

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：17701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14871

研究課題名(和文) 口蹄疫ウイルスRNAの特異的翻訳抑制と耐病性家畜開発に向けたアプローチ

研究課題名(英文) Foot and mouth disease virus specific translation inhibition and application for development of disease resistant livestock

研究代表者

小原 恭子 (Kohara, Kyoko)

鹿児島大学・農水産獣医学域獣医学系・教授

研究者番号：20225478

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：口蹄疫ウイルス(Foot-and mouth disease virus；FMDV)は、家畜に甚大な被害を及ぼす重要な伝染病の病原体である。ピコルナウイルス科に属し、プラス1本鎖RNAをゲノムとして持つ。特殊な翻訳機構を持っており、非翻訳領域(5' UTR)内の40Sリボソームの内部認識領域(IRES)から蛋白合成を行う。宿主因子のうちPTB、4E-BP1とITAF45がFMDV-IRES活性に関与している事が明らかとなった(BMC Vet.Res.12:66, 2016)。また阻害剤の探索に必要なFMDV-IRES発現細胞を樹立した(特許申請準備中)。

研究成果の概要(英文)：FMD is a highly contagious infectious disease in cloven-hoofed animals. FMDV possess a positive sense, single stranded RNA genome. Internal ribosomal entry site (IRES) element exists within its 5' UTR of the viral RNA. IRES mediated translation is unique translation mechanism, which are mostly observed in picornaviruses and hepacivirus. Our data indicated that IRES-mediated translational activity was not linked to FMDV host range. ITAF45 promoted IRES-mediated translation in all cell lines, and the effects of poly-pyrimidine tract binding protein (PTB) and eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1 (4E-BP1) were observed only in FMDV-susceptible cells. Thus, PTB and 4E-BP1 may influence the host range of FMDV. Moreover, we have established the cell line expressing FMDV-IRES reporter gene, which can be applicable for the screening of FMDV-IRES inhibitors. Thus, these findings may contribute the development of disease resistant domestic animals and novel drugs.

研究分野：ウイルス学、分子生物学

キーワード：FMDV IRES 宿主因子 PTB 4E-BP1 ITAF45 細胞株

1. 研究開始当初の背景

口蹄疫は感染力が強いウイルス性家畜伝染病で、国境を越えて伝播し畜産を営む多くの国に被害を与える。病気の蔓延を防ぐために行う感染家畜の殺処分やワクチン接種の必要性から経済的被害は甚大で一国の畜産産業を壊滅させかねない疾病である。近年英国での口蹄疫発生により被った経済的損失は2兆900億円(英国のGDPの1.1%相当)に上ったとされ、2010年宮崎県で発生した口蹄疫の損失は2,350億円に上った。未だ近隣諸国(中国、台湾、韓国)での発生が報告され、疾病の侵入防止には、予断を許さない状況である。現在我が国は清浄国ではあるが、疾病の侵入を防止し、発生を未然に防ごうとしても、近隣諸国で発生が多くなれば、水際での防止にも限界がある。近隣諸国において、何らかの方法で口蹄疫の発生を減らすことが出来れば、結果として我が国への侵入リスクが減少すると期待される。口蹄疫は、ピコルナウイルス科に分類される口蹄疫ウイルス(Foot and mouse disease virus; FMDV)により引き起こされる。ピコルナウイルスはプラス1本鎖RNAをゲノムとして持ち、5'末端側にはウイルス蛋白質の翻訳開始を制御する非翻訳領域(5'-untranslated region; 5'UTR, 約700塩基)があり、リボゾームが内部認識できる配列(Internal Ribosomal Entry Site; IRES)が存在する。IRESは一部のウイルスRNAに主に見られる配列であり、これから始まる翻訳を抑制する事によってFMDV-RNAの翻訳開始を特異的に抑制する事ができる。

2. 研究の目的

FMDV-IRESから始まる翻訳開始機構の特徴を明らかにし、これを特異的に抑制する方法を確立すると同時に、FMDV抵抗性動物の作出に必要な基礎的知見を得る。

(A)IRESはその構造から3グループ(I型、エンテロウイルス、ライノウイルス;II型、アフトウイルス;III型、ヘパシウイルス)に分類される。

FMDV-IRESはII型に分類されるが、このIRESの特徴を明らかにする。

(B)FMDV-IRESに作用する宿主因子を同定する。宿主因子のIRESへの作用や他の因子との相互作用の有無を明らかにする。

(C)宿主因子の作用がFMDV感染感受性動物由来とそれ以外の細胞で異なる予備的知見を得ている。感染感受性を規定する宿主因子の作用があるのか、明らかにする。

(D)FMDV-IRES発現細胞を樹立し、宿主因子のIRES-RNAへの結合を阻害する低分子化合物や、核酸誘導体を用い、FMDV-IRES活性を特異的に抑制する物質のスクリーニングを可能にする。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

ヒト腎臓由来細胞(HEK293)や牛腎臓細胞(MDCK)はAmerican Type Culture Collection(ATCC)から得た。これらの細胞は10%牛胎児血清(FCS)添加ダルベッコ変法培地(DMEM, ニッスイ)で培養した。イヌ腎臓細胞(MDCK)もATCCから得たが、培地はイーグル最小培地(MEM, Life technologies)に新生児牛血清(NCS)を5%で

添加して培養した。豚腎臓 (CPK) 細胞は 10%FCS を MEM に添加して培養を行った。全ての細胞は 37°C 5%CO₂ 存在下で培養を行った。

(2) プラスミド

FMDV の IRES 活性の測定は pRF/FMDV-IRES プラスミド (ニューファンドランド記念大学平沢博士より供与) を pCAGGS ベクターに入れ替えて作成した (ジシストロニックベクター)。

(3) siRNA による解析

宿主因子の作用を解析するために、特異的な siRNA を細胞に導入して FMDV-IRES 活性における作用を解析した。ITAF45 に対する siRNA は Santa Cruz Biotechnology 社から購入した。また、PTB と 4E-BP1 遺伝子に対する siRNA の配列は下記の様になっている。

5'-GGCAGGAAATCTGTATTG-3' (PTB),

**5'-GAGTCACAGTTTGAGATGGACATTTA
A-3' (4E-BP1) (Lifetechnologies)**

細胞にプラスミドを導入する際は 24 ウェルプレートを用い、1 ウェルあたり 10⁵ 個の細胞を撒いて Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いてマニュアルに従って DNA トランスフェクションを行った。siRNA の処理は RNAiMax (Invitrogen) を用いてマニュアルに従って行った。

(4) ルシフェラーゼ活性の測定

FMDV-IRES の活性を測定するジシストロニックベクターは、第一シストロンのレニラルシフェラーゼの活性 (R) と第 2 シストロンの蛍ルシフェラーゼ (F) の活性を測定した。R の値を F の値で割ったものを、標準化した FMDV-IRES の活性として計算した。蛍

光は、GloMax96 マイクロプレートリーダーで 10 秒間測定した。

(5) ウェスタンブロット (WB) 法

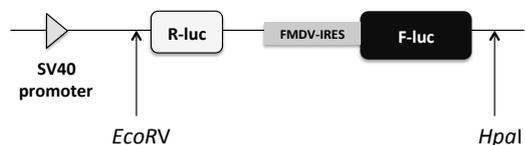
siRNA による宿主因子のノックダウン効果は WB 法による蛋白質発現解析で検討を行った。細胞を溶解液 (RIPA: 0.1% SDS, aprotinin 10 ug/mL, 100ug PMSF/mL, 1% phosphatase inhibitor cocktail (Sigma)) で溶解して SDS-PAGE を行い、常法に従って WB 解析を行った。

4. 研究成果

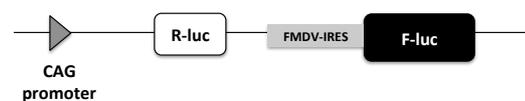
(1) FMDV-IRES 活性の細胞における評価

FMDV-IRES 活性はジシストロニックベクターを細胞にトランスフェクションして測定した (図 1)。

pRF/FMDV-IRES



pCAGGS/FMDV-IRES

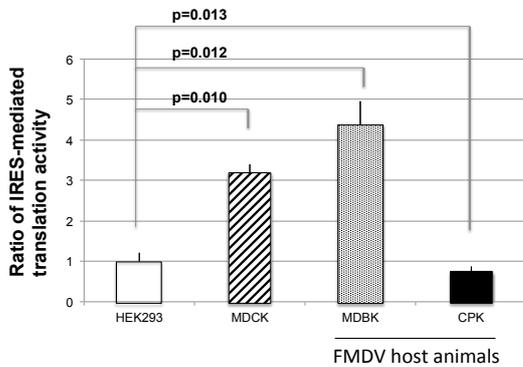


[図 1. ジシストロニックベクターの構造]

