

氏名(本籍)	たき ざわ なお き 滝 沢 直 己 (東京都)		
学位の種類	博 士 (医 学)		
学位記番号	博 甲 第 4103 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	インフルエンザウイルスゲノム集合機構の解析		
主査	筑波大学教授	獣医学博士	八 神 健 一
副査	筑波大学講師	獣医学博士	國 田 智
副査	筑波大学講師	博士(理学)	三 輪 佳 宏
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)

インフルエンザウイルスのゲノムは 8 本に分節化し、分節の組換えにより新型ウイルスが出現し大流行を繰り返す。しかし、感染細胞内において分節化したゲノムの選別、集合機構については全く未解明である。本研究では、感染細胞内において分節化したゲノムが集合する細胞内コンパートメントを同定することを目的とし、温度感受性変異株を用いた実験系の構築、ウイルス RNA 合成における核内構造の検討、ウイルスタンパク質 NS2 の機能解析を行った。

(対象と方法)

1) インフルエンザウイルスゲノム集合機構の解析

2 種の温度感受性変異株を感染させた細胞同士を融合させ、組換えウイルス出現効率を算出した。

2) 機能的インフルエンザウイルス RNP と核マトリックスの結合

ウイルス感染細胞核よりクロマチンおよび核マトリックスの各画分を回収し、ウイルスタンパクおよびウイルス RNA を検出した。また、感染細胞核を DNase 感受性および非感受性画分に分け、*in vitro* RNA 合成反応を行い、ウイルス RNA 合成活性を検討した。

3) NS2 のウイルス遺伝子発現抑制活性の解析

NS2 変異体発現細胞にウイルスを感染させ、感染細胞を用いた免疫沈降法により NS2 と結合するウイルスタンパク質を同定した。また、組換え NS2 と vRNP (viral ribonucleoprotein complex) を用いた pull down 法により *in vitro* における結合を確認した。

(結果)

1) インフルエンザウイルスゲノム集合機構の解析

2 株の温度感受性変異株の感染細胞の融合細胞で野生型ウイルス粒子の産出が確認され、分節間の組換え

効率は共感染時に比べて約 6 割であった。また、非感染細胞と感染細胞の融合を行い、NP の局在を観察したところ、非感染細胞由来の核には NP の蓄積が観察されなかった。

2) 機能的インフルエンザウイルス RNP と核マトリックスの結合

DNase 処理によりウイルスポリメラーゼの大部分が核より溶出し、NP は核マトリックス画分にも存在した。vRNA (viral RNA) は核マトリックス画分にも存在したが、cRNA (complementary RNA) は大部分がクロマチン画分より回収された。

3) NS2 のウイルス遺伝子発現抑制活性の解析

NS2 発現細胞においてウイルス遺伝子発現抑制が観察された。NS2 変異体による解析で、NS2 上 23-54 アミノ酸に発現抑制能をもつ領域が存在した。また、NS2 は NP と *in vivo*, *in vitro* において相互作用した。

(考察)

融合細胞より野生型ウイルス粒子産生が検出されたことから、細胞質でウイルスゲノム集合が行われていることが示唆された。また、融合細胞では共感染時と比べ組換え効率が低いことから、核内でも一部のゲノム集合過程が行われている可能性が考えられた。NP および vRNA が共に核マトリックス画分に回収されたことから、vRNP は NP を介して核マトリックスと結合していることが示唆された。DNase 非感受性画分でもウイルス RNA 合成が検出されたことから、ウイルス RNA 合成は核内構造体でも行われることが示唆された。さらに、NS2 はウイルスタンパクの発現抑制、ウイルス RNA 合成の阻害を示し核外輸送活性を持つことが示唆された。また、NS2 は NP と結合することから、従来考えられていた vRNP-M1-NS2 複合体でなく、vRNP-NS2 複合体で核外輸送が行われる可能性が考えられた。

審 査 の 結 果 の 要 旨

インフルエンザウイルス感染細胞内において、分節化したゲノムの選別、集合機構については全く未解明である。本研究では、細胞質でウイルスゲノム集合が行われ一部のゲノム集合過程が核内でも行われていること、vRNP は NP を介して核マトリックスと結合すること、ウイルス RNA の合成は核内構造体でも行われることが示唆された。また、NS2 はウイルスタンパクの発現抑制、ウイルス RNA 合成を阻害し核外輸送活性を持つことが明らかにされた。インフルエンザウイルスのゲノム集合機構に関する多くの新知見を示し、今後、本ウイルスの変異予測や予防治療薬の開発に結びつく優れた研究である。

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。