

令和元年6月7日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08804

研究課題名(和文) パラインフルエンザウイルスの粒子形成機構の解析と新規ワクチンの開発

研究課題名(英文) Analysis of virus particle formation of paramyxovirus and development of new vaccines

研究代表者

竹内 薫 (Takeuchi, Kaoru)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：00192162

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：牛パラインフルエンザウイルス3型の遺伝子改変系を用いて膜(M)タンパク質遺伝子を欠損するウイルスを回収した。このMタンパク質遺伝子欠損ウイルス感染細胞に変異を加えたMタンパク質を発現させることによりMタンパク質の機能解析を行った。その結果、Mタンパク質のアミノ末端、カルボキシ末端の数アミノ酸がウイルスの粒子形成に重要であることがわかった。牛下痢症ウイルス(BVDV)のE2タンパク質を発現する組換えBPIV3を構築し、ハムスターに接種したところBVDVに対する中和抗体が誘導された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の結果は、牛パラインフルエンザウイルス3型(BPIV3)に非常に近縁なウイルスであるヒトパラインフルエンザウイルス3型(HPIV3)の粒子形成機構の解析に役立つと思われる。これらの結果は、まだワクチンの開発されていないHPIV3に対するワクチン開発あるいは抗ウイルス薬開発に役立つ可能性がある。また、我々が開発したBPIV3の遺伝子操作系は牛の各種ウイルス感染症に対するワクチン開発に利用出来る可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We successfully recovered membrane (M) protein gene-deficient bovine parainfluenza virus type 3 (BPIV3) using our reverse genetics system. We analyzed the function of the M protein in virus particle formation by transfecting M protein expressing plasmids into cells infected with M protein gene-deficient BPIV3. We found that a few amino acids in both amino and carboxy-termini of the M protein are important for BPIV3 virus particle formation. We generated recombinant BPIV3 expressing the E2 protein of bovine viral diarrhea virus (BVDV). When hamsters were infected with this recombinant BPIV3, neutralizing antibodies against BVDV were detected in sera of infected hamsters, indicating that this recombinant BPIV3 would be useful as a vaccine against BVDV.

研究分野：ウイルス

キーワード：パラミクソウイルス Mタンパク質 牛下痢症 牛白血病 ワクチン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) ヒトに感染する呼吸器ウイルスとしては、インフルエンザウイルス、パラインフルエンザウイルス、RSウイルス、メタニューモウイルス等が挙げられる。これらの呼吸器ウイルスに毎年世界中の多くの人々が罹患している。上気道、下気道感染症を起こし、特に、老人、幼児、乳幼児への感染では重篤になるケースも多い。呼吸器ウイルスによる感染症はその重要性にも関わらず未解明な点が多い。これらのウイルスの呼吸器特異的な感染・増殖機構も不明のままである。牛パラインフルエンザウイルス3型(BPIV3)は典型的なパラミクソウイルスであり、牛に感染して軽度の呼吸器症状(いわゆる輸送熱)を呈するが、細菌の二次感染により重篤な牛呼吸器症候群(BRDC)を引き起こす事が知られている。BPIV3は、培養細胞で良く増殖し、ヒトに対する病原性も無く取扱いが容易であり、古くからヒト呼吸器ウイルス研究のモデルとして使われてきた。最近、私たちは、BPIV3のウイルスゲノム改変技術(リバースジェネティクス)の開発に成功した。そこで、この技術を用いて任意の変異を導入したBPIV3を作製し、呼吸器ウイルスの呼吸器特異的な感染・増殖機構を研究することを着想した。呼吸器ウイルスに関しては、インフルエンザウイルス以外、ヒト用ワクチンは実用化されていないのが現状である。呼吸器ウイルス感染症の制圧がこれからのウイルス学に課せられた問題の一つである。

(2) 上述のようにBPIV3は自然宿主である牛に軽度の呼吸症状を引き起こすが弱毒生ワクチンも開発されている。また、BPIV3の感染は一過性であり宿主の免疫機構により排除されるので牛の乳や肉を食用に供する際の安全性が高い。したがって、BPIV3弱毒生ワクチン株の遺伝子操作系を確立して異種抗原を発現する組換えBPIV3を構築することが出来れば牛用のワクチンとして利用出来る可能性があると考えられた。

2. 研究の目的

(1) BPIV3を含む呼吸器ウイルスについては、なぜ呼吸器の上皮細胞特異的に感染・増殖するのかといった基本的な問題も未だ解明されていない。細胞apical面へのウイルスタンパク質やゲノムRNA輸送機構、ウイルス粒子の形成・出芽機構も十分解明されていない。これらの知見は、安全で有効なワクチン、あるいは抗ウイルス剤を開発する際にも重要である。BPIV3のウイルス粒子形成機構と呼吸器特異的な細胞指向性(トロピズム)の解析のためには、BPIV3の膜タンパク質の解析が重要である。BPIV3の膜タンパク質はM、F、HNタンパク質の3種類であるが、これらのタンパク質がウイルスの粒子形成に具体的にどのように関わっているか不明な点が多い。そこで、今回は膜タンパク質のひとつであるMタンパク質遺伝子を欠損したBPIV3を構築し、変異を加えたMタンパク質をトランスに供給することにより、Mタンパク質の機能解析を行うことを目的とした。

