

博士論文

単純ヘルペスウイルス 1 型の遺伝子発現に関する解析

佐藤 由佳

単純ヘルペスウイルス 1 型の遺伝子発現に関する解析

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

佐藤 由佳

## 目次

要旨	1
序文	2-16
実験方法	17-34
結果	35-67
考察	68-75
総括	76
謝辞	77-78
引用文献	79-98

宿主転写コアキチベーター RanBP10 と

単純ヘルペスウイルス 1 型 ICPO は相互作用し、

協調的にウイルス遺伝子発現と増殖を促進する

Y. Sato, et al., *J. Virol.* in press [1]

## 要旨

単純ヘルペスウイルス 1 型がコードする ICP0 はウイルス増殖, 遺伝子発現等を制御する重要な多機能因子である. 本研究ではウイルス遺伝子発現に関する新しい知見を得るために, 質量解析で同定された ICP0 の相互作用因子 RanBP10 に着目した.

ICP0 欠損時と同様に RanBP10 発現抑制時にウイルス増殖と遺伝子発現量の低下及び histone occupancy の増加が認められた. またこれらの表現型は野生株感染時と比較し ICP0 欠損ウイルス感染時に顕著だった. 以上の結果から, 感染細胞において RanBP10 は ICP0 と類似した機能を有し ICP0 と協調して働くことが示唆された.

## 序文

### ヘルペスウイルス

ヘルペスウイルス科に属するヘルペスウイルスは直鎖状2本鎖DNAをゲノムとして有するDNAウイルスである。

ヘルペスウイルスは、無脊椎動物からヒトに至るまで広範囲の自然宿主を有し、各々の宿主に固有の病態を引き起こす。ヒトを自然宿主とするヘルペスウイルスは現在までに、単純ヘルペスウイルス1型 (HSV-1)、単純ヘルペスウイルス2型 (HSV-2)、ヒトサイトメガロウイルス (HCMV)、水痘・帯状ヘルペスウイルス (VZV)、Epstein-Barr ウイルス (EBV)、ヒトヘルペスウイルス 6A, 6B, 及び 7 (HHV-6, HHV-6B, HHV-7)、カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス (KSHV, HHV-8) の9種類が同定されており、ヒトに多様な病態を引き起こすことが知られている。また獣医・畜産領域ではオーエスキー病、馬鼻肺炎、牛伝染性鼻気管炎、マレック病などが問題となっており、多領域においてヘルペスウイルスは重要である[2]。

ヘルペスウイルス科はアルファヘルペスウイルス、ベータヘルペスウイ

ルス，ガンマヘルペスウイルスの3つの亜科に分類される．HSV-1, HSV-2, VZV  
などが属するアルファヘルペスウイルス亜科は，他のヘルペスウイルス科と比  
較して増殖サイクルが短く培養細胞での感染の進行が速い，神経節に潜伏感染  
するなどの特徴を有する．HCMV, HHV-6A, HHV-6B, HHV-7などが属するベータ  
ヘルペスウイルス亜科は，増殖サイクルが長く培養細胞での感染の進行が遅  
い，分泌腺や腎臓及び他の組織に潜伏感染するなどの特徴を有する．EBV, KSHV  
などが属するガンマヘルペスウイルス亜科は，培養細胞ではリンパ芽球様細胞  
株に感染する，生体内ではT細胞やB細胞に特異的に感染する，リンパ組織に  
潜伏感染するなどの特徴を有する[2, 3].

本研究では，ヘルペスウイルス科のプロトタイプとして基礎研究が推進  
され増殖機構の理解が最も進んでいる単純ヘルペスウイルス1型 (HSV-1) を対  
象としている．

### 単純ヘルペスウイルス (HSV)

HSV はヒトに脳炎，性器ヘルペス，皮膚疾患，眼疾患，小児ヘルペスなど  
多様な病態を引き起こす．HSV には2つの血清型 (HSV-1 と HSV-2) があり，  
一般的には脳炎や眼疾患など上半身の病態は HSV-1 によって，性器ヘルペスな

ど下半身の病態は HSV-2 によって引き起こされると考えられているが、各 HSV の疾患発生部位の棲み分けは厳密ではない[2, 4].

HSV は初感染後、感染局所の粘膜上皮細胞で増殖する (溶解感染). その後ウイルス粒子は三叉神経節または仙髄神経節に到達し、ウイルス粒子を産生しない潜伏感染へと移行する. 潜伏したウイルスは宿主側のストレス等の刺激により再活性化, 増殖し, 再び局所に病態を引き起こすようになる. このようにヘルペスウイルスは一度感染すると終生に渡って宿主に潜伏感染し, 再発を繰り返すようになる[2, 3].

HSV 感染症にはアシクロビルを始めとした効果的な抗ヘルペスウイルス剤が存在するが, その効能は増殖期のウイルス感染細胞に限られており潜伏感染した感染細胞には全く効果を示さない. そのため現行の治療薬による HSV 感染症の根治は不可能であり, 再発した HSV 患者とくに性器ヘルペス患者はその度に抗ヘルペスウイルス剤を服用することになり臨床上問題となっている. また少量の抗ヘルペスウイルス剤を長期間服用する再発抑制療法が実施され一定の効果が得られているが根治には至っていない[2, 5]. 潜伏感染したウイルスが除去できるような新しい治療法の確立が望まれており, HSV の増殖, 潜伏感染機構, 宿主相互作用に関する一層の詳細解析が重要である.



## HSV-1 粒子と遺伝子構造

ほぼ球形の形をした直径約 200 nm の HSV-1 粒子は外側からエンベロープ、テグメント、カプシドの主要構造からなる。エンベロープにはウイルスがコードする糖タンパク質がスパイク状に配置されており、ウイルスの細胞への侵入に大きな役割を果たしている。テグメントはヘルペスウイルスに特徴的な構造で、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る。正 20 面体のカプシドの中にはウイルスゲノムが内包されている。HSV ゲノムは約 150 kbp の直鎖状 2 本鎖 DNA で、unique long (UL) と unique short (Us) の 2 つの unique 配列と各両端の repeat long (RL) と repeat short (Rs) の 2 つのリピート配列により構成される。80 種類以上のウイルスタンパク質をコードしており、そのうちの 3 つの遺伝子 infected cell protein 0 (ICP0/RL2), ICP34.5/RL1, immediate-early protein of 175 Da (ICP4/IE175/RS1) はウイルスゲノムのリピート配列部位に 2 コピー存在する。またこれらのコード遺伝子以外にも non-coding RNA として機能する非コード遺伝子もいくつか存在する[2, 6].

## HSV の潜伏感染

HSV 初感染後、局所の組織で増殖したウイルスは知覚神経アクソン末端

の細胞膜と融合することにより神経節内へ侵入する。放出されたヌクレオカプシドはアクソン内を逆行性輸送され、三叉神経節または仙髄神経節に到達し、一過性の増殖後、ウイルス粒子を産生しない潜伏感染に移行する。潜伏感染時には latency associated transcript (LAT) と呼ばれる遺伝子が高発現している。LAT は約 8.3 kb の転写物で、スプライシングされ約 2 kb と約 1.5 kb の安定したイントロンを発現する[2]。最近、潜伏感染時に LAT 遺伝子領域からいくつかの small non-coding RNA が発現していることが報告された。LAT 遺伝子領域にコードされる small non-coding RNA が前初期遺伝子である ICP4 および ICP0 の遺伝子発現を抑制することが示されており、small non-coding RNA の前駆体である LAT が溶解感染に重要な前初期遺伝子産物の遺伝子発現を制御することで潜伏感染を維持しているのではないかというモデルが提唱されている[6]。

### HSV-1 の遺伝子発現 (図 1)

ウイルスは細胞表面のレセプターと結合し感染を開始させる。エンベロープが細胞膜と融合しウイルスが細胞内に侵入すると、テグメントタンパク質である VHS (virion host shut off, UL41 遺伝子産物) と VP16 ( $\alpha$ -TIF, UL48 遺伝子産物) 等が細胞質に放出される。細胞質内に侵入したヌクレオカプシドが核膜孔

に到達すると、ウイルス DNA が核内へと注入され環状化し、ウイルス遺伝子の転写が開始される。HSV-1 がコードする遺伝子は発現時期によって前初期 (immediate early: IE,  $\alpha$ ) 遺伝子、初期 (early: E,  $\beta$ ) 遺伝子、後期 (late: L,  $\gamma$ ) 遺伝子に大別される。ウイルス遺伝子の発現は前初期遺伝子から始まり、後期遺伝子までカスケード状に制御されている。前初期遺伝子の活性化は、テグメントタンパク質である VP16 が宿主転写因子である Oct-1 や HCF-1 と複合体を形成し、VP16 response element に結合することにより開始する[2]。ICP0, ICP4 などの前初期タンパク質は、ウイルス DNA 複製に必要な初期タンパク質やウイルス構造タンパク質の産生に必要な後期タンパク質の発現を制御することで効率的な HSV-1 増殖に寄与していると考えられているが[7]、ICP0 や ICP4 による転写活性化メカニズムに関しては不明な点が多い。

一方で、ウイルスが細胞内に侵入するとウイルス DNA を抑制しようとする宿主側の働きが直ちに認められるようになる。このウイルス遺伝子発現の抑制にはクロマチンリモデリングを介した転写制御が深く関与していることが知られている[8]。

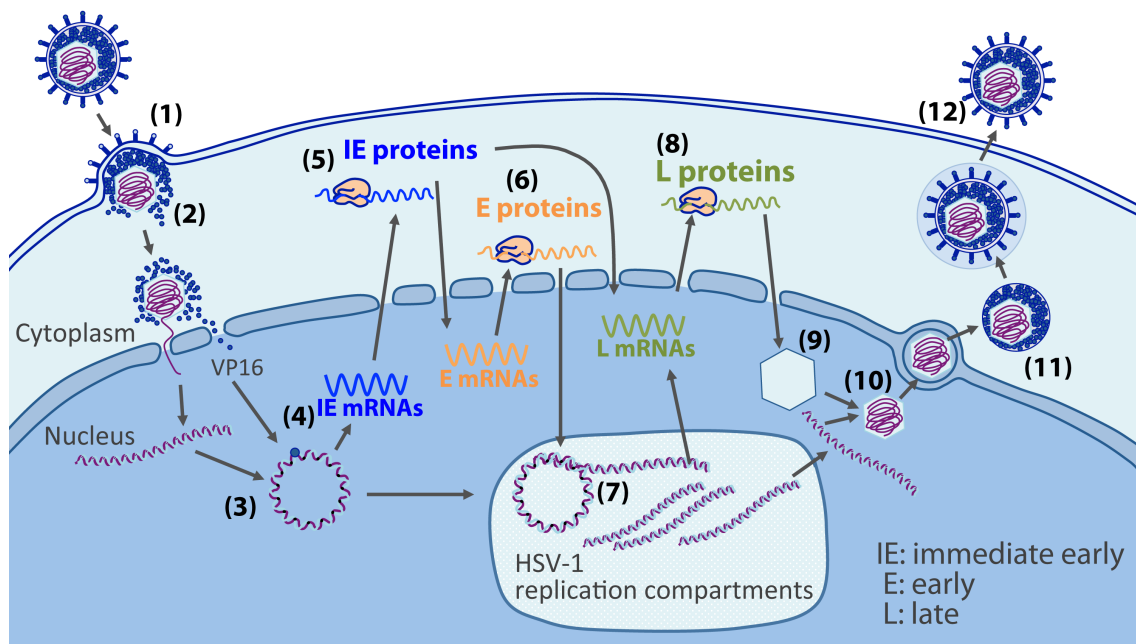


図 1: ヘルペスウイルスの生活環

HSV-1 は細胞に吸着し侵入後 (1), テグメントタンパク質である VP16 や UL41 を細胞質に放出する (2). ヌクレオカプシドは核膜孔に輸送され, ウイルス DNA が核内へと注入され環状化する (3). VP16 や宿主転写因子によって  $\alpha$  タンパク質群の転写が活性化され (4),  $\alpha$  タンパク質群が合成される (5).  $\beta$  タンパク質群によってウイルス DNA は複製され (6, 7),  $\gamma$  タンパク質群によってカプシドなどの構成タンパク質が生成される (8, 9). カプシドにウイルス DNA がパッケージングされると (10), ヌクレオカプシドは核膜を通過後テグメントタンパク質とエンベロープタンパク質を獲得し (11), エキソサイトーシスによりウイルス粒子は出芽する (12) [2].

### クロマチンリモデリングと HSV-1 遺伝子発現制御

真核生物においてクロマチン動態制御は, 転写, 複製, DNA 修復などの様々なゲノム制御に重要であることがわかっている. ヌクレオソームはクロマチンの基本構成単位で, 4 種のヒストン (H2A, H2B, H3, H4) 各 2 個ずつから構

成される 8 量体に DNA が巻き付いた構造をとる。クロマチン構造は動的に制御されており、ゲノムの核への適切なパッケージングだけでなく、RNA ポリメラーゼ II (Pol II) などの転写制御因子の DNA へのアクセスも制御している[9, 10].

ヌクレオソームが凝集した状態では Pol II が DNA にアクセスできず転写及び mRNA 合成は抑制されているが、ヌクレオソームが脱凝集した状態では Pol II が DNA にアクセス可能となり、転写が開始される[9, 10]. またヒストン修飾によるクロマチン構造制御も重要な働きをすることがわかってきた。ヒストン修飾はヒストンテールと呼ばれるヒストンの N 末端側で主に起こる。ヒストンはアセチル化、メチル化、リン酸化などの様々な修飾を受け、クロマチン構造制御を介した遺伝子発現を制御すると考えられている。ヒストンのアセチル化は可逆的で、ヒストンアセチル化酵素 (histone acetyltransferase: HAT) とヒストン脱アセチル化酵素 (histone deacetylase: HDAC) によって調節されている。ヒストン H3 の 9 番目と 14 番目のリジンにおけるアセチル化 (H3K9/K14ac) はヌクレオソーム間の相互作用を緩め、転写を誘導すると言われている。ヒストンのメチル化はヒストンメチルトランスフェラーゼ (histone methyltransferase: HMT) によって誘導される。ヒストン H3K4 のメチル化は遺伝子の活性化と、ヒストン H3K9 のメチル化は遺伝子の抑制と相関することが知られている[9, 10].

細胞の DNA と同様に DNA ウイルスのゲノムもクロマチン動態制御を受けることが知られている[11, 12]. HSV の DNA は潜伏感染及び溶解感染時においてヒストンと結合しヌクレオソームを形成することが示されている. 潜伏感染時にはほとんど全てのウイルス遺伝子発現が抑制されており, プロモーター領域におけるヘテロクロマチン状態を示す H3K9me2 及び低レベルのヒストン H3 のアセチル化が認められる[11, 13, 14]. ウイルス粒子中のウイルス DNA はヒストンと結合していないと言われているが, ウイルス DNA が核内に注入されるとすぐにヒストンと結合し, ヘテロクロマチン構造が形成され, ウイルス DNA のサイレンシングが起こる. このサイレンシングには抗 HSV 応答に働く宿主因子が関与していると考えられている[11]. 溶解感染が進行するとウイルス DNA の histone occupancy が減少し, ウイルス遺伝子が活性化されウイルスが効率的に増殖可能となると言われている[15]. これらのクロマチンリモデリングを介した HSV-1 遺伝子発現制御には VP16 や ICP0 などのウイルス因子といくつかの宿主因子が重要であることが報告されている[15-19].

### HSV-1 がコードする ICP0

ICP0 は効率的なウイルス増殖, ウイルス遺伝子発現制御, 潜伏感染から

の再活性化，宿主タンパク質の分解など様々な現象に関与することが知られている重要な多機能因子である．ICP0 は U2OS 細胞を除くほとんどの培養細胞において HSV-1 野生株感染時と比較して ICP0 欠損ウイルス感染時にウイルス増殖が 10~100 倍低下することが知られている[7, 8, 20-23]．ICP0 は promiscuous な転写活性化因子で，全てのウイルス遺伝子のプロモーターを活性化することが示されている[24]．また ICP0 欠損ウイルスを用いた動物実験の結果から，ICP0 は潜伏感染からの再活性化に重要であることが明らかとなっている[20-22, 25, 26]．HSV の再活性化を誘導すると言われている DNA ダメージ処理は，他のウイルス因子の存在なしに ICP0 プロモーター活性を増強すること，神経芽腫細胞における溶解感染時の ICP0 タンパク質発現を増強することが知られている[27]．また ICP0 タンパク質の単独発現でも再活性化が起こることから，ICP0 が HSV-1 の再活性化を引き起こすスイッチになっていることが示唆されており[28-30]，ICP0 を介した再活性化のメカニズムが注目されている．

ICP0 は RING finger 領域を有するユビキチン E3 リガーゼで，promyelocytic leukemia (PML)，DNA-dependent protein kinase (DNA-PK)，RING finger protein (RNF) 8, RNF168, ubiquitin-specific protease 7 (USP7)，interferon gamma-inducible protein 16 (IFI16) など様々な宿主タンパク質をプロテアソーム依存的に分解す

ることが知られている[8, 31-37]. その中のいくつかの宿主タンパク質と ICP0 が結合することが示されており, 以前 Sara E. Conwell らによって行われた感染細胞を用いた質量解析においても, 新たに tripartite motif protein 27 (TRIM27) などの ICP0 の基質候補因子が同定された[38]. この質量解析では, 野生型 HSV-1 または ICP0 RING finger 変異ウイルス感染細胞とプロテアソーム阻害剤を使用することにより, ユビキチン E3 リガーゼである ICP0 の基質を多く同定している[38]. このように多くの ICP0 の基質が報告されてきたが, ICP0 RING finger 変異ウイルスは ICP0 欠損ウイルスほどの表現型を示さないことや, ICP0 が様々なタンパク質と結合しタンパク質の安定性, クロマチン制御, DNA ダメージ応答等に関与することなどから, E3 ユビキチンリガーゼ活性以外にも重要な機能が多く存在することが示唆されている[8].

#### ICP0 による HSV-1 遺伝子発現制御

Nuclear domain 10 (ND10) または PML は感染後直ぐにウイルス DNA に結合しウイルス複製を阻害すると言われている[8, 39]. PML とその構成因子である speckled protein of 100 kDa (Sp100), death domain-associated protein (Daxx), alpha thalassemia/mental retardation X-linked (ATRX) 各々の発現抑制細胞ではコントロ



ール細胞と比較して ICP0 欠損ウイルスの増殖が 5-10 倍増加することから, ICP0 は HSV 複製を阻害する PML を分解し Daxx や ATRX を拡散させることにより ND10 の HSV ゲノムへの結合を阻害し, 効率的なウイルス増殖に寄与していることが示唆されている[14, 40, 41]. Daxx と ATRX は複合体を形成してヘテロクロマチン領域に局在し転写抑制に働いていると言われている[41, 42]. しかしながらウイルスゲノム上のヌクレオソームと Daxx/ATRX 複合体との関連性や他の宿主因子のリクルートといった HSV ゲノム転写抑制のメカニズムに関しては定かではない[43]. Daxx/ATRX 複合体以外にも CoREST/REST/HDAC1/LSD1 repressor complex や clock circadian regulator (CLOCK) が ICP0 依存的なウイルスゲノムのクロマチン構造制御に関与していると報告されている[8, 44, 45]. ICP0 は repressor element-1 silencing transcription factor corepressor 1 (CoREST) と結合し, 転写抑制に重要なヒストン脱アセチル化酵素 histone deacetylase 1 (HDAC1) を CoREST/REST/HDAC1/LSD1 repressor complex から除去することで, 宿主因子によるウイルス遺伝子発現抑制から逃れていると考えられている[44, 46]. また CoREST の 146-482 番目のアミノ酸でドミナントネガティブ変異体として働く CoREST<sub>146-482</sub> ポリペプチドも ICP0 と同様に CoREST/REST/HDAC1/LSD1 repressor complex から HDAC1 を除くことが可能であること, CoREST<sub>146-482</sub> ポリ

ペプチドを搭載した ICP0 欠損ウイルスは ICP0 欠損ウイルスと比較して 10~100 倍ウイルス増殖が増加することが報告されている[47]. さらに CoREST の発現を抑制すると CoREST/REST/HDAC1/LSD1 repressor complex 構成因子である REST や LSD1 の発現が抑制されること、 $\alpha$  タンパク質及び mRNA 発現が低下すること、野生型 HSV-1 の増殖が低下することが報告されている[48]. しかしながら他のグループの研究で CoREST の発現抑制は野生型 HSV-1 と ICP0 欠損ウイルスどちらの増殖にも影響がないことも報告されており[49], 不確実な点が多い.

HDAC1 とは逆にヒストンアセチル化を行う酵素で転写活性化に重要な HAT の 1 つである CLOCK は, yeast two-hybrid system により同定された ICP0 相互作用因子である brain-muscle ARNT-like protein 1 (BMAL1) と複合体を形成することが知られている[50]. BMAL1 が SUMO 化により活性化されると BMAL1/CLOCK 複合体は ND10 に局在するようになる. BMAL1 はユビキチン化されプロテアソーム依存的に分解されるが, HSV-1 感染細胞においては ICP0 と結合することにより BMAL1 は安定化され, 結果的に CLOCK による HSV-1 ゲノムのヒストンアセチル化が促進されると言われている[14, 50]. さらに ICP0 欠損ウイルスに CLOCK 遺伝子発現カセットを搭載することにより ICP0 欠損ウイルスの増殖が 10 倍以上回復すること, その回復には CLOCK の HAT 活性が重要であること,

CLOCK の発現抑制により野生型 HSV-1 のウイルスタンパク質発現量が減少することから、クロマチンリモデリングを介した HSV-1 遺伝子発現制御に CLOCK の HAT 活性が重要であると言われている[14, 45, 51]. しかしながら CLCOK と ICPO の結合や ICPO 非存在下における CLOCK 発現抑制がウイルスの遺伝子発現に与える影響に関しては解析が不十分である.

