

牛パラミクソウイルス感染症の革新的ワクチン改良技術の構築

鹿児島大学共同獣医学部附属越境性動物疾病制御研究センター・准教授 松本 祐介

■ 目的

パラミクソウイルス科には重要な病原体が多数含まれる。遺伝子操作によるウイルス弱毒化技術は、パラミクソウイルス感染症に対する弱毒生ワクチン開発に繋がる。これまでに我々はヒトパラインフルエンザウイルス (HPIV) を例として、ワクチン開発を目指したウイルス弱毒化技術の開発を進めてきた。本研究では、ヒト感染症の研究で得られた知見を産業動物感染症へ応用するべく、牛パラインフルエンザウイルス (BPIV) を対象としたウイルス弱毒化技術の構築を目指した。

■ 方法

BPIV のゲノム RNA は核蛋白質 (NP) によって覆われている。HPIV の実験で、NP の 202 番目のグルタミン (Q202) に変異を持つウイルスは増殖効率が減弱し、異常な長さの RNA を合成し宿主免疫応答を刺激する。これがウイルス弱毒・高免疫原性を同時に達成できるワクチン開発技術であるため、この手法を BPIV に応用する。感染性 BPIV 作製に先立ち、ウイルスゲノムにレポーター遺伝子を組み込んだミニゲノムを作製し、NP Q202 変異が BPIV ポリメラーゼ活性に与える影響を調べた。HPIV NP Q202 変異による異常 RNA 合成は、ゲノムの長さが本来と異なるものを認識して増幅することに起因するため、様々な欠損変異を持つ BPIV のミニゲノムを作製し Q202 変異型 NP によるポリメラーゼ活性を調べた。

ウイルスのゲノム複製プロモーターはゲノムの末端に保存領域として存在し、ウイルスはこの部分への変異を許容できない。我々は全てのパラミクソウイルスのゲノム配列の網羅的解析を行い、ゲノムの内部にプロモーターとして機能する別の領域の存在を探索した。得られたデータに基づき、BPIV のミニゲノムを用いてウイルスのゲノム内部プロモーターの欠損体を作製し、ウイルスポリメラーゼ活性を調べた。

■ 結果および考察

BPIV のミニゲノムを用いて、NP Q202 アラニン置換変異体 (Q202A) によるポリメラーゼ活性の変化を調べた。通常型の BPIV ミニゲノムに加えて、長さを変更した変異ミニゲノムを用いた解析を行った。HPIV の場合、NP Q202A 変異によってミニゲノム複製活性が増強し、変異ミニゲノムでも複製できるようになる。これがウイルスの弱毒化・高免疫原性の指標である。BPIV の場合、NP Q202A 変異によってポリメラーゼ活性の増強は起こらず、また本来の長さとは異なるミニゲノムを複製できる活性は認められなかった。

パラミクソウイルスのゲノム配列について、ゲノム内部に複製プロモーターとして機能し得る配列を網羅的に探索した結果、BPIV ゲノム上には、ゲノム複製速度を調節する第二プロモーター領域が存在することがわかった。BPIV ミニゲノム実験を行い、この部位を 6 塩基ごとに欠損させることで 3 段階に BPIV のゲノム複製速度を調節できることがわかった。

■ 結語

本研究では、BPIV を題材としてウイルス弱毒化手法を検討した。これまでの解析により、HPIV で見られた NP Q202A 変異では弱毒・高免疫原性は達成できないと考えられたため、NP への変異の加え方を検討する必要があるとわかった。続いてウイルスのゲノム複製を調節するゲノム内部プロモーターを見出し、この部位への変異によって任意の速度にウイルス増殖を調節することができた。全てのパラミクソウイルスはこの内部プロモーターを持つため、本ウイルス増殖速度制御法は多くのパラミクソウイルスに適応できると考えられる。