

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：32669

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08088

研究課題名(和文) 自然免疫制御能の異なるペスチウイルスの共存に起因する感染特性の分子基盤研究

研究課題名(英文) Molecular analysis of infectious properties caused by coexistence of pestiviruses with different innate immune regulation within viral strains

研究代表者

青木 博史 (Aoki, Hiroshi)

日本獣医生命科学大学・獣医学部・准教授

研究者番号：10440067

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ペスチウイルスの原型とされる牛ウイルス性下痢ウイルス1型と2型の自然免疫抑制型と誘導型を単離し、全ゲノムを比較し、両型に共通して非構造タンパク質3領域にアミノ酸置換がみつき、自然免疫応答の責任遺伝子がNproである可能性が高まった。自然免疫抑制型と誘導型のウイルスが培養細胞に重感染すると、感染細胞に現れる生物現象が消失することや、お互いの自然免疫制御能やウイルス複製を抑制しつつも感染を維持することが判った。インターフェロン受容体ノックアウト細胞の樹立し、それを用いて詳細に解析することで、ウイルス株に共存する自然免疫抑制型と誘導型の直接的なウイルス間相互反応が明らかになると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、牛ウイルス性下痢ウイルスの同一株内に遺伝子検査や通常のウイルス検査では捉え難い性格の異なるウイルスが混在しており、それらが相互に影響しあいながらウイルス株の性状を変化させ、しいては宿主への病原性等を変化させている可能性を示唆している。すなわち、ペスチウイルス共通の現象である可能性もあり、ペスチウイルスの多様な病態や持続感染性を理解する上で重要かつ新たな知見を提供する可能性が高い。また、自然免疫誘導型のウイルスがその他の性状のウイルスの複製や宿主への作用に抑制的に働く可能性を有しており、ペスチウイルスの診断やワクチンへの応用の可能性を有すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Bovine viral diarrhea virus, which is the prototype of pestivirus, is divided to two types: innate immunosuppressive (E+) and inducible (E-) types. Each type was reisolated from some viral strains of BVDV-1 and BVDV-2, respectively, and the whole genomes of these viruses were compared. As a result, there are substitutions in 3 nonstructural viral protein regions between these types, and Npro was likely to be responsible for the innate immune response. Superinfection of E+ and E- viruses on cultured cells had result the biological phenomenon caused by each virus to disappear, but each virus had maintain the infection while suppressing each other's innate immune regulation and virus replication. The establishment of interferon receptor knockout cells in this study might reveal in detail the direct viral interactions between E+ and E- viruses that coexist in virus strains.

研究分野：ウイルス学

キーワード：ペスチウイルス 牛ウイルス性下痢ウイルス 自然免疫制御 ウイルス間相互反応 内因性干渉

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) ペスチウイルス属に分類される病原ウイルス3種：豚熱ウイルス、牛ウイルス下痢症ウイルス、羊のボーダー病ウイルスは、いずれも細胞病原性や自然免疫応答の違いによって少なくとも3つの生物型に分類できる。近年の分子ウイルス学的研究により、各生物型の生物学的特性と病原性や自然免疫制御能力との関係が明らかになってきたが、ペスチウイルス感染症の多様な病態や持続感染を説明するには至っていない。

(2) 野外で流行し、感染動物から分離されるペスチウイルス株の中に、自然免疫応答が相反するウイルスが様々な比率で混在していることが明らかになった。しかし、それらウイルスは自然免疫制御能力が拮抗するにもかかわらず動物の体内でどうして共存できるのか、どのように共存しているのか、疾病にどのように関与するかは不明なままである。

2. 研究の目的

ウイルス株の中に混在する自然免疫応答が拮抗するウイルスの相互作用の平衡や変調が、病態の多様性や自然界のウイルス存続に関係しているとの仮説を立てた。それを検証するため、基礎情報となる自然免疫制御能力が相反するウイルスが共感染した培養細胞内における各ウイルスの複製や自然免疫応答の分子機序を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

