

博士論文(要約)

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

略語一覽

BAC	Bacterial artificial chromosome
BCA	Bicinchoninic acid
BSA	Bovine serum albumin
CS	Carf serum
CVSC	Capsid vertex specific component
DMEM	Dulbecco's modified eagle's
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic acid
EBV	Epstein-Barr virus
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGFP	Enhanced green fluorescent protein
FCS	Fetal calf serum
FP	Fluorescent protein
HBV	Hepatitis B virus
HCMV	Human cytomegalovirus
HCV	Hepatitis C virus
HHV-6A	Human herpesvirus 6A
HHV-6B	Human herpesvirus 6B
HHV-7	Human herpesvirus 7
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HRP	Horseradish peroxidase
HSV-1	Herpes simplex virus type 1
HSV-2	Herpes simplex virus type 2
HVEM	Herpesvirus entry mediator
ICP8	Infected cell protein 8
ICR	Institute of Cancer Research
IPTG	Isopropyl-1-thio- β -galactoside
IR _L	Internal inverted repeat long
IR _S	Internal inverted repeat short
KSHV	Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus

MAG	Myelin-associated glycoprotein
MOI	Multiplicity of infection
RNA	Ribonucleic acid
mRNA	Messenger RNA
NM-IIA	Non-muscle myosin IIA
ORF	Open reading frame
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PFU	Plaque formation unit
PILRa	Paired immunoglobulin-like type 2 receptor α
PRV	Pseudorabies virus
PVDF	Polyvinylidene difluoride
SARS-CoV	Severe acute respiratory syndrome-Coronavirus
TR _L	Terminal repeat long
TR _s	Terminal repeat short
U _L	Unique sequences into long
U _s	Unique sequences into short
VHS	Virion host shut off
VP19c	Virion protein 19c
VP21	Virion protein 21
VP22a	Virion protein 22a
VP23	Virion protein 23
VP24	Virion protein 24
VP26	Virion protein 26
VP5	Virion protein 5
VZV	Varicella Zoster virus

目次

緒言	1-21
本研究の目的	22-23
第1章『VP26の機能はリン酸化によって制御される』	
要旨	25-26
序文	27-28
実験方法	39-41
結果	42-56
考察	57-61
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』	
要旨	63
序文	64
実験方法	65
結果	66
考察	67
総括	68
謝辞	69-70
参考文献	71-78

緒言

ヘルペスウイルス

ヘルペスウイルスは、自然界において、無脊椎動物からヒトに至るまでの広い宿主域を有している。これまでに、ヒトを自然宿主とするヘルペスウイルスは、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 および 7 (HHV-6A, HHV-6B, HHV-7)、およびカポジ肉腫関連ヘルペスウイルス(KSHV) の 9 種類が同定されており、それぞれのウイルスが人に様々な病態を引き起こすことが知られている(37)。

ヘルペスウイルス科は系統発生的に、 α -ヘルペスウイルス亜科、 β -ヘルペスウイルス亜科、 γ -ヘルペスウイルス亜科の3つの亜科に分類される。進化分類上では、 β 、 γ -ヘルペスウイルスは比較的近縁であるが、 α -ヘルペスウイルスは、これらのヘルペスウイルスとは遠い。 α -ヘルペスウイルス亜科は、培養細胞系においては、ウイルス増殖サイクルが比較的短く、細胞間を効率よく伝播し細胞死を引き起こし、生体内においては、知覚神経節に潜伏感染することが特徴となる亜科である。ヒトヘルペスウイルスでは、HSV-1、HSV-2、VZV、が α -ヘルペスウイルス亜科に分類される。 β -ヘルペスウイルス亜科は、培養細胞系におい

では、ウイルス増殖サイクルが長く(7日間以上)感染の進行が遅く、生体内においては、分泌腺やリンパ細網、腎臓などの組織に潜伏感染することが特徴となる亜科である(37)。ヒトヘルペスウイルスでは、HCMV、HHV-6A、HHV-6B、HHV-7が β -ヘルペスウイルス亜科に分類される。 γ -ヘルペスウイルス亜科は、培養細胞系では Latent infection を引き起こし、特定の類上皮細胞や線維芽細胞において Lytic infection を引き起こす。生体内においては、Tリンパ球もしくはBリンパ球に一般的に感染することが特徴となる亜科である。ヒトヘルペスウイルスにおいては EBV、KSHV が γ -ヘルペスウイルスに分類される。本研究においては、 α -ヘルペスウイルス亜科の HSV-1 に焦点を当てた。HSV-1 はヘルペスウイルス科のプロトタイプと言われており、HSV-1 の研究において得られた知見はすべてのヘルペスウイルスにフィードバックできることが期待されるため、本研究において得られる知見は、ヘルペスウイルス学全体においても重要な知見となると考えられる(37)。

単純ヘルペスウイルス(Herpes Simplex Virus:HSV)

HSV は皮膚や粘膜を介して感染し、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し、医学上非常に重要なウイルスである。脳炎は特に重篤な症状を引き起こし、無治療の場合は 70%-90%が死に至り、抗ヘルペスウイルス剤を用いて治療しても 10-20%が死に至る。また、神経軸索を上行し、三叉神経節や脊髄神経節に終生潜伏感染し、その後物理的な刺激、ストレス、発熱紫外線や免疫抑制などの様々な要因で

ウイルスが再活性化するというユニークな特徴を持つため、HSV は非常に興味深いウイルスである(36)。HSV には 2 つの血清型が存在し、その違いから、HSV-1 と HSV-2 に分類される。HSV-1 は主に脳炎や口唇ヘルペス、眼疾患などの上半身における病態の原因とされ、一方で HSV-2 は、性器ヘルペスの原因とされる。しかしながら、性器ヘルペスにおいて、HSV-1 が検出されることもあり、各 HSV とそれぞれの疾患の棲み分けは明確ではないことも報告されている(24, 36)。

HSV には、アシクロビルをはじめとする有効な抗ヘルペスウイルス薬が存在する。特にアシクロビルは、人類が初めて開発した抗ウイルス薬であり、ノーベル賞の受賞対象にもなっている。アシクロビルは核酸アナログであり、HSV がコードするチミジンキナーゼリン酸化され、ウイルス DNA ポリメラーゼによってウイルス DNA に取り込まれる。その結果、ウイルス DNA がそれ以上伸長することが阻害され、ウイルス増殖を阻害する。チミジンキナーゼやウイルス DNA ポリメラーゼは、増殖期の HSV が存在する感染細胞のみに発現しているため、アシクロビルは HSV が潜伏した感染細胞には効果を示さない。HSV は潜伏感染し、終生に亘って再発を繰り返すため、再発の都度、患者は抗ヘルペスウイルス薬を服用する必要があり、臨床上の問題となっている。現在までに、HSV を体内から完全に排除する抗ヘルペスウイルス薬の開発には至っていない。こうした状況から、HSV を完全に体内から排除できるような新たな治療薬、および治療法の開発が望まれており、そのためには、HSV の増殖および潜伏機構の詳細を明らかとする必要がある(18, 36)。

HSV-1 の粒子構造と遺伝子構造

HSV-1 粒子は球状であり、内側から四層の基本構造 i) ウイルスゲノムである直鎖状の二本鎖 DNA を含むコア、ii) 直径約 125nm である正二十面体構造を持つキャプシド、iii) キャプシドの外層に存在するウイルス増殖に必要なタンパク質を豊富に含むテグメント、iv) 宿主由来の脂質二重膜やウイルス糖タンパクからなるエンベロップを有する DNA ウイルスである(37) (図 1A)。ゲノムは、約 150kbp であり、Unique Long (UL) と Unique Short (Us)と呼ばれる 2 つの Unique 配列と、それぞれの領域の両端に一对の反復配列を持つ。UL 領域末端の反復配列は Terminal Repeat Long (TRL)と Internal Inverted Repeat Long (IRL)であり、Us 領域末端の反復配列は Terminal Repeat Short (TRS), Internal Inverted Repeat Short (IRS) である。TRL と TRS の末端には、"a" sequence と呼ばれる、ウイルスゲノムのパッケージングに関与する配列が存在し、IRL と IRS の間には 反転した"a" sequence の反復配列が存在する。HSV-1 はこれらのゲノムに少なくとも 80 以上のウイルスタンパク質をコードする遺伝子を有し、そのうち 40 以上の遺伝子がすべてのヘルペスウイルスに保存されることが知られている(図 1B) (37)。

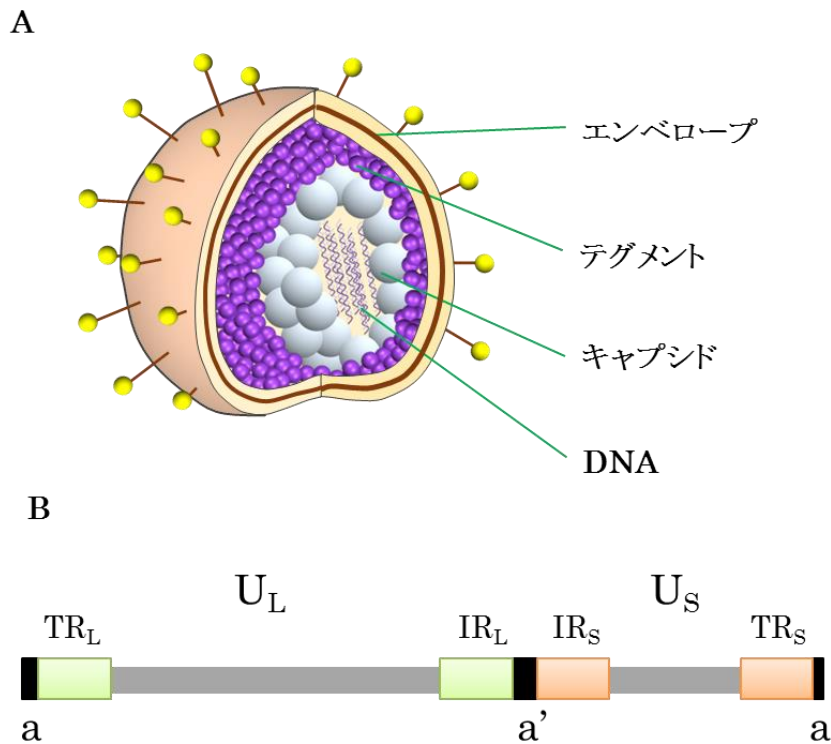


図 1 HSV-1 の粒子構造と遺伝子構造((36)より改変)

(A) HSV-1 のウイルス粒子は、球状であり、内側からウイルス DNA、キャプシド、テグメント、エンベロープの 4 層から構成される。テグメントには、ウイルス増殖に重要なウイルスタンパク質が豊富に含まれている。エンベロープは宿主細胞由来の脂質二重膜であり、多くのウイルス糖タンパク質を有する。(B) HSV-1 は約 150kbp の 2 本鎖 DNA をゲノムとして保持する。その遺伝子構造は、Unique Long (U_L) と Unique Short (U_S) と呼ばれる 2 つの Unique 配列と、それぞれの領域の両端に一对の反復配列を持つ。 U_L 領域末端の反復配列は Terminal Repeat Long (TR_L) と Internal Inverted Repeat Long (IR_L) であり、 U_S 領域末端の反復配列は Terminal Repeat Short (TR_S), Internal Inverted Repeat Short (IR_S) である。 TR_L と TR_S の末端には、“a” sequence と呼ばれる、ウイルスゲノムのパッケージングに関与する配列が存在し、 IR_L と IR_S の間には 反転した “a” sequence の反転配列である “a'” sequence が存在する。

HSV-1 の生活環

HSV-1 は、エンベロープ糖タンパク質と、宿主細胞表面に発現するレセプターとの結合を介して、細胞へ吸着・侵入を開始する(36)。吸着・侵入には、5つのエンベロープ糖タンパク質(glycoprotein B(gB), gC, gD, gH, gL)が関与する。細胞への吸着は、gB および gC と細胞表面のヘパラン硫酸群との結合が重要であり(26, 27)、吸着後、エンベロープと宿主細胞膜が融合するには、gB と NM-IIA (Non-muscle myosin IIA) , PILR α (Paired immunoglobulin-like type 2 receptor α) および MAG との結合や、gD と nectin, 3-O 硫酸化転移酵素で硫酸基が付加されたヘパラン硫酸および、HVEM (herpesvirus entry mediator : 別名 CD258)との結合が重要である(4) (62) (67) (23) (65) (48)。ウイルスキャプシドが細胞内へと侵入する際、テグメントタンパク質である UL41 遺伝子産物である VHS (virion host shut off) や UL48 遺伝子産物である VP16 等も細胞内へと放出される。これらのテグメントタンパク質は、細胞内環境を HSV-1 が増殖するのに適した状態にするために重要な働きを示す。たとえば、VHS は、RNase 活性を有し、宿主タンパク質の mRNA を分解し、宿主タンパク質の合成を阻害することで、感染細胞内においてウイルスタンパク質が優先して発現することを助ける(66)。また、VP16 は核内へと移行し、ウイルスタンパク質の発現に重要な役割を果たす(28)。細胞内に侵入したヌクレオキャプシドは、核膜孔と結合し、ウイルス DNA を核内に注入する。注入されたウイルス DNA は、核内において環状化し、様々なウイルス遺伝子の発現が開始される。HSV-1 が保持する遺伝子は、その発

現時期によって、前初期遺伝子(immediate early, α 遺伝子), 初期遺伝子(early, β 遺伝子), 後期遺伝子(late, γ 遺伝子) の3群に分類され、これらの遺伝子群は前初期、初期、後期遺伝子群の順に発現する。前初期遺伝子には、6つの遺伝子が含まれるが、そのうち5つが遺伝子発現制御因子であり、前初期遺伝子自身、および、初期、後期遺伝子の発現を制御する。初期遺伝子には、DNA ポリメラーゼ複合体や DNA プライマーゼ・ヘリカーゼ複合体などのウイルス DNA の複製に必要なタンパク質や、チミジンキナーゼやリボヌクレオチド還元酵素など、デオキシリボヌクレオチド代謝に関わる酵素群をコードする。初期遺伝子が発現すると、核内に注入されたウイルス DNA の複製が始まる。HSV のウイルス DNA はローリングサイクル型の複製様式であり、ウイルスゲノムが何コピーもつながった、巨大な分子量を持つコンカテマーDNA が形成される。後期遺伝子には、エンベロープ糖タンパク質、テグメントタンパク質、キャプシドタンパク質といったウイルス粒子の構造タンパク質がコードされる(37)。

核内でキャプシドがアセンブリすると、その内部に、コンカテマーDNA から 1 コピー分のウイルス DNA がパッケージングされる。キャプシドへのウイルス DNA のパッケージングは、ウイルス複製の場とされる Replication compartments において行われると考えられている(63) 。その後、キャプシドは核膜を通過し、細胞質へと出芽するが、HSV-1 を含めたヘルペスウイルスでは、ユニークな核膜通過のメカニズムを有している。HSV キャプシドは直径が約 125nm であり、核膜孔のサイズを上回っているため、核膜孔を通過すること

