

自己評価報告書

平成23年 5月 9日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2011

課題番号：20380165

研究課題名(和文)

ウマヘルペスウイルス1型レセプターの機能解析とそれを基盤とした感染予防法の検討

研究課題名(英文)

Functional analysis of equine herpesvirus-1 receptor and its application for infection prevention

研究代表者

木村 享史 (KIMURA TAKASHI)

北海道大学・人獣共通感染症リサーチセンター・准教授

研究者番号：90261338

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・応用獣医学

キーワード：ヘルペスウイルス、ウマ、レセプター

1. 研究計画の概要

ウマヘルペスウイルス1型 (EHV-1) はアルファヘルペスウイルス亜科に属し、ウマに呼吸器症状、流産、脳脊髄炎を惹き起こす。臨床上特に問題となる流産と脳脊髄炎では、妊娠子宮、中枢神経系特異的に血管内皮細胞へのウイルス感染が生じ、それに続発する血管炎、血栓形成、循環障害が病態発症に大きな役割を果たしている。従って、血管内皮細胞へのウイルス感染は流産、脳脊髄炎の発症において最も重要なステップであるにも関わらず、その感受性を規定するウイルスレセプターに関しては不明な点が多い。

本研究では、ウマ脳血管内皮細胞からクローニングした EHV-1 レセプターの機能解析を行い、レセプター遺伝子導入によるマウスモデルの作製とウイルスエンベロープ蛋白-レセプター相互作用を利用した感染予防法の検討を行う。

2. 研究の進捗状況

ウマ脳血管内皮細胞より発現クローニングした EHV-1 レセプター (ウマ MHC クラス I 分子 A68) の機能を解析する目的で、以下の実験を行った。

(1) リガンド結合部位の決定

EHV-1 レセプターとして機能しないハムスター MHC クラス I 分子と A68 の細胞外ドメイン置換変異体を作製し、レセプター機能を比較検討した結果、 $\alpha 2$ ドメインがレセプター機能に重要な役割を果たすことが明らかとなった。

(2) リガンドとなるウイルスエンベロープ蛋白の同定

EHV-1 エンベロープ蛋白 gD の細胞外ドメインとヒト IgG1 Fc 領域との融合蛋白を作製、使用し、ウマ MHC クラス I が gD をリガンドとするエントリーレセプターであることを明らかにした。

(3) 馬体内における EHV-1 レセプターの分布同定

成馬脳組織における MHC クラス I 遺伝子の発現を *in situ* ハイブリダイゼーションにより検索した結果、EHV-1 の標的細胞である血管内皮細胞に限局してシグナルが認められ、MHC クラス I の発現局在が EHV-1 脳脊髄炎の病態形成に関与している可能性が示唆された。

(4) EHV-1 レセプター導入マウスの作製
自然宿主に近い病態を再現するマウスモデルを作製する目的で、A68 遺伝子導入マウスを作製し、系統を樹立した。

(5) EHV-1 レセプターを介した細胞内侵入機構の解明

ATP 枯渇実験により、EHV-1 はエンドサイトーシス経路を利用して A68 発現 NIH3T3 細胞に侵入することが示唆された。また、EHV-1 が細胞内侵入の際に利用するエンドサイトーシス経路が細胞株によって異なることを明らかにした。

(6) アルファヘルペスウイルス共通レセプターとしての機能の検討

MHC クラス I をノックダウンした細胞にヒト単純ヘルペスウイルス (HSV) を感染させたが、感受性は低下せず、MHC クラス I は HSV に対してはレセプターとして機能しないと考えられた。

3. 現在までの達成度

①当初の計画以上に進展している。

申請書に記載した計画のうち、平成 20 年度からの 3 年間に予定された計画（上記 (1) から (6)）の全てに着手した。(2)、(5) に関しては得られた結果を既に論文報告しており、(1) に関しては現在論文を投稿中である。(3) に関しては得られた結果を学会にて発表した。(4) のマウスモデルを使用した感染実験に関しては作製に多少時間を要したが、既に系統は樹立されており、平成 23 年度中に当初予定の実験は全て終了する見込みである。(6) の実験は既に終了している。また、平成 23 年度計画実験に関しても、実験に使用する可溶性レセプターは (2) で既に作製済みであり、今年度前半には実験を終了する予定である。以上の状況から本申請課題の多くは既に達成できていると考えられるため、当初の計画以上に進展していると判断した。

4. 今後の研究の推進方策

平成 23 年度計画実験である「エンベロップ蛋白-レセプター相互作用を利用した感染予防法の検討」を行う。また、A68 遺伝子導入マウスを利用した感染実験のデータを公表する。

5. 代表的な研究成果

(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. Sasaki, M., Hasebe, R., Makino, Y., Suzuki, T., Fukushi, H., Okamoto, M., Matsuda, K., Taniyama, H., Sawa, H. and Kimura, T.* Equine major histocompatibility complex class I molecules act as entry receptors that bind to equine herpesvirus-1 glycoprotein D. *Genes Cells* 16:343-357, 2011. (査読有)
2. Suzuki, T., Orba, Y., Okada, Y., Sunden, Y., Kimura, T., Tanaka, S., Nagashima, K., Hall, W.W. and Sawa, H. The human polyoma JC virus agnoprotein acts as a viroporin. *PLoS Pathogens*, 6(3):e1000801, 2010. (査読有)
3. Orba, Y., Suzuki, T., Makino, Y., Kubota, K., Tanaka, S., Kimura, T., Sawa, H. Large T antigen promotes JC virus replication in G2-arrested cells by inducing ATM- and ATR-mediated G2 checkpoint signaling. *J. Biol. Chem.*, 285:1544-54, 2010. (査読有)
4. Hasebe, R., Sasaki, M., Sawa, H., Wada, R., Umemura, T., Kimura, T.* Infectious entry of equine herpesvirus-1 into host cells through different endocytic pathways. *Virology*, 393:198-209, 2009. (査読有)
5. Orba, Y., Sunden, Y., Suzuki, T., Nagashima, K., Kimura, T., Tanaka, S., Sawa, H. Pharmacological cdk inhibitor R-Roscovitine

suppresses JC virus proliferation. *Virology*, 370:173-83, 2008. (査読有)

[学会発表] (計 3 件)

1. 佐々木道仁, 長谷部理絵, 澤洋文, 福士秀人, 谷山弘行, 木村享史. Novel entry pathway of equine herpesvirus-1. 第 33 回日本分子生物学会年会. 2010 年 12 月 7 日. 神戸ポートアイランド (神戸).
2. 佐々木道仁, 長谷部理絵, 福士秀人, 谷山弘行, 澤洋文, 木村享史. 新規エントリーレセプターを介したウマヘルペスウイルス 1 型の細胞内侵入機構の解析. 第 150 回日本獣医学会学術集会. 2010 年 9 月 16 日. 帯広畜産大学 (帯広).
3. 佐々木道仁, 長谷部理絵, 谷山弘行, 澤洋文, 木村享史. ウマヘルペスウイルス 1 型レセプターのクローニングと機能解析. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会. 2009 年 10 月 25 日. 都市センターホテル (東京).

[図書] (計 1 件)

1. Kimura, T.* Pathogenesis of equine herpesvirus-1 infection. In Maeda A. ed. *Animal Viruses* 133-141, ISBN:978-81-7895-450-9, Transworld Research Network, Kerala, India, 2010.