

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25850202

研究課題名(和文) イヌジステンパーウイルスの霊長類での病原性獲得機序の解明

研究課題名(英文) Molecular Determinant Of Canine Distemper Virus To Modulate Usage Of The Human Receptors

研究代表者

酒井 宏治 (SAKAI, KOUJI)

国立感染症研究所・その他部局等・主任研究官

研究者番号：70515535

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：サルから分離されたCYN07-dV株を用いて、H蛋白質に3つの変異パターンにより、ヒトSLAM利用が可能であることを明らかにした。しかし、これら変異は、野生型CDVイヌ分離株のヒトSLAM利用のための普遍的な変異ではなかった。野生型CDVイヌ分離株が、ヒトSLAMを利用するためには、サル分離株に独特の変異も必要であることが明らかにした。したがって、野生型CDVが霊長類であるサルにおいて流行した時点で、ヒトSLAMの効率的な利用に必要な変異の一つも獲得したが、それだけでは不十分であり、ヒトSLAMの効率的な利用には、更なる変異が必要であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：A canine distemper virus (CDV) strain, CYN07-dV, associated with a lethal outbreak in monkeys, used human signaling lymphocyte activation molecule as a receptor only poorly but readily adapted to use it following a R519S, D540G or P541S substitution in the hemagglutinin protein. Since CYN07-dV had an intrinsic ability to use human nectin-4, the adapted virus became able to use both human immune and epithelial cell receptors, as well as monkey and canine ones, suggesting that CDV can potentially infect humans. Unlike the CYN07-dV strain, these mutations did not confer hSLAM-using ability on the H proteins of wild-type CDV isolates. Our data demonstrated that a unique mutation of the CYN07-dV strain to adapt to humans and that the additional unique mutation in the H protein of wild-type CDV isolates is required to confer hSLAM-using ability.

研究分野：獣医学、ウイルス学、実験動物学

キーワード：CDV SLAM nectin4 ヒト 宿主域 受容体 イヌジステンパーウイルス

1. 研究開始当初の背景

近年、イヌジステンパーウイルス (CDV) の宿主域拡大が野生動物で問題となっている中、霊長類のサルにまでその感染が及んだ。本研究の目標は、『イヌジステンパーウイルスの霊長類での病原性獲得機序の解明』である。我々は、これまでに、サルで致死の流行を引き起こした CDV 分離株 (CYN07-dV 株) の性状解析、動物感染実験、レセプター指向性の解析を行い、in vitro 及び in vivo における、CYN07-dV 株のサルでの高い感受性を明らかにした。

2. 研究の目的

本申請では、CYN07-dV と通常の CDV 野外分離株 (野生型 CDV)、麻疹ウイルス (MeV) の3つの比較解析により、『サル分離株と野生型 CDV イヌ分離株の違いは?』と『CDV がヒトの脅威となり得るのか?』の2点の解明を試みた。

『サル分離株と野生型 CDV イヌ分離株の違いは?』については、サル分離株である CYN07-dV 株、野生型 CDV イヌ分離株、MeV との比較により、また『CDV がヒトの脅威となり得るのか?』については、ヒト SLAM 馴化株との比較、及びサルとヒトの SLAM 間の比較により、解明を試みた。

3. 研究の方法

(1) ウイルスのレセプター指向性及びウイルス増殖能の解析: 各レセプター (SLAM と nectin4) 発現細胞におけるレセプター指向性について、CYN07-dV と野生型 CDV イヌ分離株を用いて、ウイルス増殖能、H と F の発現プラスミドを用いた細胞融合能によりを解析した。

(2) 宿主のレセプター機能性の解析: サルとヒトの SLAM のアミノ酸一致率は 97% と高く、たった 10 アミノ酸の違いのみである。サル SLAM 発現プラスミドやこれら相違点のアミノ酸の変異を導入した SLAM 変異体発現プラスミドを用いて、CYN07-dV と野生型 CDV イヌ分離株のレセプター指向性を解析し、ヒトとサル SLAM の CDV 指向性の分子基盤の解明を試みた。

