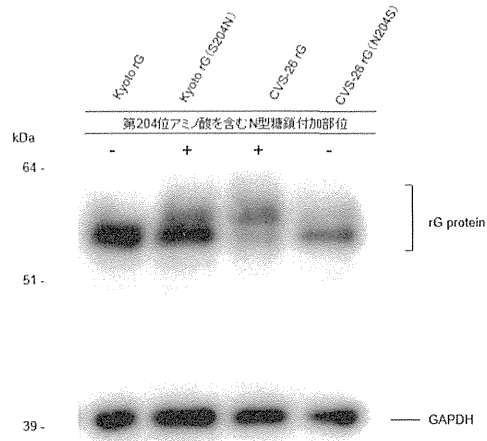
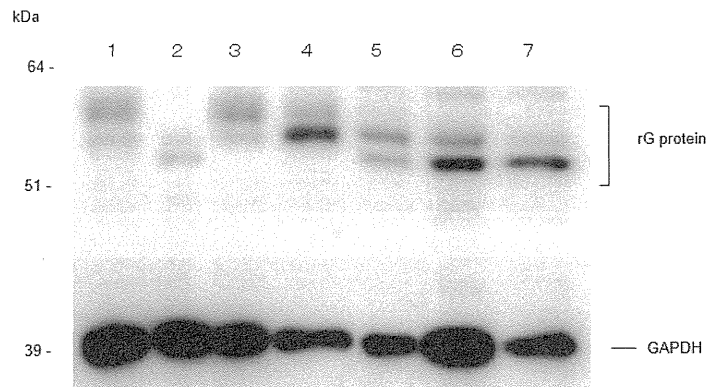


図4. 第204位アミノ酸に変異導入した組み換えG蛋白質の分子量の変動



Kyoto 株、CVS-26 株の第204位アミノ酸に変異導入してN型糖鎖付加部位を導入あるいは欠失したG蛋白質の分子量をウェスタンブロッティングで解析した。

図5. CVS-26株の37位、319位アミノ酸に変異導入したG蛋白質の分子量の変動



1: CVS-26 rG. 2: CVS-26 rG (ツニカマイシン添加). 3: CVS-26 rG(N37S). 4: CVS-26 rG(N204S). 5: CVS26 rG(N319Q). 6: CVS-26 rG(N204S, N319Q). 7: C26 rG(N37S, N204S, N319Q). MNA 細胞に rG 蛋白質を発現させてウェスタンブロッティングにより G 蛋白質を検出した。

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 (新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業)]

分担研究報告書

動物由来感染症の対応に関する研究 (H25-新興-一般-008)

分担研究課題：動物由来新興ウイルスの細胞侵入機構

研究分担者 福士秀悦 (国立感染症研究所ウイルス第一部)

研究協力者 須田遊人、福間藍子 (同)

研究要旨：中東呼吸器症候群 (MERS) は 2012 年にサウジアラビアで最初に報告のあった、新型のコロナウイルス (MERS-CoV) による感染症である。MERS-CoV の血清疫学、ヒトへの感染経路については未だ不明な点が多く、また、MERS-CoV がラットなどの実験用小動物にどの程度可能なのか等、宿主域について知見が十分に得られていない。本研究では MERS-CoV の擬似ウイルス (VSV シュードタイプ) を作製した。これを利用した、MERS-CoV に対する中和抗体が検出可能となった。また、VSV シュードタイプを用いた解析から、MERS-CoV のラットへの感染効率は低いことが明らかとなった。

A. 研究目的：

2012 年に中東地域で発生した中東呼吸器症候群 (MERS) の原因ウイルスである MERS コロナウイルス (MERS-CoV) はコウモリあるいはラクダがヒトへの感染源と推測されている。MERS-CoV のヒトへの感染リスクを評価するためには、ウイルスの自然宿主動物を同定し、ヒトへの感染経路を解明しなければならない。しかし、これまでのところ調査された地域、動物種は限られており、ウイルスの分布が中東地域に限局するのか、また、ウイルスがどのように自然宿主動物からヒトへ伝播するのか、その経路は今でも不明な点が多い。

水疱性口炎ウイルス (VSV) をベースにした擬似ウイルス (VSV シュードタイプ) はウイルス中和抗体を安全かつハイスループットに測定するための、また、ウイルス感染初期過程を解析するための有用なツールであり、これまで様々な新興ウイルスの感染性の研究に応用されてきた。本研究は、MERS-CoV の Spike (S) を被った VSV シュードタイプ (MERSpv) を作製し、MERS-CoV 中和抗体検出法を開発し、これを MERS の血清疫学に役立てることを目的とする。また、MERSpv を用いて MERS-CoV 感受性細胞域を調べ、細胞への吸着・侵入機構を明らかにすることを目的とする。

平成 25 年度は MERS_{Spv} の作製を試みたが、ウイルス感染性の解析のための十分な感染価が得られなかった。このため、平成 26 年度は MERS-CoV S の細胞質内ドメインの欠失変異体を作製し、これを被った感染価の高い MERS_{Spv} を作製し、これを用いた中和抗体測定法を開発した。また、MERS-CoV 感受性細胞域を調べるため、MERS-CoV のレセプターであるジペプジジルペプチダーゼ 4 (DPP4) に着目し、実験用小動物の一つであるラットの DPP4 がどの程度 MERS-CoV のレセプターとして機能するか検討した。

