

## 論文の内容の要旨

獣医学専攻

平成 10 年度博士課程進学

氏名 藤田 賢太郎

指導教官 甲斐 知恵子

論文題目 Analysis of virus entry and gene expression of CDV using a reverse genetics system  
(リバーシジェネティクス系を用いた CDV の侵入と遺伝子発現機構の解析)

ジステンパーはイヌにおける代表的なウイルス性伝染病であり致死感染を引きおこす疾病として知られている。イヌジステンパーウイルス(CDV)は、麻疹ウイルス、牛痘ウイルスなどと共に、パラミクソウイルス科(Paramyxoviridae)のモービリウイルス属(Morbillivirus)に分類されている。1950 年代に生ワクチンが開発されて以来、イヌでの本病の発生数は激減し、世界的によく制御されていると考えられていた。一方で近年、世界各地で CDV 感染症の流行が報告されるようになり、その上これまで感受性宿主とは考えられていなかったネコ科の大型獣や、アザラシ類からもジステンパー感染症による大量死が相次いで報告されていることから、新たな変異ウイルスの出現によるリエマージングウイルス感染症の原因となる可能性が考えられている。

CDV のゲノムは一本鎖マイナス鎖の RNA から成る。最近まで一本鎖マイナス鎖非セグメント型 RNA ウイルス (モノネガウイルス) においてはゲノムの cDNA クローンからの感染性ウイルスの作出が不可能であったため、ウイルスの病原性支配領域や転写機構などの解明を組み換えウイルスによって行う事は不可能であった。しかし 1994 年に初めて cDNA クローンから感染性のあるウイルスを産生する系 (リバーシジェネティクス系) が開発され、モノネガウイルスの研究が飛躍的に進展している。著者らの研究グループでは 1999 年にイヌジステンパーウイルスにおいて、リバーシジェネティクス系を独自に開発し、ウイルス学的基礎研究を進めると共に、ヒトの麻疹ウイルス等のモデル系として、また CDV を多価ワクチンならびに遺伝子治療用のベクターとして利用しようと考えている。本研究ではこの新リバーシジェネテ

イクス系を用いてイヌジステンパーウイルスの宿主域及び転写制御機構の基礎的な解析を行った。また同様に近年開発されたセンダイウイルスにおけるリバースジェネティクス系を応用し、生体防御に重要な役割を果たすイヌ IFN $\gamma$ を大量に発現する系の確立を行った。本論文は以下の4章より構成される。

## 第1章；EGFP ならびに luciferase 発現組み換え CDV の作製

EGFP (enhanced green fluorescent protein)や luciferase はウイルス感染の有無や細胞内での転写活性を調べるのに有用なマーカー分子である。第1章ではこれらの分子を発現する組み換えウイルスを作製し、その組み換えウイルスの性状ならびに CDV の宿主域の解析を行った。EGFP 並びに luciferase 遺伝子上流に CDV の N 遺伝子の転写終結シグナル配列及び H 遺伝子の転写開始シグナル配列からなる転写制御シグナル配列を付加し、これを近年我々が分離した野外流行株から作製した CDV の full-genome cDNA clone の N 遺伝子の下流に導入した発現プラスミドを作製した。このプラスミドと、牛痘ウイルスの N、P、L タンパクを T7 プロモーターにより発現させるプラスミドを、予め T7 RNA polymerase 発現組み換えワクチニアウイルスを感染させておいた 293 細胞にトランスフェクトした。3 日後に CDV 感受性細胞である B95a 細胞と共培養した後数日間さらに培養を続けるとそれぞれの組み換え CDV (EGFP-CDV、Luc-CDV) が得られた。得られたウイルスは何も遺伝子を導入していない親株ウイルスに比べて若干増殖は遅かったが最終的なウイルス力価はほぼ同等であった。またそれぞれの組み換えウイルス感染細胞中にはそれぞれの外来遺伝子の monocistronic mRNA と上流の N 遺伝子とつながった bicistronic RNA が Northern blot 解析により検出された。これら組み換えウイルスを様々な細胞に感染させると、程度に違いがあるものの広範囲の細胞に感染性があることが明らかになった。近縁の麻疹ウイルスが主に SLAM (CD150) をレセプターとして利用していることが最近明らかとなったが、CDV も同様に利用しているかを検索するため、EGFP-CDV を用いて anti-SLAM モノクローナル抗体による感染阻害実験を行った。その結果 SLAM を発現していない上皮系の 293 細胞への感染は阻害されなかったが、SLAM を高発現している B95a 細胞への感染が anti-SLAM モノクローナル抗体によってほぼ完全に阻害された。このことから、CDV も B95a 細胞では SLAM をレセプターとして利用していることが明らかとなった。

