

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390114

研究課題名(和文) 宿主受容体の同定によるヘルペスウイルス侵入機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of herpesvirus entry mechanism identifying its host receptor

研究代表者

森 康子 (Mori, Yasuko)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：50343257

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,500,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトヘルペスウイルス6B(HHV-6B)は乳幼児に突発性発疹を引き起こした後、生涯宿主に潜伏感染する。宿主の免疫抑制状態などにHHV-6Bは再活性し、重篤な病気を引き起こす。我々は不明であったHHV-6Bの宿主受容体を同定し、ウイルスリガンドとの詳細な相互作用を明らかにした。本研究で得られた成果はHHV-6B感染機構の解明に繋がると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Human herpesvirus 6B (HHV-6B) causes exanthem subitum in little children, and then establishes lifelong latency in the host. It can reactivate from latency in immunocompromised patients and usually causes severe diseases. No therapeutic or prophylactic methods for HHV-6B infection are available. In the current study, we focused on the entry process of HHV-6B, and identified the cellular receptor which had been unidentified. Furthermore, we did detailed analysis of the interaction between the novel pair of receptor and viral ligand, and found the key domains for their interaction. Our achievement would contribute to the elucidation of the molecular mechanism of HHV-6B infection.

研究分野：ウイルス学

キーワード：HHV-6 ウイルス感染 エントリー 受容体

1. 背景

ヒトヘルペスウイルス 6B(HHV-6B)はヒトのみを宿主とする HHV-6A とは異なったヘルペスウイルスである。活性化した T 細胞に感染増殖し、子孫ウイルスを産生できる。乳幼児期の初感染時に突発性発疹を引き起こし、その後潜伏感染する (Yamanishi K et al. Lancet. 1988)。ほぼ 100%の成人に HHV-6B は潜伏感染している。また、HHV-6B は、移植などの宿主免疫抑制状態時に再活性化し、重篤な病気、すなわち肝炎、間質性肺炎、リンパ節炎あるいは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、それらの病気に対する有効な予防法および治療法は未だ開発されておらず、それらの予防法および治療法を開発するために、HHV-6 A/B 感染の分子メカニズムの解明が急がれている。

我々は HHV-6A/B エンベロープに存在する特異的な糖タンパク質複合体 gH/gL/gQ1/gQ2 を発見した。HHV-6A の糖タンパク質複合体は、既に報告されていた宿主受容体 CD46 に結合できるが、HHV-6B のそれは結合できないことを我々は明らかにし、HHV-6B には別の受容体が存在することを示唆してきた (Santoro, F. et al. Cell. 1999; Mori, Y. et al. J. Virol. 2003; Akkapaiboon, P. et al. J. Virol. 2004)。

2. 研究の目的

そこで本研究では HHV-6B 特異的に作用する宿主受容体を同定し、HHV-6B の宿主細胞への侵入メカニズムを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

宿主受容体の同定に関しては、我々は HHV-6B gH/gL/gQ1/gQ2 複合体を用いた。

(1) HHV-6B および HHV-6A の soluble form 糖タンパク質複合体の作製

HHV-6 の gH/gL/gQ1/gQ2 のうち、gH のみが膜貫通領域を持っているため、我々は gH の膜貫通領域及び細胞質側領域をヒト抗体の Fc 部分と入れ替え、その C 末端に His タグを付加した。その後、gQ1、gQ2、gL 及び上記の方法にて作製した gH を哺乳類発現プラスミドに挿入し、それぞれの発現プラスミドを作製した。

それらのプラスミドを 293T 細胞に導入し、その培養上清から His タグと結合する NI-NTA (Qiagen) を用いて、soluble form gH/gL/gQ1/gQ2 を精製した。

