Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-04

The neutralizing linear epitope of human herpesvirus 6A glycoprotein B does not affect virus infectivity

Wakata, Aika

(Degree)
博士（医学）
(Date of Degree)
2018-03-25
(Resource Type)
doctoral thesis
(Report Number)
甲第7151号
(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1007151

※ 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）　　平成30年 1月 19日

学位論文の内容要旨

The neutralizing linear epitope of human herpesvirus 6A glycoprotein B does not affect virus infectivity

ヒトヘルペスウイルス6A 糖タンパク質 B の中和リニアエピトープは
ウイルス感染に影響しない

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

若田 愛加

[背景]

ヒトヘルペスウイルス6 (Human Herpesvirus 6: HHV-6) はヘルペスウイルス科、βヘルペスウイルス亜科に属し、T リンパ球に親和性をもつ二本鎖 DNA ウイルスである。HHV-6は塩基配列や抗原性、細胞向性の違いから HHV-6A と HHV-6B に分類されている。HHV-6B は乳幼児期に発症する突発性発疹の原因ウイルスとして知られているが、HHV-6A による病態は不明な点が多い。

HHV-6A および HHV-6B はウイルス粒子エンベロープ上にウイルス特異的な糖タンパク質複合体 [glycoprotein H (gH)/gL/gQ1/gQ2複合体] をもつ。その複合体は、各ウイルスの宿主受容体である CD46 (HHV-6A) あるいは CD134 (HHV-6B) のウイルス側リガンドとして働く。ヘルペスウイルスの宿主細胞への侵入には、ウイルスエンベロープと宿主細胞膜の融合が重要であり、その過程には、ヘルペスウイルス科で保存されている gH/gL 複合体および gB が必須である。当研究室では、HHV-6A gB 特異的な中和モノクローナル抗体（87-y-13抗体)の作製し、その抗体認識のエピトープ部位が、gB の347番目のアスパラギンであることを同定している (Takeda et al., 1996)。また、2017年には、HHV-6A gB の細胞内領域 (CTD) が HHV-6A の感染に必須であることを明らかにしている。以上により、HHV-6A gB も、その感染において重要な役割を担っていると考えられる。

[目的]

本研究では、同定されている HHV-6A gB のエピトープ部位のさらなる機能解析と87-y-13抗体の作用機序を明らかにすることを目的とした。

[方法]

HHV-6A BAC (Bacterial artificial chromosome) システムを用いて、エピトープ部位に変異を導入した2種類の gB 変異体ウイルスおよび各々の復帰体ウイルスを作製した。得られた DNA を HHV-6A 感受性細胞に導入し、gB 変異体ウイルスが再構築されるか否かを調べた。また、再構築された gB 変異体ウイルス感染細胞におけるウイルスタンパク質の発現を確認した。さらに、87-y-13抗体が gB 変異体ウイルスを認識するか否かを調べるために、免疫沈降および中和試験を行った。

本研究では、gH/gL/gQ1/gQ2および gB を293T 細胞 (CD46が発現している) に共発現させると生じる細胞間膜融合を利用し、ルシフェレース活性により膜融合を定量化するアッセイ系を構築した。この系を用いて、87-y-13抗体による膜融合阻害実験を行った。

[結果]

① 87-y-13抗体のエピトープに変異を導入した HHV-6A gB 変異体ウイルスゲノムを作製した (Fig. 1)

HHV-6A の遺伝子組換えシステムを利用し、87-y-13抗体に対するエピトープに変異を導入し、2種類の gB 変異体ウイルスゲノムを作製した。1つは gB の347番目をアスパラギンからリジンに、もう一方はアラニンに置換し、各々HHV-6A BACgB(N347K)あるいは HHV-6A BACgB(N347A) と命名した。また各々の復帰体ウイルスも同様に作製し、HHV-6A BACgB(N347K)rev あるいは HHV-6A BACgB(N347A)rev とした。

② gB変異体ウイルスは感染性をもつウイルスとして再構築された (Fig. 2, 3)

