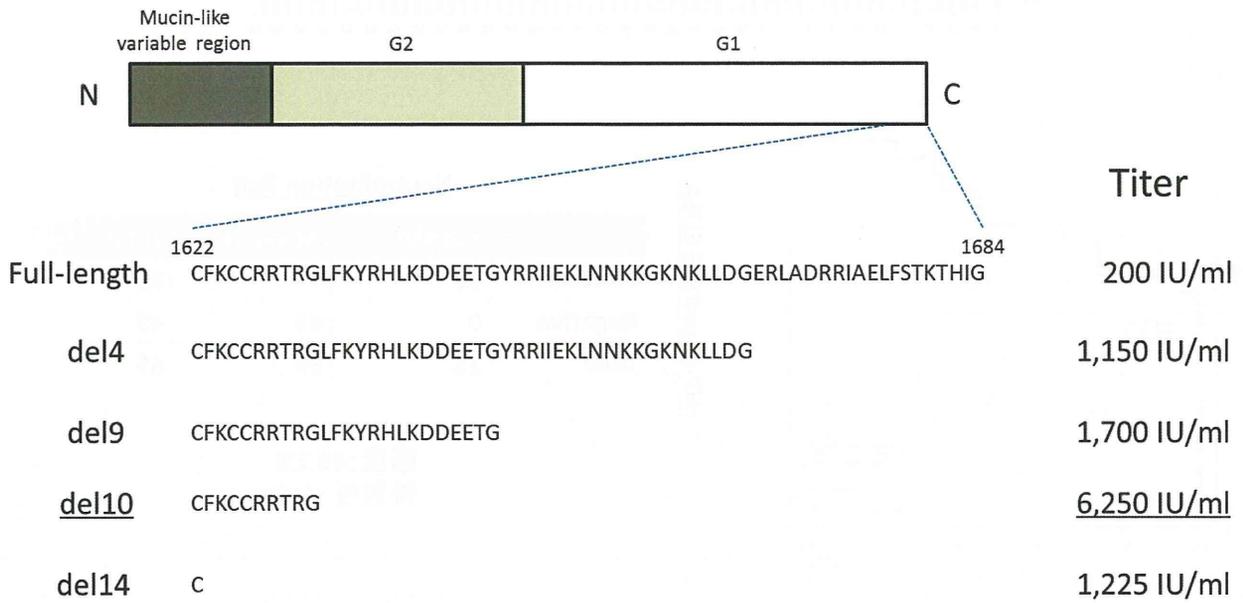


☒ 1

# Titers of VSVΔG\*-CCHF-GP (VeroE6)



☒ 2

# Effects of NH<sub>4</sub>Cl & MβCD

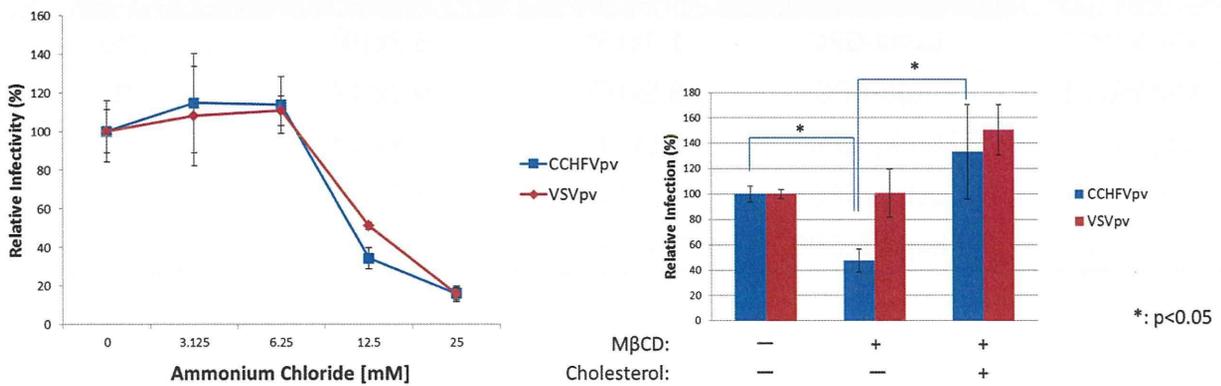
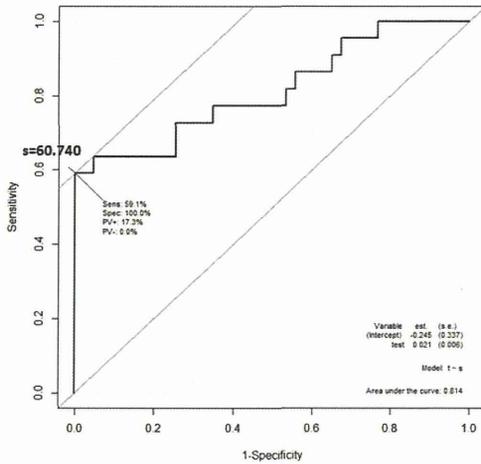
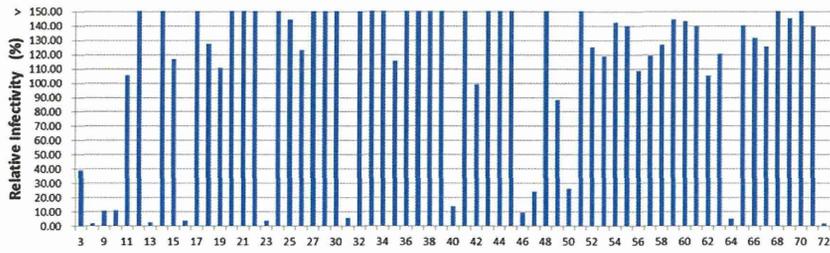


図 3



rNP-based IgG ELISA

**Neutralization Test**

	Positive	Negative	Total
Positive	13	9	22
Negative	0	43	43
Total	13	52	65

感度: 59.1%  
特異性: 100%

図 4

## アレナウイルスGPCシュードタイプの感染価 (HIV-backbone)

Taxonomy (arenavirus group)	envelope	Titer (Huh7)	Titer (Jurkat)	Ratio (Huh/Jurkat)
Old World	Lassa-GPC	1.3x10 <sup>6</sup>	6.7x10 <sup>3</sup>	200
Old World	Lujo-GPC	8.5x10 <sup>5</sup>	9.3x10 <sup>3</sup>	91
New World	Junin-GPC	1.5x10 <sup>5</sup>	1.4x10 <sup>4</sup>	11
New World	Sabia-GPC	4.2x10 <sup>5</sup>	2.3x10 <sup>4</sup>	18
New World	Chapare-GPC	5.2x10 <sup>4</sup>	4.7x10 <sup>3</sup>	11

図 5

## アレナウイルスGPCシュードタイプの感染価 (HIV-backbone)

- Receptor candidates?
  - Axl, Tyro3, DC-SIGN, LSECtin (Old World)

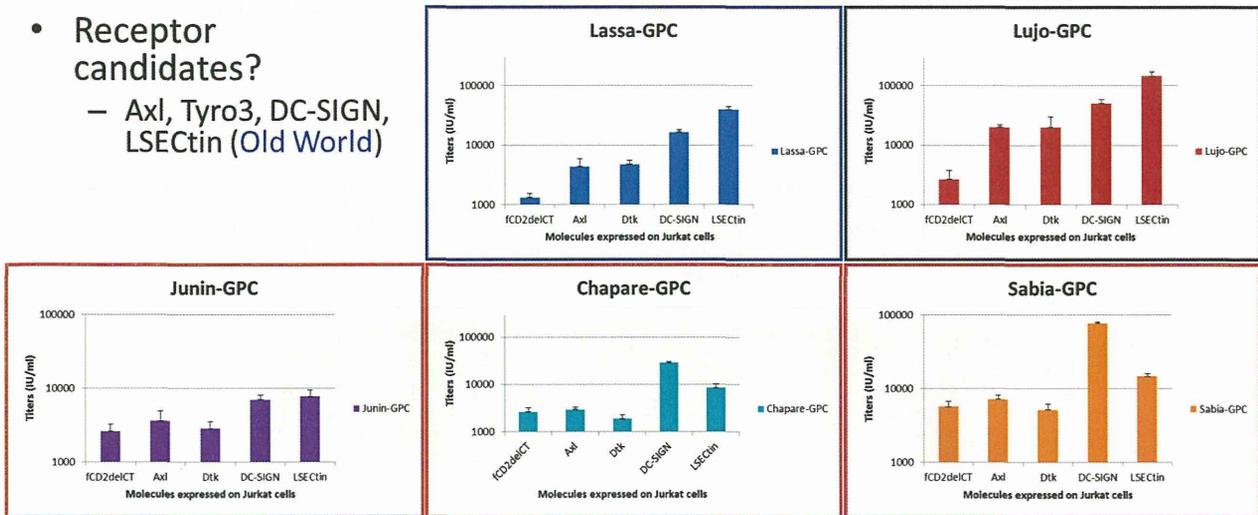


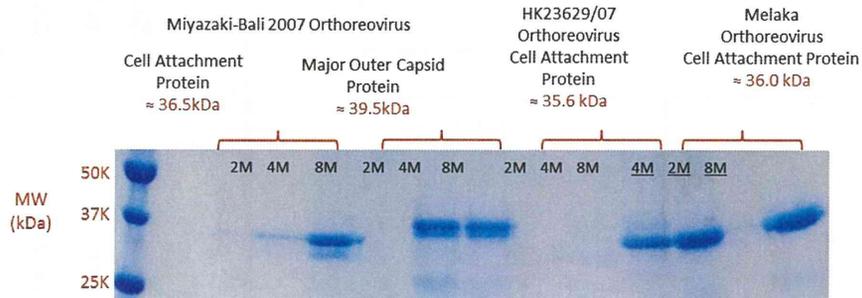
図 6

## % identity of peptide sequence

Cell attachment	Miyazaki	HK46886	HK50842	Kampar	Sikamat	Melaka	HK23629	Pulau	Xi River	Nelson Bay
Miyazaki	100									
HK46886	100	100								
HK50842	99.4	99.4	100							
Kampar	93.7	93.5	92.9	100						
Sikamat	57.1	56.2	56.5	55.6	100					
Melaka	57.3	56.4	56.7	56.1	96.3	100				
HK23629	56.2	56.2	55.6	56.5	67.3	66.4	100			
Pulau	52.9	51.9	51.9	52	80.1	79.2	64.7	100		
Xi River	43	42.4	42.7	42.1	44.6	44.9	41.5	39.4	100	
Nelson Bay	43.3	42.7	43	42.7	41.2	41.2	40.8	39.1	57.9	100

Major outer capsid	Miyazaki	HK46886	Sikamat	HK50842	HK23629	Melaka	Kampar	Nelson Bay	Pulau
Miyazaki	100								
HK46886	99.4	100							
Sikamat	98.3	98.3	100						
HK50842	99.2	99.2	98.6	100					
HK23629	99.2	99.2	98	98.9	100				
Melaka	98.1	98	98.6	98.3	97.8	100			
Kampar	96.7	96.9	96.7	97.2	96.6	97.5	100		
Nelson Bay	93.4	93.3	93.6	93.3	93	93.4	92	100	
Pulau	92.8	92.7	93.6	93	92.5	93.6	91.7	88.6	100

# Recombinant proteins of NBV strains: baculovirus expression system



防疫上緊急対応を要する一類感染症や新興・再興感染症に対する予防・診断・治療法に関する研究

— 分担研究報告書 —

分担研究課題：ハンタウイルス感染症の診断法および疫学に関する研究

分担研究者：有川 二郎（北海道大学大学院医学研究科 教授）

研究要旨

ハンタウイルス感染症は、げっ歯類媒介性の人獣共通感染症である。腎症候性出血熱(HFRS)とハンタウイルス肺症候群(HPS)の主に二つ疾病が知られているが、その症状は多岐にわたり、インフルエンザウイルス感染症、レプトスピラ症、B型肝炎などとの鑑別が困難な場合もあることが知られている。確実な診断のためには、血清診断および遺伝子診断が必要である。現在では世界各国からの輸入症例が懸念されることから、すべての病原性ハンタウイルス感染症をカバーし、かつ簡便に診断することが必要である。また、信頼度の高い疫学的情報を得るためにも、簡便な診断法が必要である、そのため本研究では迅速で簡便な診断法として、三種類のハンタウイルス組換え NP 抗原を用いた多項目同時検出人血清用イムクロマトグラフィー(Multiplex ICG)法の開発を試みた。

A. 研究目的

ハンタウイルスには数多くの血清型、遺伝子型が存在する。これらは宿主げっ歯類に依存しており、ウイルスと宿主が共存し、共に進化してきた事によると考えられている。Hantaan (HTNV)、Seoul (SEOV)、Dobrava (DOBV)、Thailand (THAIV)およびPuumala (PUUV)ウイルスは HFRS の原因となり、SinNombre, Andes (ANDV) ウイルスを始めとするアメリカネズミ亜科のげっ歯類によって媒介されるウイルスは HPS の原因となる。これらのハンタウイルス群のウイルスは互いに抗原性が大きく相違し交差反応性が低いことから、病原性ハンタウイルス感染症の血清診断には少なくとも三種類の抗原が必要である(図1)。宿主の分布に一致して、いくつかの地域には多様なハンタウイルスが共存している。我国には SEOV および PUUV が、ロシア、中国、韓国、東南アジア諸国には HTNV, SEOV, THAIV, PUUV があり、北米・南米諸国では SNV, ANDV とこれらに近縁なウイルスおよ

び SEOV が見いだされている。これらに対する抗体を迅速にスクリーニングし診断する手段として、多項目同時検出イムクロマトグラフィー(Multiplex ICG)を選択した。

B. 研究方法

ハンタウイルス感染症のうち、HFRS, HPS, NE (ヨーロッパでみられる HFRS)の原因となるハンタウイルスに対する抗体を検出するために、ICG を構築した。それぞれに対応する組換え抗原を準備し、これらの抗原を三本の検出ラインとして同一ストリップに塗布するいわゆる Multiplex ICG を作成した。同時に、3種類の抗原を混合して塗布するタイプのストリップも作成した(Mix-antigen ICG)。これらを HFRS, HPS, NE 患者血清および抗体陰性者血清を用いて有用性を検討した。

C. 研究結果

146 検体の患者血清と抗体陰性健常 25 検体を

用いて Multiplex ICG および Mix-antigen ICG の評価を実施した。患者血清の内訳は HFRS 患者血清(急性期 21, 回復期 35)、NE 患者血清(急性期 26, 回復期 36)、HPS 患者血清(急性期 12, 回復期 16)である。その結果、Multiplex ICG および Mix-antigen ICG とともに高い感度(急性期血清 88.5-100%、回復期血清 97.2-100%)と特異性(25/25, 100%)を示した。また、これらの ICG は ELISA と同等かそれ以上の検出限界を示した。IgM 抗体陽性で IgG 抗体が十分に上昇していない発症初期の血清についても、高い感度と特異性を示したことから、本法は感染初期迅速診断法として有用であると考えられた。これらの成果は現在 The Virology Journal に投稿中である(図 2)。

#### D. 考察

現在までにヒト用 Multiplex ICG を準備できたが、現場での応用については未だ実施していない。げっ歯類でのハンタウイルスの常在が確認されている地域(北部ヨーロッパ、ベトナム、インドネシア、スリランカ)等で試用すること目的とした準備を進める必要がある。

#### E. 結論

全試験を 15 分で終了できる ICG は簡易診断法として多くの感染症で使われている方法である。これをハンタウイルスの多様性を考慮して実用的な組み合わせにして応用することは、質の高い疫学情報を収集する上で、また迅速に血清診断する上で重要であると考えられる

#### F. 健康危険情報

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Amada T, Yoshimatsu K, Yasuda SP, Shimizu K, Koma T, Hayashimoto N, Gamage CD, Nishio S,

Takakura A, Arikawa J. Rapid, whole blood diagnostic test for detecting anti-hantavirus antibody in rats. J Virol Methods 193(1):42-49, 2013

##### 2. 学会発表

- 1) Arikawa J, Amada T, Yoshimatsu K, Hayashimoto N, Koma T, Shimizu K, Gamage CD, Shiokawa K, Nishio S, Ahlm C, Takakura A : Development of an Immunochromatography Strip Test for Detecting Anti-hantavirus Antibody in Rodent and Human Sera by Using an N-terminal Common Antigenic Site of Hantavirus N protein. IX International Conference on HFRS HPS & Hantaviruses, Beijing, China (2013.06)
- 2) Arikawa J, Koma T, Yoshimatsu K, Nagata N, Sato Y, Shimizu K, Amada T, Nishio S, Hasegawa H : Role of Neutrophils in the Induction of Pulmonary Edema during Hantavirus Infection in C.B-17Scid Mice. 15th International Negative Strand Virus Meeting, Granada, Spain (2013.06)
- 3) 有川二郎:実験用ラットを感染源とする腎症候性出血熱(HFRS)の実験室型流行から学ぶ事. 第 13 回日本バイオセーフティ学会総会・学術集会、札幌 (2013.09)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

