

令和 5 年 5 月 10 日現在

機関番号：23701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08844

研究課題名（和文）サイトメガロウイルスが持つオートファジー制御分子による宿主感染防御の回避

研究課題名（英文）Evasion of host-defense mechanism by autophagy regulatory gene encoded by cytomegalovirus.

研究代表者

腰塚 哲朗（Koshizuka, Tetsuo）

岐阜薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：20416267

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究はサイトメガロウイルス（CMV）が持つ遺伝子産物の機能解明を通して、ウイルスが宿主細胞を乗っ取る仕組みを明らかにすることを目的として実施した。ヒトCMV UL42遺伝子産物は宿主ユビキチンリガーゼNedd4ファミリーの機能を制御し、ウイルスや宿主細胞が持つタンパク質の働きを制御する。この点について、ウイルスが持つ主要な糖タンパク質であるgBのユビキチン化を制御し、安定性を高めることを明らかにした。宿主側タンパク質の制御については現在詳細な検討を進めており、ウイルスの細胞内、生体内における増殖能や免疫回避に関連する可能性があると考えている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CMVは200を超える遺伝子を保持しており、これらを利用して宿主細胞をウイルス増殖に適した環境に作り変える。これによりウイルスは自身の増殖を可能とし、免疫応答を回避する。本研究で主な解析対象としたUL42は宿主ユビキチンリガーゼの活性を制御することで、ウイルス側分子の安定化や免疫関連分子機能を阻害といった多様な機能を担う可能性があることを明らかにした。本研究の成果は、ウイルスが宿主細胞を乗っ取り、免疫を回避し、発症に至る過程を理解するために重要であり、新規抗ウイルス化合物の標的となる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：To elucidate the mechanism by which viruses hijack the host cells, we tried to determine the functions of the cytomegalovirus (CMV) encoded gene products. The human CMV UL42 gene product regulates the activities of the host ubiquitin ligase Nedd4 family, which ubiquitinates proteins to change the fate of proteins. In the presence of UL42, some member of Nedd4 family proteins are degraded by the hyperubiquitination. In this regard, we identified that some member of Nedd4 family proteins were able to ubiquitinate a major viral glycoprotein gB and UL42 protected gB by the elimination of Nedd4 family proteins in infected cells. We are currently conducting detailed studies on the regulation of host cell surface proteins which affected by the UL42 function.

研究分野：ウイルス感染症

キーワード：サイトメガロウイルス Nedd4 family ユビキチン化 免疫回避

1．研究開始当初の背景

ヒトサイトメガロウイルス（CMV）はヘルペスウイルス科に属するウイルスの一種である。全長 230kb 程度のゲノムを持ち、200 以上の遺伝子や transcript を持つと考えられている。CMV は通常、小児期に無症候性に感染した後、宿主体内において一生潜伏感染する。今日、主要先進国における抗体陽性率はおよそ 70%程度と考えられている。潜伏状態にある CMV は疾病の原因になることは無いものの、妊娠中の女性が感染した場合には CMV は経胎盤感染により胎児に感染し、児に先天性障害を引き起こすことが知られている（先天性 CMV 感染症）。先天性 CMV 感染症の発生頻度は高く、出生 300 に 1 例程度発生することが報告されている。

先天性 CMV 感染症は多様な症状を示す。先天性に感染した児の 1 割程度は出生時に小頭症などの明確な先天異常を認める。無症候性児であっても一部は成長に伴い難聴や精神発達遅滞を発症する。現在、先天的 CMV 感染であると診断を受けた場合には、難聴などの発症を予防するために抗ウイルス薬による治療を行う。しかしながら、症状が改善しない場合も多く、先天性 CMV 感染症の根本的な解決にはワクチンや新しい抗ウイルス薬が必要である。これらの開発には CMV が持つ遺伝子の機能を解析し、病原性発現に至るメカニズムを詳細に理解する必要がある。

我々は、CMV がコードする遺伝子の一つである UL42 に着目し、その機能解析を進めてきた。UL42 は比較的小さな膜タンパク質であり、N 末端側細胞質ドメインにおいて宿主細胞が持つユビキチン E3 リガーゼである Nedd4 ファミリーと結合し、その活性を変化させる（Koshizuka et al., J.Gen.Virol. 2016, 97 196-208）。ヒトにおいて Nedd4 ファミリーは Nedd4、Itch、Smurf などの 9 種のタンパク質から構成され、多様な細胞機能を制御する。また、Nedd4 はオートファジーの制御に関わる可能性がある。ユビキチン化によりタンパク質はその運命を変化させることから、UL42 により機能改変を受けた Nedd4 ファミリーは本来の基質とは異なる分子をユビキチン化し、ウイルスにとって都合の良い環境を作るために利用されている可能性がある。UL42 の機能的なホモログは α , β ヘルペスウイルスに保存されている（Koshizuka et al., 2018 Sci. Rep. 8(1):4447）。この点から、UL42 遺伝子産物の機能解析はヘルペスウイルス科に共通したメカニズムの解明に繋がる可能性がある。

