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

①

主論文

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 (HHV-6)

大阪大学医学部小児科

Department of Pediatrics, Osaka University Medical School

砂川富正
Tomimasa Sunagawa

（指導：岡田伸太郎教授）

（平成１０年１月27日受付）

The genomic region encoding U53 of human herpesvirus 6 (HHV-6) variant B has been cloned, sequenced and expressed in *E.coli*. Transcriptional analysis indicated that U53 encodes a full-length protease (PR) and two assembly protein precursors (pAPs). Next the PR and the AP domain (downstream of R-site plus pAP) were expressed as GST-fusion proteins in *E.coli*. The recombinant HHV-6B PR cleaved the synthetic peptides YIKASEP, which is a mimics of the release (R)-site sequence in the U53. Several protease inhibitors were effective to inhibit its activity. PR was detected both in the nucleus and cytoplasm, but AP was observed in the nucleus. The result of immunoprecipitation indicated the existence of both maturational and release site, and interestingly, antisera for both proteins co-precipitated with the major capsid protein, suggesting the strong association of the carboxyl-terminal domain of U53 with the major capsid protein.

Key Words : HHV-6/variant/protease/assembly protein/cleavage

目　的

Human herpesvirus 6（HHV-6）はHHV-6AおよびHHV-6Bの二つのvariantに分類される[1]。HHV-6A は最初にリンパ球増多症患者の末梢血より分離されたが、このvariantの詳細については不明のままである[2]。他方HHV-6Bは最初にAIDS 患者より分離され[3]、その後突発性発疹の病因であることが明らかとなった[4]。後にHHV-6Bは様々な臨床検体より多く分離され、 いくつかの疾患では病因との関連性を示唆されている[5,6,7,8]。

Human cytomegalovirus（HCMV）に関しては、新しい抗ウイルス剤のターゲットとしてヘルペスウイルス科に高度に保存されているserine protease（assemblin）の領域がその可能性を模索されている[9,10,11]。ヘルペスウイルス科のserine proteaseは細胞や他のウイルスのserine proteaseと全く異なる特徴を有していると考えられ、protease自身と、protease領域内にコードされているassembly protein precursor（pAP）が特異的基質として知られている。最近 HCMVのassemblinの結晶構造が解析され、それに基づいた抗ウイルス剤の開発が重要な戦略となりつつある[12,13,14,15]。

今回我々はHHV-6Bにおけるこの領域についてのmRNAの解析を行い PR、pAPを大腸菌で発現させ機能解析に用い、またウサギに免疫し得られた抗PR血清・抗pAP血清によっても解析を試みた。

方 法

1) ウイルスおよび細胞

HHV-6B HST株を一連の実験に用いた。この株は突発性発疹に罹患した患児末梢血より分離され、臍帯血リンパ球（CBMCs）に培養した[4]。献血由来の末梢血単核球とT-リンパ球系cell lineであるMT4をvirus DNA, RNAの調整、免疫沈降に用いた。

2) DNAのクローニングとシークエンシング

Martinらの方法によりvirus DNAを精製した[16]。制限酵素の一つである*Pst* I（Takara Shuzo Co.）により切断しpUC19にクローニングした。そのfragmentの一つである4.5 kbの断片を含むクローンのpSTY16について解析を行った。deletion mutantシリーズを作成しkilo-sequencing kit（Takara Shuzo Co.）によりシークエンスを行った。そのデータはcomputer program DNASIS（Hitachi）により解析し、予想されたアミノ酸のシークエンスに関してはSWISSPROTとNational Biomedical Protein Identification Resource databasesを用いて他種との比較を行った。

3) Complementary DNA（cDNA）ライブラリーの構築および解析

末梢血単核球にHHV-6Bを感染、72時間後にAGPC法によりtotal RNAを得た。続いてoligotex <dT30> Super（Roche）を用いて2回に渡り精製し、mRNAを分離した。得られたmRNAのうち5 μgをtemplateに供した。cDNAの合成はoligo（dT）1 μgをプライマーに用いSUPERSCRIPT Choice System for cDNA Synthesis（GIBCO-BRL）を使用した。続いて得られたcDNAに*Eco*RI, *Sal*I各制限酵素部位を有するアダプターを付加してplasmid vector pGAD424 に挿入した。このcDNAライブラリー

をelectroporation法により大腸菌DH5αに導入し増殖させた。

このcDNAライブラリーに対して、U53 ORFのmRNAの構造を解析するためにcolony hybridizationを施行した。PCR産物由来のsingle stranded DNA プローブ（25 ng）をmultiprime DNA labeling systems（Amersham）を用いて[α-^{32}P] dCTP（Amersham）にてラベリングした。プローブの合成に用いたプライマーの組み合わせはU53 ORF中852-883番目の塩基配列を含む5'-ACGGATCCTTATGAGTAATCAAAATCTG-CCAAATACTACC-3'と、1177-1153番目の配列である5'-ACGTTTTCGGTTGACGATAACCG-TG-3'であり、templateとしては感染細胞より分離したvirus DNAを用いた。この領域はAPとして予想された部分の前半325塩基をコードする。colony hybridizationは常法に従って施行され、スクリーニングされたcDNA群は制限酵素パターンにより分類され，代表的なcDNAをシークエンスによりさらに解析した。

4) Northern blot 解析

HHV-6B感染MT4細胞より得たmRNAによりNorthern blotを施行した。またmock-infected MT4細胞より得たtotal RNAを対照として使用した。すなわち1サンプルにつき1μgのmRNAまたは20 μgのtotal RNAをそれぞれdenatureし，フォルムアルデヒドゲルによる電気泳動に供した。続いてHybond^{TM}-N+ナイロンメンブレンにblotし、5xSSC、5xDenhardt's solution、0.5%SDS、50% formamide、110 μg/ mlのdenatureされたサケ精子DNAを組成とするhybridization bufferにて48°C、3時間のprehybridizationを行った。multiprime DNA labeling systems (Amersham) を用いてPCR産物由来のsingle stranded DNA プローブ（各25ng）を [α-^{32}P] dCTP (Amersham) にてラベリングした。 各プローブを合成するために用いたプライマーのシークエンスは以下の通りでtemplateとしては感染細胞より分離したvirus DNAを用いた。プローブ1：U53 ORF 5-24番目の塩基配列を含む5'-GTGGGATCCCTAAA-GTTTGGGTAGGTGG-3'および668 bpからR-site（690）の直前までを含む5'-CGGTCGA-CCCTATGCTTTAATATACGTACATTTAG-3'。プローブ2：697-719 bp を含む5'-TAGGAT-CCCACCGGTGGAGATTATTGTAGC-3'およびU53 ORFのterminal siteより94-73 bp下流の塩基を含む5'-ATTCGCCATATACCTTGTCA-G-3'。それぞれのblotはRIラベルしたプローブと共に48°Cでovernightのhybridizationを行い、メンブレンの洗浄は室温にて2xSSC、0.1% SDS中で2回、65°C、2xSSC、0.1% SDS中が1回、同様に65°C、0.5xSSC、0.1% SDS中で1回施行した。その後 -80°CでX-ray filmにコンタクトし、解析した。

5) プライマー伸長法

Fig. 2中で示した位置に合成oligo-nucleotideであるα5'-full（5'-CGGTTCTTCACCATAG-AC-3'）およびα5'-pAP（5'-CGGTGGACTT-GACAGCAAAG-3'）の各プライマーを設定し、IRD41（Aloka）により末端をラベルした。各プライマーについてはtotal RNA 31 μgをそれぞれ20 μl液中で1xfirst strand buffer (GIBCO/BRL)、

1 mM dNTP の濃度に混合し 70°C で 15 分間加熱した。加熱後、ラベルされたプライマーと Superscript Ⅱ逆転写酵素（GIBCO/BRL）200 U の存在下で 42°C で 60 分間のアニーリング、伸長反応を同時に行った。反応産物は denature され 6% polyacrylamide-8M-urea シークエンスゲル上で Li-Cor 自動 DNA シークエンサー（Aloka）を用いて解析した。転写開始位置は前述した pSTY16 プラスミド（Fig. 1）を用いて、プライマー伸長法に使用した同じプライマーを用いて塩基配列との比較を行った。

6) 3'RACE

cDNA は Superscript Ⅱ逆転写酵素（GIBCO/BRL）を用いて adapter primer（5'-GGCCACGCGTCGACTAGTACTTTTTTTTT-TTTTTTTT-3'）により合成した。cDNA は Fig. 2 中で示した特異的プライマーα3'-P1（5'-GACGCCTGAAACGGTAAACAGGAGC-3'）または α3'-P2 (5'-GACAAGGTATATGGCGAA-TGCCCACA -3') と Abridged Universal Amplification Primer（5'-GGCCACGCGTCG-ACTAGTAC -3'）との組み合わせによって PCR に供し、得られた PCR 産物を直接に Original TA Cloning Kit（Invitrogen）により pCR™ Ⅱベクターにクローニングし、manufacturer's instruction に従いシークエンスし、3'end を決定した。

