

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08074

研究課題名（和文）外来遺伝子高発現オルソブニヤウイルス作出技術の確立に関する研究

研究課題名（英文）Establishment of a strategy for generation of Orthobunyavirus expressing an enhanced foreign reporter gene

研究代表者

上間 亜希子（Uema, Akiko）

東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・特任助教

研究者番号：20630156

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）： 外来遺伝子として容易に検出できる蛍光タンパク（GFP）発現アカバネウイルスを改変し、より効果的に蛍光発現するウイルスを作出した。このウイルスは、培養細胞レベルで元のウイルスよりも蛍光が早く検出できた。またマウスに対して病原性が増しており、蛍光実体顕微鏡による中枢神経系でのウイルスの可視化に成功した。本研究で作出した改変ウイルスは、未知の感染動態を探索する有用なツールとなる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で行なった蛍光発現アカバネウイルスの改変では、アンチゲノムからの転写やゲノムへの複製が増強されていることが分かった。これまでに報告されたオルソブニヤウイルスのミニゲノムアッセイを使った研究とは逆の結果となっており、オルソブニヤウイルスゲノムに関する新たな知見が得られた。

本研究で確立されたウイルス作出手法により、蛍光遺伝子を別の病原体の遺伝子に置き換えることで、アカバネウイルスの多価ワクチン製造が可能となる。またこの手法は別のウイルスにも応用が期待でき、感染機構の解明に貢献できる。

研究成果の概要（英文）： Although the Akabane virus (AKAV) expressing enhanced green fluorescence protein, we previously generated, was able to detect infected cells in in vivo histopathological study, its fluorescent signal was too weak to apply to in vivo imaging study. Here, we successfully generated a modified reporter virus. The produced virus expressed higher intensity of eGFP fluorescence both in vitro and in vivo than the original virus did. In addition, the virus was pathogenic in mice at a comparable level to that in the original and wild-type virus. In the mice infected with the virus, the fluorescent signals, i.e., the virus-infected cells, were detected in the central nervous system using the whole-organ imaging. Our findings indicate that the modified virus could be used as a powerful tool to help elucidate the dynamics of AKAV in vivo.

研究分野：ウイルス学

キーワード：改変型組換えアカバネウイルス 転写プロモーター活性 感染の可視化

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

アカバネウイルスが家畜反芻獣に引き起こす AH 症候群 (流・早・死産および奇形子の晩出) を特徴とするアカバネ病は、日本をはじめ世界各地で散発的な発生がみられる。野外分離株における病原性の変化 (福富ら、日本獣医師会雑誌 57:101-105, 2004) や神経強毒株の出現 (Miyazato et al., *Jpn J Vet Sci* 51:128-136, 1989) が報告されており、ワクチン接種地域でのアカバネ病の発生は、抗原性、病原性変異株の流行が原因であると考えられる。2011 年にヨーロッパで大流行したシュマーレンベルグウイルスのような新奇オルソブニヤウイルスや、アカバネウイルス変異株の大流行が日本でも懸念されるなか、迅速に新奇ウイルスに対応できるワクチン開発技術は、感染制御の面から重要である。

オルソブニヤウイルスでは、外来遺伝子を安定して発現できる組換えウイルスはこれまで作出できなかったが、応募者は T7 RNA polymerase を用いた reverse genetics 系により、外来遺伝子を安定して発現する組換えオルソブニヤウイルスの作出に初めて成功した (Takenaka-Uema et al., *J Virol* 89:9477-9484, 2015)。このウイルスは、アカバネウイルスの S 分節に蛍光タンパク (GFP) 遺伝子を組み込んだものである。このウイルスを細胞に感染させた場合、ウイルス産生に遅れて蛍光が発現するため、組み込んだ GFP の転写翻訳能が、ウイルスタンパクのそれに比べて弱いことが推察される。この現象を改善し、安定的かつより高度に蛍光タンパクを発現するウイルスが作出できれば、GFP 遺伝子を他の病原体の遺伝子に置き換えることで、効果的なアカバネウイルス多価ワクチンの開発が可能となる。

