

論文内容の要旨

「論文題目」

リアルタイムイメージングを利用した単純ヘルペスウイルス成熟過程の可視化

(Visualization of HSV-1 maturation pathway using real-time imaging system)

氏名

杉本 研

単純ヘルペスウイルス (HSV: herpes simplex virus) は、ヒトに脳炎、性器ヘルペス、皮膚疾患、眼疾患、小児ヘルペスなどの多様な病態を引き起こす。米国における HSV 感染症の医療費は、年間 30 億ドルと試算されていることから明らかなように、HSV は医学上極めて重要なウイルスである。

抗ウイルス剤開発を試みる際、ウイルスの宿主依存性の高さを考えると、ウイルス特異的な現象を標的にすることが重要である。その点、ウイルス粒子成熟過程は、ウイルス特異的現象の代表格であり、その研究の重要度は高い。HSV 粒子は、カプシド、テグメント、エンベロープといった 3 つのコンポーネントより構成されており、まず、核でウイルス DNA がカプシドにパッケージングされる。ウイルスゲノムを含むカプシドは、核内膜でエンベロープを獲得し (primary envelopment)、核内外膜間 (perinuclear space) を通過して細胞質に輸送され、テグメントを獲得し、細胞質の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する (secondary or final envelopment)。しかし、核内でのカプシド構築、ゲノムパッケージング、核内膜での primary envelopment, perinuclear space への出芽過程までは比較的明らかになっているものの、その後のウイルス粒子成熟過程、例えば、テグメントやエンベロープを獲得する場に関しては不明な点が多い。

HSV 粒子成熟過程の解析は長年多くの研究者によって解析されてきた。しかし、未だに不明な点が多いという事実は、従来の研究手法では見出せないウイルス粒子成熟過程の新たな側面を明らかにする必要性を示唆している。従来、HSV 粒子成熟過程の解析は、主に固定された感染細胞を電子顕微鏡や蛍光顕微鏡で解析する手法が用いられてきた。しかし、ダイナミックな動態を示すウイルス粒子成熟過程の解析において、固定された細胞から得られる情報は限られている。よって、同一の生細胞をリアルタイムで、連続的に解析するといったイメージング技術の開発が重要である。海外においては、HSV の1つのウイルス粒子構成因子を蛍光タンパク質で標識した組み換えウイルスやウイルス粒子の異なる2つのコンポーネントの構成因子を異なる蛍光タンパク質で標識した組み換えウイルスが作製され、これらの組み換えウイルスを利用したリアルタイムイメージングによってウイルス粒子成熟過程の新たな知見が徐々に明らかにされつつある。しかし、HSV 粒子は3つのコンポーネントより構成されているので、一連のウイルス粒子成熟過程を解析するためには、カプシド、テグメント、エンベロープの構成因子を異なる3つの蛍光タンパク質で標識した組み換えウイルスを作製し、それを利用したリアルタイムイメージング系を確立することが必須である。

本研究では、ウイルス粒子の3つのコンポーネントの構成因子を異なる3つの蛍光タンパク質で標識した組換えウイルスを作製し、それを利用したリアルタイムイメージングによってウイルス粒子成熟過程の新たな知見を見いだした。

3色の蛍光を発する組み換え HSV-1 の作製

本研究では、リアルタイムイメージングによってウイルス粒子成熟過程の新たな知見を明らかにするため、相同組み換え法を利用して、カプシドタンパク質である UL35 遺伝子産物 VP26 に蛍光タンパク質 VenusA206K を、テグメントタンパク質である UL49 遺伝子産物 VP22 または UL47 遺伝子産物 VP13/14 に mRFP1 を、エンベロープタンパク質である UL27 遺伝子産物 glycoprotein B(gB)に ECFPA206K を融合させた組み換えタンパク質を発現するウイルス YK608 と YK609 を作製した。YK608, YK609 の親株には、野生株と同様の性状を有し、BAC システムにより、ウイルスゲノムに容易に変異を導入できる YK304 を使用している。そのため、YK608, YK609 は、BAC システムにより、ウイルスゲノムに容易に変異を導入することができる。

サザンブロッティング法、ウエスタンブロッティング法により、感染細胞内で正しく組み換えが行われ、目的のタンパク質が発現し、目的のウイルスが作製されたことを確認した。

YK608, YK609 の培養細胞での増殖効率を検討するため、アフリカミドリザル腎細胞株である Vero 細胞に YK608, YK609 を感染させ、経時的に細胞から産生されたウイルスを回収し、プラークアッセイを行った。その結果、YK608 の増殖効率は野生株と比べて若干低下するものの、同様のパターンで増殖することが確認された。一方、YK609 の増殖効率は野生株の 1/100 程度であった。

次に、YK608 及び YK609 感染細胞内の各ウイルスタンパク質の挙動を解析するため、共焦点レーザー顕微鏡を用いたリアルタイムイメージングを行った。その結果、カプシドタンパク質 VP26、テグメントタンパク質 VP22、エンベロープタンパク質 gB さらにテグメントタンパク質 VP13/14 の細胞内局在は、過去の報告と同様であることが確認された。このことから、組換え HSV を感染させた同一の生細胞において、各ウイルス粒子構成タンパク質の発現および局在を経時的に観察するリアルタイムイメージングが可能であることが明らかになった。次に、YK608 感染細胞の培

養上清からウイルス粒子を回収して精製し、共焦点レーザー顕微鏡下で観察した。その結果、HSV-1 野生株に関する過去の報告と同様に、YK608 感染細胞の上清からもカプシドタンパク質、テグメントタンパク質、エンベロープタンパク質を同時に有する成熟粒子と、テグメントタンパク質とエンベロープタンパク質のみから構成される Light-particle の存在が確認された。そして、成熟粒子と Light-particle の、全ウイルス粒子に対する割合は、野生株のものと同様であった。以上のことから、組み換えウイルス YK608 を使用することで、1 ウイルス粒子レベルの観察が可能であることが明らかとなった。

組み換えウイルスの新規抗ウイルス剤開発への応用

本リアルタイムイメージング系は、作製されたウイルスの増殖効率が野生株と比べて若干低下するという点を考慮しても、ウイルス粒子成熟過程を解析するための非常に有用なツールであることが示唆された。また、本系は、新しい抗ウイルス剤の開発への応用といった様々な可能性を秘めている。YK608 感染細胞に、HSV の増殖を抑制する薬剤を添加した結果、各ウイルスコンポーネントの発現量や細胞内局在が、薬剤非添加の場合と比べ、明らかに異なった。すなわち、本系はウイルス粒子成熟過程を標的とした抗ウイルス剤の開発に応用可能であることが示唆された。本系とハイコンテツリアルタイムイメージングシステムを利用した場合、多サンプルのイメージ画像を短時間で解析することが可能であるため、High-throughput なスクリーニング系も構築可能であると考えられる。本系は「ウイルス粒子の3つのコンポーネントを異なる蛍光タンパク質で標識した組換えウイルス」として特許出願中である（特願 2006-318534）。

YK608 を用いた HSV-1 の新規感染現象の発見

理想的な組み換えウイルスである YK608 が作製されたことを受け、HSV-1 の新規感染現象を発見しようと試みた。YK608 を感染させた Vero 細胞を、共焦点レーザー顕微鏡にて詳細に撮影した結果、カプシドタンパク質 VP26、テグメントタンパク質 VP22、エンベロープタンパク質 gB の3つの異なるウイルス粒子構成タンパク質が同時に集積する細胞質内コンパートメントを発見し、これを assembly sites と呼称することにした。assembly sites は、cos-1, HeLa, HeP2, HEL, RSC など、解析したほぼすべての細胞株で形成されることが観察された。網羅的に撮影した感染細胞像を3次元立体構築したところ、assembly sites は感染細胞の基底面付近に形成されることが明らかになった。この assembly sites に実際にウイルス粒子が集積しているかどうか、また、HSV-1 野生株である F 株の感染細胞においても assembly sites が形成されるかどうか検証するため、電子顕微鏡解析を行った。その結果、感染細胞の基底面付近にカプシドや膜構造、小胞、ウイルス粒子が集積する構造が複数観察された。以上より、HSV-1 感染細胞の基底面に複数の assembly sites が誘導されるという新規感染現象が明らかになった。

