

Title	Identification and analyses of glycoprotein B of human herpesvirus 7
Author(s)	羽田, 敦子
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/40017
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/repo/ouka/all/>

氏名	は た あつ 子 羽 田 敦 子
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 1 3 0 0 2 号
学位授与年月日	平成 9 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学研究科病理系専攻
学位論文名	Identification and analyses of glycoprotein B of human herpesvirus 7 (ヒトヘルペスウイルス-7 (HHV-7) gB の同定と解析)
論文審査委員	(主査) 教授 山西 弘一 (副査) 教授 栗村 敬 教授 上田 重晴

【目的】

ヒトヘルペスウイルス-7 (human herpesvirus 7, 以下 HHV-7) は, 1990年, ヒトを自然宿主とするヘルペスウイルスとして 7 番目に発見された。その初感染時に突発性発疹を引き起こすことが明らかにされたが, このウイルスの構造及び増殖に関する研究は最近始まったばかりである。ヘルペスウイルス群のエンベロープに存在する糖蛋白のうち glycoprotein B ホモログ (以下 gB) は, 既知のヘルペスウイルスに普遍的に存在することが知られている。その生物学的特性として細胞侵入過程に必須であり, 中和抗体の主要な標的であることから, HHV-7 の増殖・感染様式を知る上にも gB ホモログの同定と解析は重要であると考えられる。

【方法ならびに成績】

HHV-7 KHR 株を Sup T 1 cell line に感染させ, ヌクレオカプシドを分離し, ウイルス DNA を精製した。EcoRI 処理後, pUC19 にクローニングし, EcoRI クローンのライブラリーを作製した。これらのクローンの 5' 末端と 3' 末端の塩基配列を決定し, 他のヘルペスウイルスとのホモロジー検索を行った。E 8-39 クローンは, ヒトヘルペスウイルス-6 (以下 HHV-6) の DNA ポリメラーゼ (pol) 遺伝子と DNA で 57.2% のホモロジーを有する配列を持ち, 既知の HHV-6 の遺伝子配列から HHV-7 の gB 相同遺伝子が隣接して存在すると予想された。そこでこのクローンの全塩基配列の決定と構造解析を行った。

このクローンは 2,466bp の完全な open reading frame (ORF) を持ち, 予想される TATA BOX と poly (A) 付加シグナルが, その上流と下流に存在した。この ORF のアミノ酸配列は, HHV-6 gB に対して 56% と最も高く, 次にヒトサイトメガロウイルス (以下 HCMV) gB と 37% のホモロジーを有しており, gB 相同遺伝子であることが判明した。予想される産物は, 822 アミノ酸, 93kDa で, N 末端に leader ペプチドと C 末側に膜貫通部分と推定される疎水性領域を持つ蛋白であった。また, アミノ酸配列の 393 番目から 397 番目に protease cleavage motif が存在し, 11カ所ある N-glycosylation motif のうち 7ヶ所が HHV-6 gB と類似の位置にあった。

この ORF の上流には HHV-6 の transport capsid assembly protein (tp/cap) と相同の塩基配列が存在し, その終止コドンから 35bp さかのぼって, この ORF の開始コドン ATG が存在していた。さらに, この ORF の終始コドンは, 隣接する pol 相同 ORF の開始コドン ATG の A と重なっており, HHV-6 と同じであった。これら, tp/cap, gB, pol 相同遺伝子の位置関係は, HHV-6 と同じで, β -ヘルペス亜科に特徴的であることが判明した。

この gB 相同 ORF の C 末部分 (716-822 a.a.) を *E. coli* で発現させた glutathione S-transferase (GST) 融合蛋白をカラムクロマトグラフィで精製した。これをマウスに免疫して得た抗血清を用いて, HHV-7 感染細胞を蛍光抗体法で染色したところ, 細胞質内に特異的に染色される抗原が認められ, gB の存在を確認した。同血清の中和活

性の有無について検討したところ、この抗血清は1:10でウイルスを完全に中和した。さらに、同血清に認識される35S-methionineでラベルしたウイルス蛋白について、N-glycosylation阻害剤(tunicamycin)による影響を免疫沈降法で検討したところ、tunicamycin存在下では112kDaの代わりに88kDaの蛋白を検出した。時間経過に伴う変動についても同様に免疫沈降を行い、pulse直後の112kDaからchase 2時間、4時間とたつにつれ、51kDa、63kDa、の大きさの蛋白を検出した。以上のことから、88kDaの前駆産物が、N-glycosylationを経て112kDaの最終産物となり、おそらくproteaseによって切断されヘテロダイマーを形成することが示唆された。

【総括】

HHV-6 gBに最も高いホモロジーを有するHHV-7 gB相同遺伝子を同定した。その隣接する遺伝子との位置関係は、 β -ヘルペスウイルス亜科に属するHHV-6、HCMVと同様であった。この遺伝子がコードするウイルス蛋白は、HHV-7感染細胞中に認められ、ウイルス中和能を誘導した。この蛋白は、N-glycosylation siteに糖鎖が付加される糖蛋白であると考えられ、他の β -ヘルペスウイルスのgBと同様2つに切断され、プロセッシングされることが判明した。

論文審査の結果の要旨

本研究は新しいヒトヘルペスウイルス7 (HHV-7) の表面蛋白である糖蛋白gBの同定と蛋白発現を行い、更にgBの感染細胞内での成熟動態と生物学的特性について検討したものである。HHV-7のDNAクローニング、シーケンスを行いgB相同遺伝子が同定され、この発現蛋白に対するgB特異抗血清を用いてHHV-7感染細胞内のgBの成熟過程を解析した。その結果gBは前駆産物にN-グリコシド糖鎖が付加され、更に切断されてヘテロダイマーを形成することが示唆された。また同血清はウイルス中和能を示したことよりウイルスの細胞への感染に関わっていることが示唆された。更にHHV-7 gBと他のヘルペスウイルスgBとのホモロジー検索を行った結果、HHV-7はヒトヘルペスウイルス6及びヒトサイトメガロウイルスとホモロジーが高く β -ヘルペスウイルス亜科に属していることが示唆された。これらの研究結果はHHV-7の糖蛋白に関する初めての研究結果であり、学位論文に十分値すると認められる。