

学 位 論 文  
Doctor's Thesis

論文題名 : 一酸化窒素(NO)によるウイルス遺伝子変異促進機序に関する研究  
(Mechanism for enhanced viral mutation by nitric oxide)

著 者 名 : 吉武 淳

Jun YOSHITAKE

指導教官名 : 微生物学前教授 前田 浩

紹介教官名 : 感染防御学教授 原田 信志

審査委員名 : 分子遺伝学担当教授 森 正敬

細胞病理学担当教授 竹屋 元裕

ウイルス制御学担当教授 滝口 雅文

病態情報解析学担当教授 岡部 紘明

2004 年度

## 要旨

微生物感染病態において、宿主応答のひとつとして誘導型 NO 合成酵素 (iNOS) が発現され、過剰量の NO が産生される。ほとんどの細菌感染において NO は抗菌作用を発揮して、細菌のクリアランスに重要な役割を果たすことが示されている。しかしながら、ウイルス感染における NO の役割は、NO のウイルス増殖に及ぼす影響や、病態への関与など様々な報告がみられ、一定の見解が得られていない。

本研究ではマウスウイルス感染モデルやウイルス感染細胞に NO ドナーを添加する系、さらにヒト大腸がん由来株化細胞 SW480 細胞にラット iNOS 遺伝子をトランスフェクトすることで、恒常的に NO を産生する iNOS-SW480 細胞を作成し、NO のウイルス増殖に対する影響を解析した。

また、NO は直接、もしくは活性酸化窒素種を介して酵素の活性化や不活化、生体内物質の酸化・ニトロ化などを行うことにより、様々な生体反応に関与している。近年、NO とスーパーオキシドとの反応によって生じるパーオキシナイトライトと核酸のグアニン残基との反応により 8-ニトログアノシンが産生されることが報告された。そこで修飾核酸であるこの 8-ニトログアノシンに注目し、NO のウイルス遺伝子に対する変異原性の解析を行った。なお、ウイルスの変異率測定には green fluorescent protein (GFP) 遺伝子をリポーター遺伝子としてセンダイウイルス (SeV) に組み込んだ GFP-SeV を用いて、GFP-SeV が形成したプラークが発する、GFP 蛍光の消失を指標にして変異頻度を測定した。

GFP-SeV を iNOS 欠損マウスならびに野生型マウスに経鼻噴霧感染し、経時的にマウス肺内ウイルス量をプラークフォーミングアッセイ法により測定した結果、iNOS 欠損マウスと野生型マウス間の肺内ウイルス量に有意な差は認められなかったのに対し、GFP-SeV の変異率は野生型マウスにおいて有意に上昇した。

培養細胞にインフルエンザウイルスもしくは SeV を接種し、直後より培養液に NO ドナーを添加して経時的に培養上清中のウイルス量を測定したところ、NO ドナー添加の有無に関わらず、インフルエンザウイルスおよび SeV の増殖効率に有意な差は認められなかった。同様に、iNOS 遺伝子をトランスフェクトした iNOS-SW480 細胞においても、培養液中の NOS 阻害剤の有無による、SeV の増殖効率の差は認められなかった。

GFP-SeV を iNOS-SW480 細胞で増殖した時の変異率は、培養液中に NOS 阻害剤を添加することで有意に抑制された。また、蛍光試薬とフローサイトメトリーを用いた実験より、iNOS-SW480 細胞に常に NO 由来の酸化ストレスがもたらされていること

がわかった。さらに抗 8-ニトログアノシン抗体を用いた免疫組織化学的解析より、iNOS-SW480 細胞に親株と比較して強い 8-ニトログアノシンの染色像が確認された。一方で、GFP-SeV を 8-ニトログアノシン存在下で増殖すると、8-ニトログアノシン濃度依存的な変異率の上昇が認められ、その変異パターンは C→U transition が優勢であった。

以上の知見より、ウイルス感染による宿主応答反応によって iNOS より産生された過剰量の NO は有効な抗ウイルス活性を発揮せず、ウイルス遺伝子複製時に、ウイルス RNA と NO 由来の活性酸化窒素種とが直接反応することで、もしくは、8-ニトログアノシンがゲノム中に組み込まれることで変異原性を発揮することが示唆された。加えてウイルスはこのような NO の変異原性を、その多様性の獲得や分子進化に利用していることが示唆された。

## 発表論文一覧

1. **J. Yoshitake, T. Akaike, T. Akuta, F. Tamura, T. Ogura, H. Esumi, and H. Maeda.**  
Nitric oxide as an endogenous mutagen for Sendai virus without antiviral activity.  
*J. Virol.*, 78, 8709-8719 (2004).
2. **T. Akaike, S. Okamoto, T. Sawa, J. Yoshitake, F. Tamura, K. Ichimori, K. Miyazaki, K. Sasamoto, and H. Maeda.**  
8-Nitroguanosine formation in viral pneumonia and its implication for pathogenesis.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 685-690 (2003).
3. **Alam, M. S., T. Akaike, S. Okamoto, T. Kubota, J. Yoshitake, T. Sawa, Y. Miyamoto, F. Tamura, and H. Maeda.**  
Role of nitric oxide in host defense in murine salmonellosis as a function of its antibacterial and antiapoptotic activities.  
*Infect. Immun.*, 70, 3130-3142 (2002).
4. **K. Ishizuka, T. Kimura, J. Yoshitake, T. Akaike, M. Shono, J. Takamatsu, S. Katsuragi, T. Kitamura, T. Miyakawa.**  
Possible assessment for antioxidant capacity in Alzheimer's disease by measuring lymphocyte heme oxygenase-1 expression with real-time RT-PCR.  
*Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 977, 173-178 (2002).
5. **S. Miyajima, T. Akaike, K. Matsumoto, T. Okamoto, J. Yoshitake, K. Hayashida, A. Negi, and H. Maeda.**  
Matrix metalloproteinases induction by pseudomonal virulence factors and inflammatory cytokines in vitro.  
*Microb. Pathog.*, 31, 271-281 (2001).

6. **T. Akaike, S. Fujii, A. Kato, J. Yoshitake, Y. Miyamoto, T. Sawa, S. Okamoto, M. Suga, M. Asakawa, Y. Nagai, and H. Maeda.**  
Viral mutation accelerated by nitric oxide production during infection in vivo.  
*FASEB J.*, 14, 1447-1454 (2000).
7. **Y. Miyamoto, T. Akaike, M. Samiul, K. Inoue, T. Hamamoto, N. Ikebe, J. Yoshitake, T. Okamoto, and H. Maeda.**  
Novel function of human  $\alpha$ 1-protease inhibitor after S-nitrosylation: Inhibition of cysteine protease and antibacterial activity.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 267, 918-923 (2000).
8. **N. Ikebe, T. Akaike, Y. Miyamoto, K. Hayashida, J. Yoshitake, M. Ogawa, and H. Maeda.**  
Protective effect of S-nitroso- $\alpha$ 1-protease inhibitor on hepatic ischemia-reperfusion injury.  
*J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 295, 904-911 (2000).
9. 赤池孝章, 久保田竜生, 芥 照夫, 田村文雄, 吉武 淳, 前田 浩.  
NOによる微生物遺伝子変異と感染制御異常.  
*化学療法の領域*, 19, 1639-1644 (2003).

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始御指導、御鞭撻を賜りました熊本大学大学院医学薬学研究部微生物学分野 前田浩前教授に深甚なる感謝の意を表します。

本研究の立案・遂行および論文作成にあたり、御教示・御指導を賜りました、熊本大学大学院医学薬学研究部微生物学分野 赤池孝章助教授に深く感謝の意を表します。

本研究において、御支援・御助言を賜りました、熊本大学大学院医学薬学研究部微生物学分野 芥 照夫助手、田村文雄助手、澤 智裕前助手、および宮本洋一前助手に心より感謝いたします。

本研究に御協力を頂きました熊本大学大学院医学薬学研究部微生物学分野の諸氏に感謝の意を表します。

## 目次

要旨	1
発表論文一覧	3
謝辞	5
目次	6
略語一覧	9
第1章 研究の背景と目的	10
1.1 NOの生体内での産生と化学反応性	10
1.2 微生物感染におけるNOの役割	11
1.3 NOの変異原性	12
第2章 実験方法	17
2.1 試薬	17
2.2 細胞	17
2.3 動物	17
2.4 ウイルス	18
2.5 GFP-SeV感染モデルの作製および肺内ウイルス増殖動態の解析	18
2.6 GFP-SeVのパーオキシナイトライト処理	18
2.7 GFPおよびSeVビリオンタンパク質のウエスタンブロッティング	19
2.8 RNAの抽出	19
2.9 SeVおよびGFP-SeV遺伝子解析	20
2.10 プラークフォーミングアッセイおよび力価測定	21
2.11 NOの抗ウイルス作用の解析	22
2.11.1 NOドナー添加による抗ウイルス作用の解析	
2.12 iNOS遺伝子トランスフェクト細胞作成	22
2.12.1 iNOS遺伝子トランスフェクト細胞のiNOS発現および活性の確認	
2.12.2 iNOS強制発現細胞によるウイルス増殖および変異率測定	
2.13 NOおよび8-ニトログアノシンによる酸化ストレスの検出	24
2.14 抗ニトログアノシンマウスモノクローナル抗体の作成	24
2.14.1 8-ニトログアノシンの合成	

2.14.2	8-ニトログアノシン-ウシ血清アルブミン(BSA)の作製	
2.14.3	マウス抗 8-ニトログアノシンモノクローナル抗体の作成	
2.14.4	競合 ELISA 法による抗 8-ニトログアノシン抗体の特異性の検討	
2.15	抗ニトログアノシンモノクローナル抗体による iNOS-SW480 細胞の免疫組織学的解析	26
2.16	遺伝子塩基配列の決定	27
第 3 章	実験結果	29
3.1	野生型および iNOS 欠損マウス GFP-SeV 感染肺炎モデルを用いた NO の変異原性の解析	29
3.1.1	ESR による野生型および iNOS 欠損マウス肺内 NO の検出	
3.1.2	肺内ウイルス量	
3.1.3	GFP-SeV 変異頻度測定	
3.1.4	肺炎病態の免疫組織化学的解析	
3.1.5	小括	
3.2	パーオキシナイトライトの変異原性の解析	31
3.2.1	パーオキシナイトライト処理による GFP-SeV 変異率測定	
3.2.2	GFP 変異の解析	
3.2.3	パーオキシナイトライト処理による SeV キモトリプシン感受性変異率測定	
3.2.4	小括	
3.3	培養細胞を用いた NO の抗ウイルス作用の解析	33
3.3.1	外因性 NO の抗ウイルス活性の検討	
3.3.2	内因性 NO の抗ウイルス活性の検討	
3.3.3	小括	
3.4	iNOS 発現細胞(iNOS-SW480 細胞)を用いた NO の変異原性の解析	34
3.4.1	iNOS-SW480 細胞における GFP-SeV の変異頻度測定	
3.4.2	内因性および外因性遺伝子の変異速度の比較	
3.5	NO 由来 8-ニトログアノシンの細胞内形成とウイルス遺伝子変異原性	36
3.5.1	抗ニトログアノシンモノクローナル抗体を用いた iNOS-SW480 細胞の免疫組織学的解析	
3.5.2	GFP-SeV 変異における 8-ニトログアノシンの影響	



3.5.3	8-ニトログアノシン添加による GFP 遺伝子の変異パターン解析	
3.6	細胞に与えられる酸化ストレスの解析	37
3.6.1.	iNOS-SW480 細胞における酸化ストレスの検出	
3.6.2.	8-ニトログアノシン由来の酸化ストレス産生	
第4章	考察	52
4.1	NO の抗ウイルス活性	52
4.2	NO の変異原性について	54
第5章	結語	63
参考文献		64

## 略語一覧

BAL	bronchoalveolar lavage
BSA	bovine serum albumin
DTCS	<i>N</i> -dithiocarboxy(sarcosine)
EDTA	ethylenediamine- <i>N,N,N',N'</i> -tetraacetic acid
eNOS	endothelial nitric oxide synthase
ESR	electron spin resonance
FCS	fetal calf serum
GFP	green fluorescent protein
GSNO	<i>S</i> -nitrosoglutathione
iNOS	inducible nitric oxide synthase
IFN- $\gamma$	interferon gamma
LD <sub>50</sub>	50% lethal dose
L-NMMA	<i>N</i> <sup>w</sup> -monomethyl-L-arginine
LPS	lipopolysaccharide
m.o.i.	multiplicities of infection
nNOS	neuronal nitric oxide synthase
NOS	nitric oxide synthase
PBS	10 mM phosphate-buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PFU	plaque-forming unit
SeV	Sendai virus
SNAP	<i>S</i> -nitroso- <i>N</i> -acetyl-D,L-penicillamine
SOD	superoxide dismutase

## 第1章 研究の背景と目的

### 1.1 NOの生体内での産生と化学反応性

一酸化窒素(NO)は、ガス状のラジカル分子である。NOは生体内のあらゆる組織や細胞に存在し、血管平滑筋弛緩因子、神経伝達物質など、様々な生理活性を有する。これら生体内のNOはNO合成酵素(NOS)によって産生される。NOSは、NADPHより供与される電子を用いて活性中心のヘム鉄に配位した分子状酸素を還元し、この過程で起こるモノオキシゲナーゼ反応により、基質であるL-アルギニンの $\omega$ 位のアミノ基を酸化してNOを合成する。NOSには内皮型NOS(endothelial NOS; eNOS)、神経型NOS(neuronal NOS; nNOS)、誘導型NOS(inducible NOS; iNOS)の3つのアイソフォームが存在している(Moncada and Higgs, 1995)。このうちeNOSとnNOSは構成型NOSと呼ばれ、細胞内に常時存在し、外部からの刺激によってカルシウムイオン濃度依存的に活性化されNOを産生する。これに対してiNOSは、サイトカインやリポポリサッカライドなどの刺激により誘導・発現され、構成型NOSと違い、カルシウムイオン濃度に依存せず過剰量のNOを長時間産生する。

NOSによるNOの産生量は3種のアイソフォームで異なる。細胞100万個からNOが産生される空間を約1 mlの容積に換算した場合、eNOSやnNOSといった構成型NOSでのNOの産生量は数10 nMから数 $\mu$ Mであるのに対し、iNOSでは100倍以上の10 $\mu$ M~100 $\mu$ MのNOを産生する。組織中でのNOの半減期は数秒程度と短命である。ところがNOの拡散距離を計算すると0.1 mm程度となり、細胞の直径は数10 $\mu$ mであることを考えると、NOは生体内で十分な飛距離を有している。

また、NOは無機ラジカルであるにもかかわらず、ラジカルとしての反応性は高くない。生体内でのNOは、まず酸素分子と反応してNO<sub>2</sub>に酸化される。さらに酸化が続くとNO<sub>2</sub>はNO<sub>2</sub>またはNO<sub>3</sub><sup>-</sup>へと変換されるが、NOの合成速度やNOの反応速度を考慮すると、生体内ではNO<sub>2</sub>の産生が優位であると考えられる(図1-1)。ところが血液中では酸素と結合したヘモグロビンとの反応によってNO<sub>3</sub><sup>-</sup>に酸化されるため、血液中では高い割合でNO<sub>3</sub><sup>-</sup>が存在することになる。また炎症局所のようにNOと酸素ラジカルであるスーパーオキシド(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)が同時に存在している場所において、NOは速やかにO<sub>2</sub><sup>-</sup>と反応して非常に化学反応性の高いパーオキシナイトライト(ONOO<sup>-</sup>)を生成する(Beckman et al., 1990)。この反応はスーパーオキシドジムスターゼ(SOD)とO<sub>2</sub><sup>-</sup>との反応速度(二次反応速度定数 $2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ )のおよそ3倍と極めて速い(二

次反応速度定数  $6.7 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ )。従って、炎症局所では ONOO<sup>-</sup>が、効率良く産生されていると考えられる。ONOO<sup>-</sup>は非常に強い酸化能、ニトロ化能を持ち、生体内で蛋白のニトロ化、脂質の過酸化反応の促進、電子伝達系酵素の不活化などをもたらすことがわかっており、細胞傷害やアポトーシス誘導などにより、NO の細胞傷害性の多くの部分を担っていると考えられている。また、ONOO<sup>-</sup>は細胞外基質の改変に関わるマトリックスメタロプロテアーゼやプロスタグランジン合成系の酵素であるシクロオキシゲナーゼの活性化を惹起する。これらのことから、NO および ONOO<sup>-</sup>の炎症のメディエーターとしての役割も重要視されている (Okamoto et al., 1997)

これらの他にも NO は金属イオンや可溶性サイクリック GMP 合成酵素や P450 レダクターゼといった金属タンパク質との金属(鉄)イオンを介した結合により、酵素の活性化や不活化する。また、S-ニトロソグルタチオンのような S-ニトロソ化合物や発ガン性物質である N-ニトロソアミンの形成など、多様な生理的・病理的作用を有する NO 付加体・誘導体を産生する。

## 1.2 微生物感染における NO の役割

微生物感染により、気管支上皮細胞、マクロファージ、血管平滑筋細胞など様々な細胞に iNOS が誘導・発現され過剰量の NO を産生することがこれまでわかっている。iNOS の発現を誘導する因子としては、細菌の外膜構成成分であるリポポリサッカライド (lipopolysaccharide, LPS)、炎症性サイトカインである interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )、interleukin (IL)-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )、および tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) などがあり (Nussler et al., 1992; Fujisawa et al., 1995; Balligand et al. 1994)、逆に発現を抑制する因子としては IL-4、IL-10、transforming growth factor- $\beta$  等が知られている (Adler et al., 1995; Cunha et al., 1992; Balligand et al., 1994)。

多くの細菌、ウイルス、原虫などの感染症において、宿主の免疫応答の一つとして発現が誘導される iNOS の最も重要な機能は、生体防御因子としての役割である。なかでも細菌、原虫の感染症では多くの疾患・感染症モデルにおいて NO が感染防御因子として重要であることが示されている。たとえば、iNOS 欠損マウスを用いた *Salmonella typhimurium* によるネズミチフス症モデルにおいて、野生型マウスと比較して iNOS 欠損マウスにサルモネラに対する感受性の増加と病態の増悪が認められた。(Alam et al., 2002)。このように細菌や原虫感染における NO の役割は感染防御を考える上で非常に重要な因子として位置づけられている。

ウイルス感染症においても iNOS の発現誘導がボルナ病ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス 1 型、インフルエンザウイルス、センドライウイルス (SeV)、単純ヘルペスウイルス、狂犬病ウイルス、コクサッキーウイルスなど、多くのウイルスにおいて報告されている (Koprowski et al., 1993; Campbell et al., 1994; Akaike et al., 1995, 1996; Bukrinsky et al., 1995; Mikami et al., 1996; Adler et al., 1997; Fujii et al., 1999)。NO の抗ウイルス活性については、コクサッキー B3 ウイルスによるマウスの心筋炎モデルを用いた実験で、NOS 阻害剤の投与による組織中のウイルス量の増加および致死率の増加が報告されている (Lowenstein et al., 1996)。しかしながら、マウスインフルエンザウイルス感染モデルと iNOS 欠損マウスを用いた実験においては、iNOS 欠損マウスと野生型マウスとの間に肺内ウイルス量の差が認められないことが報告され (Akaike et al., 2000)、また単純ヘルペス 1 型を用いた実験においてもこれと同様な結果が報告されている (Fujii et al. 1999)。このように、ウイルス感染病態における NO の抗ウイルス活性の有無はいまだ相反する知見が報告され、明確にされていない (図 1-2)。

### 1.3 NO の変異原性

前述したように、NO は内因性のラジカル分子であるが、酸素ラジカルや脂質ラジカルと比較するとその反応性は低い。しかし、NO により、ヘムや非ヘム鉄やチオール基 (SH 基) を有するタンパク質への NO の結合や化学修飾を介する酵素の活性制御・不活化がもたらされる。また、NO より派生する活性酸化窒素種、特に NO とスーパーオキシドとの反応によって生じる ONOO<sup>-</sup> は酸素ラジカルと同様、生体に酸化ストレスをもたらすオキシダントであると同時に、各種生体分子に対して強力なニトロ化剤として作用する (Sawa et al., 2000; Reiter et al., 2000)。ONOO<sup>-</sup> によるタンパク質あるいはアミノ酸のニトロ化反応においては、主に L-チロシン残基がニトロ化の標的となり、3-ニトロチロシンが生成されることが知られている。また、L-トリプトファンも生体内ニトロ化反応の標的となりうることが示唆されている。

