

博士論文

単純ヘルペスウイルス制御因子 ICP22 の機能解析

丸鶴 雄平

# 目次

略語一覧	1
諸言	4
第 1 章 『ICP22 による p53 の制御』	
1-1 要旨	12
1-2 序文	13
1-3 実験方法	15
1-4 結果	25
1-5 考察	45
第 2 章 『ICP22 によるウイルス核出芽の制御』	
2-1 要旨	49
2-2 序文	50
2-3 実験方法	51
2-4 結果	57
2-5 考察	77
総括	81
謝辞	84
参考文献	85

## 略語一覽

cdk9	Cyclin dependent kinase 9
CS	Carf serum
CTD	C-terminal domain
Cy	Cytosol
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic acid
EAP	Epstein-Barr virus small RNA-associated protein
EBV	Epstein-Barr virus
FCS	Fatal carf serum
HCF-1	Host cell factor C1
HCMV	Human cytomegalovirus
HEL	Human embryonic lung cell
HHV-6A	Human herpesvirus 6 A
HHV-6B	Human herpesvirus 6B
HHV-7	Human herpesvirus 7
HHV-8	Human herpesvirus 8
HRP	Horseradish peroxidase
Hsc70	Heat shock 70kDa protein 8
HSV-1	Herpes simplex virus 1
HSV-2	Herpes simplex virus 2
ICP0	Infected cell protein 0
ICP22	Infected cell protein 22

ICP27	Infected cell protein 27
ICP4	Infected cell protein 4
INM	Inner nuclear membrane
IPTG	Isopropyl b-D-1-thiogalactopyranoside
KSHV	Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus
MEF	Myc-Tev-Flag
MOI	multiplicity of infection
mRNA	messenger ribonucleic acid
MS	Mass spectrometry
NEC	Nuclear egress complex
NM	Nuclear membrane
Nuc	Nucleus
Oct-1	POU class 2 homeobox 1
ONM	Outer nuclear membrane
ORF	Open reading frame
p53	Tumor protein p53
PBS	Phosphate buffered saline
PBS-T	Phosphate buffered saline-Tween 20
PFU	plaque forming units
Pol II	RNA polymerase II
RNase	Ribonuclease
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate-poly acrylamide gel electrophoresis
TFIID	Transcription factor II D
UL	Unique long

Us	Unique short
VP16	Viral protein 16
VZV	varicella zoster virus

# 諸言

## ヘルペスウイルス

ヘルペスウイルス科に属するウイルスの成熟粒子は、124–295 kbp の直鎖状の2本鎖 DNA のゲノム、ゲノムが収納された 161 のカプソメアで構成された約 125 nm のヌクレオカプシド、その周りを覆うテグメント、そしてテグメントを覆うエンベロープから構成され、エンベロープの表面にはヘルペスウイルスがコードする糖タンパク質がスパイク状に存在する。ヘルペスウイルス科に属するウイルスでヒトを主要な宿主とするものは、1 型単純ヘルペスウイルス (HSV-1)、2 型単純ヘルペスウイルス (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)、エプスタイン・バーウイルス (EBV)、ヒトヘルペスウイルス 6A, 6B, 及び 7 (HHV-6A, HHV-6B, HHV-7)、カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス (KSHV(HHV-8)) の 9 種類が知られている(1)。

ヘルペスウイルス科は更に、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 種類の亜科に分類される。アルファヘルペスウイルスは、比較的低い宿主特異性、短い増殖サイクル、効率的な感染細胞の破壊、宿主の感覚神経節への潜伏能を持つことなどが特徴である(1)。ヒトを主要な宿主とするヘルペスウイルス科のウイルスでは、HSV-1, HSV-2, 及び VZV がこの亜科に属する。ベータヘルペスウイルスは、高い宿主特異性、長い増殖サイクル、感染細胞の肥大化、宿主の分泌腺、リンパ細網、腎臓及び他の組織への潜伏能を持つことなどが特徴である(1)。ヒトを主要な宿主とするヘルペスウイルス科のウイルスでは、HCMV, HHV-6A, HHV-6B 及び HHV-7 がこの亜科に属する。ガンマヘルペスウイルスは、高い宿主特異性を持つ。培養細胞においてはリンパ芽球様の細胞に感染し、いくつかのウイルスは類上皮細胞や繊維芽細胞に感染することができる(1)。生体内で一般的に T 細胞や B 細胞に感染し、感染した細胞に潜伏する。ヒトを主要な宿主とするヘルペスウイルス科のウイルスでは、EBV, KSHV(HHV-8)がこの亜科に属する。これらの分類は、まだ DNA の塩基配列やア

ミノ酸の配列が解読されていなかった 1970 年代後半に、生物学的特徴を元に決定された。各ウイルスのゲノム配列が解読された現在でもこの分類は可用性が高いものであり、一般的に使用されている(1)。

本研究の対象は、ヘルペスウイルス科、アルファヘルペスウイルス亜科に属する 1 型単純ヘルペスウイルス (Herpes simplex virus type 1: HSV-1)である。

### **1 型単純ヘルペスウイルス (HSV-1)の粒子構造**

HSV-1 の成熟粒子は他のヘルペスウイルスと同様に、84 以上のタンパク質をコードする約 150 kbp の直鎖状 2 本鎖 DNA ゲノム、ゲノムを取り囲むカプシド、カプシドの周りに存在するテグメント、HSV-1 がコードする糖タンパク質がスパイク状に配置された、宿主細胞膜由来のエンベロープから成る(1)。

### **HSV-1 の遺伝子発現**

HSV-1 がエンベロープと細胞膜を融合させて細胞内に侵入すると、テグメントタンパク質は細胞質に放出される。テグメントタンパク質の中には宿主の mRNA を分解する RNase である UL41 などが含まれており、テグメントタンパク質の放出は、HSV-1 が細胞内を自身の増殖に有利な環境に変える戦略の 1 つである。細胞質内に侵入したヌcleoカプシドは、核膜孔から核内にウイルスのゲノム DNA を注入し、核内でウイルスゲノムの転写が開始される。HSV-1 がコードする遺伝子はその発現時期によって前初期遺伝子 (immediate-early: IE)、初期遺伝子 (early: E)、後期遺伝子 (late: L)の 3 種類に分類され、またそれぞれ  $\alpha$  遺伝子、 $\beta$  遺伝子、 $\gamma$  遺伝子とも呼ばれる。HSV-1 の遺伝子発現は前初期遺伝子からから開始され、後期遺伝子まで秩序を保った段階的なものである(1)。HSV-1 の遺伝子発現のスタートを意味する前初期遺伝子の発現には HSV-1 のテグメントタンパク質である VP16、宿主由来の Oct-1、及び HCF-1 などが関わる(1, 2)。VP16 は

前初期遺伝子のプロモーターに存在する認識配列に Oct-1 及び HCF-1 と共に結合し、これらのタンパク質から成るエンハンセオソームが前初期遺伝子のプロモーターを活性化し転写が開始される(2)。そして前初期遺伝子がコードする ICP0, ICP4, ICP22, Us1.5 及び ICP27 はその後に発現する初期遺伝子及び後期遺伝子の秩序だった発現に寄与する(1, 3)。この様な機構で HSV-1 の秩序だった段階的な遺伝子発現が制御されている。

### カプシドの核から細胞質への出芽 (nuclear egress)

HSV-1 のカプシドは核内で複製されたゲノム DNA をカプシド内に取り込むために核で会合する。核内で会合したカプシドは、細胞質でテグメントやエンベロープを獲得して成熟粒子になる。カプシドのサイズは核膜孔を通過するには大きい為、他のヘルペスウイルス科のウイルスと同様に、核内膜 (INM) と核外膜 (ONM) を特徴的な機構を用いて通過する。(i) 核内のカプシドは一旦 INM を被り核膜間スペースに移動する。この段階を 1 次エンベロープの獲得(primary envelopment)と呼ぶ(4-7)。(ii) 1 次エンベロープを獲得した核膜間スペースのカプシドは獲得した 1 次エンベロープを ONM と融合させ細胞質へ移行する。この段階の事を脱エンベロープ(de-envelopment)と呼ぶ(6, 8)。Nuclear egress complex (NEC)と呼ばれるヘテロ 2 量体の UL31/UL34 複合体は、全てのヘルペスウイルス亜科で保存された primary envelopment に必須のタンパク質複合体であり (1, 6, 8-10), UL31 及び UL34 の欠損株の感染細胞はカプシドが核内に集積してしまい、核膜間スペース、細胞質、細胞外のカプシドは殆んど検出できなくなることが報告されている(10, 11)。in vitroにおいて NEC は人工的に合成した脂質 2 重膜を変形させ小胞を出芽させる能力を有し(12), NEC の過剰発現によって核膜間に小胞が形成されることが報告されていることから(5), NEC は primary envelopment の際、核内膜を変形させる働きをしていることが考えられる。また、HSV-1 がコードする serine/threonine キナーゼである Us3 は NEC をリン酸化し、そのキナーゼ活性は UL31 と UL34 の局在



を制御することから、Us3 もまた nuclear egress に関与することが考えられる(4, 6, 9, 13-16). 更に、HSV-1 の主要なテグメントタンパク質である UL47 は UL31/UL34 と複合体を形成し、primary envelopment を制御することが報告されている(17). 次の段階である de-envelopment のメカニズムはまだほとんど明らかになっていないのが現状であるが、Us3 欠損株感染細胞で、核膜間スペースにカプシドが集積することが報告されていることから(18)、Us3 は de-envelopment の段階にも関与していることが考えられる.

### **HSV-1 がコードする ICP22**

本研究で注目している ICP22 は HSV-1 の Us1 にコードされ、感染細胞内で高度に翻訳後修飾を受けるタンパク質である. ICP22 が受ける翻訳後修飾には、HSV-1 がコードするプロテインキナーゼである Us3 や UL13 によるリン酸化や(19)、宿主のカゼインキナーゼ II によってもヌクレオチド化が報告されている(20, 21). Us1 は ICP22 だけでなく、ICP22 の N 末端側 1-89 アミノ酸を欠失したタンパク質である Us1.5 もコードする(22). これまでに知られている ICP22 の機能は Us1.5 との共通領域に保存されていることから、ICP22 の機能は Us1.5 と共に発現している可能性が考えられるが、Us1.5 の細胞内での発現量は ICP22 と比較して極めて低い(22). ICP22 欠損株は HEL 細胞や rabbit skin 細胞などにおいて、野生株と比較してその増殖が 100-1,000 倍低下することが報告されているが、Vero 細胞では野生株と同等の増殖能を持つ. 従って、培養細胞におけるウイルス増殖に対する ICP22 の要求性は細胞種依存的である. 一方、ICP22 欠損株はマウスにおける病原性や潜伏感染の効率、及び潜伏感染の再活性化効率が野生株と比較して低下することから(23)、HSV-1 の生体内における病原性やウイルス増殖に重要な役割を果たしている. ICP22 欠損株の培養細胞における細胞種依存的なウイルス増殖の低下や、マウスにおける病原性の低下を説明することが可能な決定的なメカニズムは明らかになっていない. しかし、ICP22 欠損株において前初期遺伝子

である ICP0 や後期遺伝子である UL26, UL26.5, UL38, UL41 及び Us11 の発現量が、タンパク質及び mRNA レベルで低下することから(3, 24, 25), ICP22 はウイルスが持ついくつかの遺伝子の発現を、特異性を持って制御する働きを持つことが示唆されている。また、ICP22 は宿主の基本転写因子である TFIID, 及び HSV-1 の遺伝子発現に重要な役割を果たしている ICP4, ICP27 と複合体を形成し、感染細胞内においては RNA polymerase II (Pol II) 及び ICP4 と共局在することが報告されている(26, 27)。更に, (i) HSV-1 の感染は Pol II の転写活性を制御する Pol II の carboxyl-terminal domain (CTD) のリン酸化状態の変化を引き起こし(28, 29), このリン酸化状態の変化に ICP22 が必要であること(30), (ii) *in vitro* で、ICP22 は Us3 依存的に Pol II CTD のリン酸化の責任キナーゼである cdk9 と相互作用すること(31), (iii) cdk9 のノックダウン及び cdk9 の特異的な阻害剤は ICP22 が発現を制御する後期遺伝子の発現を抑制すること(32), (iv) cdk9 は感染細胞で ICP22 依存的に Pol III が存在する領域にリクルートされることが報告されている(32)。これらの報告から、ICP22 は感染細胞内で cdk9 を”ウイルス RNA の転写の場”までリクルートし、Pol II CTD のリン酸化を促進することによって後期遺伝子の発現を促進する機能を持つことが考えられる。しかしながら、ICP22 の特異的な遺伝子発現制御メカニズムについては未だに解明されていないのが現状である。

## 本研究の目的

上述の通り、感染初期のイベントと考えられる ICP22 による後期遺伝子の発現制御メカニズムは徐々に明らかになってきているが、感染後期における ICP22 の機能、ICP22 の特異的な遺伝子発現制御、前初期遺伝子である ICP0 の発現制御メカニズムについては殆んど明らかになっていないのが現状である。更に、ICP22 は HSV-1 の正常なビリオンの構成に必要であることが報告されていることから(33), ICP22 は遺伝子発

現制御以外の機能を有している可能性が示唆された.

そこで本研究では ICP22 と相互作用する新規宿主因子, 及びウイルス因子を MS(Mass Spectrometry)を用いたインタクトーム解析によって同定することにより, ICP22 の既知の機能に対する作用メカニズム, 及び新規機能を解明することを目的とした.

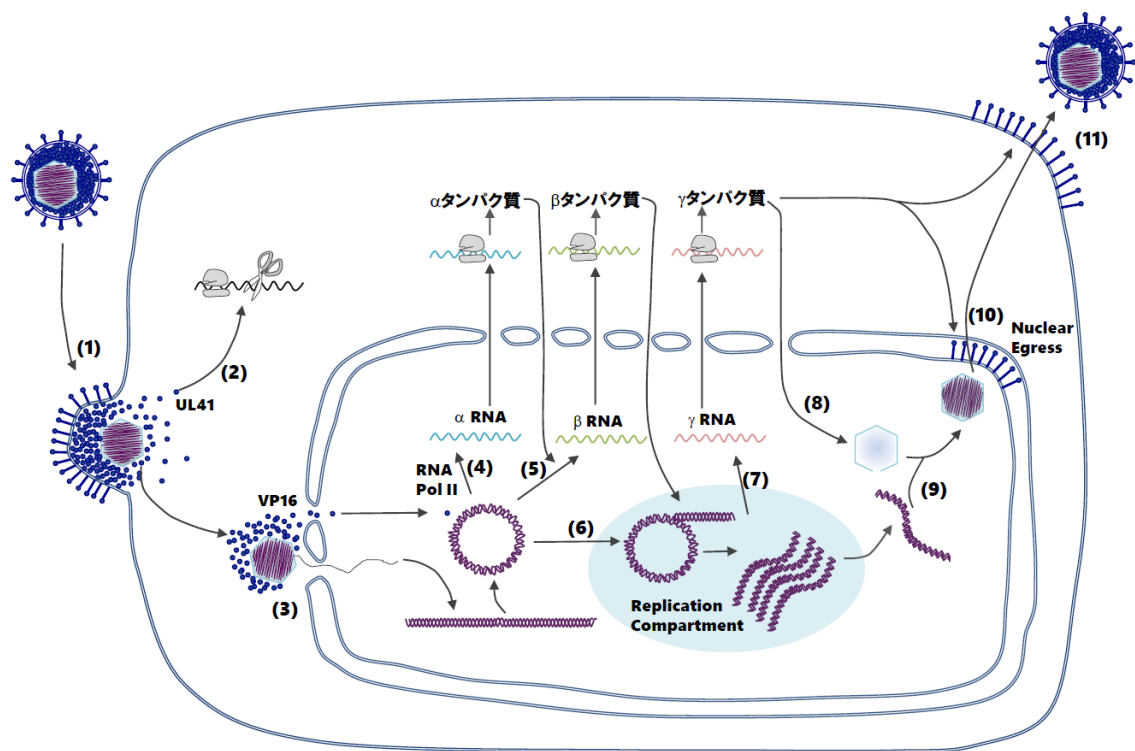


図 I-1: 単純ヘルペスウイルスの生活環

HSV は細胞に吸着・侵入後(1), UL41 などのテグメントタンパク質を細胞質に放出する(2). カプシドは核膜孔に運ばれ(3), ウイルス DNA は核内に注入され環状化される. テグメントタンパク質である VP16 により $\alpha$ 遺伝子群の RNA-polymerase II による転写が活性化され(4),  $\alpha$ タンパク質群が合成される.  $\alpha$ タンパク質群によって $\beta$ 遺伝子群の転写が活性化され,  $\beta$ 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 は複製される(6).  $\gamma$ タンパク質群が合成され(7), カプシドが生成される(8). カプシドにウイルス DNA がパッケージングされる(9). ヌクレオカプシドは核膜を通過後(10), テグメントタンパク質, エンベロップを獲得後, ウイルス粒子はエキソサイトーシスによって出芽する(11).

## 第 1 章

### ICP22 による p53 の制御

Maruzuru et al., J. Virol., 2013, 87, 9323-32

## 1-1 要旨

第 1 章では、過剰発現させた ICP22 のインタラクトーム解析によって同定された p53 を扱う。本章では p53 の HSV-1 の増殖に与える影響、及び ICP22 と p53 の相互作用の意義を解明する為に、HCT116 p53(+/+)及び p53(-/-)細胞を用いて解析を実施した。その結果、p53(-/-)細胞においては、HSV-1 野生株の増殖効率は p53(+/+)の細胞に比べ減少していた。この結果は p53 が HSV-1 の増殖に対して正の影響を持っていることを示している。その一方で、ICP22 欠損株の増殖効率は p53(+/+)と p53(-/-)の細胞で差は認められなかった。感染後 2 時間において、HSV-1 の増殖に必須の役割を果たしている ICP27 の発現量は HSV-1 野生株、及び ICP22 欠損株感染 p53(-/-)細胞で p53(+/+)細胞と比較して減少していた。その一方で、HSV-1 がコードするタンパク質である ICP0 の発現量は、感染後 18 時間において ICP22 欠損株感染 p53(-/-)細胞で p53(+/+)細胞に比べ発現が増加していた。しかし、HSV-1 野生株感染 p53(-/-)及び p53(+/+)細胞では ICP0 の発現量の差は認められなかった。これらの結果は p53 が HSV-1 に対して ICP27 の発現量の増強という正の影響と ICP0 の発現量の抑制という負の影響両方を持ち、ICP22 が負の影響を抑制していることを意味している。

## 1-2 序文

諸言で述べた通り，ICP22 は遺伝子発現制御因子ということが知られていたが，ICP0 の発現制御に対する作用機序やその他の機能については殆んど明らかになっていないのが現状であった．そこで本章では ICP22 による ICP0 の遺伝子発現制御の作用機序，及び新規機能を解明することを目的とし，ICP22 と相互作用する宿主因子を MS を用いたインタクトーム解析によって同定した．本研究では MS によって同定されたタンパク質の中から，p53 に着目し解析を進めた．

p53 はアポトーシス，細胞周期，細胞の老化，DNA 修復，オートファジーや初期免疫を制御する最もよく知られた転写因子の 1 つである(34, 35)．p53 はウイルスの増殖に対して正の影響と負の影響を持っていることが報告されている．ウイルスの感染は細胞にとってストレスとも捉えることができる為，p53 の“ウイルス感染ストレス”に対する応答はウイルスの増殖を抑制する効果を持ち，パピローマウイルスやポリオウイルス，及び JC ウイルスなどはその効果を抑制する機構を備えていることが報告されている(36-38)．その一方で CMV, EBV, 及びヒト免疫不全ウイルスなどは効率的なウイルス増殖の為に p53 を利用する(39-41)．HSV-1 の感染において，p53 は細胞種依存的に安定化され，HSV-1 の転写や DNA 複製の場である replication compartments にリクルートされること報告されている(42, 43)．p53 の活性化はその安定化によって引き起こされるため(34)，HSV-1 の感染は p53 の活性化を引き起こしていることが考えられたが，p53 が HSV-1 の増殖に与える影響は未解明であった．

本章では，HCT116 p53(+/+)細胞と p53(-/-)細胞を用いて，p53 が持つ HSV-1 の増殖に対する影響，及び ICP22 と p53 の相互作用の生物学的な意義を解明することを目的とし解析を実施した．本章における解析によって p53 は HSV-1 の増殖にとって正の影響と負の影響を合わせ持ち，ICP22 は p53 の負の影響を抑制する機能を持つということが明

らかとなった。



## 1-3 実験方法

### 細胞とウイルス

野生型HSVはF株を使用した(44). 組み換えウイルスYK711(MEF-gB)は筆者の研究室で以前に作製されたものを使用した(45). Vero細胞はDulbecco's modified Eagle's 培地(DMEM) に5 % Carf serum (CS), 100units/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で培養した. RSC細胞はDMEMに5% fatal carf serum (FCS) , 100units/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で培養した. HCT116 p53(+/+)およびp53(-/-)細胞はDr. B. Vogelsteinにより樹立されたものを分与して頂いた. HEL細胞はDr. Shinya Watanabeから分与して頂いた. これらの細胞はDMEMに10% Fatal carf serum (FCS) , 100units/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で培養した. CSおよびFCSは56°Cで30分間の非働化処理後に使用した.

Vero 細胞, HEL 細胞, HCT116 細胞におけるウイルス増殖には, 199 培地(Sigma) に1%FCS, 100units/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)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 の値を示す.

### プラスミド

N 末端側に MEF(Myc epitope - TEV protease 切断サイト-Flag epitope)タグが付加された ICP22 を発現するプラスミド pcDNA-MEF-ICP22 は, pBC1013 (46)より HSV-1 ICP22 をコードする Us1 の ORF を PCR で増幅し, pcDNA-MEF(47)にクローニングした(図 1-1A). ICP22 欠損株の復帰株である YK422 ( $\Delta$ ICP22-repair)を作製する為のトランスファープラスミド, pBS-ICP22-Kan は pcDNA-MEF-ICP22 から Us1 を含む EcoRV-NotI 断片を

pBluescript II KS(+) (Stratagene) にクローニングし, pBS-ICP22 を作製後, pEPkan-S より カ ナ マ イ シ ン 耐 性 遺 伝 子 を プ ラ イ マ ー 5'-GCCTGCAGGTGTCCGGCGGAACCTGGGGAGGATGACGACGATAAGTAGGG-3' お よ び 5'-GCCTGCAGCAAACGGCACCCACGTGCGCGCAACCAATTAACCAATTCTGATTAG-3' を用いて PCR で増幅し, pBS-ICP22 の PstI サイトにクローニングすることで作製した. ICP22 の 283-420 アミノ酸の N 末端側に glutathione S-transferase (GST)を融合させたタンパク質を大腸菌で発現させる為のプラスミド, pGEX-ICP22C<sub>283-420</sub> は pBS-ICP22 から Us1 の 283-420 番目のコドン PCR によって増幅し, pGEX-4T-1 (GE Healthcare)にクローニングした. p53 を発現するレトロウイルスベクターである pMXs-p53 は, HEL 細胞の total RNA から作製した cDNA より p53 の ORF を PCR で増幅し, pMXs-puro (48)にクローニングすることで作製した. Total RNA は High Pure RNA Isolation Kit (Roche)を用いて HEL 細胞から精製し, cDNA は Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche) を用いて作製した. VP16 の発現プラスミドである pcDNA-VP16 は, UL48 の ORF を pBC1007 から PCR によって増幅し, pcDNA5/FRT (Invitrogen)にクローニングした. Luciferase assay のレポータープラスミドである pICP27-luc は ICP27 のプロモーター領域 (ICP27 の転写開始点から -896 から +78 塩基)を pBC1007 から PCR によって増幅し, pGL3-Basic (Promega)にクローニングした. Luciferase assay で使用したもう一方のプラスミドである pSR $\alpha$ -luc は pME18S(49)の SR $\alpha$ を含む HindIII-EcoRI 断片を pGL3-Basic にクローニングすることによって作製した.

