

博士論文

単純ヘルペスウイルス 1 型の粒子形成に関する研究

尾田 真也

博士論文

単純ヘルペスウイルス 1 型の粒子形成に関する研究

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

尾田 真也

目次

要旨	2
序文	3
材料と方法	22
結果	42
考察	71
引用文献	89
謝辞	110

要旨

単純ヘルペスウイルス(HSV)の粒子形成において、テグメント蛋白質間の相互作用が重要であると考えられている。しかしながら、実際に HSV 粒子形成に貢献するテグメント蛋白質間の相互作用を示した報告は極めて少ない。本研究では、(i) ヘルペスウイルスに保存されるテグメント蛋白質 UL51 と UL14 が相互作用すること、(ii) 本相互作用が両蛋白質および TGN46 の細胞内局在を司ること、(iii) また、本相互作用が効率的な二次エンベロープ獲得に寄与することで、HSV 増殖および細胞間伝播を促進することを示す知見を得た。本研究は HSV 粒子形成機構の一端を解明したものである。

序文

ヘルペスウイルス

ヘルペスウイルスは正 20 面体のカプシドに 2 本鎖 DNA を含む DNA ウイルスであり、構造的な特徴としてヌクレオカプシドとエンベロープの間にテグメントと呼ばれる特有の蛋白質層をもつ。ヘルペスウイルスには 200 種類以上のウイルスが分類されており、系統発生学的に α 、 β 、 γ の 3 亜科に細分される。ヒトを宿主とするヘルペスウイルスとして、単純ヘルペスウイルス 1 型 (herpes simplex virus 1: HSV-1)、単純ヘルペスウイルス 2 型 (herpes simplex virus 2: HSV-2)、水痘・帯状疱疹ウイルス (varicella-zoster virus: VZV)、ヒトサイトメガロウイルス (human cytomegalovirus: HCMV)、EB ウイルス (Epstein-Barr virus: EBV)、ヒトヘルペスウイルス 6A (Human herpesvirus 6A; HHV-6A)、ヒトヘルペスウイルス 6B (Human herpesvirus 6B; HHV-6B)、ヒトヘルペスウイルス 7 (Human herpesvirus 7; HHV-7)、カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus: HHV-8) の 9 種類が同定されている。ヘルペスウイルスに共通する特徴として、初感染後に宿主細胞で潜伏感染を成立させ、免疫低下などの種々のストレスに応じて再活性化することが挙げられる[77]。

単純ヘルペスウイルス

α ヘルペスウイルス亜科に属する単純ヘルペスウイルス (herpes simplex virus: HSV) は最初に発見されたヒトのヘルペスウイルスであり、特に集中的に研究されているヘルペスウイルスである。

HSV のウイルス粒子は平均 186nm の球状で、スパイクまで含めると 225nm になり、外側からエンベロープ、テグメント、カプシドの 3 つの構造から構成される。エンベロープは宿主細胞の二重膜に由来し、13 種のウイルス蛋白質が埋め込まれている。テグメントは、前述の通り、カプシドとエンベロープの間に位置するヘルペスウイルスに特徴的な蛋白質の層であり、少なくとも 18 種類以上のウイルス蛋白質を含んでいる (図 1A)。正 20 面体のカプシドは、150 のヘクソン、11 のペントンと 1 つのポータルから成る 162 のカプソメアで構成され、少なくとも 84 種類以上のウイルス蛋白質をコードする約 150kbp の直鎖状 2 本鎖 DNA を内包する[3, 77]。

HSV 感染はヒトに口唇ヘルペス、性器ヘルペス、脳炎、新生児ヘルペスなど多様な病態を引き起こす[49]。HSV には HSV-1 と HSV-2 の 2 つの血清型がある。一般的に、HSV-1 は脳炎や眼疾患など上半身の病態を、HSV-2 は性器ヘルペスなど下半身の病態を引き起こすとされているが、両者の棲み分けは厳密ではない[60]。脳炎を発症した場合、無治療では致死率が 70~90%に達し、抗ヘルペス

ウイルス剤を投与しても 10～20%は死に至り、生存しても半分以上の患者に後遺症が残る。また、HSV 感染症にはアシクロビルなど効果的な抗ウイルス剤が開発されているが、現状の抗 HSV 剤はいずれも増殖期のウイルス感染細胞を標的としており、潜伏部位から HSV を除去することはできない。そのため、一度 HSV に感染すると生涯にわたり潜伏と再活性化のサイクルが繰り返されることになり、重症の場合は再発のたびに抗 HSV 剤を服用することになる。このように HSV 感染症は医学上極めて重要なウイルス性感染症であり、より効果的な予防法や治療法の開発が求められる。

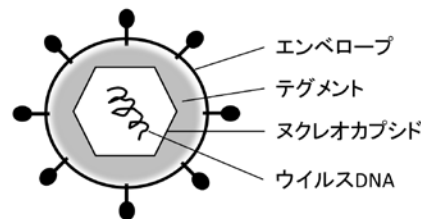
HSV の生活環

HSV の生活環については現在、以下のようなモデルが広く受け入れられている[77]。

HSV の細胞侵入は、エンベロープ糖蛋白質と宿主細胞表面のレセプターとの結合を介してエンベロープと宿主細胞膜が融合し、カプシドが細胞内へ侵入する。その際に、転写因子、核酸分解酵素、プロテインキナーゼ等を含む一部のテグメント蛋白質も細胞質へ放出され、効率的な感染成立に寄与する。細胞質へ放出されたカプシドは、カプシドに付着しているインナーテグメント群と宿主細胞のダイニン、ダイナクチンとの相互作用により微小管上を輸送され核膜

孔に到達し、核内へウイルス DNA を注入する。ウイルス DNA は核内で環状化し、ウイルス遺伝子の転写が開始される。ウイルス遺伝子は発現時期によって α 、 β 、 γ の 3 群に大別される。初めにテグメントに含まれる VP16 によって α 遺伝子群の転写が活性化され、mRNA が細胞質で α 蛋白質に翻訳されて核に移行し、 β 、 γ 遺伝子発現を制御する。 β 遺伝子群はウイルス DNA 複製に関与する β 蛋白質に翻訳され、これらの作用によりウイルス DNA がローリングサイクル機構により複製される。その際、ウイルス DNA の中間体として巨大なコンカテマーを形成する。ウイルス DNA が複製されると構造蛋白質が含まれる γ 遺伝子群が発現してカプシドが生成され、コンカテマーから開裂したウイルス DNA がカプシドへパッケージングされてヌクレオカプシドになる。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することで核内外膜間へ出芽し (primary envelopment)、核外膜と一次エンベロープが融合することで細胞質に放出される。ヌクレオカプシドは細胞質でテグメント蛋白質を獲得した後、細胞質内の Golgi 装置、*trans*-Golgi network (TGN) やエンドソームなどに由来すると考えられる膜構造に出芽することにより二次エンベロープを獲得して成熟ウイルス粒子となり (secondary envelopment)、エクソサイトーシスにより細胞外へ放出される (図 1B)。

A



B

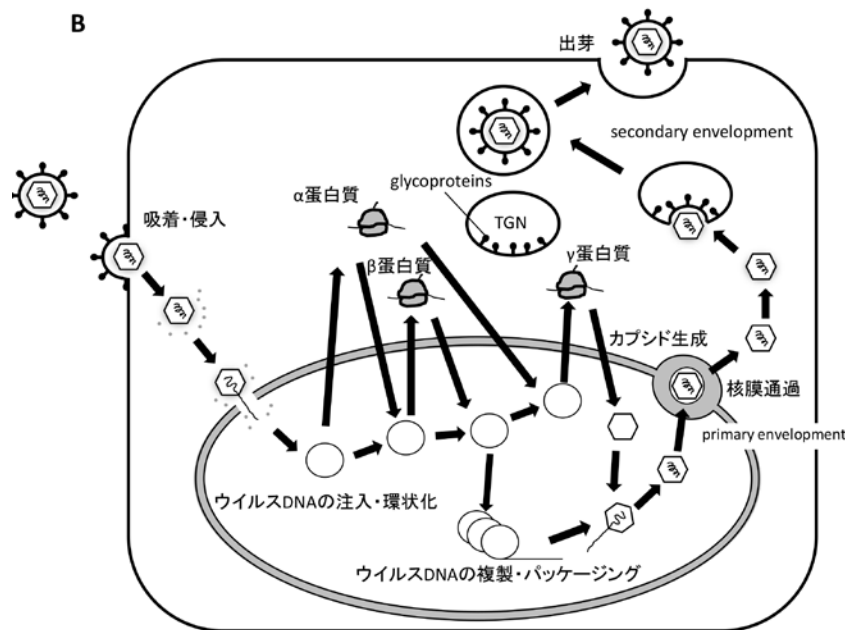


図 1. HSV のウイルス粒子構造と生活環 ([77]より改変)

HSV のウイルス粒子構造 (A) と生活環 (B) の模式図を示した。

(A) HSV の成熟ウイルス粒子はほぼ球状で、エンベロープ、テグメント、カプシドから構成される。エンベロープは宿主細胞の脂質二重膜に由来し、多数の糖蛋白質が埋め込まれている。カプシドにはウイルス DNA が内包されている。

(B) HSV のカプシドが細胞内へ侵入し、一部のテグメント蛋白質も細胞質へ放出される。カプシドが核内へウイルス DNA を注入し、ウイルス DNA は核内で環状化して転写が開始される。初めにテグメントに含まれる VP16 によって α 遺伝子群の転写が活性化され、mRNA が細胞質で α 蛋白質に翻訳されて核に移行し、 β 、 γ 遺伝子発現を制御する。 β 蛋白質によりウイルス DNA が複製され、 γ 遺伝子群によりカプシドが生成され、コンカテマーから開裂したウイルス DNA がカプシドへパッケージングされてヌクレオカプシドになる。ヌクレオカプシドは核膜を通過して細胞質に放出される。ヌクレオカプシドは細胞質でテグメント蛋白質を獲得した後、TGN へ出芽することで二次エンベロープを獲得し、エクソサイトーシスにより細胞外へ放出される。

テグメント蛋白質と secondary envelopment

HSV-1 のテグメントには少なくとも 23 種類のウイルス蛋白質が含まれている [57]。このうち、培養細胞系でのウイルス増殖に必須であるとされているのは UL36、UL37、UL48、ICP4 であり（表 1）、テグメントとして粒子形成に必須であるのは UL36 と UL37 のみである [19, 20, 23, 45]。

UL7、UL11、UL13、UL14、UL16、UL21、UL36、UL37、UL51 は、 β および γ ヘルペスウイルス亜科のゲノム上にも保存されており [46]、プロテオーム解析の結果から UL7、UL11、UL13、UL16、UL36、UL37、UL51 がヘルペスウイルス全般にテグメント蛋白質として保存されているとされる [7, 42, 95, 107]。

テグメント蛋白質群はカプシドとの位置関係からインナーテグメントとアウターテグメントに分類されている。ヌクレオカプシドに触れる US3、UL36、UL37、ICP0、UL14、UL16、UL21 がインナーテグメント [73]、UL46、UL47、UL48、UL49 がアウターテグメントに慣例的に分類されている。近年では超解像画像により、ウイルス粒子中のテグメント蛋白質が多重の層構造を形成していることが示されている [51]。

Secondary envelopment が行われる細胞内小胞は endosome あるいは TGN に由来するとされている。主に蛍光顕微鏡解析において TGN マーカー陽性の膜構造

付近にカプシドが見られることと、TGN46 マーカーと glycoprotein およびテグメント蛋白質が共局在を示すことを根拠とし、TGN 由来の小胞でカプシドが膜に包まれるのであろうと推察されている[89, 94]。さらに、カプシドを含んでいる細胞内の膜構造が TGN46 マーカーと共染色され[52]、免疫電顕でカプシド周囲の膜構造に TGN46 が検出されている[64]。一方で、endosome マーカーを含む小胞にも glycoprotein とビリオンの蓄積が認められることから、endosome 由来の小胞で secondary envelopment が行われるとする説もあり[8]、early endosome regulator の Rab5 がエンベロープ獲得に重要であることも示されている[37]。細胞に HSV-1 が感染すると、Golgi 装置、TGN および endosome の再分布や細胞質の微小管の分裂が誘導され[2, 11, 100]、再分布した TGN に glycoprotein やカプシドが集積して secondary envelopment の場になると考えられている[89]。TGN も endosome も同一の分泌経路の一部であり、TGN と endosome の間で蛋白質が流動的に輸送される。そのため、HSV-1 の secondary envelopment site が TGN や endosome のマーカーと局在することは矛盾することではなく、TGN とエンドサイトシス経路の密接な関係性を表しているという見解もある[33, 58, 69, 86]。

Secondary envelopment が行われる部位がいずれであるにせよ、カプシドがエンベロープ蛋白質を発現した小胞に出芽することによってその膜構造を 2 次エンベロープとして表面に獲得することで成熟ウイルス粒子となると考えられる。

この過程において、テグメント蛋白質がカプシド蛋白質や他のテグメント蛋白質、あるいは glycoprotein の細胞質側末端と結合することによって、カプシドとエンベロープをつなぐネットワークを形成しているというモデルも提唱されている[69]。HSV-1 感染細胞においては、テグメント蛋白質と glycoprotein を含んでいるがカプシドを欠く非感染性粒子である L-particle が産生される。L-particle は、感染性のウイルス粒子と同様の経路で形成、出芽することが示唆されており[39, 75]、細胞質内小胞における粒子形成自体にはカプシドは必須ではなく、テグメント蛋白質と glycoprotein のみで実行され得ると考えられる。近年では α ヘルペスウイルスで保存されているテグメント蛋白質が secondary envelopment やウイルスの出芽に寄与し、蛋白質間相互作用がその機能に関与していることが示されてきている。しかしながら、テグメントを獲得したカプシドの secondary envelopment site への移行や、glycoprotein やテグメント蛋白質が secondary envelopment を行う詳細なメカニズムは明らかにされていない。

以下に、HSV-1 のテグメント蛋白質を中心とする蛋白質間相互作用の概要を示す（図 2）。

①テグメント蛋白質間の相互作用で secondary envelopment への影響が大きいと考えられているものは、UL36 と UL37 の相互作用である。

UL36 はカプシド蛋白質の VP5 と結合することでテグメント層とカプシドをつなぎ[12]、ウイルス粒子にテグメントを構築する基礎となる。UL36 が欠損すると secondary envelopment が阻害されることにより、細胞質にヌクレオカプシドが蓄積する[20]。また、UL36 とカプシドとの連携には UL25 が要求され、UL36 と UL25 は一過性発現細胞での免疫沈降で共沈降が認められる[14]。UL25 と UL17 がカプシドの頂点部で capsid vertex-specific component を構成するために UL36 が要求されることが報告されている[23]。また、UL36 は最も大きなテグメント蛋白質であり、2 番目に大きなテグメント蛋白質であり HSV-1 の培養細胞系での増殖に必須な蛋白質である UL37 と N 末領域で相互作用する[19, 96]。さらに、UL37 はカプシド蛋白質の VP26 や、後述する膜蛋白質 UL20 と glycoprotein K (gK) の複合体と相互作用するため[41, 53]、ウイルス粒子の構成因子全般との相互作用が示されている。UL36 の欠損により UL37 の Golgi 複合体への局在が阻害され[18]、UL36 の UL37 との結合領域を欠損させることでウイルス増殖が阻害されることから、UL36 と UL37 の相互作用がウイルス増殖に必須であるとされている[45]。その際、細胞質にエンベロープを獲得していないヌクレオカプシドが蓄積することから、UL36 と UL37 の相互作用が secondary envelopment に必要であると考えられている[45]。しかし、いずれの欠損においてもヌクレオカプシドは secondary envelopment の場である小胞構造に蓄積しないこと [19, 20]、

さらに UL36 あるいは UL37 を欠損させても L-particle が産生されることから [76]、UL36 および UL37 は 2 次エンベロープの形成自体には必須ではない。このため、UL36 および UL37 は secondary envelopment の場へのヌクレオカプシドの輸送あるいは、secondary envelopment に必要なテグメント蛋白質のヌクレオカプシドへの結合を担っていると考えられる。

また、UL36 は宿主細胞への侵入時に核膜孔でのウイルス DNA の放出に関与することが報告されており [1, 6]、ウイルス粒子形成以外の増殖過程にも機能しているため、UL36 の UL37 との結合領域の欠損により観察されるウイルス増殖能の低下が、ウイルス粒子形成の阻害のみによる現象であるのかは疑問が残る。

②膜蛋白質である UL20 と gK はヘテロダイマーを形成することで TGN に局在し、secondary envelopment に寄与する[27]。UL20 および gK いずれの欠損においてもヌクレオカプシドは小胞構造に蓄積し、ほとんど出芽することができない。この gK-UL20 複合体は UL37 と相互作用するため、UL36-UL37 複合体とエンベロープを結ぶことで secondary envelopment に寄与するというモデルが提示されているが、本モデルの根拠となるデータが十分だとは言い難い[41]。さらに、UL20 および gK は α ヘルペスウイルス亜科には広く保存されているが、 β および γ ヘルペスウイルス亜科にホモログ分子は同定されておらず、少なくともこのモデルは α ヘルペスウイルスに限定せざるおえない。

③UL48 は培養細胞系での HSV-1 増殖に必須であるとされ、 α 遺伝子群の転写の活性化などウイルスの細胞侵入時に機能し[102]、欠損により secondary envelopment が抑制される[65, 99]。この UL48 はインナーテグメントの UL36 [48, 96]、アウターテグメント蛋白質である UL41、UL46、UL49 [22, 84, 96]、glycoprotein H (gH) の細胞質領域と相互作用し[32, 108]、また glycoprotein B (gB)、glycoprotein D (gD) との結合も cross-linking 試験により示唆されていることから[108]、UL37 と同様に、カプシドやエンベロープを架橋することで secondary envelopment に寄与していると考えられている。UL48 のウイルス粒子への取り込みには UL36 が要求されるが[48, 96]、UL36 と UL48 の相互作用を阻害しても細胞質での UL48 とカプシドの接触に対する影響は少ないため[90]、UL48 と UL36 の結合によって secondary envelopment を説明することはできない。

④UL46 はウイルス粒子形成における詳細な機能は不明であるが、yeast two-hybrid 法でのスクリーニングによってカプシド蛋白質 (UL19、UL18、UL38、UL25) やテグメント蛋白質 (UL21、UL37、UL48、US3、US10)、エンベロープ蛋白質 (UL45、gK、glycoprotein M (gM)) との相互作用が示唆されていることから[26, 53, 96]、UL46 はカプシドからエンベロープまでの間をつなぐ役割を担っていることが考えられる。

UL47 も yeast two-hybrid 法によるスクリーニングでテグメント蛋白質 (UL14、

UL21、UL48、UL49、US11) との相互作用が示唆されている[26]。UL47 は UL48 と感染細胞中でも相互作用し[90]、UL47 の欠損により UL48 によるレポーター遺伝子の転写が減少することが示されている[105]。また、UL47 はカプシド蛋白質 UL17 とも相互作用し共局在を示す[83]。

UL46 および UL47 の機能はほとんどわかっていないが、UL48 との相互作用を介して secondary envelopment へ関与すると推測されている。PrV では UL47 欠損により細胞質内に部分的にテグメントを獲得したカプシドが蓄積しウイルス増殖能が低下するが、UL46 欠損ではウイルス粒子形成への阻害が認められないことが報告されている[50]。

⑤UL49 は glycoprotein E (gE) -glycoprotein I (gI)、gM、ICP0 と結合し、gE と gM との相互作用を介して TGN 膜へ移行する[61, 88]。gE-gI と gD の欠損により感染細胞の細胞質にエンベロープを欠くヌcleoカプシドの蓄積が認められるため、これらの糖蛋白質は secondary envelopment に重要であるとされている[24]。また、UL49 は UL16 と結合し、UL16 欠損ウイルスではウイルス粒子への UL49 の取り込みが減少することが報告されている[87]。しかし、UL49 を欠損させても secondary envelopment への影響はほとんど認められない[71]。

⑥UL11 はミリスチル化とパルミチル化によって Golgi 膜や核膜にアンカーされる膜関連蛋白質であり[4, 55, 59]、ウイルス増殖に必須ではないが欠損に

より secondary envelopment が阻害される[5]。UL11 は secondary envelopment に関わるとされる gE の細胞質側領域と結合し[25]、UL11 欠損では gE のウイルス粒子への取り込みが減少し、gE 欠損では UL11 のウイルス粒子への取り込みが減少する[25, 34]。また、UL11 はテグメント蛋白質 UL16、UL21 と相互作用して複合体を形成する[35, 36, 56]。UL16 は gE と相互作用し、UL11-UL16-UL21 複合体は UL11 と UL16 を介して gE の細胞質側領域に結合することで膜に接続するとされている[35]。また、UL16 は UL36-UL37 と独立してカプシドと結合することが報告されていることから[62, 63]、膜に接続する UL11 とカプシドに接続する UL16 が相互作用してテグメントとカプシドをつないでいるとする説もある。しかしながら、UL11 と UL16 は欠損体を示す性状が異なり、UL16 欠損では membrane-associated カプシドと、複数のカプシドを含むウイルス粒子の増加が認められ[87]、UL11 欠損では細胞質にエンベロープを獲得していないヌcleoカプシドが蓄積し、その周囲にテグメント蛋白質であると予想される電子密度の高い領域が認められる[5, 31]。

⑦UL51 は UL11 同様にパルミトイル化により Golgi にアンカーされる膜関連テグメント蛋白質であり[66]、HSV-1 と PrV でウイルス増殖と secondary envelopment に関与するとされている[47, 67]。UL51 は gE およびテグメント蛋白質 UL7 との相互作用が報告されている[78, 79]。UL51 と UL7 は感染細胞と

transfected 細胞内の細胞質膜において部分的に共局在し、UL7 の膜への局在とウイルス粒子への取り込みに UL51 が関与している[78]。また、PrV の UL7 欠損により secondary envelopment 効率の低下が示されており[29]、UL51-UL7 複合体がウイルス粒子成熟に関わっている可能性が予想されるが、HSV-1 の UL7 欠損ではウイルス増殖能の低下が報告されているのみで secondary envelopment に関与するかは不明である[92]。

このようにテグメント蛋白質を中心とする蛋白質間の相互作用が明らかとなってきたが、相互作用がウイルス増殖能や secondary envelopment へ寄与することが証明されているものは UL36-UL37 複合体のみであり、ほとんどのテグメント蛋白質はカプシドやエンベロープ蛋白質と相互作用することから secondary envelopment への関与が予想されているに過ぎない。また、UL14 のように全てのヒトヘルペスウイルスに保存される蛋白質であり、secondary envelopment への貢献が報告されているにも関わらず、その相互作用対象が不明なテグメント蛋白質も残されており、secondary envelopment に寄与するテグメント蛋白質の相互作用の全体像が明らかとなっているとは言い難い。

