

【第53回 小島三郎記念文化賞】

ヒトヘルペスウイルス 6B 受容体の発見と ウイルス侵入機構の解明

Identification of cellular receptor for human herpesvirus-6B and the
elucidation of virus entry mechanism

もり やす こ
森 康 子
Yasuko MORI

はじめに

この度は、小島三郎記念文化賞という大変栄誉ある賞を受賞させて頂き、誠にありがとうございました。選考委員長の渡辺治雄先生、選考委員の諸先生方、そして、ご推薦いただいた(財)阪大微生物病研究会理事長の山西弘一先生に心よりお礼申し上げます。永年にわたるヒトヘルペスウイルス6(HHV-6)の研究成果がこのようなかたちで評価いただきましたこと、大変嬉しく思っております。私のみならず、HHV-6研究に携わっている若手研究者への大きな励みとなったことと思います。そして、これも目標に向かって、共に研究に携わって下さった皆様のおかげであり、皆様と共に頂けた賞だと思ひ、心より感謝しております。

I. 序論

私の研究者としての道は、眼科臨床医として数年過ごした後から始まりました。大阪大学医学部眼科(当時大阪大学医学部眼科学講座 眞鍋禮三教授)および関連病院で臨床に勤んでいた中で、基礎研究をやってみたいと思うようになり、大阪大学大学院医学系研究科微生物学講座の大学院に入学しました。そこで、HHV-6研究に携わるきっかけとなった恩師である山西弘一先生(当時大阪大学大学院医学系研究科微生物学講座教授)と出逢いました。私が、大学院生として研究を始めた頃、山西研究室では、山西先生が発見されたHHV-6についての研究が精力的に行われていました。その中でも、特に

HHV-6B HST株の全塩基配列の決定というプロジェクトが動いており、必然的に私もそのプロジェクトに参加することになりました¹⁾。その後、国際ヘルペスウイルスワークショップというヘルペスウイルス分野では世界的に有名な学会に出席する機会を得ました。そこで、当時Northwestern University Medical School教授であったPatricia G Spear先生が、単純ヘルペスウイルス(HSV)の宿主受容体がHVEM(for herpesvirus entry mediator)²⁾であるということシンポジウムで発表されました。その講演を聴いていた私は、そのアクティブな成果にとっても感銘を受けました。その時、ウイルスの宿主細胞への侵入機構に興味をもち、その研究に携わりたいという気持ちを持ちました。そのような経緯もあり、山西研究室において、未解明であったHHV-6の侵入機構の研究に携わらせていただけることになりました。

II. ヒトヘルペスウイルス 6 (human herpesvirus-6 ; HHV-6)

ヒトに感染するヘルペスウイルスは、今までのところ9種類同定されています。ヘルペスウイルスは、DNAウイルスであり、一度宿主に感染すると潜伏感染するという特徴を示します。ヒトヘルペスウイルスの中で、 β ヘルペスウイルス亜科に属するヒトヘルペスウイルス6(human herpesvirus 6 ; HHV-6)は、その発見後、塩基配列、抗原性、細胞向性などの違いから2つのバリエーション、すなわち、ヒトヘルペスウイルス6A(HHV-6A)およびヒトヘルペスウイルス6B(HHV-6B)に分けられました。HHV-6Aは、

1986年、AIDS患者の末梢血より分離されました³⁾。HHV-6Bは、1988年に山西弘一先生らによって突発性発疹の原因ウイルスとして発見されました⁴⁾。すなわち、HHV-6Bは、乳幼児期に初感染し、突発性発疹を発症させますが、HHV-6Aは、現在までに数種類の株しか分離されておらず、その病態は、今もなお不明であります。よって、ほぼ100%の成人の体内に潜伏感染しているのはHHV-6Bであります。このようなこともあり、2012年、HHV-6AおよびHHV-6Bは、異なったウイルスであると分類されたのです⁵⁾。

Ⅲ. HHV-6A によって誘導される細胞膜融合

1999年、HHV-6の宿主受容体は、ヒトCD46であることが報告されました⁶⁾。当時は、ヒトCD46が、HHV-6AおよびHHV-6Bの受容体であると報告されました。

その頃、私たちは、さまざまなヒト細胞 (Jurkat細胞などのT細胞株や293細胞など) に高力価のHHV-6Aウイルス粒子 (UVで不活化されたウイルス粒子でも同様) を作用させると、作用直後から多核形成を伴った細胞膜融合 (巨細胞形成) が認められることを見出しました。この結果より、HHV-6Aがひき起こす細胞膜融合には細胞内でのウイルス増殖は必要ではないことが明らかとなりました。そこで、CHO (Chinese hamster ovary) 細胞にHHV-6A粒子を作用させましたが、ウイルス粒子による細胞膜融合は認められませんでした。そこで、今度は、HHV-6の宿主受容体であるヒトCD46を恒常的に発現させたCHO細胞 (北海道大学大学院医学研究科 瀬谷 司教授より分与) にHHV-6Aのウイルス粒子を作用させました。すると、多核を伴った巨細胞形成がCHO細胞において見られました⁷⁾。UV照射したHHV-6A粒子をこの細胞に作用させた場合も同様に巨細胞が認められました。この現象は、HHV-6Bウイルス粒子を作用させた場合には見られませんでした。

この細胞間膜融合はウイルスのエンベロープに存在するウイルス糖たんぱく質である糖たんぱく質B (glycoprotein B : gB)あるいは糖たんぱく質H (gH) に対する抗体で阻止されました。よって、HHV-6A

がひき起こす細胞間の膜融合にはウイルス糖たんぱく質であるgBおよびgHがその働きを担っていることが明らかになりました。ゆえに、HHV-6Aは、ヒトCD46の存在下において、ウイルス増殖がない状態であっても、ウイルス粒子のエンベロープに存在するウイルス糖たんぱく質の働きだけで膜融合をひき起こすこと (fusion-from-without : FFWO) が証明されました。しかし、上述のように、HHV-6Bを同様にこのような細胞に作用させた場合には、同様の現象は認められませんでした。これらのことより、われわれは、HHV-6Bには、ヒトCD46ではない別の宿主受容体が存在しているのではないかと考えました。

Ⅳ. HHV-6 gH/gL/gQ1/gQ2 複合体の発見

HHV-6BおよびHHV-6Aの宿主細胞への侵入機構を解析するために、HHV-6に特異的にコードされ、かつHHV-6A/B間で相同性が低いと予測された糖たんぱく質遺伝子に焦点をあてて、その解析を当時大学院生であったAkkapaiboonさんと共に始めました。HHV-6A/BがともにコードするU100遺伝子は、機能が同定されておらず、糖たんぱく質であろうと予測された遺伝子のひとつでした。そこで、そのmRNAの発現を調べたところ、U100は、スプライスされた複数のmRNAより構成されていました。そこで、一番長いmRNAより翻訳されると考えられるたんぱく質のN末端およびC末端を認識する抗体を作製し、HHV-6AおよびHHV-6B感染細胞を用いて、western blot解析を行ったところ、主に2種類の異なる糖たんぱく質が検出されました。そこで、われわれは、各々の新たな糖たんぱく質をglycoprotein Q1およびQ2 (gQ1およびgQ2) と命名しました^{8,9)}。HHV-6A/Bの感染細胞では、gQ1およびgQ2は複合体を形成しており、高マンノースN型糖鎖が付加されたgQ1-74K、gQ2-34Kおよび複合型糖鎖が付加されたgQ1-80K、gQ2-37Kが検出されました。感染後期になるに従い、gQ1-80K、gQ2-37Kの割合が増すことが明らかとなりました。HHV-6A/B感染細胞を用いて、gQ1に対する抗体で免疫沈降し、SDS-PAGEの後に銀染色を行ったところ、約100kDa付近に、gQ1やgQ2と

