

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07528

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持続感染機構の解明

研究課題名（英文）Analysis of persistent infection of Hazara orthonairovirus 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） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：クリミア・コンゴ出血熱ウイルス(CCHFV)の持続感染機構を解明するため、CCHFVに非常に近縁なウイルスであるハザラウイルス(HAZV)をモデルウイルスとして利用し、研究を進めた。HEK293細胞にHAZVを感染させ、15代継代培養し、持続感染細胞株を樹立したところ、上清中にウイルスが検出されなくなった。持続感染している全ウイルス遺伝子の解析をした結果、G蛋白に1箇所、L蛋白に5箇所の変異があった。リコンビナントウイルス作製により検証した結果、G蛋白の変異は上清中のウイルス量に影響がないこと、L蛋白の変異はポリメラーゼ活性に影響を与え、持続感染に必須であることが明らかになった。

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はCCHFVと非常に近縁であるがBSL2で扱えるウイルスであるため代用モデルとして最適である。CCHFVは高い病原性を有するが、精液中でウイルスが長期にわたって検出される。つまり、持続感染の成立も可能であり、持続感染がどのようなメカニズムで成立するかを明らかにする事は極めて意義深い。エボラウイルスも精液中に長期にわたって検出されるが、同様のメカニズムである可能性も高いと考えている。

研究成果の概要（英文）：To analyze the persistent infection of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus (CCHFV), we use Hazara orthonairovirus(HAZV). As HAZV is closely related to CCHFV, it is a good surrogate model for CCHFV.

HEK293 cells were infected with HAZV, passaged until 15 times, and established a HEK293 cell line persistently infected with HAZV (HEK/HAZVpi). Surprisingly, virions were not detected in culture supernatant of HEK/HAZVpi cells. There were one and five mutation in G and L proteins of HAZVpi, respectively. To conform which one is a key mutation for persistent infection, we generated various recombinant HAZVs (rHAZV). Our results collectively suggest that G mutation dose not involved in virion production, and L mutations decreased its polymerase activity, and contributed to the establishment of persistent infection.

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 持続感染 リコンビナントウイルス

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(S、M、L)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(BSL) 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、BSL 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 は精液中でウイルスが長期にわたって検出されるという報告があった(Smith et al., PLoS Pathog. 15:e1008050, 2019)。エボラウイルスに関しても西アフリカ流行の生存者による調査により長期間精液からウイルスの RNA が検出されるという報告があった(Deen et al., N Engl J Med., 377:1428-1437, 2017)。これらのウイルスは高い病原性を有するが、持続感染も成立可能であるという事であり、そのメカニズムを明らかにすることは大変重要である。

CCHFV は BSL4 でしか使えないので、BSL 2 で扱える近縁の HAZV は代用モデルとして非常に有用である。HAZV を使用して持続感染メカニズムを分子ウイルス学的解析により明らかにし、CCHFV のみならず、エボラウイルスにも貴重なデータを得ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1)持続感染細胞株の作製

HEK293 細胞に HAZV を感染させ、3 日毎に継代培養を繰り返し、15 代継代し、持続感染細胞株を作成する(HEK/HAZVpi)。N 蛋白特異的抗体による免疫染色(IFA)、ウエスタンブロット法(WB)を行い、感染を確認する。

(2)ウイルス変異の同定

HEK/HAZVpi からウイルスの全ゲノム配列を決定し、ウイルスの変異箇所を解析する。

(3)リコンビナントウイルスの作製

BSR T7/5 細胞を使用したりバースジェネティック系の構築をし、組換えウイルス作製の方法を確立する。変異を持つ遺伝子を組換えウイルス作製用のプラスミドに組み込み、変異を持つリコンビナントウイルスを作製する。

(4)ミニゲノム系によるポリメラーゼ活性の比較

すでに確立したミニゲノムの系(Matsumoto et al., J Virol. 93:e02118-18, 2019)により変異によるポリメラーゼ活性への影響を検討する。

