

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23658240

研究課題名(和文) 相同組換え現象を利用した簡便で有用な新規組換えウイルス作製システムの確立

研究課題名(英文) Establishment of a simple, easy and useful new recombinant virus manufacture system using a homologous recombination phenomenon

研究代表者

三浦 智行 (Miura, Tomoyuki)

京都大学・ウイルス研究所・准教授

研究者番号：40202337

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：従来型および新世代SHIVを用いて、重複領域の長さ、位置、相同性が相同組み換え効率に与える影響や遺伝子導入法、遺伝子導入細胞等の諸条件について検討し、最適条件を明らかにした。これにより、従来型および新世代SHIVをバックボーンとして種々のCCR5型HIV-1臨床分離株のenv領域を多様性を保持したまま組み換えることに成功した。更に、デングウイルスやダニ媒介性脳炎ウイルスへの適用にも成功した。

研究成果の概要(英文)：I examined the influence that the length of the overlap domain, a position, and homology give in homologous recombination efficiency, and also the conditions such as the gene introduction method and the gene introduction cells using the conventional and new generation SHIV, and clarified the optimum. By this way, I succeeded in rearranging the env region of the various kinds of CCR5 type HIV-1 clinical isolates with maintaining variety in conventional and new generation SHIV as a backbone. Furthermore, I succeeded in an application of the method to Dengue virus and Tick-bone encephalitis virus construction.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：感染症 組換えウイルス エイズ SHIV HIV-1mt デングウイルス ダニ媒介性脳炎ウイルス

1. 研究開始当初の背景

一般に、異なる遺伝子に弱毒化変異を有するウイルス同士が同一細胞に重感染するとウイルスの複製過程で組み換えが起こり、互いに相補した形の強毒化ウイルスが生じることが良く知られている。我々は、エイズ関連ウイルス(HIV/SIV/SHIV)について、この種の実験を行ってきた過程で、一方、または両方のウイルスが複製能をもたなくても、感染性のウイルスが生じてくる場合があることを見出した。その後 PCR 法によって人工的に増幅した2つまたは3つのウイルスゲノム断片(それぞれは不完全なので感染性は持ちえない)でも、互いに重複領域があれば、それらを同一細胞に導入することによって、重複領域内で組み換えを起こし、感染性のウイルスが生じてくる場合があることを確認した。そこで、PCR 法により増幅したエイズ関連ウイルスのプロウイルス DNA 断片(クローン及び多様性を有する断片)を用いて、この相同組み換え現象を効率よく起こすための条件(重複領域の長さ、位置、相同性、細胞への遺伝子導入法、導入する細胞の種類等)を詳細に検討し、また、この手法による組み換えの前後で期待通り多様性が保持されているかシーケンス解析によって確認したいと考えた。以上の実験で蓄積された基礎情報に基づいて多様性を保持したまま効率よく簡便にエイズ関連ウイルスの組み換えウイルスを作製する新しい実験系を確立できるものと考えた。さらに、エイズ以外の他のウイルスへも本実験系を応用できるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

従来、病原性解析等のための組み換えウイルスの構築には分子クローンが用いられてきたが、ウイルスは本来多様性を含む擬種として存在する。最近我々は、細胞内で起こる相同組み換え現象を利用して効率よく組み換えウイルスを作製できる可能性を見出した。そこで、この相同組み換え現象を詳細に解析することによって、ウイルス本来の多様性を保持したまま簡便に組み換えウイルスを作製する全く新しい方法論を確立することを本研究計画の目的とする。

3. 研究の方法

本研究提案の基本的コンセプトを証明するためのモデルとして従来型および新世代 SHIV をバックボーンとして種々のCCR5型HIV-1臨床分離株の *env* 領域を多様性を保持したまま組み換えることを目指す。そのために重複領域の長さ、位置、相同性が相同組み換え効率に与える影響や遺伝子導入法、遺伝子導入細胞等の諸条件について検討する。また、本法によって作製した組み換えウイルスについて、期待するように組み換えの前後で多様性が保持されているかシーケンス解析によって明らかにする。更にエイズ関連ウイルスだけではなく、他のウイルスへの適用を検討する。

4. 研究成果

平成23年度は、新しい組み換えウイルス作製システムの基盤となる相同組み換え現象を効率的に起こす為の最適条件を明らかにすることを目的

とした。

(1)重複領域の長さ:これまでに500bp程度の重複領域があれば相同組み換えを起こすことを確認しているが、最低どのくらいの長さが重複していれば組み換えウイルスが生じるのか、また相同組み換えを効率的に起こす最適な重複長が存在するかを新世代 SHIV-NLDT5R をモデルとして種々のプライマーを用いて増幅した PCR 断片を組み合わせることにより見極めたところ、50bp程度の重複領域があれば相同組み換えを起こすことを確認した。

