

学位論文題名

Two proline-rich nuclear localization signals in the amino- and carboxyl-terminal regions of the Borna disease virus phosphoprotein

(ボルナ病ウイルスのホスフォプロテインに認められた多数のプロリンを含む新しいカテゴリーの核移行シグナル)

学位論文内容の要旨

ボルナ病ウイルス(BDV)は、ウマおよびヒツジに進行性脳脊髄炎を起こす向神経性のエンベロープを持つウイルスである。BDV は非分節の約8.9kb のマイナス鎖の一本鎖RNAをゲノムとして持ち、少なくとも6つのORFが存在する。ゲノムの構成は、水泡性口炎ウイルス(VSV)や狂犬病ウイルスのような動物に感染するラブドウイルスに類似しているが、BDV は感染細胞の核内でウイルス複製を行う点で、これらのウイルスとは異なっている。23/24kDa のホスフォプロテイン(Pタンパク質)はオープンリーディングフレーム(ORF) II にコードされており、ORF V がコードするLポリメラーゼ(RNA依存RNAポリメラーゼ)の cofactor としてウイルスの転写や複製に機能すると考えられている。このためには P タンパク質はウイルスの転写や複製の場である核内に移行する必要がある。そこで本論文では BDV P タンパク質の核移行の機構について検討を行った。

BDV に持続感染した MDCK 細胞(MDCK/BDV)から抽出した RNA を鋳型に P タンパク質(201 アミノ酸残基)cDNA を逆転写後の polymerase chain reaction(RT-PCR)で増幅した。得られた cDNA をインフルエンザウイルスのヘマグルチニン(HA)エピトープタグを付加した形で発現する真核細胞発現ベクター-pcDL-HA に組み込み(pP-Wild)、リポフェクション法を用いて COS-7 細胞にトランスフェクションした。タンパク質の発現は、抗 BDV P タンパク質ポリクローナル抗体、抗 HA モノクローナル抗体を用いウエスタンブロット法で解析した。また、発現タンパク質の細胞内分布はウエスタンブロット法で使用した抗体を用いて間接蛍光抗体法を行い、共焦点レーザー顕微鏡にて解析を行った。一方、P タンパク質の核移行シグナルの局在は、P タンパク質のアミノ末端側あるいはカルボキシ末端側を欠損した各種変異体を作製し、同様の検討を行った。さらに、核移行に重要と考えられるアミノ酸配列の決定および核移行シグナルに必須と思われるアミノ酸残基の決定のために、当該ペプチド鎖を  $\beta$ -ガラクトシダーゼ融合タンパク質として発現するプラスミドを pRSV-LacZ に構築し、それらの細胞内発現を解析した。

P タンパク質は、MDCK/BDV 細胞の核で主にスポット状に検出された。P タンパク質は pP-Wild でトランスフェクションした COS-7 細胞においても核に限局して検出されたことから、細胞質で合成された後、他のウイルスタンパク質の介在なしに核移行することが示された。アミノ末端側あるいはカルボキシ末端側のどちらかを欠いた P タンパ

