

6. ペスチウイルス

迫田 義博

北海道大学大学院獣医学研究科

ペスチウイルスとはフラビウイルス科ペスチウイルス属の牛ウイルス性下痢ウイルス、豚コレラウイルス、ボーダー病ウイルスを代表とする動物ウイルスの総称である。ペスチウイルスはいずれもヒトに感染することはないが、獣医領域では重要な疾病を引き起こす病原体である。ペスチウイルスは他のフラビウイルス科のウイルスと似た遺伝子構造を持つが、ウイルスゲノムへの宿主遺伝子の挿入、ペスチウイルス特有のウイルス蛋白 N^{pro} や E^{rns} の病原性への関与など、興味深い報告が多い。本稿ではペスチウイルスの病原性の分子基盤を中心に最新の知見も含め解説する。

1. はじめに

フラビウイルス科ペスチウイルス属は、牛ウイルス性下痢 (BVD) ウイルス、豚 (とん) コレラウイルス、羊のボーダー病ウイルスがその分離の中心を占める。ペスチウイルスの宿主は、かつては分離された動物種に基づいて命名された経緯があり、豚コレラウイルスは現在でも豚やイノシシにおける感染の報告に限られている。しかし BVD ウイルスやボーダー病ウイルスは、牛、豚、羊などの家畜やシカやキリンなどの野生動物からもウイルスが分離されており、宿主域の幅広さが認識されはじめている。BVD ウイルスが原因の牛ウイルス性下痢・粘膜病は、北欧を除く世界各地で発生が認められている。また豚コレラウイルスが原因の豚コレラは、アジア、ヨーロッパ、中南米などで現在も大きな問題となっている。豚コレラの国内での最終発生は 1992 年で、現在日本はワクチンを使用しない清浄国である。感染した豚は家畜伝染病予防法の法定伝染病として、口蹄疫、鳥インフルエンザの発生と同様に殺処分の対象となる。ボーダー病は羊の飼育が盛んな国で発生が認められるが、国内での発生はない。

野外から分離されるペスチウイルスは大きく **図 1** のよう

に分類される。豚コレラウイルスおよびボーダー病ウイルスの遺伝子型はそれぞれ 1 つであるが、BVD ウイルスは遺伝子型 1 と遺伝子型 2 に細分される。2003 年にオーストラリアで豚から分離されたボンゴワナウイルス¹⁾、野生の反芻獣から分離された Hobi²⁾、Giraffe³⁾、Antelope⁴⁾ などのウイルスは遺伝的に離れた位置にある。

2. ウイルスの基本性状

ウイルスは直径 40-60nm でエンベロープを有する⁵⁾。ウイルスゲノムは約 12.3kb のプラス 1 本鎖 RNA である^{6, 7)}。ウイルス遺伝子には 5' 末端のキャップ構造、また 3' 末端の polyA を共に欠く⁶⁻⁸⁾。Internal ribosomal entry site (IRES) を含む約 380bp の 5' 非翻訳領域⁹⁾ と 180-270bp の 3' 非翻訳領域の間に約 4000 のアミノ酸がコードされている^{6, 10, 11)}。ウイルス RNA は 1 本のポリプロテインとして翻訳された後、プロテアーゼ活性を有するウイルス蛋白 (N^{pro} , NS2, NS3) や宿主の Signalase, Signal peptide-peptidase などによりプロセッシングを受ける。開始コドンの直後は非構造蛋白 N^{pro} 、その後構造蛋白 (C, E^{rns} , E1, E2) をはさんで p7, NS2-3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B の順にコードされている^{6, 12-21)} (**図 2**)。非構造蛋白 N^{pro} と構造蛋白 E^{rns} はペスチウイルスに特有のウイルス蛋白であり、詳細は後述する。それ以外のウイルス蛋白は、他のフラビウイルス科、特に C 型肝炎ウイルスで明らかにされた機能を同様に有する²²⁾。

3. ウイルスの感染サイクル

ウイルスの細胞表面への吸着および侵入は感染の最初のステップである。BVD ウイルスは、牛の細胞表面に存在

連絡先

〒060-0818

北海道札幌市北区北 18 条西 9 丁目

北海道大学大学院獣医学研究科微生物学教室

TEL/FAX: 011-706-5208

E-mail: influ@vetmed.hokudai.ac.jp

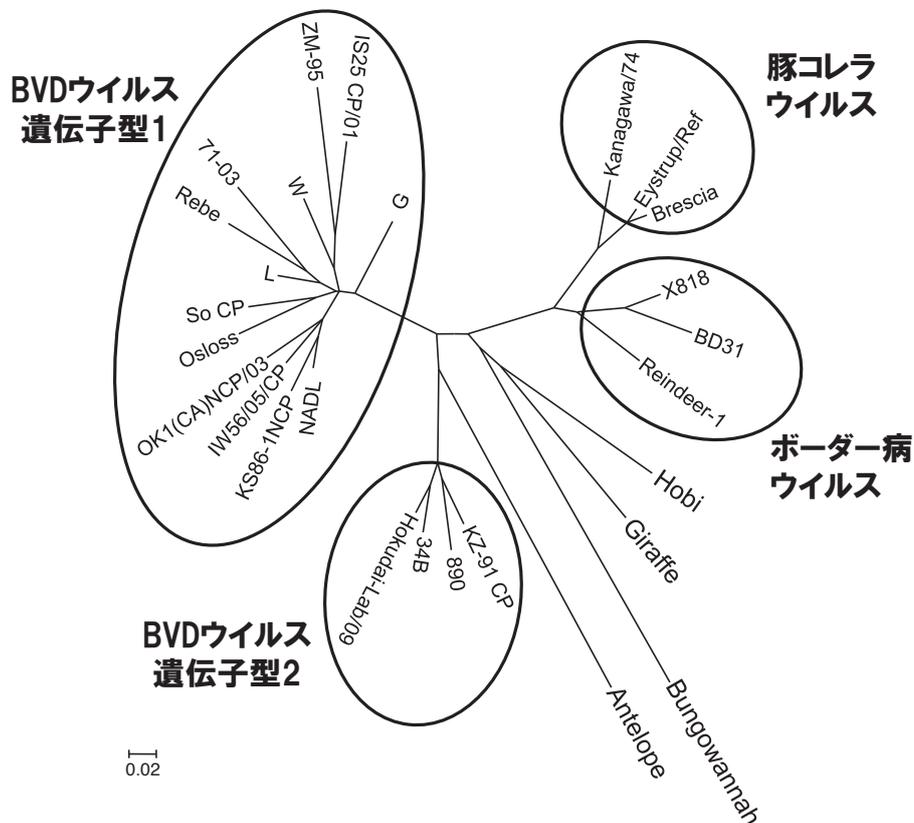


図1 ペスチウイルスの系統樹解析

ペスチウイルスは、牛ウイルス性下痢 (BVD) ウイルス、豚コレラウイルスおよびボーダー病ウイルスに大別される。その中で BVD ウイルスは遺伝子型 1 と遺伝子型 2 に細分される。また近年豚から分離されたボンゴワナウイルス (Bungowannah) や野生反芻獣から分離されたペスチウイルス (Hobi, Giraffe, Antelope) は、これらと遺伝的に離れて位置する。

