

令和 2 年 7 月 8 日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K18386

研究課題名(和文) Bas-Congo virusのウイルス学および人獣共通感染症の可能性検索

研究課題名(英文) Virological characters and zoonotic potential of Bas-Congo virus

研究代表者

朴 ウンシル(Park, Eunsil)

国立感染症研究所・獣医科学部・主任研究官

研究者番号：90750117

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：Bas-Congo virus(BASV)は出血熱患者から同定された新興ラブドウイルスである。本ウイルスは分離されていないため、BASVのG蛋白質を外殻したシュードタイプウイルス(BASVpv)を用いて、BASVのウイルス学的性状解析を実施した。その結果、1)様々な哺乳類由来細胞に感染し、宿主域が広いこと、2)G蛋白質を介して感染すること、3)Gタンパク質を発現させた細胞を低pH処理すると細胞融合が誘導されることが分かった。また、clathrin介在性感染を主体とする細胞と別経路を主体とする細胞があると考えられた。受容体検索の結果、BASVのGタンパク質と結合する細胞膜蛋白質が確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

BASVは遺伝子配列は全長の98%が患者血清中のウイルスRNAから決定されたが、ウイルスは分離されていない。現時点では、BASVpvが唯一ウイルスの感染を模倣できる系である。BASVpvを用いて得られた感染機構や受容体候補蛋白質候補などは感染防御法開発に資する。新興感染症が大流行する中で、ウイルスが分離されない感染症においてこのような性状解析は公衆衛生学的側面から意義がある。

研究成果の概要(英文)：Bas-Congo virus (BASV) is a novel rhabdovirus, detected from patients with viral hemorrhagic fever. Since BASV has not been isolated yet, BASV-G expressing VSV pseudotype virus (BASVpv) was prepared. Using this BASVpv, characteristics of BASV were analyzed and the following results were found, i.e., 1) various mammalian cells were susceptible to BASVpv infection, indicating the broad host range of BASV, similar to VSV, 2) BASVpv infection was mediated by BASV-G protein, 3) obvious syncytium formation was induced upon transient low pH treatment of BASV-G expressing cells. Furthermore, it has been indicated that BASVpv entered the cells by both a clathrin-dependent pathway and a clathrin-independent pathway. By viral overlay protein binding assay, a cellular membrane protein was found to reacted with BASV-G protein.

研究分野：人獣共通感染症

キーワード：Bas-Congo virus endocytosis viral receptor host

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

2012年 Bas-Congo virus (BASV) が新たに報告された (Grard, G., et al. 2012, PLoS Pathogen)。BASV は rhabdoviridae の Tibrogargan group に分子系統学的に最も近いが、ウイルス L タンパク質のアミノ酸配列の一致度が 33.7% と低く、novel rhabdovirus であることが示唆された。BASV は中央アフリカの Ebola, Marburg または Crimean-Congo 出血熱が多発している地域である Democratic Republic of the Congo (DRC) の Bas-Congo 州で患者が発生した。二次感染者も含めた患者 5 名の内 4 名が死亡し、致死率は 80% と高い。Rhabdovirus には魚類では出血性敗血症を引き起こすウイルスがあるが、ヒトでは狂犬病などの脳炎や風邪様症状などの原因ウイルスがある。BASV は出血熱と関連する初めての rhabdovirus である。さらに、疫学的調査から節足動物媒介性疾患である可能性が示唆された。分子系統学的に最も近縁関係にある Tibrogargan group や Ephemerovirus など蚊に媒介され、牛や水牛に感染する。

2015 年度のエボラウイルス病の西アフリカでの大流行、日本国内におけるデングウイルスの流行や中東における MERS の大流行と韓国での流行およびジカ熱ウイルスの南米および東南アジアにおける大流行など、一連の地域を超えたウイルスの大流行は公衆衛生学的だけでなく、精神的、経済的にも莫大な被害をもたらした。また、出血熱が流行している地域で新たな出血熱ウイルスが新興し、節足動物媒介性疾患の可能性があるとすることはかなり懸念される。そこで、BASV のような novel rhabdovirus の特徴、病原性および伝播様式などの解明は公衆衛生的にも意義がある。

2. 研究の目的

本研究は作製した BASV_{pv} を用いて、以下のことを明らかにすることを目的とした。

1) 感受性のある宿主および細胞の検索

既にコウモリを含め哺乳類動物由来の細胞株から BASV の感受性を確認した結果、哺乳類細胞には幅広く感染することが分かった (未発表)。BASV による出血熱は媒介性疾患である可能性が示唆されたところおよび上記の結果を踏まえて、蚊やダニなどの細胞や宿主となり得る動物由来の細胞をより多く用いて、感受性のある宿主および細胞を模索する。

