

氏 名	佐 藤 秀 樹
学位(専攻分野)	博 士 (工 学)
学 位 記 番 号	博 甲 第 227 号
学位授与の日付	平成 12 年 7 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	工芸科学研究科 材料科学専攻
学位論文題目	The molecular biological investigation of yellowtail ascites virus and application for subunit vaccine
審 査 委 員	(主査) 教 授 原 三 郎 教 授 梶 原 莞 爾 教 授 伊 倉 宏 司 助教授 森 肇 助教授 亀井加恵子

論 文 内 容 の 要 旨

魚類養殖産業における魚病の予防や治療を目的とした化学療法剤の使用を低減するため、ウイルス病に対するコンポーネントワクチンの作製を試みた。

Yellowtail Ascites Virus (YAV)は稚魚期のブリに感染し、腹水症および脾臓壊死症により大量死をもたらす病原ウイルスである。YAVはビルナウイルス科に属し、本鎖のRNA (segment AとB)をゲノムとして持っている。大きい方のsegment Aにはカプシドタンパク質VP2およびVP3とプロテアーゼNSの3種のタンパク質がコードされており、小さい方のsegment BにはRNAポリメラーゼVP1がコードされている。このsegment AのmRNAはポリシストロニックに合成され、産物はポリプロテインとして翻訳され、これがNSタンパク質によってプレVP2とVP3に分割される。プレVP2はプロテアーゼにより成熟型VP2に変換され、VP3とともにウイルス粒子を形成する。

segment Aの遺伝子解析を行ったところ、segment Aは3090bpから構成され、2916bpのORFを含んでいることが明らかとなった。一方、segment Bは2775bpから構成され、RNAポリメラーゼをコードすると推定される1つのORFが認められた。segment AとBの3'および5'-noncoding regionには特異的配列が存在しており、ゲノムの複製や翻訳開始に関与していると推定された。

YAVに対するサブユニットワクチン作製のために、segment Aの特異的部位 (1, segment A、2, VP2 epitope、3, pVP2/NS、4, NS/VP3領域)を含んだ4種類のリコンビナントバキュロウイルスを作製した。segment A、pVP2-NS、NS-VP3領域を発現させた場合、それぞれのポリタンパク質が昆虫細胞内でウイルスプロテアーゼNSによりVP2、NS、VP3にプロセッシングされたことが確認できた。NS/VP3領域を発現された場合、VP3に相当する31kDaタンパク質が検出され、この31kDaタンパク質のN末端配列の解析からNSプロテアーゼがAla-Serを認識しているものと推定された。VP2エピトプタンパク質を発現させた場合には、 1×10^6 個の細胞から100 μ gに達するほど大量のタンパク質が得られた。

ブリ稚魚に発現タンパク質を腹腔内注射し、10日間飼育した後、YAVに感染させた。コントロールとして用いた不活化YAV (ホルマリン処理) とsegment Aとタンパク質で免疫した群の生存率はいずれも97%で、サブユニットワクチンとして有効であることが明らかになった。これに対してVP2 epitope、pVP2-NS、NS-VP3タンパク質で免疫した場合は効果が低く、ワクチンとしての有効性は低かった。また、pVP2/NSとNS/VP3タンパク質の両方を同時に用いて免疫した場合もワクチンとしての効果は低かった。

本研究の結果により、YAVに対するサブユニットワクチンの開発が可能であることが明らかになった。

segment Aタンパク質を昆虫細胞内あるいは昆虫体内で生産させた場合、YAVの遺伝子を含んでいないことから安全であり、ワクチン生産コストが低いことなどから実用化の可能性は極めて高い。

以上の論文内容は、下記学術雑誌に掲載されている。

1. Cloning and expression of yellowtail ascites virus segment A

H. Sato, E. Emoto, T. Kamata, H. Mori, K. Kamei, A. Kitaoka, R. Takano, Nakajima, Y. Inui, K. Kudo, and S. Hara

Archives of Virology (1999) 144, 1405-1413

2. Expression of YAV proteins and vaccination against viral ascites among cultured juvenile yellowtail

H. Sato, K. Nakajima, Y. Maeno, T. Kamaishi, T. Kamata, H. Mori, K. Kamei, R. Takano, K. Kudo, and S. Hara

Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry (2000) 64 (7), 1494-1499

論文審査の結果の要旨

本論文はブリ稚魚に感染し、腹水症および脾臓壊死症を引き起こす Yellowtail Ascites Virus に関して、

1) ウイルスゲノム RNA の segment A および B の全塩基配列の決定、2) segment A 構成遺伝子の昆虫細胞-バキュロウイルス発現系によるタンパク質発現、および 3) コンポーネントワクチンとしての有効性の実証、で構成されている。

サケ科およびニワトリのビルナウイルスのゲノム塩基配列が明らかにされているが、ブリのビルナウイルスの塩基配列が明らかにされたのは本論文が最初のものである。申請者は YAV ゲノムの 2 本鎖 RNA のうち segment A に含まれる 3 種のタンパク質の遺伝子を適宜組み合わせ、昆虫細胞-バキュロウイルス発現系で発現し、得られたタンパク質のコンポーネントワクチンとしての有効性を検証した。その結果、segment A 全体を発現させることにより、高い効力を有するワクチン原料が得られることを明らかにした。ヒトを含め、脊椎動物のコンポーネントワクチンで有効なものはわずかししか開発されておらず、魚類では初めての成功例である。

本論文で得られた segment A のタンパク質はそのままブリの病気予防に適用できるものであり、開発された方法は魚類に止まらず、ヒトを含む脊椎動物全体のコンポーネントワクチンの開発に応用することができ、今後の発展が期待できるものである。

以上の通り、本論文は学術的および産業的価値を有するものであり、学位授与に値すると判定した。