

氏名(本籍)	山田健太郎(岐阜県)		
学位の種類	博士(獣医)		
学位記番号	獣医博甲第199号		
学位授与年月日	平成18年3月13日		
学位授与の要件	学位規則第3条第1項該当		
研究科及び専攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻		
研究指導を受けた大学	岐阜大学		
学位論文題目	Studies on the Molecular Basis for Attenuation of Rabies Virus (狂犬病ウイルス弱毒化の分子基盤に関する研究)		
審査委員	主査	岐阜大学 教授	源 宣之
	副査	帯広畜産大学 教授	藤 崎 幸 蔵
	副査	岩手大学 教授	品 川 邦 汎
	副査	東京農工大学 教授	本 多 英 一
	副査	岐阜大学 教授	杉 山 誠

論文の内容の要旨

狂犬病は狂犬病ウイルス(rabies virus; RV)によって起こる致死性の神経性疾患で、最も恐ろしい人獣共通感染症の一つである。現在、狂犬病は日本を含む少数の例外的地域を除いて世界中に発生がみられる。狂犬病はいったん発病すると治療法はなくほぼ100%死亡するが、狂犬病ウイルスの暴露後直ちにワクチンを受けることで発症を阻止することができる。現行の多くの狂犬病ワクチンは人体用および動物用ともに組織培養による不活化ワクチンであるが、一般的に不活化ワクチンは生ワクチンに比べ免疫原性が弱く、また高価である。しかしながら、現在ある生ワクチンは安全性の点で問題があるため、より安全な生ワクチンの開発は狂犬病制御のために重要である。

RVはラブドウイルス科のリッサウイルス属に分類され、そのゲノムは約12,000塩基からなるマイナス鎖の1本鎖RNAで、5つの遺伝子をコードしている。それぞれの遺伝子からウイルスの構造タンパク質であるN、P、M、GおよびLタンパク質が発現される。Gタンパク質は中和抗体の標的分子であり、また病原性に関与することが知られている。N、PおよびLタンパク質はゲノムRNAとともにリボヌクレオプロテイン(RNP)を形成し、転写・複製の鋳型活性を持つ。

これまでRVの病原性はGタンパク質の333位のアミノ酸が決めているとされており、この部位がアルギニン(Arg)のRVは脳内接種後成熟マウスに致死感染を起こす強

毒型、グルタミン (Gln) では致死感染を起こさない弱毒型である。しかしRC-HL株のその部位は強毒型のArgでありながら弱毒型で、成熟マウスに一過性の体重減少のみを起こす。一方、その親株の西ヶ原株は強毒型でその部位も強毒型である。このことから、RC-HL株の弱毒化には新規の領域の関与が示唆された。当研究室はこれまでにRC-HL株のリバースジェネティクス系を確立し、これを用いて西ヶ原株のG遺伝子open reading frame (G-ORF) が西ヶ原株の病原性に強く関連していることを明らかとしてきた。しかし逆に、RC-HL株のG-ORFが弱毒化に関連している直接的な証拠はまだない。西ヶ原株からRC-HL株への弱毒化の機構を分子レベルで解明することは安全な生ワクチンの開発において有用な情報と成り得ると考えられた。

そこで本研究では、西ヶ原株のリバースジェネティクス系の確立とRC-HL株のG-ORFの弱毒化への関連性の検討(第1章)、キメラウイルスによる弱毒化関連遺伝子の網羅的探索(第2章)、およびGタンパク質細胞質領域を欠損させた西ヶ原株とRC-HL株の作出とそれらの病原性の検討(第3章)を行った。

第1章では、先ず西ヶ原株のリバースジェネティクス系の確立を試みた。T7プロモータの下流に西ヶ原株の全長ゲノムcDNAの挿入されたプラスミドおよび西ヶ原株のN、PおよびLタンパク質がT7ポリメラーゼにより発現する各ヘルパープラスミドを構築した。これらのプラスミドをT7ポリメラーゼを発現する細胞にトランスフェクションし、培養上清よりウイルスを回収した。回収された西ヶ原株の各種生物性状は野生型のそれとほぼ一致したことから、西ヶ原株のリバースジェネティクス系が確立できた。次にこの系を用いて、西ヶ原株をベースとしてG-ORFのみを弱毒型のRC-HL株由来に組換えたキメラウイルスNi(G)を作出した。しかし予想に反して、Ni(G)ウイルスは強毒型を示した。以上より、RC-HL株G-ORFはRC-HL株の弱毒化に単独で関与していないことを明らかとした。

