

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：17301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22770

研究課題名(和文) ハザラウイルス増殖に必要な分節ゲノム内部領域の同定

研究課題名(英文) Annotation of HAZV segmented genome internal region necessary for viral propagation

研究代表者

山形 優太郎 (YAMAGATA, Yutaro)

長崎大学・熱帯医学研究所・特任研究員

研究者番号：70879410

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：ハザラウイルスの分節ゲノムの転写複製やウイルス粒子への取込に必要な配列をミニゲノム系を用いて探索した結果、M分節5'側非翻訳領域の末端から81～162塩基の配列に転写複製に重要な部位が含まれる可能性が示唆された。翻訳領域も探索したが、ミニゲノム活性が上昇する配列は見つからなかった。使用する実験系の設計や再現性の一部に問題があることが判明したため、条件検討による実験系の改良やVLP・リバースジェネティクス系の構築を進めた。また、ハザラウイルスのG蛋白質の恒常発現細胞の樹立や、切断部位候補の変異解析を行い、最も多いG蛋白質切断体の切断部位の位置をRRTN部位の近傍まで絞り込んだ。

研究成果の学術的意義や社会的意義

クリミアコンゴ出血熱ウイルス(CCHFV)は重篤な出血熱症状を引き起こし高い致死率を有する病原性ウイルスであり、有効な治療手段の確立が求められている。ハザラウイルス(HAZV)は、CCHFVに遺伝学的に近縁だがヒトに病原性を示さないため、CCHFVのモデルウイルスとして研究に用いられる。本研究の成果はHAZVの増殖に重要な要因の探索の途中段階にとどまり、HAZVの具体的な増殖機構の解明にまで踏み込む成果は得られなかったが、さらに研究を進めHAZVの増殖機構を解明することで、近縁種であるCCHFVの詳細な増殖機構を解明し、CCHFVの有効な治療手段を確立する手掛かりを得られることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Hazaravirus segmental genome regions required for transcriptional replication and packaging into viral particles were explored using a minigenome system, and it was found that in M-segment untranslated region, 81-162 nucleotides from the end of 5'-terminal may contain the region important for transcriptional replication. The translational region was also explored, but no sequences with increased minigenomic activity were found. Since some of the design and reproducibility of the experimental system created by the predecessor were found to be problematic, improvement of the experimental system was proceeded by examining the conditions and constructing a VLP and reverse genetics system. In addition, cell lines that constantly express Hazaravirus G protein were established, and analysis of mutations in candidate cleavage sites of G protein resulted that the location of the most common G protein cleavage site is in the vicinity of the RRTN site.

研究分野：ウイルス学

キーワード：ウイルス学 ハザラウイルス ミニゲノム 転写 複製 膜蛋白質

### 1. 研究開始当初の背景

クリミアコンゴ出血熱ウイルス(CCHFV)は、ブニヤウイルス目ナイロウイルス科のダニ媒介性出血熱ウイルスである。感染すると致死率が3割を超える重篤な出血熱症状を引き起こし、非常に危険な病原性を有する。1940年代のクリミア地方での感染爆発を皮切りに、CCHFVを保有するダニの生息域が気候変動に伴い世界各地に拡大しており、日本に上陸する恐れもある。クリミアコンゴ出血熱(CCHF)の有効かつ確実な治療手段は確立されておらず、感染爆発による甚大な被害を防ぐためにCCHFVを研究し治療手段の確立を進めることが求められている。しかし、CCHFVはその危険性故にBSL-4病原体に指定されており、非常に限られた研究環境でしか扱えない。

そこで、CCHFVのモデルウイルスとして、ハザラウイルス(HAZV)が注目されている。HAZVはCCHFVと非常によく似た生物学的特性を有し、かつヒトに対して病原性を示さないため、一般的なBSL-2研究設備で扱うことができる。HAZVの詳細な増殖機構の研究を通して、近縁種であるCCHFVの詳細な増殖機構の解明およびCCHFの有効な治療手段の確立の手掛かりを得られる。

