

論文の内容の要旨

生産・環境生物学専攻

平成11年度博士課程進学

氏名 田村 克

指導教官 小林 正彦

論文題目 ノーウォーク様ウイルス結合分子の探索と感染防御への利用に関する研究

日本は島国であり、その地理的環境から魚介類を食べる機会が多い。特に、多くの新鮮な魚介類を生で食べる伝統は、世界でもユニークなものとして知られている。しかし、水域で生息している魚介類には、ヒトに感染して病原性を示す様々な病原体が潜んでいる。そのうち細菌病原体は、検査によって容易に検出できるものが多いが、ウイルスは、これまで知られている限りにおいてヒトの体内でのみ感染増殖し魚介類そのものには病原性を示さないため、事実上、検出・除去が非常に困難である。これらのウイルスの存在によって、新鮮な魚介類を生で食べる我々は、常に感染の危険に晒されている。ウイルス性胃腸炎は先進国において以前から保健衛生上重要な問題であるばかりでなく、我が国のように、新鮮な生の魚介類を食べる生活習慣を持つ国にとって非常に深刻な問題である。

そこで、本研究では、魚介類によって媒介されるウイルスのうち、含有率が高く、しかも近年、非細菌性の流行性胃腸炎の主因として注目されているノーウォーク様ウイルス (Norwalk-like virus; NLV) を研究材料とし、安心して新鮮な生の魚介類を食べられる将来に向けて、ウイルス感染防御の確立を試みた。NLV は(+)一本鎖 RNA をゲノムとする小型球形のウイルスであり、世界各地の市町村、学校、キャンプ、家庭において引き起こされる非細菌性胃腸炎の主因病原体として知られる。原因食品は主として、生あるいは加熱不十分の魚介類(特にカキなどの2枚貝)が

挙げられ、レストランや学校などの集団生活の場で、水や食品を介したウイルス性胃腸炎の集団発生がみられる。NLV は長年に渡る精力的な研究にも関わらず、中和抗体が見出されていないばかりか、ウイルスの分離・培養がいかなる方法でも成功しておらず、その感染・増殖機構および免疫性は不明である。

このように中和抗体が見出されないウイルスに対し、本研究ではまず、(1)NLV が結合する細胞表面受容体を探索し、それを精製して感染防御に利用することを試みた。その結果、受容体を特定することができたが、その精製が困難であることが判明した。そこで、(2)受容体に限ることなく細胞内に存在している NLV 結合分子を探索したところ、ヒストン H1 が強い結合性を示すことが明らかになった。このため、(3)これを利用することで NLV の感染防御を試みた。

(1) 細胞表面に存在する NLV 受容体の解析

NLV は培養によって生ウイルスを得られないため、その系統の 1 つである Ueno 株から得られたキャプシドタンパク質遺伝子(ORF2)を組み込んだバキュロウイルスによって昆虫細胞内で中空粒子(Virus-Like Particle; VLP)を作製し、これを用いて細胞との相互作用を解析した。作製された VLP である recombinant Ueno Virus(rUEV)を用いて、まずはヒト腸管由来の Caco-2 細胞との結合性を調べた。Dose Response を調べたところ、rUEV は細胞膜に対し特異的に結合していた。また Scatchard Plot により、1 細胞あたりおよそ 10^6 個の rUEV が表面に結合していることがわかった。次に rUEV が細胞膜を經由して細胞内に取り込まれるかどうかを調べるために、Internalization Assay を行った。その結果、初めに細胞膜に特異的に結合した rUEV のうち約 7.5%が細胞内に取り込まれた。以上の結果は、過去に研究されてきた他のウイルス受容体の特徴とよく一致しており、NLV が細胞に侵入する際に受容体として働く何らかの細胞表面分子を利用することが示唆された。

そこで、この分子の種類を調べるために、Phospholipase C、過ヨウ素酸及び Proteinase K であらかじめ細胞表面を処理し、rUEV との結合を調べた。その結果、Proteinase K で処理した場合のみ顕著な結合低下が見られた。このことは、ウイルスが細胞膜の脂質や糖鎖ではなくタンパク質と直接結合することを示唆している。そこで、この rUEV 結合タンパク質を VOPBA 法によって検出した結果、105 kDa の位置に明瞭な単一バンドが得られた。この 105 kDa タンパク質は全ての哺乳動物細胞株に存在し、さらに UEV 以外の系統の NLV とも結合した。しかし、NLV と同じカリシウイルス科に属する E 型肝炎ウイルス(hepatitis E virus; HEV)とは結合しなかった。従って、こ

の 105 kDa タンパク質は細胞にとって何らかの重要な役割を果たしているタンパク質であり、それを NLV が特異的に受容体として利用していることが示唆された。rUEV ばかりでなく他の NLV にも共通な受容体候補分子が見つかったことから、逆にこの分子との相互作用を阻害することで NLV の感染を防げることが推測された。

