ヒトヘルペスウイルス7型の DNA ポリメラーゼサブユニットに 対する単クローン抗体の性状と有用性

難波ひかる

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 病原ウイルス学
(指導：山田雅夫教授)

Characterization and usefulness of a monoclonal antibody against human herpesvirus-7 DNA polymerase processivity factor

Hikaru Namba

Department of Virology, Okayama University Graduate School of Medicine,
Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama 700-8558, Japan
(Director : Prof. M. Yamada)

A monoclonal antibody (MAb), IK17, was developed and found useful for the analysis of human herpesvirus-7 (HHV7) genome replication. In Western blot analysis, the MAb IK17 specifically detected an HHV7 DNA polymerase subunit, U27 protein, expressed in both *Escherichia coli* (*E. Coli*) and HHV7-infected cells. Analysis by the same method of truncated U27 proteins expressed in *E. Coli* demonstrated that the MAb IK17 recognizes an epitope between amino acid 1 and 133 of the U27 protein. The indirect immunofluorescence (IF) method with MAb IK17 detected an unexpected reduction of U27 protein in the infected cells that were treated with a viral DNA polymerase inhibitor, phosphonoacetic acid (PAA), although no reduction of U27 mRNA was observed in the cells by Northern blot analysis. The data suggest the possible usefulness of the MAb IK17 for obtaining clues to characterize an unknown feature of the U27 protein. Immunoprecipitation experiments with the MAb IK17 enabled to detect at least four U27 protein-associated phosphorylated polypeptides in addition to the U27 protein itself. The result indicates the usefulness of the MAb IK17 for qualitative and quantitative analysis of the U27 protein-associated viral and cellular factors. These analyses contribute to elucidation of the HHV7 genome replication system.

キーワード：ヒトヘルペスウイルス7型 (Human Herpesvirus-7), DNA polymerase processivity factor,
単クローン抗体 (monoclonal antibody)

緒 言

大多数のヒトがヒトヘルペスウイルスをその身体の中に保有している。そのなかでも、 β ヘルペスウイルスに属する3種のウイルス、ヒトサイトメガロウイルス、ヒトヘルペスウイルス6型 (HHV6)、ヒトヘルペスウイルス7型 (HHV7) は、ほとんどのヒトにより保有されるウイルスである^{1,2)}。この保有率の高さは、これらのウイルスが、巧妙な免疫回避機能を備えていること、並びに宿主細胞への障害を最小限に抑えた効率の良いウイルス増殖機構を持っていること、に起因すると考えられる。特に、HHV7は、

宿主の免疫能が低下した際にも特記すべき疾病を引き起こしたという報告が認められない。また、健康人でも唾液中に高頻度に感染性ウイルスを排出している³⁻⁷⁾。これらの事実から HHV7が宿主と最もよく調和し、共存共栄をはかっているウイルスであると言える。

保有率の高さを説明する上記二つの理由のうち、「免疫回避機能」は数多くの研究がなされ、解明されつつある⁸⁻¹¹⁾。しかし、「宿主細胞障害を最小限に抑えた効率的ウイルス増殖機構」についてはほとんど明らかにされていない。ウイルス増殖機構の中で最も重要なものはウイルスゲノム複製である。そして、ウイルスゲノム複製の中心に位置するのがウイルス由来 DNA ポリメラーゼである。そこで、HHV7が如何にして「宿主細胞障害を最小限に抑えた効率的ウイルス増殖機構」を作り上げているかを明らかにする一環として、HHV7由来 DNA ポリメラーゼと、他の HHV7由

平成17年7月15日受理
〒700-8558 岡山市鹿田町2-5-1
電話：086-235-7167 FAX：086-235-7169
E-mail：hnamba@cc.okayama-u.ac.jp

