

# 論文内容要旨

## 論文題目

The role of the CM2 protein in the influenza C virus replication cycle

(C型インフルエンザウイルスの増殖における CM2 蛋白の役割)

責任講座: 耳鼻咽喉科学 講座

氏名: 古川 孝俊

## 【内容要旨】

### 【背景と目的】

115 個のアミノ酸からなる CM2 蛋白は、C型インフルエンザウイルスの M 遺伝子にコードされ、第二の膜蛋白としてウイルス粒子のエンベロープに存在する。これまでに CM2 の合成機構や生化学的性状は詳細に解析されてきたが、ウイルスの増殖過程における CM2 の役割は不明である。本研究では、C型インフルエンザウイルスのウイルス様粒子(virus-like particle, VLP)を作製し、また培養細胞に感染させることによって、粒子の産生や感染過程における CM2 の役割を明らかにしようと試みた。

### 【材料と方法】

C型ウイルスの NP 遺伝子の翻訳領域を GFP 遺伝子で置換したウイルス RNA (GFP-vRNA) を発現するプラスミド DNA を構築し、これを 293T 細胞にトランスフェクションした。同時に C型インフルエンザウイルスの 9 種類の蛋白質を発現するプラスミドをトランスフェクションし、培養上清に産生される野生型 VLP(WT-VLP)を回収した。また、CM2 発現プラスミドを除いて 293T 細胞にトランスフェクションし、CM2 欠損 VLP( $\Delta$ CM2-VLP)の作製を試みた。さらに精製した VLP を HMV-II 細胞に感染させ、細胞内の GFP 発現量と GFP-vRNA 量を定量した。

### 【結果と考察】

CM2 発現プラスミドを除いてトランスフェクションした 293T 細胞の培養上清中に、WT-VLP と同様の形態を示す粒子( $\Delta$ CM2-VLP)が認められた。293T 細胞から産生された WT-VLP と  $\Delta$ CM2-VLP の赤血球凝集価や蛋白量に違いはみられなかった。一方、精製した  $\Delta$ CM2-VLP 中に含まれる GFP-vRNA 量は、WT-VLP の約 1/3 であった。これらの結果から、CM2 は、VLP の産生には影響を与えないが、出芽する VLP へのゲノムのパッケージングに関与すると考えられた。

WT-VLP と  $\Delta$ CM2-VLP は等しい効率で、HMV-II 細胞に吸着し、侵入した。ところが、 $\Delta$ CM2-VLP 感染細胞中の GFP 発現量は、WT-VLP の約 1/50 に過ぎなかった。インフルエンザウイルスの RNA が転写・複製される場である核に含まれる GFP-vRNA を定量したところ、WT-VLP 感染細胞では、感染 60 分後には感染直後の値より増加していた一方で、 $\Delta$ CM2-VLP 感染細胞では増加は認められなかった。この成績は、エンドサイトーシスによって細胞内に侵入した  $\Delta$ CM2-VLP の脱殻が出来なかったことを示唆する。すなわち CM2 は細胞内に侵入した VLP が適切に脱殻し、感染が成立するために必要であると考えられた。

### 【結語】

CM2 は C型インフルエンザウイルスのゲノムのパッケージングと脱殻の過程に関与することが明らかとなった。

平成 22 年 1 月 18 日

山形大学大学院医学系研究科長 殿

## 学位論文審査結果報告書

古川 孝俊

申請者氏名:

The role of the CM2 protein in the influenza C virus replication cycle

論文題目:

(C型インフルエンザウイルスの増殖における CM2 蛋白の役割)

審査委員: 主審査委員

鈴木 氏夫



副審査委員

浅尾 裕信



副審査委員

後藤 薫



審査終了日: 平成 22 年 1 月 18 日

### 【 論文審査結果要旨 】

C型インフルエンザウイルスの M 遺伝子にコードされる 115 個のアミノ酸からなる CM2 蛋白は、膜蛋白としてウイルス粒子のエンベロープに存在する。これまでに CM2 の合成機構や生化学的性状は詳細に解析されてきたが、ウイルスの増殖過程における CM2 の役割は不明である。そこで本研究は、C型インフルエンザウイルスのウイルス様粒子(virus-like particle, VLP)を作製し、また培養細胞に感染させることによって、粒子の産生や感染過程における CM2 の役割を明らかにすることを目的とした研究である。

C型ウイルスの NP 遺伝子の翻訳領域を GFP 遺伝子で置換したウイルス RNA (GFP-vRNA) を発現するプラスミド DNA を構築し、これを 293T 細胞にトランスフェクションした。同時に C型インフルエンザウイルスの 9 種類の蛋白質を発現するプラスミドをトランスフェクションし、培養上清に産生される野生型 VLP(WT-VLP)、および CM2 発現プラスミドを除いて 293T 細胞にトランスフェクションし、CM2 欠損 VLP( $\Delta$ CM2-VLP)を作製して解析を試みた。

その結果、293T 細胞から産生された WT-VLP と  $\Delta$ CM2-VLP の赤血球凝集価や蛋白量に違いはみられなかった。一方、精製した  $\Delta$ CM2-VLP 中に含まれる GFP-vRNA 量は、WT-VLP の約 1/3 であった。これらの結果から、CM2 は、VLP の産生には影響を与えないが、出芽する VLP へのゲノムのパッケージングに関与すると考えられた。また、WT-VLP と  $\Delta$ CM2-VLP は等しい効率で、細胞 (HMV-II) に吸着し、侵入した。ところが、 $\Delta$ CM2-VLP 感染細胞中の GFP 発現量は、WT-VLP の約 1/50 に過ぎなかった。そこで、インフルエンザウイルスの RNA が転写・複製される場である核に含まれる GFP-vRNA を定量したところ、WT-VLP 感染細胞では増加していた一方で、 $\Delta$ CM2-VLP 感染細胞では増加は認められなかった。この成績は、エンドサイトーシスによって細胞内に侵入した  $\Delta$ CM2-VLP の脱殻が出来なかったことを示唆するものであった。すなわち CM2 は細胞内に侵入した VLP が適切に脱殻し、感染が成立するために必要であると考えられた。

以上の結果より、CM2 は C型インフルエンザウイルスのゲノムのパッケージングと脱殻の過程に関与することが明らかとなった。

本研究の成果は C型インフルエンザウイルス構成蛋白の機能を明らかにした点で有益な研究といえる。また、研究に用いられた方法論およびその手法、考察は適切である。さらに学位論文審査会における質疑応答の態度は優秀であった。よって本審査委員会は、本研究者が医学博士を受けるに値すると判断した。

(1, 200 字以内)