表 1. HSV-1 テグメント蛋白質の機能と保存性

HSV-1		他のヘルペスウイルスにおける保存性				
遺伝子	主な機能	PrV	VZV	HCMV	EBV	KSHV
UL7	ウイルス粒子の放出. UL51 と結合.	UL7	ORF53	UL103	BBRF2	ORF42
UL11	secondary envelopment. UL16、gE と結合.	UL11	ORF49	UL99	BBLF1	ORF38
UL13 (VP18.8)	Protein kinase	UL13	ORF47	UL97	BGLF4	ORF36
UL14	secondary envelopment. VP16 の核移行.	UL14	ORF46	UL95	BGLF3	ORF34
UL16	secondary envelopment. UL11、gE、UL21 と結合.	UL16	ORF44	UL94	BGLF2	ORF33
UL21	secondary envelopment. UL16、UL11、gE と結合.	UL21	ORF38	UL87	BcRF1	ORF24
UL23 (Thymidine kinase)	thymidine kinase	UL23	ORF36	-	BXLF2	ORF21
UL36 (VP1/2)	secondary envelopment. UL37 と結合. ウィルス DNA の核内注入.	UL36	ORF22	UL48	BPLF1	ORF64
UL37	secondary envelopment. UL36 と結合.	UL37	ORF21	UL47	BOLF1	ORF63
UL41 (vhs)	VHS. RNase	UL41	ORF17	-	-	-
UL46 (VP11/12)	UL48 と結合.	UL46	ORF12	-	-	-
UL47 (VP13/14)	核と細胞質をシャトリング. UL48 と結合.	UL47	ORF11	-	-	-
UL48 (VP16)	secondary envelopment. HSV ゲノムのクロマチン構造の制御.	UL48	ORF10	-	-	-
UL49 (VP22)	細胞間輸送活性. ウィルス蛋白質の安定発現.	UL49	ORF9	-	-	-
UL50 (dUTPase)	dUTPase	UL50	ORF8	-	-	-
UL51	細胞質での粒子成熟. UL7、gE と結合.	UL51	ORF7	UL71	BSRF1	ORF55
UL55	核マトリックス結合蛋白質.	-	ORF3	-	-	-
US2	不明	-	-	-	-	-
US3	protein kinase. 細胞死、細胞骨格 の制御. Primary envelopment.	US3	ORF66	-	-	-

US10	カプシドと結合.	-	ORF64/69	-	-	-
RL1 (ICP34.5)	翻訳阻害の解除. オートファジーの阻害.	-	-	-	-	-
RL2 (ICP0)	転写活性因子	EP0 (ICP0)	ORF61	-	-	-
<u>RS1 (ICP4)</u>	転写制御因子	IE180 (ICP4)	ORF62/71 (IE62)	-	-	-

([46, 69]を基に改変)

遺伝子名下線は培養細胞での増殖に必須であることを示す。

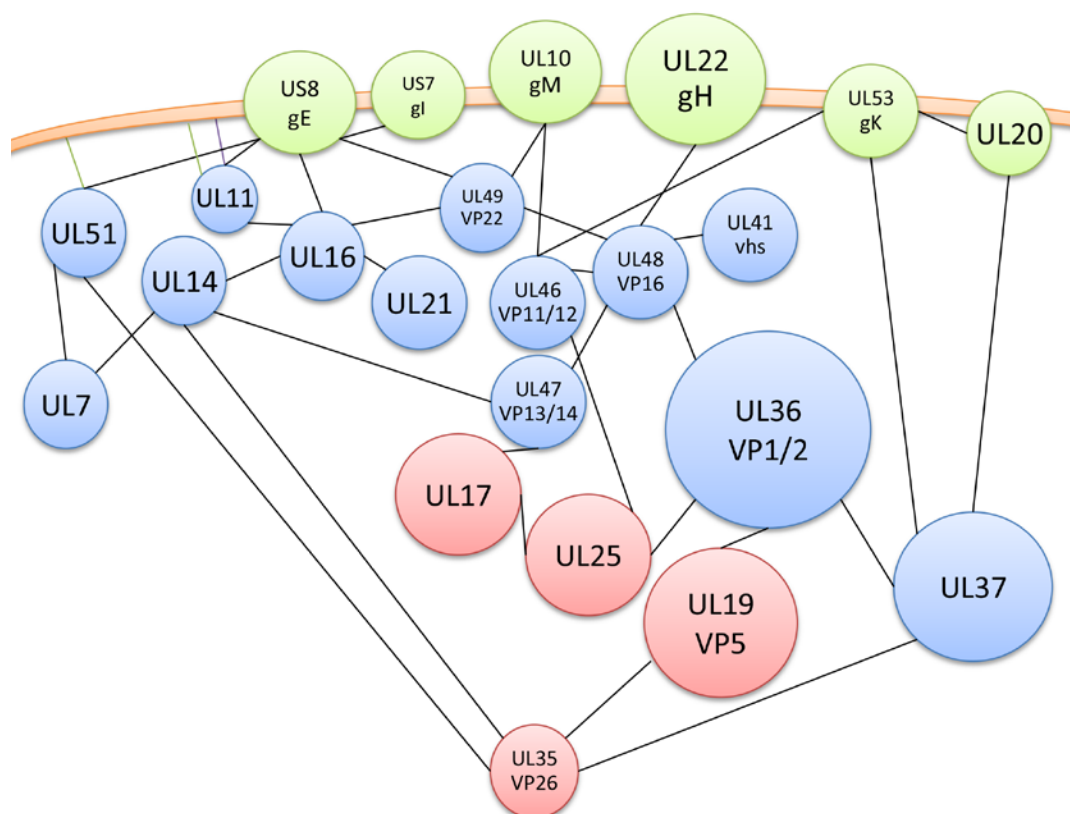


図 2. HSV-1 の主要なテグメント蛋白質間相互作用ネットワーク ([69]より改変)

● : テグメント蛋白質 ● : カプシド蛋白質 ● : エンベロープ蛋白質
 — : 既知の相互作用 — : パルミトイル化 — : ミリストイル化

本研究の目的

HSV-1 の secondary envelopment には多くのテグメント蛋白質が関与しており、それらの相互作用の全体像を把握することが secondary envelopment のメカニズムを解明するために重要であると考えられる。上述のように、これまでもテグメント蛋白質の相互作用は研究されてきており、テグメント、カプシド、エンベロープ蛋白質のつながりが示されているが、その相互作用が secondary envelopment に寄与していることを立証している報告はほとんどなく、それらの相互作用がどの程度 secondary envelopment に貢献するのか、重要な機能をもつ相互作用はどれなのか、という部分については不明である。テグメント蛋白質間の未知の相互作用が secondary envelopment に重要な役割を果たしていると予想し、本研究では HSV-1 の secondary envelopment におけるテグメント蛋白質間相互作用の意義を明らかにし、ウイルス粒子形成過程の secondary envelopment を引き起こすのに必要なテグメント蛋白質間相互作用の解明を目的とする。

HSV-1 がコードする UL51 と UL14

本研究では、secondary envelopment への関与が示唆されているが、secondary envelopment に関わる明らかな相互作用因子がわかっていない、ヘルペスウイルスに保存されるテグメント蛋白質 UL51 および UL14 に着目した。

HSV-1 がコードする UL51 は分子量 27、29、30kDa のリン酸化蛋白質であり、上述の通り、テグメント蛋白質としてヘルペスウイルス全般で保存されている。UL51 は多くのテグメント蛋白質と同様に感染の後期で発現し、感染細胞の核膜近傍に局在する[17]。過剰発現系において、UL51 は Golgi マーカーと共局在を示し、N 末端から 9 番目のシステインのパルミトイル化が Golgi への局在化に必要であるとされている[66]。UL51 とそのホモログの欠損実験が HSV-1、PrV、HCMV で報告されており、ウイルス増殖能や、細胞質におけるエンベロープ獲得に著しく貢献することが報告されている[47, 67, 82, 101]。UL51 はテグメント蛋白質である UL7 と相互作用し、UL7 のウイルス粒子への取り込みに関わること[78]、gE の細胞内輸送を制御し細胞間伝播に関与すること[79]が報告されているが、secondary envelopment に機能しウイルス増殖能に寄与する相互作用はわかっていない。

HSV-1 がコードする UL14 は感染後期に発現する分子量 32kDa のテグメント蛋白質であり、ヘルペスウイルス科全般に保存されている。テグメントとしての保存性については、これまでのプロテオーム解析の結果では、 β および γ ヘルペスウイルスのウイルス粒子中からは UL14 ホモログは検出されていない。しかしながら、精製 HSV-1 粒子の質量解析を半定量すると UL14 の含有量は 1% 未満であるとされ[57]、また、トリプシンによる開裂パターンから推測される

UL14 ホモログの検出可能な coverage は大きく見積もっても 50%には至らない。従って、UL14 ホモログは質量解析では検出が非常に困難であると考えられ、UL14 がテグメントとして他のヘルペスウイルス亜科でもウイルス粒子中に取り込まれているのかについては、各ウイルスでさらなる検証が求められる。

UL14 は UL51 と同じく効率的なウイルス増殖と secondary envelopment に寄与することが報告されている[16]。UL14 は heat shock protein (HSP) 様の機能を示し[103]、UL14 欠損により VP16 や UL46 が aggresome に蓄積することから UL14 のシャペロン様機能が他のウイルス蛋白質の成熟や細胞内局在に関わっていることが示唆されている[68]。しかし、UL14 が VP16 と相互作用するかは不明である上、他のウイルス蛋白質との相互作用がウイルス増殖に機能しているのかも不明である。

これらの背景を鑑み、本研究ではテグメント蛋白質である UL51 と UL14 はどちらもウイルス増殖と secondary envelopment に寄与するが、ウイルス増殖に寄与する相互作用が知られていないことから、UL51 と UL14 が相互作用しているのかを検討することにした。

材料と方法

細胞とウイルス

アフリカミドリザル腎細胞由来 Vero 細胞は 9.5 g/L ダルベッコ変法イーグル培地“ニッスイ”②（日水製薬）に 5% Calf Serum (CS)、100 units/ml ペニシリン、100 µg/ml ストレプトマイシン添加培地で培養した。Rabbit Skin cell は Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Sigma) に 5% Fatal Calf Serum (FCS)、100 units/ml ペニシリン、100 µg/ml ストレプトマイシンを添加した培地で培養した、アフリカミドリザル腎臓由来 Cos7 細胞は DMEM に 10% FCS、100 units/ml ペニシリン、100 µg/ml ストレプトマイシンを加えた培地で培養した。培地に加える CS 及び FCS は 56°C 30 分間の非働化処理をした後に用いた。

HSV-1 野生株として HSV-1(F)を用いた[21]。UL13 欠損ウイルス（ΔUL13）である R7356 はシカゴ大学 Dr. Roizman より分与された[72]。これらのウイルスは、Vero 細胞を用いたプラークアッセイにより感染性ウイルス力価を測定してから実験に用いた。

プラスミド

本研究でプラスミドの作製に用いたプライマーは表 2 に記載する。

HSV-1 UL51 の 1~244、12~170、164~244、12~130、47~170、47~130、47~94、90~130 アミノ酸領域の遺伝子配列をそれぞれ表 2 のプライマーを用いて PCR で増幅して pGEX-4T-1 (GE Healthcare) の EcoRI-SalI サイトにそれぞれクローニングし、pGEX-UL51、pGEX-UL51:12-170、pGEX-UL51:164-244、pGEX-UL51:12-130、pGEX-UL51:47-170、pGEX-UL51:47-130、pGEX-UL51:47-94、pGEX-UL51:90-130 を作製した。

PCR-based site-directed mutagenesis[81]により、1stPCR 用プライマーを用いて PCR で pGEX-UL51:90-130 より L111/I119/Y123 または D106/R110/D113 をアラニン置換した 90~130 アミノ酸領域の遺伝子配列を増幅した後、それらの PCR 産物から 2ndPCR 用プライマーを用いた PCR により増幅して pGEX-4T-1 の EcoRI-SalI サイトにクローニングし、pGEX-UL51:90-130L111A/I119A/Y123A および pGEX-UL51:90-130D106A/R110A/D113A を作製した。

HSV-1 野生株である HSV-1(F)由来のウイルスゲノムに bacterial artificial chromosome (BAC) をクローニングした pYEBac5002 から再構築した YK5002 (Δ Bac) のゲノムから HSV-1 UL51 の上流 1000bp から下流 894bp までを PCR で増幅し、pBluescript II KS (+) (stratagene) の EcoRI-SacI サイトにクローニングし、pBS-UL51 を作製した。YK5002 (Δ Bac) については次項に記載する。

HSV-1 UL15 の 344~745 アミノ酸領域の遺伝子配列を HSV-1(F)のウイルスゲノ

ムから PCR で増幅して pMAL-c (New England BioLabs) の EcoRI-SalI サイトにクローニングし、pMAL-UL15:344-745 を作製した。

HSV-1 UL52 の 150~349 アミノ酸領域の遺伝子配列を HSV-1(F)のウイルスゲノムから PCR で増幅して pMAL-c の EcoRI-SalI サイトにクローニングし、pMAL-UL52:150-349 を作製した。

プラスミド pACYC177 のカナマイシン耐性遺伝子を導入した pEP-KanS[93]は以前に Dr. Osterrieder から分与されたものを使用した。

カナマイシン耐性遺伝子配列と FEM (FLAG, tobacco etch virus protease cleavage site, and myc) tag と I-SceI を含む pBS-FEM-Kan (図 3) は、pEP-KanS からプライマー 5'-ATGGACTACAAGGACGACGATGACAAAGATGACCGTGATTATGATA TTCCA ACTACTGCTAGCGAGAATTTGTATTTTCAGGGTGAAGGATGACGACGATAAGTAGGG-3' および 5'-TCACAAGTCCTCTTCAGAAATGAGCTTTTGCTCCATGGTGGCGGATCCGAGCTCACCTGAAAATACAAATTCTCGCTAGCAGTAGTTGGAACAACCAATTAACCAATTCTGATTAG-3' を用いて PCR によりカナマイシン耐性遺伝子配列を増幅し、その PCR 断片をプライマー 5'-ATAAGAATGCGGC CGCATGGACTACAAGGACGACG-3' および 5'-GAGAATTCTCACAAGTCCTCTTCAGAAATGAGC-3' を用いて PCR で増幅し、PCR 断片を pBluescriptII KS(+) の EcoRI-NotI サイトにクローニングして作製した。

表 2. プラスミドの作製に用いたプライマー

plasmid			Sequence (5'-3')
pGEX-UL51			5'-GCGAATTCATGGCTTCTCTTCGCGGGC-3'
			5'-CGGTCGACTTATTGACCCAAAACACACG-3'
pGEX-UL51:12-170			5'-GCGAATTCGGAGCGCGCCCCGAGGAACA-3'
			5'-CGGTCGACCCCGGCAACCCCAAGGCGG-3'
pGEX-UL51:164-244			5'-GCGAATTCTCCGCTTCGGGGTTGCCG-3'
			5'-CGGTCGACTTATTGACCCAAAACACACG-3'
pGEX-UL51:12-130			5'-GCGAATTCGGAGCGCGCCCCGAGGAACA-3'
			5'-GCGTCGACGTCAGCCGCCCCACGGACA-3'
pGEX-UL51:47-170			5'-GCGAATTCCCCGCCCCATCACGCTCGA-3'
			5'-CGGTCGACCCCGGCAACCCCAAGGCGG-3'
pGEX-UL51:47-130			5'-GCGAATTCCCCGCCCCATCACGCTCGA-3'
			5'-GCGTCGACGTCAGCCGCCCCACGGACA-3'
pGEX-UL51:47-94			5'-GCGAATTCCCCGCCCCATCACGCTCGA-3'
			5'-GCGTCGACGGCCTCGAGCCCGGGTGGT-3'
pGEX-UL51:90-130			5'-GCGAATTCCCCGGGCTCGAGGCCCCAC-3'
			5'-GCGTCGACGTCAGCCGCCCCACGGACA-3'
PCR-based site-directed mutagenesis	1st PCR	pGEX-UL51:90-130L111A/I119A/Y123A	5'-GATGCGGCGCGCCGCGGACACGTGTATGGCCACCGCCCTGCAGATGGCCATGTCCGTG-3'
			5'-CCGGGAGCTGCATGTGTGTCAGAGG-3'
		pGEX-UL51:90-130D106A/R110A/D113A	5'-CACGGACATGGCCATCTGCAGGGCGGTGGCCATACAGTGTCCGCGGCGCGCCGCATC-3'
			5'-GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG-3'
	2nd PCR		5'-GGCCCATCAGGCCAAGATGCGGGCCCTGGCGGCCACGTGTATG-3'
			5'-CCGGGAGCTGCATGTGTGTCAGAGG-3'
pBS-UL51			5'-GCGAGCTCCGAATGGCTATGCCGGCTGA-3'
			5'-CGGAATTCGACGGTGTGCGGGCGGGGGG-3'
pMAL-UL15:344-745			5'-GCGAATTCGGAATCCGAGGCCAGGACTT-3'
			5'-GCTCTAGATCACGAAACGCGTGTGATGG-3'
pMAL-UL52:150-349			5'-GCGAATTCGCCACGTTTCGCGCTGCATGC-3'
			5'-GCGTCGACTTAACGGTCGGACACGCGCAGGC-3'
pBS-FEM-Kan	1st PCR		5'-ATGGACTACAAGGACGACGATGACAAAAGATGACCGTGATTATGATATTCCAATACTGCTAGCGAGAATTTGTATTTTCAGGGTGAAGGATGACGACGATAAGTAGGG-3'
			5'-TCACAAGTCCTCTTCAGAAATGAGCTTTTGTCTCCATGGTGGCGGATCGAGCTCACCCTGAAAATACAAATCTCGCTAGCAGTAGTTGGAACAACAATTAACCAATTCTGATTAG-3'
	2ndPCR		5'-ATAAGAATGCGCCGCATGGACTACAAGGACGACG-3'
			5'-GAGAATTCTCACAAGTCCTCTTCAGAAATGAGC-3'

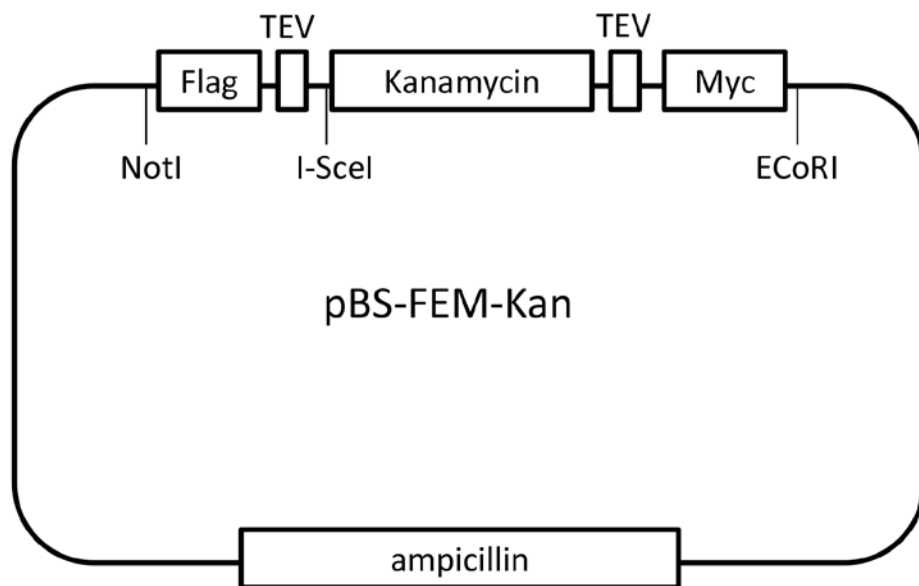


図 3. **pEP-FEM-Kan** の模式図

pBluescriptII KS(+)の EcoRI-NotI サイトに I-SceI を含むカナマイシン耐性遺伝子配列と FEM tag 遺伝子配列を挿入した。

組換えウイルスの作製

本研究で用いた変異ウイルス（図 4）は、HSV-1 野生株である HSV-1(F)由来のウイルスゲノムに bacterial artificial chromosome（BAC）をクローニングした pYEBac5002 を保持した大腸菌である *E.coli* GS1783 pYEBac5002 を、Two-step Red-mediated mutagenesis 法[93]を用いて改変後、ウイルスゲノムを精製し、培養細胞にてウイルスを再構築することで作製した。使用したプライマーは表 3 に記載する。pYEBac5002 は、HSV-1(F)由来ウイルスゲノムの UL50 と UL51 遺伝子配列の遺伝子間領域に BAC 配列と Cre 改変遺伝子をコードした発現カセットが loxP サイトに挟まれて挿入されている。Cre 改変遺伝子には loxP サイト特異的 DNA 組換え酵素である Cre と synthetic intron が含まれており、大腸菌内では機能性を欠くが、pYEBac5002 を RSC にトランスフェクションすると Cre 改変遺伝子が発現後、スプライシングされることで機能的な Cre が発現し、再構築されてくるウイルス YK5002（ Δ BAC）のゲノム上から片側の loxP サイトを残して BAC 配列が除去される（当研究室、加藤らが作製 論文投稿中）。

UL51 の C 末端に FEM tag を付加した UL51-FEM ウイルスは pBS-FEM-kan のカナマイシン耐性遺伝子および FEM tag を含む配列を表 3 のプライマーを用いて PCR で増幅し、PCR 断片をエレクトロポレーションにより *E.coli* GS1783 pYEBac5002 に導入した

UL11 の C 末端に FEM tag を付加した UL11-FEM ウイルスは pBS-FEM-kan のカナマイシン耐性遺伝子および FEM tag を含む配列を表 3 のプライマーを用いて PCR で増幅し、PCR 断片をエレクトロポレーションにより *E.coli* GS1783 pYEBac5002 に導入した。

UL51 の 43 から 244 番目のアミノ酸を欠損させた Δ UL51 ウイルスは、pEP-KanS のカナマイシン耐性遺伝子を含む配列を表 3 のプライマーを用いて PCR で増幅し、PCR 断片をエレクトロポレーションにより *E.coli* GS1783 pYEBac5002 に導入した。

UL14 の 291 から 294 番目の塩基、終始コドンに置換させた Δ UL14 ウイルスは、pEP-KanS のカナマイシン耐性遺伝子を含む配列を表 3 のプライマーを用いて PCR で増幅し、PCR 断片をエレクトロポレーションにより *E.coli* GS1783 pYEBac5002 に導入した。

UL51 の L111、I119、Y123 をアラニン置換した UL51LIY/AAA ウイルスは、pEP-KanS のカナマイシン耐性遺伝子を含む配列を表 3 のプライマーを用いて PCR で増幅し、PCR 断片をエレクトロポレーションにより *E.coli* GS1783 pYEBac5002 に導入した。

UL51 および UL14 を欠損させた Δ UL51/ Δ UL14 ウイルスは pEP-KanS のカナマイシン耐性遺伝子を含む配列を表 3 に記載した Δ UL14 用プライマーを用いて

PCR で増幅し、PCR 断片をエレクトロポレーションにより Δ UL51 ゲノムを有する大腸菌に導入した。

Δ UL14 の復帰株である Δ UL14-repair ウイルスは pEP-KanS のカナマイシン耐性遺伝子を含む配列を表 3 のプライマーを用いて PCR で増幅し、PCR 断片を Δ UL14 ゲノムを有する大腸菌に導入した。

UL51LIY/AAA の復帰株である UL51LIY/AAA-repair ウイルスは pEP-KanS のカナマイシン耐性遺伝子を含む配列を表 3 のプライマーを用いて PCR により増幅し、PCR 断片を UL51LIY/AAA ゲノムを有する大腸菌に導入した。

上述の形質転換した大腸菌は LB 寒天培地 (20 μ g/ml クロラムフェニコール + 40 μ /ml カナマイシン) に塗抹し、32°C で 1 晩平板培養した。翌日、コロニーを釣菌し、LB 寒天培地 (20 μ g/ml クロラムフェニコール + 40 μ /ml カナマイシン) に塗抹、32°C で 1 晩平板培養し単コロニーを形成させることで純化を行った。目的部位へのカナマイシン耐性遺伝子の挿入をコロニーPCR で確認した後、LB 液体培地 (20 μ g/ml クロラムフェニコール + 40 μ g/ml カナマイシン) に植菌、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 クロラムフェニコール) に加えて 32°C で 2 時間振盪培養し、I-SceI 発現を誘導させるため 10% L-アラビノースを 400 μ l 加え、さらに 1 時間振盪培養した。その後、42°C の恒温槽で 30 分間培養することでリコンビナーゼの発現を誘導し、再び 32°C で振盪培

養した後、LB 寒天培地（20 $\mu\text{g/ml}$ クロラムフェニコール）に塗抹し、32°Cで一晩平板培養した。翌日、コロニーを LB 寒天培地（20 $\mu\text{g/ml}$ クロラムフェニコール+40 $\mu\text{g/ml}$ カナマイシン、または 20 $\mu\text{g/ml}$ クロラムフェニコール培地に）塗布し、クロラムフェニコール耐性のみを示す株を選択した後、PCR によりカナマイシン耐性遺伝子が脱落していることを確認した。最後に、シーケンス解析により、各目的の変異が導入されていることを確認した。作製した大腸菌からウイルスゲノムを抽出し[91]、リン酸カルシウム法により Rabbit Skin cell にトランスフェクションし、 Δ UL51、 Δ UL14、 Δ UL14-repair、UL51LIY/AAA、UL51LIY/AAA-repair および Δ UL51/ Δ UL14 を再構築した。リン酸カルシウム法は次項に記載する。

Δ UL51 の復帰株である Δ UL51-repair を作製するため、pBS-UL51 を Cos7 細胞に Lipofectamine 2000（invitrogen）を用いてトランスフェクションし（次々項に記載）、6 時間後に Δ UL51 ウイルスを MOI 5 で感染させた。得られた培養上清中のウイルスを Vero 細胞に感染させプラークを形成させ、1%SeaPlaque アガロース（Lonza）を用いた plaque pick により純化した。Plaque pick による純化を 3 回繰り返した後、シーケンス解析により単離したウイルスの UL51 配列が復帰していることを確認した。

Δ UL51/ Δ UL14 の復帰株である Δ UL51/ Δ UL14-repair は、pEP-KanS のカナマ

イシン耐性遺伝子を含む配列を表 3 の Δ UL14-repair 用のプライマーを用いて PCR で増幅し、PCR 断片を Δ UL14 ゲノムを有する大腸菌に導入した。形質転換した大腸菌は LB 寒天培地 (20 μ g/ml クロラムフェニコール+40 μ /ml カナマイシン) に塗抹し、32°C で 1 晩平板培養した。翌日、目的部位へのカナマイシン耐性遺伝子の挿入をコロニーPCR で確認した後、LB 液体培地 (20 μ g/ml クロラムフェニコール+40 μ g/ml カナマイシン) に植菌、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 クロラムフェニコール) に加えて 32°C で 2 時間振盪培養し、I-SceI 発現を誘導させるため 10% L-アラビノースを 400 μ l 加え、さらに 1 時間振盪培養した。その後、42°C の恒温槽で 30 分間水浴させ、さらに 32°C で振盪培養した後、LB 寒天培地 (20 μ g/ml クロラムフェニコール) に塗抹し、32°C で一晩平板培養した。翌日、コロニーを LB 寒天培地 (20 μ g/ml クロラムフェニコール+40 μ g/ml カナマイシン、または 20 μ g/ml クロラムフェニコール培地に) 塗布し、クロラムフェニコール耐性のみを示す株を選択した。最後に、シーケンス解析により、UL14 が復帰していることを確認した。作製した大腸菌からウイルスゲノムを抽出し、リン酸カルシウム法により Rabbit Skin cell に pBS-UL51 とトランスフェクションし、 Δ UL51/ Δ UL14-repair を再構築した。

表 3. 組換えウイルス作製に用いたプライマー

virus	Sequence (5'-3')
UL51-FEM	5'-CCCTGGCCCATCTCGAGCAGCTCCGTGTGTTTTGGGTCAAATGGACTACAAG GACGACGA-3'
	5'-CCACAAACACAGAACACACGGGTTGGATGAAAACACGCATTACACAAGTCCT CTTCAGAAATGA-3'
UL11-FEM	5'-GAGGCGCCTGCCCCGCCACCCAGTTTCCACCCCCATGTCCGATAGCGAAGA CTACAAGGACGACGATGA-3'
	5'-TTAAAAACGACACGCGTGCGACCGTATACAGAACATTATTTTGGTTTTTACA AGTCCTCTTCAGAAATGA-3'
ΔUL51	5'-GGAGGCGGAGCCGCGGCTGCAGGAGGCCCTGGTGGTCGTTAAATGCGTGT TTCATCCAAGGATGACGACGATAAGTAGGG-3'
	5'-CAAACACAGAACACACGGGTTGGATGAAAACACGCATTAAACGACCACCA GGGCCTCAACCAATTAACCAATTCTGATTAG-3'
ΔUL14	5'-AAGCGGCGCGTCGTGACTTTCTAACCGCACACCGACGGTAGATCCGGCGCTT GGTGAGCGAGGATGACGACGATAAGTAGGG-3'
	5'-GATCGTCCACGGCGTCCAGGCGCTCACCAAGCGCCGGATCTACCGTCGGTGT GCGGTTAGCAACCAATTAACCAATTCTGATTAG-3'
ΔUL14-repair	5'-AAGCGGCGCGTCGTGACTTTCTAACCGCACACCGACGGTACCTCGATCCGGC GCTTGGTGAGCGAGGATGACGACGATAAGTAGGG-3'
	5'-GATCGTCCACGGCGTCCAGGCGCTCACCAAGCGCCGGATCGAGGTACCGTCG GTGTGCGGTTAGCAACCAATTAACCAATTCTGATTAG-3'
UL51LIY/AAA	5'-GACGGGGCCGTGGCGGCCCATCAGGACAAGATGCGGCGCGCCGCGGACACG TGTATGGCCACCGCCCTGCAGATGGCCAGGATGACGACGATAAGTAGGG-3'
	5'-ACATCCGCGGACTTGTGAGCCGCCCCACGGACATGGCCATCTGCAGGGCGG TGGCCATACAGTGTCCGCGCGCAACCAATTAACCAATTCTGATTAG-3'
UL51LIY/AAA-repair	5'-GACGGGGCCGTGGCGGCCCATCAGGACAAGATGCGGCGCCTGGCGGACACG TGTATGGCCACCATCCTGCAGATGTACAGGATGACGACGATAAGTAGGG-3'
	5'-ATCCGCGGACTTGTGAGCCGCCCCACGGACATGTACATCTGCAGGATGGTG GCCATACAGTGTCCGCCAGCAACCAATTAACCAATTCTGATTAG-3'

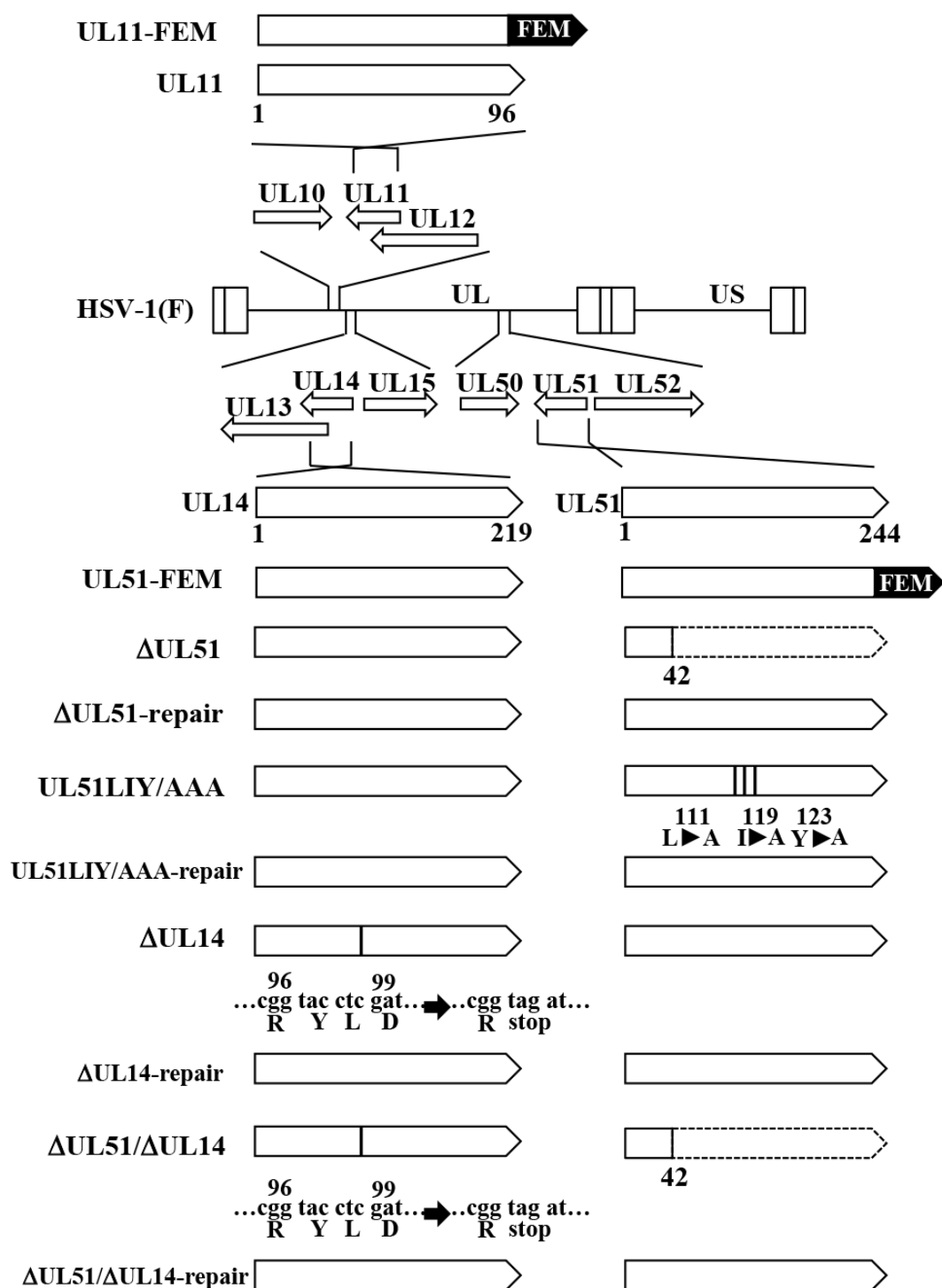


図 4. 本研究で作製した組換えウイルス

YK5002 (Cre-in) を親株として作製した各ウイルスの模式図を示す。Unique 配列は unique lung (UL) と unique short (Us) としてあらわした。UL50 と UL51 の遺伝子間に bacterial artificial chromosome が挿入されている。

リン酸カルシウム法

H₂O 250 μ l、ウイルス DNA、2.2mM CaCl₂ 35 μ l、2×Hepes Bufferd Saline (ph7.05) (0.14mM NaCl、2.7mM KCl、1mM Na₂HPO₄ · 2H₂O、1mM Dextrose) 250 μ l を混合し、20 分間室温に静置した。Rabbit skin cell をフラスコに播種し、2 時間後に DEAE Dextran in PBS で 10 分間処理し、TEN (0.1mM NaCl、10mM Tris-HCl (ph8.0)、1mM EDTA) で洗浄した。その後、Rabbit Skin cell 用培地と DNA 混合液を加えて 37°C で 4 時間以上培養し、新しい 5%FCS DMEM に培地交換した。

Lipofetamin によるトランスフェクション

Opti-MEM (Life Technologies) 200 μ l に Lipofectamine 2000 Reagent (Invitrogen) を 2 μ l を加えた溶液と、Opti-MEM 200 μ l に pBS-UL51 4 μ g を加えた溶液を DMEM 500 μ l と混合し、Cos7 細胞に播種して 37°C で培養した。

大腸菌発現系での MBP 融合蛋白質の発現、精製

LB 液体培地 (100 μ g/ml アンピシリン) で pMAL-UL15:344-745 あるいは pMAL-UL52:150-349 を保持した大腸菌を 37°C で振盪培養し、培養液の光学密度 (O.D.600) が 0.3~0.4 になった時点で isopropyl-1-thio- β -galactoside1 (IPTG) を終濃度 3mM となるように添加し、37°C で 2 時間振盪培養した。回収した大腸

菌は 1 % Tween20 in PBS で懸濁、超音波破碎処理し、15,000rpm 20 分遠心した後、上清に Amylose resin (Biolabs) を加え、4℃で転倒混和した。その後、Amylose resin を PBS で洗浄し、Elution Buffer (50mM Tris-HCl (pH8.0)、10mM D-(+)-Maltose monohydrate、25mM EGTA (pH8.0)) を加えて 4℃ 30 分間転倒混和し、目的の蛋白質を溶出した。

大腸菌発現系での GST 融合蛋白質の発現、精製

LB 液体培地(100μg/ml アンピシリン)で pGEX-UL51 を保持した大腸菌を 37℃で振盪培養し、培養液の光学密度 (O.D.600) が 0.5～0.7 になった時点で IPTG を終濃度 1 mM となるように添加し、37℃で 2 時間振盪培養した。回収した大腸菌は溶解用バッファー (500 mM NaCl, 25 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM 2-mercapto ethanol, 0.1% TritonX100) で懸濁、超音波破碎処理し、15,000rpm 20 分遠心した後、上清に Glutathione sepharose 4B (GE Healthcare) を加え、4℃で転倒混和した。その後、GST pull-down に供する場合には溶解用バッファーで Glutathione sepharose 4B を洗浄した。マウスに接種する抗原として使用する場合には Glutathione sepharose 4B を PBS で洗浄し、Elution Buffer (50mM Tris-HCl (pH8.0)、10mM グルタチオン) を加えて 4℃ 30 分間転倒混和し、目的の蛋白質を溶出した。

抗体

UL50 に対するウサギポリクローナル抗体は当研究室で作製されたものを使用した[44]。UL51 に対するウサギポリクローナル抗体は名古屋大学医学部西山名誉教授より分与されたものを使用した[67]。UL11 (CAC-CT-HSV-UL11)、UL14 (CAC-CT-HSV-UL14) に対するウサギポリクローナル抗体は CosmoBio から購入した。Myc (PL14)、 α -tubulin (DM1A) に対するマウスモノクローナル抗体、および TGN46 に対するヒツジポリクローナル抗体はそれぞれ MBL、Sigma、AbD から購入した。

UL13 に対するマウスモノクローナル抗体は、当研究室で過去に作製されたものを使用した[30]。

UL15、UL52 および UL51 に対するマウスポリクローナル抗体は、それぞれ pMAL-UL52:150-349、pMAL-UL52:150-349、pGEX-UL51 を大腸菌に発現させ、Amylose resin または Glutathione sepharose 4B を用いて精製した MBP-UL15:344-745、MBP-UL52:150-349、GST-UL51 を抗原とし、抗原約 100ug を TiterMax Gold (フナコシ) と混合して 4 週齢のメスの Balb/c マウスに腹腔接種した。得られた各血清の反応性をウエスタンブロットにより確認し、UL15、UL52 および UL51 に対するマウス抗体として用いた。

感染性ウイルス力価測定（プラークアッセイ）

1% FCS を含む 199 培地（Sigma）でウイルス液を $10^2 \sim 10^9$ 倍に希釈し、それぞれ Vero 細胞に感染させた。37℃で 1 時間吸着させた後にヒト- γ -グロブリン 160 μ g/ml（Sigma）を含む 199 培地に交換した。37℃で 2 日間培養後、培地を除き、プラーク数を測定しウイルス力価(PFU/ml)を算出した。

ウイルス増殖試験

Vero 細胞にウイルスを MOI 0.01 または MOI 5 で感染させた。37℃で 1 時間吸着させた後に、199 培地で細胞を洗浄し、37℃で培養した。MOI 0.01 の試料は感染 48 時間後に、MOI 5 の試料は感染 18 時間後に培養上清ごと細胞を回収し、3 回凍結融解した後、Vero 細胞を用いたプラークアッセイで感染性ウイルス力価を測定した。

プラークサイズの測定

Vero 細胞にウイルスを感染させ、37℃で 1 時間吸着させた後、ヒト- γ -グロブリン 160 μ g/ml を含む 199 培地に交換した。37℃で 2 日間培養した後、DP80 camera（Olympus）でプラークを観察し、cellSens（Olympus）でプラークサイズを測定した。

免疫蛍光抗体法

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 MOI 5 で感染させた。37℃で 18 時間培養した後、4% paraformaldehyde in PBS で 10 分間固定し、0.1% TritonX-100 in PBS で 15 分間処理した後、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、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 時間反応させた。その後、PBS で洗浄し、LSM5 PASCAL 蛍光顕微鏡 (Carl Zeiss) で解析した。対物レンズは 63×1.4 倍 Plan-APOCHROMAT を用いた。Alexa Fluor 488 (invitrogen) の蛍光は 488 nm で励起し、BP515-545 emission filter で観察した。Alexa Fluor 546 (invitrogen) の蛍光は 543 nm で励起し、LP620 emission filter で観察した。

ウエスタンブロット

ウイルス感染細胞、あるいは免疫沈降で得られた試料に含まれる蛋白質を、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって分離した。電気泳動後のゲルは、Transfer Buffer (Tris (hydroxymethyl) aminomethane 12.1 g、Glycine 14.4 g、メタノール 200 ml、H₂O 800ml) に浸しニトロセルロースメンブレン (BIORAD) と共に濾紙にはさみ、セミドライトランスファー装置 (BIORAD) で蛋白質をメン

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 (0.1% Tween20 を含む PBS) でブロッキングし、1% BSA in PBS-T で希釈した 1 次抗体と反応させた。その後、PBS-T で洗浄し、3% スキムミルク in PBS-T で希釈した 2 次抗体 (Horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse、anti-rabbit (GE Healthcare) あるいは Clean blot) と室温で 1 時間反応させた。2 次抗体反応終了後は、PBS-T で洗浄し、Enhanced Chemiluminescence (GE Healthcare) で発光させ、ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare) で検出した。GST-pull down 後の試料では、抗体の希釈に Canget signal solution (TOYOBO) を用いた。

免疫沈降法

Protein A-Sepharose Fast Flow (GE Healthcare) への抗体の吸着は、NP40buffer 中でビーズと各抗体を混合し、4℃で 2 時間転倒混和した後、NP40buffer で洗浄した。

Vero 細胞に各ウイルスを MOI 5 で感染させ 37℃で 18 時間培養した。感染細胞を PBS で回収した後、proteinase inhibitor cocktail (nacalai tesque) を加えた NP40buffer (0.5% NP-40、120 mM NaCl、50 mM Tris-HCl pH8.0、50 mM NaF) で溶解した。15,000rpm で遠心した後、上清を回収し、protein A-sepharose を加えて 4℃で 30 分間転倒混和し preclear した。Preclear は 2 回行った。×500g 1 分遠心

した後、上清を回収し、各抗体を吸着させた Protein A-Sepharose と 4℃で 2 時間反応させた。その後、NP40buffer で 4 回洗浄し、sample buffer に蛋白質を溶出させてウエスタンブロット解析に供した。

GST pull-down

各 GST 融合 UL51 蛋白質は上述の通り、大腸菌に発現させ、溶解用バッファー（500 mM NaCl, 25 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM 2-mercapto ethanol, 0.1% TitonX100）で溶解した後、Glutathione Sepharose 4B に吸着させて精製した。

Vero 細胞に HSV-1(F)を MOI 5 で感染させ、37℃で 18 時間培養した。感染細胞を PBS で回収した後、Protease Inhibitor Cocktail を加えた NP40buffer（0.5% NP-40、120 mM NaCl、50 mM Tris-HCl pH8.0、50 mM NaF）で溶解した。15000rpm で遠心した後、上清を回収し、Glutathion sepharose 4B を加えて 4℃で 30 分間転倒混和し preclear した。Preclear は 2 回行った。×500g 1 分遠心した後、上清を回収し、各 GST 融合 UL51 蛋白質を吸着させた Glutathione sepharose 4B を加えて 4℃で 1 時間転倒混和し反応させた。その後、NP40buffer（400 mM NaCl、50 mM Tris-HCl pH8.0、0.5% NP-40、50 mM NaF）で洗浄し、sampling buffer に蛋白質を溶出させ、抗 UL14 抗体を用いたウエスタンブロット解析に供した。

