HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	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［全文の要約］
Author(s)	西尾, 佐奈恵
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 配架番号：2253 他
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12355号
Issue Date	2016-06-30
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/62568
Type	doctoral thesis
File Information	Sanae_Nishio_summary.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文（要約）

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)

2016 年 6 月
北海道大学
西尾佐奈恵

学位論文（要約）

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)

2016 年 6 月
北海道大学
西尾佐奈恵

目次

発表論文目録および学会発表目録・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・1 頁
緒言・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・3 頁
略語表・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・7 頁
材料と方法
1. 細胞と培養液・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・8 頁
2. ウイルスとウイルスの培養液・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・8 頁
3. マウス抗血清の作製・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・8 頁
4. 間接蛍光抗体法（IFA 法）・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・8 頁
5. ウイルス感染価の測定
1）プラークアッセイ法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・9 頁
2）フォーカスアッセイの術式・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・9 頁
6. 中和試験の術式・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・9 頁
7. ウイルス増殖曲線・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・11 頁
8. ウイルス RNA の遺伝子配列の解析・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・11 頁
9. RT-PCR・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・11 頁
10. ダイレクトシークエンシング・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・11 頁
11. 低 pH 依存性細胞融合反応・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・12 頁
12. 限界希釈法によるウイルスサブストレインの単離・・・・・・・・・・・・・12 頁
13. YG1 親株およびサブストレインの GP の発現と細胞融合活性の検出・・・・・14 頁
14. アミノ酸配列の解析・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・14 頁
結果
1. ウイルスサブストレインの樹立・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・15 頁
2. B7、A4、E3 株の細胞傷害活性（CPE）と低 pH 依存性膜融合活性・・・・・・15 頁
3. B7、A4、E3 株のプラーク形成能の比較・・・・・・・・・・・・・・・・・・17 頁
4. B7、A4、E3 株の増殖曲線の比較・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・17 頁
5. B7、A4、E3 株の遺伝子変異部位・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・17 頁
6. 組み換え GP を発現させた Vero E6 細胞の低 pH 依存性細胞融合活性・・・・・21 頁
7. B7、A4 株を用いた中和試験・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・21 頁
考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・28 頁
総括および結論・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・37 頁
謝辞・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・38 頁
引用文献・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・39 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

1. Sanae Nishio, Yoshimi Tsuda, Ryo Ito, Kenta Shimizu, Kumiko Yoshimatsu, and Jiro Arikawa
Establishment of Substrains of Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus (SFTSV) YG1 strain Selected by the Degree of low-pH-dependent Cell Fusion Activity
査読あり、投稿準備中

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. 西尾佐奈恵、津田祥美、伊東諒、清水健太、吉松組子、有川二郎
Establishment of substrains from SFTSV strain YG1 with high or low pH-dependent cell-fusion activity
異なる細胞融合能を持つ重症熱性血小板減少症候群ウイルスYG1株由来ウイルスの確立
第 63 回日本ウイルス学会学術集会
2015 年 11 月 22~24 日　福岡

2. 津田祥美、西尾佐奈恵、伊東諒、吉田玲子、高田礼人、有川二郎、吉松組子
An amino acid substitution in the glycoprotein of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus enhances membrane fusion activity
第 63 回日本ウイルス学会学術集会
2015 年 11 月 22~24 日　福岡

3. 伊東諒、津田祥美、西尾佐奈恵、清水健太、吉松組子、有川二郎
重症熱性血小板減少症候群ウイルスのウイルスタンパク質の細胞内局在の解析
第 63 回日本ウイルス学会学術集会
2015 年 11 月 22~24 日　福岡

4. 津田祥美、西尾佐奈恵、伊東諒、清水健太、吉松　組子、有川二郎
異なる細胞融合活性をもつ重症熱性血小板減少症候群ウイルス株の解析
日本薬学会　第 136 年会
2016 年 3 月 26~29 日　横浜

5. Sanae Nishio, Yoshimi Tsuda, Ryo Ito, Kenta Shimizu, Kumiko Yoshimatsu, Jiro Arikawa
Isolation and characterization of substrains of YG1 strain of SFTSV

The U.S. – Japan Cooperative Medical Sciences Program presents 50th Anniversary Celebration followed by the 18th International Conference on Emerging Infectious Diseases (EID)

Date: January 11-12,

US – Japan Viral Diseases Panel Meeting

Date: January　13-14, 2016, North Bethesda, MD

緒言

重症熱性血小板減少症候群（severe fever with thrombocytopenia syndrome: SFTS）は、ブニヤウイルス科フレボウイルス属に分類されるウイルスを原因とし、白血球減少、血小板減少、発熱などを特徴とする重症の熱性疾患である。SFTSは、2009 年に中国で初めて報告され[1]、翌、2011 年には患者から原因ウイルスが分離された。ウイルスゲノムの塩基配列の決定によって、SFTSウイルス（SFTSV）は、ブニヤウイルス科フレボウイルス属に分類される新種のウイルスであることが明らかになった[2]。

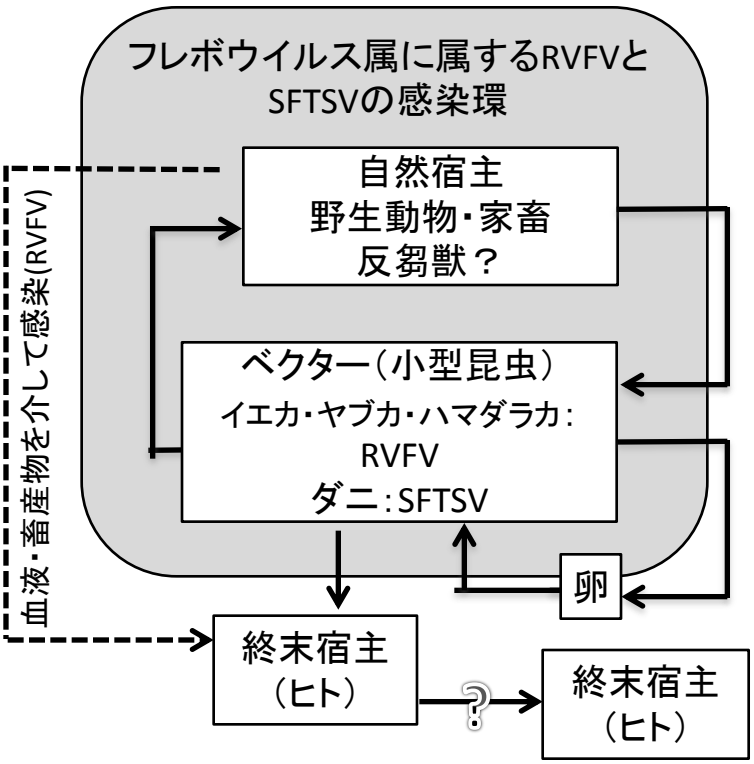
ブニヤウイルス科のウイルスのほとんどが、節足動物をベクターとし、家畜や野生動物を自然宿主として感染サイクルを形成する人獣共通感染症の原因ウイルスである。フレボウイルス属に分類されるウイルスでは、蚊やサシチョウバエをベクターとすることが知られていた[3]。しかし、SFTSV はフレボウイルス属に分類されるウイルスのなかで、唯一、マダニをベクターとする点が特徴である。

日本では、2012 年に原因不明の熱性疾患で死亡した患者から分離されたウイルスがSFTSVであることが明らかとなり、初めての症例の確認となった[4, 5]。この患者には海外渡航歴がなく、また、患者の居住地周辺のダニからSFTSVが検出されたことから、日本国内で感染したと考えられている。その後、類似症例を対象とした、懐古的調査が行われた結果、すくなくとも2005 年には、SFTS患者が発生していたことが明らかになっている[4]。2016 年4 月27 日現在、175 例が報告され、そのうち46 例が死亡し致死率は26.3%に達している（http://www.nih.go.jp/niid/ja/diseases/sa/sfts.html）。この死亡率は中国での2011-2012 年の報告である致死率6.3%よりも高く[6]、おそらくは日本では軽症SFTSの見逃し例が多く存在し、これを加えると最終的な致死率は中国での報告の6.3%とほぼ同等となるのではないかと考えられている。また、日本と中国での患者の死亡率が同程度と仮定すると、わが国におけるSFTS患者の発生数は年間250 名程度と推定される[7]。

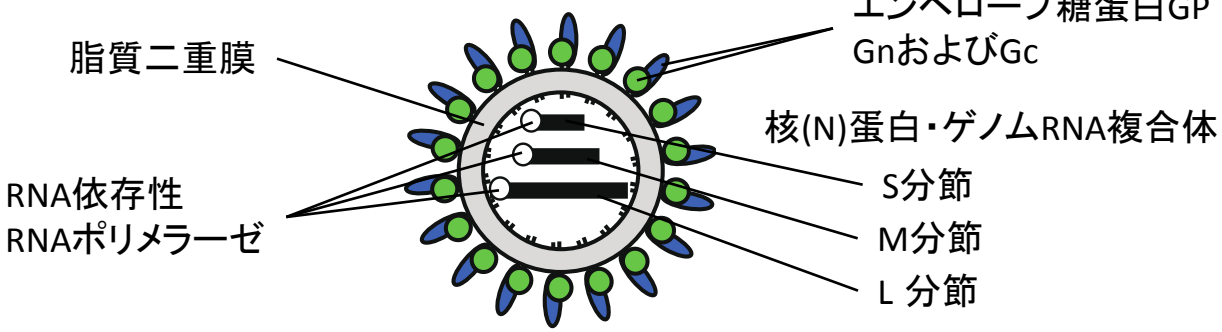
SFSTVはブニヤウイルス科フレボウイルス属に分類されるウイルスである。SFTSVはマダニ属の吸血昆虫をベクターとすることが明らかとなっている。中国では、オウシマダニとフタトゲチマダニ、米国ではキララマダニ、日本ではタカサゴキララマダニ、フタトゲチマダニがベクターであることが明らかとなっている[4]。哺乳動物では、中国ではヤギのウイルス抗体保有率が高いことが報告されている[8]。日本では西日本でウイルス保有ダニの分布に一致して、シカやイノシシが高率に抗体を保有していることが報告されており、ほぼ患者の分布と一致する[9]。日本でもウイルスの感染環はおそらく、ダニのみあるいはダニと反芻獣などで形成されていると予想され、中国でのSFTSVの感染環やフレボウイルスであるリフトバレー熱ウイルス（RVFV）の感染環に類似していると考えられる（図1A）。

ブニヤウイルス科のウイルスは、長さの異なる 3 分節に分かれたマイナス鎖 RNA のゲ

A　感染環



B　ウイルス粒子の構造



C　遺伝子の構造

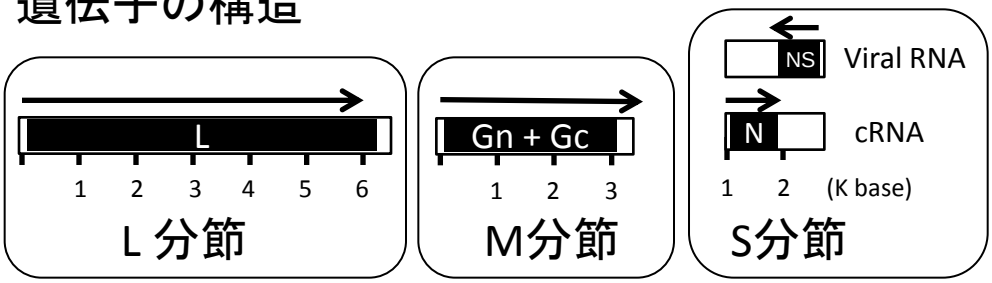


図1　SFTSVの生活環と構造

SFTSVはダニのみあるいはダニと野生動物・家畜で形成されると考えられる (A) 。
ブニヤウイルスは3 分節の一本鎖RNAをもつ。脂質二重膜上にエンベロープ糖蛋白GPであるGnとGcをもつ (B) 。
フレボウイルスは非構造蛋白NSsをS分節でアンビセンスにコードしている (C) 。

ノムを有する事を共通の特徴とする。3 分節のゲノムは、大きさによりL (large) 分節 (6.4 kb) 、M (medium) 分節 (3.6 kb) 、S (small) 分節 (2-3 kb) と称される。L分節はL蛋白 (RNA依存性RNAポリメラーゼ) 、M分節はエンベロープ糖蛋白 (GP) であるGnとGc、S分節は核蛋白であるNをコードする。RNA鎖の両末端の塩基配列が相補的であり、それらが結合して環状構造を形成している。この、末端の塩基配列と各分節の大きさによって、ブニヤウイルス科のウイルスは、オルソブニヤウイルス属、ハンタウイルス属、ナイロウイルス属、フレボウイルス属およびトスポウイルス属の5 属に分類される[3]。

図1Bに示すようにブニヤウイルス科のウイルスは直径およそ80～120 nmの球形であり、脂質二重膜のエンベロープをもつ[3]。エンベロープにはエンベロープ糖蛋白であるGnとGcが膜蛋白として存在し、これらGnとGcは細胞への吸着および侵入に関与すると考えられている。ウイルス粒子内部にはゲノムRNAと核蛋白NおよびRNA依存性RNAポリメラーゼが複合体を形成していると考えられている。図1Cに示すように、フレボウイルス属のウイルスはS分節由来の非構造蛋白NSsをアンビセンスにコードしているのが特徴である。NSsは複製時の感染細胞中にのみ観察され、ウイルス粒子には存在しないと考えられている。近年、NSsがインターフェロン等の細胞の抗ウイルスシステムに干渉して、ウイルス増殖に有利な環境を誘導すると報告されているが、その詳細については未だ定説とはなっていない[10-12]。

ブニヤウイルス表面のエンベロープ糖蛋白 Gn と Gc は、感染の初期の段階である細胞への吸着および侵入に関与すると考えられている [3]。ウイルスはエンベロープ糖蛋白を用いて細胞表面に何らかの方法で接着したのち、細胞内に取り込まれてエンドソームを形成する。エンドソームはライソソームと融合して、内部の pH がライソソーム酵素の至適 pH である低 pH に下がる。この低 pH 条件下でエンベロープ糖蛋白に構造変化が起こり、ウイルスのエンベロープ膜とエンドソームの脂質二重膜の融合を誘導し、ウイルス遺伝子を細胞質へ放出する「脱殻」へとつながると考えられている。このように、ブニヤウイルスの GP には中性域でのレセプター分子との結合活性と低 pH 依存性細胞融合活性が備わっていると考えられている。

