

平成30年6月1日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15283

研究課題名(和文) エボラウイルスと宿主間相互作用の解析

研究課題名(英文) The interaction between host and ebolavirus

研究代表者

末永 忠広 (Suenaga, Tadahiro)

大阪大学・微生物病研究所・准教授

研究者番号：20396675

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：エボラウイルスは、ウイルスグリコプロテイン分子(Ebo-GP)を宿主レセプター分子と結合させることによって宿主細胞内に侵入する。Ebo-GPと結合し宿主細胞表面に発現する新規レセプター分子EGPRを同定し、EGPRとEbo-GPとの結合には、Ebo-GP上の糖鎖が必須であることが判明した。さらに、EGPRはヒトに感染するエボラウイルス5亜種全ての感染性を増大することを明らかにした。宿主がウイルスを排除するためのNK細胞を活性化する分子EGPIMとそのリガンドとの結合をEbo-GPが阻害することが明らかとなり、エボラウイルスはNK細胞による細胞障害活性から逃避することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：When ebolavirus enter host cells, ebolavirus glycoprotein (Ebo-GP) associates with host receptors. We identified a new entry receptor EGPR on the surface of host cells. We also found that glycans on Ebo-GP are required for the binding of EGPR to Ebo-GP. Furthermore, EGPR enhances the infectivity of all 5 subgenus of ebolavirus that are known to infect human. We also analyzed EGPIM expressed on the NK cells that attack and remove viruses in the host. We discovered that Ebo-GP inhibits the binding of EGPIM to the ligand, which suggests a mechanism that ebolavirus the evade from cytotoxicity by NK cells.

研究分野：ウイルス学

キーワード：エボラウイルス グリコプロテイン エントリー 免疫逃避

1. 研究開始当初の背景

エンベロープをもつエボラウイルスやヘルペスウイルスが宿主細胞に侵入(エントリー)する際、ウイルス分子と宿主側レセプターが結合し、ウイルスエンベロープと細胞膜・エンドソーム膜と融合することが重要である。我々は、ヘルペスウイルスや水痘帯状疱疹ウイルス(VZV)のエントリーレセプターである PILR α (Cell 2008)、NMHC-IIA (Nature 2010)、MAG (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2010)、VZV のエントリーレセプターであり、かつ免疫細胞を負に制御する分子 VgBR (Suenaga et al. 論文準備中)などを明らかにしてきた。エボラウイルス GP (Ebo-GP) は、膜融合を起こすことが知られている分子であるが、我々は、EGPR-免疫グロブリン融合タンパク質 (EGPR-Fc) が Ebo-GP 発現細胞と結合することから、Ebo-GP の新規結合分子 EGPR を同定した (図 1A)。さらに、ナチュラルキラー (NK) 細胞を活性化する NK 細胞上分子 EGPIIM と、そのリガンド EGPIIM-L との結合が、Ebo-GP によって阻害されることを見出した (図 1B)。

2. 研究の目的

エンベロープをもつウイルスが宿主に侵入(エントリー)する際、ウイルス分子の宿主細胞側レセプターへの結合とそれに続くエンベロープと宿主膜の融合が重要である。エボラウイルスの場合、Ebo-GP が細胞表面で MGL、Axl、DC-SIGN などの分子と結合することによって、ウイルス粒子を宿主細胞表面に吸着させた後、エンドサイトーシスによってとりこまれる。Ebo-GP は、Endosome 内でプロセッシングを受けた後、エンドソームに局在する分子 Niemann-Pick C1 (NPC1) と結合し、エボラウイルスエンベロープと lysosome 膜の融合を引き起こし、それに続いてエントリーが起こるとされている。ヘルペスウイルスでは、エンベロープが細胞表面において、宿主細胞膜と融合してウ

イルスエントリーを引き起こすことから、エボラウイルスにおいても NPC1 非依存的に細胞表面での膜融合・エントリーを引き起こすのか、我々が新たに同定した宿主側分子 EGPR が Ebo-GP に対する細胞表面でのレセプターとなるのかを明らかにする。

