

審査の結果の要旨

氏名 川 上 英 良

本研究は、インフルエンザウイルス感染細胞内におけるインフルエンザウイルスゲノム RNA 分節間の動態の違いを明らかにするために real-time RT-PCR および Fluorescence *in situ* hybridization (FISH)法を用いて解析を行ったもので、以下の知見を得ている。

1. インフルエンザウイルスの RNA は vRNA, cRNA, mRNA という 3つの形態を有するが、従来の real-time RT-PCR 法ではこれら 3つを区別することができていないことが、*in vitro* 合成した RNA をスタンダードとして用いた実験により明らかになった。これは、real-time RT-PCR の逆転写反応の非特異性に由来するものであった。tag 付きプライマーを用いた配列特異的逆転写反応および、trehalose を用いた hot start 法を組み合わせることで、逆転写反応の特異性を向上させることに成功し、vRNA, cRNA mRNA の特異的な定量を可能にした。
2. 上記の strand 特異的 real-time RT-PCR 法を用いてインフルエンザウイルス感染細胞内の vRNA, cRNA, mRNA 量の変化を定量したところ、vRNA は感染後 12 時間後まで増え続けたのに対し、cRNA は感染後 6 時間程度で一定となった。一方、mRNA は感染後 6 時間までは指数関数的に増えたが、感染後 6 時間以降は急激に減少した。また、NP 分節と NA 分節の vRNA 量と cRNA 量はあまり差がないのに対し、mRNA 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。
3. 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もみ観察され、感染後 5 時間程度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 は核近傍の microtubule organizing center (MTOC) と呼ばれる場所に集積し、この集積は NS2 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。また、vRNA の集積は微小管重合阻害剤である nocodazol で細胞を処理することにより、微小管とともに細胞質全体に分散した。このことから、vRNP が微小管依存的な、M1 とは異なる経路により出芽の場である形質膜直下に輸送されている可能性が示唆された。
4. FISH 法とインフルエンザ NP タンパク質の免疫染色の対比から、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、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。
5. 各 vRNA 分節特異的なプローブを用いて FISH 法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。

以上、本論文はインフルエンザウイルス RNA の新規解析手法を確立したことに加えて、インフルエンザウイルスの細胞内動態においてゲノム RNA 分節ごとの量、局在の違いを明らかにした。本研究は、インフルエンザウイルスの転写・複製制御機構およびゲノム RNA の細胞内輸送機構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。