

Title	Antiviral Activity of Limitin against Encephalomyocarditis Virus, Herpes Simplex Virus, and Mouse Hepatitis Virus : Diverse Requirements by Limitin and Alpha Interferon for Interferon Regulatory Factor 1
Author(s)	川本, 晋一郎
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45338
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、 ＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed >大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	川本 晋一郎
博士の専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	第 18458 号
学位授与年月日	平成 16 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科生体制御医学専攻
学位論文名	Antiviral Activity of Limitin against Encephalomyocarditis Virus, Herpes Simplex Virus, and Mouse Hepatitis Virus : Diverse Requirements by Limitin and Alpha Interferon for Interferon Regulatory Factor I (新規インターフェロン様蛋白リミチンの抗ウイルス活性とシグナル伝達経路の特徴)
論文審査委員	(主査) 教授 金倉 譲 (副査) 教授 松浦 善治 教授 生田 和良

論文内容の要旨

〔目的〕リミチンはインターフェロン (IFN) α/β とアミノ酸配列で約 30% の相同性を有すること、IFN α/β 受容体と結合することより 1 型 IFN に属すると考えられている。リミチンは MHC class 1 の誘導や免疫応答調節は IFN と同様に認められるが、骨髄抑制作用が少ない特徴を有している。本研究においては IFN の重要な生物活性である抗ウイルス作用についてリミチンと IFN- α を比較し、その相違を明確にする事を目的とした。

〔方法と成績〕 1. リコンビナントリミチン蛋白を遺伝子組み換え CHO 細胞から精製した。リミチンの純度はゲルろ過クロマトグラフィー解析上では約 95% であった。精製したリコンビナントリミチンは濃度依存性に骨髄性白血病細胞株 WEHI3 の増殖を抑制し、生理活性を示すことが確認できた。

2. リミチンと IFN- α による線維芽細胞株 L929 のマウス脳筋炎ウイルス (EMCV) と単純ヘルペスウイルス (HSV) 感染に対する抗ウイルス作用誘導効果は cytopathic effect (CPE) dye binding assay にて解析し、脳腫瘍細胞株 DBT のマウス肝炎ウイルス (MHV) 感染に対する抗ウイルス作用誘導効果はプラークアッセイにて解析した。リミチンは細胞レベルで EMCV、HSV および MHV に対して IFN- α と同等の抗ウイルス作用を示した。L929 細胞に対する EMCV の CPE を 50% 抑制する濃度を 1 experimental unit (EU)/ml としたが、リミチン、IFN- α とともに 1EU は約 30 pg であった。次に生体内におけるリミチンの抗ウイルス作用解析のために感染実験を行った。Balb/c マウスに MHV を感染させた後、血清 GPT 値の測定と肝臓組織の変化を解析した。リミチンの投与により MHV 感染マウスの GPT 値の上昇および肝組織におけるリンパ球浸潤、肝細胞壊死が抑制された。さらに Balb/c マウスおよびヌードマウスに対して HSV を感染させ、14 日間の観察期間における生存率について検討した。Balb/c マウスにおいて、対照群では約 50% の生存率であったのに対し、リミチン投与群では全例の生存を認めた。またヌードマウスにおいてはリミチン投与により約 2 日間の生存期間の延長を認めた。以上よりリミチンは細胞レベルで IFN- α と同等の抗ウイルス作用を示し、生体内においても抗ウイルス作用を有することが明らかとなった。

3. 抗ウイルス作用に重要な 2',5'-oligoadenylate synthetase (OAS), double strand RNA dependent protein kinase

(PKR), Mx protein および Interferon regulating factor (IRF)-1 mRNA の発現をノーザンブロットハイブリダイゼーションにて解析した。またリミチンの 2',5'-OAS の酵素活性誘導を ¹²⁵I ラジオイムノアッセイにより解析した。リミチンは 2',5'-OAS, PKR および Mx protein の mRNA, 2',5'-OAS の酵素活性を誘導した。リミチンによる IRF-1 mRNA の誘導は IFN- α と比較して強かった。IRF-1 は 1 型 IFN の生理活性発現の重要な因子であり、この因子のリミチンにおける生理活性発現への関与について野生型マウス由来線維芽細胞および IRF-1 ノックアウト (KO) マウス由来線維芽細胞を用いてさらに解析を行った。野生型線維芽細胞と比較して IRF-1-KO 線維芽細胞におけるリミチンによる抗ウイルス作用は、IFN- α に比べ著しく減弱した。Interferon-stimulated response element のプロモーター活性をルシフェラーゼアッセイにて解析すると、IRF-1-KO 線維芽細胞においてリミチンによる活性誘導が IFN- α と比較して有意に低かった。以上より抗ウイルス作用発現の際にリミチンは IFN- α と同様の抗ウイルス活性関連蛋白を誘導するが、生理活性発現には IRF-1 を介した経路により依存していることが明らかとなった。

〔総括〕リミチンは IFN- α と同等の抗ウイルス作用を有する新規蛋白であり、その作用発現には IRF-1 を介した経路が重要であった。

論文審査の結果の要旨

リミチンはマウスストローマ細胞株 BMS2.4 が骨髄性白血病細胞株 WEHI3 の増殖を抑制することを指標として同定された新規蛋白で、I 型インターフェロンに属すると考えられている。インターフェロンと比較し免疫誘導作用や抗腫瘍効果は同様に認められるが、骨髄抑制作用がすくないのが特徴である。本研究はリミチンが細胞レベルおよび生体内においてインターフェロンとしての重要な生理活性である抗ウイルス活性を誘導することをマウス脳心筋炎ウイルス、マウス肝炎ウイルス、単純ヘルペスウイルスの 3 種類のウイルスを用いて確認した。またリミチンが抗ウイルス作用発現に重要な因子である 2',5'-OAS, PKR, Mx protein, IRF-1 を mRNA レベルで誘導し、2',5'-OAS を蛋白レベルで誘導することを確認した。さらに野生型および IRF-1 ノックアウトマウス由来線維芽細胞を用いて、リミチンの抗ウイルス作用発現における IRF-1 を介した経路への依存性がインターフェロンより強いことを明確にした。以上より本研究がリミチンの新しいインターフェロンとしての特徴を明確にし、今後抗ウイルス薬として臨床応用する上で重要な解析を行っており、学位に値するものと認める。