

令和 元 年 6 月 3 日現在

機関番号：32669

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18796

研究課題名（和文）牛ウイルス性下痢ウイルスが持つ免疫誘導能力の応用に向けた基盤研究

研究課題名（英文）Basic research for application of the immune induction ability of bovine viral diarrhea virus.

研究代表者

塩川 舞（Shiokawa, Mai）

日本獣医生命科学大学・獣医学部・助教

研究者番号：00739162

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000 円

研究成果の概要（和文）：牛ウイルス性下痢ウイルス(BVDV)は、宿主の自然免疫を強力に誘導するEND(-)という準種を有する。本研究は、このEND(-)を利用してBVDVの免疫誘導能を制御している遺伝子領域を解明することを目的とする。

牛由来MDBK細胞で50回継代したEND(-) P.50には3か所、インターフェロン(IFN)耐性END(-)には1ヶ所のアミノ酸変異が生じたことが次世代シーケンスより分かった。この2つのEND(-)は、親ウイルスと比較して自然免疫誘導能が増強していることも培養細胞を用いた実験から明らかになった。これらのアミノ酸変異部位がBVDVの免疫制御能に関与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

BVDVのEND(-)は宿主の免疫応答を強力に誘導するため、ウイルス自身の増殖も負に制御される。ウイルス増殖に負に働く性状を有するEND(-)の生物学的意義は不明であるが、このEND(-)の免疫特性を利用できるのではないかと考えた。

本研究により、BVDVの免疫誘導を制御しているアミノ酸領域を絞り込むことが出来た。これらの情報とリバースジェネティクス技術を活用すれば、BVDVの免疫誘導能を人為的に調節できるようになる。ワクチン等の免疫を付与するツールの作出において重要な情報となるだろう。END(-)の生物学的意義の解明に繋がる基礎的情報も得られ、ペストウイルス研究の進展にも貢献出来たと考える。

研究成果の概要（英文）：Bovine viral diarrhea virus (BVDV) has a quasispecies END(-) that strongly induces the host's innate immune response. The purpose of this study is to elucidate the genetic region that controls the immune induction ability of BVDV using this END(-). It was found from deep-sequencing that amino acid mutations occurred in three sites in END(-) P.50 that had been passaged 50-times in bovine-derived MDBK cells and in one site in the interferon resistant END(-). It was also indicated from experiments using cultured cells that these two END(-) [END(-) P.50 and IFN-resistant END(-)] have enhanced ability to induce innate immunity as compared to the parent virus[END(-) P.0]. It was suggested that these amino acid mutations may involved in the immunoregulatory ability of BVDV.

研究分野：ウイルス学

キーワード：牛ウイルス性下痢ウイルス END(-)ウイルス 準種

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

非細胞病原性の牛ウイルス性下痢ウイルス(BVDV)は、宿主の自然免疫応答を強力に誘導するEND⁻という準種を有する。この準種が有する免疫学的特徴は、ウイルス自身の増殖にも負に作用することがわかっており、END⁻がなぜこのような特性を有しているのか、BVDVの増殖にどのように関わっているのか等、その生物学的意義については不明な点が多く残されている。しかし、宿主の免疫応答を強力に誘導する能力は、動物に免疫活性を付与できるツールとして応用できるのではないかと考え、本研究を着想するに至った。

2. 研究の目的

BVDV/END⁻の応用に向けて、まずは基礎的情報の蓄積を行う。ウイルスを人工的に作出できるReverse Genetics技術とBVDVのEND⁻を用いて、**BVDVの免疫誘導能を制御している遺伝子領域を明らかにすること**を本研究の目的とする。

3. 研究の方法

①免疫誘導能が変化したEND⁻の作出

(A) 培養細胞を50回通過したEND⁻の作出：細胞を繰り返し通過するという選択圧

(B) インターフェロン(IFN)存在下でも増殖可能なEND⁻の作出：宿主免疫応答という選択圧

上記の2通りの外圧によって、END⁻の免疫制御能に変化が生じるように誘導した。(A)で回収したウイルスをEND⁻ P.50、(B)で回収したウイルスをIFN耐性END⁻とする。

②選択圧を受ける前後のEND⁻の比較・解析

・外圧によって選択を受ける前のEND⁻ウイルス(END⁻ P.0とする)と、外圧によって選択を受けたEND⁻ P.50、IFN耐性END⁻の3つを次世代シーケンス解析に供し、遺伝的変化の比較解析を行った。

