

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25460565

研究課題名(和文)ヘルペスウイルスの膜融合・エントリー機構の解析

研究課題名(英文)Mechanisms of viral entry and membrane fusion of herpesvirus

研究代表者

末永 忠広 (Suenaga, Tadahiro)

大阪大学・微生物病研究所・准教授

研究者番号：20396675

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：水痘帯状疱疹ウイルス(VZV)が宿主細胞に侵入(エントリー)する際のVZV gBに対する受容体分子として、MAGなどを同定・解析した。エントリーに際して、VZV gB上の糖鎖が必須であること、さらにgB上の糖鎖修飾部位を明らかにした。

ヒトヘルペスウイルス6型(HHV-6)のエントリーに必須である分子gH, gL, gQ1, gQ2の複合体と宿主受容体のひとつであるCD46との結合、さらにはHHV-6のエントリーも阻害する宿主分子H6IRを同定した。

また、単純ヘルペスウイルスなど大きなDNAゲノムを持つウイルスのゲノム編集を、CRISPR/Cas9を用いて簡便に行える方法を開発した。

研究成果の概要(英文)：We identified and analyzed host receptors for varicella-zoster virus (VZV) entry such as MAG. We reported that sugar chain of VZV gB is essential for entry and identified the glycosylation sites on gB.

The complex of gH, gL, gQ1 and gQ2 of human herpesvirus-6 (HHV-6) is indispensable for HHV-6 entry and binds to a host receptor CD46. We also identified a host factor H6IR that inhibits the binding of the complex to CD46 and that blocks HHV-6 entry.

We developed a simple method based on CRISPR/Cas9 system for genome-editing of large DNA virus such as herpes simplex virus.

研究分野：ウイルス学

キーワード：ヘルペスウイルス 水痘帯状疱疹ウイルス ヒトヘルペスウイルス6型 膜融合 エントリー CRISPR/Cas9 糖鎖 シアル酸

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ヒトヘルペスウイルスに属する9種類のウイルスは、エンベロープを有し、宿主細胞への侵入(エントリー)は、エンベロープと宿主細胞の膜融合を介して行われる。膜融合は、エンベロープ分子 glycoprotein B (gB)、gH-gL 複合体とそのレセプターとの結合の共役を中心に、単純ヘルペスウイルス(HSV)では gD と gD レセプター分子 HVEM、Nectin が参加して行われる。我々は、HSV、水痘帯状疱疹ウイルス(VZV)の膜融合を起こせる gB レセプターとして Paired Immunoglobulin-Like type2 Receptor  $\alpha$  (PILR $\alpha$ ) (Sato et al. *Cell* 2008)、Non-muscle myosin heavy chain-IIA (NMHC-IIA) (Arii et al. *Nature* 2010)、Myelin-Associated Glycoprotein (MAG) (Suenaga et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2010)を報告した。他のヘルペスウイルスレセプターの報告もあるが、未同定なレセプターなど膜融合・エントリー機構は不明な点も多い。

VZV は、血球細胞にエントリー後、全身に運ばれ、小児の水痘、既感染の免疫低下者に発症する帯状疱疹だけでなく、脳炎も起こし、知覚神経節に潜伏感染する。我々は、VZVの膜融合がgB、gH-gL複合体のみで起こることを示し、gBレセプターとして、神経組織特異的な分子MAGを同定し、VZVの神経組織指向性の一因を明らかにした(Suenaga et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2010)。MAGはHSV gBとも会合し、膜融合・エントリーを起すことも判明した(Suenaga et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2010)。さらに、我々は、VZVの血球細胞へのエントリーレセプターとして、血球細胞特異的に発現する分子VgBR2、VgHRが、それぞれ、VZV gB、gHと会合し、膜融合・エントリーを起すことを見出した。

