

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06512

研究課題名(和文) ヒトヘルペスウイルス6の宿主受容体認識を司るウイルス糖蛋白質複合体の構造解析

研究課題名(英文) Structure analysis of human herpesvirus 6 glycoprotein complex which is essential for the receptor binding

研究代表者

西村 光広 (Nishimura, Mitsuhiro)

神戸大学・医学研究科・助教

研究者番号：40510285

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではヒトヘルペスウイルス6 (human herpesvirus 6; HHV-6)の宿主受容体認識を司るウイルス糖タンパク質複合体gH/gL/gQ1/gQ2について、構造解析と受容体認識機構及び中和抗体による阻害作用の解析を行った。gH/gL/gQ1/gQ2は受容体CD134に対して高い親和性を持つことを示し、また中和抗体がその相互作用に競合することを明らかとした。電子顕微鏡解析によりgH/gL/gQ1/gQ2の形状を明らかとし、さらに二種の中和抗体の結合部位を解明した。gH/gL/gQ1/gQ2と中和抗体Fabとの複合体について結晶を作製し、3.8までの結晶回折データを得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトヘルペスウイルス6は全てのヒトが乳幼児期に感染するウイルスであり、生涯にわたり体内に潜伏感染し続けている病原体である。初感染時や再活性化時に脳炎を引き起こし得る危険性が知られており、未だ効果的な対処法は確立されていない。感染にはgH/gL/gQ1/gQ2と呼ばれる因子が必須の働きを担っているが、その立体構造や機能については未だに不明な点が多く残されている。本研究ではgH/gL/gQ1/gQ2の分子としての立体構造を解析するとともに、感染標的となる細胞で受容体となっているタンパク質との相互作用や、免疫系が作り出す中和抗体との相互作用の解析を行うことで、その機能についての知見を得た。

研究成果の概要(英文)：Human herpesvirus 6 (HHV-6) has a glycoprotein complex gH/gL/gQ1/gQ2 on the virion surface, and the complex plays an essential role on recognizing the host receptor CD134. The interaction between gH/gL/gQ1/gQ2 and CD134 is important for the infection, and hence the inhibition by antibodies results in neutralization. In this study the structure of gH/gL/gQ1/gQ2 and its interaction with CD134 or antibodies were analyzed. The affinity between gH/gL/gQ1/gQ2 and CD134 was revealed to be high enough to sense target cells. Inhibition of the molecular interaction by a neutralizing antibody was demonstrated. The overall shape of gH/gL/gQ1/gQ2 was visualized by electron microscopy, and binding locations of two neutralizing antibodies on the gH/gL/gQ1/gQ2 were also revealed. Protein crystals of gH/gL/gQ1/gQ2 with Fabs of neutralizing antibodies were obtained. X-ray diffraction measurement using the crystals resulted in a diffraction data at the maximum resolution 3.8 angstrom.

研究分野：構造生物学

キーワード：ヒトヘルペスウイルス6 X線結晶構造解析

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ヒトヘルペスウイルス6 (human herpesvirus 6; HHV-6)は全てのヒトが乳幼児期に感染するウイルスであり、その後も生涯にわたって体内に潜伏感染し続けている。初感染時や免疫抑制等に伴う再活性化時に脳炎を引き起こし得る病原体であるが、ウイルス学的な性質や病原性発現性機構については不明な点が多く、効果的な対処法も確立されていない。我々の研究グループの研究により、HHV-6は独自の糖タンパク質複合体 gH/gL/gQ1/gQ2 を持ち、gH/gL/gQ1/gQ2 が宿主受容体認識の機能を担っていることを示した。また HHV-6B では宿主受容体が活性化した T 細胞で特異的に発現する CD134 であることを明らかとした。HHV-6B gH/gL/gQ1/gQ2 と CD134 の相互作用はウイルスの感染において極めて重要な過程であり、gH/gL/gQ1/gQ2 を標的とする中和抗体も見出されている。一方で gH/gL/gQ1/gQ2 の分子としての成り立ちについては未だ不明な点が多く、特に HHV-6B とその類縁のウイルスである HHV-6A のみが持つ gQ1 及び gQ2 についてはどういった立体構造を持っていて、どのように宿主受容体認識能を発揮しているかが示されておらず、その解明が HHV-6B 感染機構を理解する上で重要であった。