ができない。そのため、キャプシドは核内膜を 1 次エンベロープとして獲得し、核内膜-核外膜間に一度出芽する。その後、核外膜と 1 次エンベロープが融合し、キャプシドが細胞質へと放出される(34, 46)。このような核内から細胞質への輸送機構は、細胞生物学では非常にユニークなものである。その後、キャプシドは細胞質においてテグメントを獲得し、さらに細胞質内の膜オルガネラに出芽することでエンベロープを獲得する。最終的に、エンベロープを獲得した HSV-1 粒子は、エキソサイトーシスを介して細胞外へと放出される(37)。

HSV 生活環の模式図を図 2 に示す。

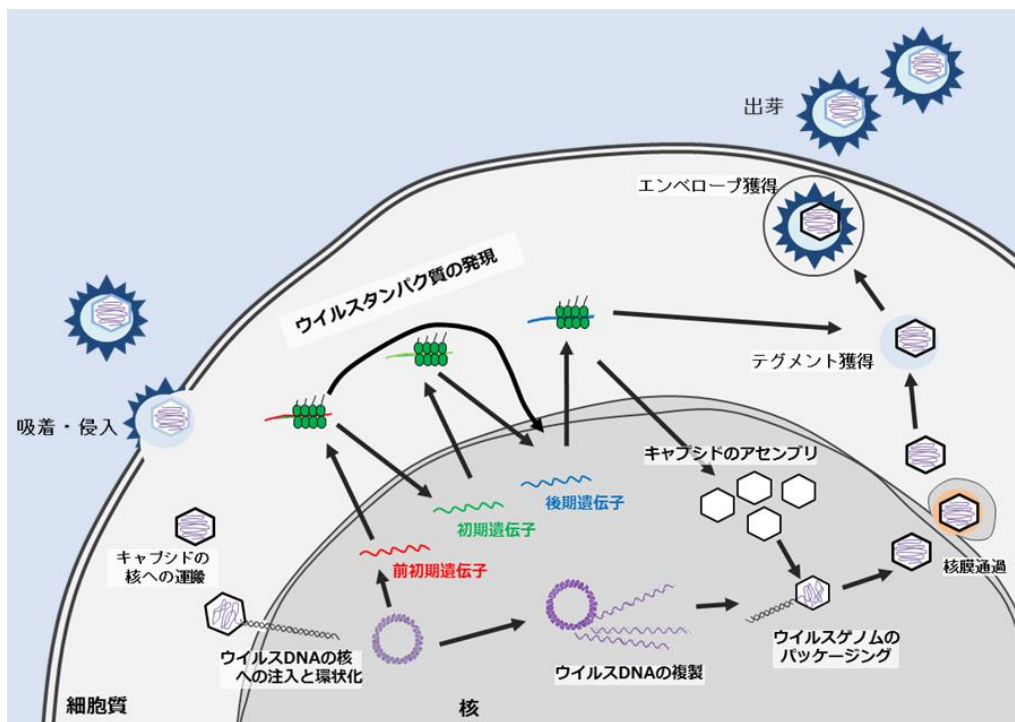


図 2 HSV-1 生活環((36)より改変)

HSV-1 は、宿主細胞のレセプターとエンベロープの糖タンパク質が結合することで吸着・侵入する。その際に、ウイルス粒子中のテグメントタンパク質を細胞内に放出する。その後、キャプシドが核膜孔へ移動し、ウイルス DNA を核内に注入する。ウイルス DNA は核内で環状化し、テグメントから放出された VP16 によって前初期遺伝子群の転写が活性化する。前初期遺伝子は、初期遺伝子群と後期遺伝子群の遺伝子発現を制御する。初期遺伝子群にコードされるウイルスタンパク質によりウイルス DNA が複製され、後期遺伝子群にコードされるウイルスタンパク質によりキャプシドが産生される。その後、コンカテマーDNA がキャプシドへパッケージングされ、ヌクレオキャプシドとなる。ヌクレオキャプシドは核膜を通過し、細胞質においてテグメントタンパク質を獲得する。さらに細胞質内の膜オルガネラに出芽することでエンベロープを獲得する。最終的にウイルス粒子は、エキソサイトーシスを介して細胞外へと放出される。

キャプシドの構造

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、ウイルスゲノムを細胞内に放出する機能を担っている。上述の通り、HSV-1 キャプシドは、約 125nm の正 20 面体構造をした巨大なタンパク質複合体である。すべてのヘルペスウイルスのキャプシドは 162 のカプソメアから構成され、その内訳は 150 個の hexon と 11 個の penton、1 つの Portal である。それぞれのカプソメアは 320 個の Triplex によってキャプシドの内側から連結される。Hexon はキャプシドの正 20 面体構造の平面部に位置し、penton は正 20 面体構造における 12 個ある頂点のうちの 11 個を占める。残ったもう 1 つの頂点は特徴的で、この頂点は Portal と呼ばれ、キャプシドへウイルス DNA がパッケージングされる際や脱殻する際のチャンネルとなる(5) (37)。

HSV-1 のキャプシドはウイルス粒子中と感染細胞中で認められるが、感染細胞においてキャプシドは、プロキャプシド、A キャプシド、B キャプシドおよび C キャプシドの 4 つのタイプに分類される。プロキャプシドは、感染細胞内においてキャプシドがアセンブリした直後のキャプシドであり、他のタイプのキャプシドとは異なり、球状の構造を示す(30)。また、プロキャプシドはキャプシドがアセンブリして間もない状態でないと観察されず、感染細胞内ではほとんど認められない。そのため、プロキャプシドはアセンブリするとすぐに成熟過程に入ると考えられている。これを支持するように、プロキャプシドが成熟過程に進まない protease の温度感受性変異体において、プロキャプシドは容易に観察される(22)。

プロキャプシドが成熟することで、その形態が他の A, B, C キャプシドに変化していくことが知られている。A キャプシドは、キャプシド内部が空洞となっている。これは、ウイルス DNA のパッケージングに失敗した形態であると考えられている。B キャプシドは、キャプシド内部にウイルス DNA ではなく、Scaffold protein を内包している。Scaffold protein はキャプシドがアセンブリする際に裏打ちタンパク質となる。つまり、A および B キャプシドはウイルス DNA を内包していない未成熟なキャプシドである。一方、C キャプシドはウイルス DNA を内包した成熟したキャプシドで、ウイルス粒子中に含まれるキャプシドと同じ構造を示す。キャプシドとウイルス粒子に含まれるキャプシドには、キャプシド表面に CVSC(Capsid Vertex Specific Complex)と呼ばれるタンパク質複合体が結合している。CVSC は A, B キャプシドにもわずかに結合が認められるが、C キャプシドにより多くの CVSC が結合することが知られている(5, 16)。

以降は、キャプシドを構成するキャプシドタンパク質について記述する。また、キャプシドの構造の模式図を図 3 に示す。

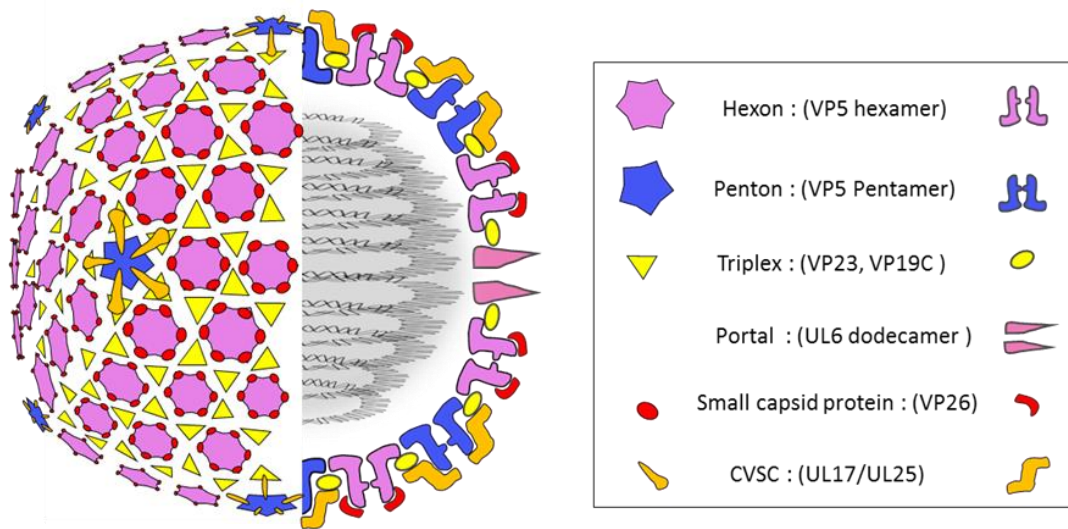


図 3 キャプシドおよび、キャプシドタンパク質の模式図 ((31)より改変)

HSV-1 キャプシドは、直径約 150nm の正 20 面体構造で、162 のカプソメアから構成され、その内訳は 150 個の hexon (VP5 の 6 量体) と 11 個の penton (VP5 の 5 量体)、1 つの portal (UL6 の 12 量体) である。それぞれのカプソメアは 320 個の triplex (VP23×2, VP19C の複合体) によってキャプシドの内側から連結される。hexon はキャプシドの正 20 面体構造の平面部に位置し、penton は正 20 面体構造における 12 個ある頂点のうち 11 個を占める。残ったもう 1 つの頂点は特徴的で、この頂点は portal と呼ばれ、キャプシドへウイルス DNA がパッケージングされる際や脱殻する際のチャンネルとなる。VP26 は、hexon における VP5 の先端部と 1 対 1 で結合する。また penton 周囲には CVSC (UL17, UL25 複合体) と呼ばれる構造体が結合している。

Major capsid protein VP5

キャプシドは、HSV-1 の UL19 にコードされる Major capsid protein VP5 の 6 量体の Hexon と 5 量体の Penton から構成され、Hexon と Penton はそれぞれ 150 個、11 個が 1 つのキャプシドあたりに含まれる。Hexon は正二十面体構造の各平面部位を構成し、Penton はキャプシドの正二十面体構造の 12 個ある頂点のうち、11 つの頂点を構成する。HSV-1 のキャプシドのほとんどは、この VP5 から構成される(53, 77)。

Small capsid protein VP26

VP26 は HSV-1 がコードするキャプシドタンパク質の中で最も分子量の小さい。VP26 は、Hexon の VP5 と 1:1 の割合で結合する。そのため、VP26 は 1 つのキャプシド当たり、900 コピー含まれると考えられている。VP26 はキャプシドタンパク質であるが、後述する HSV-1 のキャプシドのアセンブリには必須ではない。また、VP26 はプロキャプシド上では検出されず、キャプシドが正 20 面体構造を取った後にアセンブリすると考えられている(11, 54, 74, 82, 86)。

Portal protein UL6

キャプシドの正 20 面体構造の 12 点ある頂点うち、11 点は penton から構成されるが、残ったもう 1 つの頂点は特徴的で、portal protein である pUL6 の 12 量体から構成される。この頂点は Portal と呼ばれ、キャプシドへウイルス DNA がパッケージングされる際や脱殻する際のチャンネルとなる。UL6 が 12 量体である Portal ring を形成するには、UL6 にお

ける推定ロイシンジッパードメインが重要であることが報告されている(50-52)。

Triplex proteins VP19c and VP23

Hexon と Penton といったカプソメア同士は 320 コピーの Triplex によって連結されている。Triplex は $\alpha_2\beta$ heterodimer であり、UL18 にコードされる VP23 が 2 コピーと UL38 にコードされる VP19c が 1 コピーから構成される。Cryo 電子顕微鏡を用いた構造解析では、キャプシド中における triplex のわずかな構造の違いから Ta~Tf の 6 種類の Triplex に分類される。それぞれの triplex が規則正しく配置され、カプソメア同士を連結している(29, 53)。

Scaffold proteins VP21, VP22a, VP24, protease

UL26 と UL26.5 遺伝子は重なり合っており、C 末端側を同じ読み枠で共有している。それぞれがキャプシドのアセンブリや成熟過程に必須となる scaffold protein をコードする。UL26 は 635 アミノ酸の前駆体をコードし、N 末端側にプロテアーゼ活性を持つ。さらに、247-248 番目の間と 610-611 番目の間のアミノ酸を自己タンパク質分解することで、N 末端側は protease VP24 となり、248 番目から 610 番目のアミノ酸は scaffold protein VP21 となる。UL26.5 は UL26 の C 末端側の 329 アミノ酸をコードし、pre-VP22a として発現するが、UL26 の前駆体や VP24 の protease 活性により、UL26 の C 末端側の切断部位と同じのアミノ酸を切断されることで VP22a となる。Pre-VP22a,VP22a, および VP21 は、それぞれが、カプソメアの構成因子である VP5 を結合することが知られている。キャプシ

ド内部は、1100 コピー以上の VP22a が含まれ、VP24 と VP21 はそれぞれ 80 コピー以上が含まれることが推定されている(5, 42)。

Minor capsid protein UL17, UL25

UL17 と UL25 はヘテロダイマーを形成し、キャプシドの外層におけるペントン近傍の VP23 と結合する minor capsid protein である。この UL17/UL25 ヘテロダイマーは、キャプシドのペントン近傍、つまり正 20 面体構造の頂点周囲に結合することから、Capsid Vertex Specific Complex (CVSC) と呼ばれる。また、UL17, UL25 は A,B,C キャプシドそれぞれに取り込まれているが、C キャプシドに最も多く取り込まれることが報告されている。CVSC は後述するウイルス DNA キャプシドへのパッケージングにおいて必須であることや、キャプシドの強度を高めるために重要であることが報告されている。さらに、CVSC がキャプシドの核膜通過に関与する UL31/UL34 複合体と相互作用することが、核膜通過に必要であることも報告されている。このように、CVSC はキャプシドタンパク質であるだけでなく、HSV-1 生活環において様々な役割を果たす多機能ウイルスタンパク質である(16, 44, 60, 61, 75, 81, 83)。

DNA パッケージング

ウイルス DNA のキャプシドへのパッケージングステップは、HSV-1 生活環において必須のステップである。また、HSV-1 のウイルス DNA のパッケージングは、複雑に制御されており、核内でアセンブリしたプロキャプシドにウイルス DNA がパッケージングされ、成熟した C キャプシドとなるには、複数のイベントを適切に完了させる必要がある。具体的には、i) キャプシド内部の scaffold protein のタンパク質分解 ii) Terminase complex によるウイルス DNA 末端の認識と切断 iii) Terminase complex によるウイルス DNA のキャプシドへの挿入 といったイベントが必要である。DNA パッケージングに必須であるウイルスタンパク質は、UL6, UL15, UL17, UL25, UL28, UL32, UL33 の 7 つであり、それぞれが、上述の DNA パッケージングにおける各イベントに関与することが報告されている(2, 5, 6, 40, 44, 56, 58, 61, 64, 73)。

