及び、UL31 K279 の真反対に連続して突出している UL31

787 R281 及び、UL31 D282 に焦点を当てた(32)。UL31 Δ 50-His の UL31 R281 及び、

788 D282 をアラニンに置換した UL31 Δ 50-His-R281A/D282A (図 7A)と GST-UL34₁₋₁₈₅

789 を大腸菌内で共発現させた。大腸菌内における、UL31 Δ 50-His-R281A/D282A 及び、

790 GST-UL34₁₋₁₈₅ の発現は、UL31 Δ 50-His 及び、GST-UL34₁₋₁₈₅ と同程度であった(図

791 7B)。さらに、UL31 Δ 50-His-R281A/D282A は、GST-UL34₁₋₁₈₅ と共に精製された(図

792 7B)。これらの結果から、この実験系では、UL31 R281 及び、UL31 D282 をアラ

793 ニンに置換した場合には NEC の形成は阻害されないことが示唆された。UL31

794 R281 及び、UL31 D282 をアラニンに置換し、精製した NEC を本論文中では、

795 GST-NEC_{185- Δ 50-R281A/D282A₃₁} とする。

796 次に、GST-NEC_{185- Δ 50} への UL31 R281 及び、UL31 D282 をアラニンに置換した

797 変異が、GST-NEC_{185- Δ 50} と UL25 及び、C カプシドとの結合に影響を与えるのか

798 検討を行った。その結果、GST-NEC_{185-Δ50}と比較して、GST-NEC_{185-Δ50}-
799 R281A/D282A₃₁は、Flag-UL25を発現させた293FT細胞溶解液中のFlag-UL25と
800 の結合が低下していた(図8A)。また、GST-NEC_{185-Δ50}と同様に、GST-NEC_{185-Δ50}-
801 R281A/D282A₃₁は、Flag-VP23、Flag-UL17または、Flag-VP5との結合は検出さ
802 れなかった(図8)。さらに、GST-NEC_{185-Δ50}と比較して、GST-NEC_{185-Δ50}-
803 R281A/D282A₃₁は、YK497(UL17-Myc/Flag-UL25)が感染したVero細胞溶解液中
804 のVP5、UL17-Myc、Flag-UL25及び、VP23との結合が低下していた(図9)。同
805 様に、GST-NEC_{185-Δ50}と比較して、GST-NEC_{185-Δ50}-R281A/D282A₃₁は、YK497
806 (UL17-Myc/Flag-UL25)に感染したVero細胞から得られたCカプシドを含んだフ
807 ラクションにおいても、VP5、UL17-Myc、Flag-UL25及び、VP23との結合が低
808 下していた(図10)。以上の結果から、UL31 R281及び、UL31 D282はNECの
809 UL25及び、ヌクレオカプシドとの効率的な結合に必要であることが示唆された。

810

811 UL31 R281 及び、D282 に変異を導入した変異ウイルスの作製とその性状解析

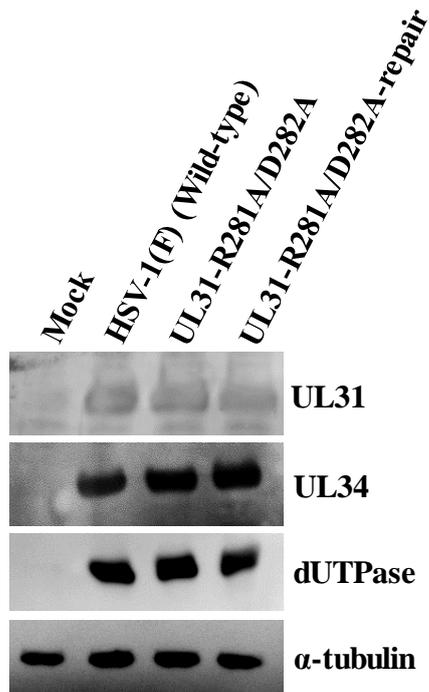
812 HSV-1感染細胞におけるUL31 R281及び、UL31 D282の役割を解析するため
813 に、HSV-1 UL31のR281及び、D282をアラニンに置換したウイルスYK731
814 (UL31-R281A/D282A)、その復帰株であるYK732(UL31-R281A/D282A-repair)さら
815 に、UL34のN末端にStrepタグが付加されたウイルスYK735(Strep-UL34)、

816 YK735 (Strep-UL34)の UL31 R281 及び、D282 をアラニンに置換したウイルス
817 YK736 (Strep-UL34/UL31-R281A/D282A)及び、その復帰株である YK737 (Strep-
818 UL34/UL31-R281A/D282A-repair)を作製した(図 6)。

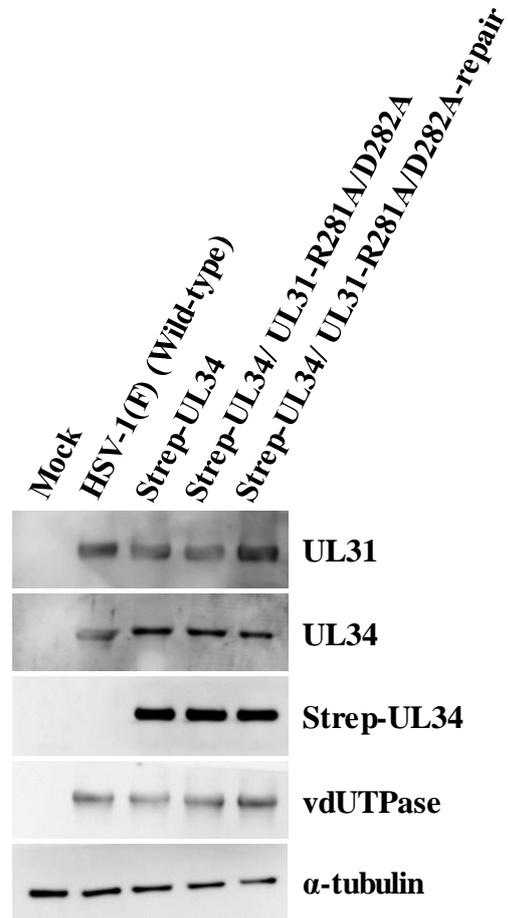
819 Vero 細胞に HSV-1(F)、YK731 (UL31-R281A/D282A)または、YK732 (UL31-
820 R281A/D282A-repair)を MOI5 で感染させ、18 時間後に感染細胞を回収し、ウイ
821 ルスタンパク質である UL31、UL34 及び、HSV-1 dUTPase (vdUTPase)の発現量を
822 ウェスタンブロットにより解析したところ、各ウイルス感染細胞において、解析
823 したウイルスタンパク質の発現量は同程度であった(図 12A)。また、Vero 細胞に
824 HSV-1(F)、YK735 (Strep-UL34)、YK736 (Strep-UL34/UL31-R281A/D282A)または、
825 YK737 (Strep-UL34/UL31-R281A/D282A-repair) を MOI5 で感染させ、18 時間後
826 に感染細胞を回収し、ウイルスタンパク質である UL31、UL34 及び、HSV-1
827 dUTPase (vdUTPase)の発現量をウェスタンブロットにより解析したところ、各ウ
828 イルス感染細胞において、解析したウイルスタンパク質の発現量は同程度であ
829 った(図 12B)。さらに、YK735 (Strep-UL34)、YK736 (Strep-UL34/UL31-
830 R281A/D282A)または、YK737 (Strep-UL34/UL31-R281A/D282A-repair)感染細胞で
831 は、ウェスタンブロットにより Strep タグが付加された UL34 を検出可能であつ
832 たが、HSV-1(F)感染細胞では、検出されなかった(図 12B)。これらの結果から、
833 UL31 R281 及び UL31 D282 への変異は、YK731 (UL31-R281A/D282A)感染細胞

834 における NEC 及び、vdUTPase の発現に影響を及ぼさないことが考えられた。

A



B



835

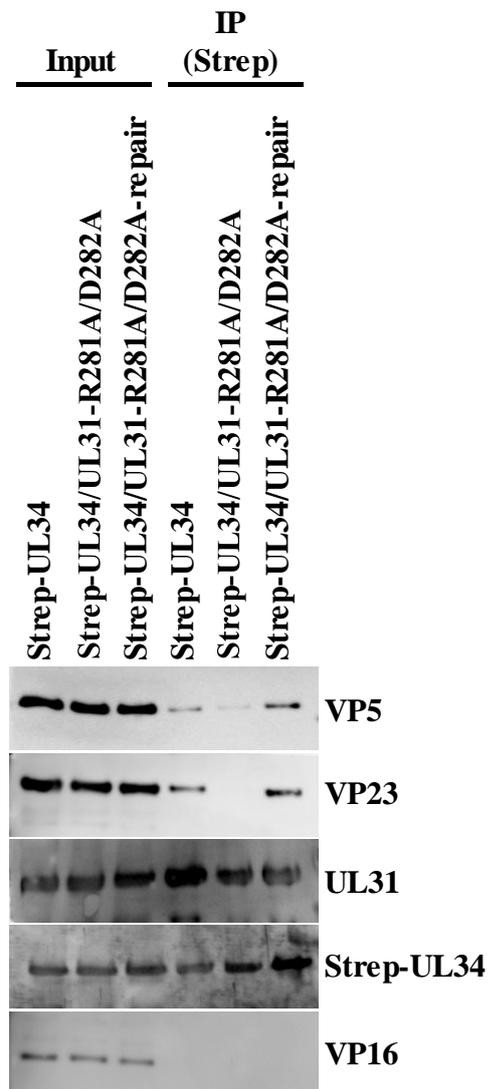
836 図 12 UL31 R281 及び UL31 D282 への変異もしくは、UL34 への Strep タグ付加
837 が HSV-1 感染細胞内のウイルスタンパク質へ与える影響

838 (A 及び、B) Vero 細胞に HSV-1(F)、YK731 (UL31-R281A/D282A)または、YK732
839 (UL31-R281A/D282A-repair) (A)と YK735 (Strep-UL34)、YK736 (Strep-UL34/UL31-
840 R281A/D282A)または、YK737 (Strep-UL34/UL31-R281A/D282A-repair) (B)をそれ
841 ぞれ MOI 5 で感染させ、18 時間培養後、細胞を回収し、UL31、UL34、Strep、
842 vdUTPase 及び、 α チューブリンに対する抗体を用いてウェスタンブロットによ
843 り検出した。

844

845 HSV-1 感染細胞において、NEC とカプシドとの相互作用に、UL31 R281 及び、
846 UL31 D282 が寄与するか解析するため、Vero 細胞に YK735 (Strep-UL34), YK736
847 (Strep-UL34/UL31-R281A/D282A) または、YK737 (Strep-UL34/UL31-
848 R281A/D282A-repair)をそれぞれ感染させ、感染細胞を溶解し、Strep-Tactin beads
849 を用いて Strep-UL34 を pull down 後、ウェスタンブロットにより解析した。YK735
850 (Strep-UL34)または、YK737 (Strep-UL34/UL31-R281A/D282A-repair)感染細胞溶解
851 液からは Strep-UL34 と共に、カプシドタンパク質である VP5 及び、VP23 が共
852 沈された(図 13)。しかし、YK736 (Strep-UL34/UL31-R281A/D282A)感染細胞溶解
853 液からは Strep-UL34 と共に、VP5 及び、VP23 がほとんど共沈されなかった(図
854 13)。また、YK735 (Strep-UL34)、YK736 (Strep-UL34/UL31-R281A/D282A)または、
855 YK737 (Strep-UL34/UL31-R281A/D282A-repair)の感染細胞溶解液中から、同程度
856 の UL31 が Strep-UL34 と共に共沈された(図 13)。これらの結果は、GST-pull down
857 の結果(図 9 及び、10)と同様であり、HSV-1 感染細胞中においても、UL31 R281
858 及び UL31 D282 は、NEC とカプシドとの効率的な結合に必要であることが示唆
859 された。

