

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：12605

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2019

課題番号：16K15059

研究課題名(和文)新規ニューロトレーサーウイルスと組織透明化技術を用いた単独神経回路可視化法の開発

研究課題名(英文)Development of a single neural circuit visualization method using a novel neurotracer virus and a tissue transparency technique.

研究代表者

谷口 隆秀 (TANIGUCHI, TAKAHIDE)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：70282803

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：豚血球凝集性脳脊髄炎ウイルス(PHEV) 67N株は齧歯類の神経細胞に効率よく感染し、シナプスを介して隣接する神経細胞に感染することから、安全性の高い新規ニューロトレーサーウイルスとして開発するための基礎研究を行った。67N株ゲノムの全塩基配列を解析し、ウイルスの神経細胞への感染に重要なSタンパク質に20アミノ酸の置換を発見した。大腸菌発現組換えNタンパク質を抗原として、抗Nモノクローナル抗体(MAb)を作製した。このMAbを用いた間接蛍光抗体法によりPHEV感染神経細胞を検出、感染神経細胞のトレースが可能であった。組換えNタンパク質を抗原として、高感度で特異性の高いELISA法を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PHEVはコロナウイルスとしては特異な神経細胞指向性を示すウイルスである。特に67N株は齧歯類の神経細胞に感染し、シナプスを介して隣接する神経細胞に感染が進み、病原性も低いことから安全性の高い新規ニューロトレーサーウイルスとして有望である。一方、最近インフルエンザ様呼吸器感染症を引き起こすPHEVが豚から分離され、遺伝子変異による組織指向性の急変の可能性が示唆された。本研究で得られた、67N及びOSN204株のゲノム塩基配列解析データやモノクローナル抗体、新規ELISA法はPHEVのニューロトレーサーとして開発のみならず、遺伝子変異による宿主や組織指向性の変化の機構解明に役立つものと思われる。

研究成果の概要(英文)：Porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus (PHEV) 67N strain efficiently infects rodent nerve cells. The virus strain infects adjacent neurons through synapses, and thus I conducted basic research to develop the 67 strain as a novel, safe neurotracer virus. We determined the whole genome sequence of 67N strain and found 20 amino acid substitutions in the S protein, which is important for the virus to infect neurons. Anti-N monoclonal antibodies (MAb) were produced using E. coli-expressed recombinant N protein as the antigen. I could detect PHEV-infected nerve cells and trace neuronal connection by the indirect fluorescent antibody method using these MAbs. And a highly sensitive and specific ELISA method for the detection of anti-PHEV antibodies was developed using recombinant N protein and extracted virus protein from PHEV infected cells as an antigen.

研究分野：ウイルス学

キーワード：コロナウイルス 神経回路 コネクトーム解析 イメージング 発光タンパク質

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

複雑な精神活動を担う脳の高次機能は、膨大な数のニューロンがシナプスを介した複雑な神経回路網を構築することにより初めて発揮される。この複雑で精巧な神経回路網を解析し、様々な機能に応じた詳細な神経回路地図を作製することは、脳がこのような高次機能を発現する機構を理解する上で重要な手がかりとなる。

複雑なニューロンネットワークを持つ哺乳類において、すべてのニューロンの神経接続を解明しニューロネットワークマップを作製するコネクトーム解析を実現するためには、従来のニューロトレーシング技術では不可能な、単独ニューロンとその神経回路を選択的に可視化する新たなニューロトレーサーの開発が不可欠である。

2. 研究の目的

特異的シナプス結合を介した神経回路網の解析はコレラ毒素や WGA などの植物レクチンのように神経細胞に親和性があり、神経細胞内・軸索内を移動し、シナプスを介して輸送されるニューロトレーサーを用いて行われてきた。しかし、これらの神経解剖学的トレーサーは注入部位の多数の神経細胞に取り込まれて複数の神経回路を染色してしまうことから、単独の神経回路の選択的な可視化は不可能である。また、狂犬病ウイルス、単純ヘルペスウイルス、オーエスキー病ウイルスなどの神経向性ウイルスがウイルス型ニューロトレーサーとして検討されてきたが、これらのウイルスはその強い病原性から人や自然宿主への感染が懸念されて取り扱いが難しい上、単独神経細胞への感染が困難であった。

