

「人獣共通感染症国際共同教育研究拠点の創成」

2009年度 博士研究員・RA研究成果発表会

プログラム

場所：北大獣医学研究科動物病院講義室 1F

日時： 2010年3月8日(月) 9:30～16:35

北海道大学 グローバルCOEプログラム
『人獣共通感染症国際共同教育研究拠点の創成』
2009年度 事業推進担当者研究成果発表会

日時 平成22年3月8日(月曜) 9:30～16:35
場所 北大獣医学研究科動物病院講義室 1F

=====

9:30-9:35 開催の挨拶

■座長■ 塩崎拓也

9:35-9:55

1. 野生水禽から分離されたインフルエンザウイルスA/mallard/Hokkaido/24/2009 (H5N1)株の性状
山本直樹 (獣医学研究科 動物疾病制御学講座 微生物学教室)

9:55-10:15

2. インフルエンザウイルス感染による宿主病態制御機構の解析
中山洋佑 (人獣共通感染症リサーチセンター バイオリソース部門)

■座長■ 中山洋佑

10:15-10:25

3. DNA免疫法を用いたマクロファージ遊走阻止因子(MIF)に対する高抗体価誘導法の研究
岩田大樹 (遺伝子病制御研究所 病態研究部門 免疫生物分野)

10:25-10:35

4. インフルエンザ脳症モデルマウスの病態解析
田中智久 (獣医学研究科 診断治療学講座 比較病理学教室)

10:35-10:55

5. 赤血球膜シアロ糖タンパク質の複合体形成と構造多様性
大塚弥生 (獣医学研究科 診断治療学講座 臨床分子生物学教室)

■座長■ 山本直樹

10:55-11:05

6. H9インフルエンザウイルスワクチンの試製と評価

野村直樹（獣医学研究科 動物疾病制御学講座 微生物学教室）

11:05-11:15

7. Protective effect of HLA-A*2402 restricted CTL-inducing peptides against influenza A virus infection

市橋 徹（人獣共通感染症リサーチセンター 国際協力・教育部門）

11:15-11:25

8. インフルエンザウイルスの病原性に関わる宿主因子の解析とウイルス増殖抑制物質の探索

塩崎拓也（人獣共通感染症リサーチセンター バイオリソース部門）

■座長■ 大塚弥生

11:25-11:35

9. インフルエンザ感染症におけるNS1とAKTの機能的分子相互機構の解析

松田真実（遺伝子病制御研究所 病態研究部門 癌生物分野）

11:35-11:55

10. 骨髄由来間葉系幹細胞のプリオン感染脳病変への走化に関与する因子の解析

宋 昌鉉（獣医学研究科 プリオン病学講座）

11:55-12:05

11. プリオンの細胞内増殖に関わる分子機構の解析

山崎剛士（獣医学研究科 プリオン病学講座）

12:05-13:10 === 休憩 ===

■座長 伊勢崎政美

13:10-13:30

12. 殺虫活性を示すミャンマー産薬用植物の探索とミャンマーにおける吸血性双翅目昆虫相の把握

宮崎智史 (獣医学研究科 動物疾病制御学講座 寄生虫学教室)

13:30-13:40

13. 多包条虫に対するRNA干渉法の確立と遺伝子機能解析

水上智秋 (獣医学研究科 動物疾病制御学講座 寄生虫学教室)

13:40-13:50

14. *Theileria parva* シゾント由来蛋白質TpSCOPによるリンパ球アポトーシス抑制およびNFκB経路活性化

林田京子 (人獣共通感染症リサーチセンター 国際協力・教育部門)

■座長 大場靖子

13:50-14:00

15. マウスOas1b のフラビウイルス抵抗性機構の解析

森藤可南子 (獣医学研究科 動物疾病制御学講座 実験動物学教室)

14:00-14:10

16. 膜内在性タンパク質の細胞内小胞輸送のタグとなるモチーフの1例

大津 航 (獣医学研究科 診断治療学講座 臨床分子生物学教室)

■座長 村田 亮

14:10-14:30

17. JCウイルス複製に関わる宿主細胞機構

大場靖子 (人獣共通感染症リサーチセンター 分子病態・診断部門)

14:30-14:40

18. JCウイルスの粒子形成機構の解析

小林進太郎 (人獣共通感染症リサーチセンター 分子病態・診断部門)

14:40-14:50

19. フィロウィルスの表面糖蛋白質 (GP) 開裂の生物学的意義

梶原将大 (人獣共通感染症リサーチセンター 国際疫学部門)

14:50-15:00 === 休憩 ===

■座長 安田俊平

15:00-15:20

20. Epidemiological Study of Tuberculosis in Lechwe (*Kobus lechwe*) in Zambia and Anthroponosis between Human and Chimpanzee in Tanzania

郡山尚紀 (獣医学研究科 環境獣医科学講座 生態学教室)

15:20-15:40

21. 北海道における野鳥由来感染症の分子疫学調査

伊勢崎政美 (獣医学研究科 動物疾病制御学講座 感染症学教室)

15:40-15:50

22. Molecular characterization of Marek's disease virus isolated from domestic and wild birds

盧 虎琳 (獣医学研究科 動物疾病制御学講座 感染症学教室)

■座長 郡山尚紀

15:50-16:10

23. ハンタウイルス実験感染ラットと自然感染ラットの病態比較

安田俊平 (医学研究科 微生物学講座 病原微生物学分野)

16:10-16:20

24. ウエストナイルウイルスの自然感染環と鳥類における抗体調査に関する研究

村田 亮 (獣医学研究科 環境獣医科学講座 公衆衛生学教室)

16:20-16:30

25. スリランカ・中央州における狂犬病対策

神田浩路 (医学研究科 予防医学講座 国際保健医学分野)

16:30-16:35 閉会の挨拶

野生水禽から分離されたインフルエンザウイルスA/ mallard/Hokkaido/24/2009 (H5N1)株の性状

山本直樹（獣医学研究科 動物疾病制御学講座 微生物学教室）

家禽と野鳥のH5N1高病原性鳥インフルエンザウイルスの感染が、ユーラシアおよびアフリカの60ヶ国以上に広がっている。日本においては2004年に山口県の養鶏場でH5N1高病原性鳥インフルエンザが発生し、34,000羽のニワトリが淘汰された(Mase *et al.* 2005)。当研究室では鳥インフルエンザサーベイランスの一環として、1996年から稚内で、2001年から北海道大学構内の大野池において、シベリアのカモの営巣湖沼から渡ってくる野生水禽の糞便を採取し、ウイルスを分離、同定している。

2009年9-12月に大野池で採取した野生水禽の糞便から、H5N1ウイルス(A/mallard/Hokkaido/24/2009)1株を含む18株のA型インフルエンザウイルスが分離された。そこで、このH5N1ウイルスについて、遺伝子と抗原性を解析した。さらに、ニワトリ静脈内接種病原性試験を行うと共に、4週齢のニワトリ、ウズラおよびアヒル8羽に $10^{6.0}$ EID₅₀/羽のウイルスを経鼻接種し、3日目に4羽安楽殺し、主要臓器とスワブからウイルスを回収した。また、残り4羽は14日間経過を観察した。

HA開裂部位には、高病原性鳥インフルエンザウイルスに特徴的な塩基性アミノ酸の連続配列が認められず、ニワトリ静脈内接種病原性指数は0.00だった。経鼻接種3日目のウズラで、4羽中2羽の気管スワブからウイルスが回収された。全ての鳥は14日間臨床症状を示さなかった。H5ウイルスに対する抗体はウズラとアヒルで検出されたが、ニワトリでは検出されなかったことから、ニワトリには感染しないことがわかった。遺伝子の系統解析の結果、HAはH5N1高病原性鳥インフルエンザウイルスとは異なる、野生水禽で維持されているH5亜型の低病原性鳥インフルエンザウイルスと同じ分岐に属していた。また、NAも野生水禽で維持されているN1亜型の低病原性鳥インフルエンザウイルスと同じ分岐に属していた。他の6分節とも野生水禽で維持されている低病原性鳥インフルエンザウイルスの遺伝子と近縁だった。HAの抗原性は、H5亜型の低病原性鳥インフルエンザウイルスと同様であった。

A/mallard/Hokkaido/24/2009 (H5N1)株は、ニワトリに感染しない鳥インフルエンザウイルスであり、ウズラとアヒルに対しても病原性を示さなかった。すなわち、本ウイルスは野生水禽で維持されている非病原性鳥インフルエンザウイルスそのものであることがわかった。

インフルエンザウイルス感染による宿主病態 制御機構の解析

中山洋佑(人獣共通感染症リサーチセンター バイオリソース部門)

