

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（医学）	氏名	松原 稔樹
学位授与の条件	学位規則第4条第①・2項該当		
論文題目 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)			
論文審査担当者			
主査教授	菅野 雅元	印	
審査委員教授	田中 純子		
審査委員准教授	入江 崇		
<p>〔論文審査の結果の要旨〕</p> <p>B型肝炎ウイルス(HBV)のエンベロープを構成するSタンパク質は、単独発現でウイルス様粒子(VLP)を形成するがその意義は不明である。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。また、HBVのヌクレオカプシドを構成するCoreタンパク質も、単独発現で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可能性があるが、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。</p> <p>Sタンパク質に関して、培養細胞にSタンパク質遺伝子あるいはHBVゲノムをそれぞれ導入して実験的に生成したVLPと、B型肝炎患者血清中に見られるsubviral particleについて、密度、タンパク質組成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。</p> <p>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、HBVDNA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</p>			

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圈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っている可能性を示した。

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(免疫沈降後ウェスタンブロット)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。

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、長さを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 タンパク質が、カプシド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、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 が集合してカプシド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、Core タンパク質によるカプシド形成と Alix 結合との関連が示唆された。これについては、さらに検討が必要であると思われる。

以上の結果から、本論文は HBV の S タンパク質あるいは Core タンパク質による VLP 放出の機構とその意義について明らかにした点で高く評価される。

よって審査委員会委員全員は、本論文が著者に博士 (医学) の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。

最終試験の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（医学）	氏名	松原 稔樹
学位授与の条件	学位規則第4条第①・2項該当		
論文題目 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)			
最終試験担当者			
主査教授	菅野 雅元	印	
審査委員教授	田中 純子		
審査委員准教授	入江 崇		
〔最終試験の結果の要旨〕			
判定合格			
<p>上記3名の審査委員会委員全員が出席のうえ、平成30年12月10日の第2回研究科発表会（MD-PhDコース）及び平成31年2月15日日本委員会において最終試験を行い、主として次の試問を行った。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1 HBV放出の多様性の機構と意義 2 細胞株における tetherin の抗ウイルス作用の違い 3 ARD 欠損 Core タンパク質の細胞外放出についての既報と本結果の整合性 4 Tetherin 発現量および HBV 放出の個人差 5 S-VLP が受容体結合において囿となっている可能性 6 S-VLP、Core-VLPの薬剤、ワクチンなどへの応用の可能性 <p>これらに対して極めて適切な解答をなし、本委員会が本人の学位申請論文の内容及び関係事項に関する本人の学識について試験した結果、全員一致していずれも学位を授与するに必要な学識を有するものと認めた。</p>			