



HOKKAIDO UNIVERSITY

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 [全文の要約]
Author(s)	永野, 悠馬
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。【担当：薬学部図書室】 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
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/2115/73881
Type	doctoral thesis
File Information	Yuma_Nagano_summary.pdf



学 位 論 文 の 要 約

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分子同士の直接的相互作用の有無、及びその特異性を議論することができなかった。そこで、著者は、これまで精製蛋白質としての報告例が無い MeV-V の調製を試み、分子の性状を詳細に解析すること、STAT1, STAT2 を単離・精製し、MeV-V に対する結合特異性を解析することにより、MeV-V の自然免疫不活化機構を解明することを目的とした。

本論文では、MeV-V の全長 (1-299) を V protein full length (VFL), NTD (1-231) を VNTD, CTD (151-299) を VCTD と表記する。これら全てを大腸菌により可溶性蛋白質として組換え発現させた。調製した MeV-V の性状を検証したところ、次のことが明らかになった。まず、(1) SEC-MALS の結果から、VFL, VNTD, VCTD は溶液中で単量体として存在すること、また、(2) 質量分析の結果から、VFL, VNTD 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、(3) SEC-SAXS の Guinier plot から、VFL, VNTD, VCTD は unfolded region (IDR) を示唆する大きな慣性半径を持つこと、(4) SEC-SAXS の Kratky plot から、VNTD は unfolded region がほとんど全ての領域を占め、VFL, VCTD は folded region を含むこと、(5) XAFS 測定から、VFL, VCTD は亜鉛を保持することを明らかにした。

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、精製した。調製した蛋白質を用いた Isothermal Titration Calorimetry (ITC) による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、とりわけ STAT2 に対する親和性が特に高いことが分かった。また、MeV-V はキナーゼを発現する大腸菌 TKB1 で調製したリン酸化 STAT1 には結合できなかった。そこで、著者は、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。そこで著者は、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。

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, 精製した。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 より強く競合的に STAT2 と結合することで, IRF9 の結合を介する 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。