The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Human herpesvirus 6 (HHV-6)によってコードされるproteaseおよびassembly proteinの解析
Author(s)	砂川, 富正
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3143843
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【56】

氏　　名	砂川富正（すなかわとみまさ）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学位記番号	第　13729　号
学位授与年月日	平成10年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科内科系専攻
学位論文名	Human herpesvirus 6（HHV-6）によってコードされるproteaseおよびassembly proteinの解析 （Analysis of a virus protease and assembly proteins coded by human herpesvirus-6）
論文審査委員	（主査） 教　授　岡田伸太郎 （副査） 教　授　山西　弘一　　教　授　上田　重晴

論文内容の要旨

【目的】

HHV-6は全長約161kbの二本鎖DNAウイルスであり，variant A・Bに分類され，特にvariant Bは突発性発疹の病因であると共に種々の疾患との関連性が示唆されている。同じβヘルペスウイルス亜科に属するhuman cytomegalovirus（HCMV）では，近年新しい抗ウイルス剤のターゲットとしてvirus proteaseの解析が進んでいるが，このprotease（PR）は同じ遺伝子内にコードされるassembly protein precursor（pAP）およびprotease precursor自身を特異的基質とし，ヘルペスウイルス科においてはウイルスの成熟に重要な役割を果たしていることがわかってきた。HHV-6に関するcapsidの形成過程は不明であり，本研究は，HHV-6においてPRおよびpAPのhomologueをコードするU53遺伝子領域について，ウイルス感染細胞中におけるmRNA・発現蛋白の動態と，その機能解析を行うことを目的とした。

【方法ならびに成績】

HHV-6B感染細胞より得たmRNAを用いてNorthern blotおよびcDNAライブラリーの解析を行った。U53 C末側をプローブとした場合に得られた主なtranscriptは，U53 open reading frame（ORF）完全長のtranscriptと，ORFのC末側にコードされmethionine siteを有するtranscriptに大別できたが，それぞれHCMVのPRとpAPに対してhomologyを有した。プライマー伸長法により，完全長の5'末端は1カ所で，短いtranscriptは異なる2カ所の5'末端を有した。3'RACEでは180bp離れた2カ所のco-terminalが見出された。U53領域の転写・発現に関わるtranscriptは1.8kbから0.8kbの間に6つであった。次にU53完全長（PR precursor）をGST融合蛋白として大腸菌に発現させ精製したが，release（R）-siteでのautocleavageによると思われる約55kDaの蛋白質を得た。得られた蛋白はR-site前後のアミノ酸配列に対して設計された合成ペプチドYIKASEPをcleaveしたことからproteaseとしての酵素活性を有し，数種のprotease阻害剤は阻害効果を示した。R-siteよりC末側（AP domain）も同様に発現させ，これらの蛋白より抗血清を作製し，感染細胞を間接蛍光抗体法（IFA）により観察した。感染細胞でPRは核・細胞質両方に存在したが，APは主として核に存在した。また免疫沈降では抗PR血清は65，60，28，24 kDaに，抗APd血清では65，60，30，28 kDaにpolypeptideが検出された。DNA合成阻害剤を前処理した感染細胞での発現は共に認められなかったことから，後期蛋白であることが確認された。共に150kDaに共沈降が見られ，その蛋白

が major capsid protein（MCP）であることを確認した。MCP は抗 APd 血清に対して有意に多い共沈を示した。

【総括】

HHV-6B の U53遺伝子領域における transcript が，2種の3'末端を持つ co-terminal であることが明らかとなったが，PR・pAP 共に転写開始位置と予測される methionine および stop codon もそれぞれ同一であることから，重複する mRNA の構造は，各蛋白の豊富な発現に寄与していると思われる。また，大腸菌により発現させた recombinant HHV-6B protease は酵素活性を有し，阻害剤の結果からも serine protease である事が示唆された。PR・APd の各抗血清を用いた Western blot では，感染細胞中での両蛋白の豊富な発現がみられたが，IFA での抗 PR 血清と抗 APd 血清を用いた時の差は，pAP が protease の作用により AP となり，B-capsid より放出された scaffold protein の大部分として核内に留まることを意味しているのかもしれない。また pAP はC末側で MCP との顕著な相互作用を有することが共沈降より示唆され，capsid assembly の過程で様々な機能を担うことが一連の実験から示された。

論文審査の結果の要旨

本研究は，HHV-6B における virus protease とその特異的基質である assembly protein に関して，酵素としての protease の機能を解析し，また両蛋白の感染細胞内での動態について遺伝子および蛋白レベルでの解析を行ったものである。一般にヘルペスウイルス科においては protease および assembly protein は高度に保存され，ウイルスの成熟に重要な役割を担っていると言われるが DNA シークエンスの結果や mRNA の構造は基本的に HHV-6B も同様であることが示唆されるものであった。しかし今回明らかとなった複数の co-terminal という transcript の構造は初めて報告された形態であり，HHV-6B の性質を考える上で興味深い現象である。また融合蛋白として大腸菌で発現させ精製した recombinant HHV-6B protease が実際に protease としての活性を有し，Futhan により阻害されることが示されたことは基礎・応用両面で意義深い。得られた抗血清により同領域中に maturational site・release site が存在することが示された。major capsid protein（MCP）との共沈降は特に同領域のC末側と MCP との強い相互作用が HHV-6B においても存在し，IFA で AP が核内に局在した結果と併せて同ウイルスの capsid assembly の過程を示唆させるものでウイルス学的に興味深い所見となった。

以上により HHV-6B における protease と assembly protein の遺伝子構造および機能の一部が解析されたことは重要であり，学位に値するものと考えられる。