

氏 名	竹 内 健 司
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	博 士 (論) 第 3 7 9 号
学 位 授 与 の 要 件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学 位 授 与 年 月 日	平 成 2 3 年 3 月 1 0 日
学 位 論 文 題 目	Sendai virus C protein plays a role in restricting PKR activation by limiting the generation of intracellular double-stranded RNA  (センダイウイルスのC蛋白質は細胞内二重鎖RNAの発生を制限すること によりPKR活性化抑制に関与する)
審 査 委 員	主 査 教 授 杉 原 洋 行  副 査 教 授 安 藤 朗  副 査 教 授 辻 川 知 之

## 論文内容要旨

※整理番号	383	氏名 (ふりがな)	竹内 健司
学位論文題目	Sendai virus C protein plays a role in restricting PKR activation by limiting the generation of intracellular double-stranded RNA (センダイウイルスの C 蛋白質は細胞内二重鎖 RNA の発生を制限することにより PKR 活性化抑制に関与する)		
<p>【目的】センダイウイルス (SeV) はパラミクソウイルス科に属し、マウスに急性肺炎を起こす。一般に、ウイルス感染を認識した宿主はインターフェロン(IFN)-<math>\alpha/\beta</math> を産生し感染ウイルスの制圧を図ろうとする。産生された IFN は細胞膜上のレセプターに結合し、その細胞に抗ウイルス状態をもたらすが、これは IFN シグナルが細胞内の JAK-STAT 経路を経て PKR などの抗ウイルスタンパク質の遺伝子発現を増強するためである。PKR などの抗ウイルスタンパク質は、最終的にタンパク質合成活性を低下させる。しかしながら、SeV は、IFN の作用により抗ウイルスタンパク質が発現増強している細胞においても、ウイルスタンパク質合成を低下させることなくウイルス産生を継続する。本論文では、このウイルスタンパク質合成維持機構を解明することを目的とした。</p> <p>【方法】<u>ウイルスと細胞</u>： SeV Z 株 (本論文では wt とする)、並びに、これに由来し C タンパク質を発現しない組換え SeV[4C(-)]、SeV pB 株、ニューキャッスル病ウイルス (NDV) Ulster 株を使用した。ウイルス感染実験には、IFN-<math>\alpha/\beta</math> 遺伝子を欠失しているヒト神経膠芽腫由来培養細胞株 U118 を主に用いた。<u>細胞のタンパク質合成活性</u>：<math>^{35}\text{S}</math> 標識アミノ酸を含む培養液で細胞を 1 時間培養後、細胞抽出液の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、泳動ゲルの放射活性を測定した。<u>ウェスタンブロット (WB) 分析</u>：細胞抽出液の WB 分析により、各種ウイルスタンパク質、並びに、446 番 Threonine リン酸化 PKR や 51 番 Serine リン酸化 eIF2<math>\alpha</math> などの宿主タンパク質を検出した。<u>二重鎖 RNA(dsRNA)の検出</u>：3%パラホルムアルデヒドで細胞を固定、0.5% Triton X-100 で細胞膜を除去したのち、40 bp 以上からなる dsRNA を認識する特異抗体(J2)を一次抗体として用い、細胞の蛍光染色を行った。<u>C 発現細胞の樹立</u>：EF1<math>\alpha</math> プロモータ下流に SeV C タンパク質コード領域 cDNA を挿入した哺乳動物細胞発現用プラスミドを U118 細胞にトランスフェクション後、G418 耐性コロニーを採取して C 発現細胞 (U118-C) を得た。</p>			

- (備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等で印字すること。
2. ※印の欄には記入しないこと。