しかし、これだけで、VZV・HSVがエントリーする組織特異性(トロピズム)の説明にはならない。我々は、**図1**のように、MAG発現細胞へのVZV・HSVの膜融合・エントリーが、ウイルス側のシアリダーゼ処理でシアル酸を除去したことにより減弱することを発見した。このように、エンベロープ分子と宿主レセプターのタンパク同士の相互作用のみならず、糖鎖修飾の関与も解析することは、

ヘルペスウイルス感染機構やトロピズム解明において重要である。

前に述べたように、VZV・HSVだけでなく、他のヘルペスウイルスに関し、膜融合・エントリーに関与する未知なエンベロープ分子、宿主レセプターの存在が示唆されており、これらを明らかにすることで、感染機構の詳細やトロピズムを解析することが可能となる。

### 2. 研究の目的

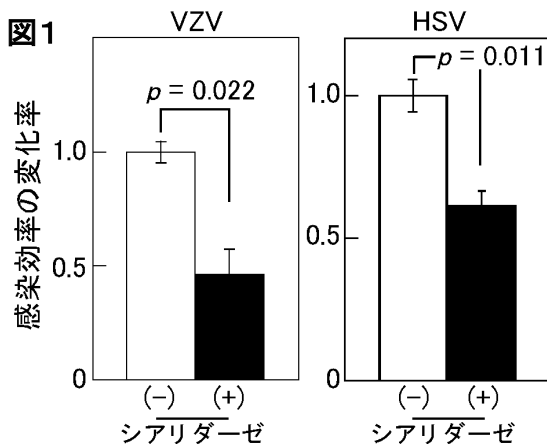
9種あるヒトヘルペスウイルスのエントリーに関与するウイルスエンベロープ分子 gB、gH-gL、ウイルスによっては、他のウイルス表面蛋白質分子と宿主細胞上の各々のレセプター分子が存在する。また、我々の研究から、エントリー・膜融合に、タンパク同士の結合だけでなく、ウイルス・宿主細胞双方の糖鎖修飾が重要であることが分ってきた。本研究では、1) ヘルペスウイルスの、膜融合・エントリーに関与する糖鎖の種類、及び糖鎖がどのように膜融合・エントリーに関わるかの分子メカニズムを明らかにする。さらに、2)これまで知られていない各ヘルペスウイルスの表面分子に結合する宿主側分子を同定する。3)各ヘルペスウイルスのエントリーに必須な膜融合の分子メカニズムを解析する。

### 3. 研究の方法

1) 図1に示すように、HSV、VZVのシアル酸を除去すると、MAGを介したウイルスエントリー効率が低下することから、ウイルスエンベロープ上のシアル酸がエントリーに関与していると考えられる。シアル酸は、ほ乳類において、N型糖鎖末端、もしくはO型糖鎖末端に結合していることが知られている。N型糖鎖、O型糖鎖どちらか片方を除去し、どちらの種類糖鎖上のシアル酸がウイルス感染に必要なかを解析する。MAGはgBと結合することから、gB上のMAGとの結合に必須な糖鎖修飾部位を変異gBを用いて決定する。さらに、その糖鎖が膜融合に関与するかを明らかにする。2)各ウイルスの表面分子を可溶化した蛋白質と種々の細胞との結合の有無を解析し、結合する分子を質量分析にて同定する。逆に、可溶化した種々の宿主側分子とウイルス感染細胞との結合から、ウイルス分子と結合する宿主分子を同定する。3)gBとMAGもしくはVgBR2、及びgHとVgHRを介したVZVの膜融合のメカニズムを、分子レベルで解析する。そのために、相互の結合部位を明らかにした上で、gB、gH、各レセプター分子の結合部位変異体を用いて、膜融合アッセイ、エントリー解析を行う。

