

機関番号：12605

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20580319

研究課題名（和文） 安全で機能的な低病原性ニューロトレーシングウイルス作成系の開発

研究課題名（英文） Development of the safe and functional avirulent neurotracing virus producing system.

研究代表者

谷口 隆秀（TANIGUCHI TAKAHIDE）

東京農工大学・大学院農学研究院・准教授

研究者番号：70282803

研究成果の概要（和文）：

神経高親和性のコロナウイルスである豚赤血球凝集性脳脊髄炎ウイルス（PHEV）67N 株の全塩基配列を決定し、特異的シナプス結合を介した神経回路網の解析に有効なニューロトレーサーウイルス開発のための基盤となる知見を得た。塩基配列の解析結果から、非構造タンパク質 ns2 遺伝子の大きな欠失や挿入が確認され、同遺伝子の神経親和性との関連についてさらなる検討が必要と思われる。神経系およびグリア系株化細胞を用いた研究結果から、PHEV の神経細胞に対する高い親和性が明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

The entire genome sequence of the porcine hamagglutinating encephalomyelitis virus (PHEV) 67N strain, neurotropic coronavirus, was determined, and the sequence data is useful for reverse genetics of PHEV to develop the PHEV based neurotracing virus. There is about 400 base insertion in ns2 gene of neurotropic 67N strain and 200 base deletion in ns2 gene of non neurotropic OSN204 strain. The results of in vitro PHEV infection to Neuroblastoma and glioma cell line indicated that PHEV 67N strain have high neurotropism.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2009 年度	700,000	210,000	910,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：ウイルス、脳・神経、バイオテクノロジー、ニューロトレーサー

1. 研究開始当初の背景

これまでニューロンの機能研究は、細胞生物学的・分子生物学的手法やCa⁺⁺オシレーションなど電気生理学的・生物物理学的

手法を用いて、個々の神経細胞を詳細に解析することによって発展してきた。一方、特異的シナプス結合を介した神経回路網の解析はコレラ毒素や WGAなどの植物レ

クチン、デキストランなどの、神経細胞に親和性があり、神経細胞内・軸索内を移動し、シナプスを介して輸送される順行性あるいは逆行性ニューロトレーサーを用いて行われてきたが、これまで十分研究が進んだとはいえない状況にある。

2. 研究の目的

これまで神経回路網の解析に用いられてきた神経解剖学的トレーサーは注入部位の多数の神経細胞に取り込まれて複数の神経回路を染色してしまうことから、単独の神経回路の選択的な可視化は不可能である。また、狂犬病ウイルス、単純ヘルペスウイルス、オーエスキー病ウイルスなどの神経向性ウイルスがウイルス型ニューロトレーサーとして検討されてきたが、これらのウイルスは人や自然宿主への感染が懸念されて取り扱いが難しい上、単独神経細胞への感染が困難であった。

我々は哺乳類の神経系・免疫系・消化器系など様々な細胞を標的として感染するコロナウイルスの病態発生における宿主側の要因（主にTNF α などの炎症性サイトカインの関与）に注目して研究を進めてきた。その過程で、ブタを宿主とするコロナウイルスである赤血球凝集性脳脊髄炎ウイルス（PHEV）は、病原性が極めて低く、神経細胞親和性が高いこと、また、ラットなどの実験動物においてニューロトレーサーウイルスとしての有効性が明らかとなってきたことから、HEVの病原性や遺伝子構造の詳細を解明するとともに、神経細胞を生存させたまま蛍光染色可能な Living Colors (GFP: Green Fluorescent Protein等) 遺伝子を組み込んだ新規のニューロトレーシングウイルス作製系の開発を試みることにした。

3. 研究の方法

これまでPHEVは病原体として全く重要視されてこなかったため、ウイルスゲノムの塩基配列など、その分子生物学的基盤はほとんど調べられていない。そのため、PHEVを用いたニューロトレーシングウイルスを作製するためには、まずウイルスゲノムの組換えを行うための遺伝子情報や神経親和性に関する遺伝子領域の情報を得る必要がある。

