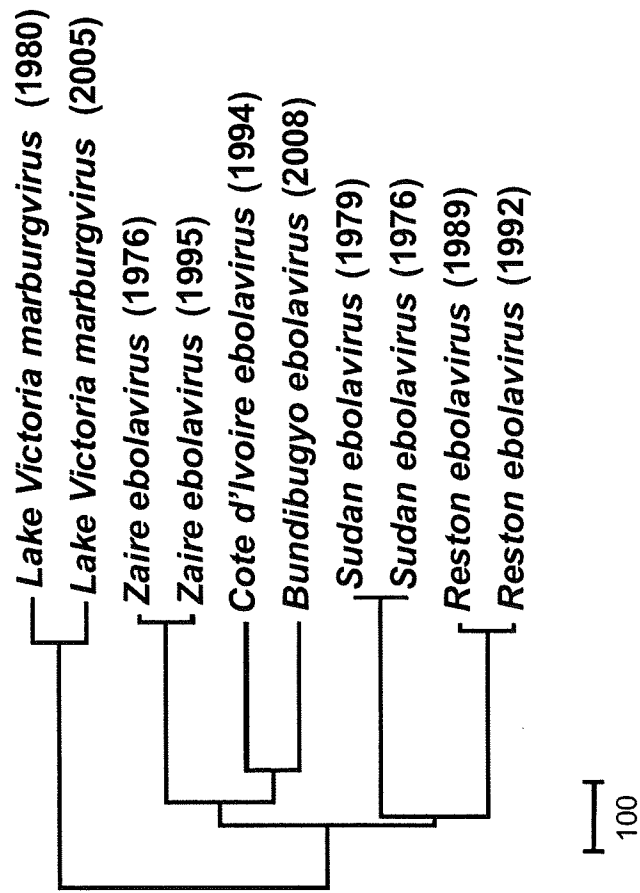


図1 フィロウィルスの系統解析



## 図2 フィロウイルス検出のためのユニバーサルプライマー

### FiLoNP656-680 Fmix

FiLoNP656-680Fa TGCACATGGTTGCCGGGCATGATGC  
 FiLoNP656-680Fb TGCATATGGTAGCAGGTCACGATGC  
 FiLoNP656-680Fc TAAATTTGGTGACAGGTCATGATGC

### FiLoNP1032-1057 Rmix

FiLoNP1032-1057Ra TGCTTCTCAGCCCTCAGTGGCAGCCTC  
 FiLoNP1032-1057Rb TGTTTTCTGCCCTCAGTGGCTGCTTC  
 FiLoNP1032-1057Rc TTTACYTCTGCATCATGTGCTGCYTC

### QIAGEN OneStep RT-PCR Kit

50°C	30 min	} 50 cycles
94°C	15 min	
94°C	15sec	
55°C	30sec	
72°C	30sec	
72°C	7 min	
4°C	pause	

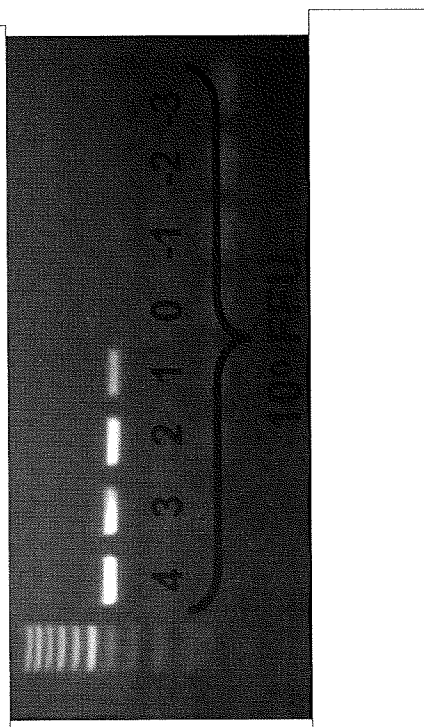
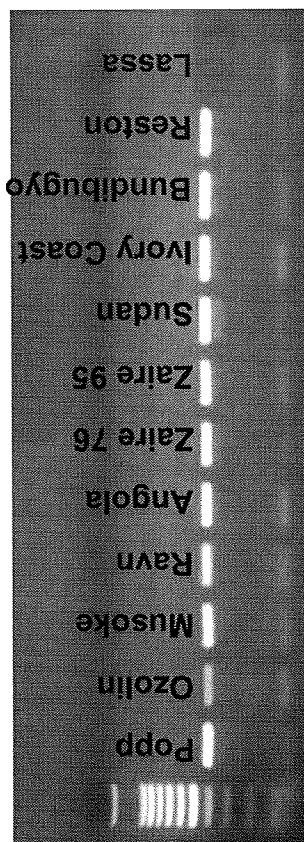


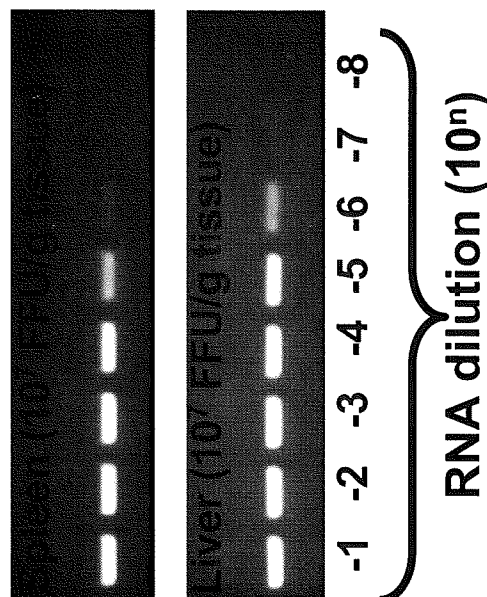
図3 感染マウス臓器中のウイルス検出

**FilONP656-680 Emix**

FilONP656-680Fa TGCACATGGTTGCCGGGCATGATGC  
 FilONP656-680Fb TGCATATGGTAGCAGGTCACGATGC  
 FilONP656-680Fc TAAATTTGGTGACAGGTCATGATGC

**FilONP1032-1057 Rmix**

FilONP1032-1057Ra TGCTTCTCAGCCTCAGTGGCAGCCTC  
 FilONP1032-1057Rb TGTTTTTCTGCCCTCAGTGGCTGCTTC  
 FilONP1032-1057Rc TTTACYTCTGCATCATGTGCTGCTC



(1.0μl of RNA extracted from 0.01g tissue, eluted in 10μl DW was used)