宿主の免疫細胞は、ウイルスや感染細胞上の分子を認識して、ウイルスを排除する。ウイルスは、その排除機構から逃れるため、免疫細胞を負に制御するといったように、生体内ではウイルス対宿主の攻防が行われている。エボラウイルスの場合、感染細胞の MHC class I を、Ebo-GP で覆い、CD8⁺ T 細胞の認識から逃れる。しかし、MHC class I を持たない細胞は、NK 細胞に非自己と認識され排除される。一般的に、ウイルスは、NK 細胞から逃れるため、宿主細胞上で、NK 細胞の抑制化レセプターリガンドを発現させたり、活性化レセプターリガンドをダウンレギュレートしたりする。我々は、Ebo-GP によって免疫細胞分子との結合が制御される宿主分子 (EGPIIM リガンド、EGPIIM-L) と EGPIIM-L と結合する免疫細胞活性化分子 EGPIIM を発見した (図 1B)。エボラウイルスが、Ebo-GP を使って、EGPIIM と EGPIIM-L との結合を阻害することによって、宿主免疫から逃避するのかどうかを解析する。

Ebo-GP は、膜融合、エントリーだけでなく、宿主の抗体ターゲットともなるなど、エボラウイルス表面において、多くの働きをされると考えられている分子である。本研究では、Ebo-GP をめぐるエボラウイルスと宿主間の相互作用を明らかにする。

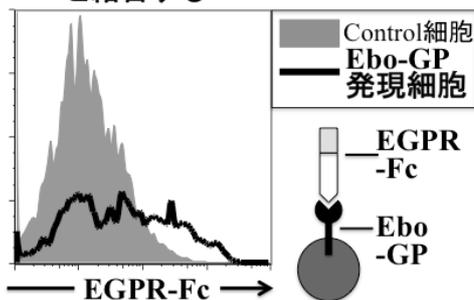
3. 研究の方法

- EGPR と Ebo-GP の結合の性質を、EGPR や既報の NPC1 や Tim-1 等と Ebo-GP 可溶性タンパク質を用いてそれぞれとの親和性を解析する。また、膜融合アッセイ、Ebo-GP 発現シュードウイルス感染実験を行い、EGPR のレセプターとしての機能を検証する。EGPR と Ebo-GP の変異体を利用し、両者の結合や膜融合に必要な構造を決定し、エントリー機構を解析する。
- Ebo-GP 発現細胞では、NK 細胞活性化レセプター EGPIIM とそのリガンド EGPIIM-L の結合が低下している (図 1B)、この観点から、エボラウイルスの NK 細胞からの逃避機構を解析する。Ebo-GP 発現細胞における、NK 細胞による細胞障害活性を解析する。

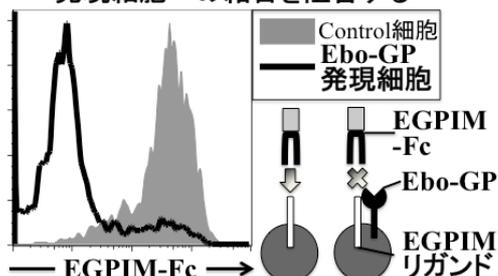
4. 研究成果

図 1(A) のように EGFR-Fc は Ebo-GP 発現細胞と結合したので、EGPR が、エボラウイルス感染効率を増大させるかを検討した。バイオセーフティーの関係上、エボラウイルス感染実験を、BSL4 環境下以外で行うことはできないため、Ebo-GP を発現する水疱性口内炎ウイルス (VSV) のシュードウイルスを用いた (北海道大学、高田礼人教

図1 (A) EGPR-Fcは、Ebola GP発現細胞と結合する



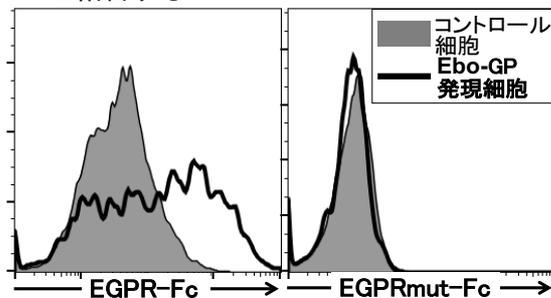
(B) Ebo-GPは、EGPIIM-FcのEGPIIMリガンド発現細胞への結合を阻害する