HAZVは、L分節、M分節、S分節の3本に分節化したマイナス鎖RNAをゲノムとして有している(図1左)。近年、HAZVの各分節の両末端の非翻訳領域(UTR)の間にレポーター遺伝子であるウミシイタケルシフェラーゼ(Rluc)配列を挿入したミニゲノムウイルスRNA(vRNA)を用いて、各分節の転写複製活性を評価する実験系が確立され、M分節のUTR内の転写複製に重要な領域が同定された(Matsumoto et al, J.Virol, 2019)。しかし、この実験ではM分節に比べてS分節の転写複製活性が低く、L分節はほとんど転写複製されていなかった。このことから、HAZVの分節ゲノムの両末端のUTRだけでなく、他の分節ゲノム領域、例えば内側の翻訳領域等にも、ゲノムの転写複製やウイルス粒子への取り込みに必要な配列が存在する可能性が考えられる。

ウイルスゲノムの粒子への取り込みに関しては、HAZVの膜蛋白質であるG蛋白質が寄与している可能性も考えられる。先行研究で、C末端にタグ配列を付加したG蛋白質を細胞内で発現させると、アミノ酸配列から予測された切断部位での切断体よりも分子量が大きく、全長よりも分子量が小さいバンドが多く検出された。G蛋白質は細胞内において予測切断部位とは異なる箇所でも切断を受けており、この切断がウイルスの粒子形成に大きく影響する可能性が考えられる。

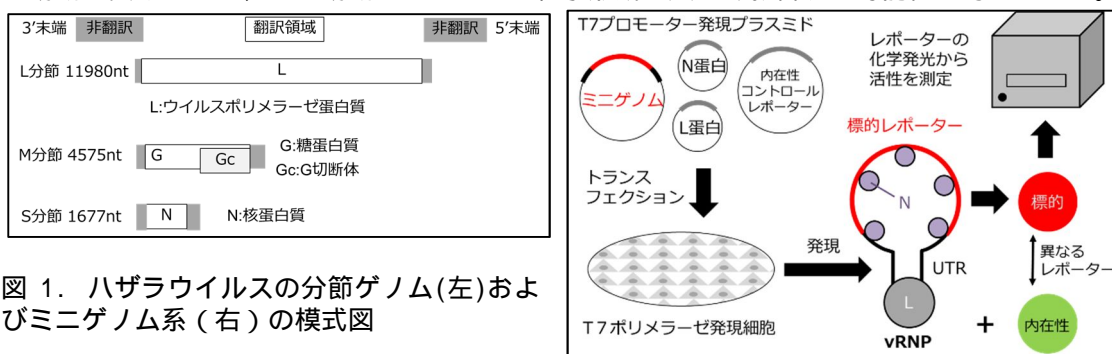


図 1. ハザラウイルスの分節ゲノム(左)およびミニゲノム系(右)の模式図

### 2. 研究の目的

これまで確立された HAZV の実験系を発展させて、転写・複製・ウイルス粒子内へのゲノムの取込といったウイルス増殖の過程に必要な、HAZV の各分節ゲノムの配列を探索する。先行研究で構築された HAZV のミニゲノム系を用いて、HAZV の各分節ゲノムの転写・複製に必要な配列を探索する。また、ミニゲノム vRNA とウイルス蛋白質の複合体(vRNP)を取り込んだウイルス様粒子を合成し、vRNA の粒子への取り込みに寄与する配列の調べる実験系や、探索した配列の HAZV 増殖への影響を詳しく解析するために、HAZV 変異体ウイルスを安定して合成できるリバースジェネティクス系の構築を目指す。構築したリバースジェネティクス系でウイルス蛋白質欠失変異体を合成して解析する可能性を見据え、先行研究で樹立されていない G 蛋白質を恒常的に発現する細胞を樹立する。さらに、G 蛋白質欠失変異体ウイルスの回復やウイルスゲノムの粒子取り込みに必要な G 蛋白質領域を絞りこむため、G 蛋白質の切断部位候補の変異解析を行う。

