

日本在来翼手目が保有するウイルスの検索と性状解析

北村(小林)知也

目次.....	1
略語.....	3
序章.....	7
コウモリの生態学的特徴.....	8
世界のコウモリから報告されているウイルス.....	10
日本のコウモリから報告されているウイルス.....	10
図表.....	13
第1章 日本産コウモリからのコウモリコロナウイルスおよびコウモリヘペウイルスの検出と進化	
系統学的解析.....	23
要旨.....	24
背景と目的.....	25
材料と方法.....	29
結果.....	33
考察.....	38
図表.....	43
第2章 日本産コウモリから分離したコウモリアデノウイルスのウイルス学的性状解析.....	57
要旨.....	58
背景と目的.....	59
材料と方法.....	61
結果.....	66

考察.....	70
図表.....	73
第3章 日本産コウモリから分離したコウモリアデノウイルスの受容体の同定	86
要旨.....	87
背景と目的.....	88
材料と方法.....	91
結果.....	95
考察.....	97
図表.....	99
総括	110
引用文献.....	114
謝辞.....	147

略 語

SARS: severe acute respiratory syndrome

MERS: Middle East respiratory syndrome

SADS: swine acute diarrhea syndrome

RT-PCR: reverse transcription polymerase chain reaction

HEV: hepatitis E virus

ICTV: International Committee on Taxonomy of Viruses

RdRp: RNA-dependent RNA polymerase

ORF: open reading frame

S: spike

E: envelope

M: membrane

N: nucleocapsid

ACE2: angiotensin I converting enzyme 2

DPP4: dipeptidyl peptidase 4

BatHEV: bat hepatitis E virus

DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium

MDCK: Madin-Darby canine kidney

MDBK: Madin-Darby bovine kidney

CRFK: Crandell feline kidney

FBS: fetal bovine serum

RPMI: Roswell Park Memorial Institute (medium)

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

NCBI: National Center for Biotechnology Information

MAFFT: multiple sequence alignment based on fast Fourier transform

CoV: coronavirus

PBS: phosphate-buffered saline

CPE: cytopathic effect

BtAdV: bat adenovirus

AdV: adenovirus

CAdV: canine adenovirus

TCID₅₀: median tissue culture infectious dose

IUDR: 5-iodo-2'-deoxyuridine

M: mol/L

MOI: multiplicity of infection

BSA: bovine serum albumin

MEM: minimum essential medium

PFU: plaque forming unit

PRNT₈₀: 80% plaque reduction neutralization test

IFA: Indirect immunofluorescence assay

ITR: inverted terminal repeat

CXADR: coxsackie-adenovirus receptor

CRISPR: clustered regularly interspaced short palindromic repeat

Cas9: CRISPR associated protein 9

Da: dalton

HEK293T: human embryonic kidney 293T

VSV: vesicular stomatitis virus

gRNA: guide RNA

PEI: polyethylenimine

EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid

PVDF: polyvinylidene fluoride

SDS: sodium dodecyl sulfate

HRP: horseradish peroxidase

ACTB: actin beta

WT: wild type

序 章

コウモリの生態学的特徴

コウモリは哺乳綱翼手目に分類される哺乳類の総称で、約 1,300 種類が知られている。(Fenton *et al.*, 2014)。これは全哺乳類の種数 5,416 種のうち 20%を占め、げっ歯目に次いで 2 番目に大きなグループである(Wilson and Reeder, 2005)。コウモリは哺乳類の中では唯一飛翔することができる。伝統的に、コウモリは形態学あるいは生態学的な違いからオオコウモリ *macrobat* とココウモリ *microbat* と呼称される。オオコウモリは分類学的にはオオコウモリ上科に属するコウモリを指し、170 種が現存する。視力が発達しており、コウモリの代名詞でもあるエコーロケーション能力を有さないものがほとんどである。主に果実や花などを食し、亜熱帯から熱帯に分布する(図 1)。一方、残りの 1,000 種余りはココウモリに属し、熱帯から亜寒帯まで広く分布している(図 2)。食性は昆虫を主食とする種が大半であるが、花や果実を食すコウモリ、魚を捕食するコウモリ、カエルを捕食するコウモリ、小型哺乳類などを捕食するコウモリ、哺乳類の血を飲むコウモリなども知られる。これらコウモリはいずれも夜行性で、日中は樹木、洞窟または家屋などの人工物をねぐらとし、数頭から数百万頭の集団を形成する。興味深いことに、コウモリ種によっては複数種のコウモリによって集団が形成される。夜間の行動圏は種によって異なるが、数 km から数十 km を移動して採餌し、夜明け前には帰巢する。夜間は常に採餌のため飛翔しているわけではなく、特定の休息場(ナイトルースト)を利用することが知られる。繁殖あるいは冬眠時に向けてねぐらを変え、この際コウモリの種によっては 1,000 km を超える移動をする(Roberts *et al.*, 2012)。また、コウモリは体のサイズから想定されるよりも寿命が長く、同サイズの哺乳類の約 3.5 倍も長命である(Wilkinson *et al.*, 2002)。野外に生息するコウモリでは 41 年以上生きた個体が報告されている(Podlutsky *et al.*, 2005)。

このような生態学的特徴を有するコウモリが病原体を媒介した場合、病原体はコウモリ集団内で容易に水平伝播し、短時間で地理的に広い範囲に伝播される。また、寿命が長いこと持続感染する病原体の場合は、長期にわたってウイルスを保有し続ける。すなわち、コウモリの生態学的特徴は病原体を伝播する上で非常に合理的であると推測される。

日本には 37 種のコウモリが現存している。このうちオオコウモリは 2 種のみで、沖縄県および鹿児島県の離島にエラブオオコウモリ *Pteropus dasymallus* が、小笠原諸島にオガサワラオオコウモリ *Pteropus pselaphon* が生息しており、どちらも果実などを好んで食す。残りの 33 種は昆虫食のコウモリで、キクガシラコウモリ属が 4 種 (キクガシラコウモリ *Rhinolophus ferrumequinum*、コキクガシラコウモリ *Rhinolophus cornutus*、オキナワコキクガシラコウモリ *Rhinolophus pumillus*、ヤエヤマコキクガシラコウモリ *Rhinolophus perditus*)、ホオヒゲコウモリ属が 9 種 (モモジロコウモリ *Myotis macrodactylus*、ヒメホオヒゲコウモリ *Myotis ikonnikovi*、ウスリホオヒゲコウモリ *Myotis gracilis*、ドーベントンコウモリ *Myotis petax*、ノレンコウモリ *Myotis nattereri*、クロホオヒゲコウモリ *Myotis pruinosus*、ヤンバルホオヒゲコウモリ *Myotis yanbarensis*、カグヤコウモリ *Myotis frater*、クロアカコウモリ *Myotis formosus*)、ユビナガコウモリ属が 2 種 (ユビナガコウモリ *Miniopterus fuliginosus*、リュウキュウユビナガコウモリ *Miniopterus fuscus*)、ヒナコウモリ属が 2 種 (ヒナコウモリ *Vespertilio sinensis*、ヒメヒナコウモリ *Vespertilio murinus*)、クビワコウモリ属が 2 種 (クビワコウモリ *Eptesicus japonensis*、キタクビワコウモリ *Eptesicus nilssonii*)、ウサギコウモリ属が 1 種 (ニホンウサギコウモリ *Plecotus sacrimontis*)、テングコウモリ属が 4 種 (テングコウモリ *Murina hilgendorfi*、コテングコウモリ *Murina ussuriensis*、リュウキュウテングコウモリ *Murina ryukyuana*、クチバテングコウモリ *Murina tenebrosa*)、ヤマコウモリ属が 2 種 (*Nyctalus aviator*、コヤマコウモリ *Nyctalus furvus*)、アブラコウモリ属が 2 種 (*Pipistrellus abramus*、モリアブラコウモリ *Pipistrellus endoi*)、オオアブラコウモリ属が 1 種 (*Hypsugo alaschanicus*)、チチブコウモリ属が 1 種 (*Barbastella leucomelas*)、カグラコウモリ属が 1 種 (*Hipposideros turpis*)、オヒキコウモリ属が 2 種 (*Tadarida insignis*、スミイロオヒキコウモリ *Tadarida latouchei*) である。下線は本研究で捕獲した種を示す。

世界のコウモリから報告されているウイルス

上述のように世界には 1,000 種を超すコウモリが生息している。様々なコウモリ種がウイルス叢調査の対象となっており、これまでに無数と言っても過言ではない種類のウイルスが報告されているが、そのほとんどは分離に成功しておらず、ウイルス学的性状について明らかになっていない。具体的には、オルソミクソウイルス、フィロウイルス、ラブドウイルス(狂犬病ウイルス、リッサウイルス)、ヘルペスウイルス、サーコウイルス、ピコルナウイルス、レトロウイルス、カリシウイルス、アデノウイルス、ヘペウイルス、ヘパドナウイルス、コロナウイルス、レオウイルス、パラミクソウイルス、パピローマウイルス、ポリオーマウイルス、パルボウイルス、フラビウイルス、ブニヤウイルス、アレナウイルス、トガウイルス、アストロウイルス、ポックスウイルス、ボルナウイルスなどが報告されている(表 1)。ヒトに対して病原性があり、コウモリによる媒介が示唆されるウイルスにはフィロウイルス(エボラウイルス、マールブルグウイルス)、パラミクソウイルス(ニパウイルス、ヘンドラウイルス)、ラブドウイルス(狂犬病ウイルスを含むリッサウイルス)、コロナウイルス(SARS コロナウイルス、MERS コロナウイルス)がある。ニパウイルスやヘンドラウイルスはブタまたはウマにも病原性があり、家畜衛生においても重要である。また、2018 年 4 月には中国のコウモリが保有するアルファコロナウイルスを起源とする SADS コロナウイルスがブタで致死的な感染症を引き起こした(Zhou *et al.*, 2018)。このようなコウモリ由来感染症の発生予測の一助として、コウモリの保有するウイルスの調査は極めて重要であるといえる。

日本のコウモリから報告されているウイルス

わが国には約 100 種の哺乳動物が生息しており、その中で最大の種数を占めるのがコウモリである(Ohdachi *et al.*, 2009)。現在までに、日本のコウモリが保有するウイルスとしてはフラビウイルス、ラブドウイルス、アデノウイルス、コロナウイルスおよびヘルペスウイルスの報告がある。

まず、フラビウイルスは 1971 年にユビナガコウモリ *Miniopterus fuliginosus* の血液から分離されたフラビウイルス科フラビウイルス属の Yokose virus である。Yokose virus は黄熱ウイルスや

デングウイルスとの弱い中和交叉性が認められている(Tajima *et al.*, 2005)。病原性については不明であるが、ルーセットコウモリ的一种(*Rousettus leschenaultii*)への感染実験では病原性は確認されていない(Watanabe *et al.*, 2010)。

ラブドウイルスは 1972 年にコキクガシラコウモリ *Rhinolophus cornutus* の血液からラブドウイルス科レダンテウイルス属のウイルスが分離されている(Oita virus)。本ウイルスは乳のみマウスに脳内接種すると病原性を示すことが報告されている(Iwasaki *et al.*, 2014)。

アデノウイルスは 2008 年に、沖縄県に生息するヤエヤマオコウモリ *Pteropus dasymallus yayeyamai* から分離された(Maeda *et al.*, 2008)。分離されたウイルスの詳細な遺伝子性状やウイルス学的性状について明らかにされていない。

コロナウイルスは 2012 年に、Shirato らが和歌山県で捕獲したユビナガコウモリ *Miniopterus fuliginosus* の腸管と糞便からアルファコロナウイルスを検出している(Shirato *et al.*, 2012)。また、2014 年に Suzuki らはコキクガシラコウモリ *Rhinolophus cornutus* の糞便から SARS コロナウイルスに近縁なベータコロナウイルスを検出している(Suzuki *et al.*, 2014)。いずれのウイルスも分離は成功しておらず、詳細なウイルス学的性状解析や病原性については不明である。

Noguchi らはキクガシラコウモリ *Rhinolophus ferrumequinum* の脾臓初代培養細胞作製時に、偶発的にペルカウイルス属のガンマヘルペスウイルスが分離されたことを報告している(Noguchi *et al.*, 2018)。進化系統樹解析によって、本ウイルスは中国の *Myotis ricketti* から分離されたウイルスと同一の種であると考えられている。病原性等のウイルス性状に関しては明らかになっていない。

わが国ではこれまでにコウモリ由来感染症が発生したことはなく、コウモリが保有するウイルスに関する報告も少ない。しかしながら、日本に生息するドーベントンコウモリ *Myotis petax* に近縁な外国産コウモリ(*Myotis daubentonii*)からリッサウイルスが検出されており(Johnson *et al.*, 2006)、国内のコウモリの詳細なウイルス叢探索は急務である。また、温暖化の影響で生物の分布の高緯度への遷移が推測されている。コウモリは海を越えた移動も報告されており、この影響

を受けてヘンドラウイルスやニパウイルスなどの人獣共通感染症病原体を保有する熱帯産コウモリが越境性に国内に分布域を広げる可能性がある。このような背景から、国内のコウモリが保有するウイルスを体系的に把握し、かつウイルス叢の継続的なモニタリングを実施することが肝要である。

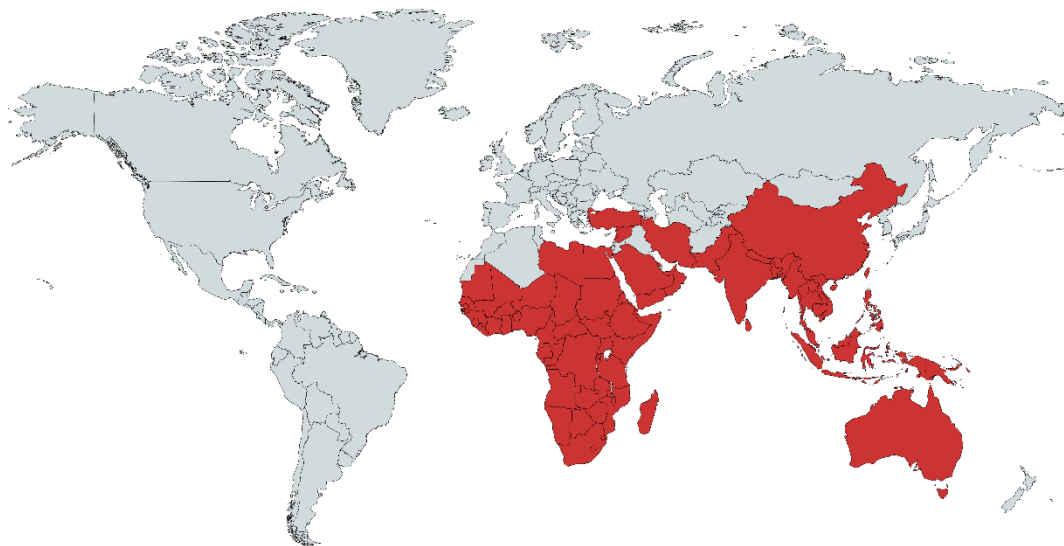


図1 オオコウモリの分布域

オオコウモリの分布している国を赤色で示した。分布域は熱帯から亜熱帯に限局する。

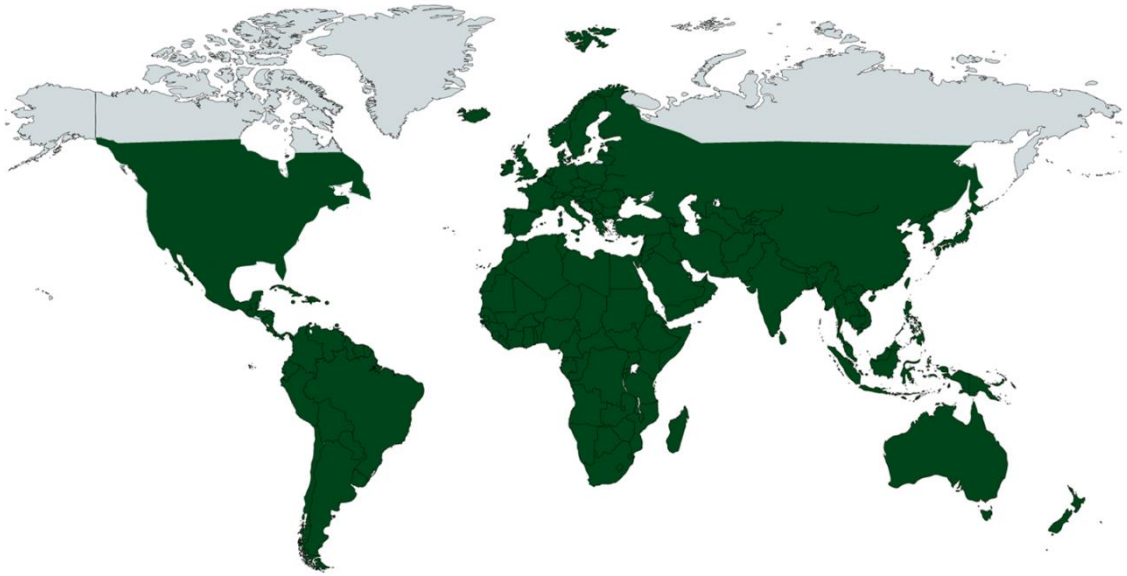


図2 ココウモリの分布域

ココウモリの分布している国を緑色で示した。分布域は極地を除く、ほぼ地球全域におよぶ。

表 1 コウモリから検出されているウイルス種

Family	Genus	Source	Reference	
Adenoviridae	Mastadenovirus	<i>Pteropus dasymallus</i>	Maeda <i>et al.</i> , 2008	
		<i>yayeyamae</i>		
		<i>Pipisterellus pipistrellus</i>	Sonntag <i>et al.</i> , 2009	
		<i>Myotis ricketti</i>	Li <i>et al.</i> , 2010	
		<i>Rousettus leschenaultii</i>	Raut <i>et al.</i> , 2012	
			Tan <i>et al.</i> , 2017	
			Baker <i>et al.</i> , 2013	
			Ogawa <i>et al.</i> , 2018	
			<i>Myotis nattereri</i>	Dacheux <i>et al.</i> , 2014
			<i>Rhinolophus sinicus</i>	Tan <i>et al.</i> , 2016
Circoviridae	Circovirus	<i>Miniopterus schreibersii</i>	Tan <i>et al.</i> , 2017	
		<i>Corynorhinus rafinesquii</i>	Hackenbrack <i>et al.</i> , 2016	
	Circovirus	<i>Rhinolophus pusillus</i>	Hu <i>et al.</i> , 2017	
		<i>Rousettus aegyptiacus</i>	Jonson <i>et al.</i> , 2018	
	Circovirus	unknown	Li <i>et al.</i> , 2010	
		<i>Rhinolophus ferrumequinum</i>	Wu <i>et al.</i> , 2012	
	Cyclovirus	unknown	Li <i>et al.</i> , 2010	
	Herpesviridae	Simplexvirus	<i>Eidolon dupreanum</i>	Razafindratsimandresy <i>et al.</i> , 2009
<i>Eidolon helvum</i>			Razafindratsimandresy <i>et al.</i> , 2009	
<i>Pteropus lylei</i>			Razafindratsimandresy <i>et al.</i> , 2009	
<i>Lonchophylla thomasi</i>			Razafindratsimandresy <i>et al.</i> , 2009	
Simplexvirus		<i>Pteropus sp.</i>	Sasaki <i>et al.</i> , 2018	
		<i>Roseolovirus ferrumequinum</i>	Pozo <i>et al.</i> , 2016	

			Watanabe <i>et al.</i> , 2009
			Watanabe <i>et al.</i> , 2010
	<i>unclassified genus</i>	<i>many species</i>	Zhang <i>et al.</i> , 2012
			Host <i>et al.</i> , 2016
			Pozo <i>et al.</i> , 2016
	<i>Rhadinovirus</i>	<i>Eptesicus serotinus</i>	Molnár <i>et al.</i> , 2008
		<i>Eptesicus fuscus</i>	Subudhi <i>et al.</i> , 2018
	<i>Percavirus</i>	<i>Myotis velifer incautus</i>	Shabman <i>et al.</i> , 2016
		<i>Pteropus vampyrus</i>	Paige <i>et al.</i> , 2013
			Chu <i>et al.</i> , 2008
			Zhu <i>et al.</i> , 2009
	<i>Mamastrovirus</i>	<i>many species</i>	Dufkova <i>et al.</i> , 2015
<i>Astroviridae</i>			Fischer <i>et al.</i> , 2017
			Mendenhall <i>et al.</i> , 2017
			Hoarau <i>et al.</i> , 2018
	<i>unclassified genus</i>	<i>Miniopterus schreibersii</i>	Wu <i>et al.</i> , 2012
		<i>Eptesicus serotinus</i>	Drexler <i>et al.</i> , 2012
		<i>Vampyrodes caraccioli</i>	Drexler <i>et al.</i> , 2012
		<i>Hipposideros abae</i>	Drexler <i>et al.</i> , 2012
		<i>Myotis bechsteinii</i>	Drexler <i>et al.</i> , 2012
<i>Hepeviridae</i>	<i>Orthohepevirus</i>	<i>Myotis daubentonii</i>	Drexler <i>et al.</i> , 2012
		<i>Myotis davidii</i>	Drexler <i>et al.</i> , 2012
		<i>Rhinolophus ferrumequinum</i>	Wang <i>et al.</i> , 2017
		<i>Mystacina tuberculata</i>	Wang <i>et al.</i> , 2015
		<i>Chaerephon pumilus</i>	Kading <i>et al.</i> , 2015
		<i>Eptesicus fuscus</i>	Herbold <i>et al.</i> , 1983
		<i>Rhinolophus rouxi</i>	Rajagopalan., 1969
	<i>Flavivirus</i>	<i>Cynopterus sphinx</i>	Pavri <i>et al.</i> , 1968
		<i>Myotis lucifugus</i>	Bell <i>et al.</i> , 1964
<i>Flaviviridae</i>		<i>Cynopterus brachyotis</i>	Salaun <i>et al.</i> , 1974
		<i>Rousettus leschenaulti</i>	Zheng <i>et al.</i> , 2013
		<i>Murina aurata</i>	Zheng <i>et al.</i> , 2013
	<i>Pestivirus</i>	<i>Scotophilus kuhlii</i>	Wu <i>et al.</i> , 2018
		<i>Rhinolophus affinis</i>	Wu <i>et al.</i> , 2012

	<i>Pegivirus</i>	<i>many species</i>	Quan <i>et al.</i> , 2013	
	<i>Hepacivirus</i>	<i>Hipposideros vittatus</i>	Quan <i>et al.</i> , 2013	
		<i>Otomops martiensseni</i>	Quan <i>et al.</i> , 2013	
<i>Orthomyxoviridae</i>	<i>alphainfluenzavirus</i>	<i>Sturnira lilium</i>	Tong <i>et al.</i> , 2012	
		<i>Artibeus planirostris</i>	Tong <i>et al.</i> , 2013	
		<i>Rousettus aegyptiacus</i>	Kandeil <i>et al.</i> , 2018	
<i>Papillomaviridae</i>	<i>Dyotapapillomavirus</i>	<i>Miniopterus schreibersii</i>	Tse <i>et al.</i> , 2012 Wu <i>et al.</i> , 2012	
		<i>Rousettus aegyptiacus</i>	Rector <i>et al.</i> , 2006	
	<i>Psipapillomavirus</i>	<i>Eidolon helvum</i>	Yinda <i>et al.</i> , 2016	
		<i>unclassified genus</i>	<i>many species</i>	Wu <i>et al.</i> , 2012 Garcia-Perez <i>et al.</i> , 2014 Wang <i>et al.</i> , 2015 Yinda <i>et al.</i> , 2016
	<i>Polyomaviridae</i>	<i>unclassified genus</i>	<i>Mystacina tuberculata</i>	Wang <i>et al.</i> , 2015
			<i>Artibeus planirostris</i>	Fagrouch <i>et al.</i> , 2012
<i>Retroviridae</i>	<i>Spumavirus</i>	<i>Rhinolophus affinis</i>	Wu <i>et al.</i> , 2012	
	<i>gammaretrovirus</i>	<i>Eptesicus serotinus</i>	Dacheux <i>et al.</i> , 2014	
<i>Picornaviridae</i>	<i>unclassified genus</i>	<i>Rhinolophus affinis</i>	Wu <i>et al.</i> , 2012	
		<i>la io</i>	Wu <i>et al.</i> , 2012	
		<i>Miniopterus pusillus</i>	Lau <i>et al.</i> , 2011	
		<i>Eidolon sp.</i>	Yinda <i>et al.</i> , 2017	
	<i>Kobuvirus</i>	unknown	Li <i>et al.</i> , 2010	
	<i>Mischivirus</i>	<i>Myotis oxygnathus</i>	Lukashev <i>et al.</i> , 2017	
		<i>Myotis myotis</i>	Lukashev <i>et al.</i> , 2017 Lau <i>et al.</i> , 2011	
<i>Miniopterus schreibersii</i>		Wu <i>et al.</i> , 2012 Kemenesi <i>et al.</i> , 2015 Lukashev <i>et al.</i> , 2017		
<i>Dicistroviridae</i>	<i>unclassified genus</i>	<i>Eidolon sp.</i>	Lau <i>et al.</i> , 2011 Wu <i>et al.</i> , 2012 Kemenesi <i>et al.</i> , 2016	
		<i>Cripavirus</i>	<i>Pipistrellus pipistrellus</i>	Lau <i>et al.</i> , 2011 Wu <i>et al.</i> , 2012 Kemenesi <i>et al.</i> , 2016

<i>Secoviridae</i>	<i>unclassified genus</i>	<i>Eidolon sp.</i>	Lau <i>et al.</i> , 2011
			Wu <i>et al.</i> , 2012
			Kemenesi <i>et al.</i> , 2016
<i>Iflaviridae</i>	<i>unclassified genus</i>	<i>Eidolon sp.</i>	Lau <i>et al.</i> , 2011
			Wu <i>et al.</i> , 2012
			Kemenesi <i>et al.</i> , 2016
<i>unclassified Picornavirales</i>	<i>unclassified genus</i>	<i>Eidolon sp.</i>	Lau <i>et al.</i> , 2011
			Wu <i>et al.</i> , 2012
			Kemenesi <i>et al.</i> , 2016
	<i>unclassified genus</i>	<i>Mystacina tuberculata</i>	Lau <i>et al.</i> , 2011
			Wu <i>et al.</i> , 2012
			Kemenesi <i>et al.</i> , 2016
<i>Caliciviridae</i>	<i>Norovirus</i>	<i>Rhinolophus pusillus</i>	Lau <i>et al.</i> , 2011
			Wu <i>et al.</i> , 2012
			Kemenesi <i>et al.</i> , 2016
	<i>Sapovirus</i>	<i>Hipposideros pomona</i>	Lau <i>et al.</i> , 2011
			Wu <i>et al.</i> , 2012
			Kemenesi <i>et al.</i> , 2016
	<i>unclassified genus</i>	<i>many species</i>	Drexler <i>et al.</i> , 2012
			Mélade <i>et al.</i> , 2016
			Noh <i>et al.</i> , 2018
<i>Paramyxoviridae</i>	<i>Henipavirus</i>	<i>many species</i>	Halpin <i>et al.</i> , 2000
			Rahman <i>et al.</i> , 2010
			Drexler <i>et al.</i> , 2012
	<i>Rubulavirus</i>	<i>many species</i>	Lau <i>et al.</i> , 2010
			Drexler <i>et al.</i> , 2012
	<i>Pneumovirus</i>	<i>Eidolon helvum</i>	Drexler <i>et al.</i> , 2012
<i>Parvoviridae</i>	<i>Bocaparvovirus</i>	<i>many species</i>	Lau <i>et al.</i> , 2017
			Hu <i>et al.</i> , 2017
	<i>Dependparvovirus</i>	<i>Myotis ricketti</i> <i>Rhinolophus pusillus</i> <i>Rhinolophus sinicus</i>	Li <i>et al.</i> , 2010;
			Lau <i>et al.</i> , 2017
			Lau <i>et al.</i> , 2017
	<i>unclassified genus</i>	<i>many species</i>	Canuti <i>et al.</i> , 2011
Lau <i>et al.</i> , 2016			
			Lau <i>et al.</i> , 2017
	<i>Amdoparvovirus</i>	<i>Rhinolophus pusillus</i>	Lau <i>et al.</i> , 2017

	<i>Protoparvovirus</i>	<i>Miniopterus schreibersii</i>	Kemenesi <i>et al.</i> , 2015
<i>Picobirnaviridae</i>	<i>Picobirnavirus</i>	<i>Pipistrellus pipistrellus</i>	Dacheux <i>et al.</i> , 2014
		<i>Hypsugo savii</i>	Dacheux <i>et al.</i> , 2014
		<i>Myotis mystacinus</i>	Dacheux <i>et al.</i> , 2014
<i>Nairoviridae</i>	unclassified genus	<i>Myotis mystacinus</i>	Dacheux <i>et al.</i> , 2014
		<i>Pipistrellus pipistrellus</i>	Dacheux <i>et al.</i> , 2014
<i>Phleboviridae</i>	unclassified genus	<i>Rousettus leschnaultii</i>	Mourya <i>et al.</i> , 2014
		<i>Micropteropus pusillus</i>	Boiro <i>et al.</i> , 1987
		<i>Hipposideros abae</i>	Boiro <i>et al.</i> , 1987
<i>Hantaviridae</i>	unclassified genus	<i>Hipposideros ruber</i>	Witkowski <i>et al.</i> , 2016
		<i>Nyctalus noctula</i>	Straková <i>et al.</i> , 2016
		<i>Taphozous melanopogon</i>	Xu <i>et al.</i> , 2015
		<i>Carollia perspicillata</i>	Sabino-Santos <i>et al.</i> , 2018
		<i>Desmodus rotundus</i>	Sabino-Santos <i>et al.</i> , 2018
		<i>Hipposideros pomona</i>	Arai <i>et al.</i> , 2013
		<i>Nycteris hispida</i>	Weiss <i>et al.</i> , 2012
	<i>Rotavirus</i>	many species	Esona <i>et al.</i> , 2010 He <i>et al.</i> , 2013 Xia <i>et al.</i> , 2013 Dacheux <i>et al.</i> , 2014 Yinda <i>et al.</i> , 2016 He <i>et al.</i> , 2017
<i>Reoviridae</i>		many species	Kohl <i>et al.</i> , 2012 Lelli <i>et al.</i> , 2013 Li <i>et al.</i> , 2016
	<i>Orthoreovirus</i>	<i>Rousettus leschenaultia</i>	Du <i>et al.</i> , 2010
		<i>Pteropus poliocephalus</i>	Gard <i>et al.</i> , 1973
		<i>Pteropus hypomelanus</i>	Chua <i>et al.</i> , 2003 Pritchard <i>et al.</i> , 2007
		<i>Eonycteris spelaea</i>	Taniguchi <i>et al.</i> , 2017
		<i>Rousettus amplexicaudatus</i>	Taniguchi <i>et al.</i> , 2017
		<i>Pteropine orthoreovirus</i>	Takemae <i>et al.</i> , 2018
	<i>Bornaviridae</i>	<i>Orthobornavirus</i>	<i>Myotis nattereri</i>
<i>Pipistrellus pipistrellus</i>			

<i>Poxviridae</i>	<i>unclassified genus</i>	<i>Eidolon helvum</i>	Baker <i>et al.</i> , 2013
		<i>Eptesicus fuscus</i>	Emerson <i>et al.</i> , 2013
			Tu <i>et al.</i> , 2017
<i>Coronavirus</i>	<i>Alphacoronavirus</i>	<i>many species</i>	Poon <i>et al.</i> , 2005
			Dominguez <i>et al.</i> , 2007
			Gloza-Rausch <i>et al.</i> , 2008
			Watanabe <i>et al.</i> , 2010
			Falcón <i>et al.</i> , 2011
			August <i>et al.</i> , 2012
	<i>Betacoronavirus</i>	<i>many species</i>	Lima <i>et al.</i> , 2013
			Anthony <i>et al.</i> , 2013
			Lelli <i>et al.</i> , 2013;
			Wacharapluesadee <i>et al.</i> , 2013
			Hall <i>et al.</i> , 2014
			Smith <i>et al.</i> , 2016
<i>Hepadnaviridae</i>	<i>Orthohepadnavirus</i>	<i>many species</i>	Bourgarel <i>et al.</i> , 2018
			Lazov <i>et al.</i> , 2018
			Misra <i>et al.</i> , 2009
			Tong <i>et al.</i> , 2009
			Quan <i>et al.</i> , 2010
			Rihtaric <i>et al.</i> , 2010
			Falcón <i>et al.</i> , 2011
			Ge <i>et al.</i> , 2013
			Wacharapluesadee <i>et al.</i> , 2013
			Anthony <i>et al.</i> , 2013
			Mendenhall <i>et al.</i> , 2016
			Smith <i>et al.</i> , 2016
Bourgarel <i>et al.</i> , 2018			
<i>Hepadnaviridae</i>	<i>Orthohepadnavirus</i>	<i>Uroderma bilobatum</i>	Drexler <i>et al.</i> , 2013
		<i>Rhinolophus alcyone</i>	Drexler <i>et al.</i> , 2013
		<i>Hipposideros cf. ruber</i>	Drexler <i>et al.</i> , 2013
		<i>Rhinolophus sinicus</i>	Wang <i>et al.</i> , 2017
		<i>Rhinolophus affinis</i>	Wang <i>et al.</i> , 2017
		<i>Hipposideros pomona</i>	He <i>et al.</i> , 2015
<i>Rabdoviridae</i>	<i>Lyssavirus</i>	<i>Pteropus alecto</i>	Field <i>et al.</i> , 1999
		<i>Pteropus poliocephalus</i>	Field <i>et al.</i> , 1999

	<i>Pteropus scapulatus</i>	Field <i>et al.</i> , 1999
	<i>Pteropus conspicillatus</i>	Field <i>et al.</i> , 1999
	<i>Saccolaimus flaviventris</i>	Field <i>et al.</i> , 1999
		Barbosa <i>et al.</i> , 2007
	<i>Desmodus rotundus</i>	Kobayashi <i>et al.</i> , 2005
		Kobayashi <i>et al.</i> , 2007
	<i>Histiotus velatus</i>	Bernardi <i>et al.</i> , 2005
	<i>Eptesicus sp</i>	Kobayashi <i>et al.</i> , 2005
		Kobayashi <i>et al.</i> , 2007
	<i>Molossus sp</i>	Kobayashi <i>et al.</i> , 2005
		Kobayashi <i>et al.</i> , 2007
	<i>Nyctinomops sp</i>	Kobayashi <i>et al.</i> , 2005
		Kobayashi <i>et al.</i> , 2007
	<i>Myotis myotis</i>	Serra-Cobo <i>et al.</i> , 2002
	<i>Myotis nattereri</i>	Serra-Cobo <i>et al.</i> , 2002
	<i>Myotis schreibersii</i>	Serra-Cobo <i>et al.</i> , 2002
	<i>Rhinolophus ferrumequinum</i>	Serra-Cobo <i>et al.</i> , 2002
	<i>Myotis daubentonii</i>	Brookes <i>et al.</i> , 2005
		Moldal <i>et al.</i> , 2017
	<i>Myotis dasycneme</i>	Moldal <i>et al.</i> , 2017
	<i>Rhinolophus affinis</i>	
Vesiculovirus	<i>Rhinolophus ferrumequinum</i>	Xu <i>et al.</i> , 2017
	<i>Myotis yumanensis</i>	Walker <i>et al.</i> , 2015
	<i>Hipposideros jonesi</i>	Ghedin <i>et al.</i> , 2013
Ledantevirus	<i>Rhinolophus cornutus</i>	Iwasaki <i>et al.</i> , 2014
	<i>Rhinolophus eloquens</i>	Metselaar <i>et al.</i> , 1969
	<i>Eidolon helvum</i>	Binger <i>et al.</i> , 2015
	<i>Hipposideros jonesi</i>	Ghedin <i>et al.</i> , 2013
unclassified genus	<i>Eptesicus fuscus</i>	Ng <i>et al.</i> , 2013
	<i>Hipposideros larvatus</i>	Xu <i>et al.</i> , 2017
	<i>Rousettus aegyptiacus</i>	Towner <i>et al.</i> , 2009
Filoviridae		Pawęska <i>et al.</i> , 2018
	<i>Ebolavirus (Reston)</i>	<i>Miniopterus schreibersii</i>
		Jayme <i>et al.</i> , 2015
		<i>Miniopterus australis</i>
		Jayme <i>et al.</i> , 2015

