

論文の内容の要旨

論文題目 エボラウイルス感染に関わる表面糖蛋白質の構造的特徴と分子機能

氏名 宇佐美 克明

[序論]

エボラウイルス(EBOV)は、ヒトや霊長類に重篤な出血熱を引き起こすウイルスである。EBOVには、異なる時期に異なる場所で単離された *Zaire*, *Sudan*, *Ivory Coast*, *Reston* の4つの亜型が報告されている。*Zaire* EBOV(ZEBOV)は、ヒトに90%近い致死率をもたらすが、*Reston* EBOV(REBOV)はヒトに感染するものの、致死性は報告されていない。これまでにZEBOVの病原性・感染性について多くの研究がなされてきたが、「何故、ZEBOVはREBOVに比べて病原性が高いのか？」についてはよく知られていなかった。本研究では、上記の問いに答えることを目的とした。

EBOVの表面には、唯一の表面蛋白質として、単一遺伝子産物であるグリコプロテイン(GP)から開裂して生じる2つのサブユニットGP1とGP2が複合体を形成し存在する(図1)。GP遺伝子のみをEBOV由来として作出した疑似ウイルスを用いて単球由来未成熟樹状細胞への感染実験を行った結果、ZEBOVとREBOVの感染性の違いがGPの構造と機能のみによって決定されることが強く示唆された。また、この感染はマクロファージガラクトース型C型レクチン(MGL)のブロック抗体によって有意に阻害されたことから、GPとMGLとの相互作用がEBOV感染に重要な役割を示すことが明らかとなった。

本研究では、ZEBOVとREBOVにおけるGP1の33th-50thのアミノ酸残基の違いが、細胞表面のMGLとEBOV GPの結合性を決定すること、GP2の1アミノ酸の違いが細胞内に取り込まれたEBOVのエンドソームとの膜融合過程に重大な影響を及ぼす可能性が高いことを明らかにした。

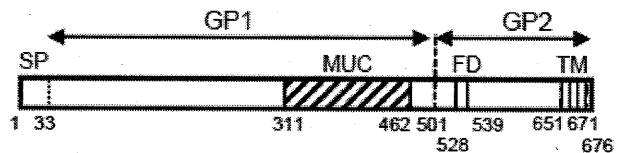


図1 GPのドメイン概略図

SP: シグナルペプチド、MUC: ムチン様領域、

FD: fusion domain、TM: transmembrane

[本論]

(第1章) 細胞表面 MGL との結合性と感染性を規定する GP1 の構造的な特徴と ZEBOV と REBOV の違い

1. EBOV GP1 に対する MGL の結合性は、EBOV の MGL 強制発現細胞への感染性と相関する

感染性の高い ZEBOV と Sudan EBOV(SEBOV) 疑似ウイルス、感染性の低い REBOV 疑似ウイルスを、MGL を強制発現した K562 細胞株(K562-MGL)へ感染させた。その結果、ZEBOV および SEBOV は、REBOV に比べて有意に感染価が高かった(図 2A)。また、これらの疑似ウイルス上の GP1 に対して、MGL を用いてレクチンプロットを行った。その結果、ZEBOV および SEBOV GP1 への MGL の結合性は、REBOV GP1 に比べて有意に高かった(図 2B)。これらの結果から、EBOV GP1 に対する MGL の結合性は、EBOV 疑似ウイルスの MGL 強制発現細胞への感染性と相関することがわかった。