7) GST-PR および GST-APd プラスミドの構築

U53 ORF の全長（1-758 a.a.）と C 末側（233-758 a.a.）を増幅させるためにプライマーを設計した。C 末側部分は 233-758 a.a.にコードされている pAP に加えて上流の 52 アミノ酸からなり assembly protein domain（APd）と認識される（Fig. 5）。プライマーのシークエンスは全長の上流側で 5'-GTGGGATCCCTAAAGTT-TGGGTAGGTGG-3', APd の上流側では 5'-TAGGA-TCCCACCGGTGGAGATTATTGT-AGC-3'であり，共通した下流側では 5'-AGGAA-TTCCCCATAACACGCACCTAAACACC-3'となっている（下線部は制限酵素消化部位を示す）。pAP 部分（285-758 a.a.）のみを増幅するプライマーも同様に設計した。PCR は DNA thermal cycler（Perkin/ Elmer/ Cetus）を用い 94°C（1 分）、55°C（1 分）、72°C（2 分）の順序で 25 cycle 行い、72°C(15 分)を 1 cycle 追加した。1 つの反応液はそれぞれのプライマーが 50 pmol、Ex*Taq*（TAKARA Shuzo, Shiga, Japan）2.5 U を用いた計 100 μl からなる。PCR 産物は *Bam* HI と *Eco* RI の制限酵素により消化され、発現ベクターである pGEX 5X-1 のこの制限酵素部位にクローニングした。それぞれのプラスミドはシークエンスを確認後、封入体形成を阻害する目的でプラスミド pTRX を予め形質転換してある大腸菌 BL21（Novagen）に形質転換した。

8) GST-PR と GST-APd の発現および精製

形質転換された大腸菌をアンピシリンを含む LB solution にて 30°C で培養し、O.D.約 0.5 で isopropyl-b-D-thiogalactosidase（IPTG）を最終濃度 1 mM となるように加え、その後 25°C にて 6 時間培養を続けた。大腸菌による蛋白の産生は 10%または 12.5%の SDS-polyacrylamide gels (SDS-PAGE) によってスクリーニングを行い、同様の方法で大量培養を行った。発現した融

合蛋白はmanufacturer's instructionに基づきglutathione Sepharose 4B (Pharmacia) を用いてaffinityカラムにより精製した。精製した蛋白は1xPBS(-)液中で透析を行い、使用時まで-80°Cで貯蔵した。

9) 酵素活性および阻害剤の解析

HHV-6Bのprotease activityは 合成ペプチドYIKASEPのcleavageをモニタリングすることによって計測した。YIKASEPはR-site (Fig. 2 and 5) 周囲のアミノ酸配列と相同である。この基質は98%以上の純度を持ちcleavageにより蛍光を発するもので、Peptide Institute Inc (Minoh、Osaka、Japan) より依託購入した。GST-PR (recombinant HHV-6B protease) 4.0 μMは50 μMの基質と共にassay buffer中で反応させたが bufferの組成は50 mM Tris-HCl、pH7.5、0.15 M NaCl、10mM $CaCl_2$、0.002% NaN_3である。蛍光は室温でのλex =328 nmおよびλem =393 nm におけるemission intensityをHitachi fluorescence spectrophotometer 650-10LCを用いて測定し、酵素活性のパラメーター (*Km*, *Vmax*) は基質の濃度が50-2,000 μMの状況下で算出した。代表的な数種類のprotease阻害剤についてもGST-PRに対する効果の測定を行った。

10) 抗血清

抗血清は精製したそれぞれの融合蛋白であるGST-PRまたはGST-APd各500 μgまたは750 μgをFreund's complete adjuvantと共にemulsion化し、ウサギに免疫して準備した。 1回ないし2回の追加免疫をFreund's incomplete adjuvant中に500 μgまたは750 μgの蛋白を用いて、2週間から6週間間隔で同様に行った。

11) 免疫蛍光 (IFA)

HHV-6B感染MT4細胞またはmock-infected MT4細胞をガラススライド上に滴下し風乾しcold acetoneにて固定した。それぞれのwellをdilution buffer (1xPBS、2% bovine serum,、0.2% Tween 20、0.05% NaN_3) にて希釈した抗体にて重層し、37°Cで 30分間incubateした。その後PBSで10分間洗浄したのちfluorescein-conjugated抗rabbit IgG goat抗体を2次抗体として重層し、37°C 20分間incubateした。再びPBSで洗浄し、蛍光顕微鏡下で観察された。同様にDNA合成阻害剤の一つであるphosphono-formic acid (PFA; Sigma、St.Louis、Mo.、USA) の存在下でのPRとpAPの発現を調べた。 同剤を1 mlあたり200 μg溶解したmediumにMT4細胞を3時間前処理しHHV-6Bを感染、48時間後の感染細胞とmock-infected MT4細胞におけるPRとpAP (またはAP) の存在をIFで観察した。この時前初期蛋白であるIE1 (GST03) に対する抗体についても同様に比較した。

12) Western blottingおよび免疫沈降

HHV-6B HST株に感染4日目のMT4細胞をsample buffer (50 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 0.1% Bromophenol blue, 10% glycerol with 5% of 2-mercaptoethanol) に溶解、熱処理後SDS-PAGEし、PVDFメンブレンに転写した。そのメンブレンに対してGST-PRまたはGST-APdに対するウサギの抗血清をそれぞれ反応させた。その後各メンブレンをウサギIgGに対するhorseradish peroxidase labeled goat antibodyにより反応させ、洗浄後、ECL Western

blotting analysis system（Amersham）を用いてPRおよびAPの検出を行った。また感染後48時間でHHV-6Bに感染したMT4細胞を含むculture mediumをmethionine-free medium（Dulbecco's Modified Eagle Medium ）に置換し、1時間後、MT4細胞は［^{35}S］methionine+cysteine（=［^{35}S］Met+Cys）（EXPRE^{35}S^{35}S, New England Nuclear）を1 mlあたり50 μCi にて30分間ラベルした。その後細胞を遠心により集め、pellet はRIPA buffer（0.01 M Tris-HCl, pH 7.4、0.15 M NaCl、1% sodium deoxycholate、1% Triton X-100、0.1% SDS、1m MPMSF）により溶解した。RIでラベルされているこのlysateをそれぞれのウサギ抗血清と混合し、生じた免疫複合体はprotein G-Sepharose（Pharmacia）を用いて免疫沈降し、10%SDS-PAGEにて電気泳動を行った。ラベルされた蛋白の検出のために、ゲルはEN^{3}HANCE solution（DUpont, Boston, MA）に液浸し、乾燥後Kodak X-Omat filmに-80°C にてコンタクトされた。

13) MCPに対するモノクローナル抗体（mAb）の確認

mAb 2.22.8はすでにHHV-6A 及びBの両方に反応するモノクローナル抗体（mAb）で、認識する蛋白は共に約 150 kDa の大きさである（unpublished data）。その認識蛋白が major capsid protein（MCP）であることを確かめるために、MCPのN末側（1-1707bp）のみをPCRにより増幅、GST（pGEX 5X-1）との融合蛋白として発現させた。HHV-6のMCPは4,035 bp長でgenome シークエンスより蛋白としては 151 kDaと予想されており[36,23]、プライマーの選択範囲は過去にN 末側3分の1が recombinant protein として高レベルの発現が得られたという報告に基づく[17]。用いられたプライマーのシークエンスは以下の通り。5'-AAAGGATCCACAGGTACCGGTGTGCTGCT-GCATATCGCCGAAACATG-3'、および 5'-AGCTCGAGGTAAAGGCATGTTGCCTATCA-TTATTC-3'（下線部は制限酵素消化部位を示す）。プラスミドの構築と大腸菌による蛋白の発現は他の GST 融合蛋白の方法と同一である。発現した蛋白に対して mAb 2.22.8 を用いたWestern blottingをECL methodにより行った。同法はWestern blot と免疫沈降の部分で詳細はすでに述べた。

結 果

1) U53のDNA塩基配列およびアミノ酸配列の解析

HHV-6BのHST株に関して、今回DNAシークエンスを行った。pSTY16 fragment には2つの完全なopen reading frame（ORF）と2つの不完全なORFが存在した（Fig. 1）。HHV-6 Aに関してはGomplelらにより全DNAシークエンスが報告されており[19]、この領域ではU52、U53、U54、U55の呼称でそれぞれのORFが示されている。pSTY16により予想されたORFとvariant Aにおける構造とに高い類似性が見られることから基本的に呼称を同一とした。我々は今回 U53に注目したが理由として HCMV UL80 にsimilarity を有しておりその遺伝子が virus proteaseをコードしていることに基づく。U53

