

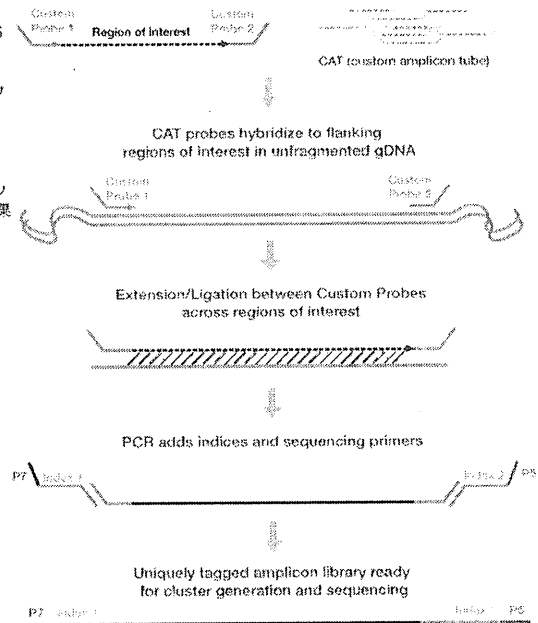
シーケンスアプリケーション：
ゲノム解析/TruSeqカスタムアンプリコンキット

TruSeq Custom Ampliconはサンプルあたり最大384箇所のゲノム領域(合計96 kb)のシーケンスを可能にし、多型・変異の検出/検証/スクリーニングのための幅広いアプリケーションを迅速かつ効率的に行えます。スタートゲノムDNA量はわずか250ngのため、希少なサンプルにもお使いいただくことができます。独自のインデックスによりMiSeqの1回のランあたり96サンプルのマルチプレックスシーケンスが可能で、研究プロジェクト遂行をサポートします。

プローブデザインは、オンラインツールであるDesignStudioによりターゲット領域に最適なデザインを簡単にデザインすることができます。IlluminaAmplicon Viewerソフトウェアを使った自動化データ解析により、MiSeqにより検出されたプロジェクト結果を視覚化することができます。

好きなターゲット領域
を増幅し、その変異バ
リエーションの存在比
を確定する。

Use DesignStudio to create custom oligo capture probes
flanking each region of interest



The TruSeq Custom Amplicon assay is a simple and streamlined method for capturing and amplifying targeted regions of interest.

図3 次世代シーケンサーによるアンプリコン・シーケンシング法の概要。

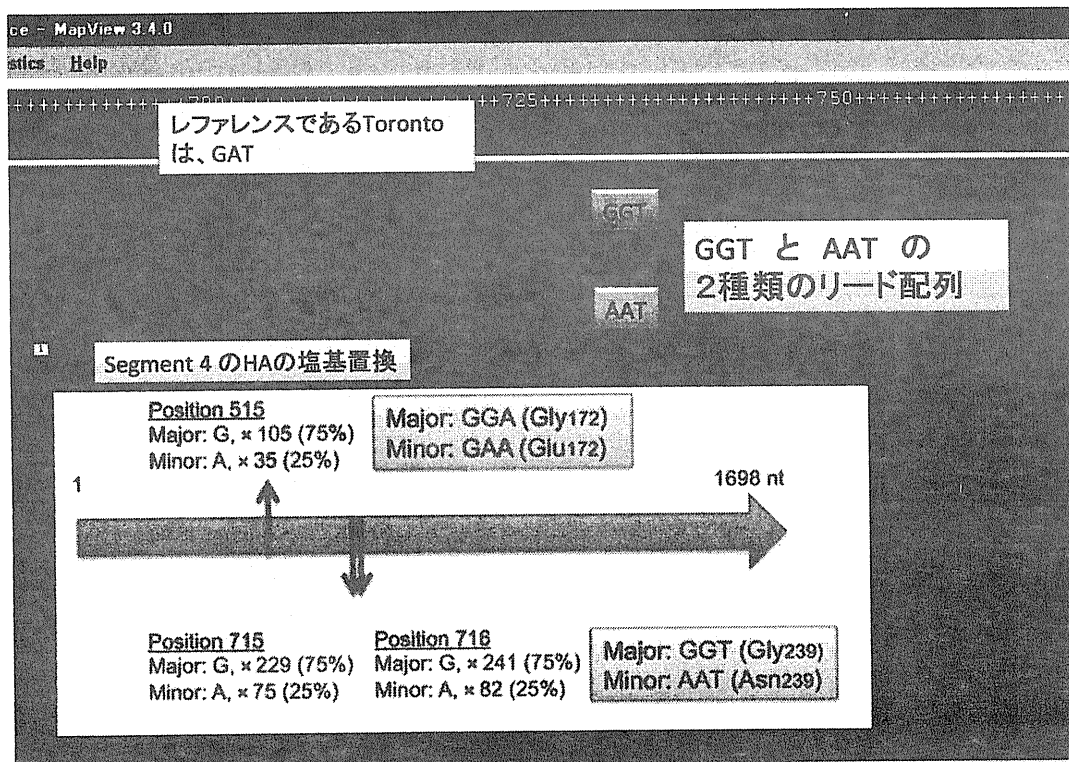


図4 A/H1N1/2009pdm 患者の左肺剖検サンプルの網羅解読により得られたHAヘマグルチニンのヘテロアレル。中和抗体の結合とヒト上皮細胞の接着に関与するantigenic site Ca2領域に、GGT(Gly239)とAAT(Asn239)のヘテロアレルが存在している。

One-step RT-PCR

2009-Flu-Nagano-HA-F668_Tn5:

5'-AGATGTGTATAAGAGACAGACAGCAAGAAGTTCAAGCCGGAAA-3'

668 – 766 (99 bp) + Tn5-seq (19 bp x2) = 137 bp

2009-Flu-Nagano-HA-R766_Tn5:
5'-AGATGTGTATAAGAGACAGAGATGTTCTACTACTAGTCTCA-3'

Bridge PCR (~13 cycle)

Primer 1:

5'-AATGATACGGCGACCACCGA-3'

Adaptor 1:

5'-AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGCTCCCTCGGCCATCAG-3'

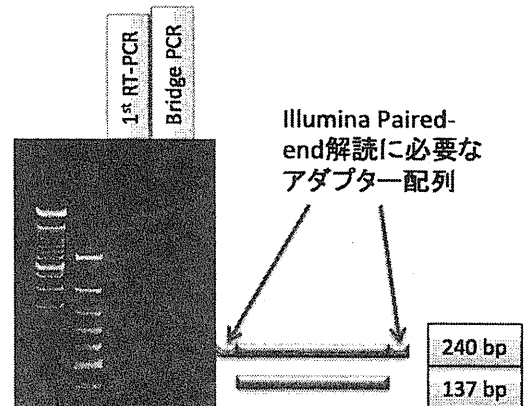
Nextera Read 1 Primer: 5'-GCCTCCCTCGGCCATCAGAGATGTGTATAAGAGACAG-3'

137 bp + 48 + 55 = 240 bp

Nextera Read 2 Primer: 5'-GCCTTGCAGCAGCCCGCTCAG-3'
5'-CAAGCAAGAAGACGGCATACGAGATCGTATCGGTCTGTGCTTGCAGCCCGCTCAG-3'
GA Adaptor 2 (IDX1):
5'-CAAGCAAGAAGACGGCATACGA-3'
Primer 2:

図5 HAヘテロアレルの存在比を確定するためのアンプリコン・ライブラリーの作成法。
HA (668 – 766 nt)のRT-PCR と、Bridge-PCRによるアダプター結合。

