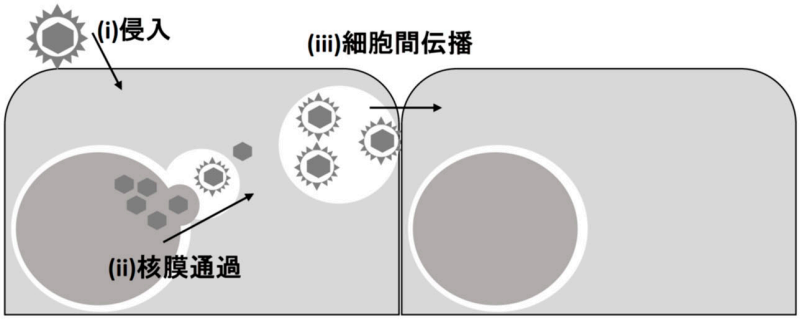
114　ヘルペスウイルスによる膜融合活性化機構の解明	有井　潤

【目的】ヘルペスウイルス科に属する単純ヘルペスウイルス（HSV: herpes simplex virus）は、我々人類にとって、もっとも身近に存在を認識できるウイルスといえるかもしれない。全世界でその感染率が 70%に上る HSV は、口唇ヘルペスの原因となるだけでなく、脳炎、性器ヘルペス、皮膚疾患、眼疾患、全身性の新生児ヘルペスといった多様な疾患を引き起こす。HSV がコードする膜タンパク質は、ウイルスエンベロープと細胞膜との間の融合を引き起こすことで標的細胞への侵入を仲介する。同時にこれらの膜タンパク質は、宿主細胞膜の変性や融合を引き起こすことでウイルス粒子形成にも貢献している。

【方法】本研究では、HSV 膜タンパク質の中でも、特に細胞間感染を引き起こす糖タンパク質である glycoprotein E（gE）と、核膜通過を引き起こすウイルスタンパク質複合体である Nuclear Egress Complex（NEC）に注目し、gE と相互作用する宿主因子および NEC の機能発現に必要なアミノ酸残基を解析した。

【結果】HSV gE と相互作用する宿主因子の発現抑制により、HSV による gE 依存的な細胞間感染は著しく低下した。すなわち、当該因子は gE の機能発現に重要な役割を担っていると考えられた。宿主細胞内でしか増殖できないウイルスにとって、膜融合は必要不可欠の行程といえ、ウイルスと宿主細胞膜との関係性の理解は、新しい抗ウイルス戦略構築に貢献すると考えられる。

HSV の感染環と膜融合



114. ヘルペスウイルスによる膜融合活性化機構の解明

有井　潤

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

Key words：ウイルス，HSV，膜タンパク質

緒　言

ヘルペスウイルス科に属する単純ヘルペスウイルス（HSV: herpes simplex virus）は、我々人類にとって、もっとも身近に存在を認識できるウイルスといえるかもしれない。全世界でその感染率が 70%に上る HSV は、口唇ヘルペスの原因となるだけでなく、脳炎、性器ヘルペス、皮膚疾患、眼疾患、全身性の新生児ヘルペスといった多様な疾患を引き起こす。HSV には核酸アナログであるアシクロビルという治療薬が存在する。しかし HSV は一度感染すると終生神経細胞に潜伏し、たびたび再活性化を繰り返すため、QOL の低下や医療費の増大が大きな問題となる。このため HSV を根本的に体内から排除する方法や、感染を予防する方法の確立が必要であると考えられている。HSV がコードする膜タンパク質は、標的細胞への侵入、とくにウイルスエンベロープと細胞膜との間の fusion に必須であるだけでなく、粒子形成過程においても重要な役割を担っていることが知られており［1〜3］、抗ウイルス戦略、とくに予防薬の魅力的な標的と考えられている。