ペスチウイルスの原型とされる牛ウイルス性下痢ウイルス (BVDV) を用いて検証する。また、遺伝的及び血清学的に異なる BVDV1 型と BVDV2 型の両方を用いた。

(1) 自然免疫応答の相反するウイルスのクローニングと遺伝子解析

BVDV1 型と BVDV2 型の野外株の中から、限界希釈法を用いて自然免疫抑制型 (E+) ウイルスを単離し、他方で逆ブラック法を用いて自然免疫誘導型 (E-) ウイルスを単離した。次いで、各々のウイルスについて限界希釈による生物学的クローニングを3回繰り返して純化した後、各ウイルスのゲノムを解析した。また、得られたゲノム情報に基づいてリバースジェネティクス系によるウイルス人工合成系の構築を試み、分子クローニングを図った。

(2) 培養細胞におけるウイルス重感染実験

クローン化した BVDV1 型の E+ 又は E- ウイルスと BVDV2 型の E- 又は E+ ウイルスを組み合わせて牛由来培養細胞に重感染させ、各ウイルスによる感染細胞に表れる生物現象の有無、BVDV1 型と BVDV2 型を識別するリアルタイム PCR による細胞内のウイルス複製状況、自然免疫応答に関与するウイルス抵抗性タンパク質 Mx1 遺伝子の発現状況について検証した。各ウイルスの生物学的検出には、E+ ウイルス感染細胞にみられるニューカッスル病ウイルスによる細胞変性効果が増強される END 現象を利用した END 法を、E- ウイルス感染細胞にみられる水疱性口炎ウイルスによる細胞変性効果を阻止する干渉現象を利用した干渉法を用いた。

(3) インターフェロン受容体欠損細胞の作製とウイルス複製の解析

E-ウイルスによって誘導される自然免疫がウイルス同士の相互関係の解析を邪魔する可能性があるため、自然免疫反応を示さない培養細胞の作製を行った。ゲノム編集ツール (CRISPR-Cas9 システム) を用い、自然免疫の中心的役割を担うインターフェロン (IFN) の受容体を欠損した IFN 受容体ノックアウト細胞を作出し、クローニングを繰り返した。得られたクローン細胞に E+ と E- ウイルスを感染させ、インターフェロン活性化遺伝子 ISG15 の発現とウイルス複製の程度を確認した。

4. 研究成果

(1) ウイルス遺伝子の相違

BVDV1 型と BVDV2 型のそれぞれの E+ 及び E- ウイルスのアミノ酸配列を比較したところ、E+ と E- の間で BVDV1 型では5カ所、BVDV2 型では6カ所にアミノ酸置換が見つかり (表1) 非構造タンパク質の Npro、NS5A 及び NS5B で共通して存在した。特に、自然免疫制御に関連する Npro 領域に1カ所のアミノ酸置換があり、Npro が自然免疫応答の責任遺伝子であるとの知見を支持する可能性があった。NS5A に見つかったアミノ酸置換の位置は BVDV1 型と2型で非常に近接しており、E+ と E- ウイルスの生物性状の相違に関与する可能性も考えられる。人工合成ウイルスを用いて自然免疫応答の責任遺伝子の検証を行ったところ、BVDV1 型では Npro の8番目のアミノ酸置換が自然免疫応答の相違を決定することが判明した。BVDV2 型では、ウイルス人工合成が達成されず、自然免疫応答の

表1 E+ウイルスとE-ウイルスの間で見つかったアミノ酸置換

ウイルス蛋白質 アミノ酸番号*1	Npro	Core	NS5A	NS5B		
				3617	3896	
BVDV1型	E+	Leu	Ala	Arg	Asn	Thr
	E-	Pro	Thr	Gly	Asp	Ala

ウイルス蛋白質 アミノ酸番号*1	Npro	NS2	NS4B	NS5A	NS5B		
					3260	3506	
BVDV2型	E+	Lys	Val	Asn	Lys	Glu	Lys
	E-	Asn	Ile	Asp	Arg	Asp	Asn

