

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、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	おか ばやし まさ ぶん 岡 林 正 文
博士の専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	第 11272 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78KD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。