

学 位 論 文 題 名

Studies on the multimerization of
hantavirus nucleocapsid protein and
its interactions with host cellular proteins

ハンタウイルス核蛋白の多量体形成及び
宿主細胞蛋白との相互作用に関する研究

学位論文内容の要旨

ハンタウイルスはブニヤウイルス科に分類される RNA ウイルスで、腎症候性出血熱(HFRS)とハンタウイルス肺候群(HPS)の原因ウイルスである。そのゲノムはマイナス鎖 3 本セグメントであり、それらはそれぞれ核蛋白(NP)、エンベロープ糖蛋白、ポリメラーゼのわずか 3 種類の蛋白をコードしているにすぎない。そのため、ハンタウイルスは数多くの宿主因子を利用して細胞中で増殖していると考えられている。このようなウイルス蛋白による宿主因子の攪乱が、HFRS や HPS に特徴的な病態発現に関与している可能性がある。一般にウイルス NP はウイルス RNA と結合し、多量体となりウイルスのキャプシドを形成すると考えられている。さらに最近多くのウイルスで NP と宿主細胞蛋白との相互作用が報告されている。本研究では、ハンタウイルス NP の構造と機能について明らかにすることを目的として以下の研究を行った。

Part I では競合 ELISA 法及び Yeast two-hybrid 法を用いてハンタウイルス NP の多量体形成能と構造について解析を行った。ELISA 法での解析からハンタウイルスの異なった血清型 Hantaan (HTN)、Seoul (SEO)、Dobrava (DOB)の NP (429 アミノ酸 (a.a.)) はいずれも多量体として存在していることが明らかになった。次に NP の N 末端 49 a.a. を欠く NP (HTN、SEO、DOB50-429、以下同様)を発現させ同様の解析を行ったところ、HTN、SEO 及び DOB ともに多量体の形成が確認された。しかし 155-429 までの a.a. を発現させて同様の解析を行った場合、SEO と DOB155-429 では多量体形成が確認されたが、HTN155-429 は単量体のままで存在している事が明らかとなった。また、HTN1-355、1-244 も多量体を形成しなかった。これらの成績から、NP の多量体形成には N 末端と C 末端の双方が重要であるが、必要な領域は血清型により若干相違があることが分った。さらに SEO155-429 と DOB155-429 は、多量体形成下では血清型特異抗体との反応性を維持しているが、多量体形成能を欠く HTN155-429 では抗体との反応性

が著しく低下した。これらの成績から、ハンタウイルス NP の血清型特異的エピトープは多量体に依在して形成されることが示唆された。一方、Yeast Two-hybrid 法での解析では、異なった血清型である HTN と SEO の NP の間でも強い相互作用が検出されたことから、ハンタウイルス NP の多量体形成の基本的なメカニズムは血清型に共通のものであると考えられた。C 末端のトランケートである HTN1-403 が全長 1-429 と全く反応を示さないことから、ELISA 法の結果と一致して C 末端 403-429 が重要であることが判明した。また、N 末端のトランケートである HTN50-429 や 100-429 は全長 NP に対して、全長の NP 同士と同様の強い活性を示したが、HTN125-429 ではその活性が著しく低下した。このため、100-125a.a.領域は、効率の良い多量体形成に関与すると考えられた。HTN100-429 の 119 番目の a.a. W を A に変化させると全長 NP との相互作用は検出されず、この領域の重要性が確認された。

Part II および III ではハンタウイルス NP を bait として Yeast two-hybrid 法でヒト腎臓細胞及び HeLa 細胞のライブラリをスクリーニングし、NP に相互作用する宿主細胞蛋白を同定・解析した。得られた 11 クローンのうち 7 クローン (6 種類の蛋白) が SUMO-1 に関連した蛋白であった。すなわち、PIAS1, PIASXbeta (SUMO-1 ligase)、Ubc9 (SUMO-1 conjugation enzyme), HIPK2, TTRAP, CHD3 (SUMO-1 関連物質との相互作用が報告されている蛋白) であった。さらに Ubc9 以外の上記 5 種類の蛋白は、いずれも Ubc9 や SUMO-1 とも相互作用することが確認された。また、PIAS が NP と相互作用するためには、PIAS の機能ドメインである Ring-like domain の存在と、多量体形成能を有する NP が必要であり、NP の立体構造の重要性が示唆された。さらに VeroE6 細胞にハンタウイルス NP と PIASxbeta, Ubc9 を発現させ、蛍光ラベル抗体と共焦点レーザー顕微鏡を用いてそれらの細胞内分布を比較した。その結果、PIAS、Ubc9 と NP はいずれも細胞質内の特に核の周辺に一致して分布していた。以上の成績はハンタウイルス NP が SUMO-1 の付加を受けている可能性を強く示唆するものである。