本研究では、(1)PHEVゲノム組換えのために必要なゲノム情報を得るため、またPHEVの神経親和性に関わる遺伝子領域を明らかにするために、高神経親和性 PHEV 67N亜株の全塩基配列を決定し、脳脊髄炎を起こさない株と比較する。同時に、神経親和性で脳脊髄炎を起こす67N株と神経親和性が低いと考えられ脳脊髄炎を起こさないOSN204株のゲノム塩基配列、特に構造遺伝子が集中する3'領域9 kbの塩基配列決定・比較する。その結果から、組換えニューロトレーシングウイルス作製の為の遺伝情報を得るとともに、神経親和性を左右する遺伝子領域を特定する。(2)ラット、マウス、ヒトの神経系株化細胞およびグリア系株化細胞を用いたウイルス感受性実験を行い、PHEVの神経細胞特異的な感染について *in vitro* の実験で確認する。(3)BAC (Bacterial artificial Chromosome) システムを用いたHEVの感染性 cDNAクローンを作製し、GFPなどの生体蛍光標識遺伝子導入PHEVの作製系の確立を試みる。

4. 研究成果

神経細胞親和性を指標として選抜することにより得られた高神経細胞親和性 67N 平野亜株の全塩基配列を決定した。さらに、3C-like protease (3CL^{PRO}) 領域および

Helicase 領域の塩基配列を基に系統樹を作成し、様々なコロナウイルスとの比較・解析を行った。

その結果、グループ2 コロナウイルス間で 3CL^{PRO} 領域および Helicase 領域の塩基配列は高い相同性を示し、よく保存されている領域であることが明らかになった。特に、PHEV、HCoV (ヒトコロナウイルス) OC43、BCoV (ウシコロナウイルス) 間の相同性は非常に高く、これらのウイルスの進化上の密接な関係にあることが示唆された。PHEV 神経高親和株 67N 株の全塩基配列が明らかとなり、PHEV の遺伝子操作 (リバーシジェネティクス) のための基盤となる知見が得られたことから、PHEV への Living color 遺伝子の組み込み実験が進めることが可能となった。

また、神経病原性が弱いとされる OSN20 株 C 末側 8 kb の塩基配列を決定し、嘔吐・衰弱型株 VW572 株、神経病原性株 67N 株と比較した。その結果、VW572 株と比べ、NS2 遺伝子領域に 67N 株では約 200 塩基対の挿入が、OSN20 株で約 400 塩基対の欠失が認められ、非構造タンパク質 ns2 の分子量や構造に大きな相違があることが示唆された。これまでのマウス肝炎ウイルスなどを用いた研究報告からも、これらの領域が神経病原性に関わる可能性があると考えられた。ns2 組換えタンパク質や抗 ns2 抗体を作製しさらに研究を進めて ns2 の働きと神経親和性との関連が明らかになるものと期待される。

PHEV の神経系細胞での感受性について検討するため、ラットおよびヒトの株化神経細胞、グリア細胞を用いて in vitro における PHEV 感受性について検討した。

PHEV 67N 株、OSN204 株とも、グリア細胞株への PHEV 感染は認められず、中枢神経系の主要な構成細胞の1つであるグリア系細胞は PHEV への感受性が無いことが確認された。

一方、ラット褐色腫由来細胞株である PC12 細胞において、神経細胞への分化処理を行わない場合には PHEV の感染は確認されなかったが、神経成長因子 (NGF) 処理により新駆細胞への分化を促したところ、PHEV に感染するようになることが明らかとなった。

PHEV の神経特異的な感染が示唆されたことから、今後は様々な動物種の神経細胞への感染性について検討し、どのような動物種において神経回路網の解析に PHEV を用いることが可能かを明らかにすることによって、ニューロトレーサーウイルスとしての PHEV の有用性がさらに明確になるとと思われる。

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[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
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷口隆秀 (TANIGUCHI TAKAHIDE)
東京農工大学・大学院農学研究院・准教授
研究者番号：70282803

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし