

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 片山英夫

---

ウイルスが宿主細胞内で増殖する際には、細胞膜への吸着→細胞内への侵入と脱殻→核酸転写→蛋白質合成→ウイルス粒子の組立→ウイルス粒子の放出、という過程を経る。この過程には種々の構成要素が定められた場所にプログラムに従って順次移動してゆく必要がある。細胞内における物質の動きの多くは、アクチンフィラメントや微小管などの細胞骨格系が関与しており、ウイルス増殖においても、その細胞内での移動・増殖の際に、宿主細胞骨格系を利用していることが考えられるが、十分な検討がなされているとは言えない。本研究は、パラミクソウイルス科モルビリウイルス属に属する犬ジステンパーウイルス(CDV)の増殖機構における細胞骨格系の役割を解明することを目的として行ったものである。

本研究では宿主細胞として、腎上皮細胞由来の Vero 細胞を用いて実験を行い、ウイルスの侵入・吸着からウイルス粒子放出に至る経路を以下の3つに区分し、検討している。

### 1. 宿主細胞への吸着から侵入の過程における細胞骨格の役割

アクチンならびに微小管線維を修飾する試薬をウイルス吸着 1 時間前から細胞に投与した後、1 時間ウイルス吸着させた直後に細胞を固定し、細胞内に取り込まれた CDV N 蛋白質の塊の数を測定した。アクチン線維切断作用を持つ mycalolide B (MLB)を細胞に投与した群において顕著な CDV の吸着の阻害が見られた。アクチン線維に対しキャッピング作用を持つ cytochalasin D (CD)と微小管脱重合作用を持つ colchicine (CL)を細胞に投与した群においても吸着抑制の傾向が見られた。

### 2. 宿主細胞内での遺伝子複製から蛋白質合成の過程における細胞骨格の役割

宿主細胞内に侵入したウイルスのヌクレオカプシドの移動と細胞骨格の関連を見るために、高濃度のウイルスを1時間吸着させた後、細胞に各試薬を投与し、12-24 時間後にアクチンフィラメントと N 蛋白質の分布を免疫蛍光染色法により観察した。薬剤処置をしていない細胞では、細胞質内に線維状のアクチンフィラメントが認められ、CDV の感染の有無で顕著な差は見られなかった。ウイルス蛋白質は細胞内の特定の場所に局在することなく、一様に分布していた。MLB を投与した細胞では、線維状のアクチンフィラメントは消失し顕著な細胞の円形化が生じ、一部残ったアクチンフィラメントは塊を形成していた。ウイルス蛋白質も激しく凝集し、細胞内にいくつかの塊を形成していた。一方、CD を投与した細胞では、細胞の変形は見られず、細胞膜直下には正常に近いアクチンフィラメントが認められたが、細胞中心部にはアクチンフィラメントは見られなかった。ウイルス蛋白質は、細胞膜直下にのみ局在しており、細胞中心部には全く存在が認められなかった。

一方、MLB や CD を細胞に投与した群において CDV の N および H 蛋白質の mRNA 発現量は薬剤無処置群と較べて有意な抑制は認められなかった。CL を細胞に投与した群においても CDV の mRNA 発現量に明らかな差は見られなかった。さらに、MLB を細胞に投与した群では、N 蛋白質の合成量が著しく減少していることが認められた。CD を細胞に投与した群においても N 蛋白質の合成は有意に抑制された。

### 3. ウイルス粒子の組立から放出の過程における細胞骨格の役割

ウイルス粒子の組立・放出の段階におけるアクチンフィラメントの関与を見るために、ウイルス吸着後 24 時間以降に MLB を細胞に投与し、その影響を検討した。24 時間後に MLB を細胞に投与しても、CDV 感染性粒子の生成に顕著な抑制は見られなかった。

以上の成績から、アクチンフィラメントは、主に CDV の吸着から細胞内への進入の過程に関与していることが示唆された。さらに、宿主のアクチンフィラメントは mRNA の複製には関与しないが、ウイルス蛋白質の合成には重要な役割を担っている可能性が示唆され、アクチンフィラメントが CDV の感染・増殖機構に密接に関与していることが明らかとなった。微小管もまた CDV の感染・増殖機構に関与する可能性が示された。これらの知見は、モルビリウイルス属ウイルスにおける細胞骨格系の役割をはじめて明らかにしたものであり、学術上の重要性はいうに及ばず、今後の抗ウイルス薬の開発にとっても有用な知見と考えられる。よって、審査員一同は本論文が博士（獣医学）の論文として価値あるものと認めた。