

令和元年6月11日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15372

研究課題名(和文) I型ネコ伝染性腹膜炎ウイルスの利用するウイルス受容体の同定

研究課題名(英文) Identification of virus receptor for type I feline infectious peritonitis virus

研究代表者

土岐 朋義 (Doki, Tomoyoshi)

北里大学・獣医学部・助教

研究者番号：40792396

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：ネコ伝染性腹膜炎(FIP)の原因ウイルスであるFIPウイルス(FIPV)にはI型とII型の2つの血清型が存在する。I型FIPVの吸着時に利用するウイルス受容体はII型FIPVとは異なることが証明されているが、その分子は未だ同定されていない。そこで申請者はプルダウン法を応用してI型FIPVのウイルス受容体の同定を試みた。ウイルス受容体と相互作用させるベイトとしてI型FIPV Sタンパク質のS1領域をFcタグと融合させた組換えタンパク質を作製した。しかし、この組換えタンパク質は感受性細胞であるfcwf-4細胞と相互作用が認められず、ウイルス受容体の同定には至らなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

I型FIPVの吸着時に利用するウイルス受容体は未だ同定されていない。申請者はウイルス受容体とFIPVのSタンパク質の相互作用を利用してウイルス受容体の同定を試みた。しかし、I型FIPV Sタンパク質はII型FIPV Sタンパク質と異なり、感受性株化細胞への結合性が非常に乏しいことが明らかになった。これはI型FIPVのウイルス受容体の同定及びI型FIPVの株化細胞に対する感染経路を調べていく上で意義のある知見であるといえる。

研究成果の概要(英文)：Feline infectious peritonitis (FIP) is caused by FIP virus (FIPV). FIPV is classified into 2 serotypes, type I and type II FIPV. Although virus receptor for type I FIPV is confirmed that it is different from type II, it has not been identified. We investigated virus receptor for type I FIPV by pull-down assay. We developed recombinant Fc-tagged S1 domain of type I FIPV S protein as a bait that interact to virus receptor. However, the recombinant S1 domain did not interact with type I FIPV-sensitive cell line fcwf-4. Thus, we could not identify virus receptor for type I FIPV.

研究分野：獣医感染症学

キーワード：猫伝染性腹膜炎ウイルス ウイルス受容体

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

## 1. 研究開始当初の背景

ネコ伝染性腹膜炎（FIP）はイェネコおよびネコ科動物の致死性ウイルス感染症である。これまで、FIPを治療するために国内外で様々な研究が試みられてきたが、未だにFIPに対する有効な治療方法は確立していない。FIPは飼いネコの死亡原因の第3位であり、感染症としては第1位の死亡原因である。したがって、獣医臨床の現場では、FIP予防薬および治療法の確立が望まれている（図1）。

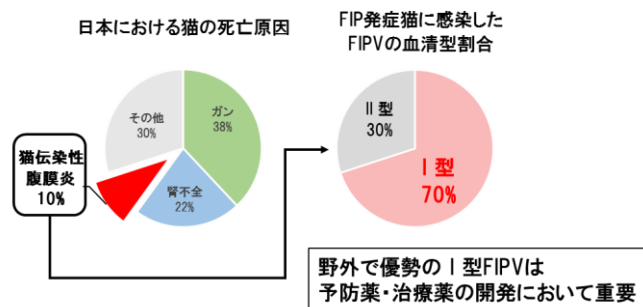
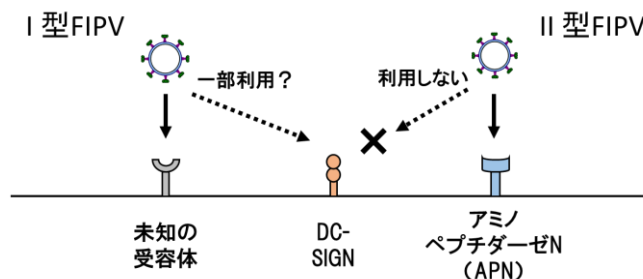


