

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4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とうして、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の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、国内および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ついて、鳥インフルエンザウイルスの保有状況を調査し、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において増殖性を獲得すること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、野鳥等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等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、野鳥から過去最速の9月下旬にH5N1亜型高病原性鳥インフルエンザウイルスが分離され、その後、全国の家禽農場へ広がり、過去最多の1,700万羽以上が殺処分された。野鳥において過去最多の感染事例が報告され、年が明けてから4月まで、昨シーズン同様にカラスの感染死亡事例が多数報告された。また、国内では分離報告が無いものの、欧州では哺乳類の感染性に関与するPB2-E627K変異を持った高病原性鳥インフルエンザウイルスが野鳥から分離されており、今後注視する必要がある。我々の継続的に行っている琵琶湖周辺および山陰地方に飛来する野鳥における鳥インフルエンザウイルスの保有状況の調査では、高病原性のウイルスは分離されなかったが、H5亜型を含む低病原性の鳥インフルエンザウイルス10株を分離した。また、大分県の糞便調査では、46検体より、2株の低病原性のH9N2亜型鳥インフルエンザウイルスを分離した。長野県において発見された死亡野鳥5羽のうちの2羽(スワブ4検体)について、高病原性鳥インフルエンザの確定検査を行い、全て陰性であったことを確認した。今年度以降も、国内において高病原性鳥インフルエンザの発生する可能性が高く、引き続き、野鳥のウイルス保有状況を継続して監視する必要がある。

(2) パンデミックを引き起こすことが懸念されているH9N2亜型鳥インフルエンザウイルスにおいて、ウイルス内部タンパク質であるPAタンパク質などの変異により、マウスに対する病

原性が高まることが示されている。哺乳類に対する病原性に関わる新たな変異候補として、作用機序の詳細な解析を行っている。

(3) 遺伝子改変鶏による発育鶏卵を用いたワクチン生産法の開発のための基礎検討を継続し、 α 2,6 型シアル酸転移酵素を発現する発育鶏卵の作製を試みており、今後ヒトインフルエンザウイルスの増殖性を解析する予定である。

(4) 以前より、鳥インフルエンザウイルスに対するヨード活性炭の抗ウイルス効果について(株) 化研と共同で研究を行い、開発に取り組んでいたヨード活性炭を改良し、(株) エーアンドエーマテリアルより、散布型消毒剤ヨドックス粒として販売された。今後、防疫に利用されることに期待する。

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 (SvPs、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を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ープ (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を探るために、ボルナ病ウイルス (BoDV) 感染後のマウスにストレスホルモン抑制効果があるオキシトシンを投与し、発症病態を解析した。その結果、オキシトシン投与により発症の遅延が認められた。その原因について解析を進めている。また、高血圧の素因が BoDV 感染に及ぼす影響について探るために、高血圧自然発症ラットである SHR ラットとそのバックグラウンド系統である WKY ラットに BoDV を感染し、病態について解析を始めた。

(2) フラビウイルスのデングウイルス1型のウイルス様粒子 (DENV1-VLPs) の作製を試みたが、残念ながら DENV1-VLPs の培養上清への放出は認められなかった。そこで、昨年作製したウエストナイルウイルス (WNV) と日本脳炎ウイルス (JEV) の VLP を用いた中和試験法を開発した。また、WNV と JEV、DENV1 の中空ウイルス粒子 (SvPs、殻の内部にゲノム RNA やレプリコン RNA を含まない粒子様構造体) を作製できたため、これらを用いた検査法を開

発する予定である。

論文・著書

なし。

学会発表

1. Tate Shawn, Shibutani Minori, Kawamoto Ryo, Nishino Yoshij, Saito Toshiyuki. GABA neurons affected by inflammation in the cardiovascular center of spontaneously hypertensive rats. **第100回日本生理学会**、2023.3.14-16 (京都市)

その他

1. 第74回日本衛生動物学会 (2022.4.8-4.10) を主催した。

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

京都市の大学近辺を定点として週1回、マダニの捕獲調査を行った。捕獲したマダニについて種別を鑑定し、動物やヒトにマダニ媒介性感染症を引き起こす重症熱性血小板減少症ウイルス (SFTS)、ダニ媒介性脳炎ウイルス (TBEV) およびトゴトウイルス (THOV) の保有状況を調査したが、いずれも陰性であった。また、調査地で優占種となっているフタトゲチマダニとキチマダニの保有細菌を調べたところ、フタトゲチマダニに特異的にコクシエラ属の細菌の遺伝子が検出された。また、マダニが保有するリケッチアの遺伝学的解析を進めた。本結果は、マダニの分子疫学的解析に応用できるものと考えられた。

