

1. 研究概要 アフリカ馬疫ウイルス及び関連ウイルスの分子生物学的解析 ～豚水胞病ウイルス病原性の分子機構の解明～

研究期間：H12年度～H13年度

研究代表者：井上互（農業技術研究機構）他1機関

研究の概要・目標

1. 何をを目指しているのか

病原性の分子機構の全容解明を目標とする。得られた成果を活用し、病原性遺伝子を標的とする新しい診断法の開発及び非病原性遺伝子を応用したワクチン開発、更に病原性分子機構に基づく新しい予防法の開発を目指す。

1年後の目標：

分子機構解明のための変異ウイルス材料を得る。世界の野外株の病原性遺伝子型を明らかとする。

2年後の目標：

病原性の分子機構の全容解明を目標とする。

2. 何を研究しているのか

豚水胞病ウイルスの病原性の分子機構を明らかとする。

具体的には、遺伝子の構造、蛋白の機能と病原性との関係を詳細に解析し、分子レベルで病原性発現機構を解明する。

3. 何が新しいのか

口蹄疫をはじめ豚水胞病等水疱性疾患原因ウイルスの病原性決定遺伝子及び病原性発現の分子機構はこれまで全く明らかにされていない。我々は、世界に先駆けて豚水胞病ウイルス日本分離株の病原性決定遺伝子の特定を行った。本成果を更に押し進め、プロテアーゼの機能解析で世界をリードする研究者の協力を得、世界の野外株を材料として豚水胞病の病原性の世界分布並びに病原性発現の分子機構の全容解明にせまる。

諸外国等の現状

1. 現状

国際重要伝染病病原体(OIEリストA)の1つであるため本ウイルスが取り扱える機関・施設は限定される。

現在豚水胞病研究を実施している国は、英国、ベルギー、スペイン、オランダ、ドイツ、イタリア、北アイルランドである。いずれもELISA、RT-PCR等既存の技術を用いた診断法の開発研究が主体であり、本研究と類似の研究はなされていない。最近オランダ（レリスタット研究所；Dr. Dekker）でオランダ分離株について感染性cDNAを開発、病原性解明に向けた研究を開始するとの情報があるが、詳細は不明であり、成果は報告に上がっていない。

アメリカは清浄国であり、侵入の歴史もないため研究は実施していない。

常在国は、公式にはヨーロッパ（イタリア）台湾であるがロシア、東欧、中国はじめアジア諸国の現状は不明。

英国は世界の豚水胞病ウイルス野外株を収集し、類似の口蹄疫ウイルス研究では世界をリードしている。

2. 我が国の水準

豚水胞病は、1970年代に2度の発生を見て以来独自に研究が進んでいる。特に病原体である豚水胞病ウイルスの遺伝子の構造と機能の解析分野でいち早く全塩基配列の決定並びに感染性cDNAを構築し機能解析に着手し世界をリードしている。

成果として日本分離ウイルス株を用いた中和抗原遺伝子の決定とウイルス3次元構造のモデリング、病原性決定遺伝子の特定他がある。

研究進展・成果がもたらす利点

1. 世界との水準の関係

豚水胞病ウイルス研究で最先端の領域であり得られる成果は全て新しい知見となり更にリードが広がる。

方法論的にも最先端のレベルにある。ウイルス学領域において病原性の分子機構の解明は大きな命題であり、各国の研究者がそれぞれのウイルス分野でしのぎを削っている。

2. 波及効果

豚水胞病の遺伝子病原型による世界分布、病原性の分子機構が解明される。

得られた成果を活用し、病原性遺伝子を標的とする新しい診断法の開発及び非病原性遺伝子を応用したワクチン開発、更に病原性の分子機構に基づく新しい予防法の開発・研究への応用につながる。

