

令和 4 年 6 月 24 日現在

機関番号：34204

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16678

研究課題名(和文) 亜急性硬化性全脳炎の発症過程の解明-ウイルスの細胞融合誘導能の役割

研究課題名(英文) Elucidation of the onset process of subacute sclerosing panencephalitis-Role of viral cell fusion ability

研究代表者

佐藤 友人 (Sato, Yuto)

長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・助教

研究者番号：60778835

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)：麻疹ウイルスの融合活性を変化させる変異が亜急性硬化性全脳炎(subacute sclerosing panencephalitis: SSPE)の発症過程に与える影響について解明する目的で、SSPE発症6週間後の5歳患児から分離されたSSPEウイルスKobe-1株のFおよびH蛋白質の変異について解析した。融合活性を低下させるFおよびH蛋白質の変異は、複数重ね合わせると融合活性を欠失させることが明らかとなり、持続感染成立に寄与するものと考えられた。また、H蛋白質内の融合活性を上昇させる変異がウイルスの融合活性を著しく上昇させたことから、神経病原性発現段階への移行に寄与する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

亜急性硬化性全脳炎は、通常の麻疹に罹患した小児が稀に発症する致死的疾患である。脳内に侵入した麻疹ウイルスが宿主の免疫機構から逃れて潜伏し(持続感染)、その後脳内環境に適応して増殖力を亢進させて感染拡大し、神経病原性を発揮する。その神経病原性はF蛋白質の変異により亢進した融合活性が原因であると報告されているが、持続感染に関わる変異はこれまでに全く報告されていなかった。本研究では、融合活性を著しく低下させるFおよびH蛋白質の変異が持続感染成立に寄与する可能性が初めて示されており、大きな意義がある。今後は、それらの変異が実際にマウスの脳内で持続感染を成立させるか、検討する予定である。

研究成果の概要(英文)：In order to elucidate the effect of mutations that change fusion activity on the onset process of subacute sclerosing panencephalitis (SSPE), we analyzed mutations in the F and H proteins of the SSPE virus Kobe-1 strain isolated from a 5-year-old child 6 weeks after the onset of SSPE. Mutations in the F and H proteins that reduce the fusion activity were found to delete the cell fusion activity when multiple mutations were superimposed, which was considered to contribute to the establishment of persistent infection. In addition, mutation that increase the cell fusion activity in the H protein significantly increased the viral fusion activity, suggesting that it may contribute to the transition to the neuropathogenicity expression stage.

研究分野：ウイルス学

キーワード：麻疹ウイルス SSPEウイルス 細胞融合 持続感染 神経病原性

1. 研究開始当初の背景

亜急性硬化性全脳炎(SSPE)では、神経細胞に侵入した麻疹ウイルス(MV)が脳内で持続感染することで変異を蓄積し、進行性に感染拡大して致死となる。SSPE ウイルス(SSPEV)の神経病原性は、F 蛋白質の変異が引き起こす著明に増強した融合活性が原因とされているが、麻疹ウイルスが脳内で持続感染する条件や機序は不明であり、持続感染中のウイルスの融合活性も不明である。また、SSPE ウイルスの融合活性や神経病原性に影響する H 蛋白質の変異についても全く報告されていない。研究代表者はこれまでに、SSPE 発症 6 週間後の 5 歳患児から分離した SSPE ウイルス Kobe-1 株の F および H 蛋白質の各変異が融合活性に与える影響について蛋白質発現系実験で検討し、(1)F 蛋白質と H 蛋白質の両方に細胞融合能を低下させる変異が存在すること、(2)F 蛋白質だけでなく H 蛋白質にも細胞融合能を上昇させる変異が存在することを明らかにした。しかし、これらの融合活性を上昇させる変異と低下させる変異が、それぞれ何を意味しているかについては不明である。

2. 研究の目的

研究代表者はこれまでの結果から、SSPE ウイルス Kobe-1 株が F および H 蛋白質の融合活性を低下させることで持続感染を成立させ、続いて F および H 蛋白質の融合活性を著しく上昇させることで神経病原性を獲得した、と仮説を立てた。本研究では、SSPE ウイルス Kobe-1 株を用いて、(1)持続感染段階の成立が、F および H 蛋白質の変異による融合活性の低下に起因するのか、(2)神経病原性発現段階への移行に、F 蛋白質に加えて H 蛋白質の変異による融合活性の上昇が必須であるか、の 2 点について検討し、麻疹ウイルス持続感染の成立機序を明らかにしつつ、H 蛋白質の変異が関わる新たな SSPE 発症機序の証明を目指した。また、(3)各段階において融合活性を調節する変異の作用機序の解明を試みた。

