

Title	Reverse Genetics for Fusogenic Bat-Borne Orthoreovirus Associated with Acute Respiratory Tract Infections in Humans : Role of Outer Capsid Protein σ C in Viral Replication and Pathogenesis
Author(s)	川岸, 崇裕
Citation	大阪大学, 2016, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/55805
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 ＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"> 大阪大学の博士論文について をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

論 文 内 容 の 要 旨
Synopsis of Thesis

氏 名 Name	川 岸 崇 裕
論文題名 Title	Reverse Genetics for Fusogenic Bat-Borne Orthoreovirus Associated with Acute Respiratory Tract Infections in Humans: Role of Outer Capsid Protein σC in Viral Replication and Pathogenesis (急性呼吸器症状を示したヒトから分離されたコウモリレオウイルスにおけるリバースジェネティクスの確立およびOuter Capsidタンパク質 σC の解析)
論文内容の要旨	
<p>〔目的(Purpose)〕</p> <p>ネルソンベイオルソレオウイルス (NBV) はレオウイルス科オルソレオウイルス属のFusogenicグループに属するウイルスであり、10分節の2本鎖RNAをゲノムとして保持している。NBVは1968年にコウモリから分離されたが、これまでNBVと病原性との関連は不明であった。しかし、近年、重篤な急性呼吸器症状を呈した患者からNBVが相次いで分離され、日本国内においても、申請者のグループがMiyazaki-Bali/2007 (MB) 株の分離を報告した。これらの報告はNBVが種の壁を超え、ヒトへの感染性をもつことを示唆しており、新興の人獣共通感染症として早急な対策が望まれる。しかし、NBVの複製機構ならびに病態発現機序については不明な点が多く、その原因の一つとして、人工的に組換えウイルスを作製できる遺伝子改変技術 (リバースジェネティクス系) の開発の遅れが挙げられる。本研究では、ウイルス学的性状を解析する上で強力なツールとなるリバースジェネティクス系を確立し、細胞表面への吸着、侵入に必須と考えられるOuter Capsidタンパク質σCのウイルス複製、病原性における機能解析を行った。</p>	
<p>〔方法(Methods)〕</p> <p>MB株の全塩基配列を決定し、MB株由来ウイルス遺伝子cDNAをT7プロモーター配列とリボザイム配列の間に配置したプラスミドを構築した。これら10分節のプラスミドをT7RNAポリメラーゼ発現細胞に導入した。培養後、目的とする組換えウイルスをプラークアッセイ法により単離した。作製した組換えウイルス (rsMB) が親株の性状を反映しているかを確認するため、ウイルスゲノム泳動パターンおよび培養細胞での複製能を親株と比較解析した。また、リバースジェネティクス系を用いてσC変異ウイルスを作製し、培養細胞での複製能、感染性およびマウスにおける病原性について解析を行った。</p>	
<p>〔成績(Results)〕</p> <p>10分節のウイルス遺伝子cDNAを細胞に導入したところ、24時間後に3.6×10^4 PFU/mlのウイルス力価が得られた。rsMBは親株と同様のウイルスゲノム泳動パターンを示し、培養細胞でも親株と同様に効率良く複製した。σCのORFを欠損したプラスミドと他の9つのプラスミドを細胞に導入したところ、感染性ウイルスが得られた。得られたσC欠損ウイルスはマウス由来L929細胞において野生株と同程度の複製能、感染性を示したが、ヒト由来A549細胞ではσC欠損ウイルスの感染性は顕著に低下することが明らかとなった。マウスにおける病原性を解析した結果、野生株では80%のマウスが死亡したのに対して、σC欠損ウイルスでは全個体が生存し、病原性が低下していた。</p>	
<p>〔総括(Conclusion)〕</p> <p>本研究ではFusogenicグループで初めてとなるNBVのリバースジェネティクス系を確立した。リバースジェネティクス系を応用し、σC欠損ウイルスの作製に成功した。σC欠損ウイルスを用いた解析から、σCはL929細胞でのウイルス複製には必須ではないが、A549細胞での感染性 (吸着) およびマウスにおける病原性に重要な役割を担っていることを明らかにした。これらの成果は、NBVが<i>in vitro</i>および<i>in vivo</i>の感染において、複数のウイルスリガンド、レセプターを用いていることを示唆しており、オルソレオウイルス属の細胞侵入機構についての新しいメカニズムを提唱した。今後、NBVの細胞侵入機構に関する研究をさらに詳細に行うことで、NBVのヒトにおける高病原性獲得機序の解明につなげたいと考える。</p>	

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 川岸 崇裕	
論文審査担当者	(職) 氏 名
	主 査 大阪大学教授 松浦善治
	副 査 大阪大学教授 塩田達彦
	副 査 大阪大学教授 上田啓次
<p>論文審査の結果の要旨</p> <p>コウモリ由来のネルソンベイオルソレオウイルス (NBV) は、近年、ヒトの急性呼吸器疾患との関連性が報告されている。しかし、NBVの予防・治療法に関する開発研究は進んでいない。任意の遺伝子変異をウイルスゲノムに導入することができる技術 (リバースジェネティクス系; RG系) はウイルス複製機構、病態発現機序を解析する上で強力な手法である。申請者は、急性呼吸器症状を呈した患者から分離されたMiyazaki-Bali/2007株のRG系を開発し、細胞への侵入に必須と予想されるOuter Capsidタンパク質σCの欠損ウイルスの作製に成功した。σC欠損ウイルスの解析から、σCはマウス由来L929細胞を含む多くの細胞への侵入に必須ではないが、ヒト肺由来A549細胞への侵入に重要であることを明らかにした。さらに、NBV感染マウスの解析からσCはNBVの病原性因子であることも明らかにした。これらの成果は、NBVの細胞侵入機構、感染病態機構を理解する上で有用な知見であり、本医学系研究科からの学位授与に相当すると考えられる。</p>	