

論文の内容の要旨

論文題目 ポリオウイルス感染神経細胞における細胞変性効果阻害の機構

氏 名 柳谷 朗子

【序論】 ポリオウイルス (PV) は一本のプラス鎖 RNA をゲノムとして持つ、小児麻痺 (急性灰白髄炎) の病因となるウイルスである。感染細胞内において、PV ゲノムは mRNA として機能し、PV 特異的蛋白質の合成は PV ゲノムの非翻訳領域 (5'-UTR (5' untranslated region)) に存在する Internal ribosomal entry site (IRES) よりキャップ非依存的翻訳開始機構により行われる (Fig. 1)。

PV はヒトとサルのみで感染するという明確な種特異性を示し、この種特異性はポリオウイルスレセプター (PVR : CD155) の存在で決定されている。ヒト PVR (hPVR) 遺伝子をもつトランスジェニック (Tg) マウスは、PV に感受性を示す。PV はヒトの腸管上皮細胞および神経細胞などにおいて増殖する。

また、PV は培養細胞においても増殖が可能であり、PV が細胞に感染すると、細胞膜の透過性の亢進、宿主細胞側の転写と翻訳阻害、クロマチンの縮合といった核の破壊、核内蛋白質の細胞質への移行などが生じ、劇的な細胞変性効果 (Cytopathic effect : CPE) が観察される。この CPE の発現には PV 特異的蛋白質である 2A protease (2A^{pro}) が重要な因子の一つであり、2A^{pro} を HeLa 細胞で単独発現させると CPE が発現する。

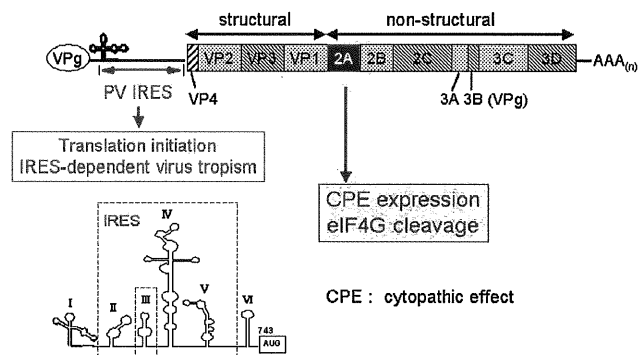


Fig. 1 ポリオウイルス (PV) の構造

PV 感染細胞内において 2A^{pro} が翻訳開始因子の一つである eIF4G を切断することにより、宿主細胞側の Cap 依存的な翻訳を阻害する一方、PV 特異的蛋白質は IRES より翻訳が開始されて、PV に有利な翻訳が進行することが明らかとなっている (Fig. 2)。

神経細胞での特異的な現象として、PV 感染 2 時間後に抗 PV 抗体または抗 PVR 抗体を添加することにより、CPE 発現が抑制されることが確認された。本研究では、この神経細胞に特異的な CPE 発現阻害機構を分子レベルで解明することを目的とした。

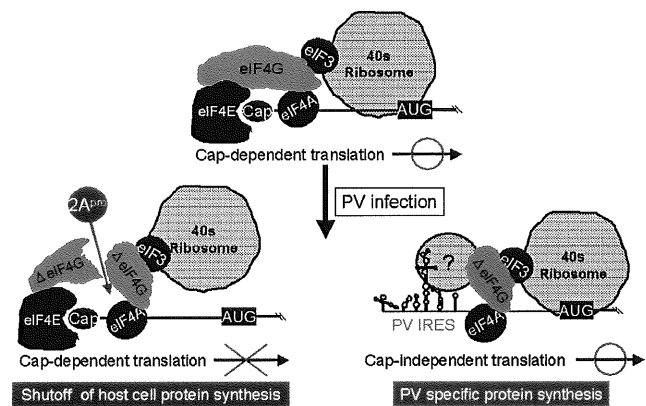


Fig. 2 PV 感染細胞内における蛋白合成

抗 PV 抗体または抗 hPVR 抗体による CPE 発現の阻害

PV 感染 2 時間後に、抗 PV 抗体または抗 hPVR 抗体を添加すると、神経細胞特異的に CPE 発現が阻害された (Fig. 3)。免疫染色法と一段階増殖実験により、抗体処理による PV 複製の阻害はないことが明らかとなり、PV の複製を各処理抗体が阻害することによって、PV 感染神経細胞において CPE 発現が抑制されているのではないことが明らかとなった。また、感染 24 時間後の抗体処理神経細胞では、一度は増殖した PV 抗原が減少していることが観察された。

