

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：32203

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19115

研究課題名(和文) 日本脳炎ウイルスゲノムの環状化がウイルス複製に及ぼす影響

研究課題名(英文) Function of Japanese encephalitis genome circularization on viral replication

研究代表者

石川 知弘 (Ishikawa, Tomohiro)

獨協医科大学・医学部・助教

研究者番号：40609327

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では日本脳炎ウイルス(JEV)のゲノム末端に存在する4組の相補配列がゲノム環状化を介して複製に関与するかどうかを解析した。その結果、ゲノム環状化に重要な相補配列とウイルス複製に重要な領域をそれぞれ決定した。また、ゲノム環状化に必要な領域はウイルス複製に関与するが、ウイルス複製に必要な領域がすべてゲノム環状化に重要であるとは限らないことが明らかになった。これらゲノム上の相補配列の機能は哺乳類細胞と蚊細胞において差は認められなかった。これらの知見は未だ開発段階の特異的治療薬の開発に貢献するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Functional analyzes of four pairs of complement sequences found in Japanese encephalitis virus (JEV) genome terminus were conducted to elucidate the effect of the genome circularization on virus replication. As results, essential sequences and/or complementarity for genome circularization as well as virus replication were determined. These regions possessed identical functions both in mammalian cells and mosquito cells. The essential sequences and/or complementarity for genome circularization were all important for virus replication. On the other hand, the essential sequences and/or complementarity for virus replication were not always essential for genome circularization. Since functions of these regions of JEV genome have been largely unknown, findings obtained in the present study can contribute to the novel anti JEV drug development which has not been available yet.

研究分野：ウイルス学、ワクチン学

キーワード：日本脳炎ウイルス ゲノム環状化 相補性 複製

### 1. 研究開始当初の背景

日本脳炎ウイルス (JEV) は蚊媒介性フラビウイルスの 1 種であり、アジア地域に広く分布している。ワクチンは国内外で認可されているが、特に途上国ではワクチン接種率が十分でなく、年間約 70,000 例ほどが発生し、20,000 例の死者があると推定されている。従って特異的治療薬の開発が期待されるが未だ実用化には至っていない。

JEV はプラス鎖 RNA をゲノムとして有す。同属のデングウイルスやウエストナイルウイルスはゲノム末端に 3 組の相補配列があり、ゲノム末端が結合することでゲノムの環状化が起こることが知られている<sup>1)</sup>。これらのウイルスではゲノム環状化がウイルス複製に必須であることも報告されているが、JEV ではゲノム環状化の形成に関する報告はない。一方で、デングウイルスやウエストナイルウイルスと JEV のゲノム構造を比較すると、ゲノム環状化に寄与する 3 組の相補配列は保存されており、それに加えて第 4 の相補配列があることも確認されることから、JEV ゲノムもこれら相補配列により環状化が起こり、ウイルス複製に関与することが期待された。

### 2. 研究の目的

JEV の詳細な複製機構を明らかにすることは、新たなメカニズムの特異的治療薬の開発に貢献するものと考えられることから、本研究では、JEV ゲノムの環状化形成の有無とその役割について明らかにすることを目的とした。

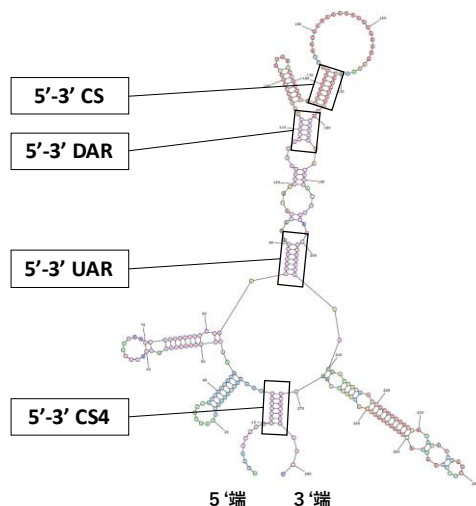


図 1. JEV ゲノム上の相補配列

JEV ゲノムの 5' 端 160 塩基と 3' 端 149 塩基を 20 塩基の A で結合したのについて二次構造予測し、環状化に関与する可能性のある相補配列 4 組を示す。