09-71 Nagano-swFlu/left lung (2009.8)			
RNA: 100 ng/ul			
One-step RT-PCR			
TAKARA: PrimeScript II HighFidelity one-step RT-PCR kit			
2x One step High Fidelity Buffer	25 ul		
PrimeScript RT Enzyme mix	1 ul		
PrimeSTAR GXL for 1 step RT-PCR	4 ul		
2009-Flu-Nagano-HA-F668_Tn5 (20 uM)	1 ul		
2009-Flu-Nagano-HA-R766_Tn5 (20 uM)	1 ul	139 bp	
Template RNA (09-71, 100 ng/ul)	3 ul		
DW	15 ul		
total	50 ul		
	45C 10 min		
	94C 2 min		
	98C 10 sec	x20	
	55C 15 sec	x20	
	68C 10 sec	x20	10sec/kb
2% agarose gel			
139 bp gel cut, purification			
HA-668-766_1stRT-PCR: 50 ul, 8.5 ng/ul			
Bridge PCR			
HA-668-766_1stRT-PCR (8.5 ng/ul)	5 ul		
5x Buffer	10 ul		
2.5 mM dNTPs	4 ul		
50x NEXTERA Primer cocktail (illumina)	1 ul		
50x NEXTERA Adaptor 2 (index 11)	1 ul		
2.5 uM NEXTERA Read1 and 2	1 ul	- or +	
DW	28.5 ul		
Phusion DNA polymerase	0.5 ul		
total	50 ul		
NEXTERA PCR			
72C	3 min		
95C	30 sec		
95C	10 sec	x13	
62C	30 sec	x13	
72C	3 min	x13	
2% E-gel separation			
Promega purification kit			
HA-668-766_2nd-Bridge-PCR: 50 ul, 8.9 ng/ul			



→ Illumina GAllx, MiSeq での解読

図6 図5における RT-PCR と Bridge PCR の調整方法と増幅断片の PAGE 電気泳動による確認。

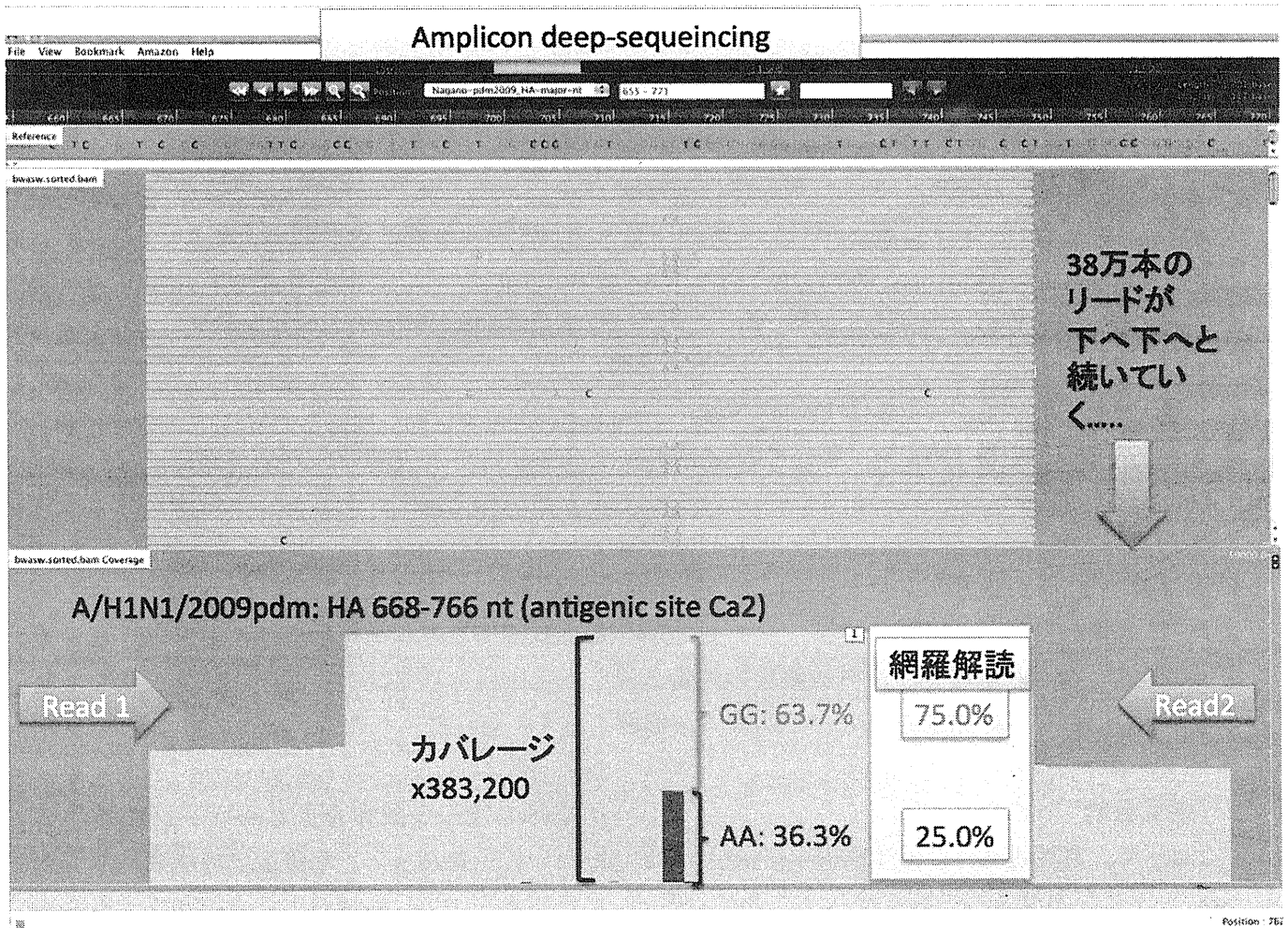


図7 図5, 6で調整したライブラリーを解読し、38万本の配列を得た。A/H1N1/2009pdm 肺剖検サンプルの網羅解読でHAの antigenic site Ca2 にGGT (Gly239)とAAT (Asn239)が75% : 25%の割合で混在していることを分かっており、今回のアンプリコン・シーケンシング (38万本) でも63.7% : 36.3%と同等の精度で存在比を確定することができた。

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）
分担研究報告書

衛生研究所における未知のウイルスの同定に関する研究

研究分担者 水谷哲也 東京農工大学 農学部附属国際家畜感染症防疫研究教育センター
疫学説明部門

研究協力者 浅野康子 鳥取県衛生環境研究所
濱田洋通 東京女子医科大学

研究要旨

RDV 法は特別な機器を必要とせず、ウイルス分離後 2 日間でウイルスを網羅的に解析できるシステムである。RDV 法はウイルス分離後の培養上清を出発材料としている。本年度は鳥取県衛生環境研究所へ RDV 法を技術移転し、不明検体を解析することを目的とした。

A. 研究目的

2003 年、重症急性呼吸器症候群（SARS）が極めて大きな問題として取り扱われて以来、日本においても新興ウイルスの検出に関する研究が発展してきた。SARS に限らず、エボラウイルス、ニパウイルスなど新興ウイルス感染症は数年おきに社会的問題となっている。また、この数年ヒトゲノムプロジェクトに伴うハイスループットシーケンサー（いわゆる次世代型シーケンサー）の技術の急速な進歩により、原因不明の疾患から新しいウイルスを発見できるようになってきた。

一方、我々は 2007 年に特別な機器を必要としないウイルスの網羅的検出法（Rapid determination system of viral DNA/RNA sequences）を開発し、昆虫からヒトに至るまで様々な検体から新規ウイルスを検出してきた（図 1）。RDV 法は各種検体からウイルス分離をおこない、その培養上清を解析する。核酸抽出から新規ウイルスの遺伝子断片の塩基配列決定まで 2 日間で終了する。本法はランダム増幅を行った後にダイレクトシーケンスを実施するので、新規ウ

イルスの遺伝子断片をクローニングする必要がない。したがって、本研究では所属機関における組換え DNA 申請および文部科学大臣の許可は必要なく、未知のウイルスを解析できる。RDV 法は感度が悪いながらも、培養上清だけではなくウイルス感染マウスの脳組織からもウイルスの遺伝子断片を検出することに成功している。しかしながら、培養細胞を用いたウイルス分離は、ウイルスを取り扱う研究者の基本であり、ウイルス分離を行わない研究においては、ウイルスの性状、病原性の解明、ワクチン開発などその後の研究を継続することが困難である。

衛生研究所では日常的にヒト検体からウイルス分離をおこない、原因ウイルスを特定している。しかしながら、培養上清を継代し細胞傷害を起こしているにもかかわらず、既知のウイルスの PCR ではウイルス種を特定できない場合がある。このような検体には、稀少ウイルスもしくは未知のウイルスが含まれている可能性がある。上述のように、RDV 法は特別に機器を必要とせず、サーマルサイクラーや小型遠心

機があればどの施設でも実施可能な方法である。そこで、本年度は RDV 法を実際に衛生研究所で実施し、不明検体をできる限り少なくすることを目的とする。

B. 研究方法

RDV 法

「検体の前処」検体 10 ul (1000 PFU 以上)に 10X DNase buffer, DNase I (Turbo DNA free) をそれぞれ 1 ul と RNase A (0.001 ug/ul)を 1 ul 加えて、37 度で 30 分間反応した。反応後、SuperaceIn 2 ul 加えた。

「RNA 抽出」Agilent Total RNA isolation mini kit のプロトコールに従い、RNA を抽出する。最大 600 ul の solution を mini prefiltration カラム（無着色）に入れ、1600g で 3 分間遠心した。カラムスルーに同量の 70%エタノールを加えて混合し、室温で 5 分間放置した。mini isolation カラムに入れ、1600g で 30 秒間遠心した。カラムスルーを捨て、カラムに wash solution 500 ul 加えて 1600g で 30 秒間遠心した。Wash をもう一度行なった後に mini isolation カラムを 1600g で 2 分間遠心し、カラムから水分を完全に除去した。Nuclease-free 水を 10 ul 加えて 1 分間放置、1600g で 1 分間遠心し、RNA を回収した。

「逆転写反応」RNA 6 ul, random primer 3 ul, 2.5 mM dNTP mix 4 ul を加えて 70 度で 5 分処理し、4 度で 2 分放置した。そこに、5x buffer 4 ul, DTT 1 ul, SuperScript III 1 ul, RNase inhibitor 1 ul を加え、50 度で 1 時間反応した。さらに RNase H 1 ul 加えて更に 50 度で 1 時間反応した。

「1次 cDNA ライブラリー」Sigma Whole genome amplification kit のプロトコールに従い、DNA の fragmentation を行なった。cDNA 5 ul, 水 5 ul, 10x fragmentation buffer 1ul を混合して 95 度で 4 分間 fragmentation した。4 度で 2 分放置後、軽く遠心して、1xLibrary prep buffer 2u l, Library stabilization buffer 1ul を加えて 95 度で 2 分間反

応した。再び 4 度で 2 分間放置して軽く遠心し、再び 4 度へ戻した。ここに Library prep enzyme 1ul を加えた後、サーマルサイクラーで、16 度 20 分、24 度 20 分、37 度 20 分、75 度 5 分の反応を行なった。この DNA 5ul, 10x Amplification mix 4ul, Amplitaq Gold LD 0.25ul, dw 30.75 ul を加えて、95 度 9 分後に、94 度 1 分、68 度 1 分、72 度 5 分、70 サイクルの条件で PCR をおこなった。

「HaeIII による切断」PCR product 10-20 ul (GL サイエンス社の MonoFas を用いて精製、以下同様), 10x M buffer 4ul, HaeIII 4 ul で最終 40 ul に調整し、37 度で 30 分間反応した。

「adaptor ligation」blunt adaptor 0.5ul, ligation mix 3ul, DNA 2.5 ul を室温で 30 分以上反応させた。

「2次 cDNA ライブラリー」DNA 0.5ul, 2x AmpliTaQ Gold mix 15 ul, 50uM primer 1ul ずつ、dw 13 ul の反応液を 95 度 12 分の後、94 度 30 秒、72 度 30 秒を 70 サイクル行なった。Primer については初出論文を参考のこと (Mizutani et al., Emerg. Infect. Dis. 13, 322-324, 2007)。

「ダイレクトシーケンス」電気泳動にてバンドの確認を行ない、ゲルから切り出し、精製後、ダイレクトシーケンスをおこなった。

C. 研究結果

1. これまでの衛生研究所における RDV 法導入の実績

当初、RDV 法は仙台市衛生研究所における不明検体を明らかにするために開発した (Mizutani et al., Emerg. Infect. Dis. 13, 322-324, 2007)。仙台衛生研究所の検体は国立感染症研究所に送付されてエンテロウイルスを検出したが、群馬県衛生環境研究所においては方法を導入し、研究所でウイルス分離から RDV 法の実施に至るまでをおこなった。その結果、カルジオウイルスが検出された (Tsukagoshi et al., Jpn. J. Infect. Dis. 63, 478-380, 2010 ; Itagaki et al.,

Scand. J. Infect. Dis. 42, 950952, 2010)。また、高知県衛生研究所においても不明検体を解明したところ、カルジオウイルスが検出されている。このように衛生研究所においてカルジオウイルスが検出され、本ウイルスについても検査に関する関心が高まってきた。さらに我々は、2007年にインドネシアを旅行した男性が帰国途中に熱と激しい咳症状を訴え入院した事例をRDV法で解析した。この患者は高病原性鳥インフルエンザの感染が疑われたが、宮崎県衛生環境研究所と国立感染症研究所において否定された。そこで、ウイルス分離後にRDV法を実施したところ、コウモリが保有していると考えられるネルソンペイレオウイルスが検出された。本ウイルスによる呼吸器症状は世界で3例目の報告であり、マウスへの感染実験もおこなった。

以上のRDV法の実施は共同研究でおこなってきたが、アドバイザーとしてRDV法を北海道衛生研究所に導入して不明検体の解明をおこなっている。糞便からノロウイルスを検出するためにRDV法を実施し、ウイルス分離の課程を経ることなく検体から直接ウイルス遺伝子の検出に成功している(Miyoshi et al., J. Virol. Methods. 179, 256-260, 2012)。我々の開発したRDV法では、培養液をヌクレアーゼ処理することにより培養細胞由来のDNAやRNAを除去しているが、北海道衛生研究所ではヌクレアーゼ処理を行わない方が感度よくノロウイルスを検出できるという結論を得ている。ヌクレアーゼ処理の効果について、我々はエンベロープを持つコロナウイルスを用いて検討したが、北海道衛生研究所ではエンベロープのないノロウイルスを用いている。詳細な検討が必要であるが、ヌクレアーゼの浸透度はエンベロープによって低くなるのかもしれない。

2. 鳥取県衛生研究所への導入

上記のように、RDV法は検出するウイルスによって方法の調整が必要であることがわかった。また、RDV法は検体の種類によっても方法を若干変える必要がある(図2)。RDV法は使いやすい反面、どのバージョンを選択するかについてはある程度の解析経験が必要である。このように、衛生研究所においてRDV法のバージョン選択に悩むことなく、できるだけ最短で不明検体を解明していただくために、衛生研究所と綿密な連絡が必要と考えられた。

鳥取県衛生環境研究所の浅野康子先生が中心となり、不明検体を解明するためにRDV法を導入するプロジェクトが立ち上がった(調査研究事業:感染症の原因となるRNAウイルス羅列的な検出方法の確立)。そこで、本年度は鳥取県衛生環境研究所にRDV法を導入することを目的として、研究所を訪れ、ミーティングとRDV法を実施した。

本研究においては、咳など呼吸器症状を示した不明検体を解析した(図3)。いずれもVero細胞において細胞傷害が観察された検体である。検体番号11304と11455は同時期にRNA/DNA抽出をおこない、同時にRDV法で解析した。これらの検体からはウイルス様の配列は得られなかったが、マイコプラズマの遺伝子配列がいくつか得られた。我々の経験からVero細胞は腎臓由来なのでMycoplasma hominisが感染していることが多いことがわかっている。本研究ではさらにマイコプラズマの種を特定しなかったが、もともとVero細胞に常在していたマイコプラズマである可能性を否定できない。