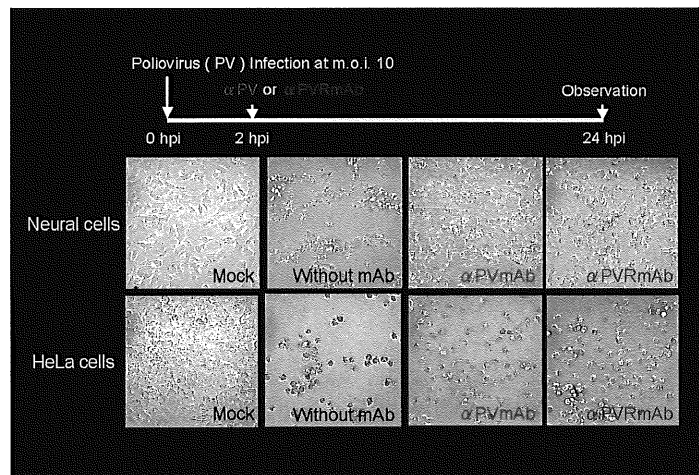


Fig. 3 抗 PV 抗体または抗 PVR 抗体処理による神経細胞特異的な CPE 発現阻害

各抗体添加時間に対する CPE 発現阻害作用を検討する為に、PV 感染神経細胞において抗体添加時間の経時変化を検討した。子孫ウイルスが出現する感染 4 時間以後に各抗体を添加すると CPE が発現することが観察された。この結果より、子孫ウイルスの感染による PV 特異的蛋白質の感染細胞内蓄積が CPE の発現に重要であることが示唆された。また子孫ウイルス感染阻害以外にも、各抗体処理神経細胞において、初回に感染したウイルスに対するクリアランス機構が存在していることが考えられたので、以下の実験では PV 感染神経細胞内における分子の動向を検討した。

各抗体処理 PV 感染神経細胞における蛋白合成

各抗体処理 PV 感染細胞内における蛋白質合成をパルスラベル法により検討したところ、非神経細胞である HeLa 細胞では各抗体の有無にかかわらず、宿主細胞側の蛋白合成が阻害され、PV 特異的蛋白合成のみが行われることが明らかとなった。

一方、神経細胞では抗体が存在しない場合でも、少なくとも感染 10 時間後まで宿主細胞側の蛋白合成が進行し、各抗体添加の場合は宿主細胞側の蛋白質合成は持続し、かつ感染 7 時間後に PV 特異的蛋白合成が阻害されることが明らかとなった (Fig. 4)。

感染 7 時間後に、PV mRNA はノーザンブロット法により確認されるので、PV IRES からの翻訳が阻害されていることが示唆された (Fig. 5)。以上の結果から、神経細胞内に PV 感染に応答して発現する分子が存在し、その作用によって PV IRES 活性が阻害されている可能性が示唆された。

各抗体処理神経細胞内における PV 2A^{pro} による eIF4G 切断活性

CPE 発現の原因の一つとして宿主細胞側蛋白合成阻害が報告されており、その阻害には、PV 2A^{pro} が翻訳開始因子の eIF4G を切断することが原因の一つであると考えられている。各抗体処理 PV 感染神経細胞における 2A^{pro} の活性を eIF4G の切断を指標として検討した。

HeLa 細胞の場合、各抗体処理の有無にかかわらず、eIF4G の切断が感染 5 時間までに確認された。一方、神経細胞では各抗体処理により、感染 5 時間後に eIF4G は一度完全に切断されるが、感染 11 時間後には再び完全長の eIF4G が出現し、またこの時点で 2A^{pro} は存在していることが明らかとなった (Fig. 6)。

