

令和 2 年 6 月 24 日現在

機関番号：14501  
 研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）  
 研究期間：2016～2019  
 課題番号：15KK0281  
 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（国際共同研究強化）  
 研究課題名（英文）Analysis of double-strand RNA virus replication(Fostering Joint International Research)  
 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） 9,900,000円  
 渡航期間：15.7ヶ月

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、IBAVの複製機構や病原性発揮機序に関する知見が、IBAVに特有なものを明らかにするため、IBAVと他のオルビウイルス属のウイルスを比較した。レオウイルス科でもオルビウイルス属に特有の構造タンパク質VP6の機能については、オルビウイルスで共通している点が多かったが、マウス由来細胞における顕著な増殖抑制は、ヌカカが媒介するオルビウイルスでのみ起こることが示唆された。また、オルビウイルスは共感染時、タンパク質レベルでの自己認識が曖昧であることが示唆された。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、同属他種のウイルスを、全く同じ条件で同時に比較した論文は少ない。また、同種の異なる株のウイルスの共感染時に細胞内で起こる現象については報告があるが、同属異種のウイルスが共感染した時に何が起きているかについて、その分子機構を調べた報告はない。二本鎖RNAウイルスは医学的・獣医学的領域で重要なものも多にも関わらず、その分子生物学的発見はやや後進的とみられることがあるが、本研究で得られた知見には完全に新規の発見が含まれている。また、本研究成果は、治療法やワクチン開発にも大いに貢献できると期待され、学術的だけでなく社会的にも非常に意義があると考えられる。

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. Previously, we developed reverse genetics system (RG) for IBAV, to clarify the molecular mechanism of orbivirus replication. We also found several cell lines, in which, the replication of IBAV was suppressed. Here, using newly developed plasmid-based RG for two other orbiviruses, bluetongue virus (BTV) and Muko virus (MUV), fluorescent-labeled (FL-) BTV and MUV were generated. Co-infection assay using FL-BTV and FL-MUV together with FL-IBAV revealed the fuzzy self-recognition mechanisms in virus inclusion body. In addition, we demonstrated that some mechanisms of a unique protein, VP6, were shared among orbiviruses. Further, the replication of midge-borne orbiviruses, not tick-borne virus, was likely to be suppressed in several cell lines. We also tried to reveal VP6 structure using Cryo-EM technique, which was unfortunately failed.

研究分野：分子ウイルス学

キーワード：二本鎖RNAウイルス 遺伝子改良法 VP6 ウイルス封入体

## 1. 研究開始当初の背景

二本鎖 RNA (dsRNA) をゲノムとして持つイバラキウイルス (IBAV) は、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 (EHDV) 群に属する。IBAV が病因であるイバラキ病は 1959 年日本で初めて報告された嚙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。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 年に鹿児島において 2 頭のイバラキ病発症が確認され、2015 年には兵庫県下で、EHDV 血清型 6 が病因の「イバラキ病様疾病」による死産が確認されている。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、IBAV や EHDV のアウトブレイクが起こる可能性は否定できない。

ウイルス性疾患の予防や治療には宿主内でウイルスがどのように増殖するかを知る必要がある。しかし、IBAV をはじめ、多くのオルビウイルス属のウイルスについて分子生物学的な感染・複製機序はほとんど解明されていない。我々はこれまで IBAV で樹立した遺伝子操作系 (RG) を用いて、IBAV の感染・複製機序の解明を進めてきた。しかし、これまで得られた知見をさらに発展させ、最終目標である、「新規予防法および治療法の確立」に向け、dsRNA ウイルスの特異性や病原性決定機序を解明するためには、IBAV で得られた知見が、「IBAV 特有なものなのか」、「オルビウイルスに特有なものなのか」それとも「dsRNA ウイルスに共通するものか」を明らかにする必要がある。そのため、異なる dsRNA ウイルスを用いた比較実験が必要となる。

## 2. 研究の目的

本研究では、新規予防法および治療法の確立に向け、まず、オルビウイルスのみがもつ、ユニークな構造タンパク質であり、「オルビウイルスの複製に必須である」VP6 に着目し、「何故、他の dsRNA ウイルスには VP6 ないのか」を明らかにするため、ウイルス感染・複製時におけるオルビウイルス VP6 の詳細な機能を分子生物学的手法ならびに構造学的手法を用いて明らかにすることで、dsRNA ウイルスの特異性や病原性決定機序の解明を目指す。さらに、先行研究で明らかになった「マウス由来細胞における IBAV の増殖抑制と、再感染による増殖抑制解除および IBAV の持続感染化」が、IBAV を含むオルビウイルス属のウイルスに共通した現象であるかを、IBAV とは病原性を発揮する宿主動物や感染時の毒力が異なるオルビウイルスを用いて調べることで、「宿主側のウイルス種特異的防御機構」について調べる。

