

EX-Taq で行う方法 (B 法) を選択可能とした。

＜風疹ウイルス遺伝子型決定用 RT-PCR プライマーセットの評価＞

E1 遺伝子内に設定された遺伝子型決定領域 (739 塩基長) を増幅するためのプライマーセットを設計し、主要な遺伝子型ウイルスに対する検出感度を検討した。また、遺伝子検出用 RT-PCR で評価を行った A 法および B 法について比較を行った。

＜風疹ウイルス遺伝子検出用 Real-time RT-PCR の検出範囲に関する検討＞

既報の Real-time RT-PCR が風疹ウイルスのすべての遺伝子型ウイルスに対して検出可能かを明らかにするため、各遺伝子型のリファレンス株二対する感度の検討を行った。

C. 研究結果

＜風疹ウイルス遺伝子検出用 RT-PCR に用いる RT-PCR 試薬および参照 RNA の評価＞

麻疹風疹リファレンスセンター 9 カ所より回答を回収した。A 法を選択して評価したのは 6 カ所、B 法を選択して評価したのは 5 カ所で、そのうち 2 カ所は両方法と実施していた (図 2)。

A 法を使用した場合、nested PCR まで行った場合、100 から 1000 コピー/5 μ L まで検出可能であった。しかし、1st PCR まででも同じ検出感度であり、増幅産物の電気泳動バンドが明瞭になること以外は Nested PCR の利点はなかった。

一方、B 法を用いた場合には、1st PCR で 100 から 1000 コピー/5 μ L の感度、nested PCR で 1 から 10 コピー/5 μ L の感度を示し、A 法よりも Nested PCR まで行った場合には高感度であることが示された。

＜風疹ウイルス遺伝子型決定用 RT-PCR プライマーセットの評価＞

WHO より遺伝子型決定のため遺伝子配列を解析する領域は E1 遺伝子の 739 塩基と定められているが、一度に増幅するにはやや長いことから、2 断片に分けて増幅し、遺伝子配列情報をつなげて全長の遺伝子型決定領域を解析することを考え、プライマーセットを設定した (図 1)。これらのプライマーセットについて、風疹ウイルス遺伝子検出用 RT-PCR と同様に二種類の試薬を用いた方法 (A 法および B 法)、参照 RNA に対する感度を比較した。その結果、B 法の方が、感度が 10 から 100 倍高いことが分かった。また、これらのプライマーセットを用いて、遺伝子型 1a、1E および 2B ウイルスの遺伝子検出を試みたところ、B 法を用いた場合、いずれのウイルスもプライマーセット NS と同程度に感度よく検出可能であることが明らかとなった。

＜風疹ウイルス遺伝子検出用 Real-time RT-PCR の検出範囲に関する検討＞

Real-time RT-PCR は実験室コンタミネーションの機会を減少させることが期待され、風疹遺伝子

検査へ導入が期待されている。既報の風疹ウイルス遺伝子検出用 Real-time RT-PCR について、すべての遺伝子型の参照ウイルスについて検出可能かを検討したところ、いずれの株も 1 から 10PFU の感度で検出可能であることが示された (図 4)。

D. 考察

風疹遺伝子検査として、最初に遺伝子検出用 RT-PCR あるいは Real-time RT-PCR を実施し、陽性だった場合に遺伝子型決定用 RT-PCR を行うことが想定される。今回、これらの目的に合致する RT-PCR 法の確立および評価を行った。安井ら (IASR, 2012) は風疹ウイルス遺伝子決定領域増幅 RT-PCR について、本研究で A 法と B 法と示す方法で比較し、A 法で遺伝子が増幅できなかった検体から B 法では増幅できたことを示している。本研究ではこのことを証明し、さらに風疹ウイルス遺伝子検出用 RT-PCR でも同様であると示した。B 法は麻疹検査マニュアル示された麻疹検出 RT-PCR と試薬等が同一であり、麻疹と風疹の検査の共通化にも有用であると考えられる。

参照 RNA は遺伝子検出用 RT-PCR および遺伝子型決定用 RT-PCR の両方で検出が可能な 1000 コピー/5 μ L とするのが適当であると考えられた。

風疹ウイルス遺伝子検出用 Real-time RT-PCR についてはすべての遺伝子型ウイルスの参照ウイルスについて検出可能であることから、十分に遺伝子検査に対応可能であると考えられた。今後、麻疹ウイルス遺伝子検出用 Real-time RT-PCR との同時測定について検討し、検査への導入を進めることが求められる。

E. 結論

風疹遺伝子検査に用いる RT-PCR 法を整備した。なお、本研究を踏まえ、病原体検出マニュアル＜風疹＞を改訂し、本研究で定めた RT-PCR を掲載した。また、本 RT-PCR で用いるための参照 RNA は全国の地方衛生研究所に配布をおこなった。

F. 健康危険情報 特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

安井善宏、小林慎一、山下照夫、平松礼司、皆川洋子、森嘉生 麻疹疑い症例からの風疹ウイルス検出と遺伝子解析-愛知県 病原微生物検出情報、33(6):167-168, (2012)

2. 学会発表

内野清子、三好龍也、森嘉生、駒瀬勝啓、田中智之。いわゆる臨床検体三点セットを用いた風疹ウイルス検出状況。第 60 回日本ウイルス学会 学術集会、2012

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

無し

2. 実用新案登録

無し

図1 風疹ウイルス遺伝子検出および遺伝子型決定用RT-PCRのプライマー部位

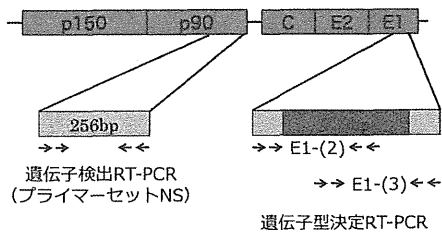


図2 風疹参照RNA検出の結果集計

		検出可能濃度(コピー/5μL)			
		A法		B法	
		1st PCR	Nested PCR	1st PCR	Nested PCR
リファレンスセンター	1	100	100		
	2	1000	1000		
	3	100	100		
	4	100	100		
	5			1000	10
	6			100	1
	7			1000	10
	8	100	100	100	10
	9	100	100	100	10
感染研		100	100	1000	10

