

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08510

研究課題名(和文) 新興出血熱ウイルスの細胞内侵入受容体の探索と抗ウイルス薬への応用

研究課題名(英文) Study for entry receptor of emerging hemorrhagic fever virus and its application for antivirals

研究代表者

谷 英樹 (TANI, HIDEKI)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・准教授

研究者番号：20397706

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：出血熱ウイルス感染症は致死率が高く重篤な疾患を引き起こすため、ウイルス感染そのものを阻止することが重要であり、感染初期の吸着・侵入機構を解明することが急務である。本研究では、ラッサウイルスの新規細胞侵入受容体であるリソソーム関連膜タンパク質1の関与および重症熱性血小板減少症候群ウイルス(SFTSV)の細胞侵入に関するウイルス側エンベロップ蛋白質および宿主側因子の性状解析を行った。その結果、SFTSVの細胞侵入時に細胞融合に関与するエンベロップ蛋白質のアミノ酸を同定することができた。また、宿主側因子として細胞侵入の際に活性化されるシグナル分子も同定することができた。

研究成果の概要(英文)：Because hemorrhagic fever virus infection has a high fatality rate and causes severe disease, it is important to prevent virus infection itself, and it is urgent to elucidate the mechanism of adsorption and invasion in the early stage of infection. In this study, we analyzed the properties of the novel entry receptor, lysosome-associated membrane protein 1, for Lassa virus and the viral envelope proteins and host factors for severe fever with thrombocytopenia syndrome virus (SFTSV). As a result, it was possible to identify amino acids of envelope proteins involved in cell fusion of SFTSV. In addition, signal molecules activated upon cell entry could also be identified as a host factor.

研究分野：ウイルス学

キーワード：新興ウイルス感染症 SFTSV 細胞侵入

1. 研究開始当初の背景

ウイルスが宿主細胞へ感染するためには、多くの場合、特定受容体を介した侵入が成立しなければならない。ウイルスは宿主細胞内にゲノムを放出するために、細胞膜表面で結合および膜融合を誘発する形態や、細胞表面で結合後、エンドソームによるエンドサイトーシスで細胞内に取り込まれて、そこで pH の変化などで膜融合を誘発する形態をとることが知られている。また、単一の受容体で感染が成立するウイルスもあれば、複数の受容体が必要なウイルスもあり、ウイルスの細胞侵入は予想以上に複雑であると考えられている。これまでウイルス受容体は多くが細胞表面に存在する分子であると考えられていたが、最近新たに、エボラウイルスとラッサウイルスにおいて、エンドソーム内で作用できる細胞内侵入受容体として、それぞれ、ニーマンピック C1 (NPC1) とリソソーム関連膜タンパク質 1 (LAMP-1) の存在が明らかになった (Carette *et al.*, Nature 2011, Jae *et al.*, Science, 2014)。これらのウイルスでは、細胞表面に存在するそれぞれ別の結合受容体に結合後、細胞内に取り込まれ、エンドソーム内の酸性環境下で、新たにそこに存在する細胞内侵入受容体と結合し、膜融合が誘発されゲノムの放出が起こる。

エボラウイルスおよびラッサウイルスは、ともにバイオセーフティレベル (BSL) 4 最高危険ウイルスに分類されているが、ウイルス属としては異なっており、利用する受容体の種類も異なるため、共通項は考えにくい。ただ、両ウイルスは、細胞表面にエンベロープタンパク質 (GP) が局在しているにも関わらず、通常、他のウイルス GP では細胞間膜融合が見られる酸性条件下 (pH5.0) でも膜融合が観察されず、これは、前述の細胞内侵入受容体が細胞表面にほとんど発現していないことに起因していると考えられる。C 型肝炎ウイルスにおいても、近年、細胞侵入に

関わる分子としてニーマンピック C1 様 1 (NPC1L1) が同定されており (Sainz *et al.*, Nat Med. 2012)、こうした細胞内侵入因子 (受容体) はまだ多くのウイルスに存在すると考えられる。

申請者は、これまでアレナウイルス科に属する種々のウイルス GP を用いて、その局在や細胞融合活性、また水疱性口内炎ウイルス (VSV) を基盤としたシュードタイプウイルスを作製して細胞侵入機構の解析を行ってきた (Tani *et al.*, J Virol. 2014)。その結果、新興アレナウイルスであるルジョウイルスの GP 発現細胞では、酸性条件下でも細胞間膜融合が確認されなかった。これは、エボラウイルスやラッサウイルスと同様に細胞表面には局在していない細胞内侵入受容体が存在することが示唆される。

重症熱性血小板減少症候群 (severe fever with thrombocytopenia syndrome, SFTS) の原因ウイルスとして新たに同定された SFTS ウイルス (SFTSV) においては、現在までウイルスの生活環は多くが不明であり、受容体に関しても確定的な同定には至っていない。日本における SFTS による致死率は現段階で 30% 近くに及び、極めて致死率の高いウイルス感染症である。SFTSV は、野山に生息するマダニが媒介源と考えられており、万人が罹患するリスクに晒されているにも関わらず、現在、予防薬はおろか治療薬も開発されておらず、早急な対策が必要となっている。

