The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Human Herpesvirus 6 Immediate-Early 2 Protein Interacts with Heterogeneous Ribonucleoprotein K and Casein Kinase 2
Author(s)	嶋田, 和也
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45355
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	嶋　田　和　也（しま　だ　かず　や）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　１８４７１　号
学位授与年月日	平成 16 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	Human Herpesvirus 6 Immediate-Early 2 Protein Interacts with Heterogeneous Ribonucleoprotein K and Casein Kinase 2 （ヒトヘルペスウイルス６前初期遺伝子２は hnRNPK 及び CK2 と相互作用する）
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]

ヘルペスウイルスでは、前初期、初期、後期遺伝子がカスケード様に発現することにより、効率的にウイルス産生を行っている。前初期、初期、後期遺伝子は、それぞれ調節タンパク質、DNA 複製に関わるタンパク質、構造タンパク質をコードしている。

単純ヘルペスウイルスに代表されるα-ヘルペスウイルスでは、転写の段階でこのカスケードが調節されている。しかしながら、ヒトサイトメガロウイルス（HCMV）及びヒトヘルペスウイルス 6（HHV-6）を含むβ-ヘルペスウイルスでは、転写のカスケードが明確ではなく、転写後調節が重要である、ということが示唆されてきた。中でも前初期遺伝子はウイルスの複製の開始を担う重要な因子であり、転写後調節に関与すると考えられる。

そこで、HHV-6 の前初期遺伝子 immediate-early 2（IE2）による転写後調節の可能性を想定して、IE2 が細胞内で相互作用するタンパク質の同定を、yeast two-hybrid 法によって行った。スクリーニングには、HHV-6（HST 株）を感染させた PBMC から得た cDNA library を用い、IE2 が相互作用するウイルス側及び宿主側の因子を明らかにすることを目的とした。

[方法ならびに成績]

HHV-6 の IE1 は、exon1,2,3,4,5 の５つのエクソンから構成され、そのタンパク質は exon3,4,5 にコードされている。また、IE2 は、IE1 と exon1,2,3,4 を共有し、exon5 の下流の exon6 より構成され、タンパク質は exon3,4,6 にコードされている。

この IE2 タンパク質のうち、5'末端の 95 アミノ酸、及び 3'末端を欠く cDNA を yeast の発現ベクターに組み込んで、yeast two-hybrid 法によりスクリーニングを行った。

その結果、cDNA ライブラリーのサイズは、3×10^5 で、trp^+、leu^+、his^+ の表現型を示したクローンは、65 個、そのうちβ-gal assay で陽性と判定されたものは 19 クローンあった。それらをシークエンスした結果、hnRNP K が３クローン、CK2β が２クローンについて、IE2 との特異的相互作用が示された。

heterogeous nuclear ribonucleoprotein K（hnRNP K）は、核・細胞質間をシャトリングしており、pre-mRNAのプロセシング及び輸送に関与し、転写因子としての機能があることが知られている。一方、casein kinase 2（CK2）は、セリン・スレオニンキナーゼであり、ユビキタスに存在するタンパク質リン酸化酵素であることが知られている。さらに、βサブユニットにはそれらの機能に対する制御能が認められている。これら２種類の遺伝子は、α-ヘルペスウイルス亜科に属する単純ヘルペスウイルス１型（HSV-1）の前初期遺伝子 ICP27 とのタンパク質間相互作用が報告されており、ヒトヘルペスウイルス 6B と単純ヘルペスウイルスの前初期遺伝子において保存されている機能が見出された。

また、IE2 との相互作用を確認するために、GST pull-down assay, coimmunoprecipitation（Co-IP）、及び細胞内での局在を検討した。その結果、hnRNP K との相互作用は、GST pull-down assay, Co-IP で確認できた。また、IE2 と hnRNP K を Cotransfection した実験から、核内で共局在することが確かめられた。CK2β に関しては、GST pull-down assay において相互作用が確認できた。さらに、IE2 と CK2β を Cotransfection した実験から、hnRNP K と同様に核内で共局在することが確かめられた。

また、IE2 と相互作用を示す部位を検討するために、hnRNP K 及び CK2β の truncation を作製し、再度 yeast two-hybrid を行った。その結果、HSV-1 の ICP27 とは異なる部位で相互作用していることが示された。

[総括]

以上の結果から、HHV-6 IE2 が hnRNP K 及び CK2β と結合することが示された。

また、IE2 がこれらの細胞内因子と相互作用することによって、IE2 が細胞内因子及びウイルス因子の発現を制御し、転写後調節因子としての役割を担っている可能性が示唆された。

さらに、hnRNP K 及び CK2β は、HSV-1 の前初期遺伝子 ICP27 とのタンパク質間相互作用が報告されており、ヒトヘルペスウイルス 6B と単純ヘルペスウイルスの前初期遺伝子において保存されている機能が見出された。

論文審査の結果の要旨

本研究は、ヒトヘルペスウイルス 6（HHV-6）の前初期遺伝子 IE2 の Yeast two-hybrid 法を用いて、相互作用するタンパク質を同定した論文である。HHV-6 は、突発性発疹の原因ウイルスであり、主にリンパ球で感染増殖する。ほとんどのヒトが幼児期に感染し、その後は宿主に潜伏感染していると考えられているが、AIDS、白血病や移植患者等の免疫抑制状態で再活性化を起こすことが知られている。

一般的に、ヘルペスウイルスでは、前初期、初期、後期遺伝子がカスケード様に発現することにより、効率的にウイルス産生を行っている。しかしながら、HHV-6 では、これらの転写のカスケードが明確ではなく、転写後調節が重要であることが示唆されてきた。中でも前初期遺伝子はウイルスの複製の開始を担う重要な因子であり、転写後調節に関与すると考えられる。

本研究では、HHV-6 IE2 が相互作用する因子を、yeast two-hybrid 法を用いて検索した結果、heterogeneous ribonucleoprotein K（hnRNP K）及び casein kinase 2β subunit（CK2β）と相互作用することを明らかにした。hnRNP K は、pre-mRNA のスプライシングに関与する重要な因子であり、IE2 と hnRNP K が相互作用することによって IE2 が転写後調節に関与している可能性を示す、という新しい知見を提供し、学位の授与に値すると考えられる。