- すべての研究室において1st PCRで検出可能な1000コピー/5μLを使用濃度とする
- A法は1st PCRとnested PCRの間で検出可能濃度に差が認められない
- Nested PCRまで行った場合、B法の方が10~100倍感度が高い

図3 遺伝子型決定用RT-PCRの感度評価

鏡型	プライマーセット	検出限界濃度(コピー/5μL)	
		A法 (nested PCR)	B法 (nested PCR)
参照RNA	NS	100	10
	E1-(2)	100	10
	E1-(3)	1000	10
遺伝子型1a ウイルス (KRTワクチン株)	NS	:10 ⁷	:10 ¹
	E1-(2)	>:10	:10 ⁴
	E1-(3)	:10 ⁷	:10 ²
遺伝子型1E ウイルス (Rvi/Toyama/31.10)	NS	:10 ¹	:10 ⁵
	E1-(2)	:10	:10 ⁵
	E1-(3)	:10 ³	:10 ⁴
遺伝子型2B ウイルス (Rvi/Osaka/07)	NS	:10 ⁴	:10 ⁵
	E1-(2)	>10	:10 ¹
	E1-(3)	:10 ³	:10 ⁴

図4 各ウイルス株に対するReal-time RT-PCRの感度

Viral titer (PFU/reaction)		10 ³	10 ²	10	1	0.1
Rvi/BEL/63/WAC	1a	28.0 ± 0.06	31.6 ± 0.12	35.0 ± 0.34	38.1 ± 0.60	40.0c
Rvi/Jerusalem/5R/75	1b	27.0 ± 0.04	30.6 ± 0.12	34.2 ± 0.19	37.4 ± 0.51	40.0c
Rvi/Los Angeles/USA/91	1c	27.4 ± 0.07	31.2 ± 0.08	33.3 ± 0.39	37.7 ± 0.31	40.0c
Rvi/Osaka JPN/94	1d	26.7 ± 0.15	30.8 ± 0.12	34.3 ± 0.09	37.8 ± 0.02	40.0c
Rvi/Dezhou CHN/02	1e	27.9 ± 0.30	31.3 ± 0.12	34.7 ± 0.32	38.5 ± 0.96	40.0c
Rvi/Linqing CHN/00	1f	26.5 ± 0.05	30.2 ± 0.10	34.1 ± 0.17	37.3 ± 0.45	40.0c
Rvi/JGA/20.01	1g	26.5 ± 0.13	29.8 ± 0.19	32.7 ± 0.27	36.6 ± 0.80	40.0c
Rvi/Minsk BEL/28.05	1h	28.4 ± 0.03	31.8 ± 0.17	35.3 ± 0.32	40.0c	40.0c
Rvi/Milan ITA/46.92	1i	29.3 ± 0.07	32.7 ± 0.26	35.9 ± 0.21	40.0c	40.0c
Rvi/Miyazaki JPN/10.01 CRS	1j	28.3 ± 0.27	32.2 ± 0.21	35.7 ± 0.32	40.0c	40.0c
Rvi/Beijing CHN/80/WAC	2A	29.3 ± 0.15	32.8 ± 0.15	36.2 ± 0.12	39.8 ± 0.29	40.0c
Rvi/Telaviv ISR/68	2B	28.7 ± 0.26	32.2 ± 0.18	35.3 ± 0.43	39.1 ± 0.56	40.0c
Rvi/Moscow RUSS/67	2C	28.8 ± 0.13	32.2 ± 0.15	35.6 ± 0.30	40.0c	40.0c

早期麻疹排除及び排除状態の維持に関する研究

研究分担者 柳 雄介 九州大学大学院医学研究院ウイルス学分野

研究要旨

受容体に結合後、F 蛋白質の構造変化を誘導して膜融合を起こすためには、麻疹ウイルス H 蛋白質 4 量体の配向変化が重要であることが、H 蛋白質 4 量体を形成する 2 量体同士の界面に変異を導入する実験から示唆された。また、麻疹の病態に関して、麻疹ウイルス F 蛋白質の変異により融合能が亢進すると、SLAM や nectin 4 のような特異的な受容体がなくても F 蛋白質が活性化され、細胞融合を起こしてウイルスが伝播しうることが示された。

A. 研究目的

麻疹ウイルスは、パラミクソウイルス科モルビリウイルス属のマイナス鎖 RNA ウイルスで、エンベロープ膜上に受容体結合蛋白質である hemagglutinin (H) と膜融合を担う fusion (F) 蛋白質という 2 つの糖蛋白質を持っている。受容体である免疫細胞上の SLAM あるいは上皮細胞上の nectin 4 に H 蛋白質が結合後、F 蛋白質の働きにより細胞表面で膜融合を起こし細胞内に侵入する。しかし、受容体への結合がどのようにして膜融合を誘導するかはよくわかっていない。また、麻疹ウイルスは SLAM や nectin 4 を発現していない細胞、たとえば神経細胞にも感染することが知られている。本研究では、麻疹ウイルスの膜融合活性化機構および SLAM や nectin 4 非依存性の感染機構を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

H 蛋白質の細胞表面発現は、遺伝子導入細胞を Flow cytometry で解析することにより行った。受容体との結合は、分泌型 H 蛋白質と分泌型受容体(SLAM および CD46)の相互作用を表面プラズモン共鳴解析により測定した。H 蛋白質と F 蛋白質との相互作用

は、免疫沈降により解析した。H 蛋白質、F 蛋白質の融合能は、H 遺伝子と F 遺伝子を培養細胞にトランスフェクトし、顕微鏡で観察するとともに、レポーターを用いた定量法も併用して測定した。組換えウイルスは、これまでに報告されている方法に従って作製した。ウイルスの神経病原性は、10 週齢ハムスターにウイルスを脳内接種し、経時的に動物を観察することにより行った。

(倫理面への配慮)

