

学 位 論 文 題 名

Study on ecology and pathogenicity
of Newcastle disease viruses

(ニューカッスル病ウイルスの病原性と生態に関する研究)

学位論文内容の要旨

ニューカッスル病ウイルス(NDV)は発育鶏卵や鶏に対する毒力によって強毒株、中等毒株および弱毒株に分けられる。NDV のエンベロップ上には2種類の糖蛋白、膜融合(F)蛋白とヘマグルチニン-ノイラミニダーゼ(HN)蛋白が存在する。F蛋白は感染細胞内で非活性型前駆体 F₀ として合成され、蛋白分解酵素によって F₁ と F₂ に開裂し、活性化される。NDV が細胞に感染するためには、F蛋白の開裂活性化が必須である。F蛋白は開裂部位のアミノ酸配列によって開裂性が異なり、強毒型 (RRQRR-FI ないし RRQKR-FI) と弱毒型 (GRQGR-LI) に分けられる。強毒型の配列を持ったF蛋白は細胞内の酵素で F₀ が開裂した後ウイルス粒子に取り込まれる。一方、弱毒型のF蛋白は細胞内では開裂できず、非活性型の F₀ がウイルス粒子に取り込まれる。このため、強毒型のF蛋白を持ったNDV はあらゆる組織で増殖可能であるのに対し、弱毒型のF蛋白はトリプシン様の蛋白分解酵素が分泌されている気管などの組織でのみ増殖可能である。したがって、NDV の病原性にはF蛋白の開裂性が大きく関与している。一方、中等毒株である Beadette C や弱毒ワクチン株である Komarov は鶏に対して病原性が低いにもかかわらず、F蛋白の開裂部位は強毒型である。したがって、NDV の病原性にはF蛋白の開裂性のみならず、その他の因子も関与していると考えられる。

本研究ではNDVの病原性に関わる因子を明らかにするため、鶏に対して病原性が低い弱毒ワクチン株 TCND とその親株である強毒の California 11914 (CAL)の生物性状と各々の糖蛋白の生物活性ならびに遺伝子を比較した。TCND はトリプシン非存在下で MDBK 細胞単層培養にプラークを形成した。TCND のF蛋白の開裂性を調べたところ、CAL と同程度であった。また、開

裂部位のアミノ酸配列に変異は認められなかった。これらの成績は TCND の弱毒化は F 蛋白の開裂性以外によることを示している。TCND は 41.5℃ で培養すると増殖性が著しく低下したことから温度感受性変異株と考えられた。一方、TCND を接種した発育鶏卵を 41.5℃ で長期間培養することによって非許容温度で増殖可能な復帰変異株が得られた。そこで、TCND、CAL および復帰変異株を用いて、TCND の温度感受性に関わる因子の同定を行った。その結果、いずれの株においても両温度間でウイルス RNA および蛋白合成に差は認められなかった。次に、ウイルス感染細胞の赤血球吸着活性を調べた。CAL および復帰株の 41.5℃ における赤血球吸着活性は 35℃ のその 2 ～ 3 倍であったのに対し、TCND は約 1/3 に低下していた。この成績は HN 蛋白の感染細胞表面への輸送が阻害されていることを示唆する。さらに、各々の感染細胞の細胞融合活性を調べたところ、CAL は 41.5℃ で 35℃ の 3 倍の活性を示したのに対し、TCND は同程度、復帰変異株は同程度ないし 2 倍の活性であった。また、TCND と復帰株の細胞融合活性はいずれの温度においても CAL の 1/2 以下であった。膜蛍光抗体染色の結果、41.5℃ で培養された TCND 感染細胞では HN 蛋白の細胞膜への輸送が阻害されていることが確かめられた。CAL および復帰変異株では HN 蛋白の輸送に両温度間で差は認められなかった。F 蛋白の輸送はいずれのウイルスにおいても差が認められなかった。35℃ と 41.5℃ で感染細胞から放出された TCND 粒子を比較したところ、非許容温度で増殖した粒子は HN 蛋白を欠くことが分かった。TCND と CAL の HN 蛋白のアミノ酸配列を比較したところ、3ヶ所に置換が認められた。温度感受性復帰変異株ではこれらのうちの 1 つ Thr435→Ile435 が CAL 型に復帰していたことから、この変異が 41.5℃ における HN 蛋白の輸送に関連する可能性がある。F 蛋白のアミノ酸配列では TCND と CAL の間で 2ヶ所の置換が認められた。これらはいずれも F₁ のアミノ末端付近に存在し、復帰変異株にも保存されていた。F₁ のアミノ末端はウイルスが感染細胞内に侵入する際に細胞膜と相互作用する部位にあたる。したがって、これらの変異が TCND と復帰変異株の低い細胞融合活性に関連する可能性がある。TCND、CAL ならび温度感受性復帰株の病原性を比較した結果、復帰株では胎子に対する病原性はほぼ CAL と同等にまで復帰したのに対し、1 日令雛、6 週令鶏に対する病原性は部分的に回復したのみであった。以上の成績から、TCND は温度感受性変異のため弱毒化したことが分かった。また、NDV の病原性には F 蛋白の開裂性のみならず細胞融合活性の強弱が関与する可能性が示された。

