

学 位 論 文 要 旨

氏名 安藤 清彦

題 目 : Functional and immunological analysis of glycoproteins gC and gE of equine herpesvirus type 1
(馬ヘルペスウイルス 1 型糖蛋白 gC と gE の機能及び免疫学的解析)

論文要旨 :

Equine herpesvirus-1 (EHV-1) and -4 (EHV-4) belong to the order *Herpesvirales*, family *Herpesviridae*, the subfamily *Alphaherpesvirinae* and the genus *Varicellovirus*. These viruses have linear double-stranded genomes of 150 and 145 kb, respectively, and both encode 76 distinct genes. EHV-1 causes acute upper respiratory disease, occasional central nervous system disorder and contagious abortion in horses. On the other hand, EHV-4 infects young horses in breeding farms and causes pyrexia and respiratory disease. Both viruses have shown a wide geographic distribution and cause serious economic losses in horse industry worldwide. EHV-1 and -4 are closely related both genetically and antigenically, and show cross-reactivity in many serological tests such as virus-neutralization (VN), complement-fixation (CF) and immunoblot analysis. However, they are different in some characteristics, including their pathogenesis. Notably, EHV-1 can grow in some non-equine cells, whereas the growth of EHV-4 appears to be restricted to equine cells. Furthermore, it is reported that only EHV-1 could agglutinate equine red blood cell (RBC). Until now, there is only inactivated vaccine against EHV-1 in Japan. However, EHV-1 with a deletion of the glycoprotein E (gE) gene, which is responsible for the pathogenesis of EHV-1, is ongoing attempts to introduce as a new live modified vaccine.

The aim of this study is to clarify the virulence factor of EHV-1 by comparing differences between EHV-1 and -4 and to contribute to the vaccine development.

First of all, we established a new equine cell line, FHK-Tcl3.1. As equine cell lines were very rare, it was so difficult to isolate, propagate and analyze EHV-4. Therefore, comparative analysis between EHV-1 and -4 is difficult. To resolve the problem, we established a new cell line, named FHK-Tcl3.1, which was derived from fetal horse kidney and immortalized by SV40 large T antigen. FHK-Tcl3.1 cells grew well and could support propagation of EHV-1, -2 and -4 with clear cytopathic effect (CPE). These results indicated that FHK-Tcl3.1 cells are useful for the research on EHV-1.

Next, we identified the haemagglutinin of EHV-1 using expression plasmids encoding EHV-1 glycoproteins. Haemagglutination (HA) test and haemadsorption assay using 293T cells transfected with the expression plasmid encoding major EHV-1

glycoproteins, gp2, gB, gC, gD, gE, gG, gI, gM and gN, were performed. As the result, only 293T cells expressing gC adsorbed and agglutinated equine RBC. In addition, the HA activity was inhibited by monoclonal antibodies (MAbs) against EHV-1 gC, suggesting that gC is certainly responsible for the HA activity. Furthermore, the HA activity was not inhibited by addition of heparin, indicating that the EHV-1 gC has a different character from gCs of other herpesviruses. Therefore, it is hypothesized that HA activity of EHV-1 might be related to EHV-1-specific virulence.

Finally, we identified EHV-1 gE-specific epitope to develop a new diagnosis method. To identify EHV-1 gE specific epitope, the various fragments of EHV-1 gE were expressed as fusion proteins with glutathione S-transferase (GST) in *Escherichia coli* and their antigenicities were compared by immunoblot analysis using EHV-1-infected horse serum. As the result of immunoblot analysis, it was indicated that EHV-1 gE-specific epitope was located in gE1 (169-201). For further identification, three 20-mer synthetic peptides, gE1 (169-188), gE1 (176-196) and gE1 (182-201), were analyzed by ELISA, resulting in identification of the EHV-1-specific epitope, gE1 (169-188). In addition, we established a new ELISA assay using the gE1 (169-188) peptide as the antigen. The ELISA could sensitively detect EHV-1 infection, but not react with EHV-1 Δ gE inoculation. The new ELISA using synthetic peptides is a simple method to distinguish between EHV-1 and EHV-4 infections and will be available as a vaccine marker after introduction of EHV-1 Δ gE into field horses.

In conclusion, some novel findings are shown in the study.

1. The novel cell line derived from horse, FHK-Tcl3.1, was established.
2. EHV-1 gC is responsible for the HA activity and the HA activity is not inhibited by heparin. This is the first report of a herpesviral gC capable of agglutinating the RBCs of its respective host.
3. EHV-1 gE-specific epitope is located in amino acid position 169 -188 (gE1 (169-188)).
4. New ELISA using the epitope peptide gE1 (169-188) is useful for the diagnosis of EHV-1 infection.

These findings must be available for the research on EHV-1 and the development of effective vaccine.

