

機関番号： 10101
 研究種目： 基盤研究 (B)
 研究期間： 2008~2010
 課題番号： 20380157
 研究課題名 (和文) マレック病ウイルスの病原性進化とワクチンブレイクの分子基盤の解明

研究課題名 (英文) Studies on the molecular mechanisms for Marek' s disease virus to increase its virulence in the field

研究代表者

大橋 和彦 (OHASHI KAZUHIKO)
 北海道大学・大学院獣医学研究科・教授
 研究者番号： 90250498

研究成果の概要 (和文) : マレック病ウイルス (MDV) の野外における病原性進化の分子機構を明らかにするために、種々の MDV 株におけるウイルス遺伝子を解析した。その結果、一部のウイルス遺伝子 (*meq*) に病原性進化に関与すると思われる遺伝子多型が同定された。そこでこれらの遺伝子多型の *meq* 遺伝子産物 (Meq) の機能に対する影響を解析したところ、Meq の転写活性化能や形質転換能が、多型によるアミノ酸置換により大きく変化することが示され、これらの遺伝子多型の MDV の病原性進化への寄与が示唆された。

研究成果の概要 (英文) : To clarify the molecular mechanisms for Marek' s disease virus (MDV) to increase its virulence, several viral genes of MDV strains recently isolated from the field were analyzed. Diversities/polymorphisms were identified in one of the MDV genes, *meq*, that could be potentially related to the increase in MDV virulence. When we analyzed the effects of these diversities/polymorphisms in the *meq* gene on the functions of the *meq* gene product (Meq), the amino acid substitutions resulted from the diversities/polymorphisms significantly altered the transactivation and transforming activities of Meq. These findings suggest that the diversities/polymorphisms in the *meq* gene could contribute to the recent increase in MDV virulence in the field.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2008年度 | 5,900,000 | 1,770,000 | 7,670,000 |
| 2009年度 | 4,700,000 | 1,410,000 | 6,110,000 |
| 2010年度 | 3,900,000 | 1,170,000 | 5,070,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 14,500,000 | 4,350,000 | 18,850,000 |

研究分野： 獣医学
 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、マレック病、マレック病ウイルス

1. 研究開始当初の背景

マレック病ウイルス (MDV) は、ヘルペスウイルス科に属し、自然宿主である鶏に悪性リンパ腫を引き起こす。MDV はこれまで、養鶏業界に甚大な被害をもたらしてきたが、1970年代以降、非病原性 MDV をワクチンとして用いることで、現在ではほぼ完全に制圧さ

れている。しかし、依然 MDV による腫瘍化の分子機構やワクチンのマレック病防御機構については解明されていない。また MDV は感染鶏に免疫抑制を引き起こし、他の疾病を増悪する因子としても重要であり、近年、世界各地でワクチン接種鶏でもマレック病が発生する、いわゆる“ワクチンブレイク”が発

生し、野外におけるMDVの強毒化（病原性進化）が報告されている。そして、このようなMDVの強毒化により、今後現行のワクチンが効力を失う可能性があり、強毒MDVによるワクチンブレイクの分子基盤を明らかにして新規防除法を樹立することが急務となっている。しかしワクチンブレイクを引き起こすMDVの強毒化の原因やその分子機構は現在のところ不明である。

以上より、近年、国内で分離された強毒MDV株や野鳥由来MDV株の病原性進化に伴うウイルスゲノムの変化を同定し、それらの変化による病原性への影響を検討することは、今後MDVによるワクチンブレイクに対抗する新規防除法を開発するためにも重要であると考えられる。また強毒MDVによる病態形成の分子機構やワクチンブレイクを引き起こす際の宿主側標的因子や病原性発現の分子機構については全く判明していないのが現状であり、今後の解析が待たれている。