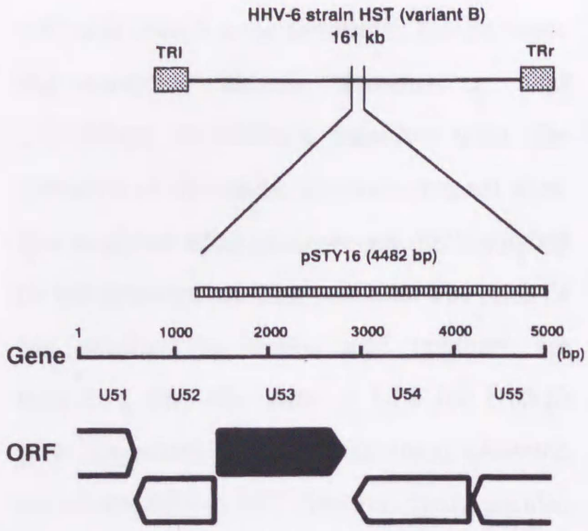
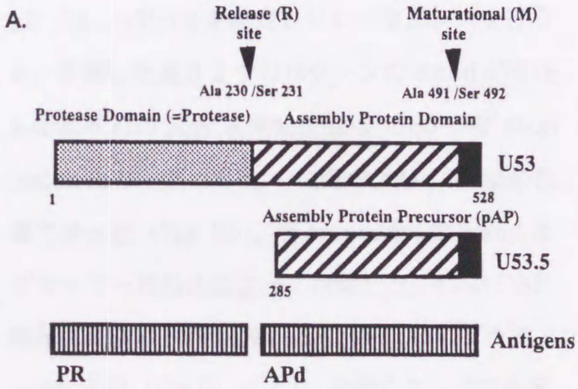


Fig. 1. Top: Schematic genome map of HHV-6 strain HST (variant B). TRl and TRr, terminal repeats left and right. Bottom: The map of open reading frames (ORF) surrounding of HHV-6B U53 ORF. Mapping data for partial U52, complete U53, U54, and partial U55 are from the sequence of pSTY16 fragment described here. The mapping data for U51 and partial U52 are from our previous sequence data on HHV-6B strain HST.

前後のDNAシークエンスはFig. 2に示された通りでU53遺伝子は全長が1,587 bp、121番目の塩基の methionine より開始する。U53はORFの上流に1つとORF内部に2つの可能性のあるTATA 配列を有している（Fig. 2）。同様に下流に存在する2つのpoly A signalが存在した（Fig. 2）。アミノ酸シークエンスはFig. 2にDNAシークエンスと並記したがその配列より HHV-6 proteaseは機能的にU53領域のN末側230 a.a.として存在することが予想された。HHV-6B HST株proteaseのアミノ酸レベル（230 a.a.）のidentityを比較するとHCMV AD169株[18]に対して31.0 %、HHV-6A U1102株[19]に96.8 %、HHV-7 JI株[20]に62.0 %であった。シークエンスから導き出された酵素反応部位のアミノ酸配列をHCMV、HHV-6A、HHV-6B、HHV-7のβ-herpesvirus 亜科について比較した（Fig. 5）。β-herpesvirus亜科ではrelease site（R-site）においてP4(tyrosine)・P2(lysine)・P1(alanine)・P'1(serine)が、maturational site（M-site）ではP2(asparagine)・P1(alanine)・P'1(serine)などがよく保存されているものと考えられた。しかしHCMVに存在するinactivation site（I-site）と相同のアミノ酸配列はHHV-6では認められなかった。



B.

Release site	P4	3	2	1		P1'	2'	3'	4'
HCMV	Y	V	K	A	*	S	S	V	P
HHV-6A	Y	I	K	A	*	S	E	P	P
HHV-6B	**Y**	**I**	**K**	**A**	*	**S**	**E**	**P**	**P**
HHV-7	Y	I	K	A	*	S	E	N	L
Maturational site									
HCMV	V	V	N	A	*	S	C	R	L
HHV-6A	I	L	N	A	*	S	L	A	P
HHV-6B	**I**	**L**	**N**	**A**	*	**S**	**L**	**T**	**P**
HHV-7	V	V	N	A	*	S	L	T	P
Inactivation site									
HCMV	D	V	E	A	*	A	T	S	L

Fig. 5. A. Schematic representation of the

U53 and U53.5 gene products. The protease and assembly protein domains of U53 polyprotein are shown together with the positions of the release and maturational sites. The products after cleavage are distinguished by the different shading patterns. The sizes of the proteins in amino acid residues are indicated. And the parts of U53 (or U53.5) gene expressed in the recombinant plasmids for PR and APd as GST-fusion proteins are also indicated. B. Alignments of β-herpesvirus protease cleavage recognition sequences. Inactivation (I) site is known to exist only in cytomegalovirus of all herpesviruses so far.

2) HHV-6B PR と pAP の転写レベルの解析

まずHHV-6Bのこの領域からmRNAがどのように転写されているかをmappingするためにNorthern blottingを試みた。シークエンスの結果に基づき設定されたプローブ1、プローブ2はそれぞれU53 N末側に位置するPR部分とC末側のpAP部分に相当する（Fig. 3）。その結果をFig. 3に示すが、プローブ1（PR）は3.3 kb、1.8 kb、1.6 kbのtranscriptにhybridizeし、プローブ2（pAP）は3.3 kb, 1.8 kb、1.6 kb、1.0 kb、0.8 kbのtranscriptにhybridizeした。1.0 kbは最も豊富なtranscriptであった。スクリーニングされた約200個のcDNAは制限酵素パターンで3つのグループに大別され Northern blotの結果と概ね一致した。約3.3 kbのtranscript群は7.5％存在し、シークエンス上U51のORFを一部含んでいた（Fig. 3）。また約1.8 kbのtranscript群は22.5％でシークエンスの結果はmethionineから開始するU53 ORFの全長にほぼ相当し、homologyからPR precursorをコードしているものと予想された。さらに約1.0 kbのtranscript群は62.0％と最多でU53 ORF後半部分に相当し同様にmethionineサイトを有し、homologyからpAPであることが予想された。U53の全長1,587 bpに関してsplicingは存在せずgenomeシークエンスと一致した。3'endに関しては制限酵素パターンの違いによって、PRとpAPに共通して2つの異なった3'endが存在することが示唆されたことから3'RACE法を行って確認した。HHV-6B感染細胞より分離したtotal RNA 5 μgを用いた。Fig.2 に示した位置にプライマーα3'-P1、α3'-P2を設定してシークエンスを行うと、予想した通り2つのパターンの3'endが存在しそれぞれのpoly A開始位置は U53 ORF stop codonより下流に6 bpの位置および186 bpの位置であった（Fig. 2）。各transcriptの5'endはプライマー伸長法によって決定した。U53 ORF開始部位より+51塩基からantisenseのプライマーα5'-full（Fig.2）により 全長をコードする遺伝子はORF開始部位より-28塩基に5'endを持つことが明らかとなった（Fig.2 and Fig.4）。同様に+903塩基からantisenseのプライマーα5'-pAP（Fig. 2）によりpAPは+645塩基と+712塩基に5'endを持つことを示した（Fig.2, Fig.5b）。以上の結果をまとめたのがFig. 3の上の図である。proteaseとして全長をコードする遺伝子と、異なる2つの5'endを持つpAPがコードされている。この組み合わせとしてはco-terminalであり、かつそれぞれ2パターンの

3'end を持っていることが明らかとなった。3.3 kb fragment はORFをまたがってコードされており、U53領域の転写・発現には直接の関係はないものと予想された。

3) 大腸菌による HHV-6B PR および APd の発現と精製

GST融合蛋白としてU53全長（1-528 a.a.）を大腸菌にて発現させ、55 kDa の蛋白を得た（Fig. 6A, lane 4）。GST蛋白は27 kDa であり、U53全長で発現した蛋白より R-site（Fig. 3）で release されたN末側の実質的な protease と予想される部分（1-23 a.a.）が融合したものと予測される（=GST-PR）。次に約57 kDa の蛋白を大腸菌で発現させたが、これは assembly protein domain (APd)と GST との融合蛋白（=GST-APd）であり、U53 ORF の R-site よりC末側半分（233-528 a.a.）をコードするように設計されている（Fig 6B, lane 4）。pAP単独（285-528 a.a.）では GST 融合蛋白（=GST-pAP）として発現させることは出来なかった。

4) HHV-6B protease の酵素活性と阻害剤の効果

Ala-Ser が切断部位であることを予測して(Fig. 5) R-site 周辺の相同ペプチドを作成、PR の R-site における酵素活性を測定する系を作成した。この HHV-6B R-site 基質の配列は MoCAc-GYIKASEPK(Dnp)rr-NH2 であり、ペプチドの cleavage により蛍光を生ずる。時間の経過に従い蛍光は emission intensity として測定された（Fig.7）。GST のみを酵素の対照として測定したときは反応は起こらず、GST-PR を用いた時は時間の経過に伴いゆっくりとした加水分解が観

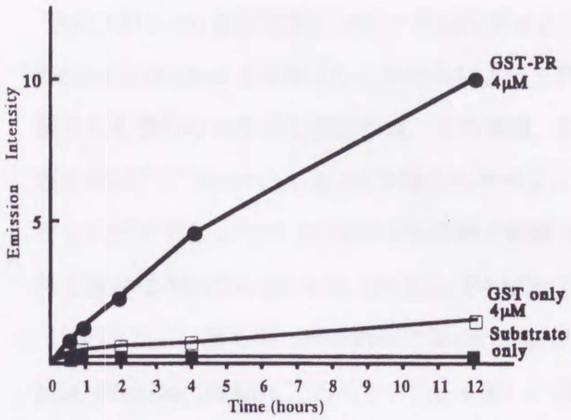


Fig. 7. Rates of hydrolysis of R-site substrate. The fluorescence of the substrate was measured as described in Methods. Peptide substrate YIKASEP was incubated with [●] GST-PR and with [□] GST only respectively. The reaction of [■] substrate without enzyme was shown as above.