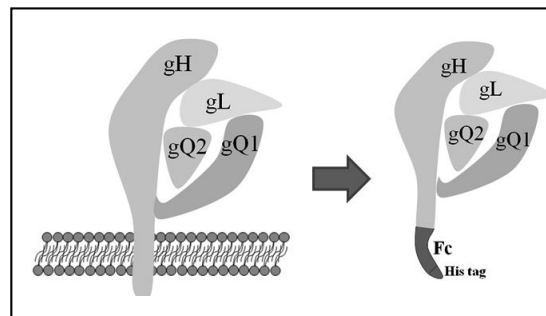


図 1. Soluble form 複合体作製方法

(2) HHV-6B の soluble form 糖タンパク質複合体を用いた、宿主受容体の同定

我々は上記で精製した複合体を、細胞表面タンパク質を Biotin で標識した HHV-6B 感受性細胞の溶解液と反応させ、その後、反応した溶液から NI-NTA および protein G sepharose を用いて、soluble form 糖タンパク質複合体およびその複合体と結合する宿主タンパク質を精製した。精製したサンプルをタンパク質分離ゲルで泳動させた後、streptavidin-HRP を用いた western blot 法或いは銀染色法で共沈したタンパク質を検出した。HHV-6A の複合体由来のサンプルと比べ、HHV-6B の複合体由来サンプルに特異的なバンドを検出した。そのバンドを切り出し、含まれるタンパク質を LC/MS 解析によって同定した。

(3) HHV-6B の soluble form 糖タンパク質複合体と結合するタンパク質 X の侵入における役割の解明

上記で同定したタンパク質 X が HHV-6B の宿主受容体であるか否かを下記の実験で調べた。

タンパク質 X に対する抗体を用いた中和実験

タンパク質 X に対する抗体を HHV-6B の感受性細胞と反応させた後、HHV-6B を感染させた。感染 24 時間後、ウイルスが細胞に侵入した後最初に発現するタンパク質である IE1 タンパク質の発現を western blot 法により検出し、ウイルスの侵入効率を定量した。

Soluble form タンパク質 X を用いた中和実験

上記の gH の soluble form と同様にタンパク質 X の soluble form を作製した。そのタンパク質と HHV-6B とを反応させた後、そのウイルス液を HHV-6B の感受性細胞に感染させた。上記と同様に IE1 タンパク質の発現でウイルスの侵入効率を定量した。

タンパク質 X の発現レベルとウイルス感受性との関連を確認

タンパク質 X の発現を抑制した HHV-6B 感受性細胞に HHV-6B を感染させ、その動態を調べた。

また、タンパク質 X を強制発現させた HHV-6B 非感受性細胞に HHV-6B を感染させ、その動態を調べた。

(4) 宿主受容体とウイルス側リガンド結合部位の同定

同定した宿主受容体の変異体 (マウス由来のものの一部の配列を入れ替えた変異体) を作製し、HHV-6B リガンドとの結合を、免疫沈降法を用いて調べた。

HHV-6B のリガンド複合体のうち、HHV-6A の gQ1 の一部の配列と入れ替えた gQ1 変異体を作製し、宿主受容体との結合を、免疫沈降法を用いて調べた。

4 . 研究成果

(1) Soluble form HHV-6B gH/gL/gQ1/gQ2 の

作製及び精製に成功

作製した変異 gH、gL、gQ1 および gQ2 のプラスミドを 293T 細胞に導入し、その上清から精製したタンパク質を western blot 法で調べた結果、gH、gL、gQ1 および gQ2 が検出された。

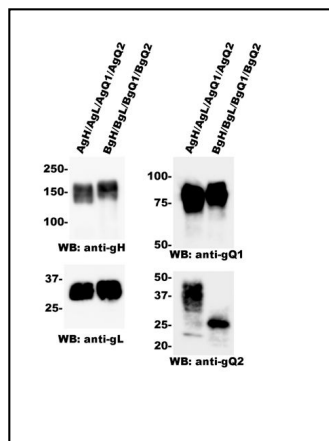


図 2 . Soluble form gH/gL/gQ1/gQ2 の培養上清中への分泌 (Tang, H. et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013)