#### タンデム免疫沈降と MS を用いた ICP22 の相互作用因子のスクリーニング

Polyethylenimine (50)を用いて 293T 細胞に pcDNA-MEF-ICP22 をトランスフェクションし, 48 時間後にセルスクレイパーによって回収し PBS で 2 回洗浄した. 回収した細胞

をプロテアーゼ阻害剤カクテル(ナカライ)とフォスファターゼ阻害剤カクテル(ナカライ)を添加した 0.1% NP-40 buffer (50 mM Tris-HCl [pH 8.0], 120 mM NaCl, 50 mM NaF, 0.1% NP-40)で溶解後, 4°C, 9,000 rpm で 20 分間遠心し、上清に protein A ビーズ(GE)を加え、4°Cで 30 分ローテーションすることによってプレクリアランスした。遠心によりビーズを除去後、anti-Myc 抗体(MBL)を加え 4°Cで 2 時間ローテーションした。protein A ビーズを加え 4°Cで 1 時間ローテーション後、遠心によってビーズを回収し、0.1% NP40-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した。遠心後、上清を回収し anti-Flag affinity gel (Sigma)を加え、一晚 4°Cでローテーションした。遠心して上清を除去後、anti-Flag affinity gel を wash buffer (50 mM Tris-HCl [pH 8.0], 120 mM NaCl, 50 mM NaF)で 3 回洗浄し、Flag elution buffer (50 mM Tris-HCl [pH 7.5], 150 mM NaCl, 0.5 mg Flag peptide/ml)を加え 4°Cで 2 時間ローテーションすることによって anti-Flag affinity gel から免疫沈降物を溶出させた。1/10 の溶出液を SDS-PAGE に供し、銀染色によって免疫沈降を確認した (図 1-1 B)。残り 90%の溶出液はトリプシンで処理し、常法に従い脱塩処理し、nano liquid chromatography tandem mass spectrometry (nanoLC-MS/MS)解析に供した(45)。MS は Q-STAR Elite (AB SCIEX) と Dina (KYA Technologies)を用いた。共沈降されたタンパク質は RefSeq database (National Center for Biotechnology Information; 38,963 sequences as of July 5, 2010)を使用し、Mascot algorithm(Version 2.2.04; Matrix Science)を用いて同定した。その時のパラメーターは以下のものを使用した。“variable modifications, oxidation (Met), protein N-terminal acetylation, pyroglutamination (Gln), phosphorylation (Ser, Thr, and Tyr); maximum missed cleavages, 2; peptide mass tolerance, 200 ppm; and MS/MS tolerance, 0.5 Da.” あるタンパク質由来の 1 本以上のペプチドが Mascot score の閾値( $P < 0.05$ )を下回っていた場合そのタンパク質が同定されたとみなした。

## 組み換えウイルスの作製

本章で用いた組み換えウイルスの作製には pYEBac102 を保持した大腸菌である GS1783 (51)での two-step Red-mediated mutagenesis 法(52)を用いた. 20  $\mu$ g/ml のクロラムフェニコールを含む 32 度の LB 培地で培養し, 600 nm の OD が 0.5 から 0.7 の間で回収後, 42°Cの恒温槽で15分間インキュベートし, 氷上で20分間冷却した GS1783 をエレクトロコンピテントセルとして調製した(44). ICP22 欠損株 YK421( $\Delta$ ICP22) は I-SceI 認識配列とカナマイシン耐性遺伝子を内部に持つ, pEP-KanS をテンプレートとして ICP22 の ORF 両端に隣接する 40bp ずつのターゲット配列をその両端に持つカセッ ト を 5'-gcggggggaagccactgtggtcctccggacgttttctgggtccggtcgccccgacccccaggatgacgacgataagtaggg-3' と 5'-ttttatttggggacatacaaggggggtcggggcgaccggacccagaaaaacgtcccgaggacaaccaattaaccaattctgattag-3'のプライマーで PCR によって作製した. 調製した GS1783 に PCR によって作製したカセッ トをエレクトロポレーションによって導入し, 抗生物質を含まない LB 培地中で 32°C で 1.5 時間培養後, 20  $\mu$ g/ml のクロラムフェニコールと 40  $\mu$ g/ml のカナマイシンを含む LB 寒天培地にプレーティングした. 翌日形成されたカナマイシン耐性の大腸菌のコロニーから PCR によって HSV ゲノム上の適切な位置にカセットが導入されたコロニーを選択した (便宜上この GS1783 の保持する HSV-BAC を pYEBac102- $\Delta$ 22-Kan と呼ぶ). 次に, カナマイシン耐性カセットを pYEBac102- $\Delta$ 22-Kan から除去するために, 20  $\mu$ g/ml のクロラムフェニコールと 40  $\mu$ g/ml のカナマイシンを含む LB 培地で一晩前培養した pYEBac102- $\Delta$ 22-Kan を保持する GS1783 100  $\mu$ l を 20  $\mu$ g/ml のクロラムフェニコールのみを含む 2 ml の LB 培地に加え, 32°Cで 2.5 時間培養した. その後 GS1783 が保持する I-SceI を誘導するために 400  $\mu$  L の 10%アラビノースを培地中に加え, 更に 1 時間培養した. その後 Red recombination を誘導するために 42°Cで 30 分

間培養し、更に 32℃で 90 分間培養後 20  $\mu$ g/ml のクロラムフェニコールを含む LB 寒天培地にプレーティングした。翌日、生育したコロニーをクロラムフェニコールのみの寒天培地とクロラムフェニコールとカナマイシンを含む寒天培地それぞれにリストリークし、12 時間から 24 時間 32℃で培養した後、カナマイシンを含む寒天培地で生育しなかった大腸菌クローンの HSV-BAC 中の Us1 領域を適切なプライマーで PCR によって増幅することで、カナマイシン耐性遺伝子が除去されたことを確認し、更にシーケンスによって欠失した Us1 の ORF の周辺の配列に変異が入っていないこと確認した（この方法によって作製した HSV-BAC を pYEbac102- $\Delta$ 22 と呼ぶ）。

RSC 細胞を培養ボトルにまいた 2 時間後に、精製した pYEbac102- $\Delta$ 22 と pcDNA3-MEF-ICP22 を各 1  $\mu$ g, ddH<sub>2</sub>O 250  $\mu$ l, 2.2mM CaCl<sub>2</sub> 35  $\mu$ l, 2 $\times$ Hepes buffered Saline pH7.05 (0.14mM NaCl, 2.7mM KCl, 1mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 50mM HEPES, 1mM dextrose) 250  $\mu$ l を混合して室温で 15 分間インキュベートした。RSC を PBS で洗浄後、DEAE-dextran (0.2% DEAE-dextran (Pharmacia) in PBS) で 10 分間インキュベートして、TEN で洗浄した。DNA 混合液と培地を添加して 6 時間培養後、新しい培地に交換した。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。

ICP22 欠損株の復帰株 YK422( $\Delta$ ICP22 repair) は上記で作製した pYEbac102- $\Delta$ 22 を保持する GS1783 から同様にエレクトロコンピテントセルを作製し、pBS-ICP22-KanS を テ ン プ レ ー ト に 5'-gcggggggaagccactgtggtcctccgggacgttttctggatggccgacatttccccaggcgc-3' と 5'-cttttatttggggacatacaaggggtcgggcgaccggactcacggcggagaaacgtgt-3' のプライマーセットによって PCR によって増幅したカセットをエレクトロポレーションで導入し、上記と同様の方法で pYEbac102- $\Delta$ 22 repair を作製し、BAC を精製後 RSC にトランスフェクションすることで YK422( $\Delta$ ICP22 repair)を得た。

ICP22 の N 末端側に MEF タグが付加された組み換えウイルス YK423(MEF-ICP22) は pYEBac102 を保持する GS1783 のエレクトロコンピテントセルに、  
5'-tgctcgctcgggcgggggaagccactgtggtcctccggcggttttctggatggagcaaaagctcatttc-3' 及び  
5'-ggacgccgcgcttttacacaaggcgcaaaagcgctg gggaaatgtcggcatctttgtcatcgctcgtcct-3' のプライマーセットによって PCR で増幅したカセットを導入し、上記と同様の方法で pYEBac102-MEF-ICP22 を作製し BAC を精製後 RSC にトランスフェクションすることで YK423(MEF-ICP22)を得た。

## 抗体

本章で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:  $\alpha$ -Flag (M2, Sigma),  $\alpha$ -Myc (PL14, MBL),  $\alpha$ -p53 (DO-1, Biolegend),  $\alpha$ - $\alpha$ -tubulin (DM1A, Sigma),  $\alpha$ -ICP27 (8.F.137B, Abcam), 及び $\alpha$ -ICP0 (1112, Goodwin Institute), and ウサギポリクローナル抗体:  $\alpha$ -Flag (DDDDK, MBL), 及び $\alpha$ -laminB1 (ab16048, Abcam)

ICP22 の pGEX-4T-1-ICP22 で大腸菌 (BL21 DE3-star) をエレクトロポレーションによって形質転換し、その大腸菌に培養後 IPTG を添加することによって GST-ICP22(283-420)の発現誘導を行った。2 時間の誘導後、大腸菌を回収し 1% Triton-X in PBS によって懸濁しソニケーションを行った。遠心後、上清にグルタチオンセファロースビーズを加え、3 時間 4℃でローテーションした。遠心によってビーズを回収後、PBS でビーズを 4 回洗浄した。ビーズに 10 mM glutathione buffer を加え、GST-ICP22 (283-420)を溶出した。精製した GST-ICP22 (283-420)を MBL に送付し、ポリクローナル抗体の作製を委託した。

## ウイルスの力価測定 (プラークアッセイ)

10 倍で段階希釈したウイルス希釈液を Vero 細胞に 1 時間吸着させた後、ヒト $\gamma$ -グロブ

リン (Sigma) を含む新しい199V 培地に変え、37℃で 3 日間培養した。細胞をメタノールで固定し、クリスタルバイオレットで染色後、実態顕微鏡 Stemi DV4 (Carl Zeiss)により well ごとのプラーク数をカウントしウイルスの力価を算出した。

### 増殖曲線

Vero 細胞, HEL 細胞, HCT116 p53(+/+)細胞, HCT116 p53(-/-)細胞に各ウイルスを図 1-3,5,6 に示した MOI で感染させた。37℃で 1 時間吸着させた後、199 培地で細胞を洗浄し、37℃で培養し、継時的に回収した。回収した細胞は 3 回凍結融解した後、Vero 細胞を用いてウイルス力価を測定した。

### 共免疫沈降

HEL 細胞に各ウイルスを MOI5 で感染させ、感染9時間後にセルスクレイパーで回収後、0.1% NP-40 buffer で溶解し、遠心によって細胞片を取り除いた。上清に Flag 抗体を加え 4℃で 2 時間ローテーション後、Protein A ビーズを加え更に 4℃で 1 時間ローテーションした。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

HEL 細胞をあらかじめコラーゲンコート (機能性ペプチド研究所)した 35 mm ガラスボトムディッシュ (Matsunami)で培養し、各ウイルスを MOI10 で感染させ、9 時間後に 4% paraformaldehyde in PBS で 15 分間固定した。PBS で洗浄後、0.1% Triton X-100 を含む PBS を加え室温で 20 分間静置し、PBS で洗浄後、ブロッキング液 (10% ヒト血清を含む PBS)を加え、室温で 2 時間ブロッキングした。その後各種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) と 63×1.4 倍 Plan-APOCHROMAT 対物レンズで観察した。

LSM5 での観察には Argon laser (458 nm, 488 nm, 514 nm) と HeNe laser (543 nm, 633 nm) (Carl Zeiss) を使用した。Alexa Fluor 488 (Invitrogen) の蛍光は 488 nm で励起し, BP515-545 emission filter で観察した。Alexa Fluor 546 (Invitrogen) の蛍光は 543nm で励起し, LP620 emission filter で観察した。

### ウェスタンブロッティング

各ウイルスの感染細胞から得られたタンパク質を SDS-PAGE にて分離した。SDS-PAGE 後, transfer buffer (Tris 12.1g, glycine 14.4g, methanol 200 ml, H<sub>2</sub>O 800 ml) に浸したろ紙でゲル及びニトロセルロースメンブレン (Bio-Lad) をはさみ, 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 in PBS) を用いて室温で 30 分以上ブロッキングした後, 1% BSA を含む PBS-T で希釈した 1 次抗体で, 2 時間以上反応させた。PBS-T で洗浄後, 2 次抗体である Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-mouse または anti-rabbit 抗体 (GE) を 3% スキムミルク in PBS-T で希釈し, 室温で 1 時間反応させた。PBS-T で洗浄後, Enhanced chemiluminescence (GE Healthcare) で反応後 X 線フィルム (FUJIFILM) により目的のバンドを検出した。

### 統計処理

エラーバーは各 n 数で行った実験の標準誤差を示した。有意差は Student の t 検定によって評価した。

### HCT116 p53(-/-)細胞への p53 の再導入

293T 細胞由来の murine leukemia virus を元にしたパッケージング細胞である Plat-GP 細



胞に pMx-p53-puro または空ベクターである pMxs-puro を vesicular stomatitis virus のエンベロープ G タンパク質をコードする pMDG と共にコトランスフェクションした。トランスフェクション 2 日後，レトロウイルスを含む培養上清を HCT116 p53(-/-)及び p53(+/+)細胞に添加した。レトロウイルス添加 2 日後に最終濃度が 2 $\mu$ g/ml となるように puromycin を培地中に添加し，puromycin 耐性の細胞を選択した。puromycin 耐性能を得た HCT116-p53(-/-)の細胞のコロニーを単離し，p53 に対する抗体を用いて p53 の再導入を確認し，HCT116 p53(-/-)-p53+細胞とした。puromycin 耐性能を pMX-puro 由来のレトロウイルスの感染によって獲得した HCT116 p53(-/-)，HCT116 p53(+/+)細胞は本章ではそれぞれ HCT116 p53(-/-)-empty 及び，HCT116 p53(+/+)-empty と表記する。

### **定量 PCR**

上述した方法と同様に，各ウイルス感染細胞から total RNA を精製し，cDNA を作製した。ICP27, ICP0 及び 18s rRNA の cDNA はそれぞれの特異的なプライマーと加水分解プローブ Universal ProbeLibrary (Roche) 及び，DNA polymerase TaqMan Master (Roche)を製品説明書通りに混合後，Light Cycler 1.5Systemm (Roche)で定量した。遺伝子特異的なプライマーと universal probe は ProbeFinder software (Roche)を用いて設計した。本章で使したプライマーとプローブを列挙する。ICP27 : 5'-TCCGACAGCGATCTGGAC-3', 5'-TCCGACGAGGAACACTCC-3' 及び Universal ProbeLibrary probe #56 , ICP0: 5'-ACCACCATGACGACGACTC-3', 5'-AGCCCCGTCTCGAACAGT-3' 及び Universal ProbeLibrary Probe #56 , 18s rRNA : 5'-GCAATTATCCCCATGAACG-3', 5'-GGGACTTAATCAACGCAAGC-3' 及び ProbeLibrary Probe #48. ICP27 と ICP0 の発現量は 18S rRNA の発現量によって補正した。各遺伝子の発現量は $\Delta\Delta C_t$ 法を用いて計算した(53)。

### **Luciferase assay**

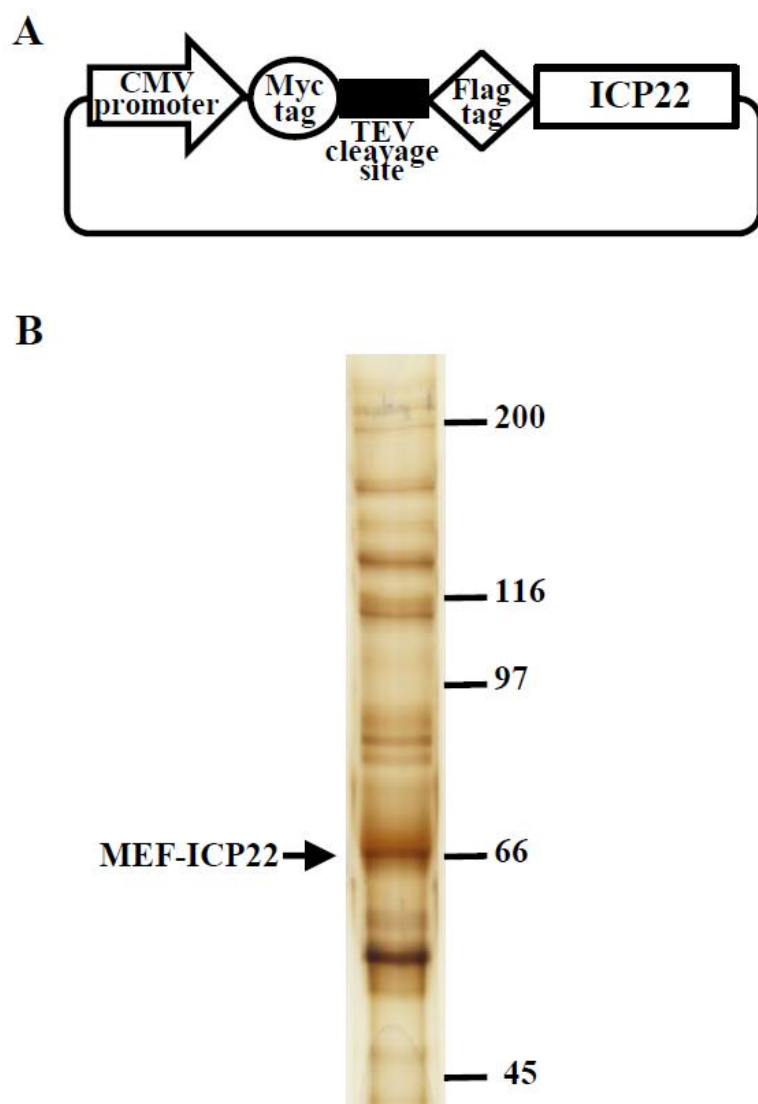
48 well プレートで培養した HCT116 p53(-/-)細胞に polyethylenimine を用いて 125 ng の pICP27-luc (ICP27 promoter)と, インターナルコントロールとして 12.5 ng の pRL-CMV (Promega)をトランスフェクションした. 更に, 図 1-9 に示した通り, 4 パターンでエフェクタープラスミドを同時にトランスフェクションした(empty: 270 ng の pcDNA5/FRT, empty + p53: 30 ng の pcDNA5/FRT と 240 ng の pcDNA-p53, VP16 + empty: 30 ng の pcDNA-VP16 と 240 ng の pcDNA5/FRT, VP16 + p53: 30 ng の VP16 と 240 ng の pcDNA-p53). pSR $\alpha$ をトランスフェクションしたウェルも同様の組み合わせでプラスミドをトランスフェクションした. プラスミドのトランスフェクション後 24 時間後に回収し Passive lysis buffer (Promega)で細胞を溶解後, 各ウェルのホタルルシフェラーゼとウミシイタケルシフェラーゼの活性を dual-luciferase reporter assay system (Promega)で測定した(FLUOstar OPTIMA [BMG LABTECH]).

相対的なプロモーター活性は (ホタルルシフェラーゼ活性) / (ウミシイタケルシフェラーゼ活性) により算出した.

## 1-4 結果

### ICP22 と相互作用する宿主因子の同定

ICP22 と相互作用する宿主因子を同定する為に、MEF-ICP22 を過剰発現させた 293T 細胞を用いて、MS によるインタラクトーム解析を行った。その結果、ICP22 と相互作用する宿主因子を 329 種類同定した(図 1-1B)。同定されたタンパク質の中には既に ICP22 との相互作用が報告されている p78, Hsc70, EAP, casein kinase II の 2 つのサブユニットが含まれていた(21, 26, 54, 55)。本研究では同定されたタンパク質の中で、様々な細胞現象を制御する p53 に注目し解析を進めることにした(34)。



**図 1-1: pcDNA-MEF-ICP22 の模式図とタンデム免疫沈降後の銀染色像**

(A) N 末端側に MEF-tag が付加された ICP22 の発現プラスミドである pcDNA-MEF-ICP22 の模式図 (B) 293T 細胞に(A)で示した pcDNA-MEF-ICP22 をトランスフェクションし、回収後、Myc 抗体と Flag 抗体で 2 回免疫沈降し、免疫沈降物の 10% を SDS-PAGE に供し、銀染色を行った。矢印は MEF-ICP22 を示し、分子量マーカーは右に示した。

### 本章で用いたウイルスの性状解析

感染細胞での ICP22 と p53 の相互作用, 及びその生物学的意義を解明する為, 本研究では ICP22 欠損株である YK421 ( $\Delta$ ICP22) 及び, その復帰株である YK422 ( $\Delta$ ICP22-repair), 更に ICP22 の N 末端側に MEF-tag が付加された組み換えウイルスである YK423 (MEF-ICP22) を作製した (図 1-2). 過去の報告通り, 野生株である HSV-1 (F) 及び YK422 ( $\Delta$ ICP22-repair) 感染 HEL 細胞の細胞溶解液を SDS-PAGE 後ウェスタンブロッティングで解析した結果, 本研究で作製した ICP22 に対するポリクローナル抗体は 67-72 kDa にかけての複数のタンパク質を検出した (3) (図 1-3A). その一方で非感染細胞 (mock), YK421 ( $\Delta$ ICP22) 感染細胞の細胞溶解液に対しては反応しなかった (図 1-3A). また, 過去に報告された ICP22 欠損株の性状解析の結果と同様に (3, 23), YK421 ( $\Delta$ ICP22) 感染 HEL 細胞における ICP0 の発現量は, HSV-1 (F) 及び YK422 ( $\Delta$ ICP22-repair) 感染 HEL 細胞に比較して低下していたが, ICP27 の発現量はこれらの細胞間で同様であった (図 1-3 A). 更に, HEL 細胞において YK421 ( $\Delta$ ICP22) は HSV-1 (F) 及び YK422 ( $\Delta$ ICP22-repair) と比較してその増殖が顕著に減少していたが (図 1-3B), Vero 細胞ではこれらのウイルス間での増殖は同等であった (図 1-3 C).

YK423 (MEF-ICP22) 感染 HEL 細胞の細胞溶解液を SDS-PAGE 後ウェスタンブロッティングで解析した結果, Flag 抗体及び ICP22 の抗体はいずれも複数のバンドを認識した (図 1-3A). YK423 の MEF-ICP22 のバンドの移動度が HSV-1 (F) と比べて減少したのは, ICP22 への MEF-tag の付加に起因すると考えられる. また, HEL 細胞において YK423 (MEF-ICP22) は HSV-1 (F) と同等の増殖能を持ち (図 1-3B), YK423 感染細胞における ICP0 の発現量が低下しないことから (図 1-3 A), ICP22 への MEF-tag への付加は ICP22 の機能に影響を及ぼさないものであると考えられる.

