Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-07-15

Human herpesvirus 6 major immediate early promoter has strong activity in T cells and is useful for heterologous gene expression

Matsuura, Masaaki

(Degree)
博士（医学）

(Date of Degree)
2014-03-06

(Date of Publication)
2015-03-01

(Resource Type)
doctoral thesis

(Report Number)
乙第3244号

(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2003244

※ 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。

（論文博士関係）

学位論文の内容要旨

Human herpesvirus 6 major immediate early promoter has strong activity in T cells and is useful for heterologous gene expression

ヒトヘルペス 6 主要前初期プロモーターは T 細胞において強い活性を有し、異種遺伝子発現に有用である

（指導教員：神戸大学大学院医学研究科医科学専攻　仲　哲治　客員教授）

松浦　正明

ヒトヘルペスウイルス 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するウイルスであり、主に T 細胞向性を示す。HHV-6 は塩基配列、抗原性、細胞向性の違いにより HHV-6A と HHV-6B の 2 つのバリアントに分類され、このうち HHV-6B は乳幼児における突発性発疹の原因ウイルスとして知られている。同じベータヘルペスウイルス亜科に属する代表的なウイルスとして、ヒトサイトメガロウイルス (CMV) が挙げられる。CMV において主要前初期 (MIE) 遺伝子 IE1、IE2 の発現を制御する CMV MIE プロモーター (CMV プロモーター) は広範な細胞種において強い活性を示すことから、外来遺伝子発現において汎用されているプロモーターの一つである。CMV と同じβヘルペスウイルス亜科に属する HHV-6 も、CMV の IE1、IE2 に対するポジショナルホモログを有しており、CMV プロモーターと同様に高いプロモーター活性が期待されるが、これまでにそのプロモーターについては解析されていない。そこで、我々は HHV-6 の MIE プロモーターについての解析を試みると共に外来遺伝子発現用プロモーターとしての応用について検討を行なった。

まず、HHV-6B の HST 株の配列を用いてプロモーター活性の強度について解析を行なった。HHV-6 の IE1 の転写開始点から上流 971 塩基を HHV-6 MIE プロモーターとし、ルシフェラーゼを発現するレポータープラスミドを作製した。これを様々な細胞にトランスフェクションし、ルシフェラーゼアッセイを行うことでプロモーター活性を測定したところ、ヒト二倍体細胞である MRC-5 など付着細胞においては CMV プロモーターに比べて低い活性を示したが、Molt-3 などの T 細胞株においては CMV プロモーターよりも高い活性を示した。

CMV において IE1 は 4 つのエクソンからなり、第 1 イントロンであるイントロン A が CMV プロモーターのエンハンサー活性を有することが知られており、市販の CMV プロモーターにもこのイントロン A 配列がエンハンサーとして含まれている。HHV-6 の IE1 は 5 つのエクソンからなっており、4 つのイントロンが存在する。これらのイントロンについて CMV のイントロン A と同様にエンハンサー活性があるのか否かについて検討を行なった。イントロン 1 からイントロン 4 まで延長した HHV-6 MIE プロモーターをそれぞれ作製し、プロモーター活性を調べたところ、イントロン 1 領域までプロモーターを延長することで活性が大幅に上昇したが、それ以上の延長では活性の上昇は認められなかった。このようにイントロン 1 の配列にエンハンサー効果があることが示され、イントロン 1 領域を付加することにより、T 細胞株ではより高い活性を示し、MRC-5 細胞や MeWo 細胞などの付着細胞においても細胞株によっては CMV プロモーターと同程度まで高い活性を示すようになった。

次に、この HHV-6 MIE プロモーターの配列においてどの領域がプロモーター活性にとって重要であるのかを確かめるため、5'末端から削ってサイズの小さいいくつかの欠損プロモーターを作製し、プロモーター活性を調べた。その結果転写開始点より上流 381～552 塩基を欠損させることで、大幅にプロモーター活性が低下することが確認された。この領域の配列について TFSEARCH を用いて転写因子結合配列を解析したところ、NF-κB 結合配列と AP-1 結合配列があることが予測された。一方、この領域は繰り返し配列が多く含まれる repeat region 3 (R3) の末端領域であり、R3 の反対側の末端には U95 のプロモーター領域となっていることが知られており、この U95 プロ

