

学 位 論 文 題 名

マレック病ウイルスの主要抗原の遺伝子同定と組換え
ファウルポックスウイルスを利用した遺伝子産物の解析

学位論文内容の要旨

研究の背景

マレック病(MD)はMarek's disease virus(MDV)の感染に起因するニワトリの伝染性悪性リンパ腫である。MDVはヘルペスウイルス科に属し3つの血清型に分類される。血清型1 (MDV-1)は腫瘍原性が強くMDの病因ウイルスである。血清型2 (MDV-2)は腫瘍原性を欠く。血清型3 (MDV-3)はherpesvirus of turkey (HVT)として知られており、MDV-2と同様に腫瘍原性を欠く。病原性を示さないMDV-2とMDV-3はMDV-1に対する混合2価生ワクチンとして現在使用されている。MDワクチンは、ワクチン株が体内で増殖して持続感染を起こし、これにより野外強毒ウイルスの感染によって引き起こされるMD病変形成を阻止している。しかしながら完全には感染を阻止できないためワクチン株と野外ウイルスの重感染が生じ、さらに感染ニワトリからはウイルスの排泄が常時行われるために環境からMDVを完全には除去できない。このような現状よりMDVの分子レベルでの解明を通じて、ニワトリの飼育環境に適応し、簡便で安全性に優れ、かつ100%感染防御する次世代ワクチンの開発が望まれている。

研究の目的

MDVの分子レベルの解明は他のヘルペスウイルスに比べて著しく遅れている。その最も大きな理由は、MDVは細胞随伴性が強く、子ウイルスは細胞内にとどまり、培養上澄には放出されない点にある。近年、遺伝子工学の応用により、ようやくウイルスのDNAレベルでの解析が可能になったが、遺伝子産物の機能については、まだ十分な解明はなされていないのが現状である。

本研究の目的は、MDVの分子レベルでの解析を行い、MDVの感染防御に関与する抗原タンパクを同定することである。本論文では、特にMDV major envelope glycoproteinであるglycoprotein B(gB)およびglycoprotein L(gL)の機能・生理活性、さらに感染防御効果を組換えファウルポックスウイルス(FPV: fowlpox virus)発現システムを利用して解析した。gBは、糖タンパクとしてはヘルペスウイルス間で最も良く保存さ

れている。HSV-1の研究より、gBはウイルスの宿主細胞への侵入、cell-to-cell fusionの機能を有していることが明らかになっている。さらに、宿主の感染防御に關与する免疫応答のターゲットであることが示唆されている。gLは、HSV-1の10番目の糖タンパクとして同定された。HSV-1 gLはcell-to-cell fusionに關与しており、ウイルス増殖に必須タンパクであると考えられている。

本研究で利用した組換えFPV発現システムは、ファウルボックスウイルスをベクターとして主に家禽のウイルス性疾病の解析を目的として開発された。この発現システムを利用してMDVの遺伝子産物の解析および感染防御効果を調べた。

本論の要約

本研究論文は、4つの研究成果をまとめたもので以下にそれぞれの要旨を述べる。

第1に、MDVワクチン株であるMDV-2、-3のglycoprotein B (gB)遺伝子(gB-2, gB-3)のクローニングを行い、その全塩基配列を決定した。その結果、gB-2、-3遺伝子の予想されるアミノ酸配列は、すでに同定されているMDV-1 gB(gB-1)のそれと比較するとgB-1/gB-2(83%), gB-1/gB-3(82%), gB-2/gB-3(76%)の相同性であり、また3つのgB間では72%の相同性があった。共通の特徴として10ヶ所のシステイン残基、potential N-linked glycosylation siteの8ヶ所が保存されおり、3つのgBは、お互いに非常に類似したコンフォメーションをとっていると予想された。次にこれらgB遺伝子をそれぞれ組換えFPVに挿入し、発現の解析を行った。その結果、組換えFPVで発現したgB遺伝子産物は、ともにMDV感染細胞で発現しているgBと同一分子量であった。gB-1とgB-3は、アミノ酸配列より予想される分子量ではほぼ同一であるにもかかわらず、MDV感染細胞で発現したgB-1とgB-3とは分子量に相違があった。Endoglycosidaseを用いた解析の結果よりgB-1とgB-3の分子量の差は、糖鎖修飾の程度に相違があることを明らかにした。

