

学位論文題名

Studies on the biological activities  
of Hantaan virus envelope glycoproteins

(ハンタウイルスのエンベロップ糖蛋白の生物活性に関する研究)

学位論文内容の要旨

腎症候性出血熱 (HFRS) はユーラシア大陸全域で報告され、致死率 5-15% のげっ歯類媒介性のウイルス性人獣共通感染症である。本疾患の主な流行地である中国では年間 10 万人以上の患者が報告されている。病因ウイルスであるハンタウイルスは年々新たなウイルス株が分離されるのみでなく、1993 年より今まで疾患の報告がなかった南北アメリカで HFRS とは異なった症状を示す致死率 40% 以上のハンタウイルス肺症候群 (HPS) が発生している。ハンタウイルスはウイルスごとに固有のげっ歯類を自然宿主としており、げっ歯類は全く無症状でウイルスを終生排泄する。

ハンタウイルス表面を構成するエンベロップ糖蛋白 (G1/G2) は、標的細胞上の分子と相互作用し、ウイルスエンベロップと細胞膜の膜融合を引き起こしウイルスゲノムを細胞内に放出させ、ウイルスのライフサイクルを開始させると考えられている。したがって、G1/G2 は多くのエンベロップウイルスと同様に、宿主域や感染個体内での標的細胞の主要な決定因子であると考えられているが、詳細は明らかになっていない。

本研究では細胞へのウイルスの侵入に関与する細胞側の因子を解析することを目的とし、G1/G2 の生物活性について、細胞への感染と感染細胞融合現象に注目して解析を行った。

1. ウイルス感染開始の細胞表面への接着・侵入の段階における糖鎖の関与を解析するために、特異的な糖鎖構造を認識する多価の蛋白であるレクチンを用い、以下の知見を得た。1) Vero E6 細胞へのハンタウイルス感染に、それぞれ異なる糖鎖構造を認識するレクチン 6 種類を用いて、感染価に及ぼす影響を解析した。ウイルスにレクチンを混合したのち細胞に接種した場合と、細胞にレクチンを処理した後にウイルスを接種した場合に、感染を抑制するレクチン (ConA, Mannose タイプ) と感染を増強するレクチン (DBA と SBA, GalNAc タイプ) が得られた。これらの効果は感染前にウイルスと混合すると最も強い効果を示した。2) FACScan を用いた解析より、Vero E6 細胞表面には ConA, DBA, SBA のみならず、UEA I 以外すべてが結合した。ウイルス粒子をレクチンプロットで解析した結果、ConA が G1 と G2 の両方に、DBA と SBA は G1 に結合した。また、DBA への結合能を欠く P388D1 細胞では、ConA と SBA は Vero E6 細胞と同じ効果を示したが、DBA はウイルスの感染を増強しなかった。また DBA と SBA

の競合単糖である GalNAc で感染増強が阻害されたことから、レクチン介在性感染増強は、細胞とウイルスの間をレクチンが糖鎖結合部位を介して架橋して細胞への接着・侵入効率を高めていることによって起きていると考えられた。3) 細胞へレクチンを処理した後、競合単糖である GalNAc をさらに加えた細胞では、ウイルスの感染が抑制された。これは細胞表面上に結合した GalNAc-レクチンの複合体がハンタウイルスの本来の侵入経路そのものを阻害したことを示唆している。

以上の成績より、ウイルス感染におけるレクチンの効果は、ウイルスレセプターそのものへ吸着を強めているか、レセプター近傍の分子に吸着してレセプターへの結合を容易にしている可能性が示唆された。これらの知見はハンタウイルスの細胞へのレセプターを検索する上で有用な情報となることが期待される。