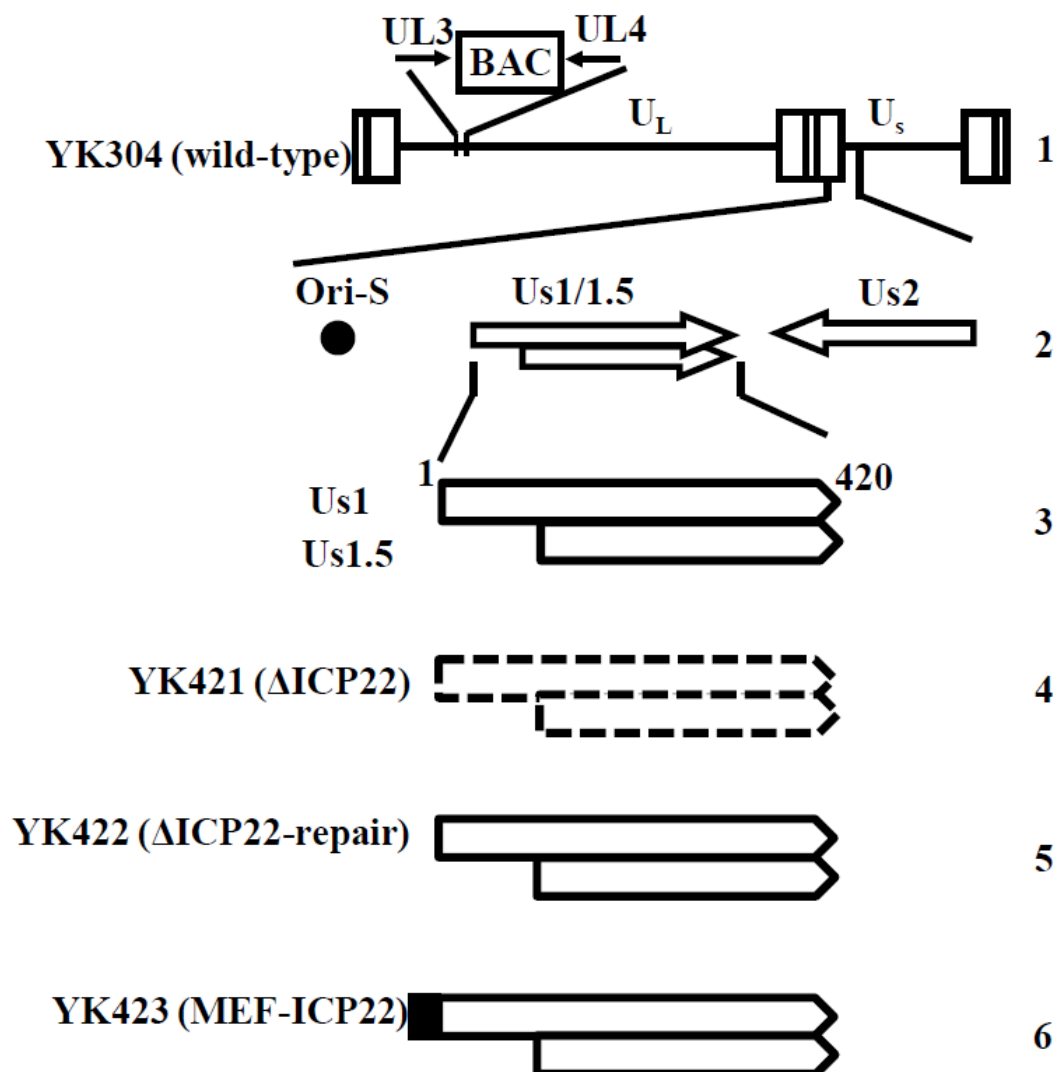


図 1-2: ウイルスゲノム構造と本章で作製したウイルス

野生型ウイルスである YK304 のゲノム構造の模式図. Unique 配列は Unique Long (UL) と unique short (Us) ドメインとして表した(1 行目). YK304 ゲノムは Bacmid (BAC) を UL3 と UL4 遺伝子間に挿入されている. ウイルス DNA の複製起点である Ori-S と Us1 及び Us2 の ORF(2 行目). ICP22 と Us1.5 のドメイン(3 行目). 本研究で作製した組み換えウイルスの模式図(4 - 6 行目).

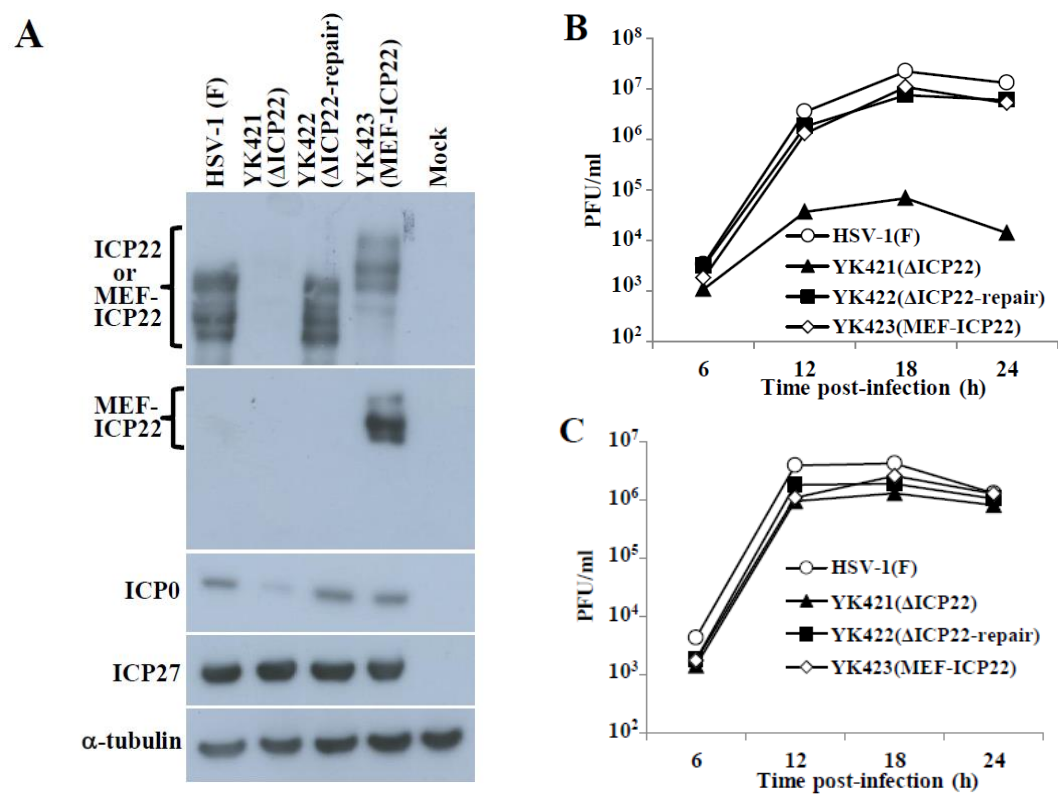


図 1-3: 本研究で作製したウイルスの性状解析

(A) HEL 細胞に各ウイルスを MOI 5 で感染させ、18 時間後に ICP22, Flag, ICP0, ICP27 及び  $\alpha$ -tubulin の抗体によってウェスタンブロッティングによって解析した. (B) HEL 細胞及び (C) Vero 細胞に MOI 5 で各ウイルスを感染させ、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 ICP22 と p53 の相互作用

感染細胞中での ICP22 と p53 の相互作用を確認する為に感染細胞における共免疫沈降の実験を行った。YK423 (MEF-ICP22), YK711 (MEF-gB), または野生株である HSV-1 (F) を HEL 細胞に感染させ、その細胞溶解液を Flag 抗体で免疫沈降し、免疫沈降物を p53, LaminB1 及び Flag 抗体を用いてウェスタンブロッティングで解析した。図 1-4 A に示した通り、YK423 (MEF-ICP22) 感染細胞の細胞溶解液を Flag 抗体によって免疫沈降することで MEF-ICP22 が免疫沈降され、p53 の共沈降も確認されたが、野生株である HSV-1 (F) の感染細胞はどちらも免疫沈降されなかった。更に、YK711 (MEF-gB) の細胞溶解液を Flag 抗体で免疫沈降しても p53 は共沈降されず、LaminB1 は YK423 及び YK711 感染細胞の細胞溶解液どちらも共沈降されなかった(図 1-4B)。これらの結果は感染細胞中で ICP22 は特異的に p53 と複合体を形成していることを示している。次に、YK423 (MEF-ICP22) 感染 HEL 細胞における MEF-ICP22 と p53 の局在を Flag 抗体と p53 抗体を用いて免疫蛍光抗体法によって解析した。過去の報告と同様に(26, 43), ICP22 と p53 は主に核に局在し、部分的に共局在していることを確認した(図 1-4C)。この結果は感染細胞において ICP22 と p53 が複合体を形成することを支持するものである。



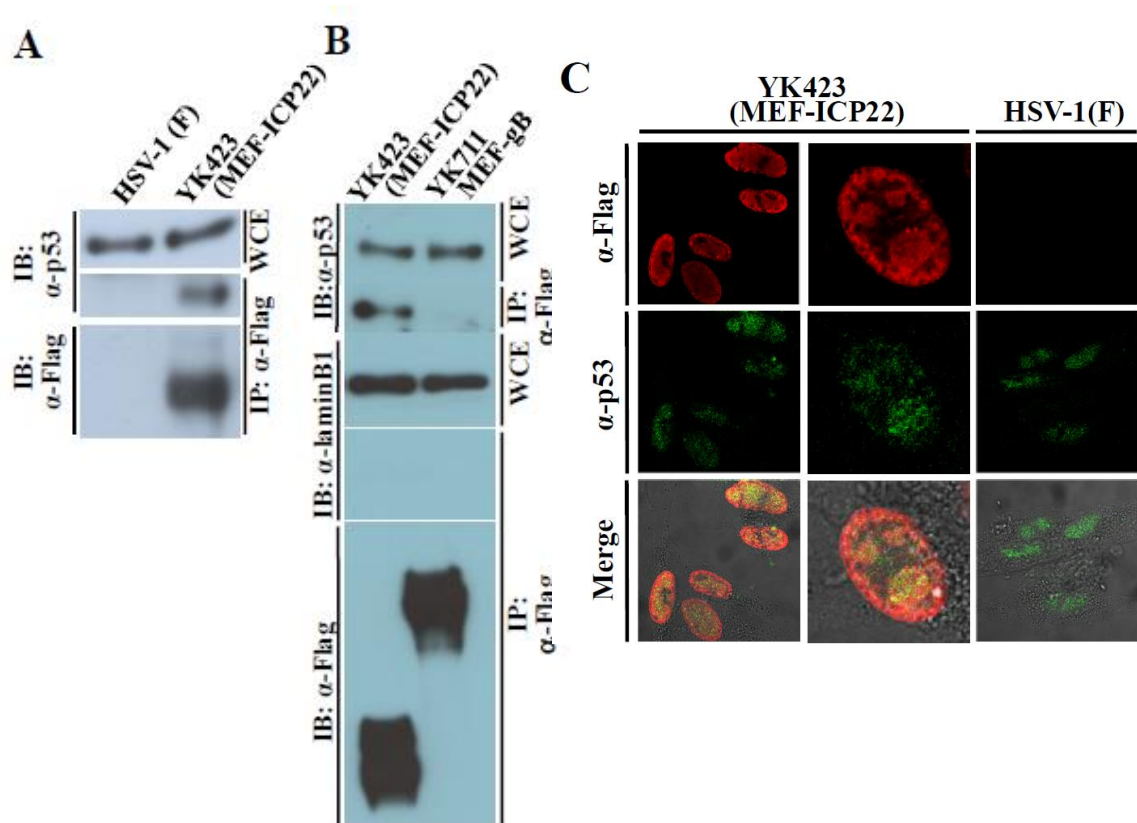


図 1-4: 感染細胞におけるICP22とp53の相互作用

(A) HEL細胞にMOI 5でHSV-1 (F) 及びYK423 (MEF-ICP22)を感染させ、感染後9時間後に回収後、Flag抗体で免疫沈降 (IP) を行い、p53抗体とFlag抗体を用いてウェスタンブロッティング (IB) を行った。WCE, whole cell extract

(B) HEL細胞にMOI 5でYK423 (MEF-ICP22)及びYK711 (MEF-gB)を感染させ、感染後9時間後に回収後、Flag抗体で免疫沈降 (IP) を行い、p53抗体とFlag抗体及びLaminB1抗体を用いてウェスタンブロッティング (IB) を行った。WCE, whole cell extract

(C) 各ウイルスをHEL細胞にMOI10で感染させ、感染後9時間後に固定しFlag抗体及びp53抗体を用いて免疫蛍光抗体法により共染色後、共焦点顕微鏡で観察した。

### p53 欠損変異の HSV-1 野生株および ICP22 欠損株に与える影響

p53 が HSV-1 の増殖に与える影響を調べる為、HSV-1(F), YK421 ( $\Delta$ ICP22) 及び YK422 ( $\Delta$ ICP22-repair)の増殖を HCT116 p53(+/+)及び p53(-/-)細胞を用いて解析した。図 1-5 に示す通り、HCT116 p53(+/+)細胞と比較して HCT116 p53(-/-)細胞において、野生株である HSV-1 (F)及び YK422 ( $\Delta$ ICP22-repair)はその子孫ウイルスの力価が低下していた。HCT116 p53(-/-)細胞感染 48 時間後の HSV-1 (F)及び YK422 ( $\Delta$ ICP22-repair)の子孫ウイルスの力価の低下倍率は HCT116 p53(+/+) 細胞に比較してそれぞれ 22 倍、及び 22.8 倍であった。その一方で、HCT116 p53(-/-)細胞における YK421 ( $\Delta$ ICP22)の増殖は HCT116 p53(+/+) 細胞と同等であった (図 1-5)。

p53 は DNA 複製や細胞周期のチェックポイントを制御することによってゲノムの安定性に関わることから、“ゲノムの守護神”とも呼ばれる (34)。従って、HCT116 p53(-/-)細胞における野生型 HSV-1 の増殖の低下は p53 の欠損が直接の決定要因ではなく、ゲノムの変異によって生じた他のタンパク質の変異や欠失が原因である可能性が否定できない。この可能性を排除する為に、本研究では HCT116 p53(-/-)細胞にレトロウイルスによって p53 を再導入した HCT116 p53(-/-)-p53+細胞を作製した。更に実験のコントロールとして empty レトロウイルスによって puromycin 耐性能を獲得させた HCT116 p53(-/-)-empty 及び、HCT116 p53(+/+)-empty も同時に作製した (図 1-6A)。HCT116 p53(-/-) 細胞及び HCT116 p53(+/+)細胞と同様に、HCT116 p53(-/-)-empty 細胞において、野生株である HSV-1 (F)及び、YK422 ( $\Delta$ ICP22-repair)の子孫ウイルスの力価は HCT116 p53(+/+)-empty と比較して有意に減少していた (図 1-6B)。更に、レトロウイルスによる HCT116 p53(-/-)への p53 の再導入は HSV-1 (F)及び YK422 ( $\Delta$ ICP22-repair)の増殖効率を有意に増加させ、HCT116 p53(-/-)-p53+細胞におけるこれらのウイルスの増殖は HCT116 p53(+/+)-empty 細胞と同等であった (図 1-6B)。その一方で、HCT116 p53(-/-)細胞と HCT116 p53(+/+)細胞を用いた解析と同様に、HCT116 p53(-/-)への p53 の再導入は、

YK421 ( $\Delta$ ICP22)の増殖に影響を与えなかった(図 1-6 B).

これらの結果は p53 が HSV-1 野生株の増殖に対して正の影響を持つが, ICP22 欠損株の増殖に対しては影響を持たないことを示している.

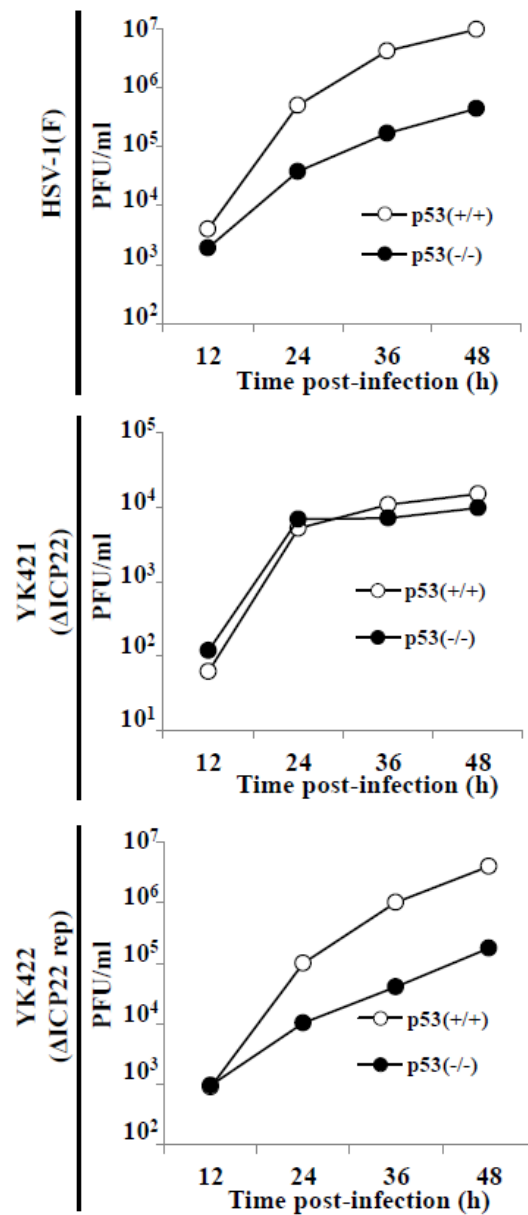
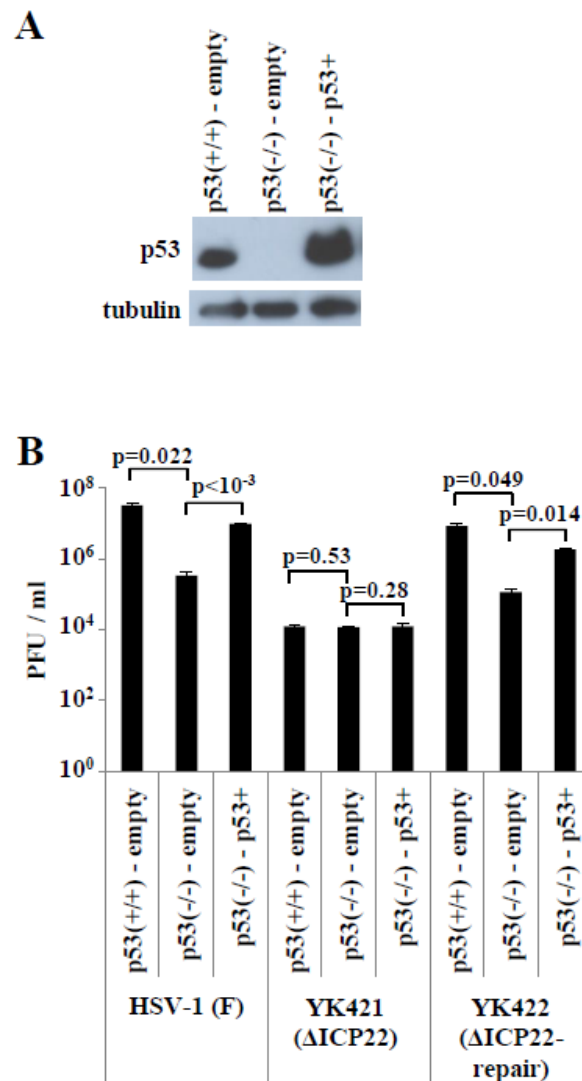


図 1-5: HSV-1 の増殖に対する p53 欠損変異の影響

HCT116 p53(+/+)及び、HCT116 p53(-/-)細胞に MOI0.01 で各ウイルスを感染させ、各タイムポイントにおけるウイルス力価を Vero 細胞を用いて測定した。



**図 1-6: HSV-1 の増殖に対する HCT116 p53(-/-)への p53 の再導入による影響**

(A) HCT116 p53(+/-)-empty 細胞, HCT116 p53(-/-)-empty 細胞, 及び HCT116 p53(-/-)-p53+ 細胞の溶解液を p53 抗体と  $\alpha$ -tubulin 抗体を用いてウェスタンブロッティングによって解析した(B) HCT116 p53(+/-)-empty 細胞, HCT116 p53(-/-)-empty 細胞, 及び HCT116 p53(-/-)-p53+ 細胞に MOI 0.01 で各ウイルスを感染させ感染後 48 時間後に回収しウイルス価を Vero 細胞を用いて測定した. エラーバーは triplicate で行った実験の標準誤差を表しており,  $P$  値の計算は two-tailed Student  $t$  test で行った.

### p53 の欠損が ICP27 の発現量に与える影響

p53 は様々な遺伝子の発現量を転写レベルや、転写後レベルで制御することが報告されている(34, 56). 従って、本研究では p53 がある特定の HSV-1 の遺伝子の発現を制御しているという仮説を立てた. この仮説を確かめる為に、野生株である HSV-1(F)及び YK421 ( $\Delta$ ICP22)の感染時の HCT116 p53(+/+)細胞及び、HCT116 p53(-/-)細胞における HSV-1 がコードするタンパク質の発現量を比較した. 本研究で検討した HSV-1 タンパク質の中で、ウイルスの増殖に必須の役割を果たしている IE タンパク質である ICP27 の発現量が感染後 2 時間という段階で、HCT116 p53(+/+)細胞に比べ HCT116 p53(-/-)細胞で減少していることが明らかとなった(図 1-7A). HSV-1 (F)及び YK421 ( $\Delta$ ICP22)での感染で同様の結果が得られたことから(図 1-7A), これらの結果は ICP22 非依存的なものであることが考えられた. 別の IE タンパク質である ICP22 の発現量は野生株である HSV-1 (F) の感染において HCT116 p53(-/-)細胞及び、HCT116 p53(+/+)細胞で差が認められなかった(図 1-7B). また、感染後 8 時間、18 時間においては ICP27, ICP22 の発現量は HCT116 p53(-/-)細胞及び、HCT116 p53(+/+)細胞で差が認められなかった(図 1-7A, B). 更に、HCT116 p53(-/-)細胞への p53 の再導入によって感染後 2 時間における HSV-1 (F)の ICP27 の発現量が回復した(図 1-7C). また、野生株である HSV-1 (F)感染 1.5 時間後の HCT116 p53(-/-)細胞及び、HCT116 p53(+/+)細胞における ICP27 の mRNA 量を定量した. その結果、図 1-7 における結果と同様に HCT116 p53(-/-)細胞における ICP27 の mRNA は HCT116 p53(+/+)細胞と比較して有意に低下していた(図 1-8). しかし、感染後 8 時間においては 2 つの細胞間で ICP27 の mRNA に有意な差は認められなかった(図 1-8).

これらの結果は感染後 2 時間という非常に早い段階で、p53 が ICP22 非依存的に ICP27 の効率的な発現に寄与していることを示している.

