



Identification of the Human Herpesvirus 6A gQ1 Domain Essential for Its Functional Conformation

Maeki, Takahiro

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2014-03-25

(Date of Publication)

2015-03-01

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第5986号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1005986>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博士関係)

学位論文の内容要旨

Identification of the Human Herpesvirus 6A gQ1 Domain Essential for Its Functional Conformation

ヒトヘルペスウイルス 6A gQ1 の機能的に作用するドメインの同定

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻
臨床ウイルス学
(指導教員：森 康子 教授)

前木 孝洋

【背景】

ヒトヘルペスウイルス 6 (human herpesvirus-6, HHV-6) は、 β -ヘルペス亜科に属するヒトヘルペスウイルスの 1 種である。HHV-6 は、従来、HHV-6A と HHV-6B の 2 つのバリエーションに分類されてきたが、近年、それぞれ別の種として再分類された。

HHV-6A の細胞への侵入に関与するウイルス側リガンドおよび宿主側レセプターは、既に明らかになっている。即ち、ウイルス側リガンドは、ウイルス粒子エンベロープに存在する糖蛋白 H (glycoprotein H, gH)、糖蛋白 L (glycoprotein L, gL)、糖蛋白 Q1 (glycoprotein Q1, gQ1)、糖蛋白 Q2 (glycoprotein Q2, gQ2) 複合体 (HHV-6A gH/gL/gQ1/gQ2 複合体) であること、さらにその宿主側レセプターがヒト CD46 であることが報告されている。しかし、その侵入機構についての詳細はまだまだ明らかにされていない。

【目的】

HHV-6A が細胞へ侵入する際の機構の解明を目的とする。

【方法】

HHV-6A に対する中和モノクローナル抗体を作成し、そのエピトープ同定を試みた。

具体的には、まず、HHV-6A 感染細胞から HHV-6A 粒子を精製し、UV 照射にて不活化後、マウスに免疫することでモノクローナル抗体を作製した。得られた抗体のうち、gQ1 を標的とする中和抗体を、IFA (indirect immunofluorescence antibody assay) 法及び中和試験にて選別した。さらに、様々な塩基長の、HHV-6A gQ1 の C 末端欠損変異体を作製し、IFA 法にてその中和抗体のエピトープ同定を試みた。

【結果】

1. HHV-6A gQ1 に対する中和モノクローナル抗体の作製

まず、[方法]に記載した通りに HHV-6A に対する中和モノクローナル抗体の作成を試みた。その結果、HHV-6A gQ1 を特異的に認識する(即ち、HHV-6B gQ1 は認識しない)中和モノクローナル抗体の作製に成功した(AgQ 1-1 抗体と命名)。

2. HHV-6A gQ1 の 492 ~ 504 アミノ酸の領域は AgQ 1-1 抗体の認識に必須である (Fig. 1)

次に、作成した AgQ 1-1 抗体のエピトープ同定を試みた。

具体的には、様々な塩基長の HHV-6A gQ1 の C 末端欠損変異体を作製し、IFA にて抗体への反応性を検討した(解析には、293T 細胞による一過性発現系を用いた)。その結果、504 アミノ酸までの欠損変異体には反応を示すが、492 アミノ酸以降の欠損変異体には反応を示さなかった(Fig. 1)。この結果より、gQ1 の 492 から 504 アミノ酸の領域が、AgQ 1-1 抗体の認識に必須であることが明らかとなった。

3. HHV-6A gQ1 の 494 ~ 497 アミノ酸領域は、AgQ 1-1 抗体のエピトープではないが、認識に必須の領域である (Fig. 2, 3)

1.に記載したように、AgQ 1-1 抗体は、HHV-6A gQ1 を特異的に認識した(即ち HHV-6B gQ1 を認識しなかった)。そのため、次に、HHV-6A gQ1 と HHV-6B gQ1 との間で、492 から 504 アミノ酸領域におけるアミノ酸配列比較を行った。その結果、この領域内で異なるのは、496 アミノ酸の一つ所のみであった(HHV-6A gQ1 では Q, HHV-6B では E) (Fig. 2 A)。