モーター活性にはNF-κB結合配列が重要であることが明らかになっている。つまりU-95プロモーターと同様にHHV-6 MIEプロモーターもNF-κB結合配列が重要ではないかと考え、NF-κB結合配列を欠損させたプロモーターを作製したところ、予想通り活性の大幅な低下が認められた。これらのことより、HHV-6 MIEpのプロモーター活性にはR3に存在するNF-κB結合配列が重要であることが明らかとなった。

イントロン1を含むHHV-6 MIEプロモーターは高い活性を有することが示され、CMVプロモーターのように外来性遺伝子発現用プロモーターとして利用できる期待が高まったので、次に応用について検討を行なうこととした。我々は水痘帯状疱疹ウイルス (VZV) の全ゲノムをBacterial Artificial Chromosome (BAC) ベクターへクローニングすることに成功し、VZV岡ワクチン株 (vOka) をベースとした外来抗原を発現する組換え多価ワクチンの開発に取り組んでおり、組換えVZVワクチン開発でのHHV-6 MIEプロモーターの利用について検討を行なった。イントロン1配列を含むHHV-6 MIEプロモーターの下流にレポーター遺伝子として赤色蛍光タンパクであるDsRed、さらにBGH poly Aシグナル配列をつなぎ、これの両端をトランスポゾン配列Tn7で挟んだカセットを作製し、予めトランスポゾンのターゲット配列*att*Tn7をVZVのORF12とORF13の間に挿入しておいたVZV-BACベクターへトランスポゾンを利用して、この発現カセットをVZVゲノムへと挿入した。得られた組換えVZV DNAをMRC-5細胞へトランスフェクションし、感染性の組換えVZVを再構築することに成功した。この組換えVZV感染細胞では細胞変性に沿ってDsRedの蛍光が観察されると共に、ウエスタンブロッティングでもDsRedタンパク質の発現が確認された。このようにHHV-6 MIEプロモーターはVZVゲノム上においてもプロモーターとして機能することが確認され、外来性遺伝子発現用プロモーターとして利用できることが示された。

以上の結果から、HHV-6 MIEプロモーターは外来遺伝子発現用プロモーターとしての利用が可能であり、特にT細胞においてはCMVプロモーターよりも高い活性を有しており、T細胞での発現系に有用であることが示唆された。

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	乙 第2128号	氏　名	松浦　正明
論文題目 Title of Dissertation	ヒトヘルペス6主要前初期プロモーターはT細胞において強い活性を有し、異種遺伝子発現に有用である Human herpesvirus 6 major immediate early promoter has strong activity in T cells and is useful for heterologous gene expression		
審査委員 Examiner	主　査 Chief Examiner 副　査 Vice-examiner 副　査 Vice-examiner	中村俊一 山口端直人 力武良行	

（要旨は1，000字～2，000字程度）

ヒトヘルペスウイルス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するウイルスであり、主にT細胞向性を示す。HHV-6は塩基配列、抗原性、細胞向性の違いによりHHV-6AとHHV-6Bの2つのバリアントに分類され、このうちHHV-6Bは乳幼児における突発性発疹の原因ウイルスとして知られている。同じベータヘルペスウイルス亜科に属する代表的なウイルスとして、ヒトサイトメガロウイルス（CMV）が挙げられる。CMVにおいて主要前初期（MIE）遺伝子IE1、IE2の発現を制御するCMV MIEプロモーター（CMVプロモーター）は広範な細胞種において強い活性を示すことから、外来遺伝子発現において汎用されているプロモーターの一つである。CMVと同じβヘルペスウイルス亜科に属するHHV-6も、CMVのIE1、IE2に対するポジショナルホモログを有しており、CMVプロモーターと同様に高いプロモーター活性が期待されるが、これまでにそのプロモーターについては解析されていない。そこで、申請者らはHHV-6のMIEプロモーターについての解析を試みると共に外来遺伝子発現用プロモーターとしての応用について検討を行なった。