860



861

862 図 13 UL31 R281 及び UL31 D282 への変異が HSV-1 感染細胞内での UL31 と
863 UL34 及び、UL31 とカプシドタンパク質との結合に与える影響

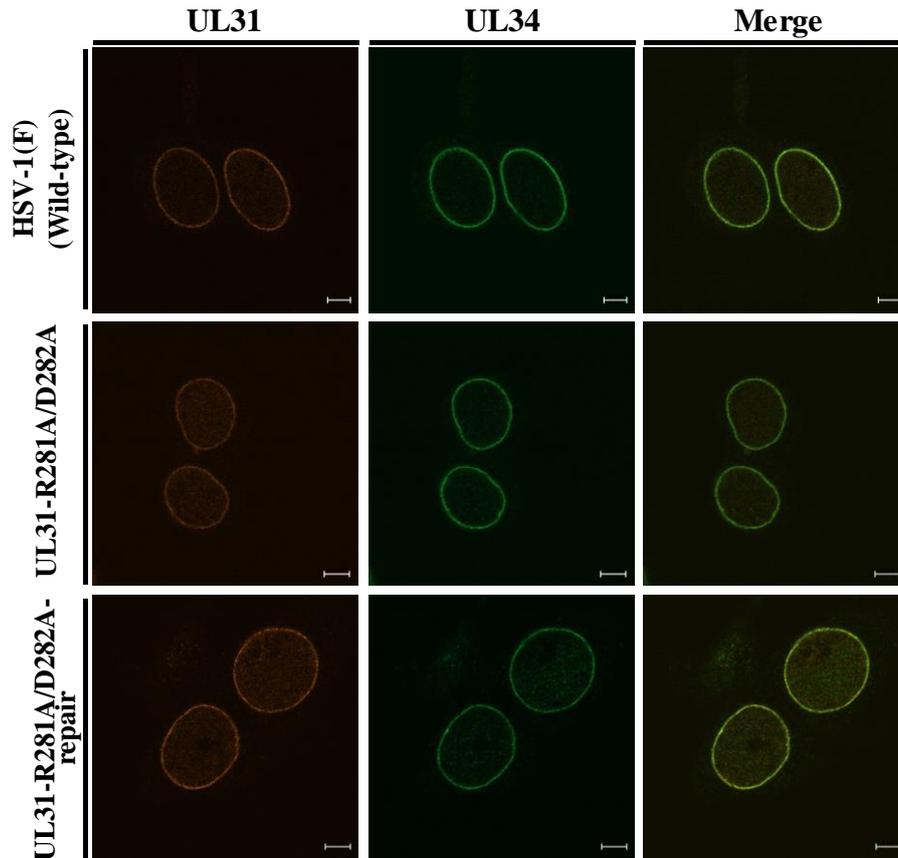
864 Vero 細胞に YK735 (Strep-UL34)、YK736 (Strep-UL34/UL31-R281A/D282A) または、
865 YK737 (Strep-UL34/UL31-R281A/D282A-repair) をそれぞれ MOI5 で感染させ、18
866 時間培養後の感染細胞溶解液を Strep-Tactin Sepharose beads を用いて精製し、VP5、
867 VP23、UL31、Strep 及び、VP16 に対する抗体を用いてウェスタンブロットによ
868 り解析した。

869

870

871 次に、UL31 R281 及び UL31 D282 が HSV-1 感染細胞における NEC の局在に
872 関与するか解析するため、HSV-1(F)、YK731 (UL31-R281A/D282A)または、YK732
873 (UL31-R281A/D282A-repair)に感染した細胞内の UL31 と UL34 の局在を共焦点
874 顕微鏡によって観察した。Vero 細胞に YK731 (UL31-R281A/D282A)を MOI 5 で
875 感染させ 18 時間培養後の感染細胞を観察したところ、UL31 及び、UL34 は核膜
876 に沿って共局在しており、HSV-1(F)または、YK732 (UL31-R281A/D282A-repair)
877 感染細胞中の UL31 及び UL34 の局在と同様であった(図 14)。しかし、超高解像
878 度画像が取得可能な、Airyscan (Zeiss)を用いて、解析を行ったところ、HSV-1(F)
879 または、YK732 (UL31-R281A/D282A-repair)感染細胞では laminA/C と共に核膜に
880 沿った局在を示す UL34 が、YK731 (UL31-R281A/D282A)感染細胞においては、
881 核膜から細胞質側へ分離し、laminA/C の外側にドット様の局在を示すことが観
882 察された(図 15)。また、UL31 及び UL34 については、Airyscan を用いた解析で
883 あっても、HSV-1(F)、YK731 (UL31-R281A/D282A)または、YK732 (UL31-
884 R281A/D282A-repair)感染細胞では共局在していた(図 16)。これらの結果から、
885 UL31 R281 及び UL31 D282 は HSV-1 感染細胞における NEC の適切な局在に必
886 要であることが示唆された。

887

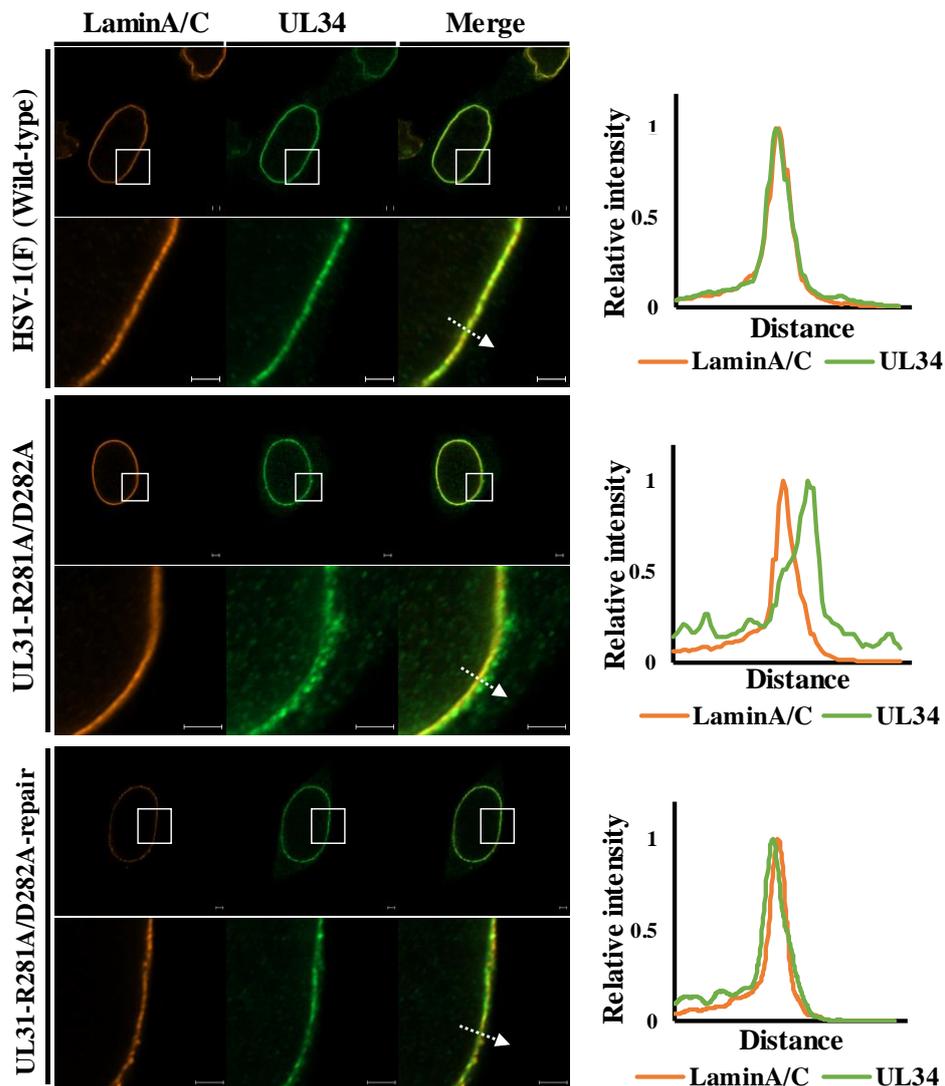


888

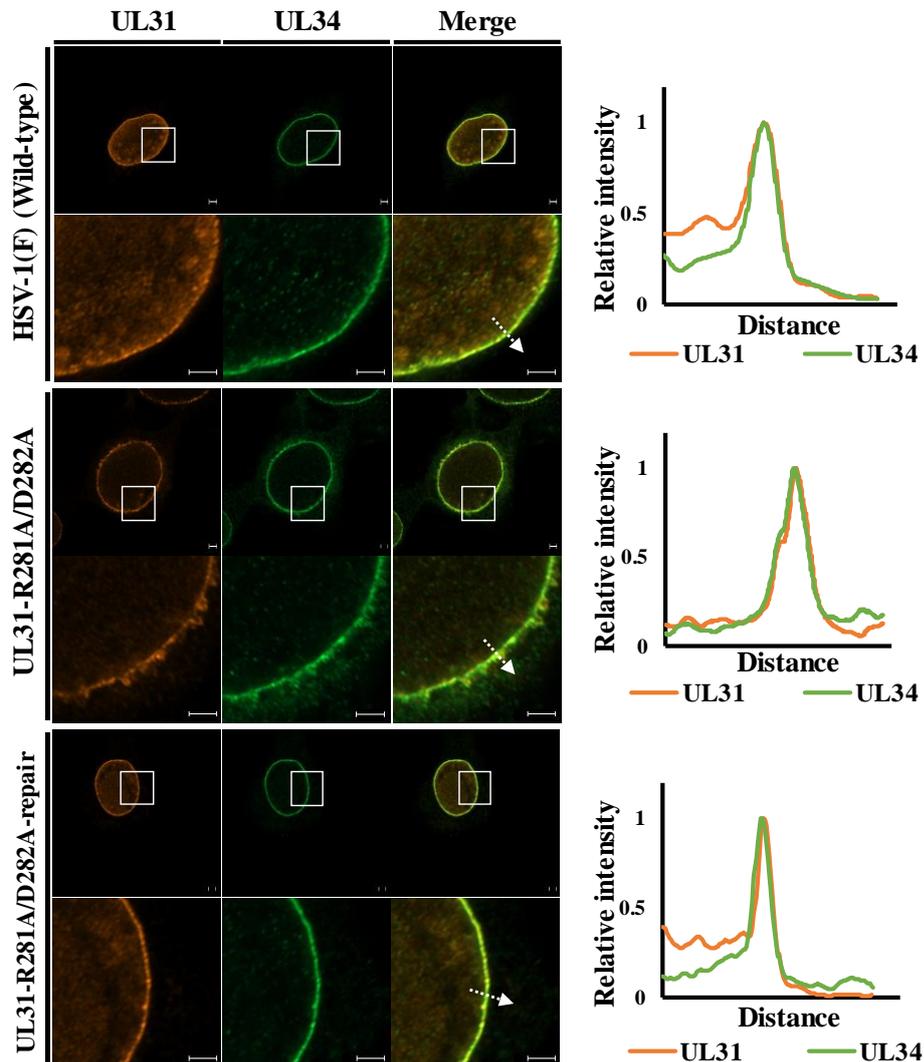
889 図 14 共焦点顕微鏡を用いた UL31 R281 及び UL31 D282 への変異が HSV-1 感
890 染細胞内での UL31 及び UL34 の局在に与える影響の解析

891 Vero 細胞に HSV-1(F)、YK731 (UL31-R281A/D282A)または、YK732 (UL31-
892 R281A/D282A-repair)をそれぞれ MOI 5 で感染させ、18 時間培養後、感染細胞を
893 UL31 及び、UL34 に対する抗体を用いた免疫蛍光抗体法により共染色し、共焦
894 点顕微鏡を用いて観察した。スケールバーは 5 μ m を示す。

