

Title	Nuclear Targeting Activity Associated with the Amino Terminal Region of the Borna Disease Virus Nucleoprotein
Author(s)	小林, 剛
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/41828">https://hdl.handle.net/11094/41828</a>
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、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

氏名	小林 剛
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 15257 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	Nuclear Targeting Activity Associated with the Amino Terminal Region of the Borna Disease Virus Nucleoprotein (ボルナ病ウイルスNタンパク質のアミノ末端領域に認められる核移行能)
論文審査委員	(主査) 教授 生田 和良  (副査) 教授 山西 弘一 教授 上田 重晴

### 論文内容の要旨

#### 【目的】

ボルナ病ウイルス (BDV) の自然感染は、ウマ、ヒツジ、ネコ、ダチョウなどに認められ、特にウマでは脳炎の原因となっている。さらに、広範な疫学調査の結果より、BDV のヒトへの感染が明らかとなった。特にヒトでは、精神分裂病などの中枢神経系の異常に起因すると思われる疾患と BDV 感染との関連性が示唆されている。一方、BDV の伝播経路および病態機序については明らかにされていない。これらのことより、BDV が人畜共通伝染病である可能性を考慮に入れた BDV のウイルス学的な研究が重要視されている。

BDV は、非分節、マイナス鎖、一本鎖 RNA ウイルスである。BDV の特徴は、神経親和性で非細胞傷害性であること、感染細胞の核内で複製することである。しかし、細胞内での増殖速度が極めて遅いことから、その複製機序に関する情報はほとんど得られていない。本研究では、核内での BDV 複製機構を解明することを目的とし、感染細胞内で豊富に発現され、BDV の感染最小単位であるリボヌクレオ複合体の主な構成因子と考えられるヌクレオカプシドタンパク質 (N) の核内輸送機構についての詳細な検討を行った。

#### 【方法ならびに成績】

##### 1. BDV 持続感染細胞内における N タンパク質の細胞内局在

BDV 持続感染イヌ腎株化 (MDCK/BDV) 細胞を用いた。N タンパク質の細胞内局在の解析は、N タンパク質に対する特異抗体を用いた蛍光抗体法により行った。その結果、N タンパク質は、核内に強い局在を示した。

##### 2. サル腎株化 (COS-7) 細胞に発現した組換え N タンパク質の細胞内局在

BDV N タンパク質の組換え発現プラスミド (pcDL-N-Wild) は、MDCK/BDV 細胞由来の cDNA より、N タンパク質をコードする領域を増幅後、動物細胞発現ベクター pcDL-SR  $\alpha$  296 にクローニングし作成した。この pcDL-N-Wild を COS-7 細胞に導入し、細胞内局在を調べた結果、組換え N タンパク質は他のウイルスタンパク質の介在なしに単独で核に局在した。

##### 3. 組換え N タンパク質欠損変異株を用いた核移行能の解析

N タンパク質の核移行に関与する領域を同定するために、pcDL-N-Wild を基に N 末端 13、32、105 アミノ酸残基をそれぞれ欠損させた変異体 (pcDL-del.N92、pcDL-del.N147、pcDL-del.N369)、中央の 130 アミノ酸残基を欠損させた変異体 (pcDL-del.M375) および C 末端 27、77、143 アミノ酸残基をそれぞれ欠損させた変異体 (pcDL-

del.C1085、pcDL-del.C940、pcDL-del.C738) を作成し、COS-7 細胞に導入後、その細胞内局在について解析を行った。その結果、N末端13アミノ酸残基を欠損させた3つの変異体 pcDL-del.N92、pcDL-del.N147、pcDL-del.N369は、細胞質に局在した。一方、その他の変異体 pcDL-del.M375、pcDL-del.C1085、pcDL-del.C940、pcDL-del.C738ではすべての核に局在した。この結果から、Nタンパク質のN末端13アミノ酸残基(1-MPPKRR LVDDADA-13)が核移行に関与することが明らかとなった。

#### 4. 塩基性アミノ酸に富む領域の置換変異体を用いた核移行能の解析

幾つかのウイルスタンパク質の核移行シグナルとして、塩基性アミノ酸に富む配列(Basic amino acid sequence: BAS)の重要性が知られている。BDV Nタンパク質では類似のBAS(4-KRR-6 [BAS 1])が、N末端13アミノ酸残基内に存在するのに加えて、中央領域にBAS 2(163-KKRFK-167)およびC末端領域にBAS 3(338-RYRRREISR-346)が存在する。このため、各BASのアミノ酸置換変異体を作成し、それぞれの細胞内局在について解析を行った。その結果、BAS 1置換変異体を発現させた細胞において、Nタンパク質は細胞質に局在した。対照的にBAS 2およびBAS 3の変異体では、核に局在していた。これらの結果より、Nタンパク質の核移行にはN末端13アミノ酸残基内の4-KRR-6の重要性が明らかとなった。

#### 5. N末端9アミノ酸残基の核移行活性の検討

N末端13アミノ酸残基の核移行活性における重要性を明らかにするため、N末端9アミノ酸残基(3-PKRRLVDDA-11)を $\beta$ -ガラクトシダーゼ( $\beta$ -gal)と融合させた発現プラスミド(pRSV-N.LacZ)を作成し、その細胞内局在を解析した。その結果、 $\beta$ -galのみでは細胞質に局在したのに対して、pRSV-N.LacZを導入した細胞では明瞭な核移行が観察された。

#### 【総括】

感染細胞核内で豊富に認められるBDV Nタンパク質の核内移行能について解析した結果、Nタンパク質は、他のウイルスタンパク質の介在なしに単独で核内に移行することが証明された。さらに、この核移行に必須の領域についての詳細な解析を行ったところ、Nタンパク質の核移行には、アミノ末端領域に存在する4-KRR-6を含む3-PKRRLVDDA-11の9アミノ酸残基が核移行シグナルとして重要であることが明らかとなった。

### 論文審査の結果の要旨

ボルナ病ウイルス(BDV)は向神経性の非分節、マイナス鎖、一本鎖(NNS)RNAウイルスである。しかし、これまで知られているNNS RNAウイルスの中で唯一、感染細胞の核内で複製することが知られている。本研究は、BDVの主要粒子構成タンパク質であるヌクレオカプシドタンパク質(N)の核移行機構について検討したものである。まず、全長の組換えNタンパク質発現ベクターを作成し、細胞内導入後の局在を確認したところNタンパク質は核内に局在した。この核移行に関与する領域を同定するために各種Nタンパク質欠損体を用いた解析を行ったところ、核移行にはNタンパク質のアミノ末端13アミノ酸残基の重要性が明らかとなった。これまで多くの核移行シグナルとして塩基性アミノ酸に富む領域(Basic amino acid sequence: BAS)の重要性が知られていることから、Nタンパク質のN末端13アミノ酸領域に存在するBAS(4-KRR-6)に加えて、その他2箇所のBASについて詳細な解析を行ったところ、Nタンパク質の核移行には4-KRR-6を含む9アミノ酸残基(3-PKRRLVDDA-11)が核移行シグナルとして機能することを明らかにした。

本研究の成果は、BDVの核内での複製機構を理解する上で極めて重要な知見を与えるものであり、学位の授与に値するものと考えられる。