

論文の内容の要旨

論文題目 単純ヘルペスウイルス 1 型の粒子形成に関する研究

氏名 尾田 真也

単純ヘルペスウイルス 1 型 (herpes simplex virus type-1: HSV-1) の粒子形成過程において、核内で産生された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、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) あるいはエンドソーム由来とさ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。Secondary envelopment においてテグメント蛋白質はカプシド蛋白質や他のテグメント蛋白質、あるいはエンベロープに含まれる 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アンカーしているのではないかというモデルが提唱されている。従って、テグメント蛋白質を中心とする蛋白質間相互作用が secondary envelopment を引き起こす原動力であることが予想される。これまでにテグメント蛋白質が関与する複数の蛋白質間相互作用が報告されているが、secondary envelopment に寄与することが明確に証明されている相互作用はない。本研究では HSV-1 の secondary envelopment におけるテグメント蛋白質の相互作用の意義を明らかにするため、テグメント蛋白質間の新たな相互作用を見出し、secondary envelopment に寄与していることの証明を目的とする。

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 はどちらもウイルス増殖と secondary envelopment に寄与することが報告されているが、それに関わる相互作用因子は明らかになっていない。本研究ではまず UL51 と UL14 が相互作用しているのか検討するこ

とにした。

UL51 の C 末端に FLAG, tobacco etch virus protease cleavage site, and myc tag を付加した組換えウイルスを作製し、感染細胞を溶解し免疫沈降を試みた結果、UL51 と UL14 の共沈降が認められた。さらに野生株である HSV-1(F)感染細胞を抗 UL51 および抗 UL14 抗体を用いた免疫蛍光抗体法により解析すると、UL51 と UL14 は細胞質領域で両蛋白質が共局在していた。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た。

次に、UL51 と UL14 の相互作用の意義を解析するため、GST pull-down 法により UL14 との結合に必要な UL51 のアミノ酸残基の探索を試みた結果、UL51 の 90 から 130 番目のアミノ酸領域が UL14 との結合に重要であり、111 番目のロイシン、119 番目のイソロイシン、123 番目のチロシンの 3 箇所をアラニンに置換することにより UL51 と UL14 の結合が有意に減少することが明らかとなった。この結果を基に、UL51 の 111 番目のロイシン、119 番目のイソロイシン、123 番目のチロシンの 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、各欠損ウイルスである 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。その結果、UL51LIY/AAA ウイルスは Δ UL51 ウイルス、 Δ UL14 ウイルス、 Δ UL51/ Δ UL14 ウイルスと同程度のウイルス増殖能の低下とプラークサイズの縮小が認められ、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た。

HSV-1(F)感染細胞を溶解し、抗 UL51、抗 UL14 抗体を用いて免疫沈降すると、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。また、UL51LIY/AAA ウイルス感染細胞ではこの共沈降は検出されなかった。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、その結合は UL51 の L111A/I119A/Y123A 変異によって消失することを確認できた。

次に、UL51 と UL14 の相互作用がそれぞれの細胞内局在に影響を及ぼしているのかを検討した。免疫蛍光抗体法により UL51 と UL14 の感染細胞内での局在を観察したところ、 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。また、 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。また、 Δ UL51 ウイルス、 Δ UL14 ウイルス、UL51LIY/AAA ウイルス感染細胞における UL11 の局在は野生型と同様の局在を示したことから、UL51 と UL14 の局在変化はウイルス蛋白質に非特異的に起きている現象ではない。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。

次に、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、各ウイルス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。 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。さらに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像も観察され、secondary envelop を獲得している途中であると考えられる。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ており、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。

HSV-1 の secondary envelopment site の候補として TGN が考えられており、HSV-1 感染により TGN が再分布することが知られている。UL51 と UL14 の TGN との関連性を調べるため、各ウイルス感染細胞を TGN のマーカーである抗 TGN46 抗体を用いた免疫蛍光抗体法により観察した。非感染細胞で細胞質の核膜近傍に局在する TGN46 は、野生型感染により細胞質全体に拡散されるが、 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 TGN46 は、非感染細胞とは異なるものの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 TGN 蛋白質の再分布に要求されることが明らかとなった。

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。ウイルス増殖においてこの相互作用が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 の適切な細胞内局在に要求されること (ii) 効率的なウイルス増殖とプラーク形成に要求されること (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に要求されること (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。以上の結果から、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が示された。本知見は、テグメント蛋白質間の相互作用がウイルス粒子の形成過程で重要な役割を果たしていることが明確に示した重要な報告であると考えられる。UL51 はパルミトイル化により膜構造にアンカーされることやエンベロープ構成因子である glycoprotein E との相互作用が報告されており、UL14 はカプシド蛋白質である VP26 と相互作用することが報告されている。これらの知見を鑑みると、ヘルペスウイルスに保存されたテグメント蛋白質である UL51 と UL14 間の相互作用によりカプシドとエンベロープがアンカーしていることで、secondary envelopment が効率的に実行されるのではないかという可能性が考えられる。また、本相互作用が HSV secondary envelopment site の有力な候補である TGN の局在制御に必要である知見からは、本相互作用は secondary envelopment site の場の形成に重要なのではないかという 2 つの仮説が考えられる。今後、本研究を足がかりとし、HSV secondary envelopment の分子メカニズムの解明が進むことが期待される。