

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19319

研究課題名(和文)ゲノム編集した培養細胞を用いた鳥インフルエンザウイルス空気伝播性獲得機構の解明

研究課題名(英文)A study of airborne transmission of avian influenza virus using genome-edited cultured cells

研究代表者

村上 晋(Murakami, Shin)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・准教授

研究者番号：10636757

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文):鳥、ヒト由来インフルエンザAウイルスはそれぞれ、ヒト型、鳥型受容体と結合し感染する。ウイルスの宿主域を決定する仕組みの解明にはウイルスの受容体指向性の研究が必須だが、そのためには受容体指向性を解析するためのツールが必要である。本研究では、CRISPR/Cas9法により鳥型、ヒト型受容体をノックアウトしたMDCK細胞を樹立した。またこれらのノックアウト細胞におけるウイルスの増殖性を調べることで、ウイルスの受容体指向性解析に有用であることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの方法では、A型インフルエンザウイルスの受容体指向性の解析には特殊な試薬や方法が必要であり、容易には実施できなかった。また生物学的活性と受容体結合性の関係も明らかにすることはできなかった。本研究で作製したシアル酸ノックアウトMDCK細胞は、A型インフルエンザウイルスの受容体指向性の解析に有用である。また、in vitroでの空気伝播するポテンシャルを保持するウイルスの研究にも有用であると考えられる。

研究成果の概要(英文): Influenza A viruses bind to terminal -2,3-linked or -2,6-linked sialic acid, which are preferentially recognized by avian and human viruses, respectively, as receptors. Although studies on receptor tropism among viruses are important to elucidate factors influencing the viral host range, specialized tools are required to analyze its receptor binding potential. In this study, we established modified MDCK cells, wherein either avian-type or human-type receptors were knocked out (KO) via the CRISPR/Cas9 system, and assessed viral replication in these KO cells to evaluate viral receptor tropism.

研究分野：ウイルス学

キーワード：インフルエンザウイルス

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

季節性インフルエンザは毎年冬期に流行を繰り返しているが、数十年に一度の割合で季節性ウイルスとは抗原性の異なる新型ウイルスが世界的に大規模な流行(パンデミック)を起こす。ひとたびパンデミックが発生すれば、多数の死者、罹患者が出ることが予測され、その場合は社会機能が麻痺する可能性が高い。

ヒトの季節性インフルエンザウイルスは主にヒトの上部気道に発現しているヒト型レセプター(ガラクトースと 2,6 結合したシアル酸を末端に持つ糖鎖)をウイルス表面の HA が認識して感染する。一方、鳥インフルエンザウイルスは鳥型レセプター(ガラクトースと 2,3 結合したシアル酸を末端に持つ糖鎖)を認識して感染する。ヒトの上部気道には鳥型レセプターがほとんど発現していないため、鳥インフルエンザウイルスがヒトに感染することはまれである。つまり種の壁が存在する。

パンデミックウイルスは、自然宿主である水禽由来のウイルスがニワトリやブタなどの中間宿主を経て、ウイルスの表面抗原であるヘマグルチニン(HA)などが変異し、ヒトへの感染性およびヒト-ヒト間での伝播性獲得した結果、発生する。しかし今後どのようなウイルスがどのような変異を獲得してパンデミックを起こすかは予測不可能である。

これまでの研究では空気伝播する鳥由来ウイルスを得るために、インフルエンザウイルス空気伝播モデル動物であるフェレットで鳥ウイルスを継代し変異ウイルスを得る必要があった。しかしこの方法の実施には施設、技術、コスト、安全性など多くの課題があり、容易には実施できない。したがって、この分野の重要性にもかかわらず、研究はほとんど進捗していない。

フェレット等の動物を用いずに、培養細胞等で変異ウイルスを獲得する簡便な方法が求められている。ゲノム編集技術の進歩により、ほとんどすべてのインフルエンザウイルスの増殖を許容しかつ高力価のウイルスを産生するイヌ由来 MDCK 細胞を改変し、ヒト型あるいは鳥型レセプターのみを発現する MDCK 細胞を作製することが可能となった。これらの細胞は空気伝播するポテンシャルを保持するウイルスの研究に有用である。さらに MDCK 細胞を用いた系では非増殖型インフルエンザウイルス(ウイルスポリメラーゼサブユニットである PB2 を欠損したウイルス)による実験が可能である。したがって、変異ウイルスが拡散するおそれはなく安全性が高い。

### 2. 研究の目的

本研究では、今後のウイルス馴化研究に用いることができる鳥型、ヒト型受容体をノックアウト(KO)した MDCK 細胞を CRISPR/Cas9 法により作製し、KO 細胞におけるウイルスの増殖性を調べることで、ウイルスの受容体指向性を評価した。

