

令和元年6月14日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15075

研究課題名(和文) ヒトヘルペスウイルス6がコードする転写活性化因子IE2の構造および機能解析

研究課題名(英文) Structure based analysis of human herpesvirus 6 transactivator IE2

研究代表者

西村 光広 (Nishimura, Mitsuhiro)

神戸大学・医学研究科・助教

研究者番号：40510285

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)：ヒトヘルペスウイルス6はほぼ全てのヒトが乳幼児期に感染するウイルスであるが、その感染機構や病原性発現機構については不明な点が多い。本研究では感染直後にウイルス遺伝子の発現を促進する転写活性化因子である immediate early protein 2 (IE2) タンパク質について立体構造と機能を解析した。IE2のC末端領域の立体構造から、DNAへの結合モデルを作製する事ができ、またIE2の機能に關与すると予想される部位を推定した。この情報に基づいて実際に変異体を作製し、それらの転写活性化機能を解析する事によって、IE2の機能に關与している部位を見出す事ができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではヒトヘルペスウイルス6の感染開始時に重要な働きを持つIE2についてそのC末端領域の立体構造を詳細に解析し、IE2の転写活性化機能に必要な機能部位を新たに見出すことができた。これらの成果はHHV-6の感染において、実際にIE2がウイルスタンパク質としてどのように機能するかをその立体構造に基づいて解析したものであり、さらに今後IE2がヒト細胞内の宿主因子とどのように相互作用するかを解析していくための手掛かりとなることで、ウイルス感染機構の解明及びその制御法開発へ繋がる事が期待できる。

研究成果の概要(英文)：研究成果の概要(英文)：

Human herpesvirus 6 infects almost all humans during infancy, although the infection mechanism and pathogenicity still remain unclear. A HHV-6 viral protein, immediate early protein 2 (IE2), expresses immediately after the infection and promote the expression of the other viral factors as a transactivator. In this study, the structure and function of IE2 protein were analyzed. A DNA binding-model of IE2 C-terminal domain (IE2-CTD) was constructed based on the determined structure. Putative functional sites of IE2-CTD were proposed from the structural analysis, and several sites were proved to be significant on the IE2 transactivation function by a mutation analysis.

研究分野：構造生物学

キーワード：ヒトヘルペスウイルス6 X線結晶構造解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒトヘルペスウイルス 6(HHV-6)は他のヘルペスウイルスと異なった T 細胞向性を持ち、乳幼児期にほぼ全てのヒトに感染する。この初感染時には重篤な症状に至らない事も多いが、感染した乳幼児に高熱と突発性発疹を引き起こし、場合によっては後遺症を残す脳炎へ進展する。また初感染後には生涯に渡って体内に潜伏感染するため、免疫低下状態にある臓器移植患者等で HHV-6 の再活性化が起こり、ウイルス血症を経て致死的な脳炎を引き起こすことが臨床上的の問題となっている。HHV-6 は増殖感染時に前初期、初期、後期に分けて段階的にウイルス遺伝子を発現する。HHV-6 の転写活性化因子 Immediate early protein 2 (IE2)はウイルス侵入直後の前初期に発現する必須因子で、初期遺伝子の発現を促すことでゲノムの複製、ウイルス粒子の産生へと感染を進行させる。また IE2 は潜伏状態にあるウイルスが再活性化する際にも開始点となる因子であり、ウイルスの生活環および臨床上的の診断において重要な意義を持つ。

HHV-6 IE2 は全長 1500 残基からなるタンパク質で中央付近(729-944)に SSRA/D のリピート領域を持つ。その N 末端側、リピート領域、C 末端領域のいずれを欠損させた場合にも転写活性化能が減少することから、それらの領域が共同的に働くことで、クロマチン構造の制御やプロモーターへの結合、転写複合体の形成を行う事が示唆されている。我々の研究グループでは IE2 の機能を解明するため IE2 の部分的なドメインの単離に取り組み、特に IE2 C 末端ドメイン (IE2-CTD)を単離し、大量精製することに成功した。IE2-CTD はヒトサイトメガロウイルスのような HHV-6 と類縁のヘルペスウイルスが持つ転写制御因子でも相同性が見られる共通の領域であり、二量体化し DNA に結合する部位であることが示唆されていたが、その実際の様式については不明であった。これまでの研究で IE2-CTD の結晶構造解析を行い、その立体構造を決定する事ができた。

