

岐阜薬科大学博士（薬学）学位論文

サイトメガロウイルスの感染防御回避機構の解析

**The Mechanisms of Immune Evasion by Guinea Pig  
Cytomegalovirus**

馬 島 龍 一

2020 年



## 目次

序論.....	1
第1章 $\beta$ 亜科ウイルスのゲノム構造比較に基づく感染防御回避遺伝子の推定.....	6
第1節 緒言 .....	6
第2節 材料および方法 .....	6
第3節 結果 .....	8
第4節 考察 .....	16
第2章 GPCMV GP38.1 の機能解析.....	17
第1節 緒言 .....	17
第2節 材料および方法 .....	18
第3節 結果 .....	27
第4節 考察 .....	38
第3章 GPCMV GP119.1 の機能解析.....	41
第1節 緒言 .....	41
第2節 材料および方法 .....	42
第3節 結果 .....	45
第4節 考察 .....	56
総括および結論.....	58
謝辞.....	60
引用文献.....	61
略語一覧.....	66
試薬一覧.....	68



## 序論

### 1. サイトメガロウイルス (CMV) について

#### ウイルス学的特徴

サイトメガロウイルス (CMV) は、ヘルペスウイルス科  $\beta$  ヘルペスウイルス亜科 (以下、 $\beta$  亜科) に属する 2 本鎖 DNA ウイルスである。ウイルス粒子の直径は約 200 nm とヘルペスウイルス科において最大であり、ウイルス粒子はウイルスゲノムを内包する正二十面体のタンパク質殻であるカプシド、ウイルス糖タンパク質を含みウイルス粒子表面を覆う脂質膜であるエンベロープ、カプシドとエンベロープの間に存在するタンパク質群であるテグメントから構成されている[1]。

CMV は上皮細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞、血球系細胞 (単球やマクロファージ) など幅広い細胞種や組織に対して親和性を有する。その一方で、何百万年にもわたる共進化と種分化によって自然宿主に適応してきた CMV は極めて高い宿主特異性を持ち、ヒト CMV (HCMV) はヒト以外の動物には感染しない[1]。

#### 感染経路および病態

HCMV 初感染の多くは幼少期に起こる。主にウイルス粒子を含む尿や唾液との接触、あるいは授乳によって不顕性感染し、生涯続く潜伏感染が成立する。その他の感染経路として、分娩時の産道感染や、輸血・臓器移植などの医原的感染も確認されている。

通常、健常状態の宿主が HCMV 感染症を発症することは稀である。一方、免疫抑制状態にある臓器移植患者や AIDS 患者では、初感染または潜伏していたウイルスの再活性化によって肺炎、脳炎、網膜炎などの重篤な病態を呈するため、臨床上問題となる。

CMV 感染症が大きく問題視されるもう一つの理由は、妊婦に感染した CMV が胎盤を介して胎児に先天性感染することにある。我が国では、先天性 CMV 感染は 300 人に 1 人の割合で起こり、流産や死産を引き起こす。また、感染児の約 3 割が点状出血や肝脾腫などの典型的な臨床症状 (24%) および脳内石灰化などの頭部画像所見の異常 (10%) を伴って出生する[2]。さらに、出生時無症候性であった感染児の約 1 割が遅発性の難聴や精神発達遅滞などの神経学的後遺症を発症する[3]。

初感染した乳幼児はその後数年にわたり尿や唾液中にウイルスを排出する。尿中のウイルス粒子は常温で数日は感染性を維持するため、保育園や幼稚園、公園などでの子供同士の密な接触によって多くの乳幼児が CMV に感染すると考えられる。従来、

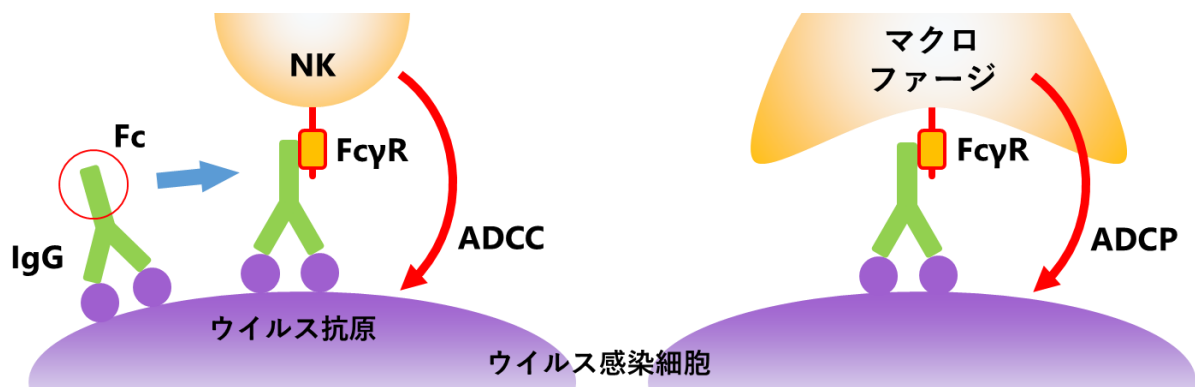
我が国では乳幼児期にほとんどの人が HCMV に感染し、免疫が成立している状態が続いていた。ところが近年では妊娠可能年齢の女性における HCMV 抗体保有率は 90% 台から 70% 台にまで低下していることが、いくつかの地域における血清疫学的研究で報告されている[4]。なお、抗体陽性の母親から出生した児における経胎盤感染の頻度は 0.2-2.2% であるが、妊娠中に初感染を受けた場合では 20-40% まで上昇する[5]。こうした事実は、成人以降に初感染する妊婦の増加により、先天性 CMV 感染症患児を出産する頻度が増加する危険性を示唆している。

また、我が国の調査[6]では、感染児には有意に年長同胞が存在し、感染児と年長同胞のウイルス株は 85% で同一であった。このことから、不顕性感染した年長同胞を介して妊娠中の母親が初感染することで胎児への経胎盤感染が起きるという先天性感染経路が考えられる。妊婦への感染予防教育・啓発のみでこれを防ぐことは非常に困難であり、経胎盤感染に対する予防策の確立が急務となっている。妊婦に使用可能な抗ウイルス薬が存在しないことなどから、最終的にはワクチンによる集団としての防御が必須であると考えられる。しかしながら、実用段階に至ったワクチンは未だ存在しない。

### CMV ワクチン開発

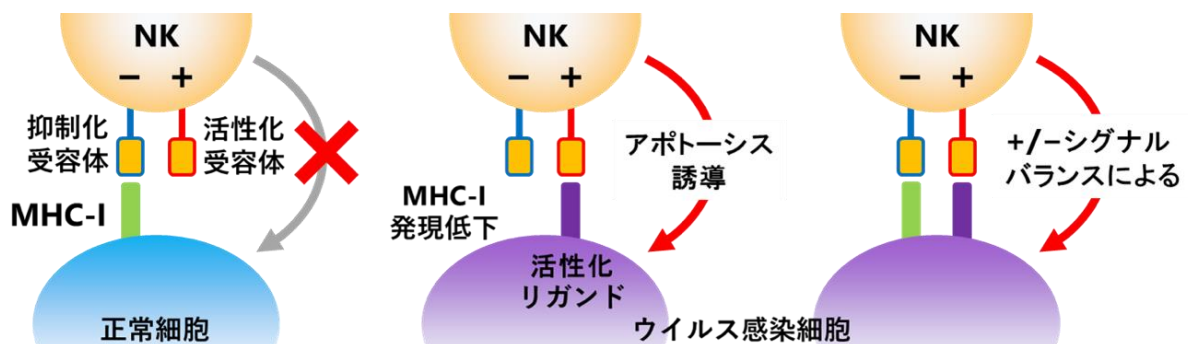
先天性 CMV 感染を防ぐことのできるワクチンに求められることは、ウイルス粒子に結合して感染性を失わせる HCMV 特異的抗体、すなわち中和抗体を誘導し、臓器への感染、特に胎盤への感染を防ぐことであると考えられてきた。これまでに開発・検討されてきたワクチンには、1) 弱毒株 (Towne 株) と強毒株 (Toledo 株) とのキメラを用いた弱毒生ワクチン、2) 特定の遺伝子を欠損させることにより生体内で増殖しない組換えウイルス株を用いた Disabled infectious single cycle (DISC) ワクチン、3) エンベロープ糖タンパク質 B (gB) やテグメントタンパク質 pp65 を発現するウイルスベクター (弱毒カナリア痘ウイルス ALVAC、改変型ワクシニアウイルスアンカラ株 MVA など) を用いたワクチン、4) gB や pp65 抗原を発現するプラスミドやメッセンジャー RNA (mRNA) を、送達体となる脂質ナノパーティクルや免疫賦活剤 (アジュバント) とともに投与する DNA ワクチンや RNA ワクチン、そして 5) 組換え gB タンパク質を用いたサブユニットワクチンなどがある[7]。臨床試験が行われた gB サブユニットワクチンは、野生株の自然感染に対し、実用化には不十分であるものの 50% の感染防御効果を示した[8]。興味深いことに、ワクチン接種により誘導された高力価抗 gB 抗体は中和能に乏しく、細胞培養系における CMV の細胞間伝播を抑制できなかった[9]。モルモット先天性感染動物モデルを用いた gB ウイルスベクターワクチンによ

る防御能も、胎仔へのウイルス伝播を抑制しきれない点において不十分であり、その原因は胎盤深部でのウイルスの細胞間伝播を gB 特異的抗体が抑制できないためであると推測された[10]。このような知見から、近年では中和以外の抗体機能、すなわち抗体の Fc 領域を介した抗体依存性細胞傷害 (ADCC) や抗体依存性細胞貪食 (ADCP) といった作用 (Fig. 1) が gB ワクチンの防御効果に寄与している可能性が指摘されている[9,11,12]。ADCC の主たるエフェクター細胞であるナチュラルキラー (NK) 細胞は自然免疫系を担うリンパ球であり、主要組織適合遺伝子複合体クラス I(MHC-I) 分子の発現が低下したウイルス感染細胞やがん細胞を認識し、MHC 非拘束的にアポトーシスを誘導することで細胞破壊を行うことが知られている (Fig. 2)。



**Fig. 1** Fc $\gamma$  受容体 (Fc $\gamma$ R) によって媒介されるエフェクター細胞機能

(左)Fc $\gamma$ RIIIa を発現するエフェクター細胞 (NK 細胞) が、ウイルス抗原に結合した IgG の Fc 領域を認識して活性化し、パーフォリンおよびグランザイムを放出して標的細胞にアポトーシスを誘導する抗体依存性細胞傷害 (ADCC) 作用。(右)Fc $\gamma$ RIIIa を発現するエフェクター細胞 (単球、マクロファージ、好中球) が IgG Fc 領域を認識して活性化し、標的細胞を貪食する抗体依存性細胞貪食 (ADCP) 作用。



**Fig. 2** NK 細胞によるウイルス感染細胞排除機構

(左) NK 細胞の抑制化受容体が正常細胞の MHC-I を認識した状態。抑制化シグナル優位であるため、アポトーシス誘導は起こらない。(中央) ウイルス感染による MHC-I の発現低下と活性化リガンドの発現増加を認識した NK 細胞は活性化シグナル優位となり、標的細胞にアポトーシスを誘導する。(右) このように、NK 細胞応答は活性化および抑制化受容体からのシグナルバランスによって決定される。

## CMV の感染防御回避機構と胎盤の免疫学的特性

CMV のゲノム長は 200 kb を超え、予想される翻訳フレーム (ORF) は 250 に上るが、その多くは細胞培養系でのウイルス増殖に必須ではないことから「アクセサリー遺伝子」と呼ばれる。アクセサリー遺伝子の多くは個体でのウイルス感染・伝播など特定の条件下で機能し、ウイルスに対する宿主の防御機構から逃れるための様々な機構、すなわち感染防御回避機構に関わることが報告されている。例えば、ウイルス増殖に伴う細胞死 (アポトーシス) 誘導の抑制[13]や、細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の攻撃から逃れることを目的とした MHC-I 分子の発現阻害[14]、NK 細胞の攻撃を逃れることを目的とした MHC-I や FcγR の分子模倣[15-17]などは、CMV が生涯にわたって宿主との共生関係を成立させるために重要な機構である。こうした感染防御回避機構の共通性と多様性は、ウイルスに対する感染制御におけるそれらのメカニズムの重要性を物語っている。

先天性 CMV 感染の機序を考える上では、妊娠時の母体の免疫学的特性、ならびに妊娠時に一過性に形成される臓器である胎盤の免疫学的特性に注目する必要がある。すなわち、妊娠時は Th2 優位な環境下で液性免疫が誘導され CTL による細胞性免疫は抑制されていることや、先天性 CMV 感染のリスクが高いとされる妊娠初期の胎盤では NK 細胞が増加し胎盤組織の形成やアポトーシスを誘導することを考慮すると、胎盤を介した CMV 感染の防御機構は細胞死や NK 細胞による細胞傷害といった自然免疫系に依存すると考えられる[18]。しかし、こうした宿主の感染防御機構の先天性感染における重要性や、これらを回避して胎児に感染する CMV の機構について、個体における詳細な解析は行われていない。

## 感染動物モデル

一般に、動物を用いた病原性解析において、神経病原性や移植のモデルとしてはマウスが多用されている。先天性感染における胎児への病原性に関して HCMV と酷似しているのは、ヒトに近い霊長類であるチンパンジーやアカゲザルの CMV であることが知られている。しかし、チンパンジーやアカゲザルなど大型の実験動物は取り扱いが困難であるうえ、未感染動物コロニーの樹立が進んでいない。また、取り扱いが容易な小動物であるマウスでは胎盤構造の違いから経胎盤感染が起こらないため、組換え CMV 株を用いた病態や感染免疫の解析を行うことが難しい。一方、モルモットは母体の血液と胎仔の組織が一層の細胞で隔てられている点でヒトと類似した胎盤構造を有しており、モルモットを宿主とするモルモット CMV (GPCMV) は小動物で唯一経胎盤感染を起こす。さらに、母体の子宮動脈に感染したのち、血管内皮細胞を



介して胎児 (胎仔) 由来の栄養膜細胞層へ感染するという CMV 胎盤感染経路についてもヒトとモルモットで類似していることが知られている[19–21]。したがって、モルモットはヒトの先天性 CMV 感染症のモデル動物として有用である。しかしながら、モルモットおよび GPCMV のタンパク質に対する入手可能な抗体が限られることなどから、GPCMV を用いた先天性 CMV 感染機序の詳細な解析は進んでいない。

## 2. 本研究の目的・構成

本研究では GPCMV の機能未同定遺伝子の解析を通して、CMV の感染防御回避機構を明らかにする。第 1 章では、GPCMV ゲノムの機能未同定領域に由来する cDNA 配列を解析し、転写産物に含まれる ORF について、塩基配列データベースから相同性を持つ遺伝子を検索するほか、他の  $\beta$  亜科ウイルスの機能既知遺伝子とゲノム上の位置を比較することで、GPCMV 特有の機構により宿主防御の回避に関与する可能性がある GPCMV 遺伝子を抽出した。そのうち GP38.1 および GP119.1 について、各遺伝子を欠損させた GPCMV 株 (以下、欠損株) ならびに欠損株に対して親株配列への復帰変異を導入した株 (以下、復帰株) を作製し、第 2 章では GP38.1 について、第 3 章では GP119.1 について機能解析を行った。

## 第1章 $\beta$ 亜科ウイルスのゲノム構造比較に基づく感染防御回避遺伝子の推定

### 第1節 緒言

序論で述べたように、GPCMV は、CMV の感染防御回避機構の解析を通して先天性感染機序を解明する上で有用な感染動物モデルとなりうる。CMV で報告されている回避機構の一部は GPCMV においても判明している。私たちのグループは、GPCMV GP33 はウイルスがコードする G タンパク質共役型受容体であり、妊娠動物におけるウイルスの病原性発揮に重要であることを報告した[22]。Schleiss らは GPCMV GP1 が炎症性マクロファージの遊走に関わる CC ケモカインである MIP-1 のホモログであること[23]、GP145 が二本鎖 RNA を認識して PKR 経路を阻害すること[24]、GP147, GP148, GP149 が MHC-I ホモログをコードし、これら3つの遺伝子を欠損させたウイルスは免疫原性を保持しながら動物個体での病原性が大幅に減弱することを報告した[25]。こうしたいくつかの報告があるものの、GPCMV ゲノム配列に含まれる ORF の同定や機能の推定 (アノテーション) は HCMV やマウス CMV (MCMV) など他の  $\beta$  亜科ウイルスに比べて進んでいない。そこで本研究では、GPCMV と他の  $\beta$  亜科ウイルスのゲノム構造を比較することにより、宿主の感染防御機構を回避する機能が推測される GPCMV 遺伝子の抽出を試みた。

### 第2節 材料および方法

#### 1.2.1 培養細胞

本章では以下の細胞株を使用した。培養培地の組成は巻末に記載した。

細胞株	由来	形態	入手先	倍化日数	最大継代比	培地
GPL	モルモット肺	線維芽	ATCC	1-2	1:6	F10

#### 1.2.2 ウイルス

##### 1.2.2.1 GPCMV ウイルス株

大腸菌の性決定因子であり通常1細菌に1コピーとなるように厳格に複製が制御されている F 因子プラスミドを改変して作製されたクローニングベクターである大腸菌人工染色体 (BAC, bacterial artificial chromosome) に、緑色蛍光タンパク質 EGFP を発現する GPCMV をクローニングした pBAC-GPCMV $\Delta$ 9k を培養細胞に導入して得られた組換え GPCMV 株である GPCMV $\Delta$ 9k を親株 (WT, wild type) として用いた[26]。また、一部の実験にはモルモット個体で唾液腺までの伝播がみられる GPCMV 野生株

である GPCMV SG 株を用いた[27]。

#### 1.2.2.2 GPCMV ウイルス粒子の精製

GPCMV 感染細胞の培養上清はそのままウイルスストックとして利用可能であるが、種々の生理活性物質 (IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$  など) が含まれる点やウイルス力価が低い点において一部の実験には適さない。そのため、スクロースクッション法によるウイルス粒子の部分精製を以下の手順で行い、より高純度・高力価のウイルスストックを得た。

80%コンフルエントになるように 150 cm<sup>2</sup> フラスコ (T150) または 175 cm<sup>2</sup> フラスコ (T175) に播種した GPL 細胞に、GPCMV 感染細胞および培養上清を細胞数比 1:6 となるように加え、37°C、5% CO<sub>2</sub> 存在下で約 5 日間培養した。50%程度の細胞がフラスコから剥がれたことを確認し、セルスクレーパー (IWAKI) を使用して培養上清ごと細胞を回収した。室温、3,000 rpm (1,700 × g)、10 分間遠心した上清を、5 mL の 20% スクロース溶液を加えた超遠心管 (40PA チューブ、日立工機) に重層した。超遠心機 (himac CP90WX、日立工機)、スイングローター (P32ST、日立工機) およびバケットを使用して、20°C、20,000 rpm (70,000 × g)、2 時間超遠心した。上清を除き、ペレットを超遠心管あたり 100  $\mu$ L の PBS で懸濁して分注し、-80°C で保存した。

#### 1.2.2.3 GPCMV ウイルスストックの力価測定

80-90%コンフルエントになるように 96-well プレート (Corning) に播種した GPL 細胞に、ウイルスストックを適宜希釈して感染させた。感染 2 日目に蛍光観察を行い、GFP 陽性細胞のフォーカス数をカウントすることで、希釈倍率からウイルスストックの力価 (focus forming units (FFUs)/mL) を決定した。

#### 1.2.3 RACE 法

GPCMV $\Delta$ 9k を感染多重度 (MOI) 5 で感染させて 2 日間培養した GPL 細胞から RNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いてトータル RNA を抽出した。抽出した RNA から SMARTer RACE 5'/3' Kit (Clontech) を用いて cDNA を合成した。これを鋳型とし、GP37-GP43 間領域および GP117-GP122 間領域にそれぞれ複数設定したプライマー (Tables 1, 2) で増幅された PCR 産物、または 1 回目の増幅産物を鋳型とした nested PCR による増幅産物を MagExtractor (TOYOBO) を使用して精製した。これらの塩基配列を、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いたサンガー法により解析した。

#### 1.2.4 相同性解析

RACE 法により明らかとなった各転写産物の cDNA 配列情報をもとに、複数の方法で相同性解析を行った。具体的には、日本 DNA データバンク (DDBJ, DNA Data Bank of Japan) のデータベースを利用した相同性検索プログラム Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) により、cDNA の塩基配列や推定アミノ酸配列に相同な、ウイルスまたは宿主の遺伝子やタンパク質を検索した。また、DDBJ の多重整列プログラム ClustalW や遺伝子解析ソフトウェア GENETYX (Ver.10, ゼネティックス) の配列相同性解析機能を用いて特定の塩基配列やアミノ酸配列との相同性を解析した。

#### 1.2.5 ノーザンブロット法

GPCMV SG を MOI 1 で感染させて 90 時間培養した GPL 細胞から RNeasy Mini Kit を用いてトータル RNA を抽出した。トータル RNA サンプル 5  $\mu$ L (5-20  $\mu$ g) に RNA ローディングバッファー 15  $\mu$ L を添加し、65°C で 5 分間熱変性した。氷上で 5 分間急冷したあと、2.2 M ホルムアルデヒド含有 1.2% アガロースゲルで分離し、Hybond-N+ メンブレン (GE Healthcare) にキャピラリーブロッティングした。Table 2 に記載したプライマーセットを用いて DNA プロブを作製し、ECL Direct Kit (GE Healthcare) を使用して標識プロブの調製および RNA とのハイブリダイゼーションを行い、CCD イメージャー ChemiDoc (BioRad) を用いてシグナルの検出を行った。

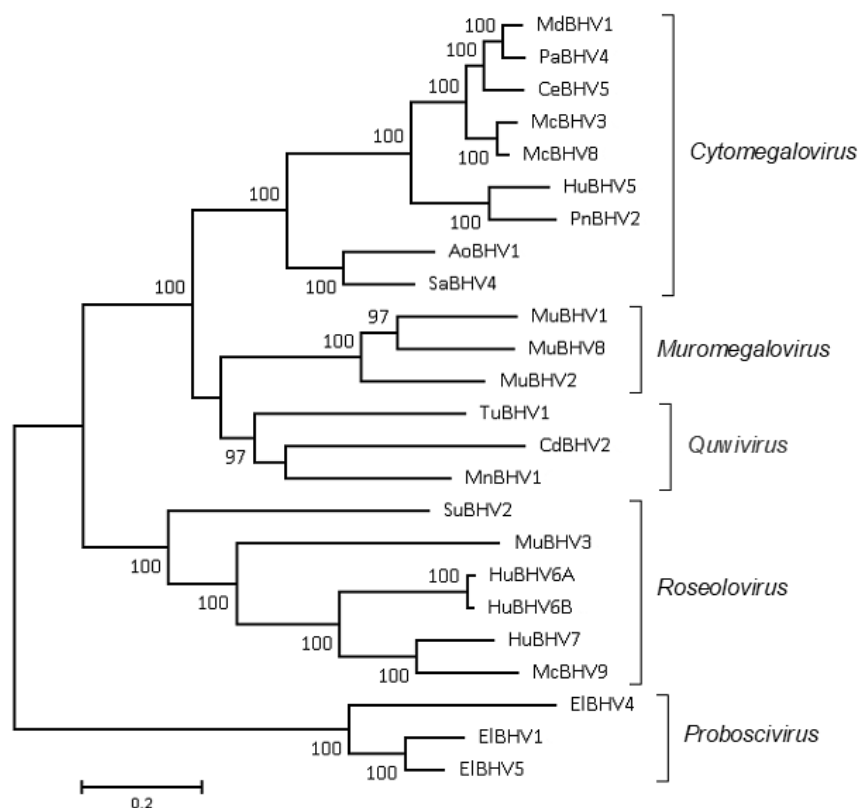
### 第 3 節 結果

#### 1.3.1 $\beta$ 亜科ウイルスのゲノム構造比較に基づく機能未同定遺伝子領域の抽出

国際ウイルス分類委員会 (ICTV) がゲノム配列情報に基づいて定義する最新の系統分類では、GPCMV (ICTV 正式種名称 CdBHV2) は  $\beta$  亜科の中でも系統分類学的知見が少ない 3 つのウイルス種が割り当てられた Quwivirus 属に分類されており、同じ  $\beta$  亜科に属し研究が進んでいる HCMV (Cytomegalovirus 属, HuBHV5) や MCMV (Muromegalovirus 属, MuBHV1)、ヒトヘルペスウイルス (HHV)-6 および HHV-7 (Roseolovirus 属, HuBHV6A/6B/7) のいずれとも分離されている (Fig. 3)。

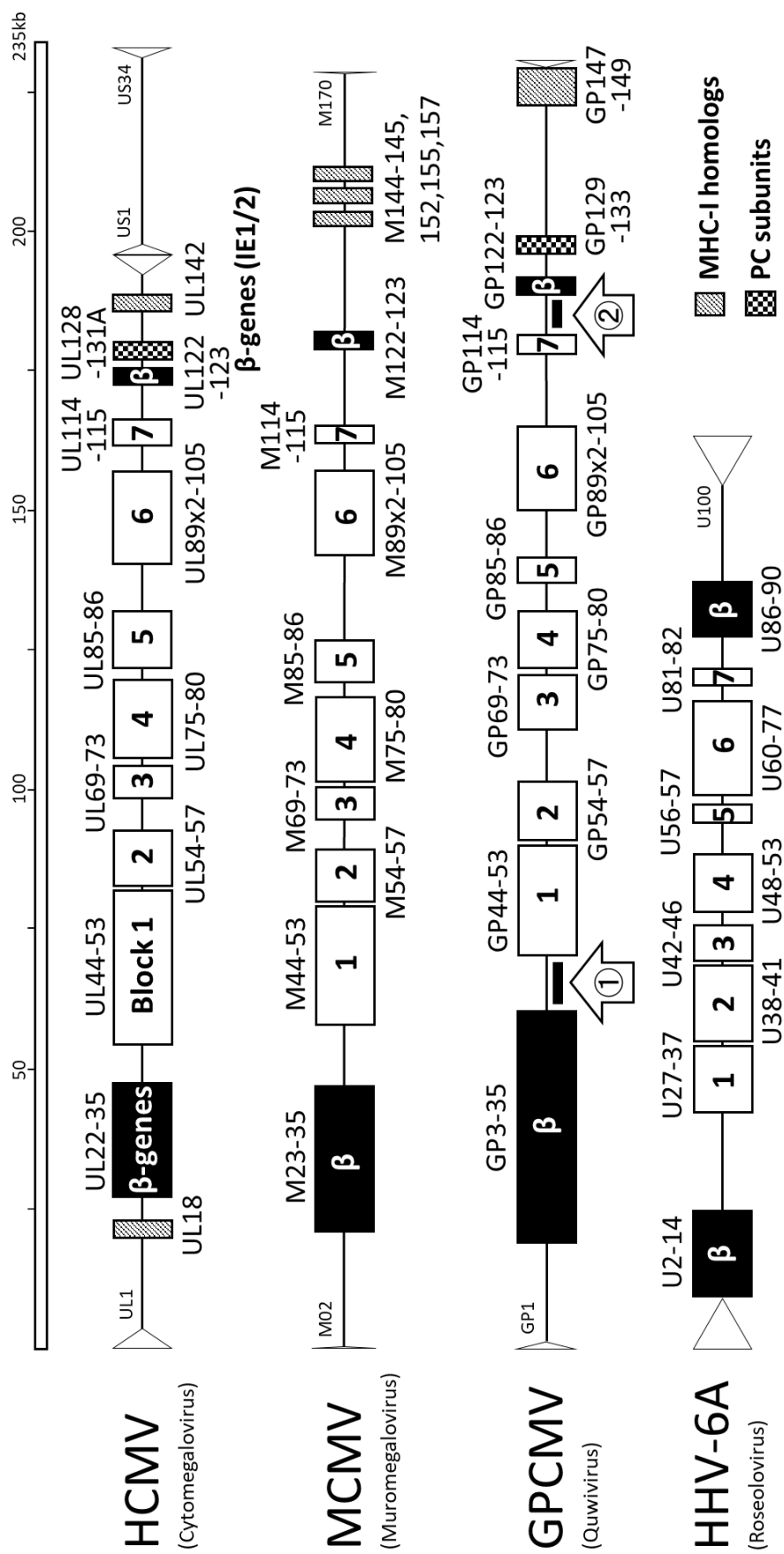
一方で、これら  $\beta$  亜科ウイルスのゲノムには、遺伝子の順序や転写の方向性が高度に保存された複数の遺伝子ブロックが存在することが知られている (Fig. 4)[28]。 $\beta$ -genes は  $\beta$  亜科に特異的に保存されている遺伝子であり、ウイルス遺伝子の転写活性化を担う遺伝子などが含まれる。 $\beta$  亜科に限らずヘルペスウイルス科に共通して保存されている Block 1-7 の各ブロックに属する遺伝子は、ウイルス粒子を形成する major

capsid protein (MCP) などの構造タンパク質、DNA 複製やヌクレオチド代謝に必要な酵素群といった、ウイルス増殖に必須な遺伝子をコードしている。HCMV や MCMV で報告されている感染防御回避遺伝子はこのような進化的に保存された遺伝子ブロックには存在しない。また、ORF のみの解析から機能が同定されているものが多く、cDNA 構造を厳密に解析した例は少ない。こうした事実を踏まえると、 $\beta$  亜科ウイルスのゲノム構造の比較から、GPCMV ゲノムにおける進化的に保存されたブロック外の領域を抽出し、それらに対し RACE 法による cDNA 構造解析を行うことで、未知の感染防御回避機能を有する GPCMV 遺伝子が同定できる可能性がある。そこで、このように抽出した GPCMV ゲノム領域のうち、すでに解析が行われた GP147-GP149 [25] や CMV 感染の細胞指向性に関わるタンパク質をコードすることが判明した GP129-GP133 [26,29]などを除き、未だ解析が行われていない GP37-GP43 間領域 (Fig. 4, ①) および GP117-GP122 間領域 (Fig. 4, ②)を本研究における解析対象とした。



