

令和 2 年 9 月 8 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15167

研究課題名(和文)高病原性コウモリ由来レオウイルスにおけるヒトへの感染性獲得機構の解明

研究課題名(英文)Molecular mechanisms of viral infection by Nelson Bay Reovirus isolated from humans

研究代表者

川岸 崇裕 (Kawagishi, Takahiro)

大阪大学・微生物病研究所・特任研究員(常勤)

研究者番号：90800029

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文):ネルソンベイレオウイルス(NBV)のヒトへの感染性獲得機構の解明を目的に、NBVのセルアタッチメントタンパク質Cを介した細胞侵入機序を解析した。ヒト分離株およびコウモリ分離株のCの比較解析から、C Bodyドメイン内のアミノ酸がヒト分離株の効率的な感染およびマウスでの病原性に重要であることが明らかとなった。組換えCタンパク質を用いた解析より、C Bodyドメイン内のアミノ酸はCの構造的安定性に寄与していることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エボラウイルスやニパウイルスなど、コウモリを自然宿主とするウイルスの中には、ヒトに致死的な病原性を引き起こすものが存在する。しかし、ヒトへの感染性獲得機序について不明な点は多い。本研究では、ネルソンベイレオウイルスのコウモリ分離株とヒト分離株のCの違いが感染性、病原性の違いを決める重要な要因であることを明らかにした。さらに、コウモリおよびヒト分離株間での感染性・病原性の違いは、C受容体との吸着能ではなく、Cの構造的安定性によるものであることが明らかとなった。本研究成果は、コウモリからヒトへの感染性を獲得し、ヒトで病原性を示すウイルスの感染性獲得機構の理解に有益な知見を与えると期待される。

研究成果の概要(英文):Nelson Bay Reovirus (NBV), a member of family Reoviridae is recently recognized as a causative agent of acute respiratory tract infections in humans. In this study, we characterized NBV NelB strain (isolated from a bat) and MB strain (isolated from human) to understand how strain-specific difference of C gene influences viral infectivity and pathogenesis. By using reverse genetics system, we generated recombinant virus expressing NelB-C in genetic background of MB. All mice infected with NelB-C didn't show any sign of illness. To better understand functional differences of C between NelB and MB strains, we generated chimeric C mutant viruses and demonstrated that body domain in C is associated with strain specific difference in viral infectivity and pathogenesis. These data suggest that biological properties of C, including infectivity and pathogenesis, segregate in a strain-specific manner.

研究分野: ウイルス学

キーワード: レオウイルス コウモリ 細胞侵入 遺伝子操作系

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ネルソンバイレオウイルス (NBV) はレオウイルス科に分類され、10 分節の 2 本鎖 RNA ゲノムを有する。コウモリを自然宿主とする NBV は長らく非病原性ウイルスであると考えられてきた。しかし、2007 年以降、東南アジアを中心に重篤な急性呼吸器症状を示した患者から相次いで NBV が分離され、国内でも申請者らのグループが急性呼吸器疾患患者から Miyazaki-Bali/2007 (MB) 株を分離している (Yamanaka et al., PLoS One, 2014)。東南アジアで行われた血清学的検査から、発生地域における有意な抗体保有率が明らかにされており、これらの報告は、NBV 感染が東南アジア諸国で常態化し、ヒト呼吸器疾患の原因ウイルスとして流行している可能性を示唆している。しかし、新興の人獣共通感染症である NBV の基礎研究は進んでいない。

申請者らは国内で分離した MB 株を用いて、人工的にウイルスを作製するリバースジェネティクス (RG) 系ならびにマウスに致死的な呼吸器疾患を引き起こす動物モデルの確立に成功しており、NBV の性状解析を進めてきた (Kawagishi et al., PLoS Pathog, 2016、Kanai et al., Virology, 2018)。NBV 粒子外層を構成する構造タンパク質 σC はセルアタッチメントに必須であると考えられてきたが、申請者は σC 欠損ウイルス ($\Delta\sigma C$) が作製可能であることを見出した。 $\Delta\sigma C$ はヒト肺由来 A549 細胞への感染性およびマウスでの病原性が顕著に低下していたことから、MB 株 σC が A549 細胞への感染や *in vivo* での病原性に必須であることが明らかとなった (Kawagishi et al., PLoS Pathog, 2016)。