		<i>Cynopterus brachyotis</i>	Jayne et al., 2015
		<i>Chaerephon plicata</i>	Jayne et al., 2015
	<i>Cuevavirus</i>	<i>Miniopterus schreibersii</i>	Negredo et al., 2011
	<i>unclassified genus</i>	<i>Rousettus leschenaultia</i>	He et al., 2015
<i>Arenaviridae</i>	<i>Mammarenavirus</i>	<i>Artibeus jamaicensis</i>	Cogswell-Hawkinson et al., 2012

第1章

日本産コウモリからの コウモリコロナウイルスおよび コウモリヘペウイルスの 検出と進化系統学的解析

要 旨

日本に生息するコウモリがどのようなウイルスを保有しているかを明らかにするため、私は日本に生息する野生のコウモリを捕獲し、糞検体を採取した。これら糞検体から、コロナウイルスまたはヘペウイルスに対する特異的 RT-PCR 法によって、コウモリコロナウイルスとコウモリヘペウイルスの検出に成功した。

コロナウイルスの検出は 236 検体中 62 検体で成功した。検出されたコロナウイルス遺伝子の進化系統樹解析によって、12 検体がアルファコロナウイルス属、26 検体がベータコロナウイルス属 lineage B、24 検体がベータコロナウイルス属 lineage C に分類され、日本産コウモリには様々な種類のコウモリコロナウイルスが保有されていることが明らかとなった。Lineage B および lineage C にはヒトの病原体として知られる SARS コロナウイルスや MERS コロナウイルスが属す。しかし、進化系統樹およびスパイクタンパク質のアミノ酸配列の解析によって、今回検出されたウイルスはこれら病原体とは異なることが示唆された。

ヘペウイルスの検出は 81 検体中 3 検体で成功した。ヘペウイルスにはヒトの E 型肝炎の病原体である HEV が含まれる。進化系統樹解析によって検出されたヘペウイルスを分類したところ、既報のコウモリヘペウイルス株と同様に、*Orthohepevirus D* 種に属することが示された。

本研究によって、日本に生息するコウモリが複数種のアルファコロナウイルスを保有していること、ベータコロナウイルス lineage C ウイルスを保有していること、コウモリヘペウイルスを保有していることが初めて明らかになった。

背景と目的

コウモリは、SARS コロナウイルス、狂犬病ウイルス、ニパウイルス、およびマールブルグウイルスなど様々な人獣共通感染症病原体の自然宿主であることが知られている (Butler *et al.*, 2004; Johnson *et al.*, 2010; Kuzmin *et al.*, 2010; Lau *et al.*, 2005)。序章で記載したように、コウモリは極地を除きほぼ世界中に分布し、その種の多さから無数のウイルスを保有している。そのため、コウモリが保有するウイルスが世界的に注目され、精力的に研究されている。

コロナウイルスはエンベロープを持つ一本鎖プラス鎖 RNA ウイルスであり、ニドウイルス目コロナウイルス科に属するウイルスの総称である。ICTV は RdRp 遺伝子の進化系統樹解析によりコロナウイルスをアルファ、ベータ、ガンマおよびデルタコロナウイルスの 4 つの属に分類している。ベータコロナウイルスはさらに 4 つの lineage に分けられ、lineage B に SARS コロナウイルスが、lineage C に MERS コロナウイルスが含まれる。コロナウイルスは、様々な種類の家禽、家畜、ペット、さらにはヒトに感染し、呼吸器、腸、肝臓および中枢神経系に疾患を引き起こす (Weiss and Navas-Martin, 2005)。

コロナウイルスは約 30 kb の RNA をゲノムとして保有する (Gorbalenya *et al.*, 2006)。ゲノムの 5' 末端からおよそ 2/3 の領域には非構造タンパク質がコードされている。およそ 16 種類の非構造タンパク質は 2 つの ORF にコードされているが、ribosomal frameshift 機構によって 1 つのポリプロテインとして翻訳され、宿主またはウイルスプロテアーゼによって開裂し、成熟する (Thiel *et al.*, 2003)。残りの 1/3 の領域には構造タンパク質である S タンパク質、M タンパク質、E タンパク質、N タンパク質およびアクセサリタンパク質がコードされている (Spaan *et al.*, 1988; Liu *et al.*, 2014)。

S タンパク質はウイルス粒子から表出する I 型膜貫通糖タンパク質であり (Bosch *et al.*, 2003)、ウイルス受容体への結合を担う S1 領域と膜融合に関与する S2 領域からなる (Collins *et al.*,

1982; Li., 2016)。SARS コロナウイルスでは ACE2 を、MERS コロナウイルスでは DPP4 を受容体として認識することが報告されている(Li *et al.*, 2003; Raj *et al.*, 2013)。

2002 年に中国で発生した SARS は SARS コロナウイルスを病原体とする新興人獣共通感染症であり(Peiris *et al.*, 2003)、その発生は 30 以上の国で確認され 8,096 人が発症した(World Health Organization, 2004)。その後、SARS の流行は終息したが、この新しい病原体の自然宿主については強い関心がもたれた。SARS コロナウイルスに近縁なコロナウイルスがコウモリから検出されたことから、SARS コロナウイルスの自然宿主はコウモリである可能性が強く示唆された。この SARS コロナウイルスに近縁なウイルスの多くはキクガシラコウモリ科 *Rhinolophidae* のコウモリから報告されている (Lau *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2005; Tong *et al.*, 2009; Rihtaric *et al.*, 2010)。一方、MERS は 2012 年のサウジアラビア人の患者が初発として報告されている(Zaki *et al.*, 2012)。発生からほどなくして MERS コロナウイルスに近縁なコロナウイルスがコウモリから検出されたが(Memish *et al.*, 2013)、現在に至るまで MERS コロナウイルスとコウモリの関係性については不明な点が多い。2018 年 10 月 31 日までに 2,266 人の患者が報告され、804 人が命を落としている(致死率:35.5%)。発生のほとんどはサウジアラビアであるが(患者:1,888 人、死亡:730 人)、現在も散発的に患者が発生している(World Health Organization, 2018)。

SARS コロナウイルスや MERS コロナウイルスは既報のコロナウイルスとは異なりヒトに対して高い病原性を示したため、公衆衛生上の脅威として注目された(Holmes *et al.*, 2003; Zaki *et al.*, 2012)。これらウイルスの自然宿主がコウモリである可能性が報告されたことを契機に、コウモリが保有するコロナウイルスに関する研究が開始された(Li *et al.*, 2005; Memish *et al.*, 2013)。コウモリは様々な地域に多様な種類のコウモリが生息しており、その種数は 1,300 種を超える(Fenton *et al.*, 2014)。現在までに、アジア(Poon *et al.*, 2005; Watanabe *et al.*, 2010; Wacharapluesadee *et al.*, 2013; Mendenhall *et al.*, 2016)、アメリカ(Dominguez *et al.*, 2007; Misra *et al.*, 2009; Lima *et al.*, 2013; Anthony *et al.*, 2013)、ヨーロッパ(Gloza-Rausch *et al.*, 2008; Rihtaric *et al.*, 2010; Falcon *et al.*, 2011; August *et al.*, 2012; Lelli *et al.*, 2013; Lazov *et*

al., 2018)、アフリカ(Tong *et al.*, 2009; Quan *et al.*, 2010; Geldenhuys *et al.*, 2013; Bourgarel *et al.*, 2018)、オセアニア(Hall *et al.*, 2014; Smith *et al.*, 2016)に生息するコウモリからコロナウイルスが報告されている。

へぺウイルスはエンベロープの無い一本鎖プラス鎖 RNA ウイルスである。へぺウイルスのゲノム長はおよそ 7.2 kb で 3 つの ORF を有する(Tam *et al.*, 1991)。ORF1 はゲノム全長の 2/3 を占め、ポリプロテインとして翻訳される。ポリプロテインにはヘリカーゼや RdRp などの複製に関連するタンパク質が含まれ、プロテアーゼによる開裂を経て成熟すると考えられている。残りの ORF は subgenomic RNA からバイシストロニックに翻訳される。ORF2 はカプシドタンパク質をコードしており、多くの中和エピトープを含む(Jammel *et al.*, 1996; Yamashita *et al.*, 2009)。ORF3 はリン酸化タンパク質でウイルス粒子の細胞外への放出に関係すると考えられている(Yamada *et al.*, 2009)。

へぺウイルス科には *Orthohepevirus* 属または *Piscihepevirus* 属のウイルスが含まれる。*Orthohepevirus* 属には *Orthohepevirus A~D* の 4 種が分類されている(Smith *et al.*, 2014)。*Orthohepevirus A* には、ヒトの急性肝炎の病原体である HEV が含まれる(Wong *et al.*, 1980)。*Orthohepevirus B* には、ニワトリの肝炎・脾腫症候群の病原体であるトリ E 型肝炎ウイルスが含まれる(Haqshenas *et al.*, 2001)。*Orthohepevirus C* には、2 種類の遺伝子型(C1 と C2)が知られ、C1 はげっ歯類、C2 は食肉目から検出されている(Johne *et al.*, 2010; Raj *et al.*, 2012)。*Orthohepevirus D* は BatHEV を含む(Drexler *et al.*, 2012)。BatHEV は 2012 年に初めてドイツのコウライクビワコウモリ(*Eptesicus serotinus*)より報告された新しいへぺウイルスで、HEV と 57.4-64.8%のゲノムの相同性を有する(Smith *et al.*, 2014)。これまでの BatHEV の報告は中国、ドイツ、パナマ、ガーナ、ニュージーランドに生息する数種類のコウモリからにとどまる(Drexler *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2017)。本ウイルスはこれまでに分離が成功しておらず、詳細なウイルス学的性状や病原性に関する報告はない。

わが国には 37 種のコウモリが生息しているが(Ohdachi *et al.*, 2009)、コウモリコロナウイルス

が検索されたコウモリ種はわずか数種である(Shirato *et al.*, 2012; Suzuki *et al.*, 2014)。また、コウモリヘペウイルスに関する報告はない。本研究では、日本に生息するコウモリを対象とし、コロナウイルスとヘペウイルスの保有状況を調査した。また、検出されたウイルスについて進化系統学的解析を実施した。

材料と方法

コウモリの検体

2015 年から 2016 年にかけて、環境省または各都道府県自治体の許可を得て、青森県、秋田県、岩手県、栃木県、東京都、長野県で計 236 頭のコウモリ(12 種類)をハープトラップまたは霞網を用いて捕獲した(許可番号:自第 147 号、環東地野第 15060430-1 号、環東地野第 120525-004 号)。捕獲したコウモリは主として形態的特徴を元に同定した(図 1-1)。同定が困難であった種については、遺伝的情報を元に同定した。具体的には、糞検体に含まれる宿主 DNA(剥離した腸細胞などに由来)を抽出し、PCR 法によりチトクロム b 遺伝子を増幅後、塩基配列を決定した。新鮮な糞便を得るために、捕獲したコウモリをプラスチック袋に最大で 1 時間入れ、その間に排泄された糞を 1 mL の DMEM が入った 1.5 mL のサンプルチューブに回収した。糞便回収後、コウモリは速やかに放獣した。糞便に含まれる細菌や真菌の増殖を防ぐため、DMEM にはペニシリン(100U/mL)、ストレプトマイシン(1mg/mL)、ゲンタマイシン(100 μ g/mL)、およびアンホテリシン B(2 μ g/mL)を添加した。検体はドライアイスに入れた状態で輸送した。

細胞

イヌ腎臓由来細胞(MDCK)、アフリカミドリザル腎臓由来細胞(Vero)、ヒト肺腺癌由来細胞(A549)、ウシ腎臓由来細胞(MDBK)、ネコ腎臓由来細胞(CRFK)、ブタ腎臓由来(PK-15)は 5%ウシ胎児血清(FBS)加 DMEM 培地を用いて、37°C, 5%CO₂ インキュベーターで培養、継代した。コウモリ由来細胞 BKT、IndFSP1、YubFKT1、DemKT1 および FBKT は山口大学の前田健先生から分与いただいた。これらは 10%FBS 加 RPMI-1640 培地を用いて、37°C, 5%CO₂ インキュベーターで培養、継代した。

コロナウイルスおよびヘペウイルス遺伝子の検出

コロナウイルスおよびヘペウイルス遺伝子は RT-PCR 法によって検出した。ウイルス RNA は糞便の遠心上清 200 μ L から QIAamp viral RNA mini kit (QIAGEN) を用いて抽出した。cDNA は PrimeScript™ RT reagent Kit (TAKARA bio) を用いて合成した。コロナウイルス遺伝子の検出には Poon らのコロナウイルスの RdRp 遺伝子をターゲットとしたコンセンサスプライマー (表 1-1) を改変して使用した (Poon *et al.*, 2005)。ヘペウイルス遺伝子の検出用プライマーは、既知のヘペウイルスの RdRp 遺伝子の塩基配列比較に基づいて、高い保存性を示した領域に設計した (表 1-1)。増幅産物はサンガー法 (Applied biosystems 3170xl, Life technologies) により塩基配列を決定し、BLAST 解析によって目的ウイルスの遺伝子であることを確認した。

コロナウイルス S 遺伝子塩基配列の決定

コロナウイルス遺伝子が陽性の検体については S 遺伝子の検出を試みた。プライマーは NCBI に登録されているコロナウイルスの塩基配列を元に設計した (表 1-2)。

ヘペウイルスゲノムの部分塩基配列の決定

ヘペウイルス遺伝子が陽性の検体についてはゲノム塩基配列の一部を決定した。プライマーは、数種類の既知のヘペウイルスのゲノム塩基配列の比較から、高度に保存されていることが推定された領域に設計した (表 1-3)。増幅産物の塩基配列はサンガー法により決定し、ATGC ソフトウェア (ゼネティックス) を用いてアッセンブルした。

進化系統樹解析

コロナウイルスの RdRp 遺伝子の塩基酸配列または S 遺伝子のアミノ酸配列に基づき、近隣結合法 (Saitou and Nei, 1987) により進化系統樹を作成した。塩基置換モデルには木村二変数モデルを、アミノ酸置換モデルには Jones-Taylor-Thornton モデルを用いた (Kimura, 1980;

Jones *et al.*, 1992)。塩基配列またはアミノ酸配列のアラインメントには MAFFT version 7.409 ソフトウェアを使用した(Katoh and Standley, 2013)。進化系統樹の作成には MEGA version 7.0 ソフトウェアを用いた(Kumar *et al.*, 2016)。進化系統樹作成に使用した参照株の GenBank アクセション番号は次のとおりである。HCoV 229E (AF304460)、TGEV (KX900411)、BtCoV HKU-2 (EF203067)、BtCoV HKU-8 (DQ249228)、FIPV (NC_002306)、BtCoV 512 (NC_009657)、PEDV (MH052689)、BtCoV/1A (NC_010437)、BtRf-AlphaCoV/HuB2013 (KJ473807)、BtCoV/KY33 (HQ728485)、BtCoV CDPHE15 (NC_022103)、BtMr-AlphaCoV (NC_028811)、BtCoV/HKU10/TLC1347A (JQ989273)、BtCoV/NM-98-62 (GU190216)、BtCoV M.ful/Japan/01/2009 (AB619638)、BtCoV M.ful/Japan/01/2010 (AB619640)、HCoV NL63 (AY567487)、MHV (AY700211)、HCoV HKU-1 (NC_006577)、HCoV OC43 (AY391777)、SARS-CoV (AY274119)、SL-CoVRsSHC014 (KC881005)、SL-CoVRs3367 (KC881006)、BtCoV Rf1 (DQ412042)、BtCoV Rm1 (DQ412043)、BtCoV HKU3-1 (DQ022305)、BtCoV Rp3 (DQ071615)、BtCoV Og44 (AB890000)、BtCoV BM48-31 (NC_014470)、MERS-CoV (JX869059)、BtCoV HKU-4 (NC_009019)、BtCoV HKU-5 (NC_009020)、BtVs-BetaCoV/SC2013 (KJ473821)、Eptesicus/13RS384 (KF312399)、BtCoV HKU9-1 (NC_009021)、IBV (AY851295)、および BWCoV (NC_010646)。

ヘペウイルスの RdRp 遺伝子またはカプシドタンパク質遺伝子のアミノ酸配列に基づき、最尤法を利用して進化系統樹を作成した。アミノ酸置換モデルには Jones-Taylor-Thornton モデルを用いた(Jones *et al.*, 1992)。アミノ酸配列のアラインメントには CLUSTAL W を使用した(Thompson *et al.*, 1994)。進化系統樹の作成には MEGA version 7.0 ソフトウェアを用いた(Kumar *et al.*, 2016)。進化系統樹作成に使用した参照株の GenBank アクセション番号は次のとおりである。BtHEV-Ej1 (LC340968)、BtHEV-Ps1 (LC340969)、BtHEV-Ej2 (LC340970)、HEV genotype 1 (D11092)、HEV genotype 2 (M74506)、HEV genotype 3

(EU723512)、HEV genotype 4 (AB220974)、Rabbit-HEV (FJ906895)、Wild boar-HEV (AB573435)、Avian-HEV (AM943647)、HEV genotype C1 (GU345042)、Rf-HEV (KJ562187)、Bat-HEV/BS7 (JQ001749)、BtHEV-Md2350 (KX513953)、および Cutthroat trout virus (NC_015521)。

ベータコロナウイルス lineageC のゲノム塩基配列の決定

検出されたベータコロナウイルス lineageC に属するコロナウイルスのうち 1 検体 (Vespertilio sinensis CoV-1 と命名) については全ゲノム配列の決定を実施した。プライマーは NCBI に登録されているベータコロナウイルス lineageC のウイルスの塩基配列を元に設計した (表 1-2)。増幅産物の塩基配列はサンガー法により決定し、ATGC ソフトウェア (ゼネティックス) を用いてアセンブルした。

ウイルス分離

コロナウイルスまたはヘペウイルスの遺伝子陽性検体からウイルス分離を試みた。糞便検体の遠心上清 (10,000×g、15 分間、4°C) を 10 倍希釈し、その 100 μL を MDCK、Vero、A549、MDBK、CRFK、PK-15、BKT、IndFSP1、YubFKT1、DemKT および FBKT 細胞に接種した。37°C で 1 時間の吸着の後、接種液を除去し、細胞を PBS で洗浄し、1%FBS 加 DMEM 培地を加えた。サンプルを接種した細胞の上清を最大で 3 回盲継代し、CPE を指標としてウイルス分離の有無を観察した。

結 果

日本のコウモリからのコロナウイルス遺伝子の検出と分類

捕獲した計 236 匹の食虫コウモリは、その形態学的特徴またはチトクロム b 遺伝子塩基配列によって 12 種類に分類された(図 1-1)。コロナウイルスを検出するために、糞便検体を用いて RT-PCR を実施したところ、236 検体のうち 62 検体がコロナウイルス遺伝子陽性であった。

次に、検出されたコロナウイルスを分類するために、増幅した RdRp 遺伝子塩基配列に基づいた進化系統樹を作成した(図 1-2)。なお、RdRp 遺伝子塩基配列の相同性が 100%であった検体は一つの株として扱った。62 陽性検体中 12 検体がアルファコロナウイルス属に分類された。また、26 検体は SARS コロナウイルスが含まれるベータコロナウイルス lineageB に分類された。残りの 24 検体は MERS コロナウイルスが含まれるベータコロナウイルス lineageC に分類された(表 1-4)。この結果は、日本に生息するコウモリが複数種のコロナウイルスを保有していることを示している。また、日本産コウモリがベータコロナウイルス lineageC のウイルスを保有していることが初めて明らかになった。

今回検出されたアルファコロナウイルス 12 検体は日本のユビナガコウモリ *Miniopterus fuliginosus* から検出されたアルファコロナウイルス(BtCoV M.ful/Japan01/2009)とは近縁ではなかった(Shirato *et al.*, 2012)。また、検出されたコウモリ種についても 2 検体はコキクガシラコウモリ *Rhinolophus cornutus*、1 検体はキクガシラコウモリ *Rhinolophus ferrumequinum*、2 検体はヒメホオヒゲコウモリ *Myotis ikonnikovi*、7 検体はモモジロコウモリ *Myotis macrodactylus* 由来で、ユビナガコウモリとは異なった(Shirato *et al.*, 2012)。この結果は、日本に生息する様々な種類のコウモリがアルファコロナウイルスを保有していることを示している。

検出されたベータコロナウイルス lineage B は 25 検体がコキクガシラコウモリに、1 検体がキクガシラコウモリに由来していた。2 種のコウモリはいずれも *Rhinolophus* 属のコウモリであるが、

この結果は、ほとんどの lineage B のウイルスが *Rhinolophus* 属由来であるというこれまでの報告を支持する(Lau *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2005; Tong *et al.*, 2009; Rihtaric *et al.*, 2010)。すでに、Suzuki らによって lineage B のウイルス(Og44)が日本に生息するコキクガシラコウモリによって保有されていることが明らかにされている(Suzuki *et al.*, 2014)。一方、日本に生息するキクガシラコウモリによる lineage B のウイルスの保有が明らかになったのは初めてである。また、今回検出された lineage B のウイルスは SARS コロナウイルスとは進化系統学的に離れていることが示唆された。

検出されたベータコロナウイルス lineage C は 18 検体がヒナコウモリ *Vespertilio sinensis* に 6 検体がクビワコウモリ *Eptesicus japonensis* に由来した。Lineage C には MERS コロナウイルスが含まれる。RdRp 塩基配列による進化系統樹では、今回検出された lineage C ウイルスは MERS コロナウイルスの近傍に位置したため、S 遺伝子の進化系統樹解析を実施した。

コロナウイルス S 遺伝子の進化系統樹解析

RdRp で得られた進化系統関係を裏付けるために、RdRp 遺伝子陽性のすべての検体において S 遺伝子の検出および進化系統樹解析を試みた。S 遺伝子の増幅に成功した検体を進化系統樹解析に供したところ、RdRp 遺伝子の系統樹と同様の分類結果が得られた(図 1-3)。また、RdRp 系統樹では、MERS コロナウイルスと検出された lineage C ウイルスとの進化系統関係が不明瞭であったが、S 遺伝子の進化系統樹によって、検出されたウイルスが MERS コロナウイルスとは異なるクラスターに属することが示された。

コロナウイルス S タンパク質の受容体結合領域のアミノ酸配列

S タンパク質は宿主受容体との結合に関与し、SARS コロナウイルスでは ACE2 を、MERS コロナウイルスでは DPP4 を受容体として利用する(Li *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2013)。一方、コウモリ由来の lineage B や lineage C ウイルスの多くはこれらを受容体として利用できないことが

報告されている(Ren *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2014)。検出された Lineage B および lineage C のウイルスが ACE2 や DPP4 を認識し得るかを推定するために、S タンパク質の受容体結合領域のアミノ酸配列を比較した。まず、検出された lineage B ウイルスでは 1 検体(Rhinolophus cornutus CoV-3)で受容体結合領域のアミノ酸配列を決定できた。この配列を SARS コロナウイルスの同領域のアミノ酸配列と比較したところ、lineage B ウイルスでは受容体結合領域の 465 番目から 472 番目のアミノ酸が欠損していた(図 1-4A)。さらに検出された lineage B のウイルスでは、S タンパク質が受容体を認識する上で重要なアミノ酸残基(Li *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2012)が保存されていなかった(図 1-4A)。検出された lineage C ウイルスでは、クビワコウモリ由来の 1 検体(Eptesicus japonensis CoV-1)とヒナコウモリ由来の 1 検体(Vespertilio sinensis CoV-1)で受容体結合領域のアミノ酸配列を決定した。しかしながら、これらの受容体結合領域には欠損が認められ(図 1-4B)、受容体認識に重要なアミノ酸残基(Wang *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2014)も保存されていなかった。

ベータコロナウイルス株のゲノム塩基配列の決定

検出されたベータコロナウイルス lineage C のうち 1 検体(Vespertilio sinensis CoV-1)についてはサンガー法によるゲノム塩基配列の決定を試みた。その結果、末端配列の一部を除きほぼすべてのゲノム塩基配列を決定することに成功した。Vespertilio sinensis CoV-1 は他の lineage C のウイルスと同様のゲノム構造を有していた。Vespertilio sinensis CoV-1 の各 ORF にコードされているタンパク質の相同性を参照株と比較した結果を表 1-5 に示した。その結果、いずれのタンパク質においても Vespertilio superans BtCoV/SC2013 (Yang *et al.*, 2014) と最も高い相同性(80-100%)を有することが分かった。一方、MERS コロナウイルスとは 37-82%の相同性にとどまった。

日本のコウモリからのヘペウイルス遺伝子の検出と分類

日本のコウモリがへペウイルスを保有するかどうかを調べるために、上述の 236 検体のうち 81 検体を用いてへペウイルスの検出を試みた(図 1-5)。その結果、81 検体中 3 検体が RT-PCR 陽性となり、クビワコウモリ *Eptesicus japonensis* から得た 2 検体を BtHEV-Ej1 および BtHEV-Ej2、ニホンウサギコウモリ *Plecotus sacrimontis* から得た 1 検体を BtHEV-Ps1 と命名した。増幅産物の塩基配列を BLAST 解析したところ、BtHEV-Ej1 または BtHEV-Ej2 はドイツで捕獲されたコウライクビワコウモリ *Eptesicus serotinus* から検出された BatHEV/BS7 と最も高い相同性を示した。一方、BtHEV-Ps1 は、ドイツで捕獲されたドーベントンコウモリ *Myotis daubentonii* から検出された BtHEV/NMS098B と最も高い相同性を示した。したがって、これら 3 検体はいずれも BatHEV であることが示唆された。次に検出された BatHEV の進化系統関係を詳細に解析するために RdRp 遺伝子塩基配列に基づいた進化系統樹を作成した(図 1-6)。その結果、検出した BatHEV はいずれも *Orthohepevirus D* に属することが分かった。

検出されたへペウイルスのゲノム配列の決定

検出された BatHEV の全ゲノム塩基配列を決定するために、特異的プライマーを用いたサンギ一法を実施した。しかし、いずれの検体でも全ゲノム塩基配列を得るには至らず、ORF1 の一部から ORF2 の末端付近までの解読にとどまった。今回検出した 3 検体で共通して解読できたゲノム領域(2844 bp)の相同性を比較したところ、BtHEV-Ej1 と BtHEV-Ej2 間で 99%、BtHEV-Ej1 または BtHEV-Ej2 と BtHEV-Ps1 間で 75%であった。したがって、日本に生息するコウモリに複数種の BatHEV が保有されていることが分かった。

カプシド遺伝子の進化系統樹解析

RdRp で得られた系統関係を裏付けるために、ゲノム解読で得られたカプシド遺伝子のアミノ酸配列をもとに進化系統樹解析を試みた(図 1-7)。その結果、RdRp 遺伝子系統樹と同様に、他の BatHEV と同じ *Orthohepevirus D* 種に属した。

コウモリコロナウイルスとコウモリヘペウイルスの分離

コロナウイルス RNA またはコウモリヘペウイルス RNA が検出されたすべての検体に関して複数の細胞を用いてウイルスの分離を試みたが、3 回の盲継代後の接種細胞には、CPE は認められなかった。また、培養上清からはいずれのウイルス RNA も検出できなかった。

考 察

コウモリは様々な人獣共通感染症の病原体を媒介していることが知られており、コウモリがどのようなウイルスを保有しているかを解析することは非常に重要な研究課題となっている。コウモリ目にはおよそ 1,300 種類が含まれており、哺乳類の中ではげっ歯目に次いで 2 番目に大きなグループである(Fenton *et al.*, 2014)。日本にはこのうち 5 科 37 種が生息しているが(Ohdachi *et al.*, 2009)、そのほとんどの種においてどのようなウイルスを保有しているかは明らかになっていない。第 1 章では、12 種類のコウモリから採取した糞検体から、コロナウイルスとヘペウイルスをターゲットとして検出を試みた。その結果、日本のコウモリには、SARS コロナウイルスや MERS コロナウイルスに近縁なウイルスを含めた様々なコロナウイルスが保有されていることが明らかとなった。また近年、海外産コウモリから報告が相次いでいるコウモリヘペウイルスが、わが国のコウモリにも保有されていることが明らかとなった。

これまでに日本のコウモリから検出されたアルファコロナウイルスとしてはユビナガコウモリ *Miniopterus fuliginosus* から検出された BtCoV M.ful/Japan01/2009 があるが(Shirato *et al.*, 2012)、今回検出されたアルファコロナウイルスとの RdRp 遺伝子の相同性は 68-71%にとどまった。この結果は、日本のコウモリによって複数種のコウモリコロナウイルスが保有されていることを示唆している。アルファコロナウイルスが検出されたコウモリ種に着目すると、コキクガシラコウモリ *Rhinolophus cornutus* またはキクガシラコウモリ *Rhinolophus ferrumequinum* から検出されたウイルスは互いに近縁であった。また、ヒメホオヒゲコウモリ *Myotis ikonnikovi* またはモモジロコウモリ *Myotis macrodactylus* に由来するウイルスは互いに近縁であった。参照株として進化系統樹に加えた海外産コウモリの種類を踏まえると、検出されたアルファコロナウイルスの系統の差異はコウモリの分類の違いと相関しており、コウモリ種とアルファコロナウイルスが長い年月の中で共進化した結果である可能性が高い。

Lineage B のウイルスがコキクガシラコウモリ *Rhinolophus cornutus* とキクガシラコウモリ *Rhinolophus ferrumequinum* から検出された。コキクガシラコウモリの検体はすべて岩手県の 1 地点で採取したものである。Suzuki らは同県その他地点で捕獲したコキクガシラコウモリから lineage B のウイルスを検出しており (Suzuki *et al.*, 2014)、今回検出した lineage B のウイルスと非常に近縁であった (98% の相同性)。また、キクガシラコウモリから検出された lineage B のウイルスとコキクガシラコウモリから検出されたウイルスとは進化系統樹上で共通のクラスターに位置した。この結果は、*Rhinolophus* 属コウモリ間で lineage B のウイルスが伝播していることを示唆している。興味深いことに、日本の *Rhinolophus* 属コウモリから検出された lineage B のウイルスは、SARS コロナウイルスおよび海外に生息する *Rhinolophus* 属コウモリ由来の lineage B のウイルスとは進化系統学的に離れていた。さらに、中国には同種のキクガシラコウモリが生息しているが (Piraccini *et al.*, 2016)、このコウモリから検出された lineage B のウイルス (Rf1) (Ren *et al.*, 2006) は、日本のキクガシラコウモリから検出されたウイルスとは明らかに遠縁であった。これらの結果から、日本のコウモリが保有する lineage B のウイルスは島国という閉鎖的な環境の中で独自の進化を遂げていることが示唆された。今後はより多くの地域、検体を対象としてさらなる調査を行い、lineage B ウイルスの国内における分布や宿主域について調べる必要がある。

コウモリが保有する lineage B のウイルスでは、ACE2 を受容体として利用できるウイルスとできないウイルスが存在し (Ren *et al.*, 2008; Ge *et al.*, 2013)、前者は SARS コロナウイルスと同じ祖先ウイルスに由来すると考えられている。そこで、検出した lineage B のウイルス 1 検体については S タンパク質の受容体結合領域のアミノ酸配列から SARS コロナウイルスの受容体である ACE2 を利用できるかを推定した。ACE2 を利用できない lineage B のウイルスでは、S タンパク質の受容体結合領域に少なくとも 2 カ所の欠損が認められている (Ge *et al.*, 2013)。興味深いことに、今回検出された株の S タンパク質には 8 アミノ酸残基からなる 1 カ所の欠損があり、その 1 カ所も他の lineage B のウイルスで認められたものよりも小さかった。しかし、この欠損によって受容体結合領域の立体構造が変化する可能性があり、SARS コロナウイルスの S タンパク質の

ように ACE2 に結合できる可能性は低くなると考えられた。また、SARS コロナウイルスの S タンパク質上の 5 つのアミノ酸残基、すなわち Y442、L472、N479、T487、Y494 はヒト ACE2 との結合親和性を決定するために重要であることが報告されている (Li *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2012)。今回検出したウイルスにおいて、対応するアミノ酸残基は I442、K479、A487、H494 であり、いずれのアミノ酸残基も一致しない。また、472 位は上述の欠損領域に位置する。このことから、仮に上述の 8 アミノ酸残基の欠損が立体構造に影響しなかったとしても、これら 5 つのアミノ酸残基がまったく一致しなかったことを考えると、今回検出されたウイルスが ACE2 に結合できる可能性は低いと考えられた。

今回、国内のコウモリからでは初めて Lineage C のウイルスをヒナコウモリ *Vespertilio sinensis* とクビワコウモリ *Eptesicus japonensis* から検出した。これらのウイルスは海外に生息する *Eptesicus* 属または *Vespertilio* 属のコウモリから検出された lineage C のウイルス (Yang *et al.*, 2014; De Benedictis *et al.*, 2014) と進化系統学的に近縁であった。一方、外国産の *Pipistrellus* 属や *Tylonycteris* 属のコウモリから検出されているウイルスとは異なる進化系統関係を示した。これらの結果から、少なくともこれら 4 属のコウモリを含む共通祖先種が保有していた lineage C の祖先ウイルスがコウモリの種分岐とともに進化してきたことが推察された。

lineage C のウイルスにおいても、MERS コロナウイルスの受容体である DPP4 を利用できるウイルスとできないウイルスが存在することが知られており (Yang *et al.*, 2014; Luo *et al.*, 2018)、前者は MERS コロナウイルスと同じ祖先ウイルスに由来する可能性がある。検出した lineage C のウイルスのうちヒナコウモリ由来 1 検体とクビワコウモリ由来 1 検体において、S タンパク質の受容体結合領域のアミノ酸配列を比較したところ、両受容体結合領域には欠損が認められた。興味深いことに、受容体結合領域に欠損がない BtCoV HKU4 や BtCoV NL13845 と比較すると親和性は低いのが、欠損を伴う BtCoV HKU25 も DPP4 に結合できることが報告されている (Yang *et al.*, 2014; Luo *et al.*, 2018; Lau *et al.*, 2018)。また、MERS コロナウイルスの S タンパク質上の 12 個のアミノ酸残基、すなわち Y499、L506、D510、E513、W535、E536、D537、D539、Y540、

R542、W553、および V555 は DPP4 との結合親和性を決定するために重要であることが報告されている (Wang *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2014)。BtCoV HKU4 や BtCoV NL13845 ではこのうち 4~6 残基が保存されているが、BtCoV HKU25 や DPP4 に結合できない BtCoV HKU5 ではわずか 1 残基にとどまる。今回検出したウイルスにおいても 0~1 残基の一致であった。これらの結果から、今回の lineage C のウイルスが DPP4 への結合性を有するかは不明であるが、結合できたとしてもその親和性は低いことが推定された。