・END⁻ P.50及びIFN耐性END⁻の免疫学的性状の解析を実施し、END⁻ P.0の性状と比較した。

③見つかった変異部位を有した変異ウイルスの作出(リバーシジェネティクス技術による)及びその性状解析を実施する。

①②③で得られた結果を総合的に判断し、BVDVの自然免疫制御に関与するアミノ酸部位を同定する。

4. 研究成果

①免疫誘導能が変化したEND⁻の作出

(A)細胞通過を50回経たEND⁻ウイルスの回収

MDBK細胞にBVDV/END⁻を感染させ、その上清継代を50回繰り返し行った。感染することで宿主細胞のインターフェロン(IFN)産生が誘導されるため、END⁻の増殖は継代の増加に伴って低下し、最終的には消失する可能性も考えられたが、END⁻はその増殖を維持し、50回の細胞通過後も10^{4.7} TCID₅₀/mLのウイルス力価を維持した(図1)。このP.50(END⁻ P.50)を次世代シーケンス解析に供するウイルス試料とした。

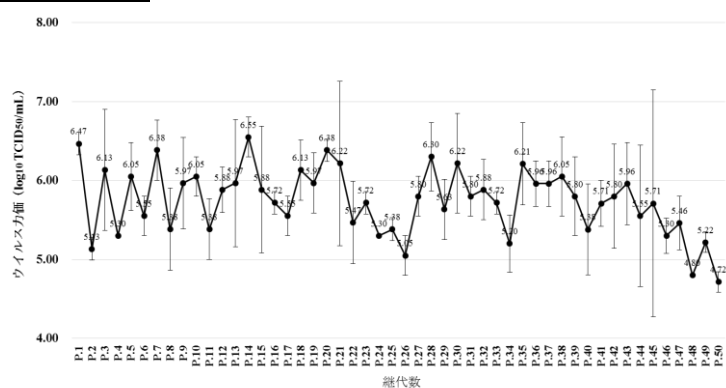


図1：牛腎由来株MDBK細胞で50回継代したEND⁻ウイルスの力価の推移

(B) IFNの存在下でも増殖可能なEND⁻の回収

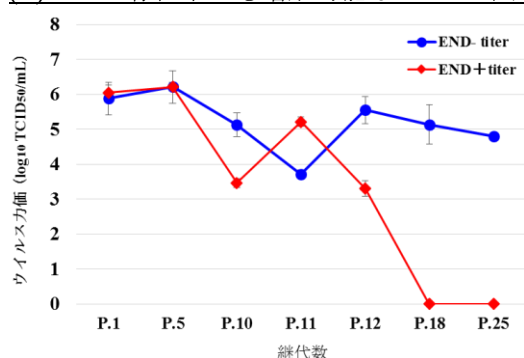


図2：IFN耐性END⁻を回収するまでのウイルス力価の推移

MDBK細胞にEND⁻を感染させ、IFNを添加させた状態でウイルス継代を実施した。また、IFNは継代の度に添加した。P.11で一時的に力価の低下が認められたものの、その後すぐに増殖が回復し、IFNの存在下でも10^{4.0~5.0} TCID₅₀/mLで推移した(図2)。IFN耐性END⁻(P.25; 10^{4.8} TCID₅₀/mL)を次世代シーケンス解析に供するウイルス試料とした。また、感染すると宿主のIFN産生を抑制するEND⁺でも同様の実験を行ったところ、END⁺は、IFNに対して耐性を獲得出来ずに消失することも明らかになった(図2)。以上の結果から、BVDV

が有する2つの準種は、IFNに対する感受性が大きく異なることが本研究から示された。

表 1. END⁻P.50の次世代シーケンス解析結果

Nucleotide position	Viral protein	Reference (vBVD12 ⁻ P.0)	Allele (vBVD12 ⁻ P.50)	Read count	Coverage	Frequency	Amino acid change
93	5'UTR	G	A	82	205	40	—
3229	E2	G	A	133	279	47.67025	Glu → Lys
4722	p7-NS2	A	T	140	375	37.33333	No
4884	p7-NS2	C	T	166	405	40.98765	No
7427	NS4B	C	T	155	406	38.17734	Ala → Tyr
8487	NS5A	C	A	202	250	80.8	Asn → Lys
9600	NS5A	C	T	130	368	35.32609	No

