

## 審査の結果の要旨

氏名 桑原 朋子

本研究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。そして、以下の結果を得ている。

1. 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。
2. 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。
3. 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。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。
4. GPS1 が NF- $\kappa$ B シグナル伝達経路に影響を及ぼすかどうかを調べるため、GPS1 発現抑制細胞にルシフェラーゼをコードする NF- $\kappa$ B のレポータープラスミドを導入し、レポーターアッセイを行った。MEKK タンパク質で刺激し、細胞のライセート中のルシフェラーゼ活性を測定することにより、NF- $\kappa$ B シグナル伝達経路の活性化を調べた。

その結果、GPS1 発現抑制細胞における NF- $\kappa$ B シグナル伝達経路の活性は、コントロールの 50%程度にまで低下することが明らかになった。先行研究から、NF- $\kappa$ B 阻害剤で処理した細胞ではインフルエンザウイルスの vRNA 合成量が低下することが明らかになっている。このことから、GPS1 発現抑制細胞における、ウイルスの転写・複製への影響には、NF- $\kappa$ B シグナル伝達経路が関与することが示唆された。

以上、本研究は、GPS1 がインフルエンザウイルスの増殖、特にウイルスゲノムの転写・複製に重要な宿主細胞因子であることを明らかにした。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。