

審査の結果の要旨

氏名 宇佐美 克明

「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」と題する本論文は、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エボラウイルス(EBOV)の糖蛋白質のアミノ酸配列に、このウイルスが高い致死的な感染性を持つ原因が隠されている事を解明するに至った経緯が述べられている。EBOVには、異なる時期に異なる場所で単離された4つの亜型が報告されているが、そのうち *Zaire* EBOV(ZEBOV)は、ヒトに90%近い致死率をもたらすが、*Reston* EBOV(REBOV)はヒトへの感染性は軽微で、致死性は報告されていない。これまで何故、ZEBOVはREBOVに比べて致死的な感染を起こす病原性が高いのかについてはよく知られていなかった。EBOVの表面に存在する唯一の蛋白質は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。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の感染性の違いが示され、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)のブロッキング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。これらの知見を背景として、ZEBOVとREBOVの間のGP1及びGP2の配列の違いが感染の成立に至る過程における役割を解明した。

第1章では、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の違いについて追求した結果が述べられている。感染性の高いZEBOVと感染性の低い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は、REBOVに比べて有意に感染価が高かった。また、これらの疑似ウイルス上のGP1に対して、MGLを用いてレクチンブロットを行った。その結果、ZEBOVのGP1へのMGLの結合性は、REBOV GP1に比べて有意に高かった。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推定された。

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。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。更にR311-462に対するMGLの結合性は、ZEBOV GPと同程度だった。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。一方、GP1の大半をZEBOVからREBOVに入れ換えたR33-462に対するMGLの結合性がZEBOV GPに比べて減少した。更に、この疑似ウイルスの感染性は、ZEBOV疑似ウイルスに比べ、劇的に減少した。これらの結果から、いわゆるムチン様領域ではなく、GP1の33から186番目のアミノ酸残基が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33から186番目のアミノ酸残基のみをREBOVに入れ換えた疑似ウイルスはZEBOV疑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。更にGP1の33から50番目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。このことから、GP1の33から50番目のアミノ酸残基がムチン様領域のグリコシル化を制御し、これを通してZEBOVとREBOVの感染性の違いを決めていることが明らかとなった。

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ブロットで調べ

た結果、*N*-結合型糖鎖切断前後で MGL の結合性は変化しなかった。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であることがわかった。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。

第 2 章では ZEBOV と REBOV GP2 の構造的な違いと感染性への影響について追求した結果が述べられている。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疑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、疑似ウイルスの感染が ZEBOV 疑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、疑似ウイルスの感染が REBOV 疑似ウイルスよりも劇的に上昇した。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 502-527 番目のアミノ酸残基を REBOV のそれに入れ換えた疑似ウイルスの感染が ZEBOV 疑似ウイルスに比べ劇的に減少した。一方、REBOV GP2 の 502-527 番目のアミノ酸残基を ZEBOV のそれに入れ換えた疑似ウイルスの感染は、REBOV 疑似ウイルスに比べ劇的に上昇した。従って、GP2 の 502-527 番目のアミノ酸残基が 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。

GP2 の 502-527 番目のアミノ酸残基の中で、H516 は β シート 19 内に存在するアミノ酸であることが GP2 の構造から予想されたので、516 番目のアミノ酸を ZEBOV と REBOV との間で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。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。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。

本研究において、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が明らかにされた。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 33-50 番目のアミノ酸残基は 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た。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され、GP2 の安定性を通してウイルス感染に必須な膜融合の過程に大きく影響する事が示唆された。これらの結果は、EBOV の感染性についての新たな知見を与え、糖鎖生物学、ウイルス学、及び免疫学に資するところが大きい。よって、これらの研究を行った宇佐美克明は博士 (薬学) の学位を得るにふさわしいと判断した。