

プロテアソーム阻害剤は HSV-1 感染が惹起する ERK シグナル抑制を  
阻害することで抗ウイルス活性を発揮する

2021 年度  
京都薬科大学大学院 課程博士学位論文  
【薬学】細胞生物学分野  
石丸 華子

# 課程博士学位論文 内容の要旨

## 序章

単純ヘルペスウイルス 1 型(HSV-1:Herpes simplex virus 1)は $\alpha$ ヘルペス亜科に属す DNA ウィルスである。日本における成人健常人の 5 割以上が HSV-1 感染者であるといわれている。HSV-1 は、宿主細胞に吸着・侵入した後、細胞内でウィルス遺伝子を発現する。細胞内でウィルスゲノムが複製されウィルスタンパク質が産生されると、子孫ウィルス粒子が組立てられ細胞から出芽する。HSV-1 は三叉神経に潜伏感染するが、宿主の免疫低下や紫外線暴露により再活性化し様々な病態を引き起こす。HSV-1 は口唇ヘルペスや角膜ヘルペス、ヘルペス脳炎の原因となる。現在、HSV-1 感染症に対する治療薬としてアシクロビル、バラシクロビルなどが使用されているが、腎毒性や精神神経症状などの副作用や薬物耐性ウィルスの出現などの問題を有している。

多くのウィルスは感染成立や複製のために宿主やウィルス性のプロテアーゼを利用することが知られている。ウィルスカプシドやスパイクなどの構造タンパク質の成熟や活性化にプロテアーゼ活性は必須とされている。事実、HIV や C 型肝炎ウィルス感染ではこれらのプロテアーゼ阻害剤が抗ウィルス薬として用いられている。しかし、HSV-1 感染におけるプロテアーゼの役割は不明な点が多く残されていた。本研究ではプロテアソーム阻害剤が HSV-1 の増殖を抑制することを見出し、その作用機序解析を行った。

第 1 章 プロテアソーム活性は HSV-1 の感染に必要である。

HSV-1 の感染や増殖にプロテアーゼを利用するか否かプロテアーゼ阻害剤を用いて解析した。プロテアーゼ阻害剤としてキモトリプシン様酵素阻害剤 TPCK、トリプシン様酵素阻害剤 TLCK、システインプロテアーゼ阻害剤 E64d、プロテアソーム阻害剤 MG132 およびボルテゾミブを使用した。HSV-1 感染および増殖阻害効果をプラークリダクションアッセイにより評価した。その結果、MG132 およびボルテゾミブが感染により形成されるプラーク数を減少させた。ポリペプチド性阻害剤の MG132 は 20S プロテアソームの活性部位である Thr 残基に結合しプロテアソーム活性を阻害する。これら結果からプロテアソーム活性がウィルス感染、または増殖に必要であることが示唆された。次に、MG132 が感染の初期ステップであるウィルスの吸着・侵入を阻害するか解析した。その結果、MG132 は吸着、侵入ともに影響を与えなかった。そこで、MG132 がウィルス性遺伝子の発現に影響を与えるか否か、RT-qPCR にて解析した。その結果、ウィルスの前初期遺伝子(Us12)および後期遺伝子(UL19)の発現を MG132 が阻害した。次に、ウィルスゲノムの複製量とウィルス産生量を qPCR 法により評価した。その結果、MG132 を処理した感染細胞内でウィルスゲノムの複製量は 20%減少し、細胞上清中のウィルス産生量を 10%以下に抑制した。さらに、MG132 処理によりウィルス前初期遺伝子産物(ICP27)および後期遺伝子産物(ICP5)の発現が抑制した。これら結果から、MG132 はウィルスの侵入以降、かつウィルス前初期遺伝子発現の間のプロセスを阻害することでウィルス増殖を抑制することが示された。すなわち、ウィルスは細胞に侵入後遺伝子発現に至るまでの過程で宿主のプロテアソームを利用することが示唆された。

第 2 章 MG132 は HSV-1 感染による ERK 抑制をキャンセルし抗ウィルス活性を発揮する。

HSV-1 の感染時には、様々な細胞内シグナル伝達が活性化・不活化することが報告されている。そこで、MG132 存在下での HSV-1 感染におけるシグナル伝達の変動を解析した。その結果、細胞増殖や分化に関与する ERK シグナルの ERK のリン酸化が HSV-1 感染により抑制され、さらに MG132 処理によりこの ERK 抑制がキャンセルされた。さらに、NF- $\kappa$ B シグナルの抑制分子である I $\kappa$ B $\alpha$  が HSV-1 感染により不安定化し、MG132 によりこの I $\kappa$ B $\alpha$  不安定化がキャンセルされた。次に、感染による ERK シグナル抑制および NF- $\kappa$ B シグナル活性化が HSV-1 感染に必要な否か、ERK シグナル阻害剤(PD98059)および NF- $\kappa$ B シグナル阻害剤(BAY11-7082)を用いてプラークアッセイにより検証した。その結果、BAY11-7082 処理は HSV-1 感染でのプラーク数およびプラーク径に影響を与えなかったが、PD98059 処理は HSV-1 感染のプラーク径を増大した。さらに PD98059 処理により、感染細胞内のウイルスゲノム複製量は約 10 倍増加した。つまり、HSV-1 感染時の ERK シグナル抑制はウイルス増殖に必要であることが示された。

第 3 章 MG132 は HSV-1 感染により誘導される Ras-GRF2 のプロテアソーム分解を抑制することで抗 HSV-1 活性を発揮する。

HSV-1 感染が ERK シグナルのどの因子に作用して、シグナルを抑制するのか明らかにするため、ERK シグナルの上流分子である EGFR、FGFR、Ras-GRF2 の発現量および下流分子である c-Raf、MEK1/2、ERK1/2、p90RSK のリン酸化について解析した。その結果、HSV-1 感染前後で EGFR、FGFR の発現量に変化はなかったが、Ras-GRF2 (Ras-グアニンヌクレオチド放出因子 2) が HSV-1 感染により発現量が低下し、MG132 処理によりこの Ras-GRF2 発現低下がキャンセルされた。さらに、HSV-1 は Ras-GRF2 の下流分子である c-Raf、MEK1/2、ERK1/2、p90RSK のリン酸化を抑制した。そして MG132 はこれらウイルスによる一連のリン酸化抑制をキャンセルした。GEF (Guanine ヌクレオチド交換因子) に属す Ras-GRF2 は Ras の活性化因子であり、ERK シグナルを活性化する。また、Ras-GRF2 はポリユビキチン化修飾を受けプロテアソームで分解されることが知られている。そこで Ras-GRF2 のポリユビキチン化修飾を免疫沈降法により解析した結果、HSV-1 は感染時に Ras-GRF2 のポリユビキチン化修飾を惹起した。以上より、HSV-1 は感染時にプロテアソーム分解に必要なポリユビキチン化修飾を Ras-GRF2 に付与し、Ras-GRF2 のプロテアソーム分解を亢進させることで ERK シグナルを抑制することが示唆された。

## 総括

本研究により、HSV-1 感染時の ERK シグナル抑制は HSV-1 の増殖に必要であること、また、HSV-1 は感染時に ERK シグナルの活性化因子 Ras-GRF2 のプロテアソーム分解を誘導することが示された。さらに、HSV-1 感染時の MG132 処理は Ras-GRF2 のプロテアソーム分解を阻害することで ERK シグナルを活性化し、抗 HSV-1 活性を発揮することが示された。以上の研究結果から、プロテアソーム阻害剤はアシクロビルなどの核酸代謝拮抗剤とは作用機序の異なる新しい抗 HSV-1 化合物になり得ることが示唆された。

本論文は以下の報告の内容を総括したものである。なお、図の転載については出版社より許可済みである。

1 ) Hanako Ishimaru, Kohei Hosokawa, Atsuko Sugimoto, Riho Tanaka, Tadashi Watanabe, T, Masahiro Fujimuro. MG132 exerts anti-viral activity against HSV-1 by overcoming virus-mediated suppression of the ERK signaling pathway. *Sci. Rep.* **2020**, 10, 6671.

## 略語表

Amp	Ampicillin
ANOVA	Analyses of variance
APS	Ammonium Peroxodisulfate
ATP	Adenosine triphosphate
BD	Becton Dickinson
BES	N, N-Bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethanesulfonic acid
cDNA	Complementary DNA
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic acid
Dw	Distilled water
E1	Ubiquitin-activating enzyme
E2	Ubiquitin-conjugating enzyme
E3	Ubiquitin ligase
E6AP	E6-Associated Protein
ECL	Enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGFP	Enhanced green fluorescent protein
FBS	Fetal bovine serum
GTPase	Guanosine triphosphatase
HCV	Hepatitis C virus
HECT	Homologous to the E6-AP Carboxyl Terminus
HEK293T	293T
HRP	Horseradish peroxidase
Ig	Immunoglobulin
MBL	Medical & Biological Laboratories
MHC	Major histocompatibility complex
Mini prep	Mini preparation
NEM	N-Ethylemaleimide
ns	Not significance
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride

RIPA	Radioimmunoprecipitation assay
RNase	Ribonuclease
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
S.D.	Standard deviation
SDS	Sodium dodecyl sulfate
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylene-Diamine
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethane
Tween-20	Polyoxyethylene (20) Sorbitan Monolaurate
Ub	Ubiquitin

## 試薬

Aprotinin

APS

BES

Bovain serum albumin

CaCl<sub>2</sub>

Can Get Signal<sup>®</sup> Immunoreaction Enhancer Solution

DMEM

DMSO

ECL

EDTA

HCl

Lactacystin

LB 培地

Leupeptin

MG132

NaCl

NaOH

NEM

NP-40

Pepstatin

PMSF

Protein A/G PLUS-Agarose

PureLink<sup>™</sup> HiPure Plasmid Midiprep Kit

QIAamp DNA Blood mini Kit

S-ptotein agarose

SDS

Sodium deoxycholate

Sphadex G-75

TEMED

Tris

Trypsin

Tween-20

イソプロパノール

エタノール

## 社名

ナカライテスク

ナカライテスク

同仁化学研究所

シグマアルドリッチ

ナカライテスク

東洋紡

ナカライテスク

富士フィルム和光純薬

GE ヘルスケア

ナカライテスク

富士フィルム和光純薬

ペプチド研究所

ナカライテスク

ナカライテスク

ペプチド研究所

ナカライテスク

ナカライテスク

ナカライテスク

富士フィルム和光純薬

ナカライテスク

ナカライテスク

Santa Cruz

Invitrogen

QIAGEN

Merck Millipore

ナカライテスク

富士フィルム和光純薬

Pharmacai fine chemicals

ナカライテスク

ナカライテスク

ナカライテスク

ナカライテスク

富士フィルム和光純薬

ナカライテスク

酢酸

酢酸カリウム

ニトロセルロース膜

メタノール

$\beta$ -メルカプトエタノール

ナカライテスク

ナカライテスク

富士フィルム和光純薬

富士フィルム和光純薬

富士フィルム和光純薬



## 目次

序論	1
第 1 章プロテアソーム活性は HSV-1 の感染に必要である。	4
1-1. はじめに	4
1-2. 材料と実験方法	6
1-2-1. 阻害剤調製と抗体	6
1-2-2. 細胞培養と継代	6
1-2-3. ウイルスの増殖方法	6
1-2-4. 細胞増殖アッセイ	6
1-2-5. プラークアッセイ法	6
1-2-6. HSV-1 の吸着阻害効果の評価	7
1-2-7. HSV-1 の侵入阻害効果の評価	7
1-2-8. 出芽したウイルス量の定量	7
1-2-9. 細胞内ウイルス量の定量	8
1-2-10. HSV-1 遺伝子発現の測定	8
1-2-11. ワンステップグロースカーブアッセイ法	8
1-2-12. ウェスタンブロット法	9
1-2-13. 統計処理	10
1-3. 結果	11
1-3-1. 各種プロテアソーム阻害剤の抗 HSV-1 活性評価	11
1-3-2. MG132 による HSV-1 の吸着および侵入への影響	12
1-3-3. MG132 によるウイルス複製およびウイルス性遺伝子発現の抑制	13
1-3-4. MG132 による HSV-1 タンパク質の発現抑制	14
1-3-5. MG132 によるウイルス放出の抑制	15
1-3-6. MG132 によるウイルス産生サイクルへの影響	16
1-4. 考察	17
第 2 章 MG132 は HSV-1 感染による ERK 抑制をキャンセルし抗ウイルス活性を発揮する。	18
2-1. はじめに	18
2-2. 材料と方法	21
2-2-1. 阻害剤調製と抗体	21
2-2-2. 細胞培養と継代	21
2-2-3. ウェスタンブロット法	21
2-2-4. 蛍光抗体染色と共局在解析	21
2-2-5. 培養細胞への遺伝子導入 (トランスフェクション)	22

2-2-6. レポーターアッセイ	22
2-2-7. 細胞分画	23
2-2-8. 統計解析	23
2-3. 結果	24
2-3-1. HSV-1 感染後の MG132 処理による細胞内シグナルへの影響	24
2-3-2. HSV-1 感染後 MG132 処理による NF- $\kappa$ B シグナルの挙動解析	26
2-3-3. HSV-1 感染に対する NF- $\kappa$ B シグナル活性化の影響	28
2-3-4. HSV-1 感染後 MG132 処理による ERK シグナルの挙動解析	30
2-3-5. ERK シグナル抑制による HSV-1 感染の促進	31
2-4. 考察	34
 第 3 章 MG132 は HSV-1 感染により誘導される Ras-GRF2 のプロテアソーム分解 を抑制することで抗 HSV-1 活性を発揮する。	 37
3-1. はじめに	38
3-2. 材料と方法	38
3-2-1. 阻害剤調製と抗体	38
3-2-2. 細胞培養と継代	38
3-2-3. フローサイトメトリー法	38
3-2-4. ウェスタンブロット法	38
3-2-5. 蛍光抗体染色と共局在解析	38
3-2-6. 免疫沈降	39
3-2-7. プロテアソーム活性測定法	39
3-3. 結果	40
3-3-1. HSV-1 感染による Ras-GRF2 の不安定化	40
3-3-2. HSV-1 感染による Ras-GRF2 のポリユビキチン化亢進	43
3-4. 考察	45
総括	48
結語	48
謝辞	49
参考文献	50

## 序論

単純ヘルペスウイルス 1 型 (HSV-1) は  $\alpha$  ヘルペス亜科に属する DNA ウイルスである。HSV-1 の主な感染経路は唾液を介した接触感染や飛沫感染である。HSV-1 は感染後、知覚神経節に潜伏感染し、感染者の紫外線暴露時や免疫低下時に再活性化し<sup>1)</sup>、溶解感染に移行して様々な病態を引き起こす。HSV-1 関連疾患として口唇ヘルペス、ヘルペス脳炎、無菌性髄膜炎、皮膚疾患などがあげられ、主に上半身に病態が出現する<sup>2,3)</sup>。ヘルペス脳炎はウイルス性脳炎の中で、もっとも発生頻度が高く、無治療の場合の致死率は 70~90% に達し、抗ヘルペス薬を使用しても 10~20% が死に至る。現在 HSV-1 感染症に対する治療薬は、ウイルスゲノム複製を阻害するアシクロビル(ACV)やバラシクロビル(VCV)などの核酸誘導体薬が主流である (Figure 1)。しかし、これらの薬剤は、薬物耐性ウイルス出現や副作用などの問題が提起されている<sup>4-6)</sup>。

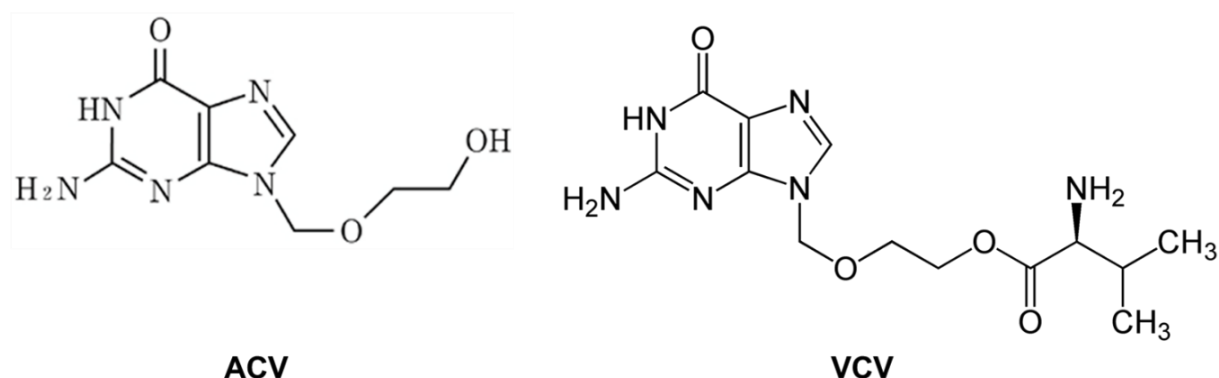


Figure 1. ACV および VCV の構造

ACV、VCV ともにグアニン誘導体であり、核酸骨格を有している。ACV は HSV のチミジンキナーゼにより ACV 一リン酸誘導体に変換される。さらに、細胞性酵素によりリン酸化され活性化体のアシクロビル三リン酸に変換される。アシクロビル三リン酸は伸長中のウイルス DNA に取り込まれ、DNA 鎖の伸長を阻害する。VCV は ACV の難吸収性を改善した ACV のプロドラッグである。肝臓や血中のエステラーゼにより VCV は代謝されることで ACV となり、ACV と同じ薬効を示す。

薬物耐性ウイルス出現のメカニズムは、ウイルスゲノムが増幅される際に一定数起こるミスコピーによって薬物の作用点に変異が入ったウイルスが出現することに起因する。今後もこれら既存薬において、多様な薬物耐性ウイルスの出現が予想されている。さらに、腎機能低下者や高齢者には腎障害や傾眠などの精神神経症状の副作用が出現しやすく、該当患者には適正使用が困難な薬剤である。現在、ウイルスゲノム複製阻害以外の作用機序を有し、かつ ACV 耐性株に効果を示す HSV-1 薬の開発が求められている<sup>7)</sup>。

HSV-1 は外径 120~200 nm の球状ウイルスで、外側から順にスパイク、エンベロープ、テグメント、カプシド、ウイルスゲノムの構造を有する。約 15 万塩基対の二本鎖線状 DNA を有し、約 80 の蛋白をコードしている。HSV-1 はウイルス粒子を産生しない潜伏感染と、ウイルス粒子を産生し細胞外へ放出する溶解感染の二つの感染様式を有する。HSV-1 は細胞膜に

吸着し侵入後、テグメントタンパク質を細胞内で放出し、カプシドが核まで到達すると脱殻を行い、ウイルスゲノムを核内に放出する。核内に運ばれたウイルスゲノムはウイルス遺伝子を発現し、ウイルスタンパク質を合成後、ウイルスゲノムの複製を行う。核内でウイルスゲノムがカプシドに封入されヌクレオカプシドが核から出芽し、さらに、トランスゴルジ網でテグメントタンパク質と一次エンベロープを獲得しウイルス粒子の組み立てが完了する。トランスゴルジ網から出芽した感染性粒子（ビリオン）は二次エンベロープに包まれエンドサイトーシス経路により細胞膜から出芽する (Figure 2)。

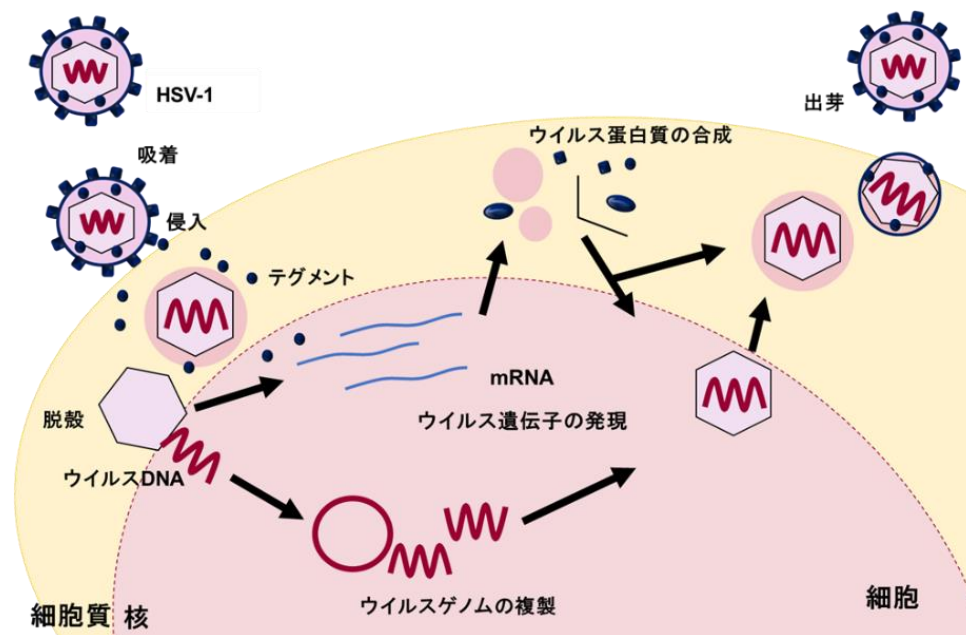


Figure 2. HSV-1 の生活環

HSV-1 がウイルス粒子産生を行う溶解感染期の生活環を示した。HSV-1 は細胞膜に吸着し侵入後、テグメントタンパク質を細胞内で放出し、カプシドが核まで到達すると脱殻を行い、ウイルスゲノムを核内に放出する。核内に運ばれたウイルスゲノムはウイルス遺伝子を発現し、ウイルスタンパク質を合成後、ウイルスゲノムの複製およびウイルス粒子の組み立てを行い、細胞を破壊して出芽する。

HSV-1 は感染の時間軸に沿って、前初期 (Immediate-Early/IE/ $\alpha$ ) 遺伝子、初期(Early/E/ $\beta$ ) 遺伝子、後期(Late/L/ $\gamma$ ) 遺伝子の 3 種類に大別されるウイルス遺伝子群を発現する。ウイルス感染直後に発現するのが前初期(Immediate-Early)遺伝子である。IE 遺伝子は、紫外線暴露や免疫低下により活性化する細胞性転写活性化因子、または、感染したウイルスから放出される転写活性化能をもつテグメントタンパク質により遺伝子発現が開始される。産生した IE 産物は転写活性化能を有し、初期遺伝子(Early)の発現を惹起する。E 遺伝子は DNA ポリメラーゼなどのウイルス DNA 複製に必要な蛋白質をコードしておりウイルスゲノムの複製を行う。そして、一部の E 産物は転写活性化能を持ち、後期(Late)遺伝子の転写を誘導しウイルス粒子の組み立てに使われるウイルス構成蛋白質の発現を誘導する。

本研究の到達目標の一つ「新規抗 HSV-1 化合物の探索」では、プロテアーゼ阻害剤に着目した。細胞内プロテアーゼは、タンパク質の分解だけでなく、シグナル伝達経路の制御、エンドサイトーシス、アポトーシス、免疫反応、ウイルス複製などにおいて重要な役割を担っている。ウイルスはウイルス性プロテアーゼを利用し、生存、免疫反応からの回避、複製、組み立て、侵入、そして出芽する<sup>8,9)</sup>。実際、HIV-1 のアスパルチルプロテアーゼや C 型肝炎の NS3/4A セリンプロテアーゼに対する阻害剤が臨床使用されている<sup>6,10)</sup>。さらに、HIV のプロテアーゼ阻害剤は KSHV や EBV のウイルス複製を阻害することが報告されている<sup>11)</sup>。また、プロテアソーム阻害剤も同様に、水痘帯状疱疹ウイルス<sup>12)</sup>、サイトメガロウイルス<sup>13,14)</sup>、KSHV<sup>15)</sup>、HSV-1<sup>16,17)</sup>の複製を抑制する。これらの報告から、プロテアーゼ阻害剤は HSV-1 薬としての新規化合物になり得ると考えた。本研究の第 1 章では 5 種類のプロテアーゼ阻害剤の抗 HSV-1 活性を評価し、プロテアソーム阻害剤 MG132 およびボルテゾミブが抗 HSV-1 活性を有することを見出した。第 2 章、第 3 章では抗 HSV-1 活性を有する MG132 の作用機序解析を行った。

