

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24380165

研究課題名(和文)ウマヘルペスウイルスの神経病原性発現機構の解明

研究課題名(英文)Studies on neuropathogenesis of equine herpesviruses

研究代表者

福士 秀人(Fukushi, Hideto)

岐阜大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：10156763

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,800,000円

研究成果の概要(和文)：ウマヘルペスウイルス1型(EHV-1)の神経病原性発現機構を分子レベルで明らかにすることを研究目的とした。馬に対する神経病原性が異なるEHV-1ゲノム解析から神経病原性に関与すると推測される遺伝子およびアミノ酸変異を同定した。既知の神経病原性因子であるORF30 D752Nを持たない神経病原性EHV-1の解析から神経病原性発現に関与する複数のウイルス遺伝子を見出した。神経病原性株感染細胞におけるウイルス遺伝子転写動態を解析した。感染8時間後にはウイルスゲノム全体から転写されていた。これまでの考えよりもウイルス遺伝子転写は複雑であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to reveal the mechanism of neuropathogenicity of equine herpesvirus type 1 (EHV-1) at the molecular level. Comparing EHV-1 genomes of neuropathogenic and nonneuropathogenic strains, several open reading frames and amino acid substitution including ORF30 D752 neuropathogenic marker were identified. Particularly comparison of neuropathogenic strains possessing ORF30 N752 instead of D752 indicated several viral genes associated with neuropathogenicity of EHV-1. Transcription start site analyses on EHV-1 infected cells showed transcription from whole genome sequence at 8 hour post infection. These results indicated that virus transcription might be much complicated.

研究分野：動物ウイルス学

キーワード：ウマヘルペスウイルス1型 神経病原性 網羅的転写解析

## 1. 研究開始当初の背景

ウマヘルペスウイルス1型 (EHV-1) 感染症は届出伝染病である。不活化ワクチンが使用されているが、予防効果は必ずしも高くないため、新たに生ワクチンが開発されている。しかしながら、新規生ワクチンの効果は限定的であるとされている。一方、国外では EHV-1 による新たな感染症としてウマヘルペスウイルス髄膜脳症 (equine herpesvirus myeloencephalopathy, EHM) が大きな問題となっている。日本においても 1989 年、2001 年、2010 年に発生がみられた。これまでに DNA ポリメラーゼをコードする ORF30 における変異、すなわち EHM 関連株の多くが 752 番目のアミノ酸としてアスパラギン酸を有し、他の株はアスパラギンであること (D752N 変異) が Nugent ら(2006) により明らかにされている。

申請者はこれまで EHM を引き起こすウイルス要因について研究し、以下の成果を得た。

(1) ハムスターモデル：EHM 関連 EHV-1 はハムスターに神経病原性および肺炎を示すが、他の EHV-1 は肺炎を起こすのみであった。このモデルからハムスターにおける EHV-1 の神経病原性は EHM 発症と関連するという作業仮説を導いた。

(2) 神経病原性発現における EHV-1 各遺伝子の寄与：ハムスターモデルにより ORF13, 37, 38, 63, 76 変異 EHV-1 の神経病原性を評価した。ORF37, 38, 63, 76 変異体は神経病原性を喪失ないし減弱したが、ORF13 欠損は神経病原性にほとんど影響しなかった。ORF63 では 1 アミノ酸変異により神経病原性が消失した。これらの結果から、各遺伝子の神経病原性に対する寄与の程度は様々であることが示唆された。

(3) 比較ゲノム解析による EHM マーカーの探索：日本、アメリカ、イギリスにおける EHM 発症馬分離株および EHM と無関係な分離株、計 11 株の全ゲノム塩基配列を解読した。ゲノム解析からは神経病原性との関連性を持つ絶対的遺伝的マーカーは見いだされなかった。日本における EHM 分離株 01c1 と非神経病原性株 90c16 の比較から、両者の相違は ORF13, ORF14, ORF24, ORF30, ORF35.5, ORF65, ORF66, ORF67, ORF68 にみられ、ORF14 および ORF66 は 2 アミノ酸の相違だが、他はすべて 1 アミノ酸の相違であった。