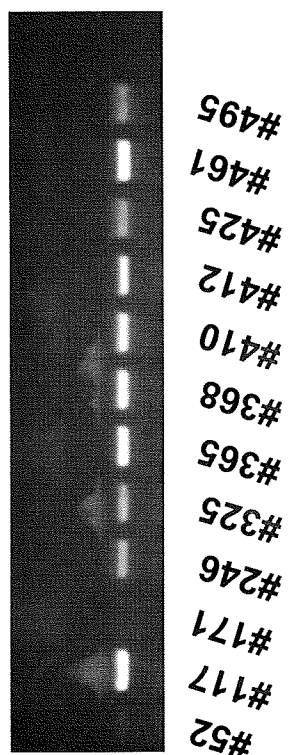
**図4 アンゴラマールブルグウイルス感染  
患者血清中のウイルス検出**

**FilNP656-680 Fmix**

FilNP656-680Fa TGCACATGGTTGCCGGGCATGATGC  
 FilNP656-680Fb TGCATATGGTAGCAGGTCACGATGC  
 FilNP656-680Fc TAAATTTGGTGACAGGTCATGATGC

**FilNP1032-1057 Rmix**

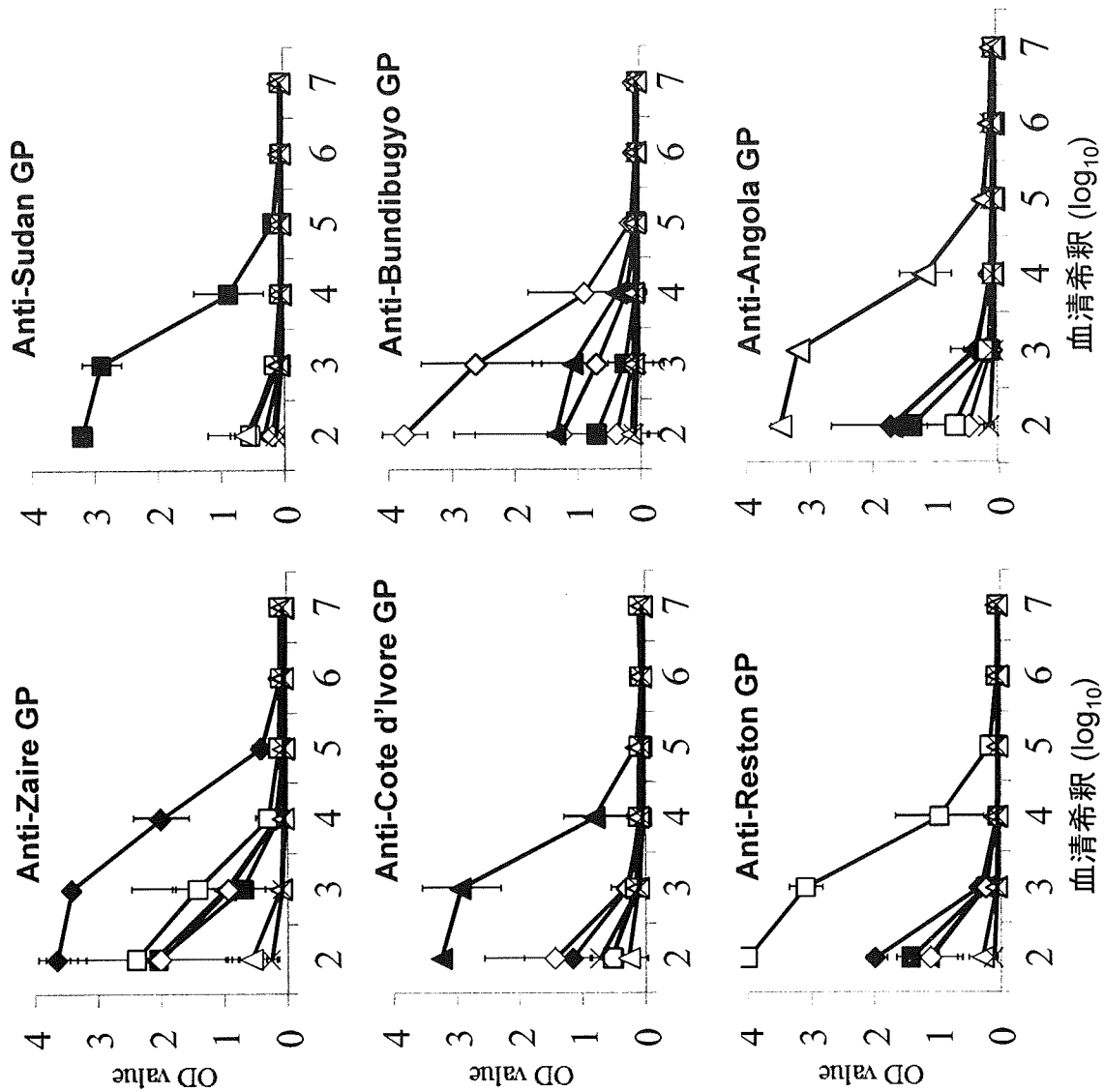
FilNP1032-1057Ra TGCTTCTCAGCCTCAGTGGCAGCCTC  
 FilNP1032-1057Rb TGTTTTTCTGCCCTCAGTGGCTGCTTC  
 FilNP1032-1057Rc TTTACYTCTGCATCATGCTGCTGCYTC



Patient ID

(1.0μl of RNA extracted from 0.1ml  
 serum, eluted in 10μl DW was used)

