

The impact of winter epidemics of influenza
and respiratory syncytial virus on paediatric
admissions to an urban general hospital

Sugaya N, Mitamura K,

Nirasawa M, Takahashi K

Journal of Medical Virology 60(1):102-106, 2000

協力研究報告書

インターフェロン誘導性 Mx タンパク質を利用した
インフルエンザウイルス制御法の開発に関する研究

協力研究者 永田 恭介（東京工業大学大学院生命理工学研究科）

研究要旨 本研究の最終目的は、インターフェロンによって誘起される抗ウイルスメカニズムのうち特にインフルエンザウイルスに特異性の高い Mx タンパク質の作用機構について解析を行い、得られた情報に基づいて Mx を利用した抗インフルエンザウイルスシステムの開発を目指すことにある。ヒト MxA 発現細胞を用いて、MxA 発現細胞ではタンパク質合成とウイルス増殖の低下および細胞死の亢進が観察された。また、MxA によるウイルス増殖抑制機能の発現にはウイルス種や株特異性があることが明らかとなった。

A. 研究目的

インフルエンザウイルスに対する最も重要な予防策の1つはワクチンによる免疫系の活性化である。一方、感染直後に効果を発揮するのはウイルスタンパク質を標的とした薬と生体にもともと備わっているインターフェロン（IFN）系と考えられる。本研究では、IFN によって誘起される抗ウイルスメカニズムのうち特にインフルエンザウイルスに特異性の高い Mx タンパク質の作用機構について解析を行い、そこから得られた基盤情報に基づいて Mx を利用した抗インフルエンザウイルスシステムの開発を目指す。

本研究で対象とするヒト MxA タンパク質は、インフルエンザウイルス抵抗性を支配するマウス Mx1 のヒトホモログとして同定された。これまでに Mx はヒトやマウスのみならず多くの脊椎動物で発見されており、IFN による生体防御機構において重要な役割を担っていると考えられている。MxA はインフル

エンザウイルスのみならず水疱性口内炎ウイルスや麻疹ウイルスなど多くの RNA ウイルスの増殖を抑制することも報告されているが、MxA による抗ウイルス機構については不明な点が多い。従って、インフルエンザウイルスのみならず他のウイルスを制御するためにも、MxA による抗ウイルス機構を解明することは重要と考えられる。

B. 研究方法

クローン化した MxA cDNA をメタロチオネイン遺伝子プロモーターに連結し、NIH3T3 細胞に導入し、金属イオンの添加によって MxA を発現誘導できる細胞株を樹立した。構成的に MxA を発現する Swiss3T3 細胞は、O. Haller 博士より分与を受けた。

C. 研究結果

MxA 遺伝子を導入した細胞株（MxA 発現細胞）ではインフルエンザウイルス

A/PR/8/34 (A/PR/8) (H1N1) の子孫ウイルス粒子の増殖が感染 36-48 時間後において約 1/10 に抑制された。この時、感染細胞全体のタンパク質合成量が低下し、さらにアポトーシス細胞に特徴的なクロマチン DNA の断片化が顕著に促進されていた。一方、MxA 発現細胞においては MxA を発現していない細胞と同様にウイルス mRNA が合成されていることやウイルスのゲノム RNA と mRNA の蓄積量も変わらないことが明らかとなった。共焦点顕微鏡を用いて観察したところ、MxA は小胞体に特徴的な網目状構造と同様の分布を示し、またタンパク質合成開始因子の 1 つである eIF-4E との共局在が観察された。以上の結果から、MxA は小胞体に局在してタンパク質合成反応を抑制することによってウイルス増殖を抑制しているという作用機構が考えられる。

MxA の A/PR/8 に対する増殖抑制能はすでに報告されている他の株に対するものよりも弱いことから、種々のウイルス種および株に対する効果を再検討した。我々が用いた MxA 発現細胞は、報告どおり水疱性口内炎ウイルスに対しては強い抗ウイルス作用を示したが、同様に細胞質で増殖するセンダイウイルスに対してはほとんど抗ウイルス作用を示さなかった。インフルエンザウイルス A/tern/South Africa (H5N3) を感染させた場合には、A/PR/8 感染細胞における MxA による増殖抑制が感染後 36-48 時間に観察されるのとは異なり、感染 12 時間後においても MxA による顕著なウイルスタンパク質合成の抑制効果が観察された。