来蛋白質や細胞因子との相互作用を調べ、他のウイルスと比較することが重要である。この調査・研究を行うためには HHV7由来 DNA ポリメラーゼに対する単クローン抗体が必要である。特に、免疫沈降法により HHV7由来 DNA ポリメラーゼと複合体を形成する他の因子を分取できる単クローン抗体が必須である。今回、筆者は HHV7由来 DNA ポリメラーゼに対する単クローン抗体を作成し、その単クローン抗体が HHV7由来 DNA ポリメラーゼと相互作用する他の因子を解析することに有用であることが判明したので報告する。

材料と方法

1. 細胞とウイルス

ウイルス増殖には臍帯血単核球 (CBMC) を用いた。臍帯血を PBS (－) で希釈後、Ficoll-conray にて分離し、10% fetal calf serum (FCS), 5 ug/ml phytohemagglutinin (PHA), 0.1U/ml 組換えヒト interleukin-2 (IL-2) 含有 RPMI1640培地で3日間培養後、ウイルスを感染させた。HHV7は臨床分離株である MSO 株と MRK 株¹²⁾を使用した。培養3日目の CBMC と HHV7感染細胞を5:1で混合し、10% FCS, 5 ug/ml PHA, 0.1U/ml IL-2 含有 RPMI1640培地で5日間共培養した。培養液を遠心分離し、上清から感染実験のウイルス液、あるいは、精製ウイルス粒子を調製した。この精製ウイルス粒子は、単クローン抗体作製の抗原、ウエスタンブロットティングの抗原に供した。一方、HHV7感染細胞は間接蛍光抗体法やウエスタンブロットティングの抗原に供した。

2. 単クローン抗体の作成

単クローン抗体 (MAb) の作成は常法に従った¹³⁾。HHV7感染細胞を Freund's complete adjuvant と共に、6週齢 BALB/cマウスの背面皮下に免疫した。3～4週後、精製 HHV7粒子を静脈注射しブーストをかけ、その3日後にエーテル麻酔により安楽死させ、脾臓リンパ球を分離した。脾臓リンパ球を P3 X63-Ag8-U1 myeloma cells と50% polyethylene glycol 4000存在下で融合し、96穴プレートで HAT 培地を用いて培養した。増殖した細胞 (ハイブリドーマ) の上清を用いて、HHV7感染細胞を抗原とする間接蛍光抗体法をおこない、抗体産生細胞を選択した。さらに、抗体産生細胞を限界希釈法により単クローンとした。

3. Glutathione-S-transferase (GST) 融合 HHV7 U27蛋白質の作製

HHV7 JI 株¹⁴⁾の U27蛋白質アミノ酸配列を GENETYX ソフトウェアを用いて解析し、T細胞認識エピトープを検索した。そこで U27全長 (727F; Met₁-Met₃₆₄) と、予想される T cell epitope の分布より3つの部分 (727N; Met₁-

Ser₁₃₃, 727M; Asp₁₃₄-Lys₂₆₇, 727C; Asn₂₆₈-Met₃₆₄) に分割して GST 融合蛋白質, GST727N, GST727M, GST727C を作製した (図1)。蛋白質の発現はアマシヤムジャパンの GST 融合蛋白質発現キットを用いた。まず、目的部分のプライマーとして、727F は H7U27BEA (5'-cgggatccgcgtaggtagcgtacaa-3') と H7U27BE3E (5'-ccggaattccgcgcattccacatctttgtct-3'), 727N は H7U27BEA と H7U27BEN1E (5'-ccggaattccgcggtatgcccgtgacta-3'), 727M は H7U27M2BEB (5'-cgggatccgatattgtgcacaa-3') と H7U27BEM1F (5'-ccggaattccgcggttttagc gattaaaa-3'), 727C は H7U27BEC1B (5'-cgggatccgcgaattgttttctgacc-3') と H7U27BE3E を用い、HHV7 MSO 株の DNA を鋳型として、94℃ 30秒間、56℃ 60秒間、72℃ 60秒間の反応を25サイクル行い、目的遺伝子を増幅した。増幅した遺伝子を制限酵素 *Bam*H I と *Eco*R I で処理し、精製後に *Bam*H I と *Eco*R I で処理した pGEX-4 T-1 クローニングベクターに接合し、大腸菌 JM109 に形質導入した。アンピシリン添加 LB 培地上でコロニーを選別した後、目的の蛋白質を発現しているコロニーを選択し、プラスミドクローンを抽出し保存した。得られたクローンを大腸菌 BL21株に導入し、0.1mM IPTG で発現誘導した大腸菌 lysate を抗原として供した。

