

論文の内容の要旨

論文題目 Analysis of the Interactions between Host Systems and the Influenza Viral Proteins Encoded by the NS Segment

(インフルエンザウイルス NS 分節にコードされる蛋白質の機能への宿主因子の関与)

氏 名 五来 武郎

【背景】

インフルエンザウイルスのゲノム RNA は、8 本に分節化している。ゲノム分節の一つである NS 分節は、nonstructural protein 1 (NS1), nonstructural protein 2 (NS2)と呼ばれる二つの蛋白質をコードしている。これらのウイルス蛋白質と宿主細胞システムとの相互作用について、以下の研究を行った。

【第一部：NS1 の SUMO 化修飾とその病原性への関与】

インフルエンザウイルスの NS1 は感染細胞内で発現する非構造蛋白質である。その代表的な機能は抗インターフェロン活性であるが、他にも宿主 mRNA のプロセッシング阻害など、多くの機能が報告されている。

アミノ酸配列上に Small Ubiquitin-like MOdifier (SUMO) acceptor site (SAS: Ψ-K-x-D/E, Ψ: 疎水性アミノ酸)を有する蛋白質は、可逆的に SUMO 化と脱 SUMO 化を受けることにより、その機能に多様性を持つことが知られている。

最近、NS1 が感染細胞内で SUMO 化を受けることが報告された。そこで、データベースに登録されている NS1 のアミノ酸配列上に SAS が存在するか否かを調べたところ、NS1 の 3 カ所に SAS のアミノ酸配列が存在していた (図 1 ; SAS1-SAS3)。そこで、インフルエン

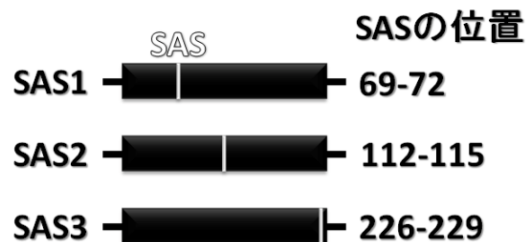


図1. A型インフルエンザウイルスのNS1蛋白質に保存されたSASの位置。SAS; SUMO-acceptor site.

ザウイルス感染における各 SAS の生物学的意義を調べるために、以下の実験を行った。

SAS1 : SAS1 は主にヒトから分離されたウイルスの NS1 で見られ、その 96% が SAS1 を有する。そこで SAS1 に変異を導入し、ヒトの細胞におけるウイルス増殖、NS1 の機能、さらに病原性に与える影響を調べた。野生型ウイルス (WSN) と SAS1 を欠損させた変異 NS1 を発現するウイルス (WSN-K70R) を細胞に感染させ、感染 12 時間後に細胞溶解液を調整し、ウエスタンブロット法をおこなった。抗 NS1 抗体を用いたところ、WSN 感染細胞では NS1 と NS1 よりも 10 kDa 程度高い位置にシグナルが検出されたが、WSN-K70R 感染細胞では NS1 以外にはシグナルが検出されなかった。NS1 より高い位置のシグナルは抗 SUMO 抗体でも検出された。SUMO の分子量は 10 kDa 程度であることから、このシグナルは NS1 に SUMO が結合したものであり、SAS1 は実際に SUMO が結合する部位であると考えられた。次に、NS1 の機能と SAS1 の関係を明らかにするため、細胞に WSN あるいは WSN-K70R を感染させ、経時的に total RNA と培養上清を回収し、qRT-PCR および ELISA 法により IFN- β の発現および放出量を定量した。その結果、WSN-K70R 感染細胞の IFN- β の mRNA 量は感染 12 時間後にピークを示し、WSN 感染細胞におけるそれよりも有意に高かった。また、感染 24 および 48 時間後において、WSN-K70R 感染細胞が上清中に放出した IFN- β 量は WSN のそれよりも有意に高かった。次に、マウスに WSN あるいは WSN-K70R を感染させ、その病原性を比較した。50% マウス致死量 (MLD₅₀) を調べたところ、WSN-K70R の MLD₅₀ は WSN より 10 倍程度高く、WSN-K70R は弱毒化していた。それぞれのウイルスを感染させたマウスの肺を病理解析したところ、WSN を感染させたマウスの肺では抗原が広範に検出されたのに対し、WSN-K70R を感染させたマウスの肺では抗原の分布が狭い範囲に限局していた。さらに、それぞれのウイルスを感染させたマウスの肺におけるウイルス増殖を比較したところ、感染 3、6 日目のウイルス量は WSN-K70R と比較して WSN の方が高く、NS1 の SUMO 化がウイルスの効率的な増殖に関与していることが示唆された。