流行型	感染源動物	疾患	重篤度	血清型／遺伝子型	流行地域
実験室型	実験用ラット	HFRS	中等度	Seoul (ソウル)型	日本、韓国、中国、フランス、ベルギー
都市型	ドブネズミ	HFRS	中等度	Seoul (ソウル)型	極東アジア～世界中
ペット型	愛玩用ラット	HFRS	中等度	Seoul (ソウル)型	英国、スウェーデン
田園型	セシジネズミ	HFRS	重症	Hantaan (ハンターン)型	極東アジア
	キクビアカネズミ	HFRS	重症	Dobrava (ドブラバ)型	ヨーロッパ
	ヨーロッパヤチネズミ	HFRS	軽症	Puumala (プーマラ)型	北欧
	シカシロアシマウス	HPS	重症	Sin Nombre (シンノンブレ)型	北アメリカ
	コメネズミ	HPS	重症	Andes (アンデス)型	南アメリカ

図1 ハンタウイルス感染症の流行型と血清型  
赤、緑および青枠で囲った3種類の抗原がスクリーニングには必要

Patient	Total No.	Phase	No. tested	ELISA or IFA		1 antigen / strip			3 antigens / 3 lines / strip			3 antigens mixture / 1 line / strip
				IgG (+)	IgM (+)	HFRS (+)	PUU (+)	HPS (+)	HFRS (+)	PUU (+)	HPS (+)	
HFRS (HTNV or SEOV)	56	acut.	21	19	17	21	1	1	21	1	0	20
		conv.	35	35	20	35	1	0	35	1	0	35
NE (PUUV)	62	acut.	26	21	24	0	24	2	1	23	10	24
		conv.	36	36	5	0	35	17	0	36	7	35
HPS (SNV or AND)	28	acut.	12	7	4	0	4	12	0	3	12	12
		conv.	16	16	3	0	10	16	0	8	16	16

図2 各種イムノクロマト法での急性期および回復期血清における抗体検出数

防疫上緊急対応を要する一類感染症や新興・再興感染症に対する予防・診断・治療法に関する研究

— 分担研究報告書 —

分担研究課題：フィロウィルスの疫学・診断・治療法に関する研究

分担研究者：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）による感染症の診断法開発のために、ザイールエボラウイルスの Nucleoprotein (NP) に対するモノクローナル抗体を作出した。得られた抗体はすべてマールブルグウイルスには反応せず、エボラウイルスに特異的な抗体であった。エボラウイルスに属する全てのウイルス種の NP に対する反応性およびザイールエボラウイルス NP アミノ酸配列由来の合成ペプチドに対する反応性を解析し、NP 分子上に7ヶ所の抗原部位を決定した。

#### 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。現在見つかった全てのエボラおよびマールブルグウイルスはヒトまたはサルに急性で致死率の高い感染症を惹き起こす病原体である。現在のところ、マールブルグウイルス属は一種のみが知られているのに対し、エボラウイルス属は進化系統学的に5種 Zaire、Sudan、Tai Forest、Bundibugyo および Reston) に分けられている。このうち Reston エボラウイルスのみアジアで見ついている。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、フィロウィルスの疫学に関する研究は新たな展開をみせている。

フィロウイルスによる感染症（エボラ出血熱およびマールブルグ出血熱）は主に中央アフリカで散発的な流行を繰り返してきたが、近年それらの発生頻度が高くなっている。特に、2012年には合計4回の独立した発生が報告された。また、2008年に、ウガンダから帰国したオランダ人が、自国でマールブルグ出血熱を発症する事例が起きた。アメリカでも同様の事例が確認

され、輸入感染症病原体としてのこれらのウイルスの危険性が先進各国で再認識されている。

ヒトに対する病原性が強いこと、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、エボラおよびマールブルグウイルスは 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、感染動物あるいはヒト血清中のウイルス特異抗体およびウイルス抗原を高感度で検出する方法の確立とその野外応用を目指す。

#### B. 研究方法

Zaire エボラウイルスの NP、マトリックス蛋白質 VP40 および表面糖蛋白質 GP を発現するプラスミドをトランスフェクションした 293T 細胞の培養上清に放出されるウイルス様粒子 (VLP) をショ糖濃度勾配遠心で精製した。皮下および腹腔内に VLP を接種したマウスの脾臓を用いて、ハイブリドーマを作出した。ハイブリドーマの培養上清またはハイブリドーマを腹腔内に投与したマウスの腹水から EBOV NP に対するモノクローナル抗体 (mAb) を精製した。こ

これらの抗体の反応性をエボラウイルス属に分類される5種のウイルスおよびマールブルグウイルスの各精製NPまたは可溶化VLPを抗原としたELISAおよびウイルス感染Vero細胞上清を用いたウエスタンブロット法で解析した。また、NPのアミノ酸配列(762アミノ酸)を網羅する合成ペプチドライブラリー(各20アミノ酸、10アミノ酸ずつ重複)に対する反応性をELISAにより解析し、エピトープマッピングを行った。また、Genetyx ver 6.0を用いて、全てのエボラウイルス種のNP上の種特異的抗原部位を予想し、該当アミノ酸配列を含む合成ペプチドで免疫したウサギ血清の反応性についても同様の方法で解析した。

### C. 結果と考察

EBOV NPに反応するモノクローナル抗体126クローンを作成し、各種ウイルスに対する反応性から7群に分類した(表1)。得られた抗体はすべてマールブルグウイルスには反応せず、エボラウイルスに特異的な抗体であった。各群から選別した計10クローンについて合成ペプチドによるエピトープ解析を行ったところ、8クローンから7か所の抗原部位が決定された(図1)。これらはすべてNPのC末端側に位置しており、421-440番目と601-620番目の2つの領域は5種のエボラウイルスすべての共通エピトープであった。一方、2クローンは直鎖状ペプチドとの反応性は見られず立体構造を認識しているものと考えられた。また、遺伝子解析ソフトで予測されたアミノ酸配列の合成ペプチドで免疫したウサギ血清の反応性から、627-644番目はエボラウイルス種特異的な抗原部位であることが示唆された(表2)。これらの詳細なエピトープ情報は、今後のイムノクロマトグラフィーによる迅速診断法の開発に寄与するものと考えられる。

これまでは、フィロウイルスによる感染症は世界の限られた地域でしか発生が認められてい

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、ウイルス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。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はバイオテロリズムの手段として使用される可能性が指摘されている。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

#### 1. 論文発表

- 1) Takada A. Do therapeutic antibodies hold the key to an effective treatment for Ebola hemorrhagic fever? *Immunotherapy* 5(5):441-3, 2013.
- 2) Changula K, Yoshida R, Noyori O, Marzi A, Miyamoto H, Ishijima M, Yokoyama A, Kajihara M, Feldmann H, Mweene AS, Takada A. Mapping of conserved and species-specific antibody epitopes on the Ebola virus nucleoprotein. *Virus Res* 176(1-2):83-90, 2013.
- 3) Hoenen T, Groseth A, Callison J, Takada A, Feldmann H. A novel Ebola virus expressing luciferase allows for rapid and quantitative testing of antivirals. *Antiviral Res* 99(3):207-13, 2013.
- 4) Noyori O, Matsuno K, Kajihara M, Nakayama E, Igarashi M, Kuroda M, Isoda N, Yoshida R,

