

# 「一・二・三分節マイナス鎖RNAウイルスの 細胞内増殖機構の解析」

長崎大学

熱帯医学研究所 新興感染症学分野  
感染症共同研究拠点

浦田 秀造

# 本講演の内容

- ・ マイナス鎖一本鎖RNAをゲノムとして保有するウイルス

**1分節**: エボラウイルス

**2分節**: ラッサウイルス・LCMV (リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス)

**3分節**: SFTSウイルス

- ・ 長崎大学が建設を計画しているBSL-**4**施設について

# エボラウイルスについて

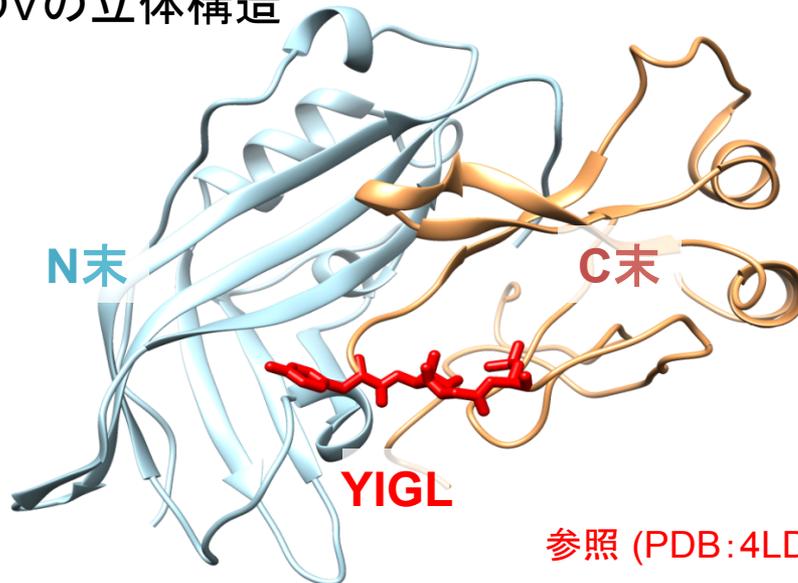


- ・ フィロウィルス科に属し、マイナス鎖一本鎖RNAをゲノムとして保有する。
- ・ ゲノムは7つのウイルスタンパク質をコードしている。
- ・ 2013年終わりから2014年にかけて西アフリカ一帯で大規模アウトブレイクが起きたが、それ以外も中央アフリカ地域で散発的に感染発生が起きている。
- ・ 認可されたワクチンや治療薬はない。
- ・ VP40が粒子産生において中心的な役割を果たしている。

# エボラウイルスVP40タンパク質のYIGL配列は 分子表面に露出している

		292	295		326
EBOV	LRPGISEFH	GQPIIPVLLPKYIIGLDPVAPGDLTMVITQDCDICHSPASLPAVIEK*			
BDBV	LRPGISEFH	GQPIIPILLPKYIIGLDPISQGDLTMTVITQDCDICHSPASLPPVSEK*			
RESTV	LRPGLSLH	...	GQPIIPVLLPKYVGLDPISPGDLTMTVITQDCDSCHSPASHPYHMDKQNSYQ*		
SUDV	LRPGLSEFH	GQPIIPVLLPKYIIGLDPISPGDLTMVITPDYDDCHSPASC SYLSEK*			
TAFV	LRPGISEFH	GQPIIPILLPKYIIGLDPISQGDLTMTVITQDCDSCHSPASLPPVNEK*			

## EBOVの立体構造



参照 (PDB:4LDB)

EBOV: ザイールエボラウイルス  
BDBV: ブンディブギョエボラウイルス  
RESTV: レストンエボラウイルス  
SUDV: スーダンエボラウイルス  
TAFV: タイフォレストエボラウイルス

## 背景

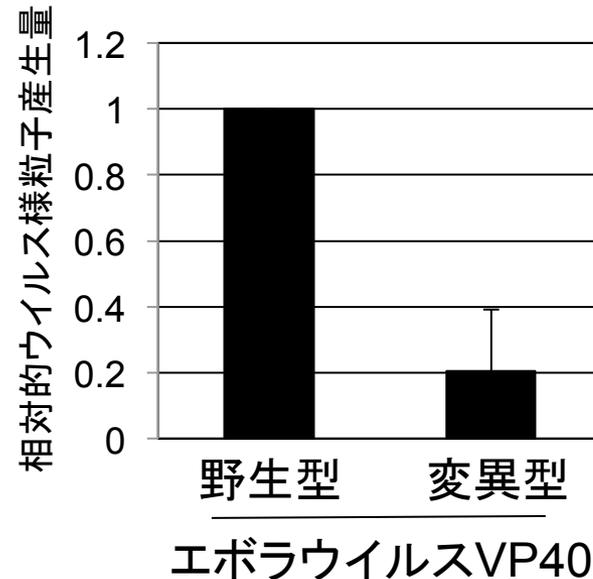
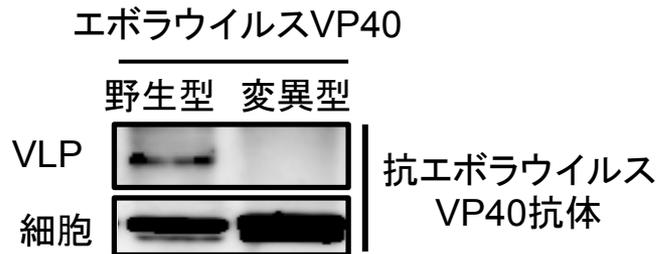
- ・ エボラウイルスVP40タンパク質による粒子形成に重要なアミノ酸配列は完全に分かっていない。
- ・ VP40タンパク質のYIGL配列が分子表面に露出していること、細胞表面との結合に重要なC末端に位置することから、粒子形成において重要な役割が示唆される。
- ・ YxxL配列が宿主因子 (AP2やAIP1/ALIX)との結合に重要であり、粒子形成に関与している可能性がある。

## 目的

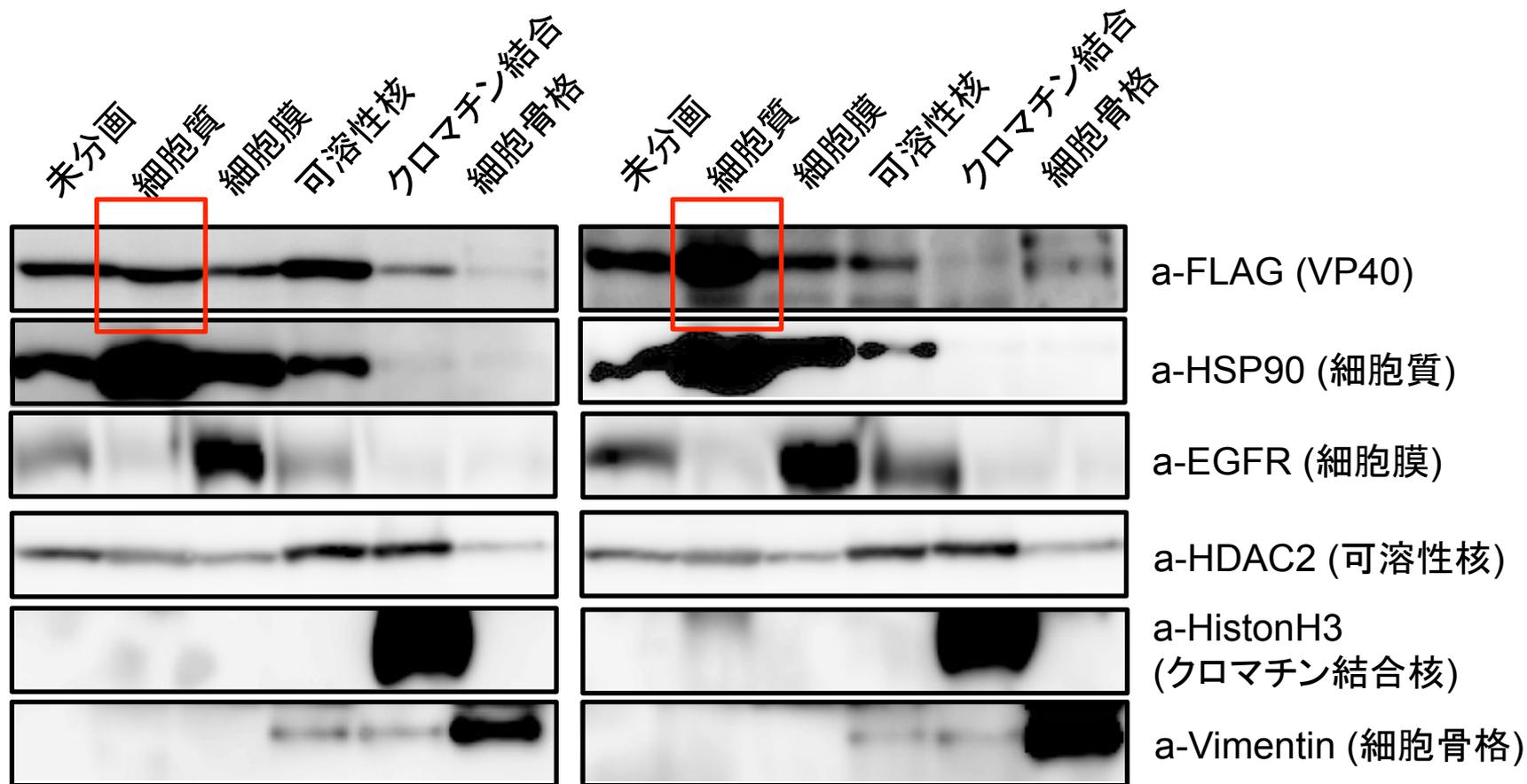
エボラウイルスVP40タンパク質内YIGL配列のウイルス細胞内複製及び粒子形成における役割を理解すること。

