

学位論文題名

アンチセンス核酸によるマウス肝炎ウイルスの
増殖阻害に関する研究

学位論文内容の要旨

マウス肝炎ウイルス（MHV）は、コロナウイルスに属し、実験動物のマウスに肝炎や腸炎、脱ミエリン症等を起こし、実験動物学上重要な疾病となっている。MHVのゲノムは、約31キロ塩基のポジティブ鎖のRNAであり、ウイルス粒子中ではヌクレオキャプシド（N）タンパク質と結合し、ribonucleoproteinとして存在している。

近年、各種のアンチセンス核酸を用いた遺伝子機能の解析や抗ウイルス剤の開発が行なわれている。アンチセンス核酸は標的RNAと塩基配列特異的に結合し、標的RNAの発現を阻害すると考えられている。しかしながら、遺伝子発現に対する阻害機構については、不明な点も多い。MHVはその複製サイクルが全て細胞質中で行なわれDNAの段階を経ないため、また、ポジティブ鎖とネガティブ鎖の両者が共存しているため、アンチセンス核酸の作用機構を検討する上で有用と考えられる。本研究では、アンチセンスオリゴヌクレオチド、アンチセンスRNA、リボザイムの3種のアンチセンス核酸を用いて、MHVの感染培養細胞中における転写や増殖に対する効果を検討した。

1) MHVの転写様式では、leader-primed transcription のモデルが提唱されており、リーダーRNAがプライマーとして機能することによってmRNAが合成されると考えられている。そこで、MHVのリーダー配列に相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチドによる感染DBT細胞の増殖阻害効果について検討した。このオリゴヌクレオチドはMHVの転写や複製において重要とされるリーダー配列中に存在するUCUAAに相補的な配列を含み、5～

10 μ M の濃度で培地に添加すると、MHVの転写、翻訳と増殖を感染後比較的初期に効率良く阻害した。一方、アンチセンスオリゴヌクレオチドに相補的なオリゴヌクレオチド（センスオリゴヌクレオチド）やリーダー配列に無関係なオリゴヌクレオチドを5~10 μ Mの濃度で添加した場合には、MHVの増殖は影響されなかった。また、各オリゴヌクレオチド添加後4.5時間目で感染細胞内のRNAをノーザンブロット解析すると、アンチセンスオリゴヌクレオチドで処理した細胞のみMHVのmRNA合成が抑制されていた。これらの結果は、リーダー配列に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドが感染初期に塩基配列特異的に作用していることを示している。また、センスオリゴヌクレオチドを20 μ Mの濃度で添加すると、程度は低いがMHVの増殖阻害効果が得られた。MHVはポジティブ鎖のゲノムをもつが、複製サイクル中でネガティブ鎖が生じるので、センスオリゴヌクレオチドはネガティブ鎖に作用することも考えられる。

2) Nタンパク質はMHVのゲノムの他にリーダーRNAやネガティブ鎖RNAにも親和性があり、mRNAの合成量の調節を行なっていると考えられている。Nタンパク質の産生を抑制する目的で、これをコードするmRNA7に対するアンチセンスRNAを発現するベクターを構築し、DBT細胞にトランスフェクションした。また、センスオリゴヌクレオチドがMHVの増殖を阻害することが示唆されたので、ネガティブ鎖のRNAを標的とするmRNA7と同じ塩基配列を有するセンスRNAについても検討した。アンチセンスRNAあるいはセンスRNAを安定に発現するトランスフォーマントにおけるMHV・JHM株の増殖は、対象の非転換DBT細胞と比較して、感染後9時間目で約95%、12時間で約99%抑制されていた。感染後3.5時間目でRNAを抽出しノーザンブロット解析を行うと、MHVのRNA合成は両方のトランスフォーマントともに対象の非転換DBT細胞の場合と比較して、顕著に抑制されていた。以上の結果からmRNA7に対するアンチセンスRNAならびにセンスRNAはMHV感染初期にウイルスの複製を阻害することが示唆された。

