

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 6日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590518

研究課題名（和文） 高病原性ウイルスの粒子形成・出芽解析と新規抗ウイルス戦略への応用

研究課題名（英文） Approaches to establish the novel antiviral strategies focused on assembly and budding of highly pathogenic viruses

研究代表者

安田 二郎（YASUDA JIRO）

長崎大学・熱帯医学研究所・教授

研究者番号：10282518

研究成果の概要（和文）：人類にとって大きな脅威となっている高病原性ウイルス感染症に対する新規抗ウイルス戦略の確立に資するため、幅広いウイルス種に抗ウイルス作用をもつ細胞性因子 Tetherin の作用機構と抗ウイルススペクトルを解析した。その結果、Tetherin はラッサウイルスやマールブルグウイルスに対するのと同様にインフルエンザウイルスやハザラウイルスに対しても抗ウイルス活性をもつことを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：In this study, to establish novel antiviral strategies against highly pathogenic viruses, we analyzed the action mechanism of the antiviral cellular factor, Tetherin, and its antiviral spectrum. We demonstrated that Tetherin has the antiviral activities against influenza and Hazara viruses as well as Lassa and Marburg viruses.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	0	1,500,000
2010年度	1,000,000	247,557	1,247,557
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	547,557	4,047,557

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：Tetherin、抗ウイルス、インフルエンザウイルス、ハザラウイルス、出血熱ウイルス

1. 研究開始当初の背景

エボラウイルス、マールブルグウイルス、ラッサウイルス、クリミア-コンゴ出血熱ウイルスはヒトに出血熱を主徴とする重篤な疾患を引き起こす新興感染症の病原因子であり、何れもRNAをゲノムとしてもつエンベロープウイルスである。これらのウイルスは度々アウトブレイクを引き起こしているが、

未だに有効な予防・治療法は確立されていない。高い致死率、予防・治療法が確立されていない点、社会に与えるインパクトの強さ等の理由からバイオテロへの使用も危惧されており、これらの感染症のアウトブレイクは人類にとって大きな脅威となっている。

ウイルス感染症に対するこれまでの抗ウイルス戦略としては、ワクチン、ウイル

ス吸着・侵入阻害剤など感染初期段階を標的としたものやウイルスの転写・複製を阻害するものが主流であったが、最近ではウイルス増殖の後期過程を標的としたHIVのプロテアーゼ阻害剤、インフルエンザのノイラミニダーゼ阻害剤（タミフル、リレンザ等）などの効果が臨床レベルで証明されており、感染細胞からの新たな感染性子孫ウイルスの放出を阻害し、感染拡大を抑制することが新規抗ウイルス戦略として有効であると認識されるようになってきた。上記出血熱ウイルスについても同様にウイルス増殖後期過程を標的とした抗ウイルス戦略が有効であると思われる。

我々はこれまでにレトロウイルス、出血熱ウイルス、インフルエンザウイルスの出芽を解析し、出芽に必須なウイルス側のエレメントである L-ドメインの発見や出芽に関わる宿主因子の同定を行ってきた。そして、これらのウイルスの出芽に関わる宿主因子のほとんどが細胞内小胞膜輸送系の一つである MVB 経路に関わるタンパク質であることから、ウイルス出芽は MVB 形成機構を利用したものであることが示唆されている。出芽機構を解析する過程で宿主因子を標的とした siRNA や Dominant-Negative 変異体、更にはプロテオソーム阻害剤がウイルス出芽を顕著に阻害することも示してきたが、このことは、これらを応用した抗ウイルス療法が確立できる可能性を示している。

また、最近、我々はヒト免疫不全ウイルス (HIV-1) のウイルス粒子産生を阻害する細胞性因子として同定された Tetherin がマールブルグウイルスやラッサウイルスに対しても産生阻害効果を持つことを発見した (Sakuma et al., *J. Virol.*, 2009)。Tetherin は、他の多くのエンベロープウイルスに対しても阻害効果をもつことが期待出来るため、Tetherin を利用した新規抗ウイルス戦略の確立も期待できる。

2. 研究の目的

エボラウイルス、マールブルグウイルス、クリミア - コンゴ出血熱ウイルス、ラッサウイルスはヒトに出血熱を主徴とする重篤な疾患を引き起こす新興感染症の病原因子であり、現在、感染症およびバイオテロの両面から人類にとって大きな脅威となっている。また、インフルエンザウイルスも新型ウイルスや高病原性鳥インフルエンザウイルスの出現により同じく脅威が増している。本研究では、これらのウイルスの増殖後期過程（特に粒子形成・出芽過程）で関与する宿主因子を同定し、分子レベルでそのメカニズムを解明することにより、ウイルス増殖後期過程を標的とした新規抗ウイ

ルス戦略の確立を目指す。さらに、最近我々がマールブルグウイルス、ラッサウイルスのウイルス様粒子 (VLP) 産生に対して阻害活性をもつことを明らかにした Tetherin の抗ウイルススペクトルと作用機構についても明らかにする。

3. 研究の方法

(1) Tetherin の抗ウイルス作用機構の解析：Tetherin は分子の N 末が細胞内に貫通し、C 末が GPI アンカーで膜に埋まった構造をしている。このことから Tetherin は子孫ウイルス粒子を細胞膜に直接繋ぎとめることによりウイルス放出を抑制すると考えられている。しかしながら、そのメカニズムの詳細は明らかになっていない。Tetherin の抗ウイルス作用としては図 1 に示したような機序が想定され、二量体化が必須である A あるいは B の機序が有力モデルとして提唱されている。そこでこのモデルが正しいか検証する為に、二量体化できない Tetherin 変異体を作製してラッサおよびマールブルグウイルスの VLP 放出への影響を調べた。

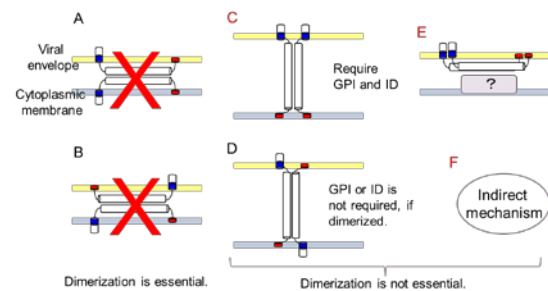


図 1. Tetherin の抗ウイルス作用機構

(2) インフルエンザウイルスに対する Tetherin の抗ウイルス活性：Tetherin の抗インフルエンザウイルス活性を調べるために Tetherin を安定発現する MDCK 細胞 (Teth-MDCK 細胞) を樹立し、MDCK 細胞と Teth-MDCK 細胞におけるインフルエンザウイルス (A/PR/8/38(H1N1)) の増殖をプラークアッセイにより比較解析した。また、インフルエンザウイルスは HeLa 細胞で効率よく増殖しないことが報告されている。HeLa 細胞は恒常的に Tetherin を発現している細胞として知られているので、HeLa 細胞で Tetherin がインフルエンザウイルス増殖の制限因子として働いている可能性が考えられる。そこで、Tetherin の発現を抑制する shRNA を安定発現する HeLa 細胞株 (TKD-HeLa 細胞) を樹立し、ウイルス増殖をプラークアッセイにより比較解析した。更に、HIV やエボラウイルスでは Tetherin の抗ウイルス作用に対抗す

るためのアンタゴニストがコードされていることが報告されている。インフルエンザウイルスタンパク質にもアンタゴニストとしての機能をもつものがある可能性があるので 10 種類のウイルスタンパク質の各々を発現するプラスミドを HeLa 細胞に導入して Tetherin 細胞表面発現の抑制を FACS で解析した。

(3) ハザラウイルスに対する Tetherin の抗ウイルス活性：ハザラウイルスはクリミア・コンゴ出血熱ウイルス (CCHFV) に近縁のウイルスで同じニヤウイルス科ナイロウイルス属に分類される。CCHFV は BSL4 の病原体であるため国内では取り扱うことができないが、ハザラウイルスはヒトに対する病原性がないため CCHFV のモデルウイルスとして P2 実験室で取り扱える。そこで、ハザラウイルスに対する Tetherin の抗ウイルス活性を解析した。

まず、Tetherin を安定発現する SW13 細胞株 (Teth-SW13 細胞) を樹立した。SW13 細胞と Teth-SW13 細胞におけるハザラウイルスの増殖をプラークアッセイにより比較解析した。

4. 研究成果

(1) Tetherin の抗ウイルス作用機構の解析：Tetherin には細胞外領域に 3 か所、細胞内領域に 2 か所のシステインが存在するが、二量体化は細胞外領域の 3 つのシステインをアラニンに置換した時 (C53/63/91A) に部分的に阻害され、5 つすべてを置換した時 (C9/20/53/63/91A) に完全に阻害された。

ラッサウイルス及びマールブルグウイルスの VLP 産生系にこれらの変異体を発現させたところ、C53/63/91A 変異体も C9/20/53/63/91A 変異体も 70%以上の阻害効果をまだ持っていた (図 2)。

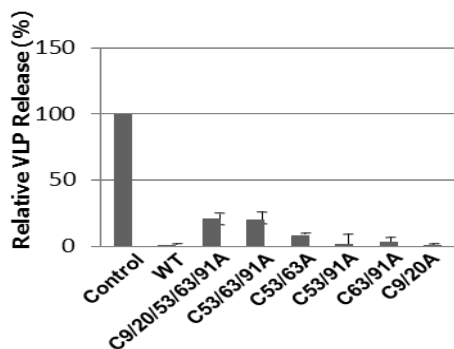


図 2. Tetherin 変異体のラッサ VLP 放出阻害

したがって、Tetherin の二量体化は抗ウイルス活性に必須ではなく、図 1 のモデル A、B は Tetherin の抗ウイルス作用機序としては

正しくないことが示された。現在は、他の研究グループの構造解析の成績とあわせてモデル C が有力視されている。

(2) インフルエンザウイルスに対する Tetherin の抗ウイルス活性：Teth-MDCK 細胞におけるインフルエンザウイルスの増殖は MDCK 細胞と比較して 1/5 程度に減少した。インフルエンザウイルスを感染させた Teth-MDCK 細胞を電子顕微鏡で観察すると MDCK 細胞よりも多くのウイルスが細胞表面に蓄積している像が観察された。つまり、Tetherin は HIV と同様にインフルエンザウイルスの細胞外放出を抑制することで抗インフルエンザウイルス活性を示すことが示唆された。

また、TKD-HeLa 細胞におけるウイルス産生は moi=0.1 および moi=1 で感染させた時ともに HeLa 細胞に比べて顕著に増加した (図 3)。

以上の成績は、Tetherin がインフルエンザウイルスに対しても抗ウイルス作用をもつこと、及び HeLa 細胞でインフルエンザウイルスが効率よく増殖しないのは Tetherin が制限因子として働いているためであることが示された。

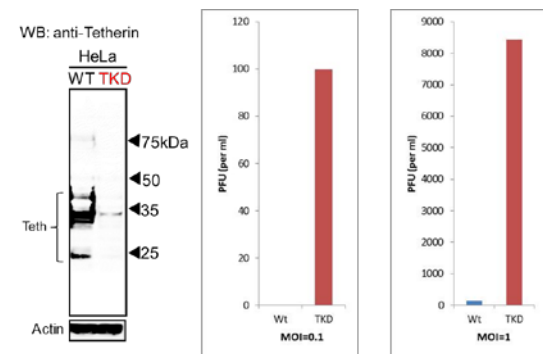


図 3. Tetherin 発現をノックダウンした HeLa 細胞におけるインフルエンザウイルスの増殖

インフルエンザウイルス 10 種類のタンパク質を HeLa 細胞に各々発現させて Tetherin の細胞表面発現を FACS で解析したが、何れのウイルスタンパク質発現も Tetherin の細胞表面発現に全く影響しなかった。このことは、インフルエンザウイルスは Tetherin アンタゴニストをもたないことを示唆する。

(3) ハザラウイルスに対する Tetherin の抗ウイルス活性：Teth-SW13 細胞におけるハザラウイルスの増殖は SW13 細胞と比較して 1/20 程度に減少した (図 4)。Tetherin はハザラウイルスに対しても抗ウイルス活性をもつことが明らかになった。

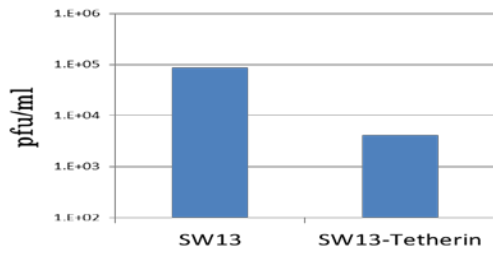


図4. ハザラウイルスに対する Tetherin の抗ウイルス活性

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5件)

- ① *Yasuda, J.: Ebolavirus replication and tetherin/BST-2. *Frontiers in Microbiology*, **3**, 111 (1-5), 2012. 査読有
- ② Fukuma, A., Kurosaki, Y., Morikawa, Y., Grolla, A., Feldmann, H., and *Yasuda, J.: Rapid detection of Lassa virus by reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification. *Microbiology and Immunology*, **55**, 44-50, 2011. 査読有
- ③ Fukuma, A., Abe, M., Morikawa, Y., Miyazawa, T., and *Yasuda, J.: Cloning and Characterization of the Antiviral Activity of Feline Tetherin/BST-2. *PLoS One*, **6**, e18247 (1-6), 2011.
- ④ *Yasuda, J.: Marburg virus budding: ESCRT of progeny virion to the outside of the cell. *Future Virology*, **5**, 627-637, 2010. 査読有
- ⑤ Sakuma, T., Sakurai, A., and *Yasuda, J.: Dimerization of tetherin is not essential for its antiviral activity against Lassa and Marburg viruses. *PLoS One*, **4**, e6934, 2009. 査読有

[学会発表] (計7件)

- ① Yohei Kurosaki, Ayato Takada, Jiro Yasuda: Anti-Tetherin activities of Zaire and Reston ebolavirus glycoprotein. In "The XVth International Congress of Virology, Sapporo, September 11-16, 2011.
- ② Takeda E., .Sakurai A., Takasita E. and Yasuda J.: Tetherin/BST-2 functions as an antiviral cellular factor against influenza virus. In "The XVth International Congress of

Virology, Sapporo, September 11-16, 2011.

- ③ 黒崎陽平, 安田二郎: エボラウイルス表面糖タンパク質GPによる抗ウイルス因子BST-2/Tetherinの活性阻害、第33回日本分子生物学会年会BMB2010、神戸、2010年12月7日-10日。
- ④ 西村聡子、安田二郎: Bst-2/Tetherinによるハザラウイルス放出抑制機構の解析、第33回日本分子生物学会年会BMB2010、神戸、2010年12月7日-10日。
- ⑤ 黒崎陽平, 安田二郎: エボラウイルス表面糖タンパク質GPによるBST-2/Tetherinの活性阻害、第58回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010年11月7日-9日。
- ⑥ Yasuda, J., Sakurai, A., Noda, T., Urata, S., Kawaoka, Y., and Sakuma, T.: ANTIVIRAL ACTIVITY OF TETHERIN/BST-2 AGAINST NEGATIVE STRAND RNA VIRUSES. In "The XIVth International Conference on Negative Strand Viruses", Brugge, Belgium, pp, June 21-25, 2010.
- ⑦ 安田二郎、櫻井陽、佐久間稔恵: Antiviral mechanism of BST-2/tetherin、第32回日本分子生物学会年会、横浜、2009年12月9日-12日。

[その他]

ホームページ等

<http://www.tm.nagasaki-u.ac.jp/emerging/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安田 二郎 (YASUDA JIRO)
長崎大学・熱帯医学研究所・教授
研究者番号: 10282518

(2) 研究分担者

該当者なし ()

研究者番号:

(3) 連携研究者

黒崎 陽平 (KUROSAKI YOHEI)
長崎大学・熱帯医学研究所・助教
研究者番号: 40415443