



|              |                                                                                                                                                                                                                    |
|--------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title        | Varicella-Zoster Virus Glycoprotein M Homolog Is Glycosylated, Is Expressed on the Viral Envelope, and Functions in Virus Cell-to-Cell Spread                                                                      |
| Author(s)    | 山岸, 義晃                                                                                                                                                                                                             |
| Citation     | 大阪大学, 2009, 博士論文                                                                                                                                                                                                   |
| Version Type |                                                                                                                                                                                                                    |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/49972">https://hdl.handle.net/11094/49972</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">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="#">ご参照ください</a> 。 |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

|               |                                                                                                                                                                                                                               |
|---------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏 名           | やま ぎし よし あき<br>山 岸 義 晃                                                                                                                                                                                                        |
| 博士の専攻分野の名称    | 博 士 (医 学)                                                                                                                                                                                                                     |
| 学 位 記 番 号     | 第 2 2 5 9 2 号                                                                                                                                                                                                                 |
| 学 位 授 与 年 月 日 | 平成 21 年 2 月 19 日                                                                                                                                                                                                              |
| 学 位 授 与 の 要 件 | 学位規則第 4 条第 2 項該当                                                                                                                                                                                                              |
| 学 位 論 文 名     | Varicella-Zoster Virus Glycoprotein M Homolog Is Glycosylated,<br>Is Expressed on the Viral Envelope, and Functions in Virus Cell-<br>to-Cell Spread<br>(水痘帯状疱疹ウイルス糖タンパク gM ホモログは糖修飾され、ウイルス<br>エンベロープ上に発現し、ウイルス細胞間伝播において機能する) |
| 論 文 審 査 委 員   | (主査)<br>教 授 大 菌 恵一<br>(副査)<br>教 授 松 浦 善 治 教 授 生 田 和 良                                                                                                                                                                         |

## 論 文 内 容 の 要 旨

〔 目 的 〕 水痘帯状疱疹ウイルス (VZV) は水痘および帯状疱疹の病原因子であり、広くヒトに蔓延している。一方で、VZV は強く細胞に関連し、ウイルス増殖が比較的遅いことから、他のアルファヘルペスウイルスにくらべ研究は遅れていた。ヘルペスウイルスゲノムは様々な糖タンパクをコードしているが、ヘルペスウイルスの中で保存されているものは gB, gH, gL, gM, gN の 5 つに限られている。ヘルペスウイルスの gM は 6-8 回膜貫通型の膜糖タンパクで、いくつかのウイルスで gN と複合体を形成することが分かっている。gB, gH/gL は細胞培養系での増殖に必須である反面、gM は保存されているにもかかわらず、HSV 等いくつかのアルファヘルペスウイルスにおいて非必須遺伝子である。一方で、その欠損変異体はウイルスにより細胞間伝播の障害、ウイルス粒子形成の障害、cell free virus の細胞への侵入の障害など異なる表現型を示す。これらのことから gM の機能はウイルスにより異なることが予想される。

VZV の gM については、未だ検討されていない。そこで本研究では VZV gM に対する特異抗体を作成し、水痘帯状疱疹ウイルス岡株 (p0ka) の全ゲノムを組み込んだ Bacterial artificial chromosome (p0kaBAC) において gM 遺伝子を欠損させた変異体ウイルス rp0kaΔ gM を作成し、水痘帯状疱疹ウイルスの gM の機能解析を行った。

〔 方法ならびに成績 〕 まず、VZV gM の感染細胞中およびウイルス粒子中の存在を確認するため、組換え VZV 岡株 (rp0ka) 感染細胞および精製 rp0ka ウイルス粒子を VZV gM 特異的抗体を用いて Western blot に供した。VZV gM は感染細胞中では、37kDa と 42-48kDa のバンドで検出されたが、ウイルス粒子中では成熟した 42-48kDa のバンドのみが検出された。同様のサンプルを endo H および PNGase F を用いて消化し Western blot を行ったところ、PNGase F でのみ消化されることから VZV gM は複合型糖鎖修飾を受けウイルス粒子に取り込まれることが分かった。

次に、共焦点顕微鏡をもちいて VZV gM の感染細胞内の局在を検討した。感染力価 (MOI) 0.01 で感染 48 時間後の感染細胞を用い検討した。VZV gM はゴルジ器官のマーカーである GM130 および *trans* Golgi network (TGN) のマーカーである p230 と強く共局在をしめし、主にゴルジ器官と TGN に局在していた。

次に我々は感染細胞中でのgMの機能を検討するため、p0kaBACに対して、pGET/Rec法を用いてgM遺伝子欠損変異体（p0kaBACΔgM）を作成した。作成したBACをMRC5細胞に遺伝子導入し、ウイルス粒子rp0kaBACΔgMを再構成した。再構成されたウイルス中のBAC部分をCre recombinaseを用いて取り除きgM欠損ウイルスrp0kaΔgMとした。rp0kaとrp0kaΔgMをMRC5細胞及に感染させ、ウイルスの増殖に与える影響を検討した。

MRC5細胞にMOI 0.005にてrp0kaおよびrp0kaΔgMを感染させ、10日間培養しplaque形成能を検討した。rp0kaΔgMのplaque（ $0.35\text{mm}^2 \pm 0.01\text{mm}^2$ ）はrp0kaのplaque（ $4.09\text{mm}^2 \pm 0.37\text{mm}^2$ ）に比してplaque形成能が約90%減弱していた。さらに細胞間伝播を検討するためrp0kaΔgMおよびrp0kaを用いてinfectious center assayを行った。感染後5日目の時点でウイルス感染細胞数はrp0kaΔgMはrp0kaにくらべ約半数程度にとどまっており、plaque形成能の減弱化は細胞間伝播の障害によるものと考えられた。

感染細胞内でのrp0kaΔgMの障害を検討するため、電子顕微鏡下にて感染細胞を検討した。rp0kaΔgMは電子顕微鏡下で、野生型ウイルスには認められない、高電子密度の物質を含んだ異常な粒子が認められた。一方で、未熟なL particleと呼ばれるエンベロープをもった粒子は、野生型ウイルス、gM欠損変異体ウイルス双方の感染細胞の細胞膜上に認められた。このことより、ウイルス粒子の2次エンベロープ形成は障害されないと考えられた。

〔 総 括 〕 これらの結果からVZV gMはウイルス増殖には必須ではないが、ウイルス増殖に重要な因子であることが明らかになった。さらに、VZV gMがウイルス増殖にはたしている役割は、ウイルス粒子の2次エンベロープ形成においてよりは、むしろ細胞間伝播に重要な機能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

ヘルペスウイルス科のウイルスにおいて糖タンパクgMは保存されている。一方で、その欠損はウイルスにより細胞間伝播能、ウイルス粒子形成、cell free virusの細胞への侵入機構の障害など異なる表現型を示し、ウイルスにより役割が異なることが予想される。

本研究では水痘帯状疱疹ウイルス(VZV)gMの解析のため、BAC法を用いgM欠損組換えVZVを作成した。gM欠損ウイルスは細胞培養系で増殖可能であり、非必須遺伝子であることを明らかにした。また、gM欠損ウイルスのプラーク形成能の検討をおこない、VZV gMが効率的なプラーク形成に重要なことを示した。gM欠損ウイルスのプラーク形成能の減弱化は細胞間伝播の減弱化と関連していた。電子顕微鏡下での観察から増殖能の減弱化は、2次エンベロープ形成の障害よりも、細胞間伝播能の障害によることを示した。本研究よりVZVのgMはウイルスの感染拡大において重要な因子であることが明らかにした。

VZV gMに関する報告は本研究が初出であり、主に細胞間伝播で感染拡大するVZV感染症の病態理解へつながり、学位の授与に値すると考えられる。