方法および結果

1.　HSV 細胞間伝播を引き起こす糖タンパク質 gE の解析

HSV は、細胞への親和性が極めて高く、いわゆるウイルス粒子を細胞外にあまり放出せず、細胞間を直接伝播することが知られている。このような細胞間伝播は、生体内では宿主免疫や抗ウイルス剤への抵抗性を上げていると考えられ、その理解は HSV 対策に貢献すると考えられる。HSV が保持する糖タンパク質である glycoprotein E（gE）は、cell-free なウイルス粒子による細胞侵入には用いられていないものの、細胞間伝播には必須と考えられている［4］。gE が細胞間において何らかの宿主因子を認識し、隣の細胞への感染を引き起こすと考えられているが、その具体的なメカニズムは不明である。研究者はこれまでに、HSV-1 gE と相互作用する因子を質量解析によって網羅的に同定している。本研究ではこの中の一つ、gEbp1 に注目した。gEbp1 は gE と共免疫沈降法で相互作用を検出することが可能な宿主膜タンパク質であり、真核細胞に広く保存されている。本研究では、CRISPR/Cas9 システムを用いることで gEbp1 体発現細胞を樹立し、野生体あるいは gE 欠損 HSV の挙動を解析した。

gEbp1 低発現細胞においては野生体 HSV による細胞間伝播は著しく抑制されていた一方で、細胞内のウイルス増殖量自体には影響を与えなかった（図 1A）。gE 欠損 HSV は細胞内で野生体同様に増殖できるものの、細胞間伝播を行うことができず、培養細胞において極小のプラークしか形成しない。gEbp1 低発現細胞では gE 欠損株の性状に影響を与えなかった（図 1B）。すなわち、gE 依存的な HSV 細胞間伝播には、新たに同定された宿主因子 gEbp1 が必要とされており、gEbp1 は gE の機能発現に重要な役割を担っていると考えられる。また gEbp1 に対する阻害剤は、野生体ウイルスの細胞間伝播を阻害したが、gE 欠損株には影響を与えなかった。

2.　HSV 膜タンパク質によって引き起こされる小胞媒介性核外輸送の解析

核内で複製する HSV は、小胞媒介性核外輸送と呼ばれる特殊な方法を用いてゲノムを保持したカプシドを核外へと輸送する。すなわち、カプシドは一旦核内膜から出芽し、核膜間にエンベロープに包まれたウイルス粒子を形成する。このウイルス粒子が核外膜と融合することで、カプシドを核内から核外へと輸送する。HSV がコードする膜タンパク質である Nuclear Egress Complex（NEC）がこのシステムを担っていると考えられているが、その詳細な分子機構は不

明であるため、NEC の機能発現に重要なアミノ酸残基の同定を試みた。NEC に変異を導入した組換え HSV を作製し、ウイルス増殖およびウイルスカプシドの小胞媒介性核外輸送が低下するものを探索した。現在これらの組換え体の性状を解析中である。

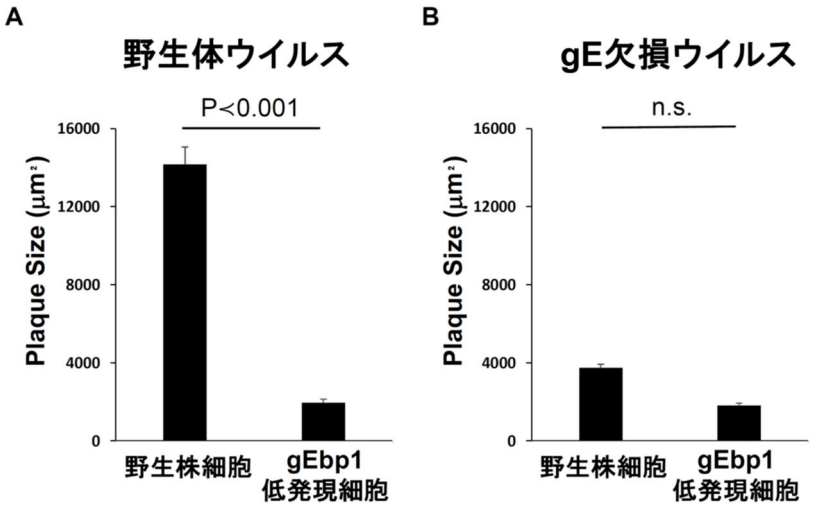


図 1. gEbp1 はヘルペスウイルスの細胞間伝播に重要な機能を持つ
野生体細胞または gEbp1 発現抑制細胞に、野生体 HSV-1（A）または gE 欠損 HSV-1（B）を感染させ、48 時間後にプラークサイズを計測した。検定は Student t-test を用いた。

