

論文の内容の要旨

論文題目

Studies on the Mechanisms of Ebola Virus Replication

エボラウイルス増殖メカニズムの解析

指導教官 河岡 義裕 教授

東京大学大学院医学系研究科 医学博士課程 病因・病理学専攻

平成 19 年 4 月入学

氏名 岩佐 彩香

エボラ出血熱は、モノネガウイルス目、フィロウイルス科に属する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急性熱性疾患である。その致死率は極めて高く、社会的に深刻な被害をもたらしている。しかし、エボラウイルスは、Biosafety Level (BSL) 4 施設で取り扱わなければならない病原体であるため、その研究の進展は遅れており、ウイルス増殖メカニズムにおいても不明な点が多い。そのため、エボラウイルスに対する効果的な予防および治療法は確立されていない。そこで、本研究では、エボラウイルスの増殖過程における、ウイルス蛋白質の働きや宿主因子の役割を詳細に解析することによって、本ウイルスの増殖メカニズムを解明することを目的とする。本研究で得られる結果は、エボラウイルスに対する治療法や予防法の開発に役立つことが期待さ

れる。

まず、エボラウイルス特異的な蛋白質 secreted glycoprotein (sGP) に着目し、研究を行った。エボラウイルスの sGP 蛋白質は、膜貫通型 GP 蛋白質の N 末端側の GP₁ 部分と 295 アミノ酸が共通する糖蛋白質である。sGP は、ウイルス非構造蛋白質として認識されており、分泌型ホモ二量体として存在し、TNF- α による血管内皮障害を阻害することが報告されている。しかし私は、GP 蛋白質に特異的な中和抗体が sGP 蛋白質と思われる蛋白質を免疫沈降すること、sGP mRNA が RNA 編集により産生される GP mRNA の約 3 倍産生されること、GP 蛋白質の N 末端側の GP₁ 部分が単独で放出されることなどの報告から、“GP が GP 蛋白質の C 末端側の GP₂ 部分と結合し膜貫通型の糖蛋白質を形成している”という仮説を立てた。本研究ではプラスミドより各蛋白質を発現させ、この仮説の検証を行った。

sGP がエボラウイルスの virus-like particle (VLP) に取り込まれるかを調べるために、sGP, GP 蛋白質発現プラスミドを VP40, NP 蛋白質発現プラスミドとともに 293T 細胞に導入して VLP を産生させ、2 回 超遠心して回収したものをウェスタンブロットで解析した。GP 特異的中和抗体 KZ52 (GP₁ と GP₂ が形成する立体構造を認識) との反応性は FACS で測定した。感染性や中和能については水疱性口炎ウイルス由来のシェードタイプウイルス VSV Δ G*を用いて検討した。

VLP のウェスタンブロットでは、全長 GP(175kDa) のみでなく sGP(50kDa) と GP₂(25kDa) が SS 結合していると考えられるバンド(75kDa) が検出された。FACS 解析では KZ52 抗体は全長 GP のみでなく sGP と GP₂ を共発現させた細胞にも反応した。sGP 単独発現や GP₂ 単独発現の細胞には KZ52 抗体は反応しなかった。sGP と GP₂ を共発現させ作製した VSV Δ G*(sGP+GP₂) は Vero E6 細胞で感染性を示し、VSV Δ G*(GP) と同様に濃度依存的に KZ52 抗体で中和された。sGP と GP

を共発現させて作製した VSV Δ G*(sGP+GP)は GP 単独の VSV Δ G*(GP)と比べ 0.5-1 log 低い感染価を示した。

これらの結果から、GP 蛋白質内で形成される GP₁-GP₂間の SS 結合のように、SS 結合により sGP と GP₂の間で二量体を形成し、構造蛋白質としてエボラウイルスの感染に関与すると考えられた。今後、本物のウイルスを用いてこの現象がみられるかを検討する必要がある。

次に、エボラウイルスの増殖過程をより深く理解するため、エボラウイルス蛋白質と相互作用する宿主細胞側の因子を同定し、その宿主因子がエボラウイルスの生活環にどのように関わっているかを検討した。

VP24 蛋白質は、マイナーマトリックス蛋白質として知られる、エボラウイルスの構造蛋白質である。VP24 の役割としては、インターフェロン抵抗性を示すこと、ヌクレオカプシド形成に必要なこと、ウイルスゲノムの転写・複製を阻害することなどが報告されている。本研究では、より詳細な VP24 の機能を調べるために、この蛋白質と相互作用する宿主蛋白質の同定を試みた。

まず、VP24 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 VP24 蛋白質と相互作用する 68 種類の宿主蛋白質が同定された。これらの中から、私は、Sec61 α に着目し、さらに詳細な解析を進めた。その理由は、VP24 は核周辺および細胞膜に局在するが、Sec61 α は ER に存在するため、核近傍で相互作用する可能性が高いと推測されたからである。VP24 と Sec61 α の相互作用および核周辺での共局在を確認した。

Sec61 α がエボラウイルス増殖に関わっているかどうかを調べるために、RNAi 法により Sec61 α の発現をノックダウンした細胞に、Ebola Δ VP30 ウイルスを感染させた。本実験は、共同研究者のウイスコンシン大学の Dr. Peter Halfmann に

よって行われた。その結果、Sec61 α の発現をノックダウンした細胞では、ネガティブコントロールに比べて、Ebola Δ VP30 ウイルスの増殖効率が低下していた。この結果は、Sec61 α がエボラウイルス増殖に重要な役割を果たすことを示している。

上述のように、VP24 は、1) インターフェロン抵抗性、2) ヌクレオカプシド形成、3) エボラウイルスゲノムの転写・複製の阻害に関わることが報告されている。そこで、これらの VP24 の機能への Sec61 α の関与を調べるため、RNAi 法により Sec61 α の発現をノックダウンした 293 細胞において、1) ~ 3) の効率を調べた。その結果、Sec61 α は、インターフェロン抵抗性およびヌクレオカプシド形成には関与しないことが分かった。それに対して、Sec61 α ノックダウン細胞では、VP24 によるエボラウイルスゲノムの転写・複製の阻害能が低下しており、この結果は Sec61 α が VP24 の転写・複製の阻害能に関与することを示している。興味深いことに、Sec61 α ノックダウン細胞では、VP24 非存在下でも、転写複製効率が 約 50-60%低下していた。この結果は、Sec61 α が、VP24 の機能とは別に、ウイルスポリメラーゼ活性に関与する可能性を示唆している。

さらに、私は、VSV Δ G*EbolaGP シュードタイプや iVLP の系を用いて、Sec61 α がウイルスの侵入や出芽のステップに関与するかどうかを調べた。その結果、Sec61 α はウイルスの侵入や出芽には関与しないことが分かった。

本研究から、これまで非構造蛋白質として考えられてきたエボラウイルスの sGP が構造蛋白質としてエボラウイルスの感染性に関与する可能性が示唆された。また、Sec61 α という宿主因子がエボラウイルスの増殖に重要な働きをしていることが明らかとなった。本研究のように、ウイルス側と宿主側の両方のサイドから研究を進めることは、統合的にウイルス増殖メカニズムを理解することにつながり、抗ウイルス薬の開発の一助となることが期待される。