2. 研究の目的

1968 年に初めてコウモリから分離された Nelson Bay (NelB) 株は、長らく非病原性ウイルスであると考えられてきた (Gard et al., J Virol, 1970)。一方、近年、急性呼吸器疾患を示した患者から NBV が分離され、NBV がヒトに病原性を示すことが明らかとなった。しかし、NBV がどのようにしてヒトへの感染性を獲得したのかは不明である。

NBV は 10 分節の dsRNA ゲノムを保持している。これまでにヒトおよびコウモリから分離されたウイルス株の遺伝子配列の比較から、10 分節の中でも、S1 遺伝子が最も株間での相同性が低い。さらに、S1 分節にコードされる 3 つのタンパク質、Fusion-associated small transmembrane protein (FAST)、p17、 σC の中では、 σC が最も株間での相同性が低い (Yamanaka et al., PLoS One, 2014)。そのため、 σC が NBV 株間の性状の違いに深く関与していると示唆される。MB 株 σC が *in vivo* での病原性に必須であることを考慮すると、ヒト分離株とコウモリ分離株間での σC を介した感染過程の違いが NBV の病原性の違いに関与している可能性が考えられた。

そのため、本研究では、コウモリ分離株とヒト分離株由来の σC の違いに着目し、 σC を比較解析することでヒト分離株 σC による細胞侵入機構の理解を目的とした。具体的には、

- (1) ヒト分離株の病原性に重要な σC 内のアミノ酸の同定
 - (2) σC の細胞表面への吸着能の評価
 - (3) σC の構造的安定性の評価
 - (4) ヒト分離株 σC の感染受容体の同定
- 以上の 4 点を目的とした。

3. 研究の方法

- (1) ヒト分離株の病原性に重要な σC 内のアミノ酸の同定

MB 株の RG 系を用いて、MB 株をバックボーンとして、コウモリ由来 NelB 株の S1 分節または σC を発現する組換えウイルス (NelB-S1 および NelB- σC) を作製する。作製したウイルスを A549 細胞に接種し、免疫蛍光抗体法を用いて感染性を評価する。また、C3H マウスに経鼻接種し、接種後の体重、生存率の経日変化を調べ、病原性を評価する。

これまでに分離されている NBV σC の配列をデータベースから取得し、 σC のアミノ酸配列を比較してヒト分離株で保存されているアミノ酸を同定する。同定したアミノ酸について、NelB- σC 内にヒト分離株型のアミノ酸変異を導入した組換えウイルスを作製する。作製したウイルスを A549 細胞に接種し、免疫蛍光抗体法により感染性を評価する。また C3H マウスに経鼻接種し、接種後の体重、生存率の経日変化を調べ、病原性を評価する。これらの結果を元に、ヒト分離株 σC の病原性に重要なアミノ酸を同定する。ホモロジーモデリングを用いて、得られたアミノ酸の位置を解析する。

- (2) σC の細胞表面への吸着能の評価

σC の N 末端に FLAG タグを付加した σC タンパク質発現ベクターを作製し、293T 細胞に発現後、抗 FLAG アフィニティゲルで組換え σC を回収する。得られた σC を A549 細胞とインキュベーション後、抗 FLAG 抗体とフローサイトメーターを用いて、細胞表面への吸着量を評価する。

- (3) σC の構造的安定性の評価

NBV と近縁の哺乳類レオウイルスは σC のホモログとなる $\sigma 1$ をコードしている。これまでの研究から、 $\sigma 1$ は細胞表面の受容体と結合後、構造変化を起こすことが知られており、Body ドメインが構造変化に関与することが知られている。 σC の構造的安定性を評価するため、 σC 遺伝子を大腸菌発現ベクターにクローニングして、大腸菌を用いて大量発現・精製する。円二色性分

