

氏 名	とり うみ はる ふさ 鳥 海 治 房
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学 位 記 番 号	論 薬 博 第 711 号
学位授与の日付	平 成 16 年 5 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学 位 論 文 題 目	狂犬病ウイルスヌクレオカプシド蛋白質(N)の燐酸化と機能との関連性について
論文調査委員	(主 査) 教 授 河 合 明 彦 教 授 藤 井 信 孝 教 授 川 寄 敏 祐

論 文 内 容 の 要 旨

狂犬病は、世界的にみると流行地は広く、年間30,000～50,000人の死亡が報告されている。いったん発病すれば対症療法しか存在せず、ほぼ100%の患者が死亡するが、潜伏期間中にワクチンを接種し免疫を成立させれば発病を阻止できると考えられている。しかし、例えば動物脳乳剤で作成した危険なワクチンしか手に入らないような地域もあるように、現行のワクチンには、安全性やコストの面で問題があり、現行のワクチンの改良や新たなワクチンの開発のためにも、病原体である狂犬病ウイルスの基礎的な研究が不可欠である。

狂犬病ウイルスは、非分節型マイナス鎖 RNA をゲノムとするモノネガウイルス目に属するラブドウイルス科のウイルスであり、そのゲノム中には、N、P、M、G、L の 5 つのウイルス蛋白質がコードされている。N 蛋白質は、感染細胞内で、合成後まず分子シャペロンとして働く P 蛋白質と結合して、RNA を含まない N-P 複合体を形成し、その後、ゲノム RNA と結合してヌクレオカプシド (NC) を形成する。同じラブドウイルス科の水疱性口内炎ウイルスとは異なり、狂犬病ウイルスでは、N 蛋白質が燐酸化されるという特徴があるが、この燐酸化の仕組みや意義について、詳細は明らかではない。本研究では、狂犬病ウイルス N 蛋白質の燐酸化に焦点をあてながら、N 蛋白質及び P 蛋白質の成熟過程、ならびにそれらの機能的関連について調べた。

第一章 NC 形成時の N 蛋白質の構造変換と燐酸化との関連

N 蛋白質に対するモノクローナル抗体 #5-2-26 は、フォスファターゼ感受性のリニアエピトープを認識するため、N 蛋白質の燐酸化の研究に有用である。#5-2-26 の他に、N 蛋白質のコンフォーメーションエピトープを認識する 6 種類のモノクローナル抗体を用いて、N-P 複合体や NC との反応性を免疫沈降法で調べると、いずれも NC とは反応したが、RNA と結合していない N-P 複合体を認識しなかった。なお #5-2-26 以外の 6 種類のモノクローナル抗体は、燐酸化部位である 389 位のセリンをアラニンに置換した N 蛋白質 (N-S389A) とともにフォスファターゼ処理した NC とともに反応した。この中の一つ #1-7-11 を代表としてさらに解析した。その結果、#1-7-11 が N-P 複合体と反応しないのは、そのエピトープ部位が P 蛋白質結合により隠されるからではなく、エピトープが形成されていないか、あるいは、エピトープ部位が N 蛋白質内部に隠れているからと推測され、N-P 複合体を構成する N 蛋白質と NC を構成する N 蛋白質とでは立体構造が異なることが示唆された。また、#5-2-26 は、N-P 複合体を SDS で変性させた場合も N 蛋白質を認識しなかったため、N-P 複合体においては N 蛋白質は燐酸化されていないことが示唆された。一方、非変性条件下で NC から外した N 蛋白質が #1-7-11 と反応しなかったことから、NC から外れると N 蛋白質は NC 形成前に近い構造に戻ってしまうことが示され、NC から外した N 蛋白質は燐酸化されているはずなのに #5-2-26 とともに反応しなかったため、NC 形成前には、燐酸化されるべき部位も内側に隠れていることが示唆された。さらに、燐酸化部位に変異を入れた N 蛋白質も、正常な N 蛋白質同様に NC に組み込まれたため、NC 形成までの過程には N の燐酸化は不必要であることが確認された。

