The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Ifit1 Inhibits Japanese Encephalitis Virus Replication through Binding to 5' Capped 2'-0 Unmethylated RNA
Author(s)	喜村, 大志
Citation	大阪大学, 2014, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/34211
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

論　文　内　容　の　要　旨
Synopsis of Thesis

氏　名 Name	喜村大志
論文題名 Title	Ifit1 Inhibits Japanese Encephalitis Virus Replication through Binding to 5' Capped 2'-O Unmethylated RNA. （Ifit1は2'-O非メチル化5'-キャップRNAへの結合を介して日本脳炎ウイルスの増殖を抑制する）

論文内容の要旨

〔目　的(Purpose)〕

インターフェロンによって誘導される抗ウイルス分子のひとつであるIfit1は、近年の研究から2'-Oメチル基転移酵素(MTase)変異体ウイルスの増殖を抑制する事が示されている。しかしながらその作用機序が依然として不明である。我々は新規にIfit1欠損マウス及び2'-O MTase変異体日本脳炎ウイルス（JEV）を作製し、Ifit1の抗ウイルス作用機序の解析に取り組んだ。

〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕

まず最初にIfit1欠損マウスの作製を行った。Ifit1欠損マウスはメンデルの法則に従って正常に生まれ、SPF条件下で健康に成長した。更に2'-O MTaseをコードするJEV non-structuralタンパク質NS5の61番目のリジンをアラニンに置換したK61A変異体JEVを作製した。組換え体のK61A MTaseが試験管内で2'-O MTase活性を欠損している事を確認した。

次に我々は野生型及びIfit1欠損マウス由来の胎児線維芽細胞及びマクロファージに対してJEV-WT, JEV-K61Aの二種類の日本脳炎ウイルス株を感染させた結果、JEV-WTは野生型及びIfit1欠損細胞においてほぼ同等に増殖した一方で、JEV-K61Aは野生型細胞においてその増殖が顕著に抑制され、Ifit1欠損細胞においてはその増殖が高まった（$P<0.05$）。この事はIfit1が2'-O MTase変異体ウイルスの増殖を抑制する事を示している。

次に四種類（5'-OH, 5'-PPP, 2'-O非メチル化5'-キャップ, 2'-Oメチル化5'-キャップ）の5'末端が異なるJEV RNAを試験管内で転写し、それらを組換え体Ifit1とインキュベートして非変性ゲル上で結合を調べた。その結果Ifit1は5'-OH RNAの移動度には影響しなかったが、5'-三リン酸RNAの移動度をわずかに抑えた。更にIfit1は2'-O 非メチル化5'-キャップRNAの移動を顕著に抑え、2'-Oメチル化5'-キャップRNAの移動にほとんど影響を与えなかった。以上の結果は、Ifit1が2'-O非メチル化5'-キャップRNAに直接且つ優先的に結合する事を示している。

我々は同時にFlagタグを付加したIfit1が恒常的に発現する細胞にJEV-WT, JEV-K61Aを感染させて、その細胞破砕液を用いてRNA免疫沈降法も行った。抗Flag抗体による免疫沈降の後にJEVのRNAをリアルタイムRT-PCR法によって検出した。その結果、JEV-K61A感染細胞におけるウイルスRNAの検出量はJEV-WT感染細胞におけるウイルスRNA検出量のおよそ37倍高く認められた（$P<0.05$）。以上の事は、Ifit1が2'-Oメチル化のないウイルスRNAに直接結合している事を示唆している。

更に我々はIfit1のRNAへの結合が翻訳効率に及ぼす影響を調べた。三種類(5'-PPP, 2'-O非メチル化5'-キャップ, 2'-Oメチル化5'-キャップ）の5'末端が異なるルシフェラーゼmRNAをin vitroで転写し、それらをI型IFNで刺激済みの野生型およびIfit1欠損細胞に導入した。その六時間後に導入されたRNAの量および翻訳効率を、リアルタイムRT-PCR法及びルシフェラーゼアッセイによって決定した。その結果、三種類のルシフェラーゼmRNAは野生型およびIfit1欠損細胞にほぼ同等に導入された。一方、過去に報告されていたように、5'-三リン酸RNAは野生型およびIfit1欠損細胞両者においてほとんど翻訳されなかった。2'-O非メチル化5'-キャップRNAは野生型細胞でわずかに翻訳されたが、Ifit1欠損細胞では翻訳レベルが顕著に高く認められた（$P<0.05$）。2'-Oメチル化5'-キャップmRNAは野生型およびIfit1欠損細胞でほぼ同レベルに翻訳された。以上の結果は、Ifit1が2'-O非メチル化5'-キャップmRNAの翻訳を選択的に抑制している事を示している。

〔総　括(Conclusion)〕

Ifit1は2'-O非メチル化5'-キャップRNAへの直接結合を介してウイルスmRNAを認識し、更にそのmRNAの翻訳を抑制する事によって抗ウイルス作用を発揮しているという事が明らかになった。

論文審査の結果の要旨及び担当者

（申請者氏名）	喜村大志		
論文審査担当者		（職）	氏　名
	主　査	大阪大学教授	竹田潔
	副　査	大阪大学教授	生田和良
	副　査	大阪大学教授	荒瀬尚

論文審査の結果の要旨

インターフェロンによって誘導される抗ウイルス分子のひとつであるIFN-inducible gene with tetratricopeptide 1 (Ifit1)は、いくつかの2'-Oメチル基転移酵素変異体ウイルスの増殖を抑制する事が知られている。しかしながらその抗ウイルス作用機序はこれまで不明であった。本論文では、Ifit1欠損マウスおよび2'-Oメチル基転移酵素変異体の日本脳炎ウイルスを用いて、Ifit1が2'-O非メチル化型5'-キャップRNAへの直接的な結合を介してウイルスのRNAを認識し、mRNAの翻訳を抑制する事によって抗ウイルス作用を発揮するという事を明らかにした。本論文はIfit1依存的な抗ウイルス応答の作用機序を解明した物であり、学位の授与に値すると考えられる。