

平成 30 年 5 月 21 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15032

研究課題名(和文)フラビウイルスによる局所翻訳制御ハイジャックが誘発する脳高次機能異常の病態解明

研究課題名(英文) Neuro-pathogenesis of flavivirus by hijack of dendritic transport

研究代表者

好井 健太郎 (YOSHII, Kentaro)

北海道大学・獣医学研究院・准教授

研究者番号：50421988

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：神経向性のフラビウイルスの感染は、様々な脳神経の高次機能障害を引き起こすが、その機序は殆ど不明である。近年、神経細胞は複雑な神経活動の即時的な制御のために、mRNAを神経突起上に輸送し局所的に蛋白合成を行う、局所翻訳制御機構を持つことが分かってきた。本研究ではこの神経細胞の局所翻訳制御に着目して、神経細胞のmRNA局所翻訳制御機構を利用したウイルスRNA輸送の分子機序の解析を行い、ウイルスゲノムRNAの局所輸送・翻訳による神経病態への影響を検討することで、フラビウイルスは局所翻訳制御機構のハイジャックを行い、これにより特徴的な神経病態を発現している事が示された。

研究成果の概要(英文)：Flaviviruses represent a significant threat to public health worldwide, and several flaviviruses cause severe neurological disease in humans and animals. However, no specific treatment has been developed due to the lack of information about the detailed pathogenic mechanisms. In current study, we revealed that the transport of the viral RNA of tick-borne flavivirus in neuronal dendrites was involved in the development of the neurological disease. The virus hijacked the transport system of host mRNA in dendrites, which is important for neuronal functions, such as neurogenesis and the plasticity of the synaptic communication. Our findings of this unique virus-host interaction will promote the study of neurodegenerative diseases caused by disruption of dendritic mRNA transport and development of their treatment.

研究分野：獣医公衆衛生学

キーワード：フラビウイルス 局所翻訳制御 脳高次機能

1. 研究開始当初の背景

フラビウイルス科フラビウイルス属に属するウイルスの多くは、ダニや蚊等の節足動物によって媒介されており、ヒトや家畜に感染した場合重篤な症状(脳炎・出血熱等)を引き起こす人獣共通感染症の原因ウイルスが属している。近年話題となっている、デングウイルスやジカウイルスのように、フラビウイルスは世界人口の1/3に感染リスクがあるとされており、また日本脳炎ウイルス、ダニ媒介性脳炎ウイルス等の神経向性フラビウイルスは日本にも常在していて公衆衛生上の重要な問題となっている。しかしその病態発現機序は不明な点が多く、特異的な治療法も開発されていない。

そのような中、近年、神経細胞では軸索や樹状突起等の神経突起上において、膨大な数のシナプス刺激に対して即自的な応答をするために、細胞体で転写された mRNA が突起内で輸送されシナプス刺激などに応じて局所的に蛋白を翻訳する mRNA 局所翻訳制御機構が存在すること明らかになってきている。この局所翻訳制御が、脳における認知・記憶・学習等の高次生命機能を支えており、この機能の異常と様々な神経変性疾患や機能性精神疾患との関連性が指摘されている。

さらに我々は以前の研究において、神経向性フラビウイルス感染した神経細胞の神経突起上でウイルスゲノム RNA が輸送され、その中で翻訳されたウイルス蛋白質が神経突起の構造を変性させることを明らかにし、これが神経突起内の輸送障害等の神経機能異常に関与する可能性を示してきた(Hirano et al., 2014)。

以上のような研究動向の中、申請者は神経病原性の高い神経向性フラビウイルスは、感染した神経細胞の神経突起における局所翻訳制御機構をハイジャックすることで、ウイルスゲノム RNA を神経突起上へ輸送・翻訳し、これにより神経機能異常を引き起こすの

ではないかという着想に至った。

2. 研究の目的

神経向性フラビウイルスのゲノム RNA による神経細胞の mRNA 局所翻訳制御機構の利用について、神経突起上の輸送に関わるウイルスゲノム RNA 中の配列や2次構造を同定するとともに、相互作用する宿主の輸送関連因子を同定し、その機能を解析することで、フラビウイルス RNA による局所翻訳制御機構の利用の分子機序を明らかにする。

