

厚生労働科学研究費補助金 [新興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)]

研究分担者報告書

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チジルペプチダーゼ 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 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

は非常に低いが、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

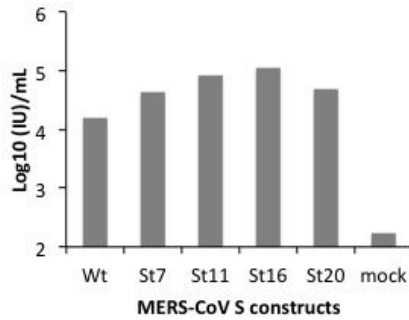
3. その他

なし

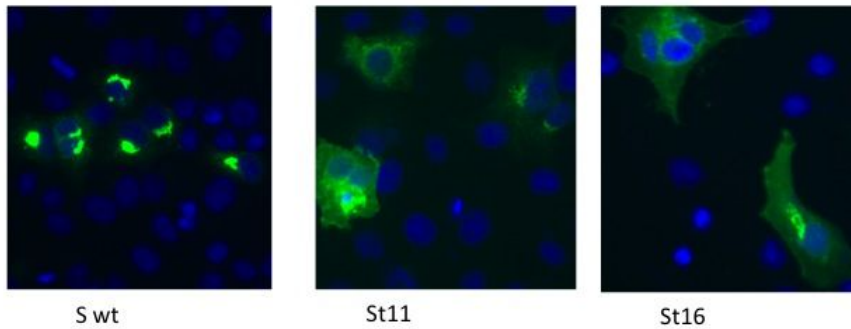
(A)

		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	NKWPWYIWLGFIAGLVALALCVFFILCCPGCGTNCM-GKLKCNRCDDRYEYDLEPHKVHVH----		1353
		*****	* * * * *	
MERS St7	1293	NKWPWYIWLGFIAGLVALALCVFFILCCPGCGTNCM-GKLKCNRCDDRYEYDLE		1346
MERS St11	1293	NKWPWYIWLGFIAGLVALALCVFFILCCPGCGTNCM-GKLKCNRCDDRYEE		1342
MERS St16	1293	NKWPWYIWLGFIAGLVALALCVFFILCCPGCGTNCM-GKLKCNRC		1337
MERS St20	1293	NKWPWYIWLGFIAGLVALALCVFFILCCPGCGTNCM-GKLKC		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).

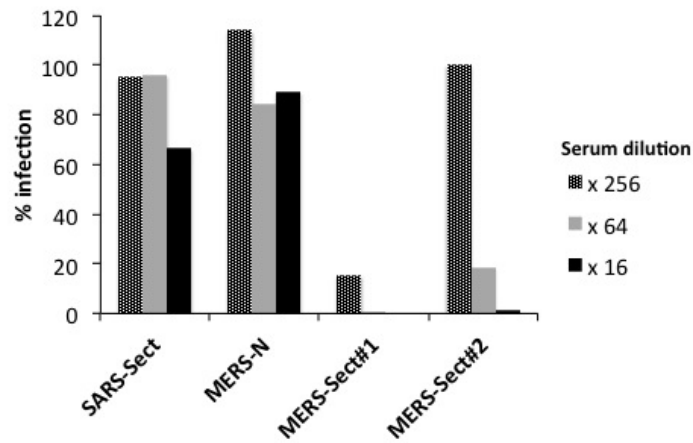
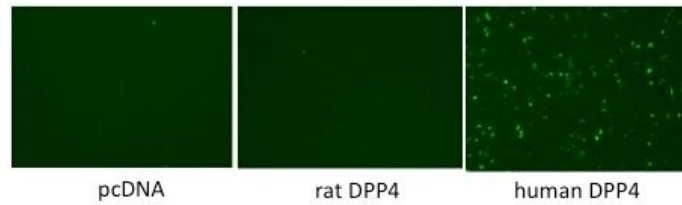


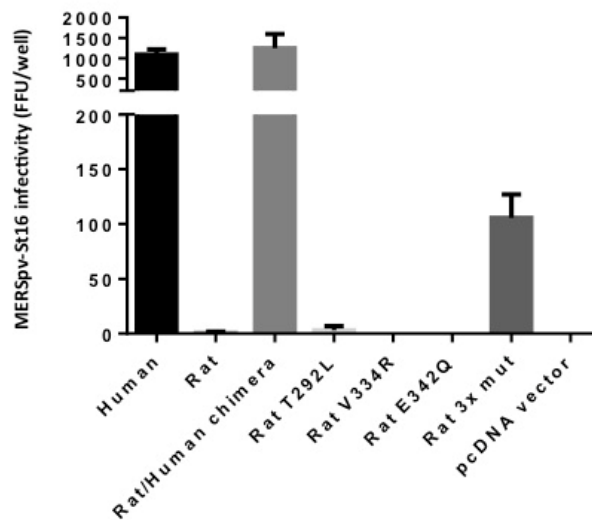
Figure 3 Specificity of MERSpv-St16 infection on Vero cells. MERSpv-St16 was pre-incubated with serially diluted rabbit anti-sera. Then the mixture was inoculated to Vero cells. The GFP-positive cells in the absence of antibodies was set as 100%. The data indicate representative of two independent experiments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

