



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=" <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>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	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, Is Expressed on the Viral Envelope, and Functions in Virus Cell-to-Cell Spread (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) 教 授 大 菊 恵 一 (副査) 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は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rp0kaΔgM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。感染力値(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、pOkaBACに対して、pGET/Rec法を用いてgM遺伝子欠損変異体（pOkaBACΔgM）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rpOkaBACΔgM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rpOkaΔgMとした。rpOkaとrpOkaΔgMをMRC5細胞及び感染させ、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rpOkaおよびrpOkaΔgMを感染させ、10日間培養しplaque形成能を検討した。rpOkaΔgMのplaque ( $0.35\text{mm}^2 \pm 0.01\text{mm}^2$ )はrpOka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rpOkaΔgMおよびrpOkaを用いてinfectious center assayを行った。感染後5日目の時点でのウイルス感染細胞数はrpOkaΔgMはrpOka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。

感染細胞内のrpOkaΔgM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。rpOkaΔgM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

312

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欠損ウイルスのブラーク形成能の検討をおこない、VZV gMが効率的なブラーク形成に重要なことを示した。gM欠損ウイルスのブ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。