

Title	Additional glycosylation of the H protein of measles virus deprives its hemagglutinating activity
Author(s)	蘇, 道
Citation	
Issue Date	
oaire:version	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38900
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	蘇 道
博士の専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	第 11273 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 医学研究科病理系専攻
学位論文名	Additional glycosylation of the H protein of measles virus deprives its hemagglutinating activity (麻疹ウイルス H 蛋白の変異による糖鎖付加と感染細胞表面での赤血球吸着の陰性化)
論文審査委員	(主査) 教授 上田 重晴 (副査) 教授 山西 弘一 教授 栗村 敬

論文内容の要旨

【目的】

麻疹ワクチンの普及により、麻疹流行規模は縮小したが、その一方で過去にワクチン接種を受けた者からの麻疹罹患もしばしば報告されるようになった。従来の麻疹ウイルスの赤血球凝集素 (H蛋白) には N 末端側に 5ヶ所の糖鎖が付加されていることが知られているが、私達が最近分離したウイルス株では H 蛋白の 416番目のアミノ酸がアスパラギン酸からアスパラギンに変異し、そこが新たに第 6 番目の糖鎖付加部位になっていた。これらの新鮮分離株では感染細胞表面でのサル赤血球の吸着現象 (HAD) が起らず、最近の麻疹の疫学的な状況と考え合わせると、ワクチン株と新鮮分離株との抗原性のずれも懸念されたので、新たな糖鎖付加が H 蛋白の機能や抗原性にどのような影響を与えるのか、それは現行の麻疹ワクチンによる免疫効果の低下に関連するのかを解析した。

【方法】

1. 麻疹ウイルス：藤井 (F) 株 (1991年分離野生株)、長畑 (N-HB) 株 (1971年分離野生株)、CAM 株 (1959年分離微研麻疹ワクチン株)。
2. H 遺伝子の cDNA 作成と変異導入：特異プライマーを用いた PCR 法で H 遺伝子の cDNA を作成した。変異導入には変異導入用のプライマー (CGP-416, CGP-2, CGP-3, CGP-4, CGP-5) を作成し、シーケンスによって変異が導入されたことを確認した。
3. H 蛋白の発現：H 遺伝子 cDNA を発現ベクター (pcDL-SR α) に組み込み、エレクトロポレーションにより COS-7細胞にトランスフェクトした。H 蛋白の発現は単クローン抗体を用いた免疫沈降法で確認した。
4. 赤血球凝集 (HA) 活性の検出：H 蛋白の HA 活性はアフリカミドリサル赤血球を用い、細胞表面での赤血球吸着現象 (HAD) で検出した。

【成績】

1. HA 陽性 N-HB 株 H 蛋白への新たな糖鎖付加と HA 活性の喪失：H 蛋白の 416番目の新たな糖鎖付加が HA 活性を喪失させるのかを知るために、HA 活性のある N-HB 株の H 遺伝子 cDNA の 1266番目の G を A に置換し、新たな糖鎖付加部位を導入した発現ベクター pcDL-SR α CGP-416 を作成後、COS-7細胞で変異導入 H 蛋白を発現させた。

抗 H 単クローン抗体を用いた間接蛍光抗体法で H 蛋白が細胞表面に発現していることは確認できたが、HAD は起らなかった。免疫沈降法で 80Kd の H 蛋白 (変異のない N-HB 株では 78 Kd) が合成されていることが確認できた。

tunicamycine 処理によってこの H 蛋白の分子量は変異のない N-HB 株と同値の 65 Kd に減少した。

この結果は新鮮分離麻疹ウイルス株 H 遺伝子の 1266 番目の変異に伴う H 蛋白の新たな糖鎖付加と HA 活性の喪失とよく一致した。

2. N-HB 株 H 蛋白からの糖鎖削除と HA 活性：従来から知られている 5 つの糖鎖を削除した場合の HA 活性の変化を知るため、変異導入用のプライマーを用い 1. と同様の検討を行なった。変異が導入できた 2 番目から 5 番目までの 4 ケ所ずつの削除では HA 活性に影響は認められなかった。

3. 新鮮分離株のワクチン接種によって産生された抗体に対する反応性：過去にワクチン接種を受けた小学生 11 名に麻疹生ワクチン (CAM) を再接種し、2 週後に得られた血清抗体について、新鮮分離 (F) 株とワクチン (CAM) 株を用い、中和抗体価を測定した。F 株で測定した平均中和抗体価は $2^{8.3}$ 、CAM 株では $2^{10.0}$ であった。

【総括】

HA 活性陽性の麻疹ウイルス株の H 蛋白に新たな糖鎖を付加することにより HA 活性が消失した。従来からの糖鎖を 1 ケ所ずつ削除しても HA 活性には影響はなかった。最近の流行株とワクチン株とでは軽微な抗原性のずれが認められたが、実用的に問題が生じるほど大きな差異ではなく、現行麻疹生ワクチンで最近の麻疹を充分予防できることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

最近流行する麻疹ウイルス株は従来のウイルス株と異なり、サル赤血球と反応しない。ウイルスの赤血球凝集素 (H 蛋白) に新たな糖鎖が付加されたことがその原因に上げられている。一方、過去に麻疹ワクチン接種をうけた小児の麻疹罹患例が増加していることから、最近の流行株とワクチン株との間での抗原性のずれが懸念されていた。本研究では、H 蛋白の 416 番目のアミノ酸に新たな糖鎖を付加すると、サル赤血球との反応性が消失することを sitedirected mutagenesis 法で作成した変異導入 H 遺伝子の発現実験で明らかにし、さらに、従来から知られている 5 本の糖鎖を 1 本ずつ削除しても H 蛋白のサル赤血球との反応性に変化がないことを明らかにした。また、麻疹ワクチン接種歴のある小児に麻疹ワクチンの再接種を行ない、産生された中和抗体価を最近流行株とワクチン株とで測定し、最近流行株とワクチン株の間に実用上問題にするほどの抗原性のずれがないことを明らかにした。

本研究は、過去のウイルス株で製造されたワクチンを使用する現行の麻疹予防を評価する上で、意義のある研究で、学位の授与に値すると認める。