D. 考察

本研究の目的は、衛生研究所でRDV法を使用してもらい、不明検体の正体を明らかにするシステムを確立することである。RDV法はウイ

ルス分離後に核酸の抽出、アダプターライゲーション、PCR をおこない 1 次 cDNA ライブラリーを構築する。さらに制限酵素でライブラリーを消化し、別のアダプターを結合して PCR をおこない 2 次 cDNA ライブラリーを構築する。これをアガロース電気泳動して得られたバンドを切り出し、ダイレクトシーケンスをおこなう。したがって、RDV 法はサーマルサイクラーや電気泳動、シーケンサー（外注も可）など衛生研究所において普段から使用されている機器だけで解析できるのが特徴である。ウイルス分離をした培養上清を出発材料とした場合、RDV 法の検出感度は 1000 コピーである（ウイルスの種類により変動する）。これは比較的感度の良い 1st PCR に相当する。それゆえ、もしウイルス分離が成功し、明らかな細胞傷害が確認され、培養上清にウイルスが相当量放出されていると考えられるサンプルを用いて、RDV 法でウイルス様遺伝子断片が得られない検出できなかった場合、検出感度の面から培養上清にはウイルスが存在していない可能性が高い。しかしながら、ヒト白血病ウイルスやボルナウイルスなどのように極めて cell associate なウイルスでは培養上清にウイルスはほとんど放出されないため、RDV 法では解析不可能である。このような場合には、次世代型シーケンサーのようなハイスループットシーケンスをおこなうべきと考えられる。

本研究では RDV 法を鳥取県衛生環境研究所に導入できたことで、少なくとも 3 か所の衛生研究所において RDV 法が実施できる体制が整った。上述の鳥取県衛生環境研究所の調査研究事業による成果として報告しているが、浅野先生らは不明熱と嘔吐（呼吸器症状がないため本研究の対象外とした）を主徴とする検体から、RDV 法を用いてパレコウイルスに相同性のある遺伝子配列を得ている。パレコウイルスの検出に関する論文を参考に PCR をおこない、ダイ

レクトシーケンスを実施したところ、パレコウイルス 3 型であることが判明した。RDV 法は簡便であるが、PCR よりは時間を費やす。したがって、RDV 法で得られたウイルスについては、PCR で検査できシステムを確立し、今後の検査対象のウイルスとするべきである（図 4）。

最終年度はさらに 5 箇所の衛生研究所に RDV 法を導入し、不明検体の解消の一助として使用していただきたいと考えている。

E. 結論

本研究の成果として、鳥取県衛生環境研究所においても RDV 法を稼働することができ、不明検体の解明の一助となった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文作成準備中

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

謝辞（敬称略）

国立感染症研究所・黒田誠・野田雅博・木村博一

山形県衛生研究所・水田克巳

群馬県衛生研究所・塚越博之

北海道衛生研究所・三好正浩

酪農学園大学・遠藤大二

図1. RDV法の概要

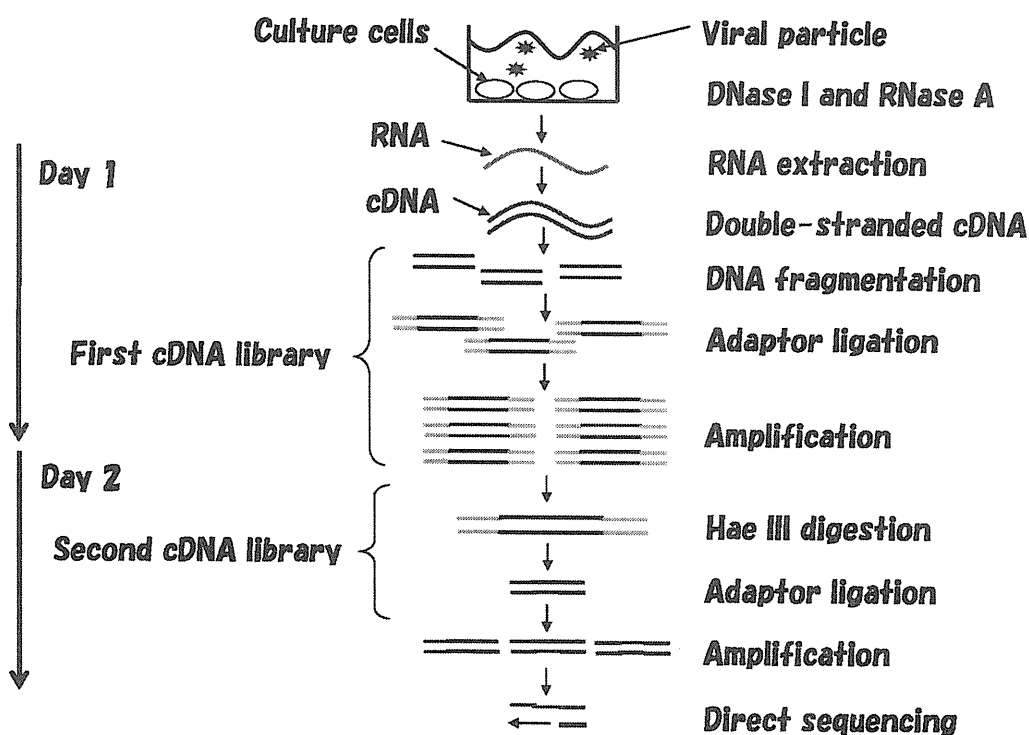


図2. RDV法 8つのバージョン

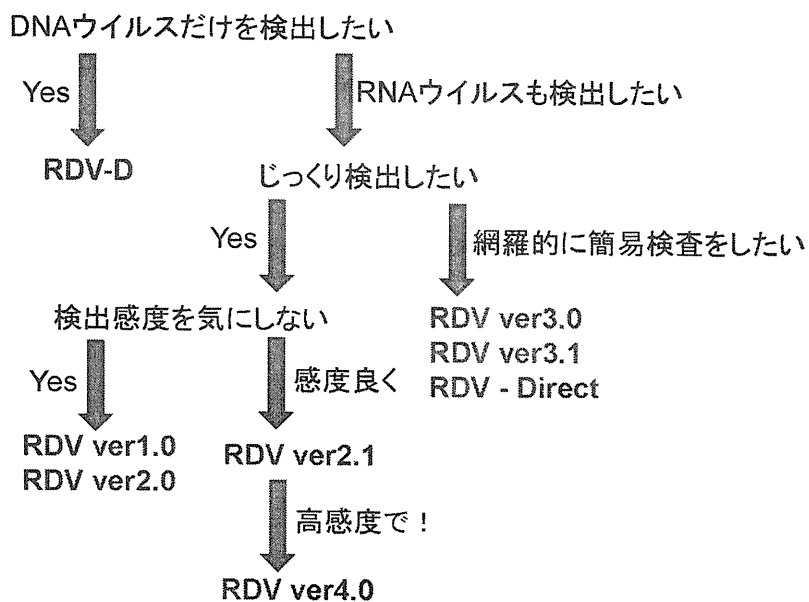


図3. 鳥取衛生研究所における呼吸器関連不明検体

番号	性別	年齢	臨床診断名	症状	CPE
11304	M	12	急性脳炎	咽赤、咳、痙攣	Vero
11455	F	1	咽頭炎	咽赤、鼻汁、咳	Vero

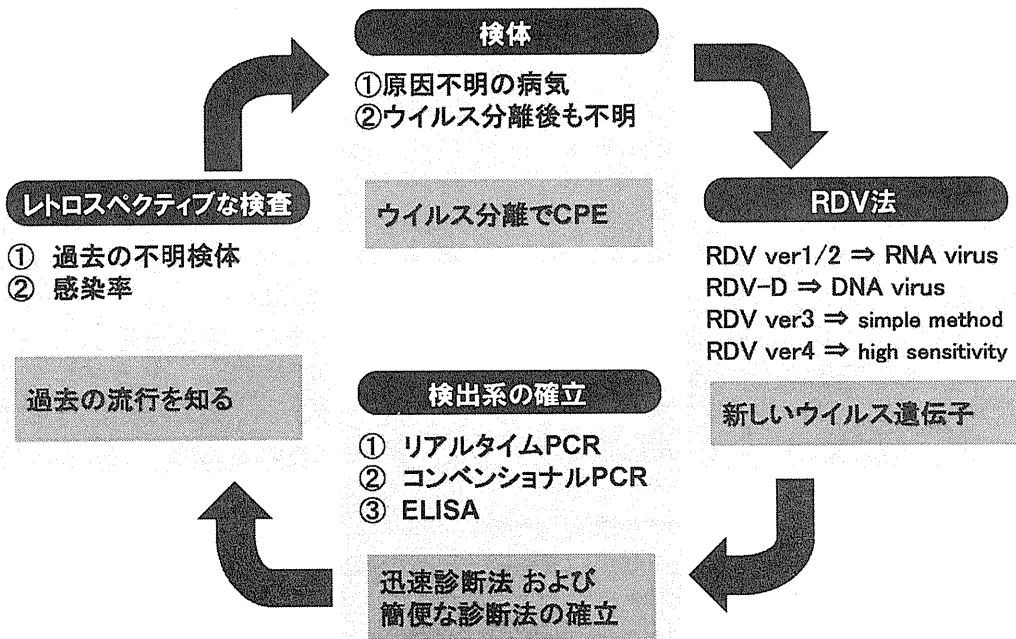
1134 急性脳炎

Mycoplasma arthritidis Identities = 80/100 (80%)
 Mycoplasma hominis Identities = 80/106 (75%)