BtHEV-Ej1 および-Ej2 は、長野県に生息するクビワコウモリから検出された。捕獲地点に隣接する建物は複数種のコウモリのナイトルーストとして使用されている。ルーストの共有はウイルスが別種のコウモリに伝播する可能性を高めると考えられるが、クビワコウモリと同日に捕獲したヒメホオヒゲコウモリとキクガシラコウモリコウモリからは BatHEV は検出されなかった。このことから、BtHEV-Ej1 および BtHEV-Ej2 はクビワコウモリに対する宿主特異性が高いことが示唆された。BtHEV-Ej1 または BtHEV-Ej2 と進化系統学的に近縁であった Bat HEV/BS7 は、*Eptesicus* 属の異なる種であるコウライクビワコウモリから検出されている (Drexler *et al.*, 2012)。これらのコウモリの分布域は重複していないため、BtHEV-Ej1、BtHEV-Ej2 および BatHEV/BS7 の祖先ウイルスはこれらコウモリの共通祖先に感染しており、コウモリ種の進化の過程でウイルス種が分岐してきた可能性がある。

通常、ニホンウサギコウモリは 10-30 頭ほどから成る出産保育コロニーを形成する (Swift, 1998; Entwistle *et al.*, 2000)。本研究においても BtHEV-Ps1 が検出されたニホンウサギコウモリは、青森県の小規模の繁殖コロニーで捕獲された。また、Entwistle らは、ウサギコウモリが出生したコロニーに忠実に帰還し、コロニー周囲 300 m 以内で生活することを 15 年間にも及ぶ標識再捕獲調査によって明らかにした (Entwistle *et al.*, 2000)。さらに、ウサギコウモリの採餌時の移動距離はねぐらから最長で 2.8 km であったことが報告されている (Entwistle *et al.*, 1996)。これらの情報は、ウサギコウモリが出生した地点からほとんど移動せずに生涯を全うすることを示しており、BtHEV-Ps1 がニホンウサギコウモリ内で循環している可能性が高いことを示している。

第 1 章では、日本に生息するコウモリがコロナウイルスとヘペウイルスを保有していることを明らかにした。しかし、これは日本に生息するコウモリが保有するウイルスの一端を解明したに過ぎない。今後は、日本に生息するより多くのコウモリ種を対象とし、それらが保有するウイルス叢を網羅的に明らかにしていく必要がある。

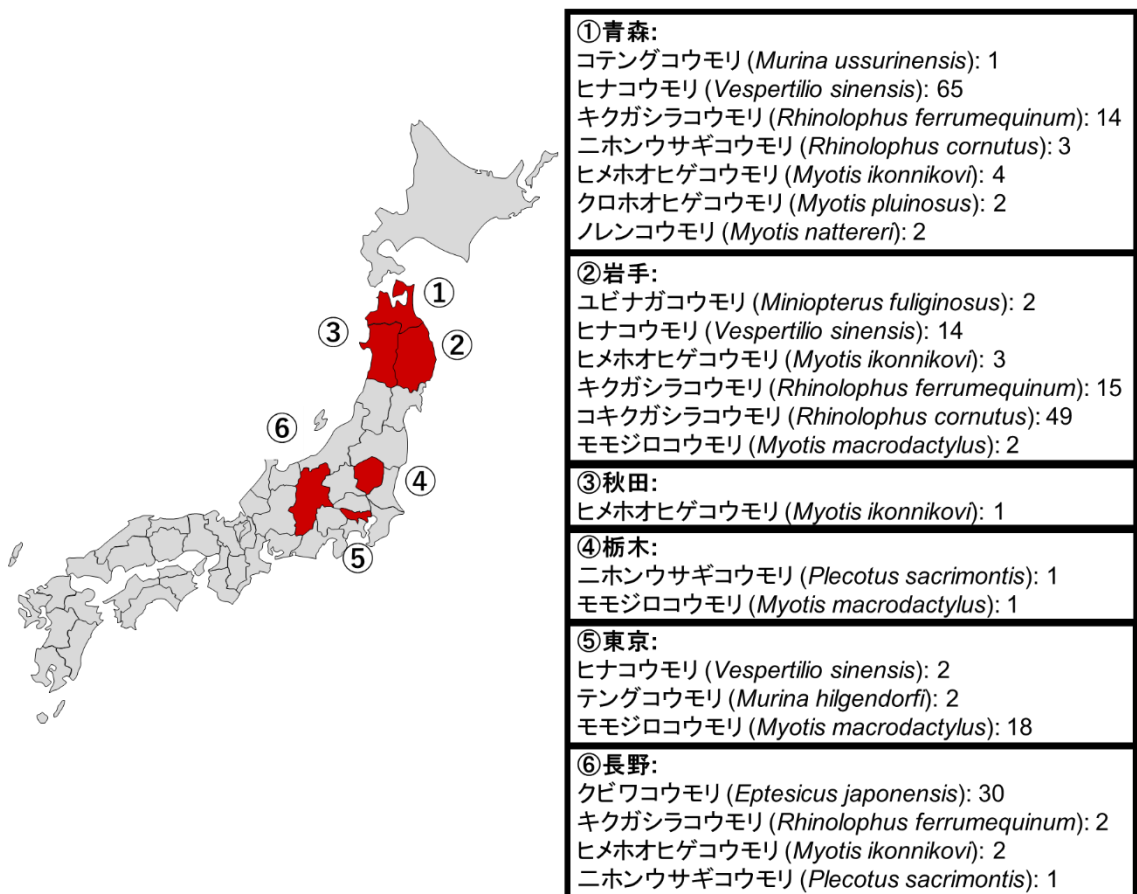


図 1-1 コロナウイルスの検出に用いたコウモリの検体

1 都 5 県 (赤色) で捕獲した 12 種類のコウモリから、計 236 の糞便検体を採集した。コウモリ種と検体数を都道府県ごとに記載した。

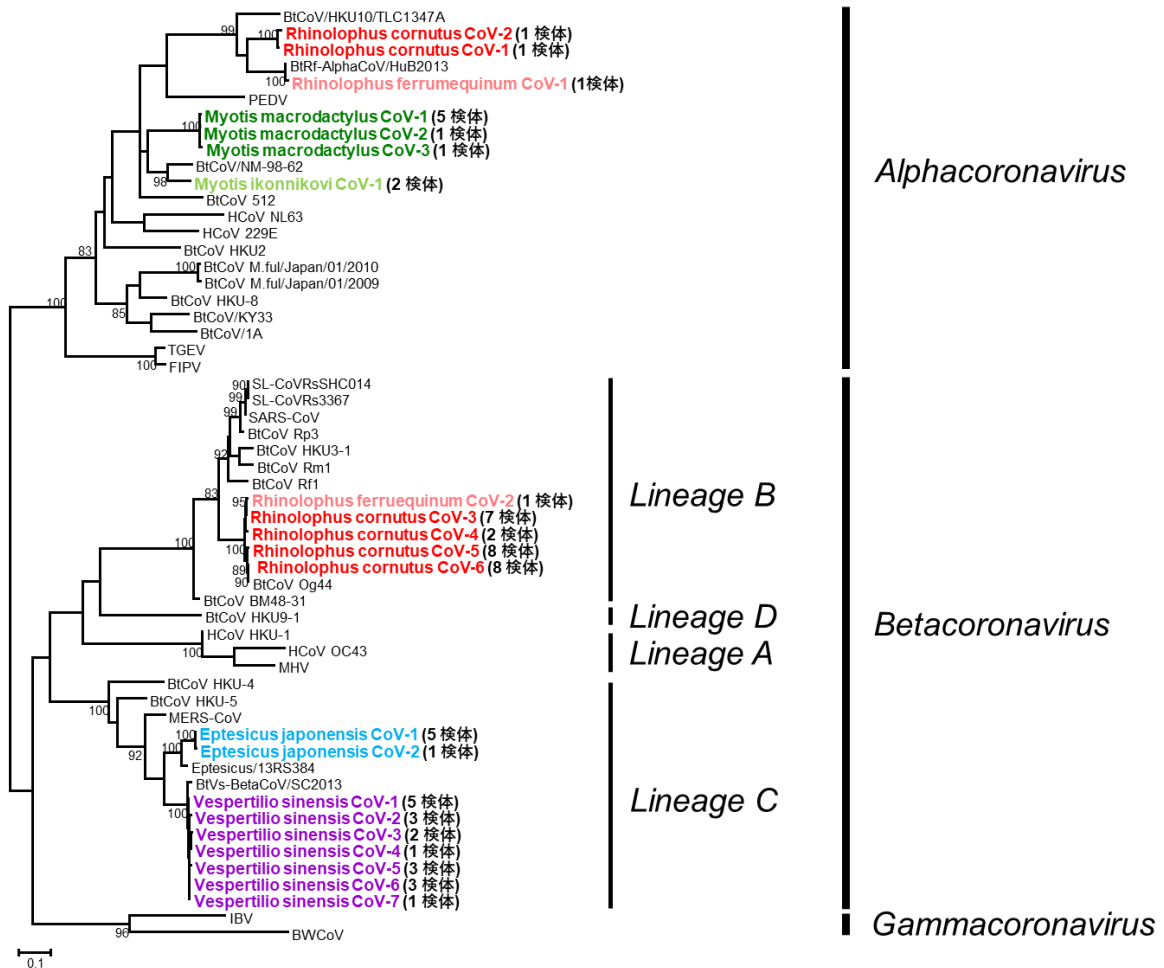
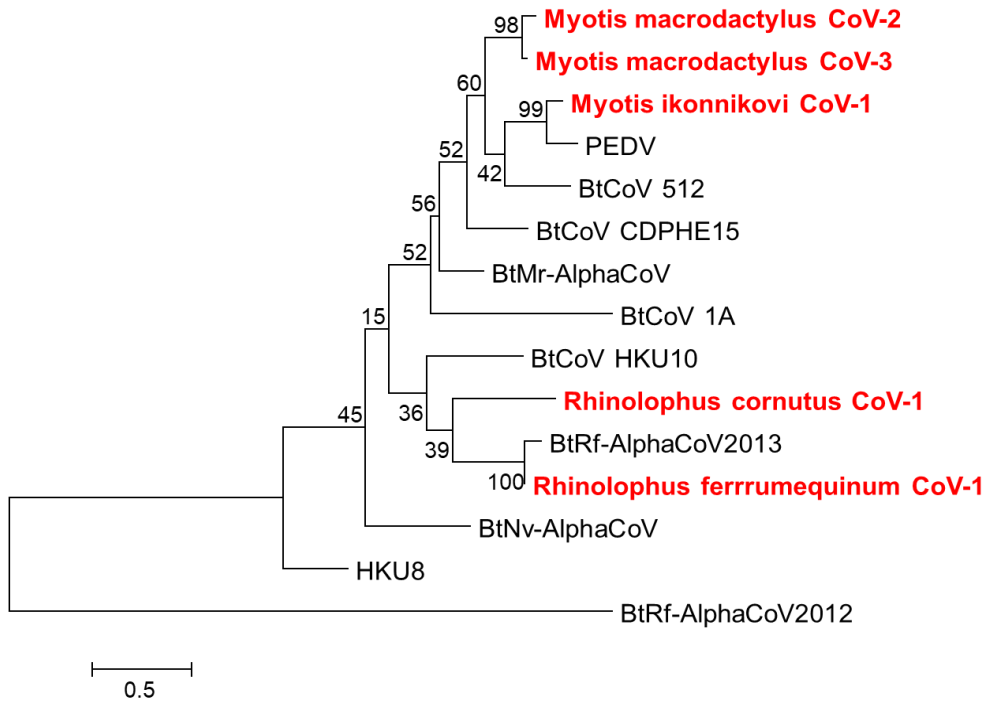


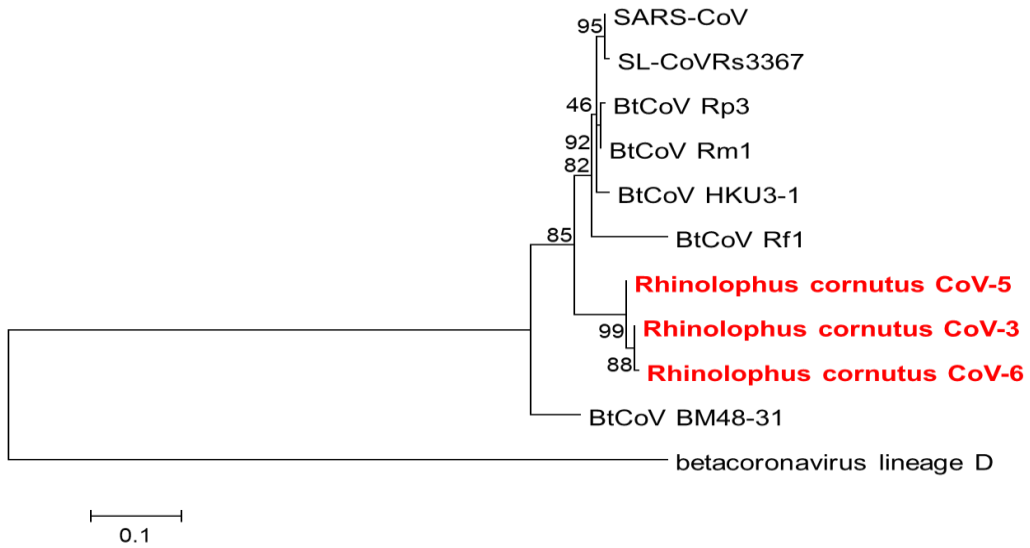
図 1-2 検出したコロナウイルスの RdRp 遺伝子系統樹による分類

検出したコロナウイルスの RdRp 遺伝子の塩基配列 (SARS-CoV の 15302-15594 bp に相当する領域) に基づいて近隣結合法による進化系統樹を作成した。ブートストラップ値は 70 以上の値のみを分岐部に示した (1,000 回演算)。スケールバーは、座位あたり 0.1% の置換を表す。今回検出したコロナウイルスは太字で示し、検出されたコウモリ種の違いを色で区別した。RdRp 遺伝子塩基配列の相同性が 100 % であった検体は 1 つの株として扱った。株名の横にそれらの検体数を記載した。

A



B



C

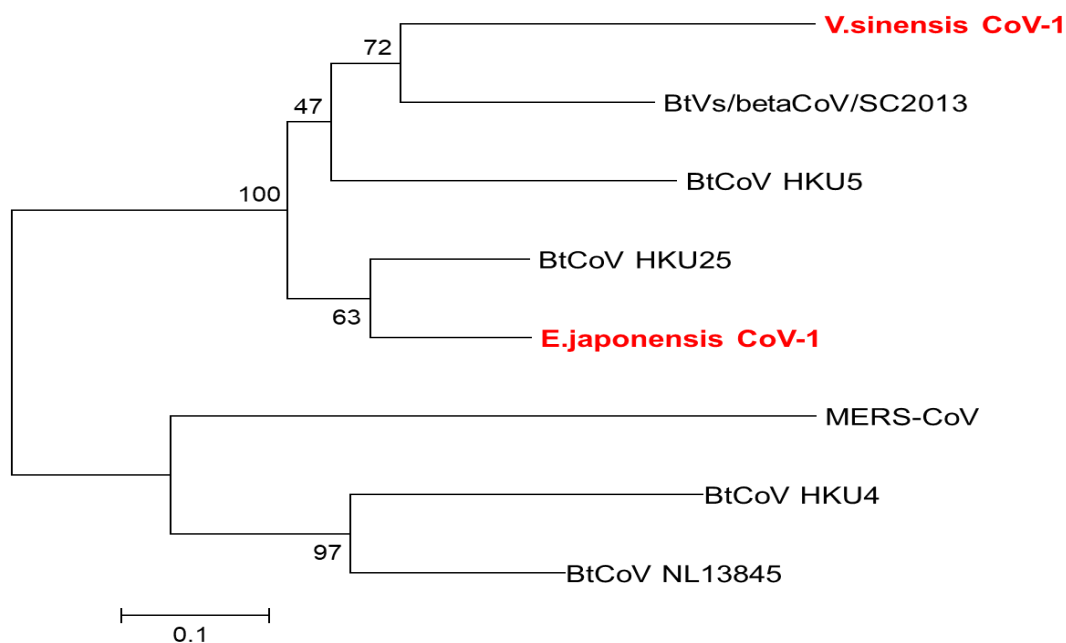


図 1-3 検出したコロナウイルスの spike 遺伝子系統樹による分類

(A) 検出したアルファコロナウイルスの spike 遺伝子のアミノ酸配列 (BtMr/AlphaCoV の 1167-1323 aa に相当する領域) に基づいて進化系統樹を作成した。(B) 検出したベータコロナウイルス lineage B ウイルスの spike 遺伝子のアミノ酸配列 (SARS-CoV の 308-494 aa に相当する領域) に基づいて進化系統樹を作成した。(C) 検出したベータコロナウイルス lineage C ウイルスの spike 遺伝子のアミノ酸配列 (MERS-CoV の 367~588 aa に相当する領域) に基づいて進化系統樹を作成した。進化系統樹は最尤法で作成し、検出したコロナウイルスは赤色の太字で示した。検出されたウイルスの株名は RdRp 遺伝子系統樹と対応している。

A

321

```

SARS-CoV          LAWNTRNIDATSTGNYNYKYRYLRHGKLRPFPERDISNVPFSPDGKPCTPPALL-NCYWPLNNDYGFYTTIGIGYQPYRVVVL
SL-CoVRs3367     LAWNTNSKDSSTSGNYNYLYRWVRRSKLNPYERDLSNDIYSPGGQSCSAVGE-NCYNPLRPYGFFTTAGVGHQQPYRVVVL
R.cornutus CoV-3 LAWNSRNQDASTSGNFNYYYRIWRSEKLRPFPERDIAHYDYQVGT------QFKSSLKNYGFYSSAGDSHQPYRVVVL
BtCoV BM48-31    IAWNTNSLDSSN-----EFFYRRFRHGKIKPYGRDLSNVLFNPSGGTCSAEGL-NCYKPLASYGFTQSSGIGFQPYRVVVL
BtCoV Rm1        IAWNTAQQDQG-----QYYRSYRKEKLKPFERDLSSD------E-NGVYTLSTYDFYPSVPVAYQATRVVVL
BtCoV Rp3        IAWNTAKDQG-----QYYRSSHRKTKLKPFERDLSSD------E-NGVRTLSTYDFYPSVPVAYQATRVVVL
BtCoV HKU3-1     IAWNTAKHDTG-----NYYRSSHRKTKLKPFERDLSSD------DNGVYTLSTYDFNPNVPVAYQATRVVVL
BtCoV Rf1        IAWNTAKQDVG-----SYFYRSHRSSSKLKPFERDLSSE------E-NGVRTLSTYDFNQNVPPLEYQATRVVVL

```

B

367

```

MERS-CoV          EAKPSGSVVEQAEGVECDFSPLLSGTPPQVYNFKRRLVFTNCNYNLTKLLSLFSVNDFTCSQISPAAISSNCYSSLLILDYF
BtCoV HKU4        EASATGTFIEQPNATECDFSPMLTGVAPQVYNFKRRLVFSNCNYNLTKLLSLFAVDEFSCNGISPDSIARGCYSLTVDYF
BtCoV NL13845     EVRSKGEFIEQPTSECDFASMLNGTPPVYNFNRRLVFTNCNYNLTKLLSLLFMVNEFSCNGISPDAIARGCYSSLIVDYF
BtCoV HKU25       EAQPRGAFIEQSSGKECDFSPMLTGTPPPQVYNFRRRLVFDCNYNLTKLLSLLFQVSEFSCHQVSPSSALASGCYSSLIVDYF
BtCoV HKU5        EASPRGEFIEQATTQECDFTPMLTGTPPPPIYNFKRRLVFTNCNYNLTKLLSLLFQVSEFSCHQVSPSSALASGCYSSLIVDYF
BtVs/betaCoV/SC2013 EAQPRGSFIEQAQGTECDFSPLLKDEPQVYNFSRRLVFTNCNYNLTKLLSLLFQVSEFSCHQVSPSSALASGCYSSLIVDYF
V.sinensis CoV-1  EAQPRGYFVEQPHSSECDFSAMFSSQPPQVYNFSRRLVFTNCNYNLTRLLSLLFQVSEFSCHQVSPSSALASGCYSSLIVDYF
E.japonensis CoV-1 EAQPRGEFIEQPNSKECDFSPLSGTPPPQVYNFRRRLVFDCNYNLTKLLSLLFQVNEFSCHQVSPDALASGCYSSLIVDYF

MERS-CoV          SYPLSMKSDLSSVSSAGPISQFNYKQSFNPTCLILATVPHNLT----ITKPLKYSMINKSRLLSDDR-TEVPQLVNAN
BtCoV HKU4        AYPLSMKSYIRPGSAGNIPLYNYKQSFANPTCRVMASVLANV-T----ITKPHAYGYISKSRLTGANQDVETPLYINPG
BtCoV NL13845     SYPLSMKSYMDPGSAGVVAQFNYKQSFANPTCRIFATAPANL-T----ISKPSSYSYISKSRLTGDNQHIETPITINPG
BtCoV HKU25       AYPLSLASYLQGGSTGEITQYNYKQDFSNPTCRILATAPANI-T----LTKPNNYNLTECYHSTAFGK---QPYYVQPG
BtCoV HKU5        AYSTDMSYLQPGSAGAIVQFNYKQDFSNPTCRVLATVPQNLT----ITKPSNYALTECYKTSAYGK---NYLYNAPG
BtVs/betaCoV/SC2013 AYPTYMSSYLQGGSTGEISQFNYKQDFSNPTCRILATVPANL-SASGLLPKPSNYVWLSECYQNSFTGK--NFQYVKAG
V.sinensis CoV-1  AYPLSMASYLRGGSTGPIAQFNYKQDFTNPTCRILAAVPSN-T----IPLQSYMMLTQCYTNSPS-----NSHYVEAG
E.japonensis CoV-1 AYPLSLASYLQGGSTGEIAQYNYKQDFSNPTCRILATVPSNV-T----INKPSNYNLSQCYRLTAYGN---LPLYVNPG

MERS-CoV          QYSPCVSI-VPSTVWEDGDYRKQLSPLEGGGLLVASGSTVAMT-EQLQMGFGITVQYGTDTNSVCPKLE
BtCoV HKU4        EYSICRDF-SPGGFSEDGQVFKRTLTQFEGGGLLIGVGTRVPMT-DNLQMSFIISVQYGTDSDSVCPMLD
BtCoV NL13845     EYSICRDF-APNGLSEDGQVFKRTLTQFEGGGLLIGVGTRVPMT-EGLQMAFIISVQYGTDTNSVCPMMD
BtCoV HKU25       QYTPCLGL-AISGFTSYETRRDP-----NTKMAATGLVTAMT-TSLQMAFIISVQYGTDTNSVCPMQA
BtCoV HKU5        AYTPCLSL-ASRGFSTKYQSHSD-----GELTTTGYIYPVTT-GNLQMAFIISVQYGTDTNSVCPMQA
BtVs/betaCoV/SC2013 QYTPCLGL-AANGFEKSYQTHRDP-----VSKLAVTGVVTPMT-SALQMAFIISVQYGTDTNSVCPMQA
V.sinensis CoV-1  SYTPCLGL-ASRGFNTNSMHYDP-----ATGLTATGSYQYISEEALEMAFIISVQYGTDTNSVCPLQA
E.japonensis CoV-1 QYTPCLGLVAHNGFSYTSESSDP-----NTKVSATGGVFTMT-TNLQMAFVISVQYGTDTNSVCPMRA

```

図 1-4 lineage B ウイルスおよび lineage C ウイルスの受容体結合領域のアミノ酸配列

(A) 検出したウイルス(R.cornutus CoV-3)と SARS コロナウイルスを含む lineage B ウイルスの S タンパク質の受容体結合領域付近のアミノ酸配列 (321~499 aa) を MAFFT でアラインメントし、比較した。SARS コロナウイルスや ACE2 への結合能を有する SL-CoV Rs3367 では受容体結合領域に欠損は認められないが、その他の lineage B ウイルスでは欠損が認められる。検出した

ウイルスは赤字で示し、ACE2 との結合に重要とされるアミノ酸残基は緑色でハイライトした。(B) 検出したウイルス(V.sinensis CoV-1 と E.japonensis CoV-1)と MERS コロナウイルスを含む lineage C ウイルスの S タンパク質の受容体結合領域付近のアミノ酸配列(367~588 aa)を MAFFT でアラインメントし、比較した。MERS コロナウイルス、BtCoV HKU4 および BtCoV NL13845 では受容体結合領域に欠損は認められないが、その他の lineage C ウイルスでは欠損が認められる。検出したウイルスは赤字で示し、DPP4 との結合に重要とされるアミノ酸残基は緑色でハイライトした。

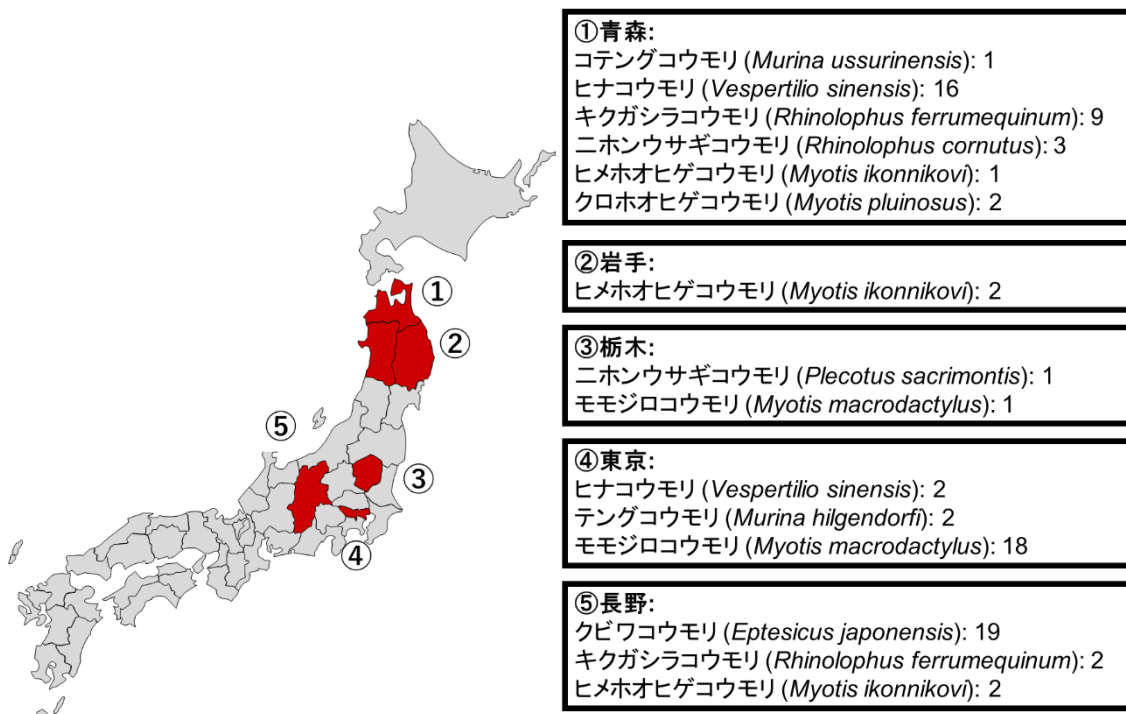


図 1-5 ヘペウイルス検出に用いたコウモリの検体

1 都 4 県 (赤色) で捕獲した 9 種類のコウモリから、計 81 糞便検体を採集した。コウモリ種と検体数を都道府県ごとに記載した。

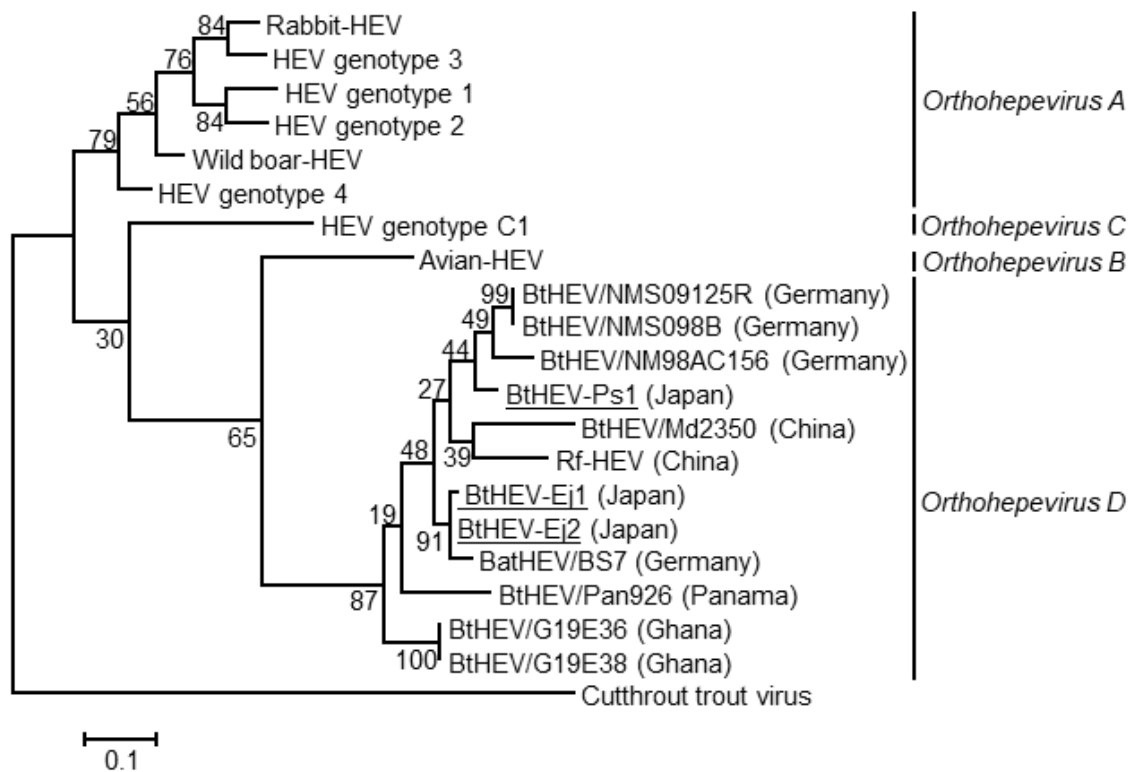


図 1-6 検出したへペウイルスの RdRp 遺伝子系統樹による分類

検出したへペウイルスの RdRp 遺伝子のアミノ酸配列 (BatHEV/BS7 の 1313-1421 aa に相当する領域) に基づいて最尤法による進化系統樹を作成した。ブートストラップの値は、各分岐部に示した (1,000 回演算)。スケールバーは、座位あたり 0.1% の置換を表す。本研究で検出したへペウイルスは下線で示した。

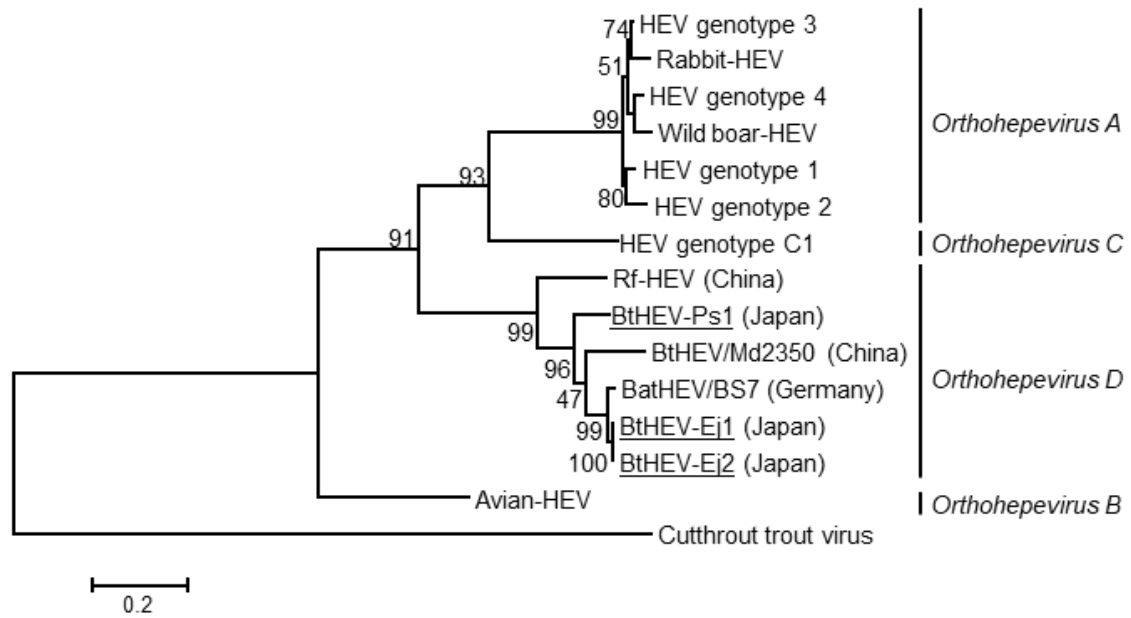


図 1-7 検出したへぺウイルスのカプシド遺伝子系統樹による分類

検出したへぺウイルスのカプシド遺伝子全長のアミノ酸配列に基づいて最尤法による進化系統樹を作成した。ブートストラップの値は、各分岐部に示した(1,000 回演算)。スケールバーは、座位あたり 0.2%の置換を表す。本研究で検出したへぺウイルスは下線で示した。

表 1-1 コロナウイルスまたはヘペウイルスの検出に使用したプライマー

Primer name	5'→3'
Pan-CoVαβabc F	GGTTGGGAYTATCCTAARTGTGA
Pan-CoVαβabc R	CCATCATCAGATARDATCATCAT
Pan-HEV F	GTTTTTGAGAATGAYTTYTCTGA
Pan-HEV R	TCACCGGAGTGYYTTYTTCCA