(2) HHV-6B 感受性細胞から HHV-6B 複合体と特異的に結合するタンパク質を同定

精製した複合体と HHV-6B 感受性細胞の溶解液とを反応させたところ、HHV-6B 複合体由来サンプル特異的なバンドが検出された。そのバンドの中に含まれるタンパク質を LC/MS 解析で調べた結果、CD134 が同定された。さらに CD134 の抗体を用いて、その結合の確認に成功した。

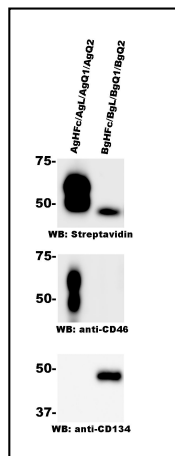


図 3 . CD134 と HHV-6B 複合体との結合を確認 (Tang, H. et al. Proc Natl Acad Sci U S A.

2013)

(3) CD134 は HHV-6B の宿主受容体である。

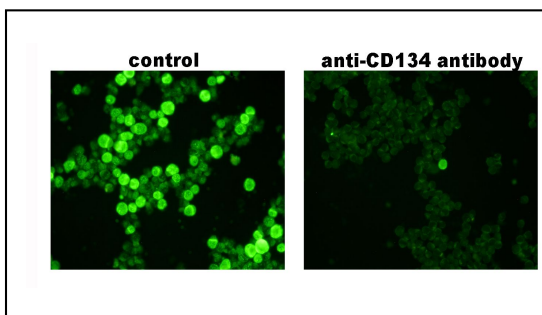


図 4. CD134 の抗体を用いた、HHV-6B の感染阻害(Tang, H. et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013)

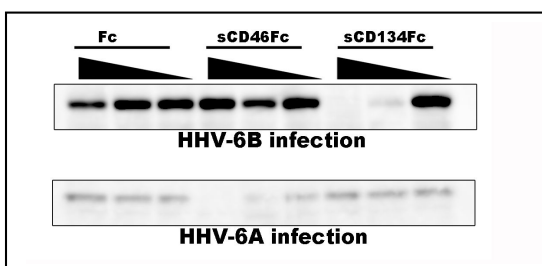


図 5. Soluble form CD134 による HHV-6B の感染阻害(Tang, H. et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013)

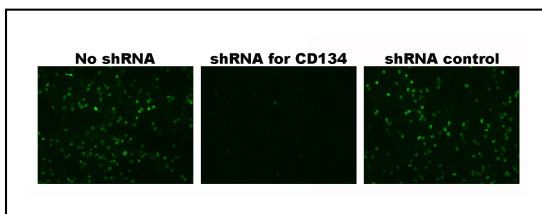


図 6. CD134 の knockdown により HHV-6B の感染が減弱

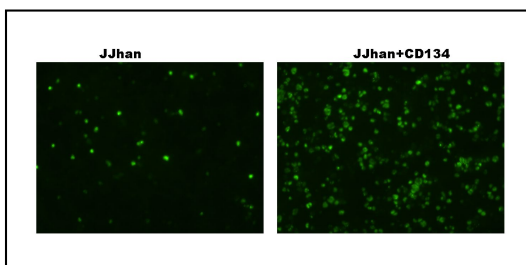


図 7. CD134 強発現による HHV-6B の感染促進

(4) CD134 と HHV-6B gH/gL/gQ1/gQ2 との結合部位を同定

キメラ CD134 を用いて、免疫沈降法で調べた結果、CD134 の cysteine rich domain 2 (R2) が HHV-6B の複合体との結合に重要であった。またキメラ gQ1 を用いて調べた結果、