察された。酵素活性の代表的な指標である *Km* 値、*Vmax* を R-site ペプチド基質の cleavage より計算し、結果はそれぞれ0.35±0.05mMおよび0.89±0.06であった（Table 1）。protease 阻害剤の検討では HHV-6B PR は 500 μM に調整した benzamidine、aprotinin、pepstatin A、leupeptin、phenylmethyl-sulfonyl fluoride（PMSF）、iodoacetamide（IAA）、gabexate mesylate（FOY）および 100 U/ml 濃度の heparin では阻害されなかった。しかし 500 μM 濃度の $ZnCl_2$ と nafamostadt mesilate（Futhan）下では完全な阻害が観察された（Table 1）。

Table 1. A. Kinetic parameters for the hydrolysis of HHV-6B R-site substrate by HHV-6B protease, calculated from the initial velocities of peptide cleavage

peptide substrate (site)	* *Km (mM)*	† *Vmax*
YIKA SEP (R)	0.35±0.05	0.89±0.06

*, † Calculated from the emission intensity of the fluorescence of cleaved peptides. The substrate concentration range was 50 to 2000 μM. The enzyme concentration was 4.0μM.

B. Effect of inhibitors on the activity of HHV-6B protease

Inhibitor	Concn (μM)	% Inhibition
$ZnCl_2$	500	100
Benzamide	500	0
Aprotinin	500	0
Pepstatin	500	0
Leupeptin	500	0
PMSF	500	0
Iodoacetamide(IAA)	500	0
gabexate mesylate (FOY)	500	0
nafamostat mesilate(Futhan)	500	100
heparin	10 U/ml	0
	100 U/ml	0

Reactions were in the assay buffer as described in Methods in a total volume of 1 ml. Enzyme (4.0 μM) were preincubated with the inhibitors at the final concentration shown at 24℃ for 1 h before addition of the substrate, YIKASEP (50 μM). Hydrolysis of the substrate was measured 4 h later.

5) 培養細胞中における HHV-6B PR と pAP の検出と processing の観察

方法の項で述べたように精製した recombinant protein である GST-PR と GST-APd を抗体を作成するためそれぞれウサギに免疫した。得られた抗血清を用いて HHV-6B 感染細胞中のウイルス抗原への各抗体の特異性を測定するために間接蛍光免疫（IFA）を行った。HHV-6B 感染細胞中に GST-PR に対する抗体では細胞質と核の両方が染色されたが GST-APd に対する抗体は核のみを染色された（Fig. 8 上）。非感染細胞は両方の抗体に対して染色されなかった。次に方法の項で述べたように DNA 阻害剤存在下での PR と AP の発現について調べた。phosphonoformic acid（PFA）を処理した状況では PR と AP は共に感染後 48 時間においても IFA で検出されなかったが抗 GST03 抗体によって IE1 蛋白は著明に検出された（Fig.8 下）。

次に HHV-6B 感染細胞に対して免疫沈降法と Western blotting とを施行し、各抗体によって認識される蛋白の大きさを決定した。その結果、免疫沈降は[^{35}S] Met+Cys を 30 分間のみラベリングしただけであったが、抗 GST-PR 抗体で認識される蛋白は 65 kDa, 60 kDa, 28 kDa, 24 kDa で（Fig. 9 左）、抗 GST-APd 抗体では 65 kDa, 60 kDa, 30 kDa, 28 kDa であった（Fig. 9 右）。感染後 4 日目の感染細胞に対する Western blotting では抗 GST-PR 抗体は 28kDa および 26kDa の蛋白を認識し、抗 GST-APd 抗体も同様に豊富な 30kDa および 28kDa の蛋白を認識した（データ示さず）。これらの結果は、各蛋白が翻訳後に予測されていた分子量や、その後の proteolysis を受けた大きさの予測とほぼ一致する。加えて免疫沈降では共通して約 150 kDa の大きさの蛋白が検出されている（Fig. 9, 共に lane 3）。そして Gompels らのシークエンス[19]からの予測に基づき、分子量からこれが major capsid protein（MCP）である可能性が高まった。同定するために Okuno らが作成していたモノクローナル抗体の一つであり、 150 kDa のウイルス蛋白を認識することが調べられている mAb 2.22.8（未発表データ）について解析を行った。最初に MCP の N 末側 1-1,707 bp を用いて GST との融合蛋白を発現させるプラスミドを構築し、大腸菌で発現させた。次に前述した mAb 2.22.8 を用いてこの大腸菌の lysate に Western blotting を行い、反応が見られたことから MCP であることを確認した（データ示さず）。 抗 GST-PR 抗体を用いた結果と比較して、抗 GST-APd 抗体の MCP と共沈するのが有意に多かった。

考　察

virus protease はヘルペスウイルスでは DNA polymerase や glycoprotein B と同様に最も高度に保存されている遺伝子であり、ウイルスの成熟に関して protease（PR）の役割を理解する事は重要である。ヘルペスウイルスの capsid は まず内側の scaffold protein 周囲に形成されるが、scaffold protein は virus genome の packaging に伴い失われる[21,22]。この scaffold protein の中心が assembly protein precursor (pAP)であり、これまで調べられてきた全てのヘルペスウイルスについて PR と overlap してコードされ、inframe であり、3'coterminal であり、PR の特異的基質としての性質を有している[23,24,18,25,26,9,19,20]。PR は serine protease としての性質を有し[27,28,29,30]、まずは precursor として作られ、ウイルスの capsid assembly が進行していく間に autoproteolytic processing を受ける。serine protease としての活性を有する部位は precursor の N 末側に位置する[31,11]。PR precursor は 2 カ所ないし 3 カ所の autoproteolytic cleavage を有するがそれぞれは以下のようになっている。（1）ORF の C 末側に位置し、pAP 上に重複する maturational (M) site。（2）PR precursor の中央付近に位置する release (R) site[9,32,33,11]。（3）assemblin 中央付近に位置する inactivation (I) site はHCMV のみで発見されている[34]。そして基質としての pAP は、M-site での開裂によって成熟した assembly protein（AP）となる[10]。pAP は scaffold protein 中最も豊富に見られる蛋白で、major capsid protein（MCP）との相互作用が注目されている[35,36]。PR による cleavage はウイルスの成熟に必須であり、AP 部分が pAP の C 末側、M-site より取り去られることで DNA の packaging が初めて可能となる[21,22]。我々は今回、HHV-6B において PR および pAP をコードしていると思われる U53 領域の転写、PR の酵素学的特徴、また培養細胞中での両蛋白の動態に関して解析を行った。

genome DNA と cDNA ライブラリーのシークエンスでは PR precursor および pAP をコードしている領域において splicing は見られなかった。いわゆる実質的な protease 領域は HHV-6A との homology が特に高く[37]、variant 間で異なるアミノ酸は 3 個のみ存在したが conserved domain（CD）を推定された位置においてはアミノ酸の違いは見られなかった。よってこの差は variant 間の違いに影響を及ぼすものではないと思われる。この領域を他の β-herpesvirus 科と比較してみると、一般に HHV-6B は HCMV よりも HHV-7 により近縁であるかもしれない。しかし HHV-7 の maturational (M)-site におけるアミノ酸シークエンスはむしろ HHV-6B より HCMV に近い（common residue of P4 and P3: valine）可能性がある（Fig. 5）。この領域のさらなる分子的構造の解析が求められる。

次に PR と pAP の mRNA の構造を決定した（Fig. 3）。まとめると プライマー伸長法より 5'end は U53 ORF 全長をコードする遺伝子としては単一で（Fig. 4）、C 末側の pAP では 67 bp 離れた 2 つの 5'end が存在した（Fig. 4）。またそれぞれ約 25-30 bp 上流に potential TATA box が見られた。しかし興味深いことに 180 bp 離れ、それぞれに poly A signal を有する 2 つの 3'end が存

在することが3'RACE法より明らかとなった(Fig. 2)。cDNAライブラリーよりこの結果に相当する2パターンの3'endを持つクローンがPR、pAPそれぞれに得られた。よってHHV-6Bにおいてはこれまでの他のヘルペスウイルス科の報告同様PRとpAPはco-terminalとしてコードされているもののそのパターンが2つあり、HHV-6Bに特徴的な現象であると考えられる。しかしPR、pAPとも転写開始位置と予想されるmethionineはそれぞれ1つであり、かつstop codonもそれぞれ同一であることから、重複するmRNAの構造は各蛋白の発現量が豊富に得られることに寄与しているものと思われる。

