

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660222

研究課題名(和文) アレナウイルスの異種動物間感染における分子動態の解析

研究課題名(英文) Molecular analysis of xenotropic infection of arenaviruses

研究代表者

石井 秋宏 (Ishii, Akihiro)

北海道大学・人獣共通感染症リサーチセンター・助教

研究者番号：90421982

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：アフリカ ザンビア共和国で採集した、マストミスを含む様々な齧歯類動物の保有するアレナウイルスを分離し、マストミスから新規LunaウイルスSLW株、Grammomys属ネズミからSolweziウイルスを発見した。これらのウイルス及び、これまでに分離したアフリカンピグミーマウス由来Lunkウイルスの細胞侵入機構を解析するため、近縁種であるラッサウイルスの細胞侵入受容体であるLAMP-1の機能を検討した結果、Lunaウイルスは齧歯類動物のLAMP-1を受容体とするが、Solweziウイルス及びLunkウイルスは受容体として利用できないことを明らかとした。

研究成果の概要(英文)：We detected and isolated various species of arenavirus in wild rodent in Zambia. A novel Luna virus strain in mastomys and a novel arenavirus species of Solwezi virus in Grammomys rodents were isolated. To elucidate cellular entry mechanism of Luna virus, Solwezi virus, and previously isolated Lunk virus in African pigmy mouse, the known entry receptor of LAMP-1 for Lassa virus was examined its function. Notably, rodent LAMP-1 was available of the receptor for Luna virus, but not for Solwezi virus and Lunk virus.

研究分野：ウイルス学

キーワード：アレナウイルス ザンビア 細胞侵入機構

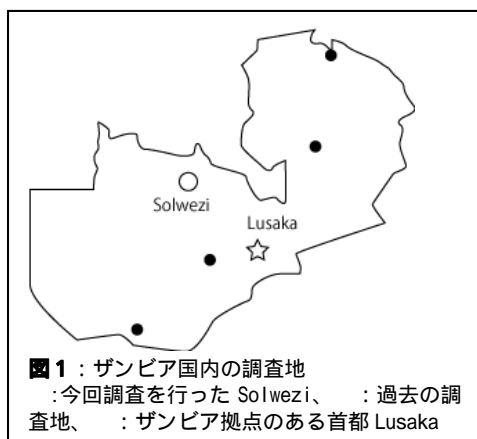
1. 研究開始当初の背景

アフリカ、アジア等旧大陸で見いだされるアレナウイルス (Old World Arenavirus: OWA) は齧歯類動物に保有されるウイルスで、遺伝学的にはラッサウイルス群、Lymphocytic choriomeningitis (LCM) ウイルス群に大別される。本研究者は、これまでザンビア共和国内で齧歯類動物の保有するアレナウイルスの調査を行い、マストミスから新規のラッサウイルス様ウイルスである Luna ウイルス (LUNV)、アフリカンピグミーマウスから新規 LCM ウイルス様 Lunk ウイルス (LNKV) を発見している。

西アフリカのマストミスに保有されるラッサウイルスは、ヒト出血熱であるラッサ熱を引き起こす人獣共通感染症病原体である。一方、他の齧歯類動物に保有されている OWA 及び、アフリカ中央部から東部、南部で検出されるマストミス由来の OWA は病原性を有しないと考えられている。また、ザンビアでは 2008 年に新規アレナウイルス (Lujo ウイルス) による出血熱が発生し、最終的に 4 人の死亡者が出た。Lujo ウイルスは遺伝学的に OWA に属すると考えられるが、これまでに知られているアレナウイルスとは大きく異なり、自然宿主動物を含め不明な点が多い。OWA を含むアレナウイルスの宿主特異性や、病原性に関する遺伝的要因は明らかとされていない部分も多く、アフリカにおける疫学的調査も未だ途上である。

2. 研究の目的

ザンビア国における野外調査で、新規アレナウイルスの発見と解析から、アフリカのアレナウイルスの分布を明らかとすること、これまでに得られたウイルス株と併せて、宿主特異性や、病原性に関わると考えられる因子を明らかとすることを目的としている。



3. 研究の方法

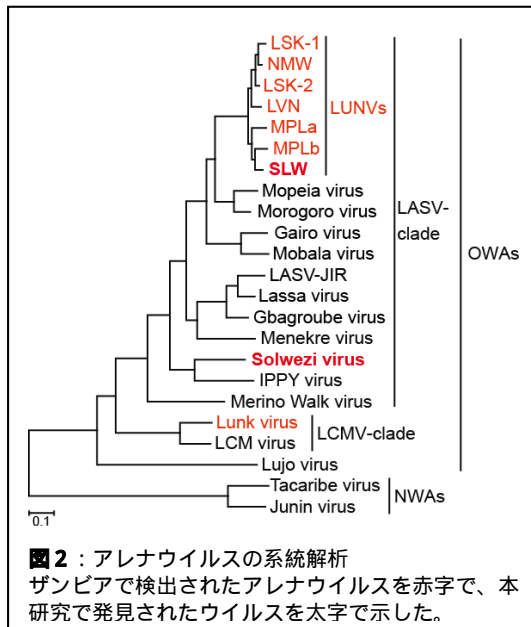
ザンビア国 Solwezi (図 1) において捕獲した齧歯類動物の腎臓から RNA を抽出し、OWA に対するユニバーサルプライマーを用いた

RT-PCR でアレナウイルスの検出を試みた。捕獲した齧歯類動物の種は *cytochrome b* 遺伝子配列の相同性で決定した。

アレナウイルス陽性の腎臓試料は、乳剤として VeroE6 細胞に接種してウイルスを分離した。得られたウイルスは、次世代シーケンサーを用いて全ゲノムを決定し、既知のウイルスゲノムを含めて、遺伝系統学的解析を行った。これらのウイルスの宿主特異性の解析については、細胞侵入機構に注目し、関連遺伝子の欠失細胞や、過剰発現系を構築し、各ウイルスの感染能を検討した。

4. 研究成果

Solwezi 近郊で捕獲した齧歯類動物 89 頭の腎臓試料の RNA を検査した結果、56 頭のマストミスの内 1 頭、2 頭の *Grammomys* 属ネズミの内 2 頭がアレナウイルス陽性であった。それぞれ、VeroE6 細胞に腎臓乳剤を接種し、ウイルスを分離した。次世代シーケンサーを用いて全ゲノムを解析し、相同性解析をした結果、マストミス由来の株は LUNV の新規株であること、*Grammomys* 属ネズミ由来株は新規アレナウイルスであることが明らかとなり、それぞれ Luna ウイルス SLW 株及び、Solwezi ウイルス (SOLV) と命名した (図 2)。



新規アレナウイルス種である SOLV は *Grammomys* 属ネズミから分離された初めての種であり、遺伝学的にはラッサウイルス群に属すると考えられる。次に、他のザンビア由来アレナウイルスであり、ラッサウイルス群に属する Luna ウイルスと LCM ウイルス群に属する Lunk ウイルスに対する抗血清を用いて反応性を確認した。Solwezi ウイルスは抗 Luna ウイルス血清に反応性があり、確かにラッサウイルス群に属することが明らかとなった (図 3)。

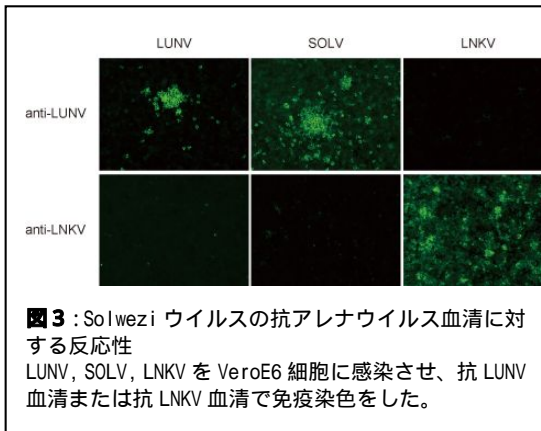


図3 : Solwezi ウイルスの抗アレナウイルス血清に対する反応性
LUNV, SOLV, LNKV を VeroE6 細胞に感染させ、抗 LUNV 血清または抗 LNKV 血清で免疫染色をした。

これまで、OWA の細胞侵入受容体としては、 α -dystroglycan が考えられていたが、近年、Lysosomal associated protein-1(LAMP-1)がラッサウイルスに必須の受容体であり、宿主特異性を規定している因子であることが報告された。そこで、共にラッサウイルス群でありながら異なる宿主動物を持つ LUNV 及び SOLV の細胞侵入機構の解析をするため、HEK293 細胞の LAMP-1 遺伝子を欠失させ、各宿主動物の LAMP-1 発現系を構築した(図 4)。

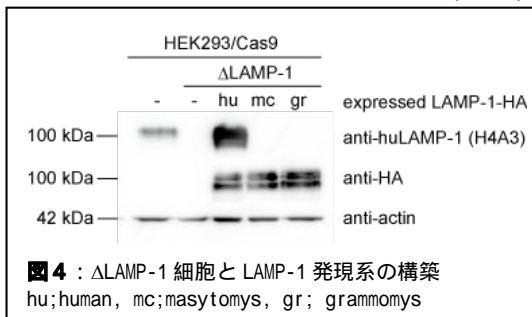


図4 : Δ LAMP-1 細胞と LAMP-1 発現系の構築
hu;human, mc;masytomys, gr; grammomys

HEK293 細胞は CRISPR/Cas9 システムによるゲノム編集技術を用いて LAMP-1 遺伝子にフレームシフト変異を導入し、限外希釈によって Δ LAMP-1 細胞をクローニングした。ウェスタンブロットで内在性のヒト LAMP-1 が確かに発現していないことを確認し、C 末端に HA タグを付加した mastomys LAMP-1 及び、grammomys LAMP-1 を発現させた。これらの細胞に対する Luna ウイルス及び Solwezi ウイルスの感染能を免疫染色で観察した(図 5)。

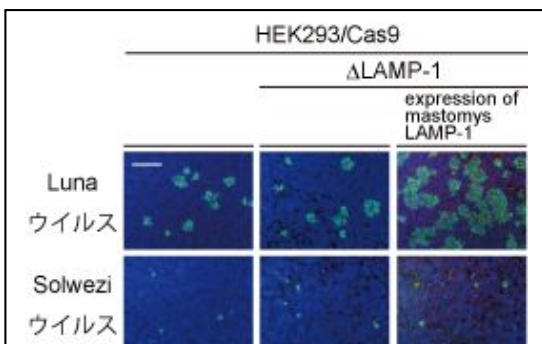


図5 : LAMP-1 発現調節細胞に対する LUNV 及び SOLV の感染能の検討
感染ウイルスフォーカスの免疫染色像(緑)、核(青)、発現 LAMP-1(赤)。

Luna ウイルス及び Solwezi ウイルスは

HEK293 細胞に感染性を持つが、LAMP-1 欠失細胞でも感染能を失わず、同様の感染能が観察された。Luna ウイルスについては、欠失細胞にマストミス及び grammomys からクローニングした LAMP-1 遺伝子を発現することで感染能が増大したことから、Luna ウイルスは LAMP-1 依存/非依存的な 2 つの感染経路を持つことが明らかとなった。一方、Solwezi ウイルスは LAMP-1 過剰発現では感染能に変化はなく、LAMP-1 非依存的な経路のみを持つことが明らかとなった。

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 1 件)

石井秋宏、「アフリカ野生齧歯類動物およびコウモリの保有する潜在的な人獣共通感染症病原体」医学のあゆみ、査読無、Vol.253、No.1、2015、pp.37 - 42

[学会発表](計 1 件)

石井秋宏 第 157 回日本獣医学会学術集会シンポジウム「人獣共通感染症の先回り対策策定に向けた情報戦略」(招待講演)平成 26 年 9 月 11 日 北海道大学、札幌

[図書](計 0 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：
出願年月日：
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

石井 秋宏 (ISHII, Akihiro)

北海道大学・人獣共通感染症リサーチセン

ター・助教

研究者番号：9 0 4 2 1 9 8 2

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：