組換え麻疹ウイルスや動物を用いた実験は、必要な大臣確認および九州大学動物実験委員会の許可を得て行った。

C. 研究結果

1. 麻疹ウイルス H 蛋白質による膜融合活性化

麻疹ウイルス H 蛋白質と受容体 SLAM の複合体の結晶構造は、2 量体が 2 つ結合した 4 量体(dimer of dimers)構造をとり、それには配向の異なる 2 型(Form I, Form II)が存在する。この H 蛋白質 4 量体が構造変化することが、隣接する F 蛋白質の構造変化を誘導し、その結果膜融合が起こる可能性を検討するために、Form I、Form II それぞれにおける 2 量体同士の

界面にアミノ酸置換を導入した。その結果、作製した4種の変異H蛋白質(3種はForm I、1種はForm IIの界面に変異を導入)は、野生型H蛋白質と比べて、細胞表面発現、受容体(SLAMおよびCD46)との結合能、F蛋白質との相互作用に変化を認めなかった。しかし、これらの変異H蛋白質は、F蛋白質との共発現による細胞融合能が顕著に低下した。

2. 麻疹ウイルスのSLAM、nectin 4非依存性感染

麻疹ウイルスによる膜融合が抑制されるような条件下(H蛋白質に変異導入、あるいは受容体陰性細胞での感染)でも膜融合能を示す変異ウイルス3株を分離したところ、Hやmatrix(M)遺伝子には変異が認められず、F蛋白質に1アミノ酸置換が起こっていた。さらに、麻疹ウイルスの持続感染で起こる亜急性硬化性全脳炎(SSPE)の患者由来ウイルス株の複数で認められるF蛋白質の変異を2種類選択した。これらの変異を持つ5種のF蛋白質は、SLAM陽性細胞で野生株のF蛋白質よりも高い融合能を示すだけでなく、野生株のF蛋白質が膜融合を示さない受容体(SLAM、nectin 4)陰性細胞において膜融合活性を示した。これらのF蛋白質をもつ組換え麻疹ウイルスは、野生型ウイルスとは異なり、受容体陰性細胞に感染して巨細胞を形成するとともに、ハムスターへの脳内接種で神経病原性を示した。一方、これまでSSPEの発症に重要だとされてきたM蛋白質の欠失を導入した組換え麻疹ウイルスは受容体陰性細胞において膜融合活性を示さなかった。

D. 考察

麻疹ウイルスがH蛋白質によって受容体に結合した後、H蛋白質4量体の構造変化が起こることがF蛋白質の活性化に重要であることが示唆された。Form I、Form IIいずれの界面に変異を導入しても膜融合能が低下することから、これら両者の間での構造変化が膜融合の引き金になっていると考えられた。

また、麻疹ウイルスは、F蛋白質が変異してその膜融合能を亢進させると、SLAMやnectin 4のような受容体がない細胞でも感染や伝播が起こると考えられる。これは、受容体非依存的に、あるいは効率の低い未知の受容体によりF蛋白質が活性化されることが原因だと考えられる。このような感染は、神経系での持続感染など、特別な条件下での麻疹ウイルスの病原性に関わっている可能性がある。

E. 結論

麻疹ウイルスの受容体結合による膜融合の引き金になる構造変化が明らかになった。また、麻疹ウイルスの病原性に関して、F蛋白質の変異により受容体陰性細胞へのトロピズムを獲得しうることが明らかになった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- Watanabe S, Shirogane Y, Suzuki SO, Ikegame S, Koga R, Yanagi Y. Mutant fusion proteins with enhanced fusion activity promote measles virus spread in both human neuronal cells and brains of suckling hamsters. *Journal of Virology* (in press)
- Shirogane Y, Watanabe S, Yanagi Y. Cooperation between different RNA virus genomes produces a new phenotype. *Nature Communications* 3:1235, 2012
- Mitsuki YY, Terahara K, Shibusawa K, Yamamoto T, Tsuchiya T, Mizukoshi F, Ishige M, Okada S, Kobayashi K, Morikawa Y, Nakayama T, Takeda M, Yanagi Y, Tsunetsugu-Yokota Y. HIV-1 infection *ex vivo* accelerates measles virus infection by upregulating signaling lymphocytic activation molecule (SLAM) in CD4+ T cells. *Journal of Virology* 86:7227-7234, 2012

Hashiguchi T, Ose T, Kubota M, Maita N, Kamishikiryo J, Maenaka K, Yanagi Y. Crystallization Strategy for the Glycoprotein-receptor Complex Between Measles Virus Hemagglutinin and its Cellular Receptor SLAM. *Protein & Peptide Letters* 19:468-473, 2012

2. 学会発表

渡辺俊平, 白銀勇太, 鈴木諭, 池亀聡, 古賀律子, 柳雄介. 麻疹ウイルスの神経病原性はウイルスの膜融合能によって規定される. 第60回日本ウイル

ス学会学術集会, 大阪, 11月15日, 平成24年.

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）

（分担）研究報告書

麻疹ウイルスの抗原エピトープの構造解析と効果的なワクチン維持のための研究

研究分担者 前仲勝実 北海道大学大学院薬学研究院 教授

研究要旨

麻疹（はしか）ウイルスの弱毒生ワクチンは大変有効であり、ワクチン接種で十分に予防できるが、その理由はよくわかっていなかった。我々は、麻疹ウイルス表面抗原 H 蛋白質(measles virus hemagglutinin, MV-H)と SLAM(CD150)受容体との複合体の結晶構造解析に成功し、効果的な中和抗体産生に H 蛋白質に付加される糖鎖が重要であるモデルを提唱した。最近発表された H 蛋白質と Nectin4 受容体との複合体の結晶構造も、受容体が糖鎖付加部位以外に結合し、我々のモデルをサポートするものであった。他方、麻疹ウイルスの近縁にあたるイヌジステンパーウイルス(canine distemper virus, CDV)が近年サルに感染することが報告され、感染宿主域の拡大に関する懸念が出てきている。昨年度取り組んだ複数種の SLAM 分子に対する結合活性評価から発展させ、今年度は、Nectin4 に着目し、MV-H および CDV-H に対して SLAM と同様に結合活性評価系を確立し、その結果を基に感染宿主拡大の可能性について考察した。