SAS2 : SAS2 は主に 2001 年以降に分離された H5N1 亜型ウイルスの NS1 に存在していた。H5N1 ウイルスのヒトへの感染は現在も散発的に起こっており、その致死率は 60% である。この非常に高い致死率は、季節性のインフルエンザウイルスとは異なる、H5N1 亜型ウイルス特有の病原性発揮メカニズムが存在することを示唆している。そこで H5N1 亜型ウイルスの NS1 に存在する SAS2 に変異を導入して実験をおこなった。まず、プラスミドトランスフェクションの系を用いて、SAS2 が SUMO 化を受けるか否かをウエスタンブロット法により確認した。その結果、野生型ウイルス (VN1203) の NS1 は SUMO 化されたが、SAS2 に変異 (K113R) を導入した NS1 は SUMO 化されなかった。次に、SAS2 を欠損させた変異 NS1 を発現するウイルス (VN1203-K113R) を作出し、マウスに対する病原性を VN1203 と比較した。その結果、VN1203-K113R の 50% マウス致死量 (MLD₅₀) は、VN1203 に比べて 5 倍程度高かった。また、感染 6 日目、VN1203 は、すべてのマウスにおいて、脳を含む調べた臓器 (脳、鼻甲介、肺、脾臓、肝臓) のほぼすべてでウイルスが検出されたのに対し、VN1203-K113R は 3 匹中 2 匹において肺のみ、1 匹において肺と脾臓のみからウイルスが検

出された。この事から、SAS2 が H5N1 亜型ウイルスのマウスへの病原性に関与する事が示唆された。

SAS3 : SAS3 は主にイヌから分離された H3N8 亜型ウイルスで見られ、その 99% に存在していた。イヌの H3N8 亜型ウイルスはウマの H3N8 亜型ウイルスに由来するが、ウマのウイルスの SAS3 保有率はわずか 1% である。この事から、SAS3 はウマからイヌへのウイルスの適応に何らかの役割を担っていることが示唆された。実際、それぞれのウイルスを感染させたイヌ由来の培養細胞内では、イヌ由来ウイルスの NS1 は SUMO 化を受けたのに対し、ウマ由来ウイルスの NS1 は SUMO 化を受けなかった。この事から、SAS3 上の SUMO 化がウイルス感染細胞内で実際に起こることが確認された。

以上より、①インフルエンザウイルスの NS1 には 3 種類の SAS (SAS1-3) が存在し、それぞれの位置は宿主生物種あるいは亜型特有であること、②NS1 の SUMO 化は抗インターフェロン活性に重要であり、病原性に関与することが示唆された。今後、インフルエンザウイルスの NS1 と宿主生物種の関係、あるいはインフルエンザウイルスの病原性を理解していくうえで、本研究成果は重要な知見となると考えられる。

【第二部：nonstructural protein 2 (NS2) と相互作用する宿主蛋白質の同定と解析】

インフルエンザウイルスが細胞内に侵入すると、様々な宿主蛋白質が利用され、子孫ウイルスが複製される。したがって、インフルエンザウイルスの増殖に必要な宿主因子を同定し、その生物学的意義を明らかにすることは、ウイルス増殖の仕組みをより深く理解することに貢献するだけでなく、抗ウイルス薬の標的を見出すことにも繋がるため非常に重要である。近年、ゲノムワイドな探索研究により、インフルエンザウイルスが効率よく増殖するために必要な因子の探索・同定が成されてきた。しかし、感染細胞内におけるウイルス因子と宿主因子の相互作用については、未だ十分に理解されていない。そこで、ウイルス蛋白質-宿主蛋白質間の相互作用に注目し、ウイルス増殖に必要な宿主因子の同定を試みた。

