

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月5日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21380179

研究課題名（和文） ヘルペスウイルスの非自然宿主における致死性病原性発現機構の解明

研究課題名（英文） Analysis of lethal pathogenicity mechanism of herpesvirus in non-natural hosts

研究代表者

福士 秀人 (FUKUSHI HIDETO)

岐阜大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：10156763

研究成果の概要（和文）：ヘルペスウイルスが非自然宿主に致死性脳炎を引き起こすメカニズムを分子レベルで解明することを目的とした。ウマ属を自然宿主とするウマヘルペスウイルス（EHV）を対象とした。EHVの非自然宿主における致死性脳炎に関与するウイルス遺伝子を明らかにした。神経病原性株と非神経病原性株の全ウイルスゲノム塩基配列比較から、両者の相違は9遺伝子であることを明らかにした。EHV感染における遺伝子発現動態を網羅的転写産物解析により調べた。EHV感染により変動する遺伝子が同定された。

研究成果の概要（英文）：The object of this research is to reveal the molecular mechanism of herpesvirus lethal encephalitis in non-natural host. Equine herpesviruses (EHVs) 1 and 9 were used. Virus genes involving in the lethal encephalitis in non-natural host were identified. Comparison of neuropathogenic and non-neuropathogenic EHV-1s showed nine gene differences between their whole genome sequences. Comprehensive transcriptome analysis in EHV-infected cells were examined. Several viral and host genes were identified as variable transcript encoded genes in EHV-infected cells.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|------|------------|-----------|------------|
| 21年度 | 5,200,000 | 1,560,000 | 6,760,000 |
| 22年度 | 4,900,000 | 1,470,000 | 6,370,000 |
| 23年度 | 4,800,000 | 1,440,000 | 6,240,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 14,900,000 | 4,470,000 | 19,370,000 |

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：病原微生物

1. 研究開始当初の背景

ヘルペスウイルスは一般に宿主特異性が高い。例えば水痘帯状疱疹ウイルス、ヒトサイトメガロウイルスなどはヒトを自然宿主とし、他の動物種における自然感染例は知られていない。しかし、一部のヘルペスウイルスは宿主の障壁を超え、非自然宿主に致死性

脳炎を引き起こす。サルのBウイルスやブタのオーエスキー病ウイルスなどである。自然宿主と非自然宿主でなぜウイルスの病原性や毒力が異なって現れるのかは不明な点が多く残されている。

2008年にアメリカ合衆国の動物園で飼育されていたホッキョクグマ（Schrenzelら、EID, 2008）およびキリンが脳炎で死亡し、

その原因が EHV-9 であることが判明した。EHV-9 は我々が 1993 年にトムソンガゼルの集団発生脳炎から分離した新しいウイルスである (Fukushi ら, *Virology*, 1997)。我々の研究からはシマウマが EHV-9 の自然宿主であることが明らかとなった。したがって、ホッキョクグマやキリンの致死性脳炎は EHV-9 が非自然宿主に引き起こした感染症である。EHV-9 は実験感染においても宿主域の広さと病原性の強さを示している。これまでにヤギ、イヌ、ウシなどをはじめ新世界ザルにも致死性脳炎を引き起こすことをあきらかにした。EHV-9 のこの広い宿主域と非自然宿主における致死性脳炎起病性は大きな問題であるとともに、ヘルペスウイルスが示す種の障壁を超えた際の病原性発現メカニズム解明の糸口になる。

我々はこれまでに EHV-9 ゲノムの全塩基配列を決定した (DDBJ Accession No. AP010838)。また、プラーク形成能を指標として得た弱毒変異体を用いた解析も行い、複数の遺伝子発現量が同時に低下していることを見いだした。

EHV-9 に近縁なウイルスに EHV-1 がある。ゲノムレベルで EHV-9 と約 90% の相同性があり、遺伝子構成は全く同じである。EHV-1 はウマに大きな被害をもたらす病原体であることから、平行して研究を進めてきた。その過程で EHV-1 には実験用げっ歯類に致死性脳炎を引き起こす株と引き起こさない株の存在を見いだした。EHV-1 のゲノム解析から神経毒力の差は 20 遺伝子程度であること、遺伝子毎の相違は 1 から数アミノ酸にすぎないことを明らかにした。これらの相違はテグメントおよび遺伝子発現調節遺伝子であり、神経病原性の相違はレセプター特異性では説明できない。細胞内における宿主因子との相互作用によると考えられる。したがって神経病原性責任遺伝子産物が感染細胞内においてどのような挙動を示すかを動的に解析する必要がある。