ONOO<sup>-</sup> による生体内ニトロ化反応のもうひとつの標的分子として、核酸塩基のグアニンがあげられる。Yermilov らは *in vitro* において ONOO<sup>-</sup> とグアニンの反応により生成する産物が主として 8-ニログアニンであること、さらにウシ胸腺 DNA と ONOO<sup>-</sup> の反応で 8-ニログアニンが生成することを報告した (Yermilov et al. 1995)。このような知見は、各種活性酸化窒素種により 8-ニログアニンが DNA 中に生成し、

ONOO<sup>-</sup>などニトロ化能を持つ分子による DNA 損傷の指標になりうることを示唆している。なお、DNA 中の 8-ニトログアニン是不安定であり、自然に脱プリン反応を受け、さらなる酸化反応により未同定の化合物へと変換される (Yermilov et al. 1995)。

また、DNA と同様に、RNA も活性酸化窒素種との反応によってニトロ化される。Masuda らは ONOO<sup>-</sup>や他の活性酸化窒素種と反応させたウシ肝 RNA 中の 8-ニトログアノシンと DNA 中の 8-ニトロデオキシグアノシンとを比較したところ、8-ニトログアノシンは DNA 中より安定に RNA 中に残存することを示した (Masuda et al., 2002)。さらに我々はこれまで、抗 8-ニトログアノシン抗体を用いてインフルエンザウイルスおよび SeV マウス感染モデルの肺組織を免疫組織化学的に解析したところ、iNOS 発現に伴い、感染病巣の気管支および細気管支上皮細胞と一部の浸潤マクロファージに濃染像が認められ、生体内において 8-ニトログアノシンが生成されることを示した (Akaike et al., 2003)。このように微生物感染において感染防御反応として過剰に産生された NO が NO 由来の活性酸化窒素種を介した組織傷害により、宿主自身にも影響を与え、微生物感染による病態の程度を左右することを明らかにしてきた。(Fujii et al., 1999; Alam et al., 2002; Akaike et al., 2003)。

また、これらの知見はウイルス感染において、感染局所より産生される NO や活性酸化窒素種が、生体内でウイルスに対して変異原性を発揮する可能性を示唆している。RNA ウイルスの変異については、1990 年に Holland らが変異誘発物質による RNA ウイルスの変異率は spontaneous mutation (自然突然変異) と比較して軽度しか上昇しないという報告を発表した (Holland et al., 1990)。以来、RNA ウイルス変異の解析にあまり大きな展開がなく、一般に RNA ウイルスはその複製酵素の不正確さにより、1 回の複製でヌクレオチド残基あたり  $10^{-5}$ - $10^{-3}$  という頻度で偶発的に変異すると考えられている。

しかしながら以前より NO 由来の活性酸化窒素種のひとつである亜硝酸 ( $\text{HNO}_2$ ) は、タバコモザイクウイルス、ポリオウイルス、インフルエンザウイルスなどの RNA ウイルスの変異を促進することが報告されている (Tsugita et al., 1962; Singer et al., 1969; Carp et al., 1962; Granoff, 1961; Scheid et al., 1976)。実際は亜硝酸が生体内で産生されても生体の持つ強力な緩衝作用により、生物学的に有意な化学反応は起こさないと考えられる。しかしながら、NO の生体内生成とその変異原性という観点から、ウイルス変異をポリメラーゼの単純な複製エラーによる偶発的な現象ではなく、『宿主の感染防御反応の一環として起こる必然的な現象』であるという作業仮説を立てることは、ウイルスの薬剤感受性変異などの分子進化を考える上で、重要であると思

われる。

そこで本研究では、ウイルス感染による免疫応答の一つとして過剰に産生される NO の抗ウイルス活性の有無を、iNOS 欠損マウスを用いたマウスウイルス感染モデルによる *in vivo* の面と、ウイルス感染細胞と NO 放出試薬を用いた *in vitro* の面の双方からの解析を行うと同時に、宿主に与えられる NO 由来の酸化・ニトロ化ストレスとウイルスの分子進化の関わりについて、特にパーオキシナイトライトや 8-ニトログアノシンの変異促進作用に焦点を当てて解析を行った(図 1-2)。

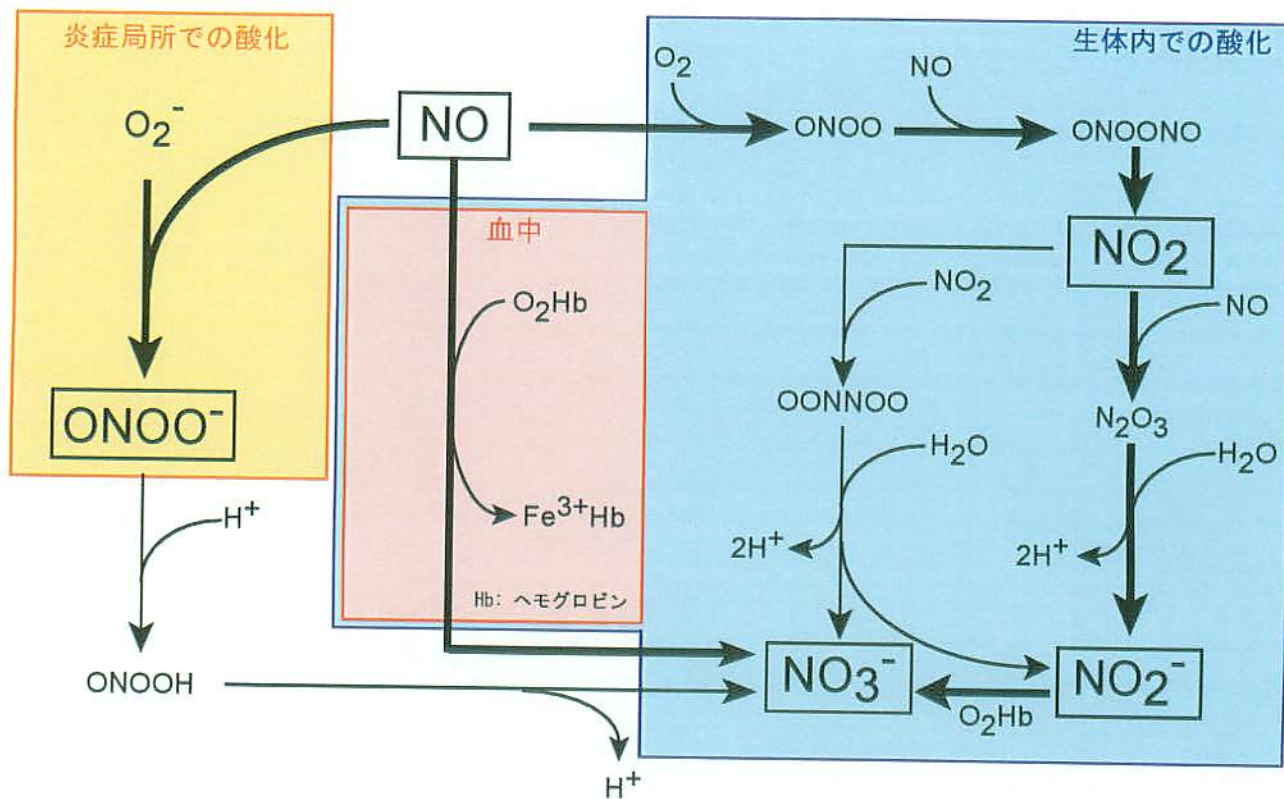


図1-1 : NOの酸化過程



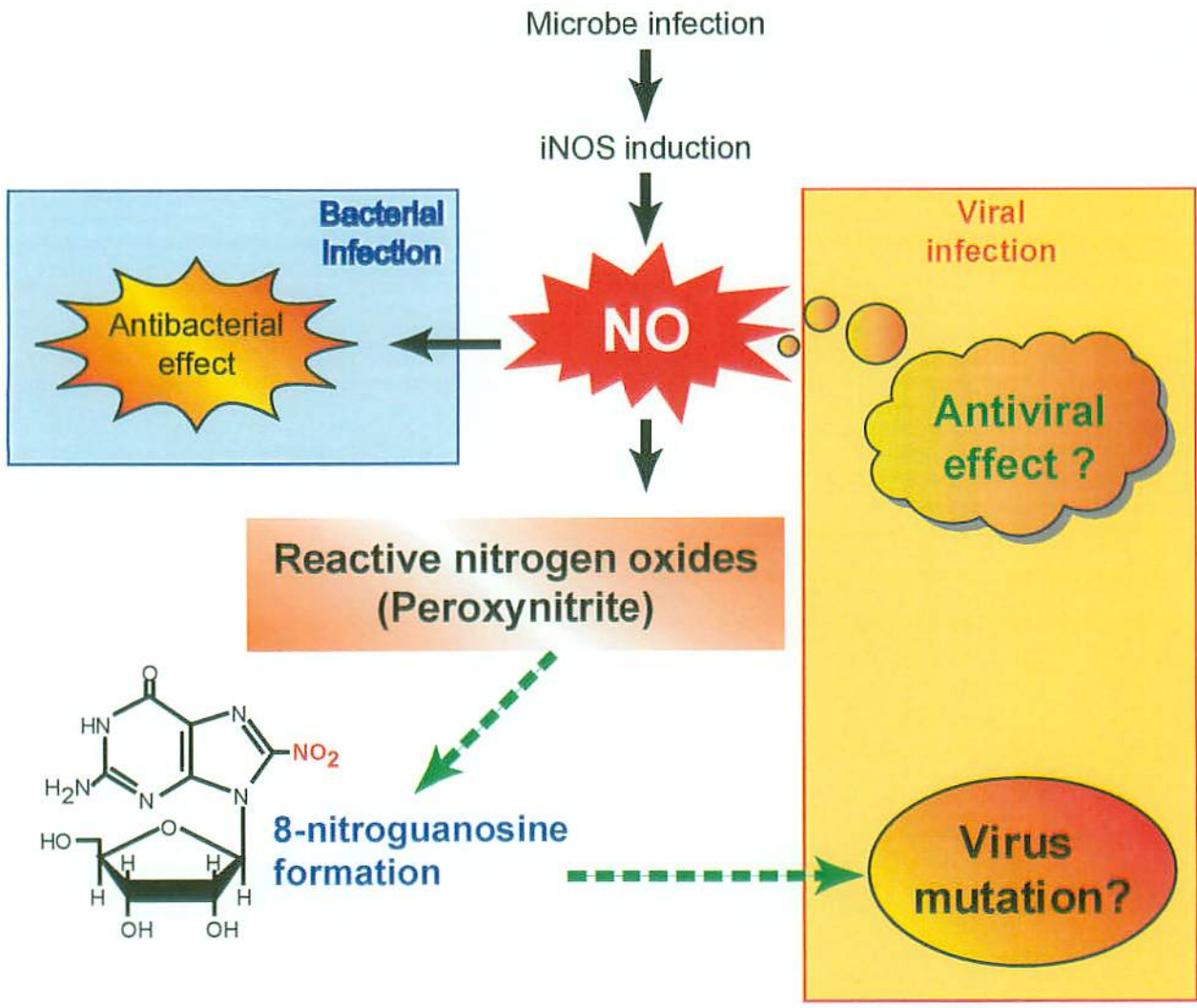


図1-2 : 細菌およびウイルス感染におけるNOの機能

## 第 2 章 実験方法

### 2.1 試薬

以下の試薬はインビトロージェン社より購入した。

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)、ペニシリン-ストレプトマイシン、細胞継代用トリプシン、ブランクフォーミングアッセイ用アガロース

以下の試薬はシグマ社より購入した。

ウシ血清アルブミン(BSA)、L-グルタミン、ブランクフォーミングアッセイ用トリプシン  
その他の試薬はすべて特級(分析グレード)のものを使用した。

### 2.2 細胞

CV-1(アフリカミドリザル腎上皮細胞)、MDCK(イヌ腎上皮細胞)、SW480(ヒト大腸ガン細胞)および恒常的に NO を産生する iNOS-SW480 細胞(ヒト大腸ガン由来の SW480 細胞にラット iNOS 遺伝子をトランスフェクトした iNOS 強制発現細胞)は 10% fetal calf serum (FCS) 添加 D-MEM (DMEM + 10% FCS) を用い 37°C、5% CO<sub>2</sub> 存在下で培養した。フラスコ底面に単層培養しその発育が飽和に達したとき、細胞の継代を下記の方法により行った。PBS で細胞を洗浄後、0.2% トリプシンおよび 0.05% EDTA を加えた PBS を添加し 37°C で約 5 分反応させ細胞を剥離した。次に DMEM + 10% FCS を添加し再懸濁後、遠心分離により回収しその 20-30% 量の細胞を新しいフラスコに移し培養した。すべての培地中にはペニシリンおよびストレプトマイシンを添加した。

### 2.3 動物

野生型 C57BL/6J マウスは、SPF グレードのものを日本クリア株式会社より購入した。iNOS 欠損マウスは、繁殖用つがいを Jackson Laboratory より購入し、本研究室にて繁殖・維持したものをを使用した。この iNOS 欠損マウスは C57BL/6J マウスをもとに、iNOS 遺伝子のカルモジュリン結合部位に相当する部分をネオマイシン耐性遺伝子で置換することにより作成されたものである(Laubach et al., 1995)。感染実験には iNOS 欠損マウスを野生型 C57BL/6J マウスと交配させて得られた iNOS ヘテロ欠損

マウスをさらに交配させて得られた同胞マウスを、各個体の遺伝子型を判定した後に用いた。3週齢、雄性マウスを SeV 感染実験に使用した。

## 2.4 ウイルス

本実験では、A 型インフルエンザウイルス (Influenza virus A/Kumamoto/67 (H2N2)) およびセンダイウイルス (SeV) の 2 種類のネガティブ一本鎖 RNA ウイルスを使用した。SeV Z 株ならびに green fluorescent protein (GFP) 遺伝子 (EGFP; 720 bp, Clontech Laboratories) を SeV cDNA の上流に組み込んだ組み換え SeV (GFP-SeV) は加藤篤博士より供与を受けた (図 2-1 A, B)。これら SeV 株は、ウイルス cDNA を用いた reverse genetics 法により作製されたリコンビナントウイルスであり、これをさらに孵化鶏卵にて継代・濃縮したものを使用した。

## 2.5 GFP-SeV 感染モデルの作製および肺内ウイルス増殖動態の解析

マウスの GFP-SeV 肺炎モデルはウイルス懸濁液の経鼻噴霧感染により作成した。回転台付き専用感染装置内に野生型もしくは iNOS 欠損マウスを入れ、感染直前に普通ブイヨンで 2LD<sub>50</sub> に希釈調製したインフルエンザウイルスもしくは SeV (Z) ならびに GFP-SeV 懸濁液をガラス製ネブライザーにて 30 分間噴霧し経気道的に感染させた。感染後 2, 4, 6, 7 日目のマウス肺を摘出し、2 ml PBS でホモジナイズした後 10000 × g、10 分遠心分離した上清を 0.45 μm フィルターにて濾過したものをサンプルとしてプラークフォーミングアッセイを行い、肺内ウイルス量を評価した。

## 2.6 GFP-SeV のパーオキシナイトライト処理

GFP-SeV のパーオキシナイトライト処理はコンスタントフラックス法を用いて行われた (Okamoto et. al., 1997)。 $1.1 \times 10^7$  PFU/ml の GFP-SeV を含む 1 mg/ml ウシ血清アルブミン加、0.5 M リン酸緩衝液 (pH 7.6) に、インフュージョンシリンジポンプにて 250 μM パーオキシナイトライト加 10 mM NaOH を室温で毎分 240 μl の添加を行い、添加開始から 30 秒毎に 120 μl の分取を行った。Constant flux 時の溶液内の pH は中性域であり、さらに反応液中のパーオキシナイトライトの濃度は常に 0.8 μM で保たれていた。

採取した GFP-SeV を希釈後に CV-1 細胞に接種し、後述するプラークフォーミングアッセイによりウイルス量およびウイルスの変異率を測定した。

## 2.7 GFP および SeV ビリオンタンパク質のウエスタンブロットティング

GFP および SeV ビリオンタンパク質の発現および変異 GFP の生化学的特徴はウエスタンブロットティングにより解析した。各種ウイルスを単層培養した CV-1 細胞に multiplicities of infection (m.o.i.) が 5 PFU/cell となるように接種し、0.5  $\mu$ g/ml トリプシン存在下で 2 日培養した。培養後、上清を除去し 0.5 %ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 加 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) を添加し、さらに凍結-溶解を 4 回繰り返して細胞を溶解した後、遠心分離によりデブリを取り除いたものをサンプルとした。

得られたサンプル (15  $\mu$ g protein) は還元条件下で 8 M 尿素存在下もしくは非存在下において SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) を行い、固定化ポリビニルデンジフルオライド (PVDF) 膜に転写して 1 %ゼラチンにてブロッキング (4  $^{\circ}$ C) した。ブロッキング後、抗 GFP ポリクローナル抗体 (クロンテック社) もしくは抗 SeV ウサギ血清と反応させた。発色はビオチン化抗ウサギ IgG およびアビジン化アルカリフォスファターゼを用いて行った。

## 2.8 RNA の抽出

ウイルス感染細胞からの RNA 抽出は、TRIzol (Invitrogen 社) を用いたグアニジンチオシアネート抽出法により行った。6 穴もしくは 12 穴プレートに単層培養した CV-1 細胞 ( $4.5 \times 10^5$  (6 穴)、 $1.8 \times 10^5$  (12 穴) cells/well) に SeV もしくは GFP-SeV を接種し、0.45  $\mu$ g/ml トリプシン存在下で培養した。培養 2 日後に培養情勢を除去し、TRIzol 試薬 1 ml/well (6 穴) または 0.5 ml/well (12 穴) を加えホモジナイズし全量を 1.5 ml チューブに移した。室温で 5 分間静置後に各チューブにクロロホルム 0.2 ml (12 穴では 0.1 ml) を添加し、1 分間激しく震盪後、3 分間の静置に続いて 18000  $\times$ g で 15 分間遠心した。遠心上清を別のチューブに回収し、イソプロピルアルコールを添加して RNA を沈殿させた。沈殿物を風乾した後に、蒸留水で懸濁したものを RNA 溶液とした。RNA の純度は 260 nm と 280 nm の吸光度の比率により確認し、260 nm の吸光度をもとに RNA の濃度を定量した。

## 2.9 SeV および GFP-SeV 遺伝子解析

GFP-SeV 変異株もしくはキモトリプシン感受性変異株の遺伝子の解析は、得られた RNA の GFP もしくは SeV タンパク質遺伝子に対する reversetranscriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)により遺伝子を増幅し、その断片のシーケンス解析により行った。

GFP mRNA の検出には次のようなプライマーを使用した。SeV に組み込まれた GFP の全遺伝子配列は 720 塩基であり、sense プライマーは 5'末端より 5-26 番目の 22 mer、antisense プライマーは 691-713 番目の 23 mer を用い、塩基配列はそれぞれ、

sense (22 mer): 5'-TGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTT-3'

antisense (23 mer): 5'-TACAGCTCGTCCATGCCGAGAGT-3'

であり、予想される産物の長さは 709bp であった。

逆転写反応は以下の反応系で 42°C、1時間反応を行った。

3 µg RNA

50 mM Tris-HCl (pH 8.3)

75 mM KCl

3 mM MgCl<sub>2</sub>

10 mM DTT

1 mM dNTP

1 µM antisense primer

0.25 U/µl ribonuclease inhibitor (Invitrogen 社)

10 U/µl M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen 社)

(Total 20 µl)

さらに 70°C、10 分間加熱により逆転写酵素を失活させた後、以下のような反応系で PCR を行った。

2 µl reverse transcription product

20 mM Tris-HCl (pH 8.4)

50 mM KCl

1.5 mM MgCl<sub>2</sub>

0.2 mM dNTP

0.5 µM sense primer

0.5  $\mu$ M antisense primer

0.025 U/ $\mu$ l Taq DNA polymerase (recombinant; Invitrogen 社)

(Total 100  $\mu$ l)

PCR は以下のような反応サイクルで行った。

95°C 2 min

94°C 45 sec (1)

60°C 30 sec (2) (annealing)

72°C 90 sec (3)

(1)-(3) 25 cycles

反応終了後、10  $\mu$ l を 1 %アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロミドで染色、バンドを固定した。

SeVF タンパク質 mRNA の検出には次のようなプライマーを使用した。SeVF タンパク遺伝子全 1698 塩基の内、sense プライマーは 5'末端より 136-159 番目の全 24 mer に、antisense プライマーは 5'末端より 440-469 番目の全 30 mer に設定し、その塩基配列はそれぞれ

sense (24 mer): 5'-AAGATAGCTGGATCCCACGAATCG-3'

antisense (30 mer): 5'-AGGCTTTGATGAGCGCTATGTCTCTTTTGG-3'

であった。このプライマーより予想される産物の長さは 334 bp であり、この部位は SeVF タンパク質のトリプシン切断部位(5'末端より 346-351 番目)を含んでいる。反応条件は上記と同様に行った。

