

	氏名	石田 幸太郎	
	本籍（国籍）	北海道	
	学位の種類	博士（学術）	
	学位記番号	連研第 846 号	
	学位授与年月日	令和 5 年 9 月 2 5 日	
	学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当課程博士	
	研究科及び専攻	連合農学研究科 生物資源科学専攻	
	学位論文題目	ヒトパルボウイルス B19 ウイルス様粒子の動態の解析 (Analysis of dynamics of human parvovirus B19 virus-like particles)	
	学位審査委員	主査 弘前大学准教授	森田 英嗣
		副査 弘前大学准教授	笹部 美知子
		副査 岩手大学教授	山下 哲郎
		副査 山形大学教授	小関 卓也

論文の内容の要旨

ヒトパルボウイルス B19 (Human parvovirus B19: B19V) 感染は小児においては伝染性紅斑や成人においては関節痛など比較的軽い症状で済むものの、妊婦への感染は母子感染へとつながり胎児水腫やそれに起因する流産・死産を引き起こす。B19V に対する抗ウイルス薬や有効なワクチンは承認されておらず、罹患した場合は対処療法のみで対応しなければならない。B19V の *in vitro* 増殖系は限られており、抗ウイルス戦略の研究は進んでいない。B19V は ssDNA ゲノムを持つノンエンベロープウイルスであり、ゲノムの両末端には inverted terminal repeats (ITR) と呼ばれる複製に必要なヘアピン構造を持つ。B19V ゲノム中には 3 種類の非構造タンパク質と 2 種類の構造タンパク質がコードされており、B19V の構造タンパク質 VP2 はそのみでウイルス様粒子 (Virus like particle: VLP) を形成する。B19V の宿主細胞における生活環の多くのステップは未だ不明である。本研究ではそのうち、細胞内でアセンブリした B19V 粒子の動態や細胞外放出に着目し解析を進め、その分泌経路の一部を明らかにした。

本研究は B19V 粒子のモデルとして VP2 発現によって形成される VLP を用いた。まず細胞内または細胞外における VLP 解析をより詳細に行うために、種々の解析に適したペプチドタグ標識 VLP を作製した。タグは高感度検出タグである HiBiT タグを用いた。VLP 形成を許容するペプチド挿入部位を探すために、構造情報(温度因子)に基づき HiBiT タグを挿入した VP2 を 12 種類作製した。いずれの HiBiT 挿入 VP2 も発現はしたものの、ショ糖密度勾配遠心での VLP 形成評価では、これらの変異体のうち 3 種類のみが HiBiT 活性を保持したまま VLP を形成していることが分かった。3 種類の挿入箇所は VLP 表面に位置していた。

また、これら VLP 形成許容箇所への HiBiT 挿入はウイルス増殖も維持されるのかどうか、B19V 感染性クローン pB19-M20 に HiBiT タグを導入して調べた。ゲノム複製のネガティブコントロールとして、ヘリカーゼ活性を阻害する K334E 変異を NS1 に導入した pB19-M20 も作製した。まず B19V 非許容性細胞であるヒト白血病細胞 UT7/Epo-S1 での複製をみたところ、HiBiT 活性は NS1 のヘリカーゼ活性依存的に上昇していた。この上昇は ITR の欠損によって抑制されたことから、HiBiT 活性は複製依存的に増加すると考えられた。B19V と同じパルボウイルス科のウイルスであるアデノ随伴ウイルス (AAV) 産生で用いられる pHelper プラスミドと pB19-M20 のコトランスフェクションにより、B19V 非許容性細胞である 293T 細胞ではウイルスゲノム複製が促進するという報告がある。同様の実験を HiBiT 挿入 pB19-M20 で行ったところ、pHelper 依存的に HiBiT 活性の増加が確認された。この pHelper 依存の HiBiT 活性の増加は NS1 K334E 変異ではみられなかった。ゲノム複製の評価でも同様の結果が確認されたことから、pHelper 依存的に 293T では HiBiT 挿入 pB19-M20 の複製の亢進が起きていると考えられた。また、ITR の欠損下でも pHelper は HiBiT 活性を増加させたことから、pHelper は B19V ゲノム複製および VP2 発現両方の増加に寄与することが確認された。UT7/Epo-S1 で複製がみられたサンプルについて細胞内で感染性ウイルスが生成されたかどうか調べるために、細胞溶解液を UT7/Epo-S1 と初代培養赤芽球前駆細胞 CD36+ に接種し HiBiT 活性を測定した。結果として、経時での増加が検出されず、二次感染は確認できなかった。

