



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

鶏伝染性ファブリキウス嚢病ウイルスレセプターの分子解剖による感染機構の解明

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2008-03-12 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 山口, 剛士 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/587

目 的

伝染性ファブリキウス嚢病(IRD)は、IRDウイルス(IRDV)によるリンパ組織の壊死性病変を主徴とする鶏の急性伝染病である。罹患鶏は、いわゆる免疫抑制状態を起こし、各種ワクチンに対する抗体産生が妨げられ、他病に対する抵抗性が失われる。このため、養鶏産業における本病の影響は極めて甚大である。

代表者の所属する研究室では、IRDに感染した鶏の感染防御能が著しく減退し種々のワクチンに対し抗体産生が抑制されること、B細胞が著名に減少し血中免疫グロブリン(IgM)も著名に減少すること、およびウイルス増殖の標的細胞が免疫グロブリン(IgM)を膜表面に持つB細胞であることをこれまでに解明した。しかし、ウイルスの病原性や病態発生機構の理解に極めて重要なウイルスレセプターを含む細胞側因子およびウイルス粒子との相互作用についての解析はほとんど進展していない。

ウイルス感染は、標的細胞への吸着・侵入を第一段階として、個体レベルでの感染が成立する。このため、ウイルス吸着の標的となるレセプター分子や感染に対する感受性を決定する細胞側因子の解析は、ウイルスと宿主細胞との相互関係を明らかにし、病態発生機構を解明するために極めて重要である。本研究は、IRDの病態解明に必須なウイルスレセプターおよびレセプター分子と結合するウイルス側分子の決定とその結合機構の解明を目的とし、1) ウイルスの吸着に関与する標的細胞側分子の検出と2) レセプター分子に対するモノクローナル抗体の作出を行った。さらに、3) ウイルス中和活性を持つモノクローナル抗体に対する抗イディオタイプ抗体を作出し、ウイルス感染の分子機構について解析を行った。さらに、4) 異なる標的細胞を用いてIRDVの細胞障害性を解析し、宿主細胞によるウイルスの増殖動態と病原性および細胞障害性との関連を明らかにした。また、5) 株化細胞での継代によるVP2アミノ酸可変領域の塩基およびアミノ酸置換を明らかにした。6) 標的細胞との吸着や侵入に関与することが推察されるVP2アミノ酸可変領域の機能をリバーシジェネティクス的手法により解明するため、cDNAからのIRDV感染性粒子構築を試み、その基礎を確立した。ウイルスレセプター分子および標的細胞との相互作用に関与するウイルス側分子の解析は、ウイルスの標的細胞、標的細胞への感染過程、宿主体内での増殖様式を明らかにし、IRDV感染による免疫抑制および病態発生機構の解明に極めて重要な情報を提供する。

伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス (IBDV) の標的細胞との相互作用を明らかにするため標的細胞のウイルスレセプターとウイルス側因子について解析を行った。

1. ウイルスの吸着に関与する標的細胞側分子の検出

IBDVが標的細胞に感染する際に吸着するレセプター分子を明らかにするため、IBDV感染に高い感受性を示す鶏B細胞由来LSCC-BK3細胞の細胞膜画分をSDS-PAGEにて分画後、ビオチン標識したIBDVによりウイルスと結合する細胞側分子の検出を行った。これにより、BK3細胞膜画分の70, 82および110kDa分子と特異的に結合することが明らかになった。

2. レセプター分子に対するモノクローナル抗体の作出

IBDVが標的細胞に感染する際に吸着するレセプター分子を明らかにするため、IBDV感染に高い感受性を示す鶏B細胞由来LSCC-BK3細胞を免疫し、IBDVのBK3細胞への吸着阻害活性を有するモノクローナル抗体を作出した。作出したモノクローナル抗体はBK3細胞膜画分の110kDa抗原と反応した。このことから110kDa抗原がウイルスの吸着に関与することが示唆された。

3. ウイルス中和活性を持つモノクローナル抗体に対する抗イディオタイプ抗体の作出

IBDVの感染過程で標的細胞との相互作用に関与することが推察されている、ウイルスカプシドを構築するVP2のアミノ酸可変領域のウイルス感染における役割を明らかにするため、アミノ酸可変領域を認識し、ウイルス中和活性を示すモノクローナル抗体GI-11のイディオタイプに対する抗体を作出した。作出した抗体はIBDVの標的細胞への吸着および感染を阻止しなかったことから、GI-11が認識するアミノ酸可変領域の親水性部位はウイルスの吸着や感染に関与していないことが推察された。

4. IBDVの細胞障害性に関する解析

超強毒型および従来型IBDVの野生株が良好に増殖するニワトリB細胞由来株化

細胞LSCC-BK3 (BK3) およびLSCC-DT40 (DT40) 細胞それぞれに超強毒株および従来株を接種し、生細胞数、死細胞数、抗原陽性細胞率および培養上清中のウイルス力価の経時的変化を観察した。いずれの細胞を用いた場合でも、超強毒株接種時に比較して、従来株接種後の生細胞率が著しく減少する傾向が認められた。一方、抗原陽性細胞率および培養上清中のウイルス力価には、いずれの細胞を用いた場合にも株間に大きな差は認められなかった。このことから、超強毒型および従来型株の培養細胞に対する傷害性が異なることが明らかになった

5. 培養細胞での継代によるVP2アミノ酸可変領域の変化

伝染性ファブリキウス囊病ウイルス病原株を鶏B細胞由来の株化細胞であるLSCC-BK3細胞で継代し、VP2アミノ酸可変領域の塩基配列および推定アミノ酸配列の変化を解析した。継代の前後で塩基置換が認められ、279番のアミノ酸残基にAspまたはAsnから、Asn、HisまたはAspへのアミノ酸置換が推定された。この部位のアミノ酸残基は、CEF細胞ではAsn、ニワトリではAspを有するウイルスがそれぞれ選択されるが、LSCC-BK3細胞ではいずれのアミノ酸残基を有するウイルスも増殖できる可能性が示唆された。

6. cDNAからのIBDV感染性粒子の構築

逆遺伝学的手法によるIBDVの病原性解析を目的に、cDNAからの超強毒型IBDV構築を試みた。IBDV分節AおよびBの全長cDNAを各々RT-PCR法で合成し、T7プロモーター配列の下流に配置した。さらに、その下流にはD型肝炎ウイルスリポザイム配列を配置し、トランスフェクション用プラスミド(pTOA,pTOB)を構築した。T7RNAポリメラーゼ発現鶏痘ウイルス感染Vero細胞に、pTOAのみ、またはpTOAおよびpTOBを同時にトランスフェクションし、IBDV抗原の発現を解析したところ、ウイルス抗原の発現が検出されたが、ウイルス粒子の回収には至らなかった。本研究により、超強毒型IBDVのcDNAから粒子作出に有用なトランスフェクション用プラスミドを構築し、効率的なトランスフェクション条件を確立した。