

氏名（本（国）籍）	井 爪 聡 子（和歌山県）
主 指 導 教 員 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482号
学位授与年月日	平成29年3月13日
学位授与の要件	学位規則第3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	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)
審 査 委 員	主査 岐 阜 大 学 教 授 石 黒 直 隆 副査 帯 広 畜 産 大 学 教 授 横 山 直 明 副査 岩 手 大 学 准教授 彦 野 弘 一 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）及び4型（EHV-4）は家畜伝染病予防法の届出伝染病である馬鼻肺炎を引き起こす。EHV-1 と EHV-4 は互いに近縁であるが、馬に対する病原性は異なる。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、EHV 感染症のより効果的な制御には、さらなる基礎的知見が必要である。本研究では、①流産胎仔と呼吸器疾患馬から分離された EHV-4 の全ゲノム配列比較による流産原因遺伝子の検索、②非必須遺伝子 US8A 欠損ウイルスを用いた培養細胞でのウイルス増殖性、細胞間伝播能並び神経病原性評価、及び③US8A の転写動態解析および細胞内局在の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。

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（流産胎仔由来2株、呼吸器疾患馬由来5株）の計8ウイルス株のゲノム配列を解読し、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と比較した。全ゲノム配列比較により、EHV-4 は2つのクラスターに分かれたが、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、流産胎仔由来株に特有なアミノ酸配列や一塩基多型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 が欠損した2つの変異体ウイルス Ab4p attB とΔUS8A は親株 Ab4p と一段階増殖実験およびプラーク形成能に差はみられなかった。ハムスターをモデルに用いた感染実験においても差はみられなかった。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、ウイルスが分離されたハムスターの個体数は、US8A 欠損体を接種した方が多かった。したがって、US8A はビルレンス因子ではないが、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ると考えられた。

本研究では、これまで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 はビルレンス因子ではないが、小胞体に局在する II 型膜貫通タンパク質であることが明らかとなった。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。

審 査 結 果 の 要 旨

わが国の馬における監視伝染病のうち継続して届出がなされているのはウマヘルペスウイルス 1 型 (EHV-1) 及び 4 型 (EHV-4) を病原体とする馬鼻肺炎のみである。馬鼻肺炎はウマにおける呼吸器疾患、流産、神経疾患を主症状とする感染症である。世界的にも発生が継続している。また、集団発生も見られ、経済的被害は大きい。申請者はこの馬鼻肺炎の病原体である EHV-1 及び EHV-4 に着目し研究を行った。研究成果は 3 章からなる博士論文としてまとめられた。主査及び副査の 5 名から構成された審査委員会は、提出された学位論文の学術的意義について審査した。学位論文の内容は以下にまとめられる。

本研究の目的は大きく二つあり、流産胎仔と呼吸器疾患馬から分離された EHV-4 の全ゲノム配列比較による流産原因遺伝子の検索及び非必須遺伝子 US8A の機能解明である。

第一章では、日本で分離された EHV-4 流産胎仔由来 2 株、呼吸器疾患馬由来 6 株のウイルスゲノム配列を解読し、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と比較した。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。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。

第二章では、EHV-1 の US8A が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 欠損体は親株と一段階増殖実験およびプラーク形成能に関して差はなかった。ハムスターをモデルに用いた感染実験においても差はみられなかった。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、ウイルスが分離された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。したがって、US8A はビルレンス因子ではないが、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。

第三章では、EHV-1 感染細胞内における 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ると考えられた。

本審査委員会は本研究において、これまで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し、さらに US8A の機能解析から 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と認めた。

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 full Genome sequences of 8 equine herpesvirus type 4 isolates from horses in Japan

著 者 名 : Izume, S., Kirisawa, R., Ohya K., Ohnuma A., Kimura T., Omatsu T.,
Katayama, Y., Mizutani, T. and Fukushi, H.
学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science
卷・号・頁・発行年 : 79(1):2017

既発表学術論文

- 1) 題 目 : Identification of B cells as a major site for cyprinid herpesvirus 3 latency
著 者 名 : Reed, AN., Izume, S., Dolan, B.P., LaPatra, S., Kent, M., Dong, J. and Jin, L.
学術雑誌名 : Journal of Virology
卷・号・頁・発行年 : 88(16):9297-9309, 2014
- 2) 題 目 : Full genome sequences of zebra-borne equine herpesvirus type 1 isolated from zebra, onager and Thomson's gazelle
著 者 名 : Guo, X., Izume, S., Okada, A., Ohya, K., Kimura, T. and Fukushi, H.
学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science
卷・号・頁・発行年 : 76(9):1309-1312, 2014
- 3) 題 目 : Intracellular localization of equine herpesvirus type 1 tegument protein VP22
著 者 名 : Okada, A., Kodaira, A., Hanyu, S., Izume, S., Ohya, K. and Fukushi, H.
学術雑誌名 : Virus Research
卷・号・頁・発行年 : 192:103-113, 2014
- 4) 題 目 : Differentiation of BHV-1 isolates from vaccine virus by high-resolution melting analysis
著 者 名 : Ostertag-Hill, C., Fang, L., Izume, S., Lee, M., Reed, A. and Jin, L.
学術雑誌名 : Virus Research
卷・号・頁・発行年 : 198:1-8, 2015
- 5) 題 目 : Evaluation of BHV-1 antibody titer in a cattle herd against different BHV-1 strains
著 者 名 : Lee, M., Reed, A., Estill, C., Izume, S., Dong, J. and Jin, L.
学術雑誌名 : Veterinary Microbiology
卷・号・頁・発行年 : 179(3-4):228-232, 2015
- 6) 題 目 : Equine herpesvirus type 1 tegument protein VP22 is not essential for pathogenicity in a hamster model, but is required for efficient viral growth in cultured cells
著 者 名 : Okada, A., Izume, S., Ohya, K. and Fukushi, H.
学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science
卷・号・頁・発行年 : 77(10):1293-1297, 2015
- 7) 題 目 : The Role of the Equine Herpesvirus Type 1 (EHV-1) US3-Encoded Protein Kinase in Actin Reorganization and Nuclear Egress
著 者 名 : Proft, A., Spiesschaert, B., Izume, S., Taferner, S., Lehmann, M.J. and Azab, W.
学術雑誌名 : Viruses
卷・号・頁・発行年 : 8(10):275, 2016