SFTSVは最近になって発見されたウイルスであるため、ウイルス学的情報についての報告は少ない。しかしながら先行するRVFVや他のブニヤウイルスとの比較から、共通の性質を持つと予想される。ブニヤウイルスのエンベロープ糖蛋白の低pH依存性細胞融合活性はウイルスの侵入に関わるステップであることから、重要な創薬ターゲットであると考えられている。

はじめに、YG 1 株感染細胞を用いて、肉眼での細胞の離脱はみとめられなかった 低 pH 依存性細胞融合活性の有無を解析した結果、全ての細胞が感染していることが、免疫染色によって確認されたにも係らず、細胞融合は一部の細胞でのみ観察された。この成績から、YG1 株が、低 pH 依存性細胞融合活性において異なる性質を持つサブストレインのウイルスの混合物、いわゆる”quasispecies”を構成している可能性が考えられた。quaspecies と

は、1971 年にはじめて提唱された考え方であり[13]、遺伝子に多様な変異を持つ微生物が共存する集団のことである。もとの単一な微生物集団に比して病原性が高くなったり、治療に抵抗性を示したりする可能性を持つ。RNA ウイルスはゲノムに変異が入りやすいために、同じ環境下で増殖した場合でも異なる特徴を示すウイルス集団が存在するようになる。これによって宿主免疫系を回避したり抗ウイルス剤に耐性を示したりするウイルスが出現する[14, 15]。

本研究では、細胞融合像を指標として、YG1株の限界希釈法によって、サブストレインウイルスのクローニングを試み、細胞融合活性の異なる3 つのサブストレイン株のクローニングに成功した。さらに、これらの株の特徴をウイルス学的に比較解析することにより、SFTSVの細胞融合活性とウイルスの構造との相互関係を明らかにすることを試みた。また、これらの株を利用した比較的簡便な中和試験の開発を試みた。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下の通りである。

CPE	cytopathic effect
E-MEM	Eagle's minimam essential medium
GP	glycoprotein
IFA	indirect immunofluorescence assay
MEM	minimam essential medium
ORF	open reading frame
PBS	phosphate-buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
RT-PCR	reverse transcriptase-polymerase chain reaction
RVFV	Rift Valley fever virus
SFTSV	severe fever with thrombocytopenia syndrome virus

材料と方法

1. 細胞と培養液

Vero E6 細胞の培養液には、最小必須培地（Minimum Essential Medium, E-MEM; Gibco, Thermo Fisher Scientific）にペニシリン・ストレプトマイシン(Penicillin-Streptomycin; SIGMA）、ゲンタマイシン（Gentamicin solution; SIGMA）、非必須アミノ酸（100 × MEM Non-Essential Amino Acid; Gibco, Thermo Fisher Scientific）、インスリン・トランスフェリン・セレニウム（100 × Insulin-Transferrin-Selenium; Gibco, Thermo Fisher Scientific）、56 ℃ 30 分で非働化したウシ胎児血清（Fetal bovine serum; Biowest）を、それぞれ最終濃度がペニシリン 44 unit/mL、ストレプトマイシン 44 μg/mL、ゲンタマイシン 88 μg/mL、FCS 4.6%となるように加え pH7.4 に調整したものを用いた。Vero E6 細胞は、37 ℃、CO_2 濃度 5%のインキュベーター中で培養した。

2. ウイルスとウイルスの培養液

SFTSV YG1 株を用いた。本株は 2012 年日本で第 1 症例目の症例から分離・同定された株である[7]。患者血液から Vero 細胞を用いて分離した YG1 株の培養液を前田健博士（山口大学共同獣医部）から分与された。この培養液を 125 倍に希釈して 25 cm^2 の培養用フラスコ（T25, COSTAR, Corning Inc.）に準備した Vero E6 単層培養細胞に 250 μl 接種し、5 日後に培養上清を回収した。この 2 代目のウイルス 1 ml を同様に T25 フラスコ単層培養 Vero E6 細胞に接種し、5 日後に培養上清を回収した。この合計 3 代継代されたウイルスを親株としてバイアルに分注し、-80 ℃に保存し、以下の実験に用いた。ウイルスの感染価は後述するフォーカスアッセイ法で 5 × 10^5 ffu/ml であった。

3. マウス抗血清の作成

6 週齢、メスの BALB/c/slc マウス（SLC, 浜松）に YG1 を 5 × 10^3 ffu/mouse となるように皮下接種し、1～3 ヶ月後に採血したものを感染免疫血清として用いた。感染実験は北海道大学動物実験委員会の許可を得て北海道大学医学部附属動物実験施設の BSL3 感染実験室において実施した。

4. 間接蛍光抗体法（IFA 法）

SFTSV を接種した Vero E6 細胞浮遊液を 24-well 高撥水性印刷スライドグラス（松浪硝子工業）上に 20 μl 接種し、37 ℃、CO_2 濃度 5%のインキュベーター中で培養した。スライドグラスを PBS に浸漬して洗浄した後、室温のアセトン中に浸漬し室温で 10 分間固定した。スライドグラスをアセトンから取り出し、すぐに蒸留水中に短時間浸漬してアセトン

を取り除いてから、室温にて乾燥させたものを IFA 用抗原として用いた。IFA は以下の方法で実施した。アセトン固定抗原上に、SFTSV 感染マウス血清をのせ、室温で 1 時間インキュベートした。その後、スライドグラスを PBS 中に 3 分間浸漬後、PBS を変えて同様に浸漬した。同じ操作を 3 回繰り返した後、Alexa488 抗マウス抗体（Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG (H+L); Life Technologies, Thermo Fisher Scientific）を反応させた。同様に 1 時間インキュベーション後、PBS で洗浄し、蛍光顕微鏡（ECLIPSE E600; Nikon）を用いて観察した。細胞質中に特異的な蛍光が認められる場合、ウイルス感染陽性細胞と判定した。

5. ウイルス感染価の測定

1) プラークアッセイ法

6-well プレート（COSTAR 3516, 6 Well Cell Culture Cluster Tissue Culture Treated Non-Pyrogenic Polystyrene; Corning Inc.）に作成した Vero E6 細胞単層培養上に、培養液で 10^2 倍から 10^7 倍まで 10 倍階段希釈されたウイルス液を 100 µl/well 接種し、37 ℃ CO_2 濃度 5%のインキュベーター中で 1 時間吸着させた。次に、ウイルス液を除去し、オーバーレイ培地（0.8% Seakem ME アガロース（FMC Corp., Takara）および 4% FCS を含む E-MEM）を 1 ml/well で重層し、7 日間培養した。0.1 mg/ml 中性赤加培養液を 2 ml/well 加え、さらに一昼夜培養後、中性赤培地を除去した。そのまま培養を継続し、プラークが認められた時点でプラーク数を算出し、プラーク形成単位（plaque forming units: pfu）とした。

2) フォーカスアッセイの術式

ウイルス液を培養液で希釈し、24-well スライドグラス上に準備した Vero E6 細胞単層培養に 20 µl/well で接種した。37 ℃ CO_2 濃度 5%のインキュベーター中で 1 時間吸着させた後、ウイルス液を除去し、1.5%カルボキシメチルセルロース（CMC: Wako）を含む MEM 培地で重層した。48 時間培養後、スライドグラスをアセトンで固定し、SFTSV 感染マウス血清と Alexa488 抗マウス抗体（Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG (H+L); Life Technologies, Thermo Fisher Scientific）を用いた IFA 法で感染細胞を染色した。概ね 50 個以上の感染細胞が集まっているものを感染フォーカスとしてフォーカス数を数え、フォーカス形成単位（focus forming units: ffu）数とした。観察されたフォーカスを図 2 に示す。

6. 中和試験の術式

培養液で 40 倍から 5120 倍まで 2 倍階段希釈したマウス血清と、培養液で希釈したウイルス液を、同量ずつ混合し、37 ℃CO_2 濃度 5%のインキュベーター中で 1 時間反応させた。その混合液 100 µl を 96 well 平底マイクロプレート（96 Well Cell Culture Cluster Flat Bottom with Low Evaporation Lid Tissue Culture Treated Non-Pyrogenic Polystyrene;

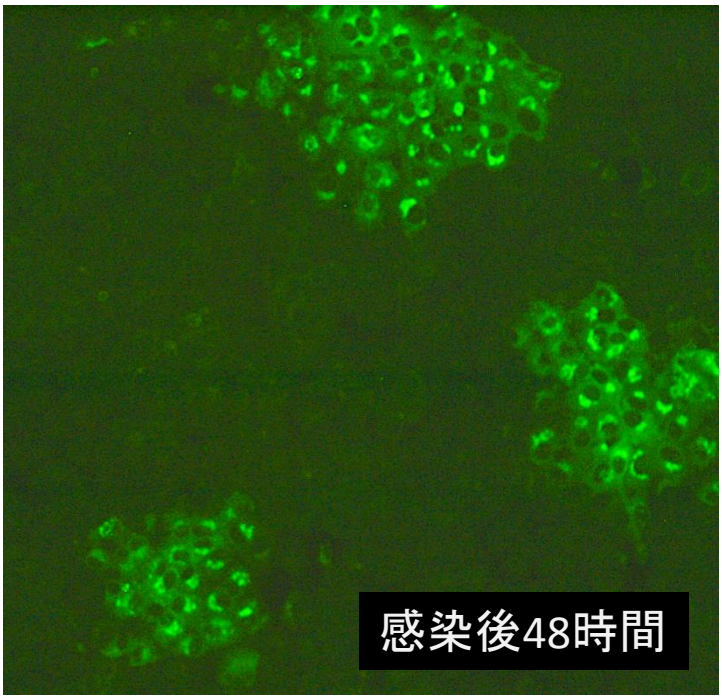


図2　SFTSVの感染フォーカス

フォーカスアッセイにおいて、IFA法でおよそ50 個程度の感染細胞が集まっているものを感染フォーカスとして数えた。

COSTAR, Corning Incorporated）上に作成した Vero E6 細胞単層培養に接種し、7 日間培養した。培養液を取り除いた後、0.15 M NaCl を含む 50 mM 酢酸緩衝液（pH5.6)を 100 µl/well を加え、室温で 2 分間反応させた。次に、酢酸緩衝液を除去し、E-MEM 100 µl/well を加え 22 時間培養した。培養液を除去し、10%ホルマリン 0.2%クリスタルバイオレットで 3 時間固定・染色した。肉眼的に細胞融合の状態を確認し、半数以上の well で細胞融合の出現が抑制される血清の最大希釈倍数の逆数を中和抗体価とした。

7. ウイルス増殖曲線

ウイルスを moi=0.005 になるよう E-MEM で希釈し、6 well プレート上の Vero E6 単層培養に接種した。37 ℃ CO_2 濃度 5%のインキュベーター中で 1 時間吸着させ、E-MEM で洗浄した後、E-MEM 3 ml/well を加え培養した。感染 1 日後～7 日後にかけて培養液 100 µl を回収し、-80 ℃で保存した。培養液のウイルス感染価をフォーカスアッセイ法で測定した。

8. ウイルス RNA の遺伝子配列の解析

ウイルス感染細胞からのウイルス RNA の抽出は、以下のように実施した。

ウイルスを T25 フラスコの Vero E6 単層培養細胞に感染させ、8～10 日間培養した。感染細胞と ISOGEN（ニッポンジーン; Wako）を混合し、室温で 5 分間以上静止した後、製造元のプロトコールにのっとり RNA を抽出した。ウイルス感染細胞の培養上清からのウイルス RNA の抽出は、QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) もしくは ISOGEN-LS (ニッポンジーン; Wako) を用いて、製造元のプロトコールに従い実施した。

9. RT-PCR

ウイルス RNA 10 µl を、ジエチルピロカルボネート処理水（DEPC 水; ニッポンジーン) 0.7 µl、2 mM dNTP 混合液（GeneAmp dNTP Mix; Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific) 1.3 µl、150 ng/µL ランダムプライマー（Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) 1 µl と混合し、65 ℃で 5 分処理した後、氷冷した。5 倍緩衝液（5 × Fisrt Strand Buffer; Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) 4 µl、0.1 M ジチオスレイトール（Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) 1 µl、RNA 分解酵素阻害薬（RNaseOUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor; Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) 1 µl、逆転写酵素 (SuperScript Ⅱ Reverse Transcriptase; Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) 1 µl を加え、25 ℃で 10 分間、42 ℃で 50 分間、70 ℃で 15 分間処理した。RNA 分解酵素（RNase H; Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) 1 µl を加え、37 ℃で 20 分間処理した。得られた DNA を cDNA として用いた。

10. ダイレクトシークエンシング

DNA ポリメラーゼ (AmpliTaq Gold; Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific) (Pfu Ultra Ⅱ Fusion HS DNA Polymerase; Agilent Technologies) (Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity; Invitrogen, Thermo fisher Scientific) を製造元のプロトコールにしたがって、 cDNA を増幅した。増幅産物を MinElute PCR Purification Kit (QIAGEN)、QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN)、illustra MicroSpin S-200 HR Columns (GE Healthcare)、illustra MicroSpin S-400 HR Columns (GE Healthcare) を用いて精製した。精製 DNA を 1%アガロースゲルで電気泳動し、DNA 染色液 (First Blast DNA Stain; BioRad) で 2 分間染色した後、蒸留水で洗浄し目的のバンドを切り出した。QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) または MinElute Gel Extraction Kit (QIAGEN) を用い、製造元のプロトコールに従い、DNA を精製した。BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequensing Kit (Applied Biosystems; Thermo Fisher Scientific) を用いて PCR を行い、Genetic Analizer 3130 を用いて配列の確認を行った。

11. 低 pH 依存性細胞融合反応

96 well 平底マイクロプレートに培養した Vero E6 細胞単層培養に、YG1 株を E-MEM で 10^3、10^4、10^5、10^6、10^7 倍に希釈したウイルス液を 100 µl/well 接種し、6～7 日間培養した。培養上清を回収し、酢酸緩衝液 100 µl/well を加え、2 分間室温に静止した。酢酸緩衝液を除去した後、E-MEM 100 µl/well を加え、24～48 時間培養した。培養上清を除去し、10%中性緩衝ホルムアルデヒド液 200 µl/well を加え 10 分間静止した後、ホルムアルデヒド液を除いた。リン酸緩衝食塩水 (PBS) で well を洗浄し、11 倍希釈ギムザ液 (Giemsa's solution; Merck) 50 µl/well を加え、1 時間染色した。PBS と蒸留水で細胞を洗浄した後、室温で乾燥させ、培養顕微鏡下で細胞融合の程度を鏡検した。細胞融合の判定の指標は図 3 に示す。