考　察

伝統的にウイルス学では、精製した細胞外のウイルス粒子を扱うことがほとんどであった。そのため、細胞外にウイルス粒子を多く放出しない HSV の感染様式への理解はまだまだ不完全といえる。本研究は、HSV の細胞間伝播に極めて重要である gE に注目することでその分子機構に迫るものである。gE と相互作用する宿主膜タンパク質 gEbp1 は、gE の機能発現に必要であった。gEbp1 は、多機能因子として知られているが、gE が gEbp1 を活性化することで、HSV の細胞間伝播を駆動していると考えられる。現在その具体的なメカニズムを探るため、gEbp1 と会合する宿主因子に注目している。また HSV 感染 gEbp1 発現抑制細胞を電子顕微鏡下で観察することで、HSV 細胞間伝播のどのステップが中断されているのか、解析したいと考えている。

また HSV カプシドの小胞媒介性核外輸送は、核膜間という狭い領域でウイルス出芽と膜融合が連続して起こる、生物学上も例を見ない特殊なシステムである。本研究で注目した、NEC の機能発現に重要なアミノ酸残基から、未同定の本システムの分子機構の解明の一助になるのではないかと考えている。

生体内では HSV はウイルス粒子がほとんど放出されず、生細胞を介して次の標的細胞に感染を起こすと考えられている（図 2）。このことが HSV の体内からの排除を困難にする主因であると考えられ、本研究で試みた細胞間伝播および小胞媒介性核外輸送の理解は、新しい抗ウイルス戦略の構築に貢献すると考えられる。

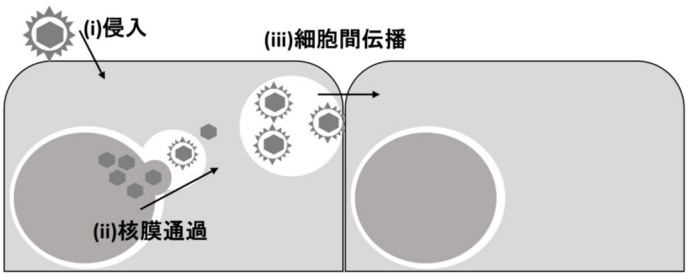


図 2. HSV の感染環と膜融合

HSV は、(i) 標的細胞への侵入、(ii) 小胞媒介性核外輸送を介したウイルスカプシドの核膜通過、(iii) 隣接する非感染細胞への細胞間伝播という、三種類の膜融合システムを駆使して増殖する。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、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渡辺瑞季、丸鶴雄平研究員、小栁直人研究員、加藤哲久先生および川口寧先生である。最後に、本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝致します

文　献

1) Farnsworth A, Wisner TW, Webb M, Roller R, Cohen G, Eisenberg R, Johnson DC. Herpes simplex virus glycoproteins gB and gH function in fusion between the virion envelope and the outer nuclear membrane. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 Jun 12;104(24):10187-92. Epub 2007 Jun 4. PMID: 17548810.

2) Johnson DC, Wisner TW, Wright CC. Herpes simplex virus glycoproteins gB and gD function in a redundant fashion to promote secondary envelopment. J Virol. 2011 May;85(10):4910-26. Epub 2011 Mar 16. PMID: 21411539 doi: 10.1128/JVI.00011-11.

3) Arii J, Shindo K, Koyanagi N, Kato A, Kawaguchi Y. Multiple Roles of the Cytoplasmic Domain of Herpes Simplex Virus 1 Envelope Glycoprotein D in Infected Cells. J Virol. 2016 Oct 28;90(22):10170-10181. Print 2016 Nov 15. PMID: 27581980.

4) Dingwell KS, Brunetti CR, Hendricks RL, Tang Q, Tang M, Rainbow AJ, Johnson DC. Herpes simplex virus glycoproteins E and I facilitate cell-to-cell spread in vivo and across junctions of cultured cells. J Virol. 1994 Feb;68(2):834-45. PMID: 8289387.