

[課程—2]

審査の結果の要旨

氏名 高橋 慧

本研究は、ヒトを含む霊長類に感染し、重篤な出血熱を引き起こすエボラウイルスのゲノム転写・複製に関わる宿主因子の同定を目的とした。エボラウイルスのRNAポリメラーゼと相互作用する宿主蛋白質を質量解析法にて同定し、次に、エボラウイルスゲノムの転写・複製をレポーター遺伝子の発現により評価出来る実験系である mini-genome assay を用いて、その発現抑制によりエボラウイルスのRNAポリメラーゼ活性が低下する宿主蛋白質を同定したものであり、下記の結果を得ている。

1. エボラウイルスのNAポリメラーゼであるL蛋白質と相互作用する宿主蛋白質を同定する為、アミノ末端にFLAGタグを付加したL蛋白質をbaitとしたpull down assayを行った。その後、質量解析法によりL蛋白質と共沈降した宿主蛋白質を同定した。その結果、65種類の宿主蛋白質を同定した。これら65種類の宿主蛋白質の内、質量解析におけるbackgroundと考えられる宿主蛋白質を除いた上で、質量解析法における”確からしさ”の指標であるMascot scoreを元に18種類の宿主蛋白質を候補宿主蛋白質として選別した。これら18種類の宿主蛋白質に対応するsiRNAを用いて、その発現を抑制する事でエボラウイルスのRNAポリメラーゼの活性が低下する宿主蛋白質の同定をmini-genome assayを用いて行った。その結果、DNA topoisomerase 1 (TOP1)、Peroxiredoxin (PRDX-1)、Vimentin (VIM)の発現が抑制された細胞においてエボラウイルスのRNAポリメラーゼの活性が認められた。
2. L蛋白質を発現する細胞において、TOP1がL蛋白質と相互作用するかどうかを免疫沈降法によって検証したところ、TOP1とL蛋白質の共沈降が確認された。次に、細胞内のどこでTOP1とL蛋白質が相互作用するのかを蛍光顕微鏡法により解析した。その結果、L蛋白質を発現する細胞においてTOP1は核だけでなく、細胞質にも局在する事が分かった。更に、エボラウイルスのヌクレオキャプシドを構成する蛋白質であるNP、VP35、VP30をL蛋白質と共に発現させると、TOP1はエボラウイルスゲノムの転写・複製の場であるinclusion bodyに局在し、L蛋白質と共局在した。これらの結果からTOP1は細胞質でL蛋白質と相互作用する事が示された。
3. siRNAを用いて内在性のTOP1の発現を抑制し、その後siRNA非感受性の野生型TOP1を発現させた所、エボラウイルスRNAポリメラーゼの活性は著しく回復した。しかし、TOP1の発現を抑制した後に、核酸切断能を欠損した変異TOP1を発現させたところ、エボラウイルスRNAポリメラーゼの活性は殆ど回復しなかった。また、TOP1による核酸再結合を特異的に阻害する薬剤であるCPT-11を用いて、TOP1の核酸再結合能のエボラウイルスRNAポリメラーゼ活性への関与を調べた。その結果、CPT-11の濃度依存的に、エボラウイルスのウイルスRNAポリメラーゼ活性は低下した。これらの結果から、TOP1の核酸切断能及び再結合能がエボラウイルスゲノムの転写・複製に関与する事が示された。

4. エボラウイルスゲノムの内、ウイルスゲノムの転写・複製に必要なウイルス蛋白質である VP30 の遺伝子をレポーター遺伝子に置き換えた変異エボラウイルスゲノムを持つウイルスである VP30 遺伝子欠損エボラウイルスを用いて、TOP1 の発現抑制がエボラウイルスの増殖に影響を与えるかどうかを調べた。その結果、VP30 発現細胞において TOP1 の発現を抑制すると、VP30 欠損エボラウイルスの増殖は有意に抑制された。この結果から、TOP1 はエボラウイルスの増殖にも関わる事が示唆された。

5. Peroxiredoxin 1 (PRDX1)、及び、Vimentin (VIM)の発現が抑制された細胞でも、エボラウイルスのRNAポリメラーゼ活性が低下することが示された。しかし、これら宿主蛋白質とL蛋白質との物理的な相互作用を免疫沈降法によって確認することは出来なかった。

以上、本論文はエボラウイルスのRNAポリメラーゼと相互作用する宿主蛋白質を質量解析により同定し、それら宿主蛋白質の中からエボラウイルスゲノムの転写・複製に関わる事が示唆されるDNA topoisomerase 1を同定した。本研究はこれまで未知に等しかった、エボラウイルスゲノムの転写・複製に関わる宿主蛋白質及びその転写・複製機構の解明に大き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。