

質量分析を用いた HCMV 感染によるオルガネラリモデリング分子機構解明

Elucidation of the molecular mechanisms of organelle remodeling induced by HCMV infection using mass spectrometry

プリンストン大学	福井 文望
研究期間	2025 年 5 月 5 日～2026 年 5 月 5 日
滞在研究機関	Department of Molecular Biology, Princeton University Princeton, NJ 08544, United States
共同研究者等	Prof. Ileana M. Cristea
区分	個人 B

Viral infection induces extensive remodeling of organelles, including mitochondria, the endoplasmic reticulum, and lysosomes, thereby creating an intracellular environment favorable for viral replication. However, the molecular mechanisms that regulate this remodeling remain poorly understood. Previous proteomic analyses showed that human cytomegalovirus (HCMV) infection broadly alters the abundance of membrane contact site (MCS) proteins and increases mitochondria-ER contacts, which may support viral growth. This study focuses on lactylation, a recently identified lysine post-translational modification derived from lactate. Reanalysis of HCMV-induced lactylome data revealed dynamic lactylation changes on several MCS proteins. Among them, we identified a candidate MCS protein whose lactylation was significantly altered during infection. Functional analysis showed that expression of a lactylation-mimic mutant increased HCMV titers compared with the wild-type protein suggesting that this specific lactylation event promotes viral replication. Furthermore, knockdown of a candidate lactylation-related enzyme markedly reduced lactylation at the target site. Because the target lactylation site is located near a predicted lipid-binding region, we also examined lipid distribution and found altered lipid localization in MCS protein knockout cells during HCMV infection. Together, these findings suggest that enzyme-mediated lactylation of MCS protein regulates lipid distribution and organelle function to promote HCMV replication.

研究目的

ウイルス感染時、ミトコンドリア、ER、リソソームなどのオルガネラの形状が大きく変化し、動的に再編成され、ウイルス増殖に有利な細胞内環境が形成される。しかし、このオルガネラ・リモデリングを分子レベルで制御する機構の多くは未解明である。過去に、所属研究室において、オルガネラ間接触部位 (Membrane Contact Site: MCS) に存在するタンパク質を対象にした質量解析が行われ、ヒトサイトメガロウイルス (Human cytomegalovirus: HCMV) 感染時、MCS タンパク質の存在量が広範囲にわたって変化することが示された。さらにミトコンドリアと ER に局在する MCS タンパク質の一部はウイルス感染の

進行とともに発現量が上昇し、HCMV 感染時のミトコンドリア-ER 間の接触増加に寄与することで、ウイルス増殖を促進することが示唆された(1,2)。

タンパク質の量的な変化のみならず、ウイルス感染時、タンパク質に付加される翻訳後修飾がダイナミックに変化することも知られている。翻訳後修飾のうち、近年新たに報告されたラクチル化はリジン残基に乳酸由来の修飾が付加される現象であり、がん、免疫応答、ウイルス感染などに関与することが示唆されている。所属研究室において HCMV 感染が乳酸を利用して広範なタンパク質ラクチル化を誘導し、免疫シグナル経路を阻害することで、ウイルス感染を促進することが報告された(3)。しかし、

HCMV 感染によるラクチル化のダイナミックな変化がオルガネラ構造制御およびその機能に及ぼす役割はほとんど解明されていない。

本研究は、オルガネラ間接触部位に存在する MCS タンパク質に付加されるラクチル化に着目し、質量分析を用い、HCMV 感染時の MCS タンパク質群のラクチル化変動を解析することで HCMV 感染細胞において重要な役割を持つラクチル化部位の同定および、オルガネラ機能に及ぼす影響を見出すことを目的とする。

研究経過

過去に所属研究室で実施された、HCMV 感染細胞におけるラクチル化プロテオーム解析データを再解析した。その結果、複数の MCS タンパク質にラクチル化修飾が検出され、さらに HCMV 感染の進行に伴い、それらのラクチル化レベルが動的に変化することが示唆された。本研究では、その中でも感染依存的にラクチル化状態が有意に変化する候補 MCS タンパク質に着目した。該当 MCS 遺伝子のラクチル化を模倣する変異体および非ラクチル化変異体を作成し、これらを発現させた細胞における HCMV 増殖能を評価した。その結果、非ラクチル化変異体を発現した細胞は野生型を発現した細胞と同程度のウイルス力価が認められた。一方ラクチル化模倣変異体を発現した細胞では、野生型発現細胞と比較してウイルス力価が有意に上昇した。以上の結果より、HCMV 感染に伴う MCS タンパク質の特定のラクチル化変動は、ウイルス増殖に関与することが示唆された。

次に、着目した MCS タンパク質上のラクチル化修飾がどの酵素によって制御されているのかを明らかにするため、既報においてタンパク質ラクチル化への関与が示唆されている候補ラクチル化酵素に着目した。候補酵素の発現抑制細胞を作製し、質量分析により HCMV 感染条件下におけるラクチル化プロテオーム解析を行った。その結果、候補酵素の発現抑制により、着目したラクチル化部位の修飾レベルが顕著に低下した。この結果から、当該酵素が HCMV 感染時に誘導される MCS タンパク質のラクチル化制御に関与することが示唆された。

さらに、この候補酵素が当該 MCS タンパク質と相互作用するかを検討するため、免疫沈降解析および蛍光顕微鏡を用いた免疫染色解析を行った。その結果、候補ラクチル化酵素は当該 MCS タンパク質と細

胞内で部分的に共局在することが確認され、加えて免疫沈降解析により両者の相互作用も検出された。以上の結果より、HCMV 感染に伴って変動する MCS タンパク質のラクチル化は、特定のラクチル化酵素によって制御されており、この修飾変化がウイルス増殖制御に関与する可能性が示された。

着目した MCS タンパク質はオルガネラ間における脂質輸送に関与することが知られている。また、本研究が着目したラクチル化部位は、既報の構造解析および機能ドメイン情報から、脂質結合に関与すると推定される領域に位置していた。HCMV 感染細胞において、この MCS タンパク質が脂質分布の制御に果たす役割を明らかにするため、当該 MCS タンパク質遺伝子欠損細胞を作製し、HCMV 感染細胞および非感染細胞において、特定脂質を蛍光プローブにより可視化した。さらに、画像解析により、対象オルガネラマーカを用いてオルガネラ領域内の脂質シグナル強度を定量的に評価した。その結果、HCMV 感染時、野生型細胞と比較して、当該 MCS タンパク質遺伝子欠損細胞において特定脂質のオルガネラ上への局在が有意に増加することが確認された。このことから、当該 MCS タンパク質は HCMV 感染時における特定脂質のオルガネラ間分布を制御しており、その欠損により脂質輸送または脂質局在制御が変化することが示唆された。

考察

本研究の結果から、HCMV 感染に伴う MCS タンパク質のラクチル化は、ウイルス増殖に有利な細胞内環境の形成に関与することが示唆された。着目したラクチル化部位は脂質結合に関与すると推定される領域に存在しており、当該 MCS タンパク質の KO 細胞では、感染時に特定脂質のオルガネラ上への局在が増加したことから、この因子は感染細胞におけるオルガネラ間の脂質分布に関与すると考えられる。さらに、候補ラクチル化酵素の発現抑制により当該部位のラクチル化が低下し、免疫沈降および免疫染色解析から両者の相互作用と共局在が確認されたことから、候補ラクチル化酵素は HCMV 感染時当該 MCS タンパク質のラクチル化に関与すると考えられる。以上より、HCMV 感染細胞において、特定のラクチル化関連酵素を介した MCS 関連因子のラクチル化が脂質輸送機能を調節し、ウイルス増殖を促進することが示唆された。

参考文献

1. Cook KC, Tsopurashvili E, Needham JM, Thompson SR, Cristea IM. Restructured membrane contacts rewire organelles for human cytomegalovirus infection. *Nature Communications*. 2022;13:4720. doi:10.1038/s41467-022-32488-6.
2. Hofstadter WA, Cook KC, Tsopurashvili E, Gebauer R, Pražák V, Machala EA, Park JW, Grünewald K, Queminn ERJ, Cristea IM. Infection-induced peripheral mitochondria fission drives ER encapsulations and inter-mitochondria contacts that rescue bioenergetics. *Nature Communications*. 2024;15:7352. doi:10.1038/s41467-024-51680-4.
3. Tyl MD, Merengwa VU, Cristea IM. Infection-induced lysine lactylation enables herpesvirus immune evasion. *Science Advances*. 2025;11(2). doi:10.1126/sciadv.ads6215.