### 3. 研究の方法

#### (1) ルシフェラーゼ発現 JEV サブゲノミッ

#### クレプリコンの構築

研究代表者らが構築に成功した JEV 遺伝子型 V 型 (Muar 株) 由来サブゲノミックレプリコン<sup>2)</sup>を改変した (MuarfullCLucrep)。JEV ゲノム上に確認される相補配列は 4 組あり、それぞれ CS、DAR、UAR、CS4 とする (図 1)。MuarfullCLucrep のそれぞれの相補配列について変異を導入した。その際、5' 端あるいは 3' 端にのみ変異を導入し、相補性を喪失させたもの (MuarfullCLuc5' CSMut/MuarfullCLuc3' CSMut など) と両者に変異を導入し、元の配列と異なる配列を有するが相補性は維持するもの (MuarfullCLuc5' -3' CSMut など) を構築した。さらに DAR、UAR、CS4 領域は直鎖状ゲノム時にステムループ (SL) やショートヘアピン (SH) の形成に寄与しているため、これらの構造を維持する変異体、維持しない変異体を構築した (詳細は下記参照)。

#### (2) ゲルシフトアッセイ用 RNA 発現プラスミド構築

JEV ゲノム 5' 端 160 塩基または 3' 端 149 塩基を発現するプラスミドを構築し (Muar5' CSWT/Muar3' CSWT)、(1) で導入した変異をそれぞれ導入した (Muar5' CSMut/Muar3' CSMut など)。

#### (3) RNA 合成とエレクトロポレーション

上記 (1) および (2) で構築したプラスミドを *Sma*I 処理により直線化し、*In vitro* transcription により RNA を得た。合成した MuarfullCLuc RNA を哺乳類細胞である BHK 細胞、蚊細胞である C6/36 細胞にエレクトロポレーション法により導入し、経時的に細胞を溶解しルシフェラーゼアッセイにより、RNA 複製・タンパク翻訳能について評価した。

細胞内競合試験は、MuarfullCLuc 連続発現細胞に Muar5' CS あるいは Muar5' CSMut をエレクトロポレーション法により導入し、上と同様に経時的にルシフェラーゼアッセイを行った。

#### (4) ゲルシフトアッセイ

上記 (2) で構築したプラスミドから得られた RNA について、5' WT と 3' WT、5' WT と 3' Mut、5' Mut と 3' WT、5' Mut と 3' Mut の組み合わせで混合し、37°C または 28°C でインキュベート後、5% ポリアクリルアミド-グリセロールゲルを用いて電気泳動を行い (150V 2.5h)、RNA 断片の結合の有無を解析した。

### 4. 研究成果

#### (1) CS に関する検討

最初に CS 領域の RNA 複製・タンパク翻訳に及ぼす影響を解析するため、MuarfullCLuc、5' CSMut、3' CSMut、5' -3' CSMut の各レプリコンを BHK 細胞と C6/36 細胞に導入し、ルシフェラーゼ活性を経時的に測定した (図 2)。MuarfullCLuc は導入 1 時間後から活性が認められ、24 時間以降も活性の上昇が認められた。導入直後に認められるルシフェラーゼ活性

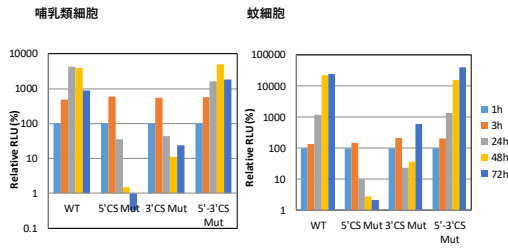


図 2. CS 領域の JEV ゲノム複製に及ぼす影響

は、導入したレプリコン RNA から翻訳されたルシフェラーゼによるもので、24 時間以降の上昇は細胞内で複製したレプリコン由来のルシフェラーゼ活性を反映している。MuarfullLuc5' CSmut または 3' CSMut レプリコンを導入すると、導入 3 時間後まではルシフェラーゼ活性を認めるが、その後は減少に転じる。これは、翻訳は起こるがレプリコンの細胞内複製が低下していることを示す。しかし、MuarfullLuc5' -3' CSMut レプリコンを導入すると、野生型レプリコンと同様に導入 24 時間以降の活性上昇が検出され、細胞内複製が進んでいることを示した。同様の結果が哺乳類細胞と蚊細胞で得られた。これらの結果より、CS 領域は効率的な RNA 複製に必要な領域であるが、5' 端と 3' 端の相補性が維持されていれば、その塩基配列は問わないことが明らかになった。