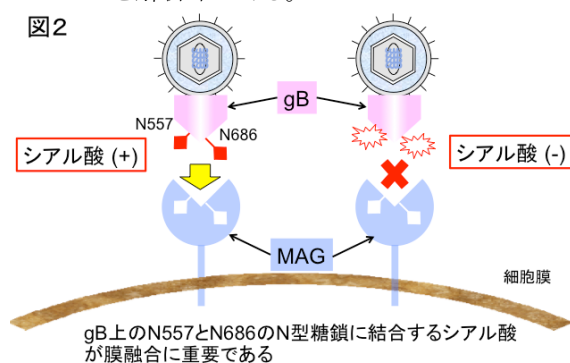
### 4. 研究成果

1) ツニカマイシン処理、あるいは、Benzyl- $\alpha$ -GalNac処理によって、それぞれN型糖鎖、O型糖鎖のどちらか片方を失った場合、VZV gBはMAGと結合できず、MAG発現細胞へのエントリーも減弱した。gB上のN型糖鎖部位の内、557番と686番目のアスパラギン酸に結合するN型糖鎖に結合するシアル酸がMAGとの結合、



VZV の膜融合に必須であることが明らかになった(図2)。一方、単一の O 型糖鎖修飾部位を変異した gB では、MAG との結合、膜融合が野生型と同程度であったことから、gB 上の O 型糖鎖修飾糖鎖は複数の糖鎖が同時に MAG との結合、膜融合に関与していると考えられた(Suenaga et. al: *J. Biol. Chem.* 2015)。一方、HSV gB における MAG との結合、膜融合、HSV エントリーに必要な gB 上の糖鎖修飾部位、糖鎖の種類は現在解析中である(論文準備中)。gB 上の糖鎖修飾部位の変異ウイルスを産生するために、簡便に HSV ウイルスゲノムを編集する方法を、CRISPR/Cas9 システムを用いて開発した(Suenaga et. al: *Microbiol. Immunol.* 2014)。本法では、HSV gE のノックアウトウイルスと gE 復帰ウイルス、HSV gE に FLAG タグを付加したウイルスをそれぞれ作製したが、他のヘルペスウイルスのみならず、全てのウイルス、特にゲノムウイルスが大きいものに有用な手法である。2)免疫系細胞表面に発現し、その活性化、抑制化を制御する多くのペーパー型受容体の可溶性タンパクを約 150 種類作製し、各ヒトヘルペスウイルス感染細胞との結合性を解析した。その中で、これまで知られていない HHV-6A、-6B 感染細胞に結合する H6IR を発見した。本分子は、免疫細胞の制御に関わるだけでなく、HHV-6 のエントリーにも関与するらしいことがわかってきており、詳細を解析中である。3) VgBR2 も MAG と同様に、VZV gB との結合において VZV gB 側の糖鎖が必要であることが明らかになった。しかし、MAG との結合に必要な糖鎖修飾部位とは異なることも判明し、現在 VgBR2 との結合に必要な糖鎖修飾部位を確定する作業を行っている。一方、VgHR と VZV gH との結合部位は明らかとなり、VgBR2-gB 結合との共役メカニズムを解析中である。

図2



## 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 8 件)

- ① Hirayasu K, Saito F, Suenaga T, Shida K, Arase N, Oikawa K, Yamaoka T, Murota H, Chibana H, Nakagawa I, Kubori T, Nagai H, Nakamaru Y, Katayama I, Colonna M, Arase H. Microbially cleaved immunoglobulins are sensed by the innate immune receptor LILRA2. *Nat. Microbiol.* 2016. 1(6):16054. 査読有  
DOI: 10.1038/nmicrobiol.2016.54.