表 1-2 コロナウイルスゲノムシーケンスに用いたプライマー

Gene	Primer name	5'→3'
5UTR	betaC 5UTR F	CCAGTTYCGTCNNGGTGCGTG
ORF1ab	betaC ORF1ab 260 F	GTGTTTACCTGGTWGAGAG
	betaC ORF1ab 428 R	TAGTCACCAGTCTCAAGTGC
	betaC ORF1ab 1185 F	ATTCGCAAAGGGTGATAGC
	betaC ORF1ab 1338 R	AATAAAGTRCATAGTACC
	betaC ORF1ab 1843 F	CTGCTGTTAGACTGTGTTGG
	betaC ORF1ab 1913 R	GCTTTTCTCATCCAGCAGTCG
	betaC ORF1ab 2643 F	ATGAGGAAGTACACGAAGTG
	betaC ORF1ab 2665 R	CGTCTAGCACAGCATGAATG
	betaC ORF1ab 3332 F	GTGTTACAGCAGTTACTAAG
	betaC ORF1ab 3419 R	TGCAGCAGCAACAGATTGAG
	betaC ORF1ab 3729 F	TAATGCTGCTAACACACATC
	betaC ORF1ab 3829 R	TAATATACTCATCAGACTCC
	betaC ORF1ab 4623 F	TTGGTCWGRTCAAACCATNTG
	betaC ORF1ab 4676 R	TCTTTTAACACGAAGAGCTG
	betaC ORF1ab 5246 F	GACTACTCCACATCGTGCTC
	betaC ORF1ab 5859 R	ATTAGTATAMACACTACCTG
	betaC ORF1ab 5883 F	CCAAGTGAGTGGTGATCCTA
	betaC ORF1ab 5989 R	TTTCATCTGGTAGGACTGAG
	betaC ORF1ab 6524 F	TGTTCAAGGAATTTGCTAGC
	betaC ORF1ab 6621 R	GACACTAGCAACAGTACCAC
	betaC ORF1ab 7083 F	AGGTCAAGACTCCATTACAC
	betaC ORF1ab 7158 R	TACGTTAAGAACATAGTGGC
	betaC ORF1ab 7635 F	TCGCAAATGACCTCACTACC
	betaC ORF1ab 7749 R	ATAGCAGGTTTGACCGTCTC
	betaC ORF1ab 8161 F	GCTGGTGTGGARTCTGATG
	betaC ORF1ab 8281 R	TAGTAGCTACACTATCAGGC
	betaC ORF1ab 9045 F	ATACTGAYATGAYCCTACTG
	betaC ORF1ab 9186 R	TTTAGTAACCCTGATAGTGC
	betaC ORF1ab 9753 F	TGTTTTCACTGATGGCAAGC
	betaC ORF1ab 9851 R	ATAGAATTCCTAAGAGCCAC
	betaC ORF1ab 10486 F	TGTGGTAGTGTGGTTACAC
	betaC ORF1ab 10640 R	GTCAACTGTGCTTGGTGCAC
betaC ORF1ab 10949 F	GTGTTGTWATGCARAGTGGTG	
betaC ORF1ab 11353 R	TAACAACAACAGCCAATGCC	

	betaC ORF1ab 11797 F	GGYATTGGCGGTACACCTT	
	betaC ORF1ab 11987 R	TCGAAGGCCTCAGTGGGATC	
	betaC ORF1ab 12618 F	TGAAAGTTTGACATGGCCACTTG	
	betaC ORF1ab 12797 R	TTACGACCTTGAATAGGCTC	
	betaC ORF1ab 13518 F	TAGGGCATTGACATCTGCAA	
	betaC ORF1ab 13743 R	GTCAAACACGAAGAAGTCATG	
	betaC ORF1ab 14458 F	TGTGGTTACCACTACAA	
	betaC ORF1ab 14559 R	ATCTGCKGCATACATCAT	
	betaC ORF1ab 15302 F	CTATGCCTAACATGTGTAGG	
	betaC ORF1ab 15371 R	GTAGWGCAGCAAGTACCATG	
	betaC ORF1ab 15969 F	CGTCAAGACTGACGGTAC	
	betaC ORF1ab 16136 R	TAAGTGTWAGCATGTG	
	betaC ORF1ab 16830 F	CATTGATTATAGTGATGCTG	
	betaC ORF1ab 16962 R	ATACCTCTCTTGATTACAC	
	betaC ORF1ab 17539 F	AGTATGTGCTACAGGTG	
	betaC ORF1ab 17696 R	GGTCTATTAATGGCRGAGC	
	betaC ORF1ab 18560 F	GTACGTTTGTGTTGGGC	
	betaC ORF1ab 18734 R	GGGTRTARACATARTCA	
	betaC ORF1ab 19839 F	CGTCCTTTGGGATTATGAGC	
	betaC ORF1ab 19959 R	ACCATTATCACGAATGTC	
	betaC ORF1ab 21393 F	CTTCAATTAANGAGAGTCARATTAACGAAC	
	betaC S 100 R	CTACTTCATCACAAGTATCC	
	betaC S 711 F2	CCCAAATGCGCAAGGT	
	betaC S 875 R1	TTATACACRTARAADGCAGCCCA	
<i>spike</i>	betaC S 1659 F3	TGTCTGTCCACTACAGGCTG	
	betaC S 1809 R2	ATCATAAACAAAGCGCTG	
	betaC S 2326 R3	ACTGTTTACAATCDACAGTAA	
	betaC S 2352 F4	CCTATTAECTCTAGTAGG	
	betaC S 3038 F5	TATCTAATACYTTYGGTG	
	betaC S 3101 R4	ATTTGMGCVTCYTGTTT	
	<i>ORF3</i>	betaC orf3 80 R	ACAGTAGGTCTAGAGAATGC
	<i>ORF4a</i>	betaC ORF4a 1 F	ATGGATTACGTGTCTYTGTCTTAA
betaC ORF4a 119 R		AATGAAGTACCAGTGACAGG	
<i>ORF4b</i>	betaC ORF4b 149 F	CTTCAGATGTAATGGACA	
	betaC ORF4b 748 F	TAACGAACTATGGCTTTCTC	
<i>ORF5</i>	betaC ORF5 379 R	TCAGCATGAGACAGAAACGA	
<i>envelope</i>	betaC E 1 F	ATGTTACCCTTTGTCCAAGAAC	
	betaC E 111 R	CGTGGCCGTAAGGAATGC	
<i>membrane</i>	betaC M 379 R	CGGTAGTGCCGCAATTGG	
<i>nucleocapsid</i>	betaC N 76 F	AGAGGCCGAGGAAGAACTC	
	betaC N 246 R	CTGTCTCCGCCAATACCCAGC	
3UTR	betaC 3UTR R	AACATGATTCCATTCTGTGC	

表 1-3 ヘペウイルスゲノム解読に用いたプライマー

Primer name	5'-3'
Ej1 1933F	CCTGGCGGTGGNATNTGCGG
Ej1 2790R	GACCGGACCACATCAGAAG
Ej1 2602F	CCTGTTGCTTCTGATCATGC
Ej1/2 3135 R	TCAGCTGGCTCAATAGGTGC
Pan HEV F	GTTTTTGAGAATGAYTTYTCTGA
Pan HEV R	TCACCGGAGTGYTTYTTCCA
Ej1/2 4058 F	CCTTTATTGGCTGCAGAG
Ej1/2 5096 R	CCACCGACAGACGCAGG
Ej1/2 5035 F	CACATCATGTCAACGGAGG
Ej1/2 Ps1 5834 R	GGGCGGTCNGNCTCATGGTTA
Ej1/2 5703 F	CTTTATGGGAAACCAGTGAC
Ej1/2 6123 R	GCCARAANGACAATTTGCCG
Ej1/2 6059 F	ACTGGACCAAGGCCACATTG
Ps1 2987 F	AGYCGTGCNCANGCCATTG
Ps1 4072 R	TGCATCCGGTGCAACAAGAG
Ps1 4008 F	GGCTAGAATGTGAGCTCCTG
Ps1 4658 R	GAAAAGGGAGCGGCATGTCC
Ps1 4647 F	ATGAATAACACCCCTTTCTG
Ps1 5277 R	TTAGCAGTCTCAACAGATCG
Ps1 5743 F	GACGGTCCAACCTCTACGGTTC
Ps1 6331 R	TCGGGCATCGNGAAGGNCTC
Ps1 6194 F	CCCTTATCAGTATNACAACAATG
Ej1/2 Ps1 terminal R	TTTTTTTTAAGGGTATTACACTG

表 1-4 コロナウイルス遺伝子検出の結果と分類

コウモリの種類	遺伝子 検出数	コロナウイルスの分類		
		アルファ	ベータ B	ベータ C
コキクガシラコウモリ	27/49	2	25	
ヒナコウモリ	18/81			18
モモジロコウモリ	7/21	7		
クビワコウモリ	6/30			6
キクガシラコウモリ	2/31	1	1	
ヒメホオヒゲコウモリ	2/10	2		
クロホオヒゲコウモリ	0/2			
ユビナガコウモリ	0/2			
テングコウモリ	0/2			
ノレンコウモリ	0/2			
コテングコウモリ	0/1			
ニホンウサギコウモリ	0/5			
合計	62/236	12/62	26/62	24/62

表 1-5 検出したウイルスの各 ORF のアミノ酸配列の相同性の比較

Viruses	Vespertilio sinensis CoV-1 の各 ORF のアミノ酸配列の相同性(%)									
	ORF1a	ORF1ab	S	ORF3	ORF4a	ORF4b	ORF5	E	M	N
BtVs-CoV/SC2013	99	99	80	96	100	98	98	99	96	99
BtCoV HKU5	66	75	70	48	54	37	55	68	82	71
BtCoV HKU4	64	72	69	48	44	37	45	68	84	75
MERS-CoV	73	80	66	48	62	48	65	87	87	78

第 2 章

日本産コウモリから分離した コウモリアデノウイルスの ウイルス学的性状解析

要 旨

第 1 章に記載したように、私は 2015 年から 2016 年に日本の野生のコウモリから 236 の糞検体を採取した。このうち 163 検体を 11 種類の哺乳類培養細胞に接種し、CPE を指標にウイルス分離を試みたところ、2 種類のコウモリ(モモジロコウモリ *Myotis macrodactylus* およびヒナコウモリ *Vespertilio sinensis*)からコウモリアデノウイルス(BtAdV)の分離に成功した。両分離ウイルスのゲノム塩基配列を次世代シーケンサーで決定し、DNA polymerase アミノ酸配列に基づく進化系統樹解析を行ったところ、両ウイルスはともに *Mastadenovirus* 属に属した。モモジロコウモリから分離した BtAdV (BtAdV-Mm32 と命名)はコウモリマスタデノウイルス A に分類されたが、ヒナコウモリから分離した BtAdV (BtAdV-Vs9 と命名)は他の BtAdV とは進化系統学的に独立していた。DNA polymerase 遺伝子の distance matrix analysis の結果、BtAdV-Vs9 は新種のコウモリアデノウイルスであることが強く示唆された。これら分離ウイルスは進化系統学的にイヌアデノウイルスに近縁であったが、血清学的には異なっていた。両分離ウイルスは、様々な種類の哺乳類培養細胞で増殖し、広い細胞指向性が示唆された。また、これら分離ウイルスを BALB/c マウスに経鼻投与したところ、弱い病原性が認められた。

背景と目的

アデノウイルス(AdV)は、エンベロープを持たない二本鎖 DNA ウイルスである。現在、AdV は *Mastadenovirus*、*Atadenovirus*、*IChtadenovirus*、*Siadenovirus* および *Aviadenovirus* の 5 つの属に分類されている (Harrach *et al.*, 2011)。このうち *Mastadenovirus* 属と *Atadenovirus* 属のウイルスは哺乳類を宿主とすることが知られている。AdV のウイルス粒子径は約 100 nm で、ゲノムは約 26-48 kbp である。ウイルスカプシドは正二十面体で、主としてファイバー、ペントン、ヘキソンの 3 つのカプシドタンパク質から構成されている。ファイバーは宿主細胞上のウイルス受容体と結合し、AdV の細胞への吸着に重要な役割を担っている (Henry *et al.*, 1994; Louis *et al.*, 1994)。ペントンは正二十面体の頂点部分に位置し、ファイバータンパク質の基部と結合している。ペントンは AdV の細胞侵入に関係し、特にウイルスの細胞内移行に重要であると考えられている。ヘキソンはウイルス粒子上に最も豊富に存在し、カプシドの構造維持に重要である。これらカプシドタンパク質は AdV の中和抗体の主要な標的となることが知られている (Stallwood *et al.*, 2000; Hong *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2008)。

コウモリアデノウイルス(BtAdV)の初めての報告は 2008 年で、日本に生息するヤエヤマオコウモリ *Pteropus dasymallus yayeyamae* から分離された (Maeda *et al.*, 2008)。しかしながら、わずか数百塩基配列のみのゲノム情報しか登録されておらず、詳細な解析はなされていない。一方、ココウモリからは、2009 年にドイツに生息するヨーロッパアブラコウモリ *Pipistrellus pipistrellus* から初めて BtAdV が分離された (Sonntag *et al.*, 2009)。コウモリが保有するウイルスを対象としたメタゲノム解析でアデノウイルスの遺伝子が多数検出、報告されている (Baker *et al.*, 2013; He *et al.*, 2013)。ウイルス分離については、現在までに中国、インド、ガーナ、アメリカ、ザンビア、南アフリカに生息するコウモリから報告され (Li *et al.*, 2010; Raut *et al.*, 2012; Baker

et al., 2013; Hackenbrack *et al.*, 2016; Ogawa *et al.*, 2017; Jansen *et al.*, 2018)、ICTV には 7 種の BtAdV (BtAdV-A から G) が登録されている。

このようにこれまでに多くの BtAdV が検出または分離されているがそのウイルス学的な性状はほとんど明らかにされていない。そこで、第 2 章では日本産コウモリから 2 種類の BtAdV を分離し、その増殖性や抗原性に着目して性状を解析した。また、進化系統学的に分離ウイルスと近縁な CAdV と増殖性や抗原性を比較した。

材料と方法

コウモリの検体

第 1 章に記載した 236 検体のうち 163 検体を実験に供した(図 2-1A)。

細胞とウイルス

MDCK、Vero、A549、MDBK、CRFK、および PK-15 細胞は 5%FBS 加 DMEM 培地を用いて培養した。BKT、IndFSP1、YubFKT1、DemKT1 および FBKT 細胞は 10%FBS 加 RPMI-1640 培地を用いて培養した。本章で分離した BtAdV-Mm32 および BtAdV-Vs9、並びに CAdV1 (D43 株) および CAdV2 (Toronto A 26/61 株) は、1%FBS 加 DMEM 培地で MDCK 細胞を用いて増殖させた。D43 株は日本のイヌから当研究室で分離されたものを使用した(Ochi *et al.*, 1956)。Toronto A 26/61 株はカナダで呼吸器症状を呈したイヌから分離された株で(Ditchfield *et al.*, 1962)、当研究室に分与されたものである。いずれも 37°C の 5%CO₂ インキュベーターを用いて培養した。

ウイルスの分離

糞便サンプルを抗生物質加 DMEM 培地に懸濁し、その遠心上清を回収した(10,000×g、15 分間、4°C)。MDCK、Vero、A549、MDBK、CRFK、PK-15、BKT、IndFSP1、YubFKT1、DemKT1 および FBKT 細胞を 12 穴プレートに準備し、抗生物質加 DMEM で 10 倍希釈した遠心上清 100 μL を接種した。37°C で 1 時間の吸着の後、接種液を除去し、細胞を PBS で洗浄し、1%FBS 加 DMEM 培地を加えた。細胞にサンプルを接種した後最大で 3 回盲継代を行い、CPE を指標としてウイルス分離の有無を観察した。CPE が認められた細胞から得られた培養上清を、限界希釈することによってウイルスを生物学的にクローニングした。その後、ウイルス同定

を試みた。

ウイルスの同定

分離ウイルスのおおよその粒子径を決定するために、孔のサイズが 100 nm のメンブレンフィルター (Millipore) を用いて分離ウイルスの通過試験を行った。具体的には、メンブレンを通過させたウイルス液を MDCK 細胞に接種し、CPE の有無を観察した。

分離ウイルスがエンベロープを有するかを決定するため、クロロホルム耐性試験を実施した (国立予防衛生研究所学友会, 1973)。まず、分離ウイルス液 1.8 mL に 200 μ L のクロロホルムまたはコントロール (DMEM) を加え、室温で 15 分間インキュベートした。その後、750 \times g で 10 分間遠心し、上清のウイルスカ価を次のように測定した。まず、遠心上清の 10 倍階段希釈系列を作製し、100 μ L ずつ 96 穴プレートに蒔いた MDCK 細胞に接種し、37°C で 5 日間インキュベートした。CPE を示すウェルを計数し、Reed-Muench 法を用いて、TCID₅₀ を算出した。コントロール試料に関してクロロホルム処理した場合にウイルスカ価が 10⁴ TCID₅₀ 以上の低下が認められる場合、クロロホルム感受性とした。

分離ウイルスが DNA と RNA のどちらをウイルスゲノムとして有するかを決定するため、ピリミジン類似体である IUDR に対する感受性試験を実施した (国立予防衛生研究所学友会, 1973)。まず、分離ウイルスの 10 倍階段希釈系列を作製し、12 穴プレートに準備した MDCK 細胞に吸着させた (37°C、60 分)。ウイルス液を除去し、10^{-4.5} M の IUDR を含んだ 1% FBS 加 DMEM 培地または IUDR を含まない同培地 (コントロール) を加えた。37°C で 5 日間インキュベートし、CPE を示すウェル数から TCID₅₀ を算出した。コントロール群に比較してウイルスカ価が 10³ 以上低下した場合を IUDR 感受性と判定した。

分離ウイルス粒子の観察には透過型電子顕微鏡を用いた。まず、各分離ウイルスにグルタルアルデヒド (最終濃度 0.25%) を加え、4°C で一週間かけて固定した。これをコロジオン膜で被覆したメッシュグリッド上に塗った。次に、リンタングステン酸で陰性染色し、透過型電子顕微鏡で観

察した。

次に、次世代シーケンサー(IonPGM™, Thermo Fisher Scientific)を用いて、ゲノム配列を決定した。まず、200 µL のウイルス溶液から QIAamp DNA mini kit (QIAGEN)を用いて、ウイルス DNA を抽出した。ライブラリーの調整は NEBNext Fast DNA Library Prep Set for Ion Torrent(New England Biolabs)を用いておこなった。次世代シーケンスには Ion PGM™ Hi-Q™ View OT2 Kit および Ion PGM™ Hi-Q™ View Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific)を使用した。いずれもプロトコルに従って実施した。出力されたデータは CLC Genomics Workbench version 8(CLC bio)を用いて解析した。まず、BtAdV-Mm32 から得られた配列データは BtAdV-A の配列データにマッピングした。BtAdV-Vs9 から得られた配列データは既報の BtAdV との相同性が低かったため、同ソフトウェアで *de novo* アセンブルをおこなった。アセンブルできなかった領域および得られた配列の信頼性が低いゲノム領域については、特異的プライマーを用いたサンガー法(Applied biosystems 3170xl、Life technologies)により配列を決定した。決定した配列は NCBI に登録した(BtAdV-Mm32 (LC385828)および BtAdV-Vs9 (LC385827))。

進化系統樹解析

AdV の DNA polymerase のアミノ酸配列に基づき、近隣結合法を利用した進化系統樹を作成した。アミノ酸置換モデルには Jones-Taylor-Thornton モデルを用いた(Jones *et al.*, 1992)。また、アミノ酸配列アラインメントには MAFFT version 7.409 ソフトウェアを使用した(Katoh and Standley, 2013)。進化系統樹の作成には MEGA version 7.0 ソフトウェアを用いた(Kumar *et al.*, 2016)。進化系統樹作成に使用した参照株の NCBI アクセション番号は次のとおりである。Bat AdV-A (GU226970)、Bat AdV-B (JN252129)、Bat AdV-C (KT698853)、Bat AdV-D (KT698856)、Bat AdV-E (KT698852)、Bat AdV-F (KX961095)、Bat AdV-G (KX871230)、Bovine AdV-B (NC_001876)、Canine AdV1 (NC_001734)、Canine AdV2 (AC000020)、Human AdV-A (NC_001460)、Human AdV-B NC_011203)、Human AdV-C (NC_001405)、

Human AdV-D (NC_010956)、Human AdV-E (NC_003266)、Human AdV-F (NC_001454)、Skunk AdV-A (NC_027708)、Porcine AdV-C (NC_002702)、Tree shrew AdV-A (AC000190)、Murine AdV-A (NC_000942)、Equine AdV-A (JN418926)、Ovine AdV-A (NC_002513)、Ovine AdV-D (NC_004037)、Fowl AdV-A (NC_001720)、および Frog AdV-A (NC_002501)。

増殖曲線

12 穴プレートに準備した MDCK、CRFK、A549、MDBK、PK-15、Vero、FBKT、および DemKT1 細胞に、ウイルス (BtAdV-Mm32、BtAdV-Vs9、CAv1 または CAv2) を 0.01 の MOI で感染させた。37°C で 60 分間吸着させた後、ウイルス液を完全に除去した。洗浄後、1%FBS 加 DMEM を加え、上清を感染後 6 日まで毎日回収した。ウイルスカ価を測定するために、MDCK 細胞でプラークアッセイを行った。回収したウイルス液の 10 倍階段希釈系列を作製し、その 100 μ L を 12 穴プレートに準備した MDCK 細胞に吸着させた (37°C、60 分間)。ウイルス液を除去し、0.3%BSA (Sigma-Aldrich) および 0.8%アガロース (Lonza) 加 MEM を細胞に重層した。感染から 5 日後にアガロースゲルを除去し、プラークを 0.1%クリスタルバイオレット溶液で染色した。プラーク数から PFU を算出し、ウイルスカ価とした。

マウスへの感染実験

マウスに対する BtAdV の病原性を評価するために、4 週齢の雌 BALB/c マウス (n = 3) (日本 SLC) に BtAdV-Mm32 (10^5 PFU)、BtAdV-Vs9 (10^5 PFU) または PBS (コントロール) のいずれかを鼻腔内または経口接種した。感染後は臨床徴候および体重変動を 21 日間記録した。

プラーク減少中和試験と中和交叉性

BtAdV に対する抗血清は、BtAdV-Mm32 (10^5 PFU) または BtAdV-Vs9 (10^5 PFU) のいずれかを経鼻感染させた BALB/c マウスから得た。一方、CAv に対する抗血清は CAv1 (D43 株)

または CAdV2 (Toronto A 26/61 株)のいずれかを腹腔内投与したモルモットから得た。各抗血清の 2 倍階段希釈液 50 μ L に 100 PFU の BtAdV-Mm32、BtAdV-Vs9、CAdV1、または CAdV2 を含有する 50 μ L のウイルス懸濁液を加え、37°C で 30 分間中和させた。反応後にウイルス力価をプラークアッセイによって測定した。感染 5 日後にプラーク数を計数し、PRNT₈₀ を算出した。中和交叉性は抗血清とウイルスをヘテロの組み合わせで反応させて、同様に PRNT₈₀ を算出した。

IFA と抗原交叉性

MDCK 細胞を 24 穴プレートに準備し、MOI=1 で各ウイルスを感染させた。ウイルスを 37°C で 1 時間吸着させた後、ウイルス液を除去し、1%FBS 加 DMEM を加えた。感染 24 時間後にウイルス液を除去し、PBS で洗浄した後、細胞を 4%パラホルムアルデヒド(Wako)で 15 分間固定した。次いで、0.1%Triton X-100 で 15 分間透過処理し、ブロックエース(Block Ace; DS Pharma Biomedical)で 45 分間ブロッキングした。0.1%Tween-20 加 PBS (PBS-T)で洗浄した後、各ウイルスに対する抗血清を一次抗体として 45 分間反応させた。PBS-T で洗浄した後、ヤギ抗マウス Alexa488 またはヤギ抗モルモット Alexa488 抗体 (Abcam)を二次抗体として 45 分間反応させた。洗浄後、蛍光顕微鏡 (Axio Vert.A1, Carl Zeiss)により細胞を観察した。抗原交叉性は抗血清とウイルス感染細胞をヘテロの組み合わせで反応させて、同様に蛍光顕微鏡で観察した。

統計処理

動物実験でのマウスの体重増加率に関するデータは Dunnett 検定を用いて分析して、統計学的有意性を決定した。

倫理規定

マウスを用いた BtAdV の病原性に関する動物実験は、東京大学での動物管理規則に則り、東京大学農学生命科学研究科動物実験委員会(承認番号 P17-149)の許可のもと実施した。

結 果

コウモリアデノウイルスの分離と同定

日本のコウモリに AdV が存在するかどうかを調べるために、青森県、岩手県、秋田県、栃木県、東京都、長野県で合計 163 匹の食虫コウモリを捕獲した(図 2-1A)。捕獲されたコウモリは、その形態学的特徴およびシトクロム b 遺伝子配列から 10 種に分類された。ウイルスを分離するために、抗生物質で処理した糞便サンプルを様々な動物種由来の培養細胞に接種した。その結果、モジロコウモリ *Myotis macrodactylus* およびヒナコウモリ *Vespertilio sinensis* (図 2-1B) 由来の検体を接種した MDCK 細胞において、細胞の円形化、剥離および死滅などを主徴とする CPE が認められた。これらの 2 つの分離ウイルスは、孔のサイズが 100 nm のメンブレンフィルターを通過できず、クロロホルム処理に耐性であり、IUDR に対して感受性であることにより、100nm 未満の粒子サイズを有する DNA ウイルスであると推定された。さらに、透過型電子顕微鏡によりアデノウイルス様粒子を観察した(図 2-1C)。これらの結果から、分離した 2 種類のウイルスはいずれも AdV であることが強く示唆された。そこで、次世代シーケンサーを利用してゲノム塩基配列を決定したところ、いずれも AdV であることが判明した。

次に、分離ウイルスのペントン遺伝子の塩基配列を元に BLAST 解析をおこなった。その結果、BtAdV-Mm32 は、中国の *Myotis ricketti* というコウモリから分離された BtAdV-A (Li *et al.*, 2010) と最も高い相同性(99%)を示した。一方、BtAdV-Vs9 は CAdV2 Toronto A 26/61 と最も高い相同性(75%)を示した。いずれのウイルスも *Mastadenovirus* に属することが示唆されたため、DNA polymerase のアミノ酸配列に基づいた進化系統樹を作成し、詳細な関係性を解析した(図 2-2)。その結果、両分離株は *Mastadenovirus* 属に属することが分かった。*Mastadenovirus* 属の種は ICTV によって、DNA polymerase のアミノ酸配列の distance matrix analysis で算出された進化系統学的距離がいずれの AdV とも 15% 以上離れている必要がある

(https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/dsdna-viruses-2011/w/dsdna_viruses/93/adenoviridae)と定義されている。BtAdV-Vs9 と進化系統樹上で近傍に位置した BtAdV-A、BtAdV-B、BtAdV-G、CAdV1 および CAdV2 との間の進化系統学的距離は、それぞれ 22.0%、23.9%、19.8%、22.4 および 20.9%であった。したがって、BtAdV-Vs9 は、新種の BtAdV(例えば BtAdV-H と命名する)であると考えられた。

BtAdV のゲノム構造

BtAdV-Mm32 (31,750 bp)および BtAdV-Vs9 (31,218 bp)の全ゲノム塩基配列を決定した。両ウイルスは他の AdV と相同な 30 個の ORF を有していた。また、ゲノムの 5'および 3'末端に ITRs を有していた(表 2-1、図 2-3)。分離ウイルスの各 ORF にコードされているタンパク質のアミノ酸配列の相同性を他の BtAdV や CAdV と比較解析した(表 2-2 および 2-3)。BtAdV-Mm32 では、相同性を比較したすべての ORF において BtAdV-A と最も高い相同性(95%~100%)を示し(表 2-2)、分離ウイルスが BtAdV-A に分類されることが明らかとなった。一方、BtAdV-Vs9 は、他の BtAdV(21-87%の相同性)および CAdV(42-86%相同性)のほとんどの ORF に対して低い配列相同性を示した(表 2-3)。これらの結果は、BtAdV-Vs9 が *Mastadenovirus* 属に含まれる新種の BtAdV であるという上述の結果を支持している。

BtAdV のマウスにおける病原性

Kohl らは一部の BtAdV がコウモリに対して軽度の肺炎を引き起こす可能性があることを報告している(Kohl *et al.*, 2012)。しかし、BtAdV の他の動物に対する病原性に関する報告はない。そこで、マウスにこれらの分離株を経鼻または経口接種し、臨床徴候の観察および中和抗体価の測定を実施した。ウイルス接種から 21 日後に経口接種したマウスから採取した血清は、両ウイルスに対する中和抗体が検出限界以下であった。一方、経鼻接種したマウスから採取した血清は、中和試験において抗体陽性となった。この結果は、分離した BtAdV がマウスに感染したことを示

している。いずれの BtAdV を感染させたマウスにおいても、見かけ上病気の徴候を示したり、死亡したりすることはなかった。しかし、BtAdV-Vs9 感染マウスの体重増加率は非感染マウスと比較すると有意に低かった(図 2-4)。また、感染後 21 日目にマウスを安楽殺し、ウイルス DNA の検出を試みたところ、83%のマウスの肺および腸で陽性となった。これらのデータは、分離した BtAdV はマウスに感染するが、病原性は低いことを示している。

BtAdV と CAdV の抗原交叉性

分離した BtAdV、特に BtAdV-Vs9 は進化系統学的に CAdV と近縁であった。そこで BtAdV と CAdV との間の抗原交叉反応性について解析した。まず中和試験では、各抗血清とウイルスがホモの組み合わせにおいて高い中和抗体価が認められた。また、過去に報告されているように (Ditchfield *et al.*, 1962)、CAdV1 と CAdV2 間では、中和交叉性が確認された(図 2-4A)。しかし、BtAdV 間および BtAdV と CAdV 間に中和交叉性は観察されなかった。対照的に、IFA では、抗 BtAdV-Mm32 および抗 CAdV1 血清は、ホモおよびヘテロのどちらの組み合わせにおいても強い反応を示したが、抗 BtAdV-Vs9 および抗 CAdV2 血清は、ホモと比較してヘテロの組み合わせでは弱い反応しか示さなかった(図 2-4B)。これらの結果によって、中和エピトープを含まない何らかのウイルス抗原が、BtAdV 間および BtAdV と CAdV 間で抗原交叉していることが示唆された。

BtAdV の *in vitro* における細胞指向性

これまでに、BtAdV-A、BtAdV-G および BtAdV-Eidolon helvum は、様々な哺乳動物由来細胞株で増殖することが報告されている(Li *et al.*, 2010; Hackenbrack *et al.*, 2017; Ogawa *et al.*, 2017)。分離した BtAdV の培養細胞における増殖能を評価するために、様々な種類の哺乳動物由来細胞株に接種し、CAdV の増殖能と比較した(図 2-6)。BtAdV および CAdV はいずれも、MDCK 細胞において最も高いウイルスカ価を示した。興味深いことに、BtAdV も CAdV もコウモ

り由来の FBKT および DemKT1 細胞で増殖しなかった。BtAdV は、BtAdV-Vs9 が増殖しなかった Vero 細胞を除いて、試験した全ての非コウモリ由来哺乳類培養細胞株において効率的に増殖した。一方、CAv2 は PK-15 および Vero 細胞を除いた非コウモリ由来哺乳類培養細胞株において増殖したが、CAv1 は試験した細胞では MDCK および CRFK 細胞でしか増殖しなかった。以上の結果から、これまでに報告された BtAdV と同様に、BtAdV-Mm32 および-Vs9 は、様々な哺乳類由来培養細胞で増殖することがわかった。また、BtAdV と CAv とでは培養細胞の細胞指向性が異なることが示唆された。

考 察

コウモリは SARS コロナウイルスやニパウイルスなどの重要な人獣共通感染症病原体を保有することが知られており、世界的にサーベイランスが行われ、多くの種類のウイルスが検出されている。BtAdV は世界中の様々な種類のココウモリおよびオオコウモリから分離されており、そのうちいくつかの種は培養細胞において広い宿主域を示し、種間伝播の可能性を示唆している (Maeda *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2010., Kohl *et al.*, 2012; Tan *et al.*, 2016; Hackenbrack *et al.*, 2017; Tan *et al.*, 2017; Ogawa *et al.*, 2017)。第 2 章では、日本のコウモリから分離した BtAdV の性状解析を実施した。BtAdV-Vs9 については進化系統学解析の結果から、新種の BtAdV であることが分かった。

本章では、初めて日本のココウモリから 2 種類の BtAdV を分離した。分離株の 1 つである BtAdV-Mm32 はモモジロコウモリ *Myotis macrodactylus* から分離され、中国に生息する *Myotis ricketti* から分離された BtAdV-A 種に属する BtAdV-TJM 株 (98%のゲノム相同性)と進化系統学的に近縁であった(図 2-2)。どちらのウイルスも *Myotis* 属のコウモリから分離されたが、これら 2 種のコウモリの分布域は重複していない。それにもかかわらず、BtAdV-Mm32 と BtAdV-TJM が高いゲノム相同性を有していたことは非常に興味深い。*Myotis* 属のコウモリは種数が豊富で世界中に広く分布しているため、類似の BtAdV についても世界中に分布している可能性がある。他の *Myotis* 属のコウモリが保有する BtAdV を調べることによって、BtAdV ゲノムの保存性が高い原因が明らかになる可能性がある。また、モモジロコウモリはしばしばキクガシラコウモリ *Rhinolophus ferrumequinum*、テングコウモリ *Murina hilgendorfi*、またはユビナガコウモリ *Miniopterus fuliginosus* との混合コロニーを形成する (Bat Study and Conservation Group of Japan, 2011)。異種コウモリと共同生活するという独特な生態によって、ウイルスがコウモリ間を伝播することを容易にすると考えられる。今回は、これらのコウモリ種から BtAdV は検出されなか

ったが、今後はより多くの検体を対象として、BtAdV のコウモリ種間での伝播に関して明らかにする必要がある。

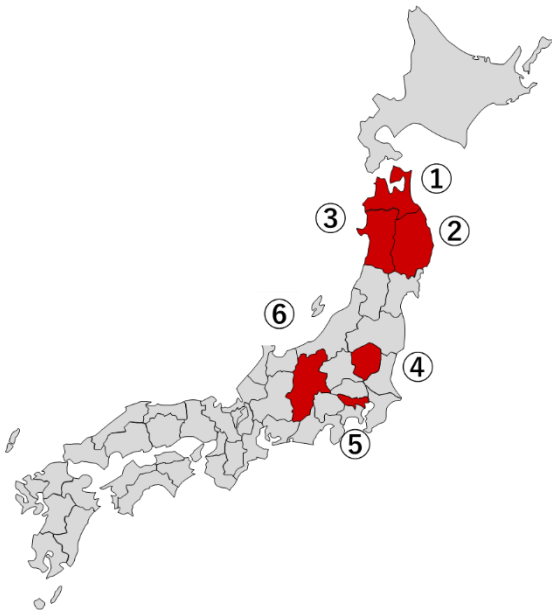
中国、韓国、モンゴル、日本などに分布する昆虫食コウモリであるヒナコウモリ *Vespertilio sinensis* から BtAdV-Vs9 を分離した(図 2-1A)。BtAdV-Vs9 は東京に生息するヒナコウモリの検体から分離されたが、私は最近、約 800km 離れた青森県で捕獲された同種のコウモリから、BtAdV-Vs9 と非常に近縁なウイルス(ゲノムの相同性が 95%)を分離した(小林ら、未公表)。したがって、BtAdV-Vs9 に近縁なウイルスは、ヒナコウモリの分布域である日本および東アジアの広範囲に分布している可能性が高い。ヒナコウモリは元来洞窟や樹洞に生息していたが、近年は新幹線の高架などのヒトの生活圏に隣接した場所での生息も報告されている(Bat Study and Conservation Group of Japan, 2011)。また、非常に長距離の移動(約 780 km)をおこなうことが知られている(Bat Study and Conservation Group of Japan, 2011)。このようなヒナコウモリの生態学的特徴はウイルスを伝播する上で優れており、BtAdV-Vs9 を含めたヒナコウモリが保有するウイルス叢の探索は今後の課題である。

今回、BtAdV-Mm32 および BtAdV-Vs9 は糞便から分離されたが、マウスを用いた実験では経口感染は成立しなかった(図 2-4)。これまでの報告では、BtAdV とコウモリの呼吸器疾患との関連が示唆されているため(Kohl *et al.*, 2012)、BtAdV は消化器官ではなくむしろ呼吸器でより効率的に増殖する可能性が高いと考えられた。興味深いことに、BtAdV を経鼻感染させて 21 日間経過したマウスの一部では腸管からもウイルス遺伝子が検出された。したがって、BtAdV は呼吸器を介して感染するが、感染成立後は多臓器にウイルスが播種する可能性が示唆された。BtAdV の種間伝播や多種動物への病原性の有無を解明する上で、本章で得られた BtAdV の組織指向性および病原性に関する知見は重要であると考えられる。

進化系統樹解析の結果、BtAdV-Vs9 は CAdV と最も近縁であり、BtAdV-Vs9 または類似のウイルスがイヌに感染する、あるいは突然変異によって感染能を獲得する可能性がある。今回の血清学的試験では、BtAdV-Vs9 と CAdV 間に中和交叉性は認められなかった(図 2-5A)。また、今

回分離した株を含め BtAdV は広範な種類の哺乳類培養細胞株で増殖するため(図 2-6)、種間伝播しやすい可能性がある。したがって、仮に BtAdV が種の壁を越えた場合、イヌに広く使用されている CAdV ワクチンは、BtAdV 感染に対して効果的ではなく、その感染は犬の個体群に容易に広がる可能性がある。今後、BtAdV のイヌに対する病原性の有無やイヌを対象とした血清調査などを実施し、BtAdV に関する知見を集積することが肝要である。