学位論文審査の結果の要旨

氏 名	安藤 清彦
審 査 委 員	主 査：山口大学 教授 前田 健
	副 査：山口大学 教授 岩田 祐之
	副 査：鹿児島大学 教授 望月 雅美
	副 査：山口大学 教授 水野 拓也
	副 査：JRA 競走馬総合研究所 山中 隆史
題 目	Functional and immunological analysis of glycoproteins gC and gE of equine herpesvirus type 1 馬ヘルペスウイルス 1 型糖蛋白 gC と gE の機能及び免疫学的解析
<p>審査結果の要旨：</p> <p>ウマヘルペスウイルス 1 型 (EHV-1) 及び 4 型 (EHV-4) はヘルペスウイルス科、アルファヘルペスウイルス亜科に属する 2 本鎖 DNA ウイルスである。両ウイルスはともに馬鼻肺炎の原因ウイルスとして世界的に流行しており、ウマ産業において経済的に大きな被害を引き起こしている。両ウイルスは遺伝的、抗原的に相同性が高く、分子生物学的試験や免疫学的試験で交差反応を示すが、EHV-1 はウマに呼吸器疾患や神経症状、流産など強い病原性を示す一方で、EHV-4 は主に呼吸器症状のみを引き起こすなど、その病原性には差異が認められる。</p> <p>本学位論文は EHV-1 と EHV-4 を比較することで EHV-1 の病原性因子を解明するとともに、培養細胞や新規診断法を開発することで馬鼻肺炎の対策に貢献することを目的としている。本学位論文における研究は、以下の 3 章より構成される。</p> <p>【第 1 章】新規ウマ由来培養細胞株の樹立</p> <p>EHV-1 と EHV-4 の違いの一つとして、EHV-1 はウマ以外の動物種由来培養細胞で増殖できるのに対して、EHV-4 はウマ由来細胞のみでしか増殖できないという特徴がある。ウマ由来細胞が貴重であることに加え、EHV-1 あるいは EHV-4 をウマ以外の動物種由来培養細胞に馴化させると変異が生じてしまう為、特に EHV-1 や EHV-4 の分離や培養、性状解析は困難であった。本章ではこれらの問題を解決する為、ウマ由来の新規培養細胞株の樹立を試みた。</p> <p>本研究ではウマ胎児腎由来細胞に SV40 の Large T 抗原遺伝子を導入した細胞株 FHK-Tc13 から、さらに長期継代が可能になった細胞株 FHK-Tc13.1 を樹立し、各種 EHV への感受性を評価した。その結果、FHK-Tc13.1 細胞で EHV-1、-2 及び -4 が明瞭な細胞変性効果 (CPE) を伴って増殖することが確認され、この細胞は EHV の培養に適しており、今後の EHV 研究に有用であることが示された。</p>	

【第 2 章】 EHV-1 糖蛋白 gC が持つ赤血球凝集 (HA) 活性の解析

過去の報告により、EHV-1 のみがウマの赤血球を凝集し、EHV-4 は HA 活性を持たないことが知られている。本章ではこの EHV-1 にのみ認められるウマ赤血球に対する HA 活性に着目し、EHV-1 の主要な糖蛋白質を発現する発現プラスミドを用いて責任蛋白質の同定と解析を実施した。

EHV-1 の主要な糖蛋白質を培養細胞で発現させて HA 活性の有無を解析した結果、gC を発現した細胞のみが HA 活性を示し、この HA 活性は gC 特異的なモノクローナル抗体によって阻害されることが確認された。さらに、この HA 活性はヘパリンによって阻害されず、他のヘルペスウイルス gC のヘパリン感受性の HA 活性とは異なる性質を持つものであることが判明した。

本研究により、EHV-1 gC の HA 活性は EHV-1 に特徴的な性状であり、EHV-1 の病原性に関与していることが示唆された。

【第 3 章】 EHV-1 糖蛋白 gE の主要エピトープ領域の同定と ELISA 開発への応用

現在、EHV 感染症に対する血清学的診断法として gG 特異的なエピトープを抗原とした gG ELISA が実施されているが、この gG ELISA では近年開発されている病原性関連遺伝子である gE 遺伝子を欠損させた遺伝子欠損 EHV-1 生ワクチンを識別不可能である。本章では新規ワクチンを識別可能な血清学的診断法の確立を目的として、EHV-1 gE 特異的なエピトープ領域の同定とそのエピトープペプチドを用いた新規診断法の開発を試みた。

EHV-1 gE を分割して GST 融合蛋白質として大腸菌発現させた組換え蛋白質を用いたウェスタンブロット解析と合成ペプチドを用いた ELISA 解析の結果、gE1 (169-188) がエピトープ領域として同定された。さらに、このエピトープペプチドを抗原とした ELISA は EHV-1 感染に対して特異的に反応し、gE 欠損 EHV-1 や EHV-4 とは交差反応を示さないことが確認された。この結果から、同定されたエピトープペプチドを用いた新規診断法 gE ELISA は gE 欠損ワクチンによる抗体と野外株感染による抗体を識別可能であり、なおかつ EHV-1 と EHV-4 の感染をも識別可能であることが示され、今後の EHV 感染症の診断方法として有用であることが示された。

本研究において、新規ウマ由来培養細胞株が樹立され、EHV-1 に特異的な HA 活性の責任蛋白質が同定された。EHV-1 gC が持つ HA 活性はヘパリンにより阻害されないという特徴から他のヘルペスウイルス gC が持つ HA 活性とは異なる性質を持つものであり、EHV-1 の病原性に寄与している可能性が示唆された。さらに、EHV-1 gE 特異的なエピトープは 169-188 の領域に存在することが判明し、このペプチドを用いた新規 ELISA は EHV の診断に有用であることが示された。

これら一連の研究は、EHV-1 と EHV-4 の比較解析と馬鼻肺炎の対策に大きく貢献するものである。EHV-1 gC が持つ HA 活性は EHV-4 を含めた他のヘルペスウイルスにはない EHV-1 に特徴的な性質であり、EHV-1 の病原性の解明に寄与しうる可能性を示唆した。さらに、EHV-1 gE 特異的なエピトープ領域の同定と新規血清学的診断 ELISA 法の開発は今後の馬鼻肺炎対策において重要なツールとなり得る。本研究の成果は今後の EHV 感染症の研究と対策に大いに役立つと期待される。以上により、本論文は博士 (獣医学) の論文として、妥当なものであると判断された。