

博士論文

単純ヘルペスウイルスエンベロープ糖蛋白質の機能解析

廣畑吉崇

目次

<u>要旨</u>	3
<u>1. 緒言</u>	7
<u>2. 序論</u>	12
<u>3. 実験方法</u>	16
<u>4. 結果</u>	25
<u>I. gB と相互する宿主因子の同定</u>	
<u>II. CD98hc は感染細胞において gB、gH、UL31、UL34、Us3、および $\beta 1$ integrin と複合体を形成した</u>	
<u>III. HSV-1 の感染によって CD98hc は核膜ヘリクルートされた</u>	
<u>IV. CD98hc の発現抑制による HSV-1 感染細胞における UL31 および UL34 の局在への影響</u>	
<u>V. CD98hc は HSV-1 の効率的な de-envelopment に必要であった</u>	
<u>VI. $\beta 1$ integrin の発現抑制による HSV-1 感染細胞における UL31 および UL34 の局在および HSV-1 の de-envelopment への影響</u>	
<u>VII. CD98hc および $\beta 1$ integrin の HSV-1 増殖への寄与</u>	
<u>5. 図表</u>	34
<u>6. 考察</u>	64
<u>謝辞</u>	69
<u>参考文献</u>	71

要旨

単純ヘルペスウイルス (herpes simplex virus : HSV) の粒子成熟における大きな特徴として、核内で生成されたヌクレオカプシドの核膜通過が知られている。ウイルスゲノムを内包したヌクレオカプシドは直径約 125nm の正二十面体であり、直径約 50nm の核膜孔をそのままの形状を保ったまま通過できるとは考え難い。そこで HSV は、まず核内膜を一次エンベロープとしてヌクレオカプシドに獲得させ、核内膜と核外膜の間に出芽した後、核外膜と一次エンベロープを融合させて、ヌクレオカプシドを細胞質に放出するというユニークな核外輸送機構を備えていると考えられている。これらの過程には、ウイルス因子の glycoprotein B (gB)、glycoprotein H (gH)、UL31、UL34、Us3 が関わりと考えられている。UL31、UL34 は複合体を形成し、核内膜に存在する lamin の網目構造の変換に関与する宿主細胞因子 protein kinase C (PKC) を核内膜にリクルートすることが報告されている。また、試験管内において、精製 UL31、UL34 複合体はリポソーム膜を変形させる。そして、UL31 あるいは UL34 の欠損ウイルス感染細胞において、核内外膜間、細胞質および細胞表面にウイルス粒子がほぼ観察されないことから、UL31、UL34 は、ヌクレオカプシドが一次エンベロープを獲得し、核内外膜間へ出芽するのに必要であると考えられている。一方、一次エンベロープを獲得したヌクレオカプシドと核外膜の融合には、UL31、UL34 および、エンベロープ糖蛋白質 gB、gH が関与すると考えられている。さらにプロテインキナーゼである Us3 は UL31、gB をリン酸化し、この過程に寄与することが示唆されている。しかし、一次エンベロープと核外膜が融合 (de-envelopment) し、ヌクレオカプシドが細胞質に放出される詳細なメカニズムは未解明である。

本研究は HSV の de-envelopment に関わる新規宿主因子を探索するために、まず、gB と相互作用する因子の網羅的な同定を試みた。同定された gB との相互作用候補因子の中で、CD98 heavy chain (CD98hc) という分子に着目した。CD98hc は、培養細胞および生体において、高頻度に発現することが知られ、アミノ酸のトランスポーターとしての機能のほか、 $\beta 1$ integrin、 $\beta 3$ integrin と相互作用し、integrin によるシグナル伝達を制御することで、細胞の接着や遊走に関与することが報告されている。また、興味深い事に、CD98hc と $\beta 1$ integrin は、様々なエンベロープウイルスの感染細胞における細胞膜融合 (cell-cell fusion) を制御することも報告されている。そこで、CD98hc の膜融合を制御する機能に着目し、HSV-1 感染における CD98hc と gB が相互作用する生物学的意義の解明を試みた。

まず、gB と相互作用するウイルスおよび宿主因子を探索するにあたり、ヒト喉頭癌由来細胞 (HEp-2 細胞) にタンデム免疫沈降用の MEF (myc-TEV-flag) タグと融合した形の gB (MEF-gB) を発現する変異ウイルスを感染させ、タンデム免疫沈降法により gB 複合体を精製し、高感度質量分析計によって、その構成因子を網羅的に決定した。その結果、17 種類の宿主因子および、1 種類のウイ

ルス因子が gB と相互作用しうることが明らかになった。同定された因子の中で、エンベロープウイルスの膜融合を制御することが報告されている CD98hc に着目した。

網羅的な相互作用因子の探索において検出された CD98hc と gB の相互作用を確認するため、HSV-1(F) 野生型ウイルスを HEp-2 細胞に感染させ、抗 gB、gC あるいは myc 抗体で免疫沈降した結果、抗 gB 抗体でのみ CD98hc の共沈降が確認された。さらに、MEF タグを融合した形の CD98hc (MEF-CD98hc) を発現する変異ウイルス(MEF-CD98hc 発現 HSV-1)を作製し、HEp-2 細胞に感染後、抗 myc 抗体で免疫沈降し、様々なウイルス因子および宿主細胞因子の抗体で検出した結果、核外膜における de-envelopment に関与が報告されている gB、gH、UL31、UL34 および Us3、さらに CD98hc との相互作用が報告されている β 1 integrin の共沈降が確認された。一方で、ウイルス因子である gC、gE および VP23 の共沈降は認められなかった。これらの結果は、CD98hc が HSV-1 感染細胞において gB、gH、UL31、UL34、Us3 および β 1 integrin と特異的に複合体を形成していることを示す。

293T 細胞に HSV-1 のエンベロープ糖蛋白質である gB、gH および gL とヘテロダイマーを形成することが報告されている gL、あるいは gD の発現ベクターと、MEF-CD98hc の発現ベクターをそれぞれ co-transfection し、抗 flag 抗体で免疫沈降後、抗 gB、gH あるいは gD 抗体で検出した結果、gB および gH の共沈降が確認された。一方で、核膜通過において機能していないと考えられる gD の共沈降は認められなかった。この結果から、gB と gH は、それぞれが単独で CD98hc と結合しうること、また、その結合は他のウイルス因子に依存しないことが示唆された。gB と gH の 2 重欠損ウイルスにおいて、de-envelopment が阻害されることから、CD98hc と gB および gH がそれぞれ単独でも相互作用しうるといふ本知見は、CD98hc が de-envelopment を制御する宿主因子の候補となりうると考えられる。

次に、感染細胞における CD98hc の局在を蛍光抗体法により解析した。その結果、CD98hc は、非感染細胞では主に細胞膜に局在したのに対し、感染細胞では主に核膜周辺に局在し、核内膜マーカーである lamin A/C との共局在も認められた。さらに、感染細胞において、CD98hc と gB、gH、UL31 あるいは UL34 の共局在を解析したところ、核膜および核膜周辺において CD98hc と gB、gH、UL31 あるいは UL34 の共局在が認められた。さらにその局在変化の原因因子を探索するために、gB、gH、UL31 の欠損ウイルス感染時の CD98hc の局在変化の有無を検証したが、いずれのウイルスにおいても野生体ウイルスと同様に、CD98hc の局在変化が認められた。一方で、UV 不活化ウイルスを感染させた細胞では CD98hc の局在変化は認められなかった。一連の結果より、CD98hc は HSV-1 感染特異的に核膜へ集積すること、その局在変化は gB、gH、UL31 以外のウイルス因子に依存することが示された。

これまでの結果から、CD98hc は感染細胞において、HSV-1 の核膜通過への関与が報告されているウイルス因子 gB、gH、UL31、UL34 および Us3 と相互作用し、核膜に局在することから、CD98hc

が HSV-1 の核膜通過に関与する可能性が示唆された。そこで、CD98hc mRNA の 3' UTR 領域に対する shRNA を定常発現させ、CD98hc の発現を抑制した CD98hc ノックダウン細胞 (sh-CD98hc-HEp-2) を作製した。コントロールとして、firefly luciferase mRNA に対する shRNA を定常発現する細胞 (sh-Luc-HEp-2)を用いた。また、CD98hc ノックダウン細胞の作製に用いた shRNA による非特異的な表現型ではないことを示すために、CD98hc ノックダウン細胞にレトロウイルスベクターを用いて外因的な CD98hc を発現させた CD98hc レスキュー細胞 (sh-CD98hc/CD98hc-HEp-2 細胞)も作製した。

作製した細胞を用いて、野生型ウイルス感染時における UL31、UL34 の局在を検証した。コントロールおよびレスキュー細胞において、90%以上の細胞で核膜にスムーズに局在した一方で、CD98hc ノックダウン細胞においては、26%の細胞で核膜近傍にパンクテッド構造が認められた。これらの結果から、CD98hc は HSV-1 感染細胞において UL31、UL34 の適切な局在に必要であることが明らかとなった。

次に、ウイルス粒子の核膜通過をより詳細に解析するために、電子顕微鏡解析を試みた。その結果、HSV-1 感染 CD98hc ノックダウン細胞において、顕著に一次エンベロップを獲得したウイルス粒子が核内外膜間に蓄積し、核内に陥入構造体が形成されていた。感染細胞中のエンベロップを獲得したウイルス粒子の割合を解析した結果、一次エンベロップを獲得したウイルス粒子の割合は、コントロール細胞およびCD98hc レスキュー細胞においてそれぞれ9.5%、14.3%であったのに対して、CD98hc ノックダウン細胞では51.2%であった。これらの結果は、CD98hc はウイルス粒子の核膜通過、とくに核外膜からの脱出に寄与していることを示唆している。

CD98hc は先行報告において、様々なエンベロップウイルス感染細胞における細胞膜融合を制御し、その制御には $\beta 1$ integrin が関与することが示されている。本研究においても、共免疫沈降実験から、HSV-1 感染細胞において CD98hc と $\beta 1$ integrin の相互作用が確認された。そこで、CD98hc と同様に、 $\beta 1$ integrin の感染細胞における局在も検証した。その結果、 $\beta 1$ integrin は、非感染細胞では細胞膜および細胞質に散在性に局在したのに対し、感染細胞では核膜周辺に局在した。さらに、感染細胞において、 $\beta 1$ integrin と CD98hc および gB の共局在の有無を解析したところ、核膜周辺において $\beta 1$ integrin は CD98hc および gB と共局在することが明らかとなった。さらに、その局在変化の原因因子を探索するために、gB、gH、UL31 欠損ウイルス感染時の局在変化を検証したところ、いずれのウイルスにおいても $\beta 1$ integrin の局在変化が認められた。一方で、UV 不活化ウイルスを感染させた細胞では $\beta 1$ integrin の局在変化は認められなかったことから、CD98hc 同様に、 $\beta 1$ integrin は HSV-1 感染特異的に核膜へ局在が変化すること、その局在変化は gB、gH、UL31 以外のウイルス因子に依存することが示された。

続いて $\beta 1$ integrin が CD98hc 同様に、HSV-1 の核膜通過に関与するかを検証するために、CD98hc と同様に、 $\beta 1$ integrin ノックダウン細胞 (sh- $\beta 1$ integrin-HEp-2) および $\beta 1$ integrin レ

スキュー細胞 (sh- $\beta 1$ integrin / $\beta 1$ integrin -HEp-2 細胞) を作製した。作製した細胞を用いて、 $\beta 1$ integrin が HSV-1 の核膜通過への関与を解析したところ、CD98hc ノックダウン細胞での結果と同様に、(i) UL31、UL34 のパンクテッド構造への局在変化、(ii) 一次エンベロープを獲得したウイルス粒子が核内外膜間の蓄積、(iii) 核内への陥入構造体の形成が確認された。

続いて、CD98hc ノックダウンおよび $\beta 1$ integrin ノックダウンによる野生型ウイルスの増殖への影響を検証した。MOI=0.05 および MOI=5 でウイルスを感染させた後、培養上清中または、培養上清および細胞内の合計のウイルス力価を測定した結果、CD98hc ノックダウン細胞において培養上清、および培養上清および細胞内の合計のどちらにおいてもウイルス力価の低下が認められた。一方、エンベロープウイルスであるインフルエンザウイルスの培養上清中のウイルス力価に有意な差は認められなかった。これらの結果から、CD98hc は HSV-1 の効率的な増殖に特異的に寄与することが明らかになった。

$\beta 1$ integrin ノックダウンによる野生型ウイルスの増殖への影響を検証した結果、CD98hc ノックダウンの結果と同様に、MOI=0.05 における感染 72 時間後の上清中のウイルス力価がコントロール細胞に比べて低下した。一方で、MOI=0.05 および MOI=5 における培養上清および細胞内の合計のウイルス力価、また、MOI=5 における培養上清中のウイルス力価、およびインフルエンザウイルスの培養上清中のウイルス力価に有意な差は認められなかった。これらの結果から、 $\beta 1$ integrin は、HSV-1 の効率的なウイルス産生に特異的に寄与する事が明らかになった。

CD98hc とウイルス感染細胞における膜融合に関して、これまでも複数の報告がある。(i) 様々なエンベロープウイルス感染における細胞融合が抗 CD98hc 抗体の処理によって変化する、(ii) この抗 CD98hc 抗体による膜融合活性の変化には、種々のエンベロープウイルスがコードするエンベロープ糖蛋白質もしくは補因子が寄与する、(iii) human immunodeficiency virus (HIV) 感染において抗 CD98hc 抗体による膜融合活性の変化は、抗 $\beta 1$ integrin 抗体によって阻害される。先行報告におけるこれらの知見は、CD98hc は $\beta 1$ integrin と協調的にウイルス感染細胞における膜融合を制御しうることを示唆していると考えられる。一方、本研究によって以下の知見が明らかとなった。(i) CD98hc は、HSV-1 感染細胞において、 $\beta 1$ integrin および、HSV-1 の核膜通過における de-envelopment に関与する gB、gH、UL31、UL34 および US3 と複合体を形成した、(ii) CD98hc および $\beta 1$ integrin は、HSV-1 感染細胞において核膜に集積し、de-envelopment の必須因子である UL31、UL34 の適切な局在に必要であった、(iii) CD98hc および $\beta 1$ integrin ノックダウン細胞において、一次エンベロープを獲得したウイルス粒子が核内外膜間に蓄積し、核内への陥入構造体の形成が確認された、(iv) CD98hc および $\beta 1$ integrin の発現抑制は、効率的なウイルス産生を阻害した。したがって、一連の知見より、HSV-1 が、CD98hc/ $\beta 1$ integrin を介した膜融合制御システムを核膜に移行させ、HSV-1 の粒子成熟における一次エンベロープと核外膜の融合を促進することで、効率的にヌクレオカプシドを細胞質に放出するという de-envelopment に関する新たなモデルを提唱する。

1. 緒言

ヘルペスウイルス

ヘルペスウイルスは、自然界に広く分布するウイルスであり、無脊椎動物から高等哺乳動物まで様々な宿主から分離される。それぞれの生物種に固有のヘルペスウイルスが存在することから、ヘルペスウイルス科には 200 種類を超えるウイルスが分類されている (1)。自然宿主をヒトとするヘルペスウイルスはこれまでに、1 型単純ヘルペスウイルス (herpes simplex virus 1: HSV-1)、2 型単純ヘルペスウイルス (herpes simplex virus 2: HSV-2)、水痘・帯状疱疹ウイルス (varicella-zoster virus: VZV)、EB ウイルス (Epstein-Bar virus: EBV)、ヒトサイトメガロウイルス (human cytomegalovirus: HCMV)、ヒトヘルペスウイルス 6 (human herpes virus 6: HHV-6)、ヒトヘルペスウイルス 7 (human herpes virus 7: HHV-7)、カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス (Kaposi's sarcoma-associated herpes virus: KSHV) の 8 種類が同定されている (1)。ヘルペスウイルスは、それぞれの宿主域、自然宿主における持続性、感染細胞での性状といった生物学的特徴から、 α 、 β 、 γ の 3 つの亜科に大別される(1)。 α ヘルペスウイルス亜科には、HSV-1、-2 および VZV が、 β ヘルペスウイルス亜科には、HCMV、HHV-6 および HHV-7 が、 γ ヘルペスウイルス亜科には EBV および KSHV が分類される (1)。ヘルペスウイルスの最大の特徴は、潜伏感染を引き起こす点であり、生体内に侵入したヘルペスウイルスは、発症の有無に関わらず、主体内の特定の臓器、組織において潜伏感染する。潜伏感染細胞では、ウイルスゲノムは環状化され、宿主の染色体から遊離したエピソーム上に存在し、限定されたウイルス因子のみを発現している。宿主が様々なストレスや免疫不全といった状態に陥ることで、再活性化・増殖 (溶解感染) し、再び病態を引き起こす (回帰発症) ことが知られている (1)。

ヘルペスウイルスの粒子は、外側から、エンベロープ、テグメント、カプシドの順に構成される。エンベロープは、細胞由来の脂質膜である。エンベロープ上にはスパイク状にウイルスのエンベロープ糖タンパク質が存在し、主にウイルスの細胞への侵入に関わっている。テグメントとは、エンベロープとカプシドの間に存在するタンパク質層であり、ヘルペスウイルスに特徴的な構造である。ウイルスゲノムは直鎖状の 2 本鎖 DNA で、直径約

125 nm の正二十面体であるカプシドに内包されている。ヘルペスウイルスのゲノムサイズはウイルスの中でも非常に大型であり、124 から 295 kbp にも及ぶ。ヘルペスウイルスはその大型のゲノムに数十から百以上ものウイルスタンパク質をコードしている (1)。

単純ヘルペスウイルス (HSV)

(i) HSV 感染症

HSV は、ヒトヘルペスウイルスの中で最も研究の歴史が長く、20 世紀初頭に初めて分離同定されて以降、多彩な臨床疾患病巣から分離されている。HSV はヒトに感染すると、脳炎、口唇ヘルペス、皮膚疾患、眼疾患、全身性の新生児ヘルペス、性器ヘルペスと言った多様な疾患を引き起こすことが報告されている (2)。アメリカ合衆国における統計によると、口唇ヘルペスは年間約 50 万人が初感染し、再発口唇ヘルペス患者は年間 9800 万人に達する。また、性器ヘルペスに関しては、年間約 50 万人が初感染し、年間約 1000 万人が再発の性器ヘルペスに罹患する(3)。HSV 感染症の医療費は年間数千億円と試算され、HSV は医療費の観点からも極めて重要なウイルスであるといえる。HSV 感染症における最大の問題は、HSV が他のヘルペスウイルスと同様に潜伏感染するためである。これまでに開発されたアシクロビルをはじめとする抗 HSV 剤は、ウイルスが増殖期に入った感染細胞を標的とするため、潜伏感染している感染細胞には効果を示さない。そのため、一度 HSV に感染すると、現時点では潜伏感染した HSV を排除する抗 HSV 剤が存在しないため、回帰発症の度に抗 HSV 剤を服用しなければならない。そのため、HSV 感染症の制御法として、初感染の防御や、回帰発症を防ぐ安全なワクチンの開発、潜伏感染したウイルスの排除といった新しい抗 HSV 戦略が構築される必要がある。

(ii) HSV の溶解感染

HSV 粒子はまず、ウイルスのエンベロープ糖タンパク質と宿主細胞膜上の複数存在する受容体分子との結合を介して細胞に吸着し、宿主細胞膜とエンベロープを融合させること

で細胞に侵入する (4)。細胞種によっては、エンドサイトーシスによって細胞に侵入することが知られているが、その後、同様に宿主細胞膜 (エンドソーム膜) とエンベロープの融合を介して細胞質に侵入する。この時、テグメントタンパク質である、**virion host shut off protein (VHS)** および **α -trans-inducing factor (α -TIF)** が細胞質中に放出される (5)。VHS は RNase 活性を有し、宿主の mRNA を分解することにより、宿主タンパク質の合成を阻害し、効率的なウイルスタンパク質の合成に寄与する。 α -TIF は核内に侵入し、以後のウイルス遺伝子の発現に寄与している (5)。カプシドは核膜孔まで移行し、核膜孔を介してゲノム DNA を核内に注入する。ウイルスゲノムは核内で環状化し、宿主の RNA ポリメラーゼ II によって HSV 遺伝子が転写される。この際、HSV 遺伝子の転写は、厳密にカスケード状の制御を受けることが知られ、遺伝子は発現する順から、前初期 (α)、初期 (β)、後期 (γ) の 3 群に分類される。 α 遺伝子群のプロモーター領域には、 α -TIF によって活性化される配列が存在する。 α -TIF は宿主の転写因子 Oct-1 および HCF と複合体を形成し、その配列に結合することで、 α 遺伝子の発現を活性化する (5)。 α 遺伝子群にコードされるタンパク質は、その後のウイルス因子の発現を制御し、その多くが HSV の増殖感染において極めて重要な役割を果たす。 α 遺伝子群にコードされるタンパク質は、核内に移行し、 β 、 γ 遺伝子の発現を制御する。 β 遺伝子群は、DNA ポリメラーゼ複合体、DNA プライマーゼ・ヘリカーゼ複合体などのウイルスゲノムの複製に必要なタンパク質や、チミジンキナーゼやリボヌクレオチド還元酵素などのデオキシリボヌクレオチド代謝に関与する酵素群がコードされている。ウイルスゲノムはローリングサークル型の複製様式によって複製され、複製中間体として巨大なコンカテマーが形成される (6)。その後、 γ 遺伝子群が発現する。 γ 遺伝子群は、エンベロープ糖タンパク質、テグメントタンパク質、カプシドタンパク質といった構造タンパク質をコードしている。カプシドタンパク質によってカプシドが形成された後、コンカテマーはウイルスゲノムの大きさに開裂され、ウイルスゲノムがカプシドにパッケージングされる (6)。この時、ウイルスゲノムの複製と、パッケージングは核内の replication compartment (RC) と呼ばれる構造体で行われると考えられている。ウイルスゲノムを内包したカプシド (ヌクレオカプシド) は、核内から細胞質に輸送される。その際のヌクレオカプシドの大きさは、直径約 125nm であり、直径約 50nm の核膜孔を通過することができない。そのため、HSV を含めたヘルペスウイルスは、核内膜を一次エン

ベロープとして獲得し、核内外膜間に出芽した後に、一次エンベロープと核外膜を融合させることで核内から細胞質にヌクレオカプシドを輸送していると考えられている (7, 8)。細胞質に放出されたヌクレオカプシドは、細胞質中でテグメントを獲得し、細胞質の膜オルガネラ (trans-golgi network : TGN) に出芽することで、最終エンベロープを獲得する。最終エンベロープを獲得した成熟粒子は、エキソサイトーシスによって細胞外に放出される (5) (図 1)。

(iii) HSV エンベロープ糖タンパク質

HSV 粒子のエンベロープ上には、glycoprotein B、C、D、E、G、H、I、K、L、M、J、N (gB、gC、gD、gE、gG、gH、gI、gK、gL、gM、gJ、gN) の 12 種類の HSV エンベロープ糖タンパク質が存在する。gH と gL、gE と gI はそれぞれヘテロダイマーを形成する (5)。

HSV の細胞侵入の際におけるウイルスエンベロープと細胞膜の融合には、4 種類の HSV エンベロープ糖タンパク質 gD、gB、gH、gL から構成される膜融合複合体が必須である (4)。細胞侵入時の膜融合の初期においては、gD とその特異的受容体分子の結合が起こる。gD の受容体として、宿主の nectin-1、herpesvirus entry mediator (HVEM)、3-O-sulfated heparan sulfate (3-O HS) の 3 つの分子が同定されている (9-12)。gD とこれらの受容体の結合が起こると、gD の構造変換が引き起こされ、その構造変換によって gH、gL ヘテロダイマーの構造が変化し、最終的に gB の活性化が起こると考えられている (13)。gB は結晶構造解析から、膜融合タンパク質である vesicular stomatitis virus (VSV) のエンベロープ糖タンパク質 G と構造上の類似性が確認されている (14)。対して、gH、gL ヘテロダイマーは結晶構造解析から、他のウイルスのどの膜融合タンパク質とも類似性が見られず、また脂質に挿入される部位を持たないことから、gH、gL ヘテロダイマーは gB の構造変換に関与することで、gB の膜融合活性に寄与すると考えられているが、その詳細なメカニズムは明らかではない(15)。また、gB の受容体としては、NMHC-IIA (non-muscle myosin heavy chain IIA)、paired immunoglobulin-like type 2 receptor α (PILR α)、myelin associated glycoprotein) MAG、が同定されており、gB は他のウイルス膜融合タンパク質

同様に、受容体リガンドとしても機能していると考えられている (16-18)。

HSV の核膜通過において、核内外膜間に出芽した一次エンベロープを獲得したウイルス粒子は、一次エンベロープと核外膜を融合させる過程 (de-envelopment) をへて、ヌクレオカプシドを細胞質に放出する。gB および gH はこの過程に関与することが示唆されている。gB および gH を二重欠損させたウイルスにおいて、核内外膜間の一次エンベロープを獲得したウイルス粒子の数が増加し、細胞表面のウイルス粒子の数が減少することが報告されている(19)。この結果は、一次エンベロープを獲得したウイルス粒子の一次エンベロープと核外膜との融合が阻害されたために、核外膜から脱出できなくなり、一次エンベロープを獲得したウイルス粒子が核内外膜間に蓄積するためだと考えられている。gB および gH のそれぞれの欠損ウイルスではその表現型が認められないことから、gB および gH はそれぞれが独立にこの過程に寄与しているが示唆されている (19)。さらに、この結果は、一次エンベロープと核外膜の膜融合は、gB および gH が必須である細胞侵入時に起こる膜融合とは異なる機構で起こることを示唆している。

2. 序論

ヘルペスウイルスは、直鎖状の二本鎖 DNA をゲノムにもつエンベロープウイルスである。ヘルペスウイルスは核内でゲノム複製を行い、核内でゲノムのカプシドへのパッケージングが起こる。ゲノムを内包したカプシドは、核膜を通過した後に、細胞質にてテグメントを獲得し、最終エンベロープの獲得の場である TGN に出芽する。最終エンベロープを獲得した成熟粒子はエキソサイトーシスを介して細胞外に放出される (5)。この際、核内で生成されたヌクレオカプシドは核内膜 (inner nuclear membrane ; INM) および核外膜 (outer nuclear membrane ; ONM) からなる二重膜である核膜を通過しなくてはならない。しかし、ウイルスゲノムを内包したヌクレオカプシドは直径約 125nm の正二十面体であり、直径約 50nm の核膜孔を通過するとは考え難い。そこでヘルペスウイルスは、まず核内膜を一次エンベロープとしてヌクレオカプシドに獲得させ (primary envelopment)、核内膜と核外膜の間に出芽した後、核外膜と一次エンベロープを融合させて (de-envelopment)、ヌクレオカプシドを細胞質に放出するという生物学的にもユニークな小胞を介した核外輸送機構を用いていると考えられている (7, 8) (図 2)。

これまで、こうした膜小胞を介した核外輸送機構は、ヘルペスウイルス感染細胞における核外輸送においてのみ観察されていたが、近年になり、*Drosophila* の神経細胞において、リボヌクレオタンパク質 (RNP) の核外輸送にも同様の機構が用いられている事が報告された (20)。これらの報告は、核膜孔を通過することが出来ない大きさの構造体を核外へ輸送するために、膜小胞を介した核外輸送機構が存在し、その機構は細胞の蛋白質によって引き起こされることを示唆している。しかしながら、ヘルペスウイルス感染細胞では容易に核膜間の小胞が検出されるのに対して、*Drosophila* の神経細胞における RNP の核外輸送を除いて、これまでこのような機構が報告されなかった経緯を鑑みると、通常は誘導されない特殊なシグナルがこの膜小胞を介した核外輸送を誘導するために必要であることが予想される。ヘルペスウイルスは自身のウイルスタンパク質を用いて、自らの粒子成熟のために効率的に膜小胞を介した核外輸送機構を利用していることが予想される。先行報告から、ヘルペスウイルスは宿主因子である protein kinase C (PKC) を核膜に移行させ、核内膜を覆う lamin をリン酸化することで、その網目構造を崩壊させることが報告されている(7, 8)。 lamin の崩壊は、ヘルペスウイルスの核膜通過におけるスタートの段階である、

primary envelopment を促進すると考えられている。また、この過程にはヘルペスウイルスに広く保存された二つの因子からなる nuclear egress complex (NEC) が必須であると考えられている(7, 8)。

単純ヘルペスウイルス 1 型 (HSV-1) は、ヘルペスウイルスの中で最も研究が進んでいるプロトタイプのウイルスである。ヒトに口唇ヘルペス、性器ヘルペス、ヘルペス性角膜炎、ヘルペス脳炎、新生児ヘルペスなど様々な疾患を引き起こすことが知られている(5)。HSV-1 の NEC は UL31 と UL34 から構成され、他のヘルペスウイルスではそのホモログ因子が NEC を構成することが報告されている。UL31 および UL34 は複合体を形成し、核内膜に存在する lamin の網目構造の変換に関与する PKC を核内膜に移行させることが報告されている(7, 8)。さらに、NEC はウイルスゲノムの複製およびパッケージングの場である RC の核内膜への移行に寄与する(21)。また、試験管内において、精製 UL31、UL34 複合体はリポソーム膜を変形 (deformation) させ、切断 (scission) する機能を有する (22)。また、UL31、UL34 の過剰発現細胞では、核膜間に小胞が形成される(23)。これらの知見から、UL31、UL34 は単独でウイルス様粒子の形成が可能であると考えられている (図 3)。そして、UL31 あるいは UL34 の欠損ウイルス感染細胞において、核内外膜間、細胞質および細胞表面にウイルス粒子がほぼ観察されないことから、UL31、UL34 は、ヌクレオカプシドが一次エンベロープを獲得し、核内外膜間へ出芽するのに必須であると考えられている。核内外膜間に出芽したウイルス粒子は、ヌクレオカプシドを細胞質に放出するために、一次エンベロープと核外膜の融合を引き起こす。先行報告から、HSV-1 のセリン、スレオニンプロテインキナーゼである Us3 の欠損変異またはリン酸化活性消失変異、エンベロープ糖タンパク質である glycoprotein B (gB)、glycoprotein H (gH) の二重欠損変異、Us3 によるリン酸化部位変異型 gB または膜融合活性消失変異型 gB および gH 欠損変異、Us3 によるリン酸化部位変異型 UL31 ウイルス感染細胞において、一次エンベロープを獲得したウイルス粒子が核内外膜間に蓄積し、核内へ一次エンベロープを獲得したウイルス粒子が蓄積した陥入構造体を、形成することが知られている(19, 24-27)。これらの知見から、Us3 は gB および UL31 のリン酸化を介して de-envelopment に寄与していることが示唆される。また、gB および gH それぞれを欠損したウイルスでは上記の表現型が見られないことから、gB および gH はそれぞれが独立にこの過程に寄与し、gB においては自身の膜融合活性が重

要であることが示唆される (図 3)。また、宿主の ATPase である *torsinA* の過剰発現は、細胞質中に、一次エンベロープを獲得した粒子と見られる二重膜に包まれた形のウイルス粒子が増加させることが報告されている (28)。これらの知見から、ウイルス因子 *Us3*、*UL31*、*gB*、*gH* および宿主因子 *torsinA* が HSV 感染における一次エンベロープと核外膜の融合 (de-envelopment) に寄与することが示唆されるが、その詳細なメカニズムは未解明である。

そこで本研究では、HSV-1 の de-envelopment に寄与する宿主因子を探索するために、まず、*gB* と相互作用する宿主因子を探索することとした。先に述べたとおり、*gB* は HSV-1 の de-envelopment への関与が示唆され、また、一次エンベロープと核外膜の融合には膜融合が起こることから、HSV-1 のウイルス因子の中で唯一、膜融合を引き起こす機能を有する *gB* と相互作用する因子が de-envelopment に寄与する候補因子である可能性が高いと考えた。そこで、タンデム免疫沈降法により感染細胞中から *gB* 複合体を精製し、高感度質量分析計を用いてその構成因子を同定した。同定された *gB* の新規相互作用候補因子と、過去に当研究室で行われた同実験系を用いた質量解析結果を対照し、その中で共通して高い頻度で同定されているもの (フリークエントリーヒッター) を除いた中で、最も上位に同定された CD98 heavy chain (CD98hc) という分子に着目した。

CD98hc は、2 型の膜糖タンパク質であり、様々な培養細胞株および、生体器官の細胞において細胞膜に発現していることが報告されている (29, 30)。CD98hc の主な機能は、二つ知られている。まず一つ目の機能として、ヒトにおいて 7 種類知られている CD98 light chain (CD98lc) とジスルフィド結合することでヘテロダイマーを形成し、それぞれの CD98lc によって様々な種類アミノ酸のトランスポーターとして働くことが知られている (29, 30)。二つ目の機能として、 $\beta 1$ 、 $\beta 3$ integrin と複合体を形成し、integrin を介したシグナル伝達を制御することで、細胞の接着や遊走に寄与することが知られている (29, 30)。また、興味深いことに、CD98hc は過去に Fusion regulatory protein-1 (FRP-1) としても報告されている。これは、Newcastle disease virus (NDV) を感染させた細胞を CD98hc に対するモノクローナル抗体で処理した際に、細胞融合が促進されるという知見に由来する (31)。さらにこの現象は、Human immunodeficiency virus (HIV) の感染細胞においても同様に観察されている (32, 33)。逆に、Human parainfluenza type 2 (HPIV-2) におい

では CD98hc に対するモノクローナル抗体処理によって、細胞融合が阻害されることが報告されている (34)。一連の知見から、CD98hc は様々なエンベロープウイルス感染における細胞融合を制御することが示唆される。また、抗 CD98hc 抗体処理による HIV 感染細胞における細胞融合の促進効果は、抗 $\beta 1$ integrin 抗体の処理によって阻害されることが報告されている (32)。これらの知見から、CD98hc の膜融合制御は、 $\beta 1$ integrin を介していることが示唆される。

本研究は、(i) HSV-1 感染細胞において CD98hc が HSV-1 の効率的な de-envelopment に寄与することが報告されているウイルス因子 gB、gH、Us3、UL31 およびそのパートナー因子である UL34 と複合体を形成すること、(ii) CD98hc は HSV-1 感染細胞において $\beta 1$ integrin と複合体を形成し、さらに、核膜へ局在が移行し、ウイルス因子 gB、gH、UL31、UL34 および $\beta 1$ integrin と核膜において共局在すること、(iii) CD98hc または $\beta 1$ integrin の発現抑制によって、核内外膜間に一次エンベロープを獲得したウイルス粒子が蓄積し、核内に一次エンベロープを獲得したウイルス粒子が蓄積した陥入構造体が形成されることを示した。この表現型は、HSV-1 の効率的な de-envelopment が阻害された結果だと考えられている。CD98hc および $\beta 1$ integrin の膜融合を制御する機能および、一連の実験結果は、CD98hc および $\beta 1$ integrin は、HSV-1 の効率的な de-envelopment を制御する新規宿主因子であることを支持している。

3. 実験方法

細胞

Vero 細胞（アフリカミドリザル腎臓由来上皮細胞株）は Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) に 5% calf serum (CS)、100 units/ml ペニシリン、100 μ g/ml ストレプトマイシンを添加した培地で培養した。HEp-2 細胞（ヒト喉頭癌由来上皮様細胞株）、293T 細胞（ヒト胎児由来腎臓上皮細胞株）、Plat-GP 細胞（293T 細胞由来のレトロベクターパッケージング細胞株）は Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) に 10% fetal calf serum (FCS)、100 units/ml ペニシリン、100 μ g/ml ストレプトマイシンを添加した培地で培養した。sh-Luc-HEp-2 細胞は Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) に 10% fetal calf serum (FCS)、100 units/ml ペニシリン、100 μ g/ml ストレプトマイシン、50 μ g/ml ハイグロマイシンを添加した培地で培養した。Flp-In-CV-1/ α 27-gB (17) は、Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) に 5% calf serum (CS)、100 units/ml ペニシリン、100 μ g/ml ストレプトマイシン、1 μ g/ml ハイグロマイシン B を添加した培地で培養した。UL31-CV-1 細胞 (35) は、Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) に 10% fetal calf serum (FCS)、100 units/ml ペニシリン、100 μ g/ml ストレプトマイシン、200 μ g/ml ハイグロマイシン B を添加した培地で培養した。CS および FCS は 56°C で 30 分非働化処理を行ったものを使用した。

ウイルス

野生体ウイルスは laboratory strain HSV-1 (F) を使用した。組換えウイルス YK711 (MEF-gB)、YK538 (MEF-UL34)、YK701 (Δ gB)、YK720 (Δ UL31) は当研究室で過去に作製されたものを使用した(図 4) (16, 17, 36, 37)。インフルエンザウイルス (A/WSN/33 (H1N1)) は過去に当研究室で使用されたものを使用した (16)。YK701 (Δ gB)、YK720 (Δ UL31) は、それぞれ Flp-In-CV-1/ α 27-gB 細胞、UL31-CV-1 細胞にて増殖、力価測定を行い使用した。

プラスミド

HSV-1 の gB、gH、gL、gD をそれぞれ発現するプラスミド (pPEP-gB, pPEP-gH, pPEPgL, pPEP-gD) は、過去に Dr. Spear, P.G の研究室で作製され、当研究室に分与されたものを使用した (38)。MEF tag を融合した形の CD98hc を発現するプラスミド DNA (pcDNA-MEF-CD98hc) は、HEp-2 細胞より精製した total RNA から合成した cDNA より CD98hc 全長の ORF を PCR で増幅し、pcDNA3.1 に MEF tag が挿入された pcDNA-MEF (39) にクローニングして作製した。CD98hc の 3'UTR 領域を特異的に認識する shRNA を発現するプラスミド (pSSCH-CD98hc) は、以下の通りに作製した。オリゴ DNA

5'-TTTGTCTCATTCTGGTTCTACTGGGCTTCCTGTCACCCAGTAGAACCAGAATCAGACT
TTTTTG-3' と

5'-AATTCAAAAAAGTCTGATTCTGGTTCTACTGGGTGACAGGAAGCCCAGTAGAACCAG
AATCAGA-3'をアニーリングさせ、pmU6 プラスミド(16) の *Bbs*I と *Eco*RI 部位にクロー
ニングした。作製したプラスミドから、U6 プロモーターおよび CD98hc の 3'UTR 領域の特
異的に認識する shRNA の配列を *Bam*HI と *Sa*II 部位で切断し、pSSCH (16) にサブク
ローニングした。β1 integrin の 3'UTR 領域を特異的に認識する shRNA を発現するプラス
ミド (pSSCH-β1 integrin) は以下のオリゴを用いて pSSCH-CD98hc と同様に作製した。
オリゴ DNA

5'-TTTGTAGCAATTTCCATAGTCACAGCTTCCTGTCACTGTGACTATGGAAATTGCTACT
TTTTTG-3' と

5'-AATTCAAAAAAGTAGCAATTTCCATAGTCACAGTGACAGGAAGCTGTGACTATGGAA
ATTGCTA-3'。CD98hc を発現するレトロウイルスベクター (pMXs-CD98hc) は、CD98hc
の全長を pcDNA-MEF-CD98hc から PCR で増幅し、pMXs-puro (40) にクローニングして
作製した。β1 integrin を発現するレトロウイルスベクター (pMXs-β1 integrin) は、
HEp-2 細胞より生成した total RNA から合成した cDNA より β1 integrin 全長の ORF を
PCR で増幅し、pMXs-puro にクローニングして作製した。gH を発現するレトロウイル
スベクターは、HSV-1 (F) ゲノムの UL3 と UL4 の間に BAC (bacterial artificial
chromosome) を挿入して作製された pYebac102 から gH 全長の ORF を PCR で増幅し、
pMXs-puro にクローニングして作製した。CD98hc 全長の ORF を有するプラスミド

(pBS-CD98hc) は、CD98hc の全長を pcDNA-MEF-CD98hc から PCR で増幅し、pBluescriptII KS (+) (Stratgene) にクローニングして作製した。CD98hc を発現する組換えウイルス YK715 (MEF-CD98hc) を作製するための、カナマイシンカセットを挿入した形の CD98hc を有するプラスミド (pBS-CD98hc-Kan) は、I-SceI 配列およびカナマイシン耐性遺伝子を pEPkan-S (41) から以下のオリゴ 5'-GCACGCGTTCTCCGCTGGGCCTGGACTCAGGATGACGACGATAAGTAGGG-3'、5'-GCACGCGTGGAAGTCCCCATGCAGTAGGCAACCAATTAACCAATTCTGATTAG-3' を用いて PCR で増幅し、CD98hc の *MluI* 部位にクローニングして作製した。

gB と相互作用するタンパク質の網羅的な同定

HEp-2 細胞に YK711 (MEF-gB) を MOI=5 で感染させ、24 時間後に回収し、プロテアーゼ阻害剤カクテル (Nacalai Tesque) を含む 0.1% NP40 Buffer (50mM Tris-HCl [pH 8.0], 120mM NaCl, 50mM NaF, 0.1% NP-40) で可溶化した。遠心後、上清をプロテイン A ビーズ (GE Healthcare) と混合し、ビーズに非特異的に結合するタンパク質を除去した。遠心後、上清を抗 Myc 抗体で免疫沈降し、沈降物を AcTEV プロテアーゼで処理した。遠心後、上清を抗 Flag 抗体で免疫沈降し、沈降物を洗浄 buffer (50mM Tris-HCl [pH 8.0], 120mM NaCl, 50mM NaF) で 3 回洗浄した後、Flag 溶出 buffer (50mM Tris-HCl [pH 8.0], 150mM NaCl, 0.5mg Flag peptide/ml) を加え、4°C で 2 時間インキュベートした。溶出液をトリプシン消化し、Zip Tip (C₁₈; Milipore) を用いて脱塩処理後、得られた精製ペプチドを nano liquid chromatography (Dina, KYA Technologies) -tandem mass spectrometry (Q-STAR Elite, AB SCIEX) システムに供した。LC-MS/MS で得られたペプチド質量は、HSV-1 (F) のウイルスタンパク質データベース (74 virus protein sequences based on complete genome sequence of human herpes virus 1 starin F, GenBank accession number GU734771) に National Center for Biotechnology Information (NCBI) ヒトタンパク質データベース (68,711 protein sequences, Refseq human protein database) を統合した後、Mascot algorithm (Version 2.4.1; Matrix Science) を用いてデータの解析を行った。

組換えレトロベクターの作出と CD98hc および $\beta 1$ integrin に対する shRNA 定常発現細胞、gH 定常発現細胞の樹立

Plat-GP 細胞 (293T 細胞由来のパッケージング細胞) に、pSSCH-CD98hc、pSSCH- $\beta 1$ integrin もしくは pMXs-gH と、Vesicular stomatitis virus のエンベロップ G タンパク質をコードする pMDG をそれぞれ co-transfection し、2 日後、培養上清を回収した。sh-CD98hc-HEp2 細胞、sh- $\beta 1$ integrin 細胞、gH-Vero 細胞は HEp-2 細胞、Vero 細胞にそれぞれ Plat-GP 細胞に pSSCH-CD98hc、pSSCH- $\beta 1$ integrin もしくは pMXs-gH を transfection して得られたレトロベクターを含む培養上清を加え、 $50 \mu\text{g/ml}$ ハイグロマイシン B (HEp-2 細胞) もしくは $2.5 \mu\text{g/ml}$ ピューロマイシン (Vero 細胞) で選択的に培養した。

CD98hc、 $\beta 1$ integrin をそれぞれ発現する sh-CD98hc-HEp-2 細胞と sh- $\beta 1$ integrin-HEp-2 細胞の樹立