4. ウエスタンブロットティング

HHV7 MRK 株感染細胞または GST 融合 U27蛋白質を発現する大腸菌を抗原とし、10% SDS-PAGE 電気泳動後、ニトロセルロース膜に転写し、5% スキムミルク、0.2% Tween-20添加 TBS (20mM Tris-HCl, 0.5M NaCl, pH 7.5) でブロッキングした。単クローン抗体反応後、TBS で洗浄し、2次抗体 (アルカリフォスファターゼ標識抗マウス IgG 抗体) を更に反応させた。検出はバイオラッド製発色キットを用いた。

図1 GST 融合 U27部分蛋白質の構造

HHV7 U27蛋白質の全長を727F (Met₁-Met₃₆₄)、部分蛋白質を727N (Met₁-Ser₁₃₃)、727M (Asp₁₃₄-Lys₂₆₇)、727C (Asn₂₆₈-Met₃₆₄) とし、N末側に GST を融合して、GST727F, GST727N, GST727M, GST727C とした。GENETYX ソフトウェアで予想される T cell epitope の存在を*で示す。PSORT ソフトウェアにより予想される核局在シグナルを NLS で示す。

5. 免疫蛍光抗体法 (IF)

HHV7 MSO 株感染細胞を PBS (－) で洗浄後、14穴スライドガラス上で風乾後、冷アセトン固定した。ハイブリドーマの培養上清を 1 次抗体とし、FITC 標識抗マウス IgG 抗体を 2 次抗体とした。

6. ノザンブロッティング

培養 3 日目の CBMC に HHV7 MSO 株を感染させ、12, 36, 72 時間後、cycloheximide 存在下で 12 時間後、ホスホノ酢酸 (PAA) 存在下で 36 時間後に細胞を回収し、AGPC 法¹⁵⁾にて RNA を抽出した。抽出した RNA を DNaseI 処理し、20 ug total RNA を泳動に用いた。ホルムアルデヒドゲルで泳動し、Hybond-N⁺ (Amersham) にブロッティングした。HHV7 U27 全長、U54 全長、 β -actin 遺伝子を放射標識プローブとして用いてハイブリダイゼーションし、オートラジオグラフィーにて検出した。

7. 免疫沈降法

HHV7 MSO 株を 1 TCID₅₀/cell で CBMC に感染させ、感染後 3 日目に培養 3 日目の非感染細胞と 1 : 3 で混合し、50 uCi/ml [³⁵S]methionine (Amersham) を非放射標識 methionine に対し 1 : 10 で加えた 10% FCS, 5 ug/ml PHA, 0.1 U/ml IL-2 含有 RPMI1640 培地 (GIBCO) で 48 時間培養した。また別に、200 uCi/ml [³²P]orthophosphate (Dupon) を加えた 10% FCS, 5 ug/ml PHA, 0.1 U/ml IL-2 含有 RPMI1640 培地 (GIBCO) で 48 時間培養した。HHV7 感染細胞を RIPA 緩衝液 (0.15 M NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 1% deoxycholic acid, 0.1% sodium dodecyl sulfate, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 0.1 mM TLCK, 0.1 mM TPCK, 2 mM Tris-HCl, pH 7.2) にて溶解し、遠心 (50,000xg, 1 時間) して上清に抗 HHV7 MAb IK17 を加えて 4℃ で反応後、recombinant Protein G Sepharose 4 B (Zymed Laboratories) で免疫複合体を回収し、SDS-PAGE 泳動後にオートラジオグラフィーにて検出した。

