

令和元年6月25日現在

機関番号：34204

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09112

研究課題名(和文)麻疹流行株交代現象の解析 排除状態維持のためのウイルス伝播能力の分子基盤

研究課題名(英文) Analysis on the genotype transition of measles virus prevailing in Japan - molecular bases explaining the ability of the virus to spread in the field

研究代表者

伊藤 正恵 (ITOH, MASAE)

長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・教授

研究者番号：10201328

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：麻疹ウイルスの増殖特性の遺伝子型による違いを明らかにする目的で、日本国内で1990年代後半に流行したD3遺伝子型と2000年代になってこれに置換したH1遺伝子型について比較した。Vero/SLAM細胞における感染拡大速度は、両ウイルスで明らかに異なっていた。D3-H1型キメラウイルスの細胞融合と粒子形成は、H蛋白質ではH1型、F蛋白質では逆にD3型により促進されたが、H、F蛋白質が同じ遺伝子型由来の場合には相互に補完し合い、H1型とD3型で差が認められなかった。M蛋白質の機能には差はなかった。以上の結果から、D3型とH1型の増殖性の違いは、他のウイルス蛋白質も関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

麻疹ウイルスは、A遺伝子型のワクチンが野生株の全ての遺伝子型に対して有効で遺伝子型間で抗原性に大差がなく、遺伝子型特異的抗原性や血中抗体の保有状況など従来の疫学因子では日本国内で流行株が置換した現象を説明できない。これまで遺伝子型間で、増殖特性の比較はほとんど行われてこなかったが、本研究では、D3型とH1型で大きく異なること、ウイルス蛋白質の機能も遺伝子型で違いのあることを明らかにした。遺伝子型間でのこの違いが流行株交代を説明する可能性があり、その意義は大きい。D3型とH1型の増殖特性を決定するウイルス蛋白質の同定と機序の解明には至らず今後の課題である。

研究成果の概要(英文)：Measles virus (MV) is genetically highly variable and classified into 24 genotypes, whose comparison among genotypes has hardly been performed so far. Here, the growth characteristics were studied on the genotype D3- and H1-MV that caused outbreak in Japan in the late 1990s and after 2000, respectively. The growth pattern of the H1-MV absolutely differed from that of the D3-MV. The H protein of the H1-MV enhanced, but the F protein reduced the cell fusion as well as the infectious progeny virus production compared to those of the D3-MV. The results demonstrated for the first time that functional activities of MV proteins differ, leading to the specific growth characteristics depending on the genotypes. Transition of the MV genotype prevailing in an endemic area could not be explained by the antigenicity of the virus and immunized status of the residents since MV is thought to be serologically monotypic. Difference in growth characteristics might be possible to cause the transition.

研究分野：ウイルス学

キーワード：麻疹ウイルス 遺伝子型 流行株 個体間伝搬

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 麻疹ウイルスは、宿主細胞レセプターとして CD150 および nectin4 を使い分け、異なる組織へ感染する特異なウイルスである。経気道的に侵入したウイルスは、まず免疫系細胞上の CD150 を利用して樹状細胞やマクロファージ、続いてリンパ球で増殖し全身感染を起こす。感染後期には、nectin4 を利用して気管や尿管の上皮細胞で増殖し、これらの内腔側へ感染性粒子を放出することにより体外へ出、次の感受性者へと感染していく。従って、これらの極性上皮細胞での増殖は、ウイルスのヒトからヒトへの伝播に密接に関係していると考えられる。

(2) 国内の麻疹では、C1 型(1984 年以前)→D3 型(1987-1988 年)→Palau-typeD5 型(1991 年以降)→Chicago-typeD3 型(1997-1999 年)と大流行毎に遺伝子型が交代し、2000 年以降、侵入した中国由来の H1 型が土着の D3 あるいは D5 型に置き換わり主流となった。しかし、血中抗体の保有状況や遺伝子型特異的抗原性など従来の疫学因子では流行株の交代現象を説明できない。

