

Title	Temperature-sensitive Phenotype of a Mutant Sendai Virus Strain Is Caused by Its Insufficient Accumulation of the M protein
Author(s)	近藤, 亨
Citation	大阪大学, 1994, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3075029
rights	© the American Society for Biochemistry and Molecular Biology
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	近藤 亨
博士の専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	第 11260 号
学位授与年月日	平成 6 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学研究科生理系専攻
学位論文名	Temperature-sensitive Phenotype of a Mutant Sendai Virus Strain Is Caused by Its Insufficient Accumulation of the M protein (センダイウイルス粒子形成における M タンパク質の役割)
論文審査委員	(主査) 教授 米田 悦啓 (副査) 教授 山西 弘一 教授 上田 重晴

論文内容の要旨

(目的)

外来遺伝子の組織細胞内への導入は、先天性遺伝子疾患の解析の急速な進歩に伴い、医学上重要な手法となっている。我々のグループは以前からリポソーム内に封入した DNA を HVJ (センダイウイルス) の膜融合活性を利用して培養細胞や動物組織内に導入してきた。この方法で導入された DNA は動物組織内でその遺伝情報を発現したが 1 週間程度でおわり、治療という面では応用範囲が狭いと考えられる。外来遺伝子を長期間、持続的に発現をさせるためにこのウイルス自体の持つ持続感染という特性を利用し、ウイルス自身をベクターとする研究を開始した。本研究では、ウイルスが持続的に感染する機構について検討を加え、ウイルスの産生が温度感受性である突然変異株 C1.151 株についてウイルス粒子の形成を左右している原因を研究した。

(方法ならびに成績)

1) 温度感受性突然変異センダイウイルス (C1.151 株) の粒子形成不全と M タンパク質の関係

C1.151 株持続感染細胞を用いて非許容温度 (38°C) と許容温度 (32°C) でウイルスのタンパク質の量の変動を Immunoblotting により調べた。同時にウイルスの産生を赤血球凝集反応により検討した。その結果、非許容温度から許容温度への変化により M タンパク質の量は約 6 倍増加したが転写、複製に関与する NP, P タンパク質の量は変化しなかった。また M タンパク質の量の増加に伴いウイルスの産生が検出された。この結果から、ウイルスの産生が M タンパク質の量の増加に因っていると考えられたので、野生型 (Z 株) の M タンパク質を強制発現させた細胞株を樹立し、非許容温度下で C1.151 株を感染させてウイルスの産生を調べた。その結果、野生型の M タンパク質の補充により非許容温度下でウイルスの産生を誘導することが出来た。更に C1.151 株の M タンパク質をワクシニアウイルスを用い持続感染細胞内で強制発現させた結果、非許容温度で多量のウイルスの産生が検出された。これらの結果は、C1.151 ウイルスの持続感染はその M タンパク質に機能上の異常があるためではなく、非許容温度では感染細胞内の M タンパク質の量が少ないことによると考えられる。また、M 以外のタンパク質の量が温度により変化しないことから M タンパク質が他のウイルス遺伝子の発現に影響を与えないことが明らかとなった。

次に感染細胞内の M タンパク質の変動の原因を調べるために C1.151 株感染細胞の非許容温度と許容温度での M タンパク質の mRNA 量を Northern Blotting で、翻訳効率を ^{35}S -Met で 20 分間 pulse-label 後 Immunoprecipitation で、M タンパク質の安定性については、Z 株、C1.151 M タンパク質を強制発現した細胞を作製し、非許容温度と

許容温度で pulse-chase 後, Immunoprecipitation により検討した。その結果, mRNA の量, 翻訳効率については両温度で変化は見られなかったが, C1.151 株の M タンパク質は非許容温度で非常に不安定であった。この不安定性によりウイルスの産生に十分な量の M タンパク質の蓄積が阻害されていると考えられる。

2) C1.151 ウイルス M タンパク質の不安定化に関わる変異

M タンパク質の不安定性の原因を調べるために C1.151 株と野生型 (Nagoya 株) の M タンパク質遺伝子の塩基配列を決定した。更に報告されている Z 株, Harris 株の M タンパク質遺伝子と比較検討した結果, 69 番目のグリシンがグルタミンに, 116 番目のスレオニンがアラニンに, 183 番目のアラニンがセリンに置変わる変異が C1.151 株の M タンパク質だけに見出されたのでこれらのアミノ酸変異がこのタンパク質の不安定化に働いていることが示唆された。この C1.151 株 M タンパク質の不安定性をきめているアミノ酸変異を調べるために In vitro mutagenesis により C1.151 株 M タンパク質遺伝子に見られる変異を Z 株の M タンパク質発現ベクターに作り, 3 種類の mutant M タンパク質発現細胞を作製した。これらの細胞を用いた結果, どの 3 つの変異 M タンパク質も非許容温度で不安定性を示した。

(総括)

温度感受性突然変異ウイルス C1.151 株が細胞と持続感染し, 非許容温度でウイルスを産生することが出来ない理由は, その M タンパク質が変異により非常に不安定となりウイルスが細胞から産生されるのに必要な量の M タンパク質の蓄積がないためであると考えられる。本研究により, M タンパク質は, ウイルス粒子形成には関係するが, ウイルスの遺伝子発現には関与しないことが明らかとなった。このことから, M 遺伝子を欠失させることにより細胞外に粒子を放出しないベクターの作成が可能であることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

遺伝子の動物細胞への導入と発現の技術は, 遺伝子治療の基礎として重要であるが遺伝子の発現が一過性であったり, 導入効率が低い, 導入できる細胞が限られているなどまだ不完全なものである。これまでに報告されている動物細胞内への遺伝子導入法のうち, 導入効率, 再現性共に優れた方法の 1 つにセンダイウイルスの膜融合活性を利用した膜融合リポソーム法があるが, 導入された遺伝子の発現は一過的なものであり, 遺伝子治療を念頭に置いた場合は, 利用範囲は限られている。

本研究は, センダイウイルスが持つ優れた特性を利用して, 安定に導入遺伝子を発現する新しいベクターを開発することを目的とし, センダイウイルスの変異株である温度感受性突然変異ウイルス C1.151 についてその持続感染の機構を解析することで, 遺伝子の持続的な発現が可能であるかを検討したものである。

その結果, C1.151 ウイルスの持続感染の原因は, 構造タンパク質の 1 つである M タンパク質がアミノ酸変異により非許容温度下で著しく不安定となり, ウイルス形態形成に必要とされる量の M タンパク質を細胞内に蓄積することが出来ないためであると判明した。また, このタンパク質はウイルスの転写, 複製に関与していないことが示唆された。

本研究は, センダイウイルスの形態形成において M タンパク質が重要な機能を果たしていること, 及び, 遺伝子治療を目的としたウイルスベクターとして最も重要な性質の 1 つである安定で持続的な遺伝子の発現をするための必要条件をセンダイウイルスにおいて明らかにしたもので, 今までにない応用範囲の広いウイルスベクターの開発に大きく貢献し, 学位論文として十分価値のあるものと認められる。