

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)

総括研究報告書

細胞内脂質合成を標的とした抗高病原性ウイルス療法の分子基盤

長崎大学熱帯医学研究所 助教 浦田 秀造

研究要旨：本研究は未だに有効なワクチン・抗ウイルス薬がないヒト高病原性ウイルスであるルジョウイルス (アレナウイルス科)、デングウイルス (フラビウイルス科)、及びクリミア・コンゴ出血熱ウイルス (ブニヤウイルス科)に対して脂質合成において中心的な役割を果たす S1P/SKI-1 が有効な抗ウイルス薬の標的となり得るか評価するものである。対象ウイルスには感染性ウイルスの使用がバイオセーフティ レベル (BSL)-4 に限定されているルジョウイルス、クリミア・コンゴ出血熱ウイルスが含まれ、本国においてこれらの感染性ウイルスでの評価はできないが、ウイルスタンパク質発現系・モデルウイルスの系を駆使し、分子生物学的解析を進める。最終的には海外 BSL-4 施設にて感染性ウイルスを用いて S1P/SKI-1 がこれらのウイルスに対して有効な抗ウイルスの標的となり得るか評価する。本年度においては、ルジョウイルス、クリミア・コンゴ出血熱ウイルスについてはタンパク質発現系、モデルウイルスの系にて S1P/SKI-1 が有効な抗ウイルスの標的となり得る結果を得、デングウイルスにおいても感染性ウイルスを用いてデングウイルス血清型 2 型に対して S1P/SKI-1 が有効な抗ウイルスの標的となり得る結果を得た。

研究分担者：

早坂 大輔 (長崎大学熱帯医学研究所)

黒崎 陽平 (長崎大学熱帯医学研究所)

研究協力者：

内田 玲麻 (長崎大学熱帯医学研究所)

A. 研究目的：人類はこれまでに多くの感染症を克服してきたにも関わらず、近年新たに出現した(新興)感染症または一度は克服したように見えたが再度感染が拡散している(再興)感染症の危険に曝されている。これらの中でもヒトに対して病原性が非常に高く、有効な治療法が開発されていない病原体は感染症法において1種病原体に分類されており、その感染性病原体(全てウイルス)の使用はバイオセーフティーレベル(BSL)-4でのみ可能である。1種病原体にはエボラ出血熱の原因であるエボラウイルス(フィロウイルス科)、ラッサ熱の原因であるラッサウイルス(アレナウ

イルス科)、クリミア・コンゴ出血熱の原因であるクリミア・コンゴ出血熱ウイルス(ブニヤウイルス科)などが含まれる。これらの他にも致死率は上記のものと比較すれば低いものの、依然人類にとって脅威であり、更に有効な治療法がないウイルス感染症も多く存在する。それらの中でもヒト感染症として最も重要であるものの一つが Dengue 熱である。Dengue 熱の原因となる Dengue ウイルスは熱帯地域を中心に感染域が広く、患者数は年間数千万人とも推定され大きな問題となっている。特に Dengue ウイルスの血清型の異なる2度目の感染は重症化すると考えられており、早急な治療法の確立が求められている。上記ウイルスに対する治療薬開発・同定のためにはそれぞれのウイルスの細胞内複製過程を詳細に理解する必要がある。本研究は2009年に新たに同定された高病原性アレナウイルスであるルジョウイルス(浦田)、Dengue ウイルス(早坂)、クリミア・コンゴ出血熱ウイルス(黒

崎)とウイルス科の異なるウイルスを対象に、細胞内脂質合成阻害がウイルス複製に与える影響、特に脂質合成において中心的な役割を果たす S1P/SKI-1 が有効な抗ウイルス薬の標的となり得るか分子生物学手法にて評価することを目的としている。

各ウイルスの研究目的を記載する前に本研究で焦点としている脂質について記載する。脂質とは生物から分離される水に溶けない物質の総称とされており、1) 単純脂質 (グリセリド・セラミドなど) 2) 複合脂質 (リン脂質・リポタンパク質・スフィンゴ脂質など) 3) 誘導脂質 (脂肪酸・ステロイド・カロテノイド・コレステロール) に分類される。

