

審査の結果の要旨

氏名 竹島 功高

本研究は、単純ヘルペスウイルス 1 型(HSV-1)感染細胞核内で形成されたヌクレオカプシドを細胞質へと輸送する機構である、小胞媒介性核外輸送の必須因子 HSV-1 タンパク質 UL31、及び UL34 の複合体 nuclear egress complex(NEC)に焦点を当てた。NEC と核内のヌクレオカプシドとの結合は、小胞媒介性核外輸送に重要であると考えられているが、NEC とヌクレオカプシドとの結合を直接的に示したデータは存在せず、感染細胞におけるその意義も明らかとなっていなかった。そこで、NEC とヌクレオカプシドとの結合を検出することができる実験系を構築、及び感染細胞における NEC とヌクレオカプシドとの結合の意義解明を試みた。得られた結果は以下の通りである。

1. UL31、及び GST に融合させた UL34 を大腸菌内において共発現させ、NEC を精製した。精製した NEC は、カプシドタンパク質である UL25 を単独発現させた HEK293FT 細胞から UL25 を Pull Down した。一方で、精製した NEC は、カプシドタンパク質である、VP5、VP23 および、UL17 をそれぞれ単独発現させた HEK293FT 細胞から、これらのカプシドタンパク質を Pull Down しなかった。さらに、精製した NEC は、HSV-1 感染細胞から精製したヌクレオカプシドを Pull Down した。また、UL25 に対する抗体存在下において、精製した NEC は、ヌクレオカプシドを Pull Down しなかった。これらの結果から、NEC は、ヌクレオカプシドに含まれる UL25 を介してヌクレオカプシドと結合していることが示唆された。また、精製した NEC を用いた Pull Down の実験系は NEC とヌクレオカプシドとの結合を検出することが可能であると考えられた。
2. NEC の結晶構造から UL31 の 281 番目のアルギニンと 282 番目のアスパラギン酸が、NEC におけるヌクレオカプシドとの結合部位であると予測した。予測した二つのアミノ酸をアラニンに置換した変異体 NEC を精製し、1. で構築した実験系を用いて変異体 NEC とヌクレオカプシドとの結合を検出した。変異体 NEC は、野生体 NEC と比較してヌクレオカプシドの Pull down 効率が低下していた。これらの結果から UL31 の 281 番目のアルギニンと 282 番目のアスパラギン酸は NEC と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。
3. NEC とヌクレオカプシドとの結合を阻害するように、UL31 の 281 番目のアルギニンと 282 番目のアスパラギン酸をアラニンに置換した UL31 変異ウイルスを作製しその性状を解析した。UL31 変異ウイルスは、野生体と比較し、ウイルス増殖能が低下していた。免疫蛍光法により HSV-1 感染細胞内におけるにおける UL31、及び UL34 の局在を観察した結果、UL31 変異ウイルスまたは、野生体感染細胞において、UL31、及び UL34 は

共局在していた。これらの結果から、UL31 への変異は UL31 と UL34 の相互作用に影響を与えず、ウイルス増殖を減少させることが示唆された。

4.NEC とヌクレオカプシドとの結合が小胞媒介性核外輸送にどのような影響を与えているか、UL31 変異ウイルス感染細胞を電子顕微鏡により観察した。野生体感染細胞と比較して UL31 変異ウイルス感染細胞では、核内に存在するカプシド数が野生体感染細胞と比較して増加していた。一方で、UL31 変異ウイルス感染細胞において細胞質に存在するヌクレオカプシド数は、野生体感染細胞と比較して減少していた。これらの結果から、NEC とヌクレオカプシドとの結合は、核内のヌクレオカプシドを細胞質へと輸送する小胞媒介性核外輸送に重要であることが考えられた。

5.小胞媒介性核外輸送では、NEC が核内膜の変性を引き起こすことにより、核内のヌクレオカプシドを核内膜から出芽させ、核内膜をエンベロープとして獲得したウイルス粒子を形成する。その後、核膜間のウイルス粒子が核外膜と融合することによって、ウイルス粒子中のヌクレオカプシドが核外へと放出される。電子顕微鏡下において、野生体感染細胞核膜間には、ヌクレオカプシドを含んだウイルス粒子が観察されたが、UL31 変異体感染細胞核膜間には、ヌクレオカプシドを含まない空の粒子が多数観察された。これらの結果は、UL31 への変異は、NEC の小胞形成能に影響を与えずに、核膜間ウイルス粒子へのヌクレオカプシド取り込みを阻害していることが示唆された。

以上、本論文は HSV-1 NEC がヌクレオカプシドと直接的に結合することを生化学的に初めて証明し、NEC とヌクレオカプシドとの結合は、小胞媒介性核外輸送において、感染細胞核膜間に形成されるウイルス粒子へのヌクレオカプシド取り込みに寄与することを示唆した。本研究は、生物学的にとってもユニークな現象である HSV-1 の小胞媒介性核外輸送のメカニズム解明に重要な貢献をなすと考えられる。

よって本論文は博士（医学）の学位請求論文として合格と認められる。