

平成30年6月26日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19144

研究課題名(和文) E型肝炎ウイルスのゲノムRNAの複製機構に関する宿主因子の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of host factor participating in replication mechanism of the hepatitis E virus genome RNA

研究代表者

小林 富成 (Kobayashi, Tominari)

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：00634164

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内におけるHEVゲノムRNAの複製機構を明らかにするために、細胞内でゲノムRNAのみが複製するHEVレプリコンを構築した。試験管内で合成したレプリコンRNAを細胞に導入すると、細胞内でレプリコンRNAの複製と、複製産物であるsubgenomic RNAから翻訳されるORF3蛋白質を確認することができた。この結果、レプリコンRNAを用いることで、ゲノムRNAの複製機構の解析が可能であることが示唆された。また、ラットHEVのORF3蛋白質はウイルス粒子の放出に必須のアミノ酸配列(PSAP)を欠いている。そこで、各種変異体を構築し、PxYP配列の2つのプロリンが重要であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this study, in order to elucidate the replication mechanism of hepatitis E virus (HEV), we constructed an HEV replicon that can multiply full-length genomic RNA but cannot produce virions in transfected cells. We could obtain evidence that a 2.2-kb subgenomic RNA was transcribed, from which ORF3 proteins were translated. Obtained results suggested that we could establish a replicon-based method to analyze the replication mechanism of the HEV genomic RNA in cultured cells. In addition, since rat HEV ORF3 protein lacks an amino acid sequence motif of proline, serine, alanine and proline (PSAP) that has been demonstrated to be essential for release of human HEV particles from infected cells, various infectious rat HEV cDNA clones with mutations in proline residues were constructed. Obtained results indicated that two proline residues of the PxYP sequence play a pivotal role for egress of rat HEV particles.

研究分野：ウイルス学

キーワード：E型肝炎ウイルス レプリコン リバースジェネティクス法 細胞培養 ウイルス複製 PSAPモチーフ

### 1. 研究開始当初の背景

E型肝炎は、E型肝炎ウイルス(HEV)の感染によって引き起こされる急性ウイルス性肝炎である。このE型肝炎は発展途上国において流行性肝炎として、これまでに繰り返し発生してきたが、日本を含む先進各国では稀な輸入感染症として殆ど注目されていなかった。しかし、10年余り前から日欧米で、輸入感染によらないE型肝炎症例が報告されるようになった。また、ヒト以外でもブタやシカなどの動物でのHEV感染が明らかとなった。さらにヨーロッパや日本で臓器移植などで免疫抑制治療を受けている患者で慢性化するという報告や、劇症肝炎による死亡例も認識されるなど、「人獣共通感染症」としてのE型肝炎が注目を集めている。

一方で、HEVの複製機構の解析に関しては、申請者の研究室で世界に先駆けて効率の良い感染培養系を樹立できたことで、漸く可能になった。E型肝炎を制圧するためには、宿主細胞におけるHEVの複製機構を理解することが必要不可欠である。申請者らはこれまでHEVの細胞培養系および感染性cDNAクローンを用いたリバースジェネティクスによる解析系を確立した(Tanaka et al. J Gen Virol 2007, Yamada et al. J Gen Virol 2009)。またHEVの放出に関わる因子を同定し、エンベロープの存在を明らかにした(Nagashima et al. J Gen Virol 2011)。さらに、申請者はHEVの5'非翻訳領域に様々な変異を導入することにより、HEVが細胞内で増殖するために重要な5'非翻訳領域の2次構造と塩基配列を明らかとした。このように感染性cDNAクローンを用いた感染培養系が確立されたことで、飛躍的にHEVの研究が進展してきており、これまで未解決であったHEVの複製機構に関する数々の疑問に答えを出すことが可能となった。

### 2. 研究の目的

E型肝炎ウイルス(HEV)は人獣共通感染症であるE型肝炎の原因となるRNAウイルスである。申請者らが確立したHEVの感染培養系とHEVレプリコンを用いて、未だ解明されていないHEVの細胞内増殖機構に関与する宿主因子を解明し、ゲノムRNAと宿主因子の相互作用を明らかにすることで、E型肝炎撲滅に向けた研究基盤の構築を目的とする。

そこで、本研究で計画している具体的な研究課題は次のものである。①ORF2(カプシドタンパク質)の領域をレポーター遺伝子に置換したHEVレプリコンの構築、②感染細胞内での複製複合体の局在、および複製に関与する宿主因子の解明。