電子顕微鏡解析

Vero 細胞に MOI 5 でウイルスを感染させ 37℃で 18 時間培養した。感染細胞から培地を除去して PBS で洗浄し、アルデヒド固定液（2% paraformaldehyde、2% glutaraldehyde in 0.1M phosphate buffer（19mM NaH₂PO₄、81mM Na₂HPO₄、pH 7.4））を加え室温で 30 分間固定した。セルスクレイパーで細胞を回収、ペレット化させ、新しいアルデヒド固定液に交換し室温で 1 晩固定した。3% sucrose in 0.1M phosphate buffer（pH 7.4）で洗浄し、オスミウム固定液（1% osmium tetroxide in 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%、50%、70%、90%、99.5% Ethanol、Propylene oxide の順に置換して脱水し、Epon 812 resin mixture（TAAB Laboratories Equipment Ltd., Berks, England）で包埋した。Reichert Ultracut N Ultramicrotome（Reichert）を用いて超薄切片を作製し、2% uranyl acetate in 70% Ethanol と Reynolds' 鉛染色液（pH 12）で染色し、透過型電子顕微鏡（Hitachi H-7500）で観察した。

統計処理

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 検定により評価した。

結果

UL51 は UL14 と相互作用する

HSV 感染細胞内で UL51 と相互作用する蛋白質を探索するため、UL51 に FEM tag を付加した組換えウイルスを作製した。また、コントロールに用いるため、UL11 に FEM tag を付加した組換えウイルスも作製した。Vero 細胞に野生型ウイルスである HSV-1(F)、UL51-FEM ウイルスあるいは UL11-FEM ウイルスを MOI 5 で感染させ、18 時間後に回収し、ウエスタンブロットにより UL51、UL11 それぞれに FEM tag が付加されていることを確認した (図 5A, B)。また、Vero 細胞に HSV-1(F)、UL51-FEM ウイルスおよび UL11-FEM ウイルスを MOI 5 あるいは MOI 0.01 で感染させ、それぞれ 18 時間後、48 時間後のウイルス力価を測定したところ、FEM tag の付加によるウイルス増殖能への影響はほとんど認められなかった (図 5C, D)。

作製した UL51-FEM ウイルスおよび UL11-FEM ウイルスを Vero 細胞に MOI 5 で感染させ、18 時間後の感染細胞を溶解し、抗 Myc 抗体を用いた免疫沈降に供した。その結果、UL51-FEM と UL14 の共沈降が認められたが、UL11 との共沈降は認められなかった。また、UL11-FEM は UL51 および UL14 のいずれとも共沈降が認められなかった (図 6)。

さらに、HSV-1(F)を Vero 細胞に感染させ、感染後 18 時間の細胞を抗 UL51 抗体及び抗 UL14 抗体で共染色し、免疫蛍光抗体法により解析した。HSV-1(F)感染細胞において UL51、UL14 共に細胞質領域に局在し、両蛋白質は共局在していた（図 7）。

これらの結果から、UL51 と UL14 は感染細胞内で共局在し、相互作用していることが示唆される。

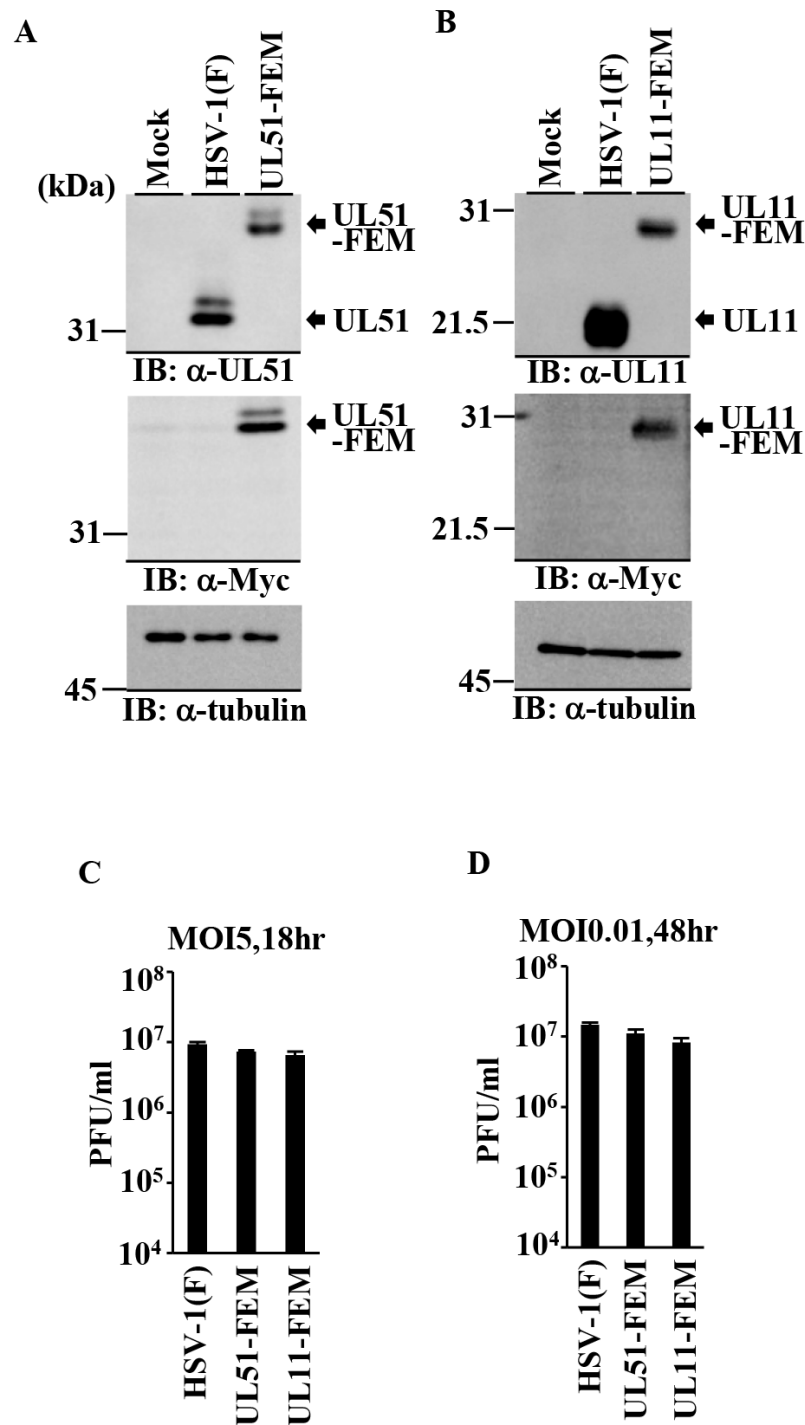


図 5. UL51-FEM、UL11-FEM ウイルスの性状解析

(A, B) 各ウイルスを Vero 細胞で MOI 5 で感染させ、18 時間後の感染細胞を UL51、Myc、 α -tubulin (A) および UL11、Myc、 α -tubulin (B) に対する抗体を用いたウェスタンブロットにより解析した。(C, D) 各ウイルスを Vero 細胞に MOI 5 (C) および MOI 0.01 (D) で感染させ、それぞれ 18 時間あるいは 48 時間で回収し、ウイルス力価を測定した。

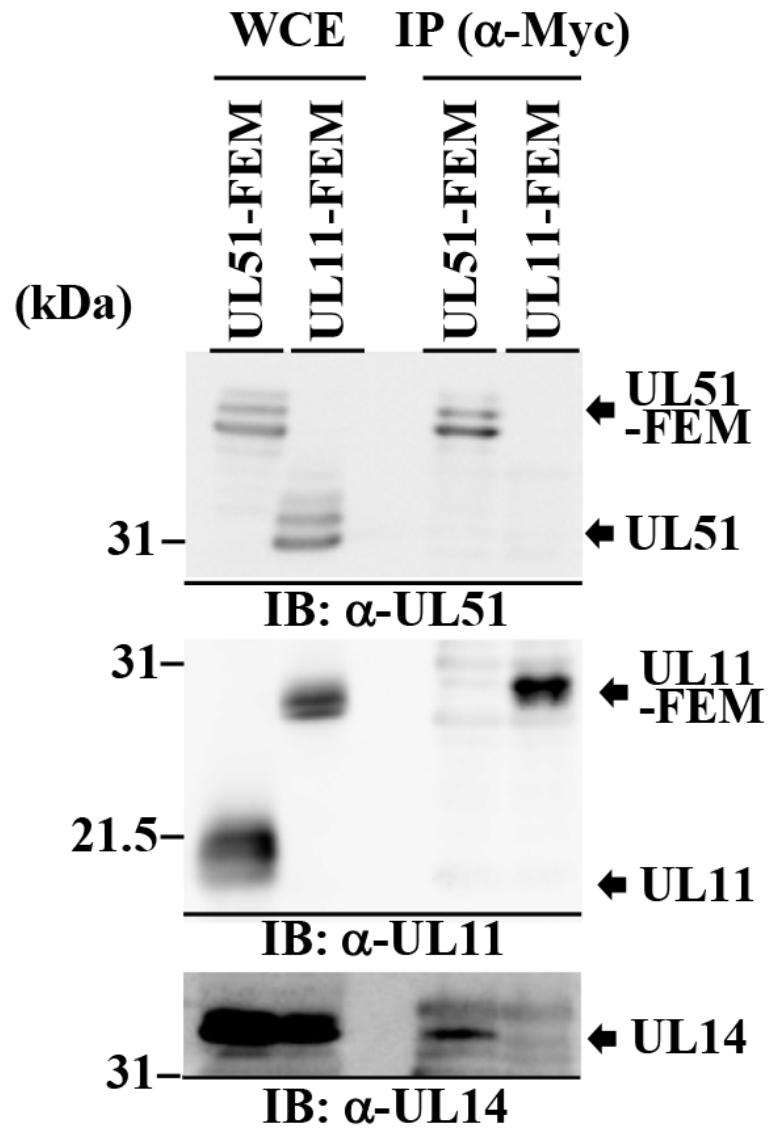


図 6. HSV-1 感染細胞における UL51 と UL14 の相互作用の検出

Vero 細胞に UL51-FEM ウイルスまたは UL11-FEM ウイルスを MOI 5 で感染させ、18 時間後の感染細胞を回収し、抗 Myc 抗体で免疫沈降し (immunoprecipitated: IP)、UL51、UL11、UL14 に対する抗体でウェスタンブロットにより解析した。WCE: whole-cell extract

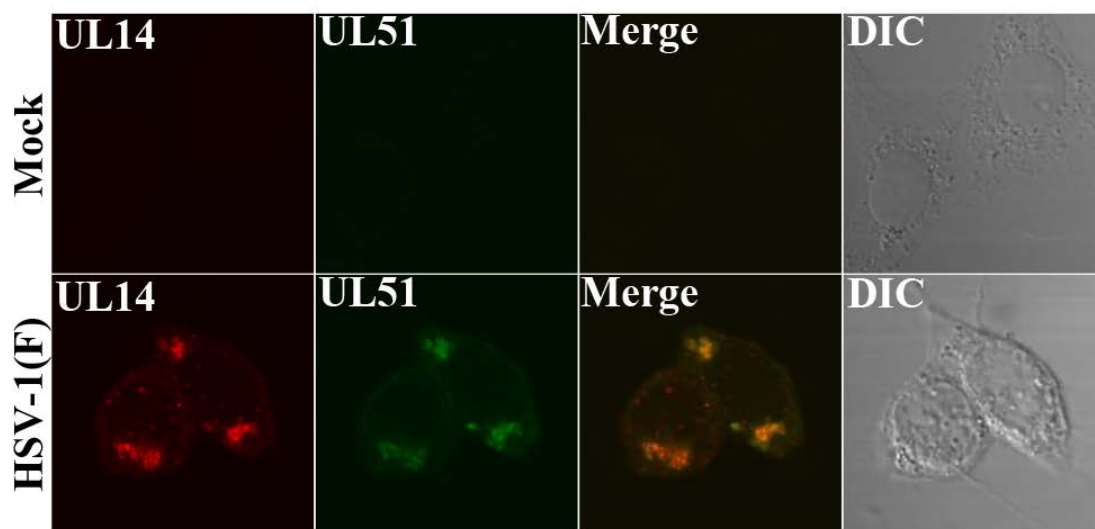


図 7. HSV-1 感染細胞における UL51 と UL14 の共局在

Vero 細胞に HSV-1(F)を MOI 5 で感染させ、感染 18 時間後の細胞を固定、透過処理し、UL51 と UL14 に対する抗体で免疫蛍光抗体法により共染色し、共焦点顕微鏡で観察した。

UL51 の UL14 との結合部位の同定

UL51 と UL14 の相互作用の意義を解析するため、GST pull-down により UL14 との結合に必要な UL51 のアミノ酸残基の探索を試みた。PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) により UL51 の二次構造を予測したところ、UL51 は 7 箇所の α -helix 構造をとる領域とその間をつなぐランダムコイルから成っていることが予測された。この予測に基づいて、 α -helix 構造を維持するようにランダムコイル部分で段階的に分割された UL51 を発現する GST 融合蛋白質を設計した(図 8A)。各アミノ酸領域の UL51 と GST の融合蛋白質(GST-UL51)を大腸菌に発現させて Gultathion sepharose 4B に吸着させ、HSV-1(F)を感染させた Vero 細胞を溶解したものと反応させた。GST 単独では UL14 との結合は検出されず、GST-UL51 では UL14 との結合が検出された。UL51 を段階的に短くしていくと、GST-UL51_12-170aa は UL14 との結合が検出されたが、GST-UL51_164-244aa では UL14 との結合が検出されなかった。UL51 の 12-170 アミノ酸領域をさらに短くすると、GST-UL51_12-130aa および GST-UL51_47-170aa の両方で UL14 との結合が検出された。重複している 47-130 アミノ酸領域をさらに分割すると、GST-UL51_47-94aa では UL14 との結合は検出されず、GST-UL51_90-130aa で UL14 との結合が検出された(図 8B)。このことから、UL51 の 90-130 アミノ酸領域の間に含まれる α -helix 構造領域が UL14

との結合に重要であることが示唆される。

蛋白質間の相互作用を形成する上で、疎水性アミノ酸残基あるいは荷電アミノ酸残基が重要であるケースが多い。ウイルスの構成蛋白質同士の結合に疎水性アミノ酸残基が重要である一例として、Human immunodeficiency virus の Gag の構成因子である p6 の 3 つの疎水性アミノ酸残基が Vpr との結合に重要であることが報告されている[28]。また、酵素と基質の複合体形成のような蛋白質間相互作用の多くは蛋白質の表面電荷による結合力が重要であることが多い。そこで、UL51 の 90-130 アミノ酸領域の Helix 構造を HeliQuest (<http://heliquet.ipmc.cnrs.fr/>) により予測し、予測された Helix 構造上において同側に位置する疎水性のアミノ酸である 111 番目のロイシン (L111)、119 番目のイソロイシン (I119)、123 番目のチロシン (Y123) の 3 箇所を選択し、アラニンに置換した GST-UL51_90-130_L111A/I119A/Y123A を作製し GST pull-down を試みたところ、UL14 との結合が UL51_90-130 と比較して有意に減少した (図 8B,C)。一方で、UL51 の 90-130 アミノ酸領域で荷電アミノ酸である 106 番目のアスパラギン酸、110 番目のアルギニン、113 番目のアスパラギン酸の 3 箇所を選択し、アラニン置換して作製した GST-UL51_90-130_D106A/R110A/D113A では UL14 との結合の減少は認められなかった (data not shown)。これらの結果から、UL51 の 90-130 アミノ酸領域が UL14 との結合において重要であり、L111、

I119、Y123 の 3 箇所をアラニンに置換することにより、UL51 と UL14 の結合が減少することが示唆される。

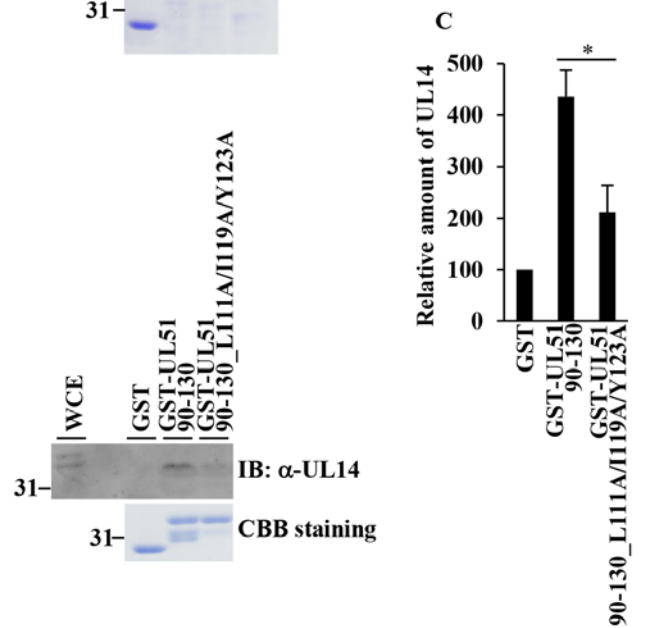
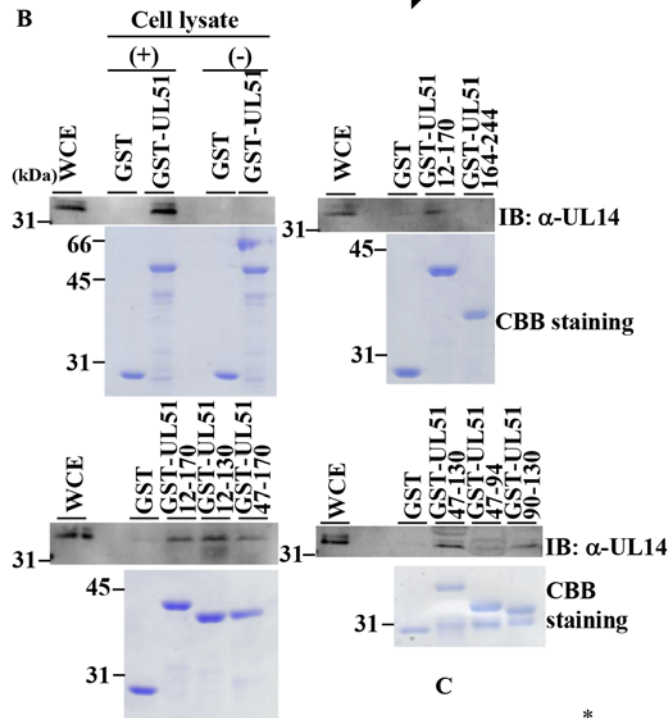
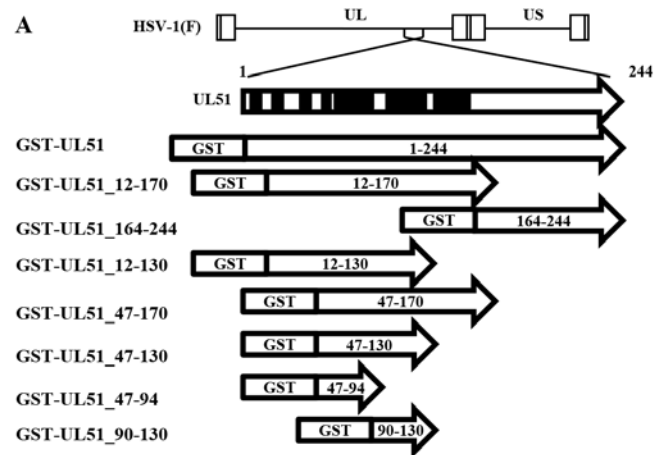


図 8. GST pull-down による UL51 の結合部位の同定

(A) 作製した各長の GST 融合 UL51 蛋白質の模式図を示す。UL51 の黒い塗りつぶしは予測された α -helix 構造のおよその位置を示す。(B) Vero 細胞に HSV-1(F)を MOI 5 で感染させ、感染後 18 時間の細胞を溶解し、大腸菌による発現後に Gultathion sepharose 4B に吸着させた各長の GST 融合 UL51 蛋白質と反応させ、抗 UL14 抗体を用いたウエスタンブロットにより解析した。GST 融合蛋白質の量は CBB 染色により評価した。(C) UL51 に導入した変異の UL14 との結合に対する影響の評価。結合能は GST pull-down によって検出された UL14 の蛋白質量を定量することで評価した。ウエスタンブロットによって検出された UL14 量は GST 融合蛋白質の量で標準化した。各値は独立した 3 回の実験で得られた値の平均値 \pm 標準誤差であり、コントロールとした GST 単独での値を 100 とした。* $P < 0.05$ (by analysis of T test)

UL51 と UL14 の結合は HSV-1 のウイルス増殖能に寄与する

GST pull-down により決定した UL51 の L111、I119、Y123 の 3 箇所をアラニンに置換した UL51LIY/AAA ウイルスとその復帰株を作製し、 Δ UL51 ウイルス、 Δ UL14 ウイルス、 Δ UL51/ Δ UL14 ウイルスおよびこれらの復帰株の性状を比較した。Vero 細胞にこれらのウイルスおよび HSV-1(F)を MOI 5 で感染させ、感染後 18 時間後の感染細胞を回収し、ウェスタンブロットにより変異を導入した遺伝子およびその隣接する遺伝子の蛋白質発現量を確認した。 Δ UL51 ウイルス感染細胞では UL51 の発現が検出されなくなり、 Δ UL51-repair ウイルス感染細胞で UL51 発現の回復が確認できた。また、 Δ UL51 ウイルス、 Δ UL51-repair ウイルス、UL51LIY/AAA ウイルスおよび UL51LIY/AAA-repair ウイルスの感染細胞で UL50 と UL52 の発現量への影響はほとんど認められなかった (図 9A)。 Δ UL14 ウイルス感染細胞では UL14 の発現が検出されなくなり、 Δ UL14-repair ウイルスで UL14 の発現の回復が確認できた。また、UL15 の発現に影響は認められなかった (図 9B)。 Δ UL51/ Δ UL14 ウイルス感染細胞では UL51 および UL14 が検出されなくなり、 Δ UL51/ Δ UL14-repair ウイルス感染細胞で UL51 と UL14 の発現の回復が確認できた。また、UL50、UL52、UL15 の発現への影響は認められなかった (図 9C)。この実験において、YK5002 をベースとする組換えウイルスにおいて UL13 の発現の消失が認められた。これは YK5002 (Cre-in) の UL13

遺伝子に変異が生じていたためであることがシーケンス解析により確認された(data not shown)。本研究では、UL13 発現の欠損が結果に影響していないことを示すため、これ以降の実験に UL13 を欠損した HSV-1、 Δ UL13 ウイルス (R7356) をコントロールに用いた。