する CD46 をレセプターとしてこれに表面糖蛋白 E2 が結合する²³⁻²⁵⁾。ウイルスはクラスリン依存性のエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれ²⁶⁾、脱核する。ウイルスゲノムの複製は NS3 以降 NS5B までの非構造蛋白により行われる^{27, 28)}。ウイルス蛋白の翻訳は、キャップ非依存的に IRES を用いてリボソーム上で行われる⁹⁾。翻訳されたポリプロテインは上述の通りプロセッシングを受け、個々のウイルス蛋白に分かれる。陽性の電荷を持ったコア蛋白はウイルス RNA と非特異的に結合し、ウイルスの粒子形成の最初のステップが始まる²⁹⁾。このコア蛋白と RNA の複合体 (ヌクレオプロテイン) は、E^{ms}, E1, E2 を含む小胞体の脂質二重膜で覆われる³⁰⁾。このウイルス粒子形成の制御には NS2-3-4A 複合体も役割を果たすことがわかってきたが^{31, 32)}、その分子メカニズムは不明である。ウイルス粒子は最終的にゴルジ体を通してエキソサイトーシスにより細胞外に放出される³⁰⁾。

4. 各ウイルスの宿主に対する病原性

ペスチウイルスの感染では、ウイルス側と宿主側の要因が絡まって複雑な病態をとる。その典型が BVD ウイルス

の牛への感染である (図 3)。ボーダー病ウイルスの感染による病態も BVD ウイルスのそれと似ている。一方、豚コレラウイルスの感染では胎子感染が起こることは希で、急性感染時に重篤な症状を示すことが多い。

1) BVD ウイルス

健康な牛が本ウイルスに急性感染すると、一過性の発熱、下痢、鼻汁、泌乳量の低下などの症状を呈する³³⁾。細菌や他のウイルスの混合感染により症状は重篤化することがあるが³⁴⁻³⁶⁾、宿主の免疫応答に伴って治癒することが多い。細胞変性効果 (CPE) を示さない BVD ウイルスが妊娠牛に感染するとウイルスは胎盤を通過する³⁷⁾。胎子へのウイルス感染により死産または流産が起こる³⁸⁾。また胎子の免疫機能が形成される胎齢 100 日前後に感染が成立すると、感染したウイルスも胎子の一部として認識されてしまうため、ウイルスに対して免疫学的に寛容な子牛が生まれる³⁹⁻⁴¹⁾。この子牛は持続感染牛と呼ばれ、生涯多量のウイルスを排泄し続けて周りの牛への慢性的な感染源となる^{42, 43)}。この持続感染牛で増殖する CPE を示さない BVD ウイルスが、持続感染牛の体内で変異して CPE を示すウイルスが変わると、牛は全身粘膜のびらんや潰瘍、食欲の廃絶、

ペスチウイルス属 (約12.3kb)

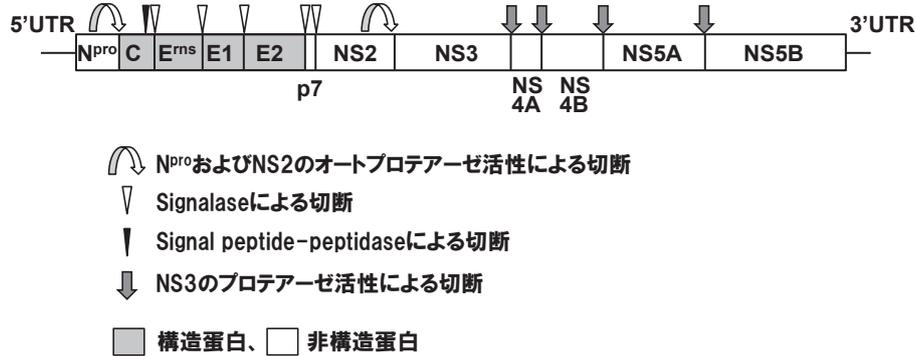


図2 ペスチウイルスのゲノム構造

翻訳されたポリプロテインは、ウイルス由来のプロテアーゼ、宿主由来の signalase や signal peptide-peptidase によってプロセッシングされる。

元気消失、水溶性下痢、血便などの重篤な症状を呈して、100% 死に至る³³⁾。この病態を粘膜病と呼ぶ。

持続感染牛の早期発見と淘汰が本病のコントロールに重要であり、国内では持続感染牛の摘発とワクチンによる予防が地道に行われている。米国と同様に、現在日本で流行している BVD ウイルスはその遺伝子と抗原性が年々変化しており、ワクチン株に含まれていない遺伝子型 1b のウイルスが主流となっている^{44,45)}。

2) 豚コレラウイルス

豚に豚コレラウイルスが感染すると、ウイルスはまず扁桃で増殖し、その後リンパ向性に全身に広がる⁴⁶⁾。ウイルス血症が起これ、高病原性株では 8-10 日で豚は急死する⁴⁷⁾。また中程度の病原性を持つウイルスは、豚に持続感染し数週間から数ヶ月の経過で死亡する。低病原性株が感染した場合、若齢の子豚のみが症状を示し、成豚は無症状で経過する。さらに病原性の低い株では、前述した BVD ウイルスと同様にウイルスは妊娠豚の胎盤を通過し胎子感染し、持続感染豚が生まれる。このようにウイルスの病原性は株により様々である⁴⁶⁾。

3) ボーダー病ウイルス

羊およびヤギの疾病で、急性感染では軽い発熱、まれに呼吸器症状や下痢を呈す³³⁾。胎子感染では免疫寛容、死産・流産、小脳形成不全、内水頭症、関節弯曲症を起これ、新生子羊は神経症状や体毛の異常を示す³³⁾。

4) ボンゴワナウイルス

2003 年にオーストラリア ニューサウスウェールズ州で子豚から初めて分離された¹⁾。遺伝的にはこれまで報告のあったペスチウイルスと大きく離れている¹⁾。BVD ウイルス、豚コレラウイルス、ボーダー病ウイルスと遺伝的に離れたペスチウイルスが野生反芻獣から分離されることはあったが²⁻⁴⁾、ボンゴワナウイルスは家畜である豚から分

離されたことが衛生対策上重要な意味を持つ。感染すると心筋炎を引き起こし、子豚は死亡することもある⁴⁸⁾。本ウイルスはこれまでのところオーストラリアでのみ分離されている。

