OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Identification and Analysis of the K5 gene of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus
Author(s)	Muzammel, Haque
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41820
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	Muzammel (ムザメル) Haque (ハク)
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学位記番号	第 15256 号
学位授与年月日	平成12年3月24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	Identification and Analysis of the K5 gene of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus （カポジ肉腫関連ヘルペスウイルスK5遺伝子の同定と解析）
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】

カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス（KSHV）／ヒトヘルペスウイルス8（HHV8）は、1994年にカポジ肉腫から分離された新しいγヘルペスウイルスである。全長約140kbのゲノムには80以上の遺伝子がコードされ、またこれらのなかにはIL6やMIPなどのケモカイン／サイトカインをはじめ、様々な宿主相同遺伝子が含まれる。このウイルスはカポジ肉腫だけでなくprimary effusion lymphoma（PEL）やmulticentric Castleman's disease（MCD）の発生にも関与していることが示されているが、その機構は未だ明らかではない。病態を解明するにはそれぞれのウイルス遺伝子がどのように機能しているのかを理解することは大変重要な課題である。我々はHHV8／KSHV陽性細胞であるPEL細胞株BCBL－1をTPAで処理しウイルス蛋白を誘導し全細胞抽出物でマウスを免疫し種々のモノクローナル抗体を得た。その一つ（MAb328C7）が抗K5抗体であることが判明した。今回我々はこの抗体、MAb328C7を用いてHHV8／KSHVK5遺伝子の解析を行った。

【方法と結果】

BCBL－1をTPAによりウイルスの溶解複製を誘導し全細胞抽出液を調整、これをマウスに免疫し約50個のハイブリドーマを得た。同様のBCBL－1細胞から作製したλgt11cDNAライブラリーをスクリーニングした結果、これらのうちの一つ（MAb328C7）がK5遺伝子産物と反応することが判明した。分子生物学的手法によりK5遺伝子全長を得、また発現がどのように制御されているかをRNA、蛋白質のレベルで検討した。細胞内局在の検討には免疫系蛍光抗体法（immunofluorescent assay）や免疫電子顕微鏡法を用いた。

RACE（rapid amplification of cDNA ends）法によりK5mRNAの5'及び3'端を決定し、RT-PCR法により、K5cDNA全長を得た。K5mRNAはORFの上流に一つのイントロンを有する全長約1.2kbの分子であることが判明した。コードする蛋白の全長は256アミノ酸で、ring fingerと呼ばれる転写因子によくみられるモチーフを有し転写に関わる因子としての可能性が示唆された。

K5遺伝子全長をほ乳類発現ベクターに組み込み、Cos7に遺伝子導入しIFAで検討した結果、MAb328C7はK5遺伝子産物を特異的に認識した。Cos7細胞への遺伝子導入による発現、TPAで誘導したBCBL1における発現は細胞質への局在を示した。共焦点レーザースキャン顕微鏡、免疫電子顕微鏡による観察でも、K5遺伝子産物は細胞質内に局在し、小胞体膜に介在することが確認された。

ウエスタンブロット法による解析では約36kdの単一のバンドとして認められたが、予想分子量28kd より大きく何らかの修飾を受けているものと考えられた。

時間的な発現パターン解析によるとウエスタンブロット法では約4時間で、IFA では約2時間で発現が誘導され、時間的な発現パターンは前初期（IE）遺伝子に匹敵するものと考えられた。この発現はヘルペスウイルス DNA 合成阻害剤である phosphonoformic acid（PFA）にて抑制されず、蛋白合成阻害剤 cycloheximide（CHX）による蛋白合成抑制と RNA 合成阻害剤 actinomycinD とを組み合わせた実験でも発現が観察された。RNA レベルの検討は TPA 誘導後12時間で行ったが、PFA では発現が抑制されなかった。CHX はやや毒性が強く33μg／ml 以上では解析が困難であったが10μg／ml で初期遺伝子の一つと考えられるK9遺伝子が抑制されるのに対しK5遺伝子の発現は認められた。これらの結果はK5遺伝子が前初期遺伝子として発現し機能していることを示すものと考えられた。

【総括】

1．HHV8／KSHVK5遺伝子産物に対するモノクローナル抗体を確立した。

2．K5遺伝子産物はウエスタンブロット法では予想分子量（28kd）より大きい約36kd のバンドとして同定されるため何らかの修飾を受けているものと考えられた。

3．K5遺伝子の発現は TPA 誘導後約2時間後より認められ、薬剤による抑制実験は前初期遺伝子の発現パターンを示した。

4．K5遺伝子の細胞内局在は小胞体膜に認められたが、前初期遺伝子として発現すること、転写因子の motif の一つである ring fingermotif をもつことなどは転写制御因子として機能することを示唆しているものと考えられた。

論文審査の結果の要旨

カポシ肉腫関連ヘルペスウイルス（KSHV）は1994年に発見されたヘルペスウイルスでカポジ肉腫の原因ウイルスである。本研究では KSHV の遺伝子のひとつであるK5遺伝子の解析を行った。まず KSHV 感染細胞をマウスに免疫しK5遺伝子産物に特異的な単クローン抗体を得て、K5遺伝子産物の性状解析を行った。まず RACE 法によりK5 mRNA の5'及び3'末端を決定し、RT-PCR 法によりK5 cDNA 全長を得た。K5 mRNA は ORF の上流に一つのイントロンを有する全長約1.2kb の分子であることが判明した。コードする蛋白の全長は256アミノ酸で、ring finger と呼ばれる転写因子によくみられるモチーフを有し転写に関わる因子としての可能性が示唆された。この遺伝子の Cos 7 細胞への遺伝子導入による発現、TPA で誘導した BCBL 1 における発現はこの抗原の細胞質への局在を示した。共焦点レーザースキャン顕微鏡、免疫電子顕微鏡による観察でも、K5遺伝子産物は細胞質内に局在し、小胞体膜に介在することが確認された。更にウエスタンブロット法によりK5蛋白は約36kDa の分子量を有し、約2時間で発現が誘導され、この発現はヘルペスウイルス DNA 合成阻害剤である phosphonoformic acid にて抑制されず、蛋白合成阻害剤 cycloheximide による蛋白合成抑制と RNA 合成阻害剤 actinomycinD とを組み合わせた実験でも発現が観察された。これらの結果はK5遺伝子が前初期遺伝子として発現し機能していることを示すものと考えられた。これらの結果は世界に先駆けて明らかにされたことであり、今後の研究の発展に大きく貢献すると思われ、学位の授与に値するものと考えられる。