Plat-GP 細胞に、pMXs-CD98hc あるいは pMXs- $\beta 1$ integrin と、Vesicular stomatitis virus (VSV) のエンベロップ G タンパク質をコードする pMDG (16) をそれぞれ co-transfection し、2 日後、培養上清を回収した。sh-CD98hc-HEp2 細胞、sh- $\beta 1$ integrin 細胞にそれぞれ Plat-GP 細胞に pMXs-CD98hc あるいは pMXs- $\beta 1$ integrin を transfection して得られたレトロベクターを含む培養上清を加え、 $2 \mu\text{g}$ ピューロマイシン/ml で選択的に培養し、CD98hc を外因的に発現する sh-CD98hc/CD98hc-HEp2 細胞あるいは $\beta 1$ integrin を外因的に発現する sh- $\beta 1$ integrin/ $\beta 1$ integrin-HEp-2 細胞を樹立した。

Cell viability assay

sh-Luc-HEp-2 細胞、sh-CD98hc-HEp2 細胞、sh-CD98hc/CD98hc-HEp2 細胞、sh- β 1 integrin 細胞または sh- β 1 integrin/ β 1 integrin-HEp-2 細胞の viability を Cell Counting Kit8 (CCK-8) (Dojindo) を用いて測定した。CCK-8 は、水溶性テトラゾリウム塩 (WST-8) を発色試薬とし、細胞内の脱水素酵素により産生される *NADH* が *1-Methoxy PMS* を介して WST-8 を還元すると 460nm 付近に極大吸収をもつ水溶性ホルマザンが生じる。産生されたホルマザン量は細胞内脱水素酵素活性に依存し、それは生細胞数と直線的な比例関係であることが知られている。そこで、ホルマザンの産生量を吸光度 (460nm) により測定することで、相対的な細胞の Viability を測定した。

組換えウイルスの作製

YK715 (MEF-CD98hc) は以下のように作製した。プライマー 5'-GTGAGCTCGGATCCGCCACCATGGACTACAAGGACGACGATGACAAAGATATGGAGCTACAGCCTCCTGA-3' と 5'-TCGATAAGCTTGATATCGAATTCCTGCAGCCCGGGGATCCACTAGTTTATCAGGCCGCGTAGGGGAAGC-3' を用いて、pBS-CD98hc-Kan からカナマイシン耐性遺伝子を挿入した CD98hc を PCR で増幅し、それを Egr-1 プロモーター、MEF-tag、HSV-1 UL21、UL22 遺伝子のポリ A シグナルが UL50、UL51 の間に挿入された HSV-1 BAC (pYEbac761) を保持する大腸菌 GS1783 に形質転換した。32°C で 2 時間培養後、20 μ g/ml クロラムフェニコール、40 μ g/ml カナマイシンを含む LB 寒天プレートで培養した。PCR で MEFtag の下流に CD98hc およびカナマイシン耐性遺伝子が挿入されたことを確認後、20 μ g/ml クロラムフェニコール、40 μ g/ml カナマイシンを含む LB 液体培地で 32°C、一晩培養した。この培養液 100 μ l を 20 μ g/ml クロラムフェニコールを含む LB 培地 (2ml) に加え、32°C で 3 時間培養した。10% L-アラビノース (Wako) を 100 μ l 添加し、32°C で 1 時間培養することにより I-SceI の発現を誘導した。続いて、42°C で 30 分インキュベートし、RED リコンビナーゼの発現を誘導した。さらに 32°C で 2 時間培養し、培養液を 20 μ g/ml クロラムフェニコールを

含む LB 寒天プレートに塗布した。2 日後、コロニーを 20 μ g/ml クロラムフェニコール、40 μ g/ml カナマイシンを含む LB 寒天プレートと 20 μ g/ml クロラムフェニコールのみを含む LB 寒天プレートに植菌し、クロラムフェニコールのみを含むプレートでのみ生育するコロニーを選択し、シーケンスを確認した。gH の 1-760 番目の塩基をカナマイシン耐性遺伝子と置換した YK713 (Δ gH) は以下のように作製した。プライマー 5'-GGCGGCGATTTGCTGCTGTGTGTTGTCCGTATCCACCAGCAACACAGACAAGGATGACGACGATAAGTAGGG-3' と 5'-CAAGCCCTGCCATAGCCACGGGCCCGTGGGTTAGGGACGGGGTCCCCAAACCAATTAACCAATTCTGATTAG-3' を用いてカナマイシン耐性遺伝子を PCR で増幅し、pYEbac102 を保持した大腸菌 GS1783 に形質転換した。以降は、YK715 (MEF-CD98hc) 同様に行った。YK713 (Δ gH) は gH-Vero 細胞を用いて増殖、力価測定を行い使用した。

抗体

Flag、Myc、gB、gD、gH、gC、gE、ICP0、ICP4、ICP27、pan-cadherin、Lamin A/C、 α -tubulin に対するマウスモノクローナル抗体はそれぞれ、Sigma (Flag、pan-cadherin、 α -tubulin)、MBL (Myc)、Virusys (gB、gC)、Santa Cruz Biotechnology (gD、ICP0、LaminA/C)、ATCC (gH、ICP4)、Abcam (gE および ICP27)、から購入した。CD98hc、VP23 に対するウサギポリクローナル抗体はそれぞれ、Santa Cruz Biotechnology、CosmoBio から購入した。 β 1 integrin に対するヤギポリクローナル抗体は Santa Cruz Biotechnology から購入した。Us3、UL34、UL31 に対するウサギポリクローナル抗体は過去に当研究室で作製されたものを使用した(42)。ICP22、UL31 に対するマウスポリクローナル抗体は過去に当研究室で作製されたものを使用した(36, 37)。UL31 に対するウサギポリクローナル抗体はウェスタンブロットに使用し、UL31 に対するマウスポリクローナル抗体は蛍光免疫抗体法に使用した。

ウイルスの力価測定(プラークアッセイ)

ウイルス液を 1% FCS を含む 199 培地 (SIGMA) で 10^2 から 10^8 倍まで希釈した。そのうち 10^3 から 10^8 倍までのウイルス希釈液を、6 well プレート中の Vero 細胞、Flp-In-CV-1/ α 27-gB 細胞、UL31-CV-1 細胞、gH-Vero 細胞に感染させた。1 時間吸着させた後、ヒト γ グロブリンを含む新しい 199 培地に換え、 37°C で 3 日間培養した。Flp-In-CV-1/ α 27-gB 細胞の場合は、ニトロセルロースを含む 199 培地に換え、 37°C で 3 日間培養した。細胞をメタノール固定し、クリスタルバイオレットで染色後、well ごとにプラーク数を測定し、ウイルス力価を算出した。

ウェスタンブロット

ウイルス感染細胞から得られたタンパク質を SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) にて分離した。SDS-PAGE 後に Transfer buffer (25mM Tris、192mM glycine、10% MeOH) に浸したろ紙 2 枚ずつで、ゲルおよびニトロセルロースメンブレン (BIORAD) をはさみ、トランスファーした。その後、ブロッキング液 (5% スキムミルク、0.1% Tween20 を含むリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) (PBS-T))を用いてブロッキングし、一次抗体を 1% BSA in PBS-T で希釈して、室温で 2 時間反応させた。PBS-T で洗浄後、2 次抗体である Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti mouse、anti-rabbit あるいは anti-goat 抗体を 3% スキムミルク in PBS-T で希釈し、室温で 1 時間反応させた。PBS-T で洗浄した後、Enhanced chemiluminescence (GE Healthcare) により目的のバンドを検出した。

免疫沈降

ウイルスに感染させた HEp-2 細胞およびプラスミドをトランスフェクションした過剰発現 293T 細胞を回収し、プロテアーゼ阻害剤カクテル (Nacalai Tesque) を含む 0.5% NP40 buffer (50 mM Tris-HCl [pH8.0], 150 mM NaCl, 0.5% Nonidet P-40) で可溶化した。遠心後、上清をプロテイン A ビーズ (GE Healthcare) と混合し、 4°C で 30 分反応させ、ビーズに

非特異的に結合するタンパク質を除去した。遠心後、上清に各種 1 次抗体を加え、4 °C で 2 時間、プロテイン A ビーズを加え、4 °C で 1 時間インキュベートし、洗浄後に SDS-PAGE に供した。

免疫蛍光抗体法

細胞を 35 mm ガラスボトムディッシュ (Matsunami) で培養し、各ウイルスを MOI=5 で感染させ 16、24 時間後に 4% paraformaldehyde in PBS で 20 分間固定した。PBS で洗浄後、0.1% TritonX-100 inPBS を加え、室温で 10 分間静置し、PBS で洗浄後、PBS で希釈した 10% ヒト血清 (sigma) を加え、1 時間室温でブロッキングを行った。その後、各種抗体をブロッキング液で希釈し、室温で 2 時間反応させた。PBS で洗浄後、2 次抗体 Alexa-Fluor (Invitrogen) をブロッキング液で希釈し、室温で 1 時間反応させた。PBS で洗浄後、共焦点顕微鏡 (LSM5 PASCAL) を用いて解析を行った。

ウイルスの UV 不活化

ウイルス希釈液を FUNA-UV-Linker FS-1500 (Funakoshi)を用いて、10 分間の UV 処理した。この処理によって HEp-2 細胞におけるウイルス増殖が完全に阻害される事を確認した。

電子顕微鏡解析

sh-Luc-HEp-2 細胞、sh-CD98hc-HEp2 細胞、sh-CD98hc/CD98hc-HEp2 細胞、sh- β 1 integrin 細胞または sh- β 1 integrin/ β 1 integrin-HEp-2 細胞にウイルスを MOI=10 で感染させた。感染 24 時間後、PBS で洗浄後、アルデヒド固定液 (2% paraformaldehyde, 2% glutaraldehyde in 0.1M phosphate buffer [pH7.4]) を加え、室温で 10 分間固定した。細胞を回収し、遠心後、新しいアルデヒド固定液に交換し、室温で 2 時間固定した。3% sucrose in 0.1M phosphate buffer [pH 7.4] で洗浄後、オスmium固定液 (1% osmium tetroxide in 0.1M phosphate buffer [pH7.4]) を加え、氷上で 2 時間染色した。水洗後、30%、50%、70%、90%、99.5% エタノール、Propylene oxide (PO) の準に置換して脱水処理した後、EPON 812 resin mixture (TAAB Laboratories Equipment) で包埋した。超薄切片は、Reichert Ultracut N Ultramicrotome (Reichert) を用いて作製した。超薄切片は、2% uranyl acetate in 70% エタノールと Reynolds' 鉛染色液 [pH12] で染色し、透過型電子顕微鏡 (Hitachi H-7500) で観察した。

4. 結果

I. gB と相互する宿主因子の同定

gB と相互作用するウイルスおよび宿主因子を探索するため、HEp-2 細胞にタンデム免疫沈降用の MEF (myc-TEV-flag) タグと融合した形の gB (MEF-gB) を発現する変異ウイルスを感染させ、タンデム免疫沈降法により gB 複合体を精製し、高感度質量分析計によって、その構成因子を網羅的に決定した。その結果、17 種類の宿主因子および、1 種類のウイルス因子が gB との相互作用候補因子として同定された (表 1)。同定された gB の相互作用候補因子と、過去に当研究室で行われた同実験系を用いた質量解析結果を対照し、その中で共通して高い頻度で同定されているもの (フリークエントリーヒッター) を除いた中で、最も上位に同定された CD98 heavy chain (CD98hc) という分子に着目し、以降の解析を行った。

II. CD98hc は感染細胞において gB、gH、UL31、UL34、Us3、および $\beta 1$ integrin と複合体を形成した

網羅的な相互作用因子の探索において検出された CD98hc と gB の相互作用を確認するため、まず、野生型ウイルスを用いて、抗 gB 抗体で免疫沈降した時に CD98hc が共沈降するかを検証した。HSV-1 (F) 野生型ウイルスを HEp-2 細胞に感染させ、感染 24 時間後に回収し、抗 gB、gC あるいは myc 抗体で免疫沈降を行った結果、抗 gB 抗体でのみ CD98hc の共沈降が確認された。一方、抗 gC あるいは抗 myc 抗体では CD98hc は検出されなかった (図 5A-D)。続いて、MEF タグを融合した形の CD98hc を発現する変異ウイルス YK715 (MEF-CD98hc) を作製した (図 4)。YK715 (MEF-CD98hc) を MOI=5 で Vero 細胞に感染させた場合の増殖曲線は、野生型ウイルスと比べて顕著な差がなく、YK715 (MEF-CD98hc) は野生体と同様の性状を保っていると考えられた (図 6)。YK715 (MEF-CD98hc) あるいは野生型ウイルスを HEp-2 細胞に MOI=5 で感染させ、感染 24 時

間後に回収し、抗 myc 抗体で免疫沈降後、様々なウイルス因子および宿主細胞因子の抗体で検出した (図 7)。YK715 (MEF-CD98hc) 感染細胞の可溶画分において、抗 myc 抗体で MEF-CD98hc を免疫沈降した結果、HSV-1 の核外膜における de-envelopment への関与が報告されている gB、gH、UL31、UL34 および Us3、さらに CD98hc との複合体形成が報告されている $\beta 1$ integrin の共沈降が確認された (図 7)。一方で、核外膜における de-envelopment への関与が報告されていないウイルス因子である gC、gE および VP23 と CD98hc との共沈降は認められなかった。また、野生型ウイルス感染細胞の可溶画分において抗 myc 抗体で免疫沈降した結果、いずれのウイルス因子および宿主因子も検出されなかった。これらの結果は、CD98hc が HSV-1 感染細胞において gB、gH、UL31、UL34、Us3 および $\beta 1$ integrin と複合体を形成していることを示唆する。

293T 細胞に HSV-1 のエンベロープ糖蛋白質である gB、gH および gL とヘテロダイマーを形成することが報告されている gL、あるいは gD を発現するベクター (pPEP-gB、pPEP-gH、pPEP-gL、pPEP-gD) と、MEF-CD98hc 発現ベクター (pcDNA-MEF-CD98hc) をそれぞれ co-transfection し、48 時間後に回収し、抗 flag 抗体で免疫沈降後、抗 gB、gH あるいは gD 抗体で検出した。図 8 に示した通り、gB と MEF-CD98hc を co-transfection した細胞の可溶化画分において、抗 flag 抗体で MEF-CD98hc を免疫沈降した結果、gB の共沈降が確認された。同様に、核外膜における de-envelopment への関与が報告されている gH および gL と、MEF-CD98hc を co-transfection した細胞の可溶化画分において、抗 flag 抗体で MEF-CD98hc を免疫沈降した結果、gH の共沈降が確認された。一方で、核膜通過において機能していないと考えられる gD の共沈降は認められなかった。この結果から、gB と gH は、それぞれが単独で CD98hc と結合しうること、また、その結合は他のウイルス因子に依存しないことが示唆された。gB と gH の 2 重欠損ウイルスにおいて、de-envelopment が阻害されることから、CD98hc と gB および gH がそれぞれ単独でも相互作用しうるという本知見は、CD98hc が de-envelopment を制御する宿主因子の候補となる可能性があることを示唆する。

III. HSV-1 の感染によって CD98hc は核膜および核膜周辺へ集積した

感染細胞における CD98hc、gB、gH、UL31 および UL34 の局在を解析するために、HEp-2 細胞に野生型ウイルス、MEF tag を融合した形の UL34 を発現する組換えウイルス YK538 (MEF-UL34) を感染させ、24 時間後の感染細胞における CD98hc、gB、gH、UL31 および MEF-UL34 の局在を蛍光抗体法より共焦点顕微鏡を用いて解析した。その結果、CD98hc は、先行報告の通り非感染細胞では主に細胞膜に局在した (図 9A)。一方で、興味深いことに CD98hc は感染細胞において一部細胞膜に局在するものの、主に核膜周辺に局在し、核内膜のマーカである lamin A/C との共局在も認められた (図 9A)。この CD98hc の局在変化は、感染 16 時間後においても同様に観察された (図 9B)。また、細胞膜間の接着に寄与する cadherin の局在は、感染細胞においても影響は認められなかった (図 9C)。

さらに、CD98hc は核膜および核膜周辺において gB、gH、UL31 あるいは MEF-UL34 との共局在が認められた (図 10A-D)。さらに、その局在変化の原因因子を探索するために、gB、gH、UL31 の欠損ウイルス感染時の CD98hc の局在変化の有無を検証したが、いずれのウイルスにおいても野生体ウイルスと同様に、CD98hc の局在変化が認められた (図 11B-D)。一方で、UV 不活化ウイルスを感染させた細胞では CD98hc の局在変化は認められなかった (図 11A)。一連の結果より、CD98hc は HSV-1 感染特異的に核膜および核膜周辺へ集積すること、その局在変化は UL34、Us3 を含めた gB、gH、UL31 以外のウイルス因子に依存することが示された。また、UL34 の局在は UL31 の局在に依存することから、UL34 が CD98hc の核膜への移行に関与する可能性は低いと考えられる。

これまでの結果から、CD98hc は感染細胞において、核膜に移行し、核膜において HSV-1 の核外膜における de-envelopment への関与が報告されている gB、gH、UL31 および UL34 と相互作用している事が示唆された。

IV. CD98hc の発現抑制による HSV-1 感染細胞における UL31 および UL34 の局在への影響

ここまでの結果で、CD98hc は gB、gH、UL31、UL34、Us3 と複合体を形成し、さらに、感染細胞中で核膜への局在変化が認められた。これらの結果から、CD98hc が HSV-1 の核膜通過に寄与する可能性が考えられた。そこで、CD98hc mRNA の 3' UTR 領域に対する shRNA を定常発現させ、CD98hc の発現を抑制した細胞 (sh-CD98hc-HEp-2) を作製した。コントロールとして、firefly luciferase mRNA に対する shRNA を定常発現する細胞 (sh-Luc-HEp-2) を用いた。また、CD98hc の発現抑制細胞の作製に用いた shRNA による非特異的な表現型ではないことを示すために、CD98hc の発現抑制細胞にレトロウイルスベクターを用いて CD98hc を発現させた細胞 (sh-CD98hc/CD98hc-HEp-2 細胞) も作製した。図 12 に示すとおり、sh-CD98hc-HEp-2 細胞の内在性 CD98hc の発現量は sh-Luc-HEp-2 細胞にくらべ、顕著に低下していることが確認された。また、sh-CD98hc/CD98hc-HEp-2 細胞の CD98hc の発現量は sh-Luc-HEp-2 細胞とくらべて顕著な差は認められなかった。また、sh-Luc-HEp-2 細胞、sh-CD98hc-HEp-2 細胞、sh-CD98hc/CD98hc-HEp-2 細胞の viability はどれも同等であったことから、CD98hc の発現抑制は HEp-2 細胞の viability に影響を与えないことが示唆された。

作製した細胞を用いて、野生型ウイルス感染時における UL31、UL34 の局在を検証した。UL31、UL34 は核内膜に局在し、核膜通過に必須であるとされている (7, 8)。UL31 および UL34 は、野生型ウイルス感染細胞において核膜に一様にスムーズに局在する。一方で、核外膜における de-envelopment への関与が報告されている Us3 のリン酸化活性消失変異ウイルスの感染細胞において、UL31 および UL34 はパンクテッド様の局在をとることが報告されている (42, 43)。先行報告の通り、95% の sh-Luc-HEp-2 細胞、92% の sh-CD98hc/CD98hc-HEp-2 細胞で UL31、UL34 は核膜に一様にスムーズに局在した。しかしながら、sh-CD98hc-HEp-2 細胞においては、26% の割合で、核膜近傍に UL31 および UL34 のパンクテッド構造が認められる細胞が確認された (図 13)。これらの結果から、CD98hc は HSV-1 感染細胞において UL31 および UL34 の適切な局在に必要であることが明らかとなった。

V. CD98hc は HSV-1 の効率的な de-envelopment に必要であった

次に、ウイルス粒子の形態形成の過程における CD98hc の関与をより詳細に解析するために、sh-Luc-HEp-2 細胞、sh-CD98hc-HEp-2 細胞、sh-CD98hc/CD98hc-HEp-2 細胞に野生型ウイルスを感染させ、電子顕微鏡による解析を試みた。図 14、表 3 に示すように、37.4%の HSV-1 感染 sh-CD98hc-HEp-2 細胞において、顕著に一次エンベロープを獲得したウイルス粒子が核内外膜間に蓄積し、核内に陥入構造体が形成されていた。一方で、sh-Luc-HEp-2 細胞および sh-CD98hc/CD98hc-HEp-2 細胞において、一次エンベロープを獲得したウイルス粒子の核内外膜間への蓄積や、核内への陥入構造体の形成はほとんど認められなかった。さらに、感染細胞の核内、核膜周辺、細胞質、細胞膜表面におけるエンベロープを獲得したウイルス粒子数を定量し、その総数から、各領域におけるウイルス粒子の割合を算出した (表 3)。核内のエンベロープを獲得したウイルス粒子とは、核内陥入構造体に含まれるウイルス粒子のことを示している。核内および核膜周辺のエンベロープを獲得したウイルス粒子は、一次エンベロープを獲得したウイルス粒子、細胞質および細胞表面でエンベロープを獲得したウイルス粒子は成熟粒子である。HSV-1 感染 sh-Luc-HEp-2 細胞あるいは sh-CD98hc/CD98hc-HEp-2 細胞中の一次エンベロープを獲得しているウイルス粒子の割合はそれぞれ、9.5%、14.3%であった (図 14、表 3)。しかしながら、HSV-1 感染 sh-CD98hc-HEp-2 細胞における一次エンベロープを獲得しているウイルス粒子の割合は 51.2%であり、これは sh-Luc-HEp-2 細胞における割合の 5.4 倍、sh-CD98hc/CD98hc-HEp-2 細胞における割合の 3.6 倍程度であった (図 14、表 3)。また、HSV-1 感染 sh-Luc-HEp-2 細胞あるいは sh-CD98hc/CD98hc-HEp-2 細胞中の細胞表面上のウイルス粒子の割合はそれぞれ、62.5%、55.6%であったのに対して、sh-CD98hc-HEp-2 細胞では 17.2%であった (表 3)。この結果から、HSV-1 感染 sh-CD98hc-HEp-2 細胞においては、大部分のエンベロープを獲得したウイルス粒子は一次エンベロープを獲得した状態で陥入構造体および核内外膜間に蓄積し、sh-Luc-HEp-2 細胞あるいは sh-CD98hc/CD98hc-HEp-2 細胞では大部分のエンベロープを獲得したウイルス粒子が細胞膜表面に存在していることが明らかになった。これらの結果は、一次エンベロープを獲得したウイルス粒子と核外膜との融合が阻害され、ウイルス粒子が核外膜から脱出ができ