2. ハンタウイルス感染細胞の細胞融合に関与する細胞側の因子を解析することを目的として実験を行い、以下の知見を得た。1) Vero E6 細胞 (ATCC c1008) を親株とし、5代以内の継代歴の亜株 (Low-passaged subline, LP と定義) はハンタウイルスに感染し細胞融合を発現した。150代以上の継代を繰り返した亜株 (High-passaged subline, HP と定義) はハンタウイルスに感染したが細胞融合を発現しなかった。これらの違いが細胞自身の性質か混合した性質の細胞の集団によるものか明らかにするために、限界希釈法を用いてそれぞれの亜株を元にクローニングを行った。その結果、細胞融合を示した LP 亜株からのクローン 12 株はすべて亜株と同等の細胞融合能を発現し、細胞融合を示さない HP 亜株からクローニングしたクローン 3 株はすべて細胞融合を示さなかった。したがって、ハンタウイルスに感染した細胞の細胞融合能の感受性は、細胞自身の性質であることが明らかになった。これらの確立されたクローンの代表株を以下 LP と HP と定義した。2) LP と HP の間でウイルスの増殖能と細胞表面上の G1/G2 発現量に大きな違いは見られなかった。したがって、細胞融合抵抗性には細胞側の分子が関与していると考えられた。3) 感染と非感染細胞の混合培養で、感染 LP は非感染 LP と HP 細胞の両方と細胞融合したが、感染 LP と非感染 HP の場合、細胞融合している非感染 HP 細胞の割合は、非感染 LP と比較して明らかに低かった。また感染 HP は非感染の LP と HP とは細胞融合しなかった。これらの成績から HP 細胞上の G1/G2 が不活化されており細胞融合能を欠損している可能性と HP 細胞上に細胞融合に必要な分子が欠損している可能性が示唆された。4) 感染 HP 細胞をトリプシン処理して新たにモノレイヤーを形成させると、播き直してから 4-24 時間の間のみ細胞融合を発現した。これらの結果から、細胞融合抵抗性の HP 細胞上の G1/G2 は細胞融合に対して不活化の状態であるが、播き直してからモノレイヤーを形成する間に一過性に細胞融合に対して活性を回復する、ということが示唆された。したがって、細胞融合抵抗性に関与する分子は細胞が伸長しモノレイヤーを形成する間に制御されている分子であると考えられた。

これらの分子とエンベロープ糖蛋白との相互作用やメカニズムを解析することにより、ハンタウイルスのエンベロープ糖蛋白の振る舞いを理解できると期待される。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 有 川 二 郎  
副 査 教 授 皆 川 知 紀  
副 査 教 授 高 田 賢 藏

学 位 論 文 題 名

## Studies on the biological activities of Hantaan virus envelope glycoproteins

(ハンターンウイルスのエンベロープ糖蛋白の生物活性に関する研究)

腎症候性出血熱 (HFRS) はユーラシア大陸全域で報告され、致死率 5-15%のげっ歯類媒介性のウイルス性人獣共通感染症である。ハンタウイルスはウイルスごとに固有のげっ歯類を自然宿主としており、げっ歯類は全く無症状でウイルスを終生排泄する。ハンタウイルス表面を構成するエンベロープ糖蛋白 (G1/G2) は多くのエンベロープウイルスと同様に、宿主域や感染個体内での標的細胞の主要な決定因子であると考えられているが、詳細は明らかになっていない。

本研究では細胞へのウイルスの侵入に関与する細胞側の因子を解析することを目的とし、G1/G2 の生物活性について、細胞への感染と感染細胞融合現象に注目して解析を行った。

