

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05929

研究課題名(和文) 宿主細胞分子SLAM利用能を基にした鯨類モルビリウイルス感染拡大機序の解明

研究課題名(英文) Study of host species spreading mechanism of cetacean morbillivirus infection based on the ability of SLAM usage

研究代表者

關 文 緒 (Seki, Fumio)

国立感染症研究所・ウイルス第三部・主任研究官

研究者番号：20443111

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：鯨類モルビリウイルス(cetacean morbillivirus:CeMV)の1種であるDMVは近年、感染海域と感染宿主を拡大している。本研究では、DMVをCeMVの他の種であるPoMVと比較することで、DMV Hタンパク質の変異について検討した。DMV、PoMV共に宿主である鯨類を含めた多くの動物種のSLAMを利用できることが明らかとなった。また、イルカSLAM利用能力に關与するアミノ酸置換を同定した。またPoMV Hタンパク質と異なりDMV Hタンパク質はCHO細胞で細胞融合活性を生じ、既知の受容体以外の分子による細胞融合能力を持つことも示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではDMVが獲得した変異とSLAM使用能力が感染拡大に貢獻する可能性について明らかにした。近縁のイヌジステンパーウイルスでは、ウイルスHタンパク質における変異が動物種の拡大感染を可能にし、感染地域拡大の一因になったことが明らかになっている。海洋においても新規宿主や感染海域の拡大とウイルス変異の關連を明らかにしたことで、生息・行動域の変化について新しい知見を提示した。また研究結果から得られたDMVの各動物種SLAM利用力はDMV感染拡大による生息動物への影響を予測する上で有効である。

研究成果の概要(英文)：Dolphin morbillivirus (DMV), one subspecies of cetacean morbillivirus (CeMV), has recently expanded among seas and new hosts. In this study, DMV H protein was compared with H protein derived from PoMV (porpoise morbillivirus), another subspecies of CeMV. We examined SLAM usage with DMV-H or PoMV-H by using DSP fusion assay. And the amino acid substitutions of DMV H protein were also examined. Both DMV-H and PoMV-H have the ability to cause cell fusion with many animal species SLAM, including cetaceans. We also identified amino acid substitutions to contribute cell fusion with dolphin SLAM. In addition, DMV-H has cell fusion activity in CHO cells, indicating that it is capable of cell fusion by unknown receptor molecules.

研究分野：ウイルス学

キーワード：鯨類モルビリウイルス Hタンパク質 細胞融合 SLAM

1. 研究開始当初の背景

パラミクソウイルス科モルビリウイルス属のウイルスによるモルビリウイルス感染症は、伝搬力と病原性が特定の動物コロニーが死滅するほど強いことが知られている。鯨類モルビリウイルス(cetacean morbillivirus: CeMV)は、限定した海域で特定の鯨類に感染し大量死をおこす種を含むことが知られていたが、CeMV 種のなかで、地中海のスジイルカ種における流行株であった DMV (dolphin morbillivirus)は、近年メキシコ湾や南大西洋へ感染が拡大しており、ウイルス感染地域は宿主動物の生息域や行動範囲に限定されるため、DMV は新しい動物種へ拡大を始めたことが予測された。広い海域および多動物種に感染を拡大した DMV は、従来の限定した海域で感染・流行した CeMV とは感染性の異なる種へ変化したことが考えられる。しかし、DMV の感染性に関する解析は不足しており、新しい海域に生息する動物種の感受性は明らかでなく、感染拡大による影響は推測できない状況である。

2. 研究の目的

DMV の感染拡大は、新しい感染宿主への感染力の獲得を反映すると考えられるため、DMV が獲得した SLAM 使用能力から、感染海域の拡大を生じた変化を明らかにする。また、DMV における哺乳類 SLAM の使用能力を明らかにすることで、新しい海域で影響をうける動物種を推測する。

3. 研究の方法

(1) DMV-H 及び DMV-F 発現プラスミドの作成

DMV-H 及び DMV-F は DMV muc 株の配列を用いて作成した。Porpoise morbillivirus-H(PoMV-H)は、PMV/IRL88 株の配列を用いて作成した。MeV-H 及び MeV-F は IC323 株の配列を用いた。それぞれの遺伝子配列は哺乳類発現ベクター-pCAGGS に挿入して発現プラスミドを作成した。また、DMV-H と PoMV-H 間のキメラ H 発現プラスミドは site-direct mutagenesis 及び制限酵素サイトを利用して作成した。

(2) SLAM 発現プラスミドの作成

イルカ SLAM アミノ酸配列 N 末端への HA タグの付加は、以前報告された HA-tag-イヌ SLAM と同様に作成し、pCAGGS のマウス IgK leader 配列の後に挿入し発現プラスミドを作成した。また、イルカ SLAM アミノ酸配列 C 末端への mCherry タグの付加は、以前報告された ICM-mCherry と同様に作成し、pCAGGS 由来 pCA7 ベクターに挿入し発現プラスミドを作成した。

(3) 細胞融合能力の測定

CHO 細胞に Dual split protein を発現させ CHO.DSP1-7, CHO.DSP8-11 を作成した。CHO.DSP1-7 と CHO.DSP8-11 を 1:1 で混合してプレートに播いた後、ウイルス H タンパク質発現プラスミド、ウイルス F タンパク質発現プラスミド、または空ベクタープラスミドを共に細胞に導入し、各時間後に Renilla-Glo Luciferase Assay System 試薬(Promega)を用いて luciferase 活性を測定した。

(4) ウイルス分離

漂着鯨類検体は、ストランディングネットワーク北海道から分与を受けた。各検体は、重量の 10 倍量の培地で加えてホモジナイズし、遠心後の上清を分離材料として用いた。Vero/dolphinSLAM 細胞をフラスコに用意し、検体上清を接種し 10 日間観察を行った。

4. 研究成果

(1) イルカ SLAM アミノ酸配列 N 末端の検討

CeMV の H, F, SLAM 発現プラスミドを用いた細胞融合解析を実施するために、イルカ SLAM N 末端のタグ位置について検討を行った。ヒト、イヌ SLAM においては N 末端のシグナル配列を含む 28 アミノ酸を欠損させ HA タグを付加させても細胞融合に明らかな違いが認められないことが報告されているが、近年の研究では CeMV と同じ morbillivirus に属する麻疹ウイルスは SLAM の N 末端付近に結合部位があることが示されている。このため、CeMV がイルカ SLAM の N 末端を欠損させ、代わりに HA タグを付加した SLAM を利用可能か解析した。

イルカ SLAM 全長(doISLAM-FL)、N 末端 20 アミノ酸欠損 SLAM (HAaa20-doISLAM)、N 末端 28 アミノ酸欠損 SLAM(HAaa28-doISLAM)、C 末端 mCherry 付加 SLAM(doISLAM-mCherry)に対し DMV-H と DMV-F を共発現させ DSP 細胞融合解析を行った(図 1)。N 末端欠損 SLAM は DSP 活性が 1/5 1/4 に減少し、細胞融合が減少することが示された。一方で、C 末端 mCherry の SLAM は全長 SLAM と同定の CSP 活性を示し細胞融合への影響は認められなかった。このことから、発現確認には C 末端タグが有効であり、細胞融合活性の測定には全長 SLAM 及び C 末端 mCherry-SLAM が有効であることが明らかとなった。

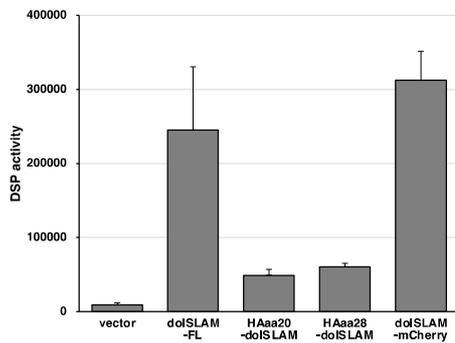


図1. DMV-H 及び DMV-F におけるタグ付加イルカ SLAM 利用能の比較

(2) DMV-PoMV 間の H タンパク質における細胞融合の比較

DMV の流行拡大を SLAM 利用能力から明らかにするために、DMV-H と PoMV-H 間における各種動物 SLAM の細胞融合能力について比較を行った。SLAM は宿主動物種として dolphin と porpoise、その他鯨類の代表種として 2 種 (sperm whale と minke whale)、他動物種 19 種の SLAM を使用し DSP による細胞融合解析を実施した (図 2)。DMV-H 及び PoMV-H 共に、多くの動物種 SLAM の共発現により細胞融合を生じることが明らかとなった。このことから DMV に加え PoMV においても多くの動物種への感染性を潜在的に有していることが考えられた。また、DMV-H は、鯨類 SLAM 及び cowSLAM, sheepSLAM においては PoMV-H より約 1.5-2 倍高い細胞融合活性が認められた。

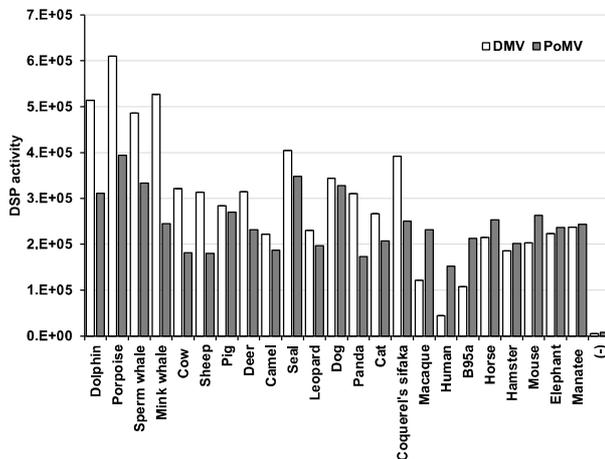


図2. 各種動物 SLAM 共発現における細胞融合活性

(3) DMV-PoMV 間の SLAM 利用能力を变化に関わるアミノ酸置換の解析

DMV-H における PoMV-H より高い細胞融合能力が、DMV 株の拡大に関係するのではないかと推測し、PMV と DMV 株間でキメラ H タンパク質を作成し DMV の細胞融合能力に関係するアミノ酸置換の同定を試みた。解析のために全体のキメラ H を 4 種、また主要な SLAM 結合部位である aa530-572 領域にある置換 3 箇所をそれぞれ置き換えた H を作成した (図 3A)。次に、これらの H タンパク質発現プラスミドを DMV-F、イルカ SLAM と共発現させ細胞融合活性を解析した (図 3B)。その結果、主要な SLAM 結合部位 aa530-572 領域内の 2 カ所のアミノ酸置換 (L548F 及び N539Y) により PoMV-H が DMV-H と同定の細胞融合活性を獲得できることが明らかとなった。

しかしながら、GenBank 上に登録された他の PoMV 株 H 遺伝子のアミノ酸配列と比較したところ、N539 は PoMV-H の鋳型として使用した IRL88 株に特徴的な変化であり他の PoMV では認められなかった。また、L548 は、他の PoMV 株においても認められ、この部位が Phe に変化することでイルカ SLAM 利用能力が上昇することが考えられた。このため、PoMV-H のより一般的なアミノ酸配列を有していると考えられる PoMV-H(N539Y) とイルカ SLAM で細胞融合活性を上昇させるアミノ酸置換 L548F をさらに導入した PoMV-H(N539Y, L548F) を用いてさらに解析を行った (図 3C)。その結果 DMV-H と PoMV-H 間の細胞融合活性の差は、PoMV-H(N539Y) と DMV-H、PoMV-H(N539Y, L548F) と DMV-H では低くなり、PoMV-H(N539Y) と PoMV-H(N539Y, L548F) 間ではイルカ SLAM を除いて差は認められなかった。このため、DMV-H は、一般的な PoMV 株の H 遺伝子 (PoMV-H(N539Y)) に対し鯨類以外の SLAM においてわずかに高い細胞融合活性を示すが、大きな違いは認められないことが明らかとなった。

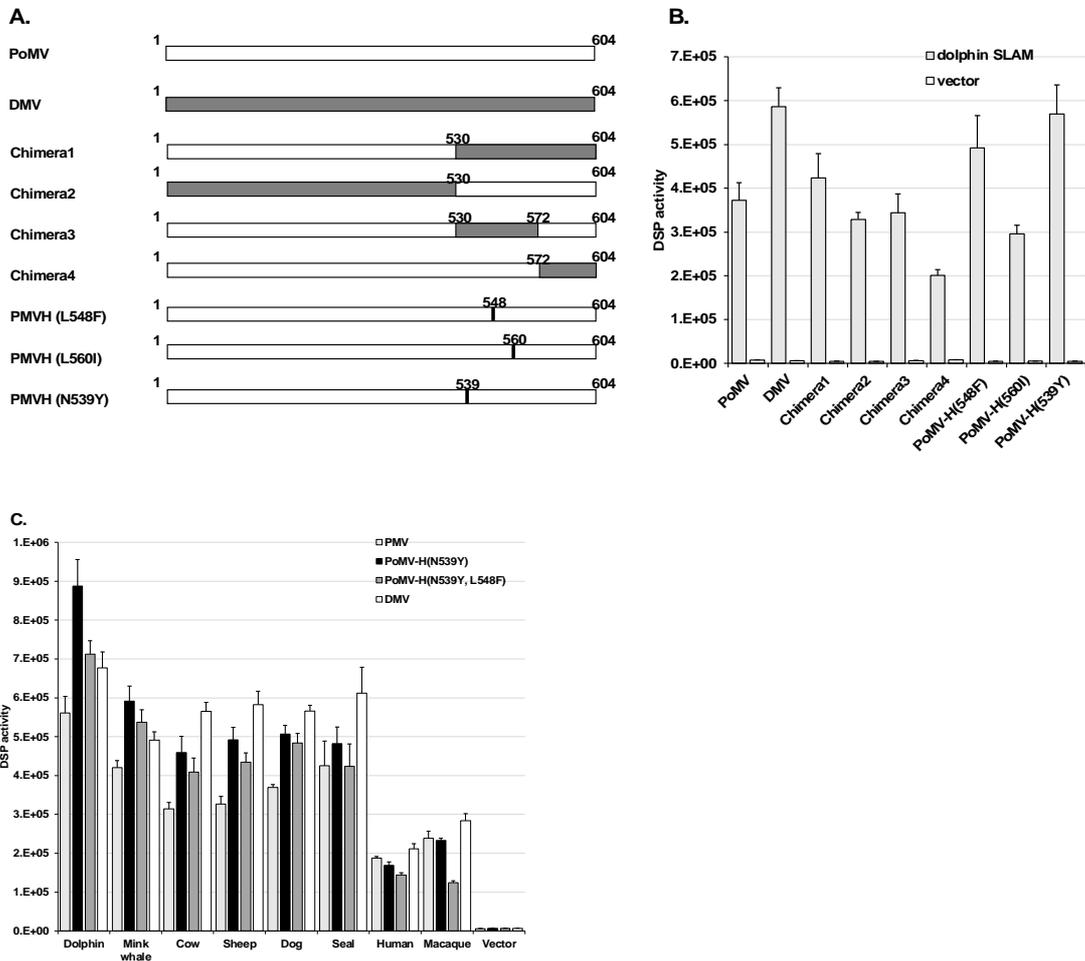


図 3. DMV-PoMV 株間の変異体模式図(A)、イルカ SLAM における細胞融合活性(B)及び多種動物 SLAM における細胞融合活性の比較(C)

(4) CeMV H タンパク質におけるイルカ SLAM に対する細胞融合の経時変化

DMV-H 及び PoMV-H におけるイルカ SLAM での細胞融合活性についてさらに解析するために、細胞へのプラスミド導入後の細胞融合の経時変化を解析した。DMV-H とイルカ SLAM (doSLAM-FL)、また PoMV とイルカ SLAM を共発現した場合、一過性の発現が最大となる 3 日目にかけて徐々に細胞融合活性の上昇が認められた(図 4)。一方で対照に用いた麻疹ウイルス(MeV-H+MeV-F)では 1 日目から速やかに細胞融合活性の上昇を示し、そのあとの上昇は緩やかであった。

DMV-H+DMV-F は、空 vector の共発現において 48 時間後から細胞融合が上昇し、72 時間では DSP 活性が $4E+05$ 程度まで上昇した。DSP assay に用いた CHO 細胞では既知の受容体 SLAM 及び Nectin-4 の発現は認められない。近年、細胞融合能力の高い F では CADM1 及び CADM2 分子を介した細胞融合が生じることが報告されている。CHO.DSP 細胞においてこれら分子が発現しているか解析を行った(図 5)。CADM1, CADM2 が発現している CHP212 細胞と比較して、CHO.DSP 細胞では CADM1 の発現は認められず、CADM2 はわずかなシフトのみを示した。このことから、DMV-H は CHO 細胞表面の他の分子を利用した細胞融合を生じたと推測された。

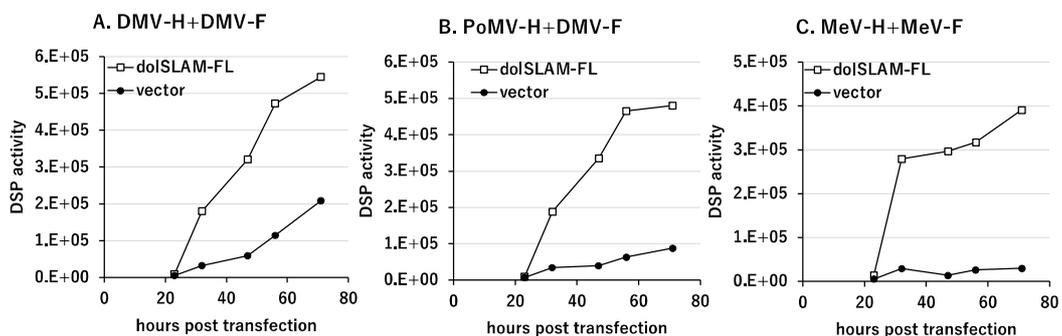


図 4. 各ウイルス H/F とイルカ SLAM の共発現における細胞融合の経時変化

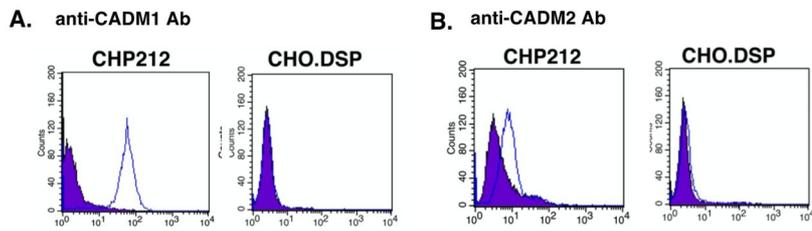


図 5. CHO.DSP 細胞における CAD1, CAD2 発現の解析

(5) 漂着鯨類に対するモルビリウイルス感染有無の検討

日本近海における鯨類モルビリウイルス感染の有無を調べるため、漂着鯨類の調査を行っているスタンディングネットワーク北海道より検体の分与を受けた。2021 年度 9 検体、2022 年度 3 検体、2023 年度 8 検体について Vero/doISLAM 細胞を用いたウイルス分離を実施したが全て陰性であった。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Fumio Seki, Makoto Takeda	4. 巻 66
2. 論文標題 Novel and classical morbilliviruses: Current knowledge of three divergent morbillivirus groups	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microbiology and Immunology	6. 最初と最後の頁 552-563
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1348-0421.13030.	査読の有無 有
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
---------	---------