

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K21152

研究課題名(和文) 遺伝子組換えイバラキウイルスを用いた二本鎖RNAウイルス感染・複製機序の解明

研究課題名(英文) Reverse genetics system for Ibaraki virus reveals the mechanisms of double-stranded virus replication

研究代表者

松尾 栄子 (MATSUO, EIKO)

神戸大学・農学研究科・助教

研究者番号：40620878

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：レオウイルス科オルビウイルス属流行性出血熱ウイルス群に属するイバラキウイルス(IBAV)は、10分節の二本鎖RNAをゲノムに持つ。本研究では、先行研究および同属ウイルスの研究を基に、様々な蛍光標識IBAVを作製し、細胞へのIBAVの吸着・侵入過程を可視化・数値化した。また、新たに遺伝子操作系を構築した。さらに、IBAVの複製が抑制されている細胞株における、IBAV抑制機構について調べたところ、侵入過程での抑制は起こっておらず、ウイルスタンパク合成過程、特に、翻訳開始時での抑制が起こっている可能性を示唆する結果を得た。また、オートファジーのIBAV複製への関与を示唆する結果も得ることができた。

研究成果の概要(英文)：Ibaraki virus (IBAV) is a member of the epizootic hemorrhagic disease virus serogroup, which belongs to the Orbivirus genus of the Reoviridae family. Although EHDV infection in cattle is subclinical in most cases, EHDV, including IBAV, is still an ongoing threat to livestock in the world. Recently we developed reverse genetics system (RG) for IBAV, to clarify the molecular mechanism of orbivirus replication. In addition, we found several cell lines, in which, the replication of IBAV was suppressed. Here, we newly developed plasmid-based RG for IBAV to produce fluorescent-labeled IBAV (FL-IBAV). Using FL-IBAV, IBAV binding to host-cells was visualized and the binding ability of IBAV was quantified. In addition, together with previous studies, we demonstrated that the suppression of IBAV replication in the several cell lines was likely to occur after transcription step, not entry step. Further, we tried to reveal the involvement of autophagy in the enhancement of IBAV replication.

研究分野：分子ウイルス学

キーワード：二本鎖RNAウイルス

1. 研究開始当初の背景

イバラキ病は 1959 年日本で初めて報告された嚥下障害を主徴とする牛の感染症（致死率~20%）で、家畜伝染病予防法の届出伝染病である。その原因ウイルスであるイバラキウイルス (Ibaraki virus, IBAV) は茨城県下の発病牛から最初に分離された。2000 年を最後にイバラキ病の発生はしばらく途絶えていたが、2013 年に、鹿児島で 2 頭の発症が確認されている。加えて、ほぼ毎年、感染モニタリング用の「おとり牛」での IBAV 抗体の陽転が確認されており、今後もアウトブレイクが起こる可能性は否定できない。

IBAV は、レオウイルス科、オルビウイルス属、流行性出血病ウイルス (EHDV) 群に属する。ウイルス粒子はエンベロープを持たない 2 層のカシド構造で、10 分節の二本鎖 RNA (dsRNA) ゲノムと 7 種類の構造タンパク質から構成されている (図 1, 2)。また、感染細胞内では 4 種類の非構造タンパク質を発現する。

IBAV が属するレオウイルス科のウイルスでは、レセプター依存性エンドサイトーシスで粒子がエンドソームに取り込まれた後、外殻がエンドソーム膜と融合し、細胞内に core 粒子が放出される。その後、放出された core 粒子から mRNA が合成され、子孫ウイルスの複製が始まる。また、ウイルスの産生量を増やすため、初期複製機構という特殊な機構が存在すると考えられている。しかし、その詳細な感染・複製機序については、国内外を通じてほとんど解明されていない。

現在、ウイルスの宿主への吸着や侵入に関しては、オルソレオウイルス属で、JAM-A (Junctional adhesion molecule-A) とシアル酸がウイルスレセプターとして同定され、さらに、感染組織や、血清型によって吸着機序が異なることが分かっている。一方、オルビウイルス属では、IBAV の近縁種であるブルータングウイルス (BTV) でシアル酸とクラスリンの関与が分かっているのみである。また、ウイルス複製に関しては、特定の変異を導入した感染性ウイルス粒子を効率よく作出できる遺伝子操作系 (RG システム) の開発により、特に、BTV などのオルビウイルス属において、申請者も中心となり詳細な複製機序の解析が始められている。