**Fig. 3**  $\beta$  亜科ウイルスの系統分類 (ICTV Herpes-viridae Study Group approved proposal, code assigned 2020.007D, N Inoue, personal communication)

$\beta$  亜科の各属名が右端に示されている。各ウイルス種は、以下の略語により定義される宿主名に betaherpesvirus (BHV) および番号を付与して命名されている。Ao, aotine; Cd, caviid; Ce, cercopithecine; El, elephantid; Hu, human; Mc, macacine; Md, mandrilline; Mn, minipterid; Pa, papiine; Pn, panine; Sa, saimiriine; Su, suid; Tu, tupaiid

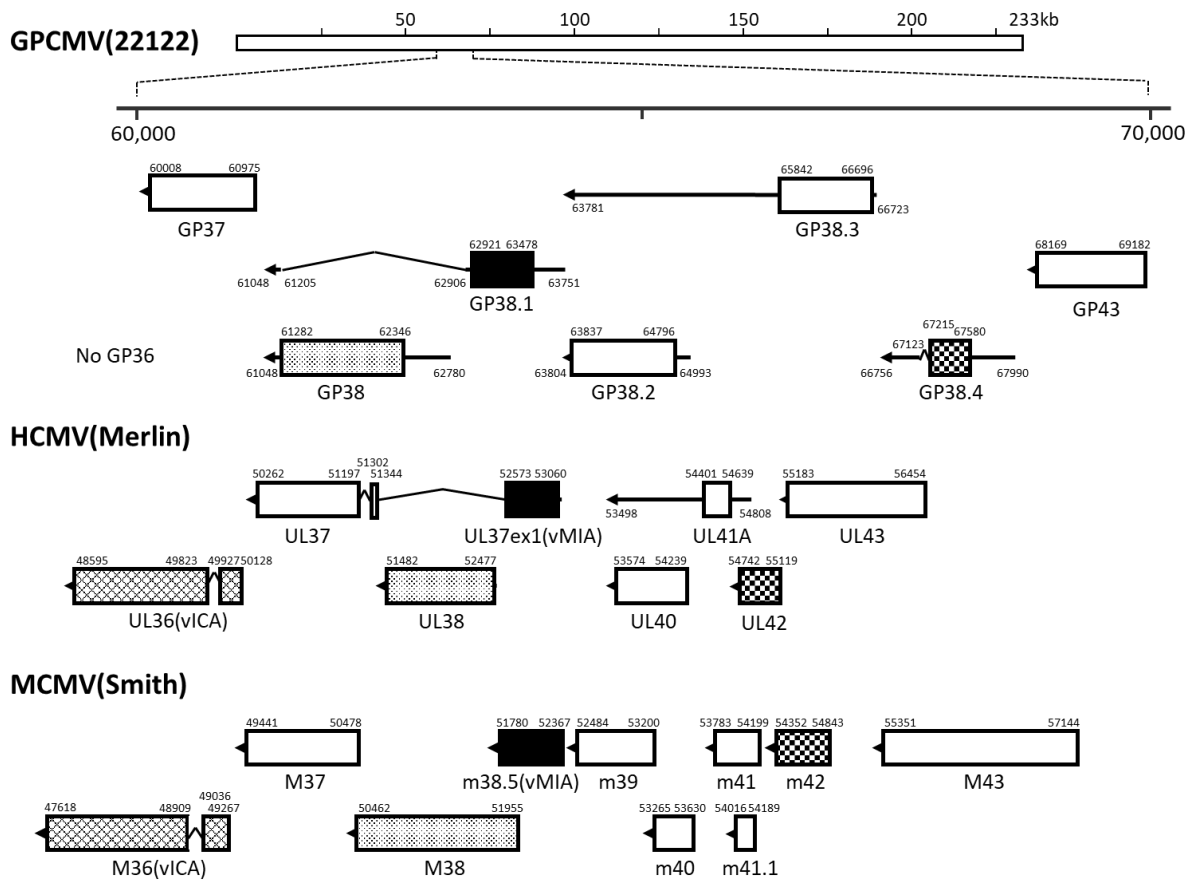


**Fig. 4** β 亜科ウイルスのゲノム構造

HCMV、MCMV、HHV-6A のゲノム構造を比較した概略図[28]に GPCMV ゲノムを追加し改変した。各ゲノムの末端または内部のくさび (▷) は逆位反復配列を表す。HCMV では、この反復配列に挟まれたセグメント (ユニーク配列) のうち長い領域をユニークロング (UL)、短い領域をユニークショート (US) と呼ぶ。ユニーク配列末端の遺伝子名、ヘルペスウイルス科に共通して保存された遺伝子ブロック (Block 1-7)、β 亜科に特有の β-genes (β)、その他すでに解析が行われた遺伝子群を表示した。また、本研究の解析対象である GP37-GP43 間領域 (①) および GP117-GP122 間領域 (②) を矢印で表示した。

### 1.3.2 GP37-GP43 間領域の解析

GPL 細胞に GPCMV を感染させ、72 時間後に RNA を抽出し、cDNA を合成した。GP37-GP43 間領域に由来するメッセンジャーRNA (mRNA) 転写産物の 5' および 3' 末端を決定するために RACE 解析を行い、約 7 kb の領域にいずれもアミノ酸長 100 以上の ORF を含む 5 つの転写産物が存在することを明らかにした。それらの塩基配列および推定アミノ酸配列に対して BLAST を用いた相同性検索を行ったところ、GP38 は既に細胞死抑制遺伝子として報告されている HCMV UL38 [30] や MCMV M38 と強い相同性を示し (GP38 vs. UL38: 29.6% identity, 67.5% similarity; GP38 vs. M38: 23.9% identity, 68.1% similarity)、GP38.2 は MHC-I のダウンレギュレーションに関わる HHV-6 および HHV-7 U21[31,32] と、GP38.3 は HCMV の糖タンパク質 H と結合するエンベロープタンパク質である HCMV UL116 [33] と弱い相同性を示した (GP38.2 vs. U21: 16.1% identity, 59.7% similarity; GP38.3 vs. UL116: 9.9% identity, 67.4% similarity)。また、GP38.4 には宿主のユビキチン化制御に関わる HCMV UL42 が有する 2 つの PPxY モチーフと膜貫通ドメイン[34]が保存されていた。PPxY モチーフは UL42 とその標的である NEDD4 ファミリータンパク質との相互作用に関与し、これらのモチーフやドメインは、ヘルペスウイルスのどの UL42 ホモログにも共通して存在する[34]。一方、GP38.1 については他の  $\beta$  亜科ウイルス遺伝子との相同性を見出せなかったため、ウイルスゲノム上での周辺遺伝子との位置関係からその機能を推測することとした。その結果、相対的に近傍に位置する  $\beta$  亜科ウイルスの遺伝子として HCMV UL37 exon 1 (UL37x1) や HCMV UL40 を見出した。特に HCMV UL37x1 は、CMV ゲノムの転写産物としては珍しくスプライシングを受ける点で GP38.1 と positional homolog の関係にある遺伝子である可能性が高いと推測された (Fig. 5)。



**Fig. 5** Genetic analysis of the GPCMV GP37-GP43 intergenic region.

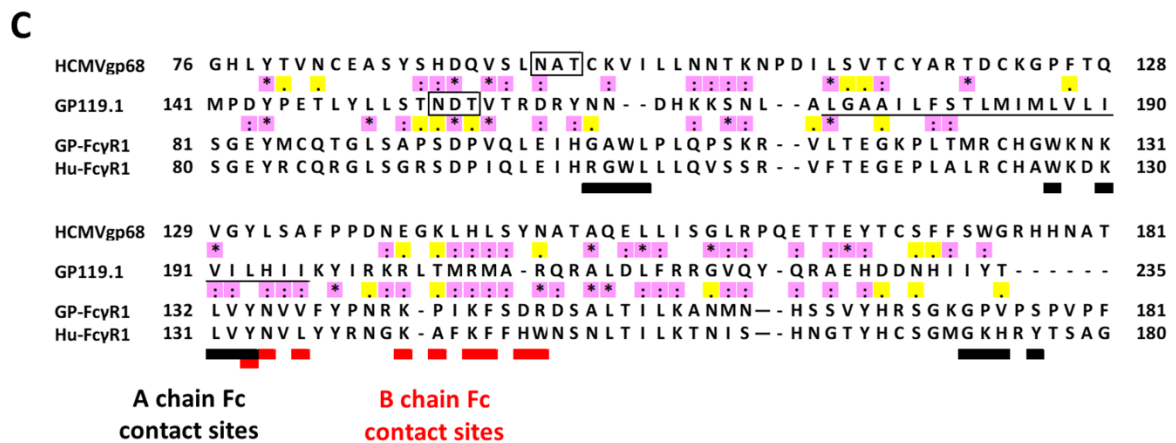
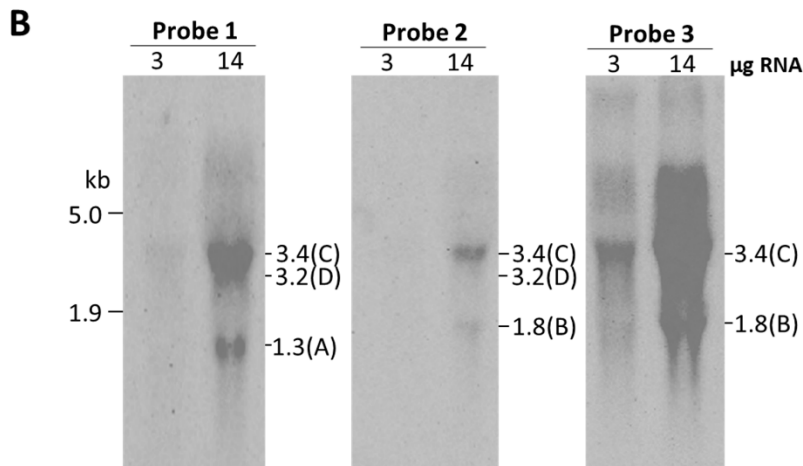
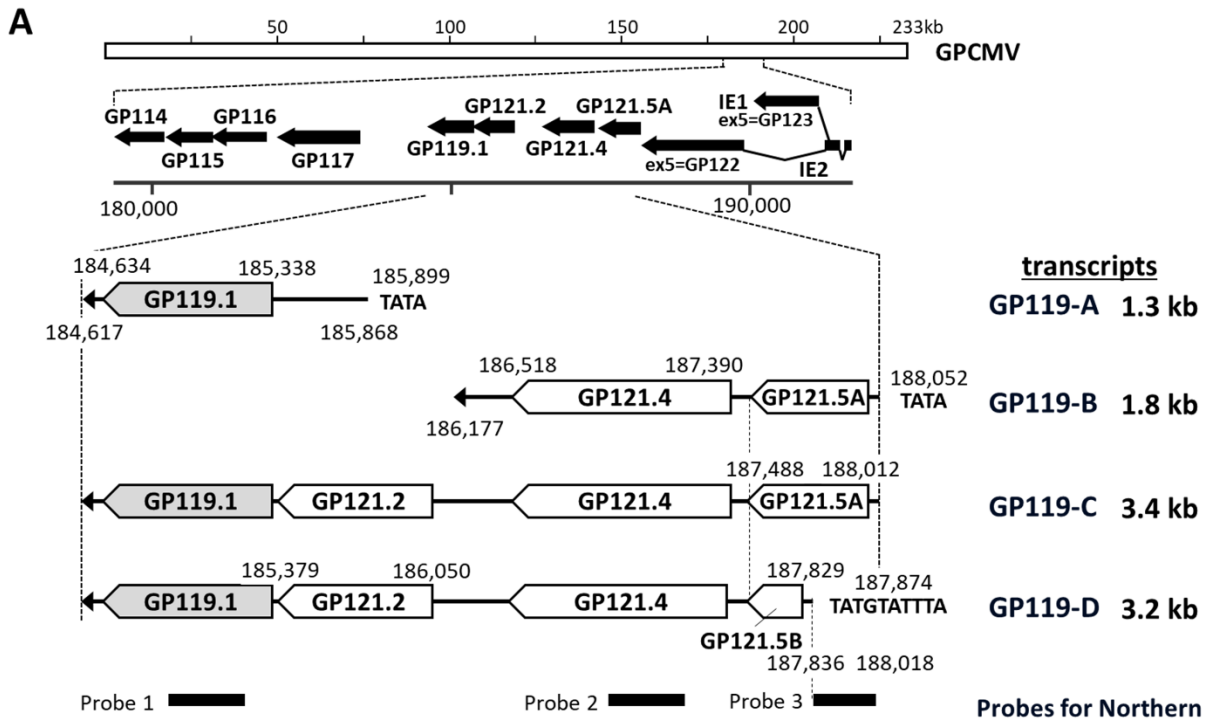
Outcomes of RACE analyses of the GPCMV GP37-GP43 inter gene region. Positions of mRNA beginnings and ends, splicing donor and acceptor sites, and ORF beginnings and ends are indicated. Comparison of splicing and coding contents of the GPCMV sequence region analyzed by RACE and its flanking ORFs with the corresponding regions of HCMV Merlin strain and MCMV Smith strain are shown. The nucleotide sequences of and the sequence positions in GPCMV, HCMV, and MCMV are based on the accession numbers AB592928, NC\_006273.2, and NC\_004065.1, respectively.



### 1.3.3 GP117-GP122 間領域の解析

GP117-GP122 間領域に由来する mRNA 転写産物の 5' および 3' 末端を決定するため、1.3.2 と同じ cDNA に対して RACE 解析を行い、約 3 kb の領域にいずれもアミノ酸長 100 以上の ORF を含む 4 つの転写産物 GP119-A, -B, -C, -D が存在することを明らかにした (Fig. 6A)。GP119-B, -C は同じ転写開始点を利用しており、GP119-A, -C, -D は同じ部位でポリアダニル化を受けていた。これら 4 つの転写産物 GP119-A, -B, -C, -D の発現をノーザンブロット法により確認した。GPCMV を感染させ 90 時間培養した GPL 細胞から RNA サンプルを調製し、Fig. 6A に示した標識 DNA プローブを作製して各転写産物を検出した。ノーザンブロット解析から推定される 4 つの転写産物 GP119-A, -B, -C, -D の鎖長はそれぞれ 1.3、1.8、3.2、および 3.4 kb であり、RACE 解析の結果と一致していた (Fig. 6B)。

4 つの転写産物 GP119-A, -B, -C, -D は、いくつかの転写産物に重複して存在する 5 つの ORF をコードしており、それぞれ GP119.1, GP121.2, GP121.4, GP121.5A, GP121.5B と呼称することとした。GP119.1 の ORF は GPCMV 22122 株で既に報告されている [27,35]。GP121.2 と GP121.4 は別の GPCMV 株 CIDMTR において報告されており [36]、当該箇所の塩基配列は 22122 株でも同一であった。GP121.5A と GP121.5B は本研究で同定された ORF であり、フレームは同じであるが異なる開始コドンを利用して発現すると考えられる。これら 5 つの ORF の産物の機能を推測するため、DDBJ BLAST および ClustalW を用いた相同性検索を行った。その結果、GP119.1 は MCMV m119.1 と弱い相同性を有していた (20% identity, 53% similarity)。また、GP119.1 は、宿主 Fc $\gamma$  受容体 (Fc $\gamma$ R) のホモログである gp68 をコードする HCMV UL119-118 [37] と弱い相同性を示した (9% identity, 40% similarity)。後述するように、GP119.1 は当初想定していた ORF のおよそ中央に位置する開始コドンを利用して発現することが判明したが、この真の GP119.1 ORF では UL119-118 との相同性が向上した (27% identity, 53% similarity)。さらに、真の GP119.1 ORF はモルモットやヒトの Fc $\gamma$ R の Fc 結合領域に弱い相同性を有していた (Fig. 6C)。既報の通り、GP121.2 は bat beta-herpesvirus B7D8 株の b121.2 に、GP121.4 は tupaia herpesvirus の t121.4 にそれぞれ相同性を有していたが、いずれも機能未同定である [36]。GP121.5A と GP121.5B は autotransporter adhesin と呼ばれるグラム陰性菌の外膜タンパク質や、HIV のエンベロープ膜に存在する糖タンパク質に弱い相同性があったが、CMV 感染制御における重要性は低いと判断した。以上のことから、本研究では GP119.1 に注目して機能解析を進めることとした。



**Fig. 6** Analyses of transcripts in the GPCMV GP117-GP122 intergenic region.

(A) Map of the transcripts, GP119-A, -B, -C, and -D, identified by the rapid amplification of cDNA ends (RACE) analyses and open reading frames (ORFs) found in the transcripts are shown along with a schematic diagram of the GPCMV genome and that of the region from GP114 to IE1 and IE2, including their 5th exons GP122 and GP123. The genomic positions for the start and end of each transcript and for those of each ORF are indicated. (B) Northern blot analyses of RNA samples purified from GPCMV-infected GPL cells using Probes 1 to 3 indicated in the panel A to verify the transcripts identified in the RACE analyses. The length of each transcript, followed by the transcript designated in panel A in parentheses, is indicated on the right side of each gel. (C) Alignment of GP119.1 with HCMV gp68, putative high affinity guinea pig Fc gamma receptor 1c (GP-Fc $\gamma$ R1; acc. no. XN\_013142802), and human Fc gamma receptor 1a (CD64) (Hu-Fc $\gamma$ R1; acc. no. BC152383) amino acid sequences was prepared using ClustalW (DDBJ ver. 2.1; slow protein alignment, weight matrix: Gonnet, gap open and extension: 25 and 0.5; multiple alignment, Gonnet, gap open, extension, and distance: 25, 0.5, and 5). Identical residues (\*) and conserved substitutions (:) in pairwise comparison are highlighted in pink, and semi-conserved substitutions (.) are in yellow. Open boxes indicate potential N-linked glycosylation sites. The transmembrane domain of GP119.1 predicted by TMHMM Server v.2.0 ([www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/](http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/)) is underlined. Black bars and red bars underneath the Hu-Fc $\gamma$ R1 sequence indicate the contact residues of human Fc $\gamma$ R1 with the A and B chains of IgG Fc (PDB 4W4O)[38]. The nucleotide sequences of and the sequence positions in GPCMV is based on the accession number AB592928.

#### 第4節 考察

本章では、 $\beta$  亜科ウイルスのゲノム構造の比較に基づき、進化的に保存された遺伝子ブロックから外れた機能未同定領域として GP37-GP43 間領域および GP117-GP122 間領域を抽出した。さらに、各遺伝子領域から発現する mRNA 群の cDNA 配列を解析し、相同性検索を行うことで、感染防御回避に関与する可能性のある GPCMV 遺伝子 GP38.1 および GP119.1 を見出した。

GP38.1 と positional homolog の関係にあると推測される HCMV UL37x1 は、Bcl-2 ファミリーに属するアポトーシス促進因子である BAX や BAK と相互作用することにより、ミトコンドリア経路のアポトーシスを抑制する[39,40]。また、GP38.1 と弱い相同性を示した HCMV UL40 は、抑制性 NK 受容体 CD94/NKG2A のリガンドとして働く MHC-I 分子である HLA-E をアップレギュレートし、宿主 NK 細胞による攻撃を回避する[41,42]。さらに、GP37-GP43 間領域に対応する HHV-6A/6B/7 ゲノム上の領域に存在する U21 は MHC-I 分子をダウンレギュレートすることが知られており、細胞傷害性 T 細胞などによる攻撃を回避する機能が推測されている[31,32]。よって、GP38.1 は細胞死を抑制する機能、または MHC-I 分子の発現に干渉することで免疫細胞による認識や攻撃を逃れる機能を担う可能性がある。

GP119.1 は宿主 Fc $\gamma$ R のホモログである gp68 をコードする HCMV UL119-118 と同様に、NK 細胞による ADCC を介した感染細胞の排除に対する回避機構を担う可能性がある。

母体胎児境界面である胎盤の絨毛細胞には MHC-I 分子である HLA-E や HLA-G が発現し、妊娠免疫を制御している。また、妊娠時の母体では Th2 有意な環境下で液性免疫が誘導され CTL による細胞性免疫は抑制されており、妊娠初期の胎盤では NK 細胞が増加し胎盤形成に関わる。これらを考慮すると、GP38.1 や GP119.1 が担うと考えられる機能は、CMV が胎盤を介して胎児に感染する機構、あるいはその結果として起こる胎児障害の発生に関与する可能性がある。続く第2章、第3章では、GP38.1 と GP119.1 それぞれの詳細な機能解析を行った。

## 第2章 GPCMV GP38.1 の機能解析

### 第1節 緒言

第1章で述べた通り、GPCMV GP37-GP43 間領域に対応する他の  $\beta$  亜科ウイルスのゲノム領域には、感染細胞の細胞死抑制に関与する遺伝子、または MHC-I 発現制御を介して NK 細胞や細胞傷害性 T 細胞の活性化に関与する遺伝子が存在した。こうした機能を担う  $\beta$  亜科ウイルス遺伝子として以下のようなものが報告されている。

HCMV や MCMV が宿主の免疫応答を回避するためにコードしている多くの遺伝子のうち、感染細胞の細胞死抑制に関わる遺伝子は3種類存在する[13]。1つ目は Bcl-2 ファミリータンパク質のアポトーシス促進因子に結合することでその作用を阻害し、ミトコンドリア膜の透過性亢進を抑制する機序を持つことから、viral mitochondria-localized inhibitor of apoptosis (vMIA) と呼ばれる。HCMV では UL37 exon 1 (UL37x1) が、MCMV では m38.5 が vMIA として報告されている[39,40]。なお、HCMV UL37x1 は Bcl-2 ファミリータンパク質のアポトーシス促進因子 BAX および BAK の両方と相互作用してアポトーシスを阻害するが、MCMV m38.5 は BAX のみと相互作用する[43-47]。さらに MCMV はミトコンドリアに局在する viral inhibitor of BAK oligomerization (vIBO) である m41.1 により、BAK を介した内因性経路 (ミトコンドリア経路) のアポトーシスを阻害する[48]。内因性経路の活性化によるアポトーシスは BAX とその類似タンパク質である BAK の両方によって引き起こされるため、内因性経路を十分に抑制するために、MCMV は BAX に対する m38.5 と BAK に対する m41.1 の両方をコードする必要があると考えられる。2つ目は不活性型の前駆体であるプロカスパーゼ 8 に結合し、イニシエーターカスパーゼである活性型カスパーゼ 8 への切断を阻害する viral inhibitor of caspase-8-induced apoptosis (vICA) である。HCMV UL36 および MCMV M36 が vICA として報告されている[49,50]。3つ目は c-Jun N-terminal kinase (JNK) のリン酸化を阻害し、エフェクターカスパーゼであるカスパーゼ 3 の活性化を抑制する inhibitor of ER stress-induced apoptosis であり、HCMV UL38 が代表的である[30,51]。

MHC-I 分子の発現に干渉して、NK 細胞や細胞傷害性 T 細胞による攻撃を回避する遺伝子も複数報告されている。NK 細胞活性化を回避するための遺伝子としては、NK 細胞の抑制化受容体 CD94/NKG2A や Leukocyte immunoglobulin-like receptor (LIR) -1 のリガンドである HLA-I 分子と高い相同性をもつ HCMV UL18 [15] や MCMV m144 [16] のほか、抑制化受容体 CD94/NKG2A のリガンドである HLA-E の細胞表面発現を亢進する HCMV UL40 [42] が報告されている。MHC-I 分子の細胞表面発現を低下させ

ることで主に細胞傷害性 T 細胞による認識を回避する遺伝子として、HCMV では、1) プロテアソームによる分解を促進する US2 および US11 [52,53]、2) MHC-I 分子を小胞体に保持し、細胞表面へのトランスロケーションを阻害する US3 [54]、3) MHC-I にローディングされる抗原ペプチドを小胞体内腔へ輸送する抗原処理関連トランスポーター (TAP) を阻害する US6 [55]などが報告されている。MCMV や GPCMV は、これらの遺伝子がコードされた US 領域に対応する領域を持たないため、対応する GPCMV 遺伝子領域をゲノム構造の比較から抽出する事は困難である。なお、HHV-6,7 はこれらとの相同性はないが MHC-I 分子の細胞表面発現を低下させる同様な機能を有する U21 を、GPCMV GP37-GP43 間領域に対応するゲノム領域にコードしている [31,32]。

そこで本章では、第 1 章において他の  $\beta$  亜科ウイルス遺伝子との明確な相同性を見出せなかった GPCMV GP38.1 にも上述のような感染防御回避機能があるのではないかと予想して、発現動態や機能の解析を行った。

## 第 2 節 材料および方法

### 2.2.1 培養細胞

本章では以下の細胞株を使用した。培養培地の組成は巻末に記載した。

細胞株	由来	形態	入手先	倍化日数	最大継代比	培地	ref.
GPL	モルモット肺	線維芽	ATCC	1-2	1 : 6	F10	
HEK293T	ヒト胎児腎	上皮	DW Russell	1	1 : 20	D10	[23]
GP2-293	ヒト胎児腎	上皮	Clontech	1	1 : 10	D10	
HeLa	ヒト子宮頸部癌	上皮	CDC core facility	1	1 : 20	D5	

### 2.2.2 発現プラスミドの構築

#### 2.2.2.1 GP38.1 発現プラスミド

終止コドンを除いた GP38.1 ORF および終止コドンを除かない GP38.1 ORF を pCMV-Tag4C (Agilent) にクローニングし、カルボキシル (C) 末端に FLAG (アミノ酸配列 DYKDDDDK) タグが付加された GP38.1 を発現するプラスミド pCMV-GP38.1-FLAG とタグを発現しないプラスミド pCMV-GP38.1 を作製した。また、終止コドンを除いた GP38.1 ORF を pEGFP-N1 (Clontech) にクローニングし、C 末端に EGFP が付加された GP38.1 を発現するプラスミド pEGFP-GP38.1 を作製した。作製したプラスミド DNA の塩基配列を BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit を用いたサンガー法により解析し、目的配列が導入されていることを確認した (以下同様)。

### 2.2.2.2 BAX および BAK 発現プラスミド

RACE 法により、モルモット Bcl-2-associated X protein (gpBAX) (Gene ID:100734553) およびモルモット Bcl-2 homologous antagonist/killer (gpBAK) (Gene ID:10073453) の cDNA 配列を取得した。gpBAX または gpBAK の ORF を pcDNA3 (Thermo Fisher Scientific) にクローニングし、それぞれの発現プラスミド pcDNA3-gpBAX, -gpBAK を作製した。同様に、終止コドンを除いた gpBAX または gpBAK の ORF を pTurboRFP-N (Evrogen) にクローニングし、C 末端に赤色蛍光タンパク質 RFP タグが付加された gpBAX または gpBAK を発現するプラスミド pTurboRFP-gpBAX, -gpBAK を作製した。

