



Title	Studies on the molecular basis of pathogenicity of classical swine fever virus [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	田村, 友和
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(獣医学)
Dissertation Number	甲第11966号
Issue Date	2015-09-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/60005
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Tomokazu_Tamura_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨
Abstract of the dissertation

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）

氏名：田村 友和
Name Tomokazu Tamura

学位論文題名
The title of the doctoral dissertation

Studies on the molecular basis of pathogenicity
of classical swine fever virus
(豚コレラウイルスの病原性の分子基盤に関する研究)

豚コレラは、豚に強い伝播力と高い致死率を特徴とするウイルス感染症で家畜伝染病に指定されている。豚コレラの原因ウイルスである豚コレラウイルスは、牛ウイルス性下痢ウイルスおよびボーダー病ウイルスと同じフラビウイルス科ペスチウイルス属に属する。ウイルスゲノムは全長約 12,300 塩基のプラス極性 1 本鎖 RNA であり、5' 末端より N^{pro}、C、E^{ns}、E1、E2、p7、NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A および NS5B 蛋白をコードしている。豚コレラウイルスの病原性は株によって様々である。強毒株が感染した豚は、著しい白血球並びに血小板数の減少、発熱および播種性血管内凝固症候群に伴う多臓器不全により、多くの場合 1 週間以内に死亡する。中等毒株が豚に感染した場合は、慢性経過をたどり死亡あるいは耐過してひね豚となる。一方、実験室で作出された弱毒生ワクチン株を接種した豚は、臨床症状を殆ど示さず強固な免疫を獲得する。豚コレラの病態についてはよく知られているが、豚コレラウイルスの病原性の分子基盤は未だ不明である。そこで本研究では、日本で使用されていた弱毒生ワクチン GPE⁻株を用いてその病原性発現に関与するウイルス蛋白を同定し、その機能を解析することで豚コレラウイルスの病原性発現機序の解明を試みた。申請者が提出する博士論文は、全 3 章構成である。

弱毒生ワクチン GPE⁻株は、野外強毒株 ALD を異種動物の培養細胞で継代することで樹立した。第 1 章では、まず GPE⁻株を本来の宿主である豚で連続継代し、病原性を獲得するか調べた。GPE⁻株を豚で 11 代継代した結果、ウイルスは豚に対して病原性を獲得した。継代後のウイルスの全長の塩基配列を決定し、継代前後でのアミノ酸配列を比較したところ、ウイルスの表面糖蛋白 E2 に 1 箇所、非構造蛋白 NS4B に 2 箇所のアミノ酸の相違を認めた。次に GPE⁻株のリバースジェネティクスの系を確立し、それを用いてそれぞれのアミノ酸を置換したウイルスを作出した。それらの変異ウイルスの豚への接種試験の結果から、認めた 3 箇所のアミノ酸置換全てが病原性発現に関与することがわかった。さらに、E2 蛋白のアミノ酸置換はウイルスの細胞間伝播の向上に、NS4B 蛋白のアミノ酸置換はウイルスゲノムの複製効率の向上に関与することを明らかにした。

豚コレラウイルスの野外株のほとんどは、宿主細胞に感染するとインターフェロン制御因子 3 を分解することで I 型インターフェロンの産生を抑制する。しかし、弱毒生ワクチン GPE⁻ 株はその樹立の過程でそれを失っている。第 2 章では、ウイルスによる I 型インターフェロンの産生抑制能が病原性発現に関与するか調べた。まず、野外株とのウイルス遺伝子の比較およびリバースジェネティクス法を用いて、GPE⁻ 株の非構造蛋白 N^{pro} 分子上の I 型インターフェロン産生調節に関与するアミノ酸部位を同定した。次にその部位のアミノ酸を置換し、I 型インターフェロンの産生抑制能を復帰させたウイルスの感染に対する豚の免疫応答と病原性を解析した。GPE⁻ 株の I 型インターフェロン産生抑制能を復帰させたウイルスの豚に対する病原性は、GPE⁻ 株と比較して同程度だった。一方、豚継代ウイルスの I 型インターフェロン産生抑制能を復帰させたウイルスの豚に対する病原性は、その親株と比較して高かった。以上から、N^{pro} 蛋白による宿主の I 型インターフェロンの産生抑制は、先に同定した E2 蛋白および NS4B 蛋白分子上のアミノ酸置換によるウイルスの増殖効率の向上に相乗作用することで、病原性発現に関与することが明らかになった。

さらにウイルスのゲノム複製と病原性発現に関してその分子機序を解明するために、機能が不明である非構造蛋白 NS4B に着目し研究を進めた。第 3 章では、GPE⁻ 株の NS4B 蛋白遺伝子を野外強毒株のそれに置き換えたキメラウイルスを作出し、ウイルスのゲノム複製および病原性に及ぼす影響を調べた。その結果、強毒株の NS4B 蛋白遺伝子を持つキメラウイルスは、親株と比較してウイルスゲノムの複製効率が向上し、豚に対する病原性が高かった。GPE⁻ 株と強毒株では NS4B 蛋白分子上に 7 つのアミノ酸相違を認め、うち 5 つは N 末端領域に、他の 2 つは膜貫通領域に位置した。後者の 2 つのアミノ酸部位は先の豚継代実験で同定したアミノ酸部位と同じだった。5 つのアミノ酸相違を認めた N 末端領域は両親媒性ヘリックス構造を有し、ウイルスゲノムの複製に重要であることを明らかにした。さらに、当該 N 末端領域が細胞内膜への親和性に関与し、アミノ酸相違によりそれが変化することを明らかにした。以上から、NS4B 蛋白の N 末端領域による細胞内膜への親和性がウイルスゲノムの複製および豚に対する病原性発現に関与することが明らかになった。

本研究により、豚コレラウイルスの病原性発現に関与するウイルス蛋白とその機能、さらには機能ドメインが明らかになった。また、それらウイルス蛋白の機能が相乗作用することで豚に対して病原性を発現することがわかった。以上、本研究の成績は豚コレラウイルスの病原性発現機序の一端を分子レベルで解明したものであると共に、豚コレラのみならず牛ウイルス性下痢症等のペスチウイルス感染症に有効で安全な生ワクチンおよび抗ウイルス薬の開発に役立つものと期待される。