## 3. 研究の方法

### (1) 遺伝子組換えオルビウイルスの作製と評価

VP6 に存在する「複製に不要な領域」に、様々なマーカー遺伝子を挿入した「機能的な VP6」を持つ遺伝子組換えウイルスならびに、「ゲノムの取り込み能のみを欠損した VP6」を持つ遺伝子組換えウイルスなどを、IBAV の他に、アフリカ馬疫ウイルス (AHSV) およびブルータンクウイルス (BTV) で作製し、その増殖性やマーカー遺伝子の安定性を評価した。

### (2) VP6 の VP3 結合能の解析

先行研究によって明らかとなった VP6 と VP3 の結合性について、IBAV, BTV, AHSV を用いて、共免疫沈降法によるタンパク同士の結合性や、結合領域変異ウイルスの感染細胞での機能性を解析した。

### (3) VP6 のループ領域の解析

先行研究によって明らかとなった VP6 のループ領域について、IBAV, BTV, AHSV のキメラウイルスを用いて解析した。

### (4) ウイルス粒子中の VP6 の局在解析

構造を維持したまま、ゲノムの取り込み機能のみを欠損した VP6 を取り込んだウイルスを作製し、クライオ電子顕微鏡 (cryo-EM) を用いて、ウイルス粒子中の VP6 の局在および構造を解析した。

### (5) 感染細胞中の VP6 の可視化と同属異種ウイルス共感染実験

(1) で作製された蛍光標識オルビウイルスを、BHK-21 細胞等に感染させ、VP6 の動きを蛍光顕微鏡で解析した。また、ウイルス共感染蛍光標識オルビウイルスを共感染させ、感染細胞内の各ウイルスタンパク質の局在を蛍光顕微鏡で解析した。

### (6) マウス由来細胞におけるオルビウイルス複製抑制能の解析

マウス肝臓細胞 (NMuLi) における BTV, AHSV の複製能力をブランクアッセイによってウイルス力価を測定することで調べるとともに、ウイルスタンパク発現を調べた。

## 4. 研究成果

(1) 効率よく遺伝子改変ウイルスを作製するために IBAV だけでなく、BTV についても plasmid-base RG を新たに樹立した (2018 年 13th International dsRNA Virus Symposium にて発表、投稿準備中)。AHSV についても樹立を試みたが、外殻タンパク質をコードする S2 分節の T7 plasmid の作製がうまくいかず、AHSV については従来通りの RNA-base RG を用いることにした。また、BTV, AHSV, IBAV は、全てヌカカが媒介するオルビウイルス だが、オルビウイルス属間での比較には、ベクターが異なるウイルスも必要と考え、2015 年に兵庫県下で採取されたダニ (アカコッコマダニ) から分離されたオルビウイルス、ムコウイルス (MUV) についても plasmid-base

RGを樹立した(2019年第162回 日本獣医学会学術集会にて発表、投稿準備中)。これらの系を用いて、IBAVおよびBTV、MUVのVP6の「複製不要領域」に赤色蛍光タンパク質mCherryおよび緑色蛍光タンパク質EGFPやUnaGを挿入した蛍光標識オルビウイルスを作製した(2019年第67回日本ウイルス学会学術集会にて発表、投稿準備中)。いずれの蛍光タンパク質も挿入可能であったが、mCherry遺伝子は不安定であり、継代によってウイルスゲノムから切り出されやすいことがわかった。一方、緑色蛍光タンパク質遺伝子は比較的安定しており、特にニホンウナギのピリンピンセンサーであるUnaG遺伝子は、継代が10代を超えても安定していた(2019年第162回 日本獣医学会学術集会にて発表、投稿準備中)。また、VP6のループ領域や、VP3結合領域に変異を入れたウイルスを作製した。蛍光標識AHSVは英国London School of Hygiene & Tropical Medicine (LSHTM)の施設が渡航中に急に使用できなくなったため、作製することができなかった。