インフルエンザウイルス感染により惹起される炎症反応の際に、血中に存在する好中球、マクロファージ等の炎症細胞が感染局所へと到達するためには、血管内皮細胞への接着、血管外遊走、基底膜の破壊や組織間質中の細胞外マトリックス(ECM)を介した遊走等のプロセスが必要である。こうした炎症細胞浸潤過程は、細胞-細胞(または細胞-ECM)相互作用および、ECM分解酵素であるマトリックスメタロプロテアーゼ(MMPs)等による血管透過性の変化により厳密に調節されていると考えられているが、インフルエンザウイルス感染後の炎症局所でのECMやMMPsの機能と役割については不明な点が多い。

インフルエンザウイルス感染による炎症細胞浸潤に関与する宿主因子の探索を行うために、まず、マウスに対する病原性の異なる2種のインフルエンザウイルスA/PR/8(H1N1)(PR/8)およびA/Aichi/2/68(H3N2)(Aichi)をC57BL/6マウスに感染させ、感染後の体重変化を比較検討した。その結果、PR/8ウイルス感染群では顕著な体重減少および致死個体が認められたのに対し、Aichi感染群では体重減少量、生存率共に顕著な変化は認められなかったことから、PR/8は、Aichiと比較してマウスにより重篤な症状を発症させることが示された。

次に、これらのインフルエンザウイルスを感染させたマウス肺組織における細胞外マトリックス関連分子群及びマトリックス分解酵素群の遺伝子発現変化をリアルタイムPCR法により網羅的に解析した。その結果、マウスにより重篤な症状を発症させるPR/8感染群において、著名に遺伝子発現が亢進する数種の分子、MMP-8,12、tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1)、およびOsteopontin等を見出した。特にTIMP-1 mRNAにおいては、PR/8感染によりコントロール(PBS投与)群の約100倍、Aichi感染群の約20倍と非常に高い遺伝子発現の亢進が認められた。

MMPs、及びその内因性阻害因子であるTIMPsは炎症反応に続いて生じる組織傷害、線維化等、様々な病態への関与も報告されており、MMPs、TIMP-1はインフルエンザウイルス感染における症状の重篤度に寄与する可能性が高い事が予想される。今後、上記分子の中和抗体の投与、またはそれぞれの遺伝子欠損マウスにPR/8を感染させ、インフルエンザウイルス感染における病態の重篤化への関与と治療への応用について詳細な解析を行う予定である。

DNA免疫法を用いたマクロファージ遊走阻止因子 (MIF) に対する高抗体価誘導法の研究

岩田 大樹 (遺伝子病制御研究所 病態研究部門 免疫生物分野)

【目的】プラスミドを用いたDNA免疫法は、ポリペプチド抗原を用意する必要がないなど、優れた面があり、感染に対するワクチンとしての応用が期待される。我々は、MIF (macrophage migration inhibitory factor) を標的として抗MIF抗体を *in vivo* に誘導する実験を行ってきた。MIFは本来自己成分であるため、MIF配列に異物である破傷風毒素 (TTX) のヘルパーT (Th) エピトープ配列を組み込んだ変異MIFに対する抗体応答を惹起し、抗MIF (自己) 抗体産生も同時に誘導する方法を用いている (*Arthritis Rheum* 56: 521-30, 2007)。しかし、この手法では高い抗体価を誘導出来る群と低力価に留まる群が生じる。本研究では、安定に高抗体価を誘導する目的でNKT細胞の抗体応答増強作用を応用した方法、すなわち、コンストラクトの構造はそのままに、アジュバントとしてNKT細胞リガンドである α -galactosylceramide (以下 α -GC) を同時に投与する (*Eur J Immunol* 38: 706-19, 2008) ことで、その効果を検討したので報告する。

【対象と方法】B10.BR (H-2^k)、J-18^{-/-}マウス♀4週齢に、MIF DNAワクチン50 μ gとともに α -GC 2 μ g、もしくはvehicleのみを筋肉内注射により投与した。6週後に血清抗MIF抗体価のレベルをELISAで測定した。一部の実験ではluciferase cDNAが組み込まれたDNAワクチンを用いて、DNAワクチンの筋肉内への取り込みを解析した。マウスの抗MIF抗体価を確認した後、抗MIF抗体の生物活性を検討するため、自己免疫性ぶどう膜網膜炎 (EAU) モデルにおける影響を検討した。我々は既にEAUが抗MIF抗体によって軽症化することを報告している。具体的には、抗体価の高い群、低い群、コントロールワクチン投与群の3群について、ヒト視細胞間レチノイド結合蛋白由来ペプチドK2 100 nmoleを結核死菌 *Mycobacterium tuberculosis* H37Raを含む完全フロインドアジュバントのエマルジョンとして皮下注射し、同時に百日咳菌毒素 *Bordetella pertussis* toxin 0.1 μ g を腹腔内注射してEAUを誘導した。誘導後7日目から臨床的重症度を観察し、また21日目に眼球を摘出して組織学的重症度を判定し、各群間で比較した。

【結果】 α -GCをアジュバントとして用いることで、抗体価の平均値は0.56 \pm 0.28となり、 α -GCを併用しなかった群の抗体価0.39 \pm 0.23と比べ上昇した。抗体価についても、OD₄₅₀の値が0.45以上であるマウスは、 α -GCを併用しなかった群の3/11nに比べ、5/11と増加した。 α -GC併用による筋肉内へのDNAワクチンの取り込みには差がみられなかった。抗MIF抗体誘導の生物学的効果を調べる目的で誘導されたEAUの21日目の臨床的重症度は、抗MIF抗体価の高い群で2.5 \pm 0.86で、抗体価の低い群の3.05 \pm 0.62 (P<0.05) とコントロールワクチン投与群の3.11 \pm 0.32に比べ有意に軽症化した (P<0.01)。

【考察】MIF DNAワクチンに α -GCを併用することで、抗体価の平均値の上昇と上昇個体の割合増加が観察され、アジュバント効果が認められた。その作用機序として、 α -GCの投与による筋肉内へのDNAワクチンの取り込みの増幅効果 (リポフェクション的効果) は認められず、type I NKT細胞を刺激することによる、サイトカイン産生を介した増強効果と考えられた。DNAワクチンと α -GCを同時投与して、高力価の抗MIF抗体が得られた群では、有意なEAUの軽症化が認められ、生物学的効果も高かった。また筋組織への刺激性も低く、筋注で接種するDNAワクチンのアジュバントとして適していると考えられた。

インフルエンザ脳症モデルマウスの病態解析

田中智久（獣医学研究科 診断治療学講座 比較病理学教室）

【背景と目的】インフルエンザ脳症（IAE）は、主にA型インフルエンザウイルス（IAV）に感染した幼児が高熱を発した後きわめて短時間のうちに重篤な脳浮腫を起こす致死的な疾患である。IAEの患者の血液中ではTNF- α 、IL-1 β 、IL-6などの炎症性サイトカインが上昇することから、サイトカイン血症による急性の血管障害がIAEの原因であると考えられている。IAV感染マウスにサイトカイン産生のインデューサーとしてリポポリサッカライド（LPS）を投与したところ（IAV+LPSマウス）、生存率の低下、IAE類似の血中サイトカインの上昇と脳病変の形成が認められた。IAV+LPSマウスのIAE様脳病変には血液脳関門（BBB）の破綻による脳血管透過性の亢進が関わっていると考えられたが、そのメカニズムは不明だった。そこで本研究では、BBB構成要素のアポトーシス、蛋白質発現の変化に注目してIAV+LPSマウスの脳血管透過性亢進の原因について検索した。

【材料と方法】IAVまたはLPSを接種したマウス（各IAV、LPSマウス）、IAV+LPSマウスの脳および脳組織切片を用い、TUNEL染色、免疫組織化学・ウェスタンブロットによるactivated caspase-3の検出を行った。また、ウェスタンブロットによりタイトジャンクション蛋白質（ZO-1、occludin）の検出を行った。

【結果】IAV+LPSマウスの脳ではIAVまたはLPSマウスに比べ、TUNEL陽性細胞数、activated caspase 3陽性細胞数の増加がみられた。これらの細胞は主に脳の血管壁やその周囲に分布しており、その一部は血管内皮細胞に一致する紡錘状の形態を示し、また、アストロサイトのマーカーであるGFAPと共染色されるものも観察された。一方、ZO-1、occludinの発現量には各マウス間で有意な差は認められなかった。

【考察】IAV+LPSマウスの脳ではアポトーシスの誘導が亢進しており、アポトーシス細胞には血管内皮細胞やアストロサイトが含まれていると考えられた。血管内皮細胞やアストロサイトはBBBの機能に密接に関与しているため、これらのアポトーシスがIAV+LPSマウスにおける脳浮腫、硝子滴形成などのIAE様脳病変の一因となっていると考えられた。IAE患者の脳においてもアポトーシス細胞が検出されることが報告されており、IAV+LPSマウスの病態はIAEに類似していることが示唆された。IAEの予防、治療法の開発に向けた本モデルマウスの応用が期待される。

