



Single amino acid substitution of sendai virus at the cleavage site of fusion protein confers trypsin resistance

伊藤, 正恵

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1987-10-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲0697

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1000697>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・(本籍)	伊 藤 正 恵 (兵 庫 県)
学 位 の 種 類	医 学 博 士
学 位 記 番 号	医博い第557号
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当
学位授与の日付	昭和62年10月31日
学位論文題目	Single Amino Acid Substitution of Sendai Virus at the Cleavage Site of Fusion Protein Confers Trypsin Resistance (センダイウイルス・トリプシン抵抗性変異株の解析—F蛋白 開裂部位の点変異)
審 査 委 員	主査 教授 本 間 守 男 教授 杉 山 武 敏 教授 高 井 義 美

論 文 内 容 の 要 旨

<緒 言>

センダイウイルスのエンベロープ表面には HANA およびFの2つの糖蛋白がある。センダイウイルスは増殖に際し、HANA で細胞表面のレセプターに吸着後、Fの働きでエンベロープを細胞膜に融合させ細胞内に侵入する。我々は、このうちF蛋白の構造と機能に関する研究を行ってきたが、これまでに以下の点を明らかにした。①Fが上記の膜融合能を発現するためには、トリプシン又はトリプシン様のプロテアーゼの作用により、F₁およびF₂分子に特異的に開裂することが必要である。②本ウイルスが良く増殖する発育鶏卵漿尿膜腔内には、トリプシン様酵素が存在し、これがF蛋白を開裂してウイルスを活性化させ、結果的に多段増殖を可能にする。③この事実は、本ウイルスの臓器嗜好性が、宿主側のトリプシン様プロテアーゼの存在により説明し得る事を示唆する。この考えに基づき、本ウイルスのマウス肺病原性の機構を調べた。その結果、このウイルスの標的細胞は細気管支上皮細胞に局限されること、この細胞内にはトリプシン様のウイルス活性化酵素が存在し、これがウイルスの多段増殖を許し、肺炎を引き起こすことを明らかにした。④この研究の過程で見出したプロテアーゼ変異株(TR)は、キモトリプシンで活性化されるが、トリプシンでは活性化されないというユニークな性状を示す。これをキモトリプシンで活性化後マウスに投与すると、細気管支内細胞内では一段増殖のみが起こり、肺炎を起こすに至らない。⑤一方、TR は一段増殖の結果、マウスに強力な感染防御能を賦与し、プロテアーゼ変異株の生ワクチンとしての有用性が示唆される。

以上の成果を背景にして、本論文は、TR・F 蛋白のアミノ酸配列をF遺伝子 cDNA の塩基配列から推定し、これにより、TR のトリプシン抵抗性の機序、ひいてはセンダイウイルスのマウス肺病原性の機序を分子レベルで解明することを目的としたものである。

<材料と方法>

1. ウイルス：センダイウイルス伏見株の野生株，トリプシン抵抗性変異株 (TR-2, TR-5) およびトリプシン感受性変異株 (TSrev-52, TSrev-58)。TR は野生株をキモトリプシン存在下に，TSrev はTR-5 をトリプシン存在下に増殖継代することにより得られた。

2. プロテアーゼ感受性の検討：ウイルスを LLC・MK₂細胞に細胞あたり0.01で感染後，各プロテアーゼ存在下で培養し，培養液中に遊離したウイルスを赤血球凝集価 (HAU/ml) として測定してウイルス増殖の程度を比較した。

3. cDNA の作製およびF遺伝子 cDNA の選択：ウイルス感染細胞から mRNA を抽出し，岡山-Berg の方法に従って cDNA を作製，pcDV1 プラスミドにクローニングした。伏見株・F 遺伝子を組込んだクローンの選択には，³⁵Sで標識したセンダイウイルス・Z株のF遺伝子 cDNA をプローブとして用いた。

4. DNA塩基配列の決定：F遺伝子 cDNA を適当な制限酵素で切断後，M13ファージにサブクローニングし，ジデオキシ法で DNA 配列を決定した。

<結果と考察>

1. 野生株のF蛋白アミノ酸配列：伏見株のF遺伝子は565アミノ酸残基より成るF蛋白をコードしていた。N-グリコシド結合型糖鎖の結合部位は3ヶ所あり，蛋白分子の三次元立体構造を形成する上で重要なシステインを12残基有していた。また，疎水性アミノ酸の連続する部位が3ヶ所あり，それぞれ，F蛋白の機能上重要な，C末端のアンカー部位，F₁分子N末端の膜融合活性を担う部位，およびF₂分子N末端のシグナルペプチド部位に相当していた。以上の構造は，これまでに報告されたセンダイウイルスの他の株のF蛋白のそれと基本的には同じであった。

2. トリプシン抵抗性変異株 (TR) のF蛋白アミノ酸配列：TR のF蛋白アミノ酸配列を野生株のそれと比較した。TR-2 では，核酸レベルで378位と400位の2ヶ所にA→GおよびG→Tの変異が生じており，これらの変異は，それぞれ，109位のAsn→Asp および116位の Arg→Ile の2ヶ所のアミノ酸の変異をともなっていた。TR-5 では，さらに567位の塩基がG→Aと変化し，その結果172位のVal→Metの変異が見られた。しかし，TR-2 とTR-5 は，トリプシン抵抗性およびキモトリプシン感受性の点で全く同様の挙動を示すので，172位の Val→Met の変異は，プロテアーゼ感受性には関与していないと推測される。