A



①青森:
 コテングコウモリ (*Murina ussurinensis*): 1
 ヒナコウモリ (*Vespertilio sinensis*): 65
 キクガシラコウモリ (*Rhinolophus ferrumequinum*): 14
 ニホンウサギコウモリ (*Rhinolophus cornutus*): 3
 ヒメホオヒゲコウモリ (*Myotis ikonnikovi*): 4
 クロホオヒゲコウモリ (*Myotis pluinus*): 2

②岩手:
 ユビナガコウモリ (*Miniopterus fuliginosus*): 2
 ヒナコウモリ (*Vespertilio sinensis*): 12

③秋田:
 ヒメホオヒゲコウモリ (*Myotis ikonnikovi*): 1

④栃木:
 ニホンウサギコウモリ (*Plecotus sacrimontis*): 1
 モモジロコウモリ (*Myotis macrodactylus*): 1

⑤東京:
 ヒナコウモリ (*Vespertilio sinensis*): 2
 テングコウモリ (*Murina hilgendorfi*): 2
 モモジロコウモリ (*Myotis macrodactylus*): 18

⑥長野:
 クビワコウモリ (*Eptesicus japonensis*): 30
 キクガシラコウモリ (*Rhinolophus ferrumequinum*): 2
 ヒメホオヒゲコウモリ (*Myotis ikonnikovi*): 2
 ニホンウサギコウモリ (*Plecotus sacrimontis*): 1

B

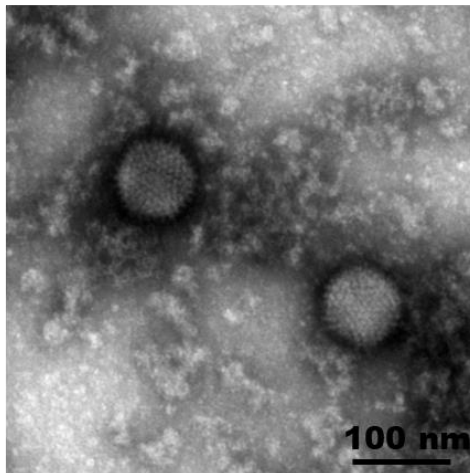


Myotis macrodactylus

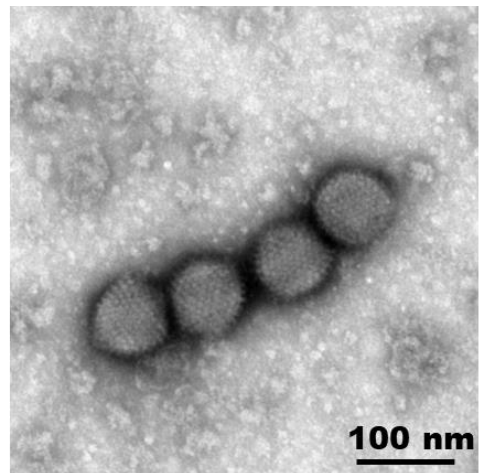


Vespertilio sinensis

C



BtAdV-Mm32



BtAdV-Vs9

図 2-1 日本に生息するコウモリから BtAdV の分離

(A) 6 都道府県で捕獲した 10 種のコウモリ種から、計 163 糞便検体を採集した。都道府県ごとにコウモリ種と検体数を記載した。(B) BtAdV-Mm32 および Vs9 はそれぞれ *Myotis macrodactylus* および *Vespertilio sinensis* から分離された。(C) 分離ウイルスを陰性染色し、透過型電子顕微鏡で観察した。

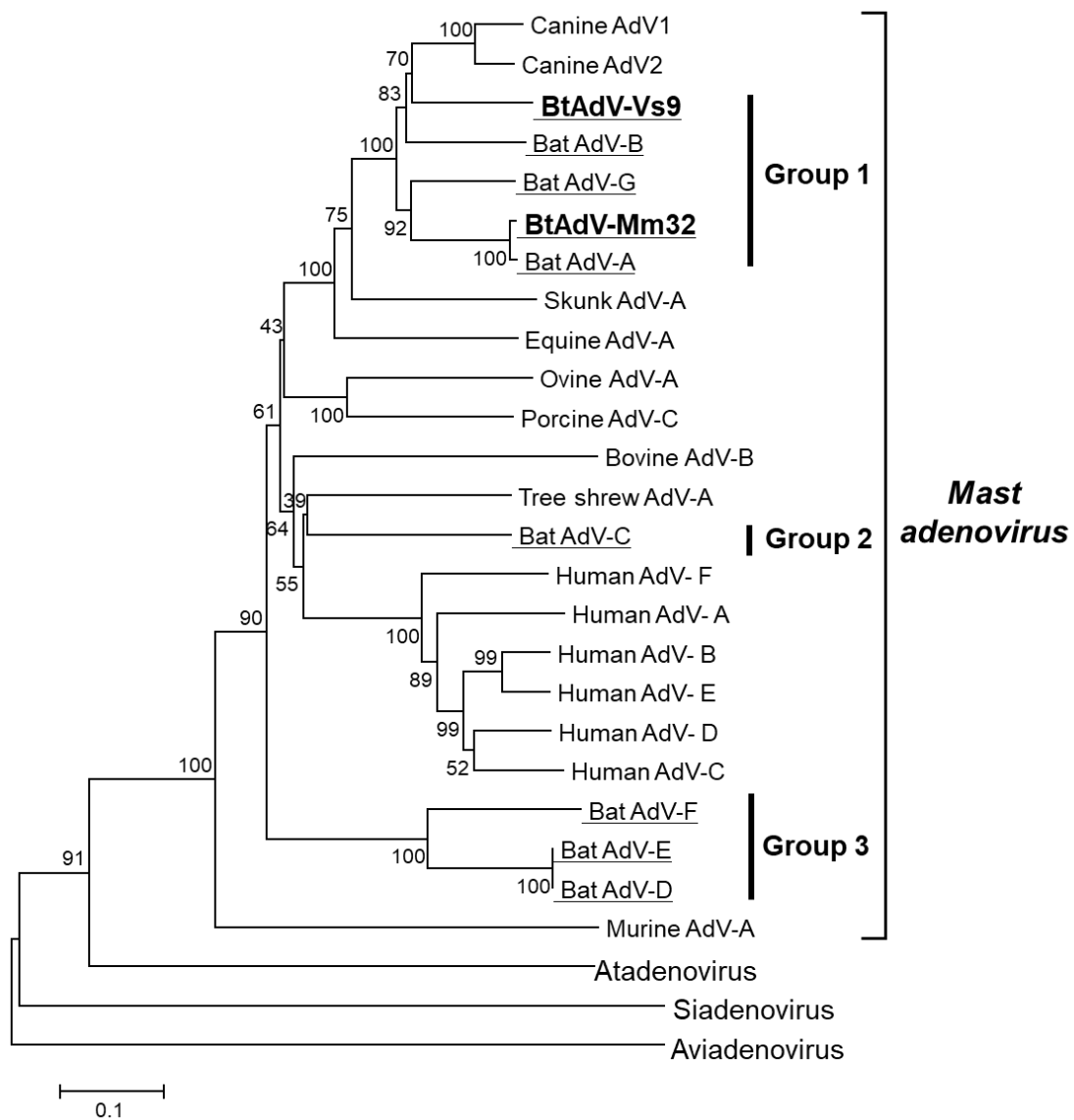


図 2-2 BtAdV の進化系統解析

DNA ポリメラーゼのアミノ酸配列に基づいて近隣結合法による進化系統樹を作成した。ブートストラップ値は系統樹の分岐部に示した。スケールバーは、座位あたり 0.1%の置換を表す。既報を含む BtAdV には下線を引き、今回分離した株は太字で示した。

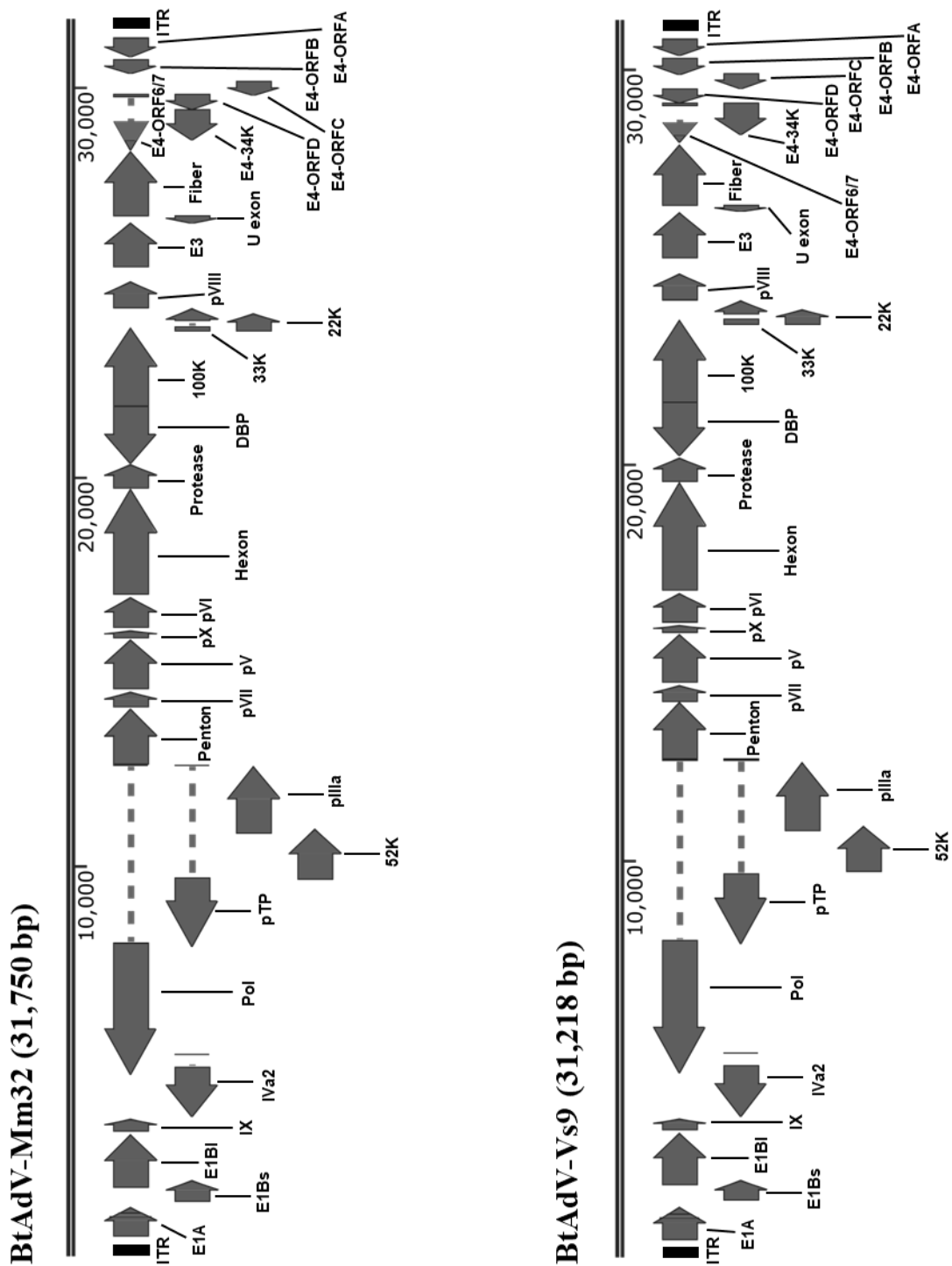


図 2-3 BtAdV-Mm32 および BtAdV-Vs9 のゲノム構造

総ゲノム長は、ウイルス株名の右に記載した。各矢印は、タンパク質をコードする ORF およびその方向を示す。黒い四角は ITR を示している。

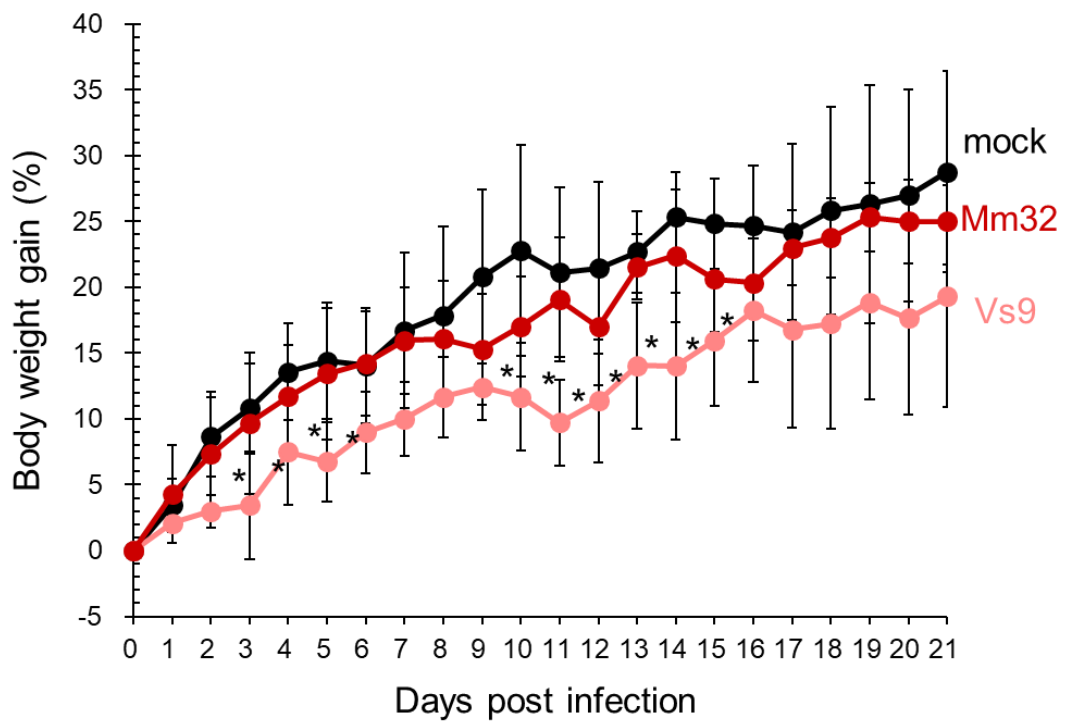


図 2-4 マウスにおける BtAdVs の病原性

10⁵ PFU の BtAdV-Mm32、BtAdV-Vs9、または PBS (mock) を BALB/c マウス (4 週齢、n = 3) に鼻腔内接種した。その後、体重を 21 日間毎日測定した。アスタリスク(*)は非感染マウスと比較して体重増加率に有意差が認められたことを示す (p < 0.05、Dunnett 検定)。

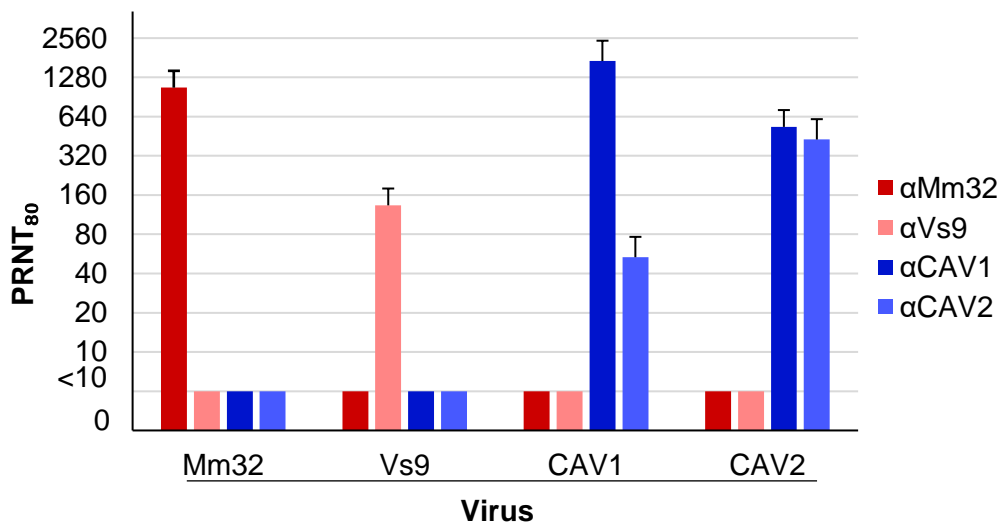
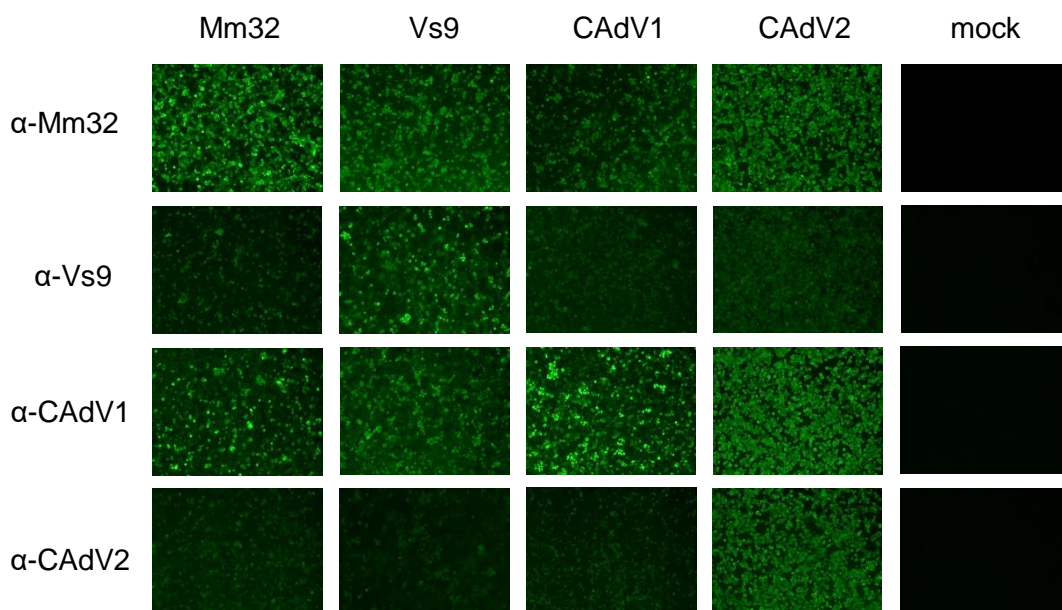
A**B**

図 2-5 BtAdV と CAdV との間の抗原交叉反応性

(A) BtAdV-Mm32、BtAdV-Vs9、CAdV1 または CAdV2 およびそれらの抗血清をホモまたはヘテロの組み合わせで反応させ、MDCK 細胞におけるプラーク減少中和試験を実施した。プラーク数の 80%減少値を中和抗体価 (PRNT₈₀) として算出した。3 回の独立した実験で得られたデータ

を平均し、標準偏差を付与した。(B) BtAdV-Mm32、BtAdV-Vs9、CAdV1、または CAdV2 を MOI=1 で細胞に接種した。感染 24 時間後に細胞を固定し、透過処理をおこなった。ブロッキング後、各抗血清をホモまたはヘテロの組み合わせで一次抗体として使用した。その後、蛍光分子で標識した二次抗体を反応させ、蛍光顕微鏡で観察した。

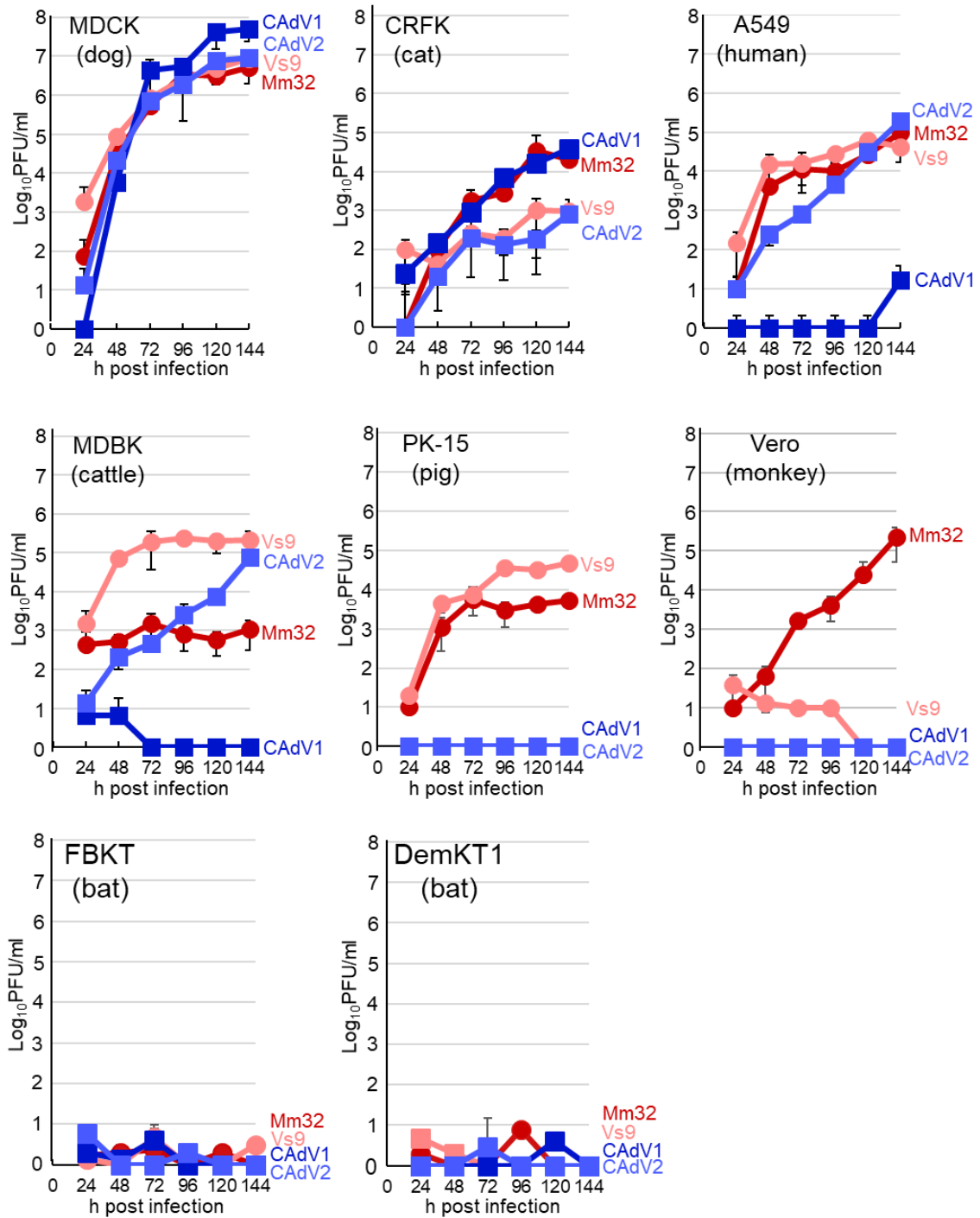


図 2-6 哺乳動物由来細胞株における BtAdV の増殖

BtAdV-Mm32、BtAdV-Vs9、CAdV1 または CAdV2 を MDCK、Vero、A549、CRFK、MDBK、PK-15、FBKT、および DemKT1 細胞に MOI=0.01 で接種した。その後、上清を感染後 6 日まで

毎日回収した。回収したウイルス液の力価は、MDCK 細胞でプラークアッセイによって測定した。

3 回の独立した実験で得られたデータを平均し、標準偏差を付与した。

表 2-1 BtAdV 遺伝子のゲノム上の位置とコードされているタンパク質の推定される機能

Gene	Genomic position (nt)		Function
	BtAdV-Mm32	BtAdV-Vs9	
<i>E1A</i>	536-1034, 1118-1278	462-1014, 1094-1293	Transcriptional activator
<i>E1Bs</i>	1424-1972	1466-1984	Small T-antigen
<i>E1BI</i>	1786-3165	1828-3165	Large T-antigen
<i>pIX</i>	3231-3551	3231-3521	Minor capsid protein
<i>IVa2</i>	3575-4890, 5190-5202	3555-4882, 5161-5173	DNA packaging
<i>Pol</i>	4675-8094, 12623-12631	4646-8053, 12581-12589	DNA polymerase
<i>pTP</i>	7590-9770, 12623-12631	7912-9732, 12581-12589	DNA terminal protein
<i>52K</i>	9697-11010	9757-10935	DNA packaging protein
<i>pIIIa</i>	10886-12610	10802-12553	Minor capsid protein
<i>Penton</i>	12657-14087	12613-14046	Major capsid protein
<i>pVII</i>	14119-14523	14074-14484	Minor core protein
<i>pV</i>	14589-15875	14551-15780	Minor core protein
<i>pX</i>	15901-16110	15805-16011	Minor core protein
<i>pVI</i>	16159-16959	16060-16806	Minor capsid protein
<i>Hexon</i>	17029-19755	16879-19605	Major capsid protein
<i>Protease</i>	19767-20387	19607-20224	Endopeptidase
<i>DBP</i>	20393-21847	20264-21622	DNA binding protein
<i>100K</i>	21860-23911	21634-23718	Hexon assembly protein

33K	23793-23937, 24050-24399	23588-23744, 23857-24212	DNA packaging protein
22K	23793-24260	23588-23986	DNA packaging protein
pVIII	24403-25071	24214-24894	Minor capsid protein
E3	25438-26586	25274-26425	Modulates immune response
U exon	26559-26762	26428-26595	Viral replication
Fiber	26761-28428	26594-28144	Major capsid protein
E4-ORF6/7	28442-28684, 29814-29861	28166-28387, 29121-29168	Transcriptional activator
E4-34K	28685-29467	28389-29168	Double strand break repair
E4-ORF4	29469-29861	29170-29550	Induced cell death
E4-ORF3	29840-30214	29553-29924	Shut-down of cellular protein
E4-ORF2	30394-30753	29905-30303	Unknown
E4-ORF1	30845-31318	30391-30783	Oncogenicity

表 2-2 BtAdV-Mm32 と他の BtAdV および CAdV とのタンパク質の相同性の比較

Viruses	Amino acid identity to BtAdV-Mm32 (%)																							
	E1A	E1B _s	E1B _l	pIX	IVa2	Pol	pTP	p3K	pIIIa	Penton	pVII	pV	pX	pVI	Hexon	Protense	DBP	100K	33K	22K	pVIII	U exon	Fiber	E4-34K
BtAdV-Ys9	41	42	50	53	72	74	80	74	76	83	77	59	83	72	87	78	70	73	59	53	75	65	42	50
BtAdV-A	95	97	98	95	98	98	99	98	99	100	98	96	100	95	100	98	99	98	98	98	99	100	98	98
BtAdV-B	46	47	53	48	75	74	84	75	78	82	71	60	84	67	86	80	70	78	63	56	80	74	48	49
BtAdV-C	21	25	25	42	64	60	64	59	52	65	34	30	58	50	72	65	43	56	43	43	56	32	25	26
BtAdV-D	39	17	25	41	63	57	61	59	50	63	39	22	55	45	70	58	53	54	60	41	54	43	26	27
BtAdV-E	35	23	25	31	60	56	58	55	52	65	46	21	56	42	71	59	48	55	52	38	56	32	24	24
BtAdV-F	20	23	27	42	58	59	52	55	51	63	46	25	57	44	69	56	45	53	53	34	56	39	23	26
BtAdV-G	48	58	63	60	79	78	88	82	85	89	84	72	85	80	90	88	79	81	78	67	86	74	50	63
CAdV1	44	45	50	52	72	74	85	77	78	84	74	60	83	71	86	78	66	74	57	60	76	80	45	49
CAdV2	40	47	51	54	76	75	86	78	80	83	74	62	82	73	86	82	66	75	59	58	80	80	50	50

表 2-3 BtAdV-Vs9 と他の BtAdV および CAdV とのタンパク質の相同性の比較

Viruses	Amino acid identity to BtAdV-Vs9 (%)																								
	E1A	E1B _s	E1B _l	E1C	pIX	IVa ₂	Pol	pTP	pI ₂ K	pIIIa	Penton	pVII	pV	pX	pVI	Hexon	Protease	DBP	100K	33K	22K	pVIII	U exon	Fiber	E1-34K
BtAdV-Mm32	41	42	50	53	72	74	80	74	76	83	77	59	83	72	87	78	70	73	59	53	53	75	65	42	50
BtAdV-A	43	46	50	52	72	74	80	75	76	83	77	58	83	70	87	79	70	72	60	53	53	76	65	43	49
BtAdV-B	49	44	58	54	75	76	84	73	79	86	85	61	85	64	85	82	69	75	81	63	79	72	40	45	
BtAdV-C	22	24	28	50	61	60	62	56	50	67	35	27	61	44	72	61	53	53	36	50	53	33	25	26	
BtAdV-D	33	21	26	31	64	57	58	62	50	65	37	24	57	45	70	60	53	55	62	37	49	51	25	27	
BtAdV-E	26	21	24	30	60	56	58	59	52	64	35	23	57	47	71	59	44	54	58	36	51	47	19	26	
BtAdV-F	27	18	26	35	58	59	54	61	50	62	44	23	55	50	69	58	48	53	58	36	53	42	24	25	
BtAdV-G	43	38	54	62	74	75	83	77	78	84	81	66	81	72	85	81	73	75	64	62	77	63	44	49	
CAdV1	43	45	55	56	75	76	82	75	77	86	76	65	80	69	85	82	64	73	71	67	74	69	42	48	
CAdV2	44	50	58	55	75	77	83	77	78	86	80	66	82	71	85	84	64	74	56	63	75	70	43	46	

第 3 章

日本産コウモリから分離した コウモリアデノウイルスの 受容体の同定

要 旨

第 2 章で、BtAdV 分離株は様々な動物種の培養細胞において増殖し、細胞指向性が広いことが示唆された。この結果は、BtAdV に関する先行研究における報告と合致しており、BtAdV は様々な動物種の細胞で増殖する能力があると考えられる。第 3 章では、BtAdV の細胞指向性に関する知見を得るために、様々な AdV の受容体として知られる CXADR の BtAdV の細胞侵入における関与を調べた。まず私は、CRISPR-Cas9 システムを用いて CXADR 遺伝子をノックアウトしたイヌ由来 MDCK 細胞を作製し、この細胞において BtAdV の吸着や複製が有意に低下することを見出した。次に、CXADR が BtAdV の複製や吸着において重要であることを示すために、イヌ CXADR を再導入した細胞において BtAdV の複製や吸着が野生型細胞と遜色ないレベルまで回復することを確認した。さらに、ヒトまたはコウモリの CXADR を導入した細胞において、イヌ CXADR を再導入した細胞と同様のレベルまでウイルスの複製や吸着が回復することを見出した。これらの結果は、BtAdV がいくつかの哺乳類由来の CXADR を侵入因子として利用できることを示唆しており、BtAdV が他の哺乳類へ感染する潜在性を示すものである。

背景と目的

第 2 章で述べたように AdV には 5 つの属が存在する。いずれも脊椎動物を宿主とするが、その宿主域には違いがあり、*Mastadenovirus* 属のウイルスは哺乳類、*IChtadenovirus* 属のウイルスは魚類、*Aviadenovirus* 属のウイルスは鳥類のみをそれぞれ宿主とする (Benkő *et al.*, 2003)。一方、*Siadenovirus* 属と *Atadenovirus* 属のウイルスは宿主域が広く、哺乳類や鳥類に加えて、両生類や爬虫類、有袋類などに感染することが知られている (Benkő *et al.*, 2003)。しかし、最近、*Mastadenovirus* 属のウイルスにおいて異種動物間での伝播に関する知見が複数報告された。例えば、*Canine mastadenovirus A* 種に分類される CAdV は、イヌ伝染性肝炎 (CAdV1) またはイヌ伝染性喉頭気管炎 (CAdV2) の原因であるが、イヌ以外にもキツネやクマ、ライオンといった食肉目動物に伝播し、病気を引き起こすことが報告された (Gerhold *et al.*, 2007; Thompson *et al.*, 2010)。さらに、simian mastadenovirus がヒトを含む霊長類間で伝播したことが報告された (Chen *et al.*, 2011; Wevers *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2013)。したがって、マストアデノウイルスの狭いとされる宿主域に関して、再検証の余地があると考えられる。

いくつかの研究報告によって、BtAdV が培養細胞において広い細胞指向性を有することが示唆されている (Li *et al.*, 2010; Hackenbrack *et al.*, 2017; Ogawa *et al.*, 2017)。また、第 2 章において、私が分離した BtAdV についても培養細胞において広い細胞指向性を有することを示した。しかしながら、BtAdV の細胞指向性のメカニズムは不明なままである。細胞表面上の受容体は、主要なウイルス宿主域決定因子の 1 つである (Connor *et al.*, 1994; Ge *et al.*, 2013; Ndungo *et al.*, 2016)。アデノウイルスはファイバータンパク質を介して受容体に結合する (Henry *et al.*, 1994; Louis *et al.*, 1994)。これまでに様々な分子がアデノウイルス受容体として報告されており (Marttila *et al.*, 2005; Bangari *et al.*, 2005; Haisma *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2011)、特に CXADR は多くの種類のアデノウイルスにおいて受容体として機能する (Bergelson

et al., 1997; Tomko *et al.*, 1997; Soudais *et al.*, 2000)。CXADR は 2 つの免疫グロブリン様ドメインからなる細胞外領域を有する 46 kDa の I 型膜貫通タンパク質であり、細胞間のタイトジャンクション形成に主要な役割を果たす (Cohen *et al.*, 2001)。CXADR ホモログは、ヒト、マウス、ラット、イヌ、バット、およびゼブラフィッシュなどをはじめとする脊椎動物間で高度に保存されている (Petrella *et al.*, 2002)。したがって、BtAdV が様々な培養細胞に感染するために CXADR を利用している可能性がある。

第 3 章では、BtAdV の広い細胞指向性に関係する要因を明らかにするため、BtAdV 感染における CXADR の役割を調べた。

材料と方法

細胞とウイルス

イヌ腎臓由来 MDCK 細胞、MDCK 細胞からイヌ CXADR (canine(c)CXADR) をノックアウトした細胞 (cCXADR-KO)、cCXADR-KO 細胞に cCXADR を再導入 (addback) した細胞、cCXADR-KO 細胞にヒト CXADR (human(h)CXADR) を導入 (transduce) した細胞、cCXADR-KO 細胞にコウモリ CXADR (bat(b)CXADR) を導入 (transduce) した細胞は 5%FBS 加 DMEM 培地を用いて、37°C、5%CO₂ インキュベーターで培養、継代した。HEK293T 細胞は 10%FBS 加 DMEM 培地を用いて、37°C、5%CO₂ インキュベーターで培養、継代した。BtAdV-Mm32、BtAdV-Vs9、CAv1 (D43 株) および CAv2 (Toronto A 26/61 株) は、1%FBS 加 DMEM 培地で MDCK 細胞を用いて増殖させた。

プラスミド

plentiCRISPR ベクターはマサチューセッツ工科大学の Feng Zhang 博士より分与していただいた。pHR-SIN-CSGW (pS) レンチウイルスベクターおよび p8.9QV は国立感染症研究所の下島博士より分与していただいた (Shimajima *et al.*, 2007; Shimajima *et al.*, 2012)。pCAGGS-VSV-G は水胞性口内炎ウイルスの G タンパク質遺伝子を pCAGGS ベクターにクローニングして作製した。

イヌ CXADR ノックアウト細胞の作製

CRISPR-Cas9 システムを用いて cCXADR 遺伝子をノックアウトした。まず、NCBI のデータベースに登録された全ての cCXADR の transcriptional variant に共通な exon 2 上にガイド RNA (5'ACCCTTAGTCCAGAAGACCA 3') を設計し、この配列を、plentiCRISPR ベクターにクロー

