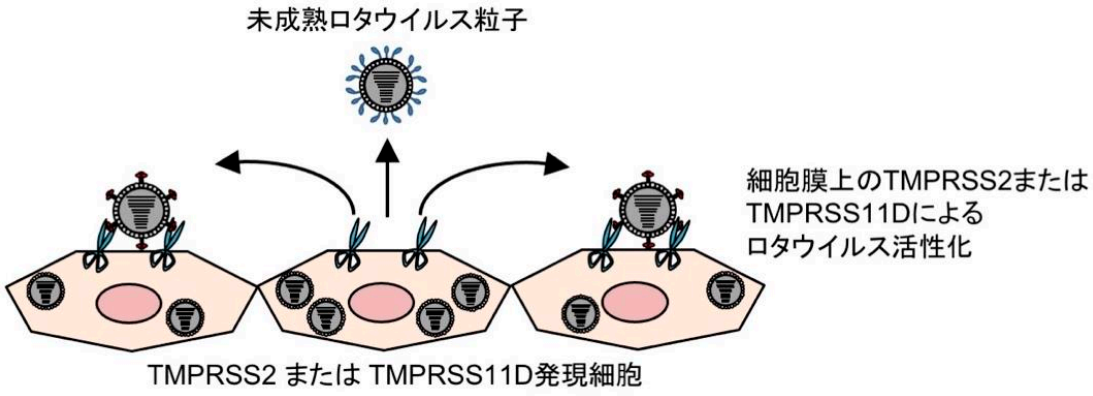
136　遺伝子導入細胞を用いた感染性ウイルスサルベージ戦略	佐々木　道仁

【目的】A 群ロタウイルス（ロタウイルス）は、ヒトを含む動物に重篤な下痢症を惹起する。ロタウイルスは、ウイルス粒子を構成する外殻スパイクタンパク VP4 が外来性のプロテアーゼにより VP5*と VP8*に開裂することにより感染性を獲得する。本研究では、インフルエンザウイルスやコロナウイルスの糖タンパクを開裂、活性化することにより、ウイルス感染を促進することが報告されている宿主の膜貫通型セリンプロテアーゼ（TTSP：Type Ⅱ transmembrane serine protease）に着目し、ロタウイルスの感染を促進する膜貫通型セリンプロテアーゼを探索した。また、同定した膜貫通型セリンプロテアーゼを恒常発現させた細胞を用いてロタウイルスの高効率分離手法の確立を　試みた。

【方法】膜貫通型セリンプロテアーゼ遺伝子（TMPRSS2、TMPRSS11D、TMPRSS11E または TMPRSS13）をサル腎由来 MA104 細胞へ導入し、恒常発現細胞を作製した。各細胞へサルロタウイルスを接種し、ウイルス感染および産生される子孫ウイルス量を解析した。次に、TMPRSS2 と TMPRSS11D を共導入し、ヒトロタウイルス、ウシロタウイルスに高い感受性を有する細胞 MA104-T2T11D を作製した。さらに、作製した MA104-T2T11D 細胞へ野外にて採集したげっ歯類糞便の懸濁液を接種し、ロタウイルスの分離を試みた。

【結果】TMPRSS2 および TMPRSS11D がロタウイルスのトリプシン非依存的感染を誘導する宿主のプロテアーゼであることが判明した。また、TMPRSS2 と TMPRSS11D を共発現させた MA104-T2T11D 細胞と回転培養を組み合わせることにより、ロタウイルスの増殖が強力に促進された。本法を用いたウイルス分離を行い、実際に野生のげっ歯類動物糞便からロタウイルスの分離に成功したことから、本研究で作製した MA104-T2T11D 細胞は、ロタウイルスの分離に有用であることが示された。