(2)重複領域の位置:種々のプライマーをデザインすることにより、相同組み換えに最適な重複領域の位置を検討した。また、生じた組み換えウイルスのシーケンス解析によって、最適な組換えポイントを推定した。モデルケースでは、HIV-1の異なる亜種間(クレードBのバックボーンにクレードCの *env* 領域を組み込む)での組換えに最適な組換えポイントを明らかにした。

(3)重複領域の相同性:組み換えウイルスの作製では必ずしも相同性が100%ではないウイルスゲノム断片同士を組換える必要が生じる場合が多い。この為どの程度の相同性があれば組み換えウイルスが生じるかを実験的に確認したところ70%程度の相同性で可能であった。

(4)遺伝子導入細胞:この現象は、現在、C8166-CCR5細胞株でのみ確認されているが、他の細胞株でも可能か検討したところ BHK 細胞でも可能であった。また、エイズウイルス研究では、より生体条件に近いと考えられる末梢血単核球(PBMC)での解析がよく用いられるので、PBMCを用いて直接組み換えウイルスを作製できるか検討したが、組換えウイルスは出来なかった。

HIV-1はヒトとチンパンジーにしか感染しないことから、我々はサル免疫不全ウイルス(SIV)と HIV-1 のゲノムの一部を組換えたサル免疫不全ウイルス(SHIV)をエイズのモデル系として開発してきた。これまでに作製された SHIV は分子クローン由来であるが、HIV-1 は元来、多様性を保持した変異集団であり、このことがウイルスの適応度を高める要因の一つと考えられる。また、HIV-1 の感染には CD4 の他にケモカイン受容体が必要であり、CCR5 を利用する R5 型ウイルスが、感染伝播と感染個体内での病態に重要なウイルスと考えられるが、既存の SHIV は CXCR4 を使用する X4 型ウイルスが多かった。一方、新世代 SHIV として全ゲノムの93%が HIV-1 で構成されサルに感染しうる HIV-1mt が構築されたが、このウイルスは X4 型であり、サルにおける増殖能はまだ不十分である。そこで平成24年度は、サル個体内で馴化させることにより増殖能が向上し、遺伝的多様性を蓄積した R5 型 SHIV-MK38 の *env* 領域を HIV-1mt に組み込んだ新規ウイルス DT5R-MK38 を相同組換え法により作製した。遺伝子解析を行ったところ、DT5R-MK38 の組換えポイントは重複領域内に複数箇所存在し、SHIV-MK38 の多様性の一部を保持していた。独立に作製したウイルス間で MK38 の多様性の異なる系統を継承することがわかり、それらを混合することにより、元の MK38 の遺伝的多様性を再構築できることがわかった。一方、フラビウイルス属に属するダニ媒介性脳炎ウイルス(TBEV)

とデングウイルス(DENV)について、DNA-based 感染性 cDNA クローンの構築に成功したことから、今後の TBEV および DENV 研究に広く貢献できるものと考えられた。

これまでよく解析されている HIV-1 は世界的な流行タイプではないサブタイプ B である。そこで平成 25 年度は世界的に最も流行している R5 型サブタイプ C の外被蛋白遺伝子を持つ新規 SHIV を、多様性を保持した状態で相同組換え法により構築し、このウイルスがアカゲザルに感染することを明らかにした。また、全ゲノムの 93% が HIV-1 で構成されサルに感染しうる HIV-1mt が構築されたが、このウイルスは X4 型サブタイプ B である。そこで、R5 型サブタイプ C の外被蛋白遺伝子を持つ新規 HIV-1mt を、多様性を保持した状態で相同組換え法により構築し、このウイルスがプタオザルに感染することを明らかにした。これらのウイルスは新規エイズ霊長類モデルとしての利用が期待される。一方、TBEV と DENV について、DNA-based 感染性 cDNA クローンの構築に前年度成功したことから、宿主相同組換え機構を用いたリバースジェネティクス系について至適条件を明らかにした。今後の TBEV および DENV 組換えウイルス作製に役立つものと期待される。

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 3 件)

Otsuki, H., Yoneda, M., Igarashi, T., and Miura, T.: Generation of a monkey-tropic human immunodeficiency virus type 1 carrying *env* from a CCR5-tropic subtype C clinical isolate. *Virology*, in press. (査読あり)