GSTとの融合蛋白の発現についてPRは全長528アミノ酸（予想約59 kDa）が発現するようにconstruuctを作成したが、大腸菌により得られた蛋白は約28 kDa（GST-PRとしては55 kDa）（Fig. 6）であった。この分子量は，予想したrelease (R)-siteにおいてautocleavageが起こっていることを示唆するもので、発現蛋白は機能的であり、酵素活性を有している可能性が高いことを示している。

我々はR-site前後に設定した合成ペプチドを基質として用い、GST-PRが酵素活性を持つことを示した（Fig. 7）（Table 1）。また結果的にこの部位でのcleavageという予測が正しいことを証明し、精製して得られたU53のN末側に酵素としての活性が存在していることを示した（Fig. 5）。このPRによるR-siteでの酵素反応速度は比較的にゆっくりであったが（Fig. 7）、この現象はHCMV proteaseのcleavage assayにおいても観察されており[38]、その報告ではproteaseによるR-siteの加水分解の速度はM-siteに比べて約6分の1倍から8分の1倍であったことが示されている。アミノ酸配列の比較や発現したPRの最終の分子量から，HHV-6BではHCMVのようなinactivation (I)-siteは存在しないものと予想される。我々はまた種々のprotease阻害剤によるHHV-6B proteaseに対する阻害効果について検討した。単純ヘルペスウイルス1型[11]やHCMV[38]などの報告では ヘルペスウイルスでは一般にproteaseはserine proteaseを示唆する阻害のスペクトラムを有していることがわかっている。Welchらはこれらのproteaseのなかで唯一セリン残基のみが保存されていることを示した[30]。今回高濃度の$ZnCl_2$ と nafamostadt mesilate（Futhan）のみが試みた阻害剤のなかで効果が見られ、かつその阻害効果は100%であった（Table 1）。Futhanは臨床の場で広く使われている代表的なserine protease阻害剤の一つであるが[39]、幾つかの報告によると Futhanは特にインフルエンザウイルスAにおけるhemagglutinin（HA）の蛋白分解を阻害することによって、このウイルスのreplicationに対して阻害効果を有する可能性が示唆されている[40]。今回我々が引き続き行った実験では Futhanは培養細胞においてはHHV-6B HST株の感染・増殖を阻害することは出来なかった（データ示さず）。Futhanの細胞への吸収は低いという情報もあり、derivativeなどの開発によってはFuthanのHHV-6Bへの抗ウイルス剤としての使用に道が開けるかもしれない。serine protease inhibitorであるFuthanの阻害効果によりHHV-6B proteaseがserine proteaseである可能性は一層

高まった。

間接蛍光抗体法（IFA）ではHHV-6B感染細胞中のPRやAP（またはpAP）の局在を調べた。PRが核と細胞質両方に分布していたのと比較すると，APはほとんど核に強く染色していた（Fig. 8）。ヘルペスウイルスでは一般にpAPはPRによってM-siteより切断を受けAPとなり、APを主とするscaffold proteinはvirion外に放出され、この段階でvirionへのDNAのpackagingが可能となる。この反応は感染細胞の核内で起こり、DNAがpackagingしたC capsidは核膜とともにenvelopmentを受け細胞質中を遊出していくが、PR部分が構造蛋白であることと核内にてvirionより放出されたscaffold proteinが恐らくはその後核外には出ていかないことを考えると、IFAにより観察されたPRやAPの局在はreasonableであるかもしれない。またPFA存在下ではPRとAPd両方の抗体に対して感染細胞は染まらず（Fig. 8）、PRとAPは共に感染細胞中では後期蛋白として発現されていることが明らかとなった。

感染後4日目のcell lysatesに対するWestern blottingの結果は抗GST-PR抗体、抗GST-APd抗体それぞれを用いた免疫沈降の結果とほぼ一致する（データ示さず）。抗GST-PR抗体では分子量約65, 60, 28, 24 kDaの特異的な分子量の蛋白が抗体に反応し、抗GST-APd抗体では65、60、30、28 kDaの蛋白が検出された（Fig. 9）。この結果は，予想されたようにmaturational (M)-siteとrelease (R)-siteの2つが存在していることを示す。感染細胞でのprocessingは速く、30分間のラベリングだけで最終段階に達した。抗GST-PR抗体で見られた最終の28 kDaと24 kDaの二重のバンドはPRがreducing conditionに反応するS-S結合を有することを示唆しているのかもしれない[41]。APdの分子量はアミノ酸シークエンスからの推定で約33 kDaであるが抗GST-APd抗体に反応した実際の分子量は約30 kDaと28 kDaであった（Fig. 9）。この場合の2つのバンドはpAPの全長と、M-siteにおいて酵素反応を受けたAPであると思われる。major capsid protein（MCP）とPRまたはpAPとの共沈殿はU53にコードされる両蛋白がcapsidの形成において重要な役割を果たしていることを予想させる。MCPのバンドは抗GST-PR抗体よりも抗GST-APd抗体によるもののほうが強くなっており、多くの研究者が報告しているように[42,36]，PRのC末側やそのPRの基質であるpAPがMCPとの相互作用において重要であることが示唆される。以上、これらのデータはHHV-6BにおいてもPRとAPは高度に保存されてはいるものの、transcriptの構造や阻害剤への反応など特徴的なことも多いことを示している．HHV-6Bのcapsid形成は全く不明であり、HHV-6Bの生活環を明らかにし、HHV-6Bの病原性を解明するためにもこの領域のより詳しい解析が今後必要であろう。

謝　辞

この研究を行うにあたり，大阪大学医学部細菌学教授 山西弘一先生に貴重な助言を数多く頂いた。ここに感謝の意を記し謝辞とする。

文 献

1. Ablashi, D. V., Balachandran, N., Joseph, S. F., Hung, C. L., Kruger, G. R. F., Kramarsky, B., Salahuddin, S. Z., & Gallo, R. C. Genomic polymorphism, growth properties, and immunologic variations in human herpesvirus-6 isolates. Virology 184: 545-552, 1991.

2. Salahuddin, S. Z., Ablashi, D. V., Markham, P. D., Josephs, S. F., Sturzenegger, S., Kaplan, M., Halligan, G., Biberfeld, P., Wong-Staal, F., Kramarsky, B., and Gallo, R. C. Isolation of a new virus, HBLV, in patients with lymphoproliferative disorders. Science 234, 596-601, 1986.

3. Lopetz, C., Pellet, P., Stewart, J., Goldsmith, C., Sanderlin, K., Black, J., Warfield, D., and Feorino, P. Characterization of human herpesvirus-6. Journal of Infectious Disease 157, 1271-1273, 1988.

4. Yamanishi, K., Okuno, T., Shiraki, K., Takahashi, M., Kondo, T., Asano, Y., and Kurata, T. Identification of human herpesvirus-6 as a causal agent for exanthem subitum. Lancet 1, 1065-1067, 1988.

5. Okuno, T., Higashi, K., Shiraki, K., Yamanishi, K., Takahashi, M., Kokado, Y., Ishibashi, M., Takahara, S., Sonoda, T., Tanaka, K., Baba, K., Yabuuchi, H., Kurata, T. Human herpesvirus 6 infection in renal transplantation. Transplantation 49, 519-522, 1990.

6. Drobyski, W. R., Knox, K. K., Majewski, A. and Carrigan, D. R. Fatal encephalitis due to variant B human herpesvirus-6 infection in a bone marrow transplant recipient. New England Journal of Medicine 330, 1356-1360, 1994.

7. Yalcin, S., Karpuzoglu, T., Suleymanlar, G., Mutlu, G., Mukai, T., Yamamoto, T., Isegawa, Y. and Yamanishi, K. Human herpesvirus 6 and human herpesvirus 7 infection in renal transplant recipients and healthy adults in Turkey. Archives of Virology 136, 183-190, 1994.

8. Challoner, P. B., Smith, K. T., Parker, J. D., MacLeod, D. L., Coulter, S. N., Rose, T. M., Schultz, E. R., Bennett, J. L., Garber, R. L., Chang, M., Schad, P. A., Stewart, P. M., Nowinski, R. C., Brown, J. P., Burmer, G. C. Plaque-associated expression of human herpesvirus 6 in multiple sclerosis. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 92, 7440-7444, 1995.

9. Welch, A. R., Woods, A. S., McNally, L. M., Cotter, R. J. & Gibson, W. A herpesvirus maturational protease, assemblin:. Identification of its gene, putative active site domain, and cleavage site. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 88, 10792-10796, 1991.

10. Preston, V. G., Rixon, F. J., McDougall, I. M., McGregor, M. & Al Kobaisi , M. F. Processing

of the herpes simplex virus assembly protein ICP35 near its carboxy terminal end requires the product of the whole of UL26 reading frame. Virology 186, 87-98, 1992.

11.Liu, F. & Roizman, B. Characterization of the protease and other products of the amino-terminus-proximal cleavage of the herpes simplex virus 1 UL26 protein. Journal of Virology 67, 1300-1309, 1993.