フラビウイルス感染による、神経突起における物質輸送の障害や、神経突起の変性等、神経ネットワークや付随する神経機能の障害を解析するとともに、生体レベルにおける影響を解析していくことにより、ウイルスの局所翻訳制御機構のハイジャックが引き起こす神経病態発現機序を明らかにする。

以上の2点を解明することにより、神経向性フラビウイルス感染による神経病態発現機序における mRNA 局所翻訳制御機構の重要性を証明していくことを目的として本研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 神経突起上の輸送に重要な神経向性フラビウイルスゲノム RNA 領域の同定

神経細胞のモデルとなり神経成長因子存在下で神経突起を伸長する PC12 細胞に、神経向性フラビウイルスの遺伝子 RNA 断片を発現させ、発現させた RNA の細胞内局在を FISH 方により検討することにより、ウイルス遺伝子 RNA 中のどの領域・配列が神経突起内の輸送に重要であるかを同定した。

(2) 神経向性フラビウイルスゲノム RNA 輸送に関与する宿主因子の解析

マウス初代培養神経細胞を用いて、神経向性フラビウイルス感染をさせた後の、ウイルス遺伝子 RNA と、局所翻訳制御機構に関連す

る各種宿主 RNA 結合蛋白の細胞内局在を解析した。

神経突起内でのウイルス遺伝子 RNA との共局在が認められた宿主 RNA 結合蛋白について、ウイルス遺伝子 RNA との共沈降実験を行い、結合性について解析した。

(3) フラビウイルスの局所翻訳制御機構の利用による神経病態発現機序の解析

マウス初代培養神経細胞を用いて、神経向性フラビウイルス感染をさせた後の、局所翻訳制御機構により輸送される mRNA の細胞内局在を解析し、局所翻訳制御機構への影響を検討した。

さらにウイルスをマウスに感染させ、生存率や神経症状等を検討することにより、神経病態発現への影響を解析した。

4. 研究成果

(1) PC12 細胞を用いたウイルス遺伝子 RNA の発現・神経突起への局在解析により、ウイルス遺伝子 RNA の神経突起内局在にはウイルス遺伝子がコードするウイルス蛋白は必要ではない事が明らかになった。さらにウイルス遺伝子 RNA 中の 5'-非翻訳領域(UTR)中の特定の配列が重要であることが明らかになった(図1)。

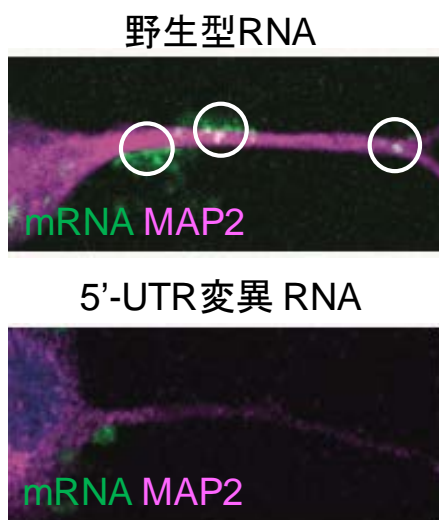


図 1. 野生型ウイルス RNA(上)及び 5'-UTR 変異 RNA(下)の神経突起内分布

この配列は神経向性フラビウイルスの中でも、蚊媒介性フラビウイルスには存在しておらず、ダニ媒介性フラビウイルスに高度に保存されていることが明らかになった。

(2) マウス初代神経培養細胞におけるウイルス遺伝子 RNA と局所翻訳制御機構に関連する各種宿主 RNA 結合蛋白の細胞内局在を解析した所、ウイルス遺伝子 RNA と FMRP との神経突起内における共局在が観察された(図2)。

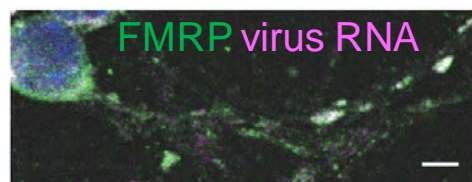


図 2. FMRP(緑)及びウイルス RNA(マゼンダ)の神経突起内分布

RNA 免疫沈降による解析により、ウイルス RNA と FMRP は結合することが明らかになり、この結合はウイルス RNA 中の 5' -UTR の変異及び FMRP 中の局所翻訳制御機構に関わるアミノ酸の変異により阻害されることが明らかになった。

