

論文の内容の要旨

論文題目 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

氏名 廣畑 吉崇

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 の核膜孔を通過するとは考え難い。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 が関わると思われている。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思われている。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、エンベロープ糖蛋白質 gB、gH が関与すると思われている。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。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。

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。

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 $\beta 1$ integrin の共沈降が確認された。

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。

これまでの結果から、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な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。感染細胞中のエンベロープを獲得したウイルス粒子の割合を解析した結果、一次エンベロー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。そこで、 $\beta 1$ 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。

続いて $\beta 1$ integrin が HSV-1 の核膜通過に関与するかを検証するために、 $\beta 1$ 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。

CD98hc とウイルス感染細胞における膜融合に関して、複数の先行報告がある。(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。これらの知見は、CD98hc は $\beta 1$ integrin と協調的にウイルス感染における膜融合を制御してい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移行し、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。