コレステロール合成：コレステロールは、真核生物の生体膜に含まれ、膜の流動性を調節する脂質でありステロイドの一種である。コレステロールは食物 (外部)から摂取されたり、新規に合成されたりする。コレステロールは主に肝臓で合成されるが、その他

腸や副腎皮質・皮膚等でも合成されている。肝臓や腸におけるコレステロール合成の速度は、細胞内のコレステロール濃度に大きく左右される。コレステロール合成は細胞質において、アセトアセチル CoA とアセチル CoA そして H₂O より開始され、メバロン酸他多くの中間体を経て合成される (図 1)。その中でも本研究において最も重要である合成反応は 3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル (HMG)-CoA よりヒドロキシメチルグルタリル CoA リダクターゼ (HMG-CoA 還元酵素)によって触媒されるメバロン酸合成経路である。

細胞内におけるコレステロール量

調節：細胞内のコレステロールは 低密度リポタンパク質 (LDL)受容体によりコレステロール含有 LDL が取り込まれることにより取り込む方法と

細胞内で直接合成される方法、とがある。細胞内のコレステロール量が不十分だと、Sterol Regulatory Element Binding Protein (SREBP)-1 もしくは

SREBP-2 が通常局在している小胞体からゴルジ体に輸送され、SCAP による第 1 の開裂を受け、引き続きゴルジ体にて S1P/SKI-1 による第 2 の開裂、S2P による第 3 の開裂を受けることでコレステロール/脂質合成を促進させる。一方で細胞内コレステロール量が十分である場合、SREBP-1 および-2 は小胞体に留まることでコレステロール合成を抑制する (図 2)。

S1P/SKI-1 によるコレステロール量調節: S1P/SKI-1 はセリンプロテアーゼの 1 種である。S1P/SKI-1 はゴルジ体において SREBP-1 及び SREBP-2 を開裂する。SREBP-1, -2 は S1P/SKI-1 による開裂後 S2P による開裂を受け、それぞれの開裂断片は転写因子として核内に輸送される。開裂断片は Sterol Regulatory Element (SRE)配列に結合し、HMG-CoA 合成酵素、ファルネシルピロリン酸合成酵素、スクアレン合成酵素、そして SREBP 自身の転写を促進する (図 1 及び図 2)。SREBP-1 の断片は主に脂

肪酸代謝関連遺伝子及びトリグリセリド (TG)合成関連脂質を、SREBP-2 の断片は主にコレステロール合成関連遺伝子の転写を促進する。つまり S1P/SKI-1 は脂質・コレステロール合成を促進する役割がある。

以上の背景を踏まえ、そしてこれまでの研究報告を元として、以下に各研究課題の目的を詳細に記述する。

1. **ルジョウウイルス** (アレナウイルス科): ルジョウウイルスは 2009 年に同定された新型アレナウイルスであるが、現在までに 5 人の感染が確認されており、その内 4 人が死亡している。この報告以降、感染の事例はなく、自然宿主も同定されていない。遺伝学的な解析から、ルジョウウイルスはこれまでに報告されてきたアレナウイルス科とは性質が大きく異なると考えられている。しかし、その表面糖タンパク質 GPC のアミノ酸配列によると宿主 S1P/SKI-1 の開裂認識配列を保有し、申請者が以前に報告したラッサウ

ウイルス GPC の開裂阻害による抗ラッサウイルス戦略 (Urata et al. J. Virol. 2011)と同じ戦略がこの新型アレナウイルスにも適応できるか検討する。またウイルス粒子への取り込み検討実験については、感染性ウイルスが使用できない点から、ルジヨウイルス Z によるウイルス様粒子産生系を用い、Z による粒子産生機構の解析と合わせて S1P/SKI-1 のルジヨウイルス粒子産生への影響の検討及び抗ウイルスへの応用の可能性を検討することを目的とした。