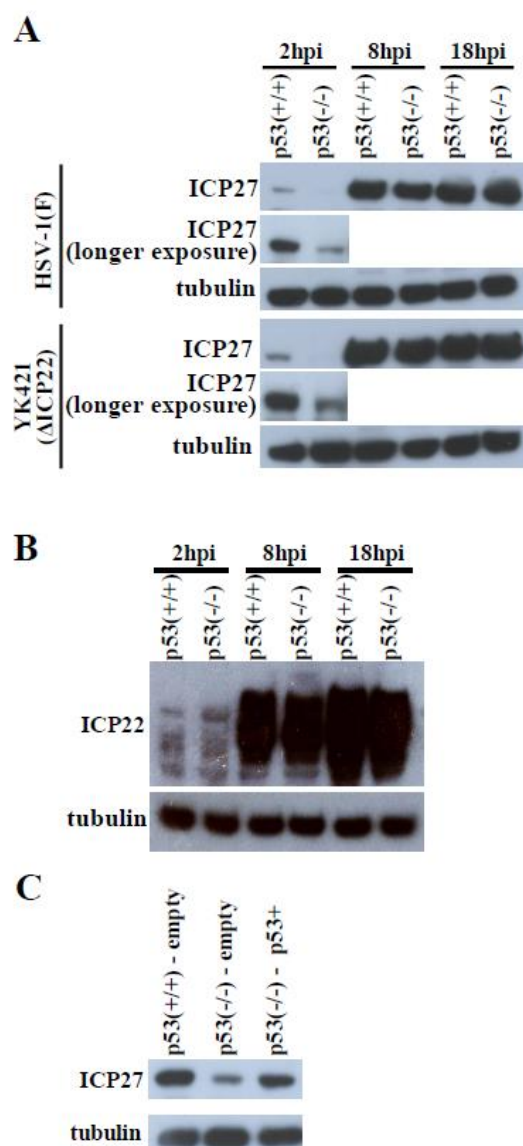
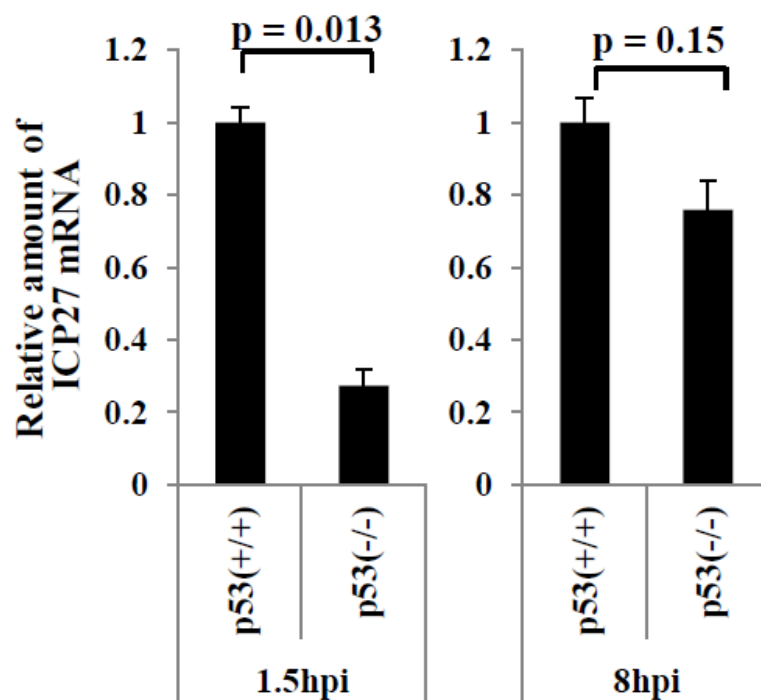


図 1-7: ICP27 の発現に対する p53 欠損変異の影響

(A) HCT116 p53(+/+) 及び HCT116 p53(-/-) 細胞に各ウイルスを MOI 5 で感染させ、各タイムポイントで回収し ICP27 及びα-tubulin に対する抗体でウェスタンブロッティングにより解析した. (B) HCT116 p53(+/+) 及び HCT116 p53(-/-) 細胞に HSV-1 (F)を MOI5 で感染させ、各タイムポイントで回収し ICP22 及びα-tubulin に対する抗体でウェスタンブロッティングにより解析した. (C) HCT116 p53(+/+)-empty 細胞, HCT116 p53(-/-)-empty 細胞 及び HCT116 p53(-/-)-p53+ 細胞に HSV-1(F)を MOI 5 で感染させ、感染後 2 時間で回収し、ICP27 とα-tubulin に対する抗体を用いてウェスタンブロッティングで解析した.



**図 1-8: ICP27mRNA の発現に対する p53 欠損変異の影響**

HCT116 p53(+/+)細胞, 及び HCT116 p53(-/-) 細胞に MOI 5 で HSV-1(F)を感染させ, 各タイムポイントで RNA を回収し, cDNA を合成後, ICP27 の mRNA の発現量を定量 PCR を用いて解析した. HCT116 p53(-/-)細胞における ICP27 の発現量は HCT116 p53(+/+)細胞における発現量を 1 とした時の相対値である. エラーバーは triplicate で行った実験の標準誤差を表し, *P* 値は two-tailed Student *t* test を用いて算出した.



### ICP27 プロモーターに対する p53 と VP16 の影響

これまでの結果は, 感染後非常に早い段階で p53 が ICP27 プロモーターを特異的に活性化していることを示している. 次に, 本研究では VP16 による ICP27 プロモーターの活性化に p53 が関与しているのか否かを検証する為に, HCT116 p53(-/-)細胞を用いて luciferase-reporter assay を行った. VP16 は HSV-1 の IE 遺伝子の発現を活性化する HSV-1 感染における転写のスターターである(2). 過去の報告と同様に, VP16 単独での発現は ICP27 プロモーターをおよそ 27 倍活性化させたが, その一方で p53 の単独発現は ICP27 プロモーターの活性にほとんど影響を及ぼさなかった(図 1-9A). 興味深いことに, p53 と VP16 の共発現は VP16 の単独発現に比べ有意に ICP27 プロモーターを活性化させた(およそ 47 倍) (図 1-9A). しかし, p53 の単独発現, 及び p53 と VP16 の共発現いずれも HSV-1 にコードされていない SR $\alpha$  プロモーターを活性化しなかった(図 1-9B). これらの結果は p53 が VP16 と協調的に ICP27 プロモーターを活性化する可能性を示している.

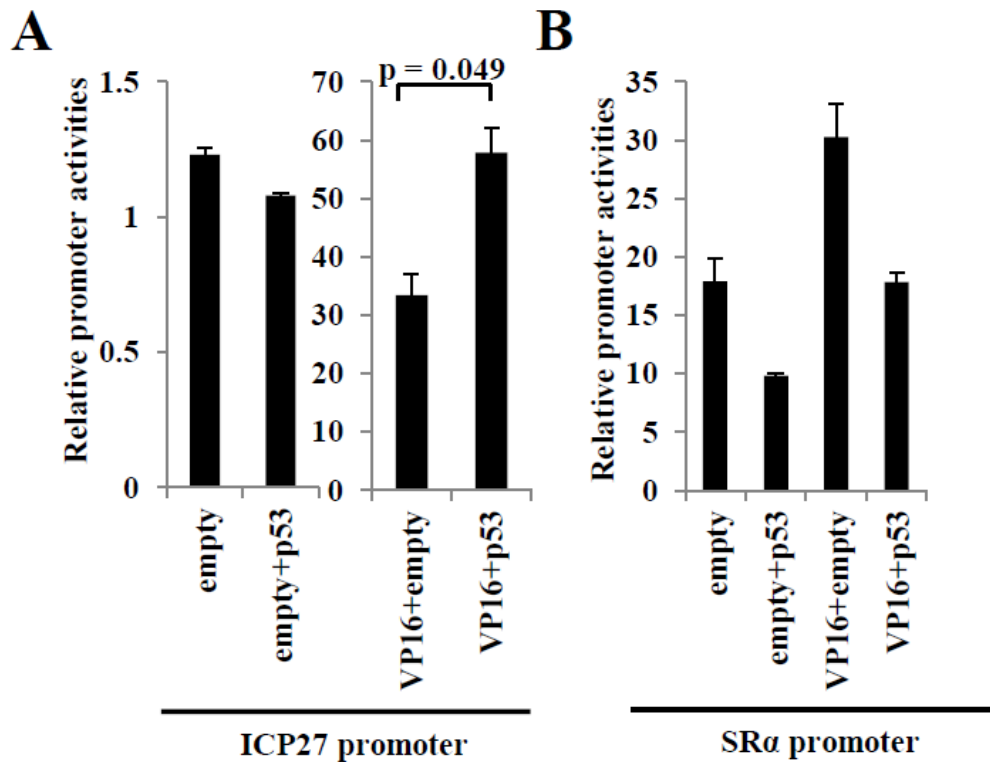


図 1-9: p53 の単独発現及び VP16 との共発現の ICP27 プロモーター活性に対する影響

HCT116 p53(-/-)に pRL-CMV, pICP27-luc (ICP27 プロモーター) (A)又は pSRα-luc (SRα プロモーター) (B)を pcDNA5/FRT (empty), pcDNA-VP16 (VP16) 又は pcDNA-p53 (p53) と共にトランスフェクションした. トランスフェクションの 24 時間後, ルシフェラーゼ活性を測定した. エラーバーは triplicate で行った実験の標準誤差を表しており,  $P$  値は two-tailed Student  $t$  test を用いて算出した.

### p53 の欠損が ICP0 の発現量に与える影響

HCT116 p53(-/-)細胞と HCT116 p53(+/+)細胞で HSV-1 タンパク質の発現量を検討している中で、p53 は HSV-1 の増殖に重要な役割を果たしている ICP0 の発現に対して(57, 58), ICP22 欠損株である YK421 ( $\Delta$ ICP22)特異的に影響を与えていることを見出した。図 1-10A に示す通り、YK421 ( $\Delta$ ICP22)感染 HCT116 p53(+/+)細胞において HCT116 p53(-/-)細胞と比較して ICP0 の発現量が低下した。一方で野生株である HSV-1 (F)及び YK422 ( $\Delta$ ICP22-repair)における ICP0 の発現量は HCT116 p53(-/-)細胞及び HCT116 p53(+/+)細胞で同等であり、ICP27 の発現量は HSV-1 (F), YK421 ( $\Delta$ ICP22)及び、YK422 ( $\Delta$ ICP22-repair)感染 HCT116 p53(+/+)及び p53(-/-)細胞で同等であった(図 1-10 A)。更に、HCT116 p53(-/-)細胞へレトロウイルスで p53 を再導入することによって YK421 ( $\Delta$ ICP22)の感染における ICP0 の発現量が低下することを確認した(図 1-10B)。これらの結果は p53 が ICP0 の発現量を ICP22 欠損株特異的に低下させる効果を持つが HSV-1 野生株に対してはその効果を持たないことを示している。従って、HSV-1 野生株においては ICP22 が p53 による ICP0 の発現量の低下の効果を阻害していることが示唆された。

次に、YK421 ( $\Delta$ ICP22)感染 HCT116 p53(-/-)細胞及び HCT116 p53(+/+)細胞における ICP0 の mRNA の発現量を比較した。図 1-10C に示した通り、ICP0 の mRNA の発現量は HCT116 p53(-/-)細胞及び HCT116 p53(+/+)細胞において有意な差は認められなかった。従って、ウェスタンブロッティングにおける ICP0 の発現量の差は転写後の段階における制御によって生じるものであることが示唆された。YK421 ( $\Delta$ ICP22)感染 HCT116 p53(-/-)細胞及び HCT116 p53(+/+)細胞における ICP0 の発現量の差は、転写後の段階による制御に関わる可能性が示唆されたことから、プロテアソーム阻害剤である MG132 がこの発現量の差に影響を及ぼすのかどうかを検討した。図 1-10 A, B における結果と同様に、dimethyl sulfoxide (DMSO)で処理した YK421 ( $\Delta$ ICP22)感染 HCT116 p53(+/+)の ICP0 の発現量は YK421 ( $\Delta$ ICP22)感染 HCT116 p53(-/-)細胞に比べて低下していた(図

1-10D). 一方, MG132 処理は YK421 ( $\Delta$ ICP22)感染 HCT116 p53(+/-)細胞の ICP0 の発現量を YK421 ( $\Delta$ ICP22)感染 HCT116 p53(-/-)及び, HSV-1 (F)感染 HCT116 p53(+/-)細胞のレベルまで回復させた(図 1-10D). これらの結果から, YK421 ( $\Delta$ ICP22)における p53 による ICP0 の発現量の低下は, プロテアソームによる分解が関与していることが示唆された.

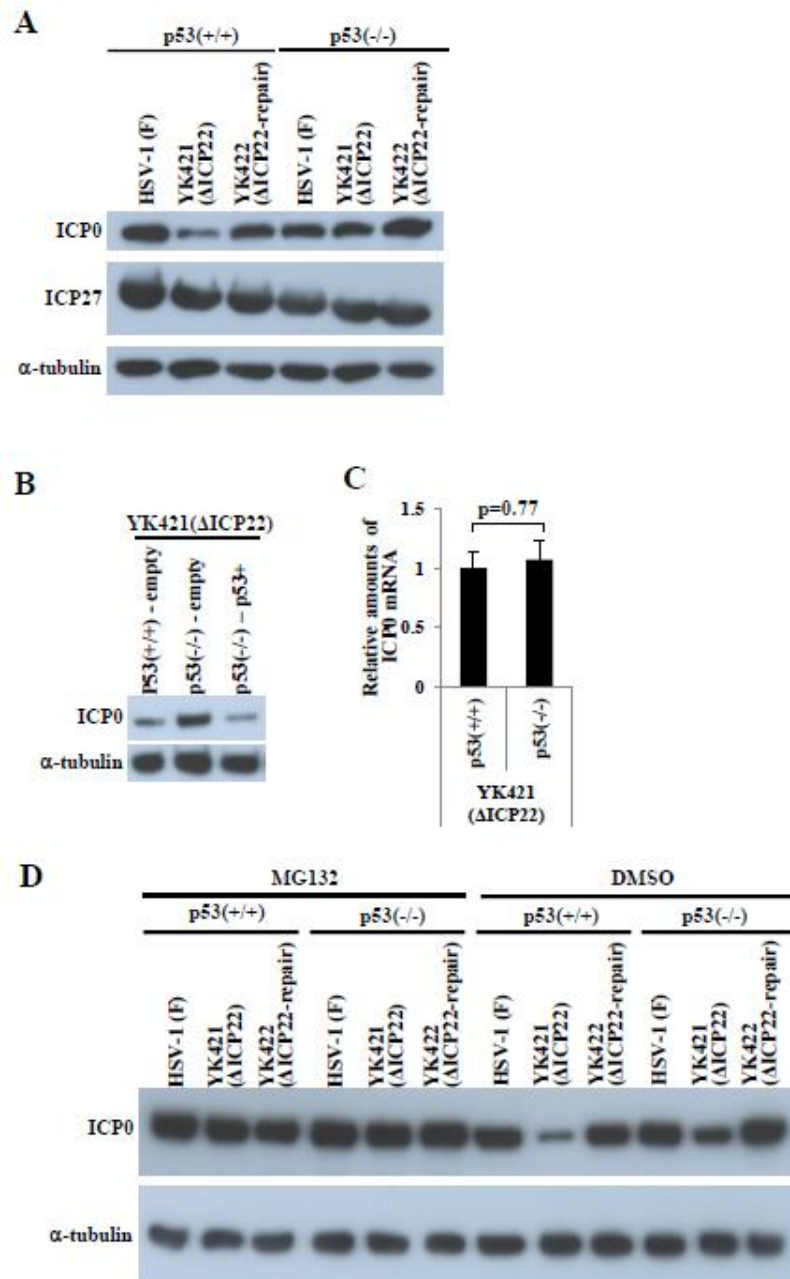


図 1-10: ICP0 の発現量に対する p53 欠損変異の影響

(A) HCT116 p53(+/-)細胞及び HCT116 p53(-/-)細胞 に 各ウイルスを MOI 5 で感染させ、感染後 18 時間後に回収し、ICP0、ICP27 及びα-tubulin に対する抗体を用いてウェスタンブロッティングにより解析した．(B) HCT116 p53(+/-)-empty 細胞， HCT116 p53(-/-)-empty 細胞， 及び HCT116 p53(-/-)-p53+ 細胞に YK421 (ΔICP22)を MOI 5 で感染

させ、感染後 18 時間後に回収し ICP0 及び $\alpha$ -tubulin に対する抗体を用いてウェスタンブロッティングにより解析した。 (C) HCT116 p53(+/+)細胞及び HCT116 p53(-/-)細胞に YK421 ( $\Delta$ ICP22)を MOI 5 で感染させ、感染 18 時間後 RNA を回収し、cDNA を合成後、ICP0 の mRNA の発現量を定量 PCR によって解析した。 HCT116 p53(-/-)細胞における ICP0 の発現量は HCT116 p53(+/+)細胞における発現量を 1 とした時の相対値である。 エラーバーは triplicate で行った実験の標準誤差を表し、*P* 値は two-tailed Student *t* test を用いて算出した。 (D) HCT116 p53(+/+)細胞及び HCT116 p53(-/-)細胞に各ウイルスを MOI5 で感染させ、MG132 (final 20  $\mu$ M)又は、DMSO を感染後 4 時間後の細胞に添加した。 MG132 と DMSO の添加後 14 時間で細胞を回収し、ICP0 及び $\alpha$ -tubulin の抗体でウェスタンブロッティングを行った。

## 1-5 考察

本章では MEF-ICP22 を過剰発現させた 293T 細胞を用いて実施したインタラクトーム解析によって、ICP22 が p53 と相互作用する可能性を見出した。また、このスクリーニングの結果に基づいて本章では ICP22 と p53 の感染細胞における相互作用、及び p53 が持つ HSV-1 の増殖に対する影響について解析をした。本章における結果は p53 が総合的には HSV-1 の増殖に対して正の影響を持つことを示している。しかしながら、p53 は潜在的には HSV-1 の増殖に対して正の影響と負の影響両方持っており、ICP22 が負の影響を抑制していることを意味している。本章における結果とそれに基づく考察を列挙する。

(i) **ICP22 は感染細胞で p53 と相互作用する。**本章で行った共免疫沈降 (図 1-4 A, B), 及び免疫蛍光抗体法による局在観察(図 1-4C)より、ICP22 と p53 が HSV-1 の感染細胞の核内において複合体を形成することが示唆された。本章で行ったインタラクトーム解析は非感染細胞を用いた。非感染細胞で ICP22 と p53 の相互作用が検出できたことは、ICP22 と p53 は他の HSV-1 タンパク質を介さずに相互作用していることを意味している。

(ii) **p53 は感染初期に ICP22 非依存的に ICP27 の発現を促進する。**ICP27 は mRNA の生合成や RNA のプロセッシング、更には mRNA の核から細胞質への移行に関わる HSV-1 の増殖に必須のタンパク質である(59)。従って、p53 が感染初期の HSV-1 野生株と ICP22 欠損株の感染いずれにおいても、ICP27 の効率的な発現に必要であるという結果は、p53 は ICP22 との相互作用非依存的に HSV-1 に対して ICP27 の発現量の促進という正の影響を与えていることを示唆している。過去の報告によれば p53 が DNA に結合し、その近傍の遺伝子の発現を制御する為のコンセンサス配列は 5'-RRRC(A/T)(A/T)GYYY-3' (R は A もしくは G, Y は T もしくは C)である(60)。し

かし、ICP27 の転写開始点から+3kbp - -1kbp の領域ではこのコンセンサス配列は存在しなかった。従って、現在までに p53 が ICP27 の発現量を感染初期において転写レベルで促進する作用機序はわかっていない。近年、p53 と結合する LSD-1 や p300 が VP16 と複合体を形成し、HSV-1 の IE 遺伝子の発現を制御することが明らかになっている(2, 61, 62). p53 はこの複合体と相互作用することで ICP27 の発現を促進する可能性も考えられる。この仮説を支持するように、HCT116 p53(-/-)細胞で行った reporter gene assay では p53 が VP16 による ICP27 プロモーターの活性化を特異的に促進するという結果が得られている(図 1-9)。また、VP16 の要求性は IE 遺伝子によって異なることが報告されている(63)。他の IE 遺伝子である ICP22 の発現に p53 の欠損が影響を及ぼさなかったのは VP16 の要求性の違いである可能性が考えられる。

**(iii) p53 は ICP22 欠損株感染細胞でプロテアソーム依存的に ICP0 の発現を抑制するが、野生株感染細胞ではその抑制能を持たない。** ICP0 は HSV-1 の遺伝子発現カスケードを移行させることや、インターフェロンによる細胞の初期免疫を抑制する機能を持ち、ウイルスの増殖に重要な役割を果たしているタンパク質である(57, 58)。従って、p53 が ICP22 欠損株特異的に ICP0 の発現量を抑制し、野生株感染細胞ではその機能を持たないという本研究における結果は、p53 が ICP22 欠損株特異的に ICP0 の抑制という、ウイルスの増殖に対して負の影響を与えていることを示している。更に、野生株は p53 の負の影響を受けないということは、野生株が持つ ICP22 が p53 と複合体を形成することで、この負の影響を抑制しているということを示唆している。諸言でも述べた通り、ICP22 による後期遺伝子の発現制御メカニズムについては徐々に明らかになってきていたが、ICP0 の発現制御メカニズムはまだ明らかになっていなかった。本章における結果は、ICP22 による p53 の負の影響の抑制が、ICP0 の発現制御に関わっていることを示唆している。また、ICP22 欠損株感染細胞における p53 の負の影響が MG132 によって消失することから、p53 は ICP22 欠損株感染細胞において、プロテアソーム依存的な



ICP0 の分解を促進していることが考えられる。ICP0 は E3 ユビキチンリガーゼ活性を持つことが知られており、ICP0 は自身をユビキチン化し、ICP0 の分解を引き起こすことが報告されている (64-66)。興味深いことに、ICP0 はユビキチン特異的プロテアーゼである USP7 と相互作用し、自身のユビキチン化を取り除くことで分解されることを防いでいる(67, 68)。更に、宿主の E3 ユビキチンリガーゼである SIAH-1 は ICP0 と相互作用し、ICP0 のプロテアソーム依存的な分解を感染細胞で引き起こすことが報告されている(69)。従って、感染細胞における ICP0 の安定性は様々なウイルス因子や宿主因子によって厳密に制御されており、未同定のタンパク質が関与している可能性が考えられる。p53 はこれらの因子の発現量や活性を制御することによって ICP0 の発現量を抑制し、ICP22 は p53 と相互作用することによって p53 のこの影響を抑制していることが考えられる。

従って、本章で得られた結果によって p53 は HSV-1 の増殖に対して ICP27 の発現量の促進という正の影響と ICP0 の発現量の抑制という負の影響両方持つが、HSV-1 野生株では ICP22 が負の影響のみ抑制することによって p53 の正の影響のみ受けるため、HCT116 p53(-/-)細胞に比べ HCT116 p53(+/+)細胞でウイルスの増殖効率が増加している可能性が考えられる(図 1-5)。また、ICP22 欠損株は p53 の負の影響を抑制できない為、正の影響と負の影響両方ける。その結果 HCT116 p53(-/-)細胞と HCT116 p53(+/+)細胞でその増殖が同様であったと考えられる(図 1-5)。

p53 は様々な細胞現象を制御する(34)。本章において明らかになった p53 が持つ HSV-1 の増殖に対する影響 (ICP27 の発現量の促進と ICP0 の発現量の抑制) 以外にも p53 が HSV-1 の増殖に対して機能を持つ可能性は十分考えられる。しかしながら、本章における結果は HSV-1 の増殖に対する p53 の機能を初めて示したものであり、更に、HSV-1 は自身に都合の悪い影響を ICP22 によって抑制していることが明らかとなった。

## 第 2 章

### ICP22 によるウイルス核出芽の制御

Maruzuru et al., J. Virol., 2014, 88, 7445-54

## 2-1 要旨

第 2 章では ICP22 と相互作用するウイルス因子を同定する為に第 1 章で作製した MEF-tag が付加された ICP22 を保持する組み換え HSV-1 を用いて ICP22 のインタラクトーム解析を行った。本章における結果は以下の通りである。(i)感染細胞における ICP22 のインタラクトーム解析とその後の共免疫沈降による解析の結果、ICP22 は HSV-1 がコードし、カプシドの核から細胞質への出芽の段階 (nuclear egress)に関与するタンパク質である UL31, UL34, UL47 及び Us3 と複合体を形成する。(ii) HSV-1 野生株感染細胞において ICP22 は UL31 と UL34 と核膜上で共局在する。(iii) UL31 欠損株感染細胞において ICP22 は核膜に局在しなくなる。(iv) ICP22 欠損株感染 Vero 細胞において UL31 と UL34 は ER への異常な局在を示し、ICP22 欠損株感染 HEL 細胞においては UL31 の発現量が減少する。また、ICP22 欠損株感染 Vero, HEL 細胞共に核膜間スペースの 1 次エンベロップメントを被った成熟粒子の割合が減少し、核内のカプシドの割合が増加する。これらの結果より、(I) ICP22 は HSV-1 がコードする nuclear egress の制御因子である UL31, UL34, UL47 及び Us3 と感染細胞中で相互作用し、(II) UL31/UL34 複合体は ICP22 の核膜への局在に必要であり、(III) ICP22 は UL31 及び、UL34 の局在を制御し、細胞種依存的に UL31 の発現量を制御することによって HSV-1 の primary envelopment の段階を制御することが明らかとなった。本章における結果は以前まで知られていなかった nuclear egress の制御という ICP22 の新規機能を示したものである。

## 2-2 序文

第 1 章では過剰発現の系を用いて ICP22 の相互作用因子をスクリーニングした為、ICP22 と相互作用するウイルス因子を同定することはできなかった。そこで本章では ICP22 と相互作用するウイルス因子を同定する為に、ICP22 の N 末端側に MEF-tag が付加された ICP22 をコードする組み換えウイルスである YK423 (MEF-ICP22)の感染細胞を使用して、MS を用いたインタラクトーム解析を行った。

上述のスクリーニング、及びその後の解析によって ICP22 は HSV-1 のカプシドの核膜通過に関与することが知られている UL31, UL34, UL47 及び、Us3 と複合体を形成することが明らかとなった。

ICP22 が UL31, UL34, UL47 及び、Us3 と複合体を形成するのであれば、ICP22 は HSV-1 の primary envelopment の制御因子である可能性が考えられた。従って本章では ICP22 が nuclear egress に果たす役割の解明を試みた。その結果 ICP22 は UL31 及び、UL34 の局在を制御し、細胞種依存的に UL31 の発現量を制御することによって HSV-1 の primary envelopment を制御することが明らかとなった。

## 2-3 実験方法

### 細胞とウイルス

Vero細胞はDulbecco's modified Eagle's 培地(DMEM) に5 % Carf serum (CS), 100units/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で培養した. RSC細胞はDMEMに5% fatal carf serum (FCS) , 100units/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で培養した. HEL細胞はDr. Shinya Watanabeから分与して頂いた. これらの細胞はDMEMに10% fatal carf serum (FCS) , 100units/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で培養した. UL31を恒常的に発現するUL31-CV1細胞は Dr. J.D. Bainesに分与して頂き, 10% fatal carf serum (FCS) , 100units/mlペニシリン, 100  $\mu$  g/mlストレプトマイシン, 200 $\mu$ g/mlハイグロマイシンBを添加した培地で培養した. DMEMにCSおよびFCSは56°Cで30分間の非働化处理後に使用した. Vero細胞, HEL細胞, HCT116細胞におけるウイルス増殖には, 199培地(Sigma) に1%FCS, 100units/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)を使用した. 野生株のHSV-1 (F), ICP22欠損株のYK421 ( $\Delta$ ICP22), ICP22欠損株の復帰株であるYK422 ( $\Delta$ ICP22-repair), MEF-tagが付加されたICP22を発現するYK423 (MEF-ICP22), MEF-tagが付加されたUL31を発現するYK539 (MEF-UL31), MEF-tagが付加されたUL34を発現するYK538, Us3のキナーゼ活性消失株であるYK511 (Us3K220M), Us3キナーゼ活性消失株の復帰株であるYK513 (Us3K220M-repair)は著者の研究室で以前に作製されたものを使用した(17, 70, 71) (図2-1). 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 の値を示す.

