

博士論文

単純ヘルペスウイルス 1 型 (HSV-1) がコードする

UL41 の機能解析

小川 遼

目次

要旨	2
序文	3
材料と方法	10
結果	22
考察	36
引用文献	45
図表	50
謝辞	70

要旨

単純ヘルペスウイルスの成熟ウイルス粒子には宿主細胞因子が含まれるが、その取り込み機構は不明であった。我々は、テグメント主要構成因子である UL41 が成熟ウイルス粒子への宿主細胞因子取り込みを抑制することを明らかにし、その制御機構を解析した。その結果、UL41 がテグメント主要構成因子である UL47 の発現量を増加させ、UL47 が成熟ウイルス粒子への宿主細胞因子取り込みの抑制に関与することを明らかにした。また、分子シャペロンである Hsp90 が UL47 の安定化に必要であり、UL41 が Hsp90 を活性化することが示唆された。本研究は、UL41 による Hsp90 の活性化を介した UL47 発現量の制御を、成熟ウイルス粒子への宿主細胞因子取り込み制御機構の一つとして報告するものである。

序文

ヘルペスウイルス

ヘルペスウイルスは、正 20 面体のカプシド構造の中に 2 本鎖 DNA をゲノムとして内包した大型の DNA ウイルスである (1)。200 を超える種類のウイルスがヘルペスウイルス科に属しており、進化の系統樹によって、それぞれ α 、 β 、 γ の 3 つの亜科に分類されている (1)。全ての脊椎動物にそれぞれ固有のヘルペスウイルスが存在すると考えられていることに加え、中には牡蠣ヘルペスのような無脊椎動物を自然宿主とするヘルペスウイルスも存在している。

このような数多くのヘルペスウイルスのうち、少なくとも 8 種類のヘルペスウイルスがヒトを自然宿主とすることが分かっている。順に、単純ヘルペスウイルス 1 型(Herpes simplex virus-1; HSV-1 or HHV-1)、単純ヘルペスウイルス 2 型(Herpes simplex virus-2; HSV-2 or HHV2)、水痘・帯状疱疹ウイルス(Varicella-zoster virus; VZV or HHV-3)、EB ウイルス(Epstein-Barr virus; EBV or HHV-4)、ヒトサイトメガロウイルス(Human cytomegalovirus; HCMV or HHV-5)、ヒトヘルペスウイルス-6 型(Human herpesvirus-6; HHV-6)、ヒトヘルペスウイルス-7 型(Human herpesvirus-7; HHV-7)、カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス(Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus; KSHV or HHV-8)であ

る (2)。これらのヘルペスウイルスは、初感染の後に潜伏感染を成立させるという共通の特徴を持っており、宿主の免疫低下など種々のストレスに応じて再活性化して回帰発症することが知られている (1)。

単純ヘルペスウイルス

単純ヘルペスウイルス(Herpes simplex virus; HSV)は、ヒトに対して口唇ヘルペス、性器ヘルペス、脳炎、全身性の新生児ヘルペスなどの多様な疾患を引き起こすことが知られている (3)。このようなヘルペスウイルスによる疾患の中で、ヘルペス脳炎は、その致死率が無治療の場合で 70 %～90 %と極めて高いことが知られ、非常に恐れられている (4)。抗ヘルペスウイルス薬であるアシクロビルの投与により、ヘルペス脳炎による致死率は 10 %程度に低下するが、現代においてこの数値は低いとは言えない。さらに、生存した患者の半数以上に深刻な後遺症を残すなど、極めて重篤な疾患であると言える (5)。

HSV は、口、手指などの上半身に感染する HSV-1、性器などの下半身に感染する HSV-2 という 2 つの血清型に区別されるが、両者に厳密な棲み分けは無く、性器ヘルペスの病変から HSV-1 が検出されることも珍しくない (6)。性感染症の病原体としての HSV は世界的に問題となっており、比較的統計が明らかになっている米国においては、毎年約 50 万人が性器ヘルペスに新規に罹患し、およ

そ 1000 万人が再発性の性器ヘルペスに苦しむと言われている (7)。このような HSV 感染症の問題は、根治及び予防が困難であるという 2 点に集約される。まず、根治が困難である点については、長期にわたって再発症が繰り返されることにより、患者への精神的苦痛が大きいことが問題となる。そして、予防が困難とされるのは、HSV は 70~80%という高い割合で不顕性感染を起こすため、無自覚のままウイルスを排出し、感染を広げてしまう場合が多いためである。これらの問題に加え、米国における HSV 感染症の医療費が年間約 30 億ドルに上ると試算されることから、HSV 研究の重要度は極めて高いと考えられる (7)。

単純ヘルペスウイルスの生活環

HSV のウイルス粒子は、ウイルス DNA を内包するカプシドが宿主細胞由来の脂質 2 重膜から成るエンベロープに包まれた構造をしており、カプシドとエンベロープの間隙にはテグメントが充填されている。(1) (図 1A)。HSV はエンベロープ上に存在する糖タンパク質と宿主細胞膜上のレセプターの特異的な結合を介して細胞に侵入する (8)。細胞質に放出されたカプシドは細胞骨格に沿って核まで輸送され、核膜孔からウイルス DNA を核内に挿入する。HSV の細胞侵入時には、カプシドと共にウイルス粒子中のテグメントタンパク質である

UL41 及び VP16 が細胞質へ持ち込まれる (1)。細胞質に放出された UL41 は、宿主細胞の mRNA を分解して宿主タンパク質の新規合成を阻害する”shut-off”と呼ばれる現象を起すことで、宿主の免疫応答を抑制する他、ウイルスタンパク質を選択的に合成できる環境を作り出すと考えられている (1)。また、VP16 は核へと移行し、ウイルス遺伝子の発現に重要な役割を果たすとされている (1)。

HSV のウイルス遺伝子は、大きく 3 群(前初期; α 、初期; β 、後期; γ)に分類されており、それぞれ発現時期が異なっている。核に移行した VP16 は α 遺伝子群の発現を開始させ、 α 遺伝子群には、 β 、 γ 遺伝子群の発現制御を行うウイルスタンパク質がコードされていることから、VP16 は遺伝子発現カスケードの起点と考えられている。核で転写された α 遺伝子の mRNA は細胞質においてタンパク質に翻訳された後、核に移行して β 遺伝子群の発現を活性化する (1)。 β 遺伝子群には、ウイルス DNA の複製を担うタンパク質が多くコードされており、それらの機能によりウイルス DNA の複製が行われる。HSV のウイルス DNA の複製様式はローリングサイクル機構と呼ばれ、中間体として多数のウイルス DNA のコピーが直鎖上に繋がった巨大なコンカテマーが形成されるという特徴がある (9)。また、ウイルス DNA の複製の進行に伴って、ウイルスの構造タンパク質を多くコードする γ 遺伝子の発現が始まる。 γ 遺伝子産物によって空のカプシドが形成されると、ウイルス DNA のコンカテマーが、ウイルスゲノムの大きさに切断され、

ウイルス DNA としてカプシドへパッケージングされる (9)。ウイルス DNA を獲得したカプシドはヌクレオカプシドと呼ばれ、核から細胞質へと移行するが、その過程は、一度核内膜をエンベロープとして被ることで核内-外膜間(perinuclear space)に出芽し(primary envelopment)、その後、核外膜に融合することで細胞質に放出されるという、HSV 感染細胞特有の現象であることが知られている。細胞質に放出されたヌクレオカプシドはテグメントを獲得し、トランスゴルジネットワークに由来する膜オルガネラに出芽することにより、最終エンベロープを獲得し(secondary envelopment)、成熟ウイルス粒子となり細胞外へ放出される (1) (図 1B)。

本研究の目的

HSV-1 成熟ウイルス粒子の形状や構成因子に関する理解は比較的進んでおり、成熟ウイルス粒子のテグメントにはウイルス因子だけでなく、宿主細胞因子が含まれることが分かっている(10)。これまで、成熟ウイルス粒子への宿主細胞因子の取り込み機構はほとんど理解されていなかったが、最近、筆者らの研究室において、UL41 の欠損により成熟ウイルス粒子への宿主細胞因子の取り込みが増加することが明らかになった。ウイルスの感染直後から感染初期における UL41 の機能は比較的明らかになっているが、感染後期におけるウイルス粒子成

熟過程に UL41 が関与することはこれまで報告されていない (図 1B)。そこで、本研究では UL41 が成熟ウイルス粒子への宿主細胞因子の取り込みを制御するメカニズムの解明を目指した。

HSV-1 のコードする UL41 と UL47

UL41 は RNaseA 様のエンドリボヌクレアーゼであり、HSV-1 ウイルス粒子のテグメントに取り込まれている (11)。UL41 の欠損は、細胞種依存的にウイルスの増殖能を低下させ、Vero 細胞やヒト胎児肺線維芽細胞である HEL 細胞ではほとんど影響がないのに対し、ヒト子宮頸がん細胞である HeLa 細胞やヒト喉頭がん細胞である Hep2 細胞においては最大で 50 倍程度低下することが報告されている (12)。また、マウスモデルにおいて著しい弱毒化を引き起こすことが報告されている (13-15)。UL41 はウイルス感染細胞において、宿主 mRNA と一部のウイルス mRNA、特に α mRNA (α 遺伝子由来の mRNA) を分解することが分かっている (11, 16)。UL41 による宿主 mRNA の分解は、ウイルス感染に伴う自然免疫系の活性化を抑えると共に、宿主のタンパク質合成系でウイルスタンパク質を優先的に合成できるようにしていると考えられている (17)。また、ウイルスの α mRNA の分解に伴う α 遺伝子産物の減少は、後続の β 、 γ 遺伝子群の連続的な発現の制御に必要とされている (16)。こうした UL41 の機能

は感染初期において発揮され、感染後期には VP16 と VP22 の働きにより UL41 の RNase 活性が中和され、機能しなくなることが分かっている (18, 19)。このように、UL41 が宿主及びウイルス因子に与える影響は多岐にわたり、その活性が厳密に制御されていることが分かっているが、成熟ウイルス粒子の構成因子の制御のような感染後期の現象に関する報告はなされていない。

本研究において、UL41RNase 活性消失ウイルス感染細胞におけるタンパク質発現量を解析した結果、UL47 の発現量が特異的に低下することが分かった。UL47 はテグメント主要構成因子であり、その欠損により培養細胞におけるウイルス増殖とマウスモデルにおける病原性が低下することが報告されている (20, 21)。UL47 はウイルス感染直後における VP16 の機能を補助することが報告されており、最近新たに UL41 による mRNA の分解からウイルス β 、 γ mRNA を保護することが報告された (20, 22)。また、UL47 は核-細胞質間のシャトリングタンパク質であることが分かっている (23-25)。そして、UL47 はカプシド表面に存在する UL17 との相互作用することと、UL47 がテグメントに最も多く含まれる因子であることから、UL47 がテグメント獲得機構において重要な役割を果たすことが予想できる(10, 26)。

材料と方法

細胞とウイルス

アフリカミドリザル腎細胞に由来する Vero 細胞は 9.5 g/1 L ダルベッコ変法イーグル培地”ニッスイ”②(日水製薬)に 5 % Calf Serum (CS)、100 units/ml ペニシリン、100 µg/ml ストレプトマイシンを加えた培地で培養した。Rabbit Skin 細胞は、Dulbecco’s Modified Eagle Medium (DMEM) (Sigma)に 5 % Fatal Calf Serum (FCS)、100 units/ml ペニシリン、100 µg/ml ストレプトマイシンを加えた培地で培養した。ヒト胎児腎細胞に由来する HEK293 細胞は DMEM に 10 % FCS、100 units/ml ペニシリン、100 µg/ml ストレプトマイシンを加えた培地で培養した。なお、培地に加える血清(CS 及び FCS)は、56 °Cで 30 分間非働化してから使用した。

HSV-1 野生株として HSV-1 (F) を用いた。組換えウイルスである UL41 欠損ウイルス (ΔUL41) 及びその復帰ウイルス (ΔUL41-Repair)、UL41RNase 活性消失ウイルス (UL41D213N) 及びその復帰ウイルス (UL41D213N-Repair)、UL47 欠損ウイルス (ΔUL47/ΔBAC) 及びその復帰ウイルス (ΔUL47-Repair/ΔBAC) は当研究室で作製されたものを用いた。本研究では、これら全てのウイルスについて、Vero 細胞を用いたプラークアッセイにより感染性ウイルスカ

価を測定してから使用した (21, 27, 28)。

プラスミド

プライマー5'-GCCTGCAGTGCTTCGCCCCGCTACCCCGAAGGATGACGAC
GATAAGTAGGG-3'及び 5'- GCCTGCAGGCCGTAGCCCAGGGTGGTCACA
ACCAATTAACCAATTCTGATTAG-3'を用いて pEP-KanS より I-SceI 配列および
カナマイシン耐性遺伝子を PCR で増幅し、pCS2-Venus の Venus 配列中の PstI サ
イトにクローニングし、pCS2-Venus-PstI-I-SceI&KAN^R を作製した (29)。

pRL-Renilla Luciferase-Control-Reporter-Vector (Promega)から Renilla Luciferase
配列を NheI-XbaI サイトで切り出し、pBluescript-II-KS(+)-phagemid-vector の XbaI
サイトにクローニングし、pBS-Renilla Luciferase を作製した。続いて、pBS-Renilla
Luciferase から Renilla Luciferase 配列を BamHI-NotI サイトで切り出し、
pENTR11-DualSelection-Vector (invitrogen)の BamHI-NotI サイトにクローニングし、
pENTR11-Renilla Luciferase を作製した。pENTR11-Renilla Luciferase と pAD-CMV-
V5-DEST (invitrogen)を用いて、pAd/CMV/V5-DESTTM Gateway® Vector に従って
組み換えを行い、pAD-CMV-Renilla Luciferase を作製した。

組換えウイルスの作製

Venus-UL47/UL41D213N ウイルスは、UL41D213N (YK478)ゲノムを有する大腸菌から以下の手順で作製した(30)。トランスファーベクター pCS2-Venus-PstI-I-SceI&KAN^R のカナマイシン耐性遺伝子を含む Venus 配列をプライマー 5'-TTCTTTTTTGGGGGGTAGCGGACATCCGATAACCCGCGTCTATCGCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTG-3' 及び 5'-CGGGGGCGGGTGGATGCGCGCCTCCTACGCCCCGCGGGTTCGCGAGCCGACTTGTACAGCTCGTCCATGCCG-3'を用いて PCR で増幅し、PCR 断片をエレクトロポレーションすることで UL41D213N (YK478)ゲノムを有する大腸を形質転換した。形質転換した大腸菌は LB 寒天培地 (20 µg/ml クロラムフェニコール+40 µg/ml カナマイシン) にプレーティングし、32°Cで一晩培養した。翌日、目的の部位にカナマイシン耐性遺伝子を含む全長の Venus が挿入されたことをコロニーPCR で確認した後、LB 液体培地 (20 µg/ml クロラムフェニコール+40 µg/ml カナマイシン)に植菌し、32°Cで一晩培養した。翌日、一晩培養液 100 µl を 2 ml の LB 液体培地 (20 µg/ml クロラムフェニコール)に加え、32°Cで振盪培養した。2 時間後に 400 µl の 10 % L-アラビノース (Wako) を加えることで I-SceI の発現を誘導し、さらに 1 時間振盪培養した。その後、42°Cに設定した恒温水槽に 30 分間水浴させることでリコンビナーゼの発現を誘導した後、32°Cで 2 時間培

養し、培養液を LB 寒天培地 (20 µg/ml クロラムフェニコール)にプレーティングして 32℃で一晩培養した。翌日、得られたコロニーを LB 寒天培地 (20 µg/ml クロラムフェニコール+40 µg/ml カナマイシン、または 20 µg/ml クロラムフェニコール)に植菌し、クロラムフェニコール耐性のみを示すクローンを選択した。最後に、シーケンスを解析し、変異のない完全長の Venus を有しているか検証した。

Venus-UL47/UL41D213N-Repair ウイルスは Venus-UL47/UL41D213N ゲノムを有する大腸菌を用いて以下のように作製した。pEP-KanS より I-SceI 配列およびカナマイシン耐性遺伝子をプライマー 5'-CCTCTATCACACCAACACGGTCGCGTACGTGTACACCACGGACACTGACCTCCTGTTGATGAGGATGACGACGATAAGTAGGG-3'及び 5'-TCCAACACAATATCGCAGCCCATCAACAGGAGGTCAGTGTCCGTGGTGTACACGTACGCGACAACCAATTAACCAATTCTGATTAG-3'を用いて PCR で増幅し、PCR 断片をエレクトロポレーションすることで Venus-UL47/UL41D213N ゲノムを有する大腸菌を形質転換した。形質転換した大腸菌は LB 寒天培地 (20 µg/ml クロラムフェニコール+40 µg/ml カナマイシン)にプレーティングし、32℃で 1 時間培養した。翌日、目的の部位にカナマイシン耐性遺伝子が挿入されたことをコロニーPCR で確認した後、LB 液体培地 (20 µg/ml クロラムフェニコール+40 µg/ml カナマイシン)に植