HHV-6B の gQ1 の 127 番目のアミノ酸残基が CD134 との結合に重要であった。

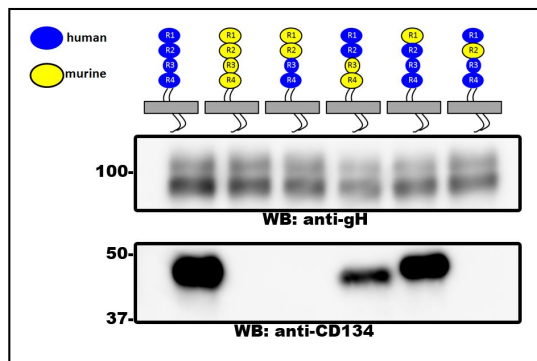


図 8. ヒト CD134 の R2 領域は HHV-6B 複合体との結合に重要である(Tang, H. et al. J Virol. 2014)

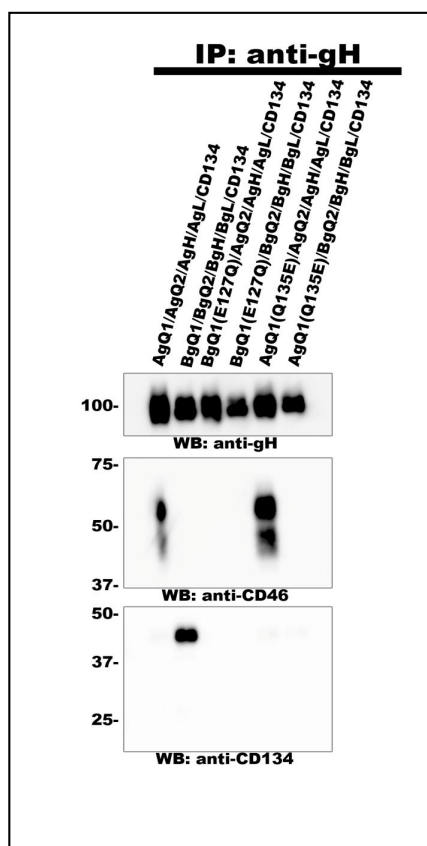


図 9. HHV-6B gQ1 の 127 番目のアミノ酸残基が CD134 との結合に重要(Tang, H. et al. J Virol. 2014)

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 10 件)

- (1) Kawabata, A., Jasirwan, C., Yamanishi, K. and Mori, Y. Human herpesvirus 6 glycoprotein M is essential for virus growth and requires glycoprotein N for its maturation. *Virology*, 査読有 2012. 429(1): p. 21-8. doi:

- 10.1016/j.virol.2012.03.027.
- (2) Oyaizu, H., Tang, H., Ota, M., Takenaka, N., Ozono, K., Yamanishi, K. and Mori, Y. Complementation of the function of glycoprotein H of human herpesvirus 6 variant A by glycoprotein H of variant B in the virus life cycle. *J Virol*, 査読有 2012. 86(16): p. 8492-8. doi: 10.1128/JVI.00504-12.
- (3) Maeki, T., Hayashi, M., Kawabata, A., Tang, H., Yamanishi, K. and Mori, Y. Identification of the human herpesvirus 6A gQ1 domain essential for its functional conformation. *J Virol*, 査読有 2013. 87(12): p. 7054-63. doi: 10.1128/JVI.00611-13.
- (4) Tang, H., Serada, S., Kawabata, A., Ota, M., Hayashi, E., Naka, T., Yamanishi, K. and Mori, Y. CD134 is a cellular receptor specific for human herpesvirus-6B entry. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 査読有 2013. 110(22): p. 9096-9. doi: 10.1073/pnas.1305187110.
- (5) Hayashi, M., Yoshida, K., Tang, H., Sadaoka, T., Kawabata, A., Jasirwan, C. and Mori, Y. Characterization of the human herpesvirus 6A U23 gene. *Virology*, 査読有 2014. 450-451: p. 98-105. doi: 10.1016/j.virol.2013.12.004.
- (6) 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*, 査読有 2014. 58(1): p. 22-30. doi: 10.1111/1348-0421.12110.
- (7) Kawabata, A., Serada, S., Naka, T. and Mori, Y. Human herpesvirus 6 gM/gN complex interacts with v-SNARE in infected cells. *J Gen Virol*, 査読有 2014. doi: 10.1099/vir.0.069336-0.
- (8) Ota, M., Serada, S., Naka, T. and Mori, Y. MHC class I molecules are incorporated into human herpesvirus-6 viral particles and released into the extracellular environment. *Microbiol Immunol*, 査読有 2014. 58(2): p. 119-25. doi: 10.1111/1348-0421.12121.
- (9) Tang, H., Wang, J., Mahmoud, N.F. and Mori, Y. Detailed study of the interaction between human herpesvirus 6B glycoprotein complex and its cellular receptor, human CD134. *J Virol*, 査読有 2014. 88(18): p. 10875-82. doi: 10.1128/JVI.01447-14.
- (10) Tang, H., Mahmoud NF. and Mori, Y. Maturation of human herpesvirus 6A glycoprotein O requires coexpression of glycoprotein H and glycoprotein L. *J Virol*, 査読有 2015. 89:5159-5163. doi: 10.1128/JVI.00140-15.
- [学会発表](計 10 件)
- (1) Mori, Y., Jasirwan, C., Furusawa, Y., Tang, H., Maeki, T. and Yamanishi, K. HHV-6 gQ1 is key factor for determination of the variant specific cell tropism. 37th International Herpesvirus Workshop Aug 4-Aug 8, 2012 (Calgary, Canada)
- (2) Oyaizu, H., Tang, H., Yamanishi, K. and Mori, Y. Functional analysis of HHV-6 gH in an infection context 37th International Herpesvirus Workshop Aug 4-Aug 8, 2012 (Calgary, Canada)
- (3) Mori, Y. Human Herpesvirus-6A/B entry into host cells 8th International Conference on HHV-6 & 7. Apr 8-Apr 10, 2013 (Paris, France)
- (4) Tang, H., Serada, S., Kawabata, A., Ota, M., Hayashi, E., Naka, T., Yamanishi, K. and Mori, Y. Identification of an Entry Receptor Specific for HHV-6B Infection 38th International Herpes Workshop Jul 20-Jul 24, 2013 (Grand Rapids, USA)
- (5) Tang, H., Wang, J., and Mori, Y. Analysis of the interaction between HHV-6B gH/gL/gQ1/gQ2 complex and the virus entry receptor. 39th Annual international herpesvirus workshop, Jul 19-Jul 23, 2014

(Kobe, Japan)

- (6) Mori, Y. The mechanism of human herpesvirus-6 infection -entry process into host cells- The 13th Awaji international Forum on Infection and Immunity in Nara Sep 23-Sep 26, 2014 (Nara, Japan)
- (7) Tang, H., Serada, S., Kawabata, A., Ota, M., Hayashi, E., Naka, T., Yamanishi, K. and Mori, Y. Identification of a cellular molecule required for HHV-6B 第28回ヘルペスウイルス研究会(2013年5月30日-6月1日 淡路夢舞台国際会議場 [兵庫県])
- (8) 前木孝洋、林麻佑子、河端暁子、湯華民、山西弘一、森康子 HHV-6A gQ1の様々な機能および構造維持に重要な領域の同定 第28回ヘルペスウイルス研究会 (2013年5月30日-6月1日 淡路夢舞台国際会議場 [兵庫県])
- (9) 森康子 ヒトヘルペスウイルス6への宿主細胞へのエントリー機構に関する研究 第61回日本ウイルス学会学術集会(2013年11月10-12日 神戸国際会議場 [兵庫県])
- (10) 湯華民、森康子 Identification of the domains in HHV-6B receptor and ligand required for their interaction 第62回日本ウイルス学会学術集会 (2014年11月10-12日 パシフィコ横浜 [神奈川県])

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森 康子 (MORI, Yasuko)
神戸大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：50343257

(2) 研究分担者

湯 華民 (TANG, Huamin)
神戸大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：10595896