次に、VP2 の VLP 形成を許容した HiBiT タグ挿入箇所に、GFP11 ペプチドを挿入し VLP の蛍光標識を試みた。GFP11 挿入 VP2 は GFP1-10 との共発現により GFP 蛍光を示すことを確認した。ショ糖密度勾配遠心により GFP 蛍光は VLP と同じ画分に検出されたことから、細胞内で VLP は GFP 標識されていると考えられた。この GFP 標識 VLP の HeLa 細胞内での局在を調べると、VP2 局在は核や細胞質に観察された。これら細胞でタイムラプスイメージングを行うと、GFP 蛍光は有糸分裂時の核膜崩壊時に細胞質へ移行することが観察された。細胞分裂後に VP2 の局在が細胞質に移行することはノコダゾールリリースアッセイでも確認することができた。

また、HiBiT 挿入 VP2 について、細胞外への放出を評価した。培養上清の段階的遠心画分について HiBiT 活性を測定したところ、いずれの画分でも HiBiT 活性が検出された。上清に放出された HiBiT 活性は界面活性剤依存的に検出されたことから、培養上清中に放出された VP2 は被膜されていることが示唆された。また、培養上清のショ糖密度勾配遠心解析においても、界面活性剤依存的に VLP 画分が検出されたことから、培養上清中の VLP は被膜されていることが示された。更にこの培養上清から得られた VLP 陽性画分について電子顕微鏡観察を行ったところ、VLP と共に小胞が確認されて、一部 VLP は小胞と相互作用している像が観察された。また、細胞外微粒子外膜に存在するフォスファチジルセリンを特異的に認識するビーズを用いて精製したところ、膜小胞画分に HiBiT 活性が認められた。また、界面活性剤により前処理すると、精製画分より HiBiT 活性が消失することから、培養上清中の一部の VLP は被膜粒子に取り

込まれていると考えられた。

次に、培養上清中への VLP 放出に関与する経路を解析するために、細胞内膜輸送に関与する各種阻害剤を処理し VP2-HiBiT の放出を評価した。その結果、有糸分裂阻害剤ノコダゾール処理によって VP2 の分泌が増加することがわかった。この VP2 分泌増加は細胞死などによる膜破壊によるものではないことを LDH アッセイで確認している。更に、ショ糖密度勾配遠心と界面活性剤感受性アッセイにより、ノコダゾール処理時に被膜 VLP の放出が増加していることを確認した。

本研究において得られた知見をまとめると、核内でアセンブリした VLP は、細胞分裂による核膜崩壊依存的に細胞質に移行し、その後、被膜して細胞外に出ていくという輸送経路により分泌されているというモデルが示された。B19V 感染細胞では、細胞周期は G2/M 期で停止することから、感染性のある B19V ウイルス粒子もこの経路で放出される可能性がある。この機構は、宿主抗体からの回避や小胞を介した細胞間伝達に寄与している可能性が高い。ヒト生体内での B19V 伝播の仕組みの全容はいまだ解明されていないが、本研究によりその一端が明らかになった。

論文審査の結果の要旨

本研究では、細胞内でアセンブリしたヒトパルボウイルス B19V 粒子の動態や細胞外放出に着目し、その分泌経路について解析を行なっている。まず、細胞内または細胞外におけるウイルス様粒子 (Virus Like Particle:VLP) 動体を解析するため、高感度検出用タグである HiBiT タグを用い、このペプチドタグの挿入を許容する構造部位の検索を行い、HiBiT 活性を保持したまま VLP を形成できる変異体を作製した。次に、この HiBiT ラベル VLP を用いて、ウイルス粒子の細胞外への放出について解析を進め、培養上清の段階的遠心画分のいずれの画分でも VLP が存在し、また、VLP は界面活性剤存在下ではじめて検出されることを明らかにした。さらに、VLP 画分の電子顕微鏡観察にて、VLP と共に小胞が確認され、一部 VLP は小胞と共に存在していることを見出した。これらの結果より、VLP が生体膜によって被膜されながら細胞外に放出されるという、これまでにない新たな分泌経路があることが示唆された。さらに、培養上清に放出された VLP 量は、微小管重合阻害剤であるノコダゾール処理によって増加すること、また、GFP 標識した VLP のタイムラプスイメージング解析により、細胞分裂依存的な VLP 核外移行が確認されたことから、これまでに報告されている細胞溶解によるウイルス粒子の放出以外に、細胞死を伴わない細胞分裂周期依存的な細胞外放出の機構があることが示された。この細胞周期依存的な被膜ウイルス粒子の放出は、ウイルスの持続感染の成立や、宿主免疫系からの回避に重要である可能性があり、ウイルス増殖メカニズムの理解につながる新たな知見といえる。よって、本審査委員会は、「岩手大学大学院連合農学研究科博士学位論文審査基準」に則り審査した結果、本論文を博士の学位論文として十分価値のあるものと認めた。

Ishida K, Noguchi T, Kimura S, Suzuki H, Ebina H, Morita E. Tracking of Human Parvovirus B19 Virus-Like Particles Using Short Peptide Tags Reveals a Membrane-Associated Extracellular Release of These Particles. *Journal of Virology* 2023 Feb 28;97(2):e0163122.