

論文の内容の要旨

論文題目 遺伝子組換え技術を用いたアカバネウイルスの作出およびその応用

氏 名 上間 亜希子

アカバネウイルス (AKAV) が原因となるアカバネ病は、ウシ、ヒツジ、ヤギ等の反芻動物が罹患するウイルス性疾患であり、その流行は、畜産業界に多大な経済的損失をもたらす。AKAV に感染した妊娠動物は臨床症状を示さないが、子宮感染によりウイルスに暴露された胎子は、流産、早産、死産、もしくは関節拘縮症および水頭性無脳症といった先天性異常 (AH syndrome) を伴う。ワクチン接種によりアカバネ病の発生は減少したが、現在も日本や韓国で散発的に発生がみられる。最近、AKAV の抗原性および病原性変異体が分離されており、このような変異体は、初期に分離された株と防御抗体の交差反応性が低いことが分かっている。分子生物学的研究は、ワクチン開発に重要な役割を果たしており、アカバネ病をコントロールするための戦略開発を担う。組換え AKAV を効率的に作出することができれば、従来のワクチンより安全で効果的な組換えワクチン株の迅速な開発が可能となる。そこで本研究では、既存の AKAV 作出法よりも効果的な組換え AKAV 作出法の確立を試みた。さらに、その作出法により作出した組換えワクチンウイルスの、宿主動物であるヤギへの接種試験を行った。また組換え AKAV 作出技術を、別の病原体の抗原領域を発現する二価ワクチン開発に繋げるために、外来遺伝子挿入 AKAV の構築法および、効果的な外来遺伝子発現をもたらす改変操作について報告する。

第1章 新しい遺伝子組換え技術を用いたアカバネウイルスの作出

AKAV 弱毒生ワクチンの発達は、アカバネ病の発生を減らして来たが、近年報告されているような抗原性および病原性の変異体の出現に迅速に対応するためには、より効率的な方法でワクチンウイルスが作出できるリバーシジェネティクスシステムが必要である。本研究では、AKAV では初めてとなる T7 RNA polymerase に基づくリバーシジェネティクス法を利用して、組換えワクチン株 TS-C2 ウイルス (rTTT) と、非構造タンパク NSs を欠損させた変異体ウイルス (rTTTΔNSs) を作出した。この方法により、これまでに確立されていた RNA polymerase I に基づくリバーシジェネティクス法に比べて、効率良く組換え AKAV を回収することが可能となった。

第2章 ヤギを用いた新規アカバネウイルスワクチン候補株の検討

第1章で作出した rTTT と rTTTΔNSs について、妊娠ヤギにおける、安全性とワクチンとしての有用性を評価した。どちらの組換えウイルスも妊娠ヤギに臨床症状を起こさなかったが、rTTT 接種で胎子脳からごく少量の AKAV RNA が検出された。rTTTΔNSs 接種ではウイルス RNA は検出されなかった。対照的に、wt Iriki 株の接種は妊娠ヤギにウイルス血症を引き起こし、胎子の水頭性無脳症や大脳半球の低形成を引き起こした。免疫効果では、rTTT や rTTTΔNSs を投与した全てのヤギで、市販ワクチンと同レベルの中和抗体価が検出された。これらの結果により、妊娠ヤギ感染モデルで、NSs 欠損株は元株より弱毒化されており、強い免疫反応を引き出すことが証明された。rTTTΔNSs のような NSs 欠損組換えウイルスのワクチン適用は、野外で感染した個体とワクチン接種個体の識別 (DIVA) ができる可能性があり、アカバネ病の流行をコントロールするのに有用である。

第3章 蛍光タンパク発現アカバネウイルスの作出と解析

リフトバレー熱ウイルス (RVFV) のSゲノムの遺伝子間領域を利用して、マイナス鎖にN/NSsとプラス鎖に高感度緑色蛍光タンパク質 (eGFP) をコードした、アンビセンスAKAV Sゲノムを人工的に構築し、eGFP発現組換えAKAV (eGFP-AKAV) を作出した。作出した組換えウイルスは、アンビセンスRNAでコードしたeGFP遺伝子を安定して保持していた。RVFVのアンビセンスS分節では、NとNSsの転写終結サイトはある特定のシグナル配列によって決定されているが、人工的に構築したAKAVのアンビセンスS分節では、RVFVの場合と異なったメカニズムで転写終結していた。eGFP-AKAVを乳のみマウスに腹腔内投与したところ、親株AKAV接種時と同等の神経症状や致死率がみられ、感染マウス脳組織でeGFP蛍光が検出できた。

第4章 蛍光タンパク発現アカバネウイルスの改変による蛍光発現の上昇

第3章で作出した eGFP-AKAV は、感染細胞で、CPE が起きた後に蛍光が検出されるが、eGFP-AKAV のアンビセンス S 分節における 5' UTR の 3'側領域を段階的に削って作出した mutant ウイルスは、感染細胞で CPE が起こる前に蛍光発現した。5' UTR を 38 nt まで短くした eGFP-AKAV/38 は、元株の eGFP-AKAV や 5' UTR を 42 nt まで短くした eGFP-AKAV/42 よりも、感染細胞で十分大きなプラックを形成し、その大きさは wt 株と同等であった。また eGFP-AKAV/38 のウイルス増殖能は、感染 48 時間までの間、eGFP-AKAV や eGFP-AKAV/42 に比べてわずかに高かった。感染細胞で蛍光発現が早まった原因が、eGFP 転写活性の上昇によるものかは確認できなかったが、S 分節 5' UTR の欠損により、複製プロモーター活性の上昇によるアンチゲノムからゲノムへの RNA 合成効率の上昇が確認された。

以上のように、本研究では、T7 RNA polymerase を用いたリバースジェネティクスによる AKAV 作出法と、それに基づいた外来遺伝子挿入 AKAV 作出法を確立した。これらは、宿主のウイルスレセプターや感染動態の詳細な解明および、多価ワクチン作製による感染症の制御に貢献することが期待される。