表 2. IFN耐性END⁻の次世代シーケンス解析結果

Nucleotide position	Viral protein	Reference (vBVD12 ⁻ P.0)	Allele (IFN 耐性 P.50)	Read count	Coverage	Frequency	Amino acid change
1736	Erns	A	T	120	131	91.60305	His → Leu
4611	NS2	A	G	82	140	58.57143	No
4620	NS2	A	G	77	128	60.15625	No

END⁻ P.0 の塩基配列と比較し、変異の有無を探索した。変異頻度が 30%以上の遺伝子領域に焦点を当て、更にアミノ酸配列の変異を伴うかどうか調べた。まず、END⁻ P.50 と END⁻ P.0 の結果を比較した (表 1)。

その結果、遺伝子変異は 7 か所で認められ、そのうちの 3 か所がアミノ酸変異を伴うものであった。アミノ酸変異を伴う領域は、E2、NS4B、NS5A であり、いずれの変異箇所も過去に BVDV による自然免疫応答との関連は報告されていなかった。これら 3 つのアミノ酸変異の中でも非構造タンパク質である NS5A に存在する変異は、変異頻度が 80.8%であり、END⁻ P.50 の 8 割以上がこの変異を有していることが次世代シーケンスの結果より示された。

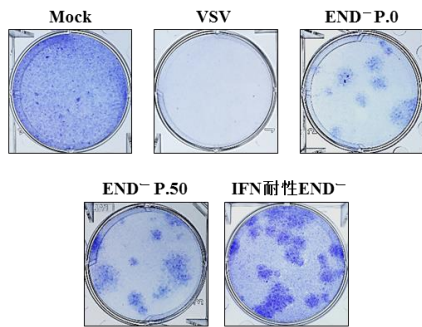
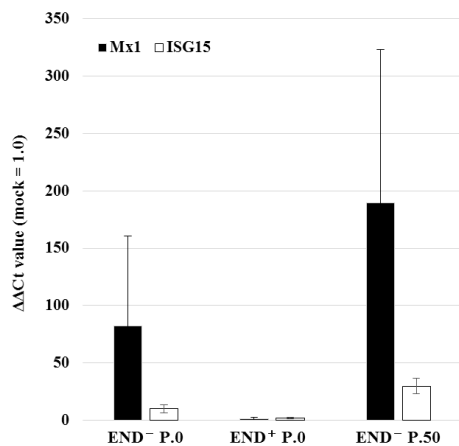
図 3 : END⁻ P.50及びIFN耐性END⁻によって形成された逆ブラック

図 4 : 感染細胞内の自然免疫関連遺伝子の発現

END⁻の性状を保持していることを証明するために、自然免疫誘導能をより詳細に調査した。まず、END⁻ P.50 及び IFN 耐性 END⁻感染細胞内において自然免疫関連遺伝子 (ISG15 及び Mx1) の発現が誘導されるかどうかリアルタイム PCR 法で調べた。各ウイルス感染から 12 時間後に測定を行ったところ、感染によって宿主細胞の IFN 産生を抑制する END⁺感染細胞では、Mx1

②選択圧を受ける前後のEND⁻の比較・解析

①の(A)で得られたEND⁻ P.50 及び(B)で得られたIFN耐性END⁻を親ウイルスであるEND⁻ P.0と比較・解析した。まず、遺伝子変化があるかどうかを知るために、END⁻ P.50 及びIFN耐性END⁻を次世代シーケンス解析に供し、

IFN耐性END⁻は、遺伝子変異が3か所、そのうちアミノ酸変異を伴うものが1ヶ所存在した(表2)。アミノ酸が変異していたのは、構造タンパク質であるErns領域(変異頻度91.6%)であり、BVDVの自然免疫制御との関連がすでに示されているウイルス蛋白質領域である。しかし、本研究で発見したこのアミノ酸変異部位は、これまでに報告されていない部位であった。

