

家畜ロタウイルスの高病原性遺伝子マーカーの同定

大阪大学微生物病研究所ウイルス免疫分野・准教授 金井 祐太

■ 目的

ロタウイルスは、ウシ、ブタ、ウマなどの産業動物の幼獣に重篤な水様性の下痢を引き起こし、家畜の下痢症の主要な原因の一つとなっている。ウイルスの遺伝子操作系は、ウイルスゲノムをコードする DNA や RNA を細胞にトランスフェクションすることで任意の遺伝子変異を持つ組換えウイルスを作製出来ることから、ウイルスの分子生物学研究には欠かせないものとなっている。本研究では 2017 年に日本国内で下痢を呈した乳牛から分離されたウシロタウイルス KM1 および KM3 株を用いた遺伝子操作系の確立を試み、ウシロタウイルスの増殖能に関与するウイルス遺伝子の同定を試みた。

■ 方法

ウイルスおよび細胞

ウイルス材料として、2017 年に岐阜県の農場で下痢を呈したウシから分離されたウシロタウイルス KM1 および KM3 株から 11 分節二本鎖 RNA ゲノムを精製し、cDNA をプラスミドにクローニングした。プラスミドからの正確なウイルス RNA の転写のため、各ウイルス遺伝子上流には T7 プロモーターを配置し下流には D 型肝炎ウイルス由来のリボザイム配列を配置した。ロタウイルスの 11 遺伝子分節をそれぞれコードする 11 種のプラスミドを T7 ポリメラーゼ発現細胞である BHK T7 細胞にトランスフェクションし、トリプシン (0.5 μ g/mL) を添加した DMEM 培地で培養することで遺伝子組換えロタウイルスを得た。

■ 結果および考察

ウシロタウイルス遺伝子型の解析

2017 年に岐阜県の農場で分離されたウシロタウイルス KM1 株と KM3 株の抗原性決定基である VP7 および VP4 遺伝子の系統樹解析を行ったところ、VP7 遺伝子については両株で塩基配列が完全一致しており G6 型であった。また VP4 遺伝子は両株とも P[5] 型であり、両株ともにウシロタウイルスとして日本では優勢に検出されている G6P[5] 型であった。次に KM1 および KM3 株の遺伝子操作系確立の為、KM1 もしくは KM3 由来の遺伝子を含むそれぞれ 11 種のプラスミドを同時に BHK-T7 細胞にトランスフェクションしたところ、人工合成ウシロタウイルス KM1 および KM3 株が得られ、それぞれ rKM3 (recombinant KM3) および rKM1 と名付けた。

ウシロタウイルスの増殖能に関連する遺伝子の同定

人工合成によって得られた rKM1 株と rKM3 の培養細胞における増殖能は同等であったが、rKM1 と比較し rKM3 は顕著に大きなプラークを形成した。KM1 株と KM3 株のプラーク形成能に関与するウイルス遺伝子特定のため、KM3 株をバックボーンとし KM1 株の任意の遺伝子分節を一つだけ持ったリアソータント (遺伝子交換体) ウイルスを作成したところ KM1 の VP1, VP3, VP4 NSP2 遺伝子を単独で KM3 株に導入した際にプラーク形成能の低下傾向が認められたが、親株である KM1 株および KM3 株間ほどの顕著な差は見られなかったため、複数のウイルス遺伝子が関与している可能性が考えられた。

■ 結語

ロタウイルスはウシ、ブタ、ウマなど様々な家畜の幼獣に重篤な下痢症を引き起こし、公衆衛生上極めて重要なウイルスである。11 分節二本鎖 RNA ゲノムを持つロタウイルスはゲノム構造が複雑なことから遺伝子操作系の確立が遅れ、分子生物学的研究の障壁となっていた。本研究ではウシロタウイルスの遺伝子操作系の確立に世界で初めて成功し、ウイルス増殖能や細胞変性に関与するウイルス遺伝子の解析に応用できることを示した。本研究成果により今後家畜ロタウイルスの病原性解析のみならず、分子疫学調査やワクチン開発等、幅広い分野での発展が期待される。