HEVのゲノム構造は図1に示すように、約7.2 kbの+鎖の1本鎖RNAであり、3つのオープンリーディングフレーム(ORFs: ORF1、ORF2、ORF3)と、両末端の非翻訳領域(5'末端:25塩基、3'末端:ポリA配列を除いて105塩基)を有しており、5'末端には2次構造が存在している。ORF1は全長ゲノムRNAから翻訳され、RNAポリメラーゼなどの非構造タンパク質をコードしている。一方、ORF2はキャプシドタンパク質をコードし、ORF3はウイルス粒子の放出に必須のタンパク質をコードしている。ORF2とORF3はサブゲノムRNAから翻訳される。

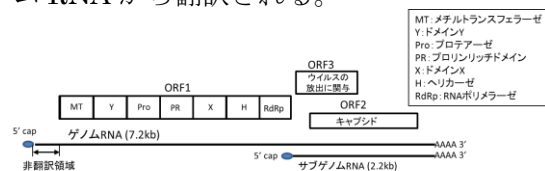


図1 HEVのゲノム構造

C型肝炎ウイルスやポリオウイルスなどに代表されるように、多くのRNAウイルスにおいて、細胞内の脂質膜はウイルスのゲノムRNAの複製に重要な役割を担っている。しかし、HEVのゲノムRNAの複製機構は未だよく分かっていない。そこで本研

究では、cDNA 由来の全長 RNA だけではなく、HEV レプリコンを構築し、感染細胞内での複製複合体の局在を明らかにし、ゲノム RNA の複製に関与する宿主因子を解明することを目的とする(図 2)。

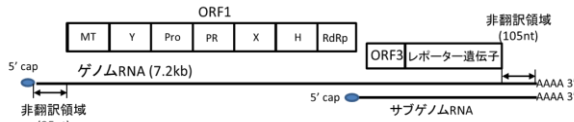


図2 HEVレプリコン

### 3. 研究の方法

HEV 感染性 cDNA クローン由来の RNA を PLC/PRF/5 細胞(肝癌細胞)に導入すると、HEV 粒子が産出される。したがって、cDNA クローンをを用いて任意の部位特異的変異を加えたウイルスが作製可能である。そこで、HEV のゲノム RNA の複製機構を明らかにするために、全長のゲノム RNA から ORF2 の領域を除き、レポーター遺伝子を組み込んだ HEV レプリコンを構築する。その cDNA に由来する RNA を試験管内で合成する。レプリコン RNA を PLC/PRF/5 細胞に導入し、2 日毎に培養上清の回収と培地の交換を行い 10 日間培養する。細胞内でレプリコン RNA が増殖しているかどうかを確認するために、細胞内からレプリコン RNA を抽出し、リアルタイム RT-PCR 法を用いて RNA の増殖を確認する。また、HEV レプリコン由来のレポータータンパク質の発現をウエスタンブロッティング法や免疫抗体染色法で確認することで、レプリコン RNA の増殖を評価する(図 3)。

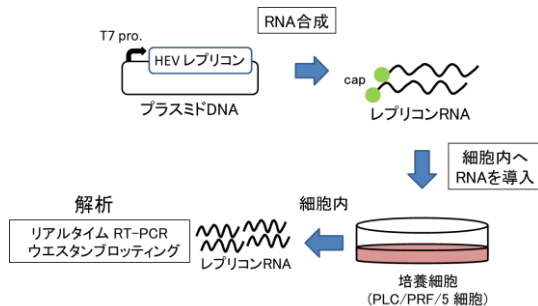


図3. HEVレプリコンRNAの解析

### 4. 研究成果

本研究では、細胞内における HEV ゲノム RNA の複製機構を明らかにするために、従来のリバースジェネティクス法で用いる cDNA 由来の全長 RNA だけではなく、細胞内でゲノム RNA のみが複製する HEV レプリコンの構築を検討した。さらに、全長のゲノム RNA から ORF2 の領域に、レポーター遺伝子を組み込んだ HEV レプリコンを構築した。試験管内で合成したレプリコン RNA を PLC/PRF/5 細胞に導入し、レプリコン RNA の増殖を解析したが、レポーター蛋白質(eGFP)を検出することができなかった。そこで、レポーター蛋白質をより蛍光強度が強い AcGFP や mOrange に変更し、蛍光発色を解析したが、レポーター蛋白質を検出することができなかった。しかし、細胞内のレプリコン RNA の増殖をノーザンブロッティング法で解析すると、複製中間体である dsRNA を検出することができ、ゲノム RNA の複製産物である subgenomic RNA から翻訳される ORF3 蛋白質も同様の発現効率であることが示された。この結果、レポーター蛋白質の蛍光発色を検出するまでの効率はないものの、細胞内でレプリコン RNA を複製させることができ、ゲノム RNA の複製機構を解析することが可能であることが示唆された。