#### HSV-1 のクロマチンを制御する宿主因子

溶解感染時、転写コアクチベーターである host cell factor-1 (HCF-1), H3K4 と H3K9 の HMT である lysine-specific demethylase (LSD1), H3K4 HMT である Set1, mixed lineage leukemia protein 1 (MLL1) は HSV ゲノムの IE プロモーター領域にリクルートされ methyltransferase 複合体を形成し転写を開始させることが知られている[14, 52]. またクロマチンリモデリング因子の 1 つである sucrose nonfermenting protein 2 homolog (SNF2H) はウイルス DNA 複製と後期遺伝子の転写が起こる場所である HSV replication compartments (RCs) に局在して chromatin-remodeling complex を形成し, HSV-1 ゲノムの histone H3 occupancy を低下させると言われている[53, 54]. しかしながら SNF2H の発現抑制がウイルスゲノムのクロマチン状態に与える影響や感染後期において HSV-1 ゲノムの

histone H3 occupancy に関与する他の宿主因子の存在に関しては明らかとなっていない。

## 本研究の目的

このように ICPO は多くの宿主タンパク質と直接的もしくは間接的に相互作用することが報告されてきた。ICPO は重要な多機能因子であり、様々な宿主タンパク質と相互作用し、多様なメカニズムで HSV-1 増殖を制御していると考えられる。よって ICPO と宿主因子の相互作用をさらに解明することは HSV-1 制御メカニズムを理解する上で重要である。またウイルス因子と宿主因子により形成される複合体が HSV-1 ゲノムのクロマチンリモデリングを介した遺伝子発現を制御するという知見が蓄積してきたが、HSV-1 の遺伝子発現は複数の宿主因子とウイルス因子の総合的な作用により制御されており、遺伝子発現制御に重要な宿主因子は他にも存在すると考えられる。そこで本研究では、ICPO と宿主因子の複合体による HSV-1 遺伝子発現制御に関する新しい知見を得るために、質量解析により ICPO と相互作用する宿主因子の同定とその生物学的意義の解明を試みた。

## 実験方法

### 細胞とウイルス

Vero 細胞 (アフリカミドリザル腎臓由来細胞株) は, Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) 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を加えた培地で培養した. Rabbit skin cell (RSC) は, DMEM に 5% fetal calf serum (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. HEK293 細胞 (ヒト胎児腎臓由来細胞株), HEK293T 細胞 (SV40 large T antigen を発現しているヒト胎児腎臓由来細胞株), HEp-2 細胞 (ヒト喉頭癌由来細胞株), Plat-GP 細胞 (HEK293T 細胞由来のレトロベクターパッケージング細胞株), U2OS 細胞 (ヒト骨肉腫由来細胞株, ATCC HTB-96) 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[55-58]. CS および FCS は 56°C で 30 分間の非働化処理後に使用した.

HSV-1 野生株として F 株を使用した[59]. 組換えウイルス YK771 (MEF-gB) と YK478 (UL41-D213N) (図 2 Line 7) は本研究室で以前に作製された

ものを使用した[58, 60]. 組換えウイルス R7910 (ICP0 欠損株:  $\Delta$ ICP0) と R7911 (R7910 復帰株:  $\Delta$ ICP0-repair) は図 2 Line4, 5 に示したものをを使用した[61, 62]. 各細胞におけるウイルス増殖の実験には, 199 培地 (Sigma) に 1% FCS, 100 units/ml ペニシリン, 100  $\mu$ g/ml ストレプトマイシンを添加した培地 (199V 培地) を使用した. R7910 及びそれと同時に使用するウイルスの調整には U2OS 細胞を使用した. Vero 細胞および U2OS 細胞におけるウイルス力価は plaque forming units (PFU) で表記する. Multiplicity of infection (MOI) は PFU/cell の値を示す.

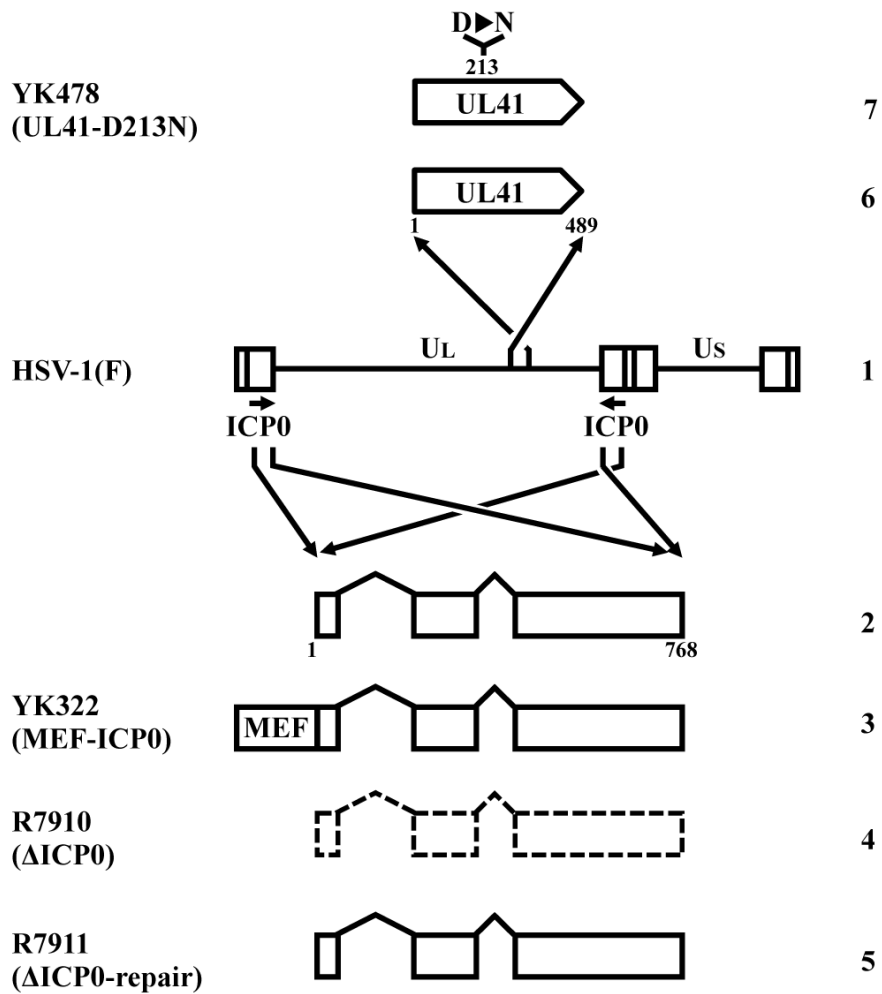


図 2: 野生型 HSV-1(F) と組換えウイルスの模式図

Line 1 は野生型 HSV-1(F) のゲノム構造を示している. Unique 配列は unique long (UL) と unique short (Us) ドメインとして表記した. Line 2 は ICP0 の open reading frame (ORF) 領域を示している. Line 3 はゲノム上に 2 コピー存在する ICP0 両方の N 末端側に MEF タグを挿入したウイルス (MEF-ICP0; YK322) である. Line 4 は ICP0 を 2 コピーとも欠損させたウイルス ( $\Delta$ ICP0; R7910) で, Line 5 はその復帰ウイルス ( $\Delta$ ICP0-repair; R7911) である. Line 6 は UL41 の ORF 領域を示している. Line 7 は UL41 の 213 番目のアミノ酸をアスパラギン酸からアスパラギンに置換した組換えウイルス (UL41-D213N; YK478) である.

## プラスミド

pcDNA-MEF-ICP0はICP0のN末端側にMEF (Myc epitope-tobacco etch virus (TEV) protease cleavage site-Flag epitope) タグを付加した発現プラスミドで, ICP0のcDNA[63]をpcDNA-MEFベクター[64]の*EcoRI-EcoRV*部位に挿入し作製した(図3A). pcDNA-HA-RanBP10はRanBP10のN末端側にHAタグを付加した発現プラスミドで, HEp-2細胞のtotal RNAから合成したcDNAをテンプレートとして使用し, プライマー 5'-CGG AAT TCA CCA TGT ACC CAT ACG ATG TTC CGG ATT ACG CTG GAT CCA CCA TGG CGG CAG CGA CGG CAG AC-3' および 5'-CGG ATA TCC TAG TGC AAG TAG TCA TCA AC-3' を用いてRanBP10のORFをPCRで増幅し, pcDNA3.1ベクター (Invitrogen) の*EcoRI-EcoRV*部位にクローニングし作製した. pcDNA-RanBP10はRanBP10の発現プラスミドで, pcDNA-HA-RanBP10を*Bam*HIで切断後にT4 DNA Ligase (TaKaRa) で再ライゲーションし作製した. pSSCH-LucはホタルルシフェラーゼmRNA配列に対するshRNAを発現するプラスミドで, 本研究室で以前作製されたものを使用した[65]. pSSCH-RanBP10はRanBP10の3' untranslated region (UTR) 領域を特異的に認識するshRNAを発現するプラスミドで, 以下の通りに作製した. オリゴDNA 5'-TTT GTT ACA TTG GTT TAT AGC ATC GCT TCC TGT CAC GAT GCT ATA AAC



CAA TGT AAC TTT TTT G-3' および 5'-AAT TCA AAA AAG TTA CAT TGG  
TTT ATA GCA TCG TGA CAG GAA GCG ATG CTA TAA ACC AAT GTA A-3'  
をアニーリングさせ, pmU6プラスミド[66]の*BbsI-EcoRI*部位にクローニングした.  
作製したプラスミドの*BamHI-SalI*部位からU6プロモーターとshRNA配列を切り  
出し, pSSCHベクター[67]にサブクローニングした. pMXs-HA-RanBP10と  
pMXs-RanBP10は, RanBP10を発現するレトロウイルスベクターで,  
pcDNA-HA-RanBP10の*EcoRI-NotI*部位とpcDNA-RanBP10の*BamHI-NotI*部位から  
切り出したものをそれぞれpMXs-Puroレトロウイルスベクター[58]にクローニン  
グし作製した. pMXs-Flag-RanBP10はRanBP10のN末端側にFlagタグを付加した  
レトロウイルスベクターで, プライマー 5'-CGG AAT TCA CCA TGG ACT ACA  
AAG ACG ATG ACG ACA AGG CGG CAG CGA CGG CAG ACC C-3' および  
5'-CCG CTC GAG CTA GTG CAA GTA GTC ATC AAC-3' を用いてRanBP10の  
ORFをPCRで増幅し, pMXs-Puroレトロウイルスベクターの*EcoRI-XhoI*部位にク  
ローニングし作製した.

#### 組換えウイルスの作製

ICP0 の N 末端側に MEF タグを付加した組換えウイルス YK322

(MEF-ICP0) は Two-step Red-mediated mutagenesis 法[68]により作製した (図 2 Line 3)[69].

### 組換えアデノウイルスの作製

pcDNA-EF1 $\alpha$ p は, Dr. K Miyake から分与して頂いた pEF-BOS[70]をテンプレートとして使用し, 酵素 Tks Gflex DNA Polymerase (TaKaRa) とプライマー 5'-GTT GCC ATG GCC TCG TGA GGC TCC GGT G-3' および 5'- GGT AAG CTT CAC GAC ACC TGA AAT GG-3' を用いて EF1 $\alpha$  promoter を PCR で増幅し, *HindIII* で処理したものを pcDNA3.1 の *NruI-HindIII* 部位にクローニングし作製した. pENTR11-EF1 $\alpha$ p は, pcDNA-EF1 $\alpha$ p をテンプレートとして使用し, 酵素 Tks Gflex DNA Polymerase とプライマー 5'-GTT GCC ATG GCC TCG TGA GGC TCC GGT G-3' および 5'-TCC CCA GCA TGC CTG CTA TTG TC-3' を用いて EF1 $\alpha$ p-MCS-bGH PA 領域を PCR で増幅し, *NcoI* で処理したものを pENTR11 (Invitrogen) の *NcoI-EcoRV* 部位にクローニングし作製した.

pENTR-EF1 $\alpha$ p-HA-RanBP10 と pENTR-EF1 $\alpha$ p-RanBP10 は, pcDNA-HA-RanBP10 ベクターの *EcoRI-EcoRV* 部位と *BamHI-EcoRV* 部位をそれぞれ切り出し, pENTR11-EF1 $\alpha$ p にクローニングし作製した. pAd/PL-DEST-HA-RanBP10 と

pAd/PL-DEST-RanBP10 は , pENTR-EF1 $\alpha$ p-HA-RanBP10 または pENTR-EF1 $\alpha$ p-RanBP10, pAd/PL-DEST ベクター (Invitrogen), LR Clonase Enzyme Mix (Invitrogen) を混合し, 25°Cで1時間 LR 反応を行い, proteinase K を 37°Cで10分間処理した後, DH5 $\alpha$  コンピテントセル (Invitrogen) に導入し作製した. 作製した組換えアデノウイルスベクターを *PacI* 処理し, HEK293 細胞にトランスフェクションすることで組換えアデノウイルスを得た.

#### 質量解析による ICP0 相互作用因子のスクリーニング

pcDNA-MEF-ICP0 を Polyethylenimine[71]を用いて HEK293T 細胞にトランスフェクションし, 36時間後にセルスクレイパーで回収し, Cold PBS で2回洗浄した. 以後の操作はすべて氷上または 4°Cで行った. 回収した細胞を, プロテアーゼ阻害剤カクテル (Nacalai Tesque) とフォスファターゼ阻害剤カクテル (Nacalai Tesque) を添加した 0.1% NP-40 buffer (50 mM Tris-HCl [pH8.0], 120 mM NaCl, 50 mM NaF, 0.1% NP-40) で30分間溶解した. 15,000 rpm で20分間遠心し, 上清に proteinA ビーズ (GE) を加え, 30分間ローテーションすることでプレ洗浄を行った. 遠心により proteinA ビーズを除去し, anti-Myc 抗体 (MBL) を加え, 2時間ローテーションし抗原抗体反応を行った. proteinA ビーズを加え, 1時間

ローテーションし抗原抗体複合体を沈降した。抗原抗体複合体が結合した proteinA ビーズを 0.1% NP-40 buffer で 4 回洗浄後, AcTEV protease (Promega) を加え, 室温で 1 時間ローテーションすることにより Myc タグと Flag タグの間に挿入した TEV protease 部位を切断した。遠心後, 上清に anti-Flag affinity gel (Sigma) を加え, 一晩ローテーションし抗原抗体反応を行った。抗原が結合した anti-Flag M2 affinity gel を 0.1% NP-40 buffer で 3 回洗浄し, その後 wash buffer (50 mM Tris-HCl [pH8.0], 120 mM NaCl, 50 mM NaF) で 2 回洗浄後, Flag elution buffer (50 mM Tris-HCl [pH8.0], 150 mM NaCl, 0.5 mg Flag peptide/ml) を加え, 2 時間ローテーションすることにより沈降物を anti-Flag M2 affinity gel から溶出させた。溶出液のうちの 10%を SDS-PAGE に供し銀染色により免疫沈降物を確認した (図 3B)。残りの 90%をトリプシン消化後, Zip Tip (Millipore) により脱塩処理し, Dina (KYA Technologies) にて分離を行いながらオンラインで Q-STAR Elite (AB SCIEX)に供し, 各ペプチドの質量分析情報を取得した。その結果をさらにヒトタンパク質データベース (35,853 protein sequences, RefSeq human protein database, 4 Feb 2013; National Center for Biotechnology Information [NCBI]) を用いて Mascot algorithm (Version 2.4.1; Matrix Science) で解析した[58]。パラメーターには variable modifications, methionine oxidation, protein N-terminal acetylation and

pyro-glutamination for N-terminal glutamine; maximum missed cleavages, 2; peptide mass tolerance, 200 ppm; and MS/MS tolerance, 0.5 Da を使用した.  $P < 0.05$  を満たす Mascot score の閾値を上回るペプチドが 1 種類以上存在した場合に, 該当アミノ酸配列を含むタンパク質が検出されたとみなした.

組換えレトロベクターの作製と sh-Luc-HEp-2 細胞, sh-RanBP10-HEp-2 細胞, sh-RanBP10/RanBP10-HEp-2 細胞, HA-RanBP10-HEp-2 細胞, Flag-RanBP10-HEp-2 細胞の樹立

Vesicular stomatitis virus のエンベロープ G タンパク質をコードする pMDG (VSV-G)[58]と, pSSCH-Luc または pSSCH-RanBP10 を Plat-GP 細胞にトランスフェクションしてから 2 日後に, 上清に含まれるレトロウイルスベクターを回収した. ホタルルシフェラーゼまたは RanBP10 の UTR に対する shRNA の恒常的発現細胞である sh-Luc-HEp-2 細胞と sh-RanBP10-HEp-2 細胞は, 得られたレトロウイルスベクターを HEp-2 細胞に感染させ, 50  $\mu\text{g/ml}$  Hygromycin B (Nacalai Tesque) による薬剤選択を行うことにより樹立した. 上記と同様に, pMXs-RanBP10, pMXs-HA-RanBP10, または pMXs-Flag-RanBP10 と VSV-G を Plat-GP 細胞にトランスフェクションし, レトロウイルスベクターを回収した.

RanBP10 を外因的に発現する sh-RanBP10/RanBP10-HEp-2 細胞は、得られたレトロウイルスベクターを sh-RanBP10-HEp-2 細胞に感染させ、50 µg/ml Hygromycin B と 1 µg/ml Puromycin で選択的に培養することにより樹立した。HA-RanBP10 または Flag-RanBP10 を外因的に発現する HA-RanBP10-HEp-2 細胞または Flag-RanBP10-HEp-2 細胞は、得られたレトロウイルスベクターを HEp-2 細胞に感染させ、1 µg/ml Puromycin による薬剤選択を行うことにより樹立した。これらの細胞は、DMEM に 50 µg/ml Hygromycin B または 1 µg/ml Puromycin , 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。

## 抗体

使用した抗体は以下の通りである。マウスモノクローナル抗体は Flag (M2; Sigma), Myc (PL14; MBL), HA (TANA2; MBL),  $\beta$ -actin (Ac15; Sigma), ICP0 (1112; Goodwin Institute), ICP4 (58S; ATCC), ICP27 (8.F.137B; Abcam), ICP8 (10A3; Millipore, HB-8180; ATCC) を使用した。マウスポリクローナル抗体である ICP22[72], ウサギポリクローナルである ICP0[63]は本研究室で以前作製されたものを使用した。ウサギポリクローナル抗体は ICP0 [63], VP16

(CAC-CT-HSV-UL48; CosmoBio), RanBP10 (ab150930; Abcam), Flag (PM020; MBL) を使用した.

### HSV-1 の力価測定 (プラークアッセイ)

199V 培地で 10 倍段階希釈したウイルス液を Vero 細胞または U2OS 細胞に 1 時間吸着させた後, ヒト  $\gamma$ -グロブリン (Sigma) を含む 199V 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, プラーク数を測定しウイルス力価を算出した.

### 組換えアデノウイルスの力価測定 (TCID<sub>50</sub>)

96 well プレーートの 1 列目に 10<sup>4</sup> 倍希釈ウイルス液を用意した. DMEM に 10% FCS, 100 units/ml ペニシリン, 100  $\mu$ g/ml ストレプトマイシンを加えた培地を用いて組換えウイルス液を 4 倍段階希釈後, HEK293 細胞を各 well に加えた. 感染 14 日後に細胞変性の終末点を顕微鏡で判定した. 50% tissue culture infectious dose (TCID<sub>50</sub>) は Karber の式を用いて算出した[73].

## 増殖曲線

各細胞に各ウイルスを MOI=0.01 または MOI=5 で感染させた。37°Cで1時間吸着後、199V 培地で細胞を洗浄し、37°Cで培養した。経時的に回収した感染細胞は3回凍結融解した後、Vero 細胞または U2OS 細胞を用いてウイルスカラムを算出した。

## 共免疫沈降

各細胞をセルスクレイパーで回収後、プロテアーゼ阻害剤カクテル (Nacalai Tesque) とフォスファターゼ阻害剤カクテル (Nacalai Tesque) を添加した 0.1% NP-40 buffer で溶解し、遠心により細胞片を取り除いた。proteinA でプレ洗浄した上清に各抗体を加え 4°Cで2時間反応後、proteinA ビーズを加えて抗原抗体複合体を沈降した。ビーズを 0.1% NP-40 buffer で4回洗浄後 SDS-PAGE に供した。

## 免疫蛍光抗体法

予めコラーゲン(機能性ペプチド研究所) でコートした 35 mm ガラスボトムディッシュ (Matsunami) に各細胞を培養し、各ウイルスを MOI=5 で感染させ、



8時間後に4% paraformaldehydeを含むPBSで10分間固定した。0.1% Triton X-100を含むPBSで15分間透過処理後、10% Human Serum (Sigma)を含むPBSで2時間ブロッキングした。各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 抗体液 (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、LSM5 PASCAL 蛍光顕微鏡 (Carl Zeiss) で観察した。LSM5での観察には Arogen laser (458 nm, 488 nm, 514 nm) と HeNe laser (543 nm, 633 nm) (Carl Zeiss) を使用した。Alexa Fluor 488 の蛍光は 488 nm で励起し BP515-545 emission filter で観察した。Alexa Fluor 546 の蛍光は 543 nm で励起し LP620 emission filter で観察した。

#### ウエスタンブロッティング

各細胞から得たタンパク質サンプルを SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) で分離した。SDS-PAGE 後、transfer buffer (Tris 12.1 g, Glycine 14.4 g, Methanol 200 ml, H<sub>2</sub>O 800 ml) に浸したろ紙でゲルと PVDF メンブレン (Millipore) を挟み、泳動したタンパク質をメンブレンに転写した。転写後のメンブレンは 5% スキムミルクを含む PBS-T (0.1% Tween20 を含む PBS) を用いて室温で1時間ブロッキングし、1% BSA を含む PBS-T で希釈した1次抗体を用

いて室温で 2 時間または 4°Cで一晩反応させた. PBS-T で洗浄後, 3%スキムミルクを含む PBS-T で希釈した horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-mouse (GE), HRP-conjugated anti-rabbit (GE), または Clean-Blot IP Detection Kit (HRP) (Thermo Scientific) を用いて室温で 1 時間反応させた. PBS-T で洗浄し, Enhanced chemiluminescence (GE) で反応後, ImageQuant LAS4000 (GE) により目的のバンドを検出した. バンドの定量は ImageQuant LAS 4000 system with ImageQuant TL7.0 analysis software (GE Healthcare Life Sciences) で行った.

