

平成 22 年 4 月 30 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007～2009

課題番号：20790363

研究課題名（和文） 水痘帯状疱疹ウイルスがコードする ORF49 の機能解析

研究課題名（英文） Functional analysis of Varicella-zoster virus encoding ORF49

研究代表者

定岡 知彦 (SADAOKA TOMOHIKO)

神戸大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：00435893

研究成果の概要（和文）：水痘帯状疱疹ウイルスがコードする ORF49 遺伝子は、ウイルス粒子テグメントタンパクをコードし、細胞間での感染性の違いに関与する細胞向性を決定する因子の一つである。本課題研究期間において、ORF49 タンパクが水痘帯状疱疹ウイルス感染に必須なタンパクである ORF44 タンパクと結合し、感染時における ORF44 タンパクの適切な器官への輸送を担う事に機能している事を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Varicella-zoster virus (VZV) ORF49 gene encodes the tegument protein in VZ virion and is one of the determinants of the VZV cell tropism *in vitro*. In this study, it has been identified that ORF49 protein interacts with ORF44 protein, which is essential for the lytic infection of the virus, and functions in the proper transportation of ORF44 protein to the place in which the virion maturation has occurred.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：感染症・ウイルス粒子成熟、出芽・抗ウイルス薬

## 1. 研究開始当初の背景

ヘルペスウイルスのウイルス粒子を構成する因子には、ウイルス遺伝子を格納し、粒子中心に存在するコアとそれを包むカプシド、最外層には細胞膜由来である脂質二重層に、ウイルス由来の糖タンパクが貫通したエンベロープが存在し、さらにカプシドとエンベロープの間には発見当初には単なる構造

物であり、ウイルス粒子の形態維持に働くのみであると考えられていたテグメントタンパクが存在する。しかし、研究の進展によりテグメントタンパクは形態維持の機能以上に、感染初期においては侵入直後に細胞内に放出されることで、ウイルス感染が円滑に行われるように感染細胞内環境を変化させ、さらにはウイルス遺伝子複製を効率よく行う

ための transactivator としての働きも明らかになり、感染過程において非常に重要な機能を有する事が示唆されていた。

水痘帯状疱疹ウイルスにおいてテグメントタンパクの機能解析は、他のヘルペスウイルスである単純疱疹ウイルスやヒトサイトメガロウイルスに比べるとあまり行われていなかったが、我々は全てのヘルペスウイルスに保存されるコア遺伝子である ORF49 遺伝子およびその産物である ORF49 タンパクに着目し、ORF49 タンパクを発現しない組換え水痘帯状疱疹ウイルスの作製により、*in vitro* において胎児肺細胞ではその感染増殖に全く影響しないが、メラノーマ由来細胞株ではその感染性が低下する事を明らかにしており、すなわち ORF49 タンパクが水痘帯状疱疹ウイルスの細胞向性に関わる因子である事を報告した (T. Sadaoka et al. J. Virol. 2007)。ORF49 遺伝子は全てのヘルペスウイルスで保存されるが、細胞向性に関わるという報告は全くされておらず、これは水痘帯状疱疹ウイルスにおける特異的な機能である。

## 2. 研究の目的

水痘帯状疱疹ウイルス ORF49 が細胞向性に関わる因子である事を前提とし、異なる細胞において結合する細胞性因子およびウイルス性因子を同定することにより、ORF49 タンパクのさらに詳細な機能を解析し、細胞向性のメカニズムの一端を明らかにするとともに、ヘルペスウイルスにおけるテグメントタンパクの新たな機能を解明する。さらに新たに同定されるであろう ORF49 と相互作用する新たなウイルス因子に関しての機能解析を行う事で、ORF49 タンパクの機能解析を中心とした、水痘帯状疱疹ウイルスにおけるテグメントタンパクネットワークの新たな機能解析を行う事を目的とした。

## 3. 研究の方法

(1)水痘帯状疱疹ウイルス ORF49 タンパクと相互作用するウイルス因子および細胞因子の同定を目指し、ORF49 に対する特異的抗体と水痘帯状疱疹ウイルス感染細胞溶解液を用いた免疫沈降を行い、ORF49 タンパクと特異的に結合する分子を、タンパク質量解析により明らかにする。

(2)ORF49 タンパクと相互作用するウイルス因子については、特異抗体、発現プラスミドを作製し、単独発現系及び ORF49 遺伝子との共発現系での性状解析を行い、さらに bacterial artificial chromosome (BAC) を用いた組換えにより、欠損および遺伝子変異ウイルスを作製し感染実験を行うと、遺伝子機能解析を行う。

(3)ORF49 タンパクと結合する細胞因子に関しては、ORF49 欠損組換え水痘帯状疱疹ウイルスが正常に増殖できる胎児肺細胞と、増殖が減弱するメラノーマ由来細胞における発現量を比較する。またメラノーマ細胞でのみ相互作用する因子あるいは、胎児肺細胞でのみ相互作用する因子に着目する。胎児肺細胞のみで相互作用する細胞因子についてはメラノーマ細胞への導入によりその感染性の増減の有無を観察し、水痘帯状疱疹ウイルス感染に必要な因子を同定し、またメラノーマ細胞でのみ相互作用する因子は shRNA によりノックダウンする事で、同様に感染に関わる細胞因子の同定とともに感染機構を明らかにする。

## 4. 研究成果

(1)本研究期間において、ORF49 タンパクと相互作用する新たなウイルス因子として、ORF49 に対する特異抗体を用いた免疫沈降法及び質量分析法により ORF44 タンパクを同定した。ORF44 遺伝子は ORF49 遺伝子と同様に全てのヘルペスウイルスに保存されるコア遺伝子であるが、水痘帯状疱疹ウイルスにおいて全く研究・報告されていない遺伝子である。

