



Title	Human parainfluenza virus type 3 : Analysis of the cytoplasmic tail and transmembrane anchor of the hemagglutinin-neuraminidase protein in promoting cell fusion
Author(s)	田中, 良和
Citation	大阪大学, 1995, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/39003
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 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	たなかよしかず 田 中 良 和
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 1 8 2 5 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 7 年 3 月 23 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	Human parainfluenza virus type 3 : Analysis of the cytoplasmic tail and transmembrane anchor of the hemagglutinin-neuraminidase protein in promoting cell fusion (ヒトパラインフルエンザウイルス 3 型 : ヘマグルチニン-ノイラミダーゼ蛋白質の細胞質内および細胞膜貫通領域の欠失と細胞融合増強)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 上田 重晴 (副査) 教 授 栗村 敬 教 授 山西 弘一

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

エンベロープをもつウイルスは、宿主細胞への侵入のために、まず、細胞側受容体と結合し、ついで細胞膜とウイルスエンベロープとの間で細胞融合を起こす。ヒトパラインフルエンザウイルス 3 型 (human parainfluenza virus type 3 : HPIV 3) は、2 種類の糖蛋白質 (hemagglutinin-neuraminidase : HN および fusion : F) を有し、細胞融合時において、HN 蛋白質が、F 蛋白質の立体構造を変えることにより、その結果、F 蛋白質が細胞融合を起こすと考えられている。本研究では、この HN 蛋白質に焦点を当て、アミノ基末端からのアミノ酸欠損ミュータントが、細胞融合能に及ぼす影響を β -ガラクトサイデースの活性を用いた定量化により、検討することを目的とした。

【方法ならびに成績】

HeLa-tat および HeLa- β gal 細胞は、Fred Hutchinson Cancer Research Institute から、HN 遺伝子の cDNA 欠損ミュータント (d10, d20, d31, d40, d44, d73 : アミノ基末端から各々 10, 20, 31, 40, 44, 73 個のアミノ酸を欠失させたもの) は、米国国立衛生研究所より提供を受けた。また、d27 ミュータント (アミノ酸欠失 27 個 : 細胞質内領域に 1 個のリジンをもつ) に関しては、PCR 法により作成した後、サンガー法により DNA 塩基配列を確認した。各々のミュータントと F 遺伝子を真核細胞発現ベクター pcDL-SR α 296 に組み込んだ後、HeLa-tat および HeLa- β gal 細胞 (各々 2.5×10^6 個ずつ混合) に、pRSV-T (SV40T 遺伝子を含むベクター) とともに、エレクトロポレーション法を用いて導入した。

HeLa-tat 細胞は、HIV-1 (human immunodeficiency virus type-1) の tat 蛋白質を持続的に発現している細胞であり、HeLa- β gal 細胞は、HIV-1 の LTR 下流に β -ガラクトサイデース遺伝子を含むベクターをもつ。このため、これら 2 種類の細胞が、細胞融合を起こすと tat 蛋白質が LTR の tat 結合領域に結合し、その結果、 β -ガラクトサイデース遺伝子の発現を促進する。また、この蛋白質の発現量は、適当な基質を用いて定量化することができる。

遺伝子導入 48 時間後、chlorophenol red- β -D-galactopyranoside (CPRG) を基質として細胞融合能を野性型のものと比較した結果、d10 および d20 ミュータントは、各々 119%、158% と融合能を増強させ、一方、d27 および d31 ミュータントは、各々 74%、4% 以下と融合能を減少させた。しかしながら、d40, d44 および d73 ミュータントにおいては、細胞融合を全く促進しなかった。そのため、間接蛍光抗体法を用い、細胞表面抗原の検出を行った結果、d40, d44 および d73 ミュータントに関しては、細胞表面上に検出できなかった。さらにフローサイトメトリー法により、細胞表

面発現量を定量した結果、野性型および d10, d20, d27, d31 ミュータントは、各々 83%, 98%, 99%, 80%, 7% を示した。一方、細胞 1 個あたりの HN 分子の発現量を比較すると、野性型および d10, d20, d27, d31 ミュータントは、各々 55.5, 121, 162.8, 53.4, 36.1 分子を示した。

ついで、免疫沈降法で HN 蛋白質の細胞内合成量を比較したところ、フローサイトメトリー法とほぼ同様の結果が得られた。

【総括】

HeLa-tat および HeLa- β gal 細胞を利用することにより、細胞融合能を正確に定量化することができた。また、d27 ミュータントが、野性型のものとはほぼ同程度の細胞融合誘導能を示したことから、HN 蛋白質の細胞質内領域において電荷をもつアミノ酸（31 番目：リジン）1 個が、HN 蛋白質の細胞内輸送にとって重要であることがわかった。さらに d10, d20 ミュータントの結果から、アミノ酸欠失 20 個までは、HN 蛋白質分子の細胞内輸送が促進されることがわかった。

論文審査の結果の要旨

有膜ウイルスの感染では初期過程としてウイルス膜と細胞膜の融合が必須条件であり、ウイルス感染の拡大には感染細胞と非感染細胞との間で起こる細胞融合が重要である。しかし、これら融合過程の詳細なメカニズムについては多々不明のまま残されていた。

本研究では、ヒトパラインフルエンザウイルス 3 型を用い、感染初期過程に必須の F と HN の 2 種の蛋白のうち、HN 蛋白について細胞質内および細胞膜貫通領域の欠失変異 HN 遺伝子を作成して細胞融合に関わる HN 蛋白の役割を検討した。

F 遺伝子と変異 HN 遺伝子を CV-1 細胞に co-transfect し、誘導される融合細胞について、蛍光抗体法、免疫沈殿法による HN 蛋白の発現ならびに細胞膜への輸送効率、 β -ガラクトサイデースの発現を利用した比色定量法による融合効率の定量を行った結果、HN 蛋白のアミノ末端から 20 残基までのアミノ酸欠失は HN 蛋白の細胞内輸送を効率化し、細胞融合を増強することが明らかとなった。また、それには 31 番目のアミノ酸リジンが重要であることも決定できた。

本研究は、細胞融合のメカニズムを分子レベルで解析する上で重要な示唆を与えるもので、学位を授与するに値すると認める。