

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08864

研究課題名(和文) クリミア・コンゴ出血熱ウイルスモデル・ハザラウイルスを使用した増殖機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of Hazara virus growth mechanism as a surrogate model for Crimean-Congo hemorrhagic fever virus

研究代表者

西尾 真智子 (Nishio, Machiko)

和歌山県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：70156040

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)：ハザラウイルス(HAZV)はクリミア・コンゴ出血熱ウイルス(CCHFV)に非常に近縁でありながら、ヒトに病気を起こさず、代用モデルとして非常に有用である。まずウイルス蛋白の機能を調べるために必要なモノクローナル抗体を作製した。HAZV感染細胞では細胞傷害性が起こるが、N蛋白にはそれを阻害する機能がある事が明らかになった。また、ウイルスの病原性を解析するためのin vivoの系をして発育鶏卵を使う方法を確立した。L蛋白のポリメラーゼ活性を評価する方法として、ミニゲノムの系を構築した。これにより、ゲノム末端のプロモータ活性を解析する事ができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CCHFVは、致死性の高い人獣共通感染症の1つであるが、その危険性ゆえにあまり研究が進んでいない。HAZVの遺伝子の多くの部分はCCHFVと一致していることから、代用モデルとして非常に有用であると考えられる。HAZVを使って各蛋白の機能など基本的情報を得る事により、CCHFVの増殖・病原性の解明し、感染予防や効果的な治療法を確立することにつながる。

研究成果の概要(英文)：Hazara virus(HAZV) is closely related to Crimean-Congo hemorrhagic fever virus(CCHFV). However, it is non-pathogenic to humans, making it a suitable model to study CCHFV. We first generated monoclonal antibodies against HAZV. In this study, we found that HAZV infection caused apoptosis, and N protein prevented it. We also established an infection model system in vivo, using embryonate chicken eggs. Furthermore, we made a minigenome system for HAZV to study the contributions of promoter elements within the genomic ends for viral RNA synthesis.

研究分野：ウイルス学

キーワード：ハザラウイルス クリミア・コンゴ出血熱ウイルス モノクローナル抗体 発育鶏卵による病原性評価  
HAZVミニゲノム系

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、研究者個人に帰属されます。

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) クリミア・コンゴ出血熱は致死率の高い人獣共通感染症である

クリミア・コンゴ出血熱は、エボラ出血熱・マールブルク出血熱・ラッサ熱とともにウイルス性出血熱 4 疾患のひとつであり、1 類感染症に定められている。その原因となるクリミア・コンゴ出血熱ウイルス (CCHFV) はブニヤウイルス目ナイロウイルス科の 3 分節マイナス鎖 RNA ウイルスである。ダニによって媒介されるが、体液や血液を介したヒト-ヒト感染も見られる。その致死率は 40% にも達することから、人獣共通感染症として最も重要な疾患と言われている。これまで日本での発生はないが、中央アジアからアフリカにかけて頻発しており、我が国においても無視できない重大な問題である。

CCHFV はその危険性ゆえに、最高クラスであるバイオセーフティレベル 4 の施設を必要とし、限られた研究機関でしか扱うことができない。このような背景により、CCHFV に関する分子生物学的知見は RNA ウイルスの中でも非常に少なく、治療法も確立されていない。

### (2) ハザラウイルスはクリミア・コンゴ出血熱ウイルスのモデルとして最適である

ハザラウイルス (HAZV) は、ダニから分離されたウイルスで、知られている中で最も CCHFV に近縁である。HAZV は、実験用マウスに感染し、CCHFV に近い病態を示す。また、ヒトを含む様々な哺乳類由来培養細胞への感染が可能である。しかし、ヒトに対しては病原性を示すことがなく、バイオセーフティレベル 2 で安全に扱うことが可能である。すなわち、HAZV は安全に扱うことのできる CCHFV のモデルとして魅力的な研究対象であると考えられる。HAZV を用いて様々なウイルスの性質を明らかにすることで、CCHFV の病態を理解するための情報を得ることができると考えられる。

