

## 論文の内容の要旨

# 論文題目:単純ヘルペスウイルス制御因子 ICP22 の機能解析

氏名 丸鶴雄平

### 背景と目的

本研究の対象である単純ヘルペスウイルス 1 型 (HSV-1: Herpes Simplex Virus 1) は、ヒトに脳炎、口唇ヘルペス、皮膚疾患、などといった多様な疾患を引き起こす。HSV-1 感染症の医療費は全世界で年間数千億円と試算され、医学上極めて重要なウイルス感染症の 1 つである。

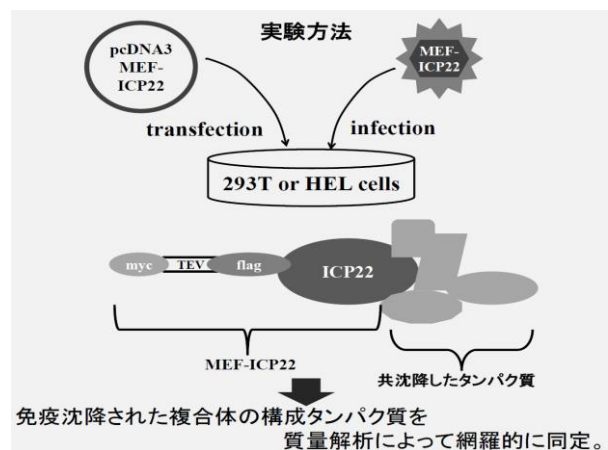
HSV-1 は宿主細胞に感染すると、およそ 80 種類のタンパク質を発現することで、宿主細胞の機能を乗っ取り、細胞を自身の増殖に有利な環境に変えてしまう。HSV-1 の宿主であるヒトの遺伝子はおおよそ 2 万種類のタンパク質をコードしている。すなわち HSV-1 は、たった 80 種類のタンパク質によって、2 万種類のタンパク質から構成される複雑系を再編成することで、ウイルス増殖に最適な細胞環境を生み出していることが容易に想像される。このようなことを成し遂げる為に、ウイルスのタンパク質には 2 つ以上の機能が割り当てられている “多機能タンパク質” が多く存在すると考えられる。

本研究ではそれら 80 種類の 1 つである ICP22 というタンパク質に着目している。ICP22 は HSV-1 の遺伝子発現を制御する因子ということが知られている。つまり、HSV-1 の ICP22 欠損株においては特定のウイルスタンパク質の発現が減少することが知られていた<sup>1)</sup>。しかし、ICP22 が如何なる宿主タンパク質の機能を制御するのか、更には如何にウイルス粒子成熟過程に関与する

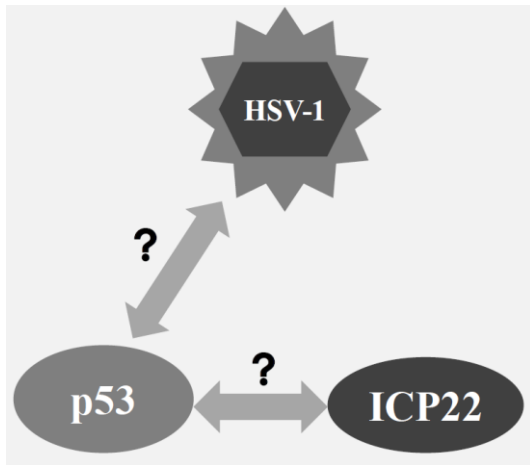
のかについてはほとんど明らかになっていないのが現状であった。そこで本研究では ICP22 と相互作用する宿主タンパク質およびウイルスタンパク質を同定することによって ICP22 の新規機能の探索を試みた。

### 相互作用因子の同定方法

①MEF(Myc-TEV-Flag)-tag が付加された ICP22 を発現するプラスミドを 293T 細胞に transfection すること、②MEF-tag が付加された ICP22 をコードする組み換え HSV-1 を HEL 細胞に感染させること、によって MEF-ICP22 を発現させ、myc 抗体と flag 抗体によって 2 回免疫沈降後、その免疫沈降物に含まれるタンパク質を質量分析法 (MS:Mass Spectrometry) によって網羅的に同定した (下図)。その結果、transfection の系では p53、感染の系ではウイルスタンパク質の複合体である Nuclear Egress Complex (NEC)が同定された。本研究は二部構成であり、第 1 部では p53 を、第 2 部では NEC を扱う。