(3) 麻疹ウイルスは、A 遺伝子型のワクチンが野生株の全ての遺伝子型に対して有効で遺伝子型間で抗原性に大差がないこともあり、これまで遺伝子型間での性状比較はほとんど行われていない。遺伝子型間で上皮細胞での増殖と感染性粒子産生能が異なれば、感染者からのウイルス排出力と感染伝播能力の差に繋がり、流行株の交代現象が理解できる可能性がある。

2. 研究の目的

(1) 麻疹大流行前後のウイルス間で、上皮細胞における感染挙動を比較して感染性粒子産生メカニズムを探り、その能力の差と流行株交代現象の関連について明らかにする。

(2) 関わるウイルス蛋白質の機能と構造の特徴を明確にし、その蛋白質構造に基づいて、あらゆる麻疹ウイルスの感染性粒子産生能と伝播能の予測を試みる。

3. 研究の方法

(1) 国内の麻疹で流行株交代現象が認められた D3 遺伝子型と H1 遺伝子型について、EGFP 発現キメラウイルスを用いて Vero/SLAM 上皮細胞における感染拡大と感染性粒子産生能を比較し、これが流行株交代現象に関連するか検討する。増殖性の違いの原因となるウイルス蛋白質とアミノ酸を同定し、M 蛋白質の粒子形成能、H および F 蛋白質のレセプター結合能や融合能などの機能への影響を調べ、蛋白質上の機能部位に対応させて構造の特徴を明確にする。

(2) 続いてやはり流行株交代現象が認められた C1 遺伝子型と D3 遺伝子型、認められなかった D9 遺伝子型と H1 遺伝子型について、同様に解析する。さらに 24 の各遺伝子型ウイルスの粒子産生能をそのアミノ酸配列と機能部位の構造から推測して伝播能を予測する。

4. 研究成果

(1) M および H 蛋白質の影響

麻疹ウイルスでは、感染細胞の細胞膜直下で M 蛋白質が粒子形成能を発揮する。M 蛋白質は、H 蛋白質の細胞質内領域と相互作用することにより感染性粒子産生を促進すると同時に、感染細胞と隣接する非感染細胞間の細胞融合を抑制する。M 蛋白質と H 蛋白質の機能を D3 型と H1 型間で比較する目的で、H1 遺伝子型の M および H 蛋白質を持つ D3 型キメラウイルスを作製した(図 1)。Vero/SLAM 細胞に感染させたところ、細胞融合能、感染性ウイルス粒子産生能ともに H 蛋白質が H1 型の時に高く、M 蛋白質の影響は D3 型と H1 型間で大差はなかった(図 2)。その結果、H1 遺伝子型の H 蛋白質を持つ組換えウイルスの感染拡大が速かった。

一方、リンパ球系の B95a 細胞では、4 つのウイルス間で細胞融合能および感染性ウイルス粒子産生能に違いは認められず、H1 型の H 蛋白質で見られた増殖促進効果は、上皮細胞に特異的であると考えられた。



図1. D3- H1遺伝子型組換え麻疹ウイルス

(2) F 蛋白質の影響

次に、融合活性を担い、感染の際エンベロープ融合や細胞融合を引き起こす F 蛋白質について検討した。H1 型の F および H 蛋白質を持つ D3 型キメラウイルスを作製し (図 1)、Vero/SLAM 細胞に感染させると、H 蛋白質とは逆に、H1 型の F 蛋白質は増殖を抑制した (図 3)。蛋白質発現系でそれぞれの F 蛋白質の融合活性を測定すると、H1 型の F 蛋白質は D3 型に比べ、低い活性を示した (図 4)。その結果、H1 型の H 蛋白質と F 蛋白質を併せ持つと両者が打ち消しあって、感染拡大速度は D3 型と変わらないことが明らかとなった。

