

令和 5 年 4 月 21 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06441

研究課題名(和文) MERS-CoVアフリカ株と中東株の間のウイルス学的差異に関する分子基盤の解明

研究課題名(英文) Study on the virological difference between African and Middle Eastern strains of MERS-CoV

研究代表者

白戸 憲也 (Kazuya, Shirato)

国立感染症研究所・ウイルス第三部・室長

研究者番号：40415477

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：アフリカでは、MERSコロナウイルス(MERS-CoV)が存在するにもかかわらず、ヒト中東呼吸器症候群(MERS)の症例は報告されていない。これまでの研究で、エチオピア分離株のSタンパク質を持つ組換えMERS-CoVは、中東分離株のSタンパク質を持つMERS-CoVに比べて、複製速度が遅く、中和されやすいことが示されている。本研究では、エチオピアと中東のMERS-CoVのウイルス特性の違いに関連するSタンパク質のアミノ酸の特定を試みた。その結果、受容体結合ドメインにおける1つのアミノ酸の違いが、中和プロファイルを逆転させるのに十分であることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果は重症急性呼吸器症候群コロナウイルス-2(SARS-CoV-2)のVOCの変遷と同様に、わずかな遺伝子の変異でMERS-CoVの優勢な集団が変化する可能性があることを示唆している。変異によって生じた強毒性MERS-CoVの拡散を検出するためには、分離株の遺伝子を注意深く監視することが重要ということを示した。

研究成果の概要(英文)：There have been no reported cases of human Middle East respiratory syndrome (MERS) in Africa, despite the presence of MERS coronavirus (MERS-CoV). Previous studies have shown that recombinant MERS-CoV carrying the S protein of an Ethiopian isolate replicated slower and was more easily neutralized relative to MERS-CoV carrying the S protein of a Middle Eastern isolate. In this study, we investigated the amino acid(s) in S protein associated with the different viral characteristics between Ethiopian and Middle Eastern MERS-CoVs. The results revealed that a single amino acid difference in the receptor binding domain was sufficient to reverse the neutralization profile. This implies that slight genetic changes can alter the predominant population of MERS-CoV, similar to the transition of variants of severe acute respiratory syndrome coronavirus-2. Careful genetic monitoring of isolates is important to detect the spread of possible virulent MERS-CoVs generated by mutation(s).

研究分野：Virology

キーワード：MERS-CoV Africa Ethiopia Neutralization Virus replication

1. 研究開始当初の背景

中東呼吸器症候群 (MERS) は、MERS コロナウイルス (MERS-CoV) による新興呼吸器疾患であり、2012 年からサウジアラビアで流行している人獣共通感染症ウイルスである。重症急性呼吸器コロナウイルス 2 (SARS-CoV-2) のパンデミック中も流行が続いており、2022 年 10 月 6 日現在、27 カ国で 2591 人の患者が確認されており、894 人が死亡している。MERS-CoV の宿主はヒトコブラクダで、ヒトコブラクダとの密接な接触によりウイルスがヒトに感染する。アフリカ北部および東部諸国のヒトコブラクダは極めて高い血清陽性率を示しているが、ヒトの感染例は報告されておらず、これらの地域で循環するウイルスの特性の違いが示唆されている。我々は、エチオピア分離株のスパイク (S) タンパク質を持つ組換え MERS-CoV が、中東分離株 (EMC、JX869059) の S タンパク質を持つウイルスと比較して、ウイルス複製の遅れや中和交差反応性に違いがあることを以前に報告している。

2. 研究の目的

これまでの研究により、アフリカ株と中東株のウイルス複製、中和交差反応性の違いは S タンパク質に存在することが示唆されており、本研究では S タンパク質における決定基の特定を目的とした。

3. 研究の方法

先の研究でエチオピアのヒトコブラクダから入手した Amibara 分離株 camel/MERS/Amibara/118/2017(MK564474、118 と表記) および、camel/MERS/Amibara/126/2017(MK564475) の S タンパク質配列を持つ組換えウイルスを作製した。組換え MERS-CoV は、EMC 分離株の全長感染性ゲノム (pBAC-MER-wt) を有する BAC クローンを使用して、以前に報告されたように生成した。簡単に説明すると、Amibara 分離株の S タンパク質配列は、Strings DNA Fragments service (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) によって合成された。EMC およびエチオピア分離株の S タンパク質配列を pKS336 ベクターにクローニングした。これらのベクターに対して、site direct mutagenesis 技術を用いて、置換基の挿入などの遺伝子操作を実施した。次に、pBAC-MERS-wt 上の S タンパク質配列を、Red/ET 組換えシステムとカウンターセレクト BAC 改変キット (Gene Bridges, Heidelberg, Germany) を用いて変異した EMC または Amibara/118/2017 S タンパク質配列と置換した。BAC プラスミドで BHK 細胞をトランスフェクションし、Vero/TMPRSS2 細胞と共培養することで組換え体を回収した。感染実験は膜型セリンプロテアーゼ TMPRSS2 を発現する Vero 細胞 (Vero/TMPRSS2) を用いて行った。

4. 研究成果

先の研究 (Front Microbiol 2019, 10:1326 以下同様) において、EMC 株とエチオピア株の S1 領域と S2 領域を入れ替える実験により、中和反応性の違いの決定因子がウイルスの宿主受容体認識に参与する S タンパク質 S1 領域にあることを明らかにした。EMC 株とエチオピア株の S タンパク質の受容体結合ドメイン (RBD) には、EMC の S タンパク質の 390 位 (S390F) の S から F、597 位 (A597V) の A から V という 2 つの共通のアミノ酸の違いがある (図 1a)。そこで、これら 2 つの置換を組換えウイルスに挿入し、交差反応性への影響を Vero/TMPRSS2 細胞を用いた中和アッセイで評価した (図 1b-e)。2013 年に異なるヒトコブラクダからそれぞれ得られた 4 つの血清 (番号 359、363、366、373) を、以前に記述したように中和反応に使用した。以前の報告と一致して、Amibara/118/2017 の S タンパク質は、EMC 分離株の血清よりも高い抗体価を再現的に示した (p < 0.005, Fig. 1b-e)。余談だが、エチオピア MERS-CoV の S タンパク質も EMC の S タンパク質で免疫したマウス血清に対して高い抗体価を示したことから、エチオピア分離株の S タンパク質は EMC 分離株と比較してウイルス分布の地域性ではなく、中和のしやすさがあることを先の研究で示している。EMC の S タンパク質に S390F と

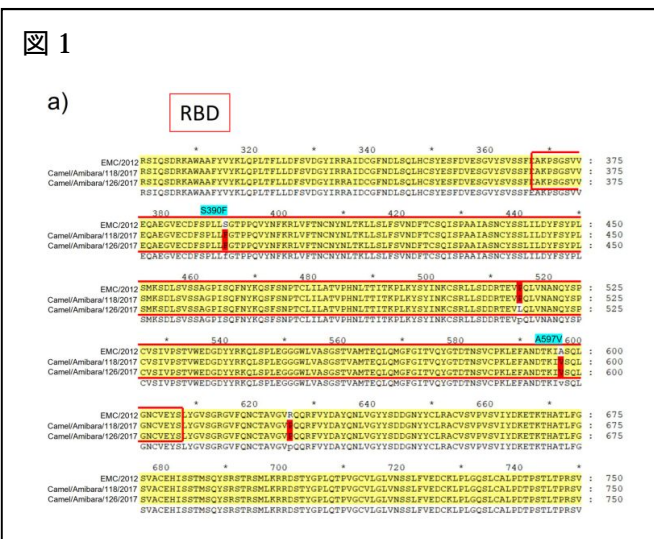


図 1

a)

RBD

EMC2012 RSIQSDRRAWAAFYVIRKLFLLFLDFSVDCYIRRAIDCGFNLSQLHCVIEFDFVEGQVSVSFFARPSGSVW 375
 Camel/Amibara/118/2017 RSIQSDRRAWAAFYVIRKLFLLFLDFSVDCYIRRAIDCGFNLSQLHCVIEFDFVEGQVSVSFFARPSGSVW 375
 Camel/Amibara/126/2017 RSIQSDRRAWAAFYVIRKLFLLFLDFSVDCYIRRAIDCGFNLSQLHCVIEFDFVEGQVSVSFFARPSGSVW 375
 RSIQSDRRAWAAFYVIRKLFLLFLDFSVDCYIRRAIDCGFNLSQLHCVIEFDFVEGQVSVSFFARPSGSVW 375
 EMC2012 ECAEGVECCDFSELLGTFPPGVNFRFLVFMNINLITLISLFSVNDFTCCGISFAAIAASNCYSSLLIDYFVYEL 450
 Camel/Amibara/118/2017 ECAEGVECCDFSELLGTFPPGVNFRFLVFMNINLITLISLFSVNDFTCCGISFAAIAASNCYSSLLIDYFVYEL 450
 Camel/Amibara/126/2017 ECAEGVECCDFSELLGTFPPGVNFRFLVFMNINLITLISLFSVNDFTCCGISFAAIAASNCYSSLLIDYFVYEL 450
 ECAEGVECCDFSELLGTFPPGVNFRFLVFMNINLITLISLFSVNDFTCCGISFAAIAASNCYSSLLIDYFVYEL 450
 EMC2012 SMRSLVSSAGPISQFNFGFSNPTCLILATVPHNLTITKFLRYSYINPKSRLLEDRTVEFLVNAVQYSE 525
 Camel/Amibara/118/2017 SMRSLVSSAGPISQFNFGFSNPTCLILATVPHNLTITKFLRYSYINPKSRLLEDRTVEFLVNAVQYSE 525
 Camel/Amibara/126/2017 SMRSLVSSAGPISQFNFGFSNPTCLILATVPHNLTITKFLRYSYINPKSRLLEDRTVEFLVNAVQYSE 525
 SMRSLVSSAGPISQFNFGFSNPTCLILATVPHNLTITKFLRYSYINPKSRLLEDRTVEFLVNAVQYSE 525
 EMC2012 CVSIYVPTWEDGIVREKLSPLFEGGMLVAGSSTVAMTECLQMGFGITVQYGTITNVCPLFANDRTVLSGL 600
 Camel/Amibara/118/2017 CVSIYVPTWEDGIVREKLSPLFEGGMLVAGSSTVAMTECLQMGFGITVQYGTITNVCPLFANDRTVLSGL 600
 Camel/Amibara/126/2017 CVSIYVPTWEDGIVREKLSPLFEGGMLVAGSSTVAMTECLQMGFGITVQYGTITNVCPLFANDRTVLSGL 600
 CVSIYVPTWEDGIVREKLSPLFEGGMLVAGSSTVAMTECLQMGFGITVQYGTITNVCPLFANDRTVLSGL 600
 EMC2012 GNCVEYELVYSGRQVFCNCTAVGVCRRFYDAYGNLVGYISDGNVYCLACRACVSVVSVIYDREKTRHATLFG 675
 Camel/Amibara/118/2017 GNCVEYELVYSGRQVFCNCTAVGVCRRFYDAYGNLVGYISDGNVYCLACRACVSVVSVIYDREKTRHATLFG 675
 Camel/Amibara/126/2017 GNCVEYELVYSGRQVFCNCTAVGVCRRFYDAYGNLVGYISDGNVYCLACRACVSVVSVIYDREKTRHATLFG 675
 GNCVEYELVYSGRQVFCNCTAVGVCRRFYDAYGNLVGYISDGNVYCLACRACVSVVSVIYDREKTRHATLFG 675
 EMC2012 SVACHISSTMSQYSRSTRLMRRRCSTYGLTFVPGVGLVNSLFLVEKCKLFLGSLCALPDTSPSTLDRV 750
 Camel/Amibara/118/2017 SVACHISSTMSQYSRSTRLMRRRCSTYGLTFVPGVGLVNSLFLVEKCKLFLGSLCALPDTSPSTLDRV 750
 Camel/Amibara/126/2017 SVACHISSTMSQYSRSTRLMRRRCSTYGLTFVPGVGLVNSLFLVEKCKLFLGSLCALPDTSPSTLDRV 750
 SVACHISSTMSQYSRSTRLMRRRCSTYGLTFVPGVGLVNSLFLVEKCKLFLGSLCALPDTSPSTLDRV 750

A597V の一重および二重のアミノ酸置換を導入すると、一般に抗体価が上昇し、中和されやすくなる。一方、Amibara/118 の S タンパク質に逆の置換 (F390S と V597A) を導入すると一般に抗体価が低下するため、中和しにくくなる。これらのことから、EMC とエチオピアの S タンパク質の中和度の違いは、RBD 領域の 1 アミノ酸の違いであることが示唆された。

また、エチオピア S タンパク質を持つ組換えウイルスは、EMC S タンパク質を持つウイルスと比較して、ウイルスの侵入量が減少した結果、ウイルスの複製が低下したことを先の研究で示している。そこで、EMC と Amibara/118 の S1/S2 キメラのウイルス複製について、Vero 細胞および Vero/TMPRSS2 細胞で解析した (図 2a)。

先に報告と同様に、Amibara/118 S タンパク質を持つ組換えウイルスは、感染後 1~2 日目に EMC S タンパク質よりも遅い複製を示した ($p < 0.01$)。S1/S2 キメラ組換えウイルス (S1-EMC/S2-Amibara/118 および S1-Amibara/118/S2-EMC) は、いずれも Vero 細胞において、EMC S タンパク質を有する組換えウイルスに比べて複製速度が遅いことが示された。Vero/TMPRSS2 細胞では、S1/S2 キメラ組換えウイルスの複製が遅くなった。Vero/TMPRSS2 細胞では、S1/S2 キメラ組換えウイルスは感染後 1 日目に複製が遅くなったが、すべての組換えウイルスが同レベルでプラトーに達した。これらの結果は、以前の報告と同じであり、決定基は単一のアミノ酸置換ではなく、S1 および S2 領域それぞれにある複数の変異であることが示唆された。ウイルス複製速度を低下させる可能性のあるウイルス侵入の違いの原因となるドメインを検討したところ、S1 では N 末端ドメイン (NTD)、S2 ではサブドメイン 3 またはコネクタドメイン (SD3/CD) が特定されました。NTD は宿主のシアル酸との相互作用が報告されている。NTD には、宿主細胞との結合に影響を与える可能性のある 4 つのアミノ酸の違いが見つかった (図 2b と c、ピンク)。ウイルス膜の近くに位置する SD3/CD にも 1 つのアミノ酸の違いがある (図 2b と c、オレンジ色)。SD3/CD は中和抗体 G4 のエピトープを含んでおり、このドメインの機能が感染において重要であ

図 1

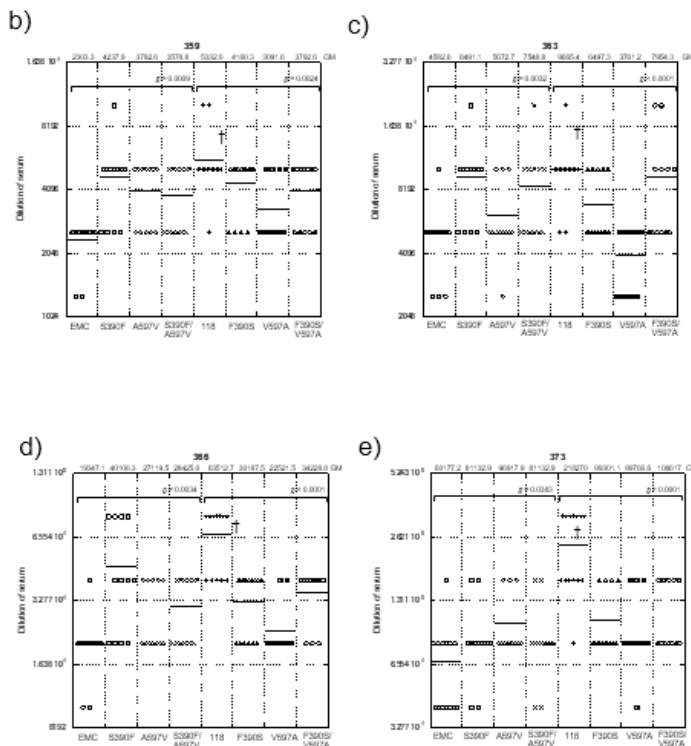
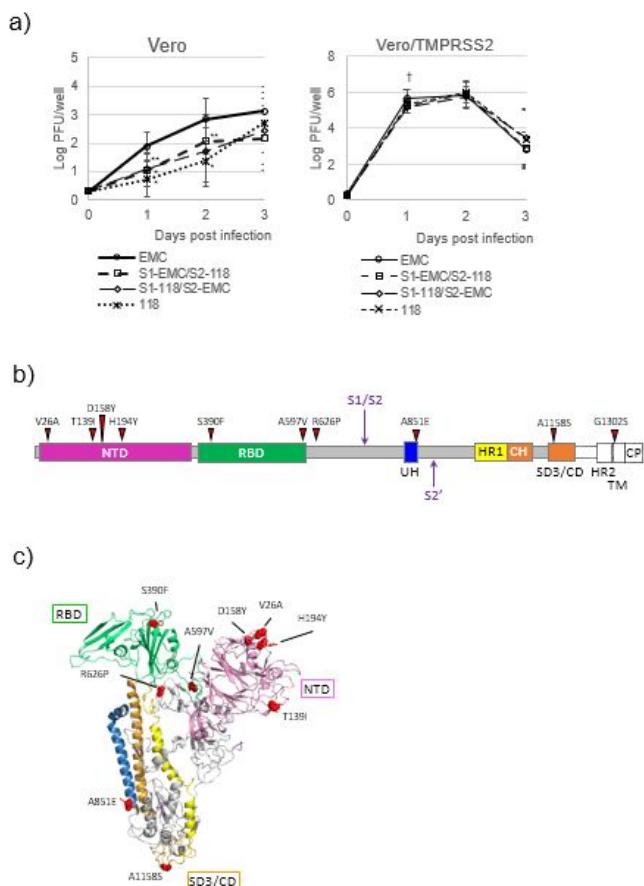


図 2



ることが示唆された。ヒトコロナウイルス 229E (HCoV229E) の実験室株は後期エンドソーム経路(カテプシン経路)を、臨床株は初期エンドソーム経路(TMPRSS2経路)を好んで細胞侵入するが、ウイルス膜に近接する1アミノ酸置換は、プロテアーゼ認識部位の露出度を変化させ、プロテアーゼに対する感受性を変え、ウイルス侵入に影響することが示されている(J Virol 2017 91:e01387)。したがって、S1およびS2のこれらの変異は、集合的にウイルスの複製速度に影響を与える可能性がある(図2a)。

本研究では、EMCとエチオピアMERS-CoV分離株のSタンパク質の抗原性の違いは、RBD領域の1アミノ酸置換に起因することを明らかにした。先行研究のデータも含めると、この差は数倍であることが判明した。インフルエンザウイルスでは、抗原性の「ドリフト」が表面糖タンパク質のアミノ酸置換によって引き起こされることがよく知られている。数倍の違いを示すウイルスは「似ている」ウイルスとされるが、この小さな違いの積み重ねが大きな違いを誘発し、ワクチン免疫の回避につながる。このようなコロナウイルス分離株間の数倍の抗原性差の生物学的意義は、これまで不明なままであった。しかし、SARS-CoV-2のVariants of concern(VOC)の出現により、ワクチン接種者において出現するこの数倍の抗原性の違いの重要性が明らかになり、優勢なVOCが新たに出現したVOCに置き換わることが繰り返されている。我々の研究は、エチオピアMERS-CoVの低複製、易中和性という弱い特性を示唆している。このことは、MERS-CoVの中東株がエチオピアに侵入した場合、すぐに拡散して優勢な変異型になることを示唆している。しかし、エチオピアから中東へのヒトコブラクダの商業輸送は一般に片道であるため、感染したヒトコブラクダを介して中東MERS-CoVがエチオピアに侵入することはあまり考えられない。現在SARS-CoV-2パンデミック中ではあるが、MERS-CoVの病原性株の新地域への拡散を防ぐために、継続的な監視が重要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4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 Shirato Kazuya, Matsuyama Shutoku, Takeda Makoto	4. 巻 75
2. 論文標題 Less Frequent Sequence Mismatches in Variants of Concern (VOCs) of SARS-CoV-2 in the Real-Time RT-PCR Assays Developed by the National Institute of Infectious Diseases, Japan	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 96 ~ 101
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7883/yoken.JJID.2021.213	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 Shirato Kazuya, Kakizaki Masatoshi, Tomita Yuriko, Kawase Miyuki, Takeda Makoto	4. 巻 11
2. 論文標題 Detection of the ORF1 Gene Is an Indicator of the Possible Isolation of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pathogens	6. 最初と最後の頁 302 ~ 302
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/pathogens11030302	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 Sugimoto Satoko, Kakizaki Masatoshi, Kawase Miyuki, Kawachi Kengo, Ujike Makoto, Kamitani Wataru, Sentsui Hiroshi, Shirato Kazuya	4. 巻 11
2. 論文標題 Single Amino Acid Substitution in the Receptor Binding Domain of Spike Protein Is Sufficient To Convert the Neutralization Profile between Ethiopian and Middle Eastern Isolates of Middle East Respiratory Coronavirus	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Microbiology Spectrum	6. 最初と最後の頁 e0459022
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/spectrum.04590-22	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Suwa Reiko, Kume Yohei, Kawase Miyuki, Chishiki Mina, Ono Takashi, Norito Sakurako, Sato Ko, Okamoto Michiko, Kumaki Satoru, Nagai Yukio, Hosoya Mitsuki, Takeda Makoto, Nishimura Hidekazu, Hashimoto Koichi, Shirato Kazuya	4. 巻 11
2. 論文標題 Practical Validation of United States Centers for Disease Control and Prevention Assays for the Detection of Human Respiratory Syncytial Virus in Pediatric Inpatients in Japan	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pathogens	6. 最初と最後の頁 754 ~ 754
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/pathogens11070754	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------