第二章 NC 形成時の P 蛋白質の構造変換と NC 結合との関連

NC 形成時に N 蛋白質の構造変換に伴って P 蛋白質の構造も変換する可能性や、その際の N 蛋白質との相互作用の変化

について、P 蛋白質のリニアエピトープを認識するモノクローナル抗体 #402-13 を用いて調べた。まず、発現系 P 蛋白質との反応性を調べると、#402-13 はウエスタンブロットではポリクローナル抗体同様反応するのに、免疫沈降法では殆ど反応しないことから、エピトープ部位が表面に露出する条件があると思われた。次に、N-P 複合体や NC 上の P 蛋白質の構造を、402-13 エピトープ形成を指標として免疫沈降法で調べると、NC 上の P 蛋白質とは反応したが、N-P 複合体とは殆ど反応しなかった。また、N-P 複合体や NC から外した P 蛋白質とも殆ど反応しなかった。これらの結果から、分子シャペロンとして N-P 複合体を形成している P 蛋白質では 402-13 エピトープが隠れており、NC 形成時に 402-13 エピトープを露出させるような構造に変換することが示唆された。

種々の欠損変異 P 蛋白質を用いて調べると、402-13 エピトープは全長 297 アミノ酸のうちの C 末端 256 位～297 位のアミノ酸領域に存在していた。この領域は NC 結合 P 蛋白質の表面に露出しているが、1994 年に Fu らによって NC 結合に必要と報告された部位と重なる。しかし、近年 Jacob らによって 209 位～215 位のアミノ酸領域が NC 結合部位だと報告された。これらの矛盾を解決するため、我々の N+P 同時発現系で結合部位を調べると、P 蛋白質の N 末側に N-P 複合体形成に関わる領域があること、また、402-13 エピトープ部位は直接の NC 結合領域ではないが NC 結合に必要であることが確認され、直接の NC 結合領域は 209 位～215 位のアミノ酸領域であると推測された。また、402-13 エピトープが表面に露出することが、結合部位が N 末側から C 末側へ変換することに関わると考えられる。

第三章 N 蛋白質の磷酸化と P 蛋白質の NC 結合との関連

NC 形成時に N 蛋白質が構造変換し磷酸化され、また、P 蛋白質も構造変換し結合部位も入れかわることから、P 蛋白質の NC 結合に N 蛋白質の磷酸化が何らかの関わりを持つと考えられ、この可能性について検討した。まず、NC をフォスファターゼ処理すると P 蛋白質の結合が大きく減少したので、N 蛋白質あるいは P 蛋白質の磷酸化が、P 蛋白質と NC との結合に関わることが示された。次に、磷酸化部位に変異を入れた N 蛋白質 N-S389A を用いて、同時発現系で N 蛋白質と P 蛋白質との結合を免疫沈降法で調べると、抗 N 蛋白質ポリクローナル抗体では共沈する P 蛋白質の量に大きな差は見られなかったが、NC のみと反応する #1-7-11 を用いると、N-S389A と共沈する P 蛋白質の量は非常に少なかった。また、正常な P 蛋白質の代わりに、N-P 複合体を形成できない N 末欠損変異 P 蛋白質を用いると、抗 N 蛋白質ポリクローナル抗体でも #1-7-11 でも、N-S389A と共沈する P 蛋白質の量は非常に少なくなった。これらの結果から、N 蛋白質の磷酸化が、P 蛋白質の NC 結合に関与していることが示唆された。

#402-13 で N 蛋白質の共沈を調べた場合も P 蛋白質と共沈する N-S389A の量は少なかった。しかし、#402-13 により沈降される P 蛋白質は、N-S389A との同時発現系でも作られたので、N 蛋白質の磷酸化は P 蛋白質の構造変換に不可欠ではないと考えられた。続いて、NC 結合部位欠損 P 蛋白質と N-S389A との同時発現系で、P 蛋白質の結合様式の変化が起こるかどうか調べると、NC 結合部位欠損 P 蛋白質と N-S389A とで形成していた N-P 複合体は、NC 形成時の結合部位変換によって解離することが確認されたので、N 蛋白質の磷酸化は P 蛋白質の結合部位変換には不可欠ではないと考えられた。このように、N 蛋白質の磷酸化は、P 蛋白質の構造変換にも結合部位変換にも不可欠ではないが、構造変換した P 蛋白質と NC との結合を強固にする働きを持つことが示唆された。

以上のように、本研究により、まず、NC 形成時に N 蛋白質の構造が変わって磷酸化部位が露出し、それによって N 蛋白質が磷酸化されることが示唆された。同時に、P 蛋白質も構造変換し、N 蛋白質との結合部位も N 末側から C 末側へ変わることが示唆された。さらに、これらの P 蛋白質の変化には N 蛋白質の磷酸化は不可欠ではないが、P 蛋白質の C 末側と NC との強固な結合には必要であると示唆された。NC 上で P 蛋白質は L 蛋白質と共に RNA 合成を担うので、N 蛋白質の磷酸化により P 蛋白質が NC と強く結合した結果 RNA 合成が誘導されると考えられ、本研究の成果は、ウイルス特異的プロセスの解明と併せて、N 蛋白質の磷酸化あるいは P 蛋白質の NC 結合を標的とした抗ウイルス薬開発の可能性を示唆する。

論文審査の結果の要旨

狂犬病は治療薬がなく一旦発病すると 100% の患者が死亡し、毎年 3 ～ 5 万人の死亡が報告されている。比較的長い潜伏期間中にワクチンを接種することで発病を阻止できると考えられているが、流行地のワクチンには、安全性やコストの面で

問題があり、予防的には使われていない。狂犬病の治療薬の開発やワクチン問題の解決のためにも、病原体である狂犬病ウイルスについて理解を深めることが必要であるが、基礎的な研究は遅れている。

狂犬病ウイルスのゲノムは、N、P、M、G、Lの5つのウイルス蛋白質をコードしている。これらの内、分子シャペロンとして働くP蛋白質は、合成されたばかりのN蛋白質を助けてゲノムRNAと正しく結合させ、ヌクレオカプシド（NC）を形成させる。狂犬病ウイルスのN蛋白質は磷酸化されるという特徴をもつが、磷酸化の仕組みや意義、P蛋白質との関連性等の詳細は明らかではない。本研究では、狂犬病ウイルスN蛋白質の磷酸化に焦点をあて、N、P両蛋白質の成熟過程や機能的関連について調べた。

まず、NC形成時のN蛋白質の構造変換と磷酸化との関連性について検討した。N蛋白質に対するモノクローナル抗体（mAb）#5-2-26は、フォスファターゼ感受性のリニアエピトープを認識するため、N蛋白質の磷酸化の研究に有用である。#5-2-26の他に、N蛋白質のコンフォーメーションエピトープを認識する6種類のmAbを用いて、N-P複合体やNCとの反応性を免疫沈降法で調べた。いずれのmAbもNCとは反応したが、RNAと結合する前のN-P複合体を認識しなかった。#5-2-26以外の6種類のmAbは、389位の磷酸化部位のセリンをアラニンに置換した変異N蛋白質N（S389A）とも、フォスファターゼ処理したNCとも反応した。また、#1-7-11がN-P複合体と反応しないのは、実験結果からそのエピトープ部位がP蛋白質結合により隠されるためでなく、エピトープが形成されていないか、あるいはエピトープ部位がN蛋白質内部に隠れているからと推測され、N-P複合体を構成するN蛋白質とNCを構成するN蛋白質とは立体構造が異なることが示唆された。また、N-P複合体をSDSで変性させた場合も#5-2-26はN蛋白質を認識しなかったため、N-P複合体を構成するN蛋白質は磷酸化されていないことが示唆された。一方、非変性条件下でNCから外したN蛋白質が#1-7-11と反応しなかったことから、NCから外れるとN蛋白質はNC形成前に近い構造に戻ってしまうことが示され、NCから外したN蛋白質は磷酸化されているはずなのに#5-2-26とも反応しなかったため、NC形成前には磷酸化されるべき部位も内側に隠れていることが示唆された。さらに、変異N蛋白質N（S389A）も正常なN蛋白質同様にNCに組み込まれたため、NC形成までの過程にはNの磷酸化は不必要であることが確認された。

次に、NC形成時のP蛋白質の構造変換とNC結合との関連性について、P蛋白質のリニアエピトープを認識するmAb #402-13を用いて解析した。まず、cDNA発現系で作られたP蛋白質との反応性をみると、#402-13はウエスタンブロットではポリクローナル抗体と同様に反応するのに、免疫沈降法では殆ど反応しないことから、エピトープ部位が表面に露出する条件があると思われた。次に、N-P複合体やNC上のP蛋白質の構造を、402-13エピトープ形成を指標として免疫沈降法で調べると、NCと結合しているP蛋白質とは反応したが、N-P複合体とは殆ど反応しなかった。また、N-P複合体やNCから外したP蛋白質とも殆ど反応しなかった。これらの結果から、分子シャペロンとしてN-P複合体を形成しているP蛋白質では402-13エピトープが隠れた構造をとっており、NC形成時に402-13エピトープを露出させるように構造を変換することが示唆された。種々の欠損変異P蛋白質を用いた解析から、402-13エピトープはP蛋白質のC末端256位～297位のアミノ酸領域にあることが示唆された。この領域はNC結合P蛋白質の表面に露出しており、1994年にFuらによってNC結合に必要と報告された部位と重なるが、近年JacobらによってNC結合部位として報告された209位～215位のアミノ酸領域とは合わない。この矛盾を解決するため、N+P同時発現系で結合部位を調べると、P蛋白質のN末側にN-P複合体形成に関わる領域があること、402-13エピトープ部位は直接のNC結合領域ではないがNC結合に必要であることが確認され、直接のNC結合領域は209位～215位のアミノ酸領域であることが推測された。また、402-13エピトープが表面に露出することはN蛋白質との結合部位がN末側からC末側へ変換することと関連すると考えられる。

最後に、N蛋白質の磷酸化とP蛋白質のNC結合との関連性について検討した。NC形成時にN蛋白質が構造変換し磷酸化され、P蛋白質も構造変換し結合部位も入れかわることから、P蛋白質のNC結合にはN蛋白質の磷酸化が何らかの関わりを持つことが予測され、この可能性を検討した。まず、NCをフォスファターゼで処理するとP蛋白質の結合が大きく減少した。磷酸化されない変異N蛋白質N（S389A）を用いた同時発現系でN蛋白質とP蛋白質との結合を免疫沈降法で調べると、抗N蛋白質ポリクローナル抗体で共沈するP蛋白質の量に大きな差はなかったが、NCのみと反応するmAb #1-7-11を用いるとN（S389A）と共沈するP蛋白質の量は非常に少なくなった。正常なP蛋白質の代わりに、N-P複合体を形成できないN末欠損変異P蛋白質を用いると、抗N蛋白質ポリクローナル抗体でもmAb #1-7-11でも、N

(S389A) と共沈する P 蛋白質量は非常に少なかった。これらの結果は N 蛋白質の磷酸化が P 蛋白質の NC 結合に関与していることを示唆する。

mAb #402-13 で N 蛋白質の共沈を調べた場合も P 蛋白質と共沈する N (S389A) の量は少なかった。しかし、#402-13 で沈降する P 蛋白質は、N (S389A) と P との同時発現系でも検出されたので、N 蛋白質の磷酸化は P 蛋白質の構造変換に不可欠ではないと推測された。続いて、NC 結合部位欠損 P 蛋白質と N (S389A) との同時発現系で、P 蛋白質の結合様式の変化が起こるかどうか調べると、NC 結合部位欠損 P 蛋白質と N (S389A) とで形成していた N-P 複合体は、NC 形成時の結合部位変換によって解離することが確認されたので、N 蛋白質の磷酸化は P 蛋白質の結合部位変換には不可欠ではないと推測された。このように、N 蛋白質の磷酸化は、P 蛋白質の構造変換にも結合部位変換にも不可欠ではないが、構造変換した P 蛋白質と NC との結合を強固にする働きを持つことが示唆された。

以上、本研究の成果として、まず N 蛋白質は NC 形成時に構造が変わり、磷酸化部位が露出し、磷酸化されること、同時に、P 蛋白質も構造変換し、N 蛋白質との結合部位も N 末側から C 末側へ変わることが示唆された。また、N 蛋白質の磷酸化はこれらの P 蛋白質の変化には不可欠ではないが、P 蛋白質の C 末側と NC との強固な結合には必要であると示唆された。さらに、P 蛋白質は NC 上で L 蛋白質と共に RNA 合成を担うので、N 蛋白質の磷酸化により P 蛋白質が NC と強く結合することにより RNA 合成が誘導されと考えられた。このようなウイルス特異的なプロセスの解明は、N 蛋白質の磷酸化あるいは P 蛋白質の NC 結合を標的とした抗ウイルス薬開発に向けての有用な知見を与えると思われる。

よって、本論文は博士(薬学)の論文として価値のあるものと認められる。

さらに、平成16年4月27日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。