

論文の内容の要旨

論文題目 : Analysis of Phosphorylation residues on Nipah virus nucleoprotein and role of the phosphorylation

和訳 : ニパウイルスヌクレオプロテインのリン酸化部位の同定及びリン酸化の意義の解明

指導教員 : 甲斐 知恵子 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 17 年 4 月入学

医学博士課程

病因・病理学専攻

氏名 : 黄 明姝 (Mingshu Huang)

【目的と意義】

ニパウイルス(Nipah virus, NiV) 感染症は、1998 年から 1999 年にかけてマレーシアで初めて確認された新興ウイルス感染症で脳炎症状を特徴とする高い致死率 (40%–70%) を示す。現在でもバングラデシュで毎年のように散発的に発生しておりニパウイルス感染症を引き起こす NiV は生物学的安全度レベル 4 に分類されている。

NiV はヘンドラウイルス(Hendra virus , HeV) とともにパラミクソウイルス科ヘニパウイルス属に属するマイナス 1 本鎖 RNA ウイルスで、nucleoprotein (N)、phosphoprotein (P)、matrix protein (M)、fusion protein (F)、glycoprotein (G)、large protein (L)の六つ

の構造蛋白から構成されている。その中でN蛋白はヌクレオカプシドの主要な構成タンパクで、多量体を形成してウイルスゲノム RNA を被覆し、RNA-dependent RNA polymerase である P-L 複合体と結合することによりウイルス RNA の転写・複製の足場として機能する。

ヘニパウイルス属に最も近縁であるモービリウイルス属の麻疹ウイルスではN蛋白がリン酸化されることが知られており、近年我々のグループがそのリン酸化部位の同定に成功した。さらにリン酸化によってウイルス遺伝子の転写やウイルスゲノム複製が調節される事を明らかにした。NiV の N 蛋白(NiV-N) についてはリン酸化されるかどうかについても未だ報告がない。そこで、NiV も同様の修飾をうけて機能の調節を受けているのかを明らかにするため、NiV-N のリン酸化の有無を検討し、そのリン酸化の意義を調べた。

【材料と方法】

NiV-N を COS-7 細胞で発現させた後、細胞を溶解し、塩化セシウム密度勾配遠心によりヌクレオカプシド分画として精製した。

精製した NiV-N の一部を抗原としてウサギポリクローナル抗体(anti-NiV-N)を作成した。

NiV-N のリン酸化部位の同定は、ESI-Q-TOF MS (Electrospray Ionization Quadrupole Time of Flight Mass Spectrometry) を利用した、MS/MS 測定により行った。リン酸化 NiV-N の検出は、³²P ラベル基質の存在下で COS-7 細胞で発現させた NiV-N を anti-NiV-N ポリクローナル抗体で免疫沈降し、SDS-PAGE 後オートラジオグラフィーにより行った。

NiV ゲノムの転写・複製における NiV-N リン酸化の影響を検索するために、ホタルルシフェラーゼ遺伝子を含む NiV ミニゲノム アッセイ系を用いた。ホタルルシフェラーゼ遺

伝子の両端に NiV リーダー配列およびトレイラー配列を結合した。NiV ミニゲノム cDNA を T7 プロモーター下流に連結し、*in vitro* でマイナス鎖のミニゲノム RNA を合成した。T7 RNA polymerase 発現ワクシニアウイルスを感染させた HEK 293 細胞に、ミニゲノム RNA と、T7 プロモーター下流に N、P、L 蛋白遺伝子をそれぞれ組み込んだ supporting plasmids を co-transfection して、24 時間後にルシフェラーゼ活性および転写された mRNA と複製したアンチミニゲノム RNA の量を比較した。

