

表1. 組換えArenavirus NP抗原とMAbの反応性

MAb	Reactivity of MAb * with NP of:					
	JUNV	MACV	GTOV	SABV	CHPV	LASV
C6-9	++/+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
C11-12	++/+	++/+	++/+	++/+	++/+	-/-
E4-2	++/+	+/-	+/-	+/-	-/-	-/-

* ELISA / IF での反応性を示す。

図1. Junin NP-MAbsの認識する epitope 部位

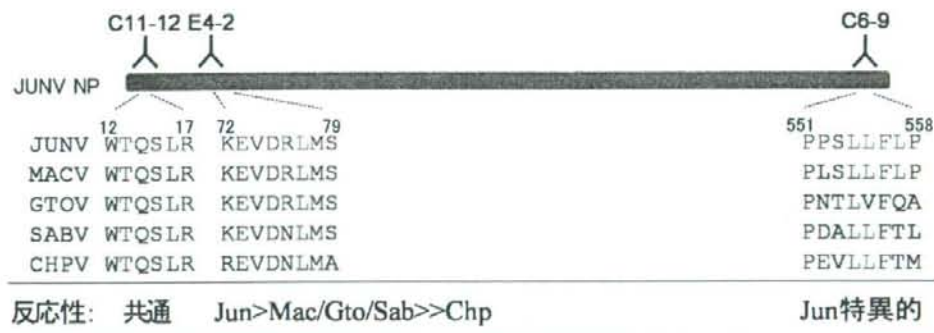


図2. 組換えArenavirus NPを用いた抗原検出ELISAの検討

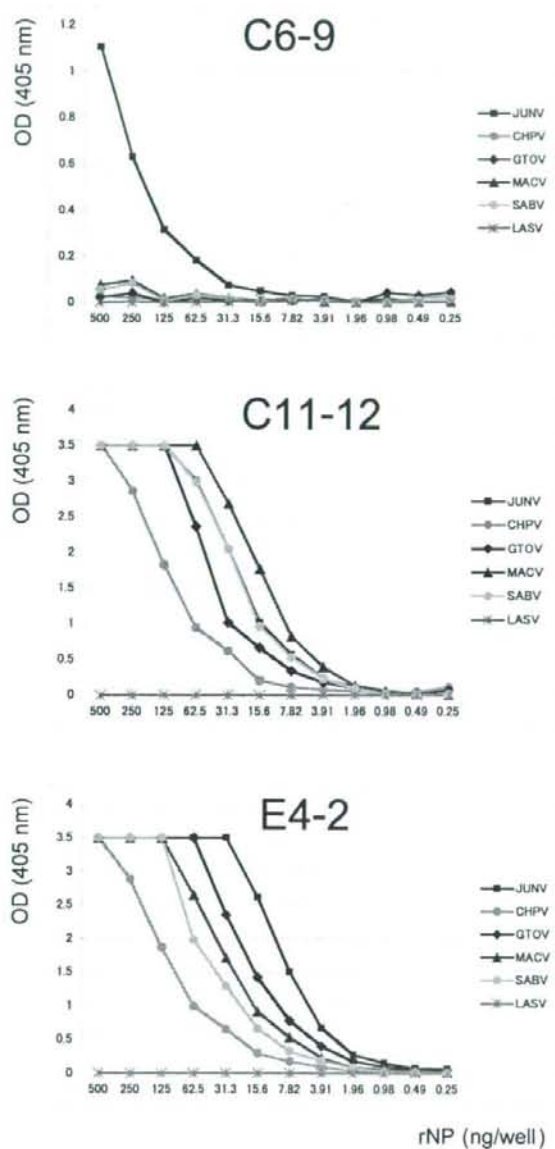
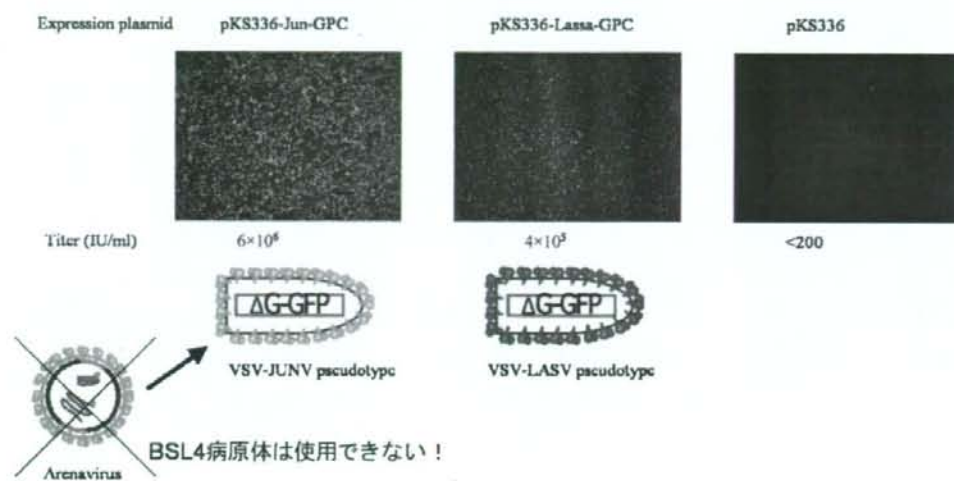


図3. 代替え中和試験のためのVSVシュードタイプ作製



防疫上緊急を要するウイルス性出血熱等に対する病原体診断法の確立
及び予防・治療法の開発に関する研究

分担研究課題：ニパウイルスの診断法の確立及び予防・治療法の開発に関する研究

研究分担者：甲斐知恵子（東京大学医科学研究所教授）

研究協力者：米田美佐子（東京大学医科学研究所）

研究要旨：ニパウイルス感染症は1998年にマレーシアで出現し、100名以上（致死率40%）の人が死亡した新興感染症である。自然宿主はオオコウモリと同定され、マレーシアではブタを介して人に伝播した。現在でもバングラディッシュ等でさらに高い致死率を示して散発的に発生しており、感染経路も人への直接伝播と考えられている。我が国では抗体陽性のオオコウモリや患者の発生は未だないが、比較的近いアジア地域で発生している感染症であり、今後の侵入に備えて迅速診断体制を整備し防御法を開発することが必要である。先進諸外国においては感染性のニパウイルスを扱う際にはBSL4施設内で行なうことが推奨されている。このため、本研究は、感染性ウイルスを用いることなくウイルス抗原や抗体を検出できる系を確立することと、予防・治療法の開発のための基礎的知見を得ることを目的とした。本年度は、以下の成果を得た。