以降、上記の各イベントについて詳細に記述する。

i) キャプシド内部の scaffold protein のタンパク質分解

プロキャプシドに含まれていた Protease が活性化し、自身を切断することで protease VP24 と scaffold protein VP21 を生じる。さらに VP21 と VP22a の C 末端側の 25 アミノ酸を切断することで、カプソメアと scaffold protein の連結を解消され、キャプシドの構造が球状から正 20 面体構造に変化する。その後、ウイルス DNA のパッケージングに伴い scaffold protein は崩壊し、キャプシド内から排出されると考えられている(29)。

ii) **Terminase complex** によるウイルス DNA 末端の認識と切断

HSV-1 が保持する Terminase は UL15, UL28, UL33 の 3 つのウイルスタンパク質複合体である(5)。これらのタンパク質は細胞質において複合体を形成し、UL15 が保持する核移行シグナルによって、核内へと移行する。UL15 は canonical Walker box を持つ DNA 依存的 ATPase であり、DNA の切断やプロキャプシドへのウイルス DNA の挿入に関与する。UL28 は、UL15 の binding partner であり、UL 領域の上流に存在する DNA パッケージング配列である “a” sequence に特異的に結合する。UL33 は UL28 に結合し、UL15 と UL28 との結合を促進することが報告されている。Terminase complex は、複製されたウイルスゲノム末端に存在する “a” sequence を認識し切断する。また、詳しいメカニズムは明らかとなっていないが、ウイルス DNA の切断には UL17 や、UL32 も必須であることが報告されている(1, 8, 40, 47, 58, 61, 64, 84)。

iii) **Terminase complex** によるウイルス DNA のキャプシドへの挿入

Terminase complex を形成する 3 つのタンパク質がそれぞれ、Portal と結合することが報告されている。ウイルス DNA と結合した Terminase complex が portal と結合し、ウイルス DNA のプロキャプシドへ挿入が開始される。1 コピー分のゲノムをパッケージングし終えた際に、Terminase が再び “a” sequence を認識し、ウイルス DNA が切断されパッケージング反応が終了すると考えられている。このステップにおいて、UL25 が必須であることが報告されている(5, 7, 44, 80)。

上述のイベントが完了すると、成熟したキャプシドである C キャプシドとなる。一方で、いずれかのパッケージングステップが不完全である場合、未成熟なキャプシドが産生される。キャプシド内部の scaffold protein のタンパク質分解 が正常に完了しなかった場合は、scaffold protein がキャプシド内部に残留した B キャプシドとなる。Terminase complex を構成する UL15, UL28, UL33、ウイルス DNA の切断に必須である UL17 をそれぞれ欠損した HSV-1 変異体感染細胞核内において、ほとんどのキャプシドが B キャプシドとなることが報告されている。このことから、ウイルス DNA 末端の “a” sequence が切断されずに、DNA のパッケージングが開始されなかった場合にも scaffold protein の崩壊が阻害され、B キャプシドが産生されることが考えられる。また、B キャプシドは HSV-1 野生体感染細胞核内において約 20~30%存在することが報告されている(2, 5, 61, 73, 85)。

Scaffold protein の分解が完了した一方で、キャプシドへの DNA のパッケージングが不完全であった場合、キャプシド内部に何も含まれていない A キャプシドとなる。A キャプシドは、HSV-1 野生体感染細胞核内において最も少ないことが知られている(5)。これは、DNA のパッケージングが一度開始されると、高い確率でパッケージングが完了することを示唆している。A キャプシドは、UL25 を欠損した HSV-1 変異体感染細胞において、高頻度で認められることがこれまでに報告されている(44)。この報告は、UL25 が、パッケージング反応の安定性や、ウイルス DNA のパッケージング後のキャプシドの安定性に重要であることを示している(17, 44) 。ウイルス DNA のキャプシドへのパッケージングステップの

模式図を図 4 に示す。また、キャプシドタンパク質、およびウイルス DNA のキャプシドへのパッケージングに関与するウイルスタンパク質の機能について、表 1 にまとめた。

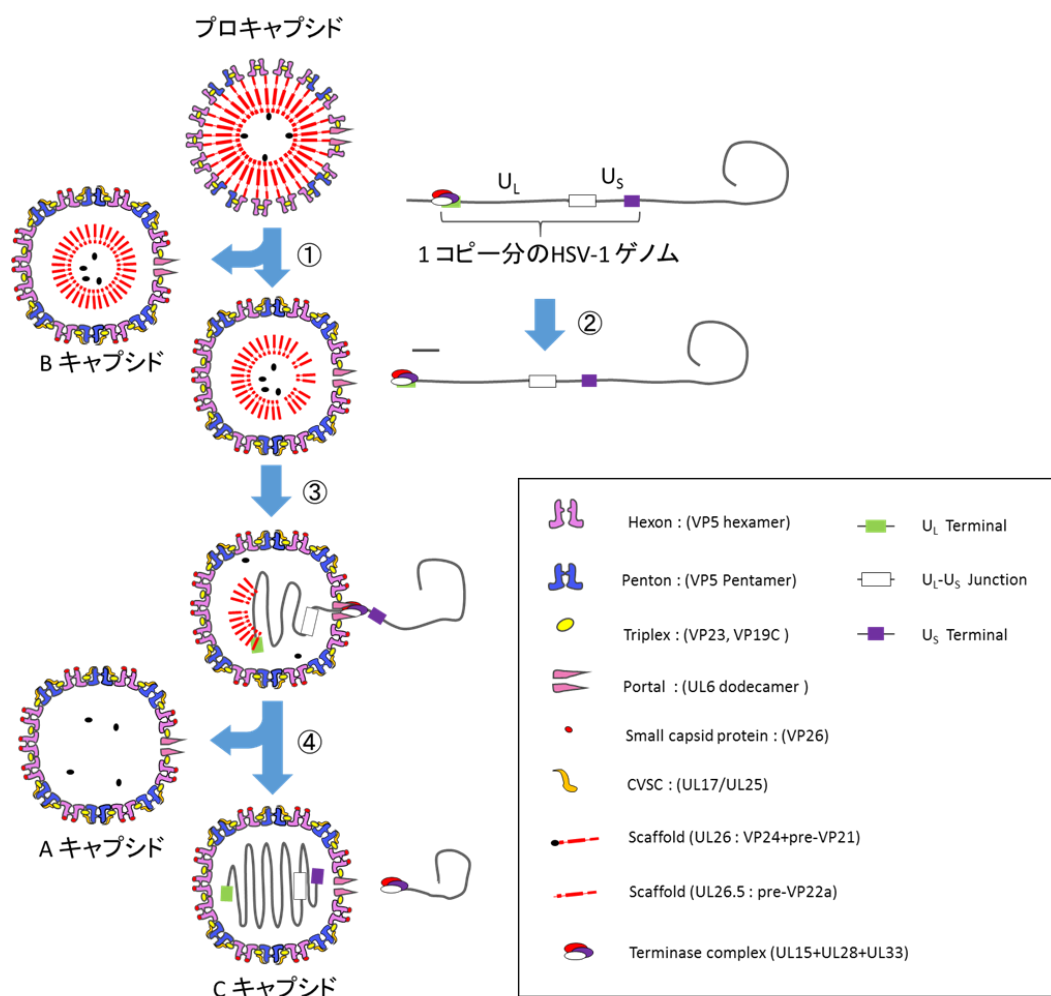


図 4 HSV-1 キャプシド成熟過程の模式図((5)より改変)

HSV-1 キャプシド成熟過程の模式図を示す。① 核内でアセンブリしたプロキャプシドは、scaffold protein 自身の protease 活性により自己分解され、キャプシドの形状が球状から正 20 面体に変化する。② 複製されたウイルス DNA であるコンカテマー DNA に terminase complex が結合し、U_L terminal の”a” sequence を切断する。③ terminase complex が portal に結合し、ウイルス DNA がキャプシドへとパッケージングされる。それに伴い scaffold protein が崩壊し、キャプシド内部から排除される。④ terminase complex により U_S terminal の “a” sequence が切断され、パッケージング反応が終了する。これらのステップが完了することでウイルス DNA がパッケージングされ、成熟したキャプシドである C キャプシドが産生される。scaffold protein のタンパク質分解が正常に完了しなかった場合は、scaffold protein がキャプシド内部に残留した B キャプシドとなる。キャプシドへの DNA のパッケージングが不完全であった場合、キャプシド内部が空洞になった A キャプシドとなる。

表 1 キャプシドタンパク質およびパッケージング関連タンパク質 一覧

遺伝子名	タンパク質名	構造名	機能	参考文献
UL6	UL6	portal	12 量体となり、Portal を形成し、ウイルス DNA がキャプシドへ出入りする際のチャンネルとなる	(51, 52)
UL18	VP23	triplex	2 つ VP23 と 1 つ VP19C との 3 量体で triplex を構成し、hexon や penton といったカプソメア同士を連結する	(53)
UL38	VP19C			
UL19	VP5	major capsid protein	VP5 の 6 量体である hexon、5 量体である penton を形成する	(53, 77)
UL26	VP21, VP24(protease)	scaffold protein, Protease	プロキャプシドにアセンブリ後、自身の protease 活性により scaffold protein VP21 と、protease VP24 に分裂する	(42)
UL26.5	preVP22a, VP22a	scaffold protein	preVP22a としてプロキャプシドにアセンブリした後、VP24(protease) 活性により C 末端が切断され、scaffold protein VP22a となる	(42)
UL35	VP26	small capsid protein	small capsid protein であり、hexon の先端に結合する	(86)
UL17	UL17	CVSC	UL17/UL25 のヘテロダイマーを形成し、キャプシド頂点周囲に結合し CVSC と呼ばれる構造を作る。DNA パッケージングやキャプシドの核膜通過に関与する	(44, 61, 81)
UL25	UL25			
UL15	UL15	terminase complex	UL15, UL28, UL33 が複合体となり、terminase complex を形成する。コンカテマー DNA をキャプシドにパッケージングし、パッケージング後にコンカテマー DNA を切断する	(5)
UL28	UL28			
UL33	UL33			
UL32	UL32		詳しい機能は解明されていないが、ウイルス DNA のパッケージング反応の開始、もしくはウイルス DNA の切断に関与する	(40, 64)

本研究の目的

このように、HSV-1 のキャプシドは、複数のタンパク質複合体であり、そのアセンブリからパッケージングまでのキャプシドの成熟過程には多くのウイルスタンパク質が関与するため、非常に複雑なメカニズムが存在すると考えられる。特に、キャプシドへのウイルス DNA のパッケージングに関しては、試験管内でのパッケージングモデルが構築されておらず、詳しいメカニズムの解明には至っていない。その上、個々のキャプシドタンパク質の機能に関しても、未解明な点が多数残っている。そのため、HSV-1 のキャプシドタンパク質の機能解析や、アセンブリからパッケージングのメカニズムを解明することは、HSV-1 の生活環を理解する上で必要不可欠な要素である。本研究では HSV-1 のキャプシドタンパク質の機能解析とともに、そのメカニズムを解明するべく、研究を遂行することにした。

その中で、本研究ではキャプシドタンパク質 Small capsid protein VP26 に焦点を当てた。VP26 はすべてのヒトヘルペスウイルスに保存され、それぞれのヒトヘルペスウイルスにおいて最も分子量の小さなキャプシドタンパク質である。

興味深いことに VZV, EBV, HCMV, KSHV における VP26 homolog は、ウイルス増殖に必須であり、VZV, EBV, KSHV においては、キャプシドのアセンブリに重要であることが報告されている(12, 14, 25, 57)。その一方で、HSV-1 が保持する VP26 は、キャプシドのアセンブリに必須ではないが(74)、効率的なウイルス増殖やマウス三叉神経節における効率

的なウイルス増殖に関与することが報告されている(20)。このようにキャプシドタンパク質でありながら、HSV-1 のウイルス増殖に対して調節的に働くという点は、ヘルペスウイルスのキャプシドタンパク質においても非常にユニークである。しかしながら、VP26 が具体的に HSV-1 生活環においてどのような役割を果たすのかといった知見は、これまでに全く報告がなかった。そうしたことから、VP26 に着目することで、HSV-1 のウイルス増殖に必須の過程であるキャプシドのアセンブリおよび成熟過程の分子機能の解明への糸口となりうるのではないかと考えられた。そこで、本研究は VP26 の生物学的意義を明らかとし、新たな HSV-1 の生活環に関する知見を得るべく、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

R.Kobayashi et al, Journal of Virology, 1:89(11):6141-7. 2015

要旨

タンパク質のリン酸化は、細胞内における主要な翻訳後修飾の 1 つであり、様々な生命現象の制御に関与する(78)。単純ヘルペスウイルス 1 型(HSV-1)がコードするタンパク質もリン酸化され、その機能が制御される(32)。すべての HSV-1 キャプシドタンパク質はリン酸化されることが知られているが、その生物学的意義は全く不明であった。そこで、本研究では、高感度質量 (MS)解析を駆使したリン酸化プロテオーム解析により得られた HSV-1 感染細胞における網羅的リン酸化情報を基盤とし、キャプシドタンパク質 VP26 Thr-111 のリン酸化現象に注目した。また、VP26 そのものの生物学的意義もほぼ未解明であったことから、VP26 Thr-111 のリン酸化部位特異的変異ウイルスに加え、VP26 欠損ウイルスも用いて、HSV-1 感染における VP26 の生物学的意義の解明も試みた。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)も低下することが明らかとなった。(ii) VP26 欠損変異体でも、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 の発現量が低下することが明らかとなった。(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、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。(iv) 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。以上の結果から、VP26Thr-111 のリン酸化は、SK-N-SH 細胞において、効率的なウイルス増殖や VP26 の発現量、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。本研究は、これまで機能未知であった HSV-1 キャプシドのリン酸化が、ウイルス増殖や病原性に関与しうることを初めて明らかにしたものである。

序文

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、ウイルスゲノムを細胞内に放出する機能を担っている(37)。また、様々なウイルスにおけるキャプシドタンパク質は、感染細胞内において上述した機能の他にウイルス増殖環において重要な役割を担っていることがこれまでに報告されている。具体的な例として、ウイルス遺伝子発現、ウイルスゲノムの複製、ウイルス粒子の運搬や成熟、宿主免疫やアポトーシスの阻害、細胞内シグナリングや細胞周期をコントロールし、効率よくウイルスが増殖するための細胞内環境を整える、といったことが報告されている(3, 10, 55, 70, 79)。

また、様々なウイルスのキャプシドタンパク質がリン酸化されることが広く知られており、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のリン酸化が、キャプシドタンパク質自身の局在制御やウイルス遺伝子の転写制御、ウイルスゲノムの脱殻、核酸シャペロン活性に寄与することが報告されている(13, 15, 19, 21, 38, 43, 69)。

緒言においても述べた通り、HSV-1は7種類のキャプシドタンパク質をコードする。さらに、これらすべてのキャプシドタンパク質はリン酸化タンパク質であることが報告されている(9, 35, 41, 45)。しかしながら、これらのリン酸がウイルス増殖や病原性に寄与するという報告はなく、キャプシドタンパク質のリン酸化の生物学的意義の解明には至ってい