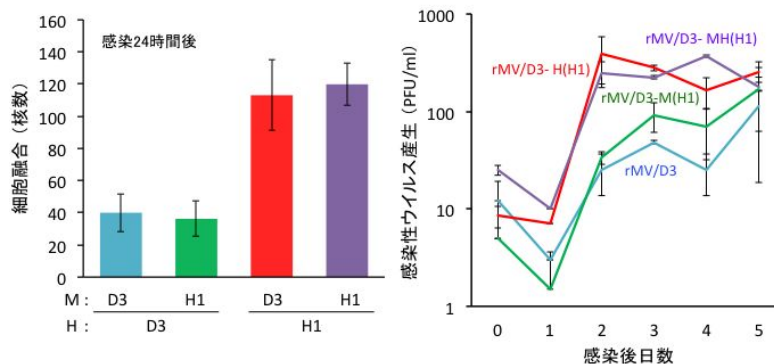


図2. H1遺伝子型H蛋白質の増殖への影響

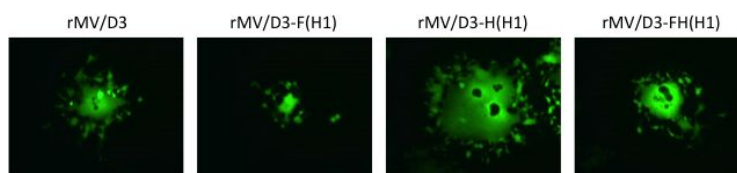


図3. H1遺伝子型F蛋白質の増殖への影響

(3) H1 遺伝子型ウイルスと D3 遺伝子型ウイルスの比較

以上の結果から、D3 型と H1 型では、H 蛋白質と F 蛋白質の活性に差があることが明らかとなり、麻疹ウイルスの遺伝子型により、各ウイルス蛋白質の持つ機能活性が異なることが初めて示された。そして、このことが遺伝子型間で増殖能力の差を生み出す可能性が考えられる。

D3 型と H1 型では、上皮細胞における感染性粒子産生に焦点を当て、これに直接関わると予測して M、H および F 蛋白質について解析を行なったが、お互いの機能を補完する形となり、増殖を変化させる効果は認められなかった。そこで、M、H、F 以外の遺伝子も全て

H1 遺伝子型に置換した H1 遺伝子型ウイルスを作製して (図 1) D3 型と比較すると、細胞融合、粒子形成とも大きく異なり、その結果、感染拡大速度に違いが確認された。従って、D3 型と H1 型の増殖性の違いは、M、H、F 以外の遺伝子も関わっているものと推測され、今後、その同定とメカニズムについて追求していく。さらに、他の遺伝子型についても検討し、遺伝子型依存的増殖能の違いを明らかにすると共に、流行株の変遷との関連について解明を目指す。

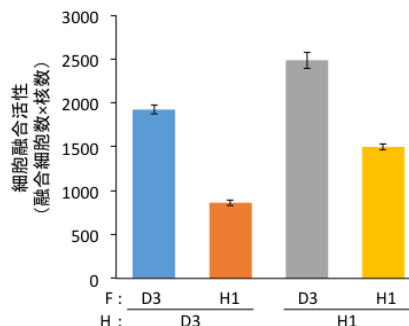


図4. H1遺伝子型F蛋白質の融合活性

< 引用文献 >

- Makoto Takeda, Maino Tahara, Noriyo Nagata, Fumio Seki. Wild-type measles virus is intrinsically dual-tropic. *Frontiers in Microbiology*, 2: 279 (2012) doi: 10.3389/fmicb.2011.00279
- Tetsuo Nakayama, Motoko Fujino, Naoko Yoshida. Molecular epidemiology of measles virus in Japan. *Pediatrics International*, 46(2): 214-223 (2004)
- Maino Tahara, Makoto Takeda, Yusuke Yanagi. Altered interaction of the matrix protein with the cytoplasmic tail of hemagglutinin modulates measles virus growth by affecting virus assembly and cell-cell fusion. *Journal of Virology*, 81(13): 6827-6836 (2007) doi: 10.1128/JVI.00248-07

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3 件)

- Yoshinori Kitagawa, Madoka Sakai, Masayuki Shimojima, Masayuki Saijo, Masae Itoh, Bin Gotoh. Nonstructural protein of severe fever with thrombocytopenia syndrome phlebovirus targets STAT2 and not STAT1 to inhibit type I interferon-stimulated JAK-STAT signaling. *Microbes and Infection*, 20(6): 360-368 (2018) doi:

