

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 田村 克

魚介類の生食によって発生する流行性胃腸炎の主因であるノーウォーク様ウイルス (Norwalk-like virus; NLV) は、感染する実験動物も培養細胞も見つかっていないため、感染機構および免疫性は不明のまま残されており、また、感染個体に産生された抗体が感染防御抗体とはなりえないため、中和抗体等による感染防御法の確立が期待されている。

本研究は、まず (1) NLV 受容体を探索し、それを精製して感染防御に利用することを試み、受容体を特定したが、受容体タンパク質が精製が進むにつれ不安定になる性質を有していたため、(2) 細胞内に存在している他の NLV 結合分子を探索し、ヒストン H1 が強い結合性を示すことを明らかにし、(3) これを利用することで NLV の感染防御を試みている。本論文はこれらの結果を 3 章に纏め、感染防御に関する総合考察を加えている。

第 1 章 細胞表面に存在する NLV 受容体の解析

NLV は培養細胞からウイルスを得られないため、バキュロウイルスによって昆虫細胞内で中空粒子を作製し、これを用いて細胞との相互作用を解析した。作製された中空粒子である recombinant Ueno Virus (rUEV) は、感染個体の糞便中から精製された NLV と一致する抗原性を示したが、これらに対する抗体は感染防御抗体とはなり得なかった。そこで、rUEV を用いて、ヒト腸管由来細胞株との結合性を調べた結果、1 細胞あたりおよそ 10^6 個の rUEV が結合し、細胞膜に特異的に結合した rUEV の約 7.5% が細胞内に取り込まれることが判明した。この結果は、受容体を介して細胞に侵入する既知のウイルスの例とよく一致しており、NLV が細胞に侵入する際に受容体分子を利用することが示唆された。

また、細胞を酵素等で処理して結合性を調べたところ、rUEV は細胞膜の脂質や糖鎖ではなくタンパク質と直接結合することが示唆された。そこで、この rUEV 結合タンパク質を VOPBA 法によって検出した結果、105 kDa の位置に明瞭な単一バンドが得られ、この 105 kDa タンパク質は UEV 以外の系統の NLV とも結合することが明らかになった。

第2章 細胞に存在する NLV 結合タンパク質の探索

105 kDa タンパク質は、UEV ばかりでなく他の NLV にも共通な受容体候補分子であったことから、これを分離精製しアミノ酸配列から遺伝子を単離して、発現ベクター系により大量増殖させ NLV の感染防御に利用することを計画した。しかし、この 105 kDa 受容体候補タンパク質は精製が進むに従い不安定になり単離精製が困難であったため、アミノ酸配列の決定にまで至らず、感染防御に利用できるかどうかについての検証もできなかった。そこで、受容体に代わる NLV 結合分子を細胞内から探索するため、細胞の全溶出液を用いて VOPBA を行った結果、およそ 35 kDa の位置に大量の NLV 結合タンパク質が検出された。アミノ酸配列を解析した結果、哺乳類のヒストン H1 と 100% の相同性を示した。rUEV とヒストン H1 との結合は、幅広い pH 領域や塩濃度条件下でも可能であることがわかった。以上の結果は、腸管管腔内のように変化に富む環境でもヒストン H1 が NLV と結合できることを示唆している。

第3章 NLV 感染防御への利用

NLV に対する細胞結合阻害剤としてのヒストン H1 の機能を検証した。ヒト腸管由来細胞株を用いて、ヒストン H1 存在下で rUEV の細胞結合検定を行った結果、25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上のヒストン H1 が存在すると、rUEV の細胞への結合は 95% 以上阻害され、他の系統の NLV に対しても同様であった。また、ヒストン H1 は、rUEV 粒子ばかりでなく細胞表面にも作用することで結合阻害効果を示すことが明らかになった。これに対し、E 型肝炎ウイルス、ポリオウイルス、昆虫核多角体病ウイルスなどの他種のウイルスに対しては阻害効果は見られず、ヒストン H1 の結合阻害効果は NLV に特異的であることが示唆された。次に、ヒストン H1 の腸管細胞および腸内細菌に対する安全性について検証した結果、NLV 結合阻害に有効な濃度の 10 倍量のヒストン H1 が存在しても細胞傷害性や殺菌作用は見られなかった。以上の結果から、ヒストン H1 が NLV の感染防御に有効かつ安全であることが示唆された。

以上要するに本論文は、魚介により媒介される流行性胃腸炎の主因であるノーウォーク様ウイルスについて、バキュロウイルスベクターによって昆虫細胞で作製した中空粒子を用いて、105kD の受容体タンパク質を特定すると共に、ヒストン H1 が特異的結合分子であり感染防御に有効であることを明らかにしたものである。よって審査委員一同は、本論文が学術上応用上価値あるものであり、博士(農学)の学位論文として、ふさわしいものであると認めた。