3. 研究の方法

本研究では、まず(1)SSPE ウイルス Kobe-1 株の F および H 蛋白質に存在する融合活性を低下させる変異を麻疹ウイルス IC-B 株に導入して、その融合活性を発現系実験とウイルス実験で測定することで、融合活性を低下させる変異の持続感染成立への寄与について調べた。次に(2)融合活性を低下させる変異を持つ F および H 蛋白質変異体に融合活性を上昇させる変異を加えた際の融合活性を発現系実験とウイルス実験で測定し、神経病原性発現段階への移行に必要な変異を探索した。さらに(3)融合活性に影響する変異の作用機序について解析するために、F および H 蛋白質変異体を細胞に発現させ、細胞全体および細胞表面の蛋白質量について測定した。また、これまでに F 蛋白質の構造を不安定化させる変異が神経病原性の発揮に関わることが報告されているため、Kobe-1 株の F 蛋白質変異が構造変化の起こしやすさ(構造安定性)に与える影響について調べた。

4. 研究成果

(1)融合活性を低下させる変異の効果

F 蛋白質変異の効果

これまでの研究により、Kobe-1 株の F および H 蛋白質内の各変異(図 1)が融合活性に及ぼす影響は検討済みであり、F 蛋白質内に存在する G401E 変異と I446T 変異が融合活性を低下させることが分かっている。そこで、これらの変異が持続感染段階の成立に寄与するか検討するために、G401E 変異と I446T 変異を合わせ持つ F 蛋白質変異体の融合活性を蛋白質発現系実験で測定した(図 2)。G401E 変異と I446T 変異はそれぞれ単独で F 蛋白質の融合活性を低下させたが、これらの変異を合わせ持つと融合活性がさらに低下することが明らかとなった。また、F 蛋白質に G401E 変異を持つ組換え麻疹ウイルスを作出してその増殖能について調べたところ、G401E 変異がウイルスの増殖能を強く抑制することが示された。

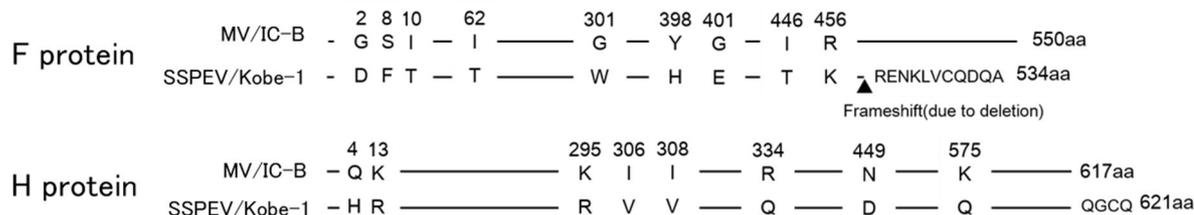


図 1. 麻疹ウイルス IC-B 株と SSPE ウイルス Kobe-1 株間における F、H 蛋白質のアミノ酸配列比較

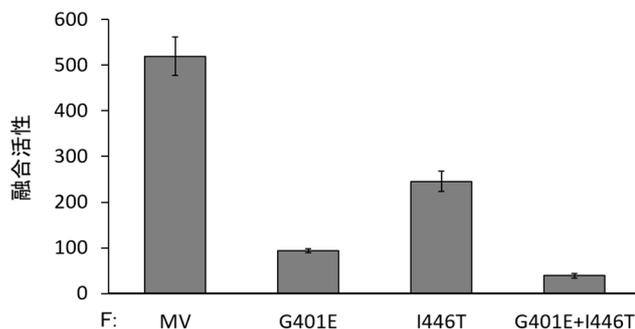


図2. Kobe-1 株の F 蛋白質内に存在する融合活性を低下させる変異の効果

F 蛋白質変異に H 蛋白質変異を組み合わせた場合の効果

これまでの研究により、Kobe-1 株の H 蛋白質内に存在する K295R 変異が融合活性を著しく低下させることが分かっている。そこで、K295R 変異を持つ H 蛋白質変異体と、 において融合活性の著しい低下を示した G401E 変異および I446T 変異を合わせ持つ F 蛋白質変異体を共発現させて融合活性の測定を試みたところ、融合細胞が全く形成されず、融合活性が発揮されなくなることが明らかとなった。これらの変異が持続感染を成立させる可能性が考えられる。今後、これらの変異を合わせ持つ組換えウイルスを作出してハムスターに脳内接種し、実際に持続感染を成立させるか検討する予定である。

(2)融合活性を上昇させる変異の効果

F 蛋白質変異の効果

Kobe-1 株 F 蛋白質の強い融合活性の発揮に必要な変異を同定することを目的として、(1)-で融合活性の著しい低下を示した G401E 変異と I446T 変異を合わせ持つ F 蛋白質変異体に、これまでの検討で融合活性を上昇させることが示されている G301W 変異と Y398H 変異を加え、その融合活性を蛋白質発現系実験で測定した。G401E 変異と I446T 変異を合わせ持つ F 蛋白質変異体に G301W 変異と Y398H 変異の両方を加えると融合活性が大きく上昇したが、Kobe-1 株 F 蛋白質の融合活性には及ばなかった。このことから、G301W 変異と Y398H 変異は神経病原性発現段階への移行に重要であるが、Kobe-1 株の強い融合活性の発揮にはこれら以外の変異も関与しているものと考えられた。また、G301W 変異と Y398H 変異が融合活性に及ぼす影響について、組換え麻疹ウイルスを作出し検討したところ、いずれの変異も発現実験での結果と同様に、ウイルスの融合活性を著しく上昇させることが示された。

H 蛋白質変異の効果

これまでの検討により、Kobe-1 株 H 蛋白質の K575Q 変異を麻疹ウイルス IC-B 株 H 蛋白質に導入すると、融合活性が著しく上昇することが分かっている。K575Q 変異が融合活性に与える影響について組換え麻疹ウイルスを作出し検討したところ、発現実験での結果と同様に、ウイルスの融合活性を著しく上昇させることが示された。

(3)融合活性に影響する変異の作用機序

F 蛋白質変異の作用機序

F 蛋白質変異の作用機序について調べるために、F 蛋白質変異体を細胞に発現させ、細胞全体および細胞表面の F 蛋白質量について検討した。その結果、融合活性を低下させる G401E 変異と I446T 変異は、いずれも細胞全体および細胞表面の F 蛋白質量を減少させることが示された。一方、融合活性を上昇させる 2 つの変異の内、Y398H 変異は細胞全体および細胞表面における F 蛋白質量を増加させた。これらの変異がどのようなメカニズムで F 蛋白質量に影響するかについて、今後検討する予定である。一方、融合活性を上昇させる G301W 変異は F 蛋白質量を減少させており、量の変化ではなく質の変化により融合活性を上昇させているものと考えられた。そこで、変異が F 蛋白質の構造安定性に与える影響について検討したところ、G301W 変異は F 蛋白質の構造変化を起こしやすくする(構造を不安定化する)ことで、融合活性を上昇させることが明らかとなった。

H 蛋白質変異の作用機序

H 蛋白質変異の作用機序について調べるために、H 蛋白質変異体を細胞に発現させ、細胞全体および細胞表面の H 蛋白質量について検討した。その結果、融合活性を低下させる K295R 変異は細胞全体での H 蛋白質量には影響しないが、細胞表面の H 蛋白質量を減少させることが示され、H 蛋白質の輸送に影響することが明らかとなった(図 3)。K295R 変異がどのようなメカニズムで H 蛋白質の輸送に影響するのか、今後検討する予定である。また、融合活性を著しく上昇させる変異である K575Q 変異は細胞表面の H 蛋白質量に影響しなかった。H 蛋白質の 575 位アミノ酸はレセプター結合部位から離れているため、今後は K575Q 変異がトリガリング活性に与える影響について検討する予定である。

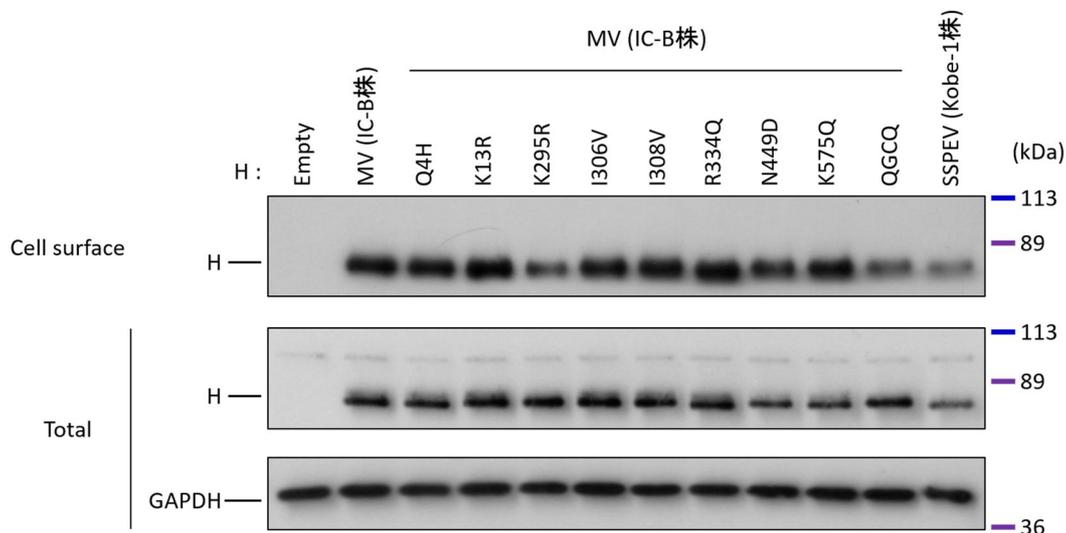


図 3. 細胞全体および細胞表面における H 蛋白質量

(4)今後の展望

以上により、SSPE ウイルス Kobe-1 株の F および H 蛋白質の融合活性を低下させる変異が持続感染段階の成立に、融合活性を上昇させる変異が神経病原性発現段階への移行に必要であるという自身の仮説を裏付ける結果を得ることができた。今後は、「融合活性を低下させる変異が実際に持続感染を成立させるか」と「H 蛋白質内に存在する融合活性を上昇させる変異が神経病原性の発揮に必要なか」について明らかにするためウイルスレベルでの検討を行い、仮説の証明を目指す。

< 引用文献 >

Yuma Sato, Shumpei Watanabe, Yoshinari Fukuda, Takao Hashiguchi, Yusuke Yanagi, Shinji Ohno. Cell-to-Cell Measles Virus Spread between Human Neurons Is Dependent on Hemagglutinin and Hyperfusogenic Fusion Protein. *Journal of Virology*, 92: e02166-17 (2018)

doi: 10.1128/JVI.02166-17

Shumpei Watanabe, Shinji Ohno, Yuta Shirogane, Satoshi O. Suzuki, Ritsuko Koga, Yusuke Yanagi. Measles virus mutants possessing the fusion protein with enhanced fusion activity spread effectively in neuronal cells, but not in other cells, without causing strong cytopathology. *Journal of Virology*, 89(5): 2710-2717 (2015)

doi: 10.1128/JVI.03346-14

Yuta Shirogane, Ryuichi Takemoto, Tateki Suzuki, Tomonori Kameda, Kinichi Nakashima, Takao Hashiguchi, Yusuke Yanagi. CADM1 and CADM2 Trigger Neuropathogenic Measles Virus-Mediated Membrane Fusion by Acting in cis. *Journal of Virology*, 95(14): e00528-21 (2021)

doi: 10.1128/JVI.00528-21

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 2件）

1. 著者名 Sato Yuto, Higuchi Kurara, Nishikawa Daichi, Wakimoto Hiroshi, Konami Miho, Sakamoto Kento, Kitagawa Yoshinori, Gotoh Bin, Jiang Da-Peng, Hotta Hak, Itoh Masae	4. 巻 102
2. 論文標題 M protein of subacute sclerosing panencephalitis virus, synergistically with the F protein, plays a crucial role in viral neuropathogenicity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of General Virology	6. 最初と最後の頁 1682
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1099/jgv.0.001682	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Sakamoto Kento, Sato Yuto, Takahashi Ken-ichi, Wakimoto Hiroshi, Kitagawa Yoshinori, Gotoh Bin, Ayata Minoru, Itoh Masae	4. 巻 573
2. 論文標題 Upregulation of viral RNA polymerase activity promotes adaptation of SSPE virus to neuronal cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Virology	6. 最初と最後の頁 1~11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.virol.2022.05.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔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 Yuto Sato, Miho Konami, Hiroshi Wakimoto, Kurara Higuchi, Da-Peng Jiang, Kento Sakamoto, Yoshinori Kitagawa, Bin Gotoh, Ken-ichi Takahashi, Hak Hotta, Masae Itoh
2. 発表標題 Characterization of the mutations in the L protein of the Kobe-1 strain of a subacute sclerosing panencephalitis (SSPE) virus.
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 Kento Sakamoto, Miho Konami, Kurara Higuchi, Da-Peng Jiang, Hiroshi Wakimoto, Shinra Kameda, Yuto Sato, Yoshinori Kitagawa, Bin Gotoh, Ken-ichi Takahashi, Hak Hotta, Masae Itoh
2. 発表標題 Role of the measles virus L protein in the development of subacute sclerosing panencephalitis (SSPE).
3. 学会等名 第68回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2021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
研究協力者	伊藤 正恵 (Itoh masae)		
研究協力者	坂本 賢人 (Sakamoto Kento)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------