

論文の内容の要旨

論文題目 フィロウィルスの増殖過程に関する解析

指導教員 河岡義裕教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 17 年 4 月入学

医学博士課程

病因病理学専攻

牧野晶子

フィロウィルスはヒトを含めた霊長類に重篤な出血熱を引き起こす病原体である。フィロウィルス科に属するエボラウィルスとマールブルグウィルスはその病原性の高さから biosafety level-4 (BSL-4) に分類されるため、感染性のウィルスを用いるには BSL-4 施設と訓練された研究従事者を必要とする。それゆえフィロウィルスの増殖過程に関する基礎研究は困難がつきまとう。しかし感染性ウィルスを用いずに増殖過程の各段階について研究するさまざまな手法がこれまでに構築されてきた。本研究において申請者はフィロウィルスの出芽の過程に着目し、その機構を詳細に解明することを目的にマトリックスタンパク質の出芽に重要な領域の同定とウィルスの出芽に関与する宿主細胞の機構の解明を試みた。

マールブルグウィルス (MARV) のマトリックスタンパク質である VP40 を

細胞へ発現させるとウイルス様粒子 (VLP) が培養上清中へ放出される。MARV の VP40 は L ドメインと呼ばれる VLP 形成に重要なアミノ酸配列を介して、宿主タンパク質である Tsg101 と相互作用する。Tsg101 は後期エンドソームの一種である Multivesicular body (MVB) のソーティング経路に関与する ESCRT-I の構成タンパク質である。MARV の粒子形成は MVB でおこなわれると考えられおり、VP40 を発現させた細胞では MVB への VP40 の集積が観察される。VP40 と Tsg101 の相互作用が VP40 の MVB への集積に関与する可能性を検討するため、L ドメインをアラニンに置換した変異体を作製し、変異体の細胞内局在を評価した。その結果 L ドメイン変異体は MVB へ集積したことから、VP40 の MVB への集積には L ドメイン以外の領域が関与することが示唆された。そこで本研究においては L ドメイン以外に VLP 形成に関与し MVB への VP40 の集積に重要な領域を決定し、MARV の粒子形成機構の詳細を明らかにすることを目的とした。

VP40 の欠損変異体、アラニン置換変異体を作製しその性状解析をおこなったところ、39 位のイソロイシンと 40 位のスレオニンをアラニンに置換した変異体は VLP を形成せず、297 位のアスパラギンをアラニンに置換した変異体は VLP の形成量が減少した。またこれらの変異体は MVB へ集積しなかった。39 位のアラニン置換変異体は MVB へ集積しないが VLP は形成した。40 位のアラニン置換変異体は VLP を形成するが、野生型とは異なり細胞膜への強く結合する像が観察され、電子顕微鏡による解析でも細胞表面に VP40 と思われる電子密度の高い構造物が観察された。本研究において、L ドメイン以外に VLP 形成

と MVB への集積に関与する VP40 上のアミノ酸配列が同定された。VLP 形成のこれらの同定したアミノ酸配列を介して相互作用し VLP 形成に関与する宿主タンパク質の存在が示唆された。VP40 の MVB への集積は粒子形成過程において重要なステップであることから、上記の成績は新規抗ウイルス薬開発に有用であると考えられる。

MARV の粒子形成の場である MVB への小胞形成機構が本ウイルスの粒子形成に関与する可能性を検討するため、同機構にはたらく宿主タンパク質である Alix に着目した。MARV の VP40 は Alix と共沈降し、Alix を過剰発現した細胞では VLP 放出が促進された。また第一章で同定した VLP 形成に重要である VP40 の 297Asn をアラニンへ置換した変異体は Alix と共沈降されるタンパク質量が減少した。これらの結果から MVB への小胞形成機構は MARV の VLP 形成に関与することが示唆された。マトリックスタンパク質が Alix と結合するエンベロープ RNA ウイルスは HIV-1、EIAV などのレトロウイルスやセンダイウイルスが報告されており、Alix を標的とすることは広範囲に効果を示す抗ウイルス戦略であると考えられる。

以上、本研究ではマールブルグウイルスの出芽過程に主な役割を果たすウイルスタンパク質の性状解析と出芽に関与する宿主機構を明らかにした。これらの知見はフィロウイルスの増殖過程に新たな知見をもたらす今後さらなる基礎研究また抗ウイルス戦略への応用につながると考えられる。