Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-04

Human herpesvirus-6A gQ1 and gQ2 are critical for human CD46 usage

Chyntia Olivia Maurine Jasirwan

(Degree)
博士（医学）

(Date of Degree)
2014-03-25

(Resource Type)
doctoral thesis

(Report Number)
甲第6045号

(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1006045

※ 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

Human herpesvirus-6A gQ1 and gQ2 are critical for human CD46 usage

ヒトヘルペスウイルス 6A gQ1 と gQ2 は、ヒト CD46 への結合に重要である

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）

Chyntia Olivia Maurine Jasirwan

【Introduction】

Human herpesvirus 6 (HHV-6) is a T lymphotropic virus and belongs to betaherpesvirus subfamily. HHV-6 isolates had been classified into two variants, HHV-6A and HHV-6B, based on their genetic and antigenetic differences, and their cell tropism. However, recently, HHV-6A and HHV-6B were re-classified as different species (the Virus Taxonomy List 2011). Although HHV-6A and HHV-6B share nearly 90 % sequence homology, it still remains unclear which genes are responsible for the differences between HHV-6A and HHV-6B.

In the case of HHV-6A, its viral ligand and entry receptor have already been identified. That is, viral ligand of HHV-6A is a glycoprotein complex, composed of HHV-6A glycoprotein H (AgH), glycoprotein L (AgL), glycoprotein Q1 (AgQ1) and glycoprotein Q2 (AgQ2), AgH/AgL/AgQ1/AgQ2 complex. And its cellular receptor is human CD46. On the other hand, in the case of HHV-6B, its viral ligand and entry receptor have not been fully elucidated yet. Although HHV-6B forms equivalent gH/gL/gQ1/gQ2 complex (BgH/BgL/BgQ1/BgQ2 complex), the complex has been reported not to bind to CD46. Furthermore, it still remains unknown which molecule(s) in the complex are important for the difference in binding to CD46.

【Object】

The object of this study is to identify which molecule(s) in the complex are important for the difference in binding to CD46 between HHV-6A gH/gL/gQ1/gQ2 and HHV-6B gH/gL/gQ1/gQ2.

【Materials and methods】

1. Immunoprecipitation and immunoblotting assays

293T cells were transfected with HHV-6A (U1102 strain) or HHV-6B (HST strain) gH, gL, gQ1 and gQ2 genes in various combinations. Cell lysate was prepared with TNE buffer and used for immunoprecipitation with anti-gH antibody or immunoblotting with anti-gH, anti-gL, anti-gQ1, anti-gQ2, or anti-CD46 antibodies.

2. Construction of soluble CD46

Soluble CD46 expressing plasmid was constructed by cloning of ectodomain of CD46 (1-1029 bp) and Fc fragment of pFuse-hIgG-Fc to pCAGGS-MCS. The constructed soluble CD46 expressing plasmid was transfected to 293T cells and soluble CD46 was purified from the cell culture medium with Ni-NTA.

3. Cell-surface biding assay with FACS

Soluble CD46 was incubated with 293T cells expressing HHV-6A or HHV-6B gH, gL, gQ1

and gQ2, followed by analysis with FACS.

4. Reconstitution of recombinant virus with BAC (bacterial artificial chromosome)

HHV-6A BAC DNA with HHV-6B gQ1 in replacement of HHV-6A (HHV-6ABACBgQ1), and its revertant (HHV-6ABACBgQ1rev) were constructed with rec A mediated recombination. Reconstitution of infectious virus was performed by transfecting the constructed DNA to JJhan cells, followed by co-culture with CBMCs (cord blood mononuclear cells).

【Results】

1. HHV-6B gH/gL/gQ1/gQ2 complex did not bind to CD46 (Fig. 1)

Firstly, we confirmed that HHV-6B gH/gL/gQ1/gQ2 complex (BgH/BgL/BgQ1/BgQ2 complex) did not bind to CD46. 293T cells were transfected with HHV-6A or HHV-6B gH, gL, gQ1 and gQ2, and cell lysate was prepared. The prepared cell lysate was used for immunoprecipitation with anti-gH antibody, followed by immunoblotting with anti-gH, anti-gL, anti-gQ1, anti-gQ2 and anti-CD46 antibodies. As a result, HHV-6B gH/gL/gQ1/gQ2 complex (BgH/BgL/BgQ1/BgQ2 complex) did not bind to CD46, although HHV-6A gH/gL/gQ1/gQ2 complex (AgH/AgL/AgQ1/AgQ2 complex) bound to CD46.

2. gQ1/gQ2 pair, but not gH/gL pair, contributed to the difference in binding to CD46 (Fig. 2)

Next, we analyzed which molecule(s) in the gH/gL/gQ1/gQ2 complex contributed to the difference in binding to CD46.

Firstly, we analyzed whether gH/gL pair or gQ1/gQ2 pair contributed to the difference in binding to CD46. In detail, 293T cells were transfected with HHV-6B gH/gL and HHV-6A gQ1/gQ2, or HHV-6A gH/gL and HHV-6B gQ1/gQ2, and similar analysis was performed.

Fig. 2 showed results below;

1) BgH/BgL formed complex with AgQ1/AgQ2 (BgH/BgL/AgQ1/AgQ2 complex), and AgH/AgL formed complex with BgH/BgL (AgH/AgL/BgQ1/BgQ2 complex).

2) BgH/BgL/AgQ1/AgQ2 complex bound to CD46. In contrast, AgH/AgL/BgQ1/BgQ2 complex did not bind to CD46.

These results suggested that gQ1/gQ2 pair, but not gH/gL pair, contributed to the difference in binding to CD46.

3. Both gQ1 and gQ2 contributed to the difference in biding to CD46 (Fig. 3)

Next, we analyzed which molecule(s) in the gH/gL/gQ1/gQ2 complex contributed to the difference in binding to CD46 one by one.

293T cells were transfected with one glycoprotein gene from HHV-6B and other three glycoprotein genes from HHV-6A (for example, HHV-6A gH and HHV-6B gL,gQ1 and gQ2), and similar analysis was performed.

Fig. 3 showed results below;

1) gH/gL/gQ1/gQ2 complex formed in all the four combinations.
(BgH/AgL/AgQ1/AgQ2, AgH/BgL/AgQ1/AgQ2,
AgH/AgL/BgQ1/AgQ2, AgH/AgL/AgQ1/BgQ2)

2) BgH/AgL/AgQ1/AgQ2 complex and AgH/BgL/AgQ1/AgQ2 complex bound to CD46. In contrast, AgH/AgL/BgQ1/AgQ2 complex and AgH/AgL/AgQ1/BgQ2 complex did not bind to CD46.

These results suggested that both gQ1 and gQ2 contributed to the difference in binding to CD46.

4. gQ1 and gQ2 contributed to the difference in binding to CD46 also in the cell-surface binding assay (Fig. 4)

Furthermore, we analyzed whether cell-surface binding assay showed the same results as the immunoprecipitation and immunoblotting assays. In cell-surface binding assay, soluble CD46 was incubated with 293T cells expressing HHV-6A or HHV-6B gH, gL, gQ1 and gQ2 in various combinations.

Fig. 4 showed results below;

1) HHV-6A gH/gL/gQ1/gQ2 complex (AgH/AgL/AgQ1/AgQ2 complex) bound to CD46. In contrast, HHV-6B gH/gL/gQ1/gQ2 complex (BgH/BgL/BgQ1/BgQ2 complex) did not bind to CD46.

2) gQ1 and gQ2 contributed to the difference in binding to CD46.

These results confirmed the results from immunoprecipitation and immunoblotting assays. (Fig. 1 ～ Fig. 3)

5. Infectious virus could not be reconstituted from HHV-6ABAC with BgQ1 in replacement of AgQ1 (Fig. 5)

Previously, our laboratory reported listed below about HHV-6A gH and HHV-6B gH (Journal of Virology. 2012. 86(16): 8492 – 8).

1) Infectious virus could be reconstituted from HHV-6ABAC with HHV-6B gH in replacement of HHV-6A gH

2) The recombinant virus showed similar growth to wild type virus in CBMCs. (cord blood mononuclear cells)

Therefore, we performed similar analysis with HHV-6A gQ1 and HHV-6B gQ1. As a result, infectious virus could not be reconstituted from HHV-6ABAC with BgQ1 in replacement of AgQ1 (HHV-6ABACBgQ1), and infectious virus could be reconstituted from its revertant (HHV-6ABACBgQ1rev). These results suggested that HHV-6B gQ1 could not complement HHV-6A gQ1 in virus replication.

【Conclusion】

This study showed that gQ1 and gQ2 contributed to the difference of binding to CD46 between HHV-6A gH/gL/gQ1/gQ2 complex and HHV-6B gH/gL/gQ1/gQ2 complex. Furthermore, unlike HHV-6B gH, HHV-6B gQ1 could not complement HHV-6A gQ1 in virus replication.

神戸大学大学院医学(系)研究科（博士課程）

論文審査の結果の要旨

受付番号	甲 第2405号	氏名	Chyntia Olivia Maurine Jasirwan
論文題目 Title of Dissertation	Human herpesvirus-6A gQ1 and gQ2 are critical for human CD46 usage ヒトヘルペスウイルス 6A gQ1 と gQ2 は、ヒト CD46 への結合に重要である		
審査委員 Examiner	主査 Chief Examiner 堀田 博 副査 Vice-examiner 古瀬幹夫 副査 Vice-examiner 匂坂敏朝		

