

Title	Human Herpesvirus 6open Reading Frame U83 Encodes a Functional Chemokine
Author(s)	鄒, 平
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/41616">https://hdl.handle.net/11094/41616</a>
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、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

氏名	鄒 平
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 14468 号
学位授与年月日	平成11年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科病理系専攻
学位論文名	Human Herpesvirus 6 Open Reading Frame U83 Encodes a Functional Chemokine (ヒトヘルペスウイルス-6のU83遺伝子にコードされる chemokine の解析)
論文審査委員	(主査) 教授 山西 弘一  (副査) 教授 上田 重晴 教授 生田 和良

### 論文内容の要旨

#### 【目的】

ヒトヘルペスウイルス6 (HHV-6) は1986年 AIDS 患者を含むリンパ球疾患患者の末梢血リンパ球から分離され、ウイルスゲノムの解析によりヒトサイトメガロウイルス (HCMV) に近縁であり、 $\beta$ ヘルペスウイルス亜科に属する。更に HHV-6 は生物的、分子生物学的および免疫学的特徴から、2つの型 (HHV-6 A, HHV-6 B) に分けられている。HHV-6 B は突発性発疹の原因ウイルスであることが明らかにされ、初感染で主として CD 4 陽性 T 細胞に感染した後、マクロファージに潜伏する。HHV-6 B の全塩基配列の決定の中で、約 161kb のゲノム上に 1 つの chemokine homolog (U83) 遺伝子を見出した。ウイルスが宿主に侵入すると宿主は非特異的、特異的な生体防御機構を動員してウイルスを排除しようとする。一方、ウイルスは宿主での生き残りのために生存戦略をもって対抗する。最近、いくつかのウイルスが molecular piracy と mimicry を利用し宿主防御機構を回避するという報告がされている。今回、HHV-6 B の chemokine 遺伝子 U83 について機能を明らかにする目的で研究を行った。

#### 【方法ならびに成績】

感染細胞中の U83 遺伝子 mRNA 構造や動態を解析するために、突発性発疹患者の末梢血リンパ球から分離した HHV-6 B HST 株を用いて PHA 処理した臍帯血単核球 (CBMC) に感染させ、蛋白質合成阻害剤サイクロヘキシミッド (CHX) あるいは DNA 合成阻害剤であるフォスフォノ酪酸 (PFA) 存在下及び非存在下で、Total RNA を AGPC 法により抽出し、RT-PCR 法と RACE 法により検討した。その結果、U83 cDNA は約 1 Kb であり、U83 ORF は 345bp で 113 アミノ酸残基からなる蛋白質をコードし、3' 末端の noncoding region には polyA シグナル (AATAAA) と mRNA destabilization シグナル (ATTTA) が存在した。N 末端 20 アミノ酸残基は疎水性でシグナル peptide と予測され、chemokine 相当位置に cystein 残基が存在した。HST 感染細胞の U83 mRNA は CHX または PFA 存在下で検出されなかった。この結果により HHV-6 B の U83 は後期遺伝子をコードすることが示唆された。

感染細胞中の U83 遺伝子の発現を解析するために、U83 遺伝子産物の C 末端 18-112 アミノ酸をコードする DNA 断片を PCR にて増幅し、pGEX-3 X に組み込んだ。GST-U83 融合蛋白質を大腸菌で誘導発現させ、精製して家兎に免疫した。免疫血清より抗 U83 抗体を ImmunoPure (A) IgG purification kit (Pierce) を用いて精製した。次に、抗 U83 抗体を用いて IFA 法により HSF 株を感染させた MT 4 細胞の U83 蛋白発現を検討した。U83 抗原は感染

細胞中に抗U83抗体で細胞質が染色されたが、免疫前血清では染色されなかった。PFA を処理した状況ではU83蛋白は感染後48時間においてもIFA で検出されなかった。これらの結果よりU83蛋白質は後期蛋白質であることをさらに確認した。

最後にU83蛋白質の活性を解析するために、U83遺伝子産物をコードするDNA断片をpEF-Fc vector に組み込み、transfect したCOS7細胞で大量発現させ、培養上清を回収、精製した。蛋白質は更にSDS-PAGEにて電気泳動し、Coommasie 染色した結果、2つ分子量の異なるbandが検出された。更にそれぞれのbandのN末端アミノ酸配列決定を行った結果、N末端は同じでposition21から開始することが明らかになった。次に、精製されたU83-Fc融合蛋白質を用いて、THP-1細胞内Ca<sup>2+</sup> fluxや遊走活性を調べた。U83-Fc蛋白質100nMでTHP-1細胞内Ca<sup>2+</sup> fluxが検出されたが、対照として用いたFas-Fc蛋白質100nMはTHP-1細胞内Ca<sup>2+</sup> fluxが検出されなかった。次いでTranswell遊走assayを用いてTHP-1細胞の遊走活性テストを行った結果、U83-Fc蛋白質はTHP-1細胞の遊走活性を誘導し、100nMで最大の効果のある典型的な用量反応曲線を示した。これらの結果よりU83蛋白質はTHP-1細胞でCa<sup>2+</sup> fluxや遊走活性を誘導されることが明らかになった。

#### 【総括】

HHV-6 BのU83遺伝子はウイルス chemokine をコードし、実際にHHV-6 Bの感染細胞ではU83蛋白質が後期に発現していることが示唆された。さらに、U83蛋白質により単核球細胞系のTHP-1細胞でCa<sup>2+</sup> fluxや遊走作用を誘導することが明らかとなった。HHV-6 Bがコードしているウイルス chemokine U83によるウイルス感染細胞中での生物学的作用は今のところ未だ明らかにされないが、一つの可能性としてはU83蛋白質は感染細胞外に分泌され、非感染の白血球を感染細胞の部位に遊走させ、ウイルスが他の細胞に感染しやすくなることが考えられHHV-6の病原性や持続感染を研究する上に非常に興味深いと考えられる。

#### 論文審査の結果の要旨

ヘルペスウイルスは chemokine 遺伝子を含む宿主遺伝子をウイルス遺伝子の中に取り込んでいる。本研究では、宿主 chemokine 遺伝子と相同性を有するヘルペスウイルス-6, variant B (HHV-6 B) 遺伝子について、ウイルス感染細胞における発現動態と機能解析を行ったものである。HHV-6 BのU83遺伝子は113アミノ酸からなる蛋白をコードし、N末端20アミノ残基はシグナル peptide であることが明かとなった。また、RT-PCR法やIFA法の解析により、U83蛋白は細胞質に局在し、ウイルス感染の後期蛋白質であることが明らかとなった。さらに、U83蛋白により単核球細胞系のTHP-1細胞にCa<sup>2+</sup> fluxや遊走作用を誘導することができることが判明した。HHV-6 BがコードしているU83蛋白はHHV-6 Bの感染細胞の後期に分泌し、非感染細胞の白血球を感染細胞部位に遊走させ、その結果、ウイルスが感染しやすくなる可能性が考えられ、HHV-6の病原性や感染機構を研究する上において非常に興味深いものと考えられる。よって、本論文が博士(医学)の学位授与に値する。