

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：82603

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670222

研究課題名(和文) ウイルス受容体同定法の新展開

研究課題名(英文) Further improvement of virus receptor identification system

研究代表者

下島 昌幸 (Shimajima, Masayuki)

国立感染症研究所・その他部局等・室長

研究者番号：10422411

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：これまでウイルス受容体を効率良く同定する方法の確立と改良を行ってきた。レトロあるいはレンチウイルスのシュドタイプが出来ないウイルスには応用できないという短所の克服に取り組んだ。大切なことは細胞に傷害を与えないウイルスを用いることである。VSVやJEVをベースに実験を開始したが効率の良い実験系を構築できなかった。そこで低い細胞傷害性で知られるSFTSウイルスを用いたところ、膜蛋白質fCD2遺伝子をSFTSウイルスのMセグメントから発現させることが出来た。SFTSウイルスのリバースジェネティクス法は確立されているので、レポーターを安定して発現させるウイルスの作製が今後は必要である。

研究成果の概要(英文)：I have established and improved experimental system based on expression cloning to identify virus receptors efficiently. The present project is to overcome a disadvantage of the system that the systems are inapplicable to viruses whose glycoproteins cannot work as envelope proteins of retro- or lentivirus vectors. Important in my system is use of viruses which don't give infected cells damage. I failed to overcome the disadvantage with VSV and JEV. However, expression of a reporter fCD2 could be done with M segment of SFTS virus being known to show no/low cell damage. Reverse genetics for SFTS virus have been reported, therefore, a next step is to prepare recombinant SFTS virus stably expressing a reporter in a future project.

研究分野：ウイルス学

キーワード：ウイルス受容体 シュドタイプ 細胞傷害

1. 研究開始当初の背景

細胞へウイルスが感染するには、ウイルスが細胞表面へ吸着する必要があり、その際用いられる細胞側の分子をウイルス受容体と呼んでいる。ウイルス受容体はウイルスによって異なり、その分子が何であるかを同定することはウイルスの感染宿主域や臓器指向性・細胞指向性の理解に役立つ。

代表者はこれまで抗体認識分子を同定する高効率の発現クローニング法を開発し、この方法をウイルス受容体の同定に応用することで複数のウイルスの受容体同定が可能であることを示してきた。ウイルスと受容体との結合力が弱い場合には、レトロあるいはレンチウイルスのシュードタイプを用いることで受容体同定が可能であることも示した。

しかし、ウイルスとウイルス受容体との結合力が弱く、かつレトロあるいはレンチウイルスのシュードタイプを用いることが出来ないウイルスには応用できず、受容体同定は行えなかった。例えばフラビウイルス科の日本脳炎ウイルス JEV やブニヤウイルス科のクリミア・コンゴ出血熱ウイルス CCHFV がそうであった。

2. 研究の目的

代表者が開発した高効率の発現クローニング法に基づくウイルス受容体同定法を更に発展させるため、JEV や CCHFV にも応用できるように改良を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

水疱性口炎ウイルスや日本脳炎ウイルスなど、シュードタイプのベクターとして用いられればウイルス受容体同定に応用できると考えられる材料を用い、実験系の構築を行なった。重要なポイントはウイルスベクターが感染しても細胞に傷害を与えないことと、レポーターを長期にわたり発現し続けさせることである。

4. 研究成果

まず水疱性口炎ウイルス vesicular stomatitis virus (VSV) をベクターとすることを考えた。VSV は JEV や CCHFV の糖蛋白質をエンベロープ蛋白質として用いることができ、昆虫細胞であれば少なくとも3週間のあいだレポーターを発現させながら細胞増殖を継続可能であることを確認済みであるからである。この場合には細胞由来の cDNA library も昆虫細胞に発現させる必要があった。VSV を用いての cDNA library の発現を検討したが、 10^6 independent レベルのクローンを発現させることは困難であることが判明し、VSV をベクターに用いての受容体同定法の改良は断念した。

次に日本脳炎ウイルス Japanese encephalitis virus (JEV) をベクターとすることを考えた。JEV のゲノム RNA より cDNA を