2. 研究の目的

EHV-1 のマウスにおける神経病原性は病理組織学的に EHV-9 感染とほぼ同一である。そこで、はじめに EHV-1 が示す非自然宿主における致死性脳炎の原因となる遺伝子を同定し、その結果を糸口として EHV-9 の病原性の解明を行おうと考えた。本研究の目的は以下のようであった。

(1) EHV-1 および EHV-9 の神経病原性責任遺伝子および相互作用する宿主細胞因子の同定。

(2) ウイルス遺伝子産物および宿主因子をそれぞれ蛍光タンパク質融合ないし間接蛍光抗体法で標識し、培養上皮細胞および培養

神経細胞内での動的相互作用を可視化。

(3) 神経病原性株感染細胞と組換え非神経病原性株感染細胞の mRNA 発現を DNA アレイにより網羅的に比較解析。

(4) ウイルス遺伝子産物と宿主因子の相互作用がどのように神経病原性発現につながるかを総合的に解析。

最終的に、EHV-1 および EHV-9 が非自然宿主であるマウスにおいてどのように致死的な病原性を発揮するかを分子レベルで解明しようとした。

3. 研究の方法

(1) マウス感染実験。CBA マウスに EHV-1 を点鼻接種した。接種後、一般症状および体重を記録した。接種後 2 日および 10 日に安楽死させ、臓器を採取した。ウイルス量測定ならびに病理組織学的検索を行った。

(2) 用いたウイルス。ウマヘルペスウイルス 1 型として Ab4p、ウマヘルペスウイルス 9 型として EHV-9 P21 を用いた。これらのウイルスは馬初代腎臓培養細胞で増殖させた。

(3) ウイルス遺伝子改変法。ウマヘルペスウイルス 1 型ゲノムに大腸菌由来 miniF プラスミドを組み込んだ Ab4p-BAC プラスミドを構築し、大腸菌においてウマヘルペスウイルスゲノムの遺伝子改変を行った (Samy et al., 2010)。

(4) テグメント蛋白質 VP22 の動態解析。VP22 遺伝子断片を PCR 増幅し、EGFP 発現プラスミドに融合遺伝子としてクローニングした。このプラスミドを培養細胞に遺伝子導入し、共焦点レーザー顕微鏡により動態を解析した。

(5) EHV-1 ゲノム塩基配列解読。病原性を異にする日本分離株のウイルス DNA を抽出し、次世代シーケンサーにより全塩基配列を解読した。

(6) 網羅的遺伝子転写動態解析。ウイルス感染細胞から全 RNA を抽出し、polyA 保有 RNA を精製した。極性を維持した塩基配列解読を行った。解読は次世代シーケンサー-Illumina によった。感染宿主細胞として自然宿主である馬由来細胞として馬腎臓細胞を用いた。解読配列は Bowtie を使い、参照配列にマッピングした。その後、Erange および R により転写産物の転写コピー数を推定した。

4. 研究成果

(1) EHV-1 病原性評価の基礎データを得るため、EHV-1 9 株を CBA マウスにそれぞれ接種した。その結果、株により神経病原性が異なる事がわかった。病理組織学的に髄膜脳炎を引き起こす株と引き起こさない株が見られた。ウマにおいてヘルペスウイルス髄膜脳症を引き起こした株はいずれもマウスで髄膜脳炎を引き起こす事がわかった。

(2) EHV-1 を用い、ORF13、ORF37 および ORF76 について解析した。これら 3 つの ORF をそれぞれ標識遺伝子で置換した欠損ウイルスを作成した。これら欠損ウイルスの培養細胞における増殖を調べたところ、いずれも増殖能が低下していた。マウス接種実験により神経病原性に及ぼす影響を調べた。その結果、ORF13 欠損は必ずしも神経病原性低下につながるが、ならびに ORF37 欠損は神経病原性の低下をもたらすことが判明した。

