

様式 4 (公表用)

氏名	大園 誠也
博士の専攻分野の名称	博士 (生命工学)
学位記番号	医工農甲 第102号
学位授与年月日	令和4年3月18日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
専攻名	統合応用生命科学専攻
学位論文題目	発光ペプチドタグを付加した高感度かつ迅速定量型ウイルスベクターシステムの開発および COVID-19 研究への応用
論文審査委員	主査 教授 岸上 哲士 教授 若山 照彦 教授 幸田 尚 教授 黒澤 尋 准教授 中川 洋史 准教授 新森 英之 准教授 大山 拓次 国立感染症研究所主任研究官 徳永 研三

学位論文内容の要旨

ウイルス研究においてウイルス産生を定量することは不可欠である。これまでの HIV-1 研究において、ウイルス量は主に逆転写酵素アッセイまたは p24 抗原 ELISA を用いて定量されてきた。しかし、これらのアッセイ系は多大なコストと時間を要することが研究者の負担になってきた。本論文では、HiBiT と呼ばれる短いペプチドタグを使用することで、この問題を解決する新しい HIV-1/レンチウイルス定量システムを確立した。さらにこの系をいち早く新型コロナウイルス研究にも応用し、欧州変異型の感染性を正確に評価することに成功し、その変異型の危険性について世界に先駆けて報告した。

第 1 章 HiBiT ペプチドタグを利用した超迅速 HIV-1 定量系の樹立

HIV-1 の研究では、通常、逆転写酵素法または p24 抗原捕捉 ELISA 法のいずれかによってウイルスの産生をモニターしている。しかし、これらのアッセイは、多数の HIV-1 サンプルを日常的に取り扱うにはコストと時間を要する。例えば、ELISA 法では検出可能な濃度の範囲が非常に狭いため、p24 タンパク質レベルを測定するためには常にサンプルの希釈が

様式 4 (公表用)

必要となる。ここでは、HiBiT と呼ばれる最近開発された小さなペプチドタグを使用することで、前述の問題を解決する新しい HIV-1 産生アッセイシステムを確立した。このペプチドは、NanoLuc ルシフェラーゼの断片であり、残りのサブユニットと相補的に結合すると強い発光シグナルを発生する。この技術を採用するために、インテグラーゼの C 末端に HiBiT タグを付加した新規の完全長プロウイルス HIV-1 DNA クローンと、レンチウイルスパッケージングベクターを構築した。インテグラーゼに HiBiT タグを付加しても、ウイルスの産生、感染性、インテグラーゼ阻害剤への感受性に影響はなかった。次に、抗ウイルス宿主因子 APOBEC3G (A3G) を発現する初代培養細胞で複製アッセイを行うためには、Luc2-IN/HiBiT ウイルスにおける Vif の機能が損なわれていないことを確認する必要がある。これは、IN ORF の C 末端と重なる Vif の N 末端配列に、HiBiT タグ由来の無関係なアミノ酸配列が挿入されていたためである。A3G を発現させると、Luc2-IN/HiBiT ウイルスの感染力は NL-Luc2-F(-)ウイルスのレベルまで著しく低下した。これは、Luc2-IN/HiBiT ウイルスの Vif タンパク質が抗 A3G 活性を欠いていることを示している。HiBiT タグによって塩基配列が切断された Vif の失われた機能を救済し、この pNL-Luc2-IN/ HiBiT-E(-)Fin と名付けた構築物をトランスフェクションした細胞から産生された VSV-G シュードタイプの Luc2-IN/ HiBiT-Fin ウイルスの感染性を調べたところ、A3G に対して完全な耐性を示し、結果として得られたウイルスが期待された Vif 活性を獲得したことが示された。Env-intact の完全長バージョンのウイルスが CD4 陽性 T 細胞へ感染させるために、pNL4-3 ベースの IN/HiBiT-Fin プロウイルスクローンを作成した。PHA-IL-2 で刺激した初代 CD4 陽性 T 細胞に、WT または IN/HiBiT-Fin のウイルスを感染させた後、上清中の p24 産生レベルを測定することでウイルスの複製を比較したところ、IN/HiBiT-Fin ウイルスの複製動態は親株ウイルスに比べて遅れただけであり、IN/HiBiT-Fin ウイルスが複製能力を持つことが確認された。以上の結果から、IN の C 末端に N 末端の vif 配列を加えることで、抗 A3G 活性が付与され、その結果、初代 CD4 陽性 T 細胞において効率的にウイルスが複製されることが示された。

