

研究種目： 基盤研究 (B)

研究期間： 2007~2009

課題番号： 19380170

研究課題名 (和文) 豚コレラウイルスの病原性に関する自然免疫回避機構の解明

研究課題名 (英文)

Molecular basis of pathogenicity of classical swine fever virus –
Mechanism of down regulation of innate immunity in the cells and
pigs infected with classical swine fever virus–

研究代表者

迫田 義博 (SAKODA YOSHIHIRO)

北海道大学・大学院獣医学研究科・准教授

研究者番号： 40333637

研究成果の概要 (和文)：

豚コレラウイルスの病原性発揮に関与すると考えられている自然免疫回避機構を分子レベルで解明することを目的とし、ウイルス非構造蛋白 N^{pro} の点変異体や欠損体を作製し、1 型 IFN の産生抑制に必須なアミノ酸領域を決定した。このアミノ酸の変異は、①C112R、②D136N、③H5Y、L8F、P17S のいずれかであることがわかった。また、この自然免疫の調節に関与する N^{pro} 上のアミノ酸の変異は、豚における病原性発揮の要因の 1 つであることを明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：

To assess the molecular basis of classical swine fever virus, the mechanism of down regulation of innate immunity mediated by type-1 interferon was analyzed using mutant viruses constructed by reverse genetics. Critical amino acids of N^{pro} protein for the control of type-1 interferon production were determined and it was concluded that the down regulation of innate immunity mediated by type-1 interferon was one of the important factors for the pathogenicity of classical swine fever virus in pigs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	6,400,000	1,920,000	8,320,000
2008 年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
2009 年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
年度			
年度			
総計	14,000,000	4,200,000	18,200,000

研究分野：微生物学／ウイルス学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学／応用獣医学

キーワード：豚コレラウイルス／病原性／自然免疫／ペスチウイルス／宿主

1. 研究開始当初の背景

豚コレラは豚の熱性、敗血症性の疾病で強い伝染力と高い致死率を特徴とする豚の最重要ウイルス疾病である。わが国では家畜法

定伝染病に指定されており、世界獣疫事務局 (OIE) の定める基準でも最重要のリスト A 疾病に指定されている。2004 年、日本の清浄化が達成されつつあった折りに鹿児島県で

疑似例が発見され、養豚業界に大きな被害を与えた。豚コレラの原因ウイルスである豚コレラウイルスはフラビウイルス科ペスチウイルス属の1本鎖RNAウイルスである。

動物は病原微生物の感染初期に即時的に働く防御機能を持っている。微生物の感染に対するこのような抵抗性を総称して自然免疫 (Innate Immunity) と呼び、抗体応答を主とする獲得免疫とは区別される。この自然免疫の中心を担っているのがインターフェロン(IFN) $-\alpha$ および IFN- β 、すなわち1型IFNである。

豚コレラウイルス野外強毒株が感染した細胞では、この1型IFNの産生が抑制され、逆に弱毒株が感染した細胞では1型IFN産生は促進される (Kumagai ら, 1958; Shimizu ら, 1961)。これまでに国内外で分離された豚コレラウイルスの分子疫学解析 (Sakoda ら, *Vet. Microbiol.*, 1999) および生物性状解析から (Sakoda ら, *J. Virol. Methods*, 1998a, 1998b; Aoki ら, 2003)、分離された野外強毒株はすべて1型IFNの産生を抑制することがわかった。

豚コレラウイルスの病原性を規定する因子として自然免疫を回避する能力の有無が重要であると考え、我々はこの分子基盤を明らかにする研究を開始した。これまでの研究成果から、豚コレラウイルスが線維芽系細胞に感染すると、ウイルス非構造蛋白 N^{pro} が宿主側の転写因子であるIFN産生調節因子3 (IRF-3) に作用し、ユビキチンプロテアソーム系によりIRF-3を分解させることがわかった (Bauhofer ら, 2006)。このIRF-3の分解により1型IFN産生が抑制され、豚コレラウイルス強毒株は、線維芽系細胞において自然免疫から回避するものと考えられる。しかし、この自然免疫の回避に必須なウイルス蛋白 N^{pro} 分子上のアミノ酸領域の同定、さらに N^{pro} がどのようにIRF-3の分解を促進させるのかは明らかになっていない。また、これまでの成績は線維芽細胞における自然免疫応答についてしか解析しておらず、抗原提示に働く免疫系細胞 (樹状細胞など) に豚コレラウイルスが感染した場合の応答は解析されていない。