RNA の内在性コントロールとして、G3PDH に対する RT-PCR を同時に行った。G3PDH の検出には次のようなプライマーを使用した。

sense (20 mer): 5'-AAACCCATCACCATCTTCCA-3'

antisense (20 mer): 5'-CAGGGTTTCTTACTCCTTG-3'

予想される産物の長さは 805 bp であった。反応条件は、アニーリングの温度を除き、上記と同様に行った。G3PDH でのアニーリング温度(上記(2))は 54°Cとした。

## 2.10 プラークフォーミングアッセイおよび力価測定

6 穴プレートに単層培養した CV-1 ( $4.5 \times 10^5$  cells/well) もしくは MDCK 細胞 ( $7 \times 10^5$  cells/well) を MEM + 0.2% BSA にて 2 回洗浄した後に、同溶液で任意の希釈率に希釈したサンプル 100  $\mu$ l を細胞に添加し、37°C で 1 時間ウイルス吸着反応を行った。

ウイルス吸着開始 30 分後に、一度プレートを傾けることによりウェル全体にサンプルを広げ、細胞の乾燥を防いだ。吸着反応終了後速やかに、0.45  $\mu\text{g/ml}$  トリプシンおよび 0.4-0.5 % アガロース加 DMEM + 0.2% BSA (3 ml) を重層した。室温に 15-20 分間放置して、アガロースが固まったのを確認した後に 37°C、5% CO<sub>2</sub> 存在下で 4-5 日 (SeV) もしくは 2 日 (インフルエンザウイルス) 培養した。培養後、プレートより重層したアガロースを取り除き、細胞に 2 % モルモット赤血球添加 MEM + 0.2% BSA 1 ml を重層して、37°C で 20-30 分赤血球吸着反応を行った後に、MEM + 0.2% BSA で細胞の洗浄を 2 回行いブランクの発色を行った (図 2-1 C)。ウイルスの力価は次の式より算出した。

$$\text{ブランク数} \times \text{希釈率} \times 10 \text{ PFU/ml}$$

なお、モルモット赤血球はモルモット頸動脈、もしくは下大静脈より採血したものを生理食塩水および MEM + 0.2% BSA でそれぞれ 3 回洗浄したものをを用いた。

## 2.11 NO の抗ウイルス作用の解析

### 2.11.1 NO ドナー添加による抗ウイルス作用の解析

MDCK 細胞 ( $1.4 \times 10^5$  cells/well) を単層培養した 24 穴プレートを MEM+0.2% BSA にて 2 回洗浄し、SeVZ 株、もしくはインフルエンザウイルスを m.o.i.=3 で接種した。37°C で 1 時間ウイルスを吸着後、MEM + 0.2% BSA で 3 回洗浄した後に培養液 (DMEM + 0.2% BSA 1 ml) を重層して培養を開始した。培養開始後 1、12、24、36 時間後に、終濃度が 0、0.01、0.1、1 mM となるように S-nitroso-N-acetyl-D, L-penicillamine (SNAP) または S-nitrosoglutathione (GSNO) を添加した。培養開始から 12、24、36、48 時間ごとに培養上清を回収し 15000  $\times g$  で 10 分間遠心した上清中に含まれるウイルス量をブランクフォーミングアッセイ法によって求め NO の抗ウイルス効果を解析した。

## 2.12 iNOS 遺伝子トランスフェクト細胞作成

内因性 NO の抗ウイルス効果の解析および NO の変異原性の解析は、ラット iNOS 遺伝子をヒト大腸がん由来株化細胞である SW480 細胞にトランスフェクトし、恒常的に iNOS を発現して過剰量の NO を産生する iNOS-AW480 細胞を作成して行った。

詳しくは、ラット iNOS 遺伝子を挿入した pSK(+)/CMV プラスミドベクターをカルシ

ウムリン酸法により SW480 細胞内にトランスフェクトし、800  $\mu\text{g/ml}$  G418 を含む培養液で 2 週間以上選択培養を行った。得られたクローンを NADPH ジアフォラーゼ染色法により染色し、ジアフォラーゼ陽性であった細胞 (iNOS-SW480 細胞) をウイルス増殖に用いた。

### 2.12.1 iNOS 遺伝子トランスフェクト細胞の iNOS 発現および活性の確認

iNOS-SW480 細胞もしくは parent 株である SW480 細胞を回収後、ライセートバッファー (0.5 % SDS、50  $\mu\text{g/ml}$  ロイペプチン、2 mM PMSF、100  $\mu\text{M}$  DTPA、50 mM Tris-HCl (pH 7.4)) にて溶解しウエスタンブロットティングのサンプルとした。また、iNOS タンパク質の標準として LPS および IFN- $\gamma$  処理したマウスマクロファージの細胞ライセートを用いた。詳しくは、5 KE/ml OK432 を C57 BL/6J マウス腹腔内に投与し、投与 4 日後に腹腔浸潤細胞 (PEC) (マクロファージ) を回収した。回収した PEC を 10  $\mu\text{g/ml}$  LPS および 100 u/ml マウス IFN- $\gamma$  にて 12 時間処理後、ライセートバッファーを用いて溶解し標準サンプルとした。ウエスタンブロットティングは、還元条件下にてサンプルを SDS-ゲル電気泳動 (ゲル濃度 7.5 %) を行い、PVDF 膜に転写して行った。iNOS 検出は 1 次抗体に抗 iNOS ポリクローナル抗体 (Santa Cruz 社)、2 次抗体にビオチン化抗ウサギ IgG (アマシャム社) を用い、アビジン化アルカリフォスファターゼ (アマシャム社) を用いて発色して検出した。

iNOS タンパク質の活性は iNOS-SW480 細胞培養上清を経時的に採取し、NO の酸化によって生じる培養上清中の  $\text{NO}_2^-$  および  $\text{NO}_3^-$  濃度を HPLC とグリース試薬を用いた方法により測定し活性の有無を確認した。

### 2.12.2 iNOS 強制発現細胞によるウイルス増殖および変異率測定

iNOS-SW480 細胞を単層培養した 24 穴プレートに、1 段階増殖では m.o.i. =3 PFU/cell、多段階増殖では m.o.i. =0.1 PFU/cell となるように GFP-SeV を接種し 37 $^{\circ}\text{C}$  で 1 時間吸着させた。ウイルス吸着反応後、NOS 阻害剤 (終濃度 0、1 または 10 mM) を含む DMEM + 0.2% BSA 1 ml を重層し 37 $^{\circ}\text{C}$  で 48 時間培養後に培養上清を回収した。NOS 阻害剤には  $N^{\omega}$ -モノメチル-L-アルギニン (L-NMMA) とその光学異性体で NOS 阻害活性を持たない D-NMMA を用いた。回収した培養上清は任意の希釈率に希釈後に、上記の方法によりプラークフォーミングアッセイを行った。

ウイルスの変異率はプラークフォーミングアッセイ後、形成されたプラークを倒立蛍光顕微鏡下で観察し、GFP の蛍光の消失を指標として全プラーク数における蛍光を



消失したプラークの割合を下記の式を用いて算出した(図 2-1 B, C)。

$$\frac{\text{GFP の蛍光を消失したプラーク数} \times 100}{\text{全プラーク数}}$$

## 2.13 NO および 8-ニトログアノシンによる酸化ストレスの検出

NO により iNOS-SW480 細胞にもたらされる酸化ストレス、および CV-1 細胞培養液内に 8-ニトログアノシンを添加することでもたらされる酸化ストレスの検出は、細胞内パーオキシデーシンの蛍光インジケータであるジヒドロローダミン 123 とフローサイトメトリーを用いた方法により検出した。

NO による酸化ストレスの検出は、12 穴プレートに iNOS-SW480 細胞を  $9 \times 10^5$  cells/well 接種し一晩培養後に KRP で洗浄し、2.5  $\mu\text{M}$  ジヒドロローダミン 123、1 mM L-アルギニン、0 または 1 mM L-NMMA を含む KRP + 0.2% BSA にて 37°C で 6 時間培養した。培養後細胞をトリプシン処理により剥離し、遠心分離により回収した。KRP + 0.2% BSA にて 2 回洗浄後、細胞内のジヒドロローダミンの蛍光をフローサイトメーター (FACSCalibur; ベクトン・ディッキンソン社) により検出した。

8-ニトログアノシンによる酸化ストレスの検出は、CV-1 細胞の培養液 (DMEM + 0.2% BSA) に 500  $\mu\text{M}$  8-ニトログアノシンおよび 10  $\mu\text{M}$  ジヒドロローダミン 123 を添加し、37°C で 12 時間培養後、トリプシンにて細胞を剥離後、回収してフローサイトメーターを用いて細胞内のジヒドロローダミンの蛍光を検出した。

## 2.14 抗ニトログアノシンマウスモノクローナル抗体の作成

### 2.14.1 8-ニトログアノシンの合成

8-ニトログアノシンは亜硝酸イオン ( $\text{NO}_2^-$ ) による 8-ブロモグアノシンの求核置換 ( $\text{Br}^- \Leftrightarrow \text{NO}_2^-$ ) により合成した。8-ブロモグアノシンを無水ジメチルスルフォキシドに溶解した亜硝酸ナトリウムに添加し、70°C にて 3 時間反応させた。生成した 8-ニトログアノシンは逆相カラムを用いた HPLC 法により分離・精製した。精製した 8-ニトログアノシンは質量分析計で測定した分子量 (323) および吸光スペクトラムにより同定した。この方法により 8-ブロモグアノシン量からの 8-ニトログアノシンの収率は 10%-20%であった。

### 2.14.2 8-ニトログアノシン-ウシ血清アルブミン(BSA)の作製

低分子である 8-ニトログアノシンに対する抗体を作製するため、担体として BSA を用いた。8-ニトログアノシンと BSA の結合には Erlanger、Beiser らが報告した過ヨウ素酸による酸化を利用する方法に、若干変更を加えて用いた (Erlanger and Beiser, 1964)。蒸留水に溶解した 8-ニトログアノシンを過ヨウ素酸ナトリウムで 15 分間処理することによりグアノシンのリボースを開環させた。余剰の過ヨウ素酸はエチレングリコールを用いて除去した。過ヨウ素酸処理により開環した 8-ニトログアノシンを、BSA を溶解した 0.5 M リン酸バッファー (pH 7.0) に添加することにより、開環したリボース部位と BSA を結合させた。BSA と 8-ニトログアノシンの共有結合を安定化させるため sodium cyanotrihydro borate により処理した。結合しなかった核酸はセファデックス G-25 を用いたカラムクロマトグラフィーにより除去した。BSA に取り込まれた 8-ニトログアノシン量を測定するため生成した 8-ニトログアノシン-BSA を酸加水分解し、モル吸光係数 ( $\epsilon_{400} = 9,144 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) から算定した。8-ニトログアノシンの平均取り込み量は BSA 1 モルあたり 6.2 モルであった。

### 2.14.3 マウス抗 8-ニトログアノシンモノクローナル抗体の作成

BDF1 マウス (日本エスエルシー社) を、8-ニトログアノシン-BSA と Freund 完全アジュバンドとのエマルジョンを抗原量にして 50  $\mu\text{g}$ /マウス腹腔内投与して免疫し、さらに 1 週間の間隔を置いて 8-ニトログアノシン-BSA と Freund 不完全アジュバンドとのエマルジョンを抗原 25  $\mu\text{g}$ /マウスで腹腔内に投与して追加免疫を行った。35 日目の追加免疫を最終免疫とし、最終免疫の 3 日後にその脾臓細胞を摘出した。脾臓細胞をメッシュろ過後、RPMI1640 培地に懸濁して脾臓細胞浮遊液を得た。一方、SP2/0 ミエローマ細胞を増殖させた後、10% FCS 含有 RPMI1640 培地に懸濁してミエローマ細胞浮遊液を得た。なお、ここでは生細胞率 95%以上の細胞懸濁液を用いた。脾臓細胞浮遊液およびミエローマ細胞浮遊液を調製した後、脾臓細胞の浮遊液に脾臓細胞数に対し 1/10-1/5 の細胞数でミエローマ細胞浮遊液を加え、次いでポリエチレングリコールを滴下し、混合することによって細胞融合を行った。遠心して上清を除去した後、細胞濃度が  $5 \times 10^6$  cells/ml となるように HAT (hypoxanthine-aminopterin-thymidine) 培地を添加し、96 穴プレートにて培養し、HAT 選択を行った。抗体のスクリーニングは、8-ニトログアノシン-BSA を用いた enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) により行った。すなわち、8-ニトログアノシン-BSA を吸着させた ELISA 用マイクロプレートに HAT

選択した抗体産生細胞の培養上清を加え、室温下で攪拌した後 Tween 20 加 PBS で洗淨した。50 ml のペルオキシダーゼ標識抗マウス抗体を各ウェルに加え、基質発色反応によって陽性株を選択した。この陽性株に関し、更に限界希釈法にてスクリーニングを繰り返し、その産生抗体について競合 ELISA 法により各種核酸誘導体との反応性を検討し、8-ニトログアノシンのみと特異的に反応する抗体を産生する陽性株をクローニングした。さらに、クローニングが完了した抗体産生細胞を BALB/c マウスの腹腔内に注射して腹水を採取し、その腹水を硫酸アンモニウムによる塩析、セファデックスによるゲル濾過により精製することによってモノクローナル抗体を得た。

#### 2.14.4 競合 ELISA 法による抗 8-ニトログアノシン抗体の特異性の検討

各種核酸誘導体 (0-500  $\mu\text{M}$ ) と抗体を混合し抗原抗体反応を起こさせた反応液を、1  $\mu\text{g/ml}$  の 8-ニトログアノアシン-BSA でコートした 96 穴プレートに添加し反応液中に残存する 8-ニトログアノアシン-BSA と結合する抗体量を 1,2-phenylenediamine dihydrochloride を基質としたペルオキシダーゼ標識抗マウス抗体による発色により測定した。結果、得られたモノクローナル抗体は 8-ニトログアノシンおよび 8-ニトログアニンと特異的に反応し、その他内因性のヌクレオチドやヌクレオシド、グアニン、グアノシン、8-オキソグアニン、8-オキソグアノシン、8-ブロモグアニン、8-ブロモグアノシン、8-クロログアニン、キサンチン、アデニン、アデノシン、チミン、デオキシチミン、ウラシル、ウリジン、3-ニトロチロシン、ニトロイミダゾール、シトシンとの反応は認められなかった。

#### 2.15 抗ニトログアノシンモノクローナル抗体による iNOS-SW480 細胞の免疫組織学的解析

4 well チャンバーに iNOS-SW480 細胞もしくはその parent 株である SW480 細胞を  $2.5 \times 10^4$  cells/well 接種し 36 時間培養後、PBS で 3 回洗淨した後にザンボニン固定液 (8.7 mM ピクリン酸、4 % パラホルムアルデヒド加 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4)) に変換して 4  $^{\circ}\text{C}$  で 7 時間固定を行った。固定後、再び PBS で洗淨しザンボニン固定液を完全に洗い流した後、0.5% Triton X-100 加 PBS を重層し、室温で 20 分間震とうし、PBS で洗淨した。Block Ace により 4 $^{\circ}\text{C}$  で 3.5 時間ブロッキングを行った後、再度 PBS で洗淨を行い、10  $\mu\text{g/ml}$  抗 8-ニトログアノシンモノクローナル抗体と 4 $^{\circ}\text{C}$  で一晩湿箱中で反応させた。反応終了後 PBS で洗淨し、二次抗体として Cy3 ラベルされたヤギ抗

マウス抗体(Amersham Biosciences 社)(1 : 100)を室温で1時間(遮光条件下)反応した。反応後に再びPBSにて洗浄し、Antifade (Molecular Probe 社)にて封入し、蛍光顕微鏡にて(励起波長 510-560 nm、蛍光波長 575 nm)観察した。

## 2.16 遺伝子塩基配列の決定

ブランクフォームミングアッセイによって形成されたブランクより分離、クローニングされた GFP 変異株もしくはキモトリプシン感受性変異株を CV-1 細胞に接種し、培養2日後に TRizol を用いて細胞内の全 RNA を回収した。回収された RNA は上記のプライマーを用いて RT-PCR を行った後、得られた cDNA 断片を PCR4-TOPO クローニングベクター (Invitrogen 社)に組み込み、E. coli DH5 $\alpha$ 株にトランスフォーメーションした。GFP 塩基配列は BigDye Terminator v1.1 cycle sequence kit (Applied Biosystems 社)を用いた dideoxy 法により DNA シークエンサー (model 373A; Applied Biosystems 社)を用いて決定した。

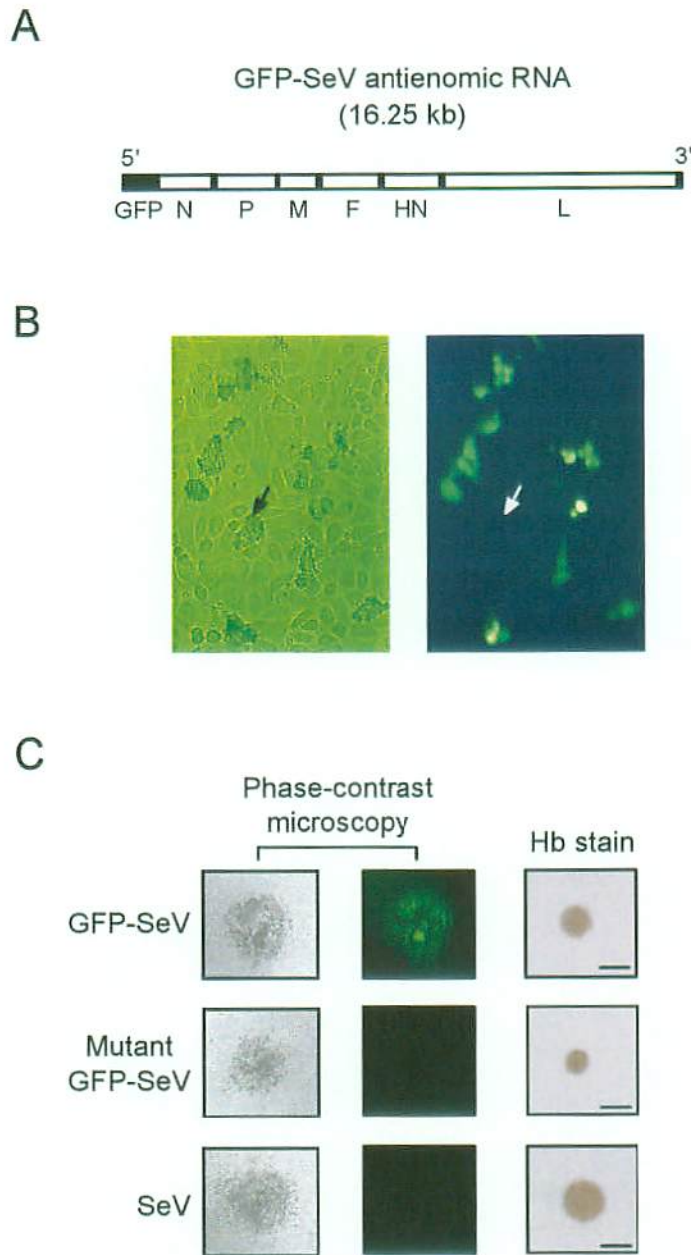


図2-1 GFP-SeVの遺伝子構造 (A) およびGFP-SeV変異株の検出 (B、C)  
 B) GFP-SeVを感染したCV-1細胞に赤血球吸着後、位相差蛍光倒立顕微鏡で観察した。明視野 (左) では赤血球の吸着した感染細胞が観察され、これら感染細胞は暗視野 (右) において GFPの蛍光が認められる。GFP-SeV変異株感染細胞 (矢印) は赤血球の吸着は認められるが暗視野でのGFPの蛍光は認められない。C) プラークフォーミングアッセイによるSeVおよび GFP-SeVのプラーク形成。左側および中央の列は位相差顕微鏡による視野、右側は赤血球染色によるプラーク検出 (bar, 1 mm) 。

## 第3章 実験結果

### 3.1 野生型および iNOS 欠損マウス GFP-SeV 感染肺炎モデルを用いた NO の変異原性の解析

NO の変異原性をマウス GFP-SeV 感染肺炎モデルを用いて検討した。致死量にあたる ( $2 \times LD_{50}$ ) GFP-SeV を C57BL/6 (野生型) もしくは iNOS 欠損マウスに噴霧感染し、感染後 2、4、6、7 日後に肺を摘出し以下の解析を行った。

