



Title	The R3 Region, One of Three Major Repetitive Regions of Human Herpesvirus 6, Is a Strong Enhancer of Immediate-Early Gene U95
Author(s)	武本, 真清
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43898
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	武もとまきや 眞清
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第17622号
学位授与年月日	平成15年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科分子病態医学専攻
学位論文名	The R3 Region, One of Three Major Repetitive Regions of Human Herpesvirus 6, Is a Strong Enhancer of Immediate-Early Gene U95. (HHV-6 ゲノムの主要繰り返し領域 R3 は前初期遺伝子 U95 の発現を増強する)
論文審査委員	(主査) 教授 山西 弘一 (副査) 教授 生田 和良 教授 塩田 達雄

論文内容の要旨

[目的] ヒトヘルペスウイルス 6 (HHV-6) は 100 個前後の遺伝子を持ち、感染時にそれらの遺伝子がカスケード様に発現することによって、効率の良いウイルス産生を行っている。遺伝子は前初期、初期、後期遺伝子に分類されるが、中でも前初期遺伝子はこのようにウイルス複製の開始を担う重要な因子であるが、今までその発現機構は全く明らかにされていない。そこで本研究ではヘルペスウイルスの中でも HHV-6 と HHV-7 だけに特有な前初期遺伝子 U95 に着目して、その発現機構の解明を目的として実験を行った。

[方法ならびに成績] まず HHV-6 を T 細胞株の MT-4 に感染させ、経時的に抽出した RNA を用いてノーザンプロットを行った。その結果 4.3 kb の転写産物が感染後 4 時間から発現し、8 時間でピークに達していることが明らかとなった。またタンパク合成阻害剤であるシクロヘキシミドで処理しても U95 mRNA は RT-PCR によって検出されたため、この遺伝子が実際に前初期遺伝子であることが確認された。次に U95 のプロモーター領域を決定するために遺伝子の構造を明らかにしたところ、興味深いことに予想より 1.6 kb 離れた位置に転写開始点が存在していた。この遺伝子からは *in vitro* 転写・翻訳によって 120 kDa のタンパクが翻訳され、感染細胞より免疫沈降によって得たタンパクと分子量が一致したため、この遺伝子が完全長であると認定した。プライマー伸長法を行って正確な転写開始点を決定したところ、そこから 220 bp 上流に R3 領域が存在した。R3 領域は HHV-6 ゲノム上に存在する主要繰り返し領域の一つであり、繰り返し配列中に様々な転写因子結合モチーフが存在するためエンハンサーとしてのはたらきが予想されてきたが、これまでその機能は一切不明であった。今回我々は R3 が U95 の遺伝子発現に関与する可能性についてレポーターアッセイを行って検討した。まず R3 領域 490 bp までを含む U95 プロモーター (pU95P-710) は、R3 領域を含まないプロモーター (pU95P-186) よりも 15 倍高い活性を示した。このことは R3 領域が U95 の転写レベルの活性化に強く関与していることを示す結果であった。さらに $I\kappa B\alpha$ 発現プラスミドを共発現することによってプロモーター活性が 10 分の 1 近くにまで抑えられたことから、R3 ユニット内に存在する NF- κ B 配列が重要な役割を果たしていることが示唆された。そこでゲルシフトアッセイを行った結果、実際にこの NF- κ B 配列に対して p50 と

c-Rel が結合することが確認された。R3 領域を構成する 24 個の繰り返しユニットを、NF- κ B 配列の保存・非保存によって分類すると、NF- κ B 配列を保存した R3 ユニットは U95 側に有意に連続していることが明らかとなった。この NF- κ B 配列の連続性が U95 の強力なプロモーター活性に重要であると考えられ、このことは NF- κ B 配列に変異を導入した R3 ユニットの連続では活性が上昇しないことからも示唆された。

[総括] 以上の実験結果より、前初期遺伝子 U95 の発現制御はこれまで機能不明であった HHV-6 ゲノムの繰り返し領域 R3 によって担われており、分子レベルでは NF- κ B が重要であることが明らかとなった。一般に HHV-6 感染によって早期に NF- κ B シグナルが活性化されることが知られているが、今回の結果と照らし合わせると、このことは U95 の発現の増強に非常に合目的であると考えられる。また U95 プロモーター活性は T 細胞系で安定して高く、CMV プロモーター活性をも大きく凌ぐため、T 細胞に限定した用途において非常に高い有用性を備えていると考えられる。

論文審査の結果の要旨

ヒトヘルペスウイルス 6 (HHV-6) のゲノムに存在する繰り返し領域 R3 は、AP2 や NF- κ B などの転写因子結合配列を多く含むことからエンハンサーとしての機能が予測されてきたが、本研究は初めてその機能を証明した。前初期遺伝子 U95 はその詳細な機能はまだ不明であるが、核内で Major Immediate-early (MIE) タンパクと共に局在を示すことから、transactivation や DNA replication に関与する重要な因子であることが予想され、その発現制御機構はウイルス学的に大きな意義を持つ。また今回発見された U95 エンハンサープロモーターは、従来 T 細胞系で活性の低かった CMV MIE エンハンサープロモーターに代わる強い活性を持ち、その応用面での有用性にも期待が持たれる。

本研究の成果は、HHV-6 前初期遺伝子の発現制御機構の解明に寄与するものであり、学位の授与に値すると考えられる。