A. 研究目的

麻疹（はしか）ウイルスに対する大変有効なワクチンがあるが、なぜそれほど効果的であるかについてはよくわかっていなかった。本研究分担者は、同じく分担者である柳教授と研究代表者の竹田部長と共同で、麻疹ウイルス表面抗原 H 蛋白質(measles virus hemagglutinin, MV-H)と受容体SLAMとの複合体についてX線結晶構造解析に成功した。その結果、MV-H蛋白質が広く糖鎖に覆われ、そのため、受容体の

結合部位に集中的に抗体が産生され、効果的な中和抗体産生につながっているとの仮説を提唱している(Hashiguchi et al. PNAS 2007および Nat. Struct. Mol. Biol. 2011)。

本研究では、研究代表者の竹田部長のグループと密に情報を共有しながら、MV-Hに加えて、宿主領域が拡大傾向にあり、大変憂慮されているイヌジステンパーウイルス (canine distemper virus、CDV、麻疹ウイルスの近縁種)の表面抗原H蛋白質(CDV-H)について、そ

の受容体Nectin4との結合評価を行い、ワクチン接種に対する知見を得ることを目的とする。

B. 研究方法

麻疹ウイルス MV-H 蛋白質、イヌジステンパーウイルス CDV-H 蛋白質については、ヒト培養細胞を用いた大量発現系を確立済みである。他方、最近発見された上皮受容体 Nectin4 についても同様にヒト培養細胞を用いた大量発現系の構築を行った。これらの大量発現を行って調製した組換え蛋白質を用いて、表面プラズモン共鳴解析や滴定型カロリメーターにより結合能を評価する。

(倫理面での配慮)

本研究にはヒトや動物を用いる実験が含まれず、倫理面の問題は特にないと考えられる。

C. 研究結果

調製した MV-H や CDV-H をチップに固定化し、同様に調製を行った Nectin4 を可溶性分子として流すことにより、表面プラズモン共鳴の変化を観測し、結合解析を行った。ヒトおよびイヌ Nectin4 は CDV-H に対して、ほとんど活性を示さなかった。他方、MV-H に対しては、結合活性を示した。そこで、発現系を精査したところ、N 末端のシグナル配列を Nectin4 由来ではないものにかえている影響が考えられた。すなわち、N 末端部分の配列が野生型と比べて、少し異なる形で発現すると考えられた。これに変異を導入し、CDV-H と MV-H との結合を調べた。その結果、いずれの H 蛋白質は、ヒトだけでなくイヌ Nectin4 に結合することがわかった。これは従来の感染実験等のデータと合致するものであった。同時に発表されている MV-H

と Nectin4 との複合体結晶構造からも、N 末端が結合部位に貢献していると言える内容であった。

D. 考察

複数の動物種 Nectin4 とイヌジステンパーウイルス(CDV) の H 蛋白質の相互作用解析から、MV と CDV との交差反応性について考察した。麻疹ウイルス H 蛋白質もイヌジステンパーウイルス H 蛋白質もヒトとイヌ SLAM 分子には結合する結果であった。Nectin4 は上皮細胞からウイルスが放出される際に重要であるが、今回の結果は、SLAM の宿主域が広がれば、簡単に感染が拡大する可能性が高いことが示唆された。現時点ではサルでの大流行が起きた CDV についての情報は十分ではなく、今後の研究により更なる情報が期待される。

E. 結論

イヌジステンパーウイルス受容体結合 H 蛋白質とヒトおよびイヌ Nectin 4 との結合を評価した。その結果、Nectin4 の N 末端領域が重要であること、また感染宿主拡大の可能性は十分にあり得ることがわかった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1.論文発表

1.

The Receptor-binding Site of the Measles Virus Hemagglutinin Protein Itself Constitutes a Conserved Neutralizing

Epitope.

Tahara M, Ohno S, Sakai K, Ito Y, Fukuhara H, Komase K, Brindley MA, Rota PA, Plemper RK, Maenaka K, Takeda M. *J Virol.* 2013 in press.

2.

Canine distemper virus with the intact C protein has the potential to replicate in human epithelial cells by using human nectin4 as a receptor.

Otsuki N, Sekizuka T, Seki F, Sakai K, Kubota T, Nakatsu Y, Chen S, Fukuhara H, Maenaka K, Yamaguchi R, Kuroda M, Takeda M. *Virology.* 2013 Jan 20;435(2):485-92.

3.

Functional and structural characterization of neutralizing epitopes of measles virus hemagglutinin protein.

Tahara M, Ito Y, Brindley MA, Ma X, He J, Xu S, Fukuhara H, Sakai K, Komase K, Rota PA, Plemper RK, Maenaka K, Takeda M. *J Virol.* 2013 Jan;87(1):666-75.

4.

Nectin4 is an epithelial cell receptor for canine distemper virus and involved in neurovirulence.

Pratakpiriya W, Seki F, Otsuki N, Sakai K, Fukuhara H, Katamoto H, Hirai T, Maenaka K, Techangamsuwan S, Lan NT, Takeda M, Yamaguchi R. *J Virol.* 2012

Sep;86(18):10207-10.

5.

Structural basis for measles virus-receptor recognition and its functional implications for viral entry and vaccination.

Maenaka K, Hashiguchi T, Yanagi Y.

Nihon Rinsho. 2012 Apr;70(4):695-703.

2.学会発表

1. 福原秀雄、橋口隆生、黒木喜美子、尾瀬農之、前仲勝実 機能および構造解析に向けた細胞表面蛋白質の調製法日本蛋白質科学会・ワークショップ、招待講演 愛知 2012.6

2. 武田森・福原秀雄・橋口隆生・柳雄介・竹田誠・Philippe Plattet・三尾和弘・佐藤主税・前仲勝実 犬ジステンパーウイルス F タンパク質の精製方法及び電子顕微鏡解析、2nd Negative strand virus-Japan symposium、ポスター発表、沖縄、2013.1

3. 東端将哲・福原秀雄・伊藤由梨・逢坂文那・齊藤貴士・児玉耕太・酒匂幸・梶川瑞穂・橋口隆生・竹田誠・柳雄介・尾瀬農之・前仲勝実 *in silico* スクリーニングによる麻疹ウイルス H タンパク質の侵入阻害化合物の探索 2nd Negative Strand Virus-Japan Symposium ポスター発表 沖縄 2013.1]

