

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 柿沼 美智留

Studies on the interaction between mouse hepatitis virus and cellular autophagic machinery

(マウス肝炎ウイルスとオートファジー機構に関する研究)

オートファジー(ATG)は全ての真核生物に保存されている細胞内タンパク質分解機構の一つであり、細胞質内にオートファゴソームと呼ばれる脂質二重膜構造が形成され、不要タンパク質やオルガネラを取り囲み、最終的にリソソームと融合してその内容物を分解する経路である。細胞の恒常性維持が ATG の主な役割であろうと考えられてきたが、近年細胞死や老化、癌、神経変性疾患、また細胞内に侵入した病原微生物の排除など、哺乳類における様々な生命現象に関与していることが解ってきた。

さて、一部のウイルスではその感染が細胞に ATG を誘導することが報告されている。ATG が抗ウイルス機構として機能する場合もあるが、ATG 機構を利用して自らを複製するウイルスの存在も示唆されている。本研究では、マウス肝炎ウイルス (MHV) の複製・増殖の過程におけるウイルスと ATG 機構の相互作用について検討した。

第一章 MHV と細胞の ATG 機構との相互作用

ウイルスのゲノム複製が行われる部位を複製複合体 (RC) と呼ぶ。MHV などのコロナウイルスでは宿主細胞の核周辺に多数形成される二重膜構造の double-membrane vesicle (DMV) が RC の存在部位であろうと考えられている。本章では、DMV とオートファゴソームの関連について検索した。

マウス胎児線維芽細胞 (MEF) に MHV-A59 株を感染させたところ、ATG 誘導の指標である LC3-II の発現上昇および GFP-LC3 dots の存在が確認された。しかし、オートファゴソーム伸長に必須な Atg5 を欠損させた MEF (Atg5^{-/-}MEF) に MHV を感染させた場合にも、野生型 MEF と同程度の高いウイルス増殖が認められた。電子顕微鏡による観察では、野生株 MEF の核周囲の細胞質内に多数の DMV が見られるのに対し、Atg5^{-/-}MEF ではそのような構造物は認められなかった。以上の結果から、MHV の複製にオートファゴソーム膜は必須でないこと、および DMV 形成に Atg5 が必要であることあるいは DMV がオートファゴソームに由来する可能性が示唆された。

MHV 感染 DBT 細胞では、感染後 4 時間からウイルス複製の指標である dsRNA シグナルが核周囲に認められたが、その局在は LC3 とは異なっていた。さらに、LC3-II の発現上昇は dsRNA シグナルの出現よりも遅く、感染後 8 時間以降に認められた。加えて、ATG 誘導剤であるラパマイシン処理 DBT 細胞と対照 DBT 細胞の MHV 感染後のウイルス RNA 量の経時的変化につ

いて検討したが、両者間に有意な差は認められなかった。以上の結果は、DMVがオートファゴソームに由来する可能性は低いこと、またMHV感染によって誘導されるATGはウイルス感染後期に関係する可能性を示唆している。

ATGによるタンパク質分解の指標であるp62の発現減少は感染後8時間以降に観察され、また感染後10時間にはLC3とリソソームの指標であるLAMP-1の共局在およびLAMP-1とウイルスS蛋白の共局在が確認され、MHV誘導性ATGはタンパク質分解を伴うことが示唆された。一方、感染8時間以降でERストレスの指標であるXBP1遺伝子のスプライシングが確認され、リン酸化eIF2 α の発現の上昇も認められた。ERストレスはATGを誘導することが知られており、その結果小胞体や凝集タンパク質の分解を促進し、ERストレスおよびそれに起因する細胞死を抑制している可能性が考えられる。これらの結果は、MHV感染による感染後期のATGの誘導はMHV感染に複雑に関わっていることを示唆している。

第二章 MHV複製の場の検索

MHV感染DBT細胞において各種オルガネラマーカーとdsRNAシグナルとの二重染色を行い、その局在を観察した。その結果、感染後6時間のDBT細胞において、dsRNAシグナルはcalnexinおよびERGIC-53とそれぞれ一部共染した。一方EEA-1、LAMP-1とdsRNAシグナルは異なる局在を示した。以上より、MHV感染により誘導されるDMVは一部小胞体の性質を有することが示唆された。

以上の結果は、MHVのRCはオートファゴソーム膜ではないこと、またMHV感染によりATGが誘導されるが、ウイルス産生に対して正あるいは負の制御に働いており、その影響は複雑であることが示唆された。これらの研究成果は獣医学学術上貢献するところが少なくない。よって、審査員一同は、本論文が博士（獣医学）の学位論文として価値のあるものと認めた。