### 2. 研究の目的

ブニヤウイルスは一本鎖のマイナス鎖 RNA ウイルスで、ゲノムは S、M、L の 3 分節 RNA からなる。アカバネウイルスを含むオルソブニヤウイルスの S 分節では、ゲノム RNA から mRNA が転写され、オーバーラップした読み枠から核タンパク (N) と非構造タンパク (NSs) とが作られる (図 1、AKAV S)。一方、フレボウイルス属やトスポウイルス属の S 分節は、マイナス鎖の N 遺伝子配列とプラス鎖の NSs 遺伝子配列を併せ持つアンビセンス構造をとっており、ゲノムとアンチゲノムの両方からそれぞれ、N と NSs の mRNA が転写されタンパクが合成される (図 1、RVFV S)。応募者が以前に作出した蛍光アカバネウイルスは、フレボウイルス属に属するリフトバレー熱ウイルスのアンビセンス構造をアカバネウイルスの S 分節に取り入れ、新しい転写方式でタンパクを作らせたものである (Takenaka-Uema et al., *J Virol* 89:9477-9484, 2015) (図 1、eGFP-AKAV S)。このウイルス (eGFP-AKAV) を細胞に感染させた場合、蛍光は細胞変性効果 (CPE) が起きた後に発現する。これは、アンチゲノムからの転写がゲノムからの転写に比べて弱いためと考えられる。そこで、この eGFP-AKAV の構造をもとに、挿入遺伝子の転写能力をあげることで、GFP 蛍光を高発現する改変型組換えアカバネウイルスの作出を試みる。作出できた改変型ウイルスは感染細胞で転写・翻訳能力を検討し、*in vitro* での性状を親株の eGFP-AKAV と比較する。またマウスに対する病原性を維持しているかを確認した上で、感染マウス体内組織での蛍光強度についても比較解析する。

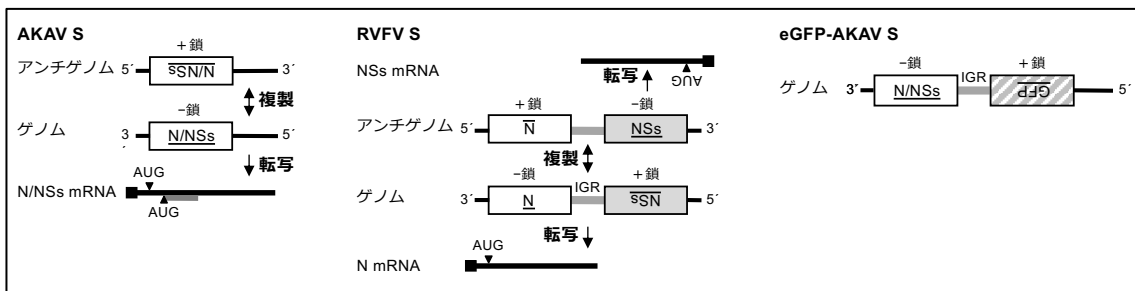


図 1. オルソブニヤウイルスの S 分節構造

### 3. 研究の方法

(1) ブニヤウイルスのゲノムは、各分節の非翻訳領域 (UTR) の両末端十数塩基が互いに相補的に結合してパンハンドルと呼ばれる環状構造を形成しており、RNA 調節やゲノム合成など重要な役割を担う (Lowen and Elliott, *J Virol* 79:12861-12870, 2005)。S 分節の UTR は、アカバネウイルスの 5' UTR が 3' UTR よりもかなり長い配列を有している (3' UTR: 33 nt, 5'

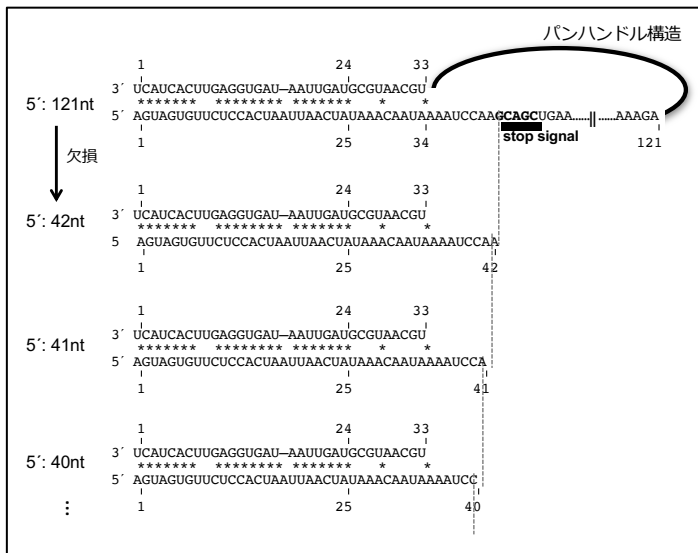


図2. アカバネウイルス S 分節 UTR

UTR: 121 nt) (図2) のに対して、アンピセンス構造を持つリフトバレー熱ウイルスの5' UTRは3' UTRとほぼ同じ長さである(3' UTR: 38 nt, 5' UTR: 34 nt)ことから、アンピセンス構造では短いUTRで転写が可能であることが分かる。またeGFP-AKAVのアンピセンスS構造では介在配列IGR内で転写が終結することが分かっており(Takenaka-Uema et al., *J Virol* 89:9477-9484, 2015)、転写終結シグナル(stop signal) (図2)は不要であると考えられる。そこでeGFP-AKAVのアンピセンスS分節構築をもとに、5' UTRの3'側領域を段階的に削った改変型アンピセンスS