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

無し

2. 実用新案登録

無し

3. その他

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

麻疹ウイルスの流行解析法に関する研究

研究分担者	木村博一	国立感染症研究所感染症情報センター
研究協力者	小澤邦壽	群馬県衛生環境研究所
	齋藤美香	群馬県衛生環境研究所
	水田克巳	山形県衛生研究所
	平良勝也	沖縄県衛生環境研究所
	岡崎薫	香川小児病院
	竹内史比古	国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター
	関塚剛史	国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター
	加納和彦	国立感染症研究所感染症情報センター
	野田雅博	国立感染症研究所ウイルス第三部
研究代表者	竹田 誠	国立感染症研究所ウイルス第三部

要旨

麻疹ウイルス (MeV) の詳細な分子疫学解析を行うため、Bayesian Markov Chain Monte Carlo method (MCMC 法)による D3, D5, D9, H1 遺伝子型の *H* 遺伝子に関する時系列系統解析を行った。また、*H* 遺伝子の変異が中和抗体のエピトープに反映するか否かに関する解析も行った。さらに、positive pressure 解析も行った。その結果、D3、D5、D9 および H1 型の MeV は 1931 年頃にこれらの始祖ウイルスから分岐し、その後約 30–40 年を経て現在の遺伝子型の系統を形成したことが推定された。さらに進化速度は、他のパラミクソウイルス科に属する呼吸器ウイルス(RSV)に比し、比較的遅い (5.57×10^{-4} substitutions per site per year) ことが推測された。また、2 箇所の Positive selection site が推定されたがこのアミノ酸置換は *H* 蛋白構造あるいは感染防御抗体のエピトープへの影響は少ないことが示唆された。以上から、アジアで主流を引き起こす MeV の各遺伝子型は約 50 年間の進化過程を経ており、また *H* 遺伝子の保存性は極めて高いことが示唆された。

A. 目的

麻疹に関する特定感染症予防指針に基づく計画の推進により、2007 年以降、国内の麻疹患者発生数は激減し、現在国内の麻疹症例のほとんどは輸入症例であることが確認されている。さらに、2013 年 4 月 1 日に「麻疹に関する特定感染症予防指針」の一部改正が適用され、2015 年の麻疹排除の達成に向けて、さらなる本疾患の対策が推進される。したがって、今後ますます国内における麻疹症例のウイルス学的検索が重要になる。今まで、MeV を含む種々のウイルスの系統解析には、標的ウイルス遺伝子の塩基・アミノ酸配列を

基とした近隣結合法(NJ 法)が多く用いられてきた。しかし、これらの解析法においては、時系列的な解析要素がないため、流行株の時系列的な伝播を解明することができなかった。最近、あらたな時系列系統解析法(ML 法や MCMC 法)が考案され、種々のウイルス遺伝子の時系列系統解析が可能になりつつある。今回の研究は、昨年度に引き続き、アジア諸国で主に流行している MeV D3, D5, D9 および H1 型の *H* 遺伝子領域における MCMC 法を用いた詳細な時系列系統解析および selection pressure 解析を行った。

B. 方法

麻疹遺伝子バンク (MeaNS) に登録されている MeV 139 株 (D3, D5, D9 および H1 型) と、MeV の A~H 型を代表する WHO 参照株の 23 株における *H* 遺伝子塩基配列 (1854nt) を材料とした。

シーケンスのアライメントには ClustalW を使用した。また、系統樹をわかりやすく簡便にするために、同年に分離された株及び塩基配列の相同性が高い株について、代表株以外を取り除き、最終的に WHO 参照株を含めた 84 株を使用した。KAKSAN4 v4.0 により、塩基置換モデルを GTR+ Γ に決定し、その後の解析に使用した。分岐年代の推定には、BEAST v1.7.2 を使用した。Selection pressure は、Data Monkey を使用した。解析法には、SLAC、FEL および IFEL を用いて、dN (非同義置換)/dS (同義置換) を *p*-value により解析した。

C. 結果

ベイズ法 (Bayesian Markov Chain Monte Carlo method) により、*H* 遺伝子の塩基配列 (1854nt) から時系列を導入した分子系統樹を作成した (図 1)。その結果、1931 年 (95%信頼区間 (CIs) : 1906-1952) に最初の分岐が見られ、H1 と H2 型のクラスターが分岐した。また、D3 型が 1975 年 (95% CIs: 1970-1980) に D5 と D9 型から分岐し、さらに D5 と D9 型が 1977 年 (95% CIs: 1972-1982) に分岐したと推測された。H1 と H2 型の分岐については、1966 年頃 (95% CIs: 1950-1979) と推定された。進化速度は、 5.57×10^{-4} (95% CIs: 4.50×10^{-4} – 6.81×10^{-4}) substitutions per site per year であった。

Selection pressure 解析では、 $p < 0.05$ で考慮した。SLAC 法により配列全体の dN/dS が 0.22 (95% CIs: 0.19–0.24) であった。また、Positively selected sites について、SLAC 法では検出されず、FEL および IFEL 法では、2 アミノ酸 (*H* 蛋白遺伝子領域の F476L と Q575K) が共通して該当した。H 蛋白構造におけるこ

の 2 アミノ酸は、H 蛋白の表面に位置していることが分かった (図 2)。一方、negatively selected sites については、FEL および IFEL 法で多くのアミノ酸が該当した。その中で共通したアミノ酸は 28 箇所であった (表 1)。

D. 考察

今回の MCMC 法による系統解析の結果から、MeV の *H* 蛋白遺伝子について、時系列を導入した分子系統樹を作成することが可能となった。MeV の D3、D5、D9 及び H1 型の出現時期あるいはある期間における進化速度の推定が可能となり、1931 年から約 30–40 年の間に、この 4 種の遺伝子型が形成・出現し、流行していたことが推測された。進化速度について、以前の報告では、ヒトパラインフルエンザウイルス 1 型 (HPIV1) の *HN* 遺伝子領域は 7.68×10^{-4} substitutions per site per year であり、進化速度が緩やかに生じていると推測される。また、進化速度の速い RS ウイルスの *G* 遺伝子領域では 1.8×10^{-3} substitutions per site per year、インフルエンザウイルス A (H1N1) の *HA* 蛋白遺伝子領域では $2 \sim 3 \times 10^{-3}$ substitutions/site/year と推測されている。今回の MeV の *H* 遺伝子領域の解析結果は、HPIV1 と近い値であったことから、MeV の *H* 遺伝子の進化速度は HPIV と同様であることが示唆された。