そこで、高神経親和性で病原性が極めて低く、経シナプ的に神経回路に感染していく豚血球凝集性脳脊髄炎ウイルス (PHEV) 67N 株を新たなニューロトレーサーウイルスとしての有用性を検討するとともに、単独神経回路をトレース可能な新規ニューロトレーシングウイルスの作製系を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) PHEV 67N 株 N 遺伝子のクローニング、組換え N タンパク質の作製と抗 N タンパク質モノクローナル抗体 (MAb) の作製。ウイルス感染神経細胞を蛍光抗体法によって染色し、神経回路を追跡するための抗 PHEV N タンパク質 MAb を作製した。

(2) PHEV の日本での浸潤状況を確認するため、組換え N タンパク質およびウイルス感染細胞抽出抗原を用いた抗 PHEV 抗体検出のための ELISA 法を開発した。

(3) 報告のある PHEV のゲノム情報は極めて少ないため、神経に高い感染能をもつ PHEV 67N 株のゲノムの全塩基配列および日本で分離され神経親和性の極めて低い OSN204 株の構造タンパク質遺伝子の塩基配列を決定していたが、さらに既報の複数の PHEV 株、近縁のウイルココロナウイルスおよびヒトコロナウイルス OC43 等のゲノムと比較し、神経親和性の有無に関わる遺伝子変異の解析を試みた。

(4) 実験動物モデルとして齧歯類の神経細胞への特異的感染性を確認するため、ラットおよびヒトの神経細胞株およびアストログリア細胞株への PHEV の感染性について *in vitro* で検討し、さらにマウス脳初代混合培養を用いて PHEV67N 株の神経細胞での特異的感染性について検討した。

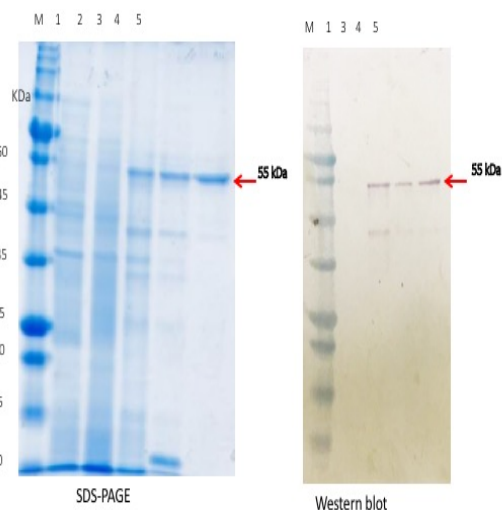
(5) 別種のウイルスと感受性細胞株を併用した遺伝子相同組換え法による蛍光タンパク質導入 PHEV 作製について検討した。

4. 研究成果

(1) 大腸菌を用いた組換えタンパク質発現系を用いて、組み換え PHEV N タンパク質の大量発現を行った (図 1)。得られた組換え N タンパク質を抗原としてマウスを免疫し、定法に従って MAb の作製を試み、3 クローンの抗 PHEV N タンパク質 MAb 産生ハイブリドーマを得た。

(2) PHEV 特異抗体を検出するため、作製した組換え N タンパク質および PHEV 感染細胞から抽出したウイルス抗原 (可溶性抗原) を ELISA 抗原と

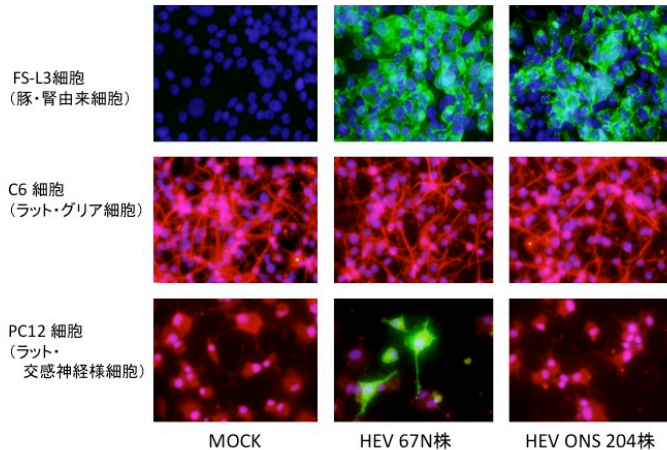
Expression and Purification of recombinant PHEV N protein (55kDa)



した間接 ELISA 法の開発を試みた。両抗原とも抗 PHEV 抗体を高感度に検出可能な ELISA 抗原として使用可能であったが、特に PHEV 可溶性抗原を用いた ELISA 法は非常に高感度で特異性も極めて良好であり、基礎研究のみならず血清疫学調査にも有効であることが期待される。

(3) 決定済みの PHEV 67N 株ゲノムの全塩基配列および ONS204 株ゲノム C 末 8kb の塩基配列をウイルスの細胞への吸着に重要と思われる S タンパク質遺伝子および HE タンパク質遺伝子の推定アミノ酸配列について解析した。HE タンパク質およびウイルスレセプターへの吸着・細胞への侵入に関わる S タンパク質の推定されるアミノ酸配列を比較したところ、HE タンパク質では 15 アミノ酸残基の相違が、S1 領域で 12 アミノ酸残基、S2 領域で 8 アミノ酸残基の相違が確認され、これらのアミノ酸、特に S1 領域の相違が神経細胞への親和性の相違に関与している可能性が推測された。

(4) ラットおよびヒトの神経細胞株およびアストログリア細胞株での PHEV の感染性と増殖能について *in vitro* で検討したところ、67N 株は神経細胞への分化誘導の有無にかかわらずラット PC-12 細胞に感染、増殖した。特に分化誘導後の PC-12 細胞での増殖能は極めて高かった。一方、グリア細胞およびヒト神経細胞での増殖は認められなかった (図 2)。また、ONS204 株はラット、ヒトの神経細胞、グリア細胞とも感染・増殖は認められなかった。さらに、より生体における状態に近い



HEV 67N 株は豚由来感受性細胞とラット PC12 細胞に感染・増殖した (緑色蛍光)。

マウス脳初代混合培養へ PHEV を接種し、感染 18 時間後に IFA でウイルス抗原を蛍光染色したところ、神経細胞特異的にウイルス抗原が検出され、各種グリア形細胞を含むその他の細胞ではウイルス抗原は検出されなかった。

(5) ネココロナウイルスおよびその感受性細胞 fcwf-4 を用いた二重遺伝子相同組換え法を用いて PHEV 67 N 株への蛍光タンパク質遺伝子導入を検討したところ、増殖能は低いものの培養上清中に多量の PHEV が放出されていることが明らかとなった。そこで様々な動物種の培養細胞を用いて PHEV の感染、増殖能について検討したところ、多くの細胞株で増殖能は低いものの CPE を示さず PHEV が増殖し、培養上清中にウイルス粒子を放出しており、これらの細胞株を相同組み換えに用いることが出来ないことが明らかとなった。検討した多くのウイルス-細胞株の組み合わせのうち、PHEV の二重遺伝子相同組換え法に使用可能なウイルス-細胞株を 1 組発見し、現在さらに解析中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 谷口隆秀・中川美佳・堀口雅史・白濱百合
2. 発表標題 豚血球凝集性脳脊髄炎ウイルス（PHEV）高神経細胞親和性67N株と非親和性ONS204株の培養細胞での増殖性とゲノム塩基配列の比較
3. 学会等名 第160回 日本獣医学会学術集会 鹿児島大学
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 CHAU Thi Huyen Trang, Hideki HAYASHIDANI, Takahide TANIGUCHI
2. 発表標題 Development of a recombinant nucleocapsid protein based ELISA for the detection of antibodies against Porcine Hemagglutinating Encephalomyelitis (PHEV)
3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会 農研機構（茨城県つくば市）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----