ウイルスの感染・複製機序の解明の手段として、ウイルスタンパク質の機能解析などのウイルス側の要因を探索する方法と、ウイルスの宿主特異性や、組織特異性に着目し、宿主側の感染因子を探索する方法がある。申請者はこれまで、オルビウイルスでの RG システムの開発、改良を行うとともに、主にウイルス側の要因を探索してきた。しかし、感染・複製機序の全容解明のためには宿主側の要因の探索も必要不可欠

である。

IBAV で RG システムを開発する過程において、これまで株化細胞系では細胞向性がないと考えられていた IBAV が増殖出来ない培養細胞株数種 (IBAV replication-deficient 細胞, IRD 細胞) が発見された。また、IBAV の IRD 細胞での増殖阻止は、細胞侵入・脱殻過程と、IBAV mRNA のタンパク質への翻訳過程の両方で起こる可能性を示す結果を得た。さらに、IBAV での RG システムの構築に成功し、BTV と IBAV で複製に不要な領域が構造タンパク質 VP6 に存在することを初めて発見した。この不要な領域を利用して、感染細胞でウイルス粒子ならびにウイルスタンパク質 (VP6) の動態を可視化できる遺伝子組換え IBAV (TC-IBAV) をはじめ、様々なマーカー遺伝子や、変異を組込んだ VP6 遺伝子 (S9) をもつ IBAV を作製することが可能となった。また、致死変異を組込んだ IBAV の複製を助けるため、機能的 IBAV タンパク質を恒常的に発現するヘルパー細胞を作製し、VP6 に致死変異のアミノ酸変異を挿入した複製能欠損 IBAV を作製することが可能となった。

2. 研究の目的

本研究では、BTV などのオルビウイルスの研究で得た知見を基に作製した TC-IBAV などの遺伝子組換え IBAV を用い、IBAV 感染時におけるウイルスおよび宿主因子の動態を、BHK-21 細胞 (ハムスター腎臓細胞) などの IBAV 感染により CPE (細胞変成効果) を起こす細胞種株と、IRD 細胞で比較し、IBAV の感染・複製機序を解明する。さらに、新規予防法および治療法の確立に向け、dsRNA ウイルスの病原性決定機序の解明をさらに大きく推し進めていく。

3. 研究の方法

(1) 様々な標識・マーカー分子付きの IBAV の作製と評価

IBAV の侵入機構の解明のため、外殻や内殻を標識した IBAV (Fluo-IBAV) を作製し、その増殖性やマーカー遺伝子の安定性等を評価した。

(2) Fluo-IBAV の BHK-21 細胞および IRD 細胞への侵入機序の可視化

(1) で作製された Fluo-IBAV の内、最も標識効率が良いものを用いた FACS 解析により BHK-21 細胞および IRD 細胞への IBAV の吸着・侵入率を定量した。また、BHK-21 細胞における Fluo-IBAV の動態を解析した。

(3) Plasmid-based RG システムの開発より効率良く遺伝子組換え IBAV を作製するために、オルソレオウイルスで開発されている Plasmid-based RG システムを参考に、IBAV の Plasmid-based RG システ

ムを開発した。

(4) 宿主細胞での IBAV タンパク質合成阻害機構の解明

IBAV ゲノムの非翻訳領域のウイルスタンパク質合成阻害への関与を調べた。また、主要な翻訳開始因子(の発現変化)について調べた。

(5) IBAV 感染における宿主細胞のウイルス排除機構の解明

オートファジーなど異物排除機構に関連する因子の感染細胞における経時変化を BHK-21 細胞および IRD 細胞を用いて調べた。また、Fluo-IBAV を用いて、感染細胞内での接種 IBAV の残留期間について調べた。

4. 研究成果

(1) IBAV の複製機構の中でも特に、吸着~脱殻の過程を可視化するため、外殻および内殻を片方もしくは両方とも標識した IBAV の作製を試みた。まず、テトラシステインタグ (TC-tag) を組込んだ VP6 (TC-VP6) をもつ TC-IBAV (論文②、学会発表⑤) の外殻 (VP2) に存在するシステインと、粒子内部の TC-VP6 をそれぞれ異なる波長の蛍光色素で標識する方法を試したが、内部の TC-VP6 を標識することはできなかった。

次に、蛍光タンパク質遺伝子を組込んだ VP6 をもつ遺伝子組換え IBAV の外殻に存在するシステインを、組込んだ蛍光タンパク質とは波長の異なる蛍光色素で標識する方法を用いて、IBAV 粒子の外殻を赤色、内殻の VP6 を緑色蛍光色素で標識することが出来た (DFluo-IBAV)。しかし、VP6 遺伝子に、組込んだ蛍光遺伝子は安定性が低く、ウイルスの継代によってその遺伝子を欠失してしまうことが分かった (学会発表①他)。そこで、先行研究によって明らかとなった VP6 の VP3 結合領域 (論文①、学会発表②他) を欠損させた変異 IBAV を、蛍光タンパク質を組込んだ機能的な VP6