図1. 国内の猫の死亡原因とFIPVの血清型

FIPの原因ウイルスであるFIPウイルス（FIPV）にはI型とII型の2つの血清型が存在し、野外においてはI型FIPVが優勢である。したがって、I型FIPVに対するワクチンおよび抗ウイルス薬を開発することは非常に重要である。しかし、II型FIPVと比較してI型FIPVは株化細胞における増殖性が悪いため、実験的取り扱いが難しい。このような理由から、I型FIPVは研究に用いられることが少なく、I型FIPVの感染機構には不明な点が多い。特に、I型FIPVの吸着時に利用するウイルス受容体はII型FIPVとは異なることが証明されているが、その分子は未だ同定されていない（図2）。



申請者らはI型FIPVのアミノ酸配列由来ペプチドがウイルスの吸着を抑制することを報告した（Doki et al., 2015., *Virus Res* 204:13-20.）。即ち、I型FIPVが受容体と結合すると考えられるSpikeタンパク質のアミノ酸配列を同定した。この知見を応用してI型FIPVの受容体が同定できれば、I型FIPVの感染・増殖メカニズムの解明が急速に進展し、治療薬および予防薬の開発が大きく前進することが期待される。

## 2. 研究の目的

### (1) I型FIPVが感染時に利用するウイルス受容体の同定

I型FIPVに感受性のある株化細胞（fcwf-4細胞）を用いてI型FIPVのウイルス受容体を同定する。また、その受容体がin vivoでの標的細胞の1つであるネコ単球およびネコマクロファージにおいても機能的な受容体であることを証明する。

### (2) 受容体タンパク質におけるウイルス結合部位の同定

受容体タンパク質のどの部位がウイルスと結合するかという情報は抗ウイルス薬を検索する上で非常に有用である。我々は、受容体タンパク質のアミノ酸配列を基に発現させたポリペプチドを用いて、ウイルスと結合する領域を同定する。さらに、このような領域のアミノ酸配列を有するポリペプチドはそれ自身がFIPVの受容体結合領域をマスクすることでウイルス感染を抑制する抗ウイルス薬として応用可能か否かを検討する。

### (3) I型FIPV感染時におけるネコDC-SIGNと同定した受容体の関係

ネコDC-SIGNはI型FIPVのコレセプターである可能性が報告されている（Regan et al., 2010., *J Virol* 84:7917-7921.）。I型FIPV感染において、同定した受容体とネコDC-SIGNが共役しているか否かを明らかにする

### 3. 研究の方法

#### (1) 組換え I 型 FIPV S タンパク質の発現系の構築

I 型 FIPV の受容体探索はプルダウン法により行う (図 3)。プルダウン法のベイトとして用いるタグ付 I 型 FIPV S タンパク質の発現系を構築する。申請者の同定した I 型 FIPV S タンパク質のレセプター結合領域を含む S1 領域をタグと融合させ、哺乳細胞の培養上清中に一過性発現させる。プルダウン法に用いるベイトは、融合させたタグによる立体的相互作用障害を受けることが問題となる。培養上清中のタグ付 S1 領域をアフィニティー精製し、精製したタグ付 S1 領域が I 型 FIPV 感受性細胞に結合すること、および I 型 FIPV の感染を競合的に阻害することを確認し、ウイルス受容体への相互作用障害がないことを確かめる。

#### (2) I 型 FIPV に対するウイルス受容体の分離・同定

精製したタグ付 S1 領域 (ベイト) を精製用セファロースゲルに結合させ、そこに I 型 FIPV 感受性細胞のライセートを反応させて、ベイトと結合するタンパク質を精製する。精製されたタンパク質に対して質量分析による解析を行い、得られた配列と類似する配列からウイルス受容体であるタンパク質を推定する。さらに、ウイルス受容体候補タンパク質の遺伝子をクローニングし、株化細胞にトランスフェクションすることで I 型 FIPV への感受性が変化するか否かを確かめる。また、受容体候補タンパク質を抗体、ネコ DC-SIGN をマンナンでそれぞれブロックし、候補タンパク質が株化細胞およびネコ単球、ネコマクロファージにおいて機能的受容体であることおよび受容体候補タンパク質とネコ DC-SIGN が共役しているかを明らかにする。

