



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Functional analyses of host factors involved in filovirus infection [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	近藤, 達成
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(獣医学)
Dissertation Number	甲第13500号
Issue Date	2019-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/74774
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Tatsunari_KONDOH_abstract.pdf, 論文内容の要旨



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： 近 藤 達 成

Name: KONDOH Tatsunari

学位論文題名
The title of the doctoral dissertation

Functional analyses of host factors involved in filovirus infection

（フィロウイルスの感染に関与する宿主因子の機能解析）

< abstract >

エボラウイルスおよびマールブルグウイルスは、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人獣共通感染症病原体である。フィロウイルス科は進化系統学的に3属（エボラウイルス属、マールブルグウイルス属、キューエヴァウイルス属）に分類され、計8種のウイルス（エボラウイルス、ブンディブギョウイルス、タイフォレストウイルス、スーダンウイルス、レストンウイルス、マールブルグウイルス、ラブンウイルス、ヨビュウウイルス）が報告されている。エボラウイルス、ブンディブギョウイルス、スーダンウイルス、マールブルグウイルスによる出血熱は中央および西アフリカで散発的に発生し、近年、その頻度が増加傾向にあることから、公衆衛生上の注意が払われている。フィロウイルスは種々の動物種由来の細胞に感受性を示すことが報告されており、フィロウイルスが持つ蛋白質と相互作用する宿主側の因子も多数報告されている。しかし、その分子基盤については未だ不明な点が多い。本論文では、フィロウイルスの細胞侵入、転写・複製および免疫抑制機構に関わるウイルス蛋白質と宿主因子の相互作用に着目した。

フィロウイルスは、粒子表面糖蛋白質 GP を介して細胞表面に吸着し、細胞内小胞に取り込まれる。後期エンドソームへと移動した後、GP は酸性 pH 下で宿主プロテアーゼにより部分的に分解される。分解を受けレセプター結合領域が露出した GP は、同じく後期エンドソーム内に発現する NPC1 と結合する。この GP と NPC1 の相互作用がウイルスエンベロープとエンドソーム膜の融合の引き金となる。したがって、NPC1 はフィロウイルスの細胞侵入において必須の分子と考えられている。第一章では、この NPC1 の一塩基多型（SNP）に着目し、ヒト NPC1 の SNP がフィロウイルスの細胞侵入効率に与える影響を解析した。GP と相互作用する NPC1 領域の SNP を調べたところ、8箇所のアミノ酸（419、420、424、425、427、500、502、508 番目）に計 10 個の SNP があることが分かった。これらの SNP がフィロウイルスの細胞侵入に与える影響を解析するために、まず、NPC1 をノックアウトした Vero E6 細胞（Vero E6/NPC1-KO）を作製した。その後、レトロウイルスベクターを用いて、ヒト由来の野生型 NPC1 または各 SNP を導入した NPC1 遺伝子を Vero E6/NPC1-KO へ導入し、各々の NPC1 恒常発現細胞を作出した。各恒常発現細胞のフィロウイルスに対する感受性を、フィロウイルスの GP をもつシュードタイプウイルスおよび感染性エボラウイルスを用いて評価した。Vero E6/NPC1-KO では、シュードタイプウイルスおよび感染性エ

ボラウイルスに対する感受性が失われる事を確認後、Vero E6/NPC1-KO にヒト由来の野生型 NPC1 を導入すると、再びそれらのウイルスの感染が成立することが分かった。計 10 個の SNP のうち、エボラウイルスでは 424 番目と 508 番目に SNP を有する細胞で、マールブルグウイルスでは 425 番目と 502 番目に SNP を有する細胞で、ウイルスの感染価が低くなる傾向が認められた。これらの結果は、NPC1 の SNP がフィロウイルスに対するヒトの感受性に影響を与える可能性を示唆している。

膜融合によりウイルス蛋白質 (NP、VP35、VP30、VP24 および L 蛋白質) とウイルスゲノムの複合体が細胞質内に放出されると、ウイルスゲノムの転写および複製が始まる。フィロウイルスの VP35 は宿主細胞における IFN- β 産生を抑制する事ならびにウイルスポリメラーゼコファクターとして転写や複製に関わる事が知られている。近年、この VP35 と高い相同性を有するアミノ酸配列をコードする領域 (mIEFL35) がトビイロホオヒゲコウモリのゲノム内に発見された。コウモリは、フィロウイルスの自然宿主あるいはレゼルボアとして有力視されている動物であり、mIEFL35 はフィロウイルスの感染制御に関わる宿主因子を発現する可能性が推測されていた。第二章では、mIEFL35 の生物学的意義を考察することを目的として、mIEFL35 がコードする蛋白質 (mIEFL35p) を培養細胞に発現させ、その機能解析を行った。エボラウイルスの VP35 と mIEFL35p のアミノ酸配列を詳細に比較したところ、多量体形成および IFN 応答抑制に必要な領域に高い相同性が見られたが、ポリメラーゼコファクター活性に重要なアミノ酸は保存されていなかった。mIEFL35p 発現プラスミドを HEK293T 細胞に導入したところ VP35 と同様に細胞質への局在が確認された。VP35 を共発現させた細胞を用いた免疫沈降法の結果から、mIEFL35p は多量体を形成し、エボラウイルスの VP35 とともに相互作用することが示唆された。mIEFL35p を発現させた細胞では、VP35 発現と同様に、RIG-I、IPS-1 および TBK1 によるヒト IFN- β プロモーターの活性化が抑制された。次に、エボラウイルスのミニゲノムアッセイを用いて、mIEFL35p の発現がウイルスゲノムの転写・複製に与える影響を解析した結果、mIEFL35p は VP35 の機能を補完することではなく、mIEFL35p の過剰発現はウイルスゲノムからのレポーター遺伝子の発現を微弱ながら抑制する事が分かった。これらの結果は、mIEFL35p はフィロウイルスの VP35 同様に IFN 応答阻害活性を有する一方で、ウイルスポリメラーゼコファクターとしての機能は持たないことを示している。

本論文では、同一宿主種内に見られる遺伝子多型がフィロウイルスの細胞指向性に影響を与えることを示した。GP と NPC1 の相互作用は、宿主特異性・宿主域決定に関与するだけでなく、同じ動物種内の個体レベルの感受性の違いにも関与していると考えられる。今後、ヒトの遺伝的多様性がより詳細に明らかになれば、地域間あるいは人種間等の SNP 分布と流行地域あるいは感受性との間に関連を見出すことも可能かもしれない。また、本論文ではコウモリのゲノムに見つかったフィロウイルス様遺伝子がコードする宿主蛋白質が、ウイルス蛋白質と似た性質を有することも示した。しかし、生体内での mIEFL35/mIEFL35p の挙動や宿主の免疫反応との関連など不明な点は数多く残されている。今後は、個体間あるいは動物間におけるフィロウイルス様遺伝子の存在・発現様式の違いおよびそれが生体に与える影響、特にフィロウイルスに対する感受性との関連性について明らかにする必要がある。

ウイルス感染による宿主の病態は、ウイルス側の因子および宿主側の因子の相互作用が蓄積した結果であり、その相互作用の全容解明はウイルスの病原性と宿主域を理解するために重要である。また、病原性発現に関わる要因が明らかになれば、それを標的とした新たな創薬開発への展開が期待される。本論文で示したアプローチと概念は、他のウイルス感染症にも応用可能であり、今後、より広汎かつ詳細な基礎研究によって、様々なウイルス感染症の制御に貢献することを期待したい。