

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月22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

研究成果の概要（和文）：

ウマ脳微小血管内皮細胞 cDNA ライブラリーより発現クローニングされたウマヘルペスウイルス1型（EHV-1）レセプター（ウマ MHC クラス I 分子 A68）の機能を解析し、同分子が EHV-1 のエンベロープ蛋白 gD と相互作用するエントリーレセプターとして機能すること、ならびに N 末端から 173 番目に位置するアミノ酸がレセプター機能に重要であることを明らかにした。加えて A68 遺伝子導入マウスの作製と、可溶性 A68 分子の感染阻害効果に関する検討を行った。

研究成果の概要（英文）：

We analyzed the function of equine MHC class I molecule A68, which was cloned from an equine brain microvascular endothelial cell cDNA expression library as an EHV-1 receptor. Studies suggest that equine MHC class I is a functional gD receptor that plays a pivotal role in EHV-1 entry into equine cells, and also suggest that the amino acid residue at position 173 of the MHC class I molecule is involved in the efficiency of EHV-1 entry. In addition, we generated transgenic mice expressing A68, and also evaluated the usefulness of soluble forms of A68 molecules for preventing EHV-1 infection.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2009年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2010年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2011年度	2,600,000	780,000	3,380,000
年度			
総計	13,700,000	4,110,000	17,810,000

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. 研究開始当初の背景

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、循環障害が病態発生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宿主因子に関しては不明な点が多かった。

2. 研究の目的

以上の背景より、我々は、EHV-1 非感受性マウス細胞に感受性を付与する宿主因子として、ウマ MHC クラス I 重鎖遺伝子 (クローン A68) をウマ脳微小血管内皮細胞 cDNA ライブラリーから発現クローニングし、本研究において、その EHV-1 レセプターとしての機能解析を行った。

3. 研究の方法

EHV-1 レセプター (ウマ MHC クラス I 分子) の機能を解析する目的で、(1) リガンドとなるウイルスエンベロープ蛋白の同定、(2) リガンド結合部位の決定、(3) EHV-1 レセプターを介した細胞内侵入機構の解明、(4) 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を行った。

また、*in vivo* における病原性発現への関与様式を検討する目的で、(5) 馬体内における EHV-1 レセプターの分布同定、(6) EHV-1 レセプター導入マウスの作製と病態解析を行った。

以上に加え、(7) 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った。

4. 研究成果

(1) リガンドとなるウイルスエンベロープ蛋白の同定

EHV-1 のエンベロープ蛋白 gD に対するポリクローナル抗体ならびに gD の細胞外ドメインとヒト IgG1 Fc 領域との融合蛋白 (gD-Ig) を使用し、ウマ MHC クラス I 分子 A68 が gD に特異的に結合することを証明した。EHV-1 のウマ細胞 (ウマ脳微小血管内皮細胞、E. Derm 細胞) への侵入は抗ウマ MHC クラス I モノクローナル抗体により阻害され、MHC クラス I 分子の細胞表面発現抑制により、E. Derm 細胞の EHV-1 感受性は著しく低下した。以上の結果から、ウマ MHC クラス I は EHV-1 gD をリガンドとし、EHV-1 のウマ細胞への侵入に重要な役割を果たすエントリーレセプターとして機能することが明らかとなった (図 1)。

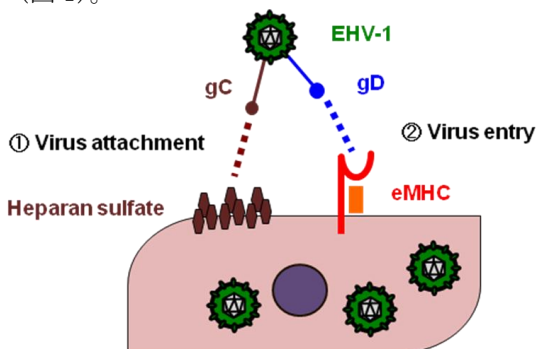


図 1. EHV-1 の細胞内侵入機構。アルファヘルペスウイルスの細胞内侵入機構は、細胞表

面へのウイルス粒子の吸着と、その後にかかる細胞内への侵入の2段階に大きく分けられる。EHV-1 の場合、エンベロープ蛋白 gC が細胞表面のヘパラン硫酸と結合することにより、ウイルスの細胞への吸着が促進される (①)。ウマの細胞 (脳血管内皮細胞、E. Derm 等) では、エンベロープ蛋白 gD と MHC クラス I の相互作用により、ウイルスは細胞内に侵入する (②)。

(2) 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 とのドメイン置換変異体、アミノ酸置換変異体を作製し、レセプター機能を比較検討した。その結果、ウマ MHC クラス I 分子の $\alpha 2$ ドメイン中に存在する N 末端から 173 番目のアミノ酸が、EHV-1 gD との結合ならびにレセプター機能に重要な役割を果たし、同部位にアラニン等の疎水性アミノ酸を有するサブセットが、レセプターとして機能することが明らかとなった (図 2)。