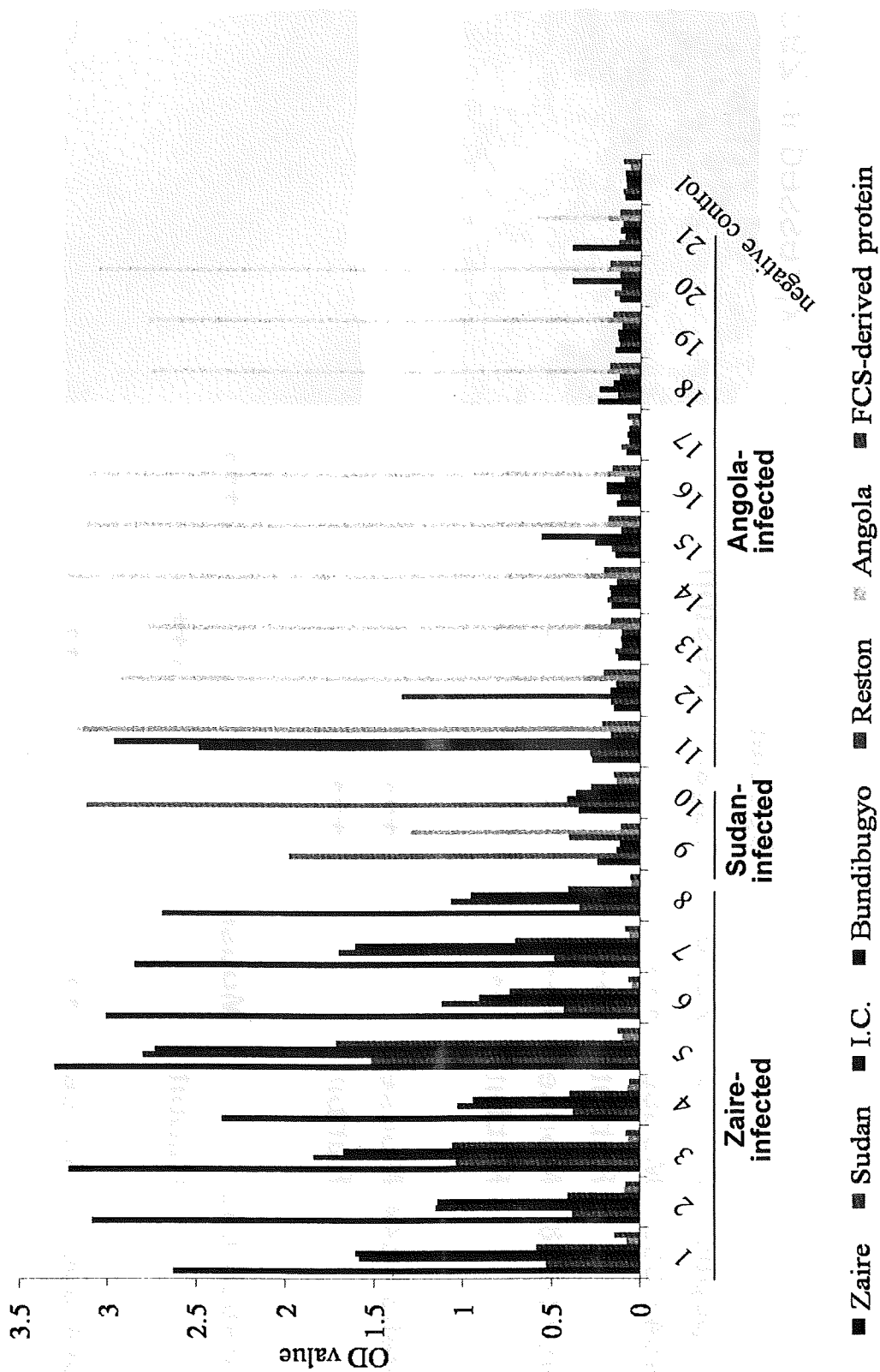
図5 分泌型ファイロウイルス表面糖蛋白質を抗原とした  
ELISAの特異性(VLP免疫マウス血清)



◆Zaire ■Sudan ▲Cote d'Ivoire □Reston △Bundibugyo ⊠Angola

—FCS-derived protein

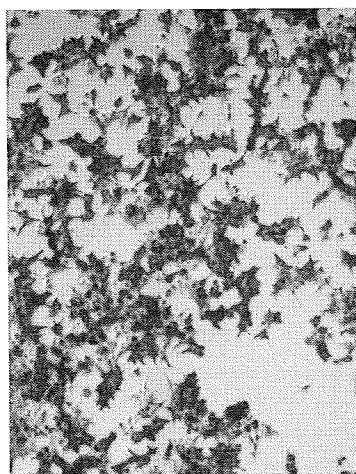
図6 分泌型ファイロウイルス表面糖蛋白質を抗原としたELISAの特異性(感染者血清)



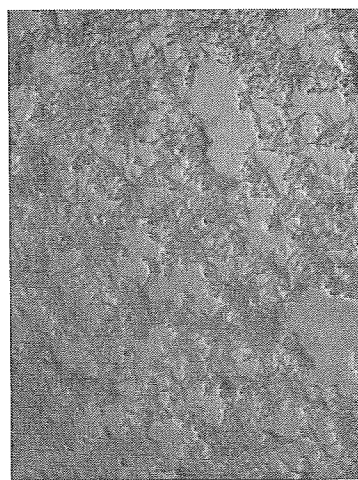
■ Zaire ■ Sudan ■ I.C. ■ Bundibugyo ■ Reston ■ Angola ■ FCS-derived protein

# 図7 合成ペプチドで免疫して作成した抗NP抗血清の反応性

NP expressed in 293T



Control

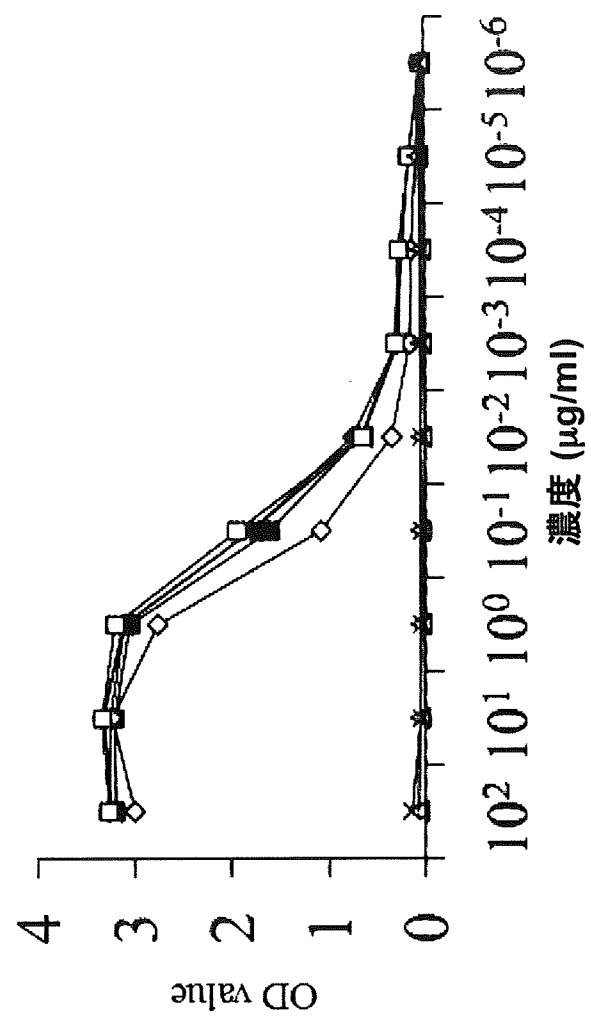


Synthetic peptide	Animal	Species		
		Zaire	Sudan	Reston
ZaireNP#542-555	Mouse	+++	-	-
	Rabbit	+++	-	-
ZaireNP#628-638	Mouse	+++	-	-
	Rabbit	++	-	-
SudanNP#631-644	Mouse	-	+++	-
	Rabbit	-	+++	-
RestonNP#630-643	Mouse	-	-	+++
	Rabbit	-	-	+++
FiloNP#344-356	Mouse	++	+	++