は異なったバンドが見られました。このたんぱく質は、そのサイズより推測し、gHではないかと考え、gHに対する抗体でwestern blotを行ったところ、見事に反応し、gQ1/gQ2複合体は、gHと結合していることが明らかとなりました。gHは、ヘルペスウイルスに保存された糖たんぱく質であり、同じく保存されたgLと複合体を形成していることが知られています。HHV-6も同様であり、gQ1/gQ2複合体は、このgH/gL複合体と結合し、4量体(gH/gL/gQ1/gQ2複合体)を形成していました。そして、この4量体は、ウイルス粒子内に取り込まれており、ウイルスエンベロープに発現していました。gQ1, gQ2は他のエンベロープ糖蛋白質(gH, gB, gLなど)と比較してHHV-6BおよびHHV-6A間でのアミノ酸の相同性が低く(約70-80%)、ウイルス間の細胞向性の違いに何らかの役割を果たしていることが、この時推測されました。そして、gQ1に対する抗体は中和能を持つことが、研究室の河端暁子博士(現神戸大学医学研究科助教)や前木孝弘博士(現国立感染症研究所研究員)の研究で明らかとなりました^{10,11)}。この後に、われわれは、gQ1/gQ2複合体は、HHV-6AおよびHHV-6Bの異なった受容体認識を行う重要なウイルスたんぱく質複合体であることを見いだしました^{12,13)}。

V. HHV-6 宿主受容体ヒト CD46 に対するウイルス側リガンドの同定

HHV-6の宿主レセプターは、ヒトCD46であることが報告されていましたが、そのウイルス側リガンドに関しては同定されていませんでした。われわれは、可溶性CD46を用いたプルダウン法により、リガンド同定を試みたところ、ヒトCD46のウイルス側リガンドは、我々が同定した新規糖たんぱく質複合体、gH/gL/gQ1/gQ2複合体でした¹⁴⁾。また、HHV-6Aの感染を中和できる抗CD46抗体(HHV-6Aの感染を中和できる濃度)は、HHV-6Bの感染を阻止することはできず、さらに同定したリガンドであるgH/gL/gQ1/gQ2複合体のヒトCD46への結合もウイルス間で差が認められました。すなわち、HHV-6BのgH/gL/gQ1/gQ2複合体は、ヒトCD46に結合せず、HHV-6Aの4量体のみが、ヒトCD46に結合しました。よって、異なった宿主受容体の認識が

ウイルス間における細胞向性の違いに関与していると考え、HHV-6Bには、別の宿主受容体が存在することを示しました。

VI. HHV-6B 特異的な受容体ヒト CD134 の発見

われわれは、HHV-6B特異的に働く宿主受容体が存在すると信じて、その受容体のクローニングを始めました。種々の方法を試みましたが、なかなか同定に至りませんでした。そんな中、上記で同定したgH/gL/gQ1/gQ2複合体の可溶型を作製することができました。それをベイトとしてHHV-6B感受性細胞を用いて結合する分子を同定することを試みました。仲 哲治先生(現高知大学教授)のグループとの共同研究であるLC/MS/MS解析により、複数の候補タンパク質が検出されました。その中で、その大きさ等を考慮し、ヒトCD134が最終候補となりました。早速、ヒトCD134に対する抗体を用いて、western blotを行ったところ、見事に反応しました。当時、この研究に携わってくれていた湯 華民博士(現南京医科大学教授)と大興奮しながら喜んだことが、今でも忘れられません。次に、本当に、この分子がHHV-6Bの受容体であることを確認するための実験をラボメンバーたちと共に行いました。gH/gL/gQ1/gQ2複合体をベイトとした実験では、HHV-6Bの複合体には、ヒトCD134は結合しますが、HHV-6Aのそれには結合しませんでした。今度は、HHV-6B感受性T細胞から、ヒトCD134をノックダウンし、HHV-6Bを感染させたところ、その細胞にHHV-6Bは、感染しなくなりました。さらに、今度は、HHV-6Bがほとんど感染しないT細胞にヒトCD134を恒常的に発現させて、HHV-6Bを感染させたところ、感染するようになり、さらに、見られなかった巨細胞も観察できました¹⁵⁾(図1)。次々とCD134が受容体であるという確証データが出てきたときには、驚きと嬉しさで、ラボの研究者たちと大興奮でした。そして、研究の醍醐味を皆で共有できた瞬間でもありました。CD134は、活性化したT細胞において発現しており、免疫学的シナプスの形成因子でもあります。HHV-6Bも活性化したT細胞に感染し、増殖できることから理にかなっており、HHV-6B感染機構の解明に、より近付

