

## 学 位 論 文 要 約

氏 名 井 爪 聡 子

題 目 Comparison of Equine Herpesvirus Type 4 Genome and Characterization of Type II Membrane Protein US8A of Equine Herpesvirus Type 1

(ウマヘルペスウイルス4型ゲノムの比較とウマヘルペスウイルス1型II型膜貫通タンパク質US8Aの機能解析)

ウマヘルペスウイルス1型 (EHV-1) は、ウマヘルペスウイルス4型 (EHV-4) とともに家畜伝染病予防法の届出伝染病に指定されている馬鼻肺炎の原因ウイルスである。EHV-1 と EHV-4 は互いに遺伝学的及び血清学的に近縁なウイルスであるが、馬に対する病原性は異なる。EHV-1 は馬に発熱性呼吸器疾患、流産ならびに神経性疾患を引き起こす。一方、EHV-4 は主に呼吸器疾患を引き起こし、他の疾患は稀である。近年、流産に加え、EHV-1 による神経麻痺を伴うウマヘルペスウイルス脳症 (EHM) の発生件数が世界的に増加しており、EHV-1 は馬産業にとって重要な病原体である。ワクチン接種プログラムの改善に伴い、日本における EHV-1 と EHV-4 による呼吸器疾患の発症率は制御されつつある。しかしながら、現行のワクチンでは流産や神経性疾患を完全に防御することは困難である。EHV 感染症の制御には、さらなる基礎的知見が必要である。すなわち、病原性に関連する遺伝子の同定や個々のウイルス遺伝子の機能解明が必須である。本研究では、以下の3点に着目し、ウマヘルペスウイルスの分子細胞生物学的解析を行った。①流産胎仔と呼吸器疾患馬から分離された EHV-4 の全ゲノム配列を比較し、流産原因遺伝子の検索を行った。②非必須遺伝子 US8A の機能を探るため、US8A 欠損ウイルスを用いて、培養細胞でのウイルス増殖性、細胞間伝播能並びに実験感染動物モデルにおける神経病原性を検証した。③US8A の感染細胞における機能をその転写動態解析および細胞内の局在から推測した。

第1章では、日本で分離された EHV-4 実験室内純化株及び7野外分離株の計8ウイルスのゲノム配列を決定し、解析した。解析に用いた野外分離株のうち、2ウイルスは流産胎仔由来で、5ウイルスは呼吸器疾患馬由来であった。日本分離8株並

びにデータベースより入手した15株の海外分離ウイルスゲノム塩基配列の計23株のゲノム配列を比較した。全ゲノム配列の比較により、EHV-4は2つのクラスターに分かれたが、これらクラスターに地域性および病原性との相関は認められなかった。全23株のそれぞれのOpen Reading Frame (ORF) のアミノ酸配列の比較でも同様の結果であり、流産胎仔由来株に特有な一塩基多型や塩基配列は認められなかった。今回用いた野外分離株のゲノム配列の比較からは、EHV-4の流産原因遺伝子を特定することはできなかった。

第2章では、EHV-1 US8AがEHV-1のビルレンス因子であるかどうかを*in vitro*および*in vivo*で評価した。US8A欠損体2ウイルス、Ab4p attB及びΔUS8Aは、神経病原性株である親株Ab4pと一段階増殖実験およびプラーク形成能に有意差はなく、US8Aがウイルスの培養細胞における増殖性および細胞間伝播に関与しないことが示された。ハムスターモデルを用いた感染実験においても、これらのウイルス間の病原性に有意差はなかった。したがって、US8Aはビルレンス因子ではないことが明らかとなった。Ab4pおよびUS8A欠損体感染ハムスターの脾臓からウイルスが分離された。ウイルスが分離された感染ハムスターの個体数は、US8A欠損体接種個体の方が多かった。EHV-1の病原性強毒株では細胞随伴性ウイルス血症により全身にウイルスが伝播するとされている。US8A欠損体感染ハムスターの脾臓からのウイルス分離率の増加は、US8Aの欠損によって細胞随伴性ウイルス血症が起こりやすくなったと推測された。

第3章では、EHV-1感染細胞内におけるUS8Aの機能を解明するために、US8Aの転写動態および細胞内局在を解析した。US8AをコードするORF 75遺伝子は前期遺伝子であり、転写開始点は増殖過程に依存して4箇所存在していた。緑色蛍光タンパク質 (EGFP) 融合US8AおよびEHV-1感染細胞において、US8Aは細胞質内で網目状に存在し、小胞体と共局在していた。US8AのC末端側膜貫通領域が、細胞内局在に重要な役割を担っていた。US8Aはタンパク質の大半が細胞質側に突出したII型膜貫通タンパク質であった。他のヘルペスウイルスのII型膜貫通タンパク質には、宿主の免疫系の働きを阻害するものも存在する。EHV-1 US8Aも宿主細胞の小胞体に局在し、何らかのタンパク質と相互作用し、宿主細胞の免疫系に関与することが推測された。

本研究ではEHV-4の流産関連遺伝子の同定には至らなかったものの、今までに情報量が乏しかったEHV-4の全ゲノム配列情報の蓄積に貢献することができた。EHV-1非必須遺伝子の一つであるUS8Aの機能解析を行うことで、EHV-1感染における非必