(4) EHV-1 レセプター解析：感染において最も重要な段階の一つであるウイルス吸着における宿主細胞レセプターについて解析し、馬 MHC タンパク質がレセプターであることを明らかにした。また、ウイルスリガンドが gD であることも明らかにした。

(5) ウイルスタンパク質 VP22 の細胞内動態：EHV-1 テグメント VP22 が核移行するメカニズムを解析し、VP22 の核移行ドメインを同定した。細胞種により核移行度が異なることを示唆した。

これらの結果から EHM を引き起こすウイルス要因として ORF30 における D752N 変異以外に明確な要因は不明であり、複数の要因が複雑に関係している可能性を示唆するものと考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的はウマヘルペスウイルス1型 (EHV-1) の神経病原性発現機構を分子レベルで明らかにすることである。ウマヘルペスウイルス1型はこれまで呼吸器疾患および流産の原因ウイルスとして知られ、これらは届出伝染病に指定されている。馬の届出伝染病では唯一発生が継続している感染症である。欧米ではウマヘルペスウイルス1型による神経疾患 (ウマヘルペスウイルス髄膜脳症：EHM) の発生が相次いでおり、大きな問題となっている。しかし、EHM を引き起こすウイルス要因は D752N 変異以外には明らかではない。そこで本研究では、EHM の予防、治療、制御方法を確立する基盤を得るため、培養細胞ならびに動物モデルを用い、EHV-1 の神経病原性発現機構をウイルスタンパク質および宿主因子との相互作用の視点から解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) ウイルス

神経病原性が異なる EHV-1 Ab4p, 90c16, 01c1, 89c25, 89c105 を用いた。Ab4p, 01c1, 89c25 および 89c105 は神経病原性株、90c16 は非神経病原性株である。シマウマ媒介性 EHV-1 としてシマウマ由来 T-616, オナガ由来 T-529 およびトムソンガゼル由来 94-137 を用いた。また、EHV-9 P19 株を用いた。これらウイルスはウマ胎児腎臓 (FEK) 細胞で増殖させた。

### (2) ウイルスゲノム全塩基配列解読

ウイルス感染細胞上清からウイルス粒子を超速心法により濃縮した。ミクロコッカスヌクレアーゼにより宿主由来 DNA を除去した。ProteinaseK およびフェノール処理により除タンパクした。最終 DNA を緩衝液に溶解し、塩基配列解読に用いた。塩基配列解読は東京農工大学の水谷博士に依頼した。解読には次世代シーケンサーは Illumina MiSeq を用いた。解読配列 (リード) は fastq 配列として得た。Bowtie2 を用い、参照配列にマッピングし、consed および SnapGene を用いて編集し、新たな参照配列とした。参照配列とリードのマッピングに矛盾がなくなるまで同様の作業を繰り返し、ウイルスゲノム全塩基配列を得た。

### (3) ウイルス感染細胞転写解析

01c1 感染細胞から一定時間毎に RNA を抽出した。全 RNA を理化学研究所に送付し、CAGE 法による網羅的転写開始点解析を行った。併せて ORF5, ORF63 および ORF75 について 5'-RACE 解析を行った。5'-RACE 解析は Smarter Kit を用いて全長 cDNA を合成したのち、遺伝子特異的プライマーを用い

て PCR 増幅した産物をプラスミドクローニングし、塩基配列を解読した。特異的プライマー配列は ORF5 : 5'-GCTGCGGGGACGCCGAGAAGCTCA CAAC-3' , , ORF63 : 5'-CCCGGCAGTCCCATTAGCGTTGAGG GGC-3' および ORF75 : 5'-CTCCTCCTTCGCAGCATCAGGCTCG GCC-3'である。解読塩基配列をウイルスゲノムにマッピングし、CAGE 法で得られた結果と比較解析した。また、宿主遺伝子に関する解析も実施し、ウイルス感染が宿主細胞の転写に与える影響を解析した。