## 第1章 プロテアソーム活性は HSV-1 の感染に必要である。

### 1-1. はじめに

本研究で抗 HSV-1 活性を評価した 5 種類のプロテアーゼ阻害剤は、プロテアソーム阻害剤 MG132 (carbobenzoxymethyl-Leu-Leu-leucinal) およびボルテゾミブ、トリプシン様酵素阻害剤 TLCK (Tosyl-L-lysyl-chloromethane hydrochloride)、キモトリプシン様酵素阻害剤 TPCK (Tosyl phenylalanyl chloromethyl ketone)、システインプロテアーゼ阻害剤 E64d である (Figure 3)。

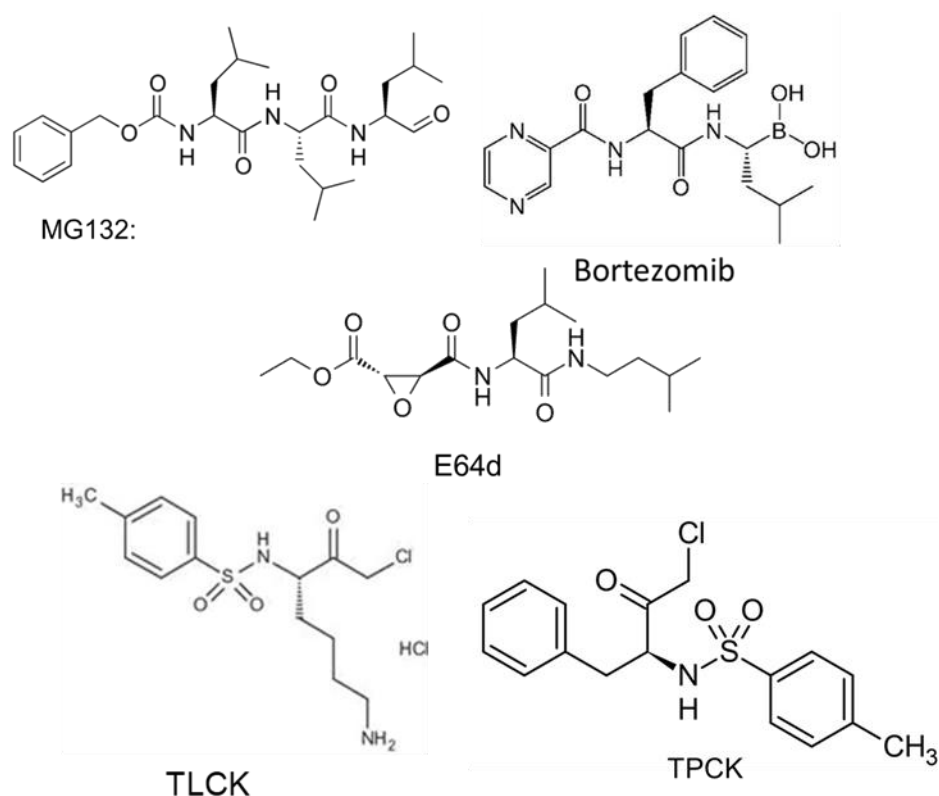


Figure 3. 抗 HSV-1 活性を評価したプロテアーゼ阻害剤の構造

各プロテアーゼ阻害剤（プロテアソーム阻害剤 MG132 および ボルテゾミブ、トリプシン様酵素阻害剤 TLCK、キモトリプシン様酵素阻害剤 TPCK、システインプロテアーゼ阻害剤 E64d）の構造を示した。各種阻害剤の作用機序については本文中に記載した。

プロテアソーム阻害剤として、MG132 およびボルテゾミブを抗 HSV-1 活性評価に使用した。MG132 は細胞膜透過性のペプチド性化合物であり、20S プロテアソームの活性部位の Thr 残基に結合し、キモトリプシン様活性を可逆的に阻害する。ボルテゾミブはプロテアソームのキモトリプシンプロテアーゼ活性を可逆的に阻害する。プロテアソームは ATP 依存性のプロテアーゼ複合体であり、選択的なタンパク質分解機能を有し、細胞生存や恒常性維持に必須な役割を担っている。プロテアソームはポリユビキチン化タンパク質の分解や免疫応答、DNA 修復に特化した生理機能を有することが知られている。26S プロテアソームはポリユビキチンが付加された標的タンパク質を認識し、選択的に分解する<sup>18)</sup> (Figure 4)。すなわち、標的タンパク質が分解されるか否かはポリユビキチンが付加されるかどうかで運命づけられる。プロテアソーム阻害剤である MG132 は 20S プロテアソームの活性部位の Thr

残基に結合し、キモトリプシン様活性を可逆的に阻害する。ボルテゾミブは、20S および 26S プロテアソームのキモトリプシン様活性を特異的に可逆的阻害剤とする。

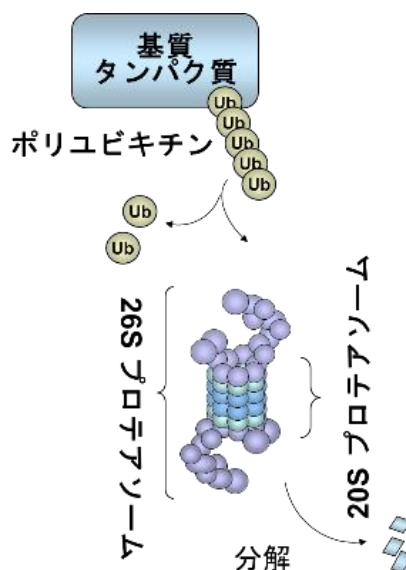


Figure 4. プロテアソームの機能

プロテアソームは ATP 依存性のプロテアーゼ複合体であり、ポリユビキチン化された標的タンパク質を認識し選択的に分解する。基質タンパク質は転写因子や細胞内シグナル伝達分子などの短寿命タンパク質および MHC クラス 1 で抗原提示されるタンパク質である。プロテアソームはポリユビキチン化タンパク質の分解や免疫応答、DNA 修復になどの生理機能を有する。

トリプシン様酵素阻害剤として TLCK、キモトリプシン様酵素阻害剤として TPCK、システインプロテアーゼ阻害剤として E64d の抗 HSV-1 活性を評価した。TLCK はトリプシンの基質である N-トシル-L-リシンエチルエステルと類似構造をもち、トリプシンの活性部位を特異的にアルキル化して不可逆的に阻害する。エンド型セリンプロテアーゼのトリプシンとトリプシン様プロテアーゼは、基質タンパク質のリジンまたはアルギニンのカルボキシル末端側のアミド結合を切断する。

TPCK はキモトリプシンおよびキモトリプシン様プロテアーゼの活性中心であるヒスチジンをアルキル化することで酵素活性を阻害する。キモトリプシンおよびキモトリプシン様プロテアーゼはエンド型セリンプロテアーゼであり、基質タンパク質の側鎖に芳香族を持つチロシンやトリプトファン、フェニルアラニンのカルボキシル末端側のアミド結合を切断する。

E64d はエポキシスクシニルペプチド構造を有し、システインプロテアーゼのカテプシン B ならびにカルパイン 1 および 2 を阻害する。システインプロテアーゼは好塩基球を活性化してアレルギー反応を引き起こすことが知られている。

本研究ではアフリカミドリザルの腎臓から分離された Vero 細胞を用いて各種プロテアーゼ阻害剤の抗 HSV-1 活性を評価した。Vero 細胞は HSV-1 に易感染性を有し、ウイルス増殖効率が低い細胞であるため、抗 HSV-1 活性評価細胞として用いた。しかし、Vero 細胞はサル由来の細胞であるため、ヒト由来細胞(HepG2 細胞、H1229 細胞、ME180 細胞、MCF7 細胞)においても同様に抗 HSV-1 活性を発揮するのか確認実験を行った。

## 1-2. 材料と方法

### 1-2-1. 阻害剤調製と抗体

TPCK、TLCK、E64d、MG132、ボルテゾミブを DMSO に溶解し、-20℃に保存した。

ウェスタンブロットで使用した抗体を以下に記す。

抗体名	会社名	カタログ番号	希釈倍率
Anti-ICP27-antibody	Santa Cruz	sc-69807	×2000
Anti-ICP5-antibody	Santa Cruz	sc-56989	×2000
Anti-β-Actin-antibody	Santa Cruz	sc-69879	×5000
Anti-UL-42-antibody	Santa Cruz	sc-53331	×2000
HRP conjugate anti-mouse IgG	GE ヘルスケア	NXA931	×3000

### 1-2-2. 細胞培養と継代

Vero 細胞、HepG2 細胞、H1299 細胞、ME180 細胞および MCF7 細胞は 10% Fetal calf serum (FCS) 含有 DMEM を用いて細胞培養を行った。培養条件は 5% CO<sub>2</sub>、37℃の条件下である。細胞の継代のため、コンフルエントになった細胞を PBS で洗浄後 1.25 mM EDTA 含有 5% トリプシン (以下トリプシン溶液)で処理し、5 分間 5% CO<sub>2</sub>、37℃の条件下でインキュベートした。トリプシン消化反応を止めるために 10% FCS 含有 DMEM を添加し、細胞を剥離した。細胞懸濁液を 15 mL チューブに回収し、1,500 rpm、2 分間室温で遠心して細胞を沈降後、上清を破棄した。再び 10% FCS 含有 DMEM で懸濁し、ディッシュまたはプレートに播種した。

### 1-2-3. ウイルスの増殖方法

感染前日に Vero 細胞を 10 cm ディッシュに 2x10<sup>6</sup>個播種し、5% CO<sub>2</sub>、37℃の条件下で培養した。次の日、血清フリーの DMEM で洗浄後 HSV-1 の HF 株(以下 HSV-1)を約 2 mL 添加し 5% CO<sub>2</sub>、37℃、30 分培養した。その後 10% FCS 含有 DMEM を 8 mL 添加後 5% CO<sub>2</sub>、37℃、48 時間培養した。培養後、細胞と上清を 15 mL チューブに回収し、3,000 rpm、5 分間室温で遠心して細胞を沈降させ、上清をウイルス液として回収した。

### 1-2-4. 細胞増殖アッセイ

96 well プレートに Vero 細胞 5x10<sup>3</sup> 個を 50 μl/well になるように 10% fetal bovine serum (FBS) を含むフェノールレッドフリーDMEM で希釈し播種した。その後、各濃度の化合物を 10% FBS フェノールレッドフリーDMEM で希釈し 50 μl/well で処理した。5% CO<sub>2</sub>、37℃の条件下で 36 時間培養後、生細胞数測定試薬 SF (ナカライデスク)を 10 μl 各 well に添加して 5% CO<sub>2</sub>、37℃の条件下で 1 時間反応後、マイクロプレートリーダーを用いて 450 nm および 620 nm(参照波長)の吸光度を測定した。

### 1-2-5. プラークアッセイ法

感染前日に Vero 細胞を 12 cm ディッシュに 2x10<sup>5</sup>個播種し、5% CO<sub>2</sub>、37℃の条件下で培養した。次の日、血清フリーの DMEM で洗浄後、100 μl あたり 150 pfu の HSV-1 を各ウェルに処理し 5% CO<sub>2</sub>、37℃の条件下で培養した。30 分間培養後、10% FCS 含有 DMEM を用いて 2 回洗浄し、各種阻害剤入りの 1% メチルセルロースを各ウェルに 1 mL 添加して 5% CO<sub>2</sub>、



37℃の条件下で培養した。48 時間培養後上清を破棄し、80% メタノールを 1 mL/well 添加し 15 分間室温で固定処理を行った。その後固定液を破棄しクリスタルバイオレットに置換後シーソー上で室温 1.5 時間放置し細胞を染色した。上清を破棄し水道水で洗浄後プレートを 1 日風乾させ、各種濃度処理時のプラーク数をカウントした。

#### 1-2-6. ウイルス吸着阻害効果の評価

感染前日に Vero 細胞を 12 cm ディッシュに  $2 \times 10^5$  個播種し、5% CO<sub>2</sub>、37℃の条件下で培養した。次の日、血清フリーの DMEM で細胞を洗浄後、4℃で 5 分間プレートを冷却して細胞膜流動性を抑制した。200 pfu HSV-1 液に MG132 を添加した各 100 µl を細胞に処理した。5℃で 30 分間プレートを冷却後、10% FCS 含有 DMEM を用いて 2 回洗浄した。洗浄後 1% メチルセルロースを各ウェルに 1 mL 添加し 5% CO<sub>2</sub>、37℃の条件下で培養した。48 時間培養後上清を破棄し、80% メタノールを 1 mL/well 添加し 15 分間室温で固定処理を行った。その後固定液を破棄しクリスタルバイオレットに置換後シーソー上で室温 1.5 時間放置し細胞を染色した。その後上清を破棄し水道水で洗浄後プレートを 1 日風乾させた。風乾後、各種濃度処理時のプラーク数をカウントした。

#### 1-2-7. ウイルス侵入阻害効果の評価

感染前日に Vero 細胞を 12 cm ディッシュに  $2 \times 10^5$  個播種し、5% CO<sub>2</sub>、37℃の条件下で培養した。次の日、血清フリーの DMEM で細胞を洗浄後、4℃で 5 分間プレートを冷却して細胞膜流動性を抑制した。100 pfu HSV-1 液を各 100 µl 細胞に処理した。5℃で 30 分間プレートを冷却し細胞にウイルスを吸着させた。ウイルス液を除去後 PBS で洗浄し MG132 を処理した細胞を 5% CO<sub>2</sub>、37℃で 30 分間培養した。細胞をクエン酸バッファーで 1 回洗浄後、2 回 PBS で洗浄した。1% メチルセルロースを各ウェルに 1 mL 添加し 5% CO<sub>2</sub>、37℃の条件下で培養した。48 時間培養後上清を破棄し、80% メタノールを 1 mL/well 添加し 15 分間室温で固定処理を行った。その後固定液を破棄しクリスタルバイオレットに置換後シーソー上で室温 1.5 時間放置し細胞を染色した。上清を破棄し水道水で洗浄後プレートを 1 日風乾させ、各種濃度処理時のプラーク数をカウントした。

#### 1-2-8. 出芽したウイルス量の定量

Vero 細胞、HepG2 細胞、ME180 細胞、MCF7 細胞を 12 cm ディッシュに  $2 \times 10^5$  個播種し、5% CO<sub>2</sub>、37℃の条件下で培養した。次の日、血清フリーの DMEM で洗浄後、MOI=1 の HSV-1 を各ウェルに処理し 5% CO<sub>2</sub>、37℃の条件下で培養した。30 分間培養後、10% FCS 含有 DMEM を用いて 2 回洗浄後、各種阻害剤入りの 10% FCS 含有 DMEM を各ウェルに 1 mL 添加し 5% CO<sub>2</sub>、37℃の条件下で培養した。24 時間培養後上清 220 µL を回収し、カプシドにパッケージされていない DNA を分解するために 10x DNase Buffer を 22 µL、及び DNase を 2 µL 添加した。その後ヒートブロックで 37℃、40 分間インキュベートすることで DNA を分解させた後、95℃で 7 分間煮沸し DNase を失活させた。その後 QIAamp DNA blood mini kit (QIAGEN)を用いてカプシド内のウイルスゲノムを抽出した。この DNA を SYBRGreen Real-time PCR Master Mix (TOYOBO)により定量した。

Table1

Real-time PCR に用いたプライマー

Gene	Forward primer (5'→3')	Revers primer (5'→3')
UL19	AACAGCCTGTACGACGTC	AACTTGGTACACACGCACGC

## 1-2-9. 細胞内ウイルス量の定量

HepG2 細胞を 12 well プレートに  $2 \times 10^5$  個/well で播種し、5% CO<sub>2</sub>、37℃の条件下で培養した。次の日、血清フリーの DMEM で洗浄後、MOI=1 の HSV-1 を各ウェルに処理し、5% CO<sub>2</sub>、37℃の条件下で培養した。30 分間培養後、10% FCS 含有 DMEM を用いて 2 回洗浄し、各種阻害剤入りの 10% FCS 含有 DMEM を各ウェルに 1 mL 添加して 5% CO<sub>2</sub>、37℃の条件下で培養した。24 時間培養後上清を破棄し PBS で細胞を 2 回洗浄した。その後 QIA amp DNA blood mini kit(QIAGEN)を用いて細胞内のウイルスゲノムを抽出し、この DNA を SYBR Green Real-time PCR Master Mix(TOYOBO)により定量した。

## 1-2-10. ウイルス遺伝子発現の測定

HepG2 細胞を 12 cm ディッシュに  $2 \times 10^5$  個播種し、5% CO<sub>2</sub>、37℃の条件下で培養した。次の日、血清フリーの DMEM で洗浄後、MOI=1 の HSV-1 を各ウェルに処理し、5% CO<sub>2</sub>、37℃の条件下で培養した。30 分間培養後、10% FCS 含有 DMEM を用いて 2 回洗浄し、各種阻害剤入りの 10% FCS 含有 DMEM を各ウェルに 1 mL 添加し 5% CO<sub>2</sub>、37℃の条件下で培養した。20 時間培養後上清を破棄し PBS で細胞を 2 回洗浄した。その後 RNAiso Plus(Takara Bio)を各ウェルに 500  $\mu$ l 添加し細胞を溶解後、chloroform を 100  $\mu$ l 添加し 15,000 rpm、4℃、15 分間遠心した。遠心後上清 160  $\mu$ l を回収し 2-propanol を 400  $\mu$ l 添加し、混和後、15,000 rpm、4℃で 15 分間遠心し、RNA を沈殿させた。遠心後上清を破棄し氷冷した 70% ethanol で洗浄後風乾し、滅菌水で溶解した。回収した RNA を ReverTra ace qPCR RT Kit を用いて逆転写を行った。試薬組成と PCR の条件は下記に記述した。逆転写反応後 cDNA を滅菌水 20  $\mu$ l を加え希釈した。この cDNA を SYBRGreen Realtime PCR Master Mix (TOYOBO)により定量した。

Table2

RT-real-time PCR に用いたプライマー

Gene	Forward primer (5'→3')	Revers primer (5'→3')
GAPDH	CATCAAGAAGGTGGTGAAGCAG	TGTCGCTGTTGAAGTCAGAGG
Us12	AGATCGTAGTGTCCGCACCG	CTTAAAGGCGTGCCGTCCG

## 1-2-11. ワンステップグロースカーブアッセイ法

HepG2 細胞を 12 cm ディッシュに  $2 \times 10^5$  個播種し、5% CO<sub>2</sub>、37℃の条件下で培養した。次の日、血清フリーの DMEM で洗浄後、MOI=1 の HSV-1 を各ウェルに処理し 5% CO<sub>2</sub>、37℃の条件下で培養した。30 分間培養後、10% FCS 含有 DMEM を用いて 2 回洗浄し、各種阻害剤入りの 10% FCS 含有 DMEM を各ウェルに 1 mL 添加した。そして 5% CO<sub>2</sub>、37℃の条件下で培養し 0、12、24 および 48 時間後に細胞上清を回収し-80℃に保存した。回収したサンプルを室温で融解させプラークアッセイ法によりプラーク数を算出しグラフを作製した。

### 1-2-12. ウェスタンブロット法

各細胞を 6 well プレートに  $4 \times 10^5$  個/well で播種し、5% CO<sub>2</sub>、37℃の条件下で培養した。次の日、血清フリーの DMEM で洗浄後、MOI=1 の HSV-1 を各ウェルに処理し 5% CO<sub>2</sub>、37℃の条件下で培養した。30 分間培養後、10% FCS 含有 DMEM を用いて 2 回洗浄し、各種阻害剤入りの 10% FCS 含有 DMEM を各ウェルに 2 mL 添加し 5% CO<sub>2</sub>、37℃の条件下で培養した。各回収時間に上清を破棄後 PBS で細胞を 2 回洗浄し 4xSDS Sample Buffer を 300  $\mu$ L/well 添加し細胞を溶解した。その後細胞溶解液に対し、出力 22%、5 秒間の超音波で細胞を破碎する処理を 3 回行い、95℃で 5 分間煮沸しウェスタンブロット用サンプルとして-20℃で保存した。

作製したサンプルを 8% ~12.5% のポリアクリルアミドゲルに添加し、SDS 泳動バッファーを用い、ミニゲル使用時は 20 mA、ワイドゲル使用時は 40 mA の定電流で泳動を行った。泳動により分離したタンパク質をゲルからニトロセルロース膜に転写した。転写方法として Wet 方式を用いて定電圧 80 V、4℃で、ミニゲルの場合 2 時間、ワイドゲルの場合は 3 時間で転写した。転写後のニトロセルロース膜に 5% スキムミルクおよび 0.1% Tween-20 含有 PBS (PBS-T) を 30 分間処理しブロッッキングを行った。PBS に希釈した 1 次抗体とニトロセルロース膜を室温で 1 時間または 4℃で 15 時間反応させた。その後その膜を 0.1% Tween-20 含有 PBS (PBS-T) で 10 分間×3 回洗浄後、HRP 結合 2 次抗体溶液にニトロセルロース膜を浸し室温で 1 時間反応させた。その膜を再び PBS-T で 10 分間×3 回洗浄後、PBS で 10 分間 ×3 回洗浄した。最後にニトロセルロース膜を ECL (Enhanced chemiluminescence) 溶液処理することで化学発光させ X 線フィルムに 12 秒~30 分間感光させた。反応が悪いときには Can Get Signal® Immunoreaction Enhancer Solution を用いて抗体を希釈した。ポリアクリルアミドゲル、SDS 泳動バッファー、トランスファーバッファー、PBS の組成を以下に記す。バンド強度を ImageJ software を用いて定量した。

#### <12.5% ポリアクリルアミドゲル>

##### Running gel

30 % アクリルアミドゲル	4.17 mL
1.5 M Tris/HCl (pH8.8)	2.5 mL
Milli Q	3.17 mL
10 % SDS	100 $\mu$ L
APS	50 $\mu$ L
<hr/>	
Total	10 mL

#### Stacking gel

30 % アクリルアミドゲル	1.66 mL
0.5 M Tris/HCl (pH6.8)	2.5 mL
Milli Q	5.62 mL
10 % SDS	100 $\mu$ L
APS	50 $\mu$ L
<hr/>	
Total	10 mL

以上の組成で混ぜた後、TEMED を 20  $\mu$ L ずつ running gel と stacking gel に加えてポリアクリルアミドゲルを作製した。

#### <SDS 泳動バッファー>

25 mM Tris  
192 mM グリシン  
0.1 % SDS

#### <トランスファーバッファー>

25 mM Tris  
192 mM グリシン  
20 % メタノール

#### <PBS>

137 mM NaCl  
2.7 mM KCl  
4.3 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$   
1.4 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$

#### <PBS-T>

137 mM NaCl  
2.7 mM KCl  
4.3 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$   
1.4 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$   
0.1 % Tween-20

#### 1-2-13. 統計処理

2 群間比較の場合、等分散であることを F 検定で判断後、等分散時 ( $p>0.05$ ) に student t 検定を用いて有意差を検定した。3 群以上の比較の場合、分散分析法として One way ANOVA を使い、検定には Dunnet 検定を用いて統計解析を実行した。統計解析ソフトは GraphPad Prism7 を使用した。得られた実験結果は平均値+標準偏差で表示した。危険率 5% 以下を統計学的に有意差があると判定した。

