

論文の内容の要旨

獣医学専攻

平成15年度博士課程 入学

氏名 小川 洋介

指導教員名 明石 博臣

論文題目 Establishment of reverse genetics system on Akabane virus and its application

(アカバネウイルスにおけるリバーシジェネティクス法の確立とその応用)

アカバネウイルス (AKAV) は、ブニヤウイルス科オルソブニヤウイルス属に分類される節足動物媒介性ウイルスである。牛、めん羊および山羊に胎子感染の結果、流死産や新生子牛に内水頭症、関節彎曲症などの奇形を主徴とするアカバネ病を引き起こし、畜産業に多大な経済的損失を与える。ブニヤウイルスは、S、MおよびLの3分節のネガティブ鎖RNAをゲノムにもち、S RNA分節は、核蛋白 (N) および、フレームシフトによりインターフェロンの拮抗物質である非構造蛋白 (NSs) をコードする。M RNA分節は、2つのエンベロープ糖蛋白 (Gn、Gc) および非構造蛋白 (NSm) をコードし、L RNA分節は、RNA依存性RNAポリメラーゼ (RdRp) をコードする。しかし、AKAVに関する分子生物学的研究は遅れており、3分節ゲノムのうちSおよびM RNA分節の塩基配列のみが報告されている。そのため、研究基盤に必須な全ゲノム配列情報を得る目的で、L RNA分節の塩基配列の決定を試みた。次に、温度感受性変異株および野外分離株の性状解析により病原性発現に関わる遺伝子領域を探索した。さらに、病原性発現機序を詳細に解析するための基盤的方法であるリバーシジェネティクス法の確立を行った。

本研究は以下の四章より構成されている。

第1章；アカバネウイルスL RNA分節の塩基配列決定および機能解析

ワクチン親株であるOBE-1株のL RNA分節の3'、5'末端配列を、それぞれ、ダイレクトRNAシーケンス、5' RACE (rapid amplification of cDNA ends) 法により決定し、それらをもとにプライマーを設計した。RT-PCRを行い、哺乳類発現ベクターにクローニングした。次にクローニングしたL cDNAの機能を確認するレポーターアッセイ系の確立を試みた。ウイルスゲノム複製の最小単位であるリボヌクレオプロテイン複合体形成に必須なN遺伝子領域を、哺乳類発現ベクターにクローニングした。また、RdRpが認識する3'、5'非翻訳領域でレポーター遺伝子を挟んだレポータープラスミドも作製した。N、RdRp発現用およびレポーターの3個のプラスミドを細胞に導入し、オワンクラゲ緑色蛍光蛋白を用いたレポーターアッセイにより機能を有するL cDNAクローンを得た。L RNA分節は6868塩基からなり、同属のウイルスの配列と相同性があった。L RNA分節の塩基配列の決定により、AKAVの全ゲノム配列が明らかとなった。また、今回確立したレポーターアッセイは、他の株においても機能を有するS、L RNA分節をクローニングすることが可能である。特にL RNA分節は約7000塩基もあり、PCRによる変異も起こり得るので、機能的な遺伝子をクローニングできるこの方法は、特に有用である。

第2章；温度感受性変異株を用いたアカバネウイルス病原性関連遺伝子領域の解析

AKAVにおいて、Gcに主要な中和エпитープが存在することは知られているが、病原性に関わる遺伝子領域およびウイルス蛋白は知られていない。そこで、温度感受性 (temperature-sensitive; ts) 変異株を作製し、病原性の変化した株の塩基配列を解析することにより、病原性関連遺伝子領域を推測した。5-fluorouracilを用いてOBE-1株のts変異株を作製し、哺乳類マウスの脳内接種試験により病原性を評価した。致死率の低下を示した株について全塩基配列を決定し、親株のそれと比較検討した。また、温度変化によるRdRpの活性も比較した。40°Cでのウイルス力価が33°Cの場合と比較し、 10^3 以上低下するts変異株を12株作出したところ、哺乳類マウスの脳内接種による致死率が、0%の株1株と10%以下の弱毒株2株が得られた。これら3株の全塩基配列を親株と比較したところ、S RNA分節に変異は存在しなかったが、MおよびL RNA分節には、3株ともアミノ酸置換を伴う変異が認められた。3株のうち1株は、M RNA分節において、Gc以外にアミノ酸置換は認められなかった。しかし、抗Gcモノクローナル抗体との反応性は、親株とほぼ同程度だった。レポーターアッセイによるRdRpの活性を親株と比較したところ、変異株の活性は、33°Cで有意に低下し、37°Cおよび40°Cで

