

学 位 論 文 題 名

Expression of antigenic glycoproteins of Newcastle disease virus and Marek's disease virus using baculovirus vectors

(バキュロウイルスベクターを用いたニューカッスル病ウイルス及びマレック病ウイルス糖蛋白抗原の発現)

学位論文内容の要旨

昆虫を宿主とするバキュロウイルスの遺伝子組み換え体を用いた外来遺伝子の発現系は、その発現効率の高さと、発現された外来蛋白がその生物活性を良く保存している点で注目されている。これらの利点を生かし、バキュロウイルス発現系を用いて多くのウイルス抗原が、リコンビナント蛋白として発現され、それがコンポーネントワクチンや診断用抗原として応用される可能性が報告されている。著者は家禽の病原ウイルスがもつ糖蛋白の感染防御における役割を検討するために、ニューカッスル病ウイルス(NDV)のヘマグルチニン-ノイラミナーゼ蛋白(HN)、及びマレック病ウイルス(MDV)のA抗原と単純ヘルペスウイルスB糖蛋白類似蛋白(gB homologue)をバキュロウイルスの1種である *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (AcNPV) を用いて発現させ、それらのリコンビナント蛋白の分子性状及び抗原性状を検討した。

NDV 宮寺株のHNをコードするcDNAを挿入したリコンビナントAcNPVは、感染細胞の表面にHNを発現した。発現したリコンビナントHNはNDVの産生するHNとSDSポリアクリルアミド電気泳動上ではほぼ同じ移動度を示し、またツニカマイシン処理によって、そのアミノ酸配列から予想される分子量とほぼ同じ大きさとなった。リコンビナントHNは、赤血球吸着活性及びノイラミナーゼ活性を保持していた。ウイルス感染の中和に関与する4種の単クローン性抗体を用いてリコンビナントHNの抗原性を調べたところ、主要な抗原決定基を含む3つの抗原決定基が保存されていた。さらに、リコンビナントHNを発現した細胞で免疫した鶏は、赤血球凝集阻止抗体及びNDV感染中和抗体を産生し、NDV強毒株による攻撃から完全に防御された。これらの結果から、リコンビナントHNは、NDVHNの生物活性及び抗原性をほぼ完全に保持しており、NDVに対するコンポーネントワクチンの候補として有望であると

考えられた。

次に MDV 抗原遺伝子の発現を試みた。MDV A 抗原をコードする DNA を挿入したリコンビナント AcNPV により発現した A 抗原は、MDV の発現する A 抗原と異なり、培養上清中には少量しか分泌されず主に細胞表面と細胞中に存在した。細胞に認められたリコンビナント A 抗原、培養上清中に認められたリコンビナント A 抗原及び MDV の産生した A 抗原は、それぞれ異なった分子量を示した。細胞に認められたリコンビナント A 抗原の分子量は、ツニカマイシン処理により、アミノ酸配列から予想される分子量とほぼ同じ大きさとなったが、MDV A 抗原のツニカマイシン処理されたものとは、異なった大きさであった。これらの結果から、リコンビナント A 抗原は MDV A と異なった翻訳後の修飾を受けていると思われた。しかし、リコンビナント A 抗原は、Enzymelinked immunosorbent assay 及びゲル内沈降反応において MDV 感染鶏血清と特異的に反応した。さらに、リコンビナント A 抗原発現細胞で免疫した鶏は、MDV A 抗原に対する抗体を産生した。これらの結果から、リコンビナント A 抗原は MDV A 抗原の抗原性を保持していると考えられ、A 抗原の MDV 感染における役割や、感染防御への関与について検討する上で有用であると思われた。

MDV の gB homologue をコードすると思われる DNA を挿入したリコンビナント AcNPV は、感染細胞の細胞質及び細胞表面に MDV 感染鶏血清によって認識される蛋白を発現した。この蛋白は、1、2 及び 3 型いずれの血清型の MDV 感染血清ないし抗血清とも反応した。また、SDS-PAGE 及び MDV 感染血清を用いたイムノプロット法によって、88-100.64 及び 54 kd の 3 本の特異的なバンドが検出された。さらに、この蛋白は MDV の B 抗原に対する単クローン性抗体とも反応した。gB homologue と B 抗原をコードする遺伝子領域が異なっていると報告があるが、両者の異同は再検討の余地がある。この B 抗原特異的単クローン性抗体はウイルス感染に対する中和活性をもつことから、ワクチンによる MDV 防御活性に gB homologue が関与している可能性が考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 沼 操
副 査 教 授 清 水 悠紀臣
副 査 教 授 佐 藤 文 昭
副 査 教 授 見 上 彪