【結果】 SeV 感染細胞のタンパク質合成活性 : SeVwt 感染細胞内に蓄積するウイルスタンパク質量は、IFN- $\alpha$  の前処理によっても低下することはなかった。しかしながら、Cタンパク質を発現しない 4C(-)の感染細胞では IFN- $\alpha$  の前処理による低下が見られた。この 4C(-)感染細胞での低いウイルスタンパク質合成量は、IFN で前処理しない場合にも認められ、SeVwt 感染細胞に比べ著しく低下していた。そこで、感染細胞のタンパク質合成活性を調べた。SeVwt 感染細胞は非感染細胞と同等のタンパク質合成活性を維持していたのに対して、4C(-)感染細胞では活性の著しい低下が起こっていた。以上から、SeV 感染細胞でのタンパク質合成活性の維持には、Cタンパク質が関与していることが明らかとなった。PKR の活性化と Cタンパク質の役割 : PKR は dsRNA を活性化因子とするタンパク質リン酸化酵素である。dsRNA との結合により自己リン酸化して活性化した PKR は、翻訳開始因子 eIF2 の  $\alpha$  サブユニットをリン酸化し、細胞のタンパク質合成を抑制する。4C(-)感染細胞では、SeVwt 感染細胞と異なり、eIF2 $\alpha$  と PKR のリン酸化が観察された。短鎖干渉 RNA により PKR をノックダウンすると eIF2 $\alpha$  のリン酸化が抑制されたことから、eIF2 $\alpha$  のリン酸化は、主として PKR の働きによるものと考えられた。しかしながら、NDV 感染や poly(I):(C) dsRNA による PKR の活性化は、SeV を先行感染して Cタンパク質をあらかじめ発現しておいても、抑制することはできなかった。このことから、Cタンパク質による PKR の活性化抑制は、ゲノム転写複製などの SeV 固有のプロセスで働いていることが推定された。PKR の活性化因子である dsRNA を dsRNA 特異抗体 J2 による蛍光抗体法で検出すると、4C(-)感染では明らかな dsRNA シグナルが認められたが、SeVwt 感染では全く認められなかった。一方、この 4C(-)感染による dsRNA の生成ならびに PKR、eIF2 $\alpha$  のリン酸化は、Cタンパク質を恒常的に発現する細胞においては、強く抑制された。

【考察】 SeV 感染細胞でのタンパク質合成活性の維持は、dsRNA 生成が Cタンパク質により抑制されているためであると考えられた。dsRNA 生成の抑制は、PKR が活性化状態になるのを防ぎ、その結果、タンパク質合成活性の低下を阻止する。麻疹ウイルスの C ノックアウトウイルス感染細胞においても eIF2 $\alpha$  や PKR の強いリン酸化が認められており (Nakatsu et al., J. Virol. 80, 11861-11867, 2006; ibid 82, 8296-8306, 2008)、最近になって SeV と同様な機構の存在が報告された (Ikegame et al., J. Virol. 84, 372-379, 2010)。dsRNA は、PKR の活性化因子であるだけでなく、IFN の強力な inducer でもある。したがって、この dsRNA 生成の制御は、Cタンパク質に認められる IFN 産生抑制活性 (Komatsu et al., Virology 325, 137-148, 2004; Microbes Infect. 9, 954-962, 2007) にも関与していると考えられた。Cタンパク質は、ウイルス RNA ポリメラーゼに結合し転写複製を抑制的に制御することが知られており、この制御と dsRNA 生成の制御は密接に関連していることが示唆された。

【結論】 センダイウイルス感染細胞ではタンパク質合成活性が維持される。これは感染細胞内での dsRNA の発生を Cタンパク質が抑制することによって PKR の活性化を防いだためだと考えられた。

## 学位論文審査の結果の要旨

整理番号	383	氏名	竹内 健司
論文審査委員			
(学位論文審査の結果の要旨)			
<p>センドライウイルス (SeV) は、ヒトに病原性を示さないパラミクソウイルスで、遺伝子を細胞に運ぶベクターとして利用されている。このウイルスの C 蛋白質はインターフェロン (IFN) や IFN による抗ウイルス蛋白質の発現誘導の抑制に働く。しかし最近、抗ウイルス蛋白質の発現が増強している細胞でも SeV はウイルス産生を続け得ることが分かった。このメカニズムを解明するために、本研究では遺伝子改変 SeV を用い、抗ウイルス蛋白質の PKR による蛋白質合成抑制の分子機構について検討し、以下の点を明らかにした。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) ウイルス蛋白質発現の維持にはウイルスの C 蛋白質が必要である。</li> <li>2) C 蛋白質は PKR の活性化を抑制する。</li> <li>3) その抑制は二重鎖 RNA の生成を抑えることによる。</li> </ol> <p>本論文は、マイナス鎖 RNA ウイルスであるセンドライウイルスの対宿主戦略として C 蛋白質による「二重鎖 RNA の生成抑制」があることを初めて明らかにし、C 蛋白質の多彩な機能について新しい知見を加えるとともに、このウイルスをベクターとして利用するさいに C 蛋白質の改変がベクターとしての性能向上に役立ち得ることを示唆したものである。最終試験として論文内容に関する試問を受け、博士 (医学) の学位論文に値するものと認められた。</p>			
(総字数 526 字)			
(平成 23 年 1 月 26 日)			