

| | |
|--------------|---|
| Title | Nucleolar protein B23 interacts with Japanese encephalitis virus core protein and participates in viral replication |
| Author(s) | 津田, 祥美 |
| Citation | |
| Issue Date | |
| Text Version | none |
| URL | http://hdl.handle.net/11094/46326 |
| DOI | |
| rights | |

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

| | |
|------------|--|
| 氏名 | 津田祥美 |
| 博士の専攻分野の名称 | 博士(医学) |
| 学位記番号 | 第 20113 号 |
| 学位授与年月日 | 平成 18 年 3 月 24 日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科分子病態医学専攻 |
| 学位論文名 | Nucleolar protein B23 interacts with Japanese encephalitis virus core protein and participates in viral replication (核小体蛋白質 B23 は日本脳炎ウイルスのコア蛋白質と結合しウイルス複製に関与する) |
| 論文審査委員 | (主査) 教授 松浦 善治 (副査) 教授 生田 和良 教授 塩田 達雄 |

論文内容の要旨

【目的】

日本脳炎ウイルス (JEV) は、重篤な急性脳脊髄炎を引き起こす人獣共通のアルボウイルスであり、プラス一本鎖 RNA をゲノムに持ち、フラビウイルス科フラビウイルス属に分類される。JEV をはじめとしてフラビウイルスは宿主細胞質で複製するが、ヌクレオカプシドの構成蛋白質であるコア蛋白質の一部は核へ移行することが知られている。我々はこれまでに、コア蛋白質のアミノ酸 42 および 43 位に変異を導入して核移行が認められなくなった JEV 変異株 (M4243) を作製し、その性状を検討してきた。その結果 M4243 は野生型 JEV (WT-JEV) に比べて、哺乳類細胞における複製能やマウスに対する神経侵襲性が著しく減弱していたことから、コア蛋白質の核移行がウイルス複製に重要な役割を演じていることを明らかにしている。しかしながら、コア蛋白質の核移行による JEV の複製促進の詳細な機構は未だ解明されていない。そこで本研究では、JEV コア蛋白質と相互作用する宿主核蛋白質を探索し、その蛋白質のウイルス複製に果たす役割を解析した。

【方法ならびに成績】

1. コア蛋白質と結合する宿主蛋白質の同定

JEV コア蛋白質と結合する核内蛋白質を検索するため、293T 細胞で発現させたコア蛋白質と共沈する宿主蛋白質を質量分析法により解析した。その結果、核小体蛋白質である B23 が同定された。次に JEV 感染細胞内における結合を免疫沈降法により検討したところ、B23 は WT-JEV のコア蛋白質とは結合するが、M4243 のコア蛋白質とは結合しないことが確認された。また、同ウイルス属のデングウイルス (DEN) のコア蛋白質と B23 の結合は認められなかった。以上の成績から、B23 は JEV コア蛋白質と特異的に結合し、その結合には 42 と 43 番目のアミノ酸 (Gly と Pro) が重要であることが示唆された。

2. B23 のコア蛋白質結合領域の決定

B23 の各種欠損変異体を作製し、免疫沈降法を用いて JEV コア蛋白質との結合領域を検討した。その結果、B23 の 38 から 77 番目のアミノ酸が JEV コア蛋白質との結合に重要であることが明らかとなった。

3. B23 およびコア蛋白質の細胞内局在

B23 とコア蛋白質の細胞内局在を、コア蛋白質の一過性発現細胞と JEV 感染細胞を免疫染色して検討した。その結果、未処置細胞や WT-JEV や M4243 のコア蛋白質を発現する細胞では B23 は核小体に観察されたが、WT-JEV あるいは M4243 の感染細胞では、B23 は核小体だけでなく顆粒状に細胞質にも検出された。このような B23 の細胞質への移行は DEN 感染細胞では認められず、JEV 感染に特異的であった。また、WT-JEV 感染細胞ではコア蛋白質の局在は B23 とほぼ一致したが、M4243 感染細胞ではコア蛋白質は細胞質に瀰漫性に拡散しており、B23 との共局在は認められなかった。これらの成績から、B23 はコア蛋白質の細胞内局在を決定する因子であることが明らかとなった。また、WT-JEV 感染細胞において細胞質に共局在する B23 とコア蛋白質はフォーカスを形成しており、その周囲に他のウイルス蛋白質も集積していた。一方、M4243 感染細胞ではそのようなフォーカス形成は認められず、他のウイルス蛋白質は細胞質に拡散して観察された。以上の成績から、ウイルス蛋白質が効率よく集積するためには、コア蛋白質と B23 の相互作用が重要であることが示唆された。

4. B23 のウイルス複製への影響

B23 のウイルス複製への影響を検討するため、B23 の欠損変異体を発現させた細胞に JEV を感染させ、24 時間後の細胞上清中ウイルス力価を測定した。その結果、N 末端及び C 末端を欠損させた B23 を発現させた細胞では、ウイルス複製の減弱が観察された。B23 は N 末端にシャペロン活性、C 末端に核酸結合部位を持つことが知られており、これらの活性が JEV の複製にも重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

【総括】

JEV のコア蛋白質と結合する宿主蛋白質として B23 を同定した。B23 はコア蛋白質の核小体局在だけではなく、JEV 感染時にはその一部が細胞質へ移行して、細胞質でのコア蛋白質の局在にも関与することが明らかとなった。B23 と結合できないコア蛋白質を持つ M4243 のウイルス複製能が非常に低いことや、B23 の欠損変異体は dominant negative として作用しウイルス複製を抑制することから、B23 は JEV の複製に重要な宿主因子であることが示された。

論文審査の結果の要旨

日本脳炎ウイルス (JEV) の構造蛋白質であるコア蛋白質の一部が、感染細胞の核内へ移行することは、JEV が哺乳動物細胞で複製するために必須な現象であることが知られている。本論文では、JEV コア蛋白質の核移行の生物学的意義を解明するため、コア蛋白質と相互作用する宿主因子を検索し、核小体蛋白質 B23 を同定した。JEV 感染によって B23 の一部は細胞質に移行し、核内の B23 はコア蛋白質と、また、細胞質に移行した B23 は他のウイルス蛋白質とも顆粒状に共局在した。一方、核移行能力を欠損させた変異型 JEV の感染においても、B23 の一部は細胞質に移行したが、野生型 JEV 感染のようなウイルス蛋白質との共局在は観察されなかった。また、C 末端および N 末端の活性部位を欠損させた B23 が、JEV の複製を抑制することが感染実験で示されたことから、B23 は JEV の複製に関与する重要な宿主因子であることが明らかとなった。本論文は、JEV 複製に関与する新規宿主因子を同定したものであり、学位の授与に値すると考えられる。