Negative selection site は、蛋白構造の長期の安定性を維持することから、本研究で推定された 28 箇所の negative selection は蛋白構造の最適化に寄与していることが推定された。また、Positive selection site は、免疫系に変化をもたらすアミノ酸置換を生じる可能性があり、本研究によって 2 箇所のアミノ酸の存在が示唆された。H 蛋白領域において、これらのアミノ酸を含む場所は、ヒト血清との反応、CD46 レセプターとの相互作用、膜融合に関する HA 活性などの特殊な作用に関連すると言われている。しかし、今回観察されたアミノ酸置換は H 蛋白構造あるいは感染防御抗体

のエピトープに大きな影響を与えないことが推測された。これは、H 抗原領域のアミノ酸は保存性が高く、現行の MeV ワクチンが高い効果を示すことへの裏付けとしても重要な知見であると思われる

E. 結論

MCMC 法を用いた MeV の D3、D5、D9 および H1 遺伝子型の時系列系統解析を行った。その結果、これらの遺伝子型の MeV は、約 50 年前の共通始祖ウイルスから分岐したことが明らかになった。また、H 遺伝子の進化速度は比較的緩やかであることがわかった。また、H 蛋白に 2 か所の positive selection site が確認されたがこのアミノ酸置換は抗原構造や中和抗体のエピトープに大きな影響を与えないことが示唆された。

F. 参考文献

1. Drummond AJ, Rambaut A (2007) BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol Biol* 7: 214.
2. Hashiguchi T, Kajikawa M, Maita N, Takeda M, Kuroki K, et al. (2007) Crystal structure of measles virus hemagglutinin provides insight into effective vaccines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 19535–19540

3. Pond SL, Frost SD (2005) Datamonkey: Rapid detection of selective pressure on individual sites of codon alignments. *Bioinformatics* 21: 2531–2533.
4. Thorne JL, Kishino H, Painter IS (1998) Estimating the rate of evolution of the rate of molecular evolution. *Mol Biol Evol* 15: 1647–1657.
5. World Health Organization (2012) Measles virus nomenclature update: 2012. *WER* 87: 73–80.

G. 研究発表

論文発表

1. Saitoh M, Takeda M, Gotoh K, Takeuchi F, Sekizuka T, et al. (2012) Molecular evolution of hemagglutinin (H) gene in measles virus genotypes D3, D5, D9, and H1. *PLoS One*. 7: e50660.

H. 知的財産の出願・登録状況

なし。

I. その他

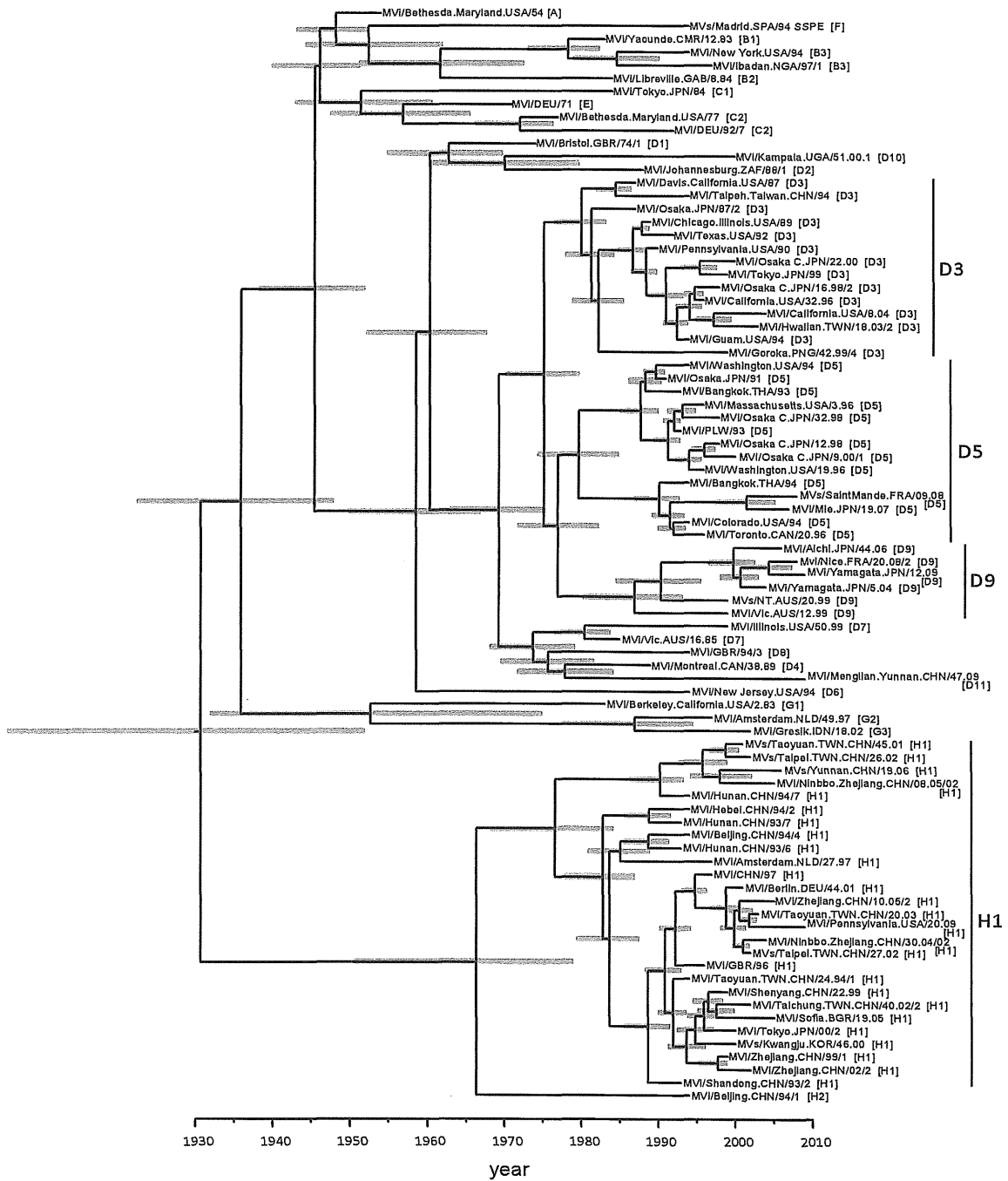


図1 ベイズ法による麻疹ウイルス D3, D5, D9 及び H1 型の H 遺伝子分子系統樹 (1854nt)
各分岐年の 95%信頼区間は grey bar で示す

