

氏 名 (本籍)	伊 藤 直 人 (愛 知 県)
学 位 の 種 類	博士 (獣医学)
学 位 記 番 号	獣医博甲第 9 6 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 1 3 年 3 月 1 3 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 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 Identification of the Pathogenicity-Related Gene of Rabies Virus
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 品 川 森 一 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 平 井 克 哉

論 文 の 内 容 の 要 旨

狂犬病ウイルスはヒトを含むほとんど全ての哺乳動物に感染する。本ウイルスは致死的な神経症状を引き起こし、発病するとヒトや動物はほぼ100%死亡するきわめて危険な人獣共通感染症である。狂犬病ウイルスの病原性に関する分子基盤は、未だほとんど明らかにされていない。パスツールによってなされた街上毒から固定毒の作出における変異メカニズムも不明のままである。狂犬病ウイルスは、N, P, M, G および L 蛋白質により構成されている。そのうち、ウイルス粒子の最外層に存在するG蛋白質は、細胞への侵入に係わっていることから病原性と密接に関連すると言われてきた。近年、狂犬病ウイルスG蛋白質333位のアミノ酸は、固定毒株の病原性に深く関与していることが報告されている。この部位にアルギニンまたはリジンを持つウイルスは、脳内接種により成熟マウスに致死感染を引き起こし強毒型を、それ以外では非致死的で弱毒型を示すことが多くの固定毒に共通して認められている。しかし、我が国の動物用ワクチンの製造株であるRC-HL株は、高度に弱毒化されているにもかかわらず、この部位に強毒型と同じアルギニンを持ち、これまでの結果と異なることを、Itoら(1994)は明らかにしてきた。そこで、弱毒型のRC-HL株とその親株で強毒型の西ヶ原株を用いて、西ヶ原株の病原性関連遺伝子の同定を試みた。

最初に、RC-HL株および西ヶ原株のゲノム全塩基配列を決定し、両株の遺伝子性状を比較した。両株のゲノムは共に11,926塩基から構成され、いずれの遺伝子領域にも塩基の欠損および挿入は認められなかった。両株間における各構造蛋白質の推定アミノ酸配列の相同率を比較した結果、G蛋白質が最も低値であった。また、蛋白質の構造に大きく影響を

及ぼすと考えられる非同類置換もG蛋白質で最も高率に認められた。このことから、G蛋白質の構造が両株の間で大きく異なることが示唆され、この蛋白質が両株の病原性の違いに影響していると推測された。

そこで、G遺伝子Open Reading Frame (ORF) のみ西ヶ原株由来、その他の全領域はRC-HL株由来のゲノムを持つキメラウイルスを作出し、このウイルスの成熟マウスに対する致死性を調べることを試みた。その前段階として、人為的操作の可能なウイルスゲノムcDNAから感染性粒子を回収するウイルス再構成系の確立が必要である。狂犬病ウイルスの再構成系は、非分節一本鎖RNAウイルスの中では最も早く、1994年にSchnellらによって報告されているが、未だに2例目の報告はない。著者は、彼らと同様の原理を用いて、RC-HL株の再構成系の確立を試みた。

まず、RC-HL株ゲノム全長のcDNAを挿入したゲノム・プラスミドと、RC-HL株のN、PおよびL蛋白質を発現するヘルパー・プラスミドを作出した。これらのプラスミドにはT7プロモーターが付加しており、T7RNAポリメラーゼによりプロモーター下流のウイルス遺伝子が転写される。なお、ゲノム・プラスミドのG-L遺伝子間非コード領域に、野生型RC-HL株には存在しない制限酵素切断部位を遺伝子マーカーとして構築した。これらのプラスミドを、T7RNAポリメラーゼ発現ワクチニアウイルスvTF7-3株を予め感染させたBHK-21細胞に導入することにより、感染性粒子を回収することができた。RT-PCRおよび制限酵素切断により、この回収されたウイルスのゲノム上に遺伝子マーカーの存在することが確認され、このウイルスがゲノム・プラスミドに由来することが明らかになった。この再構成RC-HL株は、神経系のNA細胞と非神経系のBHK-21細胞のいずれの培養細胞においても野生型と類似した増殖態度を示した。また、この再構成RC-HL株は、野生型と同様に、成熟マウスには非致死感染を、乳飲みマウスには致死感染をそれぞれ引き起こした。再構成および野生型RC-HL株の乳飲みマウスに対する50%致死量(LD50)はほぼ同じであった。以上のことから、再構成RC-HL株は、野生型とほぼ同一の生物学的性状を持っていることが明らかになった。