菌し、32℃で一晩培養した。翌日、一晩培養液 100 μ l を 2 ml の LB 液体培地 (20 μ g/ml クロラムフェニコール)に加え、32℃で振盪培養した。2 時間後に 400 μ l の 10% L-アラビノース (Wako) を加えることで I-SceI の発現を誘導し、さらに 1 時間振盪培養した。その後、42℃に設定した恒温水槽に 30 分間水浴させることでリコンビナーゼの発現を誘導した後、32℃で 2 時間培養し、培養液を LB 寒天培地 (20 μ g/ml クロラムフェニコール)にプレーティングして 32℃で一晩培養した。翌日、得られたコロニーを LB 寒天培地 (20 μ g/ml クロラムフェニコール+40 μ g/ml カナマイシン、または 20 μ g/ml クロラムフェニコール)に植菌し、クロラムフェニコール耐性のみを示すクローンを選択した。最後に、シーケンスを解析し、UL41 の配列が野生型に戻っていることを確認した。

以上のようにして作製した大腸菌からウイルスゲノムを抽出し、Rabbit Skin 細胞にリン酸カルシウム法を用いてトランスフェクションすることで、Venus-UL47/UL41D213N および Venus-UL47/UL41D213NRepsir ウイルスを再構築した。

リン酸カルシウム法によるトランスフェクション

HSV-1 の再構築には Rabbit Skin 細胞を使用した。H₂O 250 μ l、ウイルス DNA 1~5 μ g、2.2 mM CaCl₂ 35 μ l、2×Hepes Buffered Saline (HBS)(pH 7.05)(0.14

mM NaCl、2.7 mM KCl、1 mM Na₂HPO₄ · 2H₂O、50 mM HEPES、1 mM Dextrose) 250 µl の混合液を作製し、20 分間室温に静置した。DNA 混合液の作製と並行して、トランスフェクション操作の 2 時間前にパッセージしておいた Rabbit Skin 細胞に DEAE Dextran in PBS を加え、10 分後に TEN [0.1 M NaCl、10 mM Tris-HCl (pH 8.0)、1 mM EDTA] で洗浄した。続いて、Rabbit Skin 細胞用培地と DNA 混合液を加え、37 °C で 6 時間培養した。その後、培地を交換しウイルスが再構築されるまで 1 週間程度培養した。

ルシフェラーゼ発現組み換えアデノウイルスの再構築には HEK293 細胞を使用し、トランスフェクション操作の前に pAD-CMV-Renilla Luciferase を PacI で切断し、ITR 配列を露出させてから使用した。

抗体

UL41 (27)、UL47 (Liu et al. 投稿中)、UL50 (31)、UL12 (Fujii et al. 投稿中) に対するウサギポリクローナル抗体およびマウスモノクローナル抗体は当研究室で作製されたものを使用した。VP16、VP22、UL34 に対するウサギポリクローナル抗体は西山教授(名古屋大学)より分与して頂いた。VP5 (3B6)、ICP8、β-actin (AC15)、α-tubulin (DM1A)、Hsp90α/β(F-8)に対するマウスモノクローナル抗体はそれぞれ Virusys Corporation、Sigma、Santa Cruz

Biotechnology から購入した。Hsc70(1B5)に対するラットモノクローナル抗体は Enzo Life Sciences から購入した。

阻害剤

Hsc70/Hsp70 の阻害剤である VER-155008、Hsp90 の阻害剤である 17-AAG はそれぞれ Sigma、LC Laboratories から購入し、DMSO に溶解して使用した。VER-155008 は 50 μ M final、17-AAG は 1 μ M final の条件で細胞培養液に加えた。

感染性ウイルス力価測定(プラークアッセイ)

1 % FCS を含む 199 培地 (Sigma)を用いて、ウイルス試料の希釈系列 ($10^2 \sim 10^9$ 倍)を作製し、それぞれ Vero 細胞に感染させた。ウイルス液を加えて 1 時間後に、培地をヒト- γ -グロブリンを含む 199 培地に交換した。感染 3 日後に培地を除き、メタノールを加えることで固定し、クリスタルバイオレットで染色した。その後、実体顕微鏡 Stemi DV4 (Carl Zeiss) を用いてプラーク数をカウントし、感染性ウイルス力価を算出した。

増殖曲線

Low MOI と High MOI の感染条件におけるウイルスの増殖性を評価するため、Vero 細胞にウイルスを MOI 0.01 と MOI 5 の条件で感染させた。ウイルス液を加えて 1 時間後に、細胞を培地で洗浄し、新しい培地に交換した。その後、Low MOI の試料は感染 6 時間、24 時間、36 時間、48 時間後に、High MOI の試料は感染 6 時間、12 時間、18 時間、24 時間後に培養上清ごと細胞を回収した。回収した感染細胞は 3 回凍結融解した後、Vero 細胞を用いたプラークアッセイで感染性ウイルス力価を測定した。

ウイルス粒子の精製

Vero 細胞にウイルスを MOI 0.01 の条件で感染させ、細胞変性効果が全体に広がった後に回収した。低速遠心で細胞を沈殿させ、培養上清を回収して 0.45 μm フィルター (Sartorius Stedim Biotech)に通すことで試料への細胞の持ち込みを防いだ。スイングローターを用いた超遠心 [P28S rotor (Hitachi Koki) 22,000 rpm (g_{ave} 64,000 g) 1 時間]により、ウイルス粒子を沈殿させ、ペレットを TBSal [200 mM NaCl、2.6 mM KCl、10 mM Tris-HCl (pH 7.5)、20 mM MgCl_2 、1.8 mM CaCl_2]に懸濁した。続いて、ショ糖不連続密度勾配(30 %、40 %、50 % ショ糖 in TBSal)を作製し、ペレットの懸濁液を重層し、スイングロータ

ーを用いた超遠心[P40ST rotor (Hitachi Koki) 22,000 rpm (g_{ave} 61,000 g) 2 時間]により、ウイルス粒子を分画して回収した。その後、再度超遠心[P40ST rotor (Hitachi Koki) 22,000 rpm (g_{ave} 61,000 g) 1 時間]を行うことでウイルス粒子を濃縮し、精製ウイルス粒子として回収した。

蛍光顕微鏡解析

Vero 細胞を 0.01 %コラーゲン(タイプ I)(機能性ペプチド研究所)でガラス面をコーティングした 35 mm ガラスボトムディッシュ(Matsunami)にパッセージして培養し、ウイルスを MOI 5 の条件で感染させた。感染 18 時間後に 4 % パラホルムアルデヒド in PBS で 20 分間固定し、PBS で洗浄した後、LSM5 PASCAL 蛍光顕微鏡 (Carl Zeiss) による解析に供した。63 x 1.4 倍 Plan-APOCHROMAT 対物レンズを使用し、Venus の蛍光は 488 nm [Argon laser(458、488、514 nm) (Carl Zeiss)]で励起し、BP 515-545 emission filter を通して観察した。

Immunoblot 解析

ウイルス粒子および細胞由来の試料に含まれるタンパク質は、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) によって分離した。電気泳動後のゲルは Transfer Buffer [Tris(hydroxymethyl)aminomethane 12.1 g, Glycine 14.4 g

メタノール 200 ml、H₂O 800 ml]に浸して馴染ませた。続いて、Transfer Buffer に浸したろ紙をセミドライトランスファー装置にセットし、その上にニトロセルロースメンブレン(BIORAD)、ゲル、ろ紙を順番に重ね、電圧を加えることでトランスファーした。トランスファーが完了した後、メンブレンを 5 % スキムミルク in PBS-T (0.1 % Tween20 in PBS) に浸し、室温で 30 分間振盪することでブロッキングした。ブロッキング完了後、メンブレンを PBS-T で洗浄し、1 % BSA in PBS-T で 1,000 倍~10,000 倍に希釈した 1 次抗体と共にハイブリバック(コスモ・バイオ)にパッケージし、室温で 2 時間反応させた。1 次抗体の反応が終了した後、PBS-T でメンブレンを洗浄し、5 % スキムミルク in PBS-T で 5,000 倍~20,000 倍に希釈した 2 次抗体 [Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-mouse、anti-rabbit 及び anti-rat 抗体(GE Healthcare)] と共にハイブリバックにパッケージし、室温で 1 時間反応させた。2 次抗体の反応が終了した後、PBS-T で洗浄し、Enhanced Chemiluminescence (GE Healthcare)を加えて発光させ、X 線フィルム(富士フィルム)を感光させることで目的のタンパク質を検出した。

定量 RT-PCR 法

細胞から精製したトータル RNA から Transcriptor First Strand cDNA

Synthesis Kit (Roche)を使用して cDNA を合成した。目的遺伝子の cDNA 量は Universal ProbeLibrary (Roche) 及び TaqMan Master (Roche) を用いて LightCycler 1.5 system (Roche) により定量した。遺伝子特異的なプライマーとユニバーサルプローブの選択には ProbeFinder software (Roche) を用いた。使用したプライマーとプローブを以下に示す。UL19 の定量には 5'-AGCCTGTAC GACGTCGAGTT-3' 及び 5'-ACGAGCGACAGGGTGTTG-3' と ProbeLibrary probe 3、UL41 の定量には 5'-GTCGTCCTCCTCGGAGATACT-3' 及び 5'-GGCT GCCACATAACTGC-3' と ProbeLibrary probe 11、UL47 の定量には 5'-TACGA GGAGGACGACTACCC-3' 及び 5'-GTCCCTCCAGAACCTCCAC-3' と Probe Library probe 70、UL48 の定量には 5'-GCGCTCTCTCGTTTCTTCC-3' 及び 5'-GGCCAACACGGTTCGATA-3' と ProbeLibrary probe 52、18s rRNA の定量には 5'-GCAATTATTCCCCATGAACG-3' 及び 5'-GGGACTTAATCAACGCAAG C-3' と ProbeLibrary probe 48 をそれぞれ使用した。各遺伝子の発現量は、18S rRNA の発現量でノーマライズし、各遺伝子の相対発現量は $\Delta \Delta Ct$ 法により算出した (32)。

ルシフェラーゼアッセイ

Vero 細胞にルシフェラーゼ発現アデノウイルスを感染させ、24 時間後に 24

ウェルプレートに 2.5×10^5 cells/well の条件でパッセージした。6 時間後に Vero 細胞がプレート底面に定着したことを確認してから、HSV-1 を MOI 5 の条件で重感染させ、18 時間後にルシフェラーゼ活性の測定と Immunoblot 解析に供した。ルシフェラーゼ活性は luciferase reporter assay system (Promega) に従って測定した。

結果

UL41 は成熟ウイルス粒子の構成因子を制御する

先行研究で示された、UL41 の欠損による成熟ウイルス粒子構成因子の変化について全体像を明らかにするため、野生型ウイルスである HSV-1(F)と UL41 欠損ウイルス及びその復帰ウイルスを Vero 細胞に MOI 0.01 の条件で感染させた。感染 48 時間後に培養上清を回収し、ショ糖密度勾配遠心法により成熟ウイルス粒子を精製し、SDS-PAGE の後銀染色に供した。カプシド主要構成因子である VP5(150kDa の主要バンド)は、ウイルス粒子への取り込み量が一定であることが分かっているため、VP5 の量を揃えることでウイルス粒子 1 個あたりのウイルス粒子構成因子の取り込み量を比較した。その結果、図 2 で示したように UL41 欠損ウイルス由来の成熟ウイルス粒子では、野生型ウイルス由来の成熟ウイルス粒子において認められない因子や、取り込み量が増加する因子が複数認められた。一方、野生型ウイルス由来の成熟ウイルス粒子における 60kDa 及び 70kDa の主要バンドについては、UL41 の欠損により消失あるいは著しい減弱が認められた。分子量から、60kDa の因子を UL41、70kDa の因子を UL47 と予想した。

UL41 は感染細胞における UL47 の発現量と成熟ウイルス粒子構成因子を制御する

UL41 の欠損により変化した成熟ウイルス粒子構成因子を同定するため、野生型ウイルスである HSV-1(F)、UL41 欠損ウイルス及びその復帰ウイルスの感染細胞と成熟ウイルス粒子を Immunoblot 解析に供した。成熟ウイルス粒子は図 2 と同様にカプシド主要構成因子である VP5 の量を揃え、感染細胞については細胞量を揃えて解析した。成熟ウイルス粒子構成因子のうち、テグメント主要構成因子である UL41、UL47、VP16、VP22 及び宿主細胞因子である Hsc70、 β -actin、 α -tubulin の検出を行った。さらに成熟ウイルス粒子の精製純度を評価するため、成熟ウイルス粒子の構成因子ではないとされる UL12、ICP8 及び UL34 の検出も試みた (10)。

その結果、図 3 に示したように UL41 の欠損により、感染細胞及び成熟ウイルス粒子における UL41 の消失が認められた。さらに、UL47 の感染細胞における発現量と成熟ウイルス粒子への取り込み量に減少が認められた。また、それ以外のテグメント主要構成因子については、感染細胞における発現量と成熟ウイルス粒子への取り込み量に変化は見られなかった。そして、宿主細胞因子である Hsc70、 β -actin、 α -tubulin については、UL41 の欠損により成熟ウイルス粒子への取り込み量が増加することが明らかになったが、感染細胞における

発現量に変化は認められなかった。また、UL12、ICP8 及び UL34 が成熟ウイルス粒子の試料から検出されなかったことから、成熟ウイルス粒子の精製純度に問題は無いと考えられる (図 3)。

これらの結果より、図 2 で観察された UL41 欠損ウイルス由来の成熟ウイルス粒子において、取り込み量が増加していた多数の因子が主に宿主細胞因子であること、消失した 60kDa のバンドが UL41、シグナルが減弱した 70kDa のバンドが UL47 に由来することが示唆された。

UL41 の RNase 活性は感染細胞における UL47 の発現量と成熟ウイルス粒子構成因子を制御する

UL41 の機能は、ウイルス粒子のテグメントを構成する構造タンパク質としての機能と、感染細胞において mRNA を分解する RNase としての機能に区別することが出来る (図 4)。そこで、UL41 欠損による成熟ウイルス粒子構成因子の変化が、テグメント層からの UL41 の欠落に起因する現象か、または UL41RNase 活性の消失に起因する現象であるか検証した。

UL41 の 213 番目のアスパラギン酸をアスパラギンに置換することで RNase 活性が消失するという過去の報告に従い、UL41RNase 活性消失変異ウイルスである UL41D213N ウイルスとその復帰ウイルスを作製した (33, 34)。UL41

RNase 活性消失変異ウイルスでは、UL41 に導入した D213N 変異により、UL41 の RNase 活性は消失するが、ウイルス粒子のテグメントを構成する構造タンパク質としての機能は維持されると考えられる。また、Vero 細胞における UL41D213N ウイルスの増殖能は、MOI 0.01、MOI 5 の両感染条件において UL41 欠損ウイルスと同程度であり、野生型ウイルスである HSV-1(F)と比較すると 3~5 倍程度の低下が認められた (図 5)。

UL41 による成熟ウイルス粒子構成因子の制御が RNase 活性によるものか検証するため、野生型ウイルスである HSV-1(F)、UL41D213N ウイルス及びその復帰ウイルス、UL41 欠損ウイルスを MOI 0.01 の条件で Vero 細胞に感染させ、感染 48 時間後に感染細胞と成熟ウイルス粒子を Immunoblot 解析に供した。その結果、野生型ウイルスと比較して UL41D213N ウイルスと UL41 欠損ウイルス感染細胞における UL47 の発現量に低下が認められた (図 6A)。さらに、成熟ウイルス粒子への UL47 取り込み量の減少と宿主細胞因子の取り込み量の増加が UL41D213N ウイルス及び UL41 欠損ウイルスに由来する成熟ウイルス粒子で認められた (図 6B)。

これらの結果から、UL41 の RNase 活性が、感染細胞における UL47 の発現量と成熟ウイルス粒子への UL47 取り込み量の増加及び宿主細胞因子取り込み量の抑制に関与すると考えられる。

