



Title	麻疹ウイルスのV蛋白質がヒトの自然免疫を不活化する分子メカニズムの解明 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	永野, 悠馬
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(臨床薬学)
Dissertation Number	甲第13621号
Issue Date	2019-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/73880
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Yuma_Nagano_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称 博士（臨床薬学） 氏 名 永 野 悠 馬

学 位 論 文 題 名

麻疹ウイルスの V 蛋白質がヒトの自然免疫を不活化する分子メカニズムの解明

ヒトは、ウイルスの侵入を感知して Type I interferon (IFN) を産生し、IFN 受容体下流の Janus kinase-signal transducer and activator of transcription (JAK-STAT) 経路の活性化により抗ウイルス蛋白質を産生する自然免疫の機構を持っている。一方、一部のウイルスではヒトの免疫に対抗する手段として、抗ウイルス蛋白質の発現誘導を阻害する機構が知られている。パラミクソウイルス科モルビリウイルス属に属する麻疹ウイルス (Measles virus, MeV) では、V 蛋白質 (MeV-V) が JAK-STAT 経路を阻害する。MeV-V の N-terminal domain (NTD) はアミノ酸配列から Intrinsically Disordered Region (IDR), C-terminal domain (CTD) は Zn-finger motif を形成すると予測され、NTD は STAT1 と、CTD は STAT2 とそれぞれドメインを使い分けて相互作用することでシグナルを阻害すると報告されてきた。しかし、これまで行われてきた細胞生物学的・分子生物学的手法を用いた実験では相互作用が直接のものであるか、また、特異性の違いを議論することができなかった。

そこで筆者は、これまで精製蛋白質としての調製例が無い MeV-V の調製に試み、分子の性状を詳細に解析することにした。さらに、STAT1, STAT2 を単離・精製し、結合特異性を解明することにした。そして、得られた結果から MeV-V の自然免疫不活化機構を解明することにした。

MeV-V は全長 (1-299) を V protein full length (V_{FL}), NTD (1-231) を V_{NTD} , CTD (151-299) を V_{CTD} と定義し、大腸菌を用いて可溶性蛋白質として組換え発現させた。各種クロマトグラフィーを組み合わせて精製し、高い精製度で調製することに成功した。調製した MeV-V の性状を検証したところ、次のことが分かった。まず、SEC-MALS の結果から、 V_{FL} , V_{NTD} , V_{CTD} は溶液中で単量体として存在することが分かった。また、質量分析の結果から、 V_{FL} , V_{NTD} の IDR は組換え発現ホストの内在性のプロテアーゼによる分解を受けていないことが分かった。SEC-SAXS の Guinier plot から、 V_{FL} , V_{NTD} , V_{CTD} は unfolded region (IDR) を示唆する大きな慣性半径を持つことが分かった。SEC-SAXS の Kratky plot から、 V_{NTD} は unfolded region がほとんど全ての領域を占め、 V_{FL} , V_{CTD} は folded region を含むことが分かった。XAFS 測定から、 V_{FL} , V_{CTD} は亜鉛を保持することが分かった。

MeV-V の STAT1, STAT2 に対する結合特異性の解明を行うため、STAT1, STAT2 を大腸菌で可溶性蛋白質として組換え発現させた。各種クロマトグラフィーを組み合わせて精製し、高い精製度で調製することに成功した。Isothermal Titration Calorimetry (ITC) を用いて相互作用解析を行ったところ、MeV-V は STAT1, STAT2 両方に結合することができ、STAT2 に対する親和性が特に高いことが分かった。また、MeV-V はキナーゼ遺伝子を持つ大腸菌 TKB1 で調製した STAT1 には結合することができなかった。筆者は、MeV-V と STAT2 の結合が Type I IFN 経路阻害に重要であると仮説を立て、阻害メカニズムを考察することにした。

STAT2 と結合する生体内の分子として、IRF9 が知られている。IRF9 は STAT2 と結合して、interferon stimulated gene factor 3 (ISGF3) 複合体を形成するために必要な転写因子である。IRF9 は N 末端側から DNA binding domain, flexible linker, IRF associated domain (IAD) から構成されており、IRF9-IAD と STAT2 の coiled coil domain (CCD) の複合体結晶構造から、2 分子が直接結合す

ることが示されている。また, STAT2 と結合できなくなる変異を IRF9 に導入すると, Type I IFN 経路が不活化することを示すルシフェラーゼレポーターアッセイ実験の結果が報告されている。

そこで筆者は, MeV-V が STAT2 と IRF9 の結合を阻害することで, Type I IFN 経路を不活化しているという仮説を立てた。仮説を検証するため, 3 つのことを検証した。まず, MeV-V が結合する STAT2 の領域を特定することにした。そして, MeV-V と IRF9 が STAT2 と競合的に結合するか検証することにした。さらに, MeV-V と STAT2, IRF9 と STAT2 の結合親和性を比較することにした。

MeV-V が結合する STAT2 の領域の特定するため, STAT2 のドメイン欠損変異体 STAT2core を, また, IRF9 のドメイン欠損変異体 IRF9-IAD を, 大腸菌で可溶性蛋白質として組換え発現させた。各種クロマトグラフィーを組み合わせで精製し, 高い精製度で調製することに成功した。ITC を用いて MeV-V と STAT2core の相互作用解析を行ったところ, STAT2 全長と同等の結合の強さで結合することが分かり, MeV-V が結合する STAT2 の領域は STAT2core 領域に限られることが明らかになった。Surface Plasmon Resonance (SPR) を用いた競合結合実験で MeV-V と IRF9 が STAT2 と競合的に結合することを示唆する結果が得られた。ITC で MeV-V と IRF9-IAD と STAT2 の相互作用を解析した結果と, SPR を用いた競合的結合実験の結果から, MeV-V は IRF9-IAD より強力な結合親和性で, また, これらの 2 分子は競合的に STAT2 の CCD に結合することが示唆された。つまり, MeV-V は, IRF9 と競合的に, IRF9 より強く STAT2 と結合することで, Type I IFN 経路を阻害し, 自然免疫を不活化する分子メカニズムが示唆された。

ウイルスのアクセサリ蛋白質による自然免疫阻害メカニズムは, Type I IFN 産生の抑制や, STAT 分子の分解促進, STAT 分子のリン酸化阻害などが知られているが, MeV-V は, 今までの報告のどれにも当てはまらない, 新しい分子メカニズムで自然免疫を抑制している可能性がある。