出血熱ウイルスをはじめ、こうした急性期に劇症化するようなウイルス性疾患の場合は、ウイルス感染そのものを阻止することが重要であり、そのためにも、ウイルスが細胞に感染する際の最初のステップである吸着・侵入機構を解明することは、重要な研究課題の一つである。

2. 研究の目的

本研究では、ルジョウイルスをはじめとする

アレナウイルス各種、および SFTSV の GP に関与する細胞内侵入受容体の探索を行う。また、ルジヨウイルスに関しては、ラッサウイルスに比較的近縁のウイルスでもあるため、LAMP-1 の関与についても検証する。また、ウイルスの細胞侵入、細胞融合に関与するウイルス側のエンベロップ蛋白質の責任領域の探索も行う。

3. 研究の方法

LAMP-1 は細胞表面に発現する変異体が既に知られているため、この変異体を用いてラッサウイルスおよびルジヨウイルスを含むアレナウイルス科のウイルス種の細胞間膜融合を観察する。

次に、重症熱性血小板減少症候群ウイルス (SFTSV) の細胞侵入とそれに関与するエンベロップ蛋白質 (GP) の性状について検討を行う。膜融合活性の低い中国株と膜融合活性の高い日本株を比較して、アミノ酸の違いを調べ、それぞれの株で異なっているアミノ酸の配列を遺伝子レベルで改変させ、変異株を作製する。変異株の GP を発現させた細胞で細胞融合の程度を比較し、どのアミノ酸が細胞融合に重要であるか同定する。

さらには、細胞侵入に関与する分子を探索するためにキナーゼ阻害剤ライブラリーを用いてスクリーニングを行う。スクリーニングにより阻害活性の得られた阻害剤に共通する分子が同定できれば、その分子の発現抑制および過剰発現によりウイルスとの関与を検証する。また、阻害抗体や直接的な相互作用についても検討する。

4. 研究成果

出血熱ウイルス感染症は致死率が高く重篤な疾患を引き起こすため、ウイルス感染そのものを阻止することが重要であり、感染初期の吸着・侵入機構を解明することが急務である。本研究では、こうしたウイルスの新た

な細胞侵入受容体の存在を明らかにすることを目的としており、まず、最近ラッサウイルスで新たに報告された新規細胞内侵入受容体であるリソソーム関連膜タンパク質 1 (LAMP-1) のラッサウイルスおよび近縁のルジヨウイルスでの関与について検討を行った。LAMP-1 は、通常リソソーム内に発現しており細胞表面にはほとんど発現していないため、この残留シグナルを欠損させた、もしくは変異を入れた変異体を作製した。この発現プラスミドを用いて、細胞内で LAMP-1 および LAMP-1 変異体を発現させて、ラッサウイルスおよびルジヨウイルスのエンベロップ蛋白質 (GP) の発現細胞と共培養し、酸性条件下で処理後の膜融合活性を、同じく T7 ポリメラーゼ発現プラスミドと T7 ルシフェラーゼプラスミドの高感度リポーターアッセイ系を用いて検証した。その結果、LAMP-1 の発現は免疫蛍光抗体法を用いて確認できたものの、LAMP-1 と変異体とで発現局在が変わらず、リポーター活性もほぼ同等の値を呈した。

次に、重症熱性血小板減少症候群ウイルス (SFTSV) の細胞侵入とそれに関与するエンベロップ蛋白質 (GP) の性状について検討を行った。はじめに SFTSV の HB29 株 (中国株) と YG1 株 (日本株) を細胞に感染させ、膜融合がどのように生じるか、またそれぞれの GP を細胞に発現させて、同様に実験を行った。その結果、HB29 株は YG1 株に比べ、膜融合が起こりにくいことが明らかになった。そのため、2 株で GP のアミノ酸配列を比較し、膜融合の活性に変化を与えるようなアミノ酸を人為的に置き換えた遺伝子配列の GP の変異体を細胞に発現させ、膜融合の程度をルシフェラーゼを用いたレポーターアッセイで評価した。その結果、HB29 株の GP の 962 番目のアルギニン (R) をセリン (S) に変化した変異体 (R962S) で膜融合が起こりやすくなるという結果を得た。この実験結

果を確かめるために GP の 962 番目のアミノ酸に注目し、YG1 株のアミノ酸 (S) を HB29 株のアミノ酸 (R) に変異させて同様の実験を行ったところ、逆に膜融合を起こしにくくなった。加えて VSV シュードタイプウイルスを用いた感染性の測定では R962S の変異体で感染性が高まり、962 番目のアミノ酸はウイルスの感染にも関与することが示唆された。

