

氏名(本籍) おか岡 さき崎 はじめ肇

学位の種類 医 学 博 士

学位記番号 医 博 第 661 号

学位授与年月日 昭和 45 年 3 月 25 日

学位授与の要件 学位規則第 5 条第 1 項該当

研究科専門課程 東北大学大学院医学研究科
(博士課程)外科学系専攻

学位論文題目 Specific Requirement of Serine for
the Growth of Newcastle Disease
Virus
(ニューカッスル病ウイルスの増殖における
特異的セリン要求性)

(主 査)

論文審査委員 教授 葛 西 森 夫 教授 石 田 名 香 雄

教授 山 根 績

論文内容要旨

〔 研究目的 〕

HeLa-S3 細胞からクローン化して得られたS3T細胞は、その増殖にセリンを要求する。またS3T細胞におけるNewcastle disease virus(以下NDV)の増殖もやはりセリンを要求する。一方ポリオウイルスの増殖にはこのようなセリン要求性がみられないことから、この現象はNDVに特異的と考えられる。この論文ではNDV増殖過程におけるセリン要求段階及びその役割を検討した。

〔 材料と方法 〕

実験に用いた組織培養細胞はHeLa-S3をクローン化して得たS3T細胞の継代株で、培養液としては10%牛血清加YLE(0.1%Yeast extract及び0.5%Lactalbumin hydrolysateを0.45%のglucoseを含むEarle氏液に添加したもの)を使用した。NDVの感染には通常血清なしのYLEを用い、必要に応じてEagleの基礎培地(Eagle's MEM)を使用した。NDVとポリオウイルス感染価測定はそれぞれ鶏胎児細胞、S3T細胞を用いたブラック法で測定した。

〔 実験結果 〕

10%牛血清加YLEで継代しているS3T細胞をセリンを含んでいないところのEagle's MEMで培養すると細胞増殖は全くみられぬが、これに1mMのセリンを添加すると10%牛血清加YLEで培養した時と同程度の細胞増殖がみられる。YLEを用いた場合のS3T細胞におけるNDV増殖過程をみるに、感染価は4時間のlag phaseの後に急激に対数的に増加し8時間で極値に達する。YLEの代わりにセリンを含まぬMEMを用いた場合は、赤血球凝集素(HA)及び感染性ウイルスの増加は全くみられない。感染初期にこの系にセリン(1mM)を添加した場合にはNDVはYLEを用いた場合と同様の経過で増殖する。一方S3T細胞におけるポリオウイルスの増殖はMEMを用いた場合とYLEを用いた場合とで違いがみられないことから、NDV増殖の際のセリン要求性はNDVに特異的な現象と考えられる。次にMEMを用いてNDVをS3Tに感染させ、感染後種々の時間にセリンを添加することにより、NDV増殖のどの過程にセリンが要求されるかを検討した。その結果、セリン要求性の立場からNDV増殖過程を3つの段階に分けられた。感染後2時間以内にセリンを添加した場合には、ウイルス増殖過程は正常の場合と変りがない。即ち感染2時間迄の過程はセリン非要求性である(第1段階)。次に感染後4時間目にセリンを添加した場合にはlag phaseの2時間延長がみられ以後の過程は正常と同様に進展する。しかし4時間以後に与えた場合にはこのlag phaseの延長は次第に短縮され、感染後8時間目に与えた場

合には直ちにウイルスの増殖が開始する。即ち正常感染時にみられる lag phase 後半の 2~4 時間迄の過程はセリン存在下では 2 時間で終了するが、セリン非存在下では 6 時間を必要とする比較的セリン要求性の時期である (第 2 段階)。しかしこの段階迄進んでもなおセリンを添加しなければ感染価の立ち上りは見られない。即ち感染価の対数的増殖過程の開始は外から与えられセリンに依存している (第 3 段階)。第 3 段階の過程の途中でセリンを除くとそれ以後の成熟ウイルスの産生は低下する。つまり対数的にウイルスが増殖している時期においてもセリン要求性反応は進んでいる。次にセリン非存在下にウイルス特異 RNA の合成及びウイルス抗原の合成を調べた。アクチノマイシン D (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 添加により宿主 RNA の合成を抑えた条件でセリン非存在下に NDV を感染させ、 ^3H -Uridine の酸不溶性分画へのとり込みでウイルス特異 RNA の合成を調べたところ、NDV 特異的 RNA の合成はセリン添加時と同程度に起こることがわかった。さらに蛍光抗体法で見ると NDV 特異的抗原合成もセリン非存在の条件でセリン添加時と同程度で見られる。

