

学 位 論 文 題 名

オーエスキー病ウイルス前初期蛋白の構造と機能

学位論文内容の要旨

オーエスキー病ウイルス(ADV)が感染した細胞において最初に発現する前初期(IE)遺伝子産物である分子量180,000ダルトンの蛋白をIE180と呼ぶ。IE180はADVの前期および後期遺伝子プロモーターに作用して転写を活性化する一方、IE遺伝子の転写を抑制する。この様に相反するそれぞれの機能ドメインを明らかにするために、一連の欠失IE遺伝子を作成した。それぞれの欠失遺伝子の発現産物が前期チミジンキナーゼ (tk) 遺伝子、後期gX遺伝子およびIE遺伝子のプロモーターに及ぼす影響をクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ発現系を用いて解析した。また、IE180が転写調節因子として機能を発揮するためには核に局在する必要がある。これらの欠失IE遺伝子を導入した細胞を蛍光抗体法によって解析し、IE180の核への局在に関与する部位を検索した。

IE180のアミノ(N)末端の132アミノ酸残基を欠失した変異体は、tkおよびgX遺伝子プロモーターに対する転写活性化作用を欠いていた。カルボキシル(C)末端379アミノ酸残基を欠失させた変異体はIE180と同様の転写活性化作用を示した。C末端側の560アミノ酸残基を欠失させた変異体には転写活性化作用を認めなかった。以上の成績から、転写増強作用に与る領域がIE180の1,460アミノ酸残基の内、1から1,081番のアミノ酸配列内に存在することが判った。

IE180のC末端側379アミノ酸残基を欠く変異体は、IE180と同様にIE遺伝子の転写を抑制した。C末端側の560アミノ酸残基を欠く変異体は、IE遺伝子の転写を抑制しなかった。IE180のN末端側の453アミノ酸残基を欠く変異体はIE180よりさらに強い転写抑制作用を示した。N末端側の617アミノ酸残基を欠失させた変異体は転写抑制作用を失った。また、C末端およびN末端

双方から各々379および453のアミノ酸残基を欠失させた変異体は強い転写抑制作用を示した。以上の成績は、IE180の454から1,081アミノ酸配列内にIE遺伝子の転写を抑制する領域が存在することを示す。

IE180の核への局在は塩基性アミノ酸から成る核移行シグナルによるものと考えられる。IE180分子には464～468番と930～934番に塩基性アミノ酸クラスター(RRKRR)が存在する。IE180のC末端側の510アミノ酸残基を欠く変異体はIE180と同様、核に局在したが、C末端側から560アミノ酸配列を欠く変異体は、核に局在しなかった。この変異体は930～934番の核移行シグナルを欠く。しかし、この変異体からC末端側をさらに271アミノ酸残基、計831アミノ酸を欠失させた変異体は核内に検出された。一方、C末端側の1,157アミノ酸残基を欠く変異体は核と細胞質の両方に検出された。この変異体は464番からのRRKRR配列を欠く。次に、各々のRRKRR配列を含む部位を欠失させた変異体を作成した。IE180の333から575番のアミノ酸配列を欠失させた変異体は核に局在した。一方、C末端側の900から950番目のアミノ酸配列を欠失させた変異体は細胞質に留まった。従って、IE180の900から950番目までのアミノ酸配列内に核への移行に関与する部位が存在すると考えられる。IE180のC末端側560アミノ酸残基を欠失させた変異体が転写調節作用を示さなかった理由は、この変異体が核に局在しなかったためであろう。

以上の成績から、IE180の転写活性化作用には、IE180のN末端に存在する34酸性アミノ酸部位、454～696番目のDNA結合ドメインおよび930～934番目の核移行シグナルが必要であること、およびIE遺伝子の転写抑制作用にはIE180の454～696番目のDNA結合ドメインおよび930～934番目の核移行シグナルが必要であることが判った。

学位論文審査の要旨

主査	教授	喜田	宏
副査	教授	橋本	信夫
副査	助教授	小野	悦郎
副査	助教授	岡崎	克則

学位論文題名

オーエスキー病ウイルス前初期蛋白の構造と機能

オーエスキー病ウイルス(ADV)の前初期蛋白(IE180)は、ADVの初期および後期遺伝子プロモーターに作用して転写を活性化する。一方、IE180は前初期(IE)遺伝子の転写を抑制する。この様に見え相反する機能に関与する部位が、IE180分子上のどこに存在するかを明らかにするために、一連の欠失IE遺伝子を作成して解析した。

欠失遺伝子が発現する変異体が初期のチミジンキナーゼ遺伝子、後期のgX遺伝子および前初期のIE遺伝子の転写に対する作用をクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ発現系を用いて解析した。その結果、1,460アミノ酸残基から成るIE180分子の、1から1,081番のアミノ酸配列内に初期および後期遺伝子の転写増強作用に与る部位が存在することが判明した。また、IE遺伝子の転写を抑制する部位は454から1,081アミノ酸配列内に存在することが明らかとなった。

ADV遺伝子の転写は核で起こるので、IE180が転写調節機能を発揮するためには翻訳後、核に移行する必要がある。欠失IE遺伝子を導入した細胞を蛍光抗体法によって解析した結果、IE180の核への移行には930から934番目までのRRKRR配列が関与することが判った。

IE180の前期および後期遺伝子の転写活性化には、そのアミノ末端に存在する34酸性アミノ酸から成る配列、454～696番目のDNA結合ドメインおよび930～934番目の核移行シグナルがいずれも必要であると考えられる。またIE遺伝子の転写抑制にはIE180の454～696番目のDNA結合ドメインおよび930～934番目の核移行シグナルが関与するものと考えられる。

以上の成績からADV遺伝子の転写調節に関与するIE180分子の機能ドメインが明らかとなった。本研究で得られた結果は、ウイルスの増殖を転写レベルで制御する戦略を開発す

るために重要な情報を提供するものである。よって、審査員一同は田原口智士氏が博士（獣医学）の学位を受けるに十分な資格を有すると認めた。