

令和元年6月25日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08811

研究課題名(和文) MERSコロナウイルスの逆遺伝子操作系の確立と病原性因子の解明

研究課題名(英文) Application of reverse genetics system of MERS coronavirus

研究代表者

神谷 亘 (Kamitani, Wataru)

大阪大学・微生物病研究所・特任准教授(常勤)

研究者番号：60551421

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では2012年から中東地域で発生しているヒトに重篤な肺炎を引き起こす中東呼吸器症候群(MERS)コロナウイルスの遺伝子操作系の確立を行うことにより、非構造蛋白質の一つであるnsp1蛋白質のウイルス複製における影響を解析する。今回、MERSコロナウイルスの遺伝子操作系の確立を行った。MERSコロナウイルスのnsp1蛋白質がウイルスRNAと直接結合することを明らかにした。さらに、確立した遺伝子操作系を用いてnsp1蛋白質とウイルスRNAとの結合がウイルスRNAの複製に重要であることを明らかにした。このnsp1蛋白質とウイルスRNAとの結合はコロナウイルスの新しい創薬標的になると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、現在も中東地域で発生しているMERSコロナウイルスの遺伝子操作系の確立を通して、非構造蛋白質の一つであるnsp1蛋白質が、ウイルスRNAと直接結合することを見出し、さらに、この結合がMERSコロナウイルスの複製に重要であることを突き止めた。現在もMERSコロナウイルスに対する特異的な抗ウイルス薬がない状況において、今回発見したこの特異的な結合は、MERSコロナウイルスに対する新たな治療標的になることが考えられた。

研究成果の概要(英文)：Middle East respiratory syndrome (MERS) coronavirus emerged in Saudi Arabia. MERS coronavirus is lethal human coronavirus still endemic in the Arabian Peninsula. In this study, we established a reverse genetic system for MERS coronavirus using a BAC system. We studied the effect of nonstructural protein 1 (nsp1) on viral replication using the reverse genetics system. We found that MERS coronavirus nsp1 bound to viral genomic RNA. We revealed that the specific binding of nsp1 with viral genomic RNA was critical for the efficient replication of MERS coronavirus. Our data indicated that the specific binding is new target for development of novel antivirals against MERS coronavirus.

研究分野：ウイルス学

キーワード：コロナウイルス MERSコロナウイルス nsp1蛋白質 RNA結合蛋白質 ウイルス複製

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

コロナウイルスは、家畜および伴侶動物において、神経系・消化器系・呼吸器系疾患を引き起こす感染症である。コロナウイルスは、一般に、その感染宿主域は狭く、固有の動物種のみ

に感染する。一方、ヒトに重篤な肺炎を引き起こす重症急性呼吸器症候群 (SARS) コロナウイルスの自然宿主は、コウモリであると報告されている。また、2012 年から中東で発生している中東呼吸器症候群 (MERS) コロナウイルスの自然宿主は、コウモリとラクダであると報告されている。つまり、コロナウイルスは、人獣共通感染症として医学領域や獣医学領域で重要なウイルス感染症である。

しかしながら、現在のウイルス学研究において必須技術であるコロナウイルスの遺伝子操作系は以下の理由により困難であった。 SARS コロナウイルスのアウトブレイクまでは、ヒトにおけるコロナウイルス感染症対策の重要性が低かったこと。 RNA ウイルスの中でウイルスゲノム長が最長であるため、その取扱いが煩雑であること。上記と理由のため、コロナウイルスにおける逆遺伝子操作系は、世界で 2 つの研究グループが成功しているだけである (Yount B et al. PNAS 2003, Almazán F et al. JVI 2006)。

以上のことから、我が国においてもコロナウイルスの逆遺伝子操作系の確立は、コロナウイルス感染症対策のために、早急に対応する必要がある研究課題である。

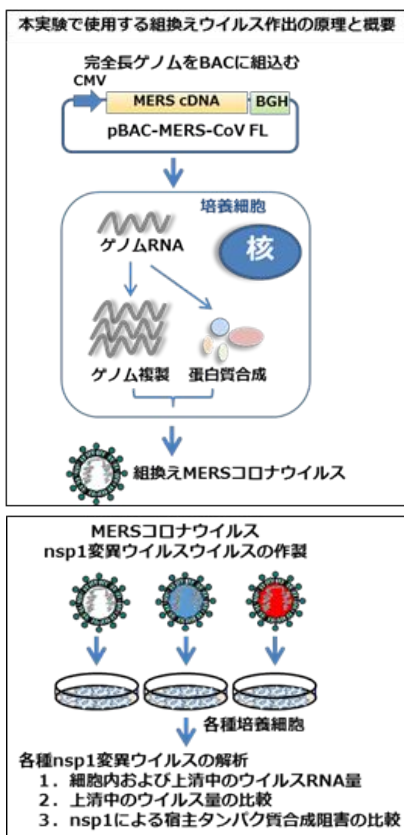
一方で、申請者は、これまでに重症急性呼吸器症候群 (Severe acute respiratory: SARS) コロナウイルスの非構造蛋白質の一つである nsp1 蛋白質に着目して研究を進めている。特に、SARS コロナウイルスの nsp1 蛋白質が 40S リボソームと結合して宿主の蛋白質合成を阻害すること、さらに宿主 mRNA を切断することを明らかにしている。