12. 限界希釈法によるウイルスサブストレインの単離

96 well 平底マイクロプレートに培養した Vero E6 細胞単層培養に、YG1 株を培養液で 10^3～10^7 倍まで 10 倍階段希釈したウイルス液を 100 µl/well ずつ接種した。各ウイルス希釈で、96 well に接種した。6～7 日間培養した後、培養上清を回収した。培養細胞を pH5.6 の酢酸緩衝液で処理し、低 pH 依存性細胞融合像の出現の有無を確認した。培養上清の一部を 24 well スライドグラス上の Vero E6 細胞に接種し、24 時間培養した。培養細胞をアセトン固定した後、IFA 法によってウイルス増殖の有無を確認した。最大希釈のウイルス液で細胞融合活性とウイルス増殖が認められた well 由来の培養上清およびウイルス増殖は観察されるが、低 pH 依存性細胞融合反応が弱い well 由来の培養上清を用いて、同様の限界希釈法を繰り返した。限界希釈法によって得られた培養上清 10 µl を、T25 Vero E6 単層培養細胞に接種し、7～10 日間培養した。培養上清を回収し、200 G で 3 分間遠心した上清を YG1 サブストレインとし、-80 ℃に保存し解析に用いた。

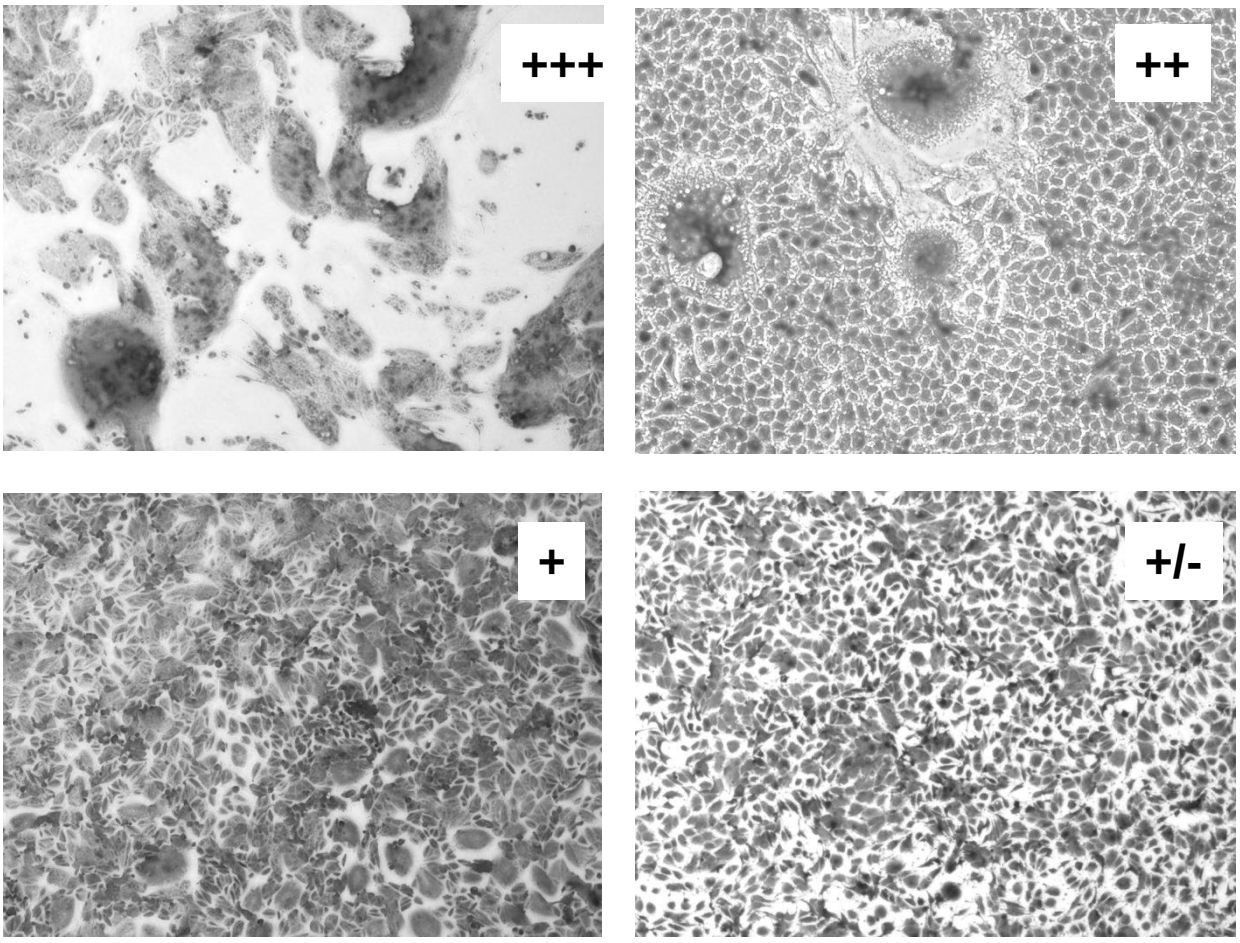


図3　各サブクローンの低pH依存性融合能

細胞融合の評価は目視で上記のように+++, ++, +, ±, - として判定した。

13. YG1 親株およびサブストレインの GP の発現と細胞融合活性の検出

GP の発現と細胞融合活性の検出は、ハンタウイルスの組換え GP により報告された方法を用いた [16]。上記 RT-PCR 法によりで親株感染細胞から準備した cDNA からプライマー ClaI-SFTSVM-19F (acatcgatgcaccatgatgaaagtcatctggttctcc) と NheI-SFTSVM-3240R (acgctagcttactaagccagcttcgtccttgatcg) を用いて全長の GP のコード領域を含む遺伝子断片を増幅し、精製した (Qiagen PCR purification kit)。使用した PCR プライマーには下線で示した制限酵素 *Cla*I と *Nhe*I により認識される配列を付加した。これらの制限酵素部位を用いて pCAGGSMCS プラスミドベクター[17] のマルチクローニングサイトの *Cla*I、*Nhe*I 制限酵素部位に目的の遺伝子断片を結合することによってクローニングし、pCSFTSV-M とした。このプラスミドの塩基配列を確認した結果、YG1 株として DNA Database of Japan (DDBJ) に登録されている塩基配列 (AB817987) と同一であった。さらに、pCSFTSV-M にサブストレイン B7 の 2 ヶ所の変異である 1000 番の T を C へ (328 番目の Y が H)、1888 番の A を T へ (624 番目の R が W) と改変したプラスミドを作成した。両方の変異を持つ変異体を pCSFTSV-M/CT、1000 番のみの変異を持つ変異体を pCSFTSV-M/CA、1888 番のみの変異を持つ変異体を pCSFTSV-M/TT とした。これらのプラスミドをそれぞれ Vero E6 細胞に Transit LT1 (Mirus Bio. LLC) を用いたリポフェクション法にて導入し、Vero E6 細胞に発現させた。

14. アミノ酸配列の解析

アミノ酸配列に基づいた YG1 株 GP の機能ドメインの検索は Interpro (http://www.ebi.ac.uk/interpro/sequencesearch/) で行った。また、多重配列による GP のアミノ酸配列の比較は Genetyx-Mac Ver. 15.0.1 (Genetyx Corp., Tokyo Japan) により行った。

結果

1. ウイルスサブストレインの樹立

96 well マイクロプレート上の Vero E6 細胞の各 well について YG1 株を 10^6 倍希釈で接種し、感染細胞の低 pH 依存性細胞融合活性の出現を観察した。その結果、最も強い細胞融合像（+++）が観察された well、D10 および次に強い細胞融合像（++）が観察された well、B3 由来の培養上清を細胞融合強陽性株として選択した。また、10^7 倍希釈で接種したマイクロプレートからは、ウイルス増殖が認められるが細胞融合現象が弱い(+/－) well が認められた。そのなかから、A9 を選択し、その well 由来の培養上清を低細胞融合株として選択した。

次に、D10 由来株について、10^6 倍希釈でさらに 2 回、同様の解析を行った。その結果、32 well 中 13 well で強い細胞融合像（+++）が観察された。そこで、これら 3 回の限界希釈実験によって、ウイルス株がクローニングされたと考え、3 回目の限界希釈感染 B7 well 由来株を、強細胞融合株の代表として、YG1 株のサブストレイン B7 株と名前を付け、以下の実験に用いた。B7 株の他に 5 株同時に樹立した（3 回目の限界希釈感染 A5、D8、E7、G8、H6 well 由来株）。

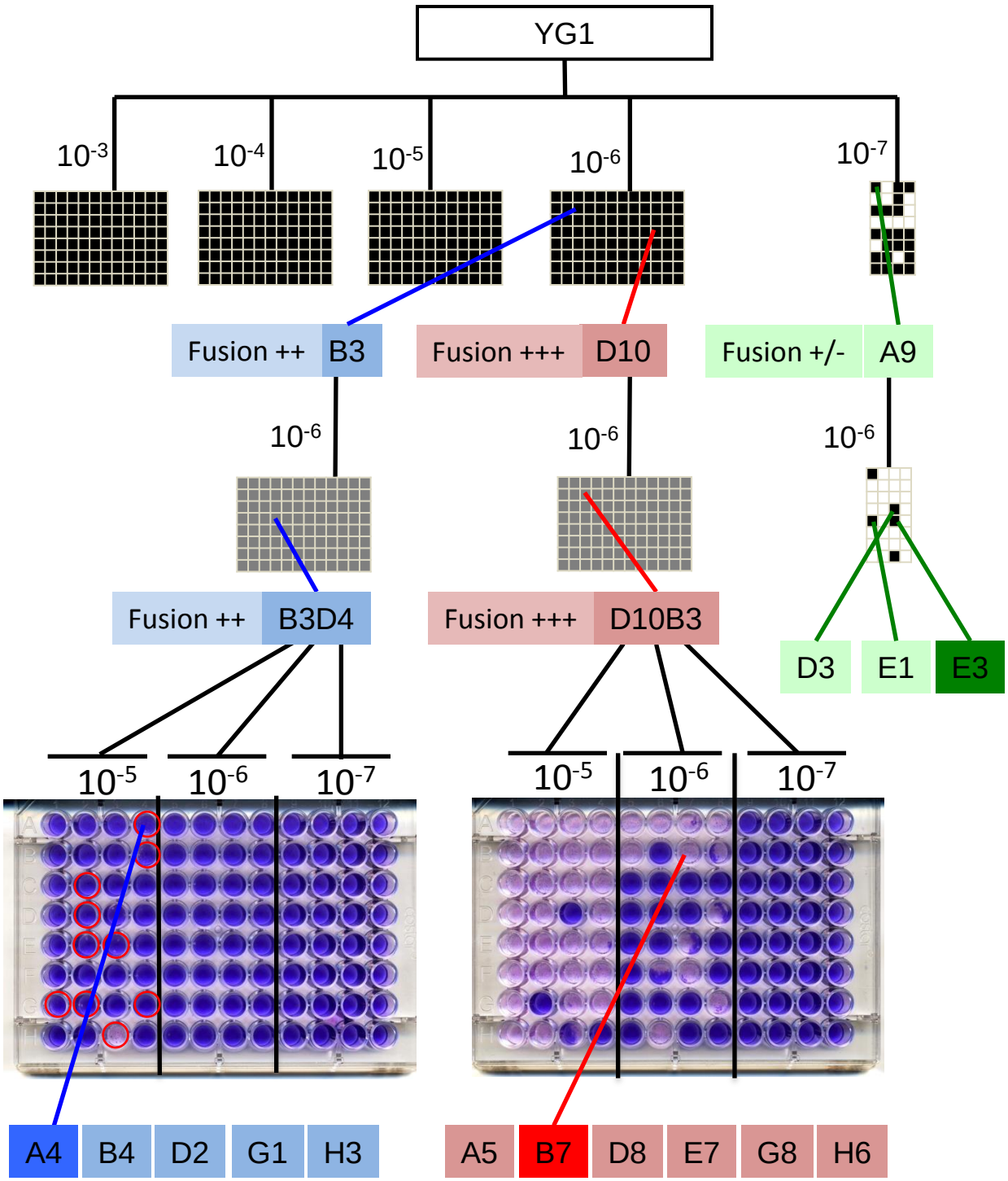
B3 well 由来株については、10^6 倍希釈、次に 10^5 倍希釈で同様の限界希釈実験を行った。その結果、32 well 中 10 well で細胞融合像（++）が観察された。そこで、これら 3 回の限界希釈実験後の A4 well 由来株を、もう一つの細胞融合株の代表として、YG1 株のサブストレイン A4 株と名前を付け以下の実験に用いた。A4 株の他に 4 株同時に樹立した（3 回目の限界希釈感染 B4、D2、G1、H3 well 由来株）。

YG1 株 10^7 倍希釈で接種したマイクロプレートでは、32 well 中 A9 well など 21 well において、ウイルス増殖が認められるが細胞融合現象が弱い（+/－）像が観察された。A9 由来株について 10^6 倍希釈で同様の解析を行い、32 well 中 5 well (A1, D3, E1, E3, H3) でウイルス増殖が認められるが細胞融合現象が弱い（+/－）像が観察されため、2 回の限界希釈感染後の E3 well 由来株を低細胞融合株の代表として選択し、YG1 株のサブストレインとして E3 株と名前を付けて以下の実験に用いた。サブストレインの樹立の図を図 4 に示す。

2. B7, A4, E3 株の細胞傷害活性(CPE)と低 pH 依存性膜融合活性

B7 株（2.5 × 10^6 ffu/ml), A4 株(2.0 × 10^5 ffu/ml), E3 株（2.0 × 10^6 ffu/ml)をそれぞれ 10^2 倍から 10^9 倍まで希釈し、96well マイクロプレートの VeroE6 単層培養細胞へ接種した。限界希釈実験と同様に、接種 7 日後に低 pH 処理をした細胞(L)としない細胞(N)について固定後染色し、細胞融合と CPE の出現パターンを比較した。

B7 株感染細胞では、低 pH 処理の前に既に 10^2～10^4 倍希釈のウイルス感染で感染細胞が CPE により脱落していた。また、低 pH 処理後は脱落のみられなかった 10^5 倍希釈のウイルス感染で強い細胞融合像が観察され、核が凝集することにより肉眼的にも well が透明に



○ ウイルス増殖あり、細胞融合像あり、
その他の青く細胞の残るwellはウイルス増殖なし

図4　サブストレインの樹立

YG1親株を10^6 倍希釈したプレートから、細胞融合 (++) のwell B3を選択し、同様の実験をあと2 回繰り返しサブストレインA4を樹立した。YG1親株を10^6 倍希釈したプレートから細胞融合 (+++) のwell D10を選択し、同様の実験をあと2 回繰り返しサブストレインB7を樹立した。YG1親株を107 倍希釈したプレートから細胞融合 (+/-) のwell A9を選択し、同様の実験をあと1 回繰り返しサブストレインE3を樹立した。E3樹立の系においてIFA法でウイルス増殖が認められたwellを黒で示す。