5. ペスチウイルスの細胞病原性とその分子基盤

ペスチウイルスの野外株や実験室株の大半は、培養細胞に対して CPE を示さない株である。そのため特異抗体を用いたウイルス抗原の検出法が開発されるまではウイルス感染細胞にニューカッスル病ウイルスや水胞性口炎ウイルスを重感染させてペスチウイルスの存在を確認する方法が汎用されていた。1 型 IFN の産生を抑制するペスチウイルスが感染した細胞にニューカッスル病ウイルスを重感染すると、ニューカッスル病ウイルスの CPE が増強される。この方法は Exaltation of Newcastle disease (END) 法と呼ばれ、広く国内で利用された^{49,50)}。また END 法を示さないペスチウイルスの検出は感染細胞に水胞性口炎ウイルスを重感染させ、水胞性口炎ウイルスの増殖抑制によりペスチウイルスの有無を確認した⁵¹⁾。これらの原理はウイルス非構造蛋白 N^{pro} の 1 型 IFN の産生調節にあると後に説明された(後述の N^{pro} の機能の項目を参照されたい)⁵²⁻⁵⁶⁾。なお CPE を示さない豚コレラウイルスも特殊な豚由来腎臓細胞に接種するとアポトーシスを誘導し、例外的に CPE が認められる^{57,58)}。

前述の通り、野外で分離されるほとんどの BVD ウイルスと豚コレラウイルスは CPE を示さないウイルスである。これらのウイルスが感染した細胞では、N^{pro} や E^{ms} の機能によりアポトーシスが抑制されている⁵⁹⁻⁶¹⁾。一方致命的な粘膜病を発症した牛から分離される BVD ウイルスは、培養細胞に対して明瞭な CPE を示す。この細胞病原性の分子基盤として、① NS2 内への宿主遺伝子 Jiv の挿入⁶²⁻⁶⁴⁾

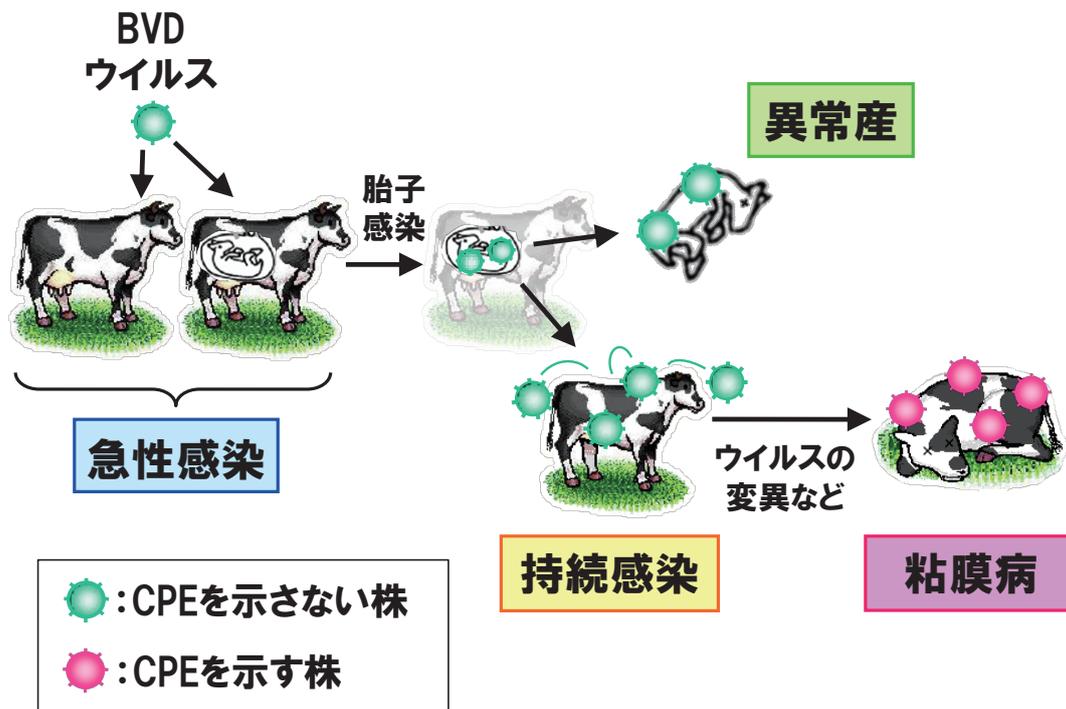


図3 BVD ウイルスの感染による様々な病型

BVD ウイルスは健康な牛に感染すると急性感染を起こす。また、妊娠牛に感染するとウイルスは胎盤を通過し胎子に感染し、異常産（流産や死産）を起こす。さらに、胎子の免疫機能の形成時期にウイルスが感染すると、生まれてきた子牛はBVD ウイルスを自己と認識し、生涯ウイルスを排泄する持続感染牛として生まれる。この持続感染牛に感染しているCPEを示さないウイルスがCPEを示すように変異すると、持続感染牛は粘膜病に移行し死に至る。

②NS2とNS3の間にユビキチンなどの宿主由来遺伝子の挿入⁶⁵⁻⁶⁷⁾ ③ゲノム中のウイルス遺伝子の繰り返しと宿主遺伝子の挿入^{11, 68, 69)} ④構造蛋白からNS2までを欠損し、NS3が直接蛋白として発現⁷⁰⁻⁷²⁾などの遺伝子構造の変化と、それに伴うNS2-3のNS2とNS3への開裂が認められる⁷³⁾。NS2-3の開裂により、細胞内でのウイルスRNAの蓄積や⁷⁴⁾、宿主細胞のDNA修復に重要なポリADPリボースポリメラーゼの分解により⁷⁵⁾、アポトーシスが誘導される^{76, 77)}。これがペスチウイルスの細胞病原性の分子メカニズムと考えられている。

6. ペスチウイルスの病原性の分子基盤

フラビウイルス科の他の属のウイルスと比べて、N^{pro}とE^{rns}がペスチウイルスに特有な蛋白である。これらはペスチウイルスの病原性に大きな役割を果たすことがわかってきた。これらを中心にペスチウイルスの病原性に関与するウイルス蛋白の機能に関する報告をまとめた。

1) N^{pro}

N^{pro}はポリプロテインのN末端にコードされている20kdの蛋白である。Glu22-His49-Cys69を活性中心とするオートプロテアーゼ活性があり、自身とコア蛋白の間を切断する^{20, 78)}。N^{pro}を欠損させたウイルスも培養細胞で増

殖するのでウイルスの複製には必須ではないが、N^{pro}の欠損により感染細胞でのI型IFN産生が増強される⁷⁹⁾。この報告以降、N^{pro}が自然免疫調節因子として機能するメカニズムに関する研究が進み、N^{pro}の持つプロテアーゼ活性とは独立してインターフェロン調節因子3 (IRF-3)をプロテアソーム系により分解し、I型IFNの産生を抑制することが明らかになった^{56, 80)}。I型IFN産生を誘導するウイルス株と抑制する株のN^{pro}のアミノ酸の比較から、112番目や136番目のアミノ酸がその差に重要であり、このアミノ酸は豚に対する病原性にも重要であることがわかった⁸¹⁾。さらに、N^{pro}はインターフェロン調節因子7 (IRF-7)を介する形質細胞様樹状細胞を中心とした自然免疫の抑制にも関与していることが明らかになった⁸²⁾。以上より、ペスチウイルスの非構造蛋白N^{pro}は、宿主の自然免疫を抑制することによりウイルスが増殖しやすい環境を作ることが明らかになった。

