

- Suzaki, Noriyo Nagata, Naoko Yoshikawa (Iwata), Hideki Hasegawa, Shuetsu Fukushi, Tetsuya Mizutani, Tetsutaro Sata, Ichiro Kurane, Shigeru Morikawa. Immune responses against EEV and IMV in non-human primates infected with monkeypox virus or vaccinated with a highly attenuated smallpox vaccine LC16m8 and protection from lethal monkeypox. International union of microbiological societies 2011 congress, Sapporo 11-16 Sept 2011
6. Chang-Kweng Lim, Yasuo Ami, Yoshiki Fujii, Meng Ling Moi, Kazutaka Kitaura, Akira Kotaki, Shigeru Morikawa, Masayuki Saijo, Ryuji Suzuki, Ichiro Kurane, Tomohiko Takasaki. Pathogenesis of epidemic chikungunya virus in nonhuman primates. International union of microbiological societies 2011 congress, Sapporo 11-16 Sept 2011
 7. Koichiro Iha, Mina Nakauchi-Hori, Satoshi Taniguchi, Shuetsu Fukushi, Tetsuya Mizutani, Momoko Ogata, Shigeru Kyuwa, Masayuki Saijo, Victor Romanowski, Delia A Enria, Shigeru Morikawa. Establishment of serological diagnosis of Argentine hemorrhagic fever using recombinant antigens. International union of microbiological societies 2011 congress, Sapporo 11-16 Sept 2011
 8. Kouji Sakai, Yohei Nishio, Noriyo Nagata, Yasushi Ami, Katsuhiko Komase, Masayuki Shimojima, Ken Maeda, Makoto Takeda, Masayuki Saijo, Shigeru Morikawa. Characterization of canine distemper virus isolated from cynomolgus monkeys during 2008 epizootic in Japan. International union of microbiological societies 2011 congress, Sapporo 11-16 Sept 2011
 9. Yusuke Sayama, Shuetsu Fukushi, Mariko Saito, Satoshi Taniguchi, Itoe Iizuka, Tetsuya Mizutani, Ichiro Kurane, Masayuki Saijo, Hitoshi Oshitani, Shigeru Morikawa. A serological survey of Reston ebolavirus infection in swine during epizootic in 2008 in the Philippines. International union of microbiological societies 2011 congress, Sapporo 11-16 Sept 2011
 10. Satoru Arai, Se Hun Gu, Luck Ju Baek, Kenji Tabara, Hong-Shik Oh, Nobuhiro Takada, Hae Ji Kang, Keiko Tanaka-Taya, Shigeru Morikawa, Nobuhiko Okabe, Richard Yanagihara, Jin-Won Song. Expanded evolutionary insights from Jeju virus, a newfound hantavirus harbored by the Asian lesser white-toothed shrew (*Crocidura shantungensis*). International union of microbiological societies 2011 congress, Sapporo 11-16 Sept 2011
 11. Tetsuya Mizutani, Masako Abe, Naoto Ito, Kouji Sakai, Yoshihiro Kaku, Mami Oba, Momoko Ogata, Ichiro Kurane, Masayuki Saijo, Shigeru Morikawa, Makoto

Sugiyama. An isolated virus homologous to porcine sapelovirus from wild boar. International union of microbiological societies 2011 congress, Sapporo 11-16 Sept 2011

12. Satoshi Taniguchi, Shumpei Watanabe, Koichiro Iha, Shuetsu Fukushi, Tetsuya Mizutani, Masayuki Saijo, Ichiro Kurane, Shigeru Kyuwa, Hiroomi Akashi, Yasuhiro Yoshikawa, Shigeru Morikawa. The detection of Reston ebolavirus antibodies in wild bats in the Philippines. International union of microbiological societies 2011 congress, Sapporo 11-16 Sept 2011

表 1. 最近発生したり宿主域を拡大しているウイルス感染症

ウイルス感染症	病原ウイルス	年	国
チャパレウイルス出血熱	チャパレウイルス	2007	ボリビア
ルジョウイルス出血熱	ルジョウイルス	2008	ザンビア、南ア
ブンディブギョエボラウイルスによるエボラ出血熱	ブンディブギョエボラウイルス	2008	ウガンダ
豚のレストンエボラウイルス感染症	レストンエボラウイルス	2008	フィリピン
ヒトの牛痘ウイルス感染症	牛痘ウイルス	2008-2009	ドイツ、フランス等
ニパウイルス感染症	ニパウイルス	2001以降	バングラディッシュ
マカク属のサルイヌジステンパーウイルス感染症	ジステンパーウイルス	2008	日本、中国
ニホンザル血小板減少症	サルレトロウイルス-4	2010	日本
重症熱性血小板減少症候群	新種のフレボウイルス	2010	中国

図 1. Lujo-NP に対する単クローン抗体 3 クローンのエピトープ

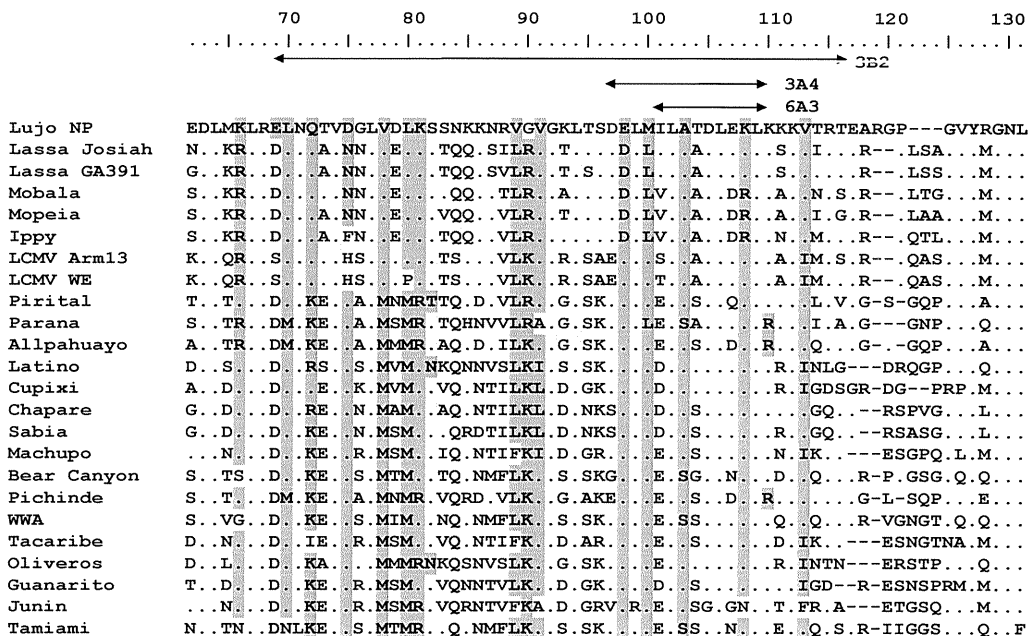
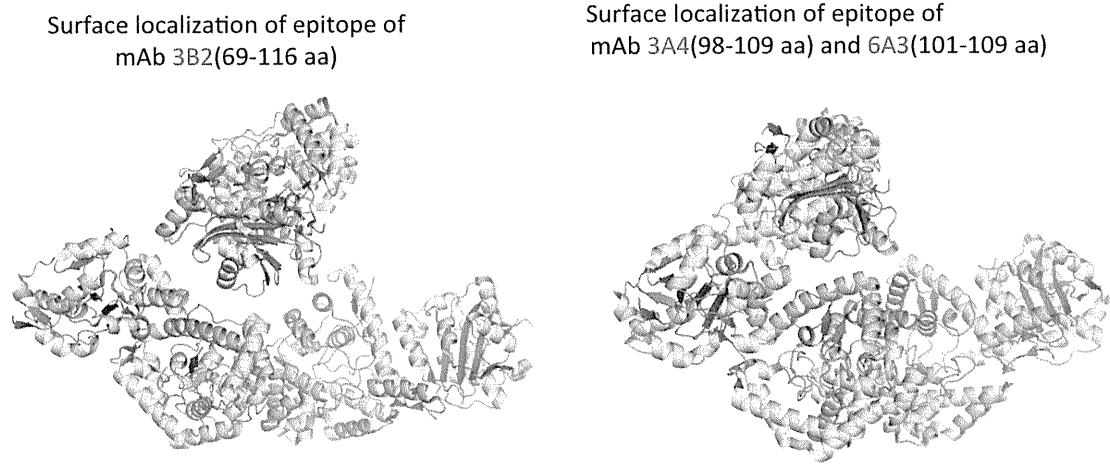
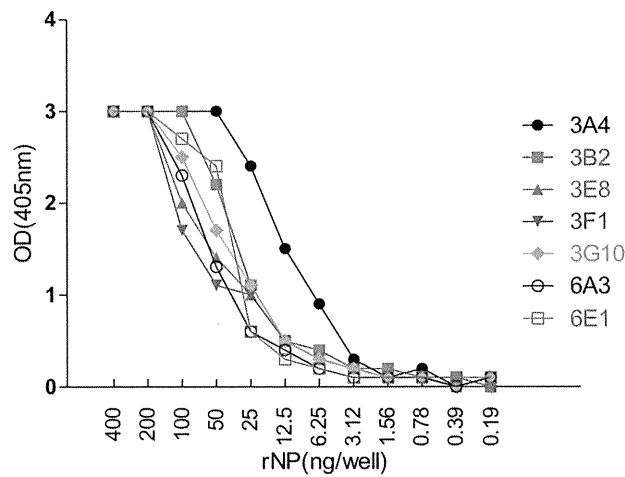


図2. Lujo-NP に対する単クローン抗体3クローンのエピトープの立体構造上の位置



(adapted from PyMol View of Lassa NP structure; 3MWP.pdb)

図3. Lujo-NP 抗原検出 ELISA の組換え Lujo-NP 検出感度



mAb	検出限界 (ng/reaction)
3A4	0.78
3F1, 3G10, 6A3	1.56
3B2, 3E8	3.12

図 4. Lujo-NP 抗原検出 ELISA の感染性 Lujo ウイルスの検出感度

Graphical results for detection of Lujo virus and negative control preparation at the highest concentration tested:

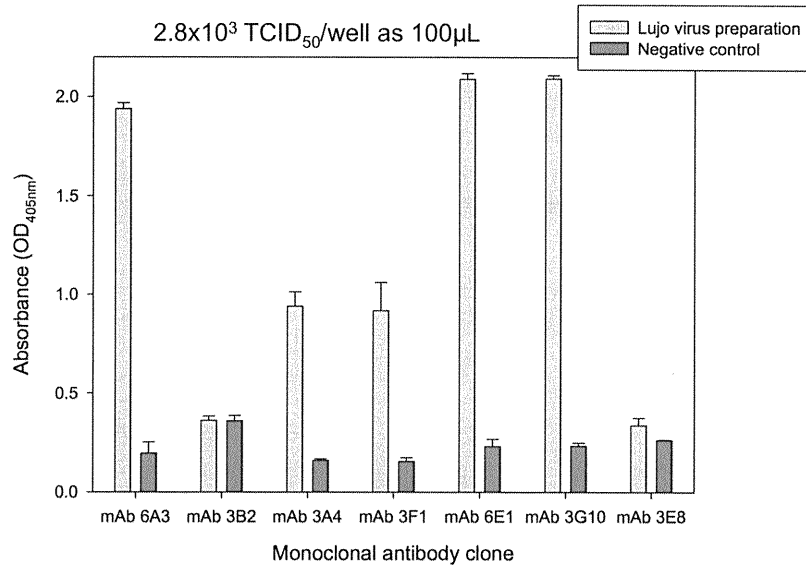
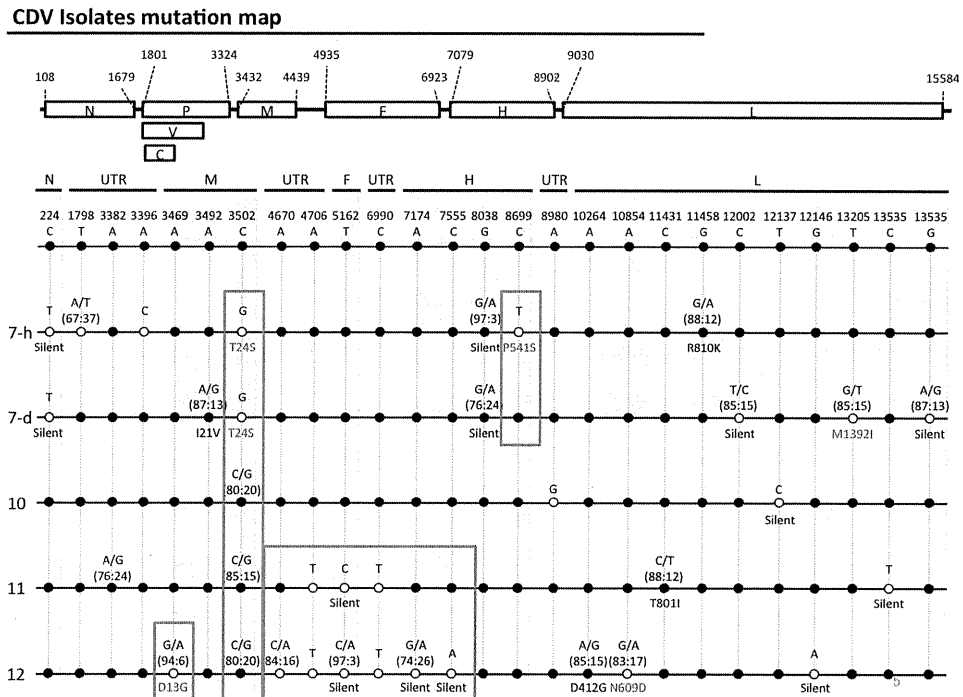