1) 病原性に関与するウイルス蛋白質の同定を目的として作出した、アクセサリー蛋白遺伝子欠損組換えウイルスのin vitroでのIFN応答抑制能を検討した。2) 上記ウイルスの病原性を、感染実験により解析した。

A. 研究目的

ニパウイルス感染症は1998年にマレーシアで出現し、100名以上（致死率40%）を死亡させた新興感染症である。自然宿主はオオコウモリと同定され、マレーシアではブタを介して人に伝播した。現在でもバングラディッシュ等でさらに高い致死率を示して散発的に発生しており、感染経路もオオコウモリから人への直接伝播と考えられている。我が国では抗体陽性のオオコウモリは未だ発見されていないが、最近中国でも多数の抗体保有個体が発見され、国際的拡大が懸念されている。我国に比較的近いアジア地域で発生している感染症であり、今後の侵入に備えて、迅速診断体制を整備

し防御法を開発することは急務である。ニパウイルスの感染性ウイルスを扱う実験は、先進諸外国ではBSL4施設内で行なうことが推奨されている。このため本研究では、感染性ウイルスを用いることなくウイルス抗原や抗体を検出できる系を確立することと、予防・治療法の開発のための基礎的知見を得ることを目的とした。昨年度までにニパウイルス蛋白に対する抗体の作製、ニパウイルス感染動物臓器からRT-PCRによるウイルスゲノムの検出系の作製を行った。本年度は、予防・治療法の開発研究として、病原性に関与するウイルス蛋白を同定する目的で、昨年度作出したアクセサリー蛋白欠損組換えウイルスの性状解析を行った。

B. 研究方法

1) アクセサリー蛋白の IFN 応答抑制能の解析

NiV のアクセサリー蛋白(V,W,C)は、個別の研究によってそれぞれが IFN 応答を抑制することが報告されている。そこでまず細胞への発現系において個々の抑制能を比較検討するため、293T 細胞に ISRE (IFN-stimulated response element)に luciferase 遺伝子を接続したプラスミドと、それぞれのアクセサリー遺伝子発現プラスミドをトランスフェクションし、その 48 時間後に type1 IFN を培養液中に添加し、さらに 24 時間培養後 luciferase 活性を測定した。

2) アクセサリー蛋白欠損ニパウイルスの *in vitro* での性状解析

我々が樹立した reverse genetics 系を用いて、ニパウイルスの 3 つのアクセサリー蛋白遺伝子をそれぞれ欠損させたウイルスを作出した (図 1)。それら 3 つの組換えウイルスの Vero および 293 細胞での増殖能を、非欠損ウイルスと比較した。それぞれのウイルスを $moi=0.01$ で細胞に接種した後、1 日後から毎日、細胞と上清を合わせて回収し、遠心後の上清のウイルス力価を測定した。

またアクセサリー蛋白欠損ウイルス感染細胞における IFN 応答についても解析した。293T 細胞に ISRE に luciferase 遺伝子を接続したプラスミドをトランスフェクションし、24 時間後に組換えウイルスを感染させた。その 6 時間後に type1 IFN を培養液中に添加し、さらに 24 時間培養後 luciferase 活性を測定した。

3) アクセサリー蛋白欠損ニパウイルスの *in vivo* での病原性の解析

アクセサリー蛋白欠損ウイルスのうち、C、W 蛋白欠損ウイルスを 1~100,000 pfu ずつハムスター腹腔内接種し、接種後 30 日目まで生死を観察した。また、各ウイルスを 1,000 pfu ずつハムスターに接種し、8 日目に安楽殺して臓器を採取し病理組織学的解析を行った。

C. 研究結果

1) アクセサリー蛋白の IFN 応答抑制能の解析

培養細胞で発現させた個々のアクセサリー蛋白の IFN 応答抑制能を reporter gene assay によって解析した。P、V、W 蛋白発現細胞では、luciferase の活性が強く抑制された。C 蛋白発現細胞においても他と比較してやや弱いものの抑制効果が認められた。これによって P 蛋白および全てのアクセサリー蛋白が IFN 応答抑制能を持つことが確認された。

2) アクセサリー蛋白欠損ニパウイルスの *in vitro* での性状解析

作出したアクセサリー蛋白欠損ウイルスの培養細胞での増殖を、親株と比較した。293 細胞および Vero 細胞において、C 蛋白を欠損させたウイルスは、親株と比較して増殖が抑えられていた。W 蛋白欠損ウイルスは、親株と同様の増殖を示した。V 蛋白欠損ウイルスでは、293 細胞においては親株と同等の増殖を示したが、Vero 細胞ではやや増殖が抑えられた (図 2)。

培養細胞における IFN 応答抑制能をみると、まず親株では luciferase の活性が強く抑制されており、ニパウイルスの感染により IFN シグナル伝達抑制が起こることが確かめられた。アクセサリー蛋白欠損ウイルスを感染させた場合、全ての感染細胞において luciferase の活性がほぼ完全に抑えられて