- ② Arase N, Yang L, Tanemura A, Yang F, Suenaga T, Arase H, Katayama I. The effect of rhododendrol inhibition of NF- $\kappa$ B on melanocytes in the presence of tyrosinase. *J. Dermatol. Sci.* 2016. 83(2):157-159. 査読有  
DOI: 10.1016/j.jdermsci.2016.05.002.
- ③ Suenaga T, Matsumoto M, Arisawa F, Kohyama M, Hirayasu K, Mori Y, Arase H. Sialic Acids on Varicella-Zoster Virus Glycoprotein B Are Required for Cell-Cell Fusion. *J. Biol. Chem.* 2015. 290(32):19833-19843. 査読有  
DOI: 10.1074/jbc.M114.635508.
- ④ Tanimura K, Jin H, Suenaga T, Morikami S, Arase N, Kishida K, Hirayasu K, Kohyama M, Ebina Y, Yasuda S, Horita T, Takasugi K, Ohmura K, Yamamoto K, Katayama I, Sasazuki T, Lanier LL, Atsumi T, Yamada H, Arase H.  $\beta$ 2-Glycoprotein I/HLA class II complexes are novel autoantigens in antiphospholipid syndrome. *Blood.* 2015. 125(18):2835-2844. 査読有  
DOI: 10.1182/blood-2014-08-593624.
- ⑤ Kishida K, Kohyama M, Kurashima Y, Kogure Y, Wang J, Hirayasu K, Suenaga T, Kiyono H, Kunisawa J, Arase H. Negative regulation of DSS-induced experimental colitis by PILR $\alpha$ . *Int. Immunol.* 2015. 27(6):307-314. 査読有  
DOI: 10.1093/intimm/dxv004.
- ⑥ Suenaga T, Kohyama M, Hirayasu K, Arase H. Engineering large viral DNA genomes using the CRISPR-Cas9 system. *Microbiol. Immunol.* 2014. 58(9):513-522. 査読有  
DOI: 10.1111/1348-0421.12180.
- ⑦ Jin H, Arase N, Hirayasu K, Kohyama M, Suenaga T, Saito F, Tanimura K, Matsuoka S, Ebina K, Shi K, Toyama-Sorimachi N, Yasuda S, Horita T, Hiwa R, Takasugi K, Ohmura K, Yoshikawa H, Saito T, Atsumi T, Sasazuki T, Katayama I, Lanier LL, Arase H. Autoantibodies to IgG/HLA class II complexes are associated with rheumatoid arthritis susceptibility. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2014. 111(10):3787-3792. 査読有  
DOI: 10.1073/pnas.1401105111.
- ⑧ Tanaka Y, Suenaga T, Matsumoto M, Seya T, Arase H. Herpesvirus 6 glycoproteins B (gB), gH, gL, and gQ are necessary and sufficient for cell-to-cell fusion. *J. Virol.* 2013. 87(19):10900-10903. 査読有  
DOI: 10.1128/JVI.01427-13.

[学会発表] (計 23 件)

