



Title	Methyl-beta cyclodextrin alters the production and infectivity of Sendai virus
Author(s)	藤田, 洋志
Citation	大阪大学, 2011, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/58170">https://hdl.handle.net/11094/58170</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 href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> 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

【117】

氏 名	藤 田 洋 志
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 2 4 4 3 9 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 23 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科未来医療開発専攻
学 位 論 文 名	Methyl-beta cyclodextrin alters the production and infectivity of Sendai virus (メチルβサイクロデキストリンによるHVJ産生と感染への影響)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 金 田 安 史 (副査) 教 授 上 田 啓 次 教 授 塩 田 達 雄

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 〔 目 的 〕

コレステロールは細胞膜上で多様な機能を果たしているが、ウイルス産生における細胞膜コレステロールの影響については種々の議論があり、ウイルスの感染性に及ぼす影響については知られていない。そこで我々はセンダイウイルス (HVJ) を用いて、膜のコレステロールがウイルス産生能やウイルスの感染性に与える影響とそのメカニズムについて検討した。

#### 〔 方法ならびに成績 〕

HVJ感染細胞に Methyl-beta-Cyclodextrin (MβCD) 処理することによってコレステロール除去を行うと産生されるHVJ量が格段に上昇した。Cholesterol-depleted cell から産生された HVJ (HVJ-CD) の産生量をゲノムの Northern blotによって比較すると約5.6倍増加していた。同様に、CBB染色によって産生されたウイルスのタンパク量を比較したところ、約2-4倍程度の増加を確認できた。Mタンパクを遺伝子導入した細胞からは Virus Like Particle (VLP) が出芽する。MβCD処理された細胞から VLP産生量が上昇していたことからコレステロールは HVJ出芽に影響していると考えられる。HVJ-CDの形質を電子顕微鏡観察した所、wild-type HVJと同様に脂質二重層の膜構造を保持しており、免疫電顕を行うとその表面にFタンパクを確認することができた。しかし、HVJ-CDは wild-type HVJよりも有意に感染効率が低下すると共にウイルスに含まれる Cholesterol量も有意に減少していた。HVJ-CDの形質をさらに詳細に検討するためにシヨ糖密度勾配遠心法を用いて12分画に分画した。top fractionを1, bottom fractionを12としたとき、wild-type HVJは fraction4-6に集中しているのに対し、HVJ-CDは広い分画に沈降していることが分かった。シヨ糖密度勾配遠心で HVJ-CDゲノムとタンパクは全フラクションから検出されたが、感染能のあるHVJ-CDはフラクション4-8のみであった。この結果から、HVJ感染細胞からコレステロールを除去すると形質的に感染能を持たない HVJが産生されることが分かったが、フラクション4-8においても感染能が著しく低下していることから、形質の異なるウイルスの産生以外にもHVJ-CDの感染効率が下がる決定的な要因があると考えられる。HVJ-CDのコレステロール量が wild-type HVJよりも劇的に減少していることから、HVJ-CDの感染効率低下はコレステロールの減少によるものである可能性がある。

そこで次に HVJ自身からコレステロールを除去すると膜の構成タンパク量は変わらないものの、感染性は低下する。また、コレステロールを除去した HVJにコレステロールを補充しても感染効率は十分に回復しなかった。このことからコレステロールの除去によってエンベロープ上のタンパク構成に不可逆的なダメージが入ったためであると考えられる。これを検証するために heptad repeat-B (HR-B) ペプチドを用いた F機能の阻害実験を行った。HR-Bペプチドは HVJが細胞と融合を起こす際に Fタンパクに結合して融合能を阻害する性質がある。HVJからのコレステロール除去により Fタンパクの機能に障害が起った場合、HR-Bペプチド存在下であっても感染効率がそれ以上減少しないと予想される。wild-type HVJとコレステロール除去 HVJ、コレステロール再添加 HVJを HR-Bペプチド存在下での感染能を比較した所、wild-HVJでは有意に感染効率の減少を確認できたがコレステロール除去 HVJおよび再添加 HVJでは有意な感染効率の減少は確認されなかった。

#### 〔 総 括 〕

HVJ感染細胞からコレステロールを除去すると HVJや VLP産生効率が劇的に上昇したので、細胞膜のコレステロールは HVJ産生における出芽の制御機能があると考えられる一方、産生されたHVJ-CDは著しく低い感染効率を示したことから、ウイルス膜のコレステロール含量が感染効率に影響を与えていることが示唆された。このことは、HVJのコレステロールを直接除去すると不可逆的な感染効率の低下が起ったことから裏付けられ、そのメカニズムをHR-Bペプチドを添加して調べた結果、ペプチド添加によりそれ以上の感染効率の減少が検出できなかったことから HVJエンベロープのコレステロールは HVJ感染時のFの機能保持に重要であることが示唆された。

#### 論文審査の結果の要旨

センダイウイルス産生と感染におけるコレステロールの影響は未知であった。本研究ではMethyl-beta-Cyclodextrinを用いてコレステロール除去を行うことによりセンダイウイルス産生と感染におけるコレステロールの影響を詳細に検討した。

センダイウイルス感染細胞のコレステロールを除去するとセンダイウイルス産生効率は上昇するが、感染性の低いウイルスが多量に産生されることも同時に明らかとなった。感染効率の低下の原因は比重の異なる感染性の低いウイルスが存在することとエンベロープからコレステロールが減少したことでFタンパクの活性が不可逆的に低下したためであることが分かった。本研究はセンダイウイルスの産生と感染におけるコレステロールの役割に新たな知見を与え、抗ウイルス薬の標的としての可能性が期待される。

よって、博士（医学）の学位授与に値する。