UL47 は成熟ウイルス粒子への宿主細胞因子取り込み量を制御する

UL41RNase 活性の消失により、UL47 の発現量が特異的に減少することに注目し、UL47 が成熟ウイルス粒子への宿主細胞因子取り込みの抑制に関与するという仮説を立てた (図 7)。その検証のため、UL47 欠損ウイルス由来の成熟ウイルスを解析した。また、UL47 以外のテグメント主要構成因子の欠損が、成熟ウイルス粒子の構成因子に与える影響を検証するため、テグメント主要構成因子である UL50 を欠損したウイルスに由来する成熟ウイルス粒子を併せて解析した。Vero 細胞に野生型ウイルスである HSV-1(F)、UL47 欠損ウイルス及びその復帰ウイルス、UL41D213N ウイルス、UL50 欠損ウイルスを MOI 0.01 の条件で感染させ、感染 48~60 時間後に感染細胞と成熟ウイルス粒子を immunoblot 解析に供した。その結果、UL47 欠損ウイルス感染細胞及び UL50 欠損ウイルス感染細胞において、それぞれ UL47 と UL50 の発現に消失が認められたが、それ以外のウイルス因子及び宿主細胞因子の発現量に変化は認められなかった。さらに、図 6A と同様に UL41D213N ウイルス感染細胞における UL47 の発現量に低下が認められた (図 8A)。そして、UL41D213N ウイルス由来の成熟ウイルス粒子と同様に、UL47 欠損ウイルス由来の成熟ウイルス粒子において宿主細胞因子取り込み量の増加が認められた。一方、UL50 欠損ウイルス由来の成熟ウイルス粒子への宿主細胞因子取り込み量は、野生型ウイルスである HSV-1(F)由

来の成熟ウイルス粒子と同程度であった (図 8B)。

これらの結果より、成熟ウイルス粒子への宿主細胞因子取り込み量の増加は、テグメント構成因子の欠損による非特異的な現象ではなく、UL47 の欠損による特異的な現象であることが示唆される。従って、UL41D213N ウイルス及び UL41 欠損ウイルスで観察された感染細胞における UL47 発現量の低下が、成熟ウイルス粒子構成因子の変化の原因となりうると考えられる。

UL41 による UL47 発現量の増加は、mRNA 量に依存した変化ではない

続いて、UL41 による UL47 発現量制御機構の解析を行った。UL41RNase 活性の消失による UL47 発現量の減少が、mRNA 量の変化に伴った現象であるか検証するため、感染細胞における UL47 mRNA 量を解析した。野生型ウイルスである HSV-1(F)、UL41D213N ウイルス及びその復帰ウイルスを MOI 5 の条件で Vero 細胞に感染させ、感染 18 時間後の UL47 mRNA 量を定量 RT-PCR 法で解析した。UL41 による分解を受けない 18S rRNA を用いてノーマライズして比較した結果、UL41D213N ウイルス感染細胞における UL47 mRNA 量は野生型ウイルス感染細胞と比較して増加することが明らかになった (図 9C)。これは、UL41RNase 活性の消失によって shut-off が解除された影響と考えられ、UL47 の他に VP5 をコードする UL19、UL41、VP16 をコードする UL48 につ

いても mRNA 量の増加が認められた (図 9A,B,D)。

これらの結果は、感染細胞におけるウイルスタンパク質の発現量が mRNA 量と一致しないことを示唆しており、UL41RNase 活性の消失による UL47 発現量の減少が mRNA 量の変化に伴った現象ではないことを意味すると考えられる。そこで、UL41RNase 活性の消失による UL47 発現量の低下は、UL47 の安定性の低下に起因することを予想した。

感染細胞において UL47 は Hsp90 および Hsc70 と相互作用する

UL41RNase 活性の消失により UL47 の安定性が低下するという仮説に基づき、筆者らの研究室において UL47 の相互作用因子の候補として、相互作用因子の安定化に作用することが知られる Hsp90 が同定されていることに注目した (投稿中)。熱ショックタンパク質である Hsp90 は、Hsc70 など他のシャペロン分子や補助因子と複合体を形成し、ATP 依存的に Hsp90 client と呼ばれる特定の基質を安定化し、分解や凝集から保護することが知られている(35-38)。従って、Hsp90 が相互作用因子である UL47 の安定化に関与することを予想した。

実際に、感染細胞において UL47 と Hsp90 が相互作用することを確認するため、UL47 の N 末端に Myc·Tev·Flag から成る MEF タグを融合した MEF-UL47 ウイルスを細胞に感染させ、免疫沈降を実施した。Vero 細胞に MEF-UL47 ウ

ウイルスを MOI 5 の条件で感染させ、感染 18 時間後に回収し、細胞抽出液に anti-Myc 抗体を加えて免疫沈降を実施して共沈物を immunoblot 解析に供した。コントロールとして野生型ウイルスである HSV-1(F)感染細胞を併せて解析した結果、MEF-UL47 ウイルス感染細胞由来の共沈物から、UL47 と Hsp90 が検出された。また、MEF-UL47 ウイルス感染細胞由来の共沈物からカプシド主要構成因子である VP23 が検出されなかったことから、UL47 と Hsp90 の共沈が特異的なものであることが示唆された (図 10)。さらに、MEF-UL47 ウイルス感染細胞由来の共沈物から、Hsp90 と複合体を形成する熱ショックタンパク質の一つである Hsc70 も検出された (図 10)。

これらの結果は、感染細胞において UL47 が Hsp90 及び Hsc70 と相互作用することを示唆するものであり、UL47 が Hsp90-Hsc70 シャペロンマシナリーによる安定化作用を受けることを予想した(図 11)。

感染細胞における UL47 の安定化に、Hsp90-Hsc70 シャペロンマシナリーが寄与する

これまでに、Hsp90 client は Hsp90 の阻害によって分解することが報告されている (39)。そこで、Hsp90 と ATP の結合を競合的に阻害し、Hsp90 の機能を阻害する Hsp90 阻害剤(17-AAG)を用いて、感染細胞において Hsp90 が UL47

発現量に与える影響を解析した (39)。野生型ウイルスである HSV-1(F)を MOI 5 の条件で Vero 細胞に感染させ、感染 4 時間後に培養液に Hsp90 阻害剤(17-AAG final 1 μ M)を添加した。感染 18 時間後に感染細胞を Immunoblot 解析に供した結果、Hsp90 阻害剤処理によって UL47 の発現量に減少が認められた。一方、VP5、VP16 の発現量には変化が見られなかったことから、Hsp90 は UL47 を特異的に安定化すると考えられる (図 12)。

また、Hsp90 client タンパク質は、Hsp90 と複合体を形成する Hsc70 の阻害によって、一部分解することが報告されている (40-42)。そこで、Hsc70 と ATP の結合を競合的に阻害し、Hsc70 の機能を阻害する Hsp70/Hsc70 阻害剤 (VER155008)を用いて、UL47 の安定化への Hsc70 の関与を検証した。野生型ウイルスである HSV-1(F)を MOI 5 の条件で Vero 細胞に感染させ、感染 4 時間後に培養液に Hsp70/Hsc70 阻害剤(VER155008 final 50 μ M)を加えた。感染 18 時間後に感染細胞を Immunoblot 解析に供した結果、Hsp70/Hsc70 阻害剤処理により、UL47 の発現量に減少が認められた。一方、VP5、VP16 の発現量には変化が見られなかったことから、Hsc70 は UL47 を特異的に安定化すると考えられる (図 13)。

これらの結果は、Hsp90-Hsc70 シャペロンマシナリーが UL47 の安定化に関与する事を示唆しており、UL47 が Hsp90 client タンパク質であるという我々

の仮説を支持するものと考えられる。

UL41 はウイルス感染細胞においてルシフェラーゼの発現量を増加させる

ここまでの結果より、我々は UL41RNase 活性の消失と、Hsp90 の阻害が同一の経路で UL47 の発現量を減少させるという仮説を立て、HSV-1 感染細胞における Hsp90 の至適なシャペロン活性には、UL41 の RNase 活性が必要であることを予想した (図 14)。

その検証のため、HSV-1 感染細胞における Hsp90 のシャペロン活性を解析した。Hsp90 のシャペロン活性を解析するため、フォールディングと活性の維持に Hsp90 を必要とするルシフェラーゼに注目し、その発現量と活性を指標として Hsp90 のシャペロン活性の評価を試みた (43-45)。ルシフェラーゼ発現アデノウイルスにより、Vero 細胞にルシフェラーゼを一過的に発現させた後、HSV-1 を MOI 5 の条件で重感染させ、感染 18 時間後にルシフェラーゼの発現量と活性を解析した。初めに、HSV-1 感染細胞における Hsp90 のシャペロン活性が、ルシフェラーゼの発現量と活性に影響するか検証した。野生型ウイルスである HSV-1(F)を重感染させ、感染 4 時間後に培養液に Hsp90 阻害剤を加えた。感染 18 時間後に解析した結果、ルシフェラーゼの発現量に低下が認められたことから、HSV-1 感染細胞におけるルシフェラーゼの発現量は Hsp90 のシャペロン活

性を反映したものであると考えられる (図 15)。続いて、UL41D213N ウイルス及びその復帰ウイルスを MOI 5 の条件で重感染させ、感染 18 時間後にルシフェラーゼの発現量と活性を解析した。その結果、UL41D213N ウイルス感染細胞では野生型ウイルスである HSV-1(F)感染細胞と比べてルシフェラーゼの発現量と活性に低下が認められた (図 15)。これらの結果は、UL41D213N ウイルス感染細胞において Hsp90 のシャペロン活性が不足していることを示唆しており、HSV-1 感染細胞における Hsp90 の至適なシャペロン活性には、UL41RNase 活性が必要であるという我々の仮説を支持するものと考えた。

UL41 及び Hsp90 は UL47 の細胞内局在を制御する

これまでの結果から、我々は UL47 が Hsp90 client であること、UL41 の RNase 活性が HSV-1 感染細胞における Hsp90 シャペロン活性を亢進するという仮説を得た。さらなる検証のため、Hsp90 client が Hsp90 によって細胞内局在を制御されることに注目した。Hsp90 client であるグルコルチコイド受容体(GR)の例では、Hsp90 阻害剤処理によって核移行が阻害され、細胞内局在が変化することが報告されている (46, 47)。そこで、Hsp90-Hsc70 シャペロンマシナリーの阻害及び UL41RNase 活性の消失により、UL47 の細胞内局在が変化することを予想した。

その検証のため、Venus-UL47 を発現する UL41D213N ウイルス(Venus-UL47/UL41D213N)とその復帰ウイルス(Venus-UL47/UL41D213N-Repair)を作製し、2 つの実験を実施した。

1 つ目の実験として、Vero 細胞に Venus-UL47/UL41D213N-Repair ウイルスを MOI 5 の条件で感染させ、感染 4 時間後に培養液に Hsp90 または Hsc70 阻害剤、そしてベヒクルコントロールとして DMSO を加えた。感染 18 時間後に Venus-UL47 の細胞内局在を共焦点顕微鏡で解析した結果、阻害剤処理していない感染細胞では過去の報告の通り、Venus-UL47 は主に核に局在し、一部が核近傍に局在することが認められた (23)。また、核内に Venus-UL47 がドット状に集合する部分が存在することも過去の報告と一致した (23, 48)。そして、Hsp90 阻害剤処理により、核に局在する Venus-UL47 の減少と、核近傍に局在する Venus-UL47 の増加が認められた。さらに、Hsc70 阻害剤処理でも核に局在する Venus-UL47 に顕著な減少が認められた (図 16)。これらの結果は、Hsp90 及び Hsc70 が UL47 の発現量だけでなく、細胞内局在の制御にも関与する事を示唆するものであり、UL47 が Hsp90 client であるという我々の仮説を支持するものと考えた。

2 つ目の実験として、Venus-UL47/UL41D213N ウイルスを MOI 5 の条件で Vero 細胞に感染させ、感染 18 時間後に共焦点顕微鏡で Venus-UL47 の細胞内

局在を解析した。その結果、Venus-UL47/UL41D213N-Repair ウイルス感染細胞と比較して、核に局在する Venus-UL47 に顕著な減少が認められた (図 16)。これらの結果は、UL41 の RNase 活性が UL47 の発現量だけでなく、核への局在の制御にも関与する事を示唆するものであった。

以上の 2 つの実験結果は、UL41 の RNase 活性と Hsp90-Hsc70 シャペロンマシナリーが共に UL47 の核への局在を制御することを示唆しており、UL41 の RNase 活性が HSV-1 感染細胞における Hsp90 シャペロン活性を亢進するという我々の仮説を支持するものと考えた。

Hsp90-Hsc70 シャペロンマシナリーは成熟ウイルス粒子への粒子構成成分の取り込みを制御する

これまでの結果より、(i) UL41D213N ウイルス感染細胞において Hsp90 のシャペロン活性が低下すること、(ii) 感染細胞において Hsp90-Hsc70 シャペロンマシナリーが UL47 発現量を増加させること、(iii) UL47 が成熟ウイルス粒子への宿主細胞因子取り込み量の抑制に関与することが示唆されることから、Hsp90-Hsc70 シャペロンマシナリーの阻害により、成熟ウイルス粒子への宿主細胞因子取り込み量が増加することを予想した。その検証のため、野生型ウイルスである HSV-1(F)を MOI 0.01 の条件で Vero 細胞に感染させ、感染 18 時間

後に培養液に Hsp90 阻害剤を加えた。感染 48 時間後に感染細胞と成熟ウイルス粒子を Immunoblot 解析に供した結果、Hsp90 阻害剤処理によって感染細胞における UL47 発現量の低下が認められ、UL41D213N ウイルスや UL47 欠損ウイルス由来の成熟ウイルス粒子と同様に、成熟ウイルス粒子への UL47 取り込み量の減少と宿主細胞因子取り込み量の増加が認められた (図 17A)。さらに、Hsc70 阻害剤処理によっても同様に、感染細胞における UL47 発現量の低下と成熟ウイルス粒子への UL47 取り込み量の減少、宿主細胞因子取り込み量の増加が認められた (図 17B)。これらの結果は、成熟ウイルス粒子への宿主細胞因子取り込み量の抑制に Hsp90-Hsc70 シャペロンマシナリーが関与することを意味すると考えられる。

考察

HSV-1 成熟ウイルス粒子の構造や構成因子に関しては比較的理解が進んでおり、成熟ウイルス粒子にはウイルス因子だけでなく、宿主細胞因子も取り込まれていることが報告されている (10)。これまでに、HSV-1 成熟ウイルス粒子の構成因子を制御する因子として、ICP22 と VP22 が報告されており、それぞれの欠損ウイルスでは、成熟ウイルス粒子へのウイルス因子の取り込み量が変化することが示されている (49, 50)。一方で、宿主細胞因子の取り込みメカニズムに関する報告は無く、詳細は不明であった。

最近、筆者らの研究室では UL41 の欠損により成熟ウイルス粒子への宿主細胞因子の取り込み量が増加するという知見を得た。UL41 はウイルスが細胞に侵入した直後から感染初期にかけて、宿主細胞の mRNA を分解して宿主タンパク質の新規合成を阻害する (shut-off) ことが知られているが、ウイルス粒子成熟過程のような感染後期の現象への関与は知られていない。そこで、本研究では UL41 による成熟ウイルス粒子への宿主因子取り込みの制御に注目し、そのメカニズムを解析した。

本研究で得られた主要な知見を以下にまとめた。(i)UL41 は RNase 活性依存的に、感染細胞における UL47 発現量と成熟ウイルス粒子への取り込み量を増

加させ、宿主細胞因子の取り込み量を減少させる。(ii)成熟ウイルス粒子への宿主細胞因子取り込み制御に UL47 が関与する。(iii)HSV-1 感染細胞において、UL47 は Hsp90-Hsc70 シャペロンマシナリーによって安定化されることで発現量が増加する。(iv) HSV-1 感染細胞において、Hsp90 client であるルシフェラーゼの発現量は、UL41 の RNase 活性と Hsp90 のシャペロン活性によって制御される。(v) HSV-1 感染細胞における UL47 の細胞内局在は、UL41 の RNase 活性と Hsp90-Hsc70 シャペロンマシナリーによって制御される。(vi)成熟ウイルス粒子への宿主細胞因子取り込み量の制御に Hsp90-Hsc70 シャペロンマシナリーが関与する。

これらの結果より、HSV-1 感染細胞では、UL41 が RNase 活性依存的に Hsp90-Hsc70 シャペロンマシナリーを活性化し、UL47 の発現量が増加することで成熟ウイルス粒子への宿主細胞因子取り込みが制御されるというモデルを得た (図 18)。本研究は、RNase 活性依存的な UL47 の発現量制御を介して、成熟ウイルス粒子の品質を保障するという UL41 の新規機能を報告するものである。

感染初期と感染後期における UL41

UL41 はウイルスの細胞侵入時にカプシドと共に細胞質に放出され、宿主

mRNA を分解するが、感染の進行に伴い後期遺伝子(γ 遺伝子)である VP16 と VP22 が発現すると、それらが UL41 と結合することで RNase 活性が中和される (18, 19)。また、UL41 も後期遺伝子であることから、感染細胞において新規に合成された UL41 についても、VP16 と VP22 に中和されることで RNase 活性を示さないとされている。従って、ウイルス感染時に持ち込まれた UL41 と感染細胞で新規に合成された UL41 は、その役割を区別して考えることが出来る。