2. **デングウイルス** (フラビウイルス科): デングウイルスは血清型により 1-4 型に分類される。デングウイルス感染によるデング熱に対する有効なワクチン及び抗ウイルス薬はない。また、血清型の異なるデングウイルスへの 2 度目の感染は抗体依存性増強効果による重篤な症状を引き起こすことも知られている。これまでにデングウイルスの細胞内増殖におい

て脂質滴 (油滴または Lipid Droplet (LD))が重要な役割を果たすことが報告されている。一方で、デングウイルスと同じフラビウイルス科に属する C 型肝炎ウイルス (HCV)もその細胞内増殖において LD が重要であることが報告されており、更には S1P/SKI-1 阻害による LD 産生阻害が有効な抗 HCV 戦略となることも報告されている。このことより、代表者・分担者はデングウイルス増殖に対して S1P/SKI-1 阻害が有効な抗ウイルス戦略となり得るか検討することを本研究における主目的とした。

3. **クリミア・コンゴ出血熱ウイルス** (ブニヤウイルス科): クリミア・コンゴ出血熱ウイルス (CCHFV) は 3 分節マイナス鎖 RNA ゲノムを保有する。感染地域はアフリカ・中東・アジアと広く有効な抗ウイルス療法はない。本ウイルスの細胞内増殖機構は未だ不明な点が多いが、S1P/SKI-1 による表面糖タンパク質 G の開裂が

感染性ウイルスの産生に必須であることが示されている。この報告を受けて、CCHFV G の S1P/SKI-1 による開裂が有効な抗ウイルス戦略となり得るか検討することが目的である。

B. 研究方法 : 1) ルジヨウイルス (アレナウイルス科)

感染性ルジヨウイルスは BSL-4 でのみ使用可能であることから本年度はウイルス様粒子産生に必要なルジヨウイルス Z 及び表面糖タンパク質 GPC の発現プラスミドを構築し、解析に用いた。また Z においては出芽において重要と考えられる L ドメインの変異体、GPC においては S1P/SKI-1 認識配列変異体を作製し、ウイルス様粒子産生への影響、GPC 開裂への影響をウェスタン・ブロット法にて検討した。さらに GPC の開裂がウイルス様粒子への取り込みに影響するかも検討した。最後に S1P/SKI-1 阻害低分子化合物 PF-429242 がルジヨウイルス GPC の開裂を阻害するか検討した。

2) デングウイルス (フラビウイルス科)

本年度はデングウイルス血清型 2 型を用いて S1P/SKI-1 阻害低分子化合物 PF-429242 がウイルス増殖を阻害するか検討した。また共焦点レーザー顕微鏡を用いて細胞内脂質滴 (LD) とデングウイルス C タンパク質の局在を検討した。

3) クリミア・コンゴ出血熱ウイルス (ブニヤウイルス科)

感染性クリミア・コンゴ出血熱ウイルスは BSL-4 でのみ使用可能であるため、表面糖タンパク質 G 発現プラスミドを構築した。またクリミア・コンゴ出血熱ウイルスのモデルウイルスとして BSL-2 で使用可能であるハラウイルスを用いて S1P/SKI-1 阻害低分子化合物である PF-429242 のウイルス増殖に与える影響を検討した。

C. 研究結果 : 1) ルジヨウイルス (アレナウイルス科)

ルジヨウイルス Z は C 末端に FLAG

タグ、HA タグを付加したプラスミド、GPC は C 末端に FLAG タグを付加したプラスミドを構築した。Z は L ドメインを 2 か所コードしており (YREL 及び PSAP)、双方とも変異アミノ酸の導入によりウイルス様粒子産生が観察されなかった。GPC においては S1P/SKI-1 認識アミノ酸配列 (RKLM) に変異を導入することで開裂が阻害されることが明らかとなった。更にこの GPC の開裂阻害はウイルス様粒子への取り込みも阻害することが明らかとなった。最後に S1P/SKI-1 阻害低分子化合物 PF-429242 はルジョウウイルス GPC の開裂を阻害することも見出した。

2) デングウイルス (フラビウイルス科)