2. 研究の目的

豚コレラウイルスの病原性に関与すると考えられる自然免疫回避機構を分子レベルで解明することを目的とし、以下の点を中心に研究を進める。

(1) 樹状細胞における豚コレラウイルスの自然免疫回避システムを解明する。

(2) 1型IFNの産生抑制に関与するウイルス蛋白 N^{pro} 上のアミノ酸領域を決定する。

(3) ウイルス蛋白 N^{pro} がプロテアソームによる細胞側因子の分解を促進する分子メカ

ニズムを解明する。

(4) N^{pro} に変異を挿入した豚コレラウイルスを作成し、本ウイルスのブタに対する病原性を解析する。

3. 研究の方法

(1) 樹状細胞における豚コレラウイルスの自然免疫回避システムの解明

我々はこれまでに、豚コレラウイルスが線維芽系細胞においてIFN- β プロモーターに結合する転写因子IRF-3の活性を阻害することを明らかにした。一方、他の研究グループの成績から、抗原提示などの役割を果たす免疫系細胞 (樹状細胞) では、宿主側の自然免疫を司る転写因子としてIRF-3と共にIFN産生調節因子7 (IRF-7) も重要と考えられている。また、1型IFN産生のためのシグナル伝達系において、IRF-3やIRF-7の上流に位置するIFN- β promoter stimulator 1

(IPS-1) も感染したウイルスのターゲットとなり、この蛋白の活性阻害が自然免疫の抑制に働くことも知られている。

そこで、豚コレラウイルス強毒株と弱毒株が感染した樹状細胞における1型IFNの産生量の測定、IPS-1、IRF-3およびIRF-7の細胞内における発現量とその局在の差を比較することにより、豚コレラウイルス強毒株が免疫系細胞内でどのように自然免疫を回避するのか体系的に解明する。さらに線維芽細胞における場合と同様に、ウイルス蛋白 N^{pro} がこれに重要な役割を果たすのか確認する。

(2) 1型IFNの産生抑制に関与するウイルス蛋白 N^{pro} 上のアミノ酸領域の決定

我々のこれまでの研究成果から、線維芽細胞ではウイルス蛋白 N^{pro} が宿主側の転写因子IRF-3の分解を促進し、1型IFNの産生を抑制していることが明らかとした (Bauhofer ら, 2006)。しかし、IRF-3の分解促進に必須な N^{pro} 上のアミノ酸領域の特定は行われていない。そこで、 N^{pro} 蛋白の点変異体や欠損体を作製し、本活性に必須なアミノ酸領域を決定する。またこの N^{pro} 分子上のアミノ酸領域が樹状細胞に豚コレラウイルスが感染した際の自然免疫からの回避にも必須な領域であることを確認する。

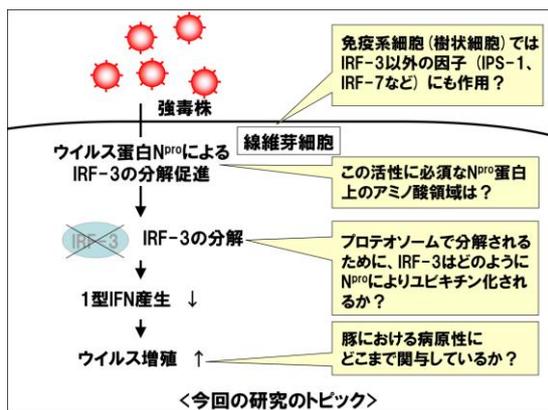
(3) ウイルス蛋白 N^{pro} がプロテアソームによる細胞側因子の分解を促進する分子メカニズムの解明

そもそも、ウイルス蛋白 N^{pro} の生物活性としてセリンプロテアーゼ活性が知られているが、 N^{pro} のプロテアーゼ活性を阻害してもIRF-3は分解されることから (我々の研究による未発表データ)、 N^{pro} にはプロテアーゼ活性とは別に、IRF-3のユビキチン化を促進する活性を有していると考えられる。そしてこ

のユビキチン化された IRF-3 がプロテアソームにより分解され、IFN- β 遺伝子の転写が抑制されると考えられる。そこで、N^{pro} が IRF-3 のプロテアソームによる蛋白分解を促進させる分子メカニズムを明らかにする。さらに樹状細胞においても N^{pro} が細胞側因子 (IPS-1、IRF-3 または IRF-7) のユビキチン-プロテアソーム分解系による蛋白分解を促進させること、さらにその分子メカニズムを同様に解析する。

(4) N^{pro} に変異を挿入した豚コレラウイルスの作出と本ウイルスのブタに対する病原性の解析

(1) ~ (3) の成績から、豚コレラウイルスが自然免疫を回避する分子メカニズムの概要が明らかにされる。これらの成績を確認するために、リバーズジェネティクス法を用いて自然免疫の制御に関与することが同定された N^{pro} 領域に変異や欠損を人工的に挿入したウイルスを作出する。この変異ウイルスをブタに接種し、生体レベルでの本ウイルスの病原性にこの自然免疫の回避が重要な役割を果たすか否かを確認する。さらに、変異ウイルスが弱毒化されていることが確認