### 1-3. 結果

#### 1-3-1. 各種プロテアソーム阻害剤の抗 HSV-1 活性評価

HSV-1 の感染や増殖にプロテアーゼが関与するのかプロテアーゼ阻害剤を用いて解析した。プロテアーゼ阻害剤としてキモトリプシン様酵素阻害剤 TPCK、トリプシン様酵素阻害剤 TLCK、システインプロテアーゼ阻害剤 E64d、プロテアソーム阻害剤 MG132 およびボルテゾミブを使用した。HSV-1 増殖阻害効果をプラークアッセイ法により評価した。その結果、TPCK、TLCK および E64d はプラーク数を減少させなかった。一方で、ボルテゾミブは 0.025  $\mu\text{M}$  および 0.25  $\mu\text{M}$  で、MG132 は 0.75  $\mu\text{M}$  でプラーク数を減少させた。MG132 の 0.025  $\mu\text{M}$ 、0.25  $\mu\text{M}$  および 0.75  $\mu\text{M}$  を 36 時間 Vero 細胞に処理した場合の細胞生存率を評価した。MG132 は 0.025  $\mu\text{M}$ 、0.25  $\mu\text{M}$  および 0.75  $\mu\text{M}$  のいずれの濃度においても細胞毒性が 5%未満であることが明らかとなった (Figure 5)。

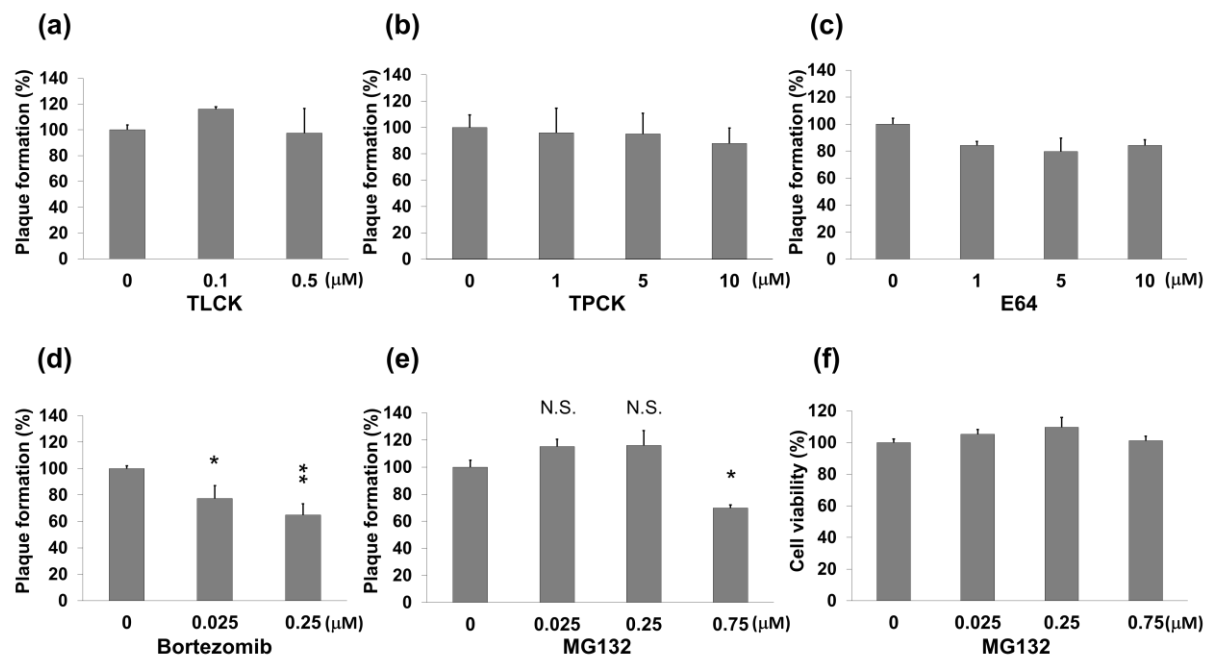


Figure 5. 各種プロテアソーム阻害剤の抗 HSV-1 活性

(a-e) TPCK、TLCK、E64d、MG132、ボルテゾミブのウイルス増殖抑制効果をプラークアッセイ法により評価した。100 pfu/well の HSV-1 を Vero 細胞に処理後、各種プロテアーゼ阻害剤を添加して 48 時間後のプラーク数を算出した。DMSO 処理時のプラーク数を 100% として相対値を示した。棒グラフは平均値+SD で表している。\*は  $p<0.05$  を\*\*は  $p<0.01$  を、N.S は有意差なしを示しており、DMSO 処理と比較した。

(f)Vero 細胞に MG132 を処理し 36 時間後の細胞生存率を測定した。(a-f) Hanako Ishimaru, et al., Sci. Rep. 2020, 10, 6671 の Figure 1 を改変。

### 1-3-2. MG132 による HSV-1 の吸着および侵入への影響

プロテアソーム阻害剤 MG132 が抗 HSV-1 活性を示したため、その作用機序解析を試みた。はじめに、MG132 が HSV-1 の吸着を MG132 が阻害するかアタッチメントアッセイ法を用いて解析した。ポジティブコントロールのヘパリンではプラーク数が減少したが、0.75  $\mu$ M の MG132 処理では大きなプラーク数の減少はみられなかった。また、MG132 が HSV-1 の侵入を阻害するかペネトレーションアッセイ法を用いて解析した。その結果、ネガティブコントロールの ACV 処理および、0.75  $\mu$ M の MG132 処理は、薬物未処理のコントロールと比較してプラーク数に変化はなかった (Figure 6)。

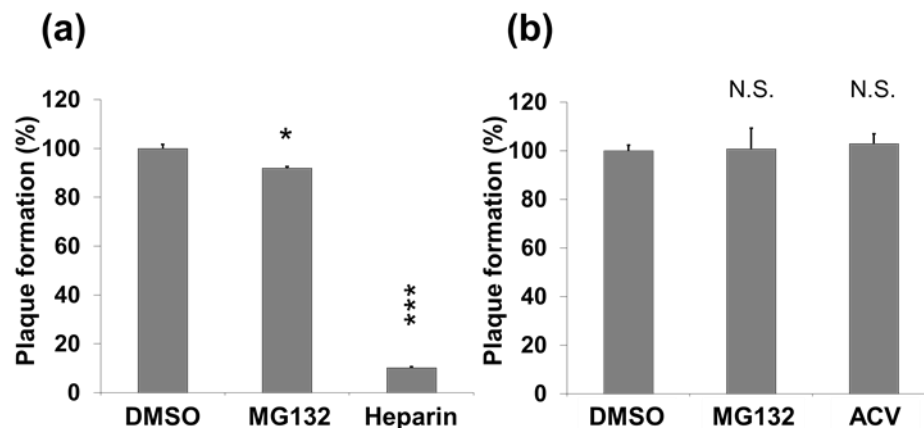


Figure 6. MG132 による HSV-1 の吸着および侵入への影響

#### (a) HSV-1 の吸着への影響

HSV-1 を 200 pfu/well で細胞に感染後、0.75  $\mu$ M の MG132 またはポジティブコントロールである 0.01 unit/mL の heparin を処理し 5°C で 30 分間プレートを冷却した。その後、細胞を洗浄し 1%メチルセルロースを添加した。48 時間培養後、細胞を固定し染色を行い各種薬剤処理時のプラーク数をカウントした。

#### (b) HSV-1 の侵入への影響

4°C で 5 分間プレートを冷却後、100 pfu/well で HSV-1 を細胞に感染させた。その後、5°C で 30 分間プレートを冷却し、ウイルス液を除去後 PBS で洗浄し MG132 または ACV を処理して 5% CO<sub>2</sub>、37°C で 30 分間培養した。培養後、細胞をクエン酸バッファーにより 1 回洗浄し、PBS で 2 回洗浄した。その後、1%メチルセルロースを添加して 48 時間培養後、細胞を固定、染色し、各種薬剤処理時のプラーク数をカウントした。

(a, b) DMSO 処理によるプラーク数を 100% として相対値を示した。棒グラフは平均値+SD で表している。\*\*\*は  $p < 0.001$  を、N.S. は有意差なしを示しており、DMSO 処理と比較した。Hanako Ishimaru, et al., Sci. Rep. 2020, 10, 6671 の Figure 2d および Figure 2e を改変。

### 1-3-3. MG132 によるウイルス複製およびウイルス性遺伝子発現の抑制

1-3-2 で MG132 は HSV-1 の吸着、侵入ともに阻害しなかったため、次に MG132 がウイルスゲノムの複製を阻害するのか解析した。HepG2 細胞に MOI=1 の HSV-1 を感染後 0.75  $\mu$ M MG132 を処理し、24 時間後の細胞内のウイルスゲノム量を real-time PCR 法により定量した。その結果、MG132 処理はウイルスゲノムの複製量を 20% 減少させた。そこで、MG132 がウイルス性遺伝子の発現に影響を与えるか否か、RT real-time PCR にて解析した。その結果、ウイルスの前初期遺伝子(Us12)および後期遺伝子 (UL19)の発現を 0.75  $\mu$ M MG132 が抑制した (Figure 7)。

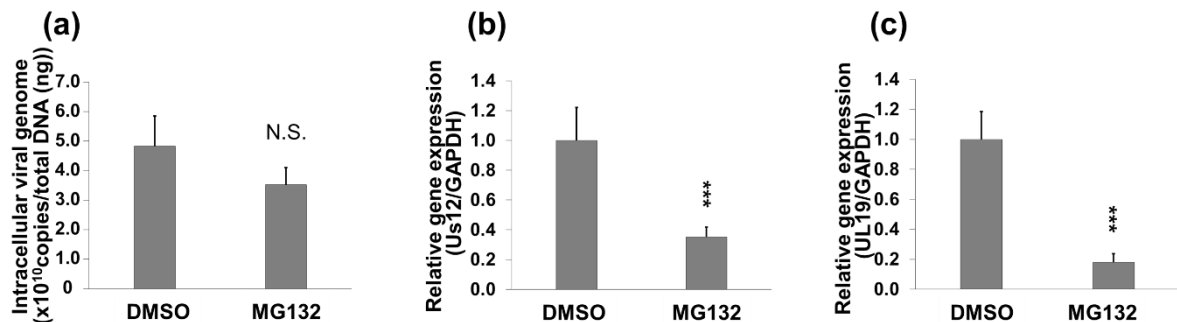


Figure 7. MG132 によるウイルス複製およびウイルス性遺伝子発現の抑制

#### (a) HSV-1 の複製抑制

MOI=1 の HSV-1 を HepG2 細胞に感染後、0.75  $\mu$ M MG132 入りの 10%FCS 含有 DMEM を各ウェルに 1 mL 添加し 5% CO<sub>2</sub>、37°C の条件下で培養し 24 時間培養後細胞内のウイルスゲノムを抽出後し real-time PCR 法を用いてウイルスゲノムを定量した。

#### (b, c) HSV-1 の遺伝子発現抑制

MOI=1 の HSV-1 を HepG2 細胞に感染後、0.75  $\mu$ M MG132 入りの 10%FCS 含有 DMEM を各ウェルに 1 mL 添加し 5% CO<sub>2</sub>、37°C の条件下で培養し、20 時間培養後、細胞内の mRNA を抽出後し RT real-time PCR 法を用いて各遺伝子発現量を測定した。DMSO 処理時の値を 1 としして相対値を示した。

(a-c) 棒グラフは平均値+SD で表している。\*\*\*は p<0.001 を、N.S は有意差なしを示しており、DMSO 処理と比較した。Hanako Ishimaru, et al., Sci. Rep. 2020, 10, 6671 の Figure 3 (f-h) を改変。

#### 1-3-4. MG132 による HSV-1 タンパク質の発現抑制

MG132 が HSV-1 タンパク質発現を阻害するのか Vero 細胞、HepG2 細胞および H1299 細胞の 3 種類の細胞を用いて解析した。Vero 細胞に HSV-1 を MOI=1 のウイルス量で感染後、MG132 を 0.025、0.25、0.75  $\mu\text{M}$  処理し 0.4、12、24、36 時間後にサンプルを回収した。IE 遺伝子産物である ICP27 および L 遺伝子産物である ICP5 の発現量を解析した結果、MG132 処理により ICP27 および ICP5 の発現量が低下した (Figure 8a)。次に HepG2 細胞に HSV-1 を MOI=1 のウイルス量で感染後 MG132 を 0.3  $\mu\text{M}$  処理し、18、21 時間後にサンプルを回収した。E 遺伝子産物である UL42 および L 遺伝子産物 ICP5(L) の発現量を解析した。その結果、MG132 処理により UL42 および ICP5 の発現量が低下した (Figure 8b)。さらに、H1299 細胞に HSV-1 を MOI=1 のウイルス量で感染後 MG132 を 0.3  $\mu\text{M}$  処理し、15、18、21 時間後にサンプルを回収した。E 遺伝子産物である UL42 および L 遺伝子産物 ICP5(L) の発現量を解析した。その結果、MG132 処理により UL42 および ICP5 の発現量が低下した (Figure 8c)。

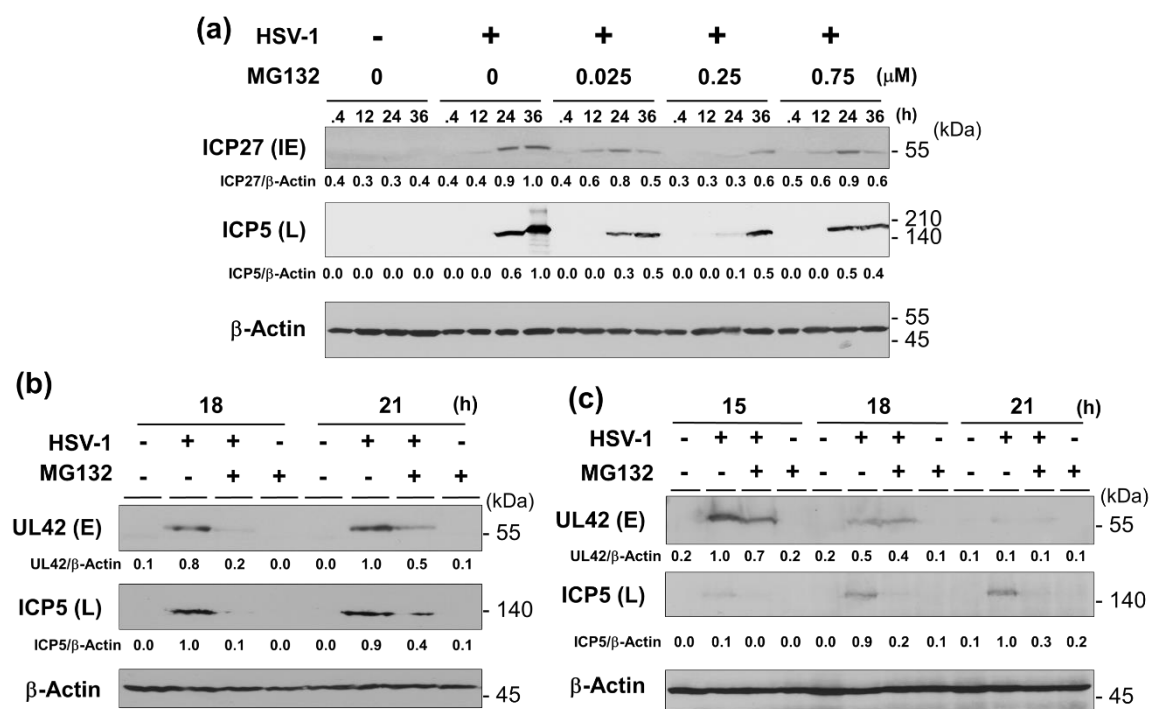


Figure 8. MG132 による HSV-1 タンパク質の発現抑制

(a)Vero 細胞、(b)HepG2 細胞、(c)H1299 細胞に MOI=1 の HSV-1 を感染後、各種阻害剤入りの 10% FCS 含有 DMEM を各ウェルに 1 mL 添加し、5% CO<sub>2</sub>、37°C の条件下で培養し、0.4、12、18、21、24、36、24 時間後に細胞を回収し、抗 ICP27、UL42、ICP5、 $\beta$ -Actin 抗体で検出した。(a-c) Hanako Ishimaru, et al., Sci. Rep. 2020, 10, 6671 の Figure 2a-c を改変。



### 1-3-5. MG132 によるウイルス放出の抑制

MG132 が HSV-1 の放出量を抑制するのか、Vero 細胞、HepG2 細胞、H1299 細胞、ME180 細胞および MCF7 細胞を用い、real-time PCR 法により解析した。5 種類の細胞とも、MG132 処理によりウイルス放出量が抑制された (Figure 9)。

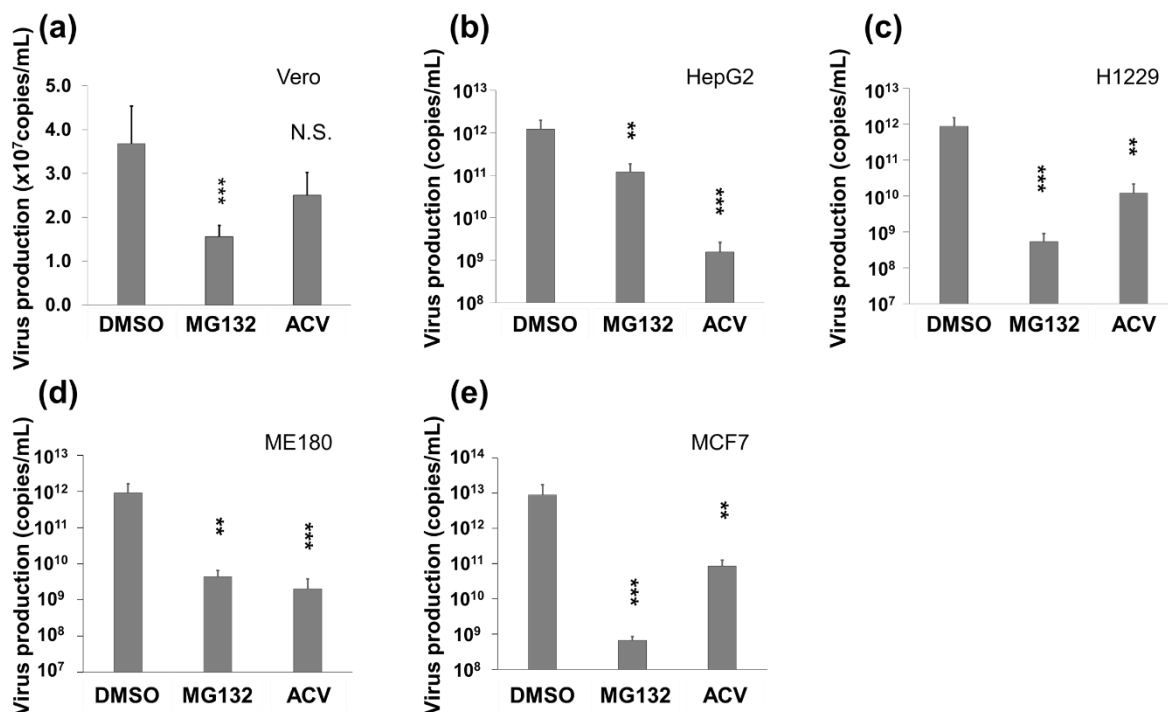


Figure 9. MG132 によるウイルス放出の抑制

(a)Vero 細胞、(b)HepG2 細胞、(c)H1299 細胞、(d)ME180 細胞、(e)MCF7 細胞に MOI=1 の HSV-1 を感染後、MG132 またはポジティブコントロールである 10  $\mu$ M ACV を処理し培養した。MG132 の濃度は 0.75  $\mu$ M MG132 (Vero 細胞、HepG2 細胞)、0.3  $\mu$ M MG132 (H1299 細胞)、0.25  $\mu$ M MG132 (ME180 細胞、MCF7 細胞) で処理した。薬物処理後 Vero 細胞は 12 時間、その他の細胞は 24 時間培養後、上清を回収しウイルスゲノムを抽出し、real-time PCR 法によりウイルスゲノム量を定量した。(a-e) 棒グラフは平均値+SD で表している。\*\*は  $p<0.01$  を\*\*\*は  $p<0.001$  を、N.S は有意差なしを示しており、DMSO 処理と比較した。Hanako Ishimaru, et al., Sci. Rep. 2020, 10, 6671 の Figure 3a-e を改変。

#### 1-3-6. MG132 によるウイル産生サイクルへの影響

MG132 を処理した HepG2 細胞では、未処理の HSV-1 感染細胞と比較してウイルスの産生速度に遅延が起こるのか解析した。HSV-1 感染細胞に 0.75  $\mu$ M MG132、10  $\mu$ M ACV を処理し、0、12、24 および 48 時間後に細胞上清を回収し-80℃に保存した。回収したサンプルをプラークアッセイ法によりプラーク数を算出しグラフを作製した。その結果、MG132 が、感染後 24 時間および 48 時間において、細胞から放出される感染性ウイルス粒子の産生量を減少させた (Figure 10)。

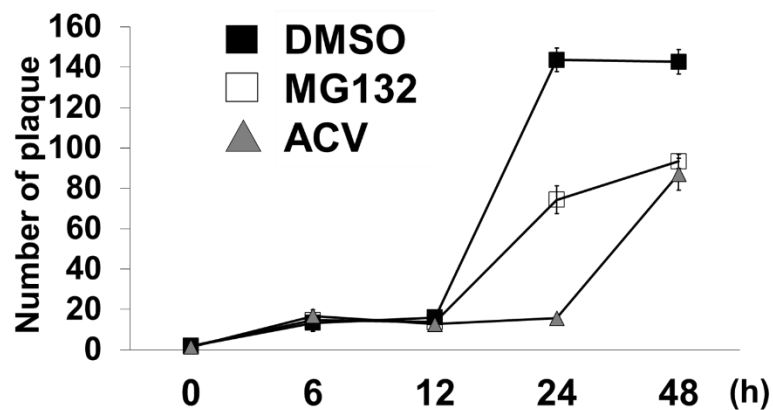


Figure 10. MG132 によるウイル産生サイクルへの影響

HepG2 細胞に MOI=1 の HSV-1 を感染後、0.75  $\mu$ M MG132 または、10  $\mu$ M ACV を処理し、0、6、12、24 および 48 時間後に細胞上清を回収し-80℃に保存した。回収したサンプルに含まれる HSV-1 粒子をプラークアッセイ法により用いて解析した。折れ線グラフは平均値 $\pm$ SD で表した。Hanako Ishimaru, et al., Sci. Rep. 2020, 10, 6671 の Figure 3i を改変。

#### 1-4. 考察

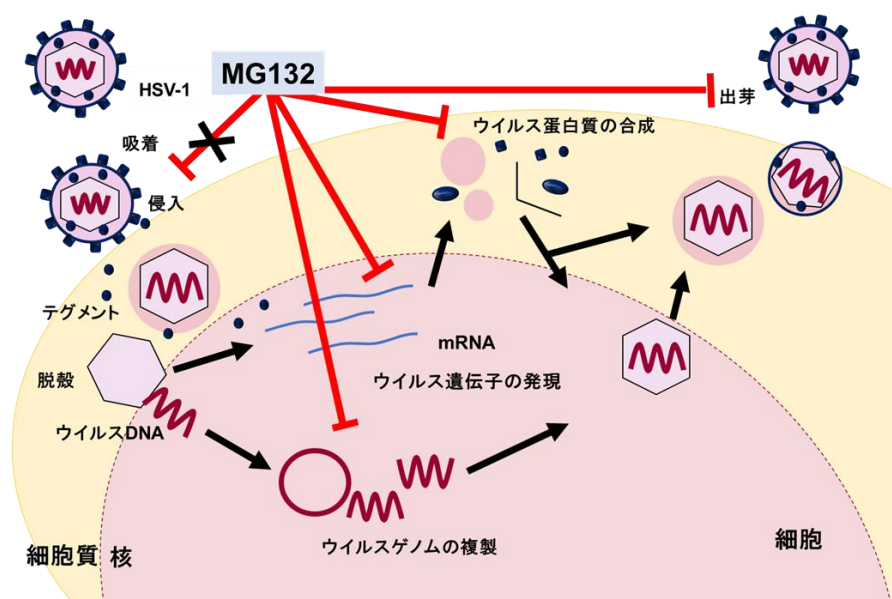


Figure 11. MG132 が HSV-1 感染に与える影響

MG132 を用いた抗 HSV-1 活性の作用機序解析の結果を図中に示した。MG132 はウイルスの吸着および侵入は阻害せず、ウイルス遺伝子発現、ウイルスゲノム複製、ウイルスタンパク質発現、ウイルス放出量を抑制することが明らかとなった。