この結果をうけて、496 アミノ酸を E に置換した変異体、AgQ1 (Q496E)、を構築し (Fig. 2B)、IFA で AgQ 1-1 抗体への反応性を検討した。その結果、AgQ1 (Q496E)は、AgQ 1-1 抗体に反応性を示した (Fig. 3 B)。この結果より、HHV-6A gQ1 の 492 ~ 504 アミノ酸領域は AgQ 1-1 抗体のエピトープではないと考えられた。しかし、494 ~ 497 アミノ酸領域を欠損させた変異体、AgQ1 (Δ 494 - 497)、は AgQ 1-1 抗体に反応性を示さなかった。この領域で更なる解析を行うために、各アミノ酸を 1 つずつ、あるいは全てを A に置換した変異体を構築し (Fig. 2 B)、同様の解析を行った。その結果、1 つのアミノ酸の置換変異体は反応性を示したが、4 つ全て置換した変異体、AgQ1 (494AAAAA497)、は反応性を示さなかった(Fig. 3 B)。

以上の結果より、HHV-6A gQ1 の 494 ~ 497 アミノ酸領域は、AgQ 1-1 抗体のエピトープではないが、認識に重要な領域であることが明らかとなった。

4. HHV-6A gQ1 の 494 ~ 497 アミノ酸領域は、AgQ 1-1 抗体の認識に必須の領域である (免疫沈降法による確認) (Fig. 4)

次に、構築した各変異体への反応性を、AgQ 1-1 抗体を用いた免疫沈降法によって検討した。具体的には、293T 細胞に wild type gQ1 あるいは変異体 gQ1 を、gH, gL, gQ2 と共発現させ、AgQ 1-1 抗体による免疫沈降を行った。得られた試料を用いて、gQ1, gH, gL, gQ2 に対する抗体による Western blotting を行った。その結果、AgQ1 (Δ 494 - 497)および AgQ1 (494AAAAA497)ではいずれの構成要素も検出されなかった(Fig. 4)。この結果より、HHV-6A gQ1 の 494 ~ 497 アミノ酸領域は、AgQ 1-1 抗体の認識に必須の領域であることが免疫沈降法による解析によっても確認された。

5. HHV-6A gQ1 の 494 ~ 497 アミノ酸領域は、HHV-6A gH/gL/gQ1/gQ2 複合体の形成に必須である (Fig. 5)

さらに、この領域が、HHV-6A のリガンドである gH/gL/gQ1/gQ2 複合体の形成に及ぼす影響について検討を行った。具体的には、gH の抗体による免疫沈降法で上記 4.と同様の解析を行った。その結果、AgQ1 (Δ 494 - 497)および AgQ1 (494AAAAA497)では gQ1 が検出されなかった (Fig. 5)。この結果より、HHV-6A gQ1 の 494 ~ 497 アミノ酸領域は、gH/gL/gQ1/gQ2 複合体の形成に必須の領域であることが明らかとなった。

6. HHV-6A gQ1 の 494 ~ 497 アミノ酸領域は、CD46 への結合に必須である (Fig. 6)

次に、この領域が、HHV-6A の宿主側レセプターである CD46 への結合に及ぼす影響について検討を行った。具体的には、CD46 を用いた免疫沈降法で上記 4.及び 5.と同様の解析を行った。その結果、AgQ1 (Δ 494 - 497)および AgQ1 (494AAAAA497)ではどの構成要素も検出されなかった。この結果より、HHV-6A gQ1 の 494 ~ 497 アミノ酸領域は、CD46 への結合に必須であることが明らかとなった。

7. HHV-6A gQ1 の 494 ~ 497 アミノ酸領域は、HHV-6A の増殖に必須である

最後に、HHV-6A の BAC (bacterial artificial chromosome)を用いて、この領域が HHV-6A の増殖に必須であるか否かについて検討を行った。その結果、AgQ1 (Δ 494 - 497)を含む HHV-6A ゲノムからはウイルスは再構築されなかった。そして、その復帰株の再構築は可能であったことから、HHV-6A gQ1 の 494 ~ 497 アミノ酸領域は、HHV-6A の増殖に必須であることが明らかとなった。