(2) BPIV3が牛の各種ウイルス感染症に対する組換えワクチンのプラットフォームとして利用出来るかどうかを調べるため、牛下痢症ウイルス(BVDV)の主要抗原であるE2を発現する組換えBPIV3および牛白血病ウイルス(BLV)の主要抗原であるenvを発現する組換えBPIV3を構築し免疫原性を評価すること、BPIV3ワクチン株(BN-CE株)を用いたBPIV3の遺伝子操作系を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) これまで行われてきたパラミクソウイルス粒子形成の研究では、プラスミド発現系を用いてこれらのタンパク質を培養細胞に一過性に発現させウイルス様粒子(Virus-like particles; VLP)形成を調べる方法(Schmitt et al, J Virol, 2002,他)が主流であった。しかし、培養細胞を用いたプラスミドからのタンパク質発現系は、ウイルスゲノム・ヌクレオカプシド複合体(RNP)が無い状態であり、本来のウイルス粒子形成を正確に反映していないのではないかという指摘が以前よりあった。そこで、この問題を解決するため、まずリバースジェネティクスを用いて個々の膜タンパク質を欠損させたBPIV3を作製した。M遺伝子欠損BPIV3の作製: EGFP発現BPIV3 BN-1株の完全長cDNAプラスミドより制限酵素とPCR法を用いてM遺伝子を削除した。この完全長cDNAプラスミドとN、P、Lタンパク質発現プラスミドに加えてMタンパク質発現プラスミドをHeLa細胞にトランスフェクションし、Mタンパク質発現プラスミドをトランスフェクションしたVero細胞と混合培養することによりM遺伝子欠損ウイルス(rBPIV3 M-EGFP)を回収した。Mタンパク質の機能解析: 変異を導入したMタンパク質発現プラスミドをトランスフェクションしたVero細胞にrBPIV3 M-EGFPを感染させ上清に放出されたウイルスを回収した。放出されたウイルスはBPIV3に対する抗体を用いたウェスタンブロッティングにより評価した。感染性ウイルスはMDBK細胞を用いEGFPの蛍光を指標にして定量した。

(2) 次に、野外株あるいはM遺伝子を個別に欠損させたBPIV3を細胞に感染させ、細胞表面上でのウイルス粒子形成の有無、培地中へのウイルス粒子放出の有無、ウイルス粒子の形状、培地中に放出されたウイルスの感染性、欠損させた膜タンパク質の他のウイルスタンパク質の

局在に与える影響を共焦点レーザー顕微鏡、生化学的方法を用いて、M、F、HN タンパク質のウイルス粒子形成における機能を解析した。

(3) 牛下痢症、牛白血病に対するワクチンを作製するため、牛下痢症の病因ウイルスである BVDV の E2 タンパク質、牛白血病の病因ウイルスである BLV の膜タンパク質である env を発現する組換え BPIV3 を作製した。BVDV E2 タンパク質を発現する組換え BPIV3 に関してはハムスターに経鼻接種して BVDV に対する中和抗体誘導能を評価した。

(4) 日本で使用されている BPIV3 の弱毒生ワクチン株である BN-CE 株の完全長ゲノム cDNA 構築し、BN-CE 株のリバースジェネティクス系を構築した。

4. 研究成果

(1) BPIV3 に非常に近縁なヒトパラインフルエンザウイルス 3 型を用いたこれまでの報告と全く異なり、M タンパク質のアミノ末端、カルボキシ末端をわずかに削っただけで感染性ウイルスは回収されなくなった。M タンパク質はその全域にわたって重要な機能が割り当てられているものと思われる。これまで、パラインフルエンザウイルスの粒子形成機構は、ウイルスタンパク質 cDNA プラスミドを細胞にトランスフェクションしてウイルス様粒子 (VLP) の形成を評価する方法、あるいは、変異を導入したウイルスをリバースジェネティクスで作製して感染性ウイルスの増殖を評価する方法で行われてきた。しかしながら、前者はウイルス RNP 複合体が無いなどウイルス感染細胞の内部を正確には反映していないという問題があり、後者は導入した変異がウイルス増殖に強く影響する場合、組換えウイルス自体が取れないという問題があった。今回の方法は、ウイルスタンパク質の機能を解析する良い方法だと考えられる。今後、電子顕微鏡、超解像顕微鏡を用いて M タンパク質のウイルス粒子形成における機能を検討していく予定である。