1. ウイルス感染開始の細胞表面への接着・侵入の段階における糖鎖の関与を解析するために、特異的な糖鎖構造を認識する多価の蛋白であるレクチンを用い、以下の知見を得た。1) Vero E6 細胞へのハンタウイルス感染に、それぞれ異なる糖鎖構造を認識するレクチン 6 種類を用いて、感染価に及ぼす影響を解析した。ウイルスにレクチンを混合したのち細胞に接種した場合と、細胞にレクチンを処理した後にウイルスを接種した場合に、感染を抑制する Mannose 特異的レクチン (ConA) と感染を増強する GalNAc 特異的レクチン (DBA と SBA) が得られた。これらの効果は感染前にウイルスと混合すると最も強い効果を示した。2) FACSscan を用いた解析より、Vero E6 細胞表面には ConA、DBA、SBA のみならず、UEAI 以外すべてが結合した。ウイルス粒子をレクチンプロットで解析した結果、ConA が G1 と G2 の両方に、DBA と SBA は G1 に結合した。また、DBA への結合能を欠く P388D1 細胞では、DBA はウイルスの感染を増強しなかった。また DBA と SBA の競合単糖である GalNAc で感染増強が阻害されたことから、レクチン介在性感染増強は、細胞とウイルスの間をレクチンが糖鎖結合部位を介して架橋して細胞への接着・侵入効率を高めていることによって起きていると考えられた。3) 細胞へレクチンを処理した後、競合単糖である GalNAc をさらに加えた細胞では、ウイルスの感染が抑制された。これは細胞表面上に結合した GalNAc-レクチンの複合体がハンタウイルスの本来の侵入経路そのものを阻害したことを示唆している。以上の成績より、ウイルス感染におけるレクチンの効果は、ウイルスレセプターそのものへ吸着を強めているか、レセプター近傍の分子に吸着してレセプターへの結合を容易にしている可能性が示唆された。

2. ハンタウイルス感染細胞の細胞融合に関与する細胞側の因子を解析することを目的として実験を行い、以下の知見を得た。1) Vero E6 細胞 (ATCC c1008) を親株とし、5 代以内の継代歴の亜株 (Low-passaged

subline, LP と定義) はハンタウイルスに感染し細胞融合を発現した。150 代以上の継代を繰り返した亜株 (High-passaged subline, HP と定義) はハンタウイルスに感染したが細胞融合を発現しなかった。これらの違いが細胞自身の性質か混合した性質の細胞の集団によるものか明らかにするために、限界希釈法を用いてそれぞれの亜株を元にクローニングを行った。その結果、細胞融合を示した LP 亜株からのクローン 12 株はすべて亜株と同等の細胞融合能を発現し、細胞融合を示さない HP 亜株からクローニングしたクローン 3 株はすべて細胞融合を示さなかった。したがって、ハンタウイルスに感染した細胞の細胞融合能の感受性は、細胞自身の性質であることが明らかになった。これらの確立されたクローンの代表株を以下 LP と HP と定義した。2) LP と HP の間でウイルスの増殖能と細胞表面上の G1/G2 発現量に大きな違いは見られなかった。したがって、細胞融合抵抗性には細胞側の分子が関与していると考えられた。3) 感染と非感染細胞の混合培養で、感染 LP は非感染 LP と HP 細胞の両方と細胞融合したが、感染 LP と非感染 HP の場合、細胞融合している非感染 HP 細胞の割合は、非感染 LP と比較して明らかに低かった。また感染 HP は非感染の LP と HP とは細胞融合しなかった。これらの成績から HP 細胞上の G1/G2 が不活化されており細胞融合能を欠損している可能性と HP 細胞上に細胞融合に必要な分子が欠損している可能性が示唆された。4) 感染 HP 細胞をトリプシン処理して新たにモノレイヤーを形成させると、播き直してから 4-24 時間の間のみ細胞融合を発現した。これらの成績から、細胞融合抵抗性の HP 細胞上の G1/G2 は細胞融合に対して不活化の状態であるが、播き直してからモノレイヤーを形成する間に一過性に細胞融合に対して活性を回復する可能性が示唆された。したがって、細胞融合抵抗性に関与する分子は細胞が伸長しモノレイヤーを形成する間に制御されている分子であると考えられた。

公開発表において、副査皆川教授から、ハンタウイルスのレセプターと LME から示唆される GalNAc を有する分子との関連性、病原性と細胞融合現象との関連性についての質問があった。次いで、副査高田教授から他のウイルスで LME 架橋説の報告の有無についての質問があった。申請者は実験結果に基づき、また文献的知識を用いて、概ね適切に回答し得た。

この論文の知見は今後ハンタウイルスの細胞へのレセプターを検索する上で有用な情報となることが期待される。また、これらの分子とエンベロープ糖蛋白との相互作用やメカニズムを解析することにより、ハンタウイルスのエンベロープ糖蛋白の感染における役割を理解できると期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位などもあわせ申請者が博士 (医学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。