

平成 21 年 6 月 1 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2006～2008  
 課題番号：18580303  
 研究課題名（和文） ペスチウイルスのビルレンスへ寄与するゲノムの 5' 端非翻訳領域の特異的二次構造  
 研究課題名（英文） Secondary structure at the 5' untranslated region of pestivirus genome, which is responsible for virulence  
 研究代表者  
 原澤 亮（HARASAWA Ryô）  
 岩手大学農学部・教授  
 研究者番号：70159101

## 研究成果の概要：

ペスチウイルスは宿主特異性が比較的強いことが知られていて、その宿主域とウイルスゲノム 5' 端の二次構造に相関があることを明らかにした。あわせて、ペスチウイルスのビルレンスがとウイルスゲノム上に想定される二次構造のループを構成する特定の塩基と関連することを明らかにし、その成果を 2008 年 9 月に開催された第 7 回国際ペスチウイルス学会（スウェーデン）において発表した。

## 交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,200,000	0	1,200,000
2007年度	900,000	270,000	1,170,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	510,000	3,410,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 応用獣医学

キーワード：ペスチウイルス，ビルレンス

## 1. 研究開始当初の背景

ペスチウイルスはプラス鎖 RNA をゲノムとする動物ウイルスの一群で、分類学的にはフラビウイルス科ペスチウイルス属と呼ばれ、牛ウイルス性下痢ウイルス 1（BVDV-1）、牛ウイルス性下痢ウイルス 2（BVDV-2）、豚コレラウイルス（CSFV）、ボーダー病ウイルス

（BDV）および未確定のキリン由来ペスチウイルス（' Giraffe '）からなる。これらのうちウイルス種として確定している 4 種は牛、豚、緬羊をそれぞれ冒すことから命名されたものであるが、豚コレラウイルス以外の 3 種はその宿主域が必ずしも固定しておらず、こ

れら動物種の壁を越えて相互に感染するだけでなく、他の偶蹄目にも伝播して発病させることが知られている。また、ペスチウイルスは牛胎仔血清あるいは偶蹄目起源の組織を介して細胞培養に迷入し、細胞変性効果を起こすことなく持続感染する機会が多いため、細胞培養を最も頻繁に汚染するウイルスとしても知られている。ところで、これら4種のウイルスは、ポリクローン性抗体を用いた血清中和試験によってほとんど区別できないとされている。このため、ペスチウイルス属におけるウイルス種の同定はもっぱら宿主動物種に依存してなされる場合が多く、しばしばウイルス種の判定に混乱を招いている。たとえば、ポーター病の羊から分離され、ポーター病ウイルスとして報告されていたペスチウイルス株(53株)の41.5%が牛ウイルス性下痢ウイルス1もしくは牛ウイルス性下痢ウイルス2であることが知られている。

## 2. 研究の目的

ペスチウイルスは一般に偶蹄類の間を動物種を越えて伝播することが知られており、Los Angeles 動物園では飼育されていたカモシカから本ウイルスが分離されている。盛岡市およびその近隣の丘陵地帯には野生のニホンカモシカが生息しているが、同地域では牛の放牧も行われている。そこで日本国内の野生動物での状況を把握するため、2001年から2004年までの間に盛岡地域で自由生活を営むニホンカモシカから採取された血清を用いてペスチウイルスによる感染を調査した。

## 3. 研究の方法

被検血清は負傷もしくは死亡した16頭から剖検時に採取され、凍結保存されていたものである。ペスチウイルスゲノムの5' UTRを標的とするRT-nested PCR法により、血清中のペスチウイルスを検出した。

## 4. 研究成果

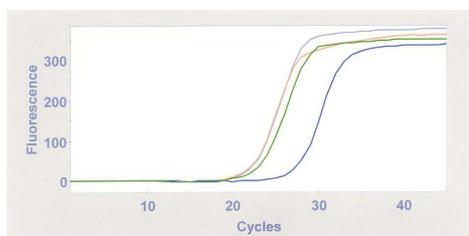
3頭のニホンカモシカに本ウイルスの感染を確認できたが、いずれの剖検所見からも本ウイルスによる感染症を示唆するものは得られなかった。また、それら3検体のPCR産物の塩基配列はすべて一致しており、同一のウイルス株による感染と考えられた。さらにその塩基配列の一次構造ならびに推定される二次構造の回文様塩基置換分析に基づき、検出されたペスチウイルスを牛ウイルス性下痢ウイルス1(BVDV-1)と同定した。これらことから、盛岡地域で自由生活しているニホンカモシカの間で、特定のBVDV-1株による感染が持続的に発生していると考えられた。

