

氏名（本籍）	熊倉 充子（新潟県）
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	博乙第 2752 号
学位授与年月	平成 27 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	アクチン-ミオシンネットワークによって制御されるインフルエンザウイルス粒子形成機構

主査	筑波大学教授	獣医学博士	八神 健一
副査	筑波大学准教授	博士（医学）	矢作 直也
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

（目的）

インフルエンザウイルス粒子形成過程では、宿主細胞膜の構造変化やウイルス出芽の場である budding site へのタンパク質の局所集積などをともなうことが知られている。一方、細胞膜直下には、アクチンフィラメントが non-muscle myosin II (Myosin II) とともにアクチン-ミオシンネットワークとよばれる高次構造を形成し、細胞質分裂時の収縮環形成、細胞の遊走、小胞分泌などの動的現象を担うことが知られている。これまで、アクチンフィラメントとインフルエンザウイルス粒子構成因子との相互作用がいくつか報告されているが、詳細な分子機構は明らかとされていない。そこで本研究では、アクチン-ミオシンネットワークに着目しウイルス粒子構成因子の集合の有無を検討することにより、インフルエンザウイルスの粒子形成機構を解明することを目的とした。

（対象と方法）

インフルエンザウイルス PR8 株および Udorn 株を培養細胞 (MDCK 細胞および HeLa 細胞) に感染させ、アクチン-ミオシンネットワークの特異的阻害剤である Blebbistatin (Bleb) を添加することでインフルエンザウイルス粒子形成過程に与える影響を検討した。ウイルスの力価はプラークアッセイ法により定量し、ウイルスゲノム RNA (vRNA) 量は Real-time RT-PCR 法、ウイルスタンパク質量は Western-blotting 法により検討した。ウイルスタンパク質の細胞内局在は、間接蛍光抗体法および Membrane floatation assay により検討し、細胞表面構造は走査型電子顕微鏡 (SEM) により観察した。タンパク質同士の結合

は、Proximity ligation assay (PLA) 法および免疫沈降法により検討した。

(結果)

Bleb の添加および非添加で、感染細胞内のウイルスゲノムおよびタンパク質合成量、vRNP の核外輸送、および vRNP、M1、HA の細胞膜への輸送効率に変化は認められなかった。一方、産生される感染性ウイルス粒子数は Bleb 存在下で低下した。Bleb 添加により感染後期の細胞表面に HA を含む凝集構造が有意に検出された。これらの結果より、アクチン-ミオシンネットワークは、インフルエンザウイルス粒子構成成分の細胞膜付近の budding site への集積を促進することが示された。

次に、Bleb 処理感染細胞表面を免疫染色法によって観察したところ、ウイルス膜タンパク質の一種である M2 は HA の凝集構造に特異的に集積していたが、M1 の集積は認められなかった。また、HA と M1 の相互作用はごく軽度であったことから、Bleb 存在下では budding site への M1 の集積が阻害されていることが示唆された。

M1 の集積を促進させた M1 過剰発現細胞では、Bleb 存在下で観察された凝集構造は小さくなり個数も減少したが、ウイルス力価は減少したままであった。したがって、アクチン-ミオシンネットワークは M1 の集積に促進的に働くが、M1 以外にも、アクチン-ミオシンネットワークが関与する粒子形成過程が存在する可能性が示唆された。

さらに、感染細胞内において vRNP が Myosin II と相互作用することが示された。また、感染細胞の上清画分に含まれる vRNA 量およびウイルス力価を定量したところ、Bleb 存在下における vRNA 量あたりのウイルス力価は、Bleb 非存在下の場合と比較して低下し、上清中の vRNP は細胞膜に包まれて放出されていることが示唆された。

(考察)

Bleb 存在下において、M2 が HA の凝集体に特異的に集積することが明らかとなった。M2 は HA とは異なりラフト局在タンパク質ではないが、HA を含むラフト同士が集合し budding site を形成したものと結合することが知られている。Bleb 存在下でも HA の集合および M2 のリクルート等のラフトクラスタリングは正常に行われていると考えられたが、M1 の budding site への集積が阻害されていることが示唆された。また、Bleb 存在下では上清中に含まれる vRNA 量あたりのウイルス力価が低下した。Bleb 存在下では vRNP 数が 7 本以下しか取り込まれていない感染性を持たないウイルス粒子が産生されている可能性が高いと考えられる。アクチン-ミオシンネットワークは M1 および vRNP の budding site への集積を促進することにより、感染性ウイルス粒子数を増加させる機構に寄与していることが示唆された。

審査の結果の要旨

(批評)

インフルエンザウイルス粒子形成過程の解明は、変異ウイルスの出現や抗ウイルス薬の開発等にも関連する重要な課題である。本研究は、宿主細胞のアクチン-ミオシンネットワークに着目しウイルス粒子構成因子の集合の有無を検討することにより、インフルエンザウイルスの粒子形成機構を解明することを目的とした。アクチン-ミオシンネットワークの特異的阻害剤である Blebbistatin (Bleb) 処理、感染細胞表面の観察、タンパク質相互作用の検討等により、アクチン-ミオシンネットワークは M1 および vRNP の budding site への集積を促進することにより、感染性ウイルス粒子数を増加させる機構に寄

与していることを示唆した。細胞の基本構造や細胞内輸送に関わり、細胞質分裂時の収縮環形成、細胞の遊走、小胞分泌などの動的現象を担うアクチン-ミオシンネットワークがインフルエンザウイルスの粒子形成過程に関わることを示した本研究の独創性は高く、今後、さらに詳細なメカニズムの解明と特異性の確認により、創薬への展開も期待できる。

平成 27 年 3 月 24 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。

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。