

論文の内容の要旨

論文題目 チュウザンウイルスの分子遺伝学的研究

氏 名 山 川 睦

1985年から1986年にかけて南九州を中心に水無脳症・小脳形成不全症候群を主徴とする異常仔牛の出産が多発した。その総数は2463頭に達し、畜産農家に多大な経済的被害をもたらした。血清疫学的及び病因学的研究により、本病は1985年におとり牛血液及びウシヌカカ (*Culicoides oxystoma*) から分離されたチュウザンウイルスに起因するものであることが明らかにされ、新しい節足動物媒介ウイルス (アルボウイルス) 性疾病として「チュウザン病」が確立された。チュウザンウイルスは、レオウイルス科オルビウイルス属パリアム血清群に分類されている。パリアム血清群ウイルスは、アジア、オーストラリア、アフリカを含む世界中の熱帯・亜熱帯地域に分布し、蚊、ヌカカ、ダニなどの多様な吸血昆虫によって媒介され、牛を主体とする反芻動物に感染する。従来よりパリアム血清群ウイルスの流産・先天性奇形を伴う牛の異常産への関与が示唆されていたが、チュウザン病の発生をみるに至るまで、その病原性について明確にされることはなかった。

近年の遺伝子工学的技術の導入によって、ブルータングウイルス (BTV) やアフリカ馬疫ウイルス (AHSV) を中心にオルビウイルスの分子生物学的性状

が急速に解明されつつあり、遺伝子診断法や分子疫学的研究手法の確立、組換えウイルスタンパク質を用いた血清診断法、ワクチンの開発などが精力的に試みられている。しかしながら、チュウザンウイルスを含むパリアム血清群ウイルスに関する分子レベルの研究は、これまでほとんど行われていないのが現状である。チュウザン病の診断・予防法の改良、パリアム血清群ウイルスの疫学や遺伝学的・進化学的関連性の解明のためには、チュウザンウイルスの分子生物学的研究が必要である。そこで、本研究ではチュウザンウイルスの遺伝子構造を明らかにし、組換えバキュロウイルスによる主要カプシドタンパク質 VP7 の発現並びに RT-PCR 法を用いたパリアム血清群ウイルスの検出と解析を試みた。

最初に、1985 年におとり牛血液から分離されたチュウザンウイルス K-47 株の RNA を抽出・精製し、cDNA ライブラリーを構築した。これをもとに全 10 分節の塩基配列を決定した結果、チュウザンウイルスのゲノムは、分節 1 の 3930 bp から分節 10 の 728 bp まで、総塩基数 18915 bp からなり、7 個の構造タンパク質及び 3 個の非構造タンパク質（計 6071 個のアミノ酸）をコードすることが明らかとなった。各 RNA 分節は介在配列のない単一のオープンリーディングフレームを有し、その 5' 及び 3' 末端には共通の塩基配列 5' GU(U/A)UAAA..... (A/G)C(U/A)(U/C)AC 3' や分節に特異的な逆位反復配列が認められた。チュウザンウイルス遺伝子と他の血清群に属する BTV、AHSV、シカ流行性出血熱ウイルス (EHDV) 及び Broadhaven ウイルスの遺伝子をアミノ酸レベルで比較した結果、コアタンパク質 VP3 が最もよく保存されていた (35.5 ~ 63.9%)。一方、ウイルス中和抗原の本体である外殻カプシドタンパク質 VP2 間の相同性は 19.7 ~ 22.5% と最も低かった。また、オルビウイルス間では、VP2 の場合を除いて、非構造タンパク質より構造タンパク質の方が保存されていることが判明した。さらに分子系統樹解析を行ったところ、宿主域や分布地域、病性が異なるにも関わらず、チュウザンウイルスは遺伝的に AHSV に最も近縁であることが明らかとなった。

次いで、組換えバキュロウイルスによって主要コアタンパク質 VP7 を発現させ、性状解析を行うとともに、その血清診断用抗原としての有用性を検討した。発現した VP7 は、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動によって分子量 38K の

