

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790442

研究課題名(和文) ヒトヘルペスウイルス6 特異的な糖タンパク質 gQ1 の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of human herpesvirus 6 (HHV-6) glycoprotein Q1 (gQ1)

研究代表者

湯 華民 (Tang, Huamin)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：10595896

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000 円、(間接経費) 1,020,000 円

研究成果の概要(和文)：HHV-6は臨床分離株間での大きなcharacterの違いによって、二種類のウイルス(HHV-6AとHHV-6B)に再分類された。今回我々はHHV-6B gQ1はHHV-6A gQ1の機能を代償できないこと、HHV-6A gQ1のN末端に侵入receptorであるCD46との結合部位が存在することを明らかにした。これらの結果は、二つのウイルスのトロピズムの違いのメカニズムの解明に繋がると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Human herpesvirus 6 has been reclassified as two virus species because of the huge different character of its clinical isolates. Here we focused gQ1 genes of HHV-6A and -6B, which have been reported to be important for these viruses' entry. We found that HHV-6B gQ1 could not substitute HHV-6A gQ1 function in the infection context. Furthermore, we found that the N terminal of HHV-6A gQ1 contains the site for the binding of CD46, HHV-6A entry receptor. Furthermore we also identified an amino acid residue required for HHV-6B gQ1 function.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：ウイルス学

キーワード：糖タンパク HHV - 6 トロピズム

## 1. 研究開始当初の背景

(1). HHV-6 の gQ1 に関する基礎研究の必要性

HHV-6A と HHV-6B は異なる病気を引き起こす。HHV-6B は乳幼児の突発性発疹を引き起こし、その後、生涯に渡り潜伏感染する (Yamanishi K et al. Lancet. 1988)。一方、HHV-6A が関わる病気はまだ不明である。95%以上の健常成人に HHV-6 が潜伏感染している。また、HHV-6 は、AIDS、移植など宿主の免疫抑制状態時に再活性し、重篤な病気、すなわち肝炎、間質性肺炎、リンパ節炎、脳炎などを引き起こす (Yao K et al. J Med Virol. 2010、Ablashi DV et al. J Med Virol. 2010)。しかし、これらの病気に対する有力な予防法および治療法は未だ開発されていない。よって予防法および治療法を開発するために、HHV-6 感染の分子メカニズムの解明が急がれている。

(2). HHV-6 の gQ1 は、ウイルス間の分子生物学的特徴の違いに関与している可能性がある。

HHV-6A と HHV-6B の宿主細胞のトロピズムの違いは、主に、HHV-6A 及び HHV-6B がコードするタンパクの違いに起因すると考えられる。HHV-6A と HHV-6B のゲノムの相同性は 90%に達しているが、gQ1 領域の相同性は 70%しかない。また、HHV-6A の gQ1 と HHV-6B の gQ1 の抗原性も異なっている。我々の研究グループは HHV-6A、HHV-6B の一方のみに中和能を有する、gQ1 に対する中和抗体を得た (Kawabata A et al. J. Virol. 2011、Maeki T et al.)。さらに、最近、我々の研究グループは、一過性の発現系を用いて、HHV-6A の gH/gL/gQ1/gQ2 複合体の各糖タンパクを HHV-6B のものに入れ替え、その複合体が HHV-6A のレセプターである CD46 分子と結合するか否かを検討した。その結果、gH のみ、gL のみ、gQ2 のみを HHV-6B のものに入れ替えた複合体はいずれも CD46 と結合したが、gQ1 のみを HHV-6B のものに入れ替えた複合体

は CD46 と結合しないことが明らかとなった。これらの現象から、gQ1 の違いがウイルスの間での分子生物学的特徴の違いに関与していると考えられる。

そこで、我々は、二つのウイルスのゲノム間での相同性が低い gQ1 遺伝子に着目し、gQ1 の機能解析と共に、二つのウイルスのトロピズムの違いの解明に繋ぎたいと考えている。

## 2. 研究の目的

HHV-6A および HHV-6B の侵入過程において重要な糖タンパクである gQ1 が、二つのウイルス間の分子生物学的な違いに関与するか否かを調べると共に、gQ1 の機能解析を行う。

## 3. 研究の方法

(1). 変異ウイルスゲノムの構築

我々は既に HHV-6A のゲノムを大腸菌に維持させることに成功した。HHV-6 の gQ1 は HHV-6 ゲノムの U97 から U100 までの領域からコードされる。そこで、我々は大腸菌内の組み換え法を用いて、HHV-6A の gQ1 (AgQ1) を HHV-6B の gQ1 (BgQ1) に変異させた。精製したウイルスゲノム DNA を制限酵素切断パターンおよび変異部位周辺のシークエンスなどによって確認した。また、精製した DNA を Jhan 細胞に導入した後、CBMCs と共培養し、作製したウイルスゲノム DNA から感染性があるウイルスの再構築可能か否かなどを調べた。