#### 3.1.1 ESR による野生型および iNOS 欠損マウス肺内 NO の検出

GFP-SeV 感染に伴う野生型および iNOS 欠損マウスの肺内 NO 産生レベルの変動を解析するために、ESR スピントラップ法によりマウス肺内 NO を測定した (図 3-1 C)。野生型マウスでは DTCS-鉄錯体 NO アダクトの 3 相性のシグナルが第 4 日以降より増強し、感染後第 6 日目にかけて最大レベルに達したのに対し、iNOS 欠損マウスでは検出限界以下であった。このことから GFP-SeV 感染における NO 産生は iNOS 欠損マウスにおいて完全に抑制されていることが示された。

#### 3.1.2 肺内ウイルス量

GFP-SeV 感染後の肺内ウイルス増殖における、iNOS 遺伝子欠損の影響を解析するため、ウイルス感染 2、4、6、7 日後における iNOS 欠損マウスおよび野生型マウス肺内ウイルス量を、ブランクアッセイ法により比較した。(図 3-1 B)。GFP-SeV 増殖のピークは野生型、iNOS 欠損マウスともに感染後第 6 日目であり、その後は減少する経過をとった。測定したいずれのタイムポイントにおいても、野生型と iNOS 欠損マウス間の肺内ウイルス量に有意な差は認められなかった。

#### 3.1.3 GFP-SeV 変異頻度測定

野生型もしくは iNOS 欠損マウスの GFP-SeV 感染 2、4、6、7 日後の肺内 GFP-SeV の遺伝子変異頻度を GFP の蛍光の消失を指標にして測定した。野生型における GFP 遺伝子の変異頻度は感染経過とともに著しく増加するのに対し、iNOS 欠損マウスでは緩やかな上昇として認められた。また、感染後 4、6、7 日目の野生型における GFP-SeV の変異頻度は iNOS 欠損マウスと比較して 6-7 倍高い値を示した (図 3-1 A)。

ほとんど NO を産生しない CV-1 細胞を用いて、GFP-SeV を段階的に増殖させた時、ウイルスの 1 回増幅による変異頻度は 0.1%未満であった。また、野生型マウスと iNOS 欠損マウスにおける肺内ウイルス量に差が無いことから、両群でのウイルス増殖回数は等しいと考えられる。従って、GFP-SeV のマウス肺細胞での変異頻度が CV-1 細胞と同じ頻度で起こると仮定するならば、特に感染 6 日目から 7 日目にかけて GFP-SeV 変異頻度がほぼ 1.5 %上昇することより、過剰な NO を産生する野生型マウスでの GFP-SeV の変異頻度は、NO に暴露されない場合の 10 倍以上の効率で上昇すると思われる。

### 3.1.4 肺炎病態の免疫組織化学的解析

GFP-SeV 感染後 7 日目もしくは 8 日目の肺炎病態を免疫組織化学的に解析した。抗 iNOS 抗体を用いた結果より、野生型マウスにおいて肺胞や肺組織間質に浸潤した浸潤マクロファージのような炎症性食細胞に iNOS の発現が認められた(図 3-2 A)。さらに NO による酸化ストレスの指標として用いられる 3-ニトロチロシンの肺内分布は、抗 iNOS 抗体によって得られた染色像と類似した分布を示した。ところが、iNOS 欠損マウス肺においてニトロチロシン生成は認められなかった(図 3-2 B,C)。注目すべき点として、GFP-SeV 感染による肺組織傷害は野生型マウスと比較して iNOS 欠損マウスにおいて著しく軽減された(図 3-2 D,E)。このことは、SeV 感染肺炎の病態増悪における NO 由来酸化ストレスの関与を示唆している。

### 3.1.5 小括

- 1) GFP-SeV 感染に伴う NO 産生は野生型マウスでは感染第 4 日以降より増強し、第 6 日目にかけて最大レベルに達した。一方、iNOS 欠損マウスでは NO 産生誘導は認められなかった。
- 2) 野生型と iNOS 欠損マウス間の肺内ウイルス量に有意な差はなかった。
- 3) 野生型におけるウイルス GFP 遺伝子の変異頻度は感染経過とともに著しく増加し、iNOS 欠損マウスでは変異頻度に比較して有意に高かった。
- 4) 免疫組織学的解析より野生型マウスにおいて炎症性食細胞による iNOS の発現と、それに類似した分布を持つニトロチロシンの染色像が認められた。一方、iNOS 欠損マウス肺においてニトロチロシン生成は認められなかった。さらに GFP-SeV 感染による肺組織傷害は野生型マウスと比較して iNOS 欠損マウスにおいて著しく軽減していた。

### 3.2 パーオキシナイトライトの変異原性の解析

NO によるウイルス変異促進を解析するために、試験管内で GFP-SeV を NO 由来の活性酸化窒素種であるパーオキシナイトライトで処理した後に、GFP とキモトリプシン感受性変異の変異頻度を測定した。

#### 3.2.1 パーオキシナイトライト処理による GFP-SeV 変異率測定

試験管内で GFP-SeV をパーオキシナイトライトで処理し、変異頻度を測定した。パーオキシナイトライト処理は、反応液中のパーオキシナイトライト濃度が常に一定となるようにコンスタントフラックス法を用いて行った。反応液中のパーオキシナイトライト濃度は  $0.8 \mu\text{M}$  を維持し、GFP-SeV の変異頻度は処理開始後 1.5 分には処理前 ( $0.26 \pm 0.02 \%$ ) の 2.6 倍 ( $0.68 \pm 0.07 \%$ ) に上昇し、その後時間依存的に上昇した。これと反してパーオキシナイトライトのウイルス殺傷能により GFP-SeV の生存率は減少した (図 3-3)。驚くべきことに、4 分後には変異率が 100 % を示す実験系も認められた (図 3-3 インセット)。

#### 3.2.2 GFP 変異の解析

蛍光を消失したプラークを形成している細胞内に GFP が発現していることを確認するために、蛍光を消失した GFP-SeV 変異株を CV-1 細胞に感染し、RNA 抽出および細胞破碎液の調整を行った。

GFP mRNA に対する RT-PCR の結果より、変異株において親株と同程度の効率の GFP mRNA の発現が認められた。またウエスタンブロッティングによる解析から、変異株 GFP と親株 GFP の間に抗 GFP ポリクローナル抗体に対する反応性の違いは認められなかった。しかしながら、8 M 尿素 SDS 電気泳動においてすべての変異株と親株との間で GFP の移動度は同じであったにもかかわらず、通常の SDS 電気泳動を行うと、変異株 GFP において親株 GFP より少し遅い移動度を示す株が認められた (図 3-5)。

このことは変異により GFP の一次配列が変化し、タンパク質のコンフォメーション変化が起こったことを示唆している。一方で、各変異株のピリオンタンパク質の発現と移動度に親株との違いは認められなかった。

さらに、GFP 塩基配列を解析したところ、GFP 変異体では、遺伝子欠損や挿入は認



められず、すべてのクローンにおいて一塩基変異であり、アミノ酸置換を伴っていた。また、パーオキシナイトライト処理 25 クローン、コントロール 19 クローンから得られた全体的な変異パターンは両群ともに A → G 変換が優位に起こっており、少なくとも、今回解析した範囲では、両群の変異パターンに有意な差は認められなかった。

### 3.2.3 パーオキシナイトライト処理による SeV キモトリプシン感受性変異率測定

外来性の遺伝子である GFP 遺伝子は SeV の生存に直接影響を与えないため、その変異は定量的に蓄積される。しかしながら、ウイルスの内因性遺伝子もパーオキシナイトライトにより変異するかどうかは明かでない。そこで、本来ウイルスの持つ遺伝子の変異頻度を測定するため、SeV のエンベロープに存在する F タンパク質に注目した。F タンパク質は SeV が細胞内へ侵入する際にトリプシンによる限定分解を受け、膜融合活性を獲得する。以前より SeV にはキモトリプシンによって感染能力を獲得するキモトリプシン感受性変異株の存在が知られており、この変異は F タンパク質遺伝子の一塩基変異によって起こることも報告されている。そこで、パーオキシナイトライト処理による SeV のキモトリプシン感受性変異の促進作用を検討した(図 3-4)。

SeV にパーオキシナイトライト処理後(終濃度 8  $\mu$ M ×3 回)キモトリプシン存在下でブランクフォーミングアッセイを行いキモトリプシン感受性変異株の出現頻度を比較した結果、パーオキシナイトライト処理群はコントロール群と比較して、変異率は約 10 倍の上昇が認められた。F タンパク質 RNA の塩基配列解析より、分離した各キモトリプシン感受性変異株における F タンパク質のトリプシン切断 P1 部位にアミノ酸変異(Arg → Ile)が認められた。

これらの結果はパーオキシナイトライトによる変異促進作用は内因性、外来性の遺伝子に関係なく引き起こされることを示唆している。

### 3.2.4 小括

- 1) コンスタントフラックス法を用いた GFP-SeV のパーオキシナイトライト処理により、GFP-SeV の変異頻度は処理開始後 1.5 分には処理前)の 2.6 倍に上昇した。
- 2) 通常の SDS 電気泳動の結果、変異株のビリオンタンパク質の移動度に親株との違いは認められなかったのに対し、変異 GFP では移動度の違いが認められた。これは変異による GFP の一次配列の変化を示唆しており、実際、塩基配列の解析より、塩基置換に伴った、アミノ酸置換が確認された。
- 3) キモトリプシン感受性変異頻度もパーオキシナイトライト処理によって上昇するこ

とより、パーオキシナイトライトの変異促進作用は内因性、外来性の遺伝子に関係なく発揮することがわかった。

### 3.3 培養細胞を用いた NO の抗ウイルス作用の解析

#### 3.3.1 外因性 NO の抗ウイルス活性の検討

MDCK 細胞に SeV もしくはインフルエンザウイルスを感染し、感染直後より NO 放出試薬である GSNO および SNAP を、12 時間おきに 4 回添加した。経時的に培養上清中のウイルス量をブランクフォーミングアッセイにより測定した結果、0.1、0.01 mM の NO ドナーを添加した系でのウイルス増殖効率にコントロールとの差は認められなかった(図 3-6)。培養上清中の  $\text{NO}_2^-$ 、 $\text{NO}_3^-$  イオン濃度を測定した結果、この濃度の NO ドナーは生理的な NO を放出していることが確認された(データ未提示)。過剰量の NO を放出する 1 mM NO ドナーを添加した系において増殖効率の軽微な減少が認められたが、感染細胞の著しい細胞の傷害が認められることより、過剰量の NO が細胞傷害を引き起こした結果、ウイルス増殖効率が減少したものと思われる。

さらに、ウイルス感染初期における NO の抗ウイルス効果を検討するために、SeV 感染細胞に感染直後より終濃度 0.1、0.01 mM の NO ドナーを 6 時間おきに 4 回添加を行い、ウイルス増殖効率を検討した。その結果、ウイルス増殖初期においても NO ドナーを添加した系とコントロールとの間に優位な差は認められなかった(データ未提示)。

加えてウイルスの多段階増殖においても NO の影響を検討したが、コントロール群と SNAP 添加群との間にウイルス増殖効率の差は認められなかった(図 3-6)。

#### 3.3.2 内因性 NO の抗ウイルス活性の検討

NO ドナーの添加すなわち外因性 NO の抗ウイルス効果解析は、NO の培地成分との反応といった様々な外的要因に影響されることが考えられる。また、ウイルス感染病態において様々な細胞に iNOS の発現誘導が起こることが知られている。そこで、ヒト大腸がん由来の SW480 細胞にラット iNOS 遺伝子をトランスフェクトして発現させた細胞(iNOS-SW480 細胞)を作成し、細胞内より産生される内因性 NO の抗ウイルス活性の検討を行った。

まず、作成した iNOS-SW480 細胞が、NO 合成活性をもった iNOS を発現しているか確認を行った。SW480 および iNOS-SW480 細胞破碎液の抗 iNOS 抗体に対するウ

エスタンプロッチングの結果より、iNOS-SW480 細胞には大量の iNOS が発現していることが確認された(図 3-7 A インセット)。さらに iNOS-SW480 細胞の培養液中に存在する NO の酸化代謝産物である NO<sub>2</sub><sup>-</sup>、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>濃度を測定した結果、培養液中で両イオン濃度の経時的な増加が認められた。これは培養液中に NOS 阻害剤である L-NMMA を添加することで完全に抑制されたことから、iNOS-SW480 細胞では恒常的に NO が産生されることが確認された(図 3-7 A)。

次にこの iNOS-SW480 細胞に SeV を感染し、感染後のウイルス増殖効率を経時的に測定した。その結果、iNOS-SW480 細胞による SeV の増殖効率に、L-NMMA 存在、非存在下にかかわらず差は認められなかった(図 3-7 B)。また、iNOS-SW480 細胞の親株である SW480 細胞ではウエスタンプロッチングによる検出可能な量の iNOS の発現が認められないにもかかわらず、両者の SeV 増殖効率に差が認められないことから、iNOS-SW480 細胞における過剰な iNOS タンパク質の発現自体がウイルス増殖を抑制していないことを示している。

### 3.3.3 小括

MDCK 細胞に SeV もしくはインフルエンザウイルスを感染後、NO ドナーを添加してもウイルスの増殖効率に影響を与えなかった。さらに、iNOS-SW480 細胞に SeV を感染した場合も同様な結果が得られたことから、外因性や内因性にかかわらず、NO は SeV およびインフルエンザウイルスの増殖に影響を与えないことが示された。

## 3.4 iNOS 発現細胞(iNOS-SW480 細胞)を用いた NO の変異原性の解析

NO の変異原性を解析するために、iNOS-SW480 細胞に GFP-SeV を感染し、様々な条件下で増殖後、培養上清に回収された GFP-SeV の変異頻度を測定した。

### 3.4.1 iNOS-SW480 細胞における GFP-SeV の変異頻度測定

GFP-SeV に感染した iNOS-SW480 細胞を NOS 阻害剤存在下もしくは非存在下に培養し、培養 48 時間後の培養上清中に存在する GFP-SeV の変異頻度をプラークフォーミングアッセイにより測定した(図 3-8 A)。iNOS-SW480 細胞によって増殖した GFP-SeV の変異頻度(Control; 0.66±0.09%)は 1 mM および 10 mM L-NMMA 存在下においてそれぞれ 0.26±0.1%、0.22±0.08%と有意に抑制され、この変異頻度は、GFP-SeV を parent 株である SW480 細胞で増殖した際の変異頻度と類似した値

( $0.21 \pm 0.09$  %)を示した。さらにL-NMMAの光学異性体でNOS阻害活性を持たないD-NMMA存在下でGFP-SeVを培養した場合、変異頻度は抑制されず、Controlと同じ値( $0.66 \pm 0.07$  %)を示した。

特筆すべきことにGFP-SeVを1回増殖した時の変異頻度において、iNOS-SW480細胞とL-NMMA添加群およびparent細胞との間に3倍の差が認められたが、GFP-SeVを多段階で増殖した際にその差が約10倍(コントロール;  $2.31 \pm 0.18$  %、10 mM L-NMMA;  $0.25 \pm 0.15$  %、SW480;  $0.27 \pm 0.25$  %)に広がったことである(図3-8 C)。この値はiNOS欠損マウスと野生型マウスにおける肺内GFP-SeVの変異頻度の差と類似した値を示した(図3-1 A)。

1回増殖および多段階増殖時において、L-NMMAの有無、parent細胞にかかわらず、GFP-SeVの増殖効率に差は認められなかった(図3-8 B, D)。

これらの結果はSeV増殖時において、NOがウイルスの変異頻度に多大な影響を与えることを示唆している。

### 3.4.2 内因性および外因性遺伝子の変異速度の比較

SeVにとって外因性の遺伝子であるGFP遺伝子は、ウイルスの生存に直接関係しない外因性遺伝子であるために、GFP遺伝子が内因性の遺伝子と同じ速度で変異を起こすか確認することは、GFP-SeVを用いた変異原性の解析結果を生物学的に考察する上で、極めて重要なポイントである。そこでパーオキシナイトライト処理したGFP-SeVより分離されたGFP変異株と、パーオキシナイトライト処理されたSeVより得られたキモトリプシン感受性変異株の1塩基変異の頻度を比較した(表3-1)。SeVのキモトリプシン感受性変異は、エンペロープタンパク質であるFタンパク質のトリプシン切断P1部位、遺伝子配列では347番目の塩基が一塩基変異(C → A)を起こして変異することが報告されている。

今回、コンスタントフラックス法で連続的に2.5分間SeVをパーオキシナイトライト処理( $0.8 \mu\text{M}$ )して生じたキモトリプシン感受性変異の変異頻度を計算した結果、 $8.3 \times 10^{-5}$ であった。パーオキシナイトライト非処理によるキモトリプシン変異株の変異頻度(バックグラウンド)は $4.7 \times 10^{-7}$ であった。従ってパーオキシナイトライトによるSeV Fタンパク質の-t(C347A)変異頻度は $8.2 \times 10^{-5}$  ( $8.3 \times 10^{-5} - 4.7 \times 10^{-7}$ )であった。

これに対してパーオキシナイトライト処理によるGFP遺伝子の変異頻度を求めた。GFP遺伝子のすべての塩基について変異を起こす確率が同様であると仮定するならば、GFP遺伝子1塩基当りの変異頻度は次の計算式により求められる。

$$\text{GFP 遺伝子の変異頻度} \times \frac{\text{GFP 遺伝子中の変異塩基数}}{\text{クローン数} \times \text{GFP 遺伝子の全塩基数}}$$

パーオキシナイトライト処理前の GFP-SeV 中の GFP 変異株は 0.26 % であり、この変異株 32 クローンより得られた 1 塩基置換は全部で 75 塩基であった。またパーオキシナイトライト処理後の GFP 変異頻度は 1.6 % であり、変異株 25 クローンより得られた 1 塩基変異数は 94 塩基であった。従ってパーオキシナイトライト処理前と処理後の 1 塩基あたりの変異頻度がそれぞれ  $8.6 \times 10^{-6}$ 、 $8.5 \times 10^{-5}$  であることから、パーオキシナイトライト処理による GFP 遺伝子 1 塩基あたりの変異頻度は、 $8.2 \times 10^{-5}$  ( $8.5 \times 10^{-5} - 8.6 \times 10^{-6}$ ) と算出される。

よって、GFP 遺伝子と F タンパク質遺伝子のパーオキシナイトライト処理による 1 塩基変異の頻度を比較すると、双方の遺伝子ともに類似した変異頻度 (GFP;  $8.2 \times 10^{-5}$ 、F タンパク質;  $8.2 \times 10^{-5}$ ) が得られた。

これらの結果は外因性の GFP 遺伝子と内因性のウイルス遺伝子の両方において同じ頻度で RNA の変異が起こることを示唆している。また今回 RNA ウイルスに対する NO の変異原性を解析するに当たって、外因性遺伝子より発現する GFP の蛍光の消失を指標とした変異頻度の解析がウイルスの内因性遺伝子の変異頻度を反映していることを示し、GFP-SeV を用いた解析の信頼性と有効性を示すものである。

### 3.5 NO 由来 8-ニトログアノシンの細胞内形成とウイルス遺伝子変異原性

我々はこれまでインフルエンザウイルスおよび SeV 感染マウス肺において NO の過剰産生とともにグアニンの 8 位炭素がニトロ化された、8-ニトログアノシンが形成されることを 8-ニトログアノシン特異的な抗体を用いて免疫組織化学的に証明し報告している。

そこで、この 8-ニトログアノシンに注目して、NO 依存的な SeV 遺伝子変異の分子メカニズムの解明を行った。

#### 3.5.1 抗ニトログアノシンモノクローナル抗体を用いた iNOS-SW480 細胞の免疫組織学的解析

SW480 細胞および iNOS 遺伝子をトランスフェクトした iNOS-SW480 細胞を、抗 8-

ニトログアノシンモノクローナル抗体による免疫染色を行い、両者の染色強度を比較した結果、親株である SW480 細胞と比較して、iNOS-SW480 細胞においてより強い 8-ニトログアノシンの染色像が得られた(図 3-9)。このことは iNOS-SW480 細胞において多くの 8-ニトログアノシンが形成されていることを示唆し、また、iNOS-SW480 細胞における GFP-SeV の変異頻度の上昇と良く関連している。

### 3.5.2 GFP-SeV 変異における 8-ニトログアノシンの影響

8-ニトログアノシンのウイルス変異に与える影響を解析するために、GFP-SeV を m.o.i. = 0.1 となるように CV-1 細胞に接種し 8-ニトログアノシン存在下で 48 時間培養後、培養上清中のウイルスの変異頻度を測定した(図 3-10)。結果、8-ニトログアノシンは GFP-SeV の増殖効率に影響を与えず、それぞれの 8-ニトログアノシン濃度の中で GFP-SeV の増殖効率に大きな差は認められなかったにもかかわらず、8-ニトログアノシン濃度に比例した GFP-SeV の変異頻度の上昇が認められた。