N^{pro}を介した自然免疫の抑制に関係する宿主側の因子としてTripartite motif 56 (TRIM56)が報告された⁸³⁾。TRIM56はE3ユビキチンリガーゼとして機能し、STINGとよばれるアダプタータンパク質⁸⁴⁾のユビキチン化を促進する⁸⁵⁾。このSTINGのユビキチン化によりリン酸化酵素TBK1が活性化され、IRF-3のリン酸化、そしてI型

IFNの発現が誘導される⁸⁵⁾。これまでインフルエンザウイルスの非構造蛋白NS1がTRIMファミリーのTRIM25のE3ユビキチンリガーゼ活性を阻害し、I型IFN産生誘導を阻害することが報告されていたが⁸⁶⁾、TRIM56とウイルス蛋白の相互作用が報告されたのは初めてである⁸³⁾。ペスチウイルスに特有な非構造蛋白N^{pro}の解析により、自然免疫に対抗するウイルスの新しい阻害機構がさらに解明されることを期待する。

2) E^{rns}

E^{rns}は44-48kdの糖蛋白で、ホモ二量体を形成しウイルス粒子表面に存在する^{17, 87)}。膜貫通領域をもたないのに、二量体のまま感染細胞上清中にも分泌される⁸⁸⁾。またE^{rns}に対する抗体は中和能を有する⁸⁹⁾。E^{rns}はT₂RNaseファミリーのリボヌクレアーゼ活性を有するが、この活性はウイルスの増殖複製には必須ではない⁹⁰⁾。E^{rns}はRNase活性を保持したまま細胞外に分泌されるので、2本鎖RNAによる細胞外からのI型IFN誘導を抑制する^{61, 91)}。このようにE^{rns}は、N^{pro}とは異なる作用機序によりI型IFNの誘導を抑制する。このRNase活性やホモ二量体の形成に重要なアミノ酸を置換した変異体は、豚や牛に対する病原性が低下した^{92, 93)}。以上より、ペスチウイルスの構造蛋白E^{rns}も宿主の自然免疫を抑制し、宿主でウイルスが増殖しやすい環境を作ることがわかった。

1) E1, E2

糖蛋白E1とE2はヘテロダイマーを、またE2は単独でホモダイマーを形成しウイルス粒子表面に局在する⁹⁴⁾。E2はE^{rns}と同様に中和抗体の標的となっている⁹⁵⁾。このE1およびE2蛋白の糖鎖付加が豚コレラウイルスの病原性に関係すること^{96, 97)}、またE2蛋白上の豚コレラウイルスとBVDウイルス、ポードー病ウイルスを識別できる表面抗原部位が豚コレラウイルスの病原性に関与することが報告されている⁹⁸⁾。

4) Core (C)

コア蛋白は14kdの蛋白でカプシドを構成する⁸⁷⁾。プラスに帯電したコア蛋白は非特異的にRNAと結合する²⁹⁾。細胞内での蛋白の安定化、細胞核-細胞質間の輸送、転写制御に関与するSmall ubiquitin-related modifier (SUMO) 蛋白⁹⁹⁾および細胞内シグナル伝達の足場蛋白として機能すると考えられているIQGAP¹⁰⁰⁾とコア蛋白がそれぞれ相互作用し、これらの相互作用を欠失した変異体は豚に対する病原性が低下した^{101, 102)}。

5) NS2-3

NS2-3は120kdの蛋白で、NS2のオートプロテアーゼ活性によりNS2(40kd)とNS3(80kd)に分かれる^{16, 103, 104)}。NS3はフラビウイルス科の他のウイルスと同様にN末端側にセリンプロテアーゼ^{19, 104)}、C末端側にRNAヘリケース活性¹⁰⁵⁾を有する。C型肝炎ウイルス同様、NS3のプロテアーゼ活性にはNS4Aがコファクターとして必要であ

る^{21, 106)}。BVDウイルスを用いた*in vitro*の試験では、ウイルス株の細胞病原性に関わらず感染後5~8時間後にNS2とNS3の開裂が認められる¹⁰⁷⁾。CPEを示す株では、感染後の時間に伴ってNS2-3の開裂はさらに加速される¹⁰⁷⁾。一方、CPEを示さない株では感染後9時間以降はNS2-3の開裂は認められない¹⁰⁷⁾。開裂したNS3/NS4Aのプロテアーゼ活性が感染細胞のアポトーシスを誘導するが、C型肝炎ウイルスとは異なりI型IFNの産生抑制には関与しない¹⁰⁸⁾。このアポトーシスの誘導がBVDウイルスに持続感染した牛が致死的な粘膜炎に移行するために重要と考えられている。しかし一見健康な持続感染牛の末梢血単核球や臓器中でもすでにNS2-3の開裂が認められる⁴²⁾など、持続感染牛が粘膜炎を発症するメカニズムの解明はこれからの課題である。

一方、豚コレラウイルスでは人工的に作出したCPEを示す株はウイルスRNAの蓄積とアポトーシスの誘導を促進するにもかかわらず、豚に対する病原性は親株より下がる¹⁰⁹⁾。これは野外で分離したCPEを示す豚コレラウイルスの感染実験の成績と一致している¹¹⁰⁾。つまりNS2-3の開裂は、ペスチウイルス共通の病原性マーカーではなく、あくまでもBVDウイルスに持続感染した牛が致死的な粘膜炎に移行する際の病原因子である。

6) NS4B

NS4Bは38kdの疎水性蛋白で、ヌクレオチド三リン酸分解酵素(NTPase)活性がある^{103, 111)}。ペスチウイルスのNS4Bの機能については不明なことが多いが、他のフラビウイルス科のウイルスと同様に小胞体膜に埋まる形で存在し、ウイルスゲノムの複製に関与すると考えられている^{112, 113)}。ペスチウイルスのNS4BにはToll/IL-1 receptor (TIR) 様のアミノ酸モチーフが存在し、この配列をアラニンに置き換えたウイルスは豚に対する病原性が親株より低下した¹¹⁴⁾。これはNS4BのTIR様ドメインが、Toll like receptor 7を介したサイトカインの誘導抑制に働くが、アミノ酸置換によりその機能が失われたためと考えられる¹¹⁴⁾。またNS4Bのアミノ酸変異がウイルス複製効率を上昇させ、これが豚に対する病原性の上昇の要因となることを最近筆者らが明らかにした(未発表データ)。NS4Bを含むウイルスゲノム複製ユニットのポリメラーゼ活性の調節に関する研究も病原性解明のために必要である。

