

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24780279

研究課題名(和文) MHCクラスI分子を介したヘルペスウイルス細胞内侵入機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of MHC class I-mediated cellular entry of herpesvirus

研究代表者

佐々木 道仁 (Sasaki, Michihito)

北海道大学・人獣共通感染症リサーチセンター・研究員

研究者番号：70609403

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：細胞表面に発現するウマ主要組織適合遺伝子複合体(MHC)クラスIがウマヘルペスウイルス4型(EHV-4)のエンベロップ糖タンパクgDと結合し、EHV-4の細胞内侵入を誘導するレセプターであることを明らかにした。また、ウマMHCクラスIを標的とする感染阻害法がウマヘルペスウイルス1型(EHV-1)とEHV-4両ウイルス感染を同時に阻害することを明らかにした。加えて、ウサギMHCクラスIのEHV-1レセプター機能を解析し、ウマ培養細胞とウサギ培養細胞におけるEHV-1感染機構の違いについて考察した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we revealed that equine major histocompatibility complex (MHC) class I binds to equine herpesvirus type 4 (EHV-4) glycoprotein D and mediates the cellular entry of EHV-4. We also showed that the treatment of recombinant proteins binding to equine MHC class I inhibits the entry of both EHV-1 and EHV-4, suggesting that the blocking of equine MHC class I will be a candidate for the prevention and treatment of EHV-1 and EHV-4 infections. In addition, we analyzed the function of rabbit MHC class I in EHV-1 entry into RK13 cells.

研究分野：農学

キーワード：ヘルペスウイルス レセプター MHCクラスI ウマ ウサギ 組換えタンパク質

1. 研究開始当初の背景

馬鼻肺炎はウマヘルペスウイルス 1 型 (EHV-1) またはウマヘルペスウイルス 4 型 (EHV-4) の感染によって引き起こされる感染症の総称であり、呼吸器症状や流産、脳脊髄炎を主徴とする。我が国において、本感染症は家畜伝染病予防法により届出伝染病に指定されており、発症例が毎年確認されている。馬鼻肺炎対策に使用されている現行の不活化ワクチンは、脳脊髄炎と流産の発症を防ぐことができないため、より有効な予防・治療法の開発が望まれている。しかしながら、馬で認められる病態がハムスターやマウス等の実験動物では再現されず、病原性に関するウイルス側因子、宿主側因子に関する知見が乏しいため、予防・治療法の研究開発は進展していない。

このような背景のもと、研究代表者はウイルスの宿主特異性や病原性に関与する宿主因子であるウイルス侵入受容体 (レセプター) に着目して研究を進めてきた。これまでに、ウマ培養細胞表面に発現するウマ主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) クラス I が EHV-1 のエンベロープ糖タンパク gD と結合し、EHV-1 の細胞内侵入を誘導することを見出した。一方、もう一つの馬鼻肺炎原因ウイルスである EHV-4 のレセプターは同定されなかった。

また、EHV-1 はウマ培養細胞に加えてウサギ培養細胞株 RK13 細胞にも感染する。RK13 細胞への細胞内侵入に際し、EHV-1 がウサギ MHC クラス I をレセプターとして利用するかは不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、ウマ MHC クラス I が EHV-4 レセプターとして機能するか解析するとともに、ウマ MHC クラス I を標的とした感染阻害法が EHV-1 と EHV-4 の両ウイルスの感染阻害に有効であるか検討した。また、ウサギ MHC クラス I が EHV-1 レセプターとして機能するか解析し、RK13 細胞が示す EHV-1 感受性に MHC クラス I が関与しているか検討した。以上の研究により、馬鼻肺炎原因ウイルスである EHV-1 と EHV-4 の細胞内侵入機構について新たな知見を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1)ウマ MHC クラス I の EHV-4 レセプター機能の解析

ウマ MHC クラス I 遺伝子クローン A68 発現プラスミドをリポフェクション法により細胞に導入、または、レンチウイルスベクターを用いて 2 ミクログロブリン遺伝子発現を抑制する shRNA を細胞に導入したのち、EHV-4 を接種し細胞の EHV-4 感染を蛍光顕微鏡下で観察した。

