

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790504

研究課題名(和文)水痘帯状疱疹ウイルスの新規血球系エントリーレセプターの解析

研究課題名(英文)Analysis of the newly identified receptor during VZV entry into hematopoietic cells

研究代表者

末永 忠広 (Suenaga, Tadahiro)

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号：20396675

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：我々が、以前報告した、神経組織特異的な水痘帯状疱疹ウイルス(VZV)エントリーレセプターであるMAGとは別に、VZVが宿主への侵入門戸のひとつとする血球系細胞のレセプターの同定、解析を行った。MAGとの相同性検索から、血球系細胞表面に発現しているVZV gBに会合する分子VgBR2を同定した。VgBR2もMAGと同様に、ウイルスエンベロープと宿主細胞膜の膜融合を介して、VZVのエントリーを可能にすることを見いだした。また、私たちの研究から、MAG、VgBR2を介する、VZVの感染には、gB上の糖鎖修飾も関与していることが明らかとなっており、gB上の糖鎖修飾部位及び修飾糖鎖の種類を同定した。

研究成果の概要(英文)：We have previously reported that myelin-associated glycoprotein (MAG) expressed limitedly in neural tissues is an entry receptor of varicella-zoster virus (VZV). Blood cells are also known as a gate for VZV to infect the host. The purpose of this study is to identify the VZV entry receptor on blood cells and to analyze the mechanism of VZV entry mediated by the newly identified receptor. We found that homologous molecule to MAG, VgBR2, expressed on blood cells binds to VZV glycoprotein B (gB). The association of gB not only with MAG but also with VgBR2 induces fusion between viral envelope and host cell membrane and permits VZV to enter into host blood cells (Suenaga et. al. manuscript in preparation). We also found that glycosylation on gB is involved in VZV infection mediated by MAG and VgBR2. We identified glycosylation sites and glycosylation styles on gB required for fusion mediated by MAG (Suenaga et. al. manuscript in preparation).

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：水痘帯状疱疹ウイルス 膜融合 エントリー グリコプロテインB(gB)

1. 研究開始当初の背景

ヘルペスウイルス科に属するウイルスの感染では、エンベロープ分子が宿主細胞上の特異的受容体と結合し、エンベロープと宿主細胞膜もしくはエンドソーム膜との膜融合が引き起こされる。単純ヘルペスウイルス(HSV)のエントリーは、グリコプロテイン B (gB)、gD、gH-gL 複合体を介して行われるが、申請者らは、膜融合を起こせる HSV gB のエントリーレセプターとして、Paired Immunoglobulin-Like type2 Receptor α (PILR α) を同定した (Sato et al. *Cell* 2008)。また、同時に、PILR が、gD のレセプターである HVEM、Nectin-1 と共役してエントリーを可能にするコレセプターであるというメカニズムも明らかにしてきた。

水痘帯状疱疹ウイルス(VZV)は、主に小児の水痘と、既感染高齢者及び免疫力低下者に発症する帯状疱疹の原因ウイルスである。VZV は HSV と同じ α ヘルペスウイルス亜科に属するが、gD を有さない。よって、VZV の膜融合及びエントリーには、gB、gH-gL 複合体と gE が gD の代替分子として必須で、Insulin degrading enzyme (IDE) が (*Cell*: 127:305 2006) gE のレセプターとして考えられてきた。我々は、VZV の膜融合、エントリーを引き起す gB のレセプターとして、神経組織に特異的に発現している Myelin-Associated Glycoprotein (MAG) を同定し、VZV の神経組織指向性の一因を明らかにした (Suenaga et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2010)。同時に、VZV の膜融合、エントリーにおいて、gE や IDE は必須ではないことも報告した。また、MAG は HSV gB とも会合し、膜癒合、エントリーを増大させることも判明した (Suenaga et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2010)。

一方、VZV は、扁桃において、免疫担当細胞に侵入(エントリー)後、感染細胞に乗って、全身に運ばれ、水痘や脳炎、脊髄炎を引き起したり、知覚神経節に潜伏感染する。MAG は神経組織でのエントリーレセプターであるが、VZV の血球系細胞へのエントリーレセプターは知られていない。

