

感染症分子研究センター 研究報告

津 下 英 明

感染症分子研究センター

要 旨

感染症分子研究センターは、疫学研究に病原分子研究を加えた組織である。センターの構成は下記の5つの部門からなる。令和2年度の研究成果を報告する。

第1部門	鳥インフルエンザ研究部門	高桑 藪田
第2部門	人獣共通感染症研究部門	西野 前田
第3部門	節足動物媒介感染症研究部門	前田 染谷
第4部門	感染症制御研究部門	横山
第5部門	感染症分子研究部門	津下 藪田

キーワード：鳥インフルエンザ、人獣共通感染症、節足動物媒介感染症、感染症制御、感染症分子

はじめに

鳥インフルエンザ研究センターは、他に類を見ない鳥インフルエンザ専門の特化型の研究機関として、平成18年10月の開設以来、社会に向けて研究成果を発信し社会の負託に応えてきた。特に産官学連携においては、国内外の研究機関との共同研究、受託研究等を通して抗菌性、抗ウイルス性の素材や材料等を開発し、鳥インフルエンザウイルスの感染を未然に防ぐことで社会に貢献をしてきた。鳥インフルエンザ研究センターで重ねてきた研究実績・成果をさらに発展させて、学术界・産業界・地域社会に向けさらには世界へとより一層の貢献を果たしていくために、平成30年度から鳥インフルエンザ研究センターを発展的に解消して、感染症分子研究センターが設置された。感染症分子研究センターの主な設置目的は、下記のとおりである。

(1)鳥インフルエンザウイルスから研究対象を拡大して、広く“感染症”に関する寄生虫、細菌、真菌、ウイルス等の病原体を扱うことで、より広範な研究成果を生み出して社会に貢献していく。(2)感染症分子の研究を通して、予防と治療法開発につながる基礎研究を進めていく。(3)研究対象を拡大することにより、より積極的に産業界や他研究機関との共同研究・受託研究等を推進することで、社会の負託に応えていく。(4)さまざまな感染症に係る正しい知識・予防法などの啓発活動を通して、感染症の拡大を防ぎ、地域社会への貢献を果たしていく。

第1部門 鳥インフルエンザ研究部門 高桑 藪田

1. 研究概要

A型インフルエンザウイルスは水禽類、家禽類などの鳥類、ヒト、ブタ、ウマなどの哺乳類等の多様な宿主に感染する。全ての亜型は自然宿主である水禽類に由来するが、ヒトを含む哺乳類に感染するウイルスの亜型は限られていた。1997年に香港で発生したH5N1亜型鳥インフルエンザは、ヒトへの感染は報告されなくなったものの、現在もアジアを中心に世界的に流行し、国内の養鶏場において発生を繰り返している。さらにH5N1亜型以外の亜型の鳥インフルエンザウイルスのヒトへ感染が確認されている。2013年に発生以降、中国ではH7N9亜型ウイルスにより、少なくとも600名以上が死亡している。また、ヒトに感染性を示す鳥インフルエンザウイルスの亜型が、多数出現してきている。そこで、国内や高病原性鳥インフルエンザの常在国であるベトナムの野鳥が保有している鳥インフルエンザウイルスを調査し、ウイルスの伝播における野鳥の役割を解明する。また、鳥インフルエンザウイルスが哺乳類での増殖性の獲得に関与するウイルスの変異を探索し、今後、出現し得るパンデミックウイルスの予測を目指す。さらに、野鳥によって国内に持ち込まれたウイルスの養鶏場への侵入による被害を抑えるため、防疫に有効な新たな消毒薬を共同研究による開発を目指す。