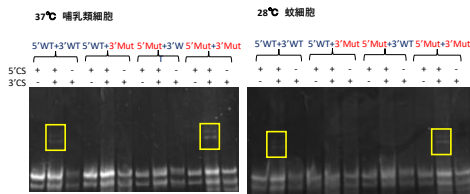


図 3. CS 領域の環状化への寄与

次に CS 領域を介したゲノム環状化が起こるかどうかを解析するため、Muar5' CSWT, 5' CSMut, 3' CSWT, 3' CSMutRNA を用いたゲルシフトアッセイを行った (図 3)。5' CSWT と 3' CSWT を混合すると、バンドの上方シフトが観察され、RNA-RNA 結合が確認された (図中黄色ボックスで示す)。しかし、どちらかに変異があるとその上方シフトは認められなくなり、変異体同士を混合すると WT 同士と同様のバンドの上方シフトが観察された。このことから、相補性さえ保存されていれば配列非依存的にゲノム末端同士の RNA-RNA 結合が起こることが示された。

また、実際に細胞内での RNA-RNA 結合を確認するため、MuarfullLuc レプリコン発現細胞を樹立し、この細胞に Muar5' CSWT または Muar5' CSMut を導入し、ルシフェラーゼ活性を測定したところ、Muar5' CSMut を導入する

よりも Muar5' CSWT を導入したときにルシフェラーゼ活性の低下が顕著であった (図 4)。この結果は導入された Muar5' CSWT が細胞内レプリコンのゲノムと結合し、競合的にゲノム環状化を阻害したものと考えられる。

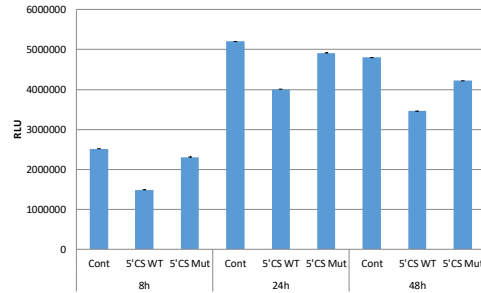


図 4. 細胞内競合試験

以上の検討により、相補性依存的に CS 領域を介して JEV ゲノムが環状化し、ゲノム環状化は効率的な RNA 複製に必要であることが明らかになった。

#### (2) CS4 に関する検討

CS4 は他のフラビウイルスでは確認されない相補配列である。この CS4 のゲノム複製における影響を確認した。3' CS4 は直鎖状ゲノムでは SL 形成に関わっていることから、変異体は SL を維持するもの (3' CS4Mut) とステムループを破壊するもの (3' CS4SLMut) を作製した。

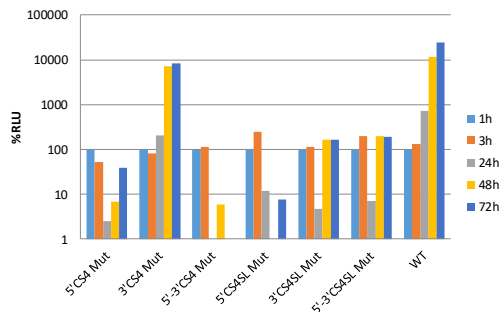


図 5. CS4 領域の JEV ゲノム複製に及ぼす影響

CS 領域と同様に RNA 複製・タンパク翻訳を解析したところ (図 5; 哺乳類細胞の結果のみ示す)、5' CS4 領域の配列および 3' 端ステムループ構造が効率的な RNA 複製に重要で

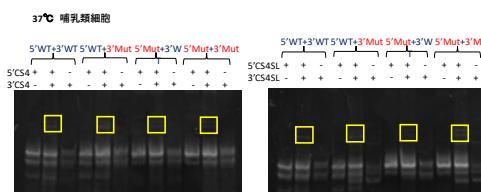


図 6. CS4 領域の環状化への寄与

あること、CS4 領域の相補性は必要ないことが示された。ゲルシフトアッセイでは、いずれの組み合わせでもバンドの上方シフトが観察された (図 6; 37°Cでの結果のみ示す。バンド上方シフトは図中黄色ボックスで示す)。この結果は CS4 領域がゲノム環状化に寄与しないことを示す。