895



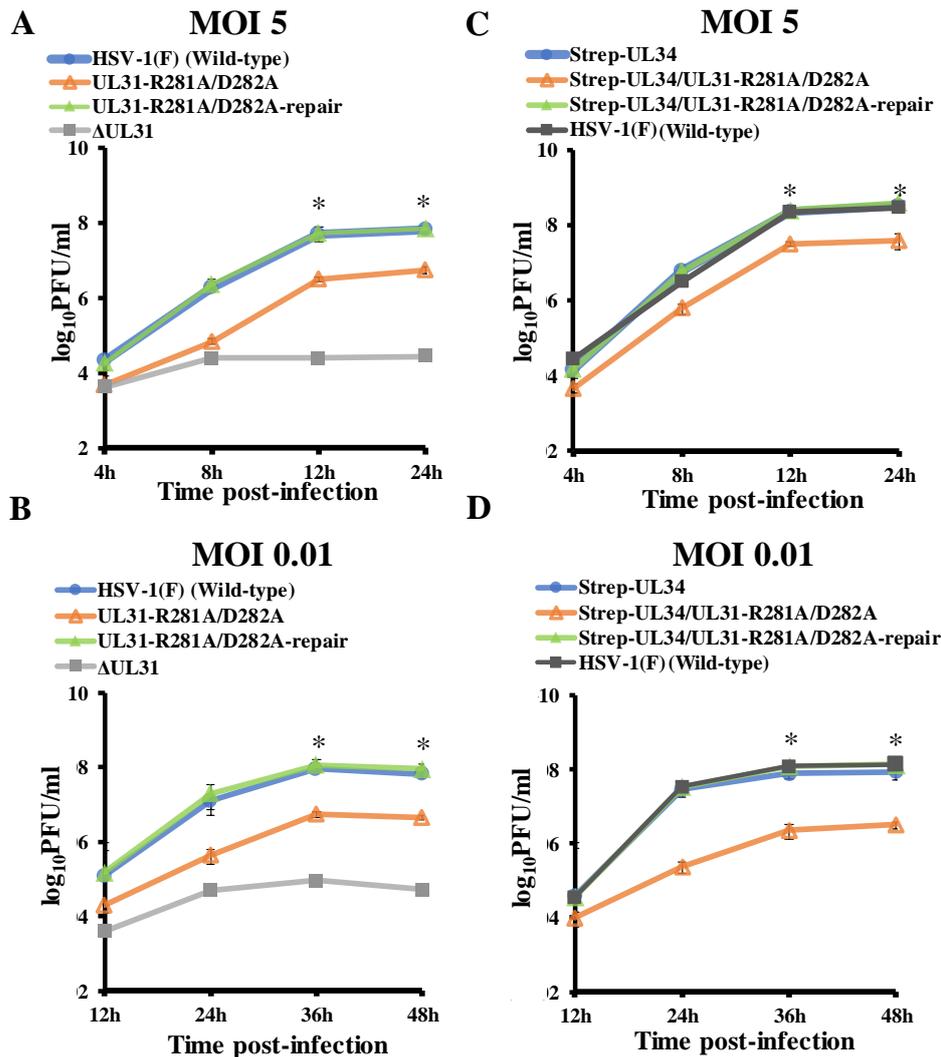
896
 897 図 15 Airyscan を用いた UL31 R281 及び UL31 D282 への変異が HSV-1 感染細
 898 胞内での laminA/C 及び、UL34 の局在に与える影響の解析
 899 Vero 細胞に HSV-1(F)、YK731 (UL31-R281A/D282A) または、YK732 (UL31-
 900 R281A/D282A-repair) をそれぞれ MOI5 で感染させ、18 時間培養後、感染細胞を
 901 laminA/C 及び、UL34 に対する抗体を用いた免疫蛍光抗体法により共染色し、
 902 Airyscan を用いて観察した。それぞれのウイルス感染細胞での画像において、下
 903 部分の画像は、上部分の画像内の白い四角で囲った部分を高倍率にした画像で
 904 ある。右のグラフは、X 軸を白点矢印の線分をとし、Y 軸を laminA/C 及び、UL34
 905 が検出される際の蛍光強度として表している。スケールバーは 5 μ m を示す。
 906



907
 908 図 16 Airyscan を用いた UL31 R281 及び UL31 D282 への変異が HSV-1 感染細胞
 909 胞内での UL31 及び、UL34 の局在に与える影響の解析
 910 Vero 細胞に HSV-1(F)、YK731 (UL31-R281A/D282A)または、YK732 (UL31-
 911 R281A/D282A-repair)をそれぞれ MOI5 で感染させ、18 時間培養後、感染細胞を
 912 UL31 及び、UL34 に対する抗体を用いた免疫蛍光抗体法により共染色し、
 913 Airyscan を用いて観察した。それぞれのウイルス感染細胞での画像において、下
 914 部分の画像は、上部分の画像内の白い四角で囲った部分を高倍率にした画像で
 915 ある。右のグラフは、X 軸を白点矢印の線分をとり、Y 軸を UL31 及び、UL34
 916 が検出される際の蛍光強度として表している。スケールバーは 5 μ m を示す。
 917

918 さらに、UL31 R281 及び UL31 D282 への変異導入、及び UL34 への Strep タグ
919 の付加が HSV-1 の増殖に関与するか調べるために、Vero 細胞に、HSV-1(F)、
920 YK731 (UL31-R281A/D282A)、YK732 (UL31-R281A/D282A-repair)、YK720
921 (Δ UL31)、YK735 (Strep-UL34)、YK736 (Strep-UL34/UL31-R281A/D282A)または、
922 YK737 (Strep-UL34/UL31-R281A/D282A-repair)を MOI5 または、MOI0.01 で感染
923 させ、多段階の培養時間における子孫ウイルスの力価を測定した。YK731 (UL31-
924 R281A/D282A)を Vero 細胞に MOI5 で 24 時間感染させた場合の子孫ウイルス力
925 価は、HSV-1(F)の場合と比較して 11.6 倍、YK732 (UL31-R281A/D282A-repair)の
926 場合と比較して 12.9 倍低かったが、YK720 (Δ UL31) の場合と比較すると 200 倍
927 高く、この傾向は感染 12 時間後の子孫ウイルス力価についても同様であった
928 (図 17A)。また、YK731 (UL31-R281A/D282A)を Vero 細胞に MOI0.01 で 48 時間
929 感染させた場合の子孫ウイルス力価は、HSV-1(F)の場合と比較して 14.7 倍、
930 YK732 (UL31-R281A/D282A-repair)の場合と比較して 20.0 倍低かったが、YK720
931 (Δ UL31) の場合と比較すると 85.7 倍高く、この傾向は 36 時間後においても同
932 様であった (図 17B)。また、YK736 (Strep-UL34/UL31-R281A/D282A)を Vero 細
933 胞に MOI5 で 24 時間感染させた場合の子孫ウイルス力価は、YK735 (Strep-UL34)
934 の場合と比較して 9.71 倍、YK732 (UL31-R281A/D282A-repair)の場合と比較して
935 7.98 倍低く、この傾向は感染 12 時間後においても同様であった(図 17C)。YK736

936 (Strep-UL34/UL31-R281A/D282A)を Vero 細胞に、MOI0.01 で 48 時間感染させた
937 場合の子孫ウイルス力価は、YK735 (Strep-UL34)の場合と比較して 27.2 倍、
938 YK732 (UL31-R281A/D282A-repair)の場合と比較して 42.7 倍低く、この傾向は感
939 染 36 時間後においても同様であった(図 17D)。また、MOI5、及び MOI0.01 で
940 Vero 細胞に感染させた YK735 (Strep-UL34)または、HSV-1(F)の各時間における
941 子孫ウイルス力価が同程度であったことから(図 17C 及び、D)、Vero 細胞での
942 HSV-1 ウイルス増殖は、UL34 への Strep タグ付加による影響を受けないことが
943 考えられた。これらの結果から、UL31 R281 及び、UL31 D282 は HSV-1 の感染
944 細胞における効率的な増殖に必要であるが、UL31 R281 及び UL31 D282 への変
945 異は UL31 欠損変異よりも、HSV-1 の増殖に影響を与えないことが示唆された。



946

947 図 17 UL31 R281 及び UL31 D282 への変異もしくは、UL34 への Strep タグ付加
948 が HSV-1 のウイルス増殖に与える影響

949 (A 及び、B) Vero 細胞に HSV-1(F)、YK731 (UL31-R281A/D282A)、YK732 (UL31-
950 R281A/D282A-repair)または、YK720 (ΔUL31)を MOI 5(A)または、MOI 0.01(B)で
951 感染させた。感染細胞を感染後グラフの X 軸に示した時間ごとにそれぞれ回収
952 し、UL31-CV1 細胞を用いて、子孫ウイルス力価を測定した。(C 及び、B)Vero 細胞
953 細胞に YK735 (Step-UL34)、YK736 (Strep-UL34/UL31-R281A/D282A) または、
954 YK737 (Strep-UL34/UL31-R281A/D282A-repair)を MOI 5(C)または、MOI 0.01(D)
955 で感染させた。感染細胞を感染後グラフの X 軸に示した時間ごとにそれぞれ回
956 収し、Vero 細胞を用いて子孫ウイルス力価を測定した。エラーバーは、独立し
957 た実験を 5 回行い、得られた結果の標準偏差を示したものである。統計処理は、
958 Student の t 検定により評価した。p 値は、 $p < 0.00833$ (0.05/6)、 < 0.01 (0.05/5)及

959 び、(0.0125/4)とホルム法により設定した。アスタリスクは、以下のウイルス間
960 での子孫ウイルス力価が有意に変化していることを表す。(A 及び、B) YK731
961 (UL31-R281A/D282A) vs HSV-1(F)、(YK731 (UL31-R281A/D282A) vs YK732
962 (UL31-R281A/D282A-repair)及び、YK731 (UL31-R281A/D282A) vs YK720 (Δ UL31)、
963 (C 及び、D) YK736 (Strep-UL34/UL31-R281A/D282A) vs HSV-1(F)、YK736 (Strep-
964 UL34/UL31-R281A/D282A) vs YK735 (Strep-UL34)及び、YK736 (Strep-UL34/UL31-
965 R281A/D282A) vs YK737 (Strep-UL34/UL31-R281A/D282A-repair)
966

967 UL31 R281 及び、UL31 D282 への変異が HSV-1 ウイルス粒子の形態形成に及ぼ

968 す影響

969 NEC とカプシドとの相互作用が HSV-1 ウイルス粒子形成過程において、どの
970 段階に作用するのか解析するために、Vero 細胞に、HSV-1(F)、YK731 (UL31-
971 R281A/D282A)または、YK732 (UL31-R281A/D282A-repair)を MOI 5 で感染させ、
972 18 時間培養したウイルス感染細胞中のウイルス粒子の形態と細胞画分ごとのそ
973 の数を電子顕微鏡によって観察した。Vero 細胞に感染した、HSV-1(F)または、
974 YK732 (UL31-R281A/D282A-repair)感染細胞中の全ウイルス粒子数における、核
975 膜間に存在するエンベロープを纏ったヌクレオカプシド数(核膜間粒子数)の割
976 合は HSV-1(F)では、10.4%であり、YK732 (UL31-R281A/D282A-repair)では、9.7%
977 であった(表 1)。一方で、Vero 細胞に感染した、YK731 (UL31-R281A/D282A) 感
978 染細胞中の全ウイルス粒子数における、核膜間粒子数の割合は 4.1%であり、
979 HSV-1(F)または、YK732 (UL31-R281A/D282A-repair)感染細胞中の核膜間粒子数
980 の割合と比べると HSV-1(F)では、2.5 倍、YK732 (UL31-R281A/D282A-repair)で
981 は、2.4 倍低く、それらの差は有意であった(表 1)。また、Vero 細胞に感染した、
982 HSV-1(F)または、YK732 (UL31-R281A/D282A-repair)感染細胞中の全ウイルス粒
983 子数における、核内のカプシド数の割合は HSV-1(F)では、55.8%であり、YK732
984 (UL31-R281A/D282A-repair)では、56.1%であった(表 1)。一方で、Vero 細胞に感