7. おわりに

C型肝炎ウイルスの分子生物学の進歩の後を追いつながら、ペスチウイルスの増殖機構や病原性の分子基盤の解明がかなり進んだ。特に、ペスチウイルスに特有なN^{pro}とE^{rns}がそれぞれ別の作用機序で自然免疫を抑制し、病原性の発揮に重要な役割を担っている点は興味深い。しかし、BVDウイルスも豚コレラウイルスも急性感染だけでなく、慢性感染や持続感染など様々な病態があるが、その分子機

序はいずれも解明されていない。安全で効果の高いワクチンや治療薬を開発するためにも、ペストウイルスの病態解明をさらに進める必要がある。

謝辞

本稿を準備するにあたり、動物衛生研究所の亀山健一郎先生および北海道大学獣医学部の田村友和君に多大な協力を頂きました。また、亀山健一郎先生および日本獣医生命科学大学の青木博史先生には貴重な助言を頂きました。ここに改めて深謝します。

参考文献

- 1) Kirkland PD, Frost MJ, Finlaison DS, King KR, Ridpath JF, Gu X. Identification of a novel virus in pigs--Bungowannah virus: a possible new species of pestivirus. *Virus Res* 129:26-34, 2007
- 2) Schirrmeier H, Strebelow G, Depner K, Hoffmann B, Beer M. Genetic and antigenic characterization of an atypical pestivirus isolate, a putative member of a novel pestivirus species. *J Gen Virol* 85:3647-3652, 2004
- 3) Becher P, Orlich M, Shannon AD, Horner G, König M, Thiel HJ. Phylogenetic analysis of pestiviruses from domestic and wild ruminants. *J Gen Virol* 78:1357-1366, 1997
- 4) Vilcek S, Ridpath JF, Van Campen H, Cavender JL, Warg J. Characterization of a novel pestivirus originating from a pronghorn antelope. *Virus Res* 108:187-193, 2005
- 5) Moennig V, Plagemann PG. The pestiviruses. *Adv Virus Res* 41:53-98, 1992
- 6) Collett MS, Larson R, Belzer SK, Retzel E. Proteins encoded by bovine viral diarrhoea virus: the genomic organization of a pestivirus. *Virology* 165:200-208, 1988
- 7) Meyers G, Rumenapf T, Thiel HJ. Molecular cloning and nucleotide sequence of the genome of hog cholera virus. *Virology* 171:555-567, 1989
- 8) Deng R, Brock KV. 5' and 3' untranslated regions of pestivirus genome: primary and secondary structure analyses. *Nucleic Acids Res* 21:1949-1957, 1993
- 9) Fletcher SP, Jackson RJ. Pestivirus internal ribosome entry site (IRES) structure and function: elements in the 5' untranslated region important for IRES function. *J Virol* 76:5024-5033, 2002
- 10) Collett MS, Wiskerchen M, Welniak E, Belzer SK. Bovine viral diarrhoea virus genomic organization. *Arch Virol Suppl* 3:19-27, 1991
- 11) Meyers G, Tautz N, Stark R, Brownlie J, Dubovi EJ, Collett MS, et al.: Rearrangement of viral sequences in cytopathogenic pestiviruses. *Virology* 191:368-386, 1992
- 12) Collett MS, Moennig V, Horzinek MC. Recent advances in pestivirus research. *J Gen Virol* 70:253-266, 1989
- 13) Elbers K, Tautz N, Becher P, Stoll D, Rumenapf T, Thiel HJ. Processing in the pestivirus E2-NS2 region: identification of proteins p7 and E2p7. *J Virol* 70:4131-4135, 1996
- 14) Harada T, Tautz N, Thiel HJ. E2-p7 region of the bovine viral diarrhoea virus polyprotein: processing and functional studies. *J Virol* 74:9498-9506, 2000
- 15) Heimann M, Roman-Sosa G, Martoglio B, Thiel HJ, Rumenapf T. Core protein of pestiviruses is processed at the C terminus by signal peptide peptidase. *J Virol* 80:1915-1921, 2006
- 16) Lackner T, Müller A, König M, Thiel HJ, Tautz N. Persistence of bovine viral diarrhoea virus is determined by a cellular cofactor of a viral autoprotease. *J Virol* 79:9746-9755, 2005
- 17) Rumenapf T, Unger G, Strauss JH, Thiel HJ. Processing of the envelope glycoproteins of pestiviruses. *J Virol* 67:3288-3294, 1993
- 18) Bintintan I, Meyers G. A new type of signal peptidase cleavage site identified in an RNA virus polyprotein. *J Biol Chem* 285:8572-8584, 2010
- 19) Tautz N, Elbers K, Stoll D, Meyers G, Thiel HJ. Serine protease of pestiviruses: determination of cleavage sites. *J Virol* 71:5415-5422, 1997
- 20) Wiskerchen M, Belzer SK, Collett MS. Pestivirus gene expression: the first protein product of the bovine viral diarrhoea virus large open reading frame, p20, possesses proteolytic activity. *J Virol* 65:4508-4514, 1991
- 21) Xu J, Mendez E, Caron PR, Lin C, Murcko MA, Collett MS, et al.: Bovine viral diarrhoea virus NS3 serine proteinase: polyprotein cleavage sites, cofactor requirements, and molecular model of an enzyme essential for pestivirus replication. *J Virol* 71:5312-5322, 1997
- 22) Fields BN, Knipe DM, Howley PM. *Fields virology*. 5th ed. Philadelphia ; London: Wolters Kluwer Health / Lippincott Williams & Wilkins; 2007.
- 23) Tschernie DM, Evans MJ, Macdonald MR, Rice CM. Transdominant inhibition of bovine viral diarrhoea virus entry. *J Virol* 82:2427-2436, 2008
- 24) Krey T, Himmelreich A, Heimann M, Menge C, Thiel HJ, Maurer K, et al.: Function of bovine CD46 as a cellular receptor for bovine viral diarrhoea virus is determined by complement control protein 1. *J Virol* 80:3912-3922, 2006
- 25) Maurer K, Krey T, Moennig V, Thiel HJ, Rumenapf T. CD46 is a cellular receptor for bovine viral diarrhoea virus. *J Virol* 78:1792-1799, 2004
- 26) Grummer B, Grotha S, Greiser-Wilke I. Bovine viral diarrhoea virus is internalized by clathrin-dependent receptor-mediated endocytosis. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 51:427-432, 2004
- 27) Behrens SE, Grassmann CW, Thiel HJ, Meyers G, Tautz N. Characterization of an autonomous subgenomic pestivirus RNA replicon. *J Virol* 72:2364-2372, 1998
- 28) Moser C, Stettler P, Tratschin JD, Hofmann MA. Cytopathogenic and noncytopathogenic RNA replicons of classical swine fever virus. *J Virol* 73:7787-7794, 1999
- 29) Murray CL, Marcotrigiano J, Rice CM. Bovine viral diarrhoea virus core is an intrinsically disordered protein that binds RNA. *J Virol* 82:1294-1304, 2008