病原性発現の分子機構のモデルとしてウイルスの病原性への理解が深まる。

アフリカ馬疫ウイルス及び関連ウイルスの分子生物学的解析 ～豚水胞病ウイルス病原性の分子機構の解明～の研究体制

(1) 豚水胞病ウイルス弱毒株及び強毒株感染性cDNAを用いた病原性変異ウイルスの作出と性状解析

農業技術研究機構

英国家畜衛生研究所

材料の提供、試験・解析の分担とデータの提供

(2) 豚水胞病ウイルス野外株の病原性関連遺伝子の構造と機能の解析

農業技術研究機構

英国家畜衛生研究所

材料の提供、試験・解析の分担とデータの提供

研究サブテーマ間の関係

サブテーマ(1)では研究の進んでいる日本型株を用い病原性の分子機構の解明を進める。

サブテーマ(2)では世界の野外株の解析を進め、非日本型病原株についてサブテーマ(1)の解析法、解析結果に基づき病原性発現の分子機構の解明を進める。

以上により、病原性発現の分子機構の全容解明にあたる。

(変異ウイルス材料の作出及び野外株病原遺伝子型の解明/病原性分子機構の全容解明)

2. 所要経費一覧

平成13年度科学技術振興調整費課題「アフリカ馬疫ウイルス及び関連ウイルスの分子生物学的解析」の実施体制及び所用経費

(千円)

研究項目	担当機関等	研究担当者	平成12年度 所用経費	平成13年度 所用経費
アフリカ馬疫ウイルス及び関連ウイルスの分子生物学的解析 (豚水胞病ウイルス病原性の分子機構の解明)	農林水産省 独立行政法人 農業技術研究機構(委託)	井上 互 他	23,510	19,766
	英国家畜衛生研究所	G.J.Belsham 他		

3. 研究成果の概要

課題名（研究代表者）：アフリカ馬疫ウイルス及び関連ウイルスの分子生物学的解析
；豚水胞病ウイルス病原性の分子機構の解明（井上 互）

【研究成果の概要】

本課題は、豚水胞病ウイルス日本分離株の病原性関連遺伝子が明らかとされたことを足がかりとして病原性発現の分子機構の解明を目的として取り組まれた。サブテーマ（1）は、豚水胞病ウイルス病原性決定遺伝子（日本型）の機能と病原性との関係を追求することにより日本型病原遺伝子の病原性発現の分子機構を明らかとすることを目的とし、サブテーマ（2）は、パーブライトで収集された世界の野外株の病原性関連遺伝子を調査し、本ウイルスの病原型遺伝子型別を行うとともに新たな病原性関連遺伝子を検索することを目的とする。新たに追加されたサブテーマ（3）は、サブテーマ（1）の成果を活用し、病原性が異なる近縁ウイルス（テシオウイルス）の遺伝子、とりわけ病原性に関連が深いと考えられるIRESの構造と機能の解析を目的とする。

サブテーマ（1）では、項目①で本研究の要となる豚水胞病ウイルス 2A 蛋白の機能解析系の開発が取り組みられ、1D-2A 結合部切断活性、eIF4G1 切断活性、キャップ依存性蛋白合成抑制活性、IRES 依存性蛋白合成促進活性に対するアッセイ系が開発された。開発されたアッセイ系は、豚水胞病ウイルス強毒株・弱毒株 2A 蛋白機能の比較解析に用いられ、eIF4G1 切断活性、キャップ依存性蛋白合成抑制活性、IRES 依存性蛋白合成促進活性に差があることが見いだされた。即ち、強毒株及び弱毒株の違いは、強毒株 2A 蛋白がより強く eIF4G1 を切断し、キャップ依存性蛋白合成を抑制し、IRES 依存性蛋白合成を促進することによるウイルス蛋白初期合成促進効果にあることが明らかとされた。項目②では、2A 蛋白の構造と機能の関係をより明らかとするため 2A 蛋白病原性決定基である 2A20 アミノ酸に着目し、2A20 アミノ酸変化が 2A 蛋白機能へ及ぼす影響が調べられた。2A20 アミノ酸変異クローンについて項目①で開発された方法により機能解析がなされた結果、2A20 のアミノ酸の種類により活性が大きく変化することから 2A20 アミノ酸が、2A 蛋白の活性強度をコントロールする事が明らかとされた。項目③では、項目①②で得られた成果が如何にウイルス性状に反映されるかを検証するため実施された。リバーズジェネティック技術を応用して 2A20 アミノ酸変異ウイルスが作出されその性状が調べられた。変異ウイルスは、導入した 2A 蛋白活性が高いほど増殖性、細胞病原性が高くなり、ブラックサイズは大きくなることが明らかとされた（豚への病原性に関する直接的証明は、2002 年 9 月からを予定されている）。以上の結果から日本型病原遺伝子の病原性発現の分子機構は、病原性決定基である 2A20 アミノ酸変異が 2A 蛋白機能の活性変化即ち 1D-2A 結合部切断活性、eIF4G1 切断活性、キャップ依存性蛋白合成抑制活性、IRES 依存性蛋白合成促進活性の変化をもたらし、ウイルスの初期蛋白合成速度に影響する結果、引き続き起こるであろうウイルス増殖と生体反応のカスケードに影響を与え、病原性の差となって現れると考えられた。