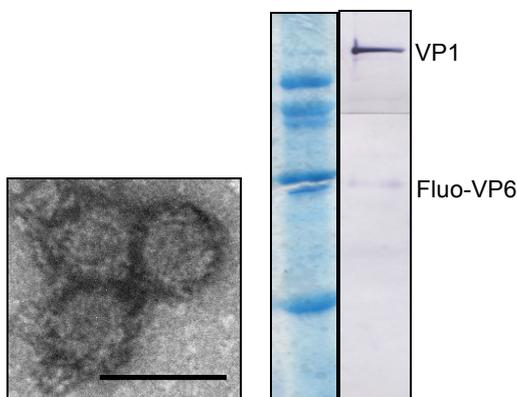


図1. 精製 Fluo-IBAV 粒子の電子顕微鏡像(左)および粒子中の Fluo-VP6 および VP1 タンパク質の検出(右)

(Fluo-VP6) を恒常的に発現するヘルパー細胞で増殖させたところ、Fluo-VP6 を IBAV 粒子中に取り込ませることに成功した (Fluo-IBAV) (図1、学会発表①他)。また、Fluo-IBAV の外殻を別の蛍光色素で標識することで、DFluo-IBAV を作製できた。

(2) Fluo-IBAV を用いて、細胞への吸着を可視化する (図2) とともに、FACS 解析により吸着率を定量する方法を構築した (学会発表①他)。この方法を用いて、

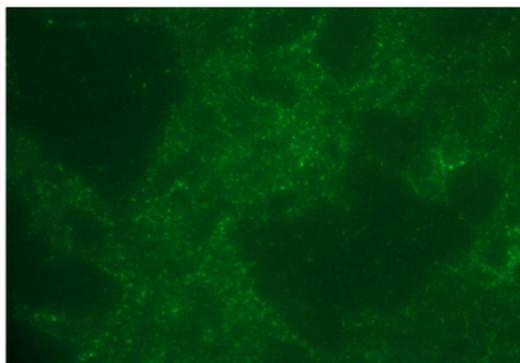


図2. Fluo-IBAV 吸着細胞の蛍光顕微鏡像

BHK-21 細胞と IRD 細胞への IBAV の吸着・侵入率を数値化して比較したところ、従来の顕微鏡観察結果とは異なり、IBAV の BHK-21 細胞と IRD 細胞への吸着・侵入率に優位な差がないことが明らかとなった (学会発表④他)。先行研究の結果と合わせ、IRD 細胞での IBAV 増殖阻止は、細胞侵入脱殻以降、恐らく IBAV タンパク質合成過程で起こることが明らかとなった (学会発表④他)。

(3) 効率よく遺伝子改変 IBAV を作製するため、完全な plasmid-base の IBAV RG システムを開発した。これまでは、IBAV コア粒子を用いて人工合成した core mRNA と、T7 ベクターから人工合成した変異 T7ssRNA とのリアソータント法を用いて変異ウイルスを作製していたが、plaque purification によって目的の変異体を得るために、時間がかかっていた。そこで、他のオルビウイルスで報告されているような、全 IBAV RNA を T7 ベクターから人工合成して用いる RG システムを目指していたが、効率が悪く、成功しなかった。しかし今回、オルソレオウイルスで用いられている方法を参考に、IBAV RNA を人工合成せずに、T7 ポリメラーゼ発現ベクターを予め導入した細胞に T7 ベクターを導入し、細胞内で IBAV RNA を作らせる方法で、遺伝子改変 IBAV を作出することに成功した (学会発表①他)。ウイルス自体の作製効率は、core mRNA を用いたときよりも悪いが、確実に変異体のみを作製することができ、かつ、plaque purification や RNA の合成をする必要がないため、安価で迅速な変異ウイル

ス作製が可能になった。

現在、Plasmid-based IBAV RG システムを用いて、より汎用性の高い Fluo-IBAV の作製を行っている。

(4) IRD 細胞における VP6 以外の IBAV タンパク質の発現を調べたところ、VP1、VP4、VP3 および NS2 の発現も抑制されていることが明らかとなった。さらに、この抑制が、IBAV mRNA の両端と、宿主因子とで構成される翻訳複合体の形成不全によって起こる可能性を検証するため、VP6 の翻訳領域のみを CAG プロモーターで強制的に発現させたところ、BHK-21 細胞と IRD 細胞での発現効率に優位な差は見られなかった。よって、IRD 細胞における IBAV タンパク質の発現抑制には、IBAV ゲノムの非翻訳領域が関与していることが示唆された(学会発表④他)。