けたのではないかと思います。

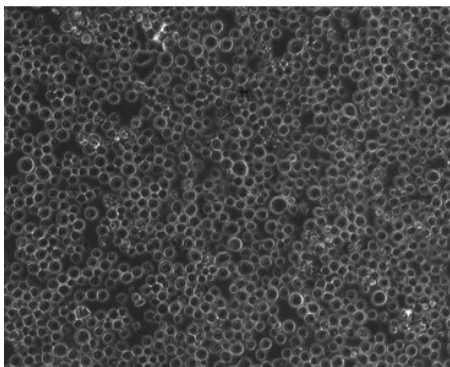
まとめますと、HHV-6B のウイルス粒子のエンベロープには、特異的な糖たんぱく質複合体、gH/gL/gQ1/gQ2 複合体が発現しており、その複合体と宿主受容体であるヒト CD134 がお互いに認識し、結合することにより、HHV-6B は、活性化した T 細胞内に侵入していくことができるのです (図 2)。

この発見は、HHV-6B の宿主受容体同定に向かつて、共に頑張ってくれた研究室の仲間たちと共同研究いただいた素晴らしい先生方のおかげです。そし

て、恩師である山西弘一先生が発見された HHV-6B というウイルスの宿主受容体を仲間たちと共に同定できたことは、この上もない喜びです。かけがえのない皆様と出会えたこの奇跡に感謝しております。そして、新たな仲間も加わり、今も、共に HHV-6 研究に邁進しております。

HHV-6B 感染症およびその感染機構には、まだまだ謎がいっぱいです。HHV-6 研究のさらなる発展を願ってやみません。

J JHAN 細胞



ヒトCD134発現 J JHAN 細胞

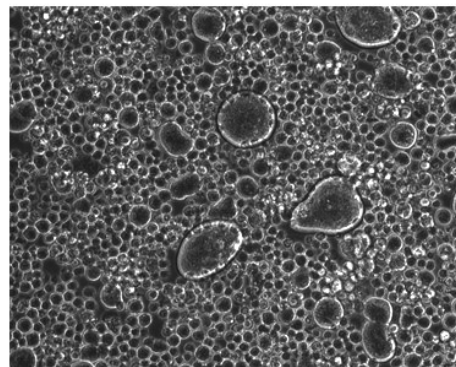


図 1 ヒトCD134発現とHHV-6B感染

JJHAN 細胞 (ヒト T 細胞株) (左) およびヒト CD134 を発現させた JJHAN 細胞 (ヒト T 細胞株) (右) に HHV-6B を感染させた。ヒト CD134 を発現させた JJHAN 細胞では、HHV-6B 感染によって、巨細胞形成が見られるが (右)、JJHAN 細胞 (ヒト T 細胞株) では、巨細胞形成は見られない (左)。