上述の背景とこれまでの研究成果をもとに、本研究では、輸入感染症として重要な MERS コロナウイルスの逆遺伝子操作系の確立により、コロナウイルス感染症対策のための基盤技術の樹立を目指す。さらに、その系を用いて、SARS コロナウイルス nsp1 蛋白質のホモログである、MERS コロナウイルス nsp1 蛋白質のウイルス学的解析を行うことで、病原性の解明およびワクチン開発に応用する。

### 2. 研究の目的

本研究は、医学領域および獣医学領域で重要なウイルス感染症の一つであるコロナウイルスの制圧のため、同ウイルスにおけるウイルス学的な分子基盤技術の確立とその応用を目指すものである。コロナウイルスの中でも特にヒトで致死性の肺炎を引き起こす中東呼吸器症候群 (Middle East respiratory syndrome: MERS) コロナウイルスの遺伝子操作系の確立を通して、MERS コロナウイルスの病原性蛋白質の一つである nsp1 蛋白質のウイルス複製における役割を明らかにする。

### 3. 研究の方法



#### 1. MERS コロナウイルスの逆遺伝子操作系の確立

逆遺伝子操作系による組換えウイルスの作出には、Bacterial Artificial chromosome (BAC) システムを用いる

概要: サイトメガロウイルスプロモーター (CMV) とポリアデニレーションシグナル (BGH) の制御下で完全長のMERS コロナウイルスゲノム cDNA を BAC に組み込み、培養細胞に導入した。

細胞内で CMV プロモーターにより、完全長ゲノム・BAC からウイルスゲノム RNA が転写される。

ウイルスゲノム RNA からウイルスタンパク質の合成、さらに、ウイルスゲノムの複製がおこる。

最終的に、培養細胞から感染性のある組換え MERS コロナウイルスが産生される。

完全長ゲノム・BAC に遺伝子操作を加えることにより、遺伝的に改変された組換えウイルスを作出することが可能になる (左図参照)。

大腸菌の相同組換え技術を利用して、任意の変異ウイルスを作製する。

#### 2. nsp1 蛋白質の宿主蛋白質阻害機構とウイルス RNA との結合に対する影響

我々は以前に SARS コロナウイルスの nsp1 蛋白質が宿主の蛋白質合成を阻害すること、自身のウイルス RNA と結合することを明らかにしている。そこで、MERS コロナウイルスの nsp1 蛋白質が宿主の蛋白質合成を阻害するか否かを、ルシフェラーゼ活性を指標として評価した。

さらに、MERS コロナウイルスの nsp1 蛋白質が自身のウイルス RNA と結合するかどうかを解析した。Nsp1 蛋白質を発現するプラスミドと MERS コロナウイルスのウイルス RNA を含むプラスミドを培養細胞に導入し、nsp1 蛋白質と共沈してきた RNA をノーザンブロットにて解析を行った。

### 3. MERS コロナウイルス nsp1 蛋白質のウイルス複製に及ぼす影響

そこで、前年度に確立した MERS コロナウイルスの逆遺伝子操作系による組換えウイルス作製技術を用いて、MERS コロナウイルス nsp1 蛋白質に変異を導入した nsp1 変異ウイルスを作製する。上述の 2 で明らかになった nsp1 蛋白質の機能を感染細胞で検討するために、培養細胞内と培養上清中のウイルス RNA 量をリアルタイム PCR にて解析する。

## 4. 研究成果

### 1. MERS コロナウイルスの逆遺伝子操作系の確立

研究方法の 1 に従い、MERS コロナウイルスの全遺伝子配列を分割して、制限酵素とライゲーションにより、順番に BAC DNA に挿入しすべての塩基配列を挿入した。MERS コロナウイルス cDNA の 5' 末端側にはサイトメガロウイルスのプロモーター配列と 3' 末端側には 25 塩基のポリ A 配列とリボザイム配列を付加した。

完全長の MERS コロナウイルス cDNA を有する BAC DNA をヒト肝がん細胞 Huh7 細胞にトランスフェクション試薬により導入した。導入後 3 日から 4 日で培養上清を回収した。回収した培養上清を Vero 細胞に感染させ、明瞭な CPE を確認後、培養上清を回収し、組換えウイルスとして保存した。

