

学 位 論 文 題 名

Molecular genetic studies on the host specificity
of the feline parvovirus host range variants.

（猫パルボウイルス宿主域変異群の宿主特異性に関する分子遺伝学的研究）

学位論文内容の要旨

犬パルボウイルス(CPV)、猫汎白血球減少症ウイルス(FPLV)、およびミンク腸炎ウイルス(MEV)はパルボウイルス科パルボウイルス属に属し、猫パルボウイルスの宿主域変異群として位置づけられている。これらは互いに98%以上のDNA塩基配列の相同性を有するが、宿主域等の生物学的性状に違いがある。またCPVは1970年代後半に突然出現したウイルスであり、FPLVあるいはMEVに変異が生じたために犬への感染性を獲得したウイルスと考えられている。従って、CPV、FPLV、およびMEVの宿主特異性の機構を解明することは、これらウイルスの相互関係とCPVの出現機構を理解する上で非常に重要である。FPLVおよびMEVは犬および犬由来の培養細胞で殆ど増殖しないことから、本研究では犬由来の株化細胞を用いてin vitroにおける宿主細胞特異性の機構を解明することを目的として、1) CPVの感染性DNAクローンの作製、2) FPLVおよびMEVの犬由来の培養細胞での増殖態度の解析、ならびに3) MEVに犬の細胞での増殖能を付与するCPVゲノムの領域の同定を行い、以下の成績を得た。

1) パルボウイルスは一本鎖DNAをゲノムとして持つが、細胞内で複製する際には二本鎖の複製型DNA(RFDNA)となる。CPV-Y1株(CPV-Y1)感染細胞よりRFDNAを抽出しこれをプラスミドベクターにクローン化した。CPV-Y1ゲノム全長を含むプラスミドpCPVY1を猫腎株化細胞にトランスフェクトすると培養上清に感染性ウイルスが産生された。pCPVY1由

来のウイルスの生物学的性状を親株であるCPV-Y1のそれと比較したところ、ウイルス抗原の発現と分子量、ウイルスDNAの複製、赤血球凝集能、およびウイルス増殖能など調べた全ての性状で差が認められなかった。従ってpCPVY1由来のウイルスは親株と同一の性状を有しており、pCPVY1はCPVおよびCPVに関連したウイルス遺伝子の機能を調べる道具として有用であることが明らかとなった。

2) 宿主細胞特異性の機構を調べるために、A72犬線維腫細胞におけるFPLVおよびMEVの感染がウイルス増殖のどの段階で停止しているかを検討した。A72細胞にFPLVあるいはMEVを感染させた場合はウイルスの増殖は殆ど起こらなかった。ウイルス吸着試験によりMEVはCPVと同程度の効率でA72細胞に吸着したが、ウイルスDNAの転写は検出限界以下であった。一方、pMEVをトランスフェクトしたA72細胞では明らかにウイルスDNAの転写が起こり、ある程度の力価のウイルスが産生されたが、産生されたウイルスはA72細胞で増殖しなかった。以上の結果から、FPLVおよびMEVの宿主細胞特異性はウイルスが細胞に吸着した以降からウイルスDNA転写開始の間のウイルス感染初期の過程で制御されていることが明らかになった。

3) 種々のCPV/MEVキメラウイルスを作製し、これらのA72細胞への感染性を指標に、MEVに犬の細胞での増殖能を付与するCPVゲノムの領域、即ち、CPVの宿主細胞域を規定する領域を同定した。その結果、CPVゲノムの60から91 map units (m.u.) の領域がMEVにA72細胞での増殖能を付与するために必要であることが明らかになった。この領域はウイルス構造蛋白(VP)遺伝子の一部、VP2蛋白の91アミノ酸(aa91)からC端までの領域をコードする部分およびそれに続く112塩基から成る5'非翻訳領域を含んでいた。60-91 m.u.の領域の塩基配列をキメラウイルス作製に使用したCPV-Y1とMEV-Abashiri株間で比較したところ、アミノ酸の変化を伴う塩基の違いが9個存在した[nt3103(aa93), nt3132(aa103), nt3723(aa300), nt3737(aa305), nt3791(aa323), nt4056(aa562), nt4515(aa564), nt4527(aa568)]。このうち5個は系統発生的にCPV特異的であることが示唆された(aa93,