図 6. サルの CDV 感染症流行初期と後期の分離ウイルスの遺伝子配列と quasispecies



厚生労働科学研究費補助金新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

現在、国内で分離・同定できないウイルス性出血熱等の
診断等の対応方法に関する研究

分担研究課題：ニパウイルスの病原性の分子機構の解明

研究分担者：甲斐知恵子（東京大学医科学研究所教授）

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、前年度までに、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した。本年度は、ニパウイルスの霊長類感染モデル系の確立と新たに開発したワクチンの検討を行なった。

研究協力者：米田美佐子（東京大学医科学研究所）

A. 研究目的

ヒトにおけるニパウイルス感染の予防法・治療法の開発には、優れた霊長類感染モデル系が不可欠である。そこで、アフリカミドリザルを用いた感染実験を行ない感染モデルとしての有用性を検討した。また、この感染モデル系を用いて、新たに作出したニパウイルス膜蛋白を発現する組換え麻疹ウイルスのワクチン効果を調べた。

B. 研究方法

1) ニパウイルスのアフリカミドリザル感染実験：

ニパウイルスを、体重 4.4 kg - 5.1 kg のアフリカミドリザル (♂) に、 10^6 、 10^8 TCID₅₀ ずつ接種した。接種経路は、経口・経鼻 (IN+PO) と腹腔内投与 (IP) の二通りで行なった。接種後、体重、体温の測定と、口腔、鼻腔スワブの採取を行ない、瀕死個体については解剖して、主な臓器を採取した。スワブ、臓器から RNA を抽出し、

real-time PCR でウイルス量を測定した。また病理組織学的解析も行なった。

2) ニパウイルス用ワクチンのハムスターでの有効性試験：

ニパウイルス用ワクチンとして、麻疹ウイルス Edmonston 株 (MV-Ed) および HL 株 (MV-HL) のリバーシジェネティックス系を用いて、ニパウイルスの G タンパクを発現する組換え麻疹ウイルスを作出した (rMV-Ed-G、rMV-HL-G)。これらを 10 週齢のハムスターに接種し、経時的採血を行ない血清中の抗 G 抗体の上昇を確認後、ニパウイルスによる攻撃試験を行った。

3) ニパウイルス用ワクチンのアフリカミドリザルでの有効性試験：

2) で作出した rMV-Ed-G をアフリカミドリザルに接種し、経時採血を行ない血清中の抗 G 抗体の上昇を確認後、ニパウイルスによる攻撃試験を行った。

C. 研究結果

1) ニパウイルスのアフリカミドリザル感染実験：

IP でニパウイルスを接種したサルでは、ウイルス量に関わらず接種 2 日後から発熱が認められ 4 日後からは体重減少し、7 日目に 2 頭とも死亡した。IN+PO でウイルス接種したサルでは、7 日目から発熱が始まり同時に体重減少が認められ、14 日後に瀕死となったがその後回復した。Real-time PCR により、IP 接種したサルのスワブからはほとんどウイルス RNA は検出されな

かったが、IN+PO 接種したサルからは接種後 2 日目から 11 日目までウイルス RNA が検出された。臓器サンプルにおいては、IP 接種のサルでのみ肺、脾臓、腎臓、心臓、扁桃、腸間膜リンパ節などからウイルス RNA を検出した。また病理組織学的解析においては、IN+PO 接種のサルでは著変は認められなかったが、IP 接種のサルにおいては多くの臓器で病変を認めた。

2) ニパウイルス用ワクチンのハムスターでの有効性試験：

rMV-Ed-G または rMV-HL-G を 2×10^4 TCID₅₀ ずつ 2 回免疫したハムスターでは、2 回目免疫後の血清中抗 G 抗体価は全ての個体において 1,600 倍以上 (ELISA) となった。これらの個体に、 10^3 TCID₅₀ のニパウイルスで攻撃試験を行ったところ、非免疫群のハムスターは 90% が死亡したのに対し、rMV-Ed-G または rMV-HL-G で免疫したハムスターは全て生存した。

3) ニパウイルス用ワクチンのアフリカミドリザルでの有効性試験：

アフリカミドリザルに、 1×10^5 TCID₅₀ の rMV-Ed-G を 2 回免疫し、2 回目免疫 2 週間後に 1×10^5 TCID₅₀ のニパウイルスを IP 接種することにより攻撃試験を行ったところ、免疫したサル 2 頭は症状を示さず生存した。攻撃 2 週間後に採材した臓器からはウイルスは検出されず、また病理組織学的解析においても著変は見られなかった。

