

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：17301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20762

研究課題名(和文)複製可能な蛍光エボラウイルス様粒子の作出と性状解析

研究課題名(英文) Generation of a visualizing system for Ebola virus glycoprotein in the viral lifecycle

研究代表者

古山 若呼 (Furuyama, Wakako)

長崎大学・高度感染症研究センター・助教

研究者番号：60908903

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：エボラウイルスは高い致死率を伴う重篤なエボラ出血熱(エボラウイルス病)を引き起こす病原体であり、高度安全実験施設(BSL-4 施設)での取り扱いが義務付けられている。そのため、野生型エボラウイルスを用いた研究は限定されている。エボラウイルスは粒子上に唯一glycoprotein (GP)と呼ばれるスパイクタンパク質を発現しており、ウイルスが標的細胞に感染する際に重要な役割を担う。本研究では、BSL-2環境下においてウイルス粒子の取り込みから新たなウイルス粒子が形成されるまで、一連のウイルス生活環でのGPの局在を追跡可能とする新規システムの開発を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで開発されたエボラウイルス感染阻害薬の多くは、最も高い病原性を持つウイルス株を標的としている。従って、今後、他種ウイルス株や変異ウイルスによるアウトブレイクが発生した場合、既存の治療薬では対応できない可能性があるため、多様な作用機序を持つ新規薬剤の開発が喫緊の課題となっている。今回開発したシステムを用いることで、特に、まだ詳細が明らかにされていない、ウイルス粒子にGPが取り込まれるメカニズムが解明されることが期待される。さらにこのプロセスを標的とした治療薬の開発へと展開することで、新規治療薬の創出に繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Ebola virus (EBOV) causes severe EBOV disease in humans and non-human primates. Currently, limited countermeasures are available, and the virus must be studied in biosafety level-4 laboratories. EBOV glycoprotein (GP) is a single transmembrane protein responsible for the entry step, and is the target of multiple approved drugs. However, the molecular mechanisms of the intracellular dynamics of GP in EBOV lifecycle are poorly understood. Here, we developed a novel GP monitoring system using transcription- and replication-competent virus-like particle (trVLP) systems, which enables the modeling of EBOV lifecycle under BSL-2 conditions. This novel monitoring system will be capable of characterizing the molecular mechanism of EBOV replication and can be applied in drug screening for the development of therapeutics against EBOV disease.

研究分野：ウイルス学

キーワード：エボラウイルス

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

エボラウイルスは、ヒトを含む霊長類に重篤なエボラ出血熱(エボラウイルス病)を引き起こす病原体であり、世界規模での公衆衛生において最も懸念すべき新興感染症の1つとして認識されているが、現在エボラウイルスに対する予防、治療法は限定的である。さらに、その病原性の高さから高度安全実験施設(BSL-4)での取り扱いが義務付けられているため、野生型エボラウイルスを用いた研究は極めて制限されている。エボラウイルスは粒子上に唯一 glycoprotein (GP) と呼ばれるスパイクタンパク質を発現する。GP はエボラウイルスが標的細胞に感染する際に重要な役割を担うため、治療薬を開発する上で重要な標的の1つである。その一方で、感染細胞で新たに産生される GP がどのようにウイルス粒子に取り込まれるのか詳細なメカニズムについては解明されていない。

### 2. 研究の目的

エボラウイルスの取扱いは通常 BSL-4 施設に限定されている。これに対して、近年、エボラウイルスの増殖に必要な最低限の遺伝子のみを内包し、BSL-2 で感染サイクルを再現できるエボラウイルス様粒子 tetracistronic transcription- and replication-competent virus-like particles (trVLP) が開発された(文献; )。そこで、本研究では trVLP を基盤として、ウイルス生活環を構成する各プロセスをリアルタイムに可視化できる新規システムを樹立し、その性状解析を行うことを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 蛍光タンパク質融合 GP の作出

エボラウイルスの GP に蛍光タンパク質を融合させ、形状や性状に変化がないかウイルス様粒子(VLP)ならびにシュードタイプウイルスを用いて解析した。

#### (2) 蛍光タンパク質融合 GP を発現する trVLP の作出と性状解析

蛍光タンパク質融合 GP を発現する trVLP を作出し、形状を電子顕微鏡にて、複製能を trVLP アッセイによって解析した。また細胞内で産生される trVLP 由来 GP の局在を共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。

### 4. 研究成果

#### (1) 蛍光タンパク質融合 GP の作出と性状解析

エボラウイルス GP のムチン様領域は、欠損させても細胞への侵入過程に影響がないことが知られている(文献; )。そこで、本研究では、ムチン様領域を蛍光タンパク質に置換した(図1)。置換による影響を観察するため、蛍光タンパク質融合 GP を纏った VLP ならびにシュードタイプウイルスを作出し、野生型 GP と比較解析した。まず、電子顕微鏡観察によって蛍光タンパク質融合 GP を纏った VLP は、通常の VLP と同様にひも状の形態を有していることが判明した。次に、シュードタイプウイルスの系を用いて GP の性状を確認した。その結果、蛍光タンパク質融

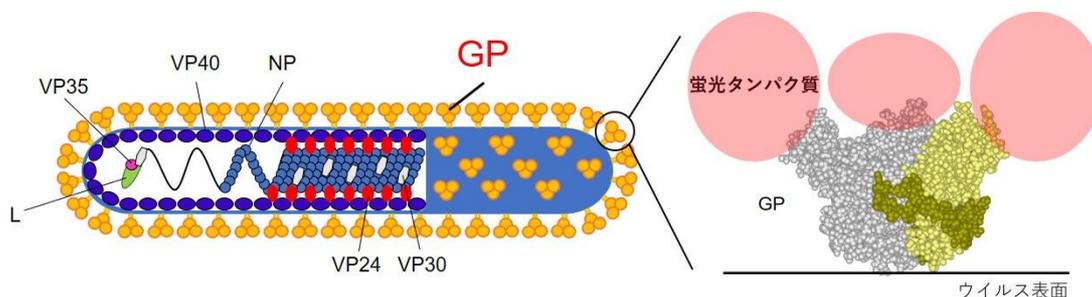


図1. エボラウイルス粒子構造と蛍光タンパク質融合GP

合 GP を纏ったシュードタイプウイルスは野生型と同様、細胞への感染が可能であることが判明した。さらに複数のエピトープが異なる中和抗体を用いて中和試験を行った結果、それらシュードタイプウイルスに対する中和活性に差異は観察されなかった。以上の結果から、本実験で作出された蛍光タンパク質融合 GP は野生型 GP の性状を保持していることが証明された。

## (2) 蛍光タンパク質融合 trVLP の作出と性状解析

(1)を基に trVLP 作出に必要なプラスミドを改変し、蛍光タンパク質融合 trVLP の作出を試みた。作出された trVLP の形状はひも状であり、野生型の trVLP と比較しても差は認められなかった(図 2A)。trVLP は野生型エボラウイルスと同様の感染サイクルを模倣可能である。そこで、次に、蛍光タンパク質の融合がウイルスの増殖と出芽に与える影響を trVLP アッセイにて観察した。その結果、蛍光タンパク質の一つである mCherry を融合した GP を纏った trVLP (trVLP-mCherry-GP)のみが継続して複製可能であることが判明した。

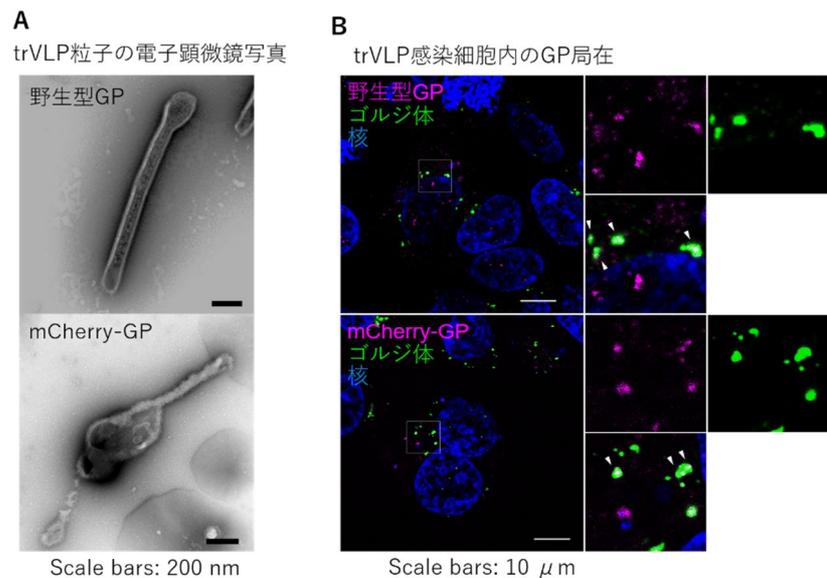


図2. 野生型trVLPとtrVLP-mCherry-GP

## (3) trVLP-mCherry-GP の細胞内局在解析

最期に、mCherry-GP のウイルス侵入から出芽までの過程を共焦点レーザー顕微鏡を用いて野生型と比較した。その結果、trVLP-mCherry-GP は、野生型と同様の経路にて細胞内に侵入していることが確認された。さらに、感染細胞内において、蛍光タンパク質融合 GP が野生型 GP と同様の細胞小器官に局在することを観察した(図 2B)。以上の結果により、細胞侵入過程からウイルス粒子形成までの一連のウイルス生活環における GP 動態の可視化に成功した。

## < 参考文献 >

- Hoenen, T., Watt, A., Mora, A., and Feldmann, H. (2014). Modeling the lifecycle of Ebola virus under biosafety level 2 conditions with virus-like particles containing tetracistronic minigenomes. *J Vis Exp*, 52381
- Zhang, X., Zhang, T., Davis, J.N., Marzi, A., Marchese, A.M., Robek, M.D., and Van Den Pol, A.N. (2020). Mucin-Like Domain of Ebola Virus Glycoprotein Enhances Selective Oncolytic Actions against Brain Tumors. *J Virol* 94.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Furuyama Wakako, Sakaguchi Miako, Yamada Kento, Nanbo Asuka	4. 巻 13
2. 論文標題 Development of an imaging system for visualization of Ebola virus glycoprotein throughout the viral lifecycle	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	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） 10.3389/fmicb.2022.1026644	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3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 古山若呼, 坂口美亜子, 山田健斗, 南保明日香,
2. 発表標題 エボラウイルス表面糖タンパク質の細胞内動態可視化システムの構築
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 Wakako Furuyama, Miako Sakaguchi, Kento Yamada, and Asuka Nanbo
2. 発表標題 Generation of a visualizing system for Ebola virus glycoprotein in the viral lifecycle
3. 学会等名 10th International Symposium on Filoviruses (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 古山若呼
2. 発表標題 米国BSL-4施設における高病原性ウイルスに関する研究紹介
3. 学会等名 第96回日本細菌学会総会（招待講演）
4. 発表年 2023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
---------	---------