2. 本年度の研究成果

(1) 今年度日本国内での高病原性インフルエンザによる被害は、発生件数および規模ともに、過去最大のものとなった。この冬、北海道から鹿児島県まで全国各地の農場で50件以上の発生事例が起こり、1千万羽近い鶏が殺処分された。渡りによって飛来した野鳥によって日本国内にウイルスが持ち込まれ、農場に広がったと考えられる。我々は継続的に国内に飛来する野鳥の鳥インフルエンザウイルスの保有状況について調査を行っている。本年度、琵琶湖周辺および山陰地方の調査において糞便試料を採取し、琵琶湖周辺、鳥根および鳥取より、それぞれ218、212および225検体から、ウイルス分離を行った。琵琶湖周辺では鳥インフルエンザウイルスは陰性であったが、鳥根では鳥インフルエンザウイルス1株を分離した。さらに、鳥取では今シーズン日本国内で発生した高病原性鳥インフルエンザと同じ亜型のH5N8亜型ウイルス4株を含む鳥インフルエンザウイルス10株を分離した。高病原性ウイルスについては環境省への報告を行った。鳥取県は農場への侵入が起らず、高病原性鳥インフルエンザの発生がなかったが、野鳥の間には高病原性ウイルスが拡散していた事が示された。また、長野県において発見された死亡野鳥41羽（スワブ68検体）について、高病原性鳥インフルエンザの確定検査機関として検査を行い、全て陰性であったことを確認した。次年度以降も国内での高病原性鳥インフルエンザの発生する可能性が高く、今後も野鳥のウイルスを継続して監視する必要がある。

高病原性鳥インフルエンザの常在国であるベトナムの野鳥における鳥インフルエンザウイル

ス汚染状況の把握のため、野鳥から採取したスワブ試料からウイルス分離を行った。608サンプルより高病原性鳥インフルエンザウイルス（H5N6亜型）9株を含む31株の鳥インフルエンザウイルスを分離した。世界の野鳥の間に拡散している高病原性鳥インフルエンザウイルスの亜型が変化して来ているものと考えられた。国内およびベトナムにおいて分離されたウイルスの性状については、現在、詳細な解析を行っている。

(2) インフルエンザウイルスの哺乳類細胞での増殖性およびウイルスポリメラーゼ活性にNPタンパク質が関与していることが示唆されたおり、このNPタンパク質と相互作用する宿主タンパク質の探索を行うため、NPタンパク質を大腸菌で発現させ、単一バンドとして精製できることを確認した。今後、この大腸菌発現NPタンパク質を用いて、相互作用する宿主タンパク質の探索を行い、ウイルスの宿主特異性との関連を検討して行く計画である。

論文・著書

なし

学会発表

なし

その他

なし

第2部門 人獣共通感染症研究部門 西野 前田

1. 研究概要

ヒトと動物の双方に感染する病原体により引き起こされる人獣共通感染症は、ヒトに重篤な疾患を引き起こすとともに、家畜を含む多くの動物種に重大な疾患を引き起こす。本研究部門では、ボルナウイルス感染症とフラビウイルス感染症について研究を行っている。

ボルナウイルスは、ヒト、家畜、野生動物および愛玩動物に持続的に感染し、神経疾患を引き起こす。ボルナウイルスは、血清疫学調査において、動物では約20%、ヒトでは献血者において数%から抗体が検出されており、特に動物では予想以上に広がっている。感染動物の多くが不顕性感染をしているが、運動障害、行動学的異常、味覚障害などを発症する場合があります、重篤な場合は致死性である。また、ヒトにおいては、リスからの感染、あるいは移植後の感染により、重篤な神経疾患が引き起こされている。そのため、感染動物の発症機序を明らかにすることは動物とヒトにおける本疾病を予防するうえで重要な課題である。

一方、日本脳炎ウイルス (JEV) やデングウイルス (DENV)、ウエストナイルウイルス (WNV) 等が引き起こすフラビウイルス感染症では、ウイルスの抗原性が似ているため、感染の鑑別が困難であり、その方法論の開発が急務である。そこで、本研究ではウイルスの中空ウイルス粒子 (SvP s、ウイルスの殻の中にゲノムRNAを含まない) やウイルス様粒子 (VLP、一度だけ感染するレポーター発現粒子) を用いた、安全で信頼性の高いフラビウイルス感染鑑別法の開発を目指している。また、ウイルスの感染に重要であると考えられているエンベロップ蛋白質 (E) 蛋白質のドメインⅢを標的とする、抗ウイルス薬の開発を目指している。