# エボラウイルスVP40タンパク質のYIGL配列は ウイルス様粒子 (VLP)産生に重要である

\* 変異型: YIGL配列→AAAA配列



# YIGL配列はVP40の細胞内局在に影響する

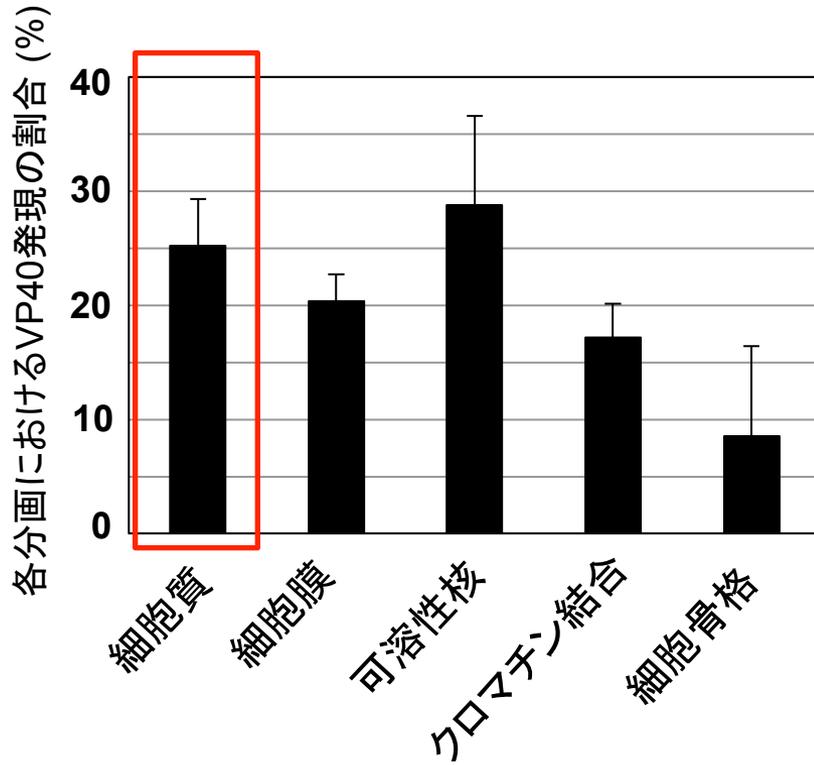


野生型

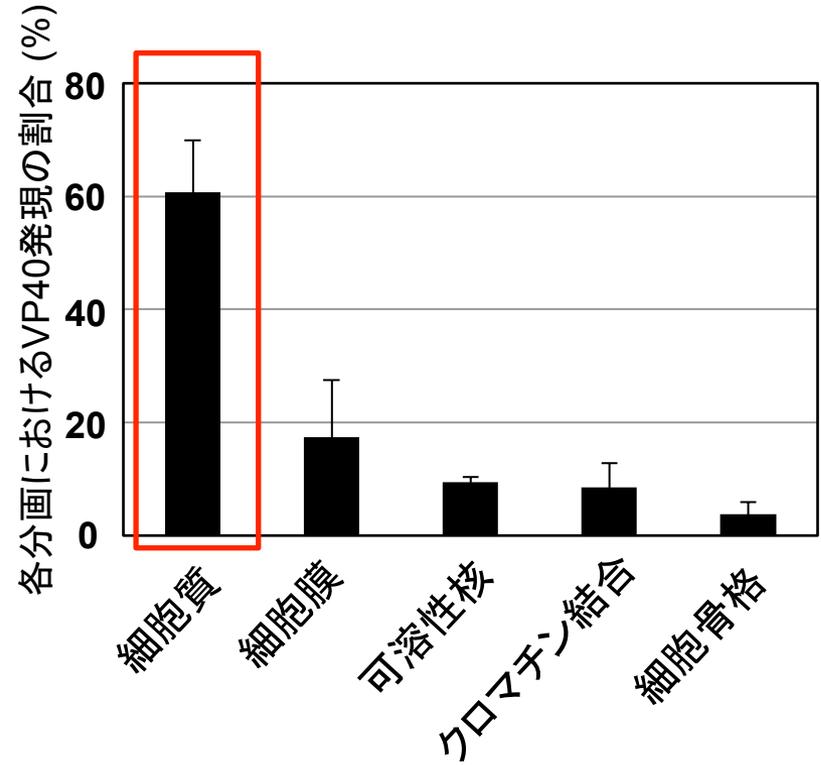
変異型

# YIGL配列はVP40の細胞内局在に影響する

## VP40 (野生型)

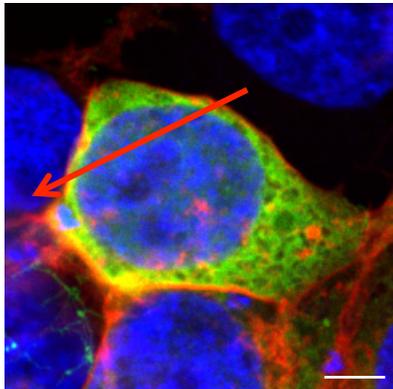


## VP40 (変異型)

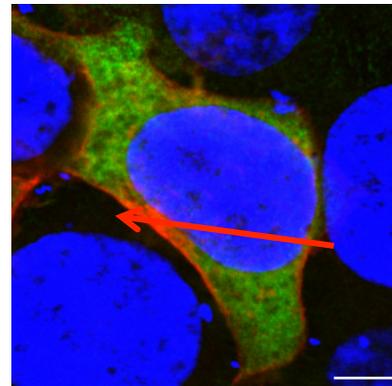


# VP40のYIGL配列は ホスファチジルセリンとの共局在に重要 -1-

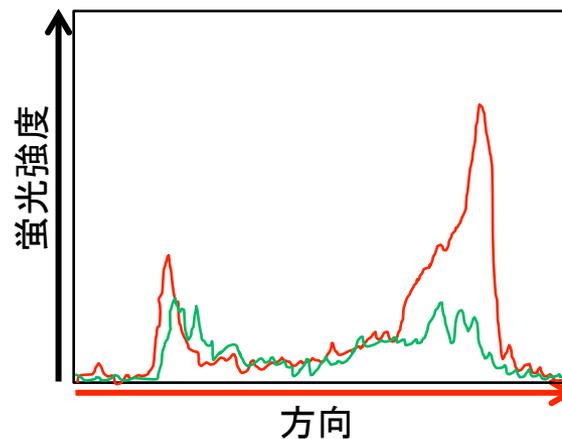
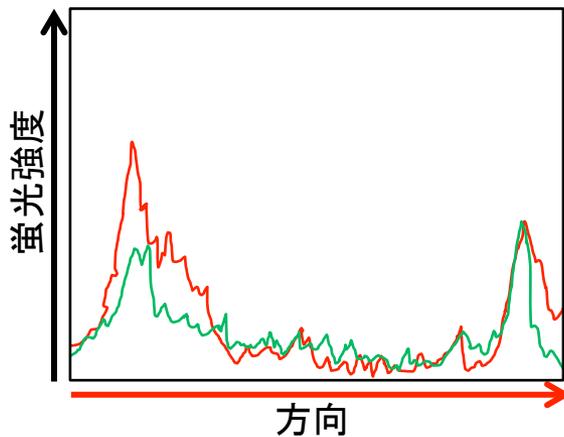
VP40 (野生型)  
ホスファチジルセリン



VP40 (変異型)  
ホスファチジルセリン

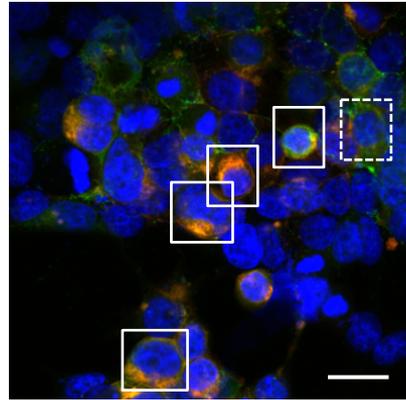


Bar: 5  $\mu$ m

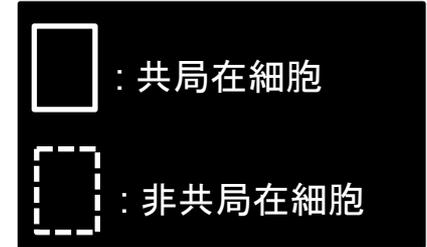
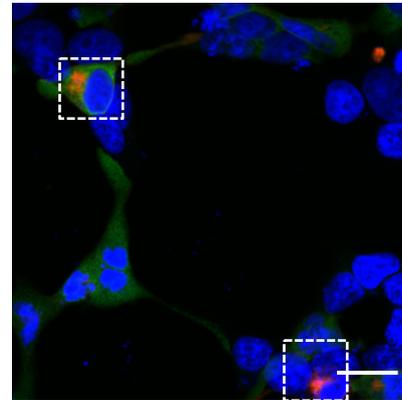


