

氏 名	たか はし たく お 高 橋 拓 男
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学 位 記 番 号	薬 博 第 463 号
学位授与の日付	平 成 13 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	薬 学 研 究 科 生 命 薬 科 学 専 攻
学位論文題目	狂犬病ウイルスのマトリックスタンパク質の構造と機能に関する研究

論文調査委員 (主 査) 教 授 河 合 明 彦 教 授 川 崎 敏 祐 教 授 市 川 厚

論 文 内 容 の 要 旨

狂犬病ウイルス (RV) はラブドウイルスファミリーに属し、そのゲノムはマイナス鎖の RNA で、ヌクレオプロテイン (N) に包まれてヌクレオカプシドを形成し、さらにフォスフォプロテイン (P) と RNA ポリメラーゼであるラージプロテイン (L) が結合してリボヌクレオプロテイン (RNP) 複合体を形成してはじめてウイルスゲノムの複製及び転写を始動することができる。RNP を包むエンベロープは宿主細胞に由来する脂質二重膜とこれを貫通するウイルス糖タンパク (G) 及び膜を裏打ちするマトリックスタンパク (M) から構成されている。

M タンパクはエンベロープと RNP との架橋、砲弾型ウイルス粒子構造の安定化等アッセンブリー過程に関与する多機能な蛋白である。さらに RNP に結合して RNA ポリメラーゼの転写を抑制する報告がある。リバーズジェネティクスを用いた研究から M タンパク欠損ウイルスの出芽効率は親株と比べ低下し、ウイルス粒子構造を維持することができないことが示された。また、同じラブドウイルス科に属する水疱性口内炎ウイルス (VSV) と比較して、RV の出芽効率は非常に低く、その要因が M タンパクの構造あるいは機能の違いに依存することが推察されている。しかし、現行 RV ワクチン製造の省力化、遺伝子組み換えワクチンの開発、遺伝子治療のためのベクター化等応用的課題を検討するうえで必要な M タンパクの機能ドメインや高次構造等についての知識が欠如している。そこで、著者は M タンパクの高次構造や構造変化による RNP との結合性、宿主蛋白及び他のウイルス蛋白との相互作用、粒子アッセンブリーの過程における役割等について解析を行った。

第 1 章：ウイルス感染細胞における M タンパクの存在様式の検討

狂犬病ウイルス (HEP 株) 感染細胞における M タンパクの存在状態を明らかにする目的で界面活性剤 Nonidet P-40 (NP-40) または sodium deoxycholate (DOC) を含む緩衝液を用いて、ウイルス感染細胞を可溶化し、蔗糖密度勾配遠心にかけて得た分画について免疫沈降法により解析した。いずれの抽出条件下においても大半の M タンパクはトップ分画に検出されたが、M タンパクのダイマーは DOC 抽出の場合にのみ、沈降速度の少し速い分画に検出されたことから、M タンパクのダイマーは NP-40 抽出に抵抗して細胞骨格成分とも結合していることが示唆された。また、NP-40 処理によって解離しなかった M タンパクについて SDS 可溶化後抗 M 抗体を用いた免疫ブロット法で解析した結果、ダイマーとモノマーが 1:3 の比率で存在し、多くは RNP に結合していることが示唆された。また、flotation assay では M タンパクのダイマーが膜分画に浮揚し、ダイマーは脂質膜とも結合することが示された。

第 2 章：M タンパクの性状解析

DOC で抽出された感染細胞の溶解液を密度勾配遠心にかけて得られた M タンパクを含む分画は、ダイマーが検出された分画と一致することから、本抗体がモノマーよりもダイマーを強く認識することが示唆された。一方、DOC を含まない M タンパク分画を 4°C から 42°C の範囲で反応性を調べた結果、温度上昇に依存して認識されるものが増え、また、DOC の添加により認識されるものが増加し、0.1%が至適濃度であった。さらに、免疫ブロット解析では、M タンパクのモノマ

ーとダイマーが同抗体で同程度に認識された。また、ウイルス感染細胞の蛍光染色像では、#3-9-16モノクローナル抗体で認識されるMタンパクがゴルジ領域に局在することが示唆された。以上からMタンパクのコンフォメーション変化によってエピトープ部位が露出した構造と隠れた構造があり、エピトープを露出した構造のものがゴルジ野において細胞骨格成分と結合していることが示唆された。

第3章：RNPおよびMタンパクの結合の解析

ウイルス感染細胞をNP-40あるいはDOCを含む緩衝液で可溶化した後、蔗糖密度勾配遠心にかけて分画した³⁵[S]標識ウイルスタンパク質と別に分離したRNPとを混合することにより*in vitro*の再結合実験を試みた。解析法として、RNPに再結合したウイルスタンパクを超遠心ベレットとして回収して検出する遠心法、及びプロテインA結合抗N抗体を用いてRNPを沈降させて検出する免疫沈降法とを確立した。PタンパクはNP-40に影響されることなくRNPに結合したが、MタンパクはPタンパクと比べて界面活性剤の影響を受けやすく、界面活性剤非存在下でのみ結合し、主にダイマーが結合することが示された。また、結合条件として150mMの至適塩濃度やpH5~6の弱酸性条件によってもその結合性が増すことが示された。さらに、flotation assayにおいて脂質膜に直接結合しないNタンパクが浮揚することが観察され、これはRNPがエンベロープ成分、おそらくMタンパクと会合することによるものと推察される。