図8 エボラウイルス表面糖蛋白質共通エピトープ

モノクローナル抗体  
ZGP 42/3.7 エピトープ

Zaire (281-300)	INADIGEWAFWENKKNLSEQ
Sudan (281-300)	IDTTIGEWAFWETKKNLTRK
Reston (282-301)	IEPDVGEWAFWETKKNFSQQ
Ivory Coast (281-300)	VDTSMGEWAFWENKKNFTKT
Bundibugyo (281-300)	VDTGVGEWAFWENKKNFTKT



◆ Zaire ■ Sudan ▲ Cote d'Ivoire ● Bundibugyo × Reston -- Angola -- FCS-derived protein



## 厚生労働科学研究費 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：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：本研究課題では、マールブルグウイルス（MARV）の出芽機構の解析とウイルス産生阻害活性をもつ細胞性因子の解析を行った。その結果、MARVの出芽にはNedd4.1、Tsg101、AP3 $\delta$ 、Vps4Bが宿主因子として重要な役割を果たすことがわかり、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はエボラウイルス（EBOV）の出芽にも関わる宿主因子であるが、MARVとEBOVはNedd4.1内の異なるWWドメインを特異的に認識して結合することも明らかになった。更に、MARV粒子産生を阻害する細胞性因子としてTetherinを同定した。TetherinはI型インターフェロンにより誘導される因子であり、実際に生体で自然免疫機構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。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。また、MARVの迅速・簡便な検出法としてRT-LAMP法を開発した。LAMP法の簡便性は、アウトブレイクの発生地である発展途上国での使用にも適していると考えられる。

研究協力者：黒崎陽平（科学警察研究所法  
科学第一部生物第五研究室）

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阻害活性をもつ細胞性因子の解析を行った。

#### 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なだけでなく、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、本研究では迅速診断法としてRT-LAMP法の開発と新規抗ウイルス戦略の標的とし

#### B. 研究方法

##### 1) RT-LAMP法の開発：

MARV分離株はMusoke系統とRavn系統の2つに分けられるので、それぞれの系統を特異的に検出することができるLAMPプライマーセットをプライマーデザイン支援ソフトPrimerExplorer ver.3を用いてデザインした。遺伝子の保存性の比較的高いNP領域を増幅の標的領域とした。各LAMPプライマーセットの特異性と検出感度をHeinz Feldmann博士（カナダ国立微生物学研究所）より御分与いただいたMusoke系

統 3 株 (Musoke、Ozoline、Angola 株) と Ravn 系統 1 株 (Ravn 株) のウイルス RNA、あるいは *in vitro* 転写反応により調製した疑似ウイルス RNA を用いて検討した。増幅反応は Loopamp RNA 増幅試薬キット (栄研化学) を用いて 63°C で行った。増幅反応の特異性の確認は反応産物を制限酵素処理し、アガロースゲル電気泳動を行うことにより確認した。また、増幅のリアルタイムモニタリングはリアルタイム濁度測定装置を用いて行った。

更に、2004-5 年のアンゴラでのアウトブレイクの際に採取された生体試料 (血液、血清、乳汁、口腔拭い液) を対象とした RT-LAMP 法の評価もカナダ国立微生物学研究所にて行った。

## 2) MARV 出芽機構の解析

MARV のマトリクス蛋白質である VP40 にはウイルス出芽に重要と考えられる L-ドメインモチーフの一つである PPxY 配列が存在する。実際にこの配列が L-ドメインとして機能することを確認するために、この配列に変異を導入した VP40 変異体発現プラスミドを作製した。野生型あるいは変異型 VP40 発現プラスミドを細胞に導入し、培養上清中にウイルス様粒子 (VLP) が産生されるかどうかをウェスタンブロット (WB) 法および電子顕微鏡観察により確認した。更に WB 法で VLP 産生量の比較解析も行った。続いて、MARV の主要構造蛋白質である GP、NP 蛋白質を発現するプラスミドも作製し、様々な組み合わせで細胞に VP40 発現プラスミドと共導入することにより、VLP 形成への GP、NP の関与を調べた。

これまでに他のエンベロープウイルスの解析で出芽に関わる宿主因子として同定されている Nedd4.1、Tsg101、Vps4、AP3  $\delta$  が MARV の出芽にも関わるかどうかを明らか

にするために、siRNA を用いて各因子の発現を抑制した細胞に VP40 発現プラスミドを導入して VLP 産生への影響を WB 法により調べた。更に、VP40 と Tsg101 の相互作用について GST-pulldown アッセイにより解析した。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 1)、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。

## 3) MARV 産生を阻害する細胞性因子の解析

Tetherin は、感染細胞からヒト免疫不全ウイルス I 型 (HIV-1) が放出されるの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、HM1.24、CD317 とも呼ばれ、インターフェロン (IFN)- $\alpha$  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 2)。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 VLP 産生に対する Tetherin 発現の効果を解析した。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、WB 法で解析した。また、Tetherin の糖鎖修飾あるいは二量体化が抗ウイルス活性に必要であるかどうかについても変異体を作製して調べた (図 2、3)。

## C. 研究結果

### 1) RT-LAMP 法の開発

Musoke 系統用、Ravn 系統用の各 RT-LAMP プライマーセットの特異性を Musoke 系統 3 株 (Musoke、Ozoline、Angola)、Ravn 系統 1 株 (Ravn)、エボラウイルス 5 株 (Zaire76、Zaire95、Sudan、Reston、Ivory Coast)、ラッサウイルス 2 株 (Josiah、Pinneo) のウイルス RNA を用いて調べた結果、何れの系統に対する RT-LAMP も同一系統の MARV のみを特異的に検出することができた (図 4)。1 ng (3.3x10<sup>4</sup> ウイルス RNA コピー相等) のウイルス RNA の検出に要した時間は両系統とも 20 分以内であった。検出限界は Musoke 用、Ravn 用共にウイルス RNA100 コピーであった (表 1)。更に、両系統用のプライマーを混合して使用 (Multiplex) することにより、全 MARV 分離株を検出することも可能であった。

更に、臨床検体についても 10<sup>4</sup>TCID<sub>50</sub>/ml 以上の MARV が存在していれば、80-100% 検出可能であることが確認された (図 5)。

### 2) MARV 出芽機構の解析

VP40 発現プラスミドを導入した 293T 細胞からひも状のウイルス様粒子 (VLP) の出芽が電子顕微鏡下で確認された (図 6A)。また、VP40 発現細胞の培養上清中に VLP が産生されていることも WB 法で確認できた。PPxY 配列に点変異をもつ VP40 変異体は何れも野生型に比べ VLP 産生能が低下していた (図 6B、C、D)。VP40 と共に GP、NP を細胞で発現させると VLP 産生量は VP40 単独時に比べ、NP 共発現で 4.2 倍、GP 共発現で 2 倍、NP/GP 双方の共発現で 9.3 倍増加した (図 7A、B)。

Nedd4.1、Tsg101、Vps4、AP3 $\delta$  に特異的な siRNA を用いて各因子の発現をそれぞれ抑制した 293T 細胞に、VP40 あるいは VP40/GP/NP 発現プラスミドを導入し、産生される VLP 量を解析した。その結果、これ

らの因子の何れについても、発現抑制が VLP 産生を顕著に阻害することがわかった (図 8)。

また、GST-pulldown アッセイにより Tsg101 が VP40 に結合することも明らかにした (図 9)。更に、VP40 の PPxY 配列欠失変異体を用いて同様に pulldown アッセイを行ったところ、Tsg101 との結合は見られなかった。Tsg101 の VP40 への結合は PPxY 配列依存性であることが示された。

一方、Nedd4.1 の過剰発現は VLP 産生を促進した (図 1)。解析した Nedd4.1 変異体のうち WW、 $\Delta$ 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。 $\Delta$ C2、 $\Delta$ 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  $\Delta$ PPPY 変異体は Nedd4.1 との結合能を失った (図 10)。更に、Nedd4.1 の 4 つの WW ドメインのうち 1 番目に変異を導入すると VP40 の結合が顕著に阻害されることも示された (図 10)。

### 3) 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 11)。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。Tetherin 発現が細胞内におけるウイルスタンパク質合成には影響がないことを確認した後、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。その結果、Tetherin 発現細胞では細胞表面で VLP の凝集が見られ、放出阻害が起きていることがわかった。

更に、Tetherin の二量体化能を失わせた変異体は若干活性が弱くなるもののまだ90%程度の抗ウイルス活性（VLP 産生阻害活性）を有していることが示された（図3）。

#### D. 考察

##### 1) RT-LAMP 法の開発

特異性が高く、迅速、簡便、かつ高感度の RT-LAMP 法を開発することができた。TaqManRT-PCR 法よりも若干検出感度は低かったが（表1）、LAMP 法は PCR 法のように厳密な温度制御を必要とせず、簡便な恒温槽があれば検査を行うことができる点、検出にかかる時間が短い点、濁度や蛍光で結果判定が可能でゲル電気泳動などが不要である点などいくつかの利点がある為、アウトブレイクの発生地である発展途上国で有用な検出法であると思われる。

##### 2) MARV 出芽機構の解析

VP40 の単独発現で VLP が形成され、出芽することが確認できた。また、VP40 に存在する PPPY 配列が L ドメインとして出芽に重要な役割を果たすことも明らかにした。VLP 形成には VP40 だけでなく、GP 及び NP も補助的に関わり、効率の良い VLP 産生に必須であることがわかった。また、siRNA を用いた解析から MARV 出芽には Nedd4.1、Tsg101、Vps4、AP3  $\delta$  が宿主因子として関与していることが明らかになった。Tsg101、Vps4 は細胞内膜輸送系の一つである 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 : Multivesicular body）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 が 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った。更に、EBOV VP40 が Nedd4.1 の3番目の WW ドメインを主に認識するのに対して、MARV VP40 は1番目の WW ドメインを主に認識することがわかりウイルス種ごとに Nedd4.1 の結合特異性が存在することが明らかになった（図10）。

宿主因子に対する siRNA が効率良く出芽を抑制することと併せて、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。

##### 3) 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 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、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、及び二量体化は活性に重要ではあるが必須では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。

以上の成績から、Tetherin は IFN によって

誘導される自然免疫機構 (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。

#### E. 結論

1-1、迅速、簡便、高感度、かつ特異性の高い RT-LAMP 法を開発した。

1-2、開発した RT-LAMP は臨床サンプルの検査にも有用であった。

2-1、MARV の出芽には VP40 が中心的な役割を果たしており、GP、NP も粒子形成・出芽に影響する。また、VP40 内に存在する PPxY 配列が L-ドメインとして出芽に重要な機能を担っている。

2-2、MARV 出芽には宿主因子として Nedd4.1、Tsg101、Vps4、AP3  $\delta$  が関わっており、その出芽機構には MVB 選別系機構が利用されていることが示唆された。また、宿主因子を標的とした抗ウイルス戦略の可能性が示唆された。

3-1、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。

3-2、Tetherin は自然免疫機構 (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。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Urata, S., and Yasuda, J.: Regulation of Marburg virus budding by Nedd4.1; a different WW domain of Nedd4.1 is

critical for the binding to Marburg and Ebola virus VP40. *Journal of General Virology*, 91, 228-234, 2010.

2. 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.
3. 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. 学会発表

1. 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。
2. 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.
3. 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.
4. 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
5. 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。

なし

6. 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 回日本生化学会大会合同大会（BMB2008）、神戸、2008 年 12 月。
7. 安田二郎、浦田秀造：ウイルス出芽と細胞内膜輸送系、第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会合同大会（BMB2007）ワークショップ「膜輸送をめぐるユビキチン機能の新展開」、横浜、2007 年 12 月
8. 浦田秀造、横沢英良、安田二郎：ユビキチンリガーゼによるマールブルグウイルス粒子形成の制御、第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会合同大会（BMB2007）、横浜、2007 年 12 月
9. 安田二郎、浦田秀造：ウイルス出芽に関わるウイルス側エレメントと宿主因子、第 55 回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2007 年 10 月
10. 浦田秀造、横沢英良、安田二郎：マールブルグウイルス粒子形成の解析、第 55 回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2007 年 10 月
11. 黒崎陽平、安田二郎：マールブルグウイルスの迅速遺伝子検出法の開発、第 55 回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2007 年 10 月
12. Urata, S., Noda, T., Kawaoka, Y., Morikawa, S., Yokosawa, H., and Yasuda, J.: The interaction between Tsg101 and VP40 depending on PPPY is important for Marburg virus-like particle production. In "The 26th Annual Meeting of American Society for Virology", Oregon, USA, pp271, July 14-18, 2007

