

平成 22 年 5 月 28 日現在

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2007～2009

課題番号：19390135

研究課題名 (和文) コロナウイルスの受容体非依存性感染機構と病原性に関する研究

研究課題名 (英文) Studies on receptor-independent infection of coronaviruses and its implication in the pathogenesis

研究代表者

田口 文広 (TAGUCHI FUMIHIRO)

日本獣医生命科学大学・獣医学部・准教授

研究者番号：30147429

研究成果の概要 (和文)：

マウスコロナウイルス(MHV)で受容体非依存性感染 (RII) を示す JHM 親株と RII 活性のない親株由来 *srr7* 変異株のマウス混合神経系培養細胞での増殖を比較すると、親株は感染後 24 時間ではほぼ全ての細胞に感染が拡大した。*srr7* は 24 時間では受容体陽性細胞のミクログリアだけに感染が認められたが、感染後 3 日では受容体陰性のニューロンなどに細胞融合し感染拡大が見られ、*srr7* から S 蛋白に変異の入った株が分離された。また、分離株は RII 活性を示した。一方、RII 活性を持つ親株は *srr7* と比べ、マウスに対して高い病原性を示したが、*srr7* 接種マウスも感染後長期間を経て死亡する例が認められた。このことから、RII 活性は高病原性発現との関連が示唆された。受容体非依存性の感染の有無を他のコロナウイルスで検討するため、豚伝染性下痢症ウイルス (PEDV) を乳のみマウス脳内継代でマウスに病原性を示す株を分離した。このウイルスは細胞融合活性が馴化前の親株と比べ高く、その活性に深く関与する S 蛋白に 4 個のアミノ酸変異がみられた。今後、このアミノ酸変異が細胞融合活性の亢進や病原性の上昇に関与しているかを reverse genetics を用いて検討したい。

研究成果の概要 (英文)：

Murine coronavirus wild type (wt) JHM strain infects in a receptor-independent fashion (receptor independent infection, RII in short), while a mutant isolated from wild type wt JHM, called *srr7*, lacks this activity, when examined at 24 hours after infection of mixed neural cell culture. However, variant viruses with RII activity were isolated from *srr7* infected mixed cells, when infection was maintained for 3 days. Wt JHM with RII activity showed high neurovirulence for mice, killing those mice within 2-3 days after infection. *Srr7* also killed mice when higher dose was inoculated after longer survival time compared with that of wt JHM. Wt JHM antigen was detected in a variety of neural cells, which may be attributed to the RII in mouse brain. However, *srr7* antigen was not widely distributed. These results suggest the possibility that high virulence of JHM is attributed to the RII activity. We also tried to obtain porcine coronavirus that grows and shows the virulence for mice to see whether coronaviruses other than JHM display RII activity. After passage of Vero-cell adapted porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) through suckling mouse brain, we obtained variant with higher virulence for mice, which shows enhanced cell-cell fusion activity compared with original, non-adapted virus. The mutant showed 4 amino acids mutation in the S protein which is believed to be critical for cell-cell fusion. However, it is not understood whether those mutations in the S could be responsible for higher virulence. In order to pursue this issue, we have to establish the reverse genetics system of PEDV.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
19年度	5,300,000	0	5,300,000
20年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
21年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
総計	13,900,000	2,580,000	16,480,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：病原性

1. 研究開始当初の背景

ウイルス感染は、ウイルス特異的な受容体に結合することから開始する。エンベロープを持つコロナウイルスでは、受容体結合後エンベロープに存在する糖蛋白（スパイク、S）が構造変化することにより、エンベロープと細胞膜の融合が誘導され、ウイルス遺伝子が細胞質内へと侵入し、複製を開始する。このような、細胞質膜から侵入するコロナウイルスとしては、感染細胞に合胞性の多核巨細胞を形成するマウス肝炎ウイルス（MHV）JHM株がある。また、SARS コロナウイルスやヒト鼻風邪ウイルス 229E では、受容体結合後エンドサイトーシスによりエンドゾームに粒子が輸送され、エンドゾーム内の酸性環境下で活性のあるプロテアーゼにより S 蛋白が開裂を受け、細胞膜融合能が活性化され、エンドゾームからウイルス遺伝子が侵入することが報告されている。