B. 研究方法：

- 1) MERS-CoV S の細胞質内ドメインを C 末端側から 7, 11, 16, 20 アミノ酸を削った cDNA 欠失変異体を作製し哺乳細胞発現ベクター pcDNA にクローニングした(図 1A)。
- 2) 各発現プラスミドを 293T 細胞にトランスフェクトし、シュードタイプ種ウイルスである VSV Δ G* (GFP をレポーター遺伝子として持つ)を感染させ、MERS-CoV の各種欠失変異 S を被った VSV シュードタイプ(MERS_{Spv})を作製した。MERS_{Spv} の細胞への感染性の解析は、GFP 陽性細胞数を計測することにより行った。
- 3) ヒト DPP4、ラット DPP4、ラット DPP4 のうち S 結合部分のアミノ酸(T292, V334, E342)をそれぞれ一つずつヒト

DPP4 のアミノ酸(L292, R334, Q342)に置換したラット DPP4 (ラット DPP4-T292L、ラット DPP4-V334R、ラット DPP4-E342Q)、これらの 3 つの変異を同時に導入したラット DPP4-mut x3、あるいはラット DPP4 の S 結合部位をヒト DPP4 に入れ替えたヒトラット DPP4 キメラを発現させた CHO 細胞を用いて、それぞれが MERS-CoV のレセプターとして働くかどうか検討した。

C. 結果：

- 1) MERS-CoV S の細胞質内ドメインを C 末端側から 7, 11, 16, 20 アミノ酸を削った cDNA 欠失変異体を作製し(図 1A)、それぞれの S を被った VSV シュードタイプ(MERS_{Spv})を作製した。C 末端から 16 アミノ酸を削ると最も高い感染効率を示し(MERS_{Spv}-St16)、その感染価は完全長の S を被った VSV シュードタイプ(MERS_{Spv}-Wt)よりも 10 倍高かった(図 1B)。
- 2) C 末端を削ることにより S の細胞内分布が変わるかどうか蛍光抗体法で調べたところ、全長の S は細胞内の ER 付近にとどまっているのに対し、C 末端を削った S は、その分布が ER から細胞膜付近に発現していることが明らかとなった。これは S の C 末端側に存在する ER 局在シグナルを欠失させたためであると考えられる(図 2)。
- 3) MERS_{Spv}-St16 の感染は MERS-CoV S に

対する抗血清により濃度依存的に阻害された。一方、コントロールとして用いた、MERS-CoV NあるいはSARS-CoV Sに対する抗血清では MERSpv-St16 の感染は阻害されなかった。このことから、MERSpv-St16 の感染は MERS-CoV S 依存的であると考えられた (図 3)。

- 4) ヒト DPP4 の MERS-CoV S 結合に必須のアミノ酸配列とコウモリ (MERS-CoV 感染可能) およびラット DPP4 の相当する部位のアミノ酸配列を図 4 に示す。ヒト DPP4、ラット DPP4、ラット DPP4 のうち S 結合部分のアミノ酸(T292, V334, E342)をそれぞれ一つずつヒト DPP4 のアミノ酸(L292, R334, Q342)に置換したラット DPP4 (ラット DPP4-T292L、ラット DPP4-V334R、ラット DPP4-E342Q)、これらの3つの変異を同時に導入したラット DPP4-mut x3、あるいは、ラット DPP4 の S 結合部位をヒト DPP4 に入れ替えたヒト-ラット DPP4 キメラを発現させた CHO 細胞に MERSpv-St16 を接種した。ラット DPP4 発現細胞には MERSpv-St16 はほとんど感染せず (図 5)、1 アミノ酸をヒト型に入れ替えたラット DPP4-T292L、ラット DPP4-V334R、ラット DPP4-E342Q 発現細胞でも同様であった。3 アミノ酸を同時に入れ替えたラット DPP4-mut x3 発現細胞には MERSpv-St16 は感染することから、3 つのアミノ酸の違いが MERS-CoV の感染する、しないを規定する主要な要因であ

ると考えられた (図 6)。また、ラット DPP4-mut x3 発現細胞への感染はヒト DPP4 およびヒト-ラット DPP4 キメラを発現する細胞への感染よりも効率が低かったことから、MERS-CoV の効率的な感染には 3 つのアミノ酸のみならず、S 結合部位の他の部位のアミノ酸配列も効率的な感染に必要であると考えられた (図 6)。

D. 考察 :

本研究で、MERS-CoV の S を被った感染価の高い VSV シュードタイプ (MERSpv-St16) を作製することができた。MERSpv-St16 の感染は S タンパク質依存的であったことから、このシュードタイプは MERS-CoV そのものの感染性を解析するうえで、また MERS-CoV に対する中和抗体を測定するうえで有用なツールとなりうる。

ラット由来 DPP4 は MERS-CoV のレセプターとして機能しないことが明らかとなった。このことから、MERS-CoV の動物モデルとしてラットは適していないと考えられた。また、ラット DPP4 の S タンパク質結合部位のアミノ酸を一つヒトの DPP4 のアミノ酸に入れ替えてもレセプターとして機能せず、また、S タンパク質結合部位をヒト DPP4 に入れ替えないとレセプターとして十分に機能しないことから、MERS-CoV レセプター機能には S 結合部位の多くのアミノ酸が関与していると考えられた。ラット DPP4 発現細胞へ MERS-CoV の感染効率

は非常に低い、MERS-CoV の S に変異を導入することにより、感染効率が上昇するかどうかについて、構造解析を含めて検討する予定である。

E. 結論

- 1) MERS-CoV の S を被った感染価の高い VSV シュードタイプ(MERSpv-St16) を作製することができた。
- 2) MERSpv-St16 は MERS-CoV そのものの感染性を解析するうえで、また MERS-CoV に対する中和抗体を測定するうえで有用なツールとなりうる。
- 3) ラット DPP4 は MERS-CoV レセプターとして機能しないことが明らかとなった。

F. 健康危険情報

MERSは、サウジアラビアを中心として、未だに患者が発生している。これまでに、輸入症例が発生しているのは、英国、フランス、チュニジア、イタリア、マレーシア、フィリピン、ギリシャ、エジプト、米国、オランダ、アルジェリア、オーストリア、トルコである。

G. 研究発表

1.論文発表

- 1) Tani H, Iha K, Shimojima M, Fukushi S, Taniguchi S, Yoshikawa T, Kawaoka Y, Nakasone N, Ninomiya H, Saijo M, Morikawa S. Analysis of Lujo Virus Cell

Entry using Pseudotype Vesicular Stomatitis Virus. *J Virol.* 88(13):7317-7330,2014.

