

論文の内容の要旨

論文題目 Identification of Host Factors that Affect the Ebola Virus RNA
Polymerase Protein

(エボラウイルス RNA 合成酵素の活性に影響する宿主因子の同定)

氏名 高橋 慧

マールブルグウイルスと共にフィロウイルス科に属するエボラウイルスは、ヒトを含む霊長類に感染し、重篤な出血熱を引き起こす。現在、Zaire, Sudan, Ivory Coast, Bundibugyo, Reston の 5 種に分類されている。中でも Zaire のヒトへの病原性は極めて高く、その致死率は時に 90%にも達する。1976 年、スーダン南部の Nzara 及びコンゴ共和国 (旧ザイール) 北部の Yambuku において、エボラウイルスは初めてその存在が報告された。それ以降、エボラ出血熱は中央及び西アフリカを中心に散発的な発生を繰り返し、2012 年 5 月までに 2,299 人の感染と 1,540 人の死亡が報告されている。2012 年の夏には、ウガンダ共和国でエボラ出血熱が発生し、50 名以上の死者が報告されている。一方、2008 年から 2009 年にかけて、フィリピン共和国において、ヒトに対して低病原性の Reston がヒトやブタに感染していた事が確認された。さらに、近年、インドネシアに棲息するオランウータンが、エボラウイルスおよびマールブルグウイルスに対する特異的抗体を有することが報告された。これらのことから、アフリカ大陸以外の地域においてもエボラ出血熱が発生する可能性が示唆された。しかし、エボラウイルスが有する病原性の高さから、感染性ウイルスを使用した研究は世界で約 40 基しか稼働していない biosafety level 4 (BSL4) 施設を使用しなければならず、その研究は十分に進展していない。そのため、エボラ出血熱に対する予防法及び治療法は、現在に至るまで確立されていない。今後、エボラウイルスの増殖機構の詳細を明らかにする事で、予防法ならびに治療法を確立することができると考

えられる。

エボラウイルスが宿主細胞で増殖する際、様々な宿主因子を必要とする。ウイルスの細胞侵入には Niemann-pick C1 や T-cell immunoglobulin and mucin domain 1 等が重要な役割を担う。また、ウイルス粒子の出芽には、Nedd4、VPS4 や Tsg101 などの宿主蛋白質が関与している。しかし、宿主細胞内へ侵入した後、どのような宿主因子を利用してウイルスゲノムの転写あるいは複製が行われているかについては分かっていない。そこで本研究では、エボラウイルスゲノムの転写及び複製に関わる宿主蛋白質の同定と、ウイルス増殖環におけるその作用機構の解明を目的とした。

エボラウイルスゲノムの転写・複製は、ウイルス核蛋白質 (NP)、VP35、VP30、L 蛋白質、およびウイルスゲノム RNA から構成されるヌクレオキャプシドが担う。ヌクレオキャプシドを構成するウイルス蛋白質のうち、L 蛋白質は RNA 依存性 RNA ポリメラーゼとして機能する。そこで、L 蛋白質と相互作用する宿主蛋白質の中から、エボラウイルスゲノムの転写・複製に関わる因子の同定を試みた。初めに、FLAG タグを付加した L 蛋白質を用いて pull down assay を行い、L 蛋白質と物理的に相互作用する宿主因子を得た。それら宿主因子を質量解析法によって同定した結果、65 種類の宿主蛋白質を同定した。次に、質量解析により同定した宿主蛋白質の中から、siRNA を用いて、ウイルス RNA ポリメラーゼの活性に影響を及ぼす宿主蛋白質を同定した (siRNA screening)。ウイルス RNA ポリメラーゼ活性の測定には、その活性をレポーター蛋白質の発現量で評価する minigenome assay を用いた。その結果、エボラウイルスの RNA ポリメラーゼ活性を有意に低下させる宿主因子として、10 種類の宿主蛋白質を同定した。同定した宿主蛋白質の中から、ホスホジエステル結合の切断及び再結合を介して核酸のねじれ構造を解消する DNA Topoisomerase 1 (TOP1)に着目した。

L 蛋白質を発現する細胞において、TOP1 が L 蛋白質と相互作用するかどうかを免疫沈降法によって検証したところ、TOP1 と L 蛋白質との共沈降が確認された。エボラ