ない。

近年、HSV-1 感染マウスマクロファージ細胞 ;BMA3.1A7 cell における網羅的リン酸化プロテオーム解析が行われ、HSV-1 がコードする 37 個のタンパク質から 90 ヶ所の新規リン酸化部位を同定された(9)。この報告におけるキャプシドタンパク質のリン酸化として、VP26 の 111 番目のスレオニン(VP26 Thr-111), VP19C の 110 番目のスレオニン(VP19C Thr-110)、UL17 の 272 番目のスレオニン(UL17 Thr-272), UL25 の 383 番目のスレオニン(UL25 Thr-383)が含まれていた(9)。さらに、HSV-1 感染ヒト癌細胞; Hep-2 cell においても、網羅的リン酸化プロテオーム解析が実施され、上記のリン酸化部位のうち VP26 の 111 番目のスレオニンのリン酸化のみが同定されている(35)。

そこで、第 1 章においては、ヘルペスウイルスにおけるキャプシドタンパク質のリン酸化がどのような生物学的意義を持つのかを解明する最初のステップとして、VP26 Thr-111 のリン酸化現象に着目し、その生物学的意義を解析すること目的とした。

実験方法

細胞とウイルス

野生型ウイルスとして HSV-1(F)株を使用した。Vero 細胞(African green monkey kidney)は Dulbecco's modified Eagle's 培地(DMEM) に 5% Carf serum (CS)、100units/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。ヒト神経芽細胞腫由来である SK-N-SH 細胞、およびヒト表皮角化細胞由来である HaCaT 細胞は DMEM に 10% fatal carf serum(FCS)、100unit/ml ペニシリン、100µg/ml ストレプトマイシンを添加した培地で培養した。Rabbit skin cell は、DMEM に 5% fatal carf serum(FCS)、100unit/ml ペニシリン、100µg/ml ストレプトマイシンを添加した培地で培養した。CS 及び FCS は 56°C、30 分間の非働化後に使用した。Vero 細胞、SK-N-SH 細胞におけるウイルス増殖には 199V 培地に 1% FCS、100units/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を使用した。ウイルス力価は、Vero 細胞における PFU (Plaque forming units) で表記する。MOI (Multiplicity of infection) は、PFU/Cells の値を示した。

プラスミド

pBS-VP26 は、pYEbac102 より PCR にて、VP26 ORF の上流 1000bp から VP26 ORF の下流 691bp を表 2. に示したオリゴを用いて、PCR で増幅し、pBluescriptII KS (+) の *NotI* および *HindIII* サイトに挿入した。PCR の増幅には Tks Gflex™ DNA Polymerase

(TaKaRa)、ライゲーションには T4 DNA Ligase (TaKaRa) を使用した。pBS-VP26-kpnI は、pBS-VP26 に PCR-based site directed mutagenesis (59) により、表 2 に示したオリゴを用いて、1st PCR を行い、得られた 2 つの PCR 産物を混合したものをテンプレートとして、2nd PCR を行った。PCR 産物を Blue Script II KS (+) の *NotI* および *HindIII* サイトに挿入し、VP26 の 330 番目の G を T に置換し、アミノ酸の置換を伴わない形で *kpnI* サイトを導入した。pBS-VP26T111A および pBS-VP26T111D も同様の方法で pBS-VP26 に、表 2. に示したオリゴを用いて、VP26 の Thr-111 をアラニンおよびアスパラギン酸に置換する変異を導入した。

表 2 第 1 章における Plasmid 作製に使用したオリゴ

Plasmid		sequence	
pBS-VP26		5'-ATTGCGGCCGCTTACGCGGGCACGCACGCTC-3' 5'-GCCAAGCTTTGTAGCACCCGGGGAGTATC-3'	
PCR-based site-directed mutagenesis	1st PCR	pBS-VP26-kpnI	5'-ATTGCGGCCGCTTACGCGGGCACGCACGCTC-3'
			5'-ACTCCCTGGGCCTCACGGGTACCGGGCGTGAAGTTCTC-3'
		pBS-VP26T111A	5'-GAGAACCTTCGACGCCCGGTACCCCGTGAGGCCAGGGAGT-3'
			5'-GCCAAGCTTTGTAGCACCCGGGGAGTATC-3'
		pBS-VP26T111D	5'-ATTGCGGCCGCTTACGCGGGCACGCACGCTC-3'
			5'-AACTCCCTGGGCCTCACGGATCCCGGGCGTGAAGTTCTC-3'
	2nd PCR	5'-GAGAACCTTCGACGCCCGGGATCCGTGAGGCCAGGGAGTT-3'	
		5'-GCCAAGCTTTGTAGCACCCGGGGAGTATC-3'	

ウイルスゲノムの抽出

Vero 細胞をローラーボトルで培養しウイルスを MOI 0.01 で感染させた。37°C で 1 時間吸着後、培養液を交換して 34°C で 2 日間培養後、感染細胞を回収した。Phosphate buffer saline (PBS: 0.14M NaCl, 2.7mM KCl, 1mM Na₂HPO₄, 1.4mM KH₂PO₄) で洗浄後、10ml の NaCl/Tris/MgCl₂ (150mM NaCl, 10mM Tris (pH7.4), 1.5mM MgCl₂) と Nonidet P-40 (NP-40) (終濃度 0.1%) に溶解した。5,000rpm、5 分間、4°C で遠心後、上清に 0.2% SDS、0.5mM EDTA 50mM β-メルカプトエタノールを添加し、フェノール-クロロホルム溶液でタンパク質を除去した。その後、エタノール沈殿で DNA を回収し、TE (10mM Tris pH8.0, 5mM EDTA) に溶解した。この溶液を 5-20% 酢酸カリウム密度勾配に重層して、27000rpm、16 時間、20°C で超遠心処理をおこなった。その後、エタノール沈殿でウイルス DNA を回収した。

組換えウイルスの作製

組換えウイルスである VP26 欠損ウイルス YK490(ΔVP26) を作製するため、野生体である HSV-1(F) のウイルスゲノムに Bacterial artificial chromosome (BAC) をクローニングした pYEBac102 (71) を保持した大腸菌である GS1783 において、5'-ACCTCCGGTCCCG ATGGCCGTCCCGCAATTTACCGCCCCAGGATGACGACGATAAGTAGGG-3' と 5'-CTGGGCCTCACGGGGTCCCGGGCGTCGAAGGTTCTCGAACCAACCAATTAACCAAT

TCTGATTAG-3' のオリゴを用いてPCRで増幅し、Two-step Red-mediated mutagenesis 法(76)により、VP26 の 28 - 308 番目の塩基領域を欠損したBacmidである Δ VP26-BACを作製し、リン酸カルシウム法を用いてRSC(Rabbit skin cell)へ導入した。なお、VP26 の欠損領域は過去の報告に従った(20)。さらに、UL3 とUL4 の間にEGFP発現カセットを保持し、かつVP26 を欠損した組換えウイルスである組換えウイルスであるVP26 欠損ウイルス(Δ VP26/EGFP virus)を作製するため、YK490(Δ VP26)とUL3 とUL4 の間にEGFP発現カセットを保持した組換えHSV-1 であるYK333(72)をVero細胞にMOI 10 で共感染させ、得られた培養上清中のウイルスをVero細胞に感染させて1% SeaPlaque を用いてプラークを形成した後に、plaque pickにより純化した。Plaque pickによる純化を3回行った後に、蛍光顕微鏡による解析とシーケンス解析によって、EGFPの発現とVP26 の欠損を確認した。VP26 Thr-111 のリン酸化を特異的に消失させた組換えウイルスであるYK492(VP26T111A/EGFP virus)を作製するため、VP26 欠損ウイルスであるYK491 (Δ VP26/EGFP virus)のgenome DNA 3 μ gとpBS-VP26T111A 12 μ gをリン酸カルシウム法により、RSCにco-transfectionし得られたウイルス集団より、作製した。方法は上述の通りである。RSCを培養ボトルにまいた2時間後に、精製した Δ VP26 欠損ウイルスYK491(Δ VP26/EGFP virus)のウイルスゲノム 3 μ gをpBS-VP26T111A 12 μ gトランスフェクションの3日後、プラークが形成されたことを確認しウイルスを回収した。以降は Δ VP26/EGFP virusの作製と同様の手順により作製した。VP26 を野生型と同様に復帰させたウイルスであ

るYK493(VP26 Δ /TA-Repair virus), 及びVP26 のリン酸化を模倣する変異体ウイルスであるYK494(VP26T111D virus)も同様の手法で作製した。その際に用いたウイルスゲノムはVP26 リン酸化消失変異ウイルスYK492 (VP26T111A virus)である。また、トランスフェクターはそれぞれpBS-VP26-kpnI, pBS-VP26T111Dを用いた。第1章において作製した各遺伝子組換えHSV-1を図5に示した。

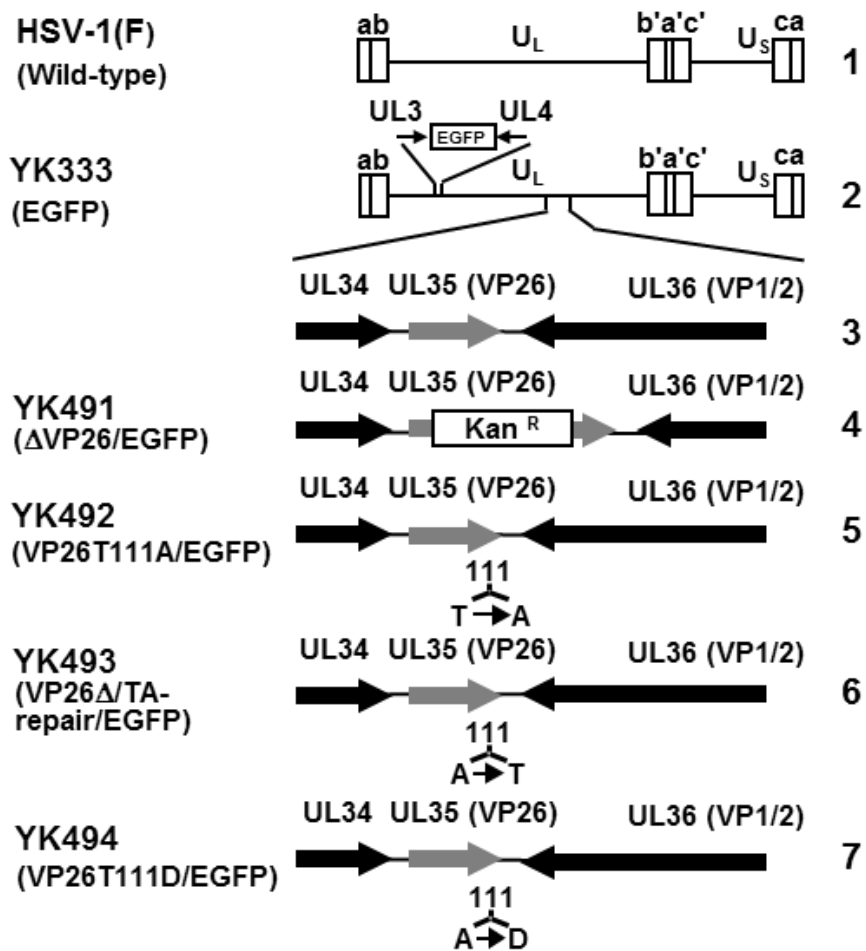


図 5 作製した遺伝子組換えウイルス

(Line1) 野生体 HSV-1(F)のゲノム構造を示している。(Line 2) UL3-UL4 間に EGFP 発現カセットを挿入した YK333 を示している。(Line 3) UL34, UL35(VP26), UL36(VP1/2)の ORF 領域を示した。(Line 4-7) 作製した UL35(VP26)遺伝子組換えウイルスの遺伝子構造を示した。

抗体

anti-UL35(VP26) rabbit polyclonal antibody は過去に報告されたものを使用した(68)。

anti-UL19(VP5) mouse monoclonal antibody(3B6)は Virusys より購入した。 anti- α -tubulin mouse monoclonal antibody (DM1A) は Sigma-Aldrich より購入した。

ウイルス力価の測定(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 細胞に感染させ、1 時間ウイルスを吸着させた後、ヒト γ -グロブリン(Sigma)を含む 199V 培地に置換し、37°Cで 2 日間培養した。その後、細胞をメタノールにより固定し、クリスタルバイオレットで染色し、プラーク数を測定しウイルス力価 (PFU/mL) を算出した。

MG132 処理

199V 培地に希釈したウイルスを 1.0×10^6 個の SK-N-SH 細胞に MOI 5 で感染させ、37°Cで 1 時間吸着した後に 1mL の 199V 培地に置換した。その後、37°Cにて培養し、感染後 6 時間に DMSO を溶媒とした 20mM MG132(Sigma)を終濃度 20 μ M もしくは、DMSO を終濃度 0.1%となるように加え、さらに 37°Cで 18 時間培養した。その後細胞を回収し、ウエスタンブロッティング解析に供した。

子孫ウイルス産生量の測定

199V 培地に希釈したウイルスを 1.0×10^6 個の SK-N-SH 細胞に MOI 5 もしくは MOI 0.01 で感染させ、37°Cにて1時間吸着させた後に、1mL の 199V 培地に置換した。さらに 37°Cで培養し、感染後 24 時間 (MOI 5)、もしくは 48 時間(MOI 0.01)で細胞を回収し、3 回凍結融解を繰り返し、ウイルス力価を Vero 細胞にて測定した。

免疫蛍光抗体法

予めコラーゲン(機能性ペプチド研究所)コートした 35mm ガラスボトムディッシュ (Matsunami)に SK-N-SH 細胞を培養し、ウイルスを MOI 5 で感染させ、37°Cにて1時間吸着させた後に 199V 培地で置換した。さらに 37°Cにて培養し、感染後 12 時間後に 4% paraformaldehyde を含む PBS で 10 分間固定した。PBS で洗浄後、0.1% Triton X-100 を含む PBS で 15 分間透過処理した。PBS で洗浄後 3% BSA (Wako), および 10% CS を含む PBS で 1 時間ブロッキングした。ブロッキング液で希釈した各抗体で一次抗体として 4°C において一晩反応させた。PBS で洗浄後、2 次抗体として 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、Nikon A1 蛍光顕微鏡で観察した。

ウェスタンブロッティング

回収したタンパク質サンプルは SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離した。電気泳動後のゲルは、トランスファーバッファー(Tris (hydroxymethyl) aminomethane 12.1g、Glycine 14.4g、Methanol 200ml、H₂O 800ml)に浸し、PVDF (Millipore) と共に濾紙に挟み、セミドライトランスファー装置 (ATTO)で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0.1% Tween20を含むPBS により希釈した5%スキムミルクで室温、1時間ブロッキングし、1% BSA を含む PBS-T で希釈した1次抗体と室温で4℃にて一晩反応させた。その後、PBS-T で洗浄し、3%スキムミルクを含む PBS-T で希釈した2次抗体 anti-mouse IgG-Horseradish peroxidase (HRP)、anti-rabbit IgG-HRP (GE Healthcare)、anti-goat IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology)と室温で1時間反応させた。その後、PBS-T で洗浄し、Enhanced Chemiluminescence (GE Healthcare)を用いて反応させ、ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare)で検出した。免疫ブロットバンドの定量は、ImageQuant LAS 4000 system with ImageQuant TL7.0 analysis software (GE Healthcare Life Science) によって解析した。