### 3. 研究の方法

- (1) MDCK 細胞はヒト型および鳥型レセプターの両方を発現しており、ほとんどのヒトおよび鳥インフルエンザウイルスの増殖性がよい。MDCK 細胞以外の細胞で、様々なインフルエンザウイルスの増殖性が良いものは見つかっていない。そこで本研究では MDCK 細胞を用いた。
- (2) MDCK 細胞の 6 種の  $\alpha 2,3$  シアル酸転移酵素(ST3Gal1-6)や 2 種の  $\alpha 2,6$  シアル酸転移酵素(ST6Gal1-2)を CRISPR/Cas9 法で KO し、鳥型受容体 KO(ヒト型細胞)、ヒト型受容体 KO(鳥型細胞)、両受容体 KO(double-KO: DKO)細胞を作製した。
- (3) 鳥型受容体、ヒト型受容体の発現は、シアル酸特異的レクチンおよび抗体を用いて認めた。
- (4) さらに、シアル酸を化学的に中性化しシアル酸の脱離を防ぐだけでなく、結合様式に応じた質量変化を与えることで本来質量が同じであるシアル酸結合異性体を質量分析で区別できるようにする技術であるシアル酸結合様式特異的修飾法(SALSA 法)により詳しく確認した。
- (5) 作製した KO 細胞に様々なウイルスを細胞に感染させ、増殖性を調べた。

### 4. 研究成果

- (1) ST3Gal は 1 から 6 の 6 種類および ST6Gal は 1 および 2 の 2 種類に対するガイド RNA を設計し、CRISPR/Cas9 法でノックアウトしたところ、MDCK 細胞の対象遺伝子すべてに in/del が入っていることをシークエンスにより確認した。
- (2) ST3Gal は 1 から 6 の 6 種類すべてに in/del が入っているクローンおよび ST6Gal1 および 2 に in/del が入っているクローンを得た。また ST3Gal の 1 から 6 の 6 種類および ST6Gal1 と 2 の 2 種類すべてに in/del が入っているクローンを得た。

- (3) (2)で得たクローンのシアル酸の発現をレクチンおよび抗体を用いて解析した(図1)。野生型細胞では  $\alpha 2,3$  および  $\alpha 2,6$  シアル酸が検出された。ST3Gal は 1 から 6 の 6 種類すべてに in/del が入っていたクローン(ヒト型細胞)では  $\alpha 2,3$  シアル酸は検出されなかった。また ST6Gal1 と 2 の 2 両方に in/del が入っていたクローン(鳥型細胞)では  $\alpha 2,6$  シアル酸が検出されなかった。さらに ST3Gal の 1 から 6 の 6 種類および ST6Gal1 と 2 の 2 種類すべてに in/del が入っていたクローン(DKO)では  $\alpha 2,3$  および  $\alpha 2,6$  シアル酸は検出されなかった。

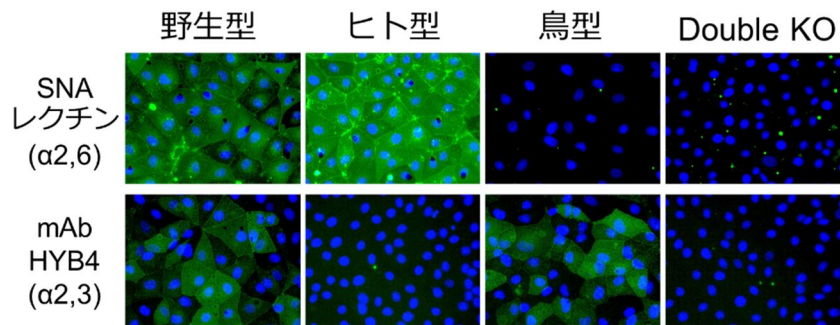


図1. 各 KO 細胞のシアル酸糖鎖の染色

- (4) これらのクローンについては SALSa 法を用いた質量分析により、酸性糖鎖についてより詳細に解析した(図2)。野生型では、酸性糖鎖のうちの 47%は  $\alpha 2,3$  シアル酸糖鎖であり、 $\alpha 2,6$  シアル酸糖鎖と硫酸化糖鎖はそれぞれ 28%、25%であった。ヒト型細胞では  $\alpha 2,3$  シアル酸糖鎖は検出されず、 $\alpha 2,6$  シアル酸糖鎖と硫酸化糖鎖が検出された。

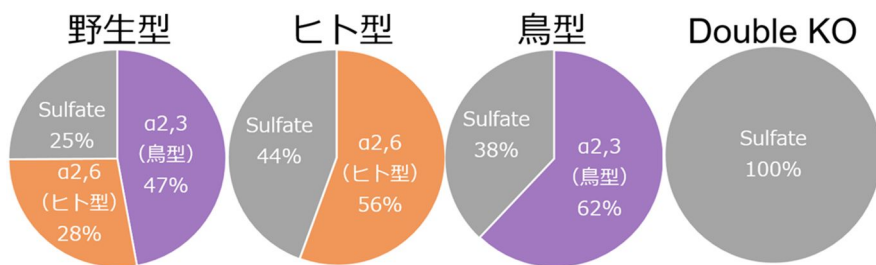


図2. 質量分析で求めた各 KO 細胞の酸性糖鎖の割合

- 鳥型細胞では  $\alpha 2,6$  シアル酸糖鎖は検出されず、 $\alpha 2,3$  シアル酸糖鎖と硫酸化糖鎖が検出された。DKO 細胞ではシアル酸結合型糖鎖は検出されず、ほぼすべての酸性糖鎖が硫酸化糖鎖であった。これらの結果から、本研究で作製したヒト型、鳥型、および DKO 細胞が、想定通りの糖鎖発現パターンを有していることが明らかとなった。

- (5) 作製した細胞におけるヒト由来、鳥由来、実験室株 A 型インフルエンザウイルスの増殖性をしらべた(図3)。鳥由来 H4、H6、H8 ウイルスは鳥型受容体 KO 細胞では増殖しにくく、また H1N1pdm2009 株はヒト型受容体 KO 細胞では増殖が遅れた。これらのウイルスは特定の受容体を認識すると考えられる。一方、研究室株の Aichi 株(H3N2)は鳥型またはヒト型受容体 KO 細胞において野生型 MDCK 細胞と同程度増殖した。これらのウイルスは両方の受容体を認識すると考えられる。

- (6) 本研究で作製した細胞は、ウイルスの受容体指向性の解析に有用である。また in vitro での空気伝播するポテンシャルを保持するウイルスの研究に有用である。

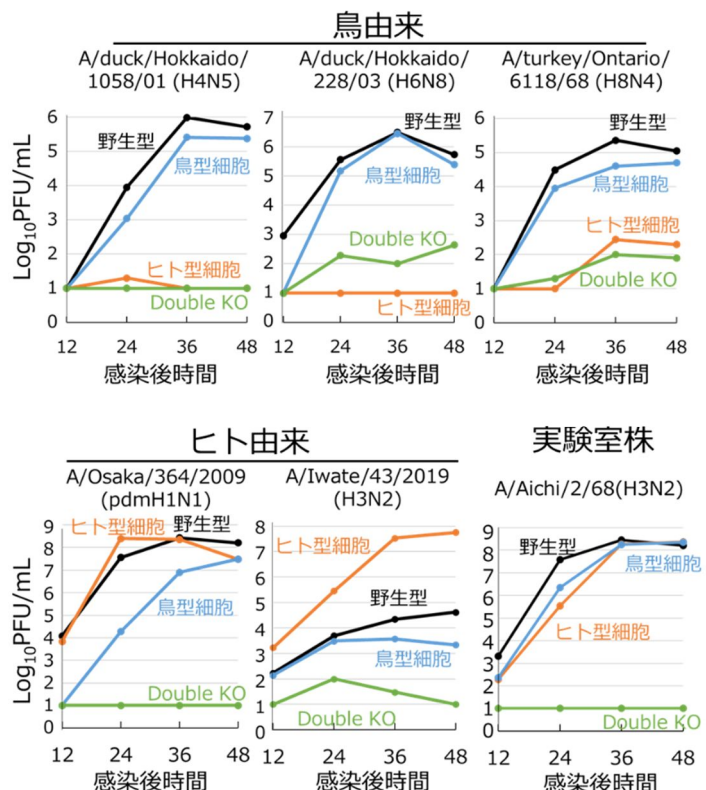


図3. 質量分析で求めた各 KO 細胞の酸性糖鎖の割合

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 村上晋
2. 発表標題 アカパネウイルス及びシュマーレンベルグウイルスの細胞内侵入機構
3. 学会等名 平成29年度日本獣医師会獣医学術学会年次大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 神木春彦、村上晋、西風隆司、松郷宙倫、石田大歩、上間亜希子、堀本泰介
2. 発表標題 シアル酸ノックアウトMDCK細胞によるインフルエンザウイルスの受容体指向性評価
3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 神木春彦、村上晋、西風隆司、松郷宙倫、石田大歩、上間亜希子、堀本泰介
2. 発表標題 Establishment of terminal sialic acid-knockout MDCK cells to evaluate influenza virus receptor tropism
3. 学会等名 第67回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 神木春彦、村上晋、西風隆司、堀本泰介
2. 発表標題 シアル酸ノックアウトMDCK細胞を用いたインフルエンザウイルス受容体指向性解析
3. 学会等名 第33回インフルエンザウイルス研究者交流の会シンポジウム
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
--	---------------------------	-----------------------	----