結 果

1. GST 融合 HHV7 U27 蛋白質に対する抗 HHV7 単クローン抗体の反応性

HHV7 の DNA ポリメラーゼサブユニットである U27 蛋白質全長 (727F) を GST 融合蛋白質 (GST727F) として大腸菌で発現させた (図 1)。この GST727F を発現する大腸菌 lysate を用いて、作製した抗 HHV7 MAb の反応性をウエスタンブロット法で調べた。その結果、MAb IK17 が GST727F を認識した (図 2)。

2. HHV7 MRK 株感染細胞における MAb IK17 の反応性

MAb IK17 を用いて HHV7 感染細胞 lysate を抗原とし

たウエスタンブロッティングを行ったところ、40 kDa の単一バンドが検出された (図 3)。また、間接蛍光抗体法により HHV7 感染細胞において MAb IK17 に認識される抗原 (U27 蛋白質) の発現が核に認められた (図 4)。また、ウイルス DNA polymerase 阻害剤である PAA 添加により、U27 蛋白質の発現が減弱した。ノザンハイブリダイゼーション法による解析では PAA 添加による低下は認められなかった。一方、後期遺伝子である U54 遺伝子の発現は PAA 添加により減弱した (データは示していない)。

3. MAb IK17 が認識する領域の同定

HHV7 U27 蛋白質を 3 つの領域に分け、GST 融合蛋白質として、GST727N, GST727M, GST727C を発現 (図 1) し、ウエスタンブロッティングを行った。その結果、3 つの部分蛋白質のうち、GST727N のみが MAb IK17 に反応した (図 5)。

4. MAb IK17 により共沈する蛋白質複合体

MAb IK17 を用いた [³⁵S]methionine 標識免疫沈降法により、共沈する複数の蛋白質が認められた (図 6)。加えて、[³²P]orthophosphate 標識による免疫沈降法では、リン酸化活性の強い U27 蛋白質 (40 kDa) の他に、複数のリン酸化蛋白質の共沈が認められた (図 6)。

図 2 MAb IK17 の GST 融合 U27 蛋白質に対する反応性
GST727F 発現プラスミドを導入した大腸菌 BL21 (lane 1) に 0.1 mM IPTG 添加 (lane 2), empty vector を導入し 0.1 mM IPTG 添加 (lane 3) して発現誘導させた大腸菌 lysate を抗原にしたウエスタンブロッティング。左側の数字はタンパク分子重量マーカーの位置を示す。矢印は GST727F (66 kDa) を示している。

図3 HHV7感染細胞における MAb IK17の反応性
HHV7感染5日後の臍帯血単核球 lysate を用いたウェスタンブロットニング。非感染臍帯血単核球 (lane 1), HHV7感染臍帯血単核球 (lane 2) の lysate を抗原とし, MAb IK17で検出した。左側の数字は蛋白分子量マーカーを示す。矢印はU27蛋白質に相当する40 kDa のバンドを示している。

図5 GST融合U27部分蛋白質を用いた MAb IK17認識領域の同定
GST727N (lane 1), GST727M (lane 2), GST727C (lane 3) を発現させた大腸菌 lysate を抗原として, MAb IK17に対する反応性をウェスタンブロット法で調べた。左側の数字は蛋白分子量マーカーを示す。右側矢印は GST727N に相当する41 kDa のバンドを示している。

図4 MAb IK17を用いた HHV7感染細胞における間接蛍光抗体像
HHV7感染5日後の臍帯血単核球に対する MAb IK17の反応性を間接蛍光抗体法で調べた。矢印は MAb IK17で検出される U27蛋白質の核局在を示す。