従って、8-ニトログアノシンはウイルスに対して変異原性を発揮することが示唆された。

### 3.5.3 8-ニトログアノシン添加による GFP 遺伝子の変異パターン解析

8-ニトログアノシン処理により変異した GFP-SeV の変異パターンを検討するために、*in vivo* より得られた GFP-SeV 変異株と、さらに spontaneous な GFP-SeV 変異株から得られた GFP 遺伝子の変異パターンと比較した(表 3-2)。

様々な塩基置換が認められるが、8-ニトログアノシン処理によって生じた変異株と、*in vivo* より得られた変異株において C→U transition が特に有意に認められる。この変異パターンは spontaneous な変異ではあまり認められないことから、8-ニトログアノシンに特異的な変異パターンであることが示唆された。さらに *in vivo* より得られた変異株においても同様の変異パターンが認められることから、生体内において 8-ニトログアノシンによる変異が、実際のウイルス感染病巣において誘発されることが示唆された。

## 3.6 細胞に与えられる酸化ストレスの解析

NO は活性酸素や遷移金属イオンと反応することで、パーオキシナイトライトに代表されるような、より反応性の高いオキシダントを生じることが知られている。NO 由来

のオキシダントは生体に酸化ストレスを与え、例えばチロシンのニトロ化や核酸塩基の損傷といった様々な活性を示す。そこで常に多量の NO を産生している iNOS-SW480 細胞における NO 由来の酸化ストレスを測定した。さらに、我々はこれまで *in vitro* での系において 8-ニトログアノシンが NADPH 存在下で iNOS からのスーパーオキシド産生を促進することを見出していることから、CV-1 細胞の 8-ニトログアノシン処理により与えられる酸化ストレスの測定を行った。

### 3.6.1. iNOS-SW480 細胞における酸化ストレスの検出

ジヒドロローダミン 123 を添加した培養液で iNOS-SW480 細胞を培養した。細胞内に取り込まれたジヒドロローダミン 123 はオキシダントによりアミノ基を酸化され、ローダミン 123 に変化し蛍光を発する。その蛍光をフローサイトメトリーで測定した。すなわち、多量のオキシダントを形成した細胞ほど強い蛍光持ち、従ってピークが右側にシフトする。

培養開始10時間後の細胞を回収し解析した結果、iNOS-SW480 細胞を NOS 阻害剤である L-NMMA 存在下で培養した細胞におけるローダミン123の蛍光強度の平均は  $12.5 \pm 0.16$  であったのに対し、L-NMMA 非存在下で培養した細胞では  $26.7 \pm 0.42$  と優位にピークが右側にシフトした(図 3-11 A)。また、細胞に与えられる酸化ストレスを経時的に測定した結果、時間依存的に酸化ストレスの形成量が増加する結果が得られた(データ未提示)。これら結果は、過剰量の NO を産生する iNOS-SW480 細胞において、常に NO 産生に依存する酸化ストレスがもたらされていることを示唆している。

### 3.6.2. 8-ニトログアノシン由来の酸化ストレス産生

CV-1 細胞を 8-ニトログアノシンおよびジヒドロローダミン 123 存在下で 12 時間培養し、酸化ストレスの形成量を測定した。その結果ローダミン 123 の蛍光のピークは、8-ニトログアノシン非存在下(蛍光の平均  $8.4 \pm 0.06$ )と比較して、8-ニトログアノシン存在下で培養した CV-1 細胞(蛍光の平均  $10.2 \pm 0.17$ )において、優位に右側にシフトした(図 3-11 B)。このことは、細胞に 8-ニトログアノシンが形成されることによって、さらなる酸化ストレスが細胞にもたらされることを示唆している。

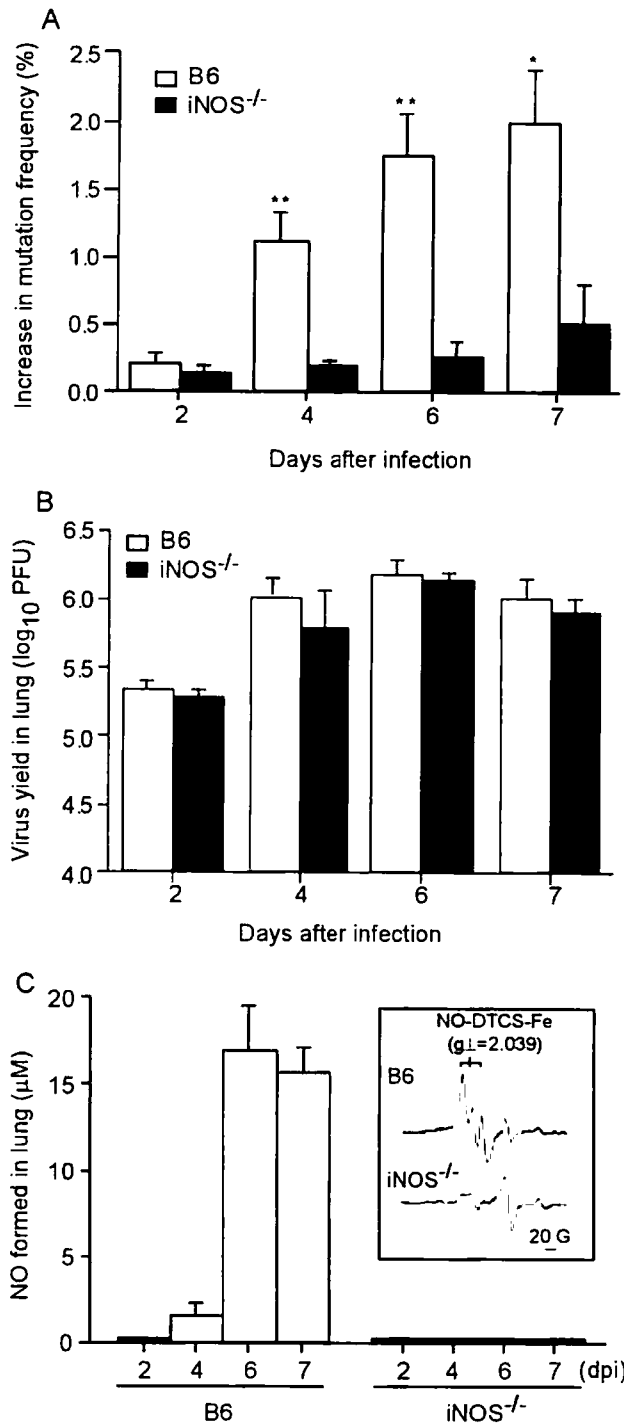


図3-1 GFP-SeV感染マウス肺炎モデルにおけるNO依存的GFP-SeV変異

A) GFP-SeV感染2、4、6、7日目の野生型およびiNOS欠損B6マウスより得られた肺内GFP-SeVの変異頻度を測定した。感染後GFP-SeVの変異頻度の上昇が認められた。(means ± SE, n=4; >500 plaques counted/ assay);  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$  (vs. iNOS欠損マウス, *t*-test)

B) 感染後、各日数における肺内ウイルス量を測定した。野生型、iNOS欠損マウスともに感染後各日数における肺内ウイルス量に差は認められなかった。 C) 野生型およびiNOS欠損マウス肺におけるNO産生量のESRによる測定。インセットは感染6日目肺内におけるNO-DTCS-Fe錯体のESRスペクトラムを示す。(means ± SE, n=3)



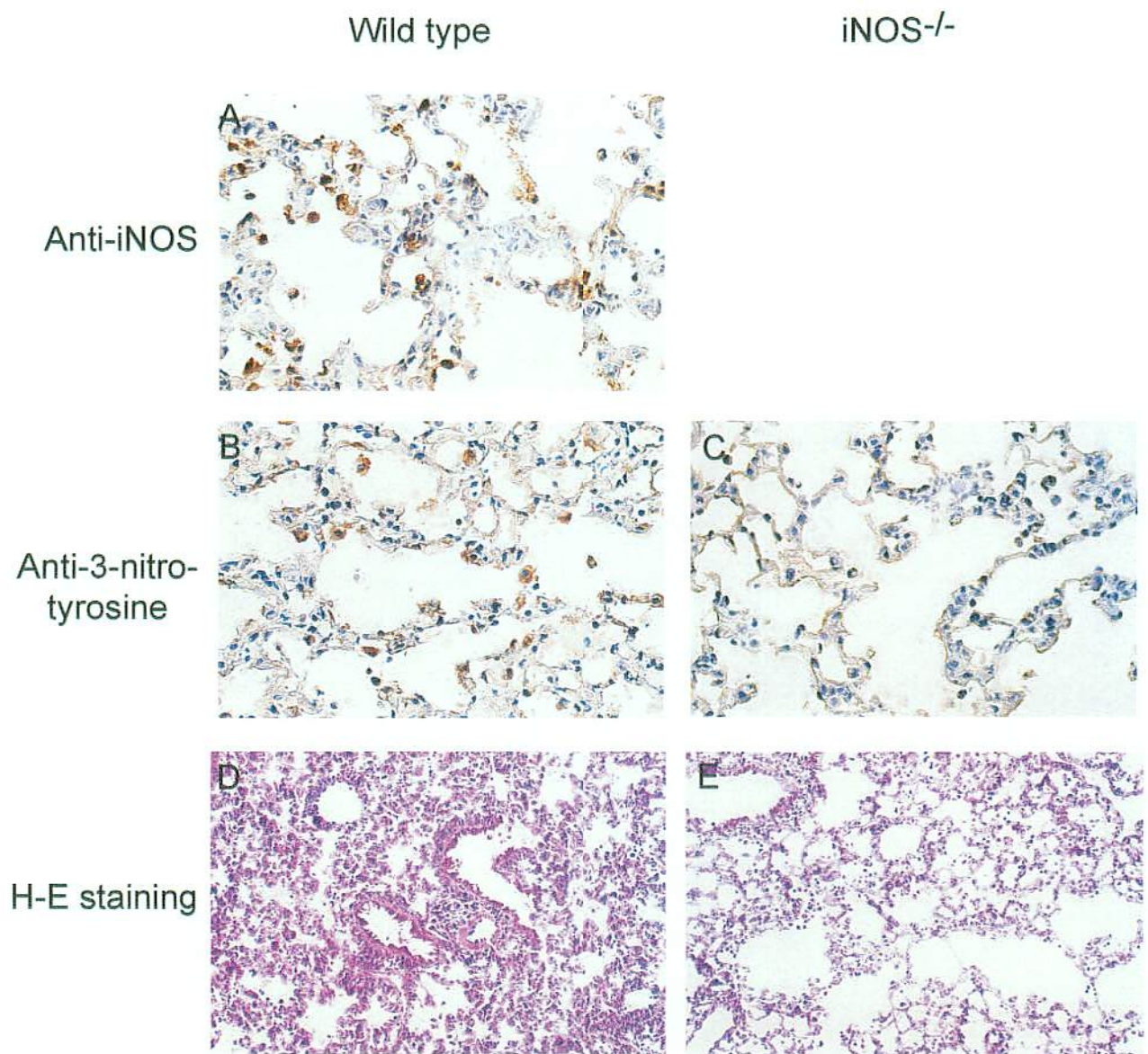


図3-2 GFP-SeV感染マウス肺のiNOSまたはニトロチロシンに対する免疫組織染色 (A-C) および野生型ならびにiNOS欠損マウスにおける肺の病理組織学的変化 (D, E)

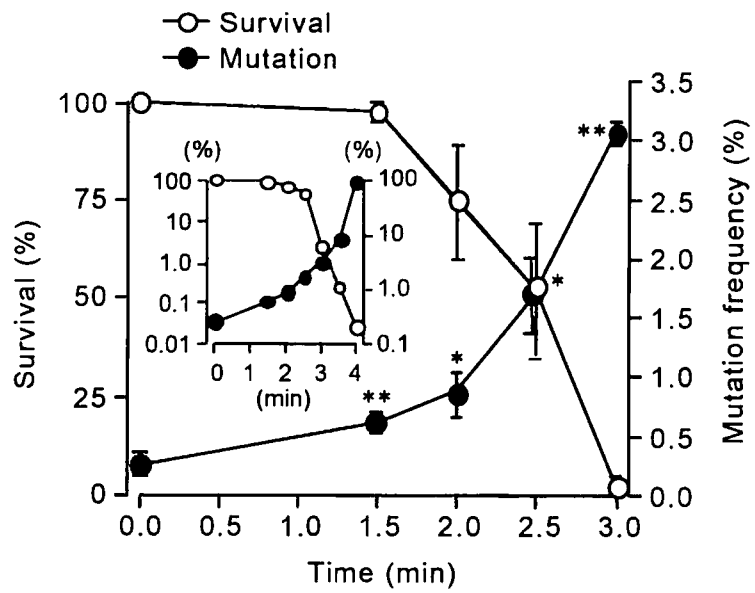


図3-3 パーオキシナイトライト処理によるGFP-SeVの変異頻度測定  
 GFP-SeVを0.8  $\mu$ Mパーオキシナイトライトのコンスタントフラックスシステムにより処理後、経時的に変異頻度を測定した。(means  $\pm$  SE, n=4; >500 plaques counted/ assay);  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$  (vs. control, *t*-test)

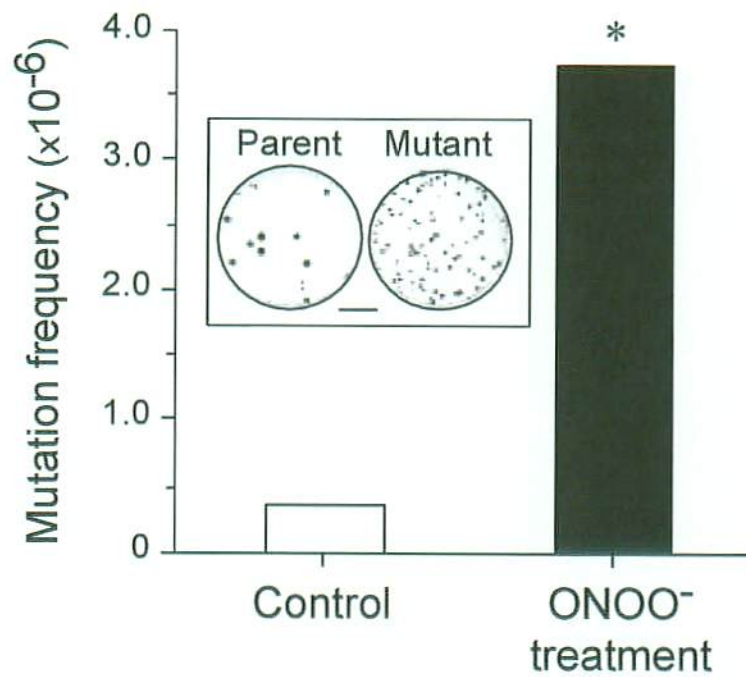


図3-4 パーオキシナイトライト処理によるSeVキモトリプシン感受性変異頻度測定

SeVを終濃度8  $\mu\text{M}$ で3回処理後にキモトリプシン存在下でプラークフォーミングアッセイを行ってキモトリプシン感受性変異頻度を測定した ( $n=3$ ;  $P<0.05$ , chi-square test)。インセットに親株と変異株のそれぞれトリプシン存在下とキモトリプシン存在下でのプラーク形成を示した (bar, 1 cm)。

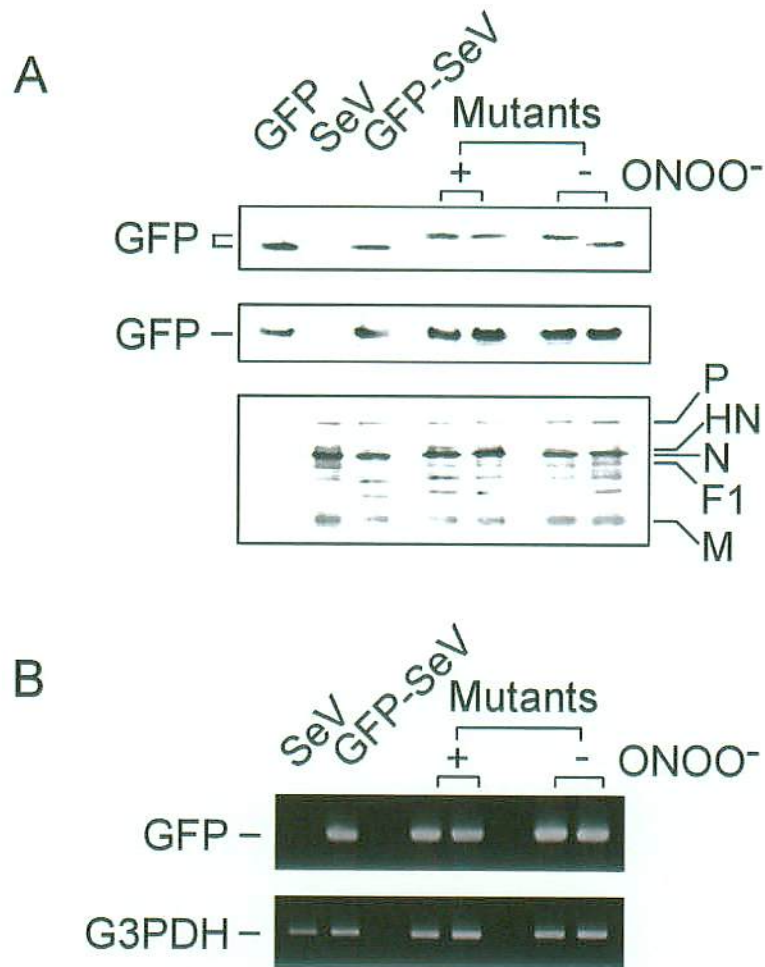
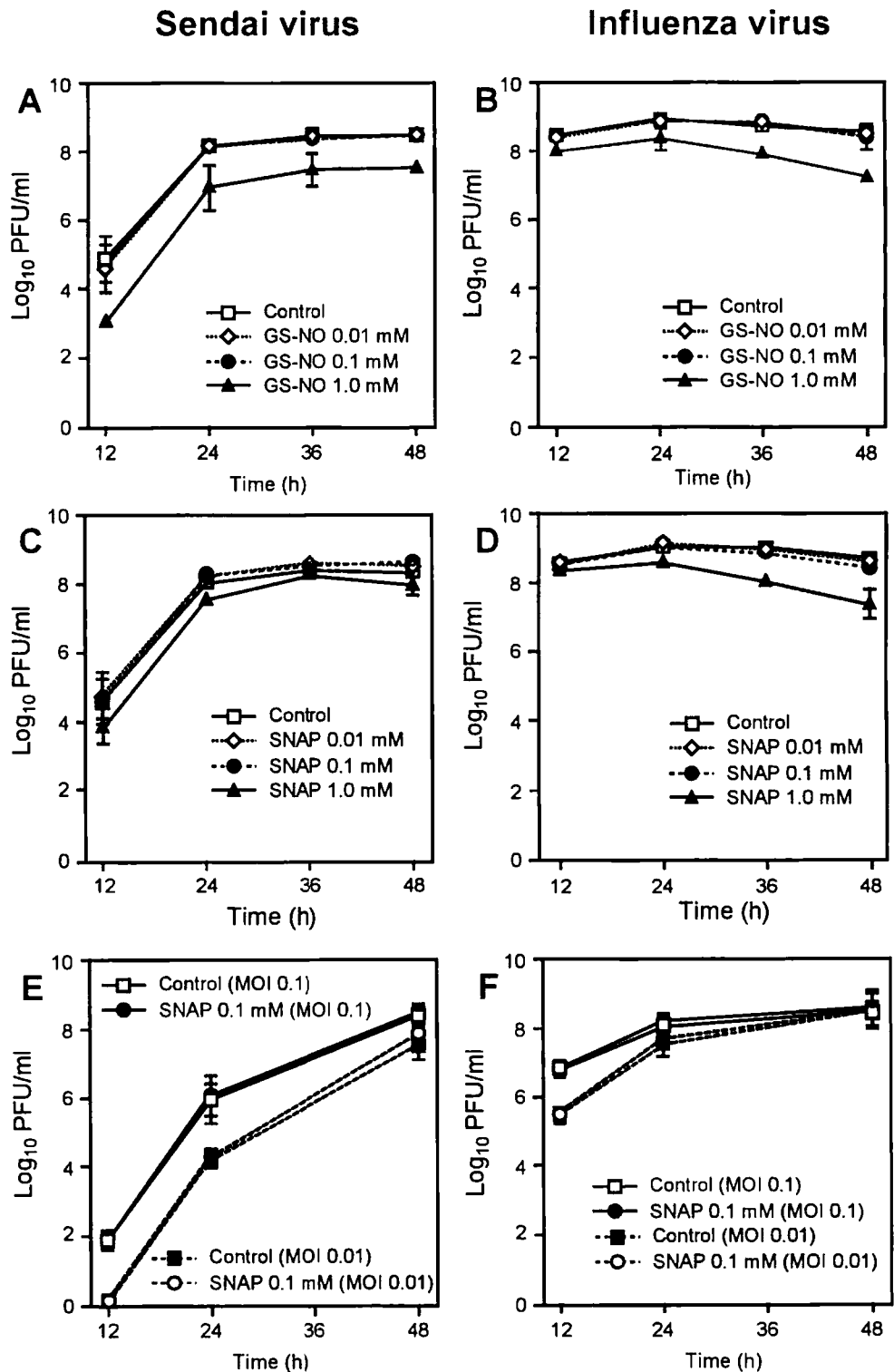


図3-5 GFP-SeVのGFPおよびウイルスタンパク質の発現

GFP-SeV感染細胞ライゼートの抗GFP抗体もしくは抗SeV抗体によるウエスタンブロットティング (A) およびGFP遺伝子のRT-PCR (B) を示した。

**Single replication**  
(m.o.i. = 3.0)



**Multicycle replications**  
(m.o.i. = 0.1 or 0.01)

図3-6 外因性NOの抗ウイルス効果の検討

センダイウイルス (A, C, E) およびインフルエンザウイルス (B, D, F) をMDCK細胞に接種直後より培養液中にNOドナーを添加しウイルスの増殖効率を経時的に測定した。センダイウイルス、インフルエンザウイルスともに生理的な濃度を放出する0.1、0.01 mM NOドナーを添加した系のウイルス増殖効率にコントロールとの差は認められなかった。(means ± SE, n=3)

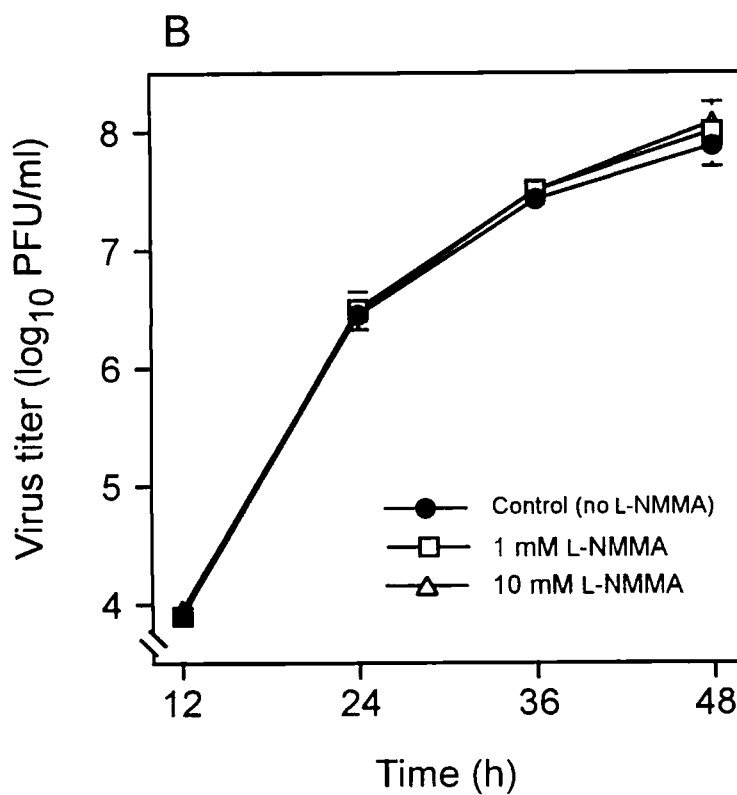
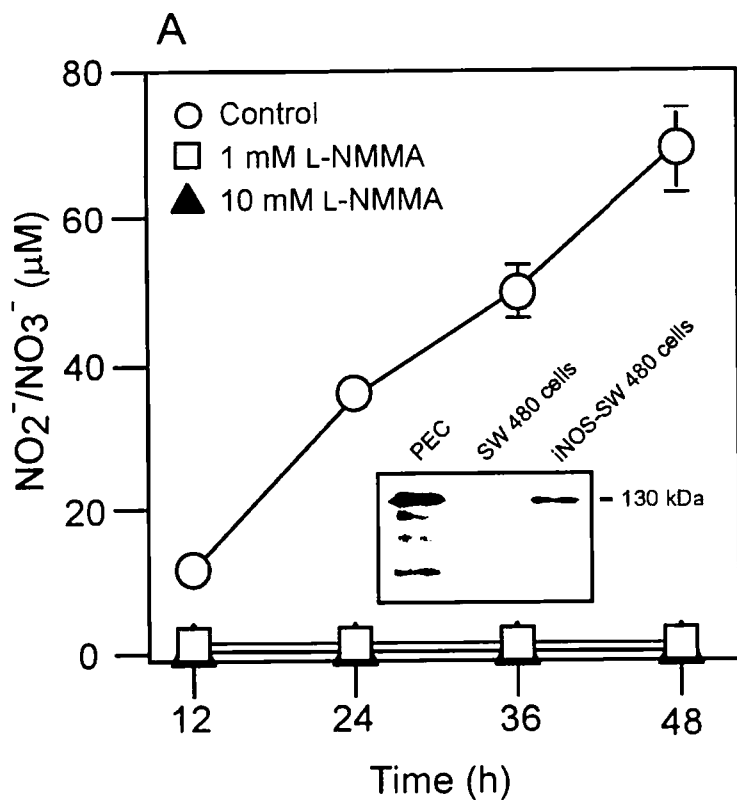


図3-7 内因性NOの抗ウイルス効果の検討

SW480細胞にラットiNOS遺伝子をトランスフェクトし恒常的にiNOSを発現する細胞を構築した。iNOS発現はウエスタンブロッティングで (A インセット)、またiNOSの活性は培養液中のNO<sub>2</sub><sup>-</sup>、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>濃度を測定して (A) 確認した。この細胞にセンダイウイルスを接種し、NOS阻害剤であるL-NMMA存在もしくは非存在下で培養し、培養液中のウイルス量を経時的に測定した (C)。(means ± SE, n=3)

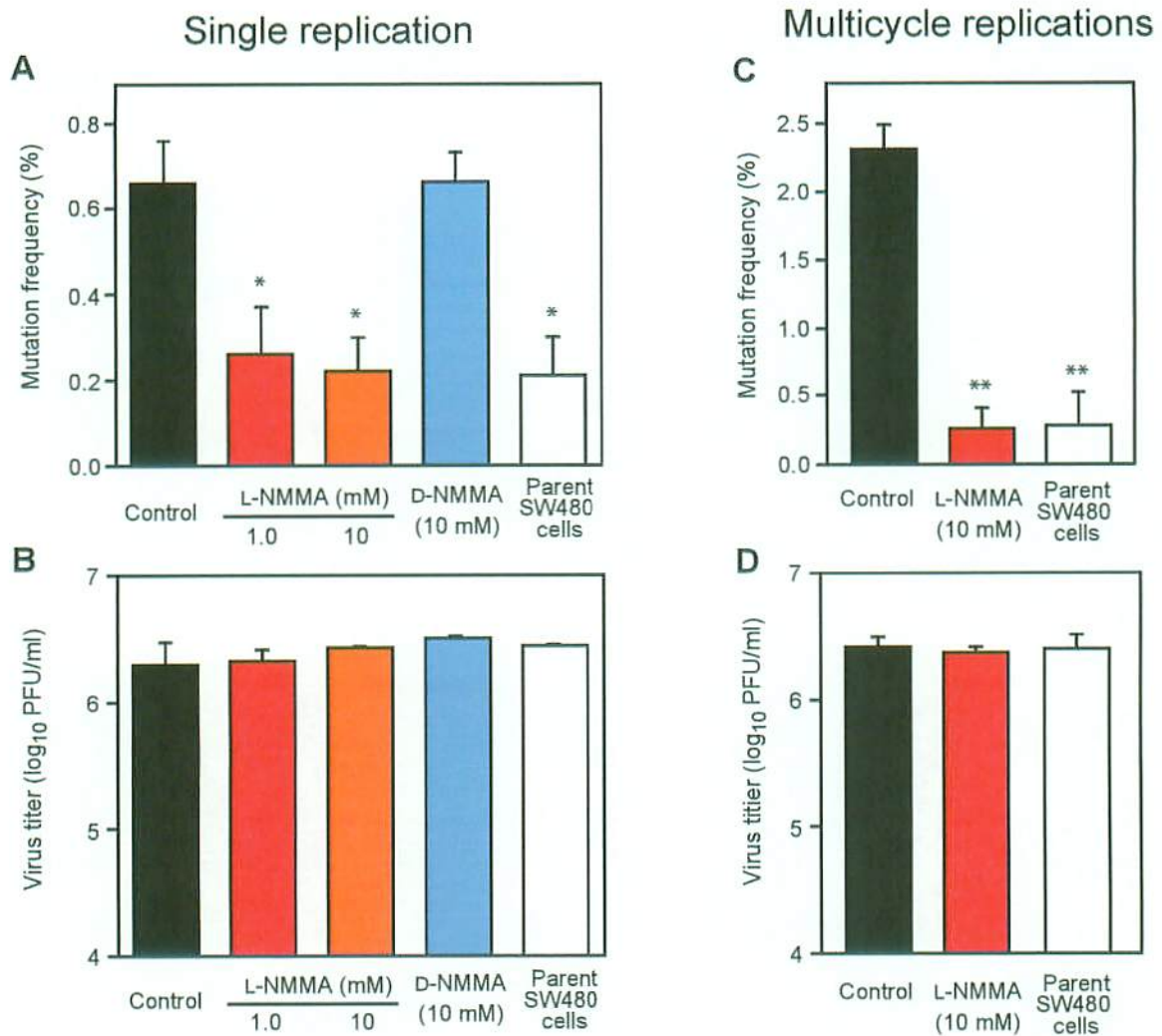


図3-8 iNOS-SW480細胞もしくはSW480細胞でGFP-SeVを増殖した時の変異頻度およびウイルス増殖効率の測定

GFP-SeVをiNOS-SW480細胞にm.o.i.=3で接種し（1回増殖）、L-NMMA存在もしくは非存在下で48時間培養後に培養上清を回収し上清中のGFP-SeVの変異頻度（A）と培養液中のウイルス量（B）を測定した。同様にiNOS-SW480細胞もしくはSW480細胞にGFP-SeVをm.o.i.=0.1で接種し（多段階増殖）、培養開始72時間後に培養上清を回収し上清中のGFP-SeVの変異頻度（C）と培養液中のウイルス量（D）を測定した。（means  $\pm$  SE, n=3; >1000 plaques counted/ assay);  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$  (vs. control and D-NMMA-treated cells)

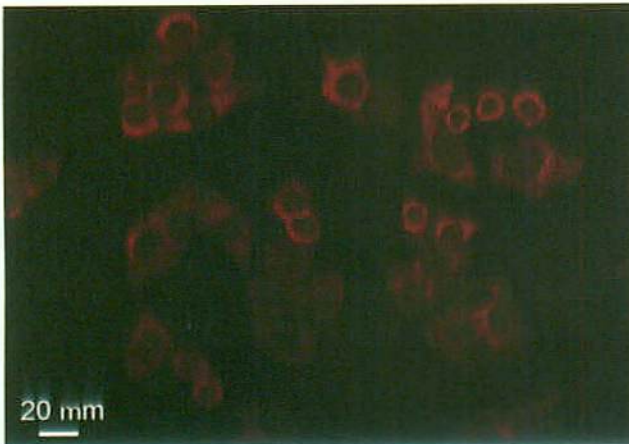
Gene	Frequency of base substitutions		Mutation rate per nucleotide generated by peroxynitrite treatment (B - A)
	Control, background (A)	Peroxynitrite-induced mutants (B)	
F protein gene (C347A)	$4.7 \times 10^{-7}$	$8.3 \times 10^{-5}$	$8.2 \times 10^{-5}$
GFP gene	$8.6 \times 10^{-6}$	$8.5 \times 10^{-5}$	$7.6 \times 10^{-5}$

表3-1 センダイウイルスのFタンパク遺伝子（内因性遺伝子）とGFP遺伝子（外来遺伝子）の変異速度比較

SeVもしくはGFP-SeVをパーオキシナイトライト処理後、キモトリプシン感受性変異株とGFP変異株を分離した。Fタンパク遺伝子とGFP遺伝子の1塩基あたりの変異速度を比較したところ、両者の変異速度に大きな差は認められなかったことから、GFP-SeVを用いた変異頻度測定はウイルス本来の遺伝子の変異を反映していることが示唆された。



SW 480 parent cells



iNOS-SW 480 cells

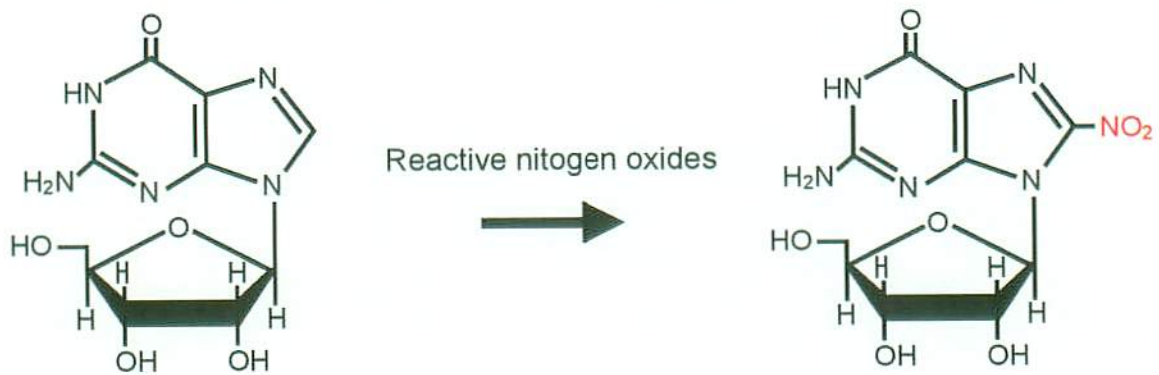
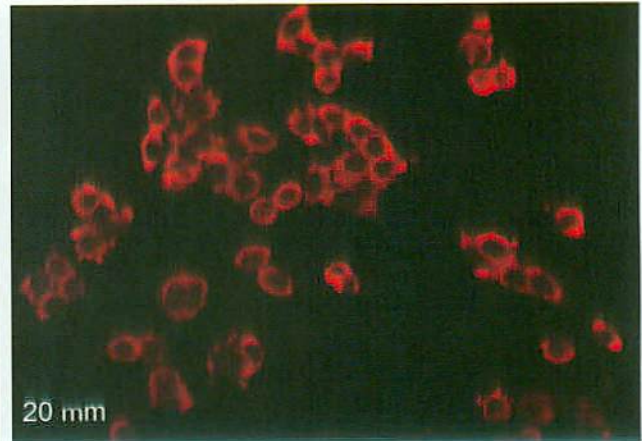


図3-9 iNOS-SW480細胞における8-ニトログアノシンの生成

iNOS-SW480細胞を抗8-ニトログアノシンモノクローナル抗体を用いて免疫組織化学的に解析した。NOを恒常的に産生しているiNOS-SW480細胞において、親株であるSW480細胞と比較して強い8-ニトログアノシンの染色像が得られた。

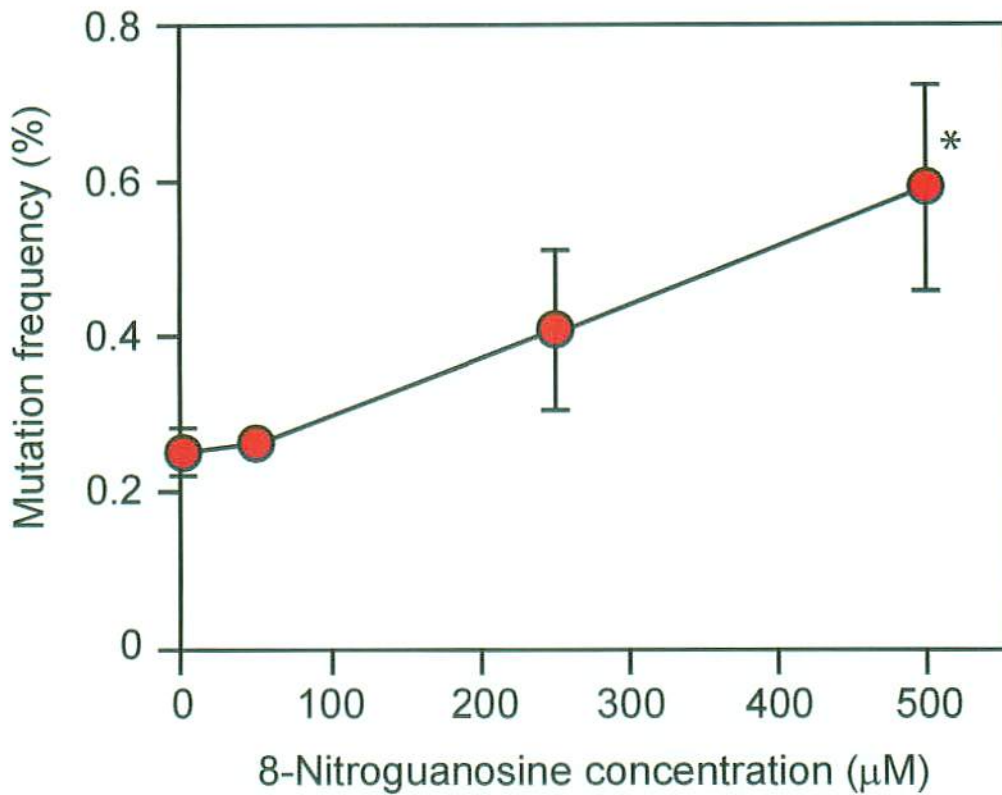


図3-10 8-ニトログアノシン依存的なGFP-SeVの変異頻度の上昇

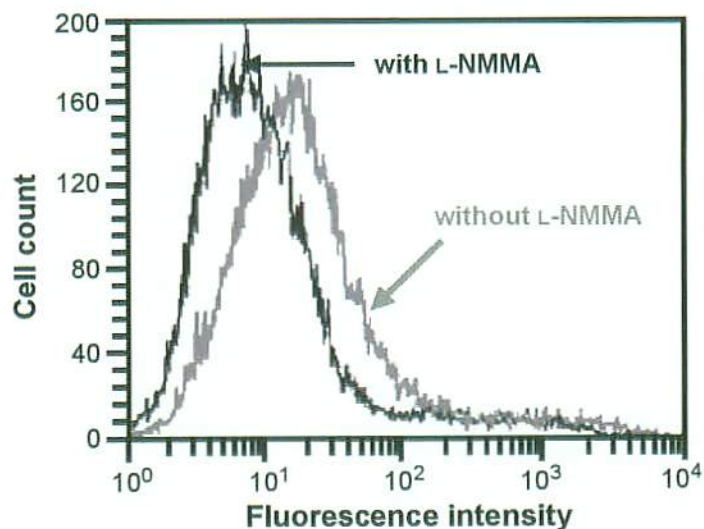
GFP-SeVをCV-1細胞に接種し、各濃度の8-ニトログアノシン存在下で72時間培養後に培養上清中のGFP-SeVの変異頻度を測定した結果、8-ニトログアノシン濃度に比例したGFP-SeVの変異頻度の上昇が認められた。(means ± SE, n=3; >1000 plaques counted/ assay);  $P < 0.05$  (vs. control without 8-nitroguanosine)

Number and frequency (%) of base substitutions			
	Mutatins from 8-nitroguanosine- treated cells (35 clones)	Mutants from lungs in vivo (29 clones)	Spontaneous mutants (32 clones)
Transition			
A→G	27 (40.9)	9 (17.0)	45 (60.0)
G→A	1 (1.5)	10 (18.9)	8 (10.7)
U→C	12 (18.2)	9 (17.0)	8 (10.7)
C→U	18 (27.3)	16 (30.2)	3 (4.0)
Subtotal	58 (87.9)	44 (83.0)	64 (85.3)
Transversion			
A→U	7 (10.6)	1 (1.9)	5 (6.7)
A→C	0	0	2 (2.7)
G→U	0	1 (1.9)	0
G→C	0	1 (1.9)	0
U→A	1 (1.5)	1 (1.9)	2 (2.7)
U→G	0	2 (3.8)	2 (2.7)
C→A	0	2 (3.8)	0
C→G	0	1 (1.9)	0
Subtotal	8 (12.1)	9 (17.0)	11 (14.7)
Total	66 (100)	53 (100)	75 (100)

表3-2 様々なGFP-SeV変異株におけるGFP遺伝子変異

マウス肺炎モデルから得られたin vivoの変異株のパターン、およびspontaneousに生じた変異株のパターンと8-ニトログアノシン処理で生じた変異株のパターンを比較した。

