

## ヘルペスウイルス感染に必須であるウイルス糖タンパク質複合体の立体構造解析

神戸大学大学院医学研究科附属感染センター・臨床ウイルス学分野 西村 光広

### 1 研究の背景と目的

ヒトヘルペスウイルス 6B (Human herpesvirus 6B; HHV-6B) はほぼ全ての乳幼児が感染する突発性発疹の原因ウイルスである。この初感染時には重篤な脳炎を引き起こすことがあるため、子供の保健を脅かす一因となっている。また HHV-6B は初感染の後、生涯ヒト体内に潜伏感染する性質を持ち、造血幹細胞の移植後などの免疫抑制状態で HHV-6B が再活性すると高い頻度で脳炎を引き起こす事が医療上の問題となっている。HHV-6B の感染とその病原性については未だ不明な点が多く、現時点で効果的な対処法は存在しない。

我々の研究グループは HHV-6B ウイルスの表面に発現している糖タンパク質複合体 (gH/gL/gQ1/gQ2 複合体; 以下テトラマーと表記) に着目して研究を行ってきた。HHV-6B の感染にはテトラマーが重要な役割を担っており、テトラマーが T 細胞上の受容体を認識、結合する事によって、感染が引き起こされる (Akkapaiboon et al. J. Virology, 2004; Mori et al. J. Virology, 2004)。またその受容体が活性化された T 細胞で特異的に発現する CD134 (OX40) であることも明らかとなっている (Tang et al. PNAS, 2013)。その感染における重要性から、テトラマーに対する抗体は HHV-6B ウイルスの感染に対して中和能を持つことも示されている (Kawabata et al. J. Virology, 2011)。したがってテトラマーは HHV-6B の感染機構において重要であると同時に、ヒト体内のウイルスに対する防御機構においても HHV-6B を中和する抗体の標的であることから、HHV-6B 感染機構の解明及び感染制御において最も重要な因子の一つである。

しかしながらテトラマーは 4 つの異なるタンパク質が一体となった高次の複合体であり、その立体構造については現在明らかとなっていない。テトラマーの構成タンパク質はヒトを初め他の多くの生物では相同性のないものであり、各タンパク質がどのような立体構造をとり、またそれぞれどのように影響を及ぼし合うことで複合体を形成しているかについては全くの未知である。そこで本研究では、テトラマーの実体を明らかとするために X 線結晶構造解析の手法によってテトラマーの立体構造を決定する事を目的とした。

### 2 研究方法・研究内容

#### テトラマー タンパク質の精製

本研究グループでは、HHV-6B テトラマーを構成する各遺伝子を哺乳動物細胞に導入する事で、培養上清中にテトラマーを発現させる系を既に構築している。この方法を用いて、テトラマーを培養上清に産生させ、アフィニティークロマトグラフィーとサイズ排除カラムクロマトグラフィーによって精製を行う事で、高純度のタンパク質を調製した。

#### テトラマー タンパク質の結晶化

得られたテトラマータンパク質を 10 mg/ml の濃度まで濃縮し、結晶化実験を行った。テトラマーの結晶化については、これまでの研究で得られていた結晶化条件を基に、結晶に影響を持つ添加物の探索を行う事で、形状の変化を指標に結晶の改善を試みた。

### テトラマー・抗体 Fab 複合体の精製

本研究グループが既に作製したテトラマーに対するマウスモノクローナル抗体について、マウス腹水からマウスのプロテイン A 樹脂により精製を行い、パピインによって Fab 化を行った。得られた抗体 Fab ドメインとテトラマーを混合し、サイズ排除クロマトグラフィーによってテトラマー・抗体 Fab 複合体を精製した。

### テトラマー・抗体 Fab 複合体の結晶化

テトラマー・抗体 Fab 複合体を 10 mg/ml の濃度まで濃縮し、市販のスクリーニングキットとナノリッター分注システムを利用し、結晶化条件の探索を行った。

### X 線結晶回折測定

テトラマー結晶及びテトラマー・抗体 Fab 複合体の結晶の X 線結晶回折測定を大型放射光施設播磨 SPring-8 にて行った。共同利用ビームタイムの申請を行い、測定は構造生物学 III ビームライン BL38b1 及び理研構造ゲノムビームライン I BL26b1 によって実施した。

## 3 研究成果

### テトラマー結晶の X 線結晶回折測定

精製されたテトラマータンパク質について、既に本研究グループで見出していた結晶化条件により結晶化し、さらに添加剤の探索を行う事で、形状が異なる 2 種類の結晶を得た (図 1)。元の結晶化条件では直方体状の結晶であったが (図 1A)、塩溶液及び界面活性剤の追加により棒状の結晶が得られ (図 1B)、また塩溶液の追加により六角柱状の結晶が得られた (図 1C)。