図6 MAb IK17を用いた HHV7感染細胞における免疫沈降反応

HHV7感染3日目の臍帯血単核球と培養2日目の非感染臍帯血単核球を $[^{35}\text{S}]$ methionine (lane 1) または $[^{32}\text{P}]$ orthophosphate (lane 2) 存在下で共培養して放射標識された細胞 lysate を用いて MAb IK17で免疫沈降させた。沈降した免疫複合体を SDS-PAGE で泳動, 乾燥したゲルのオートラジオグラフィー。左側の数字は蛋白質分子量マーカー, 右側の矢印は U27 に相当する40 kDa のバンドを示す。

考 察

MAb IK17は大腸菌で発現させた HHV7の DNA ポリメラーゼサブユニット U27蛋白質をウエスタンブロット法で特異的に検出した。また、MAb IK17は HHV7感染細胞の lysate をウエスタンブロット法で解析した際に、U27蛋白質に相当する40 kDa の蛋白質を検出した。さらに、U27蛋白質の一部を大腸菌で発現させて、MAb IK17を用いたウエスタンブロット法で解析すると、MAb IK17はU27蛋白質の1-133アミノ酸を発現させた場合に蛋白質と結合した。これらの事実から MAb IK17は HHV7 U27蛋白質の N末端を特異的に認識することが明らかとなった。Takeda ら¹⁶⁾は HHV7のU27蛋白質のC末端を認識する MAb 5H4を報告している。これに対し、MAb IK17は MAb 5H4とは異なるエピトープを認識している。このことが下記に述べるように重要な意味をもって来る。

MAb IK17を用いた免疫沈降法によって、感染細胞 lysate を調べたところ、U27蛋白質と結合する5つ以上の蛋白質が同定された。このうち少なくとも4つの蛋白質はリン酸化蛋白質であり、1つは非リン酸化蛋白質であった。この結果は、これらの蛋白質が、U27蛋白質と結合し、何らかの相互作用をしていることを示唆する。U27蛋白質は DNA polymerase のサブユニットであることから、U27蛋白質との結合が確認されたこれらの蛋白質群の一部は、HHV7 DNA 複製に関連するウイルス由来蛋白質であることが予想される。また、これらの蛋白質群の中には、その推定分子量から考えてウイルス由来複製関連蛋白質とは考えがたいものもあり、細胞側因子ではないかと考えられる。これらの事柄から MAb IK17はU27蛋白質を中心とする HHV7 DNA 複製を解析するのに役立つ抗体である。一方、U27蛋白質のC末端を認識する MAb 5H4を用いた実験では、U27蛋白質と共沈する蛋白質の存在は示されていない。これは、MAb 5H4の認識エピトープがU27蛋白質と他の因子の結合を阻害する部位に存在するためと考えられる。したがって、U27蛋白質を中心とする HHV7 DNA 複製の解析には、MAb 5H4より MAb IK17の方が優れていると言える。

MAb IK17を IF 法による感染細胞中の抗原検出に用いてみると、U27蛋白質は核の中に局在することが認められた。この結果は Takeda ら¹⁶⁾の報告と一致する。また、PAAを用いて同様の検討を試みた際に、U27蛋白質発現の減少が認められた。しかし、ノザン法によりU27遺伝子の発現を調べたところ、U27 mRNA は減少していなかった(データは示していない)。したがって、この予期せぬ PAA によるU27蛋白質発現の減少は、U27遺伝子の転写レベルで生

じたものではなく、U27 mRNA からの翻訳、またはU27蛋白質の安定性の低下から起こった可能性が推測される。このように、MAb IK17はU27蛋白質の代謝に関する未知なる部分を調べることに役立つかもしれない。

今後は、MAb IK17を用いて、U27蛋白質を中心とした HHV7 DNA 複製の質的、量的な解析を行っていくつもりである。

結 語

HHV7 DNA polymerase のサブユニットである processivity factor に対する MAb IK17を作製した。MAb IK17はウエスタンブロット、蛍光抗体法(IF)、免疫沈降法に適用可能であった。特に、MAb IK17を用いた免疫沈降法によりU27蛋白質と結合する複数の蛋白質を同定することができたことから、U27蛋白質の関与する、ウイルス DNA の複製機構の解析に有用であることが示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導と御校閲を賜った岡山大学大学院医歯薬総合研究科病原ウイルス学教室の山田雅夫教授に深謝致します。

