

令和 6 年 9 月 11 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07059

研究課題名（和文）ライブイメージング法による重症熱性血小板減少症候群ウイルス複製機構の解明

研究課題名（英文）Revealing the intra-cellular replication machinery of Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus by using live-cell imaging.

研究代表者

高松 由基（TAKAMATSU, Yuki）

長崎大学・熱帯医学研究所・准教授

研究者番号：00750407

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、SFTSVの細胞内複製機構を制御する新しい治療薬開発の基盤を構築することを目指した。まずヌクレオプロテイン（NP）のペプチドモチーフ変異体を作成し、転写・複製を評価するミニゲノムアッセイ系を構築した。これにより転写・複製を制御するNPのアミノ酸領域を同定した。さらに感染細胞におけるリボヌクレオプロテイン複合体（RNP）およびウイルス粒子の細胞内動態およびその分子機構を明らかにするための感染性・非感染性のライブセルイメージングシステムを構築した。最後にリバースジェネティクスを用いて組換えウイルスを構築し、NPにおけるRNP・ウイルス粒子形成制御ドメインの同定を進めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、RNPのコアを形成するNPタンパク質における転写・複製を制御するペプチドモチーフを同定し、RNPの形成及び他のウイルスタンパク質との相互作用に関わる領域を同定した。本研究を通して、ウイルスゲノムの転写・複製機能を評価するレポーターアッセイ、感染細胞およびタンパク質発現系を用いたライブセルイメージングアッセイ系を構築した。これらのアッセイ系により、感染細胞におけるRNP・感染性ウイルスの侵入・形成・輸送・出芽過程の分子機構を解明することが可能になり、ウイルスの複製を制御する新しい治療薬開発の基盤を構築することができた。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to establish a basis for the development of new therapeutics that regulate the intracellular replication mechanism of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus (SFTSV). First, peptide motif mutants of nucleoproteins (NPs) were generated, and a mini-genome assay system was constructed to evaluate transcription and replication of viral genome. This system identified the amino acid region of NPs that regulates transcription and replication. Furthermore, we constructed an infectious and non-infectious live-cell imaging system to elucidate the intracellular dynamics of ribonucleoprotein complexes (RNPs) and viral particles in infected cells and their molecular mechanisms. Finally, recombinant viruses were constructed using reverse genetics to evaluate the effects of NP mutations on the mechanisms of RNP and viral particle formation.

研究分野：ウイルス学

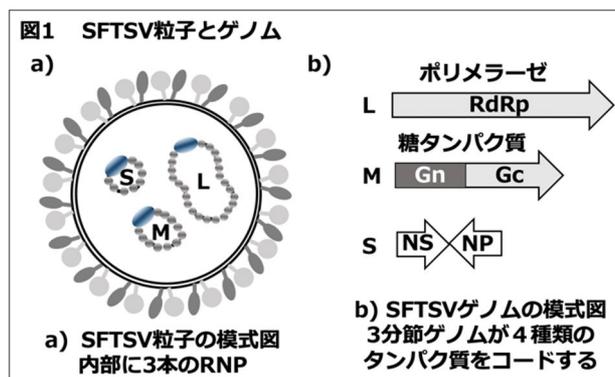
キーワード：SFTSV RNP形成 RNP輸送 NPモチーフ 転写・複製 ウイルス様粒子 ライブセルイメージング リバースジェネティクス

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

重症熱性血小板減少症候群は Dabie Bandavirus (旧名: Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus, SFTSV。本申請では SFTSV を用いる)を原因とし、マダニを介して伝播する人獣共通感染症である。特に東アジア地域で重要な新興感染症であり、本邦では 2013 年に初めて報告された。以降、毎年 50-100 人ほどの症例が報告されている。臨床症状としては、発熱、消化器症状、白血球減少、血小板減少などを認め、重症例では多臓器不全を合併する。しかしワクチンおよび治療法は確立されておらず、致死率は **30%**に及ぶ。こうした状況の中、ウイルスの複製機構を解明し特異的な治療薬を開発することは、本邦における公衆衛生上の重要課題と言える。