- 2) Bukbuk DN, Fukushi S, Tani H, Yoshikawa T, Taniguchi S, Iha K, Fukuma A, Shimojima M, Morikawa S, Saijo M, Kasolo F, Baba SS. Development and validation of serological assays for viral hemorrhagic fevers and determination of the prevalence of Rift Valley fever in Borno State, Nigeria. *Trans R Soc Trop Med Hyg.*108(12):768-773, 2014.
- 3) Yoshikawa T, Fukushi S, Tani H, Fukuma A, Taniguchi S, Toda S, Shimazu Y, Yano K, Morimitsu T, Ando K, Yoshikawa A, Kan M, Kato N, Motoya T, Kuzuguchi T, Nishino Y, Osako H, Yumisashi T, Kida K, Suzuki F, Takimoto H, Kitamoto H, Maeda K, Takahashi T, Yamagishi T, Oishi K, Morikawa S, Saijo M, Shimojima M. Sensitive and specific PCR systems for the detection of both Chinese and Japanese severe fever with thrombocytopenia syndrome virus strains, and the prediction of the patient survival based on the viral load. *J Clin Microbiol.* 52(9):3325-3333, 2014.

2.学会発表

- 1) 福士秀悦、永田典代、岩田奈織子、谷英樹、吉河智城、谷口怜、福間藍子、下島昌幸、西條政幸. 高齢マウスにおける重症熱性血小板減少症候群ウイルスの感染感受性の解析. 第62回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, (2014.11) .

- 2) 福間藍子、福士秀悦、吉河智城、鈴木忠樹、谷英樹、谷口怜、下島昌幸、西條政幸. SFTS ウイルスの核蛋白質に対するモノクローナル抗体の作製と抗原検出 ELISA への応用. 第62回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, (2014. 11) .
- 3) 西條政幸、吉河智城、福士秀悦、谷英樹、福間藍子、谷口怜、須田遊人、Harpal Singh、前田健、高橋徹、森川茂、下島昌幸. 重症熱性血小板減少症候群ウイルスの分子系統学的特徴とその地理的分布. 第62回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, (2014. 11) .
- 4) 下島昌幸、福士秀悦、谷英樹、谷口怜、西條政幸. プラークを形成する SFTS ウイルスによる中和抗体価測定. 第62回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, (2014. 11) .
- 5) 谷英樹、谷口怜、福間藍子、福士秀悦、森川茂、下島昌幸、西條政幸. 重症熱性血小板減少症候群ウイルス GP の細胞融合能と 25-hydroxycholesterol による細胞阻害効果. 第62回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, (2014. 11) .
- 6) 谷口怜、堀本泰介、Joseph Masangkay、Puentepina Roberto Jr.、大松勉、永田典代、江川和孝、福間藍子、Harpal Singh、福士秀悦、谷英樹、吉河智城、下島昌幸、吉河泰弘、西條政幸、久和茂、前田健. フィリピンのコウモリからのプテロパインオルソレオウイルスの分離. 第62回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, (2014. 11) .
- 7) 吉河智城、福士秀悦、谷英樹、福間藍子、谷口怜、須田遊人、Harpal Singh、江川和孝、下島昌幸、森川茂、西條政幸. ワクシニアウイルス LC16m8 株を土台とした組換えワクシニアウイルス作出システムの確立. 第62回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, (2014. 11) .
- 8) 岩田奈織子、福士秀悦、福間藍子、鈴木忠樹、竹田誠、田代真人、長谷川秀樹、永田典代. 中東呼吸器症候群コロナウイルスに対するマウスおよびラットの感受性について. 第62回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, (2014. 11) .
- 9) Aiko Fukuma, Shuetsu Fukushi, Satoshi Taniguchi, Hideki Tani, Tomoki Yoshikawa, Tadaki Suzuki, Hideki Hasegawa, Masayuki Saijo, Masayuki Shimojima. Development of antigen-capture ELISA for the detection of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus nucleoprotein. The 10th China-Japan International Conference of Virology. Changchun, China. (2014. 08).
- 10) Satoshi Taniguchi, Shuetsu Fukushi, Joseph S Masangkay, Roberto P Puentespina, Tsutomu Omatsu, Ken Maeda, Aiko Fukuma, Tomoki Yoshikawa, Hideki Tani, Masayuki Shimojima, Shigeru Kyuwa, Masayuki Saijo, Shigeru Morikawa. Seroepidemiological study of SFTS in wild bats in the Philippines. The 10th China-Japan International Conference of

Virology. Changchun, China. (2014. 08).

