

Title	Identification and Characterization of Cell Lines with a Defect in a Post-adsorption Stage of Sendai Virus-mediated Membrane Fusion
Author(s)	江口, 暁子
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/42636
DOI	
rights	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

氏名	江口 曉子
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 16057 号
学位授与年月日	平成13年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科病理系専攻
学位論文名	Identification and Characterization of Cell Lines with a Defect in a Post-adsorption Stage of Sendai Virus-mediated Membrane Fusion (センダイウイルスの感染初期過程における膜融合に関する因子の解析)
論文審査委員	(主査) 教授 堀井 俊宏 (副査) 教授 米田 悦啓 教授 塩田 達雄

論文内容の要旨

【目的】

センダイウイルス (SV) は、細胞膜と融合し細胞質に直接 RNA ゲノムを導入することにより感染する。SV の「細胞特異性・種特異性が低く幅広い動物細胞に感染することができる」という特性から、近年組み換え SV や SV の外膜タンパク質を持ち高分子物質を細胞に直接導入できる膜融合リポソームが開発され、遺伝子治療用ベクターとしての応用も考えられている。しかし、SV は遺伝子治療の重要な標的であるヒト B リンパ球・T リンパ球の一部はレセプターが存在するにもかかわらず感染できず、この原因については明らかにされていない。そこで本研究では、SV の感染初期過程を解析することにより SV の感受性を決める因子についての情報を得ることを目的とする。

【方法ならびに成績】

ウイルス感染初期過程を解析する手法として最も有用なのは、遺伝的に同じバックグラウンドを持ちながらウイルス感受性を失った細胞を調べることである。本研究では、LLCMK2 細胞や HeLa 細胞に温度感受性変異株 (cl.151) を感染させて持続感染細胞を樹立し、これらの細胞には野生型 SV が重複感染できないことを見出したので、以下この持続感染細胞を用いて感染初期過程の詳細な解析を行った。まず、ジフテリア毒素フラグメント A (DTA) をリポソーム内に持ち SV のエンベロープタンパク質である F、HN タンパク質を外側に持つ DTA 封入膜融合リポソーム (FL-DTA) を用いて、これらの細胞と SV における融合過程を検討した。その結果、非感染細胞は FL-DTA に感受性であるのに対し持続感染細胞は耐性であったことから、持続感染細胞では膜融合の過程が阻害されているために SV が感染できないことが分かった。

続いて、融合の前段階である結合について検討するために、¹²⁵I で標識した SV を用いて非感染細胞と持続感染細胞に対する SV の結合を測定したところ、SV の結合アフィニティー・最大結合量に差はなく、またどちらもシアル酸を介した結合であることが示され、持続感染細胞は非感染細胞に比べてレセプターに異常は見られないことを明らかにした。このことから、持続感染細胞には SV は結合できるが融合できないと結論づけた。

この結果から、SV と細胞との融合を阻害する因子の存在が示唆されたため、持続感染細胞を用いて融合阻害因子についての解析を行った。持続感染細胞の細胞表面上には SV のエンベロープタンパク質 (F、HN) が高発現していることから、これらのタンパク質が融合阻害因子になるかどうかの検討を行った。まず F タンパク質発現細胞を樹立し FL-DTA を作用させたところ感受性を示したことから、細胞表面上の F タンパク質は単独では融合阻害

因子とならないことを明らかにした。一方、HN タンパク質発現細胞は膜融合に対して耐性を示し、さらに持続感染細胞に抗 HN 抗体を作用させると、膜融合能は部分的に回復した。

以上の結果から、細胞表面には SV との膜融合に必須なレセプター以外の第 2 の因子があり、この因子は HN タンパク質と相互作用している可能性が強く示唆された。一方ヒト B リンパ球・T リンパ球の一部の細胞でも、SV が結合できるが融合できないという現象が見られることから、これらの非感受性細胞ではこの第 2 の因子が欠損している可能性がある。これまで、ヒト免疫不全ウイルス (HIV)、単純ヘルペスウイルス (HSV) という 2 つのエンベロープウイルスでレセプター以外の第 2 の因子が膜融合に必須であることが明らかになっているが、本研究の結果は SV においても同様の機構が存在することを示唆している。

【総括】

本研究の結果より 1) SV の膜融合にはレセプター以外の細胞性因子が必要であること、2) SV と細胞膜の融合に関与するレセプター以外の細胞性因子は HN タンパク質と相互作用することが強く示唆された。

論文審査の結果の要旨

センダイウイルス (SV) は感染の細胞特異性・種特異性が低く幅広い細胞に感染することができるが、ヒト B リンパ球や T リンパ球の一部には感染できない。しかし、これらの細胞には SV のレセプターが存在しており、なぜこのような細胞特異性が生じるのかについては明らかでなかった。

本研究では、DTA 封入膜融合リポソームをプローブに用いて SV 持続感染細胞を材料に、細胞と SV の感染初期過程を SV の結合とそれに引き続く膜融合に分けて解析することに成功し、さらに SV の感受性を決める因子についての解析も行った。その結果、1) SV の感染初期過程は、ウイルスの細胞膜への結合とそれに引き続く膜融合のステップが明確に分けられており、SV との融合に関与する特異性はレセプター以外の細胞性因子で決定されている場合が存在すること、2) このレセプター以外の細胞性因子は HN タンパク質と相互作用する可能性が高いことを示唆できた。

本研究は、膜融合リポソームや組み換えセンダイウイルスの遺伝子治療用ベクターとしての応用を考える上で重要な意義を持ち、学位の授与に値するものと考えられる。