

## 論文の内容の要旨

農学国際専攻

平成 12 年度博士課程進学

氏 名 中道 一生

指導教官名 大塚 治城

論文題目 **Molecular Biological Analyses of Bovine Herpesvirus 1 Infection**

(ウシヘルペスウイルス I 型感染の分子生物学的解析)

ウシヘルペスウイルス I 型 (BHV-1) は、ヘルペスウイルス科、アルファヘルペスウイルス亜科に属する。BHV-1 は牛を自然宿主とし、牛伝染性鼻気管炎や結膜炎、伝染性膿疱性陰門膿炎、流産等を引き起こす。また、BHV-1 感染牛ではウイルスが三叉神経節や仙骨神経節に潜伏感染し、それらが再活性化することで新たな感染源となる。現在、BHV-1 は世界各地に分布しており、畜産分野において経済的に重要視されている。本研究は、分子生物学的手法を用いて BHV-1 の感染、増殖機構を明らかにすることを目的とし、以下の 3 章より構成される。

### (1) BHV-1 の宿主細胞特異性 (第 1 章)

アルファヘルペスウイルスの中でも、BHV-1 は狭い宿主細胞域を示し、ウシ以外の動物に由来する細胞ではウイルス増殖が著しく低下する。これに対して、同亜科に属し、BHV-1 と近縁な豚オーエスキー病ウイルス(PrV)は、極めて幅広い宿主細胞域を示す。そこで、PrV の吸着、侵入に関与する糖蛋白質 gC と gB を発現させた BHV-1 変異株の宿主細胞域

を調べた。QCPCR による BHV-1 の微量定量解析の結果、PrV の gC と gB を発現させることで、BHV-1 感染に対して低感受性のハムスター肺由来(HmLu-1)細胞への吸着と侵入が飛躍的に増大し、ウイルス増殖が顕著に増加した。このことより、低感受性 HmLu-1 細胞における BHV-1 の増殖低下は、ウイルスの吸着や侵入の段階で生じていることが示唆された。

マウス胚由来の A31 細胞は BHV-1 感染に対して非感受性を示し、感染性の BHV-1 粒子が全く産生されない。A31 細胞において、BHV-1 は HmLu-1 細胞の場合と同程度のウイルス吸着や侵入を示した。また、A31 細胞内に侵入した BHV-1 は、効率よく細胞核へ輸送された。しかしながら、BHV-1 の前初期蛋白質である ICP4 の発現やウイルスゲノムの複製は検出されなかった。PrV の gC および gB の発現は A31 細胞への BHV-1 侵入を促進したが、ICP4 の発現は確認されなかった。このことより、非感受性 A31 細胞における BHV-1 の増殖障害は、細胞内への侵入の段階ではなく、核移行から前初期蛋白質の発現までの段階で生じていることが示唆された。

## (2) BHV-1 感染の細胞間伝播 (第 2 章)

アルファヘルペスウイルスは、標的細胞内での増殖後、細胞間の接着部(cell junction)を介して未感染細胞へと伝播する。この増殖様式は、ウイルスが宿主免疫系による攻撃を回避する上で有利であると考えられており、糖蛋白質 gE や gI の関与が示唆されている。本章では、機能が明らかとなっていない糖蛋白質 gG に注目し、BHV-1 の細胞間伝播における gG の役割について検討した。ウシ腎上皮由来の MDBK 細胞において、gG を欠損させた BHV-1 変異株は、野生型の BHV-1 と同程度のウイルス侵入能力を示した。しかしながら、糖蛋白質 gE や gI を欠損させた場合と同様に、BHV-1-gG を欠損させることで、細胞から細胞へのウイルス伝播による増殖が有意に低下した。BHV-1-gG 欠損株に正常な gG 遺伝子を組み込んだ BHV-1 復帰株は、野生株と同様の性状を示した。このことより、BHV-1-gG は、ウイルスの細胞間伝播において機能することが示唆された。

共焦点レーザー顕微鏡を用いた解析の結果、BHV-1-gE は細胞間の接着部に局在することが分かった。これに対して、BHV-1-gG は細胞間接着部と細胞核付近の細胞質に蓄積し

ており、BHV-1 - gE とは異なる細胞内分布を示すことが分かった。野生型や gE 欠損株に感染した MDBK 細胞では、細胞接着分子であるカドヘリンや  $\beta$ -カテニンが細胞間接着部に蓄積し、細胞間接着が維持されることが分かった。これに対して、BHV-1-gG 欠損株に感染した MDBK 細胞では、カドヘリンや  $\beta$ -カテニンは細胞質中に分布し、細胞間接着が乖離した。この結果から、BHV-1-gG は感染細胞間の細胞接着を維持することで、ウイルスの細胞間伝播を促進することが示された。

