

論文の内容の要旨

論文題目 : **Functional Analysis of Phosphorylation Modifications within
Measles Virus Nucleoprotein and Phosphoprotein**

(麻疹ウイルスN蛋白質及びP蛋白質におけるリン酸化修飾の機能解析)

氏名 : 菅井亮宏

麻疹ウイルスの構成蛋白質に対するリン酸化修飾の研究は、1970年代後半から始められており、N蛋白質やP蛋白質へのリン酸化修飾が報告されていた。しかしながら、それらのリン酸化修飾の機能についての詳細な報告はなく、ウイルス増殖におけるリン酸化修飾の意義は長らく不明なままであった。また、同じモービリウイルス属に分類されるイヌジステンパーウイルスや牛痘ウイルス等の、動物に感染するウイルスにおいても、構成蛋白質のリン酸化とその影響については十分に解明されていない。そのため、筆者は、比較的解析が進んでいる麻疹ウイルスを用いて、N蛋白質及びP蛋白質のリン酸化修飾の役割を明らかにするため、詳細な機能解析を行った。モービリウイルス属のウイルスは、互いに多くの類似した性質を持つことから、本研究で得られた知見は、麻疹ウイルスのみならず、イヌジステンパーウイルスや牛痘ウイルス等の獣医学的に重要なウイルスにおけるリン酸化修飾について考える上でも有用であると考えられる。

CHAPTER1

P蛋白質リン酸化のウイルスRNA合成への影響の解析

麻疹ウイルス P蛋白質はウイルスゲノムの転写及び複製に不可欠な因子であり、N蛋白質と共にウイルス RNA ゲノムに結合し、ヌクレオカプシドを形成する。N蛋白質及びP蛋白質はリン酸化修飾を受けることが知られており、幾つかのウイルスでP蛋白質のリン酸化

修飾がウイルスゲノムの転写及び複製効率に影響を及ぼすことが報告されてきたが、麻疹ウイルスの P 蛋白質に関する報告はなかった。一方で、近年、当研究室では N 蛋白質のリン酸化修飾が、ウイルスゲノムの転写及び複製の効率に影響を与えることを報告した。そこで、本研究では、N 蛋白質及び P 蛋白質のリン酸化修飾とウイルスゲノムの転写複製効率の関連性について解析した。

ウイルスゲノムの転写複製と N 及び P 蛋白質のリン酸化状態との関連性を調べるため、N 蛋白質のリン酸化部位変異体 (S479A、S510A、S479A/S510A) と P 蛋白質を、L 蛋白質及びミニゲノム RNA と共に培養細胞内で共発現し ³²P 標識して、N 及び P 蛋白質のリン酸化状態を解析した。また、ミニゲノムレポーターアッセイにより転写複製活性を測定し、N 及び P 蛋白質のリン酸化状態との関連性を調べた。P 蛋白質のリン酸化部位変異体 (S86A/S151A、T49A/S86A/S151A) を用い、N 及び P 蛋白質のリン酸化状態を解析し、転写複製活性への影響を評価した。また、転写と複製のどちらが影響を受けるのか調べるため、定量 PCR によりミニゲノム RNA の転写複製産物の量を測定した。

これらの解析の結果、N-P 蛋白質間相互作用により、N 蛋白質のリン酸化状態の変化が、P 蛋白質のリン酸化状態に影響を与えることが示唆された。この N 蛋白質のリン酸化状態の変化によって影響を受ける部位は、P 蛋白質の 86 及び 151 番目のセリン残基であり、これらの部位へのリン酸化がウイルス RNA 合成を著しく阻害することが明らかとなった。また、N 蛋白質リン酸化率とウイルスゲノムの転写及び複製効率に相関性は見られなかったが、P 蛋白質リン酸化率がウイルス RNA 転写及び複製量と逆相関することが示された。定量 PCR の結果から、S86 及び S151 のリン酸化は、ウイルス RNA の転写を選択的に抑制することが示唆された。

以上の結果から、N 蛋白質のリン酸化状態はウイルスゲノムの転写及び複製効率に直接的にはなく、P 蛋白質のリン酸化状態を変化させることにより間接的に作用するものと考えられた。P 蛋白質の S86 及び S151 のリン酸化状態が高いほど転写及び複製効率が低下するという逆相関関係が見られ、S86 及び S151 へのリン酸化は P 蛋白質の活性には必要とされないが、これらのサイトへのリン酸化がウイルス RNA 転写の下方調節に働く可能性が示唆された。

CHAPTER2

組換え麻疹ウイルスによる N 蛋白質リン酸化の機能解析

麻疹ウイルスにおける N 蛋白質の主要な役割の一つは、ウイルス RNA ゲノムを物理的に被覆し保護することである。近年、当研究室では、N 蛋白質のリン酸化部位の解析を行い、主要な 2 箇所のリン酸化部位を同定し、このリン酸化修飾がミニゲノム系においてウイルスゲノムの転写及び複製の効率に影響を与えることを報告した。しかしながら、それらのリン酸化修飾が実際のウイルス増殖に与える影響は不明であった。今回、筆者はリバーシジェネティクス法によって N 蛋白質のリン酸化部位を変異させた組換えウイルスを作出し、リン酸化修飾がウイルスの増殖効率等に与える影響を解析した。

各リン酸化部位に変異を導入した組換えウイルスの力価を測定し、増殖曲線を作製した。同時に、各組換えウイルスの遺伝子発現活性を比較する為、感染細胞内の N 蛋白質量を経時的に測定した。続いて、パルスチェイスアッセイ及びヌクレアーゼ耐性試験により、N 蛋白質のリン酸化状態とウイルスゲノムの安定性の関連を評価した。

各組換えウイルスの解析により、増殖初期には野生型に比べ変異ウイルスの遺伝子発現及び増殖が上昇することが明らかとなった。また、このウイルス増殖の上昇に伴い、著しいサイトカインの誘導が見られた。一方、増殖がプラトーに達すると N 蛋白質のリン酸化状態が低いほど増殖が高いという逆相関関係が見られた。また、N 蛋白質のリン酸化率が低いほどウイルスゲノムのヌクレアーゼ耐性が増強し、安定化することが明らかとなった。

増殖初期において、リン酸化部位変異ウイルスで N 遺伝子発現上昇が見られたことから、リン酸化が何らかの機構でウイルス遺伝子の発現調節に関わる可能性が示唆された。また、増殖後期における N 蛋白質のリン酸化レベルとウイルス増殖の逆相関は、リン酸基とウイルスゲノムの電荷的反発によるゲノムの不安定化を介したものであることが推察された。更に、P 蛋白質が N 蛋白質に結合することで、N 蛋白質のリン酸化状態の低下を引き起こし、このことがヌクレオカプシド形成の効率化に寄与していることが示唆された。

CHAPTER3

新しく同定された N 蛋白質のリン酸化部位とその役割

麻疹ウイルスの N 蛋白質はウイルスゲノム RNA に結合してヌクレオカプシドを形成し、これが足場となってウイルスゲノムの転写及び複製が行われる。これまで筆者は、N 蛋白質

質の主要な二カ所のリン酸化部位について、ウイルス増殖における役割を解析してきたが、これら二カ所以外にもリン酸化部位の存在が示唆されていた。本研究では、筆者は N 蛋白質の新たなリン酸化部位を同定し、その役割を明らかにするため、機能解析を行った。

MS 解析（質量分析法）により推定リン酸化部位を絞り込み、アラニンスキャン及び³²P ラベルによってリン酸化部位を同定した。リン酸化部位を変異させた N 蛋白質を作製し、ミニゲノムアッセイによりウイルスの転写及び複製への影響を評価した。更に、P 蛋白質との相互作用への影響を共沈実験により確認した。また、電子顕微鏡による解析、密度勾配遠心法、脱リン酸化酵素を用いた解析により、リン酸化とヌクレオカプシド形成の関連性を検索した。

MS 解析の結果、リン酸化部位の候補が九カ所見つかり、アラニン置換変異体を用いた解析で、279 番目のスレオニン残基がリン酸化されていることが明らかとなった。このリン酸化部位を変異させると、N 蛋白質と P 蛋白質の相互作用には影響しなかったが、ミニゲノムアッセイにおいて転写及び複製の活性が著しく損なわれた。更に、電子顕微鏡を用いた解析において、このスレオニン残基のアラニン置換変異体はヌクレオカプシドを形成できず、異常な構造体が観察された。また、このリン酸化部位の脱リン酸化処理によって、ヌクレオカプシドの構造が不安定化することが示唆された。

N 蛋白質 279 番目のスレオニン残基のリン酸化修飾は、正常なヌクレオカプシド構造の形成に不可欠であることが明らかとなった。このリン酸化修飾は、ウイルスゲノムの転写及び複製に必須であり、ウイルスが増殖する上で非常に重要な役割を担っていると考えられる。

結び

本研究において、筆者は N 蛋白質及び P 蛋白質のリン酸化修飾が、それぞれの機能に及ぼす影響について、リン酸化部位変異体や組換えウイルスを用いることで詳細に解析してきた。その結果、P 蛋白質のリン酸化はウイルス RNA の転写制御に関与することが示唆され、N 蛋白質のリン酸化はウイルス構成蛋白質の発現量、ウイルスゲノム RNA の安定性に影響を及ぼすことが示された。また、新規に同定された N 蛋白質の N 末端側のリン酸化修飾は、ヌクレオカプシドの形成に必須であることが明らかとなった。本研究は、麻疹ウイルス構成蛋白質に対するリン酸化修飾の機能について、組換えウイルスを用いて詳細に解析を行った初めての報告であり、リン酸化修飾が持つ生物学的意義について考察する上で重要な多くの新しい知見が示された。ここで得られた知見は、麻疹ウイルスに限らず、近縁のイヌジステンパーウイルスや牛痘ウイルスといった獣医学領域で重要なウイルスを含め、広くパラミクソウイルス全般に有用な知見を与えると考えられる。