これらの結晶を用い Spring-8 BL38b1 で X 線結晶回折測定を行った結果、形状の変化に関わらず X 線の回折能には改善しておらず (図 2)、分解能 8 Å に相当する回折点も見られたが、最終的に最も良い測定結果で最高分解能 12 Å までの回折データしか得られなかった。この測定結果から結晶の空間群は P222 であることが推定され、格子定数は  $a = 158.75 \text{ \AA}$ ,  $b = 279.23 \text{ \AA}$ ,  $c = 353.60 \text{ \AA}$ ,  $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$  であった。このことから、テトラマーの結晶は比較的大きな格子定数を持ち、本質的に回折能が低い結晶である事が示唆された。

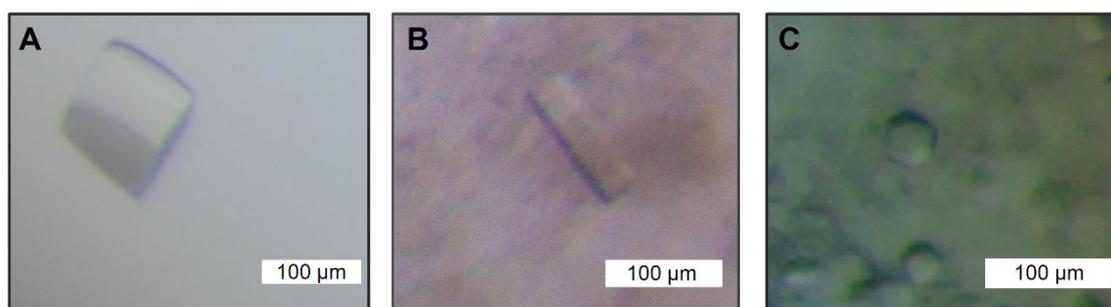


図 1. テトラマータンパク質の結晶。(A) 添加物を探索する前の直方体状結晶。(B) 界面活性剤及び塩溶液の追加により得られた棒状の結晶。(C) 塩溶液の追加により得られた六角柱状の結晶。

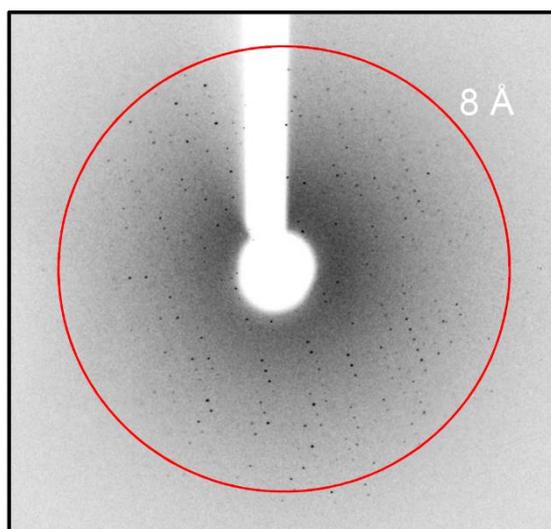


図2. テトラマー結晶のX線結晶回折。代表的な回折像を示す。

#### テトラマー・抗体 Fab 複合体の結晶化及び結晶回折測定

本研究グループはテトラマーに対する複数のマウスモノクローナル抗体を有しているため、より回折能に優れた結晶を得るために、テトラマーにこれらの抗体の Fab ドメインを結合させたテトラマー・抗体 Fab 複合体を新たに精製し、結晶化条件の探索を行った。その結果、半月状の結晶を得る事ができた (図 2A)。結晶化条件の最適化を行う事で、楕円柱状の十分な大きさを持つ結晶を作製する事ができた (図 2B)。

このテトラマー・抗体 Fab 複合体の結晶について Spring-8 BL38b1 および BL26b1 で X線結晶回折測定を行った。その結果、テトラマー単体で得られた結晶に比べて良好な X線の回折が確認され、最も良い回折点については分解能 4.3 Å を超えるものも見られた (図 2C)。この結晶について回折データの収集を行った結果、最高分解能 5 Å までの回折データを得る事ができた。推定される空間群は P222 であり、格子定数は  $a = 120.84 \text{ \AA}$ ,  $b = 224.82 \text{ \AA}$ ,  $c = 241.89 \text{ \AA}$ ,  $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$  であった。