985 染した、YK731 (UL31-R281A/D282A) 感染細胞中の全ウイルス粒子数における、
986 核内のカプシド数の割合は 80.5%であり、HSV-1(F)または、YK732 (UL31-
987 R281A/D282A-repair)感染細胞中の核内のカプシド数の割合と比べて増加してお
988 り、その差は有意であった(表 1)。YK731 (UL31-R281A/D282A) 感染細胞中の全
989 ウイルス粒子数における、核膜間粒子数または、核内のカプシド数の割合は、
990 HSV-1(F)または、YK732 (UL31-R281A/D282A-repair)の場合と比べると有意な差
991 が生じていた(表 1)。これらの結果から、UL31 R281 及び、UL31 D282 への変異
992 は、primary envelopment によって生じる核膜間粒子数を減少させ、核内のカプシ
993 ド数を増加させることが考えられた。そのため、全ウイルス粒子数における細胞
994 質及び、細胞外ウイルス粒子総数の割合は、HSV-1(F)または、YK732 (UL31-
995 R281A/D282A-repair)の感染細胞において 33.8%または、34.0%であるのに対して、
996 YK731 (UL31-R281A/D282A) 感染細胞では 15.5%と減少傾向であった(表 1)。

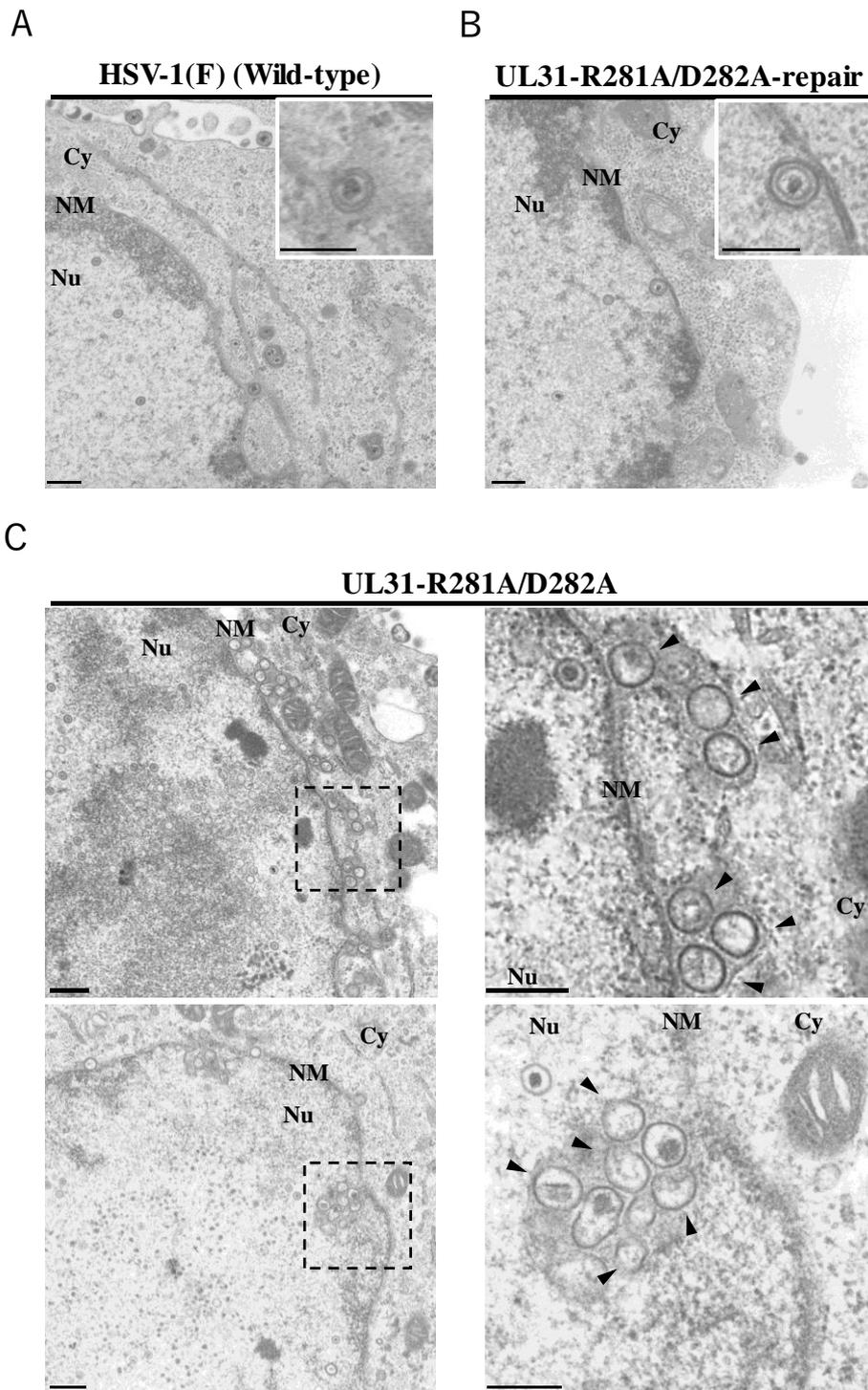
997 興味深いことに、YK731 (UL31-R281A/D282A)感染細胞中では、核外膜が細胞
998 質に向かって突出する様に、空の粒子が核膜間に蓄積していることが観察され
999 た(図 18C)。また、一部の YK731 (UL31-R281A/D282A)感染細胞において、核内
1000 膜が核内に向かって突出する様に、空の粒子が蓄積していることも観察された
1001 (図 18C)。これらの結果は、UL31 と UL34 が核膜に沿った laminA/C の外側でド
1002 ット上に観察された上記の結果と一致していた(図 15 及び 16)。さらに、YK731

1003 (UL31-R281A/D282A)感染細胞中の核膜間で観察された空の粒子のサイズは、
1004 HSV-1(F)または、YK732 (UL31-R281A/D282A-repair)感染細胞中の核膜間で観察
1005 されるウイルス粒子のサイズとほとんど同じであった(図 18)。YK731 (UL31-
1006 R281A/D282A)感染細胞中の核膜間に存在する空の粒子は HSV-1(F)または、
1007 YK732 (UL31-R281A/D282A-repair)感染細胞中では、ほとんど観察されず、YK731
1008 (UL31-R281A/D282A)感染細胞中の核膜間に存在する空の粒子数は HSV-1(F)ま
1009 たは、YK732 (UL31-R281A/D282A-repair)感染細胞中の核膜間に存在する空の粒
1010 子数と比較して有意に多かった(図 18 及び、19)。また、Vero 細胞に感染した、
1011 YK720 (Δ UL31)または、新たに作製した UL25 欠損体ウイルス YK738 (Δ UL25)
1012 (図 6 及び、20)が YK731 (UL31-R281A/D282A)と同様に感染細胞の核膜間におい
1013 て、空の粒子が観察されるか解析を行った。その結果、HSV-1(F)または、YK732
1014 (UL31-R281A/D282A-repair)感染細胞と同様に、YK720 (Δ UL31)または、YK738
1015 (Δ UL25)においても、感染細胞の核膜間には、ほとんど空の粒子が観察されな
1016 った(図 19 及び、21)。

ウイルス	各細胞画分のウイルス粒子数/全ウイルス粒子数(%)					総数 (全ウイルス粒子/ 感染細胞数)
	核内のカプシド	核膜間粒子	細胞質内の ヌクレオカプシド	細胞質内のエンベロープを纏った ヌクレオカプシド	細胞外の ウイルス粒子	
HSV-1(F)	55.8 ± 17.4 (779)	10.4 ± 0.6 (145)	5.9 ± 0.8 (82)	8.7 ± 0.8 (121)	19.2 ± 1.5 (269)	1396/10
UL31-R281A/D282A	80.5 ± 0.9* (1209)	4.1 ± 0.2 (61)*	3.5 ± 0.3 (52)	4.2 ± 0.4 (63)	7.8 ± 0.3* (117)	1502/10
UL31-R281A/D282A- repair	56.1 ± 1.1 (832)	9.7 ± 0.5 (144)	4.9 ± 0.4 (72)	9.0 ± 0.5 (134)	20.1 ± 1.1 (299)	1481/10

1018 表 1 UL31 R281 及び UL31 D282 への変異が各細胞画分のウイルス粒子分布に
1019 与える影響

1020 カッコ内はカウントしたカプシド数または、ウイルス粒子数を示す。統計処理は、
1021 Student の t 検定により評価した。p 値は、 $p < 0.0167$ (0.05/3)、 < 0.025 (0.05/2)及
1022 び、(0.05/1)とホルム法により設定した。アスタリスクは、以下のウイルス感染
1023 細胞の各細胞画分におけるカプシド数または、ウイルス粒子数が有意に変化し
1024 ていることを表す。YK731 (UL31-R281A/D282A) vs HSV-1(F)及び、YK731 (UL31-
1025 R281A/D282A) vs YK732 (UL31-R281A/D282A-repair)



1026

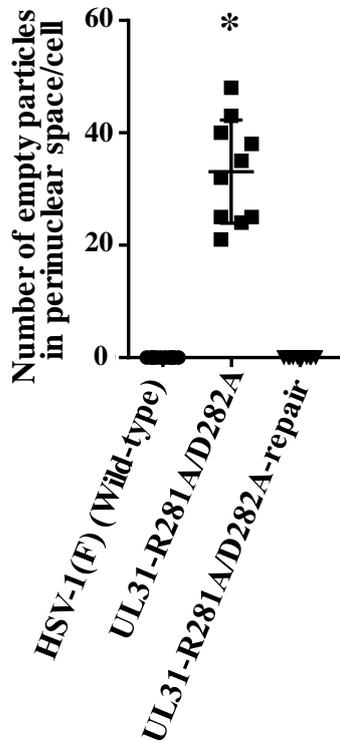
1027

1028 図 18 UL31 R281 及び UL31 D282 への変異が HSV-1 nuclear egress に与える影
 1029 響

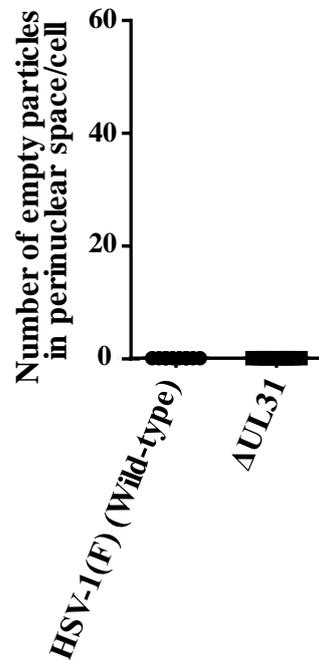
1030 (A から C)Vero 細胞に HSV-1(F) (A)、YK731 (UL31-R281A/D282A-repair) (B) また
 1031 は、YK732 (UL31-R281A/D282A) (C) をそれぞれ MOI 5 で感染させ、18 時間培

1032 養した感染細胞について、電子顕微鏡解析を行った。(A 及び、B) HSV-1(F)
1033 (A)、及び YK731 (UL31-R281A/D282A-repair) (B)それぞれのウイルス感染細胞
1034 の画像右上に核膜間粒子の拡大像を写した。(C)右の画像は、それぞれ左画像の
1035 四角内を拡大したものである。上の画像は、空の粒子が核外膜から細胞質に突
1036 出している様に核膜間に蓄積している画像である。下の画像は、空の粒子が核
1037 内膜から核内に突出する様に核膜間に蓄積している画像である。矢先は、空の
1038 粒子を示す。Nu は核内、NM は核膜、Cy は細胞質を指す。スケールバーは、
1039 300nm を示す。
1040