2. 研究の目的

病原性進化に伴い出現した強毒MDVによるワクチンブレイクに対抗する防除法を開発するために、日本国内でワクチンブレイクを起こした鶏より分離される種々の強毒MDV株のゲノム解析を行い、MDVの病原性進化に伴うウイルスゲノムの構造変化・変異領域を同定する。そして、同定された変異や遺伝子多型のMDV病原性変化における役割を培養細胞や実験感染鶏を用いて解析して、MDVの病原性進化の分子基盤を解明する。また強毒MDVが鶏に感染してワクチンブレイクを引き起こす際の宿主側標的因子や病原性発現の分子機構については全く判明していないので、強毒MDV感染鶏におけるマイクロアレイ解析を行い、MDV病原性進化に伴う宿主標的因子群を同定し、感染鶏におけるそれら因子群の動態解析を行いワクチンブレイクの分子機構を宿主側からも明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) 近年、国内において、ワクチンブレイクを起こした養鶏（MDワクチン接種済み）より分離したMDV株で、MDVの病原性に関与すると考えられている種々のウイルス遺伝子（*UL49*、*MDV074*、*vIL8*、*vTR*、*meq*など）の塩基配列を解析して、既に病原性が判明しているMDV株のものと比較して、MDVの強毒化に伴う遺伝子変化・多型などを同定した。
- (2) MDVの発癌遺伝子と考えられており、病原性に重要である*meq*遺伝子で同定された遺伝子多型について、それらが*meq*遺伝子産物（Meq）の機能（転写活性化能や形質転換能）に及ぼす影響をデュアルルシフェラーゼアッセイや軟寒天コロニー

形成試験にて解析した。

- (3) 強毒MDVの病態形成機構を明らかにするために、MDV強毒株に実験感染した鶏を用いたマイクロアレイ解析を行い、MDVの病態形成の標的となる宿主側因子の同定を行った。さらにサイトカインなど免疫関連因子のMDV強毒株感染鶏における発現動態を解析した。

4. 研究成果

国内各地でワクチンブレイクを起こしたと考えられる鶏より分離したMDV株（北海道十勝地区、岐阜県、三重県など）およびマガン（ロシアシベリア地区）で検出されたMDV株（ウイルス分離はできず）において、これまでウイルス株間で相違が報告されている種々のウイルス遺伝子（*UL49*、*MDV074*、*vIL8*、*vTR*、*meq*など）の塩基配列を解析して、病原性が既に判明しているMDV株のそれぞれの遺伝子と比較した。その結果、*UL49*や*MDV074*遺伝子には病原性の変化を示すような多型は認められず、MDVによる腫瘍化への関与が報告されている*vTR*遺伝子についても、従来報告されている強毒MDV株と同一の塩基配列であり、*vIL8*遺伝子では、遺伝子多型が若干検出されたが、MDVの病原性進化に関与するような大きな変化は検出されなかった。一方、MDVの腫瘍化に最も重要とされている*meq*遺伝子について解析したところ、国内分離MDV株やマガン由来MDVゲノムの*meq*遺伝子産物（Meq）にはいくつかのアミノ酸変異を伴う遺伝子多型が、Meqの機能的ドメインである転写調節領域（transactivation domain）や標的DNA結合領域（basic region）に存在していた。また、既知の強毒MDV株のMeqにおける多型と本研究で認められた多型は大部分が一致していたが、一部は国内分離MDV株で特有の多型も存在していた。さらに病原性進化との関連は不明であるが、一部は国内分離MDV株で*gB*遺伝子内に新規の多型が認められた。

Meqは、Jun/Fosタンパクに類似した転写活性化因子と考えられており、これまでの研究でもMeqの種々の機能的ドメインにおけるアミノ酸配列置換を伴う遺伝子多型とMDVの病原性に相関が示唆されていたので、本研究で検出されたこれらMeqにおける多型がMeqの機能に及ぼす影響を解析した。最初にMeqのtransactivation domainやbasic regionにおける多型とその転写活性化能に及ぼす影響をデュアルルシフェラーゼ試験により解析した。その結果、transactivation domainやbasic regionにおける遺伝子多型がMeqの転写活性化能を変化させることが判明した（図1）。すなわち強毒MDV株（vv/vv+）で観られた配列の方が、比較的弱毒であるMDV株（v/m）の配列に比べて、より高い転写