ORF13 については欠損ウイルスの細胞内増殖動態を電子顕微鏡で観察した。その結果、1 次エンベロープ獲得ないし 2 次エンベロープ獲得ができていないことがわかった。

以上の結果から、ORF37 遺伝子産物は EHV-1 の神経病原性発現因子の一つであることがわかった。一方、ORF13 はテグメントの一つであり、培養細胞では EHV-1 ウイルス粒子形成に重要な役割を果たしているが、マウスにおける神経病原性発現には必ずしも関与していない事が示された。

(3) 今回の研究から ORF37 の欠損は神経病原性の低下をもたらすことが判明した。ORF38 はチミジンキナーゼをコードしているが、ORF37 のプロモーター配列を含んでいる可能性がある。そのため、ORF38 欠損のウイルス増殖への影響は ORF37 発現の低下による可能性が考えられた。そこで、ORF38 欠損ウイルスを作製し ORF37 発現への影響を調べた。ORF38 欠損ウイルス感染細胞から ORF37 mRNA が検出され、ORF38 欠損は ORF37 mRNA 発現に殆ど影響しないことが分かった。逆に、ORF37 欠損が ORF38 発現に与える影響をみたところ、同様に ORF37 欠損は ORF38 発現に影響しないことがわかった。

(4) 神経病原性株 Ab4p と非神経病原性株 00c19 で 1 アミノ酸が異なる EICP0 (ORF63) に着目し、00c19 由来 EICP0 を保有する Ab4p (EICP0A416V) を作製した。Ab4p (EICP0A416V) は培養細胞における増殖は Ab4p 株と同様であったが、マウスでの神経病原性が消失していた。この結果から、EICP0 の 416 番目のアミノ酸が神経病原性発現に何らかの役割を担っている事が明らかとなった。

(5) EHV-1 テグメントタンパク質 VP22 は細胞質から核に移行するが、移行動態は宿主細胞により異なることを明らかにした。また、VP22 の核移行に必要なドメインを同定した。この核移行には VP22 のリン酸化が重要であり、このリン酸化は宿主細胞により異なる可能性を見いだした。

(6) ハムスターおよびマウスモデルにおける神経病原性株 01c1 と非神経病原性株 90c16 の全ウイルスゲノム塩基配列比較から、両者の相違は 9 遺伝子であることを明らかにした。

(7) EHV-1 および EHV-9 感染細胞における

網羅的転写解析を行った。感染 8 時間後における転写産物を EHV-1 感染細胞と EHV-9 感染細胞で比較したところ、大きな相違は見いだされなかった。

EHV-1 感染細胞について経時的な変動をみるため、感染後 0 時間、2 時間、4 時間および 8 時間後の転写産物を解読した。当初の予想と異なり、宿主由来転写産物の変動はほとんどなかった。感染後に変動がみられた遺伝子は未知のものが多く、同定にはいたらなかった。

一方、転写産物にはアンチセンス鎖由来のリードが多数見いだされた。また、非コード領域からの転写も多くみられた。この結果から、ウイルスゲノムからの転写はかなり複雑である事が示唆された。

(8) 今回の研究の基盤となっているウマヘルペスウイルス 1 型 BAC クローンについて、これまでの実験結果から親株よりもやや病原性がやや低下していることがわかっている。そこで、BAC クローン Ab4pattB の全塩基配列を解読した。その結果、ORF2 にアミノ酸置換をとともなう点突然変異が見いだされた。Red/ET システムによりこの点突然変異を親株と同じ塩基に修復した。修復ウイルスの病原性を調べたところ、親ウイルスより病原性が低く、Ab4p attB とほぼ同様であった。これらの結果から、BAC クローンの病原性低下は BAC ベクター配列挿入のために親ウイルスゲノムに挿入した attB 配列による可能性が示唆された。組み換えウイルスによる病原性評価において留意すべき点であることがわかった。

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 3 件)

① Mi Htay Htay Yu, Samy Gomaa Ahmed Kasem, Norio Yoshizaki, Ochir Pagamjav, Tsuyoshi Yamaguchi, Kenji Ohya, Hideto Fukushi, Functional characterization of EUL47 in productive replication, morphogenesis and infectivity of equine herpesvirus 1, *Virus Research*, 査読有, vol 163, 2011, pp310-319.

