

氏名	シヨウ 蕭	サ 颯
学位(専攻分野)	博士(薬学)	
学位記番号	薬博第452号	
学位授与の日付	平成12年7月24日	
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当	
研究科・専攻	薬学研究科創薬科学専攻	
学位論文題目	Studies On Some Host-Derived Membrane Components Incorporated Into The Enveloped Viruses (エンベロープをもつウイルス粒子に取り込まれる宿主細胞由来の膜成分についての研究)	
論文調査委員	(主査) 教授 河合明彦	教授 川寄敏祐 教授 藤井信孝

論文内容の要旨

ウイルスの不活化ワクチンを製造する過程にはウイルス材料の純度を高める必要があるが、エンベロープを持つウイルスの場合には、一般にウイルス粒子の精製純度を上げてもおお除去しきれない宿主由来の微量成分が残る。この点は、宿主として動物個体に代わって、培養細胞を用いた場合でも同様で、宿主成分がウイルス粒子に組込まれているために、如何に純度を上げても種々の微量成分が検出される。最近、HIV-1など一部のウイルスについて、その粒子に取り込まれる細胞成分(例: ICAM-1, LFA-1)の感染過程へのポジティブな役割に関する研究が活発に行われているが、他のウイルスについてはそのような宿主由来の微量成分についてのウイルス学的、生物学的な意義および応用ウイルス学の面での問題点などについての解析は少ない。

著者らは狂犬病ウイルスに含まれる宿主由来の微量成分についての研究を行ってきた。狂犬病ウイルスの場合、高度に精製したウイルス材料には、ウイルスのゲノムにコードされた5種類のタンパク質(L, G, N, P, M)のほかに、微量成分として、常に宿主由来のポリペプチドが約10種類(VAP260, VAP130, VAP100, VAP85, VAP82, VAP75, VAP73, VAP42, VAP21, e. t. c.)が検出される。このうち、VAP42は既にアクチンとして同定されていたが、そのほか、最近になってVAP260, VAP130, VAP85, VAP82, VAP75, VAP73はそれぞれフィブロネクチン, CD44, ERMファミリータンパク質(エズリン, ラディキシン, モエジン), 熱ショックタンパク質と同定された。また、VAP21については最近その遺伝子のクローニングにより、CD99に類似の新規の分子であることが明らかにされたが、その本来の機能など、詳細な点については未解決である。残りのVAP100については未解決のままである。そこで、著者はVAP21およびVAP100のウイルス感染との関連性、特にウイルスの複製過程との関連性を明らかにすべくその基礎的な研究を行った。

第1章 種々のウイルス感染系におけるVAP21の関与の解析

まず、狂犬病ウイルスのほかに、水疱性口内炎ウイルス、シンドビスウイルス、ヘルペスウイルス(1型)などについてVAP21の取り込みを調べた。その結果これらのウイルスの粒子にもVAP21が取り込まれたことから、エンベロープを持つウイルスに共通の現象であることが強く示唆された。次に、取り込みの仕組みとして、感染細胞内のVAP21とウイルス遺伝子産物との結合について免疫沈降実験を行ったところ、特定のウイルスタンパク質(狂犬病ウイルスおよびVSVの場合はマトリックスタンパク質、シンドビスウイルスやヘルペスウイルスではカプシドタンパク質)と結合することが分かった。この結合はかなり強固であり、NP-40やデオキシコール酸のような界面活性剤に抵抗性のものであった。この結合はウイルス粒子への選択的かつ効率の良い取り込みを説明するものであり、また、その結果細胞内のVAP21の含有量がウイルス産生と共に減少し、感染の終期には約半分になるのが観察された。

第2章 VAP100のウイルス粒子への取り込みについての解析

次に、ウイルス粒子に取り込まれる100-kDaのタンパク質(VAP100)について、これを認識するモノクローナル抗体を得て、その性状等を調べた。まず、本抗体を用いた免疫プロット法によりウイルス粒子および細胞中に含まれる

