

生 命 科 学 研 究 科

(続紙 1 )

京都大学	博士 (生命科学)	氏名	酒井 まどか
論文題目	オルソボルナウイルスの膜糖蛋白質の発現調整による戦略的粒子産出機構とその応用		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>オルソボルナウイルス属に属するボルナ病ウイルス 1 型 (BoDV-1) は、核内で非細胞傷害性に持続感染できる稀な性状を持つ RNA ウイルスである。また、ウイルスゲノムは細胞核内でエピゾーマル RNA として存在しており、分裂細胞においても染色体との相互作用を介して感染を維持することが明らかとなっている。これらの性状から、BoDV-1 は有用遺伝子を安全にかつ長期に導入できる遺伝子治療用ベクターとして開発が進んでいる。BoDV-1 を利用したウイルスベクター REVec は、幹細胞を含む多様な細胞への導入が可能であるが、導入力価の高い REVec 粒子を得ることが困難であるという課題があり、REVec の実用化を進めるにあたり克服すべき問題となっている。</p> <p>本論文は、BoDV-1 を含むオルソボルナウイルス属の膜糖蛋白質 (G) の感染性ウイルス粒子産出における役割を詳細に解析し応用することで、REVec の力価の改善を目指した研究である。</p> <p>申請者は、まず BoDV-1 感染細胞において、G 蛋白質の発現が極めて低いことを免疫染色により明らかにし、G 蛋白質の発現量の制御が BoDV-1 の感染維持と感染性粒子の産生に重要であることを突き止めた。そこで、G 遺伝子欠損 REVec (<math>\Delta G</math>-REVec) に G 蛋白質を一過性に補完したシュードタイプ REVec を用いて解析したところ、細胞内での G 蛋白質の過剰な発現は、成熟していない G 蛋白質を多く持つ導入効率の低い REVec 粒子の産出をもたらすとともに、REVec ゲノム RNA の粒子への取り込みが阻害されることを明らかにした。さらに、G 蛋白質の過剰な発現の副産物である未開裂の G がこれらの原因になることを示した。</p> <p>申請者は、感染性ウイルス粒子産生に係わる G 蛋白質の発現量の制御が、他のオルソボルナウイルス属ウイルスでも共通して観察されるのかを確認するために、オルソボルナウイルス属ウイルスの G 遺伝子の一過性発現によるシュードタイプ REVec により解析を行った。その結果、カナリアボルナウイルス 1 型 (CnBV-1) の G 蛋白質では、その発現量を増加させた場合においても高力価の REVec を産生できることを突き止めた。そして、CnBV-1 の G 蛋白質のシグナルペプチド領域が、高い導入効率を示す粒子の産出に関与していることを明らかにした。</p> <p>これらの知見を基に、CnBV-1 G 遺伝子を持つキメラタイプ REVec の作製し、この REVec が、従来型の REVec と比較して、幹細胞や初代培養細胞を含むヒト由来細胞へ高い遺伝子導入効率を示した。</p> <p>以上から、オルソボルナウイルスは G 蛋白質の発現を制限することによって、感染性粒子の産生を制御し感染を維持させている可能性が示された。また、G の発現量や種類を改良することで、REVec 産生システムと力価の向上につながることを示した。</p>			

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、ボルナ病ウイルス 1 型 (BoDV-1) を利用した新規 RNA ウイルスベクター REVec の遺伝子導入効率向上を目的に、BoDV-1 のエンベロープ膜糖蛋白質 (G) の感染性粒子産出に関する役割を解析したものである。

REVec は幹細胞や神経系細胞などの分化増殖細胞に安全に長期間、遺伝子を導入できる技術として期待が持たれている。一方で、標的細胞へ効率よく遺伝子を導入するためには高いウイルス力価を示す REVec 粒子の回収が必要であるが、REVec 産生細胞からの感染性粒子の産生効率が悪いという遺伝子治療用ベクターとして実用上での課題が残されていた。そこで本研究では、BoDV-1 G 蛋白質の感染性粒子産生に関する役割に着目することで、REVec の導入力価の向上への応用を試みた。

本論文では、BoDV-1 感染細胞内での G 蛋白質の発現量に注目し、G 蛋白質の発現量が持続感染細胞では極めて少ないことを発見した。そしてこの発見の意味を確かめるために、一過性に G 蛋白質を被るシュードタイプ REVec を用いることで、細胞内での G 蛋白質の発現量と REVec の感染力価の関連性について検討した。その結果、高い感染力価を持つ REVec の産生には、適度なレベルの G 蛋白質の発現量が必要であり、過剰な G 蛋白質量は反って REVec の力価を下げることを発見し、それは細胞中の未成熟な G 蛋白質の量に依存していることを明らかにした。この発見は、他の RNA ウイルスとは異なり、BoDV-1 が持続感染を維持するために自ら G 蛋白質の発現量を制御していることを示唆するウイルス学的にも極めて新しい発見であった。

さらに本論文では、BoDV-1 が属するオルソボルナウイルス属の他のウイルスの G 蛋白質についても同様の現象が確認されるのかについて独自の視点から研究を進展させた。その結果、同じオルソボルナウイルス属ウイルスの中でもカナリアボルナウイルス 1 型 (CnBV-1) の G 蛋白質は、細胞内で過剰発現させても産生される REVec の力価は減少しないという現象を明らかにした。論文では、他のオルソボルナウイルスと比較することで、その機序についても解明を行っている。

最終的に、本研究で得られた成果を統合させることで、CnBV-1 の G 遺伝子を持つ REVec を作製することにも成功しており、そのキメラ REVec がヒト由来の培養細胞や初代細胞そして iPS 細胞においても、従来型の REVec よりも高い力価で導入できることを示し、REVec の実用化に向け改良に貢献することができた。

本論文は申請者のウイルス学に関する高度で幅広い学識と優れた研究能力を示すのみならず、遺伝子治療用ウイルスベクターの改良と実用化に向けた重要な技術革新をもたらした。また生命科学の理解・発展に寄与する新しい発見や概念を提示している。さらに、理論的かつ一貫性をもって記述されている。よって、本論文は博士 (生命科学) の学位論文としての価値あるものと認めた。さらに令和3年2月5日に公聴会を実施し、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。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。(ただし、学位規則第8条の規定により、猶予期間は学位授与日から3ヶ月以内を記入すること。)

要旨公開可能日： 平成 年 月 日