は、さらに著しく活性が低下した。温度上昇により ts 変異株の RdRp の活性が低下することから、40°C におけるウイルス力価の低下は、L RNA 分節の変異が原因であると考えられる。同属のラクロスウイルスでは病原性発現に、M RNA 分節単独、あるいは、M および L RNA 分節が共同で関わっていると 2 つの説が報告されているが、明確にされていない。AKAV では M RNA 分節がコードする Gc に変異が認められたが抗原性は変化せず、L RNA 分節にコードされる RdRp の活性が減弱したことから、特に L RNA 分節が病原性発現に関与していることが示唆された。

第 3 章 ; 抗原性および病原性の変化したアカバネウイルス野外分離株の性状解析

AKAV は、牛などに異常産を引き起こすが、近年、子牛に神経症状を伴った非化膿性脳炎を起こす変異株 (Iriki 株) も分離されている。S RNA 分節の系統樹解析では、異常産を主徴とする OBE-1 株や JaGAR39 株 (基準種) を含むグループと、Iriki 株を含むグループは異なるクラスターに分類されることが報告されている。2001 年、2004 年に岡山県で AKAV に対する抗体陽転を示すおとり牛からウイルスが分離され

(Okayama2001 株および Okayama2004 株)、特に 2004 年は、岡山県で異常産の流行と共に神経症状を呈する成牛がアカバネ病と診断された。そこで、分離株の性状解析を行った。対照として OBE-1 株および Iriki 株を使用した。モルモット抗血清を用いた交差中和試験により抗原性を比較し、RT-PCR により増幅した S および M cDNA をクローニング、塩基配列の解読を行い、それらをもとに系統樹解析をした。また、マウス腹腔内接種試験により神経病原性の評価も行った。この結果、Okayama2001 株は、遺伝子型が Iriki 株に近縁ながら抗原性、病原性は Iriki 株と差があった。一方、Okayama2004 株は、抗原性、遺伝子型は OBE-1 株と近縁であったが、病原性は Iriki 株と類似していた。野外における AKAV の抗原性、病原性の変化が示唆された。今回、異常産を主徴とする OBE-1 株に近縁な遺伝子型の AKAV が、強力な神経病原性を保持することを初めて示した。今後、抗原性、病原性変異株流行による被害が懸念され、迅速な対応が必要であると考えられる。

第 4 章 ; リバースジェネティクス法の確立とその応用

ブニヤウイルス科では、ブニヤンベラ、ラクロスおよびリフトバレー熱ウイルスにおいて T7 RNA polymerase を用いたリバースジェネティクス法が確立されている。しかし、T7 RNA polymerase は、cRNA 5' 末端に G 塩基の付加が転写の増強のために必要であり、さらに一部の転写産物は修飾を受け、mRNA として機能しウイルス蛋白を合成してしまう。これらの修飾によるウイルスの性状変化は不明なため、ウイルスゲノム RNA と同様に修飾のない 3'、5' 末端をもつ RNA を供給することができる RNA

polymerase Iを用いたリバーシジェネティクス法の開発を試みた。第1章で構築したNおよびRdRp発現プラスミドと、murine RNA polymerase Iのプロモーターとターミネーターを持つpRF42ベクターの間にOBE-1株の3分節cDNAをそれぞれ挿入したpRF42/S、M、Lの、あわせて5つのプラスミドをハムスター肺由来のHmLu-1細胞に導入し、5日後上清を回収した。回収した上清を新鮮なHmLu-1細胞に接種することにより、感染性ウイルスを回収することに成功した。組換え体 (rAKAV) は、HmLu-1細胞において親株と同等の増殖を示したが、rAKAVのプラークサイズは、親株に比べばらつきが少なく比較的均一で小さかった。また、NSsを欠損させた変異体 (rAKAV Δ NSs) も作出し、プラークサイズを比較すると、親株やrAKAVに比べ有意に小さかった。さらに哺乳マウスの脳内接種試験により病原性を比較したところ、rAKAV Δ NSsは親株とrAKAVに比べ弱毒化していた。核内に存在するRNA polymerase Iは、核内で複製するインフルエンザウイルスのリバーシジェネティクス法に応用されており、細胞質で複製するブニヤウイルスでは、レポーターアッセイで使われているのみであった。RNA polymerase Iを用いたcDNAからの感染性クローンの回収は、ブニヤウイルス科において本研究が初めてである。本法を用いて変異体の作出も可能なことから、本法は、T7 RNA polymeraseに代わる有用な方法であることが示唆された。

以上のように、ts変異株や野外分離株の結果と本研究で確立したリバーシジェネティクス法を組み合わせ、今後、病原性に関わるウイルス蛋白ならびに遺伝子領域を特定することが可能となった。