

氏名	くり はら えい じ 栗 原 英 司
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学位記番号	薬 博 第 551 号
学位授与の日付	平成 16 年 7 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	薬学 研究科 生命薬科学 専攻
学位論文題目	狂犬病ウイルスの L タンパク質の転写後における制御について

論文調査委員 (主 査)
教授 河 合 明 彦 教授 川 寄 敏 祐 教授 伊 藤 信 行

論 文 内 容 の 要 旨

狂犬病ウイルスは哺乳動物に感染し神経病原性を持ち、いったん発病すると100%死亡するため発病予防が重要である。ウイルス曝露後の発病予防にはワクチン接種、抗血清の投与等が行われているが、接種時期が限られており高コストである。そのためより簡便かつ安価な抗ウイルス剤が求められている。狂犬病ウイルスの研究は1880年ごろ Pasteur によって始められ長い歴史があるものの分子的な機構は不明な点が多い。狂犬病ウイルスはラブドウイルス科に属し、非分節型のマイナス一本鎖 RNA を有する。狂犬病ウイルスが宿主の細胞質内に侵入すると N, P, M, G, L の 5 種類の mRNA が合成される。N タンパク質は RNA と結合してヌクレオカプシドとなり、P, L タンパク質は RNA ポリメラーゼとして働く。L タンパク質はゲノムの約半分を占める巨大なタンパク質であり、RNA 合成に関わる多くの酵素活性を有する。様々なウイルスにおいてウイルス特異的な酵素活性は抗ウイルス剤のターゲットとなりうるため、狂犬病ウイルスの L タンパク質の働きやその調節、制御についての生化学的、分子生物学的な研究は不可欠である。L タンパク質は狂犬病ウイルスの他のタンパク質と比べて極端に生成量が少なく、転写の段階の他に転写後の過程にも何らかの抑制制御のあることが示唆されている。そこで本研究では狂犬病ウイルスの L タンパク質がどのような仕組みによって制御されているのかについて探った。

第一章 狂犬病ウイルスの L タンパク質の合成における転写後の制御について

まず L 遺伝子の mRNA 量とタンパク質の量をウイルス感染細胞について調べたところ、N 遺伝子と比べて mRNA では 24 倍 (分子比)、タンパク質では 250 倍の差があった。cDNA 発現細胞において T7RNA ポリメラーゼによる転写のレベルでは N と L 遺伝子の発現時の差は 1.5 倍に過ぎなかったが、タンパク質のレベルでは 50 倍の差が見られた。これらの結果から L タンパク質では転写レベルのみならず転写段階以後にも発現抑制的な制御が存在することが示唆された。そこでこの転写後の制御がどういったメカニズムで起こっているかについてさらに詳細な解析を行った。VSV では L タンパク質の発現は P タンパク質によって安定化することが知られている。そこで L タンパク質と P タンパク質を共発現したところ、L タンパク質の安定化によって発現量は約 2 倍に上昇した。また N タンパク質をレポーター遺伝子として用いた L タンパク質との融合タンパク質の発現実験から L 遺伝子の 5' 端側、3' 端側には転写後に作用する発現抑制機構が存在することが示唆された。

第二章 狂犬病ウイルス L タンパク質の翻訳開始における制御について

次に L タンパク質の翻訳開始に注目した。L mRNA では開始コドン周辺の配列が Kozak 則に合致していなかったため改変したところ、遺伝子の発現が約 4 倍に上昇した。そして Kozak 則の不一致から開始コドンの認識が弱くリーキースキャニングが起り、26ヌクレオチド下流に存在する本来の開始コドンと読枠の異なる開始コドンから 22 個のアミノ酸からなるペプチドが翻訳されていた。また L 遺伝子は mRNA の 5' 側から 10% の領域に Kozak 則以外の制御があり、発現をさらに約 1/2 に抑えることが示唆された。狂犬病ウイルスの 5 つの mRNA の 5' 非翻訳領域における構造を調べた場合、L mRNA のみが独自の二次構造を取りうることが分かった。この二次構造があるために L 遺伝子の翻訳開始効率が低いので