ニングした。本ベクターは導入細胞中で gRNA と Cas9 タンパク質を発現する。100 μ L の Opti-MEM(GIBCO)にガイド RNA をクローニングしたプラスミド 1 μ g と 3 μ L の PEI (1 mg/mL、pH8.0) を加え、15 分間静置した後、12 ウェルプレート中に 60%コンフルエントの MDCK 細胞に導入した。プラスミドが導入された細胞をスクリーニングするため、導入の 24 時間後に培地を除去し、10 μ g/mL となるように puromycin(InvivoGen)を添加した 5%FBS 加 DMEM 培地を加えた。細胞がコンフルエントになるまで増殖させ、10 cm シャーレに希釈継代し、コロニーを形成させた。cCXADR がノックアウトされているかを確認するために、変異導入部位周辺を増幅するプライマー (Forward: 5'-CCACATTCTGTTCTCCTGAG-3'、Reverse: 5'-CACATGTGTCCTCACTTTCC-3')を用いて PCR をおこない、塩基配列の欠失・挿入・置換を指標に cCXADR がノックアウトされたコロニーを選抜した(図 3-1)。

ウェスタンブロットティングによる CXADR の発現確認

培地を完全に除去し、PBS で洗浄した後、細胞に細胞溶解液(20 mM Tris-HCl pH7.5、0.1% Triton X-100、100 mM NaCl、30 mM KCl、1 mM EDTA、1 \times protease inhibitor cocktail (Roche))を加え、4 $^{\circ}$ C で 10 分間インキュベートした。10,000 \times g で 5 分間遠心分離し、上清に等量の 2 \times SDS サンプルバッファーを加え、5 分間煮沸した。これを SDS を含むポリアクリルアミドゲルで電気泳動した(20 mA、2.5 時間)。次に、タンパク質を horizBLOT4M_1A_200w(ATTO)を用いて、PVDF 膜上に転写した(20 V、20 分間)。転写バッファーには EzFast Blot(ATTO)を使用した。その後、膜をブロックエース(DS Pharma Biomedical)で 45 分間ブロッキングし、続いて一次抗体としてマウス抗 CXADR(E1)モノクローナル抗体(Santa Cruz Biotechnology)を 45 分間反応させた。洗浄後、二次抗体としての HRP 標識ヒツジ抗マウス IgG F(ab')₂ フラグメント(GE Healthcare)を用い、45 分間インキュベートした。最後に、Chemi-Lumi One(Nacalai Tesque)を膜上に滴下し、インキュベートした後、シグナルを ImageQuant LAS 4000(Fujifilm)によって検出した。また、ローディングコントロールである ACTB の検出には HRP 標識抗 ACTB 抗体(abcam)

を用いた。

イヌ、ヒトおよびコウモリの CXADR 遺伝子のクローニング

イヌ cCXADR は MDCK 細胞からクローニングした。まず、細胞から ISOGEN (NIPPON GENE) を用いて RNA を抽出した。次に、RNA から ReverTraAce (TOYOBO) を用いて cDNA を合成した。制限酵素認識配列を付加した特異的プライマーを用いて (表 3-1)、cCXADR を増幅した。産物を *BsmBI* と *NotI* で切断し、pS レンチウイルスベクターにクローニングした。決定した配列は NCBI に登録した (LC385829) (図 3-2)。

ヒト hCXADR (NM_001338) は A549 細胞からクローニングした。上記と同様に RNA 抽出、逆転写反応を行い、制限酵素認識配列を付加した特異的プライマー (表 3-1) を用いて、hCXADR を増幅した。*BamHI* と *NotI* で切断し、上記のようにクローニングした。

コウモリ bCXADR はヒナコウモリ *V.sinensis* の新鮮な死体由来の腎組織からクローニングした。まず、腎組織を TissueLyser II (QIAGEN) で破碎し、その遠心上清から RNeasy mini kit (QIAGEN) を用いて RNA を抽出した。以下、上記と同様の方法でベクターにクローニングした。プライマーはいくつかのコウモリ種の CXADR 塩基配列を参考に設計し、決定した配列は NCBI に登録した (LC385830) (図 3-2)。

cCXADR-KO 細胞への c, h, bCXADR 遺伝子の導入

組換えレンチウイルスを作製するために、pS-CXADR (イヌ、ヒトまたはコウモリ由来 CXADR)、p8.9QV、および pCAGGS-VSV-G を HEK293T 細胞に同時にトランスフェクションした。3 日後に培養上清を回収し、3 倍量の 4×PEG 溶液を加え、4°C で一晩静置した。この溶液を遠心し、上清を除去した。沈殿を 200 μL の Opti-MEM に溶解し、このうち 100 μL を 24 穴プレートに準備した cCXADR-KO 細胞に接種した。CXADR の発現はウェスタンブロッティングによって確認した。

ウイルス吸着アッセイ

12 ウェルプレートに WT、cCXADR-KO、cCXADR 再導入、hCXADR 導入、および bCXADR 導入細胞を準備し、MOI= 1 で BtAdV-Mm32、BtAdV-Vs9、CAAdV1 または CAAdV2 を感染させた。4°C で 60 分間吸着させた後、ウイルス液を除去し、細胞を氷冷 PBS で 3 回洗浄した。次に、細胞から QIAamp DNA mini kit(QIAGEN)を用いて DNA を抽出した。細胞に結合したウイルス量を定量するため、KOD SYBR qPCR Mix(TOYOBO)を用いたリアルタイム PCR アッセイを実施した。BtAdV および CAAdV の増幅に用いたプライマーの配列は表のとおりである(表 3-2)。また、ウイルス量を標準化するために、イヌ ACTB 遺伝子に対する特異的プライマーセットを併せて使用した(表 3-2)。

ウイルス感染アッセイ

WT、cCXADR-KO、cCXADR 再導入、hCXADR 導入、および bCXADR 導入細胞を 24 穴プレートに準備し、MOI=1 で BtAdV-Mm32、BtAdV-Vs9、CAAdV1 または CAAdV2 を感染させた。ウイルスを 37°C で 1 時間吸着させた後、ウイルス液を除去し、洗浄後、1%FBS 加 DMEM を加えた。感染 24 時間後にウイルス液を除去し、PBS で洗浄した後、細胞を 4%パラホルムアルデヒドで 15 分間固定した。次いで、0.1%Triton X-100 で 15 分間透過処理し、ブロックエースで 45 分間ブロッキングした。PBS-T で洗浄した後、各ウイルスに対する抗血清を一次抗体として 45 分間反応させた。PBS-T で洗浄した後、ヤギ抗マウス Alexa488 またはヤギ抗モルモット Alexa488 抗体を二次抗体として 45 分間反応させた。洗浄後、蛍光顕微鏡により細胞を観察した。各細胞と各ウイルスの組み合わせ毎に 5 視野の細胞数をカウントした。この実験を 3 回実施し、平均値を算出した。

ウイルス増殖アッセイ

12 ウェルプレートに WT、cCXADR-KO、cCXADR 再導入、hCXADR 導入、および bCXADR

導入細胞を準備し、MOI= 1 で BtAdV-Mm32、BtAdV-Vs9、CAdV1 または CAdV2 を感染させた。37°C で 60 分間吸着させた後、ウイルス液を除去した。洗浄後、1%FBS 加 DMEM を加え、上清を感染後 6 日まで毎日回収した。ウイルス力価を測定するために、MDCK 細胞でプラークアッセイを行った。まず、回収したウイルス液の 10 倍階段希釈系列を作製し、その 100 μ L を 12 穴プレートに準備した WT 細胞に吸着させた (37°C、60 分間)。ウイルス液を除去し、0.3%BSA および 0.8%アガロース加 MEM を細胞に重層した。感染から 5 日後にアガロースゲルを除去し、プラークを 0.1%クリスタルバイオレット溶液で染色した。プラーク数から PFU を算出した。

統計処理

IFA によるウイルス感染量、リアルタイム PCR によるウイルス吸着アッセイ、および CXADR-再導入または導入細胞のウイルス増殖性に関するデータは Dunnett 検定を用いて分析し、統計学的有意性を決定した。cCXADR-KO 細胞におけるウイルス増殖性に関するデータは Student-*t* 検定によって分析し、統計学的有意性を決定した。

倫理規定

組換えウイルス等を用いた遺伝子組換え実験 (第二種使用等拡散防止措置) は、東京大学遺伝子組換え生物等の使用等実施規則に則り、東京大学農学生命科学研究科遺伝子組換え生物等委員会の許可のもと実施した (機関承認番号 739-2630、1005-2832)。

結 果

cCXADR-KO 細胞における BtAdV の感染性と増殖性

CXADR は、CAAdV およびいくつかのヒトアデノウイルスの受容体として働くことが報告されている (Bergelson *et al.*, 1997; Tomko *et al.*, 1997; Soudais *et al.*, 2000)。CXADR の BtAdV の感染における役割を明らかにするために、CRISPR-Cas9 システムを用いて cCXADR-KO 細胞を作製した。cCXADR の発現が消失したことをサンガー法およびウェスタンブロットティングによって確認し、3 つのクローン (cCXADR-KO1、-KO2、および-KO3) を得た (図 3-3A)。まず、cCXADR-KO 細胞へのウイルスの感染性について調べるために、BtAdV または CAAdV を cCXADR-KO または WT 細胞に感染させ、IFA によりウイルス抗原を検出した。図 3-3B には感染 24 時間後に実施した IFA の一例を示した。ウイルス抗原陽性細胞をカウントし、定量したところ、いずれのウイルスにおいても、抗原陽性細胞の数は WT 細胞よりも cCXADR-KO 細胞において有意に少なかった (図 3-3C)。CXADR の BtAdV の感染における役割をさらに解析するために、BtAdV または CAAdV の増殖動態を解析した (図 3-3D)。その結果、いずれのウイルスでも、感染後の各時点でのウイルスカ価は、WT よりも cCXADR-KO 細胞において低かった。興味深いことに、CXADR-KO 細胞は依然として BtAdV および CAAdV に対して感受性を示した。これらの結果から、cCXADR が両 BtAdV の感染や増殖において重要な役割を果たすことが分かった。

イヌ CXADR 再導入細胞における BtAdV の感染性と増殖性

cCXADR-KO 細胞で観察された BtAdV および CAAdV の感染性や増殖性の低下が CRISPR-Cas9 システムによるオフターゲット効果ではないことを確認するために、レンチウイルスベクターを用いて cCXADR-KO 細胞に cCXADR 遺伝子を再導入した cCXADR-KO 細胞を作製した。この細胞における cCXADR の発現はウェスタンブロットティングによって確認した (図 3-4A)。次いで、

cCXADR 再導入細胞における BtAdV または CAdV の感染性および増殖性について解析した。ウイルスの感染性は、cCXADR の再導入によりいずれのウイルスでも WT 細胞と同等に回復した(図 3-4B、C)。また、再導入細胞における BtAdV および CAdV の増殖性(図 3-4D)についても WT 細胞と同等であった。これらの結果から、両 BtAdV が cCXADR を受容体として利用することが示唆された。

ヒトおよびコウモリ CXADR 導入細胞における BtAdV の感染性と増殖性

他の哺乳類種由来 CXADR が培養細胞における BtAdV および CAdV の増殖を促進するかどうかを調べるために、ヒト(h)およびコウモリ(b)の CXADR 遺伝子を cCXADR-KO 細胞に導入した。両 CXADR の発現はウェスタンブロットニングによって確認した(図 3-4A)。興味深いことに、hCXADR または bCXADR 導入細胞における BtAdV および CAdV の感染性は、WT や cCXADR 再導入細胞と同等であった(図 3-4B、C)。また、両 CXADR 導入細胞におけるウイルスの増殖性についても、WT や cCXADR 再導入細胞と同等であった(図 3-4D)。これらの結果は、BtAdV および CAdV がイヌに加えてヒトやコウモリの CXADR を受容体として利用できることを示唆している。

BtAdV の CXADR に対する吸着

BtAdV と CXADR の相互作用を直接的に調べるため、BtAdV と CAdV の細胞表面への吸着量を real-time PCR 法によって定量した。その結果、cCXADR-KO 細胞において、両 BtAdV の吸着量の有意な減少が観察された。この吸着量の低下は、イヌ、ヒトおよびコウモリの CXADR を導入することで完全に回復することが分かった(図 3-5)。これらの結果から、BtAdV がイヌ、ヒトおよびコウモリの CXADR に吸着し、細胞受容体として利用していることが示唆された。対照的に、CAdV では cCXADR-KO 細胞における吸着量は WT 細胞に対する吸着量とほとんど変わらなかった(図 3-5)。

考 察

BtAdV は世界中に広く分布し、様々な種類のココウモリおよびオオコウモリから分離されている (Maeda *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2010; Raut *et al.*, 2012; Baker *et al.*, 2013; Hackenbrack *et al.*, 2016; Ogawa *et al.*, 2017; Jansen *et al.*, 2018)。第 2 章で示したように、私が分離したウイルスは既報の BtAdV と同様に *in vitro* で広い細胞指向性を有していることが分かった。第 3 章では、BtAdV の受容体に着目して細胞指向性を規定する要因を探索したところ、CXADR が受容体として利用されていることが分かった。また、BtAdV が様々な動物種の CXADR を受容体として利用することが、広い細胞指向性の一要因となっている可能性を見出した。

本章では、培養細胞において CXADR が BtAdV の受容体として機能し得ることを示唆した。しかし、BtAdV および CAdV は CXADR-KO 細胞において増殖性が低下したものの、依然としてかなりの増殖性を維持していた (図 3-3D)。これらの結果は、CXADR 以外に BtAdV および CAdV の受容体として機能する分子が MDCK 細胞表面に存在する可能性を示している。BtAdV や CAdV と同様に CXADR を受容体として利用するヒトアデノウイルスの場合、CXADR に加えて、インテグリンまたはヘパラン硫酸プロテオグリカンなどの受容体を利用することが明らかになっている (Wickham *et al.*, 1993; Shayakhmetov *et al.*, 2005)。ヒトアデノウイルスではインテグリン $\alpha\beta 3$ および $\alpha\beta 5$ を認識する RGD (Arg-Gly-Asp) モチーフがウイルスのペントンベースタンパク質に存在することが報告されている (Wickham *et al.*, 1993)。しかしながら、両 BtAdV および CAdVs はペントンタンパク質を含むウイルス粒子に表出するすべてのタンパク質において RGD モチーフを有していなかった。一方、インテグリン $\alpha 1\beta 4$ への結合に関与する LDV (Leu-Asp-Val) モチーフが BtAdV や CAdV の pIIIa マイナーカプシドタンパク質に保存されていた (Komoriya *et al.*, 1991)。これまでにアデノウイルスの LDV モチーフによるインテグリンの認識や細胞侵入に関する報告はないが、BtAdV や CAdV は LDV のような既報以外のインテグリン結合モチーフを利

用している可能性がある。また、ヘパラン硫酸プロテオグリカンなどの細胞表面上のインテグリン以外の分子を受容体として利用する可能性もある。BtAdV の宿主域は複数種を受容体によって規定されている可能性があり、CXADR 以外の受容体の同定は今後の課題である。

今回の分離株を含む BtAdV は様々な種類の哺乳類培養細胞株に感染するため、*in vivo*においても種間伝播する可能性がある。受容体はウイルス宿主域を決定する因子の1つである。例えば、A 型インフルエンザウイルスの受容体はシアル酸であり、糖鎖末端のシアル酸とガラクトース間の結合様式がウイルスの宿主特異性を決定している(Connor *et al.*, 1994)。本研究で分離した BtAdV のファイバータンパク質には CXADR を認識する上で重要なアミノ酸残基(Seiradake *et al.*, 2006)が高度に保存されていた(表 3-3)。また、ファイバータンパク質との結合に重要な CXADR のアミノ酸残基についても多くの動物種で高度に保存されている。このことから、BtAdV は CXADR を利用することでヒトを含む様々な哺乳動物に感染する能力を有している可能性がある。今後は様々な動物種を対象とした BtAdV の血清学的調査などを実施し、BtAdV 種間の伝播に関する知見を集積し、リスク評価を行うことが望ましい。

		151	183	
Wild type	AGAAGACCAGG	▪ ▪ ▪	AGCTGATAATCAGAAGGTGGACCAAGT	GATT
KO-1	AGAA G ACCAG AGAAG A CCAGG	▪ ▪ ▪	CAGCT G AATAATCAGAAGGTGGACCAAGT	<u>GAT</u>
KO-2	AGAA A ACCAGG AGAAGAC C AGG	▪ ▪ ▪	GCTGATAATCAGAAGGTGGACCAAGT G ATTA	<u>GATTA</u>
KO-3	AGAA A ACCAGG AGAAGAC CA AGG	▪ ▪ ▪	GCTGATAATCAGAAGGTGGACCAAGT G ATTA	<u>GATTA</u>

Insertion: Red, Deletion: Blue, Terminal codon: Bold & lined

図 3-1 CXADR-KO 細胞の選抜

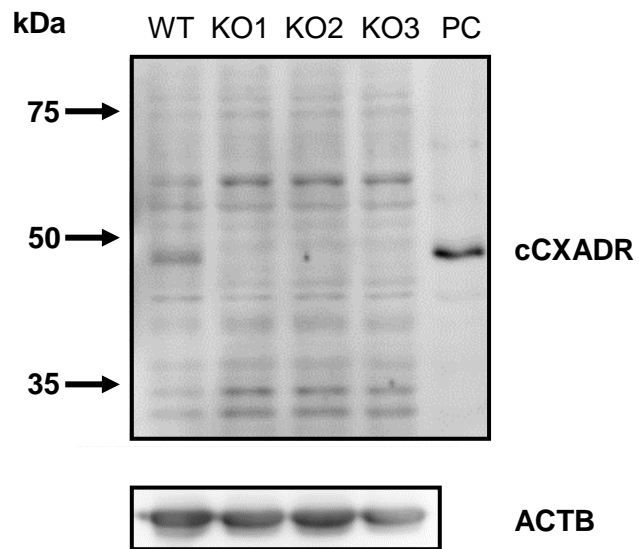
cCXADR 遺伝子がノックアウトされたかどうかを確認するために、サンガー法を実施した。いずれの cCXADR-KO 細胞でも数塩基の挿入欠損によりフレームシフトが起こり、終止コドンが形成されていた。

Canine CXADR	1	MALLLR	FVLLCGVAD	FTRSL	SITTP	EQMI	EKAKGETAYLPCKFTLSPEDQ					
Human CXADR	1	MALLLC	FVLLCGV	VDFA	RSL	SITTP	EQMI					
Bat CXADR	1	MALLLC	LLLLCGVAD	VTRSL	SITSP	DHMI	EKAKGETAYLPCKFTQGPEDQ					
Canine CXADR	51	GPLDIEWL	LSPADNQKVDQVIILYSGDKIYDDYYQ	DLKGRVHFTSNDLKS								
Human CXADR	51	GPLDIEWL	LSPADNQKVDQVIILYSGDKIYDDYYPDLKGRVHFTSNDLKS									
Bat CXADR	51	GPLDIEWL	LSPADNQKVDQVIILYSGDKIYDDYYPDLKGRVHFTS	SDLKA								
Canine CXADR	101	GDASINVTNLR	LSDIGTYQCKVKKAPGVGNKKIQ	LTVLVKPSG	IRCYVDG							
Human CXADR	101	GDASINVTNLQ	LSDIGTYQCKVKKAPGV	ANKKI	ELVVLV	KPSGAR	RCYVDG					
Bat CXADR	101	GDASINVTNLQ	LSDIGTYQCKVKKAPGVGNKKIQ	LKVLV	KPSG	IRCYVDG						
Canine CXADR	151	SEEIGNDFK	LKCEPK	EGSLPLQYEWQKLSNSQK	TPPSW	STD	MTSPVIS	IK				
Human CXADR	151	SEEIGS	DFK	LKCEPK	EGSLPLQYEWQKLS	DSQ	KMPTSW	LAEMTSS	VISVK			
Bat CXADR	151	SEEIGNDFK	LKCEPK	EGSLPL	NYEWQK	MNSQK	LP	TALISE	MTSPVI	TVK		
Canine CXADR	201	NASTEYS	SGTYSCTV	TNRV	GS	DQCQL	LRLNVVPPSNRAGTIAGAVVGI	LLAL				
Human CXADR	201	NASSEYS	SGTYSCTV	RNRV	GS	DQCQL	LRLNVVPPSNKAGLIAGAIIGT	LLAL				
Bat CXADR	201	NATTEYS	SGTYK	CTV	SNRV	GS	DQCVLRLD	VVPPSNRAGTIAGAIIGT	LLAL			
Canine CXADR	251	VLIGFIV	FCRKR	RREEK	YEKEV	HHDIRE	VPPP	KSR	TSTAR	SYIG	SNHS	
Human CXADR	251	ALIGLII	FCRKR	RREEK	YEKEV	HHDIRE	VPPP	KSR	TSTAR	SYIG	SNHS	
Bat CXADR	251	MLICV	IIFC	HR	RREEK	YEKEV	HHDIRE	VPPP	KSR	TSTAR	SYIG	SNHS
Canine CXADR	301	SLGSM	SPSNMEGY	SKTQYNQV	PS	EDFER	TPQSPTLPPAKVAAPNLS	RMGA				
Human CXADR	301	SLGSM	SPSNMEGY	SKTQYNQV	PS	EDFER	TPQSPTLPPAKVAAPNLS	RMGA				
Bat CXADR	301	SLGSM	SPSNMEGY	SKTQYNQV	PS	EDFER	APQSPTLPPAKVAAPNLS	RMGA				
Canine CXADR	351	VPVMIPA	QSKDGSIV*									
Human CXADR	351	IPVMIPA	QSKDGSIV*									
Bat CXADR	351	VPVMIPA	QSKDGSIV*									

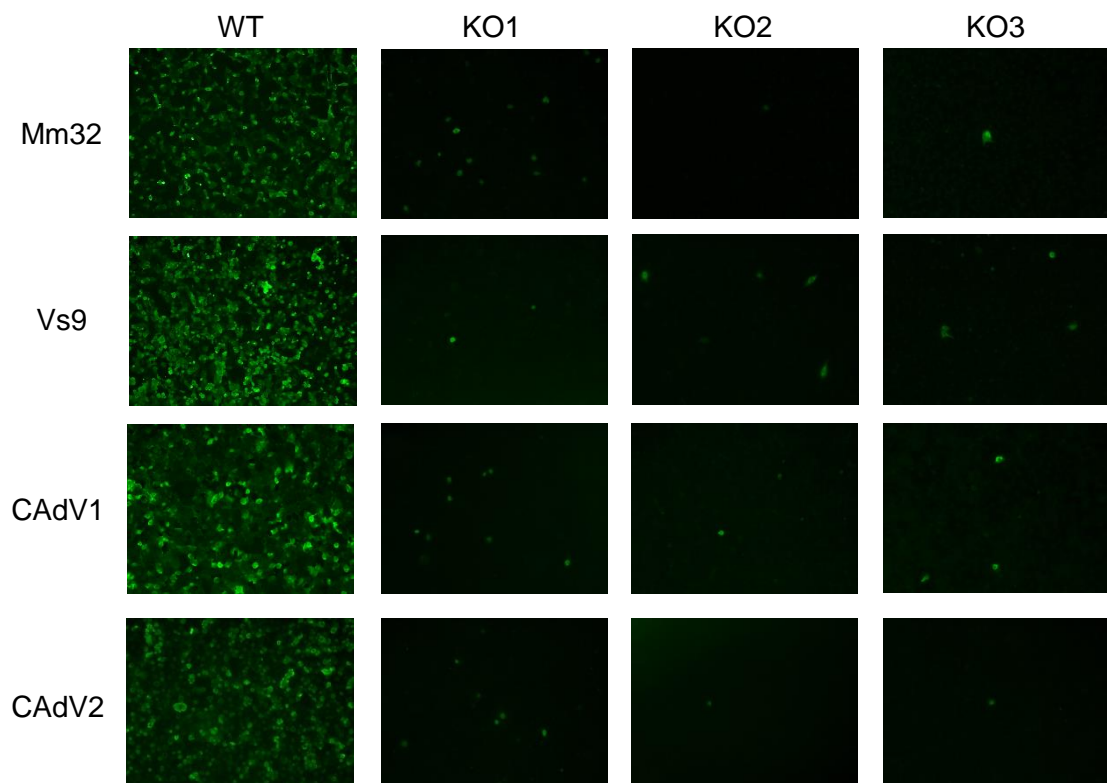
図 3-2 CXADR のアミノ酸配列

実験に用いた CXADR (イヌ、ヒト、コウモリ) の CXADR アミノ酸配列を示した。ハイライトされたアミノ酸は他の CXADR と対応するアミノ酸が異なることを示す。

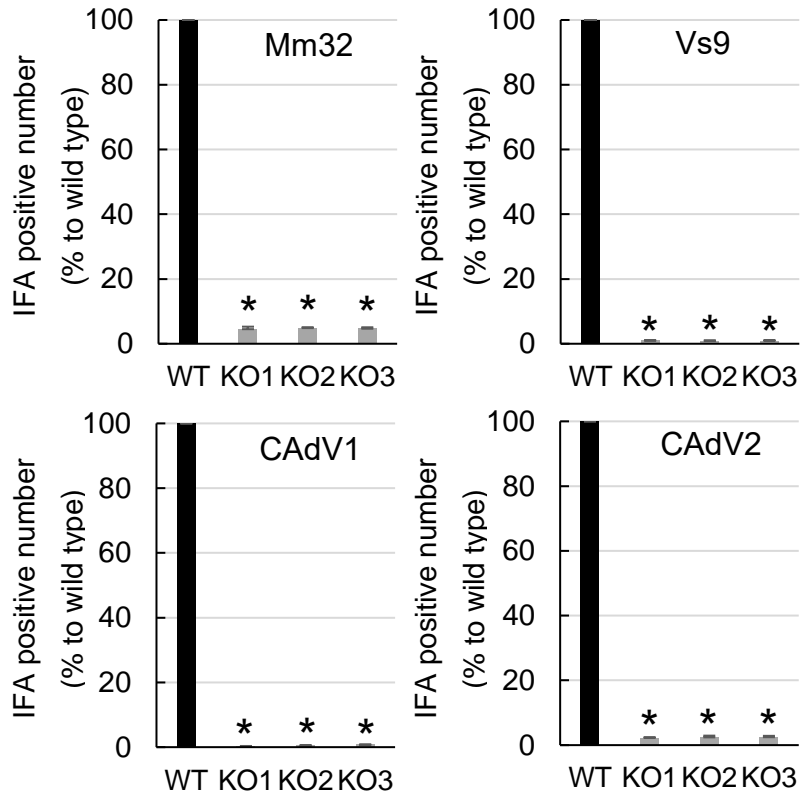
A



B



C



D

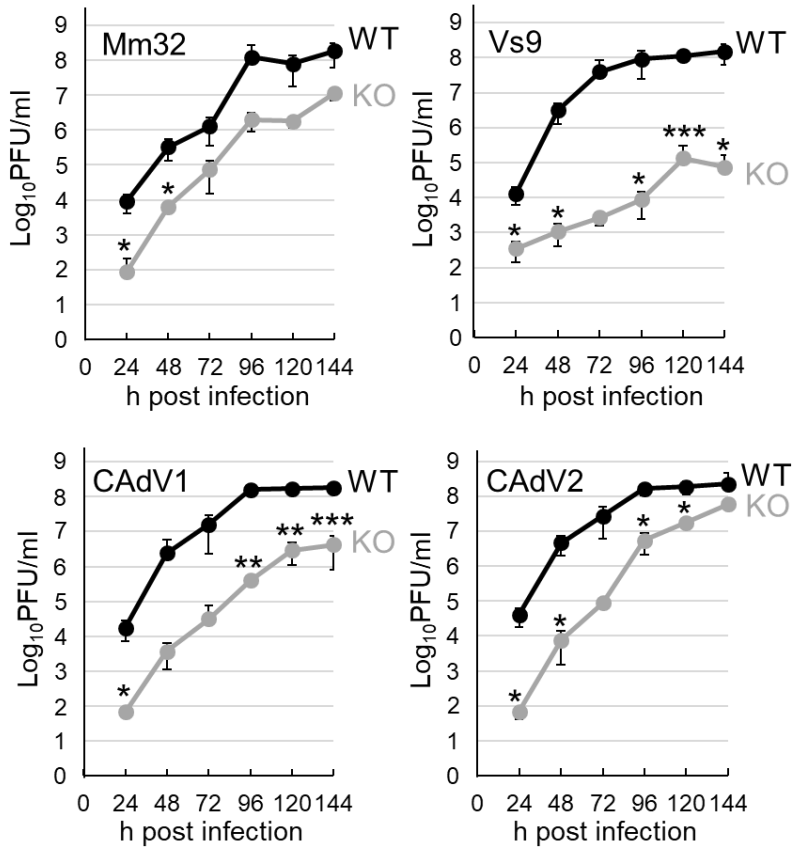
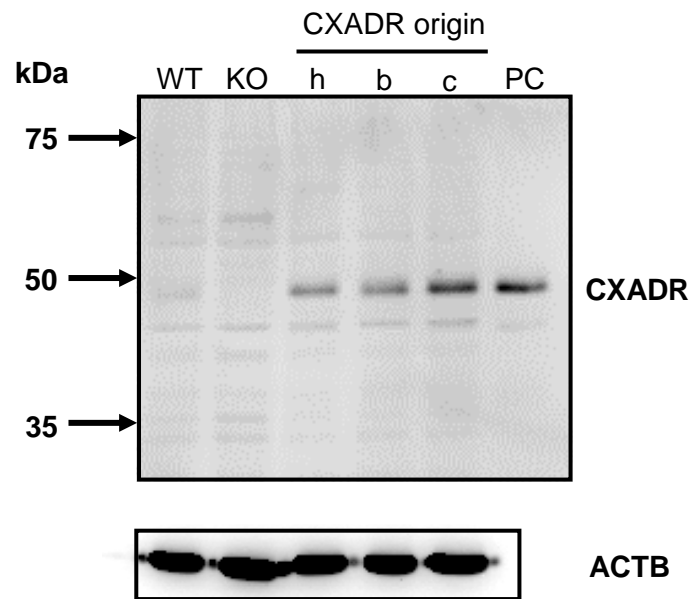


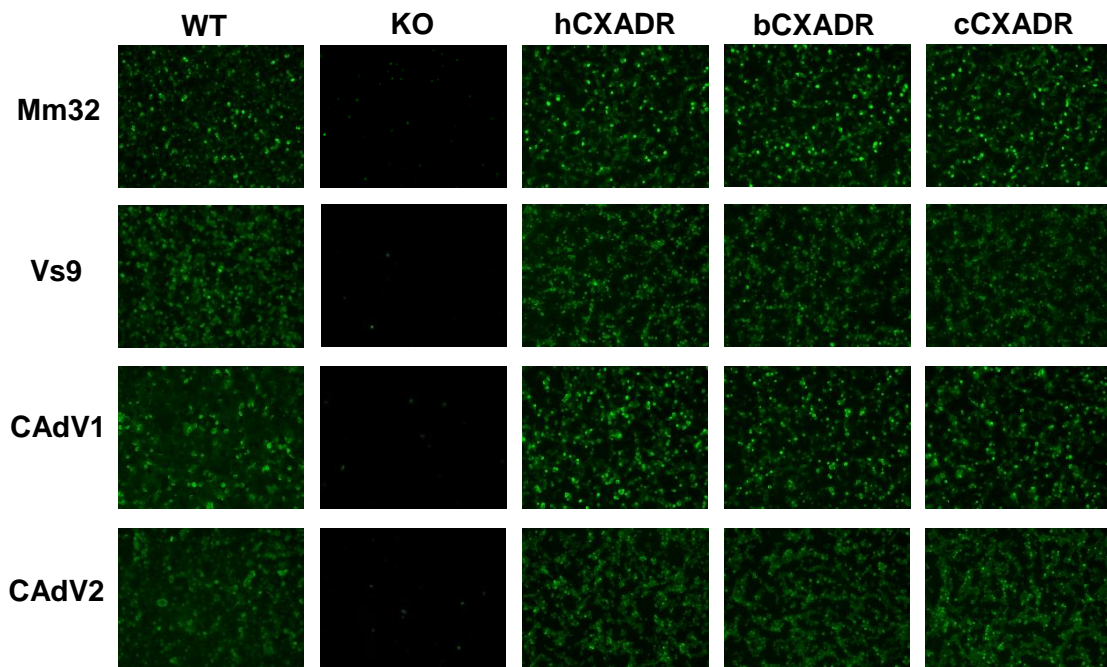
図 3-3 cCXADR-KO 細胞における BtAdV の感染性と増殖性

(A) マウス抗 CXADR モノクローナル抗体 (CXADR E1) を用いたウェスタンブロットニングで、3 系統の CXADR-KO 細胞において cCXADR がノックアウトされていることを確認した。陽性対照 (PC) として発現プラスミドから発現させた cCXADR を使用した。また、ACTB はローディングコントロールとして使用した。(B) WT または cCXADR-KO 細胞に、MOI=1 で BtAdV-Mm32、BtAdV-Vs9、CAvV1、または CAvV2 を接種した。感染 24 時間後に、各ウイルスの抗血清を用いた IFA を行い、蛍光顕微鏡下で観察した。(C) 図 3-3B の IFA 陽性細胞数を定量化した。この試験を独立に 3 回実施し、標準偏差を有する平均値として示した。アスタリスク(*)は、WT 細胞と比較して有意差があることを示している (Dunnett 検定による、 $p < 0.001$)。 (D) WT または cCXADR-KO 細胞に MOI=1 で各ウイルスを接種し、感染後 6 日間まで毎日培養上清を回収した。各上清の力価を WT 細胞で測定し、増殖曲線を作成した。この試験を独立に 3 回実施し、標準偏差を有する平均値として示した。アスタリスク(*)は、WT 細胞と比較して有意差があることを示している (Student-*t* 検定による、* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$)。