D. 考察と結論

アフリカミドリザルがニパウイルスの霊長類感染実験動物モデルとして非常に有用であることが明らかとなった。

組換え麻疹ウイルスを用いた、ニパウイルスに対するワクチンの効果を検討したところ、ハムスターモデルにおいては致死率の劇的な低下を認め、またサルモデルにおいても発症を抑えた。このことから、本ワクチンはニパウイルス感染の有効な予防法の1つとなると考えられた。

E. 健康危険情報

該当なし

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Kai, C. and Yoneda, M., Henipavirus infections – An expanding zoonosis from fruit bats. *Journal of Disaster Research*, 6, 390-397, 2011.
2. Kodama, A., Yanai, T., Kubo, M., El Habashi, N., Kasem, S., Sakai, H., Masegi, T., Fukushi, H., Kuraishi, T., Yoneda, M., Hattori, S. and Kai, C.: Cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) may not be infected with equine herpesvirus 9. *J. Med. Primatol.* 40(1):18-20, 2011.
3. Huang M., Sato H., Hagiwara K., Watanabe A., Sugai A., Ikeda F., Kozuka-Hata H., Oyama M., Yoneda, M. and Kai, C. Determination of

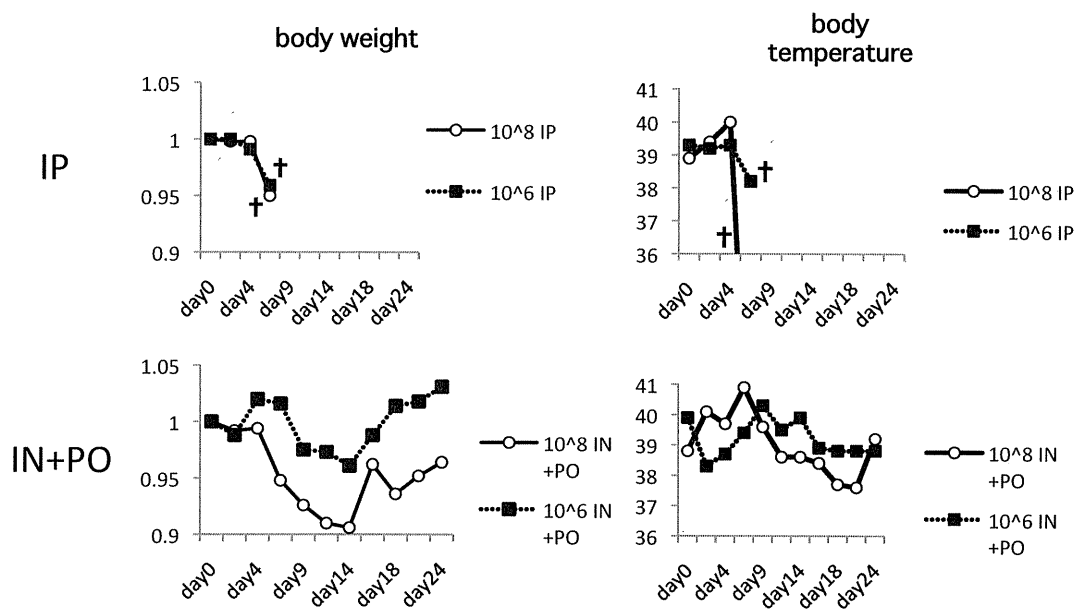
phosphorylation site in Nipah virus nucleoprotein and its involvement in viral transcription. *J.Gen.Virol.*, 92(9); 2133-2141, 2011.

4. Inoue Y, Sato H, Fujita K, Tsukiyama-Kohara K, Yoneda M, Kai C. Selective translation of the measles virus nucleocapsid mRNA by the *la* protein. *Front Microbiol.* 2:173; 2011.
5. Sato H, Yoneda M, Honda T, Kai C. Recombinant vaccines against the mononegaviruses--what we have learned from animal disease controls. *Virus Res.* 162(1-2): 63-71. 2011.
6. Takayama, I., Sato, H., Watanabe, A., Omi-Furutani, M., Kanki, K., Yoneda, M. and Kai, C. The nucleocapsid protein of measles virus blocks host interferon response. *Virology*, 424, 45-55, 2012.

G 知的財産権の出願・登録状況

現在出願予定はない。

図 1. ニパウイルスを実験感染させたアフリカミドリザルの臨床症状



厚生労働科学研究費補助金新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

現在、国内で分離・同定できないウイルス性出血熱等の
診断等の対応方法に関する研究

分担研究課題：新種エボラウイルスや新種アレナウイルス等の診断法

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教授）

研究要旨：フィロウイルス（エボラおよびマールブルグウイルス）およびアレナウイルスによる感染症の診断法開発のために、既知のウイルスの RNA 遺伝子配列をもとにプライマーを設計し、フィロウイルス科およびアレナウイルス科のウイルス種をそれぞれ広く検出する RT-PCR 法の確立を目指す。また、感染動物あるいはヒト血清中のフィロウイルスおよびアレナウイルス特異抗体を高感度で検出する ELISA 法によって、野生動物からの特異抗体の検出を試みた。

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。2008 年には、5 種目のエボラウイルスとして提案されている Bundibugyo エボラウイルスがウガンダで発見され、さらに、エボラウイルスにもマールブルグウイルスにも属さない新しいフィロウイルスがスペインのコウモリから見つかった。ウイルス表面糖蛋白質 GP の進化系統樹（アミノ酸）を図 1 に示す。さらに、近年、霊長類以外の動物（コウモリ、ブタ、イヌ、ダイカー）の

感染が確認され、フィロウイルスの疫学に関する研究は新たな展開をみせている。

アレナウイルス科アレナウイルス属のウイルスは進化系統学的に、アフリカで分離される旧世界アレナウイルスおよび中南米で分離される新世界アレナウイルスに分類される。大部分のウイルスは、げっ歯類動物を自然宿主とし、これらの動物に不顕性の持続感染をおこす。2008 年に、原因不明の出血熱がザンビア国内で発生し数名が死亡した事例は、新種のアレナウイルス（Lujo ウイルス）による感染症であったが、このウイルスの自然宿主は特定できていない。さらに近年、ザンビアのマストミスから新種のアレナウイルス（Luna ウイルス）が分離されている。