**A; iNOS-SW480 cells treated with L-NMMA**



**B; CV-1 cells treated with 8-nitroguanosine**

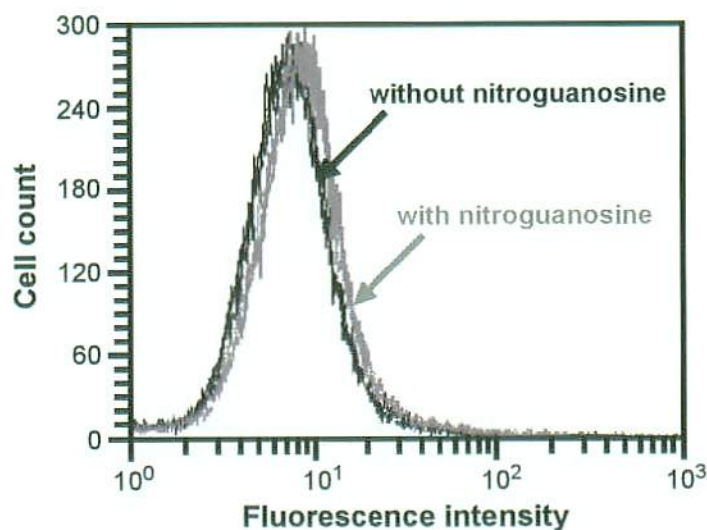


図3-11 NOもしくは8-ニトログアノシンによる酸化ストレス検出

iNOS-SW480細胞をL-NMMA存在もしくは非存在下で培養したとき (A)、およびCV-1細胞を8-ニトログアノシン存在下で培養したとき (B) に細胞に与えられる酸化ストレスを、ジヒドロローダミン123とフローサイトメトリーを用いて検出した。酸化ストレスの検出は、独立した3回の実験によって行われ、iNOS-SW480細胞ではL-NMMA非存在下、CV-1細胞では8-ニトログアノシン存在下において右にシフトしたピークが得られることから、NOや8-ニトログアノシンにより細胞に酸化ストレスが与えられることが示された。

## 第4章 考察

本研究ではウイルス感染において、感染防御反応のひとつとして生体内に産生される過剰量の NO の抗ウイルス活性の有無およびウイルス遺伝子変異原性について、iNOS 遺伝子欠損マウスと野生型マウスそして培養細胞を用いて、*in vivo* と *in vitro* の双方より解析した。特に、NO の変異原性については NO 由来の活性酸化窒素種によるグアノシンのニトロ化によって生じる 8-ニトログアノシンの役割に焦点をあて解析を行った。

### 4.1 NO の抗ウイルス活性

iNOS より産生される NO は、その発見当初より感染防御因子としての役割が注目されてきた。とくに細菌、原虫、寄生虫などの病原体に対して NO が感染防御能を持つことが示されている(Nathan, 1997)。NO の抗ウイルス活性も様々なウイルスについて解析されている。1993 年 Karupiah らはマウスポックスウイルス、ワクシニアウイルス、単純ヘルペスウイルス(HSV)-1 型の培養細胞内での複製が、NO によって抑制されることをはじめて報告した(Karupiah et al., 1993)。その後いくつかのウイルスについて NO がウイルス複製に及ぼす影響についての報告みられているが、その結果はウイルス種や *in vitro*、*in vivo* といった感染系の違い、さらには感染臓器などにより異なっており、現在も一定の見解が得られていない(Akaike and Maeda, 2000; Akaike, 2001)。

*in vitro* における NO によるウイルス複製の阻害については、マウスポックスウイルス、ワクシニアウイルス、単純ヘルペスウイルス、EB ウイルス、マウス肝炎ウイルス、コクサッキーウイルス、日本脳炎ウイルスなどが報告されている(Karupiah et al., 1993; Croen, 1993; Mannick et al., 1994; Lane et al., 1997; Lin et al., 1997; Gao et al., 1999; Saura et al. 1999)。しかし、*in vivo* の感染系における NO の抗ウイルス活性については、コクサッキー B3 ウイルス心筋症モデル、マウスサイトメガロウイルスなど限られたモデルで報告されているのみである(Lowenstein et al., 1996; Noda et al., 2001)。

その一方で、ウイルス増殖が NO 産生に依存しないという報告も多い。例えば、フラビウイルス、ワクシニアウイルス、シンドビスウイルス、およびハンタウイルスでは、ウイルス増殖は生体内における NO 産生に影響されないことが報告されている(Kreil

and Eibl, 1996; van Den Broek et al., 2000; Davis et al. 2002)。

我々はこれまでマウスのインフルエンザウイルスおよび SeV 感染モデルを用いた実験で、ウイルス感染後の肺内ウイルス量の推移に iNOS 欠損マウスと野生型マウスとの間に差は認められないことを報告している (Akaike et al., 2003)。また、同様の結果をマウスヘルペスウイルス感染脳炎モデルにおいても報告している (Fujii et al., 1999)。

本実験では、iNOS 遺伝子の欠損により、明らかな NO 産生動態の違いが認められたにもかかわらず、マウス SeV 感染モデルにおいて、野生型マウスと iNOS 欠損マウスの感染後の肺内ウイルス量に有意な差は認められなかった。さらに、NO による酸化ストレスの指標として広く用いられている 3-ニトロチロシンの肺内分布を免疫組織学的に解析した結果、SeV 感染野生型マウスにおいて、iNOS の染色像と類似した強い 3-ニトロチロシンの染色像が認められたのに対して、iNOS 欠損マウスでは 3-ニトロチロシンの顕著な染色像は認められなかった。これは、SeV 感染による免疫応答として産生される NO によって、マウス肺に多量の酸化ストレスが与えられていることを示唆している。さらに iNOS 欠損マウスと比較して、野生型マウスにおいて強い組織傷害が認められることから、これらの知見より、ウイルス感染病態において産生される多量の NO は、酸化ストレスを介して病態の像悪に関与している可能性が示唆された。

一方、培養細胞を用いた実験では、SeV およびインフルエンザウイルス感染 MDCK 細胞への NO ドナー添加による、両ウイルスの増殖効率に優位な差は認められなかった。加えて iNOS 遺伝子のトランスフェクトにより恒常的に NO を産生する iNOS-SW480 細胞による SeV 増殖においても、その増殖効率に親株との有意な差は認められなかった。

以上の結果は、RNA ウイルス、特にインフルエンザウイルスおよび SeV 感染病態において、感染防御反応の一環として産生される NO は、有効な抗ウイルス活性を発揮せず、ウイルス感染マウス肺組織切片像より、NO は逆に NO 由来の酸化ストレスを介して、細胞・組織傷害に関与することを示唆している。従って、生体における微生物感染防御システムでは、NO のような原始的な感染防御反応以外に、細胞傷害性 T 細胞や中和抗体によるウイルスクリアランス機能も存在していることから、生体におけるウイルスクリアランスは NO 以外のこれらの免疫応答が中心となって行われるものと思われる。

## 4.2 NO の変異原性について

NO の変異原性を GFP-SeV の形成するブランクの GFP の蛍光の消失を指標にして解析した結果、野生型マウスと iNOS 欠損マウスとの間で GFP-SeV の肺内ウイルス量に優位な差が認められないにもかかわらず、iNOS 欠損マウスからの GFP-SeV の変異頻度は野生型マウスと比較して優位に抑制された。

同様に iNOS 遺伝子のトランスフェクトにより、iNOS を恒常的に発現させ、NO を持続的に産生する iNOS-SW480 細胞に GFP-SeV を感染・増殖したときの変異頻度を測定した結果、GFP-SeV の変異頻度が L-NMMA による NOS 阻害により、親株である SW480 細胞で増殖させた時の値にまで抑制された。加えて L-NMMA の光学異性体であり NOS 阻害活性を持たない D-NMMA 存在下で増殖したときの変異頻度にコントロールとの差は認められなかった。

これらの結果は NO の変異原性を示唆するものである。しかしながら、NO 自体はラジカルとしては比較的安定な分子であるため、NO 自身は直接強い変異原性を発揮しないと考えられる。そこで、NO が酸素ラジカルなどと反応して形成される反応性の強い活性酸化窒素種、その中でも NO とスーパーオキシドとが直接反応して形成されるパーオキシナイトライトに注目して NO の変異原性を解析した。コンスタントフラックス法を用いてパーオキシナイトライト処理開始後から経時的に GFP-SeV の変異頻度を測定すると、パーオキシナイトライト暴露時間に伴った GFP-SeV の変異頻度の上昇が認められた。

パーオキシナイトライトは非常に強い酸化・ニトロ化作用を持ち、タンパク質、核酸および脂質の酸化あるいはニトロ化を行う。特にタンパク質のチロシン残基のニトロ化によって生じる 3-ニトロチロシンは生体内に生じる活性酸化窒素種のバイオマーカーとして幅広く用いられてきた (Kuhn et al., 2004)。また、パーオキシナイトライトにより核酸塩基のグアニンもニトロ化反応を受け、8-ニトログアニンが産生されることが報告されている。我々は SeV 及びインフルエンザウイルス感染マウス肺の抗ニトログアニン抗体を用いた免疫組織化学的な研究により、ウイルス感染病態においてマウスの気管支、細気管支上皮に 8-ニトログアニンが生成することを報告している (Akaike et al., 2003)。

そこで iNOS を発現し持続的に NO を産生する iNOS-SW480 細胞を、抗ニトログアニンモノクローナル抗体を用いて免疫組織学的に解析したところ、iNOS-SW480 細胞において parent 株と比較して強い 8-ニトログアニンの染色像が得られた。さらに

8-ニトログアノシンの変異原性を検討するために GFP-SeV を 8-ニトログアノシン存在下で増殖して変異頻度を測定した結果、8-ニトログアノシン濃度に比例した変異頻度の上昇が認められた。さらに、8-ニトログアノシン存在下で増殖して得られた GFP-SeV 変異株の変異パターンを、GFP-SeV マウス肺炎モデルから得られた in vivo での変異株のパターン、さらに 8-ニトログアノシン非存在下で増殖して偶発的に出現した GFP-SeV 変異株 (spontaneous mutants) の変異パターンとを比較した結果、様々な塩基置換が認められ、塩基置換は transition が transversion より優位に起こっていた。Transition による変異のうち特に注目されるのは、8-ニトログアノシンによって誘発された変異株と in vivo より得られた変異株において C→U transition が有意に認められたことである。C→U transition は spontaneous な変異では認められていないことから、8-ニトログアノシンに特徴的な変異パターンであることが示唆された。さらに in vivo から得られた変異株の変異パターンにおいても同様に C→U transition が有意に認められることから、ウイルス肺炎病態において、生体内で 8-ニトログアノシンによる変異が誘発されることが示唆された。

さらに iNOS-SW480 細胞に形成される酸化ストレスを検出した結果、iNOS-SW480 細胞の培養液中に NOS 阻害剤を添加することにより、細胞に与えられる酸化ストレスが有意に減少することから、iNOS-SW480 細胞は NO 由来の酸化ストレスに常にさらされていることが確認された。これにより、NO は酸化ストレスを介して変異原性を発揮している可能性が示唆された。

酸化ストレスの変異原性について Beck らは、生体の抗酸化作用に関与するグルタチオンパーオキシダーゼの構成成分であり、重要な微量原子の一つであるセレンウムを除去した飼料をマウスに与え、セレンウム欠乏マウスを作成し、コクサッキーB3 またはインフルエンザウイルス感染病態におけるセレンウム欠乏の影響を解析している (Beck et al., 1995, 2004; Nelson et al., 2001)。この中で Beck らは、セレンウム欠乏マウスにおけるウイルス遺伝子の変異とそれにともなう病態の重症化を報告している。このとき、セレンウム欠乏マウスより回収されたウイルスは、1 塩基置換により変異し、その病原性が高まっていることが明らかにされた。興味あることに、その変異パターンは特に C→U transition によるものが多く認められている (表 4-1)。この知見は、我々の 8-ニトログアノシンによる変異パターンと非常に類似しており、SeV のみならず、その他の RNA ウイルス感染症において 8-ニトログアノシンがウイルス遺伝子の変異に関与している可能性を強く示唆するものである。

8-ニトログアノシン処理によるウイルス遺伝子変異パターンは C→U transition の他



に、U→C transition も比較的多くに認められる。これら 8-ニトログアノシンによる C→U、U→C transition はどのような機序によって起こるのであろうか。SeV の遺伝情報はネガティブ 1 本鎖の RNA であるため、SeV の増幅は、ネガティブ RNA (ゲノム RNA) を鋳型としたアンチゲノム RNA の複製から始まる。細胞内でアンチゲノム RNA はメッセンジャー RNA として働き、ビリオンタンパク質を合成する。同時にアンチゲノム RNA を鋳型として子孫ウイルスゲノム RNA (ネガティブ RNA) を複製し、ビリオンタンパク質にパッケージングして増殖する。すなわち、変異が子孫ウイルスゲノム RNA に固定されるまでには 2 回の転写が行われなければならない。

C→U、U→C transition が起こるには、アンチゲノム複製時においてシトシンとウラシルがそれぞれアデニンとグアニンに変異しなければならない。これら変異が優位に起こる原因を、従来どおりに RNA ポリメラーゼの複製エラーで説明することは困難であるが、8-ニトログアニンがグアニンと認識されると同時にアデニンとしても認識されると考えると説明が可能である。すなわち、まず最初にアンチゲノム RNA の複製の際に、シトシンに相補的な塩基にグアニンが取り込まれるように、8-ニトログアニンも同様に組み込まれる。さらにこのアンチゲノムを鋳型として転写する際に 8-ニトログアニンがアデニンと誤認されることで、ウラシルが子孫ウイルスゲノム RNA に組み込まれて C→U transition が起こる (図 4-1 左)。一方 U→C transition は、アンチゲノム RNA 転写時においてウラシルに相補的なアデニンを組み込む際に、8-ニトログアニンをアデニンと誤認して組み込み、この組み込まれた 8-ニトログアニンが子孫ウイルスゲノム RNA 合成時にグアニンと認識されることによって起こることで説明される (図 4-1 右)。

一方、子孫ウイルスゲノム (粒子) 中に 8-ニトログアノシンが組み込まれた状態で出芽した場合、この状態ではまだ変異がウイルスゲノムに完全に固定されていない状態と考えられる。変異がウイルスゲノムに固定されるには、この子孫ウイルスが次世代ウイルスに複製する際に、8-ニトログアニンをアデニンと誤認し、ウラシルをアンチゲノムに組み込まれなくてはならない。この場合に起こる変異が G→A transition である (図 4-2)。このような子孫ウイルスゲノムより増幅された次世代ウイルスは、そのウイルスゲノムに G→A transition を起こしたウイルスと、変異の無いウイルスのヘテロな集団として存在する。従ってウイルスゲノム中に 8-ニトログアノシンが組み込まれた子孫ウイルスより形成されるプラークは、GFP の蛍光を持つ細胞と、蛍光を消失した細胞がモザイク状に存在するプラークを形成することになる (図 4-2)。このようなプラークは変異の無いプラークとしてカウントしている。よってこの選択により G→A transition

をもつウイルス株は塩基配列解析時に除外されてしまうために、特に、複製回数の少ない *in vitro* の細胞培養系では、G→A transition の割合が他の transition と比べて低い値を示すのではないかと推察される(表 3-3)。

このように 8-ニトログアノシン処理によるウイルス遺伝子変異パターンは、8-ニトログアニンをアデニンと誤認すると仮定すると無理なく説明できるが、本仮説を証明するためには、今後さらなる検討が必要である。

8-ニトログアノシンと酸化ストレスの相互関係を解析した結果、8-ニトログアノシンを含む培養液中で CV-1 細胞を培養することにより、CV-1 細胞に酸化ストレスが与えられることが示された。我々は以前、*in vitro* における 8-ニトログアノシンのユニークな生化学的特性として、8-ニトログアノシン添加により NADPH-P450 レダクターゼ系のスーパーオキシドの産生が増強すること、さらに NADPH および 8-ニトログアノシンの存在下において、iNOS はスーパーオキシドを産生するという報告している (Akaike et al., 2003; Sawa et al., 2003)。通常細胞内には、電子伝達系などの様々な酸化・還元に関与する反応系において、NADPH-P450 レダクターゼ系酵素が発現されていることから、CV-1 培養系への 8-ニトログアノシン添加による酸化ストレスの増加は、我々が報告した 8-ニトログアノシンのユニークな生化学的特性を支持すると同時に、培養液中に添加した 8-ニトログアノシンが細胞内に取り込まれることを示唆している。

これらの知見より、ウイルス感染による宿主応答反応によって iNOS より産生された過剰量の NO は有効な抗ウイルス活性を発揮せず、細胞にパーオキシナイトライトに代表されるような活性酸化窒素種の持つ酸化・ニトロ化ストレスを介して、細胞傷害を引き起こす事が示唆された。さらに NO 由来の活性酸化窒素種はグアノシンをニトロ化して 8-ニトログアノシンを形成し、おそらく NADPH-P450 レダクターゼ系からのスーパーオキシド産生を増強することで、細胞にさらなる酸化ストレスを与えるものと思われた。

さらに NO は、ウイルス RNA 中のグアニン残基と活性酸化窒素種とが直接反応するか、もしくは転写・複製の際に 8-ニトログアノシンがウイルスゲノム中に組み込まれることによって、ウイルス遺伝子に対して変異原性を発揮することが推察された。この NO のウイルス変異促進作用は変異ウイルス株の遺伝子変異パターンの解析により、ウイルスゲノムに生じた 8-ニトログアニンが、アデニンと誤認されることによって起こる可能性がある。以上の知見より、NO が、8-ニトログアノシン生成を介してウイルス遺伝子に対して変異原性を発揮することで、ウイルスの多様性の獲得や分子進化に関

与していることが示唆された(図 4-3)。

Number and frequency (%) of base substitutions		
	Coxsackievirus B3 <sup>a)</sup>	Influenza A virus <sup>b)</sup>
Transition		
A→G	0	1 (2.9)
G→A	2 (28.6)	6 (17.6)
U→C	0	8 (23.5)
C→U	3 (42.9)	12 (35.3)
Subtotal	5 (71.5)	27 (79.3)
Transversion		
A→U	1 (14.3)	0
A→C	0	0
G→U	0	2 (5.9)
G→C	1 (14.3)	0
U→A	0	2 (2.7)
U→G	0	4 (11.8)
C→A	0	1 (2.9)
C→G	0	0
Subtotal	2 (28.6)	9 (23.3)
Total	7 (100)	34 (100)

a) Beck M.A. et al., *Nat. Med.* (1995)

b) Nelson H. K. et al., *FASEB J.* (2001)

表4-1 セレニウム欠乏マウスウイルス感染モデルより回収された変異ウイルスの変異パターン (Beck et al., 1995; Nelson et al., 2001より)

