

学 位 論 文 題 名

Functional and Structural Analysis of
Pseudorabies Virus Early Protein 0

（オーエスキー病ウイルス初期蛋白質 0 の機能と構造の解析）

学位論文内容の要旨

オーエスキー病ウイルス（PRV）の初期蛋白質 0（EP0）は、単純ヘルペスウイルス 1（HSV-1）の前初期蛋白質 ICP0 と、アミノ酸配列の一部に相同性をもつ蛋白質として報告された。他のアルファヘルペスウイルスでは、水痘・帯状疱疹ウイルスの前初期蛋白質 ORF61、ウシヘルペスウイルス 1 の初期蛋白質 BICP0 およびウマヘルペスウイルス 1 の初期蛋白質 EICP0 が ICP0 相同蛋白質として知られている。これらはいずれも転写調節に関与している。しかし、EP0 の機能についてはこれまで詳細に検討されていない。本研究では、EP0 のウイルス遺伝子に対する転写調節作用とその機能ドメインおよび EP0 遺伝子の発現調節機構について検討した。

EP0 の機能を解析するために EP0 発現プラスミドを構築した。まず、EP0 の細胞内局在について間接蛍光抗体法で検討した。EP0 は、プラスミドを導入した細胞において、PRV 感染細胞におけると同様、核に局在した。次に、EP0 の PRV の前初期（IE）、初期チミジンキナーゼ（TK）および後期糖蛋白質 X（gX）遺伝子プロモーターに対する転写調節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（CAT）アッセイにより検討した。その結果、EP0 は、HSV-1 の ICP0 と同様、各遺伝子プロモーターからの転写を活性化することが明らかになった。また、前初期蛋白質 IE180 との共同作用によって、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が増強された。さらに、EP0 が精製ウイルス粒子中に存在することならびに EP0 発現プラスミドと PRV ゲノム DNA を細胞に共導入することにより、ウイルスの複製が増強されることが明らかになった。

EP0 分子上の転写調節ドメインを決定するために、種々の欠失 EP0 遺伝子を作成し、各々の遺伝子から発現される変異体の IE および TK 遺伝子プロモーターに対する転写調節作用を CAT アッセイにより検討した。アミノ末

端側から RING finger ドメインを含む領域を欠失させた変異体は、いずれのプロモーターに対しても転写活性化作用を示さなかった。一方、410 アミノ酸残基からなる EP0 のカルボキシル末端側から 167 アミノ酸残基を欠失させた変異体は、両遺伝子プロモーターに対して転写活性化作用を示したが、さらに 130 アミノ酸残基を欠失させた変異体はその作用を示さなかった。この領域は酸性アミノ酸を多く含んでおり、この酸性領域が EP0 の転写活性化作用に關与するものと推定される。以上の結果から、EP0 の転写活性化作用には、RING finger ドメインを含むアミノ末端側の 84 アミノ酸残基およびアミノ酸 114 から 243 番目までの酸性領域が必要であることが明らかになった。また、RING finger ドメインを含む 1 から 113 番目までのアミノ酸残基からなる変異体は両遺伝子プロモーターからの転写を抑制し、EP0 と共存した場合には EP0 の転写活性化作用を打ち消す性質を示した。さらに、この変異体を発現する細胞株は PRV 感染に対して抵抗性を示した。

EP0 遺伝子の発現機構を解析するために、EP0 遺伝子上流領域のプロモーター活性を CAT アッセイにより検討した。翻訳開始コドンから 213bp 上流の領域はプロモーター活性を有し、IE180 によってこのプロモーターからの転写が増強されることが明らかになった。この領域は TATA 配列を欠いているが、シス調節配列としてイニシエーター配列、IE180 および Sp1 結合部位が存在する。シス調節配列の変異体を解析した結果、このプロモーターからの基本転写および IE180 によるその活性化には Sp1 結合部位が重要であることが明らかになった。

以上の成績から、EP0 は、1) PRV の前初期、初期および後期遺伝子プロモーターを活性化する、2) IE180 との共同作用により初期および後期遺伝子プロモーターに対する作用を増強する、3) PRV ゲノム DNA からのウイルスの複製を増強する、4) PRV 粒子中に存在する、そして 5) EP0 分子上の RING finger ドメインを含むアミノ末端側の領域 (1 から 84 番目) および酸性アミノ酸を含む 114 から 243 番目までの領域が EP0 の転写活性化作用に必要であることならびに EP0 遺伝子プロモーターは IE180 によって活性化されることが明らかになった。

学位論文審査の要旨

主査	教授	喜田	宏
副査	教授	桑原	幹典
副査	教授	小沼	操
副査	助教授	小野	悦郎

学位論文題名

Functional and Structural Analysis of Pseudorabies Virus Early Protein 0

(オーエスキー病ウイルス初期蛋白質 0 の機能と構造の解析)

オーエスキー病ウイルス (PRV) の初期蛋白質 0 (EP0) は、単純ヘルペスウイルス 1 (HSV-1) の転写活性化因子である前初期蛋白質 ICP0 の相同蛋白質として報告された。しかし、EP0 の機能については不明であった。本研究では、EP0 のウイルス遺伝子に対する転写調節作用とその機能ドメインおよび EP0 遺伝子の発現機構について検討した。

まず、EP0 の PRV 遺伝子のプロモーターに対する転写調節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 (CAT) アッセイにより検討した。その結果、EP0 は、HSV-1 の ICP0 と同様、用いた遺伝子のプロモーターからの転写を活性化することが明らかになった。また、前初期蛋白質 IE180 との共同作用によって転写活性化作用が増強された。さらに、EP0 が精製ウイルス粒子中に存在することならびに EP0 発現プラスミドと PRV ゲノム DNA を細胞に共導入することにより、ウイルスの複製が増強されることが明らかになった。

次に、EP0 分子上の転写調節ドメインを CAT アッセイにより解析した。その結果、EP0 の転写活性化作用には、RING finger ドメインを含むアミノ末端側の 84 アミノ酸残基およびアミノ酸 114 から 243 番目までの酸性領域が必要であることが明らかになった。

さらに、EP0 遺伝子の発現機構を解析するために、EP0 遺伝子上流領域のプロモーター活性を CAT アッセイにより検討した。翻訳開始コドンから 213 塩基対上流の領域はプロモーター活性を有し、IE180 によってこのプロモーターからの転写が増強されることが明らかになった。

以上の成果から、オーエスキー病ウイルス初期蛋白質 EP0 の機能とその分子上のドメインが明らかになった。これらの知見は、真核細胞におけるウイルス遺伝子の

発現調節機構を理解する上で重要な情報を提供するものである。よって審査員一同は渡辺真治氏が博士（獣医学）の学位を受ける資格を有するものと認めた。