The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Heat shock cognate protein 70 controls Borna disease virus replication via interaction with the viral non-structural protein X
Author(s)	林, 陽平
Citation	大阪大学, 2009, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/49957
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

【25】

氏　　名	林（はやし）　陽（よう）平（へい）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　２２７３４　号
学位授与年月日	平成21年３月24日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当 医学系研究科予防環境医学専攻
学　位　論　文　名	Heat shock cognate protein 70 controls Borna disease virus replication via interaction with the viral non-structural protein X **(Hsc70はBDVの非構造蛋白質Xとの相互作用を介してウイルス複製を制御する)**
論　文　審　査　委　員	(主査) 教　授　生田　和良 (副査) 教　授　松浦　善治　　教　授　塩田　達雄

論文内容の要旨

〔　目　　的　〕

ボルナ病ウイルス（BDV）は細胞核で複製・持続感染を成立させる唯一の哺乳類由来RNAウイルスとして知られている。私たちはBDVの病原性および持続感染機構を理解する目的でBDVがコードする蛋白質の機能解析を進めている。BDVの非構造蛋白質である10 kDaのX蛋白質は、核内に移行し、ウイルス複製酵素の補助因子であるリン酸化（P）蛋白質と結合することでウイルスの転写活性を抑制していることが知られている。しかしながら、その詳細な作用機序は明らかになっておらず、宿主因子の関与についても不明である。本研究では、X蛋白質と相互作用する宿主因子の同定を行い、X蛋白質の核輸送とBDVの複製における役割について検討を行った。

〔　方法ならびに成績　〕

Tandem affinity purification法と質量分析によりBDV非感染および持続感染細胞からX蛋白質と相互作用する宿主因子の同定を行い、免疫沈降法を用いてX蛋白質と宿主因子の相互作用に重要な領域を同定した。その結果、両細胞からHeat shock cognate protein 70（Hsc70）が同定され、ウェスタンブロット法により確認された。また、相互作用に重要なアミノ酸残基はX蛋白質の1-16とHsc70の385-543であった。X蛋白質は同じ領域でBDV P蛋白質と結合することが報告されている。そこでP蛋白質存在下におけるX-Hsc70相互作用について免疫沈降法により解析を行った。その結果、P蛋白質によりX-Hsc70相互作用が競合阻害されることが示された。

次に、間接蛍光抗体法を用いてHsc70の細胞内局在を観察した。Hsc70の局在はBDV非感染細胞と持続感染細胞で変化は認められずX蛋白質との明らかな共局在も観察されなかった。Hsc70は熱ストレスにより細胞核へ蓄積することが報告されている。そこで、熱ストレス後の持続感染細胞においてHsc70とX蛋白質の局在を観察したところ、Hsc70の核移行に伴ってX蛋白質の核への局在が観察された。また、siRNAによりHsc70の発現抑制を行い、BDV持続感染への影響について間接蛍光抗体法およびreal-time PCR法により解析した。その結果、Hsc70の発現抑制によりX蛋白質およびP蛋白質の局在が細胞質へ移行することが明らかとなった。一方、BDV核（N）蛋白質の局在に顕著な変化は認められなかった。また、real-time PCR法による解析から、BDV複製が抑制されることが示された。

〔　総　　括　〕

X蛋白質が宿主因子Hsc70と相互作用することが示され、Hsc70の動態変化に伴ってX蛋白質の局在が顕著に変化することが明らかとなった。X蛋白質はBDV複製制御に重要な役割を果たしていると考えられており、特にBDVの複製部位である細胞核におけるX蛋白質量はウイルス複製効率に大きな影響を与える。Hsc70は蛋白質の折り畳みや核細胞質輸送などの役割を担うシャペロン分子として知られており、本研究によりX蛋白質が細胞内での移動にHsc70を利用している可能性が示された。また、Hsc70の発現抑制によってP蛋白質の局在も変化したことから、BDVがX、P、Hsc70の３つの蛋白質の相互作用によって適切な細胞内局在を維持し、ウイルス複製を調節している可能性が考えられた。今後、これらの蛋白質における相互作用を詳細に解析することでBDVのウイルス複製制御機構の解明につながると考えている。

論文審査の結果の要旨

ボルナ病ウイルス（BDV）は細胞核で複製し、持続感染を成立させる唯一の動物由来RNAウイルスとして知られている。非構造蛋白質であるBDV X蛋白質はBDVリン酸化（P）蛋白質と結合しウイルス複製を抑制することが明らかになっているが、宿主因子との相互作用についてはこれまでに報告がなかった。

申請者は、免疫沈降法を利用してX蛋白質と相互作用する宿主因子Hsc70を同定し、その結合がBDV P蛋白質によって競合阻害されることを明らかにした。また、BDV持続感染細胞内においてもX蛋白質とHsc70が相互作用していることを示し、Hsc70をノックダウンすることによりX蛋白質のみならずP蛋白質の細胞内局在が顕著に変化することを明らかにした。このとき、BDV複製が抑制されることも明らかにしており、申請者は持続感染細胞においてX、P、Hsc70の3つの蛋白質の相互作用が安定的なウイルス複製に重要であるという新たな知見を見出した。

以上より、申請者はBDV持続感染における宿主因子との相互作用を介した新たな複製制御機構に関する知見を見出しており、学位の授与に値すると考えられる。