## プラスミド

UL31欠損株であるYK720 ( $\Delta$ UL31)の復帰株であるYK721 ( $\Delta$ UL31-repair)を作製する為の transfer プラスミドであるpBS-UL31-repは、UL31のORFの-649bp - +508bpをpYEBac102 (44, 70)からPCRで増幅し、pBluescript II KS(+)にクローニングすることで作製した。

ICP22の1-90アミノ酸のN末端側にglutathione S-transferase (GST)を融合させたタンパク質を大腸菌で発現させる為のプラスミド、pGEX-ICP22N<sub>1-90</sub>はpBS-ICP22からUs1の1-90番目のコドンをPCRによって増幅し、pGEX-4T-1 (GE Healthcare)にクローニングすることによって作製した。

## タンデム免疫沈降と MS を用いた ICP22 の相互作用因子のスクリーニング

HEL 細胞に YK423 (MEF-ICP22)を MOI3 で感染させ、感染後 18 時間で回収し PBS で 2 回洗浄した。回収した細胞をプロテアーゼ阻害剤カクテル(ナカライ)とフォスファターゼ阻害剤カクテル(ナカライ)を添加した 0.1% NP-40 buffer (50 mM Tris-HCl [pH 8.0], 120 mM NaCl, 50 mM NaF, 0.1% NP-40)で溶解後、4°C, 9,000 rpm で 20 分間遠心後上清に protein A ビーズ(GE)を加え 4°Cで 30 分間ローテーションすることによってプレクリアランスを行った。遠心でビーズを除去後、上清に anti-Myc 抗体(MBL)を加え 4°Cで 2 時間ローテーションした。protein A ビーズを加え 4°Cで 1 時間ローテーション後、遠心によってビーズを回収し、0.1% NP40-buffer で 4 回洗浄後、ビーズに TEV protease buffer (50 mM Tris-HCL[pH8.0], 0.5 mM EDTA, 1 mM DTT)と AcTEV protease (Promega)を加え室温で 1 時間ローテーションした。遠心後、上清を回収し anti-Flag affinity gel (Sigma)を加え、一晩 4°Cでローテーションした。遠心して上清を除去後、anti-Flag affinity gel を 0.1% NP-40 buffer で 3 回洗浄後、wash buffer (50 mM Tris-HCl [pH 8.0], 120 mM NaCl, 50 mM NaF)で 2 回洗浄し、Flag elution buffer (50 mM Tris-HCl [pH 7.5], 150 mM NaCl, 0.5 mg Flag peptide/ml)を加え 4°Cで 2 時間ローテーションすることによって anti-Flag affinity gel から

免疫沈降物を溶出させた。溶出液をトリプシンで処理し、常法によって脱塩処理後、nano liquid chromatography tandem mass spectrometry (nanoLC-MS/MS)解析に供した(45)。MSはQ-STAR Elite (AB SCIEX) と Dina (KYA Technologies)を用いた。共沈降されたタンパク質はRefSeq database (National Center for Biotechnology Information; 38,963 sequences as of July 5, 2010)及び the viral proteins in non-redundant database (NCBI; 754,281 sequences as of June 10, 2011)を使用し、Mascot algorithm (Version 2.2.04; Matrix Science)を用いて同定した。その時のパラメーターは以下のものを使用した。“variable modifications, oxidation (Met), protein N-terminal acetylation, pyroglutamination (Gln), phosphorylation (Ser, Thr, and Tyr); maximum missed cleavages, 2; peptide mass tolerance, 200 ppm; and MS/MS tolerance, 0.5 Da.”あるタンパク質由来の1本以上のペプチドが Mascot score の閾値( $P < 0.05$ )を下回っていた場合そのタンパク質が同定されたとみなした。

### 組み換えウイルスの作製

本章で作製した組み換えウイルスは第1章と同様の方法で作製した。UL31の8番目から269番目のコドンに I-SceI site と kanamycin 耐性遺伝子で欠失させた組み換えウイルスである YK720 ( $\Delta$ UL31)を作製する為に、pYEBac102 を保持した大腸菌である GS1783 に、  
5'-TGTCCTGGAGCACACCCTGTGTACCTATGTATGACACCGACCCCCATCGAGGATG  
ACGACGATAAGTAGGG-3' , 及び  
5'-GTCGAAGCTGATGTCCCTCATTTCACAATAAATGTCTGCGGCCGACACGGCAACC  
AATTAACCAATTCTGATTAG-3'のプライマーで作製した kanamycin カセットをエレクトロポレーションすることによって pYEBac102- $\Delta$ UL31 を作製した。  
pYEBac102- $\Delta$ UL31 を UL31-CV1 細胞に lipofectamine 2000 (Invitrogen)でトランスフェクションすることによって YK720 ( $\Delta$ UL31)を作製した (図 2-1)。YK720 ( $\Delta$ UL31)の復帰株

である YK721 ( $\Delta$ UL31-repair)は pYEbac102 と pBS-UL31-rep を RSC 細胞にリン酸カルシウム法によってトランスフェクションし、細胞にプラークが生じるまで培養した。培養上清中のウイルスを Vero 細胞で 2 回プラーク純化し、変異が回復していることはシーケンス解析によって確認した。YK720 ( $\Delta$ UL31)を使用した実験では、野生株である HSV-1 (F)及び YK721 ( $\Delta$ UL31-repair)を含めて UL31-CV1 細胞でウイルスを増殖させ、UL31-CV1 細胞で力価を測定したものを使用した。

## **抗体**

本章で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： $\alpha$ -Flag (M2, Sigma),  $\alpha$ -Myc (PL14, MBL),  $\alpha$ - $\alpha$ -tubulin (DM1A, Sigma) and  $\alpha$ -ICP4 (58s, ATCC), ウサギポリクローナル抗体である  $\alpha$ -Calnexin (c4731, Sigma),  $\alpha$ -LaminB1 (ab16048-100, Abcam),  $\alpha$ -Flag (DDDDK, MBL) and  $\alpha$ -VP23 (CAC-CT-HSV-UL18, CosmoBio). ウサギポリクローナル抗体の  $\alpha$ -UL34,  $\alpha$ -UL31,  $\alpha$ -UL12 及び  $\alpha$ -Us3, マウスポリクローナル抗体の  $\alpha$ -UL31, チキンポリクローナル抗体の  $\alpha$ -UL34 (a generous gift from R. Roller) (9, 17, 70, 72, 73). ICP22 の C 末側と N 末側のマウスポリクローナル抗体を作製する為に、pGEX-ICP22C<sub>283-420</sub>(1 章)及び pGEX-ICP22N<sub>1-90</sub> を大腸菌(BL21 DE star [invitrogen]) にエレクトロポレーションすることによって形質転換し、その大腸菌に培養後 IPTG を添加することによって GST-ICP22 (283-420)及び GST-ICP22 (1-90)を発現誘導した。大腸菌を回収し 1% Triton-X in PBS によって懸濁しソニケーションを行った。遠心後、上清にグルタチオンセファロースビーズを加え、3 時間 4°C でローテーションした。遠心によってビーズを回収後、PBS でビーズを 4 回洗浄した。ビーズに 10 mM glutathione buffer を加え、GST-ICP22 (283-420), GST-ICP22 (1-90)を溶出させた。これらのタンパク質と TiterMax Gold (TiterMax USA, Inc)を混合したものを 4 週令、雌の BALB/c マウスの腹腔に接種し、血清の抗体価の上昇を確認後、全採血を行った。



その血清をそれぞれ ICP22 の C 末側, 及び N 末側の抗体とした. 本章で作製した ICP22 の N 末側の抗体は Us1.5 を認識せず, ICP22 のみ認識する為, ICP22 の局在を特異的に認識する抗体として免疫蛍光抗体法で使用した. ICP22 の C 末側の抗体はウェスタンブロットティングで使用した.

### 抗体を用いた解析

免疫沈降, ウェスタンブロットティング及び免疫蛍光抗体法は第 1 章と同様の方法で行った.

### 電子顕微鏡による解析

Vero 細胞または HEL 細胞に MOI 5 で各ウイルスを感染させ, 感染 18 時間後培地を除き, PBS で洗浄後アルデヒド固定液 (2% paraformaldehyde, 2% glutaraldehyde in 0.1M phosphate buffer (pH7.4))を加え, 室温で 10 分間固定した. セルスクレイパーで細胞を回収し, 遠心後, 新しいアルデヒド固定液に入れ替え, 4℃で 1 晩以上固定した. 3% sucrose in 0.1M phosphate buffer (pH7.4)で洗浄した後, オスミウム固定液 (1% osmium tetroxide in 0.1M phosphate buffer (pH7.4))を加え氷上で 2 時間固定した. 水洗し, 30%, 50%, 70%, 90%, 99.5% ethanol, propylene oxide の順に置換して脱水した後, Epon812 resin mixture (TAAB laboratories Equipment Ltd., Berks, England)で包埋した. 超薄切片を作製し, 2% uranyl acetate in 70% ethanol と Reynolds'鉛染色液 (pH12)で染色し, 透過型電子顕微鏡 (Hitachi H-7500)で観察した.

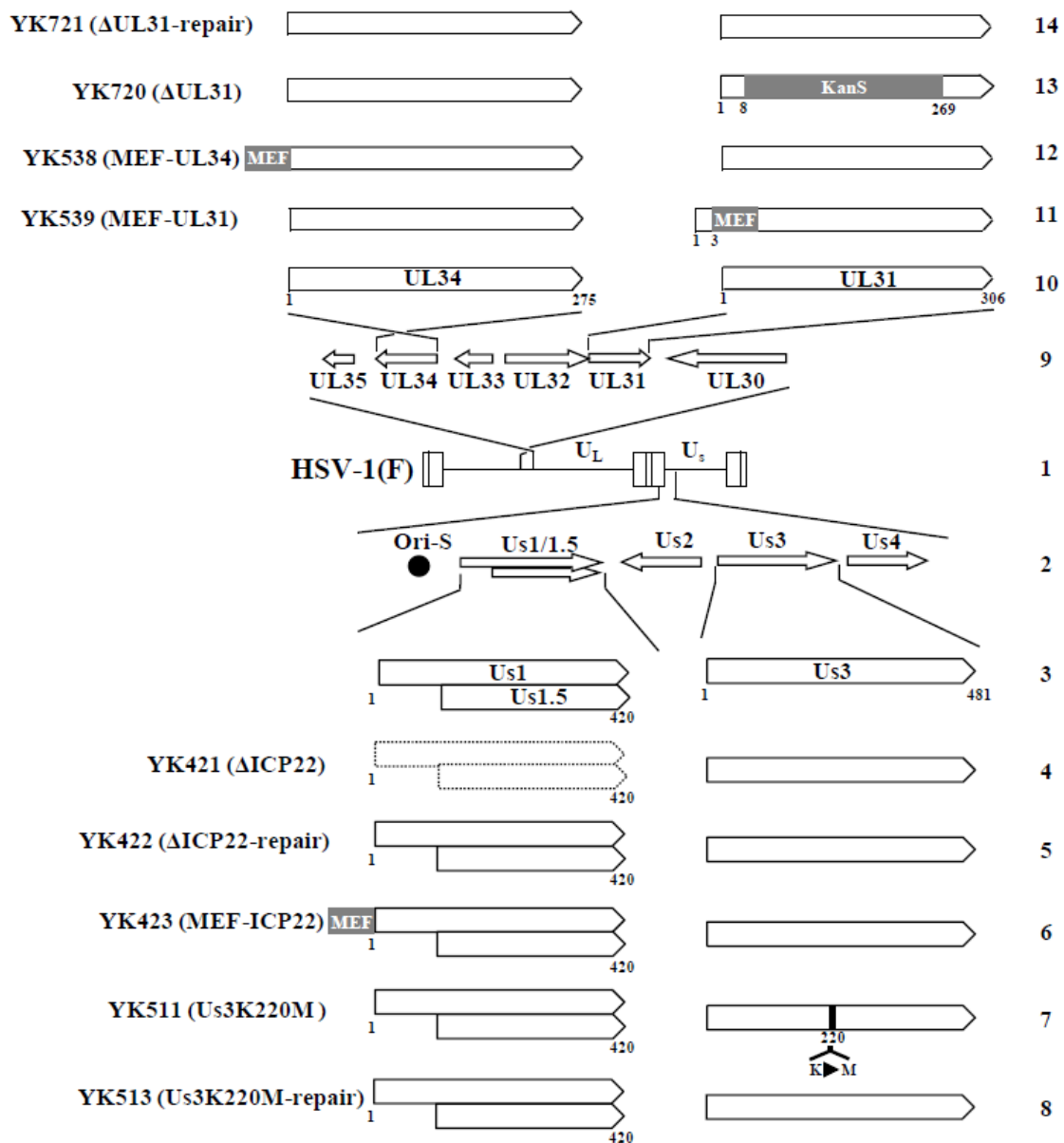


図 2-1: ウイルスゲノム構造と本章で作製したウイルス

野生型ウイルスである YK304 のゲノム構造の模式図. Unique 配列は Unique Long (UL) と unique short (Us) ドメインとして表した(1 行目). YK304 ゲノムは Bacmid (BAC) を UL3 と UL4 遺伝子間に挿入されている. ウイルス DNA の複製起点である Ori-S と Us1–Us4 の ORF(2 行目). ICP22 と Us1.5 及び, Us3 のドメイン(3 行目). UL30–UL35 の ORF (9 行目). UL34 と UL31 のドメイン(10 行目). 本研究で作製した組み換えウイルスの模式図(4–8, 11-14 行目).

## 2-4 結果

### HSV-1 感染細胞で ICP22 と相互作用するウイルス因子の同定

第 1 章では過剰発現の系を用いて ICP22 の相互作用因子をスクリーニングした為、ICP22 と相互作用するウイルス因子を同定することはできなかった。そこで本章では HSV-1 感染細胞内で ICP22 と相互作用するウイルス因子を同定する為に YK423 (MEF-ICP22)を HEL 細胞に感染させ、その溶解液を Myc 抗体と Flag 抗体でタンデム免疫沈降後、免疫沈降物の構成因子を MS によって同定した。その結果 19 種類のウイルスタンパク質と 237 種類の宿主タンパク質が同定された。同定されたタンパク質の中には既に ICP22 との相互作用が報告されている hsc70, EAP, Casein kinase II のサブユニット, ICP4, 及び ICP27 が含まれていた(21, 26, 27, 54)。本章では同定された 19 種類のウイルスタンパク質の中で、primary envelopment を制御することが知られている UL31, UL34 及び UL47 に着目し解析を進めた。

### HSV-1 感染細胞における ICP22 の UL31, UL34, Us3 及び UL47 との相互作用

上述のスクリーニングで同定されたタンパク質の UL31, UL34 及び UL47 は HSV-1 がコードする serine/threonine プロテインキナーゼである Us3 と複合体を形成することが報告されている(17, 74)。この複合体に ICP22 が含まれるのかどうかを検討する為に、HEL 細胞に野生株 HSV-1(F), YK423 (MEF-ICP22), YK538 (MEF-UL34)及び、YK539 (MEF-UL31)を感染させ、Myc 抗体によって共免疫沈降後、UL31, UL34, VP23, ICP22, UL47, Us3 及び Flag 抗体によってウェスタンブロッティング解析を試みた(図 2-2)。UL31, UL34 及び ICP22 への MEF-tag の付加は培養細胞におけるウイルス増殖にほとんど影響がないことを確認している (17, 71)。図 2-2A に示した通り、YK423 (MEF-ICP22) の感染 HEL 細胞を Myc 抗体で免疫沈降することによって MEF-ICP22 が免疫沈降され、

UL31, UL34, Us3 及び UL47 が共沈降してくるが, カプシドタンパク質である VP23 は共沈降してこないことが明らかとなった. その一方で野生株である HSV-1(F)感染 HEL 細胞を Myc 抗体で免疫沈降しても, 上記のどのタンパク質も免疫沈降されなかった(図 2-2A). これらの結果は ICP22 が UL31, UL34, Us3 及び UL47 と複合体を形成している事を示唆している. 同様に, YK539 (MEF-UL31)感染 HEL 細胞を Myc 抗体で免疫沈降することによって MEF-UL31 が免疫沈降され, それに伴い UL34, Us3, UL47 及び ICP22 が共沈降し, 更に, YK538 (MEF-UL34)感染 HEL 細胞を Myc 抗体で免疫沈降することによって MEF-UL34 と共に UL31, Us3, UL47 及び ICP22 が共沈降した (図 2-2B, C). これらの結果から UL31 は UL34, Us3, UL47 及び ICP22 と複合体を形成し, UL34 は UL31, Us3, UL47 及び ICP22 と複合体を形成していることが示唆された.

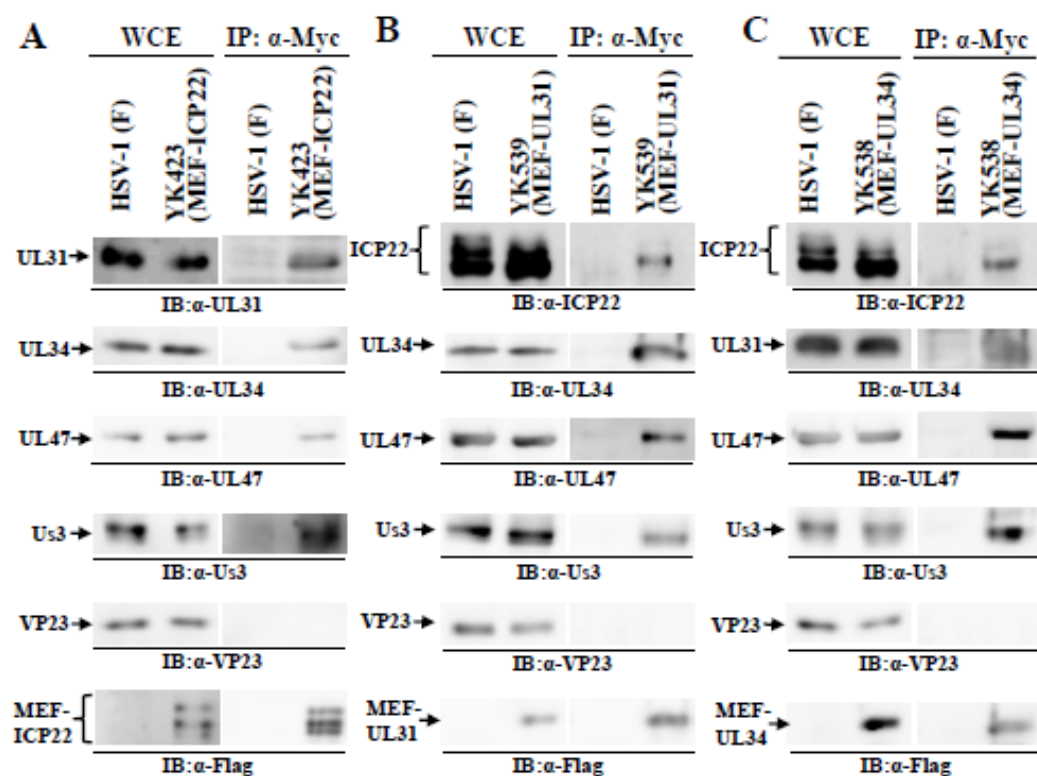


図 2-2: HSV-1 感染細胞における ICP22, UL31, UL34, UL47 及び Us3 の相互作用

HEL 細胞に HSV-1(F) (A - C), YK423 (MEF-ICP22) (A), YK539 (MEF-UL31) (B),及び YK538 (MEF-UL34) (C)を MOI 5 で感染させ, 18 時間後に回収し Myc 抗体で免疫沈降(IP) 後, 図に示した抗体を用いてウェスタンブロッティング(IB)によって解析した.