本研究では、UL41 による成熟ウイルス粒子構成因子の制御が、UL41 の RNase 活性に依存するものか検証するため、UL41 欠損ウイルスと UL41RNase 活性消失ウイルスに由来する成熟ウイルス粒子の構成因子を比較した。図 6 に示したように、成熟ウイルス粒子構成因子の変化が UL41 欠損ウイルスと UL41RNase 活性消失ウイルスに共通して認められたことから、UL41 による成熟ウイルス粒子構成因子の制御は RNase 活性に依存したものであることが明らかになった。従って、成熟ウイルス粒子の構成因子はウイルス感染時に持ち込まれた UL41 によって制御されと考えられる。これは、感染直後から感染初期における UL41 の機能が、感染後期の現象に重大な影響を与えることを示すと共に、これまで制御機構の詳細が不明とされてきたウイルス粒子のテグメント獲得過程に UL41 が関与することを初めて示すものである (図 18)。

UL47 による成熟ウイルス粒子への宿主因子取り込み制御

本研究では UL41RNase 活性の消失により、テグメント主要構成因子である UL47 の発現量が特異的に減少することに注目し、成熟ウイルス粒子への宿主細胞因子取り込み制御への関与を予想した。検証のため UL47 欠損ウイルス由来の成熟ウイルス粒子を解析した結果、宿主細胞因子の取り込み量に増加が認められた。UL47 の欠損により成熟ウイルス粒子への宿主細胞因子取り込み量が増加した原因は 2 通り考えられる。UL47 に成熟ウイルス粒子への宿主細胞因子の取り込みを積極的に抑制する機能が存在する可能性と、テグメント構成因子の欠損により成熟ウイルス粒子のテグメント層に空いたスペースに宿主細胞因子が非特異的に入り込む可能性である。2 つの可能性を区別し、成熟ウイルス粒子への宿主細胞因子取り込みの制御が UL47 特異的な現象であることを示すため、UL47 と同じ主要テグメント構成因子である UL50 の欠損によって成熟ウイルス粒子への宿主細胞因子取り込み量が変化しないことを確認した (31)。この結果は、HSV-1 の UL47 が成熟ウイルス粒子への宿主細胞因子の取り込みを抑制することを初めて報告するものである。また、HSV-1 の近縁の α -ヘルペスウイルス亜科に分類される Pseudorabies Virus (PrV)において、UL47 ホモログの欠損により成熟ウイルス粒子に取り込まれる β -actin が増加することが報告されており、これは我々の結果と一致するものと考えられる (51)。従って、成熟ウイ

ルス粒子への宿主細胞因子取り込み制御は、 α -ヘルペスウイルス亜科の UL47 に広く保存された機能の可能性がある。

テグメントに取り込まれる UL47 は、標的細胞にウイルスが侵入した際に細胞内に放出され、ウイルス因子の mRNA を UL41 の分解から保護することが分かっている (22)。UL47 の欠損により β 、 γ 遺伝子群の発現が遅れることが報告されており、標的細胞における効率的なウイルスの複製のためには、ウイルス粒子によって UL47 が持ち込まれることが必要であると考えられる。また、図 3、図 6 に示したように、UL47 の発現量は UL41 の RNase 活性によって制御され、成熟ウイルスへの取り込み量も変化するため、一種のフィードバック機構が存在すると考えることができる。

Hsp90-Hsc70 シャペロンマシナリーによる UL47 の安定化

感染細胞において UL47 を安定化する因子として注目した Hsp90 は、熱ショックタンパク質の一つである (38)。他の熱ショックタンパク質と異なり、通常細胞においても高発現し、Hsp90 client と呼ばれる特定のタンパク質に対して、その成熟や活性の維持などに関与している (55, 56)。Hsp90 は他のシャペロン分子や補助因子と共にシャペロン複合体を形成して機能することが知られている (57-59)。Hsp90 と複合体を形成する因子の一つである Hsc70 は、シャペロ

ン複合体に Hsp90 client を運び込む機能を担うことから Hsp90 client の安定化に必須とされ、Hsp90 client は Hsp90 または Hsc70 の阻害により分解することが知られている (39, 41, 42)。図 12、図 13 に示したように、Hsp90 及び Hsc70 の阻害によって感染細胞における UL47 発現量が低下したことから、UL47 は Hsp90 client であると考えられる。

本研究では、感染細胞において UL47 の発現量を特異的に増加させる因子を 2 つ明らかにしており、1 つは UL41 の RNase 活性、もう 1 つは Hsp90-Hsc70 シャペロンマシナリーである。感染細胞における UL47 発現量の制御、UL47 の細胞内局在の制御、成熟ウイルス粒子への宿主細胞因子の取り込み制御に UL41 の RNase 活性と Hsp90-Hsc70 シャペロンマシナリーが共通して関与することから、両者が同一の経路で機能することを予想し、UL47 が Hsp90 による安定化作用を受けると考えられることから、感染細胞において UL41 の RNase 活性は Hsp90 のシャペロン活性を亢進するという仮説を立てた (図 14)。その検証のため、ルシフェラーゼを発現する細胞に HSV-1 を重感染させた結果、図 15 に示したように Hsp90 のシャペロン活性及び UL41 の RNase 活性に依存したルシフェラーゼ発現量と活性の上昇が認められた。ルシフェラーゼは Hsp90 によるフォールディングを受けるとことから Hsp90 client であるとされ、Hsp90 の阻害及び UL41RNase 活性の消失によりルシフェラーゼの発現量と活

性が低下したことは、UL41RNase 活性の消失により Hsp90 のシャペロン活性が低下したことを意味すると考えられる (43-45)。これらの結果は、UL41 の RNase 活性と Hsp90 のシャペロン活性が同じ経路で UL47 の発現量を増加させるという我々の仮説を支持するものであった。Hsp90 は通常細胞において高発現しているが、そのほとんどは不活性型として存在するため、HSV-1 感染細胞においてウイルス感染時に持ち込まれた UL41 が Hsp90 を活性化することにより、ウイルスタンパク質の合成に適した環境を作り出すと考えられる(60, 61)。

UL41 による Hsp90-Hsc70 シャペロンマシナリーの制御

これまで報告されてきた UL41 の機能は、宿主細胞因子の合成阻害や自然免疫応答の抑制、ウイルス遺伝子の発現制御など、ほとんどが mRNA の分解に基づき、タンパク質合成量を低下させる機能であった。これに対し本研究では、UL41 が細胞内の Hsp90-Hsc70 シャペロンマシナリーの機能を制御しウイルスタンパク質の発現量を増加させるという新しい概念が示唆された。

UL41 による Hsp90-Hsc70 シャペロンマシナリーの制御機構としては、shut-offにより Hsp90-Hsc70 シャペロンマシナリーを抑制する因子の発現量が低下する可能性が考えられる。UL41RNase 活性消失ウイルスと野生型ウイルス感染細胞における Hsp90 シャペロン複合体の構成因子を比較することで、

Hsp90-Hsc70 シャペロンマシンナリーを抑制する因子に関する情報を得ることができると考えている。また、別の可能性として UL41 による shut-off により、感染細胞において合成されるタンパク質の量が、Hsp90-Hsc70 シャペロンマシンナリーの機能の許容量を超えないように制限されることが考えられる。後者の可能性は、Hsp90-Hsc70 のシャペロンマシンナリーの制御に UL41 は直接的に関与しないが、本研究で得られた結果を矛盾なく説明することができる。これら 2 つの可能性は、感染細胞における Hsp90-Hsc70 のシャペロン活性を直接測定することで区別することが出来ると考え、検討を行っている。

成熟ウイルス粒子に取り込まれる宿主細胞因子の生物学的意義

本研究において、HSV-1 が UL41 及び UL47 によって成熟ウイルス粒子への宿主細胞因子の取り込みを抑制することが明らかになったことから、成熟ウイルス粒子への宿主細胞因子の取り込みがウイルスにとって不利な現象であると考えた。これに該当する例として、Human Immunodeficiency Virus type 1(HIV-1)のウイルス粒子に取り込まれる APOBEC3G が挙げられる (52)。APOBEC3G は HIV ウイルス粒子に入り込み、標的細胞へ持ち込まれた後、逆転写されたウイルス DNA に変異を導入してウイルスタンパク質の合成を阻害するとされている (53)。これと同様に、標的細胞において HSV-1 に対する抗ウ

ウイルス活性を示す宿主細胞因子が存在することが予想される。一方で、成熟ウイルス粒子に含まれる宿主細胞因子のノックダウンスクリーニングにより、宿主細胞因子の一部がウイルスの感染と増殖を促進することが報告されていることから、ウイルスの感染を正に制御する因子と負に制御する因子が存在すると考えられる (54)。我々の研究室では質量解析により、成熟ウイルス粒子に取り込まれる宿主細胞因子を約 600 種類同定しており、その生物学的意義についてさらなる解析を行う必要がある。特にウイルスの感染を負に制御する宿主細胞因子は、UL41 や UL47 の機能により成熟ウイルス粒子への取り込みが抑制されることが予想される。従って、UL41D213N ウイルス及び UL47 欠損ウイルス由来の成熟ウイルス粒子に含まれる宿主細胞因子を網羅的に解析することにより、HSV-1 の増殖を抑制する未知の宿主免疫応答や因子の同定が期待される。

引用文献

1. **Roizman B, D. M. Knipe, and R.J. Whitley.** 2013. Herpes simplex viruses., p. 2501-2601. *In* D. M. Knipe PMH, 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, P. A.
2. **Davison AJ.** 2002. Evolution of the herpesviruses. *Veterinary microbiology* **86**:69-88.
3. **Koelle DM, Corey L.** 2008. Herpes simplex: insights on pathogenesis and possible vaccines. *Annual review of medicine* **59**:381-395.
4. **Skoldenberg B.** 1996. Herpes simplex encephalitis. *Scandinavian journal of infectious diseases. Supplementum* **100**:8-13.
5. **Skoldenberg B, Forsgren M.** 1985. Acyclovir versus vidarabine in herpes simplex encephalitis. *Scandinavian journal of infectious diseases. Supplementum* **47**:89-96.
6. **Manavi K, McMillan A, Ogilvie M.** 2004. Herpes simplex virus type 1 remains the principal cause of initial anogenital herpes in Edinburgh, Scotland. *Sexually transmitted diseases* **31**:322-324.
7. **Szucs TD, Berger K, Fisman DN, Harbarth S.** 2001. The estimated economic burden of genital herpes in the United States. An analysis using two costing approaches. *BMC infectious diseases* **1**:5.
8. **Spear PG, Longnecker R.** 2003. Herpesvirus entry: an update. *Journal of virology* **77**:10179-10185.
9. **Lehman IR, Boehmer PE.** 1999. Replication of herpes simplex virus DNA. *The Journal of biological chemistry* **274**:28059-28062.
10. **Loret S, Guay G, Lippe R.** 2008. Comprehensive characterization of extracellular herpes simplex virus type 1 virions. *Journal of virology* **82**:8605-8618.
11. **Taddeo B, Roizman B.** 2006. The virion host shutoff protein (UL41) of herpes simplex virus 1 is an endoribonuclease with a substrate specificity similar to that of RNase A. *Journal of virology* **80**:9341-9345.
12. **Dauber B, Pelletier J, Smiley JR.** 2011. The herpes simplex virus 1 vhs protein enhances translation of viral true late mRNAs and virus production in a cell type-dependent manner. *Journal of virology* **85**:5363-5373.
13. **Duerst RJ, Morrison LA.** 2004. Herpes simplex virus 2 virion host shutoff protein interferes with type I interferon production and responsiveness. *Virology* **322**:158-167.
14. **Pasieka TJ, Lu B, Crosby SD, Wylie KM, Morrison LA, Alexander DE, Menachery**

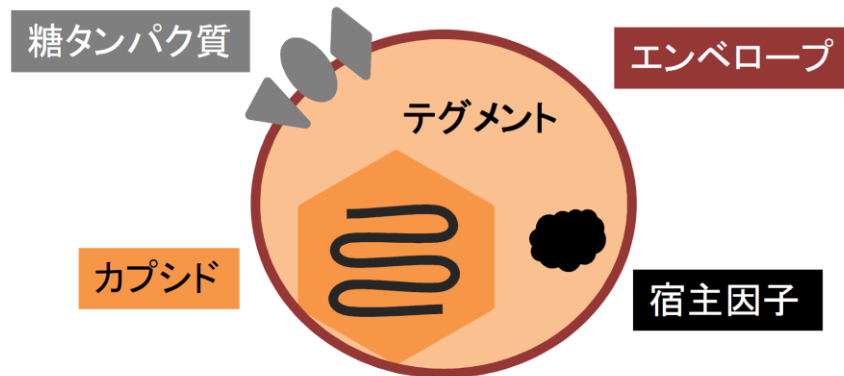
- VD, Leib DA. 2008. Herpes simplex virus virion host shutoff attenuates establishment of the antiviral state. *Journal of virology* **82**:5527-5535.
15. **Strelow LI, Leib DA.** 1995. Role of the virion host shutoff (vhs) of herpes simplex virus type 1 in latency and pathogenesis. *Journal of virology* **69**:6779-6786.
 16. **Taddeo B, Zhang W, Roizman B.** 2013. The herpes simplex virus host shutoff RNase degrades cellular and viral mRNAs made before infection but not viral mRNA made after infection. *Journal of virology* **87**:4516-4522.
 17. **Smiley JR.** 2004. Herpes simplex virus virion host shutoff protein: immune evasion mediated by a viral RNase? *Journal of virology* **78**:1063-1068.
 18. **Lam Q, Smibert CA, Koop KE, Lavery C, Capone JP, Weinheimer SP, Smiley JR.** 1996. Herpes simplex virus VP16 rescues viral mRNA from destruction by the virion host shutoff function. *The EMBO journal* **15**:2575-2581.
 19. **Taddeo B, Sciortino MT, Zhang W, Roizman B.** 2007. Interaction of herpes simplex virus RNase with VP16 and VP22 is required for the accumulation of the protein but not for accumulation of mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**:12163-12168.
 20. **Zhang Y, Sirko DA, McKnight JL.** 1991. Role of herpes simplex virus type 1 UL46 and UL47 in alpha TIF-mediated transcriptional induction: characterization of three viral deletion mutants. *Journal of virology* **65**:829-841.
 21. **Kato A, Liu Z, Minowa A, Imai T, Tanaka M, Sugimoto K, Nishiyama Y, Arai 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.
 22. **Shu M, Taddeo B, Zhang W, Roizman B.** 2013. Selective degradation of mRNAs by the HSV host shutoff RNase is regulated by the UL47 tegument protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**:E1669-1675.
 23. **Donnelly M, Elliott G.** 2001. Fluorescent tagging of herpes simplex virus tegument protein VP13/14 in virus infection. *Journal of virology* **75**:2575-2583.
 24. **Donnelly M, Elliott G.** 2001. Nuclear localization and shuttling of herpes simplex virus tegument protein VP13/14. *Journal of virology* **75**:2566-2574.
 25. **Verhagen J, Donnelly M, Elliott G.** 2006. Characterization of a novel transferable CRM-1-independent nuclear export signal in a herpesvirus tegument protein that shuttles between the nucleus and cytoplasm. *Journal of virology* **80**:10021-10035.
 26. **Scholtes LD, Yang K, Li LX, Baines JD.** 2010. The capsid protein encoded by U(L)17 of herpes simplex virus 1 interacts with tegument protein VP13/14. *Journal of virology* **84**:7642-7650.

