

令和 5 年 5 月 19 日現在

機関番号：32701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06419

研究課題名(和文) 鶏アデノウイルスの網羅的ORF探索及び病原性発現因子の解明

研究課題名(英文) Comprehensive Search for Open Reading Frames and Elucidation of Virulence Factors in Fowl Adenovirus

研究代表者

藤野 寛 (Fujino, Kan)

麻布大学・獣医学部・講師

研究者番号：40712617

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では次世代シーケンスの情報を元に、ニワトリアデノウイルス病原性株及び非病原性株間で発現している遺伝子を比較し、その配列や発現の違いが病原性に与える影響を解析する事を目的としている。研究期間内に実施した研究により、複数の新たなタンパク質の発現を確認している。また、それらのタンパク質に対する抗体を作成したことで実際にウイルスが感染時にそれらのタンパク質を作っている事も確認できた。これらの抗体を用いて、さらにウイルス感染時の各タンパク質の挙動や病原性への関連を調べることが出来る。

研究成果の学術的意義や社会的意義

鶏アデノウイルスは、二本鎖DNAをゲノムに持つウイルスであり、他のウイルスとの重感染により鶏に封入体肝炎を引き起こすことが知られている。しかしながら単独感染では強い病原性を示さないと考えられてきたことから、ウイルス自身の研究は積極的には行われていなかった。本研究の結果、複数のウイルスタンパク質の発現を確認する事が出来た。また、それらの一部は発現を抑制することでウイルスの増殖に影響することも明らかとなった。これらの結果は、病原性因子の決定に寄与するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：This study aims to compare the genes expressed between pathogenic and non-pathogenic strains of Fowl adenovirus based on next-generation sequencing information, and to analyze the effects of differences in sequence and expression on pathogenicity. Research undertaken within the investigation period has verified the expression of several new proteins. In addition, by creating antibodies against these proteins, we were able to confirm that the virus actually makes these proteins during infection. These antibodies enable further exploration of each protein's conduct during viral infection and its correlation with virulence.

研究分野：ウイルス学

キーワード：ニワトリアデノウイルス ウイルス

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

鶏アデノウイルス (Fowl Adenovirus: FAV) は、二本鎖 DNA をゲノムに持つ非エンベロープウイルスであり、他のウイルスとの重感染により鶏に封入体肝炎を引き起こすことが知られている。しかしながら単独感染では強い病原性を示さないと考えられてきたことから、疫学調査やワクチン開発を中心とした研究が行われてきており、ウイルス自身の研究は積極的には行われていなかった。ところが、申請者らは過去に、筋胃糜爛を呈する鶏から FAV JM1/1 株の分離に成功し、この JM1/1 株は単独感染により鶏に重篤な筋胃糜爛に加えて封入体肝炎をも引き起こすことを報告している (Muroga N et al. J Vet Med Sci. 2006)。現在、FAV により引き起こされる封入体肝炎や筋胃糜爛は日本全国の農場で報告されており、大きな経済的損失を発生させている。それにも関わらず、FAV はこれまでに十分なウイルス学的な研究がなされていなかったため、他のウイルスにおいて同定されているような宿主免疫抑制遺伝子や病原性に関連する遺伝子が同定されていない。比較的研究の進んでいる FAV の非病原性株である CELO 株においてさえ、実験的に機能が確認されている遺伝子は僅かである。

### 2. 研究の目的

本研究では次世代シーケンスの情報を元にした FAV 病原性株及び非病原性株の発現解析によるウイルス遺伝子予測・解析による病原性関連遺伝子の同定を目的としている。病原性株として使用する JM1/1 株は申請者らが国内で分離した株である。他の FAV 株とは異なり、単独感染で病原性を発揮することから、JM1/1 株を非病原性株である CELO 株と比較することで、特定遺伝子の配列あるいは発現の違いによる病原性因子同定に用いることが出来ると考えている。

また、ウイルスはタンパク質発現に際して、スプライシングやリーキースキャニング、フレームシフト等様々な転写翻訳機序を利用して多様なタンパク質を生み出している。近年では、次世代シーケンスによりスプライシングバリエーション等の新たなタンパク質の同定が報告されているが、FAV においてはその礎となる実験的に確認されたウイルスタンパク質の同定が遅れている。本研究では、最終的な目的となる病原性発現因子の解明だけでなく、FAV 研究を行う上で必須となる mRNA・タンパク質の決定、更には既知の ORF からのスプライシングバリエーションの同定といった結果をもたらすことが可能である。

### 3. 研究の方法

本研究では FAV の遺伝子予測・解析及び病原性発現因子の解明を目的としている。申請者らは既にニワトリ由来培養細胞である LMH 細胞に FAV を接種し、Strand-specific RNAseq により解析を行っている。本研究では病原性発現因子の解明に焦点を合わせ、実験動物を用いて実際に症状の出たサンプルの RNAseq を行う。

