

機関番号：72801

研究種目：特定領域研究

研究期間：2006～2010

課題番号：18073002

研究課題名（和文） プラス鎖RNAウイルスおよび二本鎖RNAウイルスの複製と病原性

研究課題名（英文） Replication and pathogenesis of plus strand RNA viruses and double strand RNA viruses

研究代表者

野本 明男 (NOMOTO AKIO)

財団法人微生物化学研究会・微生物化学研究所・所長

研究者番号：70112670

研究成果の概要（和文）：リバーシジェネティクス系を駆使して、ポリオウイルス（PV）、アイチウイルス、C型肝炎ウイルス（HCV）（以上、一本鎖RNAウイルス）およびロタウイルス（二本鎖RNAウイルス）の複製機構、および病原性発現機構の研究を行った。実験系が確立している前者の一本鎖RNAウイルスに関しては、宿主分子との相互作用について、二本鎖RNAウイルスについては、より効率の良いリバーシジェネティクス系の確立を目指した。

研究成果の概要（英文）：Reverse genetics systems for poliovirus, Aichivirus, and hepatitis C virus were established. For these viruses, interaction between viral and host molecules were investigated to give an insight into molecular mechanisms of viral replication and pathogenesis. As for rotavirus whose reverse genetics is not completely established, mainly antigenic structure and cleavage region of viral VP4 were studied. At the same time, we made an effort to establish better reverse genetics system for rotavirus.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	36,800,000	0	36,800,000
2007年度	36,800,000	0	36,800,000
2008年度	44,744,000	0	44,744,000
2009年度	36,800,000	0	36,800,000
2010年度	36,800,000	0	36,800,000
総計	191,944,000	0	191,944,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：ウイルス、感染症、リバーシジェネティクス、プラス鎖RNA、マイナス鎖RNA

## 1. 研究開始当初の背景

PV 研究に関しては、リバーシジェネティクス系が確立し、ヒトのPV受容体（hPVR）を持つトランスジェニック（Tg）マウスが作製され、サルに替わるPVの感染モデル動物として利用出来るようになっていた。

アイチウイルスについても、リバーシジェネティクス系はすでに開発され、無細胞複製系もほぼ確立され、実験系は我々のグループにより準備されていた。新しいウイルス属で

あるため、ゲノムRNA5'末端の非翻訳領域におけるステム・ループ構造のRNA複製およびencapsidationに関する機能解析以外、複製過程の研究はほとんど進められていなかった。

HCVに関しては、リバーシジェネティクス系が導入されたばかりで、この系を駆使した実験は、世界的にも開始されたばかりであった。

ロタウイルスについては、世界に先駆けてリ

バースジェネティックス系が開発されたばかりであったが、効率が十分でなく、また標的タンパク質も VP4 に限られていた。このシステムを利用した解析は進められていなかった。

## 2. 研究の目的

プラス鎖 RNA ウイルスとして、最も研究が進んでいる PV、我が国で発見され命名されたアイチウイルス、培養細胞での複製系が確立したばかりの HCV を、また二本鎖 RNA ウイルスとしては、不完全ながらリバースジェネティックス系が導入されたばかりのロタウイルスを使用し、リバースジェネティックスを駆使した RNA ゲノムのウイルス複製における構造と機能の解析を行うことを目的とした。さらに、改変したゲノムを保有する人工変異ウイルスの個体内での生活環および病原性発現機構を追求し、プラス鎖 RNA ウイルスおよび二本鎖 RNA ウイルスに関する感染現象の基本に対する理解を深めることを目的とした。

PV に関しては、2A プロテアーゼに注目し、その人工変異株を使用してウイルス複製に関するウイルス側機能と宿主細胞の細胞変性に関わる機能を明らかにする。また、PV 感受性 Tg マウスを使用した *in vivo* における病原性発現についての研究も展開する。アイチウイルスについては、ポリオウイルス、ライノウイルスなど主要なピコルナウイルスにはない非構造タンパク質 L および他の非構造タンパク質 2A, 3CD, 3AB のウイルス複製過程における機能解析を行うとともに、宿主タンパク質との相互作用を明らかにし、病原性との関わりを検討する。HCV については、確立した増殖系を利用し、ウイルス複製能力または RNA 複製能力にとって重要な塩基をゲノム上に同定する。また、RNA ポリメラーゼとの相互作用を解析する。

