

学位論文内容の要旨

病原微生物学分野 博士(医学) 氏名 西尾 佐奈恵

学位論文題名

低 pH 依存性細胞融合能を指標とした SFTSV YG1 株のサブストレインの確立と応用

(Establishment of substrains from SFTSV YG1 strain selected by the degree of low pH dependent cell fusion activity and its application for serological diagnosis)

【背景】 重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) は 2009 年に中国で初めて報告された発熱、血小板減少、白血球減少などを主とする致死性疾患である。ブニヤウイルス科フレボウイルス属に属する SFTS ウイルス (SFTSV) を原因とする。マダニがベクターとなり、家畜や哺乳類を自然宿主として生活環を形成する人獣共通感染症である。SFTSV と近縁なウイルスで、ダニをベクターとするウイルスが世界各地で発見されており、ダニ媒介フレボウイルスは世界中に分布していると考えられ、今後新興感染症の原因となる可能性が示唆されている。

ブニヤウイルス科のウイルスは 3 分節のマイナス鎖 RNA をもち、それぞれ L 分節 (RNA 依存性 RNA ポリメラーゼをコード)、M 分節 (エンベロープ糖蛋白をコード)、S 分節 (核蛋白をコード) と呼ばれる。エンベロープ糖蛋白 (GP) は、ウイルスと細胞の吸着および感染細胞の低 pH 依存性細胞膜融合に関与し、ウイルスが感染する際に重要な役割を担っている。本研究では、2012 年に日本での第 1 例目の症例から分離された SFTSV YG1 株を用いた。YG1 株感染細胞の低 pH 依存性細胞融合活性について解析したところ、感染細胞の中でも様々なレベルの細胞融合活性が認められた。このため、YG1 株には細胞融合活性の強さが異なるウイルスが混在し、“Quasispecies”状態であると考えられた。本研究では、細胞融合能を指標とし、YG1 株から限界希釈法によりサブストレインを樹立することができた。また、得られたサブストレインの遺伝子的、ウイルス学的な特徴を比較することにより、細胞融合活性とウイルス構造の関連性を明らかにすることを試みた。さらに、得られたウイルスを用いたより簡便な中和試験の確立を試みた。

【材料と方法】 本研究では、Vero E6 細胞を用いて 3 代継代したウイルスを YG1 株 (親株) として用いた。96 well マイクロプレート上の Vero E6 細胞に、YG1 株を 10 倍階段希釈して接種した。1 週間培養した後ウイルス上清を回収し、pH 5.6 の酢酸緩衝液で細胞を低 pH 処理した。1 日後にホルマリン固定・ギムザ染色を行い、細胞融合の状態を顕微鏡下で観察・判定した。細胞融合の強い 2 well、弱い 1 well の培養上清をさらに限界希釈感染を行うことによりクローン化し、サブストレインを樹立した。次に得られたサブストレインを用いて、細胞融合活性、細胞障害効果 (CPE)、プラーク形成能、増殖速度を解析し、それらの性質を比較した。また、それぞれのサブストレインの遺伝子配列を明らかにし、性質の差異の原因となっている変異を特定することを試みた。さらにこの変異を持つ GP を組換え蛋白として発現させ、低 pH 依存性細胞融合活性を解析することにより細胞融合に関与する変異を特定することを試みた。また、CPE の強いサブストレインを樹立し、中和試験への有用性を検討した。

【結果】 低 pH 依存性細胞融合能を指標とした 2~3 回の限界希釈感染により、細胞融合能の

強い B7 株および A4 株、弱い E3 株という 3 種のサブストレインを樹立した。B7 株は細胞融合能が強く、CPE が強く、早期に大型のプラークを形成し、増殖速度はやや速かった。A4 株は細胞融合能が強く、CPE が弱く、後期に大型のプラークを形成し、増殖速度は遅かった。E3 株は細胞融合能が弱く、CPE が弱く、プラークの形成は極めて遅く、増殖速度は速かった。YG1 親株では、3 つのサブストレインでみられたプラーク全てが混在し、増殖速度は最も速かった。

遺伝子解析の結果、B7 株と A4 株に共通して M 分節の 1,000 番および 1,888 番の塩基に YG1 株と比較して変異が認められ、それにより 328 番のアミノ酸が Y から H に、624 番のアミノ酸が R から W に変異していた。また、B7 株において L 分節の 5,689 番の塩基に変異が認められ、これにより 1,891 番のアミノ酸が N から K に変異した。M 分節において認められた変異を組み込んだプラスミドを用いて Vero E6 細胞上に組み換え GP を発現させ低 pH 依存性細胞融合能を確認したところ、1,888 番の変異を組み込んだ組み換え GP が、強い細胞融合活性を誘導した。また、B7 株は、最も強い CPE 活性を示し、CPE の有無を指標とした中和試験を肉眼的に容易に行うことができた。

【考察】 本研究によって、YG1 親株から細胞融合の強弱を指標として、3 株のサブストレインを確立することに成功し、Quasispecies を構成していることを明らかにした。一般に、RNA ウイルスでは増殖・複製する際の突然変異率が高く、その結果、強毒性ウイルスや薬剤耐性ウイルスの出現につながる。そのため、ウイルス疾患の治療にあたっては、抗ウイルス剤の 2 剤同時投与を行うなど、Quasispecies 現象を前提とした治療が望まれる。本研究で用いた YG1 株は、組織培養細胞で三代継代された、継代歴の極めて少ない培養上清中のウイルスであることから、この Quasispecies は患者内で既に構成されていた可能性が示唆された。すなわち、SFTS においても Quasispecies 現象への注意が必要であると考えられる。

組換え GP を用いた解析から、GP 上の変異 R624W が細胞融合活性を上昇させることが確認された。SFTSV と同じフレボウイルス属に分類される、Rift Valley Fever Virus (RVFV) では、その GP 上に、細胞融合活性を担うと考えられている fusion loop がある。今回、SFTSV で認められた R624W の変異は、fusion loop 様の部位の近傍上流にある。このため、大型で疎水性の側鎖を持つ W への変異が、GP の立体構造的に影響を与えることにより、細胞融合が効率的に起こるようになった可能性が考えられる。一方、GP 上のもう一つの変異、Y328H は細胞融合活性への関与は示さなかった。しかしながら H はその特性として、低 pH 刺激により容易にプロトン化して陽電荷を持ち、いわゆる pH センサーとして機能することが知られている。従って Y328H の変異は、低 pH に曝されることを引き金とする、GP の構造変化を促進している可能性があると考えられる。また、L 分節にコードされる RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ上の変異 N1891K が認められた B7 株は、A4 株に比較して強い CPE と高い培養細胞での増殖性を示す。A4 株と B7 株の差異は N1891K のみであることから、この変異は高いウイルスの増殖性と関連すると考えられるが、そのメカニズムについては不明である。

B7 株は強い CPE を示すことから、感染・増殖の抑制の程度を簡便に測定することができ、プラーク中和法や ID50 法による診断法への応用や薬剤スクリーニングへの応用も可能であると考えられ、今後の応用が期待される。

本研究を通じて SFTSV の構造・機能相関について新しい知見を加えることができた。このような蓄積から SFTS とその病原体の制御につながる、診断・予防・治療へと研究が発展してゆくことが期待される。