

学位論文題名

Antibody-mediated inhibition of Marburg virus budding

(抗体によるマールブルグウイルスの出芽阻害)

学位論文内容の要旨

マールブルグウイルス (MARV) はエボラウイルスと共にフィロウイルス科に属し、ヒトを含む霊長類動物に重篤な出血熱を引き起こす。現在、フィロウイルス感染症に対する効果的な予防・治療法は確立されておらず、その高い致死率から公衆衛生上高い関心が払われている。MARVの粒子は特徴的なひも状の構造をしており、表面には糖タンパク質 (GP) が突出している。GPは宿主組織に広範に存在するタンパク質分解酵素furinやその類似タンパク質によってGP1およびGP2の二つのサブユニットに開裂する。さらに、GP1およびGP2サブユニットにまたがるようにして、Mucin様領域 (MLR) とよばれる高度に糖鎖修飾された部位を有する。GPはMARVの唯一の表面糖タンパク質であり、ウイルスの細胞侵入に際して細胞への接着および膜融合を仲介する。したがって、GPは中和抗体の唯一の標的であり、GPを介した細胞侵入の阻害が抗体によるMARVの一般的な中和メカニズムであると考えられる。一方で、GPはMARVの出芽にも関与していることが知られており、その機能阻害がウイルスの増殖を抑制する可能性が考えられた。

第一章では、MARV GP特異的モノクローナル抗体のMARVに対する出芽阻害活性を解析した。MARV感染細胞およびVLP産生細胞を各抗体存在下で培養したところ、AGP127-8およびMGP72-17抗体存在下においてウイルス粒子およびVLPの上清への放出量が顕著に抑制された。さらに、これらの抗体存在下では、VLPどうしが重度に絡まりあい、細胞膜上で凝集・堆積している様子が電子顕微鏡により観察された。AGP127-8抗体は最も強い出芽阻害活性を見せたが、そのFab領域のみではVLPの出芽は阻害しなかった。したがって、抗体によるMARVの出芽阻害には、抗体が複数の抗原結合部位を有することが必須であることがわかった。以上の結果から、AGP127-8およびMGP72-17抗体が、GP分子間を複雑に架橋することにより、機械的にMARVの出芽過程を阻害したものと考えられる。

第二章では、出芽阻害抗体による選択圧からのMARVの逃避機構を明らかにする目的で、AGP127-8およびMGP72-17抗体存在下で増殖できるエスケープ変異体のGPに導入されたアミノ酸変異を調べた。MGP72-17抗体を用いて選択したエスケープ変異体のGPにおいて、GP1に存在するMLRの大規模な欠損が認められた。MGP72-17抗体のエピトープは欠損部位に存在していたため、これらの変異体はそのGP分子上からエピトープを喪失したことで抗体圧力から逃避したと考えられる。また、いくつかのエスケープ変異体GPは抗体のエピトープ配列に変異を持たないにも関わらず、抗体との結合力が低下していた。これらの変異GP

はアミノ酸の点変異により最適なfurin認識配列を喪失しており、furinによる開裂効率の低下が認められた。出芽阻害抗体のエピトープはGP1のfurin開裂部位近傍に存在することから、これら変異GPにおいては、構造上、エピトープがGP分子表面に露出しないために、抗体からの認識を免れているものと考えられる。これまでに、MLRおよびfurin認識配列を喪失しても、フィロウイルスGPは基本的機能（細胞への侵入仲介）を維持できることが報告されている。このようなGPの性質が、MARVの抗体圧力からの逃避に有利に働いている可能性が示唆された。

本研究で明らかにした、抗体による出芽阻害はMARV感染抑制の新規メカニズムである。よって、従来の中和試験では評価されなかったAGP127-8およびMGP72-17などの抗体もMARVに対する防御免疫に寄与している可能性が示唆された。近年、フィロウイルスGPに特異的な抗体を用いた受動免疫により、サルを致死的な感染から予防もしくは治療できることが報告されている。これらの研究はフィロウイルス感染症に対する抗体療法の開発に拍車をかけるものであるが、その結果生じる可能性のあるエスケープ変異体やその出現メカニズムについても同時に研究を進める必要がある。本研究の成績は抗体を用いたフィロウイルスの予防・治療法の開発に対して新たな知見を与えるものである。

学位論文審査の要旨

主査	教授	高田	礼人
副査	教授	鈴木	定彦
副査	教授	澤	洋文
副査	准教授	荻和	宏明

学位論文題名

Antibody-mediated inhibition of Marburg virus budding

(抗体によるマールブルグウイルスの出芽阻害)