おり、親株感染の場合と同様の結果となった(図3)。

3) アクセサリー蛋白欠損ニパウイルスの *in vivo* での病原性の解析

アクセサリー蛋白欠損組換えウイルスのうち、本年度はC、W蛋白欠損ウイルスに関してハムスターでの病原性を解析した。1~100,000 pfuの組換えウイルスを、1タイター10匹ずつのハムスターに投与し、致死率を見た結果、W蛋白欠損ウイルスを接種した場合には、親株と同じ病原性を示した。しかし、C蛋白欠損ウイルスは10,000 pfu接種しても1匹も死亡せず、臨床症状は何も認められなかった。1,000 pfuのウイルスを接種し、8日後に採取した臓器を病理組織学的に解析すると、W蛋白欠損ウイルスを接種したハムスターでは、親株を接種した場合と同様に、脳、肺、腎、肝などで広範に病変を認めた。しかし、C蛋白欠損ウイルスを接種したハムスターにおいては、肺でやや炎症が認められたが、その程度はごく軽度であった。

D. 考察

ニパウイルスの病原性を規定する遺伝子の特定は、弱毒化ワクチン開発に有用な知見を与える。アクセサリー蛋白であるV、W、C蛋白は、単独発現系において細胞のIFN応答や誘導能に関与することが報告されているが、ウイルス感染細胞や個体内における役割は未だ明らかにされていない。そこで本年度は、昨年度に作出したアクセサリー蛋白の発現を1つずつ欠損した組換えウイルスの性状、病原性解析を行った。

C蛋白欠損ウイルスは培養細胞中で、最大 10^7 TCID₅₀/ml程度まで増殖できるものの、親株の1/10程度に落ちていることが明らかとなった。またこのウイルスのハムス

ターでの病原性は著しく減弱していた。またW蛋白欠損ウイルスは、親株と比較して増殖、病原性とも同じであった。また、培養細胞中でのIFN応答抑制への影響を調べた実験の結果では、V、C、W蛋白いずれも欠損させたウイルスにおいても、親株と同等のIFN応答抑制が認められた。この結果は、IFN応答抑制能を持つアクセサリー蛋白を欠損させたウイルスでは、抑制能は減弱するという事前の予想とは全く逆の結果となった。これは、P蛋白のIFN応答抑制能が、アクセサリー蛋白の影響に比べて非常に強いためだと考えられた。

E. 結論

アクセサリー蛋白欠損ニパウイルスのうち、C蛋白欠損ウイルスの病原性が明らかに減弱していた。これは弱毒化ワクチンの候補の一つとなると考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yasui, F., Kai, C., Kitabatake, M., Inoue, S., Yoneda, M., Yokochi, S., Kase, R., Sekiguchi, S., Morita, K., Hishima, T., Suzuki, H., Karamatsu, K., Yasutomi, Y., Shida, H., Kidokoro, M., Mizuno, K., Matsushima, K. and Kohara, M. Prior immunization with SARS-CoV nucleocapsid protein causes severe pneumonia in mice infected with SARS-CoV. *J. Immunol.*, 18(9):6337-48, 2008
2. Takayama, I., Kubo, M., Takenaka, A., Fujita, K., Sugiyama, T., Arai, T., Yoneda, M., Sato, H., Yanai, T. and Kai, C. Pathological and phylogenetic features of prevalent canine distemper viruses in wild

- Masked palm civets in Japan. *Comp. Immunol. Microb.*, in press, 2008 Sep 5 [Epub ahead of print]
3. Terao-Muto, Y., Yoneda, M., Seki, T., Watanabe, A., Tsukiyama-Kohara, K., Fujita, K. and Kai, C. Heparin-like glycosaminoglycans prevent the infection of measles virus in SLAM-negative cell lines. *Antiviral Res.*, 80: 370-376, 2008.
 4. Sato, H., Honma, R., Yoneda, M., Miura, R., Tsukiyama-Kohara, K., Ikeda, F., Seki, T., Watanabe, S., Kai, C. Measles virus induced cell-type specific changes in gene expression. *Virology*, 321-330, 2008.
 5. Hagiwara, K., Sato, H., Inoue, Y., Watanabe, A., Yoneda, M., Ikeda, F., Fujita, K., Fukuda, H., Takamura, C., Kozuka-Hata, H., Oyama, M., Sugano, S., Ohmi, S. and Kai, C. Phosphorylation of measles virus nucleoprotein upregulates the transcriptional activity of minigenomic RNA. *Proteomics*, 8, 1871-1879, 2008.6.
 6. Inoue, Y., Tsukiyama-Kohara, K., Yoneda, M., Sato, H. and Kai, C. Inhibition of host protein synthesis in B95a cells infected with HL strain of measles virus. *Comp. Immunol. Microb.*, 32: 29-41, 2008.
 7. Sato, H., Kobune, F., Ami, Y., Yoneda, M. and Kai, C. Immune responses against measles virus in cynomolgus monkeys. *Comp. Immunol. Microb.*, 31(1), 25-35, 2008.
2. 学会発表
1. Yoneda, M., Gillaume, V., Sato, H., Georges-Courbot, M-C., Takayama, I., Ikeda, F., Wild, F. and Kai, C. The function of Nipah virus accessory protein as virulence factors in vivo. XIVth Int. Cong. Virol. Istanbul, Turkey, August 11-15, 2008.
 2. Kai, C. Molecular determinant of Nipah virus pathogenicity. Symposium : "Emerging Infections: A tribute to the One Medicine, One Health Concept". Manhattan KS, U.S.A. November 13-14, 2008. (Invited speaker)
- H. 知的財産権の出願・登録状況
現在出願予定はない。