赤血球膜シアロ糖タンパク質の複合体形成と構造多様性

大塚弥生（獣医学研究科 診断治療学講座 臨床分子生物学教室）

私たちの研究室では、プログラムの中でウイルスや原虫の感染に関わる宿主細胞と病原体双方の相互作用、ならびに、宿主細胞とウイルスの表面分子が宿主細胞内で共存するフェーズにおける細胞内輸送の仕組みの解明を目指している。今回は、様々なウイルスや赤血球寄生原虫の感染・細胞内侵入に関わるとされる細胞表面シアロ糖タンパク質について報告する。その代表であるグライコフォリンはヒトではA～Eまで5つのアイソフォームが存在する。とくにグライコフォリンA (GPA)は細胞外領域に多数のシアル酸に富む糖鎖を持つ最も主要なグライコフォリンであり、マラリア原虫やウイルスの受容体として数多く報告されている。

牛赤血球膜にはSDS-PAGEで250 kDa以上の領域にPAS陽性の高分子シアロ糖タンパク質 (GP250)が特徴的に認められる。私たちは、イムノブロットイングや質量解析法によってGP250がGPAオリゴマーであることを明らかにした。また、GPBには遺伝子の重複による複数のアイソフォームが存在し、それらの産物が牛の血液型Fシステムの実体分子F、V2等であることを見出した。GPAオリゴマーのPAS染色性と分子サイズには個体差があり、Fシステム血液型とPAS染色性には相関が認められたが分子サイズとは相関しなかった。そこでさらにGP250の構成分子の探索を行った結果、CD58が含まれることが判明した。牛赤血球膜ではGPA、GPB、CD58などのシアロ糖タンパク質が複合体を形成しており、赤血球膜表面の構造は個体ごとに多様性をもつものと考えられる。加えて、反芻動物に特徴的なポリトピック膜シアロ糖タンパク質gp155(=ABCC4)にも遺伝子の重複による類似分子の発現があり、これは主要な血液型抗原Bシステムを形成している可能性が指摘された。これらの分子多様性と病原体(各種ウイルス、原虫)の感染や接着・吸着との関連は今後の課題である。

H9インフルエンザウイルスワクチンの試製と評価

野村直樹（獣医学研究科 動物疾病制御学講座 微生物学教室）

H9N2インフルエンザウイルスが1998年以来ブタおよびヒトから分離されていることから、H9ウイルスが新型インフルエンザウイルスとして出現する可能性が指摘されている。本研究は野生水禽、家禽、ブタおよびヒトから分離されたH9インフルエンザウイルスの遺伝子および抗原性を解析し、ワクチン候補株を選抜することおよび試製ワクチンの免疫原性をマウスを用いて評価することを目的とする。

北米、中国、モンゴルおよび韓国で1995年～2008年に野生水禽、家禽、ブタおよびヒトから分離された22株のH9N2ウイルスのHA遺伝子を系統解析した。また、これらのウイルスの抗原性をそれぞれに対する抗血清との交差赤血球凝集阻止(HI)試験により解析した。10日齢発育鶏卵におけるウイルスの増殖性を50%鶏卵感染価(EID₅₀)で、鶏胚に対する病原性を最少致死量(MLD)および平均致死時間(MDT)により調べた。試製したワクチンをマウスに皮下接種し、A/Hong Kong/1073/99 (H9N2)株で攻撃した。攻撃後14日間の体重および攻撃後3日目の肺のウイルス価を測定し、試製ワクチンの有効性を評価した。

分子系統解析の結果、本研究で用いた22株のHA遺伝子は韓国、G1およびG9系統に区分された。それらのウイルスの抗原性を解析した結果、韓国系統に属するウイルスの抗原性は北米、韓国、G1およびG9系統のそれらと交差することがわかった。韓国系統に属するウイルス6株の発育鶏卵における増殖性および鶏胚に対する病原性を調べたところ、A/duck/Hokkaido/49/98 (H9N2)株は効率良く増殖し、鶏胚に対する病原性は低いことがわかった。これらのことから、A/duck/Hokkaido/49/98 (H9N2)株をワクチン候補株として選抜し、不活化全粒子ワクチンを試製した。このワクチンをマウスに皮下接種し、A/Hong Kong/1073/99 (H9N2)株に対する有効性を評価した。マウスの体重減少および攻撃後3日目の肺におけるウイルス価から、2ug/ml以上のワクチンを接種したマウスで効果を認めた。

Protective effect of HLA-A*2402 restricted CTL-inducing peptides against influenza A virus infection

市橋 徹(人獣共通感染症リサーチセンター 国際協力・教育部門)

[Purpose] The current inactivated influenza virus vaccines induce antibodies that protect against antigenically related viral strains. They do not, however, protect against antibody-escape variants of seasonal influenza A viruses or new pandemic influenza A viruses emerging from non-human reservoirs. To develop a broadly protective influenza vaccine, we focused on cytotoxic T lymphocyte (CTL) because CTL is able to recognize conserved internal viral peptides presented by the class I MHC of infected cells as epitopes. In this study, we designed HLA-A*2402 restricted CTL epitopes derived from H5N1 Influenza A virus internal proteins and evaluated their protective effect against Influenza A virus infection using HLA-A*2402 transgenic mice (A24Tg).

[Methods] Several epitope peptides from H5N1 Influenza A virus internal proteins were selected by CTL epitope prediction programs. To verify immunodominancy of the peptides, *in vivo* cytotoxicity assay was used. To evaluate protective effect of CTL peptides, A24Tg, in which a human CTL immune system have been reconstituted, were immunized with CTL peptides, then challenged with several Influenza A virus subtypes. After virus infection, the survival rate and the changes in body weight were daily monitored and lung virus titer was measured.

[Results and Conclusions] CTL peptide immunized A24Tg mice survived after H5N1 Influenza A virus infection. Body weight loss of immunized mice was not observed after virus challenge. Lung virus titers at infection day 5 of immunized groups were significantly lower than those of unimmunized groups. Furthermore, same combination of CTL peptides were effective for another 2 virus subtypes. So, we have demonstrated that the Influenza A virus specific CTL without neutralizing antibody induction have protective effect against Influenza A virus infection regardless of virus subtypes. These results provide the basis of CTL-inducing Influenza vaccine development for human use.

インフルエンザウイルスの病原性に関わる宿主因子の解析とウイルス増殖抑制物質の探索

塩崎拓也（人獣共通感染症リサーチセンター バイオリソース部門）

2009年4月にメキシコでの確認が報告され、6月には世界的大流行となったインフルエンザA (H1N1)ウイルス、1997年にヒトへ感染が確認され、その後感染例は500例に近づきつつある鳥インフルエンザAウイルスの感染拡大が危惧されている。また、毎年流行する季節性インフルエンザウイルスにおいては、国内だけでも毎シーズン罹患者1000万人以上死亡者1万人に上っている。このような事から、効果的なインフルエンザの予防・治療法が求められている。現在、有効な治療薬としては、インフルエンザウイルスの表面タンパクであるノイラミニダーゼを標的とした、タミフルやリレンザ、ラピアクタなどのノイラミニダーゼ阻害薬が主に用いられている。しかしながら、耐性ウイルスの存在が報告されており、これらノイラミニダーゼ阻害薬とは違う作用点を持つ新規インフルエンザ治療薬の開発が求められている。

1. インフルエンザAウイルスの病原性に関わる宿主因子の解析

インフルエンザAウイルスのRNAポリメラーゼサブユニットの一つであるPB2タンパク質は、ウイルスの増殖と病原性に深く関与していると報告されている。そこでPB2タンパク質と相互作用する細胞内宿主因子を同定した。その宿主因子のウイルス感染細胞での役割を明らかにし、インフルエンザの治療薬のターゲットの候補とする。

2. インフルエンザAウイルスの増殖抑制物質の探索

インフルエンザAウイルスの感染した細胞内では、活性酸素種(ROS)の量の上昇が認められる。このROSの上昇により細胞が酸化ストレスに曝され、その結果アポトーシスが誘導される。アポトーシス誘導は、インフルエンザAウイルスの増殖に関与している。これらの事から、活性酸素種を抑制する抗酸化作用のある物質にインフルエンザAウイルスの増殖を抑制する可能性が示唆された。抗酸化作用を持つ物質として、ポリフェノール化合物があるが、重合度の高いものは摂取後の体内での吸収効率が低い。そこでポリフェノールを、さらに低分子化し、生体吸収性を高めたプロアントシアニンによる、インフルエンザAウイルスの増殖抑制能を評価した。

