

|              |  |
|--------------|--|
| Title        | 麻疹ウイルス神経病原性の解析   |
| Author(s)    | 盛, 君   |
| Citation     | 大阪大学, 1996, 博士論文   |
| Version Type |  |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/39873">https://hdl.handle.net/11094/39873</a>  |
| 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">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a>〉</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         | 盛君   |
| 博士の専攻分野の名称 | 博士(医学)   |
| 学位記番号      | 第12381号  |
| 学位授与年月日    | 平成8年3月25日  |
| 学位授与の要件    | 学位規則第4条第1項該当<br>医学研究科病理系専攻   |
| 学位論文名      | 麻疹ウイルス神経病原性の解析<br>(Molecular Analysis of Measles Virus Neurovirulence) |
| 論文審査委員     | (主査)<br>教授 上田 重晴<br><br>(副査)<br>教授 羽倉 明 教授 栗村 敬                        |

## 論文内容の要旨

## 【目的】

麻疹ウイルス(MV)はパラミクソウイルス科に属するマイナス極性の非分節1本鎖RNAを持つウイルスである。MVは麻疹の原因ウイルスであるが、中枢神経系にも感染し、急性麻疹脳炎と亜急性硬化性全脳炎を起こす重要な病原ウイルスである。従って、MVの神経病原性に関する研究は他のウイルスの神経病原性の研究にも重要な知見を与えることになる。

MVのFタンパクはパラミクソウイルス科に特徴的な膜融合活性を持つタンパクである。Hタンパクは細胞表面に存在するレセプター(CD46)と結合する。Fタンパクはまず活性を持たない前駆体F<sub>0</sub>として合成され、細胞由来のプロテアーゼの作用により切断を受け、活性型のF<sub>1</sub>とF<sub>2</sub>に切断される。F蛋白の膜融合活性はウイルス感染の際に重要な働きをする。

一般に、MVの野性株と称される laboratory strains は実験動物レベルでは神経病原性は強くない。そのため、本研究では、1つの laboratory strain (N-V) から新生ハムスター脳内で4代継代し、成熟ハムスターに対して強い神経病原性を示す株(N-HB)を選択し、その強神経病原性株と非神経病原性の親株についてウイルス遺伝子の塩基配列の決定と比較、in vitroでのFとH遺伝子の発現によって、麻疹ウイルスの神経病原性を遺伝子レベルで解析することを試みた。

## 【材料と方法】

- 1) ウイルスRNAの精製: 直径10cmのデッシュにVero細胞を培養し、単層形成後、N-V株とN-HB株を個別に感染させた後、感染Vero細胞からGTC-CsCl超遠心法でウイルスのRNA精製を行なった。
- 2) N-V株とN-HB株ウイルス遺伝子のクローニングと塩基配列の決定: RT-PCR法でNP, P, M, F, H, L遺伝子をクローニングした。特異的プライマーを用いたPCRダイレクトシーケンシング法でNP, P, M, F, H, L遺伝子の塩基配列を決定した。
- 3) F遺伝子への変異導入: site-direct mutagenesisでF遺伝子へ変異を導入した。
- 4) FとH遺伝子の発現: 合成したプライマーを用いてFとH遺伝子をクローニングし、発現ベクターPCDL-SR $\alpha$ に組み込んだ。25 $\mu$ gの組換えプラスミドを用いてelectroporation法によりCOS-7細胞にトランスフェクションし、24時間後細胞融合を観察した。

## 【結果】

1) N-HB株が形成するプラークはN-V株のそれと比べて3-4倍大きかった。

2) 遺伝子塩基配列とアミノ酸配列：決定した遺伝子塩基配列を比較した結果、NPとF遺伝子にはそれぞれ2個ずつの塩基置換があり、Hには1個、Lには2個の silent mutation があることが明らかになった。NPに関してはアミノ酸配列で54番目の Leu から Arg へ、380番目の Val から Leu への置換があったが、置換されたアミノ酸の性質から蛋白の二次構造にはほとんど変化がないと考えられた。F遺伝子に関してはアミノ酸配列では170番目の Thr から Ala へ、Gln から Arg への置換があり、蛋白の構造変化の可能性が予想されたので以下の実験を行なった。

3) FとH蛋白の発現：F遺伝子における2個の変異のうち、どちらがF蛋白の細胞融合能に関与しているかを決定するために、Fタンパクの発現と遺伝子への変異導入を行なった。

N-HB株のFとHを同時に発現させた場合には細胞融合が起こったが、親株N-VのFでは起こらなかった。F遺伝子に変異を導入し解析した結果では、195番目の Arg が細胞融合を起こすのに重要であることが明らかになった。

FとH蛋白をそれぞれ単独で発現させた場合、細胞融合が起こらなかった。また、FとHを単独で発現させた細胞を混合培養した場合も細胞融合が起こらなかったことから、FとH蛋白の特異的な interaction が麻疹ウイルスの細胞融合に不可欠であることも明らかになった。

## 【考察】

成熟ハムスターに対して神経病原性を示した麻疹ウイルスN-HB株と非病原性の親株N-Vの全遺伝子を決定し、それを比較することによって、FとNP遺伝子にそれぞれ2個ずつの変異を認めた。F遺伝子に変異を導入することによって解析した結果、F蛋白の195番目の Gln が Arg に変化することによって強力な融合能が生じることが明らかになった。パラミキソウイルスのF蛋白を比較すると、すべての cysteine が保存されているので、Cys が保存されている領域での変異アミノ酸、特に195番目のアミノ酸 Arg がF蛋白の融合能に重要であることが想像できる。Cosbyらはジステンパーウイルス(CDV)の大プラーク形成株は幼若ハムスターに対して急性の神経病原性を示すことを報告しているが、我々の研究結果からCDVのF遺伝子に変異が起こったと想像すると、F蛋白が強い融合能を獲得することにより、脳神経細胞への感染効率がよくなり、そのために強い神経病原性を示すようになったと考えることができる。今後さらにFの細胞融合能と神経病原性との関連性を reverse genetics 法などを応用して解析して行く予定である。

## 論文審査の結果の要旨

本研究では、麻疹ウイルスの1つの laboratory strain (N-V) を新生ハムスター脳内で4代継代することによって、成熟ハムスターに対し強い神経病原性を獲得した株(N-HB)を選択し、それと親株の非神経病原性株について、ウイルス遺伝子の塩基配列を決定し、さらに in vitro でFとH遺伝子を発現させることによって、麻疹ウイルスの神経病原性を遺伝子レベルで解析した。

決定した遺伝子塩基配列を比較した結果、NPとF遺伝子にはアミノ酸置換を伴う塩基置換がそれぞれ2カ所ずつあり、またHには1カ所、Lには2カ所の silent mutations があった。F遺伝子に関してはアミノ酸配列で170番目の Thr から Ala、および195番目の Gln から Arg への置換があった。NPに関してはアミノ酸配列で54番目の Leu から Arg、および380番目の Val から Leu への置換があった。N-HB株は親株N-V株に比べて大きなプラークを形成するようになったので、細胞融合に関係するF遺伝子に変異を導入し解析した結果、195番目の Arg への置換が細胞融合に重要であることが明らかになった。これらの結果から、F遺伝子の変異に伴う強い細胞融合能の獲得が強い神経病原性につながった可能性が示唆された。

本研究は麻疹ウイルスの神経病原性を遺伝子レベルで解析する上で重要な知見を与えたものであり、学位の授与に値するものと認める。