〔 考 按 〕

NDV 増殖の過程をセリン要求性の立場から 3 つに分けられ得る。即ち第 1 段階；感染後 0~2 時間迄のセリン非要求性の過程、第 2 段階；感染後 2~4 時間迄のセリン比較的要求性の過程及び第 3 段階；感染 4 時間以後のセリン要求性の過程である。このうち第 2 段階はセリン存在下では 2 時間で終了するが、非存在では約 6 時間を必要とする。この過程はセリン非存在下に S 3 T 細胞内で少量ずつ供給されるセリンによつてまかなわれるが、第 3 段階の対数的増加の過程は細胞内のセリン供給のみではまかない得ないと考えられる。また第 3 段階の過程を維持するためには絶えず細胞外からのセリン供給を必要とする。しかしながらこの NDV 増殖に於けるセリン要求性の過程が宿主細胞の遺伝子またはウイルス遺伝子のどちらの支配下にあるのか、また既に述べた生物学的に異なつたセリン要求性の過程がそれぞれ生化学的に異なつた反応に基づくのかは不明である。セリン非存在下には NDV の HA が産生されないことから、セリンが HA ペプチドの合成に用いられる可能性は考えられる。また NDV 増殖におけるセリン要求性過程はアクチダイオンの存在下で抑制されることも、セリンが蛋白素材の一つとして利用されている可能性を示している。一方セリン非存在下にも或る種の抗原合成が蛍光抗体法で見ると殆んど正常程度に行われていることは、セリンが蛋白以外の反応に利用されていることを示唆する。事実脂質を含むセンダイウイルスや Vesicular stomatitis virus が NDV と同様セリン非存在下で増殖せず、脂質を含まぬポリオウイルスは増殖し得るといふことはセリンが代謝面で或る種のウイルスに必要な脂質の前駆物質として利用される可能性を除外することはできない。

〔 結 論 〕

1. 実験に用いた S 3 T 細胞はその増殖にセリンを要求する。
2. S 3 T 細胞における NDV の増殖もセリンを要求しその要求性から NDV の増殖過程を次の 3 段階に分けることが出来た。第 1 段階；感染後 0~2 時間のセリン非要求過程。第 2 段階；感染後 2~4 時間の比較的セリン要求性の過程。第 3 段階；感染 4 時間以後の絶対的セリン要求過程。
3. NDV 増殖に要求されるセリンの役割について考按した。

審 査 結 果 の 要 旨

HeLa-S3細胞よりクローン化して得られたS3T細胞は、その増殖に不必須アミノ酸の一種であるセリンを要求する。またこのS3T細胞におけるNewcastle Disease Virus (NDV)の増殖も、セリンを添加しなければみられない。しかしポリオウィルスの増殖にはこのようなセリン要求性がみられないことから、この現象はNDVに特異的と考えられる。

本研究はNDV増殖に於けるセリンの作用機転を明らかにすることを目的としている。

YLB液で増殖させたS3T細胞の培養液をセリンを含有しないEagle's MEMに置換し、これにNDVを感染させ、感染後一定の時間を経てセリンを添加し、その後のNDVの増殖をPlaque assayによる感染価測定により観察したものである。その結果よりNDV増殖過程を3段階に分けている。即ち感染後2時間迄のセリン非要求性の第1段階、感染後2-4時間の比較的セリン要求性の第2段階、感染4時間以後の絶対的セリン要求過程の第3段階である。第1段階はセリン存在、非存在にかかわらず同様に進行するが、第2段階の2時間を進むのにセリン非存在下では6時間を要している。この第2段階はセリン非存在下において、細胞内で少しづつ供給されるセリンでまかなわれていると考えられる。しかし第3段階の対数的増殖過程の立ち上りは外からセリン添加を行わないと観察されないので、NDVの対数的増殖過程のためには細胞外からのセリン供給を必要とするとしている。

次にセリン非存在下に、NDV感染後のウイルス特異RNAの合成及びウイルス特異抗原の合成を調べたところ、両者共セリン添加時と同程度に合成されていることを認めている。

以上の結果よりセリンがNDV増殖において、単なる蛋白素材として利用されるのか、又はその代謝産物が利用されるのか不明であるが、NDV増殖過程にセリン依存性の差による3段階があり、セリンはRNA合成後の過程で最も必要度が高いことが明らかにされたもので、ウイルス増殖機転について示唆するところが大きい。よつて学位授与に値するものと認める。