質量分析計によるリン酸化プロテオーム解析

HSV-1(F) を感染させた HaCaT 細胞の培養上清ウイルスをリン酸化プロテオーム解析に用いた。SK-N-SH 細胞に HSV-1(F)を MOI 5 で感染させ、1時間吸着させ、新たな199V

培地に置換した。18 時間後に感染細胞を回収し、質量解析用溶解バッファー(500mM Tris-HCl pH 8.2、8M Urea、Benzonase (Novagen)、PhosSTOP Phosphatase inhibitor cocktail (Roche Diagnostics) に溶解させ氷上に 1 時間静置した。その後、15,000rpm 30 分間遠心し、上清中の可溶化されたタンパク質量を BCA Protein Assay Kit (Thermo scientific) によって測定した。可溶化したタンパク質 1300 μ g に 100mM DTT を終濃度 1mM になるように加え 37 $^{\circ}$ C で 90 分静置し、ヨード酢酸を終濃度 5.5mM になるように加え 37 $^{\circ}$ C で 30 分間反応させた。その後、Lysyl Endopeptidase (Wako) を 1/50 量加え、37 $^{\circ}$ C で 3 時間処理し、その結果得られたペプチド混合物の Urea 濃度を 2M 以下にするため、10mM Tris-HCl (pH8.2) により 4 倍希釈し、1/50 量の trypsin (Sequencing grade、Promega) を加え 37 $^{\circ}$ C で 3 時間反応させた。その後、等量の trypsin を再び加え一晩処理した。回収したペプチドから Titansphere Phos-Tio Kit (GL Sciences) を用いて、リン酸化ペプチドを濃縮した。リン酸化ペプチドの濃縮のプロトコルは製品取扱説明書に従った。簡単に述べると、平衡化したカラムに回収したペプチドと 2-hydroxypropanoic acid を含んだバッファーとともに注ぎ、遠心した。カラム上で濃縮したリン酸化ペプチドは、5% アンモニア水溶液と 5% ピロリジン水溶液を用いて 2 度溶出し、それぞれ ZipTip C18 (Millipore) によって脱塩処理し、減圧濃縮器によって濃縮した。

回収したリン酸化ペプチドのショットガンプロテオミクス解析を Linear ion trap-orbitrap mass spectrometer (LTQ-Orbitrap Velos、Thermo Fisher Scientific)、nanoflow

LC system (Dina-2A, KYA Technologies) を用いて実施した。LC-MS/MS により得られたペプチドは National Center for Biotechnology Information (NCBI) ヒトタンパク質データベース (68,711 protein sequences)、HSV-1(F) のコンプライートゲノムシーケンス (GenBank accession number GU734771) をベースにしたウイルスタンパク質データベース (74 protein sequences) に照らし合わせ、Mascot アルゴリズム (Matrix Science) を用いて解析した。パラメーターには、variable modifications : methionine oxidation, protein N-terminal acetylation, pyro-glutamination for N-terminal glutamine and phosphorylation (Ser, Thr, and Tyr); fixed modifications : carbamidomethylation of cysteine residues; maximum missed cleavages, 2; peptide mass tolerance, 3 ppm; and MS/MS tolerance, 0.8 Da を使用した。ペプチド同定の基準は FDR < 0.01 とした。リン酸化部位の同定には、software program Proteome Discoverer, version 1.3 (Thermo Fisher Scientific) を用いた。

動物試験

3 週齢のメス ICR マウス (Charles river) の頭蓋内に 500PFU/50 μ L となるように希釈したウイルスを 50 μ L 二段針 (トップ) を用いて接種し、その後 14 日間のマウスの生死を観察した。すべての動物実験は、日本学術会議の「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」に従って行った。また、実験方法については、東京大学医科学研究所の動物実験委員会プロトコル番号 19-26 を採用した。

統計処理

エラーバーは各 n 数における標準誤差を示した。また、有意差に関しては、2 群間の検定は student's *t* test、多群間の検定は Tukey's test、生存曲線の検定は Log rank test を用いた。また、生存曲線における多群間の検定では、第一種過誤による擬陽性の検出を防ぐため、Bonferroni 法による P Value の補正を行った。

結果

ヒト神経芽細胞種 SK-N-SH 細胞における VP26 Thr-111 リン酸化の確認

本研究では、VP26 の 111 番目のスレオニン(VP26 Thr-111)のリン酸化の *in vitro*, *in vivo* 双方における生物学的意義を解析するため、ヒト神経芽細胞種 SK-N-SH cell を用いて解析を行った。まずは、BMA3.1A7 cells および Hep-2 cells において同定されている VP26 Thr-111 のリン酸化が、SK-N-SH 細胞においても検出されるかを検討した。野生体 HSV-1(F)を MOI 5 で感染させた SK-N-SH 細胞を感染後 18 時間において回収し、lysate をトリプシン処理によりペプチド断片化したのちに、二酸化チタンカラムを通すことで、リン酸化ペプチドを濃縮した。その後、サンプルを高感度質量解析に供した。この解析により、VP26 のペプチド断片を検出し、さらに Thr-111 のリン酸化も検出された。この結果から、VP26 Thr-111 は SK-N-SH 感染細胞においてもリン酸化されることが明らかとなった。

VP26Thr-111 のリン酸化は、培養細胞系における効率的なウイルス増殖および細胞間伝播

に寄与する

VP26 Thr-111 のリン酸化が培養細胞系における HSV-1 のウイルス増殖に寄与するかを検証するため、VP26 欠損変異体である YK491(Δ VP26/EGFP)、VP26Thr-111 を Alanine に置換することで、この部位におけるリン酸化を特異的に消失させた変異体である YK492(VP26T111A/EGFP)、その復帰株である YK493(VP26 Δ /TA-Repair/EGFP)、および VP26Thr-111 を酸性アミノ酸である Asparagic acid に置換することで、この部位におけるリン酸化を恒常的に模倣する変異体である YK494(VP26T111D/EGFP)を作製した(図 5)。

野生体 HSV-1(F), YK491(Δ VP26/EGFP), YK492(VP26T111A/EGFP), YK493(VP26 Δ /TA-Repair/EGFP), YK494(VP26T111D/EGFP) を SK-N-SH 細胞に MOI 0.01 もしくは MOI 5 で感染させ、感染後 24 時間におけるウイルス力価を測定した。その結果、MOI 0.01 で感染させた際は、図 6 に示したように、YK491(Δ VP26/EGFP)感染 SK-N-SH 細胞におけるウイルス力価は、野生体 HSV-1(F) 感染細胞と比較して 6.2 倍低いことが明らかとなった(図 6A)。一方、YK493(VP26 Δ /TA-Repair/EGFP)感染 SK-N-SH 細胞においては、ウイルス力価が野生体 HSV-1(F) 感染 SK-N-SH 細胞と同水準まで回復することが確認された(図 5A)。同様に、YK492(VP26T111A/EGFP)感染 SK-N-SH 細胞におけるウイルス力価は野生体 HSV-1(F) 感染 SK-N-SH 細胞と比較して、7.1 倍低下した(図 6A)。つまり、VP26 T111A 変異により、HSV-1 のウイルス増殖能を VP26 欠損変異体と同水準まで低下させることが明

らかとなった。さらに、注目すべきことに、YK494(VP26T111D/EGFP)感染 SK-N-SH 細胞におけるウイルス力価は、YK492(VP26T111A/EGFP)感染 SK-N-SH 細胞と比較して 2.9 倍高く、野生体 HSV-1(F) 感染 SK-N-SH 細胞におけるウイルス力価と比較すると 2.5 倍低いことが明らかとなった(図 6A)。この結果は、VP26Thr-111 におけるリン酸化を模倣する VP26T111D 変異により、このリン酸化を阻害する VP26T111A 変異により低下したウイルス増殖能を一部回復したことを示している。よって、VP26Thr-111 のリン酸化 SK-N-SH 細胞における効率的なウイルス増殖に重要であることが示唆された。MOI 5 における SK-N-SH 細胞への感染実験においても同様の結果が得られた(図 6B)。

さらに、SK-N-SH 細胞におけるプラーク形成能についても同様に検証した。YK333(EGFP), YK491(Δ VP26/EGFP), YK492(VP26T111A/EGFP), YK493(VP26 Δ /TA-Repair/EGFP), YK494(VP26T111D/EGFP) を SK-N-SH 細胞に MOI 0.00001 で感染させ、プラークアッセイと同様の条件下である感染後 48 時間におけるプラークサイズを測定した。図 5A, B で示した各ウイルスのウイルス増殖能と同様に、YK491(Δ VP26/EGFP), YK492(VP26T111A/EGFP) のプラークサイズは、YK333(EGFP), YK493(VP26 Δ /TA-Repair/EGFP) と比較して縮小することが明らかとなった(図 6C)。さらに、YK494(VP26T111D/EGFP)におけるプラークサイズは YK333(EGFP), YK493(VP26 Δ /TA-Repair/EGFP)と同水準の大きさまで回復することが明らかとなった。これらの結果は、VP26 Thr-111 のリン酸化は SK-N-SH 細胞における HSV-1 の効率的なウイルス増殖と細

胞間伝播に寄与することを示唆している。

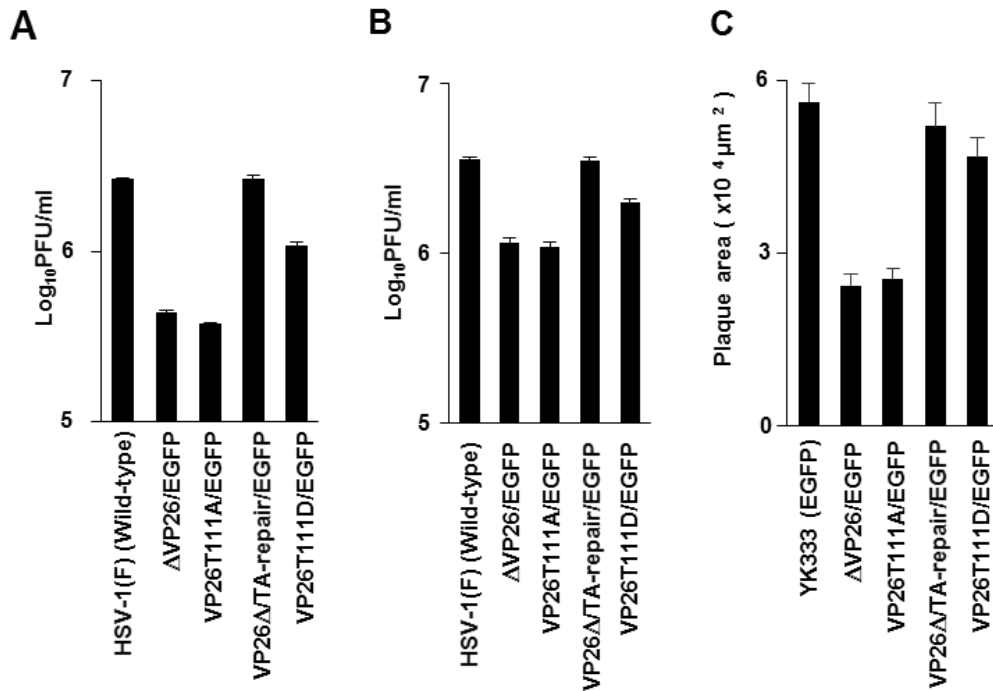


図 6 SK-N-SH 細胞における各組換えウイルスの子孫ウイルスの産生量と、プラークサイズ
 (A,B) SK-N-SH 細胞に示した組換えウイルスを MOI 0.01(A)もしくは MOI 5(B) で感染させ、感染後 48 時間(A) もしくは 24 時間(B)におけるウイルス力価を測定した。(C) SK-N-SH 細胞に、示した組換えウイルスを MOI 0.00001 感染させ、感染後 48 時間におけるプラークサイズ(面積)を測定した。 エラーバーは、Triplicate で行った実験の標準誤差を示している。

VP26 Thr-111 のリン酸化は、HSV-1 の病原性に関与する

VP26 Thr-111 のリン酸化が HSV-1 の病原性に関与するかを検証するため、3 週齢メスのマウスの頭蓋内に 500PFU の YK491(Δ VP26/EGFP), YK492(VP26T111A/EGFP), YK493(VP26 Δ /TA-Repair/EGFP), YK494(VP26T111D/EGFP)をそれぞれ接種し、マウスの生存率を 14 日間観察した。図 7 に示したように、YK491(Δ VP26/EGFP), YK492(VP26T111A/EGFP) 感染マウスの生存率は、YK493(VP26 Δ /TA-Repair/EGFP) 感染マウスよりも有意に高いことが明らかとなった。興味深いことに、YK492(VP26T111A/EGFP) 感染マウスの生存率は、YK491(Δ VP26/EGFP) 感染マウスと同水準だった。さらに、YK494(VP26T111D/EGFP) 感染マウスの生存率は、YK492(VP26T111A/EGFP)感染マウスと比較して有意に低いことが明らかとなった。これらの結果は、VP26 および、VP26 Thr-111 のリン酸化がマウス脳内における病原性、つまり神経病原性に重要であることを示唆している。

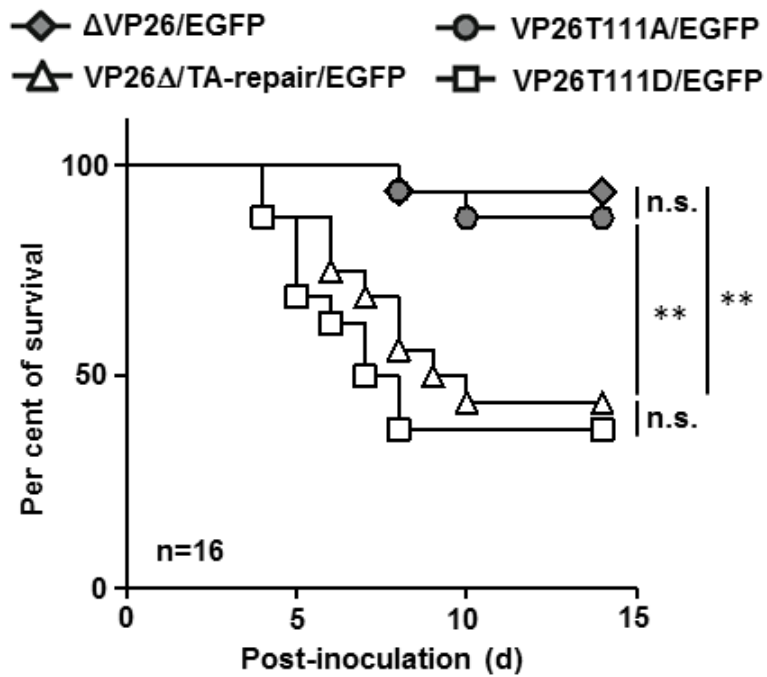


図 7 各組換えウイルスのマウス脳内接種による生存曲線

3 週齢のメス ICR マウス 16 匹に、各組換えウイルスを 500PFU にて感染させ、14 日間生死を観察した。統計処理は、Log-rank test を行い、統計学的な有意差は、** で示した。P value は、Bonferroni 法による補正を行った値を示しており、** は、 $P < 0.0083 (0.05/6)$ を示している。n.s.: not statistically significant