ロタウイルスについては、開発されたばかりのリバースジェネティックス系を駆使して、スパイクタンパク質である VP4 上の抗原構造の解析、トリプシン開裂部位の解析を行う。リバースジェネティックス系の改良を進め、特に、ヘルパーウイルスを利用しない、プラスミド DNA のみによるリバースジェネティックス系の開発を試みる。

## 3. 研究の方法

### PV :

神経細胞に PV 抵抗性があることをこれまでに明らかにしている。神経細胞内に PV の種々の変異株を感染させ、どの遺伝子に対する抵抗性があるかを検討する。各遺伝子の神経細胞に対する影響を明らかにした後、PV を基礎とした、運動神経細胞をターゲットとした PV ベクターの構築を行う。

### アイチウイルス :

Vero 細胞、HeLa 細胞および無細胞複製系を用いて、RNA 複製、感染性ウイルス粒子の生成過程を解析した。各非構造タンパク質の細胞内局在は共焦点顕微鏡により検索した。各ウイルス非構造タンパク質間および宿主細胞タンパク質との相互作用は、酵母、哺乳動物細胞ツーハイブリッド法および免疫沈降反応により行った。

### HCV :

感染性を持つ cDNA クローンと持たないクローン間で分子遺伝学的な解析を行い、感染性獲得に必要な塩基を同定する。また、HCV の複製、病原性の発現に重要な、ウイルス側分子と宿主側分子の相互作用を解析する。

### ロタウイルス :

ヘルパーウイルス（ヒトロタウイルス KU 株）、選択用中和モノクロン抗体を利用したリバースジェネティックス系を用いて、プラーク法および酵素抗体法による抗原性の解析、塩基配列決定および制限酵素による切断パターンの解析による cDNA 解析を行った。

## 4. 研究成果

### PV :

神経細胞に PV を感染させ、2 時間後に感染防御抗体を添加すると、24 時間後には PV はクリアランスされ、感染神経細胞は継代可能となる。抗体添加時期を遅らせると、この現象は見られなくなることから、添加抗体の効果は、複数回の感染を阻止することによるものと考えられた。そこで、1 回感染のみ起こる PV の欠陥干渉 (DI) 粒子を使用した感染実験を行った。その結果、神経細胞は PV の DI 粒子に抵抗性を示した。このとき、コントロールで使用した HeLa 細胞には激しい細胞変性効果が発現した。DI 感染によっても、PV の細胞変性効果発現に中心的役割をなす 2A 蛋白質は発現する。したがって、神経細胞は、2A 蛋白質に対し抵抗性があることが判明した。神経細胞が PV の 1 回の感染に対し抵抗性を持つのは、このためであると考えられる。

そこで次に、神経細胞に DI 粒子を複数回感染させ、細胞変性効果を観察したところ、予想に反し細胞変性は生じなかった。DI 粒子は神経細胞には、何回感染させてもほとんど無毒であるため、DI 粒子ゲノムで欠損しているキャプシド蛋白質領域に神経病原性が存在するとの仮説を立てた。そこで、PV のキャプシド蛋白質領域を発現するワクシニアウイルスベクターを使用し神経細胞への感染実験を行ったところ、コントロールの野生株ワクシニアウイルスに比べ、明らかに細胞変性効果が強く発現した。このことは、神経細胞は 2A 蛋白質よりもキャプシド蛋白質に

よって強く損傷を受ける可能性を示している。

それでも、2A 蛋白質による細胞変性効果は、良く知られるところなので、ベクターとして PV を使用するときには、無いに越したことは無い。そこで、2A 領域ゲノムを欠損した PV を作製し、その複製能力を観察した。このウイルスの複製能力は非常に低く、ベクターとしての力は無いと判断するに至った。

PV をベクターとして使った場合、分泌型蛋白質の発現は得られないとの論文がある。この点をクリアーし、分泌型蛋白質である **hepatocyte growth factor (HGF)** の発現を試みた。これまでの PV ベクターと異なり、EMCV の IRES を使用した **dicistronic virus** とし、キャプシド蛋白質領域に HGF を組み込んだ。このベクターを細胞に感染させたところ、期待通りの HGF の発現が見られた。また、筋肉内接種により、中枢の運動神経細胞に発現することが明らかとなった。

血流中から中枢神経へ移行しやすい PV 変異株を得た。そのゲノム構造を解析すると、キャプシド蛋白質 VP1 のウイルス粒子表面に位置するペプチドの一部に変位が生じていた。この変異が、血液脳関門 (BBB) の PV 透過に関わっているかを検討している。実際に、PV の BBB 透過に関わる宿主分子として、トランスフェリン受容体を同定し、両者の結合に関わるペプチド部位を同定したが、上記の変異箇所は、同定したペプチド内である。現在、実験は進行中である。

