

論文の内容の要旨

農学生命科学研究科 獣医学専攻

平成11年度博士課程進学

氏名 米田 美佐子

指導教官 甲斐 知恵子

論文題目 「Analysis of roles of rinderpest virus proteins in determining species specificity and pathogenicity」
(牛疫ウイルスにおける宿主特異性と病原性発現に関わるウイルス構成蛋白の解析)

牛疫ウイルス(RPV)は牛に致死性の全身疾患を引き起こし、現在でもアフリカ、中近東、南アジアで経済的損失を与え飢餓の原因の一つにも数えられており、FAOの根絶計画の最重要疾病にあげられている。RPVは麻疹ウイルス、イヌジステンパーウイルスなどとともに、パラミクソウイルス科(Paramyxoviridae)、モービリウイルス属(Morbillivirus)に分類されている。牛疫は呼吸器症状、出血性腸炎などの劇症症状の他に激しい免疫抑制、耐過後の自己抗体産生など多様な病原性を示すが、その病原性発現機構はほとんど解明されていない。また、牛でのRPV感染実験は特別な隔離施設を持つ世界でもまれな機関か牛疫常在地域でしか行なえないが、我々は、ウサギ馴化によって牛での牛疫の病態を再現する世界で唯一の優秀な実験感染モデル系を確立してきた。

これまでRPVの属する一本鎖(-)鎖非分節型RNAウイルス群では、cDNAから感染性ウイルスを獲得することができなかつたため、遺伝子からの機能解析研究は不可能であった。モノネガウイルス群には、重篤な病気を引き起こすウイルスが多く、最近問題となっているエマージングウイルスの中にも、ヒトのエボラウイルスをはじめ馬のヘンドラウイルス、ブタとヒトのニパウイルスなど多くのウイルスが含まれている。その出現の主要因は種を越えた伝播によると推察されている。しかしウイルス学における重要な命題である宿主特異性決定機構も、本ウイルス群では手法の困難さのためほとんど研究が進められていなかった。しかし、1994年

に初めて cDNA クローンから感染性ウイルスを産生する系（リバーシジェネティックス系）が開発されて以来、モノネガウイルスの研究が飛躍的に進展している。本研究では、新しいリバーシジェネティックスの手法を RPV においても確立し、ウサギに病原性を持つ RPV-L 株と牛で増殖しウサギには病原性を全く持たない RBOK 株の両者、また L 株の中からウイルスクローニングによって得た極めて近縁な遺伝的背景を持つ病原性の強い株と弱い株の両者の各々の遺伝子を組み換えたウイルスを作製し、RPV の宿主特異性決定機構および病原性発現機構の解明を試みた。本論文は以下の5章より構成される。

第1章：組換え牛疫ウイルスを用いた H 蛋白質の宿主特異的病原性発現機構における役割

種を越えた病原性発現には感染が成立することが必須であり、他のウイルスではこのステップが必要十分であると報告されている。そこで他の動物種へ侵入するための最初のステージである細胞への吸着を担う H 蛋白に注目しその種特異的病原性発現への関与を調べた。牛のワクチン株でありウサギに病原性のない RPV-RBOK 株のクローン化 cDNA にウサギに強い病原性を有する RPV-L 株の H 遺伝子を組換えたプラスミドを作製した。このプラスミドを、ウイルス再構成に必要な N、P、L 蛋白を発現するサポータープラスミドとともに細胞に導入し、これらプラスミドから RNA を転写する T7 RNA ポリメラーゼを発現するワクシニアウイルスを感染させ、3 日後に B95a 細胞と共培養することにより組換えウイルスの獲得に成功した。この組換えウイルス rRPV-lapH と、RBOK 株、L 株を用いてウサギの感染実験を行ない、感染成立の有無、臨床症状、臓器でのウイルス増殖性、病理組織学的検索を行なった。その結果、L 株接種ウサギでは臨床症状や臓器でのウイルス増殖が顕著であり、リンパ組織において広範な壊死巣を認めた。RBOK 株接種ウサギではこれらの変化は全く見られなかった。rRPV-lapH 接種ウサギでは臨床症状は認められなかったが、病理組織学的検索によりリンパ組織に反応性変化を認めた。さらに各ウイルス接種 2 週間後の抗体価を測定したところ、L 株、rRPV-lapH では抗体価の顕著な上昇をみとめた。これらの結果より、H 蛋白は細胞への侵入に重要であり、これをウサギ馴化株に変えたことによってウサギの細胞内への侵入は成立したと考えられるが、その後の増殖能を規定するのは他のウイルス蛋白の影響が大きく、宿主内でのウイルス増殖が起らないために病原性発現に至らなかったと推察された。

第2章：牛疫ウイルス N 蛋白および P 蛋白の種特異的病原性発現機構への関与

第1章で、H 蛋白は RPV の宿主細胞への侵入に重要であるが、侵入後の増殖能は他のウイルス蛋白により規定されると考えられた。そこで、さらに病原性への関与が示唆される P 蛋白およびウイルスゲノム RNA に結合しウイルスの複製に関与する N 蛋白の病原性発現への関与を調べた。第1章で述べたのと同様にして、RBOK 株の N、P 蛋白を L 株のものに組換えたウイルス lapHP、lapNHP を作製した。この2つの組換えウイルスと RBOK 株、L 株、lapH をウサギに接種し、病原性を比較した。その結果、lapHP、lapNHP を接種したウサギでは、L 株を接種したウサギほど顕著ではないものの、一過性の激しい発熱がみられ白血球数も減少傾向

向を示した。さらにリンパ系臓器から高力価のウイルスが検出され、病理組織学的検索においても、lapH を接種したウサギでは見られなかった壊死像を認めた。また臨床症状、ウイルス増殖、病理組織学的解析で、lapHP と lapNHP の病原性に差は認められなかった。これらの結果より、種を越えた病原性発現に、P 蛋白が大きく関わることを示唆された。

第3章：yeast two-hybrid 法による牛痘ウイルス P 蛋白と結合する細胞内蛋白の同定

第2章で P 蛋白が牛痘ウイルスの種を越えた病原性に関与することが示唆された。種を越えた病原性発現にはウイルス蛋白と宿主因子との相互作用が必要と考えられることから、著者は、yeast two-hybrid 法を用いて、P 蛋白との結合能を持つ宿主蛋白の探索を試みた。その結果、MDM2 binding protein (MTBP) が候補蛋白として同定された。MDM2 は p53 の機能を阻害し、細胞周期を亢進することが知られている。MTBP は近年、MDM2 に直接結合してその機能を抑制する蛋白質として同定された。現在、哺乳類細胞内で MTBP が RPV の P 蛋白と結合するか否か、またその結合によってもたらされる機能について解析を行なっている。

第4章：RPV-L 株のリバースジェネティックス系の確立と V 蛋白の病原性への関与

RPV の多様な病原性の研究のためには、ウサギに強い病原性を持つ L 株のリバースジェネティックス系を開発し、個々の蛋白遺伝子に改変または欠損を与えたウイルスによる感染実験を行なう解析系が極めて優れていると考えられる。以前我々のチームは、L 株からのウイルスクローニングによって、ウサギに対し強い病原性を持つウイルスクローン(RPV-Lv 株)を得た。そこで著者は、Lv 株の全ゲノム配列(約 16kb)の決定と、全ゲノム cDNA クローンの作製を行ない、新たなリバースジェネティックスによる独自の感染性クローンウイルス(rRPV-Lv)のレスキューに成功した。レスキューされた rRPV-Lv がウサギにおいて親株である RPV-Lv と同様の病原性を保持していることを確認した。さらに確立した Lv 株ののリバースジェネティックス系を用いて、センダイウイルスや麻疹ウイルスで病原性への関与が示唆されている V 蛋白を欠損させたウイルス(rRPV-Lv(V-))の作出にも成功した。V 蛋白の in vitro での増殖、in vivo での病原性を解析した結果、rRPV-Lv(V-)の、in vitro での増殖および in vivo での病原性は、rRPV-Lv とほとんど変わらなかった。すなわち、RPV においては V 蛋白は病原性に関与しないことが示された。

第5章：RPV-L 株における N、P、L 遺伝子中の変異がその病原性に与える影響

RPV-L 株のウイルスクローニングによって、病原性の強いクローンウイルス RPV-Lv 株が得られたのと同時に、病原性の弱いクローンウイルス RPV-La 株も得られた。Lv 株については、第4章で全塩基配列を決定した。そこで、La 株の全ての蛋白翻訳領域の塩基配列を決定し Lv 株のそれと比較した。その結果、塩基配列では、N に1ヶ所、P に2ヶ所、F に1ヶ所、L に2ヶ所の変異が認められたのみで、さらに推定アミノ酸配列の変異は N、P、C、L 蛋白中に1ヶ所ずつしかないことがわかった。この変異が病原性の違い関与している可能性が高

いと考えられたので、第4章で確立した、Lv 株のリバーシジェネティクス系を用いて、N、P、L 蛋白をそれぞれ、あるいは同時に La 株のものに組換えウイルス7種を作製し、ウサギでの病原性を調べた。その結果、N 蛋白を La 株のものに組換えウイルスを接種したウサギにおいてのみ臨床症状が軽減され、また病理組織学的解析でも、Lv 株および他の組換えウイルスと比較して病変は軽度であった。これらの結果から、この変異株 La においては、N 蛋白中に存在する1つのアミノ酸変異が、病原性の減弱に強く関わっていることが示された。

本研究は、リバーシジェネティクス系と優れた動物実験系を組み合わせることにより、RPV を含むモノネガウイルス群の宿主特異性決定機構や病原性発現機序という基礎的命題の解明に大きな知見を与えたと考える。