### 2.2.3 培養細胞への遺伝子導入

#### 2.2.3.1 リン酸カルシウム法

96-well プレートに播種した HEK293T 細胞に 0.1-0.2  $\mu\text{g}/\text{well}$  の DNA を導入した。DNA 溶液に、1 well あたりの総 DNA 量( $\mu\text{g}$ )  $\times$  4  $\mu\text{L}$  の 2M  $\text{CaCl}_2$  を加え、1 well あたりの総 DNA 量( $\mu\text{g}$ )  $\times$  30  $\mu\text{L}$  になるように滅菌水を加えた。等量の 2 $\times$  HBS を少量ずつ滴下しながら混合し、室温で 20 分間静置した。全量を well 全体に行き渡るように少量ずつ添加した。37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  存在下で 24-48 時間培養後に実験に供した。

#### 2.2.3.2 リポフェクション法

FuGENE HD Transfection Reagent (以下、FuGENE) (Promega)を用いて、96-well プレートに播種した細胞に 0.1-0.2  $\mu\text{g}/\text{well}$  の DNA を導入した。1 well あたりの総 DNA 量 ( $\mu\text{g}$ )  $\times$  5  $\mu\text{L}$  の FuGENE 原液を、1 well あたりの総 DNA 量( $\mu\text{g}$ )  $\times$  100  $\mu\text{L}$  の Opti-MEM (GIBCO) に直接加え、5 分間静置した。これを DNA 溶液に加え、室温で 15 分間静置した。全量を well 全体に行き渡るように少量ずつ添加した。37 $^{\circ}\text{C}$  で 24-48 時間培養後に実験に供した。

### 2.2.4 MHC-I 分子の細胞膜表面発現の検出

8-well Lab-Tek chamber slide (Nunc) に播種した GPL 細胞にリポフェクション法で pCMV-GP38.1 を導入し、24-48 時間後に 4%パラホルムアルデヒド含有 PBS (PFA in PBS) で固定した。一次抗体として抗 MHC-I (H2-Kb/H2-Db) マウスモノクローナル抗体 (clone 2G5, BioRad) (希釈倍率 1:200) を、二次抗体として FITC 標識抗マウス IgG 抗体 (希釈倍率 1:200) を用いて免疫染色を行った。DAPI (Thermo Fisher Scientific) による核染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM700, Zeiss) でイメージングした。

### 2.2.5 SDS-PAGE およびウエスタンブロッティング法

リン酸カルシウム法により発現プラスミドを HEK293T 細胞にトランスフェクションした。24 時間後に培養液を除去し、PBS で洗浄後、プロテアーゼ阻害剤カクテル cOmplete (Roche) を含む PBS、あるいは CHAPS Lysis Buffer (150mM NaCl, 2% 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS), 50mM Tris-HCl (pH 8.0), cOmplete ULTRA protease inhibitor cocktail, 1mM EDTA) を加え、セルスクレーパー (IWAKI) で細胞を回収した。超音波破碎装置 Bioruptor (BMBio) により細胞を破碎後、サンプルを 2-メルカプトエタノール (2-ME) 含有 SDS サンプルバッファーに懸濁し、10%アクリルアミドゲルを用いて SDS-PAGE で分離した。その後、polyvinylidene difluoride 膜 (Immobilon-P, Millipore) にセミドライトランスファー装置 BE-330 (バイオクラフト) を用いてブロッティングした。5%スキムミルク含有 PBS-Tween でブロッキングした後、イムノ-エンハンサーA液 (Wako) で希釈した一次抗体に浸し、常温で 1 時間静置した。イムノ-エンハンサーB液 (Wako) で希釈したペルオキシダーゼ標識二次抗体に浸し 1 時間静置した後、高感度化学発光試薬 ImmunoStar LD (Wako) に浸し、CCD イメージャーChemiDoc (BioRad) を用いて化学発光を検出した。

### 2.2.6 GP38.1 の細胞内局在および分子量の確認

8-well Lab-Tek chamber slide に播種した GPL 細胞に、FuGENE を用いて pEGFP-GP38.1 をトランスフェクションした。48 時間後に MitoSpy Red CMXRos (Biolegend) によりミトコンドリアを染色し、4% PFA in PBS に室温で 15 分間浸漬して細胞を固定した後、100 ng/mL の DAPI を用いて細胞核を染色し、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM700 または LSM900) でイメージングした。

HEK293T 細胞にリン酸カルシウム法により pCMV-GP38.1-FLAG を導入した。24 時間後に細胞を回収し、超音波破碎した。その細胞破碎液を 4°C、20,000 × g、30 分間遠心分離し、上清と沈殿物に分けて -80°C で保存した。また、細胞破碎液を糖鎖切断酵素 PNGaseF (NEB)、O-glycosidase (+neuraminidase) (NEB) を用いて製品プロトコールに従って処理した。各サンプルについて 2.2.5 に準じてウエスタンブロッティングを行い、抗 FLAG 抗体 (Sigma) を用いて FLAG タグが付加された GP38.1 を検出した。また、ローディングコントロールとして抗  $\beta$ -actin 抗体 (Sigma) を用いてアクチンを検出した。

### 2.2.7 GP38.1 安定発現 HeLa 細胞株の作製

GP38.1 安定発現細胞株の作製はレトロウイルスベクターによる遺伝子導入法を用



いて行った。レトロウイルス発現ベクター pLNCX (Dr. Dusty Miller より譲受)[56]に GP38.1 ORF をクローニングした pLNCX-GP38.1 を作製した。マウス白血病ウイルス (MuLV) の gag-pol 遺伝子を発現するレトロウイルスパッケージング細胞株 GP2-293 を 10 cm デイッシュに 50%コンフルエントで播種し、pLNCX-GP38.1 および pVSV-G (Clontech) をリン酸カルシウム法によりトランスフェクションした。48 時間後に、VSV-G タンパク質でシュードタイプ化した組換えレトロウイルスを含む培養上清を回収し、0.45  $\mu\text{m}$  フィルターを通してから、6-well プレートに播種した HeLa 細胞に加えた。24 時間後、1 mg/mL の G418 (Sigma) を含んだ培地に交換し、さらに 1 週間培養して選択された細胞を GP38.1 安定発現 HeLa 細胞株 (HeLa-GP38.1) とした。

## 2.2.8 フローサイトメトリー

### 2.2.8.1 スタウロスポリン誘導カスパーゼ 3 活性の評価

HeLa-GP38.1 細胞または HeLa 細胞を 12-well プレートに播種し、終濃度 1  $\mu\text{M}$  のスタウロスポリン (Adipogen) で 4 時間処理することによりアポトーシスを誘導した後、カスパーゼ活性測定試薬 CellEvent Caspase-3/7 Green Detection Reagent (Invitrogen) を加えて 37°C、30 分間静置した。その後、SYTOX AADvanced dead cell stain solution (Invitrogen) により死細胞を染色し、FACS Verse (BD Biosciences Japan) を用いて解析した。死細胞を除去 (ゲートアウト) した細胞集団における CellEvent Caspase-3/7 Green Detection Reagent 陽性細胞数および陰性細胞数を測定して求めた陽性対陰性比によりカスパーゼ 3 活性を評価した。

### 2.2.8.2 スタウロスポリン誘導ミトコンドリア膜透過性の評価

HeLa-GP38.1 細胞または HeLa 細胞を 12-well プレートに播種し、終濃度 500 nM のスタウロスポリン (Adipogen) で 4 時間処理することによりアポトーシスを誘導した後、1 mM の MitoSpy Red CMXRos (Biolegend) を加えて 37°C、30 分間静置し、ミトコンドリアを染色した。その後、Fixable Viability Dye eFluor 780 (Invitrogen) により死細胞を染色し、FACS Verse (BD Biosciences Japan) を用いて解析した。死細胞を除去 (ゲートアウト) した細胞集団における CMXRos 染色陽性細胞数および陰性細胞数を測定して求めた陰性対陽性比によりミトコンドリア膜透過性を評価した。

## 2.2.9 遺伝子組換え GPCMV の構築

本研究において、遺伝子組換えウイルスの作出は大臣確認(26 年 1 月 20 日付 25 受文科振第 2347 号; 28 年 7 月 28 日付 28 受文科振第 392 号)、岐阜薬科大学バイオセー

フティー委員会(平 27-31A)および岐阜大学組換え DNA 実験安全委員会(27 岐大術研 第9号-73)の承認を得て実施した。

組換えウイルスの構築に用いた BAC システムの概略 (Fig. 7) および組換えウイルスの基となる BAC クローンである pBAC-GPCMV $\Delta$ 9k の構造 (Fig. 8) を以下に示す。

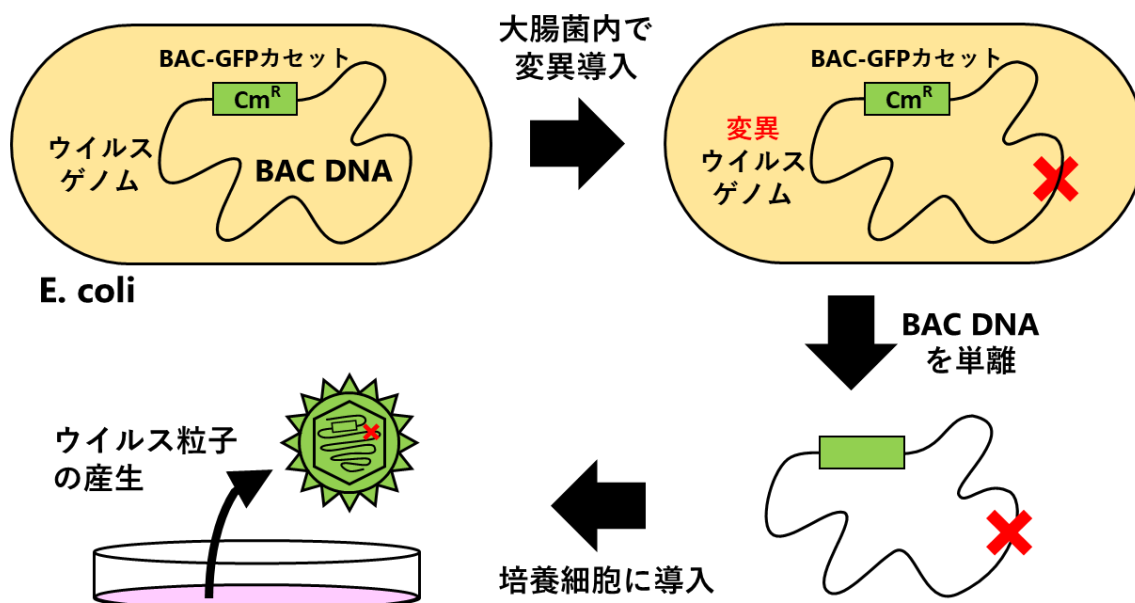


Fig. 7 BAC システム

F 因子プラスミドを基にしたクローニングベクターである BAC にウイルスゲノムおよび GFP をクローニングしたもの (BAC DNA) を大腸菌に保持させる。BAC はクロラムフェニコール (Cm) 耐性遺伝子を有するため、BAC DNA を保持する大腸菌は Cm 含有培地で選択できる。大腸菌の遺伝学を利用した相同組換え法により大腸菌内でウイルスゲノムに変異を導入した後、大腸菌から BAC DNA を単離し、培養細胞に導入することで、GFP をマーカーとして発現する組換えウイルス粒子が産生される。

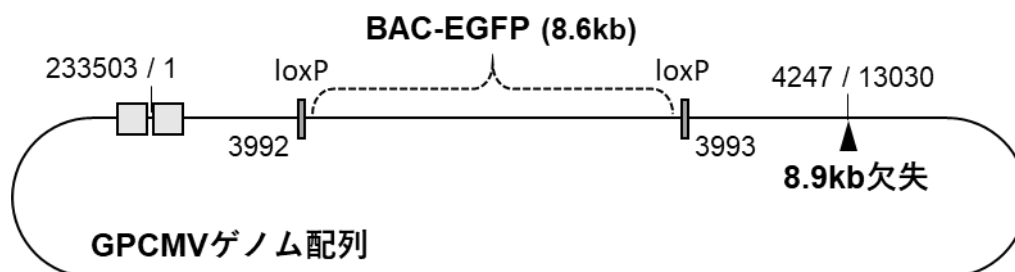


Fig. 8 pBAC-GPCMV $\Delta$ 9k の構造

CMV ゲノムは直鎖状 DNA からなるが、BAC として大腸菌内では環状 DNA 構造をとる。数字は GPCMV 塩基番号を示している[27]。

### 2.2.9.1 BAC システムを用いた GPCMV ゲノムへの変異導入

GP38.1 欠損株は、Two step markerless Red recombination 法[57]を用いて pBAC-GPCMVΔ9k (Fig. 8) の GP38.1 遺伝子に点変異を導入することにより作製した。

相同組換えは大腸菌 GS1783 (DH10B λ cI857 Δ (cro-bioA) < araC-P BAD I-sceI) (Dr. Gregory A. Smith より譲受) で行った。具体的には、GP38.1 遺伝子と相同な 60 bp の配列をもつプライマー (Table 1) を用いて、pEP-kanS (Dr. Nikolaus Osterrieder より譲受) をテンプレートに欠損変異配列とカナマイシン耐性遺伝子を含む DNA 断片を PCR 増幅した。この DNA 断片を精製・濃縮し、pBAC-GPCMVΔ9k を保持する大腸菌 GS1783 に 1.5 kV、200 Ω、25 μF でエレクトロポレーションした。この大腸菌を 10 μg/mL クロラムフェニコール、50 μg/mL カナマイシン含有 LB 寒天培地にて 30°C で 30 時間培養して得られたクローンについて、GoTaq Green Master Mix (Promega) および以下のプライマーセットを用いた PCR を行い、カナマイシン耐性遺伝子が挿入されているか (①)、GP38.1 以外の遺伝子欠損がないか (②、③) を確認した。

① カナマイシン耐性遺伝子

aphA1 rev : 5'-AATGCTGTTTTCCCGGGGATCGCAGTGGTG

GP38.1\_3RACE : 5'-GGAGGGGATAGTCCAGGAGAC

② GP50

B13-E10T7D : 5'-ACGATCTCGGGCGGAGCGCG

B26-E10M13G : 5'-AACGCTCTGTCTGTCGCTCGCTC

③ GP129-133

X9ins\_L : 5'-GTAGGTACCCGCAGGTTTGC

X9ins\_R : 5'-TTGATCACGGACGACGATAAC

PCR 条件 : 94°C 2 min、(98°C 10 sec、60°C 30 sec、68°C 1.5 min) ×40 サイクル

カナマイシン耐性遺伝子が挿入され、なおかつ GP50 および GP129-133 に欠損がない組換え中間体 pBAC-GPCMVΔ9k-Δ38.1kanS を保持するコロニーを 10 μg/mL クロラムフェニコール含有液体 LB 培地 1 mL で、菌液がかすかに濁るまで 30°C で振盪培養した。その後、L-arabinose (終濃度 1%) を添加し、30°C、1 時間振盪培養することで I-SceI の発現を誘導した。次に 42°C で 30 分間培養して Red recombinase を誘導し、30°C、2-3 時間振盪培養した。その菌液を液体 LB 培地で 200 倍希釈し、5 または 50 μL を 1% L-arabinose、10 μg/mL クロラムフェニコール含有寒天 LB 培地に塗抹し 30°C で培養した。30-48 時間後に得られたクローンについて、カナマイシン耐性遺伝子が除去されているか、GP38.1 以外の遺伝子欠損がないかを前述のプライマーセットを用いた PCR 法で確認し、GP38.1 欠損組換え体 pBAC-GPCMVΔ9k-Δ38.1 を保持する大腸菌を得た。また、この菌から BAC DNA を抽出し、EcoRI および XhoI による BAC DNA

の制限酵素断片パターンを BAC 親株と比較することで、予期しない変異が生じていないことを確認した。

GP38.1 復帰株は、pBAC-GPCMV $\Delta$ 9k- $\Delta$ 38.1 の欠損変異を親株配列へと復帰させる方法で作製した。GP38.1 遺伝子と相同な 60 bp の配列をもつプライマー (Table 1) を用いて、pEP-kanS をテンプレートに GP38.1 復帰配列とカナマイシン耐性遺伝子を含む DNA 断片を作製した。この DNA 断片を pBAC-GPCMV $\Delta$ 9k- $\Delta$ 38.1 を保持する GS1783 にエレクトロポレーションした。以降、pBAC-GPCMV $\Delta$ 9k- $\Delta$ 38.1 の作製と同様の手順により、GP38.1 復帰組換え体 pBAC-GPCMV $\Delta$ 9k-r38.1 を得た。

#### 2.2.9.2 組換え BAC DNA の精製

pBAC-GPCMV $\Delta$ 9k- $\Delta$ 38.1、-r38.1 をそれぞれ保持する大腸菌 GS1783 株を 400 mL のクロラムフェニコール含有液体 LB 培地を用いて、30°C で培養した。これを集菌し、NucleoBond Xtra BAC (Takara) を用いて各 BAC DNA を抽出・精製し、GPL 細胞へのトランスフェクションに用いた。

#### 2.2.9.3 組換えウイルスの回収および精製

FuGENE を用いて、上記の各組換え BAC DNA を GPL 細胞にトランスフェクションした。具体的には、1.5 mL チューブに 50  $\mu$ L の F12 培地、1  $\mu$ g BAC DNA (pBAC-GPCMV $\Delta$ 9k- $\Delta$ 38.1、-r38.1)、4  $\mu$ L FuGENE を混合し、室温で 15 分間静置した。これを 24-well プレートに 80-90%コンフルエントとなった GPL 細胞の培地に加え、37°C、5% CO<sub>2</sub> 存在下で 3-4 日間培養した。GFP を指標に感染の広がりを確認した後、セルスクレーパーで感染細胞を剥がし、GPL 細胞を 80%コンフルエントになるように播種した 25 cm<sup>2</sup> フラスコ (T25, Corning) へ重層し、37°C、5% CO<sub>2</sub> 存在下で 3-4 日間培養した。その後、同様に 75 cm<sup>2</sup> フラスコ (T75, Corning)、そして T150 へスケールアップしたのち 1.2.2.2 に準じてウイルス精製を行い、GP38.1 欠損株 (GPCMV  $\Delta$ 38.1) および復帰株 (GPCMV r38.1) のストックを作製した。

### 2.2.10 GPCMV 感染実験

#### 2.2.10.1 GP38.1 mRNA 発現動態の検討

96-well plate に播種した GPL 細胞に GPCMV $\Delta$ 9k (WT) を MOI 1 で感染させ、50  $\mu$ g/mL シクロヘキシミド (CHX) 存在下または非存在下で 6 時間培養した。RNeasy Mini Kit (Qiagen)を用いて RNA を抽出し、PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser (Takara) を用いて cDNA に逆転写した。Table 1 に記載したプライマーおよび GoTaq

qPCR Master Mix (Promega) を用いた定量 PCR 法により GP38.1 mRNA 量を測定した。

#### 2.2.10.2 感染細胞生存率の評価

GPL 細胞を 96-well プレートに播種し、24 時間後に GPCMV  $\Delta$ 38.1 および r38.1 を MOI 0.5 で感染させた。その後、24、48、72、96、120 時間後に細胞を回収し、 $-80^{\circ}\text{C}$  に保存した。生存細胞の指標である内在性 ATP を CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay (Promega) を用いて定量し、各サンプル中の生存細胞数を評価した。

#### 2.2.10.3 TUNEL 法

GPL 細胞を 8-well Lab-Tek chamber slide に播種し、 $\Delta$ 38.1 および r38.1 を MOI 0.5 で感染させた。その 24 時間後に、Cell Meter TUNEL Apoptosis Assay Kit (AAT Bioquest) を用いて、アポトーシスの過程で生じる断片化 DNA を染色した。その後、100 ng/mL の DAPI を用いて細胞核を染色し、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM700) でイメージングした。

#### 2.2.10.4 多段増殖法

GPL 細胞を 48-well plate に播種し、 $\Delta$ 38.1 および r38.1 を MOI 0.01 で感染させた。感染 2 時間後に培地交換し、感染 1、3、5、7、9、11 日後に上清を回収し、 $-80^{\circ}\text{C}$  へ保存した。その後、各上清のウイルス力価を 1.2.2.3 に準じて測定した。

#### 2.2.10.5 モルモット個体への感染

本研究において、動物実験は岐阜薬科大学動物飼育・動物実験委員会および岐阜大学・動物実験審査委員会の承認を得て実施した。3 週齢の系統モルモット雌 (4 匹/群) の皮下に  $\Delta$ 38.1 もしくは r38.1 を  $5.0 \times 10^6$  FFUs 接種する感染動物実験 (a)、および接種ウイルス量が 2 倍の  $1.0 \times 10^7$  FFUs であること以外は a と同条件の感染動物実験 (b) を行った。両実験とも、急性感染期に当る接種 6 日後に三種混合麻酔による安楽死処置を行ったのち解剖し、血液および臓器 (脾臓、肝臓、膵臓、肺) を採集した。

#### 2.2.11 定量 PCR 法

採集した臓器の重量を測定し、DNA 精製キット QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) を用いて、血液および各臓器中の DNA を抽出した。GPCMV GP83 遺伝子およびモルモット  $\beta$ -actin 遺伝子を標的とした定量 PCR 法[58]により、細胞数当たりの GPCMV ゲノムコピー数を算出した。

具体的には、下記の組成で1サンプルあたり20  $\mu$ L の TaqMan premix を調製し、テンプレートを含まない陰性対照、検量線作成のための標準サンプル (各遺伝子をクローニングしたプラスミドを段階希釈したもの) および目的のサンプルを各 5  $\mu$ L 添加し、Mx3000P (Stratagene) を用いて定量 PCR 反応を行った。

<b>GPCMV GP83 遺伝子</b>	<b>(<math>\mu</math>L)</b>
DW	4.31
THUNDERBIRD qPCR mix	10.00
Salmon sperm ssDNA [100 $\mu$ g/mL]	0.40
Reference dye x100 diluted in DW	0.04
GP83 primer F&R mix [25 $\mu$ M]	0.16
GP83 probe FAM [57.9 $\mu$ M]	0.09
subtotal	15.00
DW, standard DNA, or sample DNA	5.00
total	20.00

GP83 primer F 配列： 5'-CGACGACGACGATGACGAAAAC

GP83 primer R 配列： 5'-TCCTCGGTCTCAACGAAGGGTC

GP83 probe 配列： 5'-FAM-ATCCGAGTTAGGCAGCG-Minor Groove Binder (MGB)

PCR 条件： 95°C 10 min、 (95°C 15 sec, 60°C 1 min)  $\times$ 50 サイクル

<b>モルモット <math>\beta</math>-actin 遺伝子</b>	<b>(<math>\mu</math>L)</b>
DW	4.67
Brilliant III Ultra-Fast QPCR master mix	10.00
E. coli carrier DNA [100 $\mu$ g/mL]	0.40
Reference dye x100 diluted in DW	0.04
GP $\beta$ -actin primer F&R mix [25 $\mu$ M]	0.16
GP $\beta$ -actin probe FAM [54.5 $\mu$ M]	0.09
subtotal	15.00
DW, standard DNA, or sample DNA	5.00
total	20.00

GP  $\beta$ -actin primer F 配列： 5'-AGGCCAACCGCGAGAAGATGAC

GP  $\beta$ -actin primer R 配列： 5'-GAAGTCCAGGGCGACGTAGCA

GP  $\beta$ -actin probe 配列： 5'-FAM-CACTCTCCACCTTCC-MGB

PCR 条件： 95°C 3 min、 (95°C 10 sec, 60°C 30 sec)  $\times$ 50 サイクル

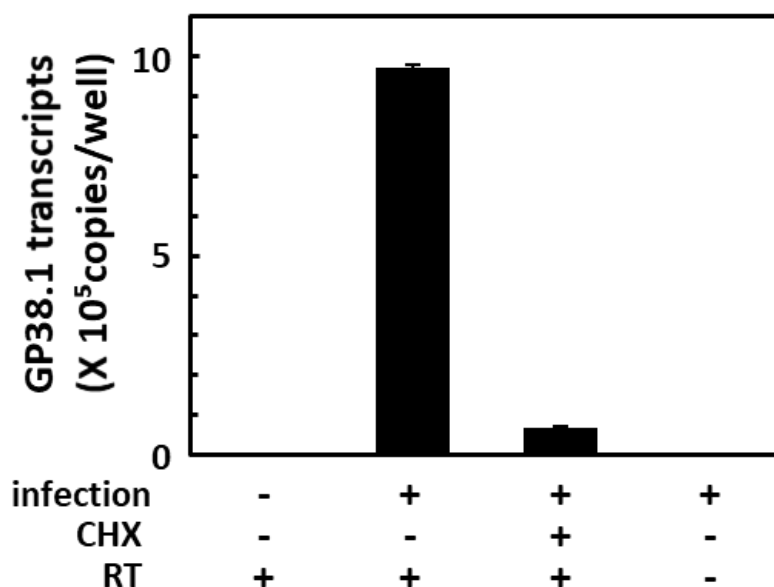
## 2.2.12 統計処理

統計処理は GraphPad Prism ver.7 (GraphPad Software) を用いて行った。2群間の組織重量や臓器中ウイルス量の有意差検定には Mann-Whitney の U 検定を用い、有意水準 5%未満を有意差ありとした。

### 第3節 結果

#### 2.3.1 GP38.1 の発現動態

CMV 遺伝子は前初期遺伝子、初期遺伝子、後期遺伝子の順に転写、翻訳される[1]。前初期遺伝子は転写調節因子、初期遺伝子は DNA ポリメラーゼなどウイルス DNA 複製に必要な装置、後期遺伝子はウイルス粒子の構造タンパク質を主にコードしている。前初期遺伝子はタンパク質合成阻害剤 CHX 存在下でも mRNA の発現誘導が起こる遺伝子と定義されていることから、GPCMV を感染させた GPL 細胞において CHX の有無による GP38.1 の発現動態を比較することで、GP38.1 が前初期遺伝子かどうかを検討した。その結果、CHX 存在下で GP38.1 mRNA 量の低下がみられたことから、GP38.1 は前初期ではなく、初期または後期に発現する遺伝子と考えられた (Fig. 9)。なお、vMIA をコードする HCMV UL37x1 は前初期[59]、MCMV m38.5 は初期に発現することが知られており[45]、MHC-I 分子の発現に関与する HCMV UL40 は初期および後期に発現することが知られている[41]。



**Fig. 9** The mRNA expression kinetics of GP38.1

GPL cells in wells of a 96-well plate were infected with mock or with GPCMV $\Delta$ 9k WT at an MOI of 1, cultured in the absence or presence of cycloheximide (CHX), and harvested at 6hrs after infection. Quantification of GP38.1 transcripts in the RNA samples reacted without or with reverse transcriptase (RT) was done as described in the Materials & Methods section. Means and SEMs of copy numbers of GP38.1 transcripts obtained from triplicate wells are shown.