#### (4) ORF30 抗体の作製

Ab4p DNA を鋳型として ORF30 を PCR 増幅し、pGEX-6P-1 ベクターにクローニングした。発現誘導した大腸菌細胞から GST-ORF30 融合タンパク質を抽出精製した。ウサギにアジュバントとともに免疫した。一定期間後に採血し、ウエスタン・ブロッティングおよび間接蛍光抗体法により抗体価および反応性を調べた。

#### (5) EHV-1 VP22 の機能解析

VP22 遺伝子 (ORF11) をプラスミドクローニングし、部分欠損 VP22 を構築した。この部分欠損 VP22 は EGFP との融合タンパク質として構築した。EGFP-部分欠損 VP22 発現プラスミドを培養細胞にトランスフェクションし、レーザー共焦点顕微鏡で観察した。また、ORF11 を rpsL-neo カセットで置換した VP22 欠損ウイルスを BAC システムにより構築した。ウイルスの神経病原性をハムスターモデルにより評価した。

## 4. 研究成果

### (1) EHV-1 ゲノム塩基配列の再確認

次世代シーケンサーにより 90c16 株および 01c1 株のゲノム塩基配列を確認した。これらの 2 株のゲノム塩基配列はこれまでウイルスゲノム全体をカバーするように重複させて PCR 増幅した産物をサンガー法 (90c16) で解読ないしウイルス感染細胞抽出 DNA を Roch 454 シーケンサー (01c1) で解読することによりえられたものであった。これらは部分的に冗長度が低い配列であったため、次世代シーケンサー MiSeq により再解読した。その結果、両株の相違は ORF24, ORF30, ORF65, ORF68 および ORF71 に存在した。ORF24 および ORF71 は繰り返し配列のコピー数の相違、ORF68 は 1 アミノ酸およびフレームシフト変異、ORF30 および ORF65 はそれぞれ 1 アミノ酸の相違であることがわかった。非コード領域では ORF25 上流に一塩基 (A47211G) および ORF64 上流に一塩基 (C118710A) がみられた。同じ塩基の繰り返しの塩基数での相違が数箇所のみみられた。これら非コード領域における塩基の相違がもつ意義については明らかではない。また、これまでの研究から繰り返し配列のコピー数と病原性との関連性は見出されていない。した

がって 01c1 と 90c16 の神経病原性の相違は ORF30, ORF65 および ORF68 に見出されたアミノ酸の相違によると考えられる。ORF30 は既知の D752N 変異である。90c16 の ORF65 および ORF68 は神経病原性株である Ab4p の ORF65 および ORF68 と同じアミノ酸配列であった。これらの結果から 01c1 と 90c16 の神経病原性の相違は単一のアミノ酸の相違である D752N 変異によって決定されていることが示唆された。

### (2) 関連 EHV-1 および EHV-9 のゲノム全塩基配列解読

D752N 変異以外の神経病原性変異を探索するため、他の神経病原性ウマヘルペスウイルスゲノムを解読した。EHV-1 のうち特に強い神経病原性をもつウイルスとしてシマウマ媒介性 EHV-1 が注目されていることから、当研究室が保有する 3 株、シマウマ由来 T-616、オナガー由来 T-529 およびトムソングゼル由来 94-137、のウイルスゲノム全塩基配列を解読した (発表論文 1)。また、EHV-1 に近縁で強い神経病原性をもつウマヘルペスウイルス 9 型 (EHV-9) のウイルスゲノム全塩基配列を解読した (発表論文 2)。その結果、T-529, T-616, 94-137 および EHV-9 の ORF30 における 752 番目のアミノ酸はアスパラギン酸であり、これらのウイルスにおいても D752 が保存されていることがわかった。T-529 は ORF1 および ORF2 が欠損していた。このことから ORF1 および ORF2 は神経病原性に関与していないことが示唆された。シマウマ由来 T-616 株は実際には 2 クローンが混在していた。2 クローンのうち一つ (substrain 1) は ORF1 から ORF76 全てを保有していたが、もう一つのクローン (substrain 2) は ORF70 の 3'末端配列および ORF71 の半ばあたりまでが欠損していた。その結果、ORF70 の 3'末端部分にフレームシフト変異が生じるとともに ORF71 が欠損していた。T-616 subsrain 1 および 2 の神経病原性を評価する必要がある。