## 第1部



p53 はがん抑制タンパク質として知られ、様々な細胞の挙動を制御する<sup>2)</sup>。これまでに p53 が HSV-1 の増殖に与える影響や、感染細胞で p53 と相互作用する HSV-1 タンパク質についての報告は存在しなかった。従って第1部では、HSV-1 の増殖に対する p53 の役割と p53 と ICP22 の相互作用の意義を解明することを目的とし、解析を試みた。

### 結果

#### (i) ICP22 と p53 は感染細胞中で相互作用する。

上述した質量解析によるスクリーニングは ICP22 を過剰発現させた非感染細胞を用いて行ったため、共免疫沈降法により、感染細胞中での相互作用の確認を試みた。その結果、ICP22 と p53 は感染細胞においても相互作用していることが明らかとなった。更に両タンパク質は核内で共局在することも明らかになった。

(ii) p53 は HSV-1 の増殖にプラスの影響を与える。上述した通り、p53 が HSV-1 の増殖に与える影響は未知であった。p53 は転写因子としてその機能を発揮する為、HSV-1 の様々なタンパク質の発現を HCT-116-p53(+/+)及び p53(-/-)細胞を用いて比較した。その結果、

HSV-1 の増殖に必須のウイルスタンパク質である ICP27 の発現量は p53(-/-)の細胞で野生株(HSV-1 wt)及び ICP22 欠損株(HSV-1  $\Delta$  ICP22)両方で低下していた。これらの結果は、p53 が ICP27 の発現量の増加という HSV-1 の増殖にとってプラスの影響を野生株、及び ICP22 欠損株両方に与えているということの意味する。

#### (iii) p53 は HSV-1 の増殖にマイナスの影響も与える。

ICP22 は HSV-1 の増殖に重要な役割を果たしているウイルスタンパク質である ICP0 の発現量を制御することが知られていた。そこで ICP0 の発現量を p53(+/+)細胞と p53(-/-)細胞とで比較した結果、興味深いことに、ICP22 欠損株感染細胞において p53(-/-)の細胞のほうが ICP0 の発現量が多かった。その一方で、野生株感染細胞においては2つの細胞間で ICP0 の発現量に差は認められなかった。この結果は ICP22 欠損株のみ p53 が ICP0 の発現量を抑制し、野生株においてはその効果を持たない事を意味している。従って p53 は ICP0 の発現量の抑制という HSV-1 の増殖にとってマイナスの影響を持つが、HSV-1 は ICP22 によってこの p53 の影響から逃れていることが示唆された。

#### (iv) p53 は HSV-1 野生株のみ増殖を亢進する。

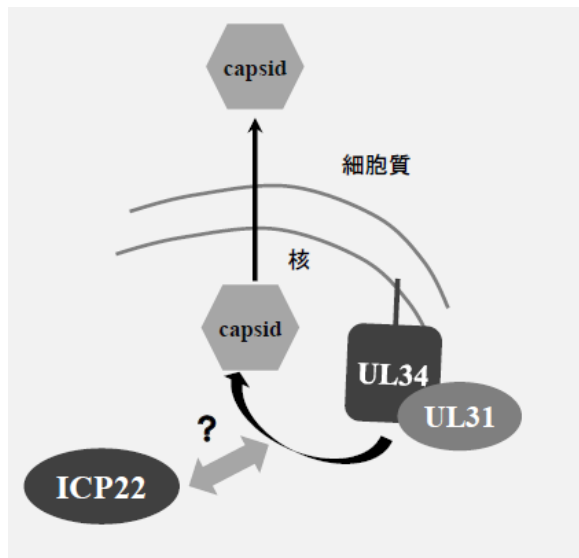
(ii)と(iii)の結果より、HSV-1 野生株は p53 のプラスの影響のみ受け、ICP22 欠損株は p53 のプラスとマイナスの影響を両方受けることが考えられた。そこで、HSV-1 野生株、及び ICP22 欠損株の増殖を p53(+/+)、及び p53(-/-)細胞で比較した結果、p53 のプラスの影響のみ受けると考えられる野生株は p53(-/-)の細胞に比べ p53(+/+)の細胞でその増殖が 40 倍亢進していた。その一方で、p53

のプラスとマイナスの両方の影響を受けると考えられる ICP22 欠損株は p53 の有無でその増殖に変化はなかった。

## 考察

これらの結果は、p53 は HSV-1 の増殖に対してプラスの影響とマイナスの影響を持つが、ICP22 が p53 のマイナスの影響に対抗することによって、HSV-1 は p53 のプラスの影響のみ享受し、自身の増殖に有利な環境を作り上げていることを示している<sup>3)</sup>。本研究結果から、進化上におけるウイルスと宿主の攻防が示唆された。( Maruzuru et al., J. Virol., 2013, 87, 9323-32 平成 25 年 東京大学医科学研究所 優秀論文賞)