### (3) BHV-1 蛋白質による細胞自殺の制御

アルファヘルペスウイルスは標的細胞に対して細胞自殺（アポトーシス）を抑制することが報告されている。また、細胞種によってはアポトーシスを誘導することも知られている。本章では、アポトーシス制御に関与する BHV-1 蛋白質の同定を試みた。BHV-1-gG 欠損株は、ウサギ腎由来 RK13 細胞において増殖能力の低下と、特徴的な細胞変性効果(CPE)を示した。BHV-1-gG 欠損株に感染した場合、対照群と比較して感染細胞の生存率が低下した。また、ウイルス増殖の初期段階（感染後約 8 時間）において、ゲノム DNA の断片化(DNA ladder)と細胞核の凝縮が観察された。アポトーシスに関与するカスパーゼの阻害剤 (Z-Asp-CH<sub>2</sub>-DCB) の存在下では、BHV-1-gG 欠損株による RK13 細胞のアポトーシスが抑制され、gG-欠損株のウイルス増殖が有意に増加した。これらの結果より、RK13 細胞において、BHV-1-gG は増殖初期段階でのアポトーシスを遅らせることで、ウイルス増殖を促進する働きをもつことが示唆された。

アルファヘルペスウイルスは様々な細胞種にアポトーシスを誘導することが知られているが、直接的にアポトーシス経路を活性化するウイルス蛋白質は未だ報告されていない。本研究では、BHV-1 の U<sub>5</sub> ORF8 遺伝子によってコードされる産物(U<sub>5</sub> ORF8 蛋白質)を同定し、U<sub>5</sub> ORF8 蛋白質の発現によって引き起こされる細胞毒性について検討した。大腸菌発現系によって U<sub>5</sub> ORF8 遺伝子産物を発現させ、これを用いて U<sub>5</sub> ORF8 蛋白質に対する抗体を得た。BHV-1 感染細胞を用いたウェスタンブロット解析の結果、分子量約 27 kDa と 32 kDa の蛋白質が検出され、翻訳後修飾の可能性が考えられた。バキュロウイルス(AcNPV)

に、哺乳類プロモーター（CAG プロモーター）の下流に U<sub>s</sub> ORF8 を接続した発現ユニットを組み込んだウイルスベクター（Ac/CA8）を作製した。Ac/CA8 を用いて RK13 細胞内に U<sub>s</sub> ORF8 蛋白質を高発現させたところ、細胞の縮小と細胞生存率の低下が観察された。U<sub>s</sub> ORF8 を発現する RK13 細胞では、ゲノム DNA の断片化と、細胞核の凝縮が検出された。BHV-1 遺伝子発現プラスミドと  $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子発現プラスミドとの共発現系を用いた細胞毒性試験の結果、他の BHV-1 蛋白質（膜蛋白質、分泌蛋白質、酵素）では、U<sub>s</sub> ORF8 蛋白質のような細胞毒性ならびにアポトーシスの誘導は観察されなかった。このことから、BHV-1 U<sub>s</sub> ORF8 遺伝子産物の一過性発現は、RK13 細胞においてアポトーシス経路を活性化し、細胞毒性を示すことが明らかとなった。

RK13 細胞に感染した野生型 BHV-1 株は、ウイルス増殖の後期においてアポトーシスを誘導する。このアポトーシス経路の活性化における U<sub>s</sub> ORF8 蛋白質の関与を調べるため、U<sub>s</sub> ORF8 遺伝子に PrV のチミジンキナーゼ遺伝子領域を挿入した U<sub>s</sub> ORF8 蛋白質欠損 BHV-1 株（BHV-1/D8 株）を作出した。BHV-1/D8 に感染した RK13 細胞では、野生株に感染した場合と比較して、感染細胞の生存率が増加した。また、BHV-1 増殖後期にみられるアポトーシスの誘導は検出されなかった。さらに、BHV-1/D8 は RK13 細胞内において野生株よりも高い増殖性を示した。しかしながら、U<sub>s</sub> ORF8 蛋白質の欠損により、RK13 細胞外への感染性 BHV-1 粒子の放出が有意に低下した。また、MDBK 細胞では、U<sub>s</sub> ORF8 蛋白質の欠損による BHV-1 の細胞毒性や増殖能力の変化は観察されなかった。これらの結果より、U<sub>s</sub> ORF8 蛋白質は、BHV-1 の増殖後期において細胞種特異的にアポトーシスを誘導し、細胞外へのウイルス粒子の放出を促進することが示された。

以上の研究結果は、アルファヘルペスウイルス感染機構の解明において有用な知見を与えるものと思われる。