一方、MHV-JHM 株では受容体依存性に感染した細胞から、受容体を持たない細胞へのウイルス感染拡大が認められ、我々の実験から、JHM 株を強引に受容体非発現細胞に吸着させることにより感染が成立することが明らかとなった（受容体非依存性感染、

receptor-independent infection, RII と呼ぶ）。

この RII は動物個体内でおこるのか、また、MHV-JHM 株以外でも同様の感染機構があるのかは不明である。

一般にコロナウイルス感染は種特異性が高いことが知られている。一方、ヒトやニワトリに感染するコロナウイルス（それぞれヒトコロナウイルス 229E と鶏伝染性気管支炎ウイルス）は乳のみマウス脳内継代でマウスに親和性、病原性を示すようになることが報告されている。これは、継代により新たな分子を受容体として認識できるようにウイルスが変異したのか、或いは JHM と同様に RII 活性を獲得したのかが不明であり、他のコロナウイルスも RII 活性を示すのかということはコロナウイルス学上極めて興味深い。

2. 研究の目的

1) ウイルスは、一般に標的細胞の特異的受容体を介して細胞内侵入するが、コロナウイルス MHV では受容体を介さない感染 RII が存在することも報告されている。MHV-JHM-cl-2 株は RII 感染するが、この株由来の srr7 株はその活性を欠く。本研究では、JHM-cl-2 株と JHMV-srr7 株のマウス脳内で

の増殖の比較を行うため、まず、乳のみマウス脳組織から混合神経系細胞培養系を用いて、両者の増殖、感染拡大の比較を行い、同様のことがマウス脳内でも起こっているかについて、検討したい。

2) コロナウイルスは種特異性が高く、固有宿主以外の動物に感染することは稀だが、ヒトやトリのコロナウイルスは乳飲みマウスへの脳内接種によりマウス脳内で増殖可能となることが知られている。このような性質を獲得したコロナウイルスは、本来の受容体とは異なるマウス脳内の分子を利用できるようになった可能性と、受容体非依存性に感染できる RII 活性を持った可能性が考えられる。このマウスへの馴化の分子機構についても、MHV 以外のコロナウイルス、豚下痢症ウイルス (porcine epidemic diarrhea virus, PEDV) を用いて 検討する。

3. 研究の方法

1) 混合マウス神経系細胞培養における JHM 株と srr7 株の増殖を比較するため、0 日零のマウス脳から混合神経系培養細胞を準備する。この培養細胞に量株を感染させ、ウイルス感染の拡大様式を多核巨細胞形成をマーカーに観察する。これまでの研究から、JHM 株は感染後 24 時間でほぼすべての細胞に感染拡大することが明らかにされ、一方 srr7 は MHV 受容体である CEACAM1 発現細胞であるミクログリアにのみ感染することが明らかとなっているが、srr7 感染について更に長期にわたり感染拡大について、観察を行った。

2) MHV 以外のコロナウイルスでの RII を見るため、豚のコロナウイルス PEDV を 0 日零乳のみマウス脳内に接種、継代し、豚以外の動物に感染するウイルスの獲得を試みた。感染後、5-6 日でマウスを麻酔剤存在下で処死し、その脳を回収し、ガラスホモジェナイ

ザーで 10% 乳剤 (PBS を希釈液とする) を作成し、乳のみマウス脳内に接種するという継代を 10 代行った。得られたウイルスに関するウイルス学的な検索を行った。

4. 研究成果

1) MHV を用いた RII に関する研究：既に明らかになっているように、JHM-cl-2 株は、混合マウス神経系細胞培養において、ミクログリア細胞から感染が始まり、その他の種類の細胞 (ニューロン、オリゴデンドロサイト、アストロサイトなど) 全てに感染後 24 時間で感染拡大し、これらの細胞は巨大な多核巨細胞を形成した。一方、srr7 株は感染後 24 時間では受容体陽性のミクログリアのみに感染が認められ、他の細胞への感染拡大は認められなかったが、感染後 3 日で、巨細胞形成が認められ始めた。2 重染色で検討したところ、この時点で srr7 株は、ニューロンやアストロサイトなど受容体非発現細胞にも感染拡大した。即ち、JHM 株同様に RII 活性を示した。そこで、RII 活性を示すウイルスの S 蛋白を検討したところ、一か所にアミノ酸変異が認められた。JHM 株と srr7 株では S 蛋白の 1114 番目のアミノ酸に違いがあるが (前者がロイシンで後者がフェニールアラニン)、srr7 株感染 3 日後に分離された RII 活性を持つウイルスは JHM 株とはことなる個所にアミノ酸変異を持っていた。また、細胞融合活性に重要と考えられる S2 サブユニットにアミノ酸変異のあるウイルスや、受容体結合に関与する S1 に変異を持つウイルスなど、幾つかの異なるウイルスが分離された。これらの実験から、RII 活性を示すウイルスは、マウス神経系混合培養細胞で長期感染することに寄り、容易に分離されることが明らかになった。これは、ミクログリアで増殖中に srr7 株に変異が起こり、それが選択的に