4. 研究成果

(1) レセプター指向性及びウイルス増殖能の解析

サルから分離された CYN07-dV 株をヒト SLAM 発現 Vero 細胞へ 1 継代馴化後、ブラッククローニングした。得られたヒト SLAM 馴化株には、H 蛋白質にそれぞれ 3 つの変異パターン (R519S, D540G, P541S) が認められ、それらヒト SLAM 馴化株は、イヌとサルに加え、ヒトの SLAM と nectin4 の両方も効率良く使えるウイルスであった (図 1-3)。また、サル分離株で得られた変異を、イヌ分離株に導入した場合、ヒト SLAM 利用能を獲得出来ない、もしくは本来の SLAM や nectin4 利用能

の低下が認められた (図 4)。したがって、これら変異 (R519S, D540G, P541S) は、本来の性状を保持しつつ、さらにヒト SLAM 利用能を獲得できる普遍的な変異でないことが明らかとなった。

【図 1】

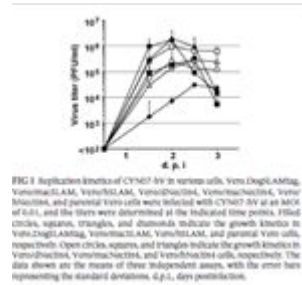


FIG 1 Replication kinetics of CYN07-IV in various cells. Vero, DugliSLAMing, VeroMacSLAM, VeroHSLAM, Vero/nectin4, Vero/nectin4, Vero/nectin4, and parental Vero cells were infected with CYN07-IV at an MOI of 0.1, and the titers were determined at the indicated time points. Filled circles, squares, triangles and diamonds indicate the growth kinetics in Vero, DugliSLAMing, VeroMacSLAM, VeroHSLAM, and parental Vero cells, respectively. Open circles, squares, and triangles indicate the growth kinetics in Vero/nectin4, VeroMacSLAM, and VeroHSLAM cells, respectively. The data shown are the means of three independent assays, with the error bars representing the standard deviations, d.p.i., days post-infection.

【図 2】

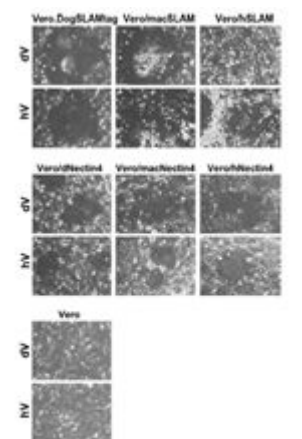


FIG 2 Syncytium induction in various cells upon infection with CYN07-IV and CYN07-dV. Vero, DugliSLAMing, VeroMacSLAM, VeroHSLAM, Vero/nectin4, Vero/nectin4, Vero/nectin4, and Vero cells were infected with CYN07-IV and CYN07-dV at an MOI of 0.1, cultured, and observed under a phase-contrast microscope. Syncytia induced in Vero, DugliSLAMing, VeroMacSLAM, and VeroHSLAM cells at 36 h p.i., in Vero/nectin4, Vero/nectin4, Vero/nectin4 cells at 36 h p.i., and in Vero cells at 36 h p.i. are shown.

【図 3】

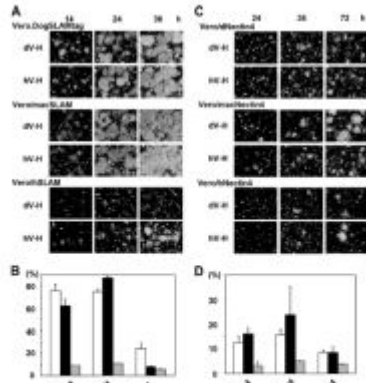


FIG 3 Cell-to-cell fusion induction in various cells upon infection with CYN07-IV and CYN07-dV. Vero cells expressing His-CMV-CYN07-dV or CYN07-IV (1:1) were infected with a mixture of plasmids encoding enhanced green fluorescent protein (EGFP) (EGFP-C2) and CDV F1 (pEGFP-C1) and/or pEGFP-C2 (1:1) or pEGFP-C2 (1:1) (1:1) at 14, 24, and 36 h post-infection. (A, C) Fluorescence microscopy images of 20,000 eightfold magnified cells at 14, 24, and 36 h post-infection. (B, D) Bar graphs of fusion percentage. Scale bars represent 100 µm. White and black scale bars indicate the expression of His-CMV-CYN07-dV or CYN07-IV (1:1), respectively. Long horizontal bars indicate the 1% threshold. The data shown are the means of three independent assays (10-50 cells) for each condition for 14, 24, 36, and 72 h post-infection for each cell type. Error bars represent the standard deviations.