図1. アクセサリー蛋白欠損ウイルスの作出

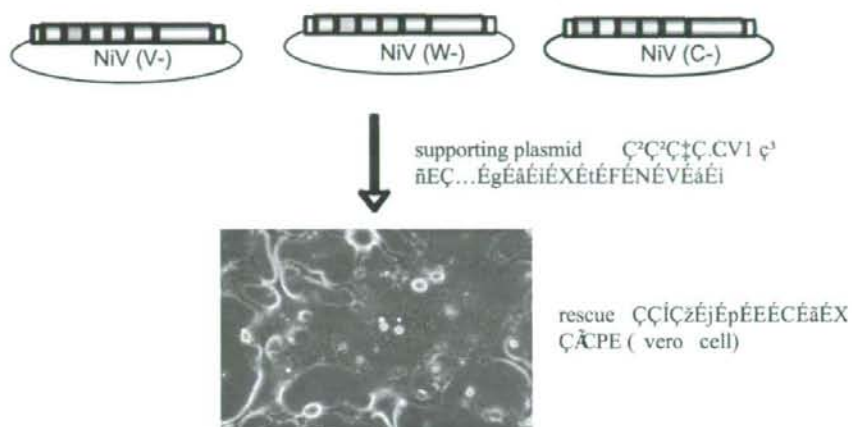


図2. アクセサリー蛋白欠損ウイルスの増殖

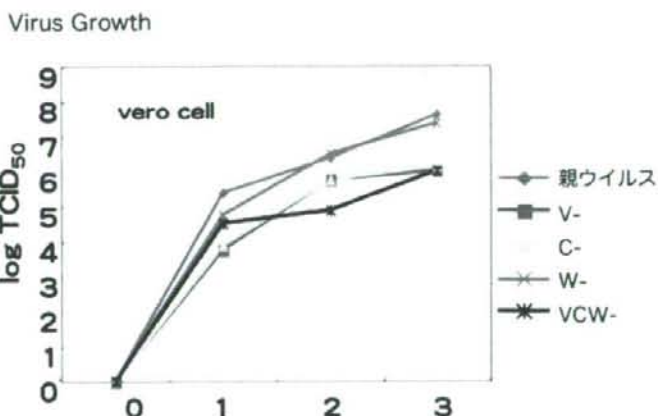
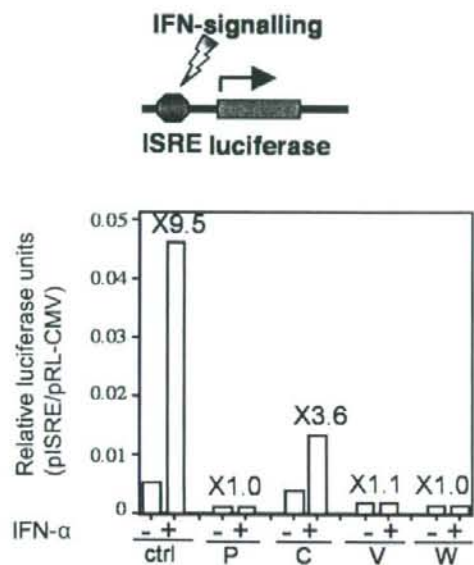


図3. ニパウイルスアクセサリ-蛋白の
IFN応答抑制能



トランスフェクションによる実験では、P、C、V、Wの全てがIFN応答反応を抑制した。

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

防疫上緊急を要するウイルス性出血熱等に対する病原体診断法の
確立及び予防・治療法の開発に関する研究

分担研究課題：エボラウイルスの診断法と抗ウイルス薬の検討

研究分担者 高田礼人 北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター

研究要旨：フィロウイルス感染症（エボラおよびマールブルグ出血熱）の診断法の開発を行う。既知のフィロウイルスの RNA 遺伝子を特異的かつ迅速に増幅する RT-PCR 法および感染動物あるいはヒト血清中のウイルス特異抗体を高感度で検出する ELISA 法を検討した。さらに、ウイルス抗原検出に用いるために、エボラウイルスの核蛋白質 NP に対する抗血清を作成した。また、中和抗体による受動免疫の効果を検討した。

A. 研究目的

フィロウイルス科はマールブルグウイルス属およびエボラウイルス属からなる。現在のところマールブルグウイルスは一属一種なのに対し、エボラウイルス属は抗原的および系統学的に 4 種（Zaire, Sudan, Ivory Coast および Reston）に分けられている。フィロウイルスによる感染症の発生頻度は近年非常に高くなっている。また近年、エボラウイルスの感染によって中央アフリカの大規模野生霊長類が多数死亡している。

フィロウイルスはヒトを含む霊長類に重篤な出血熱を引き起し、その致死率は極めて高い。病原性が強いこと、そして効果的な予防・治療法が実用化されていないことから、フィロウイルスは Biosafety Level 4 施設で取り扱わなければならない病原体である。本研究では、フィロウイルスによる感染症の診断法の開発のために、ウイルス RNA 遺伝子を特異的かつ迅速に増幅する方法、感染動物あるいはヒト血清中のウイルス特異抗体を高感度で検出する方法およびウイルス蛋白質抗原を簡便に検出する方

法を確立する。また、抗ウイルス薬の検討を行う。

B. 研究方法および成果

フィロウイルス遺伝子を検出できる RT-PCR 法の確立：

19 年度に確立した RT-PCR 法を用いて、エボラザイルウイルス感染マウスの臓器からのウイルスの検出を試みた。脾臓、肝臓および血清から高感度でウイルス遺伝子が検出されることを確認した（図 1）。

フィロウイルス特異抗体の検出法の確立：

エボラウイルス 4 種の表面糖蛋白質に関して、分泌型組み換え蛋白質を発現・精製した。それらを ELISA の抗原として用いて、それぞれの種特異血清を反応させ、特異性を確認した（図 2）。現在、臨床材料および野生動物由来材料への応用を検討している。

フィロウイルス抗原の検出法の確立：

エボラウイルス表面糖蛋白質上に種間共通

エピトープを発見した。また、そのエピトープを認識するモノクローナル抗体を得た。エボラウイルス NP 分子上の共通エピトープも検索したが見つからなかった。しかし、既知のエボラウイルスそれぞれに特異的なエピトープを発見し、それぞれに対するウサギ抗血清を作成した(表1)。

抗ウイルス薬の検討

フィロウイルスが細胞侵入に利用する宿主蛋白質の同定を行っている。

C. 考察および結論

これまでは、エボラウイルスなどの新興感染症は世界の限られた地域でしか認められていないが、昨今の急激な国際化による人の移動および動植物の輸出入に伴い、それらの疾病の原因病原体が他国に拡散する可能性が高まっている。実際に、最近オランダおよびアメリカ合衆国でマールブルグウイルスの輸入感染例が見ついている。また、エボラウイルスのような致死率の高い出血熱ウイルスがバイオテロリズムの手段として使用される危険性が高まっている。このような危険度の高い伝染性病原体が日本に持ち込まれた場合に備えて国家レベルで対策を講じる事が急務となってきた。これらの病原体の日本国内への侵入の有無を迅速に判断し、適切な対応措置を執るために、抗ウイルス薬の開発とともに、感度および特異性の高い診断法の確立は重要な課題である。