## 第2章；CDV 感染における heparan sulfate の関与

第1章で CDV が様々な細胞に感染すること、及びリンパ系細胞では SLAM をレセプターとして利用していることが明らかとなった。しかし CDV は生体内で様々な組織の細胞に感染するのに対し、SLAM はリンパ球系の細胞にしか発現していないことから、SLAM が唯一のレセプターであるとは考えられず、CDV は複数の経路で感染すると考えられた。CDV の広範な細胞

親和性は多くの細胞で発現している heparan sulfate のようなグリコサミノグリカンが CDV の感染に関与しているのではないかと考え、その可能性を検討した。EGFP-CDV を heparin、chondroitin A、B または C で処理した後に 293 細胞に感染させたところ、293 細胞への感染は heparin によって阻害され、chondroitin A 及び chondroitin C によっては阻害されなかった。また chondroitin B も感染を阻害したがその度合いは heparin に比べると低かった。一方、B95a 細胞への感染は heparin によっても阻害されなかった。実際に CDV のウイルス粒子が heparin に結合することを確かめるために精製 EGFP-CDV を用いて heparin agarose chromatography を行ったところ、精製した EGFP-CDV は heparin に結合することが分かった。また heparan sulfate を発現出来ない変異細胞株への感染効率は親細胞株への感染効率に比べて低かった。heparan sulfate ならびに chondroitin sulfate 両方を発現出来ない変異細胞株への感染効率は heparan sulfate のみを発現出来ない細胞株への感染効率とほぼ同等であったことから主として heparan sulfate が CDV の細胞への感染に関与していると考えられた。

### 第 3 章；CDV の様々な遺伝子間配列が及ぼす転写への影響

CDV のゲノム中の各ウイルス構成蛋白遺伝子間には遺伝子発現制御配列が存在する。その制御配列は上流遺伝子の転写物の終結とポリ A 付加並びに下流遺伝子の転写の再開始を制御していると考えられている。この制御配列は各遺伝子間で多様性がみられ、この違いが転写の終結、再開始に与える影響はまだ明らかにされていない。この影響を検索するため、我々は各遺伝子間の制御配列をルシフェラーゼ遺伝子の upstream に配した 6 つの組み換え CDV を作製した。これらの組み換えウイルスを B95a 細胞に感染させたところ増殖曲線はほとんど変わらなかった。また各ウイルス感染 B95a 細胞は、ほぼ同程度のルシフェラーゼ活性を示したことから、この各遺伝子間に存在する制御配列の多様性が転写に与える影響は少ないと考えられた。

### 第 4 章；イヌ IFN $\gamma$ のセンダイウイルスベクターによる発現

IFN $\gamma$  は抗ウイルス作用や抗腫瘍効果があるサイトカインである。またセンダイウイルスは宿主域が広く多種の細胞に感染しウイルスタンパクを大量に産生することから、蛋白発現並びに遺伝子治療のベクターとして有用であると考えられる。センダイウイルスにおいてもリバーシジェネティクス系が近年開発され、外来遺伝子をセンダイウイルスに導入することが可能となった。本研究ではセンダイウイルス発現系を用いてイヌ IFN $\gamma$  の大量発現を試みた。イヌ IFN $\gamma$  の遺伝子にセンダイウイルスの転写シグナルを付加し、もっとも高い発現量を得るためにセンダイウイルスの最上流遺伝子である N 遺伝子の前に導入した組み換えセンダイウイルスを作製した。Western blot 解析により組み換えセンダイウイルスは発育鶏卵のしょう尿液、並びに培養細胞 (CV-1 細胞) 上清中にイヌ IFN $\gamma$  を発現することが確認された。しょう尿液中に発現した IFN $\gamma$

は分子量約 17kDa、20kDa、25kDa の 3 分子だったが、CV-1 細胞で発現させた IFN $\gamma$  は分子量約 17kDa、19kDa、20kDa、22kDa、25kDa、27kDa の 6 分子だった。しょう尿液中あるいは培養上清中に発現された IFN $\gamma$  は、共に抗ウイルス作用は保持していたが、しょう尿液由来のものは培養上清中由来のものに比べて単位 ml あたりの IFN 活性が低かった。またどちらに由来する組み換え IFN $\gamma$  も MHC classII 誘導能を保持していた。さらに活性の高い CV-1 細胞培養上清中に発現させたイヌ IFN $\gamma$  を ConA アフィニティークロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィー並びにゲル濾過クロマトグラフィーによって精製したところ高純度の IFN $\gamma$  を得ることに成功した。

本研究の成果はリバーズジェネティクス系の有用性を明らかにし、イヌジステンパーウイルスを含むモノネガウイルスの生物学的性状の研究に多大な知見を与え、ウイルスの宿主決定機構や転写制御機構を解明するために有用な実験系を提供すると考えられる。同様にこれらの基礎的知見はワクチン開発や遺伝子治療ベクター開発など応用的領域を新たに開くものと期待出来る。