### HSV-1 感染細胞における ICP22 と UL31 及び UL34 の核膜上での共局在

感染細胞内における ICP22, UL31 及び UL34 の局在を解析する為に、野生株である HSV-1(F)及び YK423 (MEF-ICP22)を HEL 細胞に感染させ、免疫蛍光抗体法を用いてこれらのタンパク質の局在を観察した。過去の報告通り(26), HSV-1(F)及び YK423 (MEF-ICP22)が感染した HEL 細胞内で、ICP22 及び MEF-ICP22 はそれぞれ核内に分散して局在し、一部が点状の局在を示した(図 2-3)。それに加えて、ICP22 及び MEF-ICP22 は UL31 と UL34 及び Lamin B1(核内膜のマーカー)と共局在した(図 2-3)。これらの結果は、感染細胞において ICP22 が UL31 及び UL34 と核膜上で共局在することを示している。

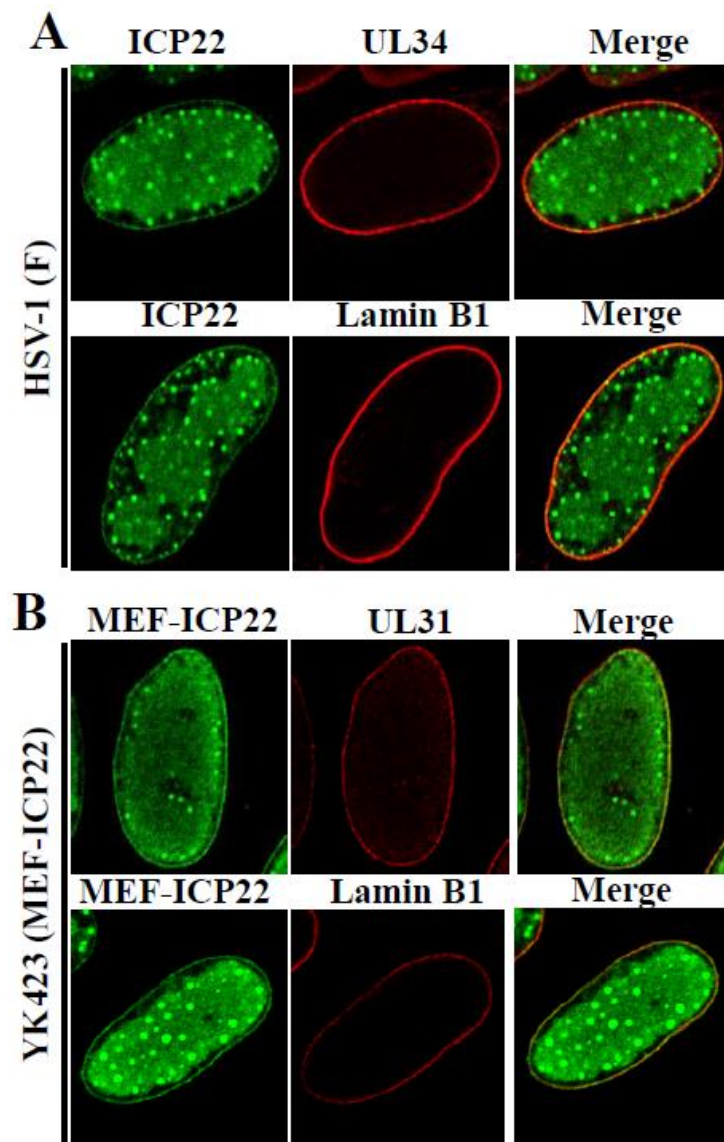


図: 2-3 HSV-1 感染細胞における ICP22, UL31, UL34 及び LaminB1 の局在

HSV-1(F) (A)及びYK423 (MEF-ICP22) (B)をHEL細胞にMOI 5で感染させ、感染後13時間後に固定し、ICP22抗体及びUL34抗体 (A)、Flag抗体及びUL31抗体(B)を用いて免疫蛍光抗体法により共染色後、共焦点顕微鏡で観察した。

### HSV-1 感染細胞における ICP22 の局在に対する Us3 のキナーゼ活性消失変異の影響

Us3 は HSV-1 感染細胞で UL31 と UL34 の核膜上の局在を制御することが報告されている . HSV-1Us3 キナーゼ活性消失変異株の感染細胞では UL31 と UL34 が核膜上で点状の異常な局在を示す(75). ICP22 が UL31 及び UL34 と核膜上で複合体を形成しているとすれば, Us3 キナーゼ活性消失株感染細胞における ICP22 の局在は, UL31 及び UL34 と同様に核膜上で点状の局在を表すことが予想される. そこで, Us3 キナーゼ活性消失株感染細胞における ICP22 の局在を観察した. 図 2-3A, 図 2-4 に示す通り, 野生株である HSV-1(F), もしくは YK513 (Us3K220M-repair)が感染した HEL 細胞では ICP22 は UL34 と核膜上に均一に局在した. その一方で, Us3 キナーゼ活性消失株である YK511 (Us3K220M)が感染した HEL 細胞において, ICP22 は UL34 と点状の構造で共局在した(図 2-4). この結果は ICP22 が UL31 及び UL34 と核膜上で相互作用していることを支持するものである.



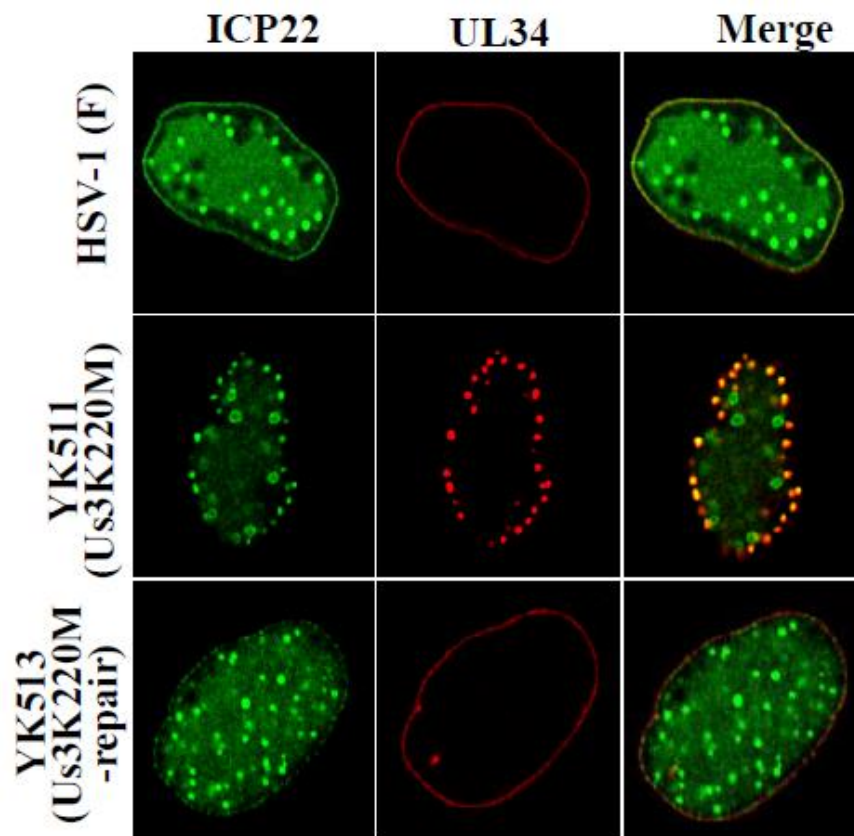


図: 2-4 Us3 キナーゼ活性消失株感染細胞における ICP22 と UL34 の局在

HSV-1(F), YK511 (Us3K220M)及び, YK513 (Us3K220M-repair)を MOI 5 で HEL 細胞に感染させ, 感染後 13 時間後に固定し, ICP22 抗体及び UL34 抗体を用いて免疫蛍光抗体法により共染色後, 共焦点顕微鏡で観察した.

### HSV-1 感染細胞における ICP22 の局在に対する UL31 消失変異の影響

UL31 と UL34 は相互にその局在を制御することが報告されている。UL31 欠損株感染細胞では UL34 は核膜に局在せず、UL34 欠損株感染細胞では UL31 が核膜に局在できない(9)。ICP22 が核膜上で UL31, UL34 と相互作用するのであれば、UL31 欠損株感染細胞において ICP22 が核膜に局在できるのであろうか。この命題に答える為に、先ず UL31 欠損株である YK720 ( $\Delta$ UL31)とその復帰株である YK721 ( $\Delta$ UL31-repair)を作製した(図 2-1)。過去の報告通り(11)、Vero 細胞における YK720 ( $\Delta$ UL31)の増殖は野生株である HSV-1(F)及び YK721 ( $\Delta$ UL31-repair)と比較して顕著に減少していた(図 2-5A)。図 2-5B に示した通り、YK720 ( $\Delta$ UL31)、HSV-1(F)及び YK721 ( $\Delta$ UL31-repair)を感染させた Vero 細胞において、UL34 と ICP22 の発現量は同等であった。これらの結果は ICP22 や UL34 の発現量に UL31 が関与していないことを示している。

次に、UL31 欠損株感染細胞における ICP22 の局在を調べる為に、HSV-1(F)、YK720 ( $\Delta$ UL31)及び、YK721 ( $\Delta$ UL31-repair)を HEL 細胞に感染させ免疫蛍光抗体法によって解析した。図 2-3 に示した結果と同様に、野生株である HSV-1(F)、及び YK721 ( $\Delta$ UL31-repair)が感染した HEL 細胞において ICP22 は UL34 及び、LaminB1 と共局在した(図 2-6A, B)。その一方で、UL31 欠損株である YK720 ( $\Delta$ UL31)の感染細胞においては ICP22 の核膜の局在は検出できなかった(図 2-6A, B)。また、過去の報告と同様に YK720 ( $\Delta$ UL31)が感染した HEL 細胞において UL34 は核膜だけでなく、ER と考えられる核周囲にもその局在が観察された。これらの結果は ICP22 の核膜への局在には UL31 もしくは UL34 が必要であり、UL31 及び UL34 は ICP22 の核膜への局在に対する足場になっていることを示唆している。

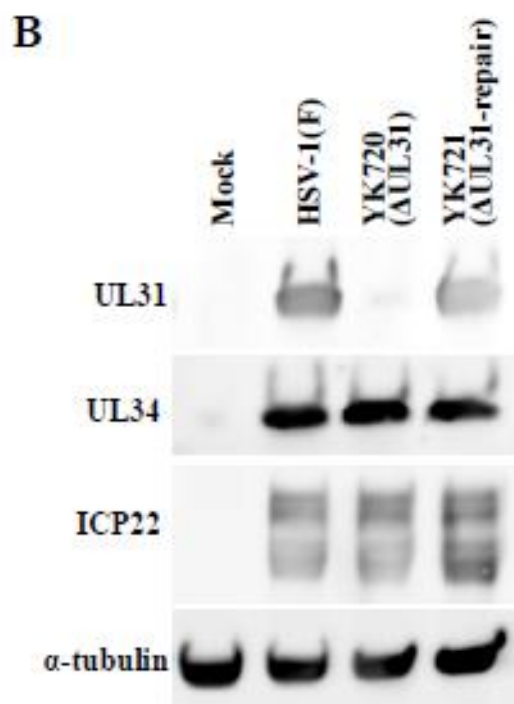
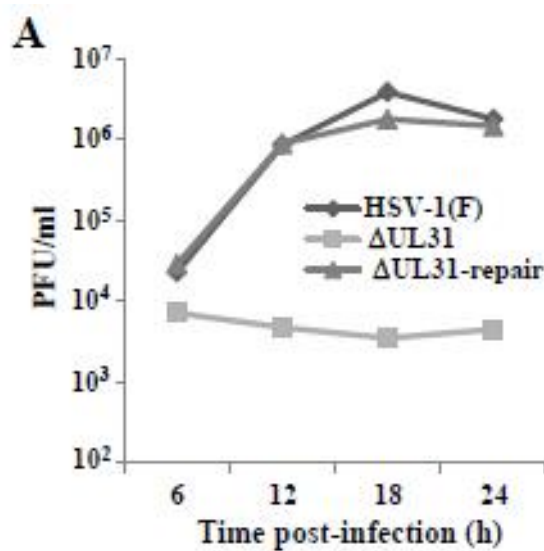


図 2-5: 本章で作製した組み換えウイルスの性状解析

(A) Vero 細胞に各ウイルスを MOI 5 で感染させ、各タイムポイントにおけるウイルス力価を UL31-CV1 細胞で測定した. (B) Vero 細胞に各ウイルスを MOI 5 で感染させ、18 時間後に回収後 UL31, UL34, ICP22 及び  $\alpha$ -tubulin に対する抗体を用いてウェスタンブロッティングにより解析した.

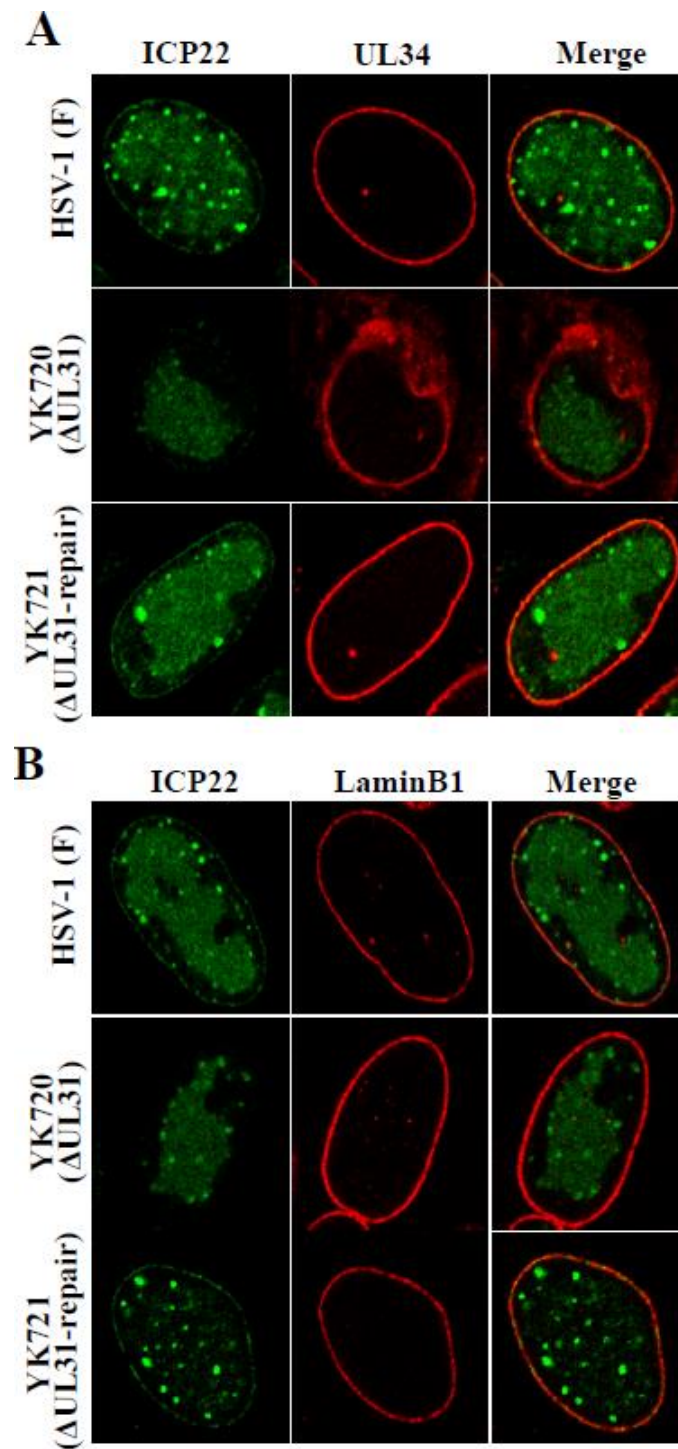


図 2-6: UL31 欠損株感染細胞における ICP22, UL34 及び LaminB1 の局在

HEL 細胞に各ウイルスを MOI 5 で感染させ、感染 13 時間後で固定後、ICP22 及び UL34 (A)または ICP22 及び LaminB1 (B)の抗体を用いて免疫蛍光抗体法により共染色後、共焦点顕微鏡で観察した。

### UL31, UL34 の局在, 及び発現に対する ICP22 欠損変異の影響

ここまでの結果は ICP22 が UL31 及び UL34 と核膜上で相互作用していることが考えられた。上述した通り UL31 と UL34 は相互にその局在を制御していることが報告されている(9)。また、図 2-6A, B の結果は UL31 が ICP22 の局在を制御していることを明らかにした。それでは、逆に ICP22 は UL31 及び UL34 の局在を制御しているのだろうか。また、HSV-1 の遺伝子発現制御因子として知られている ICP22 は UL31 及び UL34 の発現量を制御するのだろうか。それらの疑問に答える為に、ICP22 欠損株感染細胞における UL31 及び UL34 の発現量と局在をウェスタンブロッティングと免疫蛍光抗体法によって解析した。

先ず UL31 及び UL34 の発現に ICP22 が関与するのかどうかを調べる為に、野生株である HSV-1(F), ICP22 欠損株である YK421 ( $\Delta$ ICP22)及び、その復帰株の YK422 ( $\Delta$ ICP22 repair)を感染させた Vero 及び HEL 細胞で UL31 と UL34 の発現量を比較した。図 2-7A に示した通り、HEL 細胞において、野生株の感染と比較して、YK421 ( $\Delta$ ICP22)の感染では UL31 の発現量が減少していることが明らかとなった。その一方で UL34 の発現量は各ウイルスの感染において同等であった (図 2-7A)。また、YK421 ( $\Delta$ ICP22)感染 Vero 細胞では、UL31 の発現量は野生株である HSV-1(F)及び YK422 ( $\Delta$ ICP22 repair)と同等であった (図 2-7B)。これらの結果から、ICP22 は細胞種依存的に UL31 の効率的な発現に必要とされることが明らかとなった。

次に ICP22 が UL31 及び UL34 の局在に影響を与えるのかどうかを調べる為に、HSV-1(F), YK421 ( $\Delta$ ICP22), 及び YK422 ( $\Delta$ ICP22-repair)を Vero 及び HEL 細胞に感染させ、免疫蛍光抗体法によって解析した。図 2-3 の結果と同様に野生株である HSV-1(F) 及び YK422 ( $\Delta$ ICP22-repair)が感染した Vero 細胞では UL31 と UL34 は核膜上に均一に局在した(図 2-8)。しかし、YK421 ( $\Delta$ ICP22)の感染 Vero 細胞における UL31 と UL34 は核膜だけでなく核の周囲に異常な局在を示した。ICP22 欠損株感染 Vero 細胞における

UL31 と UL34 の核膜周囲の局在は HSV-1 感染における ER の局在と酷似していた(76).  
そこで HSV-1(F), YK421( $\Delta$ ICP22), 及び YK422 ( $\Delta$ ICP22-repair)を Vero 細胞に感染させ,  
UL31, UL34 及び ER のマーカーである calnexin 抗体によって観察した. その結果, 図 9  
に示す通り, YK421 ( $\Delta$ ICP22)感染細胞における UL31 と UL34 は calnexin と共局在した.  
これらの結果は, Vero 細胞において, ICP22 欠損株では UL31 と UL34 が ER に集積し  
ていることを示しており, 言い換えれば ICP22 は Vero 細胞において UL31 と UL34 の適  
切な局在に必要であることが明らかとなった. また, YK421 ( $\Delta$ ICP22)感染 Vero 細胞に  
おける calnexin は, 野生株である HSV-1(F)及び YK422 ( $\Delta$ ICP22-repair)が感染した Vero  
細胞と比較してその局在パターンが異なっていることから, ICP22 は感染細胞における  
ER の局在制御に関与していることが示唆された.

図 2-3 で示した通り, 野生株である HSV-1(F)及び YK422 ( $\Delta$ ICP22-repair)が感染した  
HEL 細胞では UL31 及び UL34 は核膜上に均一に局在した(図 2-10A). その一方で,  
YK421 ( $\Delta$ ICP22)が感染した HEL 細胞では UL31 と UL34 の蛍光が検出できなかった(図  
2-10). YK421 ( $\Delta$ ICP22)感染 HEL 細胞では, 感染のコントロールとして観察した ICP4  
と UL12 の蛍光は野生株と同等に検出できたことから (図 2-10B, C), ICP22 は本研究  
で使用了 UL31 と UL34 の抗体の IFA における反応性に必要であることを示唆してい  
る.

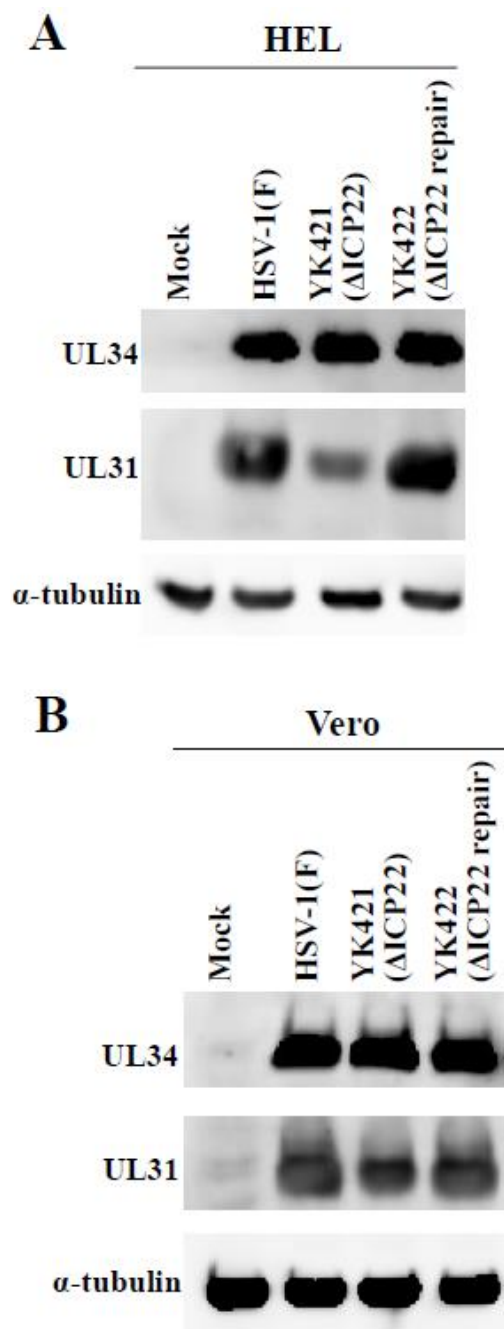


図 2-7: ICP22 欠損株感染 Vero 及び HEL 細胞における UL34, UL31 の発現

HEL (A)及び Vero (B) 細胞に各ウイルスを MOI 5 で感染させ, 感染後 13 時間(A)及び 18 時間(B)後に回収後 UL31, UL34 及び $\alpha$ -tubulin に対する抗体を用いてウェスタンブロッティングによって解析を行った.