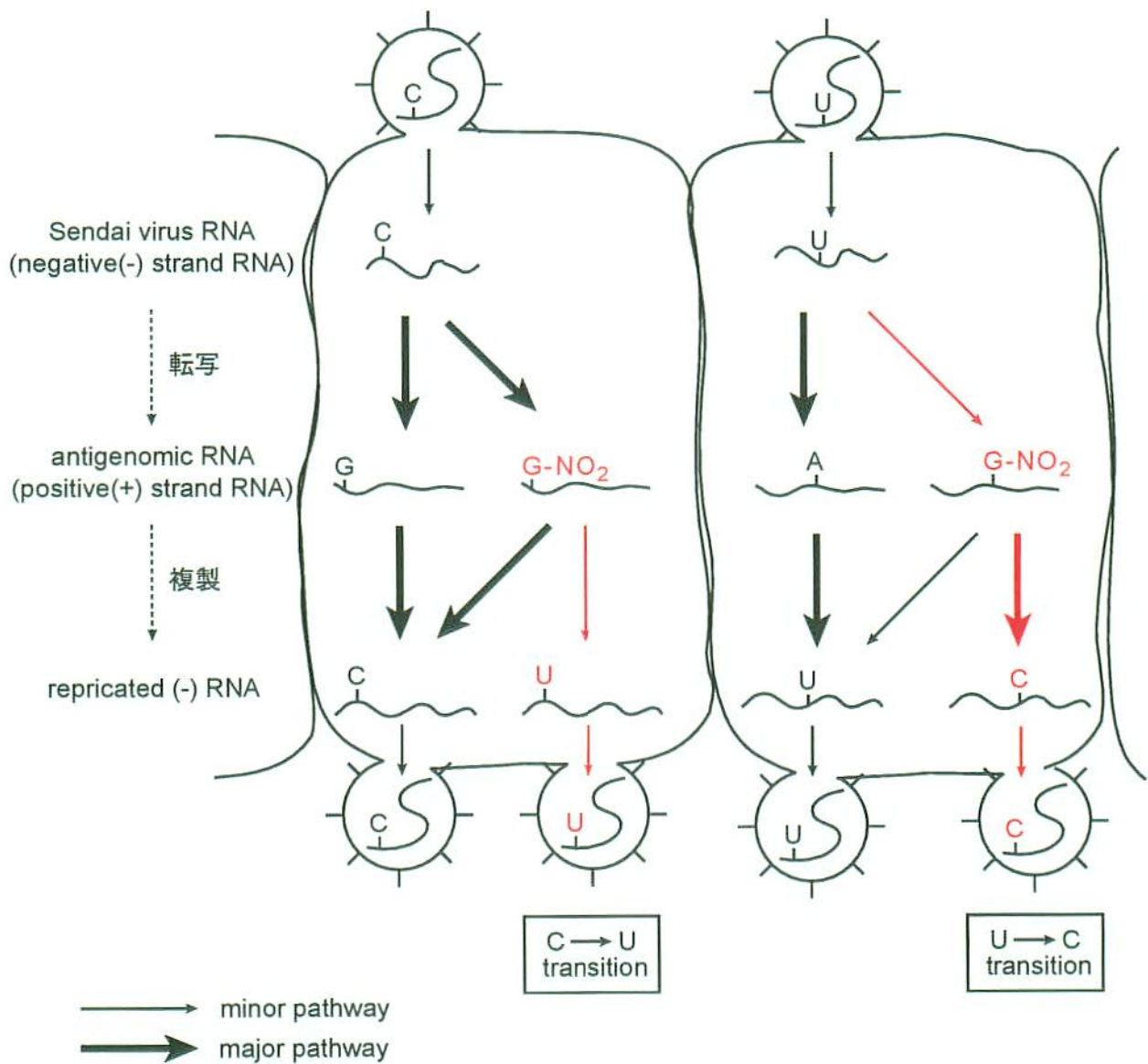
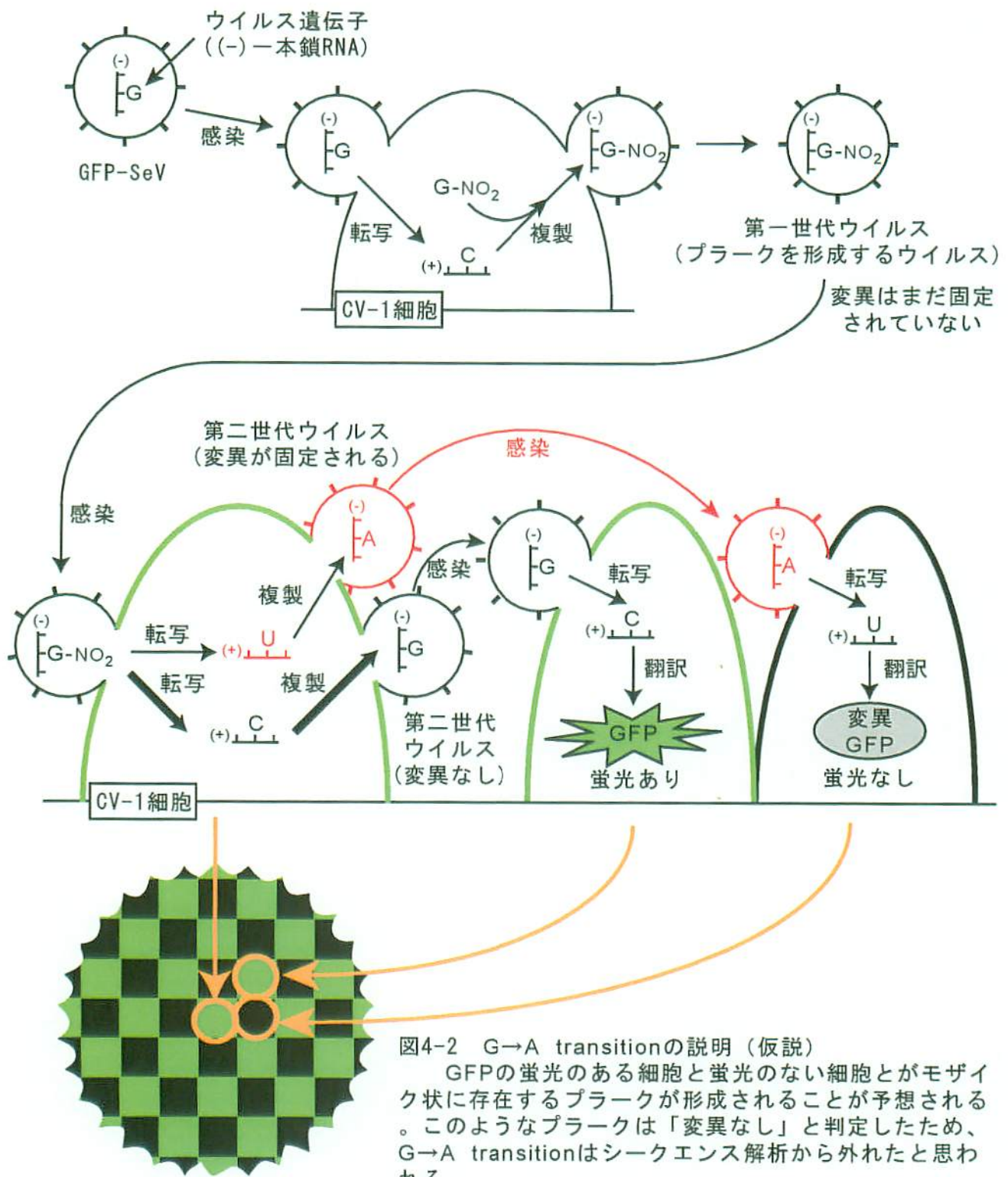


図4-1 8-ニトログアノシンによるウイルス遺伝子変異機序 (仮説)

8-ニトログアニンがアデニンと間違っ認識され変異が起こる可能性がある (赤線)。



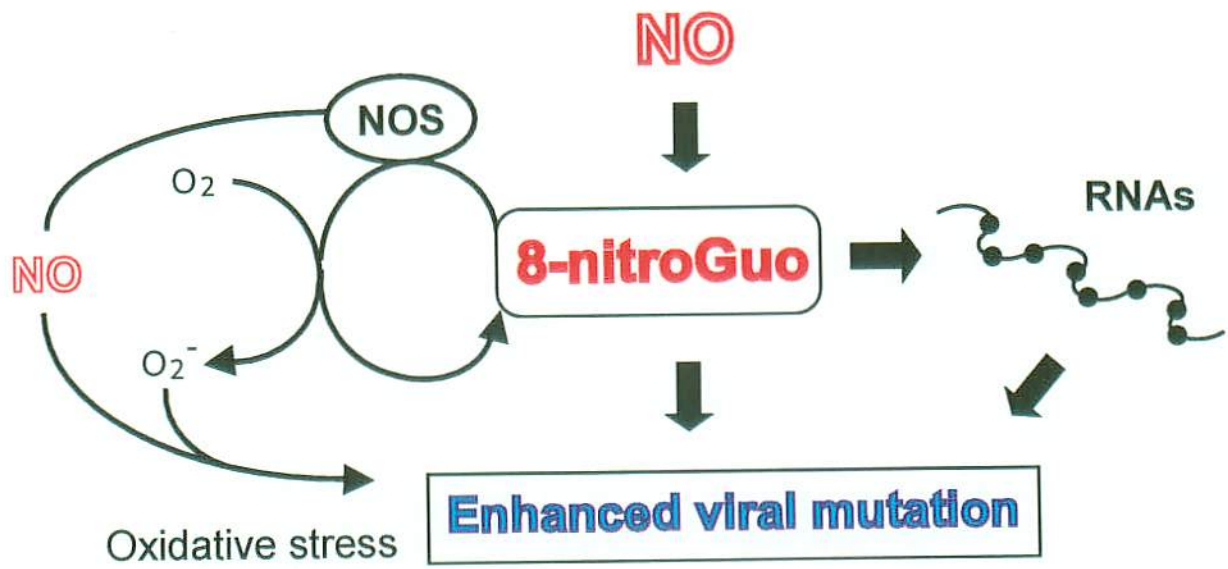


図4-3 ウイルス感染病態におけるNOの変異原性メカニズム (仮説)

## 第5章 結語

本研究により、ウイルス感染病態において、宿主応答反応のひとつとして発現される iNOS より産生された過剰量の NO は、ウイルス、特にインフルエンザウイルスおよび SeV に対して有効な抗ウイルス活性を発揮せず、逆にパーオキシナイトライトを代表とするような活性酸化窒素種を介して、細胞に酸化・ニトロ化ストレスを付加し、細胞に傷害を与えることが示された。さらに活性酸化窒素種がグアニンをニトロ化することで 8-ニトログアノシンを形成し、宿主に酸化ストレスをもたらすことが示唆された。

一方、ウイルス増殖時において、ウイルス遺伝子中のグアニン残基が活性酸化窒素種により直接ニトロ化されるか、もしくは、細胞内に生成された遊離 8-ニトログアノシン関連化合物がウイルス遺伝子増幅時に核酸中に取り込まれることによって、NO はウイルス遺伝子に対して変異原性を発揮し、ウイルスの多様性の獲得に寄与していることが推察された。

これまで、ウイルス遺伝子の変異は、RNA もしくは DNA ポリメラーゼの単純な複製エラーによって引き起こされる、偶発的な現象として理解されていた。今回の我々の知見は、ウイルス遺伝子の変異が細胞の宿主応答反応の一環として必然的に起こりうる現象であることを示した最初の報告である。今回の研究成果が、ウイルス変異と進化の分子メカニズムの解明において、新たな展開をもたらすことが期待される。



## 参考文献

**Adler H, Frech B, Thony M, Pfister H, Peterhans E, Jungi TW.** (1995). Inducible nitric oxide synthase in cattle. Differential cytokine regulation of nitric oxide synthase in bovine and murine macrophages. *J Immunol.* 154, 4710-4718.

**Adler H, Beland JL, Del-Pan NC, Kobzik L, Brewer JP, Martin TR, Rimm IJ.** (1997). Suppression of herpes simplex virus type 1 (HSV-1)-induced pneumonia in mice by inhibition of inducible nitric oxide synthase (iNOS, NOS2). *J. Exp. Med.* 185, 1533-1540

**Akaike T, Weihe E, Schaefer M, Fu ZF, Zheng YM, Vogel W, Schmidt H, Koprowski H, Dietzschold B.** (1995). Effect of neurotropic virus infection on neuronal and inducible nitric oxide synthase activity in rat brain. *J Neurovirol.* 1, 118-125

**Akaike T, Noguchi Y, Ijiri S, Setoguchi K, Suga M, Zheng YM, Dietzschold B, Maeda H.** (1996). Pathogenesis of influenza virus-induced pneumonia: involvement of both nitric oxide and oxygen radicals. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93, 2448-2453.

**Akaike T, Maeda H.** (2000). Nitric oxide and virus infection. *Immunology*, 101, 300-308

**Akaike T, Fujii S, Kato A, Yoshitake J, Miyamoto Y, Sawa T, Okamoto S, Suga M, Asakawa M, Nagai Y, Maeda H.** (2000). Viral mutation accelerated by nitric oxide production during infection in vivo. *FASEB J.* 10, 1447-1454.

**Akaike T.** (2001). Role of free radicals in viral pathogenesis and mutation. *Rev. Med. Virol.* 11, 87-101.

**Akaike T, Okamoto S, Sawa T, Yoshitake J, Tamura F, Ichimori K, Miyazaki K, Sasamoto K, Maeda H.** (2003) 8-nitroguanosine formation in viral pneumonia and its implication for pathogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100, 685-690.

**Alam MS, Akaike T, Okamoto S, Kubota T, Yoshitake J, Sawa T, Miyamoto Y, Tamura F, Maeda H.** (2002). Role of nitric oxide in host defense in murine salmonellosis as a function of its antibacterial and antiapoptotic activities. *Infect. Immun.* 70, 3130-3142.

**Balligand JL, Ungureanu-Longrois D, Simmons WW, Pimental D, Malinski TA, Kapturczak M, Taha Z, Lowenstein CJ, Davidoff AJ, Kelly RA, et al.** (1994). Cytokine-inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in cardiac myocytes. Characterization and regulation of iNOS expression and detection of iNOS activity in single cardiac myocytes in vitro. *J. Biol. Chem.* 269, 27580-27588.

**Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA.** (1990). Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87, 1620-1624.

**Beck MA, Handy J, Levander OA.** (2004). Host nutritional status: the neglected virulence factor. *Trends Microbiol.* 9, 417-423.

**Beck MA, Shi Q, Morris VC, Levander OA.** (1995). Rapid genomic evolution of a non-virulent coxsackievirus B3 in selenium-deficient mice results in selection of identical virulent isolates. *Nat Med.* 5, 433-6

**Bukrinsky MI, Nottet HS, Schmidtmayerova H, Dubrovsky L, Flanagan CR, Mullins ME, Lipton SA, Gendelman HE.** (1995). Regulation of nitric oxide synthase activity in human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected monocytes: implications for HIV-associated neurological disease. *J. Exp. Med.* 181, 735-745

**Campbell I. L., Samimi A. and Chaing C-S.** (1994). Expression of the inducible nitric oxide synthase: correlation with neuropathology and clinical features in mice with lymphocytic choriomeningitis. *J. Immunol.* 153 3622-3629

**Carp R. I., Koprowski H.** (1962). Mutation of type 3 poliovirus with nitrous acid. *Virology* 17, 99-109.

**Croen K. D.** (1993). Evidence for antiviral effect of nitric oxide. Inhibition of herpes simplex virus type 1 replication. *J. Clin. Invest.* 91, 2446-2452.

**Cunha FQ, Moncada S, Liew FY.** (1992). Interleukin-10 (IL-10) inhibits the induction of nitric oxide synthase by interferon-gamma in murine macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 182, 1155-1159.

**Davis IC, Zajac AJ, Nolte KB, Botten J, Hjelle B, Matalon S.** (2002). Elevated generation of reactive oxygen/nitrogen species in hantavirus cardiopulmonary syndrome. *J. Virol.* 76, 8347-8359.

**Fujii S, Akaike T, Maeda H. Related** (1999). Role of nitric oxide in pathogenesis of herpes simplex virus encephalitis in rats. *Virology* 256, 203-212.

**Fujisawa H, Ogura T, Hokari A, Weisz A, Yamashita J, Esumi H.** (1995). Inducible nitric oxide synthase in a human glioblastoma cell line. *J. Neurochem.* 64, 85-91.

**Gao X, Tajima M, Sairenji T.** (1999). Nitric oxide down-regulates Epstein-Barr virus reactivation in epithelial cell lines. *Virology* 258, 375-381.

**Granoff A.** (1961). Induction of Newcastle disease virus mutants with nitrous acid. *Virology* 13, 402-408.

**Holland JJ, Domingo E, de la Torre JC, Steinhauer DA.** (1990). Mutation frequencies at defined single codon sites in vesicular stomatitis virus and poliovirus can be increased only slightly by chemical mutagenesis. *J. Virol.* 64 3960-3962.

**Karupiah G, Xie QW, Buller RM, Nathan C, Duarte C, MacMicking JD.** (1993). Inhibition of viral replication by interferon-g-induced nitric oxide synthase. *Science* 261, 1445-1448.

**Koprowski H., Zheng Y. M., Heber-Kats E., Fraser N., Rorke L., Fu Z. F., Hanlon C. and Dietzschold B.** (1993). *In vivo* expression of inducible nitric oxide synthase in experimentally induced neurologic disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 3024-3027.

**Kreil TR, Eibl MM.** (1996). Nitric oxide and viral infection: NO antiviral activity against a flavivirus in vitro, and evidence for contribution to pathogenesis in experimental infection in vivo. *Virology* 219, 304-306.

**Kuhn D. M., Sakowski S. A., Sadidi M., Geddes T. J.** (2004). Nitrotyrosine as a marker for peroxynitrite-induced neurotoxicity: the beginning or the end of the end of dopamine neurons? *J. Neurochem.* 89, 529-36.

**Lane T. E, Paoletti A. D, Buchmeier M. J.** (1997). Disassociation between the in vitro and in vivo effects of nitric oxide on a neurotropic murine coronavirus. *J. Virol.* 71, 2202-2210.

**Lin YL, Huang YL, Ma SH, Yeh CT, Chiou SY, Chen LK, Liao CL.** (1997). Inhibition of Japanese encephalitis virus infection by nitric oxide: antiviral effect of nitric oxide on RNA virus replication. *J. Virol.* 71, 5227-5235.

**Lowenstein CJ, Hill SL, Lafond-Walker A, Wu J, Allen G, Landavere M, Rose NR, Herskowitz A.** (1996). Nitric oxide inhibits viral replication in murine

myocarditis. *J. Clin. Invest.* 97, 1837-1843

**Mikami S, Kawashima S, Kanazawa K, Hirata K, Katayama Y, Hotta H, Hayashi Y, Ito H, Yokoyama M.** (1996). Expression of nitric oxide synthase in a murine model of viral myocarditis induced by coxsackievirus B3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 220, 983-989

**Mannick JB, Asano K, Izumi K, Kieff E, Stamler JS.** (1994). Nitric oxide produced by human B lymphocytes inhibits apoptosis and Epstein-Barr virus reactivation. *Cell* 79, 1137-1146.

**Masuda M, Nishino H, Ohshima H.** (2002). Formation of 8-nitroguanosine in cellular RNA as a biomarker of exposure to reactive nitrogen species. *Chem. Biol. Interact.* 139, 187-197.

**Moncada S and Higgs E. A.** (1995). Molecular mechanism and therapeutic strategies related to nitric oxide. *FASEB J.* 9, 1319-1330

**Nathan C.** (1997). Inducible nitric oxide synthase: what difference does it make? *J. Clin. Invest.* 100, 2417-2423.

**Nelson HK, Shi Q, Van Dael P, Schiffrin EJ, Blum S, Barclay D, Levander OA, Beck MA.** (2001). Host nutritional selenium status as a driving force for influenza virus mutations. *FASEB J.* 10, 1846-1848.

**Noda S, Tanaka K, Sawamura S, Sasaki M, Matsumoto T, Mikami K, Aiba Y, Hasegawa H, Kawabe N, Koga Y.** (2001). Role of nitric oxide synthase type 2 in acute infection with murine cytomegalovirus. *J. Immunol.* 166, 3533-3541.

**Okamoto T., Akaike T., Nagano T., Miyajima S., Suga S., Ando M., Ichimori K. and Maeda H.** (1997). Activation of human neutrophil procollagenase by nitrogen dioxide and peroxynitrite: A novel mechanism of procollagenase activation

involving nitric oxide. *Arch. Biochem. Biophys.* 342, 261-274

**Reiter CD, Teng RJ, Beckman JS.** (2000) Superoxide reacts with nitric oxide to nitrate tyrosine at physiological pH via peroxynitrite. *J. Biol. Chem.* 275, 32460-32466.

**Saura M, Zaragoza C, McMillan A, Quick RA, Hohenadl C, Lowenstein JM, Lowenstein CJ.** (1999). An antiviral mechanism of nitric oxide: inhibition of a viral protease. *Immunity* 10, 21-28.

**Sawa T, Akaike T, Maeda H.** (2000). Tyrosine nitration by peroxynitrite formed from nitric oxide and superoxide generated by xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.* 275, 32467-32474.

**Sawa T, Akaike T, Ichimori K, Akuta T, Kaneko K, Nakayama H, Stuehr DJ, Maeda H.** (2003). Superoxide generation mediated by 8-nitroguanosine, a highly redox-active nucleic acid derivative. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 311, 300-306.

**Scheid A, Choppin P. W.** (1976). Protease activation mutants of sendai virus. Activation of biological properties by specific proteases. *Virology* 69, 265-277.

**Singer B, Fraenkel-Conrat H.** (1969). Mutagenicity of alkyl and nitroso-alkyl compounds acting on tobacco mosaic virus and its RNA. *Virology* 39, 395-399.

**Tsugita A, Fraenkel-Conrat H.** (1962). The composition of proteins of chemically evoked mutants of TMV RNA. *J. Mol. Biol.* 4, 73-82.

**van Den Broek M, Bachmann MF, Kohler G, Barner M, Escher R, Zinkernagel R, Kopf M.** (2000). IL-4 and IL-10 antagonize IL-12-mediated protection against acute vaccinia virus infection with a limited role of IFN- $\gamma$  and nitric oxide synthetase 2. *J. Immunol.* 164, 371-378.

**Yermilov V, Rubio J, Ohshima H.** (1995). Formation of 8-nitroguanine in DNA treated with peroxynitrite in vitro and its rapid removal from DNA by depurination. *FEBS Lett.* 376, 207-210.

**Yermilov V, Rubio J, Becchi M, Friesen MD, Pignatelli B, Ohshima H.** (1995). Formation of 8-nitroguanine by the reaction of guanine with peroxynitrite in vitro. *Carcinogenesis*, 16, 2045-2050.