第2に、MDV-1 gBのproteolytic cleavage siteの同定およびその特異性について解析を行った。MDV-1 gBの開裂部位とその特異性を解明するために予想される開裂部位(Arg-Leu-Arg-Arg)に存在する3つのアルギニン残基をそれぞれアラニン残基に置換し、組換えFPVを使ってそのmutant gB-1の発現を解析した。その結果、3つのアルギニン残基の置換はすべて開裂を阻害した。また、開裂しないgB-1は、細胞内輸送において小胞体あるいはゴルジ体にとどまることなく、wild type gB-1と同様に感染細胞膜表面に輸送された。すなわち、開裂部位に存在する3つのアルギニン残基はすべて開裂に重要な役割を果たしているが、gB-1の感染細胞膜表面への輸送には開裂は必須過程ではないことを明らかにした。

第3に、中和モノクローナル抗体1AN86のエピトープマッピングおよび組換えFPVの感染防御効果について解析を行った。gB-1に対する中和モノクローナル抗体1AN86は、gB-1と同様にgB-3も認識するが、gB-2とは反応しない。1AN86が認識する中和エピトープを解析するために2種類のgB-1/gB-2キメラ遺伝子を挿入した組換えFPV

を構築した。キメラタンパク gB21-SphI は、N 末端半分の gp60 が gB-2 由来 (gp60-2)、C 末端半分の gp49 が gB-1 由来 (gp49-1) より成っている。キメラタンパク gB12-SphI は、N 末端半分の gp60-1、C 末端半分の gp49-2 より成っている。1AN86 は gB21-SphI と反応したが、gB12-SphI とは反応しなかった。この結果より 1AN86 が認識する中和エпитープは、gp49-1 に存在していることを明らかにした。次に、gB の発現解析に用いた一連の組換え FPV について、*in vivo* で感染防御効果を比較した。その結果、recFPV-gB1 の感染防御率が 90% であるのに対し、recFPV-gB2 (55%)、recFPV-gB3 (33%) の感染防御率は有意に低かった。一方、キメラ gB21-SphI の感染防御率 (90%) は、予想通り gB-1 と同程度に高い感染防御率を示し、gB-2 に導入した gB-1 の中和エпитープが感染防御に重要な役割を果たしていることを明らかにした。また開裂しない mutant gB-1 も wild type gB-1 と同程度に高い感染防御率を示し、開裂の阻害は、gB-1 の免疫原性には影響を与えないことを明らかにした。

第 4 に、MDV-1 のゲノム DNA の BamHI-D 断片の DNA 塩基配列の解析を行い、HSV-1 の glycoprotein L (gL)、UL2、UL3 遺伝子と相同性のある 3 つの open reading frame (ORF)、MDV gL、UL2、UL3 ORF を同定した。同定した 3 つの遺伝子のうち gL 遺伝子について MDV-1 感染細胞での発現を確認した。MDV-1 gL は分子量 25,000-Da の糖タンパクで、PNGase F で糖鎖を除去すると分子量は、18,000-Da に減少した。この結果は、アミノ酸配列より予想されるシグナルペプチドの開裂部位、2ヶ所の N-linked glycosylation site を考慮した分子量と一致した。さらに gL 遺伝子を挿入した組換え FPV を構築し、発現の解析を行った結果、組換え FPV で発現した gL 遺伝子産物 (recombinant gL) は native gL と同じ分子量であったが、糖鎖修飾に明らかな相違が確認された。native gL は小胞体からゴルジ体、さらに細胞膜表面に輸送されるのに対し、recombinant gL は小胞体にとどまりゴルジ体での糖鎖修飾は受けていないことが明らかになった。すなわち、gL の正常な糖鎖修飾、細胞内輸送には MDV-1 の他のタンパクが関与していると考えられる。

