

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05924

研究課題名（和文）遺伝子操作技術を活用した生後感染型アカバネウイルス病原性発現機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of pathogenicity of postnatal Akababe virus using genetic engineering technology

研究代表者

正谷 達膳（Masatani, Tatsunori）

岐阜大学・応用生物科学部・准教授

研究者番号：70614072

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、生後感染型AKAVのKM株およびFI株の全ゲノム配列を明らかにすることで、生後感染型AKAVにおける遺伝学的基盤情報の蓄積に貢献した。また、両株のリバースジェネティクス系を新たに確立し、これを駆使することで、オルソブニヤウイルス共通の病原性因子NSs遺伝子に非依存性の神経病原性を示す生後感染型AKAV株が存在することを初めて明らかにした。さらに、Vero細胞での連続継代を実施することで弱毒化ウイルスを作出し、この弱毒化に関与する3つのアミノ酸を特定できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アカバネ病は、アカバネウイルス(AKAV)によるウシ等の反芻動物の節足動物媒介疾病であり、時に成牛に神経症状を起し甚大な被害をもたらす「生後感染型」と呼ばれる病型が存在する。本研究では、生後感染AKAVの神経病原性に関わるウイルス因子の特定を目指した。本課題で得られた知見は新規ワクチン開発だけでなく、生後感染型AKAVを特異的に識別する遺伝子マーカーになりうる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we obtained basic genetic information on postnatal AKAV by sequencing the whole genome of KM and FI strains of postnatal AKAV. We also established a new reverse genetics system for postnatal AKAV strains and demonstrated for the first time that postnatal AKAV strains exhibit neuropathogenicity independent of the NSs gene, a common virulence factor of orthobunyaviruses. Furthermore, we generated attenuated viruses by serial passaging in Vero cells, and were able to identify three amino acids involved in this attenuated viral strain.

研究分野：獣医病原生物学

キーワード：アカバネ病 マウス 病原性 神経系

## 1. 研究開始当初の背景

アカバネ病は、ブニヤウイルス目ペリブニヤウイルス科に属するアカバネウイルス(AKAV)によって引き起こされる牛や山羊の疾病である。AKAVは、通常は牛に対する病原性は低く、無症状のまま耐過する。しかし、本ウイルスが妊娠牛に感染し子宮内の胎仔に到達・増殖した場合、流産・死産及び仔牛の奇形を生じる。このため、本疾病による牛繁殖農家へ対する経済的ダメージは大きい。

AKAVは小型吸血昆虫(ヌカカなど)によって媒介され、夏季-秋季に鹿児島・熊本・宮崎県など南日本を中心に毎年流行する。ウイルスは媒介昆虫とともに季節風に乗って中国や東南アジアから飛来するため、年によって異なるウイルス株が流行する。したがって本病は越境性動物疾病としても監視・コントロールすることが重要である。

AKAVに対するワクチンは存在するものの、いまだに毎年散発的に発生しており、時として数十戸の農家に同時発生して多大な損害を与える。そのため、牛繁殖農家にとっては対策を要する疾病の一つである。特に、流行地である南日本は我が国の重要な肉牛生産基地でもあるため、予防の徹底が求められている。

AKAV株のなかには、上述の胎仔のみに奇形を起こす「通常型」の株とは別に、成牛にも時に致死的な脳炎を引き起こす「生後感染型」と呼ばれるウイルス株が存在し、我が国でも度々流行している。生後感染型ウイルスによる被害は従来型ウイルスに比べて甚大であり、2006年に熊本県・鹿児島県で集団流行した際は数100頭を越える被害を出している(Kono et al., BMC Vet Res, 2008)。したがって、生後感染型AKAVのコントロールは養牛業界において喫緊の課題となっている。また、通常型株と生後感染株は抗原性状が異なり交差性が低い。そのため、現行型生ワクチンでは生後感染型アカバネ病を予防することは困難である。しかし、ワクチン開発に必要となりうるウイルス側の病原性決定遺伝子に関する知見はほぼない。

