

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26292148

研究課題名(和文) 逆遺伝子操作による鳥口タウウイルスの病原性発現分子機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the molecular mechanism for pathogenesis by avian rotavirus using a reverse genetics approach

研究代表者

杉山 誠 (SUGIYAMA, MAKOTO)

岐阜大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：80196774

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 10,300,000円

研究成果の概要(和文)：鳥口タウウイルスA(RVA)の哺乳類への病原性の分子機構を解明するため、初めに鳥RVAの遺伝的多様性を明らかにした。解読した鳥RVA3株と既知RVAのゲノムの全分節ORFについて比較解析した。我々が解読した2遺伝子が、口タウウイルス遺伝子型認定機関により新規遺伝子型に認定された。次に、哺乳動物に病原性を示す鳥RVA・PO-13株ゲノムの細胞内合成にT7プロモーターとpolIIIプロモーターを用いた逆遺伝子操作系を作製した。いずれの方法でも、ウイルスを回収できなかった。しかし、polIIIプロモーターを用いた系ではRVAレプリコンの構築が確認でき、細胞内でのウイルスの転写・複製の再現が示された。

研究成果の概要(英文)：This research project was conducted to reveal molecular mechanisms by which avian rotavirus A (RAV) induces pathogenicity in mammals. Firstly, we analyzed genome sequences from 3 avian RAVs and compared them with sequences of avian RAVs from various species. We discovered unique genome sequences in the 2 RAVs, which were certificated as novel genotypes by the Rotavirus Classification Working Group. Next, we tried to establish a reverse genetics system for the avian RAV PO-13 strain to explore its pathogenicity to mammals. We constructed the reverse genetics system using T7 and polIII promoter for synthesis of virus RNAs. Neither of the systems resulted in virus rescue. We, however, detected RAV specific replicon activity in the polIII promoter system, indicating that the replication and transcription by the RAV polymerase could be induced artificially.

研究分野：人獣共通感染症

キーワード：鳥口タウウイルスA 遺伝的多様性 遺伝子操作系

1. 研究開始当初の背景

(1) 急性下痢症の原因となるロタウイルスは、鳥類を含む人・動物に広く分布している。各動物で特有のロタウイルスが感染環を形成しているが、時に種を超えた感染も見られ、動物から人へ感染したと考えられる例も多く報告されている[1]。

(2) ロタウイルスの宿主親和性あるいは宿主乗り換えに関するメカニズム、すなわち感染性・病原性に関する分子機構は、ほとんど分かっていない。

(3) 我々はこれまでに、ロタウイルスの自然界での生態と宿主の壁を乗り越える実態について分子疫学的手法を用いて解析を進め、ロタウイルスは、種間伝播と遺伝子分節の交雑により多様性を獲得していることを明らかにしてきた[2,3,4,5,6]。

(4) 我々が日本のハトから分離した鳥ロタウイルス PO-13 株は哺乳動物であるマウスに病原性を示し[7,8]、その病原性には外殻蛋白質である VP4 と VP7 遺伝子が関与していることを明らかにした[9]。

2. 研究の目的

(1) PO-13 株を含む鳥ロタウイルスの遺伝子レベルでの多様性や遺伝子分節の交雑について、分子生物学的解析により明らかにすることを目的とした。

(2) 逆遺伝子操作系はウイルスの生物学的解析に強力な研究手法であり、モノネガウイルスでは多くの研究成果に貢献してきた。一方、ロタウイルスなどの二本鎖 RNA ウィルスでは逆遺伝子操作系の確立が遅れている。鳥ロタウイルス PO-13 株は培養細胞での増殖性が高く、逆遺伝子操作系の対象としての条件を備えている。そこで、PO-13 株を用いた逆遺伝子操作系の確立を目的とした。

(3) PO-13 株はマウスに病原性を示す原因遺伝子を同定済みである。従って、逆遺伝子操作系を利用することで、病原性機構の解明を分子レベルで進めることが可能となる。そこで、PO-13 株の逆遺伝子操作系を用い、病原性に関与する遺伝子の機能を詳細に解析することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 鳥ロタウイルスの分子生物学的解析
鳥ロタウイルス Ty-1 株、Ty-3 株、Ch-1 株を用い、ウイルスから RNA を抽出した。サンガー法による塩基配列決定は、RT-PCR で増幅した cDNA を用いてダイレクトシーケンシングで行なった。次世代シーケンシング (イルミナ社ベンチトップ型 MinSeq システム) には NEBNext Ultra RNA library prep kit for Illumina version 2.0 (New England Biolabs)

