



Title	Baculovirus GP64-mediated entry into mammalian cells
Author(s)	片岡, 周子
Citation	大阪大学, 2012, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/59005
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。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	片岡周子
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第25079号
学位授与年月日	平成24年3月22日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
	医学系研究科予防環境医学専攻
学位論文名	Baculovirus GP64-mediated entry into mammalian cells (バキュロウイルスエンベロープ蛋白質GP64を介した哺乳動物細胞への 侵入機構の解明)
論文審査委員	(主査) 教授 松浦 善治 (副査) 教授 生田 和良 教授 塩田 達雄

論文内容の要旨

〔目的〕

バキュロウイルス(AcMNPV)は目的蛋白質を昆虫細胞で大量に産生可能な遺伝子発現ベクターとして広く用いられているが、哺乳動物細胞にも効率よく侵入し、複製すること無く外来遺伝子を導入できることから、遺伝子導入ベクターとしても注目されている。AcMNPVの感染にはエンベロープ蛋白質であるGP64が重要な役割を演じていが、哺乳動物細胞への侵入機構については相反する成績が報告されており、その詳細は未だ明らかにされていない。本研究では組換えバキュロウイルスおよびバキュロウイルスのGP64を搭載したシードタイプウイルスを用いて、GP64を介したウイルスの哺乳動物細胞への侵入機構を解析した。

〔方法ならびに成績〕

水疱性口内炎ウイルス(VSV)のエンベロープ蛋白質(G)遺伝子をルシフェラーゼ遺伝子に置換した組換えVSVに、一過性にAcMNPV、VSV、そして Murine leukemia virus(MLV)のエンベロープ蛋白質を粒子表面に搭載したシードタイプウイルス、NPVpv、VSVpv、MLVpvを作製した。また、CAGプロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子を搭載した組換えバキュロウイルス(AcCALuc)を使用した。

まず、GP64を介したウイルスの細胞への吸着や侵入過程に及ぼすコレステロールの役割を検討するため、コレステロール除去剤であるmethyl-beta-cyclodextrinやコレステロール合成阻害剤であるロバスタチンで細胞を処理した。これらの薬剤処理によりウイルスの細胞膜表面への吸着に変化はなかったが、細胞内への侵入は抑制された。次に、GP64を介した細胞内への侵入過程を解析するために、侵入過程の各ステップに対する阻害剤やドミナントネガティブ変異体の影響を検討した。ダイナミン活性阻害剤であるdynasoreやダイナミンのドミナントネガティブ変異体(K44A)を用いたところ、dynasoreの濃度依存的に、また、K44Aの発現によりGP64を介したウイルスの細胞内侵入が阻害された。さらに、クラスリン依存的なエンドサイトーシスの阻害剤であるchlorpromazineやクラスリンのアダプター蛋白質であるEps15のドミナントネガティブ変異体($\Delta 95-295$)を用いたところ、chlorpromazineの濃度依存的に、また、 $\Delta 95-295$ の発現によりGP64を介したウイルスの細胞内侵入が抑制された。一方、カベオリンのドミナントネガ

ティブ変異体の発現や、そのノックダウン細胞では細胞侵入には影響は認められなかった。さらに、マクロビノサイトーシスの阻害剤であるEIPA、および、マクロビノソーム形成に関与するRab34のドミナントネガティブ変異体(T66N)を用いたところ、EIPAの濃度依存的に、また、T66Nの発現によりGP64を介したウイルスの細胞内侵入が抑制された。バキュロウイルスの侵入を生きた細胞で解析するため、GP64にテトラシステインタグを挿入して蛍光標識したウイルスを調整した。標識されたバキュロウイルスは、マクロビノサイトーシスにより細胞内へ取り込まれるデキストランと共に細胞に侵入して行く様子が観察された。以上の成績から、GP64を介したウイルスの細胞内への侵入には、コレステロール、ダイナミンやクラスリン依存的なエンドサイトーシス、そしてマクロビノサイトーシスが関与することが明らかになった。

〔総括〕

バキュロウイルスのエンベロープ蛋白質GP64を介したウイルスの細胞内への侵入機構を、阻害剤やドミナントネガティブ変異体を用いて解析した。バキュロウイルスおよびGP64を搭載したシードタイプウイルスは、細胞表面のコレステロール、ダイナミンおよびクラスリン依存的なエンドサイトーシス、そしてマクロビノサイトーシスを介して細胞内へ侵入するが、カベオラ依存的なエンドサイトーシスは利用しないことが明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

バキュロウイルス(AcMNPV)は哺乳動物細胞にも効率よく感染することから、近年では哺乳動物細胞への遺伝子導入ベクターとしても注目されている。AcMNPVの細胞への侵入にはエンベロープ蛋白質であるGP64が重要な役割を演じているが、哺乳動物細胞への侵入機構に関してはこれまでにいくつかの相反する成績が報告されており、未だその詳細は明らかにされていない。本研究では、AcMNPV粒子とAcMNPVのGP64を被ったシードタイプウイルスを用いて、GP64を介した哺乳動物細胞へのウイルス侵入機構の解明を試みた。Methyl- β -cyclodextrinを用いて細胞膜からコレステロールを除去すると、濃度依存的にGP64を介した細胞内への侵入は抑制されたが、細胞表面への吸着には影響を示さなかった。また、ウイルスの細胞侵入の各ステップに対するドミナントネガティブ変異体や阻害剤を用いた解析を行った。これらの成績から、GP64を介したウイルスの細胞内侵入は、細胞膜のコレステロールが重要であり、カベオラ非依存的、ダイナミン及びクラスリンそしてマクロビノサイトーシス依存的に細胞内に侵入している事が明らかされた。

本研究はバキュロウイルスの細胞侵入機構を詳細な解析により明らかにした論文である。

以上より本論文は博士(医学)の学位授与に値するものと認められる。