11455 咽頭炎

Mycoplasma orale Identities = 244/255 (96%)

図4. 衛生研究所におけるRDV法の活用(提案)



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

呼吸器感染ヒトパラミクソウイルス全般の病態解明・制御に関する研究
－ F タンパク質の TMPRSS2 に対する基質特異性に関する解析 －

研究分担者	竹田 誠	国立感染症研究所ウイルス第三部
研究協力者	安部昌子	国立感染症研究所ウイルス第三部
	加藤 篤	国立感染症研究所ウイルス第三部
	酒井宏治	国立感染症研究所ウイルス第三部
	網 康至	国立感染症研究所動物管理室
	白戸憲也	国立感染症研究所ウイルス第三部
	加納和彦	国立感染症研究所感染症情報センター
	水田克巳	山形県衛生研究所
	松山州徳	国立感染症研究所ウイルス第三部

研究要旨

多くの呼吸器感染症ウイルスがその増殖のために宿主のタンパク分解酵素（プロテアーゼ）を利用している。ウイルスの膜融合タンパクが、プロテアーゼによって開裂を受けることによって、はじめて膜融合活性を発揮することができるためである。TMPRSS2 は、呼吸器上皮に発現している膜貫通型セリンプロテアーゼであるが、これまでの研究で、本酵素が、インフルエンザウイルス、ヒトパラインフルエンザウイルス、ヒトメタニューモウイルスの膜融合タンパク質を開裂し、これらのウイルスの増殖を促進することが明らかにされていた。本酵素のウイルス性肺炎発症における *in vivo* での重要性を明らかにするために、マウスパラインフルエンザウイルス 1 型（センダイウイルス）を用いて研究を開始した。センダイウイルスの膜融合タンパク質（F タンパク質）もまた、ヒトならびにマウス TMPRSS2 で開裂し、活性化することが明らかになった。F タンパク質の開裂部の P2 位、P3 位のアミノ酸に変異を導入し、TMPRSS2 による活性化の変化について解析を行った。その結果、P2 位のアミノ酸が、F タンパク質の TMPRSS2 に対する基質特異性に関与していることが示された。

A. 研究目的

肺炎などの下気道感染症を起こすウイルスは、多数知られている。代表的なものは、RS ウイルス、ヒトメタニューモウイルス、パラインフルエンザウイルス（1 型、2 型、3 型、4 型）、SARS（重症呼吸器症候群）コロナウイルス、インフルエンザウイルスなどである。多くの呼吸器感染症ウイルスにおいては、その増殖のために宿主のタンパク分解酵素（プロテアーゼ）が必要であり、そのようなプロテアーゼの発現が、気道上皮に限局していることが、それら呼吸器感染症ウイルスが肺や気道などで増殖する主な理由のひとつと考えられている。ウイルスの増殖にプロテアーゼが必要である理由は、ウイルスの膜融合タンパクが、プロテアーゼによって開裂を受けることによって、はじめて膜融合活性を発揮することができるからである。しかしながら、そのような働きを持つ宿主のプロテアーゼが、実際に何であるのかは、最

近になるまで、不明であった。2004 年に Garten らが（International Congress Series 1263:218-221）、ならびに 2006 年に Bottcher らが（J Virol 80:9896-8）、季節性インフルエンザウイルスの膜融合タンパク質（HA タンパク質）を開裂する宿主プロテアーゼが、肺に発現している膜貫通型プロテアーゼ TMPRSS2 であることを発見した。2008 年にわれわれは、ヒトメタニューモウイルスの膜融合タンパク質（F タンパク質）もまた、TMPRSS2 で活性化（開裂）されること（Shirogane et al. J Virol 82:8942-6）、さらに 2009 年に、スペイン風邪インフルエンザウイルスの HA タンパク質が、TMPRSS2 ならびに TMPRSS4 で活性化されることを明らかにした（Chaipan et al. J Virol 83:3200-11）。SARS コロナウイルスもまた、TMPRSS2 を利用して増殖することを松山らが証明している（Matsuyama et al. J Virol 2010. 84:12658-642010）。本年度は、TMPRSS2 のウイルス性肺炎発症に

における *in vivo* での重要性を明らかにすることを目的に、将来の動物実験を想定して小動物（マウス）モデルが確立しているマウスパラインフルエンザウイルス 1 型（センダイウイルス）を用いて研究を開始した。

B. 研究方法

【ウイルス株と細胞】感染を容易に検出するために緑色蛍光タンパク質（GFP）を発現する組換えセンダイウイルス（SeV-GFP）を用いた。細胞は、通常の Vero 細胞、ヒト TMPRSS2 を発現する Vero 細胞（Vero/TMPRSS2）、通常の HeLa 細胞、ならびにマウス TMPRSS2 を発現する HeLa 細胞（HeLa/mouseTMPRSS2）を利用した。

【ウイルス増殖】SeV-GFP を Vero、Vero/TMPRSS2、HeLa、HeLa/mouseTMPRSS2 細胞へ感染させて、経時的に感染の広がりを蛍光顕微鏡で観察した。

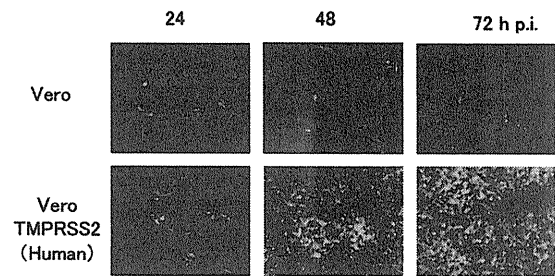
【膜融合解析】SeV の HN タンパク質、ならびに F タンパク質を発現するプラスミドを構築し、両プラスミドを赤色蛍光タンパク質（RFP）を発現するプラスミドとともに Vero 細胞に発現させ、膜融合能（細胞融合）の程度を蛍光顕微鏡下で観察した。TMPRSS2 の効果を解析するために一部の細胞には、TMPRSS2 を発現するプラスミドを同時に導入した。トリプシン添加による効果を対照として解析した。

【アミノ酸変異導入の解析】開裂部の P2 位（アミノ酸 115 番目）、P3 位（アミノ酸 114 番目）にアミノ酸変異を導入した F タンパク質を用いて上記の膜融合解析を実施した。導入した変異は、Q114A、Q114S、Q114N、Q114V、Q114I、S115R、および S115V である。

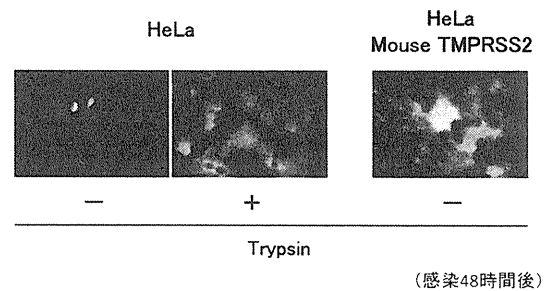
C. 研究結果

【SeV 増殖と TMPRSS2】SeV-GFP は、Vero 細胞や HeLa 細胞においては、感染はするものの、最初に感染した細胞から次の細胞へと感染が拡大することはできなかった。一方、Vero/TMPRSS2 細胞ならびに HeLa/mouseTMPRSS2 細胞では、感染が効率よく拡大し、SeV-GFP が多段階増殖することが明らかになった。