4. 研究成果

(1)持続感染細胞株の作製

HEK293 細胞に HAZV を感染させ、3 日毎に継代培養を繰り返し、15 代継代し、持続感染細胞株を作成した(HEK/HAZVpi)。N 蛋白特異的抗体による IFA により、すべての細胞に N 蛋白が発現している事、発現量は一過性感染とほぼ同程度である事を WB で確かめた。HEK/HAZVpi の上清中のウイルスをブランクアッセイ法で検出しようとしたが、驚いたことにウイルスは検出されなかった。

(2)ウイルス変異の同定

HEK/HAZVpi からウイルスの全ゲノム配列を決定し、変異箇所を解析した。N 蛋白に変異は見られなかったが、G 蛋白に 1 箇所、L 蛋白に 5 箇所のアミノ酸変異が見つかった。S、M、L の全ての非翻訳領域に変異はなかった。

(3)リコンビナントウイルスの作製

リコンビナントウイルス作製のため、T7 RNA polymerase を発現している BSR T7/5 細胞を使用しリバースジェネティック系の構築を行った。S、M、L の遺伝子を組み込んだプラスミドを BSR T7/5 細胞に発現させ、5 日後、その上清を SW13 細胞に感染させた。その 2 日後、SW13 細胞の上清を回収し、ストックウイルスとした。ストックウイルスの感染価を測定したところ、野生株と同程度の増殖、病原性を示した。リコンビナントウイルス作製法の構築に成功したので、変異の入ったウイルスの作製に応用した。

まず G 蛋白の変異を持つ M 遺伝子を組み込んだプラスミドを作製し、リコンビナントウイルスを作製したが、野生株と同様の感染を示した。また HEK/HAZVpi に野生型の G 蛋白を発現させ、上清中にウイルス粒子が検出できるようになるかを検討したが、ウイルス粒子は検出できないままであった。したがって、G 蛋白の 1 箇所のアミノ酸変異は持続感染にもウイルス粒子出芽にも影響を与えていないと考えられた。

次に、HEK/HAZVpi に野生型の L 蛋白を発現させ、上清中にウイルス粒子が検出できるようになるかを検討した。その結果、上清中にウイルス粒子が検出されるようになった。したがって、L 蛋白の変異がウイルス粒子出芽に関与していると考えられた。

L 蛋白の 5 箇所の変異(Lmut1-5)を持つ L 遺伝子を組み込んだプラスミドを作製し、リコンビナントウイルスの作製を試みたが、ウイルスはレスキュー出来なかった。そこで、5 箇所の変異の 1 つのみ(Lmut1、Lmut2、Lmut3、Lmut4、Lmut5)を持ったリコンビナントウイルスを作製することにした。Lmut1~Lmut5 のうち Lmut1 のみと Lmut4 のみを持つウイルスはレスキュー出来なかったが、他の 3 つはウイルスを作製することが出来た。Lmut4 単独の変異を持つウイルスはレスキュー出来なかったが、Lmut2、Lmut3、Lmut5 の変異を組み合わせた場合、ウイルスは作製できた。しかし、Lmut1 を持つウイルスはどのように変異を組み合わせてもレスキュー出来なかった。レスキュー出来たかどうかは SW13 細胞で N 蛋白が WB で検出できるかを指標にしていたので、細胞内の遺伝子を検出し確認をした。その結果、Lmut1 単独でも Lmut1-5 でも野生型に比べ量は少ないが、細胞内にウイルスの遺伝子は存在していた。したがって、L 蛋白の 5 箇所のアミノ酸変異はウイルスの持続感染に関与している可能性が示唆された。

持続感染を開始する時点では野生型の L 蛋白が必要である可能性がある。そこで、野生型の L 蛋白を発現させるプラスミドを追加してリコンビナントウイルスの作製を試みた。プラスミドを発現させた BSR T7/5 細胞を 3 日毎に 5 回継代し、ウイルスの検出をした。その結果、5 箇所のアミノ酸変異を持った Lmut1-5 のみで、持続感染細胞株の再現ができ、上清中にはウイルス粒子が検出できなかった。したがって、HEK/HAZVpi の状態が再現でき、この持続感染細胞の成立には 5 箇所 L 蛋白のアミノ酸変異が関与していることが明らかになった。

(4)ミニゲノム系によるポリメラーゼ活性の比較

持続感染細胞の成立に関与する L 蛋白の 5 箇所のアミノ酸変異がポリメラーゼ活性にどのような影響を与えるかを、ミニゲノムの系で検討した。野生型と比較して、Lmut1-5 を持つ L 蛋白は約 4 倍にポリメラーゼ活性が増加していた。L 蛋白に 5 箇所の変異を持ったリコンビナントウイルスは作製できなかったため、野生型より高いポリメラーゼ活性を示した事は予想外であった。

単独の変異を持つ L 蛋白のポリメラーゼ活性を検討したところ、Lmut1 の変異のみポリメラーゼ活性が低下していた。Lmut2、Lmut3、Lmut4 のいずれの変異もポリメラーゼ活性が約 4 倍に増加していた。Lmut5 の変異はポリメラーゼ活性に影響を与えなかった。

活性が低下した Lmut1 の変異と 4 倍程度の増加を示した Lmut2、Lmut3、Lmut4 の変異を組み合わせると、Lmut2 との組み合わせで Lmut1 単独に比べ若干の増加、Lmut3、Lmut4 との組み合わせでは野生型と同程度という結果になった。増加した Lmut2、Lmut3、Lmut4 同士の組み合わせでは約 5 倍程度の増加にとどまった。Lmut1 と Lmut5 の組み合わせではポリメラーゼ活性はほぼ検出できない結果となった。

(5)L 蛋白の変異箇所の考察

今回見つかった L 蛋白の 5 箇所のアミノ酸変異が機能にどのように関与しているのかは立体構造を考える必要がある。CCHFV や HAZV の L 蛋白の立体構造はまだ不明であるので、立体構造の一部が明らかになっている La Crosse orthobunyavirus を元に推測をした。その結果、ポリメラーゼ機能に重要であると考えられているモチーフの領域には変異はなく、その両側に 2 つずつあり、Lmut1 はさらに離れた場所にあることがわかった。

また、ほかのナイロウイルスの L 蛋白のアミノ酸と比較したところ、Lmut3 が現在報告されている全てのウイルスで保存されていた。Lmut1 もほぼ保存されており、Lmut2 と Lmut5 はあまり保存されていないことが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Saka Naoki, Matsumoto Yusuke, Ohta Keisuke, Kolakofsky Daniel, Nishio Machiko	4. 巻 96
2. 論文標題 A Point Mutation in the Human Parainfluenza Virus Type 2 Nucleoprotein Leads to Two Separate Effects on Virus Replication	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 e0206721
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/JVI.02067-21	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 Kolakofsky Daniel, Le Mercier Philippe, Nishio Machiko, Blackledge Martin, Cr?pin Thibaut, Ruigrok Rob W. H.	4. 巻 13
2. 論文標題 Sendai Virus and a Unified Model of Mononegavirus RNA Synthesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Viruses	6. 最初と最後の頁 2466 ~ 2466
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/v13122466	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, Nishio Machiko	4. 巻 11
2. 論文標題 Inhibition of Cavin3 Degradation by the Human Parainfluenza Virus Type 2 V Protein Is Important for Efficient Viral Growth	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 803
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmicb.2020.00803	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, Saka Naoki, Nishio Machiko	4. 巻 95
2. 論文標題 Human Parainfluenza Virus Type 2 V Protein Modulates Iron Homeostasis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 e01861-20
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/JVI.01861-20	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, Saka Naoki, Nishio Machiko	4. 巻 14
2. 論文標題 Hazara Orthornairovirus Nucleoprotein Antagonizes Type I Interferon Production by Inhibition of RIG-I Ubiquitination	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Viruses	6. 最初と最後の頁 1965
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/v14091965	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2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 太田圭介、坂直樹、西尾真智子
2. 発表標題 ハザラウイルスのN蛋白は、タイトジャンクション蛋白Claudin-1を制御してウイルスの細胞間の広がりを促進する
3. 学会等名 第69回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 坂直樹、太田圭介、西尾真智子
2. 発表標題 ヒトパラインフルエンザウイルス2型のV蛋白はミトコンドリア系のアポトーシスを阻害している
3. 学会等名 第69回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2022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・講師 (24701)	

6. 研究組織（つづき）

	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	坂 直樹 (Saka Naoki) (80867474)	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)	2020年9月4日削除

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