27. **Tanaka M, Kato A, Satoh Y, Ide T, Sagou K, Kimura K, Hasegawa H, Kawaguchi Y.** 2012. Herpes simplex virus 1 VP22 regulates translocation of multiple viral and cellular proteins and promotes neurovirulence. *Journal of virology* **86**:5264-5277.
28. **Imai T, Koyanagi N, Ogawa R, Shindo K, Suenaga T, Sato A, Arai J, Kato A, Kiyono H, Arase H, Kawaguchi Y.** 2013. Us3 kinase encoded by herpes simplex virus 1 mediates downregulation of cell surface major histocompatibility complex class I and evasion of CD8⁺ T cells. *PloS one* **8**:e72050.
29. **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.
30. **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.
31. **Kato A, Tsuda S, Liu Z, Kozuka-Hata H, Oyama M, Kawaguchi Y.** 2013. Herpes Simplex Virus 1 Protein Kinase Us3 Phosphorylates Viral dUTPase and Regulates Its Catalytic Activity in Infected Cells. *Journal of virology*.
32. **Schmittgen TD, Livak KJ.** 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nature protocols* **3**:1101-1108.
33. **Page HG, Read GS.** 2010. The virion host shutoff endonuclease (UL41) of herpes simplex virus interacts with the cellular cap-binding complex eIF4F. *Journal of virology* **84**:6886-6890.
34. **Mbong EF, Woodley L, Dunkerley E, Schrimpf JE, Morrison LA, Duffy C.** 2012. Deletion of the herpes simplex virus 1 UL49 gene results in mRNA and protein translation defects that are complemented by secondary mutations in UL41. *Journal of virology* **86**:12351-12361.
35. **Borkovich KA, Farrelly FW, Finkelstein DB, Taulien J, Lindquist S.** 1989. hsp82 is an essential protein that is required in higher concentrations for growth of cells at higher temperatures. *Molecular and cellular biology* **9**:3919-3930.
36. **Dezwaan DC, Freeman BC.** 2008. HSP90: the Rosetta stone for cellular protein dynamics? *Cell cycle* **7**:1006-1012.
37. **Taipale M, Jarosz DF, Lindquist S.** 2010. HSP90 at the hub of protein homeostasis: emerging mechanistic insights. *Nature reviews. Molecular cell biology* **11**:515-528.
38. **Young JC, Moarefi I, Hartl FU.** 2001. Hsp90: a specialized but essential protein-folding tool. *The Journal of cell biology* **154**:267-273.
39. **An WG, Schulte TW, Neckers LM.** 2000. The heat shock protein 90 antagonist geldanamycin alters chaperone association with p210bcr-abl and v-src proteins

- before their degradation by the proteasome. *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research* **11**:355-360.
40. **Powers MV, Clarke PA, Workman P.** 2008. Dual targeting of HSC70 and HSP72 inhibits HSP90 function and induces tumor-specific apoptosis. *Cancer cell* **14**:250-262.
 41. **Li J, Richter K, Buchner J.** 2011. Mixed Hsp90-cochaperone complexes are important for the progression of the reaction cycle. *Nature structural & molecular biology* **18**:61-66.
 42. **Massey AJ, Williamson DS, Browne H, Murray JB, Dokurno P, Shaw T, Macias AT, Daniels Z, Geoffroy S, Dopson M, Lavan P, Matassova N, Francis GL, Graham CJ, Parsons R, Wang Y, Padfield A, Comer M, Drysdale MJ, Wood M.** 2010. A novel, small molecule inhibitor of Hsc70/Hsp70 potentiates Hsp90 inhibitor induced apoptosis in HCT116 colon carcinoma cells. *Cancer chemotherapy and pharmacology* **66**:535-545.
 43. **Yonehara M, Minami Y, Kawata Y, Nagai J, Yahara I.** 1996. Heat-induced chaperone activity of HSP90. *The Journal of biological chemistry* **271**:2641-2645.
 44. **Minami M, Nakamura M, Emori Y, Minami Y.** 2001. Both the N- and C-terminal chaperone sites of Hsp90 participate in protein refolding. *European journal of biochemistry / FEBS* **268**:2520-2524.
 45. **Giodini A, Cresswell P.** 2008. Hsp90-mediated cytosolic refolding of exogenous proteins internalized by dendritic cells. *The EMBO journal* **27**:201-211.
 46. **Czar MJ, Galigniana MD, Silverstein AM, Pratt WB.** 1997. Geldanamycin, a heat shock protein 90-binding benzoquinone ansamycin, inhibits steroid-dependent translocation of the glucocorticoid receptor from the cytoplasm to the nucleus. *Biochemistry* **36**:7776-7785.
 47. **Zhang X, Clark AF, Yorio T.** 2006. Heat shock protein 90 is an essential molecular chaperone for nuclear transport of glucocorticoid receptor beta. *Investigative ophthalmology & visual science* **47**:700-708.
 48. **Hutchinson I, Whiteley A, Browne H, Elliott G.** 2002. Sequential localization of two herpes simplex virus tegument proteins to punctate nuclear dots adjacent to ICP0 domains. *Journal of virology* **76**:10365-10373.
 49. **Elliott G, Hafezi W, Whiteley A, Bernard E.** 2005. Deletion of the herpes simplex virus VP22-encoding gene (UL49) alters the expression, localization, and virion incorporation of ICP0. *Journal of virology* **79**:9735-9745.
 50. **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.
51. **Michael K, Klupp BG, Mettenleiter TC, Karger A.** 2006. Composition of pseudorabies virus particles lacking tegument protein US3, UL47, or UL49 or envelope glycoprotein E. *Journal of virology* **80**:1332-1339.
 52. **Sheehy AM, Gaddis NC, Choi JD, Malim MH.** 2002. Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature* **418**:646-650.
 53. **Mangeat B, Turelli P, Caron G, Friedli M, Perrin L, Trono D.** 2003. Broad antiretroviral defence by human APOBEC3G through lethal editing of nascent reverse transcripts. *Nature* **424**:99-103.
 54. **Stegen C, Yakova Y, Henaff D, Nadjar J, Duron J, Lippe R.** 2013. Analysis of virion-incorporated host proteins required for herpes simplex virus type 1 infection through a RNA interference screen. *PloS one* **8**:e53276.
 55. **Chadli A, Bouhouche I, Sullivan W, Stensgard B, McMahon N, Catelli MG, Toft DO.** 2000. Dimerization and N-terminal domain proximity underlie the function of the molecular chaperone heat shock protein 90. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**:12524-12529.
 56. **Prodromou C, Panaretou B, Chohan S, Siligardi G, O'Brien R, Ladbury JE, Roe SM, Piper PW, Pearl LH.** 2000. The ATPase cycle of Hsp90 drives a molecular 'clamp' via transient dimerization of the N-terminal domains. *The EMBO journal* **19**:4383-4392.
 57. **Riggs DL, Cox MB, Cheung-Flynn J, Prapapanich V, Carrigan PE, Smith DF.** 2004. Functional specificity of co-chaperone interactions with Hsp90 client proteins. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* **39**:279-295.
 58. **Mandal AK, Gibney PA, Nillegoda NB, Theodoraki MA, Caplan AJ, Morano KA.** 2010. Hsp110 chaperones control client fate determination in the hsp70-Hsp90 chaperone system. *Molecular biology of the cell* **21**:1439-1448.
 59. **Theodoraki MA, Caplan AJ.** 2012. Quality control and fate determination of Hsp90 client proteins. *Biochimica et biophysica acta* **1823**:683-688.
 60. **Kamal A, Thao L, Sensintaffar J, Zhang L, Boehm MF, Fritz LC, Burrows FJ.** 2003. A high-affinity conformation of Hsp90 confers tumour selectivity on Hsp90 inhibitors. *Nature* **425**:407-410.
 61. **Lu X, Xiao L, Wang L, Ruden DM.** 2012. Hsp90 inhibitors and drug resistance in cancer: the potential benefits of combination therapies of Hsp90 inhibitors and other anti-cancer drugs. *Biochemical pharmacology* **83**:995-1004.

A



B

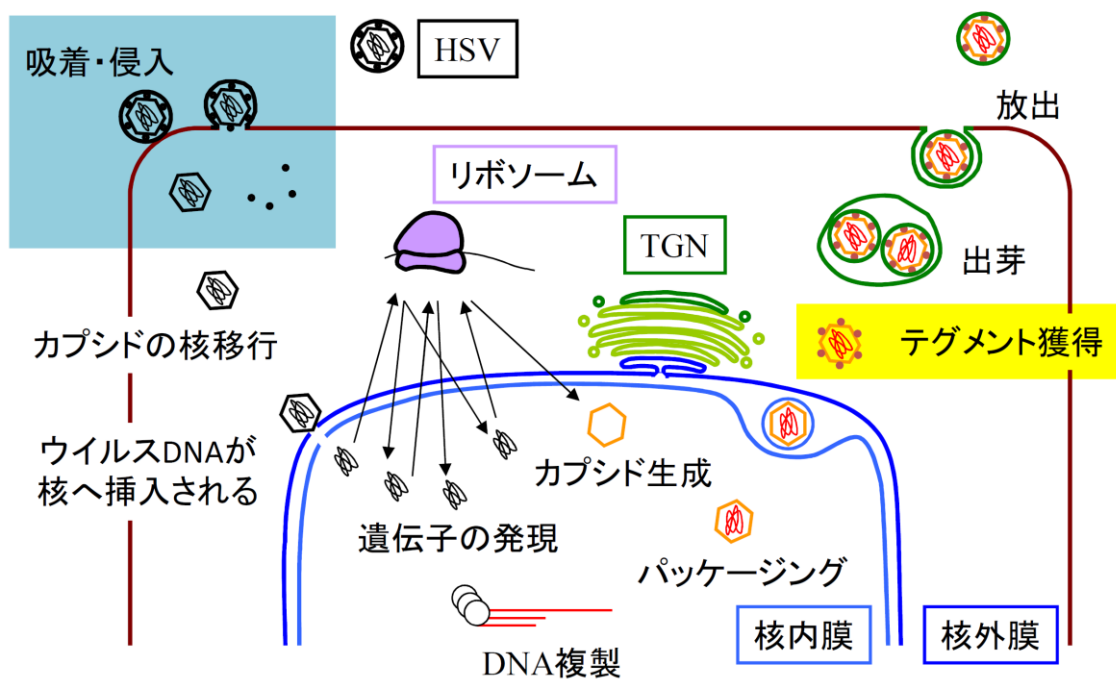


図 1 単純ヘルペスウイルス(HSV)のウイルス粒子構造と生活環

HSV のウイルス粒子構造(A)と生活環(B)のモデルを示した。HSV のウイルス粒子はウイルス DNA を内包するカプシド、カプシドを包むエンベロープ、カプシドとエンベロープの間を埋めるテグメントから成り立っている。エンベロープは宿主細胞に由来する脂質二重膜から形成され、細胞への侵入に必須である糖タンパク質が含まれている。また、テグメントにはウイルス因子の他に宿主細胞因子が含まれている。

HSV が細胞に侵入するとカプシドとテグメントタンパク質が細胞質に放出される。カプシドは核へ輸送され、核内にウイルス DNA を挿入する。また、カプシドと共に細胞に持ち込まれたテグメントタンパク質の中には、感染直後から機能を発揮するものが存在し、例えば UL41 は宿主 mRNA を分解して宿主タンパク質の新規合成を阻害し(shut-off)、ウイルスタンパク質の選択的な合成に寄与する。核に挿入されたウイルス DNA からはウイルス遺伝子が発現し、遺伝子産物の働きによりウイルス DNA の複製と空のカプシドの生成が行われる。複製されたウイルス DNA は空のカプシドにパッケージングされ、ウイルス DNA を取り込んだカプシドは核内-外膜間に出芽することで、核内膜に由来するエンベロープを獲得する。その後、核外膜に融合することでカプシドは細胞質に放出される。細胞質においてカプシドはテグメントを獲得し、トランスゴルジネットワーク(TGN)に由来する膜小胞に出芽することでエンベロープを獲得して成熟ウイルス粒子となり、細胞外へ放出される。

UL41 は、モデル図中に青く示した感染直後から感染初期において機能することが知られている。本研究において、UL41 の関与が新たに示唆された感染後期の現象であるテグメント獲得過程をモデル図中に黄色で示した。



図 2

UL41 欠損による成熟ウイルス粒子の構成因子の変化

Vero 細胞に野生型ウイルスである HSV-1(F)、UL41 欠損ウイルス及びその復帰ウイルスを multiplicity of infection(MOI) 0.01 の条件で感染させた。感染 48 時間後に培養上清を回収し、成熟ウイルス粒子をショ糖密度勾配法で精製した。精製した成熟ウイルス粒子は、カプシド構成因子であり、成熟ウイルス粒子への取り込み量が一定とされる VP5 の量が揃うように調整して SDS-PAGE 解析に供して、銀染色した。その中から代表的な結果を示した。野生型ウイルス由来の成熟ウイルス粒子と比較して、UL41 欠損ウイルス由来の成熟ウイルス粒子特異的な増加が認められる因子を (黒)矢頭で示した。また、本研究で注目したウイルス因子と予測されるものを(白)矢頭で示した。この内、分子量から 150 kDa 付近の因子は VP5 と予想される。

分子量マーカーは Broad Range SDS-PAGE Standards(BIORAD)を使用し、分子量(kDa)を示した。

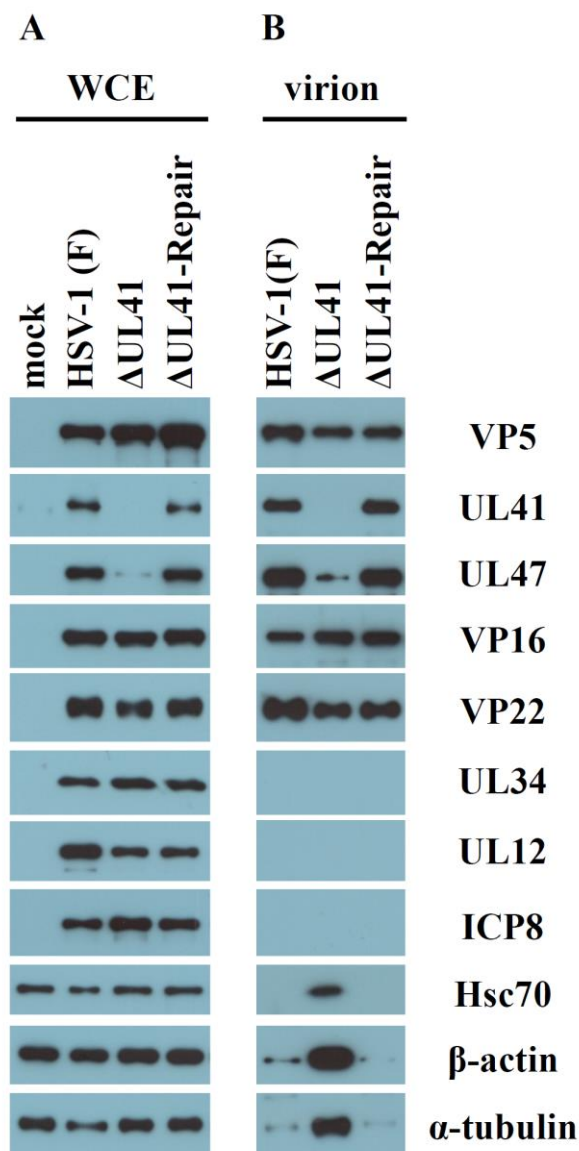


図 3

UL41 欠損による感染細胞のタンパク質発現量と成熟ウイルス粒子構成因子の変化

Vero 細胞に野生型ウイルスである HSV-1(F)、UL41 欠損ウイルス及びその復帰ウイルスを MOI 0.01 の条件で感染させ、感染 48 時間後に感染細胞と培養上清を回収した。図 2 と同様に成熟ウイルス粒子を精製し、感染細胞(A)と成熟ウイルス粒子(B)を Immunoblot 解析に供し、その代表的な結果を示した。感染細胞は細胞量を揃え、成熟ウイルス粒子は VP5 の量を揃うように調整した。検出には主要カプシド構成因子である VP5、主要tegument構成因子である UL41、UL47、VP16、及び VP22、成熟ウイルス粒子には取り込まれない UL34、UL12 及び ICP8、宿主細胞因子である Hsc70、β-actin 及び α-tubulin 抗体を使用した。WCE, whole cell extract、virion, 成熟ウイルス

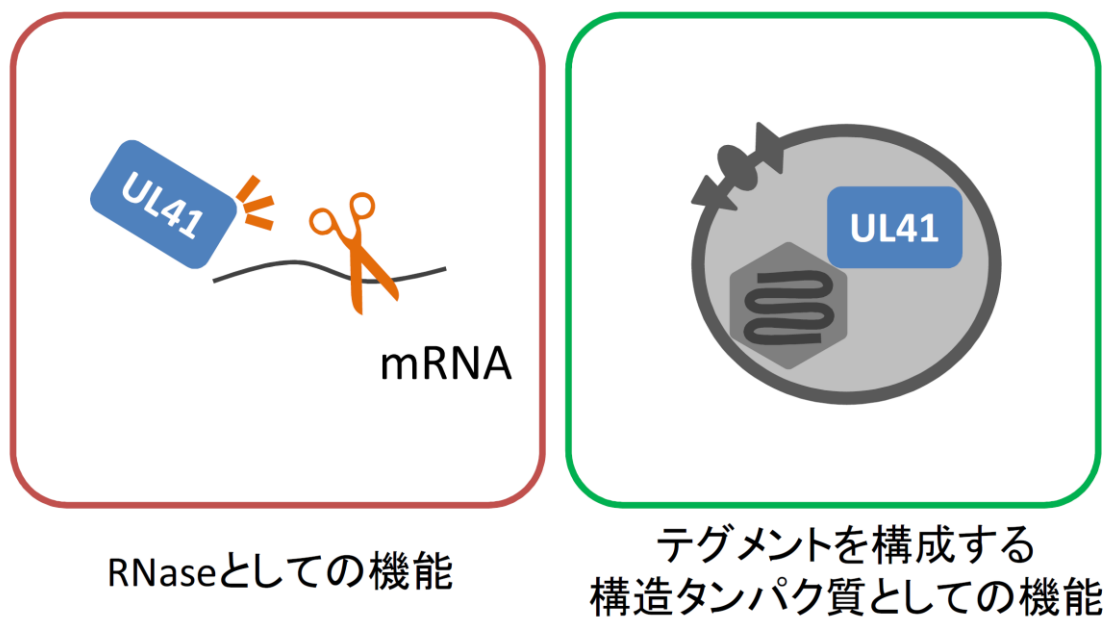


図 4

UL41 の機能

UL41 は RNase 活性を示すテグメントタンパク質であることから、その機能は感染細胞において mRNA を分解する RNase としての機能(A)とウイルス粒子においてテグメントを形成する構造タンパク質としての機能(B)に区別できる。UL41 欠損ウイルスでは両方の機能が失われているため、RNase 活性のみを消失した UL41D213N ウイルスを作製して比較することで、UL41 の RNase 活性依存的な現象とそれ以外の現象を区別した。