なくなった結果、一次エンベロープを獲得したウイルス粒子が核内外膜間に蓄積し、効率的な成熟粒子の形成が阻害されるためだと考えられる。同様の表現型が、Us3、UL31、gB および gH の変異ウイルス感染においても確認されることから (19, 24-27)、これらのウイルス因子が de-envelopment に寄与すると考えられている。また、核内および細胞質におけるヌクレオカプシド、細胞質のエンベロープを獲得したウイルス粒子（成熟粒子）の割合は、sh-Luc-HEp-2 細胞、sh-CD98hc-HEp-2 細胞、sh-CD98hc/CD98hc-HEp-2 細胞の間で顕著な差は認められなかった (data not shown)。これらの結果は、CD98hc はウイルス粒子の核膜通過、とくに核外膜からの脱出および細胞外への成熟粒子の放出に寄与していることを示唆している。

VI. $\beta 1$ integrin の発現抑制による HSV-1 感染細胞における UL31 および UL34 の局在および HSV-1 の de-envelopment への影響

CD98hc は先行報告において、様々なエンベロープウイルス感染細胞における細胞膜融合を制御し、その制御には $\beta 1$ integrin が関与することが示されている (32)。本研究においても、共免疫沈降実験から、HSV-1 感染細胞において CD98hc と $\beta 1$ integrin の相互作用が確認された (図 3)。そこで、まず CD98hc と同様に、 $\beta 1$ integrin の感染細胞における局在も検証した。図 15 に示したとおり、 $\beta 1$ integrin は、先行報告の通り非感染細胞では細胞膜および細胞質に散在性に局在したのに対し (44)、感染細胞では主に核膜周辺に局在した。さらに、感染細胞において、感染 16 時間後の $\beta 1$ integrin と CD98hc および gB の共局在の有無を解析したところ、核膜周辺において $\beta 1$ integrin は CD98hc および gB と共局在することが明らかとなった。さらに、その局在変化の原因因子を探索するために、gB、gH、UL31 欠損ウイルス感染時の局在変化を検証したところ、いずれのウイルスにおいても $\beta 1$ integrin の局在変化が認められた (図 16B-D)。一方で、UV 不活化ウイルスを感染させた細胞では $\beta 1$ integrin の局在変化は認められなかった (図 16A)。また、CD98hc 発現抑制細胞においても $\beta 1$ integrin は核膜へ局在が変化した。(図 16E)。これらの結果から CD98hc 同様に $\beta 1$ integrin は HSV-1 感染特異的に核膜へ局在が変化する事、その局在

変化は CD98hc および、gB、gH、UL31 以外のウイルス因子に依存することが示された。

続いて $\beta 1$ integrin が CD98hc 同様に、HSV-1 の効率的な de-envelopment に関与するのかを検証するために、CD98hc と同様に、 $\beta 1$ integrin mRNA の 3' UTR 領域に対する shRNA を定常発現させ、特異的に $\beta 1$ integrin の発現を抑制した細胞 (sh- $\beta 1$ integrin-HEp-2) およびその細胞にレトロウイルスベクターを用いて $\beta 1$ integrin を発現させた細胞 (sh- $\beta 1$ integrin/ $\beta 1$ integrin-HEp-2 細胞) を作製した。図 17 に示したとおり、sh- $\beta 1$ integrin-HEp-2 細胞の内在性 $\beta 1$ integrin の発現量は sh-Luc-HEp-2 細胞にくらべ、顕著に低下していることが確認された。また、sh- $\beta 1$ integrin/ $\beta 1$ integrin-HEp-2 細胞の $\beta 1$ integrin の発現量は sh-Luc-HEp-2 細胞とくらべて顕著な差は認められなかった。また、sh- $\beta 1$ integrin-HEp-2 細胞の viability は sh-Luc-HEp-2 細胞あるいは sh- $\beta 1$ integrin/ $\beta 1$ integrin-HEp-2 細胞と比べて有意に低下していた。この結果は、先行報告にもあるように、 $\beta 1$ integrin は、HEp-2 細胞の viability に寄与していることを示唆している(45)。

図 18、表 4 に示した通り、 $\beta 1$ integrin 発現抑制細胞における HSV-1 核膜通過への表現型は、CD98hc 発現抑制細胞での結果と同様に、96%の sh-Luc-HEp-2 細胞、92%の sh- $\beta 1$ integrin/ $\beta 1$ integrin-HEp-2 細胞で UL31、UL34 は核膜に一樣にスムーズに局在した。しかしながら、sh- $\beta 1$ integrin-HEp-2 細胞においては、25%の割合で、核膜近傍に UL31 および UL34 のパンクテッド構造が認められる細胞が確認された。また、HSV-1 感染 sh-Luc-HEp-2 細胞あるいは sh- $\beta 1$ integrin/ $\beta 1$ integrin-HEp-2 細胞中の一次エンベロップを獲得しているウイルス粒子の割合はそれぞれ、11.8%、12.3%であった。しかしながら、HSV-1 感染 sh- $\beta 1$ integrin-HEp-2 細胞における一次エンベロップを獲得しているウイルス粒子の割合は 51.3%であり、これは sh-Luc-HEp-2 細胞における割合の 4.3 倍、sh- $\beta 1$ integrin/ $\beta 1$ integrin HEp-2 細胞における割合の 4.2 倍程度であった。また、HSV-1 感染 sh-Luc-HEp-2 細胞あるいは sh- $\beta 1$ integrin/ $\beta 1$ integrin-HEp-2 細胞中の細胞表面上のウイルス粒子の割合はそれぞれ、71.3%、80.3%であったのに対して、sh-CD98hc-HEp-2 細胞では 36.2%であった。この結果から、HSV-1 感染 sh- $\beta 1$ integrin-HEp-2 細胞においては、CD98hc の発現抑制細胞での結果と同様に、大部分のエンベロップを獲得したウイルス粒子は一次エンベロップを獲得した状態で陥入構造体および核内外膜間に蓄積し、sh-Luc-HEp-2 細胞あるいは sh- $\beta 1$ integrin/ $\beta 1$ integrin-HEp-2 細胞では大部分のエンベ

ロープを獲得したウイルス粒子が細胞膜表面に存在していることが明らかになった。これら結果から、CD98hc 同様に、 $\beta 1$ integrin は UL31 および（または）UL34 の適切な局在に必要であること、ウイルス粒子の核外膜からの脱出および細胞外への成熟粒子の放出に寄与していることを示唆している。

VII. CD98hc および $\beta 1$ integrin の HSV-1 増殖への寄与

続いて、CD98hc の発現抑制および $\beta 1$ integrin の発現抑制による野生型ウイルスの増殖への影響を検証するために、MOI=0.05 および MOI=5 で sh-Luc-HEp-2 細胞、sh-CD98hc-HEp-2 細胞、sh-CD98hc/CD98hc-HEp-2 細胞、sh- $\beta 1$ integrin-HEp-2 細胞あるいは sh- $\beta 1$ integrin/ $\beta 1$ integrin-HEp-2 細胞にそれぞれウイルスを感染させた後、培養上清中または、培養上清および細胞内の合計のウイルス力価を測定した。図 19A、B に示したとおり、MOI=0.05 におけるウイルス増殖は、sh-CD98hc-HEp-2 細胞において sh-Luc-HEp-2 細胞あるいは sh-CD98hc/CD98hc-HEp-2 細胞と比べ、顕著に低下した。sh-CD98hc-HEp-2 細胞における MOI=0.05 感染時の、感染 72 時間後の培養上清および細胞内の合計のウイルス力価は、sh-Luc-HEp-2 細胞、sh-CD98hc/CD98hc-HEp-2 細胞とくらべてそれぞれ、8.3 倍あるいは 5.6 倍低下した（図 19B）。この結果と一致して、sh-CD98hc-HEp-2 細胞における MOI=0.05 感染時の、感染 72 時間後の培養上清のウイルス力価は顕著に低下し、sh-Luc-HEp-2 細胞、sh-CD98hc/CD98hc-HEp-2 細胞とくらべてそれぞれ、16 倍あるいは 8.1 倍低下した（図 19D）。これらの結果は、MOI=5 で感染させた場合においても、同様の結果が得られた（図 20A-D）。また、CD98hc の発現抑制は、エンベロープウイルスであるインフルエンザウイルスの HEp-2 細胞における増殖には寄与しなかった（図 21A）。これらの結果は、CD98hc が HSV-1 の効率的な増殖に寄与していることを示している。また、インフルエンザウイルスの増殖には寄与しなかったことから、CD98hc の利用は HSV-1 の増殖に特異的であると考えられる。

HSV-1 の増殖の際の HSV-1 遺伝子の発現は、厳密にカスケード状の制御を受けることが知られ、発現する順から、前初期、初期、後期の 3 群に分類される。前初期遺伝子は、細

胞侵入後、ウイルスゲノムの複製前に発現し、ウイルスゲノムの複製に必須である初期遺伝子の発現を活性化する。また、gB、gH、UL31、UL34 および Us3 を含んだ粒子形成などに関わる後期遺伝子群の発現はゲノムの複製過程後に起こる (5)。そこで、HSV-1 感染における前初期発現タンパク質である、ICP0、ICP4、ICP22、ICP27 の野生型ウイルス感染 3、8、24 時間後の発現量を検証した結果、CD98hc の発現抑制はこれらのタンパク質の発現量には影響を与えなかった (図 22)。CD98hc は HSV-1 感染における前初期遺伝子の発現に寄与しないことから、ウイルスゲノムの複製やウイルスタンパク質の発現には影響を与えておらず、ウイルス粒子形成過程に特異的に寄与すると考えられる。

CD98hc 発現抑制細胞での結果と同様に、sh- β 1 integrin-HEp-2 細胞に MOI=0.05 で感染させた場合の感染 72 時間後の上清中のウイルス力価は、sh-Luc-HEp-2 細胞に比べて 4.7 倍あるいは sh- β 1 integrin / β 1 integrin-HEp-2 細胞と比べて 3.6 倍低下した (図 23A,B)。また、 β 1 integrin の発現抑制は、インフルエンザウイルスの HEp-2 細胞の増殖に寄与しなかった (図 21B)。一方で、sh- β 1 integrin-HEp-2 細胞に MOI=0.05 および MOI=5 で感染させた場合の培養上清および細胞内の合計のウイルス力価、または、MOI=5 で感染させた場合の培養上清中のウイルス力価は sh-Luc-HEp-2 細胞および sh- β 1 integrin / β 1 integrin-HEp-2 細胞と比べて有意な差は認められなかった (図 24A-C)。これらの結果から、 β 1 integrin は、MOI 依存的に HSV-1 の効率的な上清中へのウイルス産生に寄与していることが明らかになった。また、 β 1 integrin はインフルエンザウイルスの上清中へのウイルス産生に寄与しないことから、HSV-1 の感染において特異的に利用されていると考えられる。

表 1. YK712 (MEF-gB) 感染細胞における精製 MEF-gB 複合体の網羅的質量解析によって同定された宿主因子

RefSeq accession number	Definition (gene symbol)	Score ^a	Peptide sequence		
NP_005338.1	78 kDa glucose-regulated protein (HSPA5)	38	VLEDSDLK		
		53	ETAEAYLGK		
		35	LTPEEIER		
		46	VLEDSDLKK		
		55	ITITNDQNR		
		58	VYEGERPLT		
		75	DAGTIAGLNVMR		
		79	FEELNMDLFR		
		50	NELESYAYSLK		
		46	ELEEIVQPIISK		
		64	TWNDPSVQQDIK		
		62	SDIDEIVLVGGSTR		
		52	AKFEELNMDLFR		
		65	TFAPEEISAMVLT		
		67	ITPSYVAFTPEGER		
		39	KSDIDEIVLVGGSTR		
		44	TKPYIQVDIGGGQTK		
		87	IINEPTAAAIA YGLDK		
		78	NQLTSNPENTVFD		
		87	IINEPTAAAIA YGLDKR		
		81	SQIFSTASDNQPTV		
		78	VTHAVVTVPAYFNDAQR		
		62	DNHLLGTFDLTGIPPAPR		
		65	IEWLESHQDADIEDFK		
		79	IEIESFYEGEDFSETL		
		NP_821133.1	tubulin beta chain (TUBB)	56	YLTVAAVFR
				45	LAVNMVPPFR
				66	ISEQFTAMFR
				63	ISVYYNEATGGK
				88	IMNTFSVVPSPK
				75	EVDEQMLNVQNK
				78	AILVDLEPGTMDSVR
54	LHFFMPGFAPLTSR				
78	ALTVPELTQQVFD				
46	NSSYFVEWIPNNVK				
94	GHYTEGAELVDSVLDVVR				
54	SGPFGQIFRPDNFVFGQSGAGNNWAK				
NP_006079.1	tubulin beta-2C chain (TUBB4B)	63	INVYYNEATGGK		
		61	AVLVDLEPGTMDSVR		
		55	ALTVPELTQQMFD		
NP_001737.1	calnexin precursor (CANX)	40	TGIYEK		
		42	EIEDPEDR		
		56	GTLSGWILSK		
		42	AEDEILNR		
		49	KPEDWDERPK		
		105	IVDDWANDGWGLK		
		74	IPNPdffedLEPFR		
99	APVPTGEVYFADSFDR				

NP_116093.1	tubulin alpha-1C chain (TUBA1C)	74	IPDPEAVKPDWDEDAPAK
		56	EDMAALEK
		53	EIIDLVDR
		47	QLFHPEQLITGK
		40	LISQIVSSITASLR
		96	AVFVDLEPTVIDEVR
		35	NLDIERPTYTNLNR
		43	IHFPLATYAPVISA EK
		82	TIGGGDDSFNTFFSETGAGK
		92	AFVHWYVGEEMEEGFSEAR
NP_006588.1	heat shock cognate 71 kDa protein (HSPA8)	36	EIAEAYLGK
		55	DAGTIAGLNVL R
		65	FEELNADLFR
		49	TTPSYVAFTDTER
		35	NQTAEKEFEHQK
NP_001091.1	actin, alpha skeletal muscle (ACTA1)	44	AGFAGDDAPR
		57	HQGVVMVGMGQK
		55	DSYVGDEA QSK
NP_002256.2	importin subunit beta-1 (KPNB1)	61	VLANPGNSQVAR
		56	LAATNALLNSLEFTK
NP_001012680.1	4F2 cell-surface antigen heavy chain (SLC3A2) ^b	92	VAEDEAEAAAAAK
NP_001203.1	complement component 1 Q subcomponent-binding protein, mitochondrial precursor (C1QBP)	57	AFVDFLSDEIK
		62	AFVDFLSDEIKEER
NP_444513.1	dermcidin preproprotein (DCD)	69	DAVEDLESVQK
NP_003477.4	large neutral amino acids transporter small subunit 1 (SLC7A5)	41	ALAAPAAEEK
		43	SADGSAPAGEGEGVTLQR
NP_005505.2	major histocompatibility complex, class I, B precursor (HLA-B)	54	FSDAASPR
NP_004198.1	monocarboxylate transporter 4 (SLC16A3)	51	LHKPPADSGVDLR
NP_008893.1	zinc finger protein 182 (ZNF182)	39	QHQQDDQDK
NP_694858.1	transportin-1 isoform 2 (TNPO1)	37	ESQSPDTTIQR
NP_849143.1	dynein assembly factor with WDR repeat domains 1 (DAW1)	36	HGELKTK

^a 同定ペプチドのスコアは 34 以上 ($p < 0.05$) のものを記している。

^b 4F2 cell-surface antigen heavy chain (SLC3A2)は CD98hc とも記される。

表 2. YK712 (MEF-gB) 感染細胞における精製 MEF-gB 複合体の網羅的質量解析によって同定されたウイルス因子

Definition (gene symbol)	Score ^a	Peptide sequence
UL27 (gB)	37	ENIAPYK
	62	GTSALLSAK
	49	VTDMVMR
	37	NQLHDLR
	43	SEYGGFR
	45	ALYPLTK
	56	QVDGFYAR
	54	HVNDMLGR
	35	GWHTDLK
	59	KGTSALLSAK
	66	TTSSIEFAR
	57	NTNYTQVPNK
	66	YMALVSAMER
	66	NNLETTAFHR
	46	WQEVDEMLR
	56	APVPFEEVIDK
	61	LNPNAIASATVGR
	62	LQFTYNIQR
	56	RNTNYTQVPNK
	83	YSQFMGIFEDR
	71	DSGLLDYTEVQR
	87	KLNPNAIASATVGR
	70	DVTVSQVWFGHR
	62	EGSHEHTSYAADR
	63	APVPFEEVIDKINAK
	64	DDHETDMELKPANAATR
	90	KPPNPTPPPGASANASVER
	114	NPTNPDASGEGEGGDFDEAK
	90	YEDQGPLEVQGLGENNELR
	44	RNTNYTQVPNKDGDAEDDL
	83	ELKNPTNPDASGEGEGGDFDEAK
	81	YFTFGGGYVYFEEYAYSHQLSR
	43	NNLETTAFHRDDHETDMELKPANA ATR
UL22 (gH)	56	DLGLVGAVFMR
	42	GDNVATASHPSGPR
	40	GLLYNPVASVLLR

^a 同定ペプチドのスコアは 34 以上 ($p < 0.05$) のものを記している。

表 3. CD98hc の発現抑制による各画分におけるエンベロープを獲得したウイルス粒子の割合への影響

Knockdown cell	Number of intra-nuclear vesicles	% of virus particles in morphogenetic stage ^a				Total counted (particles/cells)
		Enveloped virions in the intranuclear vesicles	Enveloped virions in the perinuclear space	Enveloped virions in the cytoplasm	Extracellular enveloped virions	
sh-Luc-HEp-2	0	0 (0)	9.5 (70)	28.0 (206)	62.5 (460)	736/9
sh-CD98hc-HEp-2	15	37.4 (274)	13.8 (101)	31.6 (231)	17.2 (126)	732/10
sh-CD98hc/ CD98hc-HEp-2	5	5.5 (39)	8.8 (62)	30.1 (213)	55.6 (393)	707/10

a ()の中は、エンベロープ粒子の各段階における割合 (%) を示している。

表 4. $\beta 1$ integrin の発現抑制による各画分におけるエンベロープを獲得したウイルス粒子の割合への影響

Knockdown cell	Number of intra-nuclear vesicles	% of virus particles in morphogenetic stage ^a				Total counted (particles/cells)
		Enveloped virions in the intranuclear vesicles	Enveloped virions in the perinuclear space	Enveloped virions in the cytoplasm	Extracellular enveloped virions	
sh-Luc-HEp-2	6	10.4 (76)	1.4 (10)	16.9 (122)	71.3 (516)	724/9
sh- $\beta 1$ Integrin-HEp-2	20	35.8 (282)	15.5 (122)	12.6 (99)	36.2 (285)	788/9
sh- $\beta 1$ Integrin/ $\beta 1$ Integrin-HEp-2	4	3.3 (26)	9.0 (71)	11.3 (89)	80.3 (633)	819/9

^a ()の中は、エンベロープ粒子の各段階における割合 (%) を示している。

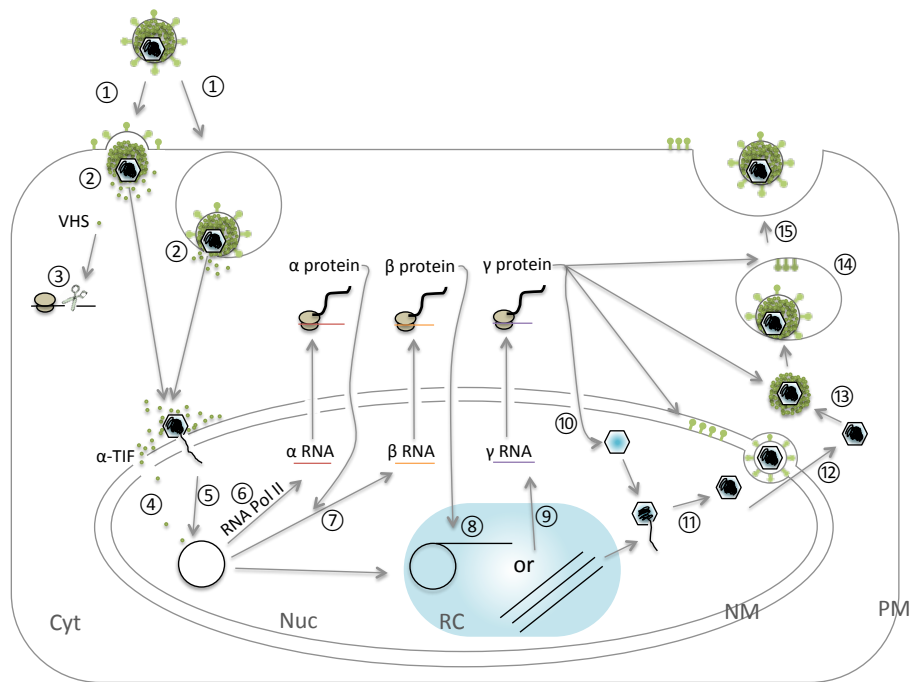


図 1. 細胞内における HSV の生活環; 宿主細胞への吸着および侵入後 (①)、テグメントタンパク質である VHS および α -TIF が細胞質に放出される (②)。VHS は宿主の mRNA を分解することにより、宿主タンパク質の合成を阻害し、効率的なウイルス因子の発現に寄与する (③)。 α -TIF は核内に移行し、 α 遺伝子群の発現に寄与する (④)。テグメントと同時に細胞質に放出されたカプシドは核膜孔まで移行し、核膜孔を介してウイルス DNA を核内に放出する。核内でウイルス DNA の環状化が起こる (⑤)。宿主の RNA ポリメラーゼ II によって α 遺伝子群が転写される (⑥)。転写を受けた α 遺伝子 mRNA は α タンパク質に翻訳される。 α タンパク質は核内に移行し、 β 遺伝子の転写を活性化する (⑦)。転写を受けた β 遺伝子群の mRNA は β タンパク質に翻訳される。 β タンパク質の作用により、環状ウイルス DNA は ローリングサークル機構により複製される (⑧)。ウイルス DNA の複製が行われると、 γ 遺伝子群が発現する (⑨)。 γ タンパク質によりカプシドが形成された後 (⑩)、ウイルスゲノム中間体であるコンカテマーの開裂が起こり、カプシドにゲノムがパッケージングされる (⑪)。ウイルスゲノムを内包したカプシド (ヌクレオカプシド) は核内膜を一次エンベロープとして獲得し、核内外膜間に出芽した後に、一次エンベロープと核外膜を融合させて、ヌクレオカプシドを細胞質に放出する (⑫)。ヌクレオカプシドは細胞質においてテグメントタンパク質を獲得する (⑬)。テグメントを獲得したヌクレオカプシドは、ウイルスエンベロープ糖タンパク質が含まれる膜オルガネラに出芽して最終エンベロープを獲得し (⑭)、エキソサイトーシスによって細胞外に放出される (⑮)。Cyt,細胞質、Nuc,核、RC,複製コンパートメント、NM,核膜、PM,細胞膜。

