

学 位 論 文 題 名

Analysis of Structure-Function of RNA Polymerase of Influenza A Virus

（インフルエンザAウイルス RNA ポリメラーゼの構造と機能の解析）

学位論文内容の要旨

インフルエンザは、地球上にもっとも広く分布する人獣共通伝染病であり、ヒトのみならず、ウマ、ブタおよび家禽に多大な被害を与えている。その病原性発現のメカニズムは未だ解明されていない。インフルエンザウイルスの病原性を解明するためにはウイルスの増殖、すなわち、ウイルス遺伝子の転写・複製過程を解析しなければならない。インフルエンザウイルスは、RNA 依存 RNA ポリメラーゼ、PB1、PB2 および PA を持ち、これらポリメラーゼ蛋白複合体がウイルス遺伝子の転写・複製を担っている。本研究は、ポリメラーゼ蛋白の機能ドメインを分子レベルで解明するために、PB1、PB2 および PA の構造-機能をそれぞれの蛋白に対する単クローン抗体を用いて解析したものである。

まず、各ポリメラーゼ蛋白に対する単クローン抗体を作出し、各々の分子上のエピトープが存在するドメインを決定した。PB2 分子上の 4 つの異なるエピトープに対する単クローン抗体を得た。そのうち、アミノ末端から 701 番目のアミノ酸を含むエピトープがウマインフルエンザウイルス株間に保存されていることが明らかとなった。PB1 分子上の少なくとも 8 つの異なるエピトープを、また PA 分子上の少なくとも 10 の異なるエピトープを認識する単クローン抗体を得た。これらの抗体の多くは、ウイルス感染細胞を用いた蛍光抗体法において、PB1 および PA 蛋白いずれとも反応を示さなかった。この成績は、これらの抗体が認識するエピトープが、他のポリメラーゼ蛋白との結合部位であるか、あるいは他のウイルス由来蛋白および細胞内の蛋白に覆われていることを示している。

PB2 のアミノ末端から 206-259 アミノ酸残基の領域を認識する抗体とカルボキシル末端を認識する抗体がウサギグロビン mRNA あるいは ApG をプライマーとして用いた試験管内ウイルス遺伝子転写反応を強く抑制した。これらの抗体は PB2 のエンドヌクレアーゼ活性をも抑制した。PB1 のアミノ末端 (1-100 アミノ酸残基) を認識する 2 つの抗体は、試験管内ウイルス遺伝子転写反応を抑制した。この領域には、PB1 の塩基認識結合部位が存在しており、これらの抗体はこの機能を障害するものと考えられる。また、この領域には PA との結合領域も存在することから、これらの抗体は PB1 の PA との複合体形成にも影響を与えるものと

考えられる。

以上の成績から、各ポリメラーゼ蛋白分子上のエピトープと、インフルエンザウイルス遺伝子の転写に関わるPB2およびPB1分子上の領域が同定された。本研究で作出した一連の単クローン抗体は、インフルエンザウイルスのRNAポリメラーゼの構造と機能を解析する上で有用である。今後、これらの抗体を用いて、未だ解明されていないインフルエンザウイルスRNAポリメラーゼ複合体としての構造と機能ならびに複合体形成に与かる分子集合のメカニズムを解明したい。

学位論文審査の要旨

主査	教授	喜田	宏
副査	教授	桑原	幹典
副査	教授	高島	郁夫
副査	助教授	岡崎	克則

学位論文題名

Analysis of Structure-Function of RNA Polymerase of Influenza A Virus

(インフルエンザAウイルス RNA ポリメラーゼの構造と機能の解析)

インフルエンザは、ヒト、ウマ、ブタおよび家禽に多大な被害を与えている人獣共通伝染病である。その病原性発現のメカニズムは未だ解明されていない。病因ウイルスの増殖、すなわち、ウイルス遺伝子の転写・複製過程が不詳のためである。インフルエンザウイルスは、RNA 依存 RNA ポリメラーゼ、PB1、PB2 および PA を持ち、これらポリメラーゼ蛋白複合体がウイルス遺伝子の転写・複製に与る。本論文は、ポリメラーゼ蛋白の機能ドメインを分子レベルで解明するために、PB1、PB2 および PA 蛋白に対する単クローン抗体を用いてその構造-機能を解析した成績を述べたものである。

まず、各ポリメラーゼ蛋白に対する単クローン抗体を作出し、各々の分子上のエпитープが存在するドメインを決定した。PB2 分子上の4つの異なるエпитープに対する単クローン抗体を得た。そのうち、アミノ末端から 701 番目のアミノ酸を含むエпитープがウマインフルエンザウイルス株間に保存されていることが明らかとなった。PB1 分子上の少なくとも8つの異なるエпитープを、PA 分子上の少なくとも 10 の異なるエпитープを認識する単クローン抗体を得た。これらの抗体の多くは、ウイルス感染細胞を用いた蛍光抗体法において、PB1 および PA 蛋白いずれとも反応を示さなかった。これらの抗体が認識するエпитープが、他のポリメラーゼ蛋白との結合部位であるか、あるいは他のウイルス蛋白および宿主細胞蛋白などに覆われているためであろう。

PB2 のアミノ末端から 206-259 アミノ酸の領域を認識する抗体とカルボキシル末端を認識する抗体がウサギグロビン mRNA あるいは ApG をプライマーとして用いた試験管内ウイルス遺伝子転写反応を強く抑制した。これらの抗体は PB2 のエンドヌクレアーゼ活性をも抑制した。PB1 のアミノ末端(1-100 アミノ酸残基)を認識する2つの抗体は、試験管内ウイルス遺伝子転写反応を抑制した。この領域に PB1 の塩基認識結合部位が存在し、これらの抗体がその機能を障害する結果であろう。この領域には PA との結合領域も存在するので、これらの抗体は PB1 の PA との複合体構造にも影響を与えるものと考えられる。

本研究により、インフルエンザウイルスポリメラーゼ各蛋白分子上のエпитープと、PB2 および PB1 分子上のウイルス遺伝子の転写に関わる領域が同定された。作出された一連の

単クローン抗体は、未だ解明されていないインフルエンザウイルス RNA ポリメラーゼ蛋白複合体としての構造と機能ならびに複合体形成に与る分子集合のメカニズムを解明するために極めて有用である。よって審査委員一同は八田正人氏が博士（獣医学）の学位を授与されるに十分な資格を有するものと認めた。