Osaka University Knowledge Archive

Title	ニューカッスル病ウイルスのF蛋白の開裂を阻害する抗体とその感染阻害効果
Author(s)	島本, 太香子
Citation	大阪大学, 1991, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/37204
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。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【10】

氏名・(本籍)	島本太香子（しまもと たかこ）
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 9661 号
学位授与の日付	平成3年3月26日
学位授与の要件	医学研究科 生理系専攻 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	**ニューカッスル病ウイルスのF蛋白の開裂を阻害する抗体とその感染阻害効果**
論文審査委員	(主査) 教授 岡田 善雄 (副査) 教授 岸本 忠三　教授 上田 重晴

論文内容の要旨

（目　的）

ニューカッスル病ウイルスNew Castle Disease Virus（NDV）はパラミクソウイルスの1種で，感染細胞に細胞融合を起こし，巨核細胞を形成する特徴を持っているが，この細胞融合の現象は，ウイルスエンベロープに存在する糖蛋白であるF（fusion）蛋白により引き起こされる。F蛋白は分子量約68kの前駆体（F_0）として産生された後，宿主プロテアーゼによる限定分解を受けて開裂し，F_1（56k）とF_2（12k）の2つのペプチドを形成して，はじめて生物活性を発現することが知られている。限定分解認識部位のアミノ酸配列は，細胞融合を引き起こすウイルスの間でよく保存されており，強毒株のウイルスほど，宿主プロテアーゼに対する感受性が高い配列を有しているが，実際に開裂を受ける細胞内部位は，未だ確定されていない。

今回，我々は，NDVを1つのモデルとして，F蛋白の開列予想部位に対する抗ペプチド抗体を作製し，それを用いてF蛋白の開裂について検討するとともに，その感染に及ぼす影響について調べ，これによりウイルスの感染が抑制されることを明らかにした。

（方法と成績）

1．抗体の作製と精製

NDVのF蛋白の開裂予想部位のF_1側2個，F_2側6個の計8個のアミノ酸配列をもつ合成ペプチド（IF：RRQRRG）に，carrier proteinとしてKeyhole Limpets HemocyaninをSMPB Succinimidyl－4－(p-maleimidophenyl) butyrateを介してconjugateさせてウサギに免疫した。得られた抗血清を，50%－硫安で沈澱させた後，Affinity Chromatography（Activated F）を用いて，8個の

アミノ酸に対する抗体を精製した。Western Blotting により，精製抗体が，抗原に用いた合成ペプチドと反応することが確認された。また，この抗体は，精製ＮＤＶの構成成分のなかのＦ蛋白と特異的に反応し，Ｆ蛋白のうち，主としてF_2蛋白を認識した。

２．感染性阻害効果の検討

(1) ウイルス粒子の細胞への感染の阻害効果

感染力をもったＮＤＶ（約70pfu）と段階希釈した抗体溶液を，４℃で反応させた後，反応液をＢＨＫ－21の Monolayer にかけ，37℃で１時間静置した後，溶液を除き，agar を含む培養液で重層し，２日後にプラークの数を算定した。Control の抗体として，Transferrin Receptor の一部の sequence をもつ合成ペプチドを同様の方法でウサギに免疫して得られた抗血清を用いた。その結果，精製した抗体は，0.1mg／ml では plaque 形成の阻害効果はみられなかった。

(2) ＮＤＶ感染細胞からの infectious virus の生産の阻害効果

ＢＨＫ－21の Monolayerに，約70pfu のＮＤＶを37℃で，吸着，感染させた後，ＮＤＶを除去し，各濃度の抗体を含んだ培養液を加えて，20時間培養した後，培養上清中に産生されてきたＮＤＶの感染価を Plaque Assay にて Titration した。その結果，精製抗体は，感染性をもった新たなウイルスの産生を，0.1mg／ml の濃度では，60％阻害した。一方，control 抗体を用いた場合には，阻害効果はみられなかった。

以上の結果より，Ｆ蛋白の開裂部位に対する精製抗体は，すでに開裂を受けたウイルスが細胞に感染する step では，阻害効果はないが，一方，感染細胞から新たに感染力をもったウイルスが産生される step に対しては，細胞外から加えた抗体が阻害効果をもつことが示された。そこで，我々は，このような開裂予想部位に対する抗体が感染力を有するウイルス量を減少させる機構を明らかにするために，生化学的な検討を進めた。

３．F_0の開裂阻害効果とその作用部位

ＮＤＶを感染させたＢＨＫ－21の Monolayer を，^{35}Ｓ－Methionine で label しながら，0.03mg／ml の精製抗体を含む培養液で培養を続けた後，その cell lysate を，Ｆ蛋白に対するマウスのモノクローナル抗体を用いて，Immunoprecipitation を行なった。その結果，精製抗体を加えない場合，ほぼ全てのF_0が開裂をうけているのに対して，精製抗体を加えた場合は，⅓のF_0が開裂阻害をうけていた。そこで，さらに，F_0の開裂が起こる細胞内部位を検索するため，細胞表面のＦ蛋白と，細胞内のＦ蛋白の separate immunoprecipitation を行なった。その結果，F_0蛋白は，主として細胞表面において同定され，開裂の阻害をうけていることが明らかになった。

（総　　括）

Ｆ蛋白の限定分解認識部位の８個のアミノ酸に対する抗体は，細胞表面において，F_0がF_1とF_2に開裂するのを阻害し，その結果として，感染性を阻害することが明らかになった。このことより，細胞表面でＦ蛋白の開裂をうけて，感染性を獲得するウイルスに対しては，開裂予想部位に対する抗体を用いた感染防御が可能であることが示された。これは，ウイルス感染症の治療に新しい方法論を示唆するものである。

論文審査の結果の要旨

ウイルスの細胞への感染は，ウイルスエンベロープのFusion（F）蛋白が大きな役割を果たし，それが開裂することが必要であると考えられている。その開裂部位は，多くのウイルスでよく保存されている。

本研究は，F蛋白開裂部位のアミノ酸配列の合成ペプチドに対する抗体を分離し，これを用いて，F蛋白の開裂の阻害，その時のウイルス感染性に対する影響を検討し，更に，開裂の実際起こる細胞内部位についても検討を加えている。

その結果，この抗体は，中和抗体としての活性はないにもかかわらず，ウイルスの感染性を阻害し，それが，F蛋白の開裂の阻害によって起こることが示された。また，F蛋白の開裂は主として細胞表面で起こっているという新たな知見も得られた。

ウイルス感染症の治療に対して，今まで様々なアプローチをなされてきたが，F蛋白の開裂活性化を阻害するという方法は，本研究においてはじめて試みられたものであるという点で，大変ユニークである。

更に，細胞表面での開裂阻害によって，実際に感染性の阻害が可能であるという知見が得られたことから，F蛋白の開裂により感染性を獲得するウイルスに対しては，開裂部位に対する抗体で感染防御が可能であることが示唆された。例えば，今後は，ＡＩＤＳに対する臨床応用も考えられる。

以上，本研究は，ウイルス感染症の治療に対して，新しい方法論を示唆したもので，大変意義深いものであり，学位論文として価値あるものと認める。