The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Borna Disease Virus Phosphoprotein Binds a Neurite Outgrowth Factor, Amphoterin/HMG-1
Author(s)	神谷, 亘
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43976
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	神谷　亘（かみたに わたる）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学位記番号	第　17641　号
学位授与年月日	平成15年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科分子病態医学専攻
学位論文名	Borna Disease Virus Phosphoprotein Binds a Neurite Outgrowth Factor, Amphoterin/HMG-1 （ボルナ病ウイルスリン酸化蛋白質と神経突起伸長因子 amphoterin/HMG-1 との結合とその意義について）
論文審査委員	（主査） 教　授　生田　和良 （副査） 教　授　松浦　善治　　教　授　山西　弘一

論文内容の要旨

〔目的〕

ボルナ病ウイルス（BDV）は、モノネガウイルス目ボルナウイルス科に属する非文節、マイナス鎖、一本鎖の RNA ウイルスである。その特徴は、向神経性のウイルスで、転写・複製を核内で行い、非常に低いウイルス産生能を有している。BDV はドイツでウマの非化膿性脳炎の原因ウイルスとして初めて報告された。動物では、ヒツジ、ウシ、ネコ、ダチョウで自然感染も報告されている。また、最近の疫学調査では、ヒトの精神疾患との関連性も報告されている。

BDV は、培養細胞においては非細胞障害性を示すことが知られている。しかしながら、新生仔ラットでは、持続感染を呈し、脳炎症状を伴わない行動異常などを呈し、さらに脳の特異的領域において感染が認められ脳の発達に影響を及ぼす。また最近の報告では、新生仔 BDV 感染において脳内のノルエピネフリン、セロトニンの含有量に影響することが示された。また BDV 感染によりシナプスの形成が、特に皮質、海馬領域において減少することが報告された。これらのことは、BDV 感染による炎症に起因する二次的な変化だけでなく、感染そのものによる脳への影響があることを示す。

また、ウイルスの主要蛋白質である BDV-p24 は、BDV-p40 nucleoprotein と同様に感染細胞や感染脳内で豊富にみとめられる。p24 蛋白質はリン酸化蛋白質で、複製・転写において BDV のポリメラーゼタンパク質のコファクターである。そのため、p24 が宿主側の因子と結合することで、感染した神経細胞に影響を与えている可能性が示唆される。そこで、p24 リン酸化蛋白質と特異的に結合する宿主側因子の同定を行い、その病態への意義を解析した。

〔方法ならびに成績〕

まず、はじめに神経系由来および上皮系由来の BDV 感受性細胞より細胞抽出液を作製し、組換え p24 蛋白質をプローブとした Far-Western 法を行った。その結果、すべての感受性細胞で、約 30 kDa 付近にバンドが検出された。また、この蛋白質は、p24 蛋白質アフィニティーカラムを用いた解析においても検出された。そこで、マイクロシークエンスをおこなった結果、検出された蛋白質はラットおよびヒトの amphoterin/HMG-1 と相同の配列を有するこ

とが確認された。さらに、この2つの蛋白質の結合を *in vivo* で確認するために、mammalian two-hybrid 法を用いたところ、特異的に amphoterin が蛋白質と結合することが確かめられた。

ここで、amphoterin は、トランスフォームした細胞もしくは胎生期から成熟期の脳で強く発現している 30 kDa の蛋白質であり、そのレセプターである RAGE と結合することで細胞の神経突起伸長能、細胞の遊走能に深く関与していることが知られている。さらに、その細胞内での局在は、伸長部位である突起伸長点に豊富に存在する。

そこで次に、p24 蛋白質が結合することにより、amphoterin のこれらの機能にどのような影響を与えるか検討した。その結果、BDV 感染細胞では、神経突起伸長が抑制され、さらに、培養上精中に組換え p24 蛋白質を添加した細胞においても同様の現象が確認された。また、感染細胞では、その細胞遊走能が減少することを確かめた。加えて、抗 amphoterin 抗体を用いた免疫染色により BDV 感染細胞では、突起伸長点における amphoterin の発現量が減少し、さらに amphoterin のレセプターである RAGE の発現について RT-PCR を用いた方法により解析したところ、BDV 感染細胞では、その発現が顕著に減少していた。

〔総括〕

これらの解析より

①p24 蛋白質と宿主側の因子である、神経突起伸長因子 amphoterin が特異的に結合した。

②BDV 感染細胞では、神経突起伸長能ならびに細胞の遊走能が非感染細胞に比べて顕著に減少した。

③BDV 感染細胞では、突起伸長点における amphoterin の発現が減少した。

④組換え p24 蛋白質は、抗 amphoterin 抗体と同様に神経突起伸長能を抑制した。

⑤BDV 感染細胞では、amphoterin のレセプターである RAGE の発現が、非感染細胞に比べて顕著に減少した。

つまり、BDV 感染細胞において p24 蛋白質と細胞内の amphoterin が結合することで、突起伸長点への移動が阻害され、その生理的機能である神経突起伸長、細胞遊走能が抑制されることが示唆された。現在までに、BDV 感染における直接的な神経細胞の機能への影響を示すことは報告されていない。

今回の結果は、BDV 感染における病態の一つに、BDV-p24 と amphoterin が結合に基づく神経細胞への直接的な影響を示すものであると考えられる。

論文審査の結果の要旨

BDV は、ウマならびにヒツジを自然宿主とし、行動異常や運動器障害などの神経疾患を引き起こす向神経性の RNA ウイルスである。これまでの研究により、BDV がヒトにも感染していることが明らかとなっている。また、疫学調査の結果より、BDV の感染と精神疾患ならびに慢性疲労症候群の発症との間に強い関連性が示唆されている。しかし、BDV の中枢神経病原性の機序については依然明らかになっていない。本研究は、BDV の神経病原性を解明するために、BDV の主要ウイルス抗原である p24 蛋白質に注目するという独創的な方法で問題の解決に望んだ。

そして、p24 蛋白質と特異的に結合する宿主因子の同定には、組換え p24 蛋白質をプローブとした Far-Western 法を行った。その結果、宿主側の結合蛋白質として 30 kDa の蛋白質が検出された。この蛋白質のアミノ酸配列は、amphoterin 蛋白質と完全に一致した。Amphoterin は、胎生期から成熟期の脳で強く発現している蛋白質で、神経細胞の突起伸長や生存維持に深く関与している宿主因子である。

事実、BDV 持続感染細胞では神経突起伸長能の低下が認められ、amphoterin の機能が阻害されていることが確認された。

本研究では、p24 蛋白質が神経細胞内の神経突起伸張因子である amphoterin と特異的に結合すること明らかにした。また、BDV 感染細胞では amphoterin の機能である神経突起の伸張ならびに細胞の遊走能力が顕著に減少していることを見事に証明した。

神谷亘君の研究内容は、p24 蛋白質が、amphoterin の機能を阻害することにより、BDV の中枢神経系病原性の発現に関与している可能性を示唆したものであり、学位の授与に値すると考えられる。