昆虫を宿主とするバキュロウイルスの遺伝子組み換え体を用いた外来遺伝子の発現系は、その発現効率の高さと、発現された外来蛋白がその生物活性を良く保存している点で注目されている。これらの利点を生かし、バキュロウイルス発現系を用いて多くのウイルス抗原が、リコンビナント蛋白として発現され、それがコンポーネントワクチンや診断用抗原として応用される可能性が報告されている。申請者は、ニューカッスル病ウイルス（NDV）のヘマグルチニン-ノイラミニダーゼ蛋白（HN）、及びマレック病ウイルス（MDV）のA抗原と単純ヘルペスウイルスB糖蛋白類似蛋白（gB homologue）をバキュロウイルスの1種である 遺伝子 *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus（AcNPV）を用いて発現させ、それらのリコンビナント蛋白の分子性状及び抗原性状を検討し本論文にまとめた。本論文は英文94頁からなり、参考論文8編を付している。

申請者はまず、NDV 宮寺株のHNをコードするcDNAを挿入したリコンビナントAcNPVについて検討した。リコンビナントAcNPVは感染細胞の表面にHNを発現し、そのリコンビナントHNはNDVの産生するHN蛋白とSDSポリアクリルアミド電気泳動上ではほぼ同じ移動度を示した。またツニカマイシン処理によって、そのアミノ酸配列から予想される分子量とほぼ同じ大きさとなった。リコンビナントHNは、赤血球吸着活性及びノイラミニダーゼ活性を保持していた。ウイルス感染の中和に関与する4種の単クローン性抗体を用いてリコンビナントHNの抗原性を調べたところ、主要な抗原決定基を含む3つの抗原決定基が保存されていた。さらに、リコンビナントHNを発現した細胞で免疫した鶏は、赤血球凝集阻止抗体及びNDV中和抗体を産生し、NDV強毒株による攻撃から完全に防御された。これらの結果から、リコンビナントHNは、NDVHNの生物活性及び抗原性をほぼ完全に保持しており、NDVに対するコンポーネントワクチンの候補として有望であると考えられた。

次にMDV抗原遺伝子の発現を試みた。MDVA抗原をコードするDNAを挿入したリコンビナントAcNPVにより発現したA抗原は、MDVの発現するA抗原と異なり、培養上清中に

は少量しか分泌されず主に細胞表面と細胞中に存在した。細胞に認められたリコンビナントA抗原、培養上清中に認められたリコンビナントA抗原及びMDVの産生したA抗原は、それぞれ異なった分子量を示した。細胞に認められたリコンビナントA抗原の分子量は、ツニカマイシン処理により、アミノ酸配列から予想される分子量とほぼ同じ大きさとなったが、MDV A抗原のツニカマイシン処理されたものとは、異なった大きさであった。これらの結果から、リコンビナントA抗原は、MDV A抗原と異なった翻訳後の修飾を受けていると思われた。しかし、リコンビナントA抗原は、MDV感染鶏血清と特異的に反応した。さらに、本抗原で免疫した鶏は、MDV A抗原に対する抗体を産生した。このように、リコンビナントA抗原はMDV A抗原の抗原性を保持しているので、A抗原のMDV感染における役割や、感染防御への関与について検討する上で有用であると思われた。

MDVのgB homologueをコードすると思われるDNAを挿入したリコンビナントAcNPVは、感染細胞の細胞質及び細胞表面にMDV感染鶏血清によって認識される蛋白を発現した。この蛋白は、1、2及び3型いずれの血清型のMDV感染鶏血清ないし抗血清とも反応した。また、SDS-PAGE及びMDV感染鶏血清を用いたイムノブロット法によって、88-100、64及び54kdの3本の特異的なバンドが検出された。さらに、この蛋白はMDVのB抗原に対する単クローン性抗体とも反応した。gB homologueとB抗原をコードする遺伝子領域が異なっているとする報告があるが、両者の異同は再検討の余地がある。このB抗原特異的単クローン性抗体はウイルス感染に対する中和活性をもつことから、ワクチンのMDV防御活性にgB homologueが関与している可能性が考えられた。

以上の成績のように申請者は、家禽の病原ウイルスの糖蛋白をAcNPVを用いて発現させ、それらリコンビナント蛋白が感染防御や血清学的診断に有用であることを示した。この研究は、ワクチン開発及び診断法開発にとり極めて有用な知見を提供するものである。よって審査員一同は、新倉昌浩氏が獣医学博士の学位を受けるのに十分な資格を有すると認めた。