



# HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Site-directed mutagenesis study of host and viral proteins : single nucleotide variants of human TBK1 and functional sites of ebolavirus VP35 [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	茂木, 和
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(獣医学)
Dissertation Number	甲第15519号
Issue Date	2023-03-23
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/89940">https://hdl.handle.net/2115/89940</a>
Rights(URL)	<a href="https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/">https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/</a>
Type	doctoral thesis
File Information	Nodoka_Kasajima_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：笠島 和

審査委員	主査 教授	澤 洋文
	副査 教授	高田 礼人
	副査 准教授	五十嵐 学
	副査 准教授	松野 啓太

## 学位論文題名

### Site-directed mutagenesis study of host and viral proteins: single nucleotide variants of human TBK1 and functional sites of ebolavirus VP35

(部位特異的変異導入法による宿主およびウイルス蛋白質の研究：  
ヒト TBK1 の一塩基多型とエボラウイルス VP35 の機能的アミノ酸残基)

新興感染症の約 60%を占める人獣共通感染症は、地球規模で公衆衛生上の脅威となっている。人獣共通感染症のうち、エボラウイルス (EBOV) 病などのウイルス性出血熱は重篤で致死率の高い疾患である。また、日本でも血小板減少を伴う比較的致死率の高いウイルス性疾患である重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) が年間 60~90 例報告されている。EBOV 病や SFTS に対して有効な治療法やワクチンは現在のところ限られている。これらのウイルス感染症の病態を決定する分子メカニズムには、宿主およびウイルス蛋白質の相互作用が深く関わっている。その相互作用を変化させる 1 つのアミノ酸変異でさえも、ウイルスの病原性や感染病態を左右する可能性がある。

第 1 章では、宿主蛋白質 TANK-binding kinase 1 (TBK1) の多型に着目した。ヒトに病原性を示すダニ媒介性バンダウイルスである SFTS ウイルス (SFTSV) およびハートランドウイルス (HRTV) の非構造 (NSs) 蛋白質は、インターフェロン (IFN) シグナル経路の TBK1 を標的として IFN の産生を抑制する。SFTSV は様々な動物種に感染することが知られている一方で、ヒト以外の動物種の TBK1 が NSs 蛋白質の標的となるのか不明であった。そこでまず、NSs 蛋白質の存在下で様々な動物種の TBK1 の IFN 誘導能について比較検討した結果、ヒトを含む他の哺乳類の TBK1 による IFN 誘導は、SFTSV の NSs 蛋白質によって抑制される一方で、ニワトリ TBK1 は抑制を受けないことが分かった。これは、ニワトリの TBK1 が SFTSV の NSs 蛋白質による IFN 阻害活性に対して抵抗性であることを示している。次に、ヒトの TBK1 のアミノ酸変異をもたらす一塩基多型 (nsSNVs) に着目し、公開データベー

スからヒト TBK1 の nsSNVs を複数選択した。個々の nsSNVs と同一のアミノ酸置換を導入した変異体 TBK1 を作出し、NSs 蛋白質存在下における IFN 誘導能への影響を調べた。その結果、ヒト TBK1 で報告されている nsSNVs の中には SFTSV や HRTV の NSs 蛋白質の IFN 阻害活性を著しく低下させるものが含まれていることが明らかになった。これらの結果は、nsSNVs を含む TBK1 の多型がバンダウイルス NSs 蛋白質の IFN 誘導阻害作用に影響を与え、ヒトにおける SFTSV と HRTV の感染病態に関与する因子の 1 つとなる可能性を示唆する。

第 2 章では、ヒトに対して高い病原性を示すことが知られている EBOV の構造蛋白質の一つであるポリメラーゼ補因子 (VP35) に注目した。VP35 は多機能蛋白質であり、EBOV 病の病態に重要な役割を果たす抗 IFN 因子でもある。本研究では、蛋白質の分子表面特性に着目し、コンピュータ計算によるパッチ解析によって、VP35 のインターフェロン抑制に重要なドメイン (IID) の表面に 3 つの疎水性パッチを同定した。そこで、疎水性パッチの特性を消失させる部位特異的変異を導入した VP35 を作出し、機能を野生型 VP35 と比較したところ、疎水性パッチ変異体では EBOV 核蛋白質との相互作用が低下し、ウイルスゲノムの転写・複製の効率が有意に低下することが明らかとなった。さらに、それらの変異体は VP35 の IFN 阻害機能をも低下させた。これらの結果は、VP35 IID の表面にある疎水性パッチが本蛋白質の機能にとって重要であることを示している。また、本研究によって、パッチ解析が蛋白質機能に重要なアミノ酸残基を同定するための有用なツールであることが示された。

本学位論文では、遺伝子多型データ解析およびパッチ解析等のバイオインフォマティクスと分子生物学的手法による蛋白質機能解析を組み合わせた研究手法によって、SFTSV、HRTV および EBOV の感染病態に関与しうるアミノ酸変異を探索した。TBK1 および VP35 の 1 アミノ酸変異が蛋白質機能に影響を与える詳細なメカニズムの解明にはさらなる解析が必要であるが、本研究によってこれらの蛋白質の基本特性に関する理解が深まった。本手法を他のウイルスや宿主蛋白質に応用することで、治療薬およびワクチン開発戦略に新たな知見をもたらすことが期待される。

よって、審査委員一同は、上記学位論文提出者 笠島和氏の学位論文は、北海道大学大学院国際感染症学院規程第 10 条の規定による本学院の行う学位論文の審査等に合格と認めた。