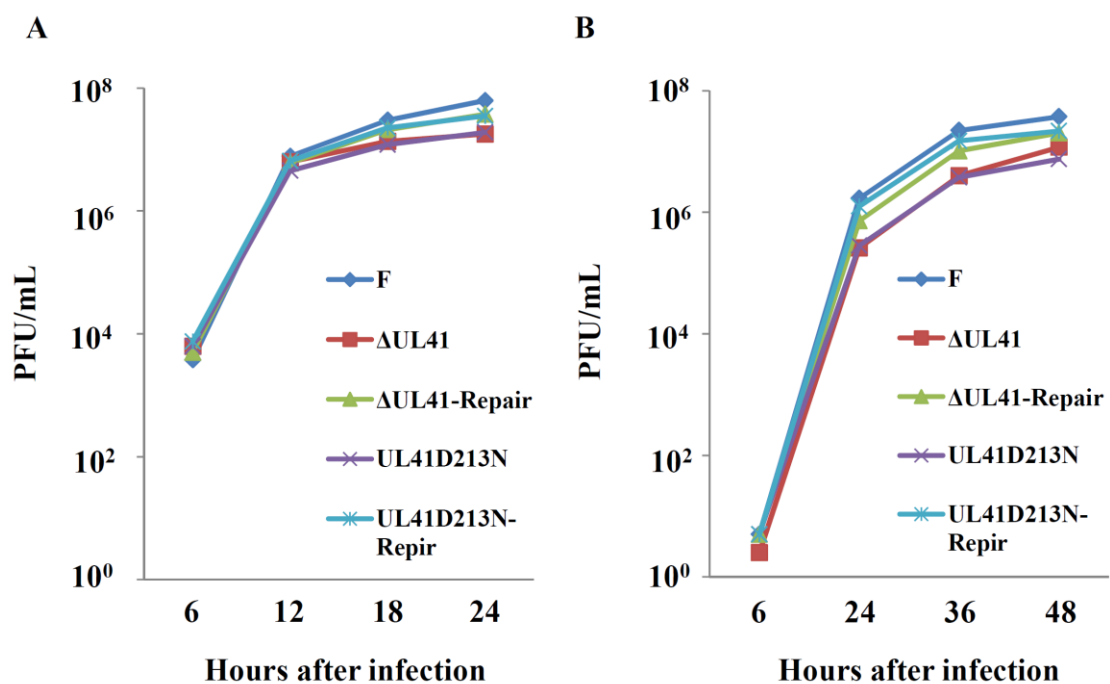


図 5

UL41 の RNase 活性が Vero 細胞におけるウイルス増殖に与える影響

Vero 細胞に MOI 5(A)、MOI 0.01(B)の条件で野生型ウイルスである HSV-1(F)、UL41 欠損ウイルス及びその復帰ウイルス、UL41D213N ウイルス及びその復帰ウイルスを感染させた。培養上清と感染細胞をグラフ中に示した時間で回収し、Vero 細胞を用いたプラークアッセイを行い、感染性ウイルス力価を測定した。

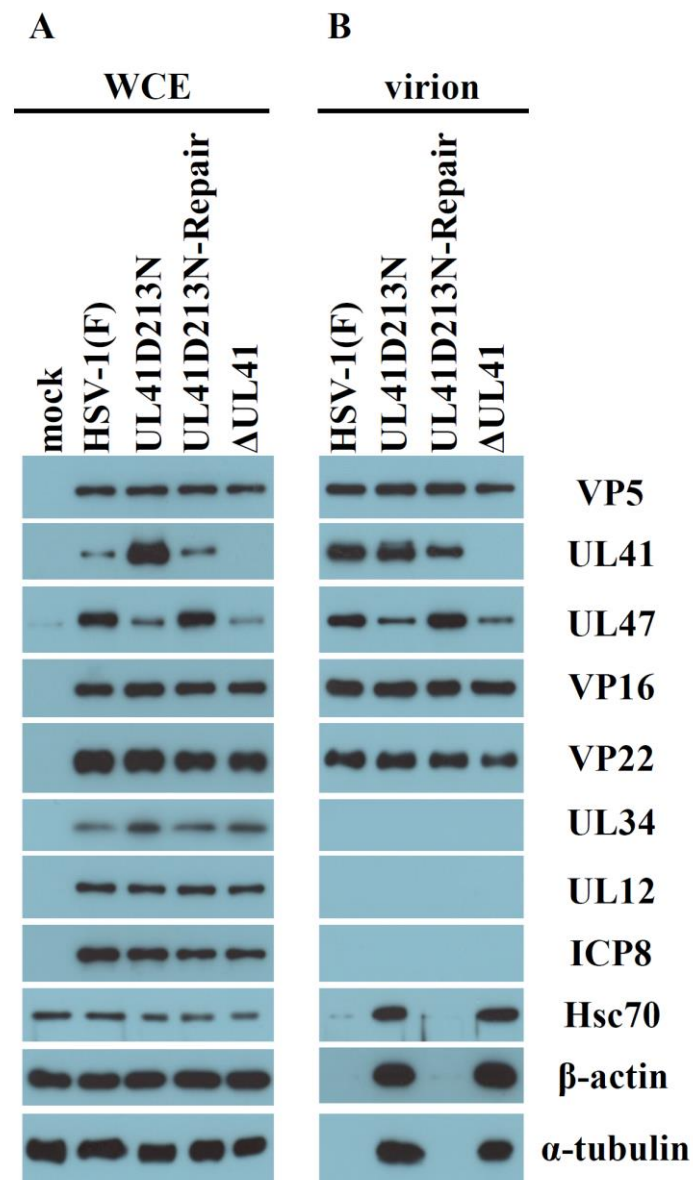


図 6

UL41RNase 活性の消失による感染細胞のタンパク質発現量と成熟ウイルス粒子構成因子の変化

Vero 細胞に野生型ウイルスである HSV-1(F)、UL41D213N ウイルス及びその復帰ウイルス、UL41 欠損ウイルスを MOI 0.01 の条件で感染させ、感染 48 時間後に感染細胞と培養上清を回収した。図 2 と同様に成熟ウイルス粒子を精製し、感染細胞(A)と成熟ウイルス粒子(B)を Immunoblot 解析に供し、その代表的な結果を示した。感染細胞は細胞量を揃え、成熟ウイルス粒子は VP5 の量を揃うように調整した。検出には図 3 で示した抗体を使用した。

WCE, whole cell extract、virion, 成熟ウイルス

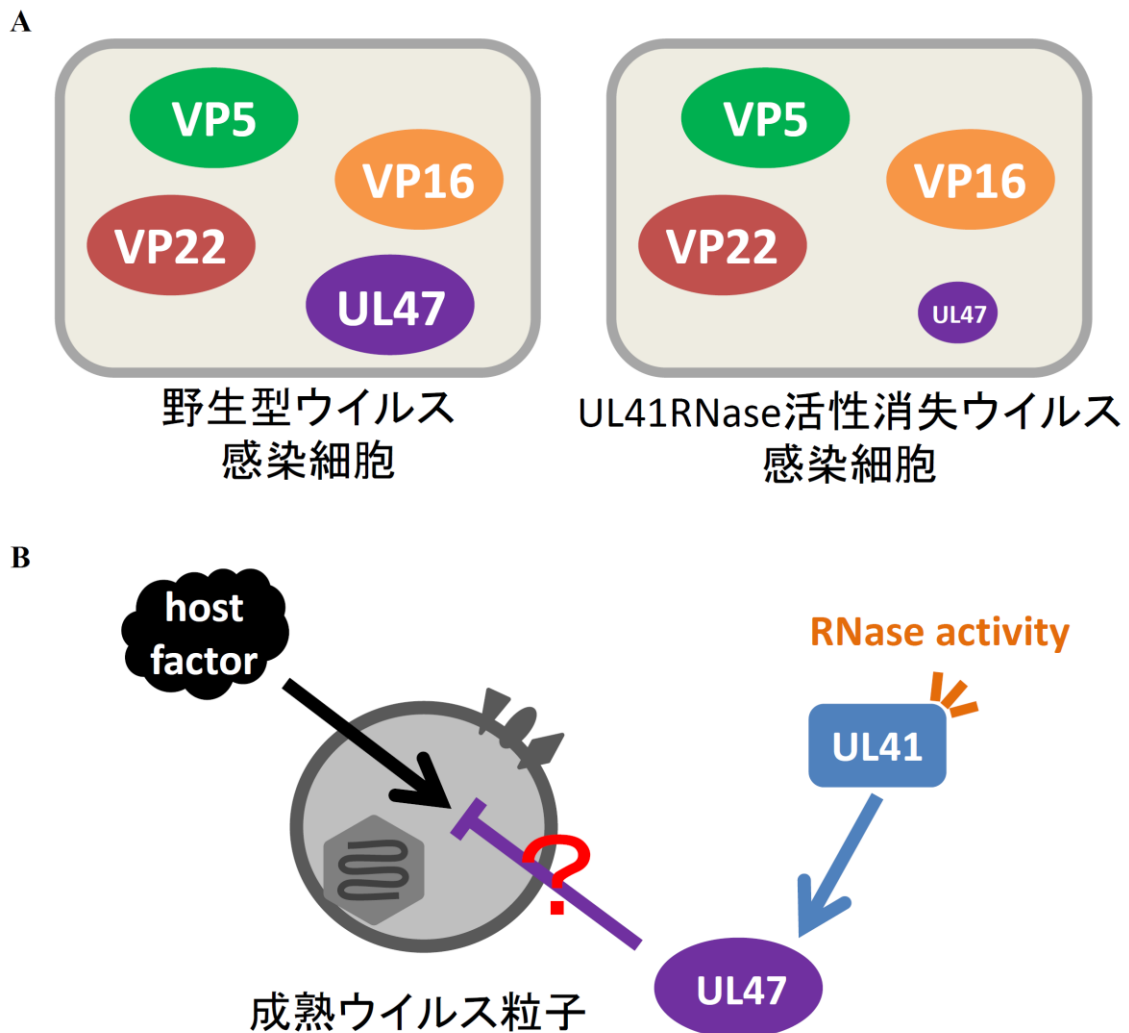


図 7

仮説；UL47 の成熟ウイルス粒子への宿主細胞因子取り込み制御への関与

UL41RNase 活性の消失により、感染細胞における UL47 の発現量が特異的に減少することに注目した(A)。UL47 はウイルス粒子に最も多く含まれるtegument構成因子であること、また複数のtegument構成因子と相互作用することからウイルス粒子のtegument獲得機構に関与する事を予想し、UL47 が成熟ウイルス粒子への宿主細胞因子取り込みを制御するという仮説を立てた(B)。

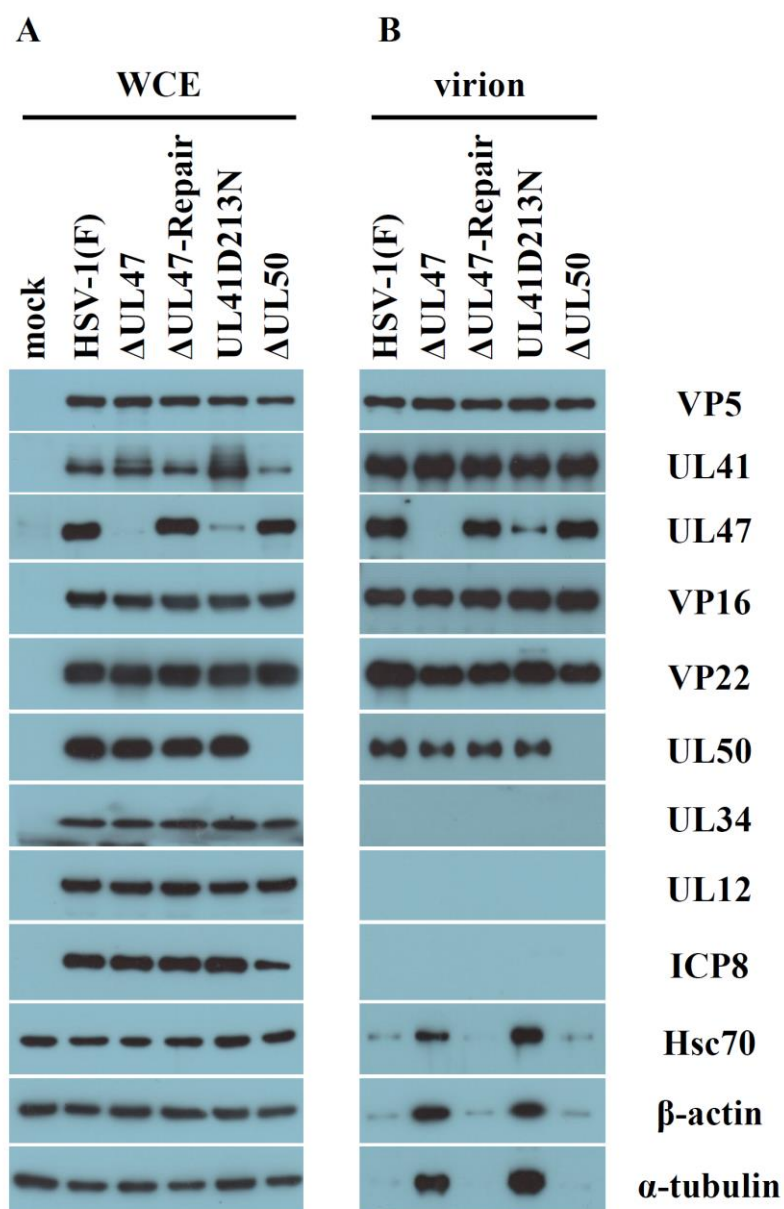


図 8

UL47 欠損による感染細胞のタンパク質発現量と成熟ウイルス粒子構成成分の変化

Vero 細胞に野生型ウイルスである HSV-1(F)、UL47 欠損ウイルス及びその復帰ウイルス、UL41D213N ウイルス、UL50 欠損ウイルスを MOI 0.01 の条件で感染させ、感染 48~60 時間後に感染細胞と培養上清を回収した。図 2 と同様に成熟ウイルス粒子を精製し、感染細胞(A)と成熟ウイルス粒子(B)を Immunoblot 解析に供し、その代表的な結果を示した。感染細胞は細胞量を揃え、成熟ウイルス粒子は VP5 の量を揃うように調整した。検出には図 3 で示した抗体に加え、主要テグメント構成因子である UL50 抗体を使用した。

WCE, whole cell extract、virion, 成熟ウイルス

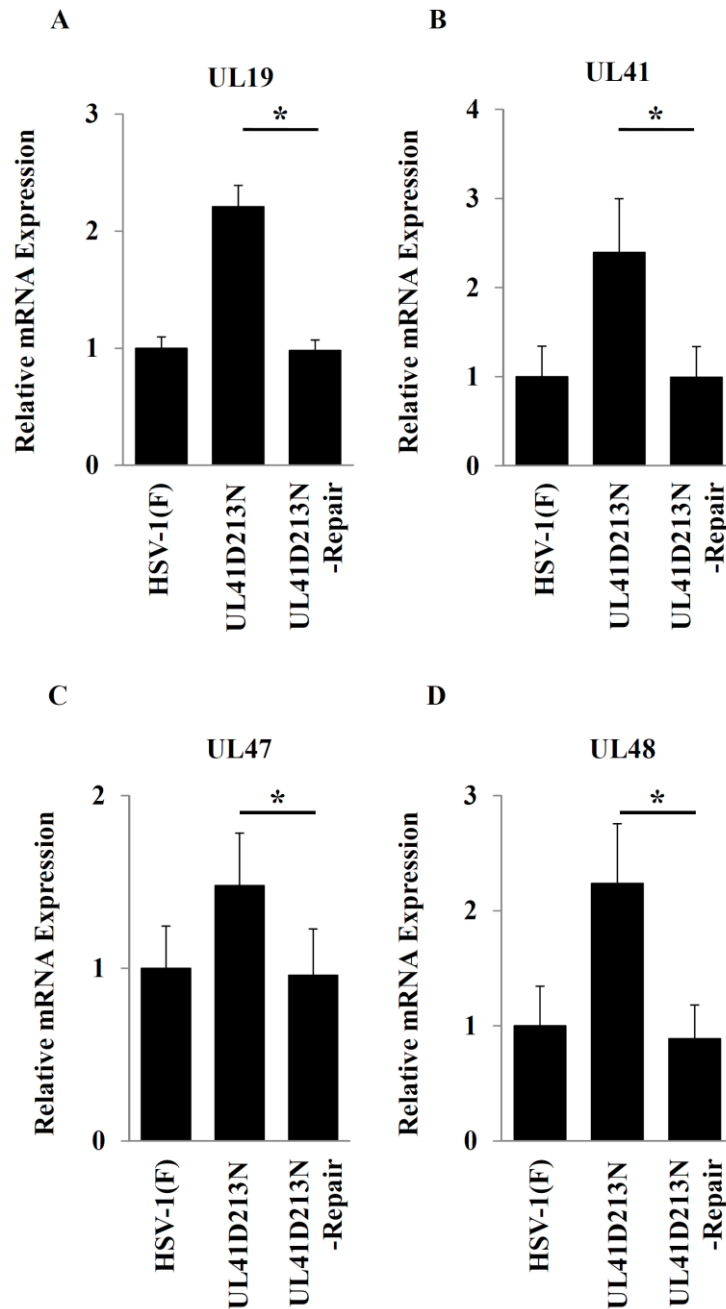


図 9

UL41 の RNase 活性が感染細胞におけるウイルス因子 mRNA 発現量に与える影響

Vero 細胞に野生型ウイルスである HSV-1(F)、UL41D213N ウイルス及びその復帰ウイルスを MOI 5 の条件で感染させた。感染 18 時間後に感染細胞を回収し、Total RNA を抽出し、逆転写の後に VP5 をコードする UL19(A)、UL41(B)、UL47(C)、VP16 をコードする UL48(D) の mRNA 量を定量 PCR 法で解析した。解析結果のノーマライズには UL41 による分解を受けない 18S rRNA を使用した。グラフには 3 回独立して試行した結果の平均値と標準偏差を、HSV-1(F)感染細胞の値を 1 として相対値を示した。*は P 値が 0.05 以下であることを示す。