## 第2部



感染の系のインタラクトーム解析で同定された NEC は HSV-1 がコードする UL31、UL34 から構成されるタンパク質複合体である。HSV-1 は、宿主細胞に感染すると核でウイルスカプシドを形成後、細胞質に移行する。しかしながら、ウイルスカプシドは核膜孔よりもサイズが大きい。従って、如何にウイルスのカプシドが核から細胞質に移行

するかは、研究が非常に盛んな課題である。NEC は、試験管内において脂質二重膜を変形させることや、感染細胞においてウイルスカプシドの核膜の通過に極めて重要な役割を果たしていることが報告されている<sup>4)</sup>。

それでは ICP22 と UL34 の相互作用は、カプシドの効率的な核膜通過に関与しているのだろうか？第 2 部ではこの命題に関して解析を試みた。

## 結果

(i)ICP22 は核膜に局在する。ICP22 は感染細胞内で核内に局在することが報告されているが、核膜に局在するという報告は存在しない。ICP22 は感染細胞で NEC と相互作用することから、ICP22 が核膜にも局在することが考えられた。そこで、ICP22 の核膜における局在を観察するため、核膜のマーカーである LaminB1、及び UL34 と ICP22 の局在を IFA によって解析した。その結果、ICP22 は LaminB1 及び UL34 と核膜上で共局在することが確認された。従って ICP22 は感染細胞で核膜にも局在することが明らかとなった。

(ii)ICP22 は NEC の局在を制御する。ICP22 の核膜への局在はウイルスの増殖にとってどのような役割を果たしているのだろうか。ICP22 は NEC と相互作用することから、HSV-1 野生株と ICP22 欠損株感染細胞で NEC の局在を比較した。その結果、ICP22 欠損株感染細胞で NEC は突起状の局在を示し、この局在が小胞体のマーカーである Calnexin と共局在することから、ER に局在していることが示唆された。従って、ICP22 は感染細胞で NEC と相互作用し、NEC の適切な局在を制御しているということが示唆された。

(iii) ICP22 欠損株はカプシドの核膜通過の効率が減少する。ICP22 は NEC の局在を制御する為、その欠損株はカプシドの核膜通過の効率の減少が起きていることが予想された。そこで、透過型電子顕微鏡によってカプシドの核膜通過効率を解析した。その結果、ICP22 欠損株で核内のカプシドの割合が有意に増加し、核膜間スペースのカプシドの割合が有意に低下していた。従って ICP22 は NEC の局在を制御することによってウイルスカプシドの効率的な核膜通過に寄与しているということが明らかとなった

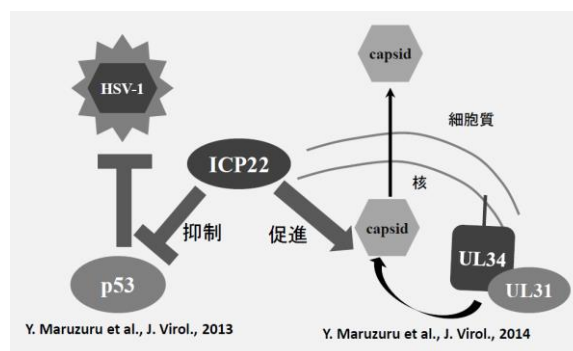
### 考察

これらの結果は、ICP22 が HSV-1 感染細胞において核膜に局在し、そこで NEC と相互作用することによって、NEC の適切な局在を制御し、カプシドの効率的な核膜通過に寄与しているということを示している。本研究により、ICP22 は従来の遺伝子発現制御機能に加え、ウイルス粒子成熟過程においても重要な役割を担っているということが示唆された<sup>5)</sup>。(Maruzuru et al., J. Virol., 2014, 88, 7445-54)。

### 総括

本研究では高感度質量分析計を用いたインタクトーム解析により、ICP22 の新規相互作用因子として p53 及び NEC を同定した。更に、ICP22 の “p53 によるマイナスの影響の抑制” 及び “効率的なカプシドの核膜移行の制御” という 2 つの新規機能を明らかにした (右上図)。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を証

明することができた。



### 参考文献

- 1) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1993, 90, 6701-6705
- 2) *Cell*, 2009, 137, 609-22
- 3) *J. Virol.*, 2013, 87, 9323-32
- 4) *J. Virol.*, 2001, 75, 8803-17
- 5) *J. Virol.*, 2014, 88, 7445-54