

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 28 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010 ～ 2011

課題番号：22790432

研究課題名（和文） 水痘帯状疱疹ウイルスがコードする ORF49 と ORF44 の機能解析

研究課題名（英文） Functional analysis of varicella-zoster virus ORF49 and ORF44

研究代表者

定岡 知彦 (SADAOKA TOMOHIKO)

神戸大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：00435893

研究成果の概要（和文）：水痘帯状疱疹ウイルスがコードする ORF49 と ORF44 は、すべてのヘルペスウイルスに保存されるコア遺伝子であり、これら遺伝子産物の相互作用も保存される。本研究において、(i) ORF49 と ORF44 における相互作用部位を同定し、(ii) ORF44 が水痘帯状疱疹ウイルス感染に必須であり、(iii) ORF49 との相互作用部位が ORF44 の機能中心である事、(iv) ORF49 が ORF44 との相互作用を通して、感染性ウイルスの産生に機能する事、を見出した。

研究成果の概要（英文）：Varicella-zoster virus (VZV) ORF49 and ORF44 are the core genes, which are conserved among herpesvirus family, and the interaction between these proteins is also conserved. In this study, it has been identified (i) that ORF44 was the binding partner of ORF49 and no other viral factor was required for the binding, (iii) that ORF44 was essential for VZV replication, (iv) that the phenylalanine at amino acid position 129 of ORF44 played a central role of ORF44 functions and was the binding determinant with ORF49, (v) that the latter half of the acidic cluster within ORF49 was the binding domain with ORF44 and (vi) that ORF49 functioned in the production of efficient progeny virus required for VZV infection both in cell-free and cell-to-cell manner through the interaction with ORF44.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

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：感染症、ウイルス粒子形成

1. 研究開始当初の背景

水痘帯状疱疹ウイルス (Varicella-zoster virus: VZV) は、ヒトに感染して初感染においては全身性に水痘を発症し、脊髄後根神経節に潜伏した後、様々な要因により再活性化

し、帯状疱疹を引き起こす。しかし、*in vitro* の実験系において、VZV 感受性細胞は非常に限られており、さらに VZV 感染モデルとしての実験動物は存在せず、病原性発現機構の解明から新規抗ウイルス薬開発につながる分

子生物学的知見を得る事は、他のヘルペスウイルスに比べ非常に困難である。

このような状況における VZV 研究分野での一つの break through は、大腸菌を用いた簡便なウイルスゲノム改変系の確立であり、bacterial artificial chromosome (BAC) を用いたこの方法は我々の研究室において世界に先駆けて確立され、近年の VZV 感染機構の分子生物学的手法による解析は、その多くがこの VZV-BAC を用いたものである。

近年、我々はこの手法を用い、ヘルペスウイルス科に保存されるエンベロープ糖タンパクである glycoprotein M の VZV 感染における機能を明らかにしてきた (Y. Yamagishi and T. Sadaoka et al. J. Virol. 2008、T. Sadaoka et al. J. Virol. 2010)。また同じくヘルペスウイルス科に保存される VZV の ORF49 遺伝子産物が、ウイルス粒子を形成するテグメントタンパクであり、VZV 感染において数少ない感受性細胞での細胞向性に関わる因子であることを見出し (T. Sadaoka et al. J. Virol. 2007)、さらに、ORF49 タンパクと相互作用するウイルスタンパクとして新たにテグメントタンパクである ORF44 タンパクを同定した。〔課題名「水痘帯状疱疹ウイルスがコードする ORF49 の機能解析」(科学研究費補助金課題番号 20790363)〕

ヘルペスウイルスのテグメントタンパクは、ウイルスゲノムを包含するカプシドと最外層に位置するエンベロープの間でウイルス粒子内に存在し、ウイルス粒子構築および形態維持としての働きに加え、宿主細胞への侵入後に細胞内に放出され、宿主細胞内環境をウイルス増殖により適した状態に変化させ、またウイルス遺伝子複製を効率よく行うための transactivator としての機能も持つ。このようにテグメントタンパクの機能は多様であり、ヘルペスウイルス研究においては様々な面から注目されているタンパク群である。ヘルペスウイルスは複数のテグメントタンパクをコードしているが、多くはお互いがその機能を補う機構＝「redundancy」を持ち、この点において非常に興味深い、その

詳細は明らかではない。

2. 研究の目的

水痘帯状疱疹ウイルスの、ウイルス増殖に必須であるウイルス粒子構成タンパクに焦点を当てた新規抗ウイルス薬の開発を全体構想とし、本研究では、水痘帯状疱疹ウイルスにおいて我々が明らかにしてきた、全てのヘルペスウイルスに保存されるウイルス粒子構成テグメントタンパクである ORF44 と ORF49 との、相互作用機構の解明とウイルス感染増殖過程におけるそれぞれのタンパクの機能解析を行うことにより、これらを標的とした新規抗ウイルス薬の開発につながる知見の蓄積を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 水痘帯状疱疹ウイルス ORF49 における ORF44 との相互作用部位を同定し、それぞれの相互作用部位に変異を導入した発現プラスミドを、水痘帯状疱疹ウイルス感受性細胞に導入し、性状解析を行なった。

