

Title	ヒトヘルペスウィルス7 遺伝子 U47 がコードする糖タンパクの性状と存在様式に関する研究
Author(s)	定岡, 知彦
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/46413
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"〉 大阪大学の博士論文について 〈/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	定岡知彦
博士の専攻分野の名称	博士(歯学)
学位記番号	第 20213 号
学位授与年月日	平成 18 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 歯学研究科統合機能口腔科学専攻
学位論文名	ヒトヘルペスウイルス 7 遺伝子 U47 がコードする糖タンパクの性状と存在様式に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 由良 義明 (副査) 教授 豊澤 悟 助教授 永田 英樹 助教授 中原 寛和

論文内容の要旨

【目的と意義】 ヒトヘルペスウイルス 7 (HHV-7) は、ヒトサイトメガロウイルス (HCMV)、ヒトヘルペスウイルス 6 (HHV-6) と同じく β -ヘルペスウイルス亜科に属し、主として CD4+ T 細胞において感染、増殖することができる T リンパ球向性のウイルスである。初感染は乳幼児期であり、多くは不顕性感染であるが、一部は突発性発疹として発症する。成人のほぼ 100% がその抗体を有し、健康人の唾液よりもウイルスが分離される。

すべてのヒトヘルペスウイルスにはエンベロープ糖タンパクである glycoprotein H, L (gH, gL) が保存されており、ウイルス粒子上で gH/gL 複合体として存在し、ウイルスが受容体に結合し、細胞へ侵入する過程でエンベロープと細胞膜の融合に大きく関与していることが知られている。HHV-7 においては、宿主レセプターとされる CD4 に結合するウイルス側リガンドが未だ同定されていないが、同じ β -ヘルペスウイルス亜科にのみ認められる glycoprotein O (gO) は近年、HCMV、HHV-6 において gH, gL とともに複合体を形成していることが報告されている。したがって、HHV-7 にも gO の homolog が存在しており、宿主レセプターのリガンドとして働く可能性が考えられる。そこで、本研究では、HHV-7 の宿主細胞への侵入機構を解明するため、HHV-7 がコードする、HCMV および HHV-6 gO の positional homolog である U47 遺伝子産物の感染細胞内での動態および機能を解析することを目的とした。

【材料と方法】 HHV-7 ウイルスは研究室株である KHR 株を用いた。実験に使用した細胞は SupT-1 細胞であり、HHV-7 が感染、増殖することが唯一可能な T-cell line である。HHV-7 感染を SupT-1 細胞に感染させ、細胞変性効果、および後期タンパクの発現が確認された時点で細胞を回収した。回収した細胞より、RNA を抽出し、RT-PCR により cDNA を作製した。gO, gH をコードすると考えられる遺伝子領域内 (ORF U47, U48) にプライマーを設定し、PCR により目的とする領域を増幅させベクターにクローニング後、塩基配列を確認した。タンパク発現ベクターにそれらの遺伝子を再度クローニングし、大腸菌内で発現させ、タンパクを精製した。精製したタンパクを抗原として BALB/c マウスに免疫し、脾臓細胞との hybridoma を作製し数種のモノクローナル抗体を得た。各モノクローナル抗体が各々の遺伝子産物を認識することは 293T 細胞を用いた一過性の遺伝子発現系により確認した。これらの得られたモノクローナル抗体を用いて、ORF U47 遺伝子産物の HHV-7 感染細胞内での局在、発現時期、糖鎖修飾、またウイルス感染細胞内及び、ウイルス粒子上での gH との相互作用について検討した。

【結果】 ORF U47 (gO) 遺伝子産物に対するモノクローナル抗体 (抗 gO 抗体) により HHV-7 感染細胞内では

49 kDa と 51 kDa の band が検出された。(遺伝子配列より予測されるタンパクの大きさは 37 kDa である。) HHV-7 ORF U47 遺伝子産物は、その塩基配列より、11 箇所の N 結合型糖鎖修飾部位を持つことが予測された。そこで endoglycosidase を用いてその糖鎖付加について検討した。49 kDa と 51 kDa の band は、Endo H 処理により、35 kDa、PNGase F 処理により、34 kDa に消化され、N 結合型糖鎖の修飾を受けた糖タンパクであることが証明された。さらに ORF U47 遺伝子産物は、精製したウイルス粒子においても検出され、主に 51 kDa の大きさを示し、endoglycosidase 処理においても感染細胞内と同様の結果を示した。次に DNA 合成阻害剤である phosphonoformic acid (PFA) を用いて、ORF U47 遺伝子産物発現時期の検討を行った。免疫蛍光抗体法 (IFA) およびウエスタンブロットにより感染細胞においては PFA 添加によってその発現は抑制され、U47 遺伝子産物は、感染後期に発現することが判明した。一般的に糖鎖の付加は endoplasmic reticulum (ER) や Golgi apparatus で起こることが知られており、U47 遺伝子産物の局在を調べるため cis-Golgi のマーカーである抗-lectin 抗体と抗 gO 抗体との二重染色を行った結果、共局在することがわかった。また gO、gH に対するモノクローナル抗体を用いた感染細胞溶解物における免疫沈降法により、gH の抗体により、gO が共沈することが判明した。

【考察】 HHV-7 感染細胞では様々な糖タンパクが発現していることが知られており、今回ウイルス粒子上に存在する糖タンパクの役割を研究するために HCMV、HHV-6 gO の positional homolog である ORF U47 遺伝子産物について検討した。ORF U47 遺伝子産物は 313 アミノ酸よりなり、11 の潜在的 N 結合型糖鎖修飾部位、6 個のシステイン残基を含み、予測されるサイズは約 37 kDa であることが予測された。今回作製したモノクローナル抗体を用いた解析により、感染細胞内において U47 遺伝子産物は、49 および 51 kDa の大きさであり、N 結合型糖鎖修飾を受けた、感染後期に発現する糖タンパクであることが示され、HCMV、HHV-6 と同様に我々は、glycoprotein O (gO) とした。gO は精製ウイルス粒子においても確認され、ウイルス粒子に存在するエンベロープ糖タンパクであることが明らかとなった。さらに HCMV、HHV-6 の gO と同様、ウイルス侵入過程における膜融合に必須である gH とも複合体を形成することも判明し、HHV-7 における gO が、感染過程とくに侵入過程において重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究は、ヒトヘルペスウイルス 7 (human herpesvirus 7: HHV-7) の宿主細胞への侵入機構を解明するために、HHV-7 がコードする糖タンパクである glycoprotein O (gO) の性状および存在様式を解析したものである。

その結果、gO は感染後期に発現しウイルス粒子に存在する糖タンパクであり、さらにウイルスの宿主細胞への侵入過程において必須である glycoprotein H と複合体を形成することが明らかとなった。

以上のことより、本研究は HHV-7 の性状を明らかにするとともに、宿主細胞への侵入過程における重要な知見を与えるものであり、博士 (歯学) の学位授与に値するものと認める。