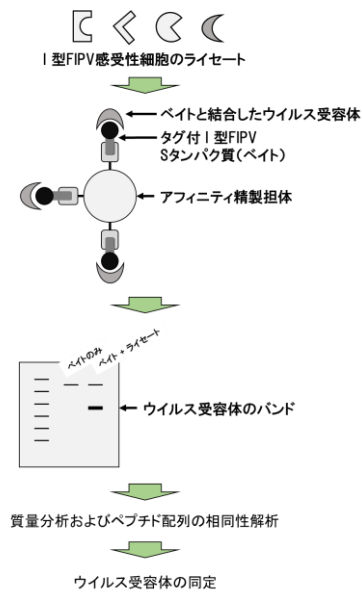


図3 プルダウン法によるウイルス受容体の同定

### 4. 研究成果

#### (1) 組換え I 型 FIPV S タンパク質の発現系の構築

I 型 FIPV S タンパク質のレセプター結合領域を含む S1 領域をタグと融合させた組換えタンパク質を哺乳細胞の培養上清中に一過性に発現させた。当初、I 型 FIPV KU-2 株のシグナル配列を含む領域を Fc タグと融合させた融合タンパク質の発現ベクターを構築したが、アフィニティー精製が可能でタンパク質の発現は認められなかった。そこでシグナル配列を IL-2 の分泌シグナルに置き換えた Fc 融合タンパク質の発現ベクターを再構築したところ、培養上清中に分泌される組換えタンパク質を発現させることに成功した。FIPV 感染猫血清を用いた western blot 解析を行ったところ、精製した組換えタンパク質は FIPV S タンパク質としての抗原性を有することを確認した。また、組換えタンパク質は天然型の FIPV S タンパク質と同様にホモ三量体構造を形成している可能性が示唆された。

#### (2) I 型 FIPV に対するウイルス受容体の分離・同定

精製したタグ付 I 型 FIPV S タンパク質をベイトとしてプルダウン法を実施し、相互作用するタンパク質の同定を試みた。しかしながら、プルダウン法では相互作用するタンパク質を同定することが出来なかった。代替として行ったファーストウェスタン法においても同様であった。そこで、ベイトであるタグ付 I 型 FIPV S タンパク質が I 型 FIPV 感受性細胞である fcwf-4 細胞に結合するか否かをフローサイトメトリー法を用いて確認したところ、I 型 FIPV S タンパク質が fcwf-4 細胞に結合している事実は確認できなかった。付加したタグが FIPV S タンパク質とウイルス受容体の相互作用を阻害する可能性を踏まえ、対照として作製したタグ付 II 型 FIPV S タンパク質の fcwf-4 細胞に対する結合性を確認したところ、II 型 FIPV S タンパク質は fcwf-4 細胞に結合した。さらにこの結合は、II 型 FIPV のウイルス受容体であるアミノペプチダーゼ N に対するモノクローナル抗体により阻害されることを確認した。これらを踏まえると、I 型 FIPV S タンパク質の fcwf-4 細胞に対する結合性の欠如は、タグによる立体障害によるものではない可能性が示唆された。fcwf-4 細胞は I 型 FIPV に感受性を持つ株化細胞である。一方、fcwf-4 細胞は組換え I 型 FIPV S タンパク質との結合親和性が非常に乏しいか示さないことは Cham らによっても報告されているが、その理由は明らかになっていない (Cham et al., 2017. Microbiol. immunol. 61:318-327)。今後は pH、温度、塩濃度、そしてプロテアーゼの添加など結合時の条件を検討することで結合親和性を向上させられるか否かを検討する必要がある。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 1 件）

Doki, T., Yabe, M., Takano, T., Hohdatsu, T. 2018. Differential induction of type I interferon by type I and type II feline coronaviruses in vitro. Res. Vet. Sci. 120:57-62. 10.1016/j.rvsc.2018.09.002 (査読有)

〔学会発表〕（計 1 件）

土岐朋義, 梅村悠香, 伊藤瑞枝, 小林晋, 笹内綾乃, 平野享, 渡部伸一, 窪田庄太郎, 高野友美, 宝達勉. 2018. I型猫伝染性腹膜炎ウイルス温度感受性変異株の解析. 第161回 日本獣医学学会学術集会.

## 6. 研究組織

※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。