これまでに申請者が入手している、3つの異なる地域・時期に分離された生後感染型AKAV株(Iriki, FI-1/Br/08およびKM-2/Br/06株)については全ゲノムを解読済みである(Okajima et al., Microbiol. Resour. Announc., 2020)。申請者らはこの情報に基づき、これら3つの異なる生後感染型AKAV株の遺伝子操作系の確立に成功している。

他のブニヤウイルス目ウイルスでは、非構造蛋白質の1つNSs蛋白質が宿主のインターフェロン(IFN)の産生を抑制し、自然免疫から回避するのに必要であることが示されている(Bridgen et al., PNAS 2000; Billecocq et al., J Virol., 2004など)。実際に、通常型AKAVにおいてNSs欠損株を遺伝子操作により作出したところ、哺乳マウスに対する病原性が著しく低下することが報告されている(Ogawa et al., J. Gen. Virol., 2007)。そこで申請者らは、生後感染型AKAVでも同様にNSs蛋白質が病原性に関与すると考え、遺伝子操作技術により上記の生後感染型AKAV株のうち、マウスに対する致死性が最も高いKM-2/Br/06株(Genogroup 1)のNSs遺伝子欠損株を作出した。その結果、NSs遺伝子欠損株は予想に反してマウスへの高い致死性を保ち、さらにNSs蛋白質は培養細胞におけるIFN産生を全く抑制しなかった(図1: 岡島ら、第162回獣医学学会にて発表)。このことは、多くのブニヤウイルスの病原性因子と考えられているNSs蛋白質は、生後感染型AKAVでは病原性に関与しない可能性があることことを示している。



図1 AKAV NSs蛋白質と宿主自然免疫抑制能の関係

## 2. 研究の目的

多くのブニヤウイルスに共通する病原性因子として NSs 蛋白質の重要性が示されているのに対し、我々が見出した「生後感染型 AKAV において、NSs 蛋白質は病原性に関与しない」という事実はユニークな事象である。そこで本研究では、ウイルス遺伝子操作技術を駆使することで、生後感染型 AKAV の病原性を決定する遺伝子領域を同定し、生後感染型アカバネ病の病態形成メカニズムの一端を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### 3-1 生後感染型 AKAV の神経病原性における NSs 遺伝子の重要性の検討

生後感染型 AKAV 株のうち Genogroup II に属する FI/Br/08 株の遺伝子操作系を KM-2/Br/06 株と同様のシステム (Takenaka-Uema et al., J. Virol. 2015) により確立した。得られた組換え FI/Br/08 株 (rFI) と、その NSs 遺伝子欠損株である FI $\Delta$ NSs の病原性について、3 日齢及び 4 週齢の ICR マウスへ脳内接種 (それぞれ  $10^2$  及び  $10^5$  プラーク形成単位 (PFU)/匹) することで検討した。4 週齢マウス脳内におけるこれらウイルスの増殖性を、感染マウス ( $10^5$  PFU/匹で接種) より採取・作製した脳乳剤上清を用いた TCID<sub>50</sub> アッセイによって検討した。さらに牛血管由来培養細胞である HH 細胞に各ウイルスを感染させ、自然免疫関連遺伝子発現量をリアルタイム PCR によって定量・比較した。

### 3-2 NSs 遺伝子以外の病原性関連遺伝子および病原性規定アミノ酸の同定

遺伝子組換え技術によって作出された KM-2/Br/06 株 (rKM) を Vero 細胞で連続継代することで、KMV20 株を作出した。4 週齢の ICR マウスに脳内接種することで、KMV20 株の神経病原性を評価した。KMV20 株に導入された遺伝子変異を探索する目的で、同ウイルスのゲノム RNA を抽出し、RT-PCR を行った。得られた PCR 断片を次世代シーケンス解析によって全長解読し、KMV20 株に導入された変異を同定した。遺伝子組換え技術によって組換え KMV20 株を作出し、培養細胞におけるマウスに対する病原性が親株である KMV20 株と同等であるかどうかを検討した。KMV20 株に導入されていたアミノ酸変換を伴う 3 つの塩基置換を単一または組み合わせて rKM 株に導入し、どのアミノ酸の変異がマウスに対する病原性減弱に寄与したか、その同定を試みた。