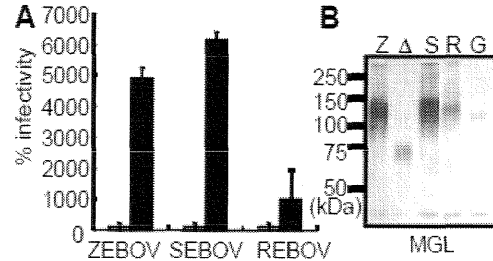


図 2 EBOV の感染性と GP1 への MGL の結合性

A) 感染実験 □: K562-mock, ■: K562-MGL,

B) MGL によるプロットニング, Z: ZEBOV, Δ: ZEBOV ΔMUC, S: SEBOV, R: REBOV, G: コントロール

2. ムチン様領域以外のドメインが ZEBOV と REBOV の感染性の違いに寄与する

GP1 には、N-結合型糖鎖・O-結合型糖鎖に富むムチン様領域が存在し、当領域のアミノ酸シーケンスは ZEBOV と REBOV で非常に異なる。従って、ZEBOV と REBOV の感染性の違いが、このムチン様領域によるものである可能性に先ず注目した(図 3A)。ZEBOV GP のムチン様領域を REBOV GP のそれに入れ換えた R311-462 疑似ウイルスの K562-MGL への感染は、ZEBOV 疑似ウイルスとほぼ同程度の感染性を示した(図 3B)。更に R311-462 に対する MGL の結合性は、ZEBOV GP と同程度だった(図 3C)。また、ムチン様領域近傍も含めて大きく入れ換えた R297-462、R260-462、R187-462 に対する MGL の結合性も ZEBOV GP と同程度であり、これらの疑似ウイルスの感染性も ZEBOV 疑似ウイルスと同等、もしくはそれ以上の感染性を示した(図 3B、C)。一方、GP1 の大半を ZEBOV から REBOV に

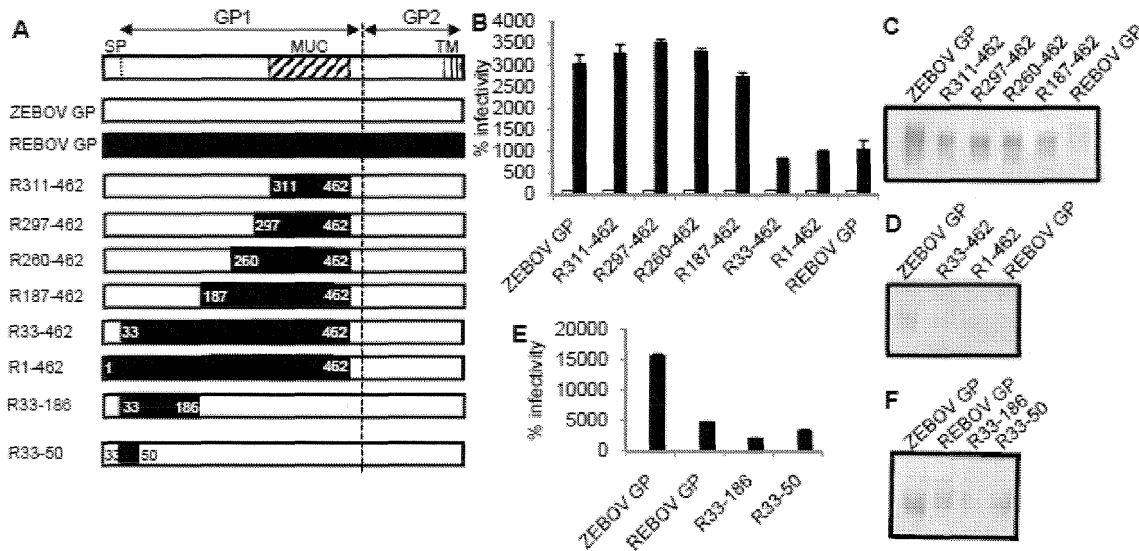


図 3 GP1 キメラ疑似ウイルスの感染性と MGL の結合性

A) キメラ GP のスキーム、B、E) 感染実験 □: K562-mock, ■: K562-MGL、C、D、F) キメラ GP1 に対する MGL の結合性

入れ換えた R33-462 に対する MGL の結合性が ZEBOV GP に比べて減少した(図 3C)。更に、この擬似ウイルスの感染性は、ZEBOV 擬似ウイルスに比べ、劇的に減少した(図 3B)。これらの結果から、いわゆるムチン様領域ではなく、GP1 の 33th-186th のアミノ酸残基が MGL との相互作用を通して感染性の違いを決定することが明らかとなった。実際に、GP1 の 33th-186th のアミノ酸残基のみを REBOV に入れ換えた擬似ウイルスは ZEBOV 擬似ウイルスに比べて劇的に減少し、R33-186 に対する MGL の結合性は ZEBOV GP に比べて劇的に減少した(図 3E, F)。更に GP1 の 33th-50th のアミノ酸残基のみを入れ換えるだけでも感染性および MGL の結合性は減少した(図 3E, F)。このことから、GP1 の 33th-50th のアミノ酸残基が ZEBOV と REBOV の感染性の違いを決めていることが明らかとなり、この部位がムチン様領域のグリコシレーションを制御していることが予想された。

