



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、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	田中良和
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第11825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-ノイラミニ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。