



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_review.pdf, 審査の要旨



学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）

氏名：黒田 誠

審査委員	主査 教授	高 田 礼 人
	副査 教授	澤 洋 文
	副査 教授	鈴 木 定 彦
	副査 教授	東 秀 明

学位論文題名

Roles of TIM-1 in filovirus entry into cells

(フィロウィルスの細胞侵入における TIM-1 の役割)

フィロウィルス科に属するエボラウィルス及びマールブルグウィルスはヒトを含む霊長類動物に感染し、重篤な出血熱を惹き起こす。現在、フィロウィルス感染症に対するワクチンや治療薬として承認されたものはなく、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、フィロウィ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で、その分子メカニズムには不明な点が多い。

第一章では、T-cell immunoglobulin and Mucin domain 1 (TIM-1) に対するモノクローナル抗体 M224/1 がフィロウィルスの細胞侵入過程を阻害する現象に着目し、その阻害メカニズムを解析した。M224/1 は、フィロウィ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て得られた抗体であり、TIM-1 細胞外領域の機能ドメインである IgV を認識する。M224/1 存在下及び非存在下で、蛍光標識したエボラウィルス様粒子 (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、フィロウィ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および蛍光タンパク質再構成法 (BiFC: bimolecular fluorescence complementation) により、TIM-1 と NPC1 が結合することが確認された。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 の局在は一致した。興味深いことに、M224/1 は TIM-1/NPC1 複合体形成を抑制した。以上の結果より、フィロウィルスは 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、TIM-1 遺伝子多型と細胞のフィロウイルスに対する感受性について解析した。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。まず、COS-1 及び BSC-1 より TIM-1 遺伝子をクローニングし、アミノ酸配列を比較した結果、Vero E6 の TIM-1 は他の細胞株と一部アミノ酸配列が異なっ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 293T 細胞を作製し、シュードタイプ水泡性口炎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 発現細胞のウイルス感受性は他の細胞由来 TIM-1 発現細胞よりも有意に高かった。これらの TIM-1 の間では、IgV ドメインの 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) が異なっており、この 48 番目のアミノ酸のみを相互に置換した TIM-1 を発現する細胞を用いてウイルス感受性を比較した結果、細胞間の感受性の違いがこの 1 アミノ酸の違いに依存することが分かった。以上より、TIM-1 の遺伝子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 がウイルスエンベロープとエンドソーム膜の融合において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、宿主分子の遺伝子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。

よって、審査委員一同は、上記学位論文提出者黒田誠氏の学位論文は、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学位論文の審査等に合格と認めた。