## 2. 研究の目的

CCHFV は、致死性の高い人獣共通感染症の 1 つであるが、その危険性ゆえにあまり研究が進んでいない。CCHFV 遺伝子には、宿主因子との相互作用を介することで病原性に関与すると思われる様々な特殊なドメインや、機能不明の遺伝子が存在する。これらがウイルス生活環に果たす役割を明らかにすることは病態解明において重要である。

HAZV は CCHFV に非常に近縁でありながら、ヒトに病気を起こさない。しかし、HAZV の遺伝子の多くの部分は CCHFV と一致していることから、代用モデルとして非常に有用であると考えられる。本研究の目的は CCHFV の増殖・病原性の解明し、感染予防や効果的な治療法を確立する為、HAZV を使って基本的情報を得る事である。

## 3. 研究の方法

### (1) HAZV 蛋白質に対するモノクローナル抗体の作製

2 種類の方法で、マウスに免疫することによって HAZV 蛋白質に対するモノクローナル抗体の作製を行う。1 つは、大腸菌で発現させた蛋白を精製し、免疫抗原とする方法。もう 1 つはマウス由来の L929 細胞にウイルスを感染させ免疫抗原とする方法。スクリーニングはウイルス感染細胞をプレートに固定し、ELISA 法により行う。

### (2) HAZV ミニゲノム系の構築

HAZV ゲノムの遺伝子領域をルシフェラーゼに変更したミニゲノムを作製する。N 及び L 蛋白を発現するヘルパープラスミドも作製する。ミニゲノムと N および L を同時に培養細胞に発現させ、ルシフェラーゼ活性を測定する。

### (3) 病原性の解析

1. in vivo の病原性評価として、4 日齢の発育鶏卵の黄卵嚢にウイルスを接種する。
2. ウイルス感染によるアポトーシスを DNA ラダーと caspase-Glo3/7 assay により評価する。

#### 4. 研究成果

##### (1) HAZV 蛋白質に対するモノクローナル抗体

大腸菌で発現させた N 蛋白を抗原とした作製方法により、N 蛋白に対するモノクローナル抗体を 5 つ得ることができた。4 つは N 末 94 アミノ酸を認識する抗体であり、残り 1 つは中央部の 187 から 296 アミノ酸の領域を認識する抗体であった。大腸菌で発現させた蛋白を抗原として作製したモノクローナル抗体はウエスタンブロット(WB)に適した抗体であった。WB の結果、HAZV の N は約 54 kDa の蛋白として検出された。興味深いことに、ヒトの感染細胞では約 30 kDa 程度の産物も同時に検出された。CCHFV の N はカスパーゼ活性により切断を受けるとの報告があるが、HAZV の N でも同様の現象が起こっていると考えられる。

ウイルス感染細胞を抗原とした作製方法では、数多くの抗体を得ることができたが、大部分が N 蛋白を認識する抗体であった。感染細胞内で最も多い N 蛋白に対する抗体が多く出来たと考えられる。感染細胞を抗原とした作製したモノクローナル抗体は大腸菌で発現させた蛋白を抗原として作製したモノクローナル抗体に比べ、免疫染色や免疫沈降に適した抗体であった。

##### (2) in vivo の病原性評価

これまで in vivo の病原性評価は免疫機能を欠損したマウスを使った系しか無かった ので、簡便に調べる方法を検討した。4 日齢の発育鶏卵の黄卵嚢にウイルスを接種すると、胎子に致死感染を示し、in vivo の病原性評価系の構築が出来た。この系を使用した結果、HAZV は、わずか 30PFU/egg で 100% の致死性を示すことが明らかになった (図 1A)。

##### (3) HAZV の細胞傷害性の解析

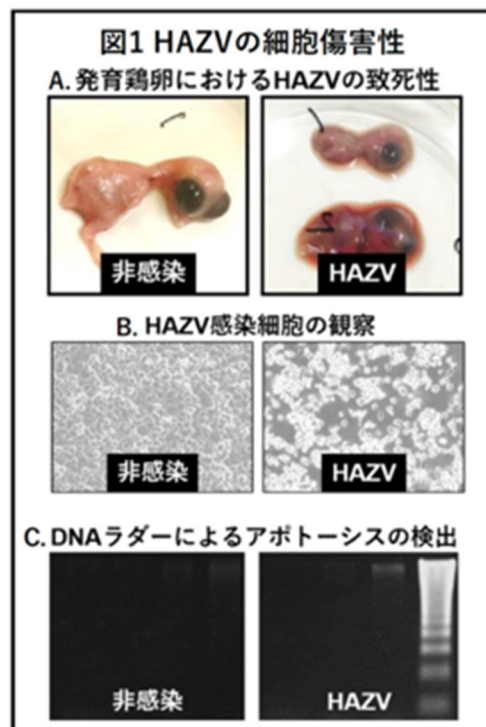
HAZV 感染細胞では、激しいアポトーシスが起こり、顕著な DNA ラダーが見られ、caspase-Glo 3/7 assay でも高い数値を示した (図 1B、C)。

HAZV の N 蛋白には DNA 分解酵素ドメイン・DNA メチル化活性ドメインと推測できる領域が存在する。N 蛋白の機能を分析する目的で、まず N 蛋白を恒常的に発現している細胞株を作製した。その細胞株に HAZV を感染させると DNA ラダーが見られなくなり、明らかに caspase-Glo 3/7 assay の値が下がった。

ウイルス増殖は感染後 36 時間でピークに達し、コントロール細胞ではその後、減少するが、N 蛋白恒常発現細胞株ではその減少が見られなかった。ピーク後、コントロール細胞では細胞が傷害されているのに対し、N 蛋白恒常発現細胞株では傷害性がほとんど見られないことが原因と考えられた。また、上清中のウイルスの安定性についても検討を行った。比較に用いたインフルエンザウイルスやヒトパラインフルエンザウイルス 2 型は 37 °C で 24 時間置いておいても感染能はほとんど落ちなかったが、HAZV では 28 °C でも少し減少が見られ、37 °C では 1/10000 以下に減少した。

##### (4) HAZV ミニゲノム系によるプロモータ解析

構築したミニゲノム系を用い、HAZV L のポリメラーゼ活性を評価した。S、M、L の非翻訳領域でルシフェラーゼ遺伝子を挟んだミニゲノムプラスミドを作製し、これを N 及び L 蛋白を発現するヘルパープラスミドと共に発現させた。ルシフェラーゼの値より、S、M、L のプロモータ活性を検討した結果、M > S > L の順となったが、L 分節のプロモータ活性は極めて低かった。L 分





## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計17件（うち査読付論文 17件 / うち国際共著 3件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Matsumoto Yusuke, Ohta Keisuke, Kolakofsky Daniel, Nishio Machiko	4. 巻 93
2. 論文標題 A Minigenome Study of Hazara Nairovirus Genomic Promoters	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 e02118-18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JVI.02118-18	査読の有無 有
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 該当する
1. 著者名 Ohta Keisuke, Matsumoto Yusuke, Yumine Natsuko, Nishio Machiko	4. 巻 524
2. 論文標題 The V protein of human parainfluenza virus type 2 promotes RhoA-induced filamentous actin formation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Virology	6. 最初と最後の頁 90-96
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.virol.2018.08.015	査読の有無 有
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 Ohta Keisuke, Matsumoto Yusuke, Nishio Machiko	4. 巻 99
2. 論文標題 Human parainfluenza virus type 2 V protein inhibits caspase-1	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of General Virology	6. 最初と最後の頁 501-511
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1099/jgv.0.001037	査読の有無 有
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 Ohta Keisuke, Matsumoto Yusuke, Nishio Machiko	4. 巻 207
2. 論文標題 Rab27a facilitates human parainfluenza virus type 2 growth by promoting cell surface transport of envelope proteins	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Medical Microbiology and Immunology	6. 最初と最後の頁 141-150
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00430-018-0536-3	査読の有無 有
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 Matsumoto Yusuke, Ohta Keisuke, Kolakofsky Daniel, Nishio Machiko	4. 巻 24
2. 論文標題 The control of paramyxovirus genome hexamer length and mRNA editing	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 RNA	6. 最初と最後の頁 461-467
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1261/rna.065243.117	査読の有無 有
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 該当する

1. 著者名 Ohtsuka Junpei, Matsumoto Yusuke, Ohta Keisuke, Fukumura Masayuki, Tsurudome Masato, Nosaka Tetsuya, Nishio Machiko	4. 巻 528
2. 論文標題 Nucleocytoplasmic shuttling of the human parainfluenza virus type 2 phosphoprotein	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Virology	6. 最初と最後の頁 54-63
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.virol.2018.12.005	査読の有無 有
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 Yumine Natsuko, Matsumoto Yusuke, Ohta Keisuke, Fukasawa Masayoshi, Nishio Machiko	4. 巻 531
2. 論文標題 Claudin-1 inhibits human parainfluenza virus type 2 dissemination	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Virology	6. 最初と最後の頁 93-99
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.virol.2019.01.031	査読の有無 有
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 Matsumoto Yusuke, Ohta Keisuke, Kolakofsky Daniel, Nishio Machiko	4. 巻 91
2. 論文標題 A point mutation in the RNA-binding domain of human parainfluenza virus type 2 nucleoprotein elicits abnormally enhanced polymerase activity.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Virol.	6. 最初と最後の頁 e02203-16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JVI.02203-16	査読の有無 有
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 該当する

1. 著者名 Ohta Keisuke, Matsumoto Yusuke, Yumine Natsuko, Nishio Machiko	4. 巻 206
2. 論文標題 Human parainfluenza virus type 2 V protein inhibits induction of tetherin	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Med Microbiol Immunol.	6. 最初と最後の頁 311 ~ 318
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00430-017-0508-z	査読の有無 有
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 Ohta Keisuke, Matsumoto Yusuke, Ito Morihiro, Nishio Machiko	4. 巻 206
2. 論文標題 Tetherin antagonism by V proteins is a common trait among the genus Rubulavirus	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Med Microbiol Immunol.	6. 最初と最後の頁 319 ~ 326
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00430-017-0509-y	査読の有無 有
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 Matsumoto Yusuke, Ohta Keisuke, Nishio Machiko	4. 巻 206
2. 論文標題 Human parainfluenza virus type 2 polymerase complex recognizes leader promoters of other species belonging to the genus Rubulavirus	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Med Microbiol Immunol.	6. 最初と最後の頁 441 ~ 446
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00430-017-0520-3	査読の有無 有
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 Tsurudome Masato, Ohtsuka Junpei, Ito Morihiro, Nishio Machiko, Nosaka Tetsuya	4. 巻 9
2. 論文標題 The Hemagglutinin-Neuraminidase (HN) Head Domain and the Fusion (F) Protein Stalk Domain of the Parainfluenza Viruses Affect the Specificity of the HN-F Interaction	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Front Microbiol.	6. 最初と最後の頁 Article391
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2018.00391	査読の有無 有
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 Matsumoto Yusuke, Ohta Keisuke, Nishio Machiko	4. 巻 163
2. 論文標題 Lethal infection of embryonated chicken eggs by Hazara virus, a model for Crimean-Congo hemorrhagic fever virus	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Archives of Virology	6. 最初と最後の頁 219 ~ 222
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00705-017-3580-1	査読の有無 有
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 Matsumoto Yusuke, Nouchi Takashi, Ohta Keisuke, Nishio Machiko	4. 巻 164
2. 論文標題 Regulation of Hazara virus growth through apoptosis inhibition by viral nucleoprotein	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Archives of Virology	6. 最初と最後の頁 1597 ~ 1607
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00705-019-04236-7	査読の有無 有
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 Matsumoto Yusuke, Ohta Keisuke, Nishio Machiko	4. 巻 164
2. 論文標題 Importance of tyrosine in the RNA-binding domain of human parainfluenza virus type 2 nucleoprotein for polymerase activity	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Archives of Virology	6. 最初と最後の頁 1851 ~ 1855
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00705-019-04240-x	査読の有無 有
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 Ohta Keisuke, Matsumoto Yusuke, Nishio Machiko	4. 巻 533
2. 論文標題 Profilin2 is required for filamentous actin formation induced by human parainfluenza virus type 2	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Virology	6. 最初と最後の頁 108 ~ 114
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.virol.2019.05.013	査読の有無 有
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 Ohta Keisuke, Matsumoto Yusuke, Nishio Machiko	4. 巻 165
2. 論文標題 Common and unique mechanisms of filamentous actin formation by viruses of the genus Orthorubulavirus	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Archives of Virology	6. 最初と最後の頁 799 ~ 807
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00705-020-04565-y	査読の有無 有
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 -

〔学会発表〕 計12件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Ohta Keisuke, Matsumoto Yusuke, Yumine Natsuko, Tsurudome Masato, Nishio Machiko
2. 発表標題 Human parainfluenza virus type 2 V protein induces filamentous actin formation.
3. 学会等名 17th International Conference of Negative Strand Viruses (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Matsumoto Yusuke, Ohta Keisuke, Nishio Machiko
2. 発表標題 Regulation of Hazara virus growth through apoptosis inhibition by viral nucleoprotein.
3. 学会等名 17th International Conference of Negative Strand Viruses (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tsurudome Masato, Nishio Machiko, Nosaka Tetsuya
2. 発表標題 The hemagglutinin-neuraminidase (HN) head domain and the fusion (F) protein stalk domain of the parainfluenza viruses affect the specificity of the HN-F interaction.
3. 学会等名 17th International Conference of Negative Strand Viruses (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Matsumoto Yusuke, Ohta Keisuke, Nishio Machiko
2. 発表標題 A stable panhandle structure in genomic promoter is required for Hazara virus polymerase activity.
3. 学会等名 第66回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ohta Keisuke, Matsumoto Yusuke, Tsurudome Masato, Nishio Machiko
2. 発表標題 Human parainfluenza virus type 2 promotes filamentous actin formation through the interaction of its V protein with profilin2.
3. 学会等名 第66回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nouchi Takashi, Matsumoto Yusuke, Ohta Keisuke, Nishio Machiko
2. 発表標題 A model for Crimean-Congo hemorrhagic fever virus: Hazara virus nucleocapsid protein inhibits apoptosis and facilitates viral growth.
3. 学会等名 第66回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Matsumoto Yusuke, Nouchi Takashi, Ohta Keisuke, Nishio Machiko
2. 発表標題 Regulation of viral growth through apoptosis inhibition by nucleoprotein of Hazara virus.
3. 学会等名 The 17th Awaji International Forum on Infection and Immunity. (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ohta Keisuke, Matsumoto Yusuke, Tsurudome Masato, Nishio Machiko
2. 発表標題 Human parainfluenza virus type 2 regulates actin cytoskeleton via RhoA activation
3. 学会等名 第65回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Matsumoto Yusuke, Ohta Keisuke, Nishio Machiko
2. 発表標題 Lethal infection of embryonated chicken eggs by Hazara virus: a surrogate model for Crimean-Congo hemorrhagic fever virus pathogenicity
3. 学会等名 第65回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Tsurudome Masato, Ito Morihiro, Nishio Machiko, Nosaka Tetusya
2. 発表標題 Specified amino acids at the dimer interface of the parainfluenza virus HN head domain are required for the virus-specific HN-F interaction
3. 学会等名 第65回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ohta Keisuke, Matsumoto Yusuke, Saka Naoki, Tsurudome Masato, Nishio Machiko
2. 発表標題 Human parainfluenza virus type 2 V protein inhibits Cavin3 degradation.
3. 学会等名 第67回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Matsumoto Yusuke, Ohta Keisuke, Saka Naoki, Nishio Machiko
2. 発表標題 Regulation of the "rule of six" of paramyxovirus genome by an amino acid in the nucleoprotein.
3. 学会等名 第67回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2019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
研究分担者	太田 圭介 (Ohta Keisuke)  (90625071)	和歌山県立医科大学・医学部・助教  (24701)	
研究分担者	松本 祐介 (Matsumoto Yusuke)  (00735912)	和歌山県立医科大学・医学部・助教  (24701)	