を構築し(図2)、ウイルス回収を試みる。構築した改変型S遺伝子をT7プロモーター配列を持つプラスミドベクター(pT7riboSM2)に組み込んだプラスミドを作製し、同様にM、Lをそれぞれ組み込んだプラスミドと一緒に、T7 RNA polymeraseを恒常発現している細胞(BHK/T7-9)に遺伝子導入する。ウイルス回収は、CPEの有無と蛍光顕微鏡によるGFP検出で判定する。

(2) 回収できた改変型組換えアカバネウイルスについて、培養細胞で蛍光発現時期の変化を観察し、転写・翻訳能力を調べる。アカバネウイルス継代細胞であるHmLu-1細胞に感染させ、継時的に回収した細胞からSおよびGFPのRNAを抽出する。これらのRNA量を、ノーザンブロットングや定量PCRで比較解析する。また培養細胞への病原性を、力価測定、増殖曲線、ブラック形成の大きさを等で解析する。

(3) eGFP-AKAVの親株である野生株(Iriki株もしくは組換えIriki株)は、新生子マウスへの腹腔内投与で致死の病原性を示す(Ogawa et al., *Vet. Microbiol* 124:16-24, 2007; Murata et al., *J Comp Pathol* 153:140-149, 2015)。作出した改変型組換えアカバネウイルスを3日齢マウスに腹腔内投与し、病原性をeGFP-AKAVや野生株と比較する。腹腔内接種後、発症したマウスを安楽殺し、蛍光実体顕微鏡にて腹腔内および脳内の蛍光分布を観察する。

#### 4. 研究成果

(1) eGFP-AKAVの5' UTR欠損S分節プラスミドライブラリーを作製し、5' UTR欠損AKAVライブラリーを作製した。まずeGFP-AKAVのS分節5' UTRを79塩基欠損させて作出したeGFP-AKAV/42のS分節をもとに、さらに1塩基ずつ欠損させた9種類の5' UTR欠損S分節プラスミドを作製した。これらを用いてウイルスレスキューを試みたところ、変異の入っていない5種類のウイルス(eGFP-AKAV/42, eGFP-AKAV/41, eGFP-AKAV/40, eGFP-AKAV/39, eGFP-AKAV/38)が回収できた。これらの改変型組換えウイルスはそれぞれ、5' UTRの121塩基のうち80~83塩基を欠損させたもので、全てのウイルスでCPE発現よりも早期に感染細胞で蛍光が検出できた。

(2) 回収できた改変型組換えアカバネウイルスのうちeGFP-AKAV/42とeGFP-AKAV/38を用いて、*in vitro*での性状解析を行なった。

① 蛍光発現時期の解析: eGFP-AKAV/42, eGFP-AKAV/38およびeGFP-AKAVをmoi=0.01でHmLu-1細胞に感染させ蛍光を観察したところ、eGFP-AKAV/42とeGFP-AKAV/38はeGFP-AKAVよりも蛍光が早く検出できた。さらにウイルス感染領域における蛍光発現率はGFP-AKAV/38が最も高く、100%であった。

② 安定性について: eGFP-AKAV/42, eGFP-AKAV/38およびeGFP-AKAVを10代までHmLu-1細胞で継代し、蛍光検出できたブラック率を継代数ごとに比較して、挿入遺伝子が安定して発現しているかを調べた。eGFP-AKAV/42は8代以降に蛍光が減少傾向を示したが、eGFP-AKAV/38は10代継代でも蛍光保持率は安定してほぼ100%であり、eGFP-AKAV(平均81%)と比べて高かった。

③ 増殖性について: eGFP-AKAV/42とeGFP-AKAV/38、およびeGFP-AKAVと野生株ウイルスを用いて感染細胞での増殖とブラックの大きさを調べた。eGFP-AKAV/38は全てのGFP発現ウイルスの中で最も増殖速度が早く、ブラック形成も最も大きかった。ブラックの大きさは野生株と同等であった。