#### Cell Viability 測定

sh-Luc-HEp-2, sh-RanBP10-HEp-2, sh-RanBP10/RanBP10-HEp-2 細胞の Cell Viability は, Cell Counting Kit-8 (Dojindo) を用いて製品説明書通りに試薬を混合し, EnSpire Multimode Plate Reader (PerkinElmer) で測定した.

#### 定量 PCR

SuperPrep Cell Lysis Kit for qPCR (TOYOBO) を使用して各ウイルス感染細胞から total RNA を回収し, Transcriptor first-strand cDNA synthesis kit (Roche) を使用して cDNA を合成した. ProbeFinder software (Roche) を用いて設計した

ICP27, ICP8, VP16, 18S rRNA 各々の遺伝子特異的プライマーと加水分解プローブ Universal ProbeLibrary (Roche) (TABLE 1), DNA polymerase Taqman Master (Roche), cDNA を製品説明書通りに混合し, LightCycler 1.1 System (Roche) で定量した. ICP27, ICP8, VP16 の mRNA 発現量は 18S rRNA の mRNA 発現量で補正した. 各ウイルス遺伝子の mRNA 発現量は  $\Delta\Delta C_t$  法を用いて計算した[74].

TABLE 1. 定量 PCR プライマー及びプローブ

遺伝子	プライマー (5'-3')	Universal ProbeLibrary probe
ICP27	TCCGACAGCGATCTGGAC	#56
	TCCGACGAGGAACACTCC	
ICP8	ACAGCTGCAGATCGAGGACT	#65
	CCATCATCTCCTCGCTTAGG	
VP16	GCGCTCTCTCGTTTCTTCC	#52
	GGCCAACACGGTTCGATA	
18S rRNA	GCAATTATCCCCATGAACG	#48
	GGGACTTAATCAACGCAAGC	

#### Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay と定量 PCR

$5 \times 10^6$  の各細胞を 100 mm dish に播種し, 各ウイルスを MOI=5 で感染させ 18 時間後に, 最終濃度 1%になるよう 5.5%ホルムアルデヒド溶液を加えて室温で 10 分間クロスリンクした. 次に最終濃度 125 mM になるよう 2.5 M グリシン

を加えてクロスリンクを止めた。Cold PBS で3回洗浄後、細胞を回収した。各細胞ペレットに溶解バッファー1 (50 mM Hepes-KOH [pH 7.5], 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10% glycerol, 0.5% NP-40, 0.25% Triton X-100) を加えて10分間溶解した。遠心後、各細胞ペレットに溶解バッファー2 (200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 10 mM Tris-HCl [pH 8.0]) を加えて10分間溶解した。再び遠心後、各細胞ペレットに溶解バッファー3 (100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 10 mM Tris-HCl [pH 8.0], 0.1% sodium deoxycholate, 0.5% sodium N-lauroylsarcosinate) を加えて溶解し、ソニケーター (Handy Sonic UR-21P; TOMY) を用いて power 10 で30秒間、合計10回のソニケーションを行い、DNA断片が平均500 bp以下になるようにした。ソニケーションした溶解液に最終濃度1%になるよう Triton-X 100 を加え 15,000rpm, 4°Cで10分間遠心し上清を回収した。Dynabeads Protein G slurry (Novex) を用いて上清を4°Cで30分間プレ洗浄後、溶解液のうち10%を whole cell extract (WCE) DNA として保存した。残りの溶解液に3 µg の anti-histone H3 抗体 (ab1791; Abcam) または Normal Rabbit IgG (MBL) を加え4時間クロマチン免疫沈降を行った。抗体は、Dynabeads Protein G を含む CHIP dilution buffer (0.5% BSA を含む PBS) と4°Cで一晩あらかじめ反応させておいたものを使用した。免疫沈降物を洗浄バッファー (50 mM

Hepes-KOH [pH 7.5], 500 mM LiCl, 1 mM EDTA, 1% NP-40, 0.7% sodium deoxycholate) で6回洗浄後, 50 mM NaClを含むTEバッファー (50 mM Tris-HCl [pH 8.0], 10 mM EDTA) で洗浄した. 次に溶出バッファー (50 mM Tris-HCl [pH 8.0], 10 mM EDTA, 1% SDS) を加えて 65°Cで15分間溶出した. 上清を65°Cで一晩インキュベートして脱クロスリンクし ChIP-DNA を得た. ChIP-DNA と WCE-DNA それぞれに最終濃度 0.2 µg/µl の RNase A (Sigma) を加えて 37°Cで2時間, さらに最終濃度 0.2 µg/µl の Proteinase K と 300 mM CaCl<sub>2</sub>を加えて 55°Cで1時間反応させた. DNAは NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (MACHERY-NAGEL) を用いて精製した. 定量PCRは, 2.5 µl の DNA, 1 µM のプライマー (TABLE 2), 2×Sybr green Mix (Roche) を製品説明書通りに混合し, LightCycler 1.1 System (Roche) で定量した.

TABLE 2. ChIP assay 定量PCR プライマー

HSV-1 プロモーター	プライマー (5'-3')
ICP27 promoter	CACCACCAGAGGCCATATCCGACA
	AGCATATCAATGTCAGTCGCCATGACCG
ICP8 promoter	GTCCTTCTGTCAATCGGTCC
	GATTTTGACGCTCGGGAGAC
VP16 promoter	GCCGCCCGTACCTCGTGAC
	CAGCCCGCTCCGCTTCTCG

## 統計処理

エラーバーは triplicate で行った実験の標準誤差を表している。有意差は one-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test により評価した。

## 結果

### ICP0 と相互作用する宿主因子の同定

ICP0 と相互作用する宿主因子を同定するために MEF-ICP0 (図 3A) を HEK293T 細胞に一過性に発現させ、タンデム免疫沈降を行い、質量分析計に供した。その結果、80 種類の ICP0 相互作用候補因子が同定された。同定されたタンパク質の中には、以前 Sara E. Conwell らによって行われた感染細胞における質量解析で ICP0 との相互作用が報告されている USP7, ribosomal protein S18, acyl-coenzyme A thioesterase 8 が含まれていた[38]。本研究では同定されたタンパク質の中の Ran-binding protein 10 (RanBP10) に着目した。

RanBP10 は微小管の伸長、短縮を調節している  $\beta$ 1-tubulin を bait とした yeast two-hybrid assay により同定されたタンパク質で[75]、核-細胞質間輸送や紡錘体微小管の形成に重要な Ran と結合するタンパク質の 1 つである[76, 77]。現在までに、転写因子 androgen receptor (AR) のリガンド依存的な転写活性化因子であることや、細胞質における Ran-guanine nucleotide exchange factor (GEF) 活性を有することが報告されているが[75, 78]、ウイルス感染における役割に関して

は報告がない。また RanBP10 と類似した構造を有する Ran-binding protein M (RanBPM/RanBP9) は, RanBP10 と複合体を形成し AR の転写活性を增強すること, hepatocyte growth factor (HGF) のレセプターである mesenchymal epithelial transition factor (MET) のアダプタータンパク質として働き Ras/ERK pathway を活性化すること, MET と結合する際に RanBP10 と競合することなどが知られており [78-80], RanBP10 と関連した機能がいくつか示されている。ICP0 は promiscuous な転写活性化因子で様々な宿主タンパク質と複合体を形成して遺伝子発現等を制御しており [7, 8, 14], ICP0 と RanBP10 は共に転写制御に関与するという共通点が認められることから RanBP10 が ICP0 の新たな相互作用因子候補として有力ではないかと考えた。

質量解析により同定された RanBP10 と ICP0 の相互作用を確認するために, HEK293T 細胞を用いてトランスフェクションによる共免疫沈降を行った。ICP0 の N 末端側に MEF タグを発現するプラスミド MEF-ICP0 と RanBP10 の N 末端側に HA タグを発現するプラスミド HA-RanBP10 と Empty Vector である pcDNA3.1 を図 4 に示す組み合わせでトランスフェクションし, Flag 抗体 (図 4A) または HA 抗体 (図 4B) を用いて免疫沈降を行った。その結果 ICP0 を認識する Flag 抗体で RanBP10 が, RanBP10 を認識する HA 抗体で ICP0 が共沈降するこ



とを確認した. これらの結果から RanBP10 は ICP0 と相互作用し, その相互作用には ICP0 以外のウイルスタンパク質を必要としないことが明らかとなった.

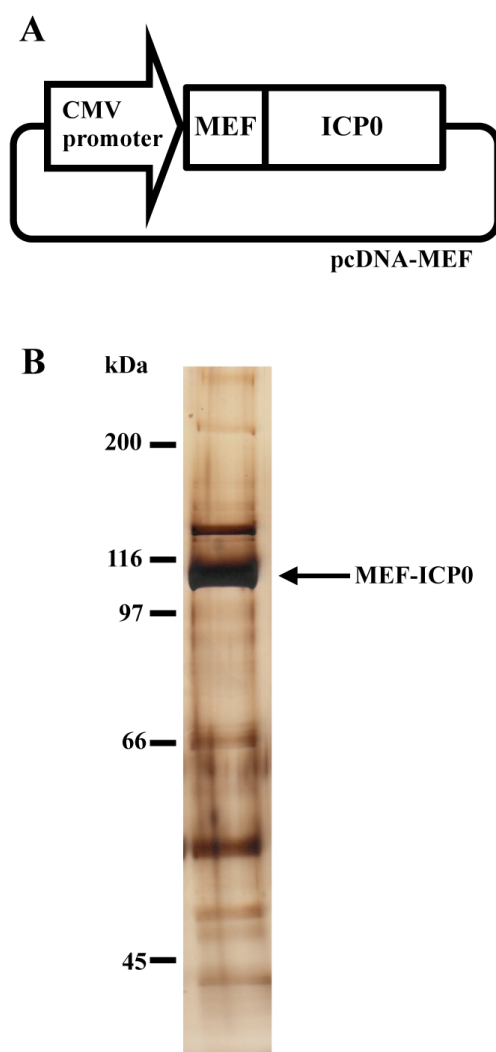


図 3: pcDNA-MEF-ICP0 の模式図とタンデム免疫沈降後の銀染色像

(A) ICP0 の N 末端側に MEF (Myc-TEV-Flag) タグを付加した発現プラスミドである pcDNA-MEF-ICP0 の模式図.

(B) HEK293T 細胞に (A) で示した pcDNA-MEF-ICP0 をトランスフェクションし, Myc 抗体と Flag M2 Affinity Gel を用いて 2 回免疫沈降後, 免疫沈降物のうちの 10% を SDS-PAGE に供し, 銀染色した. 図の右側の矢印は MEF-ICP0, 左側は分子重量マーカを示している.

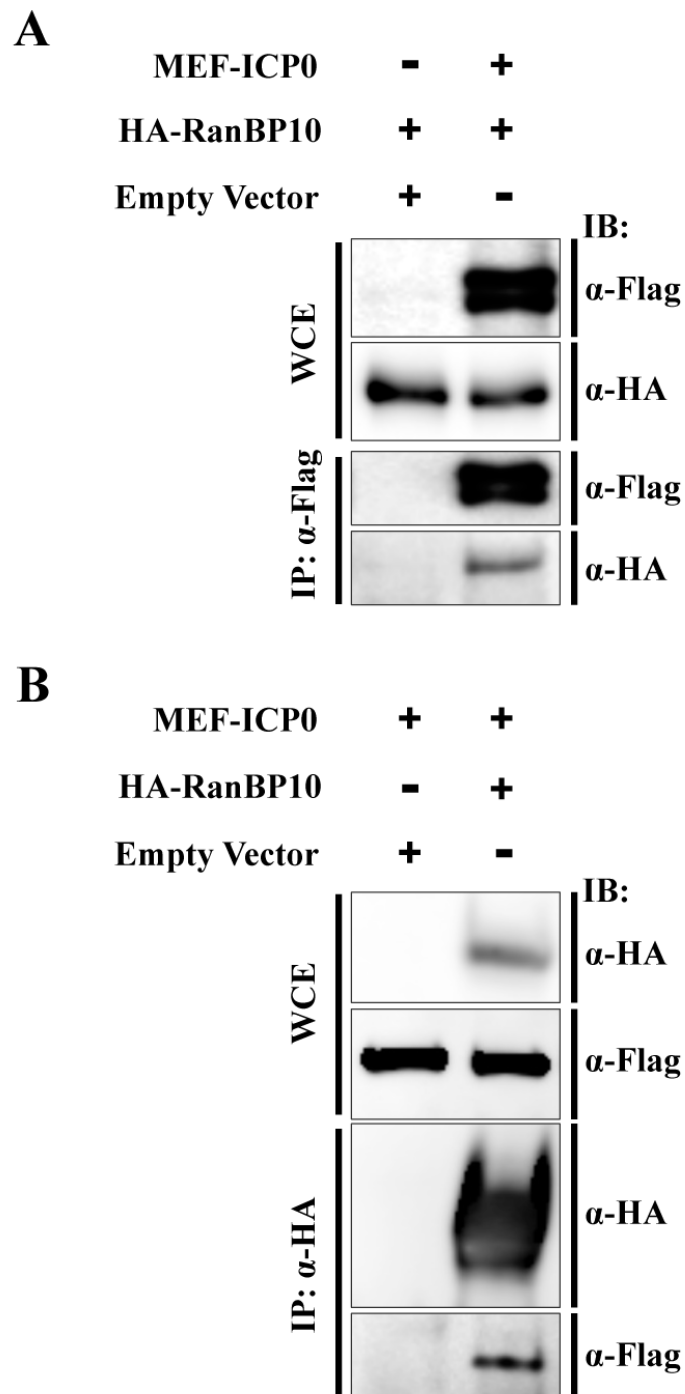


図 4: ICP0 と RanBP10 の相互作用 (トランスフェクション)

HEK293T 細胞に, pcDNA-MEF-ICP0, pcDNA-HA-RanBP10, pcDNA3.1 を図に示す組み合わせでトランスフェクションし 36 時間後に回収した. Flag 抗体 (A) または HA 抗体 (B) を用いて免疫沈降 (IP) を行い, 各抗体を用いてウェスタンブロットティング (IB) により解析した. WCE: whole cell extract,  $\alpha$ ; anti-

## 本研究で作製したウイルスの性状解析

以前作製した、HSV ゲノム上に 2 コピー存在する ICP0 の両方の N 末端側に MEF タグを挿入した組換えウイルス YK332 (MEF-ICP0) (図 2) の詳細な性状解析を行った。Vero 細胞または HEp-2 細胞に野生型 HSV-1(F) と YK332 (MEF-ICP0) を感染させ、 $\alpha$  タンパク質の 1 つで代表的なウイルスタンパク質である ICP27 タンパク質の発現量を比較したところ、発現量は同等だった (図 5A)。また High multiplicity of infection (MOI) 及び Low MOI でこれらのウイルスを Vero 細胞または HEp-2 細胞に感染させた場合のウイルス増殖も同様であった (図 5B-E)。YK332 (MEF-ICP0) は野生型 HSV-1(F) とほぼ同等の性状を有したことから、ICP0 の N 末端への MEF タグの付加は HSV-1 の増殖に影響をほとんど及ぼさないと考えられた。

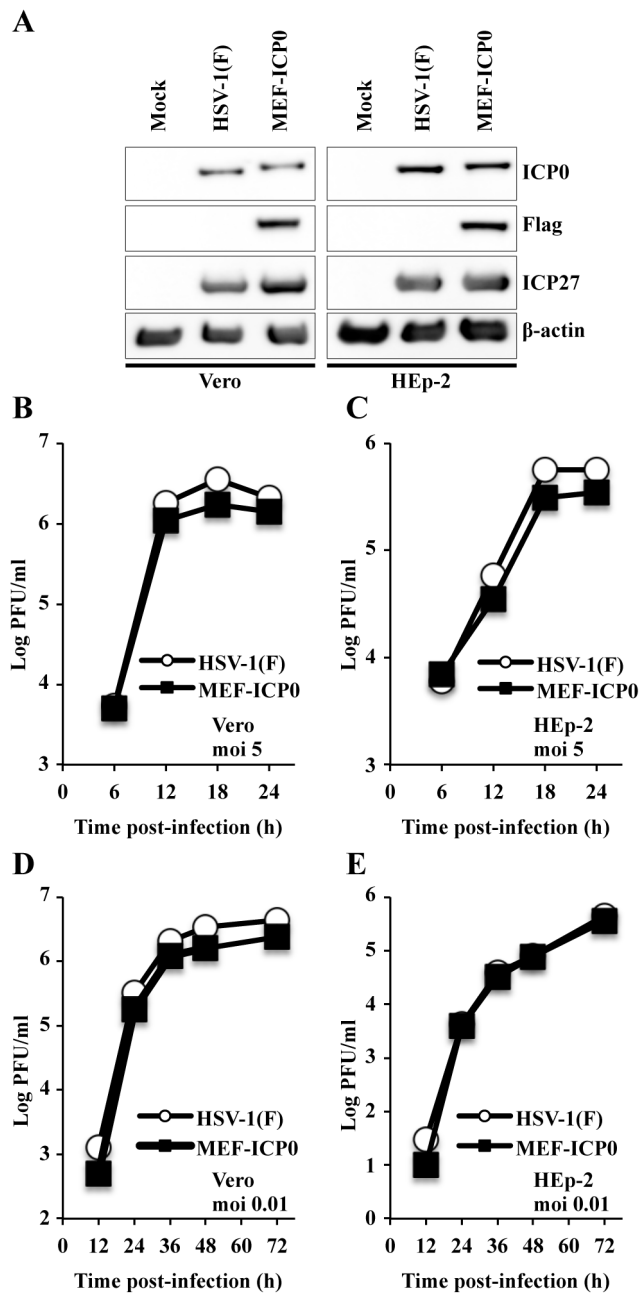


図 5: 組換えウイルス MEF-ICP0 の性状解析

(A) Vero 細胞と HEp-2 細胞に野生型 HSV-1(F) と YK322 (MEF-ICP0) を MOI=5 で感染させ、18 時間後に回収し、ICP0, Flag, ICP27,  $\beta$ -actin の抗体を用いてウエスタンブロッティングにより解析した。

(B-E) Vero 細胞 (B, D) と HEp-2 細胞 (C, E) に各ウイルスを MOI=5 (B, C), MOI=0.01 (D, E) で感染させ、各タイムポイントにおけるウイルス力価を Vero 細胞で測定した。

## HSV-1 感染細胞における ICP0 と RanBP10 の相互作用

感染細胞における ICP0 と RanBP10 の相互作用を確認するために共免疫沈降と免疫蛍光抗体法を行った。これらの実験には RanBP10 の N 末端側に HA タグを発現する組換えアデノウイルス (Ad-HA-RanBP10) と恒常的発現細胞 (HA-RanBP10-HEp-2 細胞) を使用した。まず組換えアデノウイルスを用いた実験を行った。HEp-2 細胞に組換えアデノウイルス Ad-HA-RanBP10 または Ad-RanBP10 を MOI=20 で 6 時間感染させた後、野生型 HSV-1(F) を MOI=5 で感染させ 8 時間後に回収し、ICP0, HA,  $\beta$ -actin の発現量が同程度であることをウエスタンブロッティングで確認した (図 6A)。HEp-2 細胞に Ad-HA-RanBP10 を感染させた後、野生型 HSV-1(F), YK322 (MEF-ICP0), YK711 (MEF-gB) を感染させ 8 時間後に回収し、Myc 抗体で免疫沈降を行った。ICP0 を認識する Myc 抗体で RanBP10 が共沈降することを確認した (図 6B)。また相反的に、HEp-2 細胞に Ad-HA-RanBP10 または Ad-RanBP10 を感染させた後、野生型 HSV-1(F) を感染させ 8 時間後に回収し、HA 抗体で免疫沈降を行った。RanBP10 を認識する HA 抗体で ICP0 が共沈降することを確認した (図 6C)。次に HEp-2 細胞に Ad-HA-RanBP10 または Ad-RanBP10 を感染させた後、野生型 HSV-1(F) を感染させ 8 時間後に回収し、HA 抗体と ICP0 抗体を用いて免疫蛍光抗体法を行った。

既報通り ICP0 は, HEp-2 細胞において感染 8 時間後に核と細胞質両方に局在した[81]. RanBP10 は巨核球において一部核に局在し, 主に細胞質に局在するという報告があるが[78], HEp-2 細胞においても核と細胞質両方に局在した (図 7). 非感染細胞において RanBP10 は細胞質で散在, 核で点在していた. 野生型 HSV-1(F) を感染させると RanBP10 は主に核に分散して局在するようになり, 核内において部分的に ICP0 と共局在することが確認された (図 7).