観察される部分が大きくなった。一方、A4 株感染細胞では、低 pH 処理を行った細胞でのみ顕著な肉眼的に観察される細胞融合像が確認された。また、E3 株感染細胞では、低 pH 処理後も肉眼的に観察される細胞融合像は観察されなかった。各サブストレインの CPE と低 pH 依存性細胞融合活性を図 5 に示す。

3. B7, A4, E3 株のプラーク形成能の比較

感染 7 日後に中性赤の重層を開始し、プラークの出現を観察した。YG1 株では、重層後 1 日目（感染後 8 日目）には 10^5 希釈でのみ、大型のプラーク 1 つのみ観察された。しかしながら重層後 4 日目（感染後 11 日）からには 10^3 から 10^6 にかけて、大きさも明瞭度も異なるプラークが出現した(図 8A)。一方、B7 株では、重層後 6 時間からプラークが確認され始め、24 時間重層培養後の感染後 8 日には均一かつ大型で明瞭なプラークが形成された（図 8B）。A4 株では、重層後 2 日経過した感染後 9 日に B7 株と比べほぼ同じ大きさのプラークが出現し始めた。しかし、図 8E に示すように、両株のプラークを顕微鏡下で観察すると、B7 株のプラークでは細胞は中性赤を取り込まず、細胞の離脱が始まっているのに対し、A4 株のプラークでは中性赤の色素を取り込んだ融合細胞が観察され、感染細胞が生残していることが明らかとなった。また、E3 株では、重層 4 日目の感染 11 目にプラークの出現が観察されたが、形態は、B7, A4 株に比べて小型であり、YG1 で感染後 11 日目にみられるプラークと類似していた。各サブストレインの形成能を図 6 に示す。

4. B7, A4, E3 株の増殖曲線の比較

T25 フラスコに培養した Vero E6 細胞に、YG1 株、B7, A4 および E3 株をそれぞれ moi =0.005 で感染させ、感染後 7 日まで毎日培養上清の一部を回収し、-80 ℃に保存した。それらについて、フォーカスアッセイ法により感染価を測定した。増殖速度は親株 YG1 株と E3 株が他の 2 株に比べて高く、次いで B7 株、A 4 株の順に低くなった。また、最終的な感染価は、親株 YG1 株が最も高かった（2×10^7 ffu/ml）。E3 株と B7 株はほぼ同じ感染価（8×10^6 ffu/ml）を示した。一方、A4 株は最も増殖が遅く、感染 2 日目に初めて培養上清中に感染価を認めた。感染 7 日目の感染価も、A4 株では 6×10^5 ffu/ml で他の株の 30~100 倍低く、観察期間中にはプラトーに達しなかった。各サブストレインの増殖曲線を図 7 に示す。

5. B7, A4, E3 株の遺伝子変異部位

サブストレインの性状の違いの原因を明らかにするために、各株の S, M, L 分節 RNA の塩基配列を決定し、YG1 株のデータベース上の配列（S 分節 AB817979、M 分節 AB817987、L 分節 AB817995)と比較した。その結果、S 分節にアミノ酸の変異を伴う遺伝子変異はみとめられなかった。B7 株にのみ 1487 番に同義置換を起こす点変異が認められた。M 分節

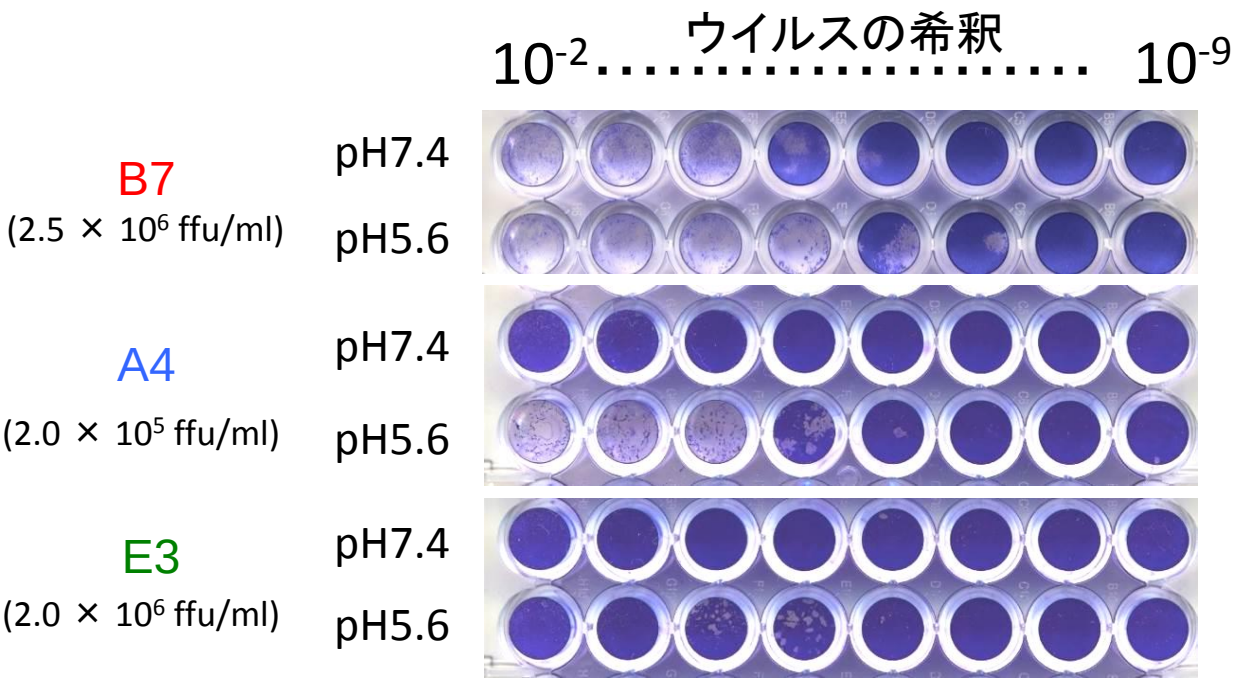


図5　各サブストレインのCPEと低pH依存性細胞融合活性

B7では低pH処理の有無にかかわらず細胞変性効果（CPE）により細胞が脱落した。
低pH処理後は10^5 倍希釈においても強い細胞融合が認められた。
A4では低pH処理群のみ強い細胞融合が認められた。
E3では低pH処理群にも細胞融合による細胞の離脱は認められなかった。

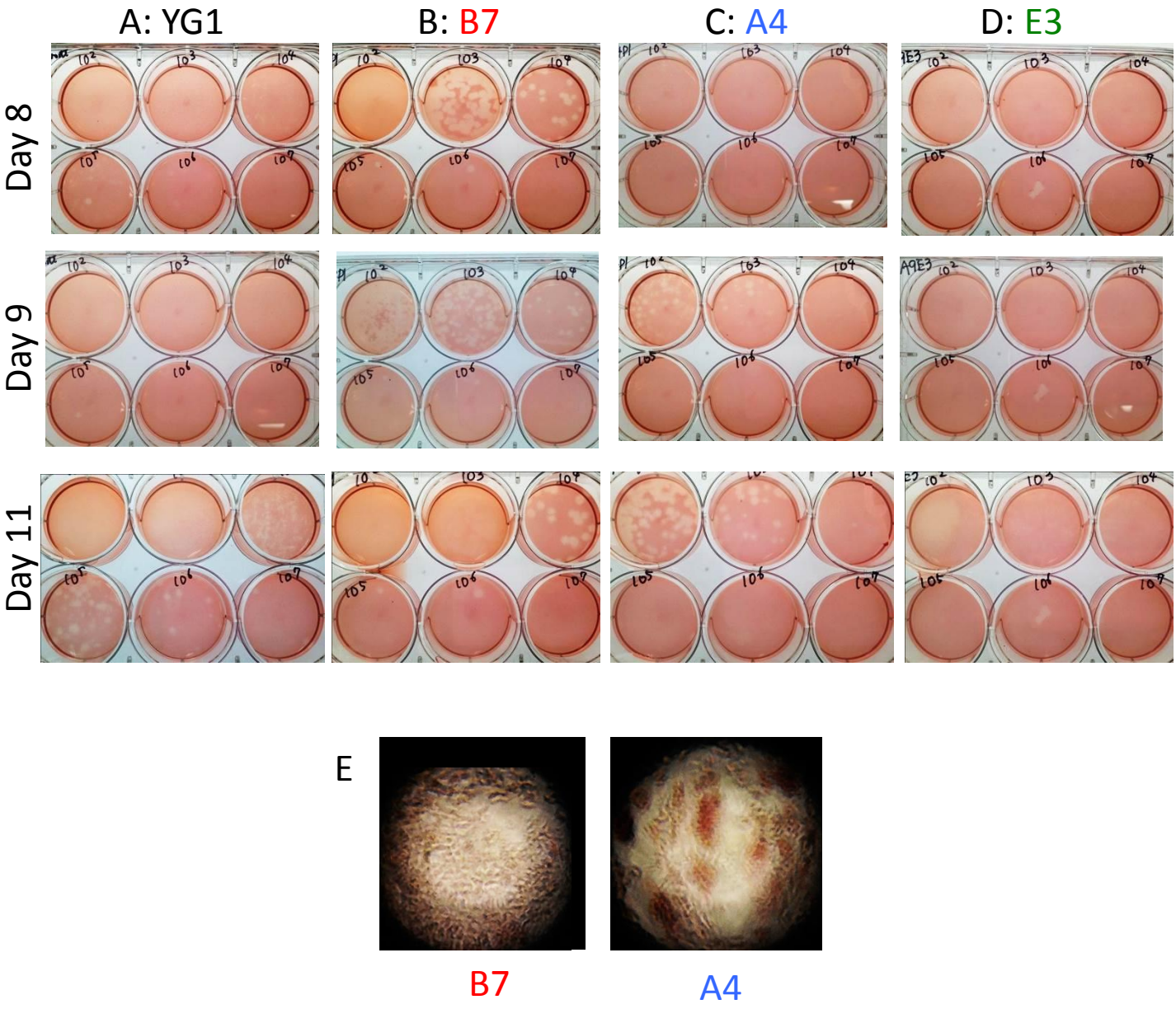


図6　各サブストレインのプラーク形成能

B7では感染後8 日から大型で明瞭なプラークが認められた (B) 。
A4では感染後9 日から大型のプラークが認められた (C) 。
E3では感染後12 日に小型のプラークが認められた (D) 。
YG1親株では様々なプラークが認められた (A) 。
B7のプラークの細胞は死滅し、中性赤は取り込まれていなかった。
A4のプラークの細胞は生存しているが、細胞融合を起こしていた (E) 。

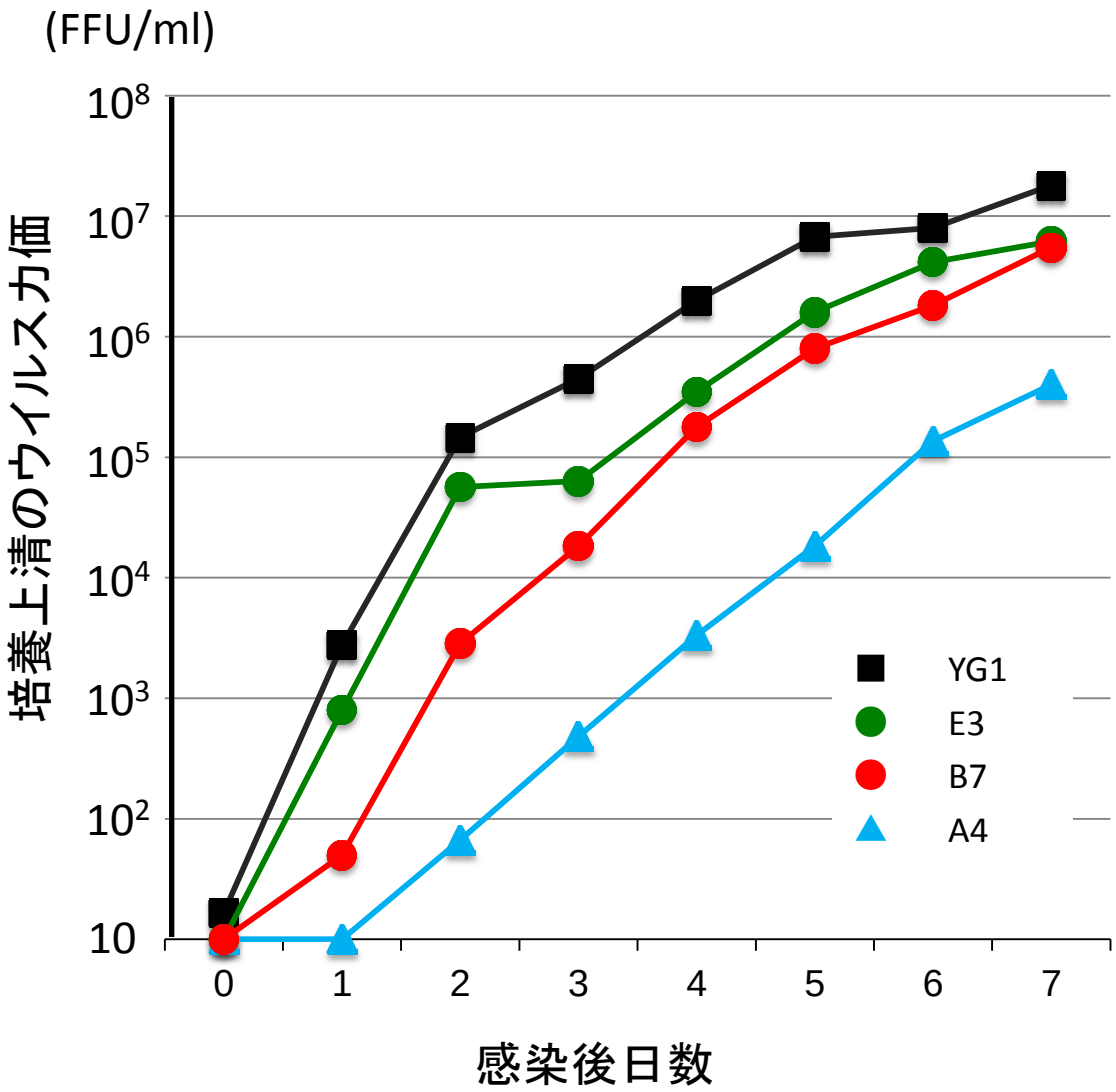


図7　各サブストレインの培養細胞 Vero E6における増殖

増殖速度が最も速いのは親株YG1で、次いでE3、B7となった。
A4の増殖速度が最も遅かった。

と L 分節には変異が確認された。表 1 にエンベロープ糖蛋白をコードする M 分節における変異の詳細を示す。A4 株および B7 株に共通して 1000 番の T が C に、1888 番の A が T に変異していた。これらの遺伝子変異によって、328 番のアミノ酸が Y から H に(Y328H)、624 番のアミノ酸が R から W に(R624W) 変異していた。さらに、A4 株にのみ 1992 番には同義置換を起こす点変異が認められた。一方、E3 株は 1000 番、1888 番ともに YG1 株データベース配列と比べ変異は認められなかった。次に L 分節についての詳細を表 2 に示す(表 2)。ポリメラーゼをコードする L 分節 RNA の塩基の配列の変異は B7 株の 5689 番にのみ認められ、T が A に変異していた。この変異により 1891 番のアミノ酸が N から K へと変異した。A4 株および E3 株にはこの部位に変異はみられなかった。