(3) 神経向性ダニ媒介性フラビウイルスを感染させたマウス初代培養神経細胞では、局所翻訳制御機構により輸送される mRNA の神経突起内の分布が減少しており、これは 5' -UTR の変異により軽減されることが明らかになった。

さらにウイルスを感染させたマウスでは、5' -UTR の変異による死亡率や平均生存期間には変化はなかったが、神経症状の発症率が減少することが明らかになった。

以上の研究結果から、ダニ媒介性の神経向

性フラビウイルスは、神経細胞の持つ局所翻訳制御機構をハイジャックすることによりウイルス遺伝子 RNA を神経突起内へと輸送させ局所においてウイルスゲノム複製を行うことが明らかになった。さらにこのハイジャック機構により神経細胞本来の局所翻訳制御機構が阻害されることも明らかになった。これらの事が神経細胞特異的な神経病態発現機序に関与していることが示され、今後は局所翻訳制御機構をターゲットとしたウイルス性神経変性疾患の治療法開発への応用、及び未知な点が多い、局所翻訳制御機構が関与する脳の高次機能の全容解明へと応用されることが期待される。

〈引用文献〉

- ① Hirano M, Yoshii K, Sakai M, Hasebe R, Ichii O, Kariwa H (2014) Tick-borne flaviviruses alter membrane structure and replicate in dendrites of primary mouse neuronal cultures. *J Gen Virol* 95:849-861

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 27 件)

- ① Kusakisako K, Hernandez EP, Talactac MR, Yoshii K, Umemiya-Shirafuji R, Fujisaki K, Tanaka T (2018) Peroxiredoxins are important for the regulation of hydrogen peroxide concentrations in ticks and tick cell line. *Ticks and tick-borne diseases*. In press 査読有
- ② Muto M, Kamitani W, Sakai M, Hirano M, Kobayashi S, Kariwa H, Yoshii K (2018) Identification and Analysis of Host Proteins that Interact with the 3'-Untranslated Region of Tick-Borne Encephalitis Virus Genomic RNA. *Virus Res*. 249: 52-56 査読有
- ③ Fuzik T, Formanova P, Ruzek D, Yoshii K, Niedrig M, Plevka P (2018) Structure of tick-borne encephalitis virus and its neutralization by a monoclonal antibody. *Nat Commun* 9:436 査読有
- ④ 好井健太朗 (2018) 「ダニ媒介性脳炎の現状と最新研究知見について」日本ウイルス学会北海道支部会報 49:10-15 査読無

- ⑤ Hirano M, Muto M, Sakai M, Kondo H, Kobayashi S, Kariwa H, Yoshii K (2017) Dendritic transport of tick-borne flavivirus RNA by neuronal granule affects development of the neurological disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 114:9960-9965 doi: 10.1073/pnas. 査読有
- ⑥ Eyer L, Kondo H, Zouharová D, Hirano M, Valdés J, Muto M, Kastl T, Kobayashi S, Haviernik J, Igarashi M, Kariwa H, Vaculovicova M, Cerny J, Kizek R, Kröger A, Lienenklaus S, Dejmeck M, Nencka R, Palus M, Salat J, Clercq ED, Yoshii K, Růžek D (2017) Escape of tick-borne flavivirus from 2'-C-methylated nucleoside antivirals is mediated by a single conservative mutation in NS5 that has a dramatic effect on viral fitness. *J Virol*. 91. e01028-17. doi: 10.1128/JVI.01028-17. 査読有
- ⑦ Yoshii K, Kojima R, Nishiura H (2017) Unrecognized subclinical infections with tick-borne encephalitis virus in Japan. *Emerg Infect Dis*. 23:1753-1754 doi: 10.3201/eid2310.170918. 査読有
- ⑧ Talactac MR, Yoshii K, Hernandez EP, Kusakisako K, Galay RL, Fujisaki K, Mochizuki M, Tanaka T (2017) Synchronous Langat Virus Infection of *Haemaphysalis longicornis* Using Anal Pore Microinjection. *Viruses* 9(7). doi: 10.3390/v9070189. 査読有
- ⑨ Fukuhara T, Tamura T, Ono C, Shiokawa M, Mori H, Uemura K, Yamamoto S, Kurihara T, Okamoto T, Suzuki R, Yoshii K, Kurosu T, Igarashi M, Aoki H, Sakoda Y, Matsuura Y (2017) Host-derived apolipoproteins play comparable roles with viral secretory proteins Erns and NS1 in the infectious particle formation of Flaviviridae. *PLoS Pathog* 13:e1006475 doi: 10.1371/journal.ppat.1006475. 査読有
- ⑩ Talactac MR, Yada Y, Yoshii K, Hernandez EP, Kusakisako K, Maeda H, Galay RL, Fujisaki K, Mochizuki M, Tanaka T (2017) Characterization and antiviral activity of a newly identified defensin-like peptide, HEdefensin, in the hard tick *Haemaphysalis longicornis*. *Dev Comp Immunol*. 68:98-107 査読有
- ⑪ Kobayashi S, Yoshii K, Hirano M, Muto M, Kariwa H. (2017) A Novel Reverse Genetics System for Production of

