



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

Molecular Biological Studies on the Roles of
UL11 Protein in the Equine Herpesvirus 1
Neurovirulent Strain Ab4p Replication

メタデータ	言語: eng 出版者: 公開日: 2018-08-29 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: Yassien Ahmed Yassien Badr メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/75223

氏名（本（国）籍）	Yassien Ahmed Yassien Badr（エジプト・アラブ共和国）		
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500号		
学位授与年月日	平成30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	Molecular Biological Studies on the Role of UL11 Protein in the Equine Herpesvirus 1 Neurovirulent Strain Ab4p Replication (ウマヘルペスウイルス1型神経病原性株 Ab4p 増殖における UL11 タンパク質の役割に関する分子生物学的研究)		
審査委員	主査	帯広畜産大学 教授	横山直明
	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	水谷哲也
	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）感染症はウマにおける主要な疾患の一つであり、我が国では馬鼻肺炎として監視伝染病とされている。EHV-1は呼吸器疾患、神経疾患および流産などを引き起こし、経済的被害は世界的にも大きい。EHV-1のウイルス粒子はヌクレオカプシド、テグメントおよびエンベロープから構成される。UL11は74アミノ酸からなるテグメントタンパク質でORF51によりコードされている。UL11はヘルペスウイルス科で保存されているタンパク質である。以前の報告で、UL11はEHV-1の増殖において非必須であるが、UL11の欠損によりプラークが小さくなることが報告された。しかしながら、EHV-1増殖におけるUL11の役割はまだ不明な点が多い。本研究では、EHV-1 UL11のウイルス増殖における特徴ならびにどのような役割を担っているかを明らかにすることを目的とした。

第一章では、EHV-1の神経病原性株であるAb4pを用い、UL11完全欠損体、C末端部分欠損体および復帰体を細菌性人工染色体（bacterial artificial chromosome, BAC）システムにより構築した。大腸菌内で構築したBAC DNAを細胞に導入したが、感染性ウイルスを得ることができなかった。BACベクター配列がコードするGFPを指標としたところ、導入はされているが、感染性ウイルスが生じていないことがわかった。先行研究ではUL11は24アミノ酸分残存していたことから、C末端を欠損させた変異ウイルスを構築し、細胞に導入したが、いずれにおいても感染性ウイルスは得られなかった。ウサギ腎臓細胞にUL11発現プラスミドを導入し、構成的に発現する細胞株（RK13-UL11細胞）を樹立した。UL11完全欠損体および部分欠損体、いずれもRK13-UL11細胞では感染性ウイ

ルスが得られた。これらの結果から、EHV-1 Ab4p 株において UL11 は必須遺伝子であることが示された。

第 2 章では、ウイルス増殖における UL11 の役割を明らかにしようとした。UL11 は感染細胞において、核近傍および細胞質に局在し、細胞質ではゴルジ装置に局在していると考えられた。RK13-UL11 細胞においても UL11 は同様の局在を示し、UL11 の局在には他のウイルスタンパク質は不要であることがわかった。UL11 の N 末端ないし C 末端に EGFP を融合させたところ、N 末端に EGFP が融合した場合には細胞内での局在がみられなかった。一方、C 末端への融合では核近傍およびゴルジ装置への局在がみられた。この結果は、UL11 の N 末端が細胞内局在に重要であることを示唆する。RK13 細胞と RK13-UL11 細胞における EHV-1 Ab4p 株のプラーク形成能を比較したところ、RK13-UL11 細胞ではプラークが有意に大きいことがわかった。UL11 完全欠損体感染 RK13 細胞の電子顕微鏡観察では細胞質内にエンベロープを持たない不完全なヌクレオカプシドが多数観察された。UL11 はゴルジ装置に局在し、ウイルスのエンベロープ獲得および成熟に必須な役割を担っていると考えられた。

本論文において、UL11 をコードする ORF51 は EHV-1 の培養細胞における増殖において必須遺伝子であることが明らかにされた。UL11 は他のウイルスタンパク質とは独立にゴルジ装置に局在すること、また、UL11 の欠損は EHV-1 ヌクレオカプシドのエンベロープ獲得および成熟に大きな影響を与えることがわかった。

審 査 結 果 の 要 旨

ウマヘルペスウイルス 1 型 (EHV-1) は監視伝染病である馬鼻肺炎の病原体である。馬鼻肺炎はわが国の馬における監視伝染病のうち唯一の継続して届出がなされている感染症である。馬鼻肺炎は呼吸器疾患、流産、神経疾患を主症状としている。世界的にも発生が継続しており、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 に着目し研究を行った。研究成果は 2 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 EHV-1 がコードするタンパク質で最も小さい UL11 に着目し、ウイルス増殖における機能を解明することである。

第一章では、EHV-1 の神経病原性株である Ab4p を用い、UL11 完全欠損体および C 末端部分欠損体をおよび復帰体を細菌性人工染色体 (bacterial artificial chromosome, BAC) システムにより構築した。大腸菌内で構築した BAC DNA を細胞に導入したが、感染性ウイルスを得ることができなかった。BAC ベクター配列がコードする EGFP を指標としたところ、導入はされているが、感染性ウイルスが生じていないことがわかった。ウサギ腎臓細胞に UL11 発現プラスミドを導入し、構成的に発現する細胞株 (RK13-UL11 細胞) を樹立した。UL11 完全欠損体および部分欠損体、いずれも RK13-UL11 細胞では感染性ウイルスが得られた。これらの結果から、先行研究に反し、EHV-1 Ab4p 株において UL11 は必須遺伝子であることが示された。

第二章では、ウイルス増殖における UL11 の役割を明らかにしようとした。UL11 は感染細胞において、核近傍および細胞質に局在し、細胞質ではゴルジ装置に局在していた。RK13-UL11 細胞においても UL11 は同様の局在を示したことから、UL11 の局在には他のウイルスタンパク質は不要であることがわかった。UL11 の N 末端ないし C 末端に EGFP を融合させたところ、N 末端に EGFP が融合した場合には細胞内での局在がみられなかった。一方、C 末端への融合では核近傍およびゴルジ装置への局在がみられ、UL11 の N 末端が細胞内局在に重要であることを示唆する。UL11 完全欠損体感染 RK13 細胞の電子顕微鏡観察では細胞質内にエンベロープを持たない不完全なヌクレオカプシドが多数観察された。これらのことから、UL11 はゴルジ装置に局在し、ウイルスのエンベロープ獲得および成熟に必須な役割を担っていると考えられた。

以上の結果から、UL11 をコードする ORF51 は EHV-1 の培養細胞における増殖において必

須遺伝子であることが明らかにされた。UL11 は他のウイルスタンパク質とは独立にゴルジ装置に局在すること、また、UL11 の欠損は EHV-1 ヌクレオカプシドのエンベロープ獲得および成熟に大きな影響を与えることがわかった。

本審査委員会は EHV-1 UL11 に関する本研究の成果として UL11 が従来の知見を覆して必須遺伝子であるという新たな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 : Equine herpesvirus type 1 ORF51 encoding UL11 as an essential gene for replication in cultured cells
- 著 者 名 : Badr, Y., Okada, A., Abo-Sakaya, R., Beshir, E., Ohya, K. and Fukushi, H.
- 学術雑誌名 : Archives of Virology
- 巻・号・頁・発行年 : In press