【図 4】

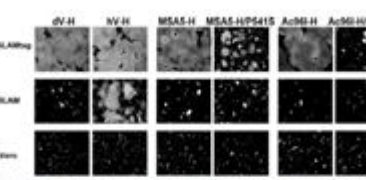


FIG 4 Effect of the P541S substitution on the cell-to-cell fusion-inducing capability of different CDV F1 proteins. Vero, DugliSLAMing, VeroMacSLAM, and parental Vero cells were transfected with a mixture of plasmids encoding EGFP (EGFP-C2), CDV F1 protein (pEGFP-C1), and different F1 protein as follows: 1) protein of the CYN07-IV (dV), MSAS-H, and A-561-H; and their possessing the P541S mutation (1b) in protein of CYN07-dV possessing the P541S mutation corresponds to the CYN07-IV (1) protein. The cells were then cultured and observed using a fluorescence microscope. Cell fusion induced at 36 h post-infection is shown.

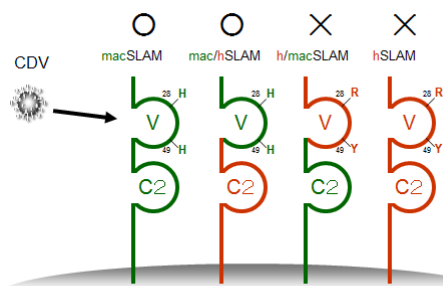
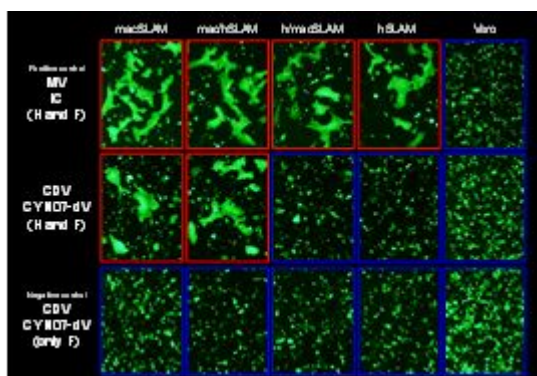
そこで、イヌ分離株は有していない、サル分離株に独特の変異もヒト SLAM 利用には必要ではないかと考えた。H タンパク質のアミノ酸配列比較では、5ヶ所 (S24F, E276V, Q392R, D435Y, I542F) にサル分離株に特徴的な変異が認められ、そのうち1箇所 (I542F) は受容体相互作用領域であったため、その関与が強く考えられた。サル分離株でヒト SLAM 利用に必要な3つの変異 (R519S もしくは D540G もしくは P541S) とサル分離株の独特の変異 I542F をそれぞれイヌ分離株に変異導入解析したところ、サル分離株と同様に、本来の性状を保持しつつ、さらにヒト SLAM を効率よく利用できた。

以上より、CDV が霊長類であるサルにおいて流行した時点で、ヒト SLAM の効率的な利用に必要な変異の一つも獲得したと考えられた。ただし、ヒト SLAM の効率的な利用には、更なる変異も必要であることが明らかとなった。

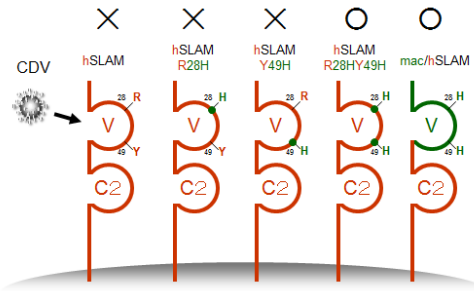
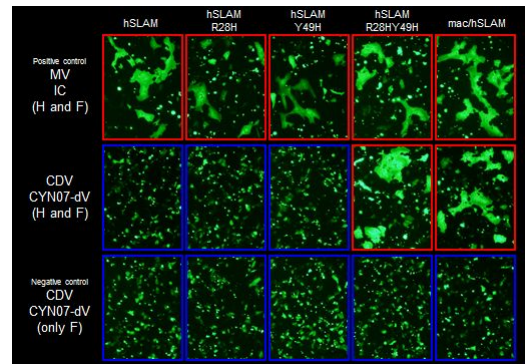
#### (2) レセプター機能性の解析