② Samy Kasem, Mi Htay Htay Yu, Souichi Yamada, Akari Kodaira, Tomio Matsumura, Koji Tsujimura, Hanafy Madbouly, Tsuyoshi Yamaguchi, Kenji Ohya, Hideto Fukushi. The ORF37 (UL24) is an neuropathogenicity determinant of equine herpesvirus 1 (EHV-1) in the mouse encephalitis model. *Virology*, 査読有, vol. 400, 2010, pp259-270.

③ Mi Htay Htay Yu, Samy Gomaa Ahmed Kasem,

Koji Tsujimura, Tomio Matsumura, Tokuma Yanai, Tsuyoshi Yamaguchi, Kenji Ohya, Hideto Fukushi. Diverse pathogenicity of equine herpesvirus 1 (EHV-1) isolates in CBA mouse model. Journal of Veterinary Medical Sciences, 査読有, vol. 72, 2010, pp259-270.

〔学会発表〕(計6件)

① 郭小芹, 岡田彩加, AbdelazizAmira, 大屋賢司, 福士秀人, The effect of point mutation found in Equine Herpesvirus BAC clone, Ab4p attB, to the pathogenicity in the hamster model), 第152回日本獣医学会学術集会, 2011年9月20日, 大阪府立大学.

② 岡田彩加, 羽入さち子, 大屋賢司, 福士秀人, ウマヘルペスウイルス1型テグメントタンパク VP22 の細胞内動態解析. 第152回日本獣医学会学術集会, 2011年9月20日, 大阪府立大学.

③ 井爪聡子, 辻村行司, 松村富夫, 大屋賢司, 福士秀人, ウマヘルペスウイルス1型 ORF75 の RK13 細胞における細胞内局在, 2011年9月20日, 大阪府立大学.

④ KasemSamy, YuMi Htay Htay, 大屋賢司, 福士秀人, In vivo and in vitro Characterization of Equine herpesvirus-1 thymidine kinase-deficient mutants, 日本獣医学会学術集会第150回, 2010年9月16日, 帯広畜産大学.

⑤ 羽入さち子, 小平彩里, 山田壮一, Samy, Kasem, Mi Htay Htay Yu, 大屋賢司, 福士秀人, 蛍光蛋白質融合テグメント VP22 保有ウマヘルペスウイルス1型感染細胞における VP22 動態のリアルタイム解析, 日本獣医学会学術集会第150回, 2010年9月16日, 帯広畜産大学.

⑥ 岡田彩加, Samy Kasem, 辻村行司, 松村富夫, 大屋賢司, 福士秀人, ウマヘルペスウイルス増殖に優れたウマ胎仔脳由来細胞株の樹立, 日本獣医学会学術集会第150回, 2010年9月16日, 帯広畜産大学.

〔図書〕(計2件)

① Hideto Fukushi and Tokuma Yanai, Virology and Pathology of Encephalitis in Alien Hosts by Neurotropic Equine Herpesvirus 9. In "Non-Flavivirus Encephalitis", ed. Sergey Tkachev, pp 127-146, In Tech, Croatia, 2011.

② Tokuma Yanai, Atsushi Kodama, Hiroki Sakai, Hideto Fukushi, Takeshi Kuraishi, Seisaku Hattori, Chieko Cai, Equine Herpesvirus 9 (EHV-9)-induced encephalitis in non-human primates. In "Non-flavivirus Encephalitis" ed. Sergey Tkachev, pp. 147-156, In Tech,

Croatia, 2011.

〔産業財産権〕
○出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福士 秀人 (FUKUSHI HIDETO)
岐阜大学・応用生物科学部・教授
研究者番号: 10156763

(2) 研究分担者

大屋 賢司 (OHYA KENJI)
岐阜大学・応用生物科学部・准教授
研究者番号: 50402219

(3) 連携研究者

松村 富夫 (MATSUMURA TOMIO)
日本中央競馬会競走馬総合研究所・栃木支所・室長
研究者番号: 20446511
辻村 行司 (TSUJIMURA KOJI)
日本中央競馬会競走馬総合研究所・栃木支所・室員
研究者番号: 50446514

