

[別紙2]

審査の結果の要旨

氏名 貫井陽子

本研究は2004年度にミクロネシアヤップ島への日本人旅行者における集団感染事例より分離した3'末端非コード領域(NCR)内に塩基欠失を有する新たなデングウイルス(DENV)1型の生物学的特性を明らかにするため、感染性クローンを用いて解析を試みたものである。さらに3'NCR可変領域全体の生物学的意義を検討するためレプリコンシステムや定量的PCR法にてRNA翻訳段階及びRNA合成段階への関与を検討したものであり、下記の結果を得ている。

1. 2004年度にミクロネシアヤップ島への日本人旅行者4名より分離されたウイルス株をダイレクトシーケンス法により遺伝子解析を行ったところ、3'NCR内の終止コドン直下に29塩基欠失を有する新たなDENV1型であることが判明した。これらの塩基欠失はすべての分離株で認められ、また細胞培養を経ずに血清から直接増幅したウイルスにおいても認められたことより、培養細胞内で人為的に挿入されたものではないと考えられ、今回のヤップ島でのDENV1型アウトブレイク(WHO報告 計658名)の責任ウイルスであることが示された。
2. 感染性完全長クローンを構築し、上記の自然分離株と同様の部位に19塩基欠失を有する変異体を作成し生物学的意義を検討した。野生型(塩基欠失を伴わない)及び変異体での増殖特性、プラーク形態の比較ではアフリカミドリザル腎細胞、ヒト肝癌、蚊由来の細胞において差異は認められなかった。よって3'NCR可変領域内の19塩基という短い欠失は、本来の生態環境ではない培養細胞でのウイルス複製に重要な役割を果たしていないことが示唆された。

3. 上記の解析より派生し、3'NCR 可変領域全体の生物学的役割を解明することを目的に新たな変異体を作成した。プラーク形成法を用いた増殖特性やイムノブロットリング法を用いた抗原分泌量の解析では哺乳動物細胞において可変領域内に終止コドンより 45, 81, 109, 45-81 番目の塩基欠失を伴う変異体及び 45-81 塩基置換を伴う変異体で、感染後早期に増殖や抗原分泌量が有意に低下することが示された。しかし蚊由来の細胞内では野生型と変異体の差異は認められなかった。
4. レプリコンシステム及びルシフェラーゼアッセイシステムを用いて3'NCR 可変領域の RNA 翻訳段階に与える影響を検討したところ可変領域内に 45 塩基欠失を伴う変異体でのみ有意に翻訳効率の低下が認められたが、他の変異体では差異は認められなかった。
5. 3'NCR 可変領域の RNA 合成への影響を検討するため、定量的 PCR 法を用いて評価したところ、45, 45-81 塩基欠失を伴う変異体及び 45-81 塩基置換を伴う変異体で RNA 合成は約 50%低下を認め、特にマイナス鎖合成で顕著であった。

以上、本論文は DENV1 型における 3'NCR 可変領域の解析を行い、3'NCR 可変領域は終止コドン直下の 45 塩基は塩基の存在自体がウイルスの翻訳、RNA 合成、複製に関与し、また 45-81 番目の塩基に関しては塩基配列が RNA 合成、複製にとって重要であることを明らかにした。また可変領域は RNA 合成、複製過程において宿主細胞の種類により異なるメカニズムで調節に関与することを明らかにした。本研究はこれまで未知に等しかった、可変領域の意義に関して重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。