Infectious West Nile Virus using Homologous Recombination in Mammalian Cells. *J Virol Methods*. 240:14-20 査読有

- ⑫ Nakao R, Matsuno K, Qiu Y, Maruyama J, Eguchi N, Nao N, Kajihara M, Yoshii K, Sawa H, Takada A, Sugimoto C (2017) Putative RNA viral sequences detected in an *Ixodes scapularis*-derived cell line. *Ticks Tick Borne Dis*. 8:103-111 査読有
- ⑬ Yoshii K., Song JY, Park SB, Yang J, Schmitt HJ (2017) Tick-borne encephalitis in Japan, the Republic of Korea, and China. *Emerg Microbes Infect.* 6:e82 doi: 10.1038/emi.2017.69 review 査読無
- ⑭ 好井健太郎 (2017) 「ダニ媒介性脳炎ウイルス」 *ウイルス* 67:143-150 査読無
- ⑮ 好井健太郎 (2017) 「ダニ媒介脳炎の疫学, 病態の特徴, 治療・予防方法」 *日本医事新報* 4877:59 査読無
- ⑯ 好井健太郎 (2017) 「ダニ媒介性脳炎ウイルス」 *感染・炎症・免疫* 47:80-81 査読無
- ⑰ 好井健太郎 (2017) 「日本におけるダニ媒介性脳炎の現状と課題」 *獣医畜産新報* 70:429-432 査読無
- ⑱ Inagaki E, Sakai M, Hirano M, Muto M, Kobayashi S, Kariwa H, Yoshii K (2016) Development of a serodiagnostic multi-species ELISA against tick-borne encephalitis virus using subviral particles. *Ticks Tick Borne Dis*. 7: 723-9 査読有
- ⑲ Kobayashi S, Suzuki T, Kawaguchi A, Phongphaew W, Yoshii K, Iwano T, Harada A, Kariwa H, Orba Y, Sawa H (2016) Rab8b Regulates Transport of West Nile Virus Particles from Recycling Endosomes. *J Biol Chem*. 291:6559-68 査読有
- ⑳ Talactac MR, Yoshii K, Maeda H, Kusakisako K, Hernandez EP, Tsuji N, Fujisaki K, Galay RL, Tanaka T, Mochizuki M (2016) Virucidal activity of *Haemaphysalis longicornis* longicin P4 peptide against tick-borne encephalitis virus surrogate Langat virus. *Parasit Vectors* 9:59 査読有

〔学会発表〕 (計 83 件)