3. トリプシン感受性復帰変異株 (TSrev) の分離：トリプシンはF蛋白の116位の Arg のC末端側に作用し，これを開裂することが知られている。TR で認められた2ヶ所のアミノ酸変異のうち，Arg→Ile の変異はこの開裂部位の変化で，トリプシンに対する感受性の変化に直接関与していることが予想される。しかし，109位も開裂部位に非常に近く，この部位の Asn→Asp の変

異が立体構造の変化を通してトリプシン感受性に影響を及ぼしている可能性や、さらには両アミノ酸の同時変異が必要である可能性も考えられる。この点を明らかにするため、TR からトリプシンで活性化を受ける復帰変異株を誘導し、そのF蛋白を解析することにした。

4. TSrev のF蛋白のアミノ酸配列：TR-5 をトリプシン存在下で継代することにより分離した復帰変異株、TSrev-52およびTSrev-58は、ともにトリプシン存在下でよく増殖し、野生株と全く同じトリプシン感受性を示した。F遺伝子の解析から推定された TSrev のアミノ酸配列を TR-5 のそれと比較したところ、全アミノ酸配列中116位の Ile だけが Arg へ変異し、109位の Asp および172位の Met をはじめ他のアミノ酸はすべて保存されていた。このことから、TSrev のトリプシン感受性が116位の Ile→Arg の変異により回復したものであることが明らかになった。

以上のことから、センダイウイルスのF蛋白のトリプシン感受性は、116位のアミノ酸により支配され、これがセンダイウイルスのマウス肺病原性の発現を規定していることが明らかになった。

論文審査の結果の要旨

センダイウイルスの表面を覆うエンベロープには、HANA およびFと呼ばれる糖蛋白質から成る2種類のスパイクがある。HANA スパイクは細胞のレセプターへの吸着の機能を持ち、F スパイクは吸着に引き続きウイルスのエンベロープを細胞膜に融合させる、いわゆるエンベロープ融合の機能を担っている。このエンベロープ融合は、センダイウイルスをはじめとするパラミクソウイルスに特徴的な細胞内侵入機構である。本研究者のグループは、長年に亘ってF蛋白の構造と機能に関する一連の研究を行い、これまでに以下の諸点を明らかにした。即ちFがエンベロープ融合の機能を発現するためには、予めF₁とF₂の2つの糖蛋白分子に開裂する必要があるが、野生型ウイルスの場合、宿主の提供するトリプシン様プロテアーゼがこれに働いている。この事は、センダイウイルスの臓器嗜好性が宿主側のトリプシン様プロテアーゼの存在により説明し得る事を示唆している。事実、センダイウイルスの感染を受けたマウスは、常に肺炎を起こして死亡するが、この際の標的細胞は細気管支上皮細胞に限局され、且つこの細胞内にはトリプシンに良く似たプロテアーゼが存在する事が明らかにされた。一方、センダイウイルスをキモトリプシン存在下に継代して得られた変異株 TR は、トリプシンではFの開裂を受けず、キモトリプシンでのみ開裂し、活性化する。このTR を、キモトリプシンで活性化後マウスに投与すると、細気管支細胞内でのウイルスの増殖は一段階にとどまり、肺炎を起こすには至らない。これらの事実は、センダイウイルスのマウス肺嗜好性が、宿主の細気管支細胞のトリプシン様酵素の存在により規定されるとの考えを支持している。

以上の成績を背景にして、本研究者は、TR 変異株のF蛋白のアミノ酸配列をF遺伝子の cDNA の塩基配列から推定し、これを基にして、TR のトリプシン抵抗性の機序を明らかにし、更にセンダイウイルスのマウス肺病原性の機序を分子レベルで明らかにする事を目的として本研究を

行った。

TRのトリプシン抵抗性に直接関与する変異点を明らかにするために、2つのTR変異株、TR-2及びTR-5を得、さらにTR-5をトリプシン存在下で継代する事により、野生株と同じプロテアーゼ感受性を持つトリプシン感受性復帰変異株、TSrev-52及びTSrev-58を分離した。これらのプロテアーゼ変異株のF蛋白のアミノ酸配列と、野生株のそれとを総合的に比較検討する事により以下の結論を得た。即ち、野生株に於ては、116位のアルギニンにトリプシンが作用してこれを開裂し、新たに疎水性のアミノ酸配列を出現させるが、TRでは、このアルギニンがイソロイシンに変わっているために、トリプシン抵抗性を獲得する。

以上、本研究は、センダイウイルスのマウス肺病原性が、F蛋白の116位のアミノ酸により支配されている事を世界に先がけて明らかにしたもので、ウイルスの臓器嗜好性を分子レベルで解明した価値ある集積であると認める。よって本研究者は、医学博士の学位を得る資格があると認める。