また、翻訳開始因子の一つである eIF2 α の感染後の発現をウエスタンブロットで確認したところ、IRD 細胞において発現量が増加傾向にあった。今後、eIF2 α mRNA 発現量や、経時的变化、ならびにリン酸化について詳細に検討を行う予定である。

(5) まず、IBAV 感染と、オートファジーの関連を明らかにするため、BHK-21 細胞を用いて、IBAV 感染によるオートファジー関連因子の動態を解析した。オートファジーマーカーである LC3 の発現を、IBAV 感染細胞と非感染細胞で比較したところ、非感染 BHK-21 細胞では、主に LC3-I が検出された。感染細胞では、非感染細胞と比べ、経時的に LC3-I の発現が減少したが、LC3-II の増加は顕著ではなかった(学会発表③)。また、オートファジーマーカー阻害剤であるクロロキンで細胞を処理したところ、IBAV の複製が抑制され、LC3-I、LC3-II 両方の発現量が増加した。さらに、クロロキン処理した感染細胞内では、LC3 の集積が確認された。以上より、IBAV 感染によって、オートファジーが誘導され、IBAV 複製を促進していることが示唆された。次に、IRD 細胞を用いて、同様の実験を行ったところ、同様の傾向が見られた。しかし、IRD 細胞では、BHK-21 細胞に比べて、LC3 の発現が非常に低いことが分かった。よって、IRD 細胞ではオートファジー関連因子の発現が弱いため、IBAV が、オートファジーの機能を有効に用いることができない可能性がある。

最後に、DFluo-IBAV を用いた感染実験において、感染細胞で Fluo-VP6 と LC3 がそれぞれ特徴的な分布をすることが分かった(学会発表③)。現在、電子顕微鏡観察等を用いて、この分布が IBAV 感染にどう関与しているかを解析中である。

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 2 件)

- ① Eiko Matsuo, Kiyoshi Yamazaki, Hiroki Tsuruta & Polly Roy*, “Interaction between a unique minor protein and a major capsid protein of Bluetongue virus controls virus infectivity”, *Journal of Virology*, 査読有, 92 巻, e01784-17, 2018 年.
- ② Eiko Matsuo, Keiichi Saeki, Polly Roy and Junichi Kawano, “Development of reverse genetics for Ibaraki Virus to produce viable VP6-tagged IBAV” *FEBS Open Bio*, 査読有, 5 巻, p445-53, 2015 年.

[学会発表] (計 19 件)

- ① Eiko Matsuo, Marina Hamaji, Hiroko Omori, Tsuji Hideyuki, Akari Saito, Polly Roy, Keiichi Saeki, Takeshi Kobayashi and Junichi Kawano, “Further analysis of Ibaraki virus VP6 to produce fluorescence-labeled orbiviruses” 13th International dsRNA Virus Symposium, 2018, 9.24-28, Houffalize (Belgium)
- ② Eiko Matsuo, Kiyoshi Yamazaki, Hiroki Tsuruta & Polly Roy*, “Interaction between a unique minor protein and a major capsid protein of Bluetongue virus controls virus infectivity” 9th International Virus Assembly Symposium, 2018, 5.6-10, Madeira (Portugal)
- ③ 松尾 栄子, 「イバラキウイルスとオートファジー」第 160 回 日本獣医学会学術集会, 2017, 9.14, 鹿児島大学 (鹿児島)
- ④ 濱治 麻理奈, 佐伯 圭一, 河野 潤一, 松尾 栄子, 「マウス肝細胞におけるイバラキウイルス (IBAV) 増殖抑制に関する研究」第 65 回日本ウイルス学会学術集会, 2017, 10.24-26, 大阪国際会議場 (大阪)
- ⑤ Eiko Matsuo, Keiichi Saeki, Polly Roy and Junichi Kawano, “Development of reverse genetics for Ibaraki Virus to produce viable VP6-tagged IBAV” 12th International dsRNA Virus Symposium, 2015. 10.6-10, Goa (India)

[その他]

ホームページ等

神戸大学農学部インターゲノミクス研究会
<http://www.research.kobe-u.ac.jp/ans-intergenomics/researcher.html>

神戸大学大学院農学研究科

<http://www.ans.kobe-u.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松尾 栄子 (MATSUO EIKO)

神戸大学・大学院農学研究科・助教

研究者番号：40620878

(2) 研究協力者

Polly Roy (POLLY ROY)
London School of Hygiene & Tropical
Medicine (United Kingdom) • 教授