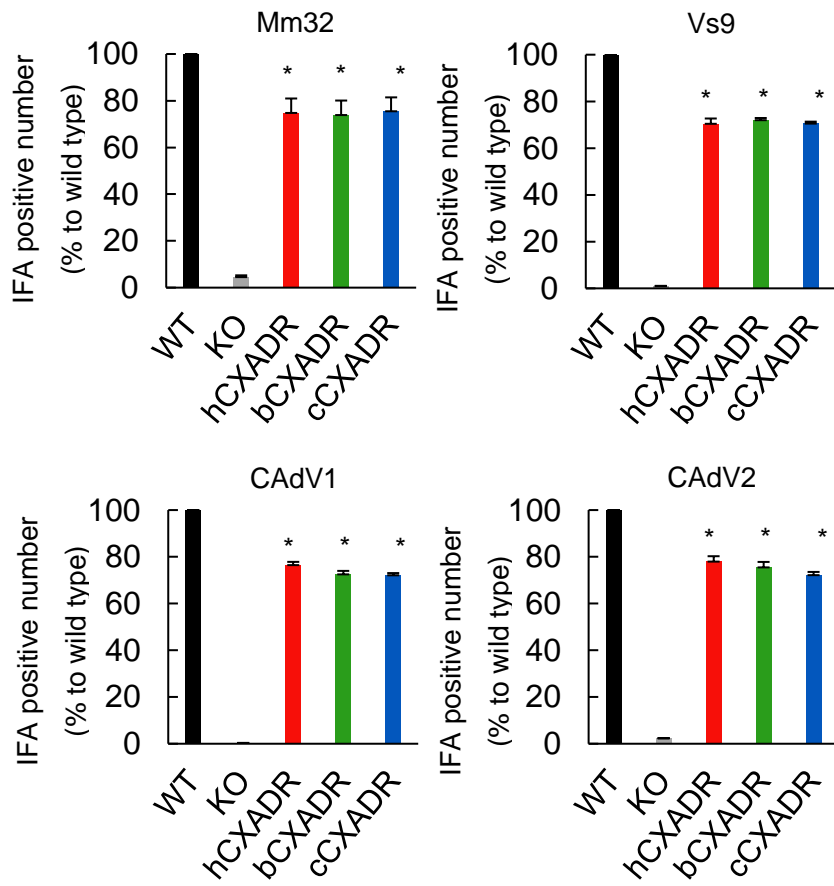
A



B



C



D

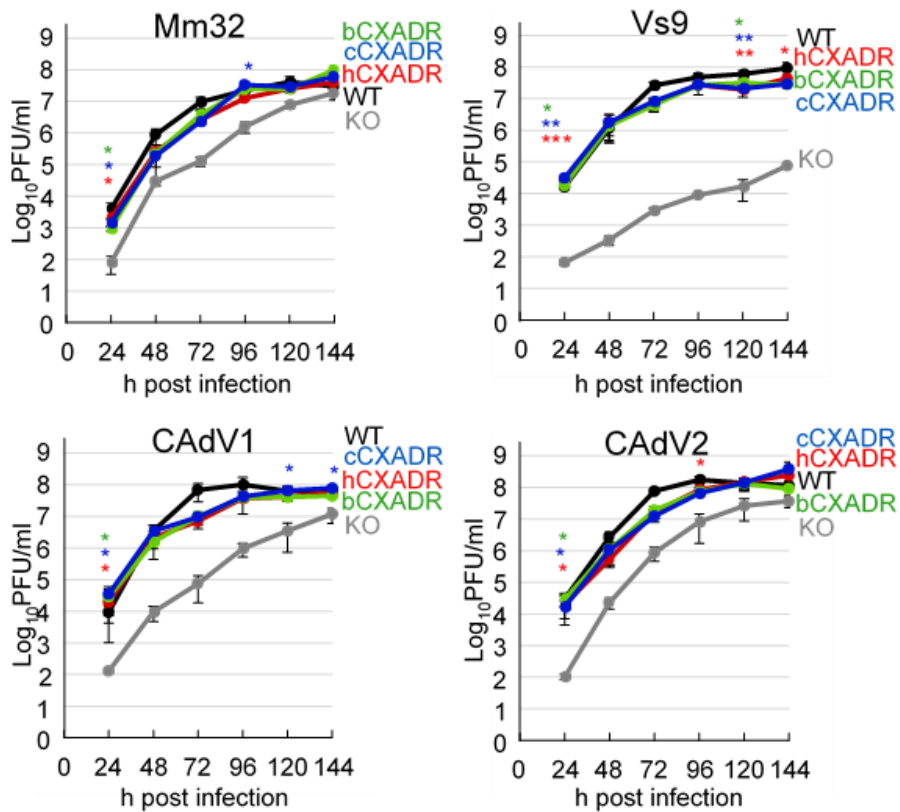


図 3-4 cCXADR 再導入、hCXADR 導入および bCXADR 導入細胞における BtAdV の感染性と増殖性

(A) イヌ canine(c)、ヒト human(h)、またはコウモリ bat(b)の CXADR の発現はマウス抗 CXADR モノクローナル抗体(CXADR E1)を用いたウェスタンブロッティングによって確認した。PC として発現プラスミドから発現させた cCXADR を使用した。また、ACTB はローディングコントロールとして使用した。(B) WT、cCXADR-KO、cCXADR 再導入、hCXADR 導入、または bCXADR 導入細胞に、MOI=1 で各ウイルスを接種した。感染 24 時間後に各ウイルスに対する抗血清と蛍光標識された二次抗体を用いた IFA によりウイルス抗原を検出した。(C) 図 3-4B の IFA 陽性細胞数を定量化した。この試験を独立に 3 回実施し、標準偏差を有する平均値として示した。アスタリスク(*)は、WT 細胞と比較して有意差があることを示している(Dunnett 検定による、*p <0.001)。(D) WT、cCXADR-KO、cCXADR 再導入、hCXADR 導入、または bCXADR 導入細胞に MOI=1 で各ウイルスを接種し、感染後 6 日間まで毎日培養上清を回収した。各上清の力価を WT 細胞で測定し、増殖曲線を作成した。この試験を独立に 3 回実施し、標準偏差を有する平均値として示した。アスタリスク(*)は、cCXADR-KO 細胞と比較して有意差があることを示している(Dunnett 検定による、*p < 0.05; **p < 0.01; ***p <0.001)。

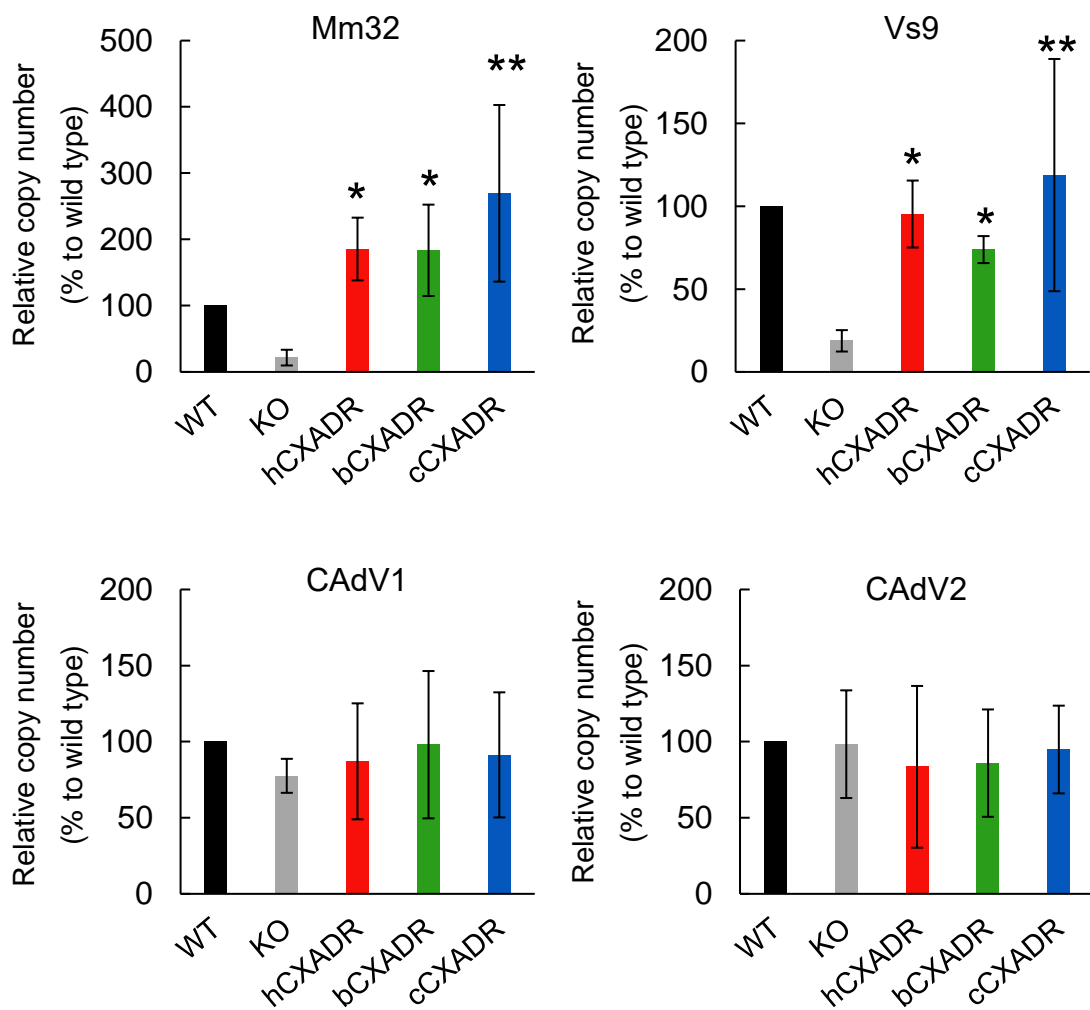


図 3-5 BtAdV の様々な動物種由来の CXADR への吸着

各ウイルスを WT、cCXADR-KO、cCXADR 再導入、hCXADR 導入または bCXADR 導入細胞に接種した。4°C で 1 時間インキュベートし、洗浄した後、細胞から DNA を抽出した。細胞表面に吸着したウイルス量をリアルタイム PCR 法により相対定量した (n=3)。アスタリスク(*)は、cCXADR-KO 細胞と比較して有意差があることを示している (Dunnett 検定による、* p <0.05; ** p <0.01)。

表 3-1 CXADR のクローニングに用いたプライマー

Primer name	5'-3'
pS-hCXADR(BamHI) F	gtaGGATCCGCCGCCACCATGGCGCTCCTGCTGTGC
pS-hCXADR(NotI) R	acaGCGGCCGCCTATACTATAGACCCATCC
pS-cCXADR(BsmBI) F	gtaCGTCTCGGATCCGCCGCCACCATGGCGCTCCTGCTGCGC
pS-cCXADR(NotI) R	acaGCGGCCGCCTATACTATAGACCCGTCC
pS-vsCXADR(BamHI) F	gtaGGATCCGCCGCCACCATGGCGCTCCTGCTGTGC
pS-vsCXADR(NotI) F	acaGCGGCCGCCTATACTATAGACCCGTC

表 3-2 BtAdV および CAdV のリアルタイム PCR 用プライマー

Primer name	5'-3'
rt Mm32 pol F	TTCATTGGAAGGGGCCAAC
rt Mm32 pol R	TGTTTCAGCGGCCTACCATT
rt Vs9 pol F	CCTCCCAAGTGTCCCATTC
rt Vs9 pol R	GTTGAGACCTACACGTGGCA
rt CAV1 pol F	GCATAAAAGGGCCTTCAGCG
rt CAV1 pol R	TTTGTCGTAGCGTACCCACC
rt CAV2 pol F	TGCGGGTAGGTCATAGAGGT
rt CAV2 pol R	CACTAAGCATTTCGCGGTG
rt ACTB F	GGACCTGACCGACTACCTCA
rt ACTB R	GTCCAGGGCCACATAACACA

表 3-3. CXADR との結合に重要なファイバータンパク質のアミノ酸

ウイルス	ファイバータンパク質上のアミノ酸の位置				
	370	372	381	384	441
CAdV2	G	S	P	R	T
CAdV1	D	N	P	R	T
BtAdV-Mm32	S	S	P	R	T
BtAdV-Vs9	D	P	P	R	T
BtAdV-A	S	S	P	R	T
BtAdV-B	D	S	P	K	T
BtAdV-G	S	S	P	R	T
BtAdV-C	D	S	N	R	F
BtAdV-D	D	N	R	L	W
BtAdV-E	N	E	R	L	L
BtAdV-F	I	K	I	I	W

※CXADR との結合に重要なアミノ酸が保存されていた場合は太字で示した。

総括

コウモリは哺乳綱翼手目に分類される哺乳類の総称で、約 1,300 種類が知られている。これは全哺乳類の種数 5,416 種のうちの約 20%を占め、げっ歯目に次いで 2 番目に大きなグループである。コウモリは SARS コロナウイルスやニパウイルスなどのヒトや家畜に対して重篤な病原性を示す様々なウイルスを保有することが知られ、新興・再興感染症の発生母体として注目されている。これまでに海外において、様々なコウモリ種を対象としてそれらが保有するウイルスが調査され、極めて多くの種類のウイルスが検出されている。一方、わが国には 35 種類のコウモリ在来種が生息しているが、これらのコウモリが保有するウイルスに関してほとんど調べられていない。本研究では、このようにブラックボックスである日本のコウモリが保有するウイルス叢の一端を解明するとともに、その公衆衛生学的な重要性について考察を加えた。

本研究では、日本に生息するコウモリがどのようなウイルスを保有しているかを明らかにするため、野生のコウモリを捕獲し、糞検体を採取した。第 1 章では、ヒトに重篤な感染症を引き起こす SARS や MERS 近縁ウイルスの存否を探る目的で、コロナウイルスを標的に調査した。特異的プライマーを用いた RT-PCR 法によって、236 検体中 62 検体からコロナウイルス RNA を検出した。それらの塩基配列を決定し進化系統樹解析によって分類したところ、12 検体がアルファコロナウイルス属、26 検体がベータコロナウイルス属 lineage B、24 検体がベータコロナウイルス属 lineage C に分類され、日本産コウモリには様々な種類のコウモリコロナウイルスが保有されていることが明らかとなった。Lineage B および lineage C には、それぞれ SARS コロナウイルスや MERS コロナウイルスが属する。しかし、進化系統樹およびスパイクタンパク質のアミノ酸配列の解析によって、今回検出されたウイルスはこれらの病原体とは異なることが示唆された。

次に、最近になってコウモリからの検出が報告されたヘペウイルスについて調べたところ、81 検体中 3 検体からヘペウイルス RNA が検出された。塩基配列を決定し進化系統樹解析を行ったところ、検出された 3 検体はヒトの E 型肝炎ウイルスとは異なり、既報のコウモリヘペウイルス株と同様に、*Orthohepevirus D* 種に属することが示された。

第 2 章では、第 1 章で用いた 236 の糞検体のうち 163 検体を、哺乳動物種由来の 11 種類の培養細胞に接種し、細胞変性効果を指標にウイルス分離を試みたところ、モモジロコウモリ *Myotis macrodactylus* およびヒナコウモリ *Vespertilio sinensis* の検体からウイルスの分離に成功した。両分離ウイルスは、そのウイルス粒子の特徴やゲノム性状から BtAdV であることが分かった。DNA polymerase のアミノ酸配列に基づく進化系統樹解析を行ったところ、両ウイルスはともに *Mastadenovirus* 属に属した。モモジロコウモリから分離した BtAdV-Mm32 はコウモリマストアデノウイルス A に分類されたが、ヒナコウモリから分離した BtAdV-Vs9 は他の BtAdV とは進化系統学的に独立し、新種の BtAdV であることが強く示唆された。分離ウイルスは進化系統学的に CAAdV に近縁であったが、血清学的抗原性には差異が認められた。複数の哺乳類培養細胞で増殖性を調べたところ、いずれの分離ウイルスも広い細胞指向性を有していた。また、これらの分離ウイルスは BALB/c マウスに経鼻感染させると、弱い病原性を示した。

第 3 章では、第 2 章で明らかになった BtAdV の広い細胞指向性のメカニズムを探索するために、複数の AdV の受容体として知られる CXADR の BtAdV の細胞侵入における役割を調べた。まず、分離した BtAdV が効率よく増殖するイヌ由来 MDCK 細胞から CRISPR-Cas9 システムを用いて CXADR 遺伝子をノックアウトした細胞を作製したところ、BtAdV の感染性や増殖性が有意に低下することを見出した。一方、組換えレンチウイルスを用いてイヌ CXADR を再導入した細胞を作製したところ、BtAdV の感染性や増殖性は野生型細胞と遜色ないレベルまで回復した。これらの結果は、イヌ CXADR が MDCK 細胞における BtAdV の感染性や増殖性を規定していることを示している。さらに、イヌ CXADR の代わりにヒトまたはコウモリの CXADR を導入した MDCK 細胞においても、BtAdV の感染性や増殖性が、イヌ CXADR を再導入した細胞と同様のレベルまで上昇することを見出した。したがって、BtAdV はいくつかの哺乳類由来の CXADR を機

能的な受容体として利用できることが明らかとなった。この結果は、BtAdV が他の哺乳類へ感染する潜在性を示すものである。

以上の研究によって、日本に生息するコウモリが保有するウイルスに関する新知見が明らかとなった。これまでに日本のコウモリから報告されていたコロナウイルスはユビナガコウモリから検出されたアルファコロナウイルスとコキクガシラコウモリから検出された lineage B ウイルスの 2 種のみであった。本研究では、新たに 4 種類のコウモリからアルファコロナウイルス、1 種類のコウモリから Lineage B ウイルスを検出した。また、これまでに国内のコウモリからの報告がなかった lineage C ウイルスやコウモリヘペウイルスおよび BtAdV を初めて検出・分離した。これらの成果は、日本のコウモリが保有するウイルス叢の解明に貢献するものである。また、これまでに日本のコウモリが保有するウイルスのウイルス学的性状について解析した研究はほとんどなかった。私は、分離した BtAdV の性状解析によって、BtAdV がヒトを含む哺乳動物由来の CXADR を機能的な受容体として利用して、それらの細胞に感染することを初めて明らかにした。この結果は、コウモリのウイルスがヒトを含む哺乳動物に伝播する潜在性を示したものである。今後、対象とするコウモリ種を広げ、それらが保有するウイルスを網羅的に調査することにより、コウモリ種や生息域ごとのウイルス叢や、動物種を超えて感染しうるウイルスの存否が明らかなることを期待する。

引用文献

Anthony SJ, Ojeda-Flores R, Rico-Chávez O, Navarrete-Macias I, Zambrana-Torrelío CM, Rostal MK, Epstein JH, Tipps T, Liang E, Sanchez-Leon M, Sotomayor-Bonilla J, Aguirre AA, Ávila-Flores R, Medellín RA, Goldstein T, Suzán G, Daszak P, Lipkin WI. (2013). Coronaviruses in bats from Mexico. *J Gen Virol* **94**(5):1028–1038.

Arai S, Nguyen ST, Boldgiv B, Fukui D, Araki K, Dang CN, Ohdachi SD, Nguyen NX, Pham TD, Boldbaatar B, Satoh H, Yoshikawa Y, Morikawa S, Tanaka-Taya K, Yanagihara R, Oishi K. (2013). Novel bat-borne hantavirus, Vietnam. *Emerg Infect Dis* **19**(7):1159-1161.

August TA, Mathews F, Nunn MA. (2012). Alphacoronavirus detected in bats in the United Kingdom. *Vector Borne Zoonotic Dis* **12**(6):530-533.

Baker KS, Leggett RM, Bexfield NH, Alston M, Daly G, Todd S, Tachedjian M, Holmes CE, Crameri S, Wang LF, Heeney JL, Suu-Ire R, Kellam P, Cunningham AA, Wood JL, Caccamo M, Murcia PR. (2013). Metagenomic study of the viruses of African straw-coloured fruit bats: detection of a chiropteran poxvirus and isolation of a novel adenovirus. *Virology* **441**(2):95-106.

Bangari DS, Sharma A, Mittal SK. (2005). Bovine adenovirus type 3 internalization is independent of primary receptors of human adenovirus type 5 and porcine adenovirus type 3. *Biochem Biophys Res Commun* **331**(4):1478-1484.

Bat Study and Conservation Group of Japan. (2011). A field guide to the bats of Japan Rev. edn. Bun-ichi Sogo Shuppan. Tokyo.

Bell JF, Thomas LA. (1964). A new virus, "MML", enzotic in bats (*Myotis lucifugus*) of Montana. *Am J Trop Med Hyg* **13**:607-612.

Benkő M, Harrach B. (2003). Molecular evolution of adenoviruses. *Curr Top Microbiol Immunol* **272**:3-35.

Bergelson JM, Cunningham JA, Droguett G, Kurt-Jones EA, Krithivas A, Hong JS, Horwitz MS, Crowell RL, Finberg RW. (1997). Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* **275**(5304):1320-1323.

Boiro I, Konstaninov OK, Numerov AD. (1987). Isolation of Rift Valley fever virus from bats in the Republic of Guinea. *Bull Soc Pathol Exot Filiales* **80**(1):62-67.

Bosch BJ, van der Zee R, de Haan CA, Rottier PJ. (2003). The coronavirus spike protein is a class I virus fusion protein: structural and functional characterization of the fusion core complex. *J Virol* **77**(16):8801-8811.

Bourgarel M, Pfukenyi DM, Boué V, Talignani L, Chiweshe N, Diop F, Caron A, Matope G, Missé D, Liégeois F. (2018). Circulation of Alphacoronavirus, Betacoronavirus and Paramyxovirus in *Hipposideros* bat species in Zimbabwe. *Infect Genet Evol* **58**:253-257.

Butler D. (2004). Fatal fruit bat virus sparks epidemics in southern Asia. *Nature* **429**(6987):7.

Canuti M, Eis-Huebinger AM, Deijs M, de Vries M, Drexler JF, Oppong SK, Müller MA, Klose SM, Wellinghausen N, Cottontail VM, Kalko EK, Drosten C, van der Hoek L. (2011). Two novel parvoviruses in frugivorous New and Old World bats. *PLoS One* **6**(12):e29140.

Chen EC, Yagi S, Kelly KR, Mendoza SP, Tarara RP, Canfield DR, Maninger N, Rosenthal A, Spinner A, Bales KL, Schnurr DP, Lerche NW, Chiu CY. (2011). Cross-species transmission of a novel adenovirus associated with a fulminant pneumonia outbreak in a new world monkey colony. *PLoS Pathog* **7**(7):e1002155.

Chu DK, Poon LL, Guan Y, Peiris JS. (2008). Novel astroviruses in insectivorous bats. *J Virol* **82**(18):9107-9114..

Cohen CJ, Shieh JT, Pickles RJ, Okegawa T, Hsieh JT, Bergelson JM. (2001). The coxsackievirus and adenovirus receptor is a transmembrane component of the tight junction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(26):15191-15196.

Collins AR, Knobler RL, Powell H, Buchmeier MJ. (1982). Monoclonal antibodies to murine hepatitis virus-4 (strain JHM) define the viral glycoprotein responsible for attachment and cell--cell fusion. *Virology* **119**(2):358-371.

Connor RJ, Kawaoka Y, Webster RG, Paulson JC. (1994). Receptor specificity in human, avian, and equine H2 and H3 influenza virus isolates. *Virology* **205**(1):17-23.

Dacheux L, Cervantes-Gonzalez M, Guigon G, Thiberge JM, Vandebogaert M, Maufrais C,

Caro V, Bourhy H. (2014). A preliminary study of viral metagenomics of French bat species in contact with humans: identification of new mammalian viruses. *PLoS One* **9**(1):e87194.

De Benedictis P, Marciano S, Scaravelli D, Priori P, Zecchin B, Capua I, Monne I, Cattoli G. (2014). Alpha and lineage C betaCoV infections in Italian bats. *Virus Genes* **48**(2):366-371.

Ditchfield J, Macpherson LW, Zbitnew A. (1962). Association of canine adenovirus (Toronto A 26/61) with an outbreak of laryngotracheitis ("Kennel cough"): A preliminary report. *Can Vet J* **3**(8):238-247.

Dominguez SR1, O'Shea TJ, Oko LM, Holmes KV. (2007). Detection of group 1 coronaviruses in bats in North America. *Emerg Infect Dis* **13**(9):1295-1300.

Drexler JF, Seelen A, Corman VM, Fumie Tateno A, Cottontail V, Melim Zerbinati R, Gloza-Rausch F, Klose SM, Adu-Sarkodie Y, Oppong SK, Kalko EK, Osterman A, Rasche A, Adam A, Müller MA, Ulrich RG, Leroy EM, Lukashev AN, Drosten C. (2012). Bats worldwide carry hepatitis E virus-related viruses that form a putative novel genus within the family Hepeviridae. *J Virol* **86**(17):9134-9147.

Drexler JF, Corman VM, Müller MA, Maganga GD, Vallo P, Binger T, Gloza-Rausch F, Cottontail VM, Rasche A, Yordanov S, Seebens A, Knörnschild M, Oppong S, Adu Sarkodie Y, Pongombo C, Lukashev AN, Schmidt-Chanasit J, Stöcker A, Carneiro AJ, Erbar S, Maisner A, Fronhoffs F, Buettner R, Kalko EK, Kruppa T, Franke CR, Kallies R, Yandoko ER, Herrler G, Reusken C, Hassanin A, Krüger DH, Matthee S, Ulrich RG, Leroy EM, Drosten C. (2012).

Bats host major mammalian paramyxoviruses. *Nat Commun* **3**:796.

Dufkova L, Straková P, Širmarová J, Salát J, Moutelíková R, Chrudimský T, Bartonička T, Nowotny N, Růžek D. (2015). Detection of diverse novel bat astrovirus sequences in the Czech Republic. *Vector Borne Zoonotic Dis* **15**(8):518-521.

Entwistle AC, Racey PA, Speakman JR. (1996). Habitat exploitation by a gleaning bat, *Plecotus auritus*. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **351**:921-931.

Entwistle AC, Racey PA, Speakman JR. (2000). Social and population structure of a gleaning bat, *Plecotus auritus*. *Journal of Zoology* **252**:11–17.

Fagrouch Z, Sarwari R, Lavergne A, Delaval M, de Thoisy B, Lacoste V, Verschoor EJ. (2012). Novel polyomaviruses in South American bats and their relationship to other members of the family Polyomaviridae. *J Gen Virol* **93**(12):2652-2657.

Falcón A, Vázquez-Morón S, Casas I, Aznar C, Ruiz G, Pozo F, Perez-Breña P, Juste J, Ibáñez C, Garin I, Aihartza J, Echevarría JE. (2011). Detection of alpha and betacoronaviruses in multiple Iberian bat species. *Arch Virol* **156**(10):1883-1890.

Fenton MB, Simmons NB. (2014). *Bats: A World of Science and Mystery*. University of Chicago Press. Chicago.

Fischer K, Pinho Dos Reis V, Balkema-Buschmann A. (2017). Bat astroviruses: Towards

understanding the transmission dynamics of a neglected virus family. *Viruses* **9**(2): E34.

García-Pérez R, Ibáñez C, Godínez JM, Aréchiga N, Garin I, Pérez-Suárez G, de Paz O, Juste J, Echevarría JE, Bravo IG. (2014). Novel papillomaviruses in free-ranging Iberian bats: no virus-host co-evolution, no strict host specificity, and hints for recombination. *Genome Biol Evol* **6**(1):94-104.

Ge XY, Li JL, Yang XL, Chmura AA, Zhu G, Epstein JH, Mazet JK, Hu B, Zhang W, Peng C, Zhang YJ, Luo CM, Tan B, Wang N, Zhu Y, Crameri G, Zhang SY, Wang LF, Daszak P, Shi ZL. (2013). Isolation and characterization of a bat SARS-like coronavirus that uses the ACE2 receptor. *Nature* **503**(7477):535-538.

Geldenhuis M, Weyer J, Nel LH, Markotter W. (2013). Coronaviruses in South African bats. *Vector Borne Zoonotic Dis* **13**(7):516-519.

Gerhold RW, Allison AB, Temple DL, Chamberlain MJ, Strait KR, Keel MK. (2007). Infectious canine hepatitis in a gray fox (*Urocyon cinereoargenteus*). *J Wildl Dis* **43**(4):734-736.

Gloza-Rausch F, Ipsen A, Seebens A, Götsche M, Panning M, Drexler JF, Petersen N, Annan A, Grywna K, Müller M, Pfefferle S, Drosten C. (2008). Detection and prevalence patterns of group I coronaviruses in bats, northern Germany. *Emerg Infect Dis* **14**(4):626-631.

Gorbalenya AE, Enjuanes L, Ziebuhr J, Snijder EJ. (2006). Nidovirales: evolving the largest RNA virus genome. *Virus Res* **117**(1):17-37.

Hackenbrack N, Rogers MB, Ashley RE, Keel MK, Kubiski SV, Bryan JA, Ghedin E, Holmes EC, Hafenstein SL, Allison AB. (2017). Evolution and cryo-electron microscopy capsid structure of a North American bat adenovirus and its relationship to other mastadenoviruses. *J Virol* **91**(2):e01504-01516.

Haisma HJ, Boesjes M, Beerens AM, van der Strate BW, Curiel DT, Plüddemann A, Gordon S, Bellu AR. (2009). Scavenger receptor A: a new route for adenovirus 5. *Mol Pharm* **6**(2):366-374.

Hall RJ, Wang J, Peacey M, Moore NE, McInnes K, Tompkins DM. (2014). New Alphacoronavirus in *Mystacina tuberculata* Bats, New Zealand. *Emerg Infect Dis* **20**(4): 697–700.

Halpin K, Young PL, Field HE, Mackenzie JS. (2000). Isolation of Hendra virus from pteropid bats: a natural reservoir of Hendra virus. *J Gen Virol* **81**(8):1927-1932.

Haqshenas G, Shivaprasad HL, Woolcock PR, Read DH, Meng XJ. (2001). Genetic identification and characterization of a novel virus related to human hepatitis E virus from chickens with hepatitis-splenomegaly syndrome in the United States. *J Gen Virol* **82**(10):2449-2462.

Harrach, B., Benkö, M., Both, G. W., Brown, M., Davison, A. J., Echavarría, M., ... & Mautner,

V. (2011). Family adenoviridae. *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses*. Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, 95-111.

He B, Li Z, Yang F, Zheng J, Feng Y, Guo H, Li Y, Wang Y, Su N, Zhang F, Fan Q, Tu C. (2013). Virome profiling of bats from Myanmar by metagenomic analysis of tissue samples reveals more novel Mammalian viruses. *PLoS One* **22**;8(4):e61950.

Henry LJ, Xia D, Wilke ME, Deisenhofer J, Gerard RD. (1994). Characterization of the knob domain of the adenovirus type 5 fiber protein expressed in *Escherichia coli*. *J Virol* **68**(8):5239-5246.

Herbold JR, Heuschele WP, Berry RL, Parsons MA. (1983). Reservoir of St. Louis encephalitis virus in Ohio bats. *Am J Vet Res* **44**(10):1889-1893.

Hoarau F, Le Minter G, Joffrin L, Schoeman MC, Lagadec E, Ramasindrazana B, Dos Santos A, Goodman SM, Gudo ES, Mavingui P, Lebarbenchon C. (2018). Bat astrovirus in Mozambique. *Virol J* **15**(1):104.

Holmes KV. (2003). SARS-associated coronavirus. *N Engl J Med* **348**(20):1948-1951.

Hong SS, Habib NA, Franqueville L, Jensen S, Boulanger PA. (2003). Identification of adenovirus (ad) penton base neutralizing epitopes by use of sera from patients who had received conditionally replicative ad (add1520) for treatment of liver tumors. *J Virol* **77**(19):10366-10375.

Host KM, Damania B. (2016). Discovery of a novel bat gammaherpesvirus. *mSphere* **1**(1). pii: e00016.

Hu D, Zhu C, Wang Y, Ai L, Yang L, Ye F, Ding C, Chen J, He B, Zhu J, Qian H, Xu W, Feng Y, Tan W, Wang C. (2017). Virome analysis for identification of novel mammalian viruses in bats from Southeast China. *Sci Rep* **7**(1):10917.

Iwasaki T, Inoue S, Tanaka K, Sato Y, Morikawa S, Hayasaka D, Moriyama M, Ono T, Kanai S, Yamada A, Kurata T. (2004). Characterization of Oita virus 296/1972 of Rhabdoviridae isolated from a horseshoe bat bearing characteristics of both lyssavirus and vesiculovirus. *Arch Virol* **149**(6):1139-1154.

Jameel S, Zafrullah M, Ozdener MH, Panda SK. (1996). Expression in animal cells and characterization of the hepatitis E virus structural proteins. *J Virol* **70**(1):207-216.

Jansen van Vuren P, Allam M, Wiley MR, Ismail A, Storm N, Birkhead M, Markotter W, Palacios G, Paweska JT. (2018). A novel adenovirus isolated from the Egyptian fruit bat in South Africa is closely related to recent isolates from China. *Sci Rep* **8**(1):9584.

Johne R, Heckel G, Plenge-Bönig A, Kindler E, Maresch C, Reetz J, Schielke A, Ulrich RG. (2010). Novel hepatitis E virus genotype in Norway rats, Germany. *Emerg Infect Dis* **16**(9):1452-1455.

Johnson N, Wakeley PR, Brookes SM, Fooks AR. (2006). European bat lyssavirus type 2 RNA in *Myotis daubentonii*. *Emerg Infect Dis* **12**(7):1142-1144.

Johnson N, Vos A, Freuling C, Tordo N, Fooks AR, Müller T. (2010). Human rabies due to lyssavirus infection of bat origin. *Vet Microbiol* **142**(3-4):151-159.

Jones DT, Taylor WR, Thornton JM. (1992). The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Comput Appl Biosci* **8**(3):275-282.

Kading RC, Kityo R, Nakayiki T, Ledermann J, Crabtree MB, Lutwama J, Miller BR. (2015). Detection of Entebbe bat virus after 54 years. *Am J Trop Med Hyg* **93**(3):475-477.

Kemenesi G, Zhang D, Marton S, Dallos B, Görföl T, Estók P, Boldogh S, Kurucz K, Oldal M, Kutas A, Bányai K, Jakab F. (2015). Genetic characterization of a novel picornavirus detected in *Miniopterus schreibersii* bats. **96**(4):815-821.

Kemenesi G, Dallos B, Görföl T, Estók P, Boldogh S, Kurucz K, Oldal M, Marton S, Bányai K, Jakab F. (2015). Genetic diversity and recombination within bufaviruses: Detection of a novel strain in Hungarian bats. *Infect Genet Evol* **33**:288-292.

Kemenesi G, Gellért Á, Dallos B, Görföl T, Boldogh S, Estók P, Marton S, Oldal M, Martella V, Bányai K, Jakab F. (2016). Sequencing and molecular modeling identifies candidate members of Caliciviridae family in bats. *Infect Genet Evol* **41**:227-232.

Kandeil A, Gomaa MR, Shehata MM, El Taweel AN, Mahmoud SH, Bagato O, Moatasim Y, Kutkat O, Kayed AS, Dawson P, Qiu X, Bahl J, Webby RJ, Karesh WB, Kayali G, Ali MA. (2018). Isolation and characterization of a distinct influenza A virus from Egyptian bats. *J Virol* doi: 10.1128/JVI.01059-18.

Katoh K, Standley DM. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol Biol Evol* **30**(4):772-780.

Kimura M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* **16**(2):111-120.

Kohl C, Vidovszky MZ, Mühldorfer K, Dabrowski PW, Radonić A, Nitsche A, Wibbelt G, Kurth A, Harrach B. (2012). Genome analysis of bat adenovirus 2: indications of interspecies transmission. *J Virol* **86**(3):1888-1892.

国立予防衛生研究所学友会. (1973). 改訂二版 ウイルス実験学 総論. 丸善株式会社. 東京.

Komoriya A, Green LJ, Mervic M, Yamada SS, Yamada KM, Humphries MJ. (1991). The minimal essential sequence for a major cell type-specific adhesion site (CS1) within the alternatively spliced type III connecting segment domain of fibronectin is leucine-aspartic acid-valine. *J Biol Chem* **266**(23):15075-15079.

Kumar S, Stecher G, Tamura K. (2016). MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol* **33**(7):1870-1874.

Kuzmin IV, Niezgodna M, Franka R, Agwanda B, Markotter W, Breiman RF, Shieh WJ, Zaki SR, Rupprecht CE. (2010). Marburg virus in fruit bat, Kenya. *Emerg Infect Dis* **16**(2):352-354.

Lau SK, Woo PC, Li KS, Huang Y, Tsoi HW, Wong BH, Wong SS, Leung SY, Chan KH, Yuen KY. (2005). Severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in Chinese horseshoe bats. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **102**(39):14040-14045.

Lau SK, Woo PC, Wong BH, Wong AY, Tsoi HW, Wang M, Lee P, Xu H, Poon RW, Guo R, Li KS, Chan KH, Zheng BJ, Yuen KY. (2010). Identification and complete genome analysis of three novel paramyxoviruses, Tuhoko virus 1, 2 and 3, in fruit bats from China. *Virology* **404**(1):106-116.

Lau SK, Woo PC, Lai KK, Huang Y, Yip CC, Shek CT, Lee P, Lam CS, Chan KH, Yuen KY. (2011). Complete genome analysis of three novel picornaviruses from diverse bat species. *J Virol* **85**(17):8819-8828.

Lau SK, Ahmed SS, Yeung HC, Li KS, Fan RY, Cheng TY, Cai JP, Wang M, Zheng BJ, Wong SS, Woo PC, Yuen KY. (2016). Identification and interspecies transmission of a novel bocaparvovirus among different bat species in China. *J Gen Virol* **97**(12):3345-3358.