により調製したライブラリーを用いた。遺伝子型の評価は、RotaC (<http://rotac.regatools.be>) [10] と、BLAST

(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) を利用した。系統学的解析には MEGA ver 6.06 ソフトウェアを用いた。

(2) 鳥ロタウイルス PO-13 株抗体の作製
VP6 および NSP6 を除くウイルス蛋白質に対する抗体は、ゲノム ORF の塩基配列から推定されるアミノ酸配列を基にして合成ペプチドを作製し、ウサギに免疫して抗血清を作製した。プラスミド免疫法は、ウイルス蛋白質発現プラスミドをマウス皮下に接種し、発現蛋白質を免疫源とした。

(3) PO-13 株の T7 プロモーター逆遺伝子操作系の検討

報告されているレオウイルスの逆遺伝子操作系[11]を参考にして、T7 プロモーターの下流に PO-13 株ゲノム cDNA を挿入してプラスミドを構築した。それらプラスミドは、T7RNA ポリメラーゼ発現細胞 (BHK/T7-9) に導入し、数日培養後の培養液をロタウイルス感受性細胞である MA104 細胞に接種した。PO-13 株の回収は CPE の有無で確認した。

(4) PO-13 株の RNA ポリメラーゼ II (polII) プロモーター逆遺伝子操作系の検討

polII プロモーターであるサイトメガロウイルス (CMV) プロモーターの下流に PO-13 株ゲノム cDNA を挿入してプラスミドを構築した。それらプラスミドは、COS7 細胞に導入し、数日培養後の培養液をロタウイルス感受性細胞である MA104 細胞に接種した。PO-13 株の回収は CPE の有無で確認した。

4. 研究成果

(1) PO-13 株を含む鳥ロタウイルスの分子生物学的解析

鳥ロタウイルスは、これまでにニワトリ、シチメンチョウ、キジなどから検出あるいは分離されているが、全塩基配列が解読されているのはわずか 6 株である。そのため、鳥ロタウイルスの感染環や遺伝的多様性に関する解析は十分に進んでいるとは言えない。本研究では、シチメンチョウ由来 Ty-1 株と Ty-3 株、ニワトリ由来 Ch-1 株の未読分節を解読し、3 株のゲノム全分節 ORF の塩基配列を明らかにした。得られた塩基配列情報に既知の鳥ロタウイルスの配列情報を加えて系統学的解析を行なったところ、ニワトリで感染環を形成するロタウイルスと家禽・野鳥で感染環を形成するロタウイルスの存在様式を示唆する結果が得られた。また、本研究で解読した Ty-1 株 VP4 遺伝子と Ty-3 株 NSP3 遺伝子が、ロタウイルス遺伝子型認定機関 (Rotavirus Classification Working Group) により、それぞれ P[38] 遺伝子型および H14

遺伝子型に認定され、鳥口ウイルスの遺伝的多様性を示すことができた。さらに、今回の系統解析により VP4 遺伝子と VP7 遺伝子は他の分節と比べて頻繁に遺伝子交雑を起こしていることが考えられた。このことは、P0-13 株のマウスに病原性に VP4 遺伝子と VP7 遺伝子の関与が示されたこれまでの結果と考え合わせると興味深い成果であった。本研究で決定した配列情報は、GenBank に登録した (LC088107 から LC088124)。