散計を用いて、得られた組換えタンパク質の変性温度を解析する。

(4) ヒト分離株 σ C の感染受容体の同定

NBV S1 遺伝子にコードされる FAST は NBV が引き起こす細胞融合に必須の非構造タンパク質である。申請者らのグループは、これまでに FAST 欠損ウイルス (Δ FAST) の作製に成功している (Kanai et al., PLoS Pathog, 2019)。野生型 MB と Δ FAST は A549 細胞に効率的に感染するのに対して、 $\Delta\sigma$ C は A549 細胞にほとんど感染しない。この結果は A549 細胞表面に σ C 受容体が発現していることを示唆している。Cas9 を恒常的に発現する A549 細胞を樹立し、gRNA を発現するレンチウイルスベクター感染させて、A549 細胞のノックアウトライブラリーを作製する。作製した細胞に Δ FAST を感染させて培養後、NGS 解析により生細胞内に存在していた gRNA を同定することで、 Δ FAST への感染抵抗性に関与する宿主因子を同定する。CRISPR/Cas9 を用いて、得られた候補因子をノックアウトした A549 細胞を樹立し、 Δ FAST を感染させる。免疫蛍光抗体法により感染性を評価し、ノックアウト細胞が Δ FAST 感染に抵抗性を示すかを調べることで候補因子が σ C 感染受容体であるかを判定する。

4. 研究成果

(1) ヒト分離株の病原性に重要な σ C 内のアミノ酸の同定

NelB-S1 および NelB- σ C を作製し、A549 細胞での感染性を解析した結果、どちらの株も MB 株と比較して低い感染性を示した。また、C3H マウスでの病原性を評価した結果、NelB-S1、NelB- σ C は病原性を示さなかった (図 1)。MB 株、NelB 株を含む複数の株間でアミノ酸配列を比較した結果、ヒト分離株とコウモリ分離株では異なり、ヒト分離株では保存されている 48 アミノ酸を同定した。これらのアミノ酸について、NelB- σ C 内にコウモリ分離株からヒト分離株型の変異を導入したウイルスを作製し、A549 細胞での感染性を評価した。その結果、2 つの変異体では感染性が増加することが明らかとなった。この 2 種類のアミノ酸を NelB- σ C 内に導入したウイルス (NelB- σ C-mut) を作製し、C3H マウスでの病原性を評価した結果、MB 株と同程度の高い病原性を示した (図 2)。ホモロジーモデリングにより同定したアミノ酸の位置を解析した結果、これらのアミノ酸は σ C Body ドメイン内に位置していたことから、 σ C Body ドメインが NBV の病原性に重要であることが示唆された。

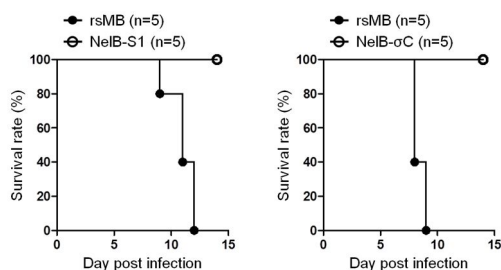


図 1. NelB-S1 (左) および NelB- σ C (右) の病原性。ウイルスを経鼻接種し、生存率の変化を記録した。

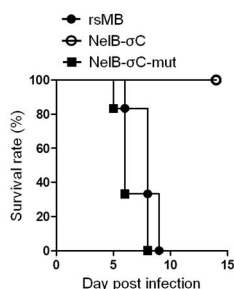


図 2. NelB- σ C-mut の病原性。ウイルスを経鼻接種し、生存率の変化を記録した。

(2) σ C の細胞表面への吸着能の評価

FLAG タグを付加した σ C タンパク質発現ベクターを作製し、MB- σ C、NelB- σ C を *in vitro* で発現・精製した。精製した σ C を用いて A549 細胞表面への吸着能を調べたところ、興味深いことに、NelB- σ C は MB- σ C と同様に A549 細胞への吸着能を示した (図 3)。以上の結果から、MB 株と NelB- σ C の感染性の違いは、細胞表面への吸着以降の過程で生じている可能性が示唆された。