図 8-9 では HA-RanBP10-HEp-2 細胞を用いた実験を行った. レトロウイルスベクターを用いて HA-RanBP10 を外因的に発現する恒常的発現細胞である HA-RanBP10-HEp-2 細胞を作製した. HA-RanBP10-HEp-2 細胞に野生型 HSV-1(F) を感染させ 8 時間後に回収し, ICP0, HA,  $\beta$ -actin の発現量がほぼ同程度であることをウエスタンブロッティングで確認した (図 8A). HA-RanBP10-HEp-2 細胞に野生型 HSV-1(F), YK322 (MEF-ICP0), YK711 (MEF-gB) を感染させ 8 時間後に回収し, Myc 抗体で免疫沈降を行った. ICP0 を認識する Myc 抗体で RanBP10 が共沈降することを確認した (図 8B). また相反的に, HA-RanBP10-HEp-2 細胞に野生型 HSV-1(F) を感染させ 8 時間後に回収し, HA 抗体で免疫沈降を行った. RanBP10 を認識する HA 抗体で ICP0 が共沈降することを確認した (図 8C). 次に HA-RanBP10-HEp-2 細胞に野生型 HSV-1(F) を感染させ 8 時間後に回収し,

HA 抗体と ICP0 抗体を用いて免疫蛍光抗体法を行った。図 7 の組換えアデノウイルスを用いた免疫蛍光抗体法と同様に、非感染細胞において RanBP10 は細胞質で散在、核で点在し、野生型 HSV-1(F) 感染細胞において RanBP10 は主に核に分散して局在するようになり、核内において部分的に ICP0 と共局在することが確認された (図 9)。図 8-9 の恒常的発現細胞を用いた実験においても図 6-7 の組換えアデノウイルスを用いた実験で得られた結果と同様の結果が得られた。これらの結果から ICP0 が RanBP10 と感染細胞で相互作用することが示唆された。

RanBP10 の HSV-1 感染細胞における局在をさらに解明するために、レトロウイルスベクターを用いて Flag-RanBP10 を恒常的に発現する Flag-RanBP10-HEp-2 細胞を作製した。Flag-RanBP10-HEp-2 細胞に野生型 HSV-1(F) を感染させ、ICP8 抗体と RanBP10 を認識する Flag 抗体を用いて各々の局在を観察した。ICP8 はウイルス DNA 複製と転写が起こる場所であると言われていた HSV replication compartment (RC) のマーカーとして使用した[53]。RanBP10 が ICP8 と核内において近接して局在し、部分的に共局在していることが確認された (図 10)。以上の結果から RanBP10 は HSV-1 RC において ICP0 と相互作用することが示唆された。

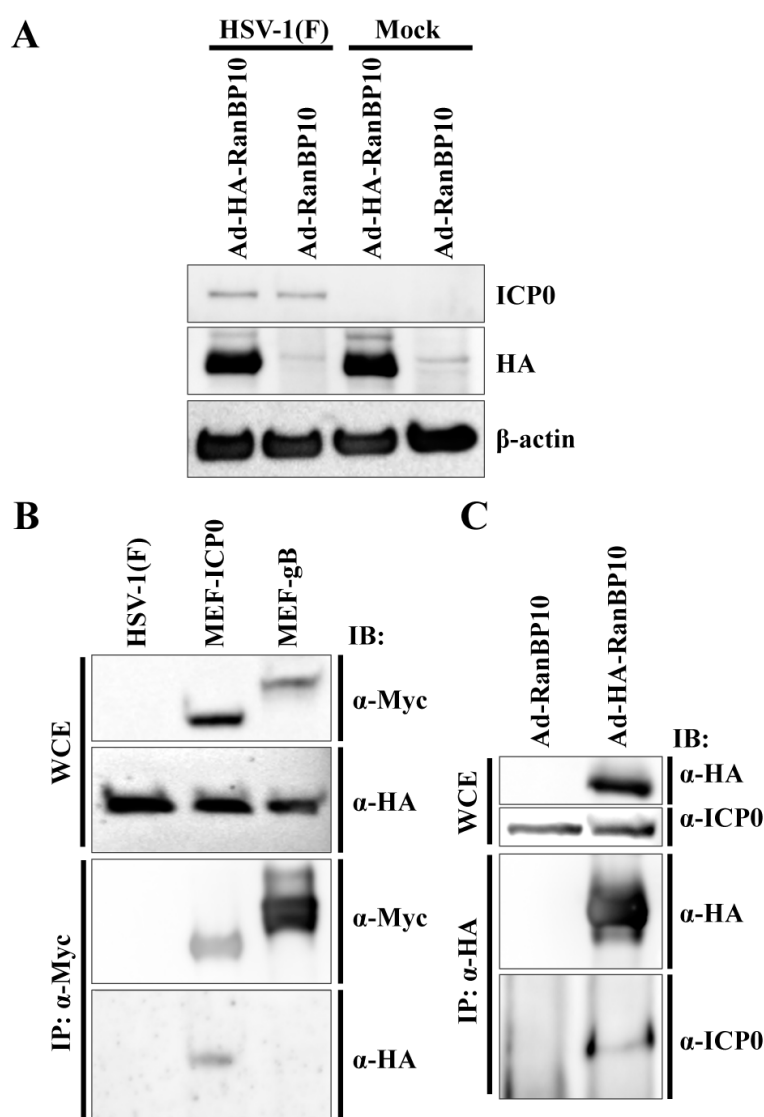


図 6: 感染細胞における ICP0 と RanBP10 の相互作用

(アデノウイルスを用いた実験)

RanBP10 の N 末端側に HA タグを発現する組換えアデノウイルス

(Ad-HA-RanBP10) と RanBP10 を発現する組換えアデノウイルス (Ad-RanBP10) を HEp-2 細胞に MOI=20 で 6 時間感染させた後、各ウイルスを MOI=5 で感染させ 8 時間後に回収した。

(A) 感染時のタンパク質発現量を ICP0, HA, β-actin の抗体を用いてウエスタンブロットティングにより解析した。

(B, C) Myc 抗体 (B) または HA 抗体 (C) を用いて免疫沈降 (IP) を行い、各抗体を用いてウエスタンブロットティング (IB) を行った。WCE: whole cell extract



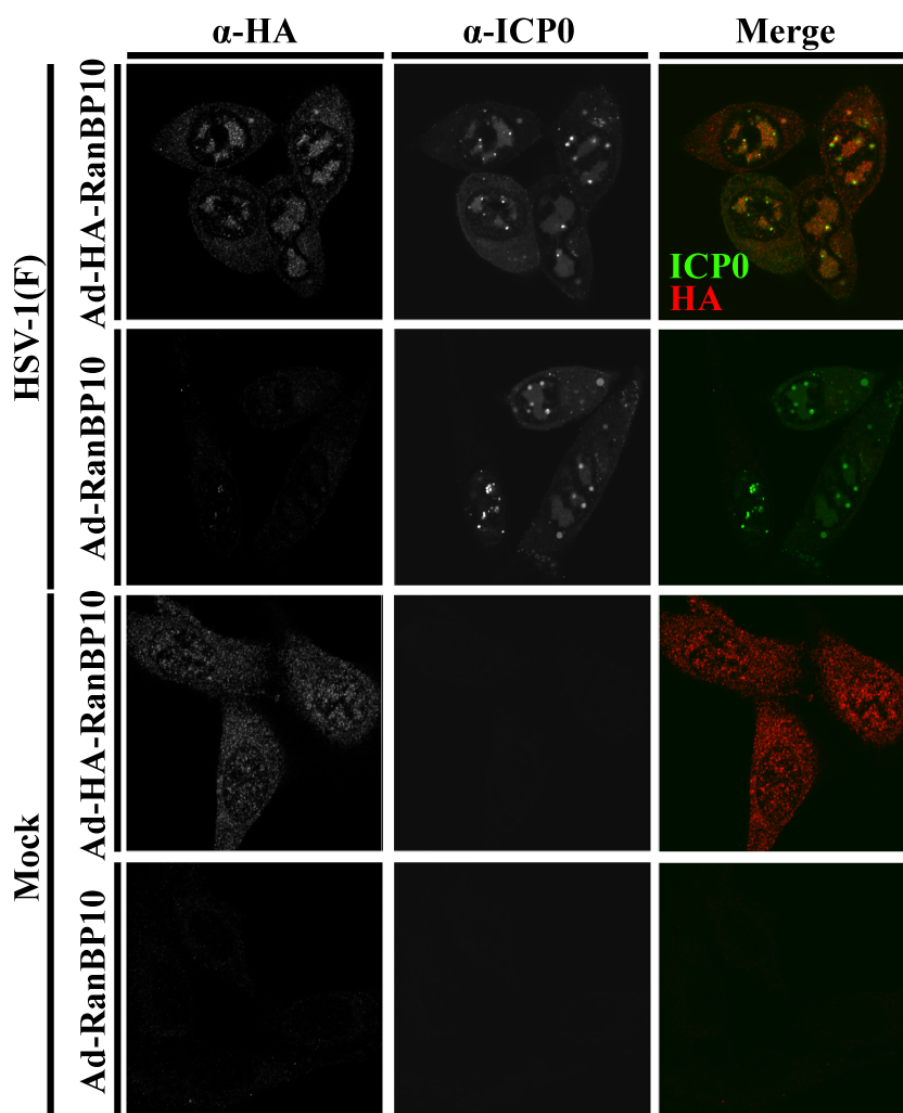


図 7: 感染細胞における ICP0 と RanBP10 の局在  
(アデノウイルスを用いた実験)

RanBP10 の N 末端側に HA タグを発現する組換えアデノウイルス (Ad-HA-RanBP10) と RanBP10 を発現する組換えアデノウイルス (Ad-RanBP10) を HEp-2 細胞に MOI=20 で 6 時間感染させた後、各ウイルスを MOI=5 で感染させ 8 時間後に回収した。HA 抗体と ICP0 抗体を用いた免疫蛍光抗体法により共染色を行い、共焦点顕微鏡で観察した。

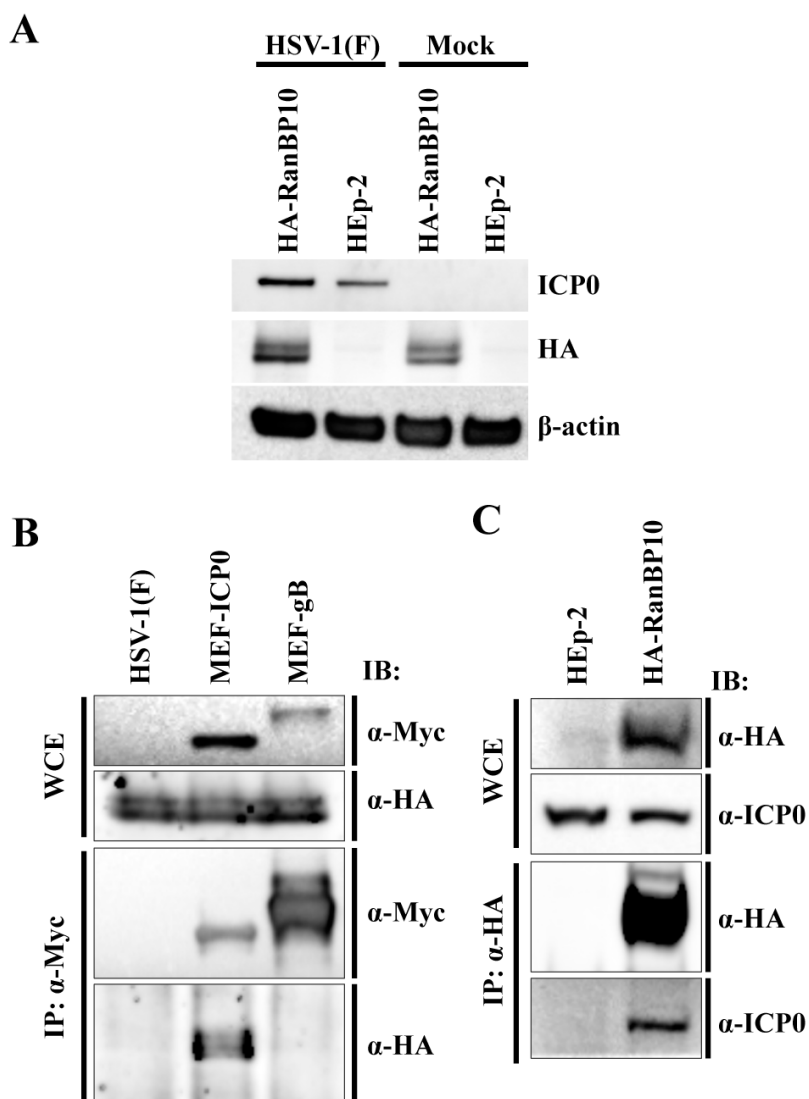


図8 感染細胞における ICP0 と RanBP10 の相互作用  
(HA-RanBP10 恒常的発現細胞を用いた実験)

HA-RanBP10-HEp-2細胞に各ウイルスをMOI=5で感染させ8時間後に回収した。  
(A) 感染時のタンパク質発現量をICP0, HA,  $\beta$ -actinの抗体を用いてウエスタンブロッティングにより解析した。

(B, C) Myc抗体 (B) またはHA抗体 (C) を用いて免疫沈降 (IP) を行い, 各抗体を用いてウエスタンブロッティング (IB) を行った。WCE: whole cell extract

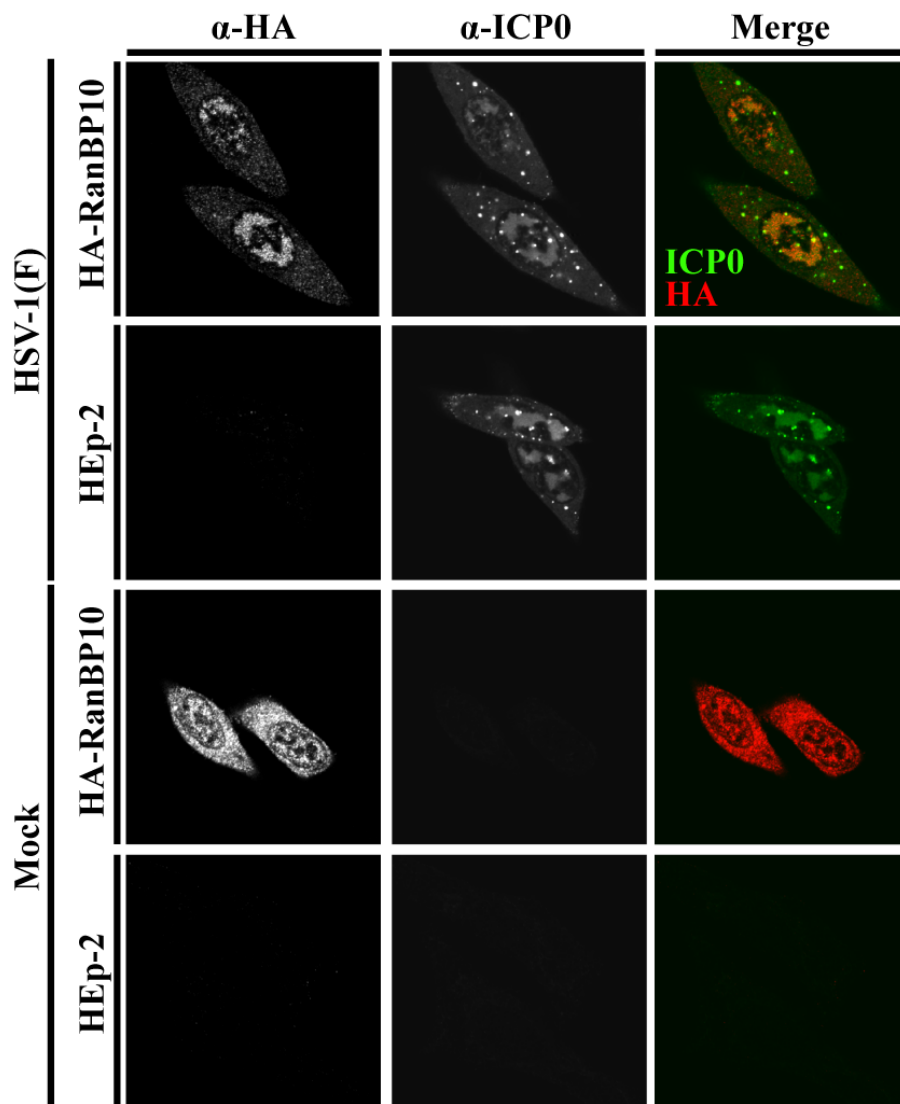


図9 感染細胞における ICP0 と RanBP10 の局在  
(HA-RanBP10 恒常的発現細胞を用いた実験)

HA-RanBP10-HEp-2細胞に各ウイルスを MOI=5 で感染させ8時間後に回収した。HA抗体と ICP0抗体を用いた免疫蛍光抗体法により共染色を行い、共焦点顕微鏡で観察した。

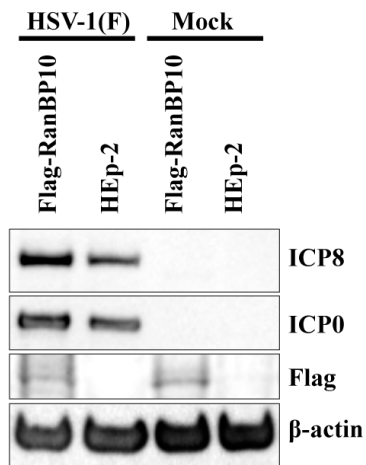
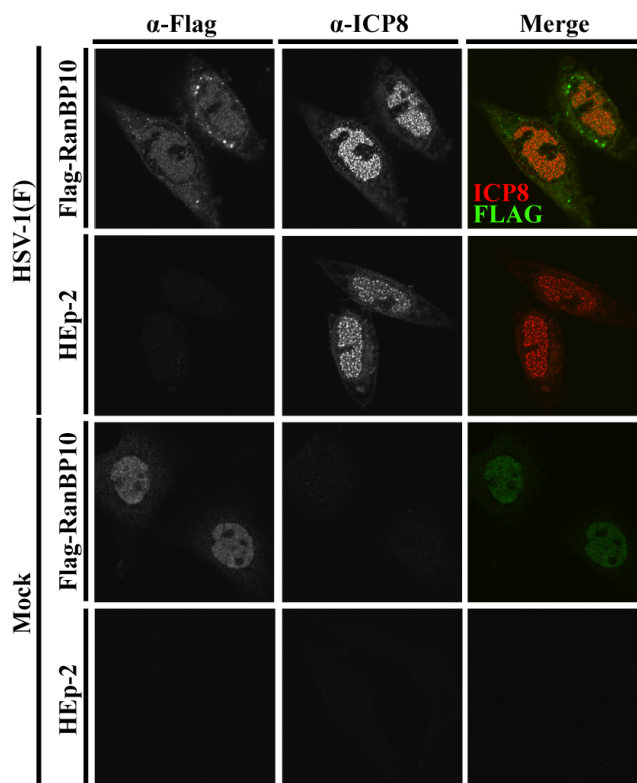
**A****B**

図 10 感染細胞における RanBP10 と ICP8 の局在

Flag-RanBP10-HEp-2 細胞に各ウイルスを MOI=5 で感染させ 18 時間後に回収した。HA 抗体と ICP8 抗体を用いた免疫蛍光抗体法により共染色を行い、共焦点顕微鏡で観察した。

## HSV-1 増殖における RanBP10 の役割

HSV-1 感染における RanBP10 の役割を解明するために RanBP10 ノックダウン (sh-RanBP10-HEp-2) 細胞を作製した. sh-RanBP10-HEp-2 細胞は RanBP10 mRNA の 3'-UTR 領域を標的とした shRNA を恒常的に発現する細胞である. コントロールとしてホタルルシフェラーゼ mRNA 配列に対する shRNA を恒常的に発現する sh-Luc-HEp-2 細胞を使用した [65]. 図 11A に示すように, sh-RanBP10-HEp-2 細胞における内在性 RanBP10 の発現量は sh-Luc-HEp-2 細胞と比較して顕著に減少した. また Cell Viability は sh-Luc-HEp-2 細胞と sh-RanBP10-HEp-2 細胞でほとんど変わらなかった (図 11B). よって RanBP10 の発現抑制は HEp-2 細胞の Cell Viability に影響がないことが示唆された.

