

# 論文審査の結果の要旨

氏名 五来 武郎

本研究は、インフルエンザウイルスの NS1 および NS2 の機能に対する宿主因子の寄与を明らかにすることを目的として行われた。

## 第 1 章 : NS1 の SUMO 化修飾とその病原性への関与

1. データベースに登録されている NS1 のアミノ酸配列上に SUMO acceptor site (SAS)が存在するか否かを調べ、NS1 の 3 カ所に SAS のアミノ酸配列 (SAS1-3)が存在することを明らかにした。
2. ヒトから分離されたウイルスの NS1 が SAS1 (69-72 番目のアミノ酸残基)を有するという特徴を明らかにした。また、感染細胞内では、SAS1 における NS1 の SUMO 化と脱 SUMO 化が感染後の時間経過とともに動的に変化することが示された。さらに、SAS1 を欠損させた変異体ウイルス (WSN-K70R)感染細胞の IFN- $\beta$  の mRNA 発現量、および IFN- $\beta$  放出量は、野生型ウイルス(WSN)感染細胞におけるそれよりも有意に高いことを明らかにした。

3. WSN-K70R の 50% マウス致死量 ( $MLD_{50}$ ) は WSN より 10 倍程度高いことを明らかにした。また、感染マウス肺におけるウイルス量の定量と病理解析により、WSN-K70R と比較して WSN の方が肺における増殖効率がよいことを示した。
  
4. H5N1 亜型ウイルスの NS1 に SAS2 (112-115 番目のアミノ酸残基) が存在し、実際に細胞内で SUMO 化を受けることを明らかにした。さらに、SAS2 を欠損させた変異体 H5N1 亜型ウイルス (VN1203-K113R) の  $MLD_{50}$  は、野生型ウイルス (VN1203) に比べて高いことを明らかにした。また、VN1203 は、マウスにおいて全身感染を起こしたのに対し、VN1203-K113R は肺における増殖効率が低く、全身感染を起こさないことが示された。
  
5. イヌから分離された H3N8 亜型ウイルスの NS1 に SAS3 (226-229 番目のアミノ酸残基) が存在するという特徴を明らかにした。イヌの H3N8 亜型ウイルスはウマの H3N8 亜型ウイルスに由来するにも関わらず、ウマの H3N8 亜型ウイルスの SAS3 保有率はわずか 1% であるという結果は、SAS3 がウマからイヌへのウイルスの適応に何らかの役割を担っていることを示唆している。実際、イヌの H3N8 亜型ウイルスの NS1 は、イヌ由来細胞内で SUMO 化を受けるのに対し、ウマの H3N8 亜型ウイルスの NS1 は SUMO 化を受けないことが示された。また、SAS3 の SUMO 化が、抗 IFN 活性に重要な役割を担うことを明らかにしている。

## 第2章：NS2 と相互作用する宿主蛋白質の同定と解析

1. NS2 を発現させた細胞溶解液から NS2 を免疫沈降し、共沈降してきた蛋白質を質量分析法により解析した。その結果、NS2 と相互作用する宿主蛋白質として計 37 種類の宿主蛋白質を同定した。さらに、これらの宿主因子のうち、siRNA を用いた発現抑制によりインフルエンザウイルスの増殖を低下させる因子として、F1Fo-ATPase を構成するサブユニット( $\alpha$  サブユニット[F1 $\alpha$ ]と  $\beta$  サブユニット[F1 $\beta$ ])を同定した。
2. 細胞分画実験により、siRNA による F1 $\beta$  の発現低下は、脂質ラフトに存在する F1 $\beta$  で顕著であることを示した。本結果は、ウイルス感染サイクルのうち、細胞膜で起こるステップに F1 $\beta$  が関与することを示唆している。この結果は、F1 $\beta$  発現抑制細胞における様々な解析を行い、出芽以外のステップに F1 $\beta$  の有無が影響を与えないという結果を得ることで補完されている。さらに、電子顕微鏡観察により、F1 $\beta$  の発現が低下した細胞表面に形成されたウイルス粒子数が、コントロール細胞に比べて低下していた。
3. ATPase 活性を低下させた F1 $\beta$  を発現する細胞を樹立し、インフルエンザウイルスの増殖効率(特に出芽効率)を検証した結果、ATPase 活性を低下させた F1 $\beta$  を発現する細胞におけるインフルエンザウイルスの増殖(出芽)効率は元の細胞に比べて低下していた。

4. NS2 と F1 $\beta$  の相互作用は F1Fo-ATPase の他のサブユニット(FoB)の介在を必要とする。NS2 と F1 $\beta$  の相互作用が無くなると、インフルエンザウイルスの増殖(出芽)効率が低下した。

以上、本論文は、NS1 の SAS が宿主生物種やウイルスの亜型によって特徴的に保存されている事を明らかにし、各々の生物学的意義を証明した。さらに、インフルエンザウイルスが NS2 と F1 $\beta$  の相互作用、特に F1 $\beta$  の ATPase 活性を利用して効率的に出芽する機構を明らかにした。本研究は NS1 および NS2 の機能への宿主因子の寄与を示しており、これらの知見は、インフルエンザウイルス-宿主間関係の解明に大いに貢献するものである。したがって、博士（生命科学）の学位授与に値することを認める。

以上 1990 字