【結果】

COS-7 細胞で発現させた NiV-N におけるリン酸化の有無を、³²P ラベル実験により検討したところ、通常の培養条件下ではリン酸化 NiV-N は検出されなかった。しかしプロテインフォスファターゼ阻害剤であるオカダ酸を細胞培地に添加したところ、強いリン酸化シグナルが検出され、NiV-N が細胞内でリン酸化を受けていることを初めて明らかにした。さらに、培地からオカダ酸を除去するとリン酸化が速やかに消失することが分かった。このことから、NiV-N は短期間だけリン酸化を受けた後速やかに脱リン酸化されると考えられた。

精製した NiV-N は MS/MS 測定による解析の結果、NiV-N のリン酸化部位は 451 番目の Ser 残基であることが示唆され、これをアラニンに置換した変異体 NiV-N S451A を作製して ³²P ラベル実験を行ったところ、本変異体では ³²P の取り込みがみられなくなったことから確かに Ser451 が NiV-N のリン酸化部位であること、またリン酸化部位はこの Ser451 の一か所のみであることを示した。

そこで、この NiV-N のリン酸化の意義を検討するため、NiV ミニゲノム アッセイを用

いた実験を行った。NiV-N S451A と、それに加えて、疑似的な常時リン酸化体として S451 をグルタミン酸に置換した S451E も作製し、ミニゲノム アッセイを行った。その結果、NiV-N S451A を用いた場合にはルシフェラーゼ活性が wild type の場合に比べて約半分に低下した。NiV-N S451E を用いた場合ではルシフェラーゼ活性がさらに低下した。このことは NiV-N の S451 のリン酸化はウイルスゲノムの転写・複製に関与していることを示唆していた。

次にミニゲノム アッセイ後の細胞から total RNA を抽出し、ノーザンブロットにより合成されたルシフェラーゼ mRNA およびアンチミニゲノム RNA 量を比較した。その結果、NiV-N S451A および S451E とともに wild type の場合よりもルシフェラーゼ mRNA 、アンチミニゲノム RNA とともに減少していたが、S451E では S451A よりルシフェラーゼ mRNA の減少が特に顕著であった。

NiV-N は RNA-dependent RNA polymerase の構成タンパクである NiV-P と結合する。そこで S451 への変異導入による Nucleocapsid-P 蛋白複合体形成への影響を検討するため、塩化セシウム密度勾配遠心法を利用した共沈実験により検討した。その結果、Nucleocapsid 画分に含まれる P 蛋白量には変異導入による影響はみられなかった。

【考察】

プロテインフォスファターゼ阻害剤の存在下でのみ NiV-N のリン酸化が検出されることから、NiV-N は細胞内ではリン酸化されるが速やかに脱リン酸化されていることが明らかとなった。同じパラミクソウイルス科に属する Human Respiratory Syncytial Virus (HRSV) の P 蛋白もこのような極めて短時間のリン酸化修飾を受け、この場合リン酸化は

HRSV 感染早期の uncoating に関与することが報告されている。

ミニゲノム アッセイの結果、NiV-N のリン酸化部位 Ser451 のアラニンへの置換によりミニゲノムの転写・複製効率の減少がみられた。一方、常時リン酸化の疑似体である NiV-N S451E と S451A を比較すると、アンチミニゲノム RNA とルシフェラーゼ mRNA はさらに減少した。これらの結果は、NiV-N のリン酸化はウイルスゲノムの複製効率を上昇させるが、常にリン酸化された状態ではかえって転写・複製効率を減少させることを示唆しており、NiV-N のリン酸化状態がウイルス RNA の合成効率に影響を与えている可能性が考えられた。

NiV-N のリン酸化によるウイルス RNA の転写・複製の調節機序は明らかではないが、NiV-N のリン酸化部位への変異導入が Nucleocapsid-P 蛋白複合体には影響を及ぼさなかった。N-P-L 複合体のコンフォメーション変化や、宿主タンパクなど他の因子との結合状態の変化などの関与が推測される。

本研究は NiV の N 蛋白がリン酸化されていること及びその部位を同定し、ウイルス RNA の転写・複製の調節に関与していることを示した初めての報告であり、NiV の転写・複製機構の包括的な解明に有用な知見を与えるので、NiV の研究に寄与することと考えられる。