HOKKAIDO UNIVERSITY

| | |
|---|---|
| Title | Studies on the molecular basis of the pathogenicity of foot-and-mouth disease virus [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review] |
| Author(s) | 西, 達也 |
| Degree Grantor | 北海道大学 |
| Degree Name | 博士(獣医学) |
| Dissertation Number | 乙第7106号 |
| Issue Date | 2020-09-25 |
| Doc URL | https://hdl.handle.net/2115/79711 |
| Rights(URL) | https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/ |
| Type | doctoral thesis |
| File Information | Tatsuya_Nishi_review.pdf, 審査の要旨 |

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）　　氏名：西　達也

| | | |
|---|---|---|
| 審査委員 | 主査　教授 | 迫田　義博 |
| | 副査　教授 | 大橋　和彦 |
| | 副査　教授 | 苅和　宏明 |
| | 副査　講師 | 松野　啓太 |

学位論文題名

**Studies on the molecular basis of the pathogenicity of foot-and-mouth disease virus**

**（口蹄疫ウイルスの病原性の分子基盤に関する研究）**

口蹄疫（FMD）は口蹄疫ウイルス（FMDV）の感染による牛，豚などの偶蹄類動物の口腔，鼻腔および蹄部への水疱形成を主徴とする急性熱性伝染病である。日本では2000年に92年ぶりに本病が宮崎県と北海道で発生し，その後清浄化を達成した。しかし，2010年に再び宮崎県で大規模な発生が確認され，畜産業に大きな被害を与えた。FMDVはゲノム複製時における変異率が高く，その遺伝子は多様であることが知られている。そのため本病の診断法の開発，有効な防疫対策の確立にあたっては，FMDVの遺伝子や病原性の多様性の理解が不可欠である。そこで西 達也氏は，2000年と2010年の国内分離株を中心にFMDVの遺伝子の多様性を明らかにし，遺伝子診断法の開発を試みた。さらにFMDV国内分離株のリバースジェネティクス系を確立し，FMDVの病原性の分子基盤の解明を試みた。

FMDVのゲノムのうち，ウイルス株間で保存性の高いポリメラーゼ遺伝子領域を標的とするプライマーセットFM8/9についてその感度と特異性を評価した。21株のFMDVに対して，本プライマーセットを国際獣疫事務局の推奨するプライマーセット1F/Rと比較したところ，新たに設計したFM8/9の方が4倍から6,300倍感度が高かった。さらに，実験的に感染させた牛および豚のサンプルを用いた評価試験において，プライマーセット1F/Rを用いた場合には検出できなかった感染初期および後期にもプライマーセットFM8/9によりFMDVに特異的な遺伝子を検出することができた。さらに本プライマーセットは，FMD類症疾病の原因ウイルスに対しては反応しないことも確認した。以上より，本検査法がFMDの高感度遺伝子診断法として有用であることがわかった。

国内で2010年に発生したFMDの292症例のうち，異なる農場から分離されたFMDV104株のゲノム配列を次世代シークエンサーにより決定した。さらに海外で分離されたFMDVの遺伝子情報と共に分子系統解析を行った。その結果，国内分離株104株

はすべて一つのグループに分類され，2010 年の宮崎での FMD 発生時に単一の FMDV が侵入・蔓延したことが示唆された。さらに，104 株の全ゲノムの相同性は 99.56％～99.98％であり，100％一致するウイルス株はなかった。また推定されるアミノ酸の変異を比較したところ，ウイルスの外殻蛋白を構成する VP2 に変異が集中していること，非構造蛋白である 2C は変異が少ないことがわかった。

2010 年に日本で分離された FMDV（O/JPN/2010）のゲノムをもとに完全長 cDNA クローンを構築した。構築した FMDV の全ゲノムを有するプラスミドを哺乳動物細胞に導入することにより感染性ウイルスのレスキューに成功した。さらに本ウイルスの培養細胞および動物に対する病原性を比較したところ，cDNA 由来ウイルスは，親ウイルスと同等の細胞内増殖性および豚に対する病原性を示すことが確認された。また O/JPN/2010 と，発生規模が小さかった 2000 年の発生原因ウイルス O/JPN/2000 との病原性の差に関与するウイルス遺伝子を特定するために，2 株間の遺伝子組換えウイルスを作出した。これらのウイルスを乳飲みマウスに 10 $TCID_{50}$ ずつ接種したところ，O/JPN/2010 の最外殻蛋白 VP1 またはウイルスゲノムの複製を担う 3D ポリメラーゼ遺伝子を O/JPN/2000 の当該遺伝子に組換えた 2 つのウイルスを接種した乳飲みマウスにおいて致死率の有意な低下が認められた。さらに VP1 の立体構造予測により，宿主レセプター結合部位の構造が 2 株間で優位に異なることがわかった。またウイルスゲノム複製時の塩基置換率も 2 株間で優位に異なっていた。以上より，最外殻蛋白のレセプター選択性およびウイルスポリメラーゼによるゲノム複製時の正確性が，FMDV の病原性に重要であることが示唆された。

本研究により FMDV の遺伝子の多様性を明らかにし，保存性の高い遺伝子領域を標的とした遺伝子診断法を確立した。さらに確立したリバースジェネティクス系を利用し，FMDV の病原性に与るウイルス遺伝子の特定とコードされるウイルス蛋白の機能解析を行い，病原性の分子基盤を明らかにした。これらの成績は，FMD の診断の高度化や安全で効果的なワクチンや抗ウイルス薬の開発を進めるための重要な基礎的知見と考えられる。

よって審査委員一同は，上記学位論文提出者 西 達也氏が博士（獣医学）の学位を授与されるに十分な資格を有するものと認めた。

（1,896 字）