### 3. 研究の方法

#### (1)HAZV のミニゲノム系による転写複製に重要なウイルスゲノム配列の探索

HAZV のウイルスゲノム由来の配列間にレポーター蛋白質配列を挿入したミニゲノム vRNA は、T7 プロモーター発現のプラスミドにコードされている(図 1 右)。PCR や制限酵素処理等のクローニングの手法を用いて、ウイルスゲノム由来配列に変異を加えたミニゲノム変異体発現プラスミドを作製した。ミニゲノム変異体、ウイルス核蛋白質 N、ウイルスポリメラーゼ蛋白質 L および内源性コントロール用レポーター蛋白質をそれぞれ発現するプラスミドを、OPTI-MEM 培地およびトランスフェクション試薬 XtremeGeneHP (Roche 社)と混合して室温で 15 分インキュベートした。L 蛋白質依存的な転写複製活性を調べるため、L 蛋白質発現プラスミドを空のプラスミドベクターに変更したサンプルも準備し、L 蛋白質に非依存的なミニゲノム活性を補正できるようにした。混合液を T7 ポリメラーゼ蛋白質発現細胞である BSRT7/5 細胞に加えてトランスフェ

クシオンし、細胞内で vRNA とウイルス蛋白質を発現させて vRNA と蛋白質の複合体(vRNP)を形成させた。ミニゲノム vRNA にはレポーター遺伝子配列が挿入されており、ミニゲノムの転写複製活性に応じてレポーター蛋白質が発現される。ミニゲノムのレポーターとして RLuc を、内在性コントロールのレポーターとしてホタルルシフェラーゼ(Fluc)を使用した。トランスフェクション後 48 時間で細胞を回収してライセート化し、レポーター基質溶液と混合してレポーターによる化学発光を測定した。レポーター活性の測定には Promega 社の Dual-Luciferase assay system を使用し、Fluc 活性で RLuc 活性を補正した値をミニゲノム活性として算出した。算出したミニゲノム活性を比較し、変異によるミニゲノムの転写複製活性への影響を評価した。

#### (2)HAZV の VLP 系およびリバースジェネティクス系の構築

ミニゲノム vRNP の合成と同時にウイルス膜蛋白質を発現させることで、ミニゲノム vRNP を取り込んだウイルス様粒子(VLP)を合成させる VLP 系を構築できる。ウイルスポリメラーゼ蛋白質およびウイルス核蛋白質を発現する細胞に VLP を感染させ、VLP から放出された変異体ミニゲノムを転写複製させて、そのレポーター活性を測定することで、変異体ミニゲノムの VLP への取込効率を評価し、ウイルスゲノムの粒子への取り込みに寄与する配列を探索できる。また、VLP 系のミニゲノムの代わりにウイルスゲノム発現プラスミドを用いると、変異体ウイルスを合成するリバースジェネティクス系となる。リバースジェネティクス系を用いることで、ウイルスゲノムの変異による実際のウイルス増殖への影響の解析が可能となる。HAZV のミニゲノムとウイルス蛋白質を用いた VLP 系と、HAZV 変異体ウイルスを安定して合成できるリバースジェネティクス系を構築するため、ウイルスゲノムのクローニングや必要なプラスミドの作製、トランスフェクション実験の条件検討等を行った。

#### (3)G 蛋白質の恒常発現細胞の樹立と切断部位解析

先行研究で確立された pCXN2 HAZV G-V5-His6(G 蛋白質発現プラスミド)および pCMV ER-Gc-3xFlag(G 切断体 Gc 蛋白質発現プラスミド)をそれぞれ SW13 細胞にトランスフェクションし、各プラスミドを導入した細胞を対応する薬剤で薬剤耐性選抜した。選抜された細胞コロニーを回収して希釈し、24 ウェルプレートに播いて継代した。増殖した細胞の一部を回収してライセート化し、タグ抗体を用いたウエスタンブロッティングの手法で G 蛋白質および Gc 蛋白質の細胞内発現を確認した。同時に細胞内で発現したアクチン蛋白質も検出し、細胞あたりの G 蛋白質および Gc 蛋白質の発現量を算出して、十分な発現量が得られた細胞をストック化した。

pCXN2 HAZV G-V5-His6 を COS 細胞にトランスフェクションし、V5 タグ抗体を用いたウエスタンブロッティングで検出すると、約 80-85kDa 程度のバンドがメジャーバンドとして検出される。先行研究では G 蛋白質の主な切断部位候補として、SKI-1 プロテアーゼ切断部位 2 箇所(RRLI, RKLL)と、furin 切断部位 1 箇所(RKQR)が予測されている(Shimada et al, Sci. Rep, 2016)。メジャーバンドとして検出された G 蛋白質最多切断体の切断部位を分子量から推定すると、RKQR 部位と RKLL 部位の間にあると考えられる。この領域には切断部位になり得るアミノ酸配列が 3 箇所存在する(Kuhn et al, viruses, 2016)。これらの切断部位候補のアミノ酸部位が非切断となる変異や、切断部位候補から N 末端側を欠失する変異等を加えた G 蛋白質変異体発現プラスミドを作製し、COS 細胞にトランスフェクションして発現させウエスタンブロッティングで検出した。変異による検出バンドの分子量の変化から、最多切断部位の絞り込みを試みた。

