

学位授与記録簿（博士）

バイオサイエンス研究科

氏名	佐藤 友人
学位の種類	博士（バイオサイエンス）
授与年月日	2015年（平成27年）3月21日
学位授与の要件	本学学位規程第18条第1項該当者（学位規則第4条第1項）
学位論文の題名	麻疹ウイルスF蛋白の膜融合活性発現の分子機構
審査委員	主査 教授 伊藤 正恵 副査 教授 齊藤 修 副査 教授 山本 章嗣

論文内容要旨

麻疹ウイルス(measles virus: MV)は、hemagglutinin (H)蛋白質で細胞のレセプターに結合した後、ウイルスエンベロープと標的細胞膜、あるいは感染細胞膜と隣接する非感染細胞膜を膜融合させてウイルス RNA ゲノムを細胞質内に放出し、感染を広げる。この膜融合は、fusion(F)蛋白質が熱力学的に準安定な prefusion 構造から、不安定な活性化中間状態を経て、高度に安定化した postfusion 構造に構造変化することによって引き起こされ、その活性に影響を及ぼすアミノ酸置換は、stalk 部分の heptad repeat B (HR-B) 領域と head 部分の DIII 領域の周辺で多く確認されている。本研究では、HR-B 領域内のアミノ酸置換により細胞融合活性を欠失した変異 F 蛋白質と、細胞融合活性を回復したその復帰変異 F 蛋白質について、熱力学的安定性の特性を明らかにし、立体構造モデルを用いて F 蛋白質が細胞融合活性を調節するメカニズムについて検討した。

麻疹ウイルス F 蛋白質は、分子内でその安定性を相補することにより、37°Cで融合活性を発揮する。麻疹ウイルス臨床分離株から、F 蛋白質の HR-B 領域に N465H 置換を持ち、細胞融合活性を失った変異株を単離した。この変異株から得られた細胞融合を示す5つの復帰変異ウイルスの F 蛋白質は、いずれも N465H 置換はそのまま、DIII 領域に新たにそれぞれ N183D、F217L、P219S、I225T、G240R のアミノ酸置換が加わっていた。N465H を持つ F 蛋白質は熱力学的に安定化しており、His の大

きな環状構造の側鎖が、HR-B 領域の 3 本の helix が解離して構造変化のきっかけとならないよう保護している可能性が考えられた。一方、DIII 領域の 5 つの変異を持つ F 蛋白質は、いずれも不安定化していた。F 蛋白質 prefusion 構造モデル上で、N183D、P219S、G240R の変異はサブユニットの界面に位置しており、側鎖の電荷やサイズ、極性等の物理化学的な性質が変化することにより、サブユニット間相互作用の不安定化を引き起こしているものと推察された。また、F217L と I225T 変異は、fusion peptide の head 部分からの解離を容易にし、構造変化のためのエネルギーバリアを下げているものと考えられた。F 蛋白質を安定化する HR-B 領域の N465H 変異と不安定化する DIII 領域の変異を同時に持つ F 蛋白質は、37°C で最も効率的に細胞融合活性を示した。本研究では、prefusion 構造上でお互いに離れた HR-B 領域と DIII 領域が F 蛋白質の安定性を相補することにより、37°C という生理的温度で高い融合活性を発揮させることを示した。

麻疹ウイルス F 蛋白質の 465 位アミノ酸は、その大きさと側鎖の方向により融合活性を制御する。麻疹ウイルス F 蛋白質の HR-B 領域は融合活性の制御に関わることが知られているが、これまでに同定された変異は全て融合活性を促進しており、細胞融合活性を欠失した変異株で同定された N465H 変異は、融合活性を低下させる初めの変異であった。そこで、F 蛋白質の 465 位を様々なアミノ酸に置換し、融合活性の制御に関連する特徴について調べた。F 蛋白質の融合活性は、環状構造を持つ Phe, Tyr, Trp, Pro, His を除き、アミノ酸側鎖の C α からの長さ、あるいは分子の物理的大きさの指標である van der Waals 体積と相関関係を示した。またこれらの非環状アミノ酸では、大きくなるほど、F 蛋白質の構造変化のためのエネルギーバリアを下げていた。一方、環状アミノ酸を持つ 5 つの F 蛋白質は、細胞融合の発現により多くのエネルギーを必要とし、安定化していた。465 位置換の影響を F 蛋白質構造モデルにより解析したところ、非環状で大きなアミノ酸は、側鎖が head 部分の疎水性アミノ酸のクラスターに侵入して相互作用を妨害し、分子の不安定化を引き起こしていた。そのため、F 蛋白質の細胞融合活性を亢進させているものと考えられた。Pro 以外の環状構造のアミノ酸の場合、それらの側鎖は prefusion 構造の head 部分に対して逆向きとなり、結果として head 部分に接触しないだけでなく、HR-B 領域表面を保護することで helix の束を安定化し、膜融合初期過程における HR-B helix の解離を防いでいると推察された。以上の結果により、麻疹ウイルス F 蛋白質 HR-B 領域のアミノ酸が融合活性を制御する仕組みについて示すことができた。

論文審査結果要旨

本研究は、F 蛋白質の点突然変異により細胞融合活性を失った麻疹ウイルス変異株から、融合活性を回復した復帰変異ウイルスを単離して解析するという独創的な手法を用い、F 蛋白質の立体構造変化により引き起こされる細胞融合活性発現・調節機構にアプローチしている。

F 蛋白質の stalk 部分の HR-B 領域に N465H 置換を持つ細胞融合活性を失った変異ウイルス株を単離し、これを軸に head 部分の DIII 領域に追加変異を持つ復帰変異ウイルス株の単離、更には変異導入 F 蛋白質の発現、融合活性測定などを行い、F 蛋白質の熱エネルギー的安定性と融合活性の関係から、F 蛋白質上の HR-B 領域と DIII 領域が F 蛋白質の安定性を相補して調節し、細胞融合活性を支配していることを突き止めた。また、HR-B 領域の 465 位を全てのアミノ酸に置換して機能解析することにより、465 位アミノ酸の側鎖の方向と大きさが融合活性を決定付け、F 蛋白質の機能発現に非常に重要な役割を果たしていること明らかにした。

本研究は、F 蛋白質の融合活性発現にはその熱力学的安定性が一定の範囲内であることが必要であるという結論を導き出し、高く評価できる。研究結果は、膨大な実験に裏打ちされた信頼度の高いデータに導かれており、解明された分子機構は学術的にも意義がある。博士論文は良く整理され、口頭発表の内容・方法・質疑応答は適切で、データへの深い理解を示していた。HR-B 領域と DIII 領域による F 蛋白質の分子内安定性相補については、筆頭著者の英文論文として発表されており、英語能力も十分に備えていると判断した。

以上のことから、審査委員は全員一致で、長浜バイオ大学の博士（バイオサイエンス）の学位を授与するに値すると結論した。