



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_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：近藤 達成

審査委員	主査 教授	高田 礼人
	副査 教授	澤 洋文
	副査 教授	東 秀明
	副査 教授	荻和 宏明

学位論文題名

Functional analyses of host factors involved in filovirus infection

（フィロウィルスの感染に関与する宿主因子の機能解析）

エボラウイルスおよびマールブルグウイルスは、フィロウィルス科に属し、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。フィロウィルスによる感染症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。フィロウィルスは様々な動物種由来の細胞に感染性を示すことが報告されており、フィロウィ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、フィロウィルスの細胞侵入、転写・複製および免疫抑制機構に関わるウィルス蛋白質と宿主因子の相互作用に着目した。

フィロウィルスは、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 の相互作用がウィ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 はフィロウィ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 に見られる SNP 関連変異がフィロウィ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 が見つかった。これらの SNP 変異がフィロウィ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、レトロウィルスベクターを用いて、ヒト由来の野生型 NPC1 または各 SNP 変異を導入した NPC1 遺伝子を Vero E6/NPC1-KO へ導入し、各細胞のフィロウィルスに対

する感受性を、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。その結果、計 10 個の SNP のうち、エボラウイルスでは 424 番目と 508 番目、マールブルグウイルスでは 425 番目と 502 番目に SNP 変異を有する細胞で、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を左右する可能性を示唆している。

フィロウイルスがもつ蛋白質の一つである 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 (mlEFL35) 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として有力視されている動物であり、mlEFL35 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、mlEFL35 の生物学的意義を考察することを目的として、mlEFL35 がコードする蛋白質 (mlEFL35p) を培養細胞に発現させ、その機能解析を行った。mlEFL35p と VP35 を共発現させた細胞を用いた免疫沈降法の結果から、mlEFL35p は多量体を形成し、エボラウイルスの VP35 とも結合することが示唆された。mlEFL35p 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、mlEFL35p 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、mlEFL35p は VP35 の機能を補完することではなく、そ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、mlEFL35p は 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。

ウイルス感染による宿主の病態は、ウイルス因子および宿主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詳細に明らかになれば、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可能性がある。

よって、審査委員一同は、上記学位論文提出者近藤達成氏の学位論文は、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。