8. HHV-6A gQ1 の 494 ~ 497 アミノ酸に相当する領域は、HHV-6B gQ1 においても細胞侵入に重要な領域である

当研究室では、以前、HHV-6B gQ1 に対する中和抗体を用いた解析結果を報告している (Journal of Virology, 2011, 85(24): 12962-71)。その報告において、HHV-6B gQ1 の、中和抗体の認識に必須の領域(HHV-6B gQ1 の 486 ~ 489 アミノ酸)を同定した。そこで、今回同定した領域との関連について検討を行った。

その結果、今回同定した HHV-6A gQ1 の領域は、以前に報告した HHV-6B gQ1 の領域に相当する領域であることが明らかとなった。即ち、今回同定した HHV-6A gQ1 の 494 ~ 497 アミノ酸領域は、HHV-6A gQ1, HHV-6B gQ1 に保存され、重要な役割を果たす領域であることが明らかとなった。

【結論】

1. 今回の解析により、HHV-6A gQ1 の 494 ~ 497 アミノ酸の領域が、以下の機能に必須かつ重要であることが明らかとなった。

- 1) 得られた AgQ 1-1 抗体による認識
- 2) リガンドである gH/gL/gQ1/gQ2 複合体の形成
- 3) レセプターである CD46 への結合
- 4) HHV-6A の複製

2. 上記領域は、HHV-6B gQ1 においても保存され、重要な役割を果たす領域であることが明らかとなった。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第2377号	氏 名	前木 孝洋
論文題目 Title of Dissertation	Identification of the Human Herpesvirus 6A gQ1 Domain Essential for Its Functional Conformation ヒトヘルペスウイルス 6A gQ1 の機能的に作用するドメインの同定		
審査委員 Examiner	主 査 堀 田 博 Chief Examiner 副 査 岡 坂 敏 朗 Vice-examiner 副 査 古 瀬 幹 夫 Vice-examiner		

(要旨は1,000字~2,000字程度)

ヒトヘルペスウイルス 6 (human herpesvirus-6, HHV-6)は HHV-6A と HHV-6B の 2 つの種に分類されている。HHV-6A の細胞侵入に関与するウイルス側リガンドは、ウイルス粒子エンベロープに存在する glycoprotein H (gH)、gL、gQ1、gQ2 複合体 (HHV-6A gH/gL/gQ1/gQ2 複合体)であり、宿主側レセプターはヒト CD46 である。しかし、その侵入機構についての詳細はまだまだ明らかにされていない。申請者らは、HHV-6A が細胞へ侵入する際の機構の解明を目的として、HHV-6A に対する中和モノクローナル抗体を作成し、そのエピトープ同定を試みた。

まず、HHV-6A gQ1 を特異的に認識する(即ち、HHV-6B gQ1 は認識しない)中和モノクローナル抗体(AgQ 1-1 抗体と命名)を作製した。そして、様々な HHV-6A gQ1 の C 末端欠損変異体を作製し、293T 細胞に発現させて、免疫蛍光法 (IFA) にて抗体の反応性を検討した。その結果、504 位アミノ酸までの欠損変異体には反応したが、492 位アミノ酸以降の欠損変異体には反応しなかった。この結果より、gQ1 の 492 位から 504 位アミノ酸の領域が、AgQ 1-1 抗体の認識に必須であることが明らかとなった。492 位から 504 位アミノ酸領域におけるアミノ酸配列比較を行ったところ、HHV-6B とは 496 位アミノ酸一ヶ所が異なるのみであった(HHV-6A gQ1 では Q, HHV-6B では E)。そこで、496 位アミノ酸を E に置換した変異体 AgQ1 (Q496E)を構築し、IFA で AgQ 1-1 抗体への反応性を検討したところ、AgQ1 (Q496E)は AgQ 1-1 抗体に反応性を示した。この結果より、HHV-6A gQ1 の 492 位~504 位アミノ酸領域は AgQ 1-1 抗体のエピトープではないと考えられた。しかし、494 位~497 位アミノ酸領域を欠損させた変異体 AgQ1 ($\Delta 494 - 497$)は AgQ 1-1 抗体に反応性を示さなかった。この領域で更なる解析を行うために、各アミノ酸を 1 つずつ、あるいは全てを A に置換した変異体を構築し、同様の解析を行った。その結果、1 つのアミノ酸の置換変異体は反応性を示したが、4 つ全て置換した変異体 AgQ1 (494AAAA497)は反応性を示さなかった。以上より、HHV-6A gQ1 の 494 位~497 位アミノ酸領域は、AgQ 1-1 抗体のエピトープではないが、認識に重要な領域であることが明らかとなった。

次に、構築した各変異体への反応性を、AgQ 1-1 抗体を用いた免疫沈降法によって検討した。具体的には、293T 細胞に wild type gQ1 あるいは変異体 gQ1 を、gH、gL、gQ2 と共発現させ、AgQ 1-1 抗体による免疫沈降を行った。得られた試料を用いて、gQ1、gH、gL、gQ2 に対する抗体による Western blotting を行った。その結果、AgQ1($\Delta 494-497$)および AgQ1(494AAAA497)ではいずれの構成要素も検出されなかった。この結果より、HHV-6A gQ1 の 494 位~497 位アミノ酸領域は、AgQ 1-1 抗体の認識に必須の領域であることが確認された。さらに、この領域が、HHV-6A のリガンドである gH/gL/gQ1/gQ2 複合体の形成に及ぼす影響について検討を行ったところ、AgQ1($\Delta 494-497$)および AgQ1(494AAAA497)では gQ1 が検出されなかった。この結果より、HHV-6A gQ1 の 494 位~497 位アミノ酸領域は、gH/gL/gQ1/gQ2 複合体の形成に必須の領域であることが明らかとなった。

次に、この領域が HHV-6A の宿主側レセプターである CD46 への結合に及ぼす影響について検討を行った。その結果、AgQ1($\Delta 494-497$)および AgQ1(494AAAA497)ではどの構成要素も検出されなかった。この結果より、HHV-6A gQ1 の 494 位~497 位アミノ酸領域は、CD46 への結合に必須であることが明らかとなった。

最後に、HHV-6A の bacterial artificial chromosome を用いて、この領域が HHV-6A の増殖に必須であるか否かについて検討を行った。その結果、AgQ1(Δ 494-497)を含む HHV-6A ゲノムからはウイルスは再構築されなかった。そして、その復帰株の再構築は可能であったことから、HHV-6A gQ1 の 494 位～497 位アミノ酸領域は、HHV-6A の増殖に必須であることが明らかとなった。

申請者の研究室では、以前、HHV-6B gQ1 に対する中和抗体を用いた解析結果を報告している。その報告において、HHV-6B gQ1 の、中和抗体の認識に必須の領域(HHV-6B gQ1 の 486 位～489 位アミノ酸)を同定した。そこで、今回同定した領域との関連について検討を行った。その結果、今回同定した HHV-6A gQ1 の領域は、以前に報告した HHV-6B gQ1 の領域に相当する領域であることが明らかとなった。即ち、今回同定した HHV-6A gQ1 の 494 位～497 位アミノ酸領域は、HHV-6A gQ1, HHV-6B gQ1 に保存され、重要な役割を果たす領域であることが明らかとなった。

以上、本研究は、HHV-6 が細胞へ侵入する際の機構の解明を目的とし、HHV-6A に対する中和モノクローナル抗体を作製し、そのエピトープ同定を試みたものであるが、今回同定した HHV-6A gQ1 の領域は、HHV-6B gQ1 にも保存され、重要な役割を果たす領域であることを明らかにしたのもとして価値ある集積と認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。