

氏 名 (生年月日) いけ だ ま り な
池 田 葉 莉 那 (1992 年 6 月 8 日)

学 位 の 種 類 博 士 (薬 学)

学 位 記 番 号 博 薬 第 201 号

学位授与の日付 2021 年 3 月 20 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当

学 位 論 文 題 目 単純ヘルペスウイルス 1 型感染により亢進するユビキチン活性化酵素
UBE1a のユビキチン化修飾とその抗ウイルス活性

論 文 審 査 委 員 (主査) 教 授 藤 室 雅 弘

(副査) 教 授 斎 藤 博 幸

(副査) 教 授 高 田 和 幸

論 文 内 容 の 要 旨

序章

可逆的な翻訳後修飾の 1 つであるユビキチン (Ub) 化修飾は、E1、E2、E3 の 3 つの酵素群による連続的な反応により触媒される。Ub 化はモノ Ub 化とポリ Ub 化があり、ポリ Ub 鎖には複数の結合様式がある。この結合様式の違いにより、Ub 化タンパク質は 26S プロテアソームを介した分解、局在変化や他のタンパク質への作用など様々な変化を起こすことが知られている。半数以上の生体内のタンパク質が Ub 化修飾を受けると考えられており、その標的タンパク質の多様性は、約 50 種類ある E2 と約 1,000 種類ある E3 が生み出している。一方で、E1 は UBE1 と UBE1L2 の 2 種類のみ同定されており、UBE1 がほぼ全ての Ub 化反応を開始させる役割をもつと考えられている。近年、いくつかのウイルスは Ub 化修飾をウイルス複製や感染の成立に利用しているとの報告がある。単純ヘルペスウイルス (HSV-1) は日本人の約 60%が潜伏感染しており、ヒトに口唇ヘルペスや脳炎など様々な疾患をもたらす。HSV-1 の遺伝子発現はカスケード状に厳格に制御されており、発現時期により前初期 (immediate early: IE)、初期 (early: E)、後期 (Late: L) 遺伝子に分類される。IE 遺伝子にはウイルス増殖において有利な宿主環境を整えるタンパク質が複数含まれる。なかでも ICP0 は Ub 化修飾の E3 活性を有し、宿主免疫回避を行う。E 遺伝子にはウイルス DNA 複製関連タンパク質、L 遺伝子にはウイルスの構造タンパク質が含まれる。これらのタンパク質は、核内のレプリケーションコンパートメント (RC) 内でウイルス DNA 複製、カプシド形成、ゲノムパッケージングを行う。さらに RC の近傍には、Ub やプロテアソームが含まれる VICE (virus-induced chaperone-enriched) ドメインが存在し、ウイルス増殖過程で生じる新生タンパク質のリフォールディングや分解を行うと考えられている。このように、HSV-1 感染と Ub 化修飾は密接しているが、その全貌は不明である。

本研究では、HSV-1 感染時に複数のタンパク質の Ub 化・脱 Ub 化が惹起し、さらに Ub 化修飾の開始反応を担う UBE1a が HSV-1 感染後モノ Ub 化修飾を受けることを明らかにした。そこで、UBE1a に対する Ub 化修飾の生理学的意義を明らかにした。

第 1 章 HSV-1 感染により亢進する UBE1a の Ub 化は UBE1a 自身の酵素活性を増大する

HSV-1 感染時における Ub 化タンパク質の同定を MS 解析により行ったところ、HSV-1 感染により UBE1 のモノ Ub 化が亢進することを見出した。UBE1 には 2 つのアイソフォームとして、核局在の

UBE1a 及び細胞質局在の UBE1b が存在する。いずれのアイソフォームも Ub 化修飾を受けるが、HSV-1 感染によりモノ Ub 化が亢進するアイソフォームは UBE1a であった。さらに Ub 化修飾を受けるアミノ酸残基の同定ため、Ub 化 UBE1a の精製、およびプロテオームデータベースより候補残基の選出を行い、変異体 UBE1a を用いたプルダウンアッセイを行った。双方の結果より、604 番目の Lys が UBE1a の Ub 化修飾部位であることを明らかにした。この Ub 化修飾部位は広く真核生物において保存されていた。次に、Ub 化修飾が与える UBE1a の酵素活性に対する影響を解析した。モノ Ub 化を受けた UBE1a は自身の酵素活性が増大していた。