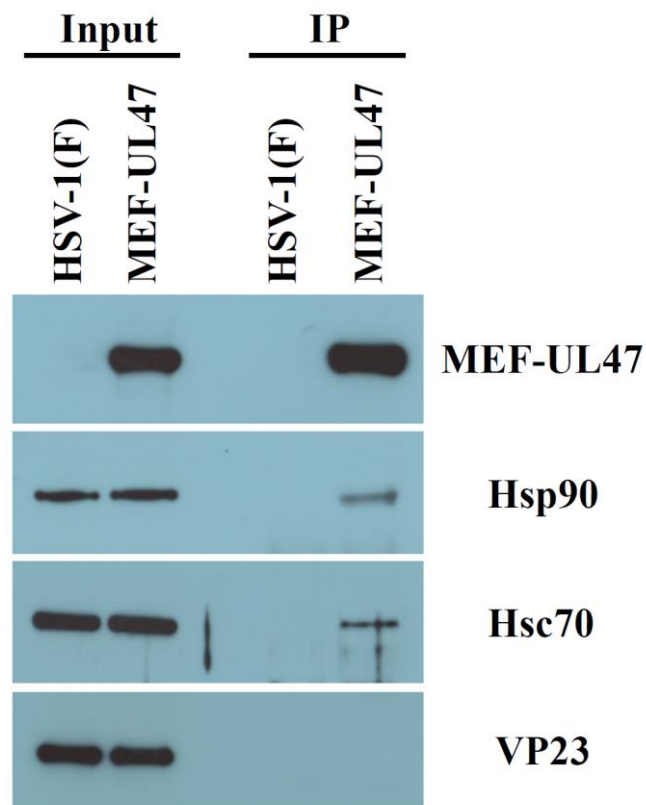


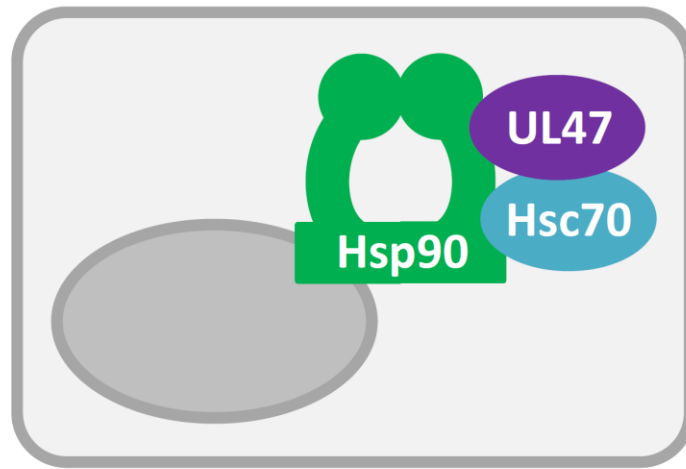
図 10

感染細胞における UL47 と Hsp90、Hsc70 の相互作用

Vero 細胞に野生型ウイルスである HSV-1(F)、MEF-UL47 ウイルスを MOI 5 の条件で感染させた。感染 18 時間後に感染細胞を 0.5 % NP40 バッファーで可溶化し、Myc 抗体で免疫沈降して Immunoblot 解析に供した。検出には FLAG、Hsp90、Hsc70、VP23 抗体を使用した。

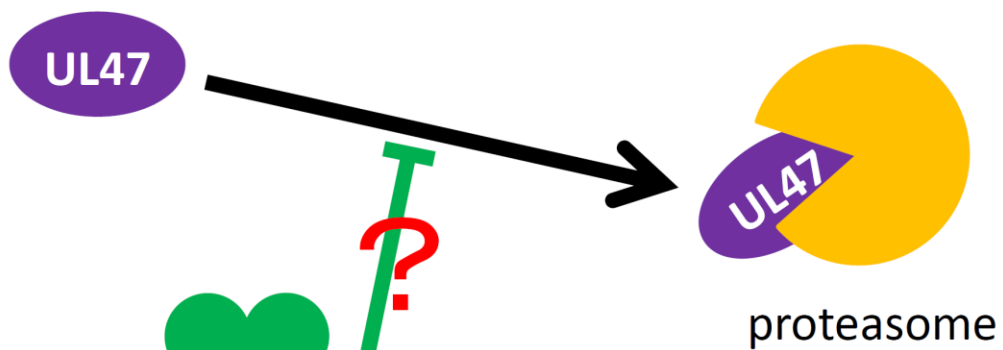
WCE, whole cell extract IP, immunoprecipitated

A



HSV-1感染細胞

B



Hsp90-Hsc70
シャペロンマシナリー

図 11

仮説 ; Hsp90、Hsc70 による UL47 の安定化

感染細胞における UL47 と Hsp90 及び Hsc70 の相互作用が示唆されたことに注目した(A)。Hsp90 は Hsc70 などのシャペロン分子や補助因子と複合体を形成し、基質を安定化して分解から保護するとされている。従って、Hsp90 及び Hsc70 が UL47 を安定化するという仮説を立てた(B)。

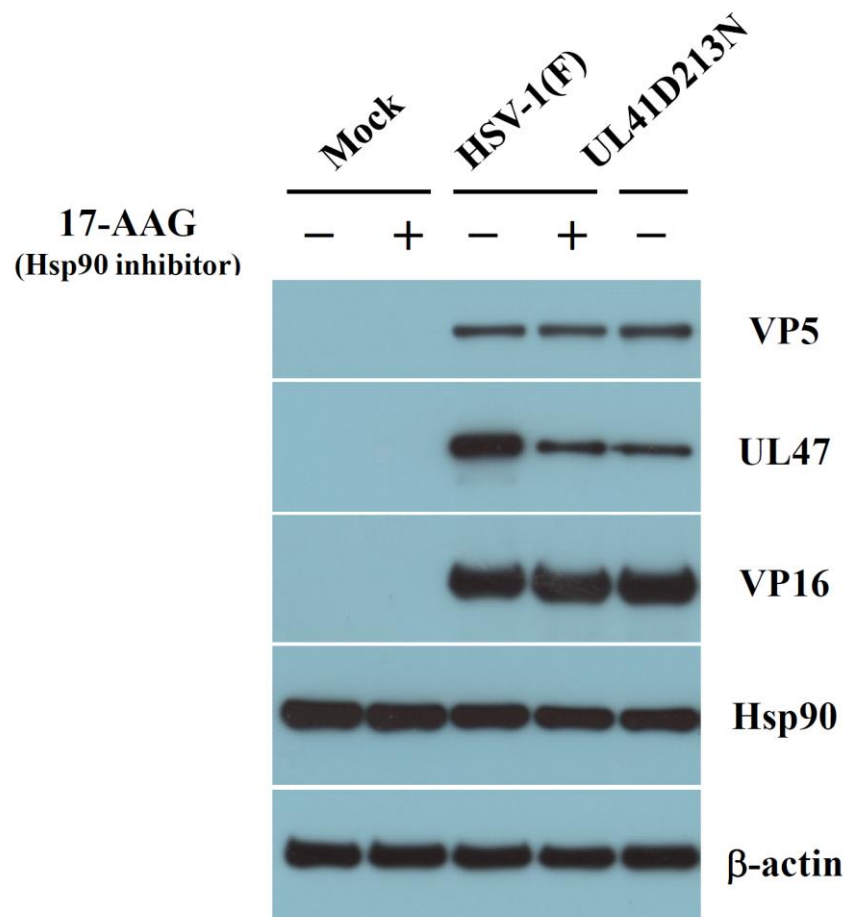


図 12

UL47 の安定化への Hsp90 の関与

Vero 細胞に野生型ウイルスである HSV-1(F)と UL41D213N ウイルスを MOI 5 の条件で感染させた。感染 4 時間後に 1 μ M 17-AAG(Hsp90 阻害剤)を加え、17-AAG 存在下で 14 時間感染を進めた。感染 18 時間後に感染細胞を回収して immunoblot 解析に供した。検出には VP5、UL47、VP16、Hsp90、 β -actin 抗体を使用した。

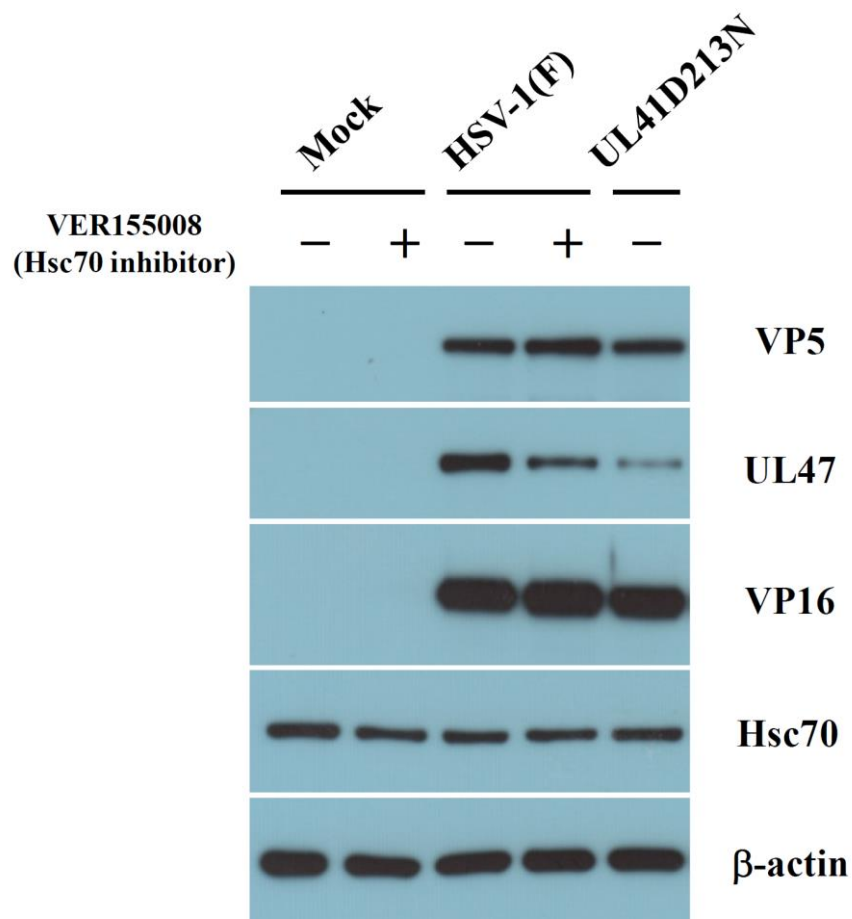


図 13

UL47 の安定化への Hsc70 の関与

Vero 細胞に野生型ウイルスである HSV-1(F)と UL41D213N ウイルスを MOI 5 の条件で感染させた。感染 4 時間後に 50 μ M VER155008(Hsc70 阻害剤)を加え、VER155008 存在下で 14 時間感染を進めた。感染 18 時間後に感染細胞を回収して immunoblot 解析に供した。検出には VP5、UL47、VP16、Hsc70、 β -actin 抗体を使用した。

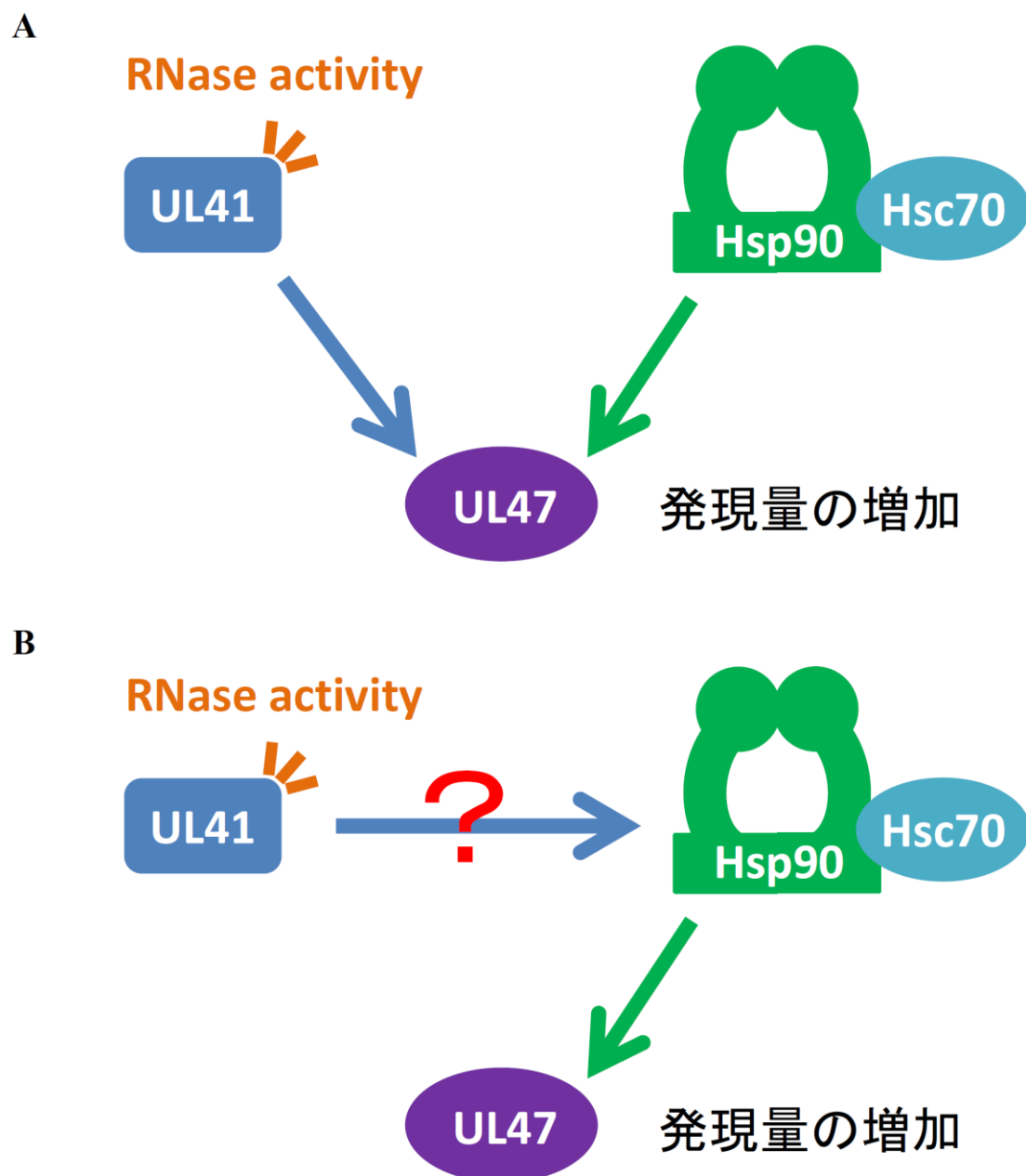


図 14

仮説 ; UL41 による Hsp90-Hsc70 シャペロンマシナリーの活性化

感染細胞において、UL41 の RNase 活性と Hsp90-Hsc70 シャペロンマシナリーが共通して UL47 の発現量を増加させることに注目した(A)。また、UL41 の RNase 活性依存的な UL47 発現量の制御は、mRNA 量の変化を伴わないことから、UL47 の安定性に関与する事が予想された。従って、UL41 は RNase 活性依存的に Hsp90-Hsc70 シャペロンマシナリーの機能を亢進し、UL47 の発現量を増加させるという仮説を立てた(B)。