6. 組換え GP を発現させた Vero E6 細胞の低 pH 依存性細胞融合活性

M 分節に認められたアミノ酸の変異を伴う二つの変異、Y328H と R624W と細胞融合活性の関連を明らかにすることを試みた。YG1 株のエンベロープ糖蛋白のコード領域を pCAGGSMCS プラスミドベクターに組み込み、この pCSFTSV−M を Vero E6 細胞に導入することによって発現させた。遺伝子の発現は感染マウス血清を用いた IFA 法により確認された。次にそれぞれの遺伝子変異を pCSFTSV−M に導入した変異体プラスミドベクターを用いて、VeroE6 細胞に発現させ、それぞれの発現細胞の低 pH 依存性細胞融合活性を解析した (図 8A)。その結果、pCSFTSV−M/CT を導入することにより、2 ヶ所の部位のアミノ酸を H328/W624 の GP に改変して発現させた場合、顕著な細胞融合像が認められた（図 8B）。また、pCSFTSV−M/TT を導入することにより、親株の配列に W624 の変異のみを導入した GP が最も強い細胞融合を示したのに対して、pCSFTSV−M/CA の導入により H328 の変異のみを導入した GP はほとんど細胞融合が認められなかった。これら結果から W624 が細胞融合活性の変化に関与していると考えられた。また、pCSFTSV−M で発現させた Y328/R624 である、データベース上の配列および E3 の配列では、細胞融合像はほとんど確認されなかった。

7. B7, A4 株を用いた中和試験

(1) マウス感染免疫血清の B7 株および A4 株に対する中和抗体価測定法を確立するため、B7 株と A4 株を用いて低 pH 依存性細胞融合活性を指標に中和試験を行った。(図 9)。B7 株では強い CPE が血清の 320 倍希釈から出現し、それよりも高濃度の血清によって感染が中和された well との判別は容易だった。一方、A4 株では、CPE を指標にすると、5120 倍希釈から CPE が出現し、CPE の出現を指標として中和抗体価を測定した場合、B7 株を用いた場合に比べ 16 倍以上高い中和抗体価と判定された。しかし、血清希釈 160 倍から 2560 倍においても顕微鏡観察により細胞融合が確認され、感染そのものが中和された訳ではないことが明らかとなった。このため、中和試験には低 pH 処理をしなくとも顕著な CPE を呈する B7 株

表1　各サブストレインのM分節の変異

ウイルス	細胞融合(酸性)	CPE		プラーク		増殖	塩基番号/アミノ酸番号			親株YG1内に占めるおよその比率
		中性	酸性	早さ	大きさ		1000/328	1888/624	1992/658	
親株YG1	+	—	+	遅*	小*	速	T/Y	A/R	T/S	—
B7	+++	+++	+++	早	大	速	C/H	T/W	T/S	1
A4	+++	—	+++	遅	大	遅	C/H	T/W	A/S	1
E3	+	—	+	遅	小	速	T/Y	A/R	T/S	1000

＊様々なプラークのうち、大多数を占めたのもの

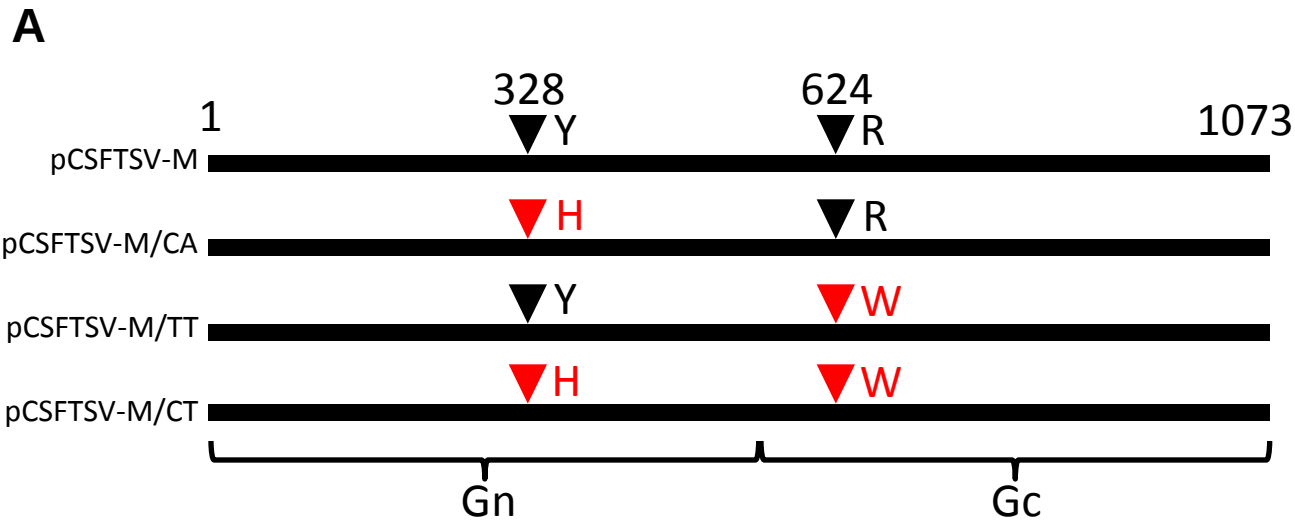
M分節のコードするGP上に、B7とA4でY328H、R624Wの非同義置換がみられた。このことから、B7とA4は、データベース上のYG1配列とは異なる同じGPを持つと示された。

表2　各サブストレインのL分節の変異

ウイルス	細胞融合(酸性)	CPE		プラーク		増殖	塩基番号/アミノ酸番号	親株YG1内に占めるおよその比率
		中性	酸性	早さ	大きさ		5689/1891	
親株YG1	+	—	+	遅*	小*	速	T/N	—
B7	+++	+++	+++	早	大	速	A/K	1
A4	+++	—	+++	遅	大	遅	T/N	1
E3	+	—	+	遅	小	速	T/N	1000

＊様々なプラークのうち、大多数を占めたのもの

L分節のコードするポリメラーゼ上に、B7でN1891Kの非同義置換がみられた。このことから、B7のみデータベース上YG1やA4、E3と異なるポリメラーゼを持つことがわかった。



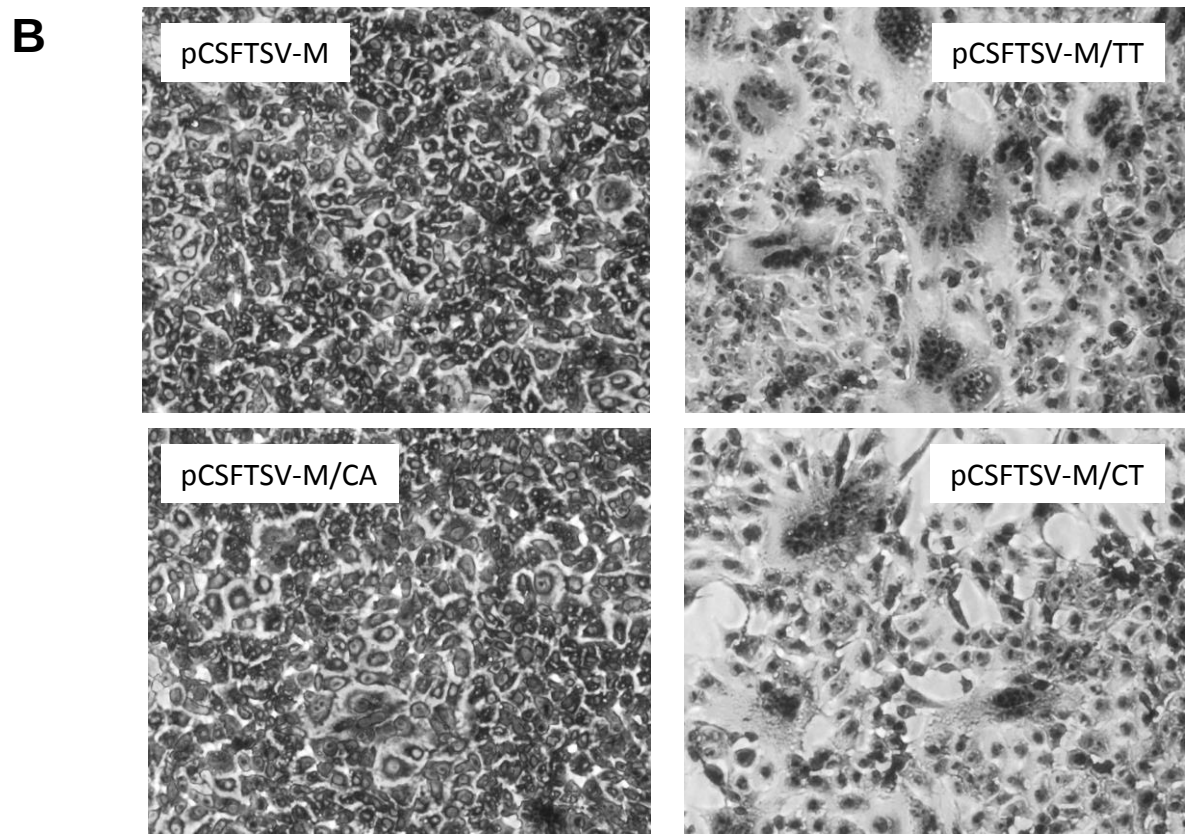


図8　細胞融合活性の変化に関与する変異の特定

組み換えGPは、データベース上のYG1の配列と同じもの、Y328Hの変異を導入したもの、R624Wの変異を導入したもの、Y328HとR624Wの両方の変異を導入したものを用いた (A) 。データベース上のYG1配列と同じGPを発現させた細胞と、Y328Hの変異のみをもつGPを発現させた細胞では、明らかな細胞融合はみられなかった。一方、R624Wの変異のみをもつGPを発現させた細胞と、Y328HとR624Wの両方の変異をもつGPを発現させた細胞では、強い細胞融合がみられた (B) 。

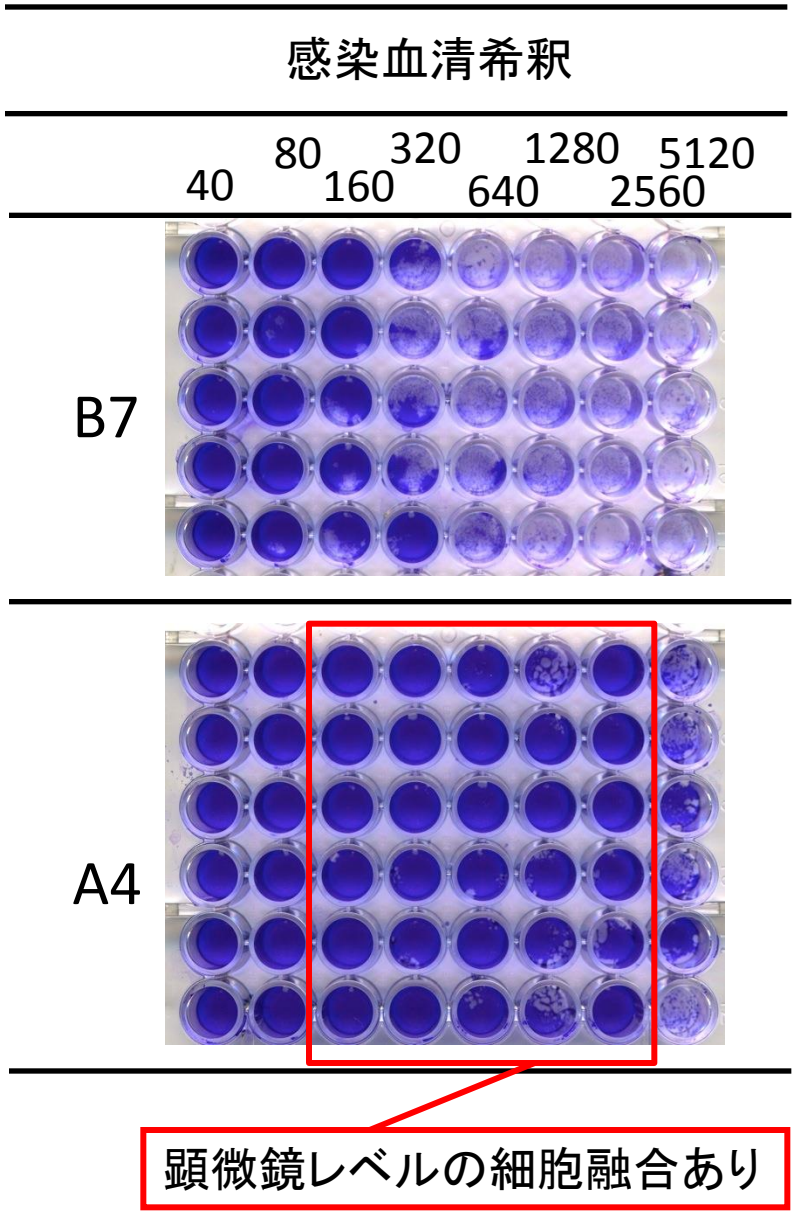


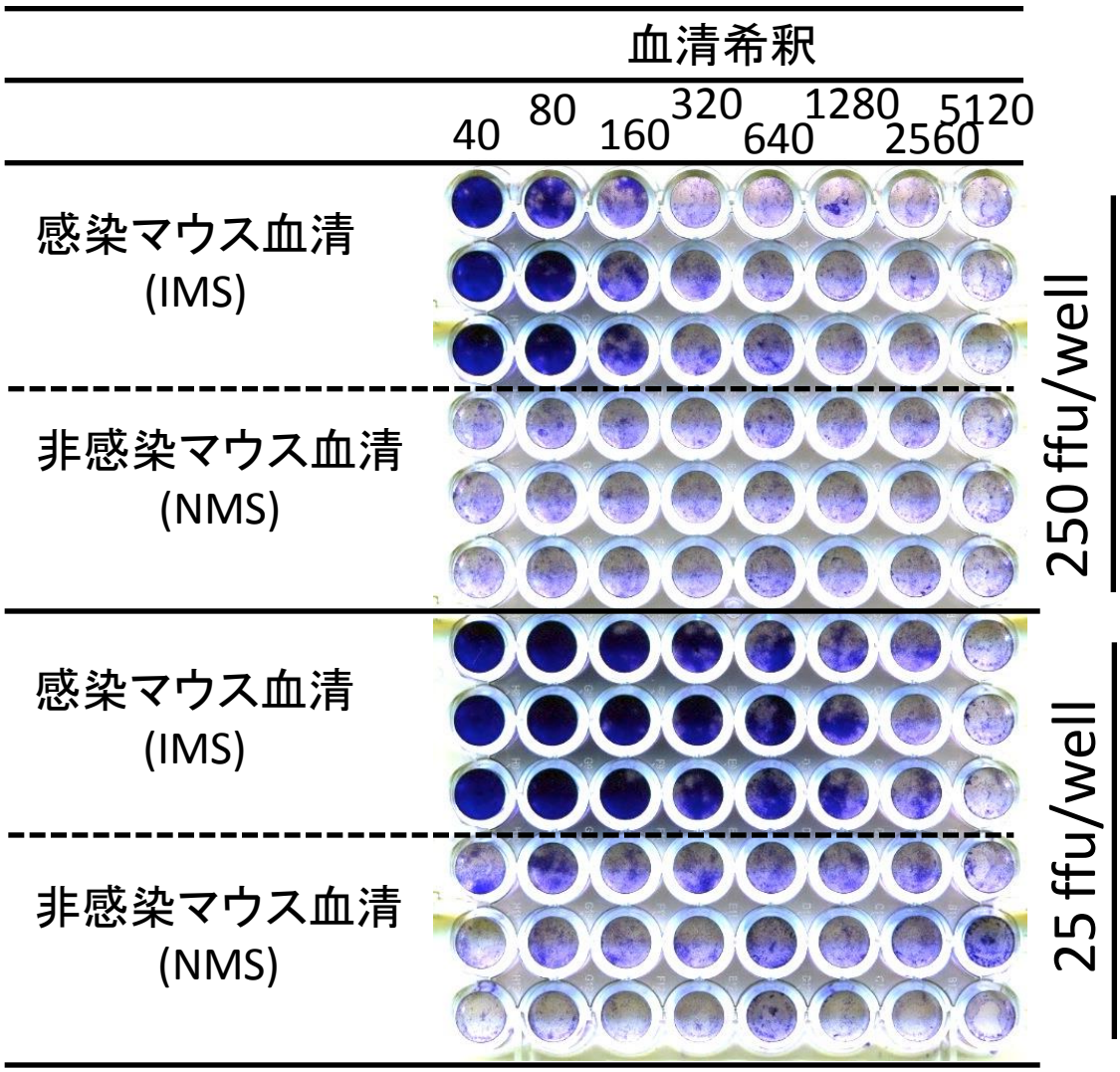
図9　SFTSV感染マウス血清による感染阻害

B7感染細胞では、320 倍から肉眼的に明らかなCPEが出現し、中和されたwellと中和されなかったwellの区別は容易だった。
A4感染細胞では、160～2560 倍で顕微鏡レベルの細胞融合が出現した。

が適していることが明らかとなった。

(2) 低 pH 処理をしなくとも顕著な CPE を呈する B7 株を用いて中和試験を試みた。希釈した SFTSV 感染マウス血清および非感染血清を、250 ffu/ml あるいは 25 ffu/ml のウイルス液と 1:1 で混合し、1 時間の反応後に 100 µl の混合液を 96 well プレートに予め準備しておいた Vero E6 細胞単層培養に接種した。7 日間培養後にホルマリンークリスタルバイオレットにより固定染色した。実験はそれぞれ 3 well ずつ実施した(図 10A)。その結果非常に明瞭な感染の阻害が肉眼的に観察された。図 10B に CPE をそれぞれの well で観察した結果を－から+++までのスコアで記録した表結果を示す。CPE (+/－) までに防ぐ最大希釈を仮に中和抗体価としたとき、この感染血清は 250 ffu /ml で 80 倍、25 ffu/ml で 320 倍となった。一方、非感染マウス血清では最も血清希釈の低い 40 倍においてもウイルスの CPE が認められ、中和抗体価はどちらのウイルス希釈でも＜40 倍となった。以上の結果からウイルスが少量であるほうが、鋭敏な中和試験となることが明らかとなった。

A



B

ウイルス (ffu/ml)	血清	血清希釈							
		40	80	160	320	640	1280	2560	5120
250	IMS	-	±	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	NMS	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
25	IMS	-	-	-	±	+++	+++	+++	+++
	NMS	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

図10　B7株がVeroE6細胞に呈する細胞傷害活性を指標とした中和試験

感染が成立したwellでは肉眼的に明らかなCPEがみられ、中和されたwellとの判別は容易だった (A) 。CPE (+/ー) までに防ぐ最大希釈を仮に中和抗体価としたとき、この感染血清は250 ffu /mlで80 倍、25 ffu/mlで320倍となった (B) 。

考察

ウイルスや細菌等の微生物は、それらが複製、増殖する過程で、一定の頻度で遺伝子に変異が起こる。変異は遺伝子の様々な部位で起こるため、微生物集団には、遺伝子に多様な変異をもつ微生物が共存することになる。この多様性をもつ集団のことを、“quasispecies” と呼ぶ [13]。quasispecies を構成する微生物のなかには、もとの微生物に比べて病原性が極めて高くなったり、免疫系を回避するようになったり、また、抗生物質や抗ウイルス薬に耐性を示したりするように変異したものが出現することがある [18, 19]。これらの変異は微生物の病原性を高めることにつながるため、感染症対策を考える際、quasispecies の存在を前提として考える必要がある。また、微生物の基礎研究の場合には、ウイルスや細菌を培養し、集団としての微生物の性状を解析することが多い。従って、培養した微生物集団における quasispecies の存在に常に配慮する必要がある。

ウイルスは、細胞に吸着して細胞内に取り込まれ、その後、ゲノムの複製や構成蛋白の翻訳が行われ、新しいウイルス粒子が完成し、最後に細胞外に放出される。この侵入・脱殻過程で、ウイルス粒子のエンベロープ膜と細胞内器官の膜との融合が起きる。この融合は、ウイルス蛋白、特に、ウイルス粒子の外側に飛び出しているスパイク状のエンベロープ糖蛋白が仲立ちとなっている。そして、膜融合の多くが低 pH によって誘導されることが明らかになっている [3]。このため、ウイルス蛋白が膜融合活性を誘導するメカニズムに関する研究は、ウイルス増殖メカニズムの解析に重要な知見を与える。また、ウイルスは感染細胞の代謝系を利用して増殖することから、このウイルス増殖メカニズムの解析は、細胞生物学の知見を得ることにも利用されている。

一方、ウイルスが感染した組織培養細胞を低 pH 条件にさらすと、感染細胞同士が融合することが知られている [24]。この低 pH 依存性細胞融合も、感染細胞の細胞膜上のウイルスエンベロープ糖蛋白によって引き起こされる。このため、低 pH 依存性細胞融合の解析を通して、エンベロープ糖蛋白の膜融合活性の解析が行われている [16, 21]。

重症熱性血小板減少症候群ウイルス（SFTSV）は、ブニヤウイルス科フレボウイルス属に分類される RNA ウイルスである。フレボウイルス属に分類される他の多くのウイルスと同様、SFTSV も、感染細胞中でエンドソーム膜とウイルスエンベロープ膜が低 pH 条件下で膜融合を起こすと考えられ、また、感染細胞同士の融合が低 pH 条件下で引き起こされることが報告されている [22]。

本研究では、わが国で発生した SFTS 患者から初めて分離されたウイルスである YG1 株を用いた。当初の実験において、YG1 株を Vero E6 細胞に感染させ低 pH 依存性細胞融合を誘導したところ、一部の細胞のみが細胞融合像を呈し、多くの細胞には変化が認められなかった。しかし、IFA 法で解析すると全ての細胞が感染し、ウイルス抗原を発現している様子が観察された。低 pH 依存性細胞融合が一部の感染細胞でしか認められなかったことか

ら、YG1 株が、低 pH 依存性細胞融合活性において異なる性質を持つサブストレインの混合物、いわゆる quasispecies を構成していると考えられた。そこで、本研究では、感染細胞の低 pH 依存性細胞融合活性を指標とした限界希釈法によって、サブストレインの単離を試み、3 株のサブストレイン、A4、B7、および E3 株の樹立に成功した。3 株は異なった低 pH 依存性細胞融合活性を示し、A4 株と B7 株では高く、E3 株では低かった。また、親株である YG1 株はプラークの形状も大型から小型まで様々であったが、A4 株と B7 株では大型、また、E3 株では小型の均一な大きさのプラークを形成した。すなわち、プラークの形状からも親株 YG1 が quasispecies を構成していることが明らかであった。用いた YG1 株は、組織培養細胞で 3 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。

A4、B7、および E3 株は、細胞融合活性の強弱とプラークの大きさ以外にも、中性または酸性条件下における細胞傷害活性（CPE）の強弱、また、組織培養細胞での増殖の速さにも相違が認められた。これらの性状の相違の原因を解析するため、A4、B7、および E3 株の L、M、S 分節 RNA の塩基配列を決定し、親株 YG1 株の塩基配列と比較した。低 pH 依存性細胞融合活性の高い A4 株と B 7 株は、細胞融合活性の低い親株 YG1 株と比較して、2 ヶ所のアミノ酸変異、328 番目の Y から H (328H) と 624 番目の R から W (624W) の変異がエンベロープ糖蛋白（GP）にあることが明らかとなった。さらに、328H および 624W の変異をそれぞれ単独および同時に持つ組換え GP を発現させ、発現細胞での低 pH 依存性細胞融合活性を解析したところ、624W 単独の変異が導入された組換え GP が強い細胞融合を誘導した。このため、この変異が低 pH 依存性細胞融合活性に関与していることが明らかとなった。

一般にブニヤウイルスの M 分節は単一の ORF を持ち、これは GP の前駆体をコードしている。前駆体は翻訳後に切断・修飾され、Gn と Gc の 2 つの膜蛋白となり、ヘテロダイマーを形成すると考えられている[23]。フレボウイルス属の代表ウイルスであるリフトバレー熱ウイルス（RVFV）では fusion loop が、Gc の N 末端部位のアミノ酸番号 820−830 に位置することが報告されている[24]。そして、RVFV の fusion loop の W や F が融合の対象となる膜への直接の侵入に関与すると考えられている。一方、YG1 株と RVFV の Gc のアミノ酸配列の比較から、YG1 株のアミノ酸番号 693-703 の部位が RVFV の fusion loop に相当すると考えられる。しかし、本研究で見出された、細胞融合活性に関わる変異 624W は、この fusion loop 相当部位近傍ではあるが、相当部位からは離れている。このため、fusion loop の細胞融合における機能について、W が立体的に影響を与えている可能性が考えられる。特に、W は、動物由来の蛋白質において出現頻度の最も低い比較的稀なアミノ酸であるが、大型で疎水性の側鎖を持つことから、蛋白質の立体構造の維持に関与すると考えられている。すなわち、YG1 株では、この 624W が、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た。そして、同時に、大型のプラーク形成に関連すると考えられた。

現在までに東アジアの国々で分離されたSFTSVは8 つのgenotypeに分類されることが報告されている[25]。そこでこの 8 つの genotype から代表的な SFTSV 株を各 1 株選び、GP のアミノ酸配列の fusion loop 相当部位および 624 番目について比較した。同時に SFTSV 以外のダニ由来フレボウイルスである Heartland ウイルス、Bhanja ウイルス、Palma ウイルス、蚊由来フレボウイルスである RVFV とも比較した (図 11A, B)。その結果、fusion loop 相当部位はSFTSV内で良く保存されていた。また、YG1株を含むSFTSV 9 株の中 8 株が 624 番目に、YG1株と同じRを持ち、日本由来の1 株（100A株）のみKをもつことが明らかとなった。KとRはどちらも塩基性アミノ酸であり、このRからKへ変異がGPの電荷に与える影響は大きくないことが予想された。

アミノ酸配列の比較の結果、中国および日本で分離された SFTSV 株のほとんど全てが、細胞融合活性の弱いタイプのアミノ酸を共有して保有していた。これらのウイルスはSFTS患者から分離された病原性株であると考えられる。すなわち、病原性の発現と細胞融合活性とは必ずしも関連しないのかもしれない。むしろ弱い細胞融合活性を持つウイルスの方が、増殖性・病原性が高い可能性も考えられる。本実験においても、限界希釈法によるサブストレインの樹立実験では、E3 株は A4 株と B7 株よりも高い希釈倍率のプレートから単離された。このため、YG1 親株においても、quasispecies 中では E3 株が最も多く含まれており、病原性を担っていると考えられた。

本研究において各分節の遺伝子構成を図 12 に示すように検証した。その結果、A4 株はE3株のL分節とB7株のM分節を持つ組換えウイルスとみなすことができた。それぞれの変異については同時に樹立したサブストレイン、B7 株の場合 A5、D8、E7、G8、およびH6株が、A4株の場合はB4、D2、G1、およびH3株が同一の変異を持つことを確認している。A4株とE3株ではS分節およびL分節のコードするN蛋白およびL蛋白が共通しており、GPのみが異なる。A4株はE3株に比較して低pH依存性細胞融合活性が高く、Vero E6細胞での増殖が遅いという特徴を持つ。これらの特徴はA4株とE3株のGPの差に由来する。A4 株の増殖性が低いことから、328H/624W の変異を持つ細胞融合活性の高いA4株のGPは、粒子形成や細胞内輸送の異常のような、ウイルス増殖における何らかの不利な性質を持つと予想された。

