

氏 名	長利 卓		
学 位 の 種 類	博士（医学）		
学 位 記 番 号	博乙第 2927 号		
学位授与年月	令和元年5月31日		
学位授与の要件	学位規則第4条第2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タンパク質NS1によるオートファ ゴソーム形成抑制機構の研究		
主 査	筑波大学教授	博士（人間・環境学）	森川一也
副 査	筑波大学教授	博士（医学）	松坂 賢
副 査	筑波大学助教	博士（薬学）	船越祐司
副 査	筑波大学助教	博士（理学）	水野智亮

論文の内容の要旨

長利卓氏の博士学位論文は、インフルエンザウイルス蛋白質 NS1 によるオートファジーの抑制機構を解析したものである。その要旨は以下のとおりである。

（目的）

著者はまず、オートファジーは細胞の代謝や恒常性の維持だけでなく、バクテリアやウイルス感染に対する自然免疫においても重要な役割を担っていること、しかしインフルエンザウイルス感染に応答したオートファジーの誘導機構はほとんど明らかにされていないことを述べている。次いで著者は、オートファジーによって分解および隔離されたウイルス由来の RNA やリポ多糖などは、Pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) として Pathogen Recognition Receptors (PRRs) と総称される Toll-like receptors (TLRs)、NOD-like receptors (NLRs)、RIG-I-like receptors (RLRs) や double-stranded RNA-binding protein kinase (PKR) などが特異的に認識するが、そのうち TLR7 シグナルがオートファジーを誘導することや、Microtubule-associated protein light chain 3 (LC3) の過剰発現細胞ではインフルエンザウイルス感染によってオートファゴソームが形成されることを述べている。著者はこれらの背景に基づき、ウイルスが進化的に獲得してきたオートファジーの抑制能に着目し、本研究ではインフルエンザウイルス感染によるオートファジーの誘導機構、および NS1 によるオートファジー抑制機構を解明することを目的として研究を行っている。

（方法）

著者はインフルエンザウイルスの抗生体防御機構において主要な役割を担う NS1 について、RNA 結合能を失った NS1 変異株 (R38AK41A 株) 及びクラス I PI3K の活性化能を欠損した NS1 変異株 (Y89F 株) を構築し、各 NS1 変異株を HeLa 細胞および A549 細胞に感染させてオートファゴソーム形成機構を解析している。

(結果)

著者はまず、野生株感染ではオートファゴソーム形成は見られないのに対して、NS1 遺伝子を欠損したインフルエンザウイルス株 (delNS1 株) を感染させた場合にはオートファゴソームが形成されることを示している。次いで著者は R38AK41A 株及び Y89F 株のどちらにおいてもオートファゴソームの形成が観察されること、すなわち NS1 は RNA 結合能およびクラス I PI3K の活性化能を介して、オートファゴソーム形成を抑制することを示唆する結果を示している。次いで著者はオートファゴソーム膜の伸長と閉鎖を担う LC3 の翻訳後修飾の程度を LC3-II の蓄積量で検討し、NS1 は LC3 の翻訳後修飾に関与しないことを示している。

次に著者は TSC2-mTORC1 経路の活性化によって隔離膜の形成が阻害されることに着目し、NS1 により活性化されたクラス I PI3K-Akt 経路により TSC2 のリン酸化が誘導されるかを検討し、野生株および R38AK41A 株では TSC2 がリン酸化されているのに対し、Y89F 株ではリン酸化は観察されないこと、すなわち NS1 はクラス I PI3K-Akt 経路を介して、TSC2 をリン酸化することで、mTORC1 複合体を活性化してオートファジーを抑制していることを示唆する結果を示している。

その一方で、R38AK41A 株では TSC2 がリン酸化されているのにも関わらず、オートファゴソームが形成されることから、著者はインフルエンザウイルス感染に応答したオートファゴソームの形成抑制には mTORC1 の活性化だけでは不十分であり、NS1 による他の抑制機構が存在するとの考えに至っている。そして著者は実際、オートファゴソームの形成を制御するとされる JNK のリン酸化レベルに関して、非感染細胞や野生株感染細胞ではリン酸化が観察されないが、R38AK41A 株感染細胞でのみリン酸化 JNK1 を観察している。著者はまた、R38AK41A 株感染細胞において JNK1 の特異的阻害剤がオートファゴソームの形成量を減少させることを示している。これらの結果は NS1 が JNK1 を阻害することで、オートファゴソーム形成を抑制することを示すものである。著者はさらに、JNK1 下流の ATG 関連遺伝子の発現量を定量し、R38AK41A 株感染細胞では転写因子 FoxO で制御される ATG12 mRNA 量が増加していることを示し、インフルエンザウイルス感染に応答して JNK1-FoxO 経路が ATG 関連遺伝子の発現を制御している可能性を推測している。

次に著者は、R38AK41A 株感染により形成されたオートファゴソームに取り込まれるウイルスタンパク質を間接蛍光抗体法及び FISH 法により検討し、子孫 vRNP 複合体が選択的にオートファゴソームに取り込まれていることを示す結果を示している。また著者は、子孫 vRNP 複合体の輸送に関わるリサイクリングエンドソームの制御分子である Rab11a とオートファゴソームが共局在すること、および Rab11a のノックダウンがオートファゴソーム形成を顕著に減少させることを観察し、インフルエンザウイルス感染によって誘導されるオートファゴソームが Rab11a 陽性リサイクリングエンドソームを供与膜とすることを示している。

(考察)

著者は NS1 により活性化されたクラス I PI3K-Akt 経路は TSC2 のリン酸化を促進することから、NS1 は mTORC1 を介して ULK1/2-ATG13-FIP200 複合体依存的に隔離膜形成を阻害していると推測している。著者はまた、NS1 は RNA 結合活性依存的に JNK1 を抑制することから、ウイルス RNA を認識して JNK1

を活性化しうる PKR や RIG-I などが NS1 の標的分子であると推測している。

また著者は、Rab11a は vRNP 複合体と結合するという事実と、Rab11a 陽性リサイクリングエンドソームが vRNP 複合体の選択的オートファジーに必須であるという本研究での知見から、vRNP 複合体は Rab11a との結合を介して選択的にオートファゴソームへと取り込まれると考察している。

審査の結果の要旨

(批評)

長利卓氏は本研究において、インフルエンザウイルスの抗生体防御機構において主要な役割を担う蛋白質 NS1 によるオートファジー制御メカニズムを明らかにしている。研究は論理的に構成され、注意深く進められている。当該分野および関連分野に関する質疑応答において、長利氏が深い背景知識と考察を有することも確認された。以上のように、本研究は、興味深い新規知見を見出した学位論文として、高く評価される。

平成 31 年 3 月 22 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

なお、学力の確認は、人間総合科学研究科学学位論文審査等実施細則第 11 条を適用し免除とした。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。