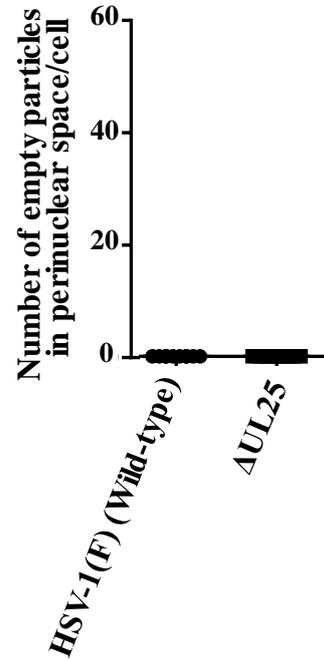
A



B



C

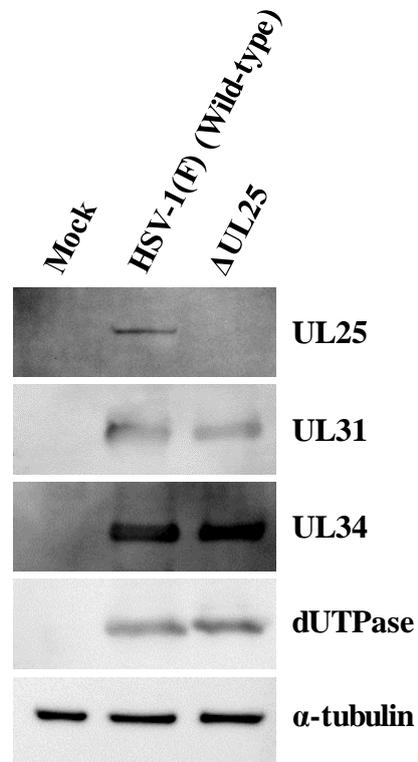


1042

1043 図 19 HSV-1 感染細胞核膜間における空の粒子数

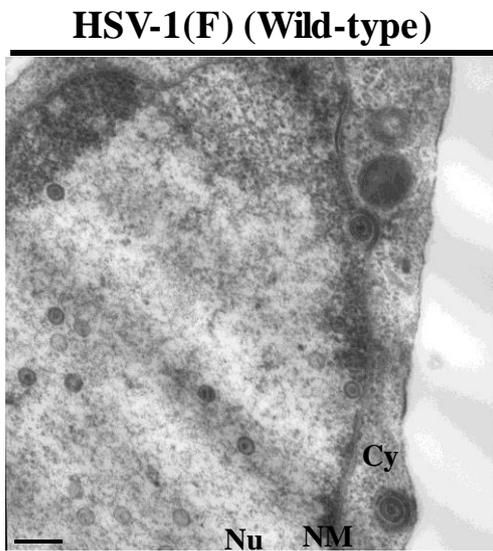
1044 (A)Vero 細胞に HSV-1(F)、YK731 (UL31-R281A/D282A)または、YK732 (UL31-
 1045 R281A/D282A-repair)をそれぞれ MOI 5 で感染させ、18 時間培養した。図 18 と
 1046 同じく、電子顕微鏡を用いて 10 個のそれぞれのウイルス感染細胞における核膜
 1047 間における空の粒子数を計測した。(B 及び、C)Vero 細胞に HSV-1(F)、YK720
 1048 (ΔUL31)(B)または、YK738 (ΔUL25)(C)をそれぞれ MOI 5 で感染させ、18 時間培
 1049 養した。図 21 と同じく、電子顕微鏡を用いて 10 個のそれぞれのウイルス感染
 1050 細胞における核膜間における空の粒子数を計測した。統計処理は、Student の t 検
 1051 定により評価した。P 値は、 $p < 0.0167$ (0.05/3)、 < 0.025 (0.05/2)及び、(0.05/1)と
 1052 ホルム法により設定した。アスタリスクは、以下のウイルス感染細胞の核膜間に
 1053 おける空の粒子数が有意に変化していることを表す。YK731 (UL31-
 1054 R281A/D282A) vs HSV-1(F)及び、YK731 (UL31-R281A/D282A) vs YK732 (UL31-
 1055 R281A/D282A-repair)

1056

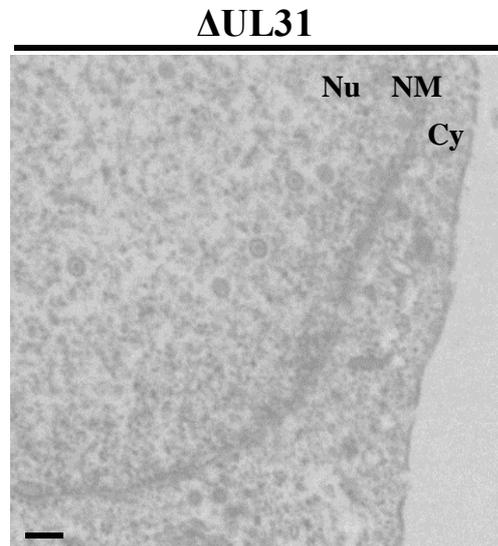


1057
 1058 図 20 UL25 欠損変異が HSV-1 感染細胞内ウイルスタンパク質に与える影響
 1059 Vero 細胞に HSV-1(F)または、YK738 (Δ UL25)を、それぞれ MOI 5 で感染させ、
 1060 18 時間培養後、細胞を回収し、UL25、UL31、UL34、vdUTPase 及び、 α チュー
 1061 ブリンに対する抗体を用いてウェスタンブロットにより検出した。
 1062

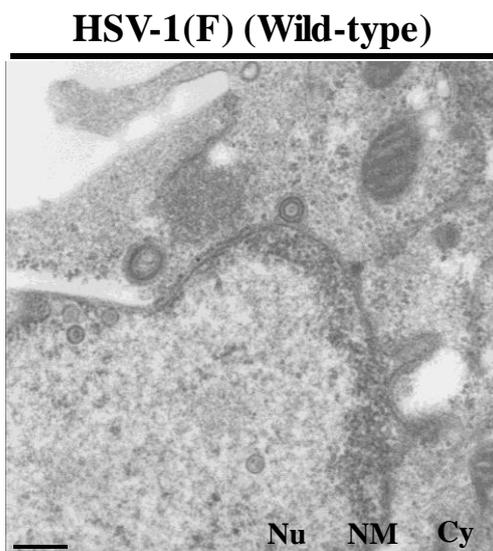
1063 A



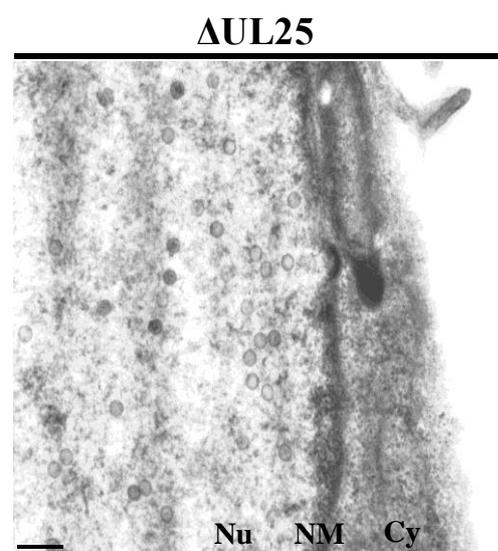
B



C



D



1064

1065

1066 図 21 UL31 または、UL25 欠損変異が HSV-1 nuclear egress に与える影響
1067 (A 及び、B)Vero 細胞に HSV-1(F) (A)または、YK720 (Δ UL31) (B)をそれぞれ MOI
1068 5 で感染させ、18 時間培養した感染細胞について、電子顕微鏡解析を行った。(C
1069 及び、D) HSV-1(F) (C)、YK738 (Δ UL25) (D)それぞれ MOI 5 で感染させ、18 時間

1070 培養した感染細胞について、電子顕微鏡解析を行った。Nu は核内、NM は核膜、
1071 Cy は細胞質を指す。スケールバーは、300nm を示す。
1072

考察

1073

1074

1075 長年にわたり、primary envelopment において、HSV-1 NEC はヌクレオカプシ
1076 ドと結合することで、ヌクレオカプシドを核内膜から核膜間に出芽させ、ヌクレ
1077 オカプシドを核膜間粒子内に取り込むと考えられていた(17, 18, 35)。先行報告に
1078 において、NEC のカプシド結合予測部位に変異を加えると、ヌクレオカプシドの
1079 核膜間粒子への取り込みが抑制されるなどの報告は存在するが、本仮説を十分
1080 に立証できる実験結果は得られていなかった(53)。本仮説を立証するためには、
1081 NEC とヌクレオカプシドまたは、NEC とカプシドタンパク質との結合を検証で
1082 きる実験系が必要であった。本研究では、先行研究で、HSV-1 NEC が膜変性を
1083 引き起こすことを証明するために使用された、大腸菌内 NEC 発現系と GST-pull
1084 down を用いることで、NEC とヌクレオカプシドまたは、NEC とカプシドタンパ
1085 ク質との結合を検証できる実験系を構築した(31, 34)。UL31 の 9 番目のヘリック
1086 スは、NEC の膜結合部位から最も離れた部分に位置しているため、NEC におけ
1087 るカプシドとの結合部位であると予測されている(32, 34, 35)。そこで、本研究で
1088 は UL31 の 9 番目のヘリックスに存在する UL31 R281 及び、UL31 D282 に焦点
1089 を当てた。NEC の構造情報と、本研究で構築した実験系から、試験管内におい
1090 て、UL31 R281 及び、UL31 D282 のアミノ酸をアラニンに置換すると、NEC と

1091 ヌクレオカプシドとの結合が阻害されることが明らかになった(34)。これらの結
1092 果から、NEC の構造から予測される NEC の膜結合部位を底辺とした時、頂点に
1093 位置している UL31 R281 及び、UL31 D282 が、NEC における、カプシドとの結
1094 合部位であることが推定された。ヘルペスウイルスの NEC における、ヌクレオ
1095 カプシドとの結合部位は未だ特定されておらず、本報告によって、初めて、HSV-
1096 1 NEC のヌクレオカプシドとの結合部位が特定された。UL31 R281 及び、UL31
1097 D282 に変異を導入したウイルスの感染細胞では、多くの場合、核膜間に核外膜
1098 が細胞質に突出する様に空の粒子が蓄積しており、一部の核膜間には核内膜が
1099 核内に陥入する様に空の粒子が蓄積していた。これらの空の粒子は、HSV-1 感染
1100 細胞中の核膜間で観察されるウイルス粒子のエンベロープとほとんど同じ大き
1101 さであることから、核膜間で観察される空の粒子は、核膜間粒子にヌクレオカプ
1102 シドが含まれていない状態であると考えられ、先行報告と同様に、UL31 R281 及
1103 び、UL31 D282 に変異を導入するとヌクレオカプシドの核膜間粒子への取り込
1104 みが阻害されることが示唆された(53)。以上のことから、primary envelopment に
1105 おいて、HSV-1 NEC はヌクレオカプシドと結合することで、ヌクレオカプシド
1106 を核内膜から核膜間に出芽させ、ヌクレオカプシドを核膜間粒子内に取り込む
1107 といった仮説を直接的に立証できる実験結果が得られた。また、UL31 R281 及
1108 び、UL31 D282 に変異を導入すると核内のカプシドが増大し、核膜間に存在す

1109 るエンベロープを纏ったヌクレオカプシドは、減少しており、先行報告と同様に
1110 primary envelopment が阻害されている結果が得られた(41, 42)。