#### アイチウイルス：

アイチウイルスについて、一連の L タンパク質段階欠変異体を作成し、ウイルス産生能、RNA 複製能を解析することにより、L タンパク質は、RNA 複製に加え、**encapsidation** にも関与していることを示した。さらに、キャプシドコード領域をルシフェラーゼ遺伝子と置換したレプリコンに EMCV の IRES を導入して作成したジストロニック RNA を用いた解析により、L タンパク質が P2P3 タンパク質と同一分子で合成されなければならないことを明らかとした。

アイチウイルスの L 蛋白質はウイルス特異的ポリ蛋白質の細胞内局在を決定していること、2A がゲノムの複製に必須であることを明らかにした。

感染細胞内において、dsRNA は細胞質に多数、dot 状に認められ、抗 dsRNA 抗体により RI や RF が検出されたが、非感染細胞ではこのような dot は確認できなかったことから、dot がウイルス RNA 複製部位を示していることが考えられた。L タンパク質は感染細胞の細胞質全体に一様に存在し、L-EGFP-P2P3 は、感染細胞での dsRNA の局在に類似して、細胞質に dot として観察さ

れた。一方、 $\Delta$ L-EGFP-P2P3 は、小胞体マーカー **calnexin** と共局在するようであったが、dot 形成は認められなかった。以上の結果から、L タンパク質は翻訳直後、ポリプロテインの一部として存在している間にポリプロテインの細胞内局在を決定し、複製複合体形成を導いていること、複製複合体形成後、プロセッシングによりポリプロテインから切り出された L タンパク質は細胞質に存在し、複製複体内での RNA 合成には関わっていないことが考えられた。

2A の N 末端の切断効率と Luc-2A と 3CD 間の相互作用には強い相関が認められた。2A の N 末端が効率よく切断されるためには 3C ではなく 3CD という形のプロテアーゼが必要であること、その切断には 3CD と 2A 間の相互作用が深く関係していることが示唆された。

アイチウイルス非構造タンパク質間における網羅的な相互作用解析では、すべてのアイチウイルス非構造タンパク質を含んだ複雑な相互作用ネットワークの存在を示唆した。特に、2A-3CD の最も強力な結合と 2A-3C、2A-3CD、2A-3D の結合は、ウイルス複製における 2A の重要性や多機能性を示唆した。

酵母ツーハイブリッド法により、各種ウイルス非構造タンパク質と相互作用する宿主タンパク質を、HeLa 細胞 cDNA ライブラリーからスクリーニングした。その結果、ウイルスタンパク質 3AB と相互作用する宿主タンパク質 X を見出した。哺乳動物培養細胞内での 3AB との相互作用を、哺乳動物細胞ツーハイブリッドおよび共免疫沈降により確認した。このタンパク質のウイルス複製における役割を明らかにした。

#### HCV：

HCV の培養細胞における複製系を作製し、レプリコン活性のあるもの (JFH-1) と無いものの比較、および両者の組換え体の複製効率の比較から、レプリコン活性の無い MA 株も NS5A の活性は保有していることが判明した。また、ウイルスの RNA ポリメラーゼ NS4B の発現により、宿主肝細胞の癌抑制遺伝子 Rb の分解が誘導されることを見いだした。このメカニズムを解析し、Rb が NS5B および宿主のユビキチンリガーゼ E6AP 依存にユビキチン化され、プロテアソームにより分解されることを示した。この情報伝達は、肝細胞の癌化に繋がる可能性がある。さらに TLR3 の転写が上昇するが、これは、Rb が減少し、そのため E2F 発現量の上昇となり、これが TLR の発現上昇につながったと考えている。感染時に TLR3 の発現は NS5B 依存的に上昇することを見いだした。更なる実験により、HCV は TLR3 により負のフィードバック制御を受けることが明らかとなった。

