

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目

The Mechanism of Intracellular Transport of Ebola Virus Matrix Protein VP40

エボラウイルス膜蛋白質 VP40 の細胞内輸送機構の解析

指導教官 河岡 義裕 教授

東京大学医学系研究科病因・病理学専攻 医学博士課程

平成16年4月入学

氏名 山吉 誠也

エボラ出血熱はエボラウイルスによって引き起こされる重篤なウイルス性人獣共通感染症であり、人での致死率は 90%に達する。本来はアフリカなどに限局する疾患であるが、交通手段の発達に伴い、何時どこでエボラ出血熱を発症する患者が出現しても不思議でない。しかし、エボラウイルスの研究は Bio-safety Label (BSL) 4 施設を必要とするため進展が遅れており、ウイルス増殖過程の詳細はわかっていないことが多い。そのために、使用可能なワクチンや治療法の確立に至っていない。そこで、エボラウイルスの増殖過程、特にウイルスの出芽機構を明らかにすることで、治療法や予防法の確立に有用な情報を提供できるのではないかと考えた。

あらゆるウイルスはその増殖過程で様々な細胞因子と相互作用し、細胞本来の機能を巧みに利用している。エボラウイルスの膜蛋白質 VP40 も細胞内で発現させると種々の宿主因子と相互作用し、VP40 を含むエボラウイルス様粒子 (VLP) が産生される。エ

ボラウイルス VP40 のアミノ末端側には、Late-domain と呼ばれるアミノ酸配列が存在している。Late-domain は、ヒト免疫不全ウイルスやラッサウイルス等の膜蛋白質にも存在し、ウイルス出芽に関わる宿主蛋白質 Tsg101 等との相互作用に重要なモチーフである。しかし、アミノ末端側から 30 アミノ酸を欠失した VP40 は Late-domain を完全に失っているにも関わらず、VLP 放出能を失っていない。以上の報告を元に、私は VLP 放出に必須なアミノ酸配列を決定するため、欠損変異体やアラニン置換変異体を多数作製し、その VLP 形成効率を野生型 VP40 と比較した。その結果、53 位プロリンに、または 51 位ロイシンと 52 位アルギニンの両方にアラニン置換を導入した場合に、顕著な VLP 形成効率の低下が認められた。また、野生型 VP40 が示す形質膜への局在や多量体形成を、これら VLP 形成効率が低下した変異体 VP40 について検討した結果、多量体形成には影響はしなかったが、形質膜へは局在せず細胞質に留まっていた。以上の成績より、VP40 の 53 位プロリン、51 位ロイシンおよび 52 位アルギニンがエボラウイルスの粒子形成過程、特に形質膜への局在に重要な働きを持つことを明らかにしている。この知見をさらに発展させるため、VP40 の細胞内輸送機構を担う宿主蛋白質の同定を試みた。

まず、VP40 を Bait 蛋白質として用いた免疫沈降および質量分析を行った。その結果、エボラウイルス VP40 蛋白質と相互作用し得る 10 種類の宿主蛋白質が同定された。これらの中から Sec24C を選出し、さらに詳細な解析を進めることとした。その理由は、Sec24C が小胞体からゴルジ装置への小胞輸送を担う COPII 輸送の構成蛋白質 Sec24 family の一つであり、その機能からウイルス出芽機構への関与が推測されたからである。COPII 輸送は、GTPase である Sar1 がトリガーとなり Sec23/24 複合体の形成を起点に開始される。

VP40 と Sec24C が相互作用することがわかったが、両者の細胞内局在は著しく異なる。つまり、VP40 は形質膜への局在を示し、Sec24C は核周辺の小胞体領域に存在する。ところが VP40 を細胞内で共発現させると、Sec24C は形質膜下に検出され、両蛋白質は共局在していた。また、Sec24C の本来の結合相手である Sec23A も、Sec24C と同様

に VP40 の共発現によって、核周辺から形質膜下への局在変化が認められた。以上の成績より、VP40 は Sec24C のみを特異的に利用するのではなく、それが本来働いている COPII 輸送を出芽機構に利用していることが示唆された。

次に、Sec24C および COPII 輸送が VLP 放出に関与しているかを調べるため、RNAi により Sec24C または Sar1 の発現をノックダウンした 2 種類の細胞株を用いて、VLP 放出効率を比較した。Sec24C ノックダウン細胞および Sar1 ノックダウン細胞における VLP 形成効率は、コントロール細胞に比べそれぞれ約 60%低下していた。これらの成績は、Sec24C のみならず COPII 輸送も VLP 放出に関与することを示している。そこで、COPII 輸送により強力な阻害効果を持つ Sar1 の Dominant Negative 変異体を用いて COPII 輸送を阻害し、それが VLP 放出および VP40 の細胞内局在に及ぼす影響を検討した。VLP 形成効率は、Sar1 の Dominant Negative 変異体により約 90%低下し、その時 VP40 は形質膜への局在を示さず細胞質に留まっていた。つまり、COPII 輸送が VP40 の形質膜への輸送（細胞内輸送）に重要な役割を果たすことが示唆された。

さらに詳細に COPII 輸送の働きを明らかにするため、VP40 にアミノ酸変異を導入し Sec24C と相互作用出来ない変異体を作製し、それらの性状を野生型 VP40 と比較することにした。まず、VP40 と Sec24C の相互作用部位を同定するために、VP40 の欠失変異体やアラニン置換変異体を多数作製し Sec24C との相互作用を免疫沈降で検討した結果、VP40 のアミノ酸 303-307 位が相互作用部位であることが明らかとなった。この 303-307 位のアミノ酸をそれぞれアラニンに置換した相互作用不全 VP40 変異体の VLP 形成効率は著しく低下していた。また、これらの細胞内局在は主に細胞質であり、形質膜への局在を示さなかった。つまり、Sec24C と相互作用できない VP40 変異体は、VLP 形成効率の低下および形質膜への局在不全が認められた。ただし、305 位メチオニンをアラニンに置換した変異体は、Sec24C との相互作用が上昇し、形質膜への局在は認められたものの、VLP 形成効率は低下していた。これらの成績より、VP40 は Sec24C との相互作用を介して COPII 輸送を細胞内輸送機構として利用していることが示唆された。

COPII 輸送がエボラウイルス VP40 以外のウイルスマトリクス蛋白質の細胞内輸送にも用いられているのかを検討するため、単独発現により VLP を効率良く放出させるヒト免疫不全ウイルス (HIV) の gag、ラッサウイルスの Z およびマールブルグウイルスの VP40 を用いることとした。HIV の gag またはラッサウイルスの Z 発現による VLP 形成効率は、Sar1 の Dominant Negative 変異体により影響を受けなかった。一方、マールブルグウイルス VP40 発現による VLP 放出は、Sar1 の Dominant Negative 変異体により阻害され、約 70%低下していた。以上より、エボラウイルスだけでなく、マールブルグウイルスの膜蛋白質 VP40 も COPII 輸送を細胞内輸送機構として用いている可能性が示唆された。

本研究から、エボラウイルス VP40 の細胞内輸送には COPII 輸送が重要な働きをしていることが明らかとなった。VP40 の形質膜への輸送はいくつかの段階が複雑に関与したメカニズムであると示唆される。さらにエボラウイルスの出芽機構の詳細が解明されれば、抗ウイルス薬の開発の一助となることが期待される。