5 種類のプロテアーゼ阻害剤のうちプロテアソーム阻害剤 MG132 およびボルテゾミブが HSV-1 感染により形成されるプラーク数を減少させた。MG132 を用いた抗 HSV-1 活性の作用機序解析の結果、MG132 はウイルスの吸着および侵入を阻害せず、ウイルス遺伝子発現、ウイルスゲノム複製、ウイルスタンパク質発現、ウイルス放出量を抑制することが明らかとなった (Figure 11)。

これらの結果からプロテアソーム活性がウイルス感染、または増殖に必要であることが示唆された。さらに、MG132 はウイルスの侵入以降、かつウイルス前初期遺伝子発現までのプロセスを阻害することでウイルス増殖を抑制することが示された。このことからウイルスは細胞に侵入以降遺伝子発現に至るまでの過程で宿主のプロテアソーム活性を利用することが示唆された。

## 第二章 MG132 は HSV-1 感染による ERK 抑制をキャンセルし抗ウイルス活性を発揮する。

### 2-1. はじめに

MG132 はウイルスの侵入以降からウイルス前初期遺伝子発現までのプロセスを阻害することで抗 HSV-1 活性を発揮することがわかった。そこで、ウイルス感染の成立、複製の促進、アポトーシスの抑制などに関わる感染細胞内のシグナル伝達を MG132 が阻害するのか本章では解明を試みた。

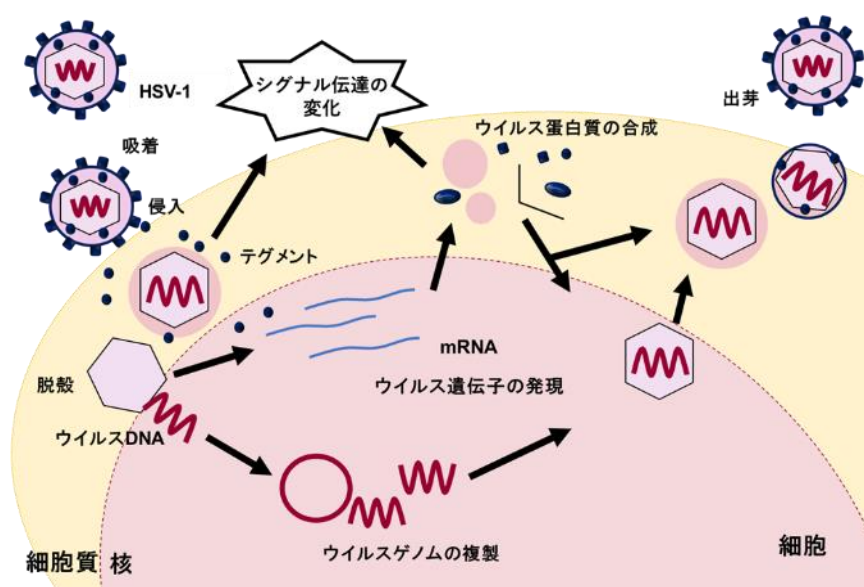


Figure 12. HSV-1 タンパク質の細胞内シグナル伝達への影響

HSV-1 は侵入時に細胞内に放出するテグメントタンパク質と細胞内で産生されるウイルスタンパク質により細胞内シグナル伝達を制御する。

HSV-1 は宿主因子なしに増殖を行うことができず、感染後様々な宿主因子をハイジャックして自身の DNA 複製やウイルス粒子産生を達成する。そのハイジャック機構の一つとして、ウイルスタンパク質が細胞内シグナル伝達を活性化または抑制することでウイルス増殖を効率的に行うことが知られている (Figure 12)。ウイルスはエンベロープとカプシドの間にテグメントタンパク質を保有しており、標的細胞に侵入後、テグメントタンパク質を細胞内に放出し様々なシグナル伝達を制御する。さらに、ウイルスが感染細胞内で発現する多くのウイルスタンパク質がシグナル伝達の調節因子や転写因子、さらに細胞機能の調節因子として作用することが知られている。このようなウイルスによるハイジャック機構により、HSV を含むウイルスは、感染の成立、効率的複製、アポトーシス抑制を獲得する<sup>20-23)</sup>。特に、カスパーゼ経路や、細胞生存にかかわる AKT シグナルと多くの遺伝子発現に関わる ERK シグナル伝達はウイルスによるハイジャックの標的にされている。なお、HSV-1 感染では、ウイルスによる ERK シグナル伝達の抑制<sup>24-26)</sup>と活性化に関する相反する効果も報告されている。

(Figure 14)<sup>27-29</sup>。

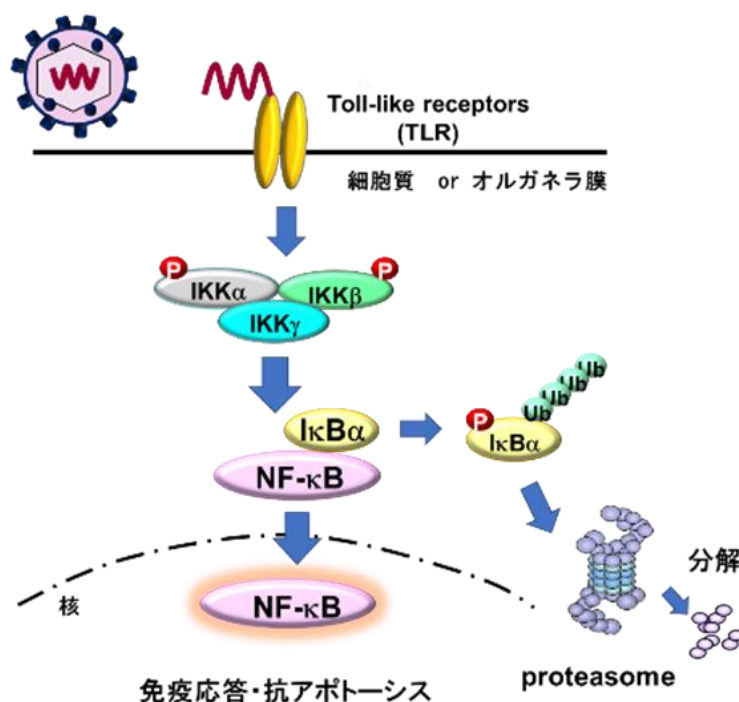


Figure 13. NF-κB シグナル

NF-κB シグナルについて本文中に記した。

細胞内シグナル伝達がウイルスにより利用される一方で、細胞内シグナル伝達は細胞にとっての抗ウイルス応答にも必須であることが知られている。多くの有核細胞はウイルス感染由来のウイルスタンパク質、つまり、病原体関連分子パターン (Pathogen-associated molecular patterns、PAMP) を認識するとサイトカイン依存的な免疫応答を惹起し自身や周辺細胞に対して抗ウイルス応答を誘導する。HSV 感染の場合、ウイルス由来の膜タンパク質やウイルスゲノム DNA が PAMPs となり、細胞の toll-like receptor (TLRs) と結合して、NF-κB シグナル伝達の活性化や転写因子 IRF の活性化により抗ウイルス反応を開始させる<sup>30-34</sup>)。HSV 感染では、NF-κB シグナル伝達はウイルス感染細胞において活性化される主要なシグナル経路であることが既に報告されている (Figure 13)<sup>35-36</sup>)。NF-κB シグナルは、Toll-like receptor などの受容体が病原性因子と結合すると下流の IKK 複合体が活性化し、抑制分子の IκBα はリン酸化されて、さらにポリユビキチン化をうけプロテアソームで分解される。そして、NF-κB は、IκBα と結合し細胞質に存在していたが、IκBα の分解により核へ移行する。その後、免疫応答に関わる遺伝子の転写を誘導することが報告されている (Figure 13)。

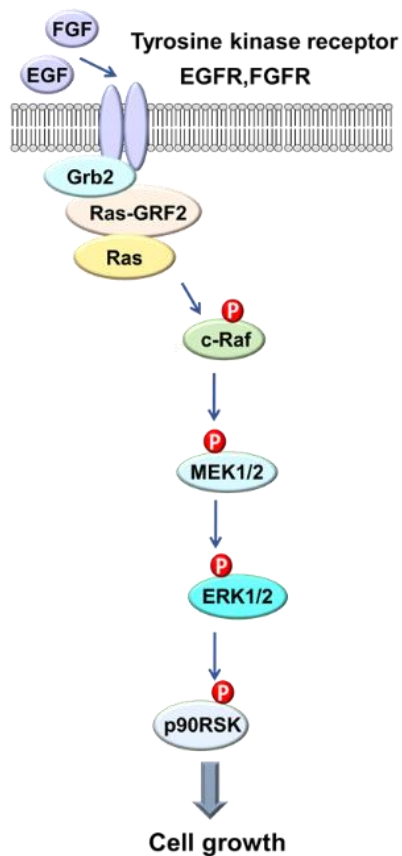


Figure 14. ERK シグナル

ERK シグナルの説明を本文中に記載した。

ERK シグナルは、細胞増殖や分化を含む様々な細胞機能に関与し、EGF、FGF などの増殖因子などがチロシンキナーゼ型受容体に結合し活性化される。リガンドと受容体の結合により活性化したシグナルは、c-Raf、MEK、ERK が順次リン酸化されることで下流へと伝わり細胞増殖に必要な遺伝子発現が起こる<sup>37)</sup> (Figure 14)。

## 2-2. 材料と方法

### 2-2-1. 阻害剤調製と抗体

BAY11-7082、PD98059 は DMSO で溶解した。

EGF は PBS で溶解した。

ウェスタンブロットで使用した抗体を以下に記す。

抗体名	会社名	カタログ番号	希釈倍率
Anti-p65-antibody	BD	610869	×2000
Anti-IKBA-antibody	BD	610691	×2000
Anti-p-PTEN(S380)-antibody	Cell Signaling	9551	×2000
Anti-Lamin B1-antibody	Cell Signaling	12586	×2000
Anti-Cleaved Caspase-3-antibody	Cell Signaling	9661	×2000
Anti-Cleaved PARP-antibody	Cell Signaling	9541	×2000
Anti-p-AKT(S473)-antibody	Cell Signaling	13038	×2000
Anti-AKT-antibody	Cell Signaling	4691	×2000
Anti-β-Catenin-antibody	BD	610154	×2000
Anti-p-STAT1(Y701)-antibody	Cell Signaling	9171	×2000
Anti-p-Erk1/2(T202/Y204)-antibody	Cell Signaling	4370	×2000
Anti-ERK1-antibody	BD	610031	×2000
Anti-ERK2-antibody	BD	51-9001959	×2000
Anti-p-MEK1/2(S217/S221)-antibody	Cell Signaling	9154	×2000
Anti-p-c-Raf(S338)-antibody	Cell Signaling	9427	×2000
Anti-p-p90RSK(S380)-antibody	Cell Signaling	11989	×2000
HRP conjugate anti-mouse IgG	GE ヘルスケア	NXA931	×3000
HRP conjugate anti-rabbit IgG	GE ヘルスケア	NA934	×3000

### 2-2-2. 細胞培養と継代

Vero 細胞、HeLa 細胞および HepG2 細胞は 10% FCS 含有 DMEM を用いて細胞培養を行った。細胞の継代は第一章の 1-1-2 に記載している方法で行った。

### 2-2-3. ウェスタンブロット法

第一章の 1-2-9 に記載した方法で行った。

### 2-2-4. 蛍光抗体染色と共局在解析

カバーガラス上へ播種された 60% コンフルエントの細胞に作業中のタンパク質分解を抑制するために 4℃に冷やした PBS で 2 回洗浄した。その後、4℃に冷やした 4% パラホルムアルデヒドにより 30 分間室温で細胞を固定した。固定した細胞を PBS で 2 回洗浄後、PBS に懸濁した 0.1% TritonX-100 により 10 分間室温で透過処理し、PBS で 3 回洗浄した。抗体の

非特異反応を防ぐため、PBS-T に懸濁した 10% bovine serum albumin を透過処理した細胞に加え 30 分間室温でブロッキングした。抗体反応以降、カバーガラスをパラフィルム上へ移して実験を進めた。1 次抗体をカバーガラス上の固定細胞に 15 時間 4℃で処理し、PBS で 3 回洗浄した。Alexa fluor 488 標識抗マウス抗体または Alexa fluor 594 標識抗ラビット抗体を二次抗体として使用し、PBS に希釈した抗体溶液を 1 次抗体処理した細胞に室温 1 時間で反応させた。PBS で 3 回洗浄した後、核標識しながら封入するため、1 枚のカバーガラスあたり 8  $\mu$ L の Fluoro-KEEPER with DAPI をスライドガラス上へ添加し、カバーガラスをスライドガラス上へ移した。染色した細胞を共焦点レーザー顕微鏡 (LSM800)で観察した。

#### 2-2-5. 培養細胞への遺伝子導入 (トランスフェクション)

トランスフェクション直前に培地を新しい 10% FCS 含有 DMEM に交換し、リン酸カルシウム法を用いてプラスミド DNA を細胞に遺伝子導入した。10 cm ディッシュにトランスフェクションを行う場合、総容量を 450  $\mu$ L になるように 20  $\mu$ g の DNA と DW をよく混合した。その溶液に 2.5 M  $\text{CaCl}_2$  水溶液を 50  $\mu$ L 加えボルテックスで混合した。さらにその溶液に等量の 500  $\mu$ L の 2xBBS バッファーを加えボルテックスでよく混合した後、37℃で 15 分間静置させることで、トランスフェクション溶液を調製した。80%コンフルエントに達した細胞に上記のトランスフェクション溶液を加え、CO<sub>2</sub> インキュベーター (35℃、3.5% CO<sub>2</sub>) 内で一晩培養した。次に、細胞を PBS で 2 回洗浄し、新しい培地に交換した後、さらに培養 (37℃、5% CO<sub>2</sub>) を続け、12 時間後に細胞を回収した。以下に培養サイズによるトランスフェクション溶液の調製方法と 2xBBS バッファーの組成を記載する。

#### <培養サイズ別トランスフェクション溶液の組成>

培養サイズ	細胞数	培地量	最大 DNA 量	DNA+DW 量
12 well プレート	5.0 x 10 <sup>5</sup> cells/ well	1 mL	3 $\mu$ g	45 $\mu$ L

培養サイズ	2.5 M $\text{CaCl}_2$	2xBBS バッファー	総量
12 well プレート	5 $\mu$ L	50 $\mu$ L	100 $\mu$ L

#### <2xBBS バッファー>

50 mM BES  
280 mM NaCl  
1.5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

#### 2-2-6. レポーターアッセイ

HeLa 細胞 (1x10<sup>5</sup> cells/well) に 2  $\mu$ g の NF- $\kappa$ B-ルシフェラーゼレポータープラスミドと 1  $\mu$ g の pSV- $\beta$ -Gal をリン酸カルシウム法でトランスフェクションした。pSV- $\beta$ -Gal はトランスフェクション効率の内部コントロールとして使用した。トランスフェクションされた細胞を 18 時間培養後 MOI =1 で HSV-1 を感染させ、30 分間後 MG132 を含む培地に置換し 12 時間または 24 時間培養を行った。その後細胞は 0.1 mL の lysis buffer に懸濁しルシフェラーゼと  $\beta$ -ガラクトシダーゼの活性を解析に用いた。ルシフェラーゼ活性は、GloMax 20/20 luminometer (Promega)を用いて測定した。転写活性はルシフェラーゼ活性をウイルスおよび薬剤未処理細胞の  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性で割った値を 100%として示した。



#### 2-2-7. 細胞分画

10 cm ディッシュに  $2 \times 10^6$  cells/well で Vero 細胞を播種した。HSV-1 を MOI=1 で 30 分間感染させ、その後 MG132 を処理し 7 時間培養を行った。400  $\mu$ l の低張力緩衝液[10 mM HEPES at (pH7.9) 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 1 mM dithiothreitol and 0.5  $\mu$ M PMSF]とともに 15 分間氷上に静置し細胞を溶解させた。その後、NP-40 を最終濃度、0.6%になるように加え、ボルテックスミキサーで攪拌後、15,000 rpm、30 秒、4°C で遠心分離した。回収した上清 (400  $\mu$ l) を 100  $\mu$ l の 5x SDS-PAGE Sample Buffer と混合し細胞質画分とした。ペレットを 0.6% NP-40 を含む低張力緩衝液で 2 回洗浄した。洗浄したペレットを 50  $\mu$ l を 1x SDS-PAGE Sample Buffer で溶解し、核画分とした。

#### 2-2-8. 統計解析

2 群間比較の場合、等分散であることを F 検定で判断後、等分散時 ( $p > 0.05$ ) に student t 検定を用いて有意差を検定した。3 群以上の比較の場合、分散分析法として One way ANOVA を用い、検定には Dunnet 検定を用いて統計解析を実行した。統計解析ソフトは GraphPad Prism7 を使用した。得られた実験結果は平均値+標準偏差で表示した。危険率 5% 以下を統計学的に有意差があると判定した。

## 2-3. 結果

### 2-3-1. HSV-1 感染後の MG132 処理による細胞内シグナルへの影響

プロテアソーム阻害剤 MG132 が、ウイルス遺伝子発現、ウイルスゲノム複製、ウイルスタンパク質発現およびウイルス放出量を抑制した。このことから MG132 は HSV-1 感染により活性化あるいは抑制される細胞内シグナル伝達を標的にしていると推察した。そこで HSV-1 感染により Caspase、AKT シグナル、Wnt シグナル、STAT シグナル、NF- $\kappa$ B シグナルおよび ERK シグナルに影響を与えるのか解析した。Cleaved Caspase-3、Cleaved PARP およびリン酸化 AKT (S473)は HSV-1 感染により活性化されたが MG132 処理による変化はなかった。 $\beta$ -catenin、リン酸化 STAT1 (Y701)は HSV-1 感染によるシグナル変動はなかった。一方で、二つのシグナル伝達が HSV-1 感染細胞により活性化もしくは不活化し、MG132 処理によりキャンセルされた。一つ目は NF- $\kappa$ B シグナルである。NF- $\kappa$ B シグナルの抑制因子 I $\kappa$ B $\alpha$  は HSV-1 感染後発現量が低下し MG132 処理により増加した。二つ目は ERK シグナルである ERK1/2 のリン酸化が HSV 感染後で抑制され、MG132 処理により抑制がキャンセルされた (Figure 15)。

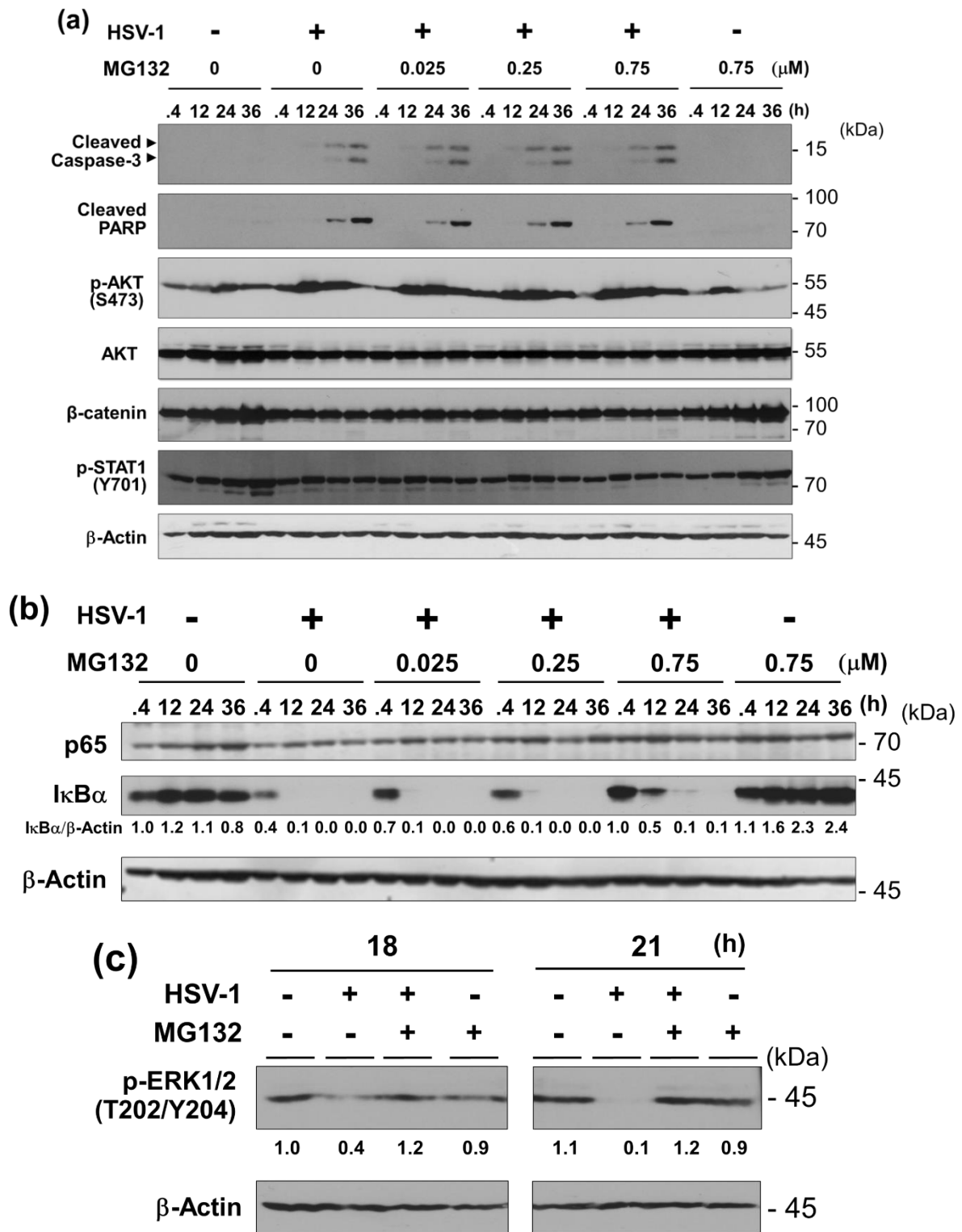


Figure 15. HSV-1 感染後の MG132 処理による細胞内シグナルの挙動解析

(a, b) Vero 細胞、(c) HepG2 細胞に HSV-1 感染後、各濃度の MG132 を処理し 0.4、12、24、36 時間後に細胞を回収し、抗 Cleaved Caspase-3、Cleaved PARP、リン酸化 AKT (S473)、AKT、β-catenin、リン酸化 STAT1 (Y701)、β-Actin、p65、IκBα リン酸化 ERK1/2 (T202/Y204)抗体で検出した。(a-c) Hanako Ishimaru, et al., Sci. Rep. 2020, 10, 6671 の Figure 5、Figure 4a および Figure 6c を改変。