始めに、FAV JM1/1 株の転写産物解析及びウイルス ORF のクローニング、機能解析を行う。RNAseq により得られた結果から、発現している mRNA・ORF を予測し、発現解析を行う。病原性株・非病原性株間での配列・mRNA 発現量等の違いから優先順位を付け ORF をクローニングし、HA タグ付加発現プラスミドを作成し、ニワトリ由来培養細胞である LMH 細胞に強制発現させ、細胞内局在やウイルスの増殖に対する影響、宿主細胞に対する影響を確認する。特にウイルス力価や宿主免疫系に関与する遺伝子が取れた場合は抗体を作成し、今後の研究に用いる。

#### 4. 研究成果

RNAseq の結果から複数の新規スプライシングバリエントを含む ORF を予測することができた。また、それらのうち、特に機能が判明している既知の ORF のスプライシングバリエントを中心に複数の遺伝子をクローニングし、HA タグ付加発現プラスミドを作成した。さらに、大腸菌を用いた組み換えタンパク質から抗体の作成とタンパク質の機能解析を行った。複数の ORF をクローニングし、大腸菌発現系を用いたタンパク質発現・精製する事により免疫源となるウイルスタンパク質を作成した。それらを抗原として用いてウイルスタンパク質に対する抗体を作成した。免疫血清を用いた WB や IFA により、これまで JM1/1 株ではタンパク質発現が確認されていなかった ORF1、ORF20、ORF0 等複数の ORF 由来のタンパク質が、感染細胞で発現している事を確認する事が出来た。特に dUTPaes ドメインを持つ ORF1 にスプライシングにより N 末端に新たな 55 アミノ酸配列が付加された新規のタンパク質発現を確認する事が出来た。また、ヒトアデノウイルスにおいて発現の確認されている U-Exon タンパク質のホモログに関しても抗体の作成に成功し、その発現を確認する事が出来た。これらの遺伝子は knockdown によりウイルス増殖に影響があることも確認している事から、今後はより詳細なウイルス増殖に対する機序を解析する予定である

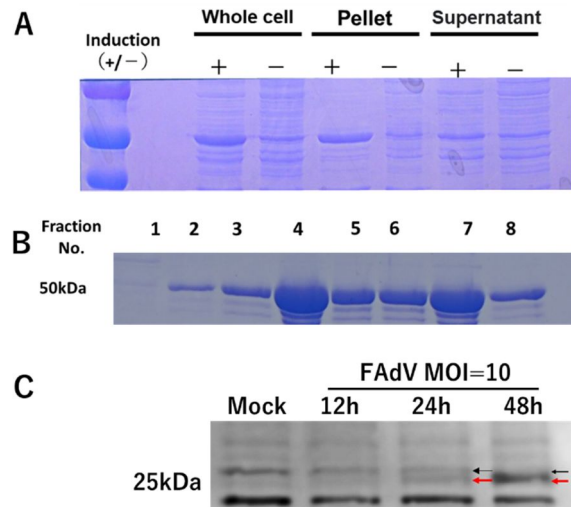


Fig. 1 U-Exon タンパク質の大腸菌発現系による発現 (A) と精製 (B)、感染細胞における U-Exon タンパク質の発現確認。感染 24h 以降でウイルスタンパク質の発現が確認された。

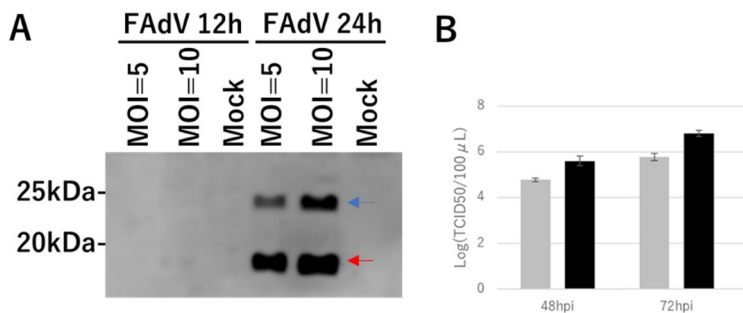


Fig. 2 ORF1 タンパク質の発現確認と knockdown 時のウイルス力価。感染 24h 以降にウイルスタンパク質の発現が確認され、knockdown 時はウイルス力価の減少傾向が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kobayashi Hiroko, Uchida Yu, Fujino Kan, Horie Masayuki, Umezawa Eisuke, Aihara Naoyuki, Kamiie Junichi, Shimoda Hiroshi, Maeda Ken, Une Yumi, Taharaguchi Satoshi	4. 巻 167
2. 論文標題 Isolation and whole-genome sequencing of a novel aviadenovirus from owls in Japan	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Archives of Virology	6. 最初と最後の頁 829 ~ 838
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00705-022-05380-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小林広子, 梅澤瑛亮, 内田悠, 堀江真行, 藤野寛, 宇根有美, 田原口智士
2. 発表標題 国内飼育繁殖施設にて死亡したフクロウ幼雛からの新規アピアデノウイルスの分離と全ゲノム配列の決定
3. 学会等名 第163回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2020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
研究分担者	田原口 智士  (Taharaguchi Satoshi)  (30312416)	麻布大学・獣医学部・教授    (32701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------