



Title	ムンプスウイルス持続感染細胞におけるウイルス遺伝子の存在様式ならびに発現調節機構
Author(s)	由良, 義明
Citation	大阪大学, 1980, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/32611
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名・(本籍)	由 良 義 明
学位の種類	歯 学 博 士
学位記番号	第 4917 号
学位授与の日付	昭和 55 年 3 月 25 日
学位授与の要件	歯学研究科 歯学臨床系専攻 学位規則第 5 条第 1 項該当
学位論文題目	ムンプスウイルス持続感染細胞におけるウイルス遺伝子の存在様式ならびに発現調節機構
論文審査委員	(主査) 教授 宮崎 正 (副査) 教授 作田 正義 助教授 加藤慶二郎 講師 村山 洋二

論 文 内 容 の 要 旨

ムンプスウイルスは慢性感染した場合、糖尿病、心内膜線維弾性症あるいは中枢神経系の疾患等の病因になり得ることが知られている。それ故、これら疾患の病因を明らかにするためには、慢性感染した細胞でのムンプスウイルス遺伝子の発現機構を解析する必要がある。そこで、生体における慢性感染のモデルシステムとして培養細胞を用い、*in vitro* のムンプスウイルス持続感染系を確立し、その細胞におけるムンプスウイルス遺伝子の存在様式ならびに発現調節機構につき検討した。

持続感染系は次に述べるようにして確立した。すなわち、仔シリアンハムスター腎由来の株化細胞である BHK21/WI-2 細胞に弱毒化ムンプスウイルス占部株 (MV) (阪大微生物病研究所の奥野良臣博士より恵与された) を MOI 1 にて感染させ、イーグルの最少必須培地に 5 % の仔牛血清を含む増殖培養液を用いて 5 % 炭酸ガス培養器中で 37°C にて培養した。MV の増殖により、ほとんどの細胞は死滅したが、一部生残した細胞は増殖し、約 1 カ月後に細胞集落を形成した。この細胞を継代培養することにより安定した増殖を示す持続感染 BHK (MV) 細胞を確立した。BHK (MV) 細胞には間接蛍光抗体法にて細胞質に MV 抗原の存在を認めた。また BHK (MV) 細胞は MV 特異的補体結合 (CF) 抗原を保有するウイルス (MV_{pi}) を産生していた。そこで MV_{pi} の生物学的特性を検索するため、以下に述べる実験を行なった。

MV_{pi} を含む BHK (MV) 細胞の培養上清を $100,000 \times g$ で 2 時間超遠心して粗 MV_{pi} ウィルス標品を調製した。この標品を 15–60% (W/W) 蔗糖密度勾配液に重層し、 $68,500 \times g$ で 2 時間遠心後、遠心管底を穿刺して分画し、各々の画分について MV の CF 抗原力値と Green らの方法に従って逆転写酵素

(RDDP) 活性を測定した。その結果、 MV_{pt} の保有する CF 抗原力値のピークと RDDP 活性のピークが一致したことから、 MV_{pt} は親株である MV には認められない RDDP を保有する ムンプス変種株ウイルスであることが示唆された。そこで、この MV_{pt} は宿主である BHK21/WI-2 細胞に潜在する BHK レトロウイルスの関与のもとに形成された合の子ウイルスであると推論し、 MV_{pt} の RNA 遺伝子 (MV_{pt} -RNA) 配列について核酸ハイブリッド形成法により検索した。 MV_{pt} の内因性 RDDP 活性にて合成された MV_{pt} -RNA に相補性を示す cDNA と MV および BHK レトロウイルスの RNA との間で、4 × SSC 中 66°C にて 24 時間ハイブリッド形成反応を行なった。形成されたハイブリッドは S₁ ヌクレアーゼを用いて検出した。その結果、cDNA は MV の RNA 遺伝子 (MV-RNA) と 50.3%， BHK レトロウイルス RNA と 10.6% の相補性を示したので、 MV_{pt} は遺伝子レベルで MV と BHK レトロウイルスとの合の子である事が明らかにされた。また、この実験結果から持続感染 BHK (MV) 細胞内にも MV-RNA に相補性を示す感染性 DNA (DNA 中間体) の存在する可能性が強く示唆された。そこで、BHK (MV) 細胞より Marmur 法に準じて抽出した DNA の感染性を検索するため、この DNA (50—100 μg) で Graham らのカルシウム法に従って BHK21/WI-2 および HeLa 細胞を処理した。その結果、DNA 処理した両者の細胞で、1 日令ヒヨコ赤血球に対する凝集 (HA) 能と BHK21/WI-2 細胞よりクローニングして得た BSR 単層培養細胞上でブラック形成能を保有するウイルス粒子の产生を認めた。HeLa 細胞を用いた実験で产生されたウイルスをクローニングして、抗原性を解析したところ、これらウイルスクローンには MV 特異 HA 抗原が認められたが、そのブラック形成能は、抗 MV 血清ではなく、抗 BHK レトロウイルス血清で中和された。すなわち、DNA 処理した HeLa 細胞の产生するウイルス粒子は、抗原性において MV と BHK レトロウイルスとのモザイクであった。なお、この BHK (MV) 細胞の DNA を DNase (10 μg/ml) で、37°C にて 1 時間前処理すると、上記の生物学的活性は失われた。それゆえ持続感染した MV の RNA 遺伝子は DNA に逆転写され、感染性を示す DNA 中間体として存在する事が示唆された。

この DNA 中間体の BHK (MV) 細胞での存在様式を明らかにするために、核酸ハイブリッド形成法による実験を行なった。すなわち、³H チミジンで標識した BHK (MV) 細胞より Hirt の方法に従って ³H 標識染色体および染色体外 DNA を抽出し、それぞれの DNA と MV-RNA との間でハイブリッド形成反応を行ない、硫酸セシウム平衡密度勾配遠心法によって形成された DNA-RNA ハイブリッドを検出した。その結果、染色体外 DNA のみが MV-RNA とハイブリッドを形成した。この実験結果は、MV-RNA を鉄型として逆転写された DNA 中間体は BHK (MV) 細胞において、染色体外 DNA として存在している事を示唆している。

論文の審査結果の要旨

本研究は、ムンプスウイルス持続感染細胞におけるウイルス遺伝子の存在様式、並びに発現調節機構を多角的に解析したものである。この研究で初めて明らかにされた事実は、次の通りである。1)

ムンプスウイルス持続感染BHK21/WI-2細胞（BHK（MV））の産生する感染性ウイルス粒子(MV_{pt})は、その親株ウイルスには存在しない逆転写酵素を保有している。2) MV_{pt} ウイルスRNAは、ムンプスウイルスRNA及び宿主細胞に潜在するレトロウイルスRNAとの間で核酸の塩基配列における相補性を示す。3) BHK（MV）細胞より抽出したDNAでBHK21/WI-2 及びHeLa細胞にトランスフェクションが成立する。さらに、4) BHK（MV）細胞の染色体外DNAにムンプスウイルスRNAに相補性を示すDNAの存在を認める。本論文で述べられた以上の知見は、ムンプスウイルス持続感染系確立の機構を解明する上で、大きな意義を持つと同時に、一連の自己免疫疾患の病因を解析するための嚆矢となりうるものと考えられる。従って、由良義明君の業績は発展性に富んだ優れた研究であり、歯学博士の学位に十分値するものと認める。