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

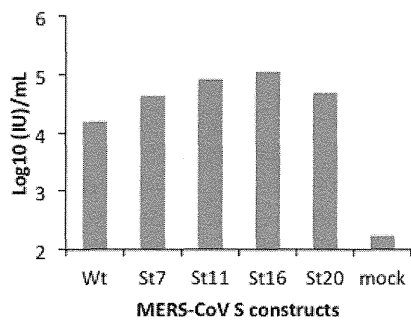
3. その他

なし

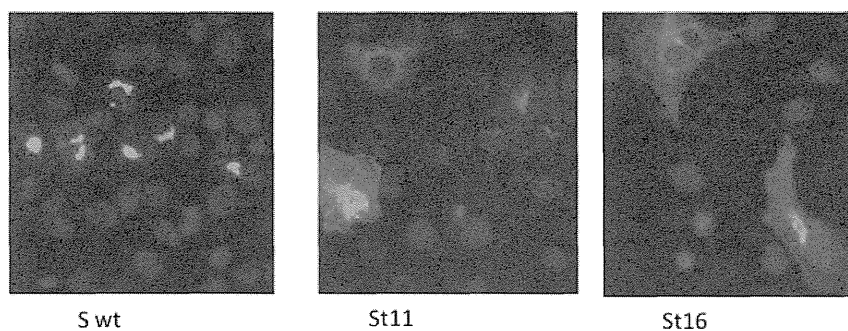
(A)

		Trans-membrane	Cytoplasmic	
SARS S wt	1192	I...V.....I.IVM-.TIL...	MTSCCS.LK.ACS.GS...KFD.D.S..VLKG.KLHYT	1255
MERS S wt	1293	NKWFNYIWLGFIAGLVALALCVFFILCC	TGCGTNCM-GKLCNRCCDRYEEYDLEPHKRVVH----	1353
		**** * * * * * * * * * *	* * * * * * * * * *	
MERS St7	1293	NKWFNYIWLGFIAGLVALALCVFFILCC	TGCGTNCM-GKLCNRCCDRYEEYDLE	1346
MERS St11	1293	NKWFNYIWLGFIAGLVALALCVFFILCC	TGCGTNCM-GKLCNRCCDRYEE	1342
MERS St16	1293	NKWFNYIWLGFIAGLVALALCVFFILCC	TGCGTNCM-GKLCNRCC	1337
MERS St20	1293	NKWFNYIWLGFIAGLVALALCVFFILCC	TGCGTNCM-GKLC	1333

(B)



(图1) VSV pseudotyped with cytoplasmic deletion mutants of S protein. (A) C-terminal sequences of MERS-CoV S protein variants used in this study. The C-terminal 19 amino acid deletion mutant of SARS-CoV S is shown for comparison. Gray box indicated cytoplasmic domain. (B) VSV/GFP pseudotyped with deletion mutants was inoculated on Vero cells. GFP-expressing cells were represented as infectious unit (IU). The data indicate representative of two independent experiments with similar results.



(图2) Differential subcellular localization of C-terminus truncated S proteins. Vero cells were transfected with expression plasmids encoding MERS-CoV full-length S (S wt), C-terminal 11 amino acids (St11), or 16 amino acids (St16) truncated version of MERS-CoV S. After 48hrs, S proteins were detected with a monoclonal antibody against MERS-CoV S (45E-11, kindly provided from Dr. K. Onishi, National Institute of Infectious Diseases, Japan, manuscript in preparation).

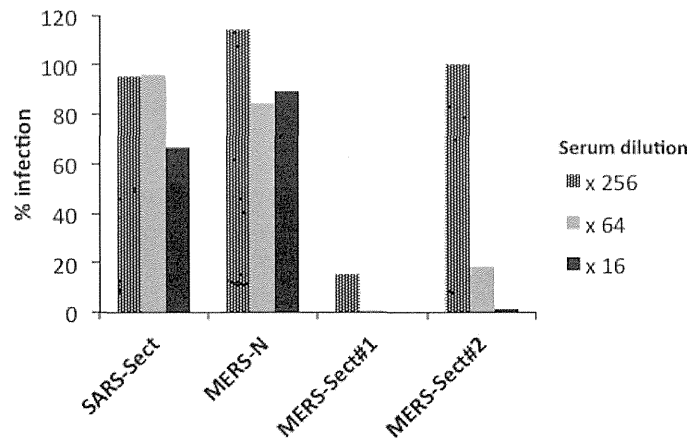
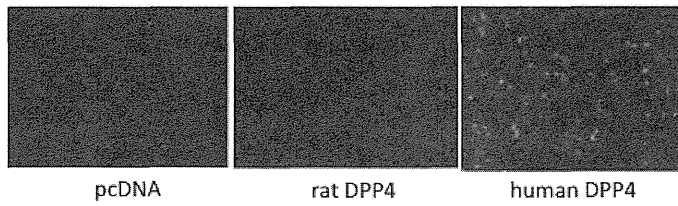


Figure 3 Specificity of MERSpv-St16 infection on Vero cells. MERSpv-St16 was pre-incubated with serially diluted rabbit anti-sera. Then the mixture was inoculated to Vero cells. The GFP-positive cells in the absence of antibodies was set as 100%. The data indicate representative of two independent experiments with similar results.

