

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860344

研究課題名(和文) E型肝炎ウイルスの複製機構に関与する5'非翻訳領域の構造と機能に関する研究

研究課題名(英文) Studies on the functional role of 5' untranslated region of the genome RNA in the replication of hepatitis E virus

研究代表者

小林 富成 (Kobayashi, Tominari)

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：00634164

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)：本研究はE型肝炎ウイルス(HEV)の増殖におけるゲノムRNAの5'非翻訳領域の機能を明らかにすることを目的とした。5'非翻訳領域に様々な変異を組み込んだ全長RNAをPLC/PRF/5細胞に導入し、培養上清中のHEV RNAをリアルタイムRT-PCR法で定量測定し増殖効率への影響を検討した。その結果、5'非翻訳領域の2次構造が欠けるとHEVの増殖が抑制されたことから、5'非翻訳領域の2次構造がHEVの増殖に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。また、構造だけではなく塩基配列の一部も増殖効率に影響していることが示された。

研究成果の概要(英文)：To investigate the functional role of 5' untranslated region (5' UTR) of the genome RNA in the replication of hepatitis E virus (HEV), various 5' UTR mutants were constructed and their full-length RNA were transfected into PLC/PRF/5 cells. Influence of 5' UTR mutations on replication efficiency was evaluated by various methods such as real-time RT-PCR. All HEV mutants lacking secondary structure in the 5' UTR could not grow in cells, indicating that the secondary structure of the 5' UTR plays an essential role for viral replication. In addition, some mutants with mutations in stem and/or bulge structures replicated less efficiently, suggesting that the primary structure of the 5' UTR is also important for active replication of HEV.

研究分野：ウイルス学

キーワード：E型肝炎ウイルス 5'非翻訳領域 ウイルス複製 リバースジェネティクス法 リアルタイムRT-PCR法

1. 研究開始当初の背景

E型肝炎は、E型肝炎ウイルス(HEV)の感染によって引き起こされる急性ウイルス性肝炎である。このE型肝炎は発展途上国において流行性肝炎として、これまでに繰り返し発生してきたが、日本を含む先進各国では稀な輸入感染症として殆ど注目されていなかった。しかし、約10年前から日欧米で、輸入感染によらないE型肝炎症例が報告されるようになった。また、ヒト以外でもブタやシカなどの動物でのHEV感染が明らかとなり、さらに重症化や劇症肝炎による死亡例も認識されるなど、「人獣共通感染症」としてのE型肝炎が注目を集めている。

一方で、HEVの複製機構の解析に関しては、我々の研究室で世界に先駆けて効率の良い感染培養系を樹立できたことで、漸く可能になった。E型肝炎を制圧するためには、宿主細胞におけるHEVの複製機構を理解することが必要不可欠である。申請者らはこれまでHEVの細胞培養系および感染性cDNAクローンをを用いたリバースジェネティクスによる解析方法を確立してきた(Tanaka et al. J Gen Virol 2007, Yamada et al. J Gen Virol 2009)。また、申請者はウイルスの複製機構を解析するもう一つの方法として、ヒト細胞由来の無細胞タンパク質翻訳系(セルフリー系)を確立してきた(Kobayashi et al. J Biochem 2011)。脳心筋炎ウイルスの感染性cDNAクローンから人工的に合成したゲノムRNAと細胞抽出液を用いて、ウイルス粒子を試験管内で合成する方法を確立し、培養細胞とは違ったアプローチによる解析が可能となった。これらを用いることにより、これまで未解明であったHEVの複製機構に関する数々の疑問に答えを出すことが可能であると考えられる。

HEVのゲノム構造は図1に示すように、約7.2kbの+鎖の1本鎖RNAであり、3つのオープンリーディングフレーム(ORFs :

ORF1、ORF2、ORF3)と、両末端の非翻訳領域(5'末端:25塩基、3'末端:ポリA配列を除いて105塩基)を有しており、5'末端には2次構造が存在している。ORF1は全長ゲノムRNAから翻訳され、RNAポリメラーゼやヘリカーゼなどの非構造タンパク質をコードしている。一方、ORF2はキャプシドタンパク質をコードし、ORF3はウイルス粒子の放出に必須のタンパク質である。ORF2とORF3はサブゲノムRNAから翻訳される。多くのウイルスにおいて、5'非翻訳領域はウイルスの複製に重要な役割を担っている。しかし、HEVの5'非翻訳領域の役割に関する報告は未だ皆無である。そこで本研究では、5'非翻訳領域に変異を導入した変異体を構築し、HEV増殖における5'非翻訳領域の機能を明らかにすることを目的とする。

