

# インフルエンザウイルス感染によるFAS遺伝子発現 促進機構の解析

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/16078">http://hdl.handle.net/2297/16078</a>

氏名	和田直也
生年月日	
本籍	石川県
学位の種類	博士(薬学)
学位記番号	博甲第208号
学位授与の日付	平成9年3月25日
学位授与の要件	課程博士(学位規則第4条第1項)
学位授与の題目	インフルエンザウイルス感染によるFAS遺伝子発現 促進機構の解析
論文審査委員	(主査) 中西義信 (副査) 大場義樹, 正宗行人 山下克美, 滝澤剛則

## 学位論文要旨

Influenza virus causes apoptosis of its host cells. An increase in the amount of FAS, a receptor for an apoptosis-inducing protein FAS-ligand, precedes this apoptosis. It is thus postulated that FAS and FAS-ligand are responsible for apoptosis of influenza virus-infected cells. In this study, I investigated the molecular basis for activation of the FAS-encoding gene in influenza virus-infected HeLa cells. *FAS* gene activation was shown to occur at the transcription level since transcription promoter of the *FAS* gene was stimulated upon virus infection. The *FAS* gene possessed putative binding sites for a transcription factor NF-IL6, and this factor stimulated the *FAS* promoter. Despite extensive analyses, DNA sequences responsible for the activation of *FAS* transcription either by influenza virus infection or by NF-IL6 were not determined. The activity of NF-IL6 increased upon virus infection without a change in protein concentration. When nuclear extracts of virus-infected cells were treated with a protein phosphatase, NF-IL6 activity decreased and its presumed phosphorylated form disappeared. NF-IL6 activity increased by the addition of cell lysates containing a protein kinase called PKR whose activity increases upon virus infection, only when a double-stranded RNA was present. Taken together, I propose a mechanism for *FAS* gene activation in influenza virus-infected cells. That is, (1) Upon influenza virus infection PKR is activated by a double-stranded RNA that is produced as an intermediate in the virus genome replication; (2) PKR phosphorylates and activates NF-IL6; (3) Phosphorylated NF-IL6 stimulates *FAS* gene transcription.

生体の発生過程そしてその後の恒常性維持には、制御された細胞の増殖および分化が必要である。しかし、細胞が増えて変化するだけでなく、細胞が死ぬこともそれらの過程において重要な役割を果たすことが知られている。そのような生理的条件下での細胞死は、プログラム細胞死と呼ばれる。細胞死は形態学的にネクロシスとアポトーシスに分けられており、プログラム細胞死の多くはアポトーシスの形態をとる。よってアポトーシスの研究はプログラム細胞死の理解につながると考えられる。また、アポトーシス/プログラム細胞死の異常が、癌を始めとする多くの疾病に関与することが示唆されている。よって、アポトーシス調節機構の解明が行われれば、それらの疾病の新しい予防・治療法の開発につながることを期待される。

近年、アポトーシスに関与する遺伝子やタンパクが次々と同定され、アポトーシスの分子機構の解明が急速な勢いでなされている。最もよく研究されているもののひとつに、アポトーシス誘導活性を持つFASリガンドとその特異的受容体FASがある。FASとFASリガンドはともに細胞表面に存在する膜タンパクであり、それぞれTNF/NGF受容体ファミリーとTNFファミリーの一員である。FASをもつ細胞はFASリガンドが結合すると速やかにアポトーシスを起こす。FASリガンド/FASを介したアポトーシスが生体に必要であることは明らかになっており、特に免疫系の成立及び維持における重要性が示されている。また、そのようなアポトーシスのいくつかは、FASリガンド及びFASの生産量増大が引き金となって誘導されることが知られている。

ウイルスに感染した細胞の多くは、ウイルスの増殖にともなって死んでしまう。これはウイルスによる細胞変性効果(cytopathic effect)と呼ばれ、増えたウイルスが外に出るために細胞を破壊する結果だと理解されてきた。ところが、近年このような細胞死の多くがアポトーシスであることが明らかとなった。アポトーシスは生理的細胞死に見られる形態であり、ウイルス感染細胞のアポトーシスは何らかの生理的な意味を有すると思われる。例えば、ウイルス感染の拡大を防ぐための生体防御反応として機能しているのかもしれない。そうすると、ウイルス感染細胞のアポトーシスがウイルス病の発症と関連している可能性も考えられる。よって、ウイルス感染細胞のアポトーシス誘導機構の解明は、ウイルス病の新しい予防・治療法の開発につながる可能性を秘めている。