### 2-3-2. HSV-1 感染後 MG132 処理による NF- $\kappa$ B シグナルの挙動解析

NF- $\kappa$ B 経路でその抑制因子 I $\kappa$ B $\alpha$  は HSV-1 感染後発現量が低下し MG132 処理により増加することがウェスタンブロット法により明らかとなった。次に免疫染色法を用いて HSV-1 感染による I $\kappa$ B $\alpha$  の不安定化および感染後 MG132 処理により発現量が回復するのか解析を行った。その結果、免疫染色法においても同様に HSV-1 感染後 I $\kappa$ B $\alpha$  発現量が低下し MG132 処理により増加することが明らかになった (Figure 16)。次に HSV-1 感染による NF- $\kappa$ B の転写活性を MG132 が抑制するのかレポーターアッセイを用いて解析した。その結果 HSV-1 感染後 12 時間および 24 時間共に活性化した NF- $\kappa$ B の転写活性を MG132 処理が抑制することが明らかとなった (Figure 17)。次に HSV-1 感染による NF- $\kappa$ B の核移行を MG132 が阻害するか解析した。HSV-1 感染細胞に MG132 を処理した細胞の細胞分画を行った。この細胞を細胞質と核に分画し、それぞれの NF- $\kappa$ B の発現量を解析した。その結果、HSV-1 感染により核画分にも NF- $\kappa$ B が検出されるようになり、これを MG132 は抑制した (Figure 18)。

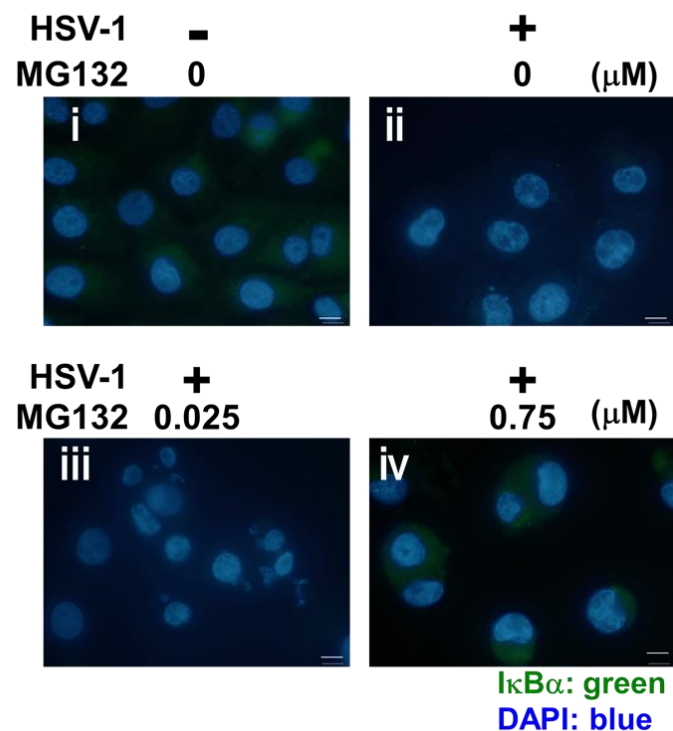


Figure 16. HSV-1 感染後 MG132 処理による NF- $\kappa$ B シグナルの影響

Vero 細胞に MOI=1 の HSV-1 を感染後、各濃度の MG132 を処理し 20 時間後にサンプルを回収し I $\kappa$ B $\alpha$  を緑色蛍光色素で、核を青色蛍光色素 DAPI で染色した。Hanako Ishimaru, et al., Sci. Rep. 2020, 10, 6671 の Figure 4b を改変。

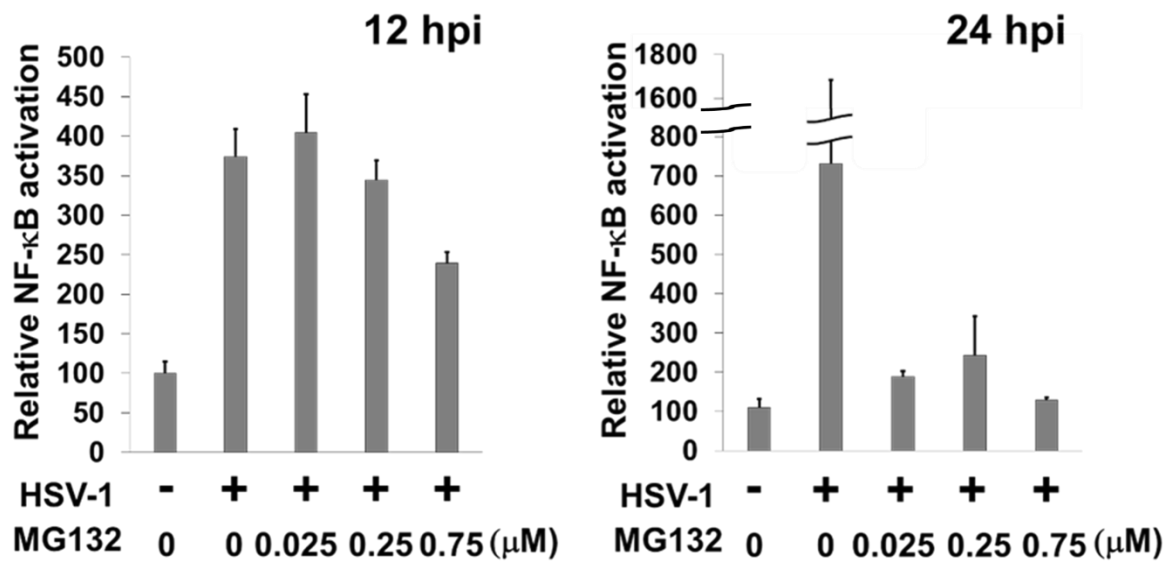


Figure 17. HSV-1 感染による NF-κB の転写活性化と MG132 処理による抑制

NF-κB 結合配列を組み込んだルシフェラーゼレポータープラスミドをリン酸カルシウム法で HeLa 細胞に導入し、MOI=1 の HSV-1 を感染後、各濃度の MG132 を処理し、12、24 時間後にサンプルを回収し、ルシフェラーゼ活性を測定した。感染 12 時間 (12 hpi)、24 時間 (24 hpi) 後、それぞれの HSV-1 非感染および DMSO 処理時のレポーター活性を 100 として相対値を示した。棒グラフは平均値+SD で表している。Hanako Ishimaru, et al., Sci. Rep. 2020, 10, 6671 の Figure 4c-d を改変。

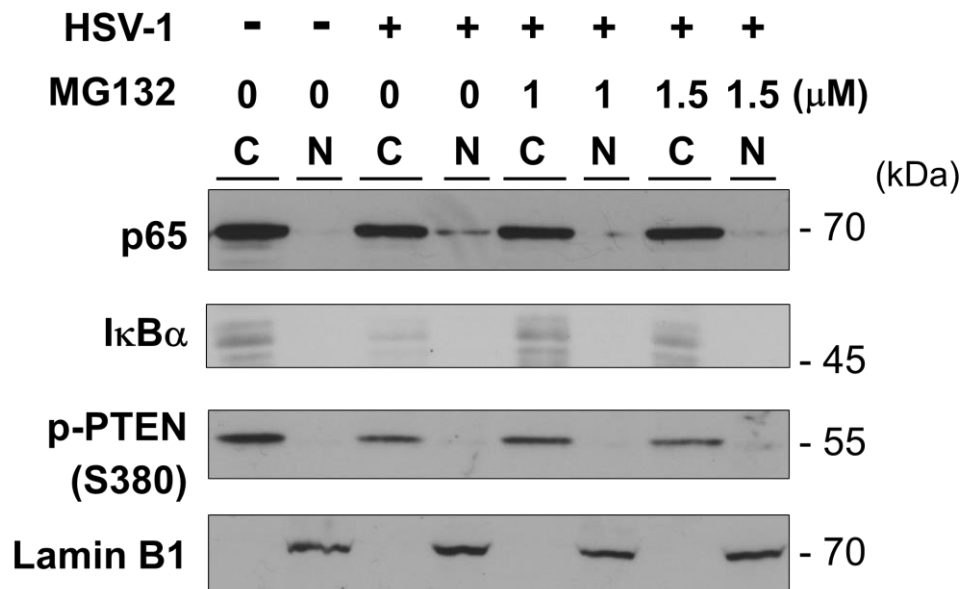


Figure 18. MG132 は HSV-1 感染により誘導される NF- $\kappa$ B の核移行を阻害した Vero 細胞に HSV-1 感染後、各濃度の MG132 を処理し、20 時間後にサンプルを回収した。(C) は細胞質画分を、(N) は核画分を示した。各サンプルをリン酸化 p65、p-PTEN(S380)、I $\kappa$ B $\alpha$ 、LaminB1 抗体で検出した。Hanako Ishimaru, et al., Sci. Rep. 2020, 10, 6671 の Figure 4e を改変。

### 2-3-3. HSV-1 感染に対する NF- $\kappa$ B シグナル活性化の影響

ウェスタンブロット法および免疫染色法により HSV-1 感染は I $\kappa$ B $\alpha$  の発現量を低下させ、MG132 処理は I $\kappa$ B $\alpha$  の発現量を回復させることがわかった。さらに、レポーターアッセイ法を用いて MG132 が HSV-1 感染による NF- $\kappa$ B の転写活性化を抑制することを明らかにした。そして、細胞分画法により細胞質分画と核分画の NF- $\kappa$ B の発現量を評価し、MG132 は HSV-1 感染による NF- $\kappa$ B の核移行増加を抑制することがわかった。これらの結果から、HSV-1 感染は NF- $\kappa$ B シグナルを活性化することで感染成立を果たし、MG132 は感染による NF- $\kappa$ B シグナル活性化を抑制することで抗 HSV-1 活性を発揮する可能性が考えられた。この可能性を検証するために、HSV-1 感染による NF- $\kappa$ B シグナルの活性化が感染成立に必要なか解析した (Figure 19)。ウイルス感染後 NF- $\kappa$ B シグナル阻害剤 BAY11-7082 を処理し、プラークアッセイ法によりウイルス増殖の影響を評価した。その結果、NF- $\kappa$ B シグナル阻害剤 BAY11-7082 はプラーク数およびプラーク径に変化はなかった (Figure 20)。よって、HSV-1 感染により惹起される NF- $\kappa$ B の活性化はウイルス複製に影響を与えないことがわかった。

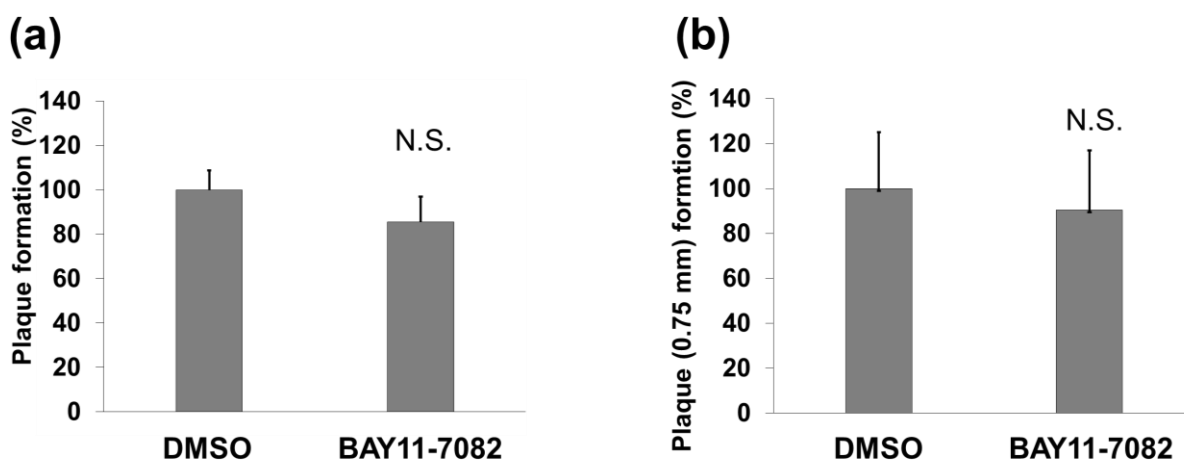
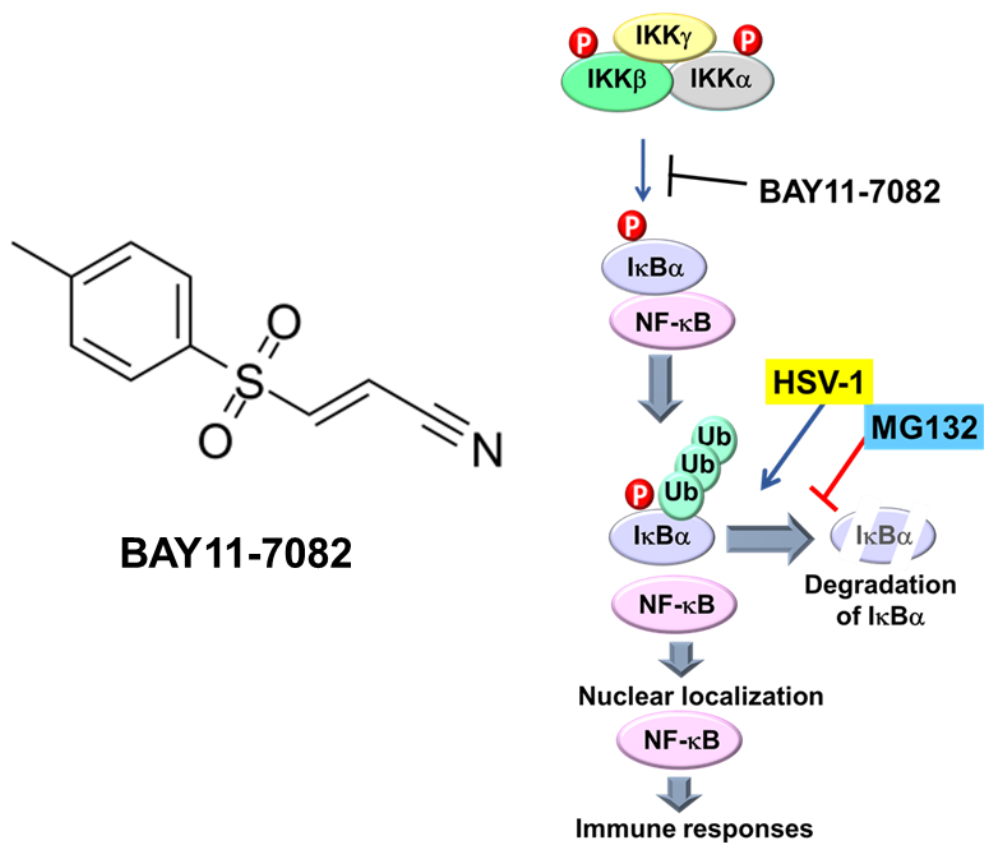


Figure 19. BAY11-7082 の構造と作用点概略図。

Figure 20. BAY11-7082 は HSV-1 感染に影響を与えない

BAY11-7082 のウイルス増殖への影響をプラークアッセイ法により評価した。100 pfu/well の HSV-1 を Vero 細胞に処理後 1  $\mu$ M の BAY11-7082 を添加して 48 時間培養を行った。(a)プラーク数を算出した。(b)プラーク径が 0.75 mm 以上のプラーク数を算出した。(a)、(b)ともに DMSO 処理時のプラーク数を 100% として相対値を示した。棒グラフは平均値+SD で表している。N.S は有意差なしを示しており、DMSO 処理と比較した。Hanako Ishimaru, et al., Sci. Rep. 2020, 10, 6671 の Figure 10a-b を改変。

#### 2-3-4. HSV-1 感染後 MG132 処理による ERK シグナルの挙動解析

HSV-1 感染により ERK1/2 のリン酸化が低下し、MG132 処理により回復することがウェスタンブロット法により明らかとなった。次に HSV-1 感染と MG132 処理が ERK1/2 の上流分子および下流分子のリン酸化状態に与える影響を解析した。その結果、HSV-1 感染により 0.4、12 時間で ERK1/2、c-Raf(S338)、MEK (S217/S221) および p90RSK (S380) のリン酸化が抑制され、MG132 処理により回復することが明らかとなった (Figure 21)。次に免疫染色法を用いて HSV-1 感染と MG132 処理による MEK (S217/S221) のリン酸化の変動を解析した。その結果、免疫染色法においても同様に HSV-1 感染後 MEK(S217/S221) のリン酸化が抑制し、MG132 処理により亢進した (Figure 22)。

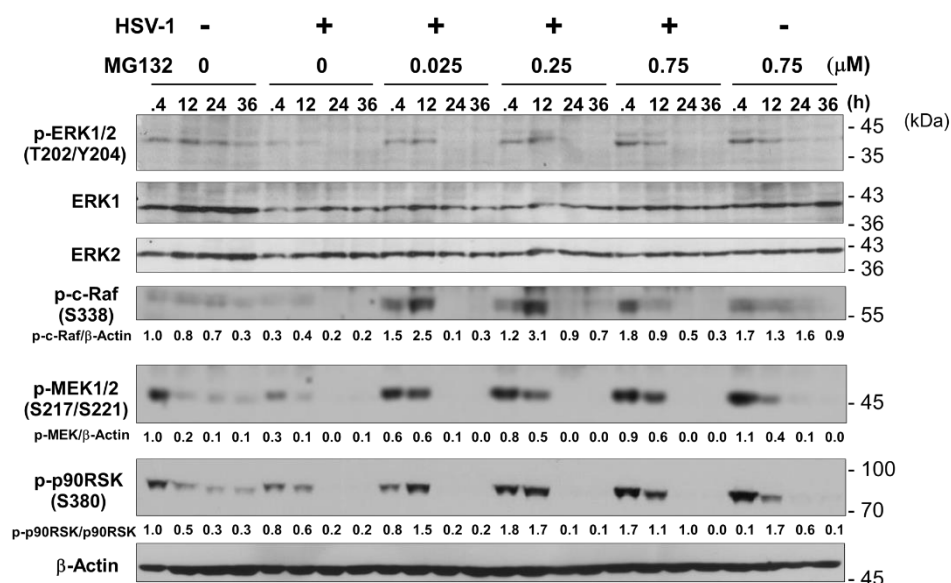


Figure 21. ERK シグナルは HSV-1 感染により抑制され、MG132 処理により再活性化した。Vero 細胞に HSV-1 感染後、各濃度の MG132 を処理し 0.4、12、24、36 時間後にサンプルを回収し anti-p-ERK1/2 (T202/Y204) antibody、anti-ERK1 antibody、anti-ERK2 antibody、リン酸化 anti-p-c-Raf (S338) antibody、anti-p-c-MEK (S217/S221) antibody、anti-p-p90RSK (S380) antibody、anti-p90RSK antibody で検出した。Hanako Ishimaru, et al., Sci. Rep. 2020, 10, 6671 の Figure 6a を改変。



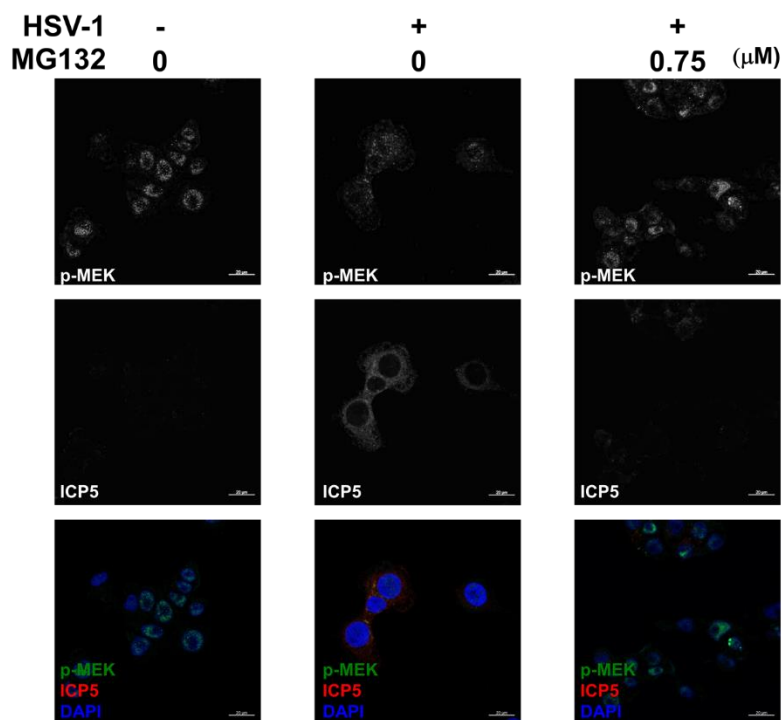


Figure 22. HSV-1 感染による pMEK 抑制と MG132 処理による再活性化

HSV-1 感染後、Vero 細胞に各濃度の MG132 を処理し 10 時間後にサンプルを回収し、MEK のリン酸化を検出した。緑色蛍光色素でリン酸化 MEK を、赤色蛍光色素で ICP5 を、青色蛍光色素 (DAPI) で DNA を染色した。Hanako Ishimaru, et al., Sci. Rep. 2020, 10, 6671 の Figure 7 を改変。

#### 2-3-5. ERK シグナル抑制による HSV-1 感染の促進

2-3-4.の結果は、HSV-1 感染は ERK シグナルを抑制し MG132 がこれを再活性化することを示している。そこで、HSV-1 感染による ERK シグナルの抑制がウイルス感染に必要なか解析した。ウイルス感染後、ERK シグナル阻害剤 PD98059 を処理し、プラークアッセイ法を行い、ウイルスの増殖に影響を与えるのか解析した (Figure 23)。その結果、PD98059 を処理してもプラーク数は変化しなかったが、0.75 mm 以上のプラーク数が増加した (Figure 24)。さらに、HSV-1 感染後に PD98059 を処理し、20 時間後に細胞を回収して real-time PCR 法によりウイルスゲノム量を定量した。その結果、PD98059 は HSV-1 感染細胞内でのウイルスゲノム量を増加させる事がわかった (Figure 25)。次に、ERK シグナル活性化が HSV-1 感染に与える影響を評価するために、ERK シグナル活性化因子である EGF を用いてプラークアッセイ法を行った。その結果、HSV-1 感染後 EGF 処理することでプラーク数が減少した (Figure 26)。

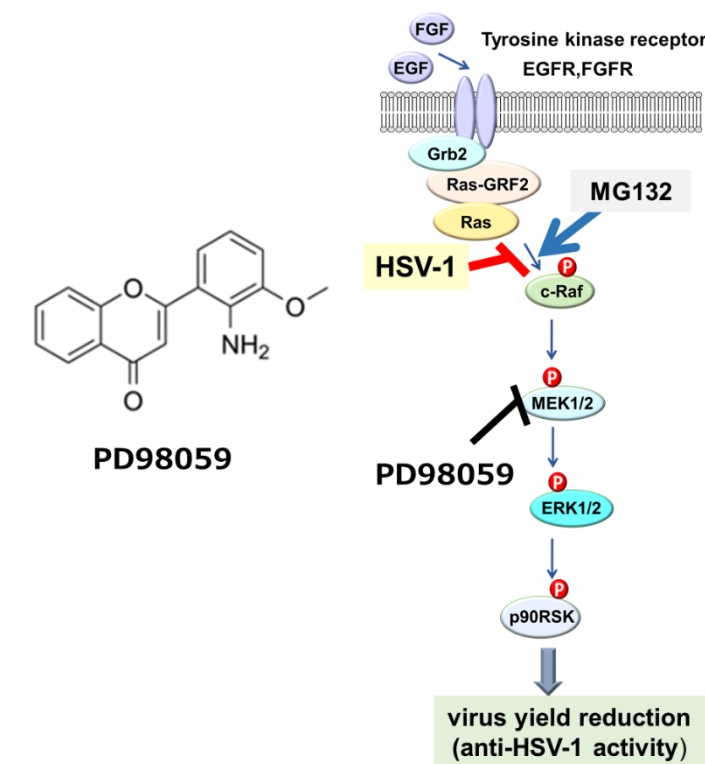


Figure 23. PD98059 の構造と作用点

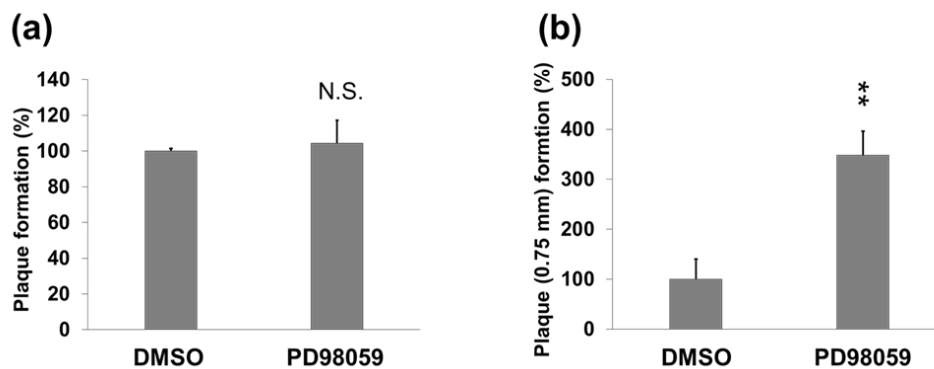


Figure 24. PD98059 による HSV-1 感染の促進

PD98059 のウイルス増殖への影響をプラークアッセイ法により評価した。100 pfu/well の HSV-1 を Vero 細胞に処理後 10  $\mu$ M の PD98059 を添加して 48 時間培養を行った。(a)プラーク数を算出した。(b)プラーク径が 0.75 mm 以上のプラーク数を算出した。(a)、(b)ともに DMSO 処理時のプラーク数を 100%として相対値を示した。棒グラフは平均値+SD で表している。\*\*は  $p < 0.01$  を、N.S は有意差なしを示しており、DMSO 処理と比較した。(a and b) Hanako Ishimaru, et al., Sci. Rep. 2020, 10, 6671 の Figure 10c-d を改変。