2．研究の目的

本研究では、1) UL42 により制御を受けるウイルス側タンパク質の同定、2) 宿主側タンパク質の同定を行った。これにより、UL42 が Nedd4 ファミリー分子の活性を制御し、感染細胞をウイルス増殖にとって都合の良い環境に作り変えるメカニズムを明らかにすることを試みた。

3．研究の方法

ウイルスゲノム上の構造及びアミノ酸配列の情報などから、CMV が持つ遺伝子産物のうち、Nedd4 ファミリーの基質となり得るものを選抜した。候補の一つである glycoprotein B (gB) について、詳細な解析を行った。HCMV gB および Nedd4 ファミリー分子の真核発現系を各種構築し、培養細胞に発現させた際の gB や Nedd4 ファミリー分子の変化を確認した。さらに、UL42 に変異を導入した遺伝子組換えウイルスを用いて、感染細胞内における gB の変化と UL42 の影響を詳細に解明した。さらに、Tandem Ubiquitin Binding Entity (TUBE) を用いて gB のユビキチ

ン化状態の変化を確認した。

UL42 の有無で発現量が変化する宿主因子の同定するために、ヒト単球系細胞株である THP-1 細胞を Mφ 様に分化させた後、遺伝子組換えウイルスを感染させ、細胞表面分子の発現パターン変化を確認した。

4 . 研究成果

1) UL42 により制御を受けるウイルス側タンパク質の同定と解析

HCMV gB は C 末端細胞質領域に Nedd4 ファミリーと相互作用できる PPXY 配列 (PY 配列) を一つ保持している。Nedd4、Nedd4L、Itch、Smurf1、Smurf2 の真核発現プラスミドを構築し、培養細胞に gB と共に遺伝子導入した結果、Nedd4、Nedd4L、Itch と共発現時に gB 量が減少することが分かった。この減少は UL42 の存在下で消失した。UL42 は Nedd4、Nedd4L、Itch を分解に導くことから、これらの Nedd4 ファミリー分子が gB の安定性に関与することが分かった。さらに、gB と Nedd4 ファミリーは直接相互作用すること、感染細胞内において UL42 の有無が gB の Ub 化状態を変化させることを確認した。以上の点から、UL42 は感染細胞内において Nedd4 ファミリーを排除することで、gB のユビキチン化状態を変化させ、分解から保護する働きを持つことが分かった。

一方で、他のヘルペスウイルスが持つ gB には PY 配列が存在しなかったことから、Nedd4 の排除と gB 安定化は HCMV においてのみ起こる現象であると言える。

2) UL42 により制御を受ける宿主側タンパク質の同定

THP-1 細胞を Mφ 様に分化させた後、UL42 変異ウイルスを感染させ、細胞表面マーカー分子の発現パターン変化を確認した。その結果、UL42 を持つ HCMV 感染により、T 細胞共刺激因子である CD86 などの細胞表面への発現が減少することが分かった。

THP-1 細胞における CD86 発現量が少なかったことから、レトロウイルスベクターを用いて CD86 を安定的に発現する THP-1 細胞株を樹立した。この細胞株を用いて、感染細胞表面の CD86 量を検討したところ、UL42 を持つウイルスの感染により消失することが分かった。さらに、感染細胞内の CD86 量変化を継時的に確認したところ、UL42 の存在により CD86 の減少速度が増加している可能性が示唆された。一方、Nedd4 ファミリーとの相互作用を破壊した UL42^Δ(UL42PY) を持つウイルスを感染させた場合であっても、長時間経過すると CD86 の減少が認められた。このことは HCMV が CD86 を感染細胞表面から排除する複数のメカニズムを持つことを示唆する。

CD86 には PY 配列が存在しない。このため、UL42 による Nedd4 ファミリーの影響を直接受けるか否かについては今後の検討が必要である。

本研究により UL42 が Nedd4 ファミリーを介して感染細胞内の多様な細胞機能を制御し、ウイルス増殖に適した環境を成立させるために働くことが示された。UL42 以外のウイルス産物の影響もあり、各因子が協調して働く可能性が強く示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Koshizuka Tetsuo、Kondo Hiroki、Kato Hiroki、Takahashi Keita	4. 巻 65
2. 論文標題 Human cytomegalovirus UL42 protein inhibits the degradation of glycoprotein B through inhibition of Nedd4 family ubiquitin E3 ligases	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microbiology and Immunology	6. 最初と最後の頁 472～480
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1348-0421.12932	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Koshizuka Tetsuo、Inoue Naoki	4. 巻 15
2. 論文標題 Activation of c-Jun by human cytomegalovirus UL42 through JNK activation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0232635
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0232635	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 腰塚哲朗、近藤紘生、加藤大輝、高橋圭太
2. 発表標題 ヒトサイトメガロウイルスgBのユビキチン化に対するNedd4ファミリー分子の役割
3. 学会等名 第68回 日本ウイルス学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 淡中美優、高橋圭太、井上直樹、腰塚哲朗
2. 発表標題 ヒトサイトメガロウイルスUL42タンパク質による細胞表面マーカーの制御
3. 学会等名 第142回 日本薬学会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------