次に sh-Luc-HEp-2 細胞と sh-RanBP10-HEp-2 細胞に野生型 HSV-1(F) を MOI=0.01 で感染させ, 各タイムポイントにおけるウイルス力価を測定したところ, sh-Luc-HEp-2 細胞と比較して sh-RanBP10-HEp-2 細胞で野生型 HSV-1(F) の増殖が低下した (図 12A, B). この結果から, HSV-1 増殖において RanBP10 が重要であることが示唆された. また RanBP10 は ICPO と相互作用しうることから (図 4, 6-9), R7910 ( $\Delta$ ICPO) を用いて同様の実験を行った. すると興味深いことに, sh-Luc-HEp-2 細胞と比較して sh-RanBP10-HEp-2 細胞で R7910 ( $\Delta$ ICPO) の増

殖が顕著に低下し、ICP0 欠損ウイルス復帰株 R7911 ( $\Delta$ ICP0-repair) では野生型 HSV-1(F) と同程度まで表現型が回復した (図 12A, B). さらに sh-RanBP10-HEp-2 細胞で認められたこれらの表現型が shRNA のオフターゲット効果によるものでないことを証明するために、RanBP10 をレトロベクターで外因的に導入した sh-RanBP10/RanBP10-HEp-2 細胞を樹立し、RanBP10 の発現が増加すること (図 11A) と Cell Viability が sh-Luc-HEp-2 細胞や sh-RanBP10-HEp-2 細胞と同程度であること (図 11B) を確認した.

sh-RanBP10/RanBP10-HEp-2 細胞におけるウイルス増殖が sh-Luc-HEp-2 細胞と同程度に回復したことから (図 13), sh-RanBP10-HEp-2 細胞で認められた R7910 ( $\Delta$ ICP0) 増殖の顕著な低下は shRNA のオフターゲット効果によるものでないことが明らかとなった. 次に sh-RanBP10-HEp-2 細胞で認められた R7910 ( $\Delta$ ICP0) 増殖の顕著な低下がウイルス増殖の低下に起因するものなのか、それとも ICP0 特異的な現象なのかを検証するために、R7910 ( $\Delta$ ICP0) と同程度に野生型 HSV-1(F) と比較してウイルス増殖が低下すると報告されている YK478 (UL41-D213N) を使用した[60]. 図 13 では各ウイルスを MOI=0.01 で感染させ、48 時間後におけるウイルス力価を測定した. YK478 (UL41-D213N) は sh-Luc-HEp-2 細胞において R7910 ( $\Delta$ ICP0) と同様に増殖が低下することが確認

されたが、sh-RanBP10-HEp-2 細胞においては R7910 ( $\Delta$ ICP0) 感染時に認められた増殖の顕著な低下は認められなかった (図 13). よって sh-RanBP10-HEp-2 細胞で認められた R7910 ( $\Delta$ ICP0) 増殖の顕著な低下が ICP0 特異的な現象であることが示唆された. さらにこれらの結果を sh-Luc-HEp-2 細胞に対する sh-RanBP10-HEp-2 細胞における各ウイルスの増殖低下率でグラフ化し、RanBP10 の発現抑制が各ウイルス増殖に与える影響を解析したところ、野生型 HSV-1(F) で 7.1 倍、R7910 ( $\Delta$ ICP0) で 361 倍、R7911 ( $\Delta$ ICP0-repair) で 9.5 倍、YK478 (UL41-D213N) で 15 倍だった (図 14A). また sh-RanBP10/RanBP-HEp-2 細胞に対する sh-RanBP10-HEp-2 細胞における各ウイルスの増殖低下率を解析したところ、野生型 HSV-1(F) で 2.5 倍、R7910 ( $\Delta$ ICP0) で 99 倍、R7911 ( $\Delta$ ICP0-repair) で 4.3 倍、YK478 (UL41-D213N) で 9.3 倍であり、sh-Luc-HEp-2 細胞に対する sh-RanBP10-HEp-2 細胞における各ウイルスの増殖低下率と同様の傾向が認められた (図 14B). sh-Luc-HEp-2 細胞または sh-RanBP10/RanBP10-HEp-2 細胞に対する sh-RanBP10-HEp-2 細胞におけるウイルス増殖低下率は、野生型 HSV-1(F), R7911 ( $\Delta$ ICP0-repair), YK478 (UL41-D213N) と比較して R7910 ( $\Delta$ ICP0) 感染時に極めて顕著だったことから、RanBP10 要求性が ICP0 欠損時に増加することが示唆された. 次に図 13 で得られた結果を野

生型 HSV-1(F) に対する R7910 ( $\Delta$ ICP0) の各感染細胞におけるウイルス増殖の低下率でグラフ化し, ICP0 欠損が各細胞に与える影響を解析したところ, sh-Luc-HEp-2 細胞で 15 倍, sh-RanBP10-HEp-2 細胞で 792 倍, sh-RanBP10/RanBP10-HEp-2 細胞で 19 倍だった (図 14C). また R7911 ( $\Delta$ ICP0-repair) に対する R7910 ( $\Delta$ ICP0) の各感染細胞におけるウイルス増殖の低下率を解析したところ, sh-Luc-HEp-2 細胞で 3.7 倍, sh-RanBP10-HEp-2 細胞で 137 倍, sh-RanBP10/RanBP10-HEp-2 細胞で 6.0 倍であり, 野生型 HSV-1(F) に対する R7910 ( $\Delta$ ICP0) の各感染細胞におけるウイルス増殖の低下率と同様の傾向が認められた (図 14C). 野生型 HSV-1(F) または R7911 ( $\Delta$ ICP0-repair) に対する R7910 ( $\Delta$ ICP0) のウイルス増殖の低下率は, sh-Luc-HEp-2 細胞や sh-RanBP10/RanBP10-HEp-2 細胞と比較して sh-RanBP10-HEp-2 細胞で極めて顕著だったことから, ICP0 要求性は RanBP10 発現抑制時に増加することが示唆された. さらに野生型 HSV-1(F) に対する YK478 (UL41-D213N) のウイルス増殖の低下率を解析したところ, sh-Luc-HEp-2 細胞で 47 倍, sh-RanBP10-HEp-2 細胞で 94 倍, sh-RanBP10/RanBP10-HEp-2 細胞で 25 倍であり, sh-RanBP10-HEp-2 細胞におけるウイルス増殖の低下率は顕著でなかった (図 14C). この結果から sh-RanBP10-HEp-2 細胞で認められたウイルス増殖の顕著な抑制が, YK478



(UL41-D213N) 感染時に認められるウイルス増殖の低下ではなく ICP0 欠損に起因することが明らかとなった。以上の結果から RanBP10 と ICP0 両方が HSV-1 の効率的な増殖に重要であることが明らかとなった。さらに RanBP10 は ICP0 の、ICP0 は RanBP10 の機能を一部補っていることが示唆された。

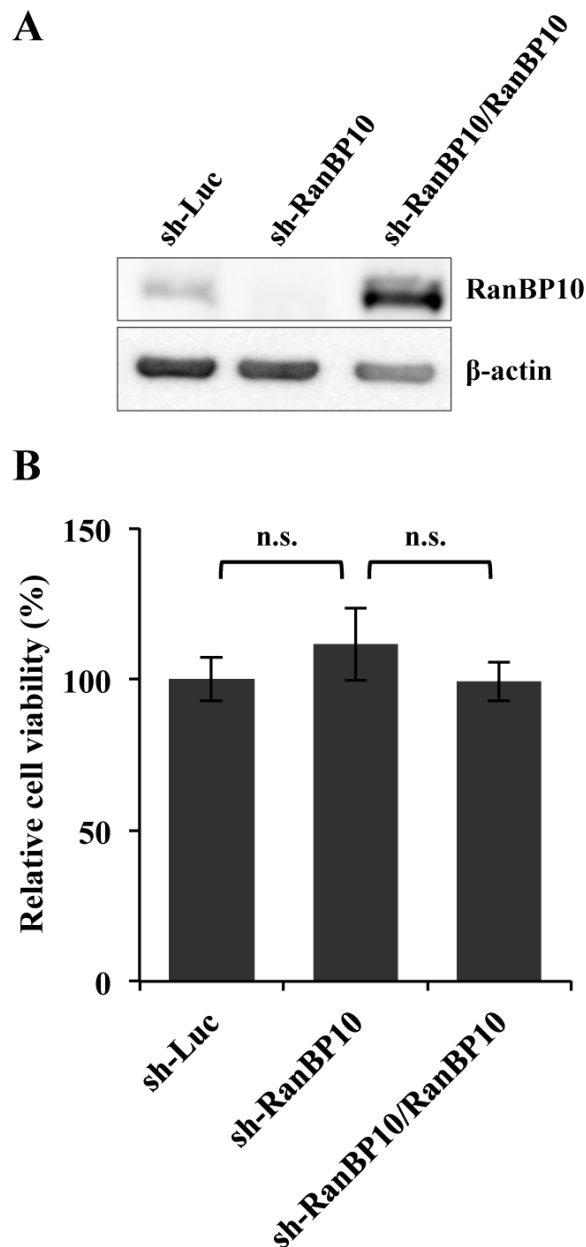


図 11: sh-Luc, sh-RanBP10, sh-RanBP10/RanBP10-HEp-2 細胞の作製

(A) sh-Luc, sh-RanBP10, sh-RanBP10/RanBP10-HEp-2 細胞におけるタンパク質発現量を RanBP10 と  $\beta$ -actin の抗体を用いてウエスタンブロッティングにより解析した。

(B) 96well プレートに  $5 \times 10^3$  個の各細胞を播種し、24 時間後に cell viability を測定した。グラフは、sh-Luc-HEp-2 細胞における Cell Viability を 100%としたときの相対値で示している。エラーバーは triplicate で行った実験の標準誤差を表しており、統計処理は one-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test で行った。n.s.: not statistically significant

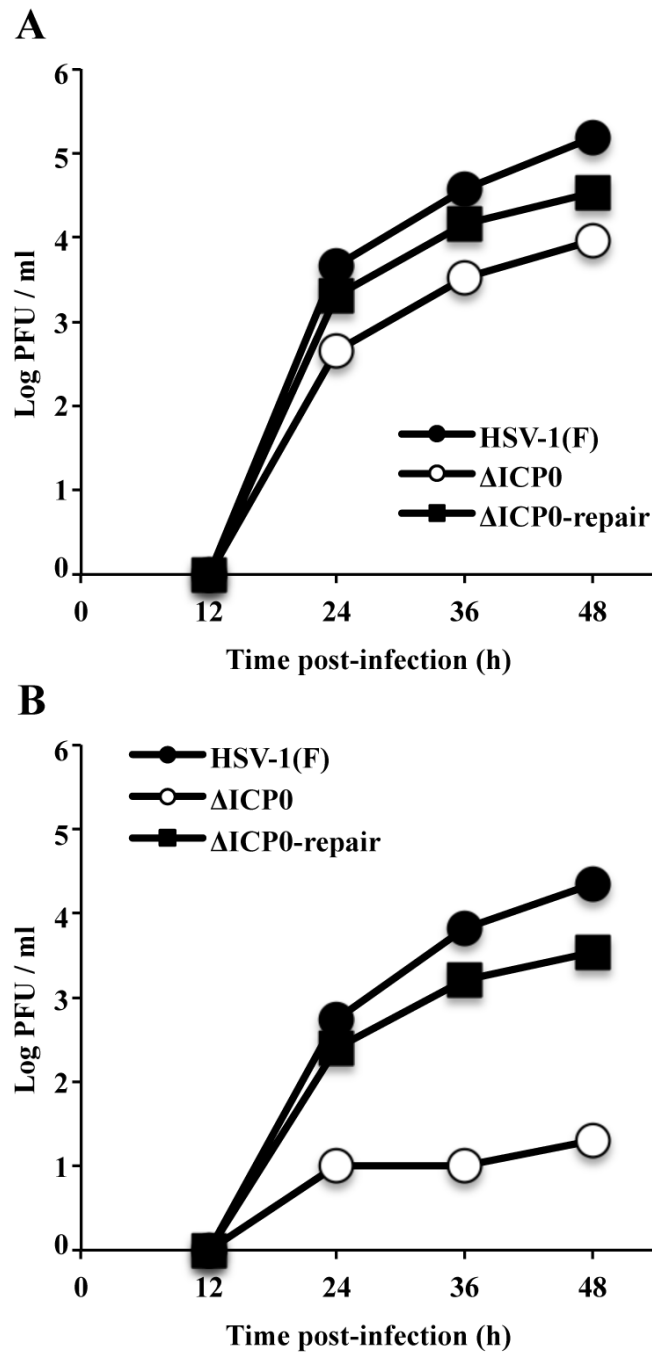


図 12: HSV-1 増殖における RanBP10 の影響

sh-Luc-HEp-2 細胞 (A) と sh-RanBP10-HEp-2 細胞 (B) に各ウイルスを MOI=0.01 で感染させ、各タイムポイントにおけるウイルス力価を U2OS 細胞で測定した。

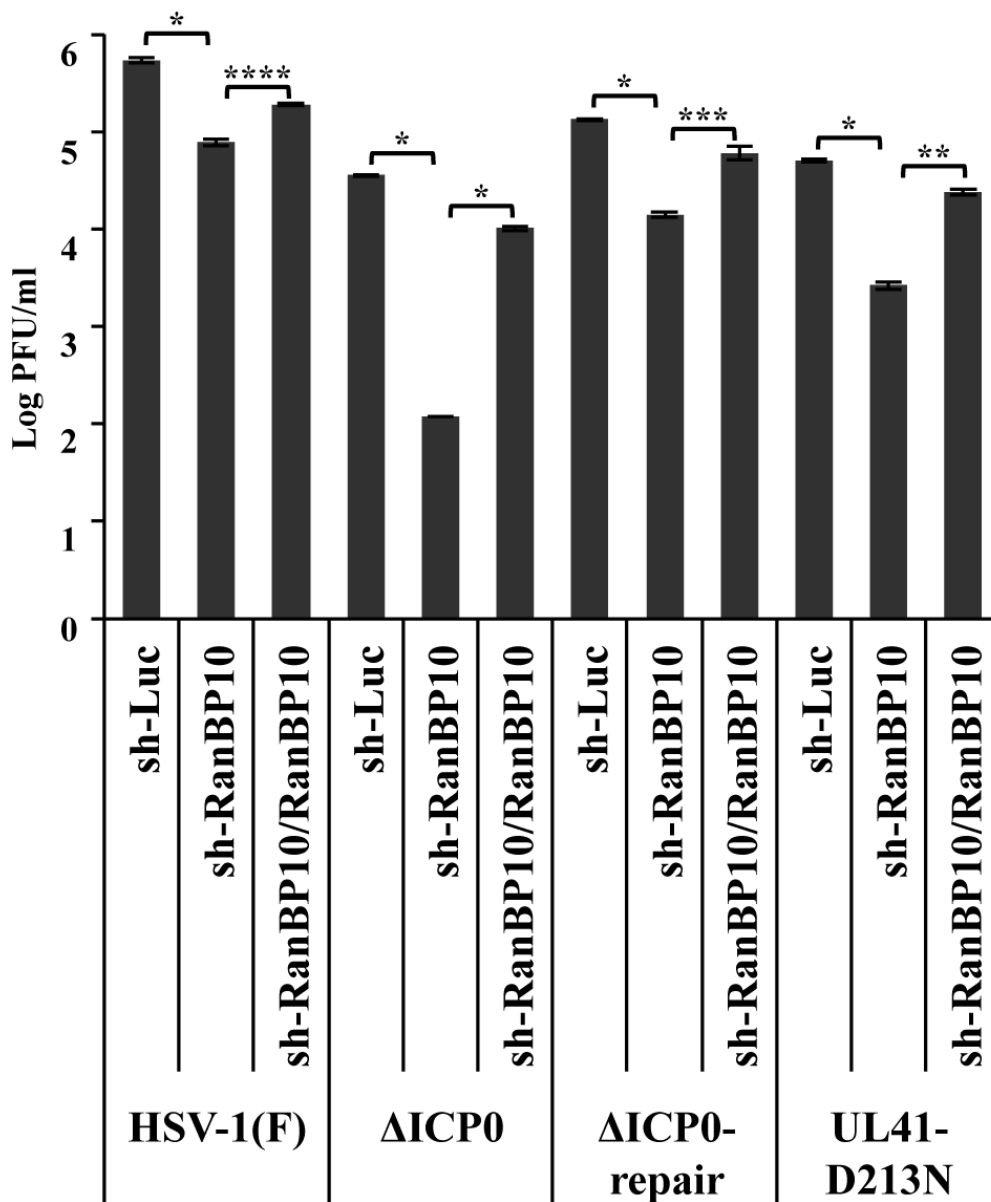


図 13: HSV-1 増殖における RanBP10 および ICP0 の影響

sh-Luc, sh-RanBP10, sh-RanBP10/RanBP10-HEp-2 細胞に各ウイルスを MOI=0.01 で感染させ、48 時間後のウイルス力価を U2OS 細胞で測定した。エラーバーは 3 回の独立した実験から得たデータの標準誤差を表しており、*P* 値は one-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test により算出し、統計学的な差を Asterisks で示した (\**P*<0.0001, *P*<0.001, \*\*\* *P*<0.01, \*\*\*\**P*<0.05)。

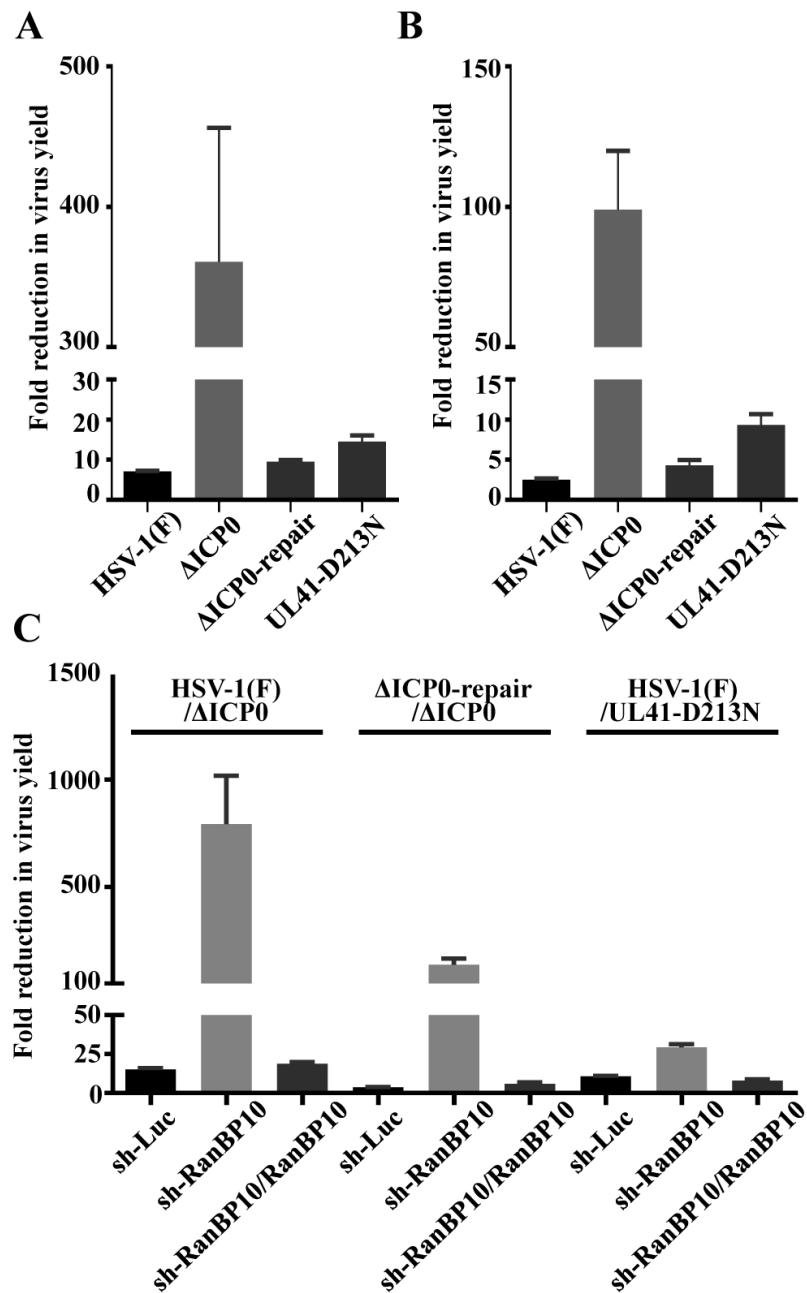


図 14: HSV-1 増殖における RanBP10 および ICP0 の影響 (図 13 の解析)

(A,B) sh-Luc-HEp-2 細胞 (A) または sh-RanBP10/RanBP10-HEp-2 細胞 (B) に対する sh-RanBP10-HEp-2 細胞における各ウイルスのウイルス増殖減少率を示しており, RanBP10 発現抑制が各ウイルス増殖に与える影響を解析している.

(C) 各細胞における野生型 HSV-1(F) または R7911 ( $\Delta$ ICP0-repair) に対する R7910 ( $\Delta$ ICP0), 野生型 HSV-1(F) に対する YK478 (UL41-D213N) のウイルス増殖減少率を示しており, ICP0 欠損が各細胞でのウイルス増殖に与える影響を解析している.

## HSV-1 遺伝子発現における RanBP10 と ICP0 の役割

RanBP10 と ICP0 が HSV-1 感染時に相互作用すること、RanBP10 の単独抑制時もしくは ICP0 の単独欠損時と比較して両因子が欠如したときにウイルス増殖が顕著に減少したことから、効率的なウイルス増殖には両因子が互いの機能を増強しながら協調的に働くことが重要であり、RanBP10 と ICP0 は類似した機能を有するのではないかという仮説を立てた。ICP0 はウイルスの遺伝子発現を mRNA レベルで制御しているといわれている[7, 8, 82]。そこで RanBP10 も ICP0 と同様にウイルスの遺伝子発現を制御するのではないかと考えた。この仮説を検証するために sh-Luc-HEp-2, sh-RanBP10-HEp-2, sh-RanBP10/RanBP10-HEp-2 細胞に野生型 HSV-1(F), R7910 ( $\Delta$ ICP0), R7911 ( $\Delta$ ICP0-repair) を感染させ、18 時間後に  $\alpha$  (ICP4, ICP0, ICP27, ICP22),  $\beta$  (ICP8),  $\gamma$  (VP16) タンパク質の発現量を比較した (図 15)。図 16 では ICP27 ( $\alpha$ ), ICP8 ( $\beta$ ), VP16 ( $\gamma$ ) タンパク質量を  $\beta$ -actin で補正し定量している。過去の報告通り[40, 83, 84], 野生型 HSV-1(F) や R7911 ( $\Delta$ ICP0-repair) 感染細胞と比較して R7910 ( $\Delta$ ICP0) 感染細胞で  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  すべてのウイルスタンパク質発現量の減少が認められた。また sh-Luc-HEp-2 細胞や sh-RanBP10/RanBP10-HEp-2 細胞と比較して sh-RanBP10-HEp-2 細胞において野生型 HSV-1(F) 及び R7911 ( $\Delta$ ICP0-repair) 感

感染時に  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  すべてのウイルスタンパク質発現量の減少が認められ, その減少は R7910 ( $\Delta$ ICP0) 感染時に顕著だった (図 15, 16). ウイルス増殖で認められた表現型と同様に, R7910 ( $\Delta$ ICP0) 感染時の sh-RanBP10-HEp-2 細胞におけるウイルスタンパク質発現量の顕著な低下が認められ (図 15, 16), その傾向は mRNA レベルでも観察された (図 18). 図 14A, B と同様に図 16 で得られた結果を sh-Luc-HEp-2 細胞または sh-RanBP10/RanBP10-HEp-2 細胞に対する sh-RanBP10-HEp-2 細胞における各ウイルスのウイルスタンパク質発現量低下率でグラフ化し, RanBP10 の発現抑制が各ウイルスタンパク質発現量に与える影響を解析した (図 17A, B). sh-Luc-HEp-2 細胞または sh-RanBP10/RanBP10-HEp-2 細胞に対する sh-RanBP10-HEp-2 細胞における各ウイルスのウイルスタンパク質発現量低下率は, 野生型 HSV-1(F) または R7911 ( $\Delta$ ICP0-repair) と比較して R7910 ( $\Delta$ ICP0) 感染時に極めて顕著だったことから, RanBP10 要求性は ICP0 欠損時に増加することが示唆された. またこの傾向は mRNA レベルでも同様だった (図 19A, B). 次に図 16 で得られた結果を野生型 HSV-1(F) または R7911 ( $\Delta$ ICP0-repair) に対する R7910 ( $\Delta$ ICP0) の各感染細胞における各ウイルスのウイルスタンパク質発現量低下率でグラフ化し, ICP0 欠損が各細胞に与える影響を解析した (図 17C, D). 野生型 HSV-1(F) または R7911 ( $\Delta$ ICP0-repair) に対する

R7910 ( $\Delta$ ICP0) のウイルスタンパク質発現量低下率は, sh-Luc-HEp-2 細胞や sh-RanBP10/RanBP10-HEp-2 細胞と比較して sh-RanBP10-HEp-2 細胞で極めて顕著だったことから, ICP0 要求性は RanBP10 抑制時に増加することが示唆された. またこの傾向は mRNA レベルでも同様だった (図 19C, D). 以上の結果から sh-RanBP10-HEp-2 細胞における R7910 ( $\Delta$ ICP0) のウイルスタンパク質発現量の低下が RanBP10 と ICP0 両方の影響によるものであることが示唆された. また RanBP10 は ICP0 と同様にウイルス遺伝子の発現を mRNA レベルで制御し, 効率的なウイルス増殖に寄与していることが示唆された.