### 2. 研究の目的

本研究では、HHV-6B の gH/gL/gQ1/gQ2 について、その分子複合体としての立体構造を解析し、また受容体や中和抗体との相互作用解析によりその機能についての知見を得ることを目的とした。

### 3. 研究の方法

既に確立された gH/gL/gQ1/gQ2 複合体の発現法及び精製法を基に、高純度の試料を調製して解析に用いた。また受容体 CD134 や中和抗体についても同様に精製し、タンパク質試料を調製した。分子間の相互作用解析には表面プラズモン共鳴法を用い、CD134 または中和抗体と gH/gL/gQ1/gQ2 との親和性を解析した。中和抗体と CD134 との間の gH/gL/gQ1/gQ2 結合における競合については酵素結合免疫吸着測定法によって解析した。中和抗体 Fab について単独での結晶化を行い、得られた結晶を用いて X 線結晶構造解析を行った。精製された gH/gL/gQ1/gQ2 試料を用いて負染色法による電子顕微鏡解析を行い、単粒子再構成法によってその形状を解析した。中和抗体の Fab ドメインとの複合体についても同様の解析を行い、抗体の結合部位を解析した。

gH/gL/gQ1/gQ2 と中和抗体 Fab との複合体について結晶化を行い、得られた結晶を用いて大型放射光施設 SPring-8 での放射光回折測定を行った。

### 4. 研究成果

分子複合体として高純度に精製した gH/gL/gQ1/gQ2 を用いて、受容体 CD134 または中和抗体との親和性を解析した結果、gH/gL/gQ1/gQ2 と CD134 との間の高い親和性が明らかとなり、gH/gL/gQ1/gQ2 と中和抗体との親和性と比べても同等と言えるものであった。2 種の中和抗体について gH/gL/gQ1/gQ2 への結合が CD134 の gH/gL/gQ1/gQ2 への結合を阻害するかを調べた結果、1 種の抗体で競合的に阻害していることが示された。

中和抗体 Fab の X 線結晶構造解析を行うことで、その原子レベルでの構造を決定し、その構造的特徴を解明した。

電子顕微鏡による gH/gL/gQ1/gQ2 の分子形状の解析では、gH/gL に相当する部分とは区別可能な gQ1/gQ2 に相当する部分が確認でき、gH/gL の先端を伸ばすように位置し、また長軸が 90° ほど屈曲する形をとっていることが示された (図 1A)。gH/gL/gQ1/gQ2 と中和抗体 Fab の複合体について同様の電子顕微鏡解析を行った結果、CD134 に対して競合することが示された中和抗体 Fab は gQ1/gQ2 部分に結合しており、gH/gL/gQ1/gQ2 全体として見た場合の長軸の先端に位置することが示された (図 1B)。このことから受容体 CD134 の結合部位も gH/gL/gQ1/gQ2 の先端部位にあることが予想された。別の中和抗体 Fab では gH 部分への結合が確認でき、先行研究で示されたエピトープについての情報との一致が確認できた (図 1C)。これらの研究成果については国際学術誌 PLoS Pathogens 誌に研究論文を投稿し、査読を経て、公開されている。

