

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 藤田 賢太郎

イヌジステンパーウイルス (CDV) はヒトの麻疹ウイルス及び獣医・畜産領域で重要な牛の牛痘ウイルスと同じモービリウイルス属に属し、イヌ及び野生のイヌ科動物に対し重篤な病気を起こすウイルスである。近年これまで自然宿主と考えられていなかった動物 (大型ネコ科獣、海棲哺乳類) への感染が報告され、その重要性は大きくなってきている。CDV の研究は古くから行われてきたが、人為的に遺伝子を組み換えたウイルスを作製することが不可能であったため、基礎的なウイルスの分子生物学的性状解析が困難であった。本論文著者らのグループは世界に先駆けてゲノムの cDNA から感染性の CDV を回収する系 (リバースジェネティクス系) を確立した。本研究第 1 章において著者はレポーター遺伝子となる外来遺伝子 (EGFP 及び luciferase 遺伝子) を CDV のゲノムに組み込んだ組み換え CDV を世界で初めて作製した。このような組み換え CDV が作製可能であることは、CDV が本来ウイルスの持っていない遺伝子を運ぶベクターとして利用可能であることを示唆し、遺伝子組み換え多価ワクチンの開発等への第一歩を踏み出したことを意味する。本著者はこれらの組み換えウイルスを用いて、CDV が多種多様な動物種および細胞種に感染することを示した。近縁のヒト麻疹ウイルスの野外分離株のレセプターはリンパ系細胞に特異的に発現する SLAM(CD150)であり、同じ属に属する CDV 及び牛痘ウイルスもこの SLAM 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、リバースジェネティクス系を用いて作製した組み換え CDV を用いて検索し、本組み換え CDV も実際に SLAM をレセプターとして利用していることを示した。SLAM はリンパ系の細胞にしか発現していないのに対し、CDV はリンパ系以外の細胞にも感染することから、SLAM 以外のレセプターも利用していると予想される。本組み換え CDV の感染効率を抗 SLAM 抗体が阻害しなかったことから、実際に上皮系の細胞には SLAM 非依存的に感染することを明らかにした。これは組み換え CDV を用いることにより複数のレセプターの存在を実証した興味深い結果である。本論文第 2 章では CDV の細胞への侵入にグリコサミノグリカンの一つである heparan sulfate が関与していることを、heparin による感染阻害および固相化 heparin へのウイルス粒子の結合を調べることにより明らかにした。heparan sulfate は様々なウイルスにおいて細胞への侵入に関与していることが報告されているが、CDV が属するモービリウイルス属での報告は初めてである。また本研究において heparan sulfate を発現していない細胞へも CDV が感染したことが示されたことから、更に他の細胞表面に存在する分子が CDV の細胞への侵入に関与していることが示唆された。このように外来遺伝子発現組み換え CDV は細胞への侵入に関わる分子の探索に有用なツールであり、今後の様々な研究に貢献すると考えられる。第 3 章においては、CDV の各構造遺伝子間に存在する転写制御シグナル配列に見られる多様性がウイルスの転写にどのような影響を及ぼすかを調べた。各遺伝子間の制御配列をルシフェラーゼ遺伝子の 5' 上流に配した 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ず、また細胞内のルシフェラーゼ活性もほぼ同等であったことから、各遺伝子間に存在する制御配列の多様性はウイルスの転写にほとんど影響を及ぼさないことが明らかになった。本結果は、近縁のセンダイウイルスでこの転写制御シグナルの多様性がウイルスの転写に大きく関わっているという結果と異なるもので、ウイルスの違いによる転写制御の違い等を検討する上で興味深い。第4章においては同じくリバーシジェネティクス系が開発されたセンダイウイルスを用いて、感染症や癌の治療に有用とされるイヌ IFN γ を大量に発現する系を確立した。組み換え蛋白を臨床応用する場合、蛋白の翻訳後修飾（糖鎖の構造など）は生体内での有効性に重要な働きをすることも多く、本来生体内で存在する形の方が有効性が高いと考えられる。センダイウイルスによって発現させたイヌ IFN γ は糖鎖修飾を受け、ヒトの IFN γ とほぼ同じ大きさを持ち、MHC classII の誘導活性や抗ウイルス活性などを保持し、また高純度に精製することが可能であったことから臨床への応用も期待できると考えられた。

本研究によって得られた知見はリバーシジェネティクスを用いたモノネガウイルスの生物学的性状の解析およびそのベクターとしての応用に大いに役立つと考えられる。よって審査員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。