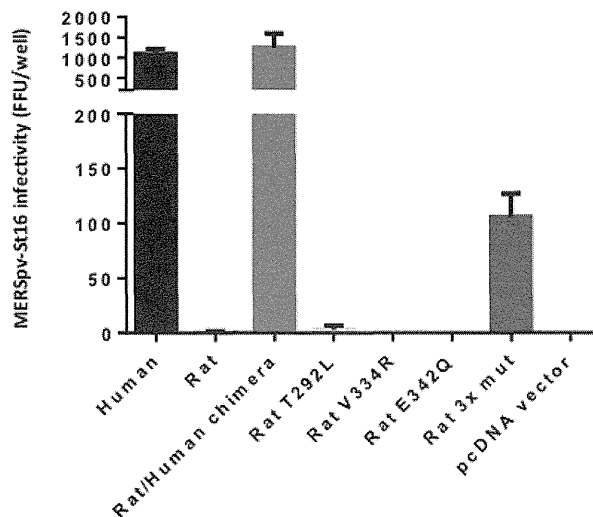
DPP4	RBD-contacting residues in DPP4*										
	265	284	286	289	292	293	315	320	334	342	344
Human	K	Q	T	A	L	I	R	Y	R	Q	I
Bat	K	Q	T	A	L	T	R	Y	K	Q	I
Rat	K	Q	T	A	T	T	R	Y	V	E	I

Figure 4 DPP4 residues contact with RBD of MERS-CoV

* The position of amino acid residues refers to the rat DPP4. Red characters indicate the amino acid residues different from human DPP4.



☒5 Rat DPP4 does not act as a MERS-CoV receptor. MERSpv-St16 was inoculated to the cells transfected with expression plasmid encoding human or rat DPP4 or pcDNA vector. GFP expression was examined by fluorescence microscopy.



☒6 Mutational analysis of rat DPP4. MERSpv-St16 was inoculated on the CHO cells transfected with expression plasmids encoding human DPP4, rat DPP4, or rat DPP4 mutants. GFP expression was examined by fluorescence microscopy, and the number of the GFP-positive cells was determined.

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 (新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業)]

分担研究報告書

動物由来感染症の対応に関する研究 (H25-新興-一般-008)

分担研究課題：野兔病の病原性発現機構の解析

研究分担者 宇田 晶彦 (国立感染症研究所獣医科学部)

研究協力者 藤田修、堀田明豊、田徳雨 (国立感染症研究所獣医科学部)

研究要旨：野兔病菌は動物に対して非常に高い感染性と病原性を有しており、野兔病菌病原因子の同定や、野兔病の発症機序の解明は公衆衛生上必要不可欠である。これまでに、マウス継代を用いて野兔病菌弱毒株 (SCHU P0 および P5) から野兔病菌強毒株 (SCHU P9) を作出し、両者のゲノム比較解析から弱毒株は *pdpC* 遺伝子の欠損により、マウスに対する病原性が完全に消失している事を明らかにしてきた。そこで本研究では、野兔病菌 *pdpC* 遺伝子が関与している他の病原遺伝子を同定、又は新たな病原遺伝子を同定する事を目的とし、弱毒株と強毒株の遺伝子発現比較解析を試みている。昨年度は、野兔病菌のタンパク質をコードする 1604 遺伝子中で 21 遺伝子が有意に発現変動している事を明らかにした。本年度は、このマイクロアレイ解析について詳細に再検討を行った。この結果、強毒株では一部の tRNA が強く発現しており、野兔病強毒株の菌体内で病原遺伝子候補を含むタンパク質の生合成が活発である可能性が示唆された。また、弱毒株と強毒株では、6 遺伝子 (*Isflu1*、*hupB*、*usp*、*FTT_1140*、*FTT_0272*、*FTT_965c*) の発現量差異が確認された。この事から、これら 6 遺伝子は新たな病原性関連遺伝子である可能性が示唆された。

A. 研究目的：

野兔病は、野兔病菌の感染によって引き起こされる人畜共通感染症である。野兔病菌のヒトへの感染経路は多岐にわたり、菌を保持するダニや蚊等の吸血昆虫による媒介、感染動物との接触、感染動物の排泄物や死体に汚染された食料や飲料水の摂取、菌を含むエアロゾルの吸引等が挙げられる。

これらのヒトへの感染は 10 個以下という極微量の生菌数で感染が成立することから、バイオテロに使用される可能性のある病原体として分類されている。故に、高い感染力を保持する野兔病菌の病原因子を同定し、感染機序を解明する事は公衆衛生上必要不可欠である。そこで本研究では、野兔病菌弱毒株と強

毒株の遺伝子発現比較解析を用いて、pdpC 遺伝子が関与している遺伝子の同定、又は新たな病原遺伝子を同定する事を目的とした。

B. 研究方法：

バクテリア及びウイルスからの核酸抽出

F. tularensis subsp. *tularensis* (野兎病菌) SCHU P0 株、SCHU P5 株および SCHU P9 株は Chamberlain defined medium (CDM 培地) で培養した後、10%グリセロールを含む CDM 培地に浮遊させ、使用するまで -80°C で保管した。

野兎病菌を CDM 培地で培養し (OD₆₀₀ = 2.0~2.5)、遠心にて集菌した後 RNeasy mini kit (Qiagen Ltd., Valencia, CA) を用いて Total RNA を精製した。得られたサンプルは 1 mM EDTA を含む 5 mM Tris-HCl (pH 8.0) 溶液で溶出した。抽出した RNA サンプルの濃度は Nanodrop 1000 (Scrum, Tokyo, Japan) で測定し、マイクロアレイ解析を行うまで -80°C で保管した。

マイクロアレイのデザイン

野兎病菌 SCHU S4 株の全ゲノム塩基配列を NCBI からダウンロードした後、Array Designer 3.01 (Premier Biosoft International, Palo Alto, CA) へインポートした。野兎病菌 SCHU S4 に添付されていたアノテーション情報に基づき、1604 種類のタンパク質をコードする遺伝子、38 種類の tRNA 遺伝子、および 10 種類の rRNA 遺伝子毎に塩基配列