(3) BVDV E2 に関しては、先行研究により、BVDV E2 タンパク質をそのまま培養細胞で発現させても正常には発現しないことが報告されていたので、VSV G タンパク質のシグナル配列、膜貫通ドメイン、細胞内ドメインを付加した BVDV E2 タンパク質遺伝子を構築し、BPIV3 の転写開始配列と転写終結配列を両端に付加し、BPIV3 完全長 cDNA プラスミドの N 遺伝子と P 遺伝子の間に挿入した。このプラスミドより、私たちの開発したリバースジェネティクス系により感染性 BPIV3 (BPIV3-E2) を回収した。BVDV E2 に対する抗血清を用いて Western blotting を行い BPIV3-E2 感染細胞中に E2 タンパク質が発現していることを確認した。また、BVDV E2 タンパク質に対する抗血清を用いて蛍光抗体法を行い、BPIV3-E2 感染細胞の細胞表面に BVDV E2 タンパク質が発現している事を確認した。BPIV3-E2 をハムスターに経鼻接種して経時的に採血したところ、BVDV に対する中和抗体 (~256 倍) が検出された。BLV env に関しては、BLV env を発現する組換え BPIV3 (BPIV3-env) を回収することが出来た。また、BLV env に対するモノクローナル抗体を用いて BPIV3 env 感染細胞の細胞表面に env が発現されていることを確認した。

(4) BPIV3 の野外株 (BN-1 株) の完全長ゲノム cDNA の一部をワクチン株 (BN-CE 株) の相当する領域で順次、置換し、最終的に BN-CE 株の完全長ゲノム cDNA を構築した。この完全長ゲノム cDNA から感染性ウイルスを回収することに成功した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 4 件)

(1) Matsuura R, Takada M, Kokuho T, Tsuboi T, Kameyama KI, Takeuchi K. A single L288I substitution in the fusion protein of bovine parainfluenza virus type 3 enhances virus growth in semi-suitable cell lines. Arch Virol. 2017 Aug;162(8):2409-2413. doi: 10.1007/s00705-017-3378-1. Epub 2017 Apr 27 (査読有)

(2) Takada M, Matsuura R, Kokuho T, Tsuboi T, Kameyama KI, Takeuchi K. Reciprocal complementation of bovine parainfluenza virus type 3 lacking either the membrane or fusion gene. J Virol Methods. 2017 Nov;249:25-30. doi: 10.1016/j.jviromet.2017.08.010. Epub 2017 Aug 24. (査読有)

(3) Van Nguyen N, Kato SI, Nagata K, Takeuchi K. Differential induction of type I interferons in macaques by wild-type measles virus alone or with the hemagglutinin protein of the Edmonston vaccine strain. Microbiol Immunol. 2016 Jul;60(7):501-5. doi: 10.1111/1348-0421.12392. doi: 10.1111/1348-0421.12392. (査読有)

(4) Kubota M, Takeuchi K, Watanabe S, Ohno S, Matsuoka R, Kohda D, Nakakita SI,

Hiramatsu H, Suzuki Y, Nakayama T, Terada T, Shimizu K, Shimizu N, Shiroishi M, Yanagi Y, Hashiguchi T. Trisaccharide containing 2,3-linked sialic acid is a receptor for mumps virus. Proc Natl Acad Sci U S A. 2016 Oct 11;113(41):11579-11584. (査読有)

〔学会発表〕(計 4 件)

(1) Haruna Ueda, Kaoru Takeuchi. Labeling of paramyxovirus HA(HN) proteins with EGFP using SpyTag/SpyCatcher system (上田遥菜、竹内 薫、SpyTag/SpyCatcher システムを用いたパラミクソウイルス HA(HN)タンパク質のEGFP 標識)第 66 回日本ウイルス学会学術集会 京都: 2018.10.28-11.30.

(2) Haruna Ueda, Kaoru Takeuchi. Function of the bovine parainfluenzavirus type 3 M protein in virus particle formation (上田遥菜、竹内 薫、牛パラインフルエンザウイルス 3 型 M タンパク質のウイルス粒子形成における機能解析)第 65 回日本ウイルス学会学術集会 大阪: 2017.10.24-11.26.

(3) Marina Takada, Kaoru Takeuchi. Rescue of defective bovine parainfluenzavirus type 3 strains by complementation (高田麻里奈、竹内 薫、欠損型牛パラインフルエンザウイルス 3 型の相互補完的回収方法の検討)第 64 回日本ウイルス学会学術集会 札幌: 2016.10.23-11.25.

(4) Marie Kubota, Kaoru Takeuchi, Shumpei Watanabe, Shinji Ohno, Rei Matsuoka, Daisuke Kohda, Shin-ichi Nakakita, Hiroaki Hiramatsu, Yasuo Suzuki, Tetsuo Nakayama, Tohru Terada, Kentaro Shimizu, Nobutaka Shinizu, Yusuke Yanagi, Takao Hashiguchi, Linear saccharide moiety containing a2,3-linked sialic acid, rather than the sialic acid alone, constitutes a receptor for mumps virus (a2,3 結合型シアル酸を含む末端三糖がムンプスウイルスの機能的受容体である)第 64 回日本ウイルス学会学術集会 札幌: 2016.10.23-11.25.

〔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:
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:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：亀山健一郎

ローマ字氏名：(KAMEYAMA, Ken-ichiro)

研究協力者氏名：村上賢二

ローマ字氏名：(MURAKAMI, Kenji)

研究協力者氏名：間 陽子

ローマ字氏名：(AIDA, Yiko)

研究協力者氏名：永田恭介

ローマ字氏名：(NAGATA, Kyosuke)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。