- Takada A. Differential potential for envelope glycoprotein-mediated steric shielding of host cell surface proteins among filoviruses. *Virology* 446(1-2):152-61, 2013.
- 5) Noyori O, Nakayama E, Maruyama J, Yoshida R, Takada A. Suppression of Fas-mediated apoptosis via steric shielding by filovirus glycoproteins. *Biochem Biophys Res Commun* 441(4):994-8, 2013.
  - 6) Maruyama J, Miyamoto H, Kajihara M, Ogawa H, Maeda K, Sakoda Y, Yoshida R, Takada A. Characterization of the envelope glycoprotein of a novel filovirus, lloviu virus. *J Virol* 88(1):99-109, 2014.
  - 7) Bukreyev AA, Chandran K, Dolnik O, Dye JM, Ebihara H, Leroy EM, Mühlberger E, Netesov SV, Patterson JL, Paweska JT, Saphire EO, Smither SJ, Takada A, Towner JS, Volchkov VE, Warren TK, Kuhn JH. Discussions and decisions of the 2012-2014 International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) Filoviridae Study Group, January 2012-June 2013. *Arch Virol*, in press
  - 8) Kuhn JH, Bào Y, Bavari S, Becker S, Bradfute S, Brauburger K, Rodney Brister J, Bukreyev AA, Cai Y, Chandran K, Davey RA, Dolnik O, Dye JM, Enterlein S, Gonzalez JP, Formenty P, Freiberg AN, Hensley LE, Hoenen T, Honko AN, Ignatyev GM, Jahrling PB, Johnson KM, Klenk HD, Kobinger G, Lackemeyer MG, Leroy EM, Lever MS, Mühlberger E, Netesov SV, Olinger GG, Palacios G, Patterson JL, Paweska JT, Pitt L, Radoshitzky SR, Ryabchikova EI, Saphire EO, Shestopalov AM, Smither SJ, Sullivan NJ, Swanepoel R, Takada A, Towner JS, van der Groen G, Volchkov VE, Volchkova VA, Wahl-Jensen V, Warren TK, Warfield KL, Weidmann M, Nichol ST. Virus nomenclature below the species level: a standardized nomenclature for filovirus strains and variants rescued from cDNA. *Arch Virol*, in press.
2. 日本語総説等
    - 梶原 将大、小川 寛人、高田 礼人 (2013) フィロウイルスの生態、*実験医学* 31(19):3054-3060.
  3. 学会発表
    - 1) 吉田玲子、Katendi Changula、野依修、Andrea Marzi、宮本洋子、石島麻理、Heinz Feldmann、Aaron S. Mweene、高田礼人、エボラウイルス核タンパク質のエピトープ解析、第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月 10 日、神戸
    - 2) 丸山隼輝、前田健、小川寛人、迫田義博、高田礼人、Lloviu virus の表面糖タンパク質 GP の性状解析、第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月 10 日、神戸
    - 3) 黒田誠、藤倉大輔、野依修、中山絵里、梶原将大、丸山隼輝、宮本洋子、吉田玲子、高田礼人、TIM-1 の多型が及ぼすフィロウイルスの細胞感受性に対する影響、第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月 10 日、神戸
    - 4) 野依修、中山絵里、丸山隼輝、吉田玲子、高田礼人、フィロウイルス糖蛋白質によるアポトーシスシグナル阻害作用、第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月 10 日、神戸
    - 5) Reiko Yoshida, Andrea Marzi, Yasuhiko Suzuki, Manabu Igarashi, Friederike Feldmann, Douglas Brining, Heinz Feldmann, and Ayato Takada. Protective Efficacy of Neutralizing Monoclonal Antibodies in a Nonhuman Primate Model of Ebola Hemorrhagic Fever. Fifteenth International Conference on Negative Strand Viruses, June 20, 2013, Granada, Spain.
    - 6) Masahiro Kajihara, Andrea Marzi, Eri

Nakayama, Takeshi Noda, Manabu Igarashi,  
Makoto Kuroda, Rashid Manzoor, Keita  
Matsuno, Heinz Feldmann, Reiko Yoshida,  
Yoshihiro Kawaoka, and Ayato Takada.  
Antibody-mediated inhibition of Marburg virus  
budding. Fifteenth International Conference on  
Negative Strand Viruses, June 20, 2013,  
Granada, Spain.

F. 知的財産権の出願・登録状況

表1 抗NPモノクローナル抗体の交差反応性

mAb (group)	Isotype	EBOV <sup>a</sup>	SUDV	TAFV	BDBV	RESTV	MARV
ZNP31-1-8 (I)	IgG <sub>1</sub>	++ <sup>b</sup>	++	++	++	++	-
ZNP41-2-4 (I)	IgG <sub>1</sub>	++	++	++	++	++	-
ZNP74-7 (I)	IgG <sub>1</sub>	++	++	++	++	++	-
ZNP24-4-2 (II)	IgG <sub>1</sub>	++	+	++	++	++	-
ZNP106-9 (III)	IgG <sub>1</sub>	++	+	++	++	-	-
ZNP108-2-5 (IV)	IgG <sub>1</sub>	++	-	++	++	-	-
ZNP105-7 (V)	IgG <sub>1</sub>	++	-	-	++	++	-
ZNP98-7 (VI)	IgG <sub>2a</sub>	++	-	-	++	-	-
ZNP35-16-3-5 (VII)	IgG <sub>1</sub>	++	-	-	-	-	-
ZNP62-7 (VII)	IgG <sub>2b</sub>	++	-	-	-	-	-

<sup>a</sup>VLP を抗原として用いた。EBOV、SUDV、TAFV、BDBV、RESTV および MARV は、それぞれ Zaire、Sudan、Tai Forest、Bundibugyo、Reston エボラウイルスおよびマールブルグウイルスを示す。

<sup>b</sup> 一定濃度 (2.5µg/ml) において得られた ELISA の OD<sub>450</sub> 値で評価した。++, OD ≥ 1.0, +, 0.5 < OD < 1; -, OD ≤ 0.5。

表2 予測されたエプトープペプチドで免疫したウサギ抗血清の反応性

Antiserum	Synthetic peptide used for immunisation (amino acid sequence)	EBOV <sup>a</sup>	SUDV	TAFV	BDBV	RESTV	MARV
FS0169	EBOV NP 628-638 (QDHTQEARNQD)	++	-	-	-	-	-
FS0191	SUDV NP 631-644 (QGSESEALPINSKK)	-	++	-	-	-	-
FS0046	TAFV NP 630-643 (NQVSGSENTDNKPH)	-	-	++	-	+	-
FS0048	BDBV NP 628-641 (QSNQTNNEDNVRNN)	-	-	-	++	+	-
FS0170	RESTV NP 630-643 (TSQLNEDPDIGQSK)	-	-	-	-	+	-
FS0610	MARV NP 635-652 (RVVTKKGRFTFLYPNDLLQ)	-	-	-	-	-	++

<sup>a</sup> VLP を抗原として用いた。EBOV、SUDV、TAFV、BDBV、RESTV および MARV は、それぞれ Zaire、Sudan、Tai Forest、Bundibugyo、Reston エボラウイルスおよびマールブルグウイルスを示す。

<sup>b</sup> 一定濃度 (2.5 $\mu$ g/ml) において得られた ELISA の OD<sub>450</sub> 値で評価した。++, OD  $\geq$  1.0, +, 0.5 < OD < 1; -, OD  $\leq$  0.5。