授との共同研究)。すると、コントロール細胞に対する EGPR 発現細胞への感染効率は、VSV コントロールウイルスのおよそ 2.5 倍となった。エボラウイルスで、ヒトに感染する亜属として、ザイール、スーダン、タイフォレスト、ブンディブーギョ、レストンの 5 種類の亜属が知られている MGPR 発現細胞は、これら5亜属の Ebo-GP を発現するシュードウイルス全てに対して感染感受性が増大した。一方、EGPR 発現細胞に対して、エボラウイルスと同じフィロウイルス科に属し、致死性の高いマールブルクウイルスのシュードウイルスへの感染感受性は、コントロールウイルスと同程度であった。このことは、EGPR がフィロウイルスの中でも、エボラウイルス特異的に感染を増大させるということを示唆した。

Ebo-GP は糖鎖修飾に富む分子であり、Ebo-GP 上の糖鎖が、Ebo-GP の受容体との結合に関与し、宿主からの抗体認識から逃れることに関与していることが報告されている。Ebo-GP と EGPR との結合に Ebo-GP の糖鎖が関与しているかどうかを解析した。EGPR が糖鎖を認識できなくなる変異体の Fc 融合タンパク質 (EGPRmut-Fc) を作成し、Ebo-GP 発現細胞との結合性を解析した (図2)。EGPR-Fc が Ebo-GP 発現細胞とよく結合するのに対して、EGPRmut-Fc はコントロール細胞と同様に Ebo-GP 発現細胞と結合しなかった。すなわち、Ebo-GP と EGPR の結合には、Ebo-GP 上の糖鎖が必要であることが判明した。

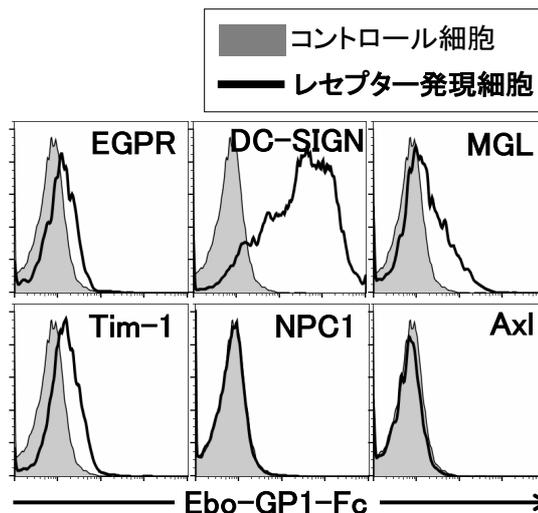
図2 EGPRは糖鎖依存的にEbo-GP発現細胞と結合する



これまで Ebo-GP の分子構造、機能の解析は数多く行われている。Ebo-GP は宿主細胞内在性酵素により、S-S 結合で結ばれた GP1, GP2 の subunit に分かれ、GP1 とレセプターが結合した後、GP2 に作用し膜融合が実行されるといわれている。そこで、GP1-Fc を作成し、GPCR だけでなく、エボラウイルスのエントリーに関わる分子として報告されている NPC1, Tim-1, Tyro3 ファミリーである Axl, MGL, DC-SIGN を発現細胞との結合性を解析した (図3)。GP1-Fc は、DC-SIGN, MGL 発現細胞とよく結合し、NPC-1 発現細胞や Axl 発現細胞とは結合しなかった。一方で、EGPR, Tim-1 とも結合したが DC-SIGN ほど高い親和性ではなかった。このことは、EGPR が、DC-SIGN, MGL, Tim-1, Axl と同様に細胞表面におけるウイルス粒子の吸着に関与することが示唆さ