RII でその他の細胞に拡大していったのか、
或いは、srr7 株のストックの中に RII 活性を
持つウイルスが、非常に低濃度に存在したの
か、現在検討中である。

JHM 親株と srr7 株のマウス脳内接種後の病
原性を検討したところ、親株では数個の感染
性ウイルス接種後 2-2 日で死亡したが、srr7
株では、 10^3 pfu 以上の接種で感染後 5 日以上
経過した後死亡する例が多かった。このこ
とは、srr7 株はマウス脳内でも RII 活性のあ
るウイルスに変異し、それが様々な細胞に感
染拡大し、脳炎を引き起こし、マウスを死亡
させるものと推測されている。今後、マウス
脳内でも、混合神経系培養細胞と同様にウイ
ルス変異が認められるのかを検討する必要
がある。

2) PEDV を用いたマウスへの馴化に関する研
究：分離後 Vero 細胞で継代された PEDV-MK
株を 0 日零の ICR 乳のみマウス脳内に接種し、
脳内継代を 10 代行った。継代前のウイルス
MK と 10 代継代株 MK-10 について、マウ
ス病原性を 0 日零マウス脳内への接種により
比較したところ、10 代継代株は親株と比べ、
マウスに対する病原性(マウスの体重増加、
生残日数、神経症状の発現など)が高くなっ
ていた。しかしながら、マウス脳内での増殖
には有意な差は認められなかった。一方、培
養細胞 Vero における細胞融合活性では、10
代継代株が親株と比べ、優位に高い細胞融合
活性を示した。コロナウイルスの細胞融合活
性や病原性は S 蛋白に依存するところが高
いことから、親株と 10 代継代株の S 蛋白の
アミノ酸配列の比較を行った。10 代継代株は
親株と比べ、4 個のアミノ酸変異を持ち、
1381 番目のアミノ酸変異(ヒスチジンからア
ルギニン変異)は 8 代継代したものから検出
された。また、細胞融合活性も 1381 番目ア
ミノ酸変異の獲得と共に、亢進することが明

らかとなった。これらのことから、このアミ
ノ酸変異が細胞融合活性に影響を及ぼすこ
とが推測されたので、今後 S 蛋白単独発現系
を用いて、この仮説が正しいか否かについて
検討していきたい。また、マウス継代におけ
る病原性の亢進に関しても、S 蛋白の担う役
割は高いと考えられるが、MHV や SARS コロナ
ウイルスでは、S 遺伝子以外にも病原性に関
与する遺伝子が報告されており、今回得られ
た結果から、S 蛋白の関与のみを考えるのは
早計と思われる。親株及びマウス馴化した病
原性株の全ゲノムの塩基配列を決定し、更に
それぞれの変異について、reverse genetics
を用いて検討する必要がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に
は下線)

[雑誌論文] (計 22 件)

1. Hirai A, Ohtsuka N, Ikeda T, Taniguchi R,
Blau D, Nakagaki K, Miura HS, Ami Y,
Yamada YK, Itohara S, Holmes KV,
Taguchi E. (2010) Role of mouse hepatitis
virus (MHV) receptor mCEACAM1 in the
resistance of mice to MHV infection:
Studies on mice with chimeric
mCEACAM1a and 1b. **J. Virol.** 84:In press
2. Kyuwa S, Takagaki S, Matsuyama S,
Taguchi E, Saegusa J, Iwakura Y, Tagawa
Y, Yoshikawa Y. (2010) Characterization
of a variant virus from ascites of subacute
granulomatous serositis in interferon
 γ -deficient mice persistently infected with
murine coronavirus, strain JHM. **Viral
Immunol.** In press.
3. Takatsuki H, Taguchi E, Nomura R,
Kashiwazaki H, Watanabe M, Ikehara Y,

- Watanabe R. (2009) Cytopathy of an infiltrating monocyte lineage during the early phase of infection with murine coronavirus in the brain. *Neuropathology*. In press
4. Matsuyama S, and Taguchi F. (2009) Two step conformational changes mediated by receptor binding and proteolysis of a coronavirus envelope glycoprotein. **J. Virol.** 83: 11133-11141
 5. Fukushima A, Fukuda N, Lai Y, Ueno T, Moriyama M, Taguchi F. Iguchi A, Shimizu K and Kuroda K. (2009) Development of a chimeric DNA-RNA hammerhead ribozyme targeting SARS virus. **Intervirology** 52: 92-99
 6. Terahara K, Yoshida M, Taguchi F. Igarashi O, Nochi T, Gotoh Y. Yamamoto T, Tsunetsugu-Yokota Y, Beauchemin N, and Kiyono H. (2009) Expression of newly identified secretory CEACAM1a isoforms in the intestinal epithelium. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 383: 340-346
 7. Ishii K, Hasegawa H, Nagata N, Ami Y, Fukushi S, Taguchi F. and Tsunetsugu-Yokota Y. (2009) Neutralizing antibody against severe acute respiratory syndrome (SARS)-coronavirus spike is highly effective for the protection of mice in the murine SARS model. **Microbiol. Immunol.** 53:75-82.
 8. Shirato K. and Taguchi F. (2009) Indirect induction of mast cell degranulation and migration by respiratory syncytial virus infection. **Virology** 386: 88-93
 9. Kawase M, Shirato K. Matsuyama S and Taguchi F. (2009) Protease-mediated entry via endosome of human coronavirus 229E. **J. Virol.** 83: 712-721.
 10. Fukushi S, Watanabe R and Taguchi F. (2008) Pseudotyped vesicular stomatitis virus for analysis of virus entry mediated by SARS coronavirus spike proteins. **Methods Mol. Biol.** 454:1-8
 11. Watanabe R, Matsuyama S, Shirato K. Maejima M, Fukushi S, Morikawa S and Taguchi F. (2008) Entry from cell surface of SARS coronavirus with cleaved S protein as revealed by pseudotype virus bearing cleaved S protein. **J. Virol.** 82: 11985-11991
 12. Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, Fukushi S, Harashima A, Sato Y, Saijo M, Taguchi F. Morikawa S and Sata T. (2008) Mouse-passaged severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus leads to lethal pulmonary edema and diffuse alveolar damage in adult but not young mice. **American J. Pathol.** 172: 1625-1637
 13. Ami Y, Nagata N, Shirato K. Watanabe R, Iwata N, Nakagaki K, Fukushi S, Saijo M, Morikawa S and Taguchi F. (2008) Co-infection of respiratory bacterium with SARS coronavirus induces an exacerbated pneumonia in mice. **Microbiol. Immunol.** 52: 118-127

14. Ujike M, Nishikawa H, Otaka A, Yamamoto N, Yamamoto N, Matsuoka M, Kodama E, Fujii N and Taguchi F (2008) Heptad repeat-derived peptides block the protease-mediated direct entry from cell surface of SARS coronavirus but not entry via endosomal pathway. **J. Virol.** 82: 588-592
15. Watanabe R, Sawiki S, and Taguchi F (2007) Heparan sulfate is a binding molecule but not a receptor for CEACAM1-independent infection of murine coronavirus. **Virology** 366: 16-22.
16. Fukushi S, Mizutani T, Sakai K, Saijo M, Taguchi F, Yokoyama M, Kurane I and Morikawa M. (2007) Amino acid substitutions in S2 region enhances SARS-CoV infectivity in rat ACE2-expressing cells. **J. Virol.** 81: 10831-10834
17. 田口文広 : 重症急性呼吸器症候群 (SARS) 分子呼吸器病 第 11 巻 第 1 号 42-47 2007
18. 田口文広 : SARS ウイルスワクチン 日本臨床 特集ワクチン 第 66 巻 第 10 号 1971-1976 2008
19. 田口文広、松山州徳 : コロナウイルスの細胞侵入機構 ウイルス 第 59 巻第 2 号 15-22 2009

[学会発表] (計 20 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 :
 出願年月日 :
 国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :
 発明者 :
 権利者 :
 種類 :
 番号 :
 取得年月日 :
 国内外の別 :

[その他]
 ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

(Fumihiko Taguchi)

田口文広

研究者番号 : 30147429

(2) 研究分担者

(Rihito Watanabe)

渡辺里仁

研究者番号 : 30129746

(Kazuya Shirato)

白戸憲也

研究者番号 : 40415477

(平 19 年度)

(Asuka Hirai)

平井明香

研究者番号 : 50450557

(平 19 年度)

(3) 連携研究者

(Kazuya Shirato)

白戸憲也

研究者番号 : 40415477

(平成 20, 21 年度)

(Asuka Hirai)

平井明香

研究者番号 : 50450557

(平成 20, 21 年度)