H. 知的財産権の出願・登録状況

表1、RT-LAMP法の検出感度

		RT-LAMP						TaqMan RT-PCR				
artificial RNA		NP(Musoke)			NP(Ravn)			NP(Multiplex)				
strain	copies/test	EP	FL	real-time (min)	EP	FL	real-time (min)	EP	FL	real-time (min)	CT	detection time (min)
Musoke	1.E+06	+	+	17.8	+	+	18.6	+	+	19.1	20.3	32.8
	1.E+05	+	+	19.4	+	+	20.5	+	+	19.6	22.1	34.3
	1.E+04	+	+	21.6	+	+	22.9	+	+	22.4	26.0	36.5
	1.E+03	+	+	26.9	+	+	27.4	+	+	25.6	29.0	38.8
	1.E+02	+	+	30.7	+	+	32.9	-	-	-	32.7	41.8
	1.E+01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	36.6	44.8
	1.E+00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1.E-01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	neg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ravn	1.E+06	+	+	-	+	+	18.6	+	+	19.1	-	-
	1.E+05	+	+	-	+	+	20.5	+	+	19.6	-	-
	1.E+04	+	+	-	+	+	22.9	+	+	22.4	-	-
	1.E+03	+	+	-	+	+	27.4	+	+	25.6	-	-
	1.E+02	+	+	-	+	+	32.9	-	-	-	-	-
	1.E+01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1.E+00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1.E-01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	neg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

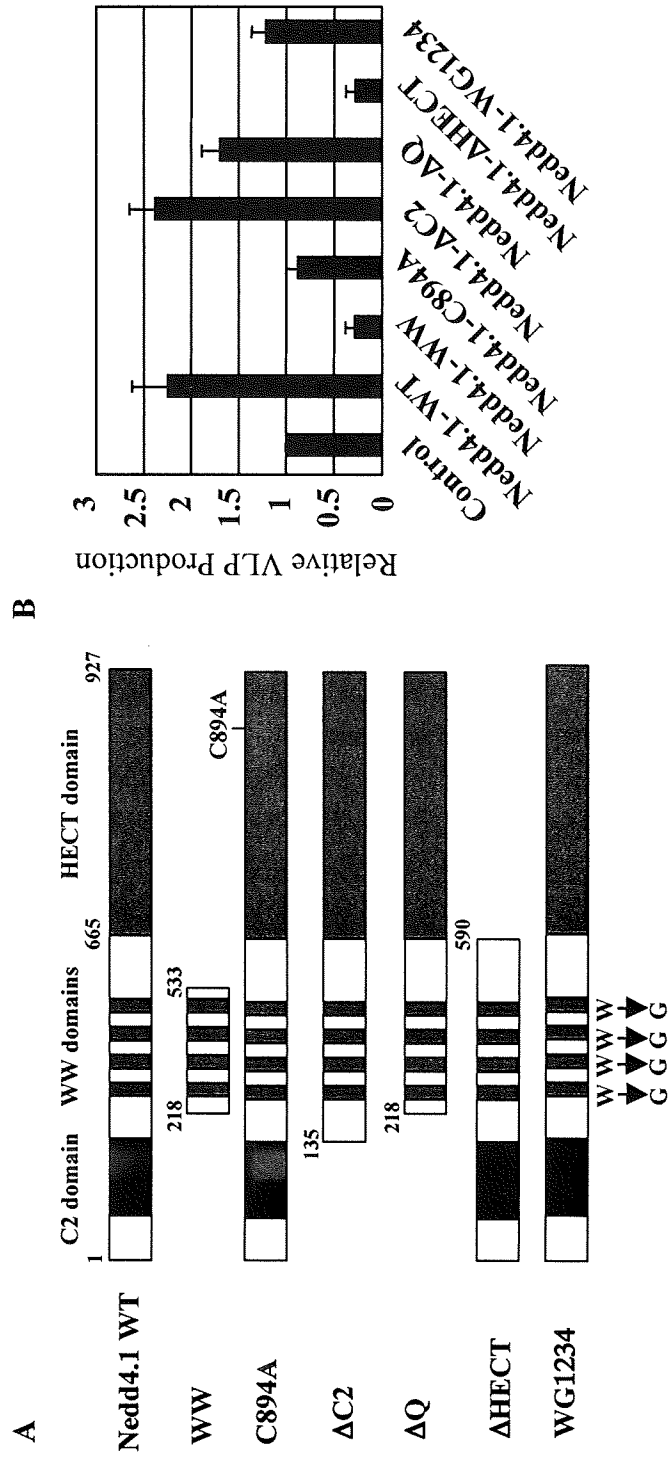
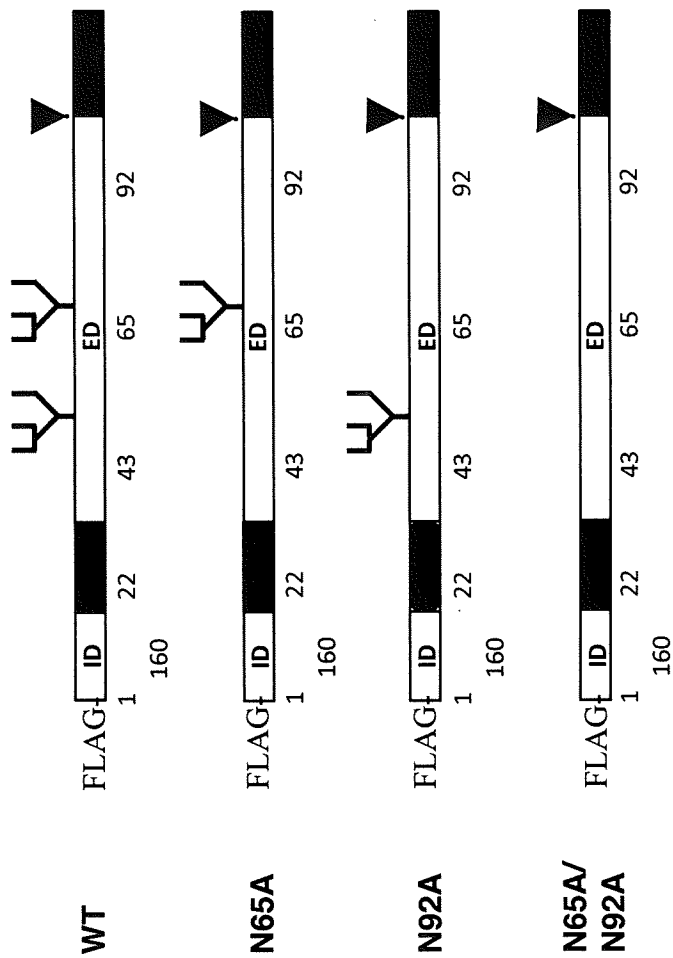
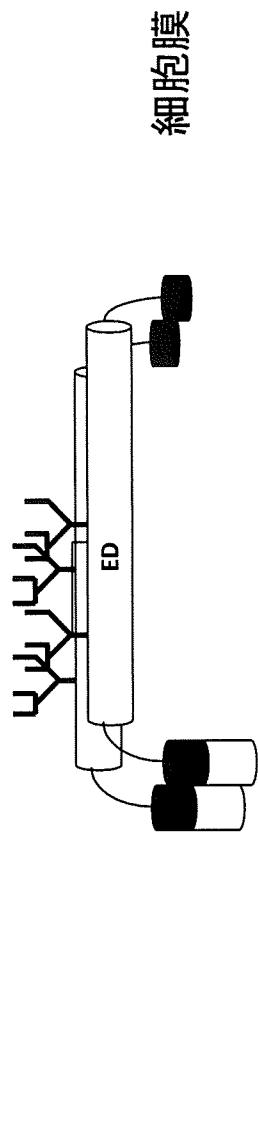


