

氏名(本(国)籍)	福士法子(青森県)		
主指導教員氏名	岐阜大学 教授 福士秀人		
学位の種類	博士(獣医学)		
学位記番号	獣医博甲第606号		
学位授与年月日	令和5年3月13日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
研究科及び専攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻		
研究指導を受けた大学	岐阜大学		
学位論文題目	Studies on the Tegument Protein UL11 of Equine Herpesvirus Type 1 (ウマヘルペスウイルス1型テグメントタンパク質UL11に関する研究)		
審査委員	主査	岐阜大学 准教授	高島康弘
	副査	帯広畜産大学 教授	小川晴子
	副査	岩手大学 教授	村上賢二
	副査	東京農工大学 教授	竹原一明
	副査	岐阜大学 教授	福士秀人

学位論文の内容の要旨

ウマヘルペスウイルス1型(EHV-1)は自然宿主であるウマに呼吸器疾患、流産および神経疾患を引き起こすとともに、ホッキョクグマや齧歯類などの非自然宿主に感染した場合には致死性脳炎を引き起こす。EHV-1感染症に対する現行のワクチンは非自然宿主における致死性脳炎は対象外であり、新規予防法の確立が求められている。本研究では、ウイルス増殖に必須であるEHV-1 UL11のさらなる機能解明を試み、その成果をワクチン開発につなげることを目的とした。

第1章ではEHV-1 UL11の機能解明のため、UL11ホモログの特徴であるアシル化に着目した。アミノ酸配列からEHV-1 UL11はN末端のグリシン(Gly)がミリストイル(Myristoylation)化、7番目ないし9番目のシステイン(Cys)がパルミトイル(Palmitoylation)化されると推定された。そこで、EHV-1 UL11の推定アシル化アミノ酸コドンアラニン(Ala)コドンに置換した7種類のORF51-EGFPプラスミドおよびウイルス(変異体名; UL11 G2A, UL11 C7A, UL11 C9A, UL11 G2AC7A, UL11 C7AC9A, UL11 G2AC9A, UL11 G2AC7AC9A)を作出した。クリックケミストリーによるアシル化検出により、UL11変異群はMyr(+)/Palm(+){UL11 C7A, UL11 C9A}, Myr(+)/Palm(-){UL11 C7AC9A}, およびMyr(-)/Palm(-){UL11 G2A, UL11 G2AC7A, UL11 G2AC9A, UL11 G2AC7AC9A}に大別された。各ORF51-EGFPプラスミドをウマ腎臓由来株化細胞(FHK Tc13.1細胞)に導入したところ、UL11(野生型)及びMyr(+)/Palm(+群はゴルジ装置に、Myr(+)/Palm(-)群は核膜周囲に局在した。Myr(-)/Palm(-)群は局在しなかった。また、Myr(-)/Palm(-)群ウイルスはFHK Tc13.1細胞において増殖が抑制されていた。以上の結果から、EHV-1のアシル化はUL11のゴルジ装置への局在およびウイルス増殖に必要で

あり、特に N 末端の Gly はアシル化に重要なアミノ酸であることもわかった。

第 2 章では、UL11 アシル化不全増殖制限型ウイルスである UL12 trunc UL11 G2AC7AC9A のワクチンとしての有用性をマウスモデルを用いて評価した。毒力試験により、UL12 trunc UL11 G2AC7AC9A はマウスに病原性を示さないこと及び EHV-1 に対する抗体誘導が確認された。中和抗体は検出されなかった。続いて、感染予防能付与試験を行った。免疫には EHV-1 UL12 trunc UL11 G2AC7AC9A を 10^5 pfu/head、攻撃には神経病原性 EHV-1 94-137 株を 10^4 pfu/head 接種した。非免疫群は 5 頭中 5 頭の全頭発症、3 頭が死亡したのに対し、免疫群は 5 頭中全頭発症せず、全頭生残した。増殖制限型ウイルスであるアシル化不全 EHV-1 UL12 trunc UL11 G2AC7AC9A はワクチンとして有用であることが示された。

本研究により、EHV-1 UL11 は N 末端 Gly のアシル化によりゴルジ装置に局在することで、EHV-1 の感染性粒子成熟に関与していると推測され、このアシル化はウイルス増殖に必須であると考えられた。アシル化不全 EHV-1 UL12 trunc UL11 G2AC7AC9A が増殖制限型ウイルスであることを見出し、マウスへの接種で免疫能を付与し、神経病原性 EHV-1 感染からマウスを守ることが明らかにされた。ウイルスタンパク質の機能不全を利用した、これまでにないワクチン作製方法を提案できた。これらの知見は、非自然宿主における EHV-1 感染症制御に必要なワクチンデザインに貢献すると考えられた。