ク質各種変異体(pP-del.N18, pP-del.N40, pP-del.N82, pP-del.C117, pP-del.C148, pP-del.C182)により発現;それぞれ末端から数字で示すアミノ酸残基の位置まで欠損)は核移行能を保持していた。この結果から、Pタンパク質の核移行に必要な領域は中央部分に存在するか、あるいはアミノ末端側とカルボキシ末端側の両方に存在するかの、二つの可能性が考えられた。そこで1-41番目のアミノ酸残基をpRSV-LacZに融合させたpSRV-1/41、172-201番目のアミノ酸を融合させたpRSV-172/201、アミノおよびカルボキシ末端の両者を除去して融合させたpRSV-41/181を構築し、これらのタンパク質の核移行活性を解析した。その結果、pRSV-41/181のタンパク質は細胞質で検出されたが、pSRV-1/41とpRSV-172/201のタンパク質は核に移行した。これらの結果から、Pタンパク質の核移行シグナルはアミノ末端側とカルボキシ末端側の両方に存在し、それぞれ独立に機能しうるということが明らかとなった。さらに同様の手法により、アミノ末端側のペプチド鎖1-41を順次短縮し、18-36番目、さらに29-PRPRKIPR-36に核移行活性が認められることが明らかになった。多くの核移行シグナルでは、塩基性アミノ酸に富んだ配列が報告されている。そこでこのアミノ末端領域の32番目のアルギニンと33番目のリジンをグルタミンに置換したところ、各移行能が保持されていることが明らかとなった。この領域にはプロリンが多く含まれていた。そこで、このプロリンの重要性を明らかにするため、それぞれのプロリンをアラニンに置換して核移行能を調べた結果、29、31および35番目のプロリンが核移行活性に重要であることが判明した。一方、カルボキシ末端側では、172-193、179-201、181-193、192-201番目のアミノ酸をそれぞれ融合させると181-PPRIYPQLPSAPT-193の配列を含むものに核移行活性が認められた。このカルボキシ末端側の核移行シグナルについてもプロリンが多く含まれており、同様の検討から、182、186、189および192番目のプロリンがこの領域の核移行活性に重要であることが判明した。

Pタンパク質は単独でゲノム複製の場である核に移行する性質を持ち、その際アミノ末端側の29-PRPRKIPR-36とカルボキシ末端側の181-PPRIYPQLPSPT-193の二カ所に核移行能があることが明らかとなった。この核移行シグナル配列中にはそれぞれプロリンが3あるいは4個存在し、いずれも核移行活性に必須のアミノ酸残基であった。これまでに報告されてきた核移行シグナルは塩基性アミノ酸に富む配列と、このような特徴を持たない配列に分けられる。今回同定したプロリンに富む核移行シグナルはこれまでは報告されておらず、新しいカテゴリーの核移行シグナルと考えられる。Lipkinらは、Pタンパク質-Nタンパク質、Pタンパク質-Xタンパク質、Pタンパク質同士間の相互作用について報告しているが、Pタンパク質上のNタンパク質、Pタンパク質との結合部位と今回明らかとなった核移行シグナルとはオーバーラップしておらず、Xタンパク質との結合部位がわずかにオーバーラップしていた。したがって、ウイルス感染後にPタンパク質が2量体を形成したり、Nタンパク質あるいはXタンパク質と結合しても、その核移行シグナルは機能しうるものと推察される。ここで得られた知見は、BDVに特徴的な核内複製機序を明らかにしていく前提となる重要な知見であると考えられる。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小野江 和 則

副 査 教 授 高 田 賢 蔵

副 査 教 授 生 田 和 良

学 位 論 文 題 名

## Two proline-rich nuclear localization signals in the amino- and carboxyl-terminal regions of the Borna disease virus phosphoprotein

(ボルナ病ウイルスのホスフォプロテインに認められた多数のプロリンを含む新しいカテゴリーの核移行シグナル)

ボルナ病ウイルス(BDV)は、ウマおよびヒツジに進行性脳脊髄炎を起こす向神経性のエンベロープを持つウイルスである。BDV は非分節の約 8.9 kb のマイナス鎖の一本鎖 RNA をゲノムとして持ち、少なくとも 6 つの ORF が存在する。ゲノムの構成は、水疱性口炎ウイルス(VSV)や狂犬病ウイルスのような動物に感染するラドウイルスに類似していると思われるが、大きな違いは BDV は感染細胞の核内でウイルスの複製を行う点である。23/24kDa のホスフォプロテイン(Pタンパク質)は ORF II にコードされており、ORF V がコードする L ポリメラーゼ(RNA 依存 RNA ポリメラーゼ)の cofactor としてウイルスの転写や複製に機能すると考えられている。このためにはウイルスの転写や複製の場である核に、翻訳後のタンパク質が移行する必要がある。そこで本研究では BDV Pタンパク質の核移行の機構について検討を行った。