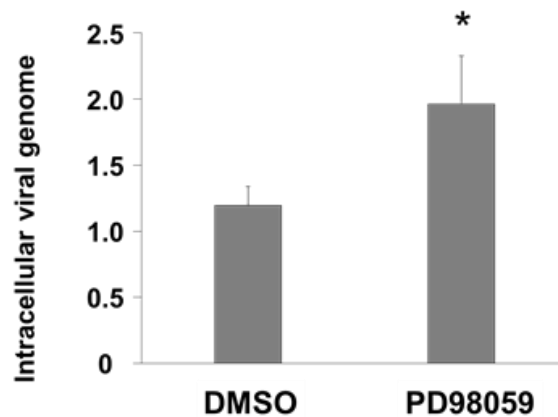


Figure 25. PD98059 による HSV-1 の複製亢進

HepG2 細胞に MOI=1 の HSV-1 を感染後、10  $\mu$ M PD98059 入りの 10% FCS 含有 DMEM を各ウェルに 1 mL 添加し 5% CO<sub>2</sub>、37°C の条件下で培養し 20 時間後に細胞内に含まれるウイルスゲノムを抽出し real-time PCR 法を用いてウイルスゲノム量を定量した。棒グラフは平均値+SD で表している。\*は  $p<0.05$  を示しており、DMSO 処理と比較した。Hanako Ishimaru, et al., Sci. Rep. 2020, 10, 6671 の Figure 10f を改変。

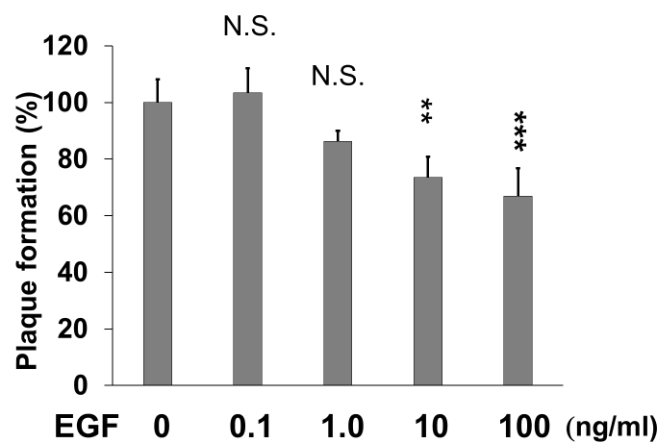


Figure 26. EGF 刺激による HSV-1 感染抑制

EGF によるウイルス増殖に与える影響をプラークアッセイ法により評価した。100 pfu/well の HSV-1 を Vero 細胞に処理後 EGF を添加して 48 時間後のプラーク数を算出した。EGF 未処理時のプラーク数を 100% として相対値を示した。棒グラフは平均値+SD で表している。\*\*\*は  $p<0.001$  を、\*\*は  $p<0.01$  を、N.S は有意差なしを示しており、DMSO 処理と比較した。Hanako Ishimaru, et al., Sci. Rep. 2020, 10, 6671 の Figure 10e を改変。

#### 2-4. 考察

本研究では、NF- $\kappa$ B シグナルの抑制因子 I $\kappa$ B $\alpha$  は HSV-1 感染後発現量が低下し、MG132 処理により増加した。また、HSV-1 感染により活性化した NF- $\kappa$ B の転写活性を MG132 が抑制した。さらに、HSV-1 感染は NF- $\kappa$ B の核移行を促進し、MG132 がこれを抑制した。これらのことから MG132 は HSV-1 感染による I $\kappa$ B $\alpha$  の分解を抑制し、それに伴い NF- $\kappa$ B の核移行を抑制すると考えられた。

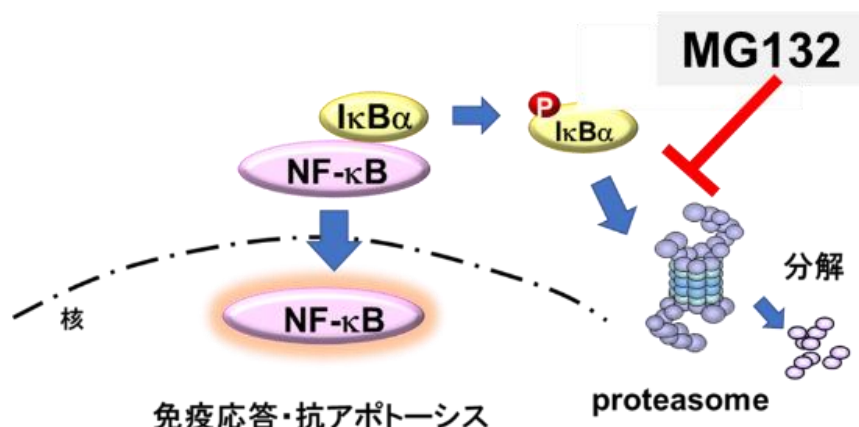


Figure 27. MG132 による NF- $\kappa$ B の核移行阻害モデル

HSV-1 感染は I $\kappa$ B $\alpha$  のプロテアソーム分解を促進し、NF- $\kappa$ B を核移行させる。このことから MG132 は HSV-1 感染による分解を抑制し、その結果、NF- $\kappa$ B の核移行を抑制する。Hanako Ishimaru, et al., Sci. Rep. 2020, 10, 6671 の Figure 11 を改変。

HSV-1 感染は、Toll-like receptors (TLR)2 を介して、下流の IKK 複合体のリン酸化を活性化する。それに伴い I $\kappa$ B $\alpha$  がリン酸化され、ポリユビキチン化された I $\kappa$ B $\alpha$  はプロテアソームにより分解され、その結果、NF- $\kappa$ B が活性化される<sup>6</sup>。HSV-1 による I $\kappa$ B $\alpha$  の不安定化は、NF- $\kappa$ B の核移行を惹起し、IL-2 および IL-6 などの免疫機構を活性化する。これらの知見より、HSV-1 感染時の NF- $\kappa$ B シグナル活性化には 2 つの可能性が考えられる。すなわち、HSV-1 が感染成立のために NF- $\kappa$ B シグナルを活性化する場合と、宿主細胞が HSV-1 感染による免疫応答として NF- $\kappa$ B シグナルを活性化する場合である。本研究ではこの二つの可能性を検証するために NF- $\kappa$ B 阻害剤 (BAY11-7082)を用いてウイルス増殖性を評価した。その結果、BAY11-7082 は HSV-1 の増殖に影響を与えなかった。この結果から、HSV-1 感染による NF- $\kappa$ B シグナル活性化は細胞による免疫応答として活性化すると考察した (Figure 27)。

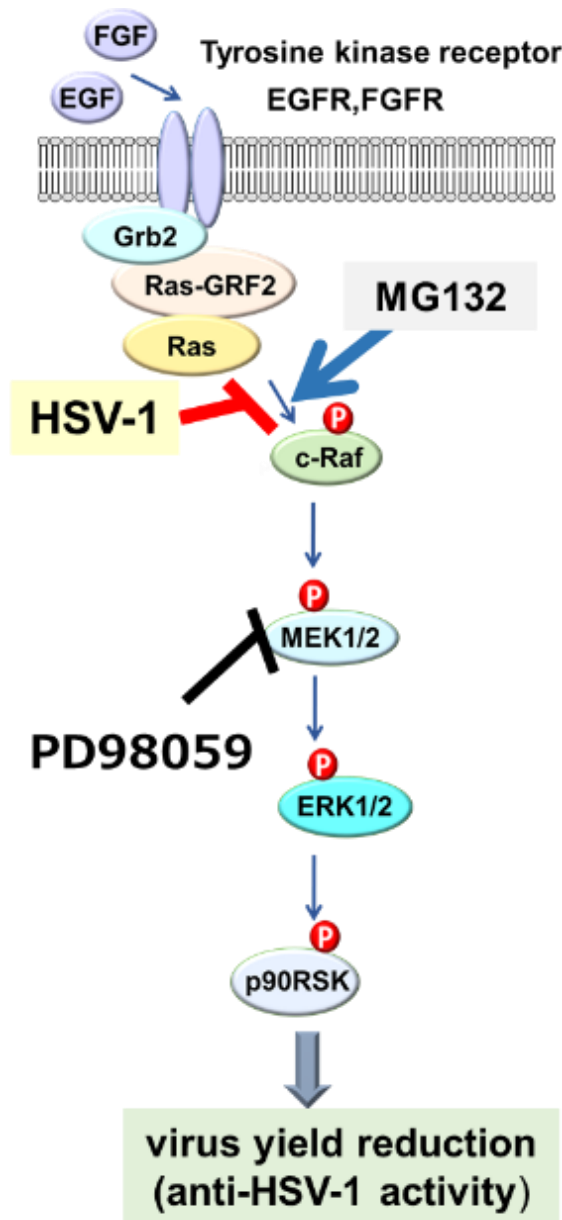


Figure 28. ERK シグナル抑制によるウイルス増殖促進と MG132 による感染抑制機構モデル  
説明は本文中に記載した。Hanako Ishimaru, et al., Sci. Rep. 2020, 10, 6671 の Figure 11 を改変。

ERK シグナル経路では HSV-1 感染により ERK1/2 のリン酸化が低下し、MG132 処理により ERK1/2 のリン酸化が再活性化した。さらに、次に ERK1/2 の上流分子 c-Raf (S338)、MEK (S217/S221)および下流分子 p90RSK (S380) のリン酸化においても ERK1/2 のリン酸化と同様に HSV-1 感染により低下し MG132 処置により回復することがわかった。HSV-1 により ERK シグナルが低下する生理的意義としては二つの可能性が考えられる。HSV-1 が感染成立のために ERK シグナルを抑制する場合と、宿主細胞が HSV-1 感染に対する免疫応答として ERK シグナルを抑制する場合である。本研究ではこの二つの可能性を検証するために ERK シグナル阻害剤(BAY11-7082)を用いてウイルス増殖性を評価した。ウイルス感染後 PD98059 を処理し、プラークアッセイ法を行い、ウイルスの増殖に影響を与えるのか解析し結果、HSV-1

感染後 ERK シグナル阻害剤 PD98059 処理によりプラーク数に変化はなかったが、0.75 mm 以上のプラーク数が増加した。PD98059 処理によりプラーク径が増大する現象は、ウイルス複製が亢進することで、cell to cell 感染が促進されることが示唆された。そこで、HSV-1 感染後の PD98059 処理が細胞内ウイルスゲノム量に影響を与えるのか real-time PCR 法を用いて解析した結果、PD98059 は HSV-1 感染細胞内のウイルスゲノム量を増加した。

次に、ERK シグナル活性化因子である EGF を用いてプラークアッセイ法を行い、ERK シグナル活性化が HSV-1 感染に与える影響を評価した結果、HSV-1 感染後 EGF 処理することでプラーク数が減少した。これらの結果から HSV-1 感染による ERK シグナル抑制がウイルス増殖に必要であることが示唆された (Figure 28)。

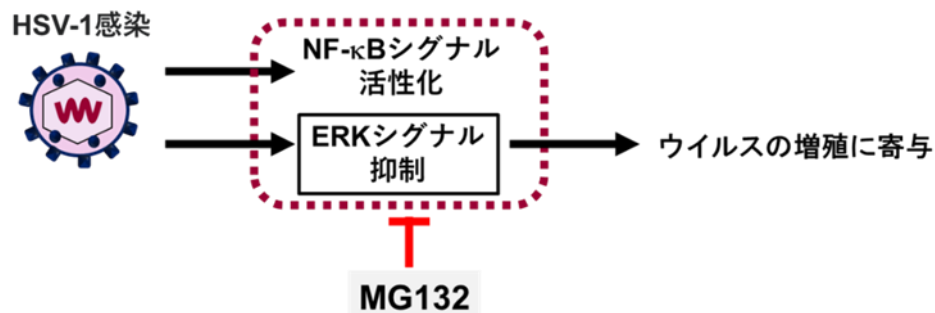


Figure 29. HSV-1 感染により変動する細胞内シグナル経路とウイルス増殖への寄与

以上のことから、HSV-1 感染による NF-κB シグナル活性化は細胞による免疫応答として活性化し、ERK シグナル抑制はウイルス増殖に必要であると示唆された (Figure 29)。

第3章 MG132 は HSV-1 感染により誘導される Ras-GRF2 のプロテアソーム分解を抑制することで抗 HSV-1 活性を発揮する。

### 3-1. はじめに

HSV-1 感染により ERK シグナル経路の c-Raf(S338)、MEK(S217/S221)、ERK1/2、p90RSK(S380) のリン酸化が抑制され、MG132 処理により再活性化する。さらに、ERK シグナル阻害剤 PD98059 処理によりウイルスの複製が亢進することは、ウイルス感染における ERK 経路抑制の重要性を示している。そこで、ERK シグナルの上流制御分子に HSV-1 感染による ERK シグナル抑制を発動するトリガー分子があると推論した。

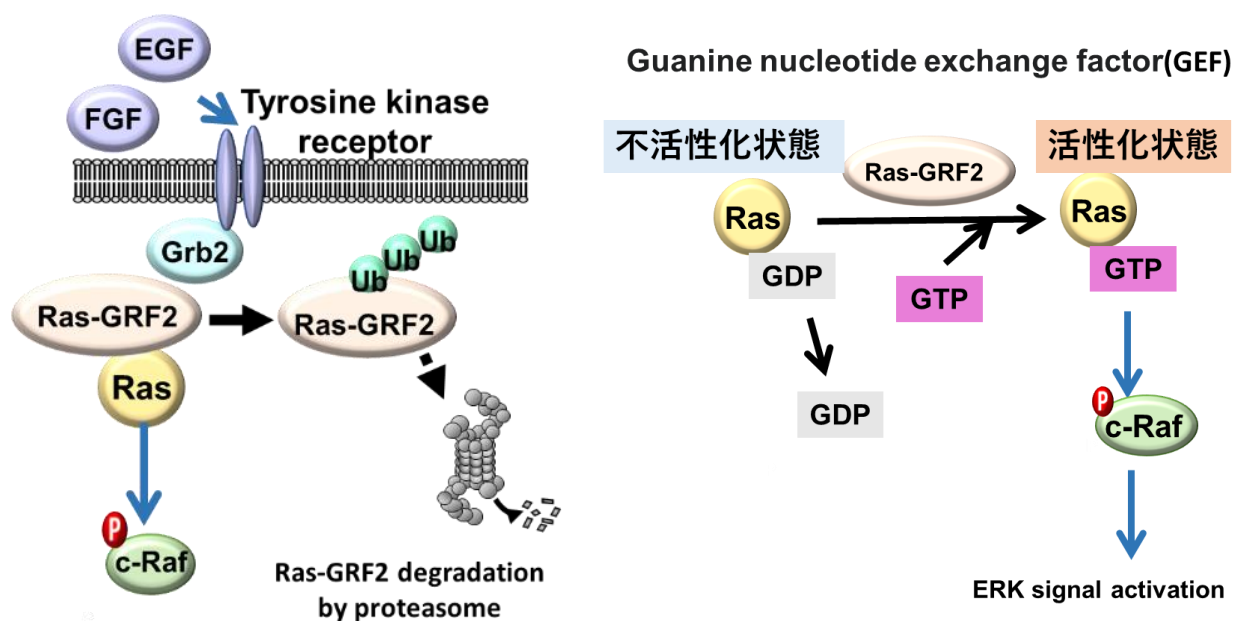


Figure 30. ERK シグナルの上流制御分子

Hanako Ishimaru, et al., Sci. Rep. 2020, 10, 6671 の Figure 11 を改変。

ERK シグナルは、EGF が EGFR に結合すると、細胞質側のチロシンキナーゼ活性が活性化される。EGFR がリン酸化されると Grb2 と GEF である Ras-GRF2 が複合体を形成し、GEF が活性化され、GDP 結合型 Ras は、GTP 結合型（活性型 Ras）になる<sup>37)</sup>。活性化された Ras は下流のリン酸化を媒介し ERK シグナルを活性化する (Figure 30)。Ras-GRF2 は分解のための PEST モチーフと、Ras および Rac 依存性の ERK シグナルを活性化するための Cdc25 ドメインを保有しており、Ras と相互作用する<sup>38、39)</sup>。

MG132 はプロテアソーム阻害剤であるため、プロテアソームで分解される ERK シグナル上流制御分子の報告を調査した。その結果、EGFR<sup>40、41)</sup>、Ras-GRF2<sup>42)</sup>、h-Ras<sup>43)</sup>の3つの分子がプロテアソームの基質であることが分かった。そこでこれらの3つの分子を中心に ERK シグナル上流分子のうちウイルス感染により不安定化する分子を探索した。

### 3-2 材料と方法

#### 3-2-1. 阻害剤調製と抗体

ウェスタンブロットで使用した抗体を以下に記す。

抗体名	会社名	カタログ番号	希釈倍率
Anti-EGFR-antibody	Cell Signaling	4267	×2000
Anti-FGFR-antibody	Cell Signaling	9740	×2000
Anti-Ras-GRF2-antibody	abcam	ab 121577	×2000
Anti-Ras-GRF1-antibody	Santa Cruz	sc-377234	×2000
Anti-h-Ras-antibody	Santa Cruz	sc-35	×2000
FK2	当ラボで作製		×2000
HRP conjugate anti-mouse IgG	GE ヘルスケア	NA931	×3000
HRP conjugate anti-rabbit IgG	GE ヘルスケア	NA934	×3000

#### 3-2-2. 細胞培養と継代

Vero 細胞、HepG2 細胞は 10% FCS 含有 DMEM を用いて細胞培養を行った。細胞の継代は第 1 章の 1-1-2 に記載している方法で行った。

#### 3-2-3. フローサイトメトリー法

細胞に発現する EGFR の発現量を解析するため、抗 EGFR 抗体と蛍光抗体を用いて蛍光強度をフローサイトメーターで解析した。EGFR の発現量にトリプシン処理が影響しないことを FACS により確認後、下記実験を行った。6 well プレートに播種した Vero 細胞にトリプシン溶液を処理し DMEM 培地で懸濁後、1,500 rpm、5 分間遠心し細胞を沈降させた。作業中のタンパク質分解を抑えるために 4℃ に冷やした PBS で 2 回洗浄し、4℃ に冷やした 4% パラホルムアルデヒドにより室温で 10 分間細胞を固定した。PBS で 3 回洗浄後、0.1% Triton X-100 で 30 分間透過処理した。抗体の非特異反応を防ぐため、3% FBS を含む PBS (FACS バッファー) で細胞を懸濁しブロッキングを 30 分間行なった。その後、3% FBS 含有 PBS で細胞を洗浄した。一次抗体は 3% FBS 含有 PBS で希釈し、4℃ で 1 時間細胞に処理後、3% FBS 含有 PBS で一次抗体を洗浄し、Alexa Fluor 647 抗ラビット抗体で 1 時間インキュベートした。その後 3% FBS 含有 PBS で 3 回細胞を洗浄し、3,000 rpm で 2 分間遠心して染色した細胞を沈降させ PBS で再懸濁した。この細胞懸濁液を 70 µm 径のナイロンメッシュに通した後、LSRFortessa Flow Cytometer を用いて蛍光強度を解析した。コントロール IgG である抗ラビット抗体を処理した細胞の蛍光強度を基準にし、抗 EGFR 抗体で染色した細胞の蛍光強度を測定した。細胞の蛍光強度を FACSDiva™ software で解析した。

#### 3-2-4. ウェスタンブロット

第 1 章の 1-2-9 に記載した方法で行った。



### 3-2-5. 蛍光抗体染色と共局在解析

第2章の2-2-3に記載した方法でおこなった。

### 3-2-6. 免疫沈降

免疫沈降は全て氷上で行なった。免疫沈降で用いる radioimmuno precipitation assay(RIPA)バッファの組成を以下に記す。

<RIPA バッファ>

50 mM Tris-HCl (pH7.5)

150 mM NaCl

5 mM EDTA

0.5% sodium deoxycholate

1% NP-40

0.1% SDS

細胞を冷却した PBS で2回洗浄した後、RIPA バッファ[1 mM NEM (N-ethylemaleimide)、500  $\mu$ M PMSF、5  $\mu$ g/mL aprotinin を含む] で細胞を懸濁し、5 秒間超音波破碎した。得られた細胞破碎液に RIPA バッファで洗浄した sephadex G-75 ビーズをビーズボリューム 30  $\mu$ L 加え、この溶液を 4°C で 10 分間攪拌した。その後ビーズを含んだ溶液を 15,000 rpm、4°C、13 分間遠心することで不溶性画分を除去し、上清を回収した。この sephadex G-75 ビーズによる洗浄をもう 1 度行い不溶性画分を完全に除去した。この上清の一部をインプットサンプルとして 70  $\mu$ L 回収した。また残りの上清に、1.5  $\mu$ L anti-Ras-GRF2 antibody を protein A/G-Sepharose に結合させた抗体結合ビーズをビーズボリューム 20  $\mu$ L 加えた。この混合液を 4°C、1 時間攪拌することで、Ras-GRF2 抗原を抗体結合ビーズに結合させた。その後この混合溶液を 3,000 rpm、4°C、10 秒遠心することで抗体結合ビーズを沈降させ、上清を除去し RIPA バッファで 3 回洗浄した。抗体結合ビーズに結合した Ras-GRF2 抗原の溶出時に 5% メルカプトエタノール含有 4xSDS sample バッファを 1 サンプルあたり 30  $\mu$ L 加え、室温で 10 分間静置させた。Ub 鎖を検出するとき、溶出したサンプルを煮沸すると Ub 鎖の凝集物が生じ、SDS-PAGE によるタンパク質の分離ができないため、煮沸は行わなかった。またインプットサンプルに 5% メルカプトエタノール含有 4xSDS Sample Buffer を 22.5  $\mu$ L 加え、その溶液を 95°C で 5 分間煮沸した。これら精製サンプルを -20°C で保存した。