まず、HHV-6BのHST株の配列を用いてプロモーター活性の強度について解析を行なった。HHV-6のIE1の転写開始点から上流971塩基をHHV-6 MIEプロモーターとし、ルシフェラーゼを発現するレポータープラスミドを作製した。これを様々な細胞にトランスフェクションし、ルシフェラーゼアッセイを行うことでプロモーター活性を測定したところ、ヒト二倍体細胞であるMRC-5など付着細胞においてはCMVプロモーターに比べて低い活性を示したが、Molt-3などのT細胞株においてはCMVプロモーターよりも高い活性を示した。

HHV-6のIE1は5つのエクソンからなっており、4つのイントロンが存在する。これらのイントロンについてCMVのイントロンAと同様にエンハンサー活性があるのか否かについて検討を行なった。イントロン1からイントロン4まで延長したHHV-6 MIEプロモーターをそれぞれ作製し、プロモーター活性を調べたところ、イントロン1領域までプロモーターを延長することで活性が大幅に上昇したが、それ以上の延長では活性の上昇は認められなかった。このようにイントロン1の配列にエンハンサー効果があることが示され、イントロン1領域を付加することにより、T細胞株ではより高い活性を示し、MRC-5細胞やMeWo細胞などの付着細胞においても細胞株によってはCMVプロモーターと同程度まで高い活性を示すようになった。

次に、転写開始点より上流381～552塩基を欠損させることで、大幅にプロモーター活性が低下することが確認された。この領域の配列についてTFSEARCHを用いて転写因子結合配列を解析したところ、NF-κB結合配列と

AP-1 結合配列があることが予測された。一方、この領域は繰り返し配列が多く含まれる repeat region 3 (R3) の末端領域であり、R3 の反対側の末端には U95 のプロモーター領域となっていることが知られており、この U95 プロモーター活性には NF-κB 結合配列が重要であることが明らかになっている。つまり U-95 プロモーターと同様に HHV-6 MIE プロモーターも NF-κB 結合配列が重要ではないかと考え、NF-κB 結合配列を欠損させたプロモーターを作製したところ、予想通り活性の大幅な低下が認められた。これらのことより、HHV-6 MIEp のプロモーター活性には R3 に存在する NF-κB 結合配列が重要であることが明らかとなった。

申請者らのグループは水痘帯状疱疹ウイルス (VZV) の全ゲノムを Bacterial Artificial Chromosome (BAC) ベクターへクローニングすることに成功し、VZV 岡ワクチン株 (vOka) をベースとした外来抗原を発現する組換え多価ワクチンの開発に取り組んでおり、組換え VZV ワクチン開発での HHV-6 MIE プロモーターの利用について検討を行なった。イントロン 1 配列を含む HHV-6 MIE プロモーターの下流にレポーター遺伝子として赤色蛍光タンパクである DsRed、さらに BGH poly A シグナル配列をつなぎ、これの両端をトランスポゾン配列 Tn7 で挟んだカセットを作製し、予めトランスポゾンのターゲット配列 *att*Tn7 を VZV の ORF12 と ORF13 の間に挿入しておいた VZV-BAC ベクターへトランスポゾンを利用して、この発現カセットを VZV ゲノムへと挿入した。得られた組換え VZV DNA を MRC-5 細胞へトランスフェクションし、感染性の組換え VZV を再構築することに成功した。この組換え VZV 感染細胞では細胞変性に沿って DsRed の蛍光が観察されると共に、ウエスタンブロッティングでも DsRed タンパク質の発現が確認された。このように HHV-6 MIE プロモーターは VZV ゲノム上においてもプロモーターとして機能することが確認され、外来性遺伝子発現用プロモーターとして利用できることが示された。

本研究は、HHV-6 MIE プロモーターが外来遺伝子発現用プロモーターとしての利用が可能でありことを初めて示したものであり、ワクチン開発などに向けた有力な方向性を得たもの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。