

現プラスミド作製にあたり、細胞内タンパク質発現を確認できるブニヤウイルス科 G 発現プラスミドの作製が困難であること、また、発現においてプラスミドのプロモーターの影響が大きいとの情報をもとに、CMV プロモーターによる発現プラスミドと CAG プロモーターによる発現プラスミドを作製した (図 2)。また、CCHFV の Gn または Gc を認識するポリクローナル抗体の作製を外注し (オペロン社)、その評価を行った (図 6)。更に Gn の C 末端に V5/His タグを付加したプラスミド (G803) を作製し、S1P/SKI-1 による Gn (Pre-Gn から GP38 と Gn) の開裂を評価できる系を構築した (図 4 及び図 6)。CCHFV G 同様 HAZV G 発現プラスミドの構築も試みた (図 5 及び図 6)。

2. S1P/SKI-1 阻害剤 PF-429242 による HAZV 増殖への影響

Vero 細胞に HAZV を moi=0.01 で感染させ、DMSO をコントロールとし、PF-429242 を最終濃度 10 μ M もしく

は 30 μ M となるように培地を交換した。HAZV 感染後 24 時間、48 時間後の培養上清中のウイルス力価を SW13 細胞によるプラークアッセイ法にて比較検討した (図 7)。

C. 研究結果：

1. 293T 細胞にて CMV プロモーターによる CCHFV G 発現及び CAG プロモーターによる CCHFV G 発現をウエスタン・ブロット法にて抗 V5 タグ抗体を使用して検出したところ、CAG プロモーターによる Gc の発現が確認された。一方 CMV プロモーターによる CCHFV G の発現は確認できなかった。CAG プロモーターを保有するプラスミドを使用し、外注した抗 CCHFV Gn もしくは Gc 抗体の検出を試みた結果、Gc の検出は確認されなかった (結果示さず)。一方、Gn 抗体による G, preGn, Gn は確認された (図 6)。同様に HAZV G, G803 の細胞内発現、検出も確認できた。

2. HAZV の Vero 細胞でのウイルス増殖が確認できた。コントロールの DMSO 処理と比較し、10 μ M もしくは 30 μ M の PF-429242 処理は約 3 log (約 1000 倍)のウイルス増殖抑制効果を示した。

D. 考察 : BSL-4 にて取り扱う必要がある感染性 CCHFV の研究において、本研究にて作製した一連の CCHFV G 発現プラスミドは BSL-2 にて研究を進めるに当たって非常に有用である。また、CCHFV のモデルウイルスとして使用される HAZV も BSL-2 で使用可能であることから感染性ウイルスの解析において有用である。

pCXN2-CCHFVG-V5/His は抗 Gn 抗体により、Gn を含む断片 (G、preGn、Gn)の発現が確認され、S1P/SKI-1 開裂の有無を判断することが可能である。更に、G803 は Gn に焦点を絞り G803 のみならず開裂後の GP38+Gn, そして Gn の発現を V5 抗

体で確認することができる点で有用である。

一方、CCHFV のモデルウイルス HAZV を使用しての S1P/SKI-1 阻害のウイルス増殖に与える影響として、10 μ M の PF-429242 が顕著なウイルス増殖抑制を示すことより S1P/SKI-1 は CCHFV 増殖の有効な標的であることが間接的に示された。

E. 結論

1. S1P/SKI-1 阻害による CCHFV G 開裂を評価するための発現プラスミド及び抗体を作製した。
2. S1P/SKI-1 阻害低分子化合物 PF-429242 は HAZV 増殖を顕著に抑制した。

J. 健康危険情報

特になし

K. 研究発表

論文発表

なし

学会発表

1. 浦田秀造、黒崎陽平、安田二郎：S1P/SKI-1 阻害によるアレナウイルス・ブニヤウイルス複製への影響、第 3 回日本ネガティブウイルス学会、沖縄、2014 年 1 月 13 日-15 日