フィロウイルスおよびアレナウイルスはヒトを含む霊長類に重篤な出血熱を引き起こす病原体として知られている。病原性が高いこと、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、全てのフィロウイルスおよび一部のアレナウイルスは 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、これらのウイルスによる感染症の診断法開発のために、ウイルス RNA 遺伝子の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の確立とその野外応用を行っている。

B 研究方法および成果

フィロウイルス遺伝子を検出する RT-PCR 法の確立：

これまでに、既知の全てのフィロウイルスの RNA 遺伝子塩基配列を比較し、NP 遺伝子から選択した相同性の高い領域の配列をもとにプライマーセットをデザインした (図 2 A)。これらのプライマーセットを用いて、スペインで新しくコウモリから見つかったフィロウイルス (LLOV) の検出を試みた。プライマーの配列と、その領域に相当する LLOV の遺伝子配列を図 2 B に示す (赤字はミスマッチ)。実際のウイルスから抽出した RNA が入手できないため、LLOV の NP 蛋白質をコードするプラスミドを合成し、それを鋳型に RT-PCR を行った。その結果、このプライマーで LLOV が検出可能であること (図 3 B)、ならびに

forward primer はエボラウイルスの配列 (FiloNP Fe)、reverse primer はマールブルグウイルスの配列 (FiloNP Fm) の組み合わせの方が、効率的であること (図 3 C) が分かった。しかし、検出感度は全てのプライマーを同時に使用した場合に高く、プラスミドとして 1,000 コピー程度であった (図 3 C)。

GP を抗原として用いた ELISA の野外応用：

これまでに、エボラウイルスおよびマールブルグウイルスの表面糖蛋白質に対する抗体を検出する ELISA 法の確立のために、ウイルス表面糖蛋白質の膜貫通領域と細胞質内領域を欠失させた分泌型の糖蛋白質を発現するプラスミドを、既知の全てのフィロウイルス種について構築した。これを導入した培養細胞の上清中に分泌される組換え蛋白質を精製し、抗原に用いた ELISA 法を確立した。本法を用いて、インドネシアのサル血清中の IgG 抗体検出を試みたところ、陽性個体が確認された (図 4)。面白いことに、アジア (フィリピン) で存在が確認されている Reston 種以外のウイルス (アフリカのみで見つかったウイルス) に特異的に結合する抗体を保有している個体が多数認められた。

フィロウイルス特異抗体の新規検出法の確立：

マールブルグウイルスの表面糖蛋白質に結合するモノクローナル抗体の中から、既知の全てのフィロウイルスの GP を認識す

る抗体(MGP78)を選出した。これをペルオキシダーゼ標識し、血清中の抗体による競合阻害を検出する方法の確立を試みた。フィロウイルス GP に対するマウス抗血清および感染サル血清存在下で、競合阻害活性が認められた (図 5)。

アレナウイルス NP 抗原を用いた ELISA の野外応用：

2006 年から 2010 年にかけて、ザンビアで捕獲したげっ歯類動物約 400 頭の血清中の抗体を、アレナウイルスの NP 抗原 (Lassa, Lujo および LCM ウイルス) を用いてスクリーニングした結果、多数のサンプルが陽性と判定された。特に Lassa ウイルスに対する反応性が高い個体が多かったが、近縁の Luna ウイルスの感染率が高い地域であるので、Lassa ウイルスと Luna ウイルスの抗体を区別して検出する方法が必要であると考えられた。一方、Lujo ウイルスに最も強く反応した個体が 2 頭認められた。

C 考察と結論

これまで、フィロウイルスやアレナウイルスなどによる病原性の高い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。また、新種のエボラウイルスの出現やブタにおけるレストンエボラウイルスの感染は、フィロウイルス感染症対策上、新たな問題を提起した。本研究の

結果も、アジアにおけるフィロウイルスのサーベイランスの必要性を強調するものである。また、ザンビアにおける新種のアレナウイルスの発見およびげっ歯類動物における高い血清抗体陽性率は、今後も未知のアレナウイルスによる感染症発生の可能性を示唆している。さらに、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ている。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、抗ウイルス薬やワクチンの開発とともに、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. 健康危険情報

E. 研究発表

論文発表

1. Usami, K., Matsuno, K., Igarashi, M., Denda-Nagai, K., Takada, A., and Irimura, T. (2011) Involvement of viral envelope GP2 in Ebola virus entry into cells expressing the macrophage galactose-type C-type lectin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 407(1):74-78.
2. Nakayama, E., Tomabechei, D., Matsuno, K., Kishida, N., Yoshida, R., Feldmann, H., and Takada, A. (2011) Antibody-dependent

enhancement of Marburg virus infection. *J. Infect. Dis.* Suppl 3:S978-985.

3. Falzarano, D., Feldmann, F., Grolla, A., Leung, A., Ebihara, H., Strong, J.E., Marzi, A., Takada, A., Jones, S., Gren, J., Geisbert, J., Jones, S.M., Geisbert, T.W., and Feldmann, H. (2011) Single Immunization With a Monovalent Vesicular Stomatitis Virus-Based Vaccine Protects Nonhuman Primates Against Heterologous Challenge With Bundibugyo ebolavirus. *J. Infect. Dis.* Suppl 3:S1082-1089.
4. Ishii, A., Thomas, Y., Moonga, L., Nakamura, I., Ohnuma, A., Hang'ombe, B., Takada, A., Mweene, A., and Sawa, H. (2011) Novel arenavirus, Zambia. *Emerg. Infect. Dis.* 17(10):1921-1924.
5. Nakayama, E. and Takada, A. (2011) Ebola and Marburg viruses. *J. Disaster Res.* 6(4):381-389.

日本語総説等

1. 高田 礼人 (2011) エボラ・マールブルグ出血熱、最新医学 66(12):2668-2675

F. 知的財産権の出願・登録状況

現在出願予定はない。

図1. フィロウイルスの分子系統樹

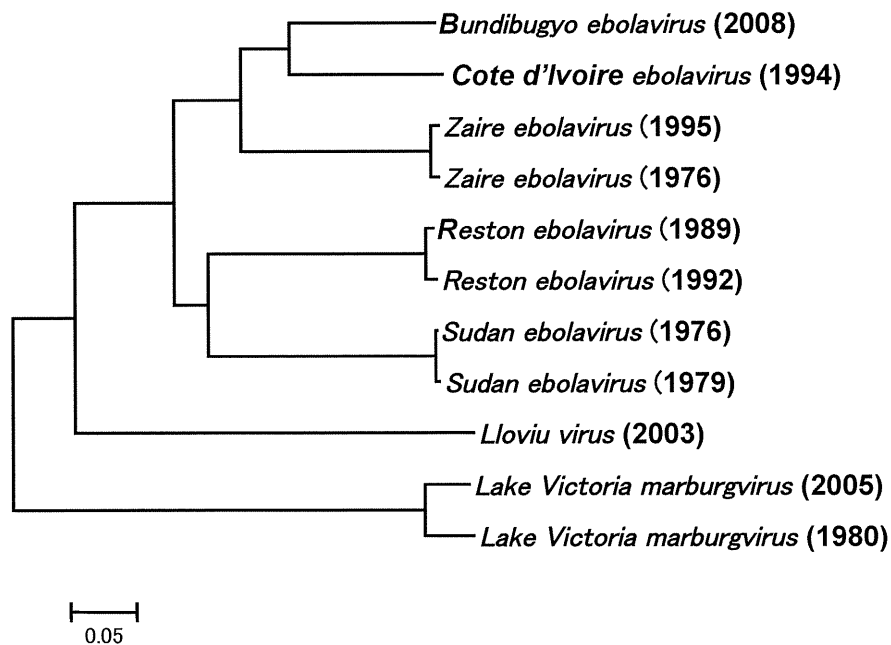


図2. フィロウイルス遺伝子を検出する RT-PCR 法

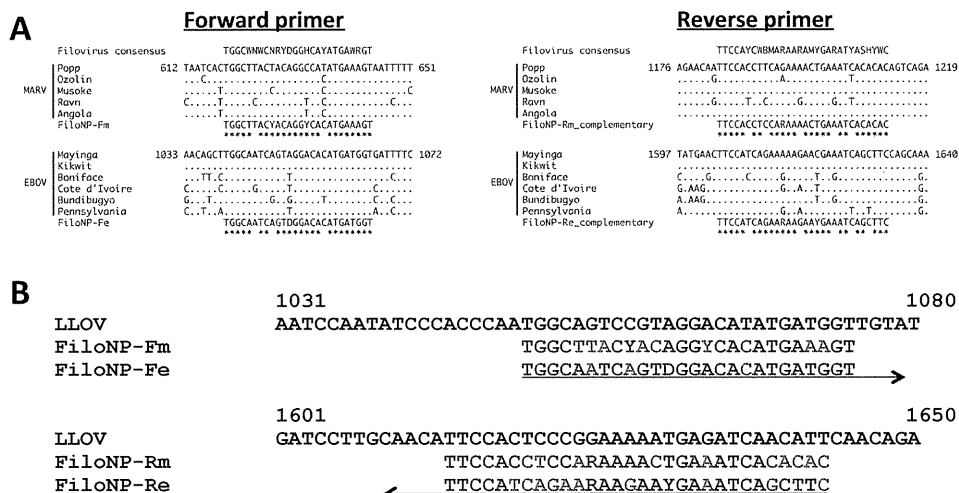


図 3. Lloviu ウイルスも検出する RT-PCR

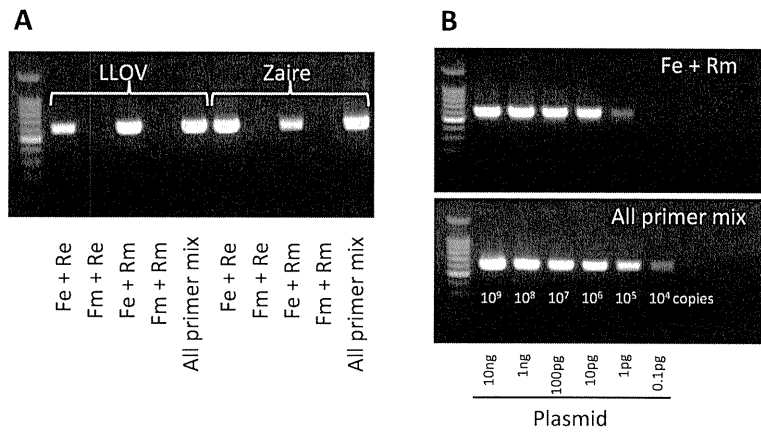


図 4. インドネシアのサル血清中のフィロウイルス抗体検出

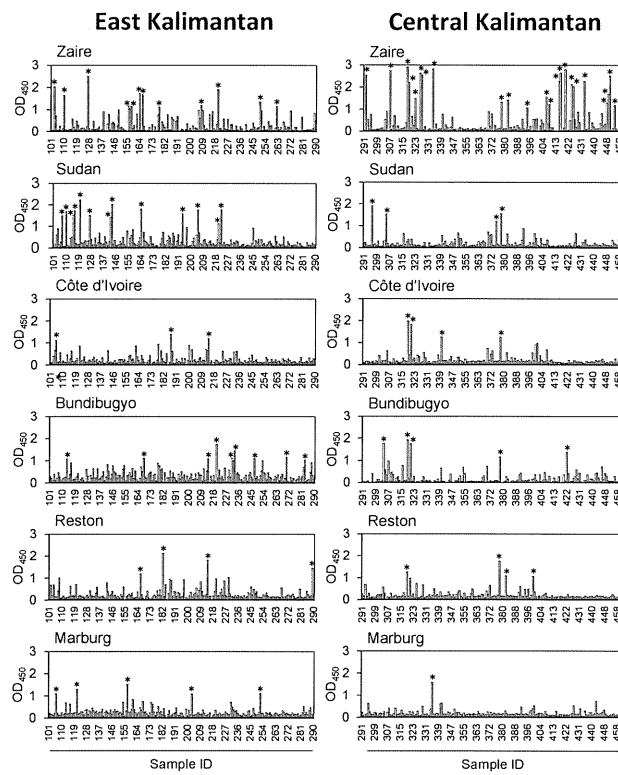
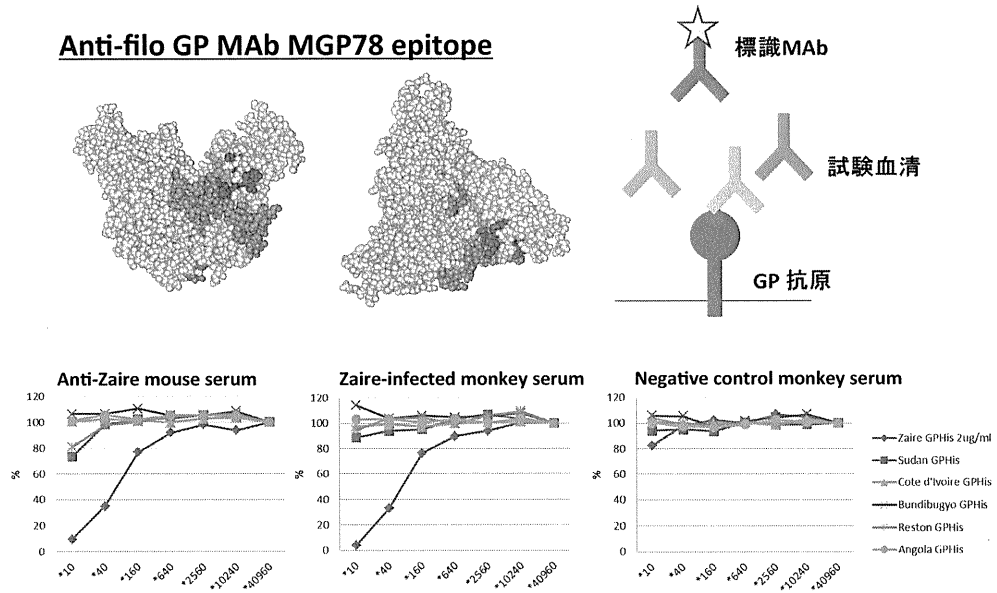


図5. 標識フィロウイルス GP MAb による競合 ELISA による特異抗体検出法



厚生労働科学研究費補助金新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

現在、国内で分離・同定できないウイルス性出血熱等の
診断等の対応方法に関する研究

分担研究課題：出血熱ウイルスの治療・予防法の確立に資する粒子形成、出芽機構の解析

研究分担者： 安田二郎（長崎大学熱帯医学研究所新興感染症学分野教授）

研究要旨：Tetherin は様々なエンベロープウイルスに対して抗ウイルス活性をもつ細胞性因子である。HIV-1 の Vpu やザイールエボラウイルス (ZEBOV) の GP はアンタゴニストとしてヒト Tetherin の抗ウイルス活性を阻害することが報告されている。我々は、本研究でレストンエボラウイルス (REBOV) の GP もヒト Tetherin アンタゴニストとして機能すること、及び、ZEBOV、REBOV の GP はともに霊長類由来の Tetherin に対してもアンタゴニストとして機能することを明らかにした。Tetherin は EBOV の VP40 タンパク質の単独発現によって形成されるウイルス様粒子 (VLP) の産生を抑制するが、その作用機構として Tetherin が VP40 の細胞膜への移行を阻害している可能性が示唆された。また、GP はトランスゴルジ・ネットワーク (TGN) で Tetherin と共局在を示したことから、GP は Tetherin を TGN に滞留させることにより Tetherin の抗ウイルス作用を阻害している可能性がある。

