

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19112

研究課題名(和文) ヒトヘルペスウイルス6 gM/gN複合体の侵入過程における役割の解析

研究課題名(英文) Analysis of the role for human herpesvirus 6 gM/gN entry

研究代表者

河端 暁子 (Kawabata, Akiko)

神戸大学・医学研究科・助教

研究者番号：30595947

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトヘルペスウイルス6 (HHV-6) は乳幼児の突発性発疹の原因で時に脳炎を引き起こすが感染機構は不明な点が多い。我々はHHV-6ウイルス粒子のエンベロープ糖タンパク質gM/gN複合体の研究を行った。本複合体は細胞内で宿主因子と結合しウイルス粒子中に存在する。ウイルス粒子にはテグメントという構造が存在し、構成するテグメントタンパク質はエンベロープ糖タンパク質と結合し粒子形成に重要である。我々はテグメントタンパク質U14について研究を行った。U14は様々な宿主因子と結合する多機能なタンパク質である。本研究ではU14と結合する宿主因子Xを見出し、HHV-6の感染に重要であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Human herpesvirus-6 (HHV-6) causes exanthem subitum and sometimes develops severe encephalitis. But the infection mechanism of HHV-6 is unknown. Recently, we analyzed the viral glycoprotein complex glycoprotein M (gM)/gN on HHV-6 envelope. gM/gN complex interacted with a cellular factor was incorporated into virions. Tegument constituted by tegument proteins is the component of viral particles. These proteins interacted with the envelope glycoproteins play an important role for the formation of virions.

We analyzed about the HHV-6 tegument protein U14. U14 has the multiple role for HHV-6 infection and interacted with several proteins. In this study, we isolated the new cellular factor associated with U14. We revealed that this protein was important for HHV-6 infection.

研究分野：ウイルス学

キーワード：ウイルス 細胞 宿主因子

1. 研究開始当初の背景

ヒトヘルペスウイルス 6 (HHV-6) は T 細胞に好んで感染するという興味深い特徴を持つウイルスである。HHV-6 は乳幼児に突発性発疹を引き起こした後に潜伏し、ほぼ 100% の成人がその抗体を保有している。造血幹細胞移植等の免疫抑制状態で再活性化し、脳炎や脳症を引き起こすが、その感染機構には不明な点が多い。

近年、我々は HHV-6 ウイルス粒子上に存在するエンペロープ糖タンパク質複合体である glycoprotein H (gH)/gL/gQ1/gQ2 複合体が宿主細胞の受容体と結合し、ウイルス侵入に必須であることを見出ししている。HHV-6 と同じベータヘルペスウイルス亜科に属するヒトサイトメガロウイルスでは、同じ糖タンパク質複合体である gM/gN 複合体がその増殖に必須であり、gM/gN 複合体に対する抗体がウイルス中和能を有することが報告されている。我々の研究室では HHV-6 gM/gN 複合体についても解析を行っており、HHV-6 においてもサイトメガロウイルスと同様に、gM/gN 複合体がウイルスの増殖に必須であることを明らかにしている。以上より、HHV-6 gM/gN 複合体も、侵入に重要な役割を担うと考えられる。

2. 研究の目的

(1) HHV-6 感染に必須である gM/gN 複合体の HHV-6 の侵入における機能を明らかにする。

(2) HHV-6 gM/gN 複合体は感染細胞において膜輸送に参与する宿主因子と相互作用し、ともにウイルス粒子中に存在することも我々は報告している。同時にウイルス粒子中にはテグメントと呼ばれるヘルペスウイルス粒子を保持する構造が存在する。他のヘルペスウイルスにおいては、テグメントを構成するテグメントタンパク質はエンペロープ糖タンパク質とも相互作用し、ウイルス粒子形成に重要であることも報告されている。我々の研究室では HHV-6 のテグメントタンパク質の 1 つである U14 について解析を行っている。その結果、U14 は HHV-6 の増殖に必須のタンパク質であり、様々な宿主因子と結合して機能する、多機能なウイルスタンパク質であることを見出した。また、我々は U14 の構造解析も行っている。そこで本研究では、gM/gN 複合体などのエンペロープ糖タンパク質とも関与する可能性がある HHV-6 U14 と相互作用する新たな宿主因子の探索を行い、HHV-6 感染における宿主因子の重要性を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) HHV-6 感染 T 細胞あるいは非感染 T 細胞を可溶化し、我々の研究室で既に樹立済である U14 に対する抗体を用いた免疫沈降を行い、

LC-MS/MS 解析により U14 と相互作用するタンパク質を網羅的に検出し、U14 と結合する宿主タンパク質候補を得た。

(2) HHV-6 感染細胞あるいは U14 発現細胞を用いて免疫沈降およびウェスタンブロットティングを行い、その相互作用を再確認した。

(3) 宿主因子 X が、HHV-6 ウイルス粒子中に含まれるか否かを調べるために、HHV-6 感染 T 細胞の上清からウイルス粒子を精製し、宿主因子 X に対する抗体を用いたウェスタンブロットティングにより検出を行った。

(4) HHV-6 感染細胞あるいは U14 発現細胞における U14 および宿主因子の局在を、蛍光抗体法を用いて検出した。

(5) 同定した宿主因子を発現抑制した T 細胞に HHV-6 を感染させて細胞を経時的に回収し、ウイルス増殖への影響を解析した。具体的には、感染細胞内におけるウイルスゲノムの増幅をリアルタイム PCR で、U14 や他のウイルスタンパク質の発現をウェスタンブロットティングにより確認した。

4. 研究成果

(1) HHV-6 感染細胞において、ウイルス粒子構成成分であるテグメントタンパク質 U14 と相互作用する宿主因子 X の同定に成功した。本宿主因子はこれまでに同定された U14 と相互作用する宿主因子とは異なる、新たなタンパク質であった。

(2) U14 および同定した宿主因子 X との相互作用を、HHV-6 感染細胞および U14 発現細胞を用いた免疫沈降およびウェスタンブロットティングによって確認することができた。

(3) 精製した HHV-6 ウイルス粒子を用いたウェスタンブロットティングにより、宿主因子 X は HHV-6 ウイルス粒子には取り込まれず、細胞内にて U14 と相互作用することを明らかにした。

(4) U14 は HHV-6 感染初期には核に、後期には細胞質に局在するユニークなタンパク質である。宿主因子 X と U14 の局在を、HHV-6 感染細胞を用いた間接蛍光抗体法により検出したところ、宿主因子 X は HHV-6 感染後期に U14 と細胞質にて一部共局在していた。また、U14 発現細胞においても宿主因子 X は U14 と細胞質にて一部共局在していることを確認した。以上より、U14 と宿主因子 X は感染後期に細胞質内にて相互作用し、機能するものと考えられる。

(5) 宿主因子 X が HHV-6 の感染においてどのような機能を担っているのかを調べるため

に、宿主因子 X の発現を抑制した T 細胞に HHV-6 を感染させ、その感染動態を解析した。宿主因子 X の発現を、shRNA を用いてノックダウンした T 細胞を作製し、それらに HHV-6 を感染させて経時的に細胞を回収し、ウイルスゲノムの増幅および種々のウイルスタンパク質の発現を調べた。その結果、宿主因子 X 抑制 T 細胞においてウイルス DNA は増幅していなかった。また、宿主因子 X 抑制 T 細胞においては、U14 の発現が減弱していた。しかしウイルス感染初期に発現するタンパク質である IE1 の発現は減弱しなかった。以上より、宿主因子 X の発現抑制により、HHV-6 は細胞内で増殖しないことを明らかにした。我々は U14 が HHV-6 の感染増殖に必須であることを明らかにしている。つまり、宿主因子 X の発現抑制により HHV-6 の感染に必須の U14 の発現が阻害され、HHV-6 が増殖できなかった可能性が考えられる。

(6)以上の結果より、ウイルス粒子構成因子であるテグメントタンパク質 U14 と相互作用する宿主因子 X は HHV-6 の増殖に必要な宿主因子と考えられる。本研究では宿主因子 X が HHV-6 感染に重要な因子であることを見出すことができたが、今後は宿主因子 X の HHV-6 感染における機能を明らかにするとともに、宿主因子 X と U14 との相互作用が HHV-6 感染に重要であるか否かを明らかにする必要がある。本研究では U14 と相互作用する新たな宿主因子を同定したが、U14 は HHV-6 特異的なテグメントタンパク質であり、他の宿主因子やウイルスタンパク質と相互作用し、HHV-6 感染において様々な役割を果たす多機能なタンパク質である。今後はエンベロープ糖タンパク質との関連性も含めて U14 についてさらなる解析を行い、U14 の機能および HHV-6 感染における役割を明らかにしていきたい。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

(1) Akiko Kawabata, Mitsuhiro Nishimura, Satoshi Serada, Tetsuji Naka and Yasuko Mori. The role of U14 in human herpesvirus-6 infection. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会、2016 年 10 月 23 日～2016 年 10 月 25 日、札幌コンベンションセンター (北海道札幌市)

(2) Akiko Kawabata, Satoshi Serada, Tetsuji Naka and Yasuko Mori. Identification of the cellular factor which interacts with HHV-6B U14. 41st Annual International Herpesvirus Workshop. 2016

年 7 月 23 日～2016 年 7 月 27 日、Madison, Wisconsin (USA)

(3) Akiko Kawabata, Satoshi Serada, Tetsuji Naka and Yasuko Mori. Identification of the cellular factor interacted with human herpesvirus-6 U14. 第 63 回日本ウイルス学会学術集会、2015 年 11 月 22 日～2015 年 11 月 24 日、福岡国際会議場 (福岡県福岡市)

(4) Akiko Kawabata, Aika Wakata, Satoshi Serada, Tetsuji Naka and Yasuko Mori. Identification of Cellular Factor Interacting with Human Herpesvirus-6 U14. 9th International Conference on HHV-6&7. 2015 年 11 月 9 日～2015 年 11 月 11 日、Boston, MA (USA)

〔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：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
特記すべきことなし

6. 研究組織

(1) 研究代表者
河端 暁子 (Kawabata Akiko)
神戸大学大学院医学研究科・臨床ウイルス学分野・助教
研究者番号：30595947

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし

(4) 研究協力者
森 康子 (Mori Yasuko)

神戸大学大学院医学研究科・臨床ウイルス
学分野・教授

世良田 聡 (Serada Satoshi)
国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養
研究所・免疫シグナルプロジェクト

仲 哲治 (Naka Tetsuji)
国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養
研究所・免疫シグナルプロジェクト