ウイルスゲノムの転写・複製が細胞質で行われるのにも関わらず、核に局在する TOP1 と L 蛋白質の相互作用が確認されたことから、次に、細胞内のどこで TOP1 と L 蛋白質が相互作用するのかを蛍光顕微鏡法により解析した。その結果、L 蛋白質発現細胞において、TOP1 は核だけでなく細胞質にも局在する事が分かった。更に、ヌクレオキャプシドを構成する蛋白質である NP、VP35、VP30 を L 蛋白質と共に発現させると、TOP1 はエボラウイルスゲノムの転写・複製の場である inclusion body に局在し、L 蛋白質と共局在した。しかし、L 蛋白質以外のヌクレオキャプシド構成蛋白質を発現する細胞では、TOP1 は細胞質に認められなかった。これらの結果から、L 蛋白質存在下では、TOP1 が細胞質に局在し、細胞質において L 蛋白質と相互作用する事が示された。

次に TOP1 のホスホジエステルの切断能及び再結合能がエボラウイルスゲノムの転写・複製に関与するかどうかを調べた。まず、TOP1 の核酸切断能の関与について検討した。siRNA を用いて TOP1 の発現を抑制し、その後 siRNA 非感受性の野生型 TOP1 蛋白質を発現させたところ、ウイルス RNA ポリメラーゼの活性は著しく回復した。しかし、TOP1 の発現を抑制した後に、核酸切断能力を欠損した変異 TOP1 を発現させたところ、ウイルス RNA ポリメラーゼの活性は殆ど回復しなかった。次に、TOP1 の核酸再結合能がエボラウイルスゲノムの転写・複製に関与するかどうかを調べるため、核酸再結合を特異的に阻害する薬剤である CPT-11 を用いて、ウイルス RNA ポリメラーゼの活性に与える影響を調べた。その結果、CPT-11 の濃度依存的に、エボラウイルスのウイルス RNA ポリメラーゼ活性は低下した。これらの結果から、TOP1 の核酸切断能及び再結合能がエボラウイルスゲノムの転写・複製に関与する事が示された。

今度は、VP30 遺伝子欠損エボラウイルスを用いて、TOP1 の発現抑制がウイルス増殖に影響を与えるかどうかを調べた。VP30 遺伝子欠損エボラウイルスは、VP30 遺伝子をレポーター遺伝子に置き換えた変異エボラウイルスゲノムを持つウイルスであり、VP30 蛋白質を発現する細胞では増殖できるが、VP30 蛋白質を発現していない細胞では増殖しな

い。VP30 発現細胞において、siRNA を用いて TOP1 の発現を抑制すると、VP30 欠損エボラウイルスの増殖は有意に抑制された。以上の結果より、TOP1 は L 蛋白質と細胞質において相互作用すること、また、ホスホジエステル結合の切断能及び再結合能を介してエボラウイルスゲノムの転写・複製、ならびにウイルス増殖に関わる事が示された。

また、siRNA screening の結果から、Peroxisome P2 (PRDX1)あるいは Vimentin (VIM)の発現が抑制された細胞でも、エボラウイルスの RNA ポリメラーゼ活性が低下することが明らかとなった。しかし、これら宿主因子と L 蛋白質との物理的な相互作用を免疫沈降法によって確認することは出来なかった。

本研究により、エボラウイルスゲノムの転写・複製を担う宿主因子として、TOP1 を同定した。エボラウイルスゲノムの非翻訳領域に TOP1 が認識しうる RNA 配列が存在する事、さらに、TOP1 の核酸切断能及び再結合能がエボラウイルスゲノムの転写・複製に関与する事から、TOP1 はエボラウイルスのゲノム RNA を直接認識し結合すると考えられる。また、PRDX1 はエボラウイルスと同じ非分節型マイナス鎖一本鎖 RNA をゲノムに持つ麻疹ウイルスにおいても、ゲノム RNA の転写・複製に関わる宿主因子であることが報告されている事、VIM はエボラウイルスゲノムの転写・複製の場である inclusion body に局在する宿主蛋白質であることから、これらの宿主因子もエボラウイルスゲノムの転写・複製に関わる宿主因子であることが示唆される。

今後、エボラウイルスの増殖環における上記宿主因子の作用機序を更に解析する必要があるが、本成果はエボラ出血熱に対する有効な治療薬を開発するための一助となると考えられる。