D. 研究発表

1.論文発表

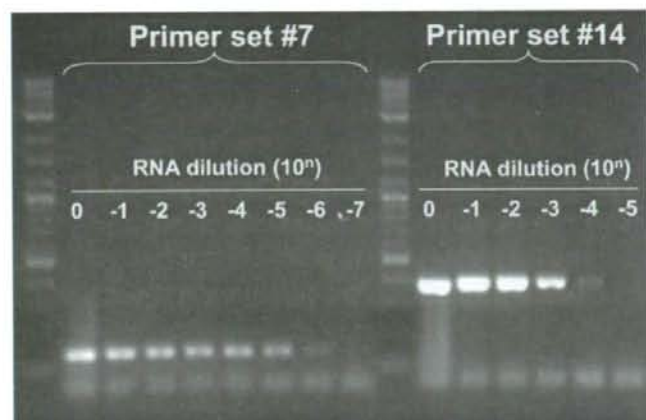
1. Igarashi, M., Ito, K., Kida, H., and Takada, A. (2008) Genetically destined potentials for N-linked glycosylation of influenza virus hemagglutinin. *Virology* 376 (2) : 323-329.
2. Kishida, N., Sakoda, Y., Shiromoto, M.,

Bai, G.R., Isoda, N., Takada, A., Laver, G., and Kida, H. (2008) H2N5 influenza virus isolates from terns in Australia: genetic reassortants between those of the Eurasian and American lineages. *Virus Genes* 37(1) : 16-21.

3. Murakami S, Iwasa A, Iwatsuki-Horimoto K, Ito M, Kiso M, Kida H, Takada A, Nidom CA, Mai le Q, Yamada S, Imai H, Sakai-Tagawa Y, Kawaoka Y, Horimoto T. (2008) Cross-clade protective immunity of H5N1 influenza vaccines in a mouse model. *Vaccine* 26(50) : 6398-6404.
4. Soda, K., Ozaki, H., Sakoda, Y., Isoda, N., Haraguchi, Y., Sakabe, S., Kuboki, N., Kishida, N., Takada, A., and Kida H. (2008) Antigenic and genetic analysis of H5 influenza viruses isolated from water birds for the purpose of vaccine use. *Arch. Virol.* 153 (11) : 2041-2048.

図1エボラザイルウイルス感染マウスからのウイルス遺伝子検出

Spleen (10^{7-8} FFU/g tissue)



Liver (10^{7-8} FFU/g tissue)

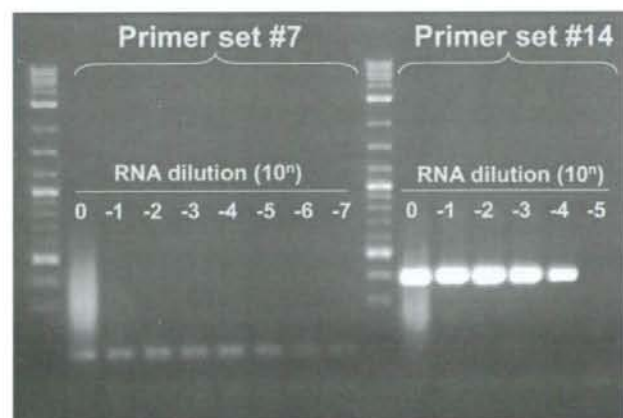


図2 エボラウイルスGP抗原を用いた特異抗体の検出
(VLP免疫マウス)

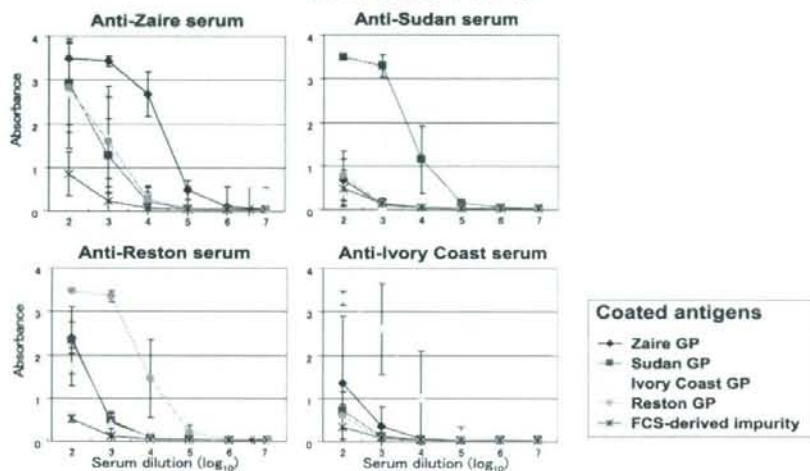


表1 NPに対するウサギ抗血清の反応性

Synthetic peptide	Animal	Species		
		Zaire	Sudan	Reston
ZaireNP#542 -555	Mouse	+++	-	-
	Rabbit	+++	-	-
ZaireNP#628 -638	Mouse	+++	-	-
	Rabbit	++	-	-
SudanNP#631 -644	Mouse	-	+++	-
	Rabbit	-	+++	-
RestonNP#630 -643	Mouse	-	-	+++
	Rabbit	-	-	+++
FiloNP#344 -356	Mouse	++	+	++

