

論文審査の結果の要旨

氏名：日高 侑也

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）

論文題名：狂犬病ウイルスゲノムの分節化

審査委員：（主査） 教授 伊藤 琢也

（副査） 教授 泉對 博

教授 遠矢 幸伸

狂犬病ウイルス (RABV) はモノネガウイルス目ラブドウイルス科リッサウイルス属に分類され、非分節型マイナス鎖 (NNS)-RNA をゲノムとしてもつ。ウイルスゲノム RNA (vRNA) は約 12,000 ヌクレオチド (nt) からなり、3'リーダー配列から始まり、核タンパク質 (N)、リン酸化タンパク質 (P)、マトリックスタンパク質 (M)、糖タンパク質 (G) および RNA 依存性 RNA ポリメラーゼの機能として重要なラージタンパク質 (L) の 5 つの構造タンパク質遺伝子をコードし、5'トレーラー配列で終わる。N によって vRNA はカプシド形成され、P および L と共にリボ核タンパク質 (RNP) 複合体を形成する。さらに RNP 複合体は M および 3 量体の G を含む宿主細胞由来の脂質 2 重膜で構成されるエンベロープに覆われ感染性のウイルス粒子 (VP) が形成される。VP サイズは直径 75 nm - 80 nm、長さ約 180 nm の弾丸状の形態をしている。

遺伝子改変が可能なクローン化ゲノム DNA または cDNA から感染性ウイルスを作出する技術であるリバーシジェネティクス (RG) 法が開発され、1994 年には Schne11 らが NNS-RNA ウイルスとして初めて RABV の RG 法の樹立に成功して以来、様々な NNS-RNA ウイルスの RG 法が開発、改良されてウイルス遺伝子の機能解析を含む基礎研究から遺伝子治療に用いるウイルスベクターを含むウイルス療法への応用研究が行われている。

ラブドウイルス科のウイルスは一般的に NNS-RNA をゲノムとしてもつが、例外的に分節型マイナス鎖 RNA をゲノムとしてもつラン壤痘斑紋ウイルスの存在が報告されている。また、水胞性口炎ウイルスおよび RABV において異なる遺伝子の欠損ウイルスが互いにウイルスタンパク質を補完し合い増殖が維持されることが報告されている。さらに、ラブドウイルス科と類似した vRNA 構造をもつパラミクソウイルス科の麻疹ウイルスおよびニューカッスル病ウイルスにおいて vRNA の分節化が可能であることが報告されている。これらの報告は RABV において vRNA の分節化が可能であることを示唆しており、子孫ウイルス産生メカニズムの解明および新たなウイルスベクター開発への展開が期待される。そこで本研究では、RG 法を利用して分節型組換え RABV (rRABV) を作出し、そのウイルス性状を解析した。

1. 分節型 rRABV の作出

分節型 rRABV の vRNA 構造を設計し、RG 法によって分節型 rRABV の作出を試みた。

分節型 rRABV の vRNA は固定毒株 HEP-Flury 株の vRNA 配列を基礎とし、N-P-M-G 遺伝子領域をコードする S1、そして L 遺伝子領域をコードする S2 に分節した。S1 および S2 発現を判別するためのレポーター遺

伝子として DsRed 遺伝子を S1 の G 遺伝子領域下流、eGFP 遺伝子を S2 の L 遺伝子領域上流に挿入した。S1 および S2 は感染細胞における vRNA の複製および VP へのパッケージングのために 3'リーダー配列および 5'トレーター配列を搭載した。S1 および S2 発現プラスミド (pH-S1 および pH-S2) をヘルパープラスミドである N、P および G 発現プラスミドと共に BHK-21 細胞に遺伝子導入することによって分節型 rRABV の作出を行った。

一般的に RG 法による rRABV の作出には vRNA-cDNA プラスミドと共に vRNA の複製および mRNA の転写に関わる N、P および L 発現プラスミドの遺伝子導入が必要とされているが、分節型 rRABV の作出には L 発現プラスミドの遺伝子導入を必要としなかった。本研究において vRNA-cDNA プラスミドおよびウイルスタンパク質発現プラスミドにはサイトメガロウイルス (CMV) プロモーター駆動性プラスミドを使用しており、vRNA 末端形成のために CMV プロモーター配列および 3'リーダー配列間に RNA 自己切断活性を有するハンマーヘッド型リボザイム (HmRz) 配列を搭載している。しかしながら、HmRz の RNA 自己切断活性は完全ではなく、CMV プロモーターの mRNA 発現活性が高いために、vRNA の分節化に伴って S2 における CMV プロモーターと L 遺伝子領域が近接したことによって pH-S2 から L が発現し、分節型 rRABV の作出に適した量の L が供給されたと推測される。

また、作出した分節型 rRABV の接種細胞におけるレポーター蛍光タンパク質の発現が確認され、培養上清において vRNA が検出されたことから、VP が放出されていることが示唆された。