VP26 Thr-111 のリン酸化は、VP26 の効率的な発現に寄与する

VP26 Thr-111 のリン酸化が HSV-1 のウイルス増殖に与える影響をさらに解明するためには、HSV-1 感染 SK-N-SH 細胞における VP26 のタンパク質発現レベルを検証した。SK-N-SH 細胞に、野生体 HSV-1(F), YK491(Δ VP26/EGFP), YK492(VP26T111A/EGFP), YK493(VP26 Δ /TA-Repair/EGFP), YK494(VP26T111D/EGFP)を MOI 5 で感染させ、感染後 24 時間で細胞を回収し、ウエスタンブロッティングにより VP26 の発現レベルを確認した。得られた VP26 のバンドを定量した結果、図 8 に示したように、YK492(VP26T111A/EGFP)感染細胞における VP26 発現量は、野生体 HSV-1(F) や YK493(VP26 Δ /TA-Repair/EGFP)と比較して有意に減少することが明らかとなった(図 8A,B)。また、YK494(VP26T111D/EGFP)感染細胞における VP26 の発現量は、YK492(VP26T111A/EGFP)と比較して有意に増加する一方、野生体 HSV-1(F) や YK493(VP26 Δ /TA-Repair/EGFP)と比較すると有意に減少することが明らかとなった(図 8C, D)。これらの結果は、VP26 T111A 変異によって低下する VP26 の発現量は、VP26 T111D 変異によって一部回復することを示唆している。

次に、プロテアソーム阻害剤である MG132 が VP26 の細胞内における蓄積量にどのような影響を及ぼすかを調べるため、野生体 HSV-1(F), YK492(VP26T111A/EGFP)を MOI 5 で感染させ、感染後 6 時間に dimethyl sulfoxide (DMSO) (Final 0.1%)もしくは MG132(Final 20mM)を添加し、18 時間培養した後、細胞を回収しウエスタンブロッティングにより VP26

を検証した。得られた VP26 のバンドを定量した結果、図 8E に示した通り、YK492(VP26T111A/EGFP)感染細胞に DMSO 処理した際の VP26 の発現レベルは、野生体 HSV-1(F)感染細胞と比較して減少した(図 8E,F)。一方、YK492(VP26T111A/EGFP)感染細胞に MG132 処理することで、VP26 の発現量が DMSO 処理と比較して有意に上昇することが明らかとなった(図 8E,F)。しかしながら、野生体 HSV-1(F)感染細胞に MG132 処理をした際の VP26 の発現量と比較すると、完全には回復することが認められなかった。これらの結果は、VP26 Thr-111 のリン酸化は VP26 の感染細胞内における適切な量の蓄積に寄与するとともに、一部の VP26 が受けるプロテアソーム依存的な分解を阻害することにも関与することが明らかとなった。しかし、プロテアソーム依存的な VP26 の分解が、直接的であるのか間接的であるかは、明らかとなっていない。

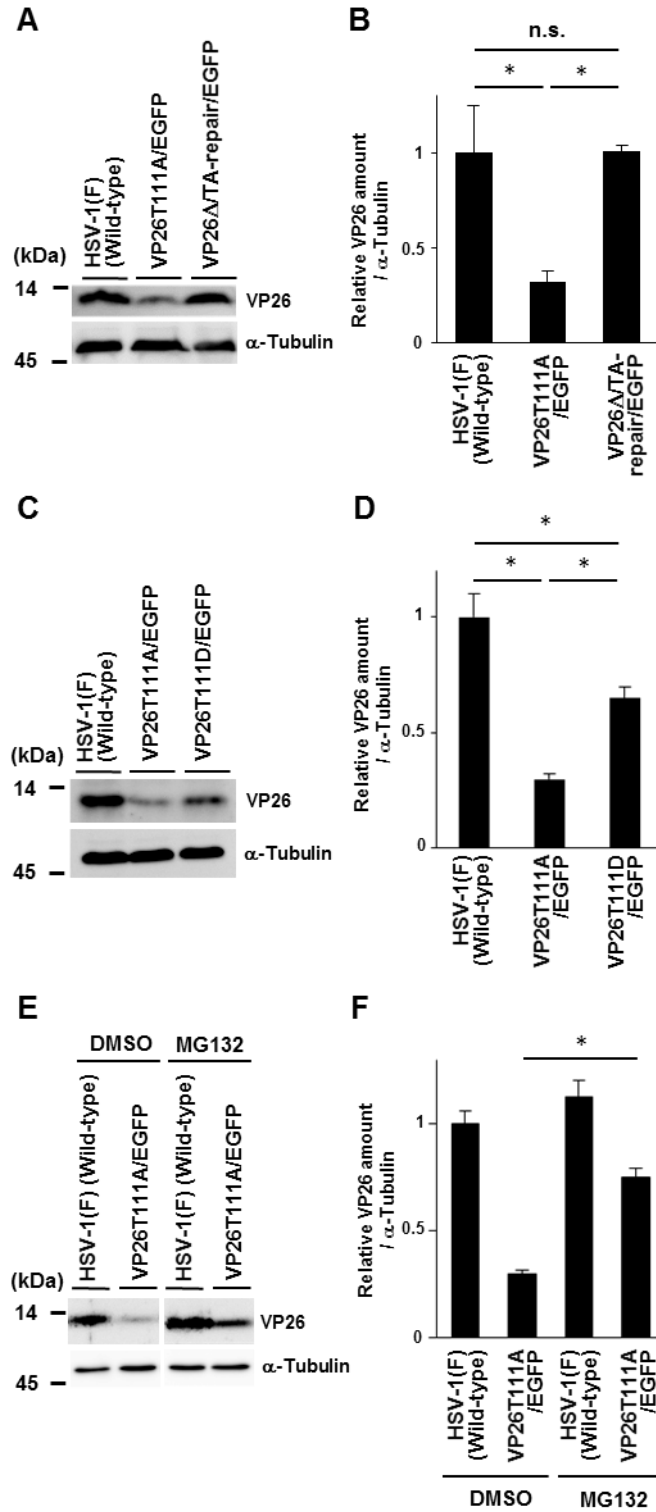


図 8 各組換えウイルスの SK-N-SH 細胞における VP26 発現レベル

(A,C) SK-N-SH 細胞に各組換えウイルスを MOI 5 にて感染させ、感染後 24 時間における、VP26 および、 α -tubulin の発現をウエスタンブロットイングにより検証した。(B,D) パネル A, C における VP26 の α -tubulin に対する相対量を定量した。(E) SK-N-SH 細胞に、各組換えウイルスを MOI 5 で感染させ、感染後 6 時間から終濃度 0.1% の DMSO もしくは、20 μ M の MG132 を添加し、さらに 18 時間培養した。その後、細胞を回収し、VP26 および、 α -tubulin の発現をウエスタンブロットイングにより検証した。(F) パネル E における VP26 の α -tubulin に対する相対量を定量した。エラーバーは、Triplicate で行った実験の標準誤差を示している。P value は Tukey's test(B, D) および student's *t* test(F) にて算出し、統計学的な有意差を* で示した。*は、 $P < 0.05$ を示す。n.s.: not statistically significant

VP26 Thr-111 のリン酸化は、VP26 および VP5 の感染細胞内における適切な局在制御に

貢献する

次に、VP26 Thr-111 のリン酸化が、VP26 や VP26 の binding partner である VP5 の細胞内局在に関与するのか検証した。SK-N-SH 細胞に野生体 HSV-1(F), YK491(Δ VP26/EGFP), YK492(VP26T111A/EGFP), YK493(VP26 Δ /TA-Repair/EGFP), YK494(VP26T111D/EGFP)を MOI 5 で感染させ、感染後 12 時間の感染細胞を免疫蛍光抗体法により、抗 VP5 抗体と抗 VP26 抗体で共染色し、VP5 と VP26 の細胞内局在を観察した。野生体 HSV-1(F), YK493(VP26 Δ /TA-Repair/EGFP)感染細胞において、VP5 と VP26 は多くの細胞において共に核内全体に拡散した局在(diffuse)を示し、共局在することが明らかとなった(図 9A)。一方、YK491(Δ VP26/EGFP)感染細胞においては、ほとんどの細胞において VP5 が核内全体に点状(punctate)の局在を示した(図 9A)。これは、VP26 が HSV-1 感染細胞内において、VP5 の適切な局在に寄与することを示唆している。興味深いことに、YK492(VP26T111A/EGFP)感染細胞においては、約半数の細胞において、VP5 が核全体に点状の局在 (punctate) を示し、VP26 との共局在が観察された。さらに、YK494(VP26T111D/EGFP)感染細胞において、VP5 と VP26 の局在が、核内全体に拡散した局在(diffuse)に回復することも確認された(図 9A)。

続いて、図 8A において観察した VP26 と VP5 の細胞内局在を、diffuse と punctate の 2 つのパターンに分類し、定量した結果を示す。野生体 HSV-1(F)と YK493(VP26 Δ /TA-

Repair/EGFP) 感染細胞核内において、VP5 の局在パターンは、それぞれ 86%と 95% diffuse であり、それ以外の一部の細胞において punctate の局在を示した。これは、VP26 の局在パターンも同様の傾向であった(図 9B)。一方で、YK491(Δ VP26/EGFP)感染細胞核内において、VP5 の局在パターンは、91%が punctate であった。これは、VP26 が HSV-1 感染細胞核内における VP5 の適切な局在に重要であることを示唆している(図 9B)。興味深いことに、YK492(VP26T111A/EGFP)感染細胞核内において、VP5 および VP26 の局在パターンは、それぞれ 60%と 50%の細胞で punctate であり、ほとんどの細胞の punctate 構造中において、VP5 と VP26 が共局在することが明らかとなった。さらに、YK494(VP26T111D/EGFP)感染細胞核内における VP5 および VP26 の局在パターンは、それぞれ 86%と 89%が diffuse に回復することが確認された(図 9B)。これらの結果は、VP26 Thr-111 のリン酸化は VP5 および VP26 の感染細胞内における適切な局在に関与することを示唆している。

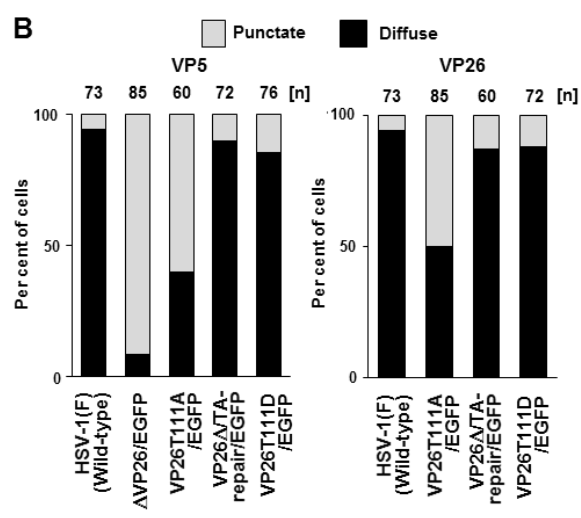
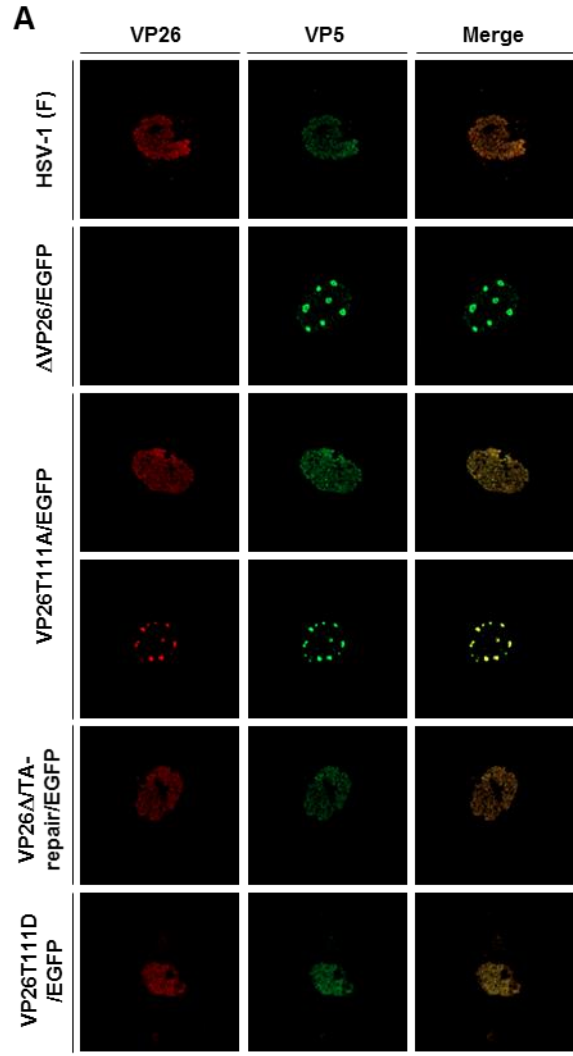


図 9 各組換えウイルスの SK-N-SH 細胞における VP26 および VP5 の局在

(A) SK-N-SH 細胞に各組換えウイルスを MOI 5 で感染させ、12 時間後に細胞を固定・透過処理を行い、VP26 抗体(赤)および、VP5 抗体(緑)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。(B) 各組換えウイルスにおける VP26 および VP5 の細胞内局在パターンを”diffuse”と”punctate”に分類し、その頻度を定量化した。カラムの上部に記載した数字は数えた細胞数を示した。これらのデータは、3 回の独立した実験の代表的な結果を示す。

考察

緒言においても述べたように、HSV-1 のキャプシドタンパク質の全てがリン酸化タンパク質であるという報告がこれまでにされているのにも関わらず、HSV-1 キャプシドタンパク質のリン酸化の生物学的意義は全く明らかとなっていなかった。本研究では、VP26 111 番目のスレオニンをアラニンに置換し、この部位におけるリン酸化を特異的に消失させる VP26 T111A 変異によって、ヒト神経芽細胞種 SK-N-SH 細胞における HSV-1 のウイルス増殖能の低下や細胞間伝播能の低下、さらにマウスにおける神経病原性の低下が引き起こされることが明らかとなった。また、これらの表現型は、111 番目のアミノ酸をアスパラギン酸置換した、この部位におけるリン酸化を恒常的模倣する VP26 T111D 変異によって、回復することが認められた。これらの結果は、VP26 Thr-111 のリン酸化は SK-N-SH 細胞における効率的なウイルス増殖や細胞間伝播、マウスにおける神経病原性に寄与することを強く示唆する。本研究は、ヘルペスウイルスにおけるキャプシドタンパク質のリン酸化が、ウイルス増殖や病原性に関与することを初めて示したものである。さらに、注目すべき点として、VP26 T111A 変異によるウイルス増殖や細胞間伝播、マウスにおける神経病原性の低下は、VP26 欠損変異によるものと同水準であった。これらの結果は、VP26 Thr-111 のリン酸化が VP26 による効率的なウイルス増殖や細胞間伝播、マウスにおける神経病原性への関与を制御することを示している。

