

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 25 年 5 月 17 日現在

機関番号：32669
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22580343
 研究課題名（和文） ネコ伝染性腹膜炎ウイルス複製過程におけるサイクロフィリンの機能解析
 研究課題名（英文） Functional analysis of cyclophilins on feline infectious peritonitis virus replication
 研究代表者
 田中 良和（TANAKA YOSHIKAZU）
 日本獣医生命科学大学・獣医学部・講師
 研究者番号：50291159

研究成果の概要（和文）：ネコ伝染性腹膜炎（FIP）は、ワクチンが無く、効果的な治療法のない致死的な感染症である。研究代表者は、免疫抑制剤サイクロスポリン A（CsA）が FIP ウイルスのゲノム複製と転写を阻害することを発見した。CsA と結合するサイクロフィリン(Cyp)のうち、CypA および CypB が FIPV の増殖を促進し、また、Cyp が有するシャペロン機能である PPIase 活性がウイルス複製に関与していることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Feline infectious peritonitis virus (FIPV) causes lethal diseases and no effective vaccine or treatment has been developed. These experiments clarified that Cyclosporin A (CsA) strongly inhibits replication and transcription of FIPV. Also, both cellular cyclophilin A (CypA) and cyclophilin B (CypB), which bind to CsA enhanced the FIPV replication. PPIase activities of Cyp are affected the FIPV replication.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2100,000	630,000	2,730,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：ウイルス複製・サイクロフィリン

1. 研究開始当初の背景

伴侶動物のウイルス性感染症のうち、ネコ伝染性腹膜炎 (FIP) はワクチン開発が未だ成功しておらず、効果的な治療法も確立されていない疾患で、一度発症すると致死的な経過をたどる。また、同じウイルス株をネコに実験感染させても、個体によって病原性が発現するものと発現しないものがあり、同じ培養細胞を用いてもウイルス株によって感染複製効率が異なるということから、ウイルス複製を制御している細胞側およびウイルス側因子の存在が考えられる。

このウイルス病は、複雑な免疫機構を介し

て発症することが報告されている。しかし、免疫に関わる各サイトカインの応答も感染ネコによって異なり、一概に免疫系だけが発症に関与しているとも考えがたい。一方、本ウイルスに対する宿主感受性の違いや異なる細胞株間におけるウイルス複製効率の違いに関する報告は、国内外問わず、極めて少ない。このため、ウイルス複製制御因子を解析し、病原性発現機構を明らかにすることが切望されている。

2. 研究の目的

ネコ伝染性腹膜炎 (FIP) は、現在、有効な

治療法やワクチンがなく、発症すると致死的な経過をたどる。代表研究者は様々な生理活性物質や薬剤の抗 FIPV 活性をスクリーニングした結果、免疫抑制剤サイクロスポリン A (CsA) が FIP ウイルス (FIPV) ゲノム複製・転写を阻害することを世界で初めて発見した。本研究は CsA と結合する細胞内サイクロフィリン (Cyp) の FIPV ゲノム複製および転写に与える影響を分析し、ウイルス複製制御機構を解析する。これにより病原性発現機構を明らかにすることを目的とした。このため、ウイルス複製に影響を与える Cyp の同定およびその標的ウイルス結合因子 (遺伝子領域、蛋白質) の同定と結合領域の解析を行う。

3. 研究の方法

(1) ネコ Cyp 遺伝子のクローニングおよびウイルス複製に影響を与える Cyp の同定

- ① 哺乳類における Cyp 蛋白質は現在 9 種類同定されているが、各動物間で遺伝子配列が高率に保存されている。このため、PCR 法によりネコ Cyp をクローニングし遺伝子配列の決定を試みた。
- ② 各 Cyp 遺伝子を細胞に強制発現させ、FIPV 感染時における複製効率の影響をウェスタンブロット法、リアルタイム PCR 法、TCID₅₀ 測定法により解析した。
- ③ クローニングした遺伝子配列を元に shRNA を作成し、細胞に導入後、各 Cyp がノックダウンされた細胞をクローニングした。
- ④ 各ノックダウン細胞に FIPV を感染させた。その後、ウェスタンブロット法、リアルタイム PCR 法、TCID₅₀ 測定法にてウイルス複製量を解析し、ウイルス複製に影響を及ぼす Cyp を同定した。