VAP100を半定量的に比較したところ、ウイルス粒子には細胞内の含有量に較べて30~40倍に濃縮されていた。一方、細胞内のVAP100の含有量は非常に少なく、この結果はVAP100が選択的にウイルス粒子に取り込まれる仕組みの存在を示唆するものである。また、水疱性口内炎ウイルスの粒子にもVAP100が検出されたが、狂犬病ウイルスに較べて含有量は少なかった。ウイルス粒子の表面をトリプシンで処理すると、表面に露出しているウイルス糖タンパク質と同様にVAP100も本モノクローナル抗体により検出されなくなったことから、少なくとも本抗体に対するエピトープ部分は粒子表面に露出していることが示唆された。なお、本モノクローナル抗体はウイルス感染に対しては特別な影響を与えなかった。さらに、蛍光抗体法による観察から、VAP100は非感染細胞において均一に分布しているのが観察されたが、ウイルスが感染すると分布が変化して斑模様になること、およびウイルスのエンベロープタンパク質と同じ分布を取るようになることが分かった。このような細胞膜部位でのVAP100とウイルスのエンベロープタンパク質との結合が示唆され、このことは同時にVAP100がウイルス粒子に取り込まれる仕組みを説明するものである。

第3章 VAP100とウイルス遺伝子産物との結合について

VAP100は感染細胞内でウイルスの特定のタンパク質と同一の分布と取るようになることから、VAP100とウイルスタンパク質との結合が予測されたので、免疫沈降法による解析を行った。NP-40を含む緩衝液で細胞を溶解して免疫沈降を行った場合、VAP100とウイルスエンベロープタンパク質(MおよびG)との共沈はなく、ヌクレオタンパク質(N)とVAP100およびアクチンとの共沈が見られた。このことから、VAP100とエンベロープタンパク質との結合はNP-40により解離する性質のものであり、Nタンパクとの結合はこの界面活性剤に抵抗性のものであることが示された。次に、このようなVAP100と共沈するNタンパクがどのような形のものであるかについて免疫プロット法により検討した。感染細胞内のフリーのNタンパクはウイルス由来分子シャペロン(Pタンパク)と結合しており、VAP100は結合していないことが示唆された。一方、感染細胞から分離したヌクレオカプシドにはRNAポリメラーゼとして機能するウイルスタンパク質(LおよびP)のほかに、VAP100やアクチンが結合していた。なお、免疫プロット法による解析において、分子量マーカーとして用いた骨格筋ミオシンのバンドが抗VAP100抗体と交叉反応するのが観察された。以上のように、エンベロープを持つウイルスの複製過程において、VAP100はウイルスのマトリックスタンパク質およびスパイクタンパク質が集結している細胞膜部位に局在するようになり、ヌクレオカプシドを細胞膜に集結したエンベロープ成分に接近させるかあるいは両者の結合を仲介することにより、出芽によるウイルス粒子形成の準備に関与することが示唆された。

総括

以上に述べた結果から、ウイルス粒子内の細胞由来の微量成分であるVAP21およびVAP100は感染細胞内で結合が見られ、このような結合はウイルス粒子への選択的かつ効率的な組込みを説明するもので、ウイルス粒子形成過程においても不可欠の過程に含まれる可能性が高い。また、このような細胞由来成分はウイルスの精製過程においても排除することが不可能なものであり、不活化ワクチンを大量に接種することが必要な狂犬病ワクチンのような場合には、ワクチンの使用に際しての安全性の面から検討しておくことが必要と思われる。

論文審査の結果の要旨

ウイルスの不活化ワクチンを製造するにはウイルス材料の純度を高める必要があるが、エンベロープを持つウイルスの場合には、一般にウイルスの精製純度を上げてもおお除去しきれない宿主由来の微量成分が残る。この点は、ウイルス増幅の宿主として培養細胞を用いた場合でも同様で、宿主成分がウイルス粒子に組込まれるために、いかに純度を上げても種々の微量成分が検出される。最近、HIV-1など一部のウイルスの粒子に組込まれる細胞成分(例:ICAM-1, LFA-1)の感染過程へのポジティブな役割に関する研究が行われているが、他のウイルスについてはそのような宿主由来の成分についての生物学的な意義や応用的な問題についての解析は少ない。このような観点から、著者らは狂犬病ウイルスに含まれる宿主由来の微量成分についての研究を行ってきた。狂犬病ウイルスの場合、高度に精製したウイルス材料には、ウイルスゲノムがコードする5種類の蛋白質(L, G, N, P, M)のほかに、微量成分として約10種類の宿主成分(VAP260, VAP130, VAP100, VAP85, VAP82, VAP75, VAP73, VAP42, VAP21等)が検出される。この内VAP42は既にアクチンとして同定されていたが、VAP260, VAP130, VAP85, VAP82, VAP75, VAP73は最近それぞれフィブロネクチン, CD44, ERMフ