# VP40のYIGL配列は ホスファチジルセリンとの共局在に重要 -2-

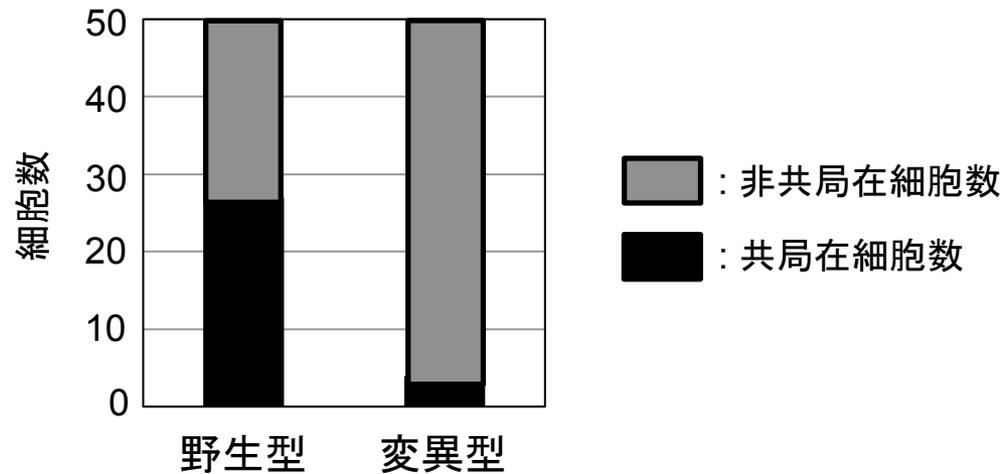
VP40 (野生型)  
ホスファチジルセリン



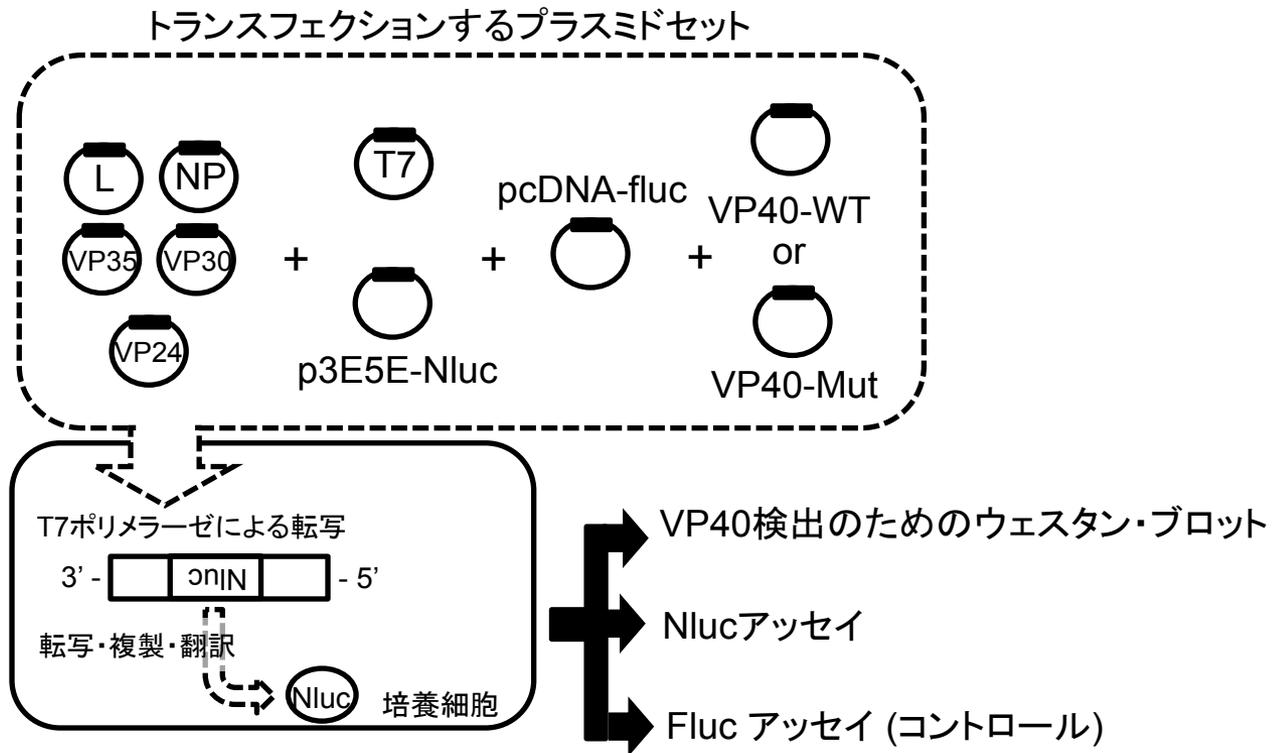
VP40 (変異型)  
ホスファチジルセリン



Bar: 20  $\mu$ m

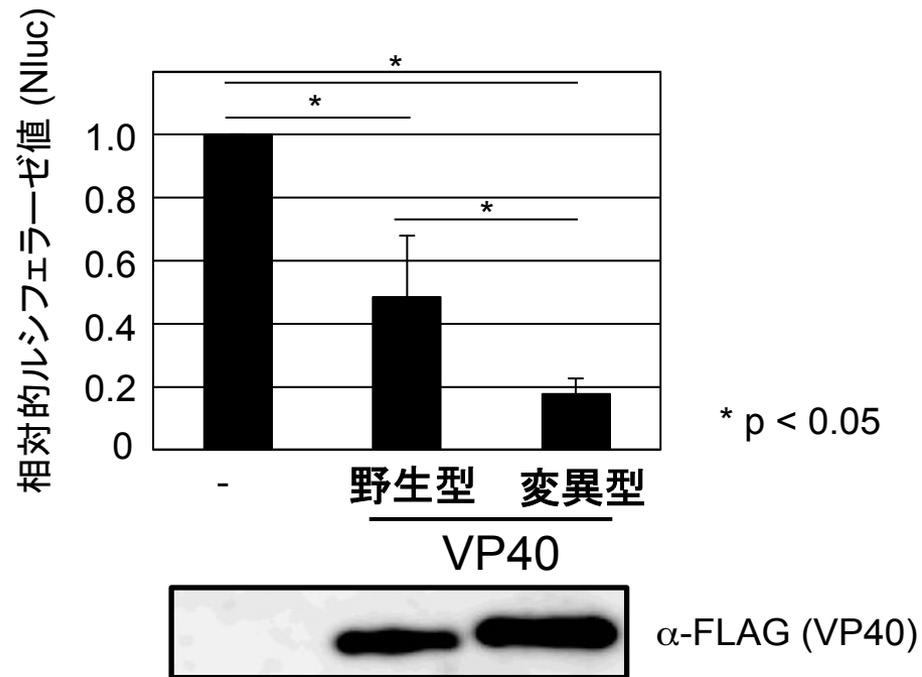


# エボラウイルス ミニゲノムアッセイ系

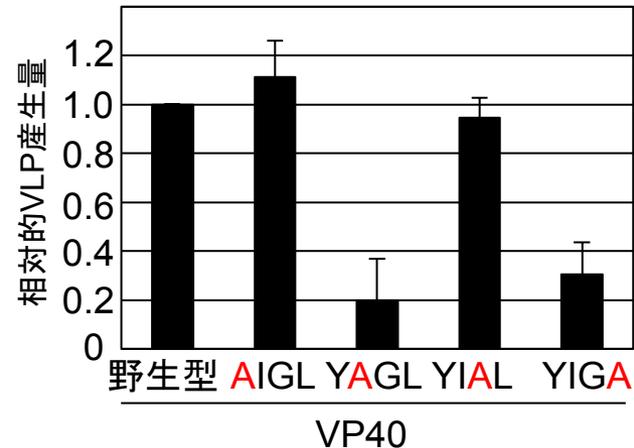
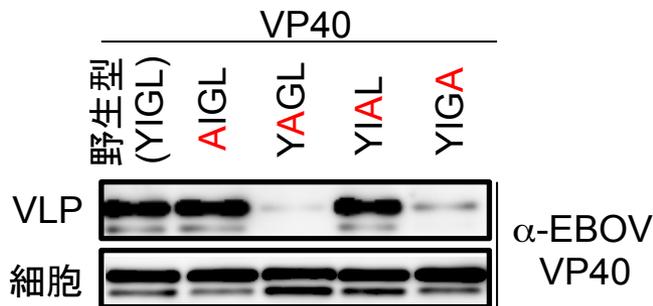
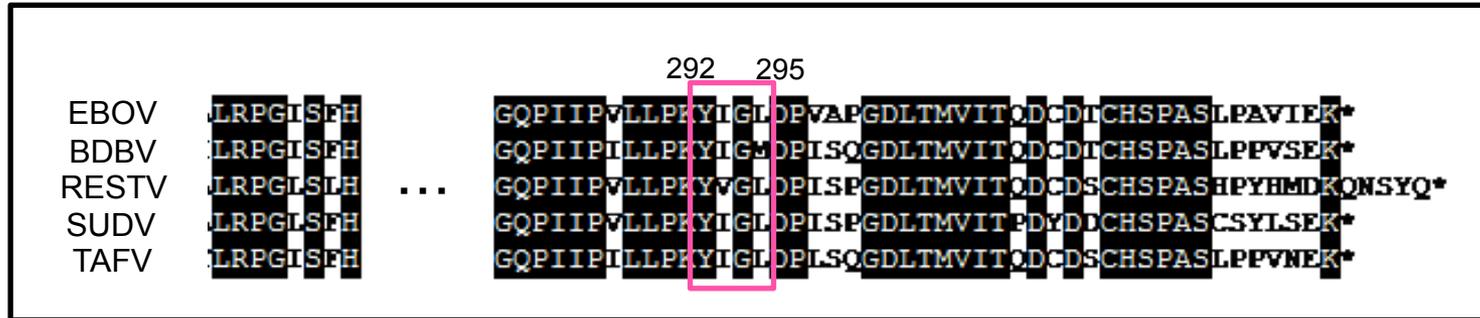