NP expressed in 293T



Control



防疫上緊急を要するウイルス性出血熱等に対する病原体診断法の確立
及び予防・治療法の開発に関する研究

分担研究課題：マールブルグウイルスの診断法とウイルス粒子形成後期過程
阻害法の検討に関する研究

研究分担者：安田 二郎 科学警察研究所法科学第一部生物第五研究室長

研究要旨：マールブルグウイルス（MARV）の産生を阻害する細胞性因子の解析およびウイルス出芽過程の解析を行った。その結果、Tetherin が MARV およびラッサウイルスの子孫ウイルス粒子産生に対して阻害活性をもつことを明らかにし、実際にこの分子が生体で先天性免疫機構（innate immunity）の一つとしてウイルスに対する防御に重要な役割を果たしていることが示唆された。更に、MARV の出芽には Nedd4.1、Vps4B が宿主因子として重要な役割を果たすことを明らかにし、出芽には MVB 選別系が利用されていることが強く示唆された。Nedd4.1 の HECT ドメインが宿主因子としての機能に重要であることもわかった。これらの成果は、MARV に対する新規抗ウイルス戦略の開発に有用な情報になると考えられる。

A. 研究目的

極めて高い病原性をもつマールブルグウイルス（MARV）は新興感染症として警戒が必要だけでなく、バイオテロへの利用も危惧されている。1967年西ドイツ、ユーゴスラビアで7名の死者を出して以来、度々アフリカでアウトブレイクを繰り返しており、最近では2004年から2005年にかけてアンゴラで277名もの死者を出している。わが国における発症報告はないが、防疫上緊急を要する新興感染症である。そこで、本研究ではMARVの迅速診断法と治療法の開発を目的として研究を行う。本年度は、新規抗ウイルス戦略の標的として有効と考えられるウイルス出芽過程の解析およびウイルス産生を阻害する細胞性因子の解析を行った。

B. 研究方法

1) MARV 産生を阻害する細胞性因子の解析：

Tetherin は、ヒト免疫不全ウイルス1型（HIV-1）の感染細胞からの放出を阻害する細胞性因子として2008年に同定された。この因子は別名BST-2、HML1.24、CD317とも呼ばれ、インターフェロン（IFN）- α によって誘導され、N末端、C末端双方で細胞膜と結合する奇異な構造をもつ糖蛋白質である（図1）。Tetherinの抗ウイルス活性はHIV-1の修飾因子Vpuによって拮抗されることも報告されているが、その阻害機構等については全くわかっていない。

そこでまず、HIV-1以外のウイルスに対するTetherinの抗ウイルス活性を調べるために、Tetherinを発現していないことが確認されているCOS-7、293T細胞で、MARV産生に対するTetherinの効果を解析した。MARVはウイルスマトリクス蛋白質VP40

の発現のみでウイルス様粒子 (VLP) を形成し、VLP を細胞外へ出芽放出する (Urata et al., 2007)。したがって、この VLP 産生系を用いて、COS-7 細胞、293T 細胞における Tetherin の共発現が VLP 産生にどのような影響を与えるかを調べた。VLP 産生の増減は培養上清から超遠心法により VLP を回収した後、ウエスタンブロット (WB) 法で解析した。また、Tetherin の糖鎖修飾が抗ウイルス活性に必要なかどうかについても糖鎖欠失変異体を作製して調べた (図 1)。

MARV に対する Tetherin の抗ウイルス作用に対しても、Vpu が拮抗作用を持つことを Vpu 発現プラスミドを用いて確認した。更に、ラッサウイルス (LASV) についてもウイルスマトリクス蛋白質 Z の発現による VLP 産生系を用いて同様の解析を行い、LASV に対する Tetherin の抗ウイルス作用を調べた。

2) MARV 出芽機構の解析:

昨年度、MARV の VP40 に存在するウイルス出芽に重要な L-ドメインモチーフの同定と宿主因子 Tsg101 の同定を報告したが、今年度は更に MARV 出芽の解析を進めた。

まず、宿主因子と予想される Nedd4.1 と Vps4 の関与を調べるために各々の発現を特異的に抑制する siRNA を MARV-VLP 発現系に導入して VLP 産生への影響を見た。Nedd4.1 は N 末側に C2 ドメイン、中心部に 4 つの WW ドメイン、C 末側に HECT ドメインをもつが (図 7)、MARV 出芽に重要な Nedd4.1 の機能ドメインを明らかにする目的で Nedd4 の各種変異体を VLP 産生系に共発現させ、VLP に対する影響を解析した。

更に、VP40 と Nedd4 の相互作用について GST-pulldown アッセイを行い、双方の結合に重要な領域を同定した。

C. 研究結果

1) MARV 産生を阻害する細胞性因子の解析:

MARV の VLP 産生系に Tetherin を発現させると COS-7 細胞、293T 細胞の何れにおいても、VLP 産生は WB で検出できないレベルまでほぼ完全に阻害された (図 2)。Tetherin の糖鎖欠失変異体も同様に VLP 産生を阻害する効果をもつことが確認された。

同様の解析を LASV の VLP 産生系でも行った結果、ラッサ VLP の産生も Tetherin 発現により阻害されることが明らかになった (図 3)。

Tetherin 発現はタンパク質合成には影響がないことを確認したので、VLP 産生阻害がどのステップで起きているのかを電子顕微鏡観察により調べた結果、Tetherin 発現細胞では細胞表面で VLP の凝集が見られ、放出阻害が起こっていることがわかった (図 4)。

更に、Tetherin によるマールブルグ VLP、ラッサ VLP の産生阻害効果は Vpu 発現により打ち消されることを確認した (図 5)。

2) MARV 出芽機構の解析:

siRNA による Nedd4、Vps4B の発現抑制はマールブルグ VLP 産生を顕著に阻害した (図 6)。

Nedd4.1 の過剰発現はマールブルグ VLP 産生を促進した (図 7)。解析した Nedd4.1 変異体のうち WW、 Δ HECT 変異体はドミナントネガティブに VLP 産生を阻害した。C894A、WG1234 変異体は促進も抑制もしなかった。 Δ C2、 Δ Q は VLP 産生を促進した。

GST-pulldown アッセイにより、VP40 と Nedd4 の相互作用を解析した結果、予想通り MARV の L ドメインである PPPY 配列を欠失させた VP40 Δ PPPY 変異体は Nedd4.1 との結合能を失った (図 8)。つまり、Nedd4.1 は VP40 の PPPY 配列を認識して結