インフルエンザ感染症におけるNS1とAKTの 機能的分子相互機構の解析

松田真実（遺伝子病制御研究所 病態研究部門 癌生物分野）

インフルエンザウイルスはOrthomyoviridaeに属するウイルスである。このインフルエンザウイルスは11の蛋白をコードするマイナスストランドRNAによって構成されている。この中で、8番目の遺伝子によってコードされるNS1蛋白(Non structural protein)について研究を進めた。このNS1蛋白は様々な細胞内の蛋白と結合し、その機能を修飾することが知られている。

私たちは本研究においてまず、NS1とAKTが結合するか否かを免疫共沈法とGST-pull down assay法により検討した。その結果、NS1はAKTとリン酸化依存的に結合することが確認された。その結合にはAKTのPHドメインとNS1のN-terminal にあるRNA binding domainが重要であることが確認された。さらにNS1蛋白はAKTのリン酸化依存的に結合することが確認できた。NS1蛋白には二つの核移行シグナルが存在し、活性型AKTは核に移行することから共焦点顕微鏡を用い、NS1蛋白とリン酸化AKTとの二つの蛋白の局在を検証した。その結果、NS1蛋白は核内部において細胞周期の中でも特に間期と呼ばれる周期においてAKTと核の内部で点状に共局在することが判明した。また、NS1蛋白はAKT in vitro kinase assayにおいて AKTとその器質を容量依存的にそのリン酸化を促進することを証明した。LC-Masを用いたNS1蛋白のリン酸化部位の解析ではNS1蛋白のThreonine 215が優位にリン酸化されていることが判明した。このThr215はAKTの特異的なリン酸化基質としてのアミノ酸配列を持たないことからこのリン酸化にはAKTによる直接的なリン酸化でなく、2次的なリン酸化酵素(群)が関与している可能性が示唆された。

AKTは細胞内の細胞死制御の要の分子であることから、このNS1によるAKTシグナル伝達系の修飾機構を制御することによりインフルエンザウイルスの感染における病態を人為的に修飾し、治療に役立てる可能性が示唆された。

骨髄由来間葉系幹細胞のプリオン感染脳病変への走化に関与する因子の解析

宋 昌鉉（獣医学研究科 プリオン病学講座）

骨髄由来間葉系幹細胞(Mesenchymal stem cells; MSCs)は、脳虚血、脳腫瘍、あるいは神経変性疾患の病変部位に移行し、病状の改善に寄与することが知られている。我々はヒトMSCs (hMSCs)をプリオン感染マウスに移植した場合、hMSCsがプリオン病の脳病変部に移動すること、および、マウスの生存期間が延長することを報告した。しかし、MSCsがプリオン病の病変部に走化する機構は知られていない。そこで、MSCsの走化に関連する宿主側の因子及びそれに対するMSCs側の受容体について解析したので報告する。

プリオン感染及び非感染の脳乳剤接種後120日目のマウスの脳から脳乳剤を作製し、hMSCsの脳乳剤への走化をQCM 96-well cell migration assay kitを用いて調べた。hMSCsの走化とサイトカイン/ケモカイン及び神経栄養因子との関連性を調べるために、12種のリガンド及びそれに対する10種の受容体に対する抗体を用いて中和実験を行った。また、接種後120日目のマウス脳内サイトカイン/ケモカインのmRNAの発現、および、hMSCsを脳乳剤と共培養した時の受容体の発現を調べた。

hMSCsは、PDGFR, IGFR, CCR3, CCR4, CXCR3, CXCR4に対する受容体を構成的に発現しており、プリオン感染脳乳剤との培養でこれら分子の発現は若干増加した。一方、CCR5はhMSCsの細胞膜上には発現しておらず、プリオン感染脳乳剤と培養した場合に細胞膜上に発現が誘導された。CCR3-5, CXCR3, CXCR4に対する抗体でhMSCsを前処理した場合、hMSCsのプリオン感染脳乳剤への走化は有意に減少した($p < 0.05$)。また、CCR3のリガンドであるCCL5とCCL7、CCR5のリガンドであるCCL3とCCL4、CXCR3のリガンドであるCXCL10、CXCR4のリガンドであるCXCL12に対するプリオン感染マウス脳でのmRNAは、非感染マウスよりも高かった。これらのリガンドに対する抗体で脳乳剤を前処理した場合、プリオン感染脳乳剤へのhMSCsの走化は有意に減少した($p < 0.01$)。以上の結果から、hMSCsに構成的に発現するCCR3, CCR4, CXCR3, CXCR4、およびプリオン感染により発現が誘導されるCCR5とこれらに対するリガンドは、hMSCsのプリオン病の病変部位に移行に関与することが示唆された。

プリオンの細胞内増殖に関わる分子機構の解析

山崎剛士（獣医学研究科 プリオン病学講座）

プリオン病で中枢神経組織に認められる神経変性には、神経細胞でのプリオンの増殖が密接に関係していると考えられている。しかし、プリオンの増殖と神経変性を結びつける分子機構は未だ知られておらず、また、プリオンの増殖機構に関しても十分に理解されていない。プリオンの細胞への侵入、およびプリオンの主要構成要素である異常型プリオン蛋白質 (PrP^{Sc}) の産生が起こる細胞内微小環境への輸送は、プリオン感染成立の中核をなす事象であり、これらを詳細に解析することは、プリオンの増殖機構を解明する上で重要な意味を持つ。近年、膜の輸送機構、特に膜のリサイクルとPrP^{Sc}の産生との関連性が示唆されており、宿主細胞の輸送機構とプリオンの増殖を結び付ける、より詳細な研究が求められている。

以上のような背景から、発表者は、プリオンの神経細胞内での増殖機構を解明するため、宿主細胞の膜輸送機構、すなわち細胞内移行、細胞内輸送、リサイクルに着目し、PrP^{Sc}の細胞内局在・輸送機構を解析している。

間接蛍光抗体法を用いてPrP^{Sc}の細胞内局在を詳細に解析した結果、PrP^{Sc}は核近傍のトランスゴルジネットワーク (TGN) に隣接した領域に、顆粒状に集簇して検出されることがわかった。このようなPrP^{Sc}は、エンドソームからTGNへ輸送されることが知られているカーゴ蛋白質、Shiga toxin subunit Bと共局在した。そこで、エンドソームからTGNへの膜輸送を阻害するため、感染細胞を20°Cで培養したところ、PrP^{Sc}は核の近傍から消え、細胞の辺縁に局在するようになった。その後、37°Cで細胞を培養すると、PrP^{Sc}は一度核の近傍に戻るが、さらに培養を続けると、PrP^{Sc}は細胞辺縁への拡散と核の近傍への集簇を繰り返した。以上の結果は、核の近傍に局在するPrP^{Sc}は細胞の辺縁へリサイクルされていることを示唆している。

PrP^{Sc}を輸送する分子機構を解析するため、Optiprepを用いて、感染細胞のミクロソーム画分を密度勾配遠心分離したところ、PrPとクラスリン重鎖 (CHC) が同じ画分から検出された。この画分を、抗CHC抗体を用いて免疫沈降すると、PrP^{Sc}が共沈降したことから、PrP^{Sc}がクラスリン被覆小胞に存在することが示唆された。そこで、エンドソームからTGNへの輸送に関わることが知られているクラスリンアダプター蛋白質、Clint1の発現をsiRNAの導入により抑制し、PrP^{Sc}の局在を解析した。Clint1の発現が抑制された細胞では、CHCは核の近傍に局在したのに対し、核の近傍で検出されていたPrP^{Sc}は、細胞辺縁に点在する像として検出されるようになった。以上の結果から、PrP^{Sc}の核の近傍への輸送には、Clint1依存性のクラスリン被覆小胞を介する経路が関与していると考えられた。

本研究では、PrP^{Sc}の輸送担体のひとつとして、クラスリン被覆小胞を提唱した。今後は、他の輸送機構に着目し、研究を行う予定である。

殺虫活性を示すミャンマー産薬用植物の探索と ミャンマーにおける吸血性双翅目昆虫相の把握

宮崎智史（獣医学研究科 動物疾病制御学講座 寄生虫学教室）

人獣共通感染症は東南アジアを含む発展途上国で広く蔓延している。畜産業を主要産業の1つとするミャンマーにおいて、人獣共通感染症のコントロールは急務である。しかしながら、現状では疫学的な調査でさえもあまり行われていない。発表者は今回、1) ミャンマーにおけるベクター分布状況の把握及び 2) ベクターコントロールのための手法の開発を目的とし、以下の2つの研究を行った。

