



Title	亜急性硬化性全脳炎ウイルス赤血球凝集素の遺伝子と蛋白の解析
Author(s)	岡林, 正文
Citation	大阪大学, 1994, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38909
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。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏 名	おか ばやし まさ ふみ 岡 林 正 文
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 1 2 7 2 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	亜急性硬化性全脳炎ウイルス赤血球凝集素の遺伝子と蛋白の解析
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】

亜急性硬化性全脳炎 (SSPE) は変異麻疹ウイルス (SSPEウイルス) の脳内持続感染に起因する遅発性ウイルス感染症である。SSPEウイルスには M 遺伝子に変異が集積していること、そのため正常に機能する M 蛋白が合成されず、感染細胞からのウイルス粒子の産生がないことが知られている。しかし、それ以上に SSPE ウイルスには感染細胞表面上でのサル赤血球着現象 (HAD) が起こらない異常も多く報告されている。ウイルスの脳内持続感染を考えると、この異常はウイルスが免疫監視機構から逃れるのに都合がよい異常であるが、そのメカニズムは不明であった。1974年に上田らが分離した SSPE ウイルス微研株にもこれらの異常が起こっていたが、微研株は *in vitro* で40代以上継代を重ねると HAD が陽性になった。SSPE ウイルスが脳内に持続感染できるメカニズム解析の一端として、HAD 陰性の SSPE 微研株と継代を重ねることによって HAD が陽性に変化した微研株について、H 遺伝子の塩基配列を決定・比較すると共に、H 蛋白の機能解析を行なった。

【方法】

1. ウイルス：SSPE ウイルス微研株をヒト胎児肺 (HEL) 細胞で14代継代した株 (SSPE14) と113代継代した株 (SSPE113) を用いた。
2. SSPE ウイルス遺伝子の塩基配列の決定：SSPE ウイルス微研株感染 HEL 細胞から全 RNA を調整し、特異的プライマーを用いた PCR 産物のダイレクトシーケンスによった。
3. H 遺伝子の cDNA 作成と発現：特異的プライマーを用い PCR 産物から cDNA を作成し、発現ベクター (pcDL-SR α) に組み込んだ (pSRSSPE14 と pSRSSPE113)。H 遺伝子の発現はこれを COS-7細胞にエレクトロポレーションでトランスフェクトし、免疫沈降法、蛍光抗体法、ABC 法で確認した。また、SSPE14と SSPE113の H遺伝子間での組み替えを行ない、COS-7細胞で発現されたキメラ蛋白の HA 活性や SSPE14, SSPE113の HA 活性は HAD で検討した。

【成績】

1. SSPE ウイルス微研株の H 蛋白：pSRSSPE14と pSRSSPE113の COS-7細胞での発現実験で、両株とも78 KD の H 蛋白を同程度発現した。これらの H 蛋白は細胞表面上に出ていることが蛍光抗体法、ABC 法で確認できた。しかし、感染細胞同様、SSPE113の H 蛋白では HAD が陽性であったが、SSPE14の H 蛋白では HAD が起こらなかった。

2. SSPE ウイルス微研株の H 遺伝子塩基配列：SSPE14 と SSPE113 の H 遺伝子のシーケンスの結果、両株間に 6 ケ所の塩基置換があることが明らかになった。これらのうち 5 ケ所はアミノ酸置換を伴っていた。（SSPE14 から SSPE113 へ、17 番目のアミノ酸が H から Y に、62W→R、184S→L、481N→Y、511S→I）

3. キメラ H 蛋白による HA 活性部位の解析：2. の結果から、置換が起こっていたアミノ酸のうち、HA 活性を抑制しているアミノ酸を特定すべく、pSRSSPE14 と pSRSSPE113 の間で組み替えを行ない、COS-7 細胞で発現させた結果、481 番目の N と 511 番目の S が並んでいることが HAD 陰性に強く影響していることが明らかになった。

【総括】

SSPE ウイルス微研株は患者脳から分離直後は、感染細胞内に H 蛋白を産生するが HAD が起こらず、細胞表面への輸送が障害されているのか、H 蛋白の機能異常によるのかが不明であった。しかし、今回の研究結果によって、細胞表面への輸送には異常がなく、H 蛋白の C 末端近傍の 2 つのアミノ酸 N と S とが並んでいること、すなわち、麻疹ウイルスの H 蛋白は C 末端がウイルス粒子外面に出、N 末端が粒子内面に隠れていることを考えあわせると、H 蛋白が赤血球のレセプターに結合するドメインか、あるいはその近傍のアミノ酸変異に基づく H 蛋白の構造変化が HA 活性を失わせる結果になったことが明らかになった。

論文審査の結果の要旨

麻疹ウイルスの感染細胞表面にはサル赤血球が吸着（HAD）するが、多くの亜急性硬化性全脳炎（SSPE）ウイルスでは HAD が陰性である。SSPE ウイルス微研株も同様であったが、継代培養を続けると HAD が陽性に变化した。本研究では、この変化の分子機構を明らかにする目的で、継代数が 14 代の SSPE14（HAD 陰性）と 113 代の SSPE113（HAD 陽性）について、両者の感染細胞内に H 蛋白は合成されており、細胞表面への輸送にも障害がないことを確認した後、H 遺伝子の塩基配列を決定し、両者間で 6 塩基の置換があることを明らかにした。また、それぞれの H 遺伝子 cDNA を用い、それらの間で作成したキメラ遺伝子 cDNA の発現実験から、SSPE14 の H 蛋白 481 番目の Asparagine（SSPE113 では Tyrosine）が HAD 陰性の原因であることも明らかにした。本研究は麻疹ウイルスのレセプターの解析ならびに脳内持続感染機構の解明に対して示唆にとむ研究であり、学位の授与に値すると認める。