### 3-2-7. プロテアソーム活性測定法

Vero 細胞( $1 \times 10^6$ )を 200  $\mu$ l の lysis buffer [50 mM Tris-HCl (pH 7.6), 1 mM  $MgCl_2$ , 0.2 mM ATP, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 0.2% NP-40, 1% glycerol]で溶解した。細胞溶解液 10  $\mu$ l を 90  $\mu$ l の反応液[50 mM Tris-HCl (pH 7.8), 10 mM  $MgCl_2$ , 2 mM ATP, 1 mM DTT, 0.1 mM Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA (methylcoumaryl-7-amide)]に加えて 37°C でインキュベートした。その後、蛍光強度 (励起波長 380 nm : 発光波長 460 nm) を microplate spectrofluorometer Infinite M200 (Tecan) により測定した。

### 3-3. 結果

#### 3-3-1. HSV-1 感染による Ras-GRF2 の不安定化

第2章で、HSV-1 感染による ERK シグナルの抑制がウイルス増殖に必要であり、ERK シグナルを解析すると、c-Raf (S338) から下流である MEK (S217/S221)、ERK1/2 および p90RSK (S380) のリン酸化が抑制されていた。そこで c-Raf (S338) より上流分子である EGFR、FGFR、Ras-GRF2、Ras-GRF1 および h-Ras の発現量を解析した。その結果、ウイルス感染による EGFR、FGFR、Ras-GRF1 および h-Ras 発現量の変化はなかった (Figure 32 and 33)。一方で、Ras-GRF2 は HSV-1 感染により発現量が低下し、MG132 処理により発現量が回復することが分かった (Figure 33)。免疫染色法により Ras-GRF2 (緑) と ICP5 (赤) を染色した結果、Ras-GRF2 が HSV-1 感染により減少し、MG132 処理によりこの減少がキャンセルされた (Figure 34)。次にこの発現量低下が、感染させる HSV-1 量に依存するのか調べるため HSV-1 を MOI=0、0.1、1、5 の4つ条件で感染させ、Ras-GRF2 の発現量を比較した。その結果、Ras-GRF2 の発現量低下が HSV-1 量依存的に亢進することが明らかになった (Figure 35)。

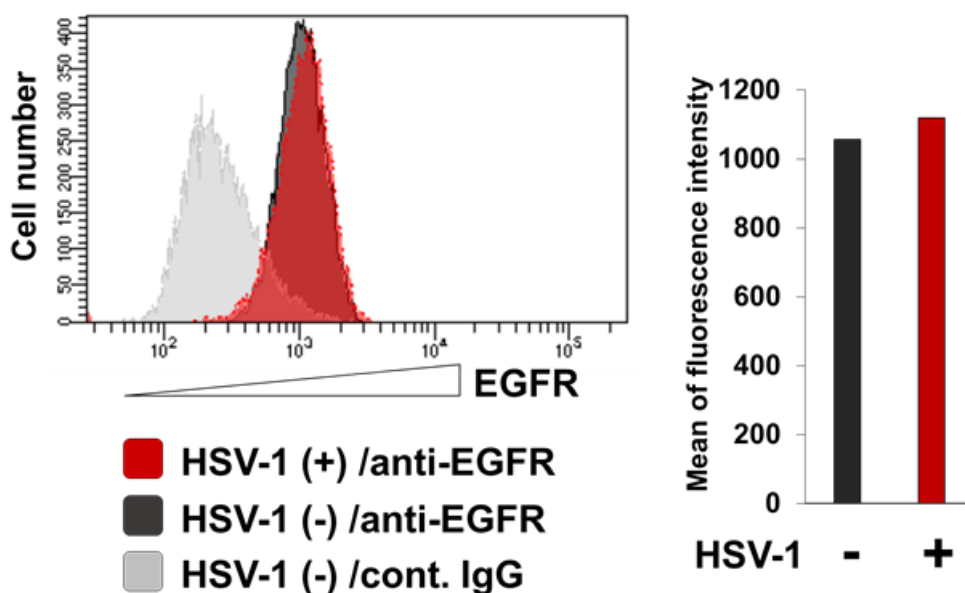


Figure 32. HSV-1 感染の EGFR の発現量への影響

Vero 細胞に HSV-1 を MOI=1 で感染させ、12 時間後、EGFR を認識する抗体を用いて細胞の EGFR の発現をフローサイトメトリーで解析した。左図は EGFR の蛍光強度のヒストグラムを示している。赤は HSV-1 感染処理、黒は非感染細胞、ライトグレーはコントロール IgG を処理した細胞のヒストグラムを示している。右図は非感染細胞での EGFR の平均蛍光強度を 1 とした相対値を縦軸に示している。Hanako Ishimaru, et al., Sci. Rep. 2020, 10, 6671 の Figure 8e を改変。

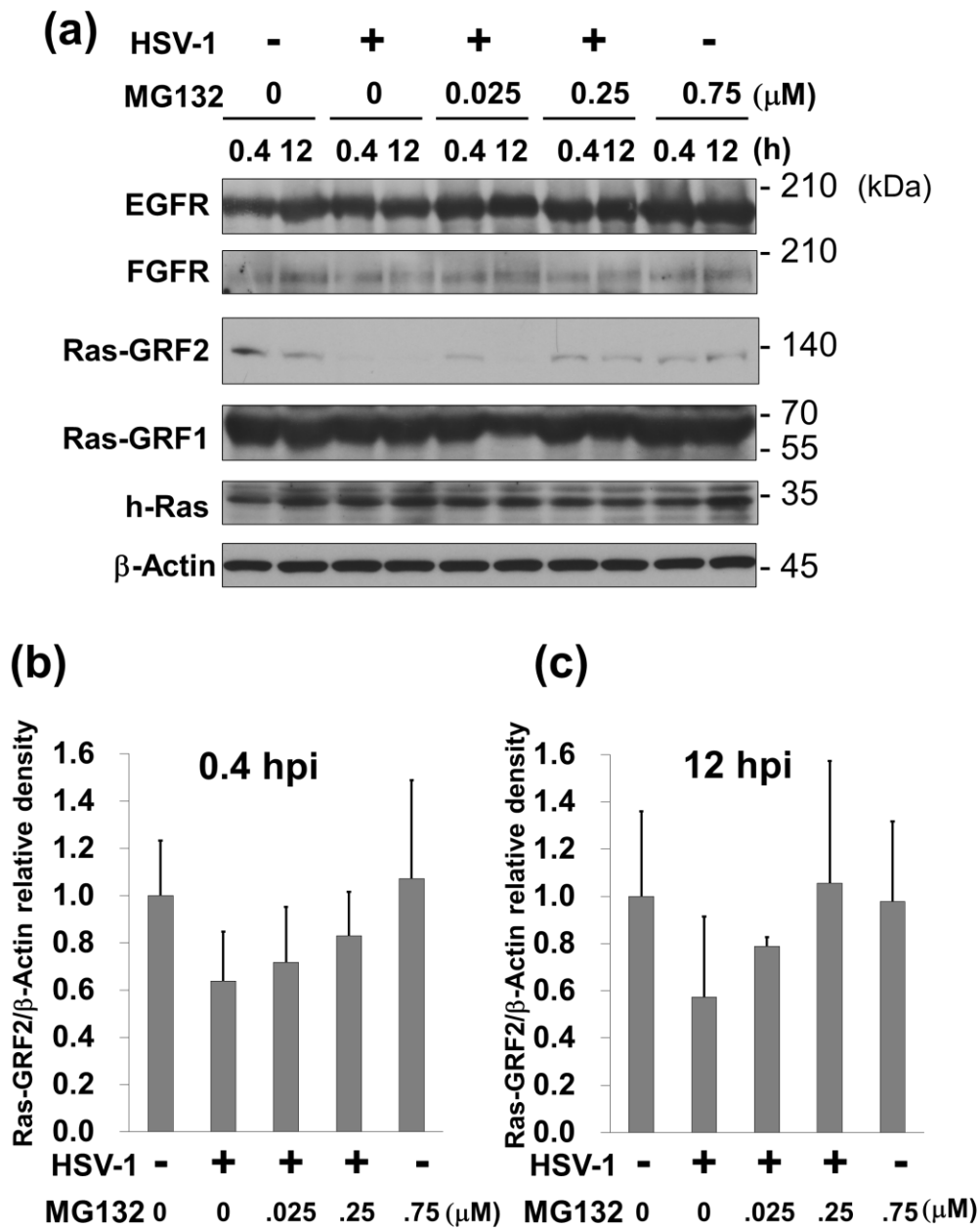


Figure 33. (a) HSV-1 感染による Ras-GRF2 の発現量低下と MG132 処理による回復  
Vero 細胞に HSV-1 感染後、各濃度の MG132 を処理し 0.4、12 時間後にサンプルを回収し、anti-EGFR antibody、anti-FGFR antibody、anti-Ras-GRF2 antibody、anti-Ras-GRF1 antibody、anti-h-Ras antibody、anti- $\beta$ -Actin antibody で検出した。(b) (a)で示した HSV-1 非感染および感染 0.4 時間後で示した Ras-GRF2 のバンドのシグナル強度を $\beta$ -Actin のバンドのシグナル強度で割った値をグラフにした。HSV-1 非感染 MG132 未処理を 1.0 として相対値を示した。(c) (a)で示した HSV-1 非感染および感染 12 時間後で示した Ras-GRF2 のバンドのシグナル強度を $\beta$ -Actin のバンドのシグナル強度で割った値をグラフにした。HSV-1 非感染 MG132 未処理を 1.0 として相対値を示した。(a-c) Hanako Ishimaru, et al., Sci. Rep. 2020, 10, 6671 の Figure 8a-b を改変。

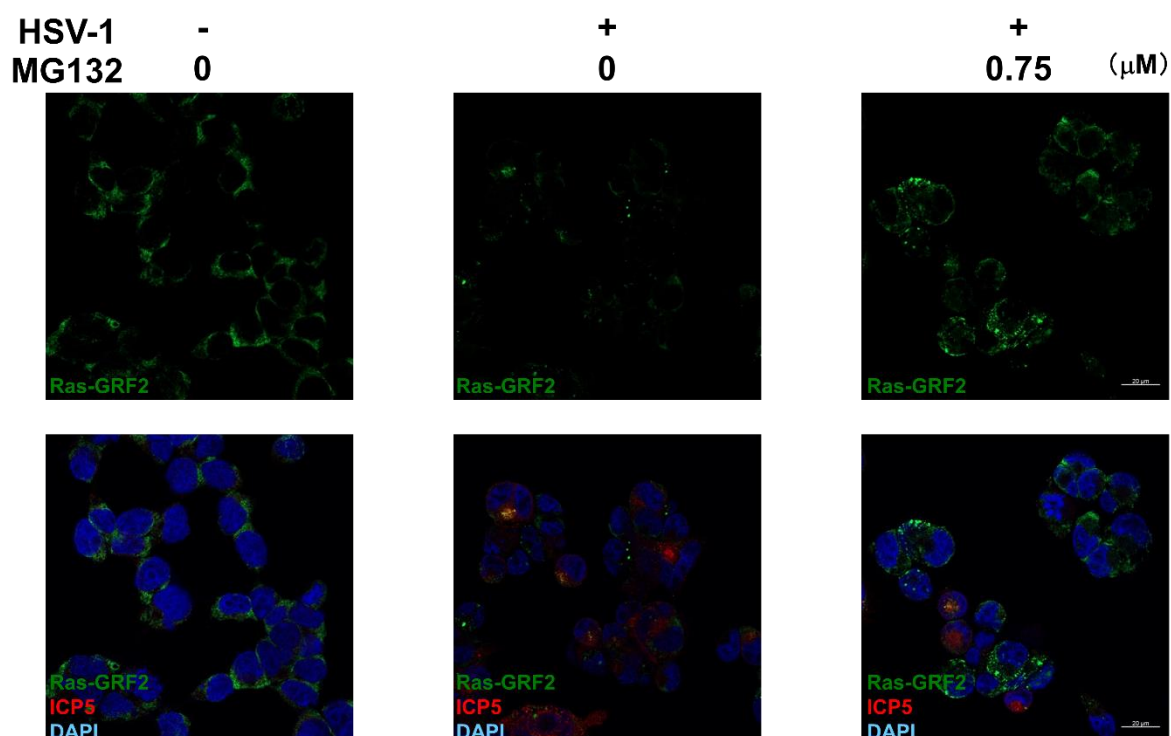


Figure 34. HSV-1 感染による Ras-GRF2 の発現低下と MG132 処理による回復。

HepG2 細胞に HSV-1 を感染後、各濃度の MG132 を処理し、12 時間後にサンプルを回収して Ras-GRF2 を緑色蛍光色素、ICP5 を赤色蛍光色素、核を青色蛍光色素 DAPI で染色した。Hanako Ishimaru, et al., Sci. Rep. 2020, 10, 6671 の Figure 9 を改変。

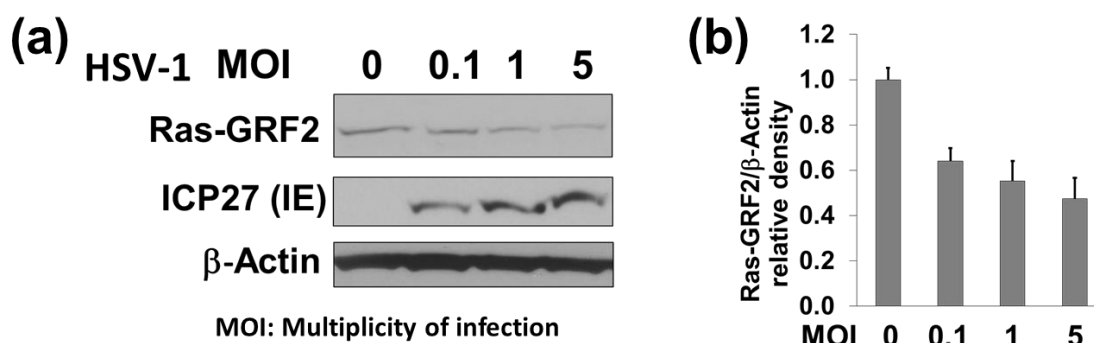


Figure 35. Ras-GRF2 不安定化のウイルス量依存

(a) Vero 細胞に HSV-1 を MOI : 0、0.1、1、5 で感染後させ、12 時間後にサンプルを回収し anti-Ras-GRF2 antibody、anti-ICP27 antibody、anti-β-Actin antibody で検出した。(b) (a)で示した Ras-GRF2 のバンドのシグナル強度をβ-Actin のバンドのシグナル強度で割った値をグラフにした。MOI=0 の条件を 1.0 として相対値を示した。Hanako Ishimaru, et al., Sci. Rep. 2020, 10, 6671 の Figure 8c を改変。

### 3-3-2. HSV-1 感染による Ras-GRF2 のポリユビキチン化亢進

3-3-1 で HSV-1 感染により ERK シグナル上流分子 Ras-GRF2 の発現が低下し、その Ras-GRF2 の発現低下は HSV-1 量依存的だった。Ras-GRF2 はポリユビキチン化を受けプロテアソームで分解されることが報告されている。そこで HSV-1 感染による Ras-GRF2 の発現量低下が HSV-1 感染によってプロテアソーム活性が上昇するのか、Ras-GRF2 のポリユビキチン化の亢進に起因するのか解析した。HSV-1 を Vero 細胞に感染させ、0、3、6、12、24 時間後のプロテアソーム活性を評価した (Figure 36) が、ウイルス感染によりプロテアソーム活性は上昇しなかった。次に HSV-1 感染による Ras-GRF2 のポリユビキチン化への影響を免疫沈降により解析した (Figure 37)。その結果、Ras-GRF2 のユビキチン化は非感染に比べて増加した。よって、これらの結果から HSV-1 感染は Ras-GRF2 のポリユビキチン化を亢進することでプロテアソーム分解を促進することが示唆された。

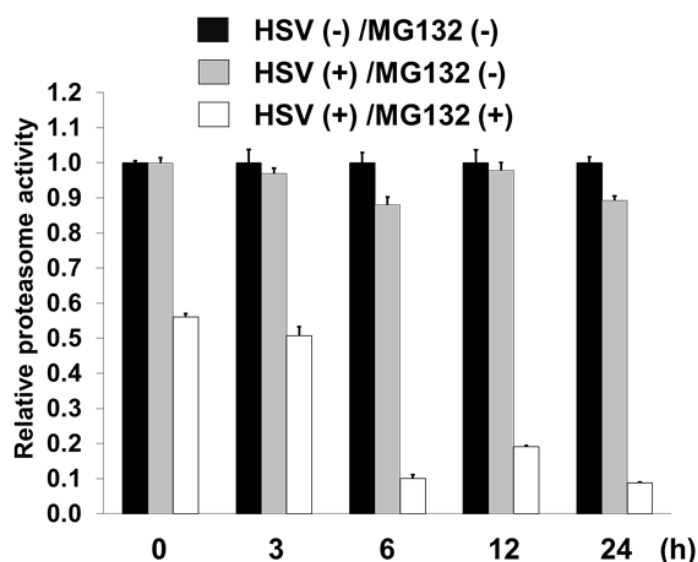


Figure 36. HSV-1 感染のプロテアソーム活性への影響

Vero 細胞に MOI=1 で HSV-1 を感染させ、0.75 $\mu$ M MG132 処理の有無で 0、3、6、12、24 時間培養し細胞溶解液を調製した。プロテアソームのキモトリプシン様活性を測定するため、細胞溶解液をプロテアソームの基質とインキュベートし、蛍光強度を fluorometric assay で比較した。非感染および MG132 未処理[HSV-1 (-) /MG132 (-), 黒]、HSV-1 感染および MG132 未処理[HSV (+) /MG132 (-), グレー]、HSV-1 感染および MG132 処理[HSV (+) /MG132 (+), 白]の細胞溶解液を用いて行い、結果をグラフにプロットした。HSV-1 (-) /MG132 (-) 細胞の 0 時間のプロテアソーム活性を 1.0 とて相対値を示した。Hanako Ishimaru, et al., Sci. Rep. 2020, 10, 6671 の Figure 8f を改変。

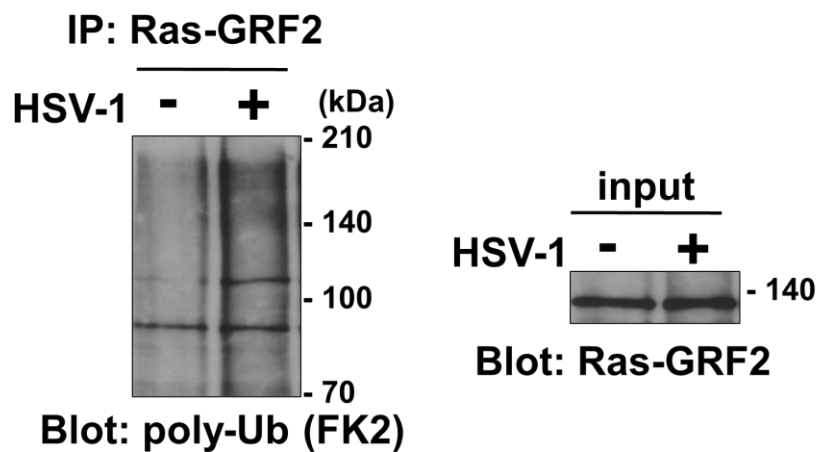


Figure 37. HSV-1 感染による Ras-GRF2 のポリユビキチン化亢進

HSV-1 感染細胞および非感染細胞に 0.025  $\mu$ M の MG132 を処理した。12 時間後回収した細胞溶解液に抗 Ras-GRF2 抗体を結合させたプロテイン A/G ビーズを添加し免疫沈降を行った。ポリユビキチン化を検出するため、Ras-GRF2 を含むサンプルに対し抗ポリユビキチン抗体 (FK2 抗体) を用いてブロットした。Hanako Ishimaru, et al., Sci. Rep. 2020, 10, 6671 の Figure 8g を改変。

### 3-4. 考察

2章では、HSV-1 感染による ERK シグナルの抑制が c-Raf (S338) から下流の分子のリン酸化低下として観察された ERK シグナルの抑制がウイルス増殖に必要であることを見出した。c-Raf より上流の分子である EGFR、FGFR、Ras-GRF1 および h-Ras の発現量に変化はなかった。一方で、Ras-GRF2 は HSV-1 感染により発現量が低下し、MG132 処理により回復した。この HSV-1 感染による Ras-GRF2 の発現低下は HSV-1 量依存的に亢進した。

3章では HSV-1 感染による Ras-GRF2 の発現低下の原因を HSV-1 感染によるプロテアソーム活性が上昇するのか、Ras-GRF2 のポリユビキチン化の亢進によるものなのか解析した。その結果、HSV-1 感染によりプロテアソーム活性は上昇せず、HSV-1 感染により Ras-GRF2 のポリユビキチン化が亢進することを見出した。したがって、HSV-1 の感染や複製に Ras-GRF2 のプロテアソーム分解を介した ERK シグナル伝達の抑制が必要であり、MG132 は HSV-1 が媒介する Ras-GRF2 のプロテアソーム分解を阻害することにより ERK シグナルの活性化を行い、抗 HSV-1 活性を発揮することを明らかにした(Figure 38)。

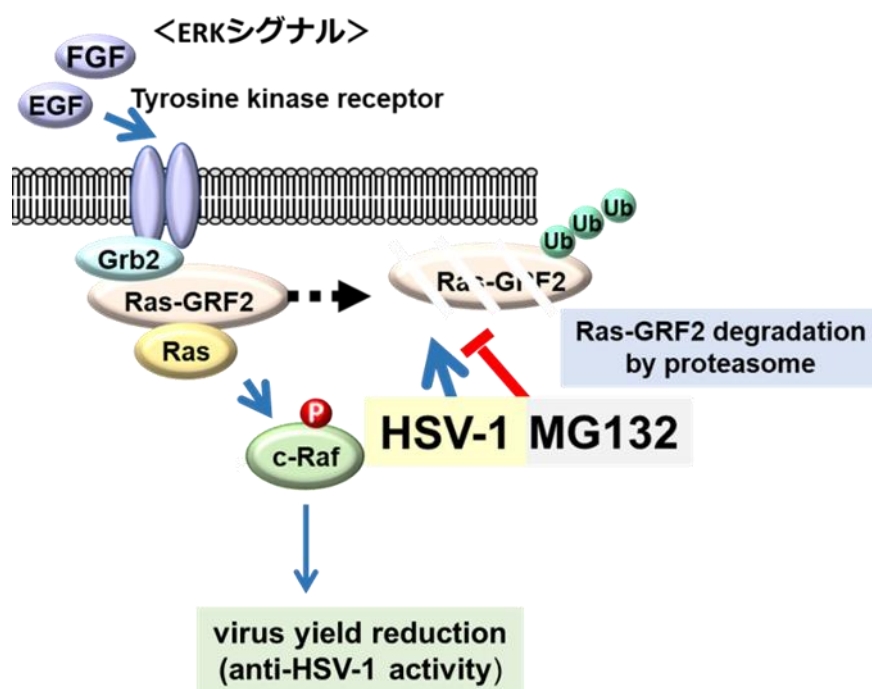


Figure 38 . HSV-1 感染による Ras-GRF2 の分解と MG132 による分解抑制

HSV-1 の感染や複製に Ras-GRF2 のプロテアソーム分解を介した ERK シグナル伝達の抑制が必要である。MG132 は HSV-1 が媒介する Ras-GRF2 のプロテアソーム分解を阻害することにより ERK シグナルの活性化を行い、抗 HSV-1 活性を発揮する。