- ・ VP40はゲノム複製を抑制することが知られている。

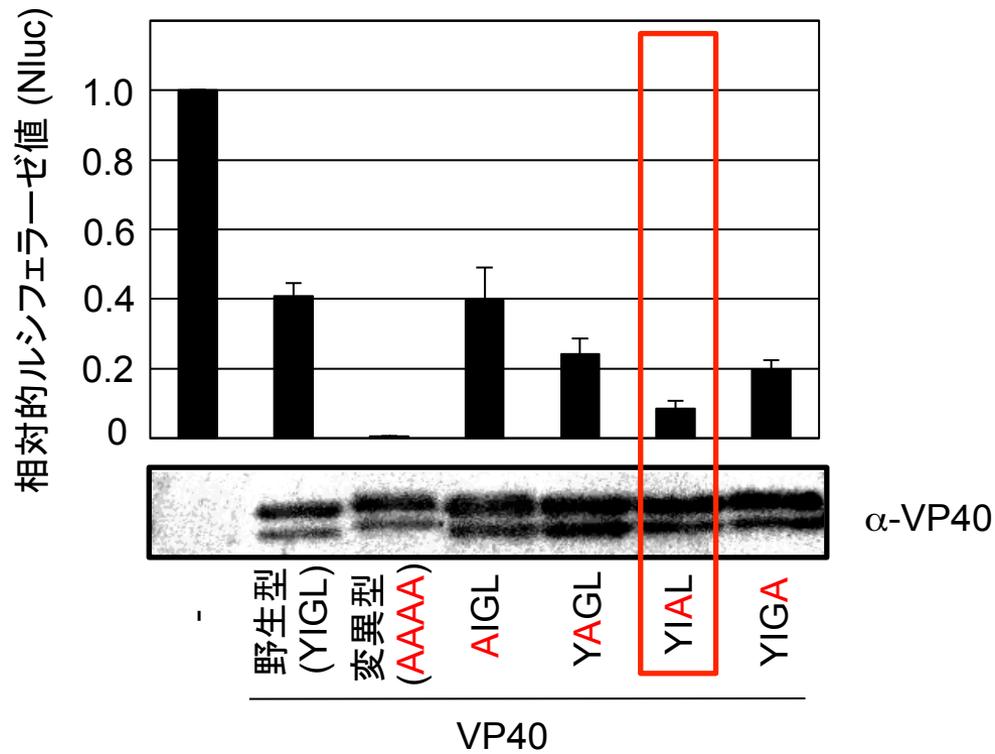
# VP40変異体はエボラウイルスゲノム複製抑制作用を促進する



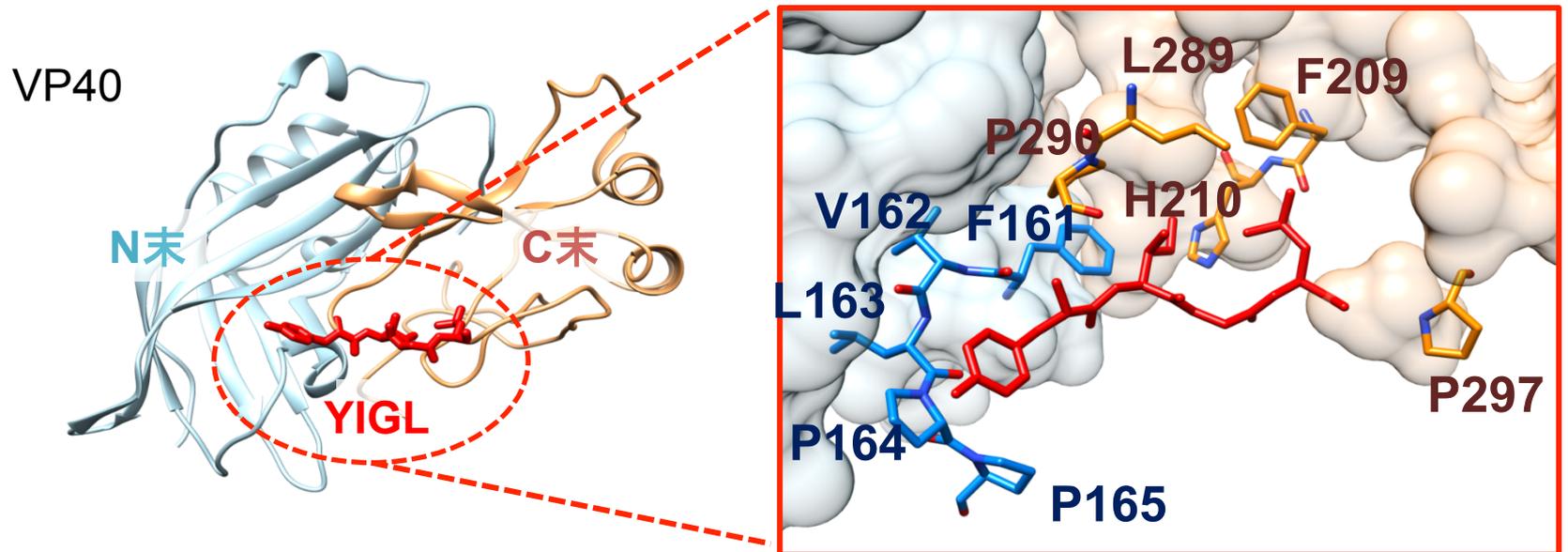
# VP40のI293-L295が粒子産生に重要である



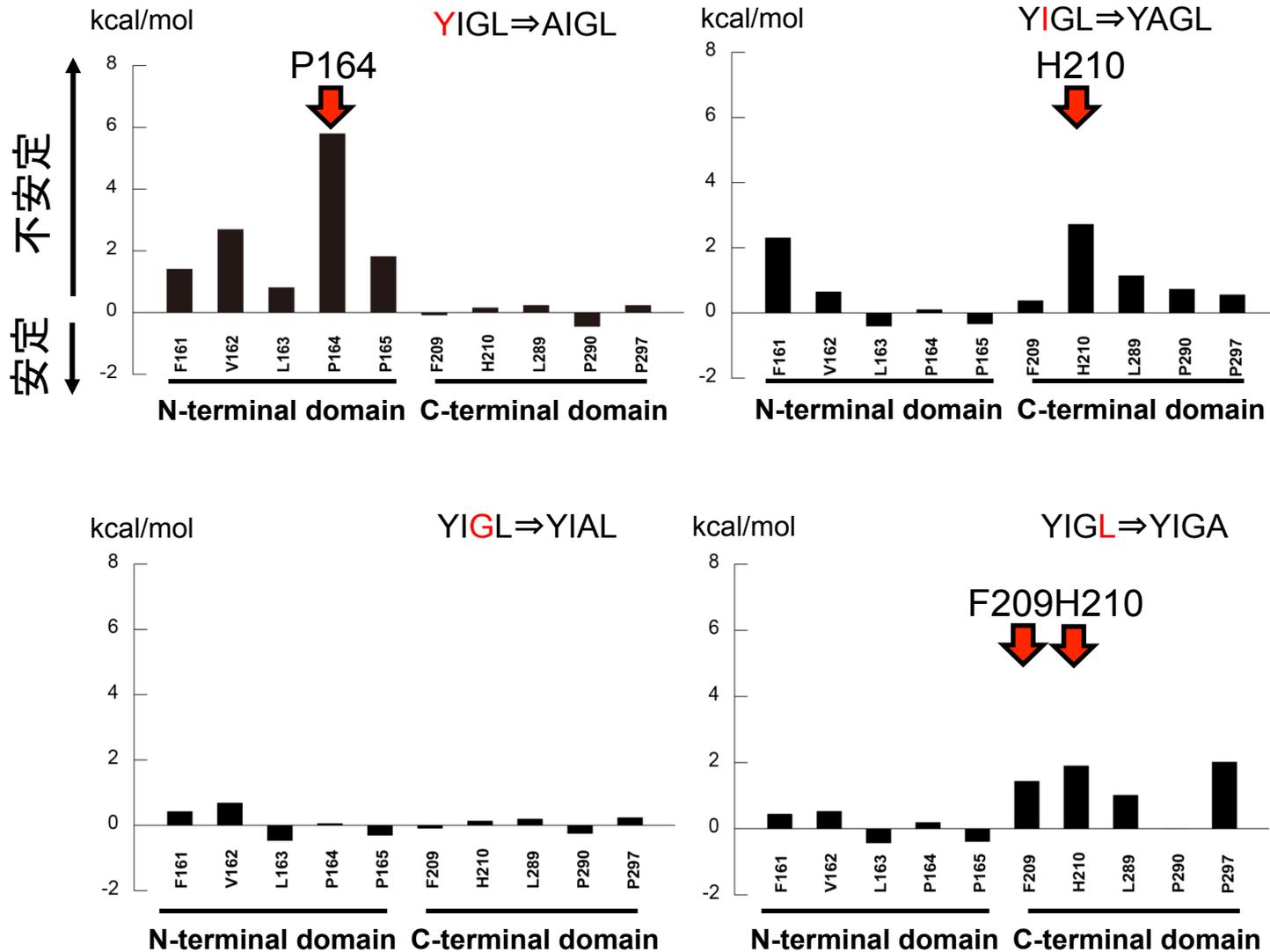
# VP40のG294がゲノム複製抑制の促進に重要である



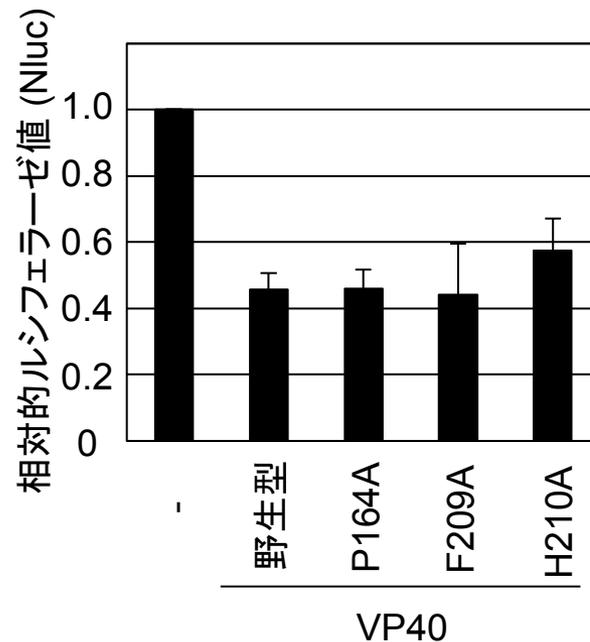
# VP40のYIGL配列と 分子内相互作用し得る周辺アミノ酸



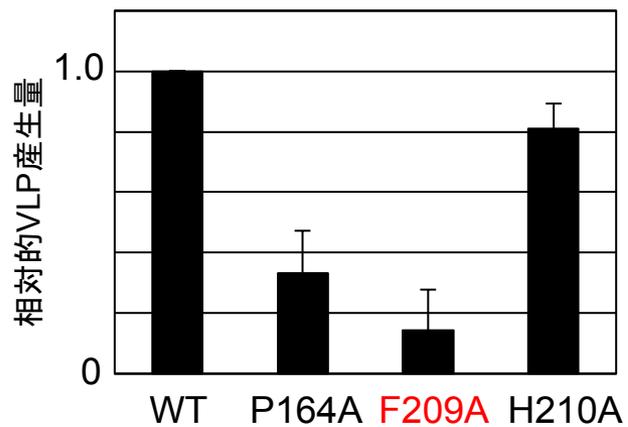
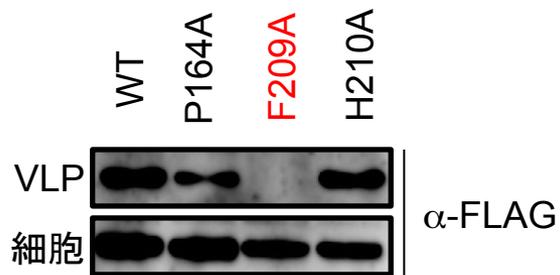
# VP40のYIGL配列変異導入による周辺アミノ酸との分子内相互作用安定性への影響 (FMO法)



# エボラウイルスVP40タンパク質 P164A, F209A, H210Aは エボラウイルスゲノム転写・複製には影響がない

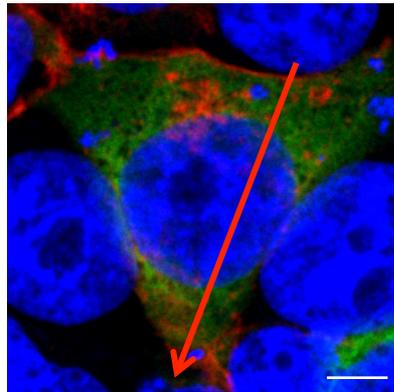


# VP40のF209はウイルス様粒子産生に重要

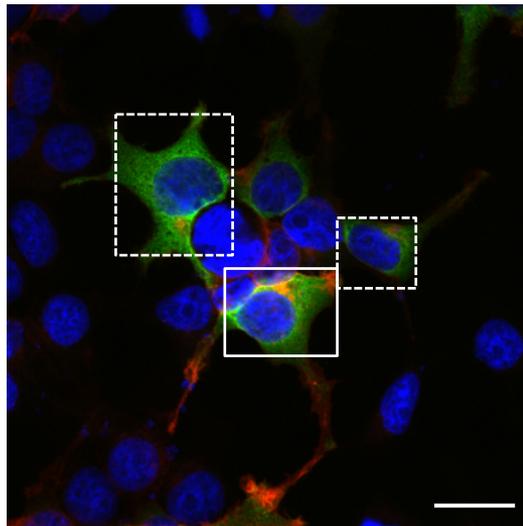
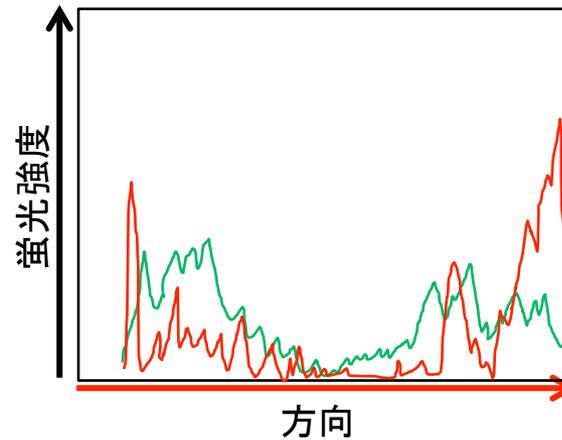


# VP40のF209は ホスファチジルセリンとの共局在に重要である

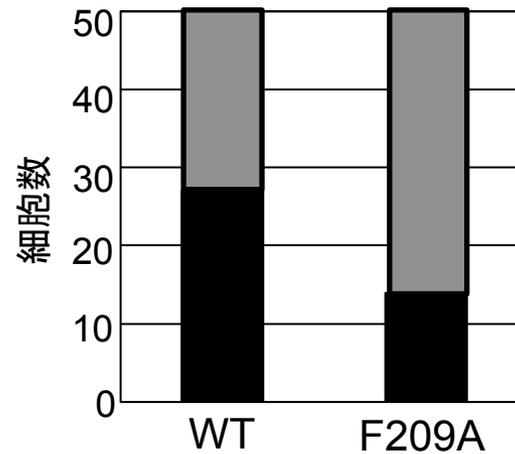
VP40-F209A  
ホスファチジルセリン



Bar: 5  $\mu$ m



Bar: 20  $\mu$ m



■ : 非共局在細胞数

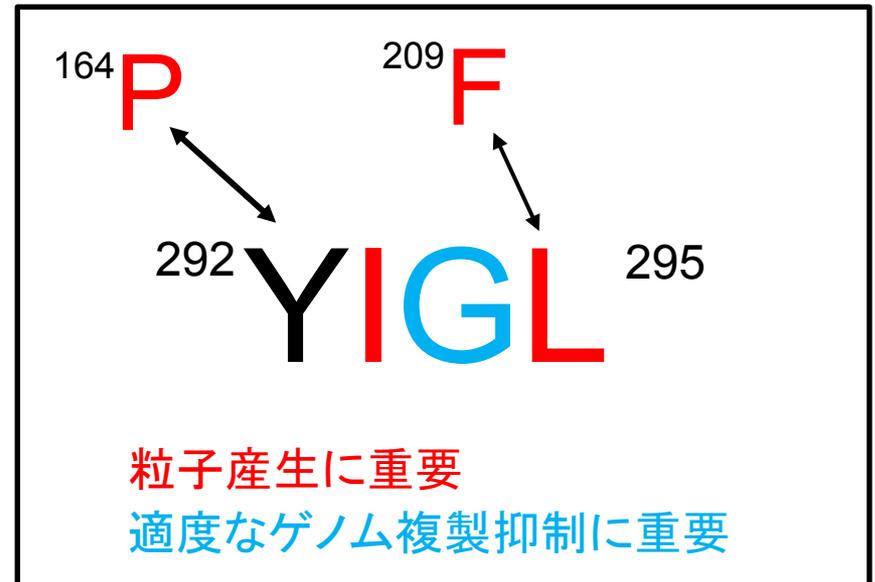
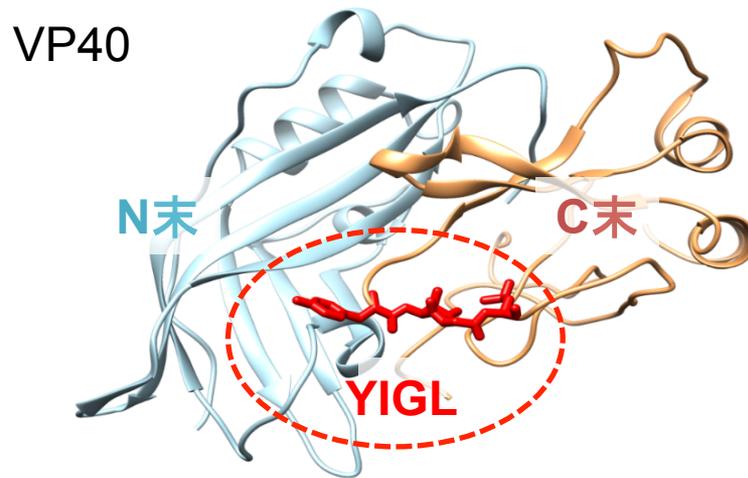
■ : 共局在細胞数

□ : 共局在細胞

□ : 非共局在細胞

# 結論1

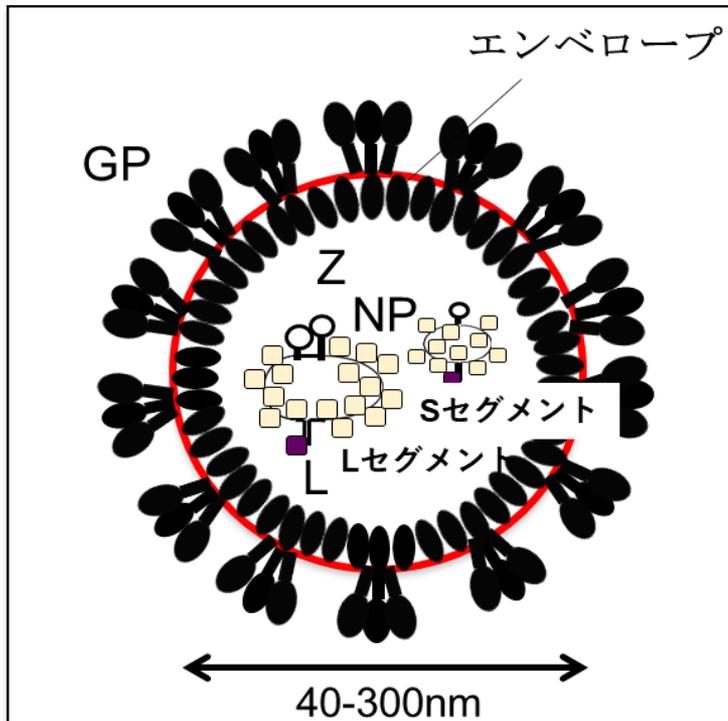
- ・ EBOV VP40は粒子形成において中心的な役割を果たす
- ・ VP40はゲノム複製を抑制する



# アレナウイルス

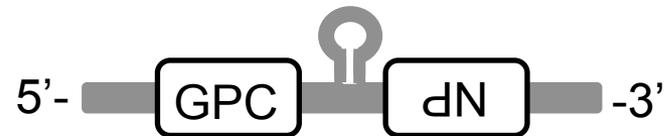
- LCMVとラッサウイルス

- ブニヤウイルス目アレナウイルス科に属する。
- ラッサウイルスは西アフリカ地域で蔓延しており、毎年30-50万人が感染、そのうち約5000人が亡くなるとされている。
- ラッサウイルス感染に対しての認可されたワクチンや抗ウイルス薬、確立された治療法はない。リバビリン投与が一部有効とされるが、副作用が高いこと等問題がある。
- ラッサウイルスはBSL-4病原体であるため、代替法として同アレナウイルス科に属するリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス (LCMV、BSL-2病原体)が一般的に用いられる。