れた。

図3 EGPRはEbo-GP1と結合する



これまで、エボラウイルスの感染においては、NPC1 が必須であると言われている。EGPR を介したエボラウイルスの感染増強が、NPC1 依存性か否かを検討した。CRISPR/Cas9 システムを用いて NPC1 をノックアウトした細胞4クローンに、EGPR を安定発現させた細胞及びコントロール細胞を合計8種類作成した。これらの細胞に対する、Ebo-GP 発現シュードウイルスの感染性を解析した。コントロールの VSV シュードウイルスは8種類全ての細胞に高感染性を示したが、NPC1 ノックアウト細胞には、EGPR の発現の有無に関わらず Ebo-GP 発現シュードウイルスは上記8種類の細胞に感染しなかった (北海道大学、高田礼人教授との共同研究)。このことは、EGPR を介したエボラウイルスの感染には NPC1 が必須であることが示唆された。

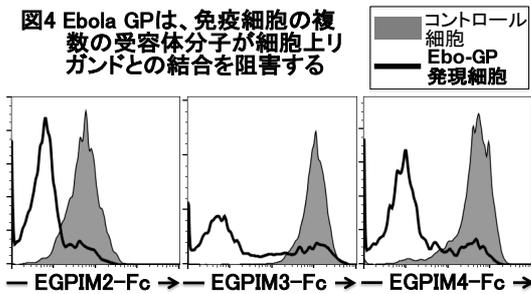
NPC1 は、エンドソームに局在する分子であるので、NPC1 がエボラウイルスの感染に関与するにしても、細胞内にウイルス粒子が取り込まれてからであることがわかっている。一方、我々のヘルペスウイルスにおける研究から、宿主細胞表面に発現するウイルス受容体は、ウイルス分子との結合によって、ウイルスエンベロープと細胞膜の融合を引き起こすことによって、ウイルスを細胞内へエントリーさせることがわかっている。そこで、次に述べるような膜融合アッセイによって、細胞表面での Ebo-GP と MGLR 結合が膜融合に関与するかどうかを解析した。一方の細胞に Ebo-GP と GFP、他方の細胞に受容体である EGPR と DsRed を発現させた細胞を用意する。これらを共培養することによって、膜融合が起これば、多核の巨細胞ができるウイルスフリーの膜融合アッセイを行った。このアッセイは、すでにヘルペスウイルスを始め、多くのエンベロープを有するウイルスによって有効性が確認されているシステムである。しかしながら、Ebo-GP 発現細胞は、DsRed のみ発現したコントロール細胞のみならず、

EGPR 発現細胞との融合を誘導しなかった。このことから、Ebo-GP と EGPR は単に結合するだけでは膜融合を引き起こさないことが示唆された。実際、Ebo-GP が膜融合を引き起こすには、Ebo-GP の S-S 結合を切断する酵素や pH 変化を必要とするという研究もあることから、EGPR を介した膜融合にも、両者の結合以外の要素も必要なのかもしれない。

以上のことから、EGPR は、Ebo-GP と糖鎖依存的に結合することによって、細胞表面でのウイルス粒子吸着に関与することがわかった。さらに、これに引き続いて、ウイルスエンベロップと宿主膜の融合を引き起こす可能性も残されており、さらに NPC1 依存的にエボラウイルスの宿主細胞内への感染を増強することが示唆された。

ウイルスは、宿主生体内において多くの宿主免疫による排除機構にさらされている。ウイルスの感染において、まず自然免疫系によるウイルス、ウイルス感染細胞の排除が試みられる。その後、T 細胞、B 細胞、抗体が機能する獲得免疫系が反応する。ウイルス感染において重要な自然免疫担当細胞として NK 細胞、マクロファージなどが挙げられる。免疫細胞にはその機能を正または負に制御する分子が数多く存在し、その中でも、我々は、図1(B)のように、Ebo-GP の発現により、その発現細胞との本来の結合が低下する EGPIIM を同定した。さらに解析を進めると、Ebo-GP 発現によって、細胞表面上のリガンドとの結合性が低下する分子 EGPIIM²~⁴ も発見した(図 4)。このような挙動を示す分子として、MHC

