

学位論文題名

Study on C-type lectin-mediated entry of  
filoviruses into cells

(フィロウイルスのC型レクチン介在性細胞侵入機構の解析)

学位論文内容の要旨

マールブルグウイルスおよびエボラウイルスはフィロウイルス科に属し、人を含む霊長類動物に致死率の高い重篤な出血熱を引き起こす。フィロウイルスは、その主な標的細胞はマクロファージや樹状細胞などの単球系の細胞および肝細胞や類洞内皮細胞であり、免疫系や凝固・線溶系を担う細胞に与える傷害がフィロウイルスの高い病原性に深く関わっている。これらの細胞に発現している膜タンパク質型のC型レクチンはフィロウイルスの感染効率を上げる分子として報告されており、ウイルスの組織向性を決定する因子であると予想される。

フィロウイルスの表面糖タンパク (GP) 分子、特に分子中央のムチン様領域には糖鎖が豊富に存在し、C型レクチンはこれらの糖鎖を認識すると考えられる。一方、GP分子上には、機能的レセプター (ウイルスの侵入過程全てを媒介するレセプター) と結合すると推測されるレセプター結合領域が存在する。本研究ではまず、吸着以降のウイルスの細胞侵入過程、すなわちウイルス粒子取り込みおよび膜融合過程へのC型レクチンの関与を明らかにすることを目的とし、C型レクチン発現細胞において機能的レセプター非依存的な侵入が成立するか否かを解析した。以降、本研究の解析は全て、豚水疱性口炎ウイルスの表面糖タンパク質をフィロウイルスのGPに置換したシュードタイプウイルスで行った。機能的レセプターとGPとの結合を阻害するため、レセプター結合領域内のアミノ酸に変異を導入したザイールエボラウイルスGPおよびマールブルグウイルスGPを作出した。C型レクチンをほとんど発現していない細胞においては、変異体GPを持つウイルスは、野生型GPを持つウイルスと比べて低い感染性を示した。C型レクチン発現細胞においても、変異体GPを持つウイルスの感染性は同様に野生型GPを持つウイルスよりも低く、機能的レセプター非依存的な感染は成立しないと考えられた。また、変異体GPと野生型GPの間でC型レクチンに対する結合能に有意差は認められず、レセプター結合領域に導入したアミノ酸変異はC型レクチンを介した細胞表面へのウイルスの吸着効率に影響を及ぼさないことが示された。これらの結果から、C型レクチンはウイルス粒子の細胞表面への吸着を補助することによってフィロウイ

ルスの感染性を増強しており、吸着以降の細胞侵入過程には直接関与していないことが示唆された。

次に、病原性の異なるマールブルグウイルス株、Angola株およびMusoke株のGPを持つウイルスを用いて、C型レクチン発現細胞への感染性を比較した。その結果、霊長類動物に高い病原性を示すAngola株のGPを持つウイルスは、比較的低い病原性のMusoke株のGPを持つウイルスよりもC型レクチン発現細胞への感染性が高いことが判明した。ウイルス株の病原性とC型レクチン介在性細胞侵入効率の相関はエボラウイルス種間でも報告されており、C型レクチンを発現する細胞への感染がフィロウイルスの病原性発現に直接関与していると推測される。本研究ではさらに、C型レクチン介在性細胞侵入効率を決定するGP分子上の領域を探索するため、Angola株とMusoke株のGP間でキメラGPを作出し、ウイルスの感染性を比較した。その結果、C型レクチンを介した感染性増強にはムチン様領域が必須であるが、この領域はC型レクチン介在性細胞侵入効率における株間の差にほとんど影響しないことが明らかとなった。また、C型レクチンに対するGPの結合能に株間で大きな違いは認められなかったことから、C型レクチンと糖鎖との結合能は株間の細胞侵入効率の違いを決定する主因ではないことが確認された。2株のGP間で異なるアミノ酸をそれぞれ置換した変異体GPを作出し同様に解析した結果、C型レクチン介在性細胞侵入効率の違いは547番目のアミノ酸（Angola株：グリシン、Musoke株：バリン）によって決定されることが明らかになった。

エボラウイルスGPの立体構造を基にしたホモロジーモデリングによりマールブルグウイルスGPの立体構造を推定したところ、547番目のアミノ酸はレセプター結合領域やムチン様領域とは離れており、膜融合に必要なループ構造基部の $\beta$ シートを構成し、カセプシンによる切断を受ける領域と近接していた。フィロウイルスの膜融合には、エンドソーム内でGPがカセプシンなどのプロテアーゼによって切断され、上述のループ構造が露出することが重要である。そこで、このアミノ酸の違いがカセプシンによる切断効率に影響すると仮説を立て、カセプシン阻害剤存在下でウイルスの感染性を調べた。C型レクチンをほとんど発現していない細胞では、いずれのウイルスも阻害剤の濃度依存的に感染性が同様に抑制されたが、C型レクチン発現細胞においてはAngola株のGPを持つウイルスの方がカセプシン阻害剤による感染抑制効果が低かった。変異体GPを用いた実験では、547番目のアミノ酸がAngola株と同じグリシンであるGPを持つウイルスに対する感染抑制効果は、Musoke株と同じバリンであるGPを持つウイルスに対する効果よりも低く、Angola株と同程度であった。すなわち、C型レクチン存在下ではこのアミノ酸がカセプシンによるGPの切断効率を決定していると推測された。以上の結果から、マールブルグウイルス株間のC型レクチン介在性細胞侵入効率の違いには、C型レクチン存在下でのカセプシンによる切断効率の違いが重要であることが示唆された。