## アレナウイルスのゲノム構造

### Sセグメント



### Lセグメント



# 目的

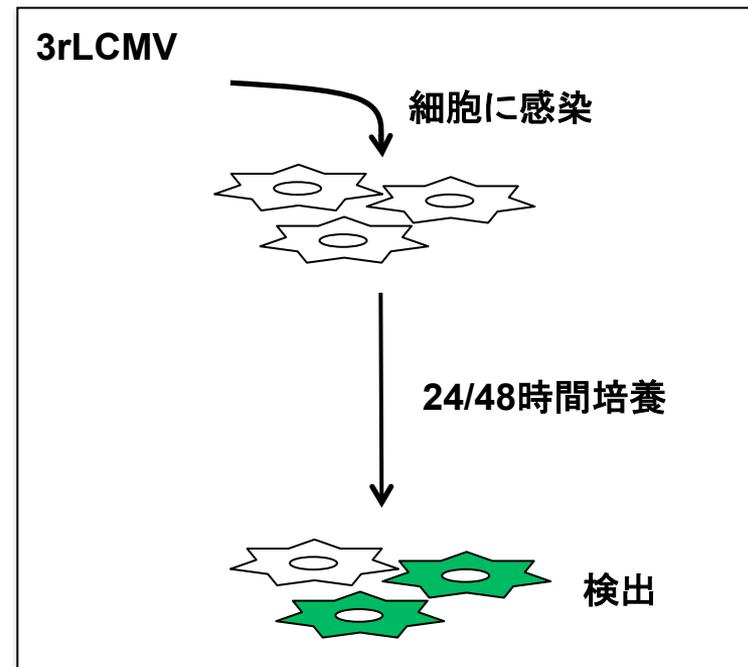
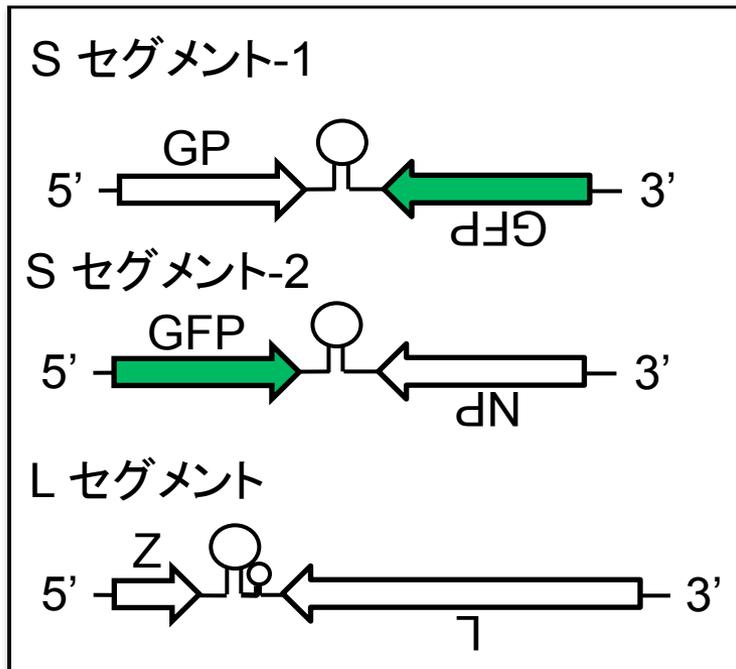
新規抗ラッサウイルス化合物に繋がる抗LCMV化合物の同定

# 3rLCMV (GFP発現)の作製

・ マイナス鎖RNAをウイルスゲノムとして保有するウイルスの人工ウイルスの作製には細胞内での

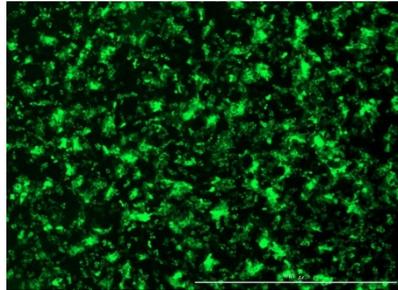
1. ウイルスゲノムの発現
2. ウイルスゲノムの複製をサポートするウイルス因子の発現

が必要である。

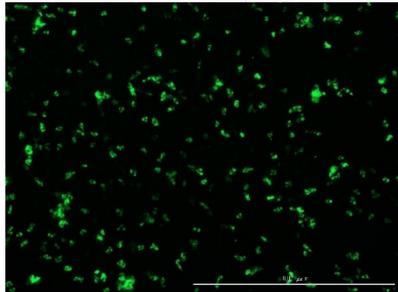


# 3rLCMVのスクリーニング応用への評価検討-1-

DMSO



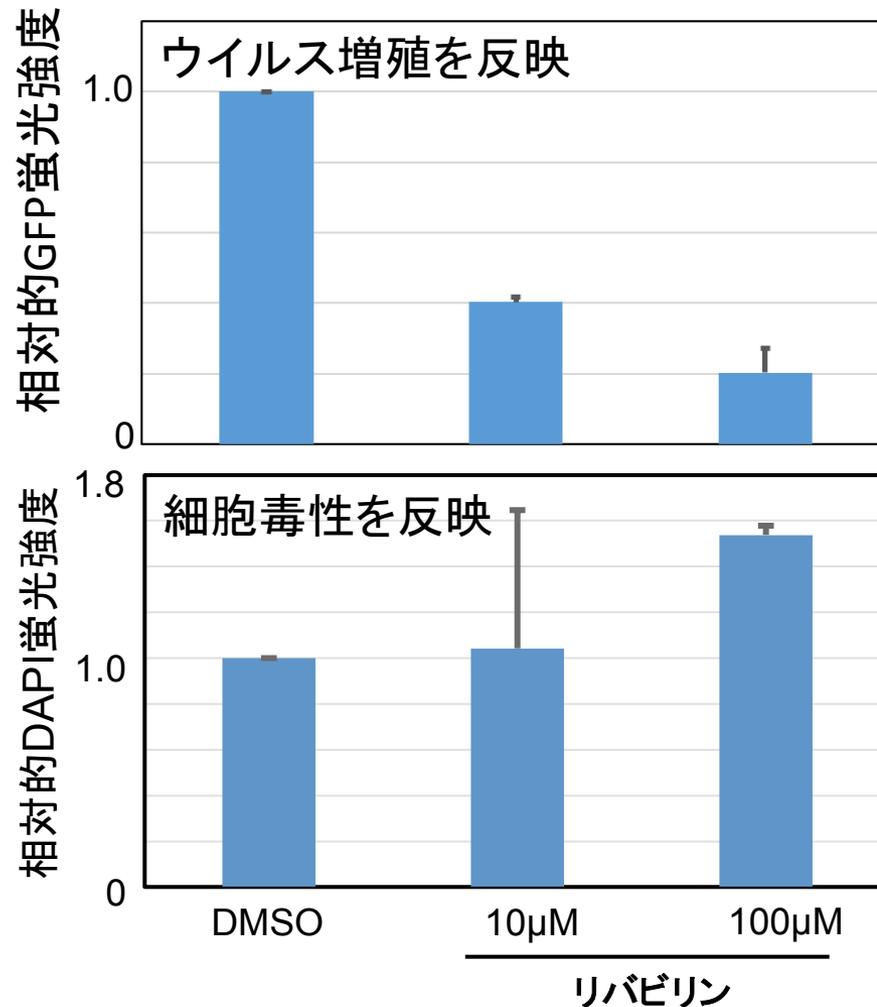
リバビリン (10  $\mu$ M)



リバビリン (100  $\mu$ M)

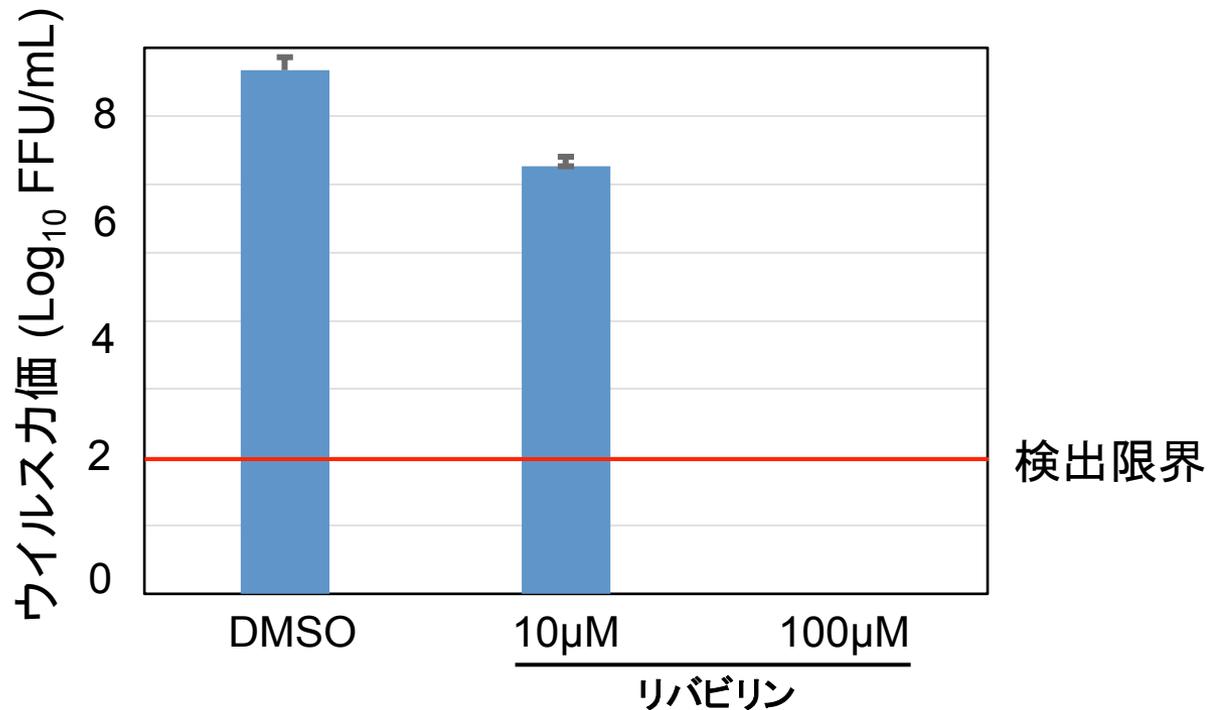


LCMV NP



# 3rLCMVのスクリーニング応用への評価検討-2-

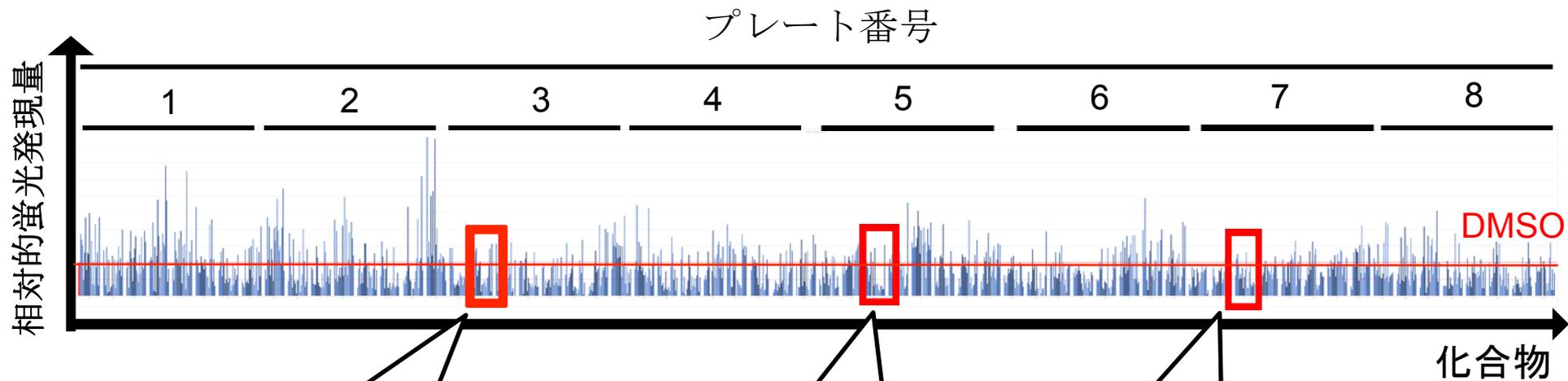
上清のウイルスカ価は...