マールブルグウイルス (MARV) はエボラウイルスと共にフィロウイルス科に属し、ヒトを含む霊長類動物に重篤な出血熱を引き起こす。現在、フィロウイルス感染症に対する効果的な予防・治療法は確立されていない。MARV粒子は特徴的なひも状構造をしており、表面に糖タンパク質(GP)をもつ。MARV GPは宿主組織に広範に存在するタンパク質分解酵素furinやその類似タンパク質によってGP1およびGP2の二つのサブユニットに開裂する。また、GP1およびGP2サブユニットにまたがるようにして、Mucin様領域 (MLR) とよばれる高度に糖鎖修飾された部位を有する。GPはMARVの唯一の表面糖タンパク質であり、ウイルスの細胞侵入(細胞への吸着および膜融合)を担う。したがって、GPは中和抗体の唯一の標的であり、細胞侵入阻害が抗体によるMARVの一般的な中和メカニズムであると考えられる。一方で、GPはウイルスのマトリックスタンパク質であるVP40とともにMARVの出芽にも関与していることが知られている。本研究では、出芽過程におけるGPの機能に着目し、GP特異的抗体によるMARV出芽阻害現象を発見するとともに、その選択圧を逃れる変異体GPに見られたユニークな免疫逃避メカニズムを考察した。

第一章では、MARV GPに対する抗体のMARV出芽阻害活性を解析した。MARV GP特異的モノクローナル抗体を作出し、ウイルス出芽阻害活性を指標にスクリーニングしたところ、2つの抗体(AGP127-8およびMGP72-17)存在下において、感染細胞から放出されるMARV粒子およびGPとVP40発現プラスミドを導入した細胞から放出されるウイルス様粒子(VLP)の上清への放出量が顕著に抑制される事を見出した。さらに、これらの抗体存在下では、出芽途中のVLP同士が重度に絡まりあい、細胞表面で凝集・堆積している様子が電子顕微鏡観察によって確認された。AGP127-8抗体は最も強い出芽阻害活性を見せたが、そのFab領域のみではVLPの出芽は阻害しなかった。以上の結果から、AGP127-8およびMGP72-17抗体は、細胞表面に発現されたGP分子間を複雑に架橋することにより、機械的にMARVの出芽を阻害したものと考えられた。

第二章では、AGP127-8およびMGP72-17抗体存在下でも増殖可能なエスケープ変異体を選択し、GPに導入されたアミノ酸変異を調べた。MGP72-17を用いて選択した変異体GPの一部には、GP1に存在するMLRの大規模な欠損が認められた。MGP72-17のエピトープは欠損部位内に位置していたため、これらの変異体GPは、エピトープを形成するペプチド鎖を丸ごとMLRの一部と共に喪失することによって抗体圧力から逃避したと考えられた。また、いくつかのエスケープ変異体GPでは、抗体のエピトープを形成するアミノ酸配列内に変異を持たないにも関わらず、抗体との結合力が低下していた。これらの変異体GPでは、*furin*認識配列内のアミノ酸に点変異が存在し、*furin*による開裂効率の低下が認められた。用いた出芽阻害抗体のエピトープはGP1の*furin*開裂部位近傍に存在することから、このエピトープはGPが*furin*によって開裂を受けた時にのみ分子表面に露出される可能性が考えられた。すなわち、これらの変異体GPにおいては、*furin*による開裂を受けていないため、エピトープが分子表面に露出しないために抗体が結合できなくなったことを示唆している。これまでに、MLRおよび*furin*認識配列を喪失しても、GPは基本的機能（細胞への侵入仲介）を維持できることが報告されている。このようなGPの性質は、MARVが抗体圧力から逃れるための高い変異許容能力を示唆しているかもしれない。

本研究で明らかにされた現象は、抗体によるMARV感染抑制の新規メカニズムであり、従来の中和試験では評価され得なかったAGP127-8およびMGP72-17のような抗体も感染防御免疫に寄与している可能性を示唆している。本研究の成績は、フィロウィルスの予防・治療法開発のための新たな知見を与えるものである。また、今後他のウイルスに関しても、出芽を阻害する抗体が発見される可能性があり、抗体によるウイルス増殖阻害作用の新たな一般概念へと発展する可能性がある。

これらの成果は、フィロウィルスの予防・治療法開発におおいに貢献すると考えられる。よって、審査委員一同は、上記博士論文提出者梶原将大氏の博士論文は、北海道大学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。