2. 研究の目的

本研究では HHV-6 IE2-CTD の立体構造の詳細な解析を通じて、IE2 が有する転写活性化および DNA 結合に関する機能部位を同定する事で、HHV-6 IE2 タンパク質の構造とウイルス感染における機能を解明する事を目的とする。

3. 研究の方法

IE2-CTD の立体構造を詳細に解析し、構造生物学的な視点から、形状、表面電荷の分布、既知構造モチーフとの類似性、類縁ウイルスの相同タンパク質間で保存されているアミノ酸残基の表面分布等の解析を行う事で IE2 の機能に関わる事が予想される部位を見出した。これらの観点から推定された機能部位に関して、部位特異的変異導入法を用いてアミノ酸残基をアラニンに置き換えた IE2 変異体を設計し、各種 IE2 変異体の哺乳動物細胞での発現ベクターを作製した。野生型 IE2 および IE2 変異体の転写活性化能を評価するために、ルシフェラーゼ遺伝子を用いたルシフェラーゼレポーターアッセイ系を構築した。この評価法により、変異の導入による IE2 機能への影響を解析し、IE2 の機能に寄与する部位をアミノ酸残基レベルで同定した。

IE2-CTD の DNA 結合様式を解明するために、タンパク質の構造データベースを検証し、他の DNA 結合タンパク質との比較を行った。ヒトヘルペスウイルスである Epstein-Bar Virus の EBNA1 タンパク質及びカポジ肉腫関連ヘルペスウイルスの LANA タンパク質と構造上の類似性が見出された事から、既に報告されていた EBNA1-DNA 複合体構造および LANA-DNA 複合体構造を参照し、IE2 と EBNA1 および LANA との構造上の相同性に基づいて IE2-CTD と DNA の複合体モデルを構築した。

4. 研究成果

本研究では HHV-6 IE2 C末端ドメインの結晶構造について構造解析を進め、IE2の機能に関わ

る部位とその部位を構成するアミノ酸残基について探索を行った。IE2-CTDはホモ二量体を形成しており、その二回対称軸を中心として正電荷が集中している領域を持っている事が示された。またアミノ酸配列の保存性について類縁のヘルペスウイルスが有するウイルスタンパク質との間で比較解析を行った結果、相同性の高いアミノ酸残基が集中する保存領域が上記正電荷領域とは離れた部位に形成されていた。さらに上記正電荷領域の反対側の位置にはDNA結合モチーフであるヘリックスターンヘリックス構造に類似した構造領域がある事が示された。これらの推定された機能部位がIE2の転写活性化機能に実際に寄与するか否かを解析するために、各領域にアミノ酸変異を導入した各種IE2変異体の発現系を作製し、IE2の転写活性化能がどのような影響を受けるかについて解析した。そのために当研究グループが過去に報告した文献を基に、IE2によってルシフェラーゼ遺伝子の転写が活性化されるルシフェラーゼレポーターアッセイ系を確立し、IE2の転写活性化能を評価した、各IE2変異体の転写活性化能を解析した結果、正電荷が集中する領域及び保存領域に変異を導入した場合には、いずれも野生型IE2と比較して転写活性化能が著しく減弱し、これらの領域がIE2-CTDにおける必須の機能部位である事が示された。一方で、DNA結合モチーフとの類似性からDNA結合への寄与が推測されたヘリックスターンヘリックス様の構造領域に関しては、アミノ酸変異の導入にも関わらず転写活性化能には影響が見られなかった。