できれば、本変異ウイルスの生ワクチン株としての有効性を評価する。

4. 研究成果

(1) 樹状細胞における豚コレラウイルスの自然免疫回避システムの解明

まず、自然免疫関連因子を追跡するために、それぞれの因子に対する特異抗体を作出した。ヒトやマウスの IFN 産生調節因子 7 (IRF-7) 遺伝子や IFN- β promoter stimulator 1 (IPS-1) 遺伝子の配列との相同性から、ブタの IRF-7 および IPS-1 の遺伝子をクローニングした。これら大腸菌発現系で発現精製後、モノクローン抗体を作出した。これらの抗体は目的の抗原を細胞内で特異的に検出できた。豚コレラウイルス強毒株 ALD または弱毒株 GPE-を樹状細胞に接種し、培養上清中の 1 型 IFN の産生量を定量し、ウェスタンブロット法により IPS-1、IRF-3、

IRF-7 およびウイルス蛋白 N^{pro} の細胞内における発現量、局在、リン酸化、二量体の形成の有無を解析した。その結果、豚コレラウイルス感染細胞内ではウイルス非感染細胞に比べて IPS-1 の発現動態に変化が起きることがわかった。この現象は豚コレラウイルス株の毒力には関係なく観察された。また、強毒株感染細胞では IRF-3 がプロテアソーム系を介して分解され、細胞内から減少することがわかった。この現象は弱毒株感染細胞では認められなかった。以上より、IRF-3 発現量の減少には線維芽細胞における場合と同様に、樹状細胞においてもウイルス蛋白 N^{pro} がこれに重要な役割を果たしていることが明らかになった。

(2) 1 型 IFN の産生抑制に関与するウイルス蛋白 N^{pro} 上のアミノ酸領域の決定

豚コレラウイルスの病原性に関与すると考えられる自然免疫回避機構を分子レベルで解明することを目的とし、ウイルス非構造蛋白 N^{pro} の点変異体や欠損体を作製し、1 型 IFN の産生抑制に必須なアミノ酸領域を決定した。その結果、1 型 IFN の産生抑制に必須なアミノ酸は、比較したウイルス株の組み合わせにより大きく 3 パターンに分けられ、① C112R の変異、② D136N の変異、③ H5Y、L8F、P17S の 3 つのアミノ酸の変異のいずれかであることがわかった。また、これらの 3 つのパターンのアミノ酸変異を有する N^{pro} の IFN- β 遺伝子プロモーター活性に及ぼす影響をルンフェラーゼアッセイによって解析したところ、これらの変異を有する N^{pro} 蛋白はインターフェロン調節因子 (IRF) -3 の働きを左右し、IFN- β 遺伝子プロモーターの活性を調節することがわかった。なお、これらのアミノ酸変異の場所は、N^{pro} が有するプロテアーゼの活性に必須な領域とは異なっていた。

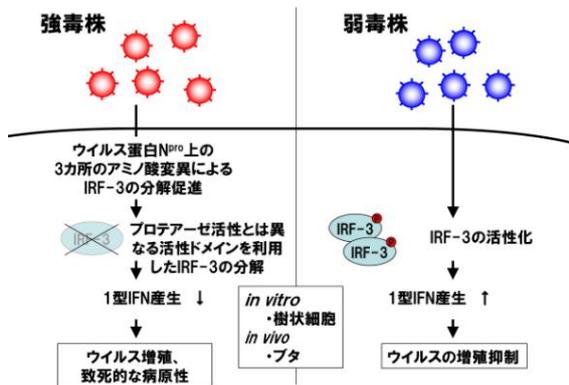
(3) ウイルス蛋白 N^{pro} がプロテアソームによる細胞側因子の分解を促進する分子メカニズムの解明

今回特定された IFN- β のプロモーター活性の抑制に必須な N^{pro} 上のアミノ酸領域のみを細胞内で発現させ、細胞内の IRF-3、IRF-7、IPS1 とウイルス蛋白 N^{pro} の発現量や細胞内局在をウェスタンブロット法と蛍光抗体法により解析したが、特定された N^{pro} 上のアミノ酸領域が細胞側因子と直接的に結合することは証明出来なかった。以上より、豚コレラウイルスの自然免疫回避機構に必須なアミノ酸領域が特定され、この領域は N^{pro} が有するプロテアーゼ活性とは独立した領域であることがわかった。

(4) N^{pro} に変異を挿入した豚コレラウイルスの作出と本ウイルスのブタに対する病原

性の解析

自然免疫の調節に關与する N^{pro} 上のアミノ酸の変異が、豚に対する病原性発現にどこまで關与するかを調べるため、強毒豚コレラウイルスの該当アミノ酸領域を自然免疫を誘導するタイプの N^{pro} に置き換えた変異ウイルスを作製した。本ウイルスは N^{pro} 上のアミノ酸変異により、自然免疫、特に1型IFNを誘導するウイルスに変わっていた。本ウイルスを豚に接種し、ウイルス血症、発熱、致死率などを指標に病原性を確認した。その結果、変異ウイルスの病原性は、元となる強毒株に比べ病原性が下がるものの、弱毒生ワクチン株の病原性ほどに弱毒化されていないことがわかった。以上より、豚コレラウイルスの N^{pro} は、1型IFNを中心とした宿主の自然免疫応答を抑制し、豚における病原性發揮の要因の1つとなっているが、N^{pro} の有する自然免疫調節機構だけでは豚コレラウイルスの病原性を説明できないことも同時に明らかとなった。



豚コレラウイルスの自然免疫回避機構に関する今回の成績

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9件)

- 1) Ruggli, N., Summerfield, A., Fiebach, A. R., Guzylack-Piriou, L., Bauhofer, O., Lamm, C. G., Waltersperger, S., Matsuno, K., Liu, L., Gerber, M., Choi, K. H., Hofmann, M. A., Sakoda, Y., and Tratschin, J. D. 2009. Classical swine fever virus can remain virulent after specific elimination of the interferon regulatory factor 3-degrading function of N^{pro}. J. Virol, 査読有, 83: 817-829.
- 2) Kameyama, K., Sakoda, Y., Matsuno, K., Ito, A., Tajima, M., Nakamura, S., and Kida, H. 2008. Cleavage of the NS2-3 protein in the cells of cattle persistently infected with non-cytopathogenic bovine viral

diarrhea virus. Microbiol. Immunol, 査読有, 52: 277-282.

- 3) Bauhofer, O., Summerfield, A., Sakoda, Y., Tratschin, J. D., Hofmann, M. A. and Ruggli, N. 2007. Classical swine fever virus N^{pro} interacts with interferon regulatory factor 3 and induces its proteasomal degradation. J. Virol, 査読有, 81: 3087-3096.

[学会発表] (計16件)

- 1) 吉野史、迫田義博、杉田征彦、野村拓志、山本直樹、岡松正敏、喜田宏 「豚コレラ弱毒生ワクチン株の豚扁桃継代による病原性の復帰」第149回日本獣医学会、2010年3月26日、日本獣医生命科学大学、東京
- 2) 青木博史、「細胞病原性牛ウイルス性下痢ウイルス Nose 株に含まれる費細胞病原性準種の遺伝子構造解析」第149回日本獣医学会、2010年3月26日、日本獣医生命科学大学、東京
- 3) 迫田義博、岡松正敏、野村拓志、杉田征彦、吉野史、喜田宏「豚コレラウイルスの病原性の分子基盤—弱毒生ワクチン株の豚継代による病原性の部分復帰—」第57回日本ウイルス学会学術集会、2009年10月25日~27日、都市センターホテル、東京
- 4) Sakoda Y., Ito A, Kameyama K, Nomura T, Ruggli N, Tratschin J.-D, Kida H: Induction of apoptosis in porcine kidney cells by type I interferon induced by infection with classical swine fever virus. The 7th ESVV Pestivirus Symposium, September 16-19, 2008, Uppsala, Sweden.
- 5) Nomura T, Sakoda Y., Matsuno K, Kida H: Expression kinetics of Interferon Promoter Stimulator-1 (IPS-1) inducing natural immunity in the cells infected with Classical Swine Fever Virus. 7th ESVV Pestivirus Symposium, Sep 16-19, 2008, Uppsala, Sweden.
- 6) 伊藤麻子、迫田義博、Nicolas Ruggli、喜田宏「豚コレラウイルスのCPK-NS細胞に対する病原性の解析」第55回日本ウイルス学会学術集会、2007年10月21日~10月23日、札幌コンベンションセンター、札幌
- 7) 小佐々隆志、青木博史、野田紗知子、関口秀人、福所秋雄、中村成幸「牛ウイルス性下痢ウイルスの生物現象の差によるゲノム塩基配列の相違」第55回日本ウイルス学会学術集会、2007年10月21

日～10月23日、札幌コンベンションセンター、札幌

- 8) 伊藤麻子、迫田義博、Nicolas Ruggli、喜田宏「豚コレラウイルスのCPK-NS細胞に対する病原性の解析」第144回日本獣医学会学術集会、2007年9月2日～9月4日、酪農学園大学、江別

6. 研究組織

(1) 研究代表者

迫田 義博 (SAKODA YOSHIHIRO)

北海道大学・大学院獣医学研究科・准教授
研究者番号：40333637

(2) 研究分担者

青木 博史 (AOKI HIROSHI)

日本獣医生命科学大学・獣医学部・講師
研究者番号：10440067

(3) 連携研究者 なし