

氏 名 (国籍)	伊 藤 啓 史 (滋賀県)
学 位 の 種 類	博士 (獣医学)
学 位 記 番 号	獣医博甲第 4 0 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 9 年 3 月 1 4 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 Molecular Biological Characteristics of Avian Rotavirus VP6
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 小 川 益 男 副査 岐 阜 大 学 教 授 平 井 克 哉

論 文 の 内 容 の 要 旨

ロタウイルスはヒトを含む多種の哺乳類や鳥類などに広く分布し、乳幼児や各種幼若動物に下痢症を惹起することからズーノーシス病原体の可能性が強く示唆されている。なかでも、トリロタウイルスは鳥からウシへの種間伝達することが明らかにされており、ロタウイルスのその可能性を探る上で重要である。ロタウイルスは、その内殻蛋白質であるVP6上に存在する群特異抗原によりA-Gの7群に分類され、さらにA群ロタウイルスはVP6上の亜群特異抗原により概ね亜群I型及び亜群II型に分類される。A群ロタウイルスのうちほとんどの動物由来ロタウイルスが亜群I型に、またヒト由来ロタウイルスが亜群II型に属することから、著者は亜群型がロタウイルスの生態あるいはヒトと動物ロタウイルスの相互関係を調べる上で重要なマーカーに成りうると考えてきた。そこで本研究において著者は、これらの群及び亜群特異抗原のエピトープをマッピングすることを目的に、トリロタウイルスPO-13株のVP6遺伝子を各種発現系により発現させ、VP6の各エピトープを認識するモノクローナル抗体 (MAb) との反応性を調べた。

1. PO-13株VP6遺伝子の塩基配列の決定

RT-PCR法により合成、増幅したVP6 cDNAをプラスミドベクターにクローニング後、塩基配列を決定した。PO-13株VP6遺伝子には、397アミノ酸(aa)をコードするオー

プンレーディングフレーム(ORF)が存在した。PO-13株と哺乳類由来株の塩基及び推定アミノ酸配列のホモロジーはそれぞれ56-70%及び73-75%で、哺乳類由来株間での78-88%及び90-98%に比べて明らかに低い値を示した。各亜群型ウイルス9株のVP6推定アミノ酸配列の比較から66-79aa、102-113aa、133-144aa及び352-374aaの4つの保存領域がA群特異抗原の形成に、120aa、315aa及び348aaの3つのアミノ酸が亜群特異抗原の形成にそれぞれに関与する可能性が示唆された。各株のORF内の塩基配列を基に系統樹を作成したところ、トリロタウイルスPO-13株は哺乳類ロタウイルスが各亜群型に分かれる以前にそれらと分岐したことが明らかとなった。

2. PO-13株VP6の真核細胞における発現

クローニングしたVP6 cDNAを用いてCOS7細胞でPO-13株VP6を発現させた。間接蛍光抗体法とウェスタンブロット法(WB)により、COS7細胞中にウイルスVP6と同じ抗原性及び分子量を持つ蛋白質の発現が確認された。また非加熱及び非還元状態下でのWBにより、発現蛋白質の三量体形成及びその分子内でのS-S結合の存在が確認できた。以上の結果、真核細胞に発現したVP6はウイルスVP6と同様の高次構造を形成し、全てのエピトープを保有していると考えられた。

3. PO-13株VP6の大腸菌における発現とA群特異抗原エピトープのマッピング

A群特異抗原のエピトープをマッピングする目的で、種々のPO-13株欠損VP6を大腸菌において発現させ、A群特異抗原を認識するMAbとの反応性をWBにより調べた。MAbはN末端側を欠損させた135-397aaから成るVP6と、C末端側を欠損させた1-142aaから成るVP6とそれぞれ反応した。従って、哺乳類及び鳥類に共通したA群特異抗原の形成に関与するエピトープは135-142アミノ酸領域に存在することが明らかとなった。

4. 亜群I型特異抗原の形成に関与するエピトープのマッピング

亜群I型特異抗原のエピトープをマッピングする目的で、種々の欠損、キメラ及び点変異VP6を*in vitro* transcription & translationにより発現させ、亜群I型に対するMAbとの反応性を免疫沈降法により解析した。各亜群型の推定アミノ酸配列の比較から亜群特異抗原に関与すると推測された120aa、315aa及び348aaにそれぞれ点変異を導入したVP6は、いずれも亜群I型に対するMAbとの反応性を保持し、これらのアミノ酸は亜群I型特異抗原の形成に関与しないと考えられた。欠損VP6あるいは亜群II型のWa株とのキメラVP6を用いた解析により亜群I型特異抗原は169-332アミノ酸領域に存在することが示された。哺乳類ロタウイルスの亜群特異抗原に関与することが報告されている172aa及び305aaに点変異を導入したVP6は、亜群I型に対するMAbとの反応性を失った。従って172aa及び305aaは哺乳類由来のみならずトリロタウイルスをも含めた全てのロタウイルスの亜群I型特異抗原の形成に関与していることが明らかとなった。

以上、著者は本論文において、鳥類及び哺乳類由来ロタウイルスが共通に保有するA

群及び亜群I型特異抗原の存在するアミノ酸領域を明らかにした。これらの情報は、今後ヒトと動物におけるロタウイルスの生態を知るうえで有用であると考えられた。

審 査 結 果 の 要 旨

申請者 伊藤啓史君の学位論文は、世界で始めてハトから分離したトリロタウイルス、PO-13 株について、従来全く解明されていなかったVP6の構造と機能を分子生物学的に解析した結果をまとめたものである。

氏はまずトリロタウイルス、PO-13株のVP6遺伝子をクローニングし、VP6の単独発現系を真核および原核細胞でそれぞれ構築した。これらの発現系を用いて種々の欠損蛋白質を合成し、モノクローナル抗体(MAb)との反応性からロタウイルスA群特異抗原に関連するエピトープを同定した。次に、欠損、キメラおよび点変異VP6を用いて、亜群特異抗原の形成に関与するエピトープのマッピングを行っている。

得られた成績は次の4つに大別することが出来る。

1. PO-13 株VP6遺伝子の塩基配列の決定

PO-13株VP6遺伝子には397アミノ酸(aa)をコードするオープンリーディングフレーム(ORF)が存在した。PO-13株と哺乳類由来株の塩基及び推定アミノ酸配列のホモロジーはそれぞれ56-70%及び73-75%で、哺乳類由来株間でのそれらに比べて低い値を示した。各亜群型ウイルス9株の推定アミノ酸配列の比較から66-79aa、102-113aa、133-144aa及び352-374aaの4つの保存領域がA群特異抗原の形成に、120aa、315aa及び348aaの3アミノ酸が亜群特異抗原の形成にそれぞれに関与する可能性が示唆された。各株のORF内の塩基配列を基に系統樹を作成したところ、トリロタウイルスPO-13株は哺乳類ロタウイルスが各亜群型に分かれる以前にそれらと分岐したことが始めて明らかとなった。

2. PO-13 株VP6の真核細胞における発現

クローニングしたcDNAを用いてCOS7細胞でPO-13株VP6を発現させた。間接蛍光抗体法及びウエスタンブロット法(WB)により、COS7細胞中にウイルスVP6と同じ抗原性及び分子量を持つ蛋白質の発現が確認された。非加熱及び非還元状態下でのWBにより、発現蛋白質の三量体形成及びその分子内でのS-S結合の存在が確認できた。以上の結果、真核細胞に発現したVP6はウイルスVP6と同様の高次構造を形成し、全てのエピトープを保有していると考えられた。

3. PO-13 株VP6の大腸菌における発現とA群特異抗原のエピトープのマッピング

大腸菌発現欠損VP6とA群特異抗原を認識するMAbとの反応性をWBにより調べた。

MAbはN末端側を欠損させた135-397aaから成るVP6と、C末端側を欠損させた1-142aaから成るVP6とにそれぞれ反応した。従って、哺乳類及び鳥類に共通したA群特異抗原の形成に関与するエピトープは135-142アミノ酸領域に存在することが明らかとなった。

4. 亜群I型特異抗原の形成に関与するエピトープのマッピング

種々の欠損、キメラ及び点変異VP6と亜群I型特異MAbとの反応性を免疫沈降法により解析した。欠損VP6あるいは亜群II型のWa株とのキメラVP6を用いた解析により亜群I型特異抗原は169-332アミノ酸領域に存在することが示された。172aa及び305aaに点変異を導入したVP6は、亜群I型に対するMAbとの反応性を失った。従って、172aa及び305aaは亜群I型特異抗原の形成に関与していることが明らかとなった。

これらの研究をとおして、申請者はトリ及び哺乳類由来ロタウイルスが共通に保有するA群及び亜群I型特異抗原の形成に関与するエピトープのアミノ酸領域を明らかにした。これらの情報は、今後ヒトと動物におけるロタウイルスの生態を研究するうえで極めて有用な知見を提供してい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あるものと認めた。