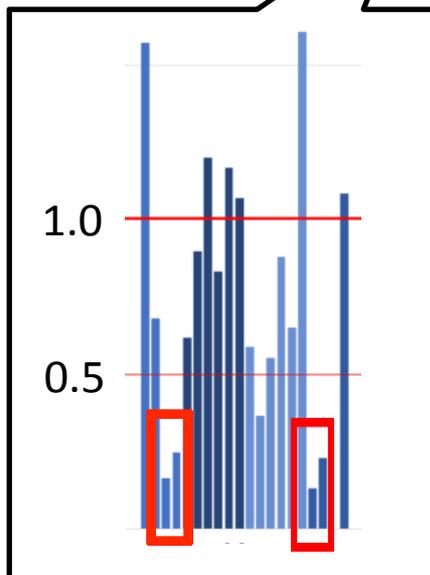
カットオフ値:  
相対的GFP蛍光強度 < 0.4  
相対的DAPI蛍光強度 > 0.7

# 3rLCMVを用いた化合物スクリーニングの結果

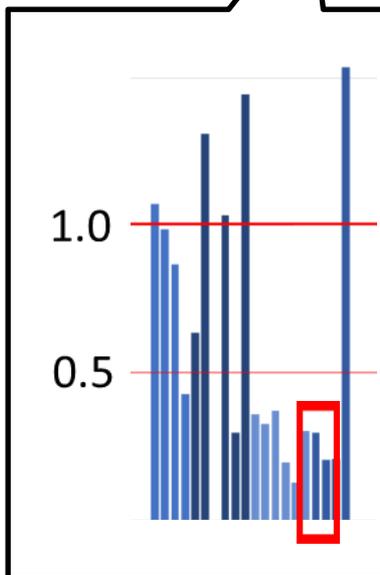
対象: FDA認可化合物ライブラリー (635化合物)



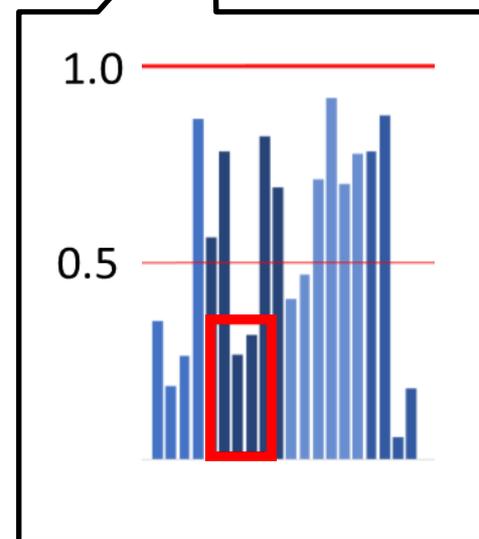
例1



例2



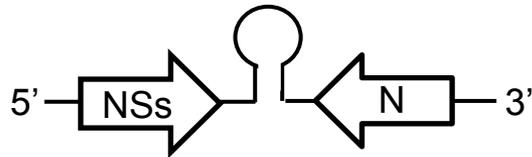
例3



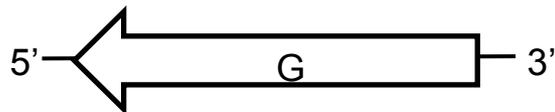
# 重症熱性血小板減少症候群ウイルス (SFTSV)

- ・ ブニヤウイルス目フェニキュウイルス科に属する。
- ・ 2011年に中国で同定され、日本では2013年に患者からのウイルス分離が報告された。
- ・ 日本においてはこれまでに404の感染例が報告され、65名が亡くなっている (感染研HPより、2019年4月24日現在)。
- ・ 確立された予防法・治療法はない。

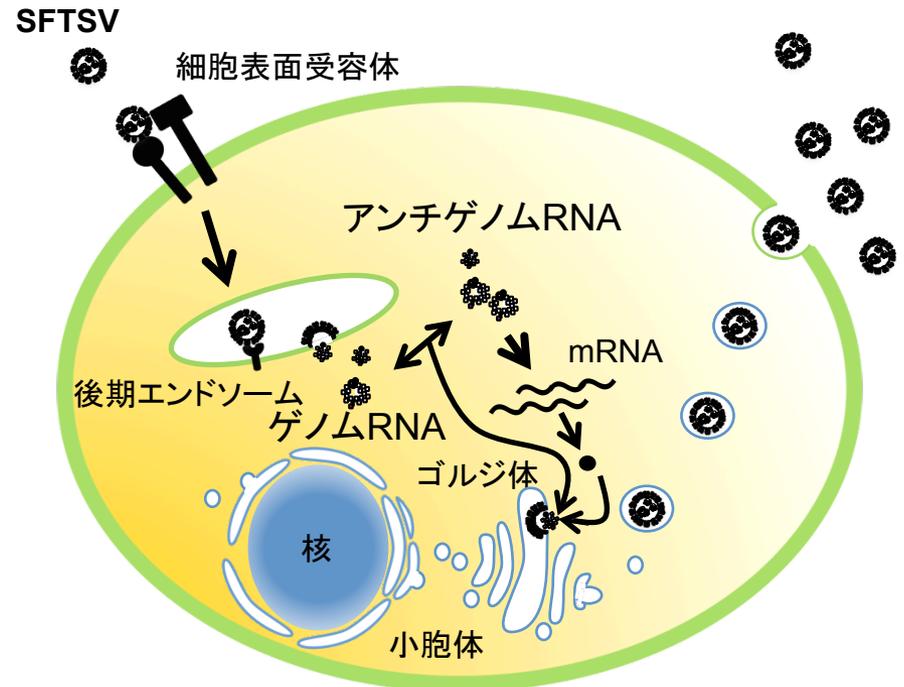
Sセグメント



Mセグメント



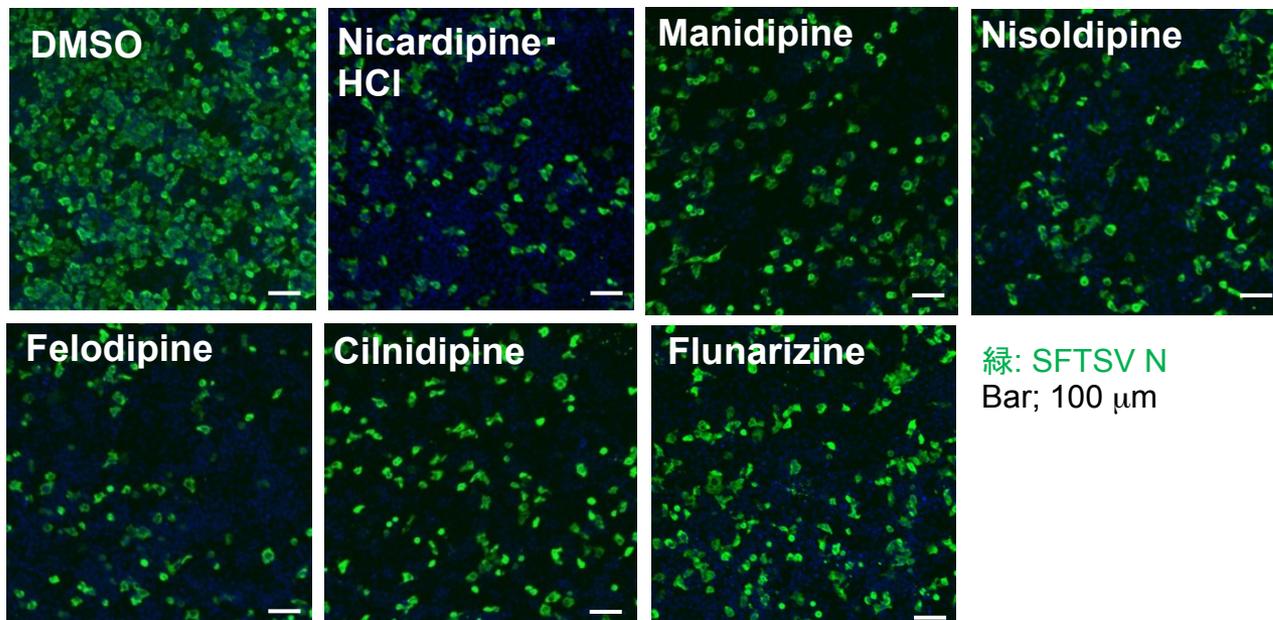
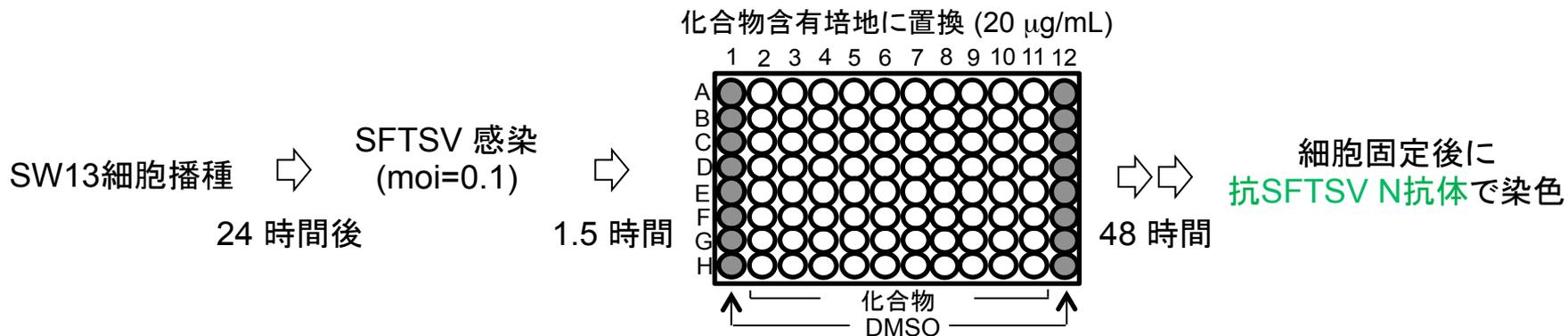
Lセグメント