Vero 細胞に HSV-1(F)と各ウイルスを MOI 5 あるいは MOI 0.01 で感染させ、それぞれ感染 18 時間後あるいは 48 時間後に回収し、感染細胞と培養上清中の感染性ウイルス力価を測定し、ウイルスの増殖能を比較した (図 10A,B)。MOI 5、MOI 0.01 のどちらの条件においても、 Δ UL51 ウイルス、 Δ UL14 ウイルス、 Δ UL51/ Δ UL14 ウイルスおよび UL51LIY/AAA ウイルスの増殖能は HSV-1(F)と各ウイルスの復帰ウイルスと比較して顕著に低下した。HSV-1(F)と各復帰ウイルスは同等の増殖能を示した。

さらに、Vero 細胞に各ウイルスを感染させ、2 日後に形成されたプラークのサイズを比較した (図 10C)。 Δ UL51 ウイルス、 Δ UL14 ウイルス、 Δ UL51/ Δ UL14 ウイルスおよび UL51LIY/AAA ウイルスの感染細胞のプラークサイズは、いずれも HSV-1(F)と各ウイルスの復帰ウイルスの感染細胞と比較して顕著に縮小した。HSV-1(F)と各復帰ウイルスの感染細胞ではほぼ同じプラークサイズを示した。

また、 Δ UL13 ウイルスでは、ウイルス増殖能も感染細胞のプラークサイズも

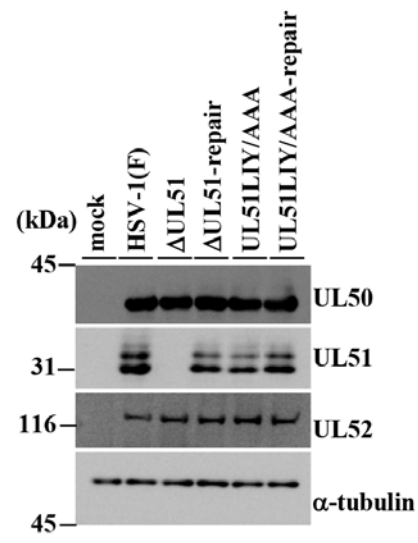
HSV-1(F)とほぼ同程度であり、UL13 の欠損による影響はほとんど認められなかった (図 10D~F)。

これらの結果から、効率的なウイルス増殖とプラーク形成における UL51 と UL14 の機能発現に両蛋白質の結合が要求されることが示唆される。

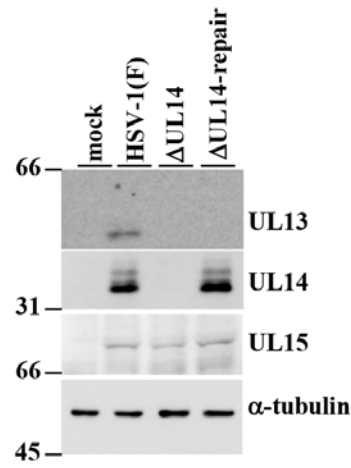
さらに、UL51LIY/AAA 変異による感染細胞中での UL51 と UL14 の結合への影響を、免疫沈降により検証した。まず、Vero 細胞に HSV-1(F)を MOI 5 で感染させ、18 時間後の細胞を回収して、抗 UL51、抗 UL14 抗体を用いた免疫沈降に供した。抗体コントロールとして抗 UL50 抗体を用いた。抗 UL51 抗体による免疫沈降では UL14 の共沈降が検出され、抗 UL14 抗体による免疫沈降では UL51 の共沈降が検出された。コントロールとして用いた抗 UL50 抗体による免疫沈降では UL51、UL14 どちらの共沈降も検出されなかった (図 11A,B)。さらに、Vero 細胞に HSV-1(F)、UL51LIY/AAA ウイルス、UL51LIY/AAA-repair ウイルスおよびコントロールとして Δ UL51 ウイルス、 Δ UL14 ウイルスを MOI 5 で感染させ、感染 18 時間後の感染細胞を回収し、抗 UL51 抗体、抗 UL14 抗体を用いた免疫沈降に供した。その結果、UL51LIY/AAA 感染細胞では抗 UL51 抗体による免疫沈降で UL14 の共沈降が検出されず、抗 UL14 抗体による免疫沈降で UL51 の共沈降が検出されなかった。また、UL51LIY/AAA-repair ウイルスでは UL51、UL14 の共沈降が検出された。以上の結果から、野生型である HSV-1(F)感染細胞でも

UL51 と UL14 が相互作用しており、その相互作用は UL51 の L111A/I119A/Y123A 変異によって減少することを確認できた。

A



B



C

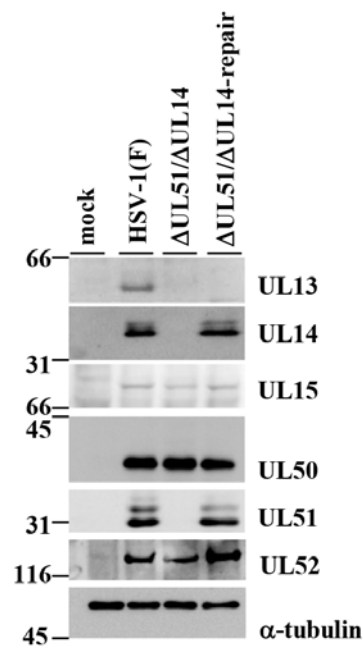


図 9. UL51 または UL14 の変異による隣接遺伝子の発現への影響

Vero 細胞に(A) Δ UL51、 Δ UL51-repair、UL51LIY/AAA、UL51LIY/AAA-repair、(B) Δ UL14、 Δ UL14-repair、(C) Δ UL51/ Δ UL14、 Δ UL51/ Δ UL14-repair ウイルスを MOI 5 で感染させ、感染 18 時間後の細胞を回収し、各蛋白質に対する抗体を用いてウエスタンブロットにより解析した。

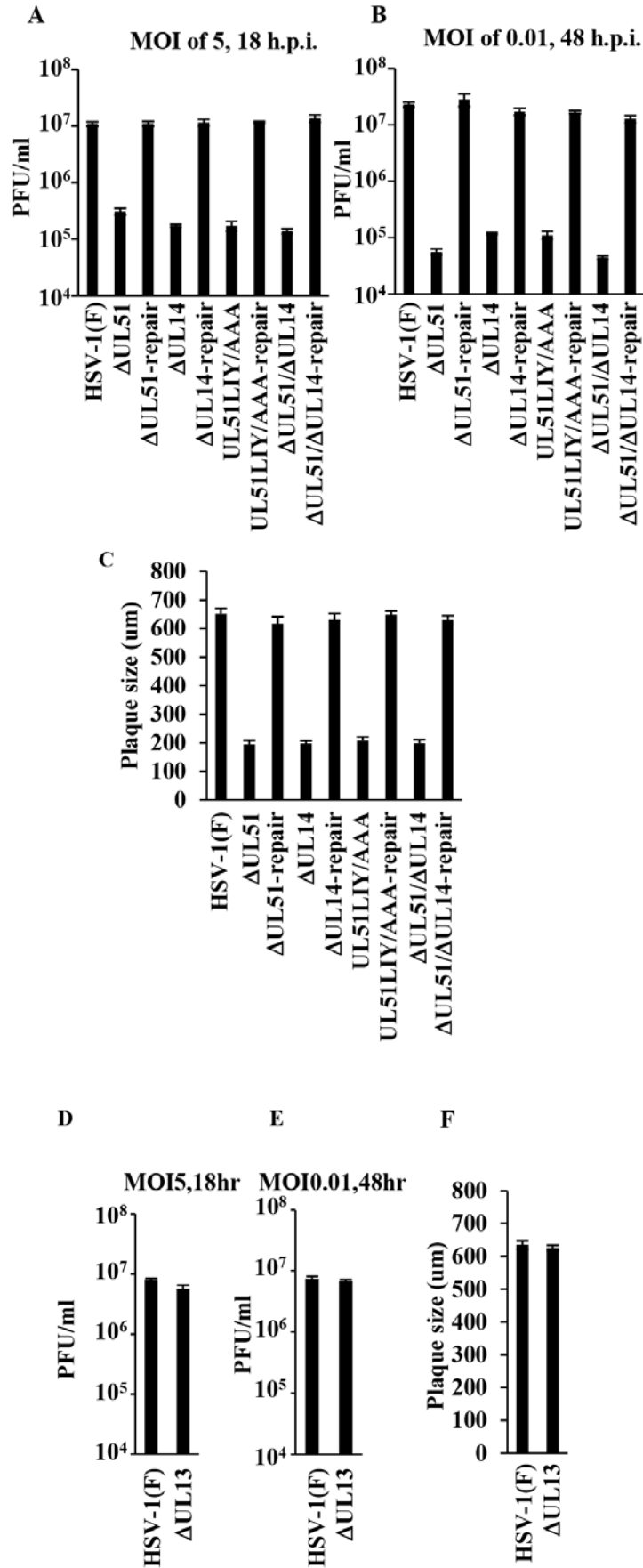


図 10. UL51 または UL14 の変異によるウイルス増殖能への影響

(A, B, D, E) Vero 細胞に各ウイルスを MOI 5 あるいは MOI 0.01 で感染させ、それぞれ感染後 18 時間、48 時間で回収しウイルス力価を測定した。(C, E) Vero 細胞に各ウイルスを感染させ、2 日後のプラークサイズを測定した。値は 10 個のプラークの直径の平均値±標準誤差を示す。3 回の独立した実験の代表的な結果を示した。

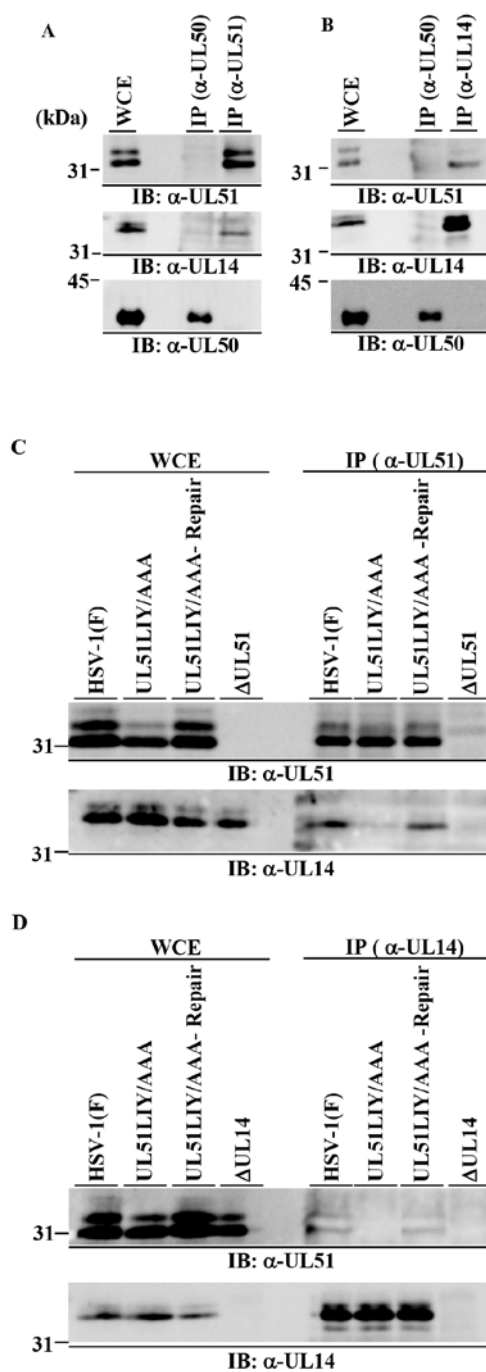


図 11. UL51 の変異による UL14 との結合に対する影響

(A, B) Vero 細胞に HSV-1(F)とコントロールとして ΔUL51 (A)、ΔUL14 (B) を MOI 5 で感染させ、感染 18 時間後のサンプルを UL51 (A)、UL14 (B) に対する抗体を用いて免疫沈降しウエスタンブロットにより解析した。コントロールとして UL50 抗体を用いた。(C, D) Vero 細胞に各ウイルスを MOI 5 で感染させ、感染 18 時間後のサンプルを UL51 (C)、UL14 (D) に対する抗体で免疫沈降し、ウエスタンブロットにより解析した。

UL51 と UL14 は相互作用により互いの細胞内局在を制御する

UL51 と UL14 の相互作用がそれぞれの細胞内局在に影響するのかを調べるため、Vero 細胞に HSV-1(F)、 Δ UL51 ウイルス、 Δ UL14 ウイルス、UL51LIY/AAA ウイルスおよび各復帰ウイルスと Δ UL13 ウイルス (R7356) を MOI 5 で感染させ、感染後 18 時間の感染細胞を免疫蛍光抗体法により抗 UL51 抗体と抗 UL14 抗体で共染色し、UL51 と UL14 の細胞内局在を観察した。HSV-(F)および各復帰ウイルス感染細胞内では、UL51 と UL14 は細胞質領域に集積した局在を示し、両蛋白質は共局在を示した。一方で、 Δ UL51 ウイルス感染細胞では UL14 の局在は野生型と異なり、細胞全体に拡散している像が観察された。 Δ UL14 ウイルス感染細胞では UL51 の局在は野生型と異なり、細胞全体に拡散している像が観察された。さらに、UL51LIY/AAA ウイルス感染細胞では UL51 と UL14 はどちらも細胞全体に拡散していた(図 12)。これらの UL51 と UL14 の局在の変化が、ウイルス蛋白質に非特異的に起きているのではないことを示すため、UL51 および UL14 と同じくテグメント蛋白質であり *secodary envelopment* に関与するとされている UL11 [5]の局在を各変異ウイルス感染細胞で確認した。HSV-1(F)、 Δ UL51 ウイルス、 Δ UL14 ウイルス、UL51LIY/AAA ウイルスおよび各復帰ウイルスと Δ UL13 ウイルスの感染細胞を免疫蛍光抗体法により抗 UL11 抗体で染色し観察したところ、いずれのウイルスの感染細胞においても、UL11 は野生型

HSV-1(F)と同様の局在を示した（図 13）。これらの結果から、UL51 と UL14 が感染細胞内で適切な局在をとるためには、UL51 と UL14 の相互作用が要求されるということが示唆される。

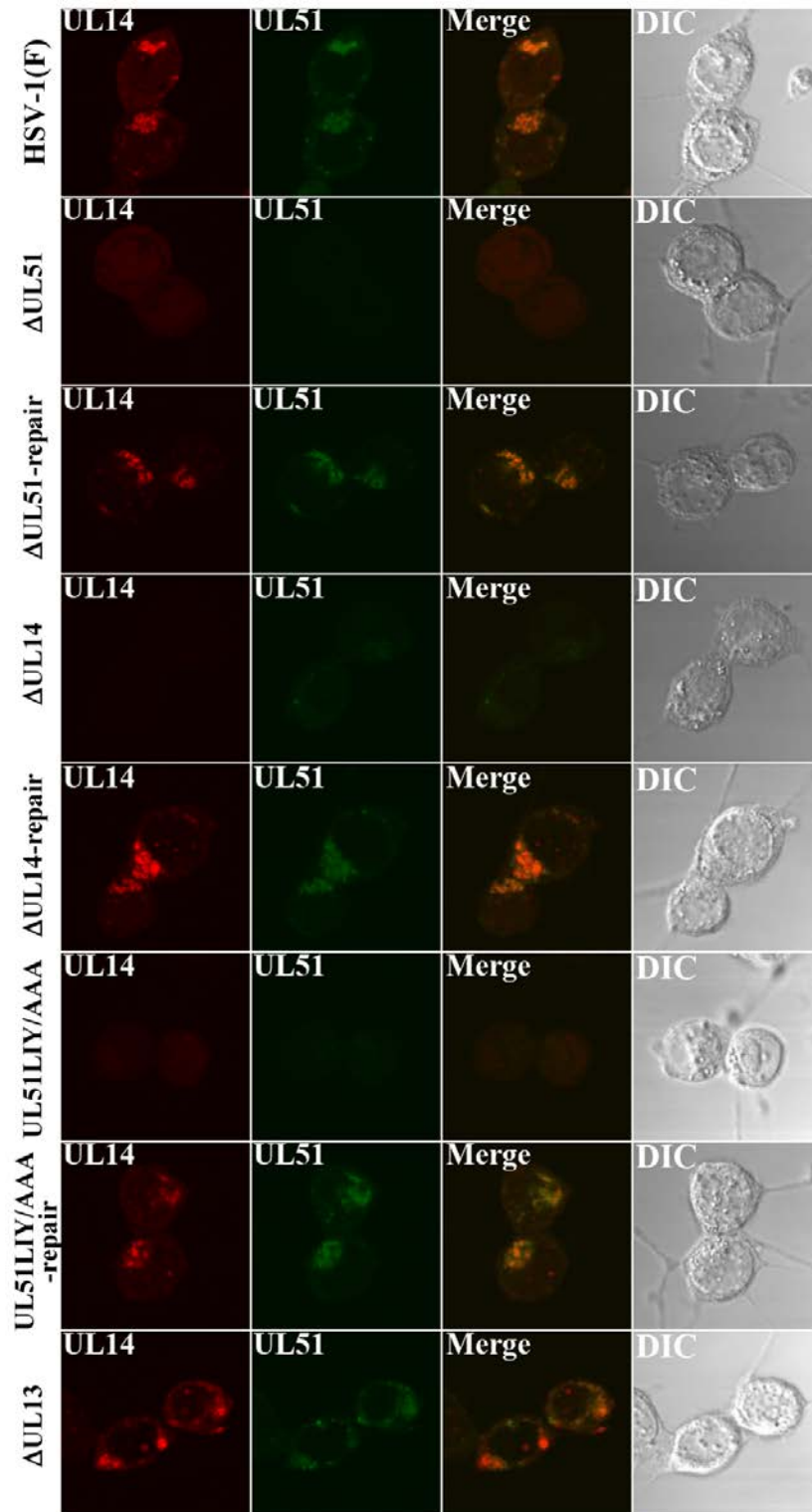


図 12. UL51 と UL14 の相互作用による互いの細胞内局在に対する影響

Vero 細胞に各ウイルスを MOI 5 で感染させ、18 時間後に固定、透過処理し、UL51 と UL14 に対する抗体を用いて免疫蛍光抗体法により共染色し、共焦点顕微鏡で観察した。

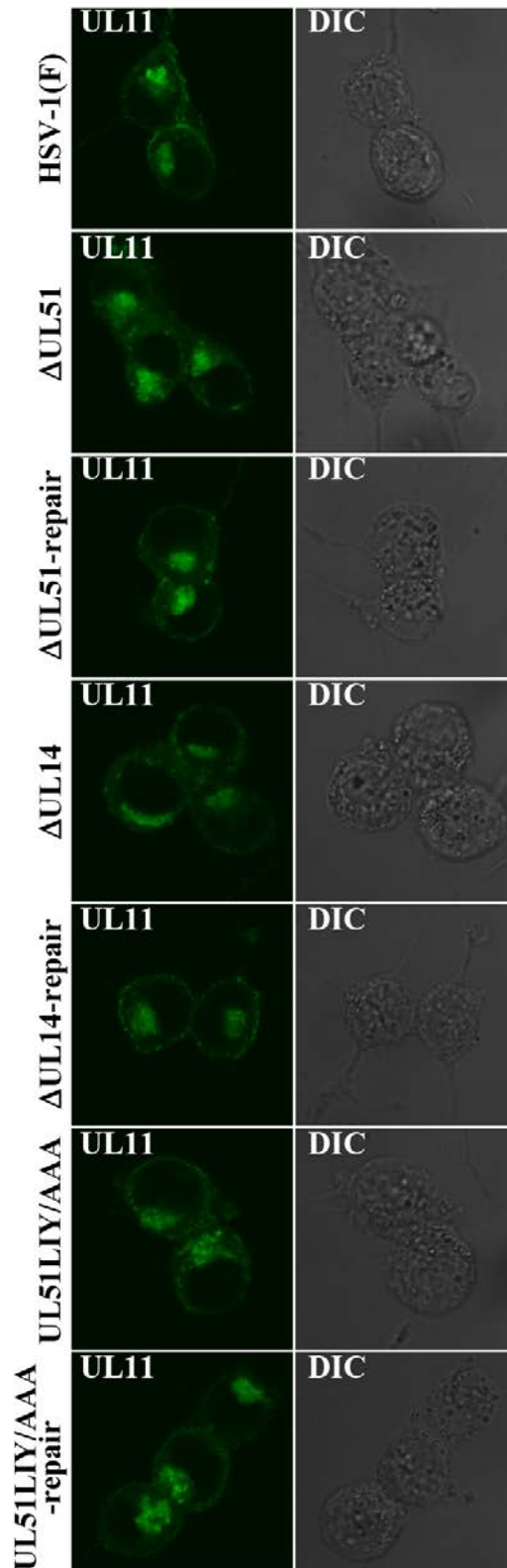


図 13. UL51 と UL14 の相互作用の UL11 の細胞内局在

Vero 細胞に各ウイルスを MOI 5 で感染させ、18 時間後に固定、透過処理し、抗 UL11 抗体を用いて免疫蛍光抗体法により染色し、共焦点顕微鏡で観察した。

UL51 と UL14 の相互作用はウイルス粒子の成熟に関与する

UL51 と UL14 は secondary envelopment に関与することが報告されている[16, 47, 67, 82]。UL51 と UL14 の相互作用が、ウイルスの粒子成熟に関与しているのかを調べるため、Vero 細胞に HSV-1(F)、 Δ UL51 ウイルス、 Δ UL14 ウイルス、UL51LIY/AAA ウイルス、 Δ UL51/ Δ UL14 ウイルスおよび各復帰ウイルスと Δ UL13 ウイルスを MOI 5 で感染させ、感染後 18 時間の感染細胞を電子顕微鏡解析に供し、感染細胞内のウイルス粒子を観察した (図 14、表 4)。 Δ UL51 ウイルス、 Δ UL14 ウイルス、UL51LIY/AAA ウイルス、 Δ UL51/ Δ UL14 ウイルス感染細胞では細胞質内にエンベロープ膜を獲得していないヌクレオカプシドの蓄積が認められた。ヌクレオカプシドの割合は HSV-(F)、各復帰ウイルスおよび Δ UL13 ウイルス感染細胞では 11%以下であるのに比較し、 Δ UL51 ウイルス、 Δ UL14 ウイルス、UL51LIY/AAA ウイルス、 Δ UL51/ Δ UL14 ウイルス感染細胞では 26%以上に増加していた。また、 Δ UL51 ウイルス、 Δ UL14 ウイルス、UL51LIY/AAA ウイルス、 Δ UL51/ Δ UL14 ウイルス感染細胞では、ウイルス粒子が細胞質内の膜構造に部分的に覆われている様子が観察され、ウイルス粒子の 11%以上まで増加していた。これらのウイルス粒子は secondary envelope を獲得している途中であると考えられ[43, 47, 82]、HSV-(F)、各復帰ウイルスおよび Δ UL13 ウイルス感染細胞では 4%以下でありほとんど観察されなかった。一方で、

