

令和 6 年 6 月 15 日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K14981

研究課題名(和文)節足動物媒介性オルソブニヤウイルス核蛋白質における新たな核局在機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of a novel mechanism of nuclear localization for arthropod-borne Orthobunyavirus nucleoprotein

研究代表者

河原 円香 (Kawahara, Madoka)

国立感染症研究所・ウイルス第一部・主任研究官

研究者番号：80847559

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：節足動物媒介性の人獣共通感染症ウイルスであるオルソブニヤウイルスは世界各地で家畜や野生動物と蚊やその他の節足動物の間で広く維持され、多くのヒト感染例も報告されている。中でもオロプーシュウイルス(OROV)は中南米でデング熱に次いで頻発する新興感染症であるが、病原性発現機構や作用機序に関する研究は十分ではない。本研究ではOROVが既存の感染機構では報告されていない「核蛋白質(N)が感染細胞の核に局在する」様子を観察した。ウイルス感染に不可欠なNの新たな機能を調査することは、OROVの新たな感染機構を提供し、さらにオルソブニヤウイルスの多様な病原性メカニズム解明の突破口となり得る。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年OROVは中南米において多くの感染者が報告されている一方、病原性発現機構や作用機序に関する知見が不足している。蛋白質の中で最も産生量が多く、強い免疫原性を持つ重要な蛋白質であるNの分子機構を明らかにすることは、ブニヤウイルスにおける新たな感染機構を提供し、また多くの宿主と臨床症状の多様性を持つオルソブニヤウイルスの多様な病原性メカニズム解明の突破口となり得ることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Orthobunyaviruses, arthropod-borne zoonotic viruses, are widely maintained between domestic and wild animals and mosquitoes and other arthropods worldwide, and many cases of human infection have been reported. Among them, Oropouche virus (OROV) is the second most frequent emerging infectious disease after dengue fever in Central and South America, but studies on pathogenesis and mechanisms of action are insufficient. In this study, we observed that OROV "localizes nuclear proteins (N) to the nucleus of infected cells," which has not been reported in existing infection mechanisms. Investigating new functions of N, which is essential for viral infection, may provide a new infection mechanism of OROV and may also be a breakthrough in elucidating the diverse virulence mechanisms of orthobunyaviruses.

研究分野：ウイルス学

キーワード：ブニヤウイルス オルソブニヤウイルス Oropouche virus 節足動物媒介性ウイルス 細胞内局在

1. 研究開始当初の背景

オルソブニヤウイルスはクリミア・コンゴ出血熱やリフトバレー熱、重症熱性血小板減少症候群(SFTS)を引き起こす人獣共通感染症の原因として知られるブニヤウイルス目に属し、20の血清群で構成される。主に蚊やダニなどの節足動物を媒介として自然宿主であるげっ歯目や鳥類などの野生動物、またウシやヒツジ等の家畜に感染する。ヒトに感染した場合には無症状または軽度の脳炎や発熱性疾患、出血熱等を引き起こし、まれに重症化する。アフリカやアメリカ大陸、ヨーロッパ、アジアと世界各地に分布している。

日本でも家畜伝染病として知られるアカパネウイルスやシュマレンベルクウイルスと同じシンプ血清群の一種であるオロプーシュウイルス(OROV)は、この血清群の中では唯一ヒト感染を引き起こし、ブラジルを中心とした中南米で重大な影響を及ぼしている。しかしデング熱やジカ熱など他の熱性疾患と症状が似ていること、また診断系の未整備などの要因から患者数が過小評価されており、病原性発現機構や作用機序に関する知見が不足している。

OROVはマイナス一本鎖RNAをゲノムにもつRNAウイルスであり、S・M・Lの3分節から構成されている。このS分節は重複したリーディングフレームで核蛋白質(N)と非構造蛋白質(NSs)の両方をコードしている。Nは細胞に感染すると多量体を形成し、細胞質でRNAやRNA依存性RNAポリメラーゼとともにリボ核蛋白質(RNP)複合体を形成して転写と複製に関与することが知られてきた。

一方申請者はOROVのN認識モノクローナル抗体を作製し、感染させたアフリカミドリザル腎臓上皮(Vero)細胞におけるNの細胞内挙動を観察したところ、Nが細胞質内に広がった後に核の側面に局在し、次に核に移行して粒状構造を形成したのちに核外に搬出される現象を目の当たりにした(図1)。

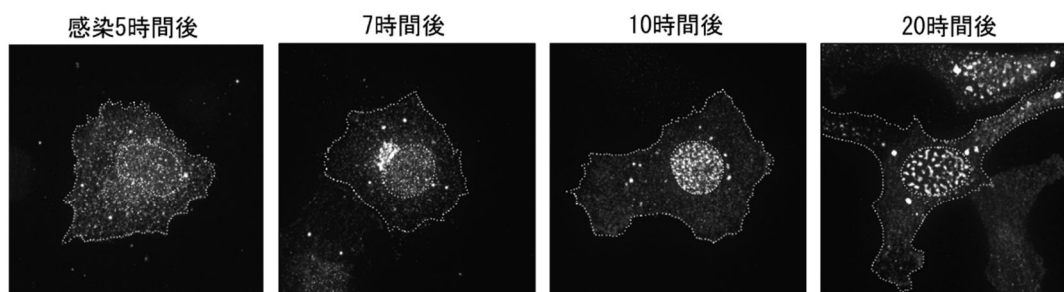


図1 OROV感染によるNのVero細胞内局在

OROV-Nは感染するとまず細胞質内全体に広がる(感染5時間後)。核の側面に局在した後(7時間後)、さらに核内部に移行して集積する(10時間後)。その後粒子状の状態に細胞質に放出される(20時間後)。

Nと同じ分節でコードされているNSsは細胞質と核の両方に局在し、感染に必須ではないが病原性に関する抗ウイルス性I型インターフェロン(IFN)阻害分子であることが知られている(1)。しかしNが核に局在するという事例は、申請者が調べた限りオルソブニヤウイルスだけでなくブニヤウイルス目を含めても報告されていない。感染細胞で産生される主要な蛋白質であり、ウイルス感染に必要不可欠であるNの細胞内挙動を明らかにすることは、未だ病原性メカニズムが明らかではないOROVの新たな感染機構の解明につながると考えた。

2. 研究の目的

オルソブニヤウイルスのNは細胞質内でRNP複合体を形成することが既に知られている。一方ウイルスにとって蛋白質が核に移動するという事は、そのウイルスが感染を成立させるために必要な何らかの理由があるはずである。そこで本研究ではOROVのNが感染細胞の核に局在するという新たな現象の解明を目的とする。インフルエンザウイルスはRNPが核へと輸送され、転写・複製を行うことが知られているが(2)、ブニヤウイルスは転写・複製の際は細胞質内とされている。この分子機構を明らかにすることは、ブニヤウイルスにおける新たな感染機構を提供し、また多くの宿主と臨床症状の多様性を持つオルソブニヤウイルスの多様な病原性メカニズム解明の突破口となり得ることが期待される。

3. 研究の方法

(1) OROV-N、NSsの核における共局在の確認

シュマレンベルクウイルスのNSsは感染細胞の核に局在して核小体を破壊し、細胞死を誘発することが示唆されている(3)。そこでまずOROV-Nの核局在がN単独によるものか、それとも

NSs との共局在であるのかを調べた。まず蛋白質発現ベクターを用いて N+NSs、N のみ(230 アミノ酸残基)、NSs のみ(90 アミノ酸残基)をそれぞれ発現するプラスミドを作製した。これらのプラスミドそれぞれを用いて Vero 細胞にトランスフェクションを行い、目的の蛋白質を発現させた。Vero 細胞内の蛋白質の局在を蛍光顕微鏡で確認し、核への局在に必要な蛋白質の特定を試みた。

(2) OROV-N の核小体局在シグナル配列の特定

シュマレンベルクウイルスの NSs には核小体局在シグナルが存在し、シグナル欠失変異体は核局在能を失う(3)。そこで OROV-N の核小体局在シグナルの有無を調べ、予測された配列を基にシグナルの特定を試みた。まず N のアミノ酸配列を核小体局在シグナル予測(4)で解析し、核小体局在シグナルの可能性のある部位を予測した。この予測された部位を含む 80 アミノ酸残基程度の欠失変異体プラスミドを数種類作製し、Vero 細胞にて欠失変異体蛋白質を発現させた。Vero 細胞内の蛋白質の局在を蛍光顕微鏡で確認し、N の核小体局在シグナル位置の絞り込みを試みた。

4. 研究成果

(1) OROV-N、NSs の核における共局在の確認

タグ配列を付加した蛋白質発現ベクターを用いて N+NSs、N のみ、NSs のみをそれぞれ発現するプラスミドを作製した。これらのプラスミドそれぞれを用いて Vero 細胞にトランスフェクションを行い、蛍光蛋白質を発現させた。Vero 細胞内の蛋白質の局在を蛍光顕微鏡で確認したところ、N+NSs 蛋白質を発現させた際には N の核局在が観察された一方、N のみを発現させた場合は局在の変化が観察された(図2)。

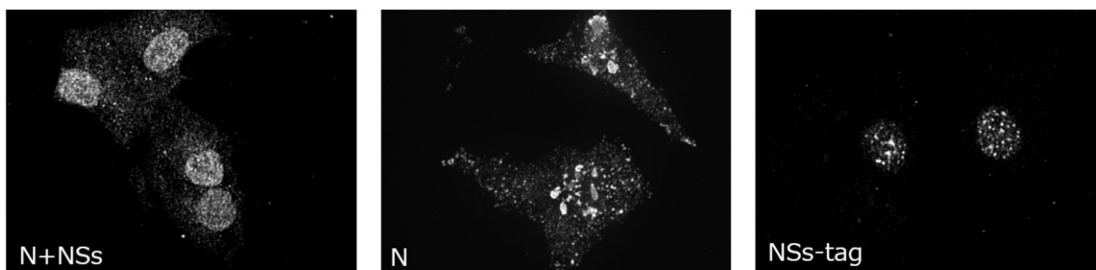


図2 OROV-N発現蛋白質のVero細胞内局在

OROV-N+NSsはNの核局在が確認されたが(左図)、Nのみを発現させると局在の様子が変化した(中央図)。またtagを付加したNSsのみを発現した場合は核への局在が確認された(右図)。

(2) OROV-N の核小体局在シグナル配列の特定

シュマレンベルクウイルスの NSs には核小体局在シグナルが存在し、シグナル欠失変異体は核局在能を失う(3)。そこで OROV-N の核小体局在シグナルの有無を調べ、予測された配列を基にシグナルの特定を試みた。まず N のアミノ酸配列を核小体局在シグナル予測(4)で解析し、核小体局在シグナルの可能性のある部位 2 か所を予測した。

この予測されたそれぞれの部位を含む 80 アミノ酸残基程度の欠失体プラスミドを 2 種類作製

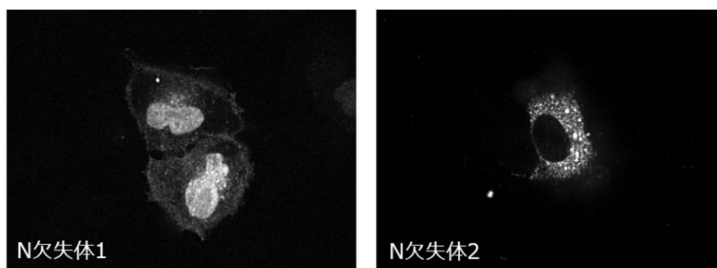


図3 OROV-N欠失変異体のVero細胞内局在

OROV-N上で予測された2か所の核小体局在シグナルをそれぞれ含むN欠失体のうち、N欠失体2は細胞内のNの局在が変化し核移行が観察されなかった(右図)。

これらの結果より、1) OROV-N は NSs 存在下において感染細胞の核に局在する可能性があり、また 2) N の核への局在は核小体局在シグナルの関与が示唆されると考えられた。一方 NSs は核に局在して核小体を破壊することが知られていたため、核小体抗体を用いて OROV-N の核局在と核小体破壊の関係を蛍光顕微鏡にて観察した。その結果 OROV-N が核に局在するより前に核小体が破壊されていることが確認できた(データ示さず)。このことから OROV-N の核移行が NSs の核における作用とは異なる機構で機能する可能性も考えられた。

OBVs の NSs は IFN 阻害分子であり病原性に関与することが知られているが、ウイルスの感染に不可欠ではない(5)。それに対して N は細胞質内で RNP 複合体を形成し、ゴルジ体で糖蛋白質と合流してペリオンを構築するという感染に必要な機能を持つ。オルソプニヤウイルスにおいて N は蛋白質の中で最も産生量が多く、強い免疫原性を持つ重要な蛋白質である。この OROV-N の核局在の解明は、プニヤウイルスの新たな作用機序の理解につながると考える。本研究における N の機能解析は、今後ますます問題となるウイルス感染症に対するワクチンや治療薬の開発に繋がる分子基盤となり得る。

[引用文献]

- 1) Thomas D, J. Biol. Chem., 279, 2004
- 2) Miyake Y, Nat Microbiol, 4;4, 2019
- 3) Gouzil J, J Virol, 91;1, 2016
- 4) Scott MS, BMC Bioinformatics, 12:317, 2011
- 5) Blakqori G, J Virol, 79;16, 2005

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Kitaura S, Tobiume M, Kawahara M, Satoh M, Kato H, Nakayama N, Nakajima N, Komeno T, Furuta Y, Suzuki T, Moriya K, Saijo M, Ebihara H, Takayama-Ito M.	4. 巻 213
2. 論文標題 Evaluation of a novel severe combined immunodeficiency mouse model for antiviral drug evaluation against Chandipura virus infection.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Antiviral Res.	6. 最初と最後の頁 105582
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.antiviral.2023.105582.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kato H, Takayama-Ito M, Satoh M, Kawahara M, Kitaura S, Yoshikawa T, Fukushi S, Nakajima N, Komeno T, Furuta Y, Saijo M.	4. 巻 15(7)
2. 論文標題 Favipiravir treatment prolongs the survival in a lethal mouse model intracerebrally inoculated with Jamestown Canyon virus	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLoS Negl Trop Dis .	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pntd.0009553	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 河原円香, 加藤博史, 吉河智城, 北浦慧, 佐藤正明, 立本完吾, 前田健, 苅和宏明, 西條政幸, 伊藤（高山）睦代
2. 発表標題 節足動物媒介性オルソブニヤウイルスであるオロブシューウイルス特異的な競合ELISA系の確立と国内野生動物における感染状況の調査
3. 学会等名 第68回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------