## 4. 研究成果

### 4-1 生後感染型 AKAV の神経病原性における NSs 遺伝子の重要性の検討

NSs 遺伝子の有無が異なる genogroup に属する生後感染型 AKAV のマウスに対する病原性を検討する目的で、Genogroup II に属する FI/Br/08 株の遺伝子操作系を確立し、rFI 株及び FI $\Delta$ NSs 株を作出した。これらの培養細胞 (Vero) における増殖能は同等であった。次に、これら 2 株に加え rKM 株、およびその NSs 遺伝子欠損株である KM $\Delta$ NSs 株を 3 日齢哺乳 ICR マウスに  $10^2$  PFU ずつ脳内接種した。その結果、rKM 株接種群は 6 日目までに全個体が死亡し、KM $\Delta$ NSs 株接種群では発症・死亡にわずかに遅延が見られたものの ( $p=0.0012$ )、7 日目までに全個体が死亡し

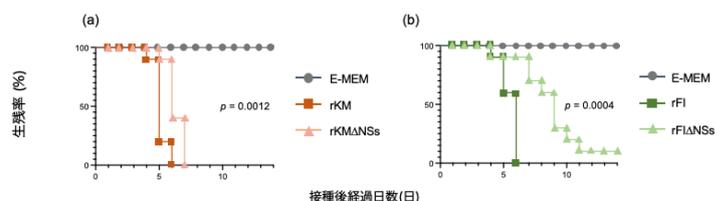


図2 組換えウイルス株およびNSs欠損ウイルス株接種マウスの生存率

3日齢ICRマウスに、Iriki株、KM株ならびにFI株の組換えウイルス株およびNSs欠損ウイルス株を  $1 \times 10^2$  FFU/匹となるように脳内接種した。接種後14日間マウスを観察し、生死を評価した。

(a)rKM株およびrKM $\Delta$ NSs株、(b)rFI株およびrFI $\Delta$ NSs株を接種したマウスの生存曲線を示す。

なお各p値は、Log-rank法にて算出した組換えウイルス株-NSs欠損ウイルス株間で算出したものを示した。

た(図 2a)。一方、rFI 株接種群は 6 日目までに全個体が死亡したのに対し、FI $\Delta$ NSs 株接種群では発症・死亡が大きく遅延した(図 2b)。したがって、両株における NSs 遺伝子の病原性への貢献度が大きく異なる可能性が示された。

次に、これら 4 株のウイルスを 4 週齢の ICR マウスへ  $10^5$ PFU ずつ脳内接種し、その症状変化、致死率について検討した。その結果、rKM 株及び KM $\Delta$ NSs 株接種群では同等の症状を示し、いずれも接種 6 日目までにほぼ全ての個体が死亡した。一方、rFI 株接種群は 9 日目までに全個体が死亡したのに対し、FI $\Delta$ NSs 株接種群では発症個体もみられたもののほとんどが無症状のまま生残した(図 3)。なお、 $10^2$ PFU ずつ脳内接種した場合は rKM 株感染マウスが全個体死亡したのに対し、KM $\Delta$ NSs 感染マウスは半数以上生残したことから、KM 株の神経病原性に NSs 遺伝子は部分的に関与している可能性が示された。