1) ミャンマーにおける吸血性双翅目昆虫相の把握

サシバエ類やアブ類などの吸血性双翅目昆虫は人獣共通感染症を機械的に伝播することが知られている。そこでまず、ミャンマーの農場における吸血性双翅目昆虫相の把握を目的とし、20カ所の農場において双翅目昆虫の採集を行った。採集の結果得られた948個体の双翅目昆虫について形態学的特徴に基づく分類を行った結果、サシバエ属が13.3 % (126個体)、そしてノサシバエ属が37.4 % (355個体) を占めた。アブ類は2個体のみ得られた。このようにベクターとなりうる吸血性双翅目昆虫が多く確認されたことから、ベクターコントロールへの取組の重要性が示唆される。

2) 殺虫活性を示すミャンマー産薬用植物の探索

ベクターコントロールの手段として、殺虫剤によるベクターの駆除は有効な手段の1つである。また、発展途上国において殺虫剤の利用を普及させるためには、安価で使用の容易な殺虫剤を開発することが望ましい。そこで、ミャンマー産の薬用植物34種の抽出液について、モデル生物の1つであるショウジョウバエ(双翅目)を用いた殺虫活性の評価を行った。殺虫活性の評価には、各植物抽出液を一定量の餌に混入させて接触・経口摂取させ、単位時間ごとの生存率を算出する手法を用いた。その結果、クスノキ科の *Cinnamomum tamala* について極めて高い殺虫活性が検出された。本種には細胞毒性やメラニン合成抑制活性を示す Germacrene A が含まれることが知られる。また一方で、調味料として利用されている本種は人体への影響が少ないと予想され、殺虫剤として理想的な条件を満たしている。

今後は *C. tamala* の構成成分の中から高い殺虫活性を示す成分を特定するとともに、それが実際にベクター種への殺虫活性を示すことを確認する必要がある。また、採集した吸血性双翅目昆虫について分子生物学的手法を用いることで、感染症の原因となる寄生虫類の保有状況を明らかにしたい。

多包条虫に対するRNA干渉法の確立と遺伝子機能解析

水上智秋（獣医学研究科 動物疾病制御学講座 寄生虫学教室）

多包虫症は、世界規模で深刻な被害をもたらしている人獣共通寄生虫症である。原因となる多包条虫(*Echinococcus multilocularis*)の幼虫(多包虫)は、患者の肝臓に浸潤しながら無性増殖し、重度の肝障害を引き起こす。多包虫症の病態形成には、多包虫の増殖機構、宿主免疫回避機構が密接に関わっているが、これらの機構に関する分子レベルの研究は近年始まったばかりであり、これまでに得られた知見は断片的なものである。発表者の所属する研究室では、マイクロアレイ解析を用いてこれらの分子機構の全体像を明らかにしようとしている。本研究では、マイクロアレイ解析後の遺伝子機能解析に用いることを目的として、幼虫組織内に多数形成される原頭節に対するSoaking法とElectroporation法を用いたRNA干渉(RNAi)法を検討した。

まず、原頭節の生存率を指標とし80%以上の高い生存率を示す条件としてSoaking法では培地100 μ lに対して導入剤10 μ lを添加する条件を、Electroporation法では減衰波における電圧とコンデンサ容量の組み合わせが100V-800 μ Fおよび200V-100 μ Fの条件を選択した。次に、この3条件について、蛍光標識したsiRNAを用いた導入効率の確認を行った。SoakingではsiRNAの導入が確認できなかったが、Electroporationでは100V-800 μ F、200V-100 μ Fの両条件においてsiRNAの導入が確認された。Electroporationの二つの条件では同程度の結果が得られたことから、以降は100V-800 μ Fの条件にしぼってRNAiの効果を評価することとした。選出された100V-800 μ Fの条件について、多包虫の14-3-3とII/3の遺伝子を標的としたsiRNAを導入し、RNAiの効果を検討した。real-time RT PCRによる解析では、siRNAを導入した原頭節において有意に標的mRNAが減少していた。また、western blot法により、処理後10日後、15日後に、標的タンパク質の減少が確認された。処理後3日後から15日後の生存率の比較では、siRNAを導入した原頭節において、コントロールの原頭節には見られなかった生存率の低下が観察された。以上より、mRNA、タンパク質、生存率の3つの段階においてRNAiの効果が確認されたことから、100V-800 μ Fの減衰波を用いたElectroporation法は多包虫の原頭節においてRNAiによる遺伝子発現抑制を誘導可能であると結論づけた。今回は15日目までの抑制を確認したが、遺伝子機能解析には発現抑制後の長期観察が必要な可能性もあり、今後さらに長期間の発現抑制法についても検討が必要であると考えている。

*Theileria parva*シゾン由来蛋白質TpSCOPによるリンパ球アポトーシス抑制およびNFκB経路活性化

林田京子（人獣共通感染症リサーチセンター 国際協力・教育部門）

＜背景＞ *Theileria parva*はマダニ媒介性原虫であり、牛に東海岸熱と呼ばれる致死性の高い疾患を引き起こす。本原虫のシゾン期虫体はリンパ球内に寄生することにより宿主細胞を不死化・無限増殖を引き起こす。この不死化機序の解明および原因分子の同定により未だ有効な手段が見いだされていないタイレリア症の予防・治療薬の開発が期待される。

我々は比較ゲノム解析を行う過程において良性タイレリアである *T. orientalis*のBand3結合性蛋白、ToMRP (Kim J.Y. *et al.*, 2004) のオーソログとして *T. parva* schizont-derived cytoskeleton binding protein (TpSCOP) を同定し、その機能解析を進めた。

＜結果＞ TpSCOPに対して作製した抗血清を用いた免疫染色により、TpSCOPは *T. parva*のシゾント期において虫体表面に発現している事が示された。さらに免疫沈降法およびin vitroにおける結合試験によりTpSCOPはアクチン分子との結合能を有することが示された。さらに、TpSCOPを強制発現させたマウスT細胞株 (3A9/TpSCOP) ではFas刺激およびT細胞受容体刺激誘導性アポトーシス(AICD)に対して抵抗性を示すことが示された。また、3A9/TpSCOPではMAPK群のリン酸化の亢進(ERKおよびJNK)とNFκBの上流分子であるIκBのリン酸化の亢進、NFκBにより制御される抗アポトーシス分子のひとつであるA1/Bfl-1の転写・発現を確認した。さらにTpSCOP分子を *T. parva*感染細胞に一過性発現させたところ、感染細胞内におけるNFκB活性の上昇が認められた。

＜考察＞タイレリア感染細胞においてシゾン膜表面に発現しているTpSCOP分子が、*Theileria*感染細胞内のNFκB経路の活性化およびアポトーシス抑制過程に密接に関与している可能性が示唆された。

マウスOas1b のフラビウイルス抵抗性機構の解析

森藤可南子(獣医学研究科 動物疾病制御学講座 実験動物学教室)

2'-5'-oligoadenylate synthetase(Oas)は、ウイルス感染初期の自然免疫機構においてウイルスの増殖を押さえるのに重要な役割を示すことが知られている。ウイルス感染細胞においてOas蛋白は、2'-5' oligoadenylate(2'-5' A)を合成し、RNaseL を活性化させ、活性型RNaseL は、ウイルスRNA を分解し宿主細胞の抗ウイルス状態を引き起こす。

マウスOas1b は、フラビウイルス感染抵抗性遺伝子として知られている。Oas1b は一般的な実験用近交系マウスにおいては、正常な蛋白が合成されずこれらのマウスはフラビウイルスに対して感受性を示すことが知られているが、多くの野生由来近交系マウスにおいても、系統間にOas1bのアミノ酸配列には多型が多く存在し、フラビウイルスに対する感受性に差があることが報告されている。

本研究室で作製したMSM/Ms(MSM)由来のOas 遺伝子座を導入したコンジェニックマウスはウエストナイル熱ウイルス(WNV)感染に対して抵抗性を示した。その一方で、インフルエンザウイルス感染、センダイウイルス感染に対してはコントロール群と差が見られなかったことから、Oas1bはウイルス全般に効果があるのではなくフラビウイルスに対して特異的に作用していること、及びMSM由来のOas1bにおいても、フラビウイルス増殖抑制効果があることが示唆された。Oas1bには、2'-5' A合成酵素としての機能がないこと、RNaseLを欠質させてもウイルスの増殖にあまり影響がないことからOas1bには他のOasにはない特別な機構がある可能性が示唆されているが、Oas1bがどのようにしてフラビウイルスの増殖を抑制しているのかはほとんど知られていない。

そこで、Oas1bが宿主細胞内で、ウイルス増殖のどのステップを阻害しているかを検討することを目的とし、MSM由来Oas1b遺伝子を導入したベクターを作製し培養細胞発現系を構築し、WNVゲノムの複製を再現するレプリコンを用いて、Oas1bの効果を検討したところ、MSM由来Oas1bには、レプリコンの複製を抑制する効果があることが確認された。このことから、Oas1bはフラビウイルス増殖過程のウイルスゲノムの複製のステップに対し効果を及ぼすものであることが示唆された。

今後、Oasファミリーに属するOas1b以外のOas蛋白との効果の比較検討とともに、Oas1bのWNV複製時の細胞内局在の確認や、Oas1bの直接的相互作用や、その他の宿主由来タンパク質との間接的相互作用の有無を検討する予定である。このことにより、マウスにおけるフラビウイルス宿主抵抗性の機序、フラビウイルスの増殖機序の解明につながることを期待される。

膜内在性タンパク質の細胞内小胞輸送のタグとなるモチーフの1例

大津 航(獣医学研究科 診断治療学講座 臨床分子生物学教室)

膜内在性タンパク質は小胞体膜へ挿入された後、小胞体脱出領域(endoplasmic reticulum exit sites: ERES)と呼ばれる小胞体の限定された領域からCOPII輸送小胞によって輸出されると考えられている。生成したCOPII輸送小胞は、VTC/ERGICを経てゴルジ装置へ輸送される。水疱性口炎ウイルス(VSV)温度感受性変異株の膜内在性タンパク質VSV-Gは、こうした膜タンパク質の細胞内小胞輸送のモデルとして利用されてきた。VSV-GのC末端細胞質内領域にはdi-acidic モチーフ(DXE, Xは任意のアミノ酸)とYXXΦモチーフ(Φは疎水性アミノ酸)が存在し、それらのアミノ酸配列が小胞体からの脱出に関与している。即ち、VSV-Gのようなウイルス由来のタンパク質を含め、小胞体ーゴルジ間輸送には、COPII構成タンパク質と脱出モチーフとの相互作用が重要であり、この過程にはウイルス分子の構造と細胞病態、疾患病態との関連が示唆される。しかし、この選別の分子メカニズムについては不明なことが多い。発表者らはBDVの膜内在性タンパク質BDV-Gを含むいくつかのエンベロープウイルスの膜内在性タンパク質の細胞内輸送を解析することを目指しており、その前段階として、VSV-GにGFPタグを付加した蛋白質を作製し、その細胞内局在を観察した。また選別機構について明らかにするために、COPII構成タンパク質であるSar1、Sec13、Sec23、Sec24、およびSec31のmycタグ付加コンストラクトを作製し、その発現を確かめた。今後はこれらの蛋白質とBDV-Gとの相互作用について解析を進めるとともに、VSV-GとのBDV-Gとの細胞内動態の比較をし、BDV-Gがどのような分子機構にて細胞内輸送されているのかについて明らかにする予定である。また、細胞内輸送研究の一例として、発表者らが見出したアニオン交換輸送体AE1のモチーフに関する研究を紹介する。

JCウイルス複製に関わる宿主細胞機構

大場靖子(人獣共通感染症リサーチセンター 分子病態・診断部門)

JCウイルス(JCV)は、ポリオーマウイルス属に属する二本鎖DNAウイルスである。多くのヒトは幼少期に初感染し、正常成人の70~80%がJCVに対する抗体を保有しているが、免疫不全状態において稀に進行性多巣性白質脳症(progressive multifocal leukoencephalopathy: PML)という致死性疾患の原因ウイルスとなる。近年ではAIDS患者の増加に伴いPML患者も増加しているが、未だ有効な治療法は確立していない。

JCVの早期タンパク質Large T Antigen (TAg) は、Helicase活性を有し、宿主細胞内の複製因子を利用し核内でウイルスDNAの複製を行う。これまでにTAgはpRbやp53と結合し細胞周期をS期に進行させることが知られているが、JCV感染細胞におけるウイルスDNA複製と細胞周期の関連性については詳細な検討がなされていない。本研究では、JCV感染細胞においてTAgが発現している細胞はG2期に集積することを明らかにし、その機序について詳細に検討を行った。G2 checkpointを誘導するシグナル経路に関わる分子について、JCV感染細胞と非感染細胞を比較した結果、JCV感染細胞ではATMおよびATRを介した経路でG2 checkpointが活性化されていることが明らかとなった。またTAgを単独で発現させた細胞を用いて同様の解析を行った結果、TAg発現細胞ではJCV感染細胞と同様にG2 checkpointの活性化が認められた。さらにTAgの変異体を作成しG2 checkpoint誘導に及ぼす影響について検討を行った結果、TAgの宿主細胞DNAとの結合性がcheckpoint誘導に関与している可能性が示唆された。こうしたTAgによるG2 checkpointの誘導、G2期への集積がウイルス増殖にどのような影響を与えているかを確認するために、G2期停止をカフェインなどのG2 checkpoint阻害剤により解除した結果、ウイルスDNA複製、ウイルス増殖が顕著に低下することが判明した。また、PML症例の脳組織を用いた免疫染色の結果、JCV感染オリゴデンドロサイトにおいてもG2期停止が誘導されている所見が得られた。

これらの結果から、JCV感染細胞では、TAgが宿主細胞のG2 checkpoint機構を誘導することで細胞周期がG2期に停止しウイルス複製の場となっていることが明らかとなった。同時に、カフェイン等のATM/ATR阻害剤がJCVの感染抑制薬として有用である可能性が示唆された。

JCウイルスの粒子形成機構の解析

小林進太郎（人獣共通感染症リサーチセンター 分子病態・診断部門）

【目的】

ポリオーマウイルス属に属するJCウイルス(JCV)は、ヒトの脱髄疾患である進行性多巣性白質脳症の原因ウイルスである。JCVのカプシドは、外郭タンパク質VP1を主体とした構造タンパク質からなり、VP1のペンタマーが72個集合して正二十面体構造をとる。JCVと同属のSV40では、新しく合成されたVP1は細胞質内でジスルフィド結合によってフォールディングし、その後ジスルフィド結合の解離・再形成によってペンタマーを形成し、ペンタマー形成後に核内に輸送されてウイルス粒子を形成することが報告されている。JCVとSV40のVP1相同性は高く、システイン残基の位置も類似していることから、JCVにおいてもSV40と同様にシステイン残基が粒子形成に重要な機能を有することが予想される。

本研究では、VP1のシステイン変異体を作成して、JCVの粒子形成におけるシステイン残基の機能を検討した。

【材料と方法】

JCV-VP1のそれぞれのシステインをアラニンに置換した変異体(C42A,C80A,C97A,C200A,C247A,C260A)、および6カ所全てのシステイン変異(6X)を導入した変異体ウイルスDNAを作成し、ヒトグリア由来細胞株に形質導入して、VP1の発現を免疫染色で解析した。さらにVP1を発現するプラスミドを作成し、再構成タンパク質合成系を用いて変異体VP1を作成し、SDSで変性した検体をショ糖密度勾配遠心法により分画してペンタマーの形成能を野生型と変異型で比較した。またVP1のオリゴマー形成について解析するために非還元条件でのSDS-PAGEに続いてイムノブロットを行った。

【結果】

各変異体ウイルスの中でC80A,6Xは野生型と異なり、VP1の局在が核ではなく細胞質に認められた。SV40においてペンタマーを形成できないVP1は細胞質に局在することから、Cys80はモノマーからペンタマー形成までの過程に重要であることが予測された。再構成タンパク質合成系で作成したVP1についてペンタマー形成能を比較するとC80Aと6Xではペンタマー形成能は有意に低く、細胞質での局在に矛盾しなかった。さらにこれらの変異体ではダイマー形成が認められなかった。

【考察】

本研究によってCys80はJCVの粒子形成において重要な役割を担うことが明らかとなった。ホモロジーモデリング法によるJCV-VP1の構造予測結果によると、Cys80はモノマーの中心に位置し、隣接するVP1のCys80とは比較的、距離が離れていることから、Cys80によって形成されるジスルフィド結合はモノマー内で形成され、そのフォールディングに関与することが示唆された。またモノマーのフォールディングが次のステップであるダイマー形成に重要であると考えられた。現在、Cys80とジスルフィド結合を形成するシステイン残基について検索している。

フィロウイルスの表面糖蛋白質 (GP) 開裂の 生物学的意義

梶原将大 (人獣共通感染症リサーチセンター 国際疫学部門)