（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、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 つのバリアントに分類されてきたが、2011 年に、それぞれ異なる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、既に明らかにされている。即ち、ウイルス側リガンドが、ウイルス粒子エンベロープ糖蛋白である糖蛋白 H (HHV-6A glycoprotein H, AgH)、糖蛋白 L (HHV-6A glycoprotein L, AgL)、糖蛋白 Q1 (HHV-6A glycoprotein Q1, AgQ1)、糖蛋白 Q2 (HHV-6A glycoprotein Q2, AgQ2)から構成される複合体(AgH/AgL/AgQ1/AgQ2 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。

一方、HHV-6B に関しては、細胞侵入の際のウイルス側リガンドおよび宿主側レセプターについては、HHV-6A ほどは明らかにされていない。即ち、HHV-6B においても、HHV-6A と同様に、糖蛋白 H (HHV-6B glycoprotein H, BgH)、糖蛋白 L (HHV-6B glycoprotein L, BgL)、糖蛋白 Q1 (HHV-6A glycoprotein Q1, BgQ1)、糖蛋白 Q2 (HHV-6A glycoprotein Q2, BgQ2)から構成される複合体 (BgH/BgL/BgQ1/BgQ2 複合体)が形成されることが証明されている。しかし、HHV-6B の複合体(BgH/BgL/BgQ1/BgQ2 複合体)は CD46 に結合しないことが報告されている。そして、複合体の構成要素のうち、どの因子が両者の違いに関与しているかは未だ明らかとなっていない。

本研究では、複合体の構成要素である gH, gL, gQ1, gQ2 のうち、どの因子が CD46 への結合の違いに関与しているかについて解析し、下記のことを明らかにした。

1. HHV-6A gH/gL/gQ1/gQ2 複合体 (AgH/AgL/AgQ1/AgQ2)は CD46 に結合したのに対し、HHV-6B gH/gL/gQ1/gQ2 複合体 (BgH/BgL/BgQ1/BgQ2)は CD46 に結合しなかった。
2. BgH/BgL は AgQ1/AgQ2 と、AgH/AgL は BgQ1/BgQ2 とそれぞれ複合体を形成した。また、BgH/BgL/AgQ1/AgQ2 複合体は CD46 に結合するのに対し、AgH/AgL/BgQ1/BgQ2 複合体は CD46 に結合しなかった。この結果より、複合体の構成要素のうち、gQ1, gQ2 が CD46 への結合の違いに関与していることが示唆された。
3. 次に、複合体のどの構成要素が関与しているかについて、１つずつ検討を行った。その結果、BgH/AgL/AgQ1/AgQ2, AgH/BgL/AgQ1/AgQ2, AgH/AgL/BgQ1/AgQ2, AgH/AgL/AgQ1/BgQ2、いずれの組み合わせでも複合体が形成された。一方、BgH/AgL/AgQ1/AgQ2 複合体および AgH/BgL/AgQ1/AgQ2 複合体は CD46 に結合したが、AgH/AgL/BgQ1/AgQ2 複合体および AgH/AgL/AgQ1/BgQ2 複合体は CD46 に結合しなかった。これらの結果より、gQ1,gQ2 の双方が CD46 への結合の違いに関与していることがわかった。
4. さらに、細胞表面に発現した複合体においても上記の結果が得られるか否かを soluble CD46 と FACS を用いて検討した。その結果、HHV-6A の gH/gL/gQ1/gQ2 複合体 (AgH/AgL/AgQ1/AgQ2)は CD46 に結合したのに対し、HHV-6B の gH/gL/gQ1/gQ2 複合体 (BgH/BgL/BgQ1/BgQ2)は CD46 に結合しなかった。このことから、免疫沈降、Western blotting から得られた結果が、FACS を用いた細胞表面での結合解析においても確認された。

5. HHV-6A gQ1 を HHV-6B gQ1 に組み換えたウイルスゲノムからはウイルスが再構築されなかった。従って、HHV-6B gQ1 は、HHV-6A gQ1 のウイルス複製における役割を代替できないことが明らかとなった。

今回の検討により、HHV-6A の gH/gL/gQ1/gQ2 複合体と HHV-6B の gH/gL/gQ1/gQ2 複合体の CD46 への結合の違いには、主に gQ1, gQ2 が関与していることが明らかとなった。さらに、HHV-6B gH とは異なり、HHV-6B gQ1 は HHV-6A gQ1 のウイルス複製における役割を代替できないことも明らかとなった。

以上、本研究は、ヒトヘルペスウイルス 6 (human herpesvirus 6, HHV-6) の複合体の構成要素である gH, gL, gQ1, gQ2 のうち、どの因子が CD46 への結合の違いに関与しているかを解明することを目的としたものであるが、HHV-6A の gH/gL/gQ1/gQ2 複合体と HHV-6B の gH/gL/gQ1/gQ2 複合体の CD46 への結合の違いには、主に gQ1, gQ2 が関与していることを明らかにし、さらに、HHV-6B gH とは異なり、HHV-6B gQ1 は HHV-6A gQ1 のウイルス複製における役割を代替できないことも明らかにしたことから、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。