表1 麻疹ウイルスH遺伝子領域の Positive selection sites と Negative selection sites

Positive selection sites			
aa position	Change	†FEL	††IFEL
220V	T or I		*
282N	K or H or D		*
235E and G	G or E or A	*	
285S	G or N		*
451V	E or M or A		*
476F	L	*	*
546S	G	*	
575Q	K	*	*

Negative selection sites		
aa common position	FEL	IFEL
3P, 7R, 13K, 14D, 16P, 90D, 209Y, 228Y, 237P, 242K, 259V, 297A, 374D, 388G, 400A, 401P, 487I, 489E, 492E, 515V, 538V, 541Y, 548S, 563P, 588S, 606C, 611E, 612D	131 sites	28 sites

$p < 0.05$

†FEL: Fixed effects likelihood

††IFEL: International fixed effects likelihood

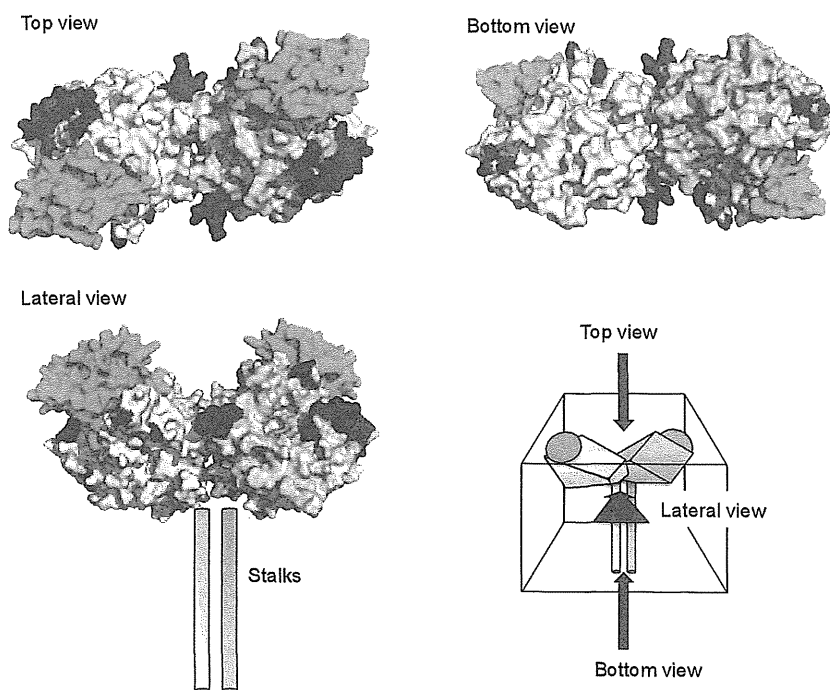


図2 麻疹ウイルスのH蛋白の予測構造（二量体）

各モノマーは gray 及び orange、エピトープは red、SLAM は cyan、Positively selected site は 476aa を light green 、575aa を blue で示す

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

著者名	論文タイトル名	発表雑誌	巻号頁	出版年
Aoki Y, Abe A, Ikeda T, Abiko C, Mizuta K, Yamaguchi I, Ahiko T.	An OutBreak of Exanthematous Disease Due to Coxsackievirus A9 in a Nursery in Yamagata, Japan, from February to March 2012.	Jpn J Infect Dis.	65:367-369	2012
Arakawa M, Okamoto-Nakagawa R, Toda S, Tsukagoshi H, Kobayashi M, Ryo A, Mizuta K, Hasegawa S, Hirano R, Wakiguchi H, Kudo K, Tanaka R, Morita Y, Noda M, Kozawa K, Ichiyama T, Shirabe K, Kimura H.	Molecular epidemiological study of human rhinovirus species ABCs from patients with acute respiratory illnesses in Japan.	J Med Microbiol.		2011
Brindley MA, Takeda M, Plattet P, Plemper R.	Triggering the measles virus membrane fusion machinery.	Proc Natl Acad Sci USA.	109:E301-8-27	2012
Hasegawa S, Hirano R, Okamoto-Nakagawa R, Ichiyama T, Shirabe K, .	Enterovirus 68 infection in children with asthma attacks: Virus-induced asthma in Japanese children.	Allergy	66(12):1618-1620	2011
Hasegawa S, Matsushige T, Inoue H, Shirabe K, Fukano R, Ichiyama T.	Serum and cerebrospinal fluid cytokine profile of patients with 2009 pandemic H1N1 influenza virus-associated encephalopathy.	Cytokine.	54(2):167-72	2011
Hasegawa S, Hirano R, Hashimoto K, Haneda Y, Shirabe K, Ichiyama T.	Characteristics of atopic children with pandemic H1N1 influenza viral infection: pandemic H1N1 influenza reveals 'occult' asthma of childhood.	Pediatr Allergy Immunol.	22:119-23	2011
Hashiguchi T, Ose T, Kubota M, Maita N, Kamishikiryo J, Maenaka K, Yanagi Y.	Crystallization Strategy for the Glycoprotein-receptor Complex Between Measles Virus Hemagglutinin and its Cellular Receptor SLAM.	Protein & Peptide Letters	19:468-473	2012
Maenaka K, Hashiguchi T, Yanagi Y.	Structural basis for measles virus-receptor recognition and its functional implications for viral entry and vaccination.	Nihon Rinsho.	70(4):695-703	2012
Mitsuki YY, Terahara K, Shibusawa K, Yamamoto	HIV-1 Infection Ex Vivo Accelerates Measles Virus	J Virol.	86:7227-34	2012

