

論文の内容の要旨

論文題目

Identification and Characterization of GPS1 as a Host Factor Involved in Influenza Virus Replication.

(インフルエンザウイルス感染環における宿主因子 GPS1 の同定と機能解析)

氏名 桑原 朋子

インフルエンザが人類の歴史に初めて登場したのは、紀元前 400 年にまで遡る。しかし、現在に至るまでインフルエンザは人類に甚大な被害を与え続けており、インフルエンザによる死者は世界中で毎年 25 万～50 万人にもものぼる。2009 年には、メキシコで発生したパ
ンデミック (H1N1) 2009 が瞬く間に世界中に広がり、18000 人以上が死亡したと報告さ
れている。1997 年に香港で出現した H5N1 高病原性鳥インフルエンザは、養鶏業に甚大な
被害を及ぼしただけでなく、家禽からヒトへ感染し、現在に至るまで、中国、インドネシ
ア、ベトナム、エジプトを中心に 400 名近くの死者を出している。さらに、2013 年 3 月に
は、中国で鳥インフルエンザ A (H7N9) のヒトへの感染が報告され、2014 年 10 月時点で
175 名の死亡例が世界保健機構 (WHO) に報告されている。

これまで、抗インフルエンザ薬として、M2 イオンチャンネル阻害剤 (アマンタジン) と
ノイラミニダーゼ (NA) 阻害剤 (オセルタミビルおよびザナミビル) が認可されている。また、
今年 3 月には、ウイルス RNA ポリメラーゼ阻害剤 (ファビピラビル) が日本で薬事承認を
受けた。アマンタジンは季節性ウイルスのほとんどが耐性を獲得したため、日本感染症学
会はオセルタミビルなど NA 阻害剤の使用を推奨している。しかし、近年 NA 阻害剤に対
して耐性を獲得した季節性インフルエンザウイルスの出現が公衆衛生上の大きな問題とな
っている。2013 年に発生した鳥インフルエンザ A (H7N9) においても、既にオセルタミ
ビルに対する耐性を獲得したウイルスが報告されており、新たな抗ウイルス薬の必要性を

示している。

インフルエンザウイルスは、8本に分節化したマイナス鎖 RNA をゲノムとして持つ。これらのゲノム RNA からは、10種類程度のウイルス蛋白質しか発現しない。そのため、インフルエンザウイルスが宿主細胞に侵入し出芽するまでの多くの増殖過程が、宿主細胞因子の機能に依存する。近年、インフルエンザウイルスの感染メカニズムの解明を目指し、ウイルス感染環において重要な役割を果たす宿主細胞因子の探索が盛んに行われている。ウイルス蛋白質はゲノムの変異に伴い絶えず変化し続けるため、宿主細胞因子をターゲットとすれば、ウイルスの変異に左右されない、より効果的な抗ウイルス薬の開発に繋がる可能性がある。

本研究では、宿主細胞因子を標的とした新たな抗ウイルス薬の開発を念頭に置き、インフルエンザウイルスの増殖において、重要な役割を果たす宿主細胞因子の同定と機能解析を試みた。なかでも、インフルエンザウイルス粒子のエンベロープに膜貫通型蛋白質として存在する M2 蛋白質に着目し、M2 蛋白質と相互作用する宿主細胞因子の探索を行った。

インフルエンザウイルス M2 蛋白質は、プロトンチャンネル活性を有し、宿主細胞内に侵入したウイルス粒子の脱殻に必須である。近年、ウイルスの粒子形成やウイルスゲノムの粒子内への取り込み、またウイルス粒子の出芽過程においても重要な役割を果たすことが明らかになってきた。さらに、M2 蛋白質は、ゴルジ体内腔の pH を変えることによって、インフラマソームの活性化にも関与することが明らかにされている。しかし、M2 蛋白質と相互作用する宿主因子については、未だほとんど明らかにされていない。

我々の研究室では、これまでに免疫沈降法と質量解析法により、他のインフルエンザウイルス蛋白質と相互作用せず、M2 蛋白質のみと特異的に相互作用する宿主細胞因子を 207 種類同定した。これら 207 種類の宿主細胞因子を機能別に分類したところ、ユビキチン・プロテアソーム系に関与する宿主タンパク質が多く存在することが明らかになった。本研究では、ユビキチン・プロテアソーム系で重要な役割を果たす COP9 シグナロソームに着目し、そのサブユニットの 1 つである G protein pathway suppressor 1 (GPS1) に焦点をあ

て、インフルエンザウイルス増殖における GPS1 の機能解析を試みた。GPS1 の機能としては、NF- κ B や AP1 などのシグナル伝達経路の制御に関与することが報告されている。

初めに、siRNA を用いて GPS1 の発現を抑制した細胞にインフルエンザウイルスを感染させ、ウイルス増殖に及ぼす影響を調べたところ、GPS1 発現抑制細胞におけるウイルス増殖は、コントロール細胞の 1/1000 程度にまで低下した。GPS1 の発現抑制により細胞毒性が認められなかったことから、GPS1 がウイルス増殖に必須の宿主因子であることが明らかになった。

次に、GPS1 が M2 蛋白質と相互作用するかどうかを確認するために、間接蛍光抗体法を行い、GPS1 および M2 タンパク質の細胞内局在を共焦点顕微鏡下で観察した。その結果、ウイルス感染細胞あるいは M2 蛋白質を単独で発現させた細胞において GPS1 と M2 蛋白質は、核近傍および形質膜周辺において共局在することが示された。さらに、免疫沈降法により GPS1 と M2 の相互作用を調べたところ、GPS1 と M2 が共沈降したことから、GPS1 と M2 蛋白質は相互作用することが確認された。

次に、GPS1 がインフルエンザウイルス増殖のどの段階に関与しているのかを明らかにするため、ミニレプリコンを用いて、GPS1 がインフルエンザウイルスのポリメラーゼ活性に与える影響を調べた。その結果、GPS1 の発現を抑制した細胞では、インフルエンザウイルスのポリメラーゼ活性がコントロールの 20%程度にまで低下することが分かった。この時、GPS1 発現抑制細胞に M2 蛋白質を発現させても、ウイルスポリメラーゼ活性に影響が認められなかったことから、GPS1 のポリメラーゼ活性に対する影響は M2 非依存的であると考えられた。さらに、GPS1 発現抑制細胞にインフルエンザウイルスを感染させ、ウイルス蛋白質およびウイルス RNA の発現を継時的に調べたところ、GPS1 発現抑制細胞におけるウイルス蛋白質およびウイルス RNA の発現量は、コントロールと比較して顕著に減少していることが明らかになった。すなわち、GPS1 はインフルエンザウイルスの転写・複製に関与することが分かった。

本研究から、GPS1 はインフルエンザウイルスの増殖に重要な宿主細胞因子であること、また、インフルエンザウイルスの転写・複製に関与することが示された。ウイルス増殖における GPS1 の作用機序の更なる解明は、新たな抗インフルエンザ薬の開発の一助となることが期待される。