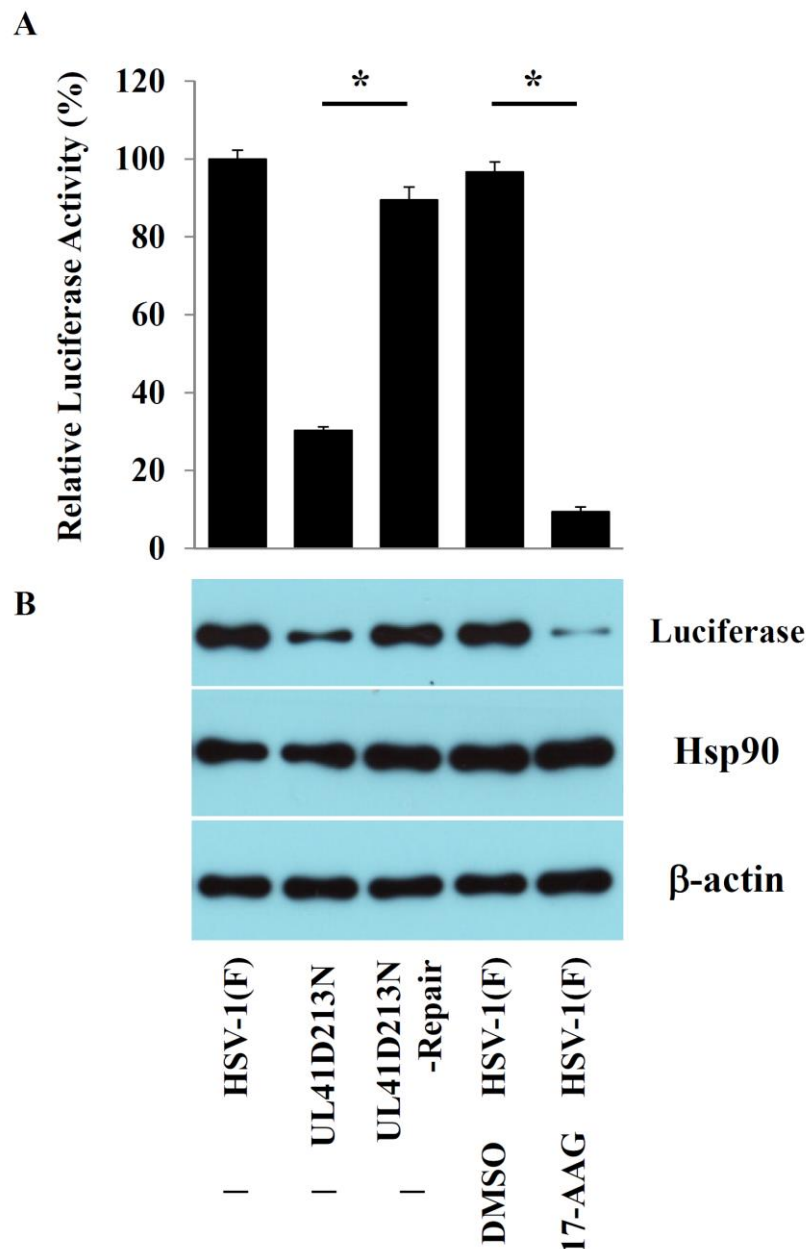


図 15

HSV-1 の感染が Luciferase 発現量に与える影響

Luciferase を発現するアデノウイルスを感染させた Vero 細胞に野生型ウイルスである HSV-1(F)、UL41D213N ウイルス及びその復帰ウイルスを MOI 5 の条件で重感染させた。HSV-1 感染 18 時間後に感染細胞を回収し、Luciferase 活性(A)および Luciferase、Hsp90、β-actin の発現量(B)を解析した。グラフには 3 回独立して試行した結果の平均値と標準偏差を、野生型ウイルスである HSV-1(F)感染細胞の Luciferase 活性に対する割合で示した。Hsp90 の阻害は、野生型ウイルスである HSV-1(F)感染 4 時間後に 1 μM 17-AAG(Hsp90 阻害剤)を加え、17-AAG 存在下で 14 時間感染を進めることで行った。*は P 値が 0.05 以下であることを示す。

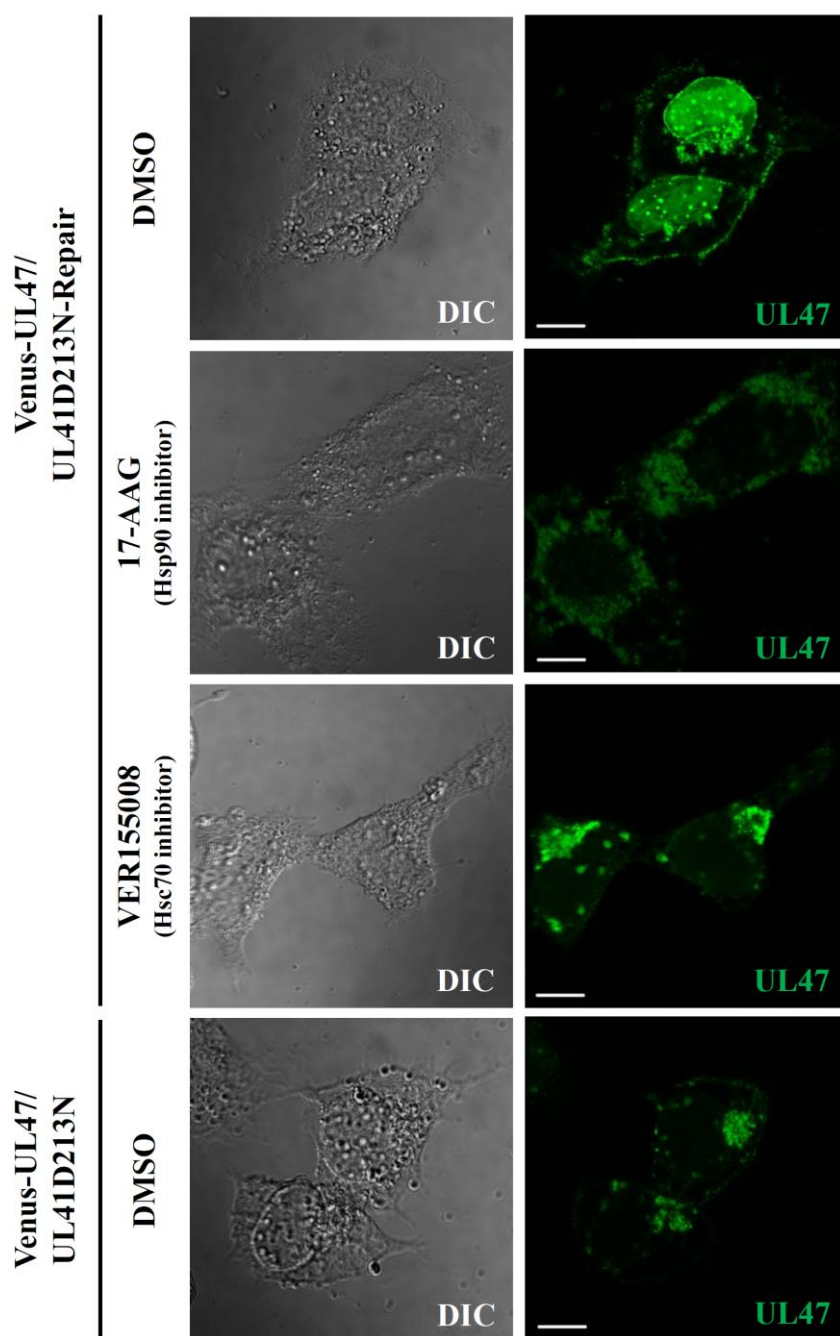


図 16

Hsp90、Hsc70 および UL41RNase 活性が Venus-UL47 の細胞内局在に与える影響

Vero 細胞に Venus-UL47/UL41D213N ウイルス及び Venus-UL47/UL41D213N-Repair ウイルスを MOI 5 の条件で感染させた。感染 4 時間後に 1 μ M 17-AAG(Hsp90 阻害剤)、50 μ M VER155008 (Hsp70/Hsc70 阻害剤)を加え、各阻害剤存在下で 14 時間感染を進めた。感染 18 時間後にパラホルムアルデヒドで細胞を固定し、共焦点顕微鏡で Venus- UL47 の細胞内局在を解析した。DIC,Differential interference contrast green; Venus-UL47 scale bar;10 μ m

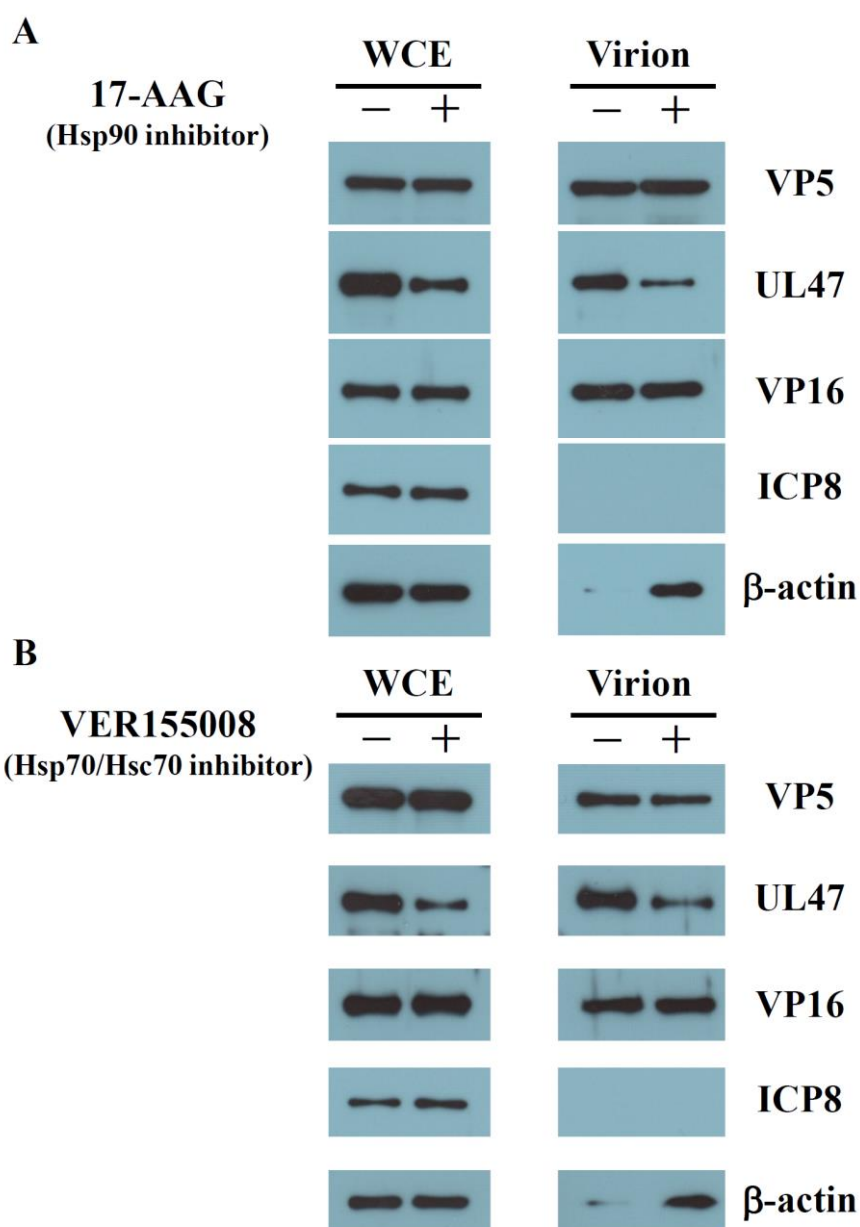


図 17

Hsp90 と Hsc70 が成熟ウイルス粒子構成因子の制御に与える影響

Vero 細胞に MOI 0.01 の条件で野生型ウイルスである HSV-1(F)を感染させ、感染 18 時間後に 1 μ M 17-AAG(Hsp90 阻害剤)、50 μ M VER155008 (Hsp70/Hsc70 阻害剤)を加え、各阻害剤存在下で 30 時間感染を進めた。感染 48 時間後に感染細胞と培養上清を回収した。図 2 と同様に成熟ウイルス粒子を精製し、感染細胞と成熟ウイルス粒子を Immunoblot 解析に供し、その代表的な結果を示した。感染細胞は細胞量を揃え、成熟ウイルス粒子は VP5 の量を揃うように調整した。検出には VP5、UL47、VP16、ICP8、 β -actin 抗体を使用した。

WCE, whole cell extract、virion, 成熟ウイルス

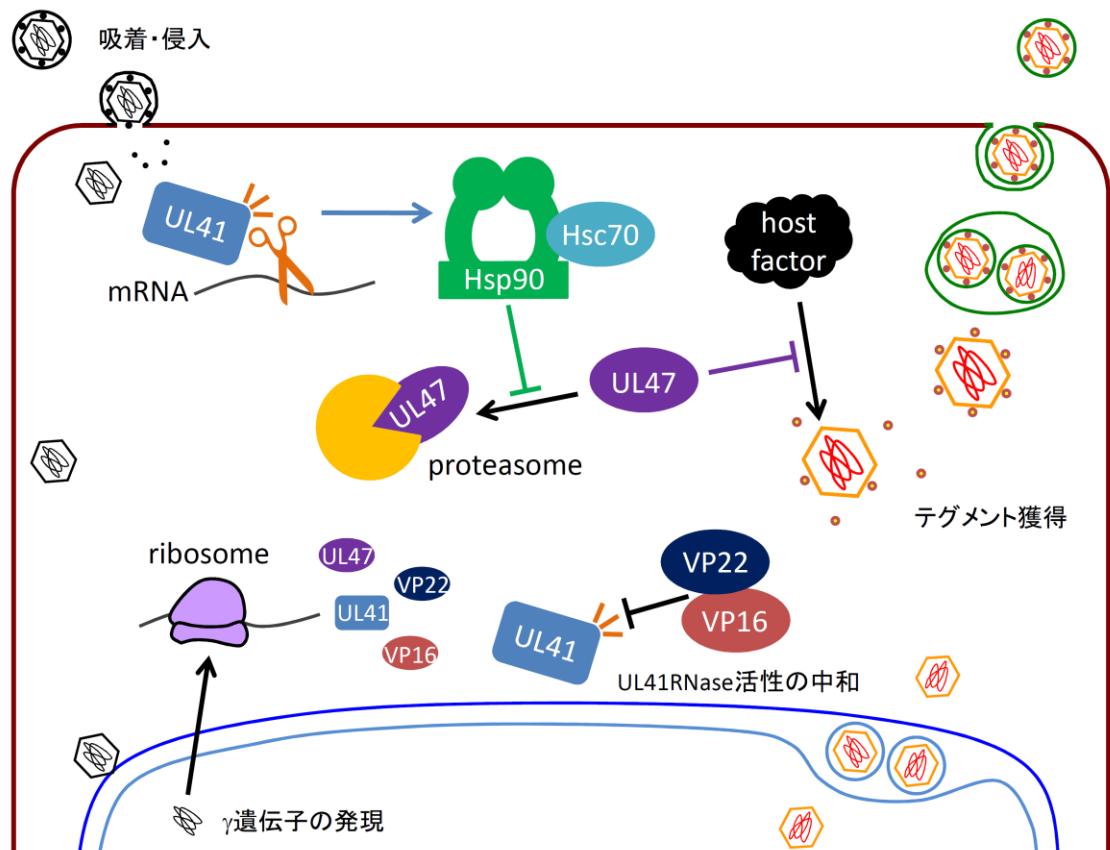


図 18

UL41RNase 活性と Hsp90-Hsc70 シャペロンマシナリーによる、成熟ウイルス粒子への宿主細胞因子取り込み制御モデル

ウイルスが細胞に侵入した際に、カプシドと共に細胞質に放出された UL41 は RNase 活性依存的に Hsp90-Hsc70 シャペロンマシナリーの機能を制御し、ウイルスタンパク質の合成に適した環境を形成すると考えられる。UL47 は、Hsp90-Hsc70 シャペロンマシナリーの作用により安定化し、分解から保護されることで感染細胞における発現量を増加させ、カプシドのテグメント獲得過程において、成熟ウイルス粒子へ宿主細胞因子が取り込まれることを抑制すると考えられる。

謝辞

本稿を終えるにあたり、4年間に渡って御指導・御鞭撻賜りました、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の川口寧教授に深く感謝いたします。

また、同研究室の加藤哲久博士、有井潤博士をはじめ、研究室の皆様、そして、卒業生の佐合健博士、木村香葉さんのご助力無くして本研究は遂行できなかったことと思います。心より感謝いたします。

最後に、4年間の研究生生活を経済面、精神面ほか、あらゆる面で支援して頂けた両親、弟、そして祖父母に、この場を借りてお礼申し上げます。本当にありがとうございました。