3) MHVの増殖を感染初期段階において阻害する目的で、ゲノムRNAの5'末端領域のp28をコードする遺伝子（p28遺伝子）

に対するアンチセンスRNA (アンチp28RNA) と、p28の翻訳開始コドンAUGの直後のGUCの後で切断するように設計したハンマーヘッド型リボザイムの発現ベクターを作製し、DBT細胞にトランスフェクションした。p28の機能は明らかにされていないが、MHVで最初に翻訳されるタンパク質であることからウイルスの複製にとって重要な役割を果たしていると考えられている。ノーザンブロット解析により、アンチp28RNAは安定に発現する系でMHV感染初期に転写を阻害していることが示された。アンチp28RNAを一過性に発現する系では、トランスフェクション後24時間目で最も効率良く導入遺伝子が発現し、安定な系の1000倍以上のアンチp28RNAが発現することが示された。この24時間の時点で、0.1m.o.i.のMHVを感染させ、ノーザンブロット解析を行なった結果、安定に発現する系と同様にMHVの転写を阻害することが示された。これらの結果から、一過性に発現する系は短期間でのアンチセンス核酸法の効果を判定する際に有用であると考えられる。リボザイムについては、無細胞系の反応では標的RNAの切断活性がしめされたが、一過性の発現系での感染実験ではMHVの転写に対する効果は認められなかった。

本研究により、MHVの種々の遺伝子や領域に対するアンチセンス核酸は塩基配列特異的にMHVのRNAに作用し転写、複製と増殖を阻害することが示された。現在、治療薬としてアンチセンスオリゴヌクレオチドを中心に研究されているが、本研究ではアンチセンスRNAの方が有効であったので、今後、アンチセンスRNAを遺伝子治療薬として発展させていく検討を行なっていきたいと考えている。

学位論文審査の要旨

主査 教授 渡邊 智正
副査 教授 橋本 信夫
副査 教授 小沼 操
副査 助教授 林 正信

学位論文題名

アンチセンス核酸によるマウス肝炎ウイルスの 増殖阻害に関する研究

マウス肝炎ウイルス (MHV) は、コロナウイルスに属し、マウスに肝炎、腸炎等を起こす。近年、各種のアンチセンス核酸を用いた遺伝子機能の解析や抗ウイルス剤の開発が行なわれている。そこで、アンチセンスオリゴヌクレオチド、アンチセンスRNA、リボザイムの3種のアンチセンス核酸を用いて、MHVの感染培養細胞中における転写や増殖に対する効果を検討し、以下のような成果を得た。

- 1) MHVでは、約70塩基のリーダーRNAがプライマーとして機能することによってmRNAが合成されると考えられている。MHVのリーダー配列に相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチドは5~10 μ Mの濃度で、MHVの転写や増殖を効率良く阻害した。
- 2) MHVのmRNA7がコードするヌクレオキャプシドタンパク質は転写の調節を行なっていると考えられている。mRNA7に対するアンチセンスRNAおよびセンスRNAを安定に発現する形質転換細胞におけるMHVの増殖は、約99%抑制され、さらに、アンチセンスRNAならびにセンスRNAはMHV感染初期にウイルスの複製を阻害することが示唆された。
- 3) MHVの増殖を感染初期段階において阻害する目的で、ゲノムRNAの5'末端領域の遺伝子に対するアンチセンスRNAを安定および一過性に発現させ、これらの系でMHVの転写が阻害されることを示した。また、この領域を切断するように設計したリボザイムは、無細胞系で切断活性を示した。

本研究により、MHVの遺伝子に対するアンチセンス核酸が塩基配列特異的にMHVのRNAに作用し転写と増殖を阻害することが示された。本研究はアンチセンス核酸を抗ウイルス剤として使用する上での重要な基礎的知見を示した。審査員一同は、申請者水谷哲也氏を博士(獣医学)を授与されるものと認めた。