2. 本年度の研究成果

(1) ボルナ病ウイルス (BoDV) 感染の発病メカニズムにおけるストレスの影響を探るために、副腎皮質ホルモン (CORT) を埋め込むことにより作成したストレス負荷モデルマウスにおけるウイルス感染病態について40日間の解析を行った。その結果、CORT処置された感染群はCORT処置されていない感染群と比べ、肉眼的臨床症状および脳全体のウイルス量は明らかな変化が認められなかった。しかしながら、埋め込んだCORTの放出が終了した時期において、CORT処置群では行動学的異常の増悪が認められ、大脳皮質における脳炎の重度化が認められた。以上の結果から、感染前のストレス負荷は、病態悪化の原因になる可能性が示唆された。

(2) フラビウイルスに属する日本脳炎ウイルス (JEV)、ウエストナイルウイルス (WNV) およびデングウイルス 1 型 (DENV1) のE蛋白質のドメインⅢ (DⅢ) 領域を有し、他のE蛋白質DIおよびDII領域はWNVに由来するキメラE蛋白質を哺乳類細胞で発現したところ、細胞外へのJEVとWNVの中空粒子の放出が確認されたが、DENVの中空粒子の産生は認められなかった。

論文・著書

なし

学会発表

西野佳以“新型コロナウイルス感染症におけるストレスの影響” 鳥取大学農学部 令和2年度新興
再興感染症学シンポジウム、2020.12.11（オンライン）（招待講演）

その他

なし

第3部門 節足動物媒介感染症部門 前田 染谷

1. 研究概要

近年、蚊やマダニ等の節足動物が媒介する感染症が世界的な公衆衛生上の問題となっている。京都市は毎年、数100万人の国内外の観光客が訪れる世界有数の観光都市であり、地球上の様々な地域より節足動物媒介感染症が侵入する危険性がある。これまでの私たちの研究から、京都に生息するマダニが、これまでに日本での報告がなかったウイルスや細菌を保有していることを明らかにした。従来、京都市の環境中に生息していた節足動物や野生動物が未知の病原微生物を有することが明らかとなったことから、本研究の成果を通して、医学・獣医学上のさらなる重要な知見が得られることが期待される。本研究では、これら節足動物が保有する病原微生物を検出・分離する。また、京都市に生息する野生動物における感染状況について疫学的に解析する。

2. 本年度の研究成果

(1) 過年度に引き続き、節足動物媒介性感染症の病原体の生態を明らかにするため、野生動物の生息状況調査および節足動物の生息状況調査を継続して実施した。京都産業大学周辺のマダニを週1回の割合で捕集し、マダニが保有するウイルスの分離培養を行ったが、本年度は分離できなかった。また、京都市内でハクビシンから分離された*Bartonella*について遺伝学的解析を行ったところ、ヒト由来株と相同性が高いことが示された。本年度は、コロナ禍でフィールドワークや共同研究先との検体のやりとりが制限されてしまい、残念ながら予定通りの研究活動は困難であった。

(2) 2013年に京都市で捕集したフタトゲチマダニから分離した野生型のトゴトウイルスHI-Kamigamo-25株 (WT-THOV) は、実験用マウスへの感染では無症状である。今年度はマウスへの馴化株 (マウスへの感染により病変を示す変異株) の作製を試みた。BALB/cマウスにWT-THOVを感染させ肝乳剤を作製した。この肝乳剤中のウイルスを、マウスで20回繰り返し継代しマウス馴化株 (MA-THOV) を得た。MA-THOVをBALB/cマウスに接種したところ、感染後5～7日に斃死した。肉眼病理所見では、肺・肝臓など様々な臓器で顕著に出血が認められ、組織病理学的には肝臓と脾臓において広範なネクロシス像が観察された。今後はWT-THOVとMA-THOVの病原学や遺伝学的な解析を通して、THOVの感染種特異性を決定する因子について解析する予定である。

