

論文内容の要旨

論文題目 **Intracellular dynamics of influenza viral RNA**

インフルエンザウイルス RNA 細胞内動態

指導教官 河岡 義裕 教授

2007 年 4 月 入学

医学博士課程 病因・病理学専攻

川上 英良

A 型インフルエンザウイルスは毎年冬季に流行し、感冒様症状を引き起こす RNA ウイルスである。インフルエンザウイルスのゲノムは 8 本に分節化されているため、異なる二種類のウイルスが共感染することによる遺伝子交雑が起きやすい。このような遺伝子交雑は抗原性の大幅な変化を引き起こし、パンデミック（世界的大流行）につながることもある。前世紀には、スペイン風邪（1918 年）、アジア風邪（1957 年）、香港風邪（1968 年）という三度のインフルエンザウイルスによるパンデミックが起これ、多数の死者が出た。今世紀では、既に 2009 年に新型 H1N1 亜型ウイルスによるパンデミックが引き起こされている。

現在のインフルエンザウイルスに対する防御策は、ワクチンと抗ウイルス薬に大別される。しかしながら、ヒトインフルエンザウイルスは抗原性の変化が早いため、ワクチン株を数年に一度更新する必要がある。また現行の抗ウイルス薬に対して耐性ウイルスが出現している。従って、インフルエンザウイルスの感染制御のために、インフルエンザウイルスの感染細胞内における増殖機構を解明し、新たな抗ウイルス薬のターゲットを同定することが求められている。

本研究では、新たな抗ウイルス薬のターゲットとして、インフルエンザウイルスの RNA に着目し、感染細胞内におけるインフルエンザウイルス RNA の動態の解析を行った。

第一章 インフルエンザウイルス vRNA, cRNA, mRNA を区別するための strand 特異的 real-time RT-PCR 法の確立

インフルエンザウイルスのゲノムである vRNA は感染細胞内の核内において、ウイルスのポリメラーゼにより転写・複製を受ける。具体的には、転写反応により、5' cap 構造および poly A tail を持つ mRNA が合成され、複製反応により vRNA に完全に相補的な cRNA が作られる。さらに、cRNA をテンプレートとして新しい vRNA が大量に合成される。

これらの転写・複製反応は全て同一のウイルスポリメラーゼ複合体によって行われるにも関わらず、感染初期には転写反応が、感染後期には複製反応が主に起こることが知られている。転写・複製の切り替えを行う因子の存在が示唆されており、いくつかのモデルが提唱されているものの、統合的な説明には至っていない。

インフルエンザウイルスの転写・複製制御機構を理解する上で、vRNA, cRNA, mRNA を区別して定量する方法が必要不可欠である。近年、その方法の一つとして感度が高く、簡便な real-time RT-PCR が用いられるようになった。従来の real-time RT-PCR においては、vRNA, cRNA, mRNA を配列特異的なプライマーを用いて逆転写し、共通のプライマーセットで real-time PCR を行うことにより定量していたが、特異性に関して十分な検証がなされていなかった。

本研究では、逆転写反応の配列特異性が非常に低く、プライマー非依存的に反応が起こることを見出した。このことが原因で、従来の real-time RT-PCR 法による vRNA, cRNA, mRNA の区別は極めて不十分であることが明らかにした。この問題を解決するために、人工的な tag 配列を付加したプライマーを逆転写反応に用い、さらに tag 配列と内部配列により real-time PCR を行った。また、逆転写反応において、酵素を安定化するトレハロースを用いることで、従来よりも高温での反応を可能にし、配列特異性を向上させることに成功した。これら二つの改良を適用することにより、vRNA, cRNA, mRNA を極めて特異的に検出できる real-time PCR 法を確立した。In vitro 合成した RNA をスタンダードに用いることにより、新しい strand 特異的 real-time PCR 法は高い感度と定量性を持つことを示された。

