

論文の内容の要旨

論文題目 単純ヘルペスウイルス1型キャプシドタンパク質VP26の機能解析

氏名 小林 亮介

【背景・目的】 本研究において研究対象としている単純ヘルペスウイルス1型 (HSV-1: Herpes Simplex Virus type 1) は、ヘルペスウイルス科に属し、2本鎖DNAを保持するDNAウイルスである。ヒトに脳炎、性器ヘルペス、皮膚疾患、眼疾患、小児ヘルペスなどの様々な病態を引き起こす。さらに、その治療にかかる医療費は、年間で数千億円に上ることから、医学上非常に重要なウイルスと考えられている。

HSV-1は少なくとも80以上の遺伝子をコードするが、特徴的な点として、培養細胞系におけるウイルス増殖に必須ではない遺伝子;アクセサリ-遺伝子を数多く保持することが挙げられる。アクセサリ-遺伝子の機能は非常に多彩であり、これらの機能解析は、HSV-1の性状や病原性の理解には不可欠である。本研究ではキャプシド構成ウイルスタンパク質の1つである small capsid protein VP26に焦点を当てた。キャプシドはウイルスゲノムを内包、保護するとともに、新たに感染した細胞において、ウイルスゲノムの細胞内への放出に関わる。興味深いことに、VP26は培養細胞系におけるこれらのイベントには必須でなく、アクセサリ-キャプシドタンパク質として知られていた(1)。しかしながら、VP26のHSV-1生活環における具体的な役割の解析が不十分であったため、本研究では、VP26のHSV-1生活環における生物学的意義を解析するべく研究を遂行した。

【第1章：VP26の機能はリン酸化によって制御される】

ヒト免疫不全ウイルス (HIV)、B型肝炎ウイルス (HBV)、C型肝炎ウイルス (HCV)、SARS コロナウイルスにおいては、キャプシドタンパク質がウイルスゲノムの保護といった機能の他にも、ウイルスゲノムの脱殻やキャプシド自身の局在制御に寄与することが報告されている(2-5)。同時に、それらの機能発現には、キャプシドタンパク質自身のリン酸化が寄与することも報告されている(2-5)。しかしながら、HSV-1のキャプシドタンパク質にはそのような報告がこれまで存在しなかった。さらに、興味深いことに、VP26はリン酸化タンパク質であることが報告されていたが、その意義は不明であった。こうした報告から、これまで機能未知であったVP26のHSV-1生活環における役割は、VP26リン酸化の生物学的意義を解析することで解明につながるのではないかと考えた。そこで、第1部では、HSV-1キャプシドタンパク質VP26のリン酸化部位を同定し、VP26の機能にそのリン酸化がどのように貢献するのかを明らかにすることを目的とした。

【結果】

HSV-1 タンパク質のリン酸化部位を同定するために、HSV-1 感染細胞の網羅的リン酸化プロテオーム解析を実施した。まず、HSV-1 を神経芽細胞種 SK-N-SH 細胞に感染させ、感染細胞の lysate を回収し、ペプチド断片化した。ペプチドを二酸化チタン(TiO₂)カラムに通すことで、リン酸化ペプチドが濃縮され、その後、カラムから溶出されたペプチドを高感度質量分析器に供し、HSV-1 感染細胞におけるリン酸化部位を網羅的に同定した(下図)。その結果、SK-N-SH 細胞における HSV-1 のウイルスタンパク質のリン酸化部位として 292 ヶ所のリン酸化部位を同定し、その中から、VP26 の 111 番目のスレオニン(VP26 Thr-111)のリン酸化に着目し機能解析を行った。

MS 解析によって同定された VP26 リン酸化部位である Thr-111 に部位特異的変異を導入した組換えウイルスを作製し、以下の結果を得た。

(i) VP26 Thr-111 を Ala に置換した VP26 リン酸化消失変異体 (VP26T111A) では、ヒト神経芽細胞腫由来の SK-N-SH 細胞においてウイルス増殖が野生体と比較して有意に低下し、さらに、マウス脳炎モデルにおける中枢神経破壊能(神経病原性)も野生体と比較して有意に低下することが明らかとなった。(ii) VP26 欠損変異体(ΔVP26)においても、VP26 リン酸化消失変異体 (VP26T111A) と同程度の SK-N-SH 細胞におけるウイルス増殖およびマウス脳炎モデルにおける神経病原性の低下が認められた。

(iii) VP26 リン酸化消失変異体 (VP26T111A) 感染 SK-N-SH 細胞では VP26 の発現量が野生体と比較して有意に低下し、さらに、プロテアソーム阻害剤である MG132 の添加により VP26 の発現量が有意に回復することが確認された。

(iv) 野生体 HSV-1 感染細胞において、VP26 自身および、VP26 と結合するキャプシドタンパク質である VP5 は、核内で均質に局在する。一方で、VP26 欠損変異体(ΔVP26)および、VP26 リン酸化消失変異体 (VP26T111A)感染細胞では、VP26 および VP5 が、核内で punctate 様の局在を示した。

(v) VP26 Thr-111 を、酸性アミノ酸であるアスパラギン酸に置換した、VP26 恒常的リン酸化模倣変異体 (VP26T111D) では、SK-N-SH 細胞における VP26 発現量やウイルス増殖の低下は限定的であり、VP26 と VP5 の局在変化も認められなかった。さらに、マウス脳炎モデルにおける神経病原性の低下も認められなかった。

【考察】

以上の結果から、VP26 は、SK-N-SH 細胞において、効率的なウイルス増殖や VP26 の安定発現、VP26 および VP5 の適切な局在の制御、さらに、HSV-1 の神経病原性に関与することが明らかとなった。また、本研究において着目した VP26Thr-111 のリン酸化がこれらの機能発現に貢献することも同時に示唆された。

本研究は、これまで機能未知であった VP26 がキャプシドとしてのウイルスタンパク質の保護以外の機能を持つことを明らかとし、さらに、その機能発現には VP26 Thr-111 のリン酸化が寄与することも同時に明らかとした(R.Kobayashi et al, Journal of Virology, 1;89(11):6141-7. 2015)。

【第2章：VP26によるHSV-1キャプシドパッケージングステップへの関与】

本章は近い将来刊行することが期待されるため、インターネットに公表することができません。

【参考文献】

- (1) D. Thomsen et al, *J. Virol.*, 1994; 68:2442–2457.
- (2) C. Cartier et al, *J. Biol. Chem.*, 1999, 274:19434–19440.
- (3) A. Deroubaix et al, *J. Gen. Virol.*, 2015, 96:183–195.
- (4) M. Surjit et al, *J. Virol.*, 2005, 79:11476–11486.
- (5) W. Lu et al, *Virology*, 2002, 300:20-30.