1. Tadahiro Suenaga, Yuriko Muramatsu, Yasuko Mori, Hisashi Arase, ヒトヘル

- ペスウイルス6型に結合する新規宿主分子の同定と機能解析, 第64回日本ウイルス学会学術集会, 札幌コンベンションセンター(北海道), 2016年10月23日
2. 末永忠広, 荒瀬尚, 糖鎖を利用した単純ヘルペスウイルス、水痘帯状疱疹ウイルスの神経組織感染制御法の開発, 第21回日本神経感染症学会総会・学術大会, 金沢東急ホテル(石川), 2016年10月21日
  3. Suenaga Tadahiro, Structure of Varicella-Zoster Virus and Herpes Simplex Virus Glycoproteins B (gB) and gH Required for Membrane Fusion, 15th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji Island, Japan, Sep. 8<sup>th</sup>, 2016.
  4. Tadahiro Suenaga, Maki Matsumoto, Fuminori Arisawa, Masako Kohyama, Kouyuki Hirayasu, Yasuko Mori, Hisashi Arase, Functional analysis of sialic acid on varicella-zoster virus glycoprotein B, 第63回日本ウイルス学会学術集会, 福岡国際会議場(福岡), 2015年11月23日
  5. Hirayasu Kouyuki, Saito Fumiji, Suenaga Tadahiro, Shida Kyoko, Arase Noriko, Oikawa Keita, Yamaoka Toshifumi, Murota Hiroyuki, Chibana Hiroji, Nagai Hiroki, Nakamaru Yuji, Katayama Ichiro, Arase Hisashi, DIR is an innate immune sensor for microbially cleaved immunoglobulins, 第44日本免疫学会学術集会, 札幌コンベンションセンター(北海道), 2015年11月20日
  6. Hiwa Ryosuke, Ohmura Koichiro, Arase Noriko, Jin Hui, Hirayasu Kouyuki, Kohayama Masako, Suenaga Tadahiro, Saito Fumiji, Iwatani Hirotugu, Atsumi Tatsuya, Terao Chikashi, Mimori Tsuneyo, Arase Hisashi. Myeloperoxidase/HLA class II complexes are targets for autoantibodies in ANCA-associated vasculitis. 第44日本免疫学会学術集会, 札幌コンベンションセンター(札幌), 2015年11月18日
  7. Jin Hui, Arase Noriko, Matsuoka Sumiko, Hirayasu Kouyuki, Kohayama Masako, Suenaga Tadahiro, Sasazuki Takehiko, Arase Hisashi. MHC class II molecules expose autoantibody epitopes on autoantigens. 第44日本免疫学会学術集会, 札幌コンベンションセンター(札幌), 2015年11月20日
  8. 日和良介、大村浩一郎、荒瀬規子、金暉、平安恒幸、香山雅子、末永忠広、齋藤史路、岩谷博次、渥美達也、寺尾知可史、三森経世、荒瀬尚、MPO/HLA class II複合体は顕微鏡的多発血管炎における自己抗体の標的である、第43回日本臨床免疫学会総会、神戸国際会議場(神戸)、2015年10月22日
  9. Tadahiro Suenaga, Yasuko Mori and Hisashi Arase, Sialic acids on varicella-zoster virus glycoprotein B required for cell-cell fusion, 14th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji Island, Japan, Sep. 9<sup>th</sup>, 2015.
  10. Tadahiro Suenaga, Yasuko Mori and Hisashi Arase, Sialic acids on varicella-zoster virus glycoprotein B required for cell-cell fusion, 40th Annual International Herpesvirus Workshop, Boise, U.S.A. Jul. 29<sup>th</sup>, 2015.
  11. 末永忠広、森康子、荒瀬尚, 水痘帯状疱疹ウイルス(VZV)感染における糖鎖機能の解析, 第29回ヘルペスウイルス研究会, 長崎につしょうかん(長崎), 2015年6月4日
  12. Hiwa Ryosuke, Ohmura Koichiro, Arase Noriko, Jin Hui, Hirayasu Kouyuki, Kohayama Masako, Suenaga Tadahiro, Matsuoka Sumiko, Iwatani Hirotugu, Atsumi Tatsuya, Terao Chikashi, Mimori Tsuneyo, Arase Hisashi. Myeloperoxidase/HLA class II complexes are targets for autoantibodies in microscopic polyangiitis. 第43回日本免疫学会学術集会, 国立京都国際会館(京都), 2014年12月12日
  13. Jin Hui, Arase Noriko, Matsuoka Sumiko, Hirayasu Kouyuki, Kohayama Masako, Suenaga Tadahiro, Nakamaru Yuji, Imatani Yoshinori, Katayama Ichiro, Arase Hisashi. MHC class II-restricted recognition of self-antigen/MHC class II complexes by autoantibodies. 第43回日本免疫学会学術集会, 国立京都国際会館(京都), 2014年12月10日
  14. 末永忠広、荒瀬尚, CRISPR/Cas9システムを用いたDNAウイルスのゲノム改変, 第62回日本ウイルス学会学術集会, パシフィコ横浜(横浜), 2014年11月12日
  15. Tadahiro Suenaga, Hisashi Arase, Engineering of large viral DNA genomes using the CRISPR-Cas9 system, 13th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji Island, Japan, Sep. 24<sup>th</sup>, 2014.
  16. Tadahiro Suenaga, Fuminori Arisawa, Maki Matsumoto, Hisashi Arase,

- Sialic Acids on N-glycosylated VZV gB are Required for Membrane Fusion Mediated by Myelin-associated Glycoprotein (MAG), The 39th Annual International Herpesvirus Workshop (IHW2014), Kobe, Japan, Jul. 19<sup>th</sup>, 2014.
17. Hui Jin, Noriko Arase, Kouyuki Hirayasu, Masako Kohyama, Tadahiro Suenaga, Fumiji Saito, Kenji Tanimura, Sumiko Matsuoka, Kosuke Ebina, Kenrin Shi, Shinsuke Yasuda, Tetsuya Horita, Ryosuke Hiwa, Kiyoshi Takasugi, Koichiro Ohmura, Hideki Yoshikawa, Takashi Saito, Tatsuya Atsumi, Takehiko Sasazuki, Ichiro Katayama, Lewis L. Lanier, Hisashi Arase, Autoantibodies in Rheumatoid Arthritis Specifically Recognize IgG Heavy Chain Complexed with HLA-DR, Which is Strongly Associated with Rheumatoid Arthritis Susceptibility. The 15th Annual European Congress of Rheumatology EULAR 2014, Paris(France), Jul. 13<sup>th</sup>, 2014.
  18. Jin Hui, Arase Noriko, Kohayama Masako, Saito Fumiji, Hirayasu Kouyuki, Matsumoto Maki, Shida Kyoko, Suenaga Tadahiro, Saito Takashi, Katayama Ichiro, Lanier Lewis L., Arase Hisashi. Rheumatoid factor binding to IgG heavy chain presented on HLA-DR is associated with Rheumatoid Arthritis susceptibility. 第42回日本免疫学会学術集会, 幕張メッセ(千葉), 2013年12月13日
  19. Tanimura Kenji, Suenaga Tadahiro, Jin Hui, Hirayasu Kouyuki, Arase Noriko, Kohayama Masako, Ebina Yasuhiko, Yasuda Shinsuke, Horita Tetsuya, Katayama Ichiro, Atsumi Tatsuya, Yamada Hideo, Arase Hisashi.  $\beta$ 2-glycoprotein I presented on MHC class II molecules are recognized by autoantibodies in antiphospholipid syndrome. 第42回日本免疫学会学術集会, 幕張メッセ(千葉), 2013年12月13日
  20. Kishida Kazuki, Kohyama Masako, Kurashima Yosuke, Wang Jing, Hirayasu Kouyuki, Suenaga Tadahiro, Kiyono Hiroshi, Kunisawa Jun, Arase Hisashi. PILR  $\alpha$  negatively regulates DSS induced experimental colitis. 第42回日本免疫学会学術集会, 幕張メッセ(千葉), 2013年12月12日
  21. 末永忠広, 森康子, 荒瀬尚, 水痘帯状疱疹ウイルス(VZV)の膜融合メカニズムの

解析, 第61回日本ウイルス学会学術集会, 神戸国際会議場(神戸), 2013年11月10日

22. Tadahiro Suenaga, Yuki Tanaka, Misako Matsumoto, Tsukasa Seya, Hisashi Arase, Herpesvirus 6 Glycoprotein B (gB), gH, gL and gQ are Necessary and Sufficient for Cell-to-Cell Fusion, 38th International Herpesvirus Workshop, Grand Rapids, Michigan, USA, Jul. 21<sup>th</sup>, 2013.
23. 末永忠広, 松本麻紀, 有澤史倫, 森康子, 荒瀬尚, 水痘帯状疱疹ウイルス(VZV) glycoprotein H (gH)受容体の解析, 第28回ヘルペスウイルス研究会, 淡路夢舞台国際会議場(兵庫), 2013年5月31日

[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]

ホームページ等

<http://immchem.biken.osaka-u.ac.jp>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

末永 忠広(SUENAGA, Tadahiro)  
 大阪大学・微生物病研究所・准教授  
 研究者番号:20396675