本研究では、VP26 の生物学的意義に加えて、これまで明らかとなっていなかった VP26 の新たな機能についても解明した。

i) VP26 欠損変異により感染細胞における VP5 が点状(punctate)の局在を示すことが明らかとなった。一方、野生体 HSV-1(F)感染細胞において、VP5 は核内全体に拡散した局在を示した。これらの結果は、VP26 が VP5 の適切な局在に寄与することを示している。

ii) 先行報告において、VP26 はマウス三叉神経節におけるウイルス増殖に関与することが示唆されていた(20)。しかしながら、その報告において、病原性試験は行われおらず、VP26 がマウスにおける病原性に寄与するか否かは解明されていなかった。本研究では、マウス頭蓋内へのウイルス接種による病原性試験により、VP26 がマウスにおける神経病原性に重要であることを示した。この結果は、VP26 が HSV-1 の中枢神経系における病原性因子であることを示唆するものである。また、 α -ヘルペスウイルス亜科の 1 つの仮性狂犬病ウイルス (Pseudorabies virus : PRV)における VP26 の homologs が、マウスにおける末梢組織から中枢神経組織へ侵襲に重要であることが報告されているが(39)、本研究の結果はこの報告を支持するものである。

VP26 Thr-111 のリン酸化が、HSV-1 の効率的なウイルス増殖や病原性へどのように関与するかという点については解明されていない。本研究では、HSV-1 感染 SK-N-SH 細胞において、VP26 Thr-111 のリン酸化が与える 2 つの影響、i) VP26 の直接的もしくは間接的なプロテアソームを介した分解を阻害し、VP26 の安定性に貢献すること、ii) 感染細胞核

内における VP26 自身と binding partner である VP5 の局在を制御することを報告した。

本研究と先行報告で報告されている、VP26 が HSV-1 の効率的なウイルス増殖や病原性に貢献するということを鑑みると、VP26 Thr-111 のリン酸化が寄与する適切な VP26 の発現量の調節が HSV-1 の効率的なウイルス増殖や病原性に重要であるという仮説が考えられる。

また、先行報告において、VP26 の N 末端に蛍光タンパク質(Fluorescent protein; FP)をタグリングすると、核内に FP-tagged VP26 が punctate 構造を形成する(49)。そして、その punctate 構造の中には、他のキャプシドタンパク質である VP5, UL25, UL17 が含まれるにも関わらず、キャプシドは認められない(49)。さらに、FP-tagged VP26 HSV-1 は、ウイルス増殖と核出芽が障害されることが報告されている(49)。FP-tagged VP26 HSV-1 感染細胞において認められる FP-VP26 や他のキャプシドタンパク質の punctate 構造は、キャプシドのアセンブリサイトではないことが考えられるが、キャプシドタンパク質が punctate 構造に隔離されることにより、キャプシドの正常なアセンブリや核出が阻害されることが示唆されている(49)。興味深いことに、本研究で報告した VP26 欠損変異や VP26 T111A 変異によって引き起こされる、VP5 や mutated VP26 を含む punctate 様の局在は、FP-VP26 による punctate 構造と類似している。

分子量が 12kDa である VP26 に約 25kDa の蛍光タンパク質をタグリングすることで、VP26 に立体障害を誘発し、VP26 の機能が損なわれていることが考えられる。この仮説を支持するように、FP-tagged VP26 homolog PRV を用いた解析においても、PRV のウイル

ス増殖と神経侵襲性が PRV VP26 homolog 欠損変異体におけるウイルス増殖と神経侵襲性と同水準まで低下することが報告されている(39)。さらに、上述の通り、VP26 T111A 変異により、VP26 欠損変異と同水準まで HSV-1 のウイルス増殖や神経病原性を低下させる。タンパク質のリン酸化はしばしば立体構造変化の原因となることが広く知られており、VP26 Thr-111 のリン酸化においても同様な立体構造変化が起こることが予想される。その結果、VP26 の機能が損なわれているのではないかと考えられる。

これらの所見から、機能的な VP26 の欠乏条件下においては、HSV-1 のキャプシドタンパク質が核内に蓄積して punctate 構造を形成する傾向にあることが示唆される。VP26 はキャプシドタンパク質の凝集を阻害し、核内全体へとキャプシドタンパク質を分布させることで HSV-1 キャプシドの効率的なアセンブリを促進するのかもしれない。また、VP26 Thr-111 のリン酸化は VP26 の適切な立体構造形成に重要であり、その結果、HSV-1 キャプシドタンパク質の核内での凝集を阻害し、効率的なキャプシドのアセンブリだけでなく、核からの出芽やウイルス増殖を促進することが考えられる。

また、本研究によって得られた結果より、VP26 T111A 変異体は、培養細胞におけるウイルス増殖能、VP26 および VP5 の細胞内局在、マウスモデルにおける神経病原性は、すべて VP26 欠損変異体と同様の表現型を示すことが明らかとなった。つまり、VP26 Thr-111 のリン酸化は、VP26 の機能発現に極めて重要な役割を担っていることが明らかとなった。このような、ウイルスタンパク質の機能発現の大部分が 1 ヶ所のリン酸化によって制御さ

れるといった報告は HSV-1 においてはなく、本知見は非常に興味深い知見であると考えられる。

VP26 は、すべてのヘルペスウイルス亜科において保存されるにも関わらず、VP26 Thr-111 は HSV-2 にしか保存されていない。Thr-111 は VP26 の C 末端に位置するが、興味深いことに、EBV の VP26 homolog の C 末端におけるリン酸化が報告されている(33)。それゆえ、EBV のみならず、他のヘルペスウイルス亜科における VP26 homolog における C 末端には、何らかのリン酸化制御機構が存在するのではないかと考えられる。

これまでに記述した通り、様々なウイルスにおいて、キャプシドタンパク質のリン酸化は、効率的なウイルス増殖などのウイルス生活環に貢献している。本研究では、ヘルペスウイルスにおいてもキャプシドタンパク質のリン酸化は、効率的なウイルス増殖や病原性に寄与することが示された。それと関連して、これまでに報告されているヘルペスウイルスの他のキャプシドタンパク質のリン酸化にも、何らかの機能制御が認められるかもしれない。

第 2 章

VP26 による HSV-1 キャプシド成熟ステップへの関与

要旨

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。

序文

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。

実験方法

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。

結果

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。

考察

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。

総括

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。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、修士課程から博士課程に亘る 5 年間、私を最高の環境において自由に研究をさせて頂き、さらには多大なご指導・ご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 川口寧 教授に深い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 助教には日々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やご指導を賜ったことを深く感謝いたします。

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 MS 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。

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、多大なご指導とご協力を賜りましたことを深く感謝致します。

本研究室の安藤朋子氏、朝倉嘉江氏、喜多尾祥代氏、過去に在籍していた松本幸氏、小山志保子氏には研究生生活を送る上で様々なご配慮やご協力を頂きまして、快適な研究生生活を送ることができたことに深く感謝いたします。

また、研究室に所属していた先輩方には研究に関する有意義な議論や研究生活を送る上での多岐にわたるご助言、ご協力いただくだけではなく、研究以外においても私の良き先輩でありました。心より感謝致します。さらに、同期、後輩の皆様にも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ことを深く感謝いたします。

最後に、長い学生生活にも関わらず経済面、私生活面を支えてくださった両親 小林恒夫氏、誠子氏、美希氏にこの場を借りて御礼申し上げます。

参考文献

1. **Adelman, K., B. Salmon, and J. D. Baines.** 2001. Herpes simplex virus DNA packaging sequences adopt novel structures that are specifically recognized by a component of the cleavage and packaging machinery. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**:3086-3091.
2. **al-Kobaisi, M. F., F. J. Rixon, I. McDougall, and V. G. Preston.** 1991. The herpes simplex virus UL33 gene product is required for the assembly of full capsids. *Virology* **180**:380-388.
3. **Almazan, F., C. Galan, and L. Enjuanes.** 2004. The nucleoprotein is required for efficient coronavirus genome replication. *Journal of virology* **78**:12683-12688.
4. **Arii, J., H. Goto, T. Suenaga, M. Oyama, H. Kozuka-Hata, T. Imai, A. Minowa, H. Akashi, H. Arase, Y. Kawaoka, and Y. Kawaguchi.** 2010. Non-muscle myosin IIA is a functional entry receptor for herpes simplex virus-1. *Nature* **467**:859-862.
5. **Baines, J. D.** 2011. Herpes simplex virus capsid assembly and DNA packaging: a present and future antiviral drug target. *Trends in microbiology* **19**:606-613.
6. **Baines, J. D., A. P. Poon, J. Rovnak, and B. Roizman.** 1994. The herpes simplex virus 1 UL15 gene encodes two proteins and is required for cleavage of genomic viral DNA. *Journal of virology* **68**:8118-8124.
7. **Beard, P. M., and J. D. Baines.** 2004. The DNA cleavage and packaging protein encoded by the UL33 gene of herpes simplex virus 1 associates with capsids. *Virology* **324**:475-482.
8. **Beard, P. M., N. S. Taus, and J. D. Baines.** 2002. DNA cleavage and packaging proteins encoded by genes U(L)28, U(L)15, and U(L)33 of herpes simplex virus type 1 form a complex in infected cells. *Journal of virology* **76**:4785-4791.
9. **Bell, C., M. Desjardins, P. Thibault, and K. Radtke.** 2013. Proteomics analysis of herpes simplex virus type 1-infected cells reveals dynamic changes of viral protein expression, ubiquitylation, and phosphorylation. *Journal of proteome research* **12**:1820-1829.
10. **Bode, J. G., S. Ludwig, C. Ehrhardt, U. Albrecht, A. Erhardt, F. Schaper, P. C. Heinrich, and D. Haussinger.** 2003. IFN-alpha antagonistic activity of HCV core protein involves induction of suppressor of cytokine signaling-3. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **17**:488-490.

11. **Booy, F. P., B. L. Trus, W. W. Newcomb, J. C. Brown, J. F. Conway, and A. C. Steven.** 1994. Finding a needle in a haystack: detection of a small protein (the 12-kDa VP26) in a large complex (the 200-MDa capsid of herpes simplex virus). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**:5652-5656.
12. **Borst, E. M., S. Mathys, M. Wagner, W. Muranyi, and M. Messerle.** 2001. Genetic evidence of an essential role for cytomegalovirus small capsid protein in viral growth. *Journal of virology* **75**:1450-1458.
13. **Cartier, C., P. Sivard, C. Tranchat, D. Decimo, C. Desgranges, and V. Boyer.** 1999. Identification of three major phosphorylation sites within HIV-1 capsid. Role of phosphorylation during the early steps of infection. *The Journal of biological chemistry* **274**:19434-19440.
14. **Chaudhuri, V., M. Sommer, J. Rajamani, L. Zerboni, and A. M. Arvin.** 2008. Functions of Varicella-zoster virus ORF23 capsid protein in viral replication and the pathogenesis of skin infection. *Journal of virology* **82**:10231-10246.
15. **Chu, T. H., A. T. Liou, P. Y. Su, H. N. Wu, and C. Shih.** 2014. Nucleic acid chaperone activity associated with the arginine-rich domain of human hepatitis B virus core protein. *Journal of virology* **88**:2530-2543.
16. **Cockrell, S. K., J. B. Huffman, K. Toropova, J. F. Conway, and F. L. Homa.** 2011. Residues of the UL25 protein of herpes simplex virus that are required for its stable interaction with capsids. *Journal of virology* **85**:4875-4887.
17. **Cockrell, S. K., M. E. Sanchez, A. Erazo, and F. L. Homa.** 2009. Role of the UL25 protein in herpes simplex virus DNA encapsidation. *Journal of virology* **83**:47-57.
18. **Coen, D. M., and P. A. Schaffer.** 2003. Antiherpesvirus drugs: a promising spectrum of new drugs and drug targets. *Nature reviews. Drug discovery* **2**:278-288.
19. **Deroubaix, A., Q. Osseman, A. Cassany, D. Begu, J. Ragues, S. Kassab, S. Laine, and M. Kann.** 2015. Expression of viral polymerase and phosphorylation of core protein determine core and capsid localization of the human hepatitis B virus. *The Journal of general virology* **96**:183-195.
20. **Desai, P., N. A. DeLuca, and S. Person.** 1998. Herpes simplex virus type 1 VP26 is not essential for replication in cell culture but influences production of infectious virus in the nervous system of infected mice. *Virology* **247**:115-124.
21. **Dochi, T., T. Nakano, M. Inoue, N. Takamune, S. Shoji, K. Sano, and S. Misumi.** 2014. Phosphorylation of human immunodeficiency virus type 1 capsid protein at serine 16, required for peptidyl-prolyl isomerase-dependent uncoating, is mediated by virion-incorporated extracellular signal-regulated kinase 2. *The Journal of general virology* **95**:1156-1166.