①にて作製した gB 変異体ウイルス DNA を HHV-6A 感受性細胞 (JJhan 細胞) に導入し、再構築を試みた。結果、感染の指標としてウイルス DNA に挿入した GFP の蛍光が時間の経過とともに増加した。さらに、ウエスタンブロッティング法により感染細胞からの gH および gB が検出された。

よって、gB 変異体ウイルスが感染性をもつウイルスとして再構築されたことより、87-y-13抗体のエピトープは HHV-6A 感染に、必須ではないことが明らかとなった。

③ 87-y-13抗体は gB 変異体ウイルスの gB を認識しない (Fig. 4)

次に、87-y-13抗体が gB 変異体ウイルスの gB を認識するか否かを調べるため、87-y-13抗体による免疫沈降法を行った。まず、各々の感染細胞を用いて87-y-13抗体による免疫沈降を行い、得られた試料に対して別の gB 抗体によりウエスタンブロッティングを行った。その結果、野生体および復帰体ウイルスの gB は検出されたが、gB 変異体ウイルスの gB は検出されなかった。一方、別の gB 抗体で同様に免疫沈降を行ったところ、すべての感染細胞から gB が検出された。

よって、87-y-13抗体は、HHV-6A gB 変異体ウイルスが持つ gB を認識しないことが明らかとなった。

④ 87-y-13抗体は HHV-6A gB 変異体ウイルス感染を阻害しない (Fig. 7)

HHV-6A gB 変異体ウイルス感染が、87-y-13抗体により阻止されるか否かを調べるために、中和試験を行った。方法は、野生体、gB 変異体、あるいはその復帰体ウイルスを各々87-y-13抗体と反応させ、その後 JJhan 細胞に感染させた。その結果、野生体および復帰体ウイルスの感染は見られなかったが、gB 変異体ウイルスの感染は認められた。一方、HHV-6A gQ1の中和抗体で同様の実験を行ったが、gB 変異体ウイルスの感染は阻止された。

よって、87-y-13抗体は、HHV-6A gB 変異体ウイルスを中和しないことが明らかとなった。

⑤ gH/gL/gQ1/gQ2複合体および gB の共発現は CD46発現細胞において細胞融合を引き起こす (Fig. 8)

ヘルペスウイルスの侵入に必須とされるエンベロープ糖タンパク質は、受容体発現細胞に共発現させると細胞融合を引き起こすことが知られており、他のヘルペスウイルスの解析では広く用いられている。

そこで HHV-6A においても、糖タンパク質の共発現により細胞間膜融合が誘導されるか否かを試みた。HHV-6A gH/gL/gQ1/gQ2と細胞膜面に局在する gB 変異体 (Y822A) を 293T 細胞 (CD46発現) に共発現させ、膜融合を観察した。さらに、ルシフェレース活性を測定することで定量的に評価した。その結果、細胞間膜融合が観察され、ルシフェレース活性が検出された。

よって、CD46発現細胞膜面における HHV-6A gH/gL/gQ1/gQ2複合体および gB の共発現は細胞融合を誘導することが明らかとなった。

⑥ gH/gL/gQ1/gQ2複合体および変異体 gB の共発現は CD46発現細胞において細胞融合を引き起こす (Fig. 9)

⑤で構築した HHV-6A 細胞融合アッセイ系を用いて、87-y-13抗体のエピトープが膜融合の誘導に必須であるか否かを調べた。まずは、gB の347番目のアスパラギンをリジンあるいはアラニンに置換した gB 変異体を作製し、各々gB (N347K-Y822A) および gB (N347A-Y822A) と命名した。⑤と同様に gH/gL/gQ1/gQ2複合体および gB 変異体を293T 細胞に共発現させ、生じた細胞融合をルシフェレース活性の測定により評価した。その結果、どちらの gB 変異体も gH/gL/gQ1/gQ2複合体との共発現によって細胞融合を引き起こし、ルシフェレース活性が検出された。

よって、87-y-13抗体のエピトープ部位は、gB の膜融機能に直接関与しないことが明らかとなった。

⑦ 87-y-13抗体は gH/gL/gQ1/gQ2複合体と gB の共発現による細胞融合を阻害する (Fig. 10)

さらに、87-y-13抗体の中和活性の分子機構を解析するため、HHV-6A 細胞融合アッセイ系を用いて中和抗体による膜融合阻害実験を試みた。具体的には、293T 細胞に HHV-6A gH/gL/Q1/gQ2および gB を導入後、87-y-13抗体を添加した。結果、HHV-6A gH/gL/gQ1/gQ2および gB の共発現で引き起こされる細胞融合は認められず、またルシフェレースの活性も検出されなかった。

よって87-y-13抗体は、HHV-6A gB が機能する膜融合を阻害することが明らかとなった。

⑧ HHV-6A gB 上の87-y-13抗体エピトープの構造予測 (Fig. 11)

87-y-13抗体の中和の分子機構を gB の立体構造からも考察するため、既に明らかとなっているサイトメガロウイルス (HCMV) gB の構造をもとに、HHV-6A gB の立体構造を予測した。その結果、87-y-13抗体のエピトープは gB の構造表面に露出しており、単純ヘルペスウイルス 1型 (HSV-1) およびサイトメガロウイルス (HCMV) に対する各々の中和抗体のエピトープに近接した領域に位置する事が示唆された。

[考察]

87-y-13抗体のエピトープは、HHV-6A 感染には必須ではなく、また細胞融合にも直接機能しない部位であった。一方で、細胞融合アッセイにおいて、87-y-13抗体は HHV-6A 糖タンパク質が引き起こす細胞融合を阻害した。また、HHV-6A gB の構造予測から87-y-13抗体のエピトープ周辺の領域は、HSV-1および HCMV においても中和抗体のエピトープが存在する領域と推測された。HSV-1および HCMV ではこの領域が中和抗体の誘導や、膜融合の過程で起こる gH/gL との相互作用に関与することが過去に報告されている。これらのことから、87-y-13抗体はエピトープである gB の347番目のアスパラギンに結合することで間接的に膜融合を阻害し、結果として感染が起こらなくなると考えられる。

具体的な87-y-13抗体の作用機序としては、以下のことが推察される。(ⅰ) 87-y-13抗体が gB の構造変化を抑制する (gB は構造変化によって活性型へと移行すると考えられているため)、(ⅱ) 受容体 CD46のリガンドである gH/gL/gQ1/gQ2複合体との相互作用を阻害する、(ⅲ) 宿主細胞側に存在する gB に対する未知の分子との相互作用を阻害する。

[結論]

87-y-13抗体が認識する gB エピトープ部位は、HHV-6A 感染に必須ではないが、87-y-13抗体は gB に結合することで、gB が機能する膜融合を阻害する。

[参考文献]

Takeda, K., Okuno, T., Isegawa, Y., Yamanishi, K., 1996. Identification of a variant A-specific neutralizing epitope on glycoprotein B (gB) of human herpesvirus-6 (HHV-6). Virology 222, 176-183.

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 2774号	氏 名	若田 愛加
論文題目 Title of Dissertation	The neutralizing linear epitope of human herpesvirus 6A glycoprotein B does not affect virus infectivity ヒトヘルペスウイルス 6A 糖タンパク質 B の中和リニアエピトープはウイルス感染に影響しない		
審査委員 Examiner	主 査 Chief Examiner 勝二郎夫 副 査 Vice-examiner 匂坂敏朗 副 査 Vice-examiner 中村俊一		

（要旨は１，０００字～２，０００字程度）

[背景]

ヒトヘルペスウイルス6 (Human Herpesvirus 6: HHV-6) はβヘルペスウイルス亜科に属し、T リンパ球に親和性をもつ二本鎖 DNA ウイルスである。HHV-6A による病態は不明な点が多い。HHV-6A はウイルス粒子エンベロープ上にウイルス特異的な糖タンパク質複合体 [glycoprotein H (gH)/gL/gQ1/gQ2複合体] をもつ。その複合体は、宿主受容体である CD46 のウイルス側リガンドとして働く。ヘルペスウイルスの宿主細胞への侵入には、ウイルスエンベロープと宿主細胞膜の融合が必須であり、その過程には gB が関与する。当研究室では、HHV-6A gB 特異的な中和モノクローナル抗体 (87-y-13抗体)の作製し、その抗体認識のエピトープ部位が、gB の347番目のアスパラギンであることを同定している。