**A**

		<b>ZNP31-1-8, ZNP41-2-4</b>		<b>ZNP106-9</b>	
		<b>ZNP74-7</b>			
EBOV	421	<u>YDDDDDI</u> <u>PF</u> <u>PGPI</u> <u>INDD</u> <u>DPGH</u> <u>QDD</u> <u>DP</u> <u>TDS</u> <u>QDT</u> <u>TIP</u> <u>DV</u> <u>VVD</u> <u>PDD</u> <u>GS</u> <u>Y</u> <u>GE</u> <u>Y</u> <u>Q</u> <u>S</u> <u>Y</u> <u>S</u> <u>E</u> <u>N</u> <u>G</u> <u>M</u> <u>N</u> <u>A</u> <u>P</u>	480		
SUDV	421	<u>Y</u> <u>P</u> <u>D</u> <u>D</u> <u>N</u> <u>D</u> <u>I</u> <u>P</u> <u>F</u> <u>P</u> <u>G</u> <u>P</u> <u>I</u> <u>Y</u> <u>D</u> <u>D</u> <u>T</u> <u>H</u> <u>P</u> <u>N</u> <u>P</u> <u>S</u> <u>D</u> <u>D</u> <u>N</u> <u>P</u> <u>D</u> <u>D</u> <u>S</u> <u>R</u> <u>D</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>I</u> <u>P</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>V</u> <u>V</u> <u>D</u> <u>P</u> <u>Y</u> <u>D</u> <u>D</u> <u>E</u> <u>S</u> <u>N</u> <u>N</u> <u>Y</u> <u>P</u> <u>D</u> <u>Y</u> <u>E</u> <u>D</u> <u>S</u> <u>A</u> <u>E</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>T</u>	480		
TAFV	421	<u>Y</u> <u>D</u> <u>D</u> <u>D</u> <u>N</u> <u>D</u> <u>I</u> <u>P</u> <u>F</u> <u>P</u> <u>G</u> <u>P</u> <u>I</u> <u>N</u> <u>D</u> <u>N</u> <u>E</u> <u>N</u> <u>S</u> <u>E</u> <u>Q</u> <u>Q</u> <u>D</u> <u>D</u> <u>D</u> <u>P</u> <u>T</u> <u>D</u> <u>S</u> <u>Q</u> <u>D</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>I</u> <u>P</u> <u>D</u> <u>I</u> <u>I</u> <u>V</u> <u>D</u> <u>P</u> <u>D</u> <u>D</u> <u>G</u> <u>R</u> <u>Y</u> <u>N</u> <u>N</u> <u>Y</u> <u>G</u> <u>D</u> <u>Y</u> <u>P</u> <u>S</u> <u>E</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>N</u> <u>A</u> <u>P</u>	480		
BDBV	421	<u>Y</u> <u>D</u> <u>D</u> <u>D</u> <u>N</u> <u>D</u> <u>I</u> <u>P</u> <u>F</u> <u>P</u> <u>G</u> <u>P</u> <u>I</u> <u>N</u> <u>D</u> <u>N</u> <u>E</u> <u>N</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>Q</u> <u>N</u> <u>D</u> <u>D</u> <u>D</u> <u>P</u> <u>T</u> <u>D</u> <u>S</u> <u>Q</u> <u>D</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>I</u> <u>P</u> <u>D</u> <u>V</u> <u>I</u> <u>I</u> <u>D</u> <u>P</u> <u>N</u> <u>D</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>Y</u> <u>N</u> <u>N</u> <u>Y</u> <u>S</u> <u>D</u> <u>Y</u> <u>A</u> <u>N</u> <u>D</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>S</u> <u>A</u> <u>P</u>	480		
RESTV	421	<u>Q</u> <u>D</u> <u>D</u> <u>G</u> <u>N</u> <u>E</u> <u>I</u> <u>P</u> <u>F</u> <u>P</u> <u>G</u> <u>P</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>N</u> <u>N</u> <u>P</u> <u>D</u> <u>Q</u> <u>D</u> <u>H</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>D</u> <u>D</u> <u>P</u> <u>R</u> <u>D</u> <u>S</u> <u>R</u> <u>D</u> <u>T</u> <u>I</u> <u>I</u> <u>P</u> <u>N</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>I</u> <u>D</u> <u>P</u> <u>E</u> <u>D</u> <u>G</u> <u>D</u> <u>F</u> <u>E</u> <u>N</u> <u>Y</u> <u>N</u> <u>G</u> <u>Y</u> <u>H</u> <u>D</u> <u>D</u> <u>E</u> <u>V</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>A</u>	480		
		<b>ZNP35-16-3-5</b>		<b>ZNP24-4-2</b>	
EBOV	481	<u>D</u> <u>D</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>F</u> <u>D</u> <u>L</u> <u>D</u> <u>E</u> <u>D</u> <u>E</u> <u>D</u> <u>E</u> <u>D</u> <u>T</u> <u>K</u> <u>P</u> <u>V</u> <u>P</u> <u>N</u> <u>R</u> <u>S</u> <u>T</u> <u>K</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>Q</u> <u>Q</u> <u>N</u> <u>S</u> <u>Q</u> <u>K</u> <u>G</u> <u>O</u> <u>H</u> <u>I</u> <u>E</u> <u>G</u> <u>R</u> <u>O</u> <u>T</u> <u>Q</u> <u>F</u> <u>R</u> <u>P</u> <u>I</u> <u>Q</u> <u>N</u> <u>V</u> <u>P</u> <u>G</u> <u>P</u> <u>H</u> <u>R</u> <u>T</u> <u>I</u> <u>H</u> <u>H</u> <u>A</u>	540		
SUDV	481	<u>G</u> <u>D</u> <u>L</u> <u>D</u> <u>L</u> <u>F</u> <u>N</u> <u>L</u> <u>D</u> <u>D</u> <u>D</u> <u>D</u> <u>S</u> <u>R</u> <u>P</u> <u>G</u> <u>P</u> <u>P</u> <u>D</u> <u>R</u> <u>G</u> <u>N</u> <u>K</u> <u>E</u> <u>R</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>R</u> <u>T</u> <u>Y</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>Q</u> <u>D</u> <u>P</u> <u>T</u> <u>L</u> <u>D</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>K</u> <u>K</u> <u>V</u> <u>P</u> <u>E</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>P</u> <u>G</u> <u>S</u> <u>H</u> <u>O</u> <u>P</u> <u>G</u> <u>N</u> <u>L</u> <u>H</u>	540		
TAFV	481	<u>E</u> <u>D</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>F</u> <u>D</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>D</u> <u>G</u> <u>D</u> <u>E</u> <u>D</u> <u>D</u> <u>H</u> <u>R</u> <u>P</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>E</u> <u>N</u> <u>N</u> <u>N</u> <u>K</u> <u>H</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>D</u> <u>S</u> <u>N</u> <u>K</u> <u>T</u> <u>S</u> <u>N</u> <u>W</u> <u>N</u> <u>R</u> <u>N</u> <u>P</u> <u>T</u> <u>N</u> <u>M</u> <u>P</u> <u>K</u> <u>K</u> <u>D</u> <u>S</u> <u>T</u> <u>O</u> <u>N</u> <u>N</u> <u>D</u> <u>N</u> <u>P</u>	540		
BDBV	481	<u>D</u> <u>D</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>F</u> <u>D</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>D</u> <u>E</u> <u>D</u> <u>D</u> <u>A</u> <u>D</u> <u>N</u> <u>P</u> <u>A</u> <u>Q</u> <u>N</u> <u>T</u> <u>P</u> <u>E</u> <u>K</u> <u>N</u> <u>D</u> <u>R</u> <u>P</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>K</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>N</u> <u>G</u> <u>Q</u> <u>D</u> <u>D</u> <u>G</u> <u>N</u> <u>O</u> <u>G</u> <u>E</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>S</u> <u>P</u> <u>R</u> <u>V</u> <u>A</u> <u>P</u> <u>N</u> <u>Q</u> <u>Y</u> <u>R</u> <u>D</u> <u>K</u> <u>P</u>	540		
RESTV	481	<u>G</u> <u>D</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>F</u> <u>D</u> <u>L</u> <u>D</u> <u>D</u> <u>H</u> <u>E</u> <u>D</u> <u>D</u> <u>N</u> <u>K</u> <u>A</u> <u>F</u> <u>E</u> <u>P</u> <u>Q</u> <u>D</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>P</u> <u>Q</u> <u>S</u> <u>Q</u> <u>R</u> <u>E</u> <u>I</u> <u>E</u> <u>R</u> <u>E</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>I</u> <u>H</u> <u>P</u> <u>P</u> <u>P</u> <u>G</u> <u>N</u> <u>N</u> <u>K</u> <u>D</u> <u>D</u> <u>N</u> <u>R</u> <u>A</u> <u>S</u> <u>D</u> <u>N</u> <u>N</u> <u>Q</u> <u>S</u> <u>A</u> <u>D</u> <u>S</u>	540		
		<b>ZNP98-7</b>			