- 30) Murray CL, Jones CT, Rice CM. Architects of assembly: roles of Flaviviridae non-structural proteins in virion morphogenesis. *Nat Rev Microbiol* 6:699-708, 2008
- 31) Agapov EV, Murray CL, Frolov I, Qu L, Myers TM, Rice CM. Uncleaved NS2-3 is required for production of infectious bovine viral diarrhoea virus. *J Virol* 78:2414-2425, 2004
- 32) Moulin HR, Seuberlich T, Bauhofer O, Bennett LC, Tratschin JD, Hofmann MA, et al.: Nonstructural proteins NS2-3 and NS4A of classical swine fever virus: essential features for infectious particle formation. *Virology* 365:376-389, 2007
- 33) Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Chanock RM. *Fields virology*. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1996.
- 34) Potgieter LN, McCracken MD, Hopkins FM, Walker RD. Effect of bovine viral diarrhoea virus infection on the distribution of infectious bovine rhinotracheitis virus in calves. *Am J Vet Res* 45:687-690, 1984
- 35) Potgieter LN, McCracken MD, Hopkins FM, Walker RD, Guy JS. Experimental production of bovine respiratory tract disease with bovine viral diarrhoea virus. *Am J Vet Res* 45:1582-1585, 1984
- 36) Pritchard GC, Borland ED, Wood L, Pritchard DG. Severe disease in a dairy herd associated with acute infection with bovine virus diarrhoea virus, *Leptospira harjo* and *Coxiella burnetii*. *Vet Rec* 124:625-629, 1989
- 37) Brownlie J, Clarke MC, Howard CJ. Experimental infection of cattle in early pregnancy with a cytopathic strain of bovine virus diarrhoea virus. *Res Vet Sci* 46:307-311, 1989
- 38) Ross CE, Dubovi EJ, Donis RO. Herd problem of abortions and malformed calves attributed to bovine viral diarrhoea. *J Am Vet Med Assoc* 188:618-619, 1986
- 39) Brownlie J, Clarke MC, Howard CJ. Experimental production of fatal mucosal disease in cattle. *Vet Rec* 114:535-536, 1984
- 40) Corapi WV, Donis RO, Dubovi EJ. Monoclonal antibody analyses of cytopathic and noncytopathic viruses from fatal bovine viral diarrhoea virus infections. *J Virol* 62:2823-2827, 1988
- 41) Howard CJ, Brownlie J, Clarke MC. Comparison by the neutralisation assay of pairs of non-cytopathogenic and cytopathogenic strains of bovine virus diarrhoea virus isolated from cases of mucosal disease. *Vet Microbiol* 13:361-369, 1987
- 42) Kameyama K, Sakoda Y, Matsuno K, Ito A, Tajima M, Nakamura S, et al.: Cleavage of the NS2-3 protein in the cells of cattle persistently infected with non-cytopathogenic bovine viral diarrhoea virus. *Microbiol Immunol* 52:277-282, 2008
- 43) Kameyama K, Sakoda Y, Tamai K, Igarashi H, Tajima M, Mochizuki T, et al.: Development of an immunochromatographic test kit for rapid detection of bovine viral diarrhoea virus antigen. *J Virol Methods* 138:140-146, 2006
- 44) Matsuno K, Sakoda Y, Kameyama K, Tamai K, Ito A, Kida H. Genetic and pathobiological characterization of bovine viral diarrhoea viruses recently isolated from cattle in Japan. *J Vet Med Sci* 69:515-520, 2007
- 45) Ridpath JF, Lovell G, Neill JD, Hairgrove TB, Velayudhan B, Mock R. Change in predominance of Bovine viral diarrhoea virus subgenotypes among samples submitted to a diagnostic laboratory over a 20-year time span. *J Vet Diagn Invest* 23:185-193, 2011
- 46) Straw BE. *Diseases of swine*. 9th ed. Ames: Blackwell; 2006.
- 47) Dunne HW. Hog cholera (European swine fever). *Adv Vet Sci Comp Med* 17:315-359, 1973
- 48) Finlaison DS, King KR, Frost MJ, Kirkland PD. Field and laboratory evidence that Bungowannah virus, a recently recognised pestivirus, is the causative agent of the porcine myocarditis syndrome (PMC). *Vet Microbiol* 136:259-265, 2009
- 49) Kumagai T, Shimizu T, Ikeda S, Matumoto M. A new in vitro method (END) for detection and measurement of hog cholera virus and its antibody by means of effect of HC virus on Newcastle disease virus in swine tissue culture. I. Establishment of standard procedure. *J Immunol* 87:245-256, 1961
- 50) Kumagai T, Shimizu T, Matumoto M. Detection of hog cholera virus by its effect on Newcastle disease virus in swine tissue culture. *Science* 128:366, 1958
- 51) Shimizu Y, Furuuchi S, Kumagai T, Sasahara J. A mutant of hog cholera virus inducing interference in swine testicle cell cultures. *Am J Vet Res* 31:1787-1794, 1970
- 52) Chen Z, Rijnbrand R, Jangra RK, Devaraj SG, Qu L, Ma Y, et al.: Ubiquitination and proteasomal degradation of interferon regulatory factor-3 induced by N^{pro} from a cytopathic bovine viral diarrhoea virus. *Virology* 366:277-292, 2007
- 53) Gil LH, Ansari IH, Vassilev V, Liang D, Lai VC, Zhong W, et al.: The amino-terminal domain of bovine viral diarrhoea virus N^{pro} protein is necessary for alpha/beta interferon antagonism. *J Virol* 80:900-911, 2006
- 54) Hilton L, Moganeradj K, Zhang G, Chen YH, Randall RE, McCauley JW, et al.: The N^{pro} product of bovine viral diarrhoea virus inhibits DNA binding by interferon regulatory factor 3 and targets it for proteasomal degradation. *J Virol* 80:11723-11732, 2006
- 55) La Rocca SA, Herbert RJ, Crooke H, Drew TW, Wileman TE, Powell PP. Loss of interferon regulatory factor 3 in cells infected with classical swine fever virus involves the N-terminal protease, N^{pro}. *J Virol* 79:7239-7247, 2005
- 56) Seago J, Goodbourn S, Charleston B. The classical swine fever virus N^{pro} product is degraded by cellular proteasomes in a manner that does not require interaction with interferon regulatory factor 3. *J Gen Virol* 91:721-726, 2010
- 57) Sakoda Y, Yamaguchi O, Fukusho A. A new assay for classical swine fever virus based on cytopathogenicity in porcine kidney cell line FS-L3. *J Virol Methods* 70:93-101, 1998
- 58) Sakoda Y, Hikawa M, Tamura T, Fukusho A. Establishment of a serum-free culture cell line, CPK-NS,