12.Chen, P., Tsuge, H., Almassy, R. J., Grbskov, C. L., Katoh, S., Vanderpool, D. L., Margosiak, S. A., Pinko, C., Matthews, D. A., Kan, C.-C. Structure of the Human cytomegalovirus protease catalytic domain reveales a novel serine protease fold and catalytic triad. Cell 86, 835-843, 1996.

13.Qiu, X., Culp, J. S., DiLella, A. G., Hellmig, B., Hoog, S. S., Janson, C. A., Smith, W.-W., & Abdel-Meguid, S. S. Unique fold and active site in cytomegalovirus protease. Nature 383, 275-279, 1996.

14.Shieh, H.-S., Kurumbail, R. G., Stevens, A. M., Stegeman, R. A., Sturman, E. J., Pak, J. Y., Wittwer, A. J., Palmier, M. O., Wiegand, R. C., Holwerda, B. C. & Stallings, W. C. Three-dimensional structure of human cytomegalovirus protease. Nature 383, 279-282, 1996.

15.Tong, L., Qian, C., Massariol, M.-J., Bonneau, P. R., Cordingley, M. G.& Lagace, L. A new serine-protease fold revealed by the crystal structure of human cytomegalovirus protease. Nature 383, 272-275, 1996.

16.Martin, J. H., Dohner, D. E., Wellinghoff, W. J., Gelb, L. D. Restriction endonuclease analysis of Varicella-Zoster vaccine virus and wild-type DNAs. Journal of Medical Virology 9, 69-76, 1982.

17.Littler, E., Lawrence, G., Liu, M.-Y., Barrell, B. G., Arrand, J. R. Identification, cloning, and expression of the major capsid protein of human herpesvirus 6. Journal of Virology 64, 714-722, 1990.

18.Chee, M. S., Bankier, A. T., Beck, S., Bohni, R., Brown, C. M., Cerny, R., Horsnell, T., Hutchison, C. A., , Kouzarides, T., Martignetti, J. A., Preddie, E., Satchwell, S. C., Tomlinson, P., Weston, K. M. & Barrell, B. G. Analysis of the protein coding content of the sequences of human cytomegalovirus strain AD169. Current Topics in Microbiology and Immunology 154, 129-173, 1990.

19.Gompels, U. A., Nicholas, J., Lawrence, G., Jones, M., Thomson, B. J., Martin, M. E. D., Efstathiou, S., Craxton, M. & Macaulay, H. A. The DNA sequence of human herpesvirus-6: structure, coding content and genome evolution. Virology 209, 29-51, 1995.

20.Nicholas, J. Determination and analysis of the complete nucleotide sequence of human herpesvirus 7. Journal of Virology 70, 5975-5989, 1996.

21.Preston, V. G., Coates, J. A. V. & Rixon, F. J.

Identification and characterization of a herpes simplex virus gene products required for encapsidation of viral DNA. Journal of Virology 45, 1056-1064, 1983.

22.Gao, M., Matusick-Kumar, L., Hurlburt, W., Feuer Ditusa, S., Newcomb, W. W., Brown, J. C., McCann, P. J., Ⅲ, Deckman, I. & Colonno, R. J. The protease of herpes simplex virus type 1 is essential for functional capsid formation and viral growth. Journal of Virology 68, 3702-3712, 1994.

23.Baer, R., Bankier, A.T., Biggin, M. D., Deininger, P. L., Farrell, P.J., Gibson, T. J., Hatfull, G., Hudson, G. S., Satchwell, S. C., Seguin., C., Tuffinell, P. S. & Barrell, B. G. DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein-Barr virus genome. Nature: 310, 207-211, 1984.

24.Davison, A. J. & Scott, J. E. The complete DNA sequence of varicella-zoster virus. Journal of General Virology 67, 1759-1816, 1986.

25.Liu, F. & Roizman, B. The promoter, transcriptional unit, and coding sequence of herpes simplex virus 1 family 35 proteins are contained within and in frame with the UL26 open reading frame. Journal of Virology 65, 206-212, 1991a

26.Liu, F. & Roizman, B. The herpes simplex virus 1 gene encoding a protease also contains within its coding domain the gene encoding the more abundant substrate. Journal of Virology 65, 5149-5156, 1991b.

27.Cox, G. A., Wakulchik, M., Sassmannshausen, L. M., Gibson, W., Villarreal, E. C. Human cytomegalovirus proteinase: candidate glutamic acid identified as third member of putative active-site triad. Journal of Virology 69, 4524-4528, 1995.

28.Dilanni, C. L., Stevens, J. T., Bolger, M., O'Boyle, D. R., Weinheimer, S. P., Colonno, R. J. Identification of the serine residue at active site of the herpes simplex virus type 1 protease. Journal of Biological Chemistry 269, 12672-12676, 1994.

29.Stevens, J. T., Mapelli, C., Tsao, J., Hail, M., O'Boyle, D., Weinheimer, S. P., Dilanni, C. L. In vitro proteolytic activity and active-site identification of the human cytomegalovirus proteinase. European Journal of Biochemistry 226, 361-367, 1994.

30.Welch, A. R., McNally, L. M., Hall, M. R. T., Gibson, W. Herpesvirus proteinase: site-directed mutagenesis used to study maturational, release, and inactivation cleavage sites of precursor and to identify a possible catalytic site serine and histidine. Journal of Virology 67, 7360-7372, 1993.

31.Davison, M. D., Rixon, F. J. & Davison, A. J. Identification of genes encoding two capsid proteins (VP24 and VP26) of herpes simplex virus type 1. Journal of General Virology 73, 2709-2713, 1992.

32.Deckman, I. C., Hagen, M., McCann, P. J., Ⅲ. Herpes simplex virus type 1 protease expressed in E. coli exhibits autoprocessing and specific cleavage of the ICP35 assembly protein. Journal of Virology 66, 7362-7367, 1992.

33.Dilanni, C. L., Drier, D. A., Deckman, I. C., McCann, P. J., Ⅲ, Liu, F., Roizman, B., Colonno, R. J. & Cordingley, M. G. Identification of the herpes simplex virus-1 protease cleavage sites by direct sequence analysis of autoproteolytic cleavage products. Journal of Biological Chemistry 268, 2048-2051, 1993.

34.Baum, E. Z., Bebernitz, G. A., Hulmes, J. D., Muzithras, V. P., Jones, T. R., Gluzman, Y. Expression and analysis of the human cytomegalovirus UL80-encoded protease: identification of autoproteolytic sites. Journal of Virology 67, 497-506, 1993.

35.Thomsen, D. R., Newcomb, W. W., Brown, J. C., Homa, F. L. Assembly of the herpes simplex virus capsid: requirement for the carboxyl-terminal twenty-five amino acids of the proteins encoded by the UL26 and UL26.5 genes. Journal of Virology 69, 3690-3703, 1995.

36.Hong, Z., Beaudet, M. M., Durkin, J., Zhang, R., Kwong, A. D. Identification of a minimal hydrophobic domain in the herpes simplex virus type 1 scaffolding protein which is required for interaction with the major capsid protein. Journal of Virology 70, 533-540, 1996.

37.Tigue, N. J., Matharu, P. J., Roberts, N. A., Mills, J. S., Kay, J., Jupp, R. Cloning, expression, and characterization of the proteinase from human herpesvirus 6. Journal of Virology 70, 4136-4141,1996.

38.Burck, P. J., Berg, D. H., Luk, T. P., Sassmannshausen, L. M., Wakulchik, M., Smith, D. P., Hsiung, H. M., Becker, G. W., Gibson, W., Villareal, E. C.(1994). Human cytomegalovirus proteinase: expression in Escherichia coli , purification, and enzymatic characterization by using peptide substrate mimics of natural cleavage sites. Journal of Virology 68, 2937-2946.

39.Hiraishi, M., Yamazaki, Z., Ichikawa, K., Kanai, F., Idezuki, Y., Onishi, K., Takahama, T., Inoue, N. Plasma collection using nafamostat mesilate and dipyridamole as an anticoagulant. The International Journal of Artificial Organs 11, 212-216, 1988.

40.Hosoya, M., Shigeta, S., Ishii, T., Suzuki, H., De-Clercq, E. Comparative inhibitory effects of various nucleoside and nonnucleoside analogues on replication of influenza virus types A and B in vitro and in vivo. Journal of Infectious Disease 168, 641-646, 1993.

41.Stevenson, A. J., Morrison, E. E., Chadhari, R., Yang, C.-C., Mereedith, D. M. Processing and intracellular localization of the herpes

simplex virus type 1 proteinase. Journal of General Virology 78, 671-675, 1997.
42.Matusick-Kumar, L., Newcomb, W. W., Brown, J. C., McCann, P. J., Ⅲ, Hurlburt, W., Weinheimer, S. P., Gao, M. The C-terminal 25 amino acids of the protease and its substrate ICP35 of herpes simplex virus type 1 are involved in the formation of sealed capsids. Journal of Virology 69, 4347-4356, 1995.