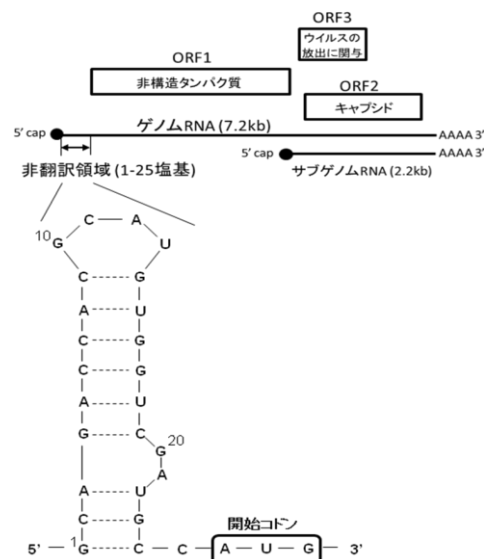


図1 HEVのゲノム構造

2. 研究の目的

本研究ではHEVの5'非翻訳領域に様々な変異を導入したHEV変異クローンを構築し、HEVの増殖における5'非翻訳領域の役割を明らかにすることで、複製機構解析の基盤となる研究を行なう。そこで本研究では以下の事を明らかとする。

① 5'非翻訳領域に変異を導入したHEV変異クローンの構築とHEV産生への影響の解析: HEVの5'非翻訳領域に任意の人為的

変異を導入した変異体を構築し、培養上清中に産出された HEV を定量することにより、HEV の複製に影響する 5'非翻訳領域の配列と 2 次構造を明らかにする。

② ウイルスタンパク質の翻訳に関与する配列と 2 次構造の解明： 培養細胞、またはセルフリー系を用いて、5'非翻訳領域に変異を導入した HEV のタンパク質(ORF1)の翻訳を解析することにより、翻訳に関与する 5'非翻訳領域の配列と 2 次構造を明らかにする。

③ ゲノム RNA およびサブゲノム RNA の複製に関与する配列と 2 次構造の解明： ノーザンブロット法を用いて、感染細胞内の変異体 RNA の複製を解析することにより、ウイルス RNA の複製 (特に一鎖から+鎖の複製) に関与する 5'非翻訳領域の配列と 2 次構造を明らかにする。また、5'非翻訳領域がサブゲノム RNA の複製に関与しているか否かを明らかにする。

3. 研究の方法

本研究では 5'非翻訳領域に変異を導入し、それぞれの変異がウイルスの複製に与える影響を解析することにより、HEV の複製における 5'非翻訳領域の役割を明らかにする。

① 5'非翻訳領域に変異を導入した HEV 変異クローンの構築と HEV 産生への影響の解析：

HEV 感染性 cDNA クローン由来の RNA を PLC/PRF/5 細胞(肝癌細胞)に導入すると、HEV 粒子が得られる。したがって、cDNA クローンを用いて任意の部位特異的変異を加えたウイルスが作製可能である。そこで 5'非翻訳領域の配列と 2 次構造のどちらが HEV の複製に影響しているかどうかを明らかにするために、塩基配列を置換・欠損させた変異体を構築する。RNA の 2 次構造予測プログラムを用いて、塩基配列の置換により 2 次構造の塩基対形成が不能となった変異体や、変異を導入しつつも 2 次構造の塩基対を保持した変異体を作成する(図 2)。その cDNA

に由来するゲノム RNA を試験管内で合成する。変異ゲノム RNA を PLC/PRF/5 細胞に導入し、2 日毎に培養上清の回収と培地の交換を行い 30~50 日間培養を行う。培養上清から HEV のゲノム RNA を抽出し、リアルタイム RT-PCR 法を用いて変異を導入した HEV の増殖効率を解析することで、HEV の複製には 5'非翻訳領域の配列と 2 次構造のどちらが影響するのかを明らかとする

また、ウイルスの増殖が認められた変異 HEV の複製効率が RNA を導入した場合と同じであるかどうかを確認するため、産生された子ウイルス細胞に感染させ、リアルタイム RT-PCR 法を用いて感染並びに増殖効率を解析する。

これらの結果より、感染性子ウイルスの産生に関与している 5'非翻訳領域の解析を行う。次に HEV が産生されなかった、またはその効率が低下した変異体に関しては、5'非翻訳領域内の変異が HEV の複製過程のどこに影響しているのかを以下の研究で明らかとする。