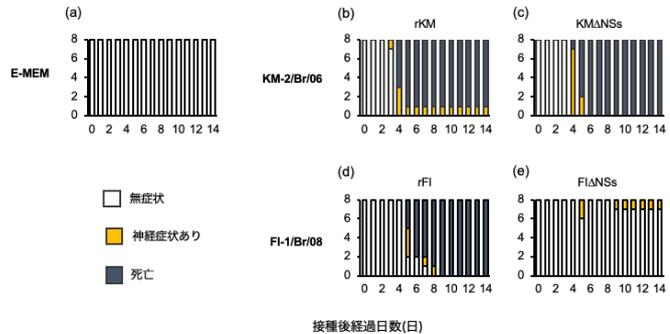


図3 組換えウイルス株およびNSs欠損ウイルス株における神経病原性の評価

4週齢ICRマウスに、rKM株、rKM $\Delta$ NSs株、rFI株ならびにrFI $\Delta$ NSs株を $1 \times 10^5$  FFU/匹となるように脳内接種した。接種後14日間マウスを観察し、無症状(白)、神経症状あり(黄)または死亡(黒)のいずれかで評価した。(a)E-MEM、(b)rKM株、(c)KM $\Delta$ NSs株、(d)rFI株、(e)FI $\Delta$ NSs株の結果を示した。

以上より、KM 株の病原性は NSs 遺伝子以外のウイルス遺伝子によって規定されるのに対し、FI 株の病原性は NSs 遺伝子に大きく依存していることが示された。

#### 4-2 NSs 遺伝子の有無がマウス脳内におけるウイルス増殖に及ぼす影響の検討

NSs 遺伝子が規定する神経病原性についてさらに調べるため、各株接種マウス脳内におけるウイルス力価を経時的に測定した(図 4)。rKM 株及び KM $\Delta$ NSs 株接種群では、脳乳剤中のウイルス力価は接種 5 日目まで同等に上昇し、いずれの接種群マウスも 6 日目までに全個体死亡した。これに対し、rFI 株接種群では接種 9 日目に全個体が死亡するまで、継続的に脳乳剤中ウイルス力価の上昇がみられたのに対し、FI $\Delta$ NSs 株接種群ではウイルス力価の上昇は間欠的であり、接種 10 日目からは検出限界以下となった。したがって、脳内におけるウイルス増殖の程度の違いが神経病原性の強さに関連することが示された。

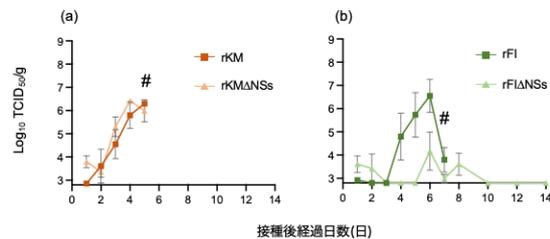


図4 マウス脳内における組換えウイルス株およびNSs欠損ウイルス株の増殖曲線

4週齢ICRマウスに、(a)rKM株およびrKM $\Delta$ NSs株、(b)rFI株およびrFI $\Delta$ NSs株を $1 \times 10^5$  FFU/匹となるように脳内接種した。接種後1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12または14日目に、各AKAV株に感染した生存マウス4匹を無作為に選り、脳を採取した。ホモジナイズしたマウス脳内のウイルス力価を、TCID<sub>50</sub>/gとして算出した。採材した4匹のマウスのTCID<sub>50</sub>/gの平均値とSEを示す。  
#: 感染マウスが14dpi前に全て死亡したことを示す。

4-3 NSs 遺伝子の有無が牛由来初代培養細胞の自然免疫関連遺伝子発現に及ぼす影響の検討  
牛血管由来培養細胞である HH 細胞に各ウイルスを感染させ、その増殖曲線を作成するとともに自然免疫関連遺伝子発現量をリアルタイムPCRによって定量・比較した。HH 細胞における rKM 株及び KM $\Delta$ NSs 株の増殖は同程度であったのに対し、FI $\Delta$ NSs 株の増殖は rFI 株に比べ、いずれの時間においても顕著に低かった(図 5)。HH 細胞は上皮系の初代培養細胞であり自然免疫系も健全であると考えられることから、FI 株の NSs 遺伝子は他の同属ウイルス同様、自然免疫回避に重要な役割を示すのに対し、KM 株の NSs 遺伝子は自然免疫回避に大きく寄与していない可能性が考えられた。