BDV 持続感染 MDCK 細胞(MDCK/BDV)から抽出した RNA を鋳型に Pタンパク質 cDNA 断片を RT-PCR で増幅し、真核細胞発現ベクター-pcDL-HA に組み込んだ(pP-Wild)。これを基に各種 Pタンパク質欠損体を作製した。さらに Pタンパク質の一部とβ-ガラクトシダーゼとの融合タンパク質を発現するプラスミド、および Pタンパク質の一部に置換を入れた融合タンパク質を発現するプラスミドを構築した。これらのプラスミドを COS-7 細胞に LIPOFECTAMINE (Gibco BRL)を用いてトランスフェクションし、各タンパク質の発現をウエスタンブロット法、細胞内分布を共焦点レーザー顕微鏡を用いた間接蛍光抗体法にて解析した。一次抗体として抗 BDV P 抗血清、または抗β-ガラクトシダーゼ単クローン抗体を用いた。

Pタンパク質は、MDCK/BDV 細胞の核で主にスポット状に検出され、また、pP-Wild をトランスフェクションした COS-7 細胞においても核に局限して検出されたことから、

能動的に核移行することが示された。アミノ末端側あるいはカルボキシ末端側のどちらかを欠いた P タンパク質(pP-del.N18、pP-del.N40、pP-del.N82、pP-del.C117、pP-del.C148、pP-del.C182 により発現)も核移行能を保持していた。この結果から、P タンパク質の核移行に必要な領域は中央部分に存在するか、あるいはアミノ末端側とカルボキシ末端側の両方に存在するかの、二つの可能性が考えられた。そこで単独発現では細胞質に局在するβ-ガラクトシダーゼに、各領域を融合(pRSV-1/41、pRSV-41/181、pRSV-172/201)し、核移行に必要な領域を解析したところ、1-41 番目のアミノ酸を融合させたものと 172-201 番目のアミノ酸を融合させたもので、それぞれに核移行活性が認められた。さらにアミノ末端側では 18-36 番目のアミノ酸を融合させると核移行能が見られたため、18-28 と 29-36 番目のアミノ酸に分けて解析した結果、29-PRPRKIPR-36 に核移行活性が認められた。一方、カルボキシ末端側では、172-193、179-201、181-193、192-201 番目のアミノ酸をそれぞれ融合させると、181-PPRIYQLPSAPT-193 の配列を含むものに核移行活性が認められた。このアミノ末端側およびカルボキシ末端側の核移行シグナルにはプロリンが多く含まれていた。そこで、このプロリンの重要性を明らかにするため、それぞれのプロリンをアラニンに置換して核移行能を調べた結果、アミノ末端側の核移行シグナルについては、29、31 および 35 番目のプロリンが、カルボキシ末端側では 182、186、189、および 192 番目のプロリンがそれぞれ核移行活性に重要であることが判明し、今までに例を見ない、プロリンに富む核移行シグナルであることが明らかとなった。

公開発表において、副査の高田教授から、今回使用したウイルス株の由来、核膜からの budding の有無、NLS のウイルス株間での保存状態、健常人における BDV の陽性率、人獣共通伝染病の可能性についての質問が、次いで主査の小野江教授から、NLS のペプチド構造について、BDV の細胞への侵入様式、融合部分ペプチドと実際の P タンパク質との挙動の比較についての質問がなされた。

また、副査の生田教授から、NLS が 2 カ所に局在する意義について、感染細胞と単独で発現させた P タンパク質の核内での局在の比較、NLS の同定と臨床材料の関連などについての質問がなされ、いずれの質問に対しても申請者は自らの学位論文や関連論文を引用し、おおむね妥当な回答を行った。

この論文は、新しいカテゴリーの核移行シグナルの発見として高く評価され、今後 BDV に特徴的な核内複製機序解明の重要な前提になると期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ、申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。