細胞質内あるいは細胞外のエンベロープを有するウイルス粒子は HSV-(F)、各復帰ウイルスおよび Δ UL13 ウイルス感染細胞ではそれぞれ 15%以上、19%以上であったのに対し、 Δ UL51 ウイルス、 Δ UL14 ウイルス、UL51LIY/AAA ウイルス、 Δ UL51/ Δ UL14 ウイルス感染細胞ではそれぞれ 8.3%以下、8.4%以下に減少していた。 Δ UL13 感染細胞における各成熟段階のウイルス粒子の割合は HSV-1(F) 感染細胞とほぼ同じであった。これらの結果は、UL51 と UL14 の結合を阻害することで二次エンベロープを獲得したウイルス粒子が減少し、細胞質におけるエンベロープを有さないヌクレオカプシドと二次エンベロープを獲得している途中の粒子が増加することを示し、UL51 と UL14 の相互作用が secondary envelopment の促進に要求されることを示唆する。

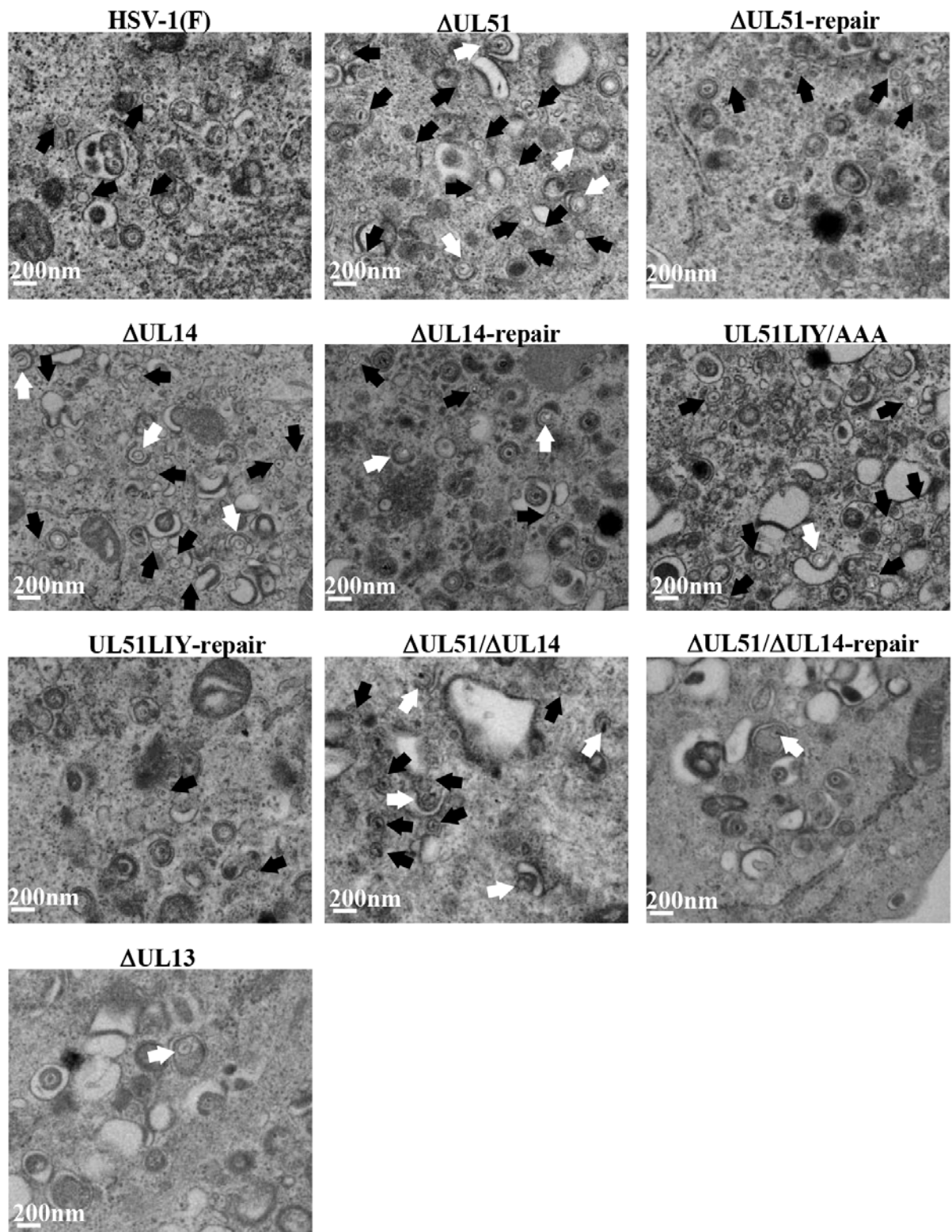


図 14. Secondary envelopment に対する UL51 と UL14 の相互作用の影響

Vero 細胞に各ウイルスを MOI 5 で感染させ、18 時間後に固定、包埋、薄切、染色し、透過型電子顕微鏡で観察した。黒矢印：ヌクレオカプシド 白矢印：部分的にエンベロープに覆われているカプシド スケールバー：200 nm

表 4. 各成熟過程のウイルス粒子の割合

virus	Avg (%) virus particles in the indicated morphogenetic stage (no. of particles counted)						Total no. of particles counted
	Nucleocapsids in the nucleus	Enveloped particles in the perinuclear space	Unenveloped capsids in the cytoplasm	partially enveloped capsids in the cytoplasm	Enveloped particles in the cytoplasm	Extracellular enveloped particles	
HSV-1(F)	44.0 (521)	6.8 (81)	5.2 (62)	4.1 (49)	15.8 (187)	24.1 (285)	1185
ΔUL51	38.0 (353)	7.3 (68)	30.0 (278)	12.1 (112)	4.2 (39)	8.4 (78)	928
ΔUL51repair	42.9 (438)	7.1 (73)	8.9 (91)	1.7 (17)	17.1 (175)	22.2 (227)	1021
ΔUL14	38.4 (308)	4.6 (37)	29.8 (239)	11.8 (95)	8.3 (67)	7.1 (57)	803
ΔUL14repair	39.8 (449)	4.5 (51)	11.0 (124)	3.5 (39)	21.3 (240)	19.9 (224)	1127
UL51LIY/AAA	45.8 (352)	3.0 (23)	26.3 (202)	12.0 (92)	5.5 (42)	7.5 (58)	769
UL51LIYrepair	36.9 (404)	9.1 (100)	10.0 (109)	3.7 (41)	18.4 (202)	21.8 (239)	1095
ΔUL51/ΔUL14	43.2 (328)	3.6 (27)	32.8 (249)	11.3 (86)	3.6 (27)	5.5 (42)	759
ΔUL51/ΔUL14repair	39.8 (382)	5.3 (51)	8.3 (80)	1.7 (16)	18.2 (175)	26.6 (255)	959
R7356 (ΔUL13)	48.1 (494)	5.4 (55)	5.2 (53)	3.1 (32)	17.7 (182)	20.5 (210)	1026

各ウイルスにつき 8 個の細胞で観察されたウイルス粒子数を計上した。

UL51 と UL14 の結合が TGN46 の局在に影響する

ここまでの結果から、UL51 は UL14 と結合することで効率的な secondary envelopment の促進に関与することが示唆された。HSV-1 の secondary envelopment site となる細胞内小胞は TGN に由来するという説が有力候補として考えられており、HSV-1 の感染により TGN が再分布されることが知られている。UL51 および UL14 の TGN との関連性と調べるため、Vero 細胞に、HSV-1(F)と Δ UL51 ウイルス、 Δ UL14 ウイルス、UL51LIY/AAA ウイルス、 Δ UL51/ Δ UL14 ウイルスと各復帰ウイルスおよび Δ UL13 を MOI 5 で感染させ、感染後 18 時間の感染細胞を抗 TGN46 抗体を用いた免疫蛍光抗体法により観察した (図 15)。非感染細胞では TGN46 は細胞質の核膜近傍に局在しており、HSV-1(F)および各復帰ウイルスと Δ UL13 ウイルスの感染により TGN46 蛋白質は細胞質全体に拡散することが観察された。一方で、 Δ UL51 ウイルス、 Δ UL14 ウイルス、UL51LIY/AAA ウイルス、 Δ UL51/ Δ UL14 ウイルス感染細胞では、非感染細胞とは異なるものの TGN46 は細胞質の核膜近傍に蓄積していた。これらの結果から、UL51 と UL14 の相互作用は HSV 感染細胞における TGN 蛋白質の再分布に要求されることが示唆された。

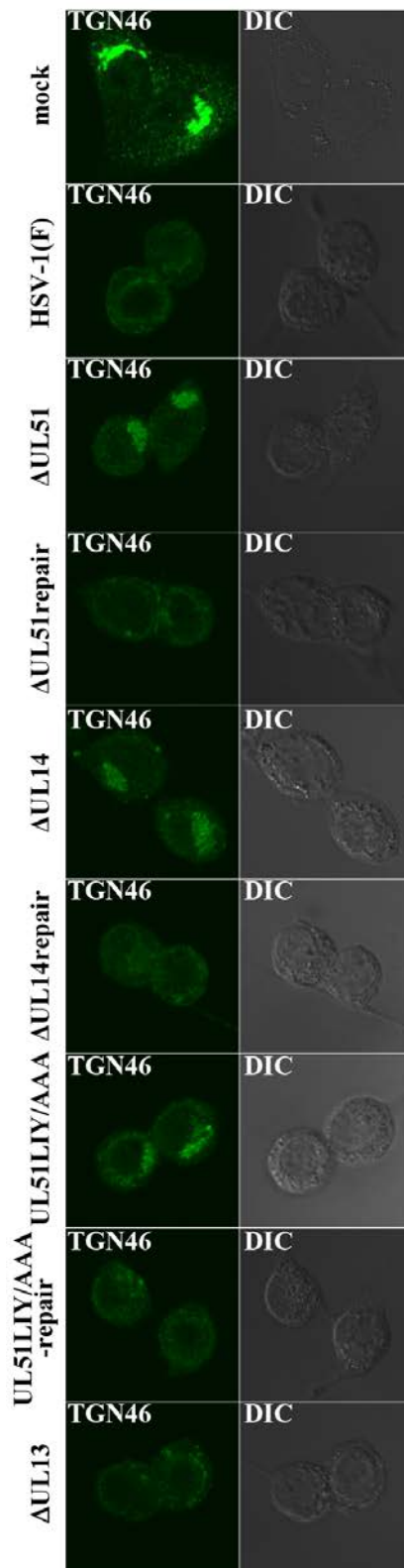


図 15. UL51 と UL14 の TGN の局在に対する影響

Vero 細胞に各ウイルスを MOI 5 で感染させ、18 時間後に固定、透過処理し、TGN46 抗体を用いて免疫蛍光抗体法により染色し、共焦点顕微鏡で観察した。

考察

本研究では、HSV-1 の感染細胞内において、ヘルペスウイルスに保存されるテグメント蛋白質である UL51 と UL14 が相互作用することを示した。この相互作用がウイルス増殖において機能しているのかを調べるため、GST pull-down により UL51 の L111/I119/Y123 が UL14 との結合に重要であることを明らかにし、この 3 箇所をアラニン置換することで UL51 と UL14 の相互作用が阻害される変異ウイルスを作製し解析を試みた。その結果、UL51 と UL14 の相互作用は (i) UL51 と UL14 それぞれの適切な細胞内局在、(ii) 効率的なウイルス増殖とプラーク形成、(iii)ヌクレオカプシドの効率的な二次エンベロープ膜獲得、(iv) HSV 感染に伴う TGN46 の再分布に要求されることが明らかとなった。

上述の通り、テグメント蛋白質を中心とするウイルス構成蛋白質同士が相互作用することが明らかにされてきており、それらの相互作用が secondary envelopment に必要であることが予想されている。しかしながら、ほとんどは secondary envelopment に関与する蛋白質が他の蛋白質と相互作用することを示していることに留まっており、その相互作用がウイルス増殖において機能していることが証明されている例はほとんどない。テグメント蛋白質間の相互作用

が secondary envelopment に必要とされることが示されているのは UL37 と UL36 の相互作用についてのみである。UL36 の UL37 との結合領域である 548 番目から 572 番目のアミノ酸領域の欠損によりヌクレオカプシドが二次エンベロープを獲得しなくなり、ウイルス増殖が阻害されることが報告されている[45]。UL36 および UL37 はどちらも HSV-1 の増殖に必須の蛋白質であり[19, 20]、これらの相互作用のウイルスの粒子形成に対する影響は大きい。ただし、変異ウイルス感染細胞ではヌクレオカプシドは細胞内小胞膜には蓄積せず、細胞質に拡散していることが報告されている[45]。つまり UL36 と UL37 の相互作用はウイルス粒子形成過程の secondary envelopment よりも上流である、ヌクレオカプシドの輸送やほかのテグメントへの結合に必要とされ、その結果として secondary envelopment の阻害が観察されていると考えられる。本研究では、UL51 の 3 つのアミノ酸残基をアラニン置換することで UL14 との結合を阻害した変異ウイルスを用いて、UL51 と UL14 の相互作用が secondary envelopment に寄与し、ウイルス増殖において機能していることを示した。しかしながら、本研究で UL51 と UL14 の相互作用を検出するために実施した実験系では、UL51 および UL14 以外の蛋白質も存在している条件下で共沈降を検出している。従って、UL51 と UL14 が直接結合していることを完全には証明できておらず、例えば UL7 などの他の蛋白質を介して間接的に結合している可能性を否定しきれていないことに

は留意する必要がある。また、実験に用いた UL51 に UL14 との結合を阻害する変異を導入したウイルスについては、変異導入部位が UL14 との結合以外の未知の機能の責任部位にもなっている可能性を否定しきれないことについても留意しておくべきである。この点についてはあらゆる組換え実験において避けられない問題であるが、現状のウイルス学分野では広く認められ採用されている手法となっている。さらに、本研究においては UL51 と UL14 の二重欠損ウイルスにおいても同様の結果が得られていることから、UL51 と UL14 の相互作用が secondary envelopment に寄与し、ウイルス増殖において機能しているという結論は支持される。ウイルス粒子形成におけるウイルス構成蛋白質の機能には redundancy があることが知られており、例として UL46 と UL47 はどちらかを欠損させると、他方の粒子への取り込み量が増加することや[104]、また、glycoprotein では gE/gI と gD [24]、あるいは gB と gD[43]は同時に欠損させることで secondary envelopment が阻害されることが報告されており、secondary envelopment における蛋白質の機能の多くには代替経路が存在していることが示唆されている。UL51 および UL14 はどちらも培養細胞での増殖に必須ではないに関わらず、UL51 と UL14 の相互作用を阻害した UL51LIY/AAA ウイルスではウイルス増殖能が野生型よりも 10 倍以上低下した。UL51 と UL14 の相互作用がウイルス増殖能に果たす役割は比較的大きいと言える。本研究はウイルス増

殖に必須ではないテグメント蛋白質同士の相互作用が、secondary envelopment 自体に貢献することで HSV-1 の効率的なウイルス増殖に寄与していることを示した初の報告となる。HSV-1 のテグメント蛋白質の多くは UL51、UL14 と同様にウイルス増殖に必須でないとされており、欠損によるウイルス増殖能の低下が 10 倍程度のものも多い。本研究による知見は、これまでに報告されている相互作用もウイルス増殖において機能している可能性を支持するものとなる。

本研究では、UL51 あるいは UL14 の単独欠損、UL51 と UL14 が相互作用しない変異、および UL51 と UL14 の二重欠損によるウイルス増殖能に対する影響はいずれもほぼ同等であるという結果が得られた。また、UL51 と UL14 は野生型ウイルス感染細胞では共局在を示すが、それには両蛋白質が相互作用する必要があることが示唆された。HSV-1 のウイルス蛋白質である UL31 と UL34 は複合体を形成することが知られており、UL31、UL34 複合体は核膜に局在し primary envelopment に寄与しカプシドの核膜通過に重要な働きをしている。UL31 欠損あるいは UL34 欠損ウイルスの解析により、UL31 と UL34 は複合体となることで核膜に局在することができヌクレオカプシドのエンベロープ獲得における機能を発揮できることが示されている[54, 74]。これと同様に、UL51 と UL14 は複合体を形成することによってウイルス増殖能における機能を発現するようにな

るという可能性が考えられる。

UL51 と UL14 が機能発現する上で複合体を形成することがどのような意義をもつかについては現段階では不明であるが、一つの仮説として、UL14 により UL51 のフォールディングが制御されている可能性が挙げられる。UL51LIY/AAA ウイルス感染細胞の WCE における UL51 の上部バンドの減少が認められた。この UL51 上部バンドの減少は Δ UL14 ウイルス感染細胞においても同様に認められたことから (図 11C, D)、UL51LIY/AAA 変異で検出された UL51 の発現量の低下は遺伝子変異に伴う副次的なものではなく、UL14 との相互作用が UL51 の蛋白質フォールディングに関与していることを示唆する。同様の現象は UL16 でも報告されている。Hsp33 と同様の motif 配列を持つ UL16 はシャペロンとしての機能が示唆されており、UL11、UL49、gE のフォールディングを促進しているという説もある[13, 87]。UL14 も Hsp70 の基質結合部位と類似した配列を有しており、シャペロン活性をもつといわれている[68]。さらに、HSV-1 の gH/glycoprotein L (gL) 複合体では gL がシャペロンとして機能し gH のフォールディングと輸送を制御している[38]。これと同様に UL14 のシャペロン活性も VP16 や UL46 の細胞内輸送に関与することが報告されている[68]。これらのことから、UL14 との相互作用によって UL51 の適切なフォールディングと細胞内輸送が維持されている可能性が示唆され、UL51 が UL14 と複合体を形成するこ

とによって機能発現するようになるという説が支持される。一方で、 Δ UL51 ウイルスおよび UL51LIY/AAA ウイルス感染細胞においては UL14 も野生型で見られる局在を示しておらず、UL14 が機能発現するためにも UL51 との相互作用が重要であることが示唆される。

電子顕微鏡解析により、各欠損ウイルスあるいは UL51LIY/AAA ウイルス感染細胞では細胞質内にヌクレオカプシドや部分的にエンベロープを獲得している粒子が蓄積することから、UL51 と UL14 の相互作用は HSV の増殖過程において secondary envelopment に機能することが強く示唆された。しかしながら、UL51 と UL14 がヌクレオカプシドの二次エンベロープ獲得を促進するメカニズムの解明には至っていない。

序文の項で言及したように、HSV-1 のテグメントを中心とするウイルス構成蛋白質間の相互作用は多数報告されており、ウイルス蛋白質同士による複合体形成が secondary envelopment を引き起こす原動力である可能性が考えられている。本研究によって新たに UL51 と UL14 の相互作用に関する知見が追加された。また、UL51 は UL7、gE との相互作用がそれぞれ報告されている[78, 79]。さらに、yeast two hybrid 法により VP26 が UL51 および UL14 と[53]、UL14 が UL2、UL7、UL16、UL30、UL34、UL38、UL40、UL47、Us10 と相互作用することが

報告されている[26]。既存の報告（図 2）と本研究による知見を総合すると図 16 のようなウイルス蛋白質間ネットワークを描くことができる。これまでは UL36-UL37、UL11-UL16-UL21-gE、UL48 と UL46、UL47、UL49、UL41 の相互作用がカプシド、テグメント、エンベロープ蛋白質をつなぐウイルス蛋白質間ネットワークの主要な部分であった。UL51 はウイルス増殖に重要であり、パルミトイル化により膜と関連するという特性があるにも関わらず、ウイルス蛋白質間の相互作用のネットワークにおける位置付けはよくわかっていなかった。本研究によって UL14 と相互作用することが明らかになったことにより、UL51 と UL14 がカプシド、テグメント蛋白質群とエンベロープ蛋白質をつなぎ、相互作用のネットワークにおいて多くのウイルス蛋白質群に影響を及ぼし得ることが示唆された。UL51 と UL14 が形成する複合体と他のウイルス蛋白質との相互作用が secondary envelopment において機能的であるのかについては、HSV のウイルス粒子の成熟メカニズムを解明する上で、今後の課題となるところである。

UL51 と UL14 が感染細胞内で野生型の局在を示すために互いの相互作用が必要であることを示した。UL51 および UL14 が細胞内の適切な部位に局在することで両蛋白質が機能を発現し、その結果として secondary envelopment を促進している可能性が考えられる。上述のように UL14 のシャペロン活性が UL51 の細

胞内輸送を制御しているという説に加えて、UL51 も UL7 および gE の細胞内局在を制御しており[78, 79]、UL51 も他の蛋白質の細胞内輸送を制御する能力を有している可能性が予想される。さらに UL51 と UL14 は他のウイルス蛋白質とも相互作用するため、両蛋白質が相互作用することにより適切な局在を取り、それに伴って他の蛋白質の細胞内輸送を制御することで secondary envelopment を効率的に促進する役割を果たしているというモデルが考えられる（図 17A）。UL51 は単独発現時には Golgi マーカー蛋白質と部分的に共局在するが[66]、UL14 との相互作用がない条件である Δ UL14 ウイルスあるいは UL5LIY/AAA ウイルス感染細胞では細胞内に拡散し、単独発現時とは異なる細胞内分布を示した。この結果も、UL51 の局在に UL14 以外のウイルス蛋白質との相互作用も関係しているということを支持するものである。さらに、UL51 および UL14 は共にカプシド蛋白質である VP26 との相互作用が報告されていることから[53]、UL51 と UL14 の複合体の作用はテグメント蛋白質だけでなくヌクレオカプシドにも影響し、ヌクレオカプシドをテグメント獲得や secondary envelopment が行われる場所へ輸送している可能性も考えられる（図 17B）。UL51 および UL14 はウイルス構成蛋白質全般の細胞内輸送を制御する中心的な役割を担う重要な制御因子であるのかもしれない。

