

氏名(本籍)	久保英幸(埼玉県)
学位の種類	博士(獣医学)
学位記番号	獣医博乙第1号
学位授与年月日	平成7年3月14日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	Molecular biological studies on the spike protein of murine coronavirus
審査委員	主査 岐阜大学教授 平井克哉 副査 帯広畜産大学教授 品川森一 副査 岩手大学教授 岡田幸助 副査 東京農工大学教授 甲野雄次 副査 岐阜大学教授 金城俊夫
審査協力者	田口文広(国立精神神経センター 神経研究所 モデル動物開発室長)

## 論文の内容の要旨

マウスコロナウイルス(マウス肝炎ウイルス: mouse hepatitis virus, MHV)は、マウスおよびラットに対して様々な臓器特異性およびウイルス病原性を示すRNAウイルスである。MHVのウイルス表面に存在するスパイク(S)蛋白は、MHV特異的細胞レセプターへの結合、中和抗体および細胞性免疫の惹起、細胞融合活性、ウイルス病原性など、MHVの持つ重要な生物活性を担うことが多数報告されている。また、S蛋白は感受性細胞内で合成・修飾された後、細胞内プロテアーゼによりアミノ(N)末のS1およびカルボキシル(C)末のS2の二つのサブユニットに開裂され、この開裂が細胞融合活性を示す他のRNAウイルスと同様に、MHVの細胞融合活性においても重要であることが示唆されてきた。しかし、最近の研究では、この開裂がMHVの細胞融合活性に必須ではないことが示唆されている。この様に、S蛋白はMHVの持つ重要な生物活性を担うとされているにもかかわらず、その構造と機能に関する解析は、モノクローナル抗体(MAb)のエピトープに関するもの以外にほとんど行われていない。

今回、著者はラットに対して強い神経病原性を示すJHMV株cl-2変異株のS蛋白を認識するMAbを作製し、S蛋白上の中和エピトープの存在領域およびMHV特異的レセプターへの結合領域、さらに細胞融合活性部位の存在領域を解明するため、S蛋白をコードするcDNAを用いて以下の分子生物学的研究を行った。

### 1. cl-2変異株のS蛋白を認識するMAbの作製、認識サブユニットの同定およびMAbの生物活性の解析

作製したcl-2認識MAbのうち15種がS蛋白に特異的であり、ほぼすべてが構造エピトープを認識していた。これらのMAbと尿素および2-メルカプトエタノールで処理したcl-2感染細胞溶解質を用いて免疫沈降を行った結果、14種がS1サブユニットを、1種がS2サブユニットを認識していた。また、高い中和および細胞融合抑制活性を示すMAbはS1を認識することから、これらに対する構造エピトープの存在領域がMHV特異的レセプターへの結合およびS蛋白の細胞融合活性部位に関与する可能性が示唆された。

## 2. 中和エпитオプの存在領域およびMHV特異的レセプター結合領域の解析

S1上の中和構造エピトプの存在領域を解析するために、S1をコードするcDNAを用いてS1のC末のアミノ酸を異なる長さで欠落する5種のS1変異蛋白 (S1utt; S1全長の769個のアミノ酸を持つ, S1NM; S1のN末から594個のアミノ酸を持つ, S1N; 同453, S1N(330); 同330, S1N(220); 同220) をワクシニアウイルス(VV)の発現系で培養細胞に発現させ、S1特異的MAbとの反応性を間接蛍光抗体法で解析した。高い中和活性を示すMAbがS1N(330)以上のS1変異蛋白と反応性を示したことから、S1のN末から330個のアミノ酸で構成される領域がMHV特異的レセプターとの結合に関与する可能性が示唆された。そこで、マウス肝からMHV特異的レセプター遺伝子を分離し、組換えVVの系で培養細胞に発現させ、発現レセプターとS1変異蛋白との結合性の解析を行った結果、S1N(330)以上のS1変異蛋白が発現レセプターとの結合性を示した。このことは、S1のN末から330個のアミノ酸で構成される領域内にMHV特異的レセプターへの結合部位が存在することを示唆するものと思われた。

## 3. 各サブユニットの培養細胞での発現および細胞融合活性部位の解析

S蛋白中の細胞融合活性部位の存在領域を明らかにする目的で、S1をコードする(pSFS1utt)、S1および膜貫通領域をコードする(pSFS1tmd)、シグナルペプチドおよびS2をコードする(pSFssS2)各cDNAを作製し、VVの発現系を用いて培養細胞に発現させた。発現した2種のS1蛋白は予測された分子量を示したが、ssS2蛋白はわずかに大きかった。一方、これらの発現蛋白は、cl-2感染細胞で認められる各サブユニット蛋白とほぼ同様の挙動および抗原性を示すことが示唆された。しかし、発現蛋白による細胞融合が観察されたのは、S蛋白全長をコードするcDNAを発現させた場合のみで、各サブユニットを単独あるいは同時に発現させた場合には観察されなかった。この結果は、S蛋白が細胞融合活性を獲得するためには、非開裂状態のS蛋白が合成・修飾の過程を経る必要があることを示唆するものと考えられた。

著者は本論文中において、MHVのS蛋白中の構造中和エピトプの存在領域およびMHVの細胞特異的レセプターへの結合部位はS蛋白のN末から330個のアミノ酸で構成される領域に存在し、さらにS蛋白の細胞融合活性は、非開裂状態のS蛋白が合成・修飾されることにより得られる可能性を示した。また、本研究はMHVのレセプター結合部位に関与した領域を初めて示したものであることから、この知見がMHV感染発生機序解明への新展開を導く基礎的資料として極めて重要であると考えられる。