マールブルグウイルス (MARV) およびエボラウイルス (EBOV) は共にフィロウイルス科に属し、ヒトを含む霊長類に非常に重篤な出血熱を引き起こす。そのウイルス粒子は特徴的なひも状の構造をしており、表面には糖蛋白質 (GP) が存在する。GPはフィロウイルスがもつ唯一の表面糖蛋白質であり、宿主細胞への侵入に深く関与している。そのため、GPはウイルスの増殖性、宿主および組織指向性、また病原性へも関与するものと考えられている。多くのウイルスにとって、宿主由来のプロテアーゼによる表面糖蛋白質の開裂が細胞侵入に不可欠であることが知られている。フィロウイルスのGPも、宿主の全身組織に存在するプロテアーゼであるfurinにより、GP1およびGP2の2つのサブユニットに開裂される。しかしこれまでの研究から、furinによるGP開裂はウイルスの感染性、増殖性および病原性に関与していないことが示されている。一方で、これまでに知られている全てのフィロウイルスのGPには、furinが認識するアミノ酸配列が高度に保存されている。この事実は、フィロウイルスGPのfurinによる開裂には未だ明らかにされていない何らかの生物学的意義が存在することを示唆している。本研究は、GP開裂の生物学的意義の解明を目的とした。

そこで、2株のMARV (AngolaおよびMusoke) および5種のEBOV (*Zaire*, *Sudan*, *Cote d'Ivoire*, *Reston*および*Bundibugyo ebolavirus*) のGPにおけるfurin認識配列にアミノ酸置換を導入した非開裂性GP [GP.CI(-)] を有する水胞性口炎ウイルス (VSV) のシュードタイプウイルスを作出し、それぞれの野生型GPを有するウイルスの感染性と比較解析した。まず、GPの開裂がある特定の動物種への感染時にのみ必須である可能性について検討するため、フィロウイルスに対して感受性と考えられるコウモリ、サル、げっ歯類およびブタ由来の細胞における、シュードタイプVSVの感染性を解析した。解析の結果、いずれの細胞においてもGP.CI(-)をもつウイルスは野生型GPをもつウイルスと同程度の感染価を示したことから、GP開裂はこれまでに用いた細胞への感染には必須ではないことがわかった。また、フィロウイルスにおいては、その特異的な受容体への結合による感染の他に、糖鎖への結合能を有する蛋白質であるC型レクチンを補助分子とした感染増強が知られている。この感染増強現象へのGP開裂の関与について検討するため、C型レクチンを発現したK562細胞への各シュードタイプVSVの感染性を解析した。解析の結果、GP.CI(-)をもつシュードタイプVSVが感染増強を示したことから、C型レクチン介在性の感染増強にGP開裂は必須ではないと思われる。ただし、一部のウイルスにおいて野生型およびGP.CI(-)をもつVSV間で感染増強の程度に差が認められたため、GPの開裂が増強効率に関与している可能性が示唆された。

今後はこれまでの実験で用いたものとは異なる様々な動物および組織由来の細胞における感染性を解析するとともに、エンドサイトーシスやエンドソーム内のpH低下を抑制する薬品などによる処理を施したVero細胞における感染価を測定する予定である。

Epidemiological Study of Tuberculosis in Lechwe (Kobus lechwe) in Zambia and Anthroponosis between Human and Chimpanzee in Tanzania

郡山尚紀（獣医学研究科 環境獣医科学講座 生態学教室）

ザンビアの首都ルサカに近いLochinvar国立公園には、レイヨウ類のリーチュエ(*Kobus lechwe*)が多く生息している。ここは完全な保護地域とゲームリザーブに分けられ、ゲームリザーブでは、ウシの放牧も行われている。この地域のリーチュエはウシ型結核菌に汚染されている事が古くから報告されており、さらに近年同所に放牧されたウシからもツ反陽性牛が多数報告されている。そのため、リーチュエとウシで結核菌が保存されていると考えられる。ウシ型結核はヒトにも感染し、感染牛を飼育するヒトのみならず肉や乳製品を摂取する事によっても感染が起こるため、ウシの結核のコントロールは重要な課題である。ところで、リーチュエには3亜種が存在し、それぞれLochinvarではKafue Lechwe、アンゴラとの西の国境にあるLiuwa flood plainではRed lechwe、北のBangweulu plainにはBlack lechweが生息しており、Kafue Lechwe以外での結核の感染状況は調べられていない。われわれは野生リーチュエの結核感染状況を把握するとともにそれらから分離された結核菌の遺伝的関連性について比較を行うことを目的とする。本年度、LochinvarでKafue lechweからの採材を行ったところ、オス20頭中3頭からウシ型結核菌が得られた。現在ザンビア大学において菌の培養中であり、今後遺伝学的系統解析を行っていく。

チンパンジーとヒトとは遺伝学的に近縁であるためその免疫学的性質も他の動物に比べて近く、お互いの感染症に対しても感受性が高いと考えられている。野生チンパンジーとヒトとが接する際に感染症の伝播が起こる確率が高いが、1つにはHIV-1のようにブッシュミートなどを介してチンパンジーの感染症がヒトへ感染した例(Zooanthroponosis)があり、つぎにエコツーリズムや研究のため保護区内に入るヒトが持ち込んだ病気に感染したチンパンジーが発症して死亡した例(Anthroponosis)が挙げられる。我々は、タンザニアマハレ山塊国立公園において、個体識別された約60頭のチンパンジーから主に糞サンプルを採材し、その糞中に含まれるヒト由来病原体の検出を試みている。これまで、細菌、寄生虫について解析した結果、ヒト由来と思われる悪性菌や寄生虫は認められなかった。また、比較検討のために国内チンパンジーについて、野生からは採材のできない血液採取を行い、血清学的検査を行った。その結果、63種類のヒト感染症について抗体陽性を示す事がわかり、これまで我々が調査した地域やそれ以外から報告されている病原体にくわえてまだまだヒト由来病原体が感染している可能性が示唆された。

北海道における野鳥由来感染症の分子疫学調査

伊勢崎政美（獣医学研究科 動物疾病制御学講座 感染症学教室）

野生水禽など野鳥は、種々の病原体、例えばインフルエンザウイルスやウエストナイルウイルスなどの感染源として、人獣共通感染症を含む多くの感染症において疫学上、重要な役割を果たしている。そこで、ガン・カモ類など種々の野鳥あるいは家禽における病原体の疫学調査を行い、種々の病原体の分布および検出された病原体の分子生物学的性状を明らかにすることを目的として研究を行う。

最初に鳥類からの採材が容易と思われる羽材料に着目し、採取した羽の羽軸根部からゲノム試料を抽出して病原体を特異的に検出する遺伝子診断法の確立を試みた。まず、ウエストナイルウイルス(WNV)および日本脳炎ウイルス(JEV)を実験感染した鶏から採材した羽軸よりRNAを抽出して、nested RT-PCR法によるウイルス検出法の樹立を行った。次にこの検出法の有用性について検討を行った。継時的に採取したウイルス感染鶏の羽軸根を用いて検討を行った結果、ウイルス血症がピークになる感染後2〜3日以降でも最低2週間以上にわたる長い期間でウイルス遺伝子を検出できることが確認された。また増幅領域をクローニングしたプラスミドを用いて検出感度の検討を行ったところ、1反応あたり10コピー以上での検出が可能であった。これらのことより今回樹立したウイルス検出法は野鳥での疫学調査に有用であることが示唆された。

21 現在、この検出法を用いて北海道各地で採取された野鳥等(カラス、オオハクチョウ、鶏など)の羽材料および臓器を用いて解析を行っているが、ウイルス遺伝子の検出には至っていない。今後はさらに多くの材料を収集して調査を進めるとともに、より簡便な診断法としてLAMP法への応用、羽材料を用いた血清学的検査法の構築、ボルナウイルスおよびサルモネラ等他の病原体の検出系の構築を行っていく予定である。

また上記の研究の他に養鶏において有害外部寄生虫であるワクモに対する防除法を開発するために、ワクモ由来発現遺伝子の網羅的解析を行っており、現在までに既知の遺伝子相同性があるものを含めて種々の発現遺伝子を同定した。これらについても薬剤耐性因子やワクモワクチン候補因子について解析を進めていく予定である。

Molecular characterization of Marek's disease virus isolated from domestic and wild birds

盧 虎琳 (獸医学研究科 動物疾病制御学講座 感染症学教室)

Marek's disease (MD), caused by Marek's disease virus (MDV), is an important neoplastic disease of poultry due to its economical threat. MD has been controlled since MDV was identified and live vaccines using apathogenic MDV were developed. However, the details of its pathogenic mechanism are still unknown. In addition, recent field isolates of MDV show tendency to increase their virulence, and MDV was also shown to be widely present in wild waterfowls. Thus, these wild birds could play a role as reservoir or carrier of MDV in transmission of MDV to domestic poultry, and outbreak in future may also occur in wild geese because of the increased virulence of MDV. For these reasons, continuing from last year, recent isolates of MDV from domestic chickens and wild birds were characterized based on their molecular properties, and compared with those previously characterized.

