

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 今井 千恵子

牛疫ウイルス(RPV)属するモノネガウイルス群により惹起されるウイルス感染症では、その強い病原性と種を超えた病原性発現が大きな問題となっているが、そのメカニズムの多くは未だ解明されていない。これまでウイルスの種を超えた病原性発現に関わる因子として、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。しかしながら近年になってRPVでは、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、侵入後の増殖には他のウイルス蛋白が必要であり、病原性発現にはP蛋白が関ることが明らかにされた。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。本研究ではRPV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。ウサギ馴化によって牛での牛疫病態を再現するウサギ強毒株のL株と牛に病原性を示さないRBOK株を用い、複数のウイルス構成蛋白を組換えたウイルスを作製し動物感染実験を行った結果、L蛋白を組換えたウイルスはリンパ系組織での増殖が促進され、感染群では軽度な臨床症状が観察された。従ってL蛋白は細胞侵入後のウイルスの増殖に関わり、病原性発現に関与することが明らかとなった。しかしながら、病原性発現に関与する程度は弱く、種を超えた強い病原性発現には、他のウイルス蛋白や非翻訳領域の検討も必要と考えられ、病原性発現に関わる因子の絞込みに繋がる結果を得ることができた。

本ウイルス属のウイルスは、終生免疫を誘導することから持続感染の可能性も推測される。また、近縁なウイルスでは、宿主の中樞神経系で持続感染を起こすことが知られているが、そのメカニズムも未だ明らかになっていない。モービルウイルスの生体内の持続感染能を解析するため、Lv株を用いて持続感染株の作出を行いその性状を解析した。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を樹立するため、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を発現する組換えウイルス(rRPV-EGFP-Lv)を作出し、さらにこの組換えウイルスを親株に、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株は血球系細胞の他、上皮系細胞においても巨細胞を形成しなかった。感染実験の結果、EGFP-Lv株が激しい病原性を誘発するのに対し、BP株の病原性は著しく減弱しており、ウイルスの増殖もEGFP-Lv株と比較し遅く、長期にわたる持続感染は成立しなかった。BP株が増殖したリンパ系組織の病理切片からは反応性変化が認められ、また感染群の血中からは高い中和抗体価が検出された。さらに、EGFP-Lv株感染群では感染初期にIFNが誘導されたが、BP株感染群では感染28日後まで検出限界値以下であった。以上のことからBP株は、ウサギへの感染性を維持し病原性は著しく低下していたが、体内での増殖はEGFP-L株よりも遅く産生能も低いながら一定期間持続し、その後免疫応答により体内から排除された可能性が考えられた。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。

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ことより、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 L 株間で比較解析した。プロモーターには genome promoter (GP) と antigenome promoter (AGP) がある。RBOK 株、L 株の各 GP と AGP の間に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 (-) 鎖ミニゲノム RNA を合成した。この RNA を N、P、L 蛋白と共に細胞に導入し、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、N、P、L 蛋白の株種に関わらず高いルシフェラーゼ活性を示した。また L 株の GP、AGP の末端 16 塩基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 の転写活性の強さを規定する塩基を絞るために、RBOK 株特有な変異部位 3 箇所を L 株塩基に置換した結果、1 箇所ずつの変異ではルシフェラーゼの値は変化しなかったが、GP を 2 つの領域に分割し、両株のキメラ 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 GP の転写活性の強さは 1 塩基によるものではなく、プロモーターの広範囲に及ぶ塩基の配列によるものであることが示唆された。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。

本論文では、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、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。よって審査委員一同は本論文を博士 (獣医学) の学位論文として認める。