(2) 免疫沈降法を用いた結合試験によってBTVとIBAVのVP6のVP3結合領域を決定した。VP3結合領域のアミノ酸配列は、BTV、IBAV共にRATAYFであり、YとFが特に結合に重要であることがわかった(引用文献)。AHSVとMUVにおける相同領域の配列はそれぞれRAKAMFとQAHILFでありアミノ酸は異なっていたが、二次構造予想ではいずれもベータシート構造をしていることがわかった。また、BTV、IBAV、MUVのVP6はいずれもVP3と結合することから、VP3とVP6の結合はオルビウイルスに共通した特徴であることが示唆された。この結合が、どのような役割を果たしているかを調べるため、BTVとIBAVでVP3結合領域に変異を入れたウイルスを作製し、性状解析を行った。BTVでは、R、Y、Fを全てAに置換した場合、「ウイルス複製が起こらない」こと、「変異VP6は、感染細胞内で粒子形成の場であるウイルス封入体(VIB)へ移行出来ない(図1)」こと、「変異VP6やウイルスゲノムだけでなく、VP1およびVP4も粒子中には取り込まれず中空粒子になる(図2)」ことが明らかになった。また、変異BTVを野生型VP6(VP6 wt)恒常発現細胞(BSR-VP6)に感染させると、多くの中空粒子が出来ることがわかった。先行研究で作製したVP6の大部分を欠損したVP6欠損変異BTVをBSR-VP6に感染させた場合は、このような中空粒子は、観察されなかった。よって、アミノ酸変異によってVP3結合能力のみを欠損させたVP6は、他の機能・構造は維持しているため、VP6 wtと競合したことが示唆された(引用文献)。

IBAVのVP3結合領域変異体においても似た結果が得られた。AHSVについては英国LSHTMの施設が緊急の整備のため使えなかった時があったため、十分に解析できなかったが、MUVでは、少なくともQAHILFを全て欠損させると、複製能力を失うことが確認された。

異種間のVP6とVP3が結合するかを調べたところ、BTVとIBAVでは異種間での結合が可能であったが、MUVとIBAV、BTVでは結合力が弱まった。また、AHSVのVP3結合モチーフがRXXXMFであるため、IBAVVP6の結合領域のYをMに置換したところ、VP3の結合能やウイルス複製能は維持されていたため、AHSVとIBAV、BTVでも異種間での結合が可能であることが示唆された(2016年第69回 日本細菌学会関西支部総会にて発表、投稿準備中)。

(3) VP6のループ領域について、AHSV、IBAV、BTV、MUVで比較したところ、ウイルス種間でループ領域のアミノ酸相同性は低かったが、荷電されたアミノ酸が多く存在していることが明らかとなった。VP3結合領域に変異を入れ、複製能力を欠損したウイルスを異種のVP6を発現した細胞に感染させても複製能力を補完することは出来ず、ウイルス粒子中に、異種のVP6は取り込まれるが、ウイルスRNAは取り込まれなかった。そこで、ループ領域の多様性が、ウイルスゲノムの選択的取り込みに関与している可能性を調べるため、IBAV VP6のループ領域をBTVやAHSVのループ領域と入れ換えた変異IBAVを作製した。この変異IBAVは、複製能力を欠損しておらず、ループ領域はゲノムの選択性に関与していないことがわかった。さらに数種類のループ領域欠損IBAVを作製したところ、ループ領域のアミノ酸の種類は重要であるが、配列そのものの重要性は低いことを示唆する結果を得た(2017年第65回日本ウイルス学会学術集会にて発表、投稿準備中)。

(4) 先行研究により、ループ領域を全て欠損させたVP6は、構造は維持しているが機能を失い、変異ウイルスは複製できないことが分かっている(引用文献)。このVP6はVP3結合領域を維持しているためウイルス粒子に取り込まれる。また、VP1、VP4も粒子中に取り込まれたが、ゲノムは取り込まれないことがわかった。これまでcryo-EMを用いたBTV粒子の解析が行なわれて

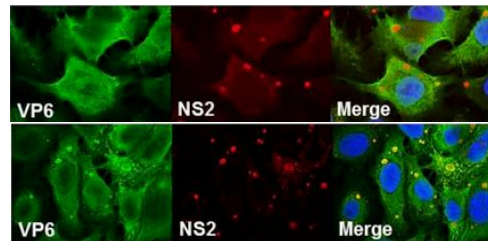


図1. VP3 結合領域変異 BTV (上段) と野生型 BTV (下段) 感染細胞における VP6 の VIB (NS2) への移行

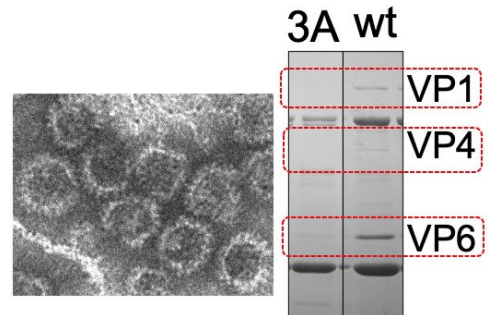


図2. VP3 結合領域変異 BTV (3A) と野生型 BTV (wt) 粒子の SAS-PAGE 像 (右図) と 3A 粒子の電子顕微鏡像 (左図)