2) 細胞内輸送経路の検索およびラブドウイルス科との比較

既に ammonium chloride や bafilomycin A など細胞内小胞体の酸化阻害薬を用いた実験から、BASV は pH 依存性に細胞内に侵入することが分かった (未発表)。また、chlorpromazine および imipramine のような脂質代謝を誘導する試薬を用いた実験から、BASV の細胞内侵入に脂質が関わっている可能性が示唆された (未発表)。脂質関連のタンパク質 (human Niemann-Pick C1; NPC1) が ebola virus や lujo virus など出血熱ウイルスの細胞内侵入に関与することが報告されている。そこで、BASV の細胞内侵入にも NPC1 が関与しているかを検証する。さらに、狂犬病ウイルスを含む他のラブドウイルス-pseudotype を対象においた実験を行い、BASV の感染経路に関して他のラブドウイルスとの相違点を明らかにする。

3) 受容体の検索

上記 1、2 実験の結果を踏まえて、受容体の候補を絞り、受容体検索には ebola virus, feline immunodeficiency virus や enterovirus 71 などの受容体検索に有用であった retroviral cDNA library 手法 (Shimojima, M, et al., 2004, Science) または、viral overlay protein binding assay (VOPBA) 手法を用いる。

3. 研究の方法

1) BASV の感受性のある宿主および細胞の検索

BASV は媒介体や宿主が不明であり、ウイルスも分離されていない。そのため、作製した BASV-G/VSV-pseudotype を用いて、様々な宿主由来の細胞に感染実験を行い、感受性細胞を検索した。用いる pseudotype virus は GFP または luciferase の reporter gene が組み込まれているため、感染が成立すると定性および定量的に測定できる。

2) 細胞内輸送経路の検索

細胞内侵入における endosomal acidification の影響

VSV をはじめ、様々なラブドウイルスは受容体結合後に pH 依存性に膜融合を起こし、細胞質内に RNP を放出する。これは G タンパク質が pH 依存性に構造変化を起こして融合能が活性化することからである。BASV 感染が細胞内小胞体の酸化を抑制する ammonium chloride や bafilomycin A などに濃度依存性に抑制されることは観察された。そこで、至適 pH や露出時間などを検索し BASV の pH 依存性細胞内侵入機構をさらに明確にすると共に、ラブドウイルス科と比較した。

細胞内侵入への脂質代謝の影響

Ebola virus や Lujo virus などでは、細胞内侵入に脂質代謝関連タンパク質 (NPC1) が関係が

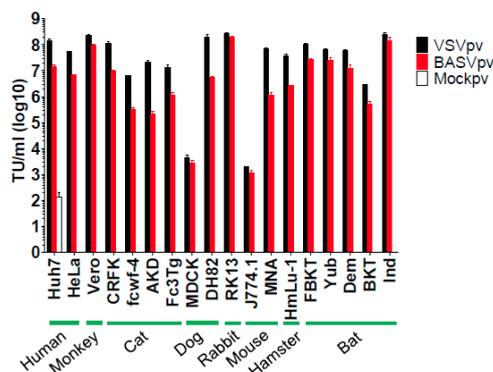
あると報告されている。Chlorpromazine, imipramine および U18999A など脂質代謝を誘導する試薬に対して濃度依存性に BASV の感染が抑制される傾向が観察され、BASV の細胞内侵入にも脂質が関わっている可能性が示唆された。そこで、これらの結果を定量化すると共に、NPC1 欠損細胞を用いて、脂質代謝関連タンパク質である NPC1 が BASV にも影響を与えるかを検索した。この実験も上記同様に他ラブドウイルス科と平行し、比較した。

3) 受容体の検索

感受性細胞由来の viral overlay protein binding assay (VOPBA) 手法を用いた検索

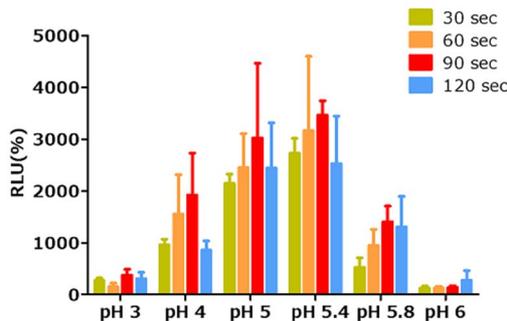
本実験においては上記の結果から Huh7 細胞が BASV に対して最も高い感受性を示したため、Huh7 細胞を用いた。膜タンパク質を精製し、SDS-PAGE 法により泳動し、BASVpv を反応させた。その後、BASV-G 蛋白質に対する抗体を用いて、immunoblot により BASV の G 蛋白質と結合した膜タンパク質を確認した。

4. 研究成果



1) BASV の感受性のある宿主および細胞の検索

BASVpv 感染に感受性を示す細胞及び宿主を検索するために、GFP 発現型の BASVpv を様々な細胞に感染させ、確認した。その結果、BASVpv はヒト、サル、イヌ、ネコ、ハムスター、コウモリ、マウス等様々な哺乳類由来細胞に感染し、宿主域が広いことが示唆され、VSV 同様 ubiquitous な受容体を介して感染すると考えられた。さらに、BASV の G 蛋白質に対する抗体により BASVpv の感染が完全に中和されることから、G 蛋白質を介して感染することが分かった。



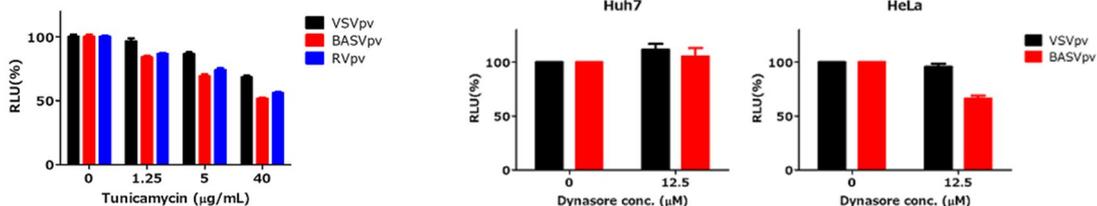
2) 細胞内輸送経路の検索

細胞内侵入における endosomal acidification の影響

BASV の G 蛋白質を一過性に発現させた細胞を低 pH 処理し、細胞融合を確認した。その結果、pH5~5.4、90 秒で処理すると最も細胞融合が誘導されることが分かった。その細胞融合能は VSV より顕著であった。また、bafilomycin 等の lysosomotropic agents の処理により BASV の感染が抑制されたことから、BASVpv は pH 依存的に細胞に侵入すると考えられた。

細胞内侵入への脂質代謝の影響

Cholesterol transport protein (Niemann-Pick C1; NPC1) の inhibitor 及び knock out 細胞を用いて、BASV の細胞内侵入における NPC1 の役割を調べたが、いずれも影響されなかったことから BASV は NPC1 を介して endosome から細胞内に輸送されるエボラウイルスとは異なる経路により輸送されると考えられた。



一方、BASV 感染における clathrin などを含む細胞内侵入経路を調べた。その結果、Huh7 細胞においては clathrin 介在性経路阻害剤及び caveolin 介在性経路阻害剤の処理に BASV の感染が影響を受けないことが分かった。一方、tunicamycin で Huh7 細胞に処理すると、BASVpv の感染が 40% 程度抑制されることから、BASVpv の感染には細胞の糖鎖が関与することが示唆された。また、HeLa 細胞を clathrin 介在性経路阻害剤で処理すると、BASV の感染が抑制された。この結果から、細胞により BASV の細胞内侵入経路が異なることが

示唆された。すなわち clathrin 介在性感染を主体とする細胞と別経路を感染経路の主体とする細胞があると考えられた。

3) 受容体の検索

viral overlay protein binding assay (VOPBA)手法により、BASV の受容体検索を試みた。今までの結果に踏まえて、BASVpv に最も感受性が高い Huh7 細胞膜から蛋白質を精製し、BASVpv を反応させ、結合する蛋白質を immunoblot により、陽性バンドが確認された。その陽性バンドをゲルから切り取り、質量分析により同定を行った。その機能に関しては更なる検討が必要である。一方、細胞内侵入経路の結果や VSV と類似したウイルス学的性状を有することから、細胞膜の lipid raft にも注目し、上記と同様の手法で試みたが、陽性バンドは確認されなかった。理由としては BASVpv と lipid raft の結合力が弱い可能性、lipid raft 関連蛋白質非依存性である可能性が考えられた。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1 . 発表者名 Shigeru Morikawa, Eun-Sil Park, Tomoki Yoshikawa, Akira Noguchi, Yoshihiro Kaku, Koichi Imaoka
2 . 発表標題 Development and evaluation of Bas-Congo virus vaccines which elicit neutralizing antibody
3 . 学会等名 日本ウイルス学会学術集会
4 . 発表年 2018年

1 . 発表者名 Eun-Sil Park, Hideki Tani, Yoshihiro Kaku, Michio Suzuki, Masanobu Kimura, Koich Imaoka, Shigeru Morikawa
2 . 発表標題 Analysis of entry mechanisms of Bas-Congo virus using a pseudotype VSV
3 . 学会等名 International Union of Microbiological Societies (国際学会)
4 . 発表年 2017年

1 . 発表者名 Eun-Sil Park, Hideki Tani, Yoshihiro Kaku, Michio Suzuki, Masanobu Kimura, Koich Imaoka, Shigeru Morikawa
2 . 発表標題 Analysis of Bas-Congo virus cell entry using a pseudotype vesicular stomatitis virus
3 . 学会等名 日本ウイルス学会学術集会
4 . 発表年 2017年

1 . 発表者名 Eun-Sil Park, Hideki Tani, Yoshihiro Kaku, Michio Suzuki, Masanobu Kimura, Koich Imaoka, Shigeru Morikawa
2 . 発表標題 Analysis of entry mechanisms of Bas-Congo virus using a pseudotype VSV
3 . 学会等名 International Conference on Emerging Infectious Diseases (国際学会)
4 . 発表年 2018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
--	---------------------------	-----------------------	----