(2) ORF44 における ORF49 との相互作用部位に変異を導入した組換えウイルスゲノムを作製し、感受性細胞に導入した。

(3) ORF49 における ORF44 との相互作用部位に変異を導入した変異ウイルスを作製し、その表現型を探索した。

(4) ORF49 をまったく発現しない組換えウイルスと、(3) で作製した ORF44 との相互作用部位変異ウイルスの表現型を比較した。

4. 研究成果

(1) ORF49 における ORF44 との相互作用部位は、全長 81 アミノ酸のうち、酸性アミノ酸に富んだ領域である acidic cluster を構成する 7 アミノ酸 (38-44) における、後半 4 アミノ酸 (41DFDE44) であった。ORF44 においては全長

363 アミノ酸のうち、129 番目のフェニルアラニンであった。

(2) ORF49 単独発現系においては、ウイルス粒子形成および出芽の場であると考えられている *trans*-Golgi network (TGN)由来の膜に局在し、この局在は ORF44 との相互作用部位変異においても変化しなかった。ORF44 単独遺伝子発現系においては細胞質に広く局在し、この局在は ORF49 との相互作用部位変異においても変化しなかった。野生型の ORF49 と ORF44 との共発現系において、ORF44 は ORF49 と結合する事で、TGN に輸送されたが、この ORF44 の輸送は、ORF44 における相互作用部位あるいは ORF49 における相互作用部位の変異により消失した。すなわち ORF49 との相互作用により ORF44 が TGN に輸送される事が明らかとなった。

(3) ORF44 における ORF49 との相互作用部位の変異はウイルス感染において致命的であり、ORF44 そのものの欠失が致命的であることとあわせ、ORF44 の ORF49 との相互作用部位が感染において重要な機能を果たす機能中心である事を明らかとした。

(4) ORF49 における ORF44 との相互作用部位の変異ウイルスは、野生型ウイルスに比較し、cell free 感染、および cell-to-cell 感染において感染拡大が減弱し、さらに感染性ウイルス産生が著しく低下していた。

(5) ORF49 における ORF44 との相互作用部位の変異ウイルスの表現型は、ORF49 を発現しない変異ウイルスとほぼ同一であり、ORF49 が ORF44 との相互作用を通して、感染性ウイルスの産生に機能している事を明らかにした。

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 3 件)

- ① Tomohiko Sadaoka, Tatsuya Yanagi, Koichi Yamanishi, Yasuko Mori, Characterization of the Varicella-Zoster Virus ORF50 Gene, which Encodes Glycoprotein M, Journal of Virology, 査読有, Vol. 84 No. 7, 2010, p. 3, 488-3, 502
- ② Yasuko Mori, Tomohiko Sadaoka, Varicella-Zoster Virus glycoprotein M, Current Topics in Microbiology and Immunology, 査読無, review, 2010, 342, p. 147-154
- ③ Huamin Tang, Tomohiko Sadaoka, Yasuko Mori, Human herpesvirus-6 and human herpesvirus-7, VIRUS, 査読無, Vol. 60, December 2010 No. 2, p. 221-236

[学会発表] (計 4 件)

- ① Tomohiko Sadaoka, Mayuko Hayashi, Koichi Yamanishi, Yasuko Mori, Interaction Mechanism of Varicell-Zoster Virus Tegument Proteins, ORF44 and ORF49 Conserved Among Herpesviruses, 36th Annual International Herpesvirus Workshop IHW (July 24-28, 2011 Gdansk, Poland)
- ② 定岡知彦、林麻佑子、山西弘一、森康子、水痘帯状疱疹ウイルス ORF44 と ORF49 の相互作用に関する解析、第 26 回ヘルペスウイルス研究会(2011年6月2～4日 大阪府大阪市)
- ③ 定岡知彦、林麻佑子、山西弘一、森康子、水痘帯状疱疹ウイルス ORF44 と ORF49 における詳細な相互作用解析、第 58 回日本ウイルス学会学術集会(2010年11月7～9日 徳島県徳島市)

- ④ 定岡知彦、林麻佑子、山西弘一、森康子、
水痘帯状疱疹ウイルス ORF44 の解析、第
25 回ヘルペスウイルス研究会（2010 年 5
月 27 ～ 29 日 静岡県浜松市）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.kobe-u.ac.jp/virol/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

定岡 知彦 (SADAOKA TOMOHIKO)

神戸大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：00435893