EBOV	541	<u>S</u> <u>A</u> <u>P</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>D</u> <u>N</u> <u>D</u> <u>R</u> <u>R</u> <u>N</u> <u>E</u> <u>P</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>S</u> <u>T</u> <u>S</u> <u>P</u> <u>R</u> <u>M</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>P</u> <u>I</u> <u>N</u> <u>E</u> <u>E</u> <u>A</u> <u>D</u> <u>L</u> <u>D</u> <u>D</u> <u>A</u> <u>D</u> <u>E</u> <u>T</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>P</u> <u>P</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>S</u> <u>D</u> <u>D</u> <u>E</u> <u>E</u> <u>Q</u> <u>D</u> <u>R</u> <u>D</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>S</u> <u>N</u> <u>R</u>	600		
SUDV	541	<u>I</u> <u>T</u> <u>K</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>S</u> <u>N</u> <u>T</u> <u>N</u> <u>Q</u> <u>P</u> <u>Q</u> <u>G</u> <u>N</u> <u>M</u> <u>S</u> <u>T</u> <u>L</u> <u>H</u> <u>S</u> <u>M</u> <u>T</u> <u>P</u> <u>I</u> <u>Q</u> <u>E</u> <u>E</u> <u>S</u> <u>E</u> <u>P</u> <u>D</u> <u>D</u> <u>Q</u> <u>K</u> <u>D</u> <u>N</u> <u>D</u> <u>D</u> <u>E</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>D</u> <u>S</u> <u>E</u> <u>G</u> <u>D</u> <u>E</u> <u>D</u> <u>G</u> <u>E</u> <u>S</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>E</u> <u>E</u> <u>N</u>	600		
TAFV	541	<u>A</u> <u>Q</u> <u>R</u> <u>A</u> <u>Q</u> <u>E</u> <u>Y</u> <u>A</u> <u>R</u> <u>D</u> <u>N</u> <u>I</u> <u>Q</u> <u>D</u> <u>T</u> <u>P</u> <u>T</u> <u>P</u> <u>H</u> <u>R</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>P</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>E</u> <u>E</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>S</u> <u>N</u> <u>G</u> <u>H</u> <u>N</u> <u>E</u> <u>D</u> <u>D</u> <u>I</u> <u>D</u> <u>S</u> <u>I</u> <u>P</u> <u>P</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>S</u> <u>D</u> <u>E</u> <u>E</u> <u>N</u> <u>T</u> <u>E</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>I</u> <u>T</u> <u>T</u>	600		
BDBV	541	<u>M</u> <u>P</u> <u>Q</u> <u>V</u> <u>Q</u> <u>D</u> <u>R</u> <u>S</u> <u>E</u> <u>N</u> <u>H</u> <u>D</u> <u>Q</u> <u>T</u> <u>L</u> <u>Q</u> <u>T</u> <u>Q</u> <u>S</u> <u>R</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>P</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>E</u> <u>E</u> <u>A</u> <u>D</u> <u>P</u> <u>S</u> <u>D</u> <u>H</u> <u>N</u> <u>D</u> <u>G</u> <u>D</u> <u>N</u> <u>E</u> <u>S</u> <u>I</u> <u>P</u> <u>P</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>S</u> <u>D</u> <u>E</u> <u>G</u> <u>S</u> <u>T</u> <u>D</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>E</u> <u>T</u>	600		
RESTV	541	<u>E</u> <u>E</u> <u>Q</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>Q</u> <u>Y</u> <u>N</u> <u>W</u> <u>H</u> <u>R</u> <u>G</u> <u>P</u> <u>E</u> <u>R</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>N</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>P</u> <u>V</u> <u>H</u> <u>E</u> <u>E</u> <u>D</u> <u>T</u> <u>L</u> <u>M</u> <u>D</u> <u>Q</u> <u>G</u> <u>D</u> <u>D</u> <u>D</u> <u>P</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>P</u> <u>P</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>S</u> <u>D</u> <u>D</u> <u>D</u> <u>A</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>Q</u> <u>Q</u> <u>D</u> <u>P</u> <u>D</u>	600		
		<b>ZNP24-4-2</b>		<b>ZNP62-7</b>	
EBOV	601	<u>T</u> <u>P</u> <u>T</u> <u>V</u> <u>A</u> <u>P</u> <u>P</u> <u>A</u> <u>P</u> <u>V</u> <u>Y</u> <u>R</u> <u>D</u> <u>H</u> <u>S</u> <u>E</u> <u>K</u> <u>K</u> <u>E</u> <u>L</u> <u>P</u> <u>Q</u> <u>D</u> <u>E</u> <u>Q</u> <u>Q</u> <u>D</u> <u>Q</u> <u>D</u> <u>H</u> <u>T</u> <u>Q</u> <u>E</u> <u>A</u> <u>R</u> <u>N</u> <u>Q</u> <u>D</u> <u>S</u> <u>D</u> <u>N</u> <u>T</u> <u>Q</u> <u>S</u> <u>E</u> <u>H</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>E</u> <u>M</u> <u>Y</u> <u>R</u> <u>H</u> <u>I</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>S</u> <u>Q</u> <u>G</u>	660		
SUDV	601	<u>T</u> <u>P</u> <u>T</u> <u>V</u> <u>A</u> <u>P</u> <u>P</u> <u>A</u> <u>P</u> <u>V</u> <u>Y</u> <u>K</u> <u>D</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>V</u> <u>D</u> <u>T</u> <u>N</u> <u>Q</u> <u>Q</u> <u>N</u> <u>G</u> <u>P</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>T</u> <u>V</u> <u>D</u> <u>S</u> <u>Q</u> <u>G</u> <u>S</u> <u>E</u> <u>S</u> <u>E</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>P</u> <u>I</u> <u>N</u> <u>S</u> <u>K</u> <u>K</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>E</u> <u>T</u> <u>Y</u> <u>Y</u> <u>H</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>K</u> <u>T</u> <u>Q</u> <u>G</u>	660		
TAFV	601	<u>K</u> <u>N</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>P</u> <u>P</u> <u>A</u> <u>P</u> <u>V</u> <u>Y</u> <u>R</u> <u>S</u> <u>N</u> <u>S</u> <u>E</u> <u>K</u> <u>E</u> <u>P</u> <u>L</u> <u>P</u> <u>Q</u> <u>E</u> <u>K</u> <u>S</u> <u>Q</u> <u>K</u> <u>Q</u> <u>P</u> <u>N</u> <u>Q</u> <u>V</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>S</u> <u>E</u> <u>N</u> <u>T</u> <u>D</u> <u>N</u> <u>K</u> <u>P</u> <u>H</u> <u>S</u> <u>E</u> <u>Q</u> <u>S</u> <u>V</u> <u>E</u> <u>E</u> <u>M</u> <u>Y</u> <u>R</u> <u>H</u> <u>I</u> <u>L</u> <u>Q</u> <u>T</u> <u>Q</u> <u>G</u>	660		
BDBV	601	<u>K</u> <u>P</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>P</u> <u>P</u> <u>A</u> <u>P</u> <u>V</u> <u>Y</u> <u>R</u> <u>S</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>V</u> <u>D</u> <u>D</u> <u>S</u> <u>V</u> <u>P</u> <u>S</u> <u>E</u> <u>N</u> <u>I</u> <u>P</u> <u>A</u> <u>Q</u> <u>S</u> <u>N</u> <u>Q</u> <u>T</u> <u>N</u> <u>N</u> <u>E</u> <u>D</u> <u>N</u> <u>V</u> <u>R</u> <u>N</u> <u>N</u> <u>A</u> <u>Q</u> <u>S</u> <u>E</u> <u>Q</u> <u>S</u> <u>I</u> <u>A</u> <u>E</u> <u>M</u> <u>Y</u> <u>Q</u> <u>H</u> <u>I</u> <u>L</u> <u>K</u> <u>T</u> <u>Q</u> <u>G</u>	660		
RESTV	601	<u>Y</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>A</u> <u>P</u> <u>P</u> <u>A</u> <u>P</u> <u>V</u> <u>Y</u> <u>R</u> <u>S</u> <u>A</u> <u>E</u> <u>A</u> <u>H</u> <u>E</u> <u>P</u> <u>P</u> <u>H</u> <u>K</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>N</u> <u>E</u> <u>P</u> <u>A</u> <u>E</u> <u>T</u> <u>S</u> <u>Q</u> <u>L</u> <u>N</u> <u>E</u> <u>D</u> <u>P</u> <u>D</u> <u>I</u> <u>G</u> <u>Q</u> <u>S</u> <u>K</u> <u>S</u> <u>M</u> <u>Q</u> <u>K</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>E</u> <u>T</u> <u>Y</u> <u>H</u> <u>H</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>T</u> <u>Q</u> <u>G</u>	660		