*ポリペプチドの第1番目のアミノ酸(メチオニン)から数えた順の番号

*Ala:アラニン、Arg:アルギニン、Asn:アスパラギン、Asp:アスパラギン酸、Glu:グルタミン酸、Gly:グリシン
Ile:イソロイシン、Leu:ロイシン、Lys:リジン、Pro:プロリン、Thr:トレオニン、Val:バリン

決定因子の同定には至っていない。

(2) 自然免疫応答が拮抗するウイルス間の相互反応

生物学的に純化した BVDV1 型の E+ と E- ウイルスの比率を変えて混合して同時に培養細胞に感染させ、48 時間後の感染細胞内の Mx1 の発現を調べたところ、自然免疫を誘導する E- が混ざっているにもかかわらず Mx1 発現が検出されない比率が存在し(図1) E+ ウイルスが E- ウイルスの自然免疫誘導能に抑制的に働いていることが判明した。

生物学的に純化した BVDV1 型と 2 型の E+ と E- ウイルスを組み合わせて培養細胞に重感染させ、48 時間後の感染細胞について、END 現象と干渉現象などの生物現象の出現状況、ウイルス遺伝子の複製、Mx1 の発現を検証した。その結果、初感染が E+ ウイルスの場合、重感染した E- ウイルスによってウイルス抵抗性蛋白質 Mx1 が弱いながらも発現し、E+ ウイルスの複製効率を低下させる一方で E- ウイルスは複製を維持、初感染が E- ウイルスの場合、E+ ウイルスが重感染してもウイルス抵抗性蛋白質 Mx1 は抑制されながらも十分に発現し、E+ と E- ウイルスともにウイルス複製効率は低下することが判明した(図2)。また、いずれの順番で感染しても、END 現象や干渉現象は消失又は減弱することがわかった。

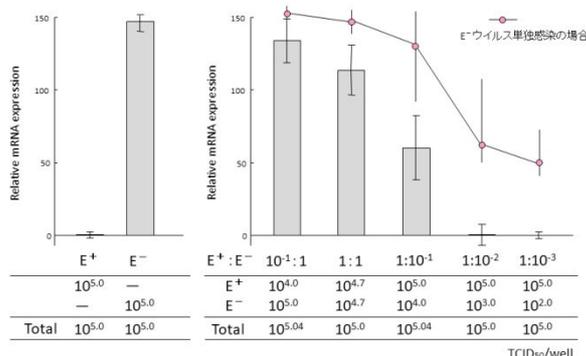


図1 E+とE-ウイルスが異なる混合比で感染したときのウイルス抵抗性タンパク質 Mx1 の発現の検出 (* 非感染細胞における Mx1 mRNA 発現量との相対発現量)

初感染が E+ ウイルスの場合、重感染した E- ウイルスによってウイルス抵抗性蛋白質 Mx1 が弱いながらも発現し、E+ ウイルスの複製効率を低下させる一方で E- ウイルスは複製を維持、初感染が E- ウイルスの場合、E+ ウイルスが重感染してもウイルス抵抗性蛋白質 Mx1 は抑制されながらも十分に発現し、E+ と E- ウイルスともにウイルス複製効率は低下することが判明した(図2)。また、いずれの順番で感染しても、END 現象や干渉現象は消失又は減弱することがわかった。

