

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2014

課題番号：23658252

研究課題名(和文) 口蹄疫研究への応用を目指したサロゲートウイルスの作出

研究課題名(英文) A surrogate virus for researches on foot-and-mouth disease

研究代表者

堀本 泰介 (Horimoto, Taisuke)

東京大学・農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：00222282

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：口蹄疫の拡大に野生動物が関与する可能性を探るため、野生ニホンジカが口蹄疫ウイルスに対するレセプター分子を有するかを検証した。その結果、主要なレセプター分子であるインテグリンalpha V、beta 6、およびbeta 8が同定され、口蹄疫ウイルスの感受性動物である偶蹄類のものと極めて高い相同性を持つことがわかった。しかし、牛ライノウイルス2型をサロゲートとして用いたレセプターの機能検証までは至らなかった。

研究成果の概要(英文)：To examine whether wildlife may be responsible for spread of foot-and-mouth disease (FMD), I searched cell receptor molecules for FMD virus (FMDV) on the organs of Japanese wild deer. I identified integrin alpha V, beta 6, and beta 8, which are supposed to be the main receptor molecules for FMDV, suggesting that such deer are susceptible to FMDV, although I have not authenticated their functional roles using bovine rhinovirus 2 as a surrogate of FMDV.

研究分野：獣医ウイルス学

キーワード：ウイルス レセプター インテグリン

1. 研究開始当初の背景

- (1) 2010年に宮崎県で発生した口蹄疫は莫大な経済被害を及ぼした。しかし、ウイルスの侵入経路と拡大様式が不明であり、科学的な防疫対策の確立までは至っていない。韓国などの周辺国ではいまだ口蹄疫の発生が見られていることから、今後再び日本で口蹄疫が発生する危険性がある。
- (2) 一方、感染の拡大には何らかの野生動物が関与する可能性があり、特にシカやイノシシなど偶蹄類の野生動物に対するウイルス感受性のデータは、今後の防疫対策に欠かせない知見となる。
- (3) しかし、感染実験など感染性ウイルスを扱う全ての実験には動物衛生研究所の高度封じ込め施設 (BSL3+ag) が必要であり、それが口蹄疫研究進展の大きな障害となっている。

2. 研究の目的

- (1) 野生動物が口蹄疫ウイルスに感受性であるかどうかをウイルスレセプターの存在から検証する。
- (2) 非感染性の口蹄疫代替サロゲートウイルスを構築し、口蹄疫ウイルスの野生動物に対する感受性を評価する。

3. 研究の方法

- (1) わが国在来の野生動物であるイノシシとニホンジカの臓器 (筋肉、肺、腎、肝臓など) を入手する。
- (2) 入手した臓器を用い、口蹄疫ウイルスの細胞レセプターとして機能するという報告のあるインテグリンファミリーのいくつかの遺伝子を同定する。
- (3) 分子進化学上、口蹄疫ウイルスに最も近縁であるウシライノウイルス2型が、口蹄

疫ウイルス研究のためのサロゲートウイルスとして応用できるかを検討する。

4. 研究成果

- (1) 初年度は、わが国在来の野生動物であるイノシシとニホンジカの臓器 (筋肉) を入手し、口蹄疫ウイルスの細胞レセプターとして機能するという報告のあるインテグリンファミリーのいくつかの遺伝子の同定を試みるために、臓器から抽出したmRNAをテンプレートにRT-PCRを実施したが目的遺伝子の増幅は認められなかった。すでに報告のあるインテグリン共通プライマーの不適合、あるいは入手臓器におけるインテグリン遺伝子の非発現が考えられた。また、ウシライノウイルス2型を日生研より入手し、培養細胞での増殖条件を検討した。それにより、今後の研究に必要な種ウイルスを調整した。

- (2) 次年度は、イノシシとニホンジカの他の臓器 (肺、腎、肝臓など) を入手し、同様にインテグリンファミリーのいくつかの遺伝子の同定を試みた。その結果、一部のインテグリン遺伝子断片の増幅に成功した。一方、サロゲート候補であるウシライノウイルス2型のレセプター結合遺伝子領域のクローニングにも一部成功した。

- (3) 前年度に引き続きインテグリンファミリー遺伝子の解析を実施した。その結果、口蹄疫ウイルスの主要レセプターとされるインテグリン alpha V、beta 6、および beta 8 の全長塩基配列の決定に成功した。その他、beta 3 の部分配列の決定にも成功した。これらの塩基配列を用い、他の動物種のインテグリンファミリー遺伝子との相同性解析を行ったところ、ニホンジカのインテグリン遺伝子は、口蹄疫ウイルスの感受性動物である偶蹄目のグループに属することが確かめられ

た。興味深いことに、口蹄疫が問題となる牛と豚の中間にシカのインテグリン遺伝子が位置している(図)。

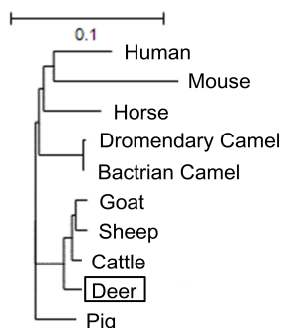


図 インテグリンαVの進化系統樹

(4) 最終年度は、口蹄疫の感受性動物である牛や豚のインテグリン分子と極めて近縁なニホンジカのインテグリン分子が、口蹄疫ウイルスのレセプターとして機能するかどうかの検証を試みた。シカのインテグリン分子を高度に発現する培養細胞を構築し、牛ライノウイルス2型をサロゲートとしてその感染が増強するかどうかの検証を計画したものの、インテグリン発現細胞が構築できなかったため、その検証までには至らなかった。

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4件)

Takemae H, Sugi T, Kobayashi K, Murakoshi F, Recuenco FC, Ishiwa A, Inomata A, Horimoto T, Yokoyama N, Kato K. Analyses of the binding between *Theileria orientalis* major piroplasm surface proteins and bovine red blood cells. *Vet. Rec.* 175: 149, 2014. DOI: 10.1136/vr.102535. 査読有

Murakoshi F, Takeuchi M, Inomata A, Horimoto T, Ito M, Suzuki Y, Kato K. Administration of lasalocid-NA is preventive against *Cryptosporidiosis*

of newborn calves. *Vet. Rec.* 175: 353, 2014. DOI: 10.1136/vr.102508. 査読有

Murakoshi F, Tozawa Y, Inomata A, Horimoto T, Wada Y, Kato K: Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from calves in Ishikari District, Hokkaido, Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 75: 837-840, 2013. DOI:無
査読有

Tsuda S, Watanabe S, Masangkay JS, Mizutani T, Alviola P, Ueda N, Iha K, Taniguchi S, Fujii H, Kato K, Horimoto T, Kyuwa S, Yoshikawa Y, Akashi H: Genomic and serological detection of bat coronavirus from bats in the Philippines. *Arch. Virol.* 157: 2349-2355, 2012. DOI: 10.1007/s00705-012-1410-z. 査読有

〔学会発表〕(計1件)

津田峻平、渡辺俊平、Masangkay JS、水谷哲也、Alviola P、上田直也、伊波興一郎、谷口怜、藤井ひかる、加藤健太郎、堀本泰介、久和茂、吉川泰弘、明石博臣：フィリピンに生息するコウモリのコロナウイルス保有状況の調査 第152回日本獣医学会 2011.9.20. 大阪府立大学(堺)

〔図書〕(計0件)

〔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

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀本 泰介 (HORIMOTO, Taisuke)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・准
教授

研究者番号: 00222282

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: