

氏 名 (本籍) さ とう てつ お  
佐 藤 徹 雄

学 位 の 種 類 医 学 博 士

学 位 記 番 号 医 第 1 6 0 3 号

学 位 授 与 年 月 日 昭 和 5 9 年 9 月 5 日

学 位 授 与 の 要 件 学 位 規 則 第 5 条 第 2 項 該 当

最 終 学 歴 昭 和 5 2 年 3 月  
東 北 大 学 医 学 部 医 学 科 卒 業

学 位 論 文 題 目 polypeptide Synthesis of Human Rotavirus.  
(ヒトロタウイルスのポリペプチド合成)

(主 査)

論 文 審 査 委 員 教 授 多 田 啓 也 教 授 後 藤 由 夫

教 授 吉 沢 善 作

# 論文内容要旨

## はじめに

ロタウイルスは、reoviridaeに属する11のsegmentを持つdsRNAウイルスで、各種動物の乳幼仔の急性胃腸炎を起こす。ヒトロタウイルスは乳児下痢症の30ないし80%の病因となっている。ロタウイルス感染細胞内でのウイルス蛋白合成に関する知見は、ウシロタウイルスで得られているが、ヒトロタウイルス感染細胞内でのウイルス蛋白合成は、ヒトロタウイルスが培養細胞での増殖、継代が困難であるため今だ明らかでない。最近、培地にトリプシンを添加することにより、培養細胞内で増殖し、継代が可能なヒトロタウイルス株が樹立された。これらのヒトロタウイルス株を用い、感染細胞内でのウイルス蛋白合成を解析した。

## 方法

ヒトロタウイルスKUN株(血清型2型)、Wa株(1型)あるいはMO株(3型)感染MA 104細胞を $[^{14}\text{C}]$ -ロイシンあるいは、 $[^3\text{H}]$ -グルコサミンにて内部ラベルし、Laemmliの方法により8.5-13.5%ゲルにて、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)を行った後、フルオログラフィーにてウイルス蛋白を分析した。内部ラベルは、宿主細胞蛋白合成を選択的に抑制するために0.15 M NaCl 加高張培地中で行った。また、培地には、ヒトロタウイルスの感染に必要なトリプシンを0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 加えた。さらに、内部ラベルしたヒトロタウイルス感染細胞および培地より、trichlorotrifluoroethane 処理ののち、ウイルス粒子を抽出し、20-60%ショ糖密度勾配遠心にてウイルス粒子を精製し、SDS-PAGE、フルオログラフィーにてウイルス粒子の構造蛋白を分析した。

## 結果

$[^{14}\text{C}]$ -ロイシンにてpulse ラベルを行った感染細胞では、既に感染5時間後にウイルス蛋白合成が認められ、感染後15時間でもウイルス蛋白合成が認められた。感染細胞中には、11本のウイルスポリペプチド、即ちVp1-Vp11(KUN株においては、Vp7に相当するポリペプチドが2本あり、Vp7A, 7Bとする。以下同。)が認められた。chase ラベルにて、Vp7(7A, 7B), 10, 11が消失し、分子量が約1キロダルトン(KD)小さいVp7c(7Ac, 7Bc), 10c, 11cが新たに出現した。糖蛋白合成阻害剤の tunicamycin 存在下での $[^{14}\text{C}]$ -ロイシンラベルにて、Vp7c(7Ac, 7Bc), 10cが消失し、これらの非糖化蛋白質と考えられる、より低分子のVp7, Vp12が新たに出現し、Vp11cも消失した。 $[^3\text{H}]$ -グルコサミンラベルにてVp7c(7Ac,

7Bc), 10c, 11c がラベルされた。以上より, Vp 7c, 10c, 11c が糖蛋白質であると考えられた。また, 感染細胞および培地よりウイルス粒子を精製した結果, ショ糖密度勾配遠心にて, 二重殻粒子を主とする radioactive peak と, コアを欠く粒子 (empty particle) を主とする peak が得られた。SDS-PAGE にて, 二重殻粒子には, 感染細胞内で合成されるウイルス蛋白 (Vp1-Vp11) のうち Vp 1, 2, 3, 6, 7c (7Ac, 7Bc) および感染細胞に含まれない分子量 54KD と 30KD の 2 つのポリペプチドが含まれることが分った。empty particle には, Vp 1 が含まれていなかった。tunicamycin 添加培養の MA 104 細胞で増殖後精製したウイルス粒子は, 外殻を欠く一重殻粒子が主であり, この粒子は, Vp 7c (7Ac, 7Bc) を含まなかった。また, トリプシン無添加培養の MA 104 細胞で増殖後精製したウイルス粒子は, Vp 4 を含み, 54KD および 30KD のポリペプチドを含まなかった。以上の結果より, 6 種類のウイルス蛋白, すなわち, Vp 1, 2, 3, 4, 6, 7c (7Ac, 7Bc) がヒトロタウイルスの構造蛋白と考えられた。54KD および 30KD のポリペプチドは, 培地中のトリプシンによる開裂産物と考えられた。Vp 1 はコアに, Vp 7c は外殻に局在する蛋白と考えられた。KUN 株の構造蛋白の分子量は, Vp 1; 112KD, Vp 2; 85KD, Vp 3; 77KD, Vp 4; 76KD, Vp 6; 41KD, Vp 7Ac; 37KD, Vp 7Bc; 35KD であった。血清型の異なる Wa, KUN, MO 株の精製ウイルス粒子の構造蛋白を, SDS-PAGE にて比較した結果, 泳動パターンは各株間で異なり, 特に血清型 2 型の KUN 株は, Vp 1, Vp 2, Vp 7c の移動度が, Wa 株, MO 株のそれと異なり, 泳動パターン上大きな相異があることが分った。

## 審 査 結 果 の 要 旨

ロタウイルスは reoviridae に属する11の segment を持つ RNA ウイルスであり、ヒトロタウイルスは乳児下痢症の主要な病因をなすものとして知られている。ヒトロタウイルス感染細胞内でのウイルス蛋白合成は、ヒトロタウイルスの培養継代が困難なため未だ明らかでない。最近、培地にトリプシンを添加することにより培養細胞内で増殖し継代が可能なヒトロタウイルス株が樹立された。本研究はこれらのヒトロタウイルス株を用い感染細胞内でのウイルス蛋白合成の解析を行なったものである。

ヒトロタウイルス KUN 株, Wa 株あるいは Mo 株感染細胞を [ $^{14}\text{C}$ ]-ロイシンあるいは, [ $^3\text{H}$ ]-グルコサミンで内部ラベルし, また培地及び感染細胞よりウイルス粒子を精製し, SDS-PAGE flurography により分析した。

感染細胞には11本ウイルス蛋白 (Vp1~Vp11) が認められた (KUN株ではVp7が2本でVp7A, Vp7Bとした)。これらの中, 3本のウイルス蛋白 (Vp7, Vp10, Vp11) は糖蛋白であり, posttranslational processing を受けることが分った。ウイルス粒子の構造蛋白は6本のポリペプチド (Vp1, 2, 3, 4, 6, 7c) と考えられた。Vp1はコアに, Vp7cは外殻に局在する蛋白と考えられた。血清型の異なるWa株 (血清型1型), KUN株 (2型), Mo株 (3型) の構造蛋白の泳動パターンは異っていた。

以上の研究成果は, ヒトロタウイルスの感染細胞内での蛋白合成を始めて明らかにしたものであり医学博士の授与に値するものと判定された。