ニューカッスル病(ND)は鶏や鳩の間で大流行を繰り返し、現在も世界中で流行が認められる。一方、NDV は世界各地の野鳥から分離されているがその多くは弱毒株である。そこで、自然界における NDV の存続機構ならびに野鳥のウイルスと家禽に流行を繰り返すNDとの関連を明らかにするため、水禽類の営巣地であるアラスカおよびシベリアにおいてカモの糞を採取し、NDV の分離を試みた。その結果、様々な営巣地点で採取した糞便から 47 株の NDV が分離された。これらの株のF蛋白の開裂性を推定するため、MDBK 細胞におけるプラーク形成能を調べた。分離株はすべてトリプシン非存在下でプラークを形成しなかったことから、これらのウイルスのF蛋白の開裂性は弱毒型であると考えられた。また、発育鶏卵、1日令雛および6週令鶏に対する病原性を調べたところ、胎子に対して強毒株と同程度の毒力を示す株が29株存在した。しかしながら、いずれも雛および鶏に対して病原性を示さなかったことから、分離株はすべて弱毒株であると考えられた。分離株のF蛋白の開裂部位のアミノ酸配列を解析した結果、5株が強毒型のアミノ酸配列を有することが分かった。また、F蛋白遺伝子の塩基配列に基づいて進化系統解析を行ったところ、一部の分離株は強毒株に遺伝子的に近縁であること、ならびにアラスカで分離された株は様々な系統に属することが分かった。すなわち、北極圏に隣接するアラスカやシベリアの水禽類の営巣地には多様な NDV が分布していることが示された。また、F蛋白のアミノ酸配列が強毒型であるにもかかわらず鶏に対して弱毒であった分離株が、鶏卵で継代されることによって毒力がわずかながら上昇することが見出された。これらの成績は、北方の水禽類の営巣地に維持されている多種多様な NDV が渡りの過程で鶏に侵入し、その集団の中で継代されることによって強毒株に変異する可能性を示唆する。

本研究の成績はNDVの病原性規定因子にはF蛋白の開裂性のみならず、温度感受性、細胞融合活性などが複雑に関連していることを示している。また、北極圏に隣接する水禽類の営巣地において多種多様な NDV が野生のカモの間で保存されていることが分かった。これらのNDVの多くは弱毒株であるが、鶏の間で継代されることによって病原性規定因子のいずれかに変異が生じ、毒力を獲得する可能性が示された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 喜 田 宏
副 査 教 授 高 島 郁 夫
副 査 教 授 梅 村 孝 司
副 査 助 教 授 岡 崎 克 則

学 位 論 文 題 名

Study on ecology and pathogenicity of Newcastle disease viruses

(ニューカッスル病ウイルスの病原性と生態に関する研究)

ニューカッスル病ウイルス (NDV) の病原性は宿主細胞内プロテアーゼによるエンベロープ膜融合 (F) 蛋白の開裂活性化と関連する。F 蛋白の開裂活性化酵素に対する感受性は同分子開裂部位のアミノ酸配列によって決まる。

弱毒ワクチン株 TCND とその親株である強毒 California11914 (CAL) の F 蛋白の開裂部位のアミノ酸配列を比較解析した結果、両者とも同じ易開裂型であることが判明した。一方、TCND は鶏の体温である 41.5℃では増殖性が低い温度感受性変異株であることが明らかとなった。TCND のヘマグルチニン-ノイラミニダーゼ (HN) 蛋白には、435 番目のアミノ酸の変異が認められた。これが 41.5℃における細胞膜への輸送阻害に関与するものと考えられる。TCND の F 蛋白にはウイルスが感染細胞に侵入する際に重要な部位に 2 ヶ所の変異があり、TCND の細胞融合活性が低いことと関連するものと推察される。TCND から得た温度感受性復帰変異株は鶏胚に対する病原性を回復したが、雛や鶏に対する毒力はほとんど示さなかった。以上の成績は、TCND は HN 遺伝子の温度感受性変異と F 遺伝子の細胞融合活性低下変異のため弱毒化したことを示している。

アラスカやシベリアに営巣する水禽から分離した NDV 49 株中 29 株は鶏胚に対して病原性を示したが、雛および鶏に対しては毒力を示さなかった。調べた 15 株中 5 株の F 蛋白の開裂部位のアミノ酸配列は強毒型であった。また、これらの NDV 株を進化系統解析した結果、多様な NDV が自然界の水禽に分布していることが明らかとなった。これらの NDV は家禽に侵入し、病原性を獲得する可能性があるものと考えられる。

以上の成果は NDV の病原性発現に F 蛋白の開裂活性化は必要条件ではあるが、

さらに温度感受性および細胞融合活性など他の因子が関与することならびに自然界には家禽に侵入して毒力を獲得し得る様々な NDV が分布していることを明らかにした。よって審査員一同は高桑弘樹氏が博士（獣医学）の学位を受ける資格を有するものと認めた。