

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 6 日現在

機関番号：32669

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450431

研究課題名(和文)豚コロナウイルスの病原性発現への宿主プロテアーゼの関与

研究課題名(英文)Effects of proteases on the pathogenesis of porcine coronaviruses

研究代表者

田口 文広 (Taguchi, Fumihiro)

日本獣医生命科学大学・獣医学部・教授

研究者番号：30107429

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：腸管病原性の豚伝染性胃腸炎ウイルス(TGEV)の欠損変異ウイルスである豚呼吸器コロナウイルス(PRCV)は呼吸器親和性で非病原性である。この病原性の相違は標的細胞でのプロテアーゼ依存性増殖能差の可能性について検討した。腸管及び肺由来プロテアーゼは両ウイルスの培養細胞での増殖に影響を及ぼさなかった。どの場合にも、TGEVはPEDVと比較して、100倍以上高い増殖を示した。増殖差に自然免疫が関与しているかを、インターフェロン感受性及び耐性細胞を用いて検討したが、その関与は認められなかった。今後、両ウイルスの病原性に欠損部位が関与しているのかを組み換えウイルスを用いて解析する必要がある。

研究成果の概要(英文)：Porcine transmissible gastroenteritis virus (TGEV) is an enteric virus, causing acute fatal diarrhea, whereas avirulent porcine respiratory coronavirus (PRCV) derived from TGEV shows the respiratory tropism in pigs. Their differences in tropism and virulence could be due to the growth difference in respective organs, which could be affected by the proteases. We examined whether proteases from enteric organs and respiratory organs enhanced the growth of those viruses and found that various proteases have no effects in terms of their growth and cytopathic effects. We then examined the sensitivity of two viruses on innate immunity, interferon (IFN), by using cells susceptible and resistant to IFN and found that IFN did not affect the growth of those viruses. To see whether the deleted region in PRCV is responsible for the attenuated virulence, the study of recombinant viruses between TGEV and PRCV is necessary.

研究分野：ウイルス感染学

キーワード：豚コロナウイルス プロテアーゼ 病原性 組織親和性

1. 研究開始当初の背景

豚に甚大な被害を及ぼすコロナウイルスとしては、2013年から日本各地で流行し、主に新生豚や哺乳豚に致死的な下痢症を誘発する豚流行性下痢ウイルス(PEDV)が問題となっているが(1)、これまでは、むしろ別の豚コロナウイルス、豚伝染性胃腸炎ウイルス(TGEV)感染が大きな問題であった。その理由としては、TGEVはPEDVより病原性が高く、感染症としての被害はより大きいことによるものである。しかしながら、近年では、TGEV感染が少なくなり、むしろPEDVによる感染発生がクローズアップされている(1)。TGEV感染が低下している理由として、TGEVと極めて類似製の高い豚呼吸器コロナウイルス(PRCV)の出現が考えられる。PRCVはTGEVの一部の遺伝子、例えばS遺伝子やORF3に欠損をもち(2)、また、TGEVが高病原性で腸管親和性を示すのに対して、PRCVは病原性が極めて低く、微弱な呼吸器疾患を起こすにすぎない(3)。これらの組織親和性及び病原性は各々のウイルス受容体の差ではなく、両ウイルスは共に、豚アミノペプチダーゼN(pAPN)を受容体として利用していることが明らかになっている(4)。PRCV感染はその病原性の低さから徐々に多くの豚牧場に蔓延し、そのため抗原的に類似性の高いTGEVの感染が抑えられていると予測される。TGEVとPRCVの組織親和性と病原性の相違について、どのような機構に依るかを検討することは極めて重要である。

2. 研究の目的

TGEVとPRCVの組織親和性及び病原性の差は、豚の組織で発現されるプロテアーゼが関与しているのではないかと推測された。何故なら、コロナウイルス感染では、プロテアーゼが組織親和性及び病原性発現に関与している例が幾つか報告されている(5, 6, 7)。例えば、人の重症急性呼吸器症候群(SARS)は肺での増殖が極めて高いが、その増殖性は肺で産生されるプロテアーゼ、エラスターゼにより感染増強が認められる(5, 6)。また、下痢などの腸管疾病を引き起こすPEDV感染ではトリプシンが感染増強することが報告されている(7)。

本研究の目的は、TGEVとPRCVの組織親和性及び病原性が組織特異的に産生されるプロテアーゼによって決定されるかを検証することにより、これらの豚コロナウイルスの病原性発現機構を解明することである。

