

論文の内容の要旨

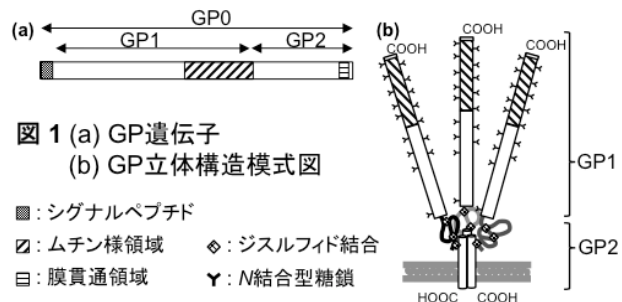
論文題目 エボラウイルス糖タンパク質に対する糖鎖修飾制御

氏名 藤平 陽彦

研究背景と目的

エボラウイルス(EBOV)はヒトを含む霊長類に感染し、重篤な出血熱を惹起する。現在までに、Zaire、Sudan、Ivory Coast、Bundibugyo、Reston の 5 つのウイルス種の存在が報告されており、ウイルス種によってヒトに対する致死性、感染性が異なる。例えば、Zaire EBOV(ZEBOV)はヒトに対して 88%の致死性を示すのに対し、Reston EBOV(REBOV)はこれまでに死亡報告が無い。なぜ異なるウイルス種間で致死性・感染性が異なるのかは不明であるが、EBOV の感染において、ウイルス表層の糖タンパク質(GP)が決定的な役割を担うことは明らかであった。

GP は、2 つのサブユニット GP1 と GP2 がウイルス表層に複合体を形成して存在し、GP1 には N 結合型糖鎖と O 結合型糖鎖に富むムチン様領域が存在する(図 1a, b)。水疱性口内炎ウイルス(VSV)の GP 遺伝子のみを EBOV 由来として作出した擬似ウイルスを用いた単球由来未成熟樹状細胞に対する感染実験の結果、ZEBOV の GP(ZGP)をまとった擬似ウイルスの方が、REBOV の GP(RGP)をまとった擬似ウイルスよりも感染性が高く、この感染がヒト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ることが先行研究で示された。この結果より、ZEBOV と REBOV の感染性の違いが GP の構造的な特徴によって決定されること、GP と MGL の相互作用が EBOV の感染に重要な役割を果たすことが示された。



本研究では、MGL を介した ZEBOV と REBOV の間の感染性の違いに着目し、これが GP の特定の amino 酸配列によって規定されていること、この配列が GP の生合成過程で糖鎖の構造的差異を生じさせることを明らかにし、その糖鎖修飾制御メカニズムの解明を目指した。

実験結果・考察

1. EBOV の異なるウイルス種間における MGL を介した感染性の違いを決定付ける GP の構造的な特徴の同定

第一に、ZEBOV、REBOV の MGL を介した感染性の違いを決定付ける GP の構造的な特徴 (amino 酸配列) の同定に取り組んだ。先行研究の結果から、VSV 改変擬似ウイルスの MGL 発現細胞に対する“感染性”と GP と MGL との“結合性”の間には正の相関 (より感染性の強いものほどより強く MGL と結合する) があること、ムチン様領域が感染性と MGL 結合性に必須であること、しかし、ムチン様領域の amino 酸配列の違いは ZEBOV、REBOV 間の感染性と MGL 結合性の違いに影響しないことが示されていた。これらの結果と amino 酸配列の相同性から、本研究では GP の N 末端側の 33-50、33-186 番目の amino 酸配列に着目した。ZGP と RGP の N 末端側 33-50、または、33-186 番目の amino 酸配列を互いに置換したキメラ型 GP を作製し、感染性、MGL との結合性を評価した。