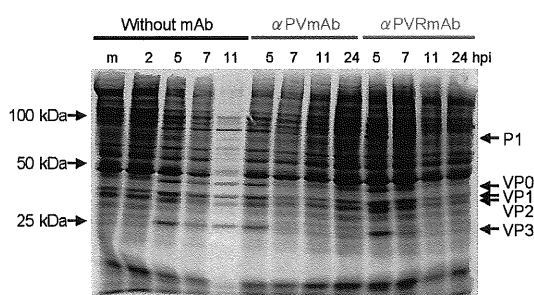


Fig. 4 PV 感染神経細胞内における蛋白合成

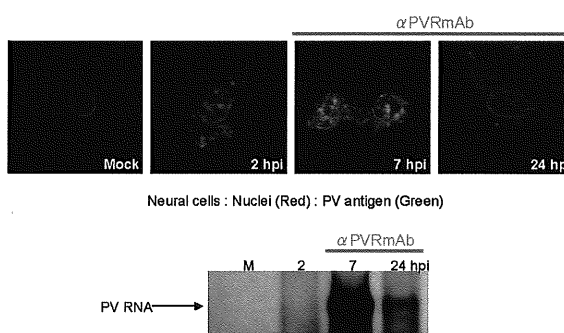


Fig. 5 ノーザンブロット法による PV mRNA の検出

Nuclei : Red, PV : Green

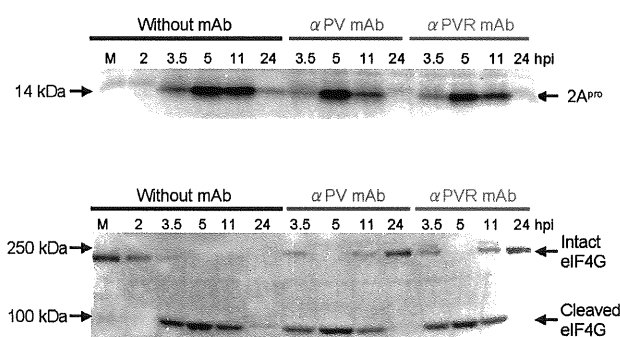


Fig. 6 神経細胞における 2A^{pro} の発現量と 2A^{pro} による eIF4G の切断

PV 2A^{pro} の細胞内局在

2A^{pro} の eIF4G 切断活性が抑制される原因の一つとして、2A^{pro} が eIF4G の切断の場である細胞質に存在しない可能性があるため、PV 感染細胞内における 2A^{pro} の細胞内局在を検討する為に HA tag 付き 2A^{pro} を発現するリコンビナントウイルスを作製した (Fig. 7)。

このウイルスを感染後、各抗体処理をして 2A^{pro} の細胞内局在を免疫染色法により検討した。その結果、各抗体処理神経細胞では感染5時間後、細胞質と核の両方に存在していた 2A^{pro} が、感染11時間後では核内に 2A^{pro} が局在し、eIF4G の切断の場である細胞質に存在しないことが明らかとなった (Fig. 8)。

この 2A^{pro} の核内におけるコンパートメント化が、2A^{pro} が eIF4G 切断活性を失った原因の一つであることが考えられた。

HA tag 付加 2A^{pro} 単独発現

哺乳細胞発現ベクターを用いて、C 末端に HA tag を付加した 2A^{pro} を神経細胞または HeLa 細胞において、一過性に発現させた。免疫染色法により HA tag 付加 2A^{pro} の細胞内局在を検討したところ、トランスフェクション2日後、HeLa 細胞では CPE の特徴を示し、HA tag 付加 2A^{pro} は細胞質と核の両方に存在していた。一方、神経細胞は CPE を発現せず、HA tag 付加 2A^{pro} は核に局在していることが明らかとなった (Fig. 9)。以上の結果より、単独発現でも 2A^{pro} は核局在することが明らかとなり、また神経細胞は 2A^{pro} 単独発現では CPE を発現しないことが明らかとなった。