また、ヒト HEV の ORF3 には PSAP モチーフといわれるウイルス粒子の放出に重要なアミノ酸配列が存在するが、ラット HEV には PSAP モチーフは存在していなかった。そこでラット HEV の ORF3 のプロリンリッチの領域に着目し、93、96、98 番目のプロリンをそれぞれロイシンに置換し、ラット HEV の増殖効率を解析した。93、96 番目のプロリンを置換した変異体はウイルスの増殖効率が 1/100-1,000 に減少し、ウイルスが細胞から放出される際に付加される細胞由来の膜成分も減少していた。

このことから、93、96 番目のプロリンはウイルスの放出に関与していることが明らかとなった。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

Kobayashi T, Takahashi M, Tanggis, Mulyanto, Jirintai S, Nagashima S, Nishizawa T, Okamoto H.

Characterization and epitope mapping of monoclonal antibodies raised against rat hepatitis E virus capsid protein: An evaluation of their neutralizing activity in a cell culture system.

J Virol Methods. (2016) 233, 78-88. 査読有り

doi: 10.1016/j.jviromet.2016.03.004.

Tanggis, Kobayashi T, Takahashi M, Jirintai S, Nishizawa T, Nagashima S, Nishiyama T, Kunita S, Hayama E, Tanaka T, Mulyanto, Okamoto H.

An analysis of two open reading frames (ORF3 and ORF4) of rat hepatitis E virus genome using its infectious cDNA clones with mutations in ORF3 or ORF4.

Virus Res. (2018) 249, 16-30. 査読有り

doi: 10.1016/j.virusres.2018.02.014.

Primadharsini PP, Miyake M, Kunita S, Nishizawa T, Takahashi M, Nagashima S, Tanggis, Ohnishi H, Kobayashi T, Nishiyama T, Jirintai S, Okamoto H.

Full-length genome of a novel genotype 3 hepatitis E virus strain obtained from domestic pigs in Japan.

Virus Res. (2017) 240, 147-153. 査読有り

doi: 10.1016/j.virusres.2017.08.003.

Nagashima S, Takahashi M, Kobayashi T, Tanggis, Nishizawa T, Nishiyama T, Primadharsini PP, Okamoto H.

The characterization of the quasi-enveloped hepatitis E virus particles released by the cellular exosomal pathway.

J Virol. (2017) 91, e00822-17. 査読有り

doi: 10.1128/JVI.00822-17.

Nishizawa T, Hoshino T, Naganuma A, Kobayashi T, Nagashima S, Takahashi M, Takagi H, Okamoto H.

Enhanced pregenomic RNA levels and lowered precore mRNA transcription efficiency in a genotype A hepatitis B virus genome with C1766T and T1768A

mutations obtained from a fulminant hepatitis patient.

J Gen Virol. (2016) 97, 2643-2656. 査読有り

doi: 10.1099/jgv.0.000566.

Nagashima S, Kobayashi T, Tanaka T, Tanggis, Jirintai S, Takahashi M, Nishizawa T, Okamoto H.

Analysis of adaptive mutations selected during the consecutive passages of hepatitis E virus produced from an infectious cDNA clone.

Virus Res. (2016) 223, 170-180. 査読有り

doi: 10.1016/j.virusres.2016.07.011.

Takahashi M, Kobayashi T, Tanggis, Jirintai S, Mulyanto, Nagashima S, Nishizawa T, Kunita S, Okamoto H.

Production of monoclonal antibodies against the ORF3 protein of rat hepatitis E virus (HEV) and demonstration of the incorporation of the ORF3 protein into enveloped rat HEV particles.

Arch Virol. 2016 161, 3391-3404. 査読有り

doi: 10.1007/s00705-016-3047-9

[学会発表] (計 2 件)

小林 富成、西山 尚志、長嶋 茂雄、西澤 勉、高橋 雅春、唐 吉思、Putu Prathiwi

Primadharsini、岡本 宏明  
感染培養系を用いた E 型肝炎治療薬の検討  
第 65 回 日本ウイルス学会学術集会  
2017 年

小林 富成、長嶋 茂雄、西澤 勉、唐 吉思、高橋 雅春、岡本 宏明

プラスミド由来 HEV リバースジェネティクス法の開発

第 64 回 日本ウイルス学会学術集会  
2016 年

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 富成 (Kobayashi Tominari)  
自治医科大学・医学部 助教

研究者番号 : 00634164

(2) 研究分担者 ( )

研究者番号 :

(3) 研究協力者 ( )