D. 考察

インフルエンザウイルスや HIV をはじめと

する多くのウイルス感染による細胞死はいわゆるアポトーシスではないかとの報告があいついでいる。インフルエンザウイルスの感染により、感染細胞におけるタンパク質合成レベルが低下し細胞が死に至るのか、あるいは感染細胞に細胞死のプログラムが発動することによりタンパク質合成が低下するのかは明らかではない。しかし MxA 発現細胞では、MxA がいずれかの過程の進行を促すことによって感染細胞の死が促進されるものと考えられる。感染細胞のアポトーシスが亢進すればウイルスは十分増殖できないことになるので、これは 1 つの生体防御機構と考えられる。従って、IFN に晒され、MxA が誘導されている細胞は、まさにこの過程が亢進している細胞と考えられるのではないだろうか。

MxA によるウイルス増殖抑制機能の発現にはウイルス種や株特異性がある。この特異性を規定しているウイルス因子を同定することが今後の重要な課題である。本研究で用いた 2 種類のインフルエンザウイルス株を比べた時に、最も異なっているのは HA ではないかと考えられる。分節を交換したキメラ組換えウイルスを作成して、この問題の解明を試みる予定である。

E. 結論

MxA は小胞体に局在しており、MxA 発現細胞ではタンパク質合成とウイルス増殖の低下が認められた。また、MxA によるウイルス増殖抑制機能の発現にはウイルス種や株特異性があることが明らかとなった。したがって、MxA の機能発現機構を明らかにするとともにその発現を制御することで、新たなインフルエンザウイルス制御法の開発の可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Karagoz, A., Arada, N., Goren, N., Nagata, K., and Kuru, A. Antiviral activity of *Sanicula europaea* L. extracts on multiplication of human parainfluenza virus type 2. *Phytother. Res.*, 13, 436-438 (1999)

Sato, T., Ishii, M., Ohtake, F., Nagata, K., Terabayashi, T., Kawanishi, Y., and Okahata, Y. Binding affinity of GM3 lactose for influenza virus. *Glycoconjugate J.*, 16, 223-227 (1999)

Nagata, K., Momose, F., and Okuwaki, M. Acidic molecular chaperones: their involvement in viral genome replication and transcription. *Recent Res. Devel. Virol.*, 1, 559-597 (1999)

永田恭介. 遺伝子が解き明かす生と死のシナリオ (共著、田沼靖一監修). *ニュートン* 19, 56-59 (1999)

永田恭介. ウイルス遺伝子 (分子生物学、田沼靖一編、丸善) 123-138 (1999)

2. 学会発表

永田恭介. インフルエンザウイルスのマトリックスタンパク質の機能. AKPS 公開研究集会「ウイルス病原性発現の分子機序」(1999)

Momose, F., Sugiyama, K., and Nagata,

K. Functional analysis of the host factors that activate the influenza virus RNA polymerase activity. The XIth International Congress of Virology (1999)

Mibayashi, M., Turan, K., and Nagata K. Analysis of the anti-viral mechanism and modulation of the cellular function by human MxA protein. The XIth International Congress of Virology (1999)

Watanabe, K., Katoh, M., and Nagata, K. Roles of influenza virus late proteins in the export of RNP and virus assembly. The XIth International Congress of Virology (1999)

Momose, F., Watanabe, K., Mibayashi, M., and Nagata, K. Interaction between viral and host factors in regulation and transcription of influenza virus genome. 第72回日本生化学会大会 (1999)

百瀬文隆、永田恭介. インフルエンザウイルス遺伝子の転写・複製に關与する宿主因子 RAF-2 の機能解析. 第47回日本ウイルス学会学術集会 (1999)

三林正樹、永田恭介. インターフェロン誘導性蛋白質 MxA の細胞内機能の解析. 第47回日本ウイルス学会学術集会 (1999)

百瀬文隆、三林正樹、杉山賢司、永田恭介. インフルエンザウイルスの複製に關与する

宿主細胞機能. 第 22 回日本分子生物学会
年会 (1999)

Watanabe, K. and Nagata, K. Post-
transcriptional modification of influenza
virus. 第 22 回日本分子生物学会年会
(1999)

三林正樹、Turan K、喜田宏、高月昭、永
田恭介. ヒト MxA 蛋白質による抗ウイル
ス機構の解析. 第 22 回日本分子生物学会
年会 (1999)

G. 知的所有権の取得状況

特になし