



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Studies on molecular determinants for susceptibilities of bats to filoviruses [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	高館, 佳弘
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(獣医学)
Dissertation Number	甲第14110号
Issue Date	2020-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/78576
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Yoshihiro_TAKADATE_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨
Abstract of the dissertation

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）

氏名：高館 佳弘

Name

学位論文題名
The title of the doctoral dissertation

Studies on molecular determinants for susceptibilities of bats to filoviruses
(フィロウイルスに対するコウモリの感受性を決定する分子基盤に関する研究)

< abstract >

フィロウイルス科は進化系統学的に 5 属 (*Ebolavirus* 属、*Marburgvirus* 属、*Cuevavirus* 属、*Striavirus* 属、*Thamnovirus* 属) に分類され、計 9 種類のウイルス (*Ebolavirus* 属; Ebola virus [EBOV]、Sudan virus、Taï Forest virus、Bundibugyo virus、Reston virus、*Marburgvirus* 属; Marburg virus [MARV]、*Cuevavirus* 属; Lloviu virus [LLOV]、*Striavirus* 属; Xilǎng virus、*Thamnovirus* 属; Huángjiāo virus) が見つかっている。EBOV および MARV を代表とする、*Ebolavirus* 属および *Marburgvirus* 属に含まれるウイルスはヒトを含む霊長類に重篤な出血熱を引き起こす事が知られている。フィロウイルス感染症のヒトでの報告は中央および西アフリカ内に限定しているが、アジアやヨーロッパ諸国に生息する動物におけるフィロウイルスの感染例も報告されている。

コウモリはフィロウイルスの自然宿主として有力視されているが、コウモリ種間でのフィロウイルスに対する感受性が大きく異なることが示唆されている。しかし、感受性の違いを決定する因子は殆ど不明である。本学位論文ではフィロウイルスのレセプターの一つである Niemann-Pick C1 (NPC1) とウイルス粒子表面糖蛋白質(GP) との相互作用に着目し、コウモリのフィロウイルスに対する感受性を決定する分子機構を解析した。

第一章では、ヒトを含む霊長類に高い病原性を示す EBOV および MARV に対するコウモリの感受性を決定する分子機構を解析した。まず、異なる 8 種のコウモリに由来する細胞を用いて、EBOV および MARV の GP を持つシュードタイプ水疱性口炎ウイルスならびに感染性の EBOV および MARV に対する感受性を比較した結果、ヤエヤマオオコウモリ由来の細胞株 FBKT1 およびストローオオコウモリ由来の細胞株 ZFBK13-76E が、それぞれ MARV および EBOV に対して殆ど感受性を示さない事が分かった。そこで、GP のレセプター結合部位が相互作用する NPC1 分子上のドメイン C 領域(フィロウイルスのレセプターとしての機能に重要なドメイン) に存在する loop 領域のアミノ酸配列 (420 番目から 428 番目[loop1 領域]、および 501 番目から 508 番目のアミノ酸残基 [loop2 領域]) を、8 種のコウモリ間で比較したところ、FBKT1 および ZFBK13-76E の loop 領域には、他のコウモリにはみられない特徴的な配列が認められた (FBKT1 では loop1 領域内に T425、E426、T427、

ZFBK13-76E では loop2 領域内に F502、T505)。次に、EBOV および MARV の両方に対して高い感受性を示すヒト由来の細胞株 HEK293T の NPC1 の loop 領域にそれらの特徴的な配列を導入した NPC1 変異体を作出し、NPC1 をノックアウトした Vero E6 細胞に発現させ、EBOV および MARV に対する感受性を比較した。その結果、FBKT1 と ZFBK13-76E の配列を導入した NPC1 変異体を発現する細胞では、それぞれ MARV および EBOV に対する感受性の低下が見られた。また、FBKT1 および ZFBK13-76E の NPC1 の loop 領域に HEK293T 由来の配列を導入した NPC1 変異体を発現させた細胞では、MARV および EBOV に対する感受性に差が認められなかった。さらに、loop 領域と相互作用する GP のレセプター結合領域に MARV と EBOV 間で異なるアミノ酸が存在することから、それらを入れ替えたウイルスを作出し、FBKT1 および ZFBK13-76E における感染性を比較した結果、MARV の GP の Q126 あるいは EBOV の GP の A148 が FBKT1 あるいは ZFBK13-76E におけるウイルスの感染性に関与することが分った。さらに、*in silico* 構造解析ならびに 1 アミノ酸変異を持つ NPC1 発現細胞を用いた解析を実施した結果、NPC1 の loop 領域上に存在する E426 および F502 が、それぞれ MARV に対する FBKT1 の感受性および EBOV に対する ZFBK13-76E の感受性の決定において中心的な役割を果たしている事が示唆された。以上の結果により、コウモリ種間における NPC1 loop 領域のアミノ酸配列の僅かな違いが MARV および EBOV に対する感受性を決定する重要な因子であることが示唆された。

2002 年、スペインの洞窟内に生息する食虫コウモリの死体から、*Ebolavirus* 属および *Marburgvirus* 属のウイルスとは進化系統学的に異なるフィロウイルスが発見され、LLOV と名づけられた。第 2 章では LLOV に対するコウモリの感受性を比較し、異なる感受性を決定する分子機構を解析した。まず、異なる 8 種のコウモリに由来する細胞を用いて、EBOV および LLOV の GP を持つシュードタイプウイルスに対する感受性を比較した。その結果、食虫コウモリである *Miniopterus sp* 由来の細胞株 SuBK12-08 細胞が LLOV に高い感受性を示すが、EBOV には殆ど感受性を示さない事が判明した。そこで、NPC1 分子の loop 領域のアミノ酸配列を、8 種のコウモリ間で比較したところ、SuBK12-08 の loop1 領域の近傍には、他のコウモリにはみられないアミノ酸残基 K416 が確認された。次に HEK293T 由来の NPC1 に SuBK12-08 由来の NPC1 のドメイン C 領域を導入したキメラ NPC1 を作出し、NPC1 をノックアウトした Vero E6 細胞に発現させ、EBOV および LLOV に対する感受性を比較した。その結果、SuBK12-08 由来の NPC1 ドメイン C を発現させた細胞は、ヒトおよび他種のコウモリ由来の NPC1 を発現させた細胞に比べて、LLOV に対する感受性の上昇および EBOV に対する感受性の低下が確認された。また、GP の NPC1 結合領域に EBOV および LLOV 間で複数の異なるアミノ酸配列が存在する事から、それらを交換したウイルスの SuBK12-08 への感染性を比較した結果、A150 および K151 が SuBK12-08 における LLOV の感染性に関与している事が判明した。以上の結果により、コウモリ種間における NPC1 のアミノ酸配列の違いが LLOV に対する細胞感受性を決定する因子である事が示唆された。

本研究により、フィロウイルスの宿主域を決定するメカニズムの一端が明らかとなった。フィロウイルスの生態の解明は、野生動物からヒトへのウイルス伝播を未

然に防ぐために重要である。今後、フィロウイルスによる感染症の予防と制圧のためには、その自然宿主とヒトへの伝播を仲介する感受性動物の特定が必要となる。