デングウイルス血清型 2 型において S1P/SKI-1 阻害低分子化合物 PF-429242 がウイルス増殖を有意に低下させることが明らかとなった。更に共焦点レーザー顕微鏡の観察より、細胞内脂質滴 (LD) を囲うように

デングウイルス C タンパク質が局在することが明らかとなった。

3) クリミア・コンゴ出血熱ウイルス (ブニヤウイルス科)

クリミア・コンゴ出血熱ウイルス表面糖タンパク質 G の発現プラスミドを構築した。また Gn 認識抗体の作製も行った。ハザラウイルスにおいては PF-429242 はウイルス増殖をコントロール (DMSO 処理) と比較して顕著に (約 1/1000) 減少させた。

D. 考察: 本年度、BSL-4 でのみ使用可能であるルジョウウイルス及びクリミア・コンゴ出血熱ウイルスはタンパク質発現プラスミドを作製した。このことより、BSL-2 において S1P/SKI-1 阻害の粒子産生に与える影響の検討が可能となった。事実、ルジョウウイルスにおいては S1P/SKI-1 阻害が GPC の開裂を阻害することを示し、この開裂阻害が、GP の粒子への取り込みを阻害することを示した。つまりルジョウウイルスにおいて S1P/SKI-1 阻害は粒子産生

そのものではなく、感染性粒子産生を抑制するものと考えられる。一方、S1P/SKI-1 阻害によるクリミア・コンゴ出血熱ウイルス G の開裂への影響は来年度以降に詳細な実験を行う。しかしながら、ハザラウイルスの増殖が S1P/SKI-1 阻害低分子化合物により顕著に抑制されたことから、S1P/SKI-1 はクリミア・コンゴ出血熱ウイルスにおいても有効な抗ウイルスの標的となり得ることを示唆する。

デングウイルスにおいては、S1P/SKI-1 阻害低分子化合物は有意にウイルス増殖を抑制した。しかし、この抑制は部分的であることから、S1P/SKI-1 は有効な抗ウイルスの標的となり得るものの、直接ウイルスの複製に関与しているとは考えにくい。デングウイルス C タンパク質が細胞内脂質滴 (LD) を取り囲むように局在することから、デングウイルスが S1P/SKI-1 によって生成される LD を粒子形成の足場にすることで粒子産生を促進していることが推測される。

この推測については来年度以降に詳細に解析を進める。

E. 結論

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

- 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.

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

4. 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・プ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

5. 早坂大輔、淵上剛志、森田公一：フラビウイルスの分子イメージング：第48回日本脳炎ウイルス生態学研究会、湯河原 (2013)

6. 青木康太郎、早坂大輔、Mya Myat Ngwe Tun、嶋田聡、森田公一：日本脳炎ウイルス感染マウスにおける感染量とインターフェロン応答の解析：第50回ウイルス学会九州支部総会、長崎 (2013)

7. 早坂大輔、淵上剛志、森田公一：フラビウイルス脳炎の分子イメージング：第156回日本獣医学会学術集会、岐阜 (2013)

8. 早坂大輔、青木康太郎、Mya Myat Ngwe Tun、嶋田聡、森田公一：日本脳炎ウイルス感染マウスにおける感染量とインターフェロン応答の解析：第 54 回日本熱帯医学会大会、長崎 (2013)
9. 高松由基、森田公一、早坂大輔：マウスモデルにおける日本脳炎ウイルスの高病原性に関わる遺伝子を特定する：第 20 回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会、神戸 (2013)
10. Mya Myat Ngwe Tun, Kyaw Zin Thant, Shingo Inoue, Takeshi Nabeshima, Kotaro Aoki, Aung Kyaw Kyaw, Tin Myint, Thi Tar, Kay Thwe Thwe Maung, Daisuke Hayasaka, Kouichi Morita : Emergence of Chikungunya virus African genotype in Myanmar : 第 20 回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会、神戸 (2013)
11. 早坂大輔、青木康太郎、Mya Myat Ngwe、嶋田聡、森田公一：日本脳炎ウイルス感染マウスにおける感染量とインターフェロン応答の解析：第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸 (2013)
12. 高松由基、岡本健太、Dihn Tuan Duc、余福勲、早坂大輔、内田玲麻、鍋島武、Corazon C Buerano、森田公一：日本脳炎ウイルスの NS1' タンパク質は、鳥細胞でのウイルス産生を増加させる：第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸 (2013)
13. 白井顕治、北浦一孝、早坂大輔、高崎智彦、鈴木隆二、倉根一郎：日本脳炎感染マウスの予後に関連する脳内浸潤 T 細胞の質的な違い：第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸 (2013)
14. Mya Myat Ngwe Tun, Daisuke Hayasaka, Kotaro Aoki, Masachika Senba, Kenji Shirai, Ryuji Suzuki, and Kouichi Morita : TNF- α and IL-10 reduce the incidence of mortality in mice following tick-borne encephalitis virus infection : 第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸 (2013)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

