



Title	Analysis of RNA polymerase activity associated with NP protein of paramyxovirus
Author(s)	眞砂, 明典
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41784
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	眞 砂 明 典
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 5 2 5 8 号
学 位 授 与 年 月 日	平成12年 3 月 24 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科病理系専攻
学 位 論 文 名	Analysis of RNA polymerase activity associated with NP protein of paramyxovirus (パラミソウイルス NP タンパク質の RNA ポリメラーゼの機能解析)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 上田 重晴 (副査) 教 授 生田 和良 教 授 堀井 俊宏

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

パラミソウイルス科のウイルス（以下、パラミソウイルス）は麻疹ウイルス、流行性耳下腺炎ウイルス、パラインフルエンザウイルスなど人間に病原性を持つものが多い。また、パラミソウイルスのプロトタイプと考えられているセンドイウイルス (SeV) は近年遺伝子治療用ベクターとしても注目されている。パラミソウイルスは約15 Kヌクレオチドの一本鎖の(-)鎖RNA を持つが、DNA ウイルスや(+)鎖 RNA ウイルスとは異なり(-)鎖ゲノム RNA は細胞に導入してもそのままではウイルスはできない。cDNA からウイルスを作成するためには、T7 RNA ポリメラーゼを発現する組換えワクシニアウイルス (RVVT7) を LLCMK₂ 細胞に感染させた後、T7 プロモーターをもつ鋳型 cDNA を導入し、同時に NP、P、L 遺伝子をトランスに供給することが必要である。その理由としては、ゲノム (-)鎖 RNA が NP タンパク質と結合してできる複合体を鋳型として、P 及び L タンパク質の複合体から成る RNA ポリメラーゼが mRNA の転写と (+)鎖アンチゲノム RNA の複製を行うためだと考えられてきた。本研究では、安定に T7 RNA ポリメラーゼを発現する細胞 (LLCMK₂ #T7) を樹立し、パラミソウイルスのヌクレオキャプシドタンパク質の機能解析を試みた。

【方法ならびに成績】

1. NP、P、Lの組合せによる鋳型のルシフェラーゼ発現

安定に T7 RNA ポリメラーゼを発現している LLCMK₂ #T7 細胞に、センドイウイルス (SeV) ゲノム 3' 及び 5' 末端に相補的な配列とルシフェラーゼ cDNA からなる (-)鎖 RNA を T7 RNA ポリメラーゼにより合成できる pHVLuciB と、SeV の NP、P、L タンパク質の発現ベクター (pGEMNP、pGEMP、pGEML) を、様々な組合せで同時に DOTAP 法でトランスフェクションし、ルシフェラーゼの発現を指標として (+)鎖 RNA 合成の比較を行った。この結果、pHVLuciB と pGEMNP の 2 つを導入した場合でも高いルシフェラーゼ活性が検出された。pHVLuciB または pGEMNP それぞれ単独ではルシフェラーゼ活性は検出されなかった。

2. NP タンパク発現による鋳型のルシフェラーゼ発現

NP タンパク質の発現が (+)鎖 RNA 合成に必須か否かを確認するために、pGEMNP を改変したプラスミドを作製した。pGEMNP、pGEMNP の T7 プロモーターと NP 遺伝子の間に開始コドン、終止コドン挿入したプラスミド、pGEMNP の T7 プロモーターを欠損させたプラスミドをそれぞれ鋳型 pHVLuciB と一緒に細胞にトランスフェクシ

ンし、(+)鎖 RNA の合成と NP タンパク質の発現との相関を検討した。その結果、anti-NP polyclonal antibody を用いた Protein blotting で検出される分子量 60KDa の NP タンパク質が発現している時のみ、(+)鎖 RNA が合成されることを確認した。

3. SeV 5'、SeV 3'配列を欠損した鋳型の(+)鎖 RNA 合成

NP タンパク質のもつ RNA ポリメラーゼ活性に鋳型塩基配列特異性があるかどうか検討するために、ミニゲノムの 5' と 3' 末端を SeV と関係のない配列に置き換えたプラスミドを用いて、NP による(+)鎖 RNA の合成を確認したところ、ルシフェラーゼ活性が約 87% 低下していた。さらに 5' あるいは 3' 末端、5' と 3' 末端の両方を削ったミニゲノムを用いて、NP タンパク質による(+)鎖 RNA の合成を検討した結果、3' 末端を削った場合にルシフェラーゼ活性が約 70% 低下していることから、(-)鎖鋳型 RNA のうち、SeV ゲノム 3' 末端に相当する配列が(+)鎖 RNA の合成に必要なことがわかった。

【総括】

パラミキソウイルスのゲノム(-)鎖 RNA を鋳型として(+)鎖 RNA を合成する RNA ポリメラーゼ活性は、ヌクレオキャプシドの主要構成成分である NP タンパク質自体にあることを明らかにした。この知見は、今後パラミキソウイルスの遺伝子複製の解明につながると考えられる。

論文審査の結果の要旨

パラミキソウイルス科のウイルス（以下、パラミキソウイルス）は麻疹ウイルス、流行性耳下腺炎ウイルス、パラインフルエンザウイルスなど人間に病原性を持つものが多い。また、パラミキソウイルスのプロトタイプと考えられているセンドライウイルス（SeV）は近年遺伝子治療用ベクターとしても注目されている。しかし、その増殖過程の詳細は十分に解析されていない。

本研究では、T7 RNA ポリメラーゼを安定に発現する細胞を樹立し、この細胞の中でパラミキソウイルスのゲノム RNA の転写・複製過程でのヌクレオキャプシドタンパク質（NP、P、L）の機能解析を目的とした。その結果、NP と SeV ゲノム 3' 及び 5' 末端に相補的な配列とルシフェラーゼ cDNA から成る(-)鎖 RNA（ミニゲノム）を同時に発現させた細胞では、P、L がなくてもミニゲノム由来の(-)鎖 RNA から(+)鎖 RNA が合成されることが確認され、ヌクレオキャプシドの主要な構成成分である NP に SeV のゲノム RNA を鋳型とした(+)鎖 RNA を合成する RNA ポリメラーゼ活性が存在することが明らかになった。

本研究は、パラミキソウイルスの転写・複製に関わる RNA ポリメラーゼ活性は P-L 複合体にのみあるとするこれまでの定説に疑問を投げかけたものであり、今後、パラミキソウイルスの遺伝子複製の解明に貢献することが期待され、学位の授与に値するものと評価できる。