

学位論文題名

Studies on the mechanism of the virus particle assembly of flavivirus and its application

（フラビウイルスのウイルス粒子形成機構とその応用に関する研究）

学位論文内容の要旨

ダニ媒介性脳炎 (TBE) ウイルスはフラビウイルス科フラビウイルス属に属し、人に感染すると重篤な臨床症状と高い致死率を示す人獣共通感染症の原因ウイルスである。TBE ウイルスは自然界において、ダニと小型野生哺乳動物の間に形成される感染環で保持されており、ヒトは主にマダニの吸血による咬傷で感染する。

フラビウイルスは感染細胞内の粗面小胞体 (ER) において粒子が形成され出芽していくと一般的に考えられている。この粒子形成過程において、エンベロープ膜蛋白 prM、E は翻訳と同時に ER 内に挿入され、ウイルスの NS2B-3 プロテアーゼと細胞のシグナルペプチダーゼによる切断を受け、ゲノム RNA と正 20 面体のヌクレオカプシド構造をとる C 蛋白を内包しつつ、ER 内腔へと出芽していく。しかし、そのウイルス粒子形成および分泌の分子機構に関しての詳細はほとんど明らかになっていない。そこで、本研究ではウイルス粒子形成におけるウイルス構造蛋白の働きを明らかにするために、本来のウイルス粒子の代用となる二つの組み換え粒子分泌系を確立し、それを用いてウイルス粒子形成の分子機構の解析を行った。

第 1 章では、準ウイルス粒子 (subviral particles ; SPs) 系および感染性 cDNA クローンを用いて TBE ウイルスの粒子形成における、エンベロープ膜蛋白の変異の影響について解析した。SPs とはエンベロープ膜蛋白 prM/E を発現する細胞より分泌され、そのエンベロープ膜蛋白は本来のウイルス粒子と同様の性状を保持している。また粒子は遺伝子 RNA を内包するヌクレオカプシドを含んでいないため、細胞内に侵入してもウイルスの増殖はおこらない。この系において prM の 63 番目のアミノ酸変異が SPs 分泌を減少させるということが明らかになった。この変異がエンベロープ膜蛋白の高次構造形成や prM のシャペロン様活性に与

える影響は認められなかった。共焦点顕微鏡で観察したところ、prM の変異によりウイルスエンベロープ膜蛋白はゴルジ体には移行せずに ER 内に蓄積していた。そして電子顕微鏡では ER 内にフィラメント状の構造物が多数形成されているのが認められた。さらに、今回確認された prM 蛋白の 63 番目のアミノ酸変異を感染性 cDNA クローンを用いてウイルスゲノム RNA に組み込んだところ、SPs の場合と同様に感染性ウイルス放出量が減少した。これらの成績より prM がウイルス粒子の出芽に重要な役割を果たしていることが明らかになった。

第 2 章では、フラビウイルスのゲノム RNA がウイルス粒子内へとパッケージング（内包）されていく機構を再現するために、TBE ウイルスのレプリコンを相補的に発現させたウイルス構造蛋白によりパッケージングさせる系を構築した。レプリコンは本来のウイルスゲノムより構造蛋白領域を欠損させたもので、レプリコン RNA は複製されるが構造蛋白がないため感染性ウイルス粒子が分泌されない。そこで細胞にレプリコン RNA をトランスフェクトしておき、続いてウイルス構造蛋白を発現するプラスミドをトランスフェクトすることにより、TBE のレプリコンを内包した粒子（ウイルス様粒子：VLPs）を分泌させることに成功した。VLPs は一度のみの感染性を有しており、その感染性は TBE ウイルス特異的な中和抗体により阻止された。そして VLPs の物理的性状も本来のウイルス粒子とほぼ同様であり、内包されたレプリコン RNA は相補的に発現させた構造蛋白の mRNA などとの遺伝子再組み換えは全く起こしていなかった。さらに緑色蛍光物質（GFP）やネオマイシン耐性遺伝子などを組み込んだレプリコンをパッケージングさせることで、外来遺伝子を導入し発現させることにも成功した。今回構築したレプリコンパッケージング系は、TBE ウイルスのゲノムパッケージング機構の分子生物学的な研究や、新たなワクチン系の開発などに有用であることが期待される。

本研究において、二つの組み換え粒子（SPs および VLPs）の系を用いて、フラビウイルスのウイルス粒子出芽およびゲノムパッケージングの二つに着目して、ウイルス粒子形成機構についての解析を行った。その結果、この組み換え粒子の系はウイルス粒子形成機構研究モデルとして有用であることが確認され、粒子形成においてウイルス構造蛋白質が重要な働きをしていることを明らかにした。これらの成績は、ウイルスの粒子形成機構解明において新たな知見を提供するとともに、ワクチンとして有効な組み換えウイルスや抗ウイルス薬の開発へ発展するものと考えられる。

# 学位論文審査の要旨

主査	教授	高島郁夫
副査	教授	小沼操
副査	助教授	荻和宏明
副査	助教授	前田秋彦

学位論文題名

## Studies on the mechanism of the virus particle assembly of flavivirus and its application

(フラビウイルスのウイルス粒子形成機構とその応用に関する研究)

ダニ媒介性脳炎 (TBE) ウイルスはフラビウイルス科フラビウイルス属に属し人に重篤な脳炎と高い致死率を示す人獣共通感染症の原因ウイルスである。フラビウイルスは感染細胞内の粗面小胞体 (ER) において粒子が形成され出芽していくと考えられているが、そのウイルス粒子形成と分泌の分子機構に関しての詳細はほとんど明らかになっていない。

本研究では、ウイルス粒子形成におけるウイルス構造蛋白の働きを明らかにするために、本来のウイルス粒子の代用となる二つの組み換え粒子分泌系を確立し、それを用いてウイルス粒子形成の分子機構の解析を行った。

ヌクレオカプシドを含まない準ウイルス粒子 (subviral particles: SPs) 系および感染性 cDNA クローンを用いて、TBE ウイルス粒子形成におけるエンベロープ膜蛋白の変異の影響について解析した。SPs の系においてエンベロープ膜蛋白の一つである prM の 63 番目のアミノ酸変異により SPs 分泌が減少した。感染性 cDNA クローンの系においてもこの変異により感染性ウイルスの放出量が減少した。これらの成績より prM がウイルス粒子の出芽に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

フラビウイルスのゲノム RNA がウイルス粒子内へとパッケージング (内包) されていく機構を解析した。TBE ウイルスのレプリコンをトランスフェクトした細胞に、さらにウイルス構造蛋白を発現するプラスミドをトランスフェクトして、ウイルスのレプリコンを内包したウイルス様粒子 (virus like particles: VLPs) を分泌させることに成功した。VLPs は一度のみの感染性を有しており、その感染性は抗 TBE ウイルス抗体により中和された。さらに緑色蛍光物質やネオマイシン耐性遺伝子をレプリコンに組み込み、ウイルス粒子内にパッケージングさせることに成功したため、外来遺伝子の導入と発現が可能となった。

本研究において、二つの組み換え粒子 (SPs および VLPs) の系を構築し、ウイルス粒子形成にウイルス構造蛋白が重要な働きをしていることを明らかにするとともに、この組み換え粒子の系がウイルス粒子形成機構研究モデルとして有用であることを示した。これらの成績は、今後ワクチンとして有効な組み換えウイルスや抗ウイルス薬の開発へ発展するものと考えられる。

よって、審査員一同は、上記博士論文提出者好井健太郎氏の博士論文は北海道大学大学院獣医学研究科規程第 6 条の規定による本研究科の行う博士論文の審査等に合格と認めた。