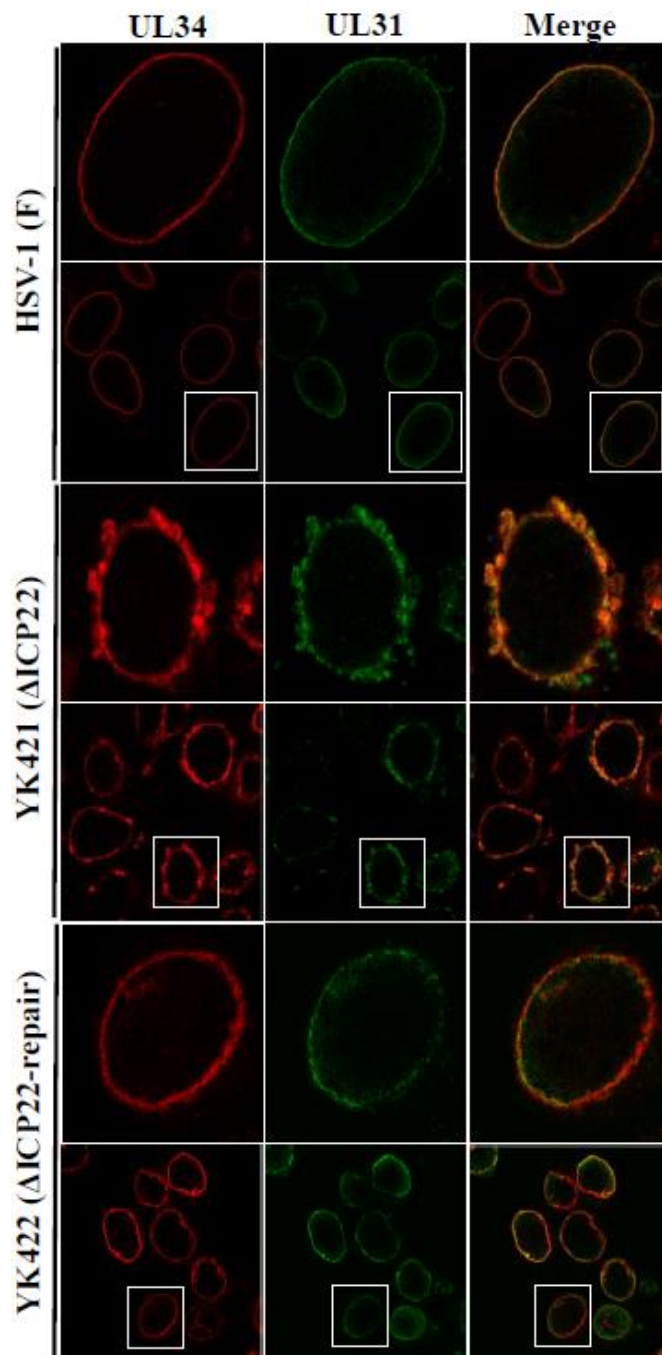


図 2-8: ICP22 欠損株感染 Vero 細胞における UL31 及び UL34 の局在

Vero 細胞に各ウイルスを MOI 5 で感染させ、感染後 18 時間で固定し、UL34 及び UL31 に対する抗体をもちいて免疫蛍光抗体法により共染色後、共焦点顕微鏡で観察した。上段のパネルは下段の四角で囲った部位の拡大像である。



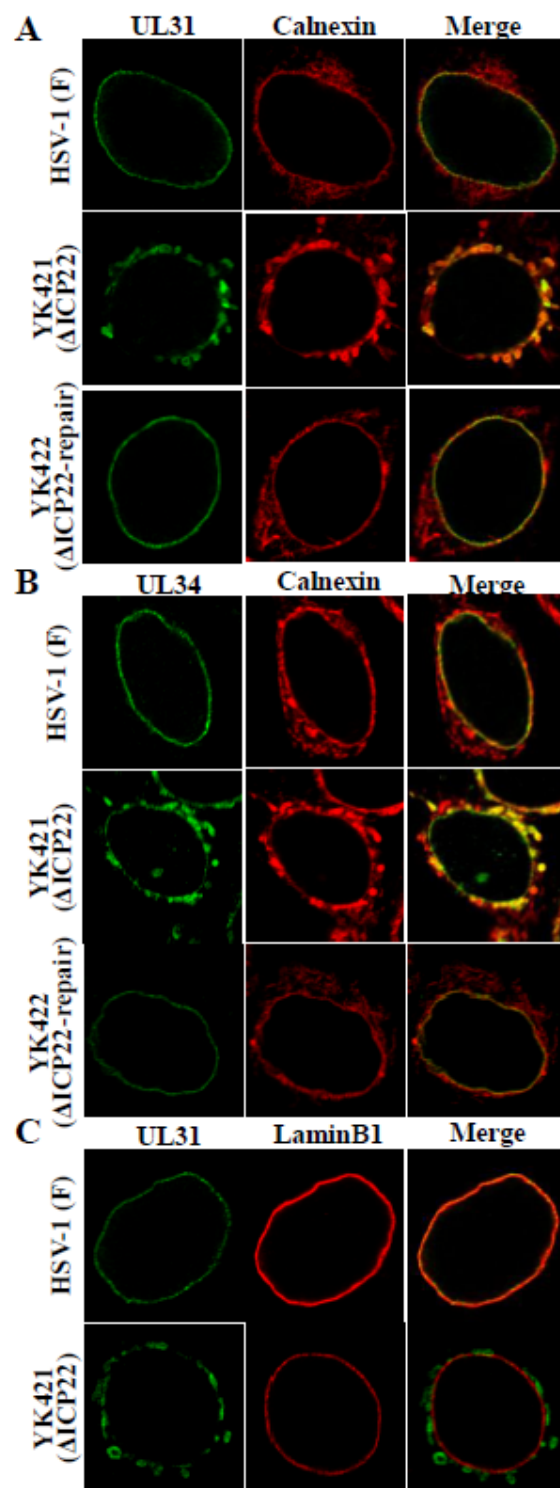


図 2-9: ICP22 欠損株感染 Vero 細胞における UL31 及び UL34 の ER への局在

Vero 細胞に各ウイルスを感染させ、感染後 18 時間で固定後、UL31 及び calnexin (A), UL34 及び calnexin (B), UL31 及び LaminB1 (C)に対する抗体を用いて免疫蛍光抗体法により共染色後、共焦点顕微鏡で観察した。

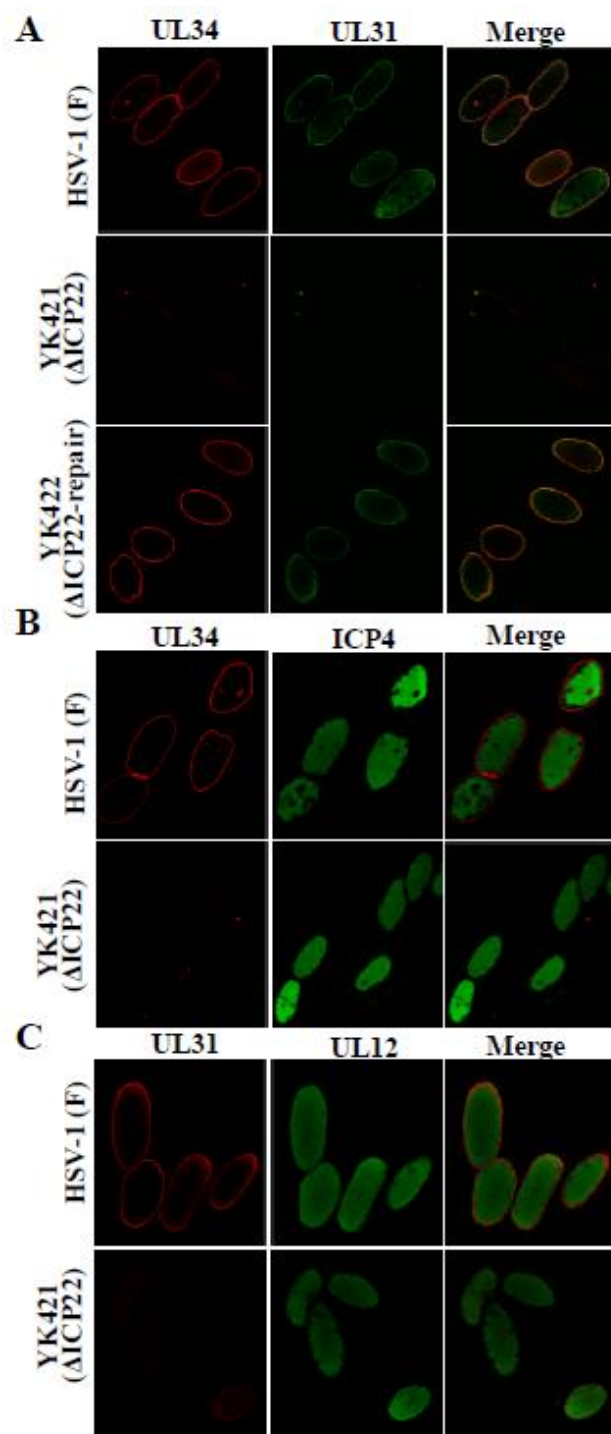


図 2-10: ICP22 欠損株感染 HEL 細胞における UL31, UL34, ICP4 及び UL12 の局在

HEL 細胞に各ウイルスを MOI 5 で感染させ、感染後 13 時間で固定後 UL31 及び UL34 (A), UL34 及び ICP4 (B), UL31 及び UL12 (C) に対する抗体を用いて免疫蛍光抗体法により共染色後、共焦点顕微鏡で観察した。

### **ICP22 が HSV-1 の nuclear egress に与える影響**

これまでの結果は、ICP22 は HSV-1 の感染細胞において、nuclear egress の制御因子と相互作用し、UL31 と UL34 の適切な局在と発現量を制御することを示している。これらの結果は ICP22 が nuclear egress を制御していることを示唆している。従って、その可能性を確かめる為に、透過型電子顕微鏡を用いて野生株である HSV-1(F)、YK421 ( $\Delta$ ICP22)及び YK422 ( $\Delta$ ICP22-repair)が感染した Vero 及び HEL 細胞における nuclear egress の効率を、核内 (Nucleocapsids in the nucleus)、核膜間スペース(Enveloped virions in the perinuclear space)、細胞質のエンベロープを獲得していないカプシド(Nucleocapsids in the cytoplasm)、細胞質のエンベロープを獲得したカプシド(Enveloped virions in the cytoplasm)、及び細胞外のカプシド(Extracellular enveloped virions)を計数し、全カプシド数で割ることによって各段階に存在するカプシドの割合を算出することによって評価した。その結果、野生株である HSV-1(F)及び YK422 ( $\Delta$ ICP22-repair)感染 HEL 細胞の核膜間スペースのカプシドの割合はそれぞれ 4.4%及び 6.6%であったのに対して(表 1) (図 2-11)、YK422 ( $\Delta$ ICP22)感染 HEL 細胞における核膜間スペースのカプシドは殆んど検出できなかった(0.8%) (表 1) (図 2-11)。一方、HSV-1(F)及び YK422 ( $\Delta$ ICP22-repair)感染 HEL 細胞の核内のカプシドの割合はそれぞれ 40.3%及び 40.9%だったのに対し(表 1)、YK422 ( $\Delta$ ICP22)感染 HEL 細胞における核内のカプシドは 52.8%と増加しており、これらの差は統計学的に有意であった(表 1)。同様の結果は HSV-1(F)、YK422 ( $\Delta$ ICP22)、及び YK422 ( $\Delta$ ICP22-repair)感染 Vero 細胞でも得られている(表 2)。従って、これらの結果は、ICP22 の欠損変異が primary envelopment によって生じた核膜間スペースのカプシドの蓄積を阻害し、核内のカプシドの割合を増加させることを示している。

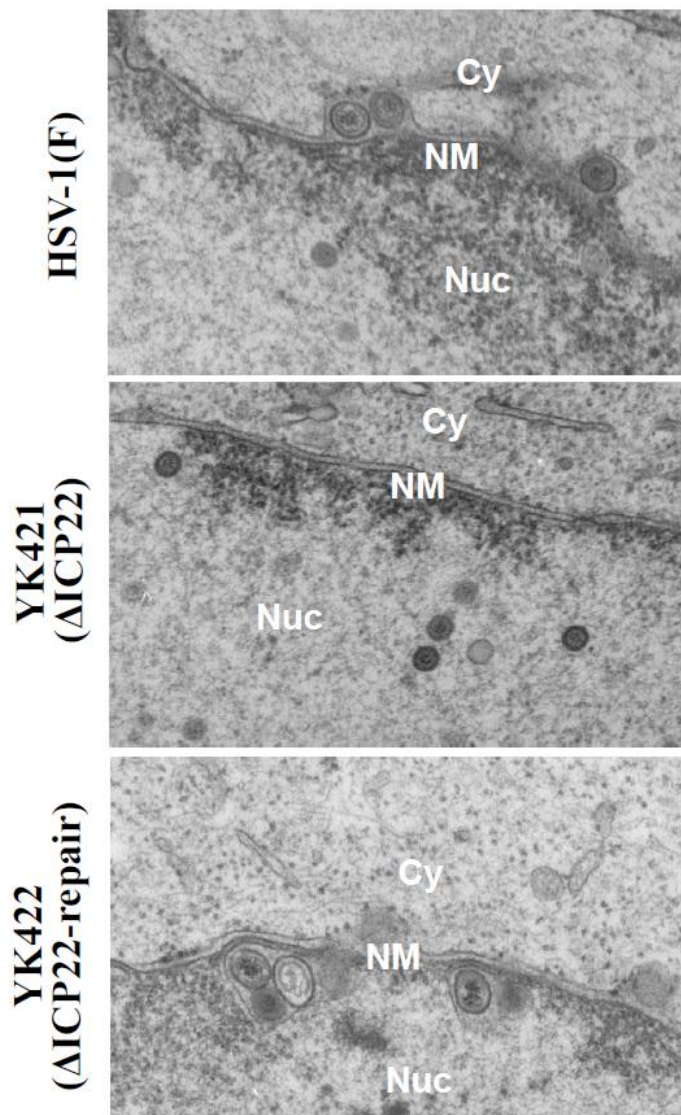


図 2-11:組み換えウイルス感染細胞の電子顕微鏡像

各ウイルスを HEL 細胞に MOI 5 で感染させ、感染後 18 時間で細胞を固定し、電子顕微鏡により観察した。 Cy: cytosol, NM: nuclear membrane, Nuc: nucleus

表 1: HEL 細胞の超薄切片における各領域のカプシドの割合

Virus	Ave % of virus particles in morphogenetic stage $\pm$ standard error <sup>a</sup>					Total counted (particles/cells)
	Nucleocapsids in the nucleus	Enveloped virions in the perinuclear space	Nucleocapsids in the cytoplasm	Enveloped virions in the cytoplasm	Extracellular enveloped virions	
HSV-1 (F)	40.3 $\pm$ 3.5 <sup>b</sup> (2183)	4.4 $\pm$ 0.7 <sup>c</sup> (227)	1.8 $\pm$ 0.4 (89)	11.7 $\pm$ 2.4 (584)	41.8 $\pm$ 2.9 (2105)	5188/20
YK421( $\Delta$ ICP22)	52.8 $\pm$ 3.9 (584)	0.8 $\pm$ 0.5 (8)	2.2 $\pm$ 0.6 (25)	15.5 $\pm$ 2.6 (175)	28.8 $\pm$ 3.8 (329)	1121/20
YK422( $\Delta$ ICP22-repair)	40.9 $\pm$ 4.0 <sup>b</sup> (1748)	6.6 $\pm$ 1.3 <sup>c</sup> (256)	1.7 $\pm$ 0.3 (62)	11.7 $\pm$ 1.9 (444)	39.2 $\pm$ 3.9 (1461)	3971/20

<sup>a</sup> カッコ内の数字はカウントしたカプシドの数を示す.

<sup>b,c</sup> YK421 ( $\Delta$ ICP22) 感染細胞と比較して統計的に有意な差が認められた (b,  $P < 0.05$ ; c,  $P < 0.0005$ ).

表 2: Vero 細胞の超薄切片における各領域のカプシドの割合

Virus	Ave % of virus particles in morphogenetic stage $\pm$ standard error <sup>a</sup>					Total counted (particles/cells)
	Nucleocapsids in the nucleus	Enveloped virions in the perinuclear space	Nucleocapsids in the cytoplasm	Enveloped virions in the cytoplasm	Extracellular enveloped virions	
HSV-1 (F)	42.0 $\pm$ 2.9 <sup>b</sup> (1206)	16.6 $\pm$ 3.0 <sup>b</sup> (516)	10.7 $\pm$ 2.0 (279)	11.1 $\pm$ 1.6 (323)	19.7 $\pm$ 3.7 (539)	2863/20
YK421( $\Delta$ ICP22)	60.4 $\pm$ 4.1 (1367)	7.1 $\pm$ 0.9 (140)	4.6 $\pm$ 0.9 (97)	7.6 $\pm$ 1.8 (188)	20.3 $\pm$ 3.2 (391)	2183/20
YK422( $\Delta$ ICP22-repair)	47.2 $\pm$ 4.3 <sup>b</sup> (871)	14.8 $\pm$ 3.4 <sup>b</sup> (316)	6.6 $\pm$ 1.5 (140)	10.3 $\pm$ 2.4 (208)	21.0 $\pm$ 2.6 (387)	1922/20

<sup>a</sup> カッコ内の数字はカウントしたカプシドの数を示す.

<sup>b</sup> YK421 ( $\Delta$ ICP22) 感染細胞と比較して統計的に有意な差が認められた(P<0.05).

## 2-5 考察

本章では YK423 (MEF-ICP22)の感染細胞における, MS を用いたインタラクトーム解析によって, ICP22 が UL31, UL34 及び UL47 と相互作用することが明らかとなった. また, UL31 と UL34 から構成される NEC が UL47 と Us3 とともに相互作用することが報告されていることから(17), ICP22 もまた NEC の構成因子である可能性を元に本章の研究は遂行された. 本章では, MEF-ICP22 が UL31, UL34, Us3 及び UL47 と相互作用し, MEF-UL31 は UL34, Us3, UL47 及び ICP22 と, 更に MEF-UL34 は UL31, Us3, UL47 及び ICP22 と相互作用するという結果が得られている. これらの結果は, HSV-1 の感染細胞において, ICP22 が UL31, UL34, Us3 及び, UL47 と複合体を形成していることを示唆している. しかし, この結果だけではこれらのタンパク質が 1 つの複合体を形成しているということを断定することはできないが, 本章, 及び過去の報告で行われた相反的な共免疫沈降実験の結果は, その可能性を強く支持するものであると考えられる.

本章で行った ICP22 の詳細な局在解析の結果, 過去に報告された核内への局在だけでなく(26), ICP22 は UL31 及び UL34 と共に核膜にも局在することが明らかとなった. HSV-1 野生株感染細胞においてほぼ全ての UL31 と UL34 が核膜に局在していることから(9), ICP22 と NEC の相互作用は核膜上で起こっていることが考えられる. 更に, 本章の解析により, Us3 キナーゼ活性消失株の感染細胞において, ICP22 と UL34 は核膜上で点状の構造で共局在することが明らかとなった. UL31 及び UL47 も Us3 キナーゼ活性消失株感染細胞において同様の局在を示すことが報告されていることから(17). これらの事実は ICP22 も UL31, UL34 及び UL47 と同様に Us3 のキナーゼ活性によって核膜上での局在が制御されていることを意味しており, HSV-1 感染細胞において ICP22 は核膜上で UL31, UL34, UL47 及び Us3 と複合体を形成しているという仮

説を支持するものであると考えられる。従って、本章における結果は ICP22 が HSV-1 の NEC の新規構成因子であることを示すものであると考えている。

本章における解析において、UL31 欠損株感染細胞では ICP22 が核膜に局在しないことから、UL31 は HSV-1 感染細胞における ICP22 の核膜への局在に必要であることが明らかとなった。UL31 欠損株感染細胞では UL34 は核膜への適切な局在を取れず、UL34 の欠損株感染細胞でも UL31 は核膜に局在できないことが報告されている(9)。UL31 欠損株感染細胞で ICP22 が核膜に局在しないという結果は、UL31/UL34 複合体は ICP22 が核膜へ局在する為の足場であることを示唆している。

ICP22 欠損株が感染した Vero 細胞において、UL31 と UL34 の ER への異常な局在が観察されることから、ICP22 は Vero 細胞における UL31 と UL34 の適切な局在を制御していることが考察される。しかしながら、UL31 と UL34 のみを過剰発現させるだけでも、UL31 及び UL34 は核膜に局在することが報告されている(9)。この報告は UL31 と UL34 は細胞内に他のウイルスタンパク質が存在しない状態でも核膜に局在する能力を持つことを示しており、ICP22 が UL31 と UL34 の適切な局在に必要であるという本研究の結果と矛盾する。この矛盾を説明する 1 つの可能性として、感染細胞と非感染細胞の違いが考えられる。感染細胞ではカプシドが核内で形成され、nuclear egress が実際に起こる。nuclear egress によってカプシドが細胞質へ移行すると de-envelopment の段階により、INM に存在していた NEC は ER を含む ONM に移行してしまうことが考えられる。一方、過剰発現の系ではカプシドが形成されず、核膜通過が起こらない為、NEC の INM から ONM への移行は起こらない。つまり、ICP22 が ONM に移行した NEC を INM に再び戻す役割を持っていると仮定すると上述の矛盾に対する説明になると考えられる。

また、ICP22 欠損株感染 HEL 細胞において野生株の感染に比べ UL31 の発現量が減少していたが、Vero 細胞においては ICP22 欠損株と野生株の感染でその発現量は同等



であった。ICP22 は HSV-1 がコードする遺伝子発現制御因子であり、下流遺伝子である Us11 の発現は細胞種依存的であることが報告されていることから(24)、UL31 の発現も細胞種依存的に制御していることが考えられる。従って、本研究によって UL31 が細胞種依存的に ICP22 によって発現が制御される新しい下流遺伝子であるということが示された。

ICP22 欠損株感染 HEL 細胞において発現量が低下する UL31 だけでなく、発現量が低下しない UL34 も免疫蛍光抗体法によって検出されなかった。この結果は ICP22 と UL31 及び UL34 の相互作用は UL31 と UL34 の適切なコンフォメーションに必要である可能性を示唆している。ICP22 は宿主のシャペロンタンパク質やプロテアソームの構成因子、更にはユビキチン化されたタンパク質が集積した virus-induced chaperone-rich (VICE) domain の形成に必要であることが報告されており、VICE domain は感染細胞におけるタンパク質の品質管理に役割を果たしていることが知られている(54, 77-79)。従って ICP22 とタンパク質のコンフォメーションの制御は無関係ではなく、本章で行った免疫蛍光抗体法で UL34 が検出されなかったのは、ICP22 欠損株感染 HEL 細胞においては UL34 のエピトープがコンフォメーションの変化によって隠れてしまった可能性が考えられる。一方で野生株感染 HEL 細胞においては、ICP22 が NEC と相互作用する事によって UL34 は適切なコンフォメーションを取ることができ、UL34 の抗体はエピトープにアクセスできたことが示唆される。

ICP22 欠損株が感染した HEL 及び Vero 細胞において、野生株感染細胞と比較して、核膜間スペースのカプシドの割合が低下し、核内のカプシドの割合が有意に増加していた。これらの結果は ICP22 欠損株感染細胞では核から核膜間スペースへのカプシドの移行効率が減少し、核膜間スペースから細胞質へのカプシドの移行効率は野生株感染細胞と同等であることを示している。これらの結果から、ICP22 が HSV-1 の効率的な primary envelopment に必要であることが示唆された。

従って、本章における研究によって、 (i) 感染細胞で ICP22 は HSV-1 の primary envelopment の制御因子である UL31, UL34, Us3 及び UL47(9, 10, 17, 18) と相互作用すること, (ii) Vero 細胞において ICP22 は UL31 と UL34 の適切な局在に必要であること, (iii) HEL 細胞において ICP22 は UL31 の発現量を制御し, UL34 の適切なコンフォメーションを制御することが明らかとなった.

## 総括

HSV-1は宿主細胞に感染すると、およそ80種類のタンパク質を発現することで、宿主細胞の機能を乗っ取り、細胞を自身の増殖に有利な環境に変えてしまう。HSV-1の宿主であるヒトの遺伝子はおおよそ2万種類のタンパク質をコードしている。すなわちHSV-1は、たった80種類のタンパク質によって、2万種類のタンパク質から構成される複雑系を再編成することで、ウイルス増殖に最適な細胞環境を生み出していることが容易に想像される。このようなことを成し遂げる為に、ウイルスのタンパク質には2つ以上の機能が割り当てられている“多機能タンパク質”が多く存在すると考えられる。

本研究ではそれら80種類のタンパク質の中の1つであるICP22というタンパク質に着目した。本研究が行われる以前までは、ICP22の遺伝子特異的な発現制御メカニズムやその他の機能についてはほとんど明らかになっていなかった。また、感染時期によるICP22の機能の変遷の有無についての報告はなされていなかった。

そこで本研究ではMSを用いたインタラクトーム解析によってICP22と相互作用するタンパク質を同定した。同定されたタンパク質の中で本研究では宿主因子であるp53、及びHSV-1のNECに着目し研究を進めた。

第1章ではHSV-1の増殖に対するp53の影響と、ICP22とp53の相互作用の生物学的意義をHCT116 p53(+/+)細胞、及びHCT116 p53(-/-)細胞を用いて解析した。その結果、p53はHSV-1の増殖に対して正の影響と負の影響の両方を持ち、ICP22がp53の負の影響を抑制することによって、HSV-1はp53が持つ正の影響のみ享受することができることが明らかとなった (図 S-1)。また、ICP22によるp53の抑制が、これまで未解明であったICP0の発現制御のメカニズムの一端を解明した。

第2章では感染の系で行ったインタラクトーム解析によって同定されたNECに着目し、解析を行った。その結果、Vero細胞においてICP22はNECの主要な構成因子であるUL31

およびUL34の適切な局在を制御し、HEL細胞においてはUL31の発現を促進することによって、ICP22はHSV-1の効率的なprimary envelopmentに関与していることが明らかとなった (図 S-2).