(2)ORF44 は水痘帯状疱疹ウイルスの感染に必須の遺伝子であり、これは胎児肺細胞においてもメラノーマ由来細胞においても同様であることを見出した。すなわち、ORF44 は他のヘルペスウイルスと異なり、その溶解感染において重要な機能を果たしている事が示唆された。

(3)ORF44 タンパクは ORF49 タンパクと同様にウイルス粒子構成成分であるが、一過性発現系の解析により、ORF44 タンパク単独ではウイルス粒子成熟の場を集積する *trans*-Golgi network のマーカータンパクとは共局在せず、ORF49 タンパクと共発現する事で初めて、*trans*-Golgi network のマーカータンパクと共局在する事を明らかにした。すなわち、ORF44 が水痘帯状疱疹ウイルス感染において機能するためには、ORF49 との相互作用が必須である事を明らかにした。

(4)ORF44 タンパクと ORF49 タンパクの相互作用には、ORF44 タンパクにおいては 1 つのアミノ酸が必須であり、また ORF49 タンパクにおいては 10 個のアミノ酸により構成されるタンパクモチーフの内、後半の 4 つのアミノ酸に関わる事を現在まで同定している。また ORF44 タンパクにおいて相互作用に関与するこの 1 つのアミノ酸変異より、変異を導入した組換えウイルスは増殖できない事を明らかにした。すなわちこれらのアミノ酸は、共

発現時における ORF44 タンパクの輸送のみならず、ORF44 タンパクの輸送を通じた、水痘帯状疱疹ウイルス感染における感染機構に必須な機能を担っている事が示唆される。

(5)本研究期間においては、同定された ORF49 タンパクと相互作用する細胞因子は水痘帯状疱疹ウイルスの細胞向性には関与していない可能性が大きい因子であったが、ヘルペスウイルス全体においては相互作用が報告されている因子ではないため、今後の解析により ORF49 タンパクの細胞因子との関連による機能解析が期待される。

(6)以上の成果は、水痘帯状疱疹ウイルス研究において全く新たな知見であり、さらにヘルペスウイルス全体を通して、そのタンパク間相互作用は保存されている事はすでに数件報告されているが、その相互作用機構は本研究で同定された機構より詳細ではなく、異なっている。すなわち、本研究において対象とした ORF49 と、ORF49 と相互作用する ORF44 はともにヘルペスウイルス全体に広く保存されるコア遺伝子であり、これらの機能がヘルペスウイルス全体に保存されることよりその重要性が示唆されるとともに、本研究で明らかになったように、保存された遺伝子の水痘帯状疱疹ウイルス特異的な相互作用機構が存在する事より、これら遺伝子及び遺伝子産物のさらなる研究を通して、ヘルペスウイルスに普遍的に存在する機能を見出すとともに、個々のウイルスが独自の進化によりそれらの機能を利用している事が示唆され、さらなるウイルス感染機構の詳細な解析が期待される。

#### 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 2 件)

- ① Tomohiko Sadaoka, Tatsuya Yanagi, Koichi Yamanishi, Yasuko Mori, Characterization of the Varicella-Zoster Virus ORF50 Gene, which Encodes Glycoprotein M, Journal of Virology, 査読有, Vol. 84 No. 7, 2010, p. 3, 488-3, 502
- ② Tetsuo Koshizuka, Tomohiko Sadaoka, Hironori Yoshii, Koichi Yamanishi, Yasuko Mori, Varicella-zoster virus ORF1 gene product is a tail-anchored membrane protein localized to plasma mem-

brane and *trans*-Golgi network in infected cells, Virology, 査読有, Vol. 377, 2008, p. 279-285

[学会発表] (計 6 件)

- ① 定岡知彦、山西弘一、森康子、水痘帯状疱疹ウイルス glycoprotein M の成熟機構の解析、第 57 回日本ウイルス学会学術集会 (2009 年 10 月 25-27 日 東京都千代田区)
- ② Tomohiko Sadaoka, Koichi Yamanishi, Yasuko Mori, VZV glycoprotein M and glycoprotein N assist each other for their functions, 14<sup>th</sup> International Conference on Immunobiology and Prophylaxis of Human Herpesvirus Infections (October 6-8, 2009 Kobe, Japan)
- ③ Tomohiko Sadaoka, Koichi Yamanishi, Yasuko Mori, Newly identified mRNA arisen from VZV ORF50 gene region was not essential for viral growth, 34<sup>th</sup> International Herpesvirus Workshop IHW (July 25-31, 2009 Ithaca, New York, USA)
- ④ 定岡知彦、山西弘一、森康子、水痘帯状疱疹ウイルス glycoprotein M の詳細な解析、第 24 回ヘルペスウイルス研究会 (2009 年 7 月 2-4 日 静岡県裾野市)
- ⑤ 定岡知彦、林麻佑子、山西弘一、森康子、水痘帯状疱疹ウイルス ORF49 と結合するウイルス性因子の同定及び解析、第 56 回日本ウイルス学会学術集会 (2008 年 10 月 26-28 日 岡山県岡山市)
- ⑥ Tomohiko Sadaoka, Yoshiaki Yamagishi, Koichi Yamanishi, Yasuko Mori, Newly identified posttranscriptional regulation in ORF50 gene which encodes glycoprotein M, 33<sup>rd</sup> International Herpesvirus Workshop IHW (July 27-August 1, 2008 Estoril, Portugal)

〔図書〕（計1件）

① Mori Yasuko, Tomohiko Sadaoka、  
Varicella-zoster virus glycoprotein M、  
Springer、Current topics in microbiology  
and immunology、Vol.342、2010 (published  
online ahead of the print)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

定岡 知彦 (SADAOKA TOMOHIKO)

神戸大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：00435893