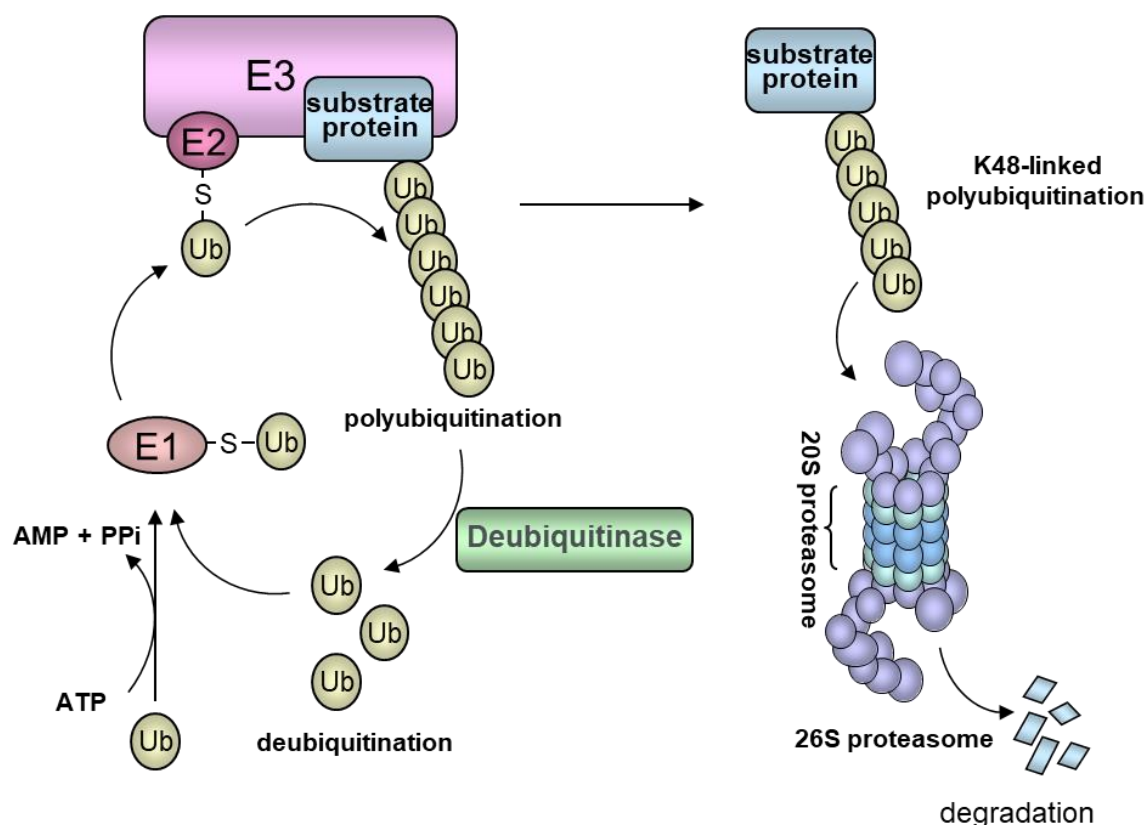


Figure 39 . Ub 化修飾とプロテアソーム分解機構

ユビキチン活性化酵素 (E1)、ユビキチン結合酵素(E2)およびユビキチンリガーゼ (E3)からなるユビキチン付加酵素群によってポリユビキチン鎖が標的蛋白質に付加される。

ユビキチン化修飾は、ユビキチン活性化酵素 (E1)、ユビキチン結合酵素 (E2)およびユビキチンリガーゼ (E3)からなるユビキチン付加酵素群によってポリユビキチン鎖が標的蛋白質に付加される翻訳後修飾システムである<sup>44-46)</sup>。E1 は ATP 依存的に Ub の C 末端が活性化する。そして活性化された Ub は E2 とシステイン残基を介してチオエステル結合し、E1 から E2 に転移し、E3 を介して基質に Ub が受け渡される。この E1-E2-E3 の一連の反応により、標的蛋白質の残基にユビキチンが共有結合し、さらに共有結合したユビキチンの Lys 残基にユビキチンが共有結合し、このユビキチン化の反応が繰り返されてポリユビキチン鎖が形成される (Figure 39)。

ユビキチン化されプロテアソームで分解される基質は共通配列として PEST 配列を保有することが報告されている<sup>47)</sup>。PEST 配列とは、プロリン (P)、グルタミン酸 (E)、セリン (S)、スレオニン (T) のアミノ酸配列に富む領域を指す。細胞内のプロテアソーム・ユビキチン系において、対象タンパク質にユビキチンを結合させる酵素がこれらの配列を認識すると考えられている。

Ras-GRF2 は、分子内にポリユビキチン化のための認識配列を含む PEST モチーフを有しておりポリユビキチン化されて分解されることが知られている<sup>38, 39)</sup>。HSV-1 感染は Ras-GRF2



のポリユビキチン化を亢進し、プロテアソーム分解を誘導するが、プロテアソーム阻害剤 MG132 は、HSV-1 感染による Ras-GRF2 分解を阻害した。そこで、Ras-GRF2 のポリユビキチン化を惹起する E3 を同定することは、抗 HSV-1 薬開発の作用点になりうると考え、HSV-1 感染により Ras-GRF2 ポリユビキチン化を惹起する E3 を考察した。

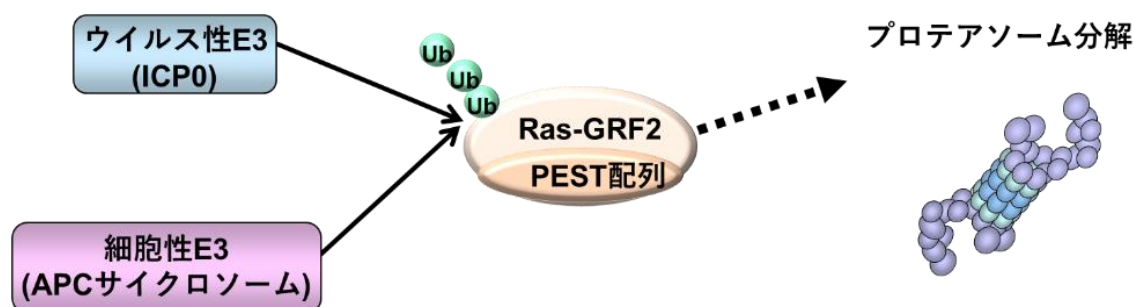


Figure 40 . HSV-1 感染により Ras-GRF2 ポリユビキチン化を惹起する E3 の候補

Ras-GRF2 ポリユビキチン化を亢進する E3 の候補として、ウイルス性 E3 である ICP0 および、細胞性 E3 である APC サイクロソームが考えられる。

HSV-1 感染により Ras-GRF2 ポリユビキチン化を惹起する E3 の候補として、ウイルス性 E3 と細胞性 E3 が考えられる。そこで、HSV-1 感染により Ras-GRF2 ポリユビキチン化を亢進する E3 の候補を文献調査した。その結果、ウイルス性 E3 である ICP0 および、細胞性 E3 である APC サイクロソームが考えられる。ICP0 は HSV-1 感染直後に発現誘導される前初期遺伝子で、転写因子としての機能の他にウイルス性の E3 リガーゼとして機能し、PML、CENP-C、DNA プロテインキナーゼのポリユビキチン化を触媒することが知られている。このことから ICP0 が Ras-GRF2 を基質として認識し Ub 化を介し分解誘導し得ると推察した。2 つ目は細胞性ユビキチン E3 リガーゼの APC サイクロソームである。APC サイクロソームは主に M 期サイクリンの分解を行うことで細胞周期の制御を行う。Ras-GRF2 のポリ Ub 化とプロテアソーム分解を報告した論文で Ras-GRF2 のユビキチンリガーゼとして APC サイクロソームが報告されている<sup>38, 39)</sup>。APC サイクロソームは PEST 配列を有したタンパク質のユビキチン化を行う。Ras-GRF2 もその配列の中に PEST 配列を保有している。以上のことから APC サイクロソームが PEST 配列を有した Ras-GRF2 の Ub 化を介し分解誘導し得ると考察した (Figure 40)。

## 総括

現在の抗ヘルペスウイルス薬は薬物耐性株や腎毒性などの課題を有している。本研究では、新規 HSV-1 薬開発研究を目的として抗 HSV-1 化合物の探索および HSV-1 の感染機構解明を行った。その結果、5 種類のプロテアーゼ阻害剤のうちプロテアソーム阻害剤 MG132 およびボルテゾミブが抗 HSV-1 活性を有していることを見出した。そして、MG132 を用いて抗 HSV-1 活性の作用機序解析を行った。その結果、MG132 はウイルスの侵入とウイルス前初期遺伝因子発現の間の過程を阻害することが明らかとなった。さらに作用機序解析を進め、HSV-1 により引き起こされるシグナル伝達経路の変化を解析した。そして、HSV-1 感染により NF- $\kappa$ B シグナルは活性化し、ERK シグナルは抑制されることを見出した。さらに MG132 が HSV-1 感染による NF- $\kappa$ B シグナルの活性化および ERK シグナル抑制をキャンセルすることを見出した。そして、各種シグナル伝達阻害剤を用いて、NF- $\kappa$ B シグナルの活性化は HSV-1 の増殖に必要なが、ERK シグナルの抑制はウイルスの増殖に必要であることを明らかにした。また、HSV-1 は感染時に ERK シグナルの活性化因子 Ras-GRF2 のプロテアソーム分解を誘導することが示された。さらに、HSV-1 感染時の MG132 処理は Ras-GRF2 のプロテアソーム分解を阻害することで ERK シグナルを活性化し、抗 HSV-1 活性を発揮することが示された。そして、HSV-1 感染が Ras-GRF2 のポリユビキチン化およびプロテアソーム分解を介して宿主細胞の Ras-Raf-MEK-ERK シグナル伝達経路を抑制することを明らかにした。

以上の研究結果から、プロテアソーム阻害剤はアシクロビルなどの核酸代謝拮抗剤とは作用機序の異なる新しい抗 HSV-1 化合物になり得ることが示唆された。さらに、HSV-1 感染による Ras-GRF2 のユビキチン化機構を解明することはその作用点を標的とした抗 HSV-1 薬開発の一助になると考える。

## 結語

- (1) プロテアソーム阻害剤ボルテゾミブと MG132 は抗 HSV-1 活性を有している。
- (2) HSV-1 感染により NF- $\kappa$ B シグナルは活性化し、ERK シグナルは抑制される。これらの活性化と抑制は MG132 処理によりキャンセルされる。
- (3) NF- $\kappa$ B シグナルの活性化は HSV-1 の増殖に必要なが、ERK シグナルの抑制はウイルスの増殖に必要である。
- (4) HSV-1 は Ras-GRF2 のユビキチン化を亢進することで Ras-GRF2 のプロテアソーム分解を誘導する。その結果、HSV-1 感染により ERK シグナルが抑制される。
- (5) MG132 は HSV-1 による Ras-GRF2 のプロテアソーム分解を抑制することで抗ウイルス活性を発揮する。

## 謝辞

本研究の遂行にあたり、丁寧かつ的確な助言をくださいました京都薬科大学大学院 薬学研究科 細胞生物学分野研究室 藤室雅弘教授に心から深く感謝いたします。

本研究の内容に関して、的確な助言及び多大なる御協力下さいました琉球大学 医学部研究科 ウイルス学講座 渡部匡史講師に心から御礼申し上げます。

本論文を審査して下さいました京都薬科大学大学院 薬学研究科生化学分野研究室 中山祐治教授、ならびに微生物・感染制御学分野研究室 八尋錦之助教授に、深く感謝いたします。

本研究にあたり、実験の一部にご協力賜りました京都薬科大学大学院 薬学研究科 細胞生物学分野研究室卒業生細川晃平氏に御礼申し上げます。

最後に、本大学院への進学に理解および支援してくれた両親に、そして温かく見守ってくださった細胞生物学分野の皆様心から深く感謝いたします。

2022 年 3 月

## 参考文献

- (1) Roizman, B.; Whitley, R. J. An Inquiry into the Molecular Basis of HSV Latency and Reactivation. *Annu. Rev. Microbiol.* **2013**, *67*, 355-374.
- (2) Whitley, R. J.; Roizman, B. Herpes Simplex Virus Infections. *Lancet (London, England)* **2001**, 357, 1513-18.
- (3) Eisenstein, L. E.; Calio, A. J.; Cunha, B. A. Herpes Simplex (HSV-1) Aseptic Meningitis. *Heart Lung* **2004**, *33*, 196-197.
- (4) Khan, M. T. H.; Ather, A.; Thompson, K. D.; Gambari, R. Extracts and Molecules from Medicinal Plants against Herpes Simplex Viruses. *Antiviral Res.* **2005**, *67*, 107-119.
- (5) Andrei, G.; Snoeck, R. Herpes Simplex Virus Drug-Resistance: New Mutations and Insights. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **2013**, *26*, 551-560.
- (6) De Clercq, E.; Li, G. Approved Antiviral Drugs over the Past 50 Years. *Clin. Microbiol. Rev.* **2016**, *29*, 695-747.
- (7) James, S. H.; Prichard, M. N. Current and Future Therapies for Herpes Simplex Virus Infections: Mechanism of Action and Drug Resistance. *Curr. Opin. Virol.* **2014**, *8*, 54-61.
- (8) Ashizawa, A.; Higashi, C.; Masuda, K.; Ohga, R.; Taira, T.; Fujimuro, M. The Ubiquitin System and Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus. *Front. Microbiol.* **2012**, *3*, 66.
- (9) Bieniasz, P. D. Late Budding Domains and Host Proteins in Enveloped Virus Release. *Virology* **2006**, *344*, 55-63.
- (10) Kurt Yilmaz, N.; Swanstrom, R.; Schiffer, C. A. Improving Viral Protease Inhibitors to Counter Drug Resistance. *Trends Microbiol.* **2016**, *24*, 547-557.
- (11) Gantt, S.; Casper, C.; Ambinder, R. F. Insights into the Broad Cellular Effects of Nelfinavir and the HIV Protease Inhibitors Supporting Their Role in Cancer Treatment and Prevention. *Curr. Opin. Oncol.* **2013**, *25*, 495-502.
- (12) di Meo, N.; Bergamo, S.; Dondas, A.; Trevisan, G. Bortezomib and Bilateral Herpes Zoster. *Acta dermatovenerologica Alpina, Pannonica, Adriat.* **2012**, *21*, 21-22.
- (13) Tran, K.; Mahr, J. A.; Spector, D. H. Proteasome Subunits Relocalize during Human Cytomegalovirus Infection, and Proteasome Activity Is Necessary for Efficient Viral Gene Transcription. *J. Virol.* **2010**, *84*, 3079-93.
- (14) Kaspari, M.; Tavalai, N.; Stamminger, T.; Zimmermann, A.; Schilf, R.; Bogner, E. Proteasome Inhibitor MG132 Blocks Viral DNA Replication and Assembly of Human Cytomegalovirus. *FEBS Lett.* **2008**, *582*, 666-672.
- (15) Saji, C.; Higashi, C.; Niinaka, Y.; Yamada, K.; Noguchi, K.; Fujimuro, M. Proteasome Inhibitors Induce Apoptosis and Reduce Viral Replication in Primary Effusion Lymphoma Cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2011**, *415*, 573-578.

- (16) Delboy, M. G.; Nicola, A. V. A Pre-Immediate-Early Role for Tegument ICP0 in the Proteasome-Dependent Entry of Herpes Simplex Virus. *J. Virol.* **2011**, 85, 5910-18.
- (17) Delboy, M. G.; Roller, D. G.; Nicola, A. V. Cellular Proteasome Activity Facilitates Herpes Simplex Virus Entry at a Postpenetration Step. *J. Virol.* **2008**, 82, 3381-90.
- (18) Nandi, D.; Tahiliani, P.; Kumar, A.; Chandu, D. The Ubiquitin-Proteasome System. *Journal of Biosciences*, **2006**, 31, 137-155.
- (19) Nishimura, M.; Watanabe, T.; Yagi, S.; Yamanaka, T.; Fujimuro, M. Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus ORF34 Is Essential for Late Gene Expression and Virus Production. *Sci. Rep.* **2017**, 7, 329.
- (20) Pleschka, S. RNA Viruses and the Mitogenic Raf/MEK/ERK Signal Transduction Cascade. *Biol. Chem.* **2008**, 389, 1273-82.
- (21) Järviluoma, A.; Ojala, P. M. Cell Signaling Pathways Engaged by KSHV. *Biochim. Biophys. Acta* **2006**, 1766, 140-158.
- (22) Qin, D.; Feng, N.; Fan, W.; Ma, X.; Yan, Q.; Lv, Z.; Zeng, Y.; Zhu, J.; Lu, C. Activation of PI3K/AKT and ERK MAPK Signal Pathways Is Required for the Induction of Lytic Cycle Replication of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus by Herpes Simplex Virus Type 1. *BMC Microbiol.* **2011**, 11, 240.
- (23) Laing, J. M.; Smith, C. C.; Aurelian, L. Multi-Targeted Neuroprotection by the HSV-2 Gene ICP10PK Includes Robust Bystander Activity through PI3-K/Akt and/or MEK/ERK-Dependent Neuronal Release of Vascular Endothelial Growth Factor and Fractalkine. *J. Neurochem.* **2010**, 112, 662-676.
- (24) Chuluunbaatar, U.; Roller, R.; Mohr, I. Suppression of Extracellular Signal-Regulated Kinase Activity in Herpes Simplex Virus 1-Infected Cells by the Us3 Protein Kinase. *J. Virol.* **2012**, 86, 7771-76.
- (25) McLean, T. I.; Bachenheimer, S. L. Activation of CJUN N-Terminal Kinase by Herpes Simplex Virus Type 1 Enhances Viral Replication. *J. Virol.* **1999**, 73, 8415-26.
- (26) Walsh, D.; Mohr, I. Phosphorylation of EIF4E by Mnk-1 Enhances HSV-1 Translation and Replication in Quiescent Cells. *Genes Dev.* **2004**, 18, 660-672.
- (27) Zhang, H.; Feng, H.; Luo, L.; Zhou, Q.; Luo, Z.; Peng, Y. Distinct Effects of Knocking down MEK1 and MEK2 on Replication of Herpes Simplex Virus Type 2. *Virus Res.* **2010**, 150, 22-27.
- (28) Farassati, F.; Yang, A. D.; Lee, P. W. Oncogenes in Ras Signalling Pathway Dictate Host-Cell Permissiveness to Herpes Simplex Virus 1. *Nat. Cell Biol.* **2001**, 3, 745-750.
- (29) Torres, N. I.; Castilla, V.; Bruttomesso, A. C.; Eiras, J.; Galagovsky, L. R.; Wachsman, M. B. In Vitro Antiviral Activity of Dehydroepiandrosterone, 17 Synthetic Analogs and ERK Modulators against Herpes Simplex Virus Type 1. *Antiviral Res.* **2012**, 95, 37-48.
- (30) Melchjorsen, J.; Sirén, J.; Julkunen, I.; Paludan, S. R.; Matikainen, S. Induction of Cytokine Expression by Herpes Simplex Virus in Human Monocyte-Derived Macrophages and Dendritic Cells Is Dependent on Virus Replication and Is Counteracted by ICP27 Targeting NF-KappaB and IRF-3. *J. Gen. Virol.* **2006**, 87, 1099-1108.

- (31) Cai, M.; Li, M.; Wang, K.; Wang, S.; Lu, Q.; Yan, J.; Mossman, K. L.; Lin, R.; Zheng, C. The Herpes Simplex Virus 1-Encoded Envelope Glycoprotein B Activates NF- $\kappa$ B through the Toll-like Receptor 2 and MyD88/TRAF6-Dependent Signaling Pathway. *PLoS One* **2013**, 8, e54586-e54586.
- (32) Leoni, V.; Gianni, T.; Salvioli, S.; Campadelli-Fiume, G. Herpes Simplex Virus Glycoproteins GH/GL and GB Bind Toll-like Receptor 2, and Soluble GH/GL Is Sufficient to Activate NF- $\kappa$ B. *J. Virol.* **2012**, 86, 6555-62.
- (33) Medici, M. A.; Sciortino, M. T.; Perri, D.; Amici, C.; Avitabile, E.; Ciotti, M.; Balestrieri, E.; De Smaele, E.; Franzoso, G.; Mastino, A. Protection by Herpes Simplex Virus Glycoprotein D against Fas-Mediated Apoptosis: Role of Nuclear Factor KappaB. *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 36059-67.
- (34) Sciortino, M. T.; Medici, M. A.; Marino-Merlo, F.; Zaccaria, D.; Giuffrè-Cuculletto, M.; Venuti, A.; Grelli, S.; Bramanti, P.; Mastino, A. Involvement of GD/HVEM Interaction in NF- $\kappa$ B-Dependent Inhibition of Apoptosis by HSV-1 GD. *Biochem. Pharmacol.* **2008**, 76, 1522-32.
- (35) Akira, S.; Takeda, K.; Kaisho, T. Toll-like Receptors: Critical Proteins Linking Innate and Acquired Immunity. *Nat. Immunol.* **2001**, 2, 675-680.
- (36) Sato, A.; Linehan, M. M.; Iwasaki, A. Dual Recognition of Herpes Simplex Viruses by TLR2 and TLR9 in Dendritic Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, 103, 17343-48.
- (37) Roberts, P. J.; Der, C. J. Targeting the Raf-MEK-ERK Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade for the Treatment of Cancer. *Oncogene* **2007**, 26, 3291-310.
- (38) Fan, W. T.; Koch, C. A.; de Hoog, C. L.; Fam, N. P.; Moran, M. F. The Exchange Factor Ras-GRF2 Activates Ras-Dependent and Rac-Dependent Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways. *Curr. Biol.* **1998**, 8, 935-938.
- (39) Fam, N. P.; Fan, W. T.; Wang, Z.; Zhang, L. J.; Chen, H.; Moran, M. F. Cloning and Characterization of Ras-GRF2, a Novel Guanine Nucleotide Exchange Factor for Ras. *Mol. Cell. Biol.* **1997**, 17, 1396–1406.
- (40) Weissman, A. M.; Shabek, N.; Ciechanover, A. The Predator Becomes the Prey: Regulating the Ubiquitin System by Ubiquitylation and Degradation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2011**, 12, 605-620.
- (41) Yokouchi, M.; Kondo, T.; Houghton, A.; Bartkiewicz, M.; Horne, W. C.; Zhang, H.; Yoshimura, A.; Baron, R. Ligand-Induced Ubiquitination of the Epidermal Growth Factor Receptor Involves the Interaction of the c-Cbl RING Finger and UbcH7. *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 31707-12.
- (42) de Hoog, C. L.; Koehler, J. A.; Goldstein, M. D.; Taylor, P.; Figeys, D.; Moran, M. F. Ras Binding Triggers Ubiquitination of the Ras Exchange Factor Ras-GRF2. *Mol. Cell. Biol.* **2001**, 21, 2107-17.
- (43) Kim, S.-E.; Yoon, J.-Y.; Jeong, W.-J.; Jeon, S.-H.; Park, Y.; Yoon, J.-B.; Park, Y. N.; Kim, H.; Choi, K.-Y. H-Ras Is Degraded by Wnt/Beta-Catenin Signaling via Beta-TrCP-Mediated Polyubiquitylation. *J. Cell Sci.* **2009**, 122, 842–848.
- (44) Scheffner, M.; Nuber, U.; Huibregtse, J. M. Protein Ubiquitination Involving an E1-E2-E3

- Enzyme Ubiquitin Thioester Cascade. *Nature* **1995**, 373, 81–83.
- (45) Hershko, A.; Heller, H.; Elias, S.; Ciechanover, A. Components of Ubiquitin-Protein Ligase System. Resolution, Affinity Purification, and Role in Protein Breakdown. *J. Biol. Chem.* **1983**, 258, 8206–8214.
- (46) Hershko, A.; Ciechanover, A.; Heller, H.; Haas, A. L.; Rose, I. A. Proposed Role of ATP in Protein Breakdown: Conjugation of Protein with Multiple Chains of the Polypeptide of ATP-Dependent Proteolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1980**, 77, 1783–1786.
- (47) Rogers, S.; Wells, R.; Rechsteiner, M. Amino Acid Sequences Common to Rapidly Degraded Proteins: The PEST Hypothesis. *Science* **1986**, 234, 364–368.