

論文の内容の要旨

農学生命科学研究科 獣医学専攻

平成 15 年度博士課程 入学

氏名 今井 千恵子

指導教官 甲斐 知恵子

論文題目 Comparative analyses of control mechanisms of pathogenicity and viral transcription/replication among rinderpest virus strains

(牛痘ウイルス株間における病原性発現と
転写・複製の制御機構に関する比較解析)

牛痘ウイルス(RPV)は牛に致死性の全身疾患を引き起こし、現在でも一部の地域で経済的損失を与えており、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共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。牛痘は呼吸器症状、出血性腸炎などの劇症症状のほかに激しい免疫抑制、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の多くは解明されていない。我々は、ウサギ馴化によって牛での牛痘病態を再現する世界でも他に類をみない優秀な実験感染モデル系を確立してきた。リバーシジェネティクス系が確立されてから、RPVの属するモノネガウイルスの研究は飛躍的に進展している。本研究ではリバーシジェネティクス系を用いて RPV 株間での病原性発現の比較解析と株間における転写、複製の基礎的研究を行った。本論文は以下3章より構成される。

第1章；牛痘ウイルス L 蛋白の種特異的病原性発現への関与

これまでウイルスの種を越えた病原性発現に関わる要因として、宿主細胞への侵入を担うウイルス構成蛋白が主として唱えられてきた。しかしながら近年、RPV において、細胞への吸着機能をもつ H 蛋白はウイルスの宿主細胞への侵入には必要であるが、侵入後の増

殖能には他のウイルス蛋白が必要であること、さらに病原性発現には RNP 構成蛋白である P 蛋白が大きく関ることが明らかとなった。ただし、病原性の強さを完全に再現するには他の蛋白の関与も示唆された。そこで、第 1 章では、牛痘ウイルスにおける、P 以外の他のウイルス蛋白の病原性発現への関与を検討するため、P 蛋白と複合体を形成しゲノム複製・転写を担う L 蛋白に着目し解析を行った。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示す RPV-L 株の L 遺伝子と H、P、N 遺伝子をそれぞれ組換えた 3 種類のウイルス、rRPV-lapHL、rRPV-lapPHL、rRPV-lapNPHL を作製した。この 3 つの組換えウイルスと RBOK 株、L 株をウサギに接種し、病原性を比較した。RBOK 株接種ウサギでは無症状であり、ウイルスの増殖も確認できなかったが、Lv 株接種ウサギでは臨床症状、臓器でのウイルス増殖が顕著であり、リンパ系組織で重度な壊死像が認められた。以前の報告で lapH 接種のウサギの臓器からはウイルスが分離できないことが明らかとなっているが、lapHL 接種ウサギでは臨床症状は認められないものの、ウサギ体内での増殖が認められ、病理組織学的解析ではリンパ系組織で反応性変化が観察された。lapPHL および lapNPHL 接種ウサギでは Lv 株接種ウサギと比較し軽度ではあるが、発熱、リンパ球減少が観察され、リンパ系組織ではウイルスの増殖と広範囲な反応性変化が認められた。これらの結果より、L 蛋白は病原性発現への関与は弱いものの、生体内細胞侵入後のウイルスの増殖に関わることが示唆された。また、これまでの報告と本実験結果より、種を超えた病原性には他のウイルス蛋白や非翻訳領域の関与が考えられ、更なる解析が必要であると推測された。

第 2 章；マーモセット B 細胞を用いて樹立した牛痘ウイルス持続感染株の解析

RPV の属するモービリウイルス属には麻疹ウイルス、イヌジステンパーウイルスが属し、これらのウイルスは宿主の中樞神経系で持続感染を起こすことが知られており、終生免疫を誘導することから中枢以外での持続感染の可能性も推測される。持続感染のメカニズムについてはこれまで多くの研究がなされているが、未だ明らかになっていない。モービリウイルスの生体内の持続感染を知るため、既に有用な実験感染モデル系が確立されている RPV を用いて持続感染株の解析を行った。全ての細胞がウイルスを産生しながら生存し続ける‘真’の持続感染性を持つウイルス樹立を目指し、まず細胞障害性を示さなくてもウイルス増殖細胞を容易に検索できるように EGFP(enhanced green fluorescent protein)を発現する組換えウイルス (rRPV-EGFP-Lv) を作出した。この組換えウイルスは *in vitro*、*in vivo* の両方で元株である Lv 株と同じ性状を示した。rRPV-EGFP-Lv を B95a 細胞に感染させ新しい細胞を添加しながら継代し続けクローニングを行い、培養細胞における持続感染ウイルス株(rRPV-EGFP-BP)を樹立した。この BP 株は B95a 細胞のみならず 293SLAM、COBL 細胞においても巨細胞形成を誘導しなかった。さらにウサギの感染実験を行ったところ、Lv 株が感染 4 日で激しい病原性を誘発するのに対し、BP 株は感染 14 日までに一過性の発熱と白血球減少が認められたのみであった。ウイルスの増殖を EGFP 蛍

