



Title	Identification and analyses of glycoprotein B of human herpesvirus 7
Author(s)	羽田, 敦子
Citation	大阪大学, 1997, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/40017
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏 名 は 羽 た あつ 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 T1 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。E8-39 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 か所ある N-glycosylation motif のうち 7 ケ所が 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 35 S-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。