また、プロモーター活性の強い pCAGGS ベクターを用いて解析を進めた。

次に FMDV-IRES 活性が細胞の種類によって異なるかを比較した (図 2)。ヒト由来の HEK293 細胞、イヌ由来の MDCK 細胞、牛由来の MDBK 細胞、豚由来の CPK 細胞で比較した。その結果、FMDV の感染感受性宿主である、MDBK や CPK 細胞における FMDV-IRES 活性が

HEK293やMDCK細胞におけるものと共に高いわけではなかったため、FMDV-IRES活性がウイルス感染の宿主域の決定に関与している可能性は低いと考えられた。



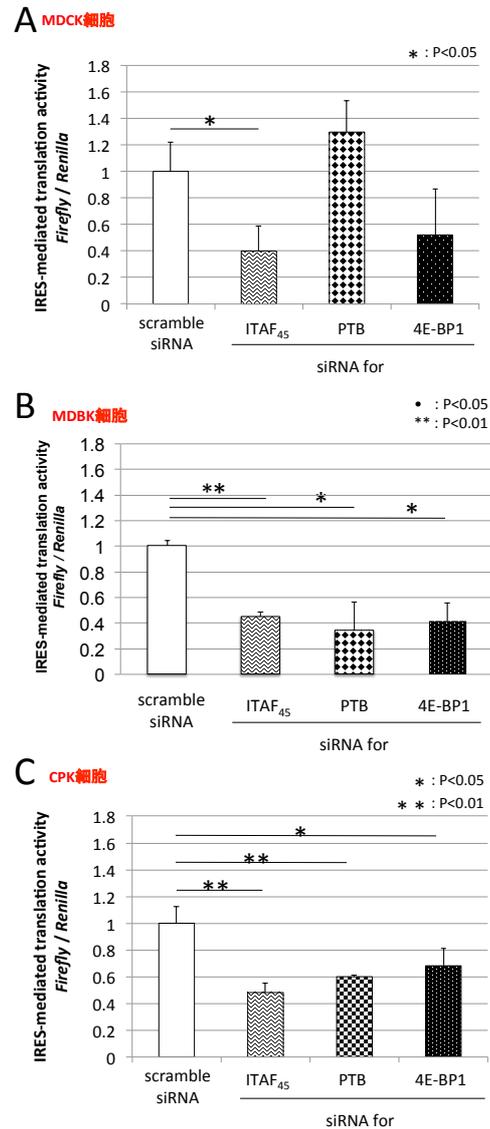
[図2 FMDV-IRESの各種細胞における活性]

(2) 宿主因子のFMDV-IRES活性における役割の解析

IRESで作用する可能性がある宿主因子, ITAF₄₅, PTB, 4E-BP1の作用をsiRNAを用いて解析した(図3)。予めWBによりsiRNAの効果を確認したのち、FMDVに感染感受性の宿主由来細胞株(MDBK, CPK)と非感受性の細胞株(MDCK)で比較したところ、非感受性細胞ではPTB, 4E-BP1のsiRNAはFMDV-IRESを有意に低下させなかったのに対し、ITAF₄₅に対するsiRNAは全ての細胞でFMDV-IRES活性を低下させた。以上の事から、PTBや4E-BP1はFMDVのIRES活性への効果を通じて宿主域の決定に関与する可能性が考えられた(図3A, B, C)。

(3) FMDV-IRES発現細胞の樹立

HEK293細胞にpCAGGS-FMDV-IRESとpCMV-Neoベクターをトランスフェクションし、G418(300ug/mL)で選択して40クローンを得た。特許申請中である。



[図3 宿主因子の各種細胞での作用]

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計18件)

*corresponding author, 全て原著論文で査読あり。下線は研究代表者。

- 1: Kayesh MEH, Kitab B, Sanada T, Hayasaka D, Morita K, Kohara M, Tsukiyama-Kohara K. Susceptibility and initial immune response of Tupaia belangeri cells to dengue virus infection. Infect Genet Evol. 2017 Jul;51:203-210. doi: 10.1016/j.meegid.2017.04.003. Epub 2017 Apr 6. PubMed PMID: 28392469.

- 2: Tokunaga Y, Osawa Y, Ohtsuki T, Hayashi Y, Yamaji K, Yamane D, Hara M, Munekata K, Tsukiyama-Kohara K, Hishima T, Kojima S, Kimura K, Kohara M. Selective inhibitor of Wnt/ β -catenin/CBP signaling ameliorates hepatitis C virus-induced liver fibrosis in mouse model. *Sci Rep*. 2017 Mar 23;7(1):325. doi: 10.1038/s41598-017-00282-w. PubMed PMID: 28336942; PubMed Central PMCID:PMC5427997.
- 3: Ezzikouri S, Jadid FZ, Hamdi S, Wakrim L, Tsukiyama-Kohara K, Benjelloun S. Supplementing Conventional Treatment with Pycnogenol® May Improve Hepatitis C Virus-Associated Type 2 Diabetes: A Mini Review. *J Clin Transl Hepatol*. 2016 Sep 28;4(3):228-233. Epub 2016 Jul 29. Review. PubMed PMID: 27777890; PubMed Central PMCID: PMC5075005.
- 4: Kouwaki T, Fukushima Y, Daito T, Sanada T, Yamamoto N, Mifsud EJ, Leong CR, Tsukiyama-Kohara K, Kohara M, Matsumoto M, Seya T, Oshiumi H. Extracellular Vesicles Including Exosomes Regulate Innate Immune Responses to Hepatitis B Virus Infection. *Front Immunol*. 2016 Aug 31;7:335. doi: 10.3389/fimmu.2016.00335. eCollection 2016. PubMed PMID: 27630638; PubMed Central PMCID: PMC5005343.
- 5: Rebbani K, Tsukiyama-Kohara K. HCV-Induced Oxidative Stress: Battlefield-Winning Strategy. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:7425628. doi: 10.1155/2016/7425628. Epub 2016 May 12. Review. PubMed PMID: 27293514; PubMed Central PMCID: PMC4880679.
- 6: Nkogue CN, Horie M, Fujita S, Ogino M, Kobayashi Y, Mizukami K, Masatani T, Ezzikouri S, Matsuu A, Mizutani T, Ozawa M, Yamato O, Ngomanda A, Yamagiwa J, Tsukiyama-Kohara K. Molecular epidemiological study of adenovirus infecting western lowland gorillas and humans in and around Moukalaba-Doudou National Park (Gabon). *Virus Genes*. 2016 Oct;52(5):671-8. doi: 10.1007/s11262-016-1360-8. Epub 2016 Jun 11. PubMed PMID: 27290717; PubMed Central PMCID: PMC5002280.
- 7: Hai-Ying C, Nagano K, Ezzikouri S, Yamaguchi C, Kayesh ME, Rebbani K, Kitab B, Nakano H, Kouji H, Kohara M, Tsukiyama-Kohara K. Establishment of an intermittent cold stress model using *Tupaia belangeri* and evaluation of compound C737 targeting neuron-restrictive silencer factor. *Exp Anim*. 2016 Jul 29;65(3):285-92. doi: 10.1538/expanim.15-0123. Epub 2016 Apr 4. PubMed PMID: 27041457; PubMed Central PMCID: PMC4976242.
- 8: Kanda T, Ozawa M, Tsukiyama-Kohara K. IRES-mediated translation of foot-and-mouth disease virus (FMDV) in cultured cells derived from FMDV-susceptible and -insusceptible animals. *BMC Vet Res*. 2016 Mar 31;12:66. doi:10.1186/s12917-016-0694-8. PubMed PMID: 27036295; PubMed Central PMCID:PMC4815274.
- 9: Sanada T, Tsukiyama-Kohara K, Yamamoto N, Ezzikouri S, Benjelloun S, Murakami S, Tanaka Y, Tateno C, Kohara M. Property of hepatitis B virus replication in *Tupaia belangeri* hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016 Jan 8;469(2):229-35. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.11.121. Epub 2015 Nov 30. PubMed PMID: 26654952.
- 10: Masatani T, Ozawa M, Yamada K, Ito N, Horie M, Matsuu A, Okuya K, Tsukiyama-Kohara K, Sugiyama M, Nishizono A. Contribution of the interaction between the rabies virus P protein and I-kappa B kinase ϵ to the inhibition of type I IFN induction signalling. *J Gen Virol*. 2016 Feb;97(2):316-26. doi:10.1099/jgv.0.000362. Epub 2015 Dec 8. PubMed PMID: 26647356.
- 11: Ohtsuki T, Kimura K, Tokunaga Y, Tsukiyama-Kohara K, Tateno C, Hayashi Y, Hishima T, Kohara M. M2 Macrophages Play Critical Roles in Progression of Inflammatory Liver Disease in Hepatitis C Virus Transgenic Mice. *J Virol*. 2015 Oct 14;90(1):300-7. doi: 10.1128/JVI.02293-15. PubMed PMID: 26468521; PubMed Central PMCID: PMC4702575.
- 12: Okuya K, Kawabata T, Nagano K, Tsukiyama-Kohara K, Kusumoto I, Takase K, Ozawa M. Isolation and characterization of influenza A viruses from environmental water at an overwintering site of migratory birds in Japan. *Arch Virol*. 2015 Dec;160(12):3037-52. doi: 10.1007/s00705-015-2610-0. Epub 2015 Sep 21. PubMed PMID: 26392284.
- 13: Ozawa M, Kawabata T, Okuya K, Nagano K, Kanda T, Kanazawa N, Tsukiyama-Kohara K, Taneno A, Deguchi E. Full genome sequences of torque teno sus virus strains that coinfect a pig with postweaning multisystemic wasting syndrome in Japan:

- implications for genetic diversity. Arch Virol. 2015 Dec;160(12):3067-74. doi: 10.1007/s00705-015-2593-x. Epub 2015 Sep 3. PubMed PMID: 26335893.
- 14: Ezzikouri S, Kimura K, Sunagozaka H, Kaneko S, Inoue K, Nishimura T, Hishima T, Kohara M, Tsukiyama-Kohara K. Serum DHCR24 Auto-antibody as a new Biomarker for Progression of Hepatitis C. EBioMedicine. 2015 Apr 13;2(6):604-12. doi: 10.1016/j.ebiom.2015.04.007. eCollection 2015 Jun. PubMed PMID: 26288822; PubMed Central PMCID: PMC4535309.
- 15: Miura R, Kooriyama T, Yoneda M, Takenaka A, Doki M, Goto Y, Sanjoba C, Endo Y, Fujiyuki T, Sugai A, Tsukiyama-Kohara K, Matsumoto Y, Sato H, Kai C. Efficacy of Recombinant Canine Distemper Virus Expressing Leishmania Antigen against Leishmania Challenge in Dogs. PLoS Negl Trop Dis. 2015 Jul 10;9(7):e0003914. doi: 10.1371/journal.pntd.0003914. eCollection 2015. PubMed PMID: 26162094; PubMed Central PMCID: PMC4498809.
- 16: Matsuu A, Hobo S, Ando K, Sanekata T, Sato F, Endo Y, Amaya T, Osaki T, Horie M, Masatani T, Ozawa M, Tsukiyama-Kohara K. Genetic and serological surveillance for non-primate hepacivirus in horses in Japan. Vet Microbiol. 2015 Sep 30;179(3-4):219-27. doi: 10.1016/j.vetmic.2015.05.028. Epub 2015 Jun 4. PubMed PMID: 26070772.
- 17: Saito M, Takano T, Nishimura T, Kohara M, Tsukiyama-Kohara K. 3 β -hydroxysterol δ 24-reductase on the surface of hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma cells can be a target for molecular targeting therapy. PLoS One. 2015 Apr 13;10(4):e0124197. doi: 10.1371/journal.pone.0124197. eCollection 2015. PubMed PMID: 25875901; PubMed Central PMCID: PMC4395381.
- 18: Ozawa M, Matsuu A, Yonezawa K, Igarashi M, Okuya K, Kawabata T, Ito K, Tsukiyama-Kohara K, Taneno A, Deguchi E. Efficient isolation of Swine influenza viruses by age-targeted specimen collection. J Clin Microbiol. 2015 Apr;53(4):1331-8. doi: 10.1128/JCM.02941-14. Epub 2015 Feb 18. PubMed PMID:25694523; PubMed Central PMCID: PMC4365228.

[産業財産権] (計2件)

- 1) 抗 DHCR24 自己抗体検出による病態診断系」特願 2015-142360 出願日 平成 27 年 7 月 16 日 発明者：小原恭子、小原道法、木村公則、金子周一 出願人：鹿児島大学、金沢大学
- 2) 口蹄疫ウイルス IRES 発現細胞(出願準備中) 発明者：小原恭子 出願人：鹿児島大学 (特許権承継決定済み)

[その他]

ホームページ等

<http://www.vet.kagoshima-u.ac.jp/kadai/V-douei/douei/index.php>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小原 恭子 (KOHARA, Kyoko)
鹿児島大学・農水産獣医学域獣医学
系・教授
研究者番号：20225478