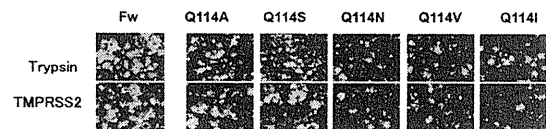
GFP発現センダイウイルスの増殖



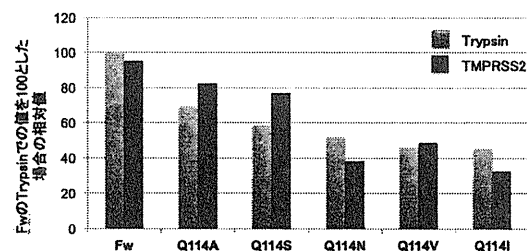
センダイウイルスはヒトTMPRSS2と同様にマウスTMPRSS2も増殖に利用できる



【アミノ酸変異導入の解析】開裂部の P3 位（アミノ酸 115 番目）の変異（Q114A、Q114S、Q114N、Q114V、Q114I）では、いずれの場合も 20~50% 程度の膜融合能の低下が起こったが、その程度は、トリプシンによって F タンパク質を活性化させた場合も、TMPRSS2 による場合も、同等であり、P3 位のアミノ酸が Q であることは、TMPRSS2 で開裂性を受けることに重要ではあるものの、TMPRSS2 特異的ではないと考えられた。

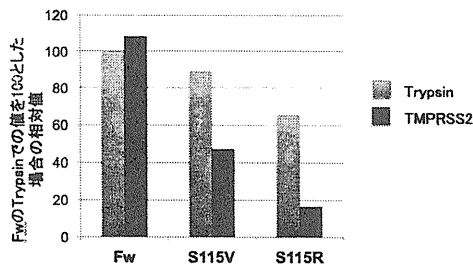


P3位のアミノ酸変異がF蛋白Fusion能に与える影響



一方、開裂部の P2 位 (アミノ酸 115 番目) の変異 (S115R、S115V) では、TMPRSS2 に依存した膜融合の方が、トリプシンに依存した膜融合に比較して、強く低下することが明らかになった。

P2位のアミノ酸変異がF蛋白Fusion能に与える影響



D. 考察

TMPRSS2 は、自身の活性化のために自己開裂する酵素である。自身の開裂部位の P1-P2-P3 位のアミノ酸はそれぞれ R-S-Q であり、センダイウイルスや、ヒトメタニューモウイルス、インフルエンザウイルス H1 亜型の膜融合タンパク質のそれらと同一である。また、インフルエンザウイルス H2 亜型、H3 亜型、ヒトパラインフルエンザ 1 型のそれらも、アミノ酸の性質や構造上、R-S-Q と非常に似通ったもの (R-S-E または R-T-Q) で構成されている。一方、ヒトへの感染性を持たないウイルスでは、それらのアミノ酸は、TMPRSS2 のものと類似性をあまり有していない。また、TMPRSS2 以外の膜貫通型セリンプロテアーゼの P1-P2-P3 位のアミノ酸は、R-S-Q とは、性質の異なるアミノ酸で構成されている。すなわち、P1-P2-P3 位のアミノ酸に R-S-Q あるいは、それらと類似性をもつアミノ酸を有することが、TMPRSS2 による開裂ならびにヒトの呼吸器での増殖に重要であると推測した。

今回の解析からは、P3 位のアミノ酸が Q であることは、TMPRSS2 で開裂性を受けることに重要ではあるものの、TMPRSS2 特異的ではないと考えられた。一方、P2 位のアミノ酸を S から V、あるいは、S から R に変異させることにより、トリプシンでの開裂に比して、TMPRSS2 による開裂が大幅に低下したと考えられ、ヒトの呼吸器ウイルスの膜融合タンパク質が、P1-P2-P3 位に R-S-Q 配列を持つ意義、あるいは、TMPRSS2 のウイルス性肺炎発症に重要であることの可能性を強く示唆する結果が示された。

E. 結論

基質タンパク質の開裂部の P3 位のアミノ酸が Q であることは、TMPRSS2 で開裂性を受けることに重要ではあるものの、TMPRSS2 特異的ではないと考えられた。一方、P2 位のアミノ酸が S であることは、一般的にセリンプロテアーゼによる開裂に重要ではないと考えられるものの、TMPRSS2 で開裂性を受けることには、非常に重要でと考えられた。これらの結果は、ヒトの呼吸器ウイルスの膜融合タンパク質が、P1-P2-P3 位に R-S-Q 配列を持つ意義、あるいは、TMPRSS2 のウイルス性肺炎発症に重要であることの可能性を強く示唆する結果と考えられる。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

なし

呼吸器感染ヒトコロナウイルス全般の感染機序解明、分離技術の向上・制御に関する研究

研究分担者 松山州徳 ウイルス第三部四室 室長

研究要旨

急性呼吸器感染症 (ARI) 関連ウイルスの中で、インフルエンザウイルスについては非常によく研究され、抗ウイルス薬とワクチンが開発されているが、他のウイルスに関しては、その罹患率や危険性と比較して、よく研究されているとは言い難い。ARI ウイルスの研究を難しくしている原因は様々にあるが、その一つは、肺胞の性質を維持している良い培養細胞株が無いことにある。ヒト肺胞上皮細胞の初代培養は難しく、数代の継代で肺胞の性質が無くなってしまふことが知られており、簡単に扱えるものではない。また、よく研究に利用されている肺胞由来の細胞株は、肺胞の性質をある程度維持しており、低いながら様々な ARI ウイルスに感受性があるが、細胞増殖が遅く性状が不安定であり、培養も難しい。今回我々はヒトコロナウイルス (SARS、NL63) の感染を指標として、これらが良く感染する細胞を開発すると共に、ヒト肺胞上皮由来 Calu-3 細胞と比較し、コロナウイルスの感受性とその感染メカニズムを解析したので報告する。

A. 研究目的

数種の ARI ウイルス (インフルエンザ、メタニューモ、コロナ) は肺に特異的に存在する膜貫通型セリンプロテアーゼ (TMPRSS2) を利用して細胞に感染することが報告されている。TMPRSS2 が発現した細胞はウイルスの分離技術向上に寄与できるとともに、感染機序の解明及びウイルス細胞侵入阻害薬のスクリーニングにも利用できる可能性がある。我々は TMPRSS2 を安定的に発現し、ウイルス感受性の高い細胞の開発を目指す。また、肺胞由来の細胞からコロナウイルスに感受性の高いものを選び出し、TMPRSS2 とレセプターの発現量を調べ、コロナウイルス感染価との関係を調べることにより、ウイルスの肺でのプロテアーゼ依存性を考察する。

B. 研究方法

VSV シュードタイプウイルスの表面に、それぞれのコロナウイルス (SARS、NL63) の S 蛋白をもたせたものを作成し、細胞侵入実験に用いた。これらのシュードタイプウイルスは感染細胞で GFP を発現するので、容易に感染価を調べることができる。また、本物の SARS-CoV を用いて細胞に感染させ、侵入したウイルスを Real-time PCR で検出することにより、感染価を定量した。

今回は HeLa 細胞に TMPRSS2 とコロナウイルスのレセプター (ACE2) を発現させた細胞 (HeLa-ACE2-TMPRSS2) と、TMPRSS2 非発現細胞 (HeLa-ACE2) を共にウイルスに感染させ感染価を比較した。また、肺由来の細胞株 (Calu-3、BEAS2B、MRC-5、A549、HPAEpiC) に SARS コロナウイルスを感染させ、感受性を

比較した。さらに siRNA を用いて Calu-3 細胞の TMPRSS2 をノックダウンし、SARS コロナウイルスの感受性を調べ、肺胞由来細胞でのプロテアーゼ依存性を調べた。

C. 研究結果

SARS と NL63 のシュードタイプウイルスの HeLa-ACE2-TMPRSS2 への感染価は HeLa-ACE2 と比較して、3 倍から 5 倍高くなった。しかし Calu-3 細胞への感染を、これらシュードタイプウイルスでは全く確認することができなかった。一方、本物の SARS、NL63 は HeLa 細胞に良く感染できたが、Calu-3 細胞へは SARS のみが感染することができた (Hela 細胞の 1/1000 程度の効率で)。

SARS は Calu-3 細胞に感染できることがわかったので、この細胞が TMPRSS2 を利用して細胞侵入していることを調べるために、siRNA を用いて TMPRSS2 をノックダウンし (FIG1)、SARS を感染させ、Real-Time PCR で感染価を測定した。結果、TMPRSS2 を抑えることにより、ウイルスの感染も 1/6 に抑えられることがわかった (FIG2)。また、前回の報告で、セリンプロテアーゼ阻害剤 (Camostat) が TMPRSS2 を特異的に抑えることを示したが、今回は Calu-3 細胞での SARS 感染阻止効果を調べた。その結果、Calu-3 への SARS の感染は Camostat により 1/10 程度に抑えられることがわかった (FIG3)。

D. 考察

ヒト肺胞上皮由来の培養細胞株は、Calu-3 の除いて SARS-CoV に感受性を示さなかった。これは、細胞の様々な抗ウイルス効果が働いたためと考えられ、SARS はこれを回避する機構を備えていることが報告されている。今後、細胞のインターフェロン応答等をノックダウンして、Calu-3 のウイルス感受性を高める試みを行う。

E. 結論

Hela-ACE2 は 2 種のコロナウイルスにとって、良い感受性細胞であるといえる。一方、肺胞上皮由来の Calu-3 細胞に感染する時、SARS コロナウイルスは、もっぱら TMPRSS2 を利用して侵入することと、セリンプロテアーゼインヒビターである Camostat により感染を阻止できることが解った。この結果は肺においても Camostat がウイルス感染を阻止する抗ウイルス薬となる可能性を示唆している。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ujike M, Huang C, Shirato K, Matsuyama S, Makino S, Taguchi F. Two palmitylated cysteine residues of the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein are critical for S-incorporation into virus-like particles, but not for M-S co-localization. *Journal of General Virology*. 2012 Jan 11 in press
- 2) Shirato K, Ujike M, Kawase M, Matsuyama S. Increased replication of respiratory syncytial virus in the presence of cytokeratin 8 and 18. *Journal of Medical Virology*. 2012 Feb;84(2):365-70
- 3) Nomura R, Kashiwazaki H, Kakizaki M, Matsuyama S, Taguchi F, Watanabe R. Receptor-independent infection by mutant viruses newly isolated from the neuropathogenic mouse hepatitis virus srr7 detected through a combination of spinoculation and ultraviolet radiation. *Japanese Journal of Infectious Diseases*. 2011;64(6):499-505.
- 4) Shirato K, Maeda K, Tsuda S, Suzuki K, Watanabe S, Shimoda H, Ueda N, Iha K, Taniguchi S, Kyuwa S, Endoh D, Matsuyama S, Kurane I, Saijo M, Morikawa S, Yoshikawa Y, Akashi H, Mizutani T. Detection of bat coronaviruses from *Miniopterus fuliginosus* in Japan. *Virus Genes*. 2011 Aug 30
- 5) Shirato K, Maejima M, Matsuyama S, Ujike M, Miyazaki A, Takeyama N, Ikeda H, Taguchi F.

Mutation in the cytoplasmic retrieval signal of porcine epidemic diarrhea virus spike (S) protein is responsible for enhanced fusion activity. *Virus Research*. 2011 Nov;161(2): 188-93.

6) Shirato K, Matsuyama S, Ujike M, Taguchi F. Role of proteases in the release of porcine epidemic diarrhea virus from infected cells. *Journal of Virology*. 2011 May 25. 85(15):7872-80

7) Kashiwazaki H, Nomura R, Matsuyama S, Taguchi F, Watanabe R. Spongiform degeneration induced by neuropathogenic murine coronavirus infection. *Pathology International*. 2011 Apr;61(4):184-91.

2. 学会発表

なし

G. 知的所有権の取得状況

なし

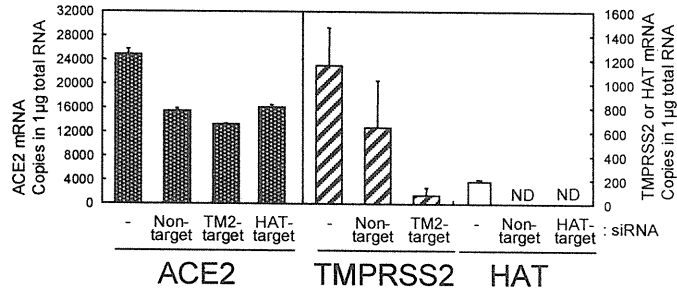


FIG1. siRNAによる、Calu-3細胞でのTMPRSS2とHATのノックダウン

Virus entry

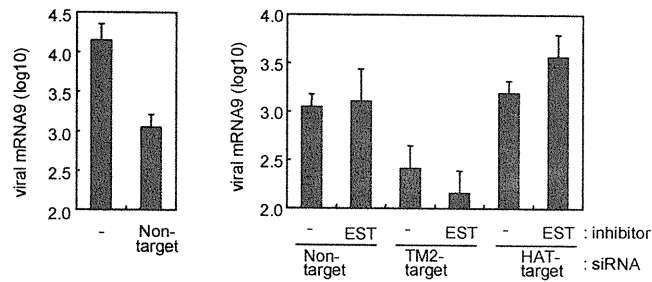


FIG2. siRNAによるSARS-CoVのCalu-3細胞への侵入阻止

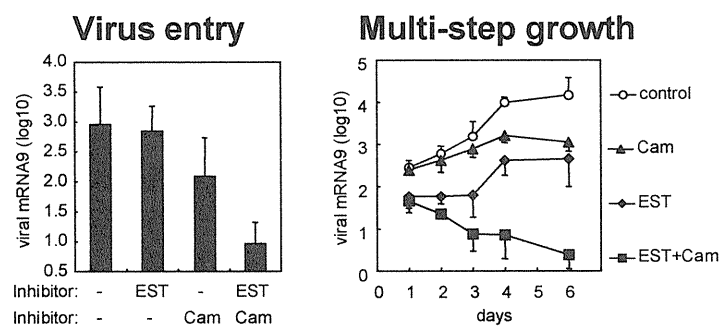


FIG3. Camostat と ESTによる SARS-CoVの Calu-3細胞への感染阻止

重症呼吸器ウイルス感染症のサーベイランス・病態解明及び制御に関する研究

～新規ワクチン開発と感染細胞モデル系の構築

研究分担者 梁 明秀 横浜市立大学医学部微生物学

研究協力者 岩崎優紀 横浜市立大学医学部微生物学

研究要旨

ヒトパラインフルエンザウイルス(parainfluenza virus,PIV)などによる呼吸器ウイルス感染は小児や老人における下気道炎の原因となるばかりではなく、感染喘息の引き金や増悪因子となることが知られている。しかしながら、これらのウイルスの感染症に対する有効な治療薬やワクチンは開発されていない。また、病原体分離や阻害剤スクリーニングのための優れた培養細胞モデル系は構築されていない。そこで、我々は、コムギ無細胞系を用いたパラインフルエンザウイルス3型外被タンパク質(PIV3-HN)とマンノース被覆リポソームを組み合わせた新しいワクチンの開発を行った。また、広いウイルス感染トポロジーを有するヒト不死化培養細胞の樹立し、これらにレポーター遺伝子を組み込むことで、簡易にウイルス感染をモニタリングかつ定量できる細胞の構築に成功した。さらに、外被タンパク質に対するモノクローナル抗体を作製し、ウイルス感染を阻止できる中和抗体の開発を行った。

A. 研究目的

インフルエンザウイルスを除くヒト呼吸器ウイルス感染症に対する有効な治療薬やワクチンは開発されていない。特に乳幼児や老人に対して時々重篤な下気道感染を引き起こすRSVやPIV-3型に対するワクチン開発に向けた基礎研究を進めることは重要である。今回、我々は、昨年度に引き続きPIV-3ワクチン開発に向け、コムギ無細胞系を用いたリコンビナントウイルス外被タンパク質(PIV-3-HN)の大量精製を行い、それをマンノース被覆リポソームに封入することで、新規ワクチン抗原・アジュバント複合体ワクチン開発を行う。また、DNAワクチンを開発する目的で、哺乳動物コドン最適化PIV-3-HN発現ベクターの構築を行う。