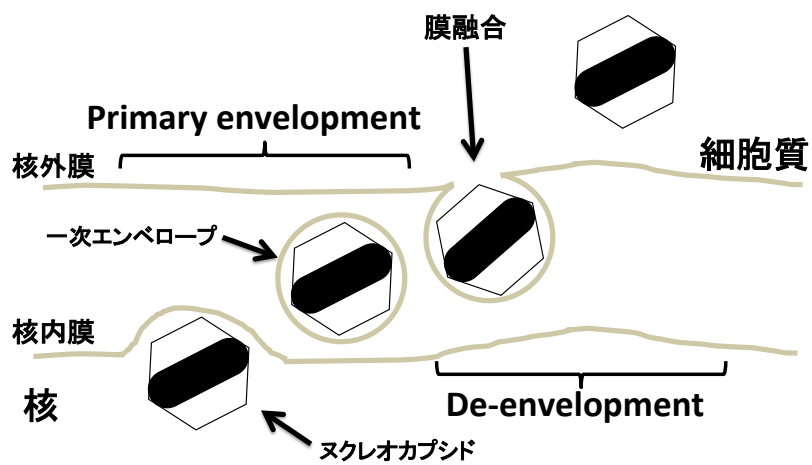


図 2. HSV-1 の核膜通過モデル; 核内で生成されたヌクレオカプシドは、核内膜を一次エンベロップとして獲得し、核内外膜間に出芽した後に、一次エンベロップと核外膜を融合させることで核内から細胞質にヌクレオカプシドを輸送していると考えられている。

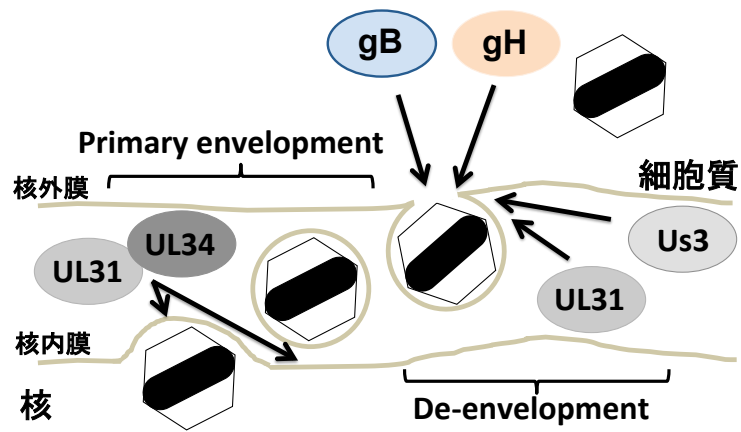


図 3. HSV-1 の核膜通過に関与が報告されているウイルス因子; HSV-1 の核膜通過において、UL31 および UL34 はヌクレオカプシドの核内外膜間への出芽に必須であり、gB、gH、UL31 および Us3 は一次エンベロープと核外膜との融合に寄与すると考えられている。

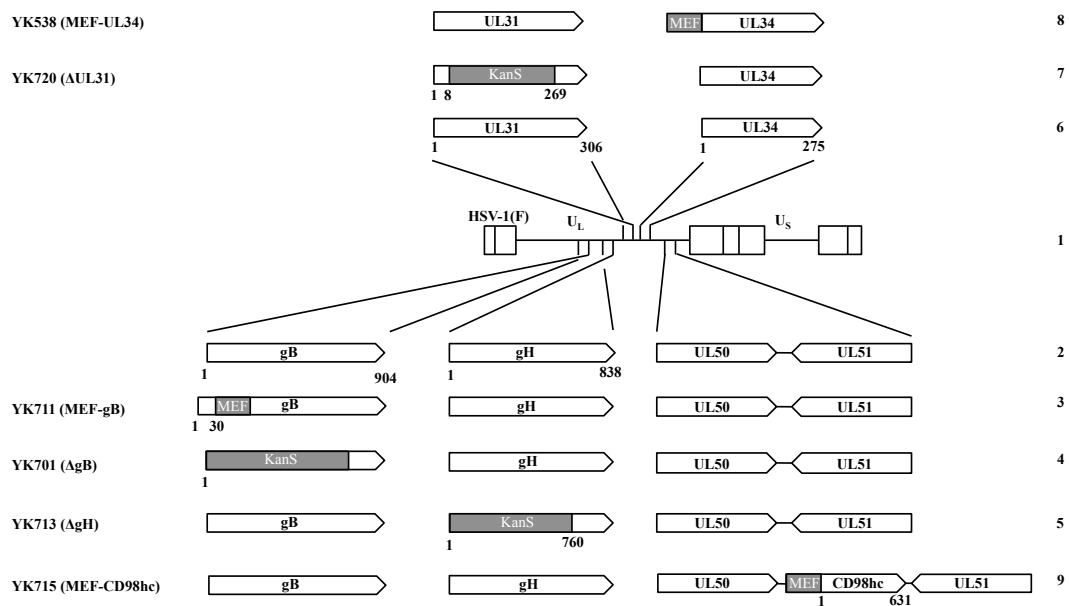


図 4. 野生型 HSV-1 のゲノム構造および本研究で使用した組換えウイルスの変異導入部位の概要。1. 野生型ウイルス HSV-1 (F) のゲノム; 2. gB、gH、UL50 および UL51; 3-5. gB および gH へ変異を導入した組換えウイルス; 6. UL31 および UL34; 7、8. UL31 または UL34 へ変異を導入した組換えウイルス; 9. UL50、UL 51 間に MEF-CD98hc を挿入した組換えウイルス

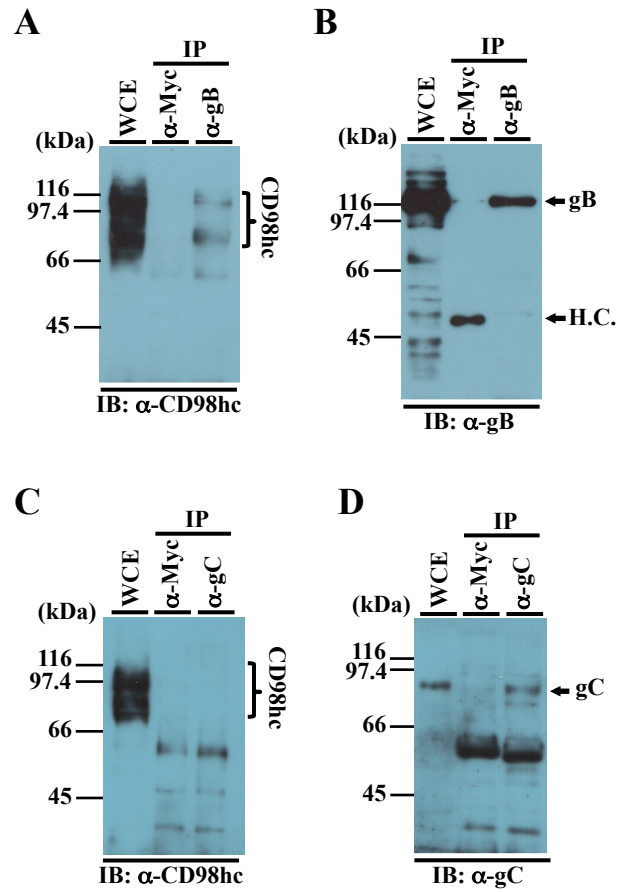


図 5 (A-D) 野生型ウイルス感染細胞において gB は CD98hc と複合体を形成する。
 HEp-2 細胞に野生型ウイルスを MOI=5 で感染させ、24 時間後に回収し、抗 myc、gB、gC 抗体で免疫沈降後、抗 CD98hc (A、C)、gB (B)、gC (D) 抗体で検出した。IP; immunoprecipitated、IB; immunoblotting、H.C; immunoglobulin heavy chains.

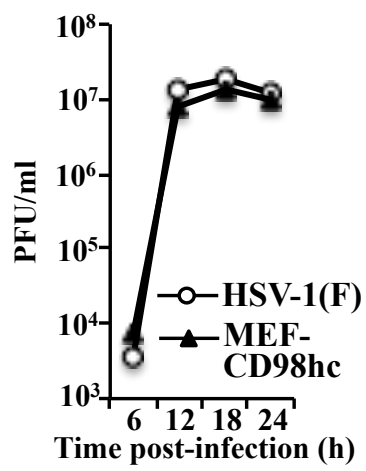


図 6. Vero 細胞における YK715 (MEF-CD98hc) および野生型ウイルスの増殖能。
 Vero 細胞に、YK715 (MEF-CD98hc) および野生型ウイルスを MOI=5 で感染させ、
 6、12、18、24 時間後の培養上清および細胞内の合計ウイルス力価を定量した。

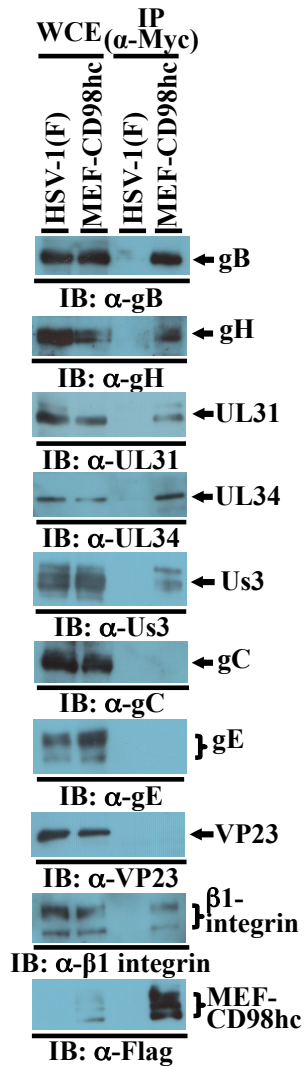


図 7. HSV-1 感染における CD98hc と gB、gH、UL31、UL34、Us3 および β 1 integrin との相互作用; HEp-2 細胞に野生型ウイルスまたは YK715 (MEF-CD98hc) を MOI=5 で感染させ、24 時間後に回収し、抗 myc 抗体で免疫沈降後、抗 gB、gH、UL31、UL34、Us3、gC、gE、VP23、 β 1 integrin または flag 抗体で検出した。IP; immunoprecipitated、IB; immunoblotting

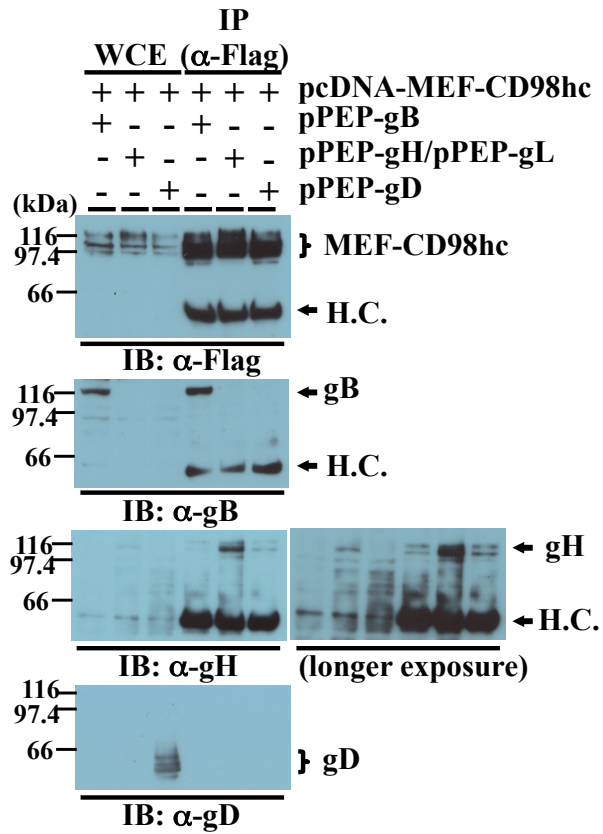


図 8. 過剰発現系における CD98hc と gB および gH との相互作用; 293T 細胞に pPEP-gB、pPEP-gH/pPEP-gL あるいは pPEP-gD と pcDNA-MEF-CD98hc をそれぞれ co-transfection し、抗 flag 抗体で免疫沈降後、抗 flag、gB、gH または gD 抗体で検出した。IP; immunoprecipitated、IB; immunoblotting、H.C; immunoglobulin heavy chains.

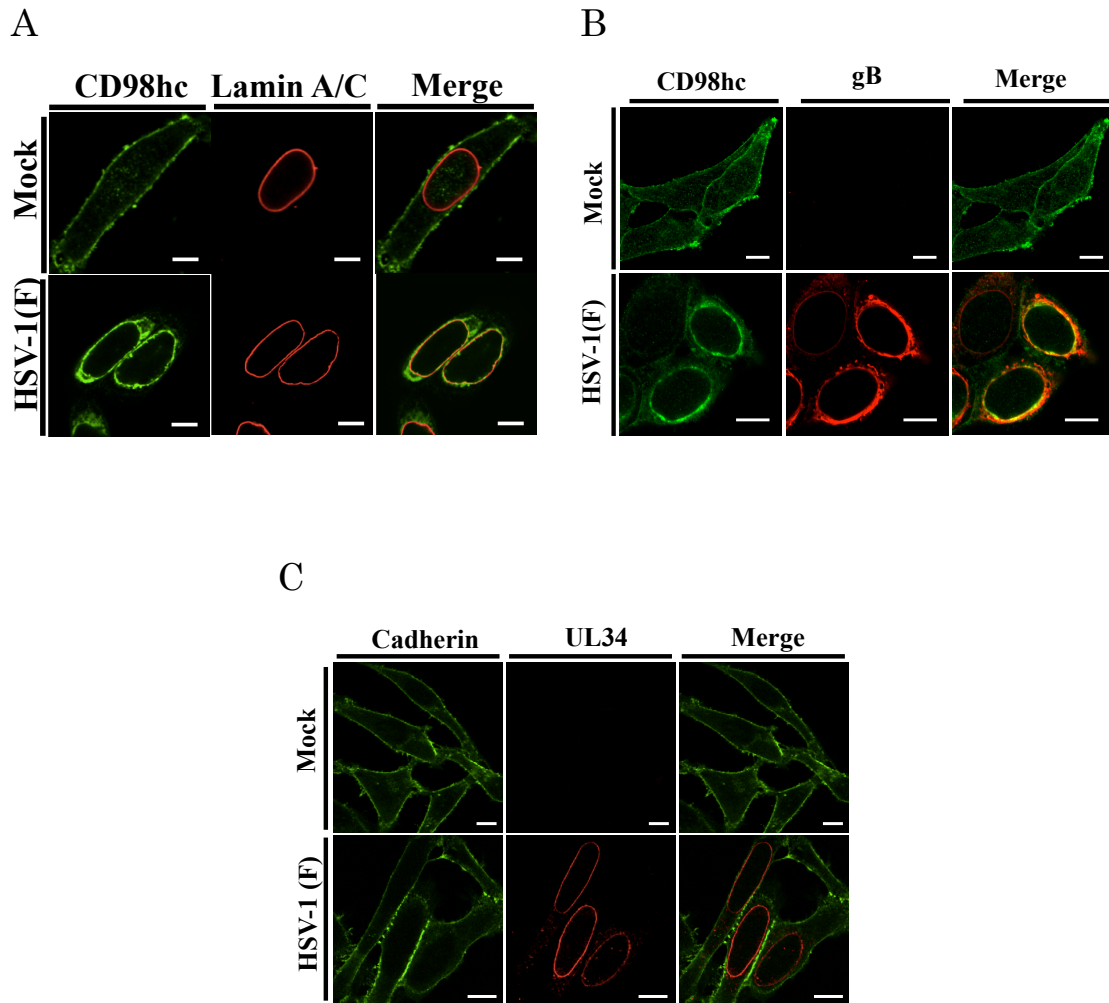


図9. HSV-1感染によるCD98hcの局在への影響; HEp-2細胞に野生型ウイルスをMOI=5で感染させ、24時間 (A、C)、16時間 (B)後に固定し、膜透過処理後に、抗CD98hc、LaminA/C (A)、gB (B)、pan-cadherinおよびUL34 (C)抗体で染色し、共焦点顕微鏡にて観察した。Bars, 10 μ m.

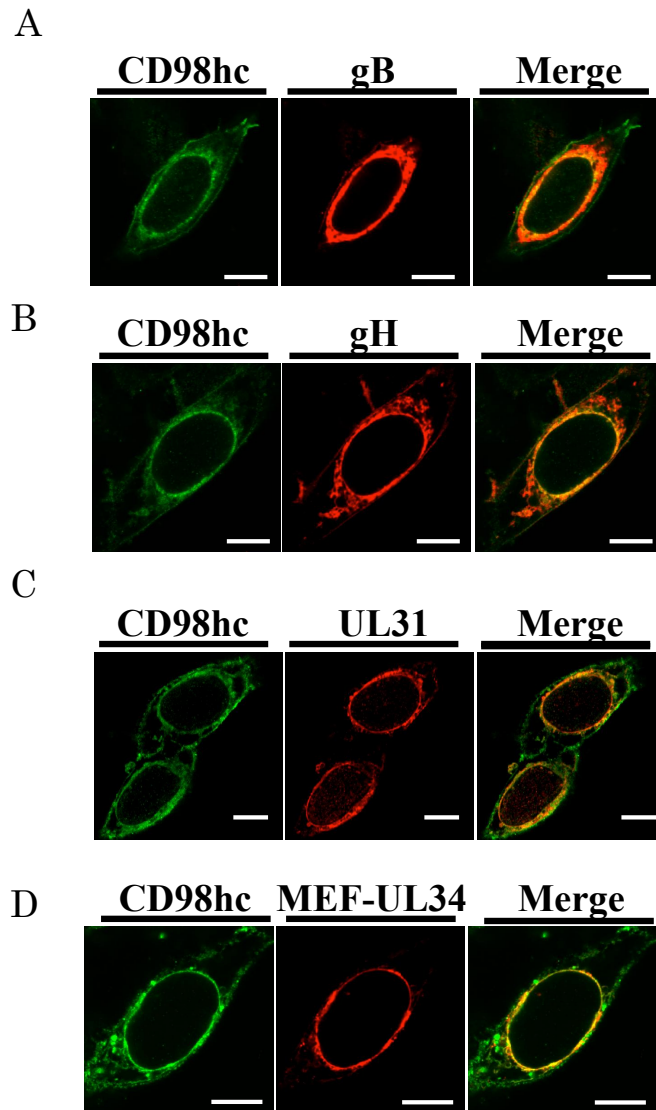


図 10. HSV-1 感染による CD98hc の局在変化および gB、gH、UL31 および UL34 との共局在; HEp-2 細胞に野生型ウイルスを MOI=5 で感染させ、24 時間後に固定し、膜透過処理後に、抗 CD98hc および gB (A)、gH (B)、UL31 (C) および flag (D) 抗体で染色し、共焦点顕微鏡にて観察した。Bars, 10 μ m.