最も重要なことは、ELISA と HiBiT ルシフェラーゼアッセイを比較することで、p24 濃度と HiBiT ベースのルシフェラーゼ活性の間に優れた線形相関を得ることに成功したことである。以上のことから、HiBiT タグ付きウイルスは、親ウイルスである HIV-1 とレンチウイルスベクターから置き換えることができ、HIV-1/レンチウイルス産生のための、超高速、安価、簡便、高精度な定量的アッセイを行うことができると結論づけた。このシステムは、将来の抗ウイルス剤の候補をスクリーニングするとともに、様々なウイルス学的研究に広く応用することができる。

第 2 章 HiBiT ペプチドタグを有するレンチウイルスベクター系を用いた COVID-19

研究への応用

コロナウイルス 2019 (COVID-19) パンデミックの原因ウイルスである重症急性呼吸器症候群コロナウイルス 2 (SARS-CoV-2) は、ヒトの間で継続的に感染する間に着実に変異している。このような変異は、アンジオテンシン変換酵素 2 (ACE2) 受容体に結合し、膜貫通型プロテアーゼセリン 2 (TMPRSS2) によって切断されるスパイク (S) タンパク質に生じる可能性がある。しかし、S の突然変異が SARS-CoV-2 の感染力に影響を与えるかどうかは、まだ不明である。本研究では、シュードタイプレンチウイルスの細胞侵入を定量化するために最近開発した新しい侵入アッセイシステムを採用した。このシステムでは、アッセイ中の HiBiT ルシフェラーゼシグナルによって生成された高精度の標準曲線に基づいてウイルス投入量を正確に正規化することができるため、細胞侵入レベルを実験的に正確に決定することができる。

このシステムを用いて、まず、SARS-S の主要な受容体である ACE2 を発現している細胞において、SARS-CoV (Urbani 株) S または SARS-CoV-2 (Wuhan-Hu-1 株) S をシュードタイプしたレンチウイルスの細胞侵入活性を調べた。その結果、ACE2 の発現だけでは、SARS-CoV-2 の細胞侵入に寄与するには不十分であることを示唆した。次に、ACE2 と TMPRSS2 の共発現が SARS2-S シュードタイプのレンチウイルスの 293T 細胞への効率的な感染を仲介できるかどうかを検証した。その結果、ACE2 と TMPRSS2 を同時に発現させると、SARS2-S を介した細胞への感染が著しく促進される一方、SARS-S シュードウイルスの感染は適度に促進された。それにもかかわらず、SARS-S と SARS2-S のシュードウイルスの間には、細胞への侵入性に約 25 倍の差が見られたことから、SARS2-S はレンチウイルス粒子との適合性が低いのではないかという仮説が立てられた。様々なウイルスエンベロップのレンチウイルス適合性は、その細胞質尾部 (CT) ドメインによって決定されることが多くの文献で示されている。S タンパク質のこのドメイン (および膜貫通ドメイン (TM)) の配列を比較したところ、SARS2-S では、CT ドメインと TM ドメインに、それぞれ 1 つ (1247 番目のアラニン-システイン) と 2 つ (1216 番目のバリン-イソロイシンと 1233 番目のロイシン-メチオニン) のアミノ酸の違いがあることがわかった。そこで、SARS2-S C1247A 変異体と、SARS-S の TM/CT ドメインを保持したキメラ型 SARS2-S を作成した。すべての SARS2-S タンパク質は、同等のレベルの細胞侵入と実際のビリオンの取り込みを示した。これらの結果から、SARS2-S シュードウイルスの細胞侵入率が著しく低かったのは、SARS2-S とレンチウイルスベクターとの間の不適合によるものではなく、むしろ SARS2-S タンパク質の本質的な性質によるものであることが示唆された。SARS-S と SARS2-S タンパク質の違いをさ