3. 研究の方法

本研究の目的であるTGEVとPRCVの組織親和性及び病原性は組織特異的なプロテアーゼによって決定されるか否か、を検討することである。そこで、腸管親和性のTGEVが腸管で機能するトリプシンやキモトリプシンで活性化され、腸管でのウイルス増殖が

高くなり、一方、PRCVでは肺などの呼吸器で産生されるエラスターゼなどがウイルス増殖を活性化するのではないかを検討した。

実験に用いたTGEVおよびPRCVとも動物衛生研究所から分与されたTO-163株とCH22株を用い、両ウイルスに感受性をもつ豚由来株化培養細胞(CPK細胞)を種ウイルス作成や、感染性実験に用いた。ウイルスの感染価は96穴プレートに培養したCPK細胞を用いTCID₅₀で求めた。

また、プロテアーゼとしてはいずれも市販されている製品で腸管由来プロテアーゼ(トリプシン、キモトリプシン、パンクレアチン)と呼吸器で産生されるプロテアーゼ(エラスターゼ)や各組織で発現されているコラゲナーゼや細菌由来のサーモリジンにより、感染増強があるかを検討した。

プロテアーゼによる感染増強は感染経路を変えることにより起こることはSARS感染について用いた方法(5)で検討した。具体的には、プロテアーゼの存在により、細胞変性効果の形態的な違いで判定した。即ち、感染細胞をプロテアーゼで処理することにより、細胞融合が見られた場合には、細胞表面からの経路で侵入し、見られない場合には、エンドゾーム経路で侵入すると判断した。

一方、これらのウイルスの増殖性、細胞変性効果は、プロテアーゼの影響を受けないことが、研究途中で明らかになってきたので、新たに、ウイルスの自然免疫に対する感受性の違いが、増殖性及び細胞変性効果に影響するか否かについて、インターフェロン(IFN)感受性及び非感受性細胞を用いて、検討した。IFN感受性細胞としては、両ウイルスの受容体であるpAPNを恒常的に発現限するHeLa細胞を用いて検討し、非感受性細胞としては、IFNに産生遺伝子を欠くVero細胞で、pAPN恒常発現細胞を用いて検討した。

4. 研究成果

1) プロテアーゼによるウイルス感染細胞の細胞変性効果への影響:

SARSコロナウイルスやMERSコロナウイルス感染では、感受性Vero細胞への感染は感染細胞の円型化及び培養プレートからの剥離を引き起こすのみであるが、トリプシン、エラスターゼや他のプロテアーゼの存在下では感染細胞の融合が観察される。このことから、これらのプロテアーゼにより、S蛋白の膜融合活性が活性化され、細胞融合が起こることが証明されている(5)。このことは、プロテアーゼ非存在下ではエンドゾーム経路で感染するが、プロテアーゼ存在下ではウイルス粒子のS蛋白の活性化も起こり、ウイルスが細胞表面から侵入し、その感染効率はエンドゾーム経路と比べ、100倍以上高いことが報告されている(5)。本実験でも、TGEV、PRCVが標的臓器で産生されるプロテアーゼにより同様の検証が起こるのかを検討した。その結果、両ウイルス共プロテアーゼ(トリ

プシン、キモトリプシン、エラスターゼ、サーモリジン、コラゲナーゼ)の存在の有無に拘わらず、細胞変性効果は感染細胞の円型化及び剥離が認められるに過ぎなかった。濃度の異なる各プロテアーゼ存在下の感染の場合にも、細胞変性効果に形態学的な変化は認められなかった。

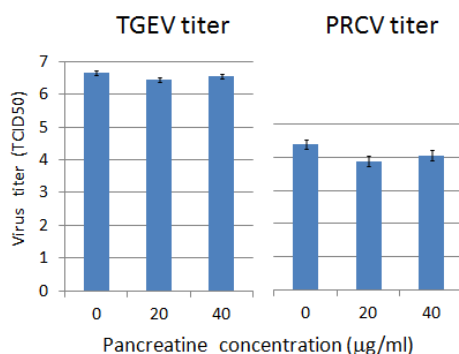
以上の結果から、TGEV と PRCV の感染による細胞変性効果は各種のプロテアーゼにより、影響を受けることがないことが明らかにされた。すなわち、腸管や肺で産生されるプロテアーゼがこれらのウイルスの表面からの侵入を可能にすることがないことが示唆された。

2) プロテアーゼのウイルス感染の影響:

プロテアーゼが細胞変性効果に影響を及ぼさないことは以上の実験から明らかになったが、ウイルス増殖を増強するか否かについて検討した。10 倍階段希釈した両ウイルスを 24 穴シャーレに準備した CPK 細胞に接種し、プロテアーゼ存在下と非存在下で細胞変性効果の出現を比較した。その結果、プロテアーゼ存在下では、非存在下で細胞変性を示さない低い力価ウイルスを接種した細胞が細胞変性を示すことは認められなかった。即ち、どのプロテアーゼも両ウイルスの増殖を増強する効果がないことが推測された。そこで、濃度の異なるパンクレアチンの存在下、非存在下での両ウイルスの増殖(ウイルス感染価)を比較した。その結果、パンクレアチン存在下で両ウイルス共、非存在下と比べより高く増殖することはなかった。即ち、パンクレアチンは腸管親和性の TGEV 感染を特異的に増強する効果はなかった(図 1)。

以上のことから、各種プロテアーゼは組織親和性の異なる両ウイルスの増殖性に影響することがないことが判明した。

図 1: TGEV,PRCV 増殖に対するパンクレアチンの影響



3) TGEV, PRCV 増殖への IFN の関与:

これらの実験で、CPK 細胞では TGEV の増殖が PRCV と比べ 100 倍以上高く、両ウイルスの病原性の差はウイルスの持つ増殖能の差による可能性が考えられた。一方、その増殖差は感染細胞で産生される内因性の IFN

による可能性も否定できないと思われた。そこで、両ウイルスを IFN 反応性細胞と非反応性細胞を用いて検討した。両ウイルス受容体である pAPN を発現する IFN 反応性細胞 HeLa と非反応性細胞 Vero に感染させ、その増殖を比較した。その結果、PRCV はどの細胞でも TGEV と比べ増殖が 100 1000 倍低いことが明らかとなった。仮に、PRCV の感染が IFN により抑えられるとすると、IFN 非反応性の Vero 細胞では他の細胞と比し、高増殖が予測されるが、IFN 非産生 Vero 細胞でも感染増強が見られたことから、PRCV の増殖性の低さは内因性の IFN によるものではないことが明らかとなった。

本研究では、遺伝子レベルで非常に類似性の高い TGEV と PRCV の組織親和性の違い、病原性の違いを明らかにする目的で、まずプロテアーゼによる影響を検討したが、その関与は用いたプロテアーゼでは説明できないことが明らかにされた。また、PRCV の増殖性の低さは、IFN への高い感受性に由来するものでもないことが明らかにされた。両ウイルスの組織親和性、病原性の相違については、宿主側因子が関与しているのか、或いはウイルスの持つ本来の性質なのかについても不明のままである。

今後は、両ウイルスの組み換えウイルスを作成し、どの遺伝子が両ウイルスの生物活性の差の原因なのかを明らかにする必要がある。幸い、30 キロベースという超巨大ゲノムを用いたリバーシジェネティクスが確立されてきたので、ウイルス側の病原性、組織親和性に関与する因子を最初に明らかにする方が、これらのウイルスによる疾病の克服には適していると思われる。

(文献)

1. Suzuki, T., Murakami, S., Takahashi, O., Kodera, A., Masuda, T., Itoh, S., Miyazaki, A., Ohashi, S., Tsutsui, T. (2015). Molecular characterization of pig epidemic diarrhoea viruses isolated in Japan from 2013 to 2014. *Infection, Genetics Evolut* 36: 363-368.
2. Rasschaert D, Duarte M, Laude H. (1990) Porcine respiratory coronavirus differs from transmissible gastroenteritis virus by a few genomic deletions. *J Gen Virol*. 71:2599-607.
3. Delmas B, Gelfi J, Sjöström H, Noren O, Laude H. (1993) Further characterization of aminopeptidase-N as a receptor for coronaviruses. *Adv Exp Med Biol*. 342:293-8.
4. Laude H, Van Reeth K, Pensaert M. (1993) Porcine respiratory coronavirus: molecular features and virus-host interactions. *Vet Res*. 24:125-50.
5. Matsuyama S, Ujike M, Morikawa S, Tashiro M, Taguchi F. (2005) Protease-mediated enhancement of