光で観察したところ、EGFP-Lv 株感染個体では、感染 4 日後にリンパ系組織切片において広範囲な EGFP 蛍光が認められたが、BP 株感染個体では 4 日後ではわずかな蛍光が認められたのみであり、感染 7 日後に全てのリンパ系組織でウイルスの増殖が確認された。この後、感染 14 日後には消失し、28 日まで認められなかった。また病理組織学的解析からウイルスが増殖したリンパ系組織の部位では反応性変化が観察された。さらに血清中の IFN を測定したところ、EGFP-Lv 株感染個体では感染 2 日から 4 日後にかけて IFN が誘導されていたが、BP 株感染個体では感染 28 日後まで検出限界値以下であった。それぞれのウイルスに対する中和抗体価は、BP 株感染個体で感染 7 日から上昇し始め 28 日後には 1400 倍まで上昇した。以上のことから BP 株はウサギへの感染性は維持され体内での増殖も出来るが、病原性誘発能は著しく弱く、増殖性においても EGFP-Lv より遅く産生能も低い。従って増殖過程で免疫応答により体内から排除されたと考えられた。以上よりウイルスの細胞融合能は病原性の発現機構および持続感染性獲得機構の 1 つであると推測された。

第 3 章；牛痘ウイルスの株間におけるプロモーター機能の比較解析

第 1 章の結果から病原性発現にはウイルス蛋白以外の因子が関与する可能性も考えられた。そこでウイルスの転写・複製を制御する重要なプロモーターの機能を RBOK 株と Lv 株間で比較解析した。ウイルスゲノムの 3'末端から 107 塩基までの genomic promoter (GP) は mRNA や全長(+)鎖 RNA の合成を担い、5'末端からの 109 塩基は antigenome promoter (AGP)とされ、全長(-)鎖 RNA の合成を担っている。3'と 5'末端の塩基はモービリウイルス間で保存性が高くまた互いに相補的である。RBOK 株、L 株のそれぞれの GP と AGP の間にホタルルシフェラーゼの遺伝子を組込んだホモまたはキメラのプラスミドを作製し、(-)鎖のミニゲノム RNA を合成した。この RNA をウイルスの転写・複製に必要な N、P、L 蛋白を T7 プロモーターにより発現させるプラスミドと共に、予め T7 RNA polymerase 発現組換えワクチニアウイルスを感染させておいた細胞に導入し、24 時間後にルシフェラーゼ活性の値を測定して各株のプロモーターの転写活性を比較した。その結果 RBOK 株 GP は、導入した細胞の種類に関わらず高いルシフェラーゼ活性を示した。また RBOK 株と L 株の両方の N、P、L 蛋白を使用しても同様な結果であった。L 株の GP の 3'末端の 16 塩基と AGP の 5'末端 16 塩基とは 5 番目、12 番目の 2 塩基が相補的でない。L 株 GP を AGP と相補的に、また RBOK 株 GP の同じ部位の塩基を非相補的になるように変異をいれた RNA を合成し、ゲノムの末端の相補性が転写効率に関与しているかを調べた。その結果 RBOK 株 GP は相補性が減少してもルシフェラーゼ活性値に影響が出ないのに対し、Lv 株 GP では 12 番目の塩基の相補的にすることにより高い活性を示した。また、L 株 AGP に GP と相補的に変異を入れた際も同じ結果が出たことから、L 株の GP と AGP の相補性は転写複製効率に影響を与えることが示唆された。RBOK 株 GP のプロモーター活性の強さを決定する塩基を特定するため、5 つの RPV のウイルス株の塩基配列を比較し、RBOK 株特有な変異部位 3 箇所を L 株塩基に置換した。その結果、1 箇所ずつの変異ではルシフェ

ラーゼの値はほぼ変化しなかった。そこで GP を 1-52 塩基と 53-107 塩基までの 2 つの領域に分割し、RBOK 株と L 株のキメラ GP を持つミニゲノム RNA でプロモーター活性を調べたところ、全長の RBOK 株 GP を持つ RNA だけルシフェラーゼ活性が高かった。このことより、RBOK 株由来の GP の転写活性の強さは 1 塩基ずつでなく、プロモーターの広範囲に及ぶ塩基の組み合わせによるものであることが示唆された。また、N 遺伝子の 5'UTR 領域の翻訳に対する影響を解析したところ、両株ともに差は認められなかったことより、これまでのルシフェラーゼ活性の強さは翻訳効率の差から生じたものではないことが考えられた。株間におけるウイルスのプロモーター活性の差と病原性との関係は不明であり、さらなる解析が必要であると思われた。

本研究において RPV 株間の比較解析により病原性決定要素に関し様々な発見がなされた。それらの成果により、RPV を含むモノネガウイルスの病原性発現機構の解明に関して極めて有用な多くの知見が得られたと考える。