10.1016/j.micinf.2018.05.007 査読有

Yoshinori Kitagawa, Madoka Sakai, Mariko Funayama, Masae Itoh, Bin Gotoh. Human metapneumovirus M2-2 protein acts as a negative regulator of alpha interferon production by plasmacytoid dendritic cells. *Journal of Virology*, 91(20) pii: e00579-17 (2017) doi: 10.1128/JVI.00579-17 査読有

Yuto Satoh, Saeka Yonemori, Mitsuhiro Hirose, Hiroko Shogaki, Hiroshi Wakimoto, Yoshinori Kitagawa, Bin Gotoh, Tsuyoshi Shirai, Ken-ichi Takahashi, Masae Itoh. A residue located at the junction of the head and stalk regions of measles virus fusion protein regulates membrane fusion by controlling conformational stability. *Journal of General Virology*, 98(2): 143-154 (2017) doi: 10.1099/jgv.0.000670 査読有

[学会発表](計 6 件)

Miyuki Tsunemi, Akihiko Shinoda, Yuto Satoh, Kento Sakamoto, Hiroshi Wakimoto, Miho Konami, Takumi Tsukamoto, Hiroko Shogaki, Yoshinori Kitagawa, Bin Gotoh, Ken-ichi Takahashi, Masae Itoh. Mutation in the matrix (M) protein is the first requirement for adaptation of the wild-type measles virus to Vero cells. The 66th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology, Kyoto Terrsa (Kyoto), October 28 – 30 (2018)

Yoshinori Kitagawa, Takumi Tsukamoto, Miki Kohno, Masae Itoh, Bin Gotoh. Middle East respiratory syndrome coronavirus accessory proteins that can block TLR7/9-dependent signaling leading to interferon production. The 66th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology, Kyoto Terrsa (Kyoto), October 28 – 30 (2018)

Hiroko Shogaki, Yuto Satoh, Hiroshi Wakimoto, Yoshinori Kitagawa, Bin Gotoh, Ken-ichi Takahashi, Masae Itoh. Measles virus fusion protein carries leucine zipper-like conformation optimized for efficient fusion induction in the HR-B domain. The 65th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology, Osaka International Convention Center (Osaka), October 24 – 26 (2017)

Yoshinori Kitagawa, Miki Kohno, Takumi Tsukamoto, Masae Itoh, Bin Gotoh. Effect of human metapneumovirus M2-2 on Toll-like receptor 7/9-dependent K63-linked polyubiquitination and phosphorylation of IRF7. The 65th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology, Osaka International Convention Center (Osaka), October 24 – 26 (2017)

Yuto Satoh, Daichi Nishikawa, Kurara, Higuchi, Da-Peng Jiang, Hiroko Shogaki, Hiroshi Wakimoto, Yoshinori Kitagawa, Bin Gotoh, Ken-ichi Takahashi, Hak Hotta, Masae Itoh. Functional roles of the hemagglutinin protein of a subacute sclerosing panencephalitis (SSPE) virus, the Kobe-1 strain. The 64th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology, Sapporo Convention Center (Sapporo), October 23 – 25 (2016)

Yoshinori Kitagawa, Mariko Funayama, Madoka Sakai, Masae Itoh, Bin Gotoh. Effect of human metapneumovirus M2-2 protein expression on IRF7 homodimerization critical for alpha interferon gene activation. The 64th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology, Sapporo Convention Center (Sapporo), October 23 – 25 (2016)

6 . 研究組織

(2)研究協力者

研究協力者氏名：高橋 健一

ローマ字氏名：Takahashi, Ken-ichi

研究協力者氏名：脇本 浩史

ローマ字氏名：Wakimoto, Hiroshi

研究協力者氏名：佐藤 友人

ローマ字氏名：Satoh, Yuto

研究協力者氏名：坂本 賢人

ローマ字氏名：Sakamoto, Kento

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。