論文・著書

なし

学会発表

なし

その他

1. 第74回日本衛生動物学会(2022.4.8-4.10)を主催した。

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 合成することで好気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入れ、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。なお、結核菌の F_0F_1 の構造解析については、競争相手から高分解能構造が報告されたこともあり、ペンディングとした。

2. 本年度の研究成果

本年度は、バクテリア由来の F_0F_1 ATP 合成酵素の構造機能解析において、成果が得られた。 F_0F_1 には ATP が結合する 3 つの触媒部位があり、すべての結合部位に ATP が結合した時に回転が連続的に起こる (定常状態)。しかし、最初の ATP が 1 つ目の触媒部位に結合したときに起こる触媒反応 (ユニサイト触媒) では、ATP に対する親和性が高く、かつその分解速度が遅いなど、特異な性質を示すことがわかっていたが、その分子基盤については不明なままであった。クライオ電子顕微鏡を用いた構造解析により、ユニサイト触媒の起こる様子を捉えることに成功し、ユニサイト触媒は、定常状態とは異なる機構で起こる反応であり、ATP に対する高親和性は、ユニサイト触媒に特有な現象であることが示唆された。

V-ATPase に関しては、時間分解能構造解析により、初期状態から定常状態への遷移過程を捉えることができた。クライオ電子顕微鏡による構造解析では、反応時間を変えることで、酵素の反応の進行に伴う構造変化を捉えることも可能である。ATP 濃度と反応時間を変化させた反応液からクライオグリッドを作成し、それぞれの条件での構造を得ることで、以下のことが判明した (図)。

酵素に ATP が結合すると、V1ATP ができる。ABopen に結合した ATP により、V1ATP が 120° ステップし、VsemilATP になる。VsemilATP に ATP が結合すると、V2ATP になる。これが 120° ステップすると、ABclosed から ADP と P_i が放出され、V2nuc に変化する。V2nuc に ATP が結合すると、V3nuc になる。ここまできると、最初に V1 部分に結合していた硫酸イオンはすべて放出され、V2nuc と V3nuc が交互に現れる定常状態になる。この結果から、硫

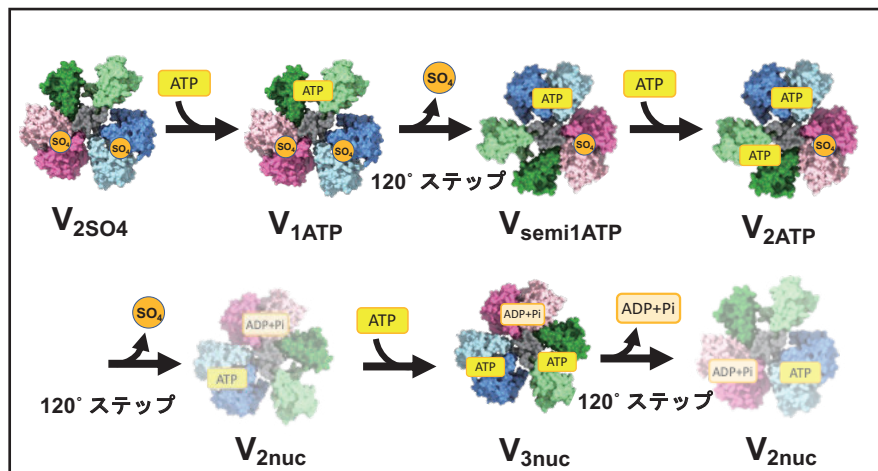


図 V-ATPase の初期状態から定常状態への遷移過程

酸イオンが V/A-ATPase の初期反応を遅くする一方、定常状態での活性に影響を与えないことがうまく説明された。

論文・著書

1. Cryo-EM analysis of V/A-ATPase intermediates reveals the transition of the ground-state structure to steady-state structures by sequential ATP binding. Nakanishi, A., Kishikawa, J.I., Mitsuoka, K., Yokoyama, K. *J Biol Chem* 299: 102884–102884 (2023)
2. Structural basis of unisite catalysis of bacterial F₀F₁-ATPase. Nakano A, Kishikawa J, Nakanishi A, Mitsuoka K, and *Yokoyama K. *PNAS Nexus* volume 1, pgac116 (2022)