ファミリー蛋白質（エズリン、ラディキシン、モエジン）、構成型熱ショック蛋白質と同定された。VAP21は最近遺伝子がクローニングされ、CD99類似の新規分子であることが明らかにされたが、機能など、詳細については未解決であり、VAP100についても未解決である。そこで著者はVAP21およびVAP100のウイルス感染、特にウイルスの複製過程との関連性を明らかにすべく基礎的研究を行った。

まず、狂犬病ウイルスのほか、水疱性口内炎ウイルス、シンドビスウイルス、ヘルペスウイルス1型など、エンベロープを持つ種々のウイルスを調べたところ、いずれのウイルスの粒子にもVAP21が取り込まれ、エンベロープを持つウイルスに共通の現象であることが示唆された。次に、感染細胞内のVAP21とウイルス遺伝子産物との結合について免疫沈降法により調べたところ、特定のウイルス蛋白質（狂犬病ウイルスおよびVSVの場合はマトリックス蛋白質、シンドビスウイルスやヘルペスウイルスではカプシド蛋白質）と結合することが分かった。この結合はかなり強固であり、NP-40やデオキシコール酸のような界面活性剤に抵抗性のものであり、ウイルス粒子への選択的かつ効率の良い取り込みを説明するものと推測された。

次に、ウイルス粒子に取り込まれる100-kDaのタンパク質（VAP100について、これを認識するモノクローナル抗体を作成し、その性状等を調べた。免疫プロット法によりウイルス粒子および細胞中に含まれるVAP100を半定量的に比較したところ、ウイルス粒子には細胞内の30~40倍ものVAP100のが取り込まれることから、VAP100を選択的に効率よく取り込む仕組みの存在が示唆された。また、狂犬病ウイルスと較べていくぶん含有量は少ないが、水疱性口内炎ウイルス粒子にもVAP100が検出された、ウイルス粒子のトリプシン処理実験から、少なくとも本抗体に対するエピトープ部分は粒子表面に露出していることが示唆されたが、本抗体はウイルス感染に対しては影響を与えなかった。さらに蛍光抗体法による観察から、VAP100は非感染細胞の表面に均一に分布するが、ウイルス感染により分布が変化した模様になり、ウイルスのエンベロープ蛋白質と同じ分布を取ることから、細胞膜でのVAP100とウイルスのエンベロープ蛋白質との結合が示唆され、これはウイルス粒子へのVAP100の組込みを説明するものと考えられる。

蛍光染色から感染細胞におけるVAP100とウイルス蛋白質との結合が予測されたので、免疫沈降法および免疫プロット法による解析を行った。感染細胞をNP-40を含む緩衝液で溶解して免疫沈降を行った場合、VAP100とエンベロープ蛋白質との共沈はみられず、ヌクレオカプシドおよびアクチンとの共沈が見られた。このことから、VAP100とエンベロープ蛋白質との結合はNP-40により解離する性質のもので、ヌクレオカプシドとの結合はこの界面活性剤に抵抗性のものである。また、感染細胞のVAP21とVAP100は同じ部位に局在することが蛍光染色により示された。なお、免疫プロット解析において、分子量マーカーとして用いた骨格筋ミオシンが抗VAP100抗体と強く交叉反応した。以上のように、エンベロープを持つウイルスの複製過程において、VAP21とVAP100はウイルスのエンベロープ蛋白質が集結している細胞膜部位に局在するようになり、ヌクレオカプシドとエンベロープ成分とを接近させるかまたは両者の結合を仲介することにより、出芽によるウイルス粒子形成の準備に関わりをもつことが示唆された。

以上から、エンベロープを持つウイルス粒子に検出される細胞由来成分VAP21およびVAP100は感染細胞内でウイルス成分と結合することがウイルス粒子への選択的かつ効率的な組込みを説明するものであり、ウイルス粒子形成過程においてなんらかの役割を果たす可能性も考えられる。また、本研究はこのような細胞由来成分がウイルス精製過程において排除されないものであり、狂犬病ワクチンのように大量に接種することが必要な不活化ワクチンについては今後の課題として細胞由来成分についても安全性の面から十分に検討しておくことの必要性を示した。

よって、本論文は博士（薬学）の論文として価値あるものと認める。

さらに、平成12年6月21日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。