また、A4株とB7株ではSおよびM分節が共通でL分節のみが異なる組換えウイルスと考えることができる。Vero E6細胞での増殖を比較したところ、B7株はA4株に比べて速い増殖を示した。プラーク形成試験においては、B7株はA4株に比べて、速やかにプラークを形成し、プラーク局所の細胞にはCPEが認められた。A4株とB7株ではL分節のみが異なることから､L分節のコードするRNA依存性RNAポリメラーゼによって増殖性、CPEの差が生じていると考えられる。図13Bに示すようにL蛋白の中央部にはブニヤウイルスに共通する部位があり[26]、またさらにその中でもマイナス鎖RNAウイルスに保存された部位が見いだされている[27]。この部位はおそらくポリメラーゼの機能の中心的役割を果たす部分であろうと考えられている。しかしながら、本研究で見出されたB7株に特異的な

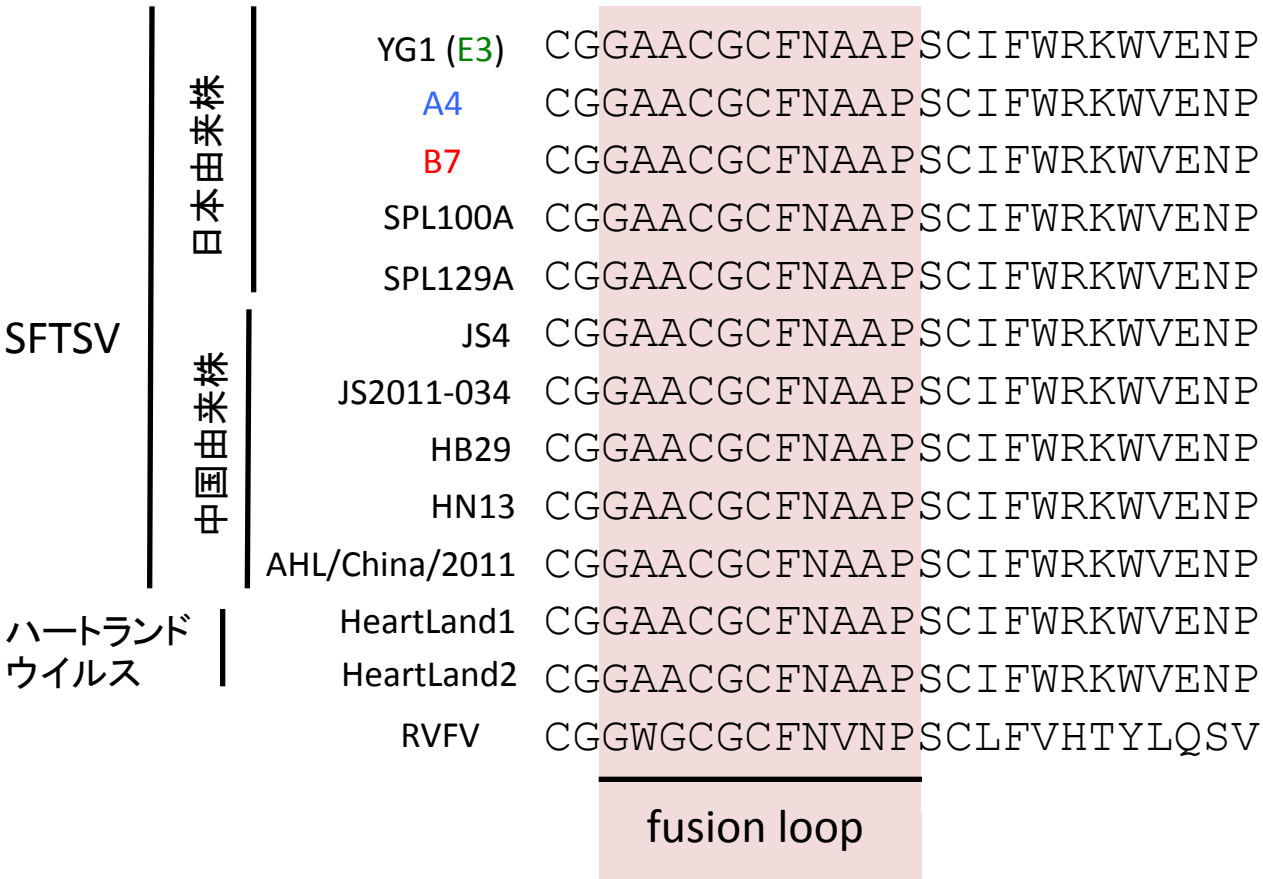


図11A RVFVのfusion loop相当部位におけるアミノ酸配列の比較

RVFVのfusion loopに相当する部位のアミノ酸配列は、SFTSVの8 つのクレードのみでなく、近縁ウイルスであるHeartland virusでも保存されている。

比較に用いたウイルスのアミノ酸配列の登録番号を以下に示す。SFTSV YG1 (AB817987), SPL100A (AB985313), SPL129A (AB985326), JS4 (HQ141605), JS2011-034 (KC505133), HB29 (HM745931), HN13 (HQ141599), AHL/China/2011 (JQ670930), Heartland virus 1 (JX005844), Hertland virus 2 (JX005845), Bhandjya virus (JQ956377), Palma virus (JQ956380), Massilia (EU725772), Toscana (EU003180), Punta Toro (DQ363407), Sandfly fever (U30500), およびRVFV (DQ380193)

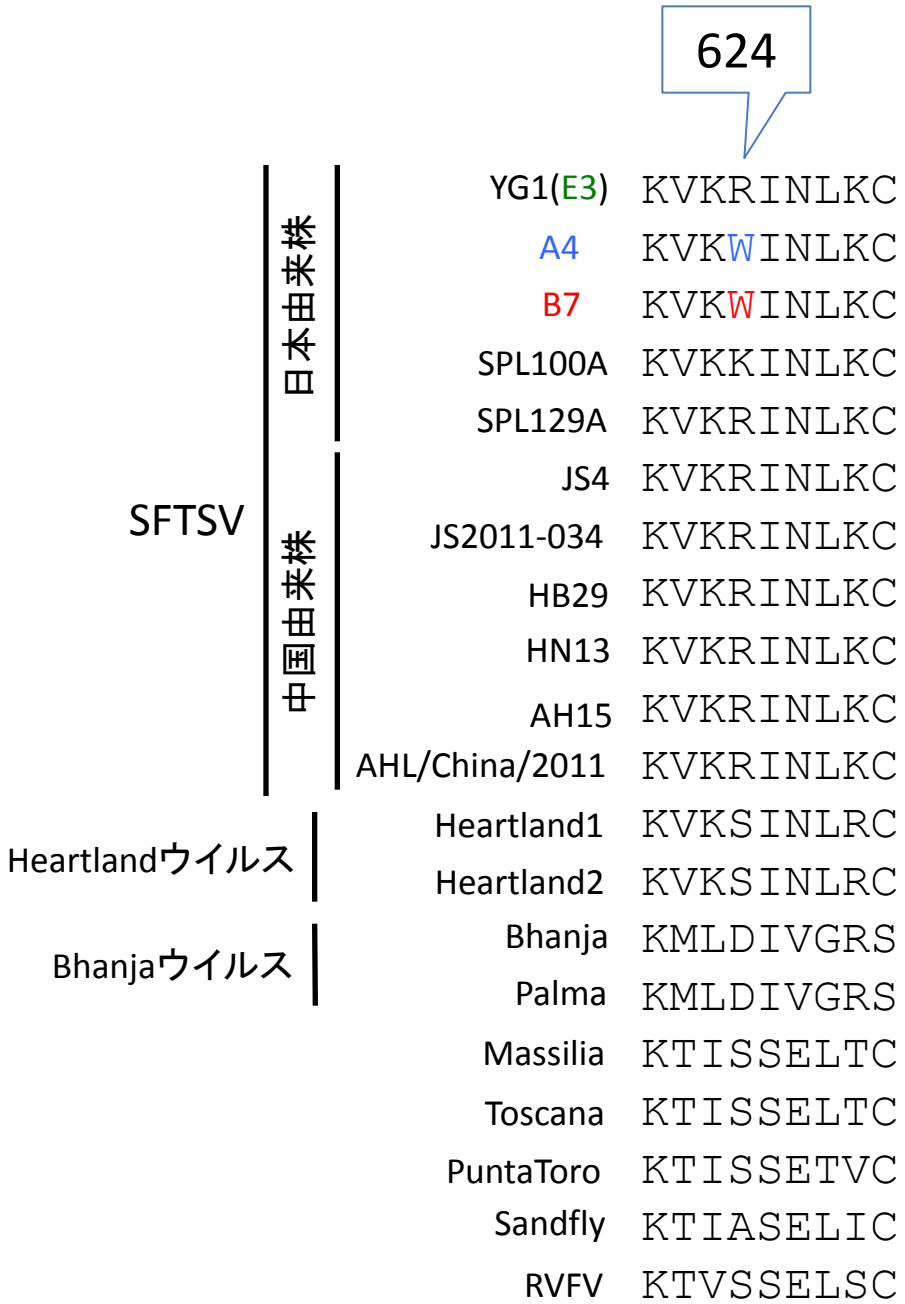


図11B 624番目のアミノ酸近傍におけるアミノ酸配列の比較

アミノ酸番号624 番相当部位は、SFTSVの8 つのクレードのうち7 つでRが保存されている。残りの1 つのクレードでも、Rと同じく塩基性アミノ酸であるKに置換されている。