### 2.3.2 GP38.1 が MHC-I 分子の発現に与える影響

GPL 細胞に一過性に発現させた GP38.1 が、MHC-I 分子の発現に何らかの影響を及ぼすかを検討した。モルモットの MHC 分子の構造は、マウスの MHC-I 分子である H-2D や H-2K と類似している[60]ため、抗 MHC-I (H2-Kb/H2-Db) マウスモノクローナル抗体を用いて免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。その結果、GP38.1 発現の有無による MHC-I 分子の発現量や局在に明らかな差は見られなかった (Fig. 10)。

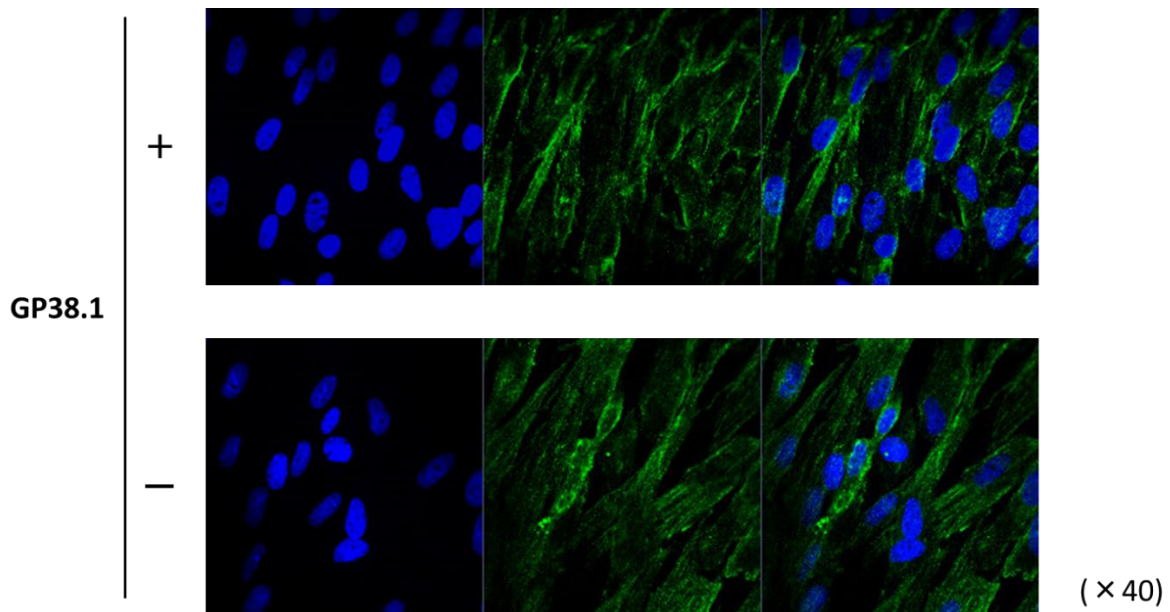


Fig. 10 GP38.1 が MHC-I 分子の発現に与える影響

### 2.3.3 GP38.1 欠損組換え GPCMV の性状

GP38.1 のウイルス増殖における役割を解析するため、pBAC-GPCMV $\Delta$ 9k を親株とし、GP38.1 遺伝子に変異を導入した pBAC-GPCMV $\Delta$ 9k- $\Delta$ 38.1、および復帰変異を導入した pBAC-GPCMV $\Delta$ 9k-r38.1 を GPL 細胞にそれぞれトランスフェクションすることで最終的に GP38.1 欠損株 (GPCMV  $\Delta$ 38.1) および復帰株 (GPCMV r38.1) の 2 種類のウイルスを回収した。

興味深いことに、ウイルスストックの作製過程において、GP38.1 欠損株感染細胞には復帰株感染細胞に比べて早期に細胞変性効果 (CPE, cytopathic effect) が現れ、培養上清中のウイルス力価も低下していたことから、精製ウイルスを用いて次の検討を行った。



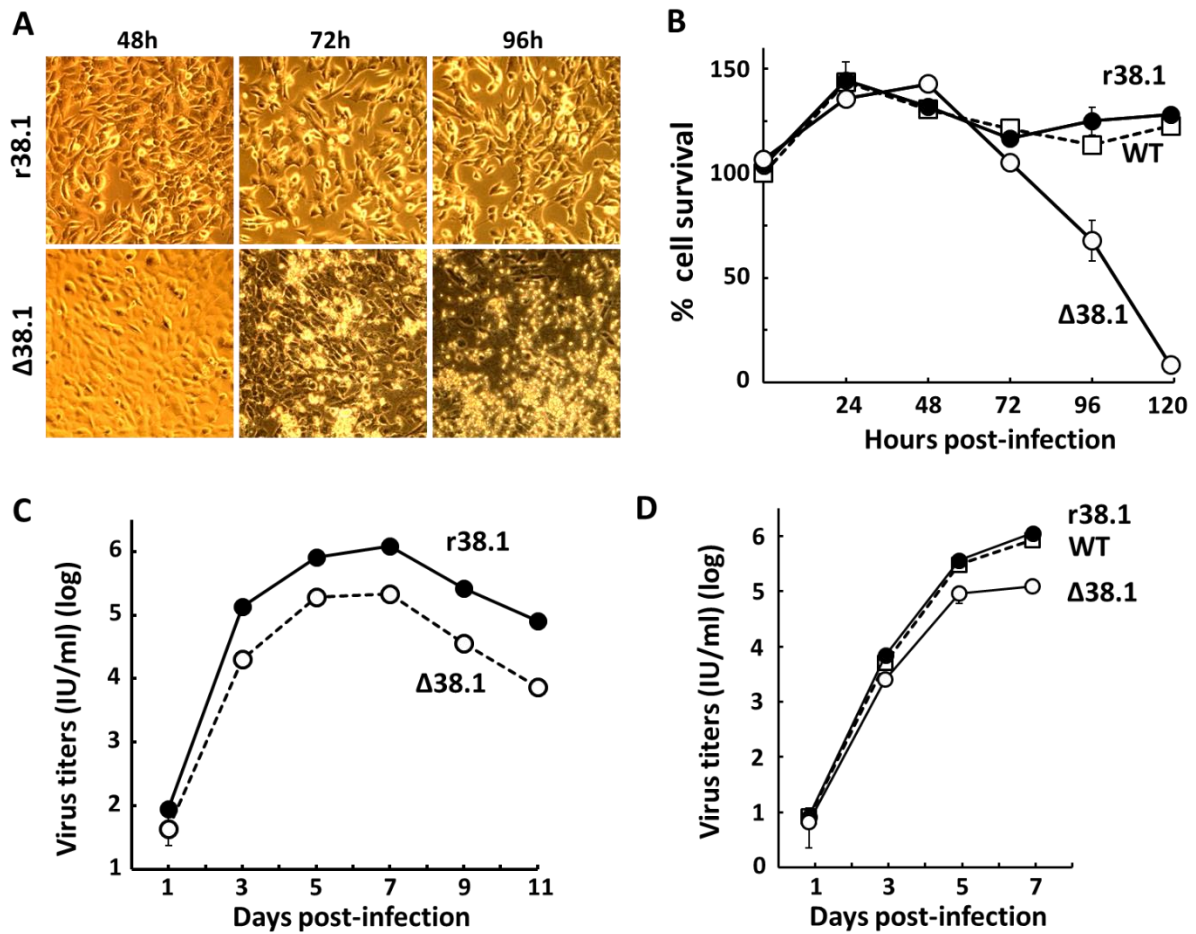
#### 2.3.4 GP38.1 が感染細胞生存率およびウイルス増殖に与える影響

GPCMV  $\Delta$ 38.1 および r38.1 を、96-well plate に播種した GPL 細胞に MOI 0.5 で感染させた。その後、経時的に感染細胞を観察したところ、r38.1 感染細胞に比べ、 $\Delta$ 38.1 感染細胞において細胞死が亢進する傾向が見られた (Fig.11A)。

そこで、GPCMV 感染細胞の生存率に対する GP38.1 の影響を明確にするため、親株である GPCMV  $\Delta$ 9k (WT)、 $\Delta$ 38.1 または r38.1 を、96-well plate に播種した GPL 細胞に MOI 0.5 で感染させ、経時的に感染細胞を回収し、細胞内在性 ATP の定量を行うことで細胞生存率を測定した。その結果、 $\Delta$ 38.1 感染細胞では、WT または r38.1 感染細胞に比べ、感染 48 時間以降の細胞生存率が有意に低下した (Fig. 11B)。このことから GP38.1 が感染細胞の細胞死を抑制する可能性が明らかとなった。

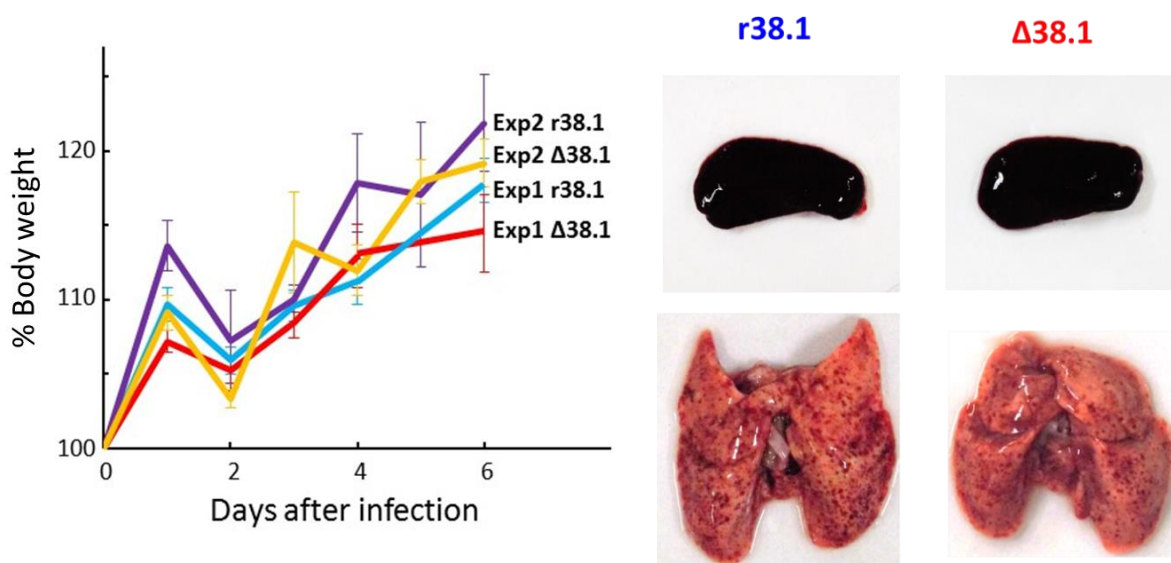
次に、GP38.1 が細胞培養系でのウイルス増殖に与える影響を明確にするため、GPCMV  $\Delta$ 38.1 および r38.1 を 48-well plate に播種した GPL 細胞に MOI 0.01 で感染させた後、1、3、5、7、9、11 日後に培養上清を回収し、各上清中のウイルス力価を測定した。その結果、 $\Delta$ 38.1 感染細胞の培養上清中のウイルス力価は、r38.1 に比べ 10 分の 1 程度に低下していた (Fig. 11C)。WT、 $\Delta$ 38.1 または r38.1 培養上清中のウイルス力価を比較した追試でも同様の結果が得られ、WT と r38.1 の培養上清中のウイルス力価には差がないことを示した (Fig. 11D)。以上の結果は、細胞培養系におけるウイルス増殖にとって GP38.1 が重要な役割を果たしていることを示している。

さらに、GP38.1 が動物個体でのウイルス増殖に与える影響を明らかにするため、3 週齢のモルモット雌個体に GPCMV  $\Delta$ 38.1 および r38.1 を皮下接種し、感染 6 日後に、血液中および臓器中ウイルス量を測定した。なお、再現性を担保するため、ほぼ同条件の感染動物実験を 2 回行った。 $\Delta$ 38.1 感染群と r38.1 感染群で、感染に伴う一過性の体重減少、脾臓の肥大化 (脾腫)、肺の出血斑等の外観病変には差が見られなかった (Fig. 12)。両実験とも  $\Delta$ 38.1 感染群の臓器中ウイルス量は r38.1 感染群よりも低い傾向があり、特に脾臓中ウイルス量には有意な差が見られた (Fig. 13)。このことから、GP38.1 は動物個体におけるウイルス増殖を部分的に促進していると考えられる。

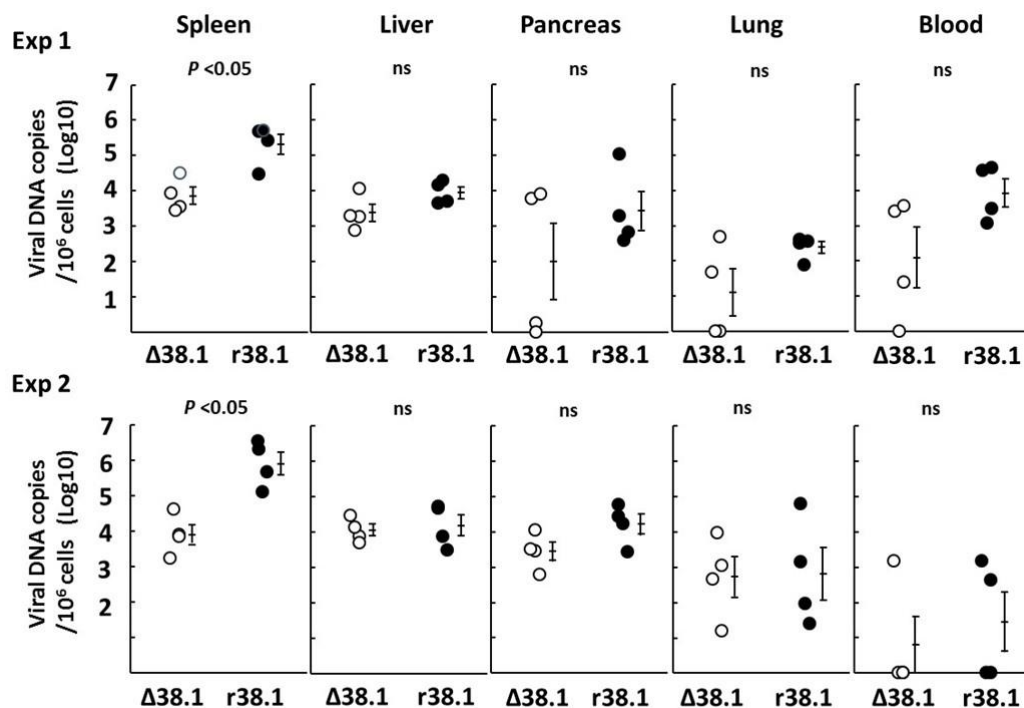


**Fig. 11** Effects of GP38.1 on cell survival, apoptosis, and viral yields.

(A, B) GPL cells were infected with GPCMV $\Delta$ 9k (WT),  $\Delta$ 38.1 or r38.1 at an MOI of 0.5. Bright field images (A) and the cell survival percentages at the indicated time points (B) are shown. (C) Culture supernatants of GPL cells infected with  $\Delta$ 38.1 or r38.1 at an MOI of 0.01 were collected at the indicated time points. (D) Comparison of viral yields among WT, r38.1, and  $\Delta$ 38.1. Culture supernatants of GPL cells infected with GPCMV $\Delta$ 9k strains at an MOI of 0.01 were collected at the indicated time points. Means and SEMs of the viral titers in the supernatants from triplicate wells are shown. Means and SEMs of the viral titers in the supernatants from triplicate wells are shown. Due to the small SEMs, error bars are hidden behind the circles.



**Fig. 12** Effects of GP38.1 on changes in body weight and on appearance of organs. (left panel) Means and SEMs of relative body weights of guinea pigs infected with r38.1 (blue and purple) or  $\Delta$ 38.1 (red and orange) in two independent experiments are shown using the body weight of each animal at the time of GPCMV infection as a 100% control. N=4 per each group in one experiment. (right panel) Appearance of the spleens and lungs of the r38.1- or  $\Delta$ 38.1-infected animals



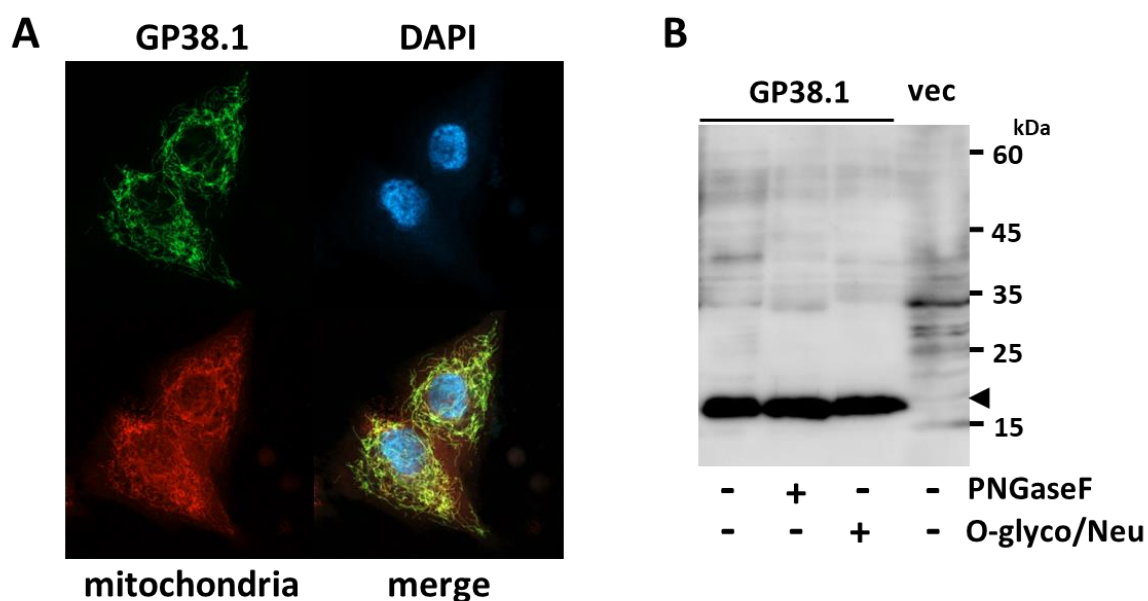
**Fig. 13** Effects of GP38.1 on viral dissemination in vivo. Viral loads in the indicated tissues of guinea pigs infected with GPCMV $\Delta$ 9k  $\Delta$ 38.1 (open circles) or r38.1 (closed circles) at 6 days post-infection were determined by real-time PCR analyses. Each closed or open circle represents one animal. Means and SEMs of the viral loads from 4 animals are shown. Results of two independent experiments are shown separately.

### 2.3.5 GP38.1 の細胞内局在と翻訳後修飾

GP38.1 のタンパク質としての基本的な性質を明らかにするため、細胞内局在および翻訳後修飾を検討した。

EGFP 標識 GP38.1 を発現させた GPL 細胞を、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した結果、GP38.1 はミトコンドリアに局在することを明らかにした (Fig. 14A)。

また、GP38.1 のアミノ酸配列は N 型糖鎖付加配列 (NXT/S) を含むことから、糖鎖修飾の有無を検討した。FLAG 標識 GP38.1 を発現させた GPL 細胞のライセートを、N 型糖鎖切断酵素 PNGaseF、O 型糖鎖切断酵素 O-glycosidase (+ neuraminidase) でそれぞれ処理し、抗 FLAG 抗体を用いたウエスタンブロッティング法により検出したが、GP38.1 の分子量に変化はなかった。このことから、GP38.1 は糖鎖修飾を受けない分子量 19 kDa のタンパク質であることを示しており (Fig. 14B)、この分子量はアミノ酸長から予想される分子量 21.7 kDa とおよそ一致していた。



**Fig. 14** Cellular localization and glycosylation state of GP38.1 in transiently transfected cells.

(A) GPL cells were transfected with pEGFP-GP38.1, one day later stained with MitoSpy Red CMXRos (red) and DAPI (blue) for mitochondrial and nuclear staining, respectively, fixed with 4% paraformaldehyde, and observed using a confocal microscope. (B) HEK293T cells were transfected with pCMV-Tag-GP38.1 (GP38.1) or with a vector plasmid (vec) and one day later harvested. After sonication, the lysates were treated with PNGaseF or with O-glycosidase along with neuraminidase (O-glyco/Neu) and analyzed by immunoblotting using an anti-FLAG tag antibody.

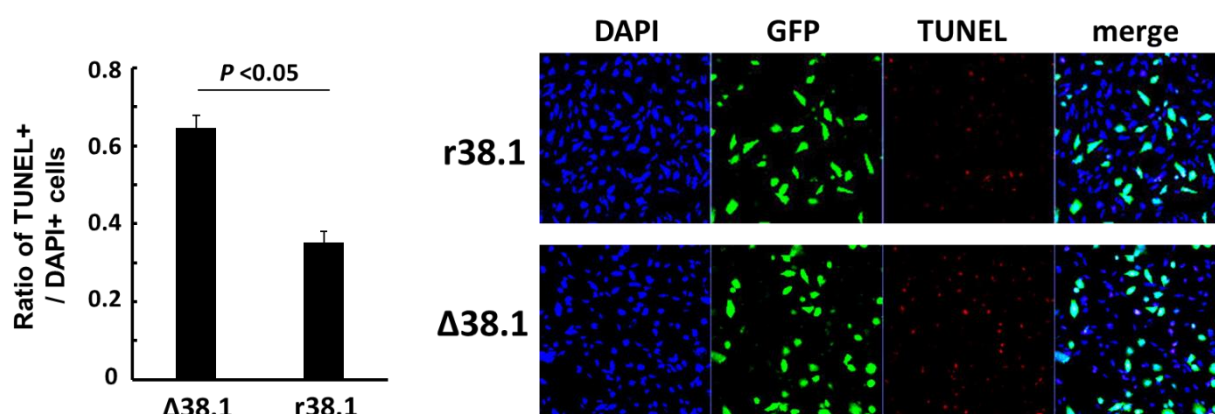
### 2.3.6 GP38.1 の部分的なアポトーシス抑制作用

GP38.1 がミトコンドリアに局在したことから、GP38.1 はミトコンドリアに局在する Bcl-2 ファミリータンパク質を介して制御される内因性アポトーシス経路を阻害することで細胞死を抑制しているのではないかと考えた。Bcl-2 ファミリータンパク質のアポトーシス促進因子 BAX や BAK はミトコンドリア膜の透過性を亢進させ、ミトコンドリア膜間腔に局在するチトクローム c などのアポトーシス誘導タンパク質を細胞質へ流出させることでカスパーゼカスケードを活性化する。最終的にはエフェクターカスパーゼであるカスパーゼ 3 が活性化されることで細胞質内の構造タンパク質の消化や核 DNA の断片化を経てアポトーシスが進行する。

そこで、アポトーシス誘導剤スタウロスポリン[61]によるミトコンドリア膜の透過性亢進およびカスパーゼ 3 の活性化、それに続く核 DNA の断片化を指標に、GP38.1 のアポトーシス経路への影響を検討した。

#### 2.3.6.1 核 DNA 断片化の抑制

まず、GPCMV 感染で誘導されるアポトーシスによる核 DNA 断片化に対する GP38.1 の影響を検討した。GPCMV  $\Delta$ 38.1 または r38.1 を GPL 細胞に MOI 0.5 で感染させ、24 時間後にアポトーシスによって生じた断片化 DNA を TUNEL 法により検出した。その結果、r38.1 感染細胞では TUNEL 陽性細胞が 45%減少したことから、GP38.1 は部分的なアポトーシス抑制作用を示すことを明らかにした (Fig. 15)。



**Fig. 15** Effects of GP38.1 on DNA fragmentation visualized by the TUNEL assay.

At 24 hrs after the infection of GPL cells with GPCMV  $\Delta$ 38.1 or r38.1 at an MOI of 0.5, apoptosis in the infected cells was monitored using a commercial TUNEL assay kit. Means and SEMs of the ratio between TUNEL-positive and -negative cell numbers obtained in triplicate experiments are shown.

### 2.3.6.2 カスパーゼ3活性化の抑制

次に、核 DNA 断片化の上流に位置するイベントであるカスパーゼ3の活性化に対する GP38.1 の影響を検討した。

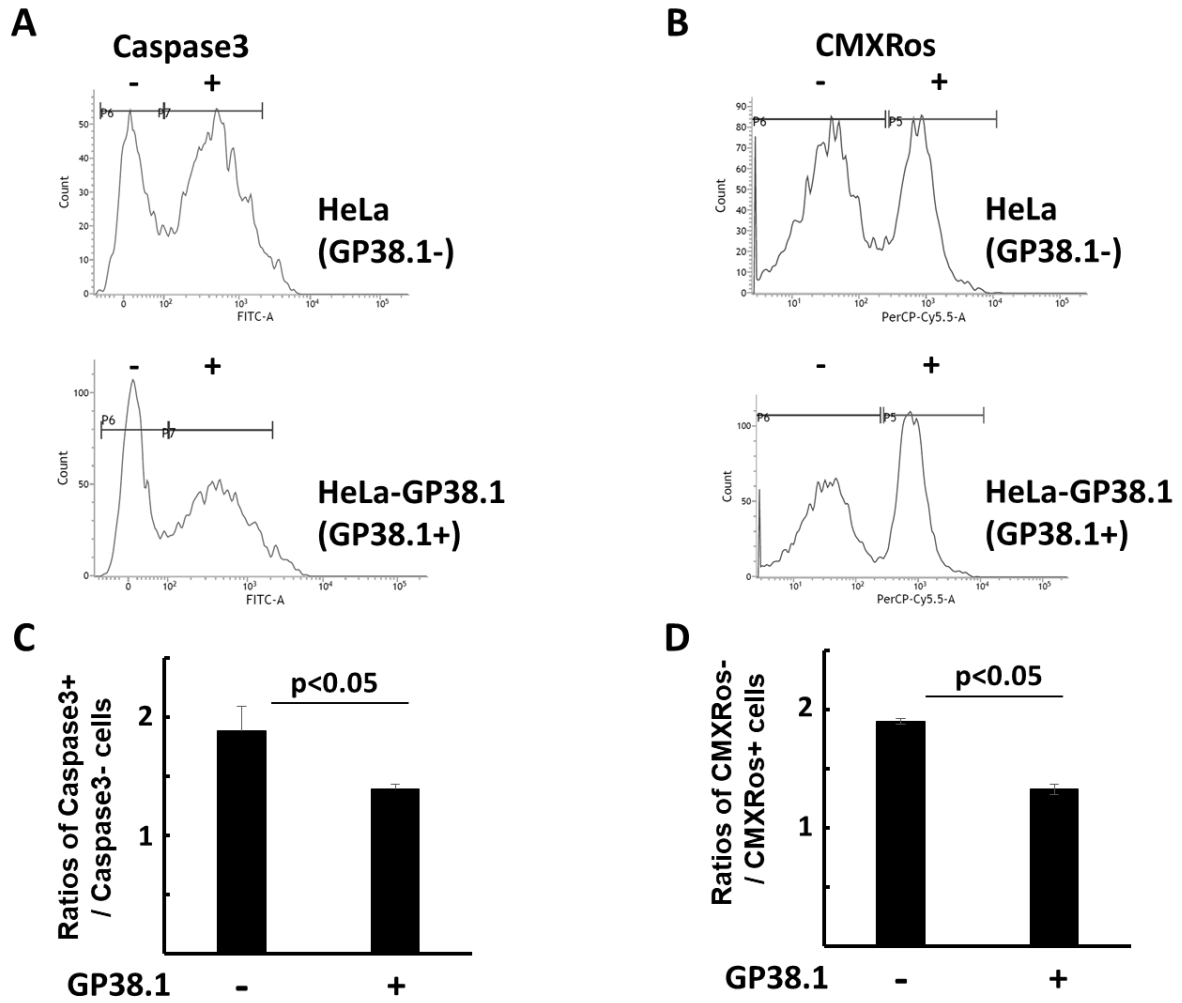
GP38.1 を安定的に発現する HeLa 細胞株 (HeLa-GP38.1) を樹立し、この細胞株に終濃度 1  $\mu$ M のスタウロスポリンを添加し、アポトーシスを誘導した。カスパーゼ3特異的に切断されることで核酸に対する蛍光プローブとなる基質ペプチドを利用した CellEvent Caspase-3/7 Green Flow Cytometry Assay Kit を用いてスタウロスポリン添加4時間後の細胞を染色し、フローサイトメトリーにより蛍光強度を測定した。その結果、HeLa-GP38.1 細胞では、陰性対照である HeLa 細胞に比べてカスパーゼ3活性陽性対陰性比が 26%減少したことから、GP38.1 がカスパーゼ3活性を抑制することを明らかにした (Fig. 16A, C)。

### 2.3.6.3 ミトコンドリア膜透過性亢進の抑制

最後に、カスパーゼ3活性化の上流に位置するイベントであるミトコンドリア膜の透過性亢進に対する GP38.1 の影響を検討した。HeLa-GP38.1 細胞に終濃度 500 nM のスタウロスポリンを添加し、アポトーシスを誘導した。4時間後に CMXRos によりミトコンドリアを染色し、フローサイトメトリーにより CMXRos 陽性細胞数に対する陰性細胞数の比を測定した。その結果、HeLa-GP38.1 細胞では、陰性対照である HeLa 細胞に比べて CMXRos 陰性対陽性比が 30%減少した (Fig. 16B, D)。ミトコンドリア膜透過性亢進による膜電位の低下に伴い CMXRos 陰性細胞の比率は増加し、陰性対陽性比は低下することから、GP38.1 はミトコンドリア膜透過性亢進を抑制することを明らかにした。

### 2.3.7 GP38.1 と Bcl-2 ファミリータンパク質 BAX との相互作用

GP38.1 はミトコンドリアに局在し、内因性アポトーシス経路を部分的に抑制したことから、GP38.1 は positional homolog と推測された HCMV UL37x1 [43,47]と同様、ミトコンドリアにおけるアポトーシス促進因子である Bcl-2 ファミリータンパク質 BAX および BAK と相互作用することで内因性アポトーシスを抑制しているのではないかと考え、次の検討を行った。



**Fig. 16** Effects of GP38.1 on intrinsic pathways of apoptosis.

(A, C) HeLa and HeLa-GP38.1 cells were treated with staurosporine and thereafter with CellEvent Caspase-3/7 Green Detection Reagent and AADvanced dead cell stain solution. After gating out dead cells, 5,000 cells were counted for the presence or absence of caspase-3-activation-specific staining. Means and SEMs of the ratio between caspase-3 activation-positive (caspase3+) and -negative (caspase3-) cell numbers obtained in triplicate experiments are shown. (B, D) HeLa and HeLa-GP38.1 cells were treated with staurosporine and thereafter with MitoSpy Red CMXRos. After gating out dead cells stained with eBioscience Fixable Viability Dye eFluor 780, approximately 7,000 cells were counted for the presence or absence of CMXRos staining. Means and SEMs of the ratio between CMXRos-negative and -positive cell numbers obtained in triplicate experiments are shown.