須遺伝子の担う役割の解明を目指した。US8A はビルレンス因子ではなく，ウイルスの増殖性ならびに細胞間伝播に関与しないことが明らかとなった。US8A は感染初期から細胞内で発現し，小胞体に局在する II 型膜貫通タンパク質であることも明らかとなった。EHV-1 の新たな分子細胞生物学的知見を得ることができた。

## 学 位 論 文 要 約

氏 名	IZUME, Satoko
題 目	Comparison of Equine Herpesvirus Type 4 Genome and Characterization of Type II Membrane Protein US8A of Equine Herpesvirus Type 1  (ウマヘルペスウイルス 4 型ゲノムの比較とウマヘルペスウイルス 1 型 II 型膜貫通タンパク質 US8A の機能解析)

Equine herpesvirus type 1 (EHV-1) and Equine herpesvirus type 4 (EHV-4) cause some of the most important viral diseases in horses. Although EHV-1 and EHV-4 are similar to each other genetically and serologically, their pathogenicities in horses are quite different. EHV-4 mainly induces a respiratory disease and rarely causes abortion and neurological disorders. On the other hand, abortion is one of the most important illnesses caused by EHV-1 because the incidence of equine abortion by EHV-1 has increased for a decade in Japan. Neurological disease associated with EHV-1 infection is now common worldwide as equine herpesvirus myeloencephalopathy (EHM) and has been reported in various countries as an emerging disease threat in horses. Recently the respiratory diseases caused by EHV-1 and EHV-4 are well controlled by a vaccination program in Japan. However, the present vaccines are insufficient to prevent and control for EHV infections. Thus, basic research on characterization of EHV-1 genes is required to clarify the virulent gene(s) in order to develop much more effective live attenuated vaccines which can protect horses from EHV-1-induced abortion and EHM. The main objectives of this study were to obtain a better understanding of pathogenic factors of EHV-1 and EHV-4 as follows. First, full genome sequences of EHV-4 isolated in Japan, Ireland, and Australia were compared to identify abortion-related genes. Second, EHV-1 mutants defective in a nonessential gene US8A were constructed to investigate whether US8A is related to EHV-1 viral replication and

cell-to-cell transmission *in vitro* and pathogenicity *in vivo*. Third, the transcription and localization of EHV-1 US8A were characterized in EHV-1-infected cells.

In Chapter 1, full genome sequences of EHV-4 isolated in Japan, Ireland, and Australia were compared to identify abortion-related genes. Full genome sequences of eight Japanese EHV-4 from two aborted fetuses and six nasal swabs of racehorses were newly determined in the present study. These eight genome sequences were compared with 15 full genome sequences of EHV-4 in Australia and Ireland. EHV-4 genome sequences were clustered into two groups, which were not related to geographical origins and their pathogenicity in horses. Furthermore, comparing the amino acid sequences of each ORF among all 23 EHV-4, there was no ORF specifically associated with abortion isolates. A key gene of abortion was not determined by comparison of the full genome sequences of EHV-4.

In Chapter 2, the role of EHV-1 US8A was evaluated *in vitro* and *in vivo*. Two EHV-1 mutants defected US8A, Ab4p attB and  $\Delta$ US8A, and a revertant  $\Delta$ US8A-R were constructed in the present study. There was no difference to one-step growth kinetics and plaque diameters in FEK cells among Ab4p, Ab4p attB,  $\Delta$ US8A, and  $\Delta$ US8A-R, indicating that US8A was not essential in virus replication and cell-to-cell transmission of EHV-1. Furthermore, US8A-defected mutants showed the same virulence as the parent and revertant viruses in the hamster model, indicating that US8A was not a virulence factor of EHV-1. US8A-defected viruses, however, tended to be isolated from spleen at higher rates than parent and revertant viruses. It is known that neurovirulent EHV-1s induce leucocyte-associated viremia more than non-neurovirulent ones. The results suggested that US8A deletion lead to leucocyte-associated viremia in hamsters.

In Chapter 3, transcriptional analysis and intracellular localization of EHV-1 US8A were examined to presume the role *in vitro* to obtain molecular biological characteristics of EHV-1 viral proteins. ORF 75 which encoded US8A was suggested to be an early gene and had four transcriptional initiation sites that depended on the replication kinetics. US8A proteins localized at

endoplasmic reticulum (ER) of transfected cells. US8A had a transmembrane region (TMR) at its C-terminus which determined the localization. Also, US8A was identified to be a type II membrane protein by protease sensitivity assay. Some viral type II membrane proteins have various functions to evade host immune system in infected-cells. These results indicated that US8A has some roles associated with ER as a type II membrane protein.

In this thesis, the key gene(s) associated with abortion were not identified by comparing full genome sequences of EHV-4 isolates with various pathogenic background. A nonessential gene, US8A, was confirmed to be a nonvirulent factor of EHV-1 and did not affect viral replication and cell-to-cell transmission of EHV-1 in infected cells. US8A localized at the ER of EHV-1-infected and transiently expressed cells. The new molecular biological findings of EHV-1 and EHV-4 were present in this thesis.