その結果、ZGP の一部を RGP の配列に置換したキメラ型 GP (R33-50、R33-186) では感染性、結合性が減少し、逆に RGP の一部を ZGP の配列に置換したキメラ型 GP (Z33-50、Z33-186) では感染性、結合性が増加した (図 2a, b)。以上の結果から、GP の N 末端側の 33-50 番目という、わずか 18 amino 酸配列が ZEBOV と REBOV の MGL を介した感染性の違いに重要であることが示された。

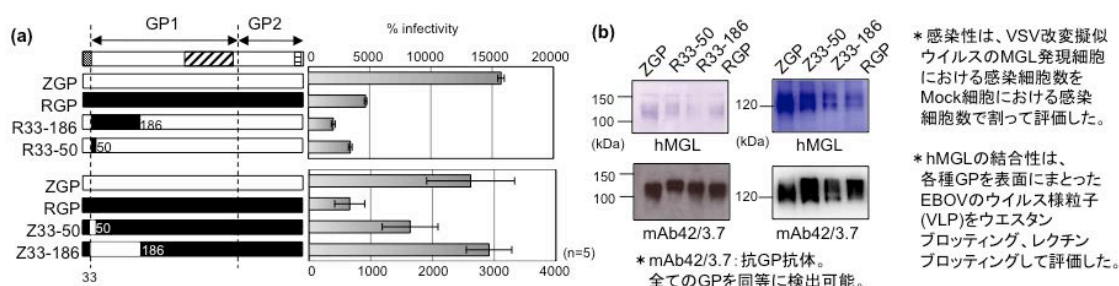
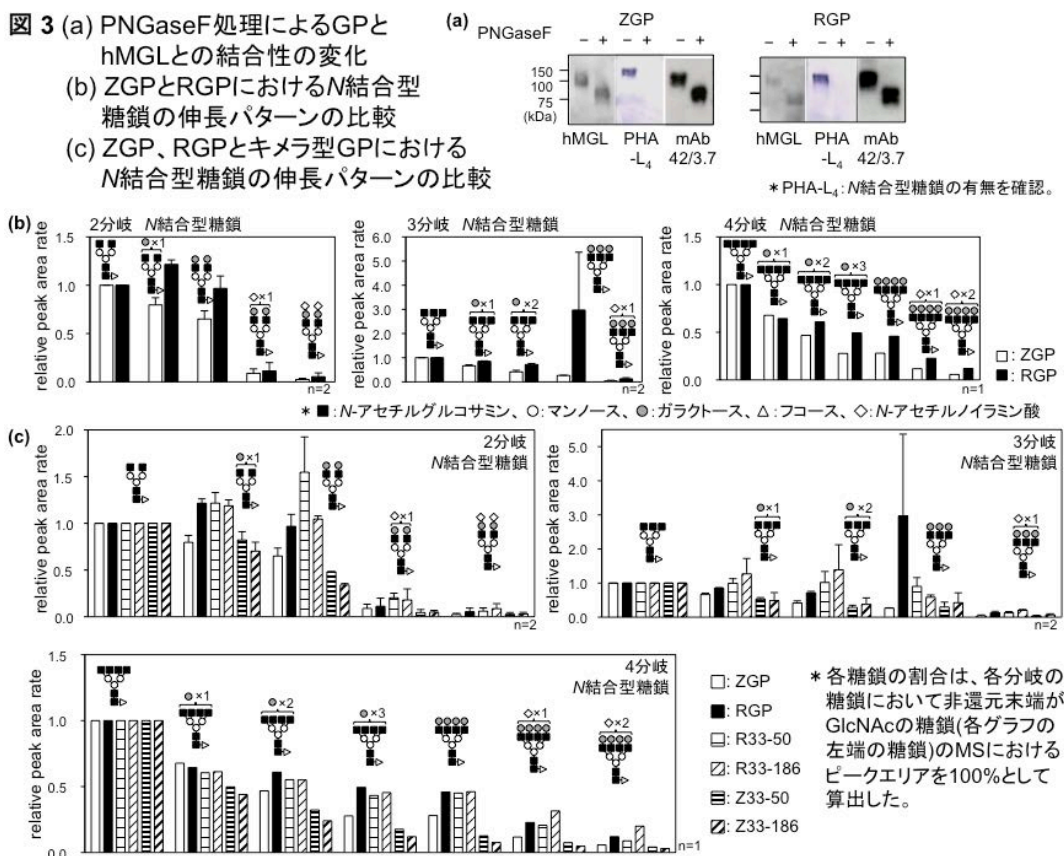