(2) ウイルスゲノム 11 分節由来蛋白質に対する抗体の作製

鳥口ウイルス P0-13 株の逆遺伝子操作系を確立するにあたり、ウイルスゲノム 11 分節それぞれから産生されるウイルス蛋白質を認識する抗体の確立は研究の推進に有利となる。本研究課題開始時では既に 2 分節に由来する VP6 および NSP4 に対するモノクローナル抗体を確立済みであったことから、それらを除く 9 分節に由来する蛋白質 (VP1、VP2、VP3、VP4、VP7、NSP1、NSP2、NSP3、NSP5) に対する抗体の作製を試みた。合成ペプチドのウサギ免疫法では VP1、VP2、NSP5 の 3 分節に由来する蛋白質に由来する抗体の産生に成功した。残り、6 分節由来蛋白質に対しては配列を変更した合成ペプチドで免疫を試みたが、期待される抗体を得られなかった。そこで、プラスミド免疫法を検討した。すなわち、6 分節由来蛋白質を発現するプラスミドを直接マウス皮下に導入して免疫した。免疫は 2 週間間隔で複数回行なったが、抗体の産生は確認できなかった。以上の結果から、この研究課題において VP1、VP2、NSP5 分節に由来する蛋白質に対する抗体を得ることができた。従って、既存の VP6 および NSP6 に対するモノクローナル抗体と加えて、P0-13 株ウイルスゲノム 5 分節に由来する蛋白質を検出できる抗体のセットを確立することに成功した。

(3) T7 プロモーター逆遺伝子操作系の検討

T7RNA ポリメラーゼと T7 プロモーターの組み合わせは、ウイルス逆遺伝子操作で汎用されるシステムである。これまでに当研究室では、T7 プロモーターを用いた狂犬病ウイルス逆遺伝子操作系の確立に成功し [12]、さらにその過程で樹立した T7RNA ポリメラーゼ恒常発現細胞 (BHK/T7-9) を保有している。そのような背景から、初めに T7 プロモーターを用いた P0-13 株の逆遺伝子操作系の確立に取り組んだ。既に当研究室でクローニングした P0-13 株ゲノム 11 分節遺伝子の塩基配列をサンガー法で再確認し、分節 cDNA を T7 プロモーターとリボザイムの間に挿入したプラスミドを 11 分節それぞれについて作製した。これらのうち、(1) で確立した抗体を用いて蛋白質産生が確認できる分節について、プラスミド導入 BHK/T7-9 細胞での蛋白質発現を蛍光抗体法で確認したところ、プラスミドに

由来するウイルス蛋白質の発現を検出できなかった。しかしながら、同細胞における pol III (CMV) プロモーターを用いた通常の蛋白質発現と比べて著しく低い発現量であった。これらの結果から、T7 プロモーター逆遺伝子操作系はプラスミド単独のレベルでは機能的ではあるものの、発現量を考えると複数のプラスミドを細胞に導入させてウイルスを産生させるには困難であることが予想された。

(4) pol III プロモーター逆遺伝子操作系の検討

T7 プロモーター逆遺伝子操作系の問題点を回避するために、より発現効率の高い pol III プロモーターを用いた逆遺伝子操作系を検討した。pol III プロモーターには、蛋白質発現で広く用いられる CMV プロモーターを採用し、pol III プロモーター下流の転写開始部位に P0-13 株ゲノム分節 cDNA とリボザイム配列を挿入し、さらにその下流にポリ A 付加シグナルを追加した。このプラスミドにより、pol III プロモーターから転写される mRNA から蛋白質が産生される一方、一部はリボザイムにより口ウイルスゲノムを供給することが期待される。作製したプラスミドを COS7 細胞に導入し、蛋白質発現効率を (3) と同様に蛍光抗体法で評価したところ、T7 プロモーターに比べて明らかに発現量の増加が確認できた。さらに、実験条件を検討するために、VP6 分節をレポーター遺伝子に置換したモデルゲノムを用いてミニレプリコン活性を評価した。モデルゲノムプラスミド単独での細胞導入に比べて口ウイルス全ゲノムを供給した条件では、レポーター発現は 8-9 倍の増加を示した。そこで、全 11 分節に対するプラスミドを COS7 細胞に導入したが、ウイルスの産生は確認できなかった。

(5) 直鎖型 DNA を用いた pol III プロモーター逆遺伝子操作系への改変

逆遺伝子操作系で細胞に導入する DNA は環状型 DNA が主である。環状型 DNA は薬剤耐性遺伝子や複製開始起点など、大腸菌での維持に必要な配列を含む。それらの細胞内逆遺伝子操作系に不必要な配列は、非特定の DNA と蛋白質との相互作用などを引き起こす。そこで、逆遺伝子操作系でのみ必要な領域、すなわち pol III プロモーターとゲノム cDNA、を PCR で増幅し直鎖型 DNA として細胞に導入する方法を検討した。レポーター遺伝子を持つモデルゲノム DNA を持つプラスミドから PCR で直鎖型 DNA を作製した。この直鎖型 DNA は、pol III プロモーターから口ウイルスゲノム + 鎖と同じ構造を持つ RNA が転写される。モデルゲノム産生直鎖型 DNA を、viroplasm 構築因子である VP1、VP2、VP3、VP6、NSP2、NSP5 発現プラスミドと同時に細胞に導入した時、レポーター発現は A 型インフルエンザウイルスの RNA ポリメラーゼとの共存に比較して明らかに経時的な増加を示した (図 1)。

これらの結果は、直鎖型 DNA によるロタウイルス特異的なレプリコンが構築されたことを強く示唆した。従って、直鎖型 DNA は P0-13 株逆遺伝子操作系の確立に有望な方法と考えられた。

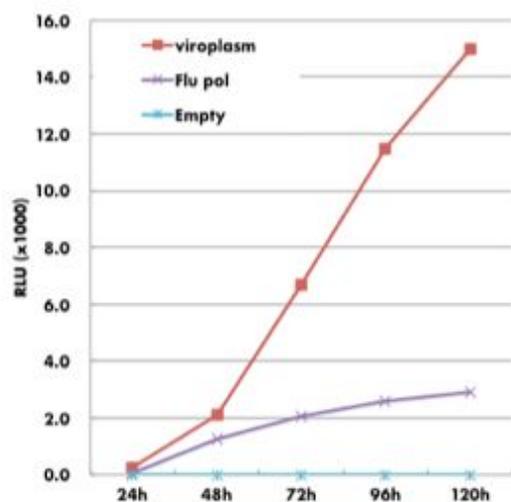


図 1

Flu pol: A型インフルエンザウイルスポリメラーゼ、
Empty: モデルゲノム産生直鎖型DNAのみ

(6) まとめ

鳥ロタウイルスの分子生物学的解析により、ロタウイルス遺伝子型認定機関に認定された 2 つの新しい遺伝子型を発見した。また、鳥類内で形成される鳥ロタウイルスの存在様式の一端を明らかにした。これらの結果は、ロタウイルスの自然界に於ける生態の解明に貢献する貴重な成果である。

P0-13 株の逆遺伝子操作系の確立は、多くの試行にもかかわらず確立に至らなかった。本研究課題遂行中に Kanai らによりロタウイルスの逆遺伝子操作系に成功した報告がなされた[13]。その報告では、ロタウイルスの逆遺伝子操作系にヘルパー因子としてロタウイルスの増殖には存在しない蛋白質が必要とされ、完全なロタウイルスの逆遺伝子操作系に向けてさらに改善の必要性がある。本研究では断片型 DNA を用いた polIII プロモーター逆遺伝子操作系でロタウイルスレプリコンを構築できた。したがって、その成果は完全なロタウイルスの逆遺伝子操作系の確立に向けて技術的基盤を一步進めた。

引用文献

- Martella et al. *Vet. Microbiol.* 140, 246-255, 2010.
 Okadera et al. *Infect. Genet. Evol.* 20, 54-60, 2013.
 Fukuda et al. *Arch Virol.* 157, 1063-1069, 2012.
 Abe et al. *J. Gen. Virol.* 92, 952-960, 2011.
 Abe et al. *Vet. Microbiol.* 146, 253-259, 2010.
 Abe et al. *Virus Res.* 144, 250-257, 2009.
 Mori et al. *Virology* 288, 63-70, 2001.
 Mori et al. *J. Virol.* 76, 5829-5834, 2002.
 Mori et al. *Virology* 316, 126-134, 2003.
 Maes et al. *BMC Microbiol.* 9, 238, 2009
 Kobayashi et al. *Cell Host Microbe* 1, 147-157, 2007.
 Ito et al. *J. Virol.* 75, 9121-9128, 2001.
 Kanai et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 114, 2349-2354, 2017.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計4件)