# 目的

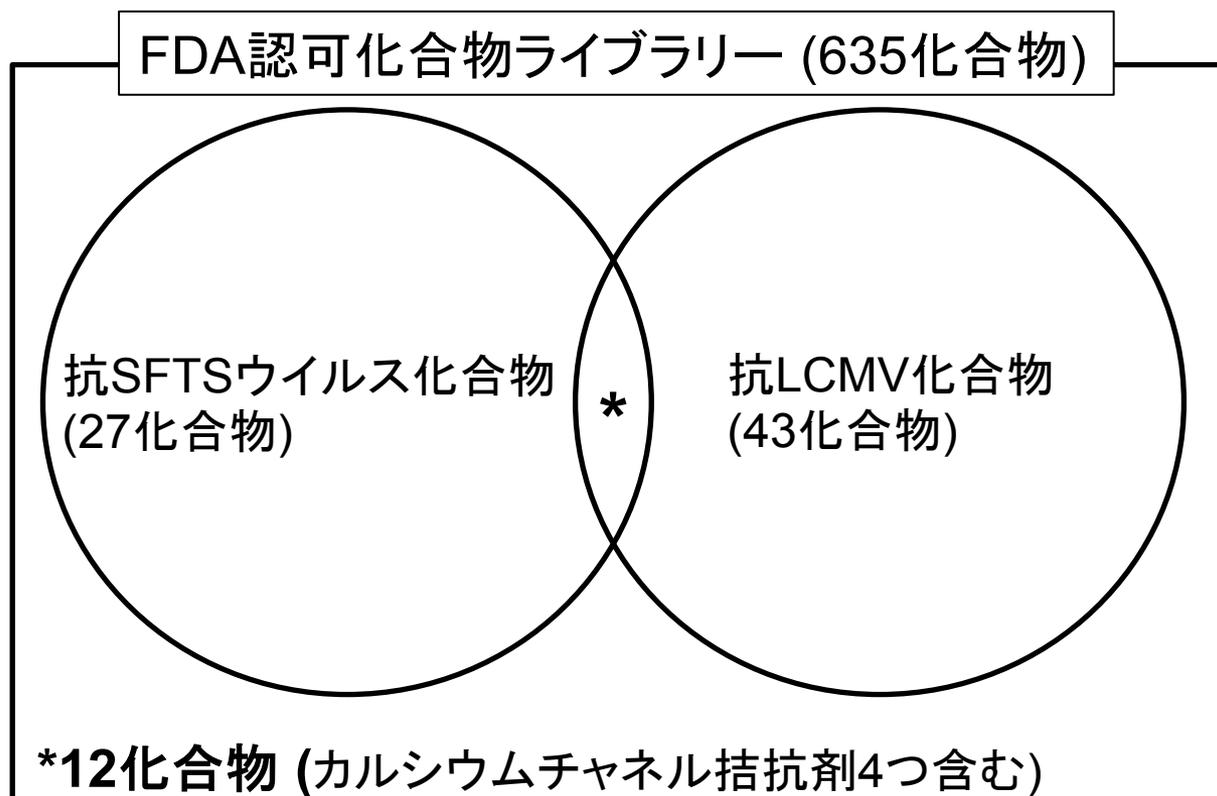
新規抗SFTSV化合物の同定

# 感染性SFTSVを用いた化合物スクリーニング

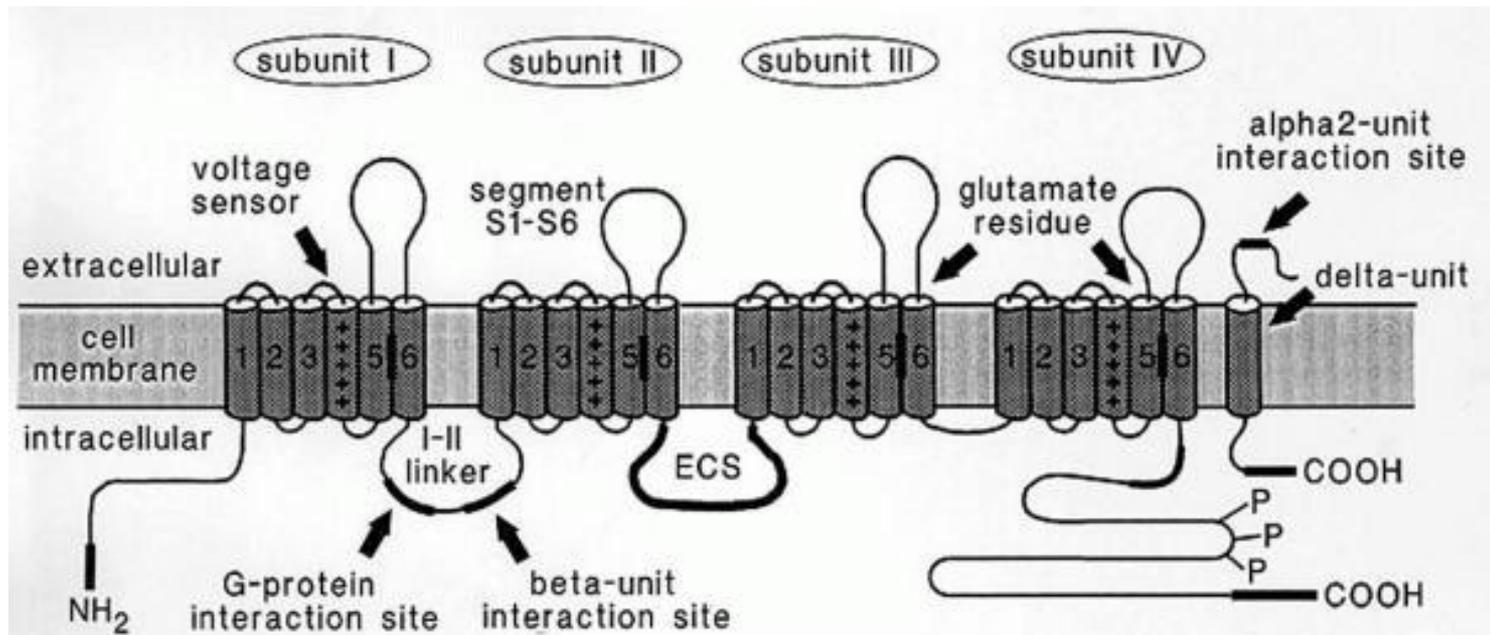


カットオフ値:  
N 陽性細胞数 < 30 %  
細胞毒性 > 70 %

# LCMV及びSFTSVに対する抗ウイルス化合物スクリーニングの結果



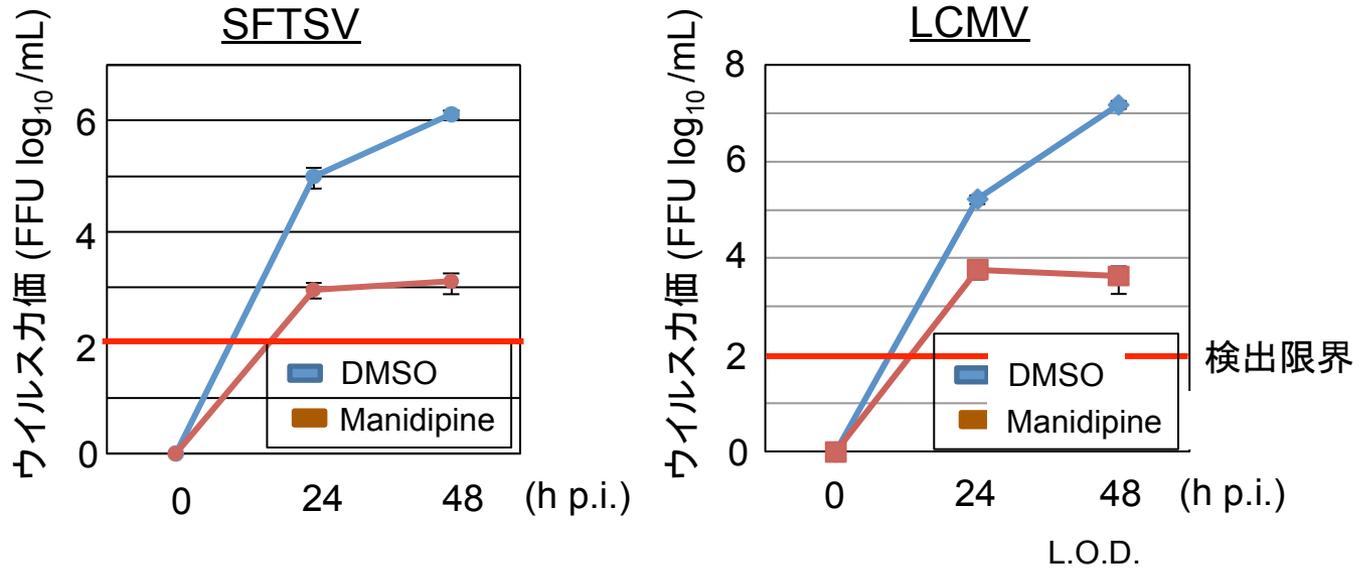
# L型カルシウムチャネルとその阻害剤



Sandmann S, Unger T Journal of Clinical and Basic Cardiology 1999; 2 (Issue 2): 187-201 ©

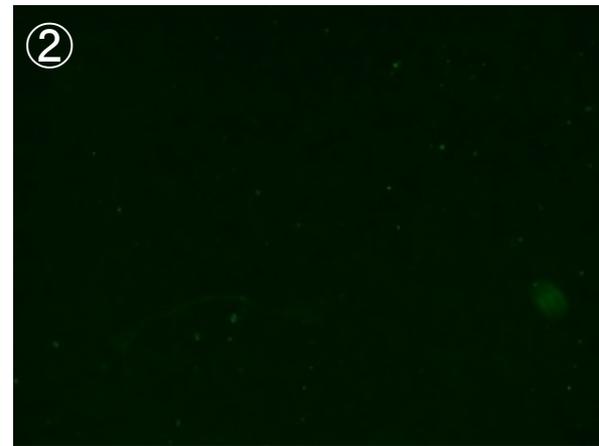
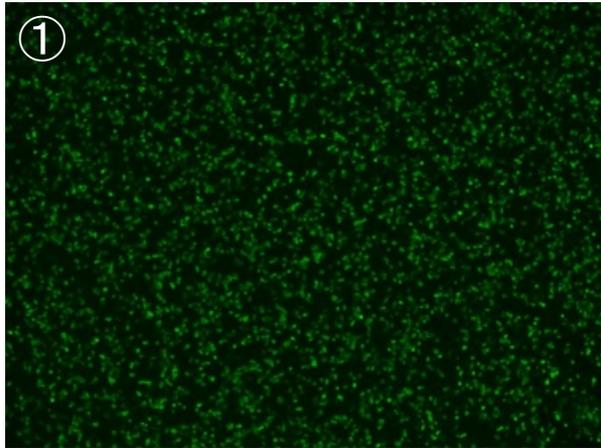
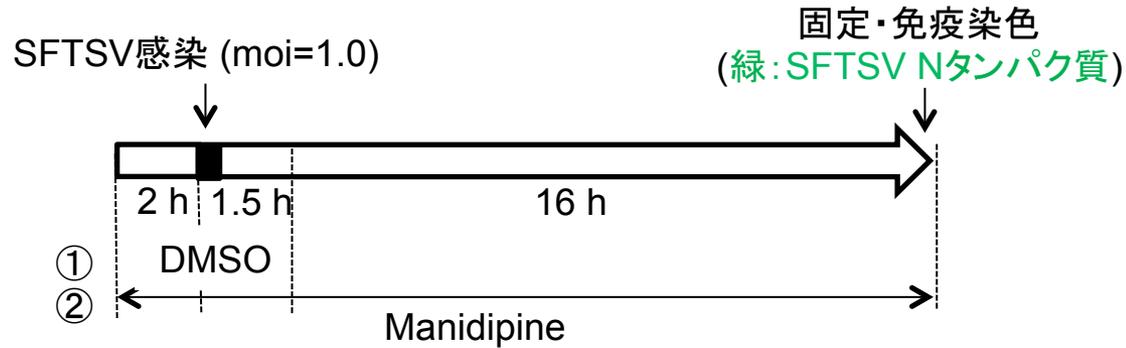
- ・ 電位依存性カルシウムチャネル (VDCC)
- ・ 高血圧薬として既に臨床使用されている
- ・ 代表例: Manidipine

# ManidipineによるSFTSV及びLCMV増殖阻害効果



SW13 cell, Manidipine: 20  $\mu$ g/mL

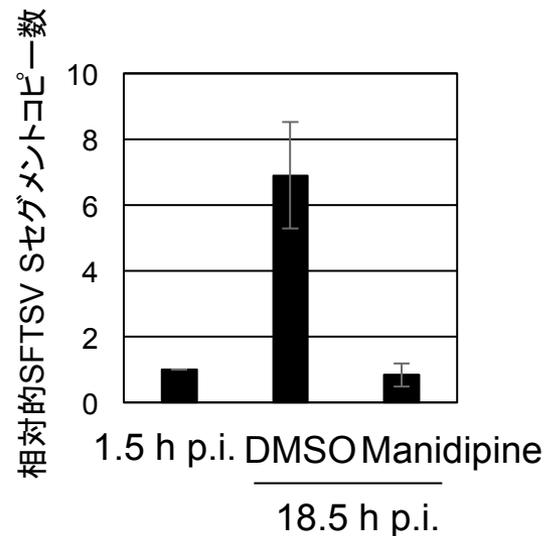
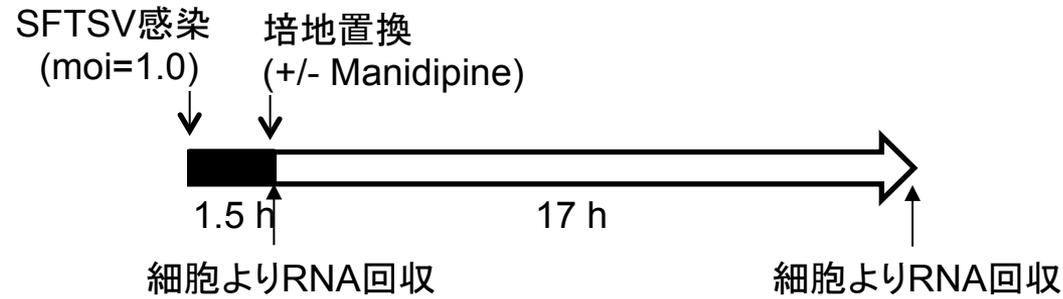
# SFTSVの生活環におけるManidipineの標的検証