ICP0 はウイルスのクロマチン構造を制御することにより効率的な遺伝子発現に関与していると言われており[15-17]. ヌクレオソームが凝集した状態では Pol II が DNA にアクセスできず転写及び mRNA 合成は抑制された状態にあり, 逆にヌクレオソームが脱凝集した状態では転写は活性化された状態にあると言われており[9, 11, 17]. HSV-1 ゲノムの histone occupancy を評価するために, ヌクレオソームの構成因子でコアヒストンの1つであるヒストン H3 の抗体を用いて ChIP アッセイを行った. R7910 ( $\Delta$ ICP0) または R7911 ( $\Delta$ ICP0-repair) 感染時の sh-RanBP10-HEp-2 細胞及び sh-RanBP10/RanBP10-HEp-2 細胞における HSV-1 ゲノムのプロモーター領域の histone occupancy を検証した.



sh-RanBP10/RanBP10-HEp-2 細胞において、ICP27, ICP8, VP16 プロモーター領域における histone occupancy は R7911 ( $\Delta$ ICP0-repair) 感染時と比較して R7910 ( $\Delta$ ICP0) 感染時に増加しており、既報通り [15, 18] R7910 ( $\Delta$ ICP0) 感染時にはウイルス遺伝子の効率的な発現が抑制されていることが示唆された (図 20).

R7911 ( $\Delta$ ICP0-repair) 感染時に、ウイルスプロモーター領域における histone occupancy は sh-RanBP10/RanBP10-HEp-2 細胞と比較して sh-RanBP10-HEp-2 細胞で増加しており、RanBP10 はウイルスゲノムの histone occupancy の低下に重要であることが示唆された. また sh-RanBP10-HEp-2 細胞に R7910 ( $\Delta$ ICP0) を感染させた際、 $\alpha, \beta, \gamma$  すべてのウイルスプロモーター領域の histone occupancy が顕著に増加しており、ウイルス遺伝子の転写が強く抑制された状態にあることが示唆された (図 20). 以上の結果から、RanBP10 と ICP0 の両方が HSV-1 プロモーター領域のクロマチンリモデリングに重要であり、互いの機能を補い合っていることが示唆された. また感染細胞において RanBP10 は ICP0 と類似した機能を有し、ICP0 と同様にウイルスゲノムのクロマチン構造をリモデリングすることでウイルス遺伝子発現を mRNA レベルで制御し、効率的なウイルス増殖に寄与していると考えられた.

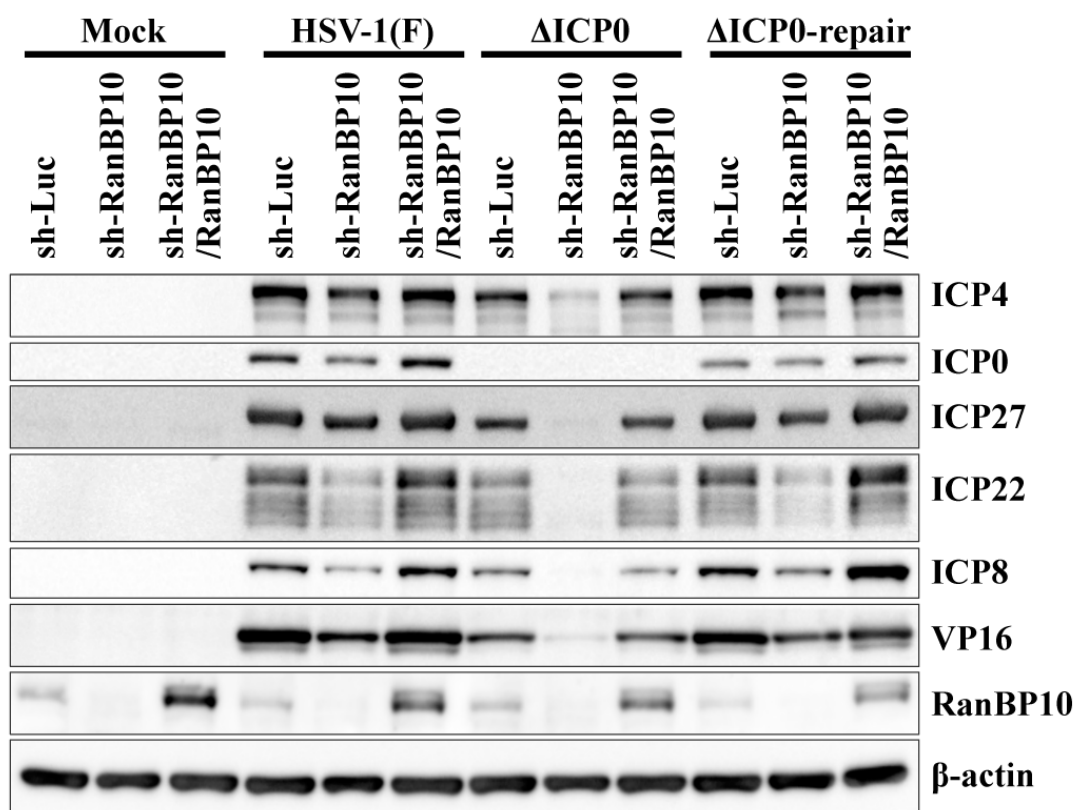


図 15: HSV-1 タンパク質発現に対する RanBP10 の影響

sh-Luc, sh-RanBP10, sh-RanBP10/RanBP10-HEp-2 細胞に各ウイルスを MOI=5 で感染させ、18 時間後に細胞溶解液を回収し、ICP4, ICP0, ICP27, ICP22, ICP8, VP16, RanBP10,  $\beta$ -actin 抗体を用いてウェスタンブロッティングで解析した。

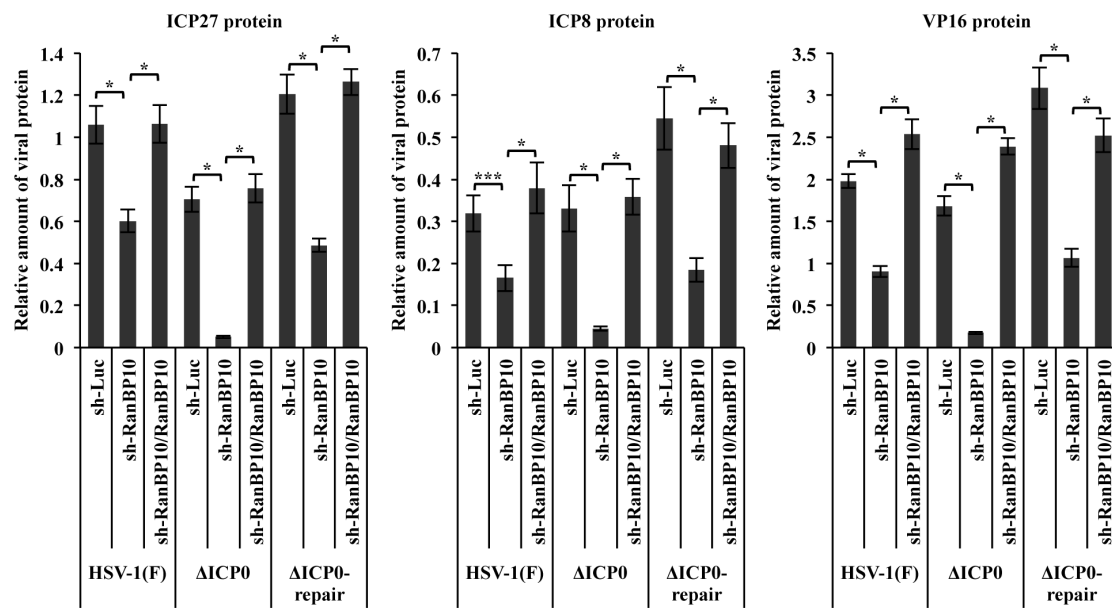


図 16: HSV-1 タンパク質発現に対する RanBP10 と ICP0 の影響 (図 15 の定量)

図 15 の ICP27, ICP8, VP16 タンパク質量を  $\beta$ -actin で補正し, 定量した. エラーバーは 3 回の独立した実験から得たデータの標準誤差を表しており,  $P$  値は one-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test により算出し, 統計学的な差を Asterisks で示した (\* $P < 0.0001$ , \*\*\*  $P < 0.01$ ).

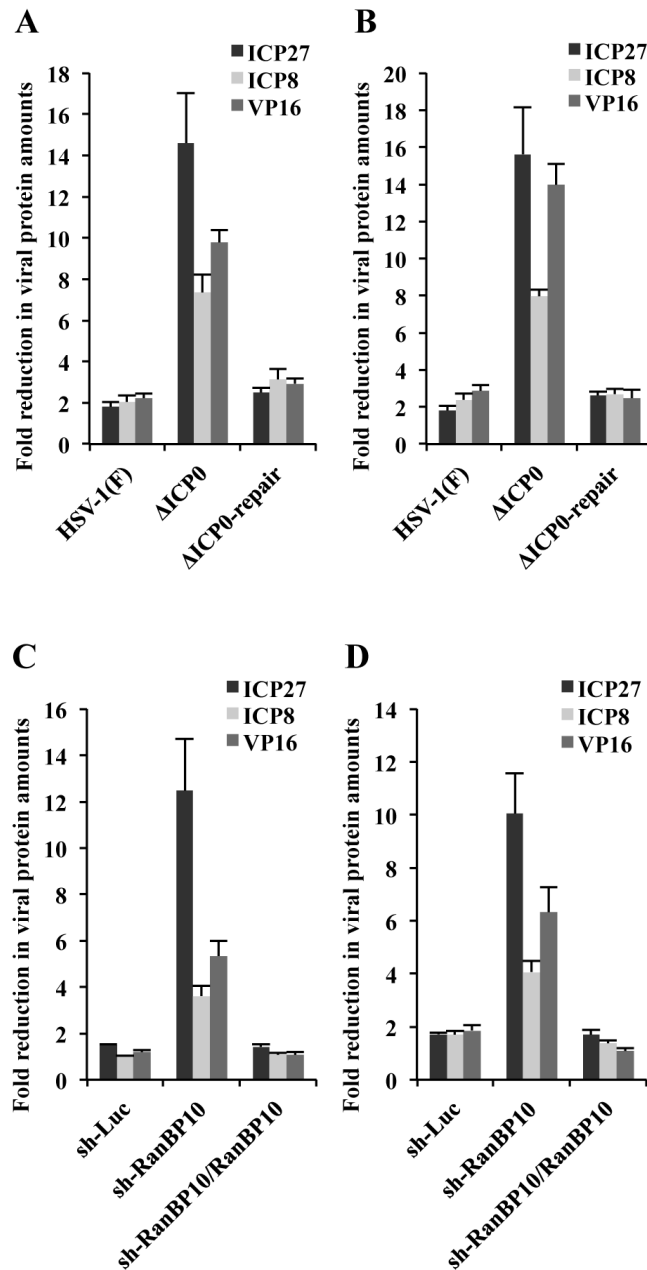


図 17: HSV-1 タンパク質発現に対する RanBP10 と ICP0 の影響 (図 16 の解析)

(A, B) sh-Luc-HEp-2 細胞 (A) または sh-RanBP10/RanBP10-HEp-2 細胞 (B) に対する sh-RanBP10-HEp-2 細胞における各ウイルスのタンパク質発現量の減少率を示しており, RanBP10 発現抑制が各ウイルスタンパク質発現に与える影響を解析している.

(C, D) 各細胞における野生型 HSV-1(F) (C) または R7911 ( $\Delta$ ICP0-repair) (D) に対する R7910 ( $\Delta$ ICP0) のウイルスタンパク質発現量の減少率を示しており, ICP0 欠損が各細胞でのウイルスタンパク質発現に与える影響を解析している.

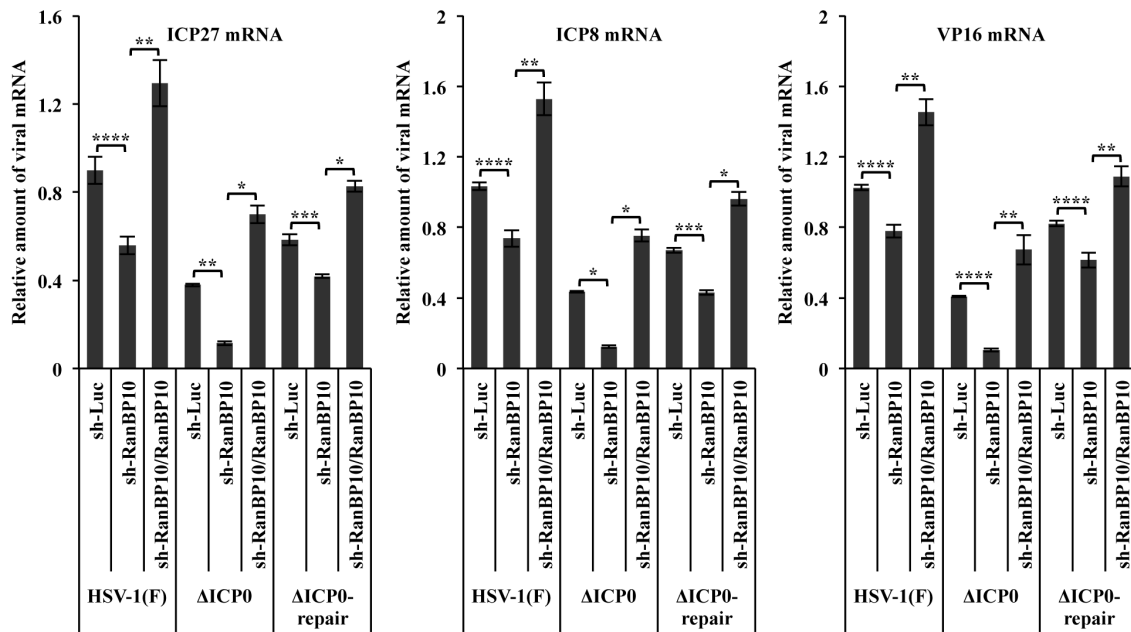


図 18: HSV-1 mRNA 発現に対する RanBP10 の影響

sh-Luc, sh-RanBP10, sh-RanBP10/RanBP10-HEp-2 細胞に各ウイルスを MOI=5 で感染させ、18 時間後に RNA を回収し、cDNA を合成後、mRNA 量を定量 PCR で解析した。各ウイルス mRNA 量は 18S rRNA の発現量により補正した。エラーバーは 3 回の独立した実験から得たデータの標準誤差を表しており、 $P$  値は one-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test により算出し、統計学的な差を Asterisks で示した ( $*P < 0.0001$ ,  $P < 0.001$ ,  $*** P < 0.01$ ,  $**** P < 0.05$ )。

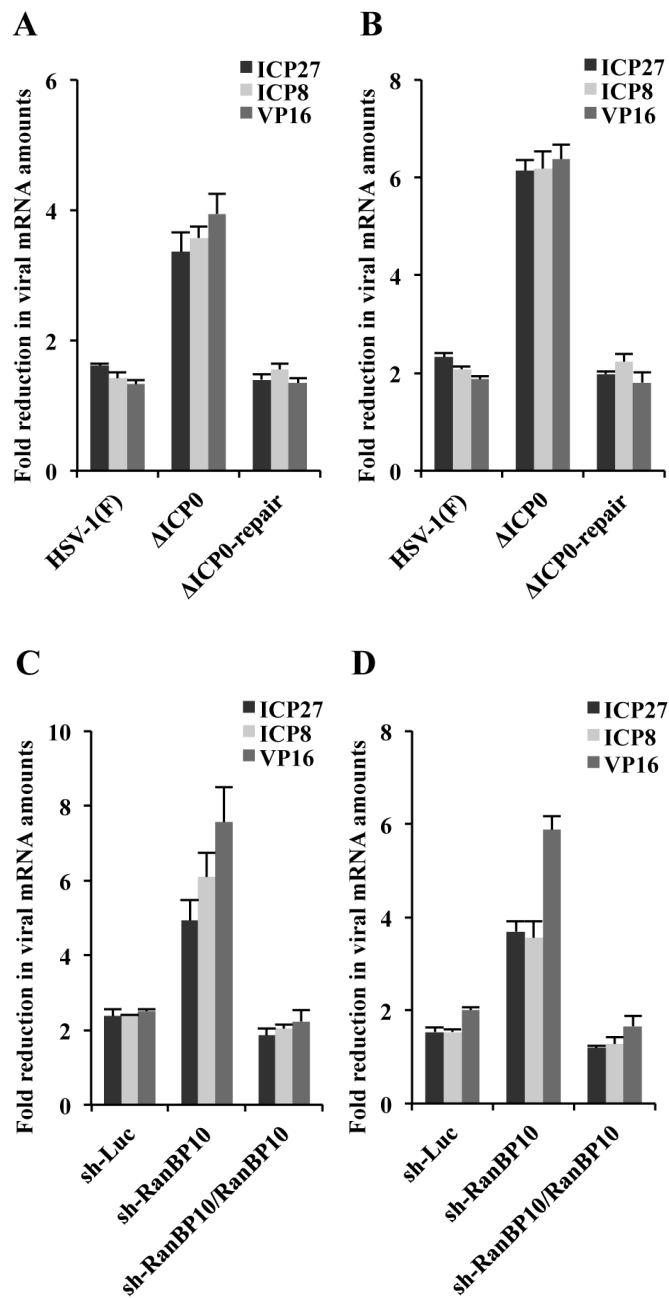


図 19: HSV-1 タンパク質発現に対する RanBP10 と ICP0 の影響 (図 18 の解析)

(A, B) sh-Luc-HEp-2 細胞 (A) または sh-RanBP10/RanBP10-HEp-2 細胞 (B) に対する sh-RanBP10-HEp-2 細胞における各ウイルスの mRNA 発現量の減少率を示しており, RanBP10 発現抑制が各ウイルス mRNA 発現に与える影響を解析している.

(C, D) 各細胞における野生型 HSV-1(F) (C) または R7911 ( $\Delta$ ICP0-repair) (D) に対する R7910 ( $\Delta$ ICP0) のウイルス mRNA 発現量の減少率を示しており, ICP0 欠損が各細胞でのウイルス mRNA 発現に与える影響を解析している.

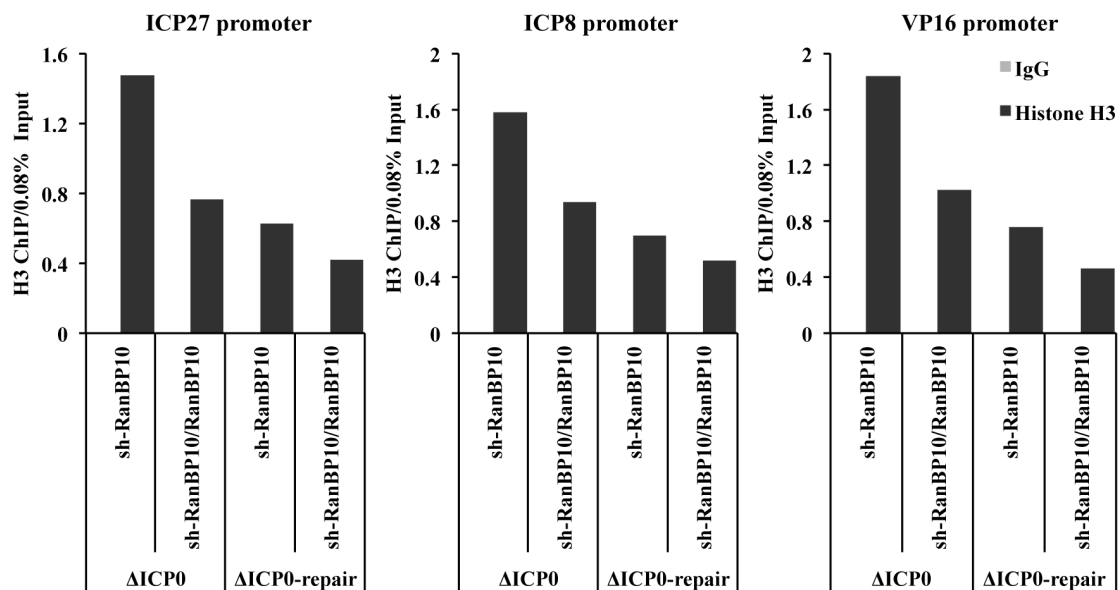


図 20: ウイルスプロモーター領域における histone occupancy に対する RanBP10 と ICP0 の影響

sh-RanBP10-HEp-2 と sh-RanBP10/RanBP10-HEp-2 細胞に各ウイルスを MOI=5 で感染させ、18 時間後に回収し、ヒストン H3 抗体または Normal Rabbit IgG を用いてクロマチン免疫沈降 (ChIP) を行った. ICP27, ICP8, VP16 プロモーター領域における DNA 沈降量は、0.08% WCE-DNA に対するヒストン H3 ChIP-DNA で計算した. データは 3 回の独立した実験で同様の結果が得られており、代表的なものを載せている.