本研究では、フィロウイルスのC型レクチン介在性細胞侵入機構について解析し、C型レクチンはウイルス粒子の標的細胞への吸着には重要である

が、粒子の細胞への取り込みや膜融合を直接媒介しないことを示した。また、フィロウイルスのC型レクチン介在性細胞侵入効率には、C型レクチンとGPとの結合能だけでなく、C型レクチン存在下でのエンドソーム内におけるGPの切断効率も関与することが示唆された。フィロウイルスの細胞侵入機構の詳細な解析は、ウイルスの体内動態および病原性発現機構を理解する上で必須であるとともに、いまだ実用化されていないフィロウイルス感染症に対する予防・治療法の開発にも繋がると期待される。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 高 田 礼 人  
副 査 教 授 喜 田 宏  
副 査 教 授 澤 洋 文  
副 査 教 授 鈴 木 定 彦

学 位 論 文 題 名

## Study on C-type lectin-mediated entry of filoviruses into cells

(フィロウイルスのC型レクチン介在性細胞侵入機構の解析)

マールブルグウイルスおよびエボラウイルスはフィロウイルス科に属し、人を含む霊長類動物に致死率の高い重篤な出血熱を引き起こす。フィロウイルスの主な標的細胞はマクロファージや樹状細胞などの単球系の細胞および肝細胞や類洞内皮細胞であり、免疫系や凝固・線溶系を担う細胞に与える傷害がフィロウイルスの高い病原性に深く関わっている。これらの細胞に発現している膜タンパク質型のC型レクチンはフィロウイルスの感染効率を上げる分子として報告されており、ウイルスの組織向性を決定する因子であると予想される。フィロウイルスの表面糖タンパク (GP) 分子、特に分子中央のムチン様領域には糖鎖が豊富に存在し、C型レクチンはこれらの糖鎖を認識すると考えられる。一方、GP分子上には、機能的レセプター (ウイルスの侵入過程全てを媒介するレセプター) と結合すると推測されるレセプター結合領域が存在する。本研究では、水疱性口炎ウイルスの表面糖タンパク質をフィロウイルスのGPに置換したシュードタイプウイルスを用いて、C型レクチン介在性細胞侵入機構の解析を行った。

第1章では、吸着以降のウイルスの細胞侵入過程、すなわちウイルス粒子取り込みおよび膜融合過程へのC型レクチンの関与を明らかにすることを目的とし、C型レクチン発現細胞において機能的レセプター非依存的な侵入が成立するか否かを解析した。機能的レセプターとGPの結合を阻害する変異を導入したGPを作出し、C型レクチン発現細胞における感染性を比較した結果、いずれの細胞においても変異体GPを持つウイルスの感染性は野生型GPを持つウイルスよりも同様に低く、機能的レセプター非依存的な感染は成立しないと考えられた。また、変異体GPと野生型GPの間でC型レクチンに対する結合能に有意差は認められなかった。これらの結果から、C型レクチンはウイルス粒子の細胞表面への吸着を補助することによってフィロウイルスの感染性を増強しており、吸着以降の細胞侵入過程には直接関与しないことが示唆された。

第2章では、病原性の異なるマールブルグウイルス株、Angola株およびMusoke株のGPを持つウイルスを用いて、霊長類動物に高い病原性を示すAngola株は、比較的低い病原性のMusoke株よりもC型レクチン発現細胞への感染性が高いことを明らかにした。ウイルス株の病原性とC型レクチン介在性細胞侵入効率の相関はエボラウイルス種間でも報告されており、C型レクチンを発現する細胞への感染がフィロウイルスの病原性発現に直接関与すると推測された。本研究ではさらに、2株のGP間で異なるアミノ酸をそれぞれ置換した変異体GPを作出し、C型レクチン介在性細胞侵入効率の違いは547番目のアミノ酸（Angola株：グリシン、Musoke株：バリン）によって決定されることを明らかにした。

次に、マールブルグウイルスGPの立体構造から547番目のアミノ酸の位置を推定したところ、カセプシンによる切断領域と近接していることが判明した。フィロウイルスの膜融合には、GPがエンドソーム内でカセプシンなどのプロテアーゼによって切断されることが必須であると考えられている。そこで、547番目のアミノ酸の違いがカセプシンによる切断効率に影響するか否かを検証するため、カセプシン阻害剤存在下でウイルスの感染性を調べた。C型レクチンを発現していない細胞では、いずれのウイルスも阻害剤の濃度依存的に感染性が同様に抑制されたが、C型レクチン発現細胞においてはAngola株のGPを持つウイルスの方がカセプシン阻害剤による感染抑制効果が低かった。変異体GPを用いた実験では、547番目のアミノ酸がAngola株と同じグリシンであるGPを持つウイルスに対する感染抑制効果は、Musoke株と同じバリンであるGPを持つウイルスに対する効果よりも低く、Angola株と同程度であった。すなわち、C型レクチン存在下ではこのアミノ酸がカセプシンによるGPの切断効率を決定していると推測された。以上の結果から、マールブルグウイルス株間のC型レクチン介在性細胞侵入効率の違いには、C型レクチン存在下でのカセプシンによる切断効率の違いが重要であることが示唆された。

本研究によって、フィロウイルスのC型レクチン介在性細胞侵入機構においてC型レクチンはウイルス粒子の標的細胞への吸着には重要であるが、細胞への粒子の取り込みや膜融合を直接媒介しないことが示された。また、フィロウイルスのC型レクチン介在性細胞侵入効率には、C型レクチンとGPとの結合能だけでなく、C型レクチン存在下でのエンドソーム内におけるGPの切断効率も関与することが示唆された。

審査委員一同は、上記論文提出者、松野啓太氏が博士（獣医学）の学位を授与されるに十分な資格を有するものと認めた。