各株感染 HH 細胞における自然免疫関連遺伝子 (*IFN-β1*, *IFN-β2*, *ISG54* および *Mx1a*) の発現量をリアルタイム PCR によって測定したところ、KM 株および FI 株の双方とも、親株に比べ NSs 遺伝子欠損株のほうが強く自然免疫関連遺伝子の発現量を上昇させることが示された (図 6)。

したがって、両株とも NSs 遺伝子は自然免疫関連遺伝子の発現制御に関わることが示された。特に、KM 株の NSs 蛋白質単独発現では自然免疫関連遺伝子の発現を抑制しないにもかかわらず (第 162 回獣医学会にて発表)、NSs 遺伝子欠損ウイルスでは自然免疫関連遺伝子の発現を強く上昇させたため、同株では他のウイルス遺伝子産物との相互作用による自然免疫回避機構の存在が示唆された。

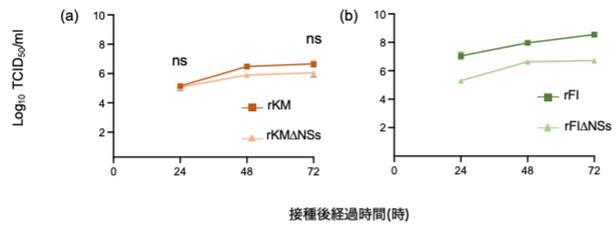


図5 HH細胞における組換えウイルス株およびNSs欠損ウイルス株の増殖曲線

ウシ頸動脈正常血管内皮初代培養細胞(HH細胞)に、rKM株、rKMΔNSs株、rFI株およびrFIΔNSs株をmoi=0.01となるよう接種し、各AKAV株の増殖曲線を描いた。(a)rKM株およびrKMΔNSs株の増殖曲線、(b)rFIおよびrFIΔNSs株の増殖曲線を示す。  
エラーバーはSEを示す(n=3)。 ns:  $p \geq 0.05$

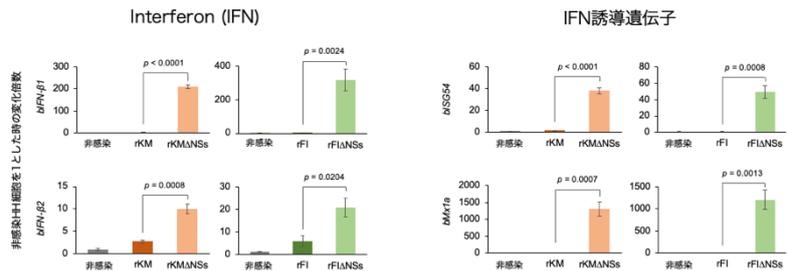


図6 組換えウイルス株およびNSs欠損ウイルス株感染HH細胞における自然免疫関連遺伝子の発現量

HH細胞に、rKM株、rKMΔNSs株、rFI株およびrFIΔNSs株をmoi=1となるよう接種し、接種から24時間後に、各ウイルス株感染HH細胞からRNAを回収した。回収したRNAを基に合成したcDNAを用いてリアルタイムPCRを行い、各AKAV株感染HH細胞中における自然免疫関連遺伝子の発現量を測定した。  
各自然免疫関連遺伝子の発現量は、陰性対照である非感染HH細胞における発現量を1とした時の変化倍数として示した。  
エラーバーはSE(n=3)を示す。

#### 4-4 NSs 遺伝子以外の病原性関連遺伝子および病原性規定アミノ酸の同定

KM 株は NS 遺伝子が自然免疫関連遺伝子発現を制御するにもかかわらず、KM ΔNSs 株のマウスに対する神経病原性は親株と同等であったことから、NSs 遺伝子以外の病原性関連因子の存在が強く示唆された。これを明らかにする目的で、他のウイルスでも行われているように、培養細胞での連続継代による弱毒株の作出とその解析を実施した。Vero 細胞で 10 回および 20 回連続継代することで KMV10 株および KMV20 株をそれぞれ樹立し、マウスに脳内接種したところ、いずれも親株である rKM 株に比べ著しい病原性の減弱が認められた (図 7)。