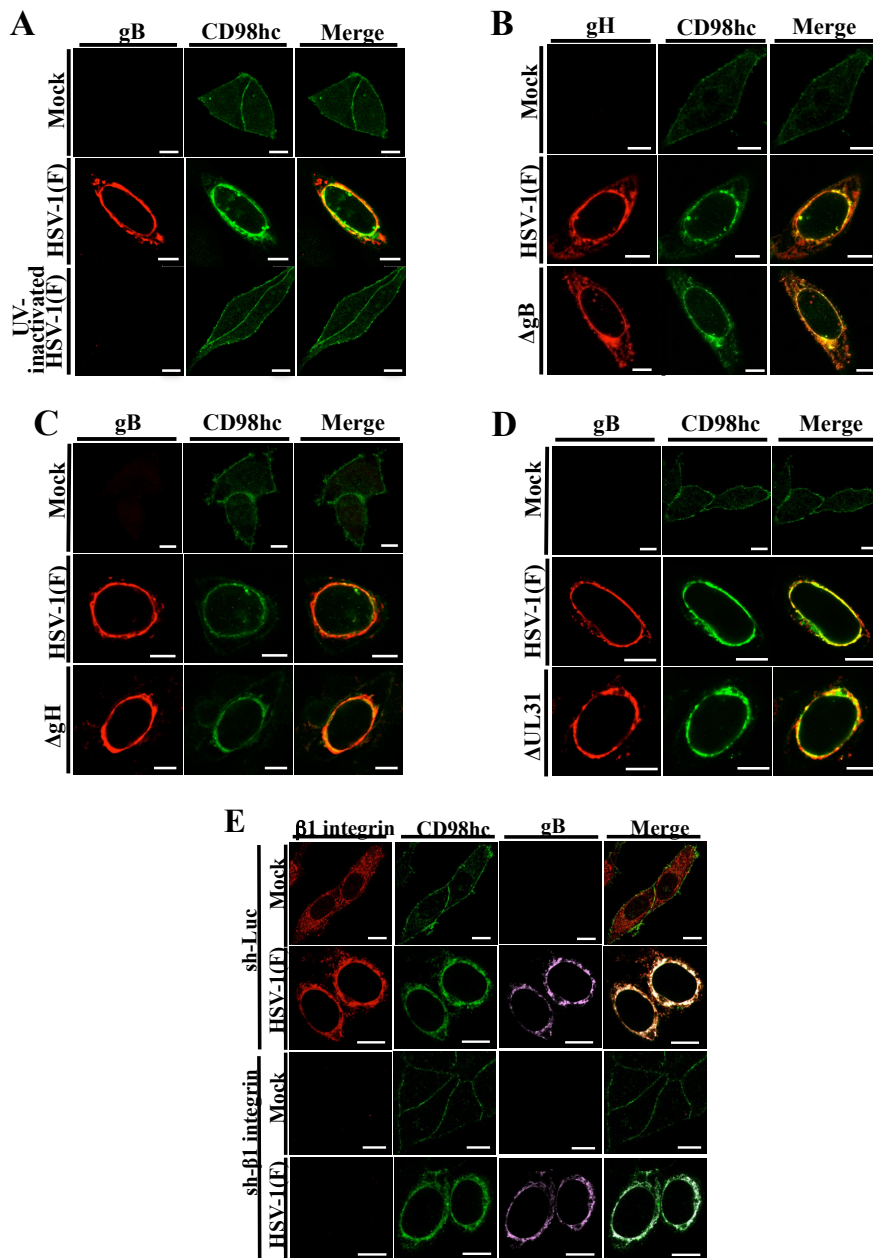


図 11. UV 不活化、gB 欠損、gH 欠損、UL31 欠損ウイルスおよび $\beta 1$ integrin 発現抑制による HSV-1 感染における CD98hc の核膜への移行への影響 (A to D) HEp-2 細胞に野生型ウイルスおよび UV 不活化 (A)、YK701 (Δ gB) (B)、YK713 (Δ gH) (C)、YK720 (Δ UL31) (D) ウイルスを MOI=5 で感染させ、24 時間後に固定し、膜透過処理後に、抗 CD98hc、gB(A,C,D)、gH (B) 抗体で検出し、共焦点顕微鏡にて観察した。(E) sh-Luc-HEp-2 細胞および sh- $\beta 1$ integrin-HEp-2 細胞に野生型ウイルスを MOI=5 で感染させ、24 時間後に固定し、膜透過処理後に、抗 $\beta 1$ integrin、CD98hc、gB 抗体で検出し、共焦点顕微鏡にて観察した。Bars, 10 μ m.

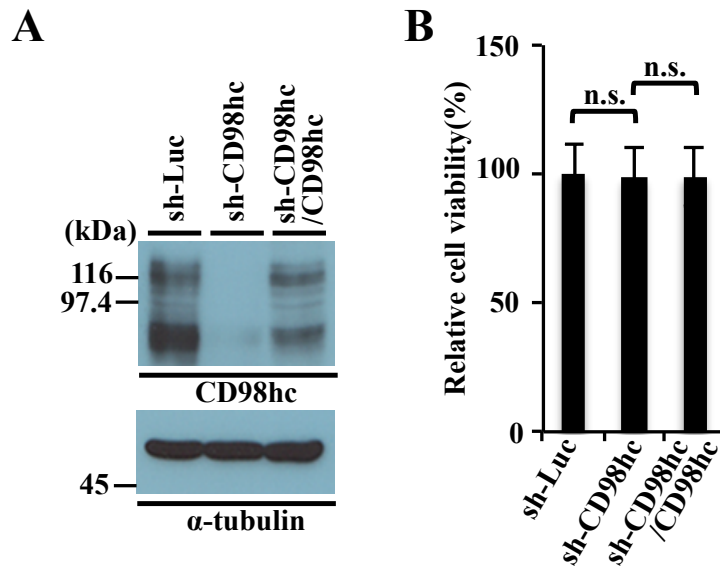


図 12. CD98hc 発現抑制細胞における CD98hc の発現および viability への影響 ; (A) sh-Luc-HEp2 細胞、sh-CD98hc-HEp-2 細胞、sh-CD98hc/CD98hc-HEp-2 細胞を可溶化し、抗 CD98hc および α -tubulin 抗体で検出した。(B) 96well プレートに 2×10^4 個の sh-Luc-HEp2 細胞、sh-CD98hc-HEp-2 細胞、sh-CD98hc/CD98hc-HEp-2 細胞をそれぞれ撒き、WST 8 試薬を用いて viability を測定した。3 回の独立した実験から得られた測定値の平均値を sh-Luc-HEp-2 細胞の値を 100%とした時の sh-CD98hc-HEp-2 細胞、sh-CD98hc/CD98hc-HEp-2 細胞の値を算出した。n.s.; not statistically significant.

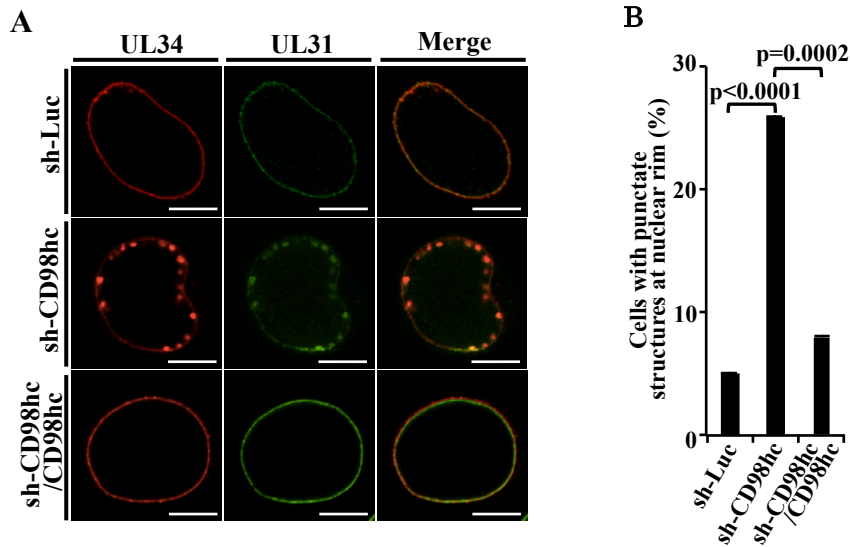
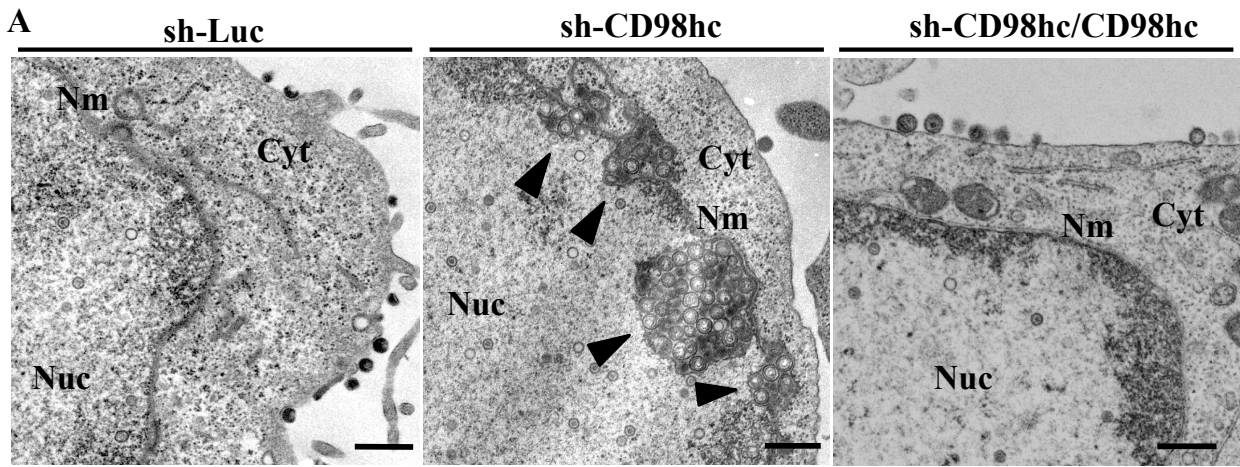


図 13. CD98hc 発現抑制による HSV-1 感染時の UL31、UL34 の局在への影響 ; (A) sh-Luc-HEp2 細胞、sh-CD98hc-HEp-2 細胞、sh-CD98hc/CD98hc-HEp-2 細胞に野生型ウイルスを MOI=5 で感染させ、24 時間後に固定し、膜透過処理後に、抗 UL31、UL34 抗体で検出し、共焦点顕微鏡にて観察した。Bars, 10 μ m. (B) (A)の実験から、UL31 および UL34 が核膜近傍でパンクテッド構造をとる細胞の割合を算出し、3 回の独立した実験から得られた測定値の平均値を算出した。



B

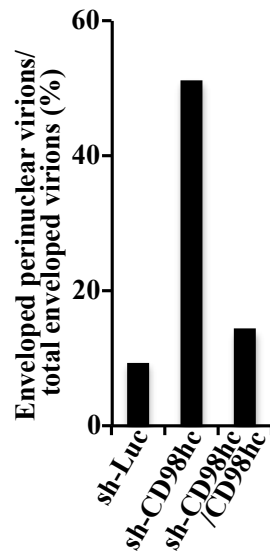


図 14. CD98hc 発現抑制による HSV-1 核膜通過への影響 ; (A) sh-Luc-HEp2 細胞、sh-CD98hc-HEp-2 細胞、sh-CD98hc/CD98hc-HEp-2 細胞に野生型ウイルスを MOI=10 で感染させ、24 時間後に固定し、エポキシ樹脂に包埋、超薄切片化、染色後に透過型電子顕微鏡にて観察した。Bars, 500nm. (B) (A)の実験から、核膜周辺で一次エンベロープを獲得した粒子の数の割合を算出した。Nuc,核、NM,核膜、Cyt,細胞質

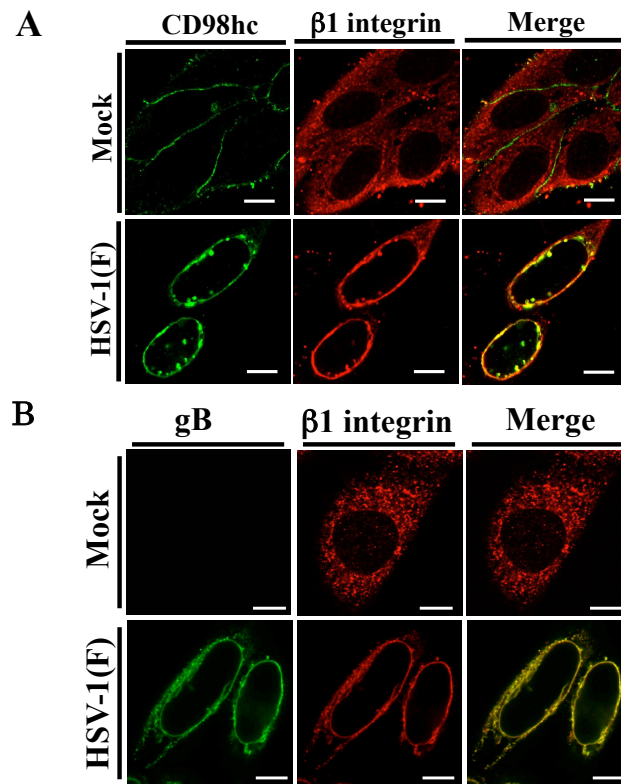


図 15. HSV-1 感染による $\beta 1$ integrin の局在への影響; HEp-2 細胞に野生型ウイルスを MOI=5 で感染させ、24 時間 (A)、16 時間 (B) 後に固定し、膜透過処理後に、抗 CD98hc、 $\beta 1$ integrin (A,B) および gB (B) 抗体で染色し、共焦点顕微鏡にて観察した。

Bars, 10 μ m.

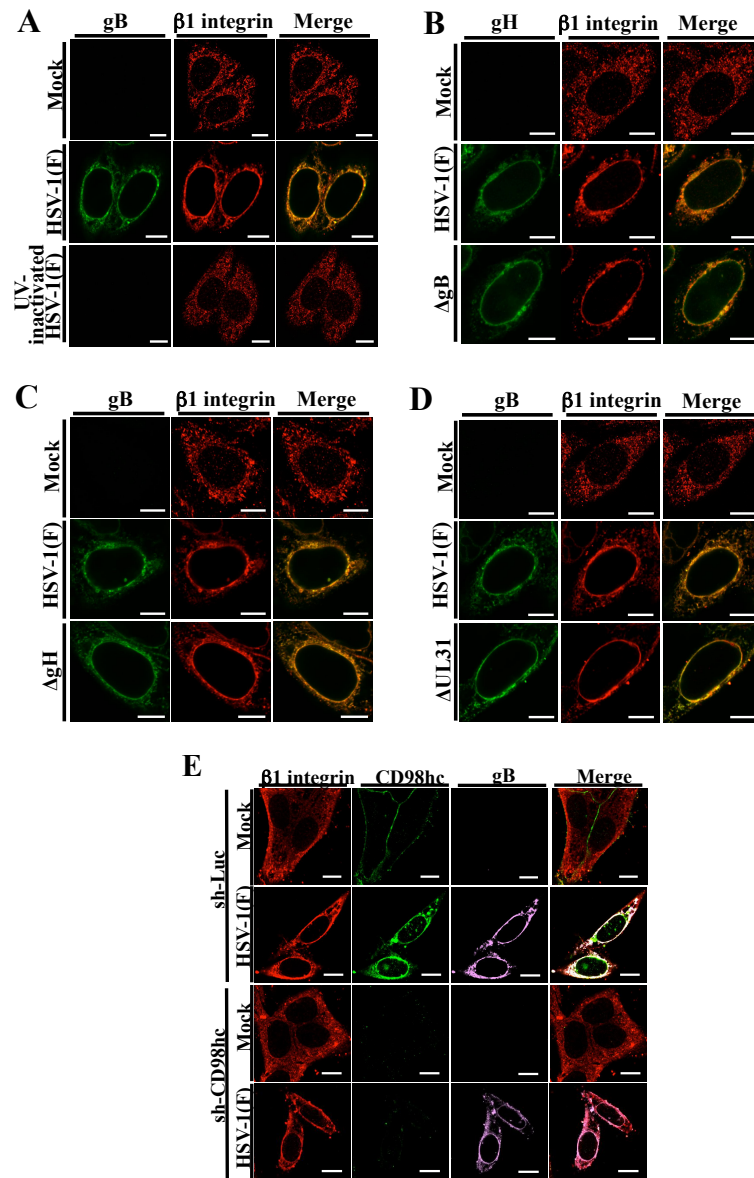


図 16. UV 不活化、gB 欠損、gH 欠損、UL31 欠損ウイルスおよび CD98hc 発現抑制による HSV-1 感染における $\beta 1$ integrin の核膜への移行への影響。(A to D) HEp-2 細胞に野生型ウイルスおよび UV 不活化 (A)、YK701 (Δ gB) (B)、YK713 (Δ gH) (C)、YK720 (Δ UL31) (D) ウイルスを MOI=5 で感染させ、24 時間後に固定し、膜透過処理後に、抗 $\beta 1$ integrin、gB(A,C,D)、gH (B) 抗体で検出し、共焦点顕微鏡にて観察した。(E) sh-Luc-HEp-2 細胞および sh-CD98hc-HEp-2 細胞に野生型ウイルスを MOI=5 で感染させ、24 時間後に固定し、膜透過処理後に、抗 $\beta 1$ integrin、CD98hc、gB 抗体で検出し、共焦点顕微鏡にて観察した。Bars, 10 μ m.

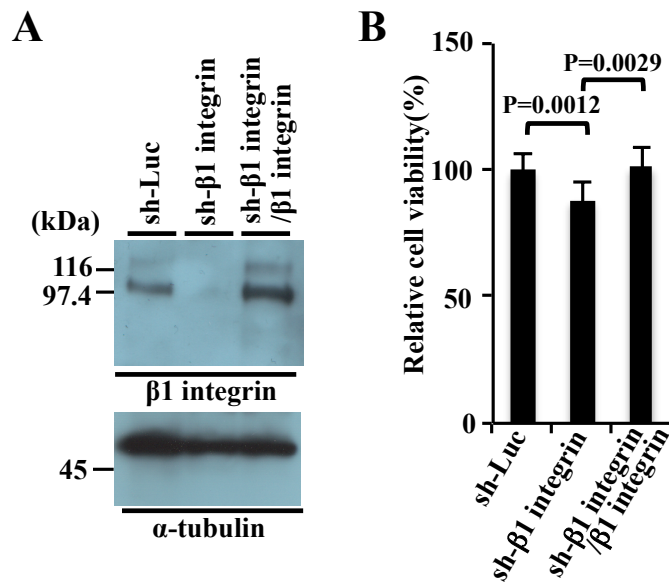


図 17. $\beta 1$ integrin 発現抑制細胞におけるの $\beta 1$ integrin 発現および viability ; (A) sh-Luc-HEp2 細胞、sh- $\beta 1$ integrin-HEp-2 細胞、sh- $\beta 1$ integrin / $\beta 1$ integrin-HEp-2 細胞を可溶化し、抗 $\beta 1$ integrin および α -tubulin 抗体で検出した。(B) 96well プレートに 2×10^4 個の sh-Luc-HEp2 細胞、sh- $\beta 1$ integrin-HEp-2 細胞、sh- $\beta 1$ integrin / $\beta 1$ integrin-HEp-2 細胞をそれぞれ撒き、WST 8 試薬を用いて viability を測定した。3 回の独立した実験から得られた測定値の平均値を sh-Luc-HEp-2 細胞の値を 100%とした時の sh- $\beta 1$ integrin-HEp-2 細胞、sh- $\beta 1$ integrin / $\beta 1$ integrin-HEp-2 細胞の値を算出した。n.s.; not statistically significant.

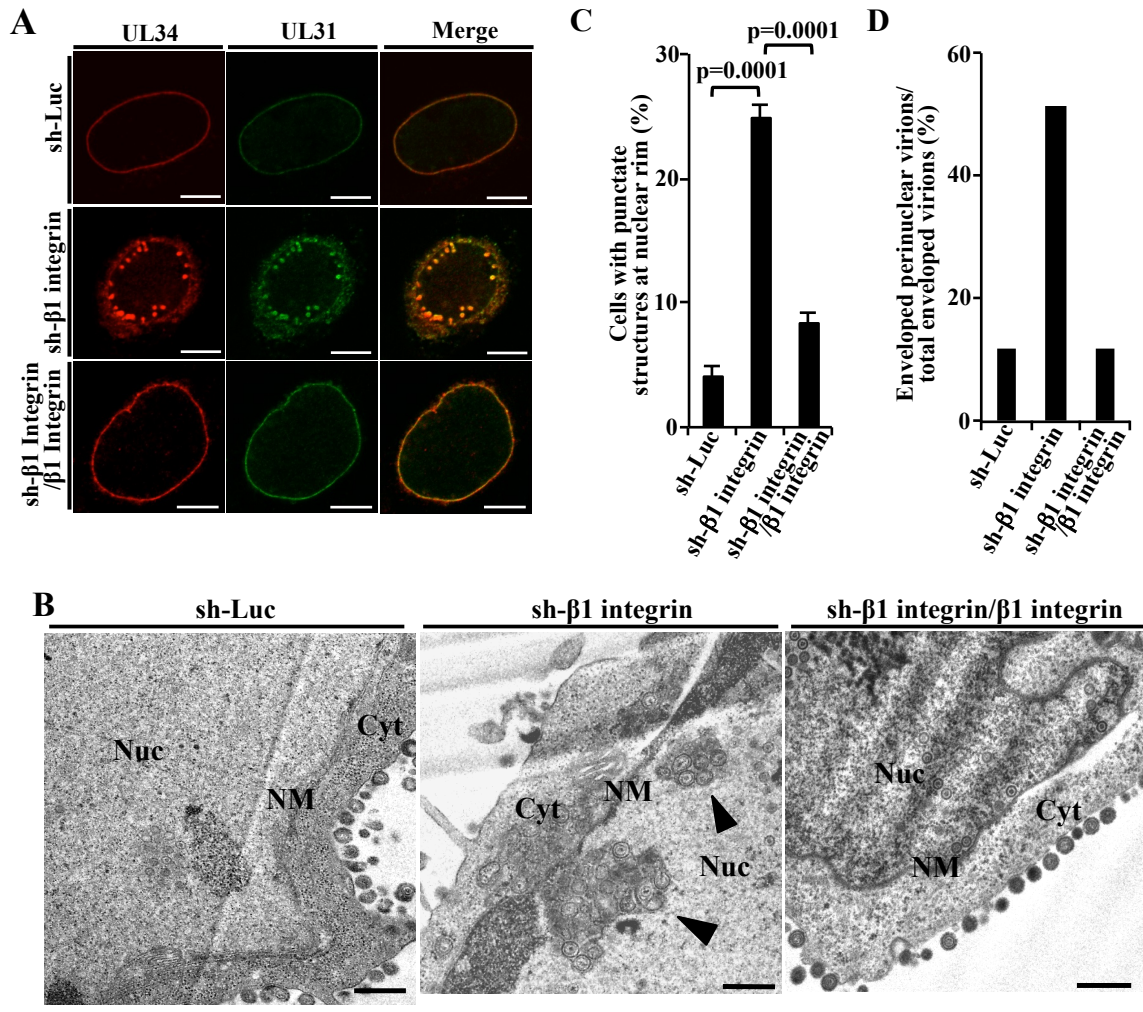


図 18. $\beta 1$ integrin 発現抑制による HSV-1 感染時の UL31、UL34 の局在および核膜通過への影響 ; (A) sh-Luc-HEp2 細胞、sh- $\beta 1$ integrin-HEp-2 細胞、sh- $\beta 1$ integrin/ $\beta 1$ integrin-HEp-2 細胞に野生型ウイルスを MOI=5 で感染させ、24 時間後に固定し、膜透過処理後に、抗 UL31、UL34 抗体で検出し、共焦点顕微鏡にて観察した。Bars, 10 μ m. (B) sh-Luc-HEp2 細胞、sh-CD98hc-HEp-2 細胞、sh-CD98hc/CD98hc-HEp-2 細胞に野生型ウイルスを MOI=10 で感染させ、24 時間後に固定し、エポキシ樹脂に包埋、超薄切片化、染色後に透過型電子顕微鏡にて観察した。Bars, 500nm. (C) (A)の実験から、UL31 および UL34 が核膜近傍でパンクテッド構造をとる細胞の割合を算出し、3 回の独立した実験から得られた測定値の平均値を算出した。(D) (B)の実験から、核膜周辺で一次エンベロープを獲得した粒子の数の割合を算出した。Nuc,核、NM,核膜、Cyt,細胞質

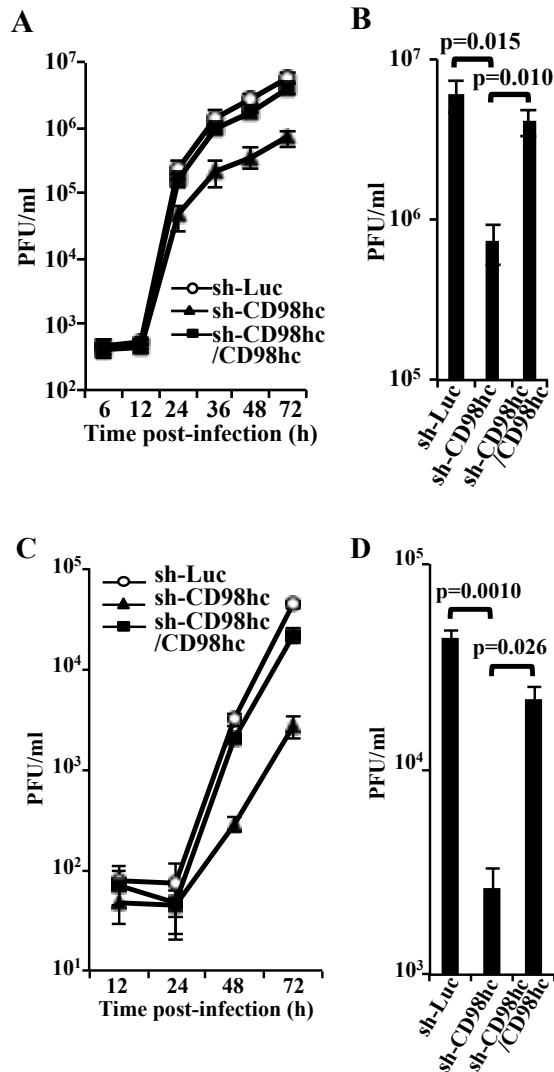


図 19. CD98hc の発現抑制による HSV-1 の増殖能への影; (A) sh-Luc-HEp2 細胞、sh-CD98hc-HEp-2 細胞、sh-CD98hc/CD98hc-HEp-2 細胞に野生型ウイルスを MOI=0.05 で感染させ、6,12,24,36,48,72 時間後の培養上清および細胞内のウイルス力価を測定し、3 回の独立した実験から得られた測定値の平均値を算出した。(B) (A)の結果から、72 時間後における値を示した。(C) sh-Luc-HEp2 細胞、sh-CD98hc-HEp-2 細胞、sh-CD98hc/CD98hc-HEp-2 細胞に野生型ウイルスを MOI=0.05 で感染させ、12,24,48,72 時間後の培養上清のウイルス力価を測定し、3 回の独立した実験から得られた測定値の平均値を算出した。(D) (C)の結果から、72 時間後における値を示した。

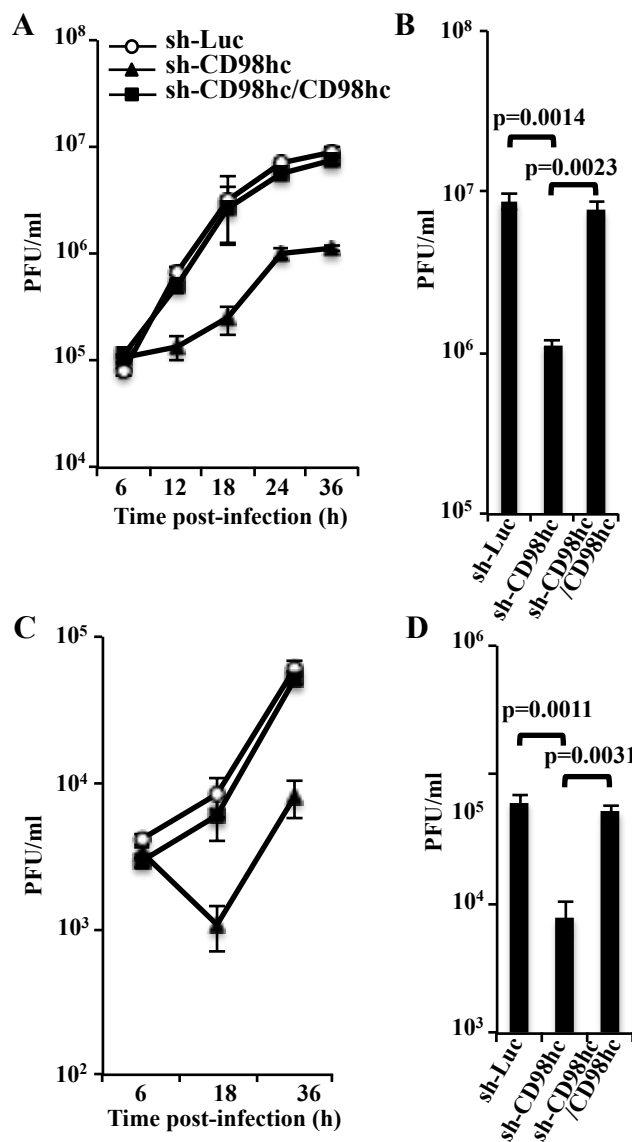


図 20. CD98hc の発現抑制による HSV-1 の増殖能への影響; (A) sh-Luc-HEp2 細胞、sh-CD98hc-HEp-2 細胞、sh-CD98hc/CD98hc-HEp-2 細胞に野生型ウイルスを MOI=5 で感染させ、6,12,18,36 時間後の培養上清および細胞内のウイルス力価を測定し、3 回の独立した実験から得られた測定値の平均値を算出した。(B) (A)の結果から、36 時間後における値を示した。(C) sh-Luc-HEp2 細胞、sh-CD98hc-HEp-2 細胞、sh-CD98hc/CD98hc-HEp-2 細胞に野生型ウイルスを MOI=5 で感染させ、6,18,36 時間後の培養上清のウイルス力価を測定し、3 回の独立した実験から得られた測定値の平均値を算出した。(D) (C)の結果から、36 時間後における値を示した。

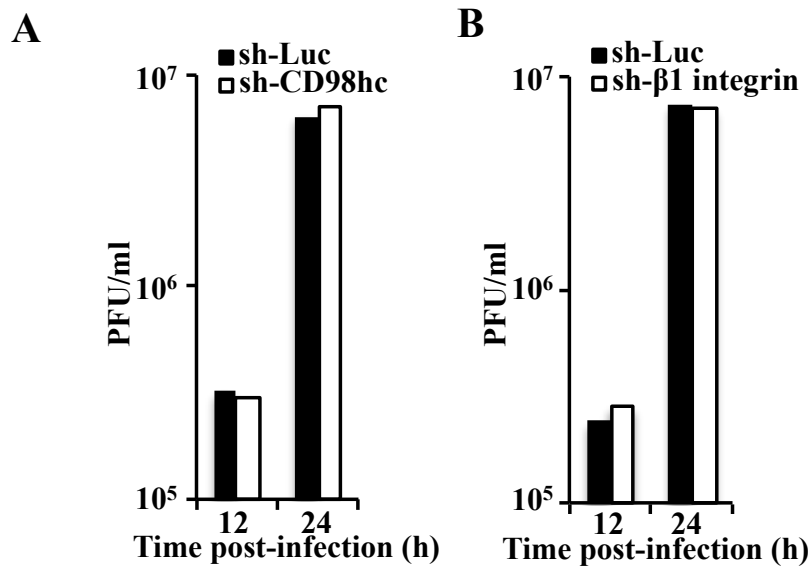


図 21. CD98hc の発現抑制によるインフルエンザウイルスの増殖能への影響; sh-Luc-HEp2 細胞、sh-CD98hc-HEp-2 細胞 (A)、sh- β 1 integrin-HEp-2 細胞 (B)に influenza virus (A/WSN/33 (H1N1)) を MOI=0.01 で感染させ、12、24 時間後に培養上清のウイルス力価を測定した。

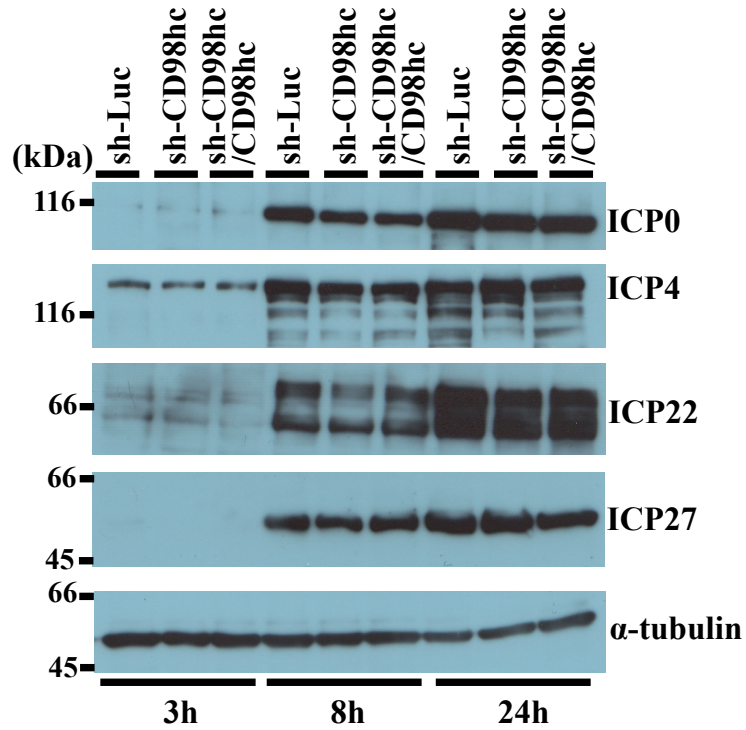


図 22. CD98hc の発現抑制による HSV-1 前初期遺伝子の発現への影響; sh-Luc-HEp2 細胞、sh- β 1 integrin-HEp-2 細胞、sh- β 1 integrin/ β 1 integrin-HEp-2 細胞に野生型ウイルスを MOI=5 で感染させ、3,8,24 時間後に回収し、可溶化後、抗 ICP0、ICP4、ICP22、ICP27 および α -tubulin 抗体で検出した。

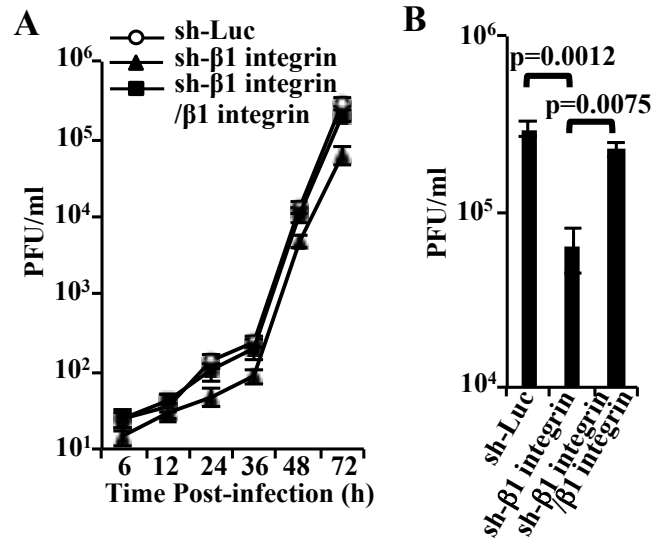


図 23. $\beta 1$ integrin の発現抑制による HSV-1 の増殖能への影響; (A)sh-Luc-HEp2 細胞、sh- $\beta 1$ integrin-HEp-2 細胞、sh- $\beta 1$ integrin/ $\beta 1$ integrin-HEp-2 細胞に野生型ウイルスを MOI=0.05 で感染させ、6,12,24,36,48,72 時間後の培養上清のウイルス力価を測定し、3回の独立した実験から得られた測定値の平均値を算出した。(B) (A)の結果から、36 時間後における値を示した。

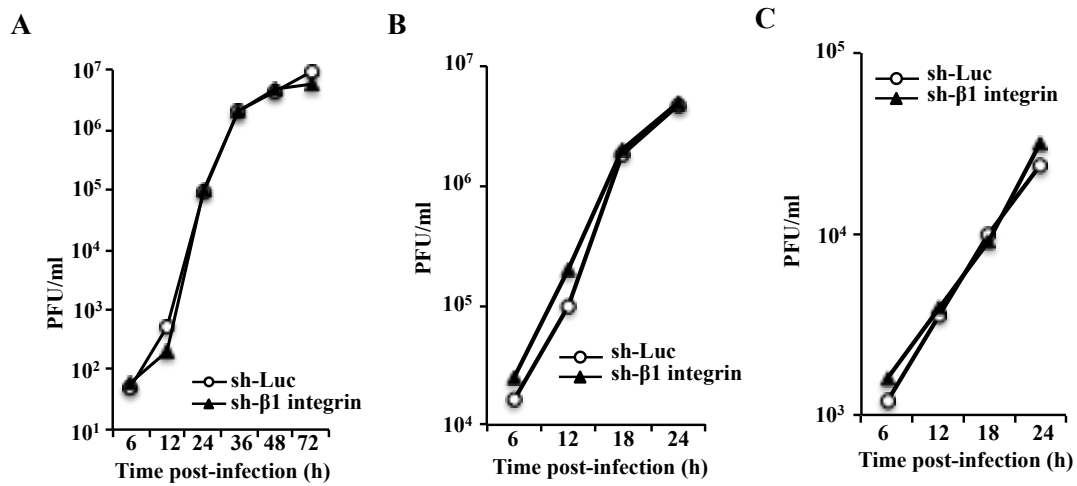


図. 24. $\beta 1$ integrin の発現抑制による HSV-1 の増殖能への影響; (A) sh-Luc-HEp2 細胞、sh- $\beta 1$ integrin-HEp-2 細胞に野生型ウイルスを MOI=0.05 (A)、5 (B,C) で感染させ、6,12,24,36,48,72 時間後の培養上清および細胞内 (A,B) 培養上清 (C) のウイルス力価を測定した。

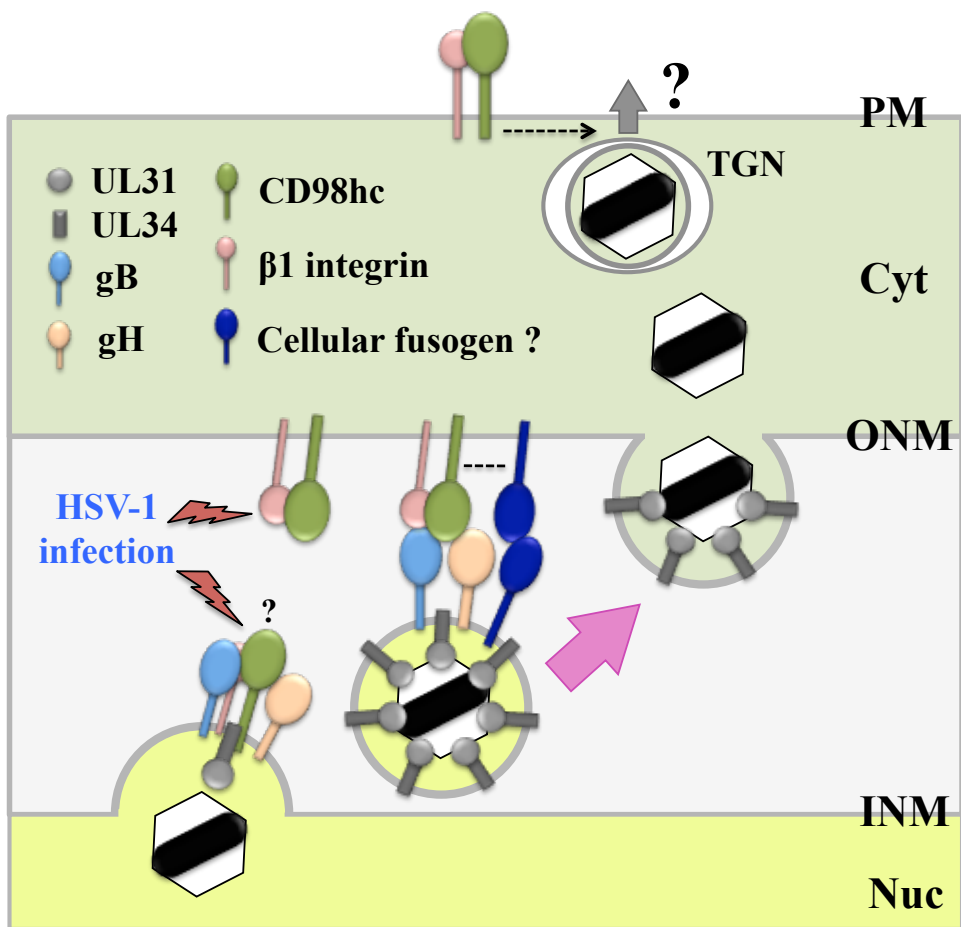


図 25. HSV-1 粒子成熟における CD98hc/ β 1 integrin を介した効率的な de-envelopment の新たなモデル; CD98hc は HSV-1 感染細胞において β 1 integrin と複合体を形成し、核膜に集積する。CD98hc および β 1 integrin は、核膜において HSV の核膜通過に関与が報告されているウイルス因子である gB、gH、UL31、UL34 および Us3 と複合体を形成する。CD98hc/ β 1 integrin を介した膜融合制御システムは核膜において、おそらく宿主の膜融合因子(cellular fusogen)と相互作用し、HSV-1 の一次エンベロープと核外膜の融合を促進することで、効率的なヌクレオカプシドの細胞質への放出に寄与する。Nuc,核、INM,核内膜、ONM,核外膜、Cyt,細胞質、PM,細胞膜。

5. 考察

先行報告において、抗 CD98hc 抗体の処理によってエンベロープウイルスである Newcastle disease virus (NDV)、Human immunodeficiency virus (HIV) 感染における細胞融合が亢進し、Human parainfluenza virus type 2 (HPIV-2) 感染における細胞融合が阻害されることから、CD98hc は膜融合を制御することが示唆されている。また、その抗 CD98hc 抗体による膜融合活性の変化には、NDV および HPIV-2 のエンベロープ糖タンパク質である F、HN または HIV のエンベロープ糖タンパク質である gp120 が寄与する (31-34)。また、CD98hc の膜融合制御への関与は、ウイルス因子が存在しない状況下において報告されている。抗 CD98hc 抗体処理によって、ヒト末梢血単球細胞 (human peripheral blood monocytes) の細胞融合が誘導され、CD98hc の発現抑制によりヒト栄養膜細胞株である BeWo 細胞 (cytotrophoblast-derived BeWo cells) の forsklin を介した膜融合が阻害されることが報告されている (46, 47)。さらに、抗 CD98hc 抗体の処理による HIV 感染における単球細胞の細胞融合の促進は、抗 $\beta 1$ integrin 抗体による処理で阻害されることが報告されている (32)。また $\beta 1$ integrin は CD98hc と複合体を形成することが報告されている (30)。先行報告におけるこれらの知見は、CD98hc は $\beta 1$ integrin と協調的にウイルス感染細胞における膜融合の制御しうることを示唆し、この CD98hc/ $\beta 1$ integrin 複合体を介した膜融合の制御機能が、HSV-1 の核膜通過における一次エンベロープと核外膜の融合過程にも寄与する可能性が考えられた。本研究において、この可能性を支持する結果が得られている。まず、先行報告から HSV-1 は核内膜を覆う Lamin の崩壊に寄与する宿主因子 PKC を核膜に移行させることが知られているが (48)、CD98hc および $\beta 1$ integrin は PKC 同様に HSV-1 感染細胞において、核膜に移行した。さらに、CD98hc および $\beta 1$ integrin の発現抑制は、(i) de-envelopment の必須因子である UL31 およびそのパートナー因子である UL34 の局在が一定の割合で変化し、(ii) 一次エンベロープを獲得したウイルス粒子が核内外膜間に蓄積し、核内への陥入構造体の形成が確認され、(iii) 野生型 HSV の上清中へのウイルス産生が阻害された。これらの結果から、CD98hc および $\beta 1$ integrin は HSV-1 の核膜通過における一次エンベロープと核外膜の融合を促進し、効率的なウイルス成熟に寄与していると考えられる。また CD98hc は細胞外へのウイルス放出にも寄与する可能性も考えられる。