(1) ペスチウイルスゲノムの5' 端非翻訳領域の3箇所に見られる種特異的な回文様塩基置換。ウイルス種と宿主動物種に関連する構造が存在することが示されている。青色の塩基は株間で変化するもの、緑色はビルレンスとの関連が疑われるもの、そして赤色はそれぞれの種に固有の塩基である。すべての種に共通している黒色で示したの塩基は、ペスチウイルス属に特異的なものである。

宿主: 牛 種: BVDV-1	牛 BVDV-2	羊 BDV	豚 CSFV	キリン 'Giraffe'
回文様配列 1				
R D D N R R Y H U:A Y:R C:G R:Y C C A-U C-C C-G 5'-U-A-3'	D A Y Y:Y U:R W W C-G U-A C C A-U C-C C-G 5'-U-A-3'	U R A R Y N R:U G-C C C A-U C-C C-G 5'-U-A-3'	B D A A C-G R:Y R:Y U-R G-C C C A-U C-C C-G 5'-U-A-3'	A G A U N U A-U C-G C-C A-U C-C C-G 5'-U-A-3'
回文様配列 2				
G G G G U C-G R:Y R:Y G-C Y:A C-G 5'-A-Y-3'	G G G G U G*U C-G G-C Y:R R:U Y:R C-G 5'-R-U-3'	G G G G U G-C C-G Y:R Y:R Y:R U-R C-G 5'-A-U-3'	G G G G U R:C G-C G:Y R:Y U-A C-G C-G 5'-A-U-3'	G G G G U G-U C-G U-A C-G C-G 5'-A C-3'
回文様配列 3				
D H Y H U:A G-C R:Y C-G R:Y 5'-A-U-3'	U C U G A-U Y:G C-G G:Y C-G R:Y 5'-A:Y-3'	A M U Y C-G A-U C-G A-U 5'-A-U-3'	Y Y A A:Y C-G A-U C-G 5'-A-U-3'	U A A U C-G C-G U-A G-C 5'-A-U-3'

(2) ペスチウイルス属に含まれるすべてのウイルス種を一括して検出するために開発した、超高感度なネステッド RT-PCR法のプロトコルを世界に先駆けて公表し、さらに本ウイルス属を特異的に検出するためのリアルタイム PCR法を開発してきた。下の図は50~200TCID<sub>50</sub>量のペスチウイルスの検出感度

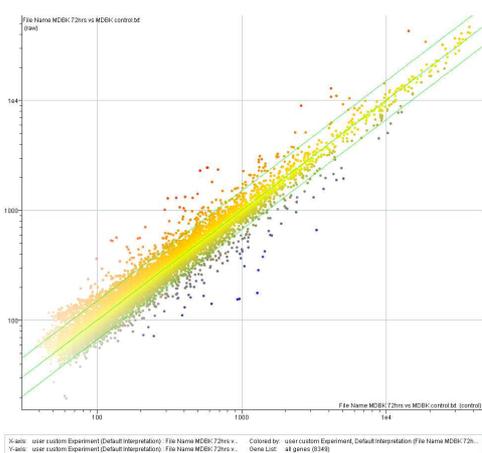
を示したリアルタイム PCR の実施例である。申請者が確立させたこのリアルタイム PCR 法では、増幅させて得た PCR 産物を直接に塩基配列の決定にも使える。また、ウイルスの定量的検出も可能であることも明らかにしている。



Site Legend

Site	Protocol	Sample ID
A1	R-PCR	Negative Control
A2	R-PCR	200 TCID50
A3	R-PCR	100 TCID50
A4	R-PCR	50 TCID50

(3) 感染細胞から抽出した RNA を蛍光色素 Cy3 により、また非感染細胞から抽出した RNA を Cy5 により分別標識し、オペロン社の OpArray Bovine を用いてハイブリダイゼーションを行い、遺伝子発現の程度を比較した。下の図は BVDV 感染 MDBK 細胞における 72 時間後の遺伝子発現をマイクロアレイ法により予備的に調べた実験例を示したものである。対角線上にある黄～オレンジ色が発現が亢進した遺伝子群で、下の緑～青色が発現が抑制された遺伝子群をそれぞれ表している。



## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計12件)

Fujihara, M., Maeda, K., Sasamori, E., Matsushita, M., and Harasawa, R. (2009) Effects of chelating reagents on colonial appearance of *Paenibacillus alvei* isolated from canine oral cavity. J. Vet. Med. Sci. 71: 147-153. 査読有

Giangaspero, M., Harasawa, R., and Zanetti, A. (2008) Taxonomy of genus *Hepacivirus*. Application of palindromic nucleotide substitutions for the determination of genotypes of human *Hepatitis C virus* species. J. Virol. Methods. 153: 280-299. 査読有

Giangaspero, M., Harasawa, R., Weber, L., and Belloli, A. (2008) Taxonomic and epidemiological aspects of the *Bovine viral diarrhoea virus 2* species through the observation of the secondary structures in the 5' genomic untranslated region. Vet. Ital. 44: 319-345. 査読有