図 2 (a) VSV改変擬似ウイルスのhMGL発現細胞に対する感染性
(b) EBOVのウイルス様粒子(VLP)上に提示された各種GPとhMGLとの結合性

2. GP の一部の amino 酸配列が糖鎖修飾に与える影響の解明

GP と MGL との結合性は GP の糖鎖の構造的な特徴によって直接、または、間接的に制御されると仮定し、GP の N 末端側 33-50、33-186 番目の amino 酸配列が GP への糖鎖修飾に与える影響の解明に取り組んだ。GP には N 結合型、O 結合型糖鎖の 2 種類の糖鎖が付加されている。糖タンパク質から N 結合型糖鎖のみを特異的に切り出す糖分解酵素、Peptide: N-glycosidase F (PNGaseF) で ZGP、RGP を処理した前後での GP への MGL の結合性の変化を調べた結果、ZGP では N 結合型糖鎖を除去しても MGL の結合性が変化しないのに対し、RGP では N 結合型糖鎖の除去によって MGL の結合性が増加した (図 3a)。この結果を受け、GP に付加された N 結合型糖鎖の構造を解析した。N 結合型糖鎖の伸長パターンに着目すると、ZGP に比べ RGP では伸長した N 結合型糖鎖の割合が多いことがわかった (図 3b)。さらに、ZGP の一部を RGP の配列に置換した R33-50 と R33-186

の糖鎖構造を見ると、伸長した *N* 結合型糖鎖の割合が増加した。一方、RGP の配列の一部を ZGP の配列に置換した Z33-50、Z33-186 においては、伸長した糖鎖の割合が減少した(図 3c)。これらの結果から、GP の *N* 末端側 33-50 番目のアミノ酸配列は、GP に付加される *N* 結合型糖鎖の伸長パターンを制御していることが示された。また、RGP に特徴的な GP の伸長型の *N* 結合型糖鎖の存在が MGL との結合性を低下させることが強く示唆された。



3. GP の一部のアミノ酸配列が *N* 結合型糖鎖の伸長を制御するメカニズムの解明

GP の一部のアミノ酸配列が *N* 結合型糖鎖の伸長を制御する分子メカニズムの解明に取り組んだ。この配列が生合成後の GP の細胞内滞留時間、または、細胞内局在に影響する可能性を考えた。細胞内滞留時間は、GP を産生している細胞において [³⁵S] 標識された Cys/Met を利用したパルスチェイス実験を行い、細胞内の [³⁵S] 標識された GP 量の経時変化を調べた。その結果、GP が細胞内から消失する経時変化、つまり、細胞内滞留時間は ZGP と RGP の間で差がなかった(図 4a)。そこで、GP の細胞内局在と糖鎖生成に関わる糖転移酵素の局在との関係を調べた。前述の糖鎖解析の結果から、ZGP と RGP 間では非還元末端の *N*-アセチルグルコサミン(GlcNAc)にガラクトース(Gal)が付加される効率が大きく異なると考えられた。そこで、β-1,4-ガラクトース転移酵素(B4GALT1)と GP の局在を共焦点顕微鏡により観察した。ZGP の発現細胞では B4GALT1 が細胞膜付近で観察されたが、RGP 発現細胞では GP を発現していない細胞と同じくゴルジ装置付近にのみ分布した(図 4b)。この B4GALT1 の細胞内局在の大きな違いが、糖鎖修飾の伸長を制御しているかを確認するため、