一方、呼吸器ウイルス感染症サーベイランスにおいて約2/3がその原因ウイルスの分離に至っておらず、広い感染トポロジーを有する

培養細胞の樹立が必須である。今回、既存の呼吸器ウイルス感染感受性正常細胞(MRC-5)の不死化を試行すると同時に、細胞初期化技術による新規呼吸器ウイルスに感受性を有する培養細胞モデル系を確立する。また、ウイルス感染に感受性を有する不死化ヒト細胞にレポーター遺伝子を導入することで簡易にウイルス感染を定量・モニタリングできる細胞系を構築する。

B. 研究方法

1. コムギ無細胞系を用いたPIV-3-HN合成

コムギ無細胞系発現ベクターpEU-E01-GST-PIV3HNおよびpEU-E01-His-PIV3HNを構築し、コムギ無細胞タンパク質合成系を用い、PIV-3-HNタンパク質全長タンパク質の合成を行った。精製はグルタチオンセファロースビーズまたはニッケルアガロースビーズによるカ

ラム法を用いた。GST-PIV3HN 間の切断は TEV プロテアーゼを用いて行った。

2. ヒト胎児肺線維芽細胞 MRC-5 細胞不死化およびレポーター細胞の構築

正常細胞の不死化を誘導するレンチウイルスベクターとして pLenti6_TERT, pLenti6_HPVI6-E7, pLenti6_sh-p16_TetOff_FRT-GFP-BSD を作製した。作製したベクターを用い、MRC-5/TERT 細胞に不死化誘導因子を導入した。次にこれらの細胞株に pNifty-ISREx5-AP-1x5-NF-kBx5-SEAP 遺伝子または pIRES-ISREx5-AP-1x5-NF-kBx5-GFP 遺伝子を導入し、抗生物質である Zeocin または Puromycin を用いて安定発現系細胞株を樹立した。

3. リポソーム封入タンパク質の定量

マンノース被覆 リポソームを PBS で希釈後、SDS で脂質膜破壊サンプルバッファーと混合し、100°C で加熱処理した。リポソームのコレステロール量が 5 もしくは 10 μg になるように、ゲルにアプライし、電気泳動後、ゲルを固定化し、Quick-CBB PLUS (Wako, 178-00551) で染色し、ルミノ・イメージ・アナライザー LAS-3000 (FULIFILM) にとりこみ、汎用解析ソフト Multi Gauge (FUJIFILM) にて定量した。

C. 研究結果

1. PIV-3-HN 全長タンパク質の作製

真核生物型無細胞タンパク質合成技術であるコムギ胚芽タンパク質合成システムを用いて、リコンビナント PIV3-HN 全長タンパク質の作製を試みた。無細胞合成用の pEU-E01-GST ベクターに PIV3-HN 全長 cDNA をサブクローニングした。次に全自動コムギ無細胞系タンパク質合成装置 PROTEMIST-DT-II を用いて GST 融合 PIV3-HN タンパク質の大量合成を行った。合成した GST 融合 PIV3-HN タンパク質を、グルタチオンセファロースビーズによるカラム法を用いて精製し、TEV プロテアーゼを用いて GST タグを切断した。その結果、PIV3-HN タン

パク質の可溶性が顕著に低下した。そこで、再度 His タグを付加した PIV3-HN を、コムギ無細胞系を用いて合成し、ニッケルアガロースビーズを用いて精製した。本法により一度の合成で約 1 mg の精製タンパク質が作製できた。そして、これらのタンパク質をマンノース被覆リポソームに封入した。

今後は、本標品を BALB/c マウスに投与し、ワクチン抗原としての有効性を検討する予定である。

2. 新規呼吸器ウイルスワクチンの開発～マンノース被覆リポソームを用いたワクチンの製造

従来の方法では、抗原タンパク質が拡散してしまうため、樹上細胞やマクロファージなどの抗原提示細胞に直接的に抗原を運ぶことが困難であった。しかし、マンノース被覆リポソーム内に抗原を封入することで、マンノースレセプターを有する抗原提示細胞に、効率的に抗原を取り込ませることが可能となる。そこで我々はマンノース被覆リポソーム (Mannose coated liposome: MCL) を用いたワクチンデバイスを開発するため、コムギ無細胞系を用いて作製した高濃度 HN タンパク溶液 (565 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を用いたりポソームの製造を試みた。タンパク質封入後の PIV3-MCL を 1 μm フィルターに通過させ、タンパク凝集物を除去した。次に確認のために SDS でリポソーム脂質膜を破壊後、コレステロール量を測定し、4 mg chol./ mL に調製した。抗原封入リポソームを 4 μg chol./ mL に調製し、動的光散乱式粒径分布測定装置 LB-500 (HORIBA) にて粒度分布測定した。Empty-MCL の平均粒径は 519 nm、HN-MCL は 882 nm となった。HN-MCL は Empty-MCL に比べ凝集傾向が強く、二次粒子が生成し、このような数値が測定されたと考えられたが、抗原としての機能は保持されていると考えられる。

続いて、リポソーム内に封入されているタンパク質の定量を行ったところ、1 mg chol.あたりのHNタンパク封入量が32 μg にまで増加した。また、これは予備実験として低濃度HNタンパク溶液16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を用いて製造した際に1 μg HN/ mg chol.であった場合と比較して、32倍にまで封入量が増加した。HNタンパク封入（包埋率）についても、両濃度のHNタンパク溶液を用いた場合、ともに70%程度になった。これらのHN-MCLを5 μg タンパク/15 μL （マウス1匹分）になるよう調製した。今後はOVA封入リポソームをコントロールとして、マウスに免疫する予定である。

3. PIV3感染を阻止する中和抗体の開発

PIV3感染症を阻止できるモノクローナル抗体を作製するため、コムギ無細胞系を用いて作製したPIV3-HN全長タンパク質をBALB/cマウスにアジュバントとともに足底に免疫し、4週間後に脾細胞を分離し、マウスミエローマ細胞を用いたハイブリドーマを作製した。これらのうち、HNに特異的なクローンが、48種類樹立出来た。今後、これらの細胞上清を用いて中和活性の検定を行う予定である。

4. 呼吸器ウイルス感染感受感受性レポーター細胞の構築

正常細胞の不死化を誘導するレンチウイルスベクター、pLenti6_TERT, pLenti6_HP16-E7, pLenti6_sh-p16_TetOff_FRT-GFP-BSD を作製した。作製したウイルスベクターをMRC-5/TERT細胞に感染させ、通常培養法にて長期培養を行った。現段階で少なくとも100回以上の分裂が可能なMRC-5/TERT, MRC-5/TERT_sh-p16, MRC-5/TERT_HP16-E7の3つの不死化MRC-5細胞の誘導に成功した。また、これらの細胞株にpNifty-ISREx5-AP-1x5-NF-kBx5-SEAP遺伝子またはpIRES-ISREx5-AP-1x5-NF-kBx5-GFP遺伝子を導入し、ウイルス感染を定量的または視覚

的に検出できる細胞系を構築した。今後は本細胞群を用いて広範囲な呼吸器ウイルスの感染感受性や細胞障害性について考察するとともに未知の病原性ヒト呼吸器ウイルスの検出を試みる予定である。

F. 知的所有権の取得状況

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) 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, and Kimura H.: Molecular epidemiological study of human rhinovirus species ABCs from patients with acute respiratory illnesses in Japan, *J Med Microbiol*, 2011
- (2) Fujitsuka A, Tsukagoshi H, Arakawa M, Goto-Sugai K, Ryo A, Okayama Y, Mizuta K, Nishina A, Yoshizumi M, Kaburagi Y, Noda M, Tashiro M, Okabe N, Mori M, Yokota S, and Kimura H.: A molecular epidemiological study of respiratory viruses detected in Japanese children with acute wheezing illness, *BMC Infect Dis*, 11: 168 2011
- (3) Tsukagoshi H, Mizuta K, Abiko C, Itagaki T, Yoshizumi M, Kobayashi M, Kuroda M, Kozawa K, Noda M, Ryo A, and Kimura H.: The impact of Saffold cardiovirus in patients with acute respiratory infections in Yamagata Japan, *Scand J Infect Dis*, 43: 669-671 2011
- (4) Nishi M, Akutsu H, Masui S, Kondo A, Nagashima Y, Kimura H, Perrem K, Shigeri Y, Toyoda M, Okayama A, Hirano H, Umezawa A, Yamamoto N, Lee S, W, and Ryo A.: A distinct role for Pin1 in the induction and maintenance of