2. 研究の目的

VZV の血球細胞におけるエントリーレセプターを同定することを最終目標にする。その過程で、我々は、免疫担当細胞に特異的に発現する分子 VgBR2 が、VZV gB と会合することを発見した。エントリーレセプターであることを証明していくために、

1) VZV gB と VgBR2 の会合が、膜融合を引

き起しうるかを検討する。

2) 両者の会合が、VZV のエントリーに関与するかを解析する。

3) gB と VgBR2 の会合様式と gB と MAG との会合様式の類似点、相違点を解析し、gB を介した、VZV のエントリーメカニズムを解析する。

4) gB と VgBR2 の会合が、免疫応答に関与するかどうかを解析する。

以上を総合し、VZV の個体レベルでの感染メカニズムを明らかにする。また、VZV 感染の組織・臓器特異性、種特異性の解明にも迫る。

3. 研究の方法

1) VgBR2 を発現した細胞と VZV gB、gH-gL 複合体を発現させた細胞による膜融合アッセイを行う。

2) VgBR2 を発現した細胞に、細胞内にエントリーすると GFP を発光する VZV (GFP-VZV) を感染させる。感染効率を蛍光顕微鏡やフローサイトメトリーにて解析する。

3) VgBR2 発現細胞に GFP-VZV を感染させる際に、VgBR2 と gB の会合を阻害する物質を添加し、VZV の感染阻害が可能かどうか蛍光顕微鏡やフローサイトメトリーにて解析する。

4) 我々の研究から、MAG と gB の会合には、ある糖鎖が必要であることが分ってきているが (Suenaga et al. 投稿準備中)、VgBR2 と gB との会合、ひいては膜融合、エントリーにも糖鎖が必要かを検討する。このために、MAG あるいは VgBR2 上の特定の糖鎖との会合に必要なアミノ酸を変異させた分子を作成する。この変異 MAG や変異 VgBR2 と gB との会合や、変異 MAG もしくは変異 VgBR2 発現細胞を用いた、膜融合アッセイや VZV 感染実験を行う。

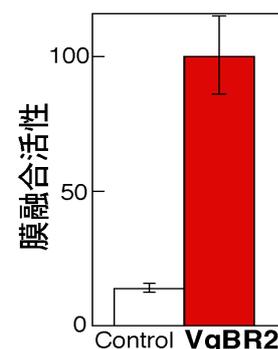
4. 研究成果

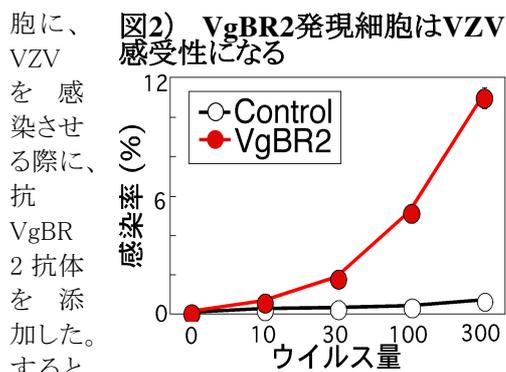
1) VgBR2 発現細胞は VZV gB、gH-gL 複合体発現細胞との膜融合を引き起したが、コントロール細胞では、gB、gH-gL 複合体発現細胞との膜融合を引き起せなかった (図 1)。

2) VgBR2 を発現させた細胞は VZV の感受性が増大したが、コントロール細胞は、VZV に感染しなかった (図 2)。

3) VgBR2 発現細

図1) VgBR2はgBと会合することによって膜融合を誘導する





細胞に、VZV を感染させる際に、抗 VgBR2 抗体を添加すると、VZV 感染は抗 VgBR2 抗体で阻害され、コントロール抗体では阻害されなかった。

以上のことから、VgBR2 は、VZV gB との会合によって膜融合を引き起こし、VZV のエンタリーを引き起こすレセプターであると判明した。

- 4) 糖鎖との会合に必要なアミノ酸を変異させた、変異 MAG や変異 VgBR2 は、VZV gB 会合しなかった。また、変異 MAG や変異 VgBR2 発現細胞は、コントロール細胞と同様に、gB、gH-gL 複合体発現細胞との膜融合を引き起こせなかった。さらに、変異 MAG や変異 VgBR2 発現細胞は、コントロール細胞と同様に、VZV に感染しなかった。