## 審 査 結 果 の 要 旨

マウスコロナウイルス (マウス肝炎ウイルス: mouse hepatitis virus, MHV) は、マウスおよびラットに対して様々な臓器特異性およびウイルス病原性を示すRNAウイルスである。MHVのJHNV株はラットに対して強い神経病原性を示すことから、ウイルス誘発性神経疾患の動物モデルとして多くの研究がなされている。MHVのウイルス表面に存在するスパイク(S)蛋白は、MHV特異的細胞レセプターへの結合、細胞融合活性、中和抗体および細胞性免疫の惹起、ウイルス病原性など、MHVの持つ重要な生物活性を担うことが多数報告されている。また、S蛋白は感受性細胞内で合成・修飾された後、細胞内プロテアーゼによりアミノ(N)末のS1およびカルボキシル(C)末のS2の二つのサブユニットに開裂され、この開裂が細胞融合活性を示す他のRNAウイルスと同様にMHVの細胞融合活性においても重要であることが示唆されてきた。しかし、最近の研究では、この開裂がMHVの細胞融合活性に必須ではないことが示唆されている。この様に、S蛋白はMHVの重要な生物活性を担うとされているにもかかわらず、その構造と機能に関する解析は、モノクローナル抗体(MAb)のエピトプに関するもの以外にほとんど行われていない。

本研究では、強い神経病原性を示すJHNV株cl-2変異株のS蛋白を認識するMAbを作製し、S蛋白上の中和エピトプの存在領域およびMHV特異的レセプターへの結合領域、さらに細胞融合活性部位の存在領域を解明するため、S蛋白をコードするcDNAを用いて以下の分子生物学的研究を行った。

### 1. cl-2変異株のS蛋白を認識するMAbの作製、認識サブユニットの同定およびMAbの生物活性の解析

作製したcl-2認識MAbのうち15種がS蛋白に特異的であり、ほぼすべてが構造エピトープを認識していた。これらのMAbと尿素および2-メルカプトエタノール処理を施したcl-2感染細胞溶解質とを用いて免疫沈降を行った結果、14種がS1サブユニットを、1種がS2サブユニットを認識することが明らかとなった。また、高い中和および細胞融合抑制活性を示すMAbはS1を認識することから、これらに対する構造エピトープの存在領域がMHV特異的レセプターへの結合およびS蛋白の細胞融合活性部位に関与する可能性が示唆された。

### 2. 中和エピトープおよびMHV特異的レセプター結合領域の解析

S1上の中和構造エピトープの存在領域を解析するために、S1をコードするcDNAを用いてS1のC末のアミノ酸を異なる長さで欠落する5種のS1変異蛋白 (S1utt; S1全長の769個のアミノ酸を持つ、S1NM; S1のN末から594個のアミノ酸を持つ、S1N; 同453, S1N(330); 同330, S1N(220); 同220) をワクシニアウイルス(VV)の発現系で培養細胞に発現させ、S1特異的MAbとの反応性を間接蛍光抗体法で解析した。高い中和活性を示すMAbがS1N(330)以上のS1変異蛋白と反応性を示したことから、S1のN末から330個のアミノ酸で構成される領域がMHV特異的レセプターとの結合に関与する可能性が示唆された。そこで、マウス肝からMHV特異的レセプター遺伝子を分離し、組換えVVの系で培養細胞に発現させ、発現レセプターと各S1変異蛋白との結合性について解析を行った結果、S1N(330)以上のS1変異蛋白が発現レセプターとの結合性を示した。このことは、S1のN末から330個のアミノ酸で構成される領域内にMHV特異的レセプターへの結合部位が存在することを示唆するものと思われた。

### 3. 各サブユニットの培養細胞での発現および細胞融合活性部位の解析

S蛋白中の細胞融合活性部位の存在領域を明らかにする目的で、S1をコードする(pSFS1utt)、S1および膜貫通領域をコードする(pSFS1tmd)、シグナルペプチドおよびS2をコードする(pSFssS2)各cDNAを作製し、VV発現系を用いて培養細胞に発現させた。発現した2種のS1蛋白は予測された分子量を示したが、ssS2蛋白はわずかに大きかった。一方、これらの発現蛋白は、cl-2感染細胞で認められる各サブユニット蛋白とほぼ同様の挙動および抗原性を示すことが示唆された。しかし、発現蛋白による細胞融合が観察されたのは、S蛋白全長をコードするcDNAを発現させた場合のみで、各サブユニットを単独あるいは同時に発現させた場合には観察されなかった。この結果は、S蛋白が細胞融合活性を獲得するためには、非開裂状態のS蛋白が合成・修飾の過程を経る必要があることを示唆するものと考えられた。

MHVのS蛋白の構造と機能の関係を解明する目的で、MAbおよびcl-2変異株のS蛋白をコードするcDNAを用いて分子生物学的解析を行った結果、S蛋白中の中和エピトープの存在領域およびMHVの細胞特異的レセプターへの結合部位はS蛋白のN末から330個のアミノ酸で構成される領域に存在し、また、この領域内に存在するこれらの生物活性部位はS蛋白の立体構造に依存することが示唆された。さらに、S蛋白の細胞融合活性は、非開裂状態のS蛋白が合成・修飾されることにより得られる可能性が示唆された。

本研究は、MHVのS蛋白中に存在する生物活性領域およびMHV特異的細胞レセプターへの結合部位領域を示し、MHVのS蛋白の構造および機能に関する新知見を提供している。また、これら

は、Journal of Virologyに1編、Journal of General Virologyに2編掲載され、MHVの感染発生機序解明への新展開を導く基礎的資料として極めて重要であると考えられる。

平成7年2月2日における発表会および提出論文、ならびに基礎となる学術論文（3編）および既発表学術論文（3編）を5人の学位論文審査委員が慎重審議した結果、岐阜大学連合獣医学研究科の学位論文としてふさわしいことを認めた。