SFTSV は三種病原体に分類され、感染実験を行うためには特別な封じ込め施設である BSL(Bio-safety level)-3 実験室を必要とする。SFTSV はマイナス鎖一本鎖の RNA で構成される L, M, S の三分節を有する。L は RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ、M は糖タンパク質 GP を、S 分節は核タンパク質 NP と抗インターフェロン作用を持つ非構造タンパク質の NS をコードする(図 1)。それぞれのウ



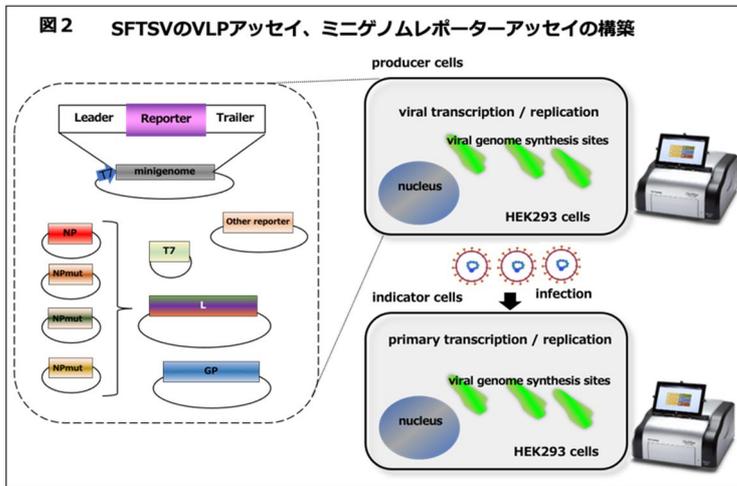
イルスタンパク質がどのようにリボ核タンパク質(RNP)を形成するか、その分子機構はよくわかっておらず、ウイルス粒子の形成機構についても詳細はわかっていない。

2. 研究の目的

SFTSV の細胞内動態はほとんどわかっておらず、移動に関わる宿主因子も不明である。そこで申請者は、SFTSV は細胞内にどのように侵入し、どうやって新規 RNP を形成し、細胞内のどういった経路を介して出芽に至るのか？また、その経路を介在する宿主細胞因子を同定することで、ウイルスの増殖を制御できるのではないかと考えた。本研究の目的は、「SFTSV の細胞内複製機構を制御する新しい治療薬開発の基盤を構築する」ことである。本研究を通して、ウイルスの複製に関わる宿主因子を解明し、SFTSV の侵入・形成・輸送・出芽を制御する新たな作用機序の治療薬開発に貢献することが期待される。

3. 研究の方法

はじめに SFTSV のライフサイクルを可視化し、複製機構を解明するための各種アッセイ系の構築を目指した。SFTSV についてはウイルスゲノムの転写・複製機能の評価するレポーターアッセイ系(ミニゲノムアッセイ)と、粒子形成や出芽などを評価するウイルス様粒子(VLP)アッセイ系が利用可能である。当研究室では既報の手法を基に、本邦由来のウイルス株を用いてミニゲノムアッセイ系とVLPアッセイ系を構築した(図 2)。



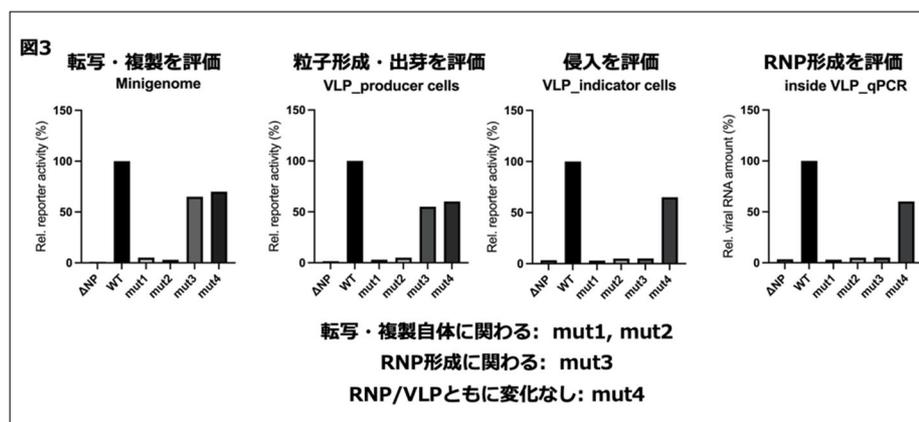
また申請者は前駆研究でフィロウィスのリボヌクレオタンパク質複合体 (RNP) やウイルス粒子を細胞内での形成過程・輸送経路を描出するライブセルイメージングシステムを構築し、病原体の細胞内動態を描出することに成功した(Takamatsu, *et al.* PNAS. 2018, Takamatsu, *et al.* J. Virol. 2020, 2022)。こ

の技術を応用し、本研究では SFTSV の細胞内動態および複製機構を解明するためのライブセルイメージングシステムを構築した。感染性のウイルスを用いたアッセイ系とタンパク質発現細胞を用いた非感染性ライブセルイメージングのアッセイ系を用いて SFTSV の細胞内動態について宿主因子を含めて可視化する。このシステムにより SFTSV の RNP の形成・輸送に必要なウイルスタンパク質を限定することが可能である。また VLP アッセイ系はウイルス粒子形成や出芽機能を評価するとともに、細胞への侵入過程を評価することができる。これらのアッセイ系に加えて、組換えウイルスを構築し、ウイルスの複製を制御するモチーフを同定することを目指した。

4. 研究成果

本研究では、五つの到達目標を定めて、全体を通して「SFTSV の細胞内複製機構を制御する新しい治療薬開発の基盤を構築する」ことを目指した。

まずウイルスゲノムの転写・複製機能を評価するレポーターアッセイ系(ミニゲノムアッセイ)と、粒子形成や出芽などを評価するウイルス様粒子 (VLP) アッセイ系を構築した。SFTSV と近縁のブニヤウイルスのアミノ酸配列を比較しウイルス種を超えて広く保存されたペプチドモチーフを同定した。核タンパク質(NP)については、機能的なドメインの報告は限られており、RNP の形成及び他のウイルスタンパク質との相互作用に関わる領域は同定されていない。そこで、SFTSV 及び近縁のウイルス群で保存されているモチーフに注目し、一連のアラニン変異体を構築した。構築した変異体の機能を解析するために、転写・複製を評価するミニゲノムアッセイ系を構築した。構築した



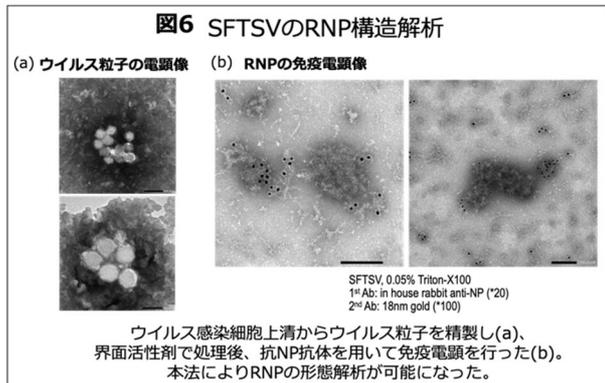
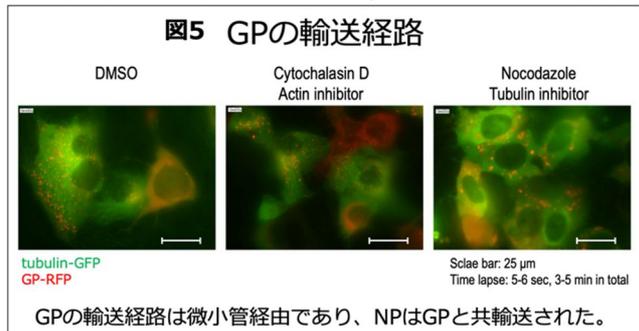
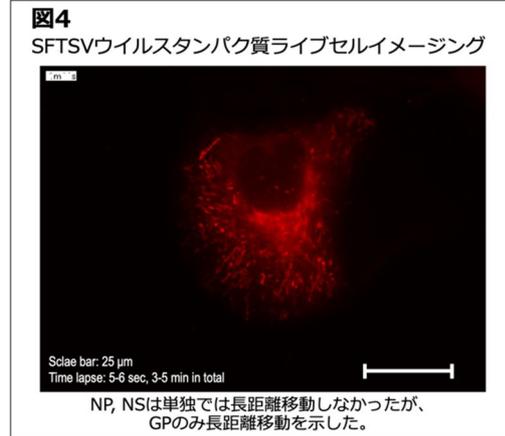
変異体の転写・複製機能を評価し、ヌクレオカプシドの機能制御ドメインを部分的に同

定することに成功した(図3)。

次に、感染細胞における RNP およびウイルス粒子の細胞内動態を解析するライブセルイメージングシステムを構築した。まずはウイルスゲノムを直接カプシド化している NP を最初の標的とした。続いて GP, L, NS タンパク質についても同様に蛍光融合タンパク質を構築した。これらのプラスミドを用いて、SFTSV 感染細胞における各ウイルスタンパク質の細胞内動態を明らかにした。続いて非感染性のライブ

セルイメージングシステムを構築し、RNP の形成・輸送に必要なウイルスタンパク質を同定した。この結果、GP がウイルス粒子の長距離輸送に関与すること、そして NP は GP と共輸送されることがわかった(図4)。GP は Gn と Gc に開裂し Gn/Gc 複合体を形成するが、GP の輸送機構については不明である。そこで Gn, Gc それぞれ蛍光標識したプラスミドと NP 変異体プラスミドを用いて、RNP 形成と RNP 輸送の制御機構の一旦を明らかにした。GP の輸送経路について細胞骨格合成阻害剤を用いて解析し、GP 輸送が微小管経路で行われることがわかった(図5)。

続いて、リバーシジェネティクスを用いて、同定したモチーフに変異を導入した組換えウイルスを構築した。組換えウイルスまたは VLP から RNP を精製し、RNP 形成制御モチーフを同定する基盤を構築した(図6)。今後、変異ウイルスから RNP を精製し、野生型と比較解析することでウイルスゲノムの複製機構を解明する準備を進める。以上から、感染細胞における RNP・感染性ウイルスの侵入・形成・輸送・出芽過程の分子機構を解明し、ウイルスの複製を制御する新しい治療薬開発の基盤構築を進める。さらに、変異タンパク質発現細胞と野生型タンパク質発現細胞における遺伝子発現の違いをトランスクリプトームで網羅的に解析し、ウイルス粒子の形成・輸送に関与する宿主タンパク質候補を限定したい。また、変異ウイルスが構築できたら、そのウイルスと野生型ウイルスについて、複製機能やウイルス粒子形成機能、出芽機能を解析し、ウイルスのライフサイクルに与える変異の影響を評価する。以上からウイルス粒子形成・輸送を制御するウイルス因子および宿主因子と、その制御機構を解明する。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計21件（うち査読付論文 19件 / うち国際共著 16件 / うちオープンアクセス 20件）

1. 著者名 Osako Hiromu, Xu Qiang, Nabeshima Takeshi, Balingit Jean Claude, Nwe Khine Mya, Yu Fuxun, Inoue Shingo, Hayasaka Daisuke, Tun Mya Myat Ngwe, Morita Kouichi, Takamatsu Yuki	4. 巻 2024.03.06.
2. 論文標題 Clinical factors associated with SFTS diagnosis and severity in cats	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 BioRxiv	6. 最初と最後の頁 1-44
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2024.03.06.583784	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Shimajima Masayuki, Sugimoto Satoko, Umekita Kunihiko, Onodera Taishi, Sano Kaori, Tani Hideki, Takamatsu Yuki, Yoshikawa Tomoki, Kurosu Takeshi, Suzuki Tadaki, Takahashi Yoshimasa, Ebihara Hideki, Saijo Masayuki	4. 巻 14
2. 論文標題 Neutralizing mAbs against SFTS Virus Gn Protein Show Strong Therapeutic Effects in an SFTS Animal Model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Viruses	6. 最初と最後の頁 1665 ~ 1665
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/v14081665	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sano Shiori, Fukushi Shuetsu, Yamada Souichi, Harada Shizuko, Kinoshita Hitomi, Sugimoto Satoko, Yoshikawa Tomoki, Kurosu Takeshi, Takamatsu Yuki, Shimajima Masayuki, Toda Shoichi, Hamada Yuka, Fujisawa Naoki, Sugimoto Takayuki, Saijo Masayuki	4. 巻 13
2. 論文標題 Development of an RT-LAMP Assay for the Rapid Detection of SFTS Virus	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Viruses	6. 最初と最後の頁 693 ~ 693
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/v13040693	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 高松 由基	4. 巻 280
2. 論文標題 ウイルス粒子の形成過程を視る ライブセルイメージングシステムを用いた高病原性ウイルス細胞内動態の解明	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 926-932
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Misu Masayasu, Yoshikawa Tomoki, Sugimoto Satoko, Takamatsu Yuki, Kurosu Takeshi, O uji Yukiteru, Yoshikawa Masahide, Shimojima Masayuki, Ebihara Hideki, Saijo Masayuki	4. 巻 14
2. 論文標題 Rapid whole genome sequencing methods for RNA viruses	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 1-17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2023.1137086	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計33件(うち招待講演 2件/うち国際学会 15件)

1. 発表者名 高松 由基
2. 発表標題 ライブセルイメージングによる高病原性ウイルス細胞内動態の解明
3. 学会等名 日本顕微鏡学会第78回学術講演会(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yuki Takamatsu, Takeshi Noda, Stephan Becker
2. 発表標題 ライブセルイメージングシステムを用いた高病原性ウイルス細胞内動態の解明
3. 学会等名 第63回日本熱帯医学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高松 由基, Olga Dolnik, 野田 岳志, 西條 政幸, Stephan Becker
2. 発表標題 フィロウイルスヌクレオカプシド形成機構の解明
3. 学会等名 第68回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三須 政康, 吉河 智城, 黒須 剛, 高松 由基, 王寺 幸輝, 下島 昌幸, 吉川 正英, 西條 政幸
2. 発表標題 迅速・簡便かつ正確なRNAウイルスの全ゲノム配列決定法の確立
3. 学会等名 第68回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉河 智城, 三須 政康, 黒須 剛, 高松 由基, 杉元 聡子, 下島 昌幸, 西條 政幸
2. 発表標題 SFTSウイルス遺伝子を保持する高度弱毒化痘そうワクチン株LC16m8を免疫したマウスで誘導される液性免疫のワクチン効果への寄与
3. 学会等名 第68回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 下島 昌幸, 米満 研三, 網 康至, 杉元 聡子, 高松 由基, 吉河 智城, 黒須 剛, 西條 政幸
2. 発表標題 SFTSウイルスの新規病原因子の同定
3. 学会等名 第68回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Nadine Biedenkopf, Lennart Kaemper, Yuki Takamatsu, Thomas Kruse, Jakob Nilsson, Stephan Becker
2. 発表標題 TO BE OR NOT TO BE PHOSPHORYLATED: HOW HOST KINASES AND PHOSPHATASES CONTROL EBOLA VIRUS RNA SYNTHESIS.
3. 学会等名 The Protein Phosphorylation Conference (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Qiang Xu, Satoshi Taniguchi, Jean Claude Balingit, Takeshi Nabeshima, Mya Myat Ngwe Tun, Masayuki Shimojima, Yuki Takamatsu
2. 発表標題 The important motif of nucleocapsid protein to reveal the molecular machinery of SFTSV transcription and replication
3. 学会等名 第70回日本ウイルス学会学術集会（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yuki Takamatsu
2. 発表標題 Arbovirus research in Vietnam
3. 学会等名 グローバルヘルス合同大会2023（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関