The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Human herpesvirus 6 envelope components enriched in lipid rafts : evidence for virion-associated lipid rafts
Author(s)	河端, 暁子
Citation	大阪大学, 2010, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/54089
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

【55】

氏　　名	河　端　暁　子（かわ　ばた　あき　こ）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　２３６２４　号
学位授与年月日	平成22年３月23日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当 医学系研究科予防環境医学専攻
学　位　論　文　名	Human herpesvirus 6 envelope components enriched in lipid rafts : evidence for virion-associated lipid rafts （ヒトヘルペスウイルス６のウイルス粒子エンベロープは脂質ラフトで構成されている）
論文審査委員	（主査） 教　授　森　　康子 （副査） 教　授　生田　和良　　教　授　松浦　善治

論 文 内 容 の 要 旨

〔　目　　的　〕

エンベロープを有するウイルスは宿主細胞への侵入や粒子形成および出芽の際にコレステロールやスフィンゴ脂質に富む膜構造である脂質ラフトを利用することが知られている。エンベロープウイルスであるヘルペスウイルスにおいてもその感染における脂質ラフトの関与がいくつか報告されている。ヒトヘルペスウイルス 6 (HHV-6) は T 細胞に好んで感染するという興味深い特徴を持ち、その塩基配列、抗原性、細胞向性などの違いにより、HHV-6A と HHV-6B の 2 つのバリアントに分けられ、HHV-6B が乳幼児の突発性発疹の原因であることが同定されている。HHV-6 もその侵入の際に細胞側の脂質ラフトが重要であること報告されているが、粒子形成および出芽における脂質ラフトの関与についての報告はない。よって本研究では、HHV-6 の粒子形成および出芽における脂質ラフトの役割を明らかにすることを目的とした。

〔　方法ならびに成績　〕

1.　<u>HHV-6 感染細胞のラフト分画における細胞側タンパク質の動態解析</u>

HHV-6 感染細胞における脂質ラフトの役割を検討するため、膜分画法を用いた実験を行った。HHV-6A (GS 株) を T 細胞株である HSB-2 細胞に遠心法により感染させ、約 96 時間後に HHV-6A 感染 HSB-2 細胞と非感染 HSB-2 細胞とを混合し、3～4 日後に 1×10^8 個の感染細胞を回収した。細胞は 4℃下で Triton-X 処理を行い、その lysate を Sucrose gradient の頂上に積み、200000×g で 16 時間遠心した。その後、分画を回収し、ウェスタンブロットに供した。その結果、HHV-6 感染下では、ラフトマーカーであるガングリオシド GM1 が多く検出された分画において、通常ラフト分画には集積しない細胞側タンパクである CD3zeta やトランスフェリンレセプターなどの集積が認められた。この現象は HHV-6 非感染細胞では認められなかった。さらに、HHV-6A の細胞側受容体である CD46 も、HHV-6 感染下ではラフト分画への集積が認められた。

2.　<u>HHV-6 感染のラフト分画におけるウイルスタンパク質の動態解析</u>

同様に、HHV-6A 感染 HSB-2 細胞からラフト分画を回収し、HHV-6 のウイルスタンパクに対する抗体を用いてウェスタンブロットを行った。その結果、ラフトマーカーである GM1 が多く検出された分画において、HHV-6 のエンベロープに存在する糖タンパクである glycoprotein H, L, Q1, Q2, O, B (gH, gL, gQ1, gQ2, gO, gB) も多く検出された。特に、gQ1 および gQ2 は、感染細胞にのみ発現し成熟ウイルス粒子には含まれない形態である、gQ1-74K および gQ2-34K はラフト分画への集積は認められなかったが、成熟ウイルス粒子に含まれる gQ1-80K および gQ1-37K が、ラフト分画に顕著に検出された。逆に、ウイルス粒子には含まれない非構造タンパクである Immediate early 1 (IE1) は、ラフト分画への集積は認められなかった。以上より、HHV-6 は粒子形成の場として脂質ラフトを利用していることが示唆された。

3.　<u>精製ウイルス粒子における細胞側タンパク質およびウイルスタンパク質の解析</u>

HHV-6 の粒子形成および出芽への脂質ラフトの関与を調べるため、成熟ウイルス粒子中に脂質ラフトが含まれているのかを検討した。HHV-6A 感染 HSB-2 細胞の上清を、ポリエチレングリコール沈殿を行って濃縮し、Nycodenz gradient を用いた分画によりウイルス粒子の精製を行った。ウイルス粒子の存在は、PCR およびエンベロープ糖タンパクに対する抗体を用いたウェスタンブロットにより確認した。ウイルスゲノムおよびウイルス糖タンパクが検出された分画において、脂質ラフトの構成分子である GM1 が検出された。この結果より、HHV-6 の成熟ウイルス粒子は脂質ラフトで構成されていることが示唆された。

〔　総　　括　〕

以上より、HHV-6 はエンベロープ糖タンパクを含む脂質ラフトを通して粒子形成および出芽している可能性が示唆された。HHV-6 はトランスゴルジネットワーク (TGN) 由来の小胞で出芽することが以前に報告されており、今回の結果より、HHV-6 の粒子形成および出芽は TGN または TGN 由来の compartment の膜に存在する脂質ラフトで行われていると考えられる。

論文審査の結果の要旨

HIV-1やインフルエンザウイルス、麻疹ウイルスなど、エンベロープを有するウイルスは、宿主細胞への侵入や粒子形成および出芽の際に、コレステロールやスフィンゴ糖脂質に富む膜構造である脂質ラフトを利用することが知られている。エンベロープウイルスであるヘルペスウイルスにおいてもその感染における脂質ラフトの関与が報告されている。ヒトヘルペスウイルス6 (HHV-6) はT細胞に好んで感染するという興味深い特徴を持ち、その塩基配列、抗原性、細胞向性などの違いにより、HHV-6AおよびHHV-6Bの2つのバリアンドに分けられる。HHV-6Bは乳幼児期における突発性発疹の原因ウイルスであることが同定されているが、HHV-6Aに関してはその病原性は未だ不明である。HHV-6において宿主細胞への侵入時における細胞膜脂質ラフトの重要性が報告されているが、粒子形成および出芽における脂質ラフトの関与についての報告はない。よって本研究では、HHV-6の粒子形成および出芽における脂質ラフトの役割を明らかにすることを目的とした。

HHV-6感染細胞における脂質ラフトの役割を検討するため、HHV-6A感染T細胞を膜分画法に供し、ラフト画分の回収を行った。ラフトマーカーであるCD59およびガングリオシドGM1が集積していた画分において、通常ラフト画分には集積しない細胞側タンパクであるCD3zetaやトランスフェリンレセプター、CD46の集積が認められた。また、この画分にHHV-6のエンベロープに存在する糖タンパクであるglycoprotein H, L, Q1, Q2, OおよびB (gH, gL, gQ1, gQ2およびgB) も検出された。特に、成熟ウイルス粒子に取り込まれるgQ1、gQ2およびgOがこの画分に検出された。さらに、HHV-6A感染細胞上清を回収し、分画法を用いてウイルス粒子の精製を行い、解析を行った。その結果、ウイルスゲノムおよびウイルス糖タンパクが検出された画分において、ラフトの構成成分であるGM1が検出された。本論文において、HHV-6のウイルス粒子エンベロープには脂質ラフトの構成成分が含まれていることが示され、HHV-6はウイルス粒子形成および出芽の場として脂質ラフトを利用している可能性が示された。よって本論文は学位論文に値すると考える。