を分割し、各遺伝子毎に 1 種類のプローブを設計した。プローブの設計時の条件は、60 mer、T_m 75°C ± 5.0°C、ヘアピンループ (< -3.0 kcal/mol) 及びセルフダイマー (< -3.0 kcal/mol)、そしてクロスホモロジーは極力避けた。設計したプローブは ProbeMower (Symplus, Tokyo, Japan) を用いてホモロジー検索 (BLAST 検索) および結果取得を行い、十分な特異性を持つ 1652 種類のセンス鎖プローブを選定した。1652 種類のプローブはアレイあたり 7 連でプリントしたマイクロアレイの作製はアジレントに委託した。

マイクロアレイのハイブリダイゼーションとデータ解析

野兎病菌 SCHU P0、P5 および P9 から抽出した Total RNA は 65°C、15 分間熱処理を行った後、Ulysis Alexa Flour 546 Nucleic Acid Labeling Kit (Molecular probes, Eugene, OR) を添加し、80°C、15 分間インキュベートした。標識された RNA はエタノール沈澱した後、70%エタノールでリンスし、乾燥後 25 μl の DEPC 処理水で溶解した。各サンプルに 25 μl の 2x Fragmentation Buffer (Agilent) を添加した後 50°C、30 分間断片化処理を行い、50 μl の 2x Hi-RPM Gene Expression Hybridization Buffer (Agilent) と混合した。100 μl のハイブリダイゼーションサンプル溶液はガスケットスライド (Agilent) の上に広げ、マイクロアレイスライドと張り合わせホルダーにセットした。

ハイブリダイゼーションは Hybridization Oven (Agilent) を用いて 65°C、毎分 10 回転で 17 時間行った。ハイブリダイゼーション後のスライドはアジレントプロトコール ver. 6.5 に従い洗浄し、マイクロアレイスキャナーのグリーンレーザーを用いてマイクロアレイスライドの蛍光画像ファイルを取得した。得られた画像ファイルから、Feature Extraction (Agilent) を用いて各スポットの蛍光強度を数値化した。

マイクロアレイデータの解析

Feature Extraction によって出力された SCHU P0、P5、P9 株の遺伝子発現データは GeneSpring GX (Agilent) にインポートし、チップ間 (Shift to 50 percentile) および各遺伝子 (median of all samples) を normalization (標準化) した。補正したデータから 3 つの株間のいずれかで有意に変動した遺伝子 (2 倍以上、 $p < 0.05$) を抽出した。

C. 結果：

野兎病菌の新たな病原遺伝子候補の同定

昨年度行った野兎病菌強毒株 (SCHU P9) と弱毒株 (SCHU P0 および P5) の遺伝子発現比較解析について再度詳細に検討を行った。液体培養した SCHU P0、P5、P9 株 (各株 $n=2$) から Total RNA を抽出後蛍光標識したサンプルと野兎病菌発現解析アレイを用いて、遺伝子発現比較解析を試みた。マイクロアレイスキャナによって読み取られ

たマイクロアレイの画像を、Feature Extraction ソフトウェアによって各遺伝子発現量を数値化、そのデータを遺伝子発現比較ソフト (GeneSpring) へ取込後、アレイ間補正および遺伝子発現補正を行った。野兎病菌弱毒株 (SCHU P0 および P5) と強毒株 (SCHU P9) の 3 株間で、2 倍以上の発現量差異、且つ有意に変動した ($p < 0.05$) 遺伝子を抽出した結果、強毒株では 19 遺伝子が発現上昇し、2 遺伝子が発現減少しており、昨年度と同じ結果が得られた。しかし、昨年度に行った解析では、これら 21 遺伝子のアノテーション情報付加の作業手順に誤りが有る事が明らかとなった。そこで、本年度は正しいアノテーション情報を付加し、再度解析を試みた。この結果、強毒 (SCHU P9) 株では 12 種類の tRNA と 1 種類の rRNA の発現量が顕著に上昇しており、野兎病強毒株の菌内では病原遺伝子候補を含むタンパク質の生合成が活発である可能性が示唆された。また、弱毒 (SCHU P0 & P5) 株と強毒 (SCHU P9) 株では、6 遺伝子 (Isflu1、hupB、usp、FTT_1140、FTT_0272、FTT_965c) の発現量に差が有る事が確認され、これらの遺伝子が病原性に関与している可能性が示唆された。

野兎病菌 PdpC タンパク質の核酸結合能に関する検討

本研究で使用している野兎病菌弱毒株 (SCHU P0 および P5) は pdpC 遺伝子が欠損している事を昨年度までに明らかにして

きた。PdpC タンパク質は、野兔病菌の中で 2 番目に大きな分子量を持ち、最も強い塩基性を示すタンパク質である。この性状は核酸結合性タンパク質に多くみられることから、PdpC も類似した機能を持つと推測されていた。そこで、液体培養した SCHU P0、P5、P9 株からタンパク質抽出を行い、抗 PdpC 抗体を用いて免疫沈降を行った。しかしながら、野兔病菌 PdpC タンパク質が核酸に結合する証拠は未だ得られていない。

D. 考察：

野兔病菌は哺乳類に対して極めて高い感染性と病原性を有し、病気性発揮機序の解析や病原性遺伝子の同定は公衆衛生上非常に重要である。本研究では、野兔病菌強毒株と弱毒株の遺伝子発現量比較解析を用いて、病原遺伝子の同定を試みている。