aa103, aa323, aa564, aa568)。CPV/FPLVキメラウイルスを用いた実験ではaa93とaa323をCPV型に置換した組換えFPLVはCPVの宿主細胞域を示すことが報告されている。本研究で使用したCPV/MEVキメラウイルスの系ではCPV特異的な5アミノ酸全てを有するウイルスでもCPVの宿主細胞域を示さなかったことから、60-91 m.u.の領域に存在するウイルス間で異なる9アミノ酸が協調的にCPVの宿主細胞域を規定することが示唆された。また、非構造蛋白(NS)遺伝子の一部がA72細胞におけるウイルス増殖の効率に影響することが明らかになった。

以上の結果を総括すると、猫パルボウイルスの宿主域変異群に位置づけられているCPV、FPLV、およびMEVの宿主細胞特異性は、ウイルス吸着以降からウイルスDNAの転写開始までのウイルス増殖初期の過程で規定されていること、およびウイルス構造蛋白遺伝子の一部が宿主細胞特異性を規定していることが明らかになった。従って、この宿主細胞特異性には細胞に侵入したウイルス粒子のウイルス構造蛋白が関与していることが示唆された。

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 助教授 高 島 郁 夫

副 査 助教授 林 正 信

学 位 論 文 題 名

Molecular genetic studies on the host specificity of the feline parvovirus host range variants.

(猫パルボウイルス宿主域変異群の宿主特異性に関する分子遺伝学的研究)

犬パルボウイルス (CPV)、猫汎白血球減少症ウイルス (FPLV)、およびミンク腸炎ウイルス (MEV) はパルボウイルス属に属し、互いに98%以上のDNA塩基配列の相同性を有するが、宿主域等の生物学的性状に違いがあり、FPLVおよびMEVは犬および犬由来の培養細胞で殆ど増殖しない。本論文は犬由来の株化細胞を用いて *in vitro*における宿主細胞特異性の機序を解析し、得られた新知見について述べたものである。

まずCPVの感染性DNAクローンを作製した。このDNAクローン由来のウイルスと親株CPVとのウイルス性状を比較したところ、両者に差は認められなかったことから本DNAクローンはウイルス遺伝子の機能を調べるのに有用であることが明らかとなった。FPLVとMEVは犬由来A72細胞でウイルスの増殖は殆ど起こらなかった。またMEVはCPVと同程度の効率でA72細胞に吸着したが、ウイルスDNAの転写は検出限界以下であった。FPLVおよびMEVの宿主細胞特異性はウイルスが細胞に吸着した以降からウイルスDNA転写開始の間のウイルス感染初期の過程で制御されていることが明らかになった。

次に種々のCPV/MEVキメラウイルスを作製し、これらのA72細胞への感染性を指標に、CPVの宿主細胞域を規定する領域を同定した。その結果、CPVゲノムの60から91map units(m.u.)の領域がMEVにA72細胞での増殖能を付与するために必要であることが明らかになった。60-91m.u.領域の塩基配列をCPVとMEVで比較したところアミノ酸の変化を伴う塩基の違いが9ヶ所認められた。CPV/MEVキメラウイルスではCPV特異的な5アミノ酸全てを有するウイルスでもCPVの宿主細胞域を示さなかったことから、60-91m.u.の領域に存在するウイルス間で異なる9アミノ酸が協調的にCPVの宿主細胞域を規定することが示唆された。

この研究はCPV, FPLV, およびMEVの宿主特異性の機序を分子レベルで解明したものであり、これらウイルスの相互関係を理解するのに重要な知見を提供するものである。よって審査員一同は堀内基広氏が博士(獣医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。