- SARS coronavirus infection. Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A. 102: 12543-1254
6. Ami Y, Nagata N, Shirato K, Watanabe R, Iwata N, Nakagaki K, Fukushi S, Saijo M, Morikawa S, Taguchi F (2008) Co-infection of respiratory bacterium with SARS coronavirus induces an exacerbated pneumonia in mice. Microbiol. Immunol. 52: 118-127
 7. Shirato K, Matsuyama S, Ujike M and Taguchi F. (2011) Role of proteases in the release of porcine epidemic diarrhea virus from infected cells. J. Virol. 85: 7872-80

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 8 件)

Islam Md T, Kubota T, Ujike M, Yahara Y and Taguchi F. Phylogenetic and antigenic characterization of newly isolated porcine epidemic diarrhea viruses in Japan. Virus Res. 査読有、2016 In press doi: 10.1016/j.virusres.2016.06.006

Ujike M, Huang C, Shirato K, Makino S, Taguchi F. The contribution of the cytoplasmic retrieval signal of severe acute respiratory syndrome coronavirus to intracellular accumulation of S proteins and incorporation of S protein into virus-like particles. J Gen Virol. 査読有、2016 in press doi: 10.1099/jgv.0.000494

Kotani O, Naeem A Suzuki T, Iwata-Yoshikawa N, Sato Y, Nakajima N, Hosomi T, Tsukagoshi H, Kozawa K, Hasegawa H, Taguchi F, Shimizu H, Nagata N. Neurovirulence of two Saffold virus type 3 isolates in mouse models PLOS ONE 査読有、2016 in press doi: 10.1371/journal.pone.0148184.

Ujike M, Taguchi F. Incorporation of spike and membrane glycoproteins into coronavirus virions. Viruses 査読有、2015 7:1700-1725 doi: 10.3390/v7041700.

Kotani O, Iwata-Yoshikawa N, Suzuki T, Sato Y, Nakajima N, Koike S, Iwasaki T, Sata T, Yamashita T, Minagawa H, Taguchi F, Hasegawa H, Shimizu H, Nagata N. Establishment of a panel of in-house polyclonal antibodies for the diagnosis of enterovirus infections. Neuropathology. 査読有、2015 35:107-121 doi: 10.1111/neup.12171.

Shirato K, Imada Y, Kawase M, Nakagaki N, MShirato K, Imada Y, Kawase M, Nakagaki N, Matsuyama S, Taguchi F Possible involvement of infection with human coronavirus 229E, but not NL63, in

Kawasaki disease. J Med. Virol. 査読有、2014 86: 2146-2153 doi: 10.1002/jmv.23950

Shimabukuro K, Ujike M, Ito T, Tsunemitsu H, Oshitani H, Taguchi F Hemagglutination mediated by the spike protein of cell-adapted bovine torovirus. Arch. Virol. 査読有、2013 158:1561-1566. doi: 10.1007/s00705-013-1636-4

Kotani O, Shirato K, Nagata N, Ikeda H, Takahashi K, Taguchi F. Neuropathogenesis of a mouse-adapted porcine epidemic diarrhea virus infection in suckling mice. J. Gen. Virol. 査読有、2013 94:831-836 doi: 10.1099/vir.0.047787-0

〔学会発表〕(計 19 件)

小谷治、Asif Naeem、鈴木忠樹、岩田菜緒子、中島典子、片野晴隆、細見卓司、塚越博之、長谷川秀樹、田口文広、清水博之、永田典代：新生児マウスを用いた Staffold virus (SAFV)患者由来株の比較解析 第156回日本獣医学会学術集会 国立大学法人岐阜大学(岐阜県岐阜市) 9. 20. 2013

氏家誠、白戸憲也、松山州徳、田口文広：サースコロナウイルスの粒子形成における ER retrieval signal の役割について 第156回日本獣医学会学術集会 国立大学法人岐阜大学(岐阜県岐阜市) 9. 20. 2013

八木ことえ、小田えりな、氏家誠、田口文広：牛トロウイルス構造蛋白質の細胞内局在に関する研究 第156回日本獣医学会学術集会 国立大学法人岐阜大学(岐阜県岐阜市) 9. 20. 2013

朝日基、島袋梢、市川諒、会田恒彦、伊藤寿浩、恒光裕、氏家誠、田口文広：ウシトロウイルスの血球凝集-エステラゼ(HE)蛋白質の血球凝集(HA)能について 第156回日本獣医学会学術集会 国立大学法人岐阜大学(岐阜県岐阜市) 9. 20. 2013