## 考察

本研究では HEK293T 細胞を用いて MEF-ICP0 を過剰発現させ、インタラクトーム解析を行い、ICP0 の相互作用候補因子として RanBP10 を同定した。このスクリーニング結果に基づき、感染細胞における ICP0 と RanBP10 の相互作用及び HSV-1 増殖や遺伝子発現における RanBP10 の役割に関して解析を行った。

ICP0 と RanBP10 の相互作用は、ICP0 と RanBP10 のトランスフェクション (図 4)、感染細胞における組換えアデノウイルスによる RanBP10 の過剰発現 (図 6B, C)、または RanBP10 恒常的発現細胞 (図 8B, C) を用いた免疫沈降で確認した。さらに RanBP10 が HSV-1 感染により主に核内に局在するようになり、ICP0 との共局在が確認されたこと (図 7, 9)、HSV-1 replication compartment (RC) マーカーである ICP8 と共局在したこと (図 10) から、RanBP10 は ICP0 と HSV-1 RC において相互作用することが示唆された。またトランスフェクションにより ICP0 を発現させた非感染細胞を用いたインタラクトーム解析で RanBP10 が同定されたこと、トランスフェクションの系で ICP0 と RanBP10 の相互作用が確認されたことから、ICP0 と RanBP10 の相互作用には他のウイルスタンパク質を介さ



ないことが考えられた。ICP0/RanBP10 複合体の機能に他のウイルスタンパク質が関与する可能性は排除できないが、少なくともその構造維持には ICP0 以外のウイルスタンパク質は重要ではないことが示唆された。

RanBP10 発現抑制時に、ICP0 欠損時と同様に HSV-1 増殖の低下、ウイルスタンパク質と mRNA 発現量の低下、ウイルスプロモーター領域における histone occupancy の増加が認められた。これらの結果から感染細胞において RanBP10 が ICP0 と類似した機能を有し、クロマチンリモデリングを介した HSV-1 遺伝子発現制御に重要な役割を果たしていると考えられた。SNF2H が chromatin-remodeling complex を形成し HSV-1 ゲノムの histone occupancy を低下させると言われているように[54]、ウイルスは多くの宿主タンパク質を利用し効率的に増殖するよう進化してきた。今回我々は HSV-1 感染時にクロマチンリモデリングを介した遺伝子発現制御に関与する新たな宿主因子 RanBP10 の存在を明らかにした。さらに RanBP10 の単独抑制時もしくは ICP0 の単独欠損時と比較して両因子が欠如したときに表現型が顕著になったことから、RanBP10 の要求性は ICP0 欠損時に、ICP0 要求性は RanBP10 発現抑制時に高くなること、RanBP10 と ICP0 は互いの機能を補い合いながら協調して働いていることが示唆された。

HSV-1 感染細胞において RanBP10 は ICP0 と相互作用すること、類似し

た機能を有すること、協調的に働くことが示唆された。DNA methyltransferase (DNMT) 1 と DNMT3b は類似した機能を有し、これら 2 つの因子が epigenetic repressor complex に含まれ、協調的にクロマチンリモデリングを制御するというモデルが提唱されている[85-87]。このモデルと同様に、RanBP10 と ICP0 がウイルスのクロマチン構造と遺伝子発現を制御する複合体に含まれ、協調的に働いているというモデルが考えられた。このモデルを支持するものとして、ICP0 が様々な宿主因子やウイルス因子と相互作用することや、ICP0 が ICP4 や ICP27 と相互作用し、協調的に働きウイルス遺伝子を活性化していることが知られている[88-92]。また RanBP10 が宿主転写因子のコアクチベーターとして働くことが示唆されていることから[78]、RanBP10 も ICP0 と同様にこの複合体に含まれる他の宿主因子やウイルス因子と協調してウイルスゲノムのクロマチン構造を制御する可能性が考えられた。RanBP10 が感染細胞において ICP0 と類似した機能を有することが示唆されたにも関わらず RanBP10 には ICP0 が有する RING finger domain やそれに似た機能を有する domain もないことから、RING finger domain を有し ICP0 と類似した機能を有する因子と RanBP10 が相互作用する可能性も考えられた。また RanBP10 単独抑制時や ICP0 単独欠損時と比較して、両因子が欠如したときにウイルス遺伝子発現抑制がより顕著になったのは、両因

子の欠如によりウイルス遺伝子発現を制御している複合体全体の機能が減弱したことによると考えられた (図 21).

本研究で RanBP10 が ICP0 と類似した機能を有し、協調的に働くことによりクロマチンリモデリングを介した遺伝子発現制御を担うことが明らかとなった (図 22). また ICP0 は, BMAL1 との結合による BMAL1/CLOCK 複合体の安定化及び CLOCK を介したヒストンアセチル化の促進, CoREST との結合による CoREST/REST/HDAC1/LSD1 repressor complex からの HDAC の除去, PML 分解による Daxx/ATRX 複合体の拡散などにより HSV-1 ゲノムのクロマチン構造を制御し, ウイルス遺伝子発現を活性化していると考えられている[14, 41, 44, 45, 47, 51]. これらの複合体と RanBP10 の関連性, ICP0/RanBP10 複合体と相互作用しうる他の宿主因子の探索やその関連性, RanBP10 の機能に関して今後さらに追求していきたい. また本研究では, 感染細胞における RanBP10 と ICP0 の相互作用が直接的な結合によるものなのか, それとも間接的な相互作用によるものなのかは明らかになっていない. もし RanBP10 と ICP0 の結合が直接的であり, その結合に必要な部位が同定されれば新たな創薬のターゲットとなりうる.

RanBP10 と ICP0 の相互作用が, 感染細胞における両因子の協調性に重要なものかどうか, また病態に与える影響はあるのかどうかを今後明らかにしたい.

RanBP10 発現抑制時に認められた表現型が ICP0 欠損ウイルス感染時に認められた表現型と同様の傾向を示したことから、感染細胞において RanBP10 は ICP0 と類似した機能を有し、効率的なウイルス増殖に寄与していることが考えられた。ウイルスは宿主細胞の存在なしには増殖することができないため、様々な宿主細胞機構を利用することで効率的な増殖を図っていると考えられている。例えばタンパク質のリン酸化は標的タンパク質を制御する重要な機構で、転写や細胞周期、タンパク質の分解など様々な活性を制御している[93]。HSV は、このように様々な細胞機構を制御する UL13, Us3 などのプロテインキナーゼをコードしており、これらの因子がウイルス因子や宿主因子をリン酸化し活性を制御することでウイルスの増殖に有利な環境を作り出していると考えられている[94-97]。例えば UL13 は宿主プロテインキナーゼである cyclin-dependent kinase 1 (cdc2) と同様に elongation factor 1 $\delta$  をリン酸化することが知られている[94, 95]。cdc2 は宿主細胞の様々な現象に関与しており、ウイルス感染に伴う cdc2 の不足を UL13 が補填しているというモデルが提唱されている[95]。本研究でも ICP0 と RanBP10 が類似した機能を有することが示唆され、HSV-1 感染に伴う RanBP10 の不足を ICP0 が補っている可能性が考えられた。このように宿主因子と類似した機能をウイルスが保持することは、宿主細胞機構を利用するのに有

利な戦略であると考えられる。さらに今回、宿主因子がウイルス因子と協調的に働き、その機能を増強するというモデルが考えられた。ICP0 は潜伏感染からの再活性化に重要であるが、ICP0 欠損ウイルスでも効率は低下するが再活性化は起こる。ICP0 発現を誘導する IE プロモーターの活性化は再活性化の引き金となり、それに宿主因子の応答が関与しているという概念が存在することから[29]、RanBP10 はICP0 の発現を増強することで効率的な再活性化に関与している可能性が考えられた。

RanBP10 の機能に関しては未だ不明な点が多いが、このようにウイルス因子を用いたことによって今回新たに RanBP10 が細胞のクロマチン制御能を有する可能性が示唆された。これまでも herpesvirus-associated ubiquitin-specific protease (HAUSP/USP7) のようにウイルス感染細胞を用いた実験により宿主因子の新たな機能が発見されたことや研究が加速した例がいくつかある[98-100]。ゆえにウイルス因子と宿主因子の感染細胞における相互作用を明らかにすることは、ウイルス増殖や潜伏感染の全体像を理解するだけでなく宿主因子の機能を解明する上でも重要である。

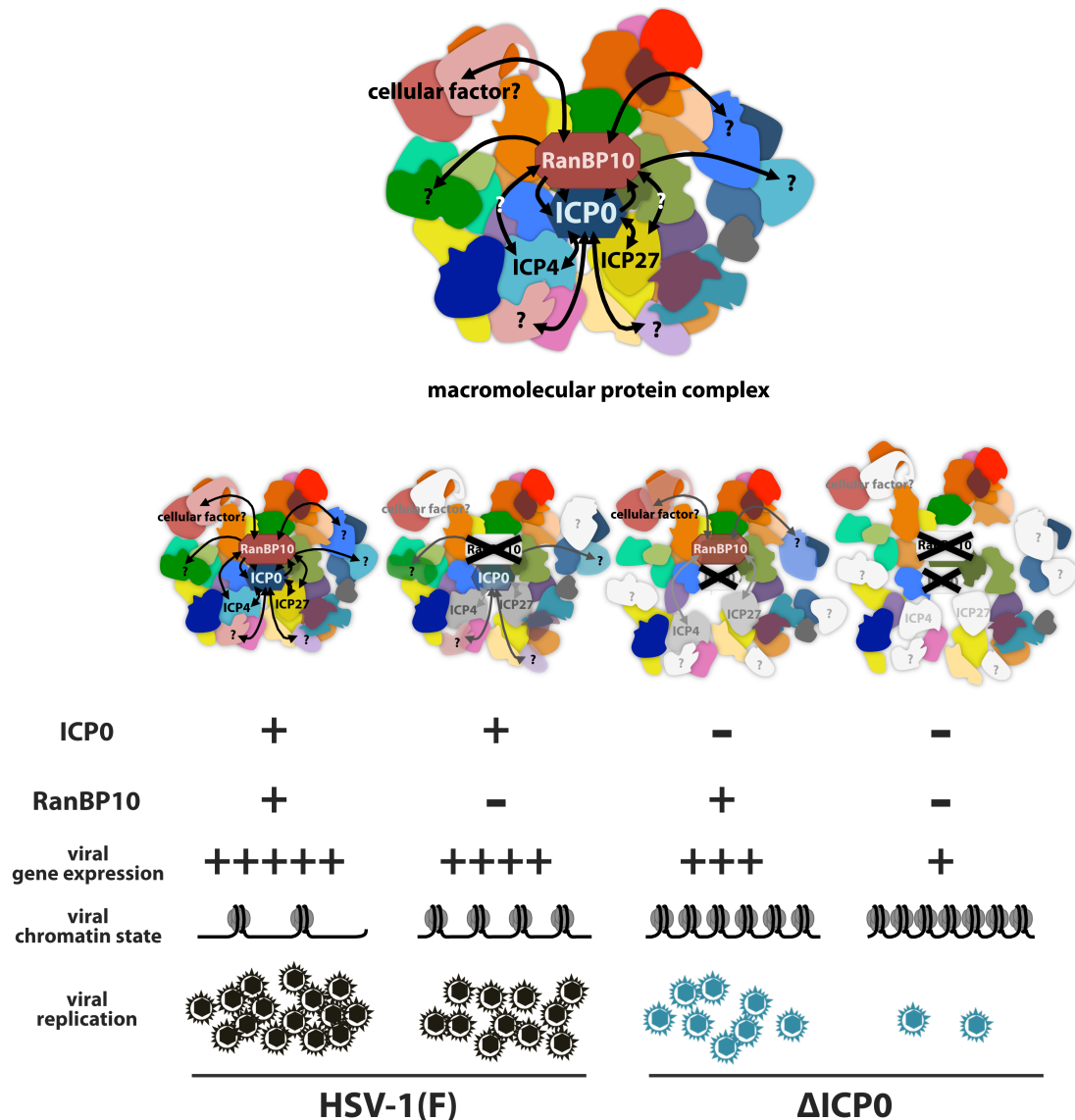


図 21: ICP0 と RanBP10 による HSV-1 遺伝子発現制御モデル

RanBP10 は ICP0 と相互作用すること、類似した機能を有すること、協調的に働くことが示唆されたことから RanBP10 と ICP0 がウイルスのクロマチン構造と遺伝子発現を制御している複合体に含まれ、協調的に働いているというモデルが考えられた。ICP0 は ICP4 や ICP27 と相互作用し、協調的に働きウイルス遺伝子を活性化していることが知られており、RanBP10 も ICP0 と同様にこの複合体に含まれる他の宿主因子やウイルス因子と協調してウイルスのクロマチン構造を制御する可能性が考えられた。また RanBP10 単独抑制時や ICP0 単独欠損時と比較して、両因子が欠如したときにウイルス遺伝子発現抑制がより顕著になったのは、両因子の欠如によりウイルス遺伝子発現を制御している複合体全体の機能が減弱したことによると考えられた。

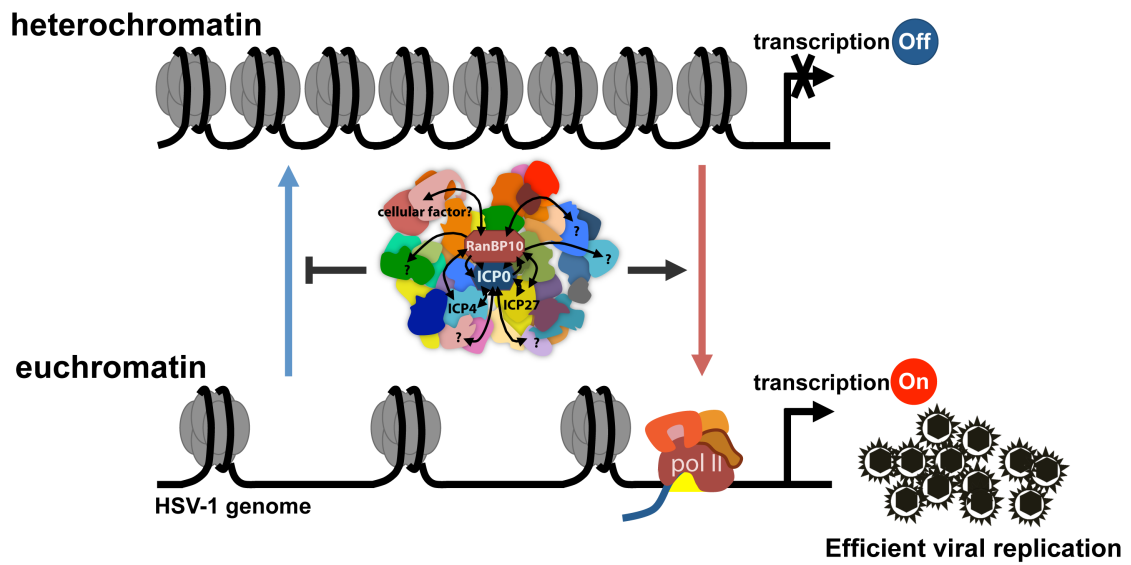


図 22: ICP0 と RanBP10 による HSV-1 遺伝子発現制御

RanBP10 はウイルスのクロマチン構造と遺伝子発現を制御する複合体に存在し、ICP0 と協調的に働くことにより HSV-1 ゲノムのクロマチンリモデリングを介した効率的なウイルス遺伝子発現と増殖に寄与していることが示唆された。

## 総括

本研究で得られた知見は以下の通りである。

- (i) HSV-1 感染細胞において RanBP10 は ICP0 と相互作用しうる。
- (ii) RanBP10 はウイルス増殖に重要である。
- (iii) RanBP10 はウイルスタンパク質及び mRNA 発現に重要である。
- (iv) RanBP10 はウイルスゲノムのクロマチン構造を制御する。
- (v) 感染細胞において RanBP10 は ICP0 と類似した機能を有する。
- (vi) RanBP10 と ICP0 は協調的に働く。

本研究では、ICP0 と相互作用し HSV-1 の遺伝子発現制御に関与する宿主因子 RanBP10 を新たに同定した。さらに RanBP10 は感染細胞において ICP0 と類似した機能を有し、mRNA レベルでウイルス遺伝子発現を制御することにより HSV-1 ゲノムのクロマチン構造を制御し、効率的なウイルス増殖に寄与していることが示唆された。また RanBP10 は ICP0 と互いの機能を増強し合いながら協調的に働くことが考えられた。



## 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ました。

本研究を遂行するにあたり、最高の研究環境と熱心なご助言、ご指導をいただきました東京大学 医科学研究所 ウイルス病態制御分野 川口寧 教授に深く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 助教には日頃の実験から学会発表に至るまで多くの場面で学生に近い立場から有益なご助言、ご指導をいただきましたことを感謝いたします。

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 尾山大明 准教授、秦 裕子 博士には質量解析のご相談から解析まで細部にわたり丁寧なご指導を賜りましたことを感謝いたします。

研究を行うにあたり、文部科学省「ライフ、イノベーションを先導するリーダー養成プログラム」東京大学ライフイノベーション、リーディング大学院 GPLLI に多大なる支援を賜りました。ここに感謝の意を表します。

本研究室の安藤朋子氏，松本幸氏，小山志保子氏，喜多尾祥代氏には研究生  
活を送る上で様々なご配慮，ご協力を頂きましたことに深く感謝いたします。ま  
た先輩方，とりわけ丸鶴雄平 博士，神道慶子 博士，藤井ひかる 博士には研究  
に関する有意義な議論や研究生生活を送る上での多岐にわたるご助言，ご協力を  
いただきました。さらに同期，後輩の皆様には日常の議論を通じて多くの知識や  
示唆をいただきました。心より感謝いたします。

最後に，長い学生生活にも関わらず全面的に私を応援し支えてくださった両  
親 佐藤正和氏と直美氏に心より感謝しております。本当にありがとうございます。  
しました。

## 引用文献

1. Sato, Y., Kato, A., Maruzuru, Y., Oyama, M., Kozuka-Hata, H., Aii, J., Kawaguchi, Y.: Cellular Transcriptional Coactivator RanBP10 and Herpes Simplex Virus 1 ICP0 Interact and Synergistically Promote Viral Gene Expression and Replication. *J. Virol.* JVI.03043–15 (2016).
2. Roizman, B., Knipe, D.M., Whitley, R.: Herpes Simplex Viruses. *Fields virology*. 2, 1823–1897 (2013).
3. Cohrs, R.J., Gildea, D.H.: Human Herpesvirus Latency. *Brain Pathology*. 11, 465–474 (2001).
4. Gupta, R., Warren, T., Wald, A.: Genital herpes. *The Lancet*. 370, 2127–2137 (2007).
5. Kawaguchi, Y.: 単純ヘルペスウイルス (HSV). *ウイルス*. 60, 187–196 (2010).

