

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24780303

研究課題名(和文)CDV感染サルでのquasispeciesの解析、リバーシジェネティクス系の確立

研究課題名(英文)Analysis of CDV quasispecies and establishment of the reverse genetics system

研究代表者

吉河 智城 (Yoshikawa, Tomoki)

国立感染症研究所・ウイルス第一部・研究員

研究者番号：20399463

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 0円

研究成果の概要(和文)：研究成果の概要(和文)：従来イヌ等、食肉類のみが罹患すると考えられていたイヌジステンパーウイルス(CDV)感染症がサルで集団発生した。本感染症の病原性メカニズム解明のためサルに感染していたイヌジステンパーウイルス(S-CDV)分離株と、感染サル組織に存在するCDVゲノムF、H遺伝子の配列バリエーションを次世代シーケンサーにて解析した。またCDVゲノム配列を決定後、これをベースとしたリバーシジェネティクスシステムを確立し、in vivoでのゲノム配列を保持した感染性のあるウイルスの作製を試みた。

研究成果の概要(英文)：There was a canine distemper outbreak, which is generally known to be occurred in carnivore happened in the monkey colony in an animal quarantine. Hence to understand the pathogenesis, the sequences from the in vitro isolates and from these of clinical specimens were determined and analyzed by utilizing next-generation sequencing technique. In addition, establishment of the reverse genetics system based on the S-CDV sequence, which enable to produce the infectious particles from the plasmids were tried.

研究分野：畜産学・獣医学

科研費の分科・細目：応用獣医学

キーワード：イヌジステンパーウイルス

## 1. 研究開始当初の背景

イヌジステウイルス(CDV)はパラミクソウイルス科モルビリウイルス属のウイルスである。特にイヌ科の動物はウイルスに高い感受性を持つ。感染初期段階においてウイルスの標的組織と考えられるリンパ球組織では壊死などが起こり、リンパ球減少が見られ、更には呼吸器、消化器症状を呈する。ウイルスは神経細胞、グリア細胞にも感染に脳炎なども引き起こす。感染性が高く症状も重篤であるために現在モイヌの重要な疾患である。2008年に輸入カニクイザルの検疫中にCDV感染症が流行し、約30頭が死亡した。ウイルス学的、血清学的、病理学的解析から、発症サルはCDVに感染し、肺炎、脳炎、および全身感染を起こしていることが確認された。時期を前後して、中国ではさらに大規模なサルのCDV感染症が発生している。

## 2. 研究の目的

CDVはイヌ科動物を主とした食肉類における感染症であり、ヒトや霊長類には感染しないと考えられてきた。しかしCDVに近縁の麻疹ウイルスがヒトや霊長類には感染するため、霊長類で致死的なCDV感染症が流行したことは、食肉類の動物だけでなくヒトを含む霊長類にも病原性を持ちうるという重要な意味を持つ。従って、まず、サルで流行したCDV(S-CDV)ゲノムを次世代シーケンシングの手法を用いて詳細に決定し、その遺伝子の特徴、quasispeciesなどの塩基配列のバリエーションと病原性との関連を解析した。更にここから得られた知見をフィードバックし、リバーシジェネティクスシステムを確立し、in vivoでのゲノム配列を保持した感染性のあるウイルスの作製を試みた。本研究はS-CDVの病原性のメカニズムを解明する水端となるため、それ以降の研究の成否をも担う重要な役割を持つ。

## 3. 研究の方法

### (1)次世代シーケンシング

国内検疫施設内のサルコロニー内で流行した時のS-CDV感染サルPBMCより、感染レセプターであるイヌSLAMを恒常的に発現させたVero細胞を用いて分離された4株のS-CDVを用いた。その全領域をRT-PCRで増幅したものをサンプルとして次世代シーケンサーで塩基配列を決定、またそのバリエーションの解析を行った。さらに感染サル体内のウイルスの塩基配列のバリエーションを検討すべく、PBMCからRNAを抽出した。ここからRT-PCRでS-CDVのF遺伝子、H遺伝子領域を増幅したものをサンプルとして、次世代シーケンサーで塩基配列とそのバリエーションの解析を行った。

### (2)リバーシジェネティクスシステムの確立

リバーシジェネティクスシステムの確立を行うべく、その上流にT7プロモーターを保持し、S-CDVゲノム全長RNAをトランスフェクションした細胞内で発現する完全長ゲノム発現プラスミド、そしてゲノムRNAを鋳型として感染性を持ったウイルス粒子を形成するためのタンパク質発現に必須であるN、P、Lタンパク質発現プラスミドを作製した。

## 4. 研究成果

(1)分離されたS-CDVの継代プロファイルを図1に示す。感染サルPBMCとイヌSLAM発現Vero細胞を共培養することで分離されたウイルスはそのサル個体番号別に4株存在する。特に#7と10についてはアウトブレイク初期、11、12は後期に発症した猿である。更に#7についてはイヌSLAM発現細胞で一度分離したウイルス#7-dを更にヒトSLAM発現Vero細胞に順化させた#7-hが存在する。これらの遺伝子配列について株内、または株間でバリエーションが存在する場所を図2に示した。まずアウトブレイク初期のサルから分離された株と比較して、後期のサルから分離された株11、12はゲノム全体と通して塩基配列のバリエーションが蓄積している傾向が見られた。M遺伝子上3502番の塩基はアミ

ノ酸変異を伴っており、24番目のアミノ酸がTからSに100%置換されている株と、Sが80%以上を占める株のバリエーションが存在した。そして、ヒトSLAM発現Vero細胞に順化させた#7-hは#7-dと比較して感染レセプターとの結合に関するH遺伝子上の541番目のアミノ酸がPではなくSが優位であった。興味深いことに感染サル組織中に存在するウイルスの塩基配列を調べたところ、541番目のアミノ酸はPの個体とSの個体の両方が存在することが判明した(図3)。このことは541番目のアミノ酸はPよりもSのほうがヒトSLAMに対する親和性が高い可能性、そしてヒトSLAMに対して親和性の高いウイルスはすでにサルに感染していたウイルスにおけるquasispeciesとして存在することを意味する。

(2)分離されたウイルス株#7-dのRNAを元にRT-PCRを用いてウイルス遺伝子を増幅し、これをプラス未ベクターに組み込んで完全長ゲノム発現プラスミドpCDV-CYN7-dVを作製した。ウイルスゲノム配列は、T7プロモーターを介して、T7ポリメラーゼを発現する細胞内でRNAに転写される。また、その5'末端はリボザイムによって適切にトリムされる。さらに、N、P、Lタンパク質発現プラスミドを作製した。この発現プラスミドにはS-CDVの遺伝子を使用した。発現ベクターpKS336に各遺伝子のオープンリーディングフレームを導入して作製した。今回作成したプラスミドを完全長ゲノム発現プラスミドと同時に細胞にトランスフェクションをした後にイヌSLAMを発現しているVero細胞と共培養を行い、感染性ウイルスの回収を試みたが、現時点では感染性ウイルスの発現は確認できなかった。

以上の結果より、S-CDVに特徴的な遺伝子配列及びバリエーションが分離株及び、感染サル検体からの次世代シーケンシングによる配列決定により明らかとなった。この特徴を詳細に解析するために必須であるリバーシジェネティクスシステムの確立を試みたが現時点では感染性粒子の回収には至っていない。引き続きシステ

ムの確立を目指し、シーケンスから得られた知見について分子生物学的手法を用いて解析することが重要である。

## 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2件)

Sakai, K., N. Nagata, Y. Ami, F. Seki, Y. Suzuki, N. Iwata-Yoshikawa, T. Suzuki, S. Fukushi, T. Mizutani, T. Yoshikawa, N. Otsuki, I. Kurane, K. Komase, R. Yamaguchi, H. Hasegawa, M. Saijo, M. Takeda and S. Morikawa (2013). "Lethal canine distemper virus outbreak in cynomolgus monkeys in Japan in 2008." *Journal of Virology* 87(2): 1105-1114. DOI 10.1128/JVI.02419-12 査読あり

Sakai, K., T. Yoshikawa, F. Seki, S. Fukushi, M. Tahara, N. Nagata, Y. Ami, T. Mizutani, I. Kurane, R. Yamaguchi, H. Hasegawa, M. Saijo, K. Komase, S. Morikawa and M. Takeda (2013). "Canine distemper virus associated with a lethal outbreak in monkeys can readily adapt to use human receptors." *Journal of Virology* 87(12): 7170-7175. DOI 10.1128/JVI.03479-12 査読あり

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

吉河 智城 (YOSHIKAWA, Tomoki)

研究者番号:20399463

Samples for Next Generation Sequencing

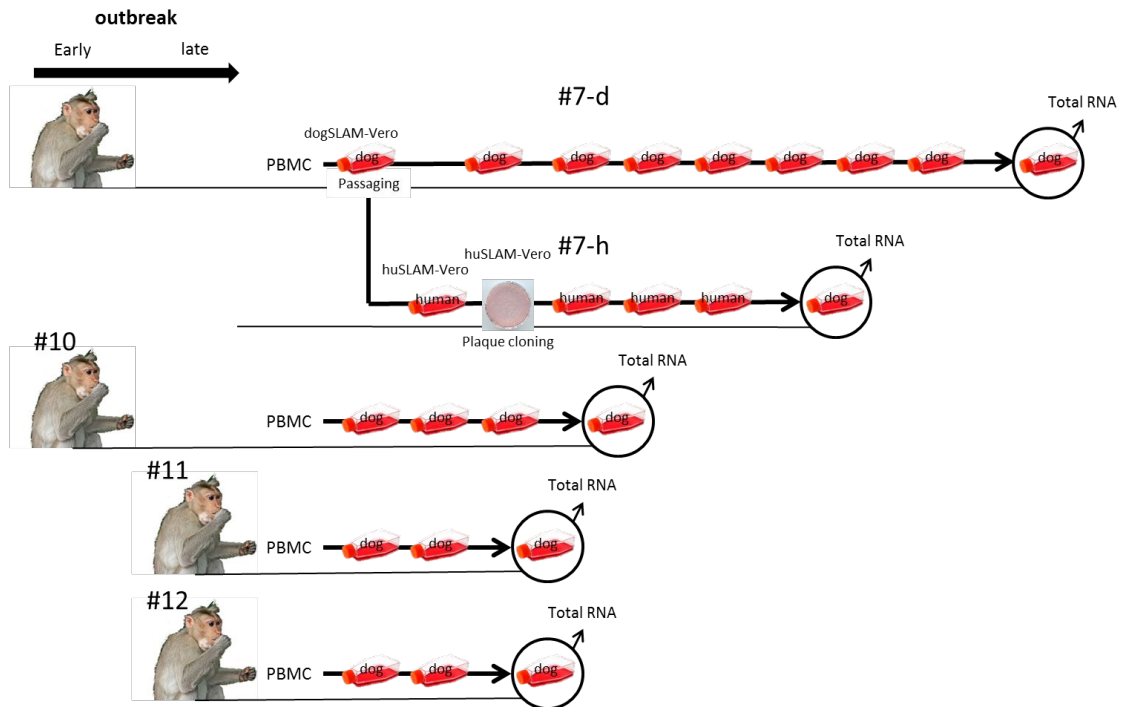


図1 分離された S-CDV のプロフィール。

CDV Isolates mutation map

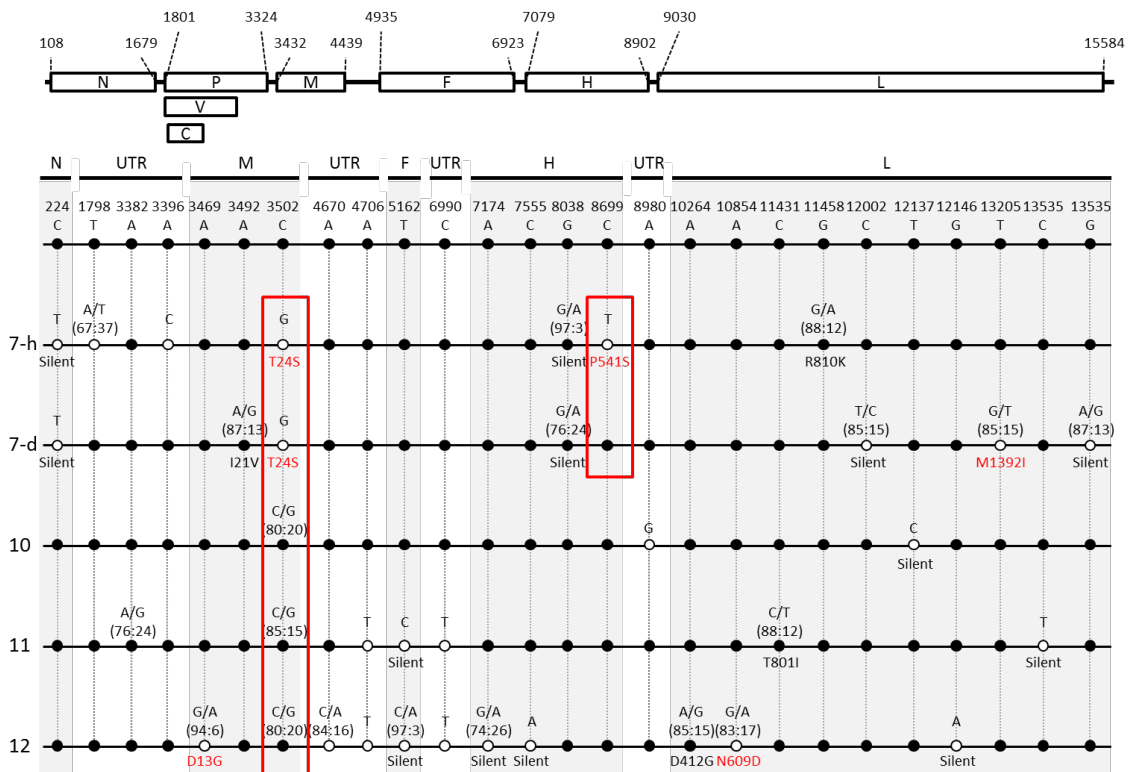


図2 次世代シーケンスによって決定した分離株の遺伝子配列の違い、及びバリエーション。各株間でメジャーな塩基を最上部に示す。メジャーな配列と異なる場合はその塩基を示し、更に株内でバリエーションが存在する場合にはその割合を括弧内に示してある。それがアミノ酸変異を伴う場合には赤字で示す。

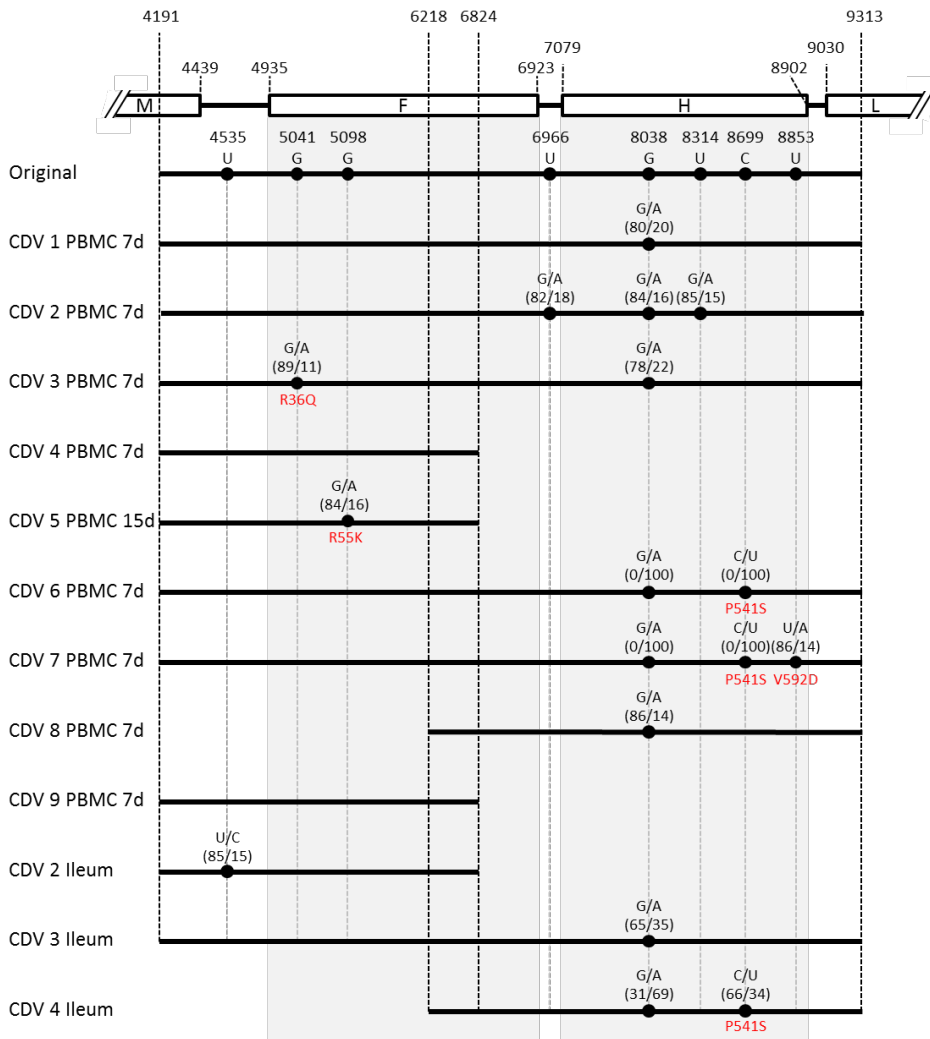


図 3 次世代シーケンスによって決定した感染サル各個体 PBMC、及び回腸中に存在するウイルスの F 遺伝子、及び H 遺伝子上の塩基配列のバリエーション。

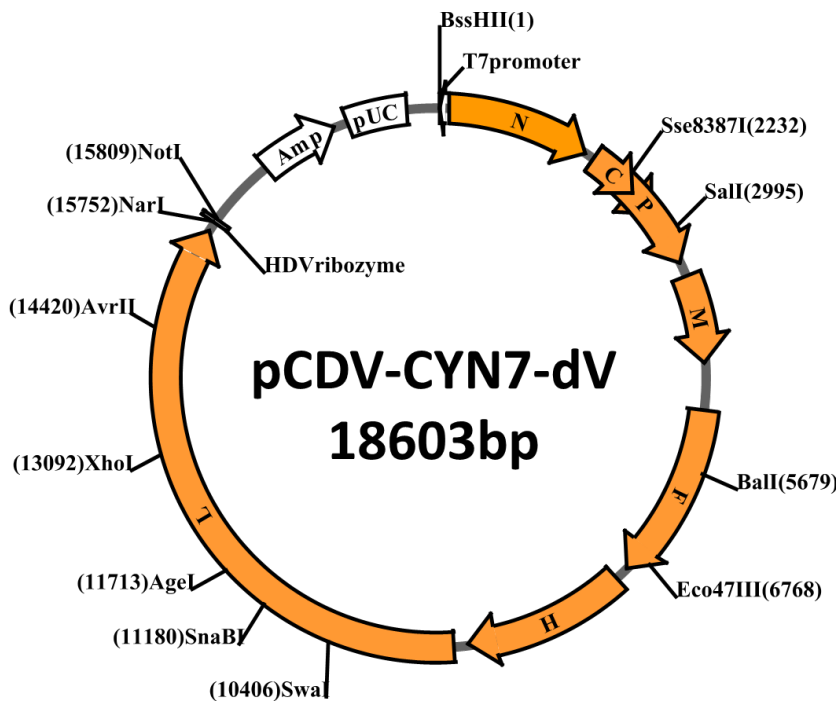


図 4 S-CDV ゲノム完全長発現プラスミド