**B**

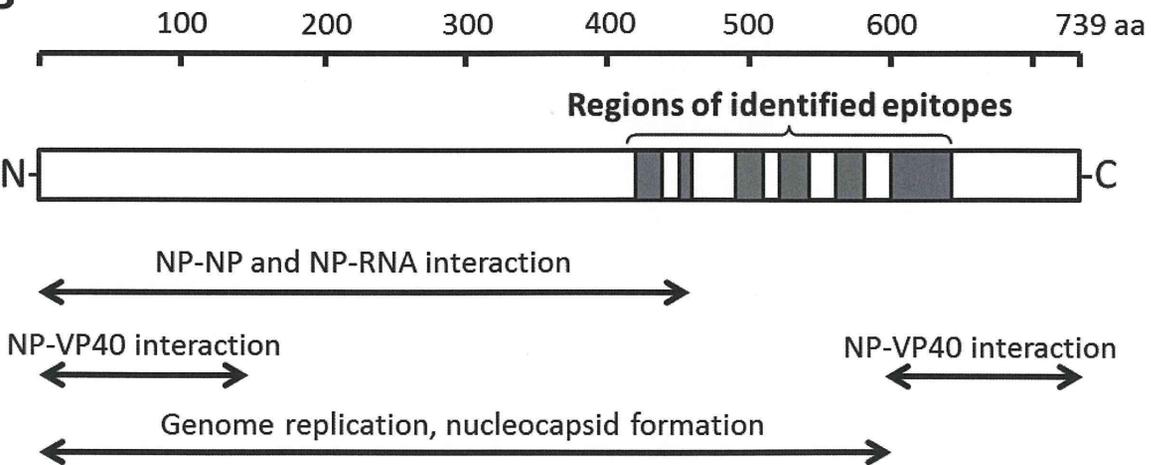


図1 同定されたエピトープとNPの機能領域マッピング

分担研究課題：出血熱ウイルスの増殖後期過程の解析と予防・治療法開発への応用

分担研究者：安田 二郎（長崎大学熱帯医学研究所 教授）

## 研究要旨

ラッサ熱の原因ウイルスであるラッサウイルスの粒子形成・出芽においてZは中心的な役割を果たす。Zの出芽に必要な配列および機能を解析するため、Z欠損変異体を作製し、そのウイルス様粒子（VLP）産生能を比較検討した。その結果3-10番目のアミノ酸がVLP産生に重要で、さらに細胞膜との結合に重要なミリスチル化を制御する配列であることを明らかとした。Zはこれまでに知られているミリスチル化配列とは異なり、新規の配列によってミリスチル化を制御していることが示唆された。

エボラウイルス表面糖タンパク質GPによるTetherin拮抗作用の詳細を明らかにするため、GP変異体を作製した。

## A. 研究目的

### 1) ラッサウイルスの粒子形成解析

アレナウイルス科に属するラッサウイルスはラッサ熱の原因ウイルスである。ラッサウイルスは西アフリカにおいて毎年数十万人の感染者が報告され、発症者の致死率は10-40%と考えられている。ラッサウイルス感染に対する有効なワクチンや抗ウイルス薬はなく、感染初期におけるリバビリンの静脈内投与が一部の感染者の発症予防に有効である。ただし、効果が限定的であること、副作用が強いこと、投与方法が限定されていることからより有効な治療法の確立が望まれている。

報告者らはこれまでにラッサウイルス粒子形成過程の分子生物学的解析を進めてきたが、この機構をより詳細に理解することで抗ラッサウイルスの標的を見出すことを目的とした。

### 2) エボラウイルスGPのTetherin拮抗作用

フィロウイルスのGPは、インターフェロン(IFN)誘導性タンパク質Tetherinが持つ抗ウイルス作用に拮抗することが知られるが、その詳細

な機構は明らかにされていない。そこで、GPのどの領域がTetherinの抗ウイルス作用の拮抗に重要か明らかにすることを目的とした。

## B. 研究方法

1) ラッサウイルスのZタンパク質はウイルス粒子形成・出芽において中心的な役割を果たす。Zタンパク質の細胞内単独発現でウイルス様粒子（VLP）が産生される。このことから、感染性ラッサウイルスの使用はバイオセーフティーレベル（BSL）-4に限定されているものの、ウイルス粒子産生機構の解析はZタンパク質やその他のタンパク質の過剰発現系にて可能となった。これまでにラッサウイルスZによるVLP産生に必要なZ側の因子として2番目のグリシン（G2）、中央に位置するRINGドメイン、そしてC末端に位置する二つのL-ドメイン（PSAPとPPPY）が知られている。そこで、G2とL-ドメインを除いた配列を平均10アミノ酸ずつ削ったZ欠損変異体を作製し（ $\Delta 1$ - $\Delta 9$ 、図1）これらZ欠損変異体によるVLP産生能を検討した（図2）。

ZのG2ミリスチル化はZの細胞膜への結合、そして粒子形成に必須の過程である。そこで上記欠損体において粒子形成を認めなかった欠損体(Δ1)のミリスチル化に与える影響をClick-chemistry(クリック反応)を利用したnon-RI法で検討した(図3)。

Δ1のVLP産生欠損がそのアミノ酸欠損(アミノ酸3-10番の8アミノ酸欠損)によるものか検討するため、3-10番目をGもしくはSに変異させた変異体(mut1、GGGSx2配列)を作製し、VLP産生に与える影響を検討した(図5)。尚、mut1はミリスチル化共通配列である(M-G-X-X-X-S/T)を保有している(図4)。更に、3-10番目の粒子形成に与える責任アミノ酸決定のため、1アミノ酸ずつA(アラニン)もしくはN(アスパラギン)に変異させた変異体を作製した(図6)。

2) エボラウイルスGPによるTetherinの拮抗がどのGP領域によるものか検討するため、C末側にV5タグを付加した野生型GP1,2及びGP1,GP2を作製した。

#### C. 研究結果

1) 作製したラッサウイルスZ欠損変異体のうち3-10番目のアミノ酸を欠損させた変異体(Δ1)はVLP産生が野生型(WT)や他の欠損変異体(Δ2-Δ9)と比べて著しく減少していた(図2)。

クリック反応を用いたミリスチル化タンパク質検出の結果、Δ1はミリスチル化されていないことが明らかとなった(図3)。

Mut1の細胞内発現によるVLP産生は確認できなかった(図5)。

最後に、3-10番目の各アミノ酸置換したZ変異体におけるVLP産生はWTと同等であった(図6)。

#### D. 考察

ラッサウイルスZのVLP産生には3-10番目

のアミノ酸配列が重要であることが明らかとなった(図2)。この中で単独の責任アミノ酸は同定されなかったが(図6)、3-10番目の配列はZのミリスチル化に重要であることが分かった(図3)。これまでにタンパク質のN末端M-G-X-X-X-S/T(Xは任意のアミノ酸)がミリスチル化共通配列として知られている。ラッサウイルスZのミリスチル化はZの細胞膜への結合そしてその後のウイルス粒子産生に必須である。しかし、ラッサウイルス株間でもZにおけるこのミリスチル化共通配列が完全には保存されていないこと、ミリスチル化共通配列を導入してもVLP産生が確認できないことから(図5)、ラッサウイルスZはこれまでに知られていない新たなミリスチル化配列によってそのミリスチル化が制御されていることが示唆された。

2) 293T細胞においてエボラウイルスGP1,2及びGP1,GP2の発現を確認した。

#### E. 結論

1) ラッサウイルスZによるVLP産生には3-10番目のアミノ酸によるミリスチル化制御が関与しており、この制御はこれまでに報告されていないミリスチル化配列によるものであることが示唆された。

2) Tetherinにより抑制されたVLP産生がGPの各変異体により回復するかを調べ、Tetherin拮抗作用に重要なGP領域を同定する。

#### F. 健康危険情報

#### G. 研究発表

1. 論文発表
2. 学会発表

1) Shuzo Urata and Jiro Yasuda : The impact of GPC and N-terminal region of Lassa virus Z on virus-like particle release、XV international Conference on Negative

Strand Viruses, Granada, Spain, 16-21 June  
2013

- 2) 浦田秀造、安田二郎：ラッサウイルスの粒子形成・出芽解析、第54回日本熱帯医学会大会、長崎、2013年10月4日-5日
- 3) 浦田秀造、安田二郎：アレナウイルスの粒子形成・出芽解析、第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013年11月10日-12日

H. 知的財産権の出願・登録状況

図1

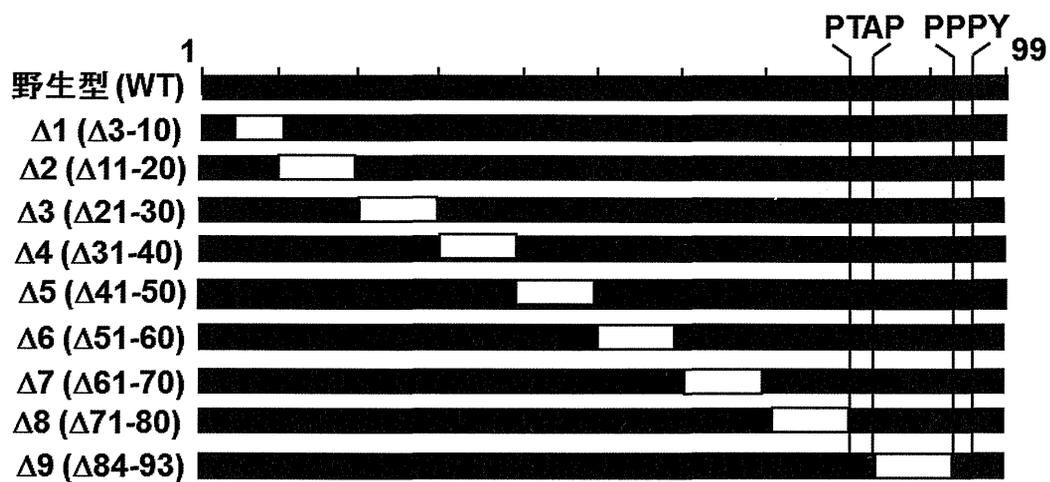


図2

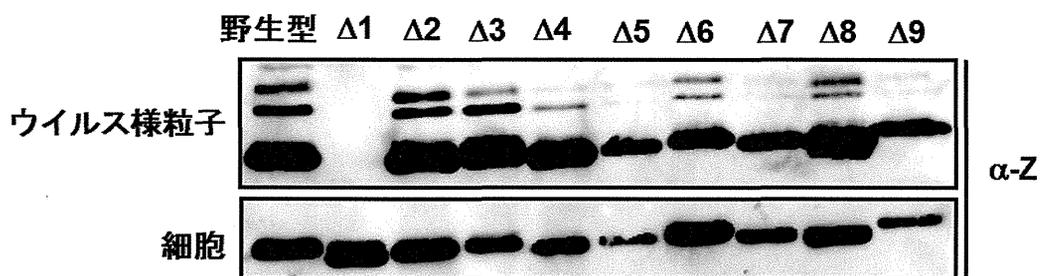


図3

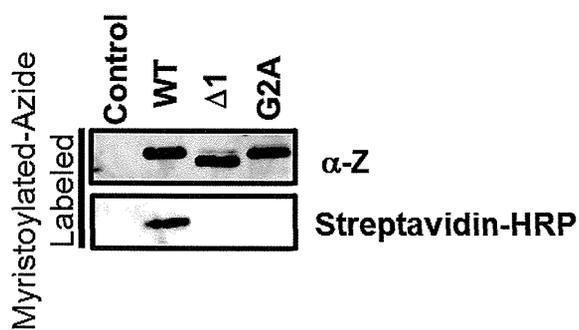


図4

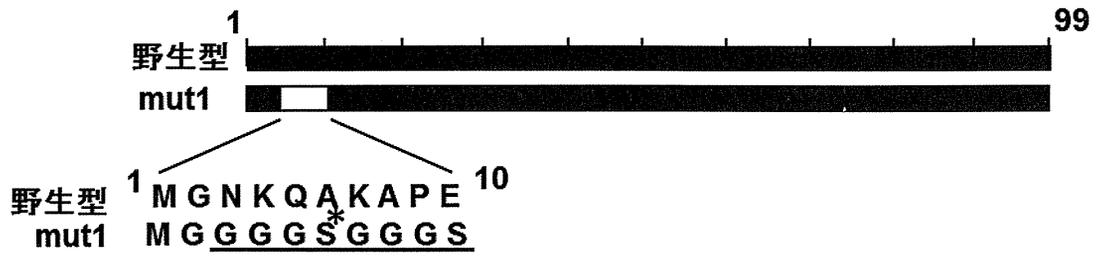


図5

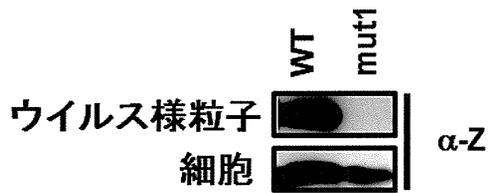
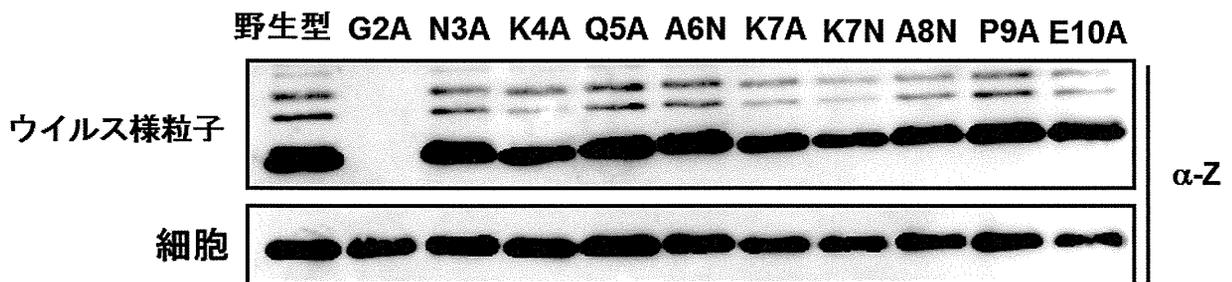


図6



分担研究課題：新型レオウイルスに関する研究

分担研究者：小林 剛（大阪大学微生物病研究所 特任准教授）

## 研究要旨

本研究課題は高病原性新型レオウイルスの感染制御基盤を確立することを目的としている。平成25年度では、新型レオウイルスの性状解析（シーケンス解析）、遺伝子操作系の開発、ウイルス抗体診断技術開発におけるコアである組換えウイルス抗原、抗体の作製を行った。これらの成果は、今後新型レオウイルス研究を遂行する上で極めて有用であると考えられる。

### A. 研究目的

*Pteropine Orthoreovirus* (PRV) は、ヒトに重篤な呼吸器疾患を引き起こすコウモリを起源とする新型の高病原性レオウイルスである。本研究課題では、PRV 感染における正確で迅速な診断法の確立、ウイルス複製、病態発現機序の解明およびワクチン開発に必須の遺伝子操作系、動物モデルの確立を行うことで、PRV の感染制御に関する基礎研究基盤を確立することを目的とする。平成25年度では、国内で分離された PRV Miyazaki 株の全塩基配列決定、Miyazaki 株における遺伝子操作系の開発、Miyazaki 株組換え外層蛋白質 (sigmaC) の発現系の構築および抗体の作製を行った。

### B. 研究方法

#### ●PRV Miyazaki 株の全10分節ウイルスゲノム塩基配列の決定

PRV Miyazaki 株感染細胞から得られたウイルス溶液からウイルスゲノム由来10分節の二本鎖(ds)RNAを抽出した。抽出したウイルスdsRNA溶解液を用いて逆転写反応により、10分節ウイルスRNA由来cDNAを合成した。合成したcDNAを鋳型として、5'、3'末端領域特異的NBVプライマーを用いて10分節Miyazaki株由来

cDNAを増幅し、サブクローニングを行った。クローン化したウイルスcDNAからコンセンサス配列の決定を行った。ウイルスゲノムの末端配列の決定は、Maanらの論文(Maan et al. 2007. J Virol. Methods 143:132-9)を参考に行った。

#### ●PRV Miyazaki 株の遺伝子操作系の開発

Miyazaki 株の全塩基配列の決定後、10分節全てのウイルスcDNAをT7RNAポリメラーゼプロモーター配列およびD型肝炎リボザイム配列の間に挿入したコンストラクトを作製した。作製した10分節cDNAをT7RNAポリメラーゼ発現L929細胞にコトランスフェクションし、培養後、組換えウイルスの産生をプラークアッセイ法により検討した。

#### ●組換えPRV Miyazaki 株 sigmaC の発現および抗体作製

sigmaC にヒスチジンタグを付加した組換えsigmaC蛋白質の発現を大腸菌で行った。大腸菌での発現が確認された組換えsigmaC蛋白質をアフィニティー精製し、ラージスケールでの組換え蛋白質の調整を行った。発現させた組換えsigmaCをマウスに免疫することで、特異抗体の作製も行った。

(倫理面への配慮)