さらに別のプロジェクトとしてキナーゼ阻害剤ライブラリーを用いたスクリーニングにより得られた重症熱性血小板減少症候群ウイルス (SFTSV) の細胞侵入に関与する分子の解析を行った。いくつかの阻害剤で SFTSV の感染阻害効果が認められたため、それぞれの阻害剤でターゲットとなる分子の 50% 阻害濃度の解析から、共通のターゲット分子となっていたのが、血小板由来増殖因子受容体 (PDGFR) であった。まず、この分子が SFTSV 増殖のどの過程に関与しているのかを調べるために、細胞侵入を解析できる一過性の感染システムである SFTSV 外被タンパク質を外殻したシュードタイプ VSV (SFTSV_{pv}) を用いて感染性を調べたところ、感染阻害が認められた。そこで次に、PDGFR の遺伝子を siRNA を用いて発現抑制させて、SFTSV_{pv} の感染性を調べたところ、コントロールの VSV_{pv} と比較して感染阻害が認められた。また、PDGFR の機能を中和できる抗体を用いても同じように SFTSV_{pv} の感染性を抑制することが明らかとなった。PDGFR が SFTSV の細胞侵入に関与する分子であることがわかったので、さらに SFTSV の感染による PDGFR のリン酸化を調べたところ、感染直後に PDGFR のリン酸化が認められた。以上の結果から、SFTSV は細胞侵入の際に PDGFR がリン酸化されることで、エンドサイトーシス等が活性化され、細胞内にウイルスが取り込まれていることが示唆された。

5 . 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

{ 雑誌論文 } (計 3 件)

1. Satoshi Taniguchi, Aiko Fukuma, Hideki Tani, Shuetsu Fukushima, Masayuki Saijo, Masayuki Shimojima. A neutralization assay with a severe fever with thrombocytopenia syndrome virus strain that makes plaques in inoculated cells. *Journal of Virological Methods* (2017). doi: 10.1016/j.jviromet.2017.01.005.
2. Hideki Tani, Masayuki Shimojima, Shuetsu Fukushima, Tomoki Yoshikawa, Aiko Fukuma, Satoshi Taniguchi, Shigeru Morikawa, Masayuki Saijo. Characterization of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus glycoprotein-mediated entry. *Journal of Virology*. (2016). 90: 5292-5301. doi: 10.1128/JVI.00110-16.
3. Aiko Fukuma, Shuetsu Fukushima, Tomoki Yoshikawa, Hideki Tani, Satoshi Taniguchi, Takeshi Kurosu, Kazutaka Egawa, Yuto Suda, Harpal Singh, Taro Nomachi, Mutsuyo Gokuden, Katsuyuki Ando, Kouji Kida, Miki Kan, Nobuyuki Kato, Akira Yoshikawa, Hiroaki Kitamoto, Yuko Sato, Tadaki Suzuki, Hideki Hasegawa, Shigeru Morikawa, Masayuki Shimojima, Masayuki Saijo. Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus antigen detection using monoclonal antibodies to the nucleocapsid protein. *PLoS Neglected Tropical Diseases* (2016). doi:10.1371/journal.pntd.0004595.

{ 学会発表 } (計 3 件)

1. Hideki Tani, Kengo Kawachi, Masayuki Shimojima, Shuetsu Fukushima, Takeshi Kurosu, Shigeru Morikawa, Masayuki Saijo: Identification of amino acid residue important for fusion of the glycoprotein of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus. 20th

International Conference on Emerging Infectious Diseases (EID). 50th Joint Working Conference on Viral Diseases. Shenzhen, China, January 10-11, 2018.

2. Hideki Tani, Hikaru Fujii, Satoshi Taniguchi, Shuetsu Fukushi, Takeshi Kurosu, Masayuki Shimojima, Shigeru Morikawa, Masayuki Saijo. The protein kinase inhibitors inhibit entry of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in vitro. The 65th annual meeting of the Japanese society for virology, Osaka, 2017.10.

3. Kengo Kawachi, Hideki Tani, Masayuki Shimojima, Shuetsu Fukushi, Takeshi Kurosu, Wataru Kamitani, Masayuki Saijo: Determination of the amino acid residue important for fusion of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus glycoprotein. The 64th annual meeting of the Japanese society for virology, Sapporo, 2016.10.

〔図書〕(計3件)

1. 西條政幸、谷 英樹：重症熱性血小板減少症候群の抗ウイルス療法—ファビピラビルとリバビリン— 化学療法の領域 (2017). 33, 97-103.
2. 谷 英樹：シュードタイプウイルスを利用したウイルス侵入機構の解析、生化学 (2017). 89, 251-254.
3. 谷 英樹：抗SFTSウイルス薬開発の進捗状況、Infectious Agents Surveillance Report (IASR) (2016). 37, 49-50.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷 英樹 (TANI, Hideki)

富山大学大学院医学薬学研究部 (医学)・

准教授

研究者番号：20397706