

氏名(本籍)	むかい 向	がわ 川	じゆん 純
学位の種類	医	学	博 士
学位記番号	医博第	986	号
学位授与年月日	昭和63年3月25日		
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当		
研究科専攻	東北大学大学院医学研究科 (博士課程)病理学系専攻		

学位論文題目 Studies on the function of influenza A virus protein PB2 in viral gene expression.
(A型インフルエンザウィルスPB2タンパク質のウィルス遺伝子発現における機能の研究)

(主査)

論文審査委員 教授 菅村和夫 教授 岩崎祐三

教授 今野多助

論 文 内 容 要 旨

インフルエンザウイルスは8本に分節化した単鎖RNA, すなわち, 8分子のRNAを遺伝子として持つ。ウイルス粒子中の遺伝子RNA (vRNA) はメッセンジャーRNA活性を示さないマイナス鎖RNAである。感染細胞内ではvRNAを鋳型として構造および機能的に異なった2種類のプラス鎖RNA (mRNAおよびcRNA) が転写される。mRNAは5'末端に10~13塩基の宿主mRNA 5'断片を取り込んでおりキャップ構造を持つ。またmRNAの転写はvRNA 5'末端から17~22塩基の位置で終了し, その後にpoly (A) 鎖が付加される。mRNAはウイルスタンパク質合成のメッセンジャーRNAとして働く。一方, cRNAはvRNAと完全に相補的であり, キャップ構造もpoly (A) も持たない。cRNAはvRNA複製の鋳型となる。さらに新生vRNAを鋳型にしてmRNAの2次転写がおこる。mRNAの転写に関しては8つの遺伝子 (PB2, PA, PB1, HA, NA, NP, M, およびNS) 間で量的および時期的に著しい差異がある。PB2, PA, およびPB1 遺伝子のmRNA転写量は非常に少く, 一方, HAおよびM遺伝子のmRNA転写は他の遺伝子より遅れて開始される。これらRNAの合成機構については多くの研究がなされてきたが未だ不明の点が多い。特にmRNA転写の量的および時間的調節機構に関してはほとんど何も明らかにされていない。

これらの各遺伝子ごとに個別に調節される遺伝子発現や複製機構を研究するためには8遺伝子それぞれについてvRNA, mRNAおよびcRNAの3種のRNA合計24種のRNA合成を正確に分別定量する必要がある。そのため我々はSP6転写系を利用して高比活性 [³²P] RNAプローブを作製し, それを用いたハイブリダイゼーションによる高感度の定量系を開発した。本研究ではこの定量系を用いてPB2 遺伝子に温度感受性 (ts) 突然変異を持つ ts 変異株6株 (UV 257, ICR 1397, ICRC 27, SPC 44, SP 571, および ICR 348) のRNA合成を測定し, ウイルスRNA転写・複製においてPB2 タンパク質が果す役割を明らかにしようとした。

インフルエンザウイルス粒子はRNA転写活性を持っているが, PB2のts変異株ではこの転写活性が温度感受性あるいは易熱性に变化していた。このことはPB2タンパク質がvRNAを鋳型とした転写に関与することを示した。最も温度感受性の強かったICR 1397株感染細胞では非許容温度である40℃では全くウイルスタンパク質の合成が見られず, 細胞内においても転写活性が温度感受性であることが示唆された。

UV 257, ICRC 27, およびSPC 44株感染細胞では40℃におけるHAおよびMタンパク質の合成が許容温度の34℃に比べて著しく減少していた。またNPおよびNSタンパク質の合成に関しては著しい遅延が見られた。ICRC 27株感染細胞ではおもしろいことに許容温度においては