様式4（公表用）

らに評価するために、これらのSタンパク質が、細胞表面に存在する一定レベルのACE2やTMPRSS2を利用する能力が異なるかどうかを調べた。一定量のACE2と様々なレベルのTMPRSS2を発現する293T細胞にSシュードタイプレンチウイルスを感染させたところ、SARS2-Sによる感染は、SARS-Sよりも高いレベルの細胞表面TMPRSS2の発現を必要とし、最大レベルの細胞侵入を達成した。したがって、SARS2-Sは本質的に十分なレベルのTMPRSS2の発現を必要としていると考えられる。S変異体の中では、欧州型D614G変異体が最も高い細胞侵入性を示すことが示唆された。この変異がSタンパク質の抗原性を変化させているのではないかと考えられた。SARS2-SのWTとD614G変異体は、シュードタイプウイルスを用いた中和試験の結果、確認されたすべての症例の原型ウイルスに対する血清に対して、同じように感受性を示した。この結果は、D614G変異体のSタンパク質に抗原性の変化がないため、抗SARS-CoV-2薬やワクチンの開発戦略に支障をきたさないという点で、公衆衛生上、特に重要であった。以上を含めた結果から、D614G変異体は、中和感受性を維持したまま、ウイルスの感染力を高めていることが明らかになった。

論文審査結果の要旨

課程博士の学位申請者（以下、課程申請者）が提出した学位論文の研究成果および価値について、統合応用生命科学専攻のディプロマ・ポリシーに基づき、主査1名、副査7名からなる論文審査委員会により審査を行った。また、学位論文公聴会及び最終試験において、十分な質疑を行い、課程申請者の学識、研究の学術的意義・成果等を厳正に評価した。審査結果の要旨については、以下の通りである。

1. 学術的意義・新規性

本論文は、HiBiTと呼ばれる短いペプチドタグを使用することにより、これまでにないHIV-1/レンチウイルス産生の超高速、安価、簡便、高精度なアッセイ系を確立した。また本論文では、そのアッセイ系の信頼性についても従来の方法との比較で十分に検証され、実用的に耐えうる定量システムであることが証明されている。今後このシステムは、HIV-1/レンチウイルスの定量システムとして世界で広く利用されることが期待される。実際、すでに海外の複数の研究者やメルク社研究所からリクエストがあり分与を行った。さらにこの系を新型コロナウイルス研究にも応用し、昨年世界を席卷した欧州変異型の評価することに世界に先駆けて成功した。今後、この定量システムは、将来の抗ウイルス剤候補のスクリーニングを含め、様々なウイルス学的研究における幅広い応用が期待される。このように、本論文の研究内容とその成果は、世界的に見ても学術的に意義深く、極めて新規性が高いことが認め

様式 4 (公表用)

られた。

2. 論文の論理性

本論文の構成が適切かつ体系的であり、文章は論理的に明確に記述され、学位論文の研究目的と結論に整合性が認められた。その緒言においては、十分な研究の背景、当該分野の研究の現状と問題点・課題、研究目的が明確であった。その結果および考察においては、適切な実験が計画・実施され、得られた実験データについて図等の適切な作成および分析され、過去の知見に基づき論理的な解釈がなされていた。

3. 研究倫理

本研究に関わる実験は、すべて国立感染症研究所において実施された。実施にあたり、遺伝子組換え実験を含むため、遺伝子組換え実験安全委員会の審査を経た後、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」を遵守して指定された場所で細心の注意をもって行われた。臨床材料を用いた実験については、医学研究倫理審査委員会の審査の後、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」を遵守して行われた。実験に使用したウイルスはバイオセーフティレベル 2 または 3 であるため、国立感染症研究所戸山庁舎実験棟内の当該施設において承認された封じ込めレベルに基づき各実験が実施された。

4. 審査の総括

本論文は、ウイルス産生の新規で安価なアッセイ法の確立とそれを応用した成果について適切に述べられていることが認められた。また、その研究成果は、2 報の査読付き学術英文誌に課程申請者が第一著者の原著論文として発表された。これらの 2 報の論文は既に多くの論文に引用されており、国際的に高い注目ならびに評価を受けているといえる。また、課程申請者は、学位論文公聴会及び最終試験において、審査員からの質問に対して的確に回答するなど、課程申請者は、統合応用生命科学専攻のディプロマ・ポリシーを十分達成したものと評価した。

以上のことから、本論文は博士（生命工学）の学位論文として適格と認め、学位論文審査及び最終試験について合格と判定した。