

審査の結果の要旨

氏名 藤平 陽彦

種類の異なるエボラウイルスの感染性の違いはウイルス表層糖蛋白質(GP)の性質に基づいており、GPに含まれるN-結合型糖鎖の構造的な違いが樹状細胞に発現するC型レクチンであるMGLへの結合性に影響する事によって感染性を決定する事が示唆されていた。「エボラウイルス表層糖タンパク質に対する糖鎖修飾制御」と題する本論文は、この仮説を裏付ける分子的な基盤を確立する事と、糖鎖の構造に差異をもたらす機構の解明を主な目的とした研究の成果を述べたものである。学士申請者は感染性の高いザイールと感染性の低いレストンと呼ばれるエボラウイルスを比較する事によって、GPのN-結合型糖鎖の伸長度、GPへのMGLの結合性、及び擬ウイルスのin vitroでの感染性という3点について明確な違いを見出す事に成功した。さらにこの原因として、GPのN-結合型糖鎖の伸長度の違いがGPのN末端側33-50番目という18アミノ酸配列によって規定されている事を明らかにした。本研究の成果の重要な点として、第一に糖タンパク質糖鎖の構造が、生合成に関わる糖転移酵素の種類や相対量とは全く別の、糖タンパク質の一部のアミノ酸配列によって規定されるという、常識を覆す発見であること、第二に結果として糖鎖構造の違いがウイルスの感染力(致死性)を理解するという医学的に重要な問題の解決に寄与すること、の二つが示されている。

本論文は、序論、研究内容、総論、実験方法、図表の5部からなり、第2部が主要な部分である。第2部は3章からなり、第1章は感染性の違いをもたらすGPのアミノ酸配列について、第2章はGPのアミノ酸配列が糖鎖伸長を制御することが詳細な糖鎖構造解析から見出された経緯について、第3章は糖鎖伸長度がGPの一部のアミノ酸配列によって制御される機構を明らかにする種々の試みについて記載している。

第2部の第1章は、エボラウイルス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と題して、感染性の違いを決定づけるGPのアミノ酸配列の同定に取り組んだ結果が述べられている。GPのN-末端側の33-50、33-186番目のアミノ酸配列に着目し、ザイールのGP(ZGP)とレストンのGP(RGP)のN-末端側33-50、または、33-186番目のアミノ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。以上の結果から、GPのN-末端側の33-50番目という、わずかに18アミノ酸配列がザイールエボラウイルスとレストンエボラウイルスのMGLを介した感染性の違いに重要であることが示された。

第2部の第2章では GP の特定アミノ酸配列が糖鎖修飾に与える影響を ZGP、RGP 及びキメラ GP の糖鎖構造解析によって明らかにした。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 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。GP に付加された *N*-結合型糖鎖の構造を解析すると、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。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。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明らかになった。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。

第2部の第3章では、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結果が述べられている。この配列が生合成後の GP の細胞内輸送速度、または、細胞内局在に影響する可能性を考え、細胞内輸送に関しては、GP を産生している細胞において、パルスチェイス実験を行い、生合成と細胞外への放出における経時変化を評価した。その結果、ZGP と RGP との間で、GP の細胞内輸送速度に差はみられなかった。GP の細胞内局在と糖鎖生合成に関わる糖転移酵素の局在との関係を調べることとし、 β -1,4-ガラクトース転移酵素と 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 β -1,4-ガラクトース転移酵素が細胞膜付近に移動したが、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分布した。興味深い違いであったが、この違いは *N*-末端側 33-50 番目のアミノ酸配列を置換してキメラ化した GP においても見られ、*N*-結合型糖鎖の伸長パターンを制御する機構ではないことが明らかになった。

以上のように、本研究を通し、MGL を介したザイールとレストンの感染性の違いには GP の *N*-末端側 33-50 番目という 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、エボラウイルスの種間での感染性の違いが制御されていることが示された。エボラウイルスに感染したヒトに対する有効な治療法は現存しないため、本研究で得られた結果が、その開発に貢献することも期待される。これらの結果は糖鎖生物学、ウイルス学、感染症学及び免疫学に資するところが大きい。よって、本研究を行った藤平陽彦は博士(薬学)の学位を得るにふさわしいと判断した。