

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 菅井 亮宏

麻疹ウイルスの構成蛋白質である N 蛋白質や P 蛋白質は、リン酸化修飾を受けることが報告されていたが、それらが持つ機能についての詳細な研究はなく、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。そのため、著者は、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、リン酸化部位変異体や組換えウイルスを用いた詳細な機能解析を行った。

第一章においては、P 蛋白質のリン酸化がウイルス RNA 合成に及ぼす影響について解析がなされた。N 蛋白質及び 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可能性が示唆されていたが、はっきりとした関連性は明らかではなかった。そこで、本章では、N 蛋白質及び P 蛋白質のリン酸化部位変異体を複数作製し、それらを様々な組み合わせで用いて、N 蛋白質及び P 蛋白質のリン酸化状態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を行った。これらの解析から、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、P 蛋白質の 86 及び 151 番目のセリン残基に対するリン酸化を介してウイルス RNA 合成が著しく阻害されることが明らかとなった。また、定量 PCR の結果から、これら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、P 蛋白質の S86 及び S151 に対するリン酸化によってウイルス RNA の転写を下方調節する機構の存在が示唆された。

第二章においては、N 蛋白質に対するリン酸化の機能解析を詳細に行う為、著者はリバースジェネティクス系を用いて組換え麻疹ウイルスを作製し、N 蛋白質に対するリン酸化がウイルス増殖に及ぼす影響を評価した。始めに、各リン酸化部位に変異を導入した組換えウイルスの増殖曲線を作製し、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。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。その結果、組換えウイルスの遺伝子発現及び増殖が上昇することが示されたが、同時に著しいサイトカインの誘導が見られた。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という逆相関関係が見られた。以上より、リン酸化が何らかの機構でウイルス遺伝子発現調節に関わる可能性が示唆された。また、リン酸基とウイルスゲノムの電荷的反発がゲノムの安定性に影響することが推察された。更に、N-P 蛋白質相互作用による N 蛋白質リン酸化状態の低下は、電荷的反発を軽減しヌクレオカプシド形成の効率化に寄与すると考えられた。

第三章では、N 蛋白質の未知のリン酸化部位の探索及び同定を行い、その生化学的役割の解明を試みた。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  $^{32}\text{P}$  標識によってリン酸化部位を同定、ウイルスの転写及び複製への影響を評価した。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。その結果、279 番目のスレオニン残基が新規リン酸化部位として同定され、このリン酸化修飾が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。ヌクレオカプシド形成は、ウイルスゲノムの転写及び複製を行う為に必須であり、ウイルスが増殖する上で、このリン酸化修飾が極めて重要な役割を担っていることが示された。

本論文において、著者は N 蛋白質及び P 蛋白質のリン酸化修飾の機能について詳細な解析を行った。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、これまで殆ど未解明であった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した初めての報告であり、リン酸化修飾が持つ意義について考察する上で重要な新しい知見が数多く示された。モービリウイルス属のウイルスは、互いに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領域で重要なウイルスにおいても極めて有用であると考えられる。よって、審査委員一同は本論文が博士（獣医学）の学位論文として価値あるものと認めた。