T, Tsuchiya T, Mizukoshi F, Ishige M, Okada S, Kobayashi K, Morikawa Y, Nakayama T, Takeda M, Yanagi Y, Tsunetsugu-Yokota Y.	Infection by Upregulating Signaling Lymphocytic Activation Molecule (SLAM) in CD4+ T Cells.			
Miyoshi M, Komagome R, Nagano H, (他 12 名), Okano M.	An isolated incidence of rubella outbreak at a workplace in Hokkaido, Japan.	Jpn J Infect Dis.	65(1): 94-97	2012
Nakayama T, Sawada A, Kubo H, Kaida A, Tanaka T, Shigemoto N, Komase K, Takeda M.	Simple method to differentiate measles vaccine from wild-type strains using loop - mediated isothermal amplification (LAMP).	Microbiol immunol		2013
Ohkura T, Kikuchi Y, Kono N, Itamura S, Komase K, Momose F, Morikawa Y.	Epitope mapping of neutralizing monoclonal antibody in avian influenza A H5N1 virus hemagglutinin.	Biochem Biophys Res Commun.	418(1): 38-43	2012
Otsuki N, Sekizuka T, Seki F, Sakai K, Kubota T, Nakatsu Y, Chen S, Fukuhara H, Maenaka K, Yamaguchi R, Kuroda M, Takeda M.	Canine Distemper Virus with the Intact C Protein Has the Potential to Replicate in Human Epithelial Cells by Using Human Nectin4 as a Receptor.	Virology.	435:485-92.	2013
Pratakipiriya W, Seki F, Otsuki N, Sakai K, Fukuhara H, Katamoto H, Hirai T, Maenaka K, Techangamsuwan S, Lan NT, Takeda M, Yamaguchi R.	Nectin4 is an epithelial cell receptor for canine distemper virus and involved in the neurovirulence.	J Virol.	86:10207-10	2012
Saitoh M, Takeda M, Gotoh K, Takeuchi F, Sekizuka T, Kuroda M, Mizuta K, Ryo A, Tanaka R, Ishii H, Takada H, Kozawa K, Yoshida A, Noda M, Okabe N, Kimura H.	Molecular evolution of hemagglutinin (H) gene in measles virus genotypes D3, D5, D9, and H1.	PLoS One.	7:e50660	2012
Sakai K, Nagata N, Ami Y, Seki F, Suzaki Y, Iwata-Yoshikawa N, Suzuki T, Fukushi S, Mizutani T, Yoshikawa T, Otsuki N, Kurane I, Komase K, Yamaguchi R, Hasegawa	Lethal Canine Distemper Virus Outbreak in Cynomolgus Monkeys in Japan in 2008.	J Virol.	87:1105-14	2013

H, Saijo M, Takeda M, Morikawa S.				
Shirogane Y, Watanabe S, Yanagi Y.	Cooperation between different RNA virus genomes produces a new phenotype.	Nature Communications	3:1235	2012
Tahara M, Ito Y, Brindley M, Ma X, He J, Xu S, Fukuhara H, Sakai K, Komase K, Rota P, Plemper R, Maenaka K, Takeda M.	Functional and structural characterization of neutralizing epitopes of measles virus hemagglutinin protein.	J Virol.	87:666-75	2013
Tahara M, Ohno S, Sakai K, Ito Y, Fukuhara H, Komase K, Brindley MA, Rota PA, Plemper RK, Maenaka K, Takeda M.	The Receptor-binding Site of the Measles Virus Hemagglutinin Protein Itself Constitutes a Conserved Neutralizing Epitope.	J Virol.		2013
Tran DN, Pham NT, Tran TT, Khamrin P, Thongprachum A, Komase K, Hayakawa Y, Mizuguchi M, Ushijima H.	Phylogenic analysis of rubella viruses in Viet Nam during 2009-2010.	J Med Virol.	84(4):705-10	2012
Watanabe K, Watanabe K, Tazawa T, Kon M, Tamara T, Komase K.	Imported cases of measles in Niigata, Japan in 2011.	Jpn J Infect Dis.	65(3):268-70	2012
Watanabe S, Shirogane Y, Suzuki SO, Ikegame S, Koga R, Yanagi Y.	Mutant fusion proteins with enhanced fusion activity promote measles virus spread in both human neuronal cells and brains of suckling hamsters.	J Virol.		2013
駒瀬勝啓、竹田誠	ヨーロッパの麻疹の状況と今後の日本の課題	病原微生物検出情報	33:29-30	2012
駒瀬勝啓、竹田誠	ウイルス感染症検査診断の新しい展開、麻疹、風疹、ムンプスの検査診断の現状、	臨床と微生物	39:656-62	2012
駒瀬勝啓	Q&A 麻疹検査診断法	日本医事新報	4605:57-59	2012
關文緒、竹田誠	麻疹のウイルス型	日本医事新報	4613:58-59	2012
關文緒、竹田誠	モルビリウイルス:麻疹ウイルス、イヌジステンパーウイルスなど	ウイルス		2013
長野秀樹、岡野素彦	ウイルス抗体検査:目的、方法、検査の解釈	小児科	53(9):1225-1231	2012
安井善宏、小林慎一、山下照夫、平松礼司、皆川	麻疹疑い症例からの風疹ウイルス検出と遺伝子型解析ー愛知県	病原微生物検出情報	33(6):167-168	2012

洋子、森嘉生:				
内野清子、岡山文香、三好龍也、西口智子、吉田永祥、田中智之、沼田富三	麻疹疑い症例検体から分離された風疹ウイルス- 堺市 -	病原微生物検出情報	32:257-2 58	2011
庵原俊昭	麻疹ウイルス	日本小児感染症学会編、小児感染症マニュアル 2012. 東京医学社、東京	283-295: 201	2012
庵原俊昭	ウイルス感染症の診断	臨床と微生物	39:649-6 55	2012
浅田和豊、一見良司、大矢和伸、谷田寿志、田中孝明、菅 秀、庵原俊昭	フィリピンからの輸入麻疹患者の発生と臨床ウイルス学的考察	日本小児科学会雑誌	116:78-8 3	2012