保存した組換えウイルスは、ウイルス力価を測定するために Vero 細胞を用いて TCDI<sub>50</sub> を算出した。その結果、感染性 cDNA から回収した組換えウイルスは、親株と同程度のウイルス力価(およそ 10 の 6 乗から 7 乗のウイルス力価であることが分かった)。

さらに、保存した組換えウイルスのウイルス増殖を調べるために、経時的にその培養上清中のウイルス量を TCDI<sub>50</sub> にて確認したところ、作製した組換えウイルスは親株と同じように増殖することが分かった。このことは、BAC DNA から作製した組換えウイルスは親株と同じ性情を示しており、本研究方法によって MERS コロナウイルスに対する遺伝子操作系が確立できたと考えられる。

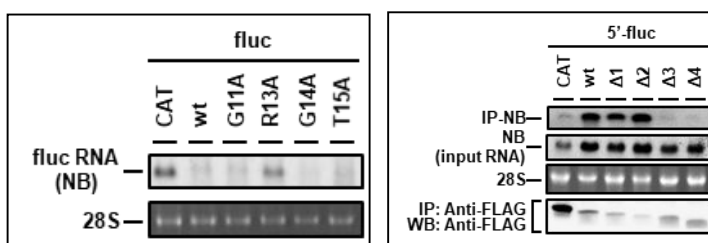
### 2. nsp1 蛋白質の宿主蛋白質阻害機構とウイルス RNA との結合に対する影響

我々は以前に SARS コロナウイルスの nsp1 蛋白質が宿主の蛋白質合成を阻害することと、自身のウイルス RNA と結合することを明らかにしている。

そこで、MERS コロナウイルスの nsp1 蛋白質が宿主の蛋白質合成を阻害するかどうかを、ルシフェラーゼ活性を指標として評価した。Nsp1 蛋白質を発現するプラスミドを作製し、ルシフェラーゼを発現するプラスミドを 293T 細胞に共発現させ、24 時間後にそのルシフェラーゼの活性を測定した。その結果、MERS コロナウイルスの nsp1 蛋白質がルシフェラーゼの活性を顕著に抑制することが明らかとなった。

さらに、MERS コロナウイルスの nsp1 蛋白質が自身のウイルス RNA と結合するかどうかを解析した。Nsp1 蛋白質を発現するプラスミドと MERS コロナウイルスのウイルス RNA を含むプラスミドを培養細胞に導入し、nsp1 蛋白質と共沈してきた RNA をノーザンブロットにて解析を行った。その結果、MERS コロナウイルスの nsp1 蛋白質は、MERS コロナウイルスの 5' UTR の RNA 配列と特異的に結合することが明らかとなった(下左図で 13 番目のアミノ酸が結合に重要であることを示している)。さらに、nsp1 蛋白質側および 5' UTR の RNA 配列に変異を導入し、それぞれの結合領域を解析したところ、nsp1 蛋白質の 13 番目のアミノ酸が RNA との結合に重要であることが明らかとなった。さらに、nsp1 蛋白質は RNA 上の Stem loop (SL) と特異的に結合することが明らかとなった(下右図で SL1 の RNA 配列が結合に重要であることを示している)。

今回、MERS コロナウイルスの nsp1 蛋白質が、SARS コロナウイルスの nsp1 蛋白質と同様に宿主蛋白質の産生を抑制できること、ウイルス由来の RNA と特異的に結合することを明らかにした。

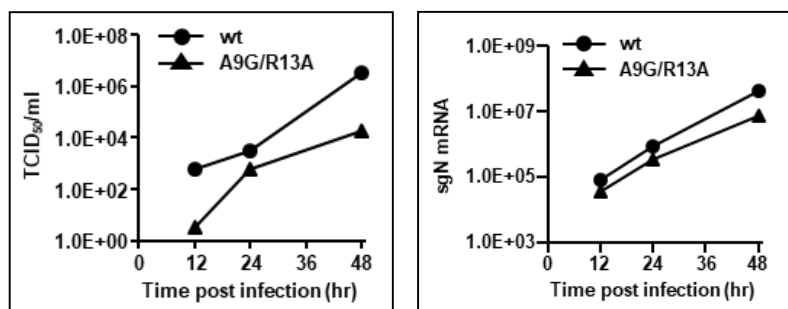


### 3. MERS コロナウイルス nsp1 蛋白質のウイルス複製に及ぼす影響

そこで、前年度に確立した MERS コロナウイルスの逆遺伝子操作系による組換えウイルス作製技術を用いて、MERS コロナウイルス nsp1 蛋白質に変異を導入した nsp1 変異ウイルスを作製し

