

[課程-2]

審査の結果の要旨

氏名 ・川 学士

本研究は、ウイルス増殖とそれを制御する宿主タンパク質のメカニズムを明らかにするために、インフルエンザウイルス RNA ポリメラーゼによる RNA 合成に着目し、それを制御する宿主タンパク質の探索・解析を試みたものであり、以下の結果を得ている。

1. インフルエンザウイルスの RNA ポリメラーゼによる遺伝子発現に影響を与える宿主タンパク質を探索するため、スクリーニング系を構築した。ウイルス遺伝子をリポーター遺伝子に置き換えその発現を指標とし、宿主タンパク質の探索を行った。この系の確立によりウイルスタンパク質と宿主タンパク質の直接の相互作用の有無に関わらない探索を可能とした。
2. 1 のスクリーニング系を用いて RNA 遺伝子発現を上昇させるものとして RuvB-like 2 (N 末が欠損したもの) を同定した。RuvB-like 2 の全長をクローニングし過剰発現させた細胞においてウイルスの RNA 合成ならびにウイルスの増殖が抑制された。siRNA を用いたヒト RBL2 ノックダウン細胞においてウイルス RNA 合成量ならびにウイルスの増殖が上昇した。以上のことから RuvB-like 2 はインフルエンザウイルスの複製を抑制していることが示唆された。
3. 免疫沈降を用いてウイルスタンパク質と RuvB-like 2 の相互作用を解析したところ RuvB-like 2 は PB1、PB2、NP と相互作用することが認められた。さらに、Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) アッセイを行ったところ RuvB-like2 と NP の細胞内における相互作用が確認できた。また BiFC アッセイを用いて RBL2 が NP のオリゴマー形成を阻害していることが認められた。
4. 1 のスクリーニングを応用した系を用いて RNA 遺伝子発現を上昇させるものとして RSK2 (N 末が欠損したもの) を同定した。ウイルスポリメラーゼ

によるリポーター遺伝子発現は、ヒト **RSK2** ノックダウン細胞において上昇したことから、N 末欠損した **RSK2** は、細胞内在する **RSK2** に対しドミナントネガティブに働いた可能性が示唆され、**RSK2** はウイルス遺伝子発現を抑制していることが示唆された。

5. インフルエンザウイルスの感染により、**MAP** キナーゼが活性化されることが報告されている。**MAP** キナーゼの下流に位置する **RSK2** も感染に伴い、活性化（リン酸化）されることを確認した。
6. **RSK2** ノックダウン細胞において A 型インフルエンザウイルス、B 型インフルエンザウイルス、センダイウイルスの増殖効率が上昇した。また **RSK2** ノックダウン細胞において、**NF- $\kappa$ B** 活性化、**IFN- $\beta$**  プロモーター活性化、**PKR** 活性化が減少していることを確認した。このことから **RSK2** が自然免疫系に関与していることが示唆された。

以上、本論文において、インフルエンザウイルス増殖に関わる宿主タンパク質探索の系を開発し、ウイルス増殖を阻害する二つの宿主タンパク質を同定した。本研究は、ウイルス増殖を抑制する宿主抗ウイルス応答の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。