第2章 UBE1a はウイルス増殖を抑制する

UBE1 が HSV-1 感染においてウイルス増殖に寄与するのか、それとも抗ウイルス応答に寄与するのか明らかにするため、UBE1 阻害剤である PYR-41 がウイルス複製に与える影響を調べた。その結果、PYR-41 処理細胞ではウイルス増殖が有意に亢進した。さらに UBE1 ノックダウン細胞でも同様の結果が得られた。以上より、UBE1 はウイルス増殖を抑制している可能性が示された。次に、UBE1a とウイルスタンパク質について免疫染色法により観察を行った結果、HSV-1 感染細胞では UBE1a 発現量にばらつきが現れ、UBE1a 発現量を指標に強弱の 2 グループに分けると、UBE1a 高発現細胞ではウイルスカプシドタンパク質 ICP5 の発現が低下しており、UBE1a 低発現細胞では ICP5 発現が上昇していた。つまり、UBE1a と ICP5 の発現は負の相関関係を示した。一方、UBE1a の総発現量は感染直後から感染後期を通して変化はなかった。さらに、PYR-41 処理細胞および UBE1 ノックダウン細胞では、有意に ICP5 の発現量が増加したことから、UBE1 が ICP5 の発現を抑制していることを明らかにした。次に、UBE1a の高発現細胞を模して UBE1a 定常発現細胞における ICP5 の総発現量を解析すると、UBE1a 定常発現細胞では ICP5 のタンパク質レベルでの発現量が減少していた。

ウイルスタンパク質 ICP27 は、VICE ドメイン形成に必須のタンパク質であり、ICP5 の mRNA の細胞質移行を正に制御するとの報告がある。UBE1a と ICP27 の部分的な共局在が観察されていることから、UBE1a と ICP27 の共局在が ICP5 の発現量調節を行っているのではないかと仮説を立てた。そこで RC や VICE ドメインの観察に用いられている *in situ* extraction 法を用いて観察を行った。その結果、UBE1a と ICP27 は、RC 上ではなく、VICE ドメイン上で部分的に共局在していた。また、プルダウンアッセイ法により UBE1a と ICP27 と結合について確認した。興味深いことに、PYR-41 処理により、UBE1a と ICP27 の部分的な共局在は解消された。以上より、UBE1a による ICP5 の発現抑制は ICP27 との結合に寄与していることが示唆された。

第3章 UBE1a の Ub 化は UBE1 の抗ウイルス活性に関与する

HSV-1 感染により UBE1a は Ub 化修飾され、UBE1a 自身の酵素活性を亢進させること、また UBE1 はウイルス増殖を抑制することを明らかにした。そこで、Ub 化された UBE1a は、ウイルス増殖にどのような影響を及ぼすのか解析を行った。野生型 UBE1a と 604 番目の Lys を Ala に置換した変異体 UBE1a (UBE1a K604A) を定常発現させた HeLa 細胞をそれぞれ樹立し、ウイルス増殖に対する影響を調べた。その結果、野生型 UBE1a ではウイルス増殖が抑制されたが、UBE1a K604A ではウイルス増殖が抑制されず、ICP5 の発現も UBE1a K604A 存在下において抑制されなかった。そこで、野生型 UBE1a と K604A 定常発現細胞における ICP5 の mRNA 量を比較すると、UBE1a K604A では ICP5 の発現が有意に上昇していた。以上より、UBE1a の Ub 化修飾は、UBE1a のウイルス増殖を抑制し、そのメカニズムは UBE1a による ICP5 の mRNA の発現抑制であった。

総括

UBE1a の 604 番目の Lys がモノ Ub 化修飾されており、HSV-1 感染により亢進する。UBE1a のモノ Ub 化修飾は、抗ウイルス応答因子として機能し、HSV-1 複製阻害や ICP5 の発現を抑制する。本研究では、モノ Ub 化修飾の新たな標的タンパク質を受ける UBE1a を同定しただけでなく、UBE1a に対するモノ Ub 化修飾が UBE1a 自身の活性化および抗ウイルス活性の発現に関与していることを新たに提示した。今後の更なる詳細な分子機構の解析により、UBE1a の Ub 化を介した新しい抗ウイルス治療法開発の一助となることが期待される。

