

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 米田 美佐子

牛疫ウイルス (RPV)は反芻獣に伝播力の強い致死性感染症を引き起こす。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。ウシでの RPV 感染実験は特別な隔離施設を持つ機関でしか行なうことができないが、著者らのグループはウサギ馴化によってウシでの牛疫の病態を再現できる世界で唯一の実験感染モデル系を確立してきた。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、モービリウイルス属に分類される、一本鎖 (-) 鎖非分節型 RNA ウイルス群のウイルスである。このウイルス群では、人為的に遺伝子を組換えたウイルスを作出することが不可能であったため、ウイルスの分子生物学的機能解析を行なうことは困難であった。1994 年に、モノネガウイルスのリバースジェネティクス系が開発され、現在本ウイルス群の研究は飛躍的に進展している。本研究では新しいリバースジェネティクス系の手法を RPV において確立し、ウサギの感染モデル系と合わせて、RPV の宿主特異性決定および病原性発現に関わるウイルス構成蛋白の解析を試みた。本論文は以下の 5 章より成る。

第 1 章で、RPV の膜蛋白である H 蛋白の宿主特異的病原性発現における役割を調べた。ウシ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、これを用いて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ったところ、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ったが、RBOK 株および rRPV-lapH 株接種ウサギではこれらの変化は全く見られなかった。しかし rRPV-lapH 接種ウサギでは、リンパ組織での反応性変化と血清中の抗 RPV 抗体の上昇が認められた。この結果より、H 蛋白は細胞への侵入には重要であること、しかし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いことが推察された。第 2 章ではさらに、P 蛋白および N 蛋白の種特異的病原性発現への関与を調べた。第 1 章と同様にして、RBOK 株の N、P 蛋白を L 株のものに組換えたウイルス lapHP、lapNHP を作出し、病原性を調べた。その結果、lapHP、lapNHP を接種したウサギでは一過性の激しい発熱がみられ白血球数も減少傾向を示した。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壊死像を認めた。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。これを受けて第 3 章では 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。

第 4 章では、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クス系の開発が不可欠であると考え、L 株からクローニングによって得た Lv 株の全ゲノム配列の決定と全ゲノム 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 の獲得に成功した。確立した Lv 株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 蛋白欠損ウイルスの作出にも成功した。V 蛋白欠損ウイルスは *in vitro* での増殖および *in vivo* での病原性とも非欠損ウイルスと変わらず、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 章では病原性の弱いクローンウイルス RPV-La の塩基配列を決定し Lv 株と比較した。その結果、推定アミノ酸配列で N、P、C、L 蛋白中に 1ヶ所ずつしか変異が無いことが分かった。これらのうちどの変異が Lv 株と La 株との病原性の違いに関与しているかを明らかにするため、Lv 株のリバース系を用いて、La 株との組換えウイルスを作出してそれぞれの病原性を比較した。その結果 N 蛋白を La 株のものに組換えウイルスの病原性が低下することがわかり、N 蛋白中に存在する 1 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明らかになった。

本研究は、リバースジェネティッ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。よって審査員一同は本論文が博士(獣医学)の学位論文として価値あるものと認めた。