

氏 名	山口 まゆ
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	博士 甲第721号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	平成27年 3月10日
学位論文題目	An anti-interferon activity shared by paramyxovirus C proteins: Inhibition of Toll-like receptor 7/9-dependent alpha interferon induction.  (パラミクソウイルスCタンパク質の抗インターフェロン活性 : Toll様受容体7/9依存性インターフェロン $\alpha$ 誘導の阻害)
審査委員	主査 教授 縣 保年 副査 教授 平田 多佳子 副査 教授 清水 猛史

## 論文内容要旨

*整理番号	727	(ふりがな) 氏名	やまぐち まゆ 山口 まゆ
学位論文題目	An anti-interferon activity shared by paramyxovirus C proteins: Inhibition of Toll-like receptor 7/9-dependent alpha interferon induction. (パラミクソウイルス C タンパク質の抗インターフェロン活性： Toll 様受容体 7/9 依存性インターフェロン α 誘導の阻害)		
<p><b>【目的】</b>          宿主インターフェロン (IFN) システムに対するウイルスの対抗戦略はウイルスの増殖や病原性発現に極めて重要であり、パラミクソウイルスでは、アクセサリータンパク質 V や C がその中心的な役割を担っている。これまでの研究から、C タンパク質は、(1)IFN が抗ウイルスタンパク質を誘導する経路 (JAK-STAT 経路) を阻害すること、(2)感染細胞に生じる二重鎖 RNA の生成を抑制し、それにより IFN 産生や抗ウイルスタンパク質の活性化を阻害していることが見いだされている。その一方、IFN 産生に至る各種シグナル伝達経路を阻害するかどうかについては明らかでない。そこで本研究では、IFN-α 産生誘導に関わる 3 つのシグナル伝達経路に対する C タンパク質の阻害効果を調べ、その分子機構について検討することにした。</p> <p><b>【方法】</b>          (1) IFN-α 産生阻害の評価(レポーターアッセイ): IFN-α6 プロモータの下流にルシフェラーゼを配したレポータープラスミドと共に、各シグナル伝達経路のシグナル伝達分子発現プラスミドとウイルスタンパク質発現プラスミドを HEK293T 細胞あるいは Vero 細胞に導入し 20 時間後のルシフェラーゼ活性を測定した。(2) C タンパク質と結合する宿主因子の検索: 各シグナル伝達分子発現プラスミドと C タンパク質を HEK293T 細胞に導入し、免疫沈降法・ウェスタンブロット法により評価した。(3) リン酸化 IRF7 の検出: シグナル伝達分子を導入した HEK293T 細胞を Laemmli のサンプルバッファーに直接溶解しウェスタンブロット法により評価した。</p> <p><b>【結果】</b>          IFN-α は、転写因子 IRF7 が活性化されることで誘導される。この活性化には、RIG-I や MDA5 で代表される RLR (RIG-I-like receptor) に依存した経路、Toll 様レセプター (TLR)3 依存性経路、TLR7/9 依存性経路の 3 つの経路が知られている。HEK293T 細胞にシグナル伝達分子[RLR 依存性経路に対しては IRF7 と RIG-IN (RIG-I の N 端ドメイン)、MDA5、IPS-1 のいずれか、TLR3 依存性経路に対しては IRF7 と TRIF、TLR7/9 依存性経路に対しては IRF7 と MyD88、TRAF6、IKKα]を強制発現させることで、</p>			