L. 知的財産権の出願・登録状況

なし

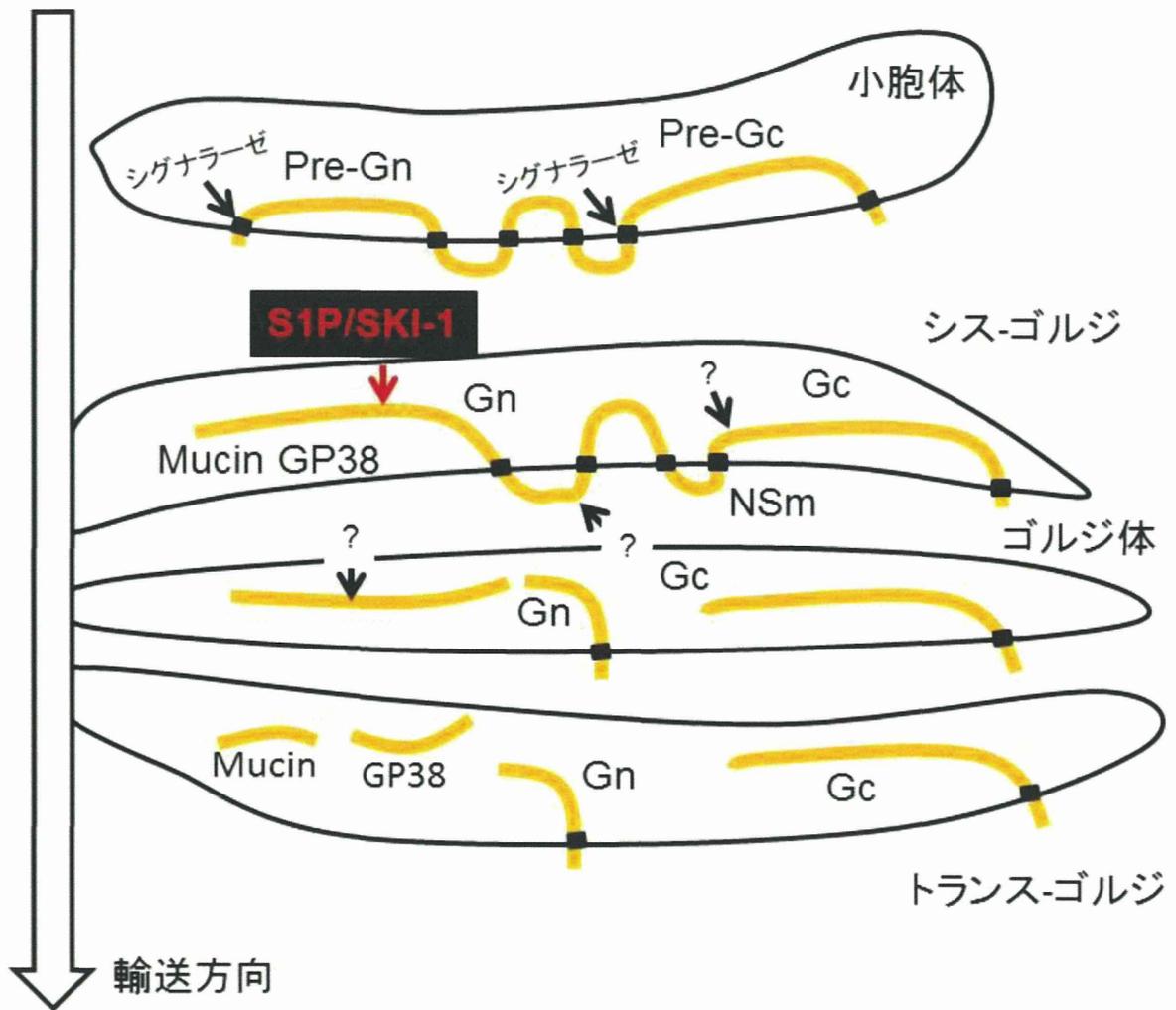


図1 クリミア・コンゴ出血熱ウイルス (CCHFV) 表面糖タンパク質Gの細胞内輸送図

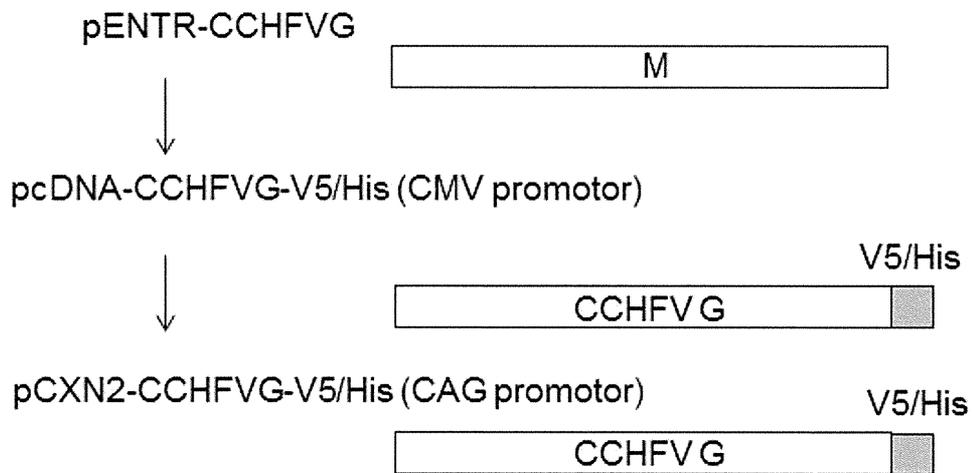


図2 クリミア・コンゴ出血熱ウイルス (CCHFV) 表面糖タンパク質Gの哺乳類細胞発現プラスミド作製の手順

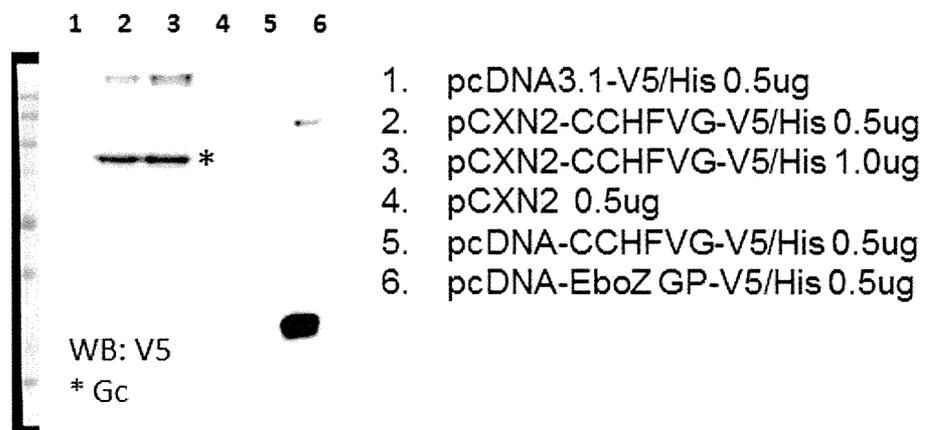


図3 CCHFV Gの293T細胞導入による発現確認

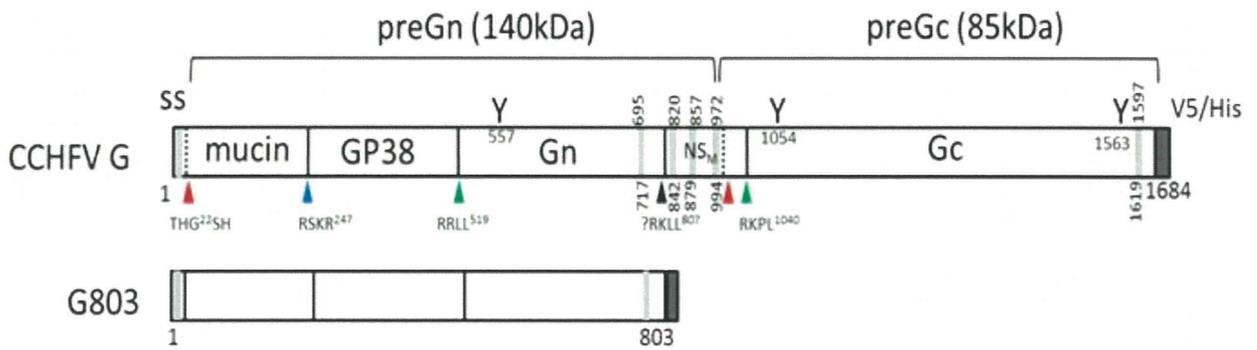


図4 CCHFV Gの模式図及び本研究にて作製した欠損体模式図

