

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 小川 洋介

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、節足動物媒介性である。牛、緬山羊に異常産を引き起こし、畜産業に多大な経済的損失を与える。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。そこで、AKAVの病原性発現機序を解析するため以下の四章から成る研究を行った。

第1章では、L RNA分節の塩基配列の決定するため、レポーターアッセイを開発した。ワクチン親株であるOBE-1株のL RNA分節全長の増幅産物を哺乳類発現ベクターにクローニングした。次に、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の形成に必須な核蛋白 (N) 遺伝子を、哺乳類発現ベクターに挿入した。また、L蛋白が認識する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、L蛋白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することで、機能を有するL cDNAを得、塩基配列を決定した。この結果、AKAVの全ゲノム配列が明らかとなった。この方法は、他株のS、L RNA分節の機能確認やウイルスゲノムの転写機構の解析もできるところから有用な手法である。

第2章では、病原性関連遺伝子領域の解析のため、温度感受性 (ts) 変異株を作製し、性状解析を行った。ts変異株のうち、哺乳類マウスの脳内接種試験による病原性評価で、致死率が10%以下の弱毒株3株を解析した。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3株ともアミノ酸置換を伴う変異が認められた。しかし、各種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L蛋白の活性を親株と比較すると、変異株の活性は培養温度の上昇とともに著しく活性が低下した。抗原性は変化せず、L蛋白の活性が著しく減弱していたことから、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章では、今までの分離株と性状の異なる野外分離株について検討した。2001年、2004年に野外から抗原性状や病原性が異なると考えられるAKAVが分離された（Okayama2001およびOkayama2004株）。そこで、両株を用い交差中和試験、SおよびM RNA分節の系統樹解析、マウス腹腔内接種試験による神経病原性の評価を行った。この結果、Okayama2001株は、遺伝子型が神経病原性株に近縁ながら抗原性、病原性は差があった。一方、Okayama2004株は、抗原性、遺伝子型は流産型株と近縁であったが、神経病原性が強かった。これまで抗原性と遺伝子型は、病原性と関連があると考えられていたが、野外におけるAKAVの抗原性、病原性の変化が示唆された。

第4章では、ウイルスゲノムRNAと同様、末端に修飾のないRNAを供給する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。RNA polymerase Iのターミネーターとプロモーター間にOBE-1株の3分節cDNAをそれぞれ挿入したプラスミドと第1章で構築したNおよびL蛋白発現プラスミドの、あわせて5つのプラスミドをHmLu-1細胞に導入した。これにより、感染性ウイルスを回収することに成功した。また、インターフェロンの拮抗物質であるウイルス非構造蛋白NSsを欠損させた変異株の作出にも成功した。

以上本論文は、アカバネウイルス全塩基配列を決定し、ts変異株や野外分離株の解析によって、病原性に関わるウイルス蛋白ならびに遺伝子領域について重要な知見を得た。また、本研究で確立したリバーシジェネティクス法を用いることで変異体を作成し、ウイルス性状を詳細に解析する道を開いたもので、学術上、応用上貢献することが少なくない。よって審査委員一同は本論文が博士（獣医学）論文として価値あるものと認めた。