得てクローニングした。糖蛋白質である prM-E 蛋白質コード領域を蛋白質発現用プラスミド pCAGGS にクローニングし、蛋白質の発現を間接蛍光抗体法で確認した。prM-E 蛋白質コード領域以外の部分は SP6 プロモーター下にクローニングし、prM-E 蛋白質コード領域にはレポーターとして緑色蛍光蛋白質 GFP あるいは膜蛋白質 fCD2 の cDNA をクローニングした。SP6 プロモーターより RNA を in vitro で合成させ、目標とする塩基長を持つ RNA を得たが、細胞に導入してもレポーター蛋白質の発現が認められなかった。導入細胞種や導入試薬を検討、配列の再確認を行ったが問題は見いだせず、レポーターが発現しない原因を突き止められなかった。

次に重症熱性血小板減少症候群ウイルス severe fever with thrombocytopenia syndrome virus (SFTSV) をベクターとすることを考えた。SFTSV は感染しても細胞傷害性が低いウイルスである。M segment (本来は糖蛋白質をコード) の末端領域に fCD2 の cDNA を連結し、これを polI プロモーター下にクローニングした。このプラスミドを SFTSV の N 蛋白質および L 蛋白質の発現プラスミドとともに細胞に導入したところ、間接蛍光抗体法で fCD2 蛋白質の発現を確認することが出来た。

ベクターとして検討した3つのウイルス (VSV, JEV, SFTSV) のうち、SFTSV ではウイルスベクター (様なもの) からのレポーターの発現を確認できた。SFTSV ではリバースジェネティクス法が既に確立されていること、また糖蛋白質発現プラスミドは準備済みであることから、SFTSV の糖蛋白質を介して細胞に感染し、その感染細胞に膜蛋白質 fCD2 を発現する組換え SFTSV の作製は可能であると考えられる。糖蛋白質遺伝子を欠くことから多段階増殖はせず、もともと細胞傷害性が低いことから、さらに傷害性は無いものと考えられる。この組換えウイルスと代表者が開発してきたウイルス受容体同定法を組み合わせることにより、SFTSV のウイルス受容体を効率よく同定できるものと考えられる。更に、SFTSV と近縁で受容体同定が未だ行われていない Heartland virus, Rift Valley fever virus, CCHFV の受容体同定も SFTSV ベースのシュードタイプを用いることで可能であろう。

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 10 件)

1. Shimajima M, Fukushi S, Tani H, Yoshikawa T, Fukuma A, Taniguchi S, Suda Y, Maeda K, Takahashi T, Morikawa S, Saijo M. Effects of ribavirin on severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in

- vitro. *Jpn J Infect Dis.* 2014;67(6):423-7.
2. Shimojima M, Takenouchi A, Shimoda H, Kimura N, Maeda K. Distinct usage of three C-type lectins by Japanese encephalitis virus: DC-SIGN, DC-SIGNR, and LSECtin. *Arch Virol.* 2014 Aug;159(8):2023-31.
 3. Yoshikawa T, Shimojima M, Fukushi S, Tani H, Fukuma A, Taniguchi S, Singh H, Suda Y, Shirabe K, Toda S, Shimazu Y, Nomachi T, Gokuden M, Morimitsu T, Ando K, Yoshikawa A, Kan M, Uramoto M, Osako H, Kida K, Takimoto H, Kitamoto H, Terasoma F, Honda A, Maeda K, Takahashi T, Yamagishi T, Oishi K, Morikawa S, Saijo M. Phylogenetic and Geographic Relationships of Severe Fever With Thrombocytopenia Syndrome Virus in China, South Korea, and Japan. *J Infect Dis.* 2015 Mar 11. pii: jiv144. [Epub ahead of print]
 4. 下島昌幸、西條政幸：中国での重症熱性血小板減少症候群の発生状況 (IASR Vol. 35 p. 33-34: 2014年2月号)
 5. 下島昌幸：重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) について、高知県医師会医学雑誌 第19巻 第一号 3-12, 2014
 6. 下島昌幸：重症熱性血小板減少症候群、感染症内科 (科学評論社) 2(2):165-169, 2014
 7. 下島昌幸、西條政幸：ダニ媒介性新興感染症 SFTS、実験医学 特集 感染症 31:3047-3057, 2013
 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、ウイルス 63: 7-12, 2013.
 9. 下島昌幸、西條政幸：日本における重症熱性血小板減少症候群 SFTS、感染 炎症免疫 43: 63-65, 2013.
 10. 下島昌幸、西條政幸：ダニ媒介性重症熱性血小板減少症候群 について、ファルマシア 49: 1085-1089, 2013.
- [学会発表](計 42 件)
1. Tomoki Yoshikawa, Shuetsu Fukushi, Hideki Tani, Aiko Fukuma, Momoko Ogata, Masayuki Saijo, Masayuki Shimojima. Phylogenetic analyses of SFTSVs in Japanese SFTS patients. VIR-PW2031, IUMS2014, Montreal, CANADA, 27th July to 1st August, 2014
 2. Shigeru Morikawa, Masanobu Kimura, Shuetsu Fukushi, Aiko Fukuma, Yoshihiro Kaku, Eunsil Park, Hideki Tani, Tomoyuki Yoshikawa, Koichi Imaoka, Masayuki Shimojima, Masayuki Saijo, Ken Maeda. Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in domestic and wild animals in Japan. VIR-PW2033, IUMS2014, Montreal, CANADA, 27th July to 1st August, 2014
 3. Aiko Fukuma, Shuetsu Fukushi, Hideki Tani, Tomoki Yoshikawa, Satoshi Taniguchi, Momoko Ogata, Masayuki Shimojima, Shigeru Morikawa, Masayuki Saijo. Development of IFA and ELISA to detect antibodies against SFTSV. VIR-PW2035, IUMS2014, Montreal, CANADA, 27th July to 1st August, 2014
 4. Yuto Suda, Hideki Tani, Masayuki Saijo, Taisuke Horimoto, Masayuki Shimojima. Use of pseudotyped vesicular stomatitis virus for measurement of neutralizing antibodies to Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. VIR-PW2039, IUMS2014, Montreal, CANADA, 27th July to 1st August, 2014
 5. 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. VIR-PW2032, IUMS2014, Montreal, CANADA, 27th July to 1st August, 2014
 6. Akihiko Uda, Hiroki Kawabata, Shuetsu Fukushi, Yoshiharu Kaku, Masayuki Shimojima, Shuji Ando, Ken Maeda, Hiromi Fujita, Masayuki Saijo, Shigeru Morikawa, Tomoyuki Yoshikawa, Aya Niikura, Sawabe Kyoko. Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in ticks in Japan. VIR-PW2034, IUMS2014, Montreal, CANADA, 27th July to 1st August, 2014
 7. 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.
 8. Masayuki Shimojima, Toru Takahashi, Shuetsu Fukushi, Hideki Tani, Tomoki Yoshikawa, Tetsuya Mizutani, Shigeru Morikawa, Masayuki Saijo, Ken Maeda: Severe fever with thrombocytopenia syndrome in Japan. XV International Conference on Negative Strand Viruses. Granada, Spain, June 16-21, 2013.
 9. 西條政幸、吉河智城、福士秀悦、谷英樹、福間藍子、谷口怜、須田遊人、Harpal Singh、前田健、高橋徹、森川茂、下島昌幸：重症熱性血小板減少症候群ウイルス

- の分子系統学的特徴とその地理的分布、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、2014 年 11 月、横浜
10. 福士秀悦、永田典代、岩田奈織子、谷英樹、吉河智城、谷口怜、福間藍子、下島昌幸、西條政幸：若齢および高齢マウスにおける重症熱性血小板減少症候群ウイルスの感染感受性の解析、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、2014 年 11 月、横浜
 11. 下島昌幸、福士秀悦、谷英樹、谷口怜、西條政幸：プラークを形成する SFTS ウイルスによる中和抗体価測定、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、2014 年 11 月、横浜
 12. 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 25hydroxycholesterol による感染阻害効果、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、2014 年 11 月、横浜
 13. 川岸崇裕、金井祐太、谷英樹、下島昌幸、西條政幸、松浦善治、小林剛：高病原性コウモリ由来レオウイルスのリバースジェネティクス系の確立、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、2014 年 11 月、横浜
 14. 谷口怜、堀本泰介、Joseph Masangkay、Puentespina Roberto Jr.、大松勉、永田典代、江川和孝、福間藍子、Harpal Singh、福士秀悦、谷英樹、吉河智城、下島昌幸、吉川泰弘、西條政幸、久和茂、前田健：フィリピンのコウモリからのプテロパインオルソレオウイルスの分離、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、2014 年 11 月、横浜
 15. 吉河智城、福士秀悦、谷英樹、福間藍子、谷口怜、須田遊人、Harpal Singh、江川和孝、下島昌幸、森川茂、西條政幸：ワクシニアウイルス LC16m8 株を土台とした組換えワクシニアウイルス作出システムの確立、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、2014 年 11 月、横浜
 16. 山田辰太郎、下島昌幸、成田亮、大石真也、高橋清大、加藤博己、西條政幸、藤田尚志：ダニ媒介性ウイルスの非構造タンパク質による自然免疫抑制機構（ポスター）、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、2014 年 11 月、横浜
 17. 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（ポスター）、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、2014 年 11 月、横浜
 18. 福間藍子、福士秀悦、吉河智城、谷英樹、谷口怜、鈴木忠樹、佐藤由子、長谷川秀樹、下島昌幸、西條政幸：SFTS ウイルスの核蛋白質に対するモノクローナル抗体の作製と抗原検出 ELISA への応用（ポスター）、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、2014 年 11 月、横浜
 19. 鎌田 龍星、竹之内 惇、木村 菜穂、寺田 豊、野口 慧多、白藤 浩明、下島昌幸、下田 宙、前田 健：日本脳炎ウイルスの細胞馴化に伴う遺伝子変異について、第 157 回日本獣医学会学術集会 2014 年 9 月、北大
 20. 金井 祐太、川岸 崇裕、下島昌幸、西條 政幸、松浦 善治、小林 剛：Fusogenic reovirus がコードする FAST 蛋白質の機能解析、第 157 回日本獣医学会学術集会 2014 年 9 月、北大
 21. 谷口 怜、堀本 泰介、Masangkay Joseph、Puentespina Roberto Jr.、大松 勉、永田 典代、江川 和孝、福士 秀悦、谷英樹、下島昌幸、吉川 泰弘、西條 政幸、久和 茂、前田 健：フィリピンのコウモリからのネルソンベイルグループに分類されるオルソレオウイルスの分離、第 157 回日本獣医学会学術集会 2014 年 9 月、北大
 22. 須田 遊人、谷 英樹、西條 政幸、堀本 泰介、下島昌幸：シュードタイプウイルスを利用したクリミア・コンゴ出血熱ウイ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 2014 年 9 月、北大
 23. 川岸 崇裕、金井 祐太、谷 英樹、下島昌幸、西條 政幸、松浦 善治、小林 剛：高病原性コウモリ由来レオウイルスの遺伝子操作系の確立、第 157 回日本獣医学会学術集会 2014 年 9 月、北大
 24. 塩田智之、李天成、吉崎佐矢香、西村順裕、清水博之、下島昌幸、西條政幸、脇田隆字、石井孝司：E 型肝炎ウイルス感染性規定因子の探索に関する研究、第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月
 25. 吉河智城、福士秀悦、谷英樹、宇田晶彦、谷口怜、福間藍子、前田健、高橋徹、森川茂、下島昌幸、西條政幸：重症熱性血小板減少症候群（SFTS）の確定診断に使用されているコンベンショナル PCR の評価、及びリアルタイム定量 PCR との比較、第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月
 26. 福間藍子、福士秀悦、谷英樹、吉河智城、谷口怜、下島昌幸、森川茂、前田健、西條政幸：重症熱性血小板減少症候群（SFTS）の血清学的診断法の開発、第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月
 27. 長谷川秀樹、亀井敏昭、高橋徹、鈴木忠樹、片野晴隆、中島典子、福士秀悦、下島昌幸、前田健、水谷哲也、森川茂、西條政幸：日本国内で発生した重症熱性血小板減少症候群の 1 剖検例、第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月
 28. 西條政幸、高橋徹、前田健、水谷哲也、大松勉、吉河智城、谷英樹、福士秀悦、

- 下島昌幸、福間藍子、緒方もも子、鈴木忠樹、中島典子、片野晴隆、永田典代、長谷川秀樹、山岸拓也、倉根一郎、森川茂：後方視的に重症熱性血小板減少症候群と診断された11名のウイルス学的・臨床的・疫学的研究、第61回日本ウイルス学会学術集会、2013年11月
29. 森川茂、木村昌伸、福士秀悦、福間藍子、加来義浩、朴ウンシル、谷英樹、吉河智城、井上智、今岡浩一、下島昌幸、西條政幸、前田健：SFTSウイルス抗体陽性動物の調査、第61回日本ウイルス学会学術集会、2013年11月
30. 谷口怜、福士秀悦、Masangkay Joseph、渡辺俊平、大松勉、下田宙、前田健、福間藍子、吉河智城、谷英樹、下島昌幸、西條政幸、明石博臣、吉川泰弘、久和茂、森川茂：フィリピンのコウモリからの重症熱性血小板減少症候群ウイルスに対する抗体の検出、第61回日本ウイルス学会学術集会、2013年11月
31. 宇田晶彦、福士秀悦、加来義浩、吉河智城、下島昌幸、新倉綾、井上智、安藤秀二、前田健、西條政幸、森川茂：マダニからのSFTSウイルス遺伝子の検出、第61回日本ウイルス学会学術集会、2013年11月
32. 下島昌幸、福士秀悦、谷英樹、吉河智城、福間藍子、谷口怜、前田健、高橋徹、西條政幸：重症熱性血小板減少症候群ウイルスに対するribavirinのin vitro増殖抑制効果、第61回日本ウイルス学会学術集会、2013年11月
33. 須田遊人、谷英樹、西條政幸、堀本泰介、下島昌幸：シュードタイプウイルスのクリミア・コンゴ出血熱ウイ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、2013年11月
34. 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、2013年11月
35. 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イルスGPを外殻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、2013年11月
36. 高橋徹、前田健、亀井敏昭、水谷哲也、下島昌幸、福士秀悦、谷英樹、吉河智城、森川茂、長谷川秀樹、中島典子、鈴木忠樹、永田典代、片野晴隆、山岸拓也、大石和徳、西條政幸：重症熱性血小板減少症候群(SFTS)の日本における初症例、第61回日本ウイルス学会学術集会、2013年11月
37. 前田健、高橋徹、奥田優、水谷哲也、山岸拓也、森川茂、下島昌幸、西條政幸：重症熱性血小板減少症候群(SFTS)ウイ

- ルス分離・同定、第156回日本獣医学会学術集会、2013年9月
38. 森川茂、木村昌伸、福士秀悦、加来義浩、朴ウンシル、鈴木道雄、井上智、今岡浩一、柳井徳磨、下島昌幸、西條政幸、前田健：動物のSFTSウイルス抗体調査、第156回日本獣医学会学術集会、2013年9月
39. 谷口怜、福士秀悦、Joseph Masangkay、渡辺俊平、大松勉、下田宙、前田健、下島昌幸、西條政幸、明石博臣、吉川泰弘、久和茂、森川茂：フィリピンのオオコウモリからのSFTSウイルスと交差する抗体の検出、第156回日本獣医学会学術集会、2013年9月
40. 宇田晶彦、福士秀悦、加来義浩、吉河智城、下島昌幸、新倉綾、安藤秀二、川端寛樹、高野愛、前田健、藤田博巳、沢邊京子、西條政幸、森川茂：マダニからのSFTSウイルス遺伝子の検出、第156回日本獣医学会学術集会、2013年9月
41. 須田遊人、谷英樹、下島昌幸、堀本泰介、西條政幸：クリミア・コンゴ出血熱ウイルスのシュードタイプ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、2013年9月
42. 竹之内惇、下田宙、前田健、下島昌幸：日本脳炎ウイルス感染におけるDC-SIGNとDC-SIGNRのレセプター機能の比較、第156回日本獣医学会学術集会、2013年9月

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織
(1)研究代表者

下島昌幸 (SHIMOJIMA, Masayuki)
国立感染症研究所・ウイルス第一部・室長
研究者番号：10422411

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：