近年私の所属する教室での研究によって、インフルエンザウイルスに感染した培養細胞がアポトーシスを起こすことが見いだされた。HeLa細胞にインフルエンザウイルスを感染させると、24時間後くらいからアポトーシスが誘導され、48時間後には8割以上の細胞が死んでしまう。この時、FAS mRNAが感染後2~3時間で増加し、細胞表面のFASタンパクは10時間前後に最大となる。さらにFASリガンドもmRNAレベルで増加することが示唆されている。また、感染細胞のアポトーシスの少なくとも一部が、FASリガンド/FASを介して起こることも示されている(Takizawa *et al.*, 1996)。よって、インフルエンザウイルス感染細胞では、FASとFASリガンド遺伝子の転写反応がともに活性化され、新たに作られたFASとFASリガンドの働きでアポトーシスが誘導されると予想される。そこで私は、インフルエンザウイルス感染細胞におけるFAS遺伝子発現の促進機構の解明を目的として研究を行った。

#### インフルエンザウイルス感染によるFAS遺伝子プロモーター活性の促進

インフルエンザウイルスによるFASの生産量の増加が転写促進によって起きているかどうかを調べるために、ヒトFAS遺伝子の転写プロモーターを含む領域を単離して解析した(Wada *et al.*, 1995)。ウイルス感染細胞におけるFASプロモーター活性の変化をDNAトランスフェクション法を用いて調べたところ、FAS mRNA量の変化と同様のタイムコースでプロモーター活性が約2倍に増加した。よって、

インフルエンザウイルス感染によるFAS遺伝子の発現量増加は転写反応が促進されるためであることが明らかとなった。

### ヒトFAS遺伝子の転写制御領域

ヒトFAS遺伝子の5'末付近約2.2 kbpの領域の塩基配列を決定したところ、NF-IL6の結合認識配列が8ヶ所も散在することがわかった。そこで、DNAトランスフェクション実験でNF-IL6を過剰発現させたところ、FASプロモーター活性が約3倍に増加した(Wada *et al.*, 1995)。よって、NF-IL6がFAS遺伝子の転写促進因子であることが示された。次に、NF-IL6の認識配列に着目してFASプロモーターの詳細な解析を行った。その結果、-752/-344に転写促進、-114/-28に転写抑制領域がそれぞれ存在し、-27/+48及び+42/+236の領域がプロモーター活性に必須であることがわかった。このうち、転写開始点を含む-27/+48領域はイニシエーターとして機能すると思われ、+42/+236領域はFASプロモーター活性の維持に最も重要なシスエレメントであると考えられる。+42/+236領域にはNF-IL6結合配列が1ヶ所存在するが、転写制御には関与していなかった。この領域に結合する転写因子は不明である。また、NF-IL6及びインフルエンザウイルス感染による転写促進を規定するDNA領域を同定することはできなかった。さらに、8ヶ所のNF-IL6結合配列を全て欠失させてもNF-IL6による転写促進が観察されたことより、NF-IL6が他の転写因子との相互作用によってFASプロモーターを促進する可能性が考えられた。

### インフルエンザウイルス感染によるNF-IL6活性の増加

いずれにせよ、NF-IL6がFAS遺伝子の転写促進因子であることは間違いないことから、インフルエンザウイルス感染によるFAS遺伝子転写促進へのNF-IL6の関与を追求した。ウイルス感染細胞におけるNF-IL6のDNA結合活性の変化を調べると、FAS遺伝子プロモーター活性の促進とほぼ同じタイムコースで約3倍に増加することがわかった(Wada *et al.*, 1995)。この活性増加はタンパク濃度の変化を伴わないことより翻訳後修飾による活性化であることが示唆された。NF-IL6はリン酸化を受けて活性化されることが報告されている。また、合成2本鎖RNAであるpoly(I)-poly(C)の添加によるFAS mRNAの増加が、蛋白リン酸化酵素阻害剤の2-aminopurineによって抑制されることがわかっている(Takizawa *et al.*, 1995)。そこで、インフルエンザウイルス感染細胞の核抽出液を脱リン酸化酵素で処理したところ、NF-IL6のDNA結合活性が著しく減少することがわかった。さらに、活性の低下と並行してNF-IL6の高分子量型が減少することが明らかとなった。このことは、高分子量型NF-IL6は低分子量型のリン酸化されたものであり、リン酸化されたNF-IL6のみがDNA結合活性を有することを示す。しかし、インフルエンザウイルス感染細胞において高分子量型NF-IL6の顕著な濃度変化は観察されなかった(Wada *et al.*, 1995)。よって、インフルエンザウイルス感染細胞におけるNF-IL6の活性促進がリン酸化によるものかどうかは、結論できなかった。

インフルエンザウイルス感染細胞では、(1)2本鎖RNA依存蛋白リン酸化酵素(PKR)を阻害する2-aminopurineによってFAS生産増大が抑制される(Takizawa *et al.*, 1995)、(2)インフルエンザウイルス感染細胞ではPKR活性が増大する(Takizawa *et al.*, 1996)、そして(3)PKRのドミナントネガティブ型を産生するDNAが導入された細胞では、インフルエンザウイルス感染によってFAS増加が起きずアポトーシス誘導も顕著に遅れる(Takizawa *et al.*, 1996)、ことなどがわかっている。これらの事実は、PKRがインフルエンザウイルス感染細胞におけるFAS遺伝子転写の活性化に関与することを強く示唆するものであ