第2章では、西ヶ原株とRC-HL株との間には全てのORFに変異が存在していることから、どのORFが弱毒化に関与しているのかを明らかにするために、新たに10種類のキメラウイルスを作出し、網羅的な探索を行った。結果として、G-ORFと少なくともあと1つのORFがRC-HL株由来であるキメラウイルスは全て弱毒型であった。このことから、西ヶ原株からRC-HL株への弱毒化はmultigenicであることが明らかとなった。また、西ヶ原株、RC-HL株およびG-ORFキメラウイルスにおいて、Gタンパク質の333位をArgからGlnに置換した変異体を作成し、病原性を検討した。その結果、333位の置換によりウイルスは弱毒化し、特に西ヶ原株G-ORFを変異させた場合には、成熟マウスに体重減少すら起こさなかった。RC-HL株感染では体重減少を伴うことから、RC-HL株の弱毒化とGタンパク質333位の変異による弱毒化は異なる機構によると考えられた。

第3章では、先ずRV感染細胞を可視化するためGFP遺伝子を挿入した西ヶ原株およびRC-HL株(Nishi-GFPおよびRCHL-GFP)を作出した。これらが感染した細胞は免疫染色をすることなく生きた状態で蛍光顕微鏡下の観察ができ、またGFP遺伝子挿入によるウイルス性状への影響もほとんど認められなかった。次に両株の病原性の違いの一部は、感染性粒子の形成に依存しないRNP-M複合体の神経細胞間伝播の効率性によることが考えられ、感染性粒子の形成に重要と考えられているGタンパ

ク質細胞質領域のみを欠損させた (G Δ CD) ウイルス (Nishi-G Δ CD/GFPおよび RCHL-G Δ CD/GFP) を作出し、それらの各種性状を調べた。培養細胞における増殖能はそれぞれの親株に比べ、Nishi-G Δ CD/GFPでは1/106以下に、RCHL-G Δ CD/GFPでは1/25に低下した。成熟マウスに脳内接種したところ両G Δ CDウイルスは体重減少すら起こさなかった。したがって、G Δ CDウイルスの解析から、西ヶ原株とRC-HL株の病原性の違いを説明することはできなかったが、感染性粒子の形成がRVの病原性発現に重要であることが示唆された。

本研究で得られた成果は安全な生ワクチンの開発に向けて有益な情報を提供できると考えられた。

審 査 結 果 の 要 旨

申請者、山田健太郎氏の学位論文は、これまでの狂犬病ウイルス(RV)の致死病的病原性に関与する分子の特定とは逆に、強毒型の西ヶ原株から弱毒型のRC-HL株への弱毒化機構を、両株間の多彩なキメラウイルス、Gタンパク質アミノ酸変異株および欠損株をリバーズ・ジェネテックス (逆遺伝学) の手法で作出し、それらのウイルスを用いて解き明かそうとしたものである。

氏は、まず西ヶ原株の逆遺伝学系を確立し、RC-HL株のG遺伝子open reading frame (G-ORF)単独では弱毒に係わっていないことを明らかにした。次いで、多数のキメラウイルスを用いて弱毒化関連遺伝子を網羅的に探索した結果、西ヶ原株からRC-HL株への弱毒化がmultigenicであることを示した。さらに、Gタンパク質の細胞質領域がRVの弱毒化に重要な働きをしていることを強く示唆した。

したがって、得られた成績は次の3つに大別することが出来る。

第一に、西ヶ原株の逆遺伝学系の確立を試みた。T7プロモータの下流に西ヶ原株の全長ゲノムcDNAの挿入されたプラスミドおよび西ヶ原株のN、PおよびLタンパク質がT7ポリメラーゼにより発現する各ヘルパープラスミドを構築した。これらのプラスミドをT7ポリメラーゼを発現する細胞にトランスフェクションし、培養上清よりウイルスを回収した。回収された西ヶ原株の各種生物性状は野生型のそれとほぼ一致したことから、西ヶ原株の逆遺伝学系が確立できた。次にこの系を用いて、西ヶ原株をベースとしてG-ORFのみを弱毒型のRC-HL株由来に組換えたキメラウイルスNi(G)を作出した。しかし予想に反して、Ni(G)ウイルスは強毒型を示した。このことから、RC-HL株G-ORFがRC-HL株の弱毒化に単独に関与していないことを明らかにした。

第二に、西ヶ原株とRC-HL株との間には全てのORFに変異が散在していることから、どのORFが弱毒化に関与しているのかを明らかにするために、新たに10種類のキメラウイルスを作出し、網羅的な探索を行った。結果として、G-ORFと少なくともあと1つのORFがRC-HL株由来であるキメラウイルスは全て弱毒型であった。このことから、西ヶ原株からRC-HL株への弱毒化はmultigenicであることが明らかとなった。また、西ヶ原株、RC-HL株およびG-ORFキメラウイルスの各Gタンパク質の333位をアルギニンからグルタミンに置換した変異体を作成し、病原性を検討した。その結果、333位のアミノ酸置換によりウイルスは弱毒化し、特に西ヶ原株G-ORFを変異させた場合に

は、成熟マウスに体重減少すら起こさなかった。RC-HL株感染では体重減少を伴うことから、RC-HL株の弱毒化とGタンパク質333位の変異による弱毒化は異なる機構によると推測した。

第三に、先ずRV感染細胞を可視化するためGFP遺伝子を挿入した西ヶ原株およびRC-HL株(Nishi-GFPおよびRCHL-GFP)を作出した。これらが感染した細胞は免疫染色をすることなく生きた状態で蛍光顕微鏡下の観察ができ、またGFP遺伝子挿入によるウイルス性状への影響もほとんど認められなかった。次に両株の病原性の違いの一部は、感染性粒子の形成に依存しないRNP-M複合体の神経細胞間伝播の効率性によると考えられたことから、感染性粒子の形成に重要と言われているGタンパク質細胞質領域のみを欠損させた(G Δ CD)ウイルス(Nishi-G Δ CD/GFPおよびRCHL-G Δ CD/GFP)を作出し、それらの各種性状を調べた。培養細胞における増殖能はそれぞれの親株に比べ、Nishi-G Δ CD/GFPでは1/106以下に、RCHL-G Δ CD/GFPでは1/25に低下した。成熟マウスに脳内接種したところ両G Δ CDウイルスは体重減少すら起こさなかった。したがって、西ヶ原株とRC-HL株の病原性の違いを説明することはできなかったが、感染性粒子の形成がRVの病原性発現に重要であることを示唆した。

以上のことより、氏はRVの弱毒化に複数の遺伝子が関与しており、またウイルス粒子形成能の低下が関連していることを示唆した。これらの成果は安全な生ワクチンの開発に向けて有益な情報を提供できるものと思われる。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値があると認めた。

学位論文の基礎となる学術論文

- 1) 題 目 : Multigenic relation to the attenuation of rabies virus
著 者 名 : Yamada, K., Ito, N., Takayama-Ito, M., Sugiyama, M. and Minamoto, N.
学術雑誌名 : Microbiology and Immunology
巻・号・頁・発行年 : (50 ・ 1 ・ _) In Press

既発表学術論文

- 1) 題 目 : Improved recovery of rabies virus from cloned cDNA using a vaccinia virus-free reverse genetics system.
著 者 名 : Ito, N., Takayama-Ito, M., Yamada, K., Hosokawa, J., Sugiyama, M. and Minamoto, N.
学術雑誌名 : Microbiology and Immunology
巻・号・頁・発行年 : 47(8) 613-617, 2003

2) 題 目 : Region at amino acids 164 to 303 of the rabies virus glycoprotein plays an important role in pathogenicity for adult mice

著 者 名 : Takayama-Ito, M., Ito, N., Yamada, K., Minamoto, N. and Sugiyama, M.

学術雑誌名 : Journal of Neurovirology

卷・号・頁・発行年 : 10(2) 131-135, 2004

3) 題 目 : Characterization of M gene-deficient rabies virus with advantages of effective immunization and safety as a vaccine strain

著 者 名 : Ito, N., Sugiyama, M. Yamada, K., Shimizu, K., Takayama-Ito, M., Hosokawa, J. and Minamoto, N.

学術雑誌名 : Microbiology and Immunology

卷・号・頁・発行年 : 49(11) 971-979, 2005