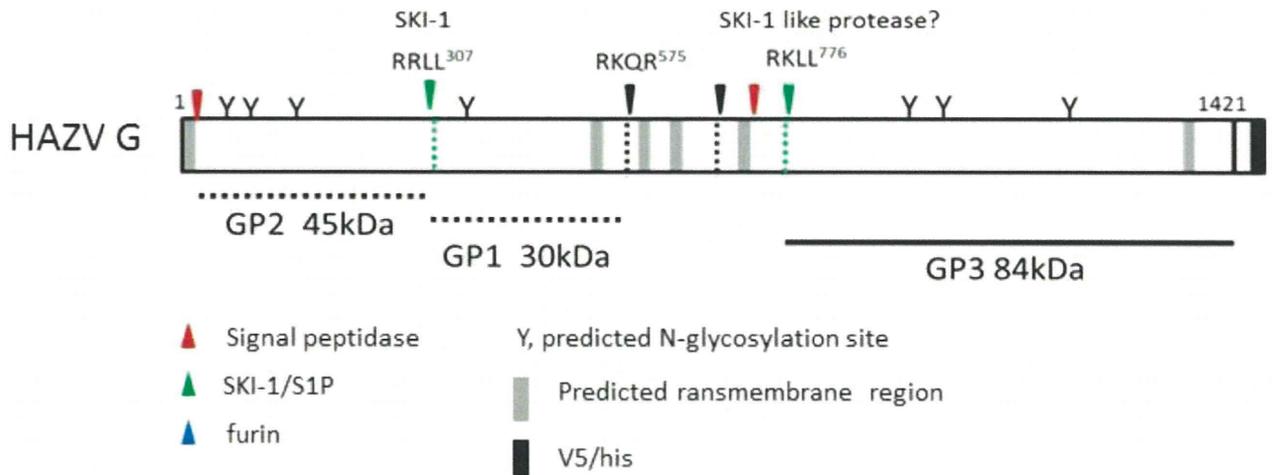


図5 ハザラウイルス (HAZV) Gの模式図

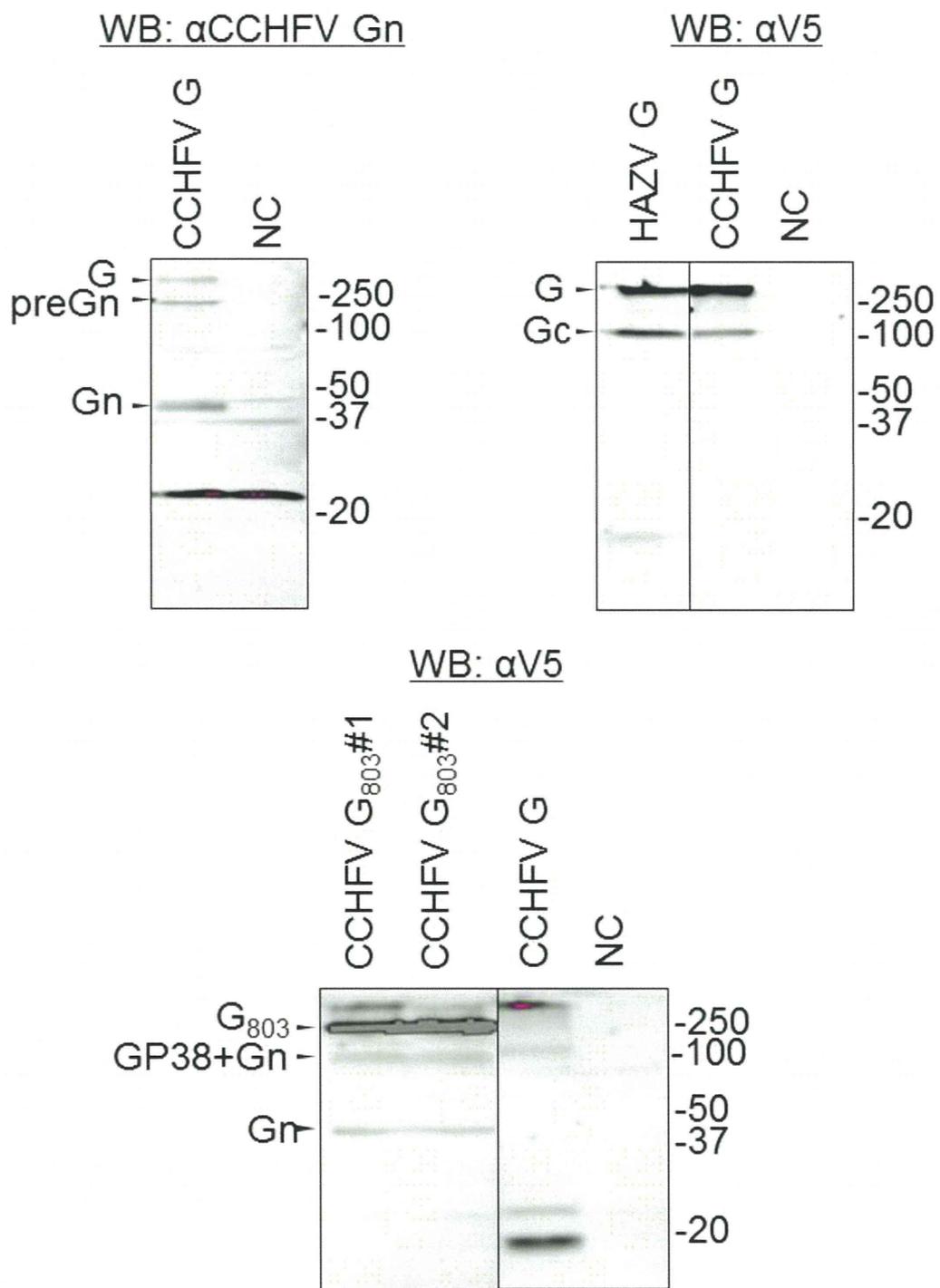


図6 図4にて示したCCHFV G全長及び欠損体の293T細胞における発現および検出の確認 (NC: ネガティブコントロール)

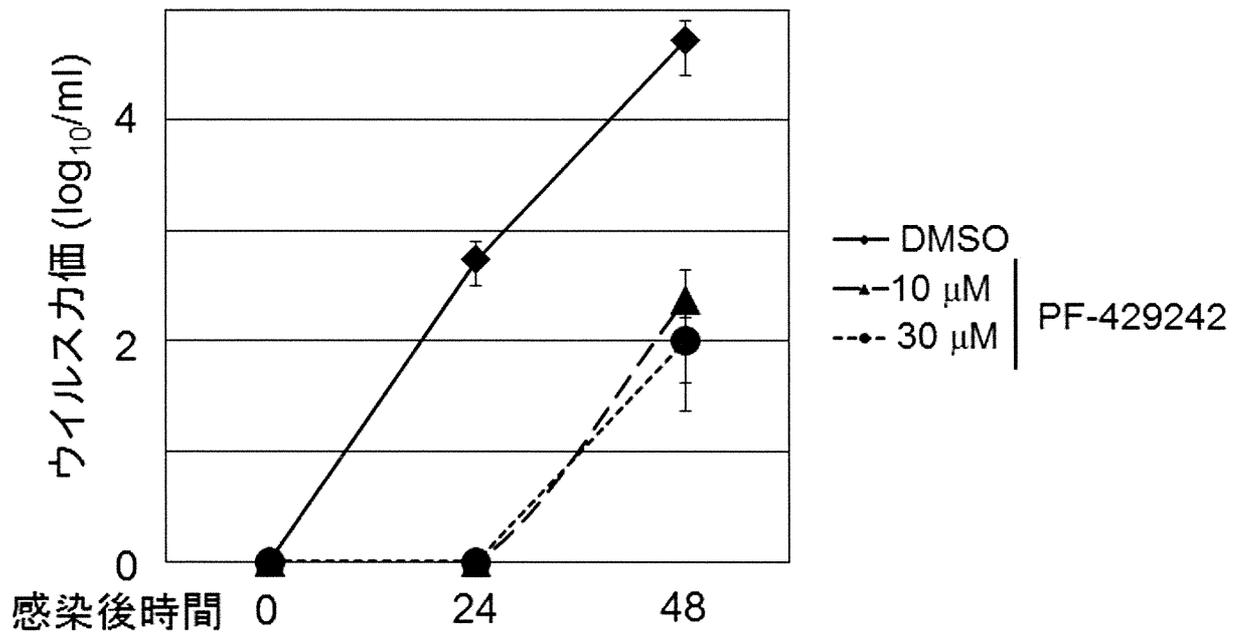


図7 Vero細胞におけるHAZV増殖に対する
S1P/SKI-1阻害低分子化合物PF-429242の影響

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

1. Takamatsu Y., Okamoto K., Dinh DT., Yu F., Hayasaka D., Uchida L., Nabeshima T., Buerano C.C., Morita K.: NS1' protein expression facilitates production of Japanese encephalitis virus in avian cells and embryonated chicken eggs. *J. Gen. Virol.* 95(2):373-383. 2014.
2. Luat L.X., Ngwe Tun M.M., Buerano C.C., Aoki K., Morita K., Hayasaka D.: Pathologic potential of variant clones of the Oshima strain of Far Eastern subtype tick-borne encephalitis virus. *Trop. Med. Health.* In press.
3. Hayasaka D., Shirai K., Aoki K., Nagata N., Simantini D.S., Kitaura K., Takamatsu Y., Gould E., Suzuki R., Morita K.: TNF- α Acts as an Immunoregulator in the Mouse Brain by Reducing the Incidence of Severe Disease Following Japanese Encephalitis Virus Infection. *PLOS ONE.* 8(8):1-18, 2013.