Giangaspero, M., and Harasawa, R. (2008) Genetic variation of classical swine fever virus based on palindromic nucleotide substitutions, a genetic marker in the 5' untranslated region of RNA. Vet. Ital. 44: 305-318. 査読有

Kawahito, Y., Ichinose, S., Sano, H., Tsubouchi, Y., Kohno, M., Yoshikawa, T., Tokunaga, D., Hojo, T., Harasawa, R., Nakano, T., and Matsuda, K. (2008) *Mycoplasma fermentans* glycolipid antigen as a pathogen of rheumatoid arthritis. Biochem. Biophys. Res. Commun. 369: 561-566. 査読有

Obara, H., and Harasawa, R. (2008) L-ascorbic acid enhances apoptosis in human gastric carcinoma cell line AZ-521 cells infected with *Mycoplasma hyorhinis*. J. Vet. Med. Sci. 70: 11-15. 査読有

Giangaspero, M., Harasawa, R., Weber, L., and Belloli, A. (2008) Genoepidemiological evaluation of *Bovine viral diarrhoea virus 2* species based on secondary structures in the 5' untranslated region. J. Vet. Med. Sci. 70: 571-580. 査読有

Giangaspero M., and Harasawa, R. (2007)

Taxonomy of Genus *Pestivirus* Species based on Palindromic Nucleotide Substitutions According to Segregation by Low Variable Positions and Quantification of Divergence by 5' Untranslated Region Secondary Structure Alignment. J. Virol. Methods 146: 375-388. 査読有

Fujihara, M., Watanabe, M., Yamada, T., and Harasawa, R. (2007) Occurrence of 'Candidatus *Mycoplasma turicensis*' infection in domestic cats in Japan. J. Vet. Med. Sci. 69: 1061-1063. 査読有

Giangaspero, M., Harasawa, R., Muschko, K., and Büttner, M. (2006) Characteristics of the 5' untranslated region of wisent (*Bison bonasus*) and reindeer (*Rangifer tarandus*) pestivirus isolates. Vet. Ital. 42: 165-172. 査読有

Harasawa, R., Aoyama, F., Goryo, M., Okada, K., Nishimura, T., Matsubara, K., Tsujimoto, T., and Giangaspero, M. (2006) Evidence for pestivirus infection in free-living Japanese serows, *Capricornis crispus*. Microbiol. Immunol. 50: 817-821. 査読有

Harasawa, R., Tanabe, H., Kurematsu, M., Mizusawa, H., Suzuki, Y. (2006) Self-propagating calciferous particles detected in a human cell line Kasumi-6 (JCRB 1024). In Vitro Cell. Dev. Biol. 42: 13-15. 査読有

[学会発表](計7件)

Giangaspero, M., and Harasawa, R. (2008年9月22日) Differential diagnosis of *Classical swine fever virus* infection from other *Pestivirus* species based on palindromic nucleotide substitutions in the 5' UTR. 7<sup>th</sup> International Conference on Pestivirus (Uppsala, Sweden)

Giangaspero, M., Apicella, C., and Harasawa, R. (2008年9月22日) Palindromic nucleotide substitutions: A new software for *Pestivirus* genotyping. 7<sup>th</sup> International Conference on Pestivirus (Uppsala, Sweden)

Giangaspero, M., and Harasawa, R. (2008年9月22日) Numerical taxonomy of the genus *Pestivirus*: species identification

and measurement of genetic distances based on palindromic nucleotide substitutions in the 5' UTR. 7<sup>th</sup> International Conference on Pestivirus (Uppsala, Sweden)

近藤景子、塩田節子、小原有広、水澤博、原澤亮、青柳秀紀(2007年9月6日)ヒト由来急性白血病細胞系から分離したナノバクテリア様微粒子の特性(第2報)第59回日本生物工学会(広島市)

小原寿人、原澤亮(2007年9月1日) *Mycoplasma hyorhinis*がヒト由来胃がん細胞株に誘発するアポトーシスはL-アスコルビン酸により増強される。第145回日本獣医学会(江別市)

松田和洋、只野有富桂子、飯田田中直子、新宮佑子、富山哲雄、原澤亮、森田大二、楠進(2007年6月5日)神経障害因子誘導に係わる *Mycoplasma pneumoniae* 特異脂質抗原の構造決定。第34回日本マイコプラズマ学会(和歌山市)

Harasawa, R., and Mizusawa, H. (2006年8月1日) Identification of mycoplasma contaminants in cell cultures by real-time PCR. 16<sup>th</sup> International Conference of Mycoplasma, Cambridge, UK

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

原澤 亮 (HARASAWA RYO)  
岩手大学・農学部・教授  
研究者番号: 70159101

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

なし