

論文内容の要旨

所属： 獣医学専攻

氏名： 北村(小林) 知也

指導教員： 堀本 泰介

日本在来翼手目が保有するウイルスの検索と性状解析

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。コウモリは重症急性呼吸器症候群 (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・再興感染症の発生源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、その公衆衛生的な重要性について考察を加えた。

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的解析

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 や中東呼吸器症候群 (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 型肝炎の病原体である 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 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

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コウモリアデノウイルス (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 (BtAdV-Mm32 と命名) 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 (BtAdV-Vs9 と命名) 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イヌアデノウイルス (CAdV) 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 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

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、第3章では、複数の AdV の受容体として知られるコクサッキー・アデノウイルス受容体 (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、本研究によって、日本に生息するコウモリが複数種のコロナウイルス、ヘペウイルス、そしてアデノウイルスを保有していることが明らかとなった。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、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。