(2) ウイルス複製に影響を与える Cyp と結合するウイルス蛋白質の同定と解析

- ① 各ウイルス遺伝子とともに Cyp 遺伝子を細胞に遺伝子導入し、蛋白質を発現させ、免疫沈降・ウェスタンブロット法にて結合を確認した。
- ② ウイルス蛋白質に結合する Cyp 遺伝子をノックダウンした細胞に野生型 Cyp 遺伝子を再び発現させ、FIPV 感染時のウイルス複製効率を検証した。
- ③ CypA および CypB 蛋白質の PPIase 活

性におけるドミナントネガティブ細胞を樹立し、FIPV の複製効率を解析した。

4. 研究成果

(1) ネコ Cyp 遺伝子のクローニングおよびウイルス複製に影響を与える Cyp の同定

- ① ネコ Cyp 遺伝子として CypA, CypB, CypC, CypD, CypH をクローニングし、塩基配列を決定した。
- ② CypA および CypB 強制発現細胞において FIPV の複製効率が表 1 に示したように増強された。

表 1.

		CypA	CypB
強制発現	WB	1.6 倍 ↑	2.8 倍 ↑
	qRT-PCR	1.8 倍 ↑	3.2 倍 ↑
	TCID ₅₀	2 倍 ↑	3 倍 ↑

- ③ 各 Cyp 遺伝子に対するノックダウン細胞を FIPV 感染感受性細胞である fcwf-4 細胞を用いて樹立を試みた結果、CypA および CypB に対するノックダウン細胞が樹立できた。
- ④ CypA および CypB ノックダウン細胞にそれぞれ FIPV を感染させ、20 時間後に細胞を回収し、ウイルス複製を解析した結果、どちらのサイクロフィリンをノックダウンしてもウイルス産生量は減少した (表 2)。

表 2.

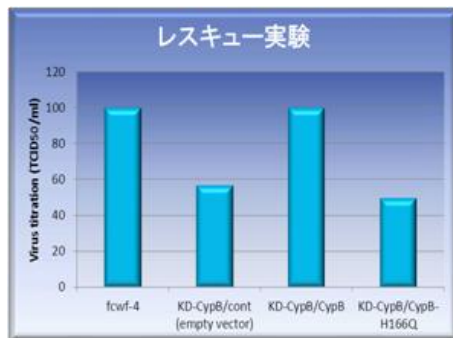
	KD-CypA	KD-CypB
WB	2.6 倍 ↓	2.4 倍 ↓
TCID ₅₀	5 倍 ↓	3.3 倍 ↓

(2) ウイルス複製に影響を与える Cyp と結合するウイルス蛋白質の同定と解析

- ① 共免疫沈降法にて CypA 蛋白質と FIPV-N 蛋白質、E 蛋白質が結合することが確認できた。
- ② CypB ノックダウン細胞に野生型の CypB を導入し、CypB 蛋白質発現を回復した細胞を樹立した。この細胞に FIPV を感染させ、ウイルス産生能を解析したところ、親株の fcwf-4 感染細胞と比較し、同程

度のウイルス産生量が回復した (図 1)。

図 1.



- ③ CypAおよびCypBのPPIaseドミナントネガティブ細胞においてFIPVの複製が有意に低下した。CypAのH126Qでは1.8倍の低下, R55Aでは2.9倍の低下, F60Aでは2.3倍の低下が認められた。また, CypBでは, H166Qにおいて1.8倍の低下が認められた (表 3)。

表 3.