単一のバンドとして検出され、抗チュウザンウイルス血清を用いた間接蛍光抗体法によって組換えウイルス感染昆虫細胞質内に確認された。各種パリアム血清群ウイルスに対する抗血清、抗 BTV 及び抗 EHDV 血清を用いて組換え VP7 の抗原性状について検討したところ、免疫沈降法とイムノプロット法で異なる結果が得られた。免疫沈降法では、VP7 はパリアム血清群ウイルスに対する抗血清すべてと強く反応し、通常の血清試験では交差反応を示さない抗 BTV 及び抗 EHDV 血清とも反応した。一方、イムノプロット法では、VP7 は抗チュウザンウイルス血清を含むすべての抗血清と反応を示さなかった。チュウザンウイルス VP7 はパリアム血清群特異抗原であることが確認されたが、その抗原決定基は一次構造によって直接決定される linear なものではなく、立体構造に依存する conformational なものであると考えられた。また、VP7 には血清群を越えて保存されている抗原決定基の存在も示された。組換え VP7 を用いて寒天ゲル内沈降反応を行ったところ、パリアム血清群ウイルスに対する抗血清と VP7 の間に明瞭な沈降線が確認された。しかしながら、免疫沈降反応でみられた抗 BTV 及び抗 EHDV 血清と VP7 の間の交差反応は認められなかった。以上のことから、組換えバキュロウイルスを用いて発現させたチュウザンウイルス VP7 は、チュウザン病の血清診断用抗原として有用であることが明らかとなった。

最後に、チュウザンウイルスとパリアム血清群に属するウイルスの RNA 電気泳動パターンの比較、チュウザンウイルスの cDNA クローンをプローブとして用いたノーザンブロットハイブリダイゼーション、さらに RT-PCR 法によるパリアム血清群特異遺伝子の検出と分子疫学的解析を行った。チュウザンウイルスは RNA ゲノムの電気泳動により他の血清群と容易に区別されたが、パリアム血清群ウイルスとは共通のパターンを示した。また、ハイブリダイゼーションの結果、外殻カプシドタンパク質をコードする RNA 分節 2 及び 6 を除く 8 分節は血清群内で保存されていることが明らかとなった。これらの成績をもとにパリアム血清群ウイルス RNA 分節 5、7 及び 9 を特異的に検出する RT-PCR 法を確立し、日本、オーストラリア及びジンバブエ分離株 24 株のウイルスから得られた PCR 産物の塩基配列を解析した。チュウザンウイルス分離株の遺伝子の変化を分離年順に調べたところ、これら RNA 分節にはほぼ同時期に塩

基の置換が認められた。また、同じ地域で分離されたウイルス株は、血清型に関係なく相互に遺伝的に近縁であり、地域型 (topotype) 別に分類されることが判明した。分子系統樹解析により、1991 年に日本で分離された D'Aguilar ウイルス KY-115 株は、異なる地域型間で起こった RNA 分節の交換 (reassortment) によって生まれた可能性が示された。

PCR 産物を用いて制限酵素断片長多型解析を行った結果、調べたオーストラリア及びジンバブエ分離株の全 8 株、日本分離株 1 株 (KY-115 株) の計 9 株の同定が可能であった。KY-115 株以外の日本分離株は塩基配列が同一であったため、個々の同定はできなかったが、1991 年を境に 2 つの群に分けられた。この方法は、新たに分離されたパリアム血清群ウイルスの地域型や遺伝子の変異を迅速かつ簡便に知るための有力な手段となることが示された。

本研究で明らかになったチュウザンウイルスの全塩基配列データは、本ウイルスの抗原性、病原性の詳細な解析やサブユニットワクチンの開発を容易にするだけでなく、オルビウイルス属の分類学的・進化学的研究の推進にも貢献すると考えられる。また、組換え VP7 を用いた寒天ゲル内沈降反応や RT-PCR 法は、チュウザン病の診断や本ウイルスのモニタリングに有効利用されると思われる。