活性化能を示した。中でも特に basic region における遺伝子多型が転写活性化能に及ぼす影響が大きく、この領域における多型の MDV の病原性への寄与が示唆された。また、未だ野外で分離される MDV 株では報告がないもの、ある特定の遺伝子多型 (図 1、basic region の KY 配列の場合) では、他の多型に比較して非常に Meq の機能が亢進することが示された。

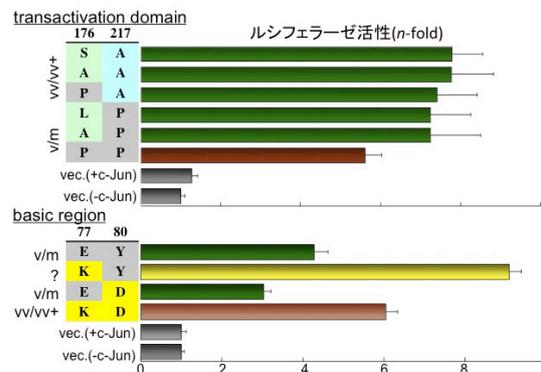


図 1 Meq の遺伝子多型による転写活性化能の変化

次にこれらの遺伝子多型が Meq の形質転換能に及ぼす影響を軟寒天コロニー形成試験により解析した。種々の遺伝子多型を導入した Meq を安定発現する細胞株 (鶏線維芽細胞株 DF-1) を樹立して、それらの軟寒天内でのコロニー形成能を解析した。その結果、前述のデュアルルシフェラーゼ試験の結果と同様に、Meq はそのアミノ酸置換 (多型) に応じて様々な形質転換能を示したが、強毒 MDV 株の Meq では高い形質転換能を示し、弱毒 MDV 株の配列では、低い活性のみが観察された。さらに特に 77、80 番目 (basic region) のアミノ酸置換によって、その活性は大きく変化することが示された。また野外分離株ではこれまで報告されていないある特定の変異 (basic region の KY 配列の場合) を導入して検討したところ、これまで報告されている強毒 MDV 株のものより高い形質転換能が観察され、MDV は将来的に、さらなる病原性を進化する可能性があることが示唆された。

強毒 MDV 株による病態形成の分子機構については、未だ不明な点が多く、MDV の病原性進化に伴う病態形成機構の変化については、ほとんど判明していない。そこで強毒 MDV の病態形成機構を明らかにするために、強毒 MDV 株を実験感染させた鶏から、経時的にリンパ球を分離して mRNA を調製して、マイクロアレイ解析を行い、標的となる宿主側因子の同定を行った。その結果、interferon- γ (IFN γ) などのサイトカインを含む種々の免疫関連因子が標的として同定された。そして強毒 MDV 株感染鶏においてより詳細に解析した結果、強毒 MDV 株単独感染鶏では、ワクチン株 (弱毒株) 感染鶏に比べて、IFN γ の産生が感染初

期から特異的に抑制されていることが示され (図 2)、強毒 MDV 株による病態形成機構への IFN γ 発現の関与が示唆された。さらに γ δ 型 TCR を持つ T 細胞が病態形成および防御機構に重要であることが明らかとなった。以上のように、本研究により MDV の病原性進化に伴う遺伝子が同定されたが、Meq タンパクを用いた in vitro での効果のみが確認された。今後、これらの遺伝子変化を含む感染性ウイルスクローンなどを作成し、実際に鶏における病原性進化の分子機構を解明する必要がある。

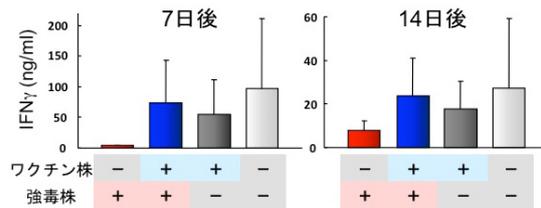


図 2 MDV 実験感染鶏における IFN γ 産生の抑制

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 15 件)