以上の結果から、1) RNPとの結合がMタンパクの構造変化に依存し、#3-9-16エピトープ部位を露出した構造をとるダイマーがモノマーに比べてRNPに結合しやすいこと、2) Mタンパクのモノマーの一部は#3-9-16エピトープを露出する構造をとるとともに、ダイマーを形成することによって安定化し、かつゴルジ野へ移行すること、また、3) ゴルジ野ではMタンパクのダイマーはGタンパクと結合し、さらに、RNPと結合することにより出芽に向けての準備が行われることが推察される。

論文審査の結果の要旨

狂犬病についてはL.パスツールによるワクチン開発以来100年以上の研究の歴史があるが、未解決の問題が多い。特にワクチンは培養細胞系でのウイルス産生の収量が少ないために不活化ワクチンの製造コストが非常に高価であり、長年に亘って改良が求められている。

狂犬病ウイルス(RV)のマトリックス(M)タンパクはウイルス粒子のエンベロープとリボヌクレオカプシド(RNP)との間を架橋する位置に存在する構造タンパク質の一つであり、また細胞内では多機能な分子として働くと考えられている。例えば、Mタンパク欠損ウイルスは親株と比べて出芽効率が非常に低く、ウイルス粒子構造を維持し得ないなど、アッセンブリー過程や粒子構造の安定化等に関与し、またウイルスRNAポリメラーゼを抑制することも知られている。しかし、Mタンパクの高次構造や構造変化による機能調節の可能性、宿主タンパク質や他のウイルスタンパク質との相互作用の意義など不明な点も多く、著者はMタンパクについてのこれらの問題を明らかにすべく、感染細胞の材料を用いて解析を行った。

まず、ウイルス感染細胞におけるMタンパクの存在様式を検討した。この目的には、界面活性剤Nonidet P-40(NP-40)あるいはsodium deoxycholate(DOC)を用いて感染細胞を溶解し、蔗糖密度勾配遠心にかけて得た分画について免疫沈降法などにより解析した。いずれの抽出条件下においても大半のMタンパクは超遠心のトップ分画に検出されたが、少量存在するMタンパクのダイマーはモノマーと1:3の比率でRNPと結合し、RNPと共に細胞骨格成分とも結合して存在していることが示唆された。さらに、MタンパクとRNPとの結合はNP-40抽出に抵抗したが、DOC抽出によりダイマーのみがRNPから解離した。超遠心分画ではモノマーよりもかなり沈降速度の速い分画に検出され、ダイマー同士の多量体形成が示唆された。

次に、このようなDOC抽出で得られた沈降速度の速いMタンパクについて、その性状を調べた。この目的には、MタンパクのN末端のリニアエピトープを認識するモノクローナル抗体#3-9-16を用いた。感染細胞をDOCで抽出し、密度勾配遠心にかけて得られた分画について、#3-9-16抗体で免疫沈降すると、ポリクローナル抗体でMタンパクが検出されるどの分画からもモノマーはほとんど沈降されず、主として沈降速度の速い分画からMタンパクのダイマーのみが検出された。この結果は、リニアエピトープを認識する本抗体が非変性条件下ではモノマーよりもダイマーを強く認識し、

またそのエピトープ部位はモノマーにおいて隠されており、ダイマーにおいて露出していることも示唆している。なお、モノマーについては、エピトープ部位を露出しているものが僅かに存在していたが、DOC 存在下 (0.1%DOC 添加が最適)あるいは温度上昇に依存してエピトープ部位を露出する率が増加した。また、感染細胞の蛍光抗体染色では、#3-9-16 抗体で認識される M タンパクがゴルジ領域に局在することが示唆された。以上から、M タンパクはそのコンフォメーションを変化することによってエピトープ部位を露出し、かつ二量体を形成して安定化すること、またエピトープ部位を露出した二量体構造のものがゴルジ領域に分布し、ウイルス糖タンパク質と結合するのみならず、細胞骨格成分とも結合していることが示唆された。

最後に、感染細胞から抽出した M タンパクと RNP との再結合の可能性について検討した。感染細胞を NP-40 および DOC で可溶化し、蔗糖密度勾配遠心にかけて得られたウイルスタンパク質分画、およびこれとは別に分離した RNP とを混合することにより *in vitro* の再結合実験を試みた (この再結合の検出法として遠心法と免疫沈降法を確立した)。再結合実験では、M タンパクは P タンパクと比べて界面活性剤の影響を受けやすく、また主にダイマーが RNP に結合することが示された。また、塩濃度や PH によっても結合性が影響された。さらに、flotation assay において脂質膜に直接結合しない N タンパクが浮揚することが観察された。これはラフトと結合したエンベロープ成分、おそらく M タンパクと RNP とが会合することによるものと推察される。

以上の結果から、M タンパクは2つの構造をとり、両者ともウイルス粒子の構成成分として取り込まれるが、特に#3-9-16 抗体に認識される構造のものは二量体を形成し、細胞内では主としてゴルジ領域に分布すること、ゴルジ領域で二量体の M タンパクはウイルス糖タンパクと結合するだけでなく、RNP とも結合して粒子形成過程に関わる可能性が示唆された。これらの成果は、現行 RV ワクチン製造の省力化、遺伝子組み換えワクチンの開発、遺伝子治療のためのベクター開発等を検討する上で不可欠の M タンパクに関する基礎的知見を新たに与えるものである。

よって、本論文は博士 (薬学) の論文として価値あるものと認める。

更に、平成13年2月27日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。