

氏 名（本籍）	ぬま じり あき こ 沼 尻 明 子（東 京 都）
学 位 の 種 類	博 士（医 学）
学 位 記 番 号	博 甲 第 4105 号
学位授与年月日	平成 18 年 3 月 24 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	IFN 誘導性因子ヒト MxA の細胞死促進活性と抗ウイルス機構の解析

主 査	筑波大学教授	医学博士	松 井 陽
副 査	筑波大学助教授	博士（医学）	渋谷 和 子
副 査	筑波大学講師	博士（医学）	大根田 絹 子
副 査	筑波大学講師	博士（人間・環境学）	森 川 一 也

論 文 の 内 容 の 要 旨

（目的）

ヒト MxA はマウス Mx1 同様、抗インフルエンザウイルス活性を有するが、細胞質に局在するヒト MxA が核内で転写・複製を行うインフルエンザウイルスの増殖をどのように抑制するか未だ明らかになっていない。これまでに MxA の細胞内機能として細胞死促進活性が知られていたので、本研究では、細胞死経路のなかでもインフルエンザウイルス増殖に重要と考えられる Caspase 系とウイルス増殖全般に関与する ER ストレス系を中心に解析した。

（対象と方法）

MxA を恒常的に発現する細胞として、マウス線維芽細胞 Swiss3T3-MxA 細胞、非発現細胞として Swiss3T3 細胞を用いた。一過的に発現させる場合、293T 細胞または HeLa 細胞を使用した。細胞死の誘導はインフルエンザウイルス感染（A/Udorn）、シクロヘキシミド添加、UV 照射を行い、細胞の生死判定はトリパンブルー染色法で行った。ER ストレスはツニカマイシン添加により誘導した。ER ストレスの活性化は RT-PCR 法またはルシフェラーゼ活性測定で検出した。

（結果）

1. MxA は様々な刺激による細胞死を促進する

インフルエンザウイルス感染、UV 照射による DNA 損傷、シクロヘキシミド添加によるタンパク質合成阻害により細胞死を誘導した結果、いずれの細胞死誘導刺激によっても MxA による細胞死の促進が確認された。いずれの細胞死誘導刺激によっても活性化されることが知られている Caspase の検出を試みたところ、シクロヘキシミドによる細胞死誘導の場合、MxA 発現細胞で pro-caspase-3 切断が促進され、細胞死促進は広域 Caspase 阻害剤添加により抑制された。しかしインフルエンザウイルス感染の場合、MxA 発現細胞で pro-caspase-3 切断は亢進されず、広域 Caspase 阻害剤の細胞死抑制効果もほとんどなかった。

2. MxA の細胞死促進活性には C 末端領域が必須である

MxA の抗ウイルス活性に必須な、N 末端の GTP 結合配列および C 末端のロイシンジッパーが細胞死促進活性にも必要か検討するため、MxA の変異体を用いた解析を行ったところ、細胞死促進には GTP 加水分解および結合活性は必要なく、C 末端領域が必須であることが明らかになった。N 末端領域はインフルエンザウイルス感染による細胞死促進機能に必要であることが示された。

3. MxA は ER ストレス誘導性細胞死を促進する

TM 添加により ER ストレスを与えると MxA 発現細胞で有意に細胞死が促進された。細胞死に先立つ ER ストレス応答である ATF6 切断、BiP mRNA 増加、XBP1 スプライシングの促進を確認した。

4. MxA による ER ストレス促進活性には BiP との結合が重要である

ER 膜結合センサー分子 ATF6 および IRE1 の活性化が MxA により亢進されることから、両者の安定化に寄与すると考えられている ER シャペロン BiP と MxA が相互作用する可能性が考えられた。Flag-BiP と HA-MxA を共発現させると細胞内局在が変わり凝集塊を形成すること、抗 Flag 抗体を用いた免疫沈降を行うと HA-MxA の共沈を確認した。BiP を過剰発現させると MxA による促進効果が打ち消されることが示された。

(考察)

MxA は様々な刺激による細胞死を促進することが明らかになった。インフルエンザウイルス感染後の細胞死促進は Caspase 依存および非依存の細胞死経路を促進している可能性が pro-caspase-3 切断活性の検出と広域 Caspase 阻害剤の効果により示された。変異体を用いた解析からも、MxA の細胞死促進機構は CHX 刺激とインフルエンザウイルス感染では異なる可能性が示された。インフルエンザウイルスの効率的な増殖には Caspase-3 活性化が必要とされているが、MxA は Caspase-3 の活性化亢進を伴わず細胞を殺す活性を持つため、細胞死の促進とインフルエンザウイルス増殖抑制を同時に行うことが可能と考えられる。ウイルス感染後の細胞死経路として ER ストレス系の解析を行った結果、MxA は ATF6 および IRE1 を活性化することが示された。MxA が BiP と相互作用すること、BiP 過剰発現で MxA の効果が打ち消されることが明らかになった。したがって、MxA が ATF6 と IRE1 の安定化に必要な BiP を奪うことで、ER ストレス応答を起こしやすい状態にしていると考えられる。ER センサーの活性化が IFN 誘導性抗ウイルス因子 PKR の活性化を促進するという報告がある。

MxA は ER ストレス活性化促進を通じて、細胞死の促進とウイルス増殖抑制効果を発揮しているものと思われる。

審 査 の 結 果 の 要 旨

著者はマウス線維芽細胞を用いて IFN 誘導性因子ヒト MxA の細胞死促進活性と抗ウイルス機構を解析した結果、ER ストレス活性化促進の関与を示唆した点で優れた新知見を提供した。

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。