Feather samples were obtained from domestic chickens, and wild birds in several different areas of Japan though the number of samples was small. None of the samples from wild birds were positive for the MDV genome, while the MDV genome was detected in domestic chickens. Some point mutations were identified in the *meq* gene, a candidate oncogene of MDV, of these MDV genomes, but mutations previously found in very virulent plus strains of MDV were not detected in these genome. To further characterize the molecular properties of these MDV strains, other viral genes were also sequenced and their sequences were compared with those of reference virulent MDV strains. So far, no significant diversities/mutations were found in the *vIL-8* genes, encoding a viral chemokine important for the early pathogenesis of MDV, of these strains. On the other hand, of the genome of one MDV strain, some insertions/mutations were found in vTR, viral telomerase RNA involved in lymphoproliferative change of T cells. More detailed molecular analysis will be necessary to clarify the biological significance of these mutations on the MDV virulence. After that, recombinant MDV infectious clones will be constructed to study the molecular basis of the increase in MDV virulence.

ハンタウイルス実験感染ラットと自然感染ラットの病態比較

安田俊平（医学研究科 微生物学講座 病原微生物学分野）

Seoul virus (SEOV) はハンタウイルス属 (*genus Hantavirus*) に分類され、腎症候性出血熱の原因ウイルスである。持続感染ドブネズミ (*Rattus norvegicus*) を自然宿主とし水平感染によって感染は集団内に広まると考えられている。しかし、野生集団における感染実態にはいまだ不明な点が多い。そこで、本研究ではSEOV実験感染ラットと自然感染野生ラットについて抗体価およびウイルスゲノム量の定量を行い、両者の病態の比較検討を行った。

研究用ラット (WKAH系統の6週メス) にSEOV、SR-11株 (6.0×10^4 FFU/rat) を腹腔内接種し、血清および肺の採材を3~4日おきに行った。野生ラットは、ベトナム、ホーチミン市で2007年に捕獲し、血清と肺を採材した。また、ハイフォン港においても2009年に同様の調査を行い、血清、肺および眼球を採材した。IgMとIgG抗体価はELISAで測定した。肺組織および血清中のウイルスゲノム量は、リアルタイムPCR法を用いて絶対定量した。ハイフォン港で捕獲されたラットについては、水晶体の乾燥重量を測定して月齢を推定した。

23
実験感染ラットでは、IgM抗体価はウイルス接種後6日目に急増し、13日目以降に減少するのに対して、IgG抗体価は9日目ごろから増加を始め、23日目以降にプラトーに達した。肺組織中で最もウイルスゲノム量が多かったのは6日目で、その後急減したが接種後一月経っても肺組織中から完全に消失することはなかった。一方、血清中からウイルスゲノムが検出されたのは3日目と6日目のみであった。野生ラット54個体からは、24個体の抗体陽性が確認され、そのうち14個体がIgGのみ陽性、10個体がIgMおよびIgG陽性であった。肺組織中のウイルスゲノム量は、実験感染ラットの100~1000倍に達しており、また、IgM陽性個体はIgM陰性個体よりウイルスゲノム量が多い傾向があった。血清中からウイルスゲノムが検出されたのは、肺組織中のウイルスゲノム量が 10^7 コピー/mgを超える2個体のみであり、IgM陰性個体と陽性個体が1個体ずつであった。IgG抗体陽性でウイルスゲノムが検出されなかった個体のうち、月齢が1ヶ月未満の個体の抗体は移行抗体であると推測された。月齢が24ヶ月を超えた個体は、既に感染状態から回復した個体であると推測された。

実験感染および自然感染個体の調査結果から、ウイルスゲノム量はIgM抗体の有無と相関があると推測された。また、実験感染では一過性の感染が引き起こされている可能性が高いが、野生ラットにおいてはウイルス量が多い状態で長期間の持続感染が成立していると考えられた。

ウエストナイルウイルスの自然感染環と鳥類における抗体調査に関する研究

村田 亮（獣医学研究科 環境獣医科学講座 公衆衛生学教室）

1999年、ニューヨーク(NY)市で北米では初めてウエストナイル熱が確認され、その後わずか数年でアメリカ合衆国全域に流行が拡大した。原因のウエストナイルウイルス(WNV)は'90年代前半までは病原性の低いウイルスと考えられてきた。しかし、近年北米で流行している株は、終末宿主であるヒトやウマだけでなく、自然宿主である鳥類に対しても強い病原性を示す。多くの病原性の弱い株はエンベロープ(E)蛋白質上にN型糖鎖付加部位を欠損しており、近年の病原性の強い株は糖鎖付加部位を持つことから、WNVの強毒化には糖鎖付加部位の遺伝的変異が関わっている可能性がある。現在WNVの分布域は北米大陸だけでなく、南米大陸およびロシアにおいても拡大しており、物流や渡り鳥を介したWNVの日本への侵入が危惧されている。日本国内での感染例はまだ報告されていないが、日本にはWNVを媒介可能な蚊と増幅動物となる鳥類が多く生息し、またWNVに近縁で血清学的に交差反応を示す日本脳炎ウイルス(JEV)が存在する。そこでWNVが侵入した際にヒトや鳥類においてウイルス感染を迅速に鑑別できる診断系の確立が緊急の課題となっている。これらの背景から以下の研究を行った。

1. ウエストナイルウイルスのE蛋白質上糖鎖付加がウイルス増殖に与える影響

WNV NY株からE蛋白質上にN型糖鎖付加部位を持つLP株と糖鎖付加部位を持たないSP株を単離し、各ウイルスの増殖性を調べた。哺乳類および鳥類由来細胞において、高温条件下でLP株はSP株より高い増殖性を示した。また、鶏雛においてLP株はSP株に比べてウイルス血症のレベルや致死率が高く、重度の壊死性心筋炎を示し、より高い病原性を有していた。これらの結果から、WNVのE蛋白質上糖鎖付加は鳥類宿主内でウイルス血症を増強し、自然界の感染環におけるウイルスの効率的な伝播に寄与している可能性が示唆された。

2. ウエストナイル熱の血清診断法の評価と極東ロシアにおける疫学調査

迅速なWNV鑑別診断法として、フォーカス減少法を基盤とした中和試験を構築した。この試験法をWNVまたはJEVを実験感染させた鶏雛の血清抗体測定に用いたところ、両者を特異的に鑑別することが可能であった。また、この試験法を用いて極東ロシアにおいて採取した野鳥血清中の抗体測定を行ったところ、145検体中21検体(14.5%)でWNVに対する中和抗体が検出され、極東ロシアの野鳥間にWNVが浸淫していることが示唆された。

スリランカ・中央州における狂犬病対策

神田浩路（医学研究科 予防医学講座 国際保健医学分野）

南アジアの島国・スリランカでは、社会的・文化的背景から増えすぎた野犬の駆除に苦慮しており、年間50～100名の狂犬病による死者を出している。また、度重なる内戦や狂犬病以外の感染症の局地的流行、慢性疾患の台頭などにより政府の狂犬病対策の優先順位が必ずしも高いとは言えず、一方でワクチン等に対する政府の支出も膨大になっており、早急な対策が望まれている。そこで、私たちはフィールド調査や介入実験を実施して一般住民の予防啓発を実施した。

フィールド調査では、前身のCOEプログラムにおいて中央州のペラデニヤ大学獣医学部に狂犬病対策室が設置されたことから、中央州をモデル地域として、狂犬病の知識や飼い犬・野犬に対する態度および行動に関する調査を一般住民を対象に実施した。調査では都市部の農村部での一般住民の行動の違いや、犬を飼っている人とそうでない人における知識や態度の違いを明らかにするとともに、飼い犬の飼育状況や予防接種の有無、また犬に噛まれた経験やその後の予防行動なども把握し、予防対策を効果的に講じるための情報をそろえた。

一方、介入実験では、農村部の一般住民に対する啓発リーフレットの頒布による狂犬病に対する知識向上を目的とする実験と、小学生を対象とした“Edutainment”を実施した。一般住民対象の介入では、廉価で製作した啓発リーフレットの各家庭に配布し、介入前後による一般住民の狂犬病に対する意識や予防知識の違いを評価し、地域社会主導で実施可能な啓発対策を提言した。また、小学生対象の“Edutainment”では、教員を対象に狂犬病に関する教育を実施して教員自身が授業を利用して生徒へ教育をするモデルを提案し、一方で狂犬病や犬に関するポスター・フォトコンテストを実施して小学生の正しい知識や関心を深めるプログラムを導入、その効果を測定した。



〒060-0818 札幌市北区北18条西9丁目
北海道大学大学院獣医学研究科 213号室 グローバルCOE推進室
Tel/fax 011-706-5294, gcoe@vetmed.hokudai.ac.jp
<http://www.vetmed.hokudai.ac.jp/gcoe/>