本年度のマイクロアレイ解析において、強毒株と弱毒株間で 6 遺伝子 (Isflu1、hupB、usp、FTT_1140、FTT_0272、FTT_965c) の発現量に有意差が確認された。これらの遺伝子は病原性に関わっている可能性が推測されることから、遺伝子破壊株の作出後、マクロファージ中での増殖能やマウスに対する病原性の確認について、今後精力的に検討を行っていききたい。また、強毒株において一部の tRNA の発現量が高く維持されていたことから野兔病菌の病原因子を含むタンパク質合成が活発に行われている可能性が示唆された。しかし、tRNA や rRNA は、比較的安定性のある RNA として知られてお

り、サンプル採材時の生菌および死菌の構成比率によって、見掛け上の遺伝子発現変動は大きな誤差を生む可能性が考えられた。また、タンパク質の生合成に関わる他の遺伝子発現変動は観察されなかった事を鑑みれば、tRNA や rRNA の発現変動が病原性に関与している可能性は少ないと思われた。しかしながら、強毒株と弱毒株における網羅的タンパク質発現比較解析を実施し、tRNA や rRNA の発現変動との関連性について検討を試行する必要性は感じられ、今後の検討課題としたい。

以上の結果から、野兔病菌強毒株と弱毒株で有意な遺伝子発現量に差異が観察された 6 遺伝子 (Isflu1、hupB、usp、FTT_1140、FTT_0272、FTT_965c) の病原性について重点的に検討を行う必要性が有ると考えられた。

E. 結論

野兔病菌強毒株と弱毒株の遺伝子発現比較を行い、6 種類の新たな病原遺伝子候補を同定した。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表
なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

1. 特許取得

なし

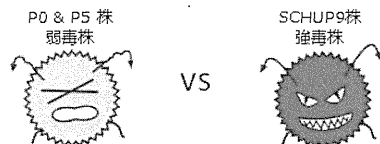
2. 実用新案登録

なし

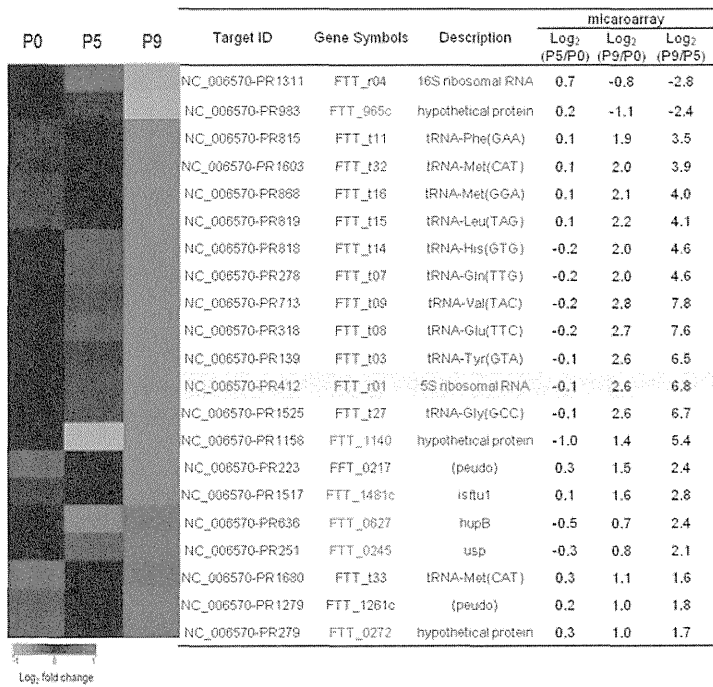
3. その他

なし

野兔病菌の病原性に関する研究



弱毒株と強毒株のmRNA発現比較解析 昨年得られた結果を詳細に再解析した



強毒株 (SCHU P9) : 発現減少 2遺伝子 / 発現増加 10遺伝子

弱毒株と強毒株の遺伝子発現比較の結果

1. 強毒株では19遺伝子が発現上昇し、2遺伝子の発現が抑制されている
2. 強毒 (SCHU P9) 株では、tRNAの発現量が高い
→野兔病強毒株の菌内では、病原遺伝子候補を含むタンパク質の生合成が活発である可能性が示唆された。強毒株と弱毒株の網羅的タンパク質発現比較を行い、確認する必要性アリ。
3. 弱毒 (SCHU P0 & P5) 株と強毒 (SCHU P9) 株では、6遺伝子 (Isflu1、hupB、usp、FTT_1140、FTT_0272、FTT_965c)に発現量に差が有る。
→これらは、病原性に関与している可能性が示唆された。6遺伝子の欠損株では、病原性の欠損が認められることを確認する。

まとめ

野兔病菌強毒株の高い感染性と病原性は、活発なタンパク質生合成に支えられている可能性が示唆された。
また、6種類の新たな病原遺伝子候補を見つけた。

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 (新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業)]

分担研究報告書

動物由来感染症の対応に関する研究 (H25-新興-一般-008)

分担研究課題：ニホンザル血小板減少症の原因となる SRV のウイルス学的解析

研究分担者 三浦智行 (京都大学ウイルス研究所附属感染症モデル研究センター霊長類モデル研究領域 准教授)

研究協力者 宮沢孝幸 (京都大学ウイルス研究所細胞生物学研究部門信号伝達学研究分野 准教授)

研究要旨：最近、京都大学霊長類研究所にてニホンザルが血小板減少症により大量死した。これまでの次世代シーケンサーなどの研究からサルレトロウイルス 4 型 (SRV-4) との関連が示唆された。昨年度においては、SRV-4 をニホンザルに実験感染した際に、同様の症状を再現できたことを報告した。このことから、京都大学霊長類研究所におけるニホンザルが血小板減少症の原因ウイルスは SRV-4 であることを確定した (発表論文①、②) 。最近、京都大学霊長類研究所とは異なる自然科学研究機構生理学研究所の動物施設にて同様の症状を呈しニホンザルが死亡する事例があった。しかし、これらのニホンザルにおいて SRV-4 の感染は確認できなかった。そこで、メタゲノム解析を行ったところ、発症個体特異的に SRV-5 に相同性の高い核酸配列が検出され、SRV-5 もしくは SRV-5 に類似したウイルスがニホンザルの血小板減少症の発症に関与していると考えられた。今年度は、発症個体より SRV-5 を分離し、その全塩基配列を確定した。さらには感染性クローンの作製に成功した。

