

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 佐藤英次

ネコ免疫不全ウイルス (FIV) は、レトロウイルス科レンチウイルス属に属し、後天性免疫不全症 (AIDS) 様症状を引き起こす。遺伝子構造などヒト免疫不全ウイルス (HIV) と多くの類似性があるため、HIV の動物モデルとして期待されている。FIV 分離株は非常に遺伝学的多様性に富み、これはウイルス自身の性質と宿主の免疫機構から免れるため変異体が生じた結果によるものと考えられる。またレトロウイルスが宿主に感染すると、生涯そのウイルスを体内から駆逐できず、FIV の感染および発症防御を目指した予防並びに FIV 感染後の治療に関する研究が困難なものになっている。

本研究では、有効な FIV のワクチン開発を目的として、ネコヘルペスウイルス 1 型 (FHV-1) をベクターに用いて FIV の抗原蛋白 (コア蛋白 (Gag) および Env 蛋白) を発現する組換えウイルスを構築し、その性状解析を行った。本論文の内容は以下の 3 章より構成されている。

第一章 FIV の Gag 前駆体蛋白を発現する組換え FHV-1 の構築

以前、横山らは FHV-1 の thymidine kinase (TK) 遺伝子中央部 (450bp) を欠損し、弱毒化した組換え FHV-1 (C7301 *dITK*) を作製したが、TK 欠損部位に外来遺伝子を挿入するとトランスファーベクターの construct 上、TK 蛋白の N 末端部と融合して発現していることが示された。外来遺伝子の翻訳産物が融合せず発現するような FHV-1 ベクターを作るため、C7301 *dITK* の TK 遺伝子開始コドンを含む N 末端部を削除した新たな組換え FHV-1 (*ddITK*) を作製した。次に、*ddITK* の TK 欠損部位に FIV *gag* 遺伝子を挿入して組換え EHV-1 (*ddITK-gag*) を作出した。*in vitro* における両ウイルスの増殖能は親株 FHV-1 のそれとほぼ同じであった。*ddITK-gag* は *in vitro* においてイムノブロット法により 50kDa の FIV Gag 前駆体蛋白を発現しており、間接蛍光抗体法 (IFA) においても Gag 蛋白発現が確認された。

第二章 FHV-1 gC promoter を用いた、組換え FHV-1 における FIV Env 蛋白の効果的な発現

本章では、第一章と同様に FIV の Env 蛋白を発現する組換え FHV-1 の作出を試みた。C7301 *dITK* の TK 欠損部位に FIV *env* 遺伝子を挿入し、組換え FHV-1 (*dITK-env*) を得た。さらに Env 蛋白の発現効率を上げるため、この *env* 遺伝子の上流に FHV-1 の gC promoter を挿入し、組換え FHV-1 (*dITK (gCp)-env*) を得た。*in vitro* における両ウイルスの増殖能は親株 FHV-1 のそれとほぼ同じであった。IFA により組換え FHV-1 の感染した細胞における FIV Env 蛋白の発現形態が、イムノブロット法により主として 130kDa の Env 蛋白を発現していることがわかった。酵素免疫抗体法 (ELISA)

により *dITK* (gCp)-env は *dITK*-env よりも 4 倍以上の Env 蛋白を発現しており、フローサイトメトリー解析では両組換え FHV-1 の感染した細胞表面上に Env 蛋白が発現していることが示され、特に *dITK* (gCp)-env において著しかった。

第三章 FIV の Gag 蛋白を発現する組換え FHV-1 のさらなる開発

本章では、第一章で作製した *ddITK*-gag による FIV Gag 蛋白の発現能を高めた組換え FHV-1 を作出し、*ddITK*, *ddITK*-gag と併せ、*in vitro* および *in vivo* における性状解析を行った。*ddITK*-gag の *gag* 遺伝子上流に FHV-1 の gB promoter を挿入し、新たな組換え FHV-1、*ddITK* (gBp)-gag を得た。FIV 感染ネコ血清を用いた IFA、イムノブロット法、ELISA により、FIV Gag 蛋白発現の増大を確認した。次に SPE ネコ各群 2 頭に、*ddITK*、*ddITK*-gag および *ddITK* (gBp)-gag を眼、鼻内および口腔内に 3 回接種したところ、免疫したネコに抗 FIV Gag 抗体の誘導は認められなかったが、組換え FHV-1 の感染は成立しており、再分離されたウイルスは接種したものと同一で、安全性も確認された。

以上本論文では、Gag 発現組換え FHV-1 を作製し、その感染性、安定性および安全性を確認したもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が、博士（農学）論文として価値あるものと認めた。