今回、立体構造解析を行ったHHV-6 IE2-CTDは、過去に立体構造が解明されていた他のタンパク質とのアミノ酸配列の相同性に乏しい新規構造であったため、データベース上のタンパク質構造と比較を行う事で立体構造の類似性および独自性について評価を行った。その結果、ヒトヘルペスウイルスであるEpstein-Bar VirusのEBNA1タンパク質及びカポジ肉腫関連ヘルペスウイルスのLANAタンパク質との構造上の類似性が見出され、これらのタンパク質がホモ二量体を形成する事で立体構造の中心に β -バレル構造を有するという共通性が示された。一方で上記のヘリックスターンヘリックス様の構造はIE2に特有の構造部位である事が明らかとなった。EBNA1タンパク質及びLANAタンパク質については、過去にDNAが結合した複合体としての立体構造が解明されていたため、それらの立体構造を参照し、IE2-CTD上のDNA結合領域を推測した。その結果、EBNA1タンパク質およびLANAタンパク質はホモ二量体化により形成される β -バレル構造の一方の側面でDNAと結合しており、IE2-CTDとの共通した構造部分を含むことが示された。またこれらのタンパク質のDNA結合部位は正電荷を持つアミノ酸残基に覆われている事が示されていたが、IE2-CTDにおいてもこの領域は上記の正電荷に覆われた領域であった事から、DNA結合機能における類似性が示唆された。その事から、EBNA1タンパク質及びLANAタンパク質との構造上の類似性を基に、IE2-CTDのDNA結合様式に関するモデル構造の構築を行ったところ、立体障害等の問題は起こらず、IE2-CTDがこの領域でDNAを結合している可能性を示すことができた。

以上より、本研究の成果としてIE2-CTDの立体構造に基づいてその転写活性化機能に關与する機能部位を見出す事ができた。DNA結合部位であると予想されたIE2-CTDの正電荷領域は、上述の通りアミノ酸変異の導入によって転写活性化能が減弱する機能領域である事がルシフェラーゼレポーターアッセイ系での評価で示されたことから、実際にIE2が転写活性化機能を発揮する際に標的DNAへの結合に寄与する事が示唆される。一方で、同じく本研究の結果IE2-CTDの転写活性化に關与する事が示された、アミノ酸残基が類縁タンパク質間で保存された保存領域に関しては、上記のDNA結合モデルを考慮した場合、結合したDNAとは離れた部位に位置している事から、DNA結合とは別の機能に寄与している可能性が考えられる。転写活性化には細胞内の転写因子群との相互作用が必要であると考えられるため、一つの可能性としてその機能に寄与する部位である事

が推測された。IE2-CTDがEpstein-Bar VirusのEBNA1タンパク質及びカポジ肉腫関連ヘルペスウイルスのLANAタンパク質との類似した構造を持つ事は、アミノ酸配列の比較からは予期できなかったものであり、各ヒトヘルペスウイルスが持つウイルス遺伝子間の関連性について新たな知見を得る事ができた。IE2-CTDはEBNA1タンパク質及びLANAタンパク質とは異なる独自の構造的特徴としてヘリックスターンヘリックス様の構造を有していたが、その表面に位置するアミノ酸残基への変異はIE2の転写活性化に影響を持たず、機能部位ではない事が示された。このヘリックスターンヘリックス様の構造はIE2-CTDがホモ二量体を形成する際に一方のモノマーから相手側のモノマーに向かって伸びているループ構造の先端である事から、DNAや他因子との相互作用ではなく二量体構造の安定化に寄与している事が示唆される。

本成果については学術論文として国際学術誌である*Journal of Virology*に公開した。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Nishimura M, Wang J, Wakata A, Sakamoto K, Mori Y. Crystal structure of the DNA-binding domain of human herpesvirus 6A immediate early protein 2. *Journal of Virology*, 2017, 91: e01121-17. doi: 10.1128/JVI.01121-17 査読有

〔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 :

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 :

国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名 :

ローマ字氏名 :

所属研究機関名 :

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。