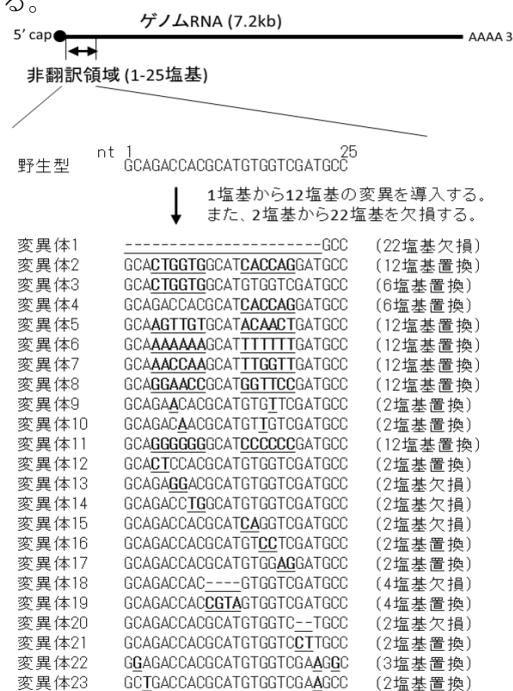


図 2 変異体 HEV の構造

② ウイルスタンパク質の翻訳に関与する 5'非翻訳領域の配列と 2 次構造の解明：

上記で HEV が複製しなかった変異体にお

いて、5'非翻訳領域内の変異がウイルスタンパク質の翻訳に影響しているかどうかを明らかとする。変異体の翻訳活性を調べるために、ORF1 タンパク質の抗体を用いたウエスタンブロット法によりウイルスタンパク質の検出を行う。

宿主細胞で HEV が増殖しない変異体に関しては、ウイルスのライフサイクルが回らないため ORF1 の発現量が低く、上記で述べた方法では検出できない可能性がある。その場合は我々が確立したセルフリー系を用いてウイルスタンパク質の発現を行う。セルフリー系は細胞抽出液にゲノム RNA を添加することで、細胞内と同じタンパク質合成を短時間で効率よく行うことができるため、ウイルスの増殖に影響されずにウイルスタンパク質の翻訳を行うことが可能である。これらの方法を用いて変異体の翻訳活性を解析することで、5'非翻訳領域内の変異が翻訳に影響しているかを明らかとする。

③ ゲノム RNA・サブゲノム RNA の複製に関与する 5'非翻訳領域の配列と 2 次構造の解明：

ゲノム RNA の複製は、HEV のゲノム RNA が翻訳されることにより、自身が持つ RNA 合成酵素によってゲノム RNA が複製される。まずゲノム RNA の 3'末端から相補鎖である一鎖 RNA が合成され、それを鋳型として一鎖 RNA の 3'末端からゲノム RNA が複製される。サブゲノム RNA に関してはまだ詳細不明である。上記で述べた翻訳の解析と同様に、PLC/PRF/5 細胞に変異 RNA を導入し、ノーザンブロット法を用いて HEV のゲノム RNA、2 本鎖 RNA の検出を行う。感染細胞内の変異体 RNA の複製を解析することにより、ウイルス RNA の複製（特に一鎖から二鎖の複製）に関与する 5'非翻訳領域の配列と 2 次構造を明らかにする。

4. 研究成果

① 5'非翻訳領域に変異を導入した HEV 変異クローンの構築と HEV 産生への影響の解析：

(1) 5'非翻訳領域のほぼ全長 (nt 1-22) を欠く変異体は増殖しなかった。そこで、6 塩基対からなるステム構造の配列をそれぞれ相補的な配列に置換し、塩基対を保持した変異体を作製したところ、野生型と同等の増殖効率を示した。一方、ステム構造の 6 塩基対のペアをすべて壊した変異体は増殖しなかった。また、構造を維持したまま塩基配列を置換すると、興味深いことに GC ペア数依存性に高い増殖効率を示した。GC ペアが 4 つの野生型と比較すると、GC ペアが 3 つの変異体は増殖効率が 1/6 に、GC ペアが 2 つの変異体は 1/20 に低下した。6 塩基対を全て GC ペアにした変異体は予想に反し、野生株以上の増殖効率を示すことはなかった。より詳細な解析のために、6 塩基対のステム構造をさらに 2 塩基ずつに分けて、塩基対を壊したところ、中央の 2 塩基対(nt 6-7)を置換した変異体では増殖は認められず、他の変異体でも増殖効率は明らかに低下した。