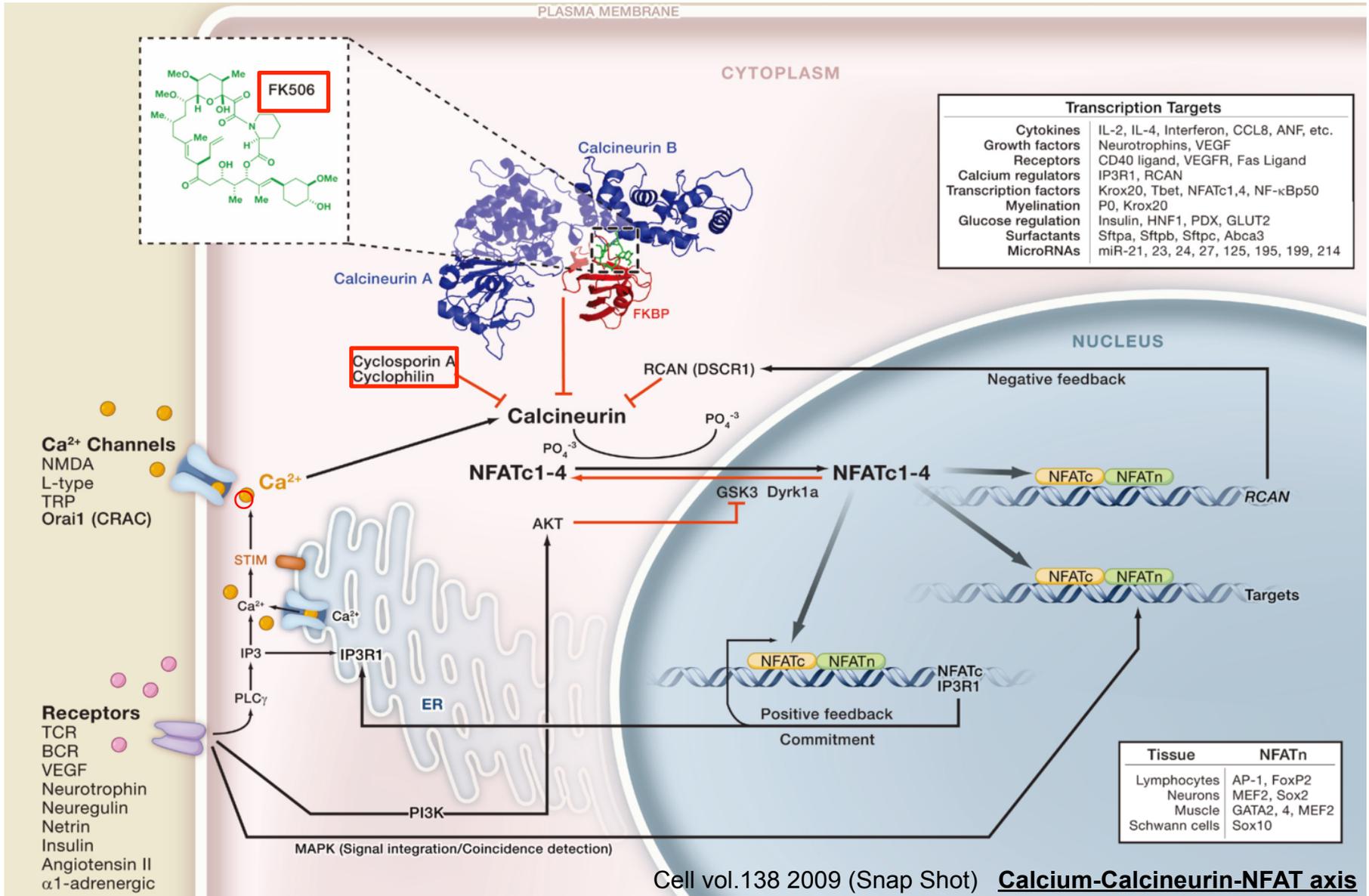
SFTSV Nタンパク質  
SW13細胞



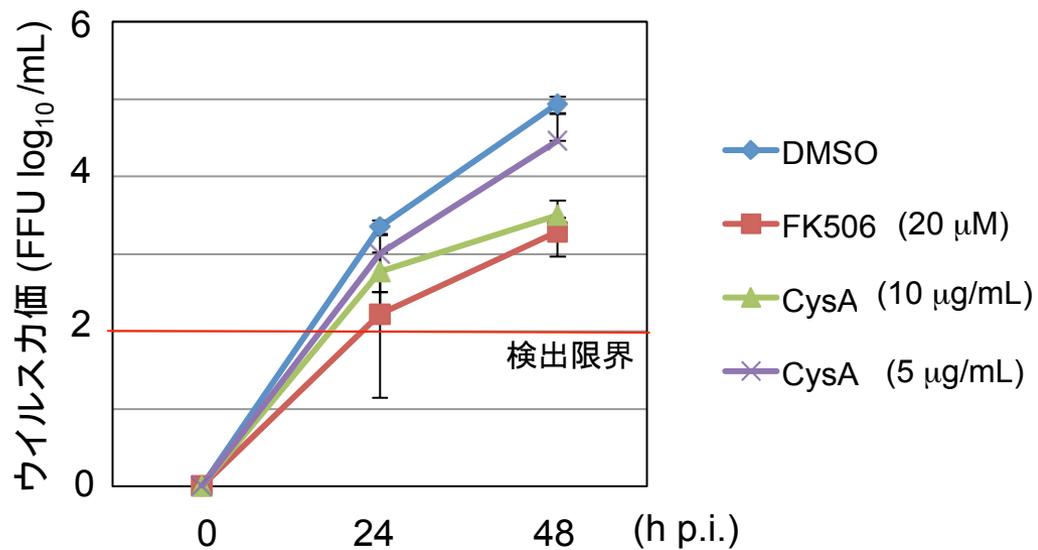
# ManidipineはSFTSVのゲノム複製を標的とする



# 細胞内カルシウム流入はカルシニューリンを活性化する

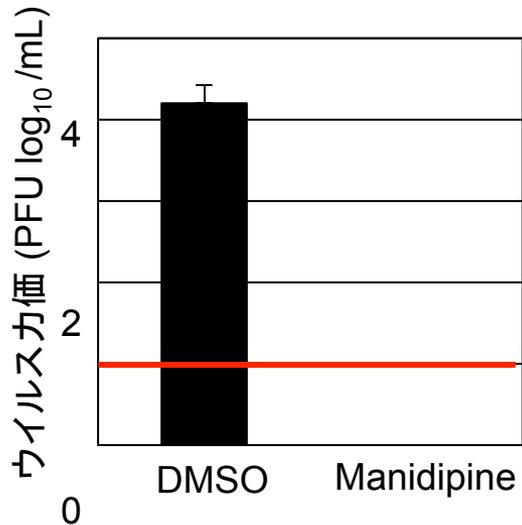


# FK506とCyclosporin A (CysA) は SFTSV増殖を阻害する

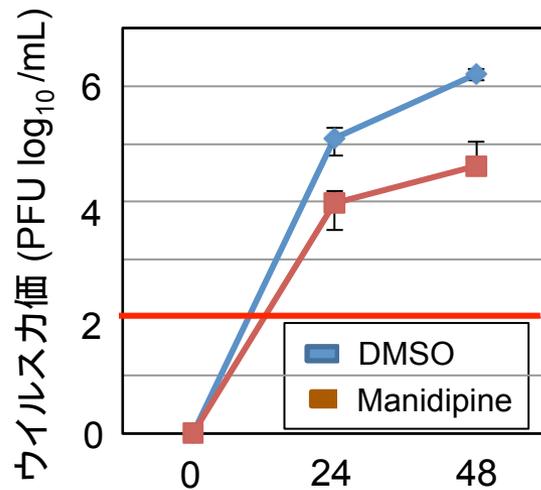


# Manidipineは他のマイナス鎖RNAウイルスの増殖も阻害する

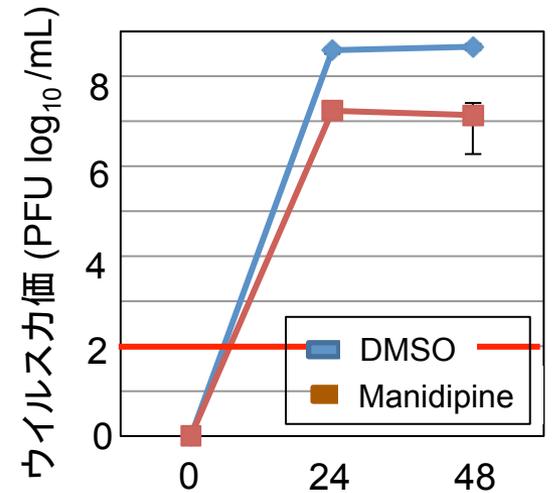
フニンウイルス  
(Candid#1, アレナウイルス科)



Hazara virus (ナイロウイルス科)



VSV (ラブドウイルス科)



## 結論2 (LCMVとSFTSV)

- ・ FDA認可化合物ライブラリーを用いて抗LCMV候補化合物を43同定した。
- ・ 同ライブラリーを用いて抗SFTSV候補化合物を27同定した。
- ・ 候補化合物の内、カルシウムチャンネルを標的とした4化合物がLCMV及びSFTSV増殖を抑制した。
- ・ ManidipineはSFTSVのゲノム複製を抑制した。
- ・ SFTSVについて、カルシウムチャンネル阻害に加え、カルシウムシグナル経路の下流にあるカルシニューリンの活性化阻害もウイルス増殖を阻害した。
- ・ カルシウムチャンネル阻害はLCMV・SFTSV以外のマイナス鎖RNAウイルスの増殖も抑制した。

# 日本とBSL-4研究施設

- ・ 先進7か国で稼働しているBSL-4施設がないのは日本だけ。
- ・ 1981年に設置された国立感染症研究所のBSL-4施設は 緊急時の一時的な稼働のみ認められている。そのうえ、グローブボックスタイプのBSL-4施設であり実験に制約がある。
- ・ 富山化学 (富士フィルム)が開発したファビピラビル (アビガン錠、T-705)のエボラウイルスに対する試験は国内で行えず、フランスに委託している現状。

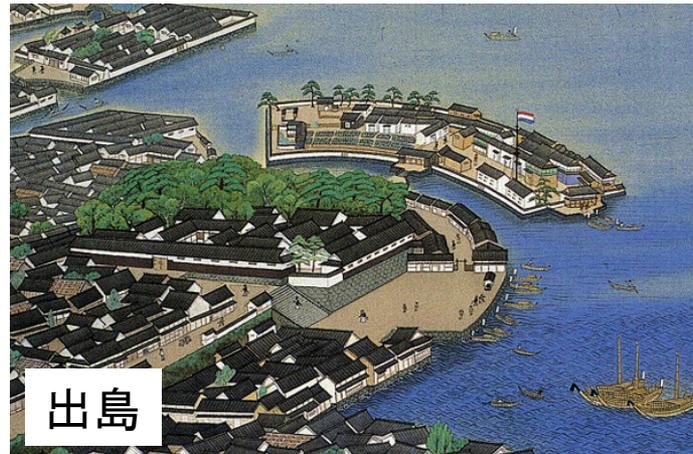
# 長崎大学によるBSL-4研究施設設置検討の経緯

- ・ 2010年に片峰茂前長崎大学学長自らが率先して長崎大学にBSL-4を設置する計画を発表
- ・ 2011年に学内ワーキンググループ発足 (大型研究費、マスタープラン申請)
- ・ 2016年 長崎県・長崎市とBSL-4設置について合意、文部科学省より感染症研究拠点に係る予算の計上
- ・ 2019年 実験研究棟工事開始
- ・ 2021年 工事完了予定
- ・ 2022年 運用開始予定

# 長崎大学感染症共同研究拠点

なぜ長崎？

- ・長崎には感染症研究における長い歴史がある (鎖国時代の出島など)。
- ・大学がコンパクトな分、機動力がある、学長先導で組織が動く。
- ・隣接する大学病院には第1種感染症病床があり、毎月患者搬送訓練も行っている。
- ・熱帯医学研究所をはじめ、感染症専門家が150名在籍している。



# 長崎大学感染症共同研究拠点



# 本講演のまとめ

## 1分節: エボラウイルス

VP40の機能解析

## 2分節: ラッサウイルス・LCMV (リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス)

化合物スクリーニング

## 3分節: SFTSウイルス

化合物スクリーニング

- ・ 長崎大学が建設を計画しているBSL-4施設について

CNN Student News - March 14, 2016

Updated 2240 GMT (0640 HKT) March 13, 2016

Top stories

- North Korea launches missile from submarine
- 28 dead following Mexican chemical plant blast

Source: CNN

# 謝辞



長崎大学熱帯医学研究所 新興感染症学分野 (2019年5月)