6. Umbach, J.L., Kramer, M.F., Jurak, I., Karnowski, H.W., Coen, D.M., Cullen, B.R.: MicroRNAs expressed by herpes simplex virus 1 during latent infection regulate viral mRNAs. *Nature*. 1–6 (2008).
7. Hagglund, R., Roizman, B.: Role of ICP0 in the Strategy of Conquest of the Host Cell by Herpes Simplex Virus 1. *J. Virol.* 78, 2169–2178 (2004).
8. Boutell, C., Everett, R.D.: Regulation of alphaherpesvirus infections by the ICP0 family of proteins. *Journal of General Virology*. 94, 465–481 (2013).
9. Henikoff, S.: Nucleosome destabilization in the epigenetic regulation of gene expression. *Nat Rev Genet.* 9, 15–26 (2008).
10. Bannister, A.J., Kouzarides, T.: Regulation of chromatin by histone modifications. *Nature Publishing Group*. 21, 381–395 (2011).
11. Paulus, C., Nitzsche, A., Nevels, M.: Chromatinisation of herpesvirus genomes. *Rev. Med. Virol.* 20, 34–50 (2010).
12. Zalckvar, E., Paulus, C., Tillo, D., Asbach-Nitzsche, A., Lubling, Y., Winterling, C., Strieder, N., Mücke, K., Goodrum, F., Segal, E., Nevels, M.: Nucleosome maps of the human cytomegalovirus genome reveal a temporal

- switch in chromatin organization linked to a major IE protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 13126–13131 (2013).
13. Ferenczy, M.W.: EPIGENETIC REGULATION OF QUIESCENT HERPES SIMPLEX VIRUS TYPE 1 GENE EXPRESSION. (2010).
  14. Conn, K., Schang, L.: Chromatin Dynamics during Lytic Infection with Herpes Simplex Virus 1. *Viruses*. 5, 1758–1786 (2013).
  15. Cliffe, A.R., Knipe, D.M.: Herpes Simplex Virus ICP0 Promotes both Histone Removal and Acetylation on Viral DNA during Lytic Infection. *J. Virol.* 82, 12030–12038 (2008).
  16. Ferenczy, M.W., DeLuca, N.A.: Epigenetic Modulation of Gene Expression from Quiescent Herpes Simplex Virus Genomes. *J. Virol.* 83, 8514–8524 (2009).
  17. Kutluay, S.B., Triezenberg, S.J.: Regulation of Histone Deposition on the Herpes Simplex Virus Type 1 Genome during Lytic Infection. *J. Virol.* 83, 5835–5845 (2009).
  18. Hancock, M.H., Cliffe, A.R., Knipe, D.M., Smiley, J.R.: Herpes Simplex Virus VP16, but Not ICP0, Is Required To Reduce Histone Occupancy and Enhance

- Histone Acetylation on Viral Genomes in U2OS Osteosarcoma Cells. *J. Virol.* 84, 1366–1375 (2010).
19. Lee, J.S., Raja, P., Knipe, D.M.: Herpesviral ICP0 Protein Promotes Two Waves of Heterochromatin Removal on an Early Viral Promoter during Lytic Infection. *mBio.* 7, e02007–15 (2016).
  20. Stow, N.D., Stow, E.C.: Isolation and Characterization of a Herpes Simplex Virus Type 1 Mutant Containing a Deletion within the Gene Encoding the Immediate Early Polypeptide Vmw110. *Journal of General Virology.* 67, 2571–2585 (1986).
  21. Sacks, W.R., Schaffer, P.A.: Deletion mutants in the gene encoding the herpes simplex virus type 1 immediate-early protein ICP0 exhibit impaired growth in cell culture. *J. Virol.* 61, 829–839 (1987).
  22. Everett, R.D.: Construction and Characterization of Herpes Simplex Virus Type 1 Mutants with Defined Lesions in Immediate Early Gene 1. *Journal of General Virology.* 70, 1185–1202 (1989).

23. Yao, F., Schaffer, P.A.: An activity specified by the osteosarcoma line U2OS can substitute functionally for ICP0, a major regulatory protein of herpes simplex virus type 1. *J. Virol.* 69, 6249–6258 (1995).
24. Cai, W.Z., Schaffer, P.A.: Herpes simplex virus type 1 ICP0 plays a critical role in the de novo synthesis of infectious virus following transfection of viral DNA. *J. Virol.* 63, 4579–4589 (1989).
25. Efstathiou, S., Preston, C.M.: Towards an understanding of the molecular basis of herpes simplex virus latency. *Virus Research.* 111, 108–119 (2005).
26. Nicoll, M.P., Proença, J.T., Efstathiou, S.: The molecular basis of herpes simplex virus latency. *FEMS Microbiology Reviews.* 36, 684–705 (2012).
27. Volcy, K., Fraser, N.W.: DNA damage promotes herpes simplex virus-1 protein expression in a neuroblastoma cell line. *J. Neurovirol.* 19, 57–64 (2013).
28. Cai, W., Astor, T.L., Liptak, L.M., Cho, C., Coen, D.M., Schaffer, P.A.: The herpes simplex virus type 1 regulatory protein ICP0 enhances virus replication during acute infection and reactivation from latency. *J. Virol.* 67, 7501–7512 (1993).

29. Everett, R.D.: ICP 0, a regulator of herpes simplex virus during lytic and latent infection. *Bioessays*. (2000).
30. Halford, W.P., Schaffer, P.A.: ICP0 Is Required for Efficient Reactivation of Herpes Simplex Virus Type 1 from Neuronal Latency. *J. Virol.* 75, 3240–3249 (2001).
31. MK, C.-A., de Thé, H.: Herpes virus induced proteasome-dependent degradation of the nuclear bodies-associated PML and Sp100 proteins. *Oncogene*. 18, 935–941 (1999).
32. Lees-Miller, S.P., Long, M.C., Kilvert, M.A., Lam, V., Rice, S.A., Spencer, C.A.: Attenuation of DNA-dependent protein kinase activity and its catalytic subunit by the herpes simplex virus type 1 transactivator ICP0. *J. Virol.* 70, 7471–7477 (1996).
33. Parkinson, J., Lees-Miller, S.P., Everett, R.D.: Herpes Simplex Virus Type 1 Immediate-Early Protein Vmw110 Induces the Proteasome-Dependent Degradation of the Catalytic Subunit of DNA-Dependent Protein Kinase. *J. Virol.* 73, 650–657 (1999).



34. Lilley, C.E., Chaurushiya, M.S., Boutell, C., Landry, S., Suh, J., Panier, S., Everett, R.D., Stewart, G.S., Durocher, D., Weitzman, M.D.: A viral E3 ligase targets RNF8 and RNF168 to control histone ubiquitination and DNA damage responses. *The EMBO Journal*. 29, 943–955 (2010).
35. Canning, M., Boutell, C., Parkinson, J., Everett, R.D.: A RING Finger Ubiquitin Ligase Is Protected from Autocatalyzed Ubiquitination and Degradation by Binding to Ubiquitin-specific Protease USP7. *Journal of Biological Chemistry*. 279, 38160–38168 (2004).
36. Boutell, C., Canning, M., Orr, A., Everett, R.D.: Reciprocal Activities between Herpes Simplex Virus Type 1 Regulatory Protein ICP0, a Ubiquitin E3 Ligase, and Ubiquitin-Specific Protease USP7. *J. Virol.* 79, 12342–12354 (2005).
37. Orzalli, M.H., DeLuca, N.A., Knipe, D.M.: Nuclear IFI16 induction of IRF-3 signaling during herpesviral infection and degradation of IFI16 by the viral ICP0 protein. *PNAS*. 109, E3008–E3017 (2012).
38. Conwell, S.E., White, A.E., Harper, J.W., Knipe, D.M.: Identification of TRIM27 as a Novel Degradation Target of Herpes Simplex Virus 1 ICP0. *J. Virol.* 89, 220–229 (2014).

39. Everett, R.D., Chelbi-Alix, M.K.: PML and PML nuclear bodies: Implications in antiviral defence. *Biochimie*. 89, 819–830 (2007).
40. Everett, R.D., Parada, C., Gripon, P., Sirma, H., Orr, A.: Replication of ICP0-Null Mutant Herpes Simplex Virus Type 1 Is Restricted by both PML and Sp100. *J. Virol.* 82, 2661–2672 (2008).
41. Lukashchuk, V., Everett, R.D.: Regulation of ICP0-Null Mutant Herpes Simplex Virus Type 1 Infection by ND10 Components ATRX and hDaxx. *J. Virol.* 84, 4026–4040 (2010).
42. Everett, R.D., Murray, J., Orr, A., Preston, C.M.: Herpes Simplex Virus Type 1 Genomes Are Associated with ND10 Nuclear Substructures in Quiescently Infected Human Fibroblasts. *J. Virol.* 81, 10991–11004 (2007).
43. Newhart, A., Rafalska-Metcalf, I.U., Yang, T., Negorev, D.G., Janicki, S.M.: Single-cell analysis of Daxx and ATRX-dependent transcriptional repression. *Journal of Cell Science*. 125, 5489–5501 (2013).
44. Zhou, G., Du, T., Roizman, B.: The Role of the CoREST/REST Repressor Complex in Herpes Simplex Virus 1 Productive Infection and in Latency. *Viruses*. 5, 1208–1218 (2013).

45. Kalamvoki, M., Roizman, B.: Circadian CLOCK histone acetyl transferase localizes at ND10 nuclear bodies and enables herpes simplex virus gene expression. *PNAS*. 107, 17721–17726 (2010).
46. Gu, H., Liang, Y., Mandel, G., Roizman, B.: Components of the REST/CoREST/histone deacetylase repressor complex are disrupted, modified, and translocated in HSV-1-infected cells. *PNAS*. 102, 7571–7576 (2005).
47. Gu, H., Roizman, B.: Herpes simplex virus-infected cell protein 0 blocks the silencing of viral DNA by dissociating histone deacetylases from the CoREST–REST complex. *PNAS*. 104, 17134–17139 (2007).
48. Zhou, G., Te, D., Roizman, B.: The CoREST/REST Repressor Is both Necessary and Inimical for Expression of Herpes Simplex Virus Genes. *mBio*. 2, e00313–10–e00313–15 (2010).
49. Everett, R.D.: Depletion of CoREST Does Not Improve the Replication of ICP0 Null Mutant Herpes Simplex Virus Type 1. *J. Virol.* 84, 3695–3698 (2010).
50. Kawaguchi, Y., Tanaka, M., Yokoyama, A., Matsuda, G., Kato, K., Kagawa, H., Hirai, K., Roizman, B.: Herpes simplex virus 1  $\alpha$  regulatory protein ICP0

- functionally interacts with cellular transcription factor BMAL1. *PNAS*. 98, 1877–1882 (2001).
51. Kondratov, R.V., Chernov, M.V., Kondratova, A.A., Gorbacheva, V.Y., Gudkov, A.V., Antoch, M.P.: BMAL1-dependent circadian oscillation of nuclear CLOCK: posttranslational events induced by dimerization of transcriptional activators of the mammalian clock system. *Genes Dev*. 17, 1921–1932 (2003).
52. Liang, Y., Vogel, J.L., Narayanan, A., Peng, H., Kristie, T.M.: Inhibition of the histone demethylase LSD1 blocks  $\alpha$ -herpesvirus lytic replication and reactivation from latency. *Nat Med*. 15, 1312–1317 (2009).
53. Taylor, T.J., Knipe, D.M.: Proteomics of herpes simplex virus replication compartments: association of cellular DNA replication, repair, recombination, and chromatin remodeling proteins with ICP8. *J. Virol*. 78, 5856–5866 (2004).
54. Bryant, K.F., Colgrove, R.C., Knipe, D.M.: Cellular SNF2H Chromatin-Remodeling Factor Promotes Herpes Simplex Virus 1 Immediate-Early Gene Expression and Replication. *mBio*. 2, e00330–10–e00330–10 (2011).

55. Tanaka, M., Kagawa, H., Yamanashi, Y., Sata, T., Kawaguchi, Y.:  
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. *J. Virol.* 77, 1382–1391 (2003).
56. Sugimoto, K., Uema, M., Sagara, H., Tanaka, M., Sata, T., Hashimoto, Y.,  
Kawaguchi, Y.: Simultaneous Tracking of Capsid, Tegument, and Envelope  
Protein Localization in Living Cells Infected with Triply Fluorescent Herpes  
Simplex Virus 1. *J. Virol.* 82, 5198–5211 (2008).
57. Kato, A., Arii, J., Shiratori, I., Akashi, H., Arase, H., Kawaguchi, Y.: Herpes  
Simplex Virus 1 Protein Kinase Us3 Phosphorylates Viral Envelope  
Glycoprotein B and Regulates Its Expression on the Cell Surface. *J. Virol.* 83,  
250–261 (2009).
58. Arii, J., Goto, H., Suenaga, T., Oyama, M., Kozuka-Hata, H., Imai, T., Minowa,  
A., Akashi, H., Arase, H., Kawaoka, Y., Kawaguchi, Y.: Non-muscle myosin  
IIA is a functional entry receptor for herpes simplex virus-1. *Nature.* 467, 859–  
862 (2010).

59. Ejercito, P.M., Kieff, E.D., Roizman, B.: Characterization of Herpes Simplex Virus Strains Differing in their Effects on Social Behaviour of Infected Cells. *Journal of General Virology*. 2, 357–364 (1968).
60. Imai, T., Koyanagi, N., Ogawa, R., Shindo, K., Suenaga, T., Sato, A., Aii, J., Kato, A., Kiyono, H., Arase, H., Kawaguchi, Y.: Us3 Kinase Encoded by Herpes Simplex Virus 1 Mediates Downregulation of Cell Surface Major Histocompatibility Complex Class I and Evasion of CD8 + T Cells. *PLoS ONE*. 8, e72050 (2013).
61. Kawaguchi, Y., Van Sant, C., Roizman, B.: Eukaryotic Elongation Factor 1 $\delta$  Is Hyperphosphorylated by the Protein Kinase Encoded by the UL13 Gene of Herpes Simplex Virus 1. *J. Virol.* 72, 1731–1736 (1998).
62. Van Sant, C., Kawaguchi, Y., Roizman, B.: A single amino acid substitution in the cyclin D binding domain of the infected cell protein no. 0 abrogates the neuroinvasiveness of herpes simplex virus without affecting its ability to replicate. *PNAS*. 96, 8184–8189 (1999).

63. Kawaguchi, Y., Van Sant, C., Roizman, B.: Herpes simplex virus 1 alpha regulatory protein ICP0 interacts with and stabilizes the cell cycle regulator cyclin D3. *J. Virol.* 71, 7328–7336 (1997).
64. Ichimura, T., Yamamura, H., Sasamoto, K., Tominaga, Y., Taoka, M., Kakiuchi, K., Shinkawa, T., Takahashi, N., Shimada, S., Isobe, T.: 14-3-3 proteins modulate the expression of epithelial Na<sup>+</sup> channels by phosphorylation-dependent interaction with Nedd4-2 ubiquitin ligase. *Journal of Biological Chemistry.* 280, 13187–13194 (2005).
65. Kato, A., Hirohata, Y., Arii, J., Kawaguchi, Y.: Phosphorylation of Herpes Simplex Virus 1 dUTPase Upregulated Viral dUTPase Activity To Compensate for Low Cellular dUTPase Activity for Efficient Viral Replication. *J. Virol.* 88, 7776–7785 (2014).
66. Yamamichi, N., Yamamichi-Nishina, M., Mizutani, T., Watanabe, H., Minoguchi, S., Kobayashi, N., Kimura, S., Ito, T., Yahagi, N., Ichinose, M., Omata, M., Iba, H.: The Brm gene suppressed at the post-transcriptional level in various human cell lines is inducible by transient HDAC inhibitor treatment, which exhibits antioncogenic potential. *Oncogene.* 24, 5471–5481 (2005).

67. Haraguchi, T., Ozaki, Y., Iba, H.: Vectors expressing efficient RNA decoys achieve the long-term suppression of specific microRNA activity in mammalian cells. *Nucl. Acids Res.* 37, gkp040–e43 (2009).
68. Tischer, B.K., Einem, von, J., Kaufer, B.: Two-step red-mediated recombination for versatile high-efficiency markerless DNA manipulation in *Escherichia coli*. *Biotechniques*. (2006).
69. Sato, Y., Kato, A., Arii, J., Koyanagi, N., Kozuka-Hata, H., Oyama, M., Kawaguchi, Y.: Ubiquitin-specific protease 9X in host cells interacts with herpes simplex virus 1 ICP0. *J. Vet. Med. Sci.* (2015).
70. Mizushima, S.N.: pEF-BOS, a powerful mammalian expression vector. *Nucl. Acids Res.* 18, 5322 (1990).
71. Boussif, O., Lezoualc'h, F., Zanta, M.A., Mergny, M.D., Scherman, D., Demeneix, B., Behr, J.P.: A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *PNAS.* 92, 7297–7301 (1995).



72. Maruzuru, Y., Shindo, K., Liu, Z., Oyama, M., Kozuka-Hata, H., Arii, J., Kato, A., Kawaguchi, Y.: Role of herpes simplex virus 1 immediate early protein ICP22 in viral nuclear egress. *J. Virol.* 88, 7445–7454 (2014).
73. Kärber, G.: Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. *Archiv f. experiment. Pathol. u. Pharmakol.* 162, 480–483 (1931).
74. Schmittgen, T.D., Livak, K.J.: Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat Protoc.* 3, 1101–1108 (2008).
75. Schulze, H., Dose, M., Korpál, M., Meyer, I., Joseph E Italiano, J., Shivdasani, R.A.: RanBP10 Is a Cytoplasmic Guanine Nucleotide Exchange Factor That Modulates Noncentrosomal Microtubules. *Journal of Biological Chemistry.* 283, 14109–14119 (2008).
76. Dasso, M.: The Ran GTPase: Theme and Variations. *Current Biology.* 12, R502–R508 (2002).
77. Yudin, D., Fainzilber, M.: Ran on tracks – cytoplasmic roles for a nuclear regulator. *Journal of Cell Science.* 122, 587–593 (2009).

78. Harada, N., Yokoyama, T., Yamaji, R., Nakano, Y., Inui, H.: RanBP10 acts as a novel coactivator for the androgen receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 368, 121–125 (2008).
79. Wang, D., Li, Z., Messing, E.M., Wu, G.: Activation of Ras/Erk Pathway by a Novel MET-interacting Protein RanBPM. *Journal of Biological Chemistry*. 277, 36216–36222 (2002).
80. Wang, D., Li, Z., Schoen, S.R., Messing, E.M., Wu, G.: A novel MET-interacting protein shares high sequence similarity with RanBPM, but fails to stimulate MET-induced Ras/Erk signaling. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 313, 320–326 (2004).
81. Kawaguchi, Y., Bruni, R., Roizman, B.: Interaction of herpes simplex virus 1 alpha regulatory protein ICP0 with elongation factor 1delta: ICP0 affects translational machinery. *J. Virol.* 71, 1019–1024 (1997).
82. Jordan, R., Schaffer, P.A.: Activation of gene expression by herpes simplex virus type 1 ICP0 occurs at the level of mRNA synthesis. *J. Virol.* 71, 6850–6862 (1997).

83. Glass, M., Everett, R.D.: Components of Promyelocytic Leukemia Nuclear Bodies (ND10) Act Cooperatively To Repress Herpesvirus Infection. *J. Virol.* 87, 2174–2185 (2013).
84. Kalamvoki, M., Roizman, B.: HSV-1 degrades, stabilizes, requires, or is stung by STING depending on ICP0, the US3 protein kinase, and cell derivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, E611–7 (2014).
85. Rhee, I., Bachman, K.E., Ben Ho Park, Jair, K.-W., Yen, R.-W.C., Schuebel, K.E., Cui, H., Feinberg, A.P., Lengauer, C., Kinzler, K.W., Baylin, S.B., Vogelstein, B.: DNMT1 and DNMT3b cooperate to silence genes in human cancer cells. *Nature.* 416, 552–556 (2002).
86. James, S.R., Link, P.A., Karpf, A.R.: Epigenetic regulation of X-linked cancer/germline antigen genes by DNMT1 and DNMT3b. *Oncogene.* 25, 6975–6985 (2006).
87. Viré, E., Brenner, C., Deplus, R., Blanchon, L., Fraga, M., Didelot, C., Morey, L., Van Eynde, A., Bernard, D., Vanderwinden, J.-M., Bollen, M., Esteller, M., Di Croce, L., de Launoit, Y., Fuks, F.: The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation. *Nature.* 439, 871–874 (2006).

88. Everett, R.D.: Trans activation of transcription by herpes virus products: requirement for two HSV-1 immediate-early polypeptides for maximum activity. *The EMBO Journal*. 3, 3135 (1984).
89. Gelman, I.H., Silverstein, S.: Identification of immediate early genes from herpes simplex virus that transactivate the virus thymidine kinase gene. *PNAS*. 82, 5265–5269 (1985).
90. Quinlan, M.P., Knipe, D.M.: Stimulation of expression of a herpes simplex virus DNA-binding protein by two viral functions. *Molecular and Cellular Biology*. 5, 957–963 (1985).
91. Everett, R.D.: The Products of Herpes Simplex Virus Type 1 (HSV-1) Immediate Early Genes 1, 2 and 3 Can Activate HSV-1 Gene Expression in trans. *Journal of General Virology*. 67, 2507–2513 (1986).
92. Sekulovich, R.E., Leary, K., Sandri-Goldin, R.M.: The herpes simplex virus type 1 alpha protein ICP27 can act as a trans-repressor or a trans-activator in combination with ICP4 and ICP0. *J. Virol.* 62, 4510–4522 (1988).
93. Cohen, P.: The regulation of protein function by multisite phosphorylation – a 25 year update. *Trends in Biochemical Sciences*. 25, 596–601 (2000).

94. Kawaguchi, Y., Kato, K.: Protein kinases conserved in herpesviruses potentially share a function mimicking the cellular protein kinase cdc2. *Rev. Med. Virol.* 13, 331–340 (2003).
95. Kawaguchi, Y., Kato, K., Tanaka, M., Kanamori, M., Nishiyama, Y., Yamanashi, Y.: Conserved protein kinases encoded by herpesviruses and cellular protein kinase cdc2 target the same phosphorylation site in eukaryotic elongation factor 1delta. *J. Virol.* 77, 2359–2368 (2003).
96. Benetti, L., Roizman, B.: Herpes simplex virus protein kinase US3 activates and functionally overlaps protein kinase A to block apoptosis. *PNAS.* 101, 9411–9416 (2004).
97. Norman, K.L., Sarnow, P.: Herpes Simplex Virus is Akt-ing in translational control. *Genes Dev.* 24, 2583–2586 (2010).
98. Everett, R.D., Meredith, M., Orr, A., Cross, A., Kathoria, M., Parkinson, J.: A novel ubiquitin-specific protease is dynamically associated with the PML nuclear domain and binds to a herpesvirus regulatory protein. *The EMBO Journal.* 16, 1519–1530 (1997).

99. Li, M., Chen, D., Shiloh, A., Luo, J., Nikolaev, A.Y., Qin, J., Gu, W.:  
Deubiquitination of p53 by HAUSP is an important pathway for p53  
stabilization. *Nature*. 416, 648–653 (2002).
100. Sowa, M.E., Bennett, E.J., Gygi, S.P., Harper, J.W.: Defining the Human  
Deubiquitinating Enzyme Interaction Landscape. *Cell*. 138, 389–403 (2009).