以上の研究をとおしてハンタウイルスの NP の多量体形成に必要な部位を明らかにした。その結果、ハンタウイルス NP の多量体形成には C 末端, および 100-125 の二つの部位が特に関与していることが明らかになった。さらに NP に相互作用する宿主因子として PIAS1, PIASXbeta, Ubc9, HIPK2, TTRAP 及び CHD3 を同定した。これらはいずれも SUMO-1 関連物質であり、今後ハンタウイルスの宿主細胞内での挙動や病原性発現機構との関連とさらに解明することが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 吉 木 敬

副 査 教 授 高 田 賢 藏

学 位 論 文 題 名

Studies on the multimerization of hantavirus nucleocapsid protein and its interactions with host cellular proteins

ハンタウイルス核蛋白の多量体形成及び
宿主細胞蛋白との相互作用に関する研究

ハンタウイルスはブニヤウイルス科に分類される RNA ウイルスで、腎症候性出血熱 (HFRS) とハンタウイルス肺候群 (HPS) の原因ウイルスである。そのゲノムは核蛋白 (NP)、エンベロープ糖蛋白、ポリメラーゼのわずか 3 種類の蛋白をコードしているにすぎない。そのため、ハンタウイルスは数多くの宿主因子を利用して細胞中で増殖していると考えられている。このようなウイルス蛋白による宿主因子の攪乱が、HFRS や HPS に特徴的な病態発現に関与している可能性がある。一般にウイルス NP はウイルス RNA と結合し、多量体となりウイルスのキャプシドを形成すると考えられている。さらに最近多くのウイルスで NP と宿主細胞蛋白との相互作用が報告されている。本研究では、ハンタウイルス NP の構造と機能について明らかにすることを目的とした。Part I では競合 ELISA 法及び Yeast two-hybrid 法を用いて NP の多量体形成能と構造について解析を行った。ELISA 法を用いた数々のトランケートの成績から、NP の多量体形成には N 末端と C 末端の双方が重要であるが、必要な領域は血清型により若干相違があることが分った。また、NP は多量体形成下では血清型特異抗体との反応性を維持しているが、多量体形成能を欠く NP では抗体との反応性が著しく低下した。これらの成績から、ハンタウイルス NP の血清型特異的エピトープは多量体に依存して形成されることが示唆された。一方、Yeast Two-hybrid 法でも、ELISA 法の結果と一致して N 末端 100-125 および C 末端 403-429 が多量体形成に重要であると考えられた。また 119 番目の W を A に変化させると全長 NP との相互作用は検出されず、この領域の重要性が確認された。

Part II および III ではハンタウイルス NP を bait として Yeast two-hybrid 法でヒト腎臓細胞及

び HeLa 細胞のライブラリをスクリーニングし、NP に相互作用する宿主細胞蛋白を同定・解析した。その結果、6 種類の SUMO-1 関連蛋白を同定した。すなわち、PIAS1, PIASXbeta (SUMO-1 ligase)、Ubc9 (SUMO-1 conjugation enzyme), HIPK2, TTRAP, CHD3 (SUMO-1 結合蛋白)であった。また、PIAS が NP と相互作用するためには、PIAS の機能ドメインである Ring-like domain の存在と、多量体形成能を有する NP が必要であり、NP が立体構造依存性に SUMO-1 付加を受ける可能性が示された。

以上の研究を通じてハンタウイルスの NP の多量体形成に必要な部位を明らかにした。その結果、ハンタウイルス NP の多量体形成には C 末端、および 100-125 の二つの部位が特に関与していることが明らかになった。さらに NP に相互作用する宿主因子として PIAS1、PIASXbeta、Ubc9、HIPK2、TTRAP 及び CHD3 を同定した。これらはいずれも SUMO-1 関連物質である。

口頭発表において、吉木敬教授より、ハンタウイルス複製における宿主蛋白の利用について、NP の血清型特異的エピトープの形成とその意義と考えられる応用について質問があった。次いで高田賢蔵教授よりウイルス感染における SUMO-1 付加の意義について、宿主細胞因子との結合能を欠く組み換えあるいはミュータント ウイルス作製が可能であるかどうかの質問があった。さらに有川二郎教授からは、ハンタウイルスの異なる血清型間で反応性が異なる理由、ハンタウイルス血清型間のアミノ酸の相同性について質問があった。いずれの質問に対しても、申請者は多くの報告を引用しおおむね適切に回答した。

本研究はハンタウイルスの NP の多量体形成に必要な部位を明らかにし、さらに NP が SUMO-1 による修飾を受ける可能性を示したものであり、今後ハンタウイルスの宿主細胞内での挙動や病原性発現機構との関連を明らかにする上で貢献することが期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院博士課程における研鑽や単位取得なども併せ申請者が博士（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。