FLAG-tag を付加した NS2 を発現させた細胞溶解液から、抗 FLAG 抗体を用いて NS2 を免疫沈降し、共沈降してきた蛋白質を質量分析法により解析した。その結果、NS2 と相互作用する宿主蛋白質として計 37 種類の宿主蛋白質が同定された。これらの宿主因子のうち、

siRNA による発現抑制によりインフルエンザウイルスの増殖を低下させる因子として、F1Fo-ATPase を構成するサブユニット(α サブユニット[F1 α]と β サブユニット[F1 β])が同定された。これらの発現を抑制しても、水疱性口内炎ウイルス(VSV)の増殖には影響を与えなかったことから、F1 α と F1 β はインフルエ

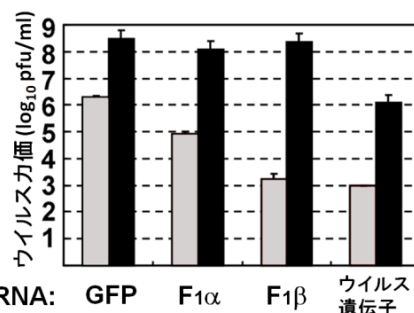


図2. F1 α , F1 β の発現を抑制した細胞において、VSV(黒)の増殖は低下しないが、インフルエンザウイルス(灰色)の増殖は低下する。

ンザウイルスの増殖に特異的に重要な因子であることが示唆された(図2)。

F1Fo-ATPase は、哺乳類の細胞においてミトコンドリア内膜と細胞膜（特に脂質ラフト）に局在することが知られている。そこで、siRNA による発現抑制が、各画分に存在する F1 β の発現をどの程度低下させるかを細胞分画法により検証したところ、脂質ラフトに存在する F1 β の発現低下は、ミトコンドリアのそれよりも顕著であった。このことから、ウイルス感染サイクルのうち、細胞膜で起こるステップに F1 β が関与すると推察された。実際、電子顕微鏡観察において、F1 β の発現が低下した細胞表面から形成されたウイルス粒子数は、コントロール細胞に比べて低下していた(図3)。

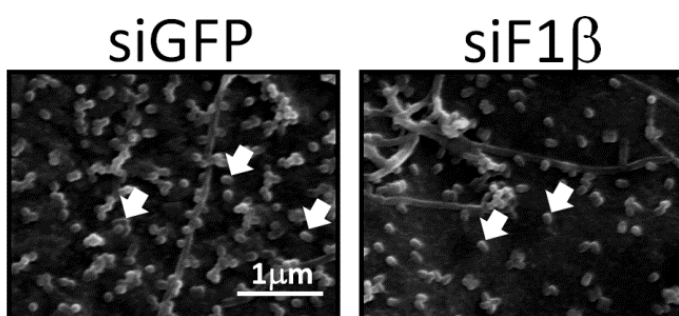


図3. F1 β の発現を抑制したウイルス感染細胞におけるウイルス粒子形成。siRNAを導入した細胞にインフルエンザウイルスを感染させ、細胞表面を走査型電子顕微鏡で観察した。白矢印:ウイルス粒子。スケールバー:1 μ m.

F1 β は、F1Fo-ATPase の ATPase 活性に重要なサブユニットとして知られている。そこで、ATPase 活性を低下させた F1 β を発現する細胞を用いてインフルエンザウイルスの増殖を調べたところ、ウイルス増殖は、野生型 F1 β を発現する細胞と比較して有意に低下していた。

これまで、HIV など他のウイルスの研究では、ウイルス粒子形成に関与する宿主因子として他の ATPase が同定されていた。しかし、インフルエンザウイルスの粒子形成に関与する宿主因子は明らかにされていなかった。本研究により、①脂質ラフト上の F1 β が効率的なウイルス粒子形成に重要である、②F1 β のATPase活性がウイルス粒子形成に重要である、という新たな知見を得た。他のウイルスの粒子形成に関与する宿主因子と同様に、インフルエンザウイルスの粒子形成にも ATPase 活性を持つ因子が同定された点は非常に興味深い。

【結語】

ウイルスは宿主細胞の存在なしに自己複製することができないことから、宿主因子はウイルス因子の機能と密接な関係を持つことが示唆される。本研究では、インフルエンザウイルスの NS 分節にコードされる NS1、NS2 と宿主因子の相互作用を調べることで、両蛋白質の宿主因子依存的機能が見出された。今後、この知見がインフルエンザウイルスの更なる理解に繋がることが期待される。