Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-05

Characterization of the human herpesvirus 6A U23 gene

Hayashi, Mayuko

(Degree)
博士（医学）
(Date of Degree)
2014-03-25
(Resource Type)
doctoral thesis
(Report Number)
甲第6046号
(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1006046

※ 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

Characterization of the human herpesvirus 6A U23 gene

ヒトヘルペスウイルス 6A U23 遺伝子の性状解析

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）

林　麻佑子

【背景】

ヒトヘルペスウイルス6 (human herpesvirus-6, HHV-6)は、ベータヘルペスウイルス亜科、ロゼオロウイルス属に属するウイルスである。HHV-6はこれまで、HHV-6AおよびHHV-6Bの2つのバリアントに分類されていたが、2011年、それぞれ別の種として再分類された。ロゼオロウイルス属はHHV-6A、HHV-6B、そして近縁のHHV-7から成るが、それらに特有な遺伝子として、U20、U21、U23、U24、U24A、U26およびU100が知られており、近年、それぞれの遺伝子の機能が相次いで報告されている。しかし、その中でもHHV-6Aがコードする U23遺伝子に関しては不明な点が多く、その性状は解明されていない。

【目的】

HHV-6A U23 遺伝子の性状を解析する。

【方法】

HHV-6A U23 に対するポリクローナル抗体を作製し、HHV-6A 感染細胞およびウイルス粒子を用いた Western blotting を行い、U23 がタンパクとして発現しているのかを確認した。次に、U23 は感染のどの時期に発現するタンパクであるのかを、ウイルスの DNA 合成阻害剤である Phosphonoformic acid（以下 PFA）を添加した感染細胞を用いて検討を行った。また U23 は糖タンパクであることが予測されたため、EndoH および PNGaseF を用いた糖鎖修飾についての解析を行った。さらに間接蛍光抗体法により、HHV-6A 感染細胞内における U23 の局在を検討した。最後に、U23 が HHV-6A の増殖に必須であるのかを検討するため、U23 遺伝子欠損株およびその revertant の作製を行い、野生株と比較してその増殖に違いがみられるかどうかを検討した。

【結果】

1. HHV-6A U23 に対するポリクローナル抗体の作製およびその解析（Fig.1, 4）

HHV-6A U23 を認識するポリクローナル抗体を作製し、それを用いた Western blotting を行ったところ、U23 は HHV-6A 感染細胞内において発現が認められたが、HHV-6A ウイルス粒子上には存在しないことが明らかとなった。

2. HHV-6A U23 は感染後期に発現するタンパクである（Fig. 2）

次に、HHV-6A 感染細胞における U23 の発現時期の検討を行った。HHV-6A を T 細胞に感染させ、経時的にその細胞を回収し、U23 の発現を Western blotting に供して確認した。その結果、感染後 1 日目で U23 の発現が確認できたが、感染の進行に伴いその発現が上昇することが明らかとなった。

さらに、ウイルスの後期遺伝子の発現を阻害する薬剤である PFA を添加した HHV-6A 感染細胞を用いた解析を行ったところ、この条件下では U23 の発現は確認できなかった。つまり、

HHV-6A U23 は感染後期に発現するタンパクであることが明らかとなった。

3. HHV-6A U23 は糖タンパクである (Fig. 3)

HHV-6A U23 は糖タンパクであることが予測されたため、高マンノース型 N 型糖鎖を切断する EndoH および複合型 N 型糖鎖を切断する PNGaseF の 2 つの酵素を用いて糖鎖付加の有無を検討した。その結果、HHV-6A U23 は EndoH および PNGaseF いずれにおいても感受性を示した。このことから、HHV-6A U23 は糖タンパクであることが明らかとなった。

4. HHV-6A U23 は感染細胞のトランスゴルジ網で主に局在する (Fig. 5)

HHV-6A 感染細胞における U23 の局在を検討するため、間接蛍光抗体法による解析を行った。その結果、U23 はウイルス粒子上に存在する糖タンパクである glycoprotein B とはほとんど共局在しなかった。また、後期エンドソームおよび多胞体のマーカーである CD63 やリソソームのマーカーである Lamp1 ともほとんど共局在せず、小胞体のマーカーである Calnexin とは一部共局在が認められた。さらに、U23 はトランスゴルジ網のマーカーである TGN46 と主に共局在していることが明らかとなった。

5. HHV-6A U23 はウイルスの増殖に非必須である (Fig. 6, 7)

Two-step Red 組換え法を利用して、大腸菌内で U23 遺伝子領域を欠損させた HHV-6A BAC (Bacterial artificial chromosome) DNA およびその revertant を構築した。次に、得られた HHV-6A BAC DNA を、JJhan 細胞 (ヒト T リンパ球系細胞株)に導入し、ヒト臍帯血単核球と共培養することで、感染性ウイルスの再構築を試みた。その結果、U23 欠損株において感染性ウイルスの再構築が認められたため、次に、U23 欠損株およびその revertant が、野生株と比較してその増殖に違いがみられるかを検討した。3 つのウイルスを同じ力価で感染後、経時的に細胞およびその培養上清を回収し、それらをリアルタイム PCR に供してウイルスゲノムの定量を行った結果、感染細胞およびその培養上清いずれにおいても、HHV-6A U23 欠損株およびその revertant は、野生株と比較してウイルスの増殖に違いは認められなかった。すなわち、U23 は HHV-6A の増殖に非必須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 U23 は感染後期に発現する糖タンパクであることが明らかとなった。
2. HHV-6A U23 はウイルス粒子上には存在せず、感染細胞内でトランスゴルジ網に主に局在することが明らかとなった。
3. HHV-6A U23 はウイルスの増殖に非必須であることが明らかとなった。

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 2406 号	氏 名	林 麻佑子
論文題目 Title of Dissertation	Characterization of the human herpesvirus 6A U23 gene ヒトヘルペスウイルス 6A U23 遺伝子の性状解析		
審査委員 Examiner	主 査 Chief Examiner 副 査 Vice-examiner 副 査 Vice-examiner	川端重人 堀田博 匂坂敏朝	

（要旨は１，０００字～２，０００字程度）

【背景と目的】

ヒトヘルペスウイルス6 (human herpesvirus-6, HHV-6)は、ベータヘルペスウイルス亜科、ロゼオロウイルス属に属するウイルスである。特有な遺伝子として、U20、U21、U23、U24、U24A、U26およびU100が知られており、その中でもHHV-6AがコードするU23遺伝子に関しては不明な点が多く、その性状を解析した。

【方法】

HHV-6A U23 に対するポリクローナル抗体を作製し、HHV-6A 感染細胞およびウイルス粒子を用いた Western blotting を行い、U23 がタンパクとして発現しているのかを確認した。次に、U23 は感染のどの時期に発現するタンパクであるのかを、ウイルスの DNA 合成阻害剤である Phosphonoformic acid (以下 PFA) を添加した感染細胞を用いて検討を行った。また U23 は糖タンパクであることが予測されたため、EndoH および PNGaseF を用いた糖鎖修飾についての解析を行った。さらに間接蛍光抗体法により、HHV-6A 感染細胞内における U23 の局在を検討した。最後に、U23 が HHV-6A の増殖に必須であるのかを検討するため、U23 遺伝子欠損株およびその revertant の作製を行い、野生株と比較してその増殖に違いがみられるかどうかを検討した。

【結果】

1. HHV-6A U23 に対するポリクローナル抗体の作製およびその解析

HHV-6A U23 を認識するポリクローナル抗体を作製し、それを用いた Western blotting を行ったところ、U23 は HHV-6A 感染細胞内において発現が認められたが、HHV-6A ウイルス粒子上には存在しないことが明らかとなった。

2. HHV-6A U23 は感染後期に発現するタンパクである

次に、HHV-6A 感染細胞における U23 の発現時期の検討を行った。HHV-6A を T 細胞に感染させ、経時的にその細胞を回収し、U23 の発現を Western blotting に供して確認した。その結果、感染後 1 日目で U23 の発現が確認できたが、感染の進行に伴いその発現が上昇することが明らかとなった。

さらに、ウイルスの後期遺伝子の発現を阻害する薬剤である PFA を添加した HHV-6A 感染細胞を用いた解析を行ったところ、この条件下では U23 の発現は確認できなかった。つまり、HHV-6A U23 は感染後期に発現するタンパクであることが明らかとなった。

3. HHV-6A U23 は糖タンパクである

HHV-6A U23 は糖タンパクであることが予測されたため、高マンノース型 N 型糖鎖を切断する EndoH および複合型 N 型糖鎖を切断する PNGaseF の 2 つの酵素を用いて糖鎖付加の有無を検討した。その結果、HHV-6A U23 は EndoH および PNGaseF いずれにおいても感受性を示した。このことから、HHV-6A U23 は糖タンパクであることが明らかとなった。

4. HHV-6A U23 は感染細胞のトランスゴルジ網で主に局在する

HHV-6A 感染細胞における U23 の局在を検討するため、間接蛍光抗体法による解析を行った。その結果、U23 はウイルス粒子上に存在する糖タンパクである glycoprotein B とはほとんど共局在しなかった。また、後期エンドソームおよび多胞体のマーカーである CD63 やリソソームのマーカーである Lamp1 ともほとんど共局在せず、小胞体のマーカーである Calnexin とは一部共局在が認められた。さらに、U23 はトランスゴルジ網のマーカーである TGN46 と主に共局在していることが明らかとなった。

5. HHV-6A U23 はウイルスの増殖に非必須である

Two-step Red 組換え法を利用して、大腸菌内で U23 遺伝子領域を欠損させた HHV-6A BAC (Bacterial artificial chromosome) DNA およびその revertant を構築した。次に、得られた HHV-6A BAC DNA を、JJhan 細胞 (ヒト T リンパ球系細胞株)に導入し、ヒト臍帯血単核球と共培養することで、感染性ウイルスの再構築を試みた。その結果、U23 欠損株において感染性ウイルスの再構築が認められたため、次に、U23 欠損株およびその revertant が、野生株と比較してその増殖に違いがみられるかを検討した。3 つのウイルスを同じ力価で感染後、経時的に細胞およびその培養上清を回収し、それらをリアルタイム PCR に供してウイルスゲノムの定量を行った結果、感染細胞およびその培養上清いずれにおいても、HHV-6A U23 欠損株およびその revertant は、野生株と比較してウイルスの増殖に違いは認められなかった。すなわち、U23 は HHV-6A の増殖に非必須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 U23 は感染後期に発現する糖タンパクであることが明らかとなった。
2. HHV-6A U23 はウイルス粒子上には存在せず、感染細胞内でトランスゴルジ網に主に局在することが明らかとなった。
3. HHV-6A U23 はウイルスの増殖に非必須であることが明らかとなった。

本研究はヒトヘルペスウイルス 6 (human herpesvirus-6, HHV-6) について、その遺伝子 U23 を研究したものであるが、従来ほとんど知られていなかった、糖タンパクでありトランスゴルジ網で主に局在する重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。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。