SLAM は、V 領域と C2 領域からなり、V 領域が H 蛋白質との結合を担う。予想通り、V 領域が hSLAM、C2 領域が macSLAM 由来のキメラ SLAM は CDV H 蛋白質の受容体として機能しなかったが、その逆の V 領域が macSLAM、C2 領域が hSLAM 由来のキメラ SLAM は受容体として機能できた (図 5)。hSLAM と macSLAM の V 領域の配列を比較したところ、2 つのアミノ酸置換のみ認められた。hSLAM の V 領域に macSLAM の 2 つの変異 (R28H, Y49H) を点変異導入したところ、両方の変異を導入した変異体でのみ、CDV H 蛋白質の受容体として機能した (図 6)。以上より、この2つのアミノ酸により、ヒトとサルの CDV への感受性が決定されると考えられた。

【図 5】



【図 6】



#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計1件)

Sakai K, Yoshikawa T, Seki F, Fukushi S, Tahara M, Nagata N, Ami Y, Mizutani T, Kurane I, Yamaguchi R, Hasegawa H, Saijo M, Komase K, Morikawa S, Takeda M. (2013) Canine distemper virus associated with a lethal outbreak in monkeys can readily adapt to use human receptors. Journal of virology 87 7170-7175.

〔学会発表〕(計8件)

Sakai K, Seki F, Tahara M, Otsuki N, Ami Y, Yamaguchi R, Saijo M, Komase K, Morikawa S, Takeda M. High potential of canine distemper virus in the ability to use macaca and human receptors. XV International Conference on Negative Strand Viruses, Granada, Spain, June 16-21, 2013

酒井宏治, 関文緒, 網康至, 西條政幸, 森川茂, 山口良二, 駒瀬勝啓, 竹田誠 『サルから分離された犬ジステンパーウイルスのヒト受容体利用能獲得に必要な変異』、第156回日本獣医学会学術集会講演要旨集、岐阜、2013年9月

PRATAKPIRIYA Watanyoo, 関文緒, 大槻紀之, 酒井宏治, 福原秀雄, 片本宏, 平井卓哉, TECHANGAMSUWAN Somporn, LAN Nguyen, 前仲勝実, 竹田誠, 山口良二 『Nectin4 は上皮に局在する犬ジステンパーウイルス特異的受容体である』、第156回日本獣医学会学術集会、岐阜、2013

年 9 月  
酒井宏治, 關文緒, 網康至, 染谷健二,  
田原舞乃, 大槻紀之, 西條政幸, 森川茂,  
山口良二, 駒瀬勝啓, 竹田誠 『犬ジス  
テンパーウイルスのヒト SLAM 利用能獲  
得に必要な変異』、第 61 回日本ウイルス  
学会学術集会、神戸、2013 年 11 月  
大槻紀之, 中津祐一郎, 久保田耐, 関塚  
剛, 關文緒, 酒井宏治, 黒田誠, 山口良  
二, 竹田誠 『イヌジステンパーウイル  
スの V タンパクはヒト肺胞上皮細胞での  
ウイルス増殖において重要な役割を果た  
す』第 61 回日本ウイルス学会学術集会、  
神戸、2013 年 11 月  
酒井宏治 『犬ジステンパーウイルスの  
霊長類レセプター利用に関する解析』  
Third Negative Strand Virus - Japan  
Symposium、沖縄、2014 年 1 月  
Makoto Takeda, Kouji Sakai, Fumio Seki,  
and Noriyuki Otsuki. Host range and  
cell tropism determinants of measles  
virus and canine distemper virus, 第  
62 回日本ウイルス学会学術集会、シンポ  
ジウム 1 「ウイルス増殖と宿主因子  
Viral replication and host factors-」  
横浜、2014 年 11 月  
吉田康貴, 酒井宏治, 喜多俊介, 福原秀  
雄, 柳雄介, 竹田誠, 前仲勝実 『イヌジ  
ステンパーウイルス H 蛋白質における  
P541S 変異が受容体 SLAM との相互作用に  
及ぼす影響』、第 62 回日本ウイルス学会  
学術集会、横浜、2014 年 11 月

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

酒井 宏治 (Sakai Kouji)

国立感染症研究所・ウイルス第三部・主任研  
究官

研究者番号 : 70515535

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号 :