即ち、VgBR と gB の会合を介した、VZV の膜融合、VZV のエンタリーは、gB 上の糖鎖が関与していることがわかった。糖鎖の構造の詳細に関しては、糖鎖アレイを用いたデータなどから予想し、現在詳細を解析中である (Suenaga et. al. 投稿準備中)。

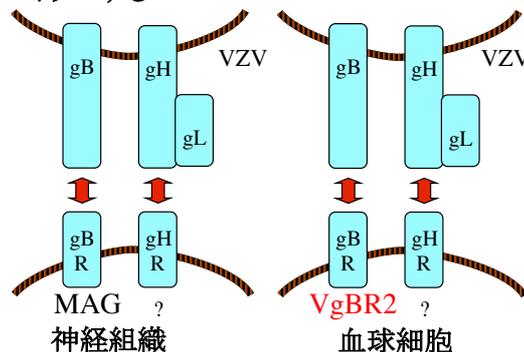
- 5) さらに、VgBR2 は、そのアミノ酸配列から、発現分子に抑制化シグナルを伝達するであろうことが予想された。実際、VZV 感染細胞や VZV gB 発現細胞と、VgBR2 発現細胞との共培養により、VgBR2 発現細胞の免疫応答を負に制御することもわかってきており、現在詳細を解析中である。

以上のことより、VgBR2 は、VZV の gB のリガンドであり、かつ血球細胞におけるエンタリーレセプターであることが判明した。VZV は、神経組織に感染する際には MAG を、神経組織に感染する際は VgBR2 を使用し、このことが VZV の感染組織特異性を決定する一因となっている可能性がある (図3)。また、MAG は魚類以上の生物で保存されている分子だが、VgBR2 は、マウスなどではその相同分子はみつからない。血球細胞が、VZV の侵入門戸のひとつだとすれば、VZV がヒトという種特異的に感染することのひとつの要因として、VgBR2 が考えられるかもしれない。

また、VZV gB の糖鎖修飾が、感染に関与しているため、VZV 供与個体もしくは供与組織によって gB の糖鎖修飾が異なれば、それによって、VZV の感染性が異なると考えられるので、VZV gB と MAG、VgBR2 の糖鎖を介した結合をより詳細に解析していくことによって、

感染制御にもつながる可能性がある。

図3) VZVは、MAGを介して神経組織にエンタリーし、VgBR2を介して血球細胞にエンタリーする



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 3 件)

- ①. Jin, H., Arase, N., Hirayasu, K., Kohyama, M., Suenaga, T., Saito, F., Tanimura, K., Matsuoka, S., Ebina, K., Shi, K., Toyama-Sorimachi, N., Yasuda, S., Horita, T., Hiwa, R., Takasugi, K., Ohmura, K., Yoshikawa, H., Saito, T., Atsumi, T., Sasazuki, T., Katayama, I., L. Lanier, L., and Arase, H. Autoantibodies to IgG/HLA-DR complexes are associated with rheumatoid arthritis susceptibility. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 111:3787-3792, 2014, 査読有 DOI: 10.1073/pnas.1401105111.
- ②. Tanaka, Y., Suenaga, T., Matsumoto, M., Seya, T., Arase, H. Herpesvirus 6 Glycoproteins B (gB), gH, gL and gQ are Necessary and Sufficient for Cell-to-Cell Fusion. *J. Virol.* 87:10900-10903, 2013, 査読有 DOI: 10.1128/JVI.01427-13.
- ③. Jiang, Y., Arase, N., Kohyama, M., Hirayasu, K., Suenaga, T., Jin, H., Matsumoto, M., Shida, K., L. Lanier, L., Saito, T. and Arase, H. Transport of misfolded endoplasmic reticulum proteins to the cell surface by MHC class II molecules. *Int. Immunol.* 25:235-246, 2013, 査読有 DOI: 10.1093/intimm/dxs155.

