

エマージングウイルスの出芽機構に関する研究

学位論文内容の要旨

人類は現在、新興感染症を引き起こすことで新たな脅威となっている SARS（重症急性呼吸器症候群）や高病原性トリインフルエンザ、度々アウトブレイクを引き起こしている エボラウイルス、マールブルグウイルス及びラッサウイルスなどの、多くの高病原性ウイルスの脅威に曝されている。また、これらのエマージングウイルスはバイオテロとして使用される危険性も非常に高い。しかし、これらの感染症に対する効果的な治療法は未だに確立されていない。最近、エボラウイルスや HIV（ヒト免疫不全ウイルス）などの多くのエンベロープウイルスが、共通のメカニズムで宿主細胞から出芽することが明らかにされつつある。そして、これらのウイルスのマトリックスタンパク質に存在する L ドメイン（PT/SAP、PPxY あるいは YxxL 配列からなる）が、ウイルス出芽の過程において必須の役割を果たすことが明らかとなっている。L ドメインはそれぞれ特異的に宿主細胞因子と結合してウイルスの出芽を誘導するが、詳細な出芽機構は不明なままである。

ウイルス出芽機構の解明は、ウイルス複製のメカニズムを明らかにするとともに、ウイルス出芽をターゲットとした新規抗ウイルス薬の開発に大きく貢献すると考えられる。そこで、本研究では、ラッサウイルス、マールブルグウイルス及び HTLV-1（ヒト T 細胞白血病ウイルス）に焦点を当て、ウイルス出芽に必要なウイルス側及び宿主側の因子を同定することを目的として、ウイルス出芽機構に関する分子生物学的解析を行った。

Tsg101、Vps4A 及び Vps4B は細胞内膜輸送系の一つである MVB（multi-vesicular body）経路及び細胞質分裂において機能する重要な因子であり、これらのタンパク質がラッサウイルスのマトリックスタンパク質 Z によって形成されるウイルス様粒子(VLP)の出芽において機能していることを明らかにした。この結果は、ラッサウイルスの出芽が MVB 経路を模倣していることを裏付ける。Z は C 末端領域に L ドメインと考えられる 2 つのモチーフ配列 PTAP と PPPY を持つが、実際にこれらの L ドメインが出芽に重要な役割を果たすことを確認した。PTAP は Tsg101 と、PPPY は HECT 型ユビキチンリガーゼと結合し、出芽を制御していると考えられている。しかし、HECT 型ユビキチンリガーゼである Nedd4.1 がラッサウイルス出芽には関与していないという成績が得られたことから、他の HECT 型ユビキチンリガーゼの関与が示唆され、今後これを同定することが重要な課題である。ラッサウイルスは Z の他にウイルス構造タンパク質として GP-c、NP を保有する。NP は Z による VLP 産生に影響しなかったのに対し、GP-c は Z による VLP 産生量を減少させた。Z による VLP 出芽と異なり、Z、GP-c による出芽は、脂質ラフトで起こることを示す成績を

得ており、GP-c は Z による VLP 出芽の場を脂質ラフトへ移行させることが示唆された。GP-c 発現による Z-VLP 出芽の減少は、このことが原因の一つとなっている可能性がある。また、Z の 3-10 番目のアミノ酸が出芽を制御する配列であることも示した。

マールブルグウイルスに関しては、VP40 の N 末端領域に存在する PPPY 配列が出芽に重要な役割を果たすことを示した。この結果は、マールブルグウイルスの出芽が MVB 経路を模倣していることを示唆する。さらに、PPPY 配列依存的な Nedd4.1 及び Tsg101 の VP40 への結合、並びに Vps4B の関与を示した。マールブルグウイルス VP40 は PPPY 配列依存的に Nedd4.1 の WW ドメインと結合することを示したが、さらに詳細な解析により VP40 は Nedd4.1 に存在する 4 つの WW ドメインのうち、1 番目の WW ドメインを最も強く認識していることが明らかとなった。AP38 が出芽（もしくは膜への集合）の過程に関与していることも示しており、この事実は興味深い。AP38 が VP40 と直接結合するかは現時点では不明である。また、Nedd4.1 による出芽制御には Nedd4.1 のリガーゼ活性は必ずしも必要ではなく、むしろ HECT ドメイン全体が必要であることを示した。これは Nedd4.1 のリガーゼ活性以外の機能がウイルス出芽に必要であることを示唆するが、詳細なメカニズムは現在不明である。また、NP や GP の存在下で、Z による VLP 産生が促進されるという結果は、感染性の完全ウイルス粒子は VLP の系よりも出芽効率が高いことを意味するが、L ドメインに変異を導入すると、NP や GP の存在下でも VLP 産生量は野生型 VP40 単独の場合と変わらなかった。この事実は、L ドメインが感染性ウイルスの出芽においても重要な役割を果たすことを示唆している。