る。そこで、PKRのNF-IL6活性に及ぼす影響を *in vitro* で解析した。その結果、ウイルス感染細胞の核抽出液をPKRを含む細胞抽出液で処理すると、NF-IL6のDNA結合活性が促進されることが判明した。よって、NF-IL6がPKRによりリン酸化されてDNA結合活性が促進されることが示唆された。

#### インフルエンザウイルス感染細胞におけるアポトーシス誘導機構

以上を総合すると、インフルエンザウイルス感染によるFAS遺伝子の転写促進機構として次のようなモデルが考えられる。すなわち、(1)まずウイルスゲノムの複製中間体として出現する2本鎖RNAによってPKRが活性化され、(2)次にそのPKRがNF-IL6をリン酸化して活性化する、(3)そして活性化されたNF-IL6がFAS遺伝子の転写制御領域に直接または間接的に作用して転写を促進する、という機構である。実際に、複製能を失ったインフルエンザウイルスを感染させても、FASの増加は起きないことが示されている(Takizawa *et al.*, 1993)。

一方、poly(D)-poly(C)で処理された細胞では、FASの生産増大は起こるがアポトーシスは誘導されない(Takizawa *et al.*, 1995)。これは、2本鎖RNA処理だけではFASリガンドが生産されないことを示唆する。インフルエンザウイルス感染細胞においては、FASの増加と同様のタイムコースでFASリガンドも増加することが示されている(富士本ら、未発表)。従って、インフルエンザウイルスの感染した細胞では、FASとFASリガンドの生産量が同時に増大し、両因子を持つようになった感染細胞どうしが接触して互いにアポトーシスを誘導すると予想される。この研究で示されたFAS遺伝子発現の誘導機構だけではアポトーシス誘導の仕組みは完全には理解されず、FASリガンド遺伝子の発現調節についても解析を行うことが必要である。これまでの結果からは、両遺伝子の転写は異なる制御下にあると予想される。

#### 医療への応用

インフルエンザウイルス感染細胞のアポトーシス機構が完全に解明されれば、インフルエンザを予防・治療する新しい医薬品を開発する糸口になると期待される。ウイルス感染細胞のアポトーシス誘導がインフルエンザの発症にどのように関係するかはまだ明らかではないが、このアポトーシスを人為的に制御すれば発症を防ぐことができるかもしれない。このような期待を持って、今後さらに研究を進展させることが必要である。

#### 参考文献

- Takizawa, T., Fukuda, R., Miyawaki, T., Ohashi, K., and Nakanishi, Y. (1995) *Virology* **209**, 288-296.
- Takizawa, T., Matsukawa, S., Higuchi, Y., Nakamura, S., Nakanishi, Y., and Fukuda, R. (1993) *J. Gen. Virol.* **74**, 2347-2355.
- Takizawa, T., Ohashi, K., and Nakanishi, Y. (1996) *J. Virol.* **70**, 8128-8132.
- Wada, N., Matsumura, M., Ohba, Y., Kobayashi, N., Takizawa, T., and Nakanishi, Y. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 18007-18012.

## 学位論文の審査結果の要旨

和田直也氏から提出された論文は5名の審査委員によって査読され、また2月4日に本人による口頭発表と質疑応答が行われた。同日に行われた審査委員会で協議された結果、当該学位論文は以下の理由により合格と判定された。

多くのウイルスが感染細胞にアポトーシスを誘導することが知られているが、いずれについてもその分子機構は不明である。インフルエンザウイルス感染細胞ではアポトーシスシグナルの受容体であるFASの濃度が増加することより、感染細胞のアポトーシスはFASを介して行われると考えられる。和田氏は、インフルエンザウイルス感染がどのようにしてFASの増加をもたらすかを遺伝子転写制御の観点から追求した。その結果、同遺伝子の転写制御領域および転写促進因子が同定され、インフルエンザウイルス感染による転写促進の機構が示唆された。

FAS遺伝子の転写については転写制御領域や転写因子の解析はこれまでいっさい行われておらず、この研究の新規性は高いと判断された。研究の到達度については、同遺伝子転写制御の基礎的な解析は十分に行われたようであるが、“インフルエンザウイルスの感染によってNF-IL6がリン酸化されて活性化する”という点は今後検証されねばならない。エイズを始めとするいくつかのウイルス病がアポトーシス変動を原因として発症するのではないかと考えられており、このような研究はインフルエンザに留まらずウイルス病一般を予防・治療するための新しい医療法の開発につながる可能性がある。よって、この研究は十分な発展性を持つと判断された。