### 4. 研究成果

#### (1)HAZV ミニゲノム変異体の作製と解析

##### M 分節 5' 側 UTR 内の転写複製に重要な領域の絞り込み

先行研究によると、M 分節 5' 側 UTR の末端から 36 塩基を残して残りの 5' UTR の一部を削った変異体ミニゲノムは、M 分節 5' 側 UTR 全長を有するミニゲノムと比較して転写活性が低下する。この削られた 206 塩基の中の転写複製に重要な領域の絞り込みを行った。M 分節 5' 側 UTR の末端から 81 or 162 塩基を残して残りの 5' UTR の一部を削った変異体ミニゲノム発現プラスミドを作製した。作製した変異体プラスミドを用いたミニゲノム系により、変異によるミニゲノムのレポーター活性の変化を解析した。結果、M 分節 5' 側 UTR の末端から 162 塩基を残して残りの 5' UTR の一部を削った変異体ミニゲノムが、他の変異体ミニゲノムの 2 倍以上のミニゲノム活性を示した(図 2 左)。M 分節 5' 側 UTR の末端から 81~162 塩基の配列に、M 分節の転写複製に重要な部位が含まれると考えられる。

##### 翻訳領域の一部を挿入したミニゲノム変異体

HAZV の各分節の UTR と RLuc 配列の間に翻訳領域の一部を挿入したミニゲノム変異体発現プラスミドを作製し、変異前と比べてミニゲノム活性が上昇する変異を見出すことで、HAZV ゲノムの転写複製に重要な翻訳領域配列の絞り込みを試みた。各翻訳領域について、L 分節は 3' 側を 500nt、5' 側を 1000~2000nt、S・M 分節は 3' 側を 300nt、5' 側を 300nt 挿入した変異体ミニゲノム発現プラスミドを作製した。想定外の蛋白質発現を防ぐため、3' 側開始コドン AUG は AAU に変異させた。作製した変異体プラスミドを用いたミニゲノム系により、変異によるミニゲノムのレポーター活性の変化を解析した。結果、これらの変異体の中でミニゲノム活性が上昇する変異は見つからなかった(図 2 右)。S・M 分節は翻訳領域を挿入しないミニゲノムで活性を示して





実験材料を移転するように努めた。大半のプラスミド等は移転できたものの、トランスフェクション実験に用いる BSRT7/5 細胞の和歌山県立医科大学医学部微生物学講座からの移転は叶わなかった。代替りの細胞として、同じ BHK-21 細胞由来で T7 ポリメラーゼ蛋白質を発現する BHK/T7-9 細胞を理研細胞材料開発室から購入して使用したが、和歌山での実験と比べて L 蛋白質非依存的なミニゲノム活性が高く、以前の実験の再現性を確認できなかった。この問題を解決すべく、細胞とプラスミドの条件検討および変更による改良を試みた。新たな実験系に使用するプラスミドとして、インフルエンザウイルスのリバースジェネティクス等に用いられる pPolI プラスミドと 293T 細胞に着目した。pPolI プラスミドは、細胞核内で RNA を発現する PolI プロモーター配列を有するプラスミドで、細胞にトランスフェクションさせると PolI プロモーターにより目的の RNA を発現することができる。293T 細胞はトランスフェクション効率が高い培養細胞で、インフルエンザウイルスのリバースジェネティクスにも用いられている。これらを用いて、T7 プロモーターに依存しない新たな HAZV ミニゲノム系の構築を目指したが、プロトコルの確立には至らなかった。

### (3) G 蛋白質の恒常発現細胞の樹立と切断部位解析

G 蛋白質恒常発現細胞は 27 株、Gc 蛋白質恒常発現細胞は 9 株ストック化した。アクチン発現量当たりの G 蛋白質または Gc 蛋白質発現量をウエスタンブロッティングで測定して算出し、実験で使用可能な G 蛋白質または Gc 蛋白質発現量が多い株を同定した。