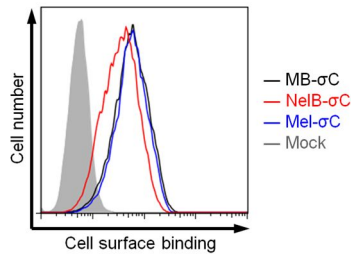


図 3. 組換え σ C タンパク質の A549 細胞表面への吸着能の評価。FLAG タグを付加した MB- σ C、NelB- σ C、Mel- σ C (ヒト分離株) を A549 細胞とインキュベーション後、抗 FLAG 抗体を用いてフローサイトメーターにより吸着能を評価した。

(3) σ C の構造的安定性の評価

大腸菌を用いて MB- σ C を発現・精製した。NelB- σ C については、大腸菌内での効率的な発現が認められなかったため、MB- σ C Body ドメイン内にコウモリ分離株型のアミノ酸を導入した変異体 (MB- σ C-mut) を作製した。円二色性分散計を用いて精製した σ C の安定性を解析した。MB 株と比較してコウモリ株型のアミノ酸を導入した変異体は低温での変性が認められた (図 4)。ヒト分離株とコウモリ分離株間での σ C Body ドメインの違いは、吸着後の構造変化の過程において重要であることを示唆している。

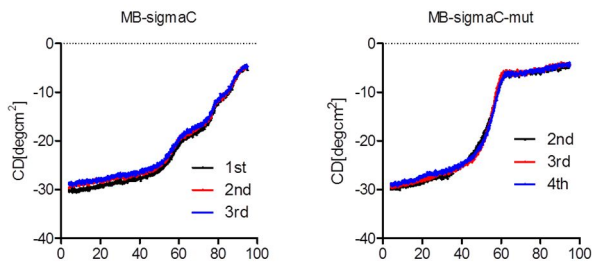


図 4. MB- σ C (左) および MB- σ C-mut (右) の CD スペクトル。

(3) σ C 受容体の同定

レンチウイルスベクターを用いて Cas9 を恒常的に発現する A549 細胞を樹立した (図 5)。さらに、gRNA を発現するレンチウイルスベクターを利用して A549 細胞のノックアウトライブラリーを作製し、 Δ FAST を感染させた。細胞を回収し NGS により生存細胞内に存在する gRNA を解析した結果、CNOT3, ZSWIN, QSOX, OR2T8 等を含む 12 因子が候補として得られた。これらの候補因子について CRISPR/Cas9 法によりノックアウト細胞を樹立した。 Δ FAST を接種し感染性を評価した結果、これらの細胞は Δ FAST に感受性を示し、 σ C 感染抵抗性には関与していないことが示唆された。

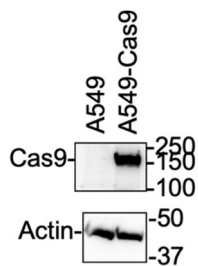


図 5. Cas9 を恒常的に発現する A549 細胞の樹立。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Takahiro Kawagishi, Yuta Kanai, Yusuke Sakai, Ryotaro Nouda, Hideki Tani, Masayuki Shimojima, Masayuki Saijo, Yoshiharu Matsuura, Takeshi Kobayashi
2. 発表標題 Nelson Bay Orthoreovirus C determines strain-specific differences in viral replication and pathogenesis
3. 学会等名 13th International dsRNA Virus Symposium (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takahiro Kawagishi, Yuta Kanai, Yusuke Sakai, Ryotaro Nouda, Hideki Tani, Masayuki Shimojima, Masayuki Saijo, Yoshiharu Matsuura, Takeshi Kobayashi
2. 発表標題 Nelson Bay Orthoreovirus C body domain is associated with strain-specific differences in viral replication
3. 学会等名 The 66th Annual Meeting of Japanese Society for Virology
4. 発表年 2018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
--	---------------------------	-----------------------	----