予想される細胞膜上の膜貫通型セリンプロテアーゼによるロタウイルス粒子活性化機構



136. 遺伝子導入細胞を用いた感染性ウイルスサルベージ戦略

佐々木　道仁

北海道大学 人獣共通感染症リサーチセンター 分子病態・診断部門

Key words：ロタウイルス，ウイルスタンパク質開裂，プロテアーゼ，ウイルス–宿主因子相互作用

緒　言

A 群ロタウイルス（ロタウイルス）は、ヒトを含む動物に重篤な下痢症を惹起する。ロタウイルス感染は世界中で認められ、年間 45 万人以上の乳幼児が本感染症により死亡している。ロタウイルスのゲノムは 11 分節の 2 本鎖 RNA から成る。2008 年、ロタウイルスの分類を担う国際組織 Rotavirus Classification Working Group により全 11 分節の塩基配列（フルゲノム）に基づく遺伝子型分類法が提唱された。本法の導入により、ヒト及び動物が保有するロタウイルスの全ゲノム解析と遺伝子型分類が進展し、ロタウイルスの遺伝的多様性が明らかとなりつつある。また、我々を含めた複数の研究者により、既知のロタウイルスとゲノム塩基配列が大きく異なり、既知の遺伝子型分類に当てはまらない遺伝子型（新規遺伝子型）のゲノムを有するロタウイルスの検出報告がなされている［1，2］。これら新規遺伝子型のロタウイルスがどのような種特異性を有しているか、既知遺伝子型のロタウイルスと類似の病原性を有しているか、既存のワクチンで感染防御が可能なのか、など多くの疑問が未解明である。これは、新規遺伝子型のロタウイルスの多くにおいて、感染性ウイルス粒子が分離されていないため、その生物学的性状が解析されていないことが原因である。従って、新規遺伝子型ロタウイルスを検出しても塩基配列解析の研究報告に留まることが多い。

ロタウイルスは、ウイルス粒子を構成する外殻スパイクタンパク VP4 が外来性のプロテアーゼにより VP5*と VP8*に開裂することにより感染性を獲得する［3］。したがって、培養細胞を用いたロタウイルスの感染実験では、VP4 の開裂を誘導するためセリンプロテアーゼの 1 種であるトリプシンを添加した無血清培地中にてロタウイルスを感染、増殖させる。一方、呼吸器や消化管組織に発現する膜貫通型セリンプロテアーゼ（TTSP：Type Ⅱ transmembrane serine protease）が、インフルエンザウイルスやコロナウイルスの糖タンパクを開裂、活性化することにより、ウイルス感染を促進することが報告されている［4，5］。そこで、本研究では、ロタウイルスの感染を促進する宿主の膜貫通型セリンプロテアーゼを探索し、同定した膜貫通型セリンプロテアーゼの機能を解析するとともに、同定した膜貫通型セリンプロテアーゼを恒常発現させた細胞を用いてロタウイルスの高効率分離手法の確立を試みた。

方法および結果

1.　ロタウイルスの感染を促進する膜貫通型セリンプロテアーゼの同定

レンチウイルスベクターを用いて膜貫通型セリンプロテアーゼ遺伝子（TMPRSS2、TMPRSS11D、TMPRSS11E または TMPRSS13）をサル腎由来 MA104 細胞へ導入し、恒常発現細胞を作製した。サルロタウイルス SA11 株を接種した各細胞をトリプシンを添加しない無血清培地にて維持し、ウイルス感染およびウイルス増殖を蛍光抗体法および子孫ウイルス力価測定により解析した。対照として、トリプシンを添加した無血清培地下にて維持する MA104 細胞をおいた。蛍光抗体法により、TMPRSS2 または TMPRSS11D を発現させた MA104 細胞において、多数のロタウイルス抗原陽性細胞を検出した。感染後 48 時間で子孫ウイルス量をフォーカスアッセイ法により測定したところ、TMPRSS2 または TMPRSS11D を発現させた MA104 細胞において、トリプシンを添加した無血清培地下にて維持する MA104 細胞と同程度のウイルス増殖が認められた（図 1）。以上の結果から、TMPRSS2 および TMPRSS11D がトリプシン非依存的なサルロタウイルスの感染、増殖を促進することが明らかとなった。

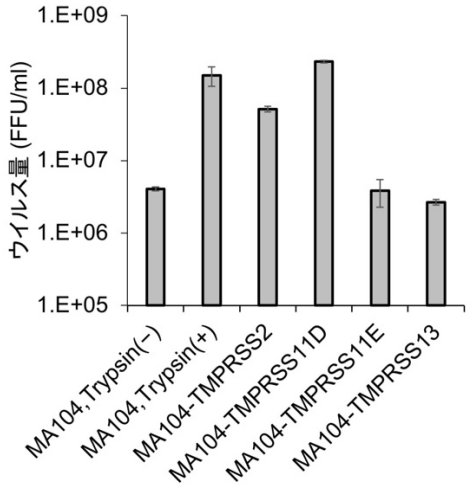


図 1. TMPRSS2 および TMPRSS11D 遺伝子発現はサルロタウイルス SA11 株の感染を促進する
MA104 細胞または各種 TTSP 遺伝子を恒常発現させた MA104 細胞へサルロタウイルス SA11 株を接種し、48 時間後に子孫ウイルス量をフォーカスアッセイ法により測定した。

