

学位論文題名

Signal Residue for Induction
of Directional Nucleotide Substitution

(核酸変異方向を誘導するシグナルについて)

学位論文内容の要旨

ウィルスのオープンリーディングフレームでは種特異的ヌクレオチド組成が存在し、これは温血動物のmRNAのヌクレオチド組成とは違って大きなバラツキを持つ。この種特異的ヌクレオチド組成はヌクレオチド置換の方向を維持するメカニズムの存在を示唆しており、このメカニズムについては(1) Transitional / transversional substitution, (2) Adaptation to tRNA abundance, (3) Methylation-deamination-mutation, (4) Selective advantage, (5) Mutational pressure, (6) Simultaneous double-nucleotide substitution という6つの仮説が考えられている。

ワクチニアウィルスの構造タンパクを単離精製、N末端アミノ酸を解析することにより、各タンパクをコードしているジーンを同定し、さらに野生株及び近縁種での同じジーンについても解析を重ねていった結果、種間でのヌクレオチドの相違には一定の規則性が存在し、これはゲノムのヌクレオチド組成により生じる選択圧だけでは説明できないものであった。

当初、ワクチニア、ヴァリオラ、MCMVのボックスウィルスでのポリメラーゼ・ジーンのヌクレオチド変異を既存の仮説によって解釈しようと試みたが、完全に当てはめることはできなかった。そこで **Signal Nucleotide Residue** という考え方により、これらのヌクレオチド置換の方向性を説明付けることを行った。

その過程では上記6つの既存仮説と **Base-pair relationships, Strand bias, Error type code-degeneration, Synonymous substitution, Over- and under-presentation of dinucleotides, Replication mode, Four parameter model** といった推計学的な検証を同時に行った。結果、ワクチニアウィルスでのヌクレオチド組成が特異な **Signal Nucleotide Residue** により規定されていることがわかった。

さらにこの考え方をボックスウィルス以外にヘルペスウィルス (単純ヘルペス、水痘-帯状疱疹、EB、サイトメガロ、ヘルペスサイミリ) ピコルナウィルス (ポリオ1型、2型、3型、A型肝炎)、ヘパドナウィルス (B型肝炎)、レトロウィルス (HIV、SIV) に関しても調べ、一定の解を得ることができた。

この結果はDNAウィルス、RNAウィルスを問わず、同じ種保存メカニズムが存在していることを表しており、ウィルス種の進化を解明するための手がかりとなると考えられる。また、頻繁に起こる疾病性ウィルスの抗原性変異の解明の一助となると期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 志 田 壽 利
副 査 教 授 高 田 賢 蔵
副 査 教 授 皆 川 知 紀

学 位 論 文 題 名

Signal Residue for Induction of Directional Nucleotide Substitution

(核酸変異方向を誘導するシグナルについて)

ワクチニアウィルスの構造タンパクを単離精製し、N末端アミノ酸を解析することにより、各タンパクをコードしている遺伝子を同定し、近縁種での同じ遺伝子との比較研究を行った。さらに細胞間融合、細胞ウィルス融合で得られた結果を併せて解析を重ねた結果、ヌクレオチド置換の方向を維持するウィルス独自のメカニズムがあるのではないかと考えられた。ワクチニアウィルスゲノムでどのような変異が起こったのか、種としての安定度合いを測ることはできないか、という疑問を解明するためにゲノムの解析研究を始めた。

ヌクレオチド置換についての一般的な仮説は現象を数量化したものであり、ヌクレオチド構成パターンがどう生み維持されるかを十分に説明するものではない。そこで、レプリカーゼコンプレックスがレプリケーションサイクルの中で、シグナルとなるヌクレオチドに導かれる形で置換を起こすのではないかとという仮説を立てた。

まず、ワクチニアウィルスのゲノム中にジヌクレオチドがどれだけ存在するかを調べた。この際にシグナルヌクレオチドと置換ヌクレオチドの位置が離れている必要があるかもしれない可能性を考慮し、間隔を持ったジヌクレオチドの場合も調べた。それらの存在数を単純にヌクレオチド構成から計算された期待値で除すことにより、ジヌクレオチドの結びつきの強さ（アソシエーション強度）を求めた。

さらに、一方のヌクレオチドを固定したまま、一定間隔上に存在するヌクレオチド種同士のアソシエーション強度の比をとった。現存するゲノムがヌクレオチド置換をある程度引き起こした結果として存在していることから、この比はある置換方向におけるシグナルの強度を表していると考えられる。

この結果を用い、逆に置換方向を固定した場合の各間隔に位置するシグナルヌクレオチドとその強度をマトリクス化し、高い強度のシグナルヌクレオチドを抽出することにより、その置換方向でのシグナルヌクレオチドの配列を得ることができる。

さらに、この置換位置とされるヌクレオチドの組み合わせを任意のヌクレオチドが特定のヌクレオチドに置換されるとい置換方向と、方向性の無い置換を起こしやすいヌクレオチドという2種類のエラータイプに分け、このシグナルヌクレオチドを配列させるところ、それぞれ3種あるシグナルヌクレオチドは数学的に偶然性を否定できるだけの一致性があるこ

とがわかった。また、その配列は5'側と3'側でコンプリメンタリーとなった。これはリーディング、ラギング鎖合成で同じ1つのレプリカゼを使うワクチニアウィルスの特徴に当てはまるものであり、当初の仮説の妥当性を支持する。

また、置換頻度を数値化できたことにより、既存のゲノムの安定度理論による「選択圧が発生しないシノニマス置換が3ヌクレオチド周期で現れる」ことを利用したパラメーターを用いることにより、種の安定性を測定した。ワクチニアウィルスのGC含量の少なさは単純にGCが減少し、ATが増えているのではなく、Gというヌクレオチドの3'側に位置するヌクレオチドがAかTに置換されやすいために起こった結果であると考えられ、かなり安定したゲノムに達しているという結果が得られた。

審査員から「本仮説の一般化の可能性」「抗原性変異の予測」「コーディング域とノンコーディング域の違い」に関しての質問があり、申請者はそれぞれ、「レプリケーションシステムの違い」「変異と置換の違い」「ワクチニアウィルスのゲノム構造」をもとにおおむね妥当に解答した。

この論文は、ウィルス種の進化を解明するための手がかりとなると考えられる。また、頻繁に起こる疾病性ウィルスの抗原性変異の解明の一助となることが期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。