1111 HSV-1 UL31 とカプシド間及び、UL31 とカプシドタンパク質間の生化学的解
1112 析や、クライオ電顕による HSV-1 核膜間粒子の観察結果などから、UL25 が NEC
1113 とヌクレオカプシドを架橋しているのではないかと考えられている(49-51)。こ
1114 れらの報告を支持する様に、精製した NEC と UL25 を単独で発現させた細胞の
1115 溶解液を反応させると、精製した NEC と UL25 との結合が検出可能であった。

1116 さらに、精製した NEC と HSV-1 感染細胞溶解液または、精製した C カプシドを
1117 含んだフラクションとそれぞれ反応させると、精製した NEC と UL25 だけでな
1118 く、VP5、VP23、及び、UL17 など多くのカプシドタンパク質との結合を検出が
1119 検出可能であった。一方で、VP5、VP23 または、UL17 を単独で発現させた細胞
1120 の溶解液と精製した NEC をそれぞれ反応させても、精製した NEC と VP5、VP23
1121 または、UL17 との結合は検出できなかった。さらに、YK497 (UL17-Myc/Flag-
1122 UL25)感染細胞から精製した C カプシドを含んだフラクションと Flag-UL25 を
1123 認識する Flag 抗体存在下で、精製した NEC と反応させると、精製した NEC と
1124 VP5 及び VP23 との結合が検出されなくなった。また、UL31 R281 及び、UL31
1125 D282 に変異を加えた NEC と UL25 を単独発現させた細胞の溶解液を反応させ
1126 た場合、野生体の NEC と比較して変異体 NEC では、UL25 との結合がほとんど

1127 検出できなくなり、感染細胞溶解液および、精製した C カプシドを含んだフラ
1128 クションとそれぞれ反応させた場合でも野生体と比較して、UL25、VP5、VP23、
1129 及び、UL17 など多くのカプシドタンパク質との結合がほとんど検出できなくな
1130 った。以上の結果から、NEC は、膜結合部位を底辺とした時、頂点に存在する
1131 UL31 R281 及び、UL31 D282 を介してヌクレオカプシドに含まれる UL25 と結
1132 合していることが示唆された。この結果から、primary envelopment において、ヌ
1133 クレオカプシドに含まれる UL25 が NEC とヌクレオカプシドを架橋することで、
1134 UL25 及び、UL17 の複合体である CVSCs が豊富に存在している C カプシドを選
1135 択的に核膜間に出芽させる、といった仮説を支持することができた(図 4)。

1136 UL34 欠損体感染細胞において、UL31 に対して免疫沈降を行うと UL25 が共
1137 沈降される(49)。さらに、UL34 欠損体感染細胞において、ショ糖密度勾配遠心
1138 分離法によりカプシド精製を行うと、ヌクレオカプシドを含む画分から UL31 が
1139 検出される(49)。すなわち UL31 は、NEC を形成せずとも UL25 または、ヌクレ
1140 オカプシドとの相互作用が可能であり、単体の UL31 と UL25 または、ヌクレオ
1141 カプシドとの結合においても、UL31 R281 及び、UL31 D282 が寄与している可
1142 能性が考えられた。NEC の結晶構造解析から、UL31 タンパク質表面は、NEC 単
1143 量体及び、多量体形成時に多くがタンパク質間の結合に使用される(34)。UL31
1144 R281 及び、UL31 D282 は、NEC 単量体及び、多量体形成時のタンパク質間の結

1145 合に使用されないことから、UL31 R281 及び、UL31 D282 は、単体の UL31 と
1146 UL25 または、ヌクレオカプシドとの結合においても寄与していることが考えら
1147 れた。この可能性を検証するには、UL31 を大腸菌内で単独発現させ、本論文中
1148 で行った実験を試みる必要があった。しかしながら、今回用いた大腸菌内発現系
1149 において、単独で発現させた UL31 は、可溶性が非常に悪いため精製が困難であ
1150 ることが知られている(34)。そのため、単体の UL31 とヌクレオカプシドとの結
1151 合を直接的に検証するには、別の実験系を用いる必要があると考えられた。

1152 UL31 R281 及び、UL31 D282 への変異は、NEC とヌクレオカプシド及び、UL25
1153 との相互作用を不安定にさせると考えられたが、一方で UL31 の構造が大きく変
1154 化することで、NEC とヌクレオカプシドとの結合以外に別の機能を阻害してい
1155 る可能性がある。この可能性は完全に排除できないが、UL31 R281 及び、UL31
1156 D282 は、報告されている NEC の構造上では表面に位置しているため、UL31 R281
1157 及び、UL31 D282 への変異による、UL31 の構造変化は極微小であると予測され
1158 た(34)。また、HSV-1 感染細胞においても、UL31 R281 及び、UL31 D282 に変異
1159 を導入した NEC では、野生体 NEC の機能を多く維持していた。これらのこと
1160 から、UL31 R281 及び、UL31 D282 への変異は、試験管内においては、NEC の
1161 複合体形成能に影響を与えず、HSV-1 感染細胞においては、効率的に核膜に局在
1162 する実験結果を得ることができた。YK731 (UL31-R281A/D282A)感染細胞中の核

1163 膜間に空の粒子が形成されることから、UL31 R281 及び、UL31 D282 への変異
1164 は、primary envelopment における、ヌクレオカプシドの核膜間粒子への取り込み
1165 を阻害するが、NEC の粒子形成能及び、膜切断能を阻害しないと考えられた。
1166 HSV-1 の複製において、primary envelopment における、ヌクレオカプシドの核膜
1167 間粒子への取り込みは必要不可欠なものである。しかしながら、UL31 R281 及
1168 び、UL31 D282 への変異は、HSV-1(F)と比較して、ウイルス増殖が 11.6 倍低倍
1169 率となるだけであった。この理由としては、UL31 R281 及び、UL31 D282 への変
1170 異のみでは、完全に NEC とヌクレオカプシドとの結合を阻害できないためだと
1171 考えられた。本研究結果からも、UL31 R281 及び、UL31 D282 に変異を加えた
1172 NEC であっても、UL25 を単独発現させた細胞溶解液または、HSV-1 感染細胞
1173 の溶解液と反応させた場合、微小であるが変異体 NEC と UL25 または、UL25 及
1174 び、他のカプシドタンパク質との結合が検出された。また、UL31 欠損ウイルス
1175 では、UL31 R281 及び、UL31 D282 に変異を加えたウイルスよりも、有意に子孫
1176 ウイルス力価が減少していた。先行報告において、子孫ウイルス力価が著しく減
1177 少するような点変異を導入したヘルペスウイルスでは、ウイルスを継代するこ
1178 とによって子孫ウイルス力価が回復しうることが知られており、子孫ウイルス
1179 力価が回復したウイルスでは、UL31 をコードする遺伝子以外の遺伝子に変異が
1180 加わっていることが報告されている(69-72)。そのため、我々は、UL31 と相互作

1181 用する報告がある UL31 を含めた、UL25、UL34、UL47、ICP22、または、Us3 を
1182 コードする遺伝子配列を検証したところ、YK731 (UL31-R281A/D282A)の遺伝子
1183 配列は、その親株の遺伝子配列と UL31 R281 及び、UL31 D282 をコードする遺
1184 伝子配列以外同一のもであった。しかし、YK731 (UL31-R281A/D282A)感染細胞
1185 で観察されたフェノタイプが検証した遺伝子配列以外の二次的な変異によって
1186 生じている可能性を完全には否定できない。

1187 YK731 (UL31-R281A/D282A)感染細胞で観察された、子孫ウイルス力価の減少
1188 と核膜間ウイルス粒子のエンベロープと同様な空の粒子が観察されるフェノタ
1189 イプは、HSV-1 UL31 の 279 番目のリシンに対応する PRV UL31 の 242 番目のリ
1190 シンをアラニンに置換し、相補性解析によって、観察されている(53)。本研究で
1191 は、試験管内において、UL31 R281 及び、UL31 D282 をそれぞれアラニンに置換
1192 した場合と比較して、UL31 の 279 番目のリシンをアラニンに置換すると NEC
1193 の形成が阻害されていた。これらの結果から、NEC の膜結合部位を底辺とした
1194 時の頂点部分は、HSV-1 と PRV で保存性が非常に高いが、アミノ酸置換によっ
1195 て起きる影響は異なることが示唆された。NEC の膜結合部位を底辺とした時の
1196 頂点部分周囲のアミノ酸配列は HSV-1 と PRV で大きく異なっている。そのため、
1197 PRV では、NEC の膜結合部位を底辺とした時の頂点部分のヘリックスに隣接す
1198 る形で、別のヘリックス構造が存在しているが、HSV-1 NEC が対応する部分は、

1199 結晶構造が解析されていない(34)。通常、結晶構造が解析できない部分は、構造
1200 の可動性が高い部分であると考えられている(73, 74)。そのため、可動性が高い
1201 部分に隣接している NEC の膜結合部位を底辺とした時の頂点部分も HSV-1 と
1202 PRV で構造力学的に大きな差があるのではないかと考えられた。これらのこと
1203 から、HSV-1 と PRV の非常に保存性が高い NEC の膜結合部位を底辺とした時
1204 の頂点部分のアミノ酸配列を変異した際の影響に違いが生じていることが示唆
1205 された。PRV UL31 の 242 番目のリシンをアラニンに置換した NEC は、UL31
1206 R281 及び、UL31 D282 をそれぞれアラニンに置換した NEC と同様に UL34 と複
1207 合体を形成し、NEC とヌクレオカプシドとの結合を阻害している可能性が考え
1208 られた。そのため、PRV では、PRV UL31 の 242 番目のリシンをアラニンに置換
1209 した場合においても NEC の形成は阻害されずに、NEC とヌクレオカプシドとの
1210 結合が阻害されていることを検証することができれば、本研究結果はより支持
1211 されると考えられた。

1212 HSV-1 ヌクレオカプシドと HSV-1 NEC との結合を架橋すると考えられたカプ
1213 シドタンパク質 HSV-1 UL25 は、HSV-1 UL31 と同様に多くのヘルペスウイルス
1214 亜科でホモログが保存されている(75)。HSV-1 UL25 の中でも HSV-1 UL25 C 末
1215 端から 20 番目までのアミノ酸配列は、他のヘルペスウイルス亜科の UL25 ホモ
1216 ログなどと共に非常に保存性が高く、構造上 HSV-1 UL25 と HSV-1 カプシドと

1217 の結合には使用されず、HSV-1ヌクレオカプシドの表面に位置している(19,75)。
1218 さらに、HSV-1 UL25 C末端から20番目までのアミノ酸を欠失した HSV-1 UL25
1219 を発現する HSV-1 UL25 変異ウイルス感染細胞において、ショ糖密度勾配遠心分
1220 離法によりカプシド精製を行うとヌクレオカプシドを含む画分から HSV-1 UL25
1221 は検出されるが、HSV-1 UL31 は検出されなくなる(50)。これらの事実から、HSV-
1222 1 UL25 C末端から20番目までのアミノ酸領域は、HSV-1 UL25 における HSV-1
1223 UL31 または、NEC との結合部位であると考えられている(50)。今後、HSV-1 NEC
1224 における UL31 R281 及び、UL31 D282 が HSV-1 UL25 C末端から20番目までの
1225 アミノ酸領域中で特異的に相互作用しているアミノ酸を本研究で構築した実験
1226 系やタンパク質間の結合シミュレーションなどを用いて解析する必要がある。