論文・著書

なし

学会発表

なし

その他

なし

第4部門 感染症制御研究部門 横山

1. 研究概要

液胞型プロトンATPase (V-ATPase) と ATP合成酵素 F_0F_1 は、回転することで働く回転分子モータータンパク質である。V-ATPaseは、ATPを使って小胞内にイオンを輸送し、その酸性化を通して様々な生理現象を担う。たとえば、毒素の活性化や、抗原タンパク質の分解による抗原提示など感染症に関する重要な分子基盤を担っている。 F_0F_1 は、ミトコンドリアの内膜、葉緑体のチラコイド膜に存在し、ATP合成酵素として働く。また結核菌などのバクテリアの細胞膜にも存在し、ATP合成することで好氣的環境下でのバクテリアの増殖を支える。クライオ電子顕微鏡は、今や構造生物学の主流となり、結晶化が困難で構造解析できない膜タンパク質などの構造を、時には原子分解能近くの精度で見ることが可能にする有力な手法になった。我々は、この技術をいち早くとりいれ、世界に先駆けて V型 ATP合成酵素の回転に伴う構造変化を明らかにした。また、結核菌の F_0F_1 は、抗結核薬の有望な標的分子であり、多剤耐性症化した結核感染症に対する薬剤の創出につながることを期待される。感染症の分子基盤の重要な部分を担う V-ATPase の構造機能の解明、および抗結核剤の創出につながる結核菌 F_0F_1 の構造決定をする目的として研究を進めている。

2. 本年度の研究成果

本年度も、引き続き単粒子解析によるV-ATPase の構造解析を行い、分解の改善を目指した。今回、大阪大学の電顕サイトで V-ATPase の凍結グリッドを作成し、東京大学にある電顕サイトおよび大阪大学タンパク質研究所の電顕サイトに凍結グリッドを持ち込み撮影し、そのデータを本学で解析した。溶液条件を変えたクライオグリッドから合計5万枚以上の電子顕微鏡画像を撮影し、それぞれの溶液条件での構造を解析した。もっとも分解能のよいものは、フォーリエル相関 0.143 で分解能 2.6 Åであり、ヌクレオチド結合部位にある ATPの立体配置をはっきりと特定することができた。V_o部分についても解析を進め、3.9 Å 分解能の密度マップを得ることができ、ここから V_o 部分の原子モデルを構築した。V_o の構造では、驚くべきことに a サブユニットの親水性部分と d サブユニットがくっついており、そのためリング複合体が回転できないことで、V_o からのプロトンの漏洩がシャットアウトされることが明らかになった。

結核菌 F_0F_1 に関しては、引き続き、構造解析に適した発現・精製系の構築を進めた。結核菌 F_0F_1 の全遺伝子を合成し、発現ベクターに組み込んだ。 F_0F_1 を欠失した大腸菌に F_0F_1 を含む発現ベクターを形質転換し、発現の条件検討を行った。負染色して電子顕微鏡で観察したところ、 F_0F_1 と推定される単粒子を観察することができたが、同じ標品でクライオグリッドを作

成すると凝集が見られ、単粒子解析にてきたクライオグリッド作成には至っていない。界面活性剤の最適化、凝集しにくい溶液条件を探す、大腸菌での発現量を増やす、等の改善を図り、安定して結核菌の F₀F₁を精製できるようにし、単分散性のよいクライオグリッドを作成することが必要である。

論文・著書

1. Mechanical inhibition of isolated V_o from V/A-ATPase for proton conductance. Kishikawa J, Nakanishi A, Furuta A, Tamakoshi M, Mitsuoka K, and Yokoyama K. (2020) *Elife* e56862
2. Identification of chemical compounds as an inhibitor of mitochondrial ATP synthesis, leading to an increased stress resistance and an extended lifespan in *C. elegans*. Ikeda T, Kishikawa J, Hayashida Y, Fujikawa M, Yokoyama K. (2020) *Biochim Biophys Acta Bioenerg* (2020) Nov 1;1861(11):148281. doi: 10.1016/j.bbabi.2020.148281.

学会発表

1. 佐伯詩織、中西温子、横山謙 “結核菌F₀F₁の発現・精製系の構築” 第46回日本生体エネルギー研究会討論会 金沢市12/2020 ポスター発表
2. 中野敦樹、佐伯詩織、中西温子、岸川淳一、横山謙 “好熱菌 V 型 ATP 合成酵素の ATP 加水分解待ち構造の解析” 第46回日本生体エネルギー研究会討論会 金沢市12/2020 口頭発表

その他

特になし

第5部門 感染症分子研究部門 津下 藪田

1. 研究概要

タンパク質の構造は今や生命の基礎理解に必要な不可欠なものとなりつつある。タンパク質複合体、特に感染症因子とホストであるヒトのタンパク質の相互作用を見たいと考えている。この基礎研究から将来的には感染症を予防や治癒する新たな創薬の可能性が生まれる。現在以下の研究テーマを軸として研究を進めている。X線結晶構造解析とクライオ電子顕微鏡を主要な手段として用いる。

(1) ADPリボシル化毒素とその標的分子複合体の構造生物学：様々な病原微生物はADPリボシル化毒素（ADPRT）を分泌して、ホストのタンパク質を修飾し、ホストのシグナル伝達系に影響を与える。この反応特異性とその反応機構の詳細を明らかにすべく、様々なADPリボシル化毒素（酵素）とその基質複合体での結晶構造解析を進めている。

(2) 細菌トランスロコンの構造と輸送機構の解明：*C.perfringens*や*C.difficile*が持つバイナリー毒素は上述したアクチンをADPリボシル化する毒素（A成分）とこれを膜内へ輸送する装置（トランスロコン）（B成分）からなる。特にトランスロコンの構造と機能—タンパク質膜透過の仕組み—に焦点を当てた研究を進めている。

2. 本年度の研究成果

*C.perfringens*が持つbinary毒素である、膜孔形成毒素Ibの構造と機能解析を進めている。膜孔形成毒素Ibはアクチン特異的ADPリボシル化する酵素Iaを膜透過させるトランスロコンである。IaがアクチンのADPリボシル化毒性を発揮するためにはIbが①水溶性プレ膜孔オリゴマー（7量体）を形成、次に細胞膜上で構造変化をおこし②Ibオリゴマーからなる膜孔を形成、③これにIaが結合し、Iaの立体構造がほどけて、④IaがIbオリゴマー膜孔を通過する、この4つのステップが必要となる。2020年3月、我々はcryo EMを用いた単粒子解析により、Ib膜孔とIaが結合したIb膜孔の構造をそれぞれ2.9Åの分解能で決定することに成功し*Nature Structural & Molecular Biology*誌に掲載した。Ia-Ib膜孔複合体は報告されている二成分毒素の酵素-膜孔複合体で唯一、3Åを切る高分解能の構造となった。Ia-Ib膜孔の解析から、二成分毒素において初めて、酵素成分が二次構造を失う様子を捉え、膜透過の直前の姿を報告した。

我々の発表とほぼ同時に、*ディフィシル*菌の2成分毒素CDTの構造が海外のグループにより報告された。*ディフィシル*菌は抗生物質耐性菌の感染が問題とされ、2つの毒素（TcdA, TcdB）の他にイオタ毒素と類似の2成分毒素を持ち、この2成分毒素が重症化に関わっているかが注目されている。2つのグループが、この毒素の構造を独立に発表したが、面白いのは、この2つともにダブルヘプタマーの構造であることである。イオタ毒素は7量体であるが、