[学会発表] (計 11 件)

- ①. Jin Hui, Arase Noriko, Kohayama Masako, Saito Fumiji, Hirayasu Kouyuki, Matsumoto Maki, Shida Kyoko, Suenaga Tadahiro, Saito Takashi, Katayama Ichiro,

- Lanier Lewis L., Arase Hisashi, Rheumatoid factor binding to IgG heavy chain presented on HLA-DR is associated with Rheumatoid Arthritis susceptibility. 第 42 回日本免疫学会学術集会, 2013 年 12 月 13 日, 幕張メッセ (千葉市)
- ②. Tanimura Kenji, Suenaga Tadahiro, Jin Hui, Hirayasu Kouyuki, Arase Noriko, Kohayama Masako, Ebina Yasuhiko, Yasuda Shinsuke, Horita Tetsuya, Katayama Ichiro, Atsumi Tatsuya, Yamada Hideo, Arase Hisashi, β 2-glycoprotein I presented on MHC class II molecules are recognized by autoantibodies in antiphospholipid syndrome. 第 42 回日本免疫学会学術集会, 2013 年 12 月 13 日, 幕張メッセ (千葉市)
- ③. Kishida Kazuki, Kohyama Masako, Kurashima Yosuke, Wang Jing, Hirayasu Kouyuki, Suenaga Tadahiro, Kiyono Hiroshi, Kunisawa Jun, Arase Hisashi, PILR α negatively regulates DSS induced experimental colitis. 第 42 回日本免疫学会学術集会, 2013 年 12 月 12 日, 幕張メッセ (千葉市)
- ④. 末永忠広, 森康子, 荒瀬尚, 水痘帯状疱疹ウイルス (VZV) の膜融合メカニズムの解析, 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 2013 年 11 月 10 日, 神戸国際会議場 (神戸市)
- ⑤. Tadahiro Suenaga, Yuki Tanaka, Misako Matsumoto, Tsukasa Seya, Hisashi Arase, Herpesvirus 6 Glycoprotein B (gB), gH, gL and gQ are Necessary and Sufficient for Cell-to-Cell Fusion. 38th International Herpesvirus Workshop, 2013 年 7 月 21 日, Grand Rapids, Michigan (USA)
- ⑥. 末永忠広, 松本麻紀, 有澤史倫, 森康子, 荒瀬尚, 水痘帯状疱疹ウイルス (VZV) glycoprotein H (gH) 受容体の解析, 第 28 回ヘルペスウイルス研究会, 2013 年 5 月 31 日, 淡路夢舞台国際会議場 (淡路市)
- ⑦. Fuminori Arisawa, Jing Wang, Tadahiro Suenaga, Hisashi Arase, Human cytomegalovirus UL10 regulates immune response via inhibitory PILR α , 第 41 回日本免疫学会学術集会, 神戸国際会議場 (兵庫), 2012 年 12 月 6 日
- ⑧. Yan Jiang, Hui Jin, Masako Kohyama, Noriko Arase, Kouyuki Hirayasu, Tadahiro Suenaga, Maki Matsumoto, Kyoko Shida, Lewis L. Lanier, Takashi Saito, Ichiro Katayama and Hisashi Arase, Transport of misfolded ER proteins to the cell surface by MHC class II molecules, 第 41 回日本免疫学会学術集会, 神戸国際会議場 (神戸), 2012 年 12 月 6 日
- ⑨. 田中 悠喜, 末永 忠広, 松本 麻紀, 森康子, 荒瀬 尚, ヘルペスウイルス 6 型の膜融合は gB, gH, gL, gQ によって引き起こされる, 第 60 回日本ウイルス学会学術集会, グランキューブ大阪 (大阪), 2012 年 11 月 13 日
- ⑩. 末永 忠広, 松本 麻紀, 有澤 史倫, 森康子, 荒瀬 尚, 水痘帯状疱疹ウイルス (VZV) の感染におけるシアル酸の役割, 第 60 回日本ウイルス学会学術集会, グランキューブ大阪 (大阪), 2012 年 11 月 13 日
- ⑪. 末永忠広, 松本麻紀, 有澤 史倫, 森康子, 荒瀬尚, 水痘帯状疱疹ウイルス (VZV) の膜融合におけるシアル酸の役割, 第 27 回ヘルペスウイルス研究会, あいち健康プラザ健康宿泊館プラザホール (愛知), 2012 年 6 月 7 日

[その他]

ホームページ等

<http://immchem.biken.osaka-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

末永 忠広 (SUENAGA, Tadahiro)
大阪大学・微生物病研究所・助教
研究者番号: 20396675