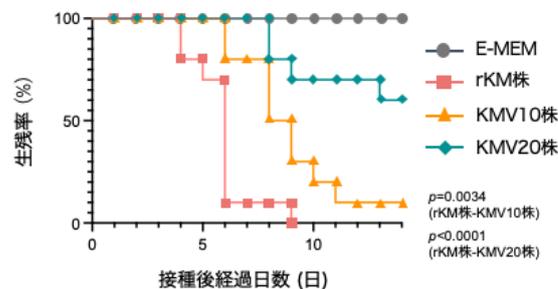


図7 Vero 細胞継代株のマウスに対する病原性

KMV20 株の全ゲノム配列を次世代シーケンスによって決定した結果、NSs 蛋白質、Gn 蛋白質および Gc 蛋白質をそれぞれコードする配列に 1 つずつ、アミノ酸変化を伴う変異を計 3 つ見出した。これらアミノ酸をさまざまな組み合わせで持つ変異ウイルスを作出し、マウスに対する神経病原性を検討した結果、いずれのアミノ酸も病原性の減弱に寄与することが示唆された。以上より、KM 株の病原性には NSs 蛋白質、Gn 蛋白質および Gc 蛋白質がそれぞれ関与していることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Okajima Misuzu, Takenaka-Uema Akiko, Fujii Yuji, Izumi Fumiki, Kojima Isshu, Ozawa Makoto, Naitou Kiyotada, Suda Yuto, Nishiyama Shoko, Murakami Shin, Horimoto Taisuke, Ito Naoto, Shirafuji Hiroaki, Yanase Tooru, Masatani Tatsunori	4. 巻 169
2. 論文標題 Differential role of NSs genes in the neurovirulence of two genogroups of Akabane virus causing postnatal encephalomyelitis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Archives of Virology	6. 最初と最後の頁 7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00705-023-05929-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岡島 美鈴, 泉 郁輝, 藤井 祐至, 西山 祥子, 伊藤 直人, 梁瀬 徹, 正谷 達膳
2. 発表標題 病原性決定遺伝子領域の特定を目的とした生後感染型アカバネウイルスVero細胞継代株の作出
3. 学会等名 第165回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 須田 遊人, 室田 勝功, 岡島 美鈴, 正谷 達膳, 梁瀬 徹
2. 発表標題 アカバネウイルスのウイルス様粒子を用いた代替中和試験法の構築
3. 学会等名 第69回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岡島 美鈴, 泉 郁輝, 藤井 祐至, 西山 祥子, 伊藤 直人, 梁瀬 徹, 正谷 達膳
2. 発表標題 神経病原性発現機構の解明を目的としたVero細胞連続継代による生後感染型アカバネウイルスの弱毒化
3. 学会等名 第69回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岡島 美鈴, 児島 一州, 内藤 清惟, 小澤 真, 須田 遊人, 梁瀬 徹, 正谷 達膳
2. 発表標題 生後感染型アカバネウイルスの神経病原性におけるNSs蛋白質の役割
3. 学会等名 第164回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Okajima M, Kojima I, Naitou K, Ozawa M, Suda Y, Yanase T, Ito N, Masatani T.
2. 発表標題 Akabane virus NSs protein shows strain-related variation as a factor for neurovirulence with post-natal infection in a mouse model
3. 学会等名 第68回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岡島美鈴, 泉郁輝, 伊藤直人, 正谷達膳
2. 発表標題 生後感染型アカバネウイルスの宿主自然免疫抑制におけるNSs蛋白質の役割
3. 学会等名 第70回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	西山 祥子  (Shoko Nishiyama)  (90817058)	岐阜大学・応用生物科学部・助教    (13701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------