A. 研究目的：

2001 年から 2010 年の間に 2 度、京都大学霊長類研究所にてニホンザルが急性血小板減少症を呈して大量死する事例があった。SRV-4 が原因ウイルスであることを確定したことを昨年度に報告した。今回、新たに霊長類研究所とは異なる動物施設 (自然科

学研究機構生理学研究所関連施設) にてニホンザルが同様の症状を呈し死亡する事例があった。まず、最初に SRV-4 を疑い、SRV-4 の感染を PCR で調査した。しかし、SRV-4 の核酸配列は検出できなかった。そこで、メタゲノム解析を行ったところ、発症個体特異的に SRV-5 に相同性の高い核酸

配列が検出され、SRV-5 もしくは SRV-5 に類似したウイルスがニホンザルの血小板減少症の発症に関与していると考えられた。今回、我々は SRV-5 核酸陽性個体よりウイルスを分離し、ウイルスの塩基配列の決定及び感染性クローンの作製を試みた。

B. 研究方法：

6 頭の SRV-5 核酸陽性のニホンザルの血漿を、ヒト胎児腎臓由来株化細胞（293T 細胞）に接種し、25 日間培養した。その後、ゲノム DNA を抽出し、SRV-5 特異的プライマーを用いて PCR を行った。さらに、SRV-5 特異的プライマー及び SRV 共通プライマーを用いて全長をクローニングし、全塩基配列を決定、感染性クローンを作製した。クローンの感染性は PCR 及び LacZ マーカーレスキューアッセイを用いて確認した(図 1)。

C. 研究結果：

ニホンザル 6 頭中 2 頭よりウイルス分離に成功した(図 2)。ニホンザルより分離された SRV-5 は既存の SRV-5(AB611707)と塩基配列で 99%相同であった。また、作製したクローンは感染性であることが確認できた(図 3)。

D. 考察：

今回、血小板減少症ニホンザルより SRV-5 の分離に成功した。SRV-5 は SRV-4 と非常に近縁なウイルスであることが知ら

れている。このことから、SRV-5 は SRV-4 と同様にニホンザルに急性に血小板減少症を引き起こすことが強く示唆される。加えて、今回作製に成功した SRV-5 の感染性クローンは、SRV-5 のウイルス学的性状の解析に役立つと考えられる。

E. 結論

SRV-5 はニホンザルに感染し、増殖しうることがわかった。

F. 健康危険情報

現在のところ、国内において SRV4 及び 5 がヒトに感染した事例はない。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yoshikawa R, Okamoto M, Sakaguchi S, Nakagawa S, Miura T, Hirai H, Miyazawa T. Simian Retrovirus 4 Induces Lethal Acute Thrombocytopenia in Japanese Macaques. *Journal of Virology* 2015 (in press).
- 2) Okamoto M, Miyazawa T, Morikawa S, Ono F, Nakamura S, Sato E, Yoshida T, Yoshikawa R, Sakai K, Mizutani T, Nagata N, Takano J, Okabayashi S, Hamano M, Fujimoto K, Nakaya T, Iida T, Horii T, Miyabe-Nishiwaki T, Watanabe A, Kaneko A, Saito A, Matsui A, Hayakawa T, Suzuki J, Akari H, Matsuzawa T, Hirai H. Emergence of infectious malignant

thrombocytopenia in Japanese macaques
(*Macaca fuscata*) by SRV-4 after
transmission to a novel host. *Scientific
Reports* 2015 (*in press*)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

1. 特許取得

なし

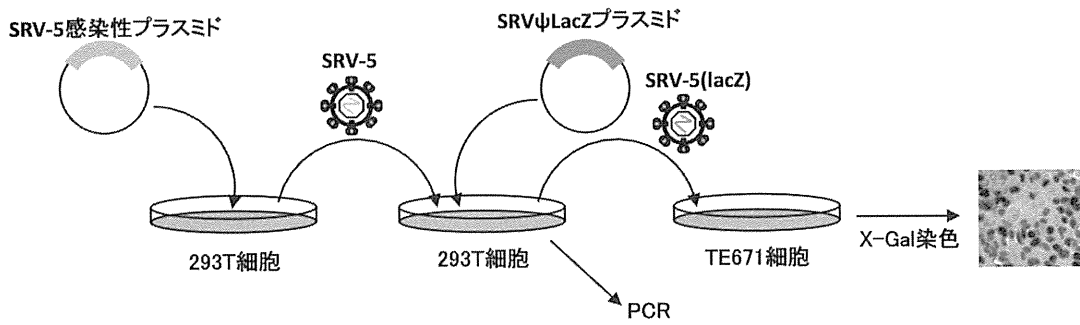
2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

図1:SRV-5プラスミドの感染性確認方法



293T細胞:ヒト胎児由来腎臓株化細胞
TE671細胞:ヒト横紋筋肉腫株化細胞

SRVψLacZプラスミド:SRVパッケージングシグナルとLacZ遺伝子の融合プラスミド
SRV-5(lacZ):LacZ遺伝子を取り込んだSRV-5

図2:病態個体血漿からのSRV5の分離

