

氏 名 (本 籍)	菅 原 靖 広 (鳥 取 県)
学 位 の 種 類	博士 (獣医学)
学 位 記 番 号	獣医博甲第 4 9 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 9 年 9 月 2 6 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	東京農工大学
学 位 論 文 題 目	ウマヘルペスウイルス 1 の非自然宿主由来細胞継代 によるウイルス吸着タンパク gC の変異
審 査 委 員	主査 東京農工大学 教 授 本 多 英 一 副査 帯広畜産大学 教 授 品 川 森 一 副査 岩 手 大 学 教 授 品 川 邦 汎 副査 岐 阜 大 学 教 授 平 井 克 哉 副査 東京農工大学 助教授 金 子 賢 一

### 論 文 の 内 容 の 要 旨

馬ヘルペスウイルス 1 (Equine herpesvirus 1: EHV-1) は妊娠馬の子ウマの鼻肺炎、また、ときには神経疾患を起こし、本ウイルスによる死流産および競走馬の発熱は経済的に重要な問題となっている。いくつかのヘルペスウイルスでは、その gC 相同タンパクが宿主細胞表面のヘパリン様物質に結合し、主要ウイルス吸着タンパクとして機能することが明らかにされている。ハムスター順化 EHV-1 株の gC のアミノ酸配列は野外株のそれとは異なることが報告された。その 1 つは最も親水性の高い領域に存在することから、gC の生物活性に何らかの影響を及ぼすことが示唆された。また、ハムスターおよびウマ以外の動物由来細胞で継代された EHV-1 株に遺伝子の欠失および変異を生じることが知られている。本研究ではウマ以外の動物由来細胞で EHV-1 を連続継代することがウイルスタンパクの活性に与える影響を明らかにするため、同一株に由来する 2 株を含む継代歴の異なる EHV-1 株を用いて糖タンパク遺伝子の解析ならびに生物性状の比較を行った。

本研究で用いたウイルスとしてはウマ由来細胞でのみ継代された EHV-1 新鮮分離株を 3 株、ハムスター順化 EHV-1 を 2 株、および同一の株をそれぞれウマ由来細胞でのみ継代した株およびウシ腎由来細胞に順化した株である。これらのウイルス株に感染した MDBK 細胞を可溶化してヘパリンビーズと反応させ、ウエスタンブロット法を用いて、EHV-1 のヘパリン結合タンパクを同定した。ヘパリン結合活性の特異

性を確認するため、予め可溶性ヘパリンと反応させた各株の感染細胞ライセートをヘパリン固相マイクロタイタープレートに添加して結合競合試験を実施した。ヘパリンが EHV-1 の感染に及ぼす影響を調べるため、各種濃度のヘパリンとウイルスを反応させてプラーク試験に供した。また、ウイルスを接種後、経時的に一定濃度のヘパリンを加え、各々の感染価を測定した。EHV-1gC 発現バキュロウイルスを構築し、その感染昆虫細胞をウシ腎由来およびウマ腎由来細胞単層培養上へ重層して、それらの細胞への吸着活性を調べた。特異性を確認するため、ヘパリンによる吸着阻止試験を実施した。継代歴の異なる 4 株の EHV-1 の gC 遺伝子の塩基配列を決定し、予測アミノ酸配列を既報の成績と比較し、以下の結果を得た。

調べた全ての EHV-1 株の gC および gB がヘパリンに結合することが判った。ヘパリン結合競合試験の結果、ウシ腎由来細胞で長期継代することによって EHV-1 gC のヘパリンに対する親和性が上昇することが示唆された。ハムスター順化株においても同様の現象が認められた。また、この 2 株および他のハムスター順化株はウマ由来細胞でのみ継代された株と比べヘパリンによって感染性を強く抑制された。ウイルスの細胞吸着後にヘパリンを加えた場合、感染阻害効果は認められなかったことから、ヘパリンはこれらの EHV-1 株の細胞表面への吸着を阻害すると考えられた。gC 発現昆虫細胞は EHV-1 宿主細胞表面に吸着した。また、ヘパリンによってその吸着が阻止された。したがって、少なくともハムスター順化 EHV-1 株の gC は宿主細胞表面のヘパリン様物質に結合することによって、ウイルス主要吸着タンパクとして機能することが示唆された。継代歴の異なる EHV-1 株の gC 遺伝子塩基配列を比較したところ、gC 遺伝子の塩基配列は継代歴にかかわらず非常によく保存されていた。一方、アミノ酸配列ではウマ由来細胞でのみ継代された株は完全に一致していたのに対し、ウシ腎細胞順化株では 2 箇所、ハムスター順化株では各々 3 箇所および 1 箇所に変異が認められた。これらの変異はハムスター順化株で認められた 3 箇所中の 1 箇所を除き、いずれも酸性あるいは中性アミノ酸から塩基性アミノ酸への置換であった。その結果、塩基性アミノ酸クラスター KRKKSR およびヘパリン結合タンパクの共通配列に類似の配列が新たに生じた。これらに配列はいずれも gC アミノ酸末端側に存在する親水性領域に集中していた。この領域は他のヘルペスウイルス gC 相同タンパクのヘパリン結合部位と重複していた。以上の成績から、EHV-1 をウマ以外の動物由来細胞で長期に継代することによって、主要ウイルス吸着タンパクである gC に変異が生じ、ヘパリンとの親和力が増大することが示唆された。また、EHV-1 gC のアミノ酸末端側親水性領域がヘパリン結合活性部位と考えられた。

