

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 ろぎえ ありやり
Roghiyh Aliyari

プラス鎖RNAをゲノムとするアルファウイルス属ウイルスは、自然界では蚊と哺乳動物および鳥類の間を循環し、実験的に培養細胞に対する宿主範囲が極めて広い。日本で分離されたサギヤマウイルスは人間に対する病原性がないため、同じアルファウイルス属のシンドビスウイルスやセムリキ森林ウイルスと同様、プラス鎖RNAウイルスの複製機構の研究に適したウイルスである。

これまで、培養細胞を用いたアルファウイルス研究では、扱いの容易なハムスター腎臓(BHK)、ニワトリ胚、ヒトスジシマカ由来の細胞が主として用いられ、感染からRNA複製、タンパク質合成と修飾、ヌクレオキャプシド形成から成熟粒子形成に至るウイルス増殖機構の詳細が明らかにされてきた。

本論文は、アルファウイルスの自然界での宿主であるイエカやシマカと同じ双翅目に属するショウジョウバエ由来のS2培養細胞に対する感染性と増殖性、そしてRNAサイレンシング経路からの回避機構を明らかにする目的で行なわれた実験結果を報告し、考察したものである。

先ず、サギヤマウイルスゲノムのショウジョウバエS2細胞に対する適応変異が解析された。ウイルス材料として、野生型サギヤマウイルス全長cDNAクローン由来の感染性RNAをBHK細胞にトランスフェクション後の細胞培養液を用いた。回収ウイルス液はcDNAクローン由来であるから、全てのウイルス粒子中のRNAは同一の塩基配列を持つものと想定される。このウイルス接種源を用い、ショウジョウバエS2細胞へ接種し、25°Cで3日間隔で15回から49回継代した。希釈限界法により適応変異ウイルスをクローニングし、BHK細胞におけるプラーク表現型の異なる4株を得た。それらのゲノムを野生型ウイルスゲノムと比較したところ、アミノ酸置換を伴う変異がゲノム全域に認められ、特にE2膜タンパク質遺伝子には4ウイルス株に共通した複数のアミノ酸置換が見出され。これらの変異を含むcDNA断片を野生型全長cDNAクローンと置き換えた後、試験管内転写RNAをBHK細胞にトランスフェクションし、変異型プラーク表現型をもたらすアミノ酸置換を同定した。その結果、E2膜タンパク質のN末端から5番目、70番目および75番目のアミノ酸がそれぞれアスパラギンからアスパラギン酸に、イソロイシンからトレオニンに、メチオニンからトレオニンに置換した場合にS2細胞での増殖性が野生型ウイルスに比べて100倍以上高まることが明らかになった。

次に、E2膜タンパク質の3つのアミノ酸置換をもたらす増殖性の増大の原因を明らかにするため、2粒子性サギヤマウイルスベクターを用いたGFP発現系を用いてS2細胞に接種しGFP蛍光の発光を調べた。その結果、野生型ベクタ

一粒子は全体の 1%以下しか感染しなかったのに対し、3 カ所のアミノ酸変異型ベクター粒子は 70%以上の細胞で GFP 蛍光を発した。発色の強度は野生型と変異型の間で有意な差は認められなかった。従って、S2 細胞適応変異ウイルスの増殖性の増大は S2 細胞への吸着か侵入効率を高めており、感染細胞内での RNA 複製能には影響しないものと判断された。次に、多くのアルファウイルスが様々な細胞種の表面に存在する硫酸ヘパランをリセプターとして利用することから、S2 細胞へのサギヤマウイルス感染におけるヘパラン硫酸処理効果を調べた。その結果、S2 細胞をヘパリン処理した場合、野生型ベクター粒子で蛍光を発する細胞数は変異型ベクター粒子接種 S2 細胞同様に 70%以上に上昇した。従って、サギヤマウイルスも他のアルファウイルス同様、細胞表面の硫酸ヘパランをリセプターとし、E2 膜タンパク質の 3 アミノ酸変異は S2 細胞リセプターへの結合効率を高めている事が示唆された。

一方、シヨウジョウバエ S2 細胞は RNA サイレncing 経路を持つことが証明されている。そこで、先ず GFP 遺伝子をマーカーとし、GFP 遺伝子に対する 2 本鎖 RNA による RNA サイレncing 現象を確認した。銅イオン誘導性ベクター pMT プラスミッドを用い、GFP 遺伝子を S2 細胞で発現し、GFP 遺伝子に対する 2 本鎖 RNA による塩基配列特異的に発現抑制を確認した。その上で、サギヤマウイルスにコードされる全ての非構造タンパク質および構造タンパク質遺伝子を pMT ベクターより発現し、RNA サイレncing 抑制効果を比較した。その結果、非構造タンパク質 nsP3 および P34 発現細胞にのみ GFP 発現に対する RNA サイレncing 抑制効果が検出された。従って、nsP3 およびそれを含むポリプロテインが S2 細胞における RNA サイレncing のサプレッサーとして機能し、ウイルス増殖阻害を抑制している可能性が示唆された。

以上を要するに、本研究では遺伝学の発達したシヨウジョウバエ S2 培養細胞を用い、プラス鎖 RNA ウイルスの代表例であるアルファウイルスの感染適応を明らかにし、S2 細胞の持つ RNA サイレncing に対するサプレッサー遺伝子の特定を試み、候補タンパク質 nsP3 を同定した。今後、本研究の成果によりアルファウイルスの複製機構、宿主防御反応およびウイルス側の抑制機構の詳細が明らかになるものと期待され、生物資源科学上、基礎および応用面で貢献する所が多い。従って、審査委員一同は本論文が博士（農学）を授与するに相応しいものと判断した。