

令和 5 年 6 月 28 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20612

研究課題名（和文）イヌアデノウイルスの新規タンパク質の機能解析

研究課題名（英文）Analysis of a novel canine adenovirus protein

研究代表者

松郷 宙倫（Matsugo, Hiromichi）

京都大学・医生物学研究所・助教

研究者番号：40907408

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,300,000円

研究成果の概要（和文）：私たちは、これまでにイヌアデノウイルス2型（CAV2）がウイルスの増殖に関わる新規タンパク質Xをコードしていることを明らかにしたが、その機能は不明であり、本研究ではその機能、分子機構の解明を目的とした。本研究により、Xタンパク質は非構造タンパク質であり、細胞死を誘導し、ウイルスの細胞外への放出を促進する機能をもつことがわかった。また、Xタンパク質はCAV2のみならず、CAV1やコウモリアデノウイルスにおいても保存されていることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題において、Xタンパク質はCAV2のみならず、CAV1やコウモリアデノウイルスなどの一部のマストアデノウイルスに保存されたタンパク質であることがわかった。このことから、Xタンパク質についての知見を集めることはCAV2のみならず、Xタンパク質をもつ他のアデノウイルスの病原性の解析やワクチン開発などにもつながると考えられる。

X欠損ウイルスに比べ、野生型ウイルスは細胞死を誘導し、細胞外に放出されるウイルス量が多かった。この知見は、細胞傷害性を上昇させるとともに腫瘍内の伝播能力を向上させた腫瘍溶解性アデノウイルスの作製や効率的なベクターの産生などにもつながると考えられる。

研究成果の概要（英文）：We have previously found that canine adenovirus type 2 (CAV2) encodes a novel protein X, which is involved in viral replication, but its function is unknown. In this study, we found X is a nonstructural protein that induces cell death and facilitates the release of viruses from cells. We also found that X is conserved not only in CAV2, but also in CAV1 and bat adenoviruses.

研究分野：ウイルス学

キーワード：アデノウイルス 獣医学 ウイルスベクター

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

イヌアデノウイルス (CAV) は、イヌにおいて伝染性肝炎を引き起こすイヌアデノウイルス 1 型 (CAV1) と伝染性喉頭気管炎を引き起こすイヌアデノウイルス 2 型 (CAV2) に分けられる。近年は病原体としてのみならず、ウイルスベクターとしても注目されており、CAV を用いた腫瘍溶解性ウイルス (OV) はイヌにおいて最も有望な OV である。申請者はこれまでに、CAV2 のヘキソン遺伝子上にヘキソンとは異なる読み枠の新規遺伝子 (X) が存在していることを明らかにした。しかし、X タンパク質は既存のタンパク質との相同性が低く、アミノ酸配列からその機能を類推することは困難であり、どのようなメカニズムでウイルスの増殖性に関わるのか、その詳細な分子機構は不明であった。

### 2. 研究の目的

X タンパク質の機能を解明することは、創薬、ワクチン、効率的なベクター産生、高い抗腫瘍効果を持つ OV 開発などにつながり、その社会的な意義は大きい。そこで、本研究では CAV の新規タンパク質 X の機能および増殖性に関わる分子機構を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 野生型 CAV2 または X 欠損 CAV2 を MDCK 細胞に感染させ、24、48、72 時間後の細胞内および細胞外のウイルス力価を調べた。

(2) X を欠損または過剰発現させた CAV1 およびコウモリアデノウイルス (BtAdV) を作出し、その増殖性を調べた。

(3) 野生型 CAV2 および X 欠損 CAV2 を超遠心により濃縮、精製し、ウイルス粒子内に X タンパク質が取り込まれるか調べた。

(4) 野生型 CAV2 および X 欠損 CAV2 を MDCK 細胞に感染させ、24 時間後にライセートを調整し、抗 X ポリクローナル抗体を用いて、共免疫沈降を行った。15 cm dish 16 枚の HEK293T 細胞に StrepII タグを付けた X 発現プラスミドをトランスフェクションし、組換え X タンパク質を作製し、共免疫沈降法により X タンパク質に結合する宿主因子を調べた。

(5) 細胞死に関係する遺伝子 (ATG5、CAAP1、CASP3、CASP7、CASP8、NOX1、RIPK1、RIPK3) をノックアウト (KO) した MDCK 細胞を樹立し、野生型 CAV2 および X 欠損 CAV2 を感染させ、野生型 MDCK 細胞における細胞変性効果と比較した。

### 4. 研究成果

(1) X 欠損 CAV2 と野生型 CAV2 の細胞内と細胞外のウイルス力価を比較した結果、細胞外のウイルス力価の差は細胞内のウイルス力価の差より大きく、X タンパク質はウイルスの細胞外への放出に関わる可能性が示唆された。

(2) 他のマストアデノウイルスにおいても X が保存されているか調べるために、CAV2 に近縁な CAV1 および BtAdV に変異を導入し、作製した組換えウイルスの増殖性を比較した。X 欠損 CAV1 は野生型 CAV1 に比べ、増殖性が低下し、また X 過剰発現 BtAdV は野生型 BtAdV に比べ増殖性が上昇した。これらの結果から CAV1、BtAdV においても X は機能的に保存されていることが示唆された。

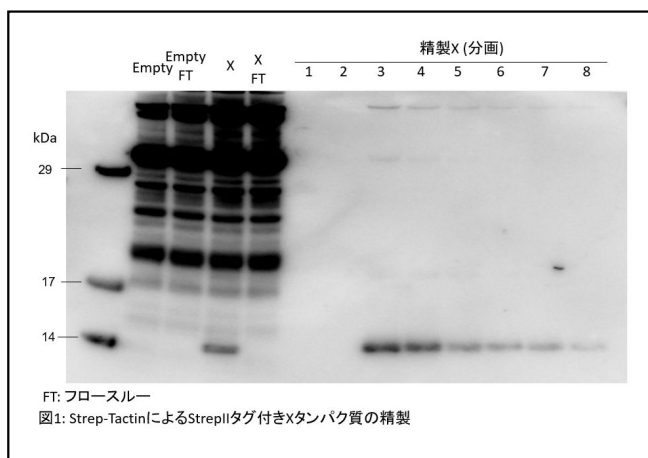
(3) X タンパク質がウイルス粒子に取り込まれるか否かについて検討するために、ウイルス粒子を精製し、ウェスタンブロッティングにより解析した結果、X タンパク質はウイルス粒子には取り込まれない非構造タンパク質であることがわかった。

(4) X タンパク質に対する抗体を用いた共免疫沈降法によって X タンパク質に結合する宿主因子の同定を試みたが、抗体の非特異的な結合が多く、同定することはできなかった。そこで、StrepII タグをつけた組換え X タンパク質を HEK293T 細胞で発現させて共免疫沈降法によって X

タンパク質に結合する宿主因子の同定を試みた。X タンパク質の精製には成功したものの(図1) 発現量が非常に低く、その後の解析に進めることはできなかった。

(5)機能的な面について解析するために、X 欠損 CAdV2 と野生型 CAdV2 の細胞変性効果(CPE)を比較すると、野生型 CAdV2 感染細胞の方が細胞死を起こしている割合が高かった。そこでその機序について調べるために、細胞死に関連する様々な宿主の遺伝子をKOしたMDCK 細胞を樹立し、X 欠損 CAdV2 と野生型 CAdV2 をそれらの細胞に感染させた。

しかしながら、各遺伝子をKOした細胞においても野生型細胞と同様のCPEが認められ、解析した遺伝子はXによる細胞死と関係していないことが示唆された。



### まとめと考察

本研究によりXタンパク質は非構造タンパク質であり、細胞死を誘導し、ウイルスの細胞外への放出を促進する機能をもつことがわかった。また、CAdV2のみならず、CAdV1やコウモリアデノウイルスにおいても保存されていることがわかった。本研究において、Xタンパク質の機能を一部明らかにできたもののその詳細な分子機構を明らかにすることはできなかった。本研究においては、トランスフェクション効率の高いHEK293T細胞を用いて、Xタンパク質を発現させ、結合する宿主因子の探索及びその機能の解明を目指したが、Xタンパク質の発現量が低く、その後の解析がうまくいかなかった。また、CAdV2はイヌのウイルスであることを考えると、Xタンパク質はイヌの宿主因子と相互作用することが予想され、ヒトの宿主因子とは結合しない、あるいは結合力が低い可能性が考えられる。そのため、MDCK細胞などのイヌ由来の細胞を用いた解析が望まれる。

野生型CAdV2感染細胞からタンパク質を抽出し、SDS-PAGEを行い、CBB染色するとXタンパク質の存在が確認できることから、Xタンパク質は感染細胞内で大量に発現していると考えられる。そのため、Xタンパク質にタグをつけたCAdV2を作出できれば、そのウイルスをMDCK細胞に感染させ、共免疫沈降法によって、Xタンパク質に結合する宿主タンパク質あるいはウイルスタンパク質の同定が容易になると考えられる。しかしながら、X遺伝子はヘキソン遺伝子上に存在することからそのような組換えウイルスを作出することは難しいと考えられる。そのため、ウイルス増殖に影響しないE3遺伝子を欠損させ、そこにタグ付きXタンパク質発現カセットを挿入した組換えCAdV2を作出することで、タグ付きXタンパク質をMDCK細胞において大量に発現させることが可能になり、Xタンパク質に結合する宿主タンパク質あるいはウイルスタンパク質が同定できるようになるのではないかと考えられる。

本研究成果はアデノウイルスの病原性の解析、効率的なベクターの産生、ワクチン開発や効果的な腫瘍溶解性ウイルスの開発などに貢献する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 松郷宙倫、神木春彦、石田大歩、北村知也、関根渉、上間亜希子、村上晋、堀本泰介
2. 発表標題 動物アデノウイルスの効率的な増殖に必要な新規ウイルスタンパク質の同定
3. 学会等名 第68回日本ウイルス学会
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------