サブテーマ（2）では、新たな病原性関連遺伝子の検索と病原型決定遺伝子を用いた型

別を行う目的で、野外株（強毒株）89株の2A蛋白の塩基配列解析が行われた。主要決定基である2A20は全て日本型強毒型である“R（Arg）”を示し、本ウイルスの病原型決定遺伝子は日本型の代表されるモノタイプであることが明らかとされた。本課題の中心テーマである病原性分子機構の観点からは、サブテーマ（1）で明らかとされた日本型メカニズムに代表型されることが明らかとされた。

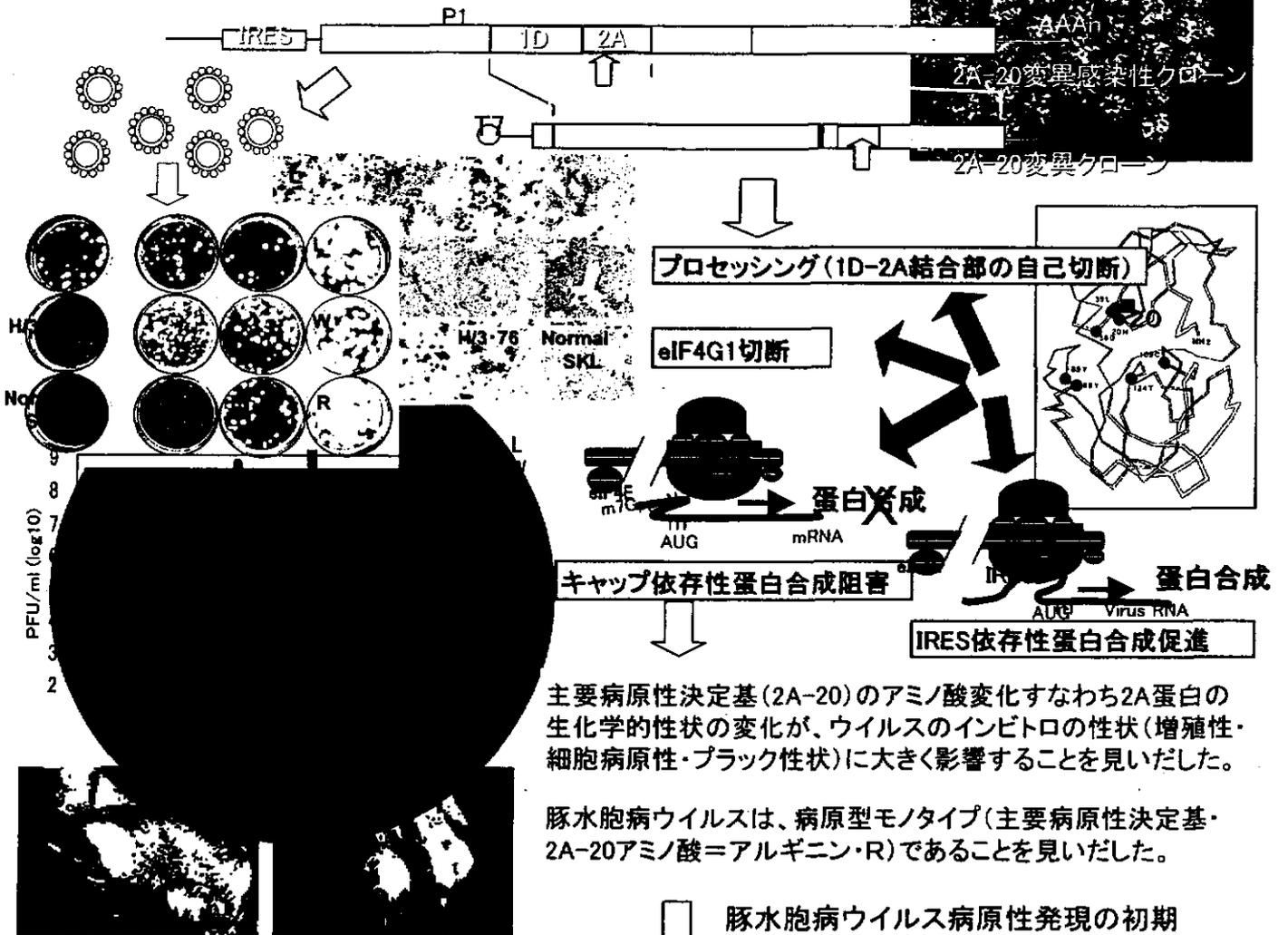
サブテーマ（3）では、テシオウイルスの遺伝子の構造と機能の解析を目的としてIRES領域の同定と機能の解析がなされ、テシオウイルスIRESは、既存のピコルナウイルスと異なる新しいIRESである可能性を示唆するデータを得た。

