

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790451

研究課題名(和文) アレナウイルスの細胞侵入機構の解析と新規受容体の探索

研究課題名(英文) Analyses of arenavirus cell entry mechanisms including novel entry factors

研究代表者

谷 英樹 (TANI, Hideki)

国立感染症研究所・ウイルス第一部・主任研究官

研究者番号：20397706

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000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、ワクチン及び有効な治療法の開発が急務である。しかしながら、出血熱ウイルスの多くはバイオセーフティーレベル4病原体に指定されているために、本国はもとより世界的にも研究への取り組みが難しい状況にあり、病態やウイルスの生活環に関する知見は乏しい。本研究では、特にアレナウイルス感染症の治療・予防法の確立のために、ラッサウイルスをはじめ各種南米アレナウイルスおよび新興アレナウイルスのエンベロープ蛋白質(GP)を外套したシュードタイプVSVを作製し、GPの性状解析および細胞指向性、細胞侵入機構の解析を行った。

研究成果の概要(英文)：Several arenaviruses are known to cause viral hemorrhagic fever (VHF) in Sub-Saharan Africa and South America, where VHF is a major public health and medical concern. The biosafety level four categorization of these arenaviruses restricts their use and has impeded biological studies, including therapeutic drug and/or vaccine development. Due to difficulties associated with handling live viruses, pseudotype viruses, which transiently bear arenavirus envelope proteins based on vesicular stomatitis virus (VSV), have been developed as surrogate virus systems. In this study, we developed a pseudotype VSV bearing each envelope protein of various species of arenaviruses, including the newly identified Lujo virus (LUJV) and Chapare virus. We found that LUJpv utilizes neither DG nor hTfR1 as receptor and unique characteristics of LUJV glycoprotein in membrane fusion and cell entry. Proper exclusion of cholesterol or some kinds of lipids may play important roles in the LUJpv cell entry.

研究分野：医学ウイルス学

キーワード：細胞侵入機構 アレナウイルス ルジョウイルス NPC-1

1. 研究開始当初の背景

アレナウイルス種やフィロウイルス種などが起因となる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、ワクチン及び有効な治療法の開発が急務である。しかしながら、出血熱ウイルスの多くはバイオセーフティーレベル4病原体に指定されているために、本国はもとより世界的にも研究への取り組みが難しい状況にあり、病態やウイルスの生活環に関する知見は乏しい。

2. 研究の目的

本研究では、特にアレナウイルス感染症の治療・予防法の確立のために、ラッサウイルスをはじめ各種南米アレナウイルスおよび新興アレナウイルスのエンベロープ蛋白質(GP)を外套したシュードタイプ VSV を作製し、GP の性状解析および細胞指向性、細胞侵入機構の解析を行う。

3. 研究の方法

各種アレナウイルスの GP の発現および糖鎖修飾等を共通に検出するために、タグを付加した発現プラスミドを作製し、これらを用いてシュードタイプウイルスを作製する。

シュードタイプウイルスを用いて、様々な哺乳動物細胞への感染感受性、pH 依存的な細胞侵入機構についての解析を行う。また GP の発現プラスミドを用いて、細胞融合活性を評価する。

さらに、シュードタイプウイルスを用いて、プロテインキナーゼ阻害剤ライブラリーから感染を指標としたスクリーニングを行い、細胞侵入の際に関連する因子を同定する。

4. 研究成果

様々なアレナウイルス GP を外套したシュードタイプウイルスを精製・濃縮し、タグに対する抗体でウエスタンブロット法を行った結果、どの種のアレナウイルス GP においてもハイマンノース型の糖鎖修飾を受けていることが明らかとなった。更に、一部のリンパ球系由来の細胞を除き、様々な哺乳動物細胞へ感染でき、また pH 依存的な細胞侵入も確認することができた。

細胞融合活性においては、新興アレナウイルスであるルジョウイルスは、他のアレナウイルス種と異なり、細胞表面に GP が発現しているにも関わらず、低 pH による細胞融合活性は認められず、最近明らかとなったエボラウイルスやラッサウイルスと同様、エンドソーム内での膜融合に必須の分子の存在が考えられた。そこで、膜融合に関連すると思われるコレステロールやリン脂質のエンドソーム内からの排除を阻害する薬剤で細胞を処理すると、ルジョウイルスおよびエボラウイルスの GP を外套したシュードタイプウイルスの感染性が低下した。またエボラウイルスの侵入受容体として報告されたニーマンピック C1 (NPC1) のノックアウト細胞で