2. ロタウイルス高感受性細胞の作出

次に、作製した TMPRSS2 および TMPRSS11D 発現 MA104 細胞におけるヒトロタウイルス Wa 株の増殖効率を解析した。感染後 48 時間で子孫ウイルス量を測定したところ、TMPRSS2 および TMPRSS11D 発現 MA104 細胞における子孫ウイルス量は、トリプシンを添加した無血清培地下にて維持する MA104 細胞よりも低かった（図 3)。そこで、コドン最適化を行い細胞における遺伝子発現量を増大させた TMPRSS2 と TMPRSS11D を共導入した細胞 MA104-T2T11D を作製した。MA104-T2T11D 細胞においてヒトロタウイルス Wa 株は、トリプシンを添加した無血清培地下にて維持する MA104 細胞よりも多くの子孫ウイルスを産生した（図 2)。また、ヒトロタウイルス DS-1 株、ウシロタウイルス Azuk-1 株を使用した同様の感染実験を実施し、これらのウイルス株が MA104-T2T11D 細胞においてより多くの子孫ウイルスを産生することを確認した。TMPRSS2 および TMPRSS11D によるロタウイルス感染増強機構について、詳細な機能解析を実施中である。

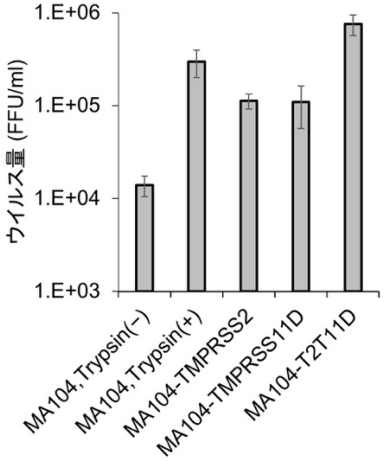


図 2. ヒトロタウイルスは MA104-T2T11D 細胞において高い増殖力を示す
MA104 細胞または各種 TTSP 遺伝子を恒常発現させた MA104 細胞へヒトロタウイルス Wa 株を接種し、48 時間後に子孫ウイルス量をフォーカスアッセイ法により測定した。

3. MA104-T2T11D 細胞を用いたロタウイルス分離手法の確率と概念実証

一般的なウイルス感染実験は静置培養で実施するが、ロタウイルスは回転培養により効率的に感染、増殖するため、ロタウイルスの分離には回転培養が用いられる［6, 7］。ヒトロタウイルス DS-1 株を用いて、最適なロタウイルス増殖条件を検討したところ、MA104-T2T11D 細胞と回転培養の組み合わせにより、最も高い子孫ウイルス量が得られた（図 3a）。

次に、野外にて採集したげっ歯類糞便 73 サンプルより懸濁液を作製し、これらを MA104-T2T11D 細胞へ接種し、回転培養を行なった。2 回の継代ののち、回収した培養上清の一部を用いて核酸を抽出し、次世代シークエンサー解析に供した。その結果、げっ歯類糞便 73 サンプルのうち 1 サンプルからロタウイルスの分離に成功した。分離したロタウイルスを MA104-T2T11D 細胞へ接種し、蛍光抗体法によりロタウイルス抗原を検出した（図 3b）。今後、分離したウイルスの性状解析を実施する。

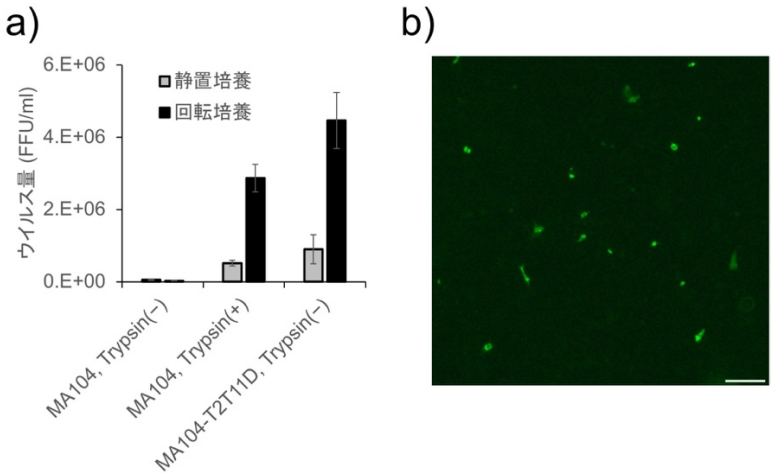


図 3. MA104-T2T11D 細胞を用いたロタウイルス感染条件の最適化

a) MA104 細胞または MA104-T2T11D 細胞へヒトロタウイルス DS-1 株を接種し、静置培養または回転培養を 48 時間行ったのち、子孫ウイルス量をフォーカスアッセイ法により測定した。

b) 野外にて採集したげっ歯類糞便より分離したロタウイルスを細胞へ接種し、抗ロタウイルスポリクローナル抗体を用いて染色した蛍光染色像（スケールバー：200 μm）。