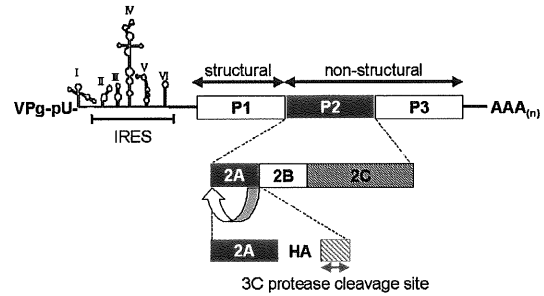


Fig. 7 HA tag 付加 2A^{pro} を発現するリコンビナントウイルスの構造

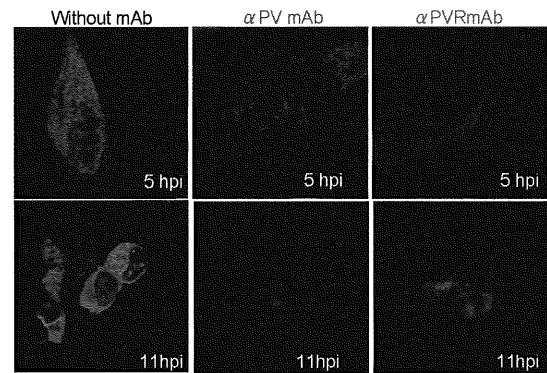


Fig. 8 神経細胞内における 2A^{pro} の局在
Nuclei : Red, HA tag 付加 2A^{pro} : Green

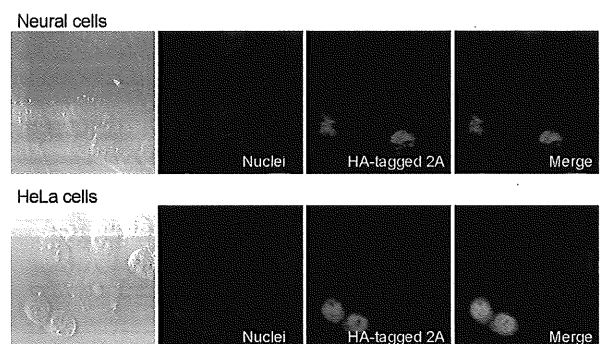


Fig. 9 HA-tagged 2A^{pro} の一過性発現
Nuclei : Red, HA tag 付加 2A^{pro} : Green

PV 感染による核膜孔複合体の構成分子である Nucleoporin p62 の分解

ウエスタンブロット法により、PV 感染神経細胞内における核膜孔構成分子の一つである Nucleoporin p62 の分解を経時的に検討した。その結果、抗体未処理神経細胞の場合、感染 11 時間までに Nucleoporin p62 は分解するが、各抗体処理の場合は Nucleoporin p62 が分解されないことが明らかとなった (Fig. 10-A)。Nucleoporin p62 の分解が CPE 発現とどのような相関にあるかを検討するために、単独発現でも CPE を誘導できる 2A^{pro} を一過性に細胞で発現させた (Fig. 10-B)。

その結果、HeLa 細胞では、トランスフェクション 2 日後までには CPE の特徴を示したにもかかわらず、Nucleoporin p62 は分解しないことが明らかとなった。このことから、PV 感染細胞内における Nucleoporin p62 の分解は他の PV 特異的蛋白質により生じる可能性が示唆された。以上の結果から、Nucleoporin p62 の分解は CPE 発現に関与していない可能性が考えられた。

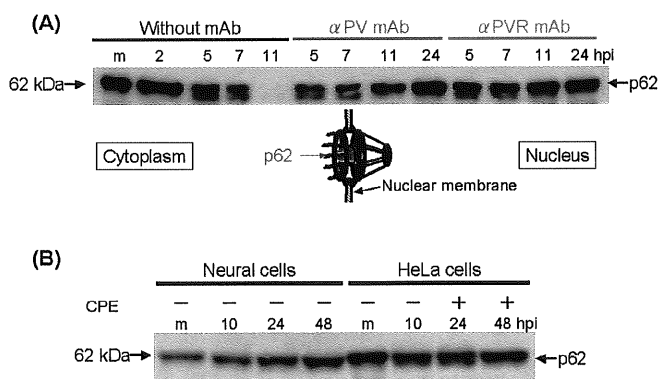


Fig. 10 Nucleoporin p62 の分解

【総括】 抗体未処理神経細胞の場合、感染 5 時間後に 2A^{pro} は細胞質と核の両方に局在するので、eIF4G は切断されている。また、この間、PV IRES からの翻訳は効率的に行われ、PV 特異的蛋白質が細胞内に蓄積される。感染 11 時間後でも 2A^{pro} は細胞質と核の両方に存在しているので、eIF4G は切断されたままであり、完全長の eIF4G による翻訳が回復することができず、CPE を発現する (Fig. 11)。一方、各抗体処理神経細胞の場合、感染 5 時間後に 2A^{pro} は細胞質と核の両方に局在し、細胞質にある eIF4G は切断されている。感染 7 時間後には PV IRES からの翻訳が阻害されて、新たに PV 特異的蛋白質、特に 2A^{pro} は合成されなくなる。感染 11 時間後には、2A^{pro} は核に局在しているので、完全長の eIF4G が細胞質に出現することが可能であり、完全長の eIF4G による翻訳が回復されて、CPE 発現阻害が生じる可能性が示唆された (Fig. 12)。

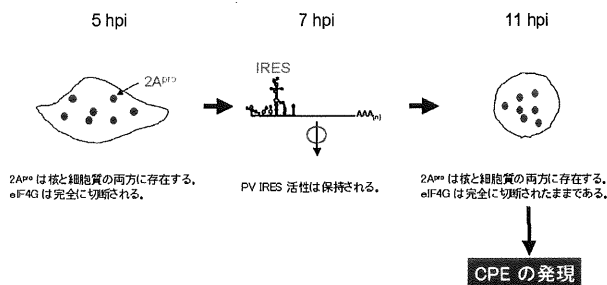


Fig. 11 抗体未処理神経細胞における CPE 発現機構

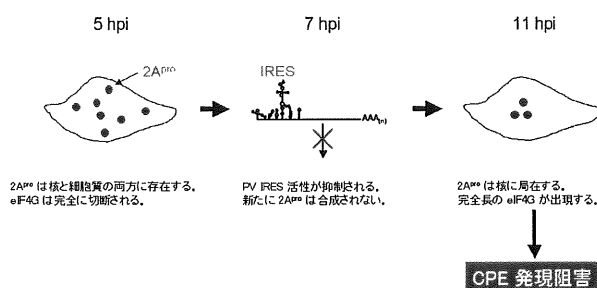


Fig. 12 各抗体処理神経細胞における CPE 発現阻害機構