

論文内容要旨

Study on particle formation mechanism of hepatitis B virus (B型肝炎ウイルスの粒子形成機構に関する研究)

主指導教員：坂口 剛正教授

(医歯薬保健学研究科 ウイルス学)

副指導教員：茶山 一彰教授

(医歯薬保健学研究科 消化器・代謝内科学)

副指導教員：酒井 規雄教授

(医歯薬保健学研究科 神経薬理学)

松原 稔樹

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

B型肝炎ウイルス(HBV)のヌクレオカプシドを構成する Core タンパク質は、単独発現でウイルス様粒子 (VLP) を形成して細胞から放出され、HBV の出芽の原動力になっていると考えられるが、詳細な出芽機構は完全には解明されていない。先行研究において ESCRT 関連タンパク質 Alix との相互作用が報告されているので、その結果をもとに Core タンパク質の放出機構の解析を試みた。また、HBV のエンベロープを構成する S タンパク質に関しても、単独発現で VLP を形成するが、その意義は不明である。さらに自然免疫に関連してウイルスの出芽を抑制する tetherin と S タンパク質との関係について解析を試みた。

Core タンパク質に関して、部分的に欠損させた Core タンパク質を Alix とともに細胞で発現し、IP-WB(免疫沈降後ウエスタンブロット)もしくは RI-IP(放射性同位体標識免疫沈降)によって検討した結果、両者の相互作用に Core タンパク質 α -3 ヘリックスが関与することを見いだした。さらに α -3 ヘリックス部位で3アミノ酸残基ずつのアラニン・スキャンニングを行って、56-58 位のアミノ酸残基が Alix との相互作用に強く関与しているという結果を得た。しかし、予想に反して、56-58 位のアラニン変異体においては、Core タンパク質による細胞外への粒子放出が抑制されなかった。

次に、Core の C 末端に位置するアルギニンに富む領域 (ARD) を欠損すると Core の放出が見られなかったことから、ARD に着目することとした。ARD の出芽における機能を解析するため、長さが変化しないように電荷を反転または中性に近づけた変異体を細胞で発現し、VLP 放出の変化を調べたところ、特に電化を反転させた変異体において細胞外への粒子放出が観測されなかった。このことから、本来 ARD が持つ強い負の電荷は、遺伝子との相互作用のためだけではなく、Core タンパク質が細胞外に放出される際に重要な役割を持つことが明らかになった。Blue-Native PAGE 法を用いて、Core が、粒子形成によると考えられる多量体を形成しているかを調べ、ARD 変異による出芽能の変化との関連を比較した。ARD 電荷反転変異体においては、多量のモノマー、オリゴマーが観察され、ヌクレオカプシドの形成不全がおこっていると考えられた。このことから Core タンパク質の細胞放出には、Core が集合して多量体を形成することが必要であると考えられる。また、Alix との相互作用部位特定の実験に使用した 56-58 位のアラニン変異体においても類似した粒子形成不全現象が観察され、さらに検討が必要であると思われる。

S タンパク質に関して、培養細胞に S タンパク質の遺伝子あるいは HBV ゲノムをそれぞれ導入して実験的に生成した VLP と、B型肝炎患者結血清中に見られる subviral particle について、密度、界面活性剤感受性などを検討した結果、類似した性状を持つことが示唆された。このことにより、細胞での S タンパク質の単独発現によって実験的に生成した VLP は臨床的に見られる患者体内の粒子を解析するために有効な手段となりうることを示した。

tetherin の有無による S タンパク質による VLP (S-VLP) の放出量を比較したところ、tetherin によって S-VLP 出芽が阻害された。S タンパク質と tetherin を発現させた細胞内において、両者が共局在していることを、蛍光抗体法を用いて確認した。一方、HBV ゲノム DNA を保有して HBV 複製が持続している培養細胞 (T23) において、tetherin を過剰発現させても、HBV

成熟粒子の指標と考えられるゲノム DNA の細胞外への放出は有意には低下しなかった。さらに、T23 細胞において、tetherin を siRNA によってノックダウンしたところ、HBV DNA の放出に変化は見られなかった。加えて、ヒト肝臓をもつマウスに HBV を感染させた場合、非感染の場合と比較して mRNA マイクロアレイで測定した tetherin の発現量が上昇していた一方で、HBV 感染自体の抑制は見られなかったため、in vivo における tetherin のウイルス抑制作用は限定的であると考えられた。

放出される subviral particle は正常な HBV 粒子の放出量に比べて 10 万倍に達するという報告もあり、subviral particle を過剰放出させることで生体内において HBV 正常粒子を tetherin の作用から保護する囷のような役割を持っているのではないかと考えられる。subviral particle は抗体の効果を減弱する機能があると言われていたが、宿主免疫機能である tetherin の抗ウイルス作用から逃れる効果ももつ可能性を示した。