	FIPV N-protein
Control	100
CypA-H126Q	55.6
CypA-R55A	34.1
CypA-F60A	44.1
CypB-H166Q	55.5

以上の結果から, Cyp蛋白質がFIPVの複製に重要な役割を持っていることが明らかとなった。また, Cypが有するPPIase活性がFIPVの複製に重要であることがわかった。本結果は, コロナウイルス複製におけるCypの役割を示した初めてのデータである。今後, 具体的にCypがどのようにウイルス複製に関与しているかを詳細に解析することで, 新たなウイルス阻害剤の開発やワクチンの開発に有用な知見を与えるものであり, 近年アウトブレイクした新型コロナウイルスやSARSを含む動物コロナウイルスの感染制御にとって新たな治療戦略の開発の突破口になる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

- ①Tanaka Y, Sato Y, Sasaki T. Suppression of coronavirus replication by cyclophilin inhibitors. *Viruses* 2013, 5, 1250-1260;

doi:10.3390/v5051250. 査読あり

- ②Terada Y, Shiozaki Y, Shimoda H, Mahmoud HY, Noguchi K, Nagao Y, Shimojima M, Iwata H, Mizuno T, Okuda M, Morimoto M, Hayashi T, Tanaka Y, Mochizuki M, Maeda K. Feline infectious peritonitis virus with a large deletion in the 5' terminal region of spike gene retains its virulence for cats. *Journal of General Virology*, 2012, 2012 Sep;93(Pt 9):1930-4. Epub 2012 Jun 20. PubMed PMID: 22718568. 査読あり

- ③Sasaki T, Tsubakishita S, Tanaka Y, Ohtsuka M, Hongo I, Fukata T, Kabeya H, Maruyama S, Hirota S, Hiramatsu K. Population genetic structures of *Staphylococcus aureus* isolates from cats and dogs in Japan. *Journal of Clinical Microbiology*. 2012 March 21. [Epub ahead of print]. 査読あり

- ④Tanaka Y, Sato Y, Osawa S, Inoue M, Tanaka S, Sasaki T. Suppression of feline coronavirus replication in vitro by cyclosporin A. *Veterinary Research*, 2012, Apr 30;43(1):41. PubMed PMID: 22546085; PubMed Central PMCID: PMC3403912. 査読あり

- ⑤Sasaki T, Tsubakishita S, Tanaka Y, Sakusabe A, Ohtsuka M, Hirota S, Kawakami T, Fukata T, Hiramatsu K. Multiplex-PCR method for species identification of coagulase-positive staphylococci. *Journal of Clinical Microbiology*. 48 (3); 765-769 [Epub ahead of print] PubMed PMID: 20053855. 2010 Jan. 査読あり

[学会発表] (計 3 件)

- ①佐藤由佳, ネコ伝染性腹膜炎ウイルスの複製におけるシクロフィリンの役割, 第152回日本獣医学会学術集会講演要旨集, Page244, 大阪, 2011年9月

- ②Yoshikazu Tanaka, Inhibition of feline infectious peritonitis viral replication by cyclosporine. American Society for Virology meeting, 29th, Montana State University, Bozeman, MO, USA, July 19, 2010, abstracts; p. 230.

- ③田中良和, オリンパス株式会社共催; ランチョンセミナー, 予防動物医学の展開, 第149回日本獣医学会学術集会講演要旨集, Page:

77, 東京・日本獣医生命科学大学, 2010年3月26日

〔産業財産権〕(計2件)

発明者: 田中 良和
特許権者: 学校法人 日本医科大学
特許第 5263729
登録日: 平成 25 年 5 月 10 日
ネコ伝染性腹膜炎ウイルス (FIPV) の予防及び治療剤特許権; 国内

発明者: 田中 良和
特許権者: 学校法人 日本医科大学
特許第 5263730
登録日: 平成 25 年 5 月 10 日
ネコ伝染性腹膜炎ウイルス (FIPV) の予防及び治療剤特許権; 国内

〔図書〕(計1件)

①田中 良和, 他, チクサン出版社, 「犬と猫の早期疾病診断学」分担
猫のウイルス感染症, 予防動物医学研究会編
2011, pp. 132-136

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 良和 (TANAKA YOSHIKAZU)
日本獣医生命科学大学・獣医学部・講師
研究者番号: 50291159