図1、マールブルグウイルス出芽に参与するNedd4.1の機能ドメイン





**図2、Tetherinの構造と糖鎖欠失変異体**

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

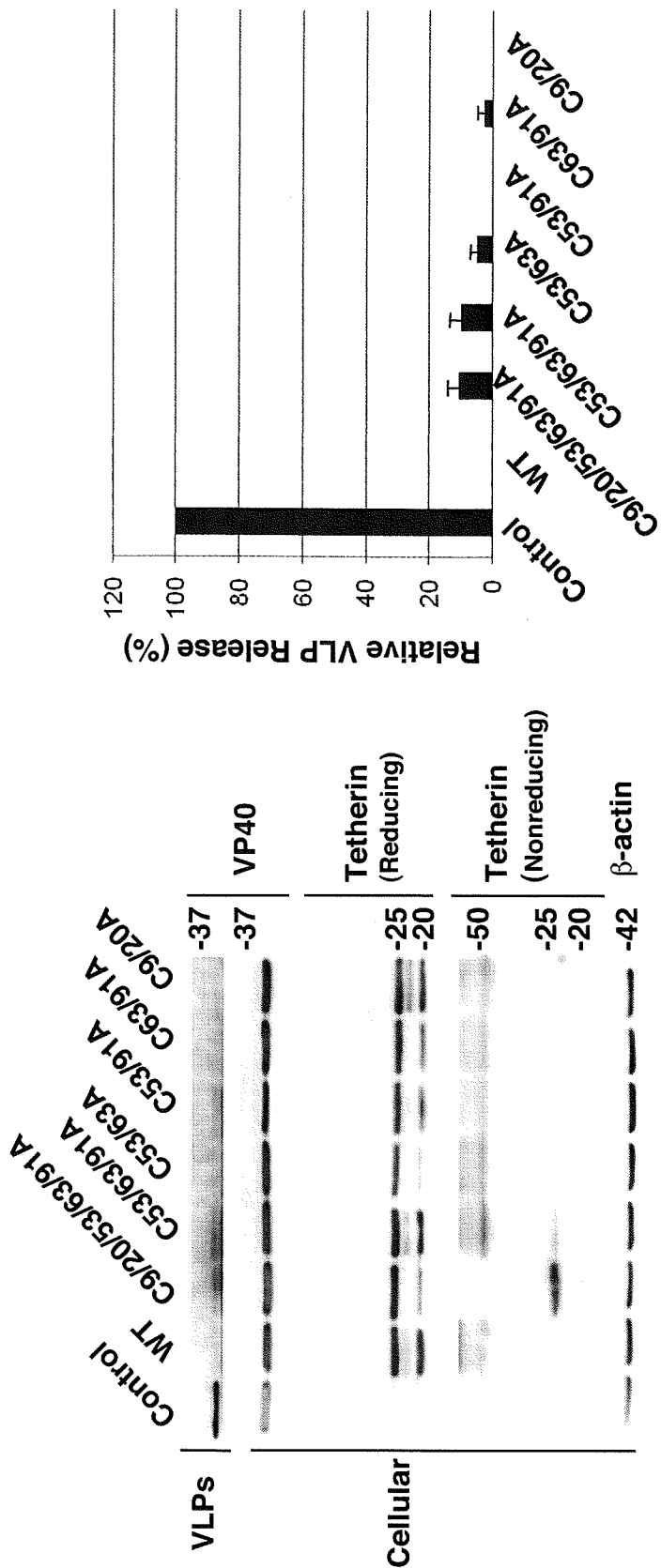
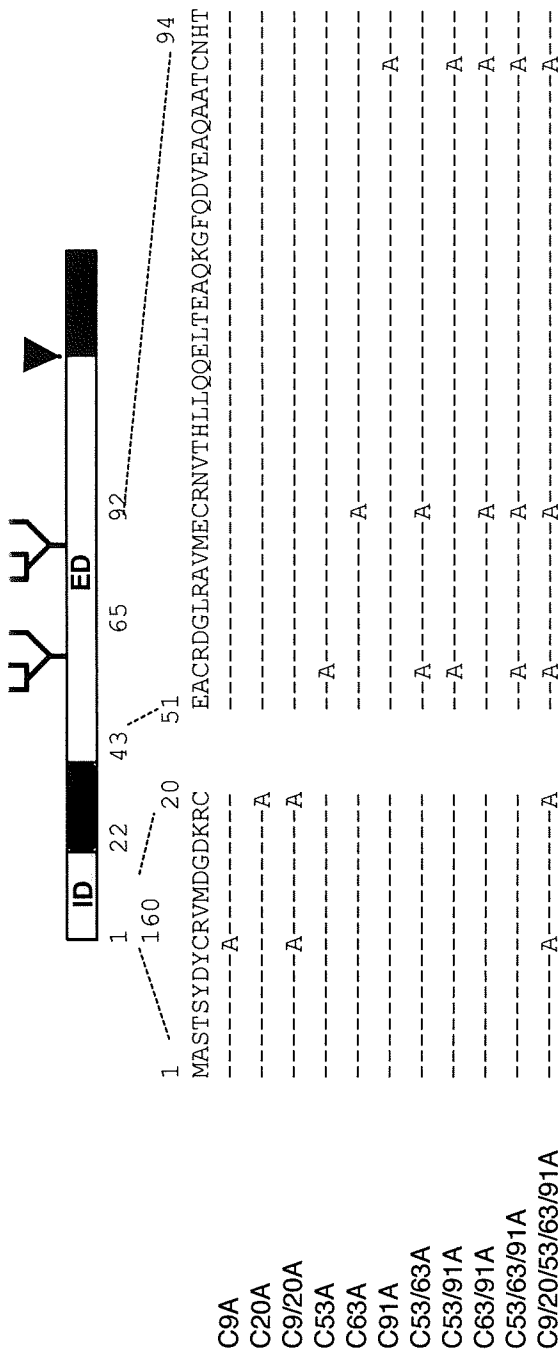
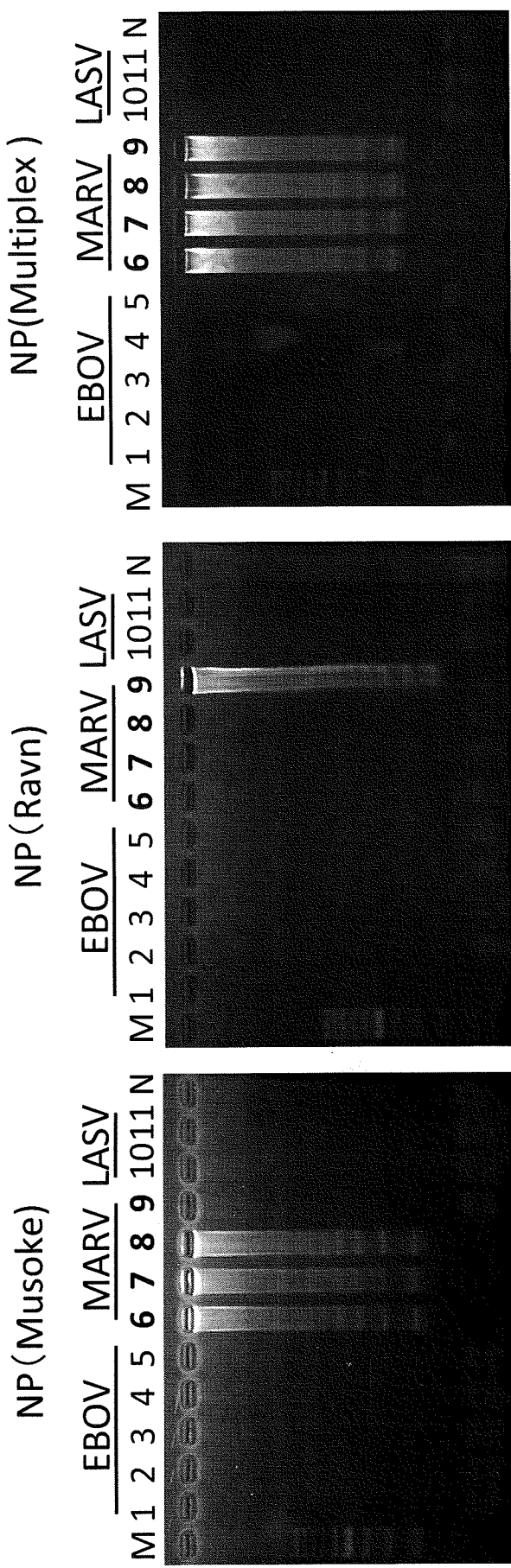