ウイルス粒子構成タンパク質の輸送形態の解析

HSV-1 の粒子成熟過程のこれまでの解析により、細胞質でテグメントタンパク質を付着させ、膜オルガネラでエンベロープタンパク質を獲得する、と考えられている。assembly sites では、テグメントタンパク質とエンベロープタンパク質の局在がほぼ完全に一致することから、テグメントタンパク質とエンベロープタンパク質が同時に輸送されている可能性が考えられた。そのため、リアルタイムイメージング系を利用して、同一の細胞を1時間ごとに撮影し、assembly sites の形

成過程を解析した。その結果、テグメントタンパク質とエンベロープタンパク質がまず同時に集積し、遅れてカプシドタンパク質が集積する様子が観察された。この結果により、テグメントタンパク質とエンベロープタンパク質が同じ小胞に乗って輸送され、カプシドタンパク質は別の機構によって assembly sites に集積するということが示唆された。

trans-Golgi Network は、HSV-1 の最終エンベロープ獲得の場である

assembly sites の形成という新規感染現象を利用して、HSV 粒子成熟過程の解明を試みた。従来、免疫染色や電子顕微鏡解析、イメージング技術を駆使した解析により、trans-Golgi Network(TGN) や後期エンドソームが HSV-1 の粒子形成に関与しているということが示唆されてきたが、決定的な報告はされていない。そこで、カプシドタンパク質、テグメントタンパク質、エンベロープタンパク質の3つのコンポーネント全てが集積している assembly sites が誘導されるオルガネラが、HSV-1 最終エンベロープ獲得の場であると考えられ、そのオルガネラを同定することを試みた。

YK608 を Vero 細胞に感染させ、免疫染色を行ったところ、cis-Golgi のマーカーである GM130、cis-medial-trans-Golgi のマーカーである Golgi58K、Golgi のマーカーである α -mannosidase II、初期エンドソームのマーカーである EEA1、後期エンドソームのマーカーである CD63 は assembly sites とは特異的に共局在しなかった。唯一、TGN のマーカーである TGN46 が、assembly sites と完全に共局在した。つまり、assembly sites は、Golgi ではなく、TGN にのみ誘導されることが明らかになった。この結果が野生株でも同様であることを証明するため、HSV-1(F)を Vero 細胞に感染させ、免疫染色を行った。その結果、感染細胞の基底面において gB と TGN46 が完全に共局在し、野生株でも assembly sites は TGN に誘導されることが明らかになった。また、HSV-2 感染細胞でも同様の解析を行ったところ、HSV-2 感染細胞の基底面には小規模の assembly sites が形成され、核の周辺にウイルスタンパク質と TGN が強く集積することが明らかになった。以上のことから、TGN が HSV の成熟粒子形成の場であることが強く示唆された。

assembly sites の形成は HSV-1 の最適な増殖に重要な役割を果たす

assembly site の形成が、HSV-1 の増殖にどのような影響を与えるか検討するため、assembly site の形成を阻害するような薬剤を探索した。その結果、モネンシンが assembly site の形成を阻害することが明らかとなった。そして、モネンシンを HSV-1(F)感染細胞、YK608 感染細胞に添加し、ウイルス産生量を解析した。その結果、モネンシンの添加量が増加すると、ウイルス産生量が低下し、assembly site の形成率も低下した。つまり、モネンシン処理による assembly site の消失とウイルス粒子産生量の低下は相関していた。一方、モネンシン処理は細胞の生存率には影響を及ぼさなかった。以上の結果より、assembly site は、HSV-1 粒子形成の場として機能的役割を果たしていることが示唆された。

本研究は、杉本研が筆頭著者の以下の論文として Journal of Virology に掲載された。

'Simultaneous tracking of capsid, tegument, and envelope protein localization in living cells infected with triply fluorescent herpes simplex virus 1. (J. Virol. 82:5198-5211, 2008). さらに、HSV-1 最終エンベロープ獲得の場に関して、現在までの最良の証拠を提示するものとして、Journal of Virology の SpotLight に紹介された(J. Virol. 82:5117, 2008)。