[目的]

本研究では、同定されている HHV-6A gB のエピトープ部位のさらなる機能解析と87-y-13抗体の作用機序を明らかにすることを目的とした。

[結果]

87-y-13抗体のエピトープに変異を導入した HHV-6A gB 変異体ウイルスゲノムを作製した

87-y-13抗体に対するエピトープに変異を導入するため、HHV-6A の遺伝子組換えシステムを利用し、一方はアスパラギンからリジンに、もう一方はアラニンに置換した2種類の gB 変異体ウイルスゲノムを作製した。作製したゲノム DNA を HHV-6A 感受性細胞 (JJhan 細胞) に導入し、再構築を試みた。結果、gB 変異体ウイルスが感染性をもつウイルスとして再構築された。

87-y-13抗体は gB 変異体ウイルスの gB を認識しない

次に、87-y-13抗体が gB 変異体ウイルスの gB を認識するか否かを調べた。まず、各々の感染細胞を用いて87-y-13抗体による免疫沈降を行い、得られた試料に対して他の gB 抗体によりウエスタンブロッティングを行った。その結果、野生体および復帰体ウイルスの gB は検出されたが、gB 変異体ウイルスの gB は検出されなかった。

87-y-13抗体は HHV-6A gB 変異体ウイルス感染を阻害しない

HHV-6A gB 変異体ウイルス感染が、87-y-13抗体により阻止されるか否かを調べた。方法は、野生体、gB 変異体、あるいはその復帰体ウイルスを各々87-y-13抗体と反応させ、その後 JJhan 細胞に感染させた。その結果、野生体および復帰体ウイルスの感染は見られなかったが、gB 変異体ウイルスの感染は認められた。

gH/gL/gQ1/gQ2複合体および gB の共発現は CD46発現細胞において細胞融合を引き起こす

293T 細胞(CD46発現)において、HHV-6A 糖タンパク質の共発現により細胞間膜融合が誘導されるか否かを試みた。HHV-6A gH/gL/gQ1/gQ2と細胞膜面に局在する gB 変異体 (Y822A) を 293T 細胞に共発現させ、膜融合を観察した。さらに、ルシフェラーゼ活性を測定することで定量的に評価した。その結果、細胞間膜融合が観察され、ルシフェラーゼ

活性が検出された。

87-y-13抗体は gH/gL/gQ1/gQ2複合体と gB の共発現による細胞融合を阻害する

さらに、HHV-6A 細胞融合アッセイ系を用いて中和抗体による膜融合阻害実験を試みた。具体的には、293T 細胞に HHV-6A gH/gL/Q1/gQ2および gB を導入後、87-y-13抗体を添加した。結果、細胞融合は誘導されず、ルシフェラーゼの活性は検出されなかった。

[考察]

87-y-13抗体のエピトープは、HHV-6A 感染には必須ではなく、また細胞融合にも直接機能しない部位であった。一方で、細胞融合アッセイにおいて、87-y-13抗体は HHV-6A 糖タンパク質が引き起こす細胞融合を阻害した。これらのことから、87-y-13抗体はエピトープである gB の347番目のアスパラギンに結合することで間接的に膜融合を阻害し、結果として感染が起こらなくなると考えられる。

[結論]

87-y-13抗体が認識する gB エピトープ部位は、HHV-6A 感染に必須ではないが、87-y-13抗体は gB に結合することで、gB が機能する膜融合を阻害する。

本研究は HHV-6A の感染機構について、HHV-6A gB 特異的な中和モノクローナル抗体（87-y-13抗体)を用い、その作用機序を研究したものであるが、従来不明であった、HHV-6A の膜融合における gB の役割と活性に必須の領域について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。