

令和 4 年 5 月 23 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03477

研究課題名(和文) アレナウイルス遺伝子間配列の翻訳における役割の解明とウイルスベクターへの展開

研究課題名(英文) Determination of the role of the intergenic region (IGR) of arenavirus in translation and rational design of the IGR sequence to develop a novel LCMV vector

研究代表者

岩崎 正治 (IWASAKI, Masaharu)

大阪大学・微生物病研究所・特任准教授(常勤)

研究者番号：90820788

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：アレナウイルスのmRNA(vmRNA)は5'末端にcap構造を持つが、3'末端はポリA付加を受けない特徴がある。人工的に合成したvmRNA様RNAを用いたレポーターアッセイにより、1) vmRNA 3'-UTRのORF直下のごく一部の領域(proximal region, PR)及びその部分のRNA2次構造が翻訳に重要な役割を果たすこと、2) vmRNAの翻訳はウイルスタンパク質非依存かつ細胞mRNAの翻訳に必要なポリA結合タンパク質(PABP)非依存であることを明らかにした。さらに、3) 組換えLCMVを用いて、PR配列に変異を加えることで外来遺伝子の発現量を制御できることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ラッサ熱を引き起こすラッサウイルスの様に、アレナウイルス科にはヒトに重篤なウイルス性出血熱症を引き起こす、公衆衛生上重要な病原体が複数含まれる。本研究ではアレナウイルスのmRNAに特徴的な、ポリA付加を受けない3'-UTR配列の翻訳制御における役割を明らかにした。今後さらに詳細に解析を進めることで、翻訳効率の調節により、弱毒化の程度を制御可能なラッサウイルス弱毒生ワクチンの開発や、外来遺伝子の発現量を自由自在に制御できる新規ウイルスベクター開発への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Mammarenavirus mRNA is characterized by 5'-capped and 3'-non-polyadenylated untranslated regions (UTRs). We previously reported that the non-polyadenylated 3'-UTR of viral mRNA, which is derived from the non-coding intergenic region (IGR), regulates viral protein levels at the post-transcriptional level. In this study, using in vitro-transcribed RNA mimics encoding a reporter gene, we showed that the 3'-UTR of lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) nucleoprotein mRNA without a poly(A) tail promoted translation in a poly(A)-binding protein-independent manner. We compared the 3'-UTR of this mRