

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15141

研究課題名(和文) ヒトヘルペスウイルス6感染に必須である受容体の同定と機能解析

研究課題名(英文) Identification of host receptors essential for Human herpesvirus 6 infection

研究代表者

森 康子 (Mori, Yasuko)

神戸大学・医学研究科・教授

研究者番号：50343257

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトヘルペスウイルス6 (HHV-6) の膜上には複数の糖タンパク質が存在し、感染において重要な役割を担う。その一つであるgBについては宿主因子が同定されておらず、その機能は不明である。本研究ではHHV-6感染におけるgBの役割の解明を目的とした。

gBは膜アンカー部を境に、細胞外ドメインと細胞内ドメインに分けられる。gB細胞内ドメインを欠損させた変異体ウイルスを作製し、感染における機能を解析した結果、ウイルスの再構築が起らず、gBの細胞内ドメインが感染に必須であることが示された。同変異体を培養細胞に発現させた結果、gBの細胞内での局在が変化したことから、gBの運搬に関与する事が示された。

研究成果の概要(英文)：Human herpesvirus 6 (HHV-6) possesses a variety of glycoproteins on the envelope. One of the glycoproteins, gB, is an important viral protein for the HHV-6 infection, however, the detailed functions still remain unclear. In this study, the functions of gB in HHV-6 infection was analyzed.

gB consists of an ectodomain, a transmembrane domain, and a cytoplasmic tail domain (CTD). We constructed a mutant virus in which the gB-CTD was truncated, and analyzed its effect on the HHV-6 infection. The mutant genome did not reconstitute virions, and thus indicating that gB-CTD is essential for the HHV-6 infection. The CTD truncated mutant of gB was expressed in culture cells, and the localization of gB was analyzed. As the result, the mutant gB exhibited a different localization compared to the wild type gB. These results suggested that the gB-CTD regulates the localization of gB, and gB-CTD is essential for the HHV-6 infection.

研究分野：ウイルス学

キーワード：HHV-6

## 1. 研究開始当初の背景

ヒトヘルペスウイルス 6 (HHV-6) は、T 細胞向性というユニークな特徴をもつヘルペスウイルスである。現在は、生物学的特質の違いにより HHV-6A と HHV-6B に分類されているが、両者間でのゲノムの相同性は約 90% と非常に高い。HHV-6B は乳幼児期に初感染することにより突発性発疹を引き起こす。時には重篤な脳炎を引き起こし問題となっている。HHV-6A についてはその病態は不明である。

HHV-6 はエンベロープウイルスであり、そのウイルス粒子のエンベロープに複数のウイルス特異的な糖タンパク質をもつ。代表的なものとして glycoprotein B (gB) および gH/gL/gQ1/gQ2 複合体があり、ウイルスの感染において重要な働きを担っている。我々は HHV-6B gH/gL/gQ1/gQ2 複合体が T 細胞表面上に発現している CD134 と結合し、細胞への侵入時に機能することを見出している。また HHV-6A gH/gL/gQ1/gQ2 複合体の受容体は CD46 であることが既に示されている。一方で HHV-6 gB の宿主受容体は明らかとされていない。

gB は、ヘルペスウイルス科に保存されたエンベロープ糖タンパク質であり、ウイルス侵入時、特にウイルスの細胞膜への吸着および膜融合時には必須であることが他のヘルペスウイルスでは既に証明されている。さらに他のヒトヘルペスウイルス [Herpes simplex virus (HSV)、Human cytomegalovirus (HCMV) や Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (KSHV)] においてはその gB に結合する宿主受容体がすでに同定されている。HHV-6 gB については宿主受容体および gB の機能が明らかとされていないため、HHV-6 が宿主細胞へ侵入する過程を解明するためには gB の機能解析が必要不可欠である。

## 2. 研究の目的

本研究では、未だ明らかにされていない、HHV-6A/B の侵入に必須である gB の機能を解明することを目的とする。

HHV-6 の gB は細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、細胞内ドメインから構成されている (図 1)。その中でも細胞外ドメインはウイルス粒子の表面に突出する事で、標的細胞への吸着および膜融合の機能に関わる部位である。一方で HHV-6 gB の細胞内ドメインについては機能が明らかではなく、その役割は未だ不明である。近年の研究では、他のヘルペスウイルスにおいて gB の細胞内ドメインが様々な機能を担っているという報告がなされており、HHV-6 においても gB の細胞内ドメインが担う役割の解析が必要である。そこで本研究では、特に gB の細胞内ドメインに着目してその機能解析を行った。

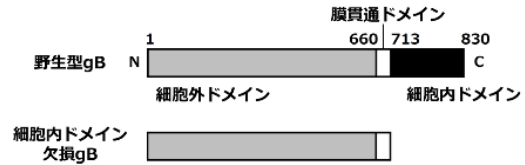


図 1 HHV-6A gB タンパク質のドメイン構成と本研究で解析された細胞内ドメイン欠損体

## 3. 研究の方法

(1) 当研究室で開発された HHV-6A Bacterial artificial chromosome (BAC) システム (Tang et al. 2010) により、細胞内ドメインが欠損した gB (図 1) を持つ変異ウイルスを作製した。変異の導入には Two-step red-mediated recombination 法を用いた。また作製した変異体 HHV-6A BAC ゲノムから、上記の方法によって変異部位を野生型に戻した復帰体 HHV-6A BAC ゲノムを作製した。

細胞内ドメインを欠損させた gB を持つ HHV-6A BAC ゲノムを、T 細胞株である JJhan 細胞にトランスフェクションし、その後 HHV-6A の感染に適した細胞である臍帯血単核球 (cord blood mononuclear cells; CBMCs) と共培養する事でウイルスの再構築および感染を解析した。HHV-6A BAC には Green fluorescent protein (GFP) 遺伝子が導入されているため、感染の様子を蛍光顕微鏡下で観察した。

(2) 細胞内ドメインを欠損させた HHV-6A gB の発現プラスミドを、培養細胞にトランスフェクションし、一過性に発現させた gB が細胞内でどのような局在を示すかについて解析を行った。

## 4. 研究成果

(1) HHV-6A/B gB の細胞内ドメインの機能を解析するために HHV-6A BAC システムを利用して gB の細胞内ドメインが欠損した変異体 HHV-6A BAC ゲノムを作製した。JJhan 細胞を用いた HHV-6A ウイルスの再構築実験では、野生型 HHV-6A BAC ゲノムおよび gB 変異の復帰体 HHV-6A BAC ゲノムを用いた場合には HHV-6A ウイルスの再構築が起こり、CBMCs への感染の広がりが認められた。一方で、gB の細胞内ドメインを欠損した変異体 BAC ゲノムを用いた場合には感染が認められず、gB 細胞内ドメインの欠損によりウイルスの再構築あるいは感染能に異常が生じている事が示された。この結果により gB の細胞内ドメインが HHV-6A の感染において重要な役割を担っていることが明らかとなった。

(2) HHV-6A gB の細胞内ドメインの機能をより詳細に調べるために、細胞内ドメインを欠

損させた gB 変異体を、培養細胞中で発現させ、細胞内での局在を解析した。野生型 gB を発現させた場合には、gB はトランスゴルジネットワーク (TGN) に局在するが、細胞内ドメインを欠損させた gB 変異体では gB の局在が小胞体 (Endoplasmic reticulum; ER) に変化している事が示された。このことから HHV-6A gB の細胞内ドメインは発現された gB が ER から TGN へと細胞内輸送される過程に必要であることが示唆された。

本研究では未だ不明な点が多い HHV-6A/B の必須タンパク質 gB の機能を解析し、その細胞内ドメインにも重要な役割がある事を明らかとした。細胞内ドメインを欠損させた変異体ではウイルス再構築が起こらないことから、細胞内ドメインの機能は HHV-6A の感染において必須であると言える。また HHV-6A gB が細胞内ドメインを欠損した場合にはその細胞内局在が変化していることも明らかとなった。このことは gB の細胞内ドメインが、細胞内で発現した gB の細胞内輸送の制御に関わることを示している。したがって gB が適切に細胞内輸送されることが HHV-6A ウイルスの構築あるいは感染において重要である可能性が示唆された。

この成果は HHV-6 gB の機能に関して細胞内ドメインの重要性と言った新たな着眼点を見出すことに繋がり、今後はより詳細な機能解析を行う必要性が示された。我々は本研究成果を発展させ、既に HHV-6 gB 細胞内ドメイン内の機能部位についての解析を進めている。本成果および更なる解析によって gB の細胞内ドメインの機能が明らかになることで、他のヘルペスウイルスの gB との共通点および相違点に関して知見が広がり、ウイルス学の発展に貢献する事も期待される。

#### <引用文献>

Tang H, Kawabata A, Yoshida M, Oyaizu H, Maeki T, Yamanishi K, Mori Y. Human herpesvirus 6 encoded glycoprotein Q1 gene is essential for virus growth. *Virology*, 407, 2010, 360-367. DOI: 10.1016/j.virol.2010.08.018.

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Mahmoud NF, Jasirwan C, Kanemoto S, Wakata A, Wang B, Hata Y, Nagamata S, Kawabata A, Tang H, Mori Y. Cytoplasmic tail domain of glycoprotein B is essential for HHV-6 infection. *Virology*, 査読有, 490, 2016, 1-5. DOI: 10.1016/j.virol.2015.12.018

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕  
特記すべきことなし

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

森 康子 (MORI, Yasuko)  
神戸大学・医学研究科・教授  
研究者番号: 5 0 3 4 3 2 5 7

##### (2)研究分担者

なし

##### (3)連携研究者

なし

##### (4)研究協力者

Nora F. Mahmoud  
神戸大学・医学研究科・博士研究員

Chyntia Jasirwan  
神戸大学・医学研究科・博士研究員

金本 慧史 (KANEMOTO, Satoshi)  
神戸大学・医学研究科・大学院生

若田 愛加 (WAKATA, Aika)  
神戸大学・医学研究科・大学院生

王 博超 (WANG, Bochao)  
神戸大学・医学研究科・大学院生

畑 佑樹 (HATA, Yuuki)  
神戸大学・医学研究科・大学院生

長又 哲史 (NAGAMATA, Satoshi)  
神戸大学・医学研究科・大学院生

河端 暁子 (KAWABATA, Akiko)  
神戸大学・医学研究科・特命助教

湯 華民 (TANG, Huamin)  
神戸大学・医学研究科・助教