
インフルエンザウイルス PB1-F2 蛋白の性状解析と 機能阻害による感染抵抗性の付与

九州大学大学院医学研究院・助教 藤本 佳万

■ 目的

インフルエンザウイルス遺伝子からは粒子形成および病原性に関わる 10 種類の蛋白が発現する事が知られていたが、21 世紀に入り新たに複数種類の非構造蛋白が発現する事が明らかにされた。そのうち PB1-F2 蛋白は、感染宿主体内における組織障害や二次性細菌感染の誘発などに関与する病原性因子と考えられているが、その詳しい蛋白性状等は未だ明らかにされていない。そこで、PB1-F2 蛋白の生体内における病原性発現機序の解明、さらに本蛋白の機能阻害によるウイルス感染抵抗性の付与を目的として以下の実験を行った。

■ 方法

インフルエンザウイルス PR8 株の PB1-F2 遺伝子を逆転写 PCR で増幅し、蛋白発現プラスミドにクローニングを行った。PB1-F2 蛋白の発現を確認する為、COS-1 細胞に構築したプラスミドを遺伝子導入し、48 時間後に細胞を固定後、抗 PB1-F2 ウサギ血清を用いた間接蛍光抗体法を行った。PB1-F2 発現トランスジェニックマウスを作製するため、構築プラスミドからプロモーター領域を含む PB1-F2 遺伝子を切り出し、マイクロインジェクション法により受精卵前核への注入および胚の仮親マウスへの移植を行った。マウスへの遺伝子導入判定の為、得られた産仔血液からの遺伝子診断を行った。

RNA 干渉法による本蛋白の機能阻害を目的として、PB1 遺伝子に対する shRNA を発現する MDCK 細胞を樹立し、得られた細胞を用いてインフルエンザウイルス感染実験 (TCID₅₀) を行い、感染抵抗性を評価した。

■ 結果および考察

1. 間接蛍光抗体法により、蛋白発現プラスミドからは PB1-F2 蛋白の発現が確認された。
2. PB1-F2 遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを 3 系統樹立した。
3. 複数の shRNA 発現 MDCK 細胞を樹立し、各細胞の shRNA のガイド鎖発現量を RT-PCR により定量した結果、いずれも 10⁵ コピー以上の発現が見られた。
4. shRNA 発現細胞におけるインフルエンザウイルスを用いた TCID₅₀ 試験の結果、shRNA 発現細胞と野生型細胞におけるウイルス増殖性に違いは見られなかった。

■ 結語

本研究により、PB1-F2 遺伝子ノックダウンによる感染抵抗性の付与は困難であり、さらに複数種類のウイルス遺伝子を同時にノックダウンすることが必要であると考えられる。また、作製したマウスの発現型解析およびインフルエンザウイルスの感染実験により、PB1-F2 の病原性発現機構における役割を明らかにする予定である。