も、両シュードタイプウイルスの感染性が低下した。ルジョウイルスと NPC-1 の直接的な関与は不明であるが、NPC-1 および脂質の蓄積が細胞侵入の際に何らかの作用を及ぼしていることが明らかとなった。

またプロテインキナーゼ阻害剤ライブラリーを用いて各種シュードタイプウイルスの細胞侵入に関与する分子の探索を行った結果、いくつかの阻害剤でラッサウイルス GP 外套シュードタイプウイルス特異的な感染阻害が認められ、この阻害剤は細胞内の主に、血小板由来成長因子受容体 (PDGFR) をターゲットとしており、ラッサウイルスの細胞侵入の際の何らかの関与因子であ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 11 件)

1. Shuetsu Fukushi, Hideki Tani, Tomoki Yoshikawa, Masayuki Saijo, and Shigeru Morikawa. Serological assays based on recombinant viral proteins for the diagnosis of arenavirus hemorrhagic fevers. *Viruses*. (2012). 4: 2097-2114.
2. Fumi Kobayashi, Shuhei Yamada, Shuhei Taguwa, Chikako Kataoka, Satomi Naito, Yoshiki Hama, Hideki Tani, Yoshiharu Matsuura and Kazuyuki Sugahara. Specific interaction of the envelope glycoproteins E1 and E2 with liver heparin sulfate involved in the tissue tropism infection by hepatitis C virus. *Glycoconjugate Journal*. (2012). 29: 211-220.
3. Hideki Tani, Koichiro Iha, Masayuki Shimojima, Shuetsu Fukushi, Satoshi Taniguchi, Tomoki Yoshikawa, Yoshihiro Kawaoka, Naoe Nakasone, Haruaki Ninomiya, Masayuki Saijo, and Shigeru Morikawa. Analysis of Lujo virus cell entry using pseudotype vesicular stomatitis virus. *Journal of Virology*. (2014). 88: 7317-7330.
4. David N. Bukbuk, Shuetsu Fukushi, Hideki Tani, Tomoki Yoshikawa, Satoshi Taniguchi, Koichiro Iha, Aiko Fukuma, Masayuki Shimojima, Shigeru Morikawa, Masayuki Saijo, F. Kasolo, S.S. Baba. Development and validation of serological assays for viral hemorrhagic fevers and determination of the prevalence of Rift Valley fever in Borno State, Nigeria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine & Hygiene*. (Trans R Soc Trop Med Hyg.) (2014). 108: 768-773.
5. Masayuki Shimojima, Shuetsu Fukushi, Hideki Tani, Tomoki Yoshikawa, Aiko Fukuma, Satoshi Taniguchi, Yuto Suda, Ken

- Maeda, Toru Takahashi, Shigeru Morikawa, Masayuki Saijo. Effects of ribavirin on severe Fever with thrombocytopenia syndrome virus in vitro. *Japanese Journal of Infectious Diseases*. (2014). 67: 423-427.
6. Hideki Tani. Analyses of entry mechanisms of novel emerging viruses using pseudotype VSV system. *Tropical Medicine and Health*. (2014). 42: 71-82.
 7. 谷 英樹、福士秀悦、吉河智城、西條政幸、森川 茂：アレナウイルス感染症 ウィルス(2013). 62: 229-238.
 8. 下島昌幸、福士秀悦、谷 英樹、吉河智城、森川 茂、西條政幸：日本における重症熱性血小板減少症候群、ウィルス(2013). 63: 7-12.
 9. 谷 英樹、西條政幸：重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) 検査と技術 (2013). 41: 1164-1167.
 10. 谷 英樹：重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) 臨床と微生物 (2014). 41: 45-49.
 11. 谷 英樹、西條政幸：重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) 血液フロンティア (2014). 24: 80-83.
- 〔学会発表〕(計 15 件)
1. Hideki Tani, Koichiro Iha, Shuetsu Fukushi, Satoshi Taniguchi, Tomoki Yoshikawa, Masayuki Saijo, and Shigeru Morikawa : Characterization of pseudotype VSV possessing New and Old World arenavirus envelope proteins. The 11th Awaji International Forum on Infection and Immunity. Japan, 2012.
 2. Kie Yamamoto, Koichiro Iha, Christine Bruce, Stuart D. Dowall, Satoshi Taniguchi, Shuetsu Fukushi, Hideki Tani, Tomoki Yoshikawa, Yoshiyuki Ishii, Shigeru Kyuwa, Roger Hewson, Masayuki Saijo, and Shigeru Morikawa : Serological assays based on recombinant viral proteins for the diagnosis of viral hemorrhagic fevers caused by arenaviruses. XVIII International Congress for Tropical Medicine and Malaria. Rio de Janeiro, Brazil, September 23-27, 2012.
 3. Hideki Tani, Koichiro Iha, Shuetsu Fukushi, Satoshi Taniguchi, Tomoki Yoshikawa, Masayuki Saijo, and Shigeru Morikawa : Analysis of cell entry of New and Old World arenaviruses using pseudotyped viruses bearing their envelope proteins. XVIII International Congress for Tropical Medicine and Malaria. Rio de Janeiro, Brazil, September 23-27, 2012.
 4. Hideki Tani, Masayuki Shimojima, Shuetsu Fukushi, Tomoki Yoshikawa, Masayuki Saijo, and Shigeru Morikawa: Characterization of New and Old World arenavirus glycoprotein-mediated entry. 15th International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim. Viral Diseases Panel Meeting. Shingapore, March 11-13, 2013.
 5. Hideki Tani, Masayuki Shimojima, Shuetsu Fukushi, Tomoki Yoshikawa, Masayuki Saijo, and Shigeru Morikawa: Analysis of cell entry of a novel arenavirus, Lujo virus, using pseudotype VSV. XV International Conference on Negative Strand Viruses. Granada, Spain, June 16-21, 2013.
 6. Hideki Tani, Masayuki Shimojima, Shuetsu Fukushi, Tomoki Yoshikawa, Aiko Fukuma, Satoshi Taniguchi, Momoko Ogata, Shigeru Morikawa, Masayuki Saijo: Analyses of cell entry of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus using pseudotype vesicular stomatitis virus system. XVI International Congress of Virology. Montreal, Canada, July 27-August 1, 2014.
 7. Hideki Tani: Entry and Fusion Mechanisms of SFTSV. 17th International Conference on Emerging Infectious Diseases (EID). Taiwan, January 28-29, 2015.
 8. 谷 英樹、伊波興一朗、谷口 怜、吉河智城、福士秀悦、西條政幸、森川 茂：シュードタイプ VSV を用いたルジョウィルスの細胞侵入機構の解析 第 60 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2012 年 11 月
 9. 須田遊人、谷 英樹、下島昌幸、堀本泰介、西條政幸：クリミア・コンゴ出血熱ウィルスのシュードタイプウィルスを用いた中和抗体価測定系の構築 第 156 回日本獣医学会学術集会、岐阜、2013 年 9 月
 10. 須田遊人、谷 英樹、西條政幸、堀本泰介、下島昌幸：シュードタイプウィルスのクリミア・コンゴ出血熱ウィルス中和抗体価測定への応用 第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013 年 11 月
 11. 福士秀悦、谷 英樹、吉河智城、谷口 怜、福間藍子、緒方もも子、下島昌幸、森川茂、西條政幸：ナイジェリアにおけるリフトバレー熱の血清疫学 第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013 年 11 月
 12. 谷 英樹、下島昌幸、福間藍子、谷口 怜、吉河智城、福士秀悦、森川 茂、前田 健、高橋 徹、西條政幸：重症熱性血小板減少症候群ウィルス GP を外套したシュードタイプ VSV の作製 第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013 年 11 月
 13. 須田遊人、谷 英樹、西條政幸、堀本泰介、下島昌幸：シュードタイプウィルスを利用したクリミア・コンゴ出血熱ウィルスの株間での中和反応の比較 第 157 回日本獣医学会学術集会、札幌、2014 年 9 月
 14. 谷 英樹、谷口 怜、福間藍子、福士秀悦、森川 茂、下島昌幸、西條政幸：重

症熱性血小板減少症候群ウイルス GP の
細胞融合能と 25-hydroxycholesterol による
感染阻害効果 第 62 回日本ウイルス
学会学術集会、横浜、2014 年 11 月

15. 須田遊人、谷 英樹、西條政幸、堀本泰
介、下島昌幸：クリミア・コンゴ出血熱
ウイルスの株間でのシュードタイプウイ
ルスを利用した抗体への反応性の比較
第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、
2014 年 11 月

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷 英樹 (TANI, Hideki)

国立感染症研究所・ウイルス第一部・主任研
究官

研究者番号：20397706

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：