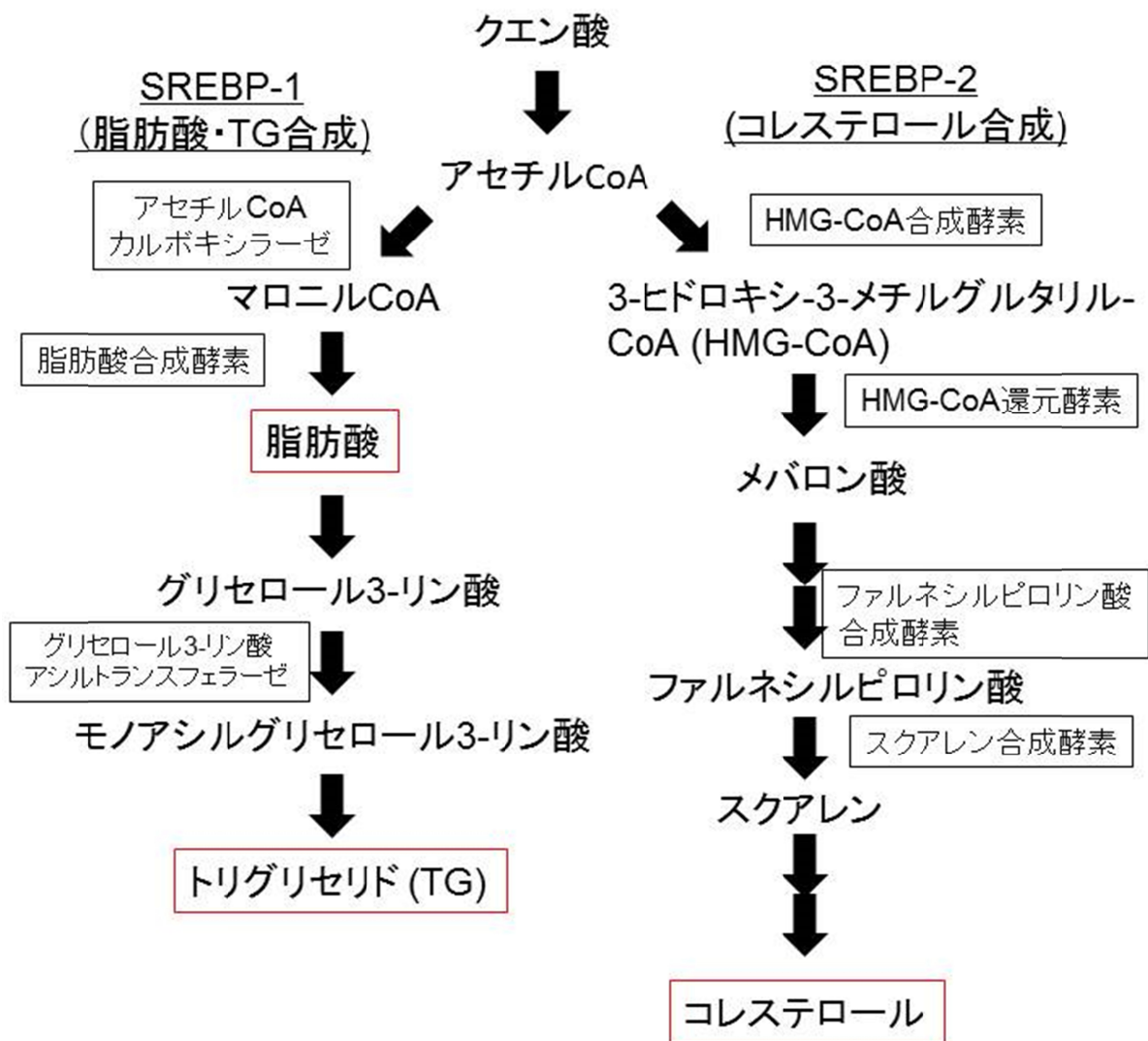


図1 SREBP-1, -2が転写因子として遺伝子調節を行う標的酵素群