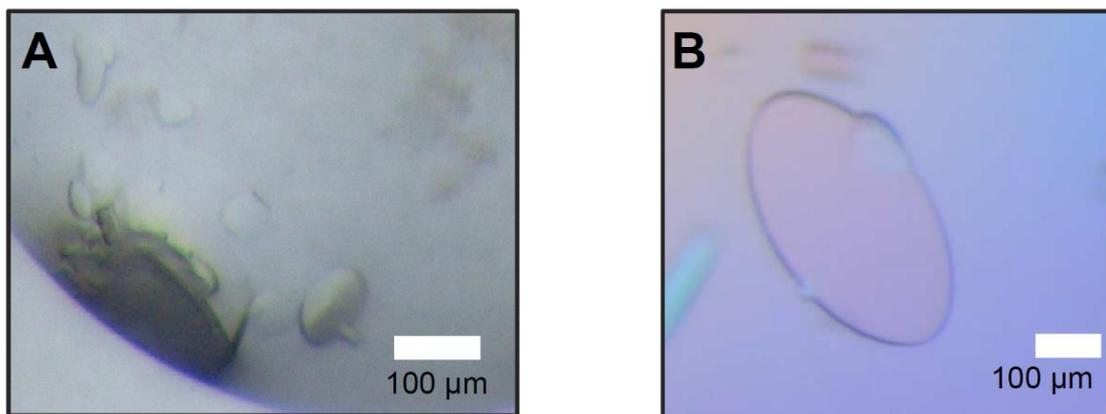


図3. 新たに得られたテトラマー・Fab 複合体の結晶。(A) 初期の結晶化条件探索により見出された半月状の結晶。(B) 条件の最適化後に得られた楕円柱状の結晶。

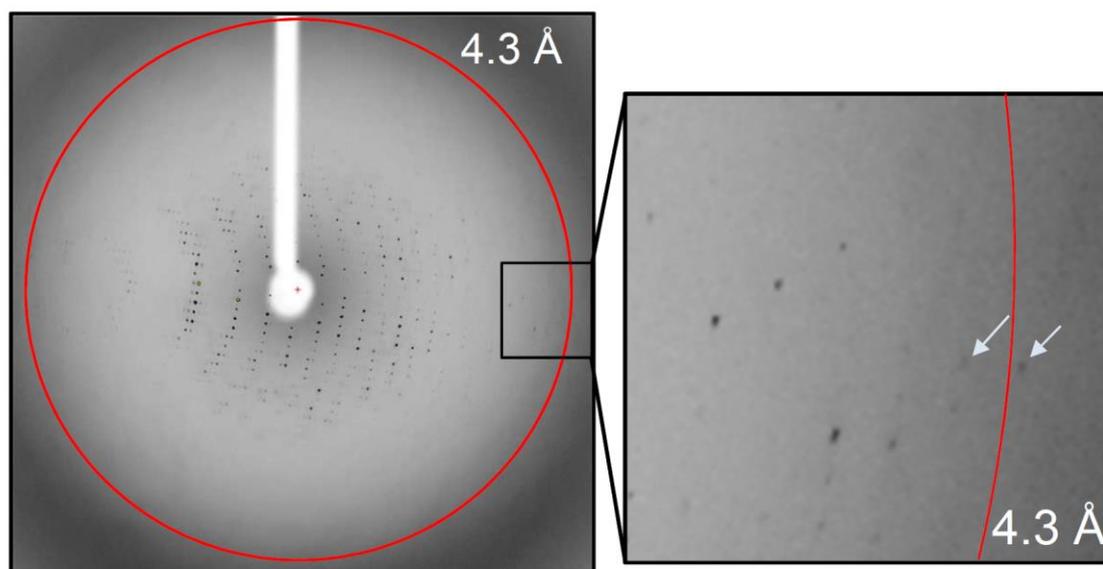


図4. テトラマー・Fab 複合体結晶による X 線結晶回折。代表的な回折像を示す。この回折像では分解能 4.3 Å 程度の回折点まで確認されている (右拡大図 矢印)。

今回の研究では構造を決定するために必要とされている最高分解能 3-4 Å までの回折データを得る事が出来なかった。しかしテトラマー単体を用いて得られた結晶に比べ、格子定数がより小さくまた回折能に優れた結晶が得られたことから、今後、抗体の種類を変更、または受容体 CD134 をテトラマーに結合させることで、より良好な回折能を持ち、X 線結晶構造解析を実現する結晶が得られる可能性が強く示唆された。

#### 4 生活や産業への貢献および波及効果

テトラマーは HHV-6B の感染において必須の働きを担い、ウイルスの感染機構または免疫による防御機構において最も重要な因子の一つである。テトラマーは 4 つの異なるタンパク質からなる複雑な複合体であり、大きな構造変化を起こす可能性のある分子であるため、回折能に優れた結晶が得られるかどうかについては懸念される場所であった。本研究では構造の決定に至る事が出来なかったが、新たにテトラマー・抗体 Fab 複合体の結晶を作製する事に成功し、より回折能に優れた結晶を得る事が出来た。この成果から、少なくとも抗体 Fab を結合させた状態では、テトラマー構造を安定とする事ができ、回折能の高い結晶の作製が可能である事が示唆された。本研究によりテトラマーの結晶構造を決定する見通しが得られ、継続して研究を行う事で将来的に HHV-6B 感染症研究に貢献する事が期待される。