小谷治、Asif Naeem、鈴木忠樹、岩田菜緒子、中島典子、片野晴隆、長谷川秀樹、田口文広、清水博之、永田典代：新生児マウスを用いた Staffold virus 小脳継代株の作出とその病原性の解析 第61回日本ウイルス学会総会、神戸国際会議場(兵庫県神戸市)、11.10, 2013

氏家誠、島袋梢、田口文広：ウシトロウイルス S 蛋白質内領域の細胞内輸送の役割について 第61回日本ウイルス学会総会、神戸国際会議場(兵庫県神戸市)、11.10, 2013

白戸憲也、今田義夫、川瀬みゆき、中垣慶子、松山州徳、田口文広：ヒトコロナ

ウイルス 229E と川崎病の関連について 第 61 回日本ウイルス学会総会、神戸国際会議場(兵庫県神戸市)、11.10, 2013
河内悠華子、八木ことえ、田口文広、氏家誠：ウシトロウイルス N 蛋白質の核移行シグナルに関する研究 第 157 回日本獣医学会学術集会 北海道大学高等教育推進機構(北海道札幌市) 9.10.2014
氏家誠、田口文広：ウシトロウイルス S 蛋白質の細胞質内領域の細胞内輸送における役割 第 157 回日本獣医学会学術集会 北海道大学高等教育推進機構(北海道札幌市)9.10.2014
氏家誠、河内悠華子、八木ことえ、田口文広：第 62 回日本ウイルス学会総会、横浜パシフィコ(神奈川県横浜市)、11.10, 2014
河内健吾、氏家誠、谷 英樹、森川茂、田口文広：Baculovirus を用いた牛 Torovirus の可溶性 Hemagglutinin-Esterase protein の発現 第62回日本ウイルス学会総会、横浜パシフィコ(神奈川県横浜市)、11.10, 2014
小谷治、藤井健、鈴木忠樹、岩田奈織子、網康至、須崎百合子、長谷川秀樹、田口文広、清水博之、永田典代：カニクイザルを用いた Saffold virus の神経病原性の病理学的解析 第 62 回日本ウイルス学会総会、横浜パシフィコ(神奈川県横浜市)、11.10, 2014
Fumihiro Taguchi : Emergency and re-emergence of human and animal diseases caused by coronaviruses: SARS, MERS and PED 第 62 回日本ウイルス学会総会、横浜パシフィコ(神奈川県横浜市)、11.10, 2014
白戸憲也、前島円、川瀬みゆき、松山州徳、田口文広：豚 aminopeptidase N は豚流行性下痢ウイルスの受容体ではないが、酵素活性によりウイルス感染を促進する 第 158 回日本獣医学会学術集会、北里大学獣医学部(青森県十和田市)、9.7.2015.
河内健吾、氏家誠、谷英樹、森川茂、田口文広：バキュロウイルスを用いた牛トロウイルスの可溶性血球凝集素 エステラーゼ蛋白質の発現と機能解析 第 158 回日本獣医学会学術集会、北里大学獣医学部(青森県十和田市)、9.7.2015.
Taguchi F, Shirato K, Maejima M, Kawase M, Matsuyama S. Porcine aminopeptidase N is not a receptor for porcine epidemic diarrhea virus (PEDV), but promotes its infection via protease activity. 第 63 回日本ウイルス学会学術集会、福岡

国際会議場(福岡県福岡市)、11.22.2015.

Islam T, Asahi M, Arita T, Tsunemitsu H, Ujike M, Taguchi F: Analysis of biological function of Hemagglutinin-esterase protein of bovine torovirus. 第 63 回日本ウイルス学会学術集会、福岡国際会議場(福岡県福岡市)、11.22.2015.

Matsunaga Y, Kawachi Y, Taguchi F, Ujike M. Identification of the regions in bovine torovirus N protein involved in the nuclear transport. 第 63 回日本ウイルス学会学術集会、福岡国際会議場(福岡県福岡市)、11.22.2015.

〔図書〕(計 2 件)

コアカリ獣医微生物学 文永堂出版 分担執筆 ウイルスの培養法と検出法 pp109 - 115, 2015
人獣共通感染症 改訂3版 文永堂出版 木村哲、喜田宏編 分担執筆 SARS(重症急性呼吸器症候群) pp 169-171, 2015

〔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：
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

田口文広 (TAGUCHI Fumihiro)

日本獣医生命科学大学・獣医学部・教授
研究者番号：30107429

(2) 研究分担者

氏家誠 (UJIKE Makoto)

日本獣医生命科学大学・獣医学部・講師
研究者番号：50415478

(3) 連携研究者

()

研究者番号：