

## Abstract of Doctoral Thesis

Name SHELLY WULANDARI

Title: Establishment of a reverse genetic system and determination of the responsible gene for the enhanced virulence of trisegmented bunyaviruses.

(3分節ゲノムを有するブニヤウイルスを対象としたリバースジェネティクス系の確立および病原性に関与するウイルス遺伝子の特定)

---

### Abstract of thesis:

Trisegmented bunyaviruses constitute a category of viruses within the *Bunyvirales* order, distinguished by their segmented, negative-sense RNA genomes that are encoded in an orientation opposite to that of messenger RNA. Their members infect broad ranges of hosts, including several significant human pathogens. Reverse genetic systems have been essential in the investigation of trisegmented bunyaviruses. The process of introducing a precise genetic change into a viral genome, known as viral reverse genetics, has revolutionized our understanding of negative-sense, segmented RNA viruses. While the specific characteristics of reverse genetic systems vary among different viruses, the fundamental principles of biology remain the same. Here, we examine the development of reverse genetic systems as applied to these virus members, emphasizing conserved approaches illustrated by some of the prominent members that cause significant human disease. We also describe the utility of their genetic systems in the determination of the responsible gene for the enhanced virulence of trisegmented bunyaviruses.

The genus *Orthonairovirus* includes highly pathogenic tick-borne viruses, such as the Crimean-Congo hemorrhagic fever orthonairovirus (CCHFV). A reverse genetics system is an indispensable tool for determining the viral factors related to pathogenicity. Tofla orthonairovirus (TFLV) is a recently identified virus isolated from ticks in Japan, and our research has suggested that TFLV is a useful model for studying pathogenic orthonairoviruses. In this study, we successfully established a reverse genetics system for TFLV using T7 RNA polymerase. Recombinant TFLV was generated by transfecting cloned complementary DNAs encoding the TFLV genome into BSR T7/5 cells expressing T7 RNA polymerase. We were able to rescue infectious recombinant TFLV mutant (rTFLVmt) and wild-type TFLV (rTFLVpt) viruses, which exhibited indistinguishable growth kinetics in mammalian cells and pathogenicity in A129 mice compared with the authentic virus. Our approach provides a valuable method for establishing a reverse genetic system for orthonairoviruses.

Severe fever with thrombocytopenia syndrome (SFTS) is a significant public health concern, with a high fatality rate in humans and cats. In this study, we explored the genetic determinants that contribute to the different virulence of SFTS virus (SFTSV) based on Tk-F123 and Ng-F264 strains isolated from cats. Tk-F123 was 100% lethal in type I interferon receptor-knockout mice, whereas Ng-F264 exhibited no fatality. We identified a pair of amino acid residues in the Gc protein, glycine and serine, at residues 581

(Appended form No. 3)

and 934, respectively, derived from Tk-F123, leading to a fatal infection. Those in Ng-F264 were arginine and asparagine. These results suggest that this pair of residues affects the Gc protein function and regulates SFTSV virulence. Our findings provide useful clues for the elucidation of viral pathogenicity and the development of effective live-attenuated vaccines and antiviral strategies.

In conclusion, we were able to rescue recombinant TFLV and SFTSV from cDNA clones, allowing detailed studies on viral genetics and pathogenesis. We also describe the molecular determinants of virulence in SFTSV, which is crucial for developing effective vaccines and therapeutics. Finally, we highlight that reverse genetics continues to be a powerful tool in elucidating the molecular mechanisms of virulence in trisegmented bunyaviruses, which will contribute to our understanding of viral biology, pathogenesis, and intervention strategies.

(About 800 words in English)

## 学位論文審査の結果の要旨

氏 名	Shelly Wulandari
審 査 委 員	主 査：山口大学 教授 早坂 大輔
	副 査：山口大学 教授 水野 拓也
	副 査：山口大学 教授 高野 愛
	副 査：鹿児島大学 准教授 松本 祐介
	副 査：山口大学 准教授 下田 宙
題 目	Establishment of a reverse genetic system and determination of the responsible gene for the enhanced virulence of trisegmented bunyaviruses (3 分節ゲノムを有するブニヤウイルスを対象としたリバースジェネティクス系の確立および病原性に関するウイルス遺伝子の特定)
<p>審査結果の要旨：</p> <p>ブニヤウイルス綱のウイルスには、ナイロウイルス科オルソナイロウイルス属に分類されるクリミア・コンゴ出血熱ウイルス (Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, CCHFV)、フェニユイウイルス科バンダウイルス属に分類される重症熱性血小板減少症候群ウイルス (Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus, SFTSV)、フェニユイウイルス科フレボウイルス属に分類されるリフトバレー熱ウイルス (Rift Valley fever virus, RVFV)、ハンタウイルス科オルソハンタウイルス属に分類されるハンターウイルスなど、人獣共通感染症の原因となる高い病原性を持つウイルスが多く知られている。これらのブニヤウイルスは、S セグメント、M セグメント、L セグメントの 3 分節で構成されるマイナス鎖もしくはアンビセンス鎖の RNA をゲノムとして持つ。</p> <p>これらのブニヤウイルスの高病原性に関するウイルス遺伝子の特定には、リバースジェネティクス系の確立が必要となる。本研究では、オルソナイロウイルス属に分類され、遺伝子系統および血清学的に CCHFV に近縁なトフラウイルス (Tofla virus, TFLV) のリバースジェネティクス系を初めて確立するとともに、SFTSV のリバースジェネティクスを用いて、SFTSV の病原性に関わるウイルス遺伝子の特定を試みた。</p> <p>第 1 章 オルソナイロウイルス属トフラウイルスのリバースジェネティクス系の確立</p> <p>本章では、オルソナイロウイルス属に分類され、CCHFV に近縁な TFLV のリバースジェネティクス系の確立について報告した。</p> <p>TFLV は日本のマダニから分離されたウイルスで、感染実験により I 型インターフェロンレ</p>	