本年度は更に南米出血熱の原因ウイルスであるフニンウイルス (アルゼンチン出血熱)、マチュポウイルス (ボリビア出血熱) の出芽機構についても解析し、これらのウイルスの Z タンパク質内の P/SAP 配列が L ドメインとしてウイルス出芽に重要であること、及び、宿主因子として Tsg101 を利用することを明らかにした。

A. 研究目的
エボラウイルス (EBOV)、マールブルグウイルス (MARV)、ラッサウイルス (LASV)、クリミア - コンゴ出血熱ウイルス (CCHFV)、南米出血熱ウイルス (フニン、マチュポ、グアナリト、サビアウイルス) は極めて高い病原性をもつ出血熱ウイルスであるが、これらが引き起こす感染症に対

する有効な予防・治療法は未だに確立されておらず、大きな脅威となっている。本研究では、これらのウイルスの増殖過程、特に粒子形成・出芽機構を詳細に解析することにより、ウイルス増殖阻害法の開発を目指す。

B. 研究方法

1) EBOV と抗ウイルス活性因子 Tetherin の相互作用の解析

Tetherin は、感染細胞から HIV-1 粒子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タンパク質である (図 1)。

Tetherin の一方の末端がウイルスエンベロップ、他方の末端が細胞膜あるいは別のウイルスのエンベロップに結合することにより細胞とウイルス、あるいはウイルス同士が解離できず、結果として細胞表面にウイルス粒子が蓄積すると考えられている。

Tetherin の抗ウイルス活性は HIV-1 の Vpu やザイール EBOV (ZEBOV) の GP によって拮抗されることも報告されている。Vpu は Tetherin の細胞表面発現を抑制することにより、Tetherin の抗ウイルス活性を阻害することが報告されているが、Vpu は HIV-1 の本来の宿主であるヒトの Tetherin に対してのみこの活性を有し、サルの Tetherin に対してはアンタゴニストとしての活性を示さない。すなわち、Vpu の Tetherin アンタゴニスト活性には種特異性が存在する。一方、EBOV GP の Tetherin 活性阻害機構の詳細についてはほとんど明らかになっていない。

そこで、我々はまず、ウイルス様粒子 (VLP) 産生系を用いて、ヒトに病原性を持つ ZEBOV とサルに病原性をもつレストン EBOV(REBOV)の VLP 産生が、ヒト、アフ

リカミドリザル、カニクイザル由来の Tetherin によって阻害されるかを調べた。解析は、培養上清中に放出された VLP を超遠心により回収し、ウェスタンブロット法で比較定量することにより行った。次に、ZEBOV、REBOV の GP が各種 Tetherin によるエボラ VLP 産生抑制を阻害するかどうかを解析した。

更に、GP の Tetherin アンタゴニストとしての作用機構を明らかにする目的で、GP が Tetherin の細胞内局在を変化させるかどうかを共焦点顕微鏡による観察で調べた。エボラ VLP に対する Tetherin の抗ウイルス作用は HIV に対するように細胞表面でのウイルス粒子係留ではないことが示唆されているので、Tetherin による VP40 の細胞内局在の変化についても同様に解析した。

2) 南米出血熱ウイルスの出芽機構の解析

アルゼンチン出血熱、ボリビア出血熱の原因ウイルスであるフニンウイルス、マチュポウイルスの出芽機構を明らかにするためにウイルスマトリクスタンパク質 Z に存在する L ドメインモチーフの解析を行った。両ウイルスの Z には L ドメインモチーフの 1 つである PT/SAP 配列が存在するのでこの配列をアラニン (AAAA) に置換した変異体を作製してウイルス様粒子産生を比較した (図 2)。PT/SAP 配列を L ドメインとしてもつものは宿主因子 Tsg101 との相互作用を介して細胞の多胞エンドソーム (MVB) 形成系をウイルス出芽に利用していると考えられているので、siRNA を用いて Tsg101

の関与についても解析した。

C. 研究結果

1) EBOV と抗ウイルス活性因子 Tetherin の相互作用の解析：

ZEBOV および REBOV の VP40 発現によって形成される VLP の産生系にヒト(Hu)、アフリカミドリザル (Agm)、カニクイザル(Mac)由来の Tetherin を発現させると VLP 産生は何れの Tetherin によっても有意に抑制された (図 3)。また、Hu - Tetherin の糖鎖修飾変異体を用いた解析から、VLP 産生抑制活性には糖鎖修飾は関与しないことも明らかになった (図 4)。

次に、ZEBOV あるいは REBOV の GP を発現させることにより、Tetherin の VLP 産生抑制作用が阻害されるかどうかを調べた (図 5)。その結果、ZEBOV、REBOV の GP は共に Hu、Agm、Mac 何れの Tetherin に対してもその抗ウイルス活性を減弱させる効果を持つことが明らかになった。

共焦点顕微鏡による解析は、Tetherin が VP40 の細胞膜局在を減少させることを示した。更に、エボラ GP は Tetherin の細胞内局在を後期エンドソーム (LE) からトランスゴルジネットワーク (TGN) へ変化させることも明らかにした。

2) 南米出血熱ウイルスの出芽機構の解析：

フニンウイルス、マチュポウイルスの Z に存在する PT/SAP 配列を AAAA に置換した変異体では VLP 産生量の顕著な減少が見られた (図 6)。また、siRNA による Tsg101

のノックダウンはフニン、マチュポ VLP の産生を顕著に阻害した (図 7)。

D. 考察

1) EBOV と抗ウイルス活性因子 Tetherin の相互作用の解析

ZEBOV、REBOV の VLP 産生はウイルスの宿主特異性とは関係なくヒト、サル双方の Tetherin によって抑制された。Tetherin による VLP 産生阻害は、Tetherin による VP40 の細胞内局在の変化すなわち VP40 の細胞膜移行阻害に起因する可能性が示唆された。ZEBOV、REBOV の GP は共に種を問わずヒト、アフリカミドリザル、カニクイザル全ての Tetherin に対してアンタゴニストとして作用することが明らかになり、双方の GP の Tetherin アンタゴニストとしての活性には HIV-1 Vpu のような種特異性はないことが分かった。

GP は Tetherin の細胞表面発現にほとんど影響を与えなかったことから Vpu とは異なるメカニズムで Tetherin の抗ウイルス活性を阻害すると考えられる。GP が Tetherin の細胞内局在を LE から TGN に変えることが観察されたことから、この局在の変化が Tetherin の抗ウイルス活性発現において障害となっている可能性が示唆された。

2) 南米出血熱ウイルスの出芽機構の解析

フニンウイルス、マチュポウイルスの出芽には Z に存在する PT/SAP 配列が L ドメインとして主要な役割を果たしていることが分かった。また、PT/SAP 配列は宿主因子

Tsg101 との相互作用を通じて MVB 形成系を利用する形でウイルス出芽していることが強く示唆された。

E. 結論

1-1、ZEBOV および REBOV の GP は、共にヒト及びサル の Tetherin の抗ウイルス作用に対してアンタゴニストとして機能する。

1-2、Tetherin の糖鎖修飾はエボラ VLP に対する Tetherin の抗ウイルス活性には影響しない。

1-3、Tetherin は、VP40 の細胞膜移行を抑制する。

1-4、GP は、Tetherin と相互作用して Tetherin を TGN に滞留させる。

2-1、フニンウイルス、マチュポウイルスの Z タンパク質の P/SAP 配列は、L ドメインとしてウイルス出芽に重要である。

2-2、フニンウイルス、マチュポウイルスの出芽には、宿主因子として Tsg101 が関与している。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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.

2. Yasuda, J.: Ebolavirus replication and Tetherin/BST-2. *Frontiers in Virology*, in press.

2. 学会発表

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. 浦田秀造、檜原知里、Juan Carlos de la Torre、安田二朗: 新規抗ラッサウイルス薬の探索、First Negative Strand Virus-Japan (NSV-J)、佐世保、2012年1月20日-22日。
3. 黒崎陽平、高田礼人、安田二朗 : BST-2/Tetherin によるエボラウイルス粒子の産生抑制、First Negative Strand Virus-Japan (NSV-J)、佐世保、2012年1月20日-22日。

H 知的財産権の出願・登録状況

現在出願予定はない。