### 2.3.7.1 GP38.1 と BAX の細胞内共局在

一過性発現系において、GP38.1 が BAX と共局在するかを検討した。赤色蛍光タンパク質 RFP で標識した gpBAX (RFP-BAX) または GFP 標識した GP38.1 (GFP-GP38.1) を GPL 細胞に発現させ、遺伝子導入後 48 時間でパラホルムアルデヒドにより固定した。その後、100 ng/mL の DAPI を用いて細胞核を対比染色し、共焦点レーザー顕微鏡で RFP-BAX と GFP-GP38.1 の局在を観察した。その結果、BAX は GP38.1 非存在下では細胞質全体に局在したが、GP38.1 を共発現させると GP38.1 と BAX はいずれもミトコンドリアに局在した (Fig. 17A)。

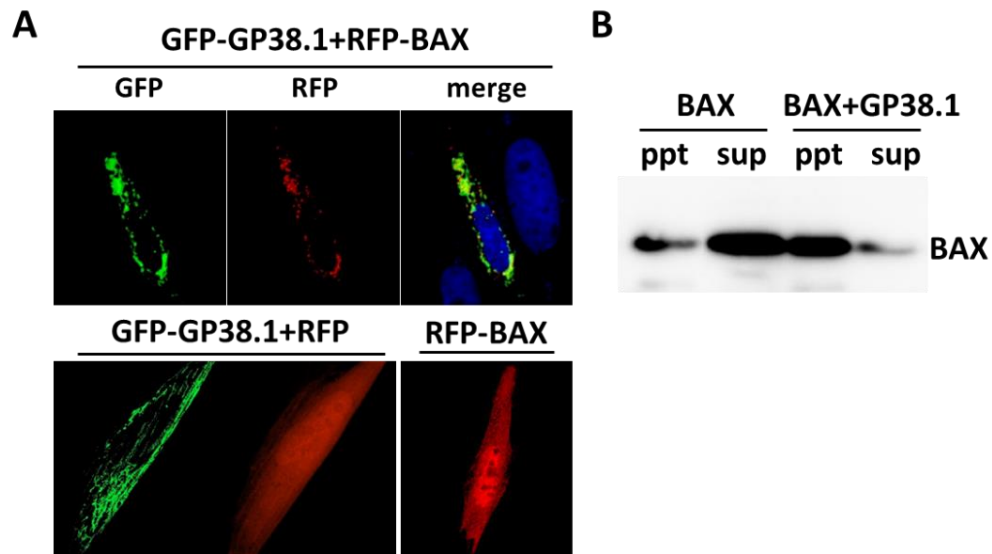
### 2.3.7.2 BAX の不溶性画分への移行

次に、免疫沈降法を用いて GP38.1 と相互作用している BAX の検出を試みた。HEK293T 細胞に、C 末端を FLAG 標識した GP38.1 を発現させ、遺伝子導入後 24 時間の細胞を回収した。細胞破碎液を遠心分離して上清と沈殿物に分離し、抗 FLAG 抗体によるウエスタンブロット解析を行ったところ、GP38.1 は沈殿物、すなわち不溶性画分に存在した。難溶性タンパク質可溶化剤である 3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS) を 2% 添加することで GP38.1 は可溶化されたが、GP38.1 を含むタンパク質抽出液中に強力な界面活性剤が存在することから、GP38.1 と BAX との相互作用を免疫沈降法により確かめることは困難と考えられた。そこで、通常では BAX は可溶性画分に存在することを利用し、GP38.1 を共発現させることにより、可溶性画分に存在した BAX の大部分が不溶性画分へと移行することを示した (Fig. 17B)。この結果は、GP38.1 が UL37x1 と同様、BAX と相互作用することを示唆している。しかし、GP38.1 が BAX と直接相互作用しているかどうかは明らかでない。

### 2.3.8 GP38.1 と BAK との相互作用

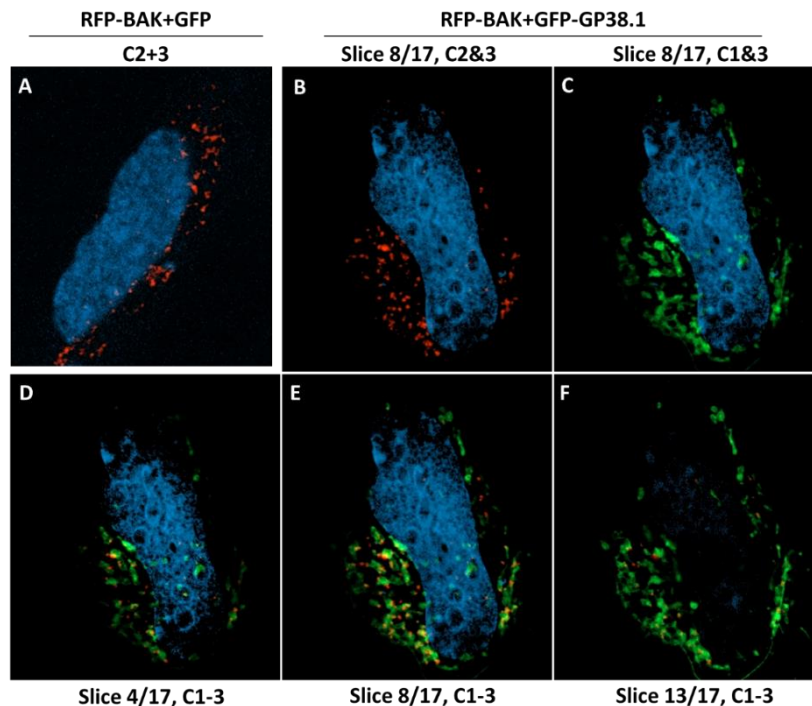
MCMV m38.5 は BAX のみと相互作用するが、HCMV UL37x1 は BAX だけでなく BAK とも相互作用する[43,47]。GP38.1 によるアポトーシス抑制作用は部分的であったことから、GP38.1 が BAK と相互作用するかどうかを検討した。一過性発現系において EGFP 標識 GP38.1 と RFP 標識 gpBAK をそれぞれ発現させた結果、BAK はミトコンドリアに局在し、その局在は GP38.1 の共発現によって変化しなかった (Fig. 18 A, B)。また、共焦点レーザー顕微鏡による Z 軸方向の連続切片像取得機能 (Z スタック) を用いて、BAK が GP38.1 と共局在していないことを示した (Fig. 18 B-F)。これらの結果は、GP38.1 が BAK と相互作用しないことを示唆している。





**Fig. 17** Interaction of GP38.1 with BAX in transiently transfected cells.

(A) GPL cells were transfected with pEGFP-GP38.1 (GFP-GP38.1) along with pTurboRFP-N (RFP) or pTurboRFP-gpBAX (RFP-BAX), 2 days later fixed with 4% paraformaldehyde, and observed using a confocal microscope. (B) HEK293T cells were transfected with pcDNA-gpBAX (BAX) with or without pCMV-Tag-GP38.1 (GP38.1) and one day later harvested. Their cell lysates were analyzed by immunoblotting using anti-BAX antibodies.



**Fig. 18** No evident interaction of GP38.1 with BAK.

GPL cells were transfected with pTurboRFP-gpBAK (RFP-BAK) along with pEGFP-N1 (A) or pEGFP-GP38.1 (GFP-GP38.1) (B-F), 2 days later fixed with 4% paraformaldehyde, and observed using the Z-stack function of a confocal microscope. Channels C1, C2, and C3 represented EGFP (green), TurboRFP (red), and DAPI (blue), respectively. Panels D to F are 4th, 8th, and 13th of 17 slices, respectively, using C1, C2, and C3.

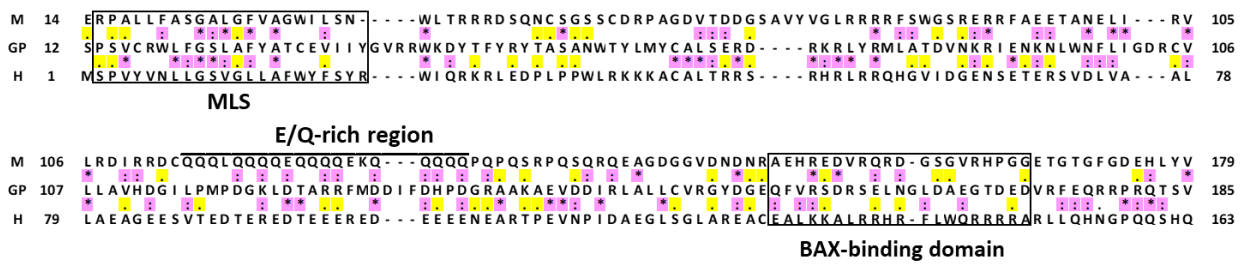
#### 第4節 考察

本章では、GPCMV GP38.1 遺伝子の機能について検討し、以下の結果を得た。

- 1) 一過性に発現させた GP38.1 は、MHC-I 分子の発現に影響しなかった。
- 2) GP38.1 欠損株感染細胞では細胞死が亢進し、培養上清中のウイルス力価が低下した。GP38.1 欠損株感染モルモットでは、脾臓中ウイルス量が有意に低下した。
- 3) GP38.1 はスタウロスポリンにより誘導されたアポトーシスを部分的に抑制した。
- 4) GP38.1 はミトコンドリアに局在し、Bcl-2 ファミリータンパク質 BAX と相互作用したが、類似タンパク質である BAK とは相互作用しなかった。

以上より、GP38.1 は BAX 特異的に感染細胞のアポトーシスを抑制する、GPCMV がコードする vMIA であると考えられる。

GP38.1 は、HCMV UL40 と弱い配列相同性を有するものの、MHC-I 分子の発現を変化させなかった。その後の検討で GP38.1 はミトコンドリアに局在すること、そして GP38.1 欠損株感染細胞では細胞死が亢進することが判明したことから、GP38.1 は感染細胞のアポトーシスに関連した機序により宿主免疫を回避する機能を有すると仮定して機能解析を進めた。ウイルスゲノム上での周辺遺伝子との位置関係から GP38.1 は vMIA である HCMV UL37x1 や MCMV m38.5 の positional homolog であると推測したが、GP38.1 は HCMV UL37x1 や MCMV m38.5、あるいは Bcl-2 ファミリータンパク質との相同性を持たない。そこで、タンパク質の膜貫通領域予測ツール TMHMM ([www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/](http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/)) を用いて解析した結果、GP38.1 のアミノ酸配列の 15 位から 37 位までの配列が膜貫通領域と予測された。こうしたミトコンドリアへの移行シグナルとなりうる疎水性ドメインの存在は UL37x1 や m38.5 においても確認されている[47]。さらに、UL37x1 の BAX 結合ドメインのうち異なる連続した 20 アミノ酸の配列を抜き出して相同性検索を行ったが、GP38.1 のアミノ酸配列中に相同性をもつ配列は検出されなかった。また、UL37x1 や m38.5 といった既知の vMIA にはそれぞれグルタミン酸 (E) またはグルタミン (Q) に富む配列が存在する[47]が、GP38.1 にそのような配列は見つからず、80 アミノ酸のうちアスパラギン酸 (D)、E、Q が合計 22 残基含まれる領域が C 末端側に存在するのみであった (Fig. 19)。このように、一次配列の検討からでは、GP38.1 が UL37x1 や m38.5 と類似した BAX との相互作用を示す機序は推測できなかった。GP38.1 が BAX の機能を抑制する機序を明らかにするためには、GP38.1 と BAX の相互作用の様式についてより詳細な解析が必要である。



**Fig. 19** Pairwise comparison of MCMV m38.5 (M), GPCMV GP38.1 (GP), and HCMV UL37x1 (H) ClustalW analysis (DDBJ ver. 2.1; slow protein alignment, weight matrix: Gonnet, gap open and extension: 10 and 0.1; multiple alignment, Gonnet, gap open, extension, and distance: 10, 0.2, and 10, no end gaps) of the amino acid sequences alignment of MCMV m38.5 (M), GPCMV GP38.1 (GP), and HCMV UL37x1 (H). In a pairwise comparison, identical residues (\*) and conserved substitutions (:) are highlighted in pink and semi-conserved substitutions (.) are in yellow. Based on the reported alignment between m38.5 and UL37x1 [47], the mitochondrial localization sequence (MLS) of UL37x1 [62] and the putative m38.5 and GP38.1 MLSs, the BAX-binding domain of UL37x1 [63] and the aligned m38.5 and GP38.1 sequences are marked with boxes.

GP38.1 はスタウロスポリンにより誘導されたミトコンドリア膜の透過性亢進やカスパーゼ3の活性化を抑制した。しかし、ミトコンドリア膜の透過性亢進やカスパーゼ3の活性化に対するGP38.1の阻害の程度はそれぞれ30%と26%であった。一方、UL37x1はミトコンドリア膜の透過性亢進を74%、カスパーゼ3の活性化を62%阻害すると報告されていることから、GP38.1のアポトーシス阻害効果は部分的であると考えられる[64,65]。なお、GP38.1欠損株感染細胞からのウイルス収量は復帰株に比べて10分の1程度まで低下するが、m38.5を欠損させたMCMVでも同程度のウイルス収量の減少が報告されている[66]。MCMVがコードするBAX特異的なvMIAであるm38.5と、BAK特異的にオリゴマー形成を阻害するvIBOであるm41.1は、細胞培養系および動物個体のいずれにおいてもウイルス感染に伴うアポトーシスを阻害する[40,45,48,66–69]。しかし、m38.5とm41.1のアポトーシス抑制作用を比較した検討や、m38.5とm41.1を同時に欠損させたMCMVを用いた検討は報告がない。GP38.1はBAKと相互作用しなかったことから、GP38.1はBAX特異的vMIAであると判断するのが妥当であり、BAK特異的にアポトーシスを阻害する別の遺伝子をGPCMVが有する可能性が示唆された。GP38.1がBAX特異的vMIAであることを直接的に証明するにはBAX以外のアポトーシス促進性Bcl-2ファミリータンパク質を欠く細胞において、内因性経路により誘導されるアポトーシスに対するGP38.1の効果を検討する必要がある。これに加え、BAK特異的にアポトーシスを阻害するGPCMV遺伝

子を探索することが重要である。なお、GPCMV 遺伝子や転写産物の塩基配列データベースを対象とした BLAST 検索により MCMV m41.1 やその rat CMV (RCMV) ホモログのアミノ酸配列と相同な配列を検索しても、それらに類似した ORF は見つからなかったことから、配列解析をもとにした探索は困難であると考えられた。

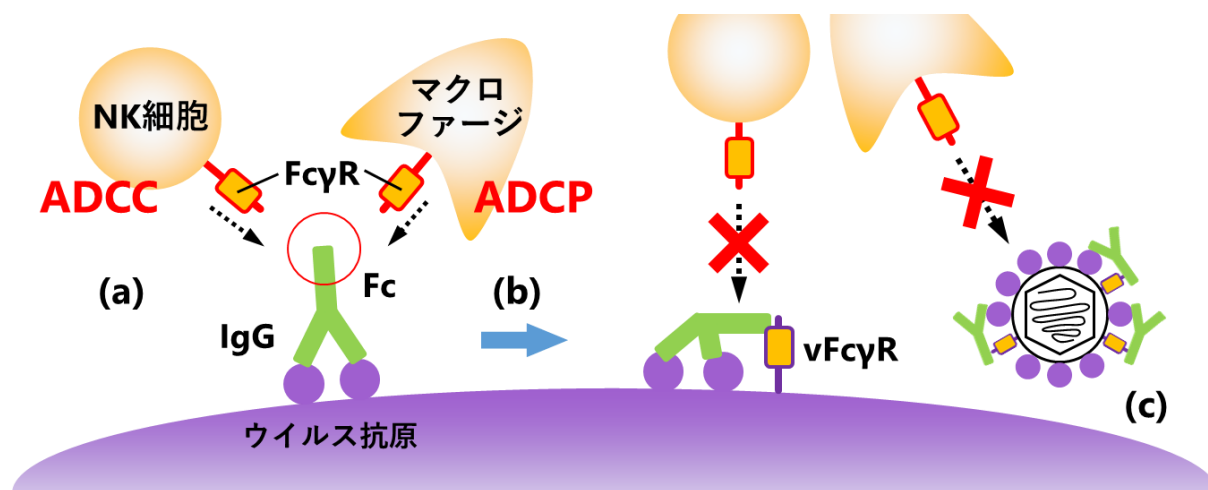
GPCMV は vICA として知られる HCMV UL36 や MCMV M36 のホモログをコードしていない (Fig. 5)。M36 を欠損させた MCMV を腹腔内投与した動物個体では脾臓、肝臓、肺、唾液腺に移行するウイルス量が減少した[70]ことから、GP38.1 を欠損させた GPCMV についても動物個体でのウイルス増殖が大幅に減弱することを期待した。実際に、本研究では GPCMV Δ38.1 を皮下投与したモルモットの臓器中ウイルス量は r38.1 投与群に比べて低下する傾向にあり、特に脾臓では有意な差が見られた。一方で、m38.5 を欠損させた MCMV を腹腔内投与した Manzur らの検討では脾臓、肝臓、肺におけるウイルス増殖に有意差は見られなかった[66]。CMV 感染動物におけるウイルス伝播や病態は投与経路によって変化する[69]との報告があることから、GP38.1 または m38.5 の欠損が脾臓中ウイルス量に及ぼす効果の違いは投与経路に起因している可能性がある。

以上より、本章では、GP38.1 は GPCMV がコードする BAX 特異的 vMIA であることを明らかにし、同時に GPCMV が未同定の BAK 特異的アポトーシス阻害遺伝子を有する可能性を示した。

### 第3章 GPCMV GP119.1の機能解析

#### 第1節 緒言

序論で述べたように、NK細胞による抗体依存性細胞傷害 (ADCC) やマクロファージによる抗体依存性細胞貪食 (ADCP) といった宿主の免疫細胞によるエフェクター機能は、ウイルスの排除に重要な感染防御機構である。IgG Fc を介した宿主 Fc $\gamma$  受容体 (Fc $\gamma$ R) の活性化により発揮されるこれらの宿主防御を回避するため、CMV は宿主 Fc $\gamma$ R と同様に IgG Fc に結合するウイルスタンパク質 (vFc $\gamma$ R) を発現し、宿主 Fc $\gamma$ R の活性化を阻害するという感染防御回避機構を有することが知られている (Fig. 20)。



**Fig. 20** ウイルス Fc $\gamma$ R (vFc $\gamma$ R) による宿主 Fc $\gamma$ R の機能阻害

(a) 感染細胞表面のウイルス抗原に結合した IgG は Fc 領域を介して宿主 Fc $\gamma$ R (例えば、NK 細胞上の Fc $\gamma$ RIIIa やマクロファージ上の Fc $\gamma$ RIIIa) を活性化し、免疫細胞のエフェクター機能を誘導する。(b) 感染細胞表面に発現した vFc $\gamma$ R は、ウイルス抗原に結合した IgG の Fc 領域を捕捉し、宿主 Fc $\gamma$ R の活性化を阻害する。(c) ウイルス粒子上の vFc $\gamma$ R は同様の機序でウイルス粒子に対するエフェクター機能を阻害することが予想される。

$\beta$  亜科ウイルスにおいて、現時点で最も多くの vFc $\gamma$ R が報告されているのは HCMV であり、UL119-118 (gp68)、RL11 (gp34)、RL12、RL13 の 4 つが同定されている。アカゲザル CMV (RhCMV) では RL11 ファミリーのホモログである Rh05 が同定されている [17,71]。MCMV がコードする m138 (fcr-1) は、IgG Fc 結合作用とは別に、NK 細胞の活性化受容体 NKG2D のリガンドである H60 や RAE-1 の発現を低下させることで NK 細胞による攻撃を回避する機能が報告されている [72]。

第 1 章において、GP117-GP122 間領域の RACE 解析から 4 つの転写産物 GP119-A、-B、-C、-D の存在が明らかとなった。これらの転写産物がコードする ORF の 1 つで

ある GP119.1 には、GPCMV の宿主であるモルモットの FcγR や、HCMV UL119-118 との配列類似性が見出されたことから、本章では GPCMV GP119.1 に注目し、発現動態や機能の解析を行った。

## 第 2 節 材料および方法

### 3.2.1 培養細胞

本章では以下の細胞株を使用した。培養培地の組成は巻末に記載した。

細胞株	由来	形態	入手先	倍化日数	最大継代比	培地	ref.
GPL	モルモット肺	線維芽	ATCC	1-2	1 : 6	F10	
GPE	モルモット腎	上皮	本研究室	1	1 : 10	D/F10	[67]
HEK293A	ヒト胎児腎	上皮	Invitrogen	1	1 : 20	D10A	

### 3.2.2 ウイルス

組換えウイルスの作製は 2.2.9 に準じた方法で行った。Table 2 に記載したプライマーセットを用いて、GP119.1 の開始コドンの下流に早期終止変異およびフレームシフト変異を導入した pBAC-GPCMVΔ9k-dGP119.1 (d119)、d119 の変異部位に対して親株配列への復帰変異を導入した pBAC-GPCMVΔ9k-rGP119.1 (r119)、そして C 末端が FLAG タグで標識された GP119.1 を発現する pBAC-GPCMVΔ9k-fGP119.1 (f119) の各 BAC DNA を作製した。上記および親株の BAC DNA に対する制限酵素断片パターン比較と PCR 法により、予期しない変異が生じていないことを確認した。なお、PCR 法によるカナマイシン耐性遺伝子挿入部位の確認には、aphA1 rev (2.2.9 参照) および CX28-M13D (5'-GGAGGGGATAGTCCAGGAGAC) のプライマーペアを用いた。

これらの BAC DNA を GPL 細胞にトランスフェクションすることで、GP119.1 欠損株 (GPCMV d119)、GP119.1 復帰株 (GPCMV r119)、タグ標識 GP119.1 発現株 (GPCMV f119) の各組換えウイルスを回収した。各ウイルスストックは、それぞれ独立した 2 つの BAC クローンに由来するものを作製して実験に供した。ウイルス粒子の精製は 1.2.2.2 に準じて、ウイルスストックの力価測定は 1.2.2.3 に準じて実施した。

### 3.2.3 GP119.1 mRNA 発現動態の検討

12-well plate に播種した GPL 細胞に GPCMV Δ9k (WT) を MOI 3 で感染させ、50 μg/mL シクロヘキシミド (CHX) およびホスホノ酢酸 (PAA, phosphonoacetic acid) の存在下または非存在下で培養した。感染 6、12、18 時間後の細胞を -80°C で凍結保存し

た。RNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いて RNA を抽出し、PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser (Takara) を用いて cDNA に逆転写した。Table 2 に記載したプライマーセットおよび GoTaq qPCR Master Mix (Promega) を用いた定量 PCR 法により GP119.1 mRNA 量を測定した。

### 3.2.4 発現プラスミドの構築

終止コドンを除いた GP119.1 ORF を pEGFP-N1 (Clontech) にクローニングし、C 末端に EGFP タグが付加された GP119.1 を発現するプラスミド pEGFP-GP119.1-FL を作製した。このプラスミドに、QuickChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) と Table 2 に記載したプライマーセットを用いて点変異または欠失変異を導入することで、EGFP と各種 GP119.1 変異体との融合タンパク質を発現するプラスミド pEGFP-GP119.1-dN1、-dN2、-MA、-NQ、-dT、-dTC を作製した (Fig. 22A)。

### 3.2.5 蛍光抗体法

2.2.3.1 または 2.2.3.2 に準じて、HEK293A 細胞または GPL 細胞に各種発現プラスミドを導入した。遺伝子導入した細胞または GPCMV を感染させた細胞を 4% PFA in PBS で 15 分間処理することにより固定した。0.5% TritonX-100 による膜透過処理を 5 分間行い、一次抗体として抗 FLAG タグウサギポリクローナル抗体を、二次抗体として Alexa594 標識抗ウサギ IgG 抗体を用いて免疫染色を行った。100 ng/ml の DAPI を用いて細胞核を染色し、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM900) によりイメージングした。

### 3.2.6 免疫沈降法

GP119.1 発現プラスミドを遺伝子導入した細胞を超音波破碎し、NP40 lysis buffer (150mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 50mM Tris-HCl (pH 8.0), cOmplete ULTRA protease inhibitor cocktail (Roche), 1mM EDTA) で 4°C、30 分間処理した。4°C、20,000 × g、30 分間遠心した上清を細胞抽出液として回収した。この抽出液中の IgG 結合タンパク質を、以下の方法により免疫沈降した。

#### 3.2.6.1 Protein A/G ビーズを用いた方法

細胞抽出液を Protein A/G magnetic beads (Merck Millipore) と 4°C で 2 時間反応させてビーズへの非特異結合成分を除き、次いで、3 μg の normal guinea pig IgG (MBL) と 4°C で一晩反応させた。この反応液に Protein A/G ビーズを加え、4°C で 1 時間反応させた。ビーズを NP40 lysis buffer で 3 回洗浄した後、ビーズに固相化された Protein A/G

に結合した IgG および IgG 結合タンパク質を、SDS サンプルバッファーを用いて溶出し、3.2.7 に準じてウエスタンブロットティング解析を行った。

#### 3.2.6.2 タンパク質固相化ビーズを用いた方法

各 30 µg のヒト由来の normal IgG (FUJIFILM)、Fab 断片 (Novus)、Fc 断片 (Novus)、およびモルモット由来の normal IgG (MBL)、Fab 断片 (Rockland)、Fc 断片 (Rockland)、または BSA を、各 1 mg の Pierce NHS-Activated Magnetic Beads (Thermo Fisher Scientific) にそれぞれ固相化した。300-500 µg のタンパク質を含む細胞抽出液を 200 µg のタンパク質固相化ビーズと 4°C で 1 時間反応させた。ビーズを NP40 lysis buffer で 4 回洗浄した後、ビーズに結合したタンパク質を、SDS サンプルバッファーを用いて溶出し、3.2.7 に準じてウエスタンブロットティング解析を行った。

#### 3.2.7 SDS-PAGE およびウエスタンブロットティング法

SDS サンプルバッファーに溶出したサンプル、あるいは 2-ME を加えて 95°C で 5 分間加熱したサンプルを、12% アクリルアミドゲルを用いて SDS-PAGE で分離した。その後、polyvinylidene difluoride 膜 (Immobilon-P) にセミドライトランスファー装置 BE-330 を用いてブロットティングした。5% スキムミルク含有 PBS-Tween でブロッキングした後、ブロッキング液で希釈した一次抗体に浸し、常温で 1 時間静置した。次いで、ブロッキング液で希釈したペルオキシダーゼ標識二次抗体に浸し 1 時間静置した。PBS-Tween で洗浄した後、高感度化学発光試薬 ImmunoStar LD と反応させ、CCD イメージャー ChemiDoc を用いて化学発光を検出した。

#### 3.2.8 GPCMV 感染動物実験

4 週齢の系統モルモット雌 (3 匹/群) の皮下に GPCMV d119 または r119 を  $1.0 \times 10^7$  FFUs 接種し、急性感染期にあたる接種 6 日後に解剖した。採集した血液および臓器 (脾臓、肝臓、膵臓、肺) から、2.2.11 に準じて DNA 抽出および定量 PCR を行い、各臓器の細胞あたりのウイルス DNA 量を決定した。

#### 3.2.9 統計処理

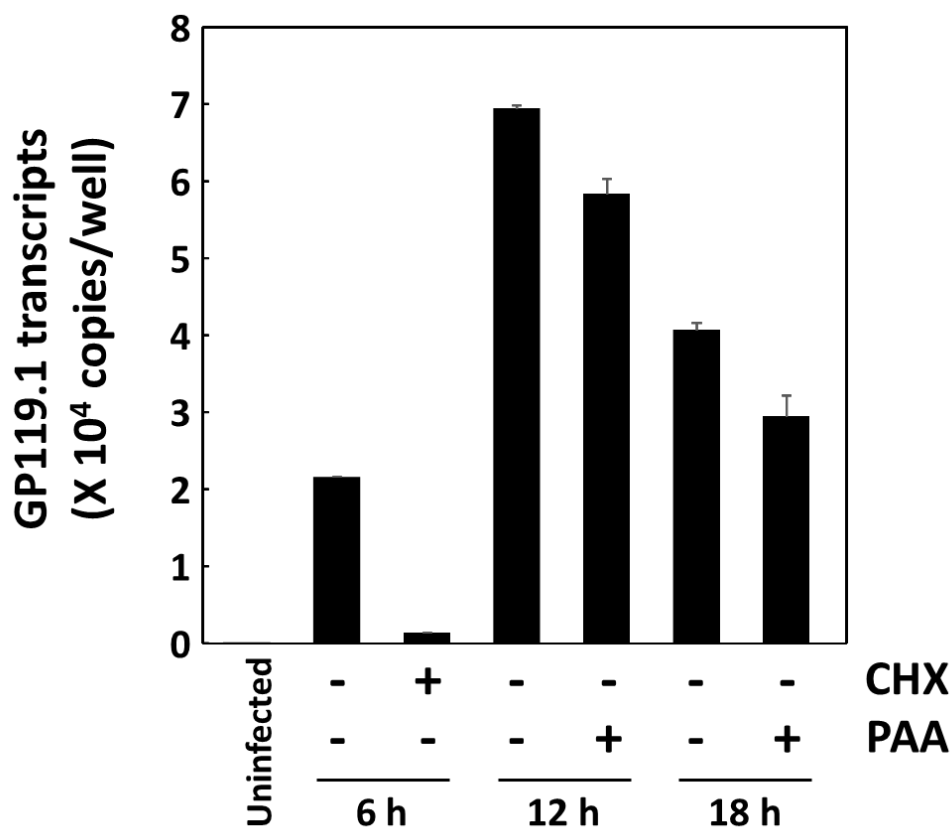
2.2.12 に準じて実施した。



### 第3節 結果

#### 3.3.1 GP119.1 の発現動態

2.3.1 で述べたように、CMV 遺伝子の発現時期は前初期、初期、後期に大別される。このうち前初期遺伝子はシクロヘキシミド (CHX) 存在下でも mRNA の発現誘導が起こり、後期遺伝子は DNA 複製阻害剤ホスホ酢酸 (PAA) により発現が抑制される。そこで、GPCMV を感染させた GPL 細胞において、CHX および PAA の有無による GP119.1 mRNA (GP119-A、-C、-D) の発現動態を比較した (Fig. 21)。GP119.1 mRNA の発現は CHX によって抑制され、GPCMV で DNA 複製が開始すると考えられる感染後 12 時間を経過しても PAA によってほとんど抑制されなかったことから、GP119.1 は感染の初期に発現すると考えられた。



**Fig. 21** The mRNA expression kinetics of GP119.1.

GPL cells in 12-well plates were infected with GPCMV $\Delta$ 9k at an MOI of 3 in the presence or absence of cycloheximide (CHX) or phosphonoacetic acid (PAA). At the indicated time points, culture supernatants were removed and the plates were kept frozen at -80°C until preparation of RNA samples. The mRNA levels of GP119.1 in each sample were quantified by real-time PCR. Means  $\pm$  SDs of the mRNA levels obtained from triplicate wells are shown.

