

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 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。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から分離されたレオウイルス科オルビウイルス属パリアム血清群ウイルス (PALV) に属するチュウザンウイルスに起因することが明らかにされ、「チュウザン病」が確立された。

チュウザン病の診断・予防法の改良、PALVの疫学や遺伝学的・進化的関連性の究明のためには、チュウザンウイルスの分子生物学的研究が必要であるが、本ウイルスを含むPALV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。そこで本研究では、その遺伝子構造を明らかにし、主要カプシドタンパク質 VP7 の発現並びに RT-PCR 法を中心とした pALV の分子疫学的解析を試みた。

第1章では、チュウザンウイルスの cDNA ライブラリーを構築し、全10分節の塩基配列を決定した。そのゲノムは総塩基数 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をコードすることが明らかとなった。各分節は介在配列のない単一の ORF を有し、その両末端には共通の塩基配列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ウイルスの遺伝子をアミノ酸レベルで比較した結果、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 VP2 間の相同性は 19.7~22.5% と最も低かった。また、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アフリカ馬疫ウイルスに最も近縁であることが判明した。

第2章では、組換えバキュロウイルスによって発現させたチュウザンウイルス VP7 の性状解析を行った。VP7 は SDS-PAGE 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 PALV に対する抗血清、抗ブルータングウイルス (BTV) 及び抗シカ流行性出血熱ウイルス (EHDV) 血清を用いて組換え VP7 の抗原性状について検討した。免疫沈降法では、VP7 は PALV に対する抗血清すべてと強く反応し、かつ抗 BTV 及び抗 EHDV 血清とも反応した。一方、イムノブロット法では、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。以上の成績から、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。寒天ゲル内沈降反応により、組換え 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。

第3章では、チュウザンウイルスと PALV の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、PALVとは共通のパターンを示した。ノーザンブロットハイブリダイゼーションによる解析の結果、外殻カプシドタンパク質をコードする分節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PALVの分節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。PCR産物を用いてRFLP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株、日本分離株KY-115株の同定が可能であった。KY-115株以外の日本分離株は1991年を境に2つの群に分けられた。

以上本論文は、チュウザンウイルスの全塩基配列を明らかにし、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の基礎的な知見を与えたもので、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 (獣医学) 論文として価値あるものと認めた。