審 査 結 果 の 要 旨

ウマヘルペスウイルス 1 型 (EHV-1) はウマに呼吸器疾患、流産および神経疾患を引き起こすとともに、ホッキョクグマや齧歯類などの非自然宿主に感染した場合には致死性脳炎を引き起こす。本研究では、ウイルス増殖に必須である EHV-1 UL11 のさらなる機能解明を試み、その成果をワクチン開発につなげることを目的とした。

初めに、UL11 ホモログの特徴であるアシル化に着目し、EHV-1 UL11 の推定アシル化アミノ酸コドンアラニン (Ala) コドンに置換した 7 種類のプラスミドおよびウイルスを作出し、アミノ酸置換による UL11 の細胞内局在およびウイルス増殖に及ぼす影響を調べた。クリックケミストリーによるアシル化検出により野生型 UL11 はミリストレル (Myr) 化およびパルミトイル (Palm) 化 [Myr(+)/Palm(+)] されていることを明らかにした。N 末端 Gly が Ala に置換された変異群は 7 番目および 9 番目が Cys, Ala に関わらず、アシル化されなかった。UL11 発現プラスミドをウマ腎臓由来株化細胞 (FHK Tc13.1 細胞) に導入した結果、UL11 (野生型) はゴルジ装置に局在し、Myr(+)/Palm(+) 群はゴルジ装置に、Myr(+)/Palm(-) 群は核膜周囲に局在した。Myr(-)/Palm(-) 群は局在しなかった。また、Myr(-)/Palm(-) 群ウイルスは FHK Tc13.1 細胞において増殖しなかった。以上の結果から、EHV-1 のアシル化は UL11 のゴルジ装置への局在およびウイルス増殖に必要であり、特に N 末端の Gly はアシル化に重要なアミノ酸であった。

Myr(-)/Palm(-) 変異群および Myr(+)/Palm(-) 変異体は UL11 アシル化不全ウイルスであり、UL11 (野生型) 補完細胞でのみ増殖する増殖制限型ウイルスであることから、UL11 アシル化不全増殖制限型ウイルスである UL12 trunc UL11 G2AC7AC9A のワクチンとしての有用性をマウスモデルを用いて評価した。初めに毒力試験を行い、UL12 trunc UL11 G2AC7AC9A はマウスに対し病原性を示さず、免疫原性があることがわかった。続いて、感染予防能付与試験を行った。免疫には EHV-1 UL12 trunc UL11 G2AC7AC9A を、攻撃には神経病原性 EHV-1 94-137 株を接種した。非免疫群は 5 頭中 5 頭の全頭発症、3 頭が死亡したのに対し、免疫群は 5 頭中全頭発症せず、全頭生残した。増殖制限型ウイルスであるアシル化不全 EHV-1 UL12 trunc UL11 G2AC7AC9A はワクチンとして有用であることが示された。

本研究により、EHV-1 UL11 は N 末端 Gly のアシル化によりゴルジ装置に局在すること

で、EHV-1 の感染性粒子成熟に関与していると推測され、このアシル化はウイルス増殖に必須であると考えられた。アシル化不全 EHV-1 UL12 trunc UL11 G2AC7AC9A が増殖制限型ウイルスであることを見出し、マウスへの接種で免疫能を付与し、神経病原性 EHV-1 感染からマウスを守ることが明らかにされた。ウイルスタンパク質の機能不全を利用した、これまでにないワクチン作製方法が提案された。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値があると認めた。

基礎となる学術論文

- 1) 題 目 : The N-terminal glycine of EHV-1 UL11 is essential for the localization of UL11 and EHV-1 replication in cultured cells
著 者 名 : Fukushi, N., Badr, Y. and Fukushi, H.
学術雑誌名 : Journal of General Virology
巻・号・頁・発行年 : In Press

- 2) 題 目 : Prevention of fatal equine herpesvirus type 1 encephalitis in mice by immunization with a limited-replication cycle virus
著 者 名 : Fukushi, N. and Fukushi, H.
学術雑誌名 : Veterinary Microbiology
巻・号・頁・発行年 : In Press