### (3) DARに関する検討

DAR 領域はデングウイルスやウエストナイルウイルスにおいて複製に関与することが報告されている領域で、直鎖状ゲノム時には SH 構造形成に関わっている。従って、本領域の変異体は、SH 構造を破壊するもの (3' DARMut、3' SHMut) と SH 構造を維持するもの (3' DAR-SHMut) を作製した。

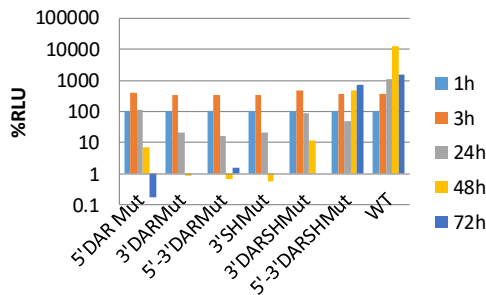


図 7. DAR 領域の JEV ゲノム複製に及ぼす影響

RNA 複製・タンパク翻訳について解析したところ (図 7; 哺乳類細胞の結果のみ示す)、5' -3' DAR-SHMut でのみレプリコン RNA の複製が観察された。この結果は、DAR 領域は SH 構造形成能および 5' 端-3' 端の相補性が RNA 複製に重要であるが、片方では不十分で、SH 構造形成能と相補性両者を有している必要があることが示された。またゲルシフトアッセイによるゲノム環状化への寄与の検討では、SH 構造を破壊すると、バンドの上方シフトが観察されなかった (図 8; 37°Cの結果のみ示す。バンド上方シフトは図中黄色ボックスで示す)。これらの結果は RNA の複製には DAR 領域の SH 構造形成能および 5' 端-3' 端の相補性が重要であるがゲノム環状化に対しては SH 構造の形成のみが必須であることを示している。

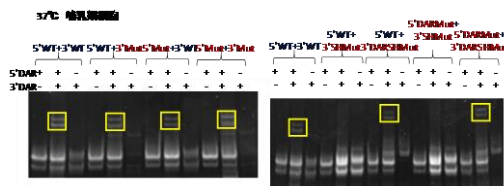


図 8. DAR 領域の環状化への寄与

### (4) UARに関する検討

UAR 領域も DAR 領域と同様に他のフラビウイルスではゲノム複製に関わる領域として

知られている。直鎖状ゲノム時には 3' SL 構造の形成に寄与していることから、変異体は SL 構造を破壊するもの (UARMut) と維持するもの (3' SLMut、5' -3' UARSLMut) を作製した。

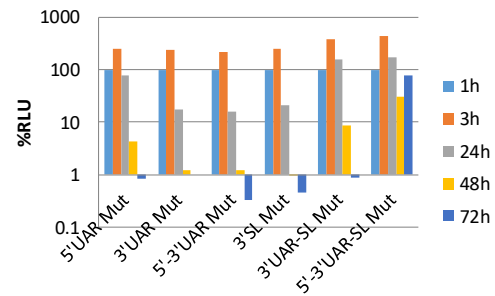


図 9. UAR 領域の JEV ゲノム複製に及ぼす影響

RNA 複製・タンパク翻訳について解析したところ、ほとんどの変異体で複製は認められなかった (図 9; 哺乳類細胞の結果のみ示す)。MuarfullC5' -3' UARSLMut でのみ非常に弱い複製が認められた。この結果は UAR 領域については相補性・SL 構造の形成に加えて、UAR 領域の塩基配列自身も RNA 複製に多大な貢献をしていることが示唆された。次にゲノム環状化への寄与に関して解析するため、ゲルシフトアッセイを行った (図 10; 37°Cの結果のみ示す。バンド上方シフトは図中黄色ボックスで示す)。いずれの組み合わせについてもバンドの上方シフトが観察されたことから、UAR 領域はゲノム環状化には寄与していないことが示された。

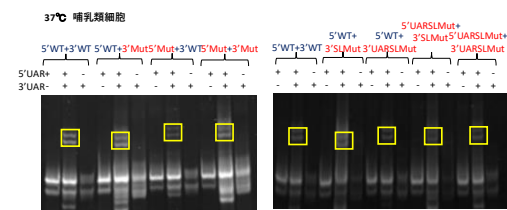


図 10. UAR 領域の環状化への寄与

### (5) 総括

本研究課題では JEV ゲノム中にある 4 組の相補配列についてウイルス複製ならびにゲノム環状化に対する影響を解析した。RNA 複製については、CS 領域の相補性、5' CS4 領域の塩基配列、3' SL 構造の形成能、3' DAR 領域の相補性と SH 構造形成能、UAR 領域の塩基配列と相補性が貢献することが明らかになった。また、ゲノム環状化については、CS4 および UAR 領域の関与は低く、CS 領域と 3' DAR 領域の SH 構造の形成が重要であることが明らかになった。また、CS 以外の検討結果は哺乳類細胞についての解析結果を示しているが、すべての相補配列の機能について哺乳類細胞と蚊細胞で同様の結果が得られ