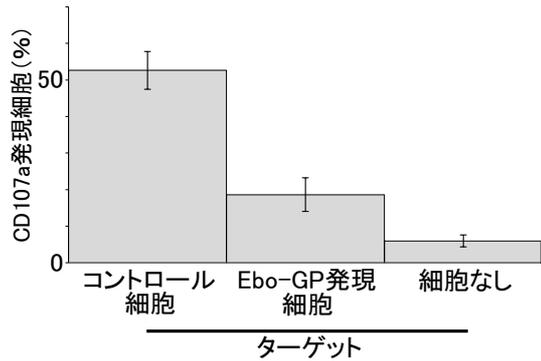
図4 Ebola GPは、免疫細胞の複数の受容体分子が細胞上リガンドとの結合を阻害する



クラスI分子が報告されており、Ebo-GP 発現によって、その立体構造上の障壁によって、ウイルス分子由来の抗原ペプチドを提示している MHC 分子が T 細胞受容体 (TCR) に認識できないようにしているといわれている。

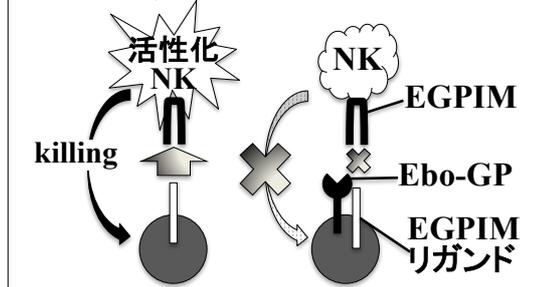
EGPIIMリガンド(EGPIIM-L)を発現している細胞に Ebo-GP が発現しているとき、EGPIIM 発現免疫細胞にどのような影響を及ぼすかを解析した。コントロール細胞もしくは Ebo-GP 発現細胞をターゲットとし、それぞれを NK 細胞と 1:1 で共培養した。NK 細胞が活性化し、ターゲット細胞への障害活性があれば、NK 細胞表面上の CD107a 分子が出現する。すなわち、CD107a 陽性細胞の割合が高いほど NK 細胞は活性化されていることになる。図 5 に示すように、Ebo-GP 発現ターゲッ

図5 Ebo-GP発現細胞は、NK細胞による細胞障害活性に抵抗性となる



ト細胞と共培養した NK 細胞の CD107a 発現は、コントロール細胞と共培養したときより低率だった。すなわち、Ebo-GP によって、NK 細胞の活性化は負に制御されたことになる。Ebo-GP が直接 NK 細胞上のネガティブレセプターを刺激した可能性も否定できない。一方で、当初の仮説通り、Ebo-GP が EGPIIM と EGPIIM-L の結合を阻害している可能性もある。後者の場合、図6に示すように、NK 細胞上に発現するポジティブレセプターが複数存在するため、この内複数が関与している可能性が考えられた。

図6 Ebo-GPは、感染細胞で発現するEGPIIMリガンドとNK細胞のEGPIIM結合を阻害し、NK細胞によるkillingから逃避する



以上のように、エボラウイルスは、感染細胞表面に Ebo-GP を発現させることによって NK 細胞を負に制御することによって宿主免疫系から逃れていることが示唆され、これまであまり明らかにされていないエボラウイルスが NK 細胞から逃避するメカニズムの一端が示唆された。

本研究によって、これまで報告されてきた以上に、Ebo-GP の新たな宿主側の結合分子や機能が明らかとなった。Ebo-GP とそのエントリーレセプターの結合の阻害、Ebo-GP による宿主免疫細胞を負に制御することを阻害することを可能にすれば、エボラウイルスの感染制御に新たな方法を見出すことができると考えられた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 1 件)

1. 末永忠広、迫口瑛史、荒瀬尚、Siglec 分子を介したヘルペスウイルス感染、糖鎖免疫 Glyco-immunology 2018、2018/2/19、東京医科歯科大学(東京)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://immchem.biken.osaka-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1)研究代表者

末永 忠広(SUENAGA, Tadahiro)
大阪大学・微生物病研究所・准教授
研究者番号:20396675