ICP22はHSV-1がコードする前初期タンパク質であり、ウイルスが細胞に感染すると直ちに発現が開始され、種々の後期タンパク質の発現を制御する。従って、“後期遺伝子の発現制御”というICP22が持つ1つの機能はウイルスの感染初期に発揮される機能であると考えられる。それでは、ICP22はHSV-1の感染後期においても機能を持つのだろうか。この疑問に対して明確に答えることができる報告は存在していなかった。しかしながら、第1章においてICP22が感染後期にp53に関わるICP0の分解を抑制するということが、第2章では、ICP22が核膜に存在しVero細胞においてUL31及びUL34の局在を制御することが明らかとなった。ICP22によるUL31及びUL34の局在は感染後期特異的な現象であり(data not shown), これらの事実はICP22が感染初期だけでなく、感染後期においても機能を持つことを示している。

これらの結果によって、ICP22の“p53の負の影響の抑制”及び“primary envelopmentの制御”という2つの新規機能を発見することができた。本研究によってウイルスの遺伝子発現制御因子として考えられていたICP22の新たな側面を解明し、本タンパク質が多機能タンパク質であるということが示された。

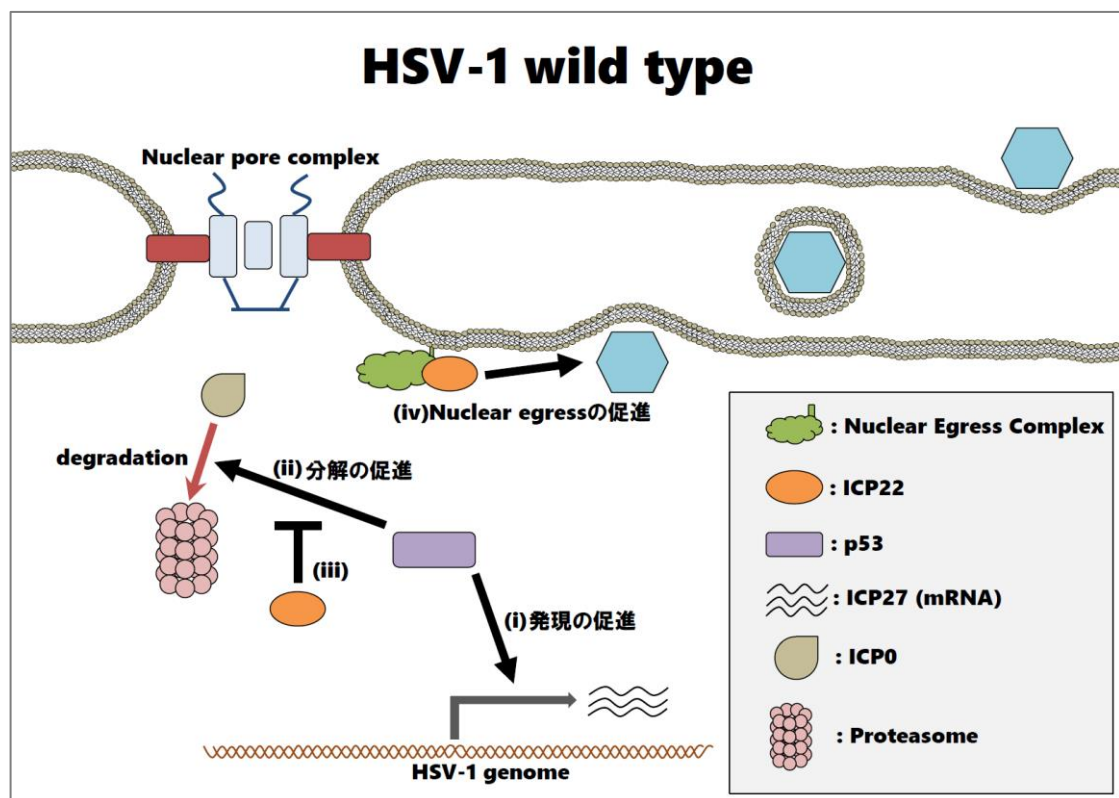


図 S-1: 本研究の総括図

p53はHSV-1の感染初期においてICP27の発現量を増強するというウイルスの増殖にとって正の影響を持つが(i), 感染後期においてICP0の分解の促進というウイルスの増殖にとって負の影響も併せ持つ(ii). ICP22はp53によるICP0の分解の促進という負の影響を阻害する機能を持つ(iii). 更に、ICP22は感染細胞の核膜においてNECと相互作用し、Nuclear egressを促進する(iv).

# 謝辞

本研究を遂行するにあたり、日々適切なご助言、ご指導を賜り、私がやりたいといった実験を全てやらせて下さった、東京大学医科学研究所 ウイルス病態制御分野 川口寧教授に感謝致します。

ウイルス病態制御分野 加藤哲久助教、有井潤 助教には、学生に近い立場から日頃の実験、学会発表に至るまで多くの場面で有益なご指導とご助言を頂きましたことを感謝致します。

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、実際の解析まで、細部にわたり丁寧なご指導を賜りましたことに感謝いたします。

ウイルス病態制御分野の小山志保子 氏、安藤朋子 氏には、研究生生活を送る上で多岐にわたって細やかな配慮、ご協力を頂きましたことに感謝いたします。

ウイルス病態制御分野の先輩方、とりわけ 神道慶子 博士には電子顕微鏡観察のための試料作成から観察、電子顕微鏡の取り扱いにおいて、細部にわたりご指導して頂きました。感謝しております。

また、ウイルス病態制御分野の同期・後輩の皆様には研究のことから私生活のことまで終始有意義な議論ができ、多くの知識や示唆を与えて頂きましたことに感謝いたします。

最後に、5年間という長い間、精神的にも経済的にも私を支えて下さった。私の両親、丸鶴義孝 氏と宏美 氏に感謝致します。

## 参考文献

1. **Bernard R, David M K, W. RJ.** 2013. Herpes Simplex Viruses, p. 1823-1825. in Knipe D. M. , Howley P. M. , et al. (ed), Fields virology, 6th ed., vol. 2. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.
2. **Kristie TM, Liang Y, Vogel JL.** 2010. Control of alpha-herpesvirus IE gene expression by HCF-1 coupled chromatin modification activities. *Biochim Biophys Acta* **1799**:257-265.
3. **Purves FC, Ogle WO, Roizman B.** 1993. Processing of the herpes simplex virus regulatory protein alpha 22 mediated by the UL13 protein kinase determines the accumulation of a subset of alpha and gamma mRNAs and proteins in infected cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**:6701-6705.
4. **Johnson DC, Baines JD.** Herpesviruses remodel host membranes for virus egress. *Nat Rev Microbiol* **9**:382-394.
5. **Klupp BG, Granzow H, Fuchs W, Keil GM, Finke S, Mettenleiter TC.** 2007. Vesicle formation from the nuclear membrane is induced by coexpression of two conserved herpesvirus proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:7241-7246.
6. **Mettenleiter TC, Muller F, Granzow H, Klupp BG.** 2013. The way out: what we know and do not know about herpesvirus nuclear egress. *Cell Microbiol* **15**:170-178.
7. **Desai PJ, Pryce EN, Henson BW, Luitweiler EM, Cothran J.** 2012. Reconstitution of the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus nuclear egress complex and formation of nuclear membrane vesicles by coexpression of ORF67 and ORF69 gene products. *Journal of virology*

86:594-598.

8. **Johnson DC, Baines JD.** 2011. Herpesviruses remodel host membranes for virus egress. *Nat Rev Microbiol* **9**:382-394.
9. **Reynolds AE, Ryckman BJ, Baines JD, Zhou Y, Liang L, Roller RJ.** 2001. U(L)31 and U(L)34 proteins of herpes simplex virus type 1 form a complex that accumulates at the nuclear rim and is required for envelopment of nucleocapsids. *Journal of virology* **75**:8803-8817.
10. **Roller RJ, Zhou Y, Schnetzer R, Ferguson J, DeSalvo D.** 2000. Herpes simplex virus type 1 U(L)34 gene product is required for viral envelopment. *J Virol* **74**:117-129.
11. **Chang YE, Van Sant C, Krug PW, Sears AE, Roizman B.** 1997. The null mutant of the U(L)31 gene of herpes simplex virus 1: construction and phenotype in infected cells. *Journal of virology* **71**:8307-8315.
12. **Bigalke JM, Heuser T, Nicastro D, Heldwein EE.** Membrane deformation and scission by the HSV-1 nuclear egress complex. *Nat Commun* **5**:4131.
13. **Bjerke SL, Roller RJ.** 2006. Roles for herpes simplex virus type 1 UL34 and US3 proteins in disrupting the nuclear lamina during herpes simplex virus type 1 egress. *Virology* **347**:261-276.
14. **Mou F, Forest T, Baines JD.** 2007. US3 of herpes simplex virus type 1 encodes a promiscuous protein kinase that phosphorylates and alters localization of lamin A/C in infected cells. *Journal of virology* **81**:6459-6470.
15. **Kato A, Yamamoto M, Ohno T, Kodaira H, Nishiyama Y, Kawaguchi Y.** 2005. Identification of proteins phosphorylated directly by the Us3



- protein kinase encoded by herpes simplex virus 1. *Journal of virology* **79**:9325–9331.
16. **Purves FC, Spector D, Roizman B.** 1991. The herpes simplex virus 1 protein kinase encoded by the US3 gene mediates posttranslational modification of the phosphoprotein encoded by the UL34 gene. *Journal of virology* **65**:5757–5764.
  17. **Liu Z, Kato A, Shindo K, Noda T, Sagara H, Kawaoka Y, Arii J, Kawaguchi Y.** 2014. Herpes Simplex Virus 1 UL47 Interacts with Viral Nuclear Egress factors UL31, UL34 and Us3, and Regulates Viral Nuclear Egress. *Journal of virology*.
  18. **Reynolds AE, Wills EG, Roller RJ, Ryckman BJ, Baines JD.** 2002. Ultrastructural localization of the herpes simplex virus type 1 UL31, UL34, and US3 proteins suggests specific roles in primary envelopment and egress of nucleocapsids. *J Virol* **76**:8939–8952.
  19. **Purves FC, Roizman B.** 1992. The UL13 gene of herpes simplex virus 1 encodes the functions for posttranslational processing associated with phosphorylation of the regulatory protein alpha 22. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:7310–7314.
  20. **Blaho JA, Mitchell C, Roizman B.** 1993. Guanylylation and adenylylation of the alpha regulatory proteins of herpes simplex virus require a viral beta or gamma function. *J Virol* **67**:3891–3900.
  21. **Mitchell C, Blaho JA, Roizman B.** 1994. Casein kinase II specifically nucleotidylates in vitro the amino acid sequence of the protein encoded by the alpha 22 gene of herpes simplex virus 1. *Proc Natl*

Acad Sci U S A **91**:11864–11868.

22. **Carter KL, Roizman B.** 1996. The promoter and transcriptional unit of a novel herpes simplex virus 1 alpha gene are contained in, and encode a protein in frame with, the open reading frame of the alpha 22 gene. *Journal of virology* **70**:172–178.
23. **Sears AE, Halliburton IW, Meignier B, Silver S, Roizman B.** 1985. Herpes simplex virus 1 mutant deleted in the alpha 22 gene: growth and gene expression in permissive and restrictive cells and establishment of latency in mice. *Journal of virology* **55**:338–346.
24. **Ogle WO, Roizman B.** 1999. Functional anatomy of herpes simplex virus 1 overlapping genes encoding infected-cell protein 22 and US1.5 protein. *Journal of virology* **73**:4305–4315.
25. **Ng TI, Chang YE, Roizman B.** 1997. Infected cell protein 22 of herpes simplex virus 1 regulates the expression of virion host shutoff gene U(L)41. *Virology* **234**:226–234.
26. **Leopardi R, Ward PL, Ogle WO, Roizman B.** 1997. Association of herpes simplex virus regulatory protein ICP22 with transcriptional complexes containing EAP, ICP4, RNA polymerase II, and viral DNA requires posttranslational modification by the U(L)13 protein kinase. *Journal of virology* **71**:1133–1139.
27. **Kalamvoki M, Roizman B.** 2011. The histone acetyltransferase CLOCK is an essential component of the herpes simplex virus 1 transcriptome that includes TFIID, ICP4, ICP27, and ICP22. *J Virol* **85**:9472–9477.
28. **Hsin JP, Manley JL.** 2012. The RNA polymerase II CTD coordinates

- transcription and RNA processing. *Genes Dev* **26**:2119–2137.
29. **Rice SA, Long MC, Lam V, Spencer CA.** 1994. RNA polymerase II is aberrantly phosphorylated and localized to viral replication compartments following herpes simplex virus infection. *Journal of virology* **68**:988–1001.
  30. **Rice SA, Long MC, Lam V, Schaffer PA, Spencer CA.** 1995. Herpes simplex virus immediate-early protein ICP22 is required for viral modification of host RNA polymerase II and establishment of the normal viral transcription program. *Journal of virology* **69**:5550–5559.
  31. **Durand LO, Advani SJ, Poon AP, Roizman B.** 2005. The carboxyl-terminal domain of RNA polymerase II is phosphorylated by a complex containing cdk9 and infected-cell protein 22 of herpes simplex virus 1. *Journal of virology* **79**:6757–6762.
  32. **Durand LO, Roizman B.** 2008. Role of cdk9 in the optimization of expression of the genes regulated by ICP22 of herpes simplex virus 1. *Journal of virology* **82**:10591–10599.
  33. **Orlando JS, Balliet JW, Kushnir AS, Astor TL, Kosz-Vnenchak M, Rice SA, Knipe DM, Schaffer PA.** 2006. ICP22 is required for wild-type composition and infectivity of herpes simplex virus type 1 virions. *Journal of virology* **80**:9381–9390.
  34. **Kruse JP, Gu W.** 2009. Modes of p53 regulation. *Cell* **137**:609–622.
  35. **Menendez D, Shatz M, Resnick MA.** 2013. Interactions between the tumor suppressor p53 and immune responses. *Curr Opin Oncol* **25**:85–92.

36. **Lepik D, Ilves I, Kristjuhan A, Maimets T, Ustav M.** 1998. p53 protein is a suppressor of papillomavirus DNA amplificational replication. *J Virol* **72**:6822-6831.
37. **Pampin M, Simonin Y, Blondel B, Percherancier Y, Chelbi-Alix MK.** 2006. Cross talk between PML and p53 during poliovirus infection: implications for antiviral defense. *J Virol* **80**:8582-8592.
38. **Staib C, Pesch J, Gerwig R, Gerber JK, Brehm U, Stangl A, Grummt F.** 1996. p53 inhibits JC virus DNA replication in vivo and interacts with JC virus large T-antigen. *Virology* **219**:237-246.
39. **Casavant NC, Luo MH, Rosenke K, Winegardner T, Zurawska A, Fortunato EA.** 2006. Potential role for p53 in the permissive life cycle of human cytomegalovirus. *J Virol* **80**:8390-8401.
40. **Pauls E, Senserrich J, Clotet B, Este JA.** 2006. Inhibition of HIV-1 replication by RNA interference of p53 expression. *J Leukoc Biol* **80**:659-667.
41. **Chang SS, Lo YC, Chua HH, Chiu HY, Tsai SC, Chen JY, Lo KW, Tsai CH.** 2008. Critical role of p53 in histone deacetylase inhibitor-induced Epstein-Barr virus Zta expression. *J Virol* **82**:7745-7751.
42. **Boutell C, Everett RD.** 2004. Herpes simplex virus type 1 infection induces the stabilization of p53 in a USP7- and ATM-independent manner. *Journal of virology* **78**:8068-8077.
43. **Wilcock D, Lane DP.** 1991. Localization of p53, retinoblastoma and host replication proteins at sites of viral replication in herpes-infected cells. *Nature* **349**:429-431.

44. Tanaka M, Kagawa H, Yamanashi Y, Sata T, Kawaguchi Y. 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.
45. Arii J, Goto H, Suenaga T, Oyama M, Kozuka-Hata H, Imai T, Minowa A, Akashi H, Arase H, Kawaoka Y, Kawaguchi Y. 2010. Non-muscle myosin IIA is a functional entry receptor for herpes simplex virus-1. *Nature* **467**:859-862.
46. Kawaguchi Y, Van Sant C, Roizman B. 1997. Herpes simplex virus 1 alpha regulatory protein ICP0 interacts with and stabilizes the cell cycle regulator cyclin D3. *Journal of virology* **71**:7328-7336.
47. Tanaka M, Sata T, Kawaguchi Y. 2008. The product of the Herpes simplex virus 1 UL7 gene interacts with a mitochondrial protein, adenine nucleotide translocator 2. *Virology* **5**:125.
48. Kato A, Arii J, Shiratori I, Akashi H, Arase H, Kawaguchi Y. 2009. Herpes simplex virus 1 protein kinase Us3 phosphorylates viral envelope glycoprotein B and regulates its expression on the cell surface. *Journal of virology* **83**:250-261.
49. Kitamura T, Hayashida K, Sakamaki K, Yokota T, Arai K, Miyajima A. 1991. Reconstitution of functional receptors for human granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF): evidence that the protein encoded by the AIC2B cDNA is a subunit of the murine GM-CSF receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**:5082-5086.

50. **Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta MA, Mergny MD, Scherman D, Demeneix B, Behr JP.** 1995. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**:7297–7301.
51. **Jarosinski KW, Margulis NG, Kamil JP, Spatz SJ, Nair VK, Osterrieder N.** 2007. Horizontal transmission of Marek's disease virus requires US2, the UL13 protein kinase, and gC. *J Virol* **81**:10575–10587.
52. **Tischer BK, von Einem J, Kaufer B, Osterrieder N.** 2006. Two-step red-mediated recombination for versatile high-efficiency markerless DNA manipulation in *Escherichia coli*. *Biotechniques* **40**:191–197.
53. **Schmittgen TD, Livak KJ.** 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* **3**:1101–1108.
54. **Bastian TW, Livingston CM, Weller SK, Rice SA.** 2010. Herpes simplex virus type 1 immediate-early protein ICP22 is required for VICE domain formation during productive viral infection. *Journal of virology* **84**:2384–2394.
55. **Bruni R, Roizman B.** 1998. Herpes simplex virus 1 regulatory protein ICP22 interacts with a new cell cycle-regulated factor and accumulates in a cell cycle-dependent fashion in infected cells. *Journal of virology* **72**:8525–8531.
56. **Puca R, Nardinocchi L, Givol D, D'Orazi G.** 2010. Regulation of p53 activity by HIPK2: molecular mechanisms and therapeutic implications in human cancer cells. *Oncogene* **29**:4378–4387.
57. **Roizman B.** 2011. The checkpoints of viral gene expression in

- productive and latent infection: the role of the HDAC/CoREST/LSD1/REST repressor complex. *J Virol* **85**:7474–7482.
58. **Hagglund R, Roizman B.** 2004. Role of ICP0 in the strategy of conquest of the host cell by herpes simplex virus 1. *J Virol* **78**:2169–2178.
  59. **Sandri-Goldin RM.** 2011. The many roles of the highly interactive HSV protein ICP27, a key regulator of infection. *Future Microbiol* **6**:1261–1277.
  60. **el-Deiry WS, Kern SE, Pietenpol JA, Kinzler KW, Vogelstein B.** 1992. Definition of a consensus binding site for p53. *Nat Genet* **1**:45–49.
  61. **Huang J, Sengupta R, Espejo AB, Lee MG, Dorsey JA, Richter M, Opravil S, Shiekhattar R, Bedford MT, Jenuwein T, Berger SL.** 2007. p53 is regulated by the lysine demethylase LSD1. *Nature* **449**:105–108.
  62. **Lill NL, Grossman SR, Ginsberg D, DeCaprio J, Livingston DM.** 1997. Binding and modulation of p53 by p300/CBP coactivators. *Nature* **387**:823–827.
  63. **Ace CI, McKee TA, Ryan JM, Cameron JM, Preston CM.** 1989. Construction and characterization of a herpes simplex virus type 1 mutant unable to transinduce immediate-early gene expression. *Journal of virology* **63**:2260–2269.
  64. **Everett RD, Freemont P, Saitoh H, Dasso M, Orr A, Kathoria M, Parkinson J.** 1998. The disruption of ND10 during herpes simplex virus infection correlates with the Vmw110- and proteasome-dependent loss of several PML isoforms. *Journal of virology* **72**:6581–6591.
  65. **Parkinson J, Everett RD.** 2000. Alphaherpesvirus proteins related to

- herpes simplex virus type 1 ICP0 affect cellular structures and proteins. *Journal of virology* **74**:10006–10017.
66. **Boutell C, Sadis S, Everett RD.** 2002. Herpes simplex virus type 1 immediate-early protein ICP0 and its isolated RING finger domain act as ubiquitin E3 ligases in vitro. *Journal of virology* **76**:841–850.
  67. **Canning M, Boutell C, Parkinson J, Everett RD.** 2004. A RING finger ubiquitin ligase is protected from autocatalyzed ubiquitination and degradation by binding to ubiquitin-specific protease USP7. *J Biol Chem* **279**:38160–38168.
  68. **Boutell C, Canning M, Orr A, Everett RD.** 2005. 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.
  69. **Fiucci G, Beaucourt S, Duflaut D, Lespagnol A, Stumptner-Cuvelette P, Geant A, Buchwalter G, Tuynder M, Susini L, Lassalle JM, Wasylyk C, Wasylyk B, Oren M, Amson R, Telerman A.** 2004. Siah-1b is a direct transcriptional target of p53: identification of the functional p53 responsive element in the siah-1b promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:3510–3515.
  70. **Kato A, Tanaka M, Yamamoto M, Asai R, Sata T, Nishiyama Y, Kawaguchi Y.** 2008. Identification of a physiological phosphorylation site of the herpes simplex virus 1-encoded protein kinase Us3 which regulates its optimal catalytic activity in vitro and influences its function in infected cells. *Journal of virology* **82**:6172–6189.



71. Maruzuru Y, Fujii H, Oyama M, Kozuka-Hata H, Kato A, Kawaguchi Y. 2013. Roles of p53 in herpes simplex virus 1 replication. *J Virol* **87**:9323–9332.
72. Morimoto T, Arii J, Tanaka M, Sata T, Akashi H, Yamada M, Nishiyama Y, Uema M, Kawaguchi Y. 2009. Differences in the regulatory and functional effects of the Us3 protein kinase activities of herpes simplex virus 1 and 2. *J Virol* **83**:11624–11634.
73. Fujii H, Mugitani M, Koyanagi N, Liu Z, Tsuda S, Arii J, Kato A, Kawaguchi Y. 2014. Role of the Nuclease Activities Encoded by Herpes Simplex Virus 1 UL12 in Viral Replication and Neurovirulence. *J Virol* **88**:2359–2364.
74. Kato A, Liu Z, Minowa A, Imai T, Tanaka M, Sugimoto K, Nishiyama Y, Arii J, Kawaguchi Y. 2011. Herpes simplex virus 1 protein kinase Us3 and major tegument protein UL47 reciprocally regulate their subcellular localization in infected cells. *Journal of virology* **85**:9599–9613.
75. Ryckman BJ, Roller RJ. 2004. Herpes simplex virus type 1 primary envelopment: UL34 protein modification and the US3–UL34 catalytic relationship. *Journal of virology* **78**:399–412.
76. Imai T, Sagou K, Arii J, Kawaguchi Y. 2010. Effects of phosphorylation of herpes simplex virus 1 envelope glycoprotein B by Us3 kinase in vivo and in vitro. *Journal of virology* **84**:153–162.
77. Burch AD, Weller SK. 2004. Nuclear sequestration of cellular chaperone and proteasomal machinery during herpes simplex virus type

- 1 infection. J Virol **78**:7175-7185.
78. **Livingston CM, DeLuca NA, Wilkinson DE, Weller SK.** 2008. Oligomerization of ICP4 and rearrangement of heat shock proteins may be important for herpes simplex virus type 1 prereplicative site formation. J Virol **82**:6324-6336.
79. **Livingston CM, Ifrim MF, Cowan AE, Weller SK.** 2009. Virus-Induced Chaperone-Enriched (VICE) domains function as nuclear protein quality control centers during HSV-1 infection. PLoS Pathog **5**:e1000619.