- which is useful for assays of classical swine fever virus. *J Virol Methods* 75:59-68, 1998
- 59) Ruggli N, Bird BH, Liu L, Bauhofer O, Tratschin JD, Hofmann MA. N(pro) of classical swine fever virus is an antagonist of double-stranded RNA-mediated apoptosis and IFN-alpha/beta induction. *Virology* 340:265-276, 2005
 - 60) Johns HL, Bensaude E, La Rocca SA, Seago J, Charleston B, Steinbach F, et al.: Classical swine fever virus infection protects aortic endothelial cells from pIpC-mediated apoptosis. *J Gen Virol* 91:1038-1046, 2010
 - 61) Iqbal M, Poole E, Goodbourn S, McCauley JW. Role for bovine viral diarrhoea virus E^{1ns} glycoprotein in the control of activation of beta interferon by double-stranded RNA. *J Virol* 78:136-145, 2004
 - 62) Becher P, Meyers G, Shannon AD, Thiel HJ. Cytopathogenicity of border disease virus is correlated with integration of cellular sequences into the viral genome. *J Virol* 70:2992-2998, 1996
 - 63) Tautz N, Meyers G, Stark R, Dubovi EJ, Thiel HJ. Cytopathogenicity of a pestivirus correlates with a 27-nucleotide insertion. *J Virol* 70:7851-7858, 1996
 - 64) Rinck G, Birghan C, Harada T, Meyers G, Thiel HJ, Tautz N. A cellular J-domain protein modulates polyprotein processing and cytopathogenicity of a pestivirus. *J Virol* 75:9470-9482, 2001
 - 65) Meyers G, Tautz N, Dubovi EJ, Thiel HJ. Viral cytopathogenicity correlated with integration of ubiquitin-coding sequences. *Virology* 180:602-616, 1991
 - 66) Tautz N, Meyers G, Thiel HJ. Processing of poly-ubiquitin in the polyprotein of an RNA virus. *Virology* 197:74-85, 1993
 - 67) Baroth M, Orlich M, Thiel HJ, Becher P. Insertion of cellular NEDD8 coding sequences in a pestivirus. *Virology* 278:456-466, 2000
 - 68) Kameyama K, Sakoda Y, Tamai K, Nagai M, Akashi H, Kida H. Genetic recombination at different points in the N^{pro}-coding region of bovine viral diarrhoea viruses and the potentials to change their antigenicities and pathogenicities. *Virus Res* 116:78-84, 2006
 - 69) Nagai M, Sakoda Y, Mori M, Hayashi M, Kida H, Akashi H. Insertion of cellular sequence and RNA recombination in the structural protein coding region of cytopathogenic bovine viral diarrhoea virus. *J Gen Virol* 84:447-452, 2003
 - 70) Tautz N, Thiel HJ, Dubovi EJ, Meyers G. Pathogenesis of mucosal disease: a cytopathogenic pestivirus generated by an internal deletion. *J Virol* 68:3289-3297, 1994
 - 71) Meyers G, Thiel HJ. Cytopathogenicity of classical swine fever virus caused by defective interfering particles. *J Virol* 69:3683-3689, 1995
 - 72) Aoki H, Sakoda Y, Nakamura S, Suzuki S, Fukusho A. Cytopathogenicity of classical swine fever viruses that do not show the exaltation of Newcastle disease virus is associated with accumulation of NS3 in serum-free cultured cell lines. *J Vet Med Sci* 66:161-167, 2004
 - 73) Meyers G, Thiel HJ. Molecular characterization of pestiviruses. *Adv Virus Res* 47:53-118, 1996
 - 74) Vassilev VB, Donis RO. Bovine viral diarrhoea virus induced apoptosis correlates with increased intracellular viral RNA accumulation. *Virus Res* 69:95-107, 2000
 - 75) Hoff HS, Donis RO. Induction of apoptosis and cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by cytopathic bovine viral diarrhoea virus infection. *Virus Res* 49:101-113, 1997
 - 76) Zhang G, Aldridge S, Clarke MC, McCauley JW. Cell death induced by cytopathic bovine viral diarrhoea virus is mediated by apoptosis. *J Gen Virol* 77:1677-1681, 1996
 - 77) Lambot M, Hanon E, Lecomte C, Hamers C, Letesson JJ, Pastoret PP. Bovine viral diarrhoea virus induces apoptosis in blood mononuclear cells by a mechanism largely dependent on monocytes. *J Gen Virol* 79:1745-1749, 1998
 - 78) Rumenapf T, Stark R, Heimann M, Thiel HJ. N-terminal protease of pestiviruses: identification of putative catalytic residues by site-directed mutagenesis. *J Virol* 72:2544-2547, 1998
 - 79) Tratschin JD, Moser C, Ruggli N, Hofmann MA. Classical swine fever virus leader proteinase N^{pro} is not required for viral replication in cell culture. *J Virol* 72:7681-7684, 1998
 - 80) Bauhofer O, Summerfield A, Sakoda Y, Tratschin JD, Hofmann MA, Ruggli N. Classical swine fever virus N^{pro} interacts with interferon regulatory factor 3 and induces its proteasomal degradation. *J Virol* 81:3087-3096, 2007
 - 81) Ruggli N, Summerfield A, Fiebach AR, Guzylack-Piriou L, Bauhofer O, Lamm CG, et al.: Classical swine fever virus can remain virulent after specific elimination of the interferon regulatory factor 3-degrading function of N^{pro}. *J Virol* 83:817-829, 2009
 - 82) Fiebach AR, Guzylack-Piriou L, Python S, Summerfield A, Ruggli N. Classical swine fever virus N(pro) limits type I interferon induction in plasmacytoid dendritic cells by interacting with interferon regulatory factor 7. *J Virol* 85:8002-8011, 2011
 - 83) Wang J, Liu B, Wang N, Lee YM, Liu C, Li K. TRIM56 is a virus- and interferon-inducible E3 ubiquitin ligase that restricts pestivirus infection. *J Virol* 85:3733-3745, 2011
 - 84) Ishikawa H, Ma Z, Barber GN. STING regulates intracellular DNA-mediated, type I interferon-dependent innate immunity. *Nature* 461:788-792, 2009
 - 85) Tsuchida T, Zou J, Saitoh T, Kumar H, Abe T, Matsuura Y, et al.: The ubiquitin ligase TRIM56 regulates innate immune responses to intracellular double-stranded DNA. *Immunity* 33:765-776, 2010
 - 86) Gack MU, Albrecht RA, Urano T, Inn KS, Huang IC, Carnero E, et al.: Influenza A virus NS1 targets the ubiquitin ligase TRIM25 to evade recognition by the host viral RNA sensor RIG-I. *Cell Host Microbe* 5:439-449, 2009
 - 87) Thiel HJ, Stark R, Weiland E, Rumenapf T, Meyers G. Hog cholera virus: molecular composition of virions from a pestivirus. *J Virol* 65:4705-4712, 1991