Lau SKP, Ahmed SS, Tsoi HW, Yeung HC, Li KSM, Fan RYY, Zhao PSH, Lau CCC, Lam CSF, Choi KKF, Chan BCH, Cai JP, Wong SSY, Chen H, Zhang HL, Zhang L, Wang M, Woo PCY, Yuen KY. (2017). Bats host diverse parvoviruses as possible origin of mammalian

dependoparvoviruses and source for bat-swine interspecies transmission. *J Gen Virol* **98**: 3046-3059.

Lau SKP, Zhang L, Luk HKH, Xiong L, Peng X, Li KSM, He X, Zhao PS, Fan RYY, Wong ACP, Ahmed SS, Cai JP, Chan JFW, Sun Y, Jin D, Chen H, Lau TCK, Kok RKH, Li W, Yuen KY, Woo PCY. (2018). Receptor usage of a novel bat lineage C betacoronavirus reveals evolution of Middle East respiratory syndrome-related coronavirus spike proteins for human dipeptidyl peptidase 4 binding. *J Infect Dis* **218**(2):197-207.

Lazov CM, Chriél M, Baagøe HJ, Fjederholt E, Deng Y, Kooi EA, Belsham GJ, Bøtner A, Rasmussen TB. (2018). Detection and characterization of distinct alphacoronaviruses in five different bat species in Denmark. *Viruses* **10**(9):E486.

Lelli D, Papetti A, Sabelli C, Rosti E, Moreno A, Boniotti MB. (2013). Detection of coronaviruses in bats of various species in Italy. *Viruses* **5**(11):2679-2689.

Li F, Li W, Farzan M, Harrison SC. (2005). Structure of SARS coronavirus spike receptor-binding domain complexed with receptor. *Science* **309**(5742):1864-1868.

Li F. (2008). Structural analysis of major species barriers between humans and palm civets for severe acute respiratory syndrome coronavirus infections. *J Virol* **82**(14):6984-6991.

Li F. (2016). Structure, function, and evolution of coronavirus spike proteins. *Annu Rev Virol* **3**(1):237-261.

Li X, Bangari DS, Sharma A, Mittal SK. (2009). Bovine adenovirus serotype 3 utilizes sialic acid as a cellular receptor for virus entry. *Virology* **392**(2):162-168.

Li Y, Ge X, Zhang H, Zhou P, Zhu Y, Zhang Y, Yuan J, Wang LF, Shi Z. (2010). Host range, prevalence, and genetic diversity of adenoviruses in bats. *J Virol* **84**(8):3889-3897.

Li W, Moore MJ, Vasilieva N, Sui J, Wong SK, Berne MA, Somasundaran M, Sullivan JL, Luzuriaga K, Greenough TC, Choe H, Farzan M. (2003). Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature* **426**(6965), 450–454.

Li W, Zhang C, Sui J, Kuhn JH, Moore MJ, Luo S, Wong SK, Huang IC, Xu K, Vasilieva N, Murakami A, He Y, Marasco WA, Guan Y, Choe H, Farzan M. (2005). Receptor and viral determinants of SARS-coronavirus adaptation to human ACE2. *EMBO J* **24**(8):1634-43.

Lima FE, Campos FS, Kunert Filho HC, Batista HB, Carnielli P Jr, Cibulski SP, Spilki FR, Roehe PM, Franco AC. (2013). Detection of Alphacoronavirus in velvety free-tailed bats (*Molossus molossus*) and Brazilian free-tailed bats (*Tadarida brasiliensis*) from urban area of Southern Brazil. *Virus Genes* **47**(1):164-167.

Liu DX, Fung TS, Chong KK, Shukla A, Hilgenfeld R. (2014). Accessory proteins of SARS-CoV and other coronaviruses. *Antiviral Res* **109**:97-109.

Louis N, Fender P, Barge A, Kitts P, Chroboczek J. (1994). Cell-binding domain of adenovirus

serotype 2 fiber. J Virol **68**(6):4104-4106.

Lukashev AN, Corman VM, Schacht D, Gloza-Rausch F, Seebens-Hoyer A, Gmyl AP, Drosten C, Drexler JF. (2017). Close genetic relatedness of picornaviruses from European and Asian bats. J Gen Virol **98**(5):955-961.

Luo CM, Wang N, Yang XL, Liu HZ, Zhang W, Li B, Hu B, Peng C, Geng QB, Zhu GJ, Li F, Shi ZL. (2018). Discovery of novel bat coronaviruses in South China that use the same receptor as Middle East respiratory syndrome coronavirus. J Virol **92**(13): e00116-e00118

Maeda K, Hondo E, Terakawa J, Kiso Y, Nakaichi N, Endoh D, Sakai K, Morikawa S, Mizutani T. (2008). Isolation of novel adenovirus from fruit bat (*Pteropus dasymallus yayeyamae*). Emerg Infect Dis **14**(2):347-349.

Marttila M, Persson D, Gustafsson D, Liszewski MK, Atkinson JP, Wadell G, Arnberg N. (2005). CD46 is a cellular receptor for all species B adenoviruses except types 3 and 7. J Virol **79**(22):14429-14436.

Mélade J, Wieseke N, Ramasindrazana B, Flores O, Lagadec E, Gomard Y, Goodman SM, Dellagi K, Pascalis H. (2016). An eco-epidemiological study of Morbilli-related paramyxovirus infection in Madagascar bats reveals host-switching as the dominant macro-evolutionary mechanism. Sci Rep **6**:23752.

Memish ZA, Mishra N, Olival KJ, Fagbo SF, Kapoor V, Epstein JH, Alhakeem R, Durosinloun

A, Al Asmari M, Islam A, Kapoor A, Briese T, Daszak P, Al Rabeeah AA, Lipkin WI. (2013). Middle East respiratory syndrome coronavirus in bats, Saudi Arabia. *Emerg Infect Dis* **19**(11):1819-1823.

Mendenhall IH, Skiles MM, Neves ES, Borthwick SA, Low DHW, Liang B, Lee BPY, Su YCF, Smith GJD. (2017). Influence of age and body condition on astrovirus infection of bats in Singapore: An evolutionary and epidemiological analysis. *One Health* **4**:27-33.

Mendenhall IH, Borthwick S, Neves ES, Low D, Linster M, Liang B, Skiles M, Jayakumar J, Han H, Gunalan V, Lee BPY, Okahara K, Wang LF, Maurer-Stroh S, Su YCF, Smith GJD. (2017). Identification of a lineage D betacoronavirus in Cave Nectar bats (*Eonycteris spelaea*) in Singapore and an overview of lineage D reservoir ecology in SE Asian bats. *Transbound Emerg Dis* **64**(6):1790-1800.

Misra V, Dumonceaux T, Dubois J, Willis C, Nadin-Davis S, Severini A, Wandeler A, Lindsay R, Artsob H. (2009). Detection of polyoma and corona viruses in bats of Canada. *J Gen Virol* **90**(8):2015-2022.

Molnár V, Jánoska M, Harrach B, Glávits R, Pálmai N, Rigó D, Sós E, Liptovszky M. (2008). Detection of a novel bat gammaherpesvirus in Hungary. *Acta Vet Hung* **56**(4):529-538..

Mourya DT, Yadav PD, Basu A, Shete A, Patil DY, Zawar D, Majumdar TD, Kokate P, Sarkale P, Raut CG, Jadhav SM. (2014). Malsoor virus, a novel bat phlebovirus, is closely related to severe fever with thrombocytopenia syndrome virus and heartland virus. *J Virol* **88**(6):3605-

3609.

Ndungo E, Herbert AS, Raaben M, Obernosterer G, Biswas R, Miller EH, Wirchnianski AS, Carette JE5, Brummelkamp TR, Whelan SP, Dye JM, Chandran K. (2016). A single residue in Ebola virus receptor NPC1 influences cellular host range in reptiles. *mSphere* **1**(2): e00007-00016.

Noguchi K, Kuwata R, Shimoda H, Mizutani T, Hondo E, Maeda K. (2018). The complete genomic sequence of *Rhinolophus gammaherpesvirus 1* isolated from a greater horseshoe bat. *Arch Virol* in press.

Noh JY, Jeong DG, Yoon SW, Kim JH, Choi YG, Kang SY, Kim HK. (2018). Isolation and characterization of novel bat paramyxovirus B16-40 potentially belonging to the proposed genus Shaanvirus. *Sci Rep* **8**(1):12533.

Ochi Y, Konishi S, Takizawa T, Ikegami T, Yamamoto S, Ishida K, Sato A. (1956). Studies on infectious hepatitis in the dog (I). *Zentralblatt für Veterinärmedizin* **3**(1):55-62.

Ogawa H, Kajihara M, Nao N, Shigeno A, Fujikura D, Hang'ombe BM, Mweene AS, Mutemwa A, Squarre D, Yamada M, Higashi H, Sawa H, Takada A. (2017). Characterization of a novel bat adenovirus isolated from straw-colored fruit bat (*Eidolon helvum*). *Viruses* **9**(12):E371.

Ohdachi SD, Ishibashi Y, Iwasa MA, Saitou T. (2009). *The Wild Mammals of Japan*. Shoukadoh. Kyoto.

Paige Brock A, Cortés-Hinojosa G, Plummer CE, Conway JA, Roff SR, Childress AL, Wellehan JF Jr. (2013). A novel gammaherpesvirus in a large flying fox (*Pteropus vampyrus*) with blepharitis. *J Vet Diagn Invest* **25**(3):433-437.

Pavri KM, Singh KR. (1968). Kyasanur forest disease virus infection in the frugivorous bat, *Cynopterus sphinx*. *Indian J Med Res* **56**(8):1202-1204.

Peiris JS, Lai ST, Poon LL, Guan Y, Yam LY, Lim W, Nicholls J, Yee WK, Yan WW, Cheung MT, Cheng VC, Chan KH, Tsang DN, Yung RW, Ng TK, Yuen KY; SARS study group. (2003). Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet* **361**(9366):1319-1325.

Petrella J, Cohen CJ, Gaetz J, Bergelson JM. (2002). A zebrafish coxsackievirus and adenovirus receptor homologue interacts with coxsackie B virus and adenovirus. *J Virol* **76**(20):10503-10506.

Piraccini R. (2016). *Rhinolophus ferrumequinum*. The IUCN Red List of Threatened Species 2016. e.T19517A21973253.

Poon LL, Chu DK, Chan KH, Wong OK, Ellis TM, Leung YH, Lau SK, Woo PC, Suen KY, Yuen KY, Guan Y, Peiris JS. (2005). Identification of a novel coronavirus in bats. *J Virol* **79**(4):2001-2009.

Yuen KY, Guan Y, Peiris JS. (2005). Identification of a novel coronavirus in bats. *J Virol* **79**(4):2001-2009.

Pozo F, Juste J, Vázquez-Morón S, Aznar-López C, Ibáñez C, Garin I, Aihartza J, Casas I, Tenorio A, Echevarría JE. (2016). Identification of novel betaherpesviruses in Iberian bats reveals parallel evolution. *PLoS One* **11**(12):e0169153.

Quan PL, Firth C, Street C, Henriquez JA, Petrosov A, Tashmukhamedova A, Hutchison SK, Egholm M, Osinubi MO, Niezgoda M, Ogunkoya AB, Briese T, Rupprecht CE, Lipkin WI. (2010). Identification of a severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in a leaf-nosed bat in Nigeria. *MBio* **1**(4):e00208-00210.

Quan PL, Firth C, Conte JM, Williams SH, Zambrana-Torrel CM, Anthony SJ, Ellison JA, Gilbert AT, Kuzmin IV, Niezgoda M, Osinubi MO, Recuenco S, Markotter W, Breiman RF, Kalemba L, Malekani J, Lindblade KA, Rostal MK, Ojeda-Flores R, Suzan G, Davis LB, Blau DM, Ogunkoya AB, Alvarez Castillo DA, Moran D, Ngam S, Akaibe D, Agwanda B, Briese T, Epstein JH, Daszak P, Rupprecht CE, Holmes EC, Lipkin WI. (2013). Bats are a major natural reservoir for hepaciviruses and pegiviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**(20):8194-8199.

Rahman SA, Hassan SS, Olival KJ, Mohamed M, Chang LY, Hassan L, Saad NM, Shohaimi SA, Mamat ZC, Naim MS, Epstein JH, Suri AS, Field HE, Daszak P; Henipavirus Ecology Research Group. (2010). Characterization of Nipah virus from naturally infected *Pteropus vampyrus* bats, Malaysia. *Emerg Infect Dis* **16**(12):1990-1993.

Raj VS, Smits SL, Pas SD, Provacia LB, Moorman-Roest H, Osterhaus AD, Haagmans BL. (2012). Novel hepatitis E virus in ferrets, the Netherlands. *Emerg Infect Dis* **18**(8):1369-1370.

Raj VS, Mou H, Smits SL, Dekkers DH, Müller MA, Dijkman R, Muth D, Demmers JA, Zaki A, Fouchier RA, Thiel V, Drosten C, Rottier PJ, Osterhaus AD, Bosch BJ, Haagmans BL. (2013). Dipeptidyl peptidase 4 is a functional receptor for the emerging human coronavirus-EMC. *Nature* **495**(7440):251-254.

Rajagopalan PK, Paul SD, Sreenivasan MA. (1969). Isolation of Kyasanur forest disease virus from the insectivorous bat, *Rhinolophus rouxi* and from *Ornithodoros* ticks. *Indian J Med Res* **57**(5):805-808.

Raut CG, Yadav PD, Towner JS, Amman BR, Erickson BR, Cannon DL, Sivaram A, Basu A, Nichol ST, Mishra AC, Mourya DT. (2012). Isolation of a novel adenovirus from *Rousettus leschenaultii* bats from India. *Intervirology* **55**(6):488-490.

Razafindratsimandresy R, Jeanmaire EM, Counor D, Vasconcelos PF, Sall AA, Reynes JM. (2009). Partial molecular characterization of alpha herpesviruses isolated from tropical bats. *J Gen Virol* **90**(1):44-47.

Rector A, Mostmans S, Van Doorslaer K, McKnight CA, Maes RK, Wise AG, Kiupel M, Van Ranst M. (2006). Genetic characterization of the first chiropteran papillomavirus, isolated from a basosquamous carcinoma in an Egyptian fruit bat: the *Rousettus aegyptiacus* papillomavirus type 1. *Vet Microbiol* **117**(2-4):267-275.

Ren W, Li W, Yu M, Hao P, Zhang Y, Zhou P, Zhang S, Zhao G, Zhong Y, Wang S, Wang LF, Shi Z. (2006). Full-length genome sequences of two SARS-like coronaviruses in horseshoe bats and genetic variation analysis. *J Gen Virol* **87**(11):3355-3359.

Ren W, Qu X, Li W, Han Z, Yu M, Zhou P, Zhang SY, Wang LF, Deng H, Shi Z. (2008). Difference in receptor usage between severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus and SARS-like coronavirus of bat origin. *J Virol* **82**(4):1899-1907.

Rihtaric D, Hostnik P, Steyer A, Grom J, Toplak I. (2010). Identification of SARS-like coronaviruses in horseshoe bats (*Rhinolophus hipposideros*) in Slovenia. *Arch Virol* **155**(4):507-514.

Roberts BJ, Catterall CP, Eby P, Kanowski J. (2012). Long-distance and frequent movements of the flying-fox *Pteropus poliocephalus*: implications for management. *PLoS One* **7**(8):e42532.

Sabino-Santos G Jr, Maia FGM, Martins RB, Gagliardi TB, Souza WM, Muylaert RL, Luna LKS, Melo DM, Cardoso RS, Barbosa NDS, Pontelli MC, Mamani-Zapana PR, Vieira TM, Melo NM, Jonsson CB, Goodin D, Salazar-Bravo J, daSilva LLP, Arruda E, Figueiredo LTM. (2018). Natural infection of Neotropical bats with hantavirus in Brazil. *Sci Rep* **8**(1):9018.

Saitou N, Nei M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**(4):406-425.

Salaün JJ, Klein JM, Hébrard G. (1974). A new virus, Phnom-Penh bat virus, isolated in Cambodia from a short-nosed fruit bat, "Cynopterus brachyotis angulatus" Miller, 1898. *Ann Microbiol (Paris)* **125**(4):485-495.

Sasaki M, Setiyono A, Handharyani E, Kobayashi S, Rahmadani I, Taha S, Adiani S, Subangkit M, Nakamura I, Sawa H, Kimura T. (2014). Isolation and characterization of a novel alphaherpesvirus in fruit bats. *J Virol* **88**(17):9819-9829.

Seiradake E, Lortat-Jacob H, Billet O, Kremer EJ, Cusack S. (2006). Structural and mutational analysis of human Ad37 and canine adenovirus 2 fiber heads in complex with the D1 domain of coxsackie and adenovirus receptor. *J Biol Chem* **281**(44):33704-33716.

Shabman RS, Shrivastava S, Tsibane T, Attie O, Jayaprakash A, Mire CE, Dilley KE, Puri V, Stockwell TB, Geisbert TW, Sachidanandam R, Basler CF. (2016). Isolation and Characterization of a novel gammaherpesvirus from a microbat cell line. *mSphere* **1**(1): e00070-00015.

Shayakhmetov DM, Gaggar A, Ni S, Li ZY, Lieber A. (2005). Adenovirus binding to blood factors results in liver cell infection and hepatotoxicity. *J Virol* **79**(12):7478-7491.

Shimojima M, Ikeda Y, Kawaoka Y. (2007). The mechanism of Axl-mediated Ebola virus infection. *J Infect Dis* **196**: Suppl 2S259–263.

Shimajima M, Ströher U, Ebihara H, Feldmann H, Kawaoka Y. (2012). Identification of cell surface molecules involved in dystroglycan-independent Lassa virus cell entry. *J Virol* **86**(4):2067-2078.

Shirato K, Maeda K, Tsuda S, Suzuki K, Watanabe S, Shimoda H, Ueda N, Iha K, Taniguchi S, Kyuwa S, Endoh D, Matsuyama S, Kurane I, Saijo M, Morikawa S, Yoshikawa Y, Akashi H, Mizutani T. (2012). Detection of bat coronaviruses from *Miniopterus fuliginosus* in Japan. *Virus Genes* **44**(1):40-44.

Smith CS, de Jong CE, Meers J, Henning J, Wang L, Field HE. (2016). Coronavirus infection and diversity in bats in the Australasian region. *Ecohealth* **13**(1):72-82.

Smith DB, Simmonds P; International Committee on Taxonomy of Viruses Hepeviridae Study Group, Jameel S, Emerson SU, Harrison TJ, Meng XJ, Okamoto H, Van der Poel WH, Purdy MA. (2014). Consensus proposals for classification of the family Hepeviridae. *J Gen Virol* **95**(10):2223-2232.

Smith JG, Cassany A, Gerace L, Ralston R, Nemerow GR. (2008). Neutralizing antibody blocks adenovirus infection by arresting microtubule-dependent cytoplasmic transport. *J Virol* **82**(13):6492-6500.

Sonntag M, Mühldorfer K, Speck S, Wibbelt G, Kurth A. (2009). New adenovirus in bats, Germany. *Emerg Infect Dis* **15**(12):2052-2055.

Soudais C, Boutin S, Hong SS, Chillon M, Danos O, Bergelson JM, Boulanger P, Kremer EJ. (2000). Canine adenovirus type 2 attachment and internalization: coxsackievirus-adenovirus receptor, alternative receptors, and an RGD-independent pathway. *J Virol* **74**(22):10639-10649.

Spaan W, Cavanagh D, Horzinek MC. (1988). Coronaviruses: structure and genome expression. *J Gen Virol*. **69**(12):2939-2952.

Stallwood Y, Fisher KD, Gallimore PH, Mautner V. (2000). Neutralisation of adenovirus infectivity by ascitic fluid from ovarian cancer patients. *Gene Ther* **7**(8):637-643.

Subudhi S, Rapin N, Dorville N, Hill JE, Town J, Willis CKR, Bollinger TK, Misra V. (2018). Isolation, characterization and prevalence of a novel Gammaherpesvirus in *Eptesicus fuscus*, the North American big brown bat. *Virology* **516**:227-238.

Suzuki J, Sato R, Kobayashi T, Aoi T, Harasawa R. (2014). Group B betacoronavirus in Rhinolophid bats, Japan. *J Vet Med Sci* **76**(9):1267-1269.

Straková P, Dufkova L, Širmarová J, Salát J, Bartonička T, Klempa B, Pfaff F, Höper D, Hoffmann B, Ulrich RG, Růžek D. (2017). Novel hantavirus identified in European bat species *Nyctalus noctula*. *Infect Genet Evol* **48**:127-130.

Swift, SM. (1998). Long-Eared Bats. T & AD Poyser Natural History. London.

Tajima S, Takasaki T, Matsuno S, Nakayama M, Kurane I. (2005). Genetic characterization of Yokose virus, a flavivirus isolated from the bat in Japan. *Virology* **332**(1):38-44.

Tam AW, Smith MM, Guerra ME, Huang CC, Bradley DW, Fry KE, Reyes GR. (1991). Hepatitis E virus (HEV): molecular cloning and sequencing of the full-length viral genome. *Virology* **185**(1):120-131.

Tan B, Yang XL, Ge XY, Peng C, Zhang YZ, Zhang LB, Shi ZL. (2016). Novel bat adenoviruses with an extremely large E3 gene. *J Gen Virol* **97**(7):1625-1635.

Tan B, Yang XL, Ge XY, Peng C, Liu HZ, Zhang YZ, Zhang LB, Shi ZL. (2017). Novel bat adenoviruses with low G+C content shed new light on the evolution of adenoviruses. *J Gen Virol* **98**(4):739-748.

Thiel V, Ivanov KA, Putics A, Hertzog T, Schelle B, Bayer S, Weissbrich B, Snijder EJ, Rabenau H, Doerr HW, Gorbalenya AE, Ziebuhr J. (2003). Mechanisms and enzymes involved in SARS coronavirus genome expression. *J Gen Virol* **84**(9):2305-2315.

Thompson H, O'Keeffe AM, Lewis JC, Stocker LR, Laurenson MK, Philbey AW. (2010). Infectious canine hepatitis in red foxes (*Vulpes vulpes*) in the United Kingdom. *Vet Rec* **166**(4):111-114.

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap

penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**(22):4673-4680.

Tomko RP, Xu R, Philipson L. (1997). HCAR and MCAR: the human and mouse cellular receptors for subgroup C adenoviruses and group B coxsackieviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(7):3352-3356.

Tong S, Conrardy C, Ruone S, Kuzmin IV, Guo X, Tao Y, Niezgodka M, Haynes L, Agwanda B, Breiman RF, Anderson LJ, Rupprecht CE. (2009). Detection of novel SARS-like and other coronaviruses in bats from Kenya. *Emerg Infect Dis* **15**(3):482-485.

Tong S, Li Y, Rivaller P, Conrardy C, Castillo DA, Chen LM, Recuenco S, Ellison JA, Davis CT, York IA, Turmelle AS, Moran D, Rogers S, Shi M, Tao Y, Weil MR, Tang K, Rowe LA, Sammons S, Xu X, Frace M, Lindblade KA, Cox NJ, Anderson LJ, Rupprecht CE, Donis RO. (2012). A distinct lineage of influenza A virus from bats. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**(11):4269-4274.

Tong S, Zhu X, Li Y, Shi M, Zhang J, Bourgeois M, Yang H, Chen X, Recuenco S, Gomez J, Chen LM, Johnson A, Tao Y, Dreyfus C, Yu W, McBride R, Carney PJ, Gilbert AT, Chang J, Guo Z, Davis CT, Paulson JC, Stevens J, Rupprecht CE, Holmes EC, Wilson IA, Donis RO. (2013). New world bats harbor diverse influenza A viruses. *PLoS Pathog* **9**(10):e1003657.

Tse H, Chan WM, Li KS, Lau SK, Woo PC, Yuen KY. (2012). Discovery and genomic characterization of a novel bat sapovirus with unusual genomic features and phylogenetic position. *PLoS One* **7**(4):e34987.

Tse H, Tsang AK, Tsoi HW, Leung AS, Ho CC, Lau SK, Woo PC, Yuen KY. (2017). Identification of a novel bat papillomavirus by metagenomics. *PLoS One* **7**(8):e43986.

Wacharapluesadee S, Sintunawa C, Kaewpom T, Khongnomnan K, Olival KJ, Epstein JH, Rodpan A, Sangsri P, Intarut N, Chindamporn A, Suksawa K, Hemachudha T. (2013). Group C betacoronavirus in bat guano fertilizer, Thailand. *Emerg Infect Dis* **19**(8):1349-1351.

Wang B, Yang XL, Li W, Zhu Y, Ge XY, Zhang LB, Zhang YZ, Bock CT, Shi ZL. (2017). Detection and genome characterization of four novel bat hepadnaviruses and a hepevirus in China. *Virology* **14**(1):40.

Wang H, Li ZY, Liu Y, Persson J, Beyer I, Möller T, Koyuncu D, Drescher MR, Strauss R, Zhang XB, Wahl JK 3rd, Urban N, Drescher C, Hemminki A, Fender P, Lieber A. (2011). Desmoglein 2 is a receptor for adenovirus serotypes 3, 7, 11 and 14. *Nat Med* **17**(1):96-104.

Wang J, Moore NE, Murray ZL, McInnes K, White DJ, Tompkins DM, Hall RJ. (2015). Discovery of novel virus sequences in an isolated and threatened bat species, the New Zealand lesser short-tailed bat (*Mystacina tuberculata*). *J Gen Virol* **96**(8):2442-2452.

Wang N, Shi X, Jiang L, Zhang S, Wang D, Tong P, Guo D, Fu L, Cui Y, Liu X, Arledge KC, Chen YH, Zhang L, Wang X. (2013). Structure of MERS-CoV spike receptor-binding domain complexed with human receptor DPP4. *Cell Res* **23**(8):986-993.

Wang Q, Qi J, Yuan Y, Xuan Y, Han P, Wan Y, Ji W, Li Y, Wu Y, Wang J, Iwamoto A, Woo PC, Yuen KY, Yan J, Lu G, Gao GF. (2014). Bat origins of MERS-CoV supported by bat coronavirus HKU4 usage of human receptor CD26. *Cell Host Microbe*. **16**(3):328-337.

Watanabe S, Ueda N, Iha K, Masangkay JS, Fujii H, Alviola P, Mizutani T, Maeda K, Yamane D, Walid A, Kato K, Kyuwa S, Tohya Y, Yoshikawa Y, Akashi H. (2009). Detection of a new bat gammaherpesvirus in the Philippines. *Virus Genes* **39**(1):90-93.

Watanabe S, Omatsu T, Miranda ME, Masangkay JS, Ueda N, Endo M, Kato K, Tohya Y, Yoshikawa Y, Akashi H. (2010). Epizootology and experimental infection of Yokose virus in bats. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **33**(1):25-36.

Watanabe S, Masangkay JS, Nagata N, Morikawa S, Mizutani T, Fukushi S, Alviola P, Omatsu T, Ueda N, Iha K, Taniguchi S, Fujii H, Tsuda S, Endoh M, Kato K, Tohya Y, Kyuwa S, Yoshikawa Y, Akashi H. (2010). Bat coronaviruses and experimental infection of bats, the Philippines. *Emerg Infect Dis* **16**(8):1217-1223.

Watanabe S, Maeda K, Suzuki K, Ueda N, Iha K, Taniguchi S, Shimoda H, Kato K, Yoshikawa Y, Morikawa S, Kurane I, Akashi H, Mizutani T. (2010). Novel betaherpesvirus in bats. *Emerg Infect Dis* **16**(6):986-988.

Weiss SR, Navas-Martin S. (2005). Coronavirus pathogenesis and the emerging pathogen severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Microbiol Mol Biol Rev* **69**(4):635-664.

Weiss S, Witkowski PT, Auste B, Nowak K, Weber N, Fahr J, Mombouli JV, Wolfe ND, Drexler JF, Drosten C, Klempa B, Leendertz FH, Kruger DH. (2012). Hantavirus in bat, Sierra Leone. *Emerg Infect Dis* **18**(1):159-161.

Wevers D, Metzger S, Babweteera F, Bieberbach M, Boesch C, Cameron K, Couacy-Hymann E, Cranfield M, Gray M, Harris LA, Head J, Jeffery K, Knauf S, Lankester F, Leendertz SA, Lonsdorf E, Mugisha L, Nitsche A, Reed P, Robbins M, Travis DA, Zommers Z, Leendertz FH, Ehlers B. (2011). Novel adenoviruses in wild primates: a high level of genetic diversity and evidence of zoonotic transmissions. *J Virol* **85**(20):10774-10784.

Wickham TJ, Mathias P, Cheresh DA, Nemerow GR. (1993). Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment **73**(2):309-319.

Wilkinson GS, South JM. (2002). Life history, ecology and longevity in bats. *Aging Cell* **1**(2):124-131.

Wong DC, Purcell RH, Sreenivasan MA, Prasad SR, Pavri KM. (1980). Epidemic and endemic hepatitis in India: evidence for a non-A, non-B hepatitis virus aetiology. *Lancet* **25**;2(8200):876-879.

World Health Organization. (2004). Summary of probable SARS cases with onset of illness from 1 November 2002 to 31 July 2003. *Communicable Disease Surveillance & Response (CSR)*. http://www.who.int/csr/sars/country/table2004_04_21/en/

World Health Organization. (2018). MERS situation update, October 2018. <http://www.emro.who.int/pandemic-epidemic-diseases/mers-cov/mers-situation-update-october-2018.html>

Wu K, Peng G, Wilken M, Geraghty RJ, Li F. (2012). Mechanisms of host receptor adaptation by severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J Biol Chem* **287**(12):8904–8911.

Wu Z, Ren X, Yang L, Hu Y, Yang J, He G, Zhang J, Dong J, Sun L, Du J, Liu L, Xue Y, Wang J, Yang F, Zhang S, Jin Q. (2012). Virome analysis for identification of novel mammalian viruses in bat species from Chinese provinces. *J Virol* **86**(20):10999-11012.

Wu Z, Liu B, Du J, Zhang J, Lu L, Zhu G, Han Y, Su H, Yang L, Zhang S, Liu Q, Jin Q. (2018). Discovery of diverse rodent and bat pestiviruses with distinct genomic and phylogenetic characteristics in several Chinese provinces. *Front Microbiol* **24**;(9):2562.

Xu L, Wu J, He B, Qin S, Xia L, Qin M, Li N, Tu C. (2015). Novel hantavirus identified in black-bearded tomb bats, China. *Infect Genet Evol* **31**:158-160.

Yamada K, Takahashi M, Hoshino Y, Takahashi H, Ichiyama K, Nagashima S, Tanaka T, Okamoto H. (2009). ORF3 protein of hepatitis E virus is essential for virion release from infected cells. *J Gen Virol* **90**(8):1880-1891.

Yamashita T, Mori Y, Miyazaki N, Cheng RH, Yoshimura M, Unno H, Shima R, Moriishi K, Tsukihara T, Li TC, Takeda N, Miyamura T, Matsuura Y. (2009). Biological and immunological

characteristics of hepatitis E virus-like particles based on the crystal structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(31):12986-12991.

Yang L, Wu Z, Ren X, Yang F, Zhang J, He G, Dong J, Sun L, Zhu Y, Zhang S, Jin Q. (2014). MERS-related betacoronavirus in *Vespertilio superans* bats, China. *Emerg Infect Dis* **20**(7):1260-1262.

Yang Y, Du L, Liu C, Wang L, Ma C, Tang J, Baric RS, Jiang S, Li F. (2014). Receptor usage and cell entry of bat coronavirus HKU4 provide insight into bat-to-human transmission of MERS coronavirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**(34):12516-12521.

Yinda CK, Rector A, Zeller M, Conceição-Neto N, Heylen E, Maes P, Ghogomu SM, Van Ranst M, Matthijnssens J. (2016). A single bat species in Cameroon harbors multiple highly divergent papillomaviruses in stool identified by metagenomics analysis. *Viol Rep* **6**:74–80.

Yinda CK, Zell R, Deboutte W, Zeller M, Conceição-Neto N, Heylen E, Maes P, Knowles NJ, Ghogomu SM, Van Ranst M, Matthijnssens J. (2017). Highly diverse population of Picornaviridae and other members of the Picornavirales, in Cameroonian fruit bats. *BMC Genomics* **18**(1):249.

Yu G, Yagi S, Carrion R Jr, Chen EC, Liu M, Brasky KM, Lanford RE, Kelly KR, Bales KL, Schnurr DP, Canfield DR, Patterson JL, Chiu CY. (2013). Experimental cross-species infection of common marmosets by titi monkey adenovirus. *PLoS One* **8**(7):e68558.

Zaki AM, van Boheemen S, Bestebroer TM, Osterhaus AD, Fouchier RA. (2012). Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. *N Engl J Med* **367**(19), 1814-1820.

Zhang H, Todd S, Tachedjian M, Barr JA, Luo M, Yu M, Marsh GA, Cramer G, Wang LF. (2012). A novel bat herpesvirus encodes homologues of major histocompatibility complex classes I and II, C-type lectin, and a unique family of immune-related genes. *J Virol* **86**(15):8014-8030.

Zhou P, Fan H, Lan T, Yang XL, Shi WF, Zhang W, Zhu Y, Zhang YW, Xie QM, Mani S, Zheng XS, Li B, Li JM, Guo H, Pei GQ, An XP, Chen JW, Zhou L, Mai KJ, Wu ZX, Li D, Anderson DE, Zhang LB, Li SY, Mi ZQ, He TT, Cong F, Guo PJ, Huang R, Luo Y, Liu XL, Chen J, Huang Y, Sun Q, Zhang XL, Wang YY, Xing SZ, Chen YS, Sun Y, Li J, Daszak P, Wang LF, Shi ZL, Tong YG, Ma JY. (2018). Fatal swine acute diarrhoea syndrome caused by an HKU2-related coronavirus of bat origin. *Nature* **556**(7700):255-258.

Zhu HC, Chu DK, Liu W, Dong BQ, Zhang SY, Zhang JX, Li LF, Vijaykrishna D, Smith GJ, Chen HL, Poon LL, Peiris JS, Guan Y. (2009). Detection of diverse astroviruses from bats in China. *J Gen Virol* **90**(4):883-887.

謝 辭

東京大学獣医微生物学研究室の堀本泰介教授には、本研究の計画、遂行、執筆まで一貫して、精力的にご指導いただきました。深甚なる感謝を申し上げます。また、本研究を遂行するにあたり非常に手厚くかつ寛大にご指導を頂いた同研究室の村上晋准教授に謹んで深謝いたします。さらに、同研究室の上間亜希子特任助教にも研究のご指導を賜りましたことを感謝申し上げます。

コウモリの保護を考える会の(故)向山満先生、峰下耕先生、作山宗樹先生および佐々木玲子先生並びにコウモリの会の山本輝正先生にはコウモリの生態、同定および捕獲方法について懇切丁寧にご指導いただきました。さらにコウモリからの検体採取にもご協力いただきました。深く御礼申し上げます。

山口大学獣医微生物学研究室の前田健教授には、コウモリ検体からのウイルス分離に用いたコウモリ由来細胞株(BKT、FBKT、YubFKT1、DemKT1、IndFSP1)を分与していただきました。大変ありがとうございました。

北海道大学人獣共通感染症リサーチセンターの高田礼人教授並びに丸山隼輝博士には、コウモリアデノウイルスの電子顕微鏡像を撮影していただきました。深く御礼申し上げます。

東京大学獣医微生物学研究室の皆様には研究面、生活面の双方において大変お世話になりました。ありがとうございました。

最後に、あらゆる面において献身的にサポートしていただいた妻と家族に心より感謝します。