④ ゲノムの転写能の検討: 蛍光発現時期の違いについて、その原因解明のためにGFP mRNA量をノーザンブロットングで調べる予定であったが、GFP mRNAの発現量が少なく検出不能であったため、リアルタイムPCRを行った。反応産物がGFPゲノムではなくmRNAであることは、反応液を電気泳動し検出したバンドの長さで確認した。その結果、eGFP-AKAV/38はeGFP-AKAVに比べてアンチゲノムから転写されるGFP mRNA量が増えていた。またノーザンブロットングの結果から、アンチゲノムからゲノムへの複製が増強されていることが分かった。これまでに、同じオ

ルソブニヤウイルスのブニヤンベラウイルスで、S分節の5' UTRを削ると転写・複製効率が下がるというミニゲノムアッセイの報告があるが、本研究結果では転写・複製効率が上がるという逆の結果となっており、感染性ウイルスでは異なることが示唆された。

(3) eGFP-AKAV/38 および eGFP-AKAV、野生株を用いてマウスの感染実験を行ない、生体内での蛍光強度についての解析を行なった。eGFP-AKAV/38 は eGFP-AKAV と比較してマウスに対する病原性が増しており、致死率は野生株と同じ 100%であった。発症したマウスの臓器を蛍光実体顕微鏡で観察したところ、eGFP-AKAV 感染では蛍光が検出されなかったのに対して、eGFP-AKAV/38

感染では小脳・大脳・脳幹などの中枢神経系で蛍光が観察され(図3)、オルソブニヤウイルス感染の ex vivo での可視化に初めて成功した。本研究のアンピセンス S 分節の改変による外来遺伝子を高発現させる手法は、他のオルソブニヤウイルスにも応用できると推測され、病原性や感染動態を探索する上で有力なツールとなる。