G 蛋白質の切断部位候補の変異解析では、RKQR 部位から N 末端側を欠失させた変異体(A)を COS 細胞内で発現させてウエスタンブロッティングで検出したところ、検出されるバンドの分子量に変化は無かった。この欠失変異体の RKQR 部位より N 末端側の RKLL 部位までにある全ての切断部位候補に非切断変異を加えた変異体(B)を作製し、COS 細胞内で発現させてウエスタンブロッティングで検出したところ、従来の最多切断体のバンドに加え、より分子量の大きいバンドが検出された。さらに、この変異体の RRTN 部位から N 末端側を欠失させた変異体(C)を COS 細胞内で発現させてウエスタンブロッティングで検出したところ、先程検出された分子量の大きいバンドは検出されず、最多切断体と同程度の分子量のバンドのみ検出された(図 4)。以上の結果から、検出量が最も多い G 蛋白質切断体の切断部位が RRTN 部位の近傍にあることが示唆された。

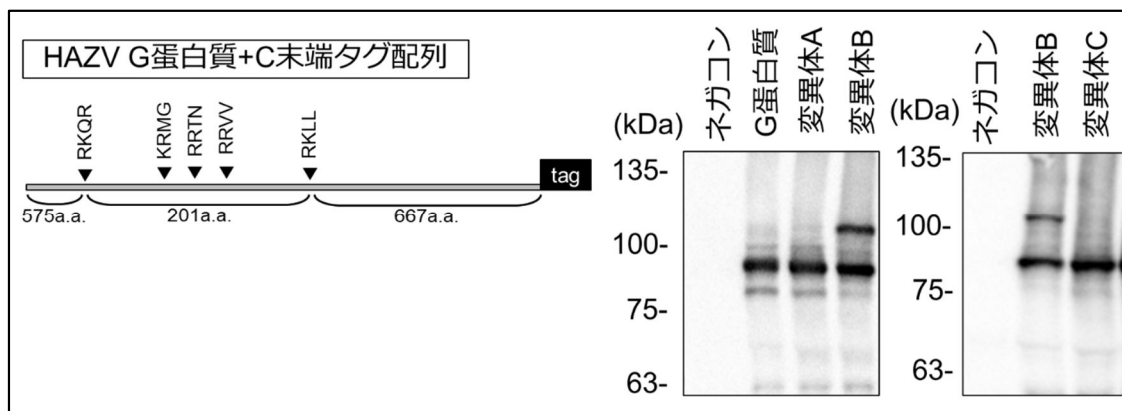


図 4. HAZV G 蛋白質の切断部位解析

本研究で使用した以下の研究材料は、以下の方々から分与を受けました。この場を借りてお礼を申し上げます。

pBlueScriptII HAZV SRluc, pBlueScriptII HAZV MRluc, pBlueScriptII HAZV MRluc tr36, pBlueScriptII HAZV MRluc le36, pBlueScriptII HAZV LRluc, pBlueScriptII HAZV LRluc le+500, pCAGGS RIuc, pTM1 HAZV N, pTM1 HAZV Lopt, pTM1 HAZV L, pTM1 FIuc: 和歌山県立医科大学医学部微生物学講座 西尾 真智子 教授(参考文献: Matsumoto Y, Ohta K, Nshio M. A minigenome study of Hazara Nairovirus genomic promoters. Journal of Virology, 93 e02118-18, 2019)

pCXN2 HAZV N, pCXN2 HAZV G-V5-His6, 野生型 HAZV: 長崎大学熱帯医学研究所新興感染症学分野 安田 二郎 教授

pPolI プラスミド: 長崎大学高度感染症研究センターBSL-4 人材育成部門 浦田 秀造 准教授  
BHK/T7-9 細胞: 理研細胞材料開発室(開発者: Dr. 伊藤直人及び Dr. 杉山誠, 参考文献: Microbiol Immunol. 2003 47(8):613-617)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山形 優太郎
2. 発表標題 ハザラウイルスゲノムの転写・複製に必要な配列の探索
3. 学会等名 ウイルス学若手研究集会2021
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------