セプター-KO (A129) マウスに高い致死性を示し、ヒトを含む哺乳動物細胞に感染性を示す。また、国内のイノシシで抗 TFLV 抗体陽性例が見つかっており、さらに、TFLV は 2024 年に中国で報告された、熱性疾患患者由来のウェットランドウイルスに非常に近縁であったことから、ヒトや動物における TFLV の感染性、病原性が示唆されている。また、CCHFV は特定一種病原体に指定されており、国内での取扱いが国が指定する BSL-4 施設でのみ可能であるため、BSL-2 もしくは BSL-3 で扱える TFLV は CCHFV のモデルウイルスとしての有用性がある。

TFLV の S、M、L セグメントの各全長遺伝子配列を pT7 プラスミド (T7 プロモーター、ターミネーター、D 型肝炎ウイルスリボザイム配列を含む) に挿入し、ウイルス RNA 転写用プラスミドを作製した。また、ヘルパープラスミドとして、TFLV のヌクレオカプシド (NC)、RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ (RdRp) 遺伝子配列を pTM プラスミド (T7 プロモーター、ターミネーター、IRES 配列を含む) に挿入し、NC および RdRp 発現用プラスミドを作製した。これらの 5 つのプラスミドを BSR-T7/5 細胞に同時にトランスフェクションし、培養上清をさらに Vero E6 で継代し、上清中の感染性 TFLV を確認した。また、初めに回収した組換え TFLV (rTFLV-mut) には親株と比べ 8 か所の塩基配列置換がみられたため、それらの塩基を親株に戻した組換え TFLV (rTFLV-wt) を作製した。

作製した組換え TFLV の性状を解析したところ、rTFLV-wt、rTFLV-mut とともに、親株の TFLV と同様の形態のフォーカスを形成した。また、Vero E6 細胞、A549 細胞、Fcwf-4 細胞、DM-WFLT 細胞における感染性、増殖性を比較したところ、rTFLV-wt、rTFLV-mut とともに親株と同様の増殖性、細胞変性 (CPE) を示した。さらに、A129 マウスにおける病原性を比較したところ、rTFLV-wt、rTFLV-mut とともに親株と同様の体重減少、致死性を示した。以上の結果から、親株と同様の性状を示す組換え TFLV の作製に成功した。

## 第 2 章 SFTSV の病原性に関与する Gc タンパク質の 2 か所のアミノ酸の特定

本章では、国内のネコから分離された SFTSV の 2 株、Tk-F123 株および Ng-F264 株を対象として、マウスモデルにおける病原性の違いに関与する遺伝子配列を特定した。

A129 マウスを用いた病原性の比較 (1 匹あたり  $10^4$  ffu を皮下接種) により、Tk-F123 株は体重減少後すべて死に至り、Ng-F264 株では体重変化はみられずにすべて生存した。そこで、2 つの遺伝子配列を決定し比較したところ、S セグメントに 4 か所、M セグメントに 10 か所、L セグメントに 19 か所の塩基配列の違いがみられた。

次いで、2 つの株の病原性の違いがどの塩基配列の違いによるものかを特定するために、はじめに Tk-F123 株、Ng-F264 株の各分節を入れ替えた組換え SFTSV を作製した。組換えウイルスの作製は第 1 章のリバースジェネティクス系と同様の方法を用いた。その結果、Tk-F123 株の M セグメントが A129 マウスにおける致死性に関与することを明らかにした。

次に、Tk-F123 株と Ng-F264 株の M セグメントにみられる 10 か所の塩基配列の違いのうち、3 か所でアミノ酸の置換がみられたことから、それぞれのアミノ酸をひとつずつ置換した組換え Tk-F123 株および Ng-F264 株を作製して A129 マウスにおける病原性を比較した。その結果、Gc タンパク質の 2 か所のアミノ酸 ( $G_{581}$ 、 $S_{934}$ ) が高い病原性に関与することを示唆した。そこで、Ng-F264 株を基に Gc タンパク質の 2 か所だけを Tk-F123 株のアミノ酸 ( $G_{581}$ 、 $S_{934}$ ) に置換した組換え SFTSV の病原性を確認したところ、Tk-F123 株と同様に 100% の致死率を示したことから、この 2 つのアミノ酸が病原性に関与することを示した。

以上の研究により、TFLV のリバーシジェネティクス系を初めて確立したことにより、CCHFV を含むオルソナイロウイルスの病原性や感染性の解析に有用な基礎ツールとして期待される成果が得られた。また、SFTSV のリバーシジェネティクス系を用いた解析により、SFTSV の病原性に関与するアミノ酸を特定した。この成果は、自然界において分布する病原性の高い SFTSV の特定や、SFTSV が高い病原性を発揮する機序の解明、ワクチンや治療法の開発に資する基礎データとして重要であると考えられた。

以上により、本論文は博士（獣医学）の論文として、妥当なものであると判断された。