(2)リガンドである EHV-4 エンベロープ糖タンパクの同定

EHV-4 gD の細胞外領域にヒト IgG1 Fc 領域を付加した Ig 融合タンパク発現プラスミドを 293T 細胞に導入し、上清中に分泌された可溶性組換え EHV-4 gD (sgD4) をプロテイン A カラムを用いて精製、回収した。ウマ MHC クラス I 遺伝子クローン A68 を発現させた 293T 細胞と sgD4 を氷上でインキュベートした後、抗ヒト IgG 抗体を用いたフローサイトメトリー解析を実施した。

(3)組換え gD を用いた感染阻害法の検討

可溶性組換え EHV-1 gD (sgD1) または(2)で作成した sgD4 を、E.Derm 細胞と反応させたのち EHV-1 または EHV-4 を接種し、細胞のウイルス感染を蛍光顕微鏡下で観察またはフローサイトメトリーにより解析した。

(4)ウサギ MHC クラス I の EHV-1、EHV-4 レセプター機能の解析

ウサギ MHC クラス I 遺伝子クローン A31 の変異体 (A31 T173A) の発現プラスミドをインバース PCR 法により作成した。A31 または A31 T173A の発現プラスミドをリポフェクション法により細胞に導入したのち、EHV-1 または EHV-4 を接種し、細胞のウイルス感染を蛍光顕微鏡下で観察した。導入遺伝子の細胞表面発現をフローサイトメトリーにより解析した。

(5)RK13 細胞における EHV-1 細胞内侵入機構の解析

sgD1 または sgD4 を RK13 細胞と反応させたのち EHV-1 を接種し、細胞のウイルス感染を蛍光顕微鏡下で観察またはフローサイトメトリーにより解析した。siRNA をリポフェクション法により、または shRNA をレンチウイルスベクターを用いて細胞に導入したのち、MHC クラス I の細胞表面発現をフローサイトメトリーにより解析した。

4. 研究成果

(1)ウマ MHC クラス I の EHV-4 レセプター機能の解析

ウマ MHC クラス I 遺伝子クローン A68 を EHV-4 非感受性細胞であるチャイニーズハムスター培養細胞株 CHO-K1 細胞に遺伝子導入し発現させたところ、細胞は EHV-4 感受性を示した。次に、EHV-4 感受性細胞であるウマ培養細胞株 E.Derm 細胞の 2 ミクログロブリン遺伝子発現を shRNA 導入により抑制し、MHC クラス I の細胞表面発現が低下した細胞に EHV-4 を感染させたところ、細胞の EHV-4 感受性が著しく減少した。以上の結果から、ウマ MHC クラス I は EHV-4 レセプターとして機能し、EHV-4 は EHV-1 と同様 E.Derm 細胞にウマ MHC クラス I を介して侵入することが明らかとなった。

(2)リガンドである EHV-4 エンベロープ糖タンパクの同定

可溶性組換え EHV-4 gD (sgD4) を用いたフローサイトメトリー解析により、ウマ MHC クラス I の遺伝子発現に依存した sgD4 の細胞表面結合を検出した。以上の結果から、EHV-4 gD がウマ MHC クラス I のリガンドであることが明らかとなった。

(3)組換え gD を用いた感染阻害法の検討

可溶性組換え EHV-1 gD (sgD1) を用いて前処理した E. Derm 細胞に EHV-1 または EHV-4 を接種したところ、組換えタンパクの濃度依存的に両ウイルスの感染阻害効果が認められた。さらに、sgD4 を用いた実験でも同様の結果が得られた。以上の結果から、EHV-1 と EHV-4 はウマ細胞への感染にウマ MHC クラス I という同一の分子をレセプターとして使用していること、ウマ MHC クラス I を標的とした感染阻害法が EHV-1 と EHV-4 両ウイルス感染を同時に阻害できることを示した。

(4)ウサギ MHC クラス I の EHV-1、EHV-4 レセプター機能の解析

RK13 細胞よりクローニングしたウサギ MHC クラス I 遺伝子クローン A31 を EHV-1 非感受性細胞であるマウス培養細胞株 NIH3T3 細胞に遺伝子導入し発現させたところ、細胞は EHV-1 感受性を示した。また、ウサギ MHC クラス I 遺伝子クローン A31 を EHV-4 非感受性細胞である CHO-K1 細胞に遺伝子導入し発現させたところ、細胞は EHV-4 感受性を示した。しかしながら、導入したウサギ MHC クラス I A31 の十分な細胞表面発現が認められたにもかかわらず、EHV-1 と EHV-4 いずれのウイルス感染においても、ウイルス感染細胞数はウマ MHC クラス I A68 を発現させた場合に比べて少なく、ウサギ MHC クラス I A31 を介したウイルスエントリーの効率はウマ MHC クラス I A68 を介したものに比べて低いことが判明した。