電子顕微鏡解析の際に、細胞質内の膜構造に部分的に覆われているウイルス

粒子が観察された。このような部分的に二次エンベロープを獲得したウイルス粒子は gB、gD の二重欠損によっても観察されており[43]、secondary envelope を獲得する段階において阻害がおきていると考えられる。UL51 と UL14 はテグメント蛋白質であるため二次エンベロープを獲得するより前の時点でウイルス粒子に取り込まれていることが予想されることから、UL51 と UL14 が secondary envelopment において機能するのは、テグメントを獲得したヌクレオカプシドが膜構造に接着し、エンベロープを獲得する過程であると考えられる。これまでに、カプシドのエンベロープ獲得を積極的に進める能力を持つ蛋白質の存在は示されておらず、UL51 および UL14 が膜を変形させる活性などを持ち、その機能を有している可能性もある (図 17C)。あるいは、UL51 と UL14 が膜変性活性をもつ宿主蛋白質を secondary envelopment site に誘導しているのかもしれない。HSV-1 の secondary envelopment に寄与する宿主因子についてはほとんど明らかにされていないが、膜の切断に endosomal sorting complex required for transport (ESCRT) 機構が関与することが示唆されている。多くのエンベロープウイルスが形成過程において膜の切断に ESCRT の機能を利用していることが知られており[97]、HSV-1 のエンベロープ獲得にも ESCRT が寄与していることが示唆されている。ESCRT の機能に重要な酵素である Vps4 の dominant-negative の発現によって secondary envelopment が阻害されること[15]、Vps4 による multivesicular

bodies の制御が gB の細胞内輸送に関与することが報告されている[10]。ESCRT がどのようにして secondary envelopment が引き起こされる場に誘導されるのかについては明らかにされていないが、多くのウイルスでは粒子内の matrix 蛋白質が ESCRT を誘導することが知られている[97]。これらのウイルスで matrix と呼ばれる部位に HSV-1 粒子で相当するのはテグメントである。すなわち、HSV-1 ではテグメント蛋白質が ESCRT を誘導している可能性が考えられる。HSV-1 の UL36 は ESCRT-I の構成因子である TSG101 のユビキチン化と細胞内局在に関与するなど、テグメント蛋白質と ESCRT との相互作用は示されている[9]。しかし TSG101 は HSV-1 のウイルス増殖に要求されないため[70]、UL36 と TSG101 の相互作用が secondary envelopment に貢献しているかどうかは議論の余地がある。HSV-1 の secondary envelopment に寄与する ESCRT とテグメント蛋白質の相互作用は不明である。UL51 および UL14 が ESCRT 等の secondary envelopment に寄与する宿主蛋白質を誘導している可能性も考えられ、UL51 および UL14 と相互作用する蛋白質を解析することで、HSV-1 の secondary envelopment に利用される新たな宿主蛋白質の発見につながることを期待できる。また、UL51 と UL14 が結合することにより、UL51 あるいは UL14 単独で存在している状態では結合しないウイルス蛋白質や宿主蛋白質に新たに結合するようになっている可能性も考えられる。HSV-1 の secondary envelopment を制御するメカニズムを明らか

にするためには、UL51 と UL14 の複合体と相互作用する蛋白質の解析を試みることも有効であるのかもしれない。

HSV-1 のヌクレオカプシドは、TGN に由来する膜を二次エンベロープとして獲得すると考えられている[89, 94]。TGN マーカーである TGN46 は HSV-1 の感染に伴い細胞内での再分布が誘導され、そこにカプシド、エンベロープ蛋白質が集積して secondary envelopment の場になる[89]。本研究では、 Δ UL51 ウイルス、 Δ UL14 ウイルス、UL51LIY/AAA ウイルス、 Δ UL51/ Δ UL14 ウイルス感染細胞では細胞質の核膜近傍に TGN46 の集積が観察されたことから、UL51 と UL14 の相互作用が TGN46 の再分布に要求されることが明らかになった。HSV-1 感染による TGN46 の局在変化を誘導するメカニズムは不明な部分が多く、UL51 と UL14 が secondary envelopment に寄与することから HSV-1 の secondary envelopment のメカニズムを解明する上で重要な知見となり得る。この現象に関しては 2 通りの解釈ができる。UL51 と UL14 が直接、または他のウイルス蛋白質を介して間接的に TGN 膜の移行を誘導、あるいは TGN からの輸送系に干渉することにより、TGN の再分布を制御することで secondary envelopment を行う場の形成に関与している可能性が考えられる。HSV-1 感染によって TGN の再分布が誘導されるメカニズムは現時点ではほぼ不明であるが、UL51 および UL14

と TGN 蛋白質や、endosome の膜輸送に関する蛋白質との相互作用を解析することで、secondary envelopment と TGN の再分布の関係性の意義を明らかにする上で重要な知見が得られることが期待できる。一方で、本研究で得られた結果からは、TGN46 の再分布は UL51 および UL14 の作用によって secondary envelopment が行われた結果として生じている現象であるとも解釈することができる。つまり、TGN の膜構造が secondary envelopment に利用された結果として、マーカーである TGN46 が細胞質内で再分布している像として観察されている可能性も考えられる。

UL51 と UL14 はどちらもヘルペスウイルスに保存されている蛋白質であり、他のウイルスにおいても UL51 のホモログである PRV の UL51[47]あるいは HCMV の UL71[82]が secondary envelopment に関与することが報告されており、VZV の ORF7 もウイルス増殖に重要であることが示されている[106]。また、UL14 のホモログである HCMV の UL95 もウイルス増殖に要求されることが報告されている[40]。γヘルペスウイルスでは、murine gammaherpesvirus 68 の UL51 のホモログである ORF55 と UL14 ホモログである ORF35 はウイルス増殖に必須であることが報告されているが[85]、EBV の BGLF3.5 はウイルス増殖に必須でない[98]。従って、UL51 および UL14 はどちらもヘルペスウイルス科全般でウイル

ス増殖に重要な蛋白質であり、本研究で明らかにした UL51 と UL14 の相互作用は、ヘルペスウイルス全般で保存されている secondary envelopment の促進機構である可能性が考えられる。しかしながら、HSV-1、PRV、HCMV、VZV、EBV、KSHV の UL51 を比較すると、 α ヘルペスウイルス亜科に属する PRV、VZV では、HSV-1 の UL51 における UL14 との結合に重要な領域が保存されていたが(図 18)、他のヘルペスウイルス亜科のウイルスでは相同性の高い領域が見当たらなかった。他のヘルペスウイルスにおいて UL51 と UL14 が相互作用するかについては、個々のウイルスで検討していく必要がある。

本研究では、HSV-1 テグメント蛋白質である UL51 と UL14 が相互作用することを初めて明らかにした。さらに、UL51 と UL14 の相互作用領域を同定し、変異ウイルスを作製して解析した結果、UL51 と UL14 は相互作用することによって secondary envelopment を促進し、効率的なウイルス増殖に寄与することを示した。しかしながら、UL51 と UL14 がどのようにして secondary envelopment に寄与するのか具体的なメカニズムは不明なままである。HSV の secondary envelopment の分子メカニズムについて明らかにされていない部分が多く、本研究で得られた知見が、より詳細な secondary envelopment の制御機構を解明するための手掛かりとなることが期待できる。

テグメントはヘルペスウイルスに特異的な構造であり、他のウイルスでは類を見ないほど多様なウイルス蛋白質をウイルス粒子中に取り込んでいる。他のウイルス、例えば *influenzavirus* ではエンベロープと *ribonucleoprotein (RNP) core* の間に *matrix protein M1* が位置し、*M1* がエンベロープ蛋白質である *hemagglutinin* や *neuraminidase* と *RNP* を架橋している [80]。ヘルペスウイルスの場合は、複数のテグメント蛋白質により蛋白質間相互作用のネットワークを形成することでエンベロープとカプシドを架橋するという独特の戦略を採用していると考えられる。この戦略では、エンベロープ獲得におけるテグメント蛋白質の機能を補完し合うことができるため、宿主体内の多様な環境下で効率良くウイルス粒子形成を進めるために有利に働くと推察できる。ヘルペスウイルスの成熟粒子中には宿主蛋白質も含まれることから[7, 42, 57, 95, 107]、ウイルス粒子形成には宿主蛋白質との相互作用も重要であると考えられる。特に、ヘルペスウイルスは上皮、神経系など宿主体内でも複数の組織にまたがり感染する性質であるため、複数の異なる宿主環境に適応する必要がある。そのため、複数種類のテグメント蛋白質が機能を代替し合うことで、多様な組織に適応してウイルス増殖効率を確保していると予想される。その中でも、本研究で明らかとなった *UL51* と *UL14* の相互作用はウイルス増殖能に対する影響も大きく、テグメント蛋白質が構成するネットワークにおいて中心的な役割を果たしている

のかもしれない。

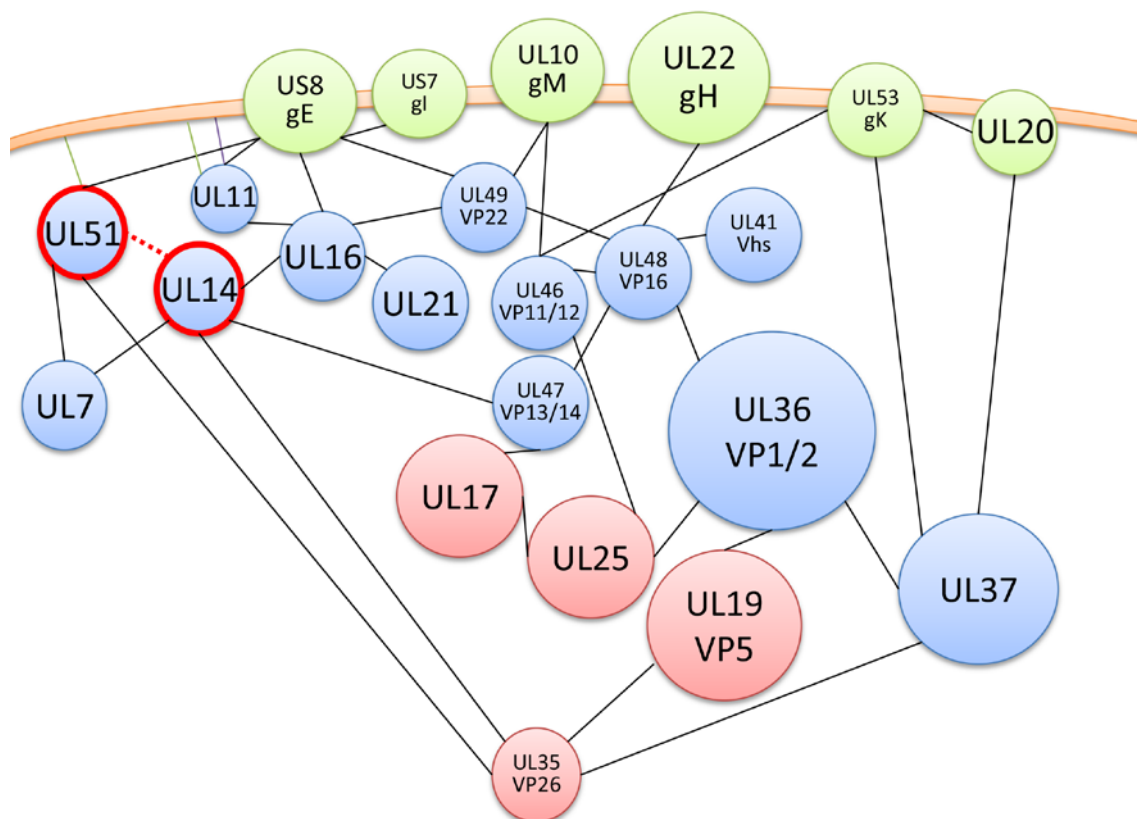


図 16. 本研究の知見を反映させた HSV-1 の主要なテグメント蛋白質間相互作用ネットワーク

- : テグメント蛋白質 ● : カプシド蛋白質 ● : エンベロープ蛋白質
- : 既知の相互作用 — : 本研究で明らかとなった相互作用
- : パルミトイル化 — : ミリストイル化

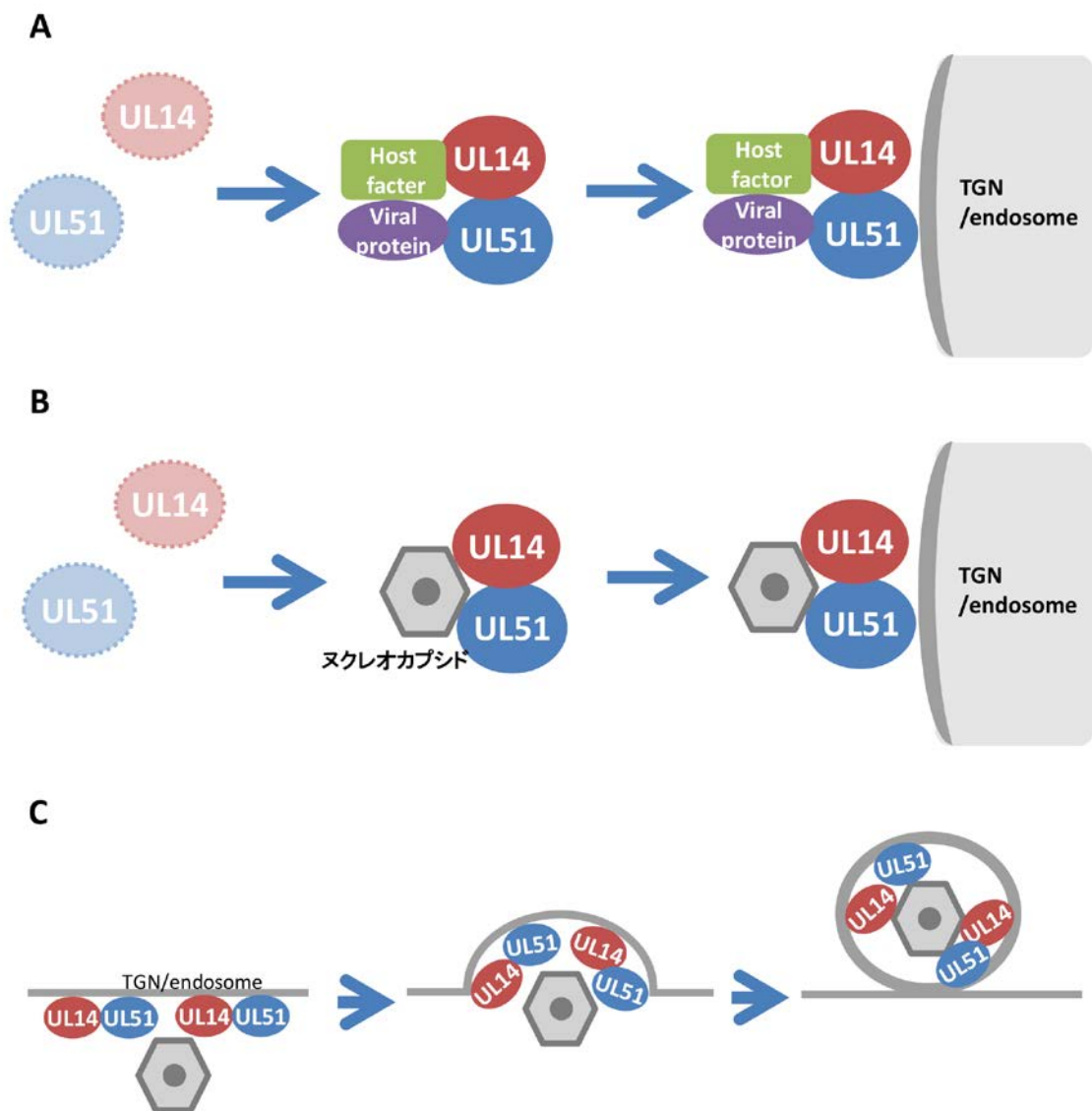


図 17. Secondary envelopment における UL51-UL14 の機能のモデル

A) UL51 と UL14 が複合体となることで機能性を獲得し、宿主因子やウイルス蛋白質を secondary envelopment site へ誘導する。

B) UL51-UL14 複合体がヌクレオカプシドを secondary envelopment site となる場所へ誘導する。

C) UL51-UL14 複合体が膜の形状を変形させ、secondary envelopment を促進する。

HSV-1_UL51	PGLEAPTIDGAVAAHQDKMRRLADTCMATILQMYMSVGAAD
PRV_UL51	ASGDD-GLDAVVAAHAANARRLADTCLAALMHLYLSVGAVD
VZV_ORF7	FTEDNPGLNAVVRSHMENSKRRLADMCLAAITHLYLSVGAVD

図 18. α ヘルペスウイルス UL51 のアミノ酸配列の比較

PRV の UL51 および VZV の ORF7 における、HSV-1(F) の UL51 の 90-130 番目のアミノ酸領域に対応するアミノ酸配列を比較した。★は L111、I119、Y123 を示す。

引用文献

1. **Abaitua, F., T. Daikoku, C. M. Crump, M. Bolstad, and P. O'Hare.** A single mutation responsible for temperature-sensitive entry and assembly defects in the VP1-2 protein of herpes simplex virus. *Journal of virology* 85: 2024-2036. 2011.
2. **Avitabile, E., S. Di Gaeta, M. R. Torrisi, P. L. Ward, B. Roizman, and G. Campadelli-Fiume.** Redistribution of microtubules and Golgi apparatus in herpes simplex virus-infected cells and their role in viral exocytosis. *Journal of virology* 69: 7472-7482. 1995.
3. **Baines, J. D.** Herpes simplex virus capsid assembly and DNA packaging: a present and future antiviral drug target. *Trends in microbiology* 19: 606-613. 2011.
4. **Baines, J. D., R. J. Jacob, L. Simmerman, and B. Roizman.** The herpes simplex virus 1 UL11 proteins are associated with cytoplasmic and nuclear membranes and with nuclear bodies of infected cells. *Journal of virology* 69: 825-833. 1995.
5. **Baines, J. D., and B. Roizman.** The UL11 gene of herpes simplex virus 1 encodes a function that facilitates nucleocapsid envelopment and egress from

- cells. *Journal of virology* 66: 5168-5174. 1992.
6. **Batterson, W., D. Furlong, and B. Roizman.** Molecular genetics of herpes simplex virus. VIII. further characterization of a temperature-sensitive mutant defective in release of viral DNA and in other stages of the viral reproductive cycle. *Journal of virology* 45: 397-407. 1983.
 7. **Bechtel, J. T., R. C. Winant, and D. Ganem.** Host and viral proteins in the virion of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Journal of virology* 79: 4952-4964. 2005.
 8. **Brunetti, C. R., K. S. Dingwell, C. Wale, F. L. Graham, and D. C. Johnson.** Herpes simplex virus gD and virions accumulate in endosomes by mannose 6-phosphate-dependent and -independent mechanisms. *Journal of virology* 72: 3330-3339. 1998.
 9. **Calistri, A., D. Munegato, M. Toffoletto, M. Celestino, E. Franchin, A. Comin, E. Sartori, C. Salata, C. Parolin, and G. Palu.** Functional Interaction Between the ESCRT-I Component TSG101 and the HSV-1 Tegument Ubiquitin Specific Protease. *Journal of cellular physiology* 230: 1794-1806. 2015.
 10. **Calistri, A., P. Sette, C. Salata, E. Cancellotti, C. Forghieri, A. Comin, H. Gottlinger, G. Campadelli-Fiume, G. Palu, and C. Parolin.** Intracellular

trafficking and maturation of herpes simplex virus type 1 gB and virus egress require functional biogenesis of multivesicular bodies. *Journal of virology* 81: 11468-11478. 2007.

11. **Campadelli, G., R. Brandimarti, C. Di Lazzaro, P. L. Ward, B. Roizman, and M. R. Torrisi.** Fragmentation and dispersal of Golgi proteins and redistribution of glycoproteins and glycolipids processed through the Golgi apparatus after infection with herpes simplex virus 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90: 2798-2802. 1993.
12. **Cardone, G., W. W. Newcomb, N. Cheng, P. T. Wingfield, B. L. Trus, J. C. Brown, and A. C. Steven.** The UL36 tegument protein of herpes simplex virus 1 has a composite binding site at the capsid vertices. *Journal of virology* 86: 4058-4064. 2012.
13. **Chadha, P., J. Han, J. L. Starkey, and J. W. Wills.** Regulated interaction of tegument proteins UL16 and UL11 from herpes simplex virus. *Journal of virology* 86: 11886-11898. 2012.
14. **Coller, K. E., J. I. Lee, A. Ueda, and G. A. Smith.** The capsid and tegument of the alphaherpesviruses are linked by an interaction between the UL25 and VP1/2

- proteins. *Journal of virology* 81: 11790-11797. 2007.
15. **Crump, C. M., C. Yates, and T. Minson.** Herpes simplex virus type 1 cytoplasmic envelopment requires functional Vps4. *Journal of virology* 81: 7380-7387. 2007.
 16. **Cunningham, C., A. J. Davison, A. R. MacLean, N. S. Taus, and J. D. Baines.** Herpes simplex virus type 1 gene UL14: phenotype of a null mutant and identification of the encoded protein. *Journal of virology* 74: 33-41. 2000.
 17. **Daikoku, T., K. Ikenoya, H. Yamada, F. Goshima, and Y. Nishiyama.** Identification and characterization of the herpes simplex virus type 1 UL51 gene product. *The Journal of general virology* 79 (Pt 12): 3027-3031. 1998.
 18. **Desai, P., G. L. Sexton, E. Huang, and S. Person.** Localization of herpes simplex virus type 1 UL37 in the Golgi complex requires UL36 but not capsid structures. *Journal of virology* 82: 11354-11361. 2008.
 19. **Desai, P., G. L. Sexton, J. M. McCaffery, and S. Person.** A null mutation in the gene encoding the herpes simplex virus type 1 UL37 polypeptide abrogates virus maturation. *Journal of virology* 75: 10259-10271. 2001.
 20. **Desai, P. J.** A null mutation in the UL36 gene of herpes simplex virus type 1 results in accumulation of unenveloped DNA-filled capsids in the cytoplasm of

- infected cells. *Journal of virology* 74: 11608-11618. 2000.
21. **Ejercito, P. M., E. D. Kieff, and B. Roizman.** Characterization of herpes simplex virus strains differing in their effects on social behaviour of infected cells. *The Journal of general virology* 2: 357-364. 1968.
 22. **Elliott, G., G. Mouzakis, and P. O'Hare.** VP16 interacts via its activation domain with VP22, a tegument protein of herpes simplex virus, and is relocated to a novel macromolecular assembly in coexpressing cells. *Journal of virology* 69: 7932-7941. 1995.
 23. **Fan, W. H., A. P. Roberts, M. McElwee, D. Bhella, F. J. Rixon, and R. Lauder.** The large tegument protein pUL36 is essential for formation of the capsid vertex-specific component at the capsid-tegument interface of herpes simplex virus 1. *Journal of virology* 89: 1502-1511. 2015.
 24. **Farnsworth, A., K. Goldsmith, and D. C. Johnson.** Herpes Simplex Virus Glycoproteins gD and gE/gI Serve Essential but Redundant Functions during Acquisition of the Virion Envelope in the Cytoplasm. *Journal of virology* 77: 8481-8494. 2003.
 25. **Farnsworth, A., T. W. Wisner, and D. C. Johnson.** Cytoplasmic residues of herpes simplex virus glycoprotein gE required for secondary envelopment and

- binding of tegument proteins VP22 and UL11 to gE and gD. *Journal of virology* 81: 319-331. 2007.
26. **Fossum, E., C. C. Friedel, S. V. Rajagopala, B. Titz, A. Baiker, T. Schmidt, T. Kraus, T. Stellberger, C. Rutenberg, S. Suthram, S. Bandyopadhyay, D. Rose, A. von Brunn, M. Uhlmann, C. Zeretzke, Y. A. Dong, H. Boulet, M. Koegl, S. M. Bailer, U. Koszinowski, T. Ideker, P. Uetz, R. Zimmer, and J. Haas.** Evolutionarily conserved herpesviral protein interaction networks. *PLoS pathogens* 5: e1000570. 2009.
 27. **Foster, T. P., V. N. Chouljenko, and K. G. Kousoulas.** Functional and physical interactions of the herpes simplex virus type 1 UL20 membrane protein with glycoprotein K. *Journal of virology* 82: 6310-6323. 2008.
 28. **Frankel, A. D., and J. A. Young.** HIV-1: fifteen proteins and an RNA. *Annual review of biochemistry* 67: 1-25. 1998.
 29. **Fuchs, W., H. Granzow, R. Klopffleisch, B. G. Klupp, D. Rosenkranz, and T. C. Mettenleiter.** The UL7 gene of pseudorabies virus encodes a nonessential structural protein which is involved in virion formation and egress. *Journal of virology* 79: 11291-11299. 2005.
 30. **Fujii, H., M. Mugitani, N. Koyanagi, Z. Liu, S. Tsuda, J. Ariei, A. Kato, and**

- Y. Kawaguchi.** Role of the nuclease activities encoded by herpes simplex virus 1 UL12 in viral replication and neurovirulence. *Journal of virology* 88: 2359-2364. 2014.
31. **Fulmer, P. A., J. M. Melancon, J. D. Baines, and K. G. Kousoulas.** UL20 protein functions precede and are required for the UL11 functions of herpes simplex virus type 1 cytoplasmic virion envelopment. *Journal of virology* 81: 3097-3108. 2007.
32. **Gross, S. T., C. A. Harley, and D. W. Wilson.** The cytoplasmic tail of Herpes simplex virus glycoprotein H binds to the tegument protein VP16 in vitro and in vivo. *Virology* 317: 1-12. 2003.
33. **Guo, Y., D. W. Sirkis, and R. Schekman.** Protein sorting at the trans-Golgi network. *Annual review of cell and developmental biology* 30: 169-206. 2014.
34. **Han, J., P. Chadha, D. G. Meckes, Jr., N. L. Baird, and J. W. Wills.** Interaction and interdependent packaging of tegument protein UL11 and glycoprotein e of herpes simplex virus. *Journal of virology* 85: 9437-9446. 2011.
35. **Han, J., P. Chadha, J. L. Starkey, and J. W. Wills.** Function of glycoprotein E of herpes simplex virus requires coordinated assembly of three tegument proteins on its cytoplasmic tail. *Proceedings of the National Academy of*

Sciences of the United States of America 109: 19798-19803. 2012.

36. **Harper, A. L., D. G. Meckes, Jr., J. A. Marsh, M. D. Ward, P. C. Yeh, N. L. Baird, C. B. Wilson, O. J. Semmes, and J. W. Wills.** Interaction domains of the UL16 and UL21 tegument proteins of herpes simplex virus. *Journal of virology* 84: 2963-2971. 2010.
37. **Hollinshead, M., H. L. Johns, C. L. Sayers, C. Gonzalez-Lopez, G. L. Smith, and G. Elliott.** Endocytic tubules regulated by Rab GTPases 5 and 11 are used for envelopment of herpes simplex virus. *The EMBO journal* 31: 4204-4220. 2012.
38. **Hutchinson, L., H. Browne, V. Wargent, N. Davis-Poynter, S. Primorac, K. Goldsmith, A. C. Minson, and D. C. Johnson.** A novel herpes simplex virus glycoprotein, gL, forms a complex with glycoprotein H (gH) and affects normal folding and surface expression of gH. *Journal of virology* 66: 2240-2250. 1992.
39. **Ibiricu, I., U. E. Maurer, and K. Grunewald.** Characterization of herpes simplex virus type 1 L-particle assembly and egress in hippocampal neurones by electron cryo-tomography. *Cellular microbiology* 15: 285-291. 2013.
40. **Isomura, H., M. F. Stinski, T. Murata, Y. Yamashita, T. Kanda, S. Toyokuni, and T. Tsurumi.** The human cytomegalovirus gene products essential for late

- viral gene expression assemble into prereplication complexes before viral DNA replication. *Journal of virology* 85: 6629-6644. 2011.
41. **Jambunathan, N., D. Chouljenko, P. Desai, A. S. Charles, R. Subramanian, V. N. Chouljenko, and K. G. Kousoulas.** Herpes simplex virus 1 protein UL37 interacts with viral glycoprotein gK and membrane protein UL20 and functions in cytoplasmic virion envelopment. *Journal of virology* 88: 5927-5935. 2014.
 42. **Johannsen, E., M. Luftig, M. R. Chase, S. Weicksel, E. Cahir-McFarland, D. Illanes, D. Sarracino, and E. Kieff.** Proteins of purified Epstein-Barr virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 16286-16291. 2004.
 43. **Johnson, D. C., T. W. Wisner, and C. C. Wright.** Herpes simplex virus glycoproteins gB and gD function in a redundant fashion to promote secondary envelopment. *Journal of virology* 85: 4910-4926. 2011.
 44. **Kato, A., S. Tsuda, Z. Liu, H. Kozuka-Hata, M. Oyama, and Y. Kawaguchi.** Herpes simplex virus 1 protein kinase Us3 phosphorylates viral dUTPase and regulates its catalytic activity in infected cells. *Journal of virology* 88: 655-666. 2014.
 45. **Kelly, B. J., R. Bauerfeind, A. Binz, B. Sodeik, A. S. Laimbacher, C. Fraefel,**

- and R. J. Diefenbach.** The interaction of the HSV-1 tegument proteins pUL36 and pUL37 is essential for secondary envelopment during viral egress. *Virology* 454-455: 67-77. 2014.
46. **Kelly, B. J., C. Fraefel, A. L. Cunningham, and R. J. Diefenbach.** Functional roles of the tegument proteins of herpes simplex virus type 1. *Virus research* 145: 173-186. 2009.
 47. **Klupp, B. G., H. Granzow, R. Klopffleisch, W. Fuchs, M. Kopp, M. Lenk, and T. C. Mettenleiter.** Functional analysis of the pseudorabies virus UL51 protein. *Journal of virology* 79: 3831-3840. 2005.
 48. **Ko, D. H., A. L. Cunningham, and R. J. Diefenbach.** The major determinant for addition of tegument protein pUL48 (VP16) to capsids in herpes simplex virus type 1 is the presence of the major tegument protein pUL36 (VP1/2). *Journal of virology* 84: 1397-1405. 2010.
 49. **Koelle, D. M., and L. Corey.** Herpes simplex: insights on pathogenesis and possible vaccines. *Annual review of medicine* 59: 381-395. 2008.
 50. **Kopp, M., B. G. Klupp, H. Granzow, W. Fuchs, and T. C. Mettenleiter.** Identification and characterization of the pseudorabies virus tegument proteins UL46 and UL47: role for UL47 in virion morphogenesis in the cytoplasm.

Journal of virology 76: 8820-8833. 2002.

51. **Laine, R. F., A. Albecka, S. van de Linde, E. J. Rees, C. M. Crump, and C. F. Kaminski.** Structural analysis of herpes simplex virus by optical super-resolution imaging. *Nature communications* 6: 5980. 2015.
52. **Lee, G. E., J. W. Murray, A. W. Wolkoff, and D. W. Wilson.** Reconstitution of herpes simplex virus microtubule-dependent trafficking in vitro. *Journal of virology* 80: 4264-4275. 2006.
53. **Lee, J. H., V. Vittone, E. Diefenbach, A. L. Cunningham, and R. J. Diefenbach.** Identification of structural protein-protein interactions of herpes simplex virus type 1. *Virology* 378: 347-354. 2008.
54. **Liang, L., and J. D. Baines.** Identification of an essential domain in the herpes simplex virus 1 UL34 protein that is necessary and sufficient to interact with UL31 protein. *Journal of virology* 79: 3797-3806. 2005.
55. **Loomis, J. S., J. B. Bowzard, R. J. Courtney, and J. W. Wills.** Intracellular trafficking of the UL11 tegument protein of herpes simplex virus type 1. *Journal of virology* 75: 12209-12219. 2001.
56. **Loomis, J. S., R. J. Courtney, and J. W. Wills.** Binding Partners for the UL11 Tegument Protein of Herpes Simplex Virus Type 1. *Journal of virology* 77:

- 11417-11424. 2003.
57. **Loret, S., G. Guay, and R. Lippe.** Comprehensive characterization of extracellular herpes simplex virus type 1 virions. *Journal of virology* 82: 8605-8618. 2008.
 58. **Lu, L., and W. Hong.** From endosomes to the trans-Golgi network. *Seminars in cell & developmental biology* 31: 30-39. 2014.
 59. **MacLean, C. A., A. Dolan, F. E. Jamieson, and D. J. McGeoch.** The myristylated virion proteins of herpes simplex virus type 1: investigation of their role in the virus life cycle. *The Journal of general virology* 73 (Pt 3): 539-547. 1992.
 60. **Manavi, K., A. McMillan, and M. Ogilvie.** Herpes Simplex Virus Type 1 Remains the Principal Cause of Initial Anogenital Herpes in Edinburgh, Scotland. *Sexually Transmitted Diseases* 31: 322-324. 2004.
 61. **Maringer, K., J. Stylianou, and G. Elliott.** A network of protein interactions around the herpes simplex virus tegument protein VP22. *Journal of virology* 86: 12971-12982. 2012.
 62. **Meckes, D. G., Jr., and J. W. Wills.** Dynamic interactions of the UL16 tegument protein with the capsid of herpes simplex virus. *Journal of virology* 81:

- 13028-13036. 2007.
63. **Meckes, D. G., J. A. Marsh, and J. W. Wills.** Complex mechanisms for the packaging of the UL16 tegument protein into herpes simplex virus. *Virology* 398: 208-213. 2010.
64. **Miranda-Saksena, M., R. A. Boadle, A. Aggarwal, B. Tijono, F. J. Rixon, R. J. Diefenbach, and A. L. Cunningham.** Herpes Simplex Virus Utilizes the Large Secretory Vesicle Pathway for Anterograde Transport of Tegument and Envelope Proteins and for Viral Exocytosis from Growth Cones of Human Fetal Axons. *Journal of virology* 83: 3187-3199. 2009.
65. **Mossman, K. L., R. Sherburne, C. Lavery, J. Duncan, and J. R. Smiley.** Evidence that herpes simplex virus VP16 is required for viral egress downstream of the initial envelopment event. *Journal of virology* 74: 6287-6299. 2000.
66. **Nozawa, N., T. Daikoku, T. Koshizuka, Y. Yamauchi, T. Yoshikawa, and Y. Nishiyama.** Subcellular Localization of Herpes Simplex Virus Type 1 UL51 Protein and Role of Palmitoylation in Golgi Apparatus Targeting. *Journal of virology* 77: 3204-3216. 2003.
67. **Nozawa, N., Y. Kawaguchi, M. Tanaka, A. Kato, A. Kato, H. Kimura, and Y. Nishiyama.** Herpes simplex virus type 1 UL51 protein is involved in maturation

- and egress of virus particles. *Journal of virology* 79: 6947-6956. 2005.
68. **Ohta, A., Y. Yamauchi, Y. Muto, H. Kimura, and Y. Nishiyama.** Herpes simplex virus type 1 UL14 tegument protein regulates intracellular compartmentalization of major tegument protein VP16. *Virology journal* 8: 365. 2011.
69. **Owen, D. J., C. M. Crump, and S. C. Graham.** Tegument Assembly and Secondary Envelopment of Alphaherpesviruses. *Viruses* 7: 5084-5114. 2015.
70. **Pawliczek, T., and C. M. Crump.** Herpes simplex virus type 1 production requires a functional ESCRT-III complex but is independent of TSG101 and ALIX expression. *Journal of virology* 83: 11254-11264. 2009.
71. **Pomeranz, L. E., and J. A. Blaho.** Assembly of infectious Herpes simplex virus type 1 virions in the absence of full-length VP22. *Journal of virology* 74: 10041-10054. 2000.
72. **Purves, F. C., W. O. Ogle, and B. Roizman.** Processing of the herpes simplex virus regulatory protein alpha 22 mediated by the UL13 protein kinase determines the accumulation of a subset of alpha and gamma mRNAs and proteins in infected cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90: 6701-6705. 1993.

73. **Radtke, K., D. Kieneke, A. Wolfstein, K. Michael, W. Steffen, T. Scholz, A. Karger, and B. Sodeik.** Plus- and minus-end directed microtubule motors bind simultaneously to herpes simplex virus capsids using different inner tegument structures. *PLoS pathogens* 6: e1000991. 2010.
74. **Reynolds, A. E., B. J. Ryckman, J. D. Baines, Y. Zhou, L. Liang, and R. J. Roller.** UL31 and UL34 Proteins of Herpes Simplex Virus Type 1 Form a Complex That Accumulates at the Nuclear Rim and Is Required for Envelopment of Nucleocapsids. *Journal of virology* 75: 8803-8817. 2001.
75. **Rixon, F. J., C. Addison, and J. McLauchlan.** Assembly of enveloped tegument structures (L particles) can occur independently of virion maturation in herpes simplex virus type 1-infected cells. *The Journal of general virology* 73 (Pt 2): 277-284. 1992.
76. **Roberts, A. P., F. Abaitua, P. O'Hare, D. McNab, F. J. Rixon, and D. Padeloup.** Differing roles of inner tegument proteins pUL36 and pUL37 during entry of herpes simplex virus type 1. *Journal of virology* 83: 105-116. 2009.
77. **Roizman, B., D. M. Knipe, and R. J. Whitley.** Herpes simplex viruses. *Fields virology*, 6th ed: 1823-1897. 2013.
78. **Roller, R. J., and R. Felters.** The herpes simplex virus 1 UL51 protein interacts

- with the UL7 protein and plays a role in its recruitment into the virion. *Journal of virology* 89: 3112-3122. 2015.
79. **Roller, R. J., A. C. Haugo, K. Yang, and J. D. Baines.** The herpes simplex virus 1 UL51 gene product has cell type-specific functions in cell-to-cell spread. *Journal of virology* 88: 4058-4068. 2014.
 80. **Rossman, J. S., and R. A. Lamb.** Influenza virus assembly and budding. *Virology* 411: 229-236. 2011.
 81. **Ryckman, B. J., and R. J. Roller.** Herpes simplex virus type 1 primary envelopment: UL34 protein modification and the US3-UL34 catalytic relationship. *Journal of virology* 78: 399-412. 2004.
 82. **Schauflinger, M., D. Fischer, A. Schreiber, M. Chevillotte, P. Walther, T. Mertens, and J. von Einem.** The tegument protein UL71 of human cytomegalovirus is involved in late envelopment and affects multivesicular bodies. *Journal of virology* 85: 3821-3832. 2011.
 83. **Scholtes, L. D., K. Yang, L. X. Li, and J. D. Baines.** The capsid protein encoded by U(L)17 of herpes simplex virus 1 interacts with tegument protein VP13/14. *Journal of virology* 84: 7642-7650. 2010.
 84. **Smibert, C. A., B. Popova, P. Xiao, J. P. Capone, and J. R. Smiley.** Herpes

- simplex virus VP16 forms a complex with the virion host shutoff protein vhs. Journal of virology 68: 2339-2346. 1994.
85. **Song, M. J., S. Hwang, W. H. Wong, T. T. Wu, S. Lee, H. I. Liao, and R. Sun.** Identification of viral genes essential for replication of murine gamma-herpesvirus 68 using signature-tagged mutagenesis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102: 3805-3810. 2005.
 86. **Spang, A.** The Road not Taken: Less Traveled Roads from the TGN to the Plasma Membrane. Membranes 5: 84-98. 2015.
 87. **Starkey, J. L., J. Han, P. Chadha, J. A. Marsh, and J. W. Wills.** Elucidation of the block to herpes simplex virus egress in the absence of tegument protein UL16 reveals a novel interaction with VP22. Journal of virology 88: 110-119. 2014.
 88. **Stylianou, J., K. Maringer, R. Cook, E. Bernard, and G. Elliott.** Virion incorporation of the herpes simplex virus type 1 tegument protein VP22 occurs via glycoprotein E-specific recruitment to the late secretory pathway. Journal of virology 83: 5204-5218. 2009.
 89. **Sugimoto, K., M. Uema, H. Sagara, M. Tanaka, T. Sata, Y. Hashimoto, and**

- Y. Kawaguchi.** Simultaneous tracking of capsid, tegument, and envelope protein localization in living cells infected with triply fluorescent herpes simplex virus 1. *Journal of virology* 82: 5198-5211. 2008.
90. **Svobodova, S., S. Bell, and C. M. Crump.** Analysis of the interaction between the essential herpes simplex virus 1 tegument proteins VP16 and VP1/2. *Journal of virology* 86: 473-483. 2012.
91. **Tanaka, M., H. Kagawa, Y. Yamanashi, T. Sata, and Y. Kawaguchi.** Construction of an excisable bacterial artificial chromosome containing a full-length infectious clone of herpes simplex virus type 1: viruses reconstituted from the clone exhibit wild-type properties in vitro and in vivo. *Journal of virology* 77: 1382-1391. 2003.
92. **Tanaka, M., T. Sata, and Y. Kawaguchi.** The product of the Herpes simplex virus 1 UL7 gene interacts with a mitochondrial protein, adenine nucleotide translocator 2. *Virology journal* 5: 125. 2008.
93. **Tischer, B. K., J. von Einem, B. Kaufer, and N. Osterrieder.** Two-step red-mediated recombination for versatile high-efficiency markerless DNA manipulation in *Escherichia coli*. *Biotechniques* 40: 191-197. 2006.
94. **Turcotte, S., J. Letellier, and R. Lippe.** Herpes simplex virus type 1 capsids

- transit by the trans-Golgi network, where viral glycoproteins accumulate independently of capsid egress. *Journal of virology* 79: 8847-8860. 2005.
95. **Varnum, S. M., D. N. Streblow, M. E. Monroe, P. Smith, K. J. Auberry, L. Pasa-Tolic, D. Wang, D. G. Camp, 2nd, K. Rodland, S. Wiley, W. Britt, T. Shenk, R. D. Smith, and J. A. Nelson.** Identification of proteins in human cytomegalovirus (HCMV) particles: the HCMV proteome. *Journal of virology* 78: 10960-10966. 2004.
 96. **Vittone, V., E. Diefenbach, D. Triffett, M. W. Douglas, A. L. Cunningham, and R. J. Diefenbach.** Determination of interactions between tegument proteins of herpes simplex virus type 1. *Journal of virology* 79: 9566-9571. 2005.
 97. **Votteler, J., and W. I. Sundquist.** Virus budding and the ESCRT pathway. *Cell host & microbe* 14: 232-241. 2013.
 98. **Watanabe, T., K. Fuse, T. Takano, Y. Narita, F. Goshima, H. Kimura, and T. Murata.** Roles of Epstein-Barr virus BGLF3.5 gene and two upstream open reading frames in lytic viral replication in HEK293 cells. *Virology* 483: 44-53. 2015.
 99. **Weinheimer, S. P., B. A. Boyd, S. K. Durham, J. L. Resnick, and D. R. O'Boyle, 2nd.** Deletion of the VP16 open reading frame of herpes simplex virus

- type 1. *Journal of virology* 66: 258-269. 1992.
100. **Wisner, T. W., and D. C. Johnson.** Redistribution of cellular and herpes simplex virus proteins from the trans-golgi network to cell junctions without enveloped capsids. *Journal of virology* 78: 11519-11535. 2004.
 101. **Womack, A., and T. Shenk.** Human cytomegalovirus tegument protein pUL71 is required for efficient virion egress. *mBio* 1. 2010.
 102. **Wysocka, J., and W. Herr.** The herpes simplex virus VP16-induced complex: the makings of a regulatory switch. *Trends in biochemical sciences* 28: 294-304. 2003.
 103. **Yamauchi, Y., K. Wada, F. Goshima, T. Daikoku, K. Ohtsuka, and Y. Nishiyama.** Herpes simplex virus type 2 UL14 gene product has heat shock protein (HSP)-like functions. *Journal of cell science* 115: 2517-2527. 2002.
 104. **Zhang, Y., and J. L. McKnight.** Herpes simplex virus type 1 UL46 and UL47 deletion mutants lack VP11 and VP12 or VP13 and VP14, respectively, and exhibit altered viral thymidine kinase expression. *Journal of virology* 67: 1482-1492. 1993.
 105. **Zhang, Y., D. A. Sirko, and J. L. McKnight.** Role of herpes simplex virus type 1 UL46 and UL47 in alpha TIF-mediated transcriptional induction:

characterization of three viral deletion mutants. *Journal of virology* 65: 829-841. 1991.

106. **Zhang, Z., A. Selariu, C. Warden, G. Huang, Y. Huang, O. Zaccheus, T. Cheng, N. Xia, and H. Zhu.** Genome-wide mutagenesis reveals that ORF7 is a novel VZV skin-tropic factor. *PLoS pathogens* 6: e1000971. 2010.
107. **Zhu, F. X., J. M. Chong, L. Wu, and Y. Yuan.** Virion proteins of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Journal of virology* 79: 800-811. 2005.
108. **Zhu, Q., and R. J. Courtney.** Chemical cross-linking of virion envelope and tegument proteins of herpes simplex virus type 1. *Virology* 204: 590-599. 1994.

謝辞

本研究を遂行するにあたり、4年間に渡って御指導・御鞭撻賜りました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の川口寧教授に深く感謝いたします。

同研究室の加藤哲久博士、有井潤博士には日頃より御指導、御助言頂きましたことを心より感謝いたします。また、4年間の研究室生活であらゆる面でご助力下さいました同研究室の皆様にも、心よりお礼申し上げます。

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、電子顕微鏡観察の際に、試料作製から機材の取り扱いについて丁寧なご指導を賜りましたことを深く感謝致します。

最後に、4年間の研究生活を経済面、私生活の面から支援してくれた両親に、この場を借りてお礼申し上げます。