3. ZEBOV GP と REBOV GP の MGL との結合性の差異は O-結合型糖鎖の構造に依存する

これらの GP において、MGL が結合する構造の特性を解明するために、ウイルス粒子上の N-結合型糖鎖を PNGaseF で切り出し、この前後の GP1 への MGL の結合性をレクチンプロットで調べた。その結果、N-結合型糖鎖切断前後で MGL の結合性は変化しなかった(図 4A)。このことから、MGL は N 結合型糖鎖ではなく、O-結合型糖鎖を認識していることが明らかとなった。また、N-アセチルガラクトサミン(GalNAc)で GP1 に対する MGL の結合性は阻害されたことから、この結合は糖鎖依存的事であることがわかった(図 4B)。

ZEBOV および REBOV GP 上に存在する O-結合型糖鎖の構造的な違いを調べるために、これらの GP から O-結合型糖鎖を切り出し、安息香酸で標識後、MALDI-TOF MS とキャピラリー電気泳動の組み合わせを用いて解析した。その結果、構造の異なる複数の糖鎖が含まれていたが、Tn 抗原(GalNAc-Ser/Thr)の含量が ZEBOV GP の方が高いことがわかった(図 5)。

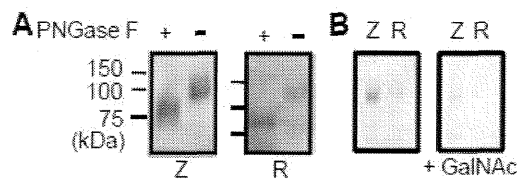


図 4 MGL の GP 上の糖鎖への結合性

A) PNGaseF 消化した GP に対する MGL プロット、
B) MGL プロットing の GalNAc 阻害、Z:ZEBOV、
R:REBOV

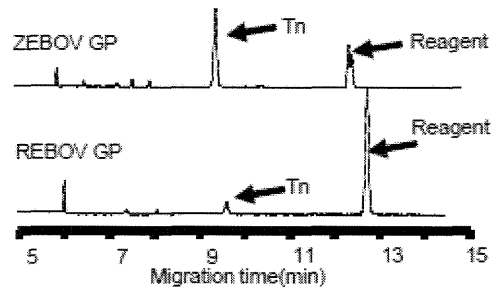


図 5 ZEBOV および REBOV GP の O-結合型糖鎖のうちの Tn 抗原のキャピラリー電気泳動

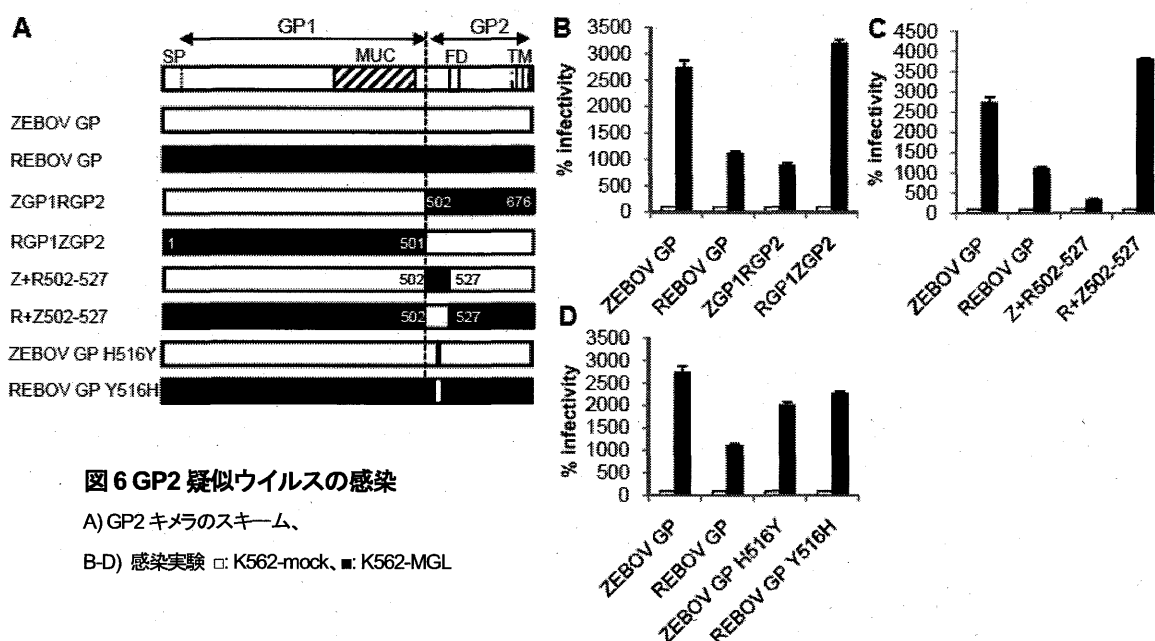
(第 2 章) ZEBOV と REBOV GP2 の構造的な違いと感染性への影響

