

氏名	水口 萌子		
学位の種類	博士（医学）		
学位記番号	博甲第 8244 号		
学位授与年月	平成 29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	宿主スプライシング因子 Prp18 によるインフルエンザウイルス RNA 合成促進機構の解析		
主査	筑波大学教授	医学博士	久武 幸司
副査	筑波大学准教授	博士（医学）	齋藤 慎二
副査	筑波大学准教授	博士（医学）	矢作 直也
副査	筑波大学講師	博士（理学）	小林 麻己人

論文の内容の要旨

水口萌子氏の博士学位論文は、宿主因子である Prp18 がインフルエンザウイルス RNA 合成をどのような機序で促進するかを解析したものであり、その要旨は以下の通りである。

(目的)

インフルエンザウイルスゲノムは、RNA 依存性 RNA ポリメラーゼおよびヌクレオキャプシドタンパク質 (NP) で構成されているウイルスリボヌクレオタンパク質 (vRNP) 複合体を形成している。vRNP のみでは、十分な転写および複製活性は観察されず、効率の良いウイルス RNA 合成には宿主由来の因子 (宿主因子) が必須である。これまでに、遺伝子欠損酵母ライブラリーを用いたスクリーニング系により、インフルエンザウイルス RNA 合成を促進する宿主因子として、Pre-mRNA processing factor 18 (Prp18) が同定されている。著者は本論文において、生化学的および細胞生物学的手法により、Prp18 によるウイルス RNA 合成促進の分子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)

本研究では、著者は生化学的及び細胞生物学的手法を用いて実験を行っている。生化学的実験では、vRNP を酵素源とした試験管内 RNA 合成系に組換え Prp18 タンパク質を添加することにより、RNA 合成促進活性を再構成し、その作用機序について解析している。また細胞生物学の実験としては、Prp18 遺伝子に対する siRNA を用いて、Prp18 ノックダウン細胞を調製し、インフルエンザウイルス感染における影響について解析している。

(結果)

Prp18 ノックダウン細胞にインフルエンザウイルスを感染させると、ウイルス粒子産生量は 10%以下に低下し、また、ウイルス RNA 合成量も低下する。このことより筆者は、Prp18 は酵母細胞内だけでなく哺乳動物細胞でも、宿主因子としてウイルス RNA 合成に関与することを推測し、vRNP を酵素源とした試験管内 RNA 合成系に Prp18 を添加することにより、Prp18 がウイルス RNA 合成活性を促進効果することを見出している。また、免疫沈降法および GST プルダウンアッセイにより、Prp18 は vRNP 上の NP およびウイルス RNA ポリメラーゼに結合することも明らかにしている。

次に筆者は、Prp18 部分欠損変異体を構築し、NP およびウイルスポリメラーゼとの結合を解析して、193-264 番目のアミノ酸を欠損した Prp18 (Prp18 Δ 71) は、NP とのみ結合し、ウイルスポリメラーゼと結合しないことを見出している。さらに、野生型 Prp18 および Prp18 Δ 71 変異体を添加して試験管内 RNA 合成反応を行うと、Prp18 Δ 71 は野生型 Prp18 とほぼ同等の RNA 合成活性を有していることも明らかにしている。筆者は、Prp18 は NP との結合を介して、ウイルス RNA 合成反応を促進していると考え、経時的に Prp18 存在下でウイルス RNA 合成量の観察を行い、Prp18 は開始反応でなく伸長反応を活性化し、約 300 塩基以上の長鎖の RNA 合成反応を促進することを見出している。

NP は一本鎖 RNA 結合タンパク質であり、NP により鋳型鎖の構造が維持されると考えられており、新規合成鎖が鋳型鎖と塩基対を形成した場合、ウイルスポリメラーゼの伸長反応が阻害されることが知られている。そこで筆者は、一本鎖 RNA を特異的に切断する RNase T2 を用いて、新規合成鎖と鋳型鎖の塩基対形成を観察し、Prp18 を添加して合成された長鎖の新規合成鎖は高い RNase 感受性を示すことを明らかにしている。また筆者は、Prp18 を添加することで鋳型鎖から新規合成鎖が遊離していることを推測して、Prp18 による NP のウイルスゲノムへのリクルート活性をゲルシフト法により検討を行い、Prp18 の量依存的に NP-RNA 複合体形成が促進されることも見出している。

(考察)

Prp18 は酵母とヒト間で約 39%のアミノ酸配列が保存性されているが、著者は Prp18 ノックダウン細胞を用いた解析より、哺乳動物細胞内でもウイルス RNA 合成に関与する宿主因子であることを明らかにしている。また、生化学的な解析より、Prp18 は NP の分子シャペロンとして機能し、ウイルス RNA 合成を促進することが示唆される結果を得ている。これまでに、宿主由来のスプライシング因子 RAF-2p48/UAP56/BAT1 および Tat-SF1 が、ウイルス RNA 合成反応を促進する NP シャペロンとして同定されている。Tat-SF1 の詳細な作用機序は不明であるが、RAF-2p48 は遊離型の NP と結合し、NP を新規合成鎖にリクルートすることでウイルス RNA 合成を促進する。本研究は、Prp18 が vRNP 上の NP を介してウイルス RNA 合成の伸長反応を促進することを明らかにし、これまでに同定された NP シャペロンとは異なる作用機序であることを示唆したものである。

審査の結果の要旨

(批評)

著者は、Prp18 は NP の分子シャペロンとして機能する可能性を見出し、細胞生物学的及び生化学的手法を駆使して、Prp18 がウイルス RNA 合成で果たす役割を明らかにしている。ウイルス RNA 合成時に鋳型鎖と新規合成鎖の塩基対形成を解消することで、新規合成鎖の鋳型鎖からの遊離を促進し、伸長反応を促進する現象を見出したのみならず、インフルエンザウイルスと宿主因子の機能的相互作用についてその分子メカニズムの一端を明らかにしていることは、高く評価できる。

平成 29 年 1 月 30 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。