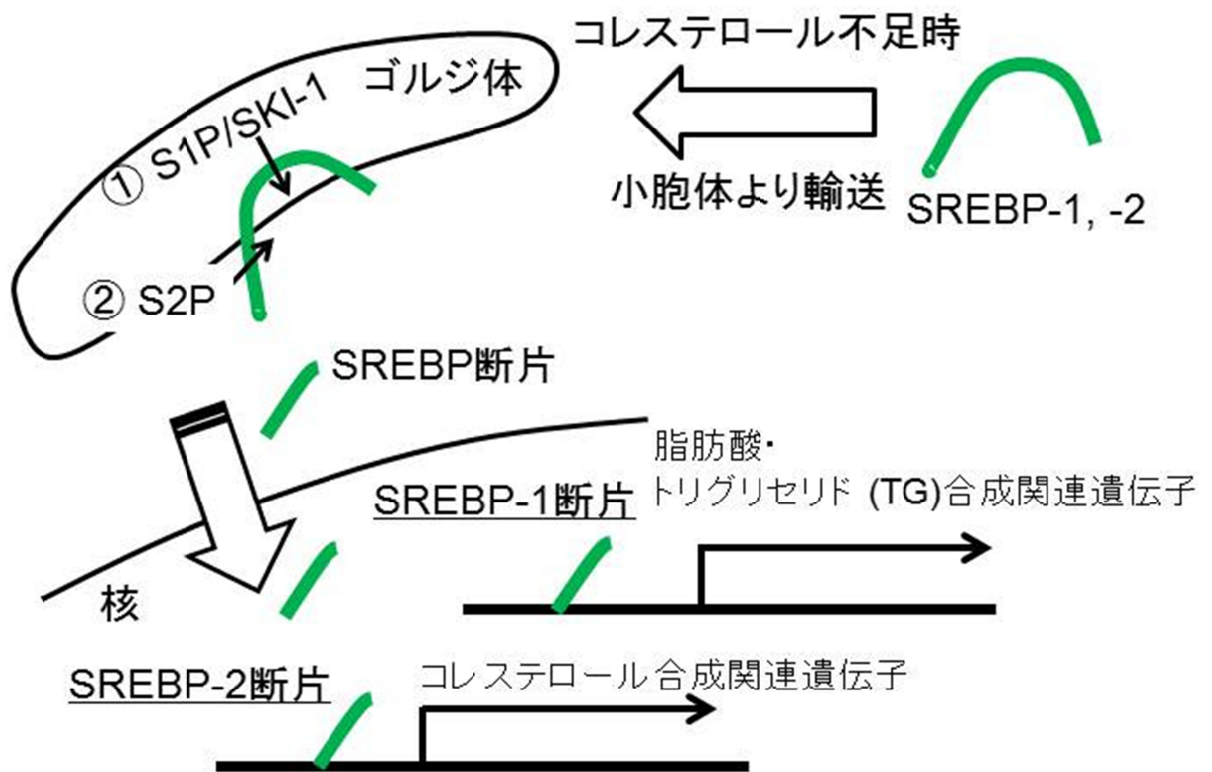


図2 S1P/SKI-1がSREBP-1, -2を介して脂質合成を調節する仕組み