PB1, PA, およびPB2 タンパク質の合成が野性株に比べて有意に増加していた。これらの結果はPB2 タンパク質が各遺伝子の発現の量的および時間的調節において重要な役割を果たしていることを示唆した。またウイルス遺伝子はその発現の調節様式からPB1-PA-PB2, NP-NS, およびHA-Mの3つのグループに分けられることが示された。いずれのグループの調節にも異常の見られる ICRC 27 株について感染細胞内の RNA 合成に関して詳細に分析した。この変異株では非許容温度においてはすべての RNA 合成が抑制されていたが, cRNA 合成の欠損がその一次的な原因であると考えられた。その結果 vRNA 合成の抑制と mRNA の 2 次転写の抑制が引き起こされたわけである。mRNA の 1 次転写は感染粒子の転写機構により行われるが, このとき HA-M 群は転写されない。逆に 2 次転写においては PB1-PA-PB2 群が転写されない。ICRC 27 株感染細胞では非許容温度において 1 次転写による PB1-PA-PB2 群や NP-NS 群の mRNA は少量合成されていた。許容温度においては 2 次転写においても PB1-PA-PB2 群の mRNA 合成が続き, この株は 2 次転写における PB1-PA-PB2 群の転写抑制機構に欠損を持つことが明らかになった。野性株では全遺伝子で cRNA 合成量は少量で mRNA の 1 次転写量と同程度の量であったが ICRC 27 株感染細胞では許容温度で PB1-PA-PB2 群の cRNA 合成が著しく増加していた。これらの結果はタンパク質合成の解析から得られた結果とよく一致した。

ICRC 27 株から ts^+ 復帰突然変異株を 3 株分離してそれら感染細胞でのタンパク質合成および RNA 合成を分析したが, ICRC 27 株で見られた異常形質はすべて消失していた。このことは PB2 の ts 突然変異が異常形質の原因であることを証明するものである。したがって PB2 タンパク質が mRNA および cRNA の合成に関与するばかりでなく, それらの量的・時間的調節においても重要な役割を果たしていることが明白に示された。

審査結果の要旨

インフルエンザウイルスは毎年のように流行性感冒の世界的流行を引き起す医学的に重要なウイルスである。本論文は、このウイルスの増殖機構を分子生物学的に解明しようとするものであり、ウイルスタンパク質の1つであるPB2の新しい機能を明らかにしている。

インフルエンザウイルスは8本に分節化した単鎖RNAを遺伝子として持ち、他のウイルスには見られない独特な様式で遺伝子の発現・複製を行なっている。著者は、PB2遺伝子に温度感受性 (ts) ウイルスの ts 変異株6株を用い、感染細胞内のウイルスタンパク質合成およびRNA合成を許容温度と非許容温度、あるいは、変異株と野生株で比較して、PB2の機能を解析した。その結果は次のとおりである。

(1)PB2タンパク質はウイルス遺伝子RNA (vRNA)を鋳型としてウイルスmRNAの転写に関与する。(2)PB2タンパク質はvRNAを鋳型として相補的RNA (cRNA)の転写にも必須である。このcRNAはvRNA複製の鋳型となる。(3)PB2タンパク質は新生vRNAを鋳型としたmRNAおよびcRNAの2次転写においてPB1-PA-PB2遺伝子群の転写抑制に関与する。この抑制機能に欠損のある変異株ではPB1, PA, PB2のmRNA, cRNAおよびタンパク質の過剰生成が起こる。(4)ウイルス遺伝子はその発現の調節様式からPB1-PA-PB2, NP-NSおよびHA-Mの3つの群に分けられる。

これらのうち(1)および(2)は従来報告されてきた成績を確認するものであるが、(3)は全く新しい知見であり、このウイルスの増殖機構を解明する上で、重要な寄与をなすものである。(4)はこの新知見に基づき、2群に分けられていたインフルエンザウイルス8遺伝子を3群に整理し直したもので、今後の研究に明確な道筋を付けた。

尚、本研究で用いられたウイルスRNAの定量法は遺伝子工学の技術を駆使した功績的なものであるが、本論文はこの新しい定量系の有用性を示した点で特筆すべきであろう。

以上のように本研究は学位論文として価値あるものと認める。