総括

1227

1228

1229 核内で新たに形成されたヌクレオカプシドを核内から細胞質に輸送する

1230 nuclear egress は、HSV-1 の増殖において、必須であると考えられている。HSV-1

1231 NEC とヌクレオカプシドの結合は、nuclear egress における、ヌクレオカプシド

1232 の核内膜からの出芽及び、核膜間粒子への取り込みに関与すると考えられてき

1233 た。しかしながら、この仮説を直接的に示すデータは、存在していなかった。本

1234 研究では、HSV-1 NEC 構造からカプシド予測部位と考えられている NEC の膜結

1235 合部分を底辺とした時に、頂点に存在する二つのアミノ酸が、NEC とヌクレオ

1236 カプシドとの効率的な結合及び、ヌクレオカプシドの核膜間粒子への取り込み

1237 に寄与することを明らかにした。この報告は、NEC とヌクレオカプシドとの結

1238 合がヌクレオカプシドの核膜間粒子への取り込みに寄与することを直接的に示

1239 した初めての報告である。

1240

謝辞

1241

1242

1243 本研究の遂行にあたり、多くのご助言、ご指導を賜り、様々な実験を行うこと
1244 を快諾してくださった、東京大学医科学研究所 ウイルス病態制御分野 川口
1245 寧 教授に感謝致します。

1246 ウイルス病態制御分野 加藤哲久 助教、有井潤 助教、小柳直人 助教、丸
1247 鶴雄平 特任助教には、日々の実験から学会発表に至るまで、細かなご助言、ご
1248 指導いただきましたことを感謝致します。

1249 東京大学医科学研究所 疾患プロテオミクスコアラボラトリー 相良洋 助
1250 教には、電子顕微鏡観察の際、多大なご指導とご協力を賜りましたことを深く感
1251 謝します。

1252 ウイルス病態制御分野の喜多尾祥代 氏、阿部里紗 氏、佐藤敬子 氏、過去
1253 に在籍していた朝倉嘉江 氏には、研究生活を送るうえで、多岐にわたるご協力、
1254 ご配慮をいただきましたことを感謝いたします。

1255 ウイルス病態制御分野の先輩方、同期、後輩の皆様には、日常の議論を通し、
1256 多くの知識、示唆を与えていただいたことを感謝致します。

1257 最後に、博士課程における日々の生活を全面的に援助していただいた家族に
1258 深く感謝いたします。

引用文献

1259

1260

- 1261 1. Roizman B, Knipe DM, Whitley RJ. 2013. Herpes simplex viruses, p 1823-1897. *In* Knipe
1262 DM H, PM, Cohen JI, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Racaniello VR, Roizman B. (ed),
1263 Fields virology, 6th ed. Lippincott-Williams &Wilkins, Philadelphia, PA.
- 1264 2. Kawaguchi Y. 2010. 単純ヘルペスウイルス(HSV). ウイルス 60:187-196.
- 1265 3. Cohrs RJ, Gildea DH. 2001. Human herpesvirus latency. *Brain Pathol* 11:465-74.
- 1266 4. Roizman B, Knipe D. 2001. Herpes simplex viruses and their replication, vol 72.
- 1267 5. Gupta R, Warren T, Wald A. 2007. Genital herpes. *The Lancet* 370:2127-2137.
- 1268 6. Herold BC, WuDunn D, Soltys N, Spear PG. 1991. Glycoprotein C of herpes simplex virus
1269 type 1 plays a principal role in the adsorption of virus to cells and in infectivity. *J Virol*
1270 65:1090-8.
- 1271 7. Herold BC, Visalli RJ, Susmarski N, Brandt CR, Spear PG. 1994. Glycoprotein C-
1272 independent binding of herpes simplex virus to cells requires cell surface heparan sulphate
1273 and glycoprotein B. *J Gen Virol* 75 (Pt 6):1211-22.
- 1274 8. Arii J, Goto H, Suenaga T, Oyama M, Kozuka-Hata H, Imai T, Minowa A, Akashi H, Arase
1275 H, Kawaoka Y, Kawaguchi Y. 2010. Non-muscle myosin IIA is a functional entry receptor
1276 for herpes simplex virus-1. *Nature* 467:859.
- 1277 9. Satoh T, Arii J, Suenaga T, Wang J, Kogure A, Uehori J, Arase N, Shiratori I, Tanaka S,
1278 Kawaguchi Y, Spear PG, Lanier LL, Arase H. 2008. PILRalpha is a herpes simplex virus-
1279 1 entry coreceptor that associates with glycoprotein B. *Cell* 132:935-44.
- 1280 10. Suenaga T, Satoh T, Somboonthum P, Kawaguchi Y, Mori Y, Arase H. 2010. Myelin-
1281 associated glycoprotein mediates membrane fusion and entry of neurotropic herpesviruses.
1282 *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:866-71.
- 1283 11. Shukla D, Liu J, Blaiklock P, Shworak NW, Bai X, Esko JD, Cohen GH, Eisenberg RJ,
1284 Rosenberg RD, Spear PG. 1999. A novel role for 3-O-sulfated heparan sulfate in herpes
1285 simplex virus 1 entry. *Cell* 99:13-22.
- 1286 12. Montgomery RI, Warner MS, Lum BJ, Spear PG. 1996. Herpes simplex virus-1 entry into
1287 cells mediated by a novel member of the TNF/NGF receptor family. *Cell* 87:427-36.
- 1288 13. Smiley JR, Elgadi MM, Saffran HA. 2001. Herpes simplex virus vhs protein, p 440-451,
1289 *Methods in enzymology*, vol 342. Elsevier.
- 1290 14. Baines JD. 2011. Herpes simplex virus capsid assembly and DNA packaging: a present
1291 and future antiviral drug target. *Trends Microbiol* 19:606-13.
- 1292 15. Homa FL, Brown JC. 1997. Capsid assembly and DNA packaging in herpes simplex virus.

- 1293 Rev Med Virol 7:107-122.
- 1294 16. Cardone G, Heymann JB, Cheng N, Trus BL, Steven AC. 2012. Procapsid assembly,
1295 maturation, nuclear exit: dynamic steps in the production of infectious herpesvirions. *Adv*
1296 *Exp Med Biol* 726:423-39.
- 1297 17. Johnson DC, Baines JD. 2011. Herpesviruses remodel host membranes for virus egress.
1298 *Nat Rev Microbiol* 9:382-94.
- 1299 18. Mettenleiter TC, Muller F, Granzow H, Klupp BG. 2013. The way out: what we know and
1300 do not know about herpesvirus nuclear egress. *Cell Microbiol* 15:170-8.
- 1301 19. Huet A, Makhov AM, Huffman JB, Vos M, Homa FL, Conway JF. 2016. Extensive subunit
1302 contacts underpin herpesvirus capsid stability and interior-to-exterior allostery. *Nature*
1303 *Structural & Molecular Biology* 23:531.
- 1304 20. Heming JD, Conway JF, Homa FL. 2017. Herpesvirus Capsid Assembly and DNA
1305 Packaging. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 223:119-142.
- 1306 21. Trus BL, Newcomb WW, Cheng N, Cardone G, Marekov L, Homa FL, Brown JC, Steven
1307 AC. 2007. Allosteric signaling and a nuclear exit strategy: binding of UL25/UL17
1308 heterodimers to DNA-Filled HSV-1 capsids. *Molecular cell* 26:479-489.
- 1309 22. Cockrell SK, Huffman JB, Toropova K, Conway JF, Homa FL. 2011. Residues of the UL25
1310 protein of herpes simplex virus that are required for its stable interaction with capsids.
1311 *Journal of virology* 85:4875-4887.
- 1312 23. Sheaffer AK, Newcomb WW, Gao M, Yu D, Weller SK, Brown JC, Tenney DJ. 2001.
1313 Herpes simplex virus DNA cleavage and packaging proteins associate with the procapsid
1314 prior to its maturation. *J Virol* 75:687-98.
- 1315 24. Thurlow JK, Rixon FJ, Murphy M, Targett-Adams P, Hughes M, Preston VG. 2005. The
1316 herpes simplex virus type 1 DNA packaging protein UL17 is a virion protein that is present
1317 in both the capsid and the tegument compartments. *J Virol* 79:150-8.
- 1318 25. Newcomb WW, Homa FL, Brown JC. 2006. Herpes Simplex Virus Capsid Structure: DNA
1319 Packaging Protein UL25 Is Located on the External Surface of the Capsid near the
1320 Vertices. *Journal of Virology* 80:6286-6294.
- 1321 26. Ogasawara M, Suzutani T, Yoshida I, Azuma M. 2001. Role of the UL25 gene product in
1322 packaging DNA into the herpes simplex virus capsid: location of UL25 product in the
1323 capsid and demonstration that it binds DNA. *Journal of virology* 75:1427-1436.
- 1324 27. Lv Y, Zhou S, Gao S, Deng H. 2019. Remodeling of host membranes during herpesvirus
1325 assembly and egress. *Protein & Cell* 10:315-326.
- 1326 28. Marschall M, Muller YA, Diewald B, Sticht H, Milbradt J. 2017. The human
1327 cytomegalovirus nuclear egress complex unites multiple functions: Recruitment of
1328 effectors, nuclear envelope rearrangement, and docking to nuclear capsids. *Rev Med Virol*

- 1329 27.
- 1330 29. Roller RJ, Zhou Y, Schnetzer R, Ferguson J, DeSalvo D. 2000. Herpes simplex virus type
1331 1 U(L)34 gene product is required for viral envelopment. *Journal of virology* 74:117-129.
- 1332 30. Reynolds AE, Ryckman BJ, Baines JD, Zhou Y, Liang L, Roller RJ. 2001. U(L)31 and
1333 U(L)34 proteins of herpes simplex virus type 1 form a complex that accumulates at the
1334 nuclear rim and is required for envelopment of nucleocapsids. *Journal of virology* 75:8803-
1335 8817.
- 1336 31. Bigalke JM, Heuser T, Nicastro D, Heldwein EE. 2014. Membrane deformation and
1337 scission by the HSV-1 nuclear egress complex. *Nat Commun* 5:4131.
- 1338 32. Zeev-Ben-Mordehai T, Weberruß M, Lorenz M, Cheleski J, Hellberg T, Whittle C,
1339 El Omari K, Vasishtan D, Dent Kyle C, Harlos K, Franzke K, Hagen C, Klupp Barbara G,
1340 Antonin W, Mettenleiter Thomas C, Grünewald K. 2015. Crystal Structure of the
1341 Herpesvirus Nuclear Egress Complex Provides Insights into Inner Nuclear Membrane
1342 Remodeling. *Cell Reports* 13:2645-2652.
- 1343 33. Hagen C, Dent KC, Zeev-Ben-Mordehai T, Grange M, Bosse JB, Whittle C, Klupp BG,
1344 Siebert CA, Vasishtan D, Bauerlein FJ, Cheleski J, Werner S, Guttmann P, Rehbein S,
1345 Henzler K, Demmerle J, Adler B, Koszinowski U, Schermelleh L, Schneider G, Enquist
1346 LW, Plitzko JM, Mettenleiter TC, Grunewald K. 2015. Structural Basis of Vesicle
1347 Formation at the Inner Nuclear Membrane. *Cell* 163:1692-701.
- 1348 34. Bigalke JM, Heldwein EE. 2015. Structural basis of membrane budding by the nuclear
1349 egress complex of herpesviruses. *EMBO J* 34:2921-36.
- 1350 35. Hellberg T, Passvogel L, Schulz KS, Klupp BG, Mettenleiter TC. 2016. Nuclear Egress of
1351 Herpesviruses: The Prototypic Vesicular Nucleocytoplasmic Transport. *Adv Virus Res*
1352 94:81-140.
- 1353 36. Park R, Baines JD. 2006. Herpes simplex virus type 1 infection induces activation and
1354 recruitment of protein kinase C to the nuclear membrane and increased phosphorylation
1355 of lamin B. *J Virol* 80:494-504.
- 1356 37. Muranyi W, Haas J, Wagner M, Krohne G, Koszinowski UH. 2002. Cytomegalovirus
1357 recruitment of cellular kinases to dissolve the nuclear lamina. *Science* 297:854-7.
- 1358 38. Arii J, Takeshima K, Maruzuru Y, Koyanagi N, Kato A, Kawaguchi Y. 2019. Roles of the
1359 Interhexamer Contact Site for Hexagonal Lattice Formation of the Herpes Simplex Virus
1360 1 Nuclear Egress Complex in Viral Primary Envelopment and Replication. *J Virol* 93.
- 1361 39. Arii J, Watanabe M, Maeda F, Tokai-Nishizumi N, Chihara T, Miura M, Maruzuru Y,
1362 Koyanagi N, Kato A, Kawaguchi Y. 2018. ESCRT-III mediates budding across the inner
1363 nuclear membrane and regulates its integrity. *Nat Commun* 9:3379.
- 1364 40. Reynolds AE, Wills EG, Roller RJ, Ryckman BJ, Baines JD. 2002. Ultrastructural

