

新規コドン変換技術を用いた鶏ウイルス病ワクチンの開発

岡山理科大学獣医学部・准教授 渡辺 俊平

■ 目 的

同じアミノ酸をコードするものの、1塩基変異の導入によって終止コドンに変化するコドン(1-to-stop コドン)を選択的に使用するように遺伝子配列を変換した、組換え RNA ウイルスは親株と比較して弱毒化することが近年報告されている(Moratorio et al., 2017)。そこで本研究では、同一アミノ酸をコードする各コドンのうち、アミノ酸の性質を大きく変える“危険コドン”を特定することを目的とした。続いて、ある遺伝子のアミノ酸配列に変化なく、候補コドンの全てを危険コドンに置換した「コドン改変ウイルス」を作製して弱毒化ワクチンを作製することを目指した。コドン改変ウイルスは親株と同一アミノ酸をコードするため、当初は同様に増殖できる。しかし遺伝子変異の蓄積を介して、標的遺伝子蛋白質の構造科学的安定性は大きく損なわれる。標的ウイルス、および遺伝子にはニューカッスル病ウイルス(NDV)のHN およびF 遺伝子を選択した。両遺伝子は、ウイルス細胞侵入過程において、細胞受容体への結合と膜融合を担う。NDV を含むパラミクソウイルスの膜融合のレベルは上昇しても下降してもウイルスの fitness に負に働くことが示唆されている。そのため両遺伝子に危険コドンが導入されることで病原性の低下が期待される。

■ 方 法

NDV Herts/33 株の全長 cDNA 配列を含む pOLTV5 を Ben Peters 博士より分与を受けて、ハンマーヘッドリボザイム配列を導入した全長プラスミドを作製した。これに加えて、同株のNP, P, L蛋白質を発現するサポートプラスミドをBHK-T7細胞にトランスフェクトして組換えウイルスの合成を行った。一方で、遺伝子配列中の候補コドンを危険コドンに変換する新規プログラムをpythonで記述した。

■ 結果および考察

改変全長プラスミドを利用することで、組換えNDVが効率的にレスキューされた。培養上清をDF-1細胞に感染させたところ明瞭なCPEが確認された。また危険コドンの特定のために、化学性状に基づき20アミノ酸を様々な観点でグループ分けした。そこで1塩基変異の導入に伴い、化学性状の遠いグループにアミノ酸が変化する場合には高い点数を与えて全ての場合を計算した。その結果、高い総得点を示す危険コドンが、いくつかのアミノ酸において特定された。そこで、ある遺伝子のコーディング配列を投げかけた場合に、該当アミノ酸の候補コドンを全て危険コドンに変換するプログラムを作製した。同プログラムを用いて、Herts/33株のF遺伝子の候補コドンを全て危険コドンで置換した配列、F dangerを入手した。同配列を受託人工合成後、オーバーラップPCR法を用いて全長ゲノム(pHHRz-FL-Herts-F danger)配列を制限酵素PacI, SpeIで切断した断片を含むバックボーンプラスミドを作製した。現在、pHHRz-FL-Herts-F dangerを作製中である。同様に、pHHRz-FL-Herts-HN dangerを今後作製する。これらを用いて、コドン変換ウイルスを今後作製して、発育鶏卵への接種継代により、各継代ウイルスの病原性を評価したい。

■ 結 語

RNAウイルスゲノムが素早く進化していく性質を逆手に取った、新しい弱毒化ウイルス集団作製法の確立を目指して、危険コドンを含む組換えNDVを作製する基礎技術を開発した。今後、コドン変換NDVの病原性を評価することによって、本研究で提唱する新しい弱毒ワクチン作製技術の有効性を確認することが可能となる。