いるが、粒子の内部が高密度であるため、その内部構造を解析することは困難であった。そこで、VP6のループ領域を欠損したBTVを用いて、粒子中のVP6の局在および構造をVP1、VP4の局在と共に探索した。しかし、解像度3.7Åの粒子構造を得ることはできたがVP6の局在を明らかにすることはできなかった(図3)。引き続き構造解析を遂行中である。

(5) 蛍光標識オルビウイルスをBHK-21細胞に感染させたところ、標識VP6は野生型のVP6と同様にVIBに移行することが分かった。また、これらの標識ウイルスは野生型のウイルスと比べて少し増殖速度が遅いが、解析には問題ない程度の増殖速度を維持していた。そこで、「同属ウイルスの共通性・異種性」を明らかにするため、まずウイルス複製の場であるウイルス封入体(VIB)に着目し、同属他種のウイルス共感染時における、VIB形成について解析した。IBAVとBTVが共感染した細胞ではIBAVとBTVはVIBを常に共有した。一方、IBAVとMUVが共感染した細胞ではそれぞれがVIBを形成する 경우가多いが、共有した場合は、VIBのサイズが常に大きいことが分かった(2019年第67回日本ウイルス学会学術集会にて発表、投稿準備中)。

また、VP6の局在を検討する過程において、BTVのVIBにはこれまで局在しないと思われていた外殻タンパク質VP5や、ウイルス粒子の出芽に關与する非構造タンパク質NS3が共局在する瞬間があることが明らかとなった。構造化照明顕微鏡法でさらに解析したところ、VP5やNS3は、VIBの中ではなく表層部に局在していることが明らかとなった(引用文献)。

(6) NMuLi細胞でのAHSV、BTV、MUVの増殖性を調べたところ、AHSVとBTVでは、IBAVで観察されたような増殖抑制が起こったが、MUVでは、BHK-21細胞での増殖と比較すると、複製能は低下しているが、明らかなウイルス増殖が確認された。AHSV、BTV、IBAVは、又カカ媒介性のウイルスであり、MUVはダニ媒介性であるため、NMuLi細胞での増殖抑制は又カカ媒介性のオルビウイルスのみに起こる可能性がある。また、IBAVの増殖抑制はタンパク合成時に起こっていたが、AHSV、BTVもNMuLi細胞内ではタンパク合成が抑制されていることが分かった(2017年第65回日本ウイルス学会学術集会にて発表、投稿準備中)。

#### <引用文献>

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, 2018, e01784-17, DOI: 10.1128/JVI.01784-17

Eiko Matsuo, Esther Leon, Steve J. Matthews and Polly Roy, "Structure based modification of Bluetongue virus helicase protein VP6 to produce a viable VP6-truncated BTV", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 451 巻, 2014, 603-608

Bjorn-Patrick Mohl, Adeline Kerviel, Thomas Labadie, Eiko Matsuo & Polly Roy, "Localization of Structural and Non-Structural Proteins during the Bluetongue Virus Replication Cycle", *Virus*, 査読有, 12 巻, 2020, 343-357, DOI: 10.3390/v12030343