22. **Gao, M., L. Matusick-Kumar, W. Hurlburt, S. F. DiTusa, W. W. Newcomb, J. C. Brown, P. J. McCann, 3rd, I. Deckman, and R. J. Colonno.** 1994. The protease of herpes simplex virus type 1 is essential for functional capsid formation and viral growth. *Journal of virology* **68**:3702-3712.
23. **Geraghty, R. J., C. Krummenacher, G. H. Cohen, R. J. Eisenberg, and P. G. Spear.** 1998. Entry of alphaherpesviruses mediated by poliovirus receptor-related protein 1 and poliovirus receptor. *Science* **280**:1618-1620.
24. **Gupta, R., T. Warren, and A. Wald.** 2007. Genital herpes. *Lancet* **370**:2127-2137.
25. **Henson, B. W., E. M. Perkins, J. E. Cothran, and P. Desai.** 2009. Self-assembly of Epstein-Barr virus capsids. *Journal of virology* **83**:3877-3890.
26. **Herold, B. C., R. J. Visalli, N. Susmarski, C. R. Brandt, and P. G. Spear.** 1994. Glycoprotein C-independent binding of herpes simplex virus to cells requires cell surface heparan sulphate and glycoprotein B. *The Journal of general virology* **75** (Pt 6):1211-1222.
27. **Herold, B. C., D. WuDunn, N. Soltys, and P. G. Spear.** 1991. Glycoprotein C of herpes simplex virus type 1 plays a principal role in the adsorption of virus to cells and in infectivity. *Journal of virology* **65**:1090-1098.
28. **Herr, W.** 1998. The herpes simplex virus VP16-induced complex: mechanisms of combinatorial transcriptional regulation. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* **63**:599-607.
29. **Heymann, J. B., N. Cheng, W. W. Newcomb, B. L. Trus, J. C. Brown, and A. C. Steven.** 2003. Dynamics of herpes simplex virus capsid maturation visualized by time-lapse cryo-electron microscopy. *Nature structural biology* **10**:334-341.
30. **Heymann, J. B., J. F. Conway, and A. C. Steven.** 2004. Molecular dynamics of protein complexes from four-dimensional cryo-electron microscopy. *Journal of structural biology* **147**:291-301.
31. **Huet, A., A. M. Makhov, J. B. Huffman, M. Vos, F. L. Homa, and J. F. Conway.** 2016. Extensive subunit contacts underpin herpesvirus capsid stability and interior-to-exterior allostery. *Nature structural & molecular biology* **23**:531-539.
32. **Jacob, T., C. Van den Broeke, and H. W. Favoreel.** 2011. Viral serine/threonine protein kinases. *Journal of virology* **85**:1158-1173.
33. **Johannsen, E., M. Luftig, M. R. Chase, S. Weicksel, E. Cahir-McFarland, D. Illanes, D. Sarracino, and E. Kieff.** 2004. Proteins of purified Epstein-Barr virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**:16286-16291.
34. **Johnson, D. C., and J. D. Baines.** 2011. Herpesviruses remodel host membranes for

- virus egress. *Nature reviews. Microbiology* **9**:382-394.
35. **Kato, A., S. Tsuda, Z. Liu, H. Kozuka-Hata, M. Oyama, and Y. Kawaguchi.** 2014. Herpes simplex virus 1 protein kinase Us3 phosphorylates viral dUTPase and regulates its catalytic activity in infected cells. *Journal of virology* **88**:655-666.
 36. **Kawaguchi, Y.** 2010. 単純ヘルペスウイルス(HSV). *ウイルス* **60**:187-196.
 37. **Knipe, D. M., P. M. Howley, J. I. Cohen, D. E. Griffin, R. A. Lamb, M. A. Martin, V. R. Racaniello, and B. Roizman.** 2013. Herpes simplex viruses, p. 1823-1897. *In* D. M. Knipe, P. M. Howley, J. I. Cohen, D. E. Griffin, R. A. Lamb, M. A. Martin, V. R. Racaniello, and B. Roizman (ed.), *Fields virology*, 6th ed. Lippincott-Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.
 38. **Kock, J., M. Kann, G. Putz, H. E. Blum, and F. Von Weizsacker.** 2003. Central role of a serine phosphorylation site within duck hepatitis B virus core protein for capsid trafficking and genome release. *The Journal of biological chemistry* **278**:28123-28129.
 39. **Krautwald, M., C. Maresch, B. G. Klupp, W. Fuchs, and T. C. Mettenleiter.** 2008. Deletion or green fluorescent protein tagging of the pUL35 capsid component of pseudorabies virus impairs virus replication in cell culture and neuroinvasion in mice. *The Journal of general virology* **89**:1346-1351.
 40. **Lamberti, C., and S. K. Weller.** 1998. The herpes simplex virus type 1 cleavage/packaging protein, UL32, is involved in efficient localization of capsids to replication compartments. *Journal of virology* **72**:2463-2473.
 41. **Lemaster, S., and B. Roizman.** 1980. Herpes simplex virus phosphoproteins. II. Characterization of the virion protein kinase and of the polypeptides phosphorylated in the virion. *Journal of virology* **35**:798-811.
 42. **Liu, F. Y., and B. Roizman.** 1991. The promoter, transcriptional unit, and coding sequence of herpes simplex virus 1 family 35 proteins are contained within and in frame with the UL26 open reading frame. *Journal of virology* **65**:206-212.
 43. **Lu, W., and J.-h. Ou.** 2002. Phosphorylation of Hepatitis C Virus Core Protein by Protein Kinase A and Protein Kinase C. *Virology* **300**:20-30.
 44. **McNab, A. R., P. Desai, S. Person, L. L. Roof, D. R. Thomsen, W. W. Newcomb, J. C. Brown, and F. L. Homa.** 1998. The product of the herpes simplex virus type 1 UL25 gene is required for encapsidation but not for cleavage of replicated viral DNA. *Journal of virology* **72**:1060-1070.
 45. **McNabb, D. S., and R. J. Courtney.** 1992. Posttranslational modification and subcellular localization of the p12 capsid protein of herpes simplex virus type 1. *Journal of virology* **66**:4839-4847.

46. **Mettenleiter, T. C., F. Muller, H. Granzow, and B. G. Klupp.** 2013. The way out: what we know and do not know about herpesvirus nuclear egress. *Cellular microbiology* **15**:170-178.
47. **Mitchell, M. S., S. Matsuzaki, S. Imai, and V. B. Rao.** 2002. Sequence analysis of bacteriophage T4 DNA packaging/terminase genes 16 and 17 reveals a common ATPase center in the large subunit of viral terminases. *Nucleic acids research* **30**:4009-4021.
48. **Montgomery, R. I., M. S. Warner, B. J. Lum, and P. G. Spear.** 1996. Herpes simplex virus-1 entry into cells mediated by a novel member of the TNF/NGF receptor family. *Cell* **87**:427-436.
49. **Nagel, C. H., K. Dohner, A. Binz, R. Bauerfeind, and B. Sodeik.** 2012. Improper tagging of the non-essential small capsid protein VP26 impairs nuclear capsid egress of herpes simplex virus. *PloS one* **7**:e44177.
50. **Nellissery, J. K., R. Szczepaniak, C. Lamberti, and S. K. Weller.** 2007. A putative leucine zipper within the herpes simplex virus type 1 UL6 protein is required for portal ring formation. *Journal of virology* **81**:8868-8877.
51. **Newcomb, W. W., R. M. Juhas, D. R. Thomsen, F. L. Homa, A. D. Burch, S. K. Weller, and J. C. Brown.** 2001. The UL6 gene product forms the portal for entry of DNA into the herpes simplex virus capsid. *Journal of virology* **75**:10923-10932.
52. **Newcomb, W. W., D. R. Thomsen, F. L. Homa, and J. C. Brown.** 2003. Assembly of the herpes simplex virus capsid: identification of soluble scaffold-portal complexes and their role in formation of portal-containing capsids. *Journal of virology* **77**:9862-9871.
53. **Newcomb, W. W., B. L. Trus, F. P. Booy, A. C. Steven, J. S. Wall, and J. C. Brown.** 1993. Structure of the herpes simplex virus capsid. Molecular composition of the pentons and the triplexes. *Journal of molecular biology* **232**:499-511.
54. **Newcomb, W. W., B. L. Trus, N. Cheng, A. C. Steven, A. K. Sheaffer, D. J. Tenney, S. K. Weller, and J. C. Brown.** 2000. Isolation of herpes simplex virus procapsids from cells infected with a protease-deficient mutant virus. *Journal of virology* **74**:1663-1673.
55. **Ni, P., and C. Cheng Kao.** 2013. Non-encapsidation activities of the capsid proteins of positive-strand RNA viruses. *Virology* **446**:123-132.
56. **Patel, A. H., F. J. Rixon, C. Cunningham, and A. J. Davison.** 1996. Isolation and characterization of herpes simplex virus type 1 mutants defective in the UL6 gene. *Virology* **217**:111-123.
57. **Perkins, E. M., D. Anacker, A. Davis, V. Sankar, R. F. Ambinder, and P. Desai.** 2008.

- Small capsid protein pORF65 is essential for assembly of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus capsids. *Journal of virology* **82**:7201-7211.
58. **Poon, A. P., and B. Roizman.** 1993. Characterization of a temperature-sensitive mutant of the UL15 open reading frame of herpes simplex virus 1. *Journal of virology* **67**:4497-4503.
 59. **Reikofski, J., and B. Y. Tao.** 1992. Polymerase chain reaction (PCR) techniques for site-directed mutagenesis. *Biotechnology advances* **10**:535-547.
 60. **Sae-Ueng, U., T. Liu, C. E. Catalano, J. B. Huffman, F. L. Homa, and A. Evilevitch.** 2014. Major capsid reinforcement by a minor protein in herpesviruses and phage. *Nucleic acids research* **42**:9096-9107.
 61. **Salmon, B., C. Cunningham, A. J. Davison, W. J. Harris, and J. D. Baines.** 1998. The herpes simplex virus type 1 U(L)17 gene encodes virion tegument proteins that are required for cleavage and packaging of viral DNA. *Journal of virology* **72**:3779-3788.
 62. **Satoh, T., J. Arii, T. Suenaga, J. Wang, A. Kogure, J. Uehori, N. Arase, I. Shiratori, S. Tanaka, Y. Kawaguchi, P. G. Spear, L. L. Lanier, and H. Arase.** 2008. PILRalpha is a herpes simplex virus-1 entry coreceptor that associates with glycoprotein B. *Cell* **132**:935-944.
 63. **Schmid, M., T. Speiseder, T. Dobner, and R. A. Gonzalez.** 2014. DNA virus replication compartments. *Journal of virology* **88**:1404-1420.
 64. **Sherman, G., and S. L. Bachenheimer.** 1987. DNA processing in temperature-sensitive morphogenic mutants of HSV-1. *Virology* **158**:427-430.
 65. **Shukla, D., J. Liu, P. Blaiklock, N. W. Shworak, X. Bai, J. D. Esko, G. H. Cohen, R. J. Eisenberg, R. D. Rosenberg, and P. G. Spear.** 1999. A novel role for 3-O-sulfated heparan sulfate in herpes simplex virus 1 entry. *Cell* **99**:13-22.
 66. **Smiley, J. R., M. M. Elgadi, and H. A. Saffran.** 2001. Herpes simplex virus vhs protein. *Methods in enzymology* **342**:440-451.
 67. **Suenaga, T., T. Satoh, P. Somboonthum, Y. Kawaguchi, Y. Mori, and H. Arase.** 2010. Myelin-associated glycoprotein mediates membrane fusion and entry of neurotropic herpesviruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**:866-871.
 68. **Sugimoto, K., M. Uema, H. Sagara, M. Tanaka, T. Sata, Y. Hashimoto, and Y. Kawaguchi.** 2008. 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.
 69. **Surjit, M., R. Kumar, R. N. Mishra, M. K. Reddy, V. T. Chow, and S. K. Lal.** 2005.

- The severe acute respiratory syndrome coronavirus nucleocapsid protein is phosphorylated and localizes in the cytoplasm by 14-3-3-mediated translocation. *Journal of virology* **79**:11476-11486.
70. **Surjit, M., B. Liu, V. T. Chow, and S. K. Lal.** 2006. The nucleocapsid protein of severe acute respiratory syndrome-coronavirus inhibits the activity of cyclin-cyclin-dependent kinase complex and blocks S phase progression in mammalian cells. *The Journal of biological chemistry* **281**:10669-10681.
 71. **Tanaka, M., H. Kagawa, Y. Yamanashi, T. Sata, and Y. Kawaguchi.** 2003. 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.
 72. **Tanaka, M., H. Kodaira, Y. Nishiyama, T. Sata, and Y. Kawaguchi.** 2004. Construction of recombinant herpes simplex virus type I expressing green fluorescent protein without loss of any viral genes. *Microbes and infection* **6**:485-493.
 73. **Tengelsen, L. A., N. E. Pederson, P. R. Shaver, M. W. Wathen, and F. L. Homa.** 1993. Herpes simplex virus type 1 DNA cleavage and encapsidation require the product of the UL28 gene: isolation and characterization of two UL28 deletion mutants. *Journal of virology* **67**:3470-3480.
 74. **Thomsen, D. R., L. L. Roof, and F. L. Homa.** 1994. Assembly of herpes simplex virus (HSV) intermediate capsids in insect cells infected with recombinant baculoviruses expressing HSV capsid proteins. *Journal of virology* **68**:2442-2457.
 75. **Thurlow, J. K., M. Murphy, N. D. Stow, and V. G. Preston.** 2006. Herpes simplex virus type 1 DNA-packaging protein UL17 is required for efficient binding of UL25 to capsids. *Journal of virology* **80**:2118-2126.
 76. **Tischer, B. K., J. von Einem, B. Kaufer, and N. Osterrieder.** 2006. Two-step red-mediated recombination for versatile high-efficiency markerless DNA manipulation in *Escherichia coli*. *BioTechniques* **40**:191-197.
 77. **Trus, B. L., W. W. Newcomb, F. P. Booy, J. C. Brown, and A. C. Steven.** 1992. Distinct monoclonal antibodies separately label the hexons or the pentons of herpes simplex virus capsid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**:11508-11512.
 78. **Ubersax, J. A., and J. E. Ferrell, Jr.** 2007. Mechanisms of specificity in protein phosphorylation. *Nature reviews. Molecular cell biology* **8**:530-541.
 79. **Urbanowski, M. D., and T. C. Hobman.** 2013. The West Nile virus capsid protein blocks apoptosis through a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent mechanism.

- Journal of virology **87**:872-881.
80. **White, C. A., N. D. Stow, A. H. Patel, M. Hughes, and V. G. Preston.** 2003. Herpes simplex virus type 1 portal protein UL6 interacts with the putative terminase subunits UL15 and UL28. *Journal of virology* **77**:6351-6358.
 81. **Wills, E., L. Scholtes, and J. D. Baines.** 2006. Herpes simplex virus 1 DNA packaging proteins encoded by UL6, UL15, UL17, UL28, and UL33 are located on the external surface of the viral capsid. *Journal of virology* **80**:10894-10899.
 82. **Wingfield, P. T., S. J. Stahl, D. R. Thomsen, F. L. Homa, F. P. Booy, B. L. Trus, and A. C. Steven.** 1997. Hexon-only binding of VP26 reflects differences between the hexon and penton conformations of VP5, the major capsid protein of herpes simplex virus. *Journal of virology* **71**:8955-8961.
 83. **Yang, K., and J. D. Baines.** 2011. Selection of HSV capsids for envelopment involves interaction between capsid surface components pUL31, pUL17, and pUL25. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**:14276-14281.
 84. **Yang, K., F. Homa, and J. D. Baines.** 2007. Putative terminase subunits of herpes simplex virus 1 form a complex in the cytoplasm and interact with portal protein in the nucleus. *Journal of virology* **81**:6419-6433.
 85. **Yu, D., A. K. Sheaffer, D. J. Tenney, and S. K. Weller.** 1997. Characterization of ICP6::lacZ insertion mutants of the UL15 gene of herpes simplex virus type 1 reveals the translation of two proteins. *Journal of virology* **71**:2656-2665.
 86. **Zhou, Z. H., J. He, J. Jakana, J. D. Tatman, F. J. Rixon, and W. Chiu.** 1995. Assembly of VP26 in herpes simplex virus-1 inferred from structures of wild-type and recombinant capsids. *Nature structural biology* **2**:1026-1030.