以上の結果より、RABV において vRNA の分節化が可能であることが示された。

2. 分節型 rRABV の VP 性状の解析

作出された分節型 rRABV の VP 形成の確認および vRNA の分節化に伴う VP 性状の変化を明らかにするために、電子顕微鏡観察および vRNA の相対定量解析を行った。

分節型 rRABV の VP は RABV に特徴的な弾丸状の形態をしていることが確認された。VP サイズに関して非分節型 rRABV (約 200 nm) と比較すると長さは半分程度 (約 130 nm) であり、vRNA の nt 数は非分節型 rRABV が 11,679 nt、分節型 rRABV の S1 が 5,973 nt、S2 が 7,513 nt であることより nt 数と VP の長さに相関関係があることが示された。また、VP の直径はほとんど変化していなかったことから分節型 rRABV の VP は S1 または S2 のどちらか一方をパッケージングしている可能性が高いことが示唆された。

そこで、分節型 rRABV における S1 および S2 の相対量の比較を行った。もし分節型 rRABV 接種細胞において S1 および S2 が並行して複製され、S1 および S2 の両方をパッケージングした VP が放出されると仮定すると、S1 における P 遺伝子領域および S2 における L 遺伝子領域を標的とした RT-PCR の増幅産物の相対量は非分節型 rRABV と同様に 1.00 に近似するはずであるが、分節型 rRABV における S2 (L)/S1 (P) は 0.58 と低かった。したがって分節型 rRABV 接種細胞の上清中には S1 または S2 をパッケージングした少なくとも 2 種類の VP (S1VP または S2VP) が放出されていることが示された。また、分節型 rRABV の vRNA は S2 よりも S1 の方が短く、複製速度が速い結果として S1 をパッケージングした VP が多く産生されていると想定される。

以上の結果より、分節型 rRABV には S1VP または S2VP が存在し、互いにサテライトウイルスであると同時にヘルパーウイルスとして機能することによって分節型 rRABV の増殖が維持されていることが示された。

3. 分節型 rRABV の外来遺伝子発現能および増殖動態の解析

分節型 rRABV のレポーター蛍光タンパク質発現の安定性および vRNA の分節化に伴う増殖動態の変化を明らかにするために、継代培養を行い、フォーカスアッセイを行った。

分節型 rRABV は DsRed 遺伝子を S1 に、eGFP 遺伝子を S2 に搭載しているが、10 継代以上の培養を行うことによってレポーター蛍光タンパク質の発現が低下することが確認された。しかしながら、18 継代培養後の分節型 rRABV 接種細胞の培養上清において vRNA の存在が確認され、接種細胞内においてウイルス感染に伴う好酸性の細胞質内封入体の形成およびウイルスタンパク質の存在が確認された。レポーター蛍光タンパク質は VP 産生に必要でないため、その発現が何らかの要因によって低下してもウイルス増殖は継続していると推察される。また、レポーター蛍光タンパク質の発現低下は別々の継代株において異なっていたことより、無作為に生じることが確認された。さらに、継代培養を行った分節型 rRABV におけるレポーター蛍光タンパク質の発現低下が相同組換えを原因とするか検討するために S1 および S2 にコードされているウイルスタンパク質遺伝子領域を標的として RT-PCR を行った。その結果、G-L 遺伝子間を標的とする RT-PCR の増幅産物が確認されなかったことから、継代培養を行った分節型 rRABV は相同組換えを生じていないことが証明された。また、VP 観察によって、非分節型 rRABV と比較して分節型 rRABV の VP の長さが短くなっていたことから分節型 rRABV が相同組換えを生じていないことは支持される。

また、vRNA の分節化に伴って vRNA の nt 数は減少するため、分節型 rRABV の増殖効率は上昇することが期待された。しかしながら、分節型 rRABV の最大ウイルス力価は非分節型 rRABV より低かった。その要因として、分節型 rRABV の子孫 VP 産生には S1VP および S2VP の共感染が必要であり、子孫 VP 産生効率が低下した結果として分節型 rRABV のウイルス力価が低下したことが推測された。また、分節型 rRABV は接種細胞においてウイルスタンパク質を発現しているにも関わらず、顕著な細胞変性効果を示さないことが確認された。

以上の結果より、分節型 rRABV は継代培養によってレポーター遺伝子、つまり外来遺伝子発現は不安定となることが示された。また、RABV は vRNA の分節化に伴って子孫 VP 産生効率が低下することが示された。

本研究によって、NNS-RNA をゲノムにもつ RABV において、分節型 rRABV の作出方法を確立し、RABV において vRNA の分節化が可能であることを実証した。また、本研究はラブドウイルス科のウイルスにおいて vRNA の分節化に成功した初めての報告でもある。

狂犬病ウイルスの分節化が可能であることを実証し、そのウイルス性状を明らかにしたことは、本ウイルスの増殖機構の解明や改変新規ワクチンや新規ウイルスベクターの開発にとって重要な新所見である。

よって本論文は、学術上および獣医学術上重要な知見が多く含まれていて、博士(獣医学)の学位を授与されるに値するものと認められる。

以 上

平成 31 年 2 月 21 日