

|         |  |      |         |
|---------|--|------|---------|
| 氏名(本籍)  | いぬ どう みち はる<br>犬 童 道 治 (鹿児島県)  |      |         |
| 学位の種類   | 博 士 (医 学)  |      |         |
| 学位記番号   | 博 乙 第 1537 号   |      |         |
| 学位授与年月日 | 平成 11 年 5 月 31 日   |      |         |
| 学位授与の要件 | 学位規則第 4 条第 2 項該当   |      |         |
| 審査研究科   | 医学研究科  |      |         |
| 学位論文題目  | Antigenicity of hepatitis C virus envelope proteins expressed in Chinese hamster ovary cells<br>(CHO 細胞で発現させた C 型肝炎ウイルスの外被蛋白質の抗原性) |      |         |
| 主 査     | 筑波大学教授   | 医学博士 | 田 中 直 見 |
| 副 査     | 筑波大学教授   | 医学博士 | 三 輪 正 直 |
| 副 査     | 筑波大学教授   | 医学博士 | 林 英 生   |
| 副 査     | 筑波大学教授   | 医学博士 | 中 内 啓 光 |
| 副 査     | 筑波大学助教授  | 医学博士 | 野 村 文 夫 |

## 論 文 の 内 容 の 要 旨

### (目的)

C型肝炎ウイルス(以下HCV)は、人において高率に持続感染を起し、肝硬変、肝癌の主たる原因ウイルスと考えられている。HCVは約9,500塩基からなるプラス1本鎖RNAウイルスである。ウイルス蛋白質はウイルスを構成する構造蛋白質(コアおよび外被蛋白質)とそれ以外でプロテアーゼなどの酵素活性をもつ非構造蛋白質とからなっている。

HCVには、2つの外被蛋白質(以下E1,E2)が存在し、宿主はこれに対して抗体を産生し、中和活性を有する可能性が示唆されている。それゆえ、E1,E2の構造あるいはE1,E2蛋白質とHCV陽性患者血清との反応性を解明することは意義あることである。しかしながら、これまで哺乳動物細胞にE1,E2遺伝子の発現を試みた際のそれらの詳しい構造は、解明されていない。また、E1,E2蛋白質とHCV陽性患者血清との反応性についても、一定の見解がえられていない。そこで、本研究では、E2遺伝子を哺乳動物細胞であるChinese hamster ovary(CHO)細胞に導入し、発現されたE2蛋白質の構造を分析することを目的とし、さらに、このHCV E2蛋白質とHCV陽性患者血清との反応性について検討した。また、E2蛋白質をラットに免疫し、得られた抗体の特徴についても検討を加えた。

### (実験方法)

HCV E2遺伝子は、HCVのアミノ酸番号384番目から809番目までをコードしている。E2蛋白質のC末端を構成している疎水性アミノ酸の一部を欠いた遺伝子(E2 724)とほとんどを欠損させた遺伝子(E2 681)の2種類をBluescript IIプラスミドに組み込んだ。また、E2蛋白質を小胞体内腔に輸送させるため、E2遺伝子の5'末端にアミロイドA4前駆体蛋白質のシグナル配列を融合させた。3'末端にはhistiding-tagをコードする遺伝子を融合させた。dihydrofolate reductase gene(DHFR)遺伝子欠損のCHO細胞にHCV E2遺伝子とDHFR遺伝子を同時に導入して、発現してくるE2蛋白質を解析した。

発現させたE2蛋白質の糖鎖構造を詳しく解析するために、3種類の脱糖鎖酵素と3種類のレクチンを使用した。また、発現したE2蛋白質には、高マンノース型糖鎖が付加された蛋白質と複合型糖鎖が付加された蛋白質の2種

類が得られたため、それぞれの蛋白質と HCV 陽性患者血清との反応性を解析した。

さらに、大量に発現した E2 蛋白質をラットに免疫し、抗 E2 抗体を産生させることを試みた。

#### (結果と考察)

CHO 細胞に導入した組み換え型 HCV E2 遺伝子 E2 724 は、分子量 62,000 の E2 蛋白質を細胞内では発現していたが、細胞外には分泌していなかった。もう一つの組み換え型遺伝子 E2 681 は、分子量 53,000 の E2 蛋白質を細胞内で発現し、分子量 66,000 の E2 蛋白質を細胞外に分泌していた。細胞内で発現された分子量 62,000 と 53,000 の E2 蛋白質は、高マンノース型の糖鎖が付加されていた。一方、細胞外に分泌された分子量 66,000 の E2 蛋白質は、複合型糖鎖で修飾されており、さらに、3 種類の脱糖鎖酵素を使用して 3 枝もしくは 4 枝の糖鎖構造であることが判明した。また、レクチンとの結合性の検討から、分子量 66,000 の E2 蛋白質は患者血中 HCV と同様の傾向を示したことより、E2 681 遺伝子で発現した E2 蛋白質は、HCV の外被蛋白質 (E2) と非常に似ていることが推測された。

次に、E2 681 遺伝子で発現された高マンノース型糖鎖の付加された E2 蛋白質 (分子量 53,000) と複合型糖鎖で付加された分泌型 E2 蛋白質 (分子量 66,000) を HCV 陽性患者血清と反応させた結果、複合型糖鎖で修飾された E2 蛋白質の方が、反応的に優れていた。このことから、HCV 患者のスクリーニングの際、複合型の糖鎖で付加された E2 蛋白質を使用する方が感度が高くなることが示唆された。

最後に、E2 蛋白質をラットに免疫し、3 種類の抗 E2 ラット抗体を得ることができた。そのうち、1 つの抗体は、E2 領域の一部である超可変領域 (HVR) に対する抗体であった。患者血清中にも HVR に対する抗体が認められており、本実験で発現された E2 蛋白質は、抗原性としても優れていることが推定された。

以上の結果から、分泌型 E2 蛋白質の立体構造は、HCV の外被蛋白質 (E2) と非常に似ており、HCV 患者のスクリーニングや HCV の受容体の解明のためのリガンドとしても使用できる可能性があると考えられた。

### 審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、これまで明らかにされていなかった C 型肝炎ウイルス (HCV) の外被蛋白質の 1 つである E2 蛋白質の糖鎖構造を、細胞外に分泌する組み換え型 HCV E2 遺伝子を構築することによって詳細に検討したものである。3 種類の脱糖鎖酵素を使用して、分泌型 E2 蛋白質の糖鎖構造を分析し、HCV 外被蛋白質 (E2) の糖鎖構造を類推することができた。さらに、糖鎖の異なる E2 蛋白質と HCV 陽性患者血清との反応性を調べ、複合型糖鎖を持つ E2 蛋白質の方が、HCV 陽性患者血清との反応性に優れていることを示した。このことから E2 蛋白質の糖鎖構造の違いが、E2 蛋白質の立体構造に影響をおよぼしている可能性が示唆された。以上のことは、本研究で発現された分泌型 E2 蛋白質は、HCV の外被蛋白質 (E2) と非常に類似していることを示しており、そのため、複合型糖鎖で修飾されているこの E2 蛋白質は、HCV の受容体検索のリガンドとして十分使用できると考えられる。また、受容体と結合する E2 蛋白質側のアミノ酸配列の解明は、HCV ワクチン開発の期待を抱きうる。本研究の成果は、今後の HCV 研究に大きく貢献することが期待される。

よって、著者は博士 (医学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。