た。上述の2で明らかになった nsp1 蛋白質の機能を感染細胞で検討するために、培養細胞内と培養上清中のウイルス RNA 量をリアルタイム PCR にて解析した。

まず、解析のために方法1で確立した BAC DNA によるコロナウイルスの遺伝子操作系を用いて、ウイルス由来 RNA との結合に必要な nsp1 蛋白質の13番目のアミノ酸(今回は13番目および9番目のアミノ酸)に変異を導入した変異ウイルスを作成した。その後、その変異ウイルスの上清中ウイルス力価の測定を TCID<sub>50</sub> にて、また細胞内のウイルス由来 RNA 量をリアルタイム PCR にて解析した。その結果、変異ウイルスでは上清中のウイルス力価(下左図)および細胞内のウイルス RNA 量(下右図)が野生株に比べて減少することが明らかとなった。このことは、nsp1 蛋白質のウイルス RNA との結合が、MERS コロナウイルスの複製に重要であることを示唆していた。



さらに、現在、nsp1 蛋白質の SL1 との結合に重要な13番目のアミノ酸がコードされているウイルス RNA 上の構造(SL5 領域)に注目して研究を進めている。実際にこの SL5 領域におけるウイルス複製に関するデータが得られつつある。

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計4件)

1. Matsuyama S, Shirato K, Kawase M, Terada Y, Kawachi K, Fukushi S, **Kamitani W**. Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Spike Protein Is Not Activated Directly by Cellular Furin during Viral Entry into Target Cells. *J Virol*. 2018 Sep 12;92(19). pii: e00683-18. 査読有
2. Chen M, Aoki-Utsubo C, Kameoka M, Deng L, Terada Y, **Kamitani W**, Sato K, Koyanagi Y, Hijikata M, Shindo K, Noda T, Kohara M, Hotta H. Broad-spectrum antiviral agents: secreted phospholipase A(2) targets viral envelope lipid bilayers derived from the endoplasmic reticulum membrane. *Sci Rep*. 2017 Nov 21;7(1):15931. 査読有
3. Terada Y, Kawachi K, Matsuura Y, **Kamitani W**. MERS coronavirus nsp1 participates in an efficient propagation through a specific interaction with viral RNA. *Virology*. 2017 Aug 23;511:95-105. 査読有
4. Sakai Y, Kawachi K, Terada Y, Omori H, Matsuura Y, **Kamitani W**. Two-amino acids change in the nsp4 of SARS coronavirus abolishes viral replication. *Virology*. 2017 Oct;510:165-174. 査読有

### 〔学会発表〕(計9件)

1. Kengo Kawachi, Matsuura Yoshiharu and **Wataru Kamitani** (2018). Host mRNA surveillance pathway regulates SARS coronavirus replication. 第66回日本ウイルス学会学術集会 京都
2. Yutaka Terada, Yoshiharu Matsuura, **Wataru Kamitani** (2018). Investigation of the functions of RNA structures within the MERS coronavirus genome. 第66回日本ウイルス学会学術集会 京都
3. Tsubasa Yamada, Kengo Kawachi, Yutaka Terada, Yoshiharu Matsuura, **Wataru Kamitani** (2018). Role of nuclear localization of MERS coronavirus nsp1 in viral replication. 第66回日本ウイルス学会学術集会 京都
4. Yutaka Terada, Yoshiharu Matsuura, **Wataru Kamitani** (2018). Functions of RNA structures within the MERS coronavirus genome. The 17th Awaji International Forum on Infection and Immunity 兵庫淡路
5. 寺田 豊、黒田雄大、前田 健、**神谷 亘**(2018). 高 FIP 起病性を有する I 型 FCoV 株を用いた逆遺伝子操作系の作出. 第161回日本獣医学会学術集会 茨城つくば
6. 鈴木 亨、**神谷 亘**、大橋 誠一(2018). 豚流行性下痢ウイルスの S 遺伝子の機能解析. 第161回日本獣医学会学術集会 茨城つくば

7. Kawachi K, Sakai Y, Matsuura Y, Kamitani W (2017). C-terminus region in nsp2 of SARS coronavirus is important for localization to nsp3-nsp4 complex and viral replication. 第 65 回日本ウイルス学会学術集会 大阪
8. Terada Y, Matsuura Y, Kamitani W (2017). Identification of the cis-acting element in MERS coronavirus genome. 第 65 回日本ウイルス学会学術集会 大阪
9. Terada Y, Matsuura Y, Kamitani W (2017). Identification of functional regions of MERS-CoV nsp1. American Society for Virology-2017 Annual Meeting 米国

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号 (8 桁)：

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。