学会発表

1. F₁-ATPase の substep の正体 中野敦樹, *横山謙 2023 年 生体運動研究合同班会議 東京大学 小柴ホール 2023/1/6 口頭発表
2. クライオ電子顕微鏡による ATP 合成酵素 F₀F₁ の回転機構の解明 中野敦樹、岸川淳一、横山謙 日本生体エネルギー研究会 第 48 回討論会 会場 京都大学 益川ホール 2022/12/15 口頭発表
3. 横山謙 クライオスナップショットによる V/A-ATPase の回転機構の解明 日本顕微鏡学会 倉敷 川崎祐宣記念講堂, 第 65 回シンポジウム 招待講演 11/2022
4. V_o 部分での回転によるプロトン輸送機構の分子基盤 西田結衣、岸川淳一、中西温子、中野敦樹、横山謙 第 60 回日本生物物理学会年会 会場 函館アリーナ・函館市民会館 2022/9/30 ポスター発表 2.

5. クライオ電子顕微鏡による ATP 合成酵素 F_0F_1 の化学力学共役機構の解明 中野敦樹、岸川淳一、中西温子、横山謙 第 60 回日本生物物理学会年会 会場 函館アリーナ 2022/9/30 ポスター発表
6. 好熱菌 F_0F_1 -ATPase のユニサイト触媒作用の構造的基盤 中野敦樹、青山桃子、岸川淳一、横山謙 第 60 回生物物理学会年会 2022/9/29 函館アリーナ ポスター発表
7. F_0F_1 -ATPase の非触媒部位の機能解明 Functional elucidation of the non-catalytic site of F_0F_1 -ATPase 小林廉、中野敦樹、横山謙 日本生物物理学会第 60 回年会 2022/9/29 函館アリーナ ポスター発表
8. ATP 合成酵素 F_0F_1 の ATP 駆動性回転における化学・力学共役機構の分子基盤 中野敦樹、岸川淳一、中西温子、横山謙 第 22 回日本蛋白質科学会年会 会場 つくば国際会議場 2022/6/8 口頭発表

その他

図書 1 件

1. 「クライオ電子顕微鏡ハンドブック」 第 4 章 第 1 節 クライオスナップショットによる V/A-ATPase の回転機構の解明 横山謙 エヌティーエヌ出版 (2022)

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、特に感染症因子と宿主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。

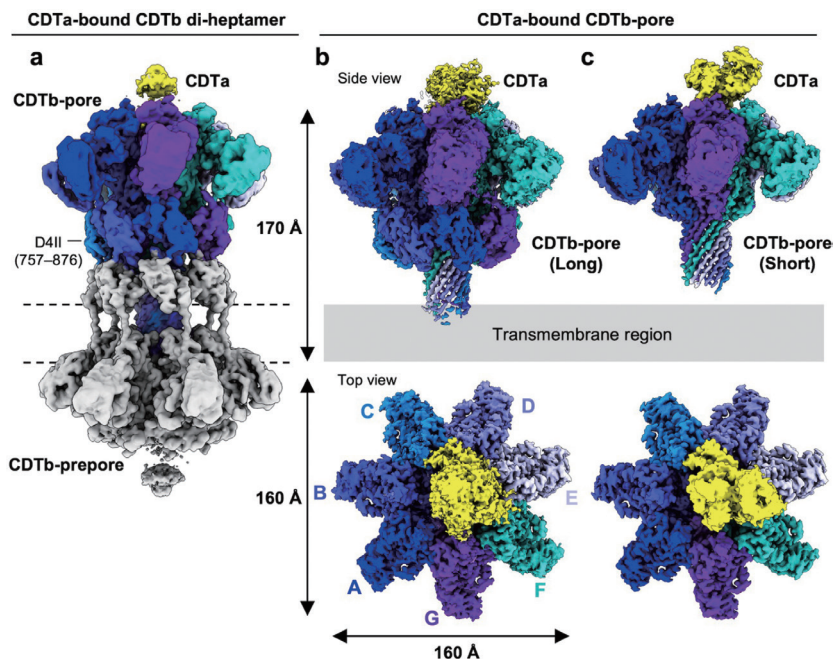
(1) ADPリボシル化毒素とその標的分子複合体の構造生物学：様々な病原微生物はADPリボシル化毒素（ADPRT）を分泌して、宿主のタンパク質を修飾し、宿主のシグナル伝達系に影響を与える。この反応特異性とその反応機構の詳細を明らかにすべく、様々なADPリボシル化毒素（酵素）とその基質複合体での結晶構造解析を進めている。

(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② Ib 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、④ Ia 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 2.9 Å の分解能で決定することに成功した (*Nature Structural & Molecular Biology*, 2020)。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、3 Å を切る高分解能の構造となった。

これに続いて、抗生物質耐性菌の感染が問題となっているデオフィシル菌が持つ二成分毒素 CDT の構造をクライオ電子顕微鏡を用いて明らかにした (*Nature Communications*, 2022)。イオタ毒素は7量体であるが、CDTb はこれが、2つ合わさったダイヘプタマーの14量体構造をとることが報告されてきたが、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。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きた。界面活性剤 LMNG の存在下で、CDTa 結合した CDTb 膜孔



を調製、電子顕微鏡でのデータ測定と解析を進めた。その結果、ダイヘプタマーの14量体とともにイオタ毒素と同様の7量体のCDTb膜孔構造が存在していることがわかった。これにCDTaを加えて、クライオ電子顕微鏡での構造決定を行った。其の結果CDTa1分子がCDTb膜孔に結合した構造を明らかにした。さらに、CDTaがCDTb膜孔に結合した状態での構造解析から、結合したばかりのCDTaとCDTb膜孔複合体と、CDTaのN末端の α ヘリックスが一部解けた状態とCDTb膜孔複合体の2つの構造をそれぞれ精密化して明らかにした。これはN末端の α ヘリックスのアンフォールディングの動的な様子を捉えた初めての報告である。これらの二成分毒素のタンパク質膜透過の仕組みはまだよくわかっていない。これらのタンパク質膜透過システムをトキシン膜透過システムと名づけ、さらに研究を進めている。

論文・著書

1. Kawamoto A., Yamada T., Yoshida T., Sato Y., Kato T., and Tsuge H. (2022) Cryo-EM structures of the translocational binary toxin complex CDTa-bound CDTb-pore from *Clostridioides difficile*. **Nature communications**, 13(1): 6119. doi: 10.1038/s41467-022-33888-4. (査読あり)

学会発表

1. 山田等仁、川本晃大、吉田徹、加藤貴之、津下英明

クライオ電子顕微鏡によるディフィシル菌二成分毒素 CDTa CDTb 複合体の構造解析
第 22 回日本蛋白質科学会 2022.6.7-9 [D3 山田：学生口頭発表賞受賞]

2. 西田和哉、山田等仁、津下英明
スクミリンゴガイ膜孔形成毒素 PcPV-2 の構造と機能の解析
第 68 回トキシシンポジウム (オンライン) 2022.9.5-6
3. 吉田徹、内田悠斗、山田等仁、津下英明
C. *perfringens* 由来二成分毒素 CPiLEb の貫通膜孔は、セリンで形成された最狭窄部位をもつ。第 68 回トキシシンポジウム (オンライン) 2022.9.5-6
4. 山田等仁、川本晃大、吉田徹、加藤貴之、津下英明
ディフィシル菌が産生する二成分毒素の構造解析
第 68 回トキシシンポジウム (オンライン) 2022.9.5-6
5. 友田駿、山田等仁、津下英明
イオタ毒素 Ia-GFP キメラのタンパク質膜透過の確認と構造解析 第 60 回生物物理学会
函館 2022.9.28-30
6. 内田悠斗、吉田徹、山田等仁、津下英明
Effect of narrowest clamp of binary toxin on cell toxicity
第 60 回生物物理学会 函館 2022.9.28-30
7. 山田等仁、杉田征彦、野田岳志、津下英明
クライオ電子顕微鏡による高分解能構造解析で明らかになってきた二成分毒素の膜透過機構 第 60 回生物物理学会 函館 2022.9.28-30 [D3 山田：口頭発表および学生発表賞受賞 (ポスター)]
8. 山田等仁、吉田徹、津下英明
ディフィシル菌の二成分毒素のタンパク質膜透過の動的な様子
第 469 回ビタミン B 研究委員会 京都 2022.11.19

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

Some bacteria express a binary toxin translocation system, consisting of an enzymatic subunit and translocation pore, that delivers enzymes into host cells through endocytosis. The most clinically important bacterium with such a system is *Clostridioides difficile*. The CDTa and CDTb proteins from its system represent important therapeutic targets. CDTb has been proposed to be a di-heptamer, but its physiological heptameric structure has not yet been reported. We report the cryo-EM structure of CDTa bound to the CDTb-pore, which reveals that CDTa binding induces partial unfolding and tilting of the first CDTa α -helix. In the CDTb-pore, an NSS-loop exists in two conformations, suggesting its involvement in substrate translocation. Finally, 3D variability analysis revealed CDTa movements from a folded to an unfolded state. These dynamic structural information provide insights into drug design against hypervirulent *C. difficile* strains.

It was reported in Nature Communications in Oct 2022.

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