審査の結果の要旨

《緒言》

ユビキチン (Ub) 化修飾は、E1、E2、E3 の 3 つの酵素群による連続的な反応により触媒される。Ub 化修飾は、プロテアソームによる分解誘導、局在変化、他分子との相互作用など、修飾を受けた分子に様々な変化を起こす。近年、ウイルスは Ub 化修飾をウイルス複製や感染の成立に利用しているとの報告が多数なされている。一方で、ヒトの免疫系は Ub 化修飾やプロテアソーム分解により制御されていることも知られている。単純ヘルペスウイルス 1 型 (HSV-1) は日本人の約 60% が潜伏感染しており、ヒトに口唇ヘルペスや脳炎など様々な疾患をもたらす。本研究では、HSV-1 感染時に E1 酵素の UBE1a がモノ Ub 化修飾を受けることを見出し、その生理学的意義を解析した。

《審査結果の要旨》

- (1) HSV-1 感染により亢進する UBE1a の Ub 化は UBE1a 自身の酵素活性を増大する

HSV-1 感染時に変化する Ub 化タンパク質の探索と同定を行った結果、HSV-1 感染により UBE1a のモノ Ub 化が亢進することを見出した。さらに、604 番目の Lys が UBE1a の Ub 化修飾部位であること、モノ Ub 化を受けた UBE1a は自身の酵素活性が増大することを明らかにした。

- (2) UBE1a はウイルス増殖を抑制する

UBE1 が HSV-1 感染においてウイルス増殖に寄与するのか、それとも細胞側の抗ウイルス応答に寄与するのかを解析した。UBE1 阻害剤である PYR-41 と UBE1 標的の shRNA 発現レトロウイルスベクターを用いて、UBE1 抑制がウイルス複製に与える影響を調べた。その結果、UBE1 はウイルス増殖を抑制していることを見出した。さらに、UBE1a 高発現細胞ではウイルスタンパク質 ICP5 の発現が低下しており、UBE1a 低発現細胞では ICP5 発現が上昇していたことから、UBE1a が ICP5 の発現を抑制していることが示された。

HSV-1 の ICP27 は、ICP5 の mRNA の細胞質移行を促進することが報告されている。そこで、UBE1a と ICP27 の細胞内局在を解析した結果、UBE1a と ICP27 は Ub やプロテアソームが含まれる VICE ドメイン上で部分的に共局在し、相互作用していた。以上の結果より、UBE1a と ICP27 との結合が UBE1a による ICP5 発現抑制に関与することが示された。

- (3) UBE1a の Ub 化は UBE1 の抗ウイルス活性に関与する

Ub 化された UBE1a は、ウイルス増殖にどのような影響を及ぼすのかを Ub 化サイトである 604 番目の Lys を Ala に置換した変異体 UBE1 K604A を用いて解析した。その結果、UBE1a の Ub 化修飾は、ICP5 の mRNA の発現抑制を介してウイルス増殖を抑制することが示された。

なお、副査と主査からのコメントと質疑に対して、申請者は本論文に追加の記述や考察を加える、過大な解釈を訂正する、表現を訂正する、詳細な条件を追記する等により、本論文を適切に修正した。

《審査の結論》

本研究により、UBE1a の 604 番目 Lys がモノ Ub 化修飾されること、また、それが HSV-1 感染により亢進することが明らかにされた。さらに、UBE1a のモノ Ub 化修飾は、細胞側の抗ウイルス応答として機能し、HSV-1 複製阻害や ICP5 の発現抑制に関与していた。本研究成果は、モノ Ub 化修飾を受ける新たな標的タンパク質として UBE1a を同定しただけでなく、UBE1a に対するモノ Ub 化修飾が UBE1a 自身の活性化および抗ウイルス活性の発現に関与していることを翻訳後修飾の研究領域に新たに提示した。

学位論文とその基礎となる報文の内容を審査した結果、本論文は博士（薬学）の学位論文としての価値を有するものと判断する。