R33-50 または Z33-50 を発現している細胞における B4GALT1 の細胞内局在を調べた。その結果、33-50 番目のアミノ酸配列を ZGP と RGP の間で置換しても B4GALT1 の細胞内局在は変化しなかった(図 4b)。つまり、B4GALT1 の細胞内局在は明らかにしたかった糖鎖伸長の制御とは関係無いことが明らかとなった。また、トランスゴルジ体、シスゴルジ体のマーカータンパク質(それぞれ TGN46 と GM130)の細胞内を、ZGP または RGP を発現している細胞で調べたところ、細胞内局在の違いは見られなかった(データは示していない)。以上の結果から、GP にみられた N 結合型糖鎖伸長の制御は、B4GALT1 の細胞内局在、生合成後の GP のゴルジ体の各コンパートメントにおける局在の違いが関与していないことが明らかとなった。今後、他の細胞内小器官や細胞内分子との局在の関係を明らかにすることにより、特定のアミノ酸配列が糖鎖伸長を制御するメカニズムをさらに明確にできると考える。

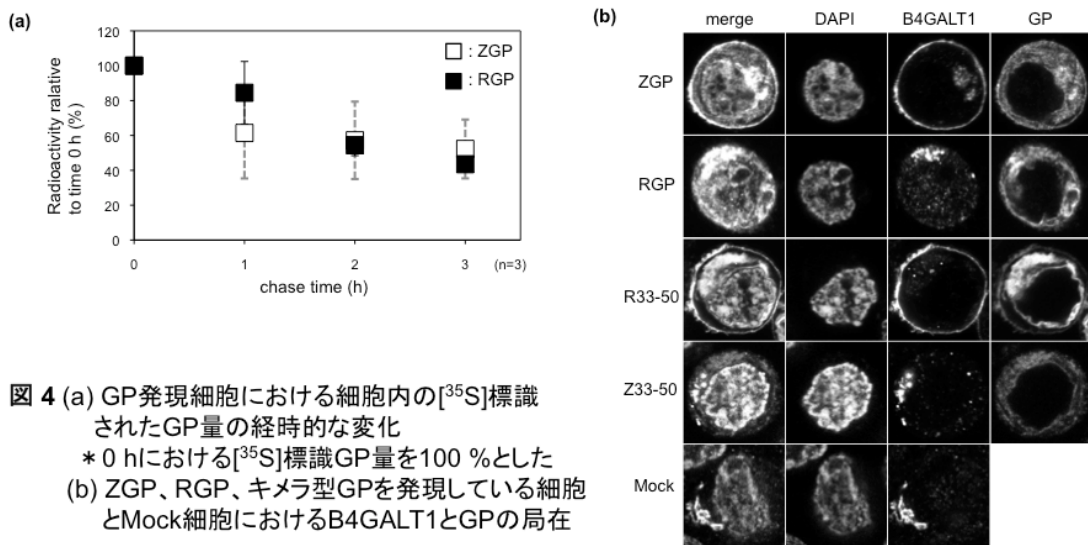


図 4 (a) GP発現細胞における細胞内の $[^{35}\text{S}]$ 標識されたGP量の経時的な変化
 * 0 hにおける $[^{35}\text{S}]$ 標識GP量を100%とした
 (b) ZGP、RGP、キメラ型GPを発現している細胞とMock細胞におけるB4GALT1とGPの局在

総括

MGL を介した ZEBOV と REBOV の感染性の違いは GP の N 末端側 33-50 番目の 18 アミノ酸配列が規定しており、その配列は GP の N 結合型糖鎖の伸長を制御していることを糖鎖構造解析によって明らかにした。本研究によって、GP 中の 18 アミノ酸が GP 全体への糖鎖修飾を制御し、その結果、GP と標的細胞表面分子との相互作用が調節され、最終的に、EBOV の異種間での感染性が制御されていることが示された。本研究で得られた結果は、EBOV に感染したヒトに対する有効な治療法の開発に貢献し、さらにタンパク質医薬の糖鎖修飾制御への応用なども期待される。