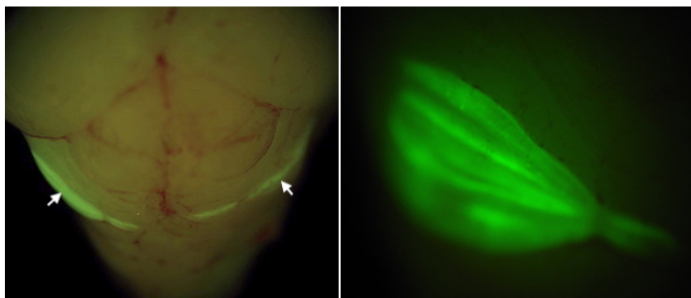


図3. (左) eGFP-AKAV/38 感染マウスの小脳における蛍光検出 (矢印)  
(右) 左図の矢印部分 (左側小脳) の拡大

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 10件）

1. 著者名 Murakami Shin, Sato Ryota, Ishida Hiroho, Katayama Misa, Takenaka-Uema Akiko, Horimoto Taisuke	4. 巻 26
2. 論文標題 Influenza D Virus of New Phylogenetic Lineage, Japan	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Emerging Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 168 ~ 171
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3201/eid2601.191092	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Odagiri T, Ishida H, Kitamura-Kobayashi T, Kamiki H, Matsugo H, Sekine W, Takenaka-Uema A, Murakami S, Horimoto T	4. 巻 2
2. 論文標題 Antigenic variation among bovine Influenza D viruses in Japan	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Veterinary Sciences and Medicine	6. 最初と最後の頁 001-004
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Takenaka-Uema Akiko, Murakami Shin, Ushio Nanako, Kobayashi-Kitamura Tomoya, Uema Masashi, Uchida Kazuyuki, Horimoto Taisuke	4. 巻 11
2. 論文標題 Generation of a GFP Reporter Akabane Virus with Enhanced Fluorescence Intensity by Modification of Artificial Ambisense S Genome	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Viruses	6. 最初と最後の頁 634 ~ 634
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/v11070634	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Okumura Miki, Takenaka-Uema Akiko, Murakami Shin, Horimoto Taisuke	4. 巻 6
2. 論文標題 A Multi-Hemagglutinin-Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assay to Serologically Detect Influenza A Virus Infection in Animals	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Veterinary Sciences	6. 最初と最後の頁 64 ~ 64
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/vetsci6030064	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Murakami Shin, Odagiri Tomoha, Melaku Simenew Keskes, Bazartseren Boldbaatar, Ishida Hiroho, Takenaka-Uema Akiko, Muraki Yasushi, Sentsui Hiroshi, Horimoto Taisuke	4. 巻 25
2. 論文標題 Influenza D Virus Infection in Dromedary Camels, Ethiopia	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Emerging Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 1224 ~ 1226
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3201/eid2506.181158	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kamiki Haruhiko, Matsugo Hiromichi, Ishida Hiroho, Kobayashi-Kitamura Tomoya, Sekine Wataru, Takenaka-Uema Akiko, Murakami Shin, Horimoto Taisuke	4. 巻 14
2. 論文標題 Adaptation of H3N2 canine influenza virus to feline cell culture	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0223507
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0223507	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kobayashi Tomoya, Matsugo Hiromichi, Maruyama Junki, Kamiki Haruhiko, Takada Ayato, Maeda Ken, Takenaka-Uema Akiko, Tohya Yukinobu, Murakami Shin, Horimoto Taisuke	4. 巻 9
2. 論文標題 Characterization of a novel species of adenovirus from Japanese microbat and role of CXADR as its entry factor	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 573
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-37224-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kamiki Haruhiko, Matsugo Hiromichi, Kobayashi Tomoya, Ishida Hiroho, Takenaka-Uema Akiko, Murakami Shin, Horimoto Taisuke	4. 巻 10
2. 論文標題 A PB1-K577E Mutation in H9N2 Influenza Virus Increases Polymerase Activity and Pathogenicity in Mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Viruses	6. 最初と最後の頁 653 ~ 653
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/v10110653	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 ODAGIRI Tomoha, ISHIDA Hiroho, LI Jun-You, ENDO Maiko, KOBAYASHI Tomoya, KAMIKI Haruhiko, MATSUGO Hiromichi, TAKENAKA-UEMA Akiko, MURAKAMI Shin, HORIMOTO Taisuke	4. 巻 80
2. 論文標題 Antigenic heterogeneity among phylogenetic clusters of influenza D viruses	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 1241 ~ 1244
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms.18-0157	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 YAMASHITA-KAWANISHI Nanako, SAWANOBORI Ryoma, MATSUMIYA Kosuke, UEMA Akiko, CHAMBERS James K., UCHIDA Kazuyuki, SHIMAKURA Hidekatsu, TSUZUKI Masano, CHANG Chia-Yu, CHANG Hui-Wen, HAGA Takeshi	4. 巻 80
2. 論文標題 Detection of <i>felis catus</i> papillomavirus type 3 and 4 DNA from squamous cell carcinoma cases of cats in Japan	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 1236 ~ 1240
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms.18-0089	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Murakami Shin, Takenaka-Uema Akiko, Kobayashi Tomoya, Kato Kentaro, Shimojima Masayuki, Palmarini Massimo, Horimoto Taisuke	4. 巻 91
2. 論文標題 Heparan Sulfate Proteoglycan Is an Important Attachment Factor for Cell Entry of Akabane and Schmallenberg Viruses	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 e00503 ~ 17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JVI.00503-17	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Arai Tetsuro, Terao-Muto Yuri, Uchida Shotaro, Lin Che, Honda Tomoyuki, Takenaka Akiko, Ikeda Fusako, Sato Hiroki, Yoneda Misako, Kai Chieko	4. 巻 98
2. 論文標題 The P gene of rodent brain-adapted measles virus plays a critical role in neurovirulence	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of General Virology	6. 最初と最後の頁 1620 ~ 1629
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1099/jgv.0.000842	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 村上晋、佐藤遼太、石田大歩、上間亜希子、堀本泰介
2. 発表標題 新しい遺伝学系統のD型インフルエンザウイルスの分離
3. 学会等名 第67回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石田大歩、神木春彦、松郷宙倫、上間亜希子、村上晋、堀本泰介
2. 発表標題 リバースジェネティクス法で作出したインフルエンザDウイルス粒子内に取り込まれるゲノムRNAの解析
3. 学会等名 第67回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上間亜希子、村上晋、堀本泰介
2. 発表標題 蛍光高発現組換えアカバネウイルスの性状解析
3. 学会等名 第66回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小田切友葉、石田大歩、李俊佑、遠藤麻衣子、上間亜希子、芳賀猛、増田恒幸、大森崇司、田積晃浩、平修、笹川千尋、山中隆史、村上晋、堀本泰介
2. 発表標題 ウシにおけるD型インフルエンザウイルス抗体保有状況の調査
3. 学会等名 第160回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2017年



〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	堀本 泰介  (Horimoto Taisuke)  (00222282)	東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・教授   (12601)	
研究 分担者	村上 晋  (Murakami Shin)  (10636757)	東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・准教授   (12601)	