まとめ

ウイルス病に果たしてきたワクチンの役割は大きく、多くのウイルス感染症がワクチンにより予防されてきた。マレック病もその1つである。マレック病は、養鶏産業に多大な損害を与えており、その防疫のためには、ワクチンが不可欠である。本研究では、遺伝子工学の手法を用いて MDV の抗原タンパクの発現解析等の基礎研究を行った。得られた科学的データは今後、社会に寄与する新規 MDV ワクチンの開発へと応用されるであろう。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 杉 本 和 則

副 査 教 授 盛 田 フ ミ

副 査 教 授 生 田 和 良

学 位 論 文 題 名

マレック病ウイルスの主要抗原の遺伝子同定と組換え ファウルボックスウイルスを利用した遺伝子産物の解析

マレック病ウイルス (MDV) は、ニワトリに感染して、伝染性悪性リンパ腫の原因となるウイルスである。MDVはヘルペスウイルス科に属しており、血清型によって、3種類に分類されている。腫瘍原性が強く病因ウイルスであるMDV-1と、病原性を示さず混合生ワクチンとして現在使用されているMDV-2、MDV-3がある。ワクチン株は、持続感染を起こし、強毒ウイルスの重感染を防御できず、ウイルスの排泄は続くが、腫瘍形成を阻止するので、広く利用されている。しかし、ウイルスの感染を防御し、ウイルスの増殖をなくし、さらに簡便で、安全なワクチンの開発が望まれている。

組組換えDNA作製によるモザイク蛋白質の形成や、DNAの塩基置換による変異蛋白質の作製などの遺伝子操作の技術は、新しいワクチンの開発にも有力な手段を与えた。

申請者は、鶏痘のワクチンとして使用されているファウルボックスウイルス (FDV) に、MDVの主要抗原でありウイルスのエンベロープ蛋白質である糖蛋白質B (gB) の遺伝子を挿入して、感染を防御するワクチンとすることを試みた。

gBは宿主細胞へのウイルスの侵入や、細胞融合の機能を有していることが明らかになっている。

MDV-1のgB遺伝子はすでに塩基配列が決定されており、新たにMDV-2、MDV-3のgB遺伝子をクローニングし、その塩基配列を決めた。3つのgBのアミノ酸配列に72%の相同性を認め、8か所の糖鎖結合部位は保存されており、高次構造もお互いに類似していると予想される。

g B 蛋白質は合成後、2つのポリペプチド鎖に開裂するが、細胞表面では複合体を形成して存在している。開裂部位の、 $-Arg-Leu-Arg-Arg-$ の3つのArgをそれぞれAlaに変換した遺伝子を作製し、その影響を調べた。いずれのArgの変換も開裂を阻害した。しかし、開裂しないg Bも開裂した蛋白質と同様に感染細胞の表面に輸送されるので、輸送には開裂は必須の過程ではないことが明らかになった。

MDV-1に対する中和モノクローン抗体1A86の存在が知られているが、そのエピトープとなる範囲を決めることができた。抗体1A86はMDV-1、MDV-3のg Bと反応するが、MDV-2のg Bを認識できない。いろいろなキメラ遺伝子を挿入したFPVの解析から、中和エピトープはg B蛋白質のC末端部分に存在することが明らかになった。従って、この部分を持つキメラ蛋白質を発現しているFPVは、高い感染防御率を示し、ワクチンとしての有効性を確認できた。

MDVには、g B以外にも多くの糖蛋白質が存在している。その中で糖蛋白質Lはウイルス増殖に必須で、細胞融合に関与している。この糖蛋白質の緒性質についての解析を行った。

ウイルス病に対するワクチンの有効性はいうまでもなく、数多くの例がある。マレック病もその1例である。養鶏業には必須のワクチンになっている。しかし、ワクチンはウイルスによる病状を抑えるだけではなく、感染を防御して、結果として病因ウイルスの撲滅へと進むことが望ましい。遺伝子操作の技術に期待が集まっている。しかし、組換えDNAの手段によって作製したウイルスの安全性も十分に配慮されなければならない。そのためには、基礎的な研究による豊富な知識の蓄積が重要となる。申請者の研究は、安全で、より有効なワクチン開発への道を開くのに重要な貢献をしたと評価することができる。学力試験、語学試験の結果も満足すべきものであり、最終試験にも合格した。よって審査員一同は、申請者が博士（理学）の学位を得るのに十分な資格があると認めた。