- ① Murata, S., Konnai, S., & Ohashi, K. 2011. Analysis of transcriptional activities of the Meq proteins present in highly virulent Marek's disease virus strains, RB1B and Md5. *Virus genes* 印刷中 査読有り
- ② Ikebuchi, R., Konnai, S., Sunden, Y., Onuma, M., & Ohashi, K. 2010. Molecular cloning and expression analysis of bovine programmed death-1. *Microbiol. Immunol.* 54: 291-298. 査読有り
- ③ Kano, R., Konnai, S., Onuma, M., & Ohashi, K. 2009. Cytokine profiles in chickens infected with virulent and avirulent Marek's disease viruses: interferon-gamma is a key factor in the protection of Marek's disease by vaccination. *Microbiol. Immunol.* 53: 224-232. 査読有り
- ④ Kano, R., Konnai, S., Onuma, M., & Ohashi, K. 2009. Microarray analysis of host immune responses to Marek's disease virus infection in vaccinated chickens. *J. Vet. Med. Sci.* 71: 603-610. 査読有り
- ⑤ Mingala, C. N., Konnai, S., Cruz, L. C., Onuma, M., & Ohashi, K. 2009. Comparative moleculo-immunological analysis of swamp and riverine type water buffaloes responses. *Cytokine* 46: 273-282. 査読有り
- ⑥ Imamura, S., da Silva Vaz, I. Jr.,

- Konnai, S., Yamada, S., Najajima, C., Onuma, M., & Ohashi, K. 2009. Effect of vaccination with a recombinant metalloprotease from *Haemaphysalis longicornis*. *Exp. Appl. Acarol.* 48:345-358. 査読有り
- ⑦ Saito, Y., Konnai, S., Yamada, S., Imamura, S., Nishikado, H., Ito, T., Onuma, M., & Ohashi, K. 2009. Identification and characterization of antimicrobial peptides, defensin, in the taiga tick *Ixodes persulcatus*. *Insect Mol. Biol.*, 18: 531-539. 査読有り
- ⑧ Mingala, C. N., Konnai, S., Venturina, A., Onuma, M., & Ohashi, K. 2009. Quantification of water buffalo (*Bubalus bubalis*) cytokine expression in response to inactivated foot-and-mouth disease (FMD) vaccine. *Res. Vet. Sci.* 87: 213-217. 査読有り
- ⑨ Mingala, C. N., Konnai, S., Onuma, M., & Ohashi, K. 2009. Classification of new BVDV isolates from Philippine water buffalo using the viral E2 region *J. Basic Microbiol.* 49: 495-500. 査読有り
- ⑩ Mekata, H., Konnai, S., Witola, W.H., Inoue, N., Onuma, M., and Ohashi, K. 2009. Molecular detection of trypanosomes in cattle in South America and genetic diversity of *Trypanosoma evansi* based on expression-site-associated gene 6. *Infect. Genet. Evol.* 9: 1301-1305. 査読有り
- ⑪ Parizi, L. F., Rech, H., Ferreira, C. A., Imamura, S., Ohashi, K., Onuma, M., Masuda, A., & da Silva Vaz I. Jr. 2009. Comparative immunogenicity of *Haemaphysalis longicornis* and *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* calreticulins. *Vet. Parasitol.* 164: 282-290. 査読有り
- ⑫ Odbileg, R., Purenvtseren, B., Gantsetseg, D., Boldbaatar, B., Buyannemekh, T., Galmandakh, Z., Erdenebaatar, J., Konnai, S., Onuma, M., & Ohashi, K., 2008. Cytokine responses in camels (*Camelus bactrianus*) vaccinated with *Brucella abortus* strain 19 vaccine. *J. Vet. Med. Sci.* 70: 197-201. 査読有り
- ⑬ Hatai, H., Ochiai, K., Nagakura, K., Imanishi, S., Ochi, A., Kozakura, R., Ono, M., Goryo, M., Ohashi, K., & Umemura, T. 2008. A recombinant avian leukosis virus associated with fowl glioma in layer chickens in Japan. *Avian Pathol.* 37: 127-137. 査読有り
- ⑭ Hatai, H., Ochiai, K., Murakami, M., Imanishi, S., Tomioka, Y., Toyoda, T., Ohashi, K., & Umemura, T. 2008. Prevalence of fowl glioma-inducing virus in chickens of zoological gardens in Japan and nucleotide variation in the *env* gene. *J. Vet. Med. Sci.* 70: 469-474. 査読有り
- ⑮ Muraio, T., Omata, Y., Kano, R., Murata, S., Okada, T., Konnai, S., Asakawa, M., Ohashi, K., & Onuma, M. 2008. Serological survey of *Toxoplasma gondii* in wild waterfowl in chukotka, Kamchatka, Russia and Hokkaido, Japan. *J. Parasitol.*, 94: 830-833. 査読有り
- [学会発表] (計9件)
- ① 河東あゆ美、村田史郎、加納里佳、今内覚、大橋和彦. マレック病ウイルス感染鶏における免疫抑制受容体 PD-1 とそのリガンド PD-L1 の発現解析. 第150回日本獣医学会学術集会 帯広畜産大学(帯広)、2010年9月18日
- ② 松原綾子、村田史郎、加納里佳、橋口知幸、伊勢崎政美、河東あゆ美、小沼操、今内覚、大橋和彦. マガンおよび鶏における interferon- γ 遺伝子プロモーター活性の比較解析. 第150回日本獣医学会学術集会 帯広畜産大学(帯広)、2010年9月18日
- ③ Matsubara, A., Murata, S., Kano, R., Hashiguchi, T., Isezaki, M., Kato, A., Onuma, M., Konnai, S., & Ohashi, K. Regulation of the interferon gamma expression by an oncoprotein of Marek's disease virus in wild waterfowls and chickens. 9th International Veterinary Immunology symposium, Tokyo, Japan. August 16-20, 2010.
- ④ 大橋和彦、松原綾子、村田史郎、今内覚. マガンなどの野生水禽の疾病抵抗性とマレック病ウイルスの分布. 第149回日本獣医学会学術集会 日本獣医生命科学大学(武蔵野)、2010年3月28日
- ⑤ 加納里佳、今内覚、小沼操、大橋和彦. 弱毒および強毒マレック病ウイルス感染鶏における免疫応答に関する研究. 第7回サイトカイン研究会学術集会 とりぎん文化会館(鳥取)、2009年9月24日
- ⑥ 橋口知幸、村田史郎、岡田幸、加納里佳、今内覚、小沼操、大橋和彦. マレック病ウイルス *meq* 遺伝子の多型に伴う Meq タンパクの転写活性化能の変化. 第146回日本獣医学会学術集会 シーガイア(宮崎)、2008年9月24日

- ⑦ Murata, S., Okada, T., Kano, R., Hayashi, Y., Hashiguchi, T., Konnai, S., Onuma, M., & Ohashi, K. Amino acid substitutions or insertion in the Meq proteins could affect their transactivation and transformation abilities. 8th International Marek' s disease symposium, Townsville, Australia. July 6-10, 2008.
- ⑧ Kano, R., Murata, S., Okada, T., Konnai, S., Onuma, M., & Ohashi, K. Expression of genes related to cell-mediated immune responses in chickens infected with Marek' s disease virus. 8th International Marek' s disease symposium, Townsville, Australia. July 6-10, 2008.
- ⑨ Kokubu, R., Yamagishi, N., Okada, T., Ohashi, K., & Takagi, M. Analysis of chicken p63 gene in chicken lymphoblastoid tumor cell lines. 8th International Marek' s disease symposium, Townsville, Australia. July 6-10, 2008.

[図書] (計1件)

- ① Ohashi, K., Murata, S., Okada, T., & Konnai, S. 2010. The detection and characterization of the *meq* variants of Marek' s disease virus. pp117-132. In: Maeda, A. (ed), Animal Viruses (総ページ数:166), Transworld Research Network, Kerala, India.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大橋 和彦 (OHASHI KAZUHIKO)
北海道大学・大学院獣医学研究科・教授
研究者番号：9 0 2 5 0 4 9 8

(2) 研究分担者

落合 謙爾 (OCHIAI KENJI)
北海道大学・大学院獣医学研究科・准教授
研究者番号：8 0 2 1 4 1 6 2
今内 覚 (KONNAI SATORU)
北海道大学・大学院獣医学研究科・准教授
研究者番号：4 0 3 9 6 3 0 4