ている。これらのことから、JEV ゲノム両端に認められる4組の相補配列はすべてRNA複製に必要であるが、それらは必ずしも環状型ゲノムの形成能と一致する訳ではないこと、そしてその機能は哺乳類細胞と蚊細胞において保存されていることが示された。従って、本研究課題において得られたJEVゲノム上にある相補配列群のウイルス複製・ゲノム環状化に関する知見は、JEV 特異的治療薬の開発に貢献できるものであると考えられる。

#### (6) 参考文献

1. Ng WC, Soto-Acosta R, Bradrick SS, Garcia-Blanco MA, Ooi EE. The 5' and 3' Untranslated Regions of the Flaviviral Genome. *Viruses*. 2017;9(6). pii: E137

2. Ishikawa T, Abe M, Masuda M. Construction of an infectious molecular clone of Japanese encephalitis virus genotype V and its derivative subgenomic replicon capable of expressing a foreign gene. *Virus Res* 2015;195:153-161.

#### 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件)

- ① Tabata K, Arimoto M, Arakawa M, Nara A, Saito K, Omori H, Arai A, Ishikawa T, Konishi E, Suzuki R, Matsuura Y, Morita E. Unique Requirement for ESCRT Factors in Flavivirus Particle Formation on the Endoplasmic Reticulum. *Cell Rep* 2016;16(9): 2339 - 47. 査読あり。
- ② Ishikawa T and Konishi E. Potential chemotherapeutic targets for Japanese encephalitis: current status of antiviral drug development and future challenges. *Expert Opin Ther Targets* 2015;19(10):1379-95. 査読あり。
- ③ Ishikawa T, Abe M, Masuda M. Construction of an infectious molecular clone of Japanese encephalitis virus genotype V and its derivative subgenomic replicon capable of expressing a foreign gene. *Virus Res* 2015;195:153-61. 査読あり。

[学会発表] (計 7件)

- ① 本荘 せいら、増田 道明、石川 知弘 : 日本への侵入が懸念されるV型日本脳炎ウイルスに対するワクチン開発に向けて、第54回日本臨床生化学会総会、宇都宮(2017)
- ② Tomohiro Ishikawa, Sarah Honjo, Michiaki Masuda : Immunogenicity of the current Japanese encephalitis virus vaccine against recent genotype V strains、第65回日本ウイルス学会学術

集会、大阪(2017)。

- ③ 本荘 せいら、増田 道明、石川 知弘 : 最近分離された遺伝子型V型に対する現行日本脳炎ワクチンの免疫原性、第52回日本脳炎ウイルス生態学研究会、那覇(2017)。
- ④ Tomohiro Ishikawa, Sarah Honjo, Michiaki Masuda : Complementary sequences in the terminal regions of Japanese encephalitis virus genome play an essential role in viral RNA replication. 第64回日本ウイルス学会学術集会、札幌(2016)。
- ⑤ 石川 知弘、本荘 せいら、増田 道明 : 日本脳炎ウイルスゲノムの環状化配列がウイルス複製に及ぼす影響、第51回日本脳炎ウイルス生態学研究会、猪苗代(2016)。
- ⑥ Tomohiro Ishikawa, Takayuki Matsui, Michiaki Masuda : Development of novel virus-like particles useful for flavivirus studies、第63回日本ウイルス学会学術集会、福岡(2015)。
- ⑦ 石川 知弘、松井 隆之、増田 道明 : 外来遺伝子を発現する日本脳炎ウイルスレプリコンの構築とその応用、第50回日本脳炎ウイルス生態学研究会、京都(2015)。

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

○取得状況 (計 0件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

[その他]  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

石川 知弘 (Ishikawa, Tomohiro)  
獨協医科大学・医学部・助教

研究者番号：40609327

(2) 研究分担者 ( )

研究者番号：

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号：

(4) 研究協力者 ( )