1. GP2 は ZEBOV と REBOV の感染性の違いを生む

ZEBOV と REBOV の感染性の違いにおいて、GP2 の構造的な差異が関与するかどうかを調べるために、GP2 を相互に入れ換えた擬似ウイルスを作出し、K562-MGL への感染性を調べた。その結果、GP2 を ZEBOV から REBOV に入れ換えることで、擬似ウイルスの感染が ZEBOV 擬似ウイルスに比べて劇的に減少した。また GP2 を REBOV から ZEBOV に入れ換えると、擬似ウイルスの感染が REBOV 擬似ウイルスよりも劇的に上昇した(図 6A, B)。このことから、GP2 が GP1 とともに ZEBOV と REBOV の感染性の違いを決める因子であることが示唆された。更に、GP2 のどの部位がこれらの感染性の違いに寄与するかを調べた結果、ZEBOV GP2 の 502th-527th のアミノ酸残基を REBOV のそれに入れ換えた擬似ウイルスの感染が ZEBOV 擬似ウイルスに比べ劇的に減少した。一方、REBOV GP2 の 502th-527th のアミノ酸残基を ZEBOV のそれに入れ換えた擬似ウイルスの感染は、REBOV 擬似ウイルスに比べ劇的に上昇した(図 6A, C)。従って、GP2 の 502th-527th のアミノ酸残基が ZEBOV と REBOV の感染性の違いに重要な役割をもつことがわかった。

2. ZEBOV GP H516 が ZEBOV と REBOV の感染の違いに関する

最近報告された ZEBOV GP の X 線結晶構造解析から、2 つの逆β 平行ストランド(β19、β20)の間に形成された FD 構造の中で、H516 はβシート 19 内に存在するアミノ酸であることが明らかにされた。GP H516 と相互作用すると考えられるアミノ酸はβシート 20 の GP E545 であり、これらは低 pH 環境で塩橋を形成しやすいことが予想された。そこで、GP2 の 502th-527th のアミノ酸残基の中で、516 番目を相互に入れ換えた疑似ウイルスを作出し、感染性を調べたところ、ZEBOV GP H516Y 疑似ウイルスの感染性は ZEBOV 疑似ウイルスに比して減少し、一方で REBOV GP Y516H 疑似ウイルスの感染性は、REBOV 疑似ウイルスに比べ上昇することがわかった(図 6A, D)。このことから、少なくとも 516 番目のヒスチジン残基は ZEBOV と REBOV の感染性の違いに関与することが示唆された。



[結論と考察]

本研究において私は、ZEBOV と REBOV の感染性の違いが GP の限られた部分のアミノ酸配列の違いによることを明らかにした。また、MGL が結合する GalNAc 含量の違いがこれらの感染性の違いを生むことを明らかにした。GP1 の 33th-50th のアミノ酸残基は MGL の結合性を決定している。これは、GP1 全体の O-結合型糖鎖の構造(特に Tn 抗原)および含有量がこの部分に制御されることによると考えられ、ウイルスの最初のステップに必要な細胞表面への結合を規定すると考えられる。

更に、GP2 の 516 番目のヒスチジン残基が ZEBOV と REBOV の感染性の違いを生み出すことを見いだした。H516 がウイルス膜とエンドソーム膜の融合の過程、すなわちウイルス感染初期の第 2 のステップに影響すると考えられる。このステップでは、エンドソーム内で GP1 がカテプシン L/B により切断を受け、露出した GP2 がエンドソームとの膜融合を起こす。ZEBOV GP の結晶構造を基にしたモデリングにおいて、H516 は GP1 のカテプシン切断部位との距離が近いことがわかった。このことから、H516 は GP1 のカテプシン感受性にも影響しているのかもしれない。

これら 2 つの結果は、EBOV の感染性についての新たな知見を与えるとともに、新たな治療薬の開発にも繋がるものと考えている。