### 3.3.2 GP119.1 の発現と局在

次に、GP119.1 のタンパク質としての発現や細胞内局在について明らかにするため、Fig. 22A に示す GP119.1 変異体を発現するプラスミドを作製し、以下の検討を行った。

#### 3.3.2.1 翻訳開始コドンの同定

GP119.1 ORF には、同一フレーム内に複数の翻訳開始コドンが存在していた。このうち、GP119.1 が実際に利用している翻訳開始コドンを明らかにすることを目的として、HEK293A 細胞に pEGFP-GP119.1-FL、-dN1、-dN2、または pEGFP-N1 をトランスフェクションし、42 時間後の細胞を回収して抗 GFP ポリクローナル抗体によるウエスタンブロッティング解析を行った (Fig. 22B)。その結果、pEGFP-GP119.1-FL、-dN1、-dN2 をトランスフェクションした細胞は共通して 50、45、40 kDa のタンパク質を発現していた。なお、これらのタンパク質の発現量は、dN2 をトランスフェクションした細胞で特に多かったことから、GP119.1 は主に dN2 の N 末端に存在する翻訳開始コドンを利用して発現する可能性が示唆された。この仮説を検証するため、当該の翻訳開始コドンである 141 位のメチオニン (M) をアラニン (A) に置換した pEGFP-GP119.1-MA の発現をウエスタンブロッティング法により確認した (Fig. 22B)。メチオニンをアラニンに置換することにより、50、45、40 kDa の GFP 標識タンパク質の発現が消失したことから、GP119.1 の真の翻訳開始コドンは GP119.1 ORF の 141 位のメチオニンであることが明らかとなった。

#### 3.3.2.2 糖鎖付加部位の同定

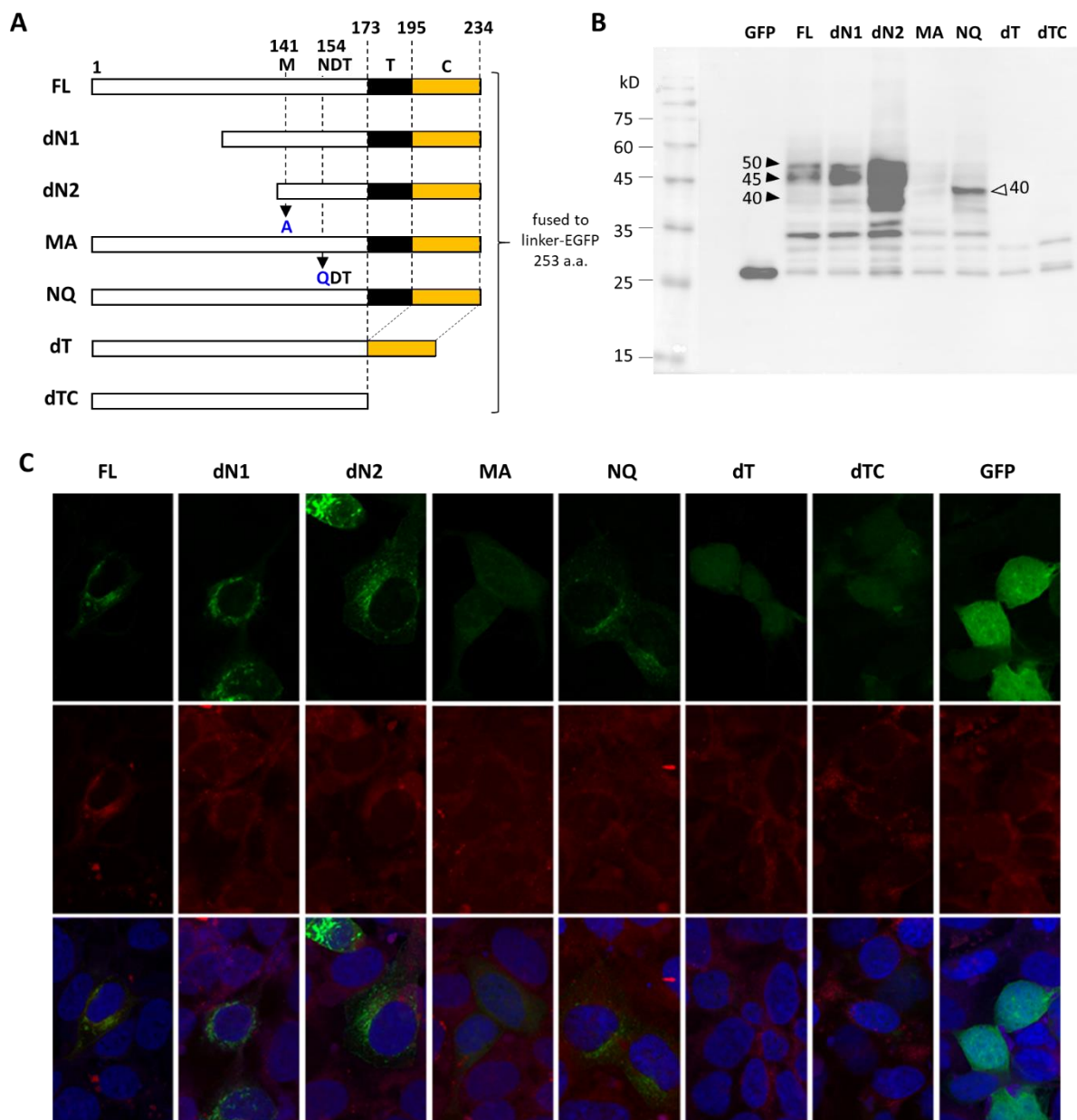
3.3.2.1 で同定した真の翻訳開始コドンと、ウェブ解析ツール TMHMM により予測された膜貫通領域との間には、N 型糖鎖付加配列 (NXT) が存在することがアミノ酸配列解析の結果明らかとなった。これに加え、ウエスタンブロット解析におけるブロードなバンドの存在からも、GP119.1 が翻訳後修飾として糖鎖付加を受ける可能性が示唆された。この仮説を検証するため、当該の N 型糖鎖付加配列のアスパラギン (N) をグルタミン (Q) に置換した pEGFP-GP119.1-NQ の発現をウエスタンブロッティング法により確認した (Fig. 22B)。NQ をトランスフェクションした HEK293A 細胞では 40 kDa のバンドのみが検出され (Fig. 22B)、その分子量は GP119.1 の 141 位以降のアミノ酸配列から予想される分子量 (11.2 kDa) に EGFP の分子量 (26.9 kDa) を加えた値とおよそ一致したことから、50 kDa および 45 kDa の産物は GP119.1 の糖鎖付加体であると考えられた。

### 3.3.2.3 膜貫通領域の欠失が発現に与える影響

膜貫通領域と予測されたドメインの性質を検討するため、膜貫通領域を欠失させた pEGFP-GP119.1-dT、および膜貫通領域と C 末端領域をともに欠失させた pEGFP-GP119.1-dTC の発現を検討した。その結果、膜貫通領域の欠失は GP119.1 タンパク質の発現量を顕著に減少させたことから、膜貫通領域の有無は GP119.1 の mRNA の発現、安定性、翻訳効率、または翻訳されたタンパク質の分解速度に影響している可能性が示唆された (Fig. 22B)。

### 3.3.2.4 細胞内局在

GP119.1 の細胞内局在を明らかにするため、EGFP で標識された GP119.1 およびその変異体、または単独の EGFP を発現するプラスミド pEGFP-GP119.1-FL、-dN1、-dN2、-MA、-NQ、-dT、-dTC、pEGFP-N1 を、小胞体マーカーである monomeric Kusabira Orange 1 (mKO1) を発現するプラスミド pER-mKO1 (MBL) とともに HEK293A 細胞にトランスフェクションした。その結果、FL、dN1、dN2、NQ は mKO1 とともに小胞体に局在した (Fig. 22C)。EGFP による蛍光シグナルが他と比較して強い dN2 では、細胞膜にも EGFP のシグナルがみられたことから、GP119.1 は小胞体以外に細胞膜にも局在する可能性が示唆された。一方、MA、dT、dTC、そして単独の EGFP は細胞質に局在した。なお、MA では他と比較して顕著に低い EGFP シグナルがみられた。これは、アラニン置換した 141 位のメチオニンの下流に同一フレームで存在する 184、186、205、207 位のメチオニンまたは EGFP の開始コドンからの翻訳産物に由来する EGFP シグナルである可能性がある。



**Fig. 22** Expression and localization of GP119.1 protein.

(A) A schematic map of EGFP-GP119.1 and its mutated forms. EGFP (239 a.a.) was fused with the carboxyl end of the following variant of GP119.1 via a linker peptide (14 a.a.) : the full-length of GP119.1 (FL) , N-terminal truncated forms, dN1 ( $\Delta$  a.a. 3-81) and dN2 ( $\Delta$  a.a. 3-121) ; carboxyl-terminal truncated forms, dT and dTC; and mutants containing an alteration M141A (MA) or N154Q (NQ) . M: methionine, T: transmembrane domain, C: carboxyl domain. The numbers are based on the longest ORF. (B) HEK293A cells were transfected with plasmids expressing EGFP (GFP) or the indicated forms of GP119.1-EGFP. Cells were harvested at 72 hrs post-transfection, and analyzed by immunoblotting using anti-GFP antibodies. Closed and open arrowheads indicated the major GP119.1 products and the product that lost N-glycosylation, respectively. (C) Fluorescence images of HEK293A cells transfected with plasmids expressing EGFP or the indicated forms of GP119.1-EGFP along with a plasmid expressing ER-targeted monomeric Kusabira-Orange 1 were captured by a confocal microscope. EGFP, mKO1, nuclei stained with DAPI are shown in green, red, and blue, respectively.

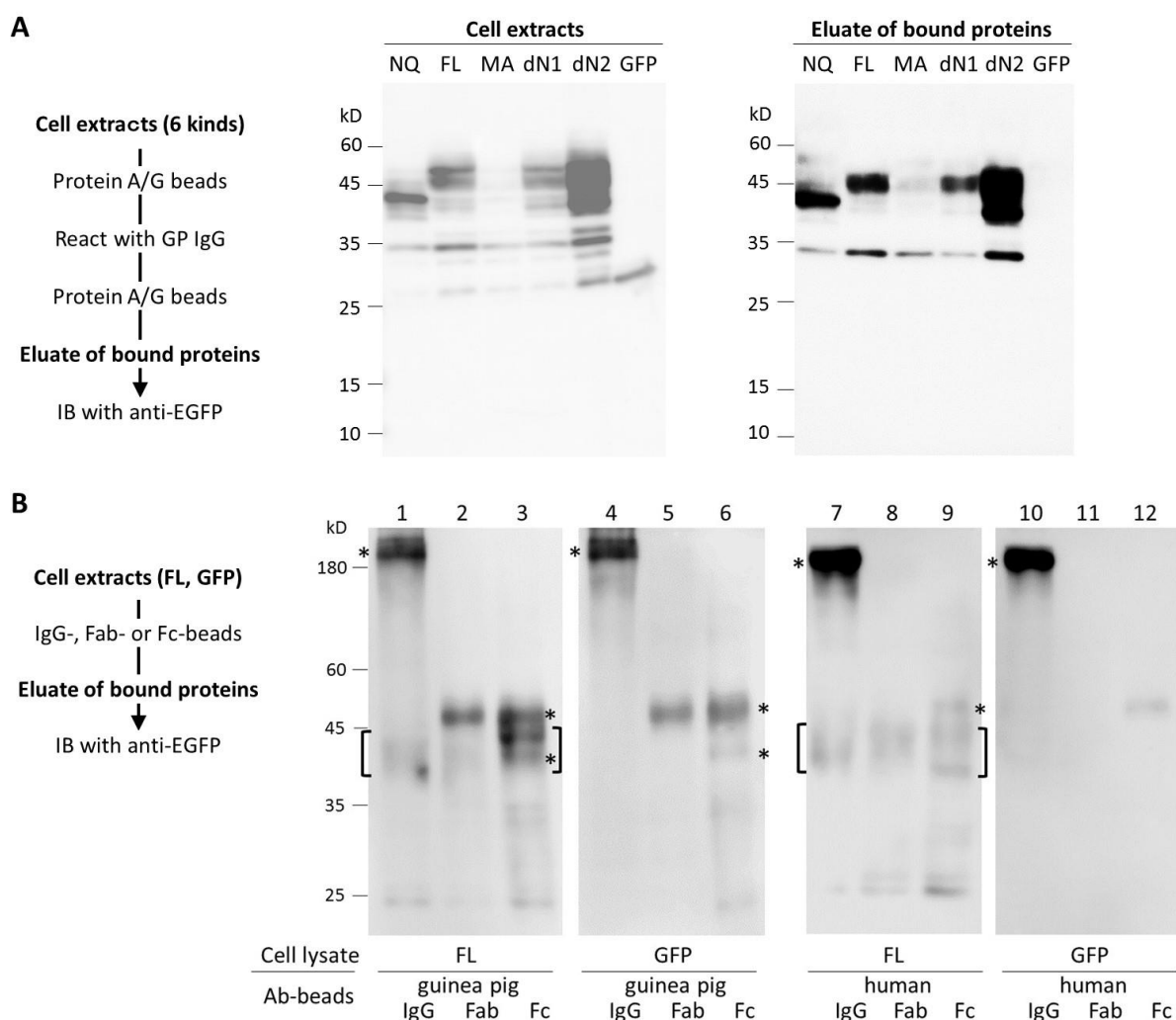
### 3.3.3 GP119.1 の IgG 結合能

#### 3.3.3.1 Protein A/G ビーズを用いた検討

次に、3.3.2 で作製した一過性発現系を用いて、GP119.1 がモルモット IgG に対する結合能をもつかどうかを検討した。FL および各変異体 (NQ、MA、dN1、dN2)、または単独の EGFP を発現させた HEK293A 細胞の細胞抽出液を、正常モルモット IgG および Protein A/G ビーズを用いて免疫沈降した。なお、この免疫沈降は、Fc 結合タンパク質としての機能を予想している GP119.1 と正常 IgG の複合体形成を検出するものであり、標的タンパク質に対する特異的抗体を用いる通常の免疫沈降とは異なる。その結果、FL、NQ、dN1、dN2 発現細胞抽出液に見られるバンドの一部が免疫沈降された (Fig. 23A)。単独の EGFP では正常 IgG との非特異的結合によるバンドが一切検出されなかったことから、EGFP と正常 IgG との非特異的結合により EGFP 標識 GP119.1 が免疫沈降されている可能性は否定された。また、NQ が免疫沈降されたことから、GP119.1 の IgG 結合機能は糖鎖修飾の有無によっては左右されないことが示された。膜貫通領域を欠失させた dT およびカルボキシル末端領域を欠失させた dTC では MA と同様にタンパク質発現量が顕著に減少したことから、膜貫通領域やカルボキシル末端領域の IgG 結合能への寄与を議論することは困難であった。

#### 3.3.3.2 タンパク質固相化ビーズを用いた検討

GP119.1 が IgG 結合能を有することを Fig. 23A より明らかにした。その結果を裏付け、さらに GP119.1 の IgG 結合特異性を明らかにすることを目的として、ヒトまたはモルモット由来の各種 IgG を用いた検討を行った。FL または陰性対照である単独の EGFP を発現させた HEK293A 細胞の細胞抽出液を、モルモットまたはヒトの正常 IgG 全長、Fab 断片、Fc 断片をそれぞれ固相化したビーズと反応させ、ビーズに結合したタンパク質をウエスタンブロッティング法で解析した。その結果、モルモット IgG 全長または Fc 断片固相化ビーズによる免疫沈降では GP119.1 発現細胞特異的な分子量 40-45 kDa のバンドが検出された。一方このバンドは Fab 断片固相化ビーズでは検出されなかった。このことは、GP119.1 がモルモットの IgG または Fc 断片に対する結合能を持つことを示している。また GP119.1 は、Fc 断片に対してより高い親和性を示した (Fig. 23B, lanes 1-6)。さらに、ヒトの IgG または Fc 断片に対する親和性が相対的に低かったことから、GP119.1 の IgG 結合能には種特異性があることが示唆された (Fig. 23B, lanes 7-12)。



**Fig. 23** IgG-binding activities of GP119.1 protein.

(A) HEK293A cells were transfected with plasmids expressing the indicated forms of EGFP-GP119.1 or EGFP. Cell extracts were prepared at 42 hrs post-transfection, reacted with normal guinea pig IgG at 4°C overnight, then reacted with Protein A/G beads. After washing the beads 3 times with NP40 lysis buffer, bound proteins were eluted from the beads by the addition of the SDS-PAGE loading buffer. Original cell extracts (left panel) and eluates from the beads (right panel) were separated on 12% SDS-PAGE gels, and analyzed by immunoblotting using anti-GFP antibodies. (B) Cell extracts of HEK293A cells transfected with plasmids expressing FL (lanes 1-3 and 7-9) or GFP (lanes 4-6 and 10-12) were prepared at 42 hrs post-transfection, reacted with beads coupled covalently with guinea pig IgG (lanes 1 and 4), Fab (lanes 2 and 5), Fc (lanes 3 and 6), human IgG (lanes 7 and 10), Fab (lanes 8 and 11), or Fc (lanes 9 and 12) at 4°C overnight. After washing the beads 3 times with the lysis buffer, bound proteins were eluted from the beads by the addition of the SDS-PAGE loading buffer without 2-mercaptoethanol. The eluates were separated on 12% SDS-PAGE gels, and analyzed by immunoblotting using anti-GFP antibodies. Brackets and asterisks indicate the specifically immune-precipitated proteins and uncoupled forms of IgG or Fab/Fc fragments recovered from the beads, respectively.

### 3.3.4 GP119.1 はウイルス粒子の構成要素である

これまで一過性発現系で明らかにしてきた GP119.1 の発現や局在、機能をウイルス感染条件下で裏付けるため、FLAG タグ標識 GP119.1 を発現する GPCMV 株 (f119)、変異導入により GP119.1 が翻訳されない欠損株 (d119)、d119 株の変異を親株配列に復帰させた株 (r119) を作製した (Fig. 24A)。

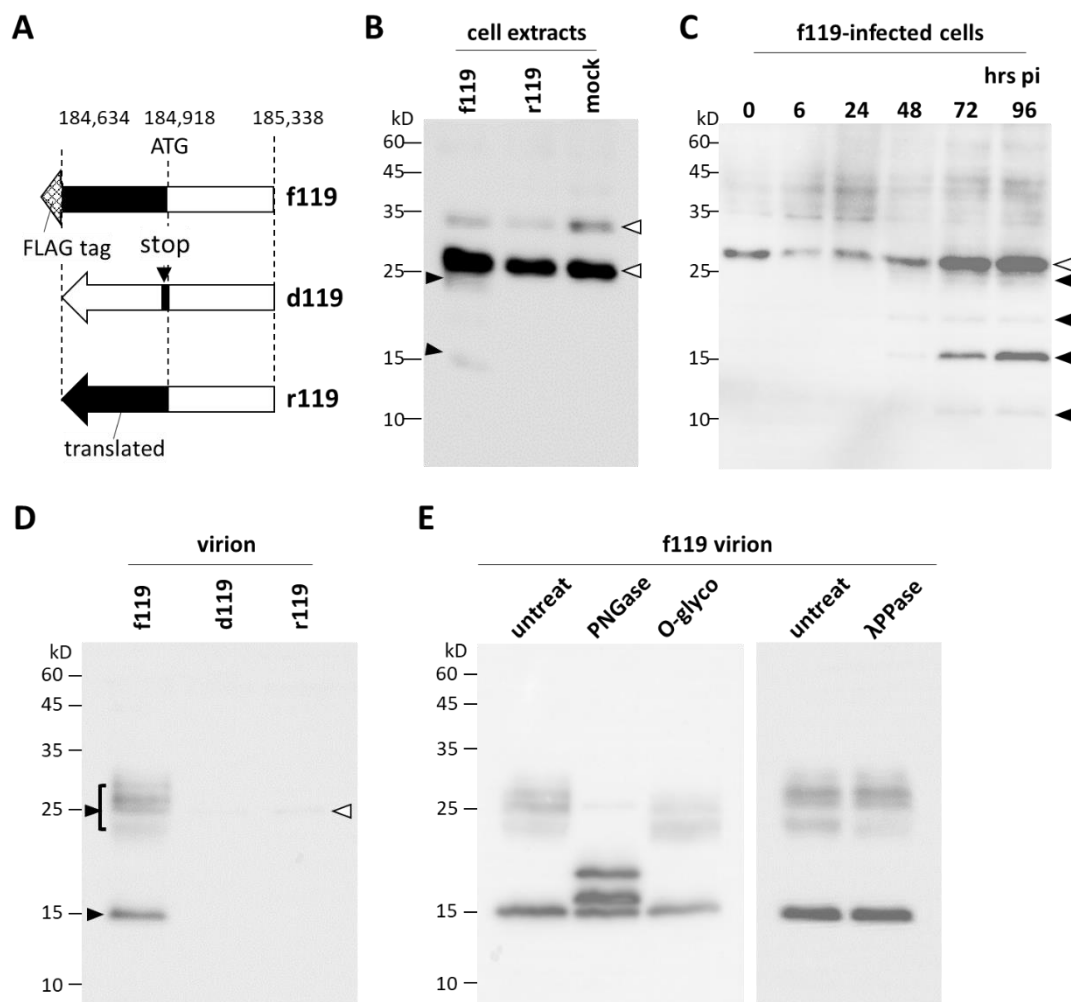
組換え GPCMV f119 および r119 を感染させた GPL 細胞、またはウイルス非感染 (mock) の GPL 細胞を感染後 72 時間で回収し、細胞抽出液を調製し、抗 FLAG 抗体を用いたウエスタンブロッティング法により GP119.1 を検出した。その結果、f119 感染細胞中に 15 kDa と 25 kDa のバンドが検出されたが、これら FLAG 標識 GP119.1 の発現量は極めて少なかった (Fig. 24B)。この理由として、細胞溶解液を遠心分離して得た可溶性画分を泳動サンプルとしたために、不溶性膜画分の GP119.1 を検出できなかった可能性が考えられる。これを踏まえ、感染後 0、6、24、48、72、96 時間の f119 感染 GPL 細胞を SDS サンプルバッファーで処理し、遠心分離することなく泳動サンプルとして、GP119.1 の発現と蓄積のタイムコースを検討した。その結果、感染 72 時間以降に 15 kDa のバンドの蓄積が見られた (Fig. 24C)。

次に、f119、d119、r119 の精製ウイルス粒子を、抗 FLAG 抗体を用いたウエスタンブロッティング法により解析した。解析に用いた各ウイルス粒子の量は、定量 PCR 法によりウイルス DNA 量を定量することで均一化した。その結果、f119 ウイルス粒子には FLAG 特異的抗体による 15 kDa および 23-30 kDa のバンドが検出されたことから、GP119.1 はウイルス粒子中に取り込まれるタンパク質であることを示した (Fig. 24D)。

### 3.3.5 ウイルス粒子中の GP119.1 は糖鎖修飾を受ける

感染細胞のライセート中には 10 kDa および 20 kDa に弱いシグナルが検出されたが (Fig. 24C)、これらのシグナルはウイルス粒子のウエスタンブロット像では検出されなかった (Fig. 24D)。このことから、細胞内で発現した GP119.1 がウイルス粒子に取り込まれる過程で生じる糖鎖付加やリン酸化など特定の翻訳後修飾が関与していると予想し、ウイルス粒子中の GP119.1 に対する翻訳後修飾について検討した。f119 精製ウイルス粒子を、糖鎖切断酵素 PNGaseF または O-glycosidase (+neuraminidase)、あるいは脱リン酸化酵素 lambda protein phosphatase ( $\lambda$ PPase) で処理し、酵素を添加しないコントロールサンプル (untreat) とともに抗 FLAG 抗体を用いたウエスタンブロッティング法により解析した。その結果、PNGaseF 処理により分子量が低下したことから、ウイルス粒子中の GP119.1 は N 型糖鎖付加を受けていると考えられた (Fig.

