

学位論文題名

インフルエンザ A ウイルスの複製に関わる

アポトーシス誘導分子 Siva-1の機能解析

学位論文内容の要旨

H5N1亜型高病原性鳥インフルエンザウイルスA/Hong Kong/483/97 (HK483)株およびA/Hong Kong/486/97 (HK486)株の哺乳動物に対する病原性の相違に関与するPB2タンパク質に注目し、抗体アレイ法によりPB2タンパク質と会合する宿主細胞分子をスクリーニングした。その結果、16種類の宿主細胞分子がPB2タンパク質と会合する候補分子として同定された。

これらの分子の会合を、免疫共沈降法で解析した結果、Siva-1タンパク質がPB2タンパク質と会合することが示された。また、Siva-1タンパク質はHK483、HK486およびA/Puerto Rico/8/34 (PR8; H1N1)株に由来するPB2タンパク質と会合するが、特にHK486株に由来するPB2タンパク質に親和性が高いことが明らかになった。次に、Siva-1タンパク質とPB2タンパク質の細胞内局在を、蛍光抗体染色法により解析した。その結果、インフルエンザAウイルスの感染した細胞ではSiva-1タンパク質とPB2タンパク質は核に局在し、ほとんど同一の細胞内分布を示すことが明らかになった。これらの結果からSiva-1タンパク質に注目し、インフルエンザAウイルスの感染した細胞での機能と役割を明らかにするために、さらに解析を進めた。

Siva-1タンパク質は、CD27タンパク質と会合しアポトーシスの誘導に関わるシグナル伝達分子として見出され、その後の解析により様々なアポトーシス誘導に関与することが報告されている。これらのことから、Siva-1タンパク質がインフルエンザAウイルスの感染による細胞死およびアポトーシスの誘導に関与している可能性が考えられた。そこで、Flp-in systemを用いて、Siva-1タンパク質を恒常的に発現するA549細胞由来の細胞株を樹立し、インフルエンザAウイルスPR8株の感染による細胞死誘導を解析した。位相差顕微鏡で観察した結果、Siva-1タンパク質を恒常的に発現させた細胞株ではコントロールの細胞に比べてPR8株の感染により細胞死が著しく誘導された。このことはトリパンブルー染色法で死細胞の割合を算出した結果からも確認された。

Siva-1を恒常的に発現させた細胞株では、インフルエンザAウイルスの感染により、細胞収縮を起こした細胞が多数認められ、アポトーシスが誘導されていると考えられた。そこでアポトーシスの誘導過程で特徴的に認められるゲノ

ムDNAの断片化を解析した。その結果、Siva-1タンパク質を恒常的に発現させた細胞株ではコントロールの細胞に比べて、ゲノムDNAの断片化によるラダー状のバンドが強く検出された。この結果からインフルエンザAウイルスの感染した細胞においてSiva-1タンパク質の発現により誘導される細胞死は、アポトーシスによるものであることが示された。さらにSiva-1タンパク質を恒常的に発現させた細胞株に、H5N1亜型高病原性鳥インフルエンザウイルスHK483株を感染させ、Siva-1タンパク質のアポトーシス誘導能を検討した。その結果、Siva-1タンパク質がH5N1亜型高病原性鳥インフルエンザウイルスの感染によるアポトーシスの誘導にも重要であることが明らかになった。

インフルエンザAウイルスの感染によるアポトーシス誘導に対する内在性のSiva-1タンパク質の機能を明らかにするために、Siva-1遺伝子に対して3種の標的配列のshRNAを発現するレトロウイルスベクターを構築した。これらのレトロウイルスベクターを用いて、インフルエンザAウイルス感染によるアポトーシス誘導に対するSiva-1遺伝子発現抑制の影響をトリパンブルー染色法により解析した。その結果、Siva-1遺伝子の発現を抑制したA549細胞では、インフルエンザAウイルス感染による細胞死の誘導が抑制された。この細胞死誘導の抑制効果と各shRNAによるSiva-1遺伝子の発現抑制効果の間には、相関関係が認められ、このことはゲノムDNAの断片化の解析によっても確認された。これらの結果から、インフルエンザAウイルス感染により誘導されるアポトーシスは、内在性のSiva-1遺伝子の発現により制御されていることが示された。

