

【298】

氏 名（本籍）	川 <sup>かわ</sup> 口 <sup>ぐち</sup> 敦 <sup>あつ</sup> 史 <sup>し</sup> （茨 城 県）		
学 位 の 種 類	博 士（医 学）		
学 位 記 番 号	博 甲 第 4438 号		
学位授与年月日	平成 19 年 3 月 23 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
審 査 研 究 科	人間総合科学研究科		
学 位 論 文 題 目	インフルエンザウイルスゲノム複製に関与するウイルスポリメラーゼ及び宿主因子 IREF-1 の機能解析		
主 査	筑波大学教授	獣医学博士	八 神 健 一
副 査	筑波大学助教授	薬学博士	伊 東 進
副 査	筑波大学講師	博士（医学）	工 藤 豊一郎
副 査	筑波大学講師	博士（医学）	黒 田 誠

## 論 文 の 内 容 の 要 旨

### （目的）

インフルエンザウイルスの増殖過程では、ウイルス側と宿主側の因子の相互作用により、ウイルスゲノムの複製や転写が制御されている。本研究では、ウイルスゲノムの複製機構に焦点を当て、複製反応に必須なウイルス側と宿主側の因子およびその相互作用を明らかにすることを目的とした。

### （対象と方法）

ウイルス RNA ポリメラーゼサブユニット PA の温度感受性変異株である ts53 株を用いて、免疫染色によるサブユニットの細胞内局在の検討、プライマー伸長法による RNA 合成量の検討、グリセロール密度勾配遠心、免疫沈降法等による複合体の構造および機能の解析を行った。また、ウイルスゲノムの複製反応を試験管内で再構成し、必要とされる宿主因子 IREF-1（Influenza replication factor-1）を同定し、その機能解析を行った。

### （結果）

グリセロール密度勾配遠心法により、ts53 株感染細胞核抽出液を分画したところ、許容温度では RNA ポリメラーゼが Light, Medium 及び Heavy の 3 画分に回収されたのに対し、非許容温度では Light 画分のみ回収され、ウイルスゲノムは Heavy 画分に回収された。さらに、許容温度で ts53 株を感染させた細胞を [<sup>35</sup>S]-Met および Cys を用いて pulse-chase 放射性標識し、密度勾配遠心法で分画を行うと、pulse 標識したものは Light 画分に回収されたが、chase 標識を行ったものでは Medium 画分に回収された。また、構造的に正常な RNA ポリメラーゼ複合体を認識しない抗 PA 抗体を用いて、免疫沈降法を行うと、Light 画分に含まれる RNA ポリメラーゼのみが免疫沈降された。さらに、各画分の RNA 合成活性は Medium 画分に認められ、Light 画分には認められなかった。

また、ウイルスゲノム複製反応を試験管内で再構成し MALDI-TOFMS 解析することにより、複製に必須な宿主因子として MCM（minichromosome maintenance）ヘテロ 6 量体（MCMs）を同定した。免疫沈降

法より、MCMsは、RNAポリメラーゼのPAと結合することが明らかになった。MCM2ノックダウン細胞では、ウイルスゲノム複製量の低下が観察された。また、伸長途中のRNAポリメラーゼを免疫沈降したところ、MCMs存在下では、RNAポリメラーゼと伸長途中の新規合成鎖の結合が促進された。インフルエンザウイルスのゲノムは、RNAであることから、MCMsのRNAヘリケース活性を検討したところ、MCMsはATP依存的に2本鎖RNAを解離する活性を持つことが明らかになった。

#### (考察)

インフルエンザウイルス温度感受性変異株は、非許容温度での感染において、温度依存的に不活性なRNAポリメラーゼ前駆体が蓄積するために、複製反応が抑制されることが示唆された。一方、MCMs存在下ではRNAポリメラーゼと新規合成鎖の結合が促進されることから、MCMsは、RNAポリメラーゼと鋳型および新規合成鎖からなる伸長反応複合体の安定化を行うことが明らかになった。また、MCMsの標的ウイルスタンパク質は複製反応に関与するPAであり、PAはMCMsをリクルートする機能をもつことが推測された。さらに、MCMsはRNAヘリケース活性を持つことから、ウイルスゲノム複製過程において、ヘリケースとして作用する可能性が考えられた。

### 審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究では、インフルエンザウイルスの増殖過程におけるウイルス因子と宿主因子の相互作用について、特に複製反応に関与する因子の同定と機能解析を実施し、RNAポリメラーゼサブユニットPAは構造的に活性型と異なる前駆体から機能的なRNAポリメラーゼ複合体を形成するのに必要であることを明らかにした。今後、複製に必須な宿主因子として新規に同定したMCMsのRNAポリメラーゼ複合体形成への関与を詳細に検討することにより、インフルエンザウイルスのゲノム複製機構の理解が進むと期待される。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。