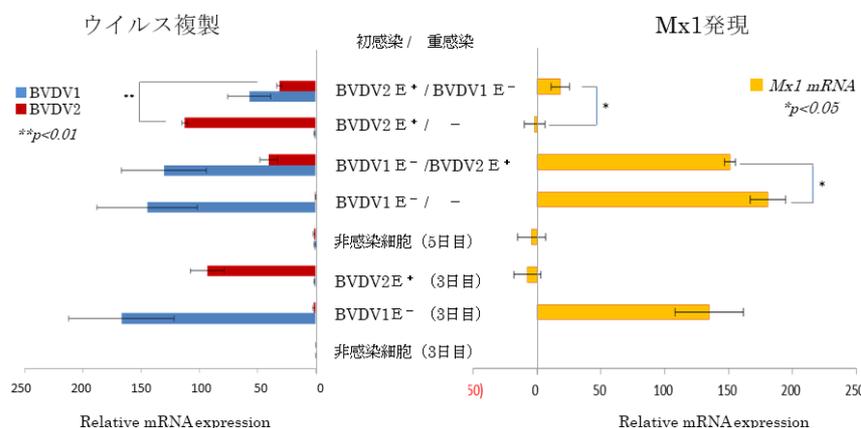


図2 E+とE-ウイルス重感染時のウイルス複製とMx1の発現

これらのことから、ウイルス株に混在する E+ と E- ウイルスが相互に影響しあって感染細胞の免疫応答を変化させているが、宿主細胞に感染する順番やウイルスの量によって生物現象が見かけ上で消失又は減弱することがわかった。また、両ウイルスの重感染はウイルス複製にとって見かけ上は不利に働いているようにみえるが、E- ウイルスは持続的な感染する可能性があることがわかった。

(3) IFN 受容体ノックアウト細胞の作製

ゲノム編集ツール(CRISPR-Cas9 システム)を用いて IFN 受容体をノックアウトした牛腎由来培養細胞の作製を試み、6 クローンの候補細胞を得た。それら細胞に、BVDV1 型の E+ 及び E- ウイルスを感染させ、並びにヒト型 IFN を添加し、インターフェロン活性化遺伝子 ISG15 の発現を調べたところ、1 クローンで発現が全く認められなかった(図3)。なお、E+ 及び E- ウイルスを感染させたいずれのクローンにおいても、細胞内で効率よくウイルスが複製していた。従って、作成した IFN 受容体ノック

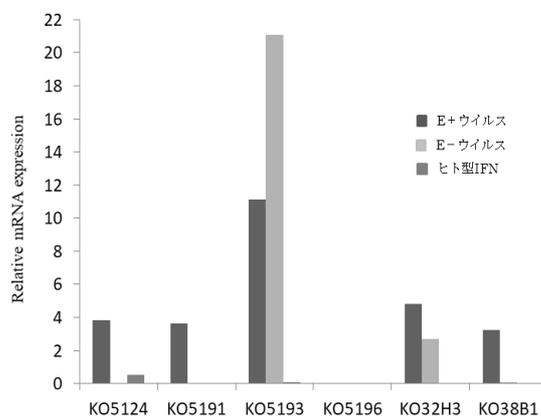


図3 インターフェロン受容体ノックアウト候補細胞におけるインターフェロン活性化遺伝子 ISG15 の発現 ISG15 mRNA 検出リアルタイム PCR を行い、非刺激細胞の ISG15 mRNA 発現量の値との比較定量値で示した。

アウト細胞は、IFN 反応系を欠損している可能性があり、今後さらなるクローニングと詳細な解析を行うことによって、IFN の影響を排除した E+ と E- ウイルスの細胞内相互反応の解析に有用なツールになると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Mai Shiokawa, Tsutomu Omatsu, Yukie Katayama, Tetsuya Mizutani, Yoshihiro Sakoda, Akio Fukusho, Hiroshi Aoki
2. 発表標題 END(-) of bovine viral diarrhoea virus supports the propagation of END(+) in the situation where host's innate immune response is induced
3. 学会等名 日本ウイルス学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 八尋大河、塩川舞、青木博史
2. 発表標題 牛ウイルス性下痢ウイルス野外株中のEND陰性ウイルス混在の簡易測定法の検討
3. 学会等名 日本獣医学会
4. 発表年 2019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
連携研究者	長井 誠 (Nagai Makoto) (10540669)	麻布大学・獣医学部・教授 (32701)	
連携研究者	塩川 舞 (Shiokawa Mai) (00739162)	日本獣医生命科学大学・獣医学部・講師 (32669)	