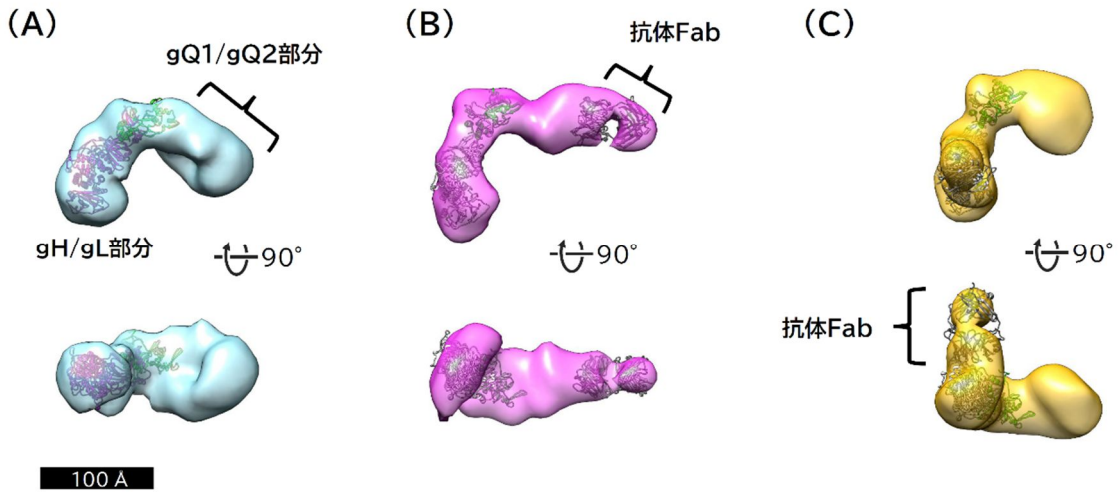


図1. HHV-6B gH/gL/gQ1/gQ2 の電子顕微鏡による解析。(A)gH/gL/gQ1/gQ2 単独での単粒子再構成像。(B) CD134 に対して競合する中和抗体 Fab と gH/gL/gQ1/gQ2 との複合体の単粒子再構成像。(C) CD134 に対して競合しない中和抗体 Fab と gH/gL/gQ1/gQ2 との複合体の単粒子再構成像。

精製された gH/gL/gQ1/gQ2 試料を用いて結晶化条件の探索を行い、最終的に Fab を結合させた状態で結晶を得ることができた。大型放射光施設 SPring-8 での結晶回折測定実験を行うことで、その回折能を確認し、結晶化条件の最適化や、測定時の条件検討を行った。結果として、最高分解能 3.8 Å の回折データを得ることができた。上述の Fab の結晶構造や gH/gL について相同性を基に作製したモデル構造を用いて回折データの解析を行った結果、gH/gL と Fab の電子密度を確認することができた。gH/gL 部分に加え、gQ1/gQ2 と予想される未知の電子密度が確認できている。gH/gL/gQ1/gQ2 の形状や Fab の結合部位については上述の電子顕微鏡解析の結果と一致する結果が得られた。この成果は gH/gL/gQ1/gQ2 の立体構造の決定にむけて大きな進展であり、継続的な研究によって原子レベルでの構造決定を行うことが期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Mitsuhiro Nishimura, Dian Novita Krisdianto, Takayuki Kato, Lidya Handayani Tjan, Bochao Wang, Aika Wakata, Anna Lystia Poetranto, Akiko Kawabata, Huamin Tang, Taiki Aoshi, Yasuko Mori	4. 巻 in press
2. 論文標題 Structural basis for the interaction of human herpesvirus 6B tetrameric glycoprotein complex with the cellular receptor, human CD134	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLoS Pathogens	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Mitsuhiro Nishimura, Dian Novita Krisdianto, Bochao Wang, Aika Wakata, Anna Lystia Poetranto, Lidya Handayani Tjan, Takayuki Kato, Taiki Aoshi, Keiichi Namba, Yasuko Mori
2. 発表標題 Molecular interaction of HHV-6B gH/gL/gQ1/gQ2 complex with the cellular receptor and neutralizing antibodies.
3. 学会等名 11th International Conference on HHV-6 & 7（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mitsuhiro Nishimura, Dian Novita Krisdianto, Zhenxiao Ren, Bochao Wang, Aika Wakata, Anna Lystia Poetranto, Lidya Handayani Tjan, Takayuki Kato, Taiki Aoshi, Keiichi Namba, Yasuko Mori
2. 発表標題 Structure based analysis of human herpesvirus 6B glycoprotein complex with neutralizing antibodies
3. 学会等名 第 58回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------