合することが明らかになった。

D. 考察

1) MARV 産生を阻害する細胞性因子の解析:

HIV-1 のウイルス放出を阻害する細胞性因子として同定された Tetherin が MARV および LASV の放出も阻害することを明らかにした。この結果は幅広いウイルス種に対して、Tetherin が同様の抗ウイルス作用をもつことを示唆した。

また、糖鎖欠失変異体を用いた解析から、糖鎖修飾は Tetherin の抗ウイルス作用に全く影響しないことが明らかになった。

電子顕微鏡による解析から Tetherin の抗ウイルス作用の一つは細胞膜からのウイルス放出阻害にあることがわかった。

更に、Vpu が、HIV-1 で観察されたのと同様に、MARV、LASV に対する Tetherin のウイルス産生阻害活性に対して拮抗作用をもつことが示され、Tetherin はこれらのウイルスに対して同様の作用機構でウイルス産生を阻害することが示唆された。

以上の成績から、Tetherin は IFN によって誘導される先天性免疫機構 (innate immunity) の一つとして実際に生体でウイルスに対する宿主防御に重要な役割を果たしていることが示唆され、Tetherin を利用した新規抗ウイルス戦略の可能性が示された。

2) MARV 出芽機構の解析:

siRNA による Nedd4、Vps4B の発現抑制がマールブルグ VLP 産生を顕著に阻害したことから、MARV 出芽には Nedd4、Vps4B も宿主因子として関与することが示された。

昨年度、宿主因子として同定した Tsg101、および今年度宿主因子として同定した Nedd4.1、Vps4B は何れも細胞内膜輸送系の一つである Multivesicular body (MVB) 選別系において重要な機能を担っていること

が知られている。MVB 選別系は、ある種のユビキチン化タンパク質を積み荷として認識し、エンドソーム膜に輸送した後、エンドソーム膜の内腔側への陥入によって形成される小胞 (MVB) に積み荷を封入するという細胞内膜輸送系 (メンブレントラフィック) の一つであるが、エンドソーム膜上における MVB 形成と細胞膜上でのウイルス出芽は位相学的に同一と見ることが出来る。したがって、MARV は MVB 形成機構を利用して出芽することが強く示唆された。

Nedd4.1 変異体の解析から、C2 ドメインを含む Nedd4.1 の N 末領域は MARV 出芽の宿主因子としての Nedd4.1 の機能に不要であること、E3 ユビキチンリガーゼ活性よりもむしろ HECT ドメイン自体が出芽に重要であること、WW ドメインが VP40 との相互作用に重要であることが明らかになった。また、VP40 の L-ドメインとして以前に同定した PPPY 配列が Nedd4.1 との結合に必須であることも明らかになった。

これらの研究成果は、ウイルス出芽を標的とした新規抗ウイルス療法の開発に有用な情報であると考えている。

E. 結論

1-1、Tetherin が MARV および LASV のウイルス産生阻害効果をもつことを明らかにした。他の様々なウイルス種に対しても同様の効果をもつことが示唆された。

1-2、Tetherin は先天性免疫機構 (innate immunity) の一つとしてウイルスに対する宿主防御に重要な役割を果たしていることが示唆され、Tetherin を利用した新規抗ウイルス戦略の可能性が示された。

2-1、MARV の出芽には Nedd4.1、Vps4B が宿主因子として重要な役割を果たすことを明らかにし、出芽には MVB 選別系が利用されていることが強く示唆された。

2-2、Nedd4.1 の HECT ドメインが宿主因子としての機能に重要であることがわかった。

会大会合同大会 (BMB2008)、神戸、2008 年 12 月。

F. 健康危険情報
該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Sakuma, T., Noda, T., Urata, S., Kawaoka, Y., and Yasuda, J.: Inhibition of Lassa and Marburg virus production by Tetherin. *Journal of Virology*, 83, 2382-2385, 2009.2.

2. 学会発表

1. Yasuda, J., and Urata, S.: Analyses of Marburg virus budding. In "The 4th International Symposium on Filovirus; Filovirus Global Symposium", Libreville, Gabon, March 26-28, 2008.
2. Kurosaki, Y., Grolla, A., Feldmann, H., and Yasuda, J.: Rapid and simple detection for Marburg virus with the RT-LAMP method, In "The 4th International Symposium on Filovirus; Filovirus Global Symposium", Libreville, Gabon, March 26-28, 2008.
3. Yasuda, J.: Cellular and viral requirements for budding of Mason-Pfizer monkey virus. In "The 14th International Congress of Virology", Istanbul, Turkey, August 10-15, 2008
4. 安田二郎、佐久間稔恵: Tetherin によるラッサウイルス、マールブルグウイルスの産生阻害、第 56 回日本ウイルス学会学術集会 ワークショップ「ウイルス侵入・粒子形成」、岡山、2008 年 10 月 28 日。
5. 安田二郎、佐久間稔恵: Tetherin によるウイルス産生阻害、第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学

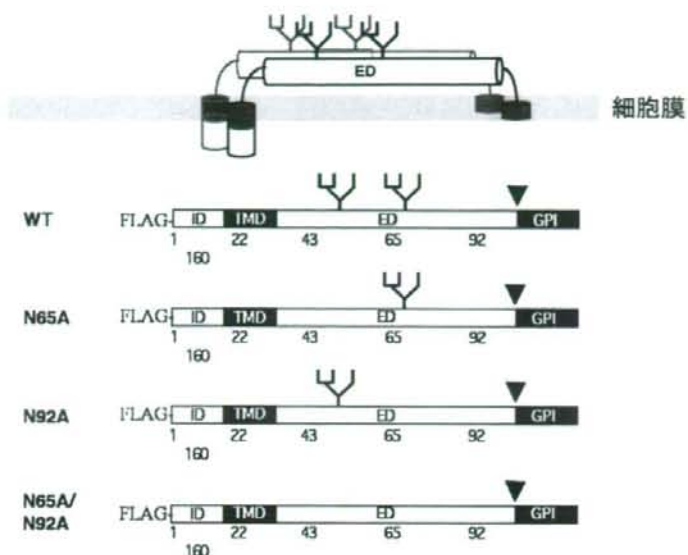


図 1、Tetherinの構造と糖鎖欠失変異体

ID: intracellular domain, TMD: transmembrane domain, ED: extracellular domain, GPI: GPI anchor.

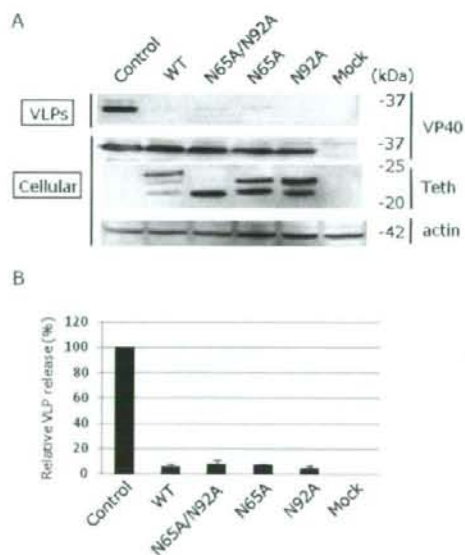


図 2、TetherinによるマールブルグウイルスVLP産生阻害 (COS-7細胞)

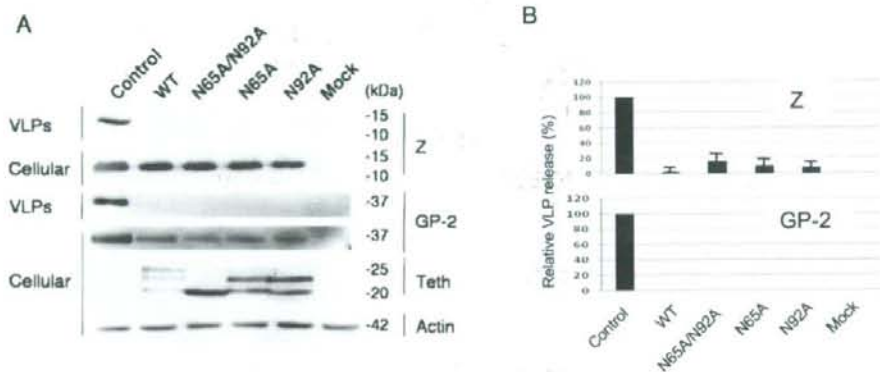


図 3、TetherinによるラッサウイルスVLP産生阻害
(COS-7細胞)

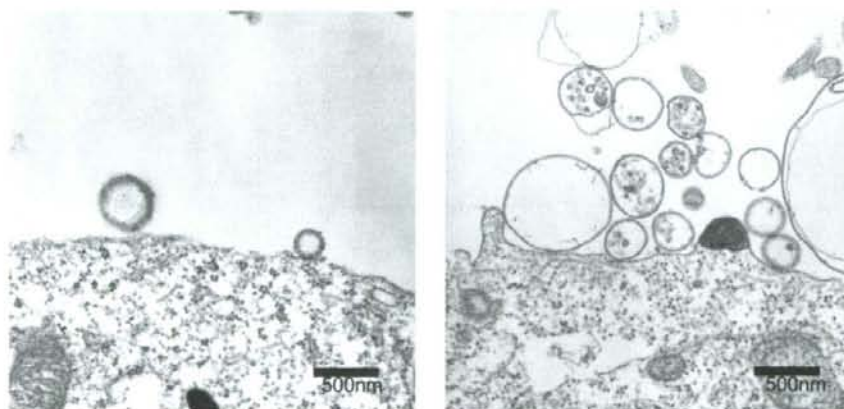


図 4、TetherinによるラッサウイルスVLP産生阻害
(左) 293T細胞にZのみを発現、(右) 293T細胞にZとTetherinを共発現

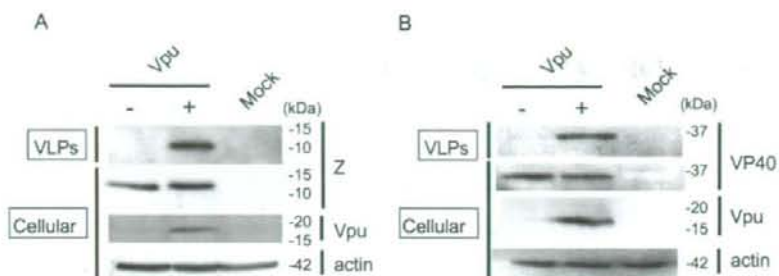
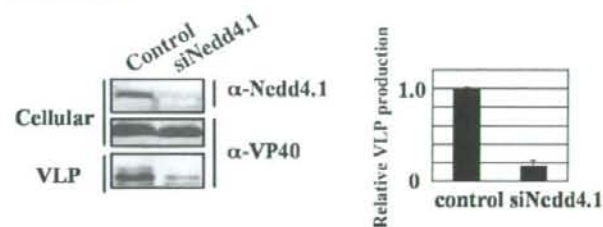


図 5、TetherinによるVLP産生阻害はHIV-1Vpu発現により拮抗される
 (左) ラッサVLP産生系、(右) マールブルグVLP産生系

A. Nedd4.1



B. Vps4B

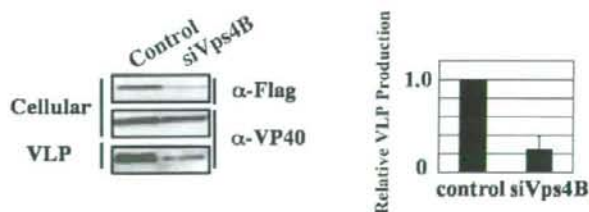


図 6、Nedd4、Vps4Bに対するsiRNAがマールブルグVLP
 産生に与える影響