HTLV-1 に関しては、HTLV-1 が保有する 2 つの L ドメイン (PTAP、PPPY) が出芽に重要な役割を果たし、それぞれが Tsg101 及び Nedd4.1（もしくは WWP1）と特異的に結合することが報告されている。本研究により、HTLV-1 の場合も、Vps4A/Vps4B が VLP 産生に関与することが明らかになり、HTLV-1 出芽においても MVB 経路が利用され、出芽していると結論した。さらに、HTLV-1 には AIP1/Alix と結合すると考えられるコンセンサス配列が存在しないにも関わらず、このタンパク質が出芽を制御していることを示したが、この制御メカニズムに関しても詳細は現在分かっていない。

以上の結果より、ラッサウイルス、マールブルグウイルス及び HTLV-1 のいずれの場合も、MVB 経路及び細胞質分裂の機構を模倣して出芽が行われていると考えられる。これは、多くのエンベロープウイルスが同様のメカニズムで出芽しているという考えを強く支持する。そして、MVB 経路で働く因子の中で、ウイルスによって出芽に必須な因子には違いがあり、本研究では、出芽に必須な因子について詳細な違いを示すことができた。今後、宿主因子とウイルスタンパク質の結合の阻害作用、あるいは、出芽に必須なウイルスタンパク質（ドメイン）の拮抗作用に基づいた創薬研究が、新規抗ウイルス療法の開発に大きく貢献すると期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 横 沢 英 良

副 査 准教授 木 原 章 雄

副 査 准教授 川 原 裕 之

副 査 室 長 安 田 二 朗 (科学警察研究所)

学 位 論 文 題 名

エマージングウイルスの出芽機構に関する研究

人類は現在、新興感染症を引き起こすことで新たな脅威となっている SARS (重症急性呼吸器症候群) や高病原性トリインフルエンザ、度々アウトブレイクを引き起こしているエボラウイルス、マールブルグウイルス及びラッサウイルスなどの、多くの高病原性ウイルスの脅威に曝されているが、これらの感染症に対する効果的な治療法は未だ確立されていない。最近、エボラウイルスや HIV (ヒト免疫不全ウイルス) などの多くのエンベロープウイルスが共通の機構で宿主細胞から出芽することが明らかにされつつあり、これらのウイルスのマトリックスタンパク質に存在する L ドメインがそれぞれ特異的に宿主細胞因子と結合してウイルスの出芽を誘導する。しかし、詳細なウイルス出芽機構は不明なままである。

本論文提出者は、ラッサウイルス、マールブルグウイルス及び HTLV-1 (ヒト T 細胞白血病ウイルス) に焦点を当て、ウイルス出芽に必要なウイルス側及び宿主側の因子に関する一連の研究を展開し、以下の成果をおさめた。

(1) 細胞内膜輸送系の一つである MVB (multi-vesicular body) 経路において機能する重要な因子である Tsg101、Vps4A 及び Vps4B が、ラッサウイルスのマトリックスタンパク質 Z によって形成されるウイルス様粒子 (VLP) の出芽において機能していることを明らかにした。この結果から、ラッサウイルスの出芽が MVB 経路を模倣していると結論した。また、Z の C 末端領域に存在する L ドメインと考えられる 2 つのモチーフ配列 PTAP と PPPY が出芽に重要な役割を果たすことを明らかにした。一方、HECT 型ユビキチンリガーゼである Nedd4.1 がラッサウイルス出芽には関与していないことを明らかにし、他の HECT 型ユビキチンリガーゼの関与を提案した。ラッサウイルスの構造タンパク質である GP-c と NP のうち、GP-c が Z による VLP 産生量を減少させ、Z と GP-c による出芽が脂質ラフトで起こることを明らかにし、GP-c は Z による VLP 出芽の場を

脂質ラフトに移行させると提案した。

(2) マールブルグウイルスの場合、VP40 の N 末端領域に存在する PPPY 配列が出芽に重要な役割を果たすことを明らかにし、マールブルグウイルスの出芽が MVB 経路を模倣していると結論した。また、PPPY 配列依存的な Nedd4.1 及び Tsg101 の VP40 への結合、Vps4B 及び AP38 の出芽への関与を明らかにした。さらに、NP や GP の存在下で、Z による VLP 産生が促進されることを明らかにし、感染性の完全ウイルス粒子は VLP の系よりも出芽効率が高いと提案した。そして、L ドメインに変異を導入すると、NP や GP の存在下でも VLP 産生量は野生型 VP40 単独の場合と変わらなかったことを明らかにし、L ドメインが感染性ウイルスの出芽において重要な役割を果たしていることを提案した。

(3) HTLV-1 の場合、Vps4A/Vps4B が VLP 産生に関与することを明らかにし、HTLV-1 の出芽が MVB 経路を利用していると結論した。また、AIP1/Alix が出芽を制御していることを明らかにした。

以上の新知見及びそれらを得るために用いた新研究方法は、ラッサウイルス、マールブルグウイルス及び HTLV-1 の出芽機構の理解にとどまらず、広く他のウイルスの出芽機構を理解する上で重要な寄与をなし、また、宿主因子とウイルスタンパク質の結合の阻害作用、あるいは、出芽に必須なウイルスタンパク質の拮抗作用に基づいた創薬研究の展開にも重要な寄与をなすものである。

審査委員一同このことを高く評価し、本論文提出者が博士（薬学）の称号を受けるにふさわしいものと一致して判断した。