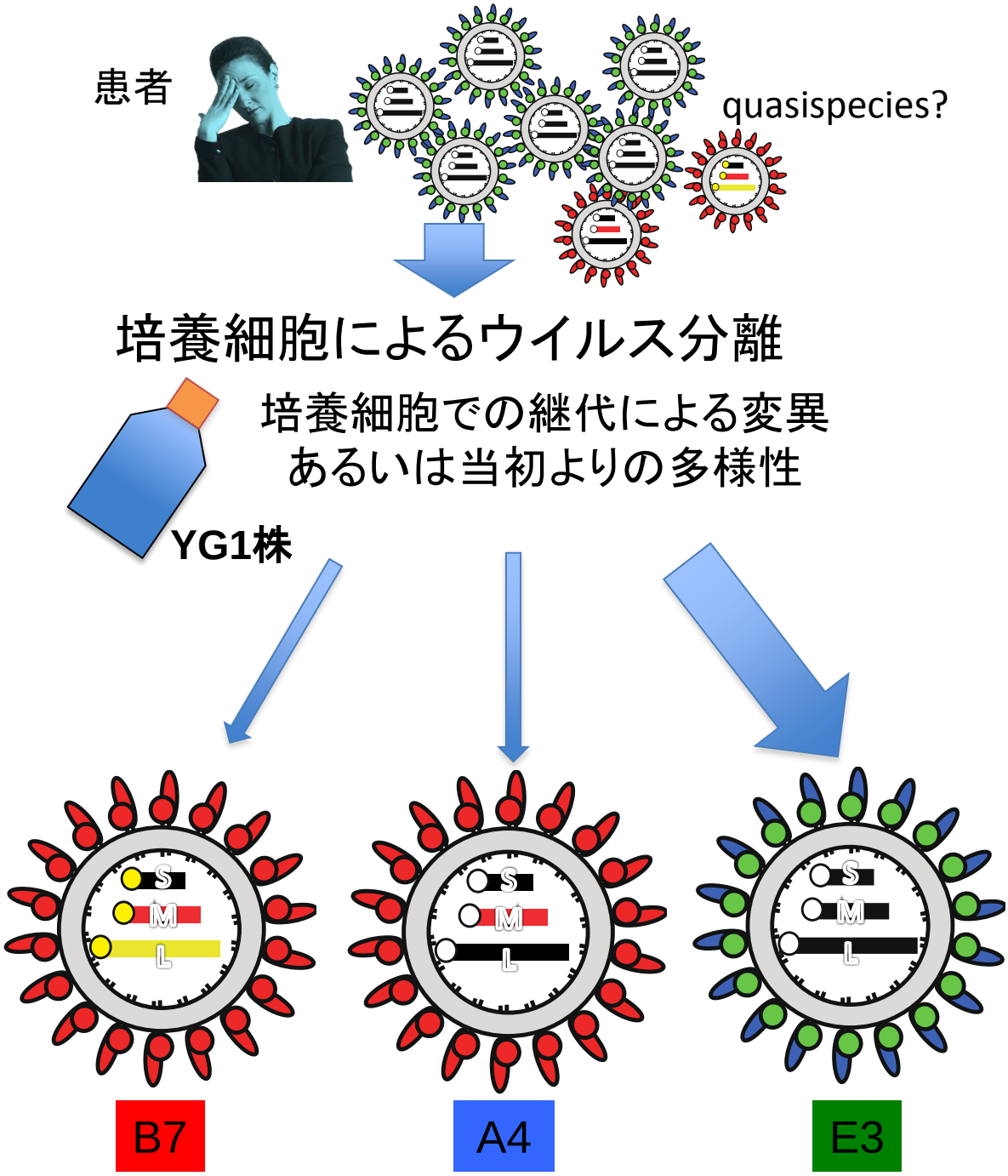


図12　サブストレインの遺伝子構成

A4は、B7と同じM分節とE3と同じL分節をもつ。

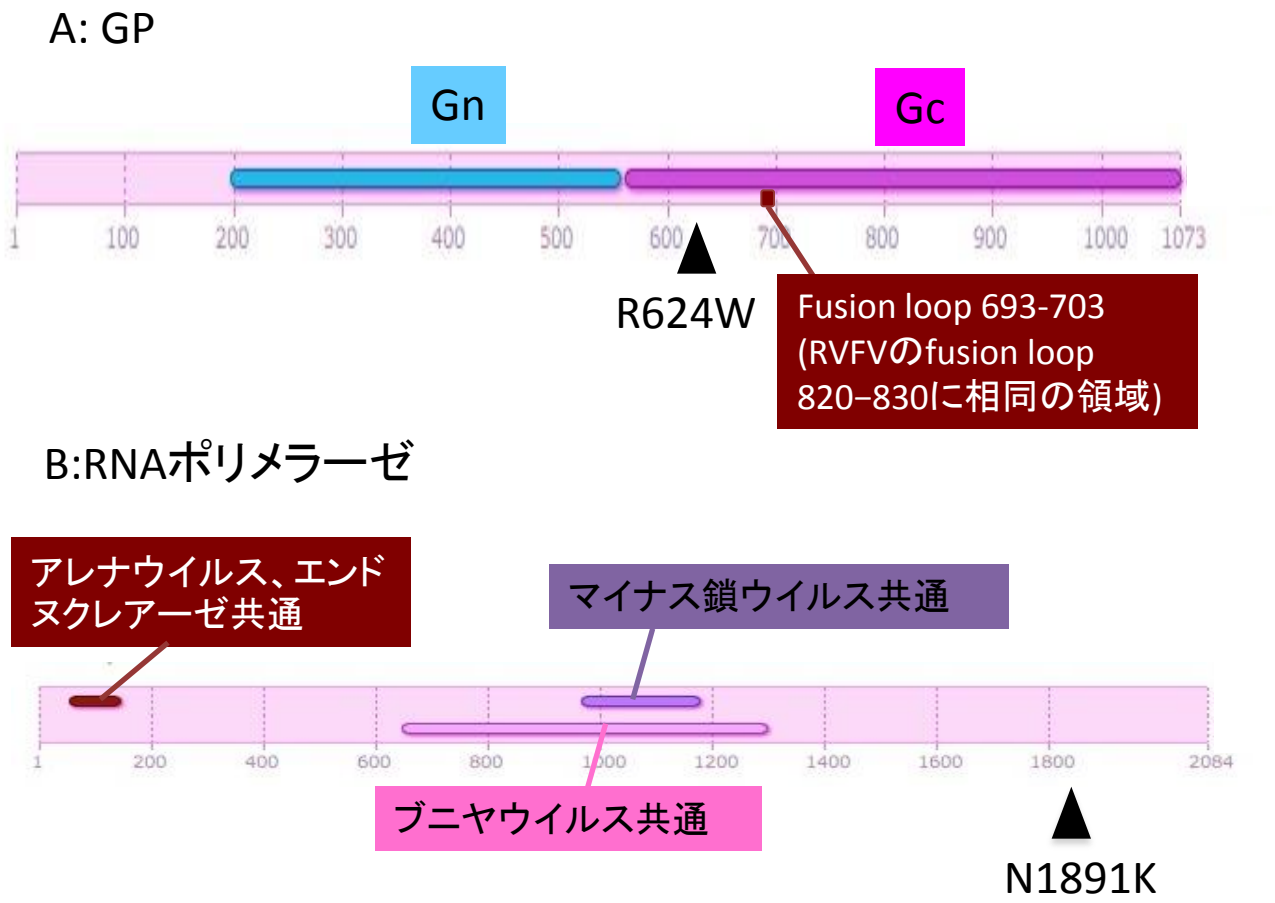


図13　ウイルス構成蛋白の構造と機能とサブストレインにみられた変異

YG1株のM分節およびL分節の遺伝子の登録データ(AB817987, AB817987)を用いて、蛋白ドメインの検索を行った(InterPro, http://www.ebi.ac.uk/interpro/sequencesearch/) 。AにGPのドメイン検索結果と、フレボウイルスGPのfusion loopとして報告されている領域(Dessau, M. et al 2013)と、A4株B7株でみられた変異R624Wを示す。BにRNAポリメラーゼのドメイン検索の結果とB7株でみられた変異N1891を示す。

1891K の変異はこの部位からは外れた C 末端側にある。この変異が L 蛋白の機能にどのような影響を与えることによりウイルスの増殖性を増しているのかは、現在のところ不明である。

B7 株や A4 株のようなサブストレインはどのように出現したのだろうか。この多様性が患者の体内で既に起こっていたのか、あるいは培養細胞に適応する段階で起こったのかは本研究の結果からは明らかではない。YG1 株は患者の血液から分離され、初代分離の段階で次世代シーケンサを使用して遺伝子配列が明らかにされ、その配列がデータベース上に登録された。この配列が本研究で得られた E3 株の配列と同一であったことから、初代培養時点ではウイルスの大多数は E3 株に類するウイルスであったと考えられる。本研究で用いた YG1 株は三代継代したウイルスであり、この時点では少なくとも B7 株や A4 株をわずかに含む多様性を持っていた。ブニヤウイルス科のウイルスは 3 本の分節遺伝子を持つため、複数のウイルス株が同時に同じ細胞に感染した場合、それぞれの遺伝子が異なる株の間で組み変わってウイルス粒子に取り込まれる、遺伝子再集合（リアソートメント）と呼ばれる現象が起こることが知られている [28]。A4 株や B7 株の出現メカニズムについて考えると、おそらく両株の M 分節の起源は共通している。しかしながら、本研究で得られた A4 株の M 分節の配列には B7 株にはみられない 1992 番目の塩基の T から A へのサイレント変異 T1992A が存在する。ウイルス集団における多様性獲得のメカニズムを解明するためには、点突然変異と遺伝子再集合の生じた時間的経過を明らかにする必要がある。より多くのサブストレインを樹立し、系統解析を行うことが必要であると考えられる。

変異を伴った多様なウイルスの集団は、協調的な相互作用を通じて、お互いに維持され、最終的には病原性を左右すると考えられている。quasispecies であることで、増殖能の低い変異ウイルスを集団内に維持することができると考えられる [19]。本研究においては、親株として用いた YG1 株が既に quasispecies となっていたことが明らかとなった。この YG1 株中に、ウイルスの増殖に不利な変異 328H と 624W を持つ GP の遺伝子が失われずに存続できたのは、quasispecies となっていたからかもしれない。一方で、増殖に有利であると予想される 1891K の変異を持つ L 分節を持つウイルスが今後の継代に伴って多数となってゆくかどうかも明らかにする必要があると考えられる。

quasispecies の研究は、特にウイルスの分野において精力的に進められてきた。 ウイルスは複製過程で変異が導入される確率が高いため、quasispecies 現象は避けられない問題である。ウイルスが増殖・複製する際の突然変異率の高さは、強毒性ウイルスの誕生や薬剤耐性ウイルスの発生につながる [18, 19]。そのため、このようなウイルスの変異体は、ウイルス疾患の疫学や治療で極めて大きな問題となり注目されてきた。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。現在、SFTS については特異的な抗ウイルス薬は報告されていないが、研究は進められている。将来的には、臨床的にも SFTSV の quasispecies 現象への注意が必要であると考えられる。

また、本研究で確立した B7 株は、2.5 × 10^6 ffu/ml の感染価を示すウイルスストックがプラーク法では 4.0 × 10^6 pfu/ml の感染価を示し、フォーカス法とプラーク法でほぼ同等の結果を得ることができた。すなわち、B7 株が顕著なプラーク形成能を示すことが明らかとなったことから、B7 株はプラーク中和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る。また、B7 株は顕著な CPE を示すことから、CPE を指標とする ID50 法による試験も簡便であり、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。

総括および結論

- 患者検体から合計 3 代継代された YG1 株から 3 つのサブストレインが分離され、YG1 株が quasispecies を形成していたことが明らかになった。
- 3 つのサブストレイン B7、A4、E3 は細胞融合能、CPE 活性、プラーク形成能、増殖速度に差を示し、遺伝子配列も異なっていた。B7 は細胞融合能、CPE 活性が高く、早期に大型のプラークを形成し、増殖はやや速かった。アミノ酸配列はデータベース上の YG1 配列に比べ GP に Y328H と R624W、ポリメラーゼに N1891K という変異が認められた。A4 は細胞融合能、低 pH における CPE 活性が高く、プラークの形成が遅く、増殖は遅かった。アミノ酸配列はデータベース上の YG1 配列に比べ GP に Y328H と R624W の変異が認められた。E3 は YG1 親株の大多数を占めたと考えられ、細胞融合能、CPE 活性は低く、プラークの形成は遅く、増殖は速かった。データベース上の YG1 配列と比べ、アミノ酸配列に変異は認められなかった。
- CPE 活性の高い B7 を用いて、簡便な中和試験を行うことができた。

今回の研究から、患者体内において YG1 が quasispecies を形成していた可能性が示唆される。quasispecies の存在は病原性や治療効果に影響を及ぼすため、今後の臨床において常に考慮する必要がある。

トランスフェクション実験や各サブストレインの比較によって、GP の Y328H と R624W が低 pH 依存性細胞融合能に関与し、ポリメラーゼの N1891K が増殖速度に関与していることが示唆された。それぞれのアミノ酸変異が性質の変化を起こす分子学的機序は未だ明らかではないが、今後 GP やポリメラーゼの活性部位などの研究に応用することができると考えられる。また、ポリメラーゼに N1891K を持つ増殖速度の速いサブストレインが今後の継代によって増加していくのかの研究も必要である。

今回は B7 と YG1 感染血清を用いて中和試験を行い、良好な結果を得た。今後、各サブストレインの抗原性の差異を調べる必要がある。また、中和試験以外の血清学的診断への応用も期待できる。

謝辞

本研究にあたり、YG1 株を、山口大学共同獣医学部前田健教授に分与していただきました。患者から分離された後に継代されていない（合計 1 代継代）という継代歴の少ないウイルスを分与していただいたことが、今回の研究では重要な意味を持ちました。深く感謝致します。

遺伝子配列の解析の際には、Genetic Analizer 3130 による解析を北海道大学人獣共通感染症センター大沼愛子技師に行っていただきました。御多忙の中、度重なる依頼に答えていただき、深く感謝致します。

本研究の機会を与えてくださり、未熟者である著者に丁寧な御指導・御協力いただきました、指導教官である北海道大学大学院医学研究科病原微生物学分野有川二郎教授、吉松組子准教授、清水健太助教、津田祥美助教、および当研究室のメンバーに心より感謝致します。

本研究と発表において、御多忙の折、査読と審査をいただきました、主査 村上正晃教授(分子神経免疫学分野）、副査 渡邉雅彦教授（解剖発生学分野）、副査 有賀正教授（小児科学分野）、副査 森松組子准教授（病原微生物学分野）に、深く感謝致します。

私事ではありますが、著者の健康管理について御指導・御協力いただきました主治医の方々に深く感謝致します。著者が基礎研究の道に進むことに関し肯定的な態度で接してくださった、首藤医師、木村医師、山本博士に心から感謝致します。著者に関わってくださった患者さん達に深く感謝します。

本研究に関わるウイルス達に深く感謝致します。

本研究と著者に関わる全ての方々に感謝致します。

引用文献

1. Xu, B. *et al.* Metagenomic analysis of fever, thrombocytopenia and leukopenia syndrome (FTLS) in Henan Province, China: discovery of a new bunyavirus. PLoS Pathog. 7, 1-10 (2011).
2. Yu, X. J. et al. Fever with thrombocytopenia associated with a novel bunyavirus in China. N. Engl. J. Med. 364, 1523-1532 (2011).
3. Schmaljohn C. S. & Nichol S. T. Bunyaviridae. In, Fields VIROLOGY (David M. Knipe & Peter M. Howley) Wolters Kluwer, 1741-1789, 2007.
4. Takahashi, T. et al. The first identification and retrospective study of Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome in Japan. J. Infect. Dis. 209, 816-827 (2014).
5. 西條政幸ら 国内で初めて診断された重症熱性血小板減少症候群患者. IASR 34, 40-41 (2013).
6. Ding, F. *et al.* Epidemiologic features of severe fever with thrombocytopenia syndrome in China, 2011-2012. Clin. Infect. Dis. 56, 1682-1683 (2013).
7. 山岸拓也ら 2013 年に発症した重症熱性血小板減少症候群 40 例のまとめ―感染症発生動向調査より. IASR 35, 38-39 (2014).
8. Zhao, L. *et al.* Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus, Shandong Province, China. Emerg. Infect. Dis. 18, 963-965 (2012).
9. ＜速報＞重症熱性血小板減少症候群（SFTS）ウイルスの国内分布調査結果（第一報）. IASR (2013)
10. Bouloy, M. *et al.* Genetic evidence for an interferon-antagonistic function of rift valley fever virus nonstructural protein NSs. J. Virol. 75, 1371-1377 (2001).
11. Savellini, G. G. *et al.* Toscana virus induces interferon although its NSs protein reveals antagonistic activity. J. Gen. Virol. 92, 71-79 (2011).
12. Qu, B. *et al.* Suppression of the interferon and NF-kappaB responses by severe fever with thrombocytopenia syndrome virus. J. Virol. 86, 8388-8401 (2012).
13. Eigen, M. Selforganization of matter and the evolution of biological macromolecules. Naturwissenschaften 58, 465-523 (1971).
14. Martell, M. *et al.* Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution. J. Virol. 66, 3225-3229 (1992).
15. Cichutek, K. *et al.* Development of a quasispecies of human immunodeficiency virus type 1 in vivo. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 89, 7365-7369 (1992).
16. Ogino, M. *et al.* Cell fusion activities of Hantaan virus envelope glycoproteins. J.

Virol. 78, 10776-10782 (2004).
17. Hitoshi, N., Ken-ichi, Y. & Jun-ichi, M. Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. Gene 108, 193-199 (1991).
18. Pawlotsky, J. M. *et al.* Genetic complexity of the hypervariable region 1 (HVR1) of hepatitis C virus (HCV): influence on the characteristics of the infection and responses to interferon alfa therapy in patients with chronic hepatitis C. J. Med. Virol. 54, 256-264 (1998).
19. Vignuzzi, M. *et al.* Quasispecies diversity determines pathogenesis through cooperative interactions in a viral population. Nature 439, 344-348 (2006).
20. Hernandez, L. D. & L. R. Hoffman, et al. Virus-cell and cell-cell fusion. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 12, 627-661 (1996).
21. Arikawa, J., Takashima, I. & Hashimoto, N. Cell fusion by haemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) viruses and its application for titration of virus infectivity and neutralizing antibody. Arch. Virol. 86, 303-313 (1985).
22. Tani, H. Analyses of Entry Mechanisms of Novel Emerging Viruses Using Pseudotype VSV System. Trop. Med. Health 42, 71-82 (2014).
23. Huiskonen, J. T., Överby, A. K., Weber, F. & Grünewald, K. Electron cryo-microscopy and single-particle averaging of Rift Valley fever virus: evidence for GN-GC glycoprotein heterodimers. J. Virol. 83, 3762-3769 (2009).
24. Nayak, V. *et al.* Crystal structure of dengue virus type 1 envelope protein in the postfusion conformation and its implications for membrane fusion. J. Virol. 83, 4338-4344 (2009).
25. Yoshikawa, T. *et al.* Phylogenetic and Geographic Relationships of Severe Fever With Thrombocytopenia Syndrome Virus in China, South Korea, and Japan. J. Infect. Dis. 212, 889-898 (2015).
26. Roberts, A. *et al.* Completion of the La Crosse virus genome sequence and genetic comparisons of the L proteins of the Bunyaviridae. Virology 206, 742-745 (1995).
27. Bruenn, J. A. A structural and primary sequence comparison of the viral RNA-dependent RNA polymerases. Nucleic Acids Res. 31, 1821-1829 (2003).
28. Gentsch, J. et al. Formation of recombinants between snowshoe hare and La Crosse bunyaviruses. J. Virol. 24, 893-902 (1977).