次に、実際にこれらEND⁻ P.50 及びIFN耐性END⁻の免疫学的性状がEND⁻ P.0と比較して変化しているかどうか、培養細胞を用いた実験系で評価した。まずは、END⁻としての性状を保持しているかどうか確認するために、VSV干渉実験を実施した。END⁻が感染すると感染細胞にI型IFN産生が誘導されるため、重感染させたVSVの感染及び細胞変性効果(CPE)の発現が阻止される。VSV攻撃後のCPEの有無を観察することで、END⁻としての性状を保持しているかどうか調べた。その結果、END⁻ P.50 及びIFN耐性END⁻のいずれも、VSV干渉陽性であり、END⁻としての性状を保持していることが明らかになった。さらに、VSV干渉を応用した逆ブラック法(END⁻感染細胞がブラックとして観察できる)を実施したところ、明瞭な逆ブラックを観察され、両ウイルスがEND⁻としての免疫学的特性を有していることが改めて確認された(図3)。

及び *ISG15* の発現誘導は認められなかったが、END⁻ P.0 感染細胞では両 mRNA の発現誘導が認められた。END⁻ P.50 感染細胞では更に強い発現誘導が観察され、特に *Mx1* の発現増強が顕著であった (図 4)。IFN 耐性 END⁻でも同様の実験を実施したところ、やはり両 mRNA の発現誘導が END⁻ P.0 と比較して強く、その傾向は特に *Mx1* で認められた。以上の結果から、END⁻ P.50 及び IFN 耐性 END⁻は、親ウイルス(END⁻ P.0)と比較して、自然免疫誘導能が増強している可能性が示唆された。

自然免疫関連遺伝子の発現誘導の増強に伴って、培養上清中に産生する I 型 IFN 量が変化しているのかどうか IFN バイオアッセイを用いて評価した。各 END⁻を感染させた 3 日後の培養上清を回収し、フィルター処理によってウイルス粒子の除去を行った。フィルター処理済みの上清試料を MDBK 細胞に感作させ、その後 VSV を感染させた。上清中に I 型 IFN が存在していれば、VSV の CPE 発現は阻止され細胞が生存するため、生存した細胞をクリスタルバイオレットで染色し、その OD 値を測定することで、I 型 IFN の有無を調べた。1/2OD 値は、(非感染細胞の OD 値 + VSV 感染細胞の OD 値) ÷ 2 で算出した値であり、この値よりも高い OD 値を示した well は、VSV の CPE を 50%阻止できるだけの I 型 IFN を含んでいることを意味する (図 5、A)。

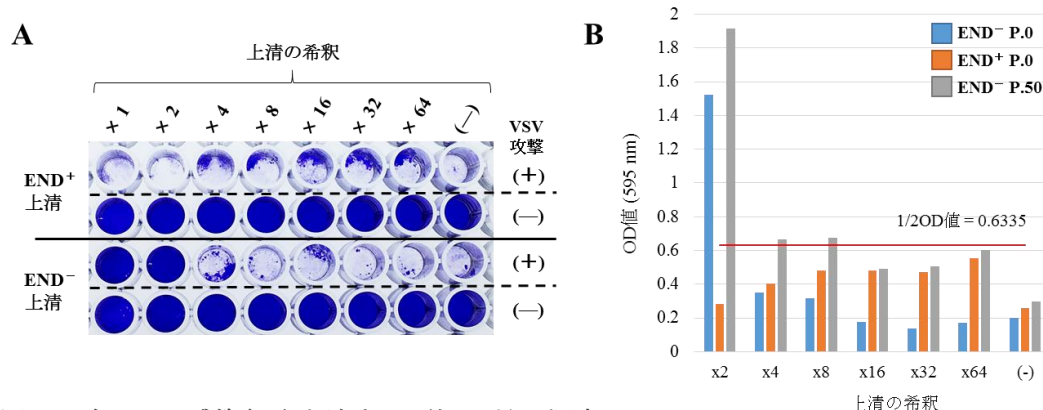


図 5 : 各END⁻感染細胞上清中のI型IFN量の測定

- (A) IFN バイオアッセイの例。END⁻の上清中には、2倍に希釈しても VSV の CPE を 50%阻止できるだけの I 型 IFN が含まれていることを示している。一方、END⁺の上清中には VSV の CPE を阻止できるだけの I 型 IFN が含まれないことを示している。
(B) 各 END⁻ 感染細胞の上清中に含まれる I 型 IFN 量を測定した。END⁻ P.50 の上清中には、8 倍まで希釈しても VSV の CPE を 50%阻止できるだけの I 型 IFN が含まれていることがわかった。