考　察

膜貫通型セリンプロテアーゼTMPRSS2およびTMPRSS11Dの細胞への遺伝子導入により、トリプシンを添加しない培養条件下においてロタウイルスの感染および増殖が認められた。このTMPRSS2とTMPRSS11Dによるトリプシン非依存的感染は複数のロタウイルス株を用いて確認された。以上の結果から、TMPRSS2およびTMPRSS11Dがロタウイルスのトリプシン非依存的な感染を誘導する宿主のプロテアーゼであることが判明した。また、TMPRSS2とTMPRSS11Dを共発現させたMA104-T2T11D細胞と回転培養を組み合わせることにより、ロタウイルスの増殖が強力に促進された。本法を用いたウイルス分離を行い、実際に野生のげっ歯類動物糞便からロタウイルスの分離に成功したことから、本研究で作製したMA104-T2T11D細胞は、ロタウイルスの分離に有用であることが示された。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、北海道大学人獣共通感染症リサーチセンターの澤洋文先生、大場靖子先生、および岐阜大学応用生物科学部人獣共通感染症学教室の杉山誠先生、伊藤直人先生である。最後に、本研究へのご支援を賜りました上原記念生命科学財団に対し深く感謝致します。

文　献

1) Sasaki M, Kajihara M, Changula K, Mori-Kajihara A, Ogawa H, Hang'ombe BM, Mweene AS, Simuunza M, Yoshida R, Carr M, Orba Y, Takada A, Sawa H. Identification of group A rotaviruses from Zambian fruit bats provides evidence for long-distance dispersal events in Africa. Infect Genet Evol. 2018;63. Epub 2018/05/21. doi: 10.1016/j.meegid.2018.05.016. PubMed PMID: 29792990

2) He B, Huang X, Zhang F, Tan W, Matthijnssens J, Qin S, Xu L, Zhao Z, Yang L, Wang Q, Hu T, Bao X, Wu J, Tu C. Group A Rotaviruses in Chinese Bats: Genetic Composition, Serology, and Evidence for Bat-to-Human Transmission and Reassortment. J Virol. 2017;91(12). Epub 2017/05/26. doi: 10.1128/JVI.02493-16. PubMed PMID: 28381569

3) Trask SD, McDonald SM, Patton JT. Structural insights into the coupling of virion assembly and rotavirus replication. Nat Rev Microbiol. 2012;10(3):165-77. Epub 2012/01/23. doi: 10.1038/nrmicro2673. PubMed PMID: 22266782

4) Laporte M, Naesens L. Airway proteases: an emerging drug target for influenza and other respiratory virus infections. Curr Opin Virol. 2017;24:16-24. Epub 2017/04/14. doi: 10.1016/j.coviro.2017.03.018. PubMed PMID: 28414992

5) Shen LW, Mao HJ, Wu YL, Tanaka Y, Zhang W. TMPRSS2: A potential target for treatment of influenza virus and coronavirus infections. Biochimie. 2017;142:1-10. Epub 2017/08/01. doi: 10.1016/j.biochi.2017.07.016. PubMed PMID: 28778717

6) Abe M, Ito N, Morikawa S, Takasu M, Murase T, Kawashima T, Kawai Y, Kohara J, Sugiyama M. Molecular epidemiology of rotaviruses among healthy calves in Japan: isolation of a novel bovine rotavirus bearing new P and G genotypes. Virus Res. 2009;144(1-2):250-7. Epub 2009/05/21. doi: 10.1016/j.virusres.2009.05.005. PubMed PMID: 19464329

7) Komoto S, Fukuda S, Kugita M, Hatazawa R, Koyama C, Katayama K, Murata T, Taniguchi K. Generation of Infectious Recombinant Human Rotaviruses from Just 11 Cloned cDNAs Encoding the Rotavirus Genome. J Virol. 2019;93(8). Epub 2019/04/03. doi: 10.1128/JVI.02207-18. PubMed PMID: 30728265