本研究によって、CD98hc は、HSV-1 感染細胞において、 $\beta 1$ integrin および、HSV-1 の核膜通過における de-envelopment への関与が示唆されている gB、gH、Us3、UL31 およびそのパートナー因子である UL34 と複合体を形成することが明らかになった。先行報告において、Us3 の欠損変異およびリン酸化活性消失変異ウイルス、UL31 の Us3 によるリン酸化部位変異ウイルス、gB および gH の二重欠損変異ウイルス、gB の Us3 によるリン酸化部位変異および gH 欠損変異ウイルス感染細胞においては、一次エンベロープを獲得したウイルス粒子の核内外膜間への蓄積および、核内への陥入構造体の形成が観察されることが知られている (19, 24-27, 43)。先行報告において、野生型ウイルス感染細胞におけるエンベロープを獲得したウイルス粒子の内、38-74%が細胞表面に観察されるのに対し、gB、gH の二重欠損ウイルスまたは Us3 欠損ウイルス感染細胞においては、75-85%が核内外膜間および核内の陥入構造体中に蓄積した一次エンベロープを獲得したウイルス粒子であった (19, 43)。本研究において、CD98hc または $\beta 1$ integrin の発現抑制細胞に野生型ウイルスを感染させた場合に、これらの先行報告と同様の傾向が観察された。

本研究において、(i) HSV-1 感染細胞において CD98hc と $\beta 1$ integrin は、複合体を形成して核膜に局在し、(ii) CD98hc および $\beta 1$ integrin の発現抑制によって HSV-1 ウイルス粒子の核外膜からの脱出過程が阻害された。これらの知見から、我々は、CD98hc が $\beta 1$ integrin および HSV-1 の de-envelopment を制御するウイルス因子と複合体を形成し、効率的なウイルス産生のために de-envelopment を促進するという新たなモデルを提唱する (図 23)。また、CD98hc および $\beta 1$ integrin の発現抑制細胞において、細胞質中のエンベロープを獲得したウイルス粒子の数はコントロール細胞と比べて差が見られないのに対し、一次エンベロープを獲得したウイルス粒子の割合が増加し、細胞表面のウイルス粒子の割合が低下したという結果から、CD98hc および $\beta 1$ integrin は HSV-1 ウイルス粒子成熟過程における、de-envelopment 以降の過程である、最終エンベロープを獲得したウイルス粒子の細胞外への輸送過程においても寄与する可能性が示唆される。

これまで述べてきたように、先行報告から、gB および gH の二重欠損ウイルスは、顕著に HSV-1 の de-envelopment が阻害されることが示されているが、一方で、gB または gH それぞれの欠損ウイルスではそのような表現型が観察されないことが報告されている(19)。これらの知見は、gB と gH は HSV-1 de-envelopment に関してお互いが独立に機能するこ

とを示唆している。本研究から、CD98hc および gB または gH をそれぞれ過剰発現させた細胞において、CD98hc が gB または gH とそれぞれ共沈降することを明らかにした。この結果から、gB と gH は、それぞれが単独で CD98hc と結合しうることを、また、その結合は他のウイルス因子に依存しないことが示唆された。gB と gH の二重欠損ウイルスにおいて、de-envelopment が阻害されることから(19)、CD98hc と gB および gH がそれぞれ単独で相互作用しうるという本知見は、CD98hc が de-envelopment を制御する宿主因子であることを支持する。(i) CD98hc および $\beta 1$ integrin の一部の結晶構造は決定されているが、その構造は膜融合を引き起こすタンパク質の構造と類似しないこと (49, 50)、(ii) HSV-1 ウイルス因子の中で膜融合を引き起こす活性があるタンパク質は、Vesicular stomatitis virus (VSV) のエンベロープタンパク質 G と構造上のホモロジーが見られることが報告されている gB のみであること (14)、(iii) *Drosophila* の神経細胞において、リボヌクレオ蛋白質 (RNP) 複合体の核外輸送に膜小胞を介した核外輸送機構が存在し、その機構は細胞因子のみで行われること (20) から、HSV-1 の核膜通過における一次エンベロープと核外膜の膜融合過程には、膜融合を引き起こす宿主因子が必須であると考えられる。gB は HSV-1 のウイルス因子において現時点で唯一膜融合を引き起こす因子だと考えられている。一方で、細胞侵入においては他のウイルス因子 gD および gH/gL との複合体の形成がその活性に必要であることから、gB は核膜通過において、CD98hc、gH、UL31、UL34、Us3 および未知の宿主因子と相互作用することで、細胞侵入時とは全く異なる方法で、一次エンベロープと核外膜との融合に寄与している可能性が考えられる。また、gB の欠損ウイルスで、一次エンベロープ膜と核外膜の融合の阻害が見られないという知見は、gB 以外の、おそらく宿主の膜融合に関わる因子がこの複合体に含まれる可能性を示唆している。CD98hc は結晶構造解析から、ホモヘテロダイマーを形成することが示唆されている。CD98hc のホモヘテロダイマーは膜に面した側の表面上の電荷の影響から、膜を変形させる可能性が示唆されている (49)。膜融合の際には、膜の変形が膜と膜の間の距離を近接させる過程に必須である。CD98hc はこの過程に寄与することで、一次エンベロープ膜と核外膜との融合を促進している可能性が考えられる。また、gB および gH は、全てのヘルペスウイルスに保存されたエンベロープ糖タンパク質であることから、CD98hc が両因子と相互作用しうるという知見は、CD98hc がヘルペスウイルスの De-envelopment に普遍的に寄与することを示唆し

ている。

過去の報告から、HSV-1 de-envelopment のモデルにおいて、膜融合に寄与する宿主因子の存在は明らかされていなかった。近年 Maric らの報告において、宿主の ATPase である *tosinA* の過剰発現細胞において、細胞質中に一次エンベロープ獲得粒子様の二重膜に包まれたウイルス粒子が増加することから、*tosinA* が HSV-1 de-envelopment に寄与する宿主因子であることを主張したが (28)、これらの解析は、artificial な過剰発現系によるものであり、生理的な発現状態での貢献は未解明であった。しかし、同グループの以降の解析から、野生型ウイルスを感染させた *tosinA* の欠損マウス胚性線維芽細胞 (Tor^{-/-} MEFs) において、核膜に大きな欠損部位が生じ、核膜の崩壊が引き起こされることが示された (51)。また、gB および gH の二重欠損ウイルスまたは UL34 欠損ウイルスを感染させた場合、核膜の崩壊が引き起こされないことから、*tosinA* は HSV-1 感染において、おそらく gB、gH または UL34 によって引き起こされる核膜の崩壊機構を阻害する因子であると考えられている。HSV-1 de-envelopment への関与が示唆されている gB、gH、Us3 および UL31 変異ウイルスで観察される、一次エンベロープを獲得したウイルス粒子の核内外膜間への蓄積および、核内への陥入構造体の形成が、CD98hc または $\beta 1$ integrin の発現抑制細胞においても観察されたことから、CD98hc および $\beta 1$ integrin は、HSV-1 de-envelopment を制御する新規宿主因子であると考えられる。

今後、宿主細胞側の膜融合を直接的に引き起こす因子の同定および CD98hc、 $\beta 1$ integrin が HSV-1 感染細胞において核膜へ移行するメカニズムの解明を行うことが、HSV-1 による膜小胞を介した核外輸送機構を解明する為に必要であると考えられる。本解析において、少なくとも gB、gH、UL31、CD98hc または $\beta 1$ integrin がその輸送に必須ではないことが明らかになった。先行報告において、CD98hc および $\beta 1$ integrin は、ガラクトースに結合することが知られるレクチン galectin-3 を介して、細胞膜からクラスリン非依存的に輸送小胞にのって細胞内に移行することが報告されている (52)。HSV-1 は、この経路を活性化し、CD98hc および $\beta 1$ integrin を効率的に細胞内へ輸送している可能性が考えられる。

膜融合の過程は、多くの場合その詳細なメカニズムは明らかにされていない。CD98hc と $\beta 1$ integrin は、宿主細胞側の膜融合を直接的に引き起こす因子の探索に当たって、有用性を有する因子であると考えられる。両因子は様々なウイルス感染細胞の細胞融合、ウイル

スが細胞へ侵入する際のウイルスエンベロープと細胞膜の融合、単球細胞の細胞融合、栄養膜細胞の細胞融合に寄与することが報告されている(31, 32, 34, 46, Kudo, 2004 #116, Stewart, 2007 #128, 47, 53)。今後 CD98hc および $\beta 1$ integrin の膜融合制御機構を解明することによって、細胞が行う膜融合機構の一端を解明することが出来る可能性が考えられる。

また、ヘルペスウイルス感染症に対する治療で用いられてきたこれまでの抗ウイルス薬は、ウイルス因子を薬効標的としていたため、ウイルス因子の変異によって薬剤が効かなくなる耐性ウイルスが出現する可能性が除外出来なかった。一方で、宿主側の因子を薬効標的にした場合、ウイルス因子の変異が起こっても阻害効果が期待できる。本研究で焦点を当てた、核膜通過の過程は、現時点で *Drosophila* の神経細胞およびヘルペスウイルス感染細胞でのみ観察された機構であり、極めて特殊な機構であることが予想される。これらの知見から、CD98hc および $\beta 1$ integrin を薬効標的とすることは、効果的かつ副作用を抑えた抗ヘルペスウイルス薬の開発に応用できる可能性があると考えられる。

謝辞

本研究は東京大学 医科学研究所 感染・免疫部門 ウイルス病態制御分野にて行われた。

本研究を遂行するにあたり、この上ない研究環境を与えて頂き、研究および研究生活に関する全てにおいて教授していただき、また 5 年間の研究生活を真摯に支えてくださった、東京大学 医科学研究所 ウイルス病態制御分野 川口 寧 教授に深い感謝と敬意を表します。

ウイルス病態制御分野 加藤 哲久 助教、有井 潤 助教には、研究者としての高い意識ならびに実験のご指導と的確なご助言を賜りました。また、学会発表の資料作製ならびに本論文執筆においても多大なるご助言を賜りましたことをこの場をお借りして厚く感謝申し上げます。

東京大学医科学研究所 疾患プロテオミクスラボラトリー 尾山 大朋 准教授、秦 裕子 技術専門員には、質量解析において多大なるご協力を賜りました。この場をお借りして厚く感謝申し上げます。

東京大学医科学研究所 疾患プロテオミクスラボラトリー 相良 洋 助教には、電子顕微鏡解析において多大なるご協力を賜りました。この場をお借りして厚く感謝申し上げます。

ウイルス病態制御分野 小山 志保子氏、安藤 朋子氏には、実験に関してだけでなく、事務手続きなど多岐にわたり多大なるご協力を賜りました。この場を借りて深い感謝の意を表します。

ウイルス病態制御分野 小柳 直人 博士研究員には、5 年間の研究生活を通じて、実験ならびに研究生活の規律をご指導して頂きました。この場をお借りして深い感謝の意を表します。

日々の研究生活を共にし、私の研究生活に多大なる刺激を与えて下さった、ウイルス病態制御分野の卒業された先輩方ならびに同期、後輩の皆様はこの場をお借りして深く感謝の

意を表します。

最後に、私の 5 年間の研究生生活を、あらゆる面から支えて下さった、家族にこの場をお借りして厚く感謝申し上げます。

参考文献

1. Pellett PE & Roizman B (2013) *Fields Virology* (Lippincott-Williams & Wilkins) 6th Ed.
2. Koelle DM & Corey L (2008) Herpes simplex: insights on pathogenesis and possible vaccines. *Annual review of medicine* 59:381-395.
3. Szucs TD, Berger K, Fisman DN, & Harbarth S (2001) The estimated economic burden of genital herpes in the United States. An analysis using two costing approaches. *BMC infectious diseases* 1:5.
4. Spear PG & Longnecker R (2003) Herpesvirus entry: an update. *Journal of virology* 77(19):10179-10185.
5. Roizman B, Knipe DM, & Whitley RJ (2013) Herpes simplex viruses. *Fields virology*, eds Knipe DM, Howley PM, Cohen JI, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Racaniello VR, & Roizman B (Lippincott-Williams & Wilkins, Philadelphia, PA), 6th Ed, pp 1823-1897.
6. Lehman IR & Boehmer PE (1999) Replication of herpes simplex virus DNA. *The Journal of biological chemistry* 274(40):28059-28062.
7. Johnson DC & Baines JD (2011) Herpesviruses remodel host membranes for virus egress. *Nature reviews. Microbiology* 9(5):382-394.
8. Mettenleiter TC, Muller F, Granzow H, & Klupp BG (2013) The way out: what we know and do not know about herpesvirus nuclear egress. *Cellular microbiology* 15(2):170-178.
9. Montgomery RI, Warner MS, Lum BJ, & Spear PG (1996) Herpes simplex virus-1 entry into cells mediated by a novel member of the TNF/NGF receptor family. *Cell* 87(3):427-436.
10. Geraghty RJ, Krummenacher C, Cohen GH, Eisenberg RJ, & Spear PG (1998) Entry of alphaherpesviruses mediated by poliovirus receptor-related protein 1 and poliovirus receptor. *Science* 280(5369):1618-1620.
11. Warner MS, *et al.* (1998) A cell surface protein with herpesvirus entry activity (HveB) confers susceptibility to infection by mutants of herpes

- simplex virus type 1, herpes simplex virus type 2, and pseudorabies virus. *Virology* 246(1):179-189.
12. Shukla D, *et al.* (1999) A novel role for 3-O-sulfated heparan sulfate in herpes simplex virus 1 entry. *Cell* 99(1):13-22.
 13. Eisenberg RJ, *et al.* (2012) Herpes virus fusion and entry: a story with many characters. *Viruses* 4(5):800-832.
 14. Heldwein EE, *et al.* (2006) Crystal structure of glycoprotein B from herpes simplex virus 1. *Science* 313(5784):217-220.
 15. Chowdary TK, *et al.* (2010) Crystal structure of the conserved herpesvirus fusion regulator complex gH-gL. *Nature structural & molecular biology* 17(7):882-888.
 16. Arii J, *et al.* (2010) Non-muscle myosin IIA is a functional entry receptor for herpes simplex virus-1. *Nature* 467(7317):859-862.
 17. Satoh T, *et al.* (2008) PILRalpha is a herpes simplex virus-1 entry coreceptor that associates with glycoprotein B. *Cell* 132(6):935-944.
 18. Suenaga T, *et al.* (2010) Myelin-associated glycoprotein mediates membrane fusion and entry of neurotropic herpesviruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(2):866-871.
 19. Farnsworth A, *et al.* (2007) Herpes simplex virus glycoproteins gB and gH function in fusion between the virion envelope and the outer nuclear membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(24):10187-10192.
 20. Speese SD, *et al.* (2012) Nuclear envelope budding enables large ribonucleoprotein particle export during synaptic Wnt signaling. *Cell* 149(4):832-846.
 21. Simpson-Holley M, Baines J, Roller R, & Knipe DM (2004) Herpes simplex virus 1 U(L)31 and U(L)34 gene products promote the late maturation of viral replication compartments to the nuclear periphery. *Journal of virology* 78(11):5591-5600.
 22. Bigalke JM, Heuser T, Nicastro D, & Heldwein EE (2014) Membrane deformation and scission by the HSV-1 nuclear egress complex. *Nature communications* 5:4131.

23. Klupp BG, *et al.* (2007) Vesicle formation from the nuclear membrane is induced by coexpression of two conserved herpesvirus proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(17):7241-7246.
24. Reynolds AE, Wills EG, Roller RJ, Ryckman BJ, & Baines JD (2002) Ultrastructural localization of the herpes simplex virus type 1 UL31, UL34, and US3 proteins suggests specific roles in primary envelopment and egress of nucleocapsids. *Journal of virology* 76(17):8939-8952.
25. Mou F, Wills E, & Baines JD (2009) Phosphorylation of the U(L)31 protein of herpes simplex virus 1 by the U(S)3-encoded kinase regulates localization of the nuclear envelopment complex and egress of nucleocapsids. *Journal of virology* 83(10):5181-5191.
26. Wisner TW, *et al.* (2009) Herpesvirus gB-induced fusion between the virion envelope and outer nuclear membrane during virus egress is regulated by the viral US3 kinase. *Journal of virology* 83(7):3115-3126.
27. Wright CC, *et al.* (2009) Fusion between perinuclear virions and the outer nuclear membrane requires the fusogenic activity of herpes simplex virus gB. *Journal of virology* 83(22):11847-11856.
28. Maric M, *et al.* (2011) A functional role for TorsinA in herpes simplex virus 1 nuclear egress. *Journal of virology* 85(19):9667-9679.
29. Deves R & Boyd CA (2000) Surface antigen CD98(4F2): not a single membrane protein, but a family of proteins with multiple functions. *J Membr Biol* 173(3):165-177.
30. Cantor JM & Ginsberg MH (2012) CD98 at the crossroads of adaptive immunity and cancer. *Journal of cell science* 125(Pt 6):1373-1382.
31. Ito Y, *et al.* (1992) Fusion regulation proteins on the cell surface: isolation and characterization of monoclonal antibodies which enhance giant polykaryocyte formation in Newcastle disease virus-infected cell lines of human origin. *Journal of virology* 66(10):5999-6007.
32. Ohta H, *et al.* (1994) Molecular and biological characterization of

- fusion regulatory proteins (FRPs): anti-FRP mAbs induced HIV-mediated cell fusion via an integrin system. *The EMBO journal* 13(9):2044-2055.
33. Ohgimoto S, *et al.* (1995) Molecular characterization of fusion regulatory protein-1 (FRP-1) that induces multinucleated giant cell formation of monocytes and HIV gp160-mediated cell fusion. FRP-1 and 4F2/CD98 are identical molecules. *J Immunol* 155(7):3585-3592.
 34. Okamoto K, *et al.* (1997) An anti-fusion regulatory protein-1 monoclonal antibody suppresses human parainfluenza virus type 2-induced cell fusion. *The Journal of general virology* 78 (Pt 1):83-89.
 35. Liang L, Tanaka M, Kawaguchi Y, & Baines JD (2004) Cell lines that support replication of a novel herpes simplex virus 1 UL31 deletion mutant can properly target UL34 protein to the nuclear rim in the absence of UL31. *Virology* 329(1):68-76.
 36. Liu Z, *et al.* (2014) Herpes simplex virus 1 UL47 interacts with viral nuclear egress factors UL31, UL34, and Us3 and regulates viral nuclear egress. *Journal of virology* 88(9):4657-4667.
 37. Maruzuru Y, *et al.* (2014) Role of herpes simplex virus 1 immediate early protein ICP22 in viral nuclear egress. *Journal of virology* 88(13):7445-7454.
 38. Pertel PE, Fridberg A, Parish ML, & Spear PG (2001) Cell fusion induced by herpes simplex virus glycoproteins gB, gD, and gH-gL requires a gD receptor but not necessarily heparan sulfate. *Virology* 279(1):313-324.
 39. Tanaka Y, *et al.* (2006) The hepatitis B virus X protein enhances AP-1 activation through interaction with Jab1. *Oncogene* 25(4):633-642.
 40. Kato A, *et al.* (2009) Herpes simplex virus 1 protein kinase Us3 phosphorylates viral envelope glycoprotein B and regulates its expression on the cell surface. *Journal of virology* 83(1):250-261.
 41. Tischer BK, von Einem J, Kaufer B, & Osterrieder N (2006) Two-step red-mediated recombination for versatile high-efficiency markerless DNA manipulation in *Escherichia coli*. *BioTechniques* 40(2):191-197.
 42. Morimoto T, *et al.* (2009) Differences in the regulatory and functional

- effects of the Us3 protein kinase activities of herpes simplex virus 1 and 2. *Journal of virology* 83(22):11624-11634.
43. Ryckman BJ & Roller RJ (2004) Herpes simplex virus type 1 primary envelopment: UL34 protein modification and the US3-UL34 catalytic relationship. *Journal of virology* 78(1):399-412.
 44. Tharmalingam S, *et al.* (2011) Calcium-sensing receptor modulates cell adhesion and migration via integrins. *The Journal of biological chemistry* 286(47):40922-40933.
 45. Wang R, *et al.* (2005) Role for beta1 integrin and its associated alpha3, alpha5, and alpha6 subunits in development of the human fetal pancreas. *Diabetes* 54(7):2080-2089.
 46. Higuchi S, *et al.* (1998) Induction of human osteoclast-like cells by treatment of blood monocytes with anti-fusion regulatory protein-1/CD98 monoclonal antibodies. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 13(1):44-49.
 47. Kudo Y & Boyd CA (2004) RNA interference-induced reduction in CD98 expression suppresses cell fusion during syncytialization of human placental BeWo cells. *FEBS letters* 577(3):473-477.
 48. Park R & Baines JD (2006) Herpes simplex virus type 1 infection induces activation and recruitment of protein kinase C to the nuclear membrane and increased phosphorylation of lamin B. *Journal of virology* 80(1):494-504.
 49. Fort J, *et al.* (2007) The structure of human 4F2hc ectodomain provides a model for homodimerization and electrostatic interaction with plasma membrane. *The Journal of biological chemistry* 282(43):31444-31452.
 50. Nagae M, *et al.* (2012) Crystal structure of alpha5beta1 integrin ectodomain: atomic details of the fibronectin receptor. *The Journal of cell biology* 197(1):131-140.
 51. Maric M, Haugo AC, Dauer W, Johnson D, & Roller RJ (2014) Nuclear envelope breakdown induced by herpes simplex virus type 1 involves the activity of viral fusion proteins. *Virology* 460-461:128-137.

52. Lakshminarayan R, *et al.* (2014) Galectin-3 drives glycosphingolipid-dependent biogenesis of clathrin-independent carriers. *Nature cell biology* 16(6):595-606.
53. Stewart PL & Nemerow GR (2007) Cell integrins: commonly used receptors for diverse viral pathogens. *Trends in microbiology* 15(11):500-507.