



Title	Characterization of human herpesvirus 7 U27 gene product and identification of its nuclear localization signal
Author(s)	武田, 和彦
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/42734
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について 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	武田和彦
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 15869 号
学位授与年月日	平成13年2月13日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	Characterization of human herpesvirus 7 U27 gene product and identification of its nuclear localization signal (ヒトヘルペスウイルス7 U27遺伝子産物の解析および核移行シグナルの同定)
論文審査委員	(主査) 教授 山西 弘一 (副査) 教授 生田 和良 教授 米田 悦啓

論文内容の要旨

[目的]

ヘルペスウイルスはそれ自身の DNA ポリメラーゼにより自らのゲノム DNA を複製するが、そのアクセサリタンパクの助けによりその複製能が活性化される。インビトロの実験より、アクセサリタンパクの N 末端側 2/3 が DNA ポリメラーゼへの結合とその活性化、及び DNA 鎖への結合に必要であることが示されている。しかしながら、C 末端側 1/3 の機能は未知であり、現在のところ不要であると考えられている。今回、ヒトヘルペスウイルス 7 型 (HHV-7) におけるアクセサリタンパク (U27 遺伝子産物) を材料に用い、C 末端側の機能解析を行った。

[方法ならびに成績]

まず、HHV-7 U27 遺伝子産物に対するモノクローナル抗体 5H4 を用いて感染細胞における動態を調べた。ウエスタンブロット分析 (WB) により、感染細胞特異的な 40kDa のバンドを検出し、経時的にサンプリングした感染細胞を用いて U27 遺伝子産物が感染後 24 時間目から発現されることを明らかにした。ウイルス DNA 合成阻害剤である PFA によっても、U27 遺伝子産物の合成は阻害されなかった。感染細胞を細胞質画分と核画分とに分け、WB を行ったところ、U27 遺伝子産物は核画分に検出された。

間接蛍光抗体法により感染細胞中での U27 遺伝子産物の局在を調べたところ、核内にドット状に発現していた。更に、完全長 U27 遺伝子産物 (364A.A.) を発現するプラスミドを動物細胞に導入し、発現産物の細胞内局在を調べたところ、感染細胞同様、核内に局在した。このことは、U27 遺伝子産物が他のウイルスタンパクの非存在下で核内に移行できることを示している。

以上の結果より、U27 遺伝子産物が核移行シグナル (NLS) を持つことが示唆された。NLS モチーフを検索したところ、176-182A.A. および 355-361A.A. に NLS が推定された。このモチーフは他のヒト β -ヘルペスウイルスの DNA ポリメラーゼ・アクセサリタンパクにも保存されていた。

予測された NLS が実際に細胞内で機能しているかどうかを調べるために、C 末欠変異体の細胞内での局在を調べた。1-250A.A. より成る変異体は細胞質に蓄積した。これにより、C 末欠変異体に含まれる推定の N 末側 NLS (176-182AA.) が実際には機能していないことが示唆された。そこで、C 末側 251-364A.A. に NLS 活性があるかどうかを確認するために、GFP タンパクとの融合タンパクを作成し、その細胞内局在を調べた。その結果、GFP 融合タンパクが核に集積することを確認した。コントロールとして使用した GFP は核と細胞質両方に均等に分布した。更

に NLS 活性をもつアミノ酸領域をマッピングするために、276-364、301-364、326-364、351-364A.A.との GFP 融合タンパクを作成し、細胞内での局在を観察した。その結果、351-364A.A.を含む GFP 融合タンパクでさえ核に強く局在することが判明した。この領域はコンピュータープログラムにより推定された C 末側 NLS (355-361A.A.) を含んでおり、この配列が実際に NLS として機能することが示唆された。

C 末側 NLS を介した核移行が Wheat germ agglutinin (WGA) により阻害されるかどうかを調べた。U27 遺伝子産物の 251-364A.A.を Maltose binding Protein (MBP) との融合タンパクとして発現させ、マイクロインジェクションにより HeLa 細胞の細胞質へ注入した。MBP だけでは核へ移行しないのに対し、この融合タンパクは速やかに核に移行した。WGA と共に細胞質にマイクロインジェクションすると、この融合タンパクの核への移行は完全に阻害された。このことは、U27 NLS を介した核移行が核膜孔複合体を経由していることを示している。また、GTP 加水分解能の欠除した Ran 変異体 Q69L Ran-GTP と共にマイクロインジェクションしたところ、核への移行が阻害された。U27 NLS を介した核移行は Ran 依存的であり、GTP の加水分解を必要とすることが示唆された。

【総括】

HBV-7 U27 遺伝子産物は 40kDa の核タンパクとして発現され、その合成にウイルス DNA の複製は必要ないことが分かった。今までヘルペスウイルス DNA ポリメラーゼ・アクセサリタンパクの C 末側は不要であると考えられてきたが、HHV-7 ホモログである U27 遺伝子産物に関する今回の実験により、C 末領域が細胞内で NLS として機能することが確認された。

論文審査の結果の要旨

全てのヘルペスウイルスはそのゲノム上に DNA polymerase processivity factor というタンパクをコードしている。In vitro の実験より、このタンパクの N 末側 2/3 の領域に DNA ポリメラーゼおよび DNA 鎖に結合し、ウイルス DNA 合成を促進させる活性のあることが分かっている。しかしながら、C 末側 1/3 の領域の生物学的な機能は明らかにされていなかった。本研究は、ヒトヘルペスウイルス 7 (HHV-7) の DNA polymerase processivity Factor である U27 遺伝子産物の諸性質および C 末側機能の解明を目的として行われた。まず、感染細胞での発現様式について調べた結果、HHV-7 U27 タンパクは感染後 24 時間という早い時期に 40 キロダルトンの核タンパクとして発現され、また、ウイルス DNA 合成阻害剤を用いた実験より、このタンパクの発現がウイルス DNA 複製に依存していないことが明らかとなった。トランスフェクション実験では、U27 遺伝子産物の核への移行が、他のウイルスタンパク非存在下でも起こり、それ自身が核移行シグナル (NLS) をコードしていることが示唆された。コンピュータープログラムを用いて NLS を検索したところ、U27 遺伝子産物の中央領域および C 末端領域の 2ヶ所に classical NLS の存在することが予想された。U27 遺伝子産物の C 末端領域の欠失変異体や長さの異なる C 末端領域との融合タンパクを用いた核移行の実験より、C 末端領域に推定された NLS が実際に機能していることが示唆され、マイクロインジェクション実験では、この NLS を介した核移行が Ran 依存的であることが証明された。以上、HHV-7 U27 タンパクの C 末端領域に NLS がコードされていることが明かとなり、学位に値するものと思われる。