過去に、ウマ MHC クラス I の 173 番目のアミノ酸が疎水性アミノ酸であることが EHV-1 レセプター機能に重要であることが示されている。一方、ウサギ MHC クラス I A31 は 173 番目に親水性アミノ酸スレオニンにコードしている。そこで、A31 の 173 番目のアミノ酸をアラニンに置換した変異体 (A31 T173A) を作製し細胞に発現させたところ、A31 T173A 発現細胞の EHV-1/EHV-4 感受性がウマ MHC クラス I A68 発現細胞と同等以上にまで上昇した。以上の結果から、ウサギ MHC クラス I はウマ MHC クラス I に比べて EHV-1/EHV-4 レセプター機能が低いことが明らかとなり、その原因としてウサギ MHC クラス I の 173 番目のアミノ酸が親水性アミノ酸であることが理由の一つであると考えられた。

(5)RK13 細胞における EHV-1 細胞内侵入機構の解析

(2)(3)で使用した sgD1、sgD4 を用いて RK13 細胞の EHV-1 感染阻害実験を実施した。

RK13 細胞を sgD1 で前処理したのち、EHV-1 を接種すると sgD1 の濃度依存的に EHV-1 感染が阻害された。一方、sgD4 を用いて行った同様の実験では、sgD4 の EHV-1 感染阻害効果は認められなかった。以上の結果から、RK13 細胞における EHV-1 gD を介した EHV-1 独自の細胞内侵入機構の存在が示唆された。

RK13 細胞における EHV-1 の細胞内侵入に MHC クラス I が関与しているか調べるため、MHC クラス I の細胞表面発現を減少させることを目的とした 2 ミクログロブリン (2m) の発現抑制を試みた。siRNA や shRNA を RK13 細胞に導入し、2m の mRNA 量の減少を確認したが、細胞表面の MHC クラス I 発現減少は認められず、siRNA や shRNA の効果が不十分な可能性が考えられた。今後、細胞表面の MHC クラス I 発現が抑制された RK13 細胞が得られ次第、EHV-1 感染実験を実施し、細胞の EHV-1 感受性の変化を解析する。

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 5 件)

Sasaki M, Setiyono A, Handharyani E, Kobayashi S, Rahmadani I, Taha S, Adiani S, Subangkit M, Nakamura I, Sawa H, Kimura T: Isolation and characterization of a novel alphaherpesvirus in fruit bats. J. Virol. 88(17): 9819-9829, 2014. (査読有)

[学会発表](計 10 件)

Sasaki M, Agus Setiyono, Ekowati Handharyani, Nakamura I, Sawa H. Kimura T: Novel alphaherpesvirus in Indonesian fruit bats. Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections 2014, 仙台国際センター(仙台) 2014 年 1 月 20 日-22 日

Sasaki M, Agus Setiyono, Ekowati Handharyani, Nakamura I, Sawa H. Kimura T: Novel herpesvirus in Indonesian fruit bats 第 36 回日本分子生物学会年会、神戸ポートアイランド(神戸) 2013 年 12 月 3 日-6 日

佐々木道仁, Agus Setiyono, Ekowati Handharyani, 中村一郎, 澤洋文, 木村享史: オオコウモリ由来新規ヘルペスウイルスの分離と性状解析、第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸国際会議場(神戸) 2013 年 11 月 10 日-12 日

佐々木道仁, Agus Setiyono, Ekowati Handharyani, 中村一郎, 澤洋文, 木村享史: インドネシア共和国に生息するオオコウモリから分離した新規ヘルペスウイルスの性状解析、第 156 回日本獣医学会学術集会、岐阜大学(岐阜大学) 2013 年 9 月 20 日-22 日

Sasaki M, Igarashi M, Hasebe R, Ito K, Fukushi H, Sawa H, Kimura T: MHC class I-mediated entry of animal herpesvirus

The 34th Naito Conference、シャトレーズ
ガトーキングダムサッポロ（札幌）、2012年
10月16日-19日

〔図書〕（計0件）

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐々木 道仁（SASAKI MICHIHITO）
北海道大学・人獣共通感染症リサーチセン
ター・研究員
研究者番号：70609403

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし