

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	
Issue Date	
oaire:version	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/32611
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

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×g で 2 時間超遠心して粗 MV_{pi} ウイ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×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 抗原力価と 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_{pi} の保有するCF抗原力価のピークとRDDP活性のピークが一致したことから、 MV_{pi} 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_{pi} 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_{pi} のRNA遺伝子(MV_{pi} -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_{pi} の内因性RDDP活性にて合成された MV_{pi} -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、 $4 \times \text{SSC}$ 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 S_1 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_{pi} 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産生を認めた。HeLa細胞を用いた実験で産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細胞の産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 $\mu\text{g}/\text{ml}$)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を鋳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_{pl})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_{pl}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。