24E)。一方で、O-glycosidase または  $\lambda$ PPase 処理では GP119.1 の分子量に変化がみられなかったことから、ウイルス粒子中の GP119.1 は O 型糖鎖付加やリン酸化は受けていないと考えられた (Fig. 24E)。

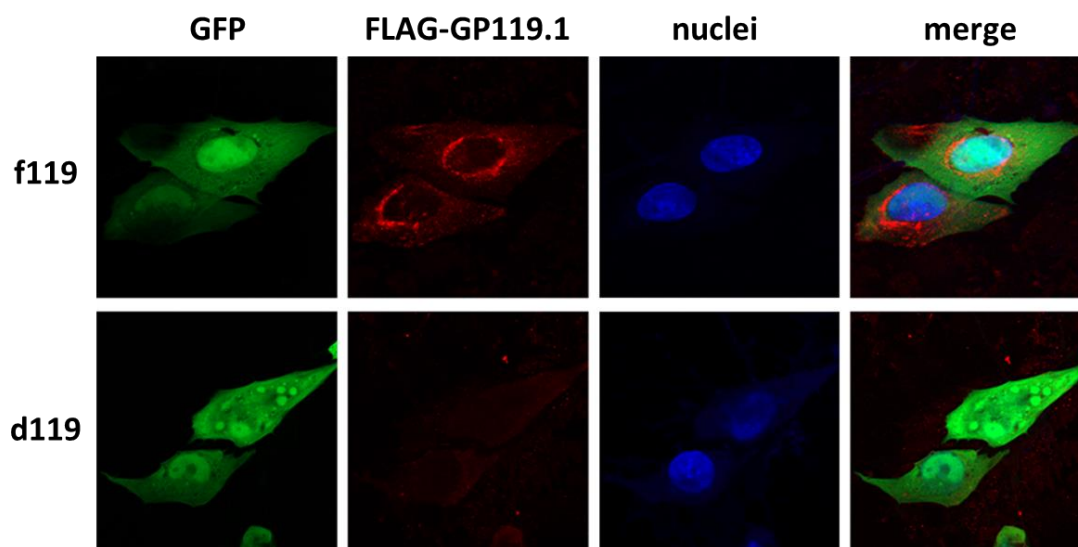


**Fig. 24** Expression of GP119.1 in the context of GPCMV infection.

(A) Schematic structures of the GP119.1 gene and its derivatives in recombinant GPCMV strains, f119, d119 and r119. The numbers are based on the positions in the genome (acc. no. AB592928). (B) GPL cells were infected with the indicated GPCMV strains at an MOI of 1. Cell extracts were prepared at 72 hrs post-infection, and analyzed by immunoblotting with anti-FLAG antibody. (C) GPL cells were infected with the f119 strain at an MOI of 1. Cell lysates were prepared by direct addition of Laemmli sample buffer to cells at the indicated hours after infection, separated on 15% SDS-PAGE gels, and analyzed by immunoblotting using anti-FLAG antibody. Closed and open arrowheads indicate specific and non-specific proteins, respectively. (D) Purified f119, d119 and r119 virions with equal GPCMV genome copy numbers ( $2 \times 10^8$  copies) were analyzed by immunoblotting with anti-FLAG antibody. Closed and open arrowheads indicate specific and non-specific proteins, respectively. (E) Purified f119 virions were treated with peptide-N-glycosidase F (PNGase), with neuraminidase followed by endo- $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase (O-glyco), or with lambda protein phosphatase ( $\lambda$ PPase).



なお、f119 を感染させた GPL 細胞を共焦点レーザー顕微鏡により観察した結果、FLAG 標識 GP119.1 は核周囲に存在する小胞体様の構造に局在し、一部は細胞膜上に発現していると思われる像が得られた (Fig. 25)。この結果は、一過性発現系での EGFP 標識 GP119.1 の局在と一致していた。細胞膜上への発現を実証するには、固定後の細胞に透過処理を行わない条件での解析が今後必要である。

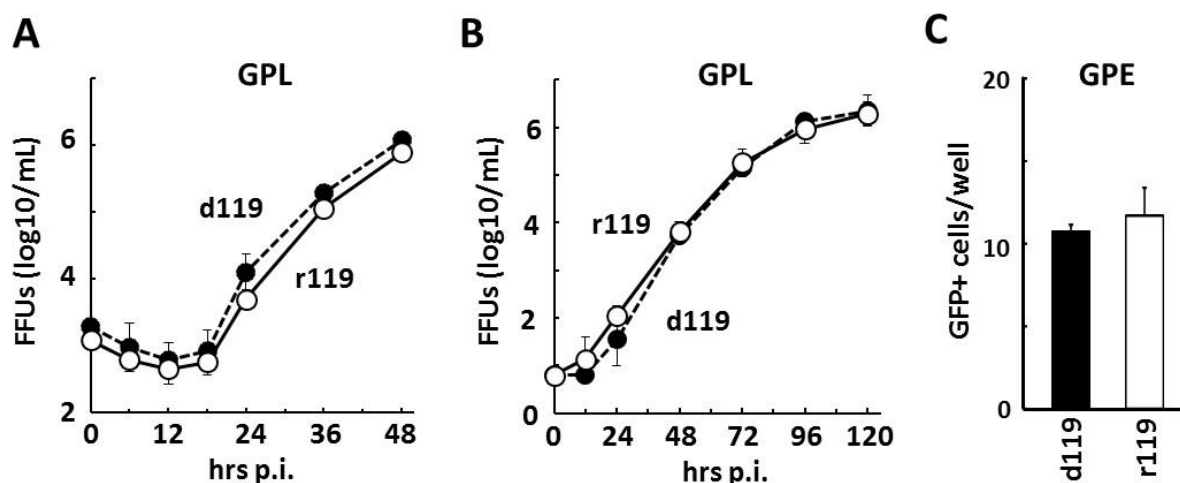


**Fig. 25** Localization of GP119.1 expressed in the GPCMV-infected cells.

At 90 hrs after infection of GPL cells with f119 or d119, the cells were stained with anti-DDDDK antibody against the FLAG tag, and fluorescent images were captured by a confocal microscope. EGFP expressed from the recombinant GPCMV, FLAG-tagged GP119.1, and nuclei stained with DAPI are shown in green, red, and blue, respectively.

### 3.3.6 GP119.1 欠損変異が細胞培養系でのウイルス増殖に与える影響

細胞培養系でのウイルス増殖における GP119.1 の影響を検討するため、GPL 細胞に GP119.1 欠損株 d119 または復帰株 r119 を MOI2 または MOI0.05 で感染させ、それぞれ感染後 0、6、12、18、24、36、48 時間 (Fig. 26A)、または感染後 0、12、24、48、72、96、120 時間 (Fig. 26B) の培養上清を回収し、 $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。回収した培養上清を GPL 細胞に加え、2 日後に GFP 陽性フォーカス数を計数することで上清中のウイルス力価を測定したところ、GPCMV d119 と r119 の増殖能に差異は無かった。さらに、モルモット線維芽細胞株である GPL 細胞と同様に、モルモット上皮細胞株である GPE 細胞における GPCMV d119 と r119 の増殖能にも差異は無かった (1 well あたりの GFP 陽性フォーカス数の平均値および標準誤差: d119=  $10.7 \pm 0.47$  vs. r119=  $11.7 \pm 1.7$ ) (Fig. 26C)。これらの結果は、GP119.1 が GPCMV の線維芽細胞または上皮細胞での *in vitro* 増殖において必須ではないことを示している。

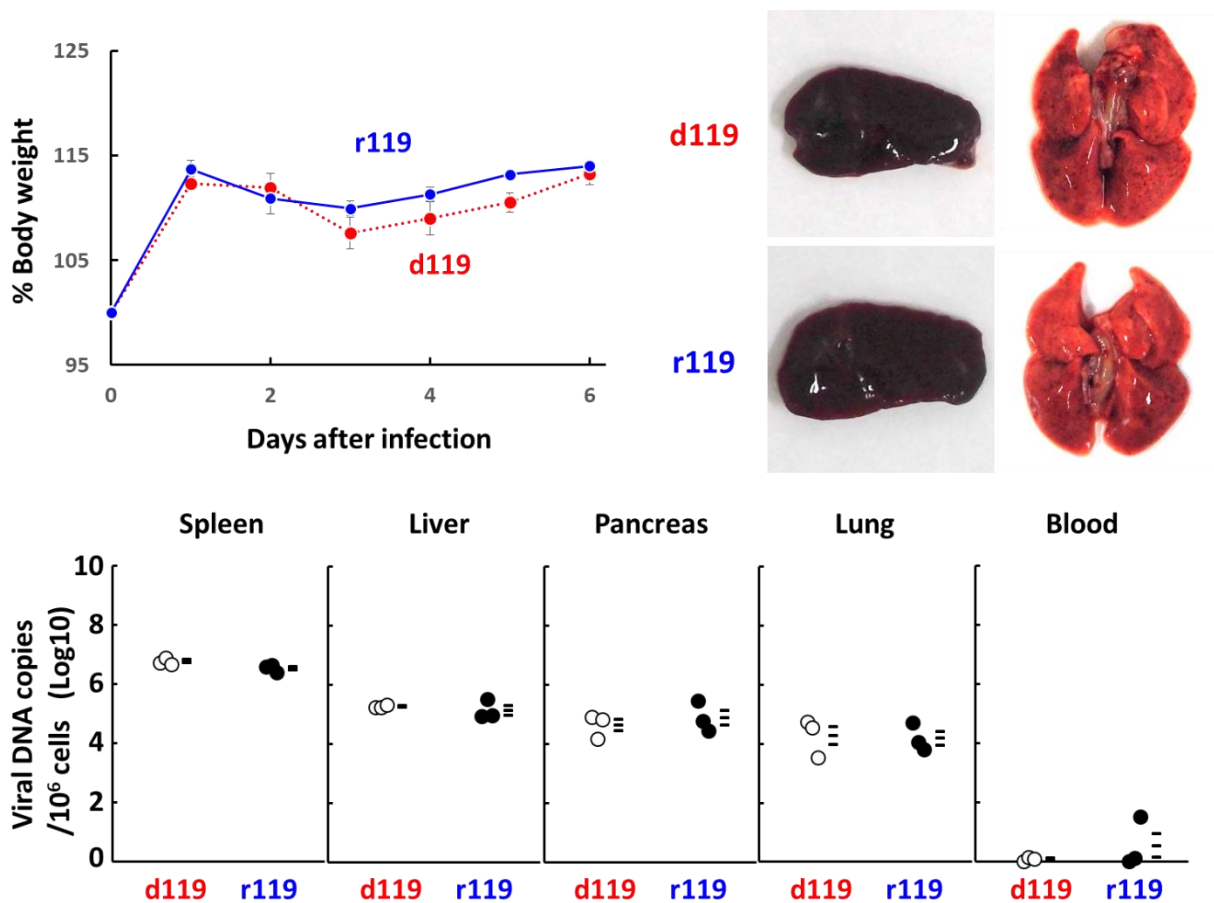


**Fig. 26** GP119.1 was dispensable for viral growth in cell cultures.

(A, B) Single-step (A) and multiple step (B) growth curves for recombinant GPCMV d119 (closed circles) and r119 (open circles). GPL cells were infected at an MOI of 2 (A) or 0.05 (B). At the indicated hrs after infection, 200  $\mu\text{L}$  of culture supernatants were collected and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Virus yields of the harvested supernatants were determined by counting GFP-positive cell foci at 48 hours after infection of GPL cells. (C) Guinea pig epithelial cell line GPE cells were infected with GPCMV d119 or r119 at an MOI of 10. Mean  $\pm$  SEM of the numbers of GFP+ cells obtained from triplicate wells are shown. FFUs, focus-forming units.

### 3.3.7 GP119.1 欠損変異が動物個体でのウイルス増殖に与える影響

動物個体でのウイルス増殖における GP119.1 の影響を検討するため、4 週齢のモルモット雌個体に d119 または r119 を  $1.0 \times 10^7$  FFUs 皮下接種し、急性感染期である感染 6 日後に、血液および臓器 (脾臓、肝臓、膵臓、肺) を採集し、各臓器中ウイルス量を測定した。その結果、d119 感染群と r119 感染群で体重の増減や臓器の外観病変、および各臓器中のウイルス DNA 量に差は見られなかった (Fig. 27)。



**Fig. 27** Effects of GP119.1 on viral dissemination in vivo.

(top left) Means and SEMs of relative body weights of guinea pigs infected with r119 (blue) or d119 (red) in two independent experiments are shown using the body weight of each animal at the time of GPCMV infection as a 100% control. N=4 per each group in one experiment. (top right) Appearance of the spleens and lungs of the r119- or d119-infected animals. (bottom) Viral loads in the indicated tissues of guinea pigs infected with GPCMVΔ9k d119 (open circles) or r119 (closed circles) at 6 days post-infection were determined by real-time PCR analyses. Each closed or open circle represents one animal. Means and SEMs of the viral loads from 4 animals are shown. Results of two independent experiments are shown separately.

#### 第4節 考察

本章では、第1章における GP117-GP122 間領域の RACE 解析から明らかになった4つの転写産物 GP119-A、-B、-C、-D がコードする 100 アミノ酸長以上の ORFのうち、vFcγR をコードする HCMV UL119-118 や GPCMV の宿主であるモルモットの FcγR との配列類似性が見出された GPCMV GP119.1 について機能解析を行い、次の結果を得た。

- 1) 一過性に発現させた EGFP 標識 GP119.1 は主に小胞体に局在した。
  - 2) 一過性に発現させた EGFP 標識 GP119.1 は IgG または IgG Fc に結合し、ヒトの IgG よりも GPCMV の宿主であるモルモットの IgG に高い親和性を示した。
  - 3) GP119.1 はウイルス粒子を構成する N 結合型糖タンパク質であった。
  - 4) GP119.1 は細胞培養系および非妊娠動物個体でのウイルス増殖に影響しなかった。
- 以上より、GP119.1 が IgG Fc に対する結合能を有する糖タンパク質であることを明らかにしたが、GPCMV の感染防御回避に関与する可能性についてはさらなる検討が必要であると考えられる。

複数の β 亜科ウイルスが、FcγR との相同性を有し感染細胞膜上、あるいはウイルス粒子のエンベロープ膜上に発現する糖タンパク質(vFcγR) をコードしていることが報告されている[17]。HCMV は単一の免疫グロブリン様ドメイン (Ig ドメイン) から成る4種類の vFcγR をコードしている。そのうち、RL11 (gp34) と UL119-118 (gp68) は、ともにヒト IgG の全てのサブクラス (IgG1-4) に結合する I 型膜糖タンパク質であり、GP119.1 と同様に感染の初期および後期に発現してウイルス粒子中に存在する[37]。さらに、gp34 と gp68 は感染細胞表面に発現して抗体の Fc 領域に結合するだけでなく、vFcγR として宿主 FcγR に対する IgG Fc の結合を阻害することが細胞培養系で実証されていることから、FcγR をもつ NK 細胞などの免疫細胞による攻撃を逃れる感染防御回避機構が予想されている[74]。最近報告された HCMV RL11 のホモログであるアカゲザル CMV (RhCMV) Rh05 も、IgG Fc に結合し宿主 FcγR の活性化を抑制する[71]。GPCMV にも GP119.1 以外に複数の vFcγR が存在する可能性が高いが、HCMV や RhCMV とのゲノム構造の違いから、RL11 や Rh05 に相当する GPCMV 遺伝子を推定することは難しい。また、GP119.1 の分子サイズは既知の vFcγR の3分の1程度であることや、宿主 FcγR の IgG 結合領域との類似配列は GP119.1 では C 末端側に存在することから、GP119.1 が他の vFcγR と同様の機序で IgG と結合するのかは明確ではない。

MCMV m119.1 はウイルスゲノム上の位置の比較から、GP119.1 と同じく、HCMV

UL119-118 の positional homolog である可能性が考えられたが、m119.1 は GP119.1 に弱い相同性があるものの UL119-118 との相同性はなく、その発現や局在、機能は未同定である。MCMV がコードする vFcγR として報告が唯一なされている m138 (fcr-1, gp86/gp88/gp105) は、HCMV のどの遺伝子とも相同性がない一方で、機能未同定の GPCMV gp138.3 [35,36]とは弱い相同性 (9.5% identity、48% similarity) がある。m138 は GP119.1 と同様に in vitro でのウイルス増殖に必須ではないが、m138 を欠損させた MCMV は動物個体における増殖能が大幅に減弱することが報告された[75]。しかし、同様の現象が B 細胞欠損マウスでも見られたことから、IgG 結合非依存的な機序の存在が示唆された。その後、NK 細胞の活性化受容体 NKG2D のリガンドである H60 や MULT-1 といった分子をダウンレギュレートするという m138 の IgG 結合非依存的機能が明らかになったことから、m138 欠損によるウイルス増殖能の減弱は、m138 の IgG 結合非依存的機能を介した NK 細胞応答の抑制が関与していると考えられている [72]。本研究では、GP119.1 が IgG 結合非依存的機能を有する可能性も考慮して非妊娠 SPF 動物個体でのウイルス増殖を検討したが、GP119.1 欠損による影響は確認できなかった。このことから、感染 3 週以降の慢性感染期や妊娠に伴う病態の差異についても今後検討する必要があると考えられる。

GP119.1 を含め、いずれの既知の vFcγR においても未だ実証されていない vFcγR の IgG 結合依存的な個体レベルの生理機能を明らかにするためには、ADCC などの感染制御が起こりうる、ウイルス特異的 IgG 存在条件下での機能解析が求められる。具体的には感染動物個体の血清から精製した GPCMV 特異的 IgG の移入 (受身免疫) 条件下で、組換え GPCMV の感染動態を検討するような実験をデザインしていくこととなる。または、GPCMV が有する GP119.1 以外の vFcγR を同定することができれば、それらを同時に欠損させた組換え GPCMV を用いて、感染に伴いウイルス特異的 IgG が誘導される条件 (例えば感染後 3 週以上) での増殖性・病原性への影響を、非妊娠・妊娠モルモット個体で解析することが可能になると考えられる。

本研究により明らかになった上記の課題を検討することで、GP119.1 を含む vFcγR によって回避される宿主の感染防御機構と CMV の先天性感染機序との関連が明らかにできると考える。

## 総括および結論

ヒト CMV (HCMV) は、胎盤を介して胎児に感染し、小頭症を含む神経学的障害や、遅発性・進行性の難聴、精神発達遅滞などの後遺症を引き起こす。CMV は自然宿主にしか感染しないため、宿主の感染防御機構、およびそれを回避するウイルスの機構の個体レベルでの解析には制約が多い。そこで本研究では、小動物で唯一ヒトの病態を反映した経胎盤感染を起こすモルモット CMV (GPCMV) モデルを利用し、NK 細胞などを主とした自然免疫系に依存すると考えられる胎盤における宿主の感染防御機構、および CMV の感染防御回避機構の解明を最終目的として GPCMV の機能未同定遺伝子の解析を行った。

第 1 章では  $\beta$  亜科ウイルスのゲノム構造を比較することで、HCMV やマウス CMV (MCMV) では報告されているが GPCMV では未同定の感染防御回避機能を担う遺伝子が存在しうる GPCMV ゲノム領域として、GP37-GP43 間領域および GP117-GP122 間領域を抽出した。さらに、各領域に由来する転写産物の cDNA 配列を明らかにし、配列相同性検索を行うことで、感染防御回避に関与する可能性のある GPCMV 遺伝子として、GP38.1 および GP119.1 を見出した。

第 2 章では GPCMV GP38.1 遺伝子の機能について検討し、以下の結果を得た。

- 1) 一過性に発現させた GP38.1 は MHC-I 分子の発現に影響しなかった。
- 2) GP38.1 欠損株感染細胞では細胞死が亢進し、ウイルス収量が低下した。GP38.1 欠損株感染モルモットでは、脾臓中ウイルス量が有意に低下した。
- 3) GP38.1 はスタウロスポリンにより誘導されたアポトーシスを部分的に抑制した。
- 4) GP38.1 はミトコンドリアに局在し、Bcl-2 ファミリータンパク質 BAX と相互作用したが、類似タンパク質である BAK とは相互作用しなかった。

これらの結果から、GP38.1 は GPCMV がコードする viral mitochondria-localized inhibitor of apoptosis (vMIA) であり、BAX 特異的に感染細胞のアポトーシスを抑制する機能を有することを明らかにした。なお、GP38.1 のアポトーシス阻害効果は、BAX および BAK を介したアポトーシスとともに抑制する HCMV で唯一の vMIA である UL37x1 に比べて部分的である。また MCMV は、BAX 特異的 vMIA である m38.5 と BAK 特異的な viral inhibitor of BAK oligomerization (vIBO) である m41.1 をそれぞれコードし、ウイルス感染に伴うアポトーシスを阻害する。しかし、ウイルスゲノム上での周辺遺伝子との位置関係から UL37x1 や m38.5 の positional homolog であると推測

される GP38.1 は、UL37x1 や m38.5、または宿主の Bcl-2 ファミリータンパク質との配列相同性を持たないことから、GPCMV には BAK 特異的にアポトーシスを阻害する未知の感染防御回避遺伝子が存在する可能性が示唆された。

第 3 章では、GPCMV GP119.1 遺伝子の機能について検討し、以下の結果を得た。

- 1) 一過性に発現させた GP119.1 は主に小胞体に局在した。
- 2) 一過性に発現させた GP119.1 は IgG または IgG Fc に結合し、ヒトの IgG よりも GPCMV の宿主であるモルモットの IgG に高い親和性を示した。
- 3) GP119.1 はウイルス粒子を構成する N 結合型糖タンパク質であった。
- 4) GP119.1 は細胞培養系および非妊娠動物個体でのウイルス増殖に影響しなかった。

これらの結果から、GP119.1 は GPCMV がコードする IgG Fc 結合タンパク質であることを明らかにした。なお、GP119.1 が GPCMV の感染防御回避に関与する可能性についてはさらなる検討が必要であると考えられる。本研究では GP119.1 の IgG 結合能非依存的作用の存在も考慮して急性感染期の非妊娠動物個体でのウイルス増殖を検討したが、GP119.1 欠損による影響は確認できなかった。このことから、感染 3 週以降の慢性感染期や妊娠に伴う病態の差異についても解析が求められる。また、既知のいずれの vFcyR においても明確ではない、IgG 結合能依存的な個体レベルの生理機能を明らかにするためには、ADCC などの感染制御が起りうるウイルス特異的な IgG 存在条件下で組換えウイルスの感染動態を解析できる系の構築が必要である。または、GPCMV がコードする GP119.1 以外の IgG Fc 結合タンパク質を同定し、それらを同時に欠損させた組換え GPCMV 株を用いて、感染に伴い抗体が誘導される条件下での増殖性・病原性への影響を解析する戦略も有効であると考えられる。

こうした課題を解決することで、GP119.1 を含む IgG Fc 結合タンパク質によって回避される宿主の感染防御機構と CMV の先天性感染機序との関連が明らかにできると考える。

以上より本研究では、 $\beta$  亜科のウイルスが、遺伝子配列に明確な相同性がなくとも宿主の感染防御を回避するための類似した機能を保持していることを明らかにした。本研究で着目した、複数のウイルス遺伝子により担われる可能性が高い回避機構は宿主との攻防において重要であり、経胎盤感染に対する宿主の防御機構を解明していく上での主要な研究課題であることを示した。本研究で明らかになった知見、および明らかになった検討課題から得られる知見は、CMV 感染の詳細な機序の理解に貢献するとともに、先天性 CMV 感染症に対するワクチン開発に寄与するものと期待される。

## 謝辞

博士学位論文を上梓するにあたり、お世話になった皆様方に、この場をお借りして感謝の意を申し上げます。

はじめに、研究室配属から本研究のとりまとめに至る7年間の長きにわたり終始温かいご指導ご鞭撻を賜りました恩師、岐阜薬科大学 生命薬学大講座 感染制御学研究室 井上直樹 教授に深甚なる感謝の意を表します。また、日ごろから研究の進捗を気にかけて下さり、行き詰ったときには的確なご助言と激励を賜りました同准教授 腰塚 哲朗 博士ならびに同講師 高橋圭太 博士には心よりお礼申し上げます。そして在学中の3年間共に研究活動に励んだ 野口和真 修士ならびに本研究に協力してくれた感染制御学研究室諸氏に深く感謝いたします。

また、本稿をご高覧頂き適切なるご助言を賜りました岐阜薬科大学 生命薬学大講座 生化学研究室 五十里彰 教授、生命薬学大講座 衛生学研究室 中西剛 教授、機能分子学大講座 薬理学研究室 田中宏幸 准教授に厚くお礼申し上げます。

最後に、これまで私の長い学生生活を支え、応援してくれた母とふたりの妹、そして見守ってくれた父に心から感謝します。

2021年3月



## 引用文献

- [1] Mocarski ES, Shenk T PR. Cytomegalovirus. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Reizman B SS, editor. *Field's Virology*. 5th ed., Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007, p. 2773–818.
- [2] Koyano S, Inoue N, Oka A, Moriuchi H, Asano K, Ito Y, et al. Screening for congenital cytomegalovirus infection using newborn urine samples collected on filter paper: feasibility and outcomes from a multicentre study. *BMJ Open* 2011;1:e000118. doi.org/10.1136/bmjopen-2011-000118.
- [3] Koyano S, Morioka I, Oka A, Moriuchi H, Asano K, Ito Y, et al. Congenital cytomegalovirus in Japan: More than 2 year follow up of infected newborns. *Pediatr Int* 2018;60:57–62. doi.org/10.1111/ped.13433.
- [4] Azuma H, Tamanashi M, Kohsaki M, H Sato FI, Yamada H. Cytomegalovirus seropositivity in pregnant women in Japan during 1996-2009. *J Jpn Soc Perin Neon Med* 2011;46:1273–9.
- [5] Stagno S, Pass R, Cloud G, Britt W, Henderson R, Walton P, et al. Primary cytomegalovirus infection in pregnancy: incidence, transmission to fetus, and clinical outcome. *JAMA* 1984;74:493–500. doi.org/10.1001/jama.1986.03380140074025.
- [6] Koyano S, Inoue N, Oka A, Moriuchi H, Asano K, Ito Y, et al. Screening for congenital cytomegalovirus infection using newborn urine samples collected on filter paper: feasibility and outcomes from a multicentre study. *BMJ Open* 2011;1:e000118. doi.org/10.1136/bmjopen-2011-000118.
- [7] Inoue N, Abe M, Kobayashi R, Yamada S. Vaccine development for cytomegalovirus. In: Kawaguchi Y., Mori Y. KH, editor. *Hum. Herpesviruses*, Springer, Singapore; 2018, p. 271–96. doi.org/10.1007/978-981-10-7230-7\_13.
- [8] Pass RF, Zhang C, Evans A, Simpson T, Andrews W, Huang M-LL, et al. Vaccine prevention of maternal cytomegalovirus infection. *N Engl J Med* 2009;360:1191–9. doi.org/10.1056/NEJMoa0804749.
- [9] Baraniak I, Kropff B, Ambrose L, McIntosh M, McLean GR, Pichon S, et al. Protection from cytomegalovirus viremia following glycoprotein B vaccination is not dependent on neutralizing antibodies. *Proc Natl Acad Sci* 2018;115:6273–8. doi.org/10.1073/pnas.1800224115.
- [10] Hashimoto K, Yamada S, Katano H, Fukuchi S, Sato Y, Kato M, et al. Effects of immunization of pregnant guinea pigs with guinea pig cytomegalovirus glycoprotein B on viral spread in the placenta. *Vaccine* 2013;31:3199–205. doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.04.078.
- [11] Nelson CS, Huffman T, Jenks JA, Cisneros de la Rosa E, Xie G, Vandergrift N, et al. HCMV glycoprotein B subunit vaccine efficacy mediated by nonneutralizing antibody effector functions. *Proc Natl Acad Sci* 2018;115:6267–72. doi.org/10.1073/pnas.1800177115.
- [12] Nelson CS, Baraniak I, Lilleri D, Reeves MB, Griffiths PD, Permar SR. Immune correlates of protection against human cytomegalovirus acquisition, replication, and disease. *J Infect Dis* 2020;221:S45–59. doi.org/10.1093/infdis/jiz428.
- [13] Collins-McMillen D, Chesnokova L, Lee BJ, Fulkerson HL, Brooks R, Mosher BS, et al. HCMV infection and apoptosis: How do monocytes survive HCMV infection? *Viruses* 2018;10:533. doi.org/10.3390/v10100533.
- [14] Lin A, Xu H, Yan W. Modulation of HLA expression in human cytomegalovirus immune evasion. *Cell Mol Immunol* 2007;4:91–8.
- [15] Prod'homme V, Griffin C, Aicheler RJ, Wang ECY, McSharry BP, Rickards CR, et al. The human cytomegalovirus MHC class I homolog UL18 inhibits LIR-1+ but activates LIR-1- NK cells. *J Immunol* 2007;178:4473–81.

doi.org/10.4049/jimmunol.178.7.4473.