次に、確立したRC-HL株の再構成系を用いて、RC-HL株のG遺伝子ORFのみを西ヶ原株のそれと置き換えたゲノム・プラスミドを構築し、キメラウイルスを作出した。RT-PCR産物の制限酵素切断とシークエンシングにより、このキメラウイルスが西ヶ原株由来のG遺伝子を持っていることを確認した。キメラウイルスは脳内接種により成熟マウスに致死感染を引き起こし、そのLD50は1フォーカス形成単位であった。しかし、キメラウイルスのLD50が西ヶ原株のそれと比べて約16倍高かったことから、その他の遺伝子領域も病原性に部分的に関与していることが示唆された。

以上のように、本研究により、西ヶ原株のG遺伝子が成熟マウスに対する病原性に密接に関与していることを直接証明することができた。これらのデータは、狂犬病ウイルスの病原性メカニズムを解明するために有益であると考えられる。

審 査 結 果 の 要 旨

申請者、伊藤直人君の学位論文は、日本で現在使用されている動物用狂犬病ワクチンの製造株である弱毒のRC-HL株とその親株で強毒の西ヶ原株を用いて、狂犬病ウイルス固定毒の成熟マウスにおける病原性関連遺伝子をリバーシ・ジェネテックスの手法で作

出したキメラウイルスを用いて同定したものである。

氏は、まずRC-HL株と西ヶ原株のゲノム全塩基配列を決定比較し、糖(G)蛋白質をコードしている遺伝子が、成熟マウスの病原性に最も関与していることを推測した。次いで、RC-HL株のゲノム全長cDNAから感染性ウイルス粒子を回収するリバース・ジェネテックス技術確立した。さらに、その技術を用いてG遺伝子Open Reading Frame (ORF)のみ強毒の西ヶ原株由来、その他の全領域は弱毒のRC-HL株由来のゲノムを持つキメラウイルスを作出し、そのキメラウイルスが脳内接種により成熟マウスに致死感染を引き起こしたことから、西ヶ原株のG遺伝子が成熟マウスの病原性に深く関与していることを明らかにした。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、弱毒型のRC-HL株および強毒型の西ヶ原株のゲノム全塩基配列を決定し、両株の遺伝子性状を比較した。両株のゲノムは共に11,926塩基から構成され、いずれの遺伝子領域にも塩基の欠損および挿入は認められなかった。両株間における各構造蛋白質の推定アミノ酸配列の相同率を比較した結果、G蛋白質が最も低値であった。また、蛋白質の構造に大きく影響を及ぼすと考えられる非同類置換もG蛋白質で最も高率に認められた。このことから、G蛋白質の構造が両株の間で大きく異なることが示唆され、この蛋白質が両株のマウスに対する病原性の違いに影響していると推測された。