- ① 好井健太郎 ダニが媒介する人獣共通感染症 日本感染管理ベストプラクティス“Saizen”研究会北海道ブロック第3回セミナー 2018

- ② 好井健太郎 日本におけるダニ媒介脳炎の現状と課題 平成 29 年度獣医学術学会年次大会 2018
- ③ 中安美樹、小林進太郎、平野港、武藤芽未、荻和宏明、好井健太郎 ダニ媒介性ウイルスのウイルス様粒子を用いた新規 IgM-ELISA 系の開発 第 65 回日本ウイルス学会学術集会 2017
- ④ 神原真生、平野港、武藤芽未、石塚万里子、小林進太郎、荻和宏明、好井健太郎 ダニ媒介性ウイルス感染におけるダニ由来 RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ (RdRp) の機能解析 第 65 回日本ウイルス学会学術集会 2017
- ⑤ Memi Muto, Wataru Kamitani, Mizuki Sakai, Minato Hirano, Shintaro Kobayashi, Hiroaki Kariwa, Kentarō Yoshii Identification of host proteins interacting with the 3' UTR of Tick-borne Encephalitis Virus 第 65 回日本ウイルス学会学術集会 2017
- ⑥ 好井健太郎 ダニ媒介性フラビウイルスの病原性発現機序に関する研究 第 65 回日本ウイルス学会学術集会 2017
- ⑦ Minato Hirano, Memi Muto, Hirofumi Kondo, Mizuki Sakai, Shintaro Kobayashi, Hiroaki Kariwa, Kentarō Yoshii ダニ媒介性脳炎ウイルスゲノム RNA と Neuronal Granule を構成する RNA 結合タンパク質との相互作用の解析 第 65 回日本ウイルス学会学術集会 2017
- ⑧ 西山祥子、平野港、武藤芽未、神原真生、小林進太郎、荻和宏明、好井健太郎 ダニ媒介性脳炎ウイルス由来 subgenomic flavivirus RNA の機能解析 第 24 回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会 2017
- ⑨ 武藤芽未、神谷亘、境瑞紀、平野港、小林進太郎、荻和宏明、好井健太郎 ダニ媒介性脳炎ウイルスの 3'非翻訳領域に関わる宿主因子の検索 第 24 回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会 2017
- ⑩ 平野港、武藤芽未、近藤寛史、境瑞紀、小林進太郎、荻和宏明、好井健太郎 ダニ媒介性脳炎ウイルスゲノム RNA と Neuronal granule の相互作用の解析 第 24 回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会 2017

- ⑪ 好井健太郎 日本におけるダニ媒介性脳炎 update 2016-2017 第 24 回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会 2017
- ⑫ 神原真生、平野港、武藤芽未、石塚万里子、小林進太郎、苺和宏明、好井健太郎 ダニ媒介性ウイルス感染におけるダニ RNAi 関連因子の機能解析 第 160 回日本獣医学会学術集会 2017
- ⑬ 好井健太郎 フラビウイルスの疫学および病態発現機序に関する研究 第 160 回日本獣医学会学術集会 2017
- ⑭ Minato Hirano, Memi Muto, Hirofumi Kondo, Mizuki Sakai, Shintaro Kobayashi, Hiroaki Kariwa, Kentaro Yoshii Genomic RNA of tick-borne encephalitis virus is transported in neuronal dendrites via neuronal granule machinery International Union of Microbiological Societies 2017
- ⑮ 好井健太郎 ダニ媒介性脳炎の現状と最新研究知見について 日本ウイルス学会北海道支部 第 51 回夏季シンポジウム 2017
- ⑯ Sayaka Yamauchi, Shintaro Kobayashi, Minato Hirano, Memi Muto, Mariko Ishizuka, Hiroaki Kariwa, Kentaro Yoshii Analysis of genome replication and packaging of Tick-borne encephalitis virus using trans-complementation 第 64 回日本ウイルス学会学術集会 2016
- ⑰ Yoshii, K Tick-borne encephalitis in Japan 第 64 回日本ウイルス学会学術集会 2016
- ⑱ Minato Hirano, Mizuki Sakai, Memi Muto, Shintaro Kobayashi, Hiroaki Kariwa, Kentaro Yoshii Analysis of the transport mechanism of the genomic RNA of flavivirus in neurites 第 64 回日本ウイルス学会学術集会 2016
- ⑲ 近藤 寛史、平野 港、石塚 万里子、武藤 芽未、小林 進太郎、苺和 宏明、Ruzek Daniel、好井 健太郎 ダニ媒介性脳炎ウイルスの Nucleoside Inhibitor 耐性変異の解析 第 159 回日本獣医学会学術集会 2016
- ⑳ 平野 港、境 瑞紀、武藤 芽未、小林 進

太郎、苺和 宏明、好井 健太郎 フラビウイルスゲノムの神経細胞内輸送機構の解析 第 159 回日本獣医学会学術集会 2016

〔図書〕(計 2 件)

- ① Daniel Ruzek, Kentaro Yoshii, Marshall E. Bloomc, Ernest A. Gould Global Health press, Tick-Borne Encephalitis, 2017 12-26
- ② Kentaro Yoshii, Global Health press, Tick-Borne Encephalitis, 2017 187-188

6. 研究組織

(1)研究代表者

好井 健太郎 (YOSHII Kentaro)

北海道大学・大学院獣医学研究科・准教授

研究者番号：50421988