(2) 細胞に存在する NLV 結合タンパク質の探索

ウイルスの感染防御には、中和抗体の他に受容体分子を利用できることが知られている。しかし、受容体の分離、同定には多大な労力と時間が必要とされる。NLV も例外ではなく、105 kDa 受容体候補タンパク質の同定は困難を極めた。そこで、受容体に代わる NLV 結合分子を細胞内から探索することにした。細胞の全溶出液を用いて VOPBA を行った結果、105 kDa タンパク質とは別に、およそ 35 kDa の位置に大量の NLV 結合タンパク質が検出された。この 35 kDa タンパク質は核画分に存在していた。アミノ酸配列を解析した結果、ヒトを始め哺乳類のヒストン H1 と 100% の相同性を示した。rUEV とヒストン H1 との結合の性質を調べた結果、VLP の立体構造が重要であること、そして幅広い pH 領域や塩濃度条件下でも結合が可能であることがわかった。ヒストン H1 は UEV 以外の系統の NLV とも結合したが、HEV とは結合しないことから NLV 特異的に結合することが示唆された。以上の結果は、腸管管腔内のように変化に富む環境でもヒストン H1 が NLV と結合できることを示唆している。すなわちウイルスに結合するヒストン H1 は受容体に代わって NLV 感染防御へ利用できることが予想された。

(3) NLV 感染防御への利用

NLV の系統によらず結合する受容体候補 105 kDa タンパク質の性質と、pH に影響されず NLV と結合するヒストン H1 の性質を利用して、NLV に対する結合阻害剤としてのヒストン H1 の機能を検証した。ヒト小腸由来細胞株 Intestine 407 を用いて、ヒストン H1 存在下で結合検定を行った結果、25 $\mu\text{g/ml}$ 以上のヒストン H1 が存在すると、rUEV の細胞への結合は 95% 以上阻害された。結合阻害作用は、他の系統の NLV に対しても同様であった。意外なことに、ヒストン H1 は rUEV 粒子表面ばかりでなく細胞表面にも作用することで結合阻害効果を示すことが判明した。

次に、ヒストン H1 によるウイルスの結合阻害効果が他種のウイルスにも成立するものか検証するために、HEV、ピコルナウイルス科に属するポリオウイルス、昆虫の核多角体病ウイルス AcNPV を用いてヒストン H1 存在下で感染実験を行った。しかし、どのウイルスに対しても阻害

効果は見られなかった。以上の結果から、ヒストン H1 の結合阻害効果は NLV 特異的なものであり、決して非特異的に細胞表面を覆うことで NLV の結合を阻害しているわけではないことが示唆された。

ヒストンは細胞に対し生理的な作用を及ぼしたり、殺菌作用を示すことが知られている。そこで、ヒストン H1 の薬剤としての腸管細胞および腸内細菌に対する安全性について検証した。その結果、NLV 結合阻害に有効な濃度のさらに 10 倍量のヒストン H1 を投与しても Intestine 407、Caco-2 細胞の生育に及ぼす傷害的な影響は見られなかった。また、腸内細菌に対しては、長時間の処理では一部の細菌に対して殺菌作用を示したが、短時間では全く問題ないこと、そして長時間でも腸内細菌全体の量には影響を及ぼさないことが確認された。以上の結果から、ヒストン H1 の投与は人体に悪影響を及ぼさず、ヒストン H1 が NLV の感染防御特効薬として有効かつ安全であることが示唆された。

本研究では、感染防御の主流である中和抗体や受容体の概念にとらわれず、NLV 結合分子を宿主細胞内から探索することで、核タンパク質として一般に広く知られているヒストン H1 の新たな機能を見出し、NLV 感染防御への糸口を掴んだ。本研究の成果を応用し、予防薬として用いることができれば、新鮮な生の魚介類を安心して口に運べる日も近いと思われる。ヒストンは、NLV 感染防御ができるほど高濃度ではないものの、元々アポトーシスに伴って腸管内に放出されているタンパク質であるため、ヒトの免疫系を刺激しないと推測される。また、受容体候補である 105 kDa タンパク質よりも、ヒストン H1 の方が容易に、しかも多量に得られるため、製薬的視点から見てもヒストンの利用価値は大きいものと思われる。本研究で得られた知見は、ウイルスの感染防御を確立するには中和抗体や受容体ばかりでなく、細胞内に存在するあらゆるウイルス結合分子が利用できることを示している。さらに概念を拡張して考えると、細胞内分子に限らずともウイルス結合分子であれば感染防御分子の候補となり得ることが推測される。本研究の実験的手法は、培養系の有無に限らずウイルス全般への利用が可能であり、感染防御を確立するための手段として広範な応用が期待されるものである。