The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

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

【53】

氏　　名	眞砂明典（まさごあきのり）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学位記番号	第　15258　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 （パラミキソウイルス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ダイウイルス（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。パラミキソウイルスは約15K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、T7RNA 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$LLCMK_2$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T7RNA ポリメラーゼを発現する細胞（$LLCMK_2$#T7）を樹立し、パラミキ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T7RNA ポリメラーゼを発現している$LLCMK_2$#T7細胞に、センダイウイルス（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T7RNA 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、終止コドンを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ョ

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にのみ，(+)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の合成に必要であることがわかった。

【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ダイウイルス（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、T7RNA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。