

審査の結果の要旨

氏名 坂井 優子

本研究は申請者らが開発したセンダイウイルス (SeV) の遺伝子操作技術を使用して、第一にウイルス学的な新知見を提唱することを目的に、ウイルスゲノム上の転写の終結に関わる配列について検討し、第二にSeVベクターとして用いる際の技術的な知見を提供することを目的に、挿入できる外来遺伝子の長さや、長さによってウイルスの増殖が受ける影響について検討したものであり、下記の結果を得ている。

1. 各遺伝子で完全に保存されているSeVの終結配列のうち、N 遺伝子の終結配列を改変したウイルスを作製し、これらのウイルスの感染細胞中の転写産物の解析を行った。改変したウイルスではいずれも N 遺伝子の下流に挿入したレポーター遺伝子であるルシフェラーゼ活性が低下し、また、N遺伝子が転写終結せず次のルシフェラーゼ遺伝子までを読み通した (リードスルー: Rth) mRNA が40から80%存在した。野生型ウイルスでは Rth- mRNAの割合は1%程度であり、ウイルスRNAポリメラーゼは1塩基であろうとも終結配列を改変した場合には完全な終結を行えなくなったことが示された。

2. 完全に保存されている配列を持った組み換えウイルスでも20%程度の Rth- mRNAが存在したため、周辺配列を拡大して検討したところ、終結配列の2塩基上流にあるUはSeVの全遺伝子で保存されていることがわかった。この塩基を持ったウイルスを再作成し、転写産物を調べると Rth- mRNAがほとんど出現しなくなっていた。このことによって、従来、教科書上でSeVの終結配列と考えられていた配列の2塩基上流のUは完全な転写の終結のためには必須な配列であること、すなわち、この2塩基 (下線) を加えた 3'-UXAUUCUUUUU-5'が正しい終結配列であることが初めて証明された。

3. SeV発現ベクターを使用していろいろな長さの外来遺伝子の組み換えウイルスを得、各ウイルスの感染細胞培養上清中のウイルス力価を経時的に測定したところ、挿入した遺伝子のサイズが長くなるにしたがって増殖が悪くなっていくことが示された。培養細胞中ではSeVゲノムが長くなるにしたがって複製の効率が低下すると結論された。

4. いろいろな長さの遺伝子を持つ組み換えSeVをマウスに 10^7 CIU/匹で経鼻感

染させ、経時的に体重、肺の肉眼病変および肺内ウイルス量を測定したところ、外来遺伝子を挿入した S e V はマウス肺内ウイルス増殖がいずれも外来遺伝子を入れていないベクターウイルスに比べ低下しており、外来遺伝子挿入により、ウイルスの複製が影響を受け、弱毒化されたことが示された。しかし、それらの低下と挿入遺伝子の長さの間には高い相関性はみられなかった。個体レベルではウイルスゲノムの長さだけでなく発現する蛋白質の性状やマウス個体内のウイルス排除機構などが複雑にからみ合って影響をうけている可能性が考えられた。

5. V 遺伝子を欠失させた S e V は、細胞中での増殖が向上することが知られており、V 遺伝子を欠失させたベクターを使用していろいろな長さの外来遺伝子を挿入した組み換え S e V も作製した。培養細胞及びマウスにおけるウイルスの増殖は V 遺伝子を持つウイルス同様の挙動を示した。挿入したうちで最も長い遺伝子である *lacZ* 発現組み換え S e V を感染させ細胞中または上清中の β -ガラクトシダーゼの酵素活性を測定したところ、40 時間後の V 遺伝子を欠失したウイルスの β -ガラクトシダーゼ活性は V 遺伝子を持つウイルスの約 3 倍もあることが示された。このことから V 遺伝子を欠いたウイルスは最も長い外来遺伝子に対してもその細胞レベルでの発現量を高める上で有効であることがわかり、高レベルに発現させることができる優良なベクターとなることを示唆した。

6. 外来遺伝子挿入の際、転写終結配列に類似の配列の存在のためにウイルスの回収が成功しない例があったためアミノ酸変異をもたらさないように塩基を置換し終結配列を変化させたところ組み換え S e V が回収可能となった。終結配列類似の配列はウイルス RNA ポリメラーゼに認識され外来遺伝子の内部で転写が中絶されてしまう可能性、ひいてはウイルス複製をも中絶させてしまう可能性が示唆された。

以上、本論文は S e V の遺伝子操作をおこなうことによって、従来教科書上で言われていた S e V の転写終結配列をさらに上流 2 塩基を含めた領域まで終結配列であると提唱し、また、S e V ベクターはゲノムの 5 分の 1 にあたる 3.2kb まで外来遺伝子を挿入可能であること、外来遺伝子挿入によってウイルスの増殖が細胞内ではそのサイズに応じて低下すること、マウスにおいては弱毒化されることなど技術面での新知見を提供した。本研究は S e V ベクターの有用性を示したことにより、医学的に重要なタンパク質の発現や構造と機能の研究、遺伝子治療のための発現ベクター開発などに多大な貢献が可能であると考えられ、また、ウイルス学的新知見を提唱したことにより、学位の授与に値するものと考えられる。