- 88) Weiland F, Weiland E, Unger G, Saalmuller A, Thiel HJ. Localization of pestiviral envelope proteins E(rns) and E2 at the cell surface and on isolated particles. *J Gen Virol* 80:1157-1165, 1999
- 89) Weiland E, Ahl R, Stark R, Weiland F, Thiel HJ. A second envelope glycoprotein mediates neutralization of a pestivirus, hog cholera virus. *J Virol* 66:3677-3682, 1992
- 90) Schneider R, Unger G, Stark R, Schneider-Scherzer E, Thiel HJ. Identification of a structural glycoprotein of an RNA virus as a ribonuclease. *Science* 261:1169-1171, 1993
- 91) Magkouras I, Matzener P, Rumenauf T, Peterhans E, Schweizer M. RNase-dependent inhibition of extracellular, but not intracellular, dsRNA-induced interferon synthesis by Erns of pestiviruses. *J Gen Virol* 89:2501-2506, 2008
- 92) Tews BA, Schurmann EM, Meyers G. Mutation of cysteine 171 of pestivirus E^{rns} RNase prevents homodimer formation and leads to attenuation of classical swine fever virus. *J Virol* 83:4823-4834, 2009
- 93) Meyers G, Ege A, Fetzer C, von Freyburg M, Elbers K, Carr V, et al.: Bovine viral diarrhea virus: prevention of persistent fetal infection by a combination of two mutations affecting E^{rns} RNase and N^{pro} protease. *J Virol* 81:3327-3338, 2007
- 94) Weiland E, Stark R, Haas B, Rumenauf T, Meyers G, Thiel HJ. Pestivirus glycoprotein which induces neutralizing antibodies forms part of a disulfide-linked heterodimer. *J Virol* 64:3563-3569, 1990
- 95) Hulst MM, Westra DF, Wensvoort G, Moormann RJ. Glycoprotein E1 of hog cholera virus expressed in insect cells protects swine from hog cholera. *J Virol* 67:5435-5442, 1993
- 96) Fernandez-Sainz I, Holinka LG, Gavrillov BK, Prarat MV, Gladue D, Lu Z, et al.: Alteration of the N-linked glycosylation condition in E1 glycoprotein of Classical Swine Fever Virus strain Brescia alters virulence in swine. *Virology* 386:210-216, 2009
- 97) Risatti GR, Holinka LG, Fernandez Sainz I, Carrillo C, Lu Z, Borca MV. N-linked glycosylation status of classical swine fever virus strain Brescia E2 glycoprotein influences virulence in swine. *J Virol* 81:924-933, 2007
- 98) Risatti GR, Holinka LG, Carrillo C, Kutish GF, Lu Z, Tulman ER, et al.: Identification of a novel virulence determinant within the E2 structural glycoprotein of classical swine fever virus. *Virology* 355:94-101, 2006
- 99) Kerscher O. SUMO junction-what's your function? New insights through SUMO-interacting motifs. *EMBO Rep* 8:550-555, 2007
- 100) Noritake J, Watanabe T, Sato K, Wang S, Kaibuchi K. IQGAP1: a key regulator of adhesion and migration. *J Cell Sci* 118:2085-2092, 2005
- 101) Gladue DP, Holinka LG, Fernandez-Sainz IJ, Prarat MV, O'Donnell V, Vepkhvadze N, et al.: Effects of the interactions of classical swine fever virus Core protein with proteins of the SUMOylation pathway on virulence in swine. *Virology* 407:129-136, 2010
- 102) Gladue DP, Holinka LG, Fernandez-Sainz IJ, Prarat MV, O'Donnell V, Vepkhvadze NG, et al.: Interaction between Core protein of classical swine fever virus with cellular IQGAP1 protein appears essential for virulence in swine. *Virology* 412:68-74, 2011
- 103) Lamp B, Riedel C, Roman-Sosa G, Heimann M, Jacobi S, Becher P, et al.: Biosynthesis of classical swine fever virus nonstructural proteins. *J Virol* 85:3607-3620, 2011
- 104) Wiskerchen M, Collett MS. Pestivirus gene expression: protein p80 of bovine viral diarrhea virus is a proteinase involved in polyprotein processing. *Virology* 184:341-350, 1991
- 105) Warrenner P, Collett MS. Pestivirus NS3 (p80) protein possesses RNA helicase activity. *J Virol* 69:1720-1726, 1995
- 106) Tautz N, Kaiser A, Thiel HJ. NS3 serine protease of bovine viral diarrhea virus: characterization of active site residues, NS4A cofactor domain, and protease-cofactor interactions. *Virology* 273:351-363, 2000
- 107) Lackner T, Muller A, Pankraz A, Becher P, Thiel HJ, Gorbalenya AE, et al.: Temporal modulation of an autoprotease is crucial for replication and pathogenicity of an RNA virus. *J Virol* 78:10765-10775, 2004
- 108) Gamlen T, Richards KH, Mankouri J, Hudson L, McCauley J, Harris M, et al.: Expression of the NS3 protease of cytopathogenic bovine viral diarrhea virus results in the induction of apoptosis but does not block activation of the beta interferon promoter. *J Gen Virol* 91:133-144, 2010
- 109) Gallei A, Blome S, Gilgenbach S, Tautz N, Moennig V, Becher P. Cytopathogenicity of classical Swine Fever virus correlates with attenuation in the natural host. *J Virol* 82:9717-9729, 2008
- 110) Aoki H, Ishikawa K, Sekiguchi H, Suzuki S, Fukusho A. Pathogenicity and kinetics of virus propagation in swine infected with the cytopathogenic classical swine fever virus containing defective interfering particles. *Arch Virol* 148:297-310, 2003
- 111) Gladue DP, Gavrillov BK, Holinka LG, Fernandez-Sainz IJ, Vepkhvadze NG, Rogers K, et al.: Identification of an NTPase motif in classical swine fever virus NS4B protein. *Virology* 411:41-49, 2011
- 112) Weiskircher E, Aligo J, Ning G, Konan KV. Bovine viral diarrhea virus NS4B protein is an integral membrane protein associated with Golgi markers and rearranged host membranes. *Viol J* 6:185, 2009
- 113) Qu L, McMullan LK, Rice CM. Isolation and characterization of noncytopathic pestivirus mutants reveals a role for nonstructural protein NS4B in viral cytopathogenicity. *J Virol* 75:10651-10662, 2001
- 114) Fernandez-Sainz I, Gladue DP, Holinka LG, O'Donnell V, Gudmundsdottir I, Prarat MV, et al.: Mutations in classical swine fever virus NS4B affect virulence in swine. *J Virol* 84:1536-1549, 2010

Pestivirus

Yoshihiro SAKODA

Laboratory of Microbiology, Graduate School of Veterinary Medicine,
Hokkaido University, Kita-18 Nishi-9, Sapporo 060-0818, Japan
E-mail: influ@vetmed.hokudai.ac.jp

Members of the genus *Pestivirus*, are causative agents of economically important diseases for livestock and wild animals that occur worldwide, such as bovine viral diarrhoea, classical swine fever, and border disease of sheep. Pestivirus have novel insertions of host genes in the viral genome and functions of unique viral proteins, N^{pro} and E^{ns}, related to the pathogenicity although genomic structure is closely related to the other viruses of *Flaviviridae* family, especially hepatitis C virus. In this review, recent studies on the molecular basis of pathogenicity of pestivirus infections were summarized.