HCV が、CDK 阻害剤により、Rb のリン

酸化が抑制され、Rb 蛋白質量が上昇することにより、HCV の増殖が抑制されると考えられた。

#### ロタウイルス：

開発したばかりのヘルパーウイルスを利用したロタウイルスのリバースジェネティクス系を利用し、抗原モザイクを有する組換えロタウイルスを作製し、その性状解析を行った。ロタウイルス VP4 はトリプシンにより VP8\* と VP5\* に開裂するが、VP5\* には交叉反応性の中和抗原領域が存在し、3 つの中和エピトープ部位からなる。サルロタウイルス SA11 株の VP5\* の中和エピトープ II をヒトロタウイルス DS-1 株の中和エピトープ II に置き換えた抗原モザイクを有する、キメラウイルスを作成した。各種特異的モノクローナル抗体との反応性の検討から、調製したキメラウイルスは、SA11 株の中和エピトープ I および中和エピトープ III 活性を有し、DS-1 株の中和エピトープ II 活性を有することを確認した。本ウイルスは、リバースジェネティクスの手法でカプシド蛋白質のアミノ酸に人工的に変異を導入した、初めての感染性ロタウイルスである。こうした抗原モザイクを有する完全粒子は、今後ワクチンとして応用可能である。

ロタウイルスは、2 種類の外層タンパク質 VP4 と VP7 をもつ。VP4 はスパイクタンパク質で細胞レセプターのリガンドとなる。開裂部位は、アミノ酸 No. 231, 241, 247 の 3 ヶ所のアルギニン残基であり、トリプシン感受性は、Arg-241>Arg-231>Arg-247 である。Arg241Ala の変異を人工的に加え、変異 VP4 を有する感染性ロタウイルスを調製した。変異ウイルスは、親株に比して、増殖能、プラークサイズも大きな差はなく、Arg241 は必須な開裂部位ではないことが示された。

サルロタウイルス SA11 株の VP4 遺伝子上のトリプシン切断領域 (244IHRR247) にフェーリン認識配列 (244RHRR247) を導入したプラス鎖 RNA 発現プラスミドを構築した。COS-7 細胞にプラスミドを導入し、ヘルパーウイルスとしてヒト RV KU 株を感染させた後に、KU 株 VP4 に対する中和モノクローナル抗体存在下で培養を行い、cDNA 由来 VP4 遺伝子を有する KU//rVP4-R247Furin を単離した。KU//rVP4-R247Furin はトリプシン非存在下では多段階増殖し得ないのみならず、トリプシン存在下でも MA104 および CV-1 細胞における増殖能は野生型 VP4 を有する親株 KU//rVP4 に比べて大きく低下していた。KU//rVP4-R247Furin 感染細胞では、総ウイルス量は親株とほぼ同じであったが、培養上清中のウイルス量が著しく低下していた。一方で、LoVo 細胞 (フェーリン発現を欠損) においては、KU//rVP4-R247Furin は親株と同程度の増殖能を示した。細胞内フェーリン

による VP4 切断効率は低いものの、細胞内での VP4 切断活性化はロタウイルス増殖には負に作用する可能性が考えられた。

プラスミド DNA のみによるリバースジェネティクス系の開発に向けた試みを、SA11 株、KU 株由来プラスミド DNA を用いてトランスフェクション効率の改良、細胞の選択、T7RNA ポリメラーゼ発現細胞の利用など、諸条件を検討することにより進めた。

#### 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 3 2 件)

- ① 2A protease is not a prerequisite for poliovirus replication. Hiroko Igarashi, Yasuko Yoshino, Miwako Miyazawa, Hitoshi Horie, Seii Ohka, & Akio Nomoto. J. Virol., 査読有 84(12): 5947-5957, 2010.
- ② Aichi virus 2A protein is involved in viral RNA replication. Sasaki J, & Taniguchi K. J. Virol., 査読有 82(19): 9765-9769, 2008.
- ③ Generation of recombinant rotavirus with an antigenic mosaic of cross-reactive neutralization epitopes on VP4. Komoto S, Kugita M, Sasaki J, & Taniguchi K. J. Virol., 査読有 82(13): 6753-6757, 2008.
- ④ Hepatitis C virus induces E6AP-dependent degradation of the retinoblastoma protein. Tsubasa Munakata, Yuqiong Liang, Seungtaek Kim, David R. McGivern, John Huibregtse, Akio Nomoto, & Stanley M. Lemon. PLoS pathogens, 査読有 3(9): 1335-1347, 2007.
- ⑤ Establishment of a poliovirus oral infection system in human poliovirus receptor-expressing transgenic mice that are deficient in alpha/beta interferon receptor. Seii Ohka, Hiroko Igarashi, Noriyo Nagata, Mai Sakai, Satoshi Koike, Tomonori Nochi, Hiroshi Kiyono, & Akio Nomoto. J. Virol., 査読有 81(15): 7902-7912, 2007.
- ⑥ Reverse genetics system for introduction of site-specific mutations into the double-stranded RNA genome of infectious rotavirus. Komoto S, Sasaki J, & Taniguchi K. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 査読有 103(12): 4646-4651, 2006.

[学会発表] (計 8 0 件)

- ① 運動神経初代培養細胞の分離培養系におけるポリオウイルス感染、大岡静衣、金田祥平、藤井輝夫、五十嵐博子、野本明男、第 58 回日本ウイルス学会、2010 年 11 月 8 日、徳島あわぎんホール
- ② Palmitate regulates HCV replication. Tsubasa Munakata, Akio Nomoto, & Michinori Kohara. The 17<sup>th</sup> International Symposium on Hepatitis C Virus & Related Viruses, Sept. 11, 2010, Pacifico Yokohama
- ③ アイチウイルス 3CD による 2A の N 末端の切断、佐々木潤、石川球美子、前野芳正、河本聡志、守口匡子、谷口孝喜、第 57 回日本ウイルス学会、2009 年 10 月 25 日、東京都市センターホテル
- ④ ポリオウイルスの新規侵入経路の発見、二瓶浩一、坂井麻依、三瓶雅迪、神代浩司、大岡静衣、野本明男、第 31 回日本分子生物学会、2008 年 12 月 12 日、神戸ポートアイランド
- ⑤ VP4 上の交叉反応性中和エピトープの抗原モザイクを有する組換えロタウイルスの作製、河本聡志、釘田雅則、油井晶子、佐々木潤、守口匡子、前野芳正、石川球美子、谷口孝喜、第 56 回日本ウイルス学会、2008 年 10 月 28 日、岡山コンベンションセンター
- ⑥ Anti-hepatitis C virus activity of cyclin-dependent kinase inhibitors. Tsubasa Munakata, Makoto Inada, & Akio Nomoto. 第 8 回あわじしま感染症・免疫フォーラム、2008 年 9 月 9 日、兵庫県淡路夢舞台国際会議場
- ⑦ アイチウイルス非構造タンパク質間における網羅的な相互作用解析、石川球美子、佐々木潤、前野芳正、守口匡子、河本聡志、谷口孝喜、第 55 回日本ウイルス学会、2007 年 10 月 23 日、札幌コンベンションセンター
- ⑧ Induction of toll-like receptor 3 by hepatitis C virus through RB/E2F pathway. Tsubasa Munakata, & Akio Nomoto. Eighth International Symposium on POSITIVE-STRAND RNA VIRUSES, May 27, 28, 2007, Washington DC
- ⑨ 2A<sup>pro</sup>を欠損した自己複製型ポリオウイルス変異株の解析、五十嵐博子、大岡静衣、野本明男、第 54 回日本ウイルス学会、2006 年 11 月 20 日、名古屋国際会議場
- ⑩ ポリオウイルス経口感染モデルマウスにおける経口感染伝播機構の解析、大岡静衣、五十嵐博子、永田典代、坂井麻依、小池智、野地智法、清野宏、野本明男、第 54 回日本ウイルス学会、2006 年 11

月 19 日、名古屋国際会議場

- ⑪ A molecular mechanism underlying down regulation of the Rb tumor suppressor by hepatitis C virus. Tsubasa Munakata, Stanley M. Lemon, & Akio Nomoto. 20<sup>th</sup> IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11<sup>th</sup> FAOBMB Congress, June 18-23, 2006, Kyoto International Conference Center

[図書] (計 1 件)

- ① Poliomyelitis. Satoshi Koike, & Akio Nomoto. ASM Press, The Picornaviruses, Chapter 21: 339-351, 2010.

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 血液脳関門を透過する薬物輸送体、ペプチド及びその用途

発明者: 野本明男、二瓶浩一

権利者: (財) 微生物化学研究会、(株) イムノフューチャー

種類: 発明

番号: 特願 2011-021224

出願年月日: 2011 年 2 月 2 日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.bikaken.or.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

野本 明男 (NOMOTO AKIO)

財団法人微生物化学研究会・微生物化学研究所・所長

研究者番号: 70112670

### (2) 研究分担者

谷口 孝喜 (TANIGUCHI KOUKI)

藤田保健衛生大学・医学部・教授

研究者番号: 40094213

### (3) 連携研究者

大岡 静衣 (OHKA SEI)

独立行政法人国立がん研究センター研究所・がん幹細胞研究分野・研究員

研究者番号: 80313097

棟方 翼 (MUNAKATA TSUBASA)

財団法人東京都医学研究機構・東京都臨床医学総合研究所・主席研究員

研究者番号: 50420237

田中 良和 (TANAKA YOSHIKAZU)  
北海道大学・創成研究機構・特任助教  
研究者番号：20374225