これらのウイルスゲノム全塩基配列比較解析から、EHV-1 と EHV-9 の共通祖先ウイルスにおいて元来は神経病原性を有していたと考えられる。ウイルスの進化の過程でシマウマ由来 EHV-1 の一部が家畜馬に適応し、その適応過程で神経病原性を消失したと考えられる。また、神経病原性は DNA 合成酵素における一つのアミノ酸によって決定されていることが再確認された。

一方、D752N 変異をもたないが神経病原性を発揮した EHV-1 (89c25, 89c105 など) が知られている。そこで、89c25 および 89c105 のウイルスゲノム全塩基配列を解読し、比較解析した。89c25 および 89c105 は我が国で初めて発生した EHM の集団発生時に分離された EHV-1 である。89c25 はその後の感染実験により EHM を発症させており、神経病原性を有していることが確認されている。ウイルスゲノム解読から 89c25 と 89c105 の ORF1

から ORF76 までは完全に一致していた。これら 2 株の相違は繰り返し配列領域におけるコピー数の相違であった。そこで、89c25 と非神経病原性株である 90c16 のゲノム配列を比較したところ、ORF8 (N131D), ORF26(Y41H), ORF30(A742V), ORF33 (N15D), ORF34(K25E, A86V), ORF65(T33P, P57L), ORF66(W53G), ORF68(E255 以降フレームシフト)にアミノ酸の相違が見られた。これらについて既報のアミノ酸配列データベース検索をしたところ、ORF8, ORF26, ORF30, ORF34, ORF65, ORF66, ORF68 における変異は 89c25 および 89c105 に固有の変異であった。89c25 および 89c105 の ORF33 は Ab4p と同じ配列であった。今後、これらのアミノ酸変異と神経病原性との関連性を検索する必要がある。

## (2) ウイルス感染細胞における転写動態

ウイルス感染細胞から mRNA を抽出し転写動態解析を行った。今回は神経病原性株である 01c1 感染細胞におけるウイルスゲノムおよび宿主ゲノム転写開始点解析を行った。

### ① 網羅的転写開始点解析による EHV-1 ゲノム転写動態

神経病原性株 01c1 のウイルス遺伝子転写動態解析を行った。全ての転写単位について転写開始点を同定できた。アンチセンス鎖および非コード領域からの転写も確認された。これら転写開始点は数塩基の範囲で同定された。感染後の時間により転写開始点に変動が見られる場合もあった。感染後 8 時間後にはウイルスゲノム全体から転写されていることが見出された (図 1)。

ORF5, 63 および 75 に関して CAGE 法により得られた結果と RACE 法の結果はよく一

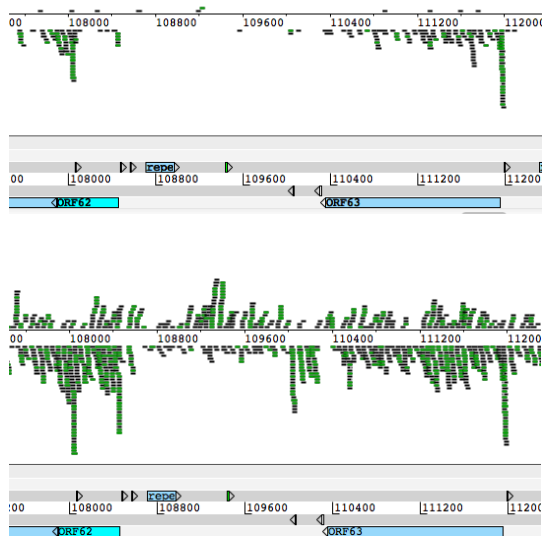


図 1 01c1 感染 4 および 8 時間後の転写開始領域解析。上段に感染 4 時間後、下段に感染 8 時間後の ORF62 から 63 の領域におけるマッピング結果を示した。