はないかと考え、5'非翻訳領域を欠損させたL cDNA, ならびにGFP遺伝子の5'非翻訳領域中にL mRNAの5'非翻訳領域を挿入したcDNAを作成した。各遺伝子の発現量を比較したところ、前者では約5倍に、後者は約1/3.5に発現量が変化した。これらの結果からL mRNAの翻訳はKozak則の不一致と5'非翻訳領域の二次構造によって開始効率が約 $\frac{1}{6} - \frac{1}{8}$ になっていることが示唆された。

第三章 狂犬病ウイルスのLタンパク質に対するPタンパク質の寄与について

二章までの結果を考慮に入れてもcDNA発現系での発現量の少なさは説明しきれない。そこでLとGFPとの融合タンパク質の発現実験からL遺伝子の後半領域、即ち3078-3563, 4513-6545の領域に別の制御機構が存在することが示唆された。3078-6545を含むGFP融合タンパク質は安定性が低く、単独発現では蛍光がほとんど見えなかった。しかしPタンパク質と共発現すると発現量が増え蛍光を観察することができた。その原因はLの3078-3563の部位を含むことによってタンパク質の安定性が損なわれるが、Pタンパク質の共発現により安定性が増加し発現量が見かけ上増加したことによるもので、Pタンパク質によるLタンパク質の安定化作用の結果と思われる。Lの3078-6545, 4315-6545はPタンパク質と結合するが結合の量は異なり、3078-6545との結合はEDTAの添加によって解離した。Lタンパク質は4714-6545の領域でPタンパク質と結合することがすでに報告されているが、本研究で明らかになった安定化に関わる領域とは一致しない。そのためLタンパク質とPタンパク質の間には従来報告されている機構とは異なる、安定化に関わる相互作用が関与する可能性があると考えられる。

以上本研究によりLタンパク質は転写段階のみならず転写以後にも発現抑制されることが示された。狂犬病ウイルスのLタンパク質の機能やその調節、制御、Pタンパク質による安定化が明らかにされ、今後新規抗ウイルス剤の開発を考える上で重要な分子レベルでの基礎知識を与えると考えられる。

論文審査の結果の要旨

狂犬病ウイルスは人を含めて哺乳動物全般に感染し、一旦脳炎を発病すると治療法がなく、患者の100%が死亡する。従って、罹患動物からウイルスが伝播された時には、発病防止策が取られる。即ち、ウイルス曝露後の数日以内にワクチン接種、抗血清の投与等が行われる。しかし、接種時期が限られており、高コストでもあり、時には発症阻止効果が見られないこともあり、抗ウイルス剤の開発も求められている。

狂犬病ウイルスの研究は1880年ごろ Pasteur によって始められ長い研究の歴史があるものの分子的な機構は不明な点が多い。狂犬病ウイルスはラブドウイルス科に属し、非分節型のマイナス一本鎖RNAを有し、ウイルスが宿主の細胞質内に侵入すると、ゲノムRNAを鋳型としてN, P, M, G, Lの5種類のmRNAが合成される。Nタンパク質はRNAと結合してヌクレオカプシドとなり、P, Lタンパク質はRNAポリメラーゼとして協同的に働く。Lタンパクはゲノムの約半分を占める巨大なタンパク質であり、ウイルスRNA合成に関わる複数のウイルス特異的な酵素活性を担い、抗ウイルス剤のターゲットとなりうるが、その働きや調節、制御についての生化学的、分子生物学的な研究が遅れている。最近の研究から、Lタンパクは他のタンパク質と比べて極端に生成量が少なく、転写段階の他に転写の後にも何らかの抑制的制御の存在が示唆された。そこで著者は狂犬病ウイルスLタンパクの産生がどのような仕組みによって制御されているかを詳細に調べた。