CDTbはこれが、2つ合わさったダブルヘプタマーの14量体構造をとる。この構造だと、膜に孔を開けることができない、またCDTaの膜透過にも支障があると考えられる。現在、CDTでも生理的な7量体の構造があるのではないと考え、その構造決定を進めている。またCDTaが結合したCDTb膜孔の構造もわかっておらず、これを明らかにするためにサンプルの調整と電子顕微鏡でのデータ測定と解析を進めている。

近年日本で起きた食中毒で、ウェルシュ菌のエンテロトキシン(CPE)欠損株の関与が疑われ、新規の食中毒毒素が見出された。この毒素は*Clostridium perfringens* iota-like toxin (CPIL)と命名された。CPILはCPIL-a, CPIL-bの2つのコンポーネントからなる2成分毒素である。前述のイオタ毒素と比較しながらCPIL-b膜孔調整と構造解析を始めた。特にCPIL-bのクランプ最狭部位はイオタおよびCDTと異なっており、毒性発現の比較研究も始めている。これら二成分毒素の、タンパク質の輸送機構、毒性発現機構を明らかにする。また、これらの透過阻害剤にも注目して研究をすすめている。

論文・著書

1. Tsuge H. A myelin sheath protein forming its lattice.
J. Biol. Chem. 295(26):8706-8707.
doi: 10.1074/jbc.H120.014273. (2020) (査読有り)
2. Yoshida T, Tsuge H. Common Mechanism for Target Specificity of Protein- and DNA Targeting ADP-Ribosyltransferases
Toxins (Basel). 2021 13(1):40. doi: 10.3390 (査読有り)
3. Yamada T, Tsuge H.
Preparation of *Clostridium perfringens* binary iota-toxin pore complex for structural analysis using cryo-EM
Methods Enzymol. 2021;649:125-148.
doi:10.1016/bs.mie.2021.01.032. (査読有り)

学会発表

1. 津下英明 “二成分毒素膜孔複合体の単粒子解析” 日本顕微鏡学会 第76回学術講演会紙上開催、2020.5.25-27 (招待講演)
2. 津下英明 “二成分毒素複合体のクライオ電子顕微鏡による構造解析：ADPリボシル化毒素の細胞内輸送機構の解明” 第460回ビタミンB研究委員会 (愛知)、2020.8.29
3. 津下英明 “見えてきたタンパク質膜透過機構、クロストリジウム二成分毒素複合体の単粒子解析から” 第46回生体エネルギー研究会、長土堀青少年交流センター (金沢)、2020.12.10 (招待講演)

4. 京都産業大学、大阪大学、筑波大学、大学プレスセンターなど

「細菌毒素タンパク質が膜透過するメカニズムをクライオ電子顕微鏡により解明 - 英国科学誌「Nature Structural & Molecular Biology」オンライン版に掲載」(津下)

その他

なし

Performance Reports of Center for Molecular Research in Infectious Diseases

Hideaki TSUGE

Abstract

Center for Molecular Research in Infectious Diseases consists of five groups. Each section is pursuing studies about avian influenza, zoonoses, arthropod-borne infections disease, infectious disease control, and molecular research in infectious diseases.

This year topic

H5N8 highly pathogenic avian influenza viruses (HPAIV) were detected nationwide from Hokkaido to Kagoshima prefecture in this winter. Outbreaks of HPAIV have been confirmed on more than 50 farms, about 10 million birds culled, the highest number of a single season. It can be surmised that migratory birds brought the viruses into Japan and wild birds or animals spread them onto the farms. We surveyed AIVs in wild waterfowl in this winter in the Sanin district. Eleven strains of AIV, including 4 strains of H5N8 HPAIV, were isolated. It supports that HPAIV had spread among wild birds in this area, even though there was no outbreak in farms. It is important to monitor the prevalence of AIV among wild birds to prevent the emergence of new epidemics. (Takakuwa and Yabuta)

Keywords: avian influenza, zoonoses, arthropod-borne infectious disease, infectious disease control, molecular research in infectious disease