第二に、G遺伝子Open Reading Frame (ORF)のみ西ヶ原株由来、その他の全領域はRC-HL株由来のゲノムを持つキメラウイルスを作出し、このウイルスの成熟マウスに対する致死性を調べることを試みた。その前段階として、人為的操作の可能なウイルスゲノムcDNAから感染性粒子を回収するウイルス再構成系の確立が必要である。狂犬病ウイルスの再構成系は、非分節一本鎖RNAウイルスの中では最も早く、1994年に Schnellらによって報告されているが、未だに2例目の報告はない。著者は、彼らと同様の原理を用いて、RC-HL株の再構成系の確立を試みた。まず、RC-HL株ゲノム全長のcDNAを挿入したゲノム・プラスミドと、RC-HL株のN、PおよびL蛋白質を発現するヘルパー・プラスミドを作出した。これらのプラスミドにはT7プロモーターが付加しており、T7RNAポリメラーゼによりプロモーター下流のウイルス遺伝子が転写される。なお、ゲノム・プラスミドのG-L遺伝子間非コード領域に、野生型RC-HL株には存在しない制限酵素切断部位を遺伝子マーカーとして構築した。これらのプラスミドを、T7RNAポリメラーゼ発現ワクチニアウイルスvTF7-3株を予め感染させたBHK-21細胞に導入することにより、感染性粒子を回収することができた。RT-PCRおよび制限酵素切断により、この回収されたウイルスのゲノム上に遺伝子マーカーの存在することが確認され、このウイルスがゲノム・プラスミドに由来することが明らかになった。この再構成RC-HL株は、神経系のNA細胞と非神経系のBHK-21細胞のいずれの培養細胞においても野生型と類似した増殖態度を示した。また、再構成RC-HL株は、野生型と同様に、成熟マウスには非致死感染を、乳飲みマウスには致死感染をそれぞれ引き起こした。再構成および野生型RC-HL株の乳飲みマウスに対する50%致死量(LD50)はほぼ同じであった。以上のことから、再構成RC-HL株は、野生型とほぼ同一の生物学的性状を持っていることが明らかになった。

第三に、確立したRC-HL株の再構成系を用いて、RC-HL株のG遺伝子ORFのみを西ヶ原株のそれと置き換えたゲノム・プラスミドを構築し、キメラウイルスを作出した。RT-PCR産物の制限酵素切断とシークエンシングにより、このキメラウイルスが西ヶ原株由来のG遺伝子を持っていることを確認した。キメラウイルスは脳内接種により成熟マウスに致死感染を引き起こし、そのLD50は1フォーカス形成単位であった。しかし、キメラウイルスのLD50が西ヶ原株のそれと比べて約16倍高かったことから、その他の遺伝子領域も病原性に部分的に関与していることが示唆された。

以上のように、本研究により、西ヶ原株のG遺伝子が成熟マウスに対する病原性に密接に関与していることを直接証明することができた。これらの成績は、狂犬病ウイルスの病原性メカニズムの解明並びに狂犬病ワクチンの開発に有益なデータを提供するものと考えられる。

以上について、審査委員全員一致で本論分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有るものと認めた。

基礎となる学術論文：

1. Naoto Ito, Misako Kakemizu, Kumi A. Ito, Atsuko Yamamoto, Yoshio Yoshida, Makoto Sugiyama and Nobuyuki Minamoto: A comparison of complete genome sequences of the attenuated RC-HL strain of rabies virus used for production of animal vaccine in Japan, and the parental Nishigahara strain. *Microbiol. Immunol.* 45(1): 51-58, 2001.

既発表学術論文：

1. Ting Rong Luo, Nobuyuki Minamoto, Hiroshi Ito, Hideo Goto, Shinya Hiraga, Naoto Ito, Makoto Sugiyama and Toshio Kinjo
A virus-neutralizing epitope on the glycoprotein of rabies virus that contains Trp251 is a linear epitope. *Virus Res.* 51: 35-41, 1997.
2. Ting Rong Luo, Nobuyuki Minamoto, Miyuki Hishida, Keiko Yamamoto, Toru Fujise, Shinya Hiraga, Naoto Ito, Makoto Sugiyama and Toshio Kinjo : Antigenic and functional analyses of glycoprotein of rabies virus using monoclonal antibodies.
Microbiol. Immunol. 42(3): 187-193, 1998.
3. Naoto Ito, Makoto Sugiyama, Kanisak Oraveerakul, Prapruddee Piyaviriyakul, Boonlert Lumlertdacha, Yoko T. Arai, Yutaka Tamura, Yoshio Mori and Nobuyuki Minamoto : Molecular epidemiology of rabies in Thailand. *Microbiol. Immunol.*, 43(6): 551-559, 1999.

4. Hideo Goto, Nobuyuki Minamoto, Hiroshi Ito, Naoto Ito, Makoto Sugiyama, Toshio Kinjo and Akihiko Kawai : Mapping of epitopes and structural analysis of antigenic sites in the nucleoprotein of rabies virus. *J. Gen. Virol.*, 81(1): 119-127, 2000.