HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Roles of TIM-1 in filovirus entry into cells [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	黒田, 誠
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(獣医学)
Dissertation Number	甲第11736号
Issue Date	2015-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/59323
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Makoto_Kuroda_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨
Abstract of the dissertation

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）　　氏名：　黒田　誠
Name

学位論文題名
The title of the doctoral dissertation

Roles of TIM-1 in filovirus entry into cells
(フィロウイルスの細胞侵入における TIM-1 の役割)

フィロウイルス科に属するエボラウイルス及びマールブルグウイルスはヒトを含む霊長類動物に感染し、重篤な出血熱を引き起こす病原体として知られている。現在、フィロウイルス感染症に対する治療薬や予防法として承認されたものはなく、それらの開発が急がれている。感染の第一ステップである細胞侵入過程はウイルス粒子表面糖タンパク質（GP）依存的であり、効果的な予防・治療薬開発のための有力な標的メカニズムの一つとして挙げられる。これまでに、フィロウイルスの細胞への吸着及び膜融合に関与する様々な宿主分子が報告されている一方、その分子メカニズムには不明な点が多い。

第一章では、フィロウイルスの細胞侵入過程におけるウイルス及び宿主分子の相互作用の解明を目的として、フィロウイルスの細胞侵入を阻害するモノクローナル抗体 M224/1 の阻害メカニズムを解析した。M224/1 は、フィロウイルスに対して高い感受性を示すアフリカミドリザル腎臓上皮細胞 Vero E6 を抗原としてマウスを免疫し、誘導された抗 Vero E6 抗体の中から、水泡性口炎ウイルス（VSV）の G タンパク質をエボラウイルスの GP に置換したシュードタイプウイルスの Vero E6 への感染阻害効率を指標としたスクリーニングにより得られた。M224/1 による感染阻害効果は、実際のエボラウイルス及びマールブルグウイルスに対して

も認められた。Vero E6 の RNA から作製した完全長 cDNA ライブラリーを、M224/1 が結合しない Jurkat T 細胞にレトロウイルスベクターによって導入し、M224 が結合するようになった細胞をクローニングした結果、M224/1 の標的分子が T cell immunoglobulin and Mucin domain 1（TIM-1）であることが明らかとなった。TIM-1 は細胞外領域に機能ドメインである IgV をもつ I 型の膜タンパク質であり、フィロウイルスの細胞への吸着に関与する分子として知られており、M224/1 は IgV ドメインに結合することが示された。次に、M224/1 存在下及び非存在下で、蛍光標識したウイルス様粒子（VLP）の吸着・取り込み・膜融合を定量的に比較解析した結果、M224/1 存在下での VLP の細胞への吸着阻害効果は僅かであるが、VLP とエンドソーム膜との膜融合が著しく阻害されることが明らかとなった。そこで、フィロウイルスの膜融合に必須である宿主分子 Niemann-Pick C1（NPC1）と TIM-1 の Vero E6 細胞内局在を蛍光顕微鏡で観察したところ、核近傍に集積する細胞内小胞において両者の共局在が認められた。さらに、293T 細胞での過剰発現系を用いた免疫沈降法により、TIM-1 と NPC1 が結合することが明らかとなった。細胞内での TIM-1/NPC1 複合体の局在は、蛍光タンパク質再構成法（BiFC: bimolecular fluorescence complementation）によっても確認された。興味深いことに、M224/1 は TIM-1/NPC1 複合体形成を濃度依存的に抑制した。さらに、細胞内の TIM-1/NPC1 複合体と膜融合を起こしている VLP を蛍光顕微鏡で観察したところ、両者の局在は一致した。以上の結果より、フィロウイルスは TIM-1 を介して細胞表面に吸着した後、TIM-1 と共に細胞内に取り込まれ、後期エンドソーム/リソソームにおいて、TIM-1 と NPC1 との相互作用を経て膜融合を行い、細胞内に侵入することが示唆された。

第二章では、フィロウイルス感受性に対する TIM-1 多型の影響について解析した。フィロウイルスの感染実験には Vero E6 の他にも複数のアフリカミドリザル腎臓上皮由来の細胞株（COS-1、BSC-1 等）が用いられている。しかし、これらの細胞間でのウイルス感受性や受容体の発現パターンなどの違いに関する情報は少ない。本章では、これらの細胞に発現する TIM-1 に焦点を当て、フィロウイルスに対する TIM-1 発現細胞の感受性について比較解析した。まず、COS-1 及び

BSC-1 より TIM-1 遺伝子のクローニングを行い、アミノ酸配列を比較した結果、Vero E6 は他の細胞株とは一部アミノ酸配列が異なる TIM-1 を発現していることが分かった。次に、それぞれの TIM-1 を安定に発現する細胞を作製し、VSV シュードタイプウイルスに対する細胞の感受性を比較したところ、Vero E6 由来 TIM-1 発現 293T 細胞のウイルス感受性は他の細胞由来 TIM-1 発現 293T 細胞よりも有意に高かった。IgV ドメインのアミノ酸配列を比較すると、48 番目のアミノ酸（Vero E6：アスパラギン、COS-1, BSC-1：ヒスチジン）が異なっていた。この 48 番目のアミノ酸を相互に置換した TIM-1 を作製し、野生型及び変異型 TIM-1 を発現する細胞間でのウイルス感受性を比較した。その結果、異なる TIM-1 間でみられた感受性増強効果の違いがこの IgV ドメイン中の 1 アミノ酸の違いに依存することが分かった。この 48 番目のアミノ酸の違いによる感受性の変化はフィロウイルス科全てのウイルス属において認められた。以上より、TIM-1 の多型がフィロウイルス感受性を左右する要因の一つであることが示唆された。

本研究によって、TIM-1 がウイルス粒子の細胞への吸着だけでなく、エンベロープとエンドソーム膜の融合においても重要であることが示された。また、M224/1 が TIM-1 と NPC1 の結合を阻害することにより、フィロウイルスの膜融合を抑制することから、ウイルスの細胞侵入過程におけるこれらの宿主タンパク質間の結合阻害はフィロウイルス感染症に対する予防・治療法の新たな標的になることが期待される。さらに本研究では、宿主分子の多型が宿主細胞のフィロウイルス感受性に関与する可能性を初めて示した。これらの新しい知見は、フィロウイルスの細胞侵入機構、宿主域、組織特異性、さらには病原性発現機構の分子メカニズム解明に繋がるとともに、フィロウイルスによる感染症の予防・治療法の開発に大きく貢献すると期待される。