Okadera, K., Abe, M., Ito, N., Mitake, H., Okada, K., Nakagawa, K., Une, Y., Tsunemitsu, H. and Sugiyama, M. Isolation and Characterization of a Novel Type of Rotavirus Species A in Sugar Gliders (*Petaurus Breviceps*). *J. Gen. Virol.* 97 (5), 1158-1167, 2016. DOI : 10.1099/jgv.0.000433 査読有り

Fujii, Y., Mitake, H., Yamada, D., Nagai, M., Okadera, K., Ito, N., Okada, K., Nakagawa, K., Mizutani, T. and Sugiyama, M.: Genome Sequences of Rotavirus A Strains Ty-1 and Ty-3, Isolated from Turkeys in Ireland in 1979. *Genome Announc.* 4(1), e01565-15, 2016. DOI : 10.1128/genomeA.01565-15 査読有り

Mitake, H., Ito, N., Okadera, K., Okada, K., Nakagawa, K., Tanaka, T., Katsuragi, K., Kasahara, K., Nihongi, T., Sakurai, S., Tsunemitsu, H. and Sugiyama, M. Persistence of the rotavirus A genome in mesenteric lymph nodes of cattle raised on farms. *J. Gen. Virol.* 96 (9), 2708-2713, 2015. DOI : 10.1099/vir.0.000191 査読有り

Mitake, H., Ito, N., Okadera, K., Okada, K., Nakagawa, K., Tanaka, T.,

Katsuragi, K., Nihongi, T., Tsunemitsu, H. and Sugiyama, M. Detection of Avian-like Rotavirus A VP4 from a Calf in Japan. J. Vet. Med. Sci. 77 (2), 221-224, 2015. DOI : 10.1292/jvms.14-0379 査読有り

〔学会発表〕(計6件)

鷲田 好将、三竹 博道、岡寺 康太、長井 誠、伊藤 直人、大松 勉、水谷 哲也、杉山 誠：アライグマ(*Procyon lotor*)から検出された鳥類口タウウイルス A の全遺伝子の解析、第 159 回日本獣医学会学術集会(藤沢) 2016 年

藤井 祐至、岡寺 康太、三竹 博道、伊藤 直人、岡田 和真、中川 賢人、岡崎 克則、迫田 義博、高田 礼人、小澤 真、正谷 達膳、杉山 誠：渡り鳥から検出された新型口タウウイルス A の遺伝学的解析、第 158 回日本獣医学会学術集会(十和田) 2015 年

山田 大悟、岡寺 康太、三竹 博道、伊藤 直人、岡田 和真、中川 賢人、杉山 誠：鳥類由来口タウウイルス A の遺伝学的解析による分子基盤の確立、第 157 回日本獣医学会学術集会(札幌) 2014 年

岡寺 康太、伊藤 直人、三竹 博道、岡田 和真、中川 賢人、宇根 有美、南 正人、杉山 誠：アライグマ (*Petaurus breviceps*)における口タウウイルス A の検出及びその浸潤状況、第 62 回日本ウイルス学会学術集会(横浜) 2014 年

岡寺 康太、伊藤 直人、三竹 博道、岡田 和真、中川 賢人、宇根 有美、南 正人、杉山 誠：アライグマ (*Petaurus breviceps*)からの口タウウイルス A の検出及びその遺伝学的解析、第 157 回日本獣医学会学術集会(札幌) 2014 年

三竹 博道、岡寺 康太、伊藤 直人、藤井 祐至、岡田 和真、中川 賢人、二本木 俊英、葛城 肅仁、田中 知未、桜井 彰二、杉山 誠：ウシ腸間膜リンパ節からの口タウウイルス A の検出、第 157 回日本獣医学会学術集会(札幌) 2014 年

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www1.gifu-u.ac.jp/~naotoito/Research/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉山 誠 (SUGIYAMA, Makoto)
岐阜大学・応用生物科学部・教授
研究者番号 80196774

(2) 研究分担者

伊藤 直人 (ITO, Naoto)
岐阜大学・応用生物科学部・准教授
研究者番号 20334922

(3) 研究協力者

岡寺 康太 (OKADARA, Kota)
三竹 博道 (MITAKE, Hiromichi)
岡田 和真 (OKADA, Kazuma)
中川 賢人 (NAKAGAWA, Kento)
山田 大悟 (TAMADA, Daigo)