以上のことは、一般にヘルペスウイルスが広く分布すること、また、ヘルペスウイルスの進化を考える上で興味深いことである。

## 審 査 結 果 の 要 旨

緒言 馬ヘルペスウイルス 1 (Equine herpesvirus 1: EHV-1) は妊娠馬の子ウマの鼻肺炎、また、ときには神経疾患を起こす。EHV-1 による死流産および競走馬の発熱

は経済的に重要な問題となっている。いくつかのヘルペスウイルスでは、その gC 相同タンパクが宿主細胞表面のヘパリン様物質に結合し、主要ウイルス吸着タンパクとして機能することが明らかにされている。ハムスター順化 EHV-1 株の gC のアミノ酸配列は野外株のそれとは異なることが報告された。その 1 つは最も親水性の高い領域に存在することから、gC の生物活性に何らかの影響を及ぼすことが示唆された。また、ハムスターおよびウマ以外の動物由来細胞で継代された EHV-1 株に遺伝子の欠失および変異を生じることが知られている。本研究ではウマ以外の動物由来細胞で EHV-1 を連続継代することがウイルスタンパクの活性に与える影響を明らかにするため、同一株に由来する 2 株を含む継代歴の異なる EHV-1 株を用いて糖タンパク遺伝子の解析ならびに生物性状の比較を行った。

**材料および方法** 供試ウイルスとしてウマ由来細胞でのみ継代された EHV-1 新鮮分離株を 3 株、ハムスター順化 EHV-1 を 2 株、および同一の株をそれぞれウマ由来細胞でのみ継代した株およびウシ腎由来細胞に順化した株を用いた。これらのウイルス株に感染した MDBK 細胞を可溶化してヘパリンビーズと反応させ、ウェスタンブロット法を用いて、EHV-1 のヘパリン結合タンパクを同定した。ヘパリン結合活性の特異性を確認するため、予め可溶性ヘパリンと反応させた各株の感染細胞ライセートをヘパリン固相マイクロタイタープレートに添加して結合競合試験を実施した。ヘパリンが EHV-1 の感染に及ぼす影響を調べるため、各種濃度のヘパリンとウイルスを反応させてプラーク試験に供した。また、ウイルスを接種後、経時的に一定濃度のヘパリンを加え、各々の感染価を測定した。EHV-1gC 発現バキュロウイルスを構築し、その感染昆虫細胞をウシ腎由来およびウマ腎由来細胞単層培養上へ重層して、それらの細胞への吸着活性を調べた。特異性を確認するため、ヘパリンによる吸着阻止試験を実施した。継代歴の異なる 4 株の EHV-1 の gC 遺伝子の塩基配列を決定し、予測アミノ酸配列を既報の成績と比較した。

**結果・考察** 調べた全ての EHV-1 株の gC および gB がヘパリンに結合することが判った。ヘパリン結合競合試験の結果、ウシ腎由来細胞で長期継代することによって EHV-1 gC のヘパリンに対する親和性が上昇することが示唆された。ハムスター順化株においても同様の現象が認められた。また、この 2 株および他のハムスター順化株はウマ由来細胞でのみ継代された株と比べヘパリンによって感染性を強く抑制された。ウイルスの細胞吸着後にヘパリンを加えた場合、感染阻害効果は認められなかったことから、ヘパリンはこれらの EHV-1 株の細胞表面への吸着を阻害すると考えられた。gC 発現昆虫細胞は EHV-1 宿主細胞表面に吸着した。また、ヘパリンによってその吸着が阻止された。したがって、少なくともハムスター順化 EHV-1 株の gC は宿主細胞表面のヘパリン様物質に結合することによって、ウイルス主要吸着タンパクとして機能することが示唆された。継代歴の異なる EHV-1 株の gC 遺伝子塩基配列を比較したところ、gC 遺伝子の塩基配列は継代歴にかかわらず非常によく保存されていた。一方、アミノ酸配列ではウマ由来細胞でのみ継代された株は完全に一致していたのに対し、ウシ腎細胞順化株では 2 箇所、ハムスター順化株では各々 3 箇所および 1 箇所に変異が認められた。これらの変異はハムスター順化株で認められた 3 箇所中の 1 箇所を除

き、いずれも酸性あるいは中性アミノ酸から塩基性アミノ酸への置換であった。その結果、塩基性アミノ酸クラスターKRKKSR およびヘパリン結合タンパクの共通配列に類似の配列が新たに生じた。これらに配列はいずれも gC アミノ酸末端側に存在する親水性領域に集中していた。この領域は他のヘルペスウイルス gC 相同タンパクのヘパリン結合部位と重複していた。以上の成績から、EHV-1 をウマ以外の動物由来細胞で長期に継代することによって、主要ウイルス吸着タンパクである gC に変異が生じ、ヘパリンとの親和力が増大することが示唆された。また、EHV-1 gC のアミノ酸末端側親水性領域がヘパリン結合活性部位と考えられた。

結論 EHV-1 の gC および gB がウイルスレセプター相同分子であるヘパリンに結合した。gC 発現昆虫細胞が EHV-1 宿主細胞に吸着したことから少なくとも gC はウイルス吸着タンパクとして機能すると考えられた。EHV-1 をウマ以外の動物由来細胞で長期間継代すると gC に変異が生じた。この変異により、ヘパリンとの親和性が増大すると考えられた。

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あるものと認めた。