

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15038

研究課題名(和文) RNA編集システムを用いた新奇の鳥インフルエンザウイルス不活化戦略

研究課題名(英文) A novel strategy on inactivation of avian influenza virus by RNA editing system

研究代表者

堀本 泰介 (Horimoto, Taisuke)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・教授

研究者番号：00222282

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)：本研究では、新奇の革新的RNA編集テクノロジーであるCRISPR/FnCas9システムを用いたウイルスゲノムの不活化戦略による、鳥インフルエンザ制御法の確立を目指した。この目的のため、本システムに必須なrgRNAとFnCas9をそれぞれ発現するインフルエンザウイルスベクターの構築を試みたが、挿入配列の部分欠失が見られ期待するウイルスベクターは得られなかった。挿入配列によるベクターウイルスのゲノムパッケージング阻害が原因だと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we used a new RNA editing technology, CRISPR/FnCas9 system, for prevention of avian influenza virus infection, whose genome RNA would be inactivated. To this end, we constructed several influenza virus vectors, each of which expresses either rgRNA or FnCas9, by reverse genetics. However, we were not able to generate such vectors having proper inserted sequences, which could be utilized for this system.

研究分野：獣医ウイルス学

キーワード：ウイルス

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 高病原性鳥インフルエンザは、毎年のように日本に侵入し、家禽産業に甚大な経済被害を及ぼしている。海外では、ヒトにも散発的に感染し、死亡者を出している。鳥インフルエンザウイルスは血清亜型が多様な上に抗原変異が頻発するため、流行株の予測は不可能であり、効果的なワクチン製造は難しい。現行不活化ワクチンでは、感染動物からのウイルス排出を抑えることができないため、緊急時以外は使用が禁止されている。耐性ウイルスの出現やコスト面から、抗ウイルス薬はヒト以外には適応されない。新しいインフルエンザ感染制御戦略が渴望されている。

(2) 近年、*Streptococcus pyogenes* 由来の SpCas9 を用いた CRISPR/SpCas9 によるゲノム編集法が確立されたが、主に DNA を標的とする。一方、*Francisella novicida* 由来の FnCas9 による CRISPR/FnCas9 システムは標的配列を含む 120 塩基程度の RNA-targeting guide RNA (rgRNA) と FnCas9 を細胞に発現させると、効率的に標的 RNA を切断できることが報告された。実際、本年度になって CRISPR/FnCas9 によって、培養細胞レベルにおいては C 型肝炎ウイルス RNA を特異的に切断し増殖抑制する可能性が示された。

## 2. 研究の目的

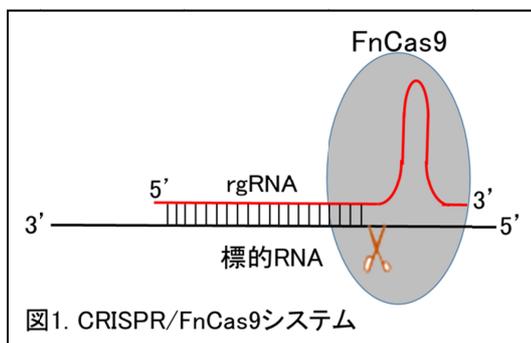
(1) 本研究では、新奇の革新的 RNA 編集テクノロジーである CRISPR/FnCas9 システムを用いたウイルスゲノムの不活化戦略により、動物のウイルス感染症の制御・治療法の確立を目指す。この目的のため、ウイルスベクターと CRISPR/FnCas9 システムを融合させる独自の方法を開発し、これまで困難とされる RNA

ウイルス感染症、具体的には鳥インフルエンザの制御を目指す。その成果は、新しい抗インフルエンザ戦略としてのブレイクスルーとなる方法論を提供すると期待される。

(2) 本研究の意義は、RNA ウイルスの増殖抑制に RNA ゲノム編集システムを初めて応用する点、全てのインフルエンザウイルスをユニバーサルに制御できる点、ウイルスベクターを利用する方法の独自性、鳥インフルエンザに対して画期的な制御法を提供する点である。また、本戦略は他の RNA ウイルス感染症の制御にも応用できる潜在性がある。

## 3. 研究の方法

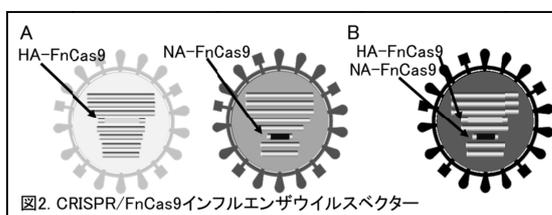
(1) 本研究は、新規の RNA 改変技術である CRISPR/FnCas9 システムとインフルエンザウイルスベクターを融合させる画期的な方法により、鳥インフルエンザウイルスの増殖を制御する戦略である。この方法では、CRISPR/FnCas9 システムに必須な rgRNA と FnCas9 をそれぞれ発現するインフルエンザウイルスベクターを、鳥インフルエンザウイルス感染動物に投与することでウイルス RNA を切断・不活化し、ウイルス増殖を抑制する。



(2) rgRNA および FnCas9 発現インフルエンザウイルスベクターの構築を構築する。インフ

ルエンザウイルスに外来遺伝子を搭載させる方法はすでに確立されている。本研究では、赤血球凝集タンパク質（HA）分節あるいはノイラミニダーゼ（NA）分節のパッケージングシグナルと rgRNA あるいは FnCas9 遺伝子を持たせた組換えウイルスをそれぞれ作製する。

(3) HA および NA 分節にそれぞれ rgRNA 遺伝子と FnCas9 遺伝子を同時に搭載したベクターも作製する。



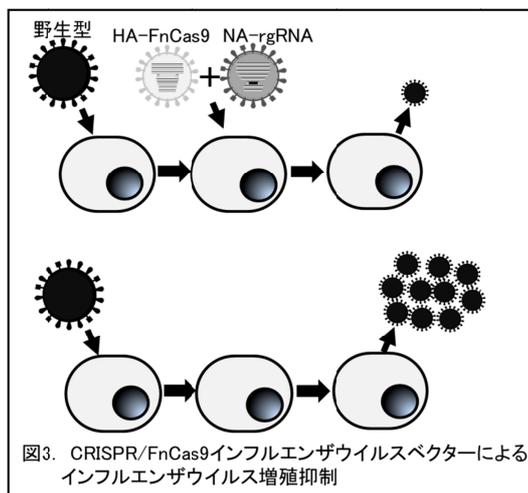
(4) これらのベクターウイルスは、感染性粒子産生に必要な HA と NA タンパク質をトランスで供給することで、培養細胞で効率よく増殖できる。一方、感染動物内では HA や NA タンパク質を発現できず、制限増殖型のベクターとなるため、安全性が高い。

(5) GFP やルシフェラーゼなどのレポーター遺伝子の mRNA を標的とした rgRNA 発現および FnCas9 発現ベクターウイルスを細胞に共感染させて、インフルエンザウイルスベクターによる CRISPR/FnCas9 システムがレポーター発現培養細胞で働くことを確認する。

#### 4. 研究成果

(1) CRISPR/FnCas9 システムに必須となる rgRNA と FnCas9 をそれぞれ発現するインフルエンザウイルスベクターをリバーシジェネティクス法によって作製することを試みる。これら組み換えウイルスが構築できれば、これ

らを鳥インフルエンザウイルスに感染した動物に直接投与するという方法で、感染したインフルエンザウイルスのゲノム RNA をダイレクトに切断することにより、ウイルス増殖を抑制する、つまり鳥インフルエンザを制御できることが期待される。



(2) 今回、インフルエンザウイルスの HA 分節にこれらを搭載する組み換えウイルス。および NA 分節にこれらを搭載する組み換えウイルスなど複数のコンストラクトを試してみた。まず、システムの実現性を評価するためのコントロール実験として、GFP レポーター遺伝子の mRNA を標的とした rgRNA を発現するウイルスベクターの構築を試みた。標的として複数の塩基配列をデザインして HA 遺伝子分節の中に組み込み、リバーシジェネティクスを用いて非増殖型の組み換えウイルスのレスキューを試みたが、期待するものは得られなかった。次に、構築法を変更して、NA 遺伝子分節を用いて同様な組み換えウイルスのレスキューを試みた。その結果、いくつかの組み換えウイルスがレスキューできたものの、挿入配列の欠失が認められ、意図する組み換えウイルスは得られなかった。そこでレトロウイルスベ

クターを用いて同様な組み換え体の作出を試みたものの、やはり安定した組み換え体の作出はできなかった。挿入によりベクターウイルスの増殖に何らかの影響を及ぼしていることが考えられた。挿入配列あるいは長さがベクターウイルスのゲノムパッケージングを阻害している可能性を考えている。

## 5. 主な発表論文

[雑誌論文](計2件)

Murakami Shin、Takenaka-Uema Akiko、Kobayashi Tomoya、Kato Kentaro、Shimajima Masayuki、Palmarini Massimo、Horimoto Taisuke

Heparan sulfate proteoglycan is an important attachment factor for cell entry of Akabane and Schmallenberg viruses

Journal of Virology 91 巻、2017、e00503 ~ 17、査読有

DOI: 10.1128/JVI.00503-17

Takenaka-Uema Akiko, Sugiura Keita, Bangphoomi Norasuthi, Shioda Chieko, Uchida Kazuyuki, Kato Kentaro, Haga Takeshi, Murakami Shin, Akashi Hiroomi, Horimoto Taisuke.

Development of an improved reverse genetics system for Akabane bunyavirus.

Journal of Virological Methods 232 巻、2016、16-20、査読有

DOI: 10.1016/j.jviromet.2015.12.014

[学会発表](計1件)

Kamiki Haruhiko, Matsugo Hiromichi, Kobayashi Tomoya, Murakami Shin,

Horimoto Taisuke

PB1-K577E mutation in H9N2 avian influenza virus increases polymerase activity and pathogenicity for mice  
第9回東アジア獣医ジョイントシンポジウム、2018、ソウル

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

堀本 泰介 (HORIMOTO, Taisuke)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授

研究者番号：00222282

(2)研究分担者

村上 晋 (MURAKAMI, Shin)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：10636757