アポトーシスは、インフルエンザAウイルスの複製にも関与することから、Siva-1タンパク質のウイルス複製への関与を調べるため、Siva-1タンパク質の発現を抑制したA549細胞にPR8株を感染させ、ウイルスの増殖を経時的に解析した。その結果、インフルエンザAウイルスの複製は、Siva-1タンパク質の発現抑制によって阻害された。Siva-1タンパク質がPB2タンパク質に会合するため、ウイルスのRNAポリメラーゼの機能阻害により複製を阻害する可能性が考えられた。そこで、ウイルスのNP(nuclear protein)の量をリアルタイムRT-PCR法で測定し、Siva-1タンパク質のインフルエンザAウイルスのRNA合成への関与を調べた。その結果、インフルエンザAウイルスのRNA合成は、Siva-1タンパク質の発現抑制によりほとんど影響を受けないことが示された。

これまでに、カスパーゼ依存的なアポトーシス誘導に極めて重要な役割を果たしているカスパーゼ3の活性化は、インフルエンザAウイルスの効率的な複製にも重要であることが報告されている。このことから、Siva-1タンパク質がカスパーゼの活性化を制御しインフルエンザAウイルス感染により誘導されるアポトーシスおよびウイルス複製に関与する可能性が考えられた。そこでカスパーゼ阻害剤であるZ-VAD-FMKを用いて、インフルエンザAウイルスの増殖と細胞死の誘導について、それぞれプラークアッセイおよびトリパンブルー染色法で解析した。その結果、コントロールの細胞およびSiva-1タンパク質の発現を抑制したA549細胞ともにインフルエンザAウイルス感染によるアポトーシス誘導は、Z-VAD-FMK処理により抑制された。一方、ウイルスの複製は

Siva-1タンパク質の発現を抑制したA549細胞ではコントロールの細胞と比べて阻害されていたが、Z-VAD-FMKの処理により、両細胞でほとんど差が認められなくなった。

これらの結果から、Siva-1タンパク質はカスパーゼの活性化によりインフルエンザAウイルス感染後の宿主細胞のアポトーシス誘導に働くとともに、ウイルス複製にとっても重要な役割を果たしていることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主査	教授	宮崎	忠昭
副査	教授	高田	礼人
副査	准教授	木村	享史
副査	講師	岩井	淳

学位論文題名

インフルエンザ A ウイルスの複製に関わる アポトーシス誘導分子 Siva-1の機能解析

Siva-1は抗体アレイ法を用いたスクリーニングによりインフルエンザAウイルスのRNAポリメラーゼサブユニットであるPB2と会合する宿主因子として見出されたアポトーシス誘導分子である。

免疫共沈降法および蛍光抗体染色法により、Siva-1がヒト培養細胞内でPB2と会合し、インフルエンザAウイルス感染後、Siva-1とPB2は核に共局在することが明らかとなった。Siva-1を恒常的に発現させたA549細胞ではウイルス感染後の細胞死の誘導が亢進されること、また、DNA断片化の解析によりこの細胞死はアポトーシスによるものであることが示された。

shRNAを用いて*Siva-1*遺伝子の発現を抑制したA549細胞では、インフルエンザAウイルス感染による細胞死の誘導が抑制され、また培養上清中に回収されるウイルスの力価も有意に抑制された。しかしながら、ウイルスのRNA合成は、*Siva-1*遺伝子の発現抑制により阻害されないことが明らかとなった。そこでカスパーゼ阻害剤であるZ-VAD-FMKを用いて解析したところ、コントロールの細胞と*Siva-1*遺伝子の発現を抑制したA549細胞の培養上清中に回収されるウイルス力価の差はZ-VAD-FMK処理により、ほとんど認められなくなった。

上述のように、本研究でインフルエンザウイルスのPB2に会合する分子として同定されたSiva-1がカスパーゼの活性化制御によりウイルス感染による宿主細胞のアポトーシス誘導に働くとともに、ウイルス複製に重要な役割を果たしていることを明らかにした。これらの研究成果は、インフルエンザAウイルスの複製制御および哺乳動物における病原性に関わる新たな分子の知見を提供するものである。

審査委員一同は、上記博士論文提出者塩崎拓也氏が、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。