各経路を活性化し、それによる IFN- $\alpha$  の誘導をレポーターアッセイあるいは分泌 IFN- $\alpha$  の定量により評価した。パラミクソウイルスのプロトタイプであるセンドライウイルス (SeV) の C タンパク質を共発現させた場合、RLR 依存性経路や TLR3 依存性経路による IFN- $\alpha$  誘導の阻害は見られなかったが、TLR7/9 依存性経路は特異的に阻害された。この阻害は、IFN 産生能力のない Vero 細胞、あるいは JAK-STAT 経路阻害活性をもたない SeV C 変異体 (C<sub>F170S</sub>, Cm5, Cm8: 1 個から数個のアミノ酸変異をもつ変異体) においても認められることから、以前 C タンパク質に見いだされていた JAK-STAT 経路阻害活性とは別の独立した活性であることがわかった。TLR7/9 依存性経路を構成する伝達分子 MyD88, TRAF6, IKK $\alpha$ , IRF7 の各々と SeV C とを HEK293T 細胞で共発現させた後、免疫沈降を行うと、IKK $\alpha$  のみ C との共沈が認められた。IKK $\alpha$  は IRF7 のキナーゼであることから、IRF7 のリン酸化について検討したところ、IRF7 のリン酸化が抑制されていることが判明した。SeV 感染細胞では C (aa 1-204) 以外に Y1(aa 24-204)や Y2(aa 30-204)という C の N 端側が短くなった C タンパク質が発現する。Y1 や Y2 も C と同様に IKK $\alpha$  との結合が認められたが、TLR7/9 依存性経路の阻害能は減弱しており、それに一致して IRF7 のリン酸化抑制の程度も減弱していた。パラミクソウイルス亜科の中で C タンパク質をもつ属は 3 つの属に限られる。各属の代表として、ウシパラインフルエンザ 3 型ウイルス (SeV と同属)、麻疹ウイルス、ニパウイルスを選び、それぞれの C タンパク質について調べたところ、いずれの C タンパク質でも TLR7/9 依存性経路阻害活性が見いだされ、また、IKK $\alpha$  への結合や IRF7 のリン酸化抑制も認められた。

#### 【考察】

本研究により C タンパク質に、TLR7/9 依存性経路を阻害する活性が存在することが明らかとなった。C タンパク質のアミノ酸配列をパラミクソウイルス亜科の属間で比較するとその相同性は 20%にすぎない。今回、見いだされた阻害活性は属を超えて保存されていること、また、いずれの属の C タンパク質も IKK $\alpha$  と結合し、IRF7 のリン酸化を抑制することから、各ウイルスの C タンパク質は属を超えた共通の祖先から進化したものである可能性が示唆された。TLR7/9 依存性経路は、大量の IFN- $\alpha$  を産生する形質細胞様樹状細胞でみられる特殊な経路である。したがって、形質細胞様樹状細胞の IFN- $\alpha$  産生は宿主の防御機構において重要な位置を占めること、またその IFN- $\alpha$  産生を抑制することがウイルスの増殖にとって重要であることが示唆された。

#### 【結論】

パラミクソウイルス C タンパク質は TLR7/9 依存性経路阻害活性をもち IFN- $\alpha$  産生を抑制する。この新規の抗 IFN 活性は、C タンパク質がリン酸化酵素 IKK $\alpha$  と結合し、その下流の転写因子である IRF7 のリン酸化を抑制することによると考えられた。

## 学位論文審査の結果の要旨

整理番号	727	氏名	山口 まゆ
論文審査委員			
<p>(学位論文審査の結果の要旨) (明朝体11ポイント、600字以内で作成のこと。)</p> <p>ウイルスが増殖し病原性を発揮するためには、宿主のインターフェロン (IFN) システムに対抗することが必要である。パラミクソウイルスでは、Cタンパク質がIFN産生阻害に必要であることが知られて来たが、その阻害機構については明らかでなかった。本研究では、IFN-<math>\alpha</math>産生誘導に関わる3つのシグナル伝達経路に対するCタンパク質の阻害機構について検討を行い、以下の点を明らかにした。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) IFN-<math>\alpha</math>の発現を誘導する転写因子IRF7の活性化には、Toll様レセプター (TLR) 7/9依存性経路の他3つの経路があるが、センダイウイルス (SeV) のCタンパク質はTLR7/9依存性経路を特異的に阻害した。</li> <li>2) TLR7/9依存性経路を構成する伝達分子MyD88、TRAF6、IKK<math>\alpha</math>、IRF7のうち、SeV Cタンパク質はIKK<math>\alpha</math>と特異的に結合し、IKK<math>\alpha</math>によるIRF7のリン酸化を抑制した。</li> <li>3) パラミクソウイルス亜科のうち、ウシパラインフルエンザ3型ウイルス、麻疹ウイルス、ニパウイルスのCタンパク質もIKK<math>\alpha</math>と結合し、IRF7のリン酸化抑制を介してTLR7/9依存性経路を阻害した。</li> </ol> <p>本論文は、パラミクソウイルスの宿主IFN発現抑制におけるCタンパク質の阻害機構について新しい知見を与えたものであり、最終試験として論文内容に関連した試問を受け合格したので、博士 (医学) の学位論文に値するものと認められた。</p> <p style="text-align: right;">(総字数 591字)</p> <p style="text-align: right;">(平成27年 1月30日 )</p>			