以上により豚水泡病ウイルス病原性発現分子機構の初期メカニズムが明らかとされた。新しく分類が設けられたテシオウイルスは、IRES構造でもユニークである可能性が示唆された。

本課題で得られた成果は、ウイルスの病原性発現機構のモデルとして利用されるとともに生体反応との相互作用の結果として生まれる病原性発現のカスケード解明の足がかりを提供するものと期待される。また病原性を人為的にコントロールする手法が提供されたことから今後ワクチン開発、抗ウイルス薬開発への応用が期待される。

アフリカ馬疫ウイルス及び関連ウイルスの分子生物学的解析 (豚水胞病ウイルス病原性の分子機構の解明)

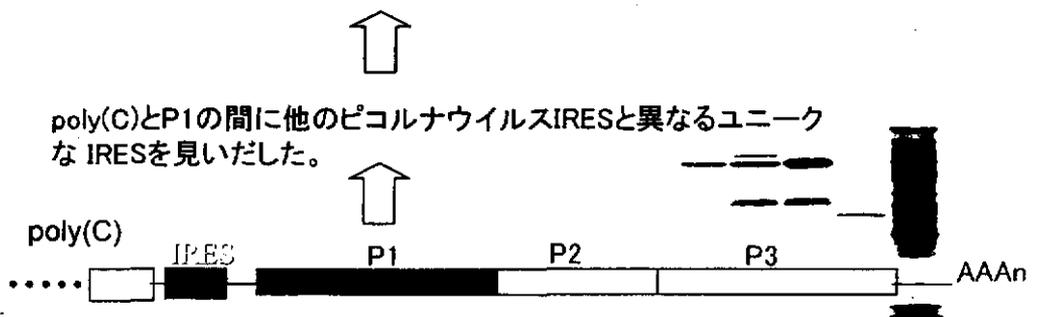
豚水胞病ウイルス



- ・ウイルスの病原性発現機構のモデルとして利用されるとともに生体反応との相互作用の結果として生まれる病原性発現のカスケード解明の足がかりを提供するものと期待される。
- ・病原性を人為的にコントロールする手法が提供され、ワクチン開発、抗ウイルス薬開発、病原遺伝子診断への応用が期待される。

テシオウイルス

脳脊髄炎
下痢
肺炎...



4. 研究成果公表等の状況

課題名（研究代表者）：アフリカ馬疫ウイルス及び関連ウイルスの分子生物学的解析
；豚水胞病ウイルス病原性の分子機構の解明（井上 互）

【研究成果発表等】

	原著論文による発表	左記以外の誌上発表	口頭発表	合計
国内	0 件	1 件	4 (2) 件	5 (2) 件
国外	2 (1) 件	0 件	2 件	4 (1) 件
合計	2 (1) 件	1 件	6 (2) 件	9 (3) 件

（注：既発表論文について記載し、投稿中の論文については括弧書きで記載のこと）

【特許出願等】 0 件（国内 件、国外 件）

【受賞等】 0 件（国内 件、国外 件）

【主要雑誌への研究成果発表】

Journal	Impact Factor	サブテーマ 1	サブテーマ 2	サブテーマ 3	合計
J Virol. 75 -22 :10643-10650, 2001 (J Virol. 投稿中) J Virol. 印刷中	5.93 (5.93) 5.93	○ (○)		○	1 (1) 1
主要雑誌小計		1 (1)		1	
発表論文合計	11.86 (5.93)				2 (1)