END⁻ P.50 感染細胞の培養上清中には、8 倍希釈しても VSV の CPE を 50%阻止できるだけの I 型 IFN が存在することがわかった (図 5、B)。親ウイルスである END⁻ P.0 は 2 倍までであったことから、上清中に産生される I 型 IFN 量が約 4 倍増加していることが明らかになった。IFN 耐性 END⁻でも同様のバイオアッセイを実施したところ、IFN 耐性 END⁻感染細胞の培養上清中には 16 倍希釈しても VSV の CPE を阻止するだけの I 型 IFN が含まれることがわかった。

つまり、END⁻ P.50 及び IFN 耐性 END⁻は親ウイルスである END⁻ P.0 と比較して、自然免疫関連遺伝子 (*ISG15* 及び *Mx1*) の発現増強が認められ、それに伴い培養上清中への I 型 IFN の産生量も増加していることがわかった。従って、次世代シーケンス解析で得られた結果から示されたアミノ酸変異 (END⁻ P.50 : E2, NS4B, NS5A., IFN 耐性 END⁻ : E^{ms}) は、自然免疫応答の増強に関与している部位であることが考えられた。

これらアミノ酸変異の中で、BVDV の自然免疫制御に密接に関与する変異部位を同定するために、リバーシジェネティクス技術を用いて、ウイルス遺伝子全長に変異を導入する作業を行った。しかし、本研究で使用している BVDV1 型 No.12 株は大腸菌体内での遺伝的安定性が著しく低く、変異導入作業が極めて困難であることがわかった。様々な手法を駆使し変異導入を試みたが、変異が挿入されないケースや、変異が挿入されても感染性粒子が産生されない等の問題が残し、研究期間中にこの問題を打開することが出来なかった。従って、リバーシジェネティクス技術によって変異ウイルスを作出するのではなく、まずはウイルス蛋白質単体でアミノ酸変異による機能の違いを検討する方法に変更した。現在は、END⁻ P.50 ウイルスが有する NS5A の変異部位 (変異頻度 80.8 %) と IFN 耐性 END⁻ が有する E^{ms} の変異部位 (変異頻度 91.6 %) に着目して、それら変異タンパク質の機能を親ウイルスのタンパク質と比較・検討中である。また、BVDV1 型 No.12 株ではなく、別のウイルス株であればリバーシジェネティクス系による変異ウイルスの作出を遂行できるのではないかと考え、BVDV2 型のウイルス株を使用したところ、遺伝子操作が容易であり、大腸菌体内での安定性も高いことがわかった。今回得られた変異情報が他の BVDV 株でも解析可能かどうか精査するとともに、蛋白質単体の機能解析及び変異ウイルスを用いた解析によって、本研究によって明らかになったアミノ酸変異部位の自然免疫制御に対する関与をより明確にすることが出来ると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 0 件)

〔学会発表〕（計 4 件）

- ① 塩川舞、大松勉、片山幸枝、水谷哲也、迫田義博、福所秋雄、青木博史、「牛ウイルス性下痢ウイルスの END- は宿主の自然免疫誘導下で END+ の増殖を支持する」日本獣医学学会学術集会、2018 年
- ② Mai Shiokawa, Tsutomu Omatsu, Yukie Katayama, Tetsuya Mizutani, Yoshihiro Sakoda, Akio Fukusho, Hiroshi Aoki. “END(-) of bovine viral diarrhea virus supports the propagation of END(+) virus in the situation where host’s innate immune response is induced.” 日本ウイルス学会学術集会、2018 年
- ③ 塩川舞、内山汐里、長井誠、片山幸枝、水谷哲也、迫田義博、福所秋雄、青木博史、「自然免疫制御能の異なる牛ウイルス性下痢ウイルスの培養細胞における感染動態の検討」日本獣医学学会学術集会、2016 年
- ④ Mai Shiokawa, Shiori Uchiyama, Makoto Nagai, Yukie Katayama, Tetsuya Mizutani, Yoshihiro Sakoda, Akio Fukusho, Hiroshi Aoki. “Infectious dynamics of noncytopathogenic bovine viral diarrhea virus exhibiting different innate immunity regulation characteristics.” 日本ウイルス学会学術集会、2016 年

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8 桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。