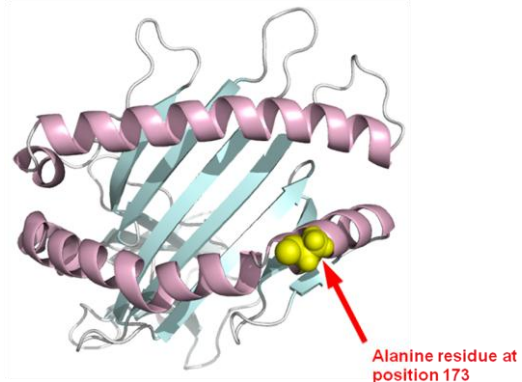


図 2. ウマ MHC クラス I の分子モデル。N 末端から 173 番目のアミノ酸は、 $\alpha 2$ ドメインの α ヘリックス構造中の表面に露出した場所に位置しており、EHV-1 の結合領域がこのアミノ酸を含めた周辺領域に存在することが予想される。

(3) 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 3T3-A68 (A68 を安定性に発現する 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。

(4) 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。

(5) 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。

(6) EHV-1 レセプター導入マウスの作製

マウス H-2 プロモーターを使用して A68 遺伝子導入マウスを作製し、系統を樹立した。EHV-1 を経鼻接種し、経時的に解析したところ、A68 遺伝子導入マウス肺では野生型マウス肺に比較してより高いレベルの EHV-1 ゲノム DNA が検出された。A68 遺伝子導入マウス、野生型マウスの双方において病変は肺においてのみ認められたが、前者の肺炎像は後者に比較してより重度であった。以上の結果より、作製されたウマ MHC クラス I 遺伝子導入マウスは野生型マウスに比較してより高い EHV-1 感受性を示すことが明らかとなった。

(7) 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

A68 の細胞外領域とヒト IgG1 Fc 領域との可溶性融合蛋白 (A68-Ig) ならびに A68 の $\alpha 2$ ドメインとヒト IgG1 Fc 領域との可溶性融合蛋白 (A68 $\alpha 2$ -Ig) を作製した。また、N 末端から 173 番目の残基を中心とした 25 アミノ酸の MHC クラス I ペプチドを調整した。E. Derm 細胞、3T3-A68 細胞をこれら可溶性融合蛋白、ペプチドで前処理し、EHV-1 を感染させたが、いずれにおいても感染阻害効果は認められなかった。

以上、4 年間の研究により、EHV-1 の新規レセプターとして同定されたウマ MHC クラス I 分子のウイルス細胞内侵入に果たす役割と機序が明らかとなった。主要な知見は既に論文として学術雑誌に報告されており、国内外の研究グループによって引用されている。A68 遺伝子導入マウスの解析から、ウマ MHC クラス I 分子はマウス体内においてレセプターとして機能することが示唆されたが、本研究課題で作製された系統における MHC クラス I 分子 (蛋白) の発現レベルは非常に低く、肺以外の組織に病変を惹起できなかった。今後、EHV-1 標的細胞にウマ MHC クラス I 分子を強発現する遺伝子導入マウスを作製することにより、より有用な感染マウスモデルの確立が期待される。

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 13 件)

1. Sasaki, M., Kim, E., Igarashi, M., Ito, K., Hasebe, R., Fukushi, H., Sawa, H., Kimura, T.* A single amino acid residue in the $\alpha 2$ domain of major histocompatibility complex class I is involved in the efficiency of equine herpesvirus-1 entry. *J. Biol. Chem.*, 286:39370-39378, 2011. (査読有)
2. 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)
3. 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)
4. 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)
5. 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)
6. 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 6 件)

1. 佐々木道仁、五十嵐学、澤洋文、伊藤公人、富士秀人、木村享史。ウマ MHC クラス I が示すウマヘルペスウイルス 1 型レセプター機能の解析。第 152 回日本獣医学会学術集会。2011 年 9 月 20 日。大阪府立大学 (堺)。
2. 木村享史、佐々木道仁、金亨振、富士秀人、澤洋文。ウマ MHC クラス I 遺伝子導入マウスのウマヘルペスウイルス 1 型に対する感受性。第 152 回日本獣医学会学術集会。2011 年 9 月 19 日。大阪府立大学 (堺)。

3. Sasaki, M., Igarashi, M., Sawa, H., Hasebe, R., Fukushi, H., Kimura, T. Single amino acid residue in equine major histocompatibility complex class I is critical for its function as an equine herpesvirus-1 receptor. XV International Congress of Virology (IUMS 2011 Congress). 13 September 2011. Sapporo Convention Center (Sapporo).
4. 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).
5. 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).
6. 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.

[産業財産権]

- 出願状況 (計0件)
- 取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

澤 洋文 (SAWA HIROFUMI)
北海道大学・人獣共通感染症リサーチセンター・教授
研究者番号: 30292006