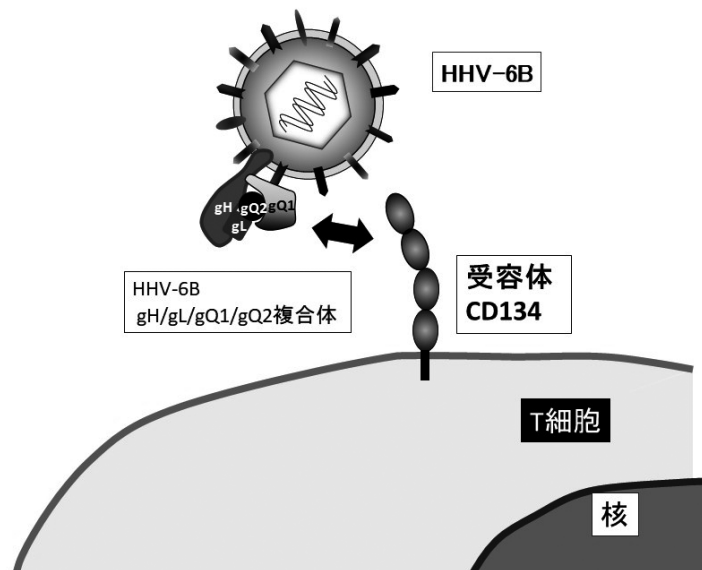


図 2 HHV-6Bウイルスと宿主受容体

HHV-6B ウイルス粒子のエンベロープには、ウイルス特異的な複合体である gH/gL/gQ1/gQ2 複合体が発現している。その複合体は、活性化したヒト T 細胞に発現している CD134 を認識して結合する。ヒト CD134 は、HHV-6B の細胞への侵入に必要な宿主受容体である。

謝 辞

共に研究に携わってくださった同僚、共同研究者、そして、ご指導、ご支援いただいたすべての皆様に深く感謝しております。今後も頂いた賞に恥じぬよう、さらなる研究の発展を目指してより一層精進して参りたいと存じます。さらには、後進の育成にも努めて参りたいと存じます。今後ともご指導、ご鞭撻を賜りますようお願い申し上げます。

文 献

- 1) Isegawa, Y., et al., *Comparison of the complete DNA sequences of human herpesvirus 6 variants A and B*. J Virol, 1999. **73**(10): p. 8053-63.
- 2) Montgomery, R.I., et al., *Herpes simplex virus-1 entry into cells mediated by a novel member of the TNF/NGF receptor family*. Cell, 1996. **87**(3): p. 427-36.
- 3) Salahuddin, S.Z., et al., *Isolation of a new virus, HBLV, in patients with lymphoproliferative disorders*. Science, 1986. **234**(4776): p. 596-601.
- 4) Yamanishi, K., et al., *Identification of Human Herpesvirus-6 as a Causal Agent for Exanthem Subitum*. Lancet, 1988. **1**(8594): p. 1065-1067.
- 5) Ablashi, D., et al., *Classification of HHV-6A and HHV-6B as distinct viruses*. Archives of Virology, 2014. **159**(5): p. 863-870.
- 6) Santoro, F., et al., *CD46 is a cellular receptor for human herpesvirus 6*. Cell, 1999. **99**(7): p. 817-27.
- 7) Mori, Y., et al., *Human herpesvirus 6 variant A but not variant B induces fusion from without in a variety of human cells through a human herpesvirus 6 entry receptor, CD46*. Journal of virology, 2002. **76**(13): p. 6750-61.
- 8) Akkapaiboon, P., et al., *Intracellular processing of human herpesvirus 6 glycoproteins Q1 and Q2 into tetrameric complexes expressed on the viral envelope*. Journal of Virology, 2004. **78**(15): p. 7969-7983.
- 9) Mori, Y., et al., *The human herpesvirus 6 U100 gene product is the third component of the gH-gL glycoprotein complex on the viral envelope*. Journal of Virology, 2003. **77**(4): p. 2452-2458.
- 10) Kawabata, A., et al., *Analysis of a neutralizing antibody for human herpesvirus 6B reveals a role for glycoprotein Q1 in viral entry*. Journal of virology, 2011. **85**(24): p. 12962-71.
- 11) Maeki, T., et al., *Identification of the human herpesvirus 6A gQ1 domain essential for its functional conformation*. Journal of virology, 2013. **87**(12): p. 7054-63.
- 12) Tang, H.M., et al., *Detailed Study of the Interaction between Human Herpesvirus 6B Glycoprotein Complex and Its Cellular Receptor, Human CD134*. Journal of Virology, 2014. **88**(18): p. 10875-10882.
- 13) Jasirwan, C., et al., *Human herpesvirus-6A gQ1 and gQ2 are critical for human CD46 usage*. Microbiol Immunol, 2014. **58**(1): p. 22-30.
- 14) Mori, Y., et al., *Human herpesvirus 6 variant A glycoprotein H-glycoprotein L-glycoprotein Q complex associates with human CD46*. J Virol, 2003. **77**(8): p. 4992-9.
- 15) Tang, H., et al., *CD134 is a cellular receptor specific for human herpesvirus-6B entry*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(22): p. 9096-9.