- 1365 localization of the herpes simplex virus type 1 UL31, UL34, and US3 proteins suggests
1366 specific roles in primary envelopment and egress of nucleocapsids. *J Virol* 76:8939-52.
- 1367 41. Liu Z, Kato A, Shindo K, Noda T, Sagara H, Kawaoka Y, Arii J, Kawaguchi Y. 2014. Herpes
1368 Simplex Virus 1 UL47 Interacts with Viral Nuclear Egress Factors UL31, UL34, and Us3
1369 and Regulates Viral Nuclear Egress. *Journal of Virology* 88:4657-4667.
- 1370 42. Maruzuru Y, Shindo K, Liu Z, Oyama M, Kozuka-Hata H, Arii J, Kato A, Kawaguchi Y.
1371 2014. Role of Herpes Simplex Virus 1 Immediate Early Protein ICP22 in Viral Nuclear
1372 Egress. *Journal of Virology* 88:7445-7454.
- 1373 43. Liu Z, Kato A, Oyama M, Kozuka-Hata H, Arii J, Kawaguchi Y. 2015. Role of Host Cell
1374 p32 in Herpes Simplex Virus 1 De-Envelopment during Viral Nuclear Egress. *J Virol*
1375 89:8982-98.
- 1376 44. Farnsworth A, Wisner TW, Webb M, Roller R, Cohen G, Eisenberg R, Johnson DC. 2007.
1377 Herpes simplex virus glycoproteins gB and gH function in fusion between the virion
1378 envelope and the outer nuclear membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:10187-92.
- 1379 45. Mou F, Wills E, Baines JD. 2009. Phosphorylation of the U_L31 Protein of
1380 Herpes Simplex Virus 1 by the U_S3-Encoded Kinase Regulates Localization
1381 of the Nuclear Envelopment Complex and Egress of Nucleocapsids. *Journal of Virology*
1382 83:5181-5191.
- 1383 46. Wisner TW, Wright CC, Kato A, Kawaguchi Y, Mou F, Baines JD, Roller RJ, Johnson DC.
1384 2009. Herpesvirus gB-induced fusion between the virion envelope and outer nuclear
1385 membrane during virus egress is regulated by the viral US3 kinase. *J Virol* 83:3115-26.
- 1386 47. Hirohata Y, Arii J, Liu Z, Shindo K, Oyama M, Kozuka-Hata H, Sagara H, Kato A,
1387 Kawaguchi Y. 2015. Herpes Simplex Virus 1 Recruits CD98 Heavy Chain and β 1 Integrin
1388 to the Nuclear Membrane for Viral De-Envelopment. *Journal of Virology* 89:7799-7812.
- 1389 48. Funk C, Ott M, Raschbichler V, Nagel C-H, Binz A, Sodeik B, Bauerfeind R, Bailer SM.
1390 2015. The Herpes Simplex Virus Protein pUL31 Escorts Nucleocapsids to Sites of Nuclear
1391 Egress, a Process Coordinated by Its N-Terminal Domain. *PLOS Pathogens* 11:e1004957.
- 1392 49. Yang K, Baines JD. 2011. Selection of HSV capsids for envelopment involves interaction
1393 between capsid surface components pUL31, pUL17, and pUL25. *Proc Natl Acad Sci U S*
1394 *A* 108:14276-81.
- 1395 50. Yang K, Wills E, Lim HY, Zhou ZH, Baines JD. 2014. Association of Herpes Simplex Virus
1396 pUL31 with Capsid Vertices and Components of the Capsid Vertex-Specific Complex.
1397 *Journal of Virology* 88:3815-3825.
- 1398 51. Newcomb WW, Fontana J, Winkler DC, Cheng N, Heymann JB, Steven AC. 2017. The
1399 Primary Enveloped Virion of Herpes Simplex Virus 1: Its Role in Nuclear Egress. *mBio* 8.
- 1400 52. Church GA, Wilson DW. 1997. Study of herpes simplex virus maturation during a

- 1401 synchronous wave of assembly. *J Virol* 71:3603-12.
- 1402 53. Ronfeldt S, Klupp BG, Franzke K, Mettenleiter TC. 2017. Lysine 242 within helix 10 of
1403 the pseudorabies virus nuclear egress complex pUL31 component is critical for primary
1404 envelopment of nucleocapsids. *J Virol* doi:10.1128/jvi.01182-17.
- 1405 54. Tanaka M, Kagawa H, Yamanashi Y, Sata T, Kawaguchi Y. 2003. Construction of an
1406 excisable bacterial artificial chromosome containing a full-length infectious clone of
1407 herpes simplex virus type 1: viruses reconstituted from the clone exhibit wild-type
1408 properties in vitro and in vivo. *J Virol* 77:1382-91.
- 1409 55. Arii J, Uema M, Morimoto T, Sagara H, Akashi H, Ono E, Arase H, Kawaguchi Y. 2009.
1410 Entry of herpes simplex virus 1 and other alphaherpesviruses via the paired
1411 immunoglobulin-like type 2 receptor alpha. *Journal of virology* 83:4520-4527.
- 1412 56. Maruzuru Y, Ichinohe T, Sato R, Miyake K, Okano T, Suzuki T, Koshihara T, Koyanagi N,
1413 Tsuda S, Watanabe M, Arii J, Kato A, Kawaguchi Y. 2018. Herpes Simplex Virus 1 VP22
1414 Inhibits AIM2-Dependent Inflammasome Activation to Enable Efficient Viral Replication.
1415 *Cell Host & Microbe* 23:254-265.e7.
- 1416 57. Liang L, Tanaka M, Kawaguchi Y, Baines JD. 2004. Cell lines that support replication of
1417 a novel herpes simplex virus 1 UL31 deletion mutant can properly target UL34 protein to
1418 the nuclear rim in the absence of UL31. *Virology* 329:68-76.
- 1419 58. Kobayashi R, Kato A, Sagara H, Watanabe M, Maruzuru Y, Koyanagi N, Arii J, Kawaguchi
1420 Y. 2017. Herpes Simplex Virus 1 Small Capsomere-Interacting Protein VP26 Regulates
1421 Nucleocapsid Maturation. *Journal of Virology* 91.
- 1422 59. Morita S, Kojima T, Kitamura T. 2000. Plat-E: an efficient and stable system for transient
1423 packaging of retroviruses. *Gene Therapy* 7:1063-1066.
- 1424 60. Maeda F, Arii J, Hirohata Y, Maruzuru Y, Koyanagi N, Kato A, Kawaguchi Y. 2017. Herpes
1425 Simplex Virus 1 UL34 Protein Regulates the Global Architecture of the Endoplasmic
1426 Reticulum in Infected Cells. *Journal of Virology* 91.
- 1427 61. Kato A, Oda S, Watanabe M, Oyama M, Kozuka-Hata H, Koyanagi N, Maruzuru Y, Arii
1428 J, Kawaguchi Y. 2018. Roles of the Phosphorylation of Herpes Simplex Virus 1 UL51 at a
1429 Specific Site in Viral Replication and Pathogenicity. *J Virol* 92.
- 1430 62. Kato A, Tanaka M, Yamamoto M, Asai R, Sata T, Nishiyama Y, Kawaguchi Y. 2008.
1431 Identification of a physiological phosphorylation site of the herpes simplex virus 1-
1432 encoded protein kinase Us3 which regulates its optimal catalytic activity in vitro and
1433 influences its function in infected cells. *J Virol* 82:6172-89.
- 1434 63. Jarosinski KW, Margulis NG, Kamil JP, Spatz SJ, Nair VK, Osterrieder N. 2007.
1435 Horizontal transmission of Marek's disease virus requires US2, the UL13 protein kinase,
1436 and gC. *J Virol* 81:10575-87.

1437 64. Shindo K, Kato A, Koyanagi N, Sagara H, Arai J, Kawaguchi Y. 2016. Characterization of
1438 a Herpes Simplex Virus 1 (HSV-1) Chimera in Which the Us3 Protein Kinase Gene Is
1439 Replaced with the HSV-2 Us3 Gene. *J Virol* 90:457-73.

1440 65. Kato A, Tsuda S, Liu Z, Kozuka-Hata H, Oyama M, Kawaguchi Y. 2014. Herpes simplex
1441 virus 1 protein kinase Us3 phosphorylates viral dUTPase and regulates its catalytic activity
1442 in infected cells. *J Virol* 88:655-66.

1443 66. Nozawa N, Yamauchi Y, Ohtsuka K, Kawaguchi Y, Nishiyama Y. 2004. Formation of
1444 aggresome-like structures in herpes simplex virus type 2-infected cells and a potential role
1445 in virus assembly. *Experimental Cell Research* 299:486-497.

1446 67. Bucks MA, O'Regan KJ, Murphy MA, Wills JW, Courtney RJ. 2007. Herpes simplex virus
1447 type 1 tegument proteins VP1/2 and UL37 are associated with intranuclear capsids.
1448 *Virology* 361:316-324.

1449 68. Taddeo B, Luo TR, Zhang W, Roizman B. 2003. Activation of NF- κ B in cells productively
1450 infected with HSV-1 depends on activated protein kinase R and plays no apparent role in
1451 blocking apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100:12408-12413.

1452 69. Vu A, Poyzer C, Roller R. 2016. Extragenic Suppression of a Mutation in Herpes Simplex
1453 Virus 1 UL34 That Affects Lamina Disruption and Nuclear Egress. *Journal of Virology*
1454 90:10738-10751.

1455 70. Roller RJ, Haugo AC, Kopping NJ. 2011. Intragenic and Extragenic Suppression of a
1456 Mutation in Herpes Simplex Virus 1 UL34 That Affects both Nuclear Envelope Targeting
1457 and Membrane Budding. *Journal of Virology* 85:11615-11625.

1458 71. Haugo AC, Szpara ML, Parsons L, Enquist LW, Roller RJ. 2011. Herpes Simplex Virus 1
1459 pUL34 Plays a Critical Role in Cell-to-Cell Spread of Virus in Addition to Its Role in Virus
1460 Replication. *Journal of Virology* 85:7203-7215.

1461 72. Grimm KS, Klupp BG, Granzow H, Müller FM, Fuchs W, Mettenleiter TC. 2012. Analysis
1462 of viral and cellular factors influencing herpesvirus-induced nuclear envelope breakdown.
1463 *Journal of virology* 86:6512-6521.

1464 73. Burke HG, Heldwein EE. 2015. Crystal Structure of the Human Cytomegalovirus
1465 Glycoprotein B. *PLoS Pathog* 11:e1005227.

1466 74. Banavali NK, Roux B. 2009. Flexibility and charge asymmetry in the activation loop of Src
1467 tyrosine kinases. *Proteins* 74:378-89.

1468 75. Bowman BR, Welschhans RL, Jayaram H, Stow ND, Preston VG, Quijcho FA. 2006.
1469 Structural Characterization of the UL25 DNA-Packaging Protein from Herpes Simplex
1470 Virus Type 1. *Journal of Virology* 80:2309-2317.

1471

1472