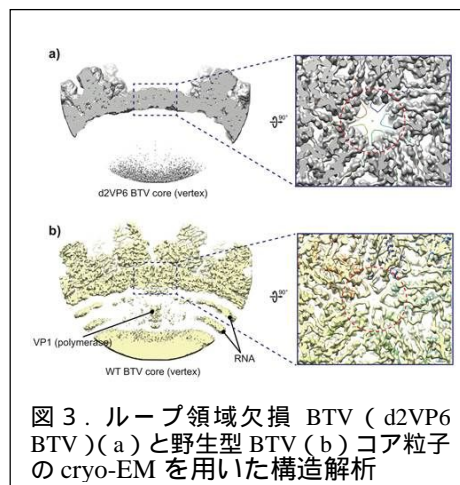


図3. ループ領域欠損 BTV (d2VP6 BTV)(a)と野生型 BTV (b)コア粒子の cryo-EM を用いた構造解析

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Bjorn-Patrick Mohl , Adeline Kerviel , Thomas Labadie , Eiko Matsuo and Polly Roy	4. 巻 12
2. 論文標題 Differential Localization of Structural and Non-Structural Proteins during the Bluetongue Virus Replication Cycle.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Viruses	6. 最初と最後の頁 343-357
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/v12030343	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Eiko Matsuo, Kiyoshi Yamazaki, Hiroki Tsuruta and Polly Roy	4. 巻 92
2. 論文標題 Interaction between a Unique Minor Protein and a Major Capsid Protein of Bluetongue Virus Controls Virus Infectivity	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 e01784-17
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/JVI.01784-17	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 松尾栄子、柳本周、満田優希、若村佳樹、林昌宏、佐伯圭一、江尻寛子、伊藤(高山)睦代、伊澤晴彦、西條政幸、沢辺京子、河野潤一
2. 発表標題 日本国内で発見されたダニ媒介性オルビウイルス、ムコウウイルスのリバースジェネティクス系の樹立
3. 学会等名 第72回 日本細菌学会関西支部総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Eiko Matsuo, Adeline Kerviel, Yuki Mitsuda, Chang-Kweng Lim, Keiichi Saeki, Masayuki Saijo, Junichi Kawano, Polly Roy
2. 発表標題 Fuzzy self-recognition mechanisms of orbivirus during core assembly in virus inclusion body
3. 学会等名 第67回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松尾栄子、若村佳樹、柳本周、満田優希、林昌宏、佐伯圭一、江尻寛子、伊藤(高山)睦代、伊澤晴彦、西條政幸、沢辺京子、河野潤一
2. 発表標題 日本国内で発見されたダニ媒介性オルビウイルス、ムコウイルスのリバースジェネティクス系の樹立
3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松尾栄子, 山崎清志, 鶴田宏樹, Polly Roy
2. 発表標題 Interaction between a unique minor protein and a major capsid protein of Bluetongue virus controls virus infectivity
3. 学会等名 Ninth Interantional Virus Assembly Symposium (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Eiko Matsuo, Marina Hamaji, Hiroko Omori, Hideyuki Tsuji, Akari Saito, Polly Roy, Kuiichu Saeki, Takeshi Kobayashi, Junichi Kawano
2. 発表標題 Further analysis of Ibaraki virus VP6 to produce fluorescence-labeled orbiviruses
3. 学会等名 13th International dsRNA Virus Symposium (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Eiko Matsuo, Keiichi Saeki, Junichi Kawano & Polly Roy
2. 発表標題 Biological roles of a loop region of orbivirus VP6 in virus replication
3. 学会等名 第65回日本ウイルス学会学術集会, 大阪国際会議場
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 松尾栄子、佐伯圭一、河野潤一、Roy Polly
2. 発表標題 オルビウイルス構造タンパク質VP6の細胞内局在とgenome packaging機能に関する研究
3. 学会等名 第70回細菌学会関西支部総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 松尾 栄子
2. 発表標題 Molecular Mechanisms of Orbivirus Replication
3. 学会等名 第6回 関西ウイルスクラブ(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 濱治 麻理奈、佐伯 圭一、河野 潤一、松尾 栄子
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第65回日本ウイルス学会学術集会,大阪国際会議場
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 松尾栄子、佐伯圭一、河野潤一、Polly Roy
2. 発表標題 オルビウイルス構造タンパク質VP6の機能解析
3. 学会等名 第69回日本細菌学会関西支部総会
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

神戸大学農学部インターゲノミクス研究会 <a href="http://www.research.kobe-u.ac.jp/ans-intergenomics/researcher.html">http://www.research.kobe-u.ac.jp/ans-intergenomics/researcher.html</a> 神戸大学大学院農学研究科 <a href="http://www.ans.kobe-u.ac.jp/index.html">http://www.ans.kobe-u.ac.jp/index.html</a> 神戸大学農学部農学部案内（英語） <a href="http://www.ans.kobe-u.ac.jp/english/graduate/ouyou/kansen1.html">http://www.ans.kobe-u.ac.jp/english/graduate/ouyou/kansen1.html</a>
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	ロイ ポーリー  (Roy Polly)	ロンドン大学衛生熱帯大学・Faculty of Infectious and Tropical Diseases・教授	London School of Hygiene & Tropical Medicine 英国
その他の研究協力者	ズウ ホン  (Zhou Z. Hong)	カルフォルニア大学ロサンゼルス校・Department of Microbiology, Immunology and Molecular Genetics・教授	University of California, Los Angeles 米国 当初渡航予定であったが、国際会議および、英国において数回打ち合わせを行なった結果、サンプル送付のみで実行可能となった。