まず第一章では、狂犬病ウイルスのLタンパク質の合成における転写後の制御の可能性を明らかにした。この目的で、ウイルス感染細胞におけるL遺伝子のmRNA量とLタンパクの量を調べたところ、N遺伝子の発現量と比べてmRNAでは24倍(分子比)、タンパク質では250倍の差があった。cDNAを用いたNとL遺伝子の発現系において、T7RNAポリメラーゼによる転写のレベルでは両者の差は1.5倍に過ぎなかったが、タンパク質のレベルでは50倍の差が見られた。これらの結果から、Lタンパク質では転写レベルのみならず転写段階以後にも発現抑制的な働きの存在することが強く示唆された。そこでこの転写後の制御についてさらに詳細な解析を行った。まず、LとPとを共発現させたところ、Pによる安定化作用によってLタンパク質の発現量は約2倍に増加した。またNタンパク質をレポーター遺伝子としてLタンパク質との融合タンパク質を発現させる実験では、L遺伝子の5'端側、3'端側のそれぞれに転写後に働く発現抑制機構の存在が示唆された。

次に、第二章では狂犬病ウイルス L タンパク質の翻訳開始における制御の可能性を調べた。L mRNA の開始コドン周辺の配列が Kozak 則に合致していなかったので合致するように改変したところ、遺伝子の発現が約 4 倍に増加した。また、Kozak 則に一致しないことからリーキスキャンニングが起りやすく、26ヌクレオチド下流に存在する別読枠の開始コドンからも22個のアミノ酸からなるペプチドが翻訳されることが強く示唆された。また L mRNA の 5' 側から10%の領域に Kozak 則以外の制御があり、発現をさらに約1/2に減少させることが示唆されたので、まず、mRNA の 5' 非翻訳領域 (5'NTR) に着目し、ウイルスの5つの mRNA の 5'NTR における二次構造の可能性を調べたところ、L mRNA のみが独自の二次構造を取りうることが分かった。この 5'NTR の二次構造形成が L mRNA の翻訳開始効率をさらに低くする可能性について、5'NTR を欠く欠損型 L cDNA、並びに GFP 遺伝子の 5'NTR 中に L mRNA の 5'NTR を挿入した組換え cDNA を作成し、それぞれの発現量を比較した。その結果、前者では約 5 倍に発現量が増加し、後者は約1/3.5に減少した。これらの結果から N mRNA と比べると、L mRNA の翻訳は Kozak 則の不一致のみならず、5'NTR の二次構造形成も加わり、全体として翻訳開始効率が約1/6-1/8に減少することが示された。

最後に、第三章では、狂犬病ウイルスの L タンパク質に対する P タンパク質の正の関与を調べた。先の二章までの結果を考慮に入れても L cDNA 発現系での発現量の少なさを説明しきれない。そこで L の断片と GFP との融合タンパク質の発現実験を行い、L 遺伝子の後半領域、即ち3078-6545の領域にも別の制御が存在することが示唆された。即ち、特に L の 3078-3653領域を含む GFP 融合タンパク質は安定性が低く、単独発現では蛍光がほとんど見えなかった。しかし、P タンパク質と共発現すると発現量が増え蛍光を観察することができた。その原因は L の 3078-3563領域を含むことによって融合タンパク質の安定性が損なわれるため、P タンパクとの共発現の場合には、P と L タンパクの結合が起り L タンパクの安定性が増し、見かけ上発現量が増加したと思われる。なお、L タンパクは4714-6545の領域で P タンパクと結合することがすでに報告されているが、本研究で明らかになった L の安定化に関わる領域とは一致せず、また P タンパクとの結合の性質が異なる (EDTA の添加によって解離した)。このことから、L と P タンパクの間には従来報告されている機構とは異なる、別の安定化に関わる相互作用の存在が強く示唆された。

以上、本研究により狂犬病ウイルスの L タンパクは転写段階のみならず、p タンパクによる安定化を含めて、転写以後にも発現が多様に制御されることが明らかにされ、今後狂犬病ウイルス特異的な酵素タンパクを標的とした新規の抗ウイルス剤の開発を考える上で有用な基礎知識を与えたとものと判断する。

よって、本論文は博士(薬学)の論文として価値あるものと認める。

更に、平成16年6月30日に論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。