(2) ループ構造では、塩基配列を置換しただけの変異体は野生型と同等の増殖効率を示したが、構成する 4 塩基をすべて欠損させた変異体は増殖効率が 1/100~1/500 に減少した。バルジ構造の 2 塩基を欠損させた変異体は増殖しなかった。3 塩基対のステム構造を変異させると、野生型に比べて増殖効率は 1/20~1/40 に減少した。

(3) 増殖が確認された変異体のウイルスを A549 細胞に接種し、感染性と増殖効率を解析したところ、これらの変異体はいずれも感染性を有し、増殖効率についても上記 RNA transfection 実験で得られた結果が再現された。

② ウイルスタンパク質の翻訳に関与する 5'非翻訳領域の配列と 2 次構造の解明：

(1) 変異体のウイルスタンパク質(ORF2, ORF3)の細胞内発現レベルをIFA法により定量的に検討した結果、培養上清中のHEV RNA titerとほぼ平行な関係にあることが分かった。

(2) セルフリー系を用いて変異体RNAの翻訳効率を解析した結果、ほぼ全長(1-22 nt)を欠失させた変異体を除く全ての変異体でウイルスタンパク質を検出した。

③ ゲノムRNA・サブゲノムRNAの複製に関与する5'非翻訳領域の配列と2次構造の解明:

(1) 変異RNAを細胞に導入し、複製中間体である2本鎖RNAをノーザンプロット法で解析すると、ウイルスが増殖した変異体のみ2本鎖RNAを検出した。

これらの結果より、5'非翻訳領域のステム構造、バルジ構造のいずれかの構造が欠けてもHEVの増殖が抑制されたことから、5'非翻訳領域の2次構造がHEVの増殖に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。また、構造だけではなく塩基配列も増殖の効率に影響していることが示唆された。さらに、5'非翻訳領域のステム構造を維持したままGCペア数を変化させるとHEVの増殖効率が低下したことから、野生株が保有している5'UTRの構造及び塩基配列がHEVにとって最も適しているものと考えられた。ステム構造の中でも中央の2つのGCペアがウイルスの複製において特に重要な役割を果たしていることが示唆された。

5'非翻訳領域のステム構造やバルジ構造を壊して、ウイルスが複製しなかった変異体において、セルフリー系を用いて変異体の翻訳活性を解析したところ、ほぼ全長(nt 1-22)を欠いた変異体を除く変異体でウイルスタンパク質の発現が確認されたことから、5'非翻訳領域はRNAの複製に関与していると考えられた。

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 5 件)

1. Kobayashi T, Machida K, Imataka H. Human cell extract-derived cell-free systems for virus synthesis. *Methods Mol Biol.* 1118:149-56, 2014
2. Nagashima S, Takahashi M, Jirintai S, Tanggis, Kobayashi T, Nishizawa T, Okamoto H. The membrane on the surface of hepatitis E virus particles is derived from the intracellular membrane and contains trans-Golgi network protein 2. *Arch Virol.* 159(5):979-91, 2014
3. Machida K, Mikami S, Masutani M, Mishima K, Kobayashi T, Imataka H. A Translation system reconstituted with human factors proves that processing encephalomyocarditisvirus proteins 2A and 2B occurs in the elongation phase of translation without eukaryotic release factors. *J Biol Chem.* 14:289(46):31960-71, 2014
4. Jirintai S, Tanggis, Mulyanto, Suparyatmo JB, Takahashi M, Kobayashi T, Nagashima S, Nishizawa T, Okamoto H. Rat hepatitis E virus derived from wild rats (*Rattus rattus*) propagates efficiently in human hepatoma cell lines. *Virus Res.* 24:185:92-102, 2014
5. Nagashima S, Jirintai S, Takahashi M, Kobayashi T, Tanggis, Nishizawa T, Kouki T, Yashiro T, Okamoto H. Hepatitis E virus egress depends on the exosomal pathway, with secretory exosomes derived from multivesicular bodies. *J Gen Virol.* 95(Pt 10):2166-75, 2014

[学会発表] (計 2 件)

小林富成, 高橋雅春, 長嶋茂雄, 西澤勉, 吉林台, 岡本宏明

「E型肝炎ウイルスの5'非翻訳領域におけるステム構造変異の増殖効率への影響」
第62回 日本ウイルス学会学術集会
平成26年11月10日 パシフィコ横浜

小林富成, 高橋雅春, 長嶋茂雄, 西澤勉, 吉林台, 岡本宏明

「E型肝炎ウイルスの複製機構に関与する5'非翻訳領域の構造と機能に関する研究」
第61回 日本ウイルス学会学術集会
平成25年11月10日 神戸国際会議場

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

小林 富成 (KOBAYASHI TOMINARI)

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：00634164