Otsuki, H., Hishiki, T., Miura, T., Hashimoto, C., Narumi, T., Tamamura, H., Yoshimura, K., Matsushita, S., and Igarashi, T.: Generation of a replication-competent simian-human immunodeficiency virus, the neutralisation sensitivity of which can be enhanced in the presence of a small molecule CD4 mimic. *J. Gen. Virol.*, 94: 2710-2716. (査読あり)

Fujita, Y., Otsuki, H., Watanabe, Y., Yasui, M., Kobayashi, T., Miura, T., and Igarashi, T.: Generation of a replication-competent chimeric simian-human immunodeficiency virus carrying *env* from subtype C clinical isolate through intracellular homologous recombination. *Virology*, 436: 100-111, 2013. (査読あり)

〔学会発表〕(計 10 件)

齊藤暁、大附寛幸、東濃篤徳、鈴木紗織、松田健太、高橋尚史、岩谷靖雅、杉浦互、野間口雅子、足立昭夫、保富康宏、俣野哲朗、三浦智行、明里宏文：CCR5 指向性を示す新規サル指向性 HIV-1 はサル個体に持続感染する、第 27 回日本エイズ学会学術集会、2013 年 11 月 20 日～2013 年 11 月 22

日、熊本

齊藤暁、大附寛幸、東濃篤徳、鈴木紗織、松田健太、高橋尚史、岩谷靖雅、杉浦互、野間口雅子、足立昭夫、保富康宏、俣野哲朗、三浦智行、明里宏文：CCR5 指向性を示す新規サル指向性 HIV-1 はサル個体に持続感染する、第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月 10 日～2013 年 11 月 12 日、神戸

大附寛幸、五十嵐樹彦、三浦智行：CCR5 指向性サブタイプ C エンベローを持つサル指向性 HIV-1 のプタオザルにおける複製、第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月 10 日～2013 年 11 月 12 日、神戸

加藤文博、小林剛、三浦智行、五十嵐樹彦、日紫喜隆行：分泌型ルシフェラーゼ遺伝子を有するデングウイルス 1 型レプリコンの構築、第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月 10 日～2013 年 11 月 12 日、神戸

齊藤暁、大附寛幸、東濃篤徳、鈴木紗織、松田健太、高橋尚史、岩谷靖雅、杉浦互、保富康宏、俣野哲朗、三浦智行、明里宏文：ウイルスの標的細胞指向性はサル指向性 HIV-1 の増殖に影響するか？、第 156 回日本獣医学会学術集会、2013 年 09 月 20 日～2013 年 09 月 22 日、岐阜

大附寛幸、一瀬裕太郎、小林剛、五十嵐樹彦、三浦智行：細胞内相同組換えを利用した CCR5 指向性サブタイプ C HIV-1 由来 *env* を持つサル指向性 HIV-1 の作出、第 26 回日本エイズ学会、2012 年 11 月 24 日～2012 年 11 月 26 日、神奈川

川岸崇裕、加藤文博、日向亮輔、三浦智行、小林剛、五十嵐樹彦：シベリア型ダニ媒介性脳炎ウイルス I R 9 9 - 2 f 7 株の感染性 cDNA クローンの構築、第 60 回日本ウイルス学会学術集会、2012 年 11 月 13 日～2012 年 11 月 15 日、大阪

大附寛幸、一瀬裕太郎、小林剛、原田恵嘉、吉村和久、鳴海哲夫、玉村啓和、松下修三、五十嵐樹彦、三浦智行：中和感受性を増強する薬剤による抗 HIV-1 治療戦略に向けた新規 SHIV/アカゲザル評価モデルの開発、第 60 回日本ウイルス学会学術集会、2012 年 11 月 13 日～2012 年 11 月 15 日、大阪

三浦智行、大附寛幸、米田舞、一瀬裕太郎、小林剛、五十嵐樹彦：霊長類エイズモデル感染病態に関わるウイルスゲノム基盤に関する研究、第 154 回日本獣医学会、2012 年 09 月 14 日～2012 年 09 月 16 日、岩手

大附寛幸、三浦智行、小林剛、吉村和久、玉村啓和、松下修三、五十嵐樹彦：中和抵抗性のサル/ヒト免疫不全ウイルスの作製と *in vitro* における立体構造変化誘導剤による中和感受性増強効果の評価、第 25 回日本エイズ学会学術集会、2011

年 11 月 30 日 ~ 12 月 2 日、東京

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

三浦 智行 (MIURA, Tomoyuki)

京都大学・ウイルス研究所・准教授

研究者番号 : 4 0 2 0 2 3 3 7