



Title	Translational Regulation of Influenza Virus mRNAs
Author(s)	山中, 邦俊
Citation	大阪大学, 1990, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/37136
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。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

氏 名・(本籍)	やま	なか	くに	とし
	山	中	邦	俊
学 位 の 種 類	医	学	博	士
学 位 記 番 号	第	9 0 8 1		号
学位授与の日付	平 成	2 年	3 月	2 4 日
学位授与の要件	医学研究科生理系専攻 学位規則第 5 条第 1 項該当			
学位論文題目	Translational Regulation of Influenza Virus mRNAs (インフルエンザウイルス遺伝子発現における翻訳制御)			
論文審査委員	(主査) 教 授	吉川	寛	
	(副査) 教 授	上田	重晴	教 授 谷口 維昭

論 文 内 容 の 要 旨

〔目 的〕

インフルエンザウイルスの遺伝子は、感染後の発現時期に応じて初期遺伝子及び後期遺伝子と大きく 2 つに分けることができ、それぞれから初期蛋白、後期蛋白が合成される。現在までインフルエンザウイルス遺伝子発現の制御機構に関しては、転写段階についての解析のみが行われてきた。しかしながら感染初期の遺伝子発現は転写調節で説明は可能であるが、感染後期の遺伝子発現については転写調節だけでは説明できない。すなわち、感染後期には後期遺伝子の mRNA のみならず初期遺伝子の mRNA も存在しているにもかかわらず、合成されるのは後期蛋白のみである。そこで私は、この現象を理解するためにインフルエンザウイルス遺伝子発現の転写後調節について研究を行った。

〔方法ならびに成績〕

- (1) 全インフルエンザウイルス遺伝子の cDNA クローニングを行った。それらのうち初期遺伝子として NS 遺伝子、後期遺伝子として NA 遺伝子を用いた。それらの翻訳開始コドンを含む 5' 末端領域を、pSV2cat ベクターの cat 遺伝子上流に翻訳フレームが合致するように挿入し、得られた組み換え体をそれぞれ pSV2NS1cat 及び pSV2NA1cat と名付けた。これらの組み換え体では NS および NA 遺伝子の翻訳開始コドンを用いて蛋白合成が開始され、CAT 蛋白の N 末端に pSV2NS1cat の場合は、19 アミノ酸残基、pSV2NA1cat の場合は 15 アミノ酸残基それぞれ付加した融合蛋白が合成されることが塩基配列より予想される。またこれらの融合遺伝子の転写は、SV40 のプロモーターとエンハンサーに支配されている。

- (2) 融合蛋白が合成されることを確かめるために、これら融合遺伝子をT7 RNAポリメラーゼのプロモーター下流に挿入した。in vitroでRNAを作成し、無細胞蛋白合成系にて蛋白合成を行わせ産物をSDS-ポリアクリルアミドゲルで解析した。その結果、塩基配列から予想される大きさの融合蛋白が合成されることが確認できた。
- (3) これら組み換え体をリン酸カルシウム法によりHeLa細胞に導入し、その後細胞抽出液を用いてCAT活性の測定、及びRNAを抽出しプライマー伸長法により転写産物の同定・定量を行った。これら融合遺伝子は、SV40プロモーターの転写開始点から転写されていた。すなわちインフルエンザウイルス由来遺伝子の挿入による転写開始点への影響はないことがわかった。次に転写産物量当たりのCAT活性(CAT比活性)を比較すると、組み換え体導入細胞は共にpSV2cat導入細胞の約70%の活性を有していた。これらの結果から、両組み換え体から合成される融合蛋白はほぼ同程度のCAT活性を持つことが明らかになった。
- (4) これら組み換え体をそれぞれHeLa細胞に導入し、24時間後にインフルエンザウイルス感染を行った。その後経時的に細胞を集め、上記方法と同様にCAT活性の測定及び転写産物の解析を行った。核由来及び細胞質由来のCAT mRNAは感染時間による変化はほとんど認められなかった。すなわち転写量、核から細胞質への移行及び細胞質でのCAT mRNAの安定性は、感染による影響を受けないことがわかった。一方CAT活性に関しては、pSV2NS1catを用いると感染初期(感染2.5時間後)にpSV2NA1catを用いると感染後期(感染5時間後)にそれぞれ最も高い活性が得られた。このことから、感染後におけるCAT活性の変化には、翻訳段階における調節機構が存在していることが明らかになった。またインフルエンザウイルス遺伝子の蛋白合成開始シグナル近傍に、翻訳調節領域が存在していることが示唆された。

[総括]

pSV2catのcat遺伝子5'末端に、インフルエンザウイルスRNAから合成したcDNAの蛋白合成開始シグナルを含む断片を挿入した組み換え体を作成し、HeLa細胞に導入後、ウイルス感染を行い、CAT比活性を指標に感染後の遺伝子発現を調べた。その結果、感染細胞におけるインフルエンザウイルス蛋白合成様式を再現する系の開発に成功し、翻訳調節機構の存在を見いだした。現在までのところ、種々のウイルス遺伝子発現の調節は転写調節のみが取り扱われてきたが、今後はそれに加えて翻訳調節機構の関与も考えていかなければならない。

今後、この現象を反映するin vitro翻訳系を開発することにより、翻訳調節因子の同定及びインフルエンザウイルス遺伝子発現における翻訳調節機構の解析が可能である。

論文の審査結果の要旨

インフルエンザウイルスの蛋白質はその機能に応じて感染後逐次的に合成される。この時間的制御は遺伝子発現の転写段階で調節されていると考えられていた。しかし山中らは転写の詳細な解析から、転写ばかりでなく翻訳段階でも調節が行われていると推定した。この可能性を検討するため、先ずクローニングしたウイルス遺伝子のcDNA から翻訳開始領域を分離し、これをリポーター遺伝子に融合した人工プラスミドを作成した。次いでこれを細胞に導入し、プラスミド上のウイルス遺伝子の転写と翻訳を独立にかつ感染後経時的に測定できる実験系を開発した。

このモデル実験の結果、1) プラスミド上の遺伝子はウイルスゲノム同様に感染初期－後期の時間的制御を受ける、2) 転写ばかりでなく、mRNA 当りの翻訳効率も顕著な時間的変動を示す、3) ウイルス遺伝子の蛋白合成開始シグナルの近傍に翻訳調節領域が存在する、ことを明らかにした。

以上本研究は遺伝子発現の調節に翻訳段階の調節が存在すること、それがウイルスの感染に於ける遺伝子発現の時間的調節に重要な役割を果たしていることを明らかにしたもので、分子遺伝学およびウイルス学に貢献する価値ある研究と評価した。