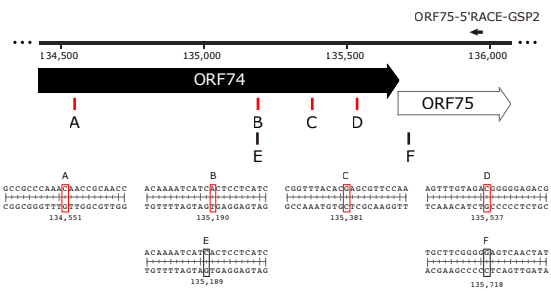


図 2 ORF75 の転写開始点。Smarter RACE (A, B, C, D) および CAGE (E および F) により同定された ORF75 の転写開始点を示す。B および E は感染後 4 時間において見出されている。感染後 8 時間では全ての転写開始点が見られた。

致していたが、CAGE 法では同定されなかった転写開始点も見出された (図 2)。

この解析により、転写開始は特定の塩基というよりは、数塩基からなる転写開始領域からなされること、感染後の時間経過にともない、転写開始領域が増加することが明らかとなった。

### ② 網羅的転写開始点解析による宿主細胞転写動態

ウイルス感染にともなう、宿主細胞の転写動態の変化もとらえることができた。ウイルス感染後の時間により up regulate および down regulate されている多数の遺伝子が見出された。詳細な解析を進めている。

### (3) 抗 ORF30 抗体の作製

ORF30 が神経病原性因子であることは明らかであるが、その機能は DNA 合成であるとされており、神経病原性との直接的な関連性は未解決である。そこで、ORF30 と相互作用する因子を明らかにすることで、なぜ

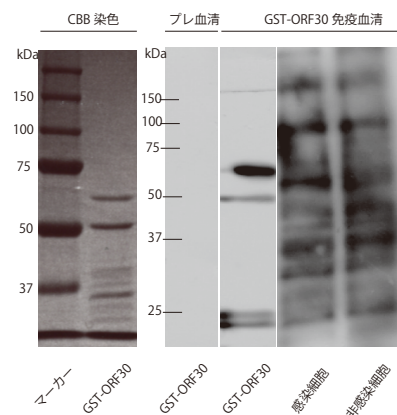


図 3 精製した GST-ORF30 の SDS-PAGE による展開後の CBB 染色像(左)。プレ血清および GST-ORF30 免疫血清を用いたウエスタン・ブロッティングの結果(右)。非感染細胞と感染細胞で反応性が同じであり、ウイルスの保有する ORF30 に対して GST-ORF30 免疫血清が反応していないことが示された。

ORF30 が神経病原性を決定しているかを明らかにしようとした。

免疫学的共沈降法により相互作用因子を明らかにするため、ORF30 に対する抗体作製を試みた。ORF30 全長を用いようとしたが結果が得られなかったため、ORF30 の部分配列に対する抗体を作製することとした。Ab4p DNA を鋳型として ORF30 の 702 番目から 958 番目アミノ酸をコードする DNA 断片を pGEX-6P-1 ベクターにクローニングした。発現誘導した大腸菌細胞から GST-ORF30 融合タンパク質を抽出精製した (図 3 左)。ウサギにアジュバントとともに免疫することで GST-ORF30 免疫血清を得ることができた。ウエスタン・ブロッティングにより免疫した GST-ORF30 融合タンパク質に対する抗体価の上昇を確認することができたが、ネイティブのウイルス ORF30 タンパク質に対してはウエスタン・ブロッティングおよび間接蛍光抗体法において反応が認められなかった (図 3 右)。これは部分配列としたために抗血清作製にもちいた ORF30 とネイティブの ORF30 では立体構造に違いがあったためであると推測された。