要　約

HHV-6 において protease(PR)及び assembly protein precursor (pAP) との相同性を有する U53 領域について、感染細胞中の mRNA・発現蛋白の動態と、その機能解析を行った。関係する transcript は重複して 6 つあり、pAP 領域の豊富な発現に寄与していると予想された。PR と GST との融合蛋白は R-site を開裂し、数種の protease 阻害剤によって阻害された。各蛋白に対する抗血清を用いた免疫沈降では数カ所の開裂部位が予想された。また pAP は major capsid protein と強く共沈降し、IFA では核に局在するなど、会合過程での様々な機能が示唆された。

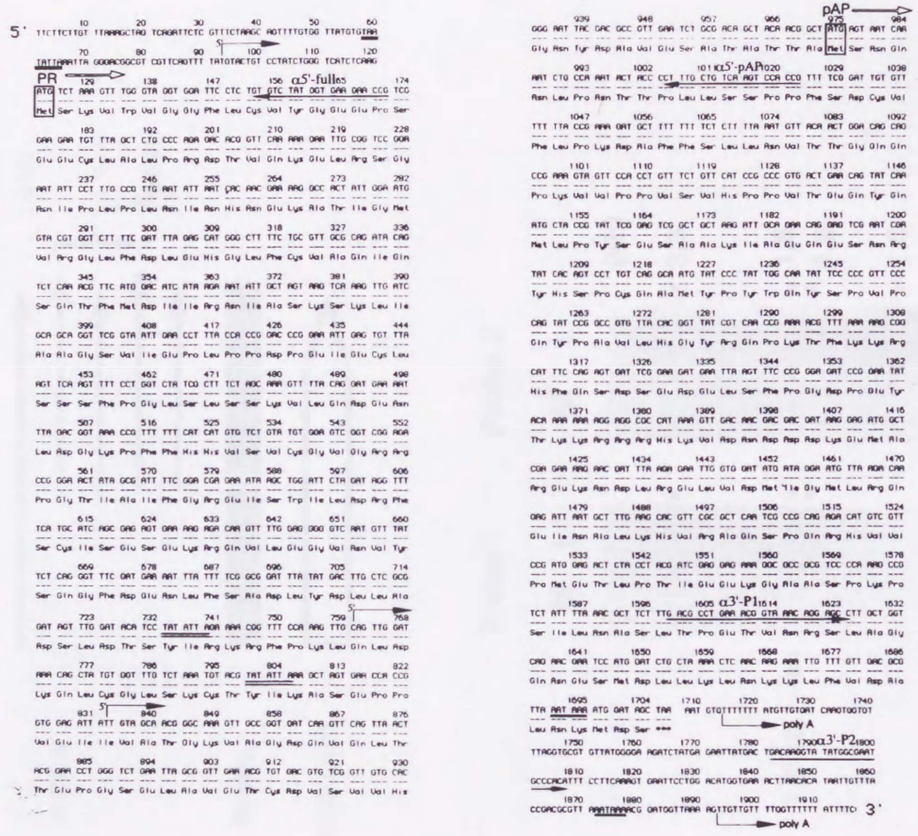
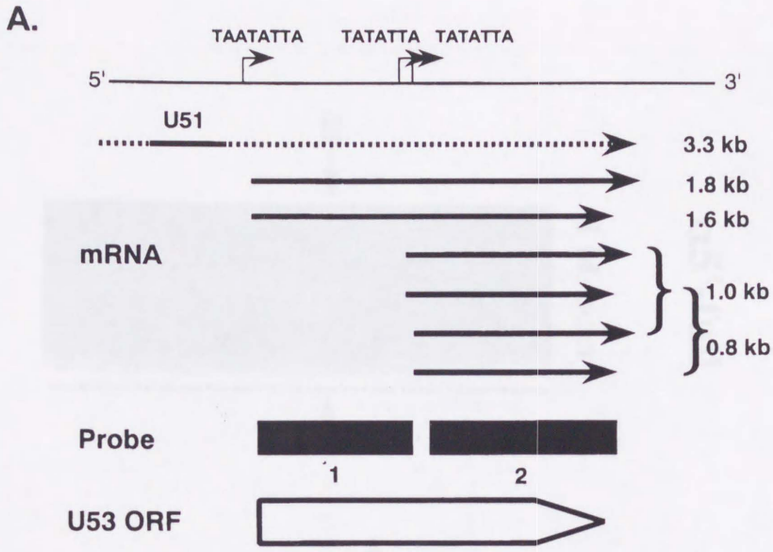


Fig. 2. Nucleotide sequence and amino acid alignment of U53 open reading frame encoding full-length protease and assembly protein precursor (pAP). Start codon of full protease or pAP are shown as methionines to be doubly underlined. Predicted TATA box and poly A signals are indicated in solid open boxes or underlined in a single band, respectively. Two TATA box are estimated for pAP. Also the predicted start sites of poly A by the cDNA library analysis are shown with arrows.



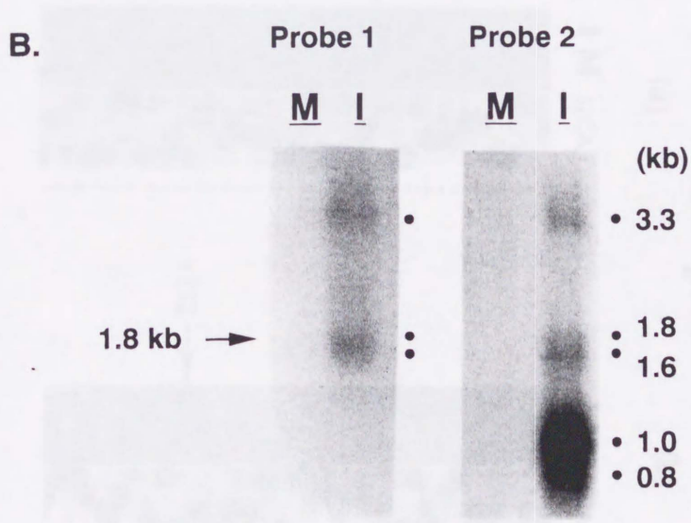


Fig. 4. Top: The numbered solid boxes below the arrows denote PCR products used as probes for Northern blot analysis. Probe 1 corresponds to the protease coding region and probe 2 to the assembly protein domain coding region both in U53 ORF. The arrows below the map denote the probable transcripts of the various genes related with U53. Bottom: Lane M contains total RNA from mock-infected MT4 cells, and lane I contains polyadenylated RNA from HHV-6B-infected MT4 cells, respectively. Molecular masses were estimated from the level of 18S rRNAs with size (in Kb) shown to the left of the blots.

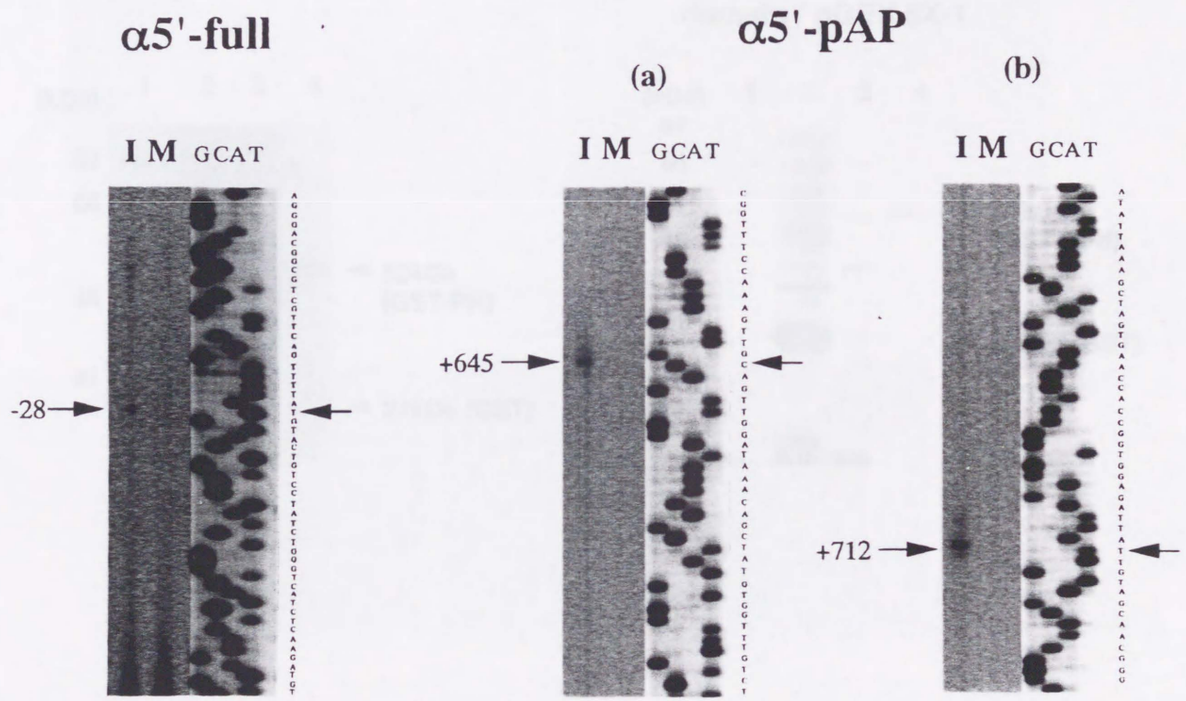


Fig. 5. Primer extension assays to map the transcript of 5'ends. The size of the extended probes were estimated from the pSTY16 sequence (pSTY16 lane). Lines in the sequence are GCAT. M: Mock-infected, I: HHV-6B infected. The site of a5' full, and a5' pAP primers each are shown in Fig. 2.

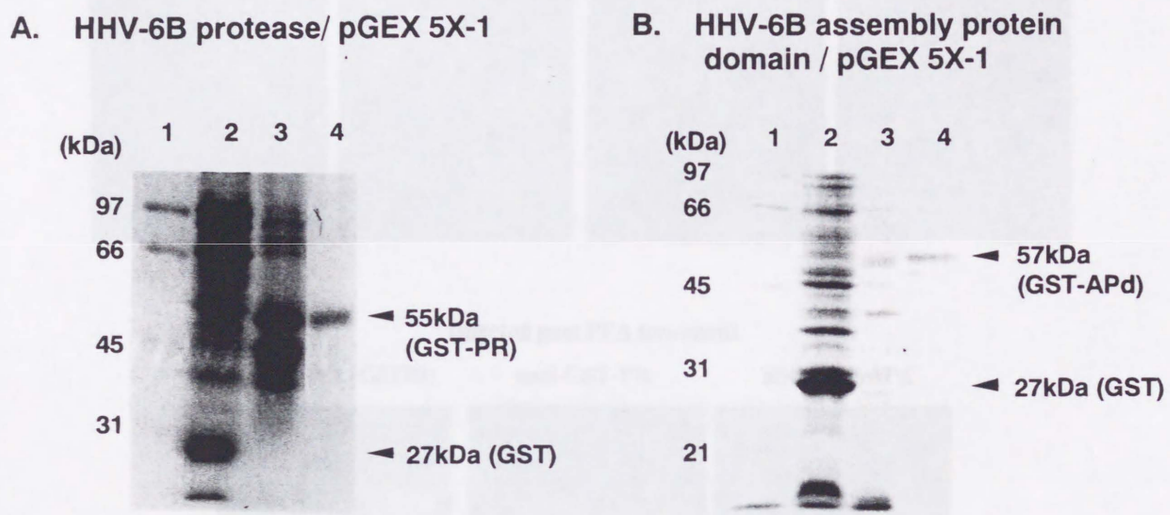


Fig. 6. Expression and purification of HHV-6B (A) protease and (B) assembly protein domain as GST-fusion proteins in *E.coli*. Protein extracts from *E.coli* induced to express from plasmids HHV-6B protease /pGEX5X-1 and HHV-6B assembly protein domain /pGEX5X-1 respectively were analyzed by SDS-PAGE as described in Methods. Lane 1, molecular mass markers; lane 2, *E.coli* lysate of pGEX 5X-1 only; lane 3, *E.coli* lysate of each recombinant proteins; lane 4, purified GST-fusion proteins eluted from Glutathione Sepharose 4B for both (A) and (B).

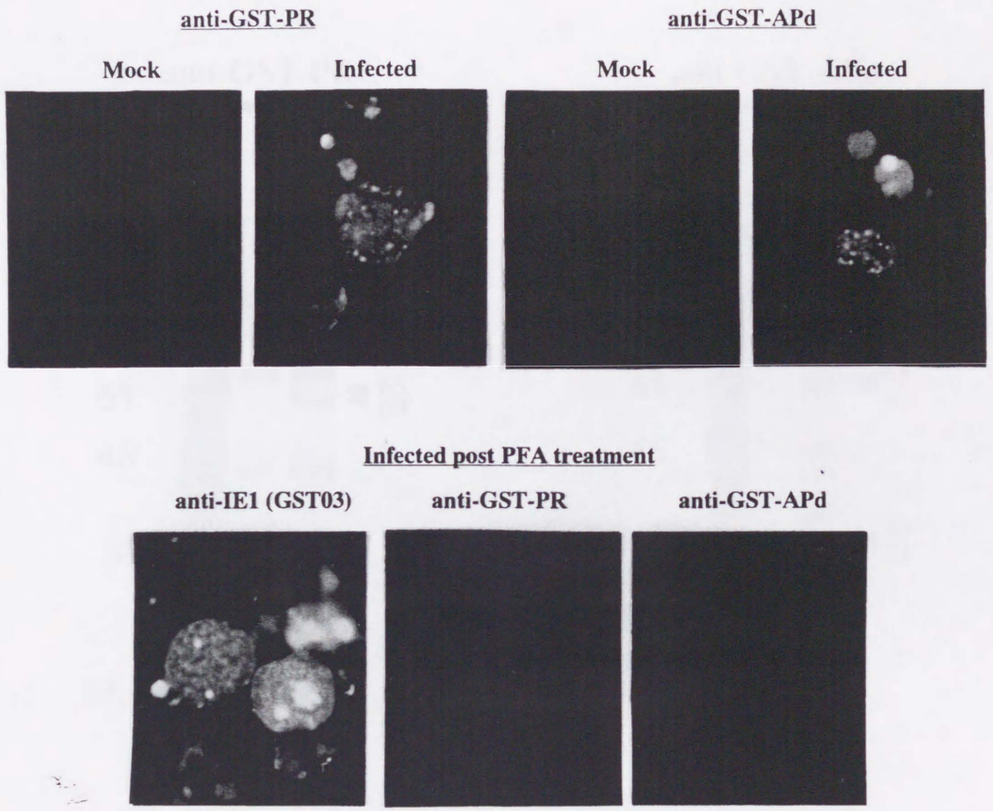


Fig. 8. Indirect immunofluorescence staining with rabbit antisera of MT4 cells uninfected or infected with HHV-6B strain HST. Top: Mock-infected and HHV-6B-infected cells treated with the antisera for GST-fusion protease (GST-PR) or GST-fusion assembly protein domain (GST-APd) are shown as above. Bottom: MT4 cells infected with HHV-6B were also compared the treatment with PFA with the untreatment of it. Antiserum for GST03 recognizes the immediate-early protein of HHV-6B infected cells.

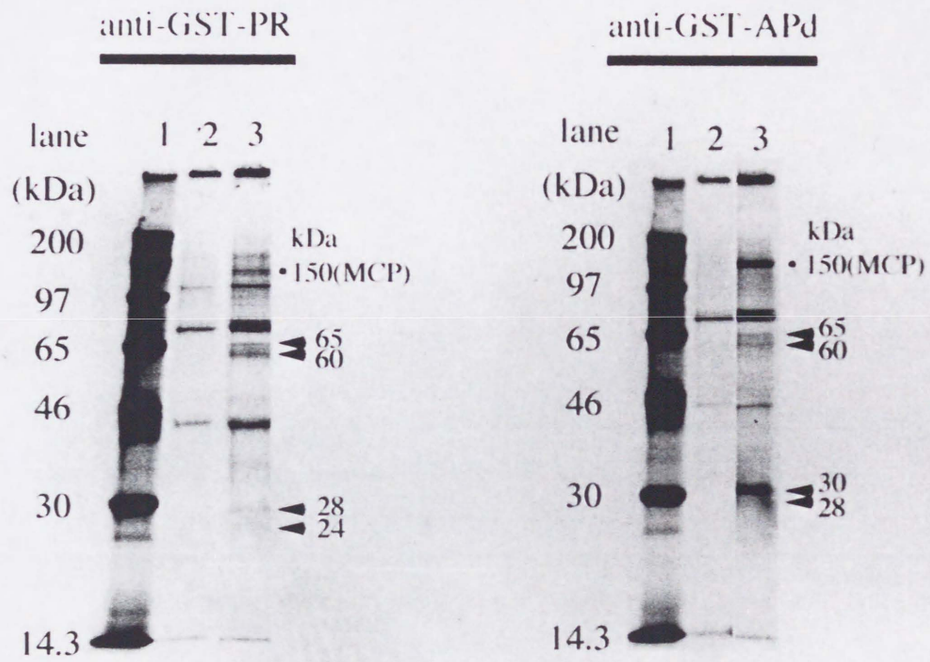


Fig. 9. Immunoprecipitation of HHV-6B infected MT4 cells with antiserum for GST-PR or for GST-APd. HHV-6B infected or uninfected cells were labeled with [^{35}S]methionine for 30 min, and then the cultures were harvested and immunoprecipitated with monospecific antisera for GST-PR or GST-APd, respectively. The cultures each were analyzed by SDS-PAGE. Lane 1, protein molecular size markers; Lanes 2, mock-infected MT4 cells; Lanes 3, HHV-6B-infected MT4 cells; (A) The 65, 60, 28 and 24 kDa bands are marked by arrowheads. (B) The 65, 60, 30, and 28 kDa bands are marked by arrowheads. The both 150 kDa bands were confirmed to be major capsid protein by a specific monoclonal antibody.