文 献

- Wyatt LS, Rodriguez WJ, Balachandran N and Frenkel N : Human herpesvirus 7 : antigenic properties and prevalence in children and adults. *J Virol* (1991) **65**, 6260-6265.
- Clark DA, Freeland ML, Mackie LK, Jarrett RF and Onions DE : Prevalence of antibody to human herpesvirus 7 by age. *J Infect Dis* (1993) **168**, 251-252.
- Frenkel N and Wyatt LS : HHV-6 and HHV-7 as exogenous agents in human lymphocytes. *Dev Biol Stand* (1992) **76**, 259-265.
- Wyatt LS and Frenkel N : Human herpesvirus 7 is a constitutive inhabitant of adult human saliva. *J Virol* (1992) **66**, 3206-3209.
- Black JB, Inoue N, Kite-Powell K, Zaki S and Pellett PE : Frequent isolation of human herpesvirus 7 from saliva. *Virus Res* (1993) **29**, 91-98.
- Fujiwara N, Namba H, Ohuchi R, Isomura H, Uno F, Yoshida M, Nii S and Yamada M : Monitoring of human herpesvirus -6 and -7 genomes in saliva samples of healthy adults by competitive quantitative PCR. *J Med Virol* (2000) **61**, 208-213.
- Hidaka Y, Liu Y, Yamamoto M, Mori R, Miyazaki C, Kusu-hara K, Okada K and Ueda K : Frequent isolation of human herpesvirus 7 from saliva samples. *J Med Virol* (1993) **40**, 343-346.
- Atedzoe BN, Ahmad A and Menezes J : Enhancement of natural killer cell cytotoxicity by the human herpesvirus-7 via IL-15 induction. *J Immunol* (1997) **159**, 4966-4972.

- 9) Secchiero P, Bertolaso L, Gibellini D, Ricci D, Bemis K, Capitani S, Gallo RC and Zauli G : Enforced expression of human bcl-2 in CD4 + T cells enhances human herpesvirus 7 replication and induction of cytopathic effects. *Eur J Immunol* (1998) **28**, 1587-1596.
- 10) Atedzoe BN, Menezes J, D'Addario M, Xu J, Ongradi J and Ahmad A : Modulatory effects of human herpes virus-7 on cytokine synthesis and cell proliferation in human peripheral blood mononuclear cell cultures. *J Leukoc Biol* (1999) **66**, 822-828.
- 11) Hudson AW, Howley PM and Ploegh HL : A human herpesvirus 7 glycoprotein, U21, diverts major histocompatibility complex class I molecules to lysosomes. *J Virol* (2001) **75**, 12347-12358.
- 12) Isomura H, Yamada M, Yoshida M, Tanaka H, Kitamura T, Oda M, Nii S and Seino Y : Suppressive effects of human herpesvirus 6 on in vitro colony formation of hematopoietic progenitor cells. *J Med Virol* (1997) **52**, 406-412.
- 13) Tsukazaki T, Yoshida M, Namba H, Yamada M, Shimizu N and Nii S : Development of a dot blot neutralizing assay for HHV-6 and HHV-7 using specific monoclonal antibodies. *J Virol Methods* (1998) **73**, 141-149.
- 14) Nicholas J : Determination and analysis of the complete nucleotide sequence of human herpesvirus. *J Virol* (1996) **70**, 5975-5989.
- 15) Chomczynski P and Sacchi N : Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* (1987) **162**, 156-159.
- 16) Takeda K, Haque M, Nagoshi E, Takemoto M, Shimamoto T, Yoneda Y and Yamanishi K : Characterization of human herpesvirus 7 U27 gene product and identification of its nuclear localization signal. *Virology* (2000) **272**, 394-401.