- [16] Cretney E, Degli-Esposti MA, Densley EH, Farrell HE, Davis-Poynter NJ, Smyth MJ. m144, a murine cytomegalovirus (MCMV)-encoded major histocompatibility complex class I homologue, confers tumor resistance to natural killer cell-mediated rejection. *J Exp Med* 1999;190:435–43. doi.org/10.1084/jem.190.3.435.
- [17] Corrales-Aguilar E, Hoffmann K, Hengel H. CMV-encoded Fcγ receptors: modulators at the interface of innate and adaptive immunity. *Semin Immunopathol* 2014;36:627–40. doi.org/10.1007/s00281-014-0448-2.
- [18] Gaynor LM, Colucci F. Uterine natural killer cells: Functional distinctions and influence on pregnancy in humans and mice. *Front Immunol* 2017;8:467. doi.org/10.3389/fimmu.2017.00467.
- [19] Fisher S, Genbacev O, Maidji E, Pereira L. Human cytomegalovirus infection of placental cytotrophoblasts in vitro and in utero: implications for transmission and pathogenesis. *J Virol* 2000;74:6808–20. doi.org/10.1128/JVI.74.15.6808-6820.2000.
- [20] Katano H, Sato Y, Tsutsui Y, Sata T, Maeda A, Nozawa N, et al. Pathogenesis of cytomegalovirus-associated labyrinthitis in a guinea pig model. *Microbes Infect* 2007;9:183–91. doi.org/10.1016/j.micinf.2006.11.004.
- [21] Schleiss MR. Nonprimate models of congenital cytomegalovirus (CMV) infection: gaining insight into pathogenesis and prevention of disease in newborns. *ILARJ* 2006;47:65–72. doi.org/10.1093/ilar.47.1.65.
- [22] Takeda M, Watanabe S, Katano H, Noguchi K, Sato Y, Kojima S, et al. Roles of GP33, a guinea pig cytomegalovirus-encoded G protein-coupled receptor homolog, in cellular signaling, viral growth and inflammation in vitro and in vivo. *PLoS Pathog* 2018;14:e1007487. doi.org/10.1371/journal.ppat.1007487.
- [23] Penfold M, Miao Z, Wang Y, Haggerty S, Schleiss MR. A macrophage inflammatory protein homolog encoded by guinea pig cytomegalovirus signals via CC chemokine receptor 1. *Virology* 2003;316:202–12. doi.org/10.1016/S0042-6822(03)00581-6.
- [24] Bierle CJ, Schleiss MR, Geballe AP. Antagonism of the protein kinase R pathway by the guinea pig cytomegalovirus US22-family gene gp145. *Virology* 2012;433:157–66. doi.org/10.1016/j.virol.2012.08.005.
- [25] Crumpler MM, Choi KY, McVoy MA, Schleiss MR. A live guinea pig cytomegalovirus vaccine deleted of three putative immune evasion genes is highly attenuated but remains immunogenic in a vaccine/challenge model of congenital cytomegalovirus infection. *Vaccine* 2009;27:4209–18. doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.04.036.
- [26] Yamada S, Fukuchi S, Hashimoto K, Fukui Y, Tsuda M, Kataoka M, et al. Guinea pig cytomegalovirus GP129/131/133, homologues of human cytomegalovirus UL128/130/131A, are necessary for infection of monocytes and macrophages. *J Gen Virol* 2014;95:1376–82. doi.org/10.1099/vir.0.064527-0.
- [27] Kanai K, Yamada S, Yamamoto Y, Fukui Y, Kurane I, Inoue N. Re-evaluation of the genome sequence of guinea pig cytomegalovirus. *J Gen Virol* 2011;92:1005–20. doi.org/10.1099/vir.0.027789-0.
- [28] Braun DK, Dominguez G, Pellett PE. Human herpesvirus 6. *Clin Microbiol Rev* 1997;10:521–67. doi.org/10.1128/cmr.10.3.521.
- [29] Nozawa N, Yamamoto Y, Fukui Y, Katano H, Tsutsui Y, Sato Y, et al. Identification of a 1.6 kb genome locus of guinea pig cytomegalovirus required for efficient viral growth in animals but not in cell culture. *Virology* 2008;379:45–54. doi.org/10.1016/j.virol.2008.06.018.
- [30] Terhune S, Torigoi E, Moorman N, Silva M, Qian Z, Shenk T, et al. Human cytomegalovirus UL38 protein blocks apoptosis. *J Virol* 2007;81:3109–23. doi.org/10.1128/jvi.02124-06.

- [31] Glosson NL, Hudson AW. Human herpesvirus-6A and -6B encode viral immunoevasins that downregulate class I MHC molecules. *Virology* 2007;365:125–35. doi.org/10.1016/j.virol.2007.03.048.
- [32] May NA, Glosson NL, Hudson AW. Human herpesvirus 7 U21 downregulates classical and nonclassical class I major histocompatibility complex molecules from the cell surface. *J Virol* 2010;84:3738–51. doi.org/10.1128/jvi.01782-09.
- [33] Caló S, Cortese M, Ciferri C, Bruno L, Gerrein R, Benucci B, et al. The human cytomegalovirus UL116 gene encodes an envelope glycoprotein forming a complex with gH independently from gL. *J Virol* 2016;90:4926–38. doi.org/10.1128/jvi.02517-15.
- [34] Koshizuka T, Kobayashi T, Ishioka K, Suzutani T. Herpesviruses possess conserved proteins for interaction with Nedd4 family ubiquitin E3 ligases. *Sci Rep* 2018;8:4447. doi.org/10.1038/s41598-018-22682-2.
- [35] Yang D, Tamburro K, Dittmer D, Cui X, McVoy MA, Hernandez-Alvarado N, et al. Complete genome sequence of pathogenic guinea pig cytomegalovirus from salivary gland homogenates of infected animals. *Genome Announc* 2013;1:e0005413. doi.org/10.1128/genomeA.00054-13.
- [36] Schleiss M, McAllister S, Armién A, Hernandez-Alvarado N, Fernández-Alarcón C, Zabeli J, et al. Molecular and Biological Characterization of a New Isolate of Guinea Pig Cytomegalovirus. *Viruses* 2014;6:448–75. doi.org/10.3390/v6020448.
- [37] Atalay R, Zimmermann A, Wagner M, Borst E, Benz C, Messerle M, et al. Identification and expression of human cytomegalovirus transcription units coding for two distinct Fcγ receptor homologs. *J Virol* 2002;76:8596–608. doi.org/10.1128/JVI.76.17.8596-8608.2002.
- [38] Kiyoshi M, Caaveiro JMM, Kawai T, Tashiro S, Ide T, Asaoka Y, et al. Structural basis for binding of human IgG1 to its high-affinity human receptor FcγRI. *Nat Commun* 2015;6:6866. doi.org/10.1038/ncomms7866.
- [39] Goldmacher VS, Bartle LM, Skaletskaya A, Dionne CA, Kedersha NL, Vater CA, et al. A cytomegalovirus-encoded mitochondria-localized inhibitor of apoptosis structurally unrelated to Bcl-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:12536–41. doi.org/10.1073/pnas.96.22.12536.
- [40] McCormick AL, Meiering CD, Smith GB, Mocarski ES. Mitochondrial cell death suppressors carried by human and murine cytomegalovirus confer resistance to proteasome inhibitor-induced apoptosis. *J Virol* 2005;79:12205–17. doi.org/10.1128/jvi.79.19.12205-12217.2005.
- [41] Tomasec P, Braud VM, Rickards C, Powell MB, McSharry BP, Gadola S, et al. Surface expression of HLA-E, an inhibitor of natural killer cells, enhanced by human cytomegalovirus gpUL40. *Science* 2000;287:1031–3. doi.org/10.1126/science.287.5455.1031.
- [42] Wang ECY, McSharry B, Retiere C, Tomasec P, Williams S, Borysiewicz LK, et al. UL40-mediated NK evasion during productive infection with human cytomegalovirus. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:7570–5. doi.org/10.1073/pnas.112680099.
- [43] Arnoult D, Bartle LM, Skaletskaya A, Poncet D, Zamzami N, Park PU, et al. Cytomegalovirus cell death suppressor vMIA blocks Bax- but not Bak-mediated apoptosis by binding and sequestering Bax at mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:7988–93. doi.org/10.1073/pnas.0401897101.
- [44] Poncet D, Pauleau A-L, Szabadkai G, Vozza A, Scholz SR, Le Bras M, et al. Cytopathic effects of the cytomegalovirus-encoded apoptosis inhibitory protein vMIA. *J Cell Biol* 2006;174:985–96. doi.org/10.1083/jcb.200604069.
- [45] Jurak I, Schumacher U, Simic H, Voigt S, Brune W. Murine cytomegalovirus m38.5 protein inhibits Bax-mediated cell death. *J Virol* 2008;82:4812–22. doi.org/10.1128/jvi.02570-07.

- [46] Arnoult D, Skaletskaya A, Estaquier J, Dufour C, Goldmacher VS. The murine cytomegalovirus cell death suppressor m38.5 binds Bax and blocks Bax-mediated mitochondrial outer membrane permeabilization. *Apoptosis* 2008;13:1100–10. doi.org/10.1007/s10495-008-0245-2.
- [47] Norris KL, Youle RJ. Cytomegalovirus proteins vMIA and m38.5 link mitochondrial morphogenesis to Bcl-2 family proteins. *J Virol* 2008;82:6232–43. doi.org/10.1128/jvi.02710-07.
- [48] Çam M, Handke W, Picard-Maureau M, Brune W. Cytomegaloviruses inhibit Bak-and Bax-mediated apoptosis with two separate viral proteins. *Cell Death Differ* 2010;17:655–65. doi.org/10.1038/cdd.2009.147.
- [49] Skaletskaya A, Bartle LM, Chittenden T, McCormick AL, Mocarski ES, Goldmacher VS. A cytomegalovirus-encoded inhibitor of apoptosis that suppresses caspase-8 activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:7829–34. doi.org/10.1073/pnas.141108798.
- [50] Ménard C, Wagner M, Ruzsics Z, Holak K, Brune W, Campbell AE, et al. Role of murine cytomegalovirus US22 gene family members in replication in macrophages. *J Virol* 2003;77:5557–70. doi.org/10.1128/JVI.77.10.5557-5570.2003.
- [51] Moorman NJ, Cristea IM, Terhune SS, Rout MP, Chait BT, Shenk T. Human cytomegalovirus protein UL38 inhibits host cell stress responses by antagonizing the tuberous sclerosis protein complex. *Cell Host Microbe* 2008;3:253–62. doi.org/10.1016/j.chom.2008.03.002.
- [52] Tomazin R, Boname J, Hedge NR, Lewinsohn DM, Altschuler Y, Jones TR, et al. Cytomegalovirus US2 destroys two components of the MHC class II pathway, preventing recognition by CD4+ T cells. *Nat Med* 1999;5:1039–43. doi.org/10.1038/12478.
- [53] Wiertz EJHJ, Jones TR, Sun L, Bogyo M, Geuze HJ, Ploegh HL. The human cytomegalovirus US11 gene product dislocates MHC class I heavy chains from the endoplasmic reticulum to the cytosol. *Cell* 1996;84:769–79. doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81054-5.
- [54] Jones TR, Wiertz EJHJ, Sun L, Fish KN, Nelson JA, Ploegh HL. Human cytomegalovirus US3 impairs transport and maturation of major histocompatibility complex class I heavy chains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:11327–33. doi.org/10.1073/pnas.93.21.11327.
- [55] Ahn K, Gruhler A, Galocha B, Jones TR, Wiertz EJHJ, Ploegh HL, et al. The ER-luminal domain of the HCMV glycoprotein US6 inhibits peptide translocation by TAP. *Immunity* 1997;6:613–21. doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80349-0.
- [56] Miller AD, Rosman GJ. Improved Retroviral Vectors for Gene Transfer and Expression. *Biotechniques* 1989;7:980–90. doi.org/10.1016/j.bbi.2008.05.010.
- [57] Karsten Tischer B, Smith GA, Osterrieder N. En passant mutagenesis: A two markerless red recombination system. *Methods Mol Biol* 2010;634:421–30. doi.org/10.1007/978-1-60761-652-8\_30.
- [58] Nozawa N, Yamamoto Y, Fukui Y, Katano H, Tsutsui Y, Sato Y, et al. Identification of a 1.6 kb genome locus of guinea pig cytomegalovirus required for efficient viral growth in animals but not in cell culture. *Virology* 2008;379:45–54.
- [59] Colberg-Poley AM, Patel MB, Erez DPP, Slater JE. Human cytomegalovirus UL37 immediate-early regulatory protein traffic through the secretory apparatus and to mitochondria. *J Gen Virol* 2000;81:1779–89. doi.org/10.1099/0022-1317-81-7-1779.
- [60] Geczy AF, de Weck AL, Schwartz BD, Shevach EM. The major histocompatibility complex of the guinea pig. I. Serologic and genetic studies. *J Immunol* 1975;115:1704–10.
- [61] Belmokhtar CA, Hillion J, Ségal-Bendirdjian E. Staurosporine induces apoptosis through both caspase-dependent and caspase-independent mechanisms. *Oncogene*

- 2001;20:3354–62. doi.org/10.1038/sj.onc.1204436.
- [62] Hayajneh WA, Colberg-Poley AM, Skaletskaya A, Bartle LM, Lesperance MM, Contopoulos-Ioannidis DG, et al. The sequence and antiapoptotic functional domains of the human cytomegalovirus UL37 exon 1 immediate early protein are conserved in multiple primary strains. *Virology* 2001;279:233–40. doi.org/10.1006/viro.2000.0726.
- [63] Ma J, Edlich F, Bermejo GA, Norris KL, Youle RJ, Tjandra N. Structural mechanism of Bax inhibition by cytomegalovirus protein vMIA. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012;109:20901–6. doi.org/10.1073/pnas.1217094110.
- [64] Huang DCS, Adams JM, Cory S. The conserved N-terminal BH4 domain of Bcl-2 homologues is essential for inhibition of apoptosis and interaction with CED-4. *EMBO J* 1998. doi.org/10.1093/emboj/17.4.1029.
- [65] Boya P, Morales MC, Gonzalez-Polo RA, Andreau K, Gourdiere I, Perfettini JL, et al. The chemopreventive agent N-(4-hydroxyphenyl)retinamide induces apoptosis through a mitochondrial pathway regulated by proteins from the Bcl-2 family. *Oncogene* 2003;22:6220–30. doi.org/10.1038/sj.onc.1206827.
- [66] Manzur M, Fleming P, Huang DCS, Degli-Esposti MA, Andoniou CE. Virally mediated inhibition of Bax in leukocytes promotes dissemination of murine cytomegalovirus. *Cell Death Differ* 2009;16:312–20. doi.org/10.1038/cdd.2008.152.
- [67] Crosby LN, McCormick AL, Mocarski ES. Gene products of the embedded m41/m41.1 locus of murine cytomegalovirus differentially influence replication and pathogenesis. *Virology* 2013;436:274–83. doi.org/10.1016/j.virol.2012.12.002.
- [68] Handke W, Luig C, Popovic B, Krmpotic A, Jonjic S, Brune W. Viral inhibition of BAK promotes murine cytomegalovirus dissemination to salivary glands. *J Virol* 2013;87:3592–6. doi.org/10.1128/JVI.02657-12.
- [69] Jackson JW, Sparer T. There is always another way! cytomegalovirus' multifaceted dissemination schemes. *Viruses* 2018;10:383. doi.org/10.3390/v10070383.
- [70] Cicin-Sain L, Ruzsics Z, Podlech J, Bubic I, Menard C, Jonjic S, et al. Dominant-negative FADD rescues the in vivo fitness of a cytomegalovirus lacking an antiapoptotic viral gene. *J Virol* 2008;82:2056–64. doi.org/10.1128/jvi.01803-07.
- [71] Kolb P, Sijmons S, McArdle MR, Taher H, Womack J, Hughes C, et al. Identification and functional characterization of a novel Fc gamma-binding glycoprotein in rhesus cytomegalovirus. *J Virol* 2018;93:e02077-18. doi.org/10.1128/JVI.02077-18.
- [72] Lenac T, Budt M, Arapovic J, Hasan M, Zimmermann A, Simic H, et al. The herpesviral Fc receptor fcr-1 down-regulates the NKG2D ligands MULT-1 and H60. *J Exp Med* 2006;203:1843–50. doi.org/10.1084/jem.20060514.
- [73] Miura T, Makino R, Yamada K, Matsuura M, Okumura M, Yamada S, et al. Differences in the effects of mutations in GP131, a guinea pig cytomegalovirus homologue of pentameric complex component UL130, on macrophage and epithelial cell infection. *J Gen Virol* 2018;99:1425–31. doi.org/10.1099/jgv.0.001137.
- [74] Corrales-Aguilar E, Trilling M, Hunold K, Fiedler M, Le VTK, Reinhard H, et al. Human cytomegalovirus Fcγ binding proteins gp34 and gp68 antagonize Fcγ receptors I, II and III. *PLoS Pathog* 2014;10:e1004131. doi.org/10.1371/journal.ppat.1004131.
- [75] Crnković-Mertens I, Messerle M, Miličić I, Szepan U, Kučić N, Krmpotić A, et al. Virus attenuation after deletion of the cytomegalovirus Fc receptor gene is not due to antibody control. *J Virol* 1998;72:1377–82. doi.org/10.1128/jvi.72.2.1377-1382.1998.

## 略語一覽

ADCC	antibody-dependent cellular cytotoxicity
ADCP	antibody-dependent cellular phagocytosis
BAC	bacterial artificial chromosome
BAK	Bcl-2 homologous antagonist/killer
BAX	Bcl-2-associated X protein
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BHV	betaherpesvirus
BLAST	basic local alignment search tool
BSA	bovine serum albumin
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate
CHX	cycloheximide
CMV	cytomegalovirus
CPE	cytopathic effect
CTL	cytotoxic T-lymphocyte
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DDBJ	DNA Data Bank of Japan
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EGFP	enhanced GFP
FBS	fetal bovine serum
Fc $\gamma$ R	Fc gamma receptor
FFUs	focus forming units
FL	full length
GFP	green fluorescent protein
GPCMV	guinea pig CMV
GPL	guinea pig lung fibroblast
HCMV	human CMV
HHV	human herpesvirus
HLA	human leukocyte antigen
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses
IFN	interferon
IgG	immunoglobulin G

IUs	infectious units
$\lambda$ PPase	lambda protein phosphatase
MCMV	murine CMV
MHC-I	major histocompatibility complex class 1
mKO1	monomeric Kusabira Orange 1
MOI	multiplicity of infection
NK	natural killer
ORF	open reading frame
PAA	phosphonoacetic acid
PBS	phosphate-buffered saline
PC	pentameric complex
PFA	paraformaldehyde
p.i.	postinfection
RACE	rapid amplification of cDNA end
RCMV	rat CMV
RFP	red fluorescent protein
RhCMV	rhesus macaque CMV
SG	salivary gland
T	transmembrane region
TC	transmembrane and carboxyl-terminal region
UL	unique long
US	unique short
vFc $\gamma$ R	viral Fc $\gamma$ R
vIBO	viral inhibitor of BAK oligomerization
vICA	viral inhibitor of caspase-8-induced apoptosis
vMIA	viral mitochondria-localized inhibitor of apoptosis
WT	wild type

試薬一覧

1. 細胞培養液

<b>D5</b>	メーカー	(mL)
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	GIBCO	500
Fetal Bovine Serum (FBS)	Hyclone	28
Penicillin 10,000 U/mL, Streptomycin 10,000 µg/mL, 0.85% NaCl (P/S)	GIBCO	5.6
<b>D10</b>	メーカー	(mL)
DMEM	GIBCO	500
FBS	Hyclone	56
P/S	GIBCO	5.6
<b>D10A</b>	メーカー	(mL)
DMEM	GIBCO	500
FBS	Hyclone	56
P/S	GIBCO	5.6
Non Essential Amino Acid (NEAA)	GIBCO	5.6
<b>F10</b>	メーカー	(mL)
F-12 Nutrient Mixture (Ham)	GIBCO	500
FBS	Hyclone	56
P/S	GIBCO	5.6
L-Glutamine 200 mM	GIBCO	5.6
<b>D/F10</b>	メーカー	(mL)
Dulbecco's Modified Eagle Medium : Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12)	GIBCO	500
FBS	Hyclone	56
P/S	GIBCO	5.6



## 2. プライマー

Table 1 GP38.1 の解析に用いたプライマー

Primer name	Primer sequence (5'→3')	Usage
gp38.1_5RACEv7	CGGCACGGCTTCCTGATTCCTCCGACTT	primers for RACE analyses
gp38.1_5RACEv8	GGTCGTCTCTGCTCAAATCTCAC	
gp38.1_3RACE	GGAGGGGATAGTCCAGGAGAC	
gp38.2_5RACE	CCTCCACACCGTGATGCATAACC	
gp38.2_5RACEv2	TCCTTGTCGGAAGTCGTGGAC	
gp38.2_3RACE	CACGAGCAGATCTTTCGGATCAAC	
gp38.3_5RACE	GCGGTGAAGTAGAAACGTCATCG	
H36-B17TRH	TGAAGCCAGATATCACGACG	
gp38.3_3RACEv3	CTTCCGATGACGTTTCTACTTCACC	
gp38.4_5RACE	GCGCAGCAGACACAGTGCTTAC	
gp38.4_5RACEv2	ATCCTCGTCGTCATCGCATAAC	
gp38.4_3RACE	TAGATGTACTGGGCTACGTGAGC	
GP38-5RACEv1	CACGCTTCCGCTGCAATTACG	
GP38-3RACE	AGTCCATACAGAATGGGAGCGTG	
gp38.1-internal-F	CCGTATCCAACCTTGCCGTCT	quantification of GP38.1 transcripts
gp38.1-internal-R	GCGCATAGAGAATAAGAACCCTGTG	
gp38.1_F	cccgcggccgccGTGACACGTTATGACACAACG	cloning of GP38.1 into pCMV-tag4c (w/ & w/o FLAGtag)
gp38.1_R	gggctcgagTTAAACGCTCGTCTGCCTC	
gp38.1_R-stop	gggctcgagAACGCTCGTCTGCCTCGGTC	
gp38.1-F-XhoI	gcgctcgagccgccGTGACACGTTATGACACAACG	cloning of GP38.1 into pEGFP-N1
gp38.1-RdS-BamHI	cgcggatccttAACGCTCGTCTGCCTCGGTC	
gp38.1-F-HindIII	gcgAAGCTTgccgccGTGACACGTTATGACACAAC	cloning of GP38.1 into pLNCX
gp38.1flag-R-HpaI	cgcgtaacCTACTTATCGTCTGCATCCT	
gpBAX-F-EcoRI	gcggaattcgccgccATGGACGGGTCGGCGAGCA	cloning of gpBAX into pTurboRFP & pcDNA3
gpBAX-RdS-SalI	cgcgtcgagctGCCCATGTTCTTCCAGATGG	
gpBAX-R-XhoI	cgcctcgagTCAGCCCATGTTCTTCCAGA	
gpBak1-F-EcoRI	gcggaattcgccgccATGGCATCAGACCAAGGCCCA	cloning of gpBAK into pTurboRFP & pcDNA3
gpBak1-RdS-XhoI	cgcctcgagctCGATGACTTGAAGAATCTTC	
gpBak1-R-XhoI	cgcctcgagTCACGATGACTTGAAGAATC	
gp38.1_TSRR_F	TCATGGATCGGTTGATGAAGTTCATCCCGAGACCGTCTCCCTAGGCT GTAGATGGCTTTTCGGTTtaggataacaggtaatcgatt	preparation of GPCMVΔ38.1 & r38.1
gp38.1_TSRR_R	GGTGGCGTAGAACGCCAGAGAACCGAAAAGCCATCTACAGCCTAGG GAGACGGTCTCGGGATGAAgccagtgtaaccaattaacc	
Rgp38.1_TSRR-F	TCATGGATCGGTTGATGAAGTTCATCCCGAGACCGTCTCCGTCGGTCT GTAGATGGCTTTTCGGTTtaggataacaggtaatcgatt	
Rgp38.1_TSRR-R	GGTGGCGTAGAACGCCAGAGAACCGAAAAGCCATCTACAGACCGAC GGAGACGGTCTCGGGATGAAgccagtgtaaccaattaacc	

Characters in lower case are sequences not in the gene of interest

Characters underlined are the sequences altered for creation of Δ38.1 or r38.1

Table 2 GP119.1 の解析に用いたプライマー

Primer name	Primer sequence (5'→3')	Usage
GP119.1_5RACEv2	GAGAGCACATATAAGGGTCGCGGTGGCG	primers for RACE analyses
GP119.1_3RACEv2	CAGACCGATAACACGCGGGCAGCGACTT	
GP119.1_gDNA_fw	CGGACCGTCTACACTCTCTGTCATCAAC	
gp119.2_5RACE	CAATTCGGGTTTCGAAACGACAACCGTGC	
GP119.1_gDNA	GCCTCGTTCCTCGCCGTTATACTTCTG	
gp119.3_5RACE	GTACCATTGTAACGTCGCATTGCC	
gp119.3_3RACE	GTGCAATATCAGCGGTGAGACACAG	
gp119.4_5RACE	CCTCTTGCGGTCCTTCGGTCCGG	
gp119.3_3RACEv2	ACCATAGTGATCGCAGACGACTCACAG	
GP119.1 qPCR w/ interL	ATTAAGTGGCTCCTTTTGGGGA	quantification of GP119.1 transcripts
GP119.1_inter_L	CGGTCGCGTTGACGGTTATC	
CX28-T7C	ACACGTAACAACACATCCAG	preparation for hybridization Probe 1 (use with GP119.1_gDNA_fw)
DX15-B41M13I	TCGGGCTCAATAGTACTGAC	preparation for hybridization Probe 2
B41-CX28MR	GTTGGTGGATGTTGTACCAG	
gp119.2 L forNB	CTCCGACTCGAAGTAAA	preparation for hybridization Probe 3
gp119.2 R forNB	ATAACTGACAGCGTGGGA	
GP119.1(234) F-BglII	GACTAGATCTACATGCGTCAATTTCTCATATTGTTTTCATTTATCC	cloning of GP119.1FL to pEGFP-N1
GP119.1ns R-Sall v3	GCGCGTCGACAGTGTGTATATATATGATTGTCATCG	
E234 Igx2 Sense	GACTCAGATCTACATGCGT <sub>agt</sub> TTTTGGGGAGAATTCGTAC	generation of pEGFP-GP119.1-dN1
E234 Igx2 Antisense	GTACGAATTCTCCCCAAA <sub>act</sub> ACGCATGTAGATCTGAGTC	
E234 Igx1 Sense	GGACTCAGATCTACATGCGT <sub>agt</sub> ATCGATAAAGAGTCC	generation of pEGFP-GP119.1-dN2
E234 Igx1 Antisense	GGACTCTTATCGAT <sub>act</sub> ACGCATGTAGATCTGAGTCC	
E234 M141A Sense	GTATTAGGCTCTTGTCCCGG <sub>Agc</sub> GCCGGATTACCCG	generation of pEGFP-GP119.1-MA
E234 M141A Antisense	CGGGTAATCCGGC <sub>gc</sub> TCCGGGACAAGAGCCTAATAC	
E234 N154Q Sense	CCTCTATCTGTTATCGACG <sub>cAg</sub> GACACGGTGAAGAGAT	generation of pEGFP-GP119.1-NQ
E234 N154Q Antisense	ATCTCTAGTCACCGTGT <sub>Cc</sub> TgCGTCGATAACAGATAGAGG	
E234 dTMD Sense	CGCTCTCGGGCCCGGATAAATCAAATATATTCGTA <sub>AAA</sub> AG	generation of pEGFP-GP119.1-dT
E234 dTMD Antisense	CTTTTACGAATATATTTGATTATCGCGGCCCCGAGAGCG	
E234 dTMICD Sense	CGAACCTCGCT <sub>ttg</sub> CTGTGCGACGGTACC	generation of pEGFP-GP119.1-dTC
E234 dTMICD Antisense	GGTACCGTCGACAG <sub>caa</sub> AGCGAGGTTCC	
FlagGP119.1-kanS fwd	CGCGGAGCACGATGACAATCATATAATATACACAGATTACAAGGATGAC GACGATAAGTAAATATCATTAGCGCTAGGGATAACAGGGTAATCGATT T	preparation of GPCMVd9k-f119
FlagGP119.1-kanS rev	GGACACATATAATATTAGCGCTAATGATAATTTACTTATCGTCGTCATC CTTGTAACTGTGTATATTATATGATGCCAGTGTTACAACCAATTAACC	
delGP119.1-kanS fwd	TCCCGTATTAGGCTCTTGTCCCGGAATGCCGGATTACCCG <sub>t</sub> GACCCTT <sub>aA</sub> CTGTTATCGACGAACGACACTAGGGATAACAGGGTAATCGATT	preparation of GPCMVd9k-d119
delGP119.1-kanS rev	TATATCGATCTCTAGTCACCGTGTCTGTCGATAACAGT <sub>t</sub> AAGGGTC <sub>a</sub> CGGGTAATCCGGCATTCCGGGCCAGTGTTACAACCAATTAACC	
repGP119.1-KanS-F	TGCGTCAATTTCTCATATTGTTTTTCAATTTATCCGCGGAC <sub>atac</sub> GTTTCT GACCGCATATTGGTAGGGATAACAGGGTAATCGATT	preparation of GPCMVd9k-r119
repGP119.1-KanS-R	GTAGTCGTAATACCACACACCCAATGATGCGGTCAGAAAC <sub>gtat</sub> GTCCGC GGATAAATGAAAAAGCCAGTGTTACAACCAATTAACC	

Characters in lower case are the sequences altered for creation of mutated or rescued versions of the gene of interest