(2). 変異 gQ1 の作製および機能解析

HHV-6A (U1102 株) の gQ1 と HHV-6B (HST 株) の gQ1 のアミノ酸の相同性は約 78%である (図 1)。そこで、我々は two step PCR 法で AgQ1 の一部を BgQ1 の相同部分に置換した変異 gQ1 を作製した (図 2)。作製した変異 gQ1 が gH、gL、gQ2 (HHV-6A および HHV-6B 由来) との複合体を形成するか否かを調べるため、変異 gQ1 を gH、gL、gQ2 と一緒に 293T 細胞に導入した後、gH の抗体を用いて、免疫沈降を行った。また、形成された複合体が宿主レセプ

ターと結合するの否かを調べるため、HHV-6A および HHV-6B の soluble form の宿主レセプターを発現させた 293T 細胞の培養上清から soluble form の宿主レセプタータンパクを回収し、上記の複合体を発現させた細胞の溶解液との結合を確認するため、pull down 実験を行った。

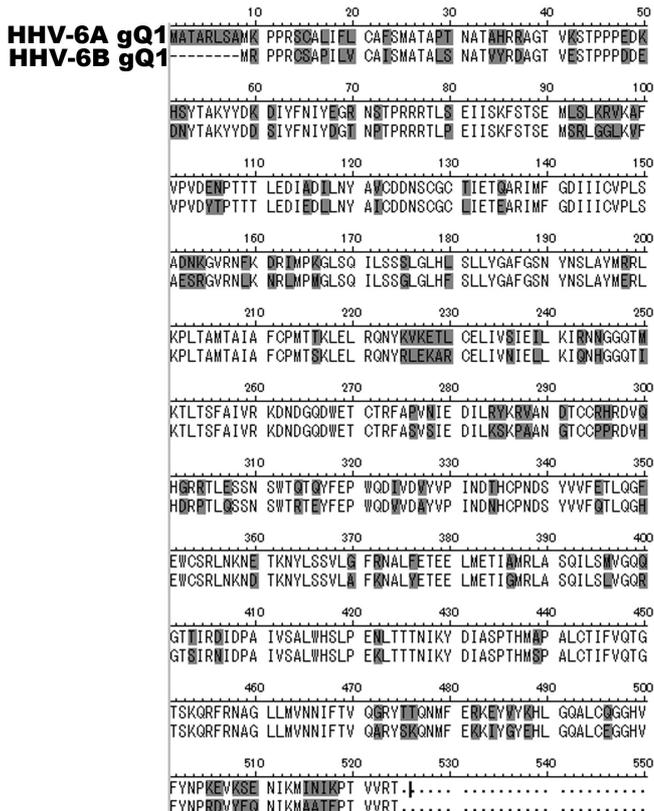


図 1 . HHV-6A gQ1 と HHV-6B gQ1 のアミノ酸の相同性は約 78%である。

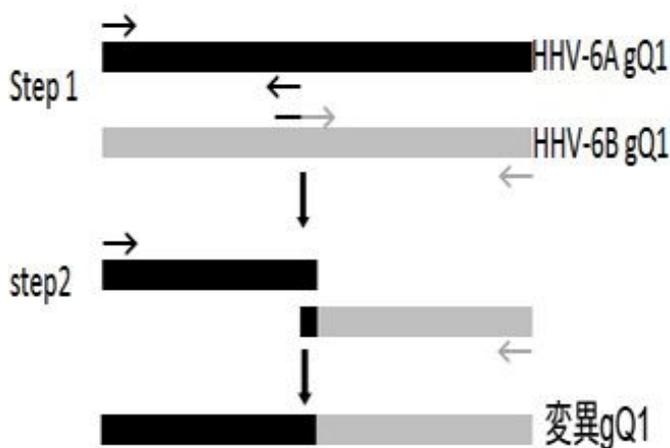


図 2 .Two-step PCR 法による変異 gQ1 の作製。

#### 4. 研究成果

(1) .我々は大腸菌内での組換え法を用いて、AgQ1 を BgQ1 に変異させたウイルスゲノム DNA を作成した。作製したウイルスゲノム DNA の制限酵素切断パターンおよびシーケンスの解析結果、AgQ1 が BgQ1 に置換されていることを確認した。その DNA を用いてウイルスの再構築を試みたところ、感染性ウイルスが再構築されなかった。この結果より BgQ1 は AgQ1 の機能を代償できないことが明らかとなった。

(2) .我々は AgQ1 の一部を BgQ1 の相同部分に置換した変異 gQ1 を作製した。作製した変異 gQ1 の機能を解析したところ、AgQ1 の N 末端を含んだ変異 gQ1 は、HHV-6A gQ2、gH、gL と複合体を形成し、HHV-6A の侵入レセプターである CD46 と結合した。また、同様の方法で、BgQ1 のうち、HHV-6B の宿主レセプターである CD134 との結合に重要なアミノ酸残基を同定した。

#### 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)

Jasirwan, C., Furusawa, Y., Tang, H., Maeki, T., and Mori, Y., Human herpesvirus-6A gQ1 and gQ2 are critical for human CD46 usage. Microbiol Immunol, 2014. 58(1): p. 22-30. 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)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

なし

6．研究組織

(1)研究代表者

湯 華民 (TANG HUAMIN)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：10595896