

審査の結果の要旨

氏名：黄 明姝(Mingshu Huang)

本研究はニパウイルスの N 蛋白(NiV-N)のリン酸化の有無及びリン酸化修飾の機能を解析するため、ESI-Q-TOF MS、NiV Minigenome Assay System による、リン酸化の意義の解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 普通の培養条件において、NiV-N のリン酸化シグナルは検出されなかった。一方、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。
2. 精製した NiV-N を MS/MS 解析した結果、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た。これをアラニンに置換した変異体 NiV-N S451A はリン酸化のシグナルが検出さ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。
3. Luciferase 遺伝子を Reporter 遺伝子として用いた Minigenome Assay の結果、リン酸化を起さない変異体 NiV-N S451A では Luciferase 活性が wild type の場合に比べて約半分に低下した。さらに、リン酸基の負電荷の模倣としてグルタミン酸に変異した NiV-NS451E では、Luciferase 活性がさらに低下した。このことから、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

が、常時負電荷であると、逆に転写複製が下がることが示唆された。

4. N 蛋白のリン酸化修飾によるウイルスゲノムの転写及び複製への影響を調べるため、Minigenome Assay において、Northern blotting により、antiminigenome RNA と Luciferase mRNA 量を比較した。その結果、S451A は WT より antiminigenomic RNA と Luciferase mRNA とともに同じくらい減少した。このことから、S451 のリン酸化は RNA の効率的な複製・転写に必要であると考えられたことから、次に、常時リン酸化の模倣として S451 をグルタミン酸に置換した変異体 S451E を用いて Minigenome Assay を行った。その結果、予想に反して antiminigenomic RNA と Luciferase 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。

5. N 蛋白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、CsCl 密度勾配遠心法を利用した共沈実験を行ったところ、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。

以上、本論文ではニパウイルスにおいて、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、このリン酸化がウイルス RNA の合成効率に影響を及ぼすことが示唆された。本研究はこれまで未知に等しかった、NiV の転写・複製機構の解明に貢献できるものと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。