図3、Tetherinの2量体化とウイルス放出阻害活性



- 1. Zaire76
- 2. Zaire 95
- 3. Sudan
- 4. Reston
- 5. Ivory Coast
- 6. **Musoke**

- 7. **Ozoline**
- 8. **Angola**
- 9. **Ravn**
- 10. Josiah
- 11. Pinneo
- N. negative control

反応条件: 63°C、60min

図4、RT-LAMP法の特異性

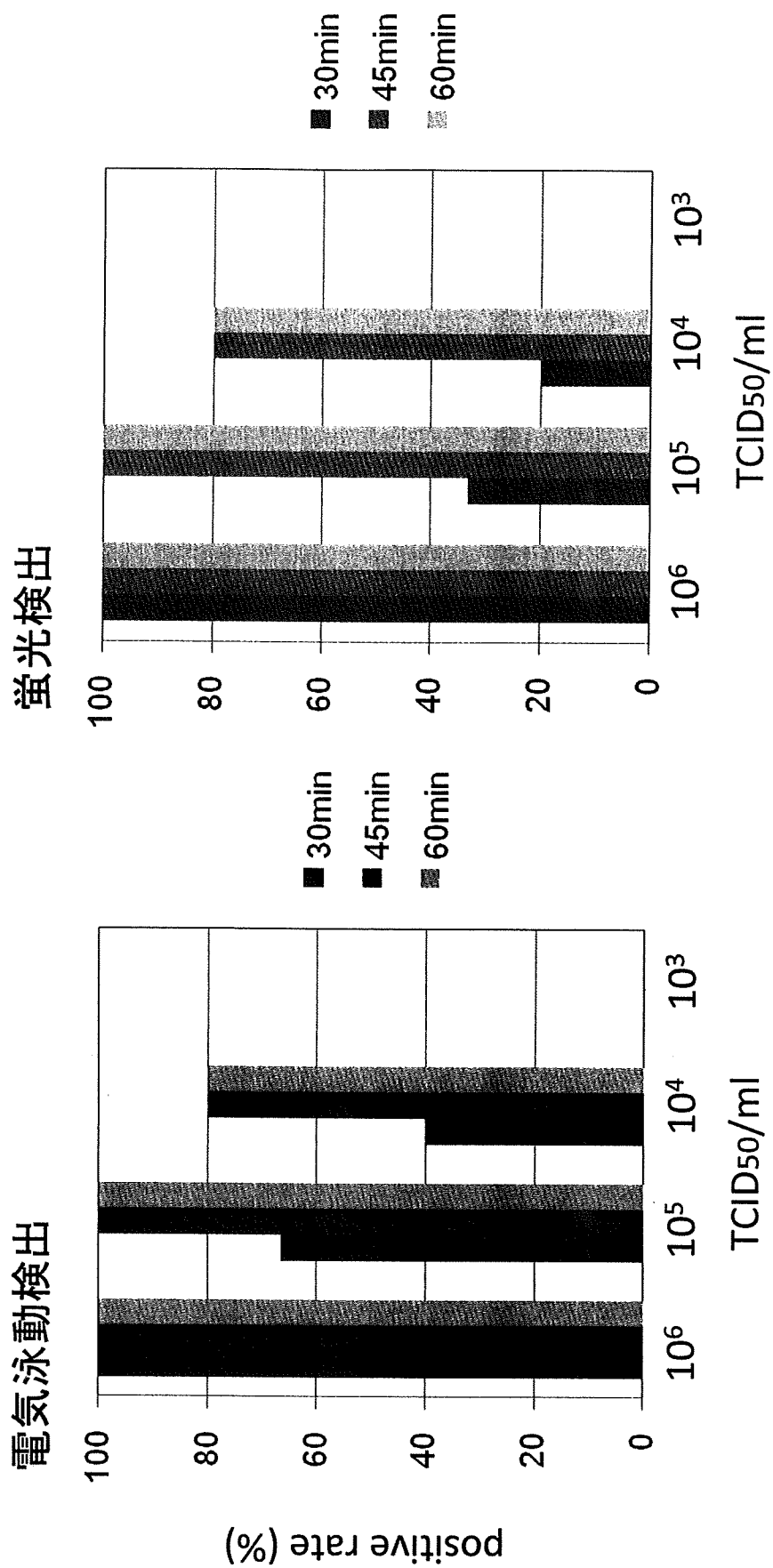


図5、臨床検体からのMARV遺伝子の検出