さらに、新しく確立した strand 特異的 real-time PCR 法により、細胞内 vRNA, cRNA, mRNA

量の経時的な変化の定量を行った。vRNA が感染初期から後期にわたって増え続けるのに対し、cRNA 量は感染後 6 時間程度で一定となった。一方、mRNA は感染後 5 時間までは指数関数的に増えたが、感染後 5 時間以降は急激に減少した。また、NP 分節と NA 分節の vRNA と cRNA 量はあまり差がないのに対し、mRNA 量は NP 分節の方が NA 分節よりも 10 倍程度多いことが明らかになった。

本研究で確立された、strand 特異的 real-time PCR 法は、細胞内の分節ごとの vRNA, cRNA, mRNA 量を区別して、正確に定量できるという点において、インフルエンザウイルス RNA の細胞内動態を解析するのに非常に有用である。今回着目したインフルエンザウイルスの転写・複製機構だけではなく、vRNA 細胞内輸送機構、vRNA のウイルス粒子への取り込み機構および関連する宿主因子の機能を解明するうえでも強力なツールとなることが期待される。

第二章 Fluorescence *in situ* hybridization (FISH)法によるインフルエンザウイルス RNA 細胞内動態の可視化

インフルエンザウイルスのゲノム (vRNA) は 8 本に分節化されており、それぞれ一つもしくは二つのタンパク質をコードしている。感染細胞の核内において、vRNA はウイルスのポリメラーゼ複合体により転写・複製を受ける。複製により増幅された vRNA はウイルスのポリメラーゼおよび核タンパク質 (NP) と結合し、複合体 (vRNP) を形成する。vRNP は宿主の核外輸送機構を利用して細胞質に出たのち、粒子形成の場である形質膜直下まで輸送される。

従来、RNA を直接検出する手段が確立されていなかったため、vRNA の細胞内における局在は NP に対する免疫染色により観察されてきた。しかしながら、NP の RNA 結合は配列特異性がないこと、RNA に結合していない NP が存在しうることから、NP の免疫染色は vRNA の細胞内局在を正確に表しているとは言えない。また、8 本の分節それぞれの局在に違いがあるのかも明らかになっていなかった。

本研究では、インフルエンザウイルスの RNA を直接的に検出するために fluorescence *in*

situ hybridization (FISH)法を確立し、インフルエンザウイルス RNA 細胞内動態の可視化を行った。

FISH 法による経時的観察から、vRNA は感染初期において核内にのみ観察され、感染後 5 時間くらいで細胞質に移行することが明らかになった。感染後期の細胞質において、vRNA は核近傍に集積し、この集積はウイルスタンパク質の一つである NS2、また微小管の集積と一致した。一方、別のウイルスタンパク質 M1 はこのような集積を示さなかった。このことにより、vRNP が微小管依存的な、M1 とは異なる経路により形質膜直下に輸送されることが示唆された。

また、NP の免疫染色の結果の対比から、細胞質において vRNA は NP と非常によく似た局在を示すのに対して、ウイルスの mRNA は全く NP と共局在しないことが明らかになった。この結果から、vRNA が細胞質においてはほぼ vRNP 複合体の形で存在していること、ウイルスの mRNA に NP は結合していないことがわかった。

さらに、各 vRNA 分節特異的なプローブを用いて FISH を経時的に行うことにより、分節間に経時的な細胞内局在の違いが存在することを明らかにした。すなわち、感染中期（感染後 5 時間程度）において、いくつかの分節は細胞質に大部分が移行しているのに対し、いくつかの分節は多くが核に留まったままであった。これらの局在の違いは分節がコードするタンパク質の発現時期と非常によく相関しており、vRNA の局在によるウイルスタンパク質の発現制御機構の存在が示唆された。

本研究において、各分節の vRNA および mRNA の局在を可視化することにより、ウイルスタンパク質の発現制御に関する重要な知見が得られた。これらの知見はインフルエンザウイルスの感染細胞内における増殖機構を明らかにする上で極めて有用であると考えられる。