(4) EHV-1 ウイルスタンパク質 VP22 の機能解析

EHV-1 テグメントタンパク質である VP22 について機能解析を行った。その結果、VP22 の核移行には 154-188 のドメインが必要であることを明らかにした (図 4)。また、VP22 をコードする ORF11 を rpsL-neo カセットで置換した VP22 欠損 Ab4p を構築した。この VP22 欠損 Ab4p は培養細胞における増殖性が低下していた (図 5)。hamster における神経病原性を調べたところ、VP22 欠損 Ab4p の神経病原性は親株と同等であることがわかった (図 6)。したがって、VP22 は神経病原性に関与しないことがわかった。VP22 欠損ウイルスは培養細胞での増殖が落ちてい

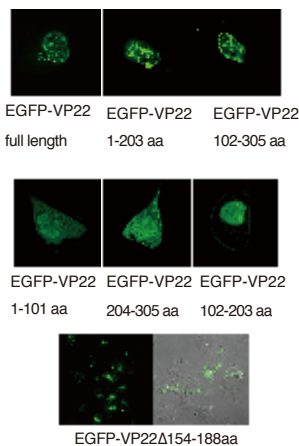


図 4 部分欠損 VP22 の局在。部分欠損変異体の局在から VP22 の 103-203 が核移行に重要であることが示唆された。さらに 103-203 アミノ酸のうち核移行シグナルと予測された 154-188 を欠損させた VP22 は核局在しなかった

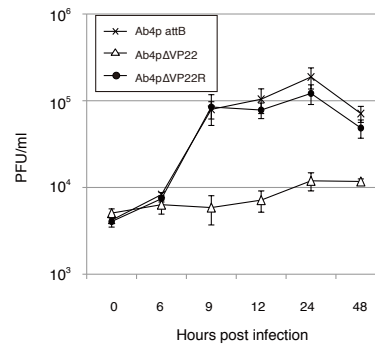


図 5 Ab4p attB, Ab4pΔVP22 および Ab4pΔVP22R の一段増殖曲線。

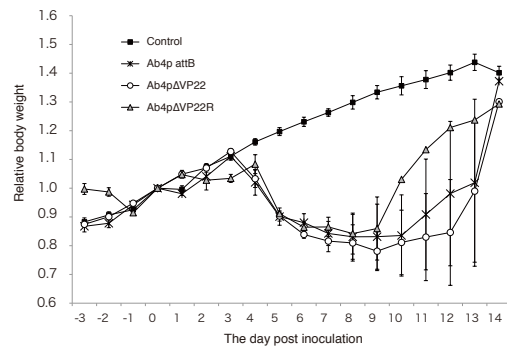


図 6 VP22 欠損ウイルス感染hamsterの体重曲線。

ることから、宿主細胞の種類によりウイルスタンパク質の機能は異なることが推測された。

## 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 4 件)

- Okada A, Izume S, Ohya K, Fukushi H. (2015) Equine herpesvirus type 1 tegument protein VP22 is not essential for pathogenicity in a hamster model but is required for efficient viral growth in cultured cells. *J Vet Med Sci*. May 7.[Epub ahead of print] (査読有) [https://www.jstage.jst.go.jp/article/jvms/advpub/0/advpub\\_14-0648/\\_pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/jvms/advpub/0/advpub_14-0648/_pdf)
- Guo X, Izume S, Okada A, Ohya K, Kimura T, Fukushi H. (2014) Full genome sequences of zebra-borne equine herpesvirus type 1 isolated from zebra, onager and Thomson's gazelle. *J Vet Med Sci*. 76(9):1309-1312. (査読有)
- Okada A, Kodaira A, Hanyu S, Izume S, Ohya K, Fukushi H. (2014) Intracellular localization of Equine herpesvirus type 1 tegument protein VP22. *Virus Res*. 192:103-113. (査読有)

4. Fukushi H, Yamaguchi T, Yamada S. (2012) Complete genome sequence of equine herpesvirus type 9. *J. Virol.* 86(24):13822. (査読有)

〔学会発表〕 (計 10 件)

1. 郭 小芹, 大屋 賢司, 福士 秀人. ウマヘルペスウイルス 9 型 ORF19 ノンストップ変異によるウイルス病原性の低下. 第 157 回日本獣医学会学術集会 北海道大学 (札幌市・北海道) 2014 年 9 月 11 日

2. 坂本 安由美, Kasem Samy, Sakya Rania, 大屋 賢司, 福士 秀人. ウマヘルペスウイルス 1 型における ORF37 および ORF38 の転写開始点の解析. 第 157 回日本獣医学会学術集会 北海道大学 (札幌市・北海道) 2014 年 9 月 11 日

3. 井爪 聡子, 大屋 賢司, 福士 秀人. ウマヘルペスウイルス 1 型 US8A のウイルス感染細胞における局在. 第 157 回日本獣医学会学術集会. 北海道大学. (札幌市・北海道) 2014 年 9 月 10 日

4. 岡田 彩加, 安井 瑠香, 井上 直樹, 大屋 賢司, 福士 秀人. 新規作用メカニズムによる EHV-1 感染症治療薬候補化合物の探索. 第 157 回日本獣医学会学術集会 北海道大学 (札幌市・北海道) 2014 年 9 月 10 日

5. 井爪 聡子, 岡田 彩加, 辻村 行司, 松村 富夫, 大屋 賢司, 福士 秀人. ウマヘルペスウイルス 1 型膜タンパク質 US8A の細胞内局在. 第 28 回 ヘルペスウイルス研究会. ウェスティンホテル淡路/淡路夢舞台国際会議場 (淡路市・兵庫) 2013 年 5 月 31 日

6. 岡田 彩加, 井爪 聡子, 小平 彩里, 羽入 さち子, 山田 壮一, 大屋 賢司, 福士 秀人. ウマヘルペスウイルス 1 型テグメントタンパク質 VP22 の機能解析. 第 28 回 ヘルペスウイルス研究会 ウェスティンホテル淡路/淡路夢舞台国際会議場 (淡路市・兵庫) 2013 年 6 月 1 日

7. 福士 秀人, 奥田 秀子, 井爪 聡子. ウマヘルペスウイルス 1 型テグメントタンパク質 VP22 の機能解析. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会 神戸国際会議場 (神戸市・兵庫) 2012 年 11 月 14 日

8. 井爪 聡子, 辻村 行司, 松村 富夫, 大屋 賢司, 福士 秀人. ウマヘルペスウイルス 1 型 ORF75 の C 末端領域の機能解析. 第 154 回日本獣医学会学術集会 岩手大学 (盛岡市・岩手) 2012 年 9 月 12 日

9. 大竹 絢子, 井爪 聡子, 岡田 彩加, 大屋 賢司, 福士 秀人. ウマヘルペスウイルス 1 型遺伝子発現の Real-timePCR による網羅的定量解析. 第 154 回日本獣医学会学術集会 岩手大学 (盛岡市・岩手) 2012 年 9 月 12 日

10. 福士 秀人, 岡田 彩加, 大竹 絢子, 井爪 聡子, 大屋 賢司. ウマヘルペスウイルス 1 型感染細胞における次世代シーケンサーを用いた網羅的転写解析. 第 154 回日本獣

医学会学術集会 岩手大学 (盛岡市・岩手) 2012 年 9 月 12 日

〔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：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

福士 秀人 (FUKUSHI HIDETO)  
岐阜大学・応用生物科学部・教授  
研究者番号：10156763

### (2)研究分担者

大屋 賢司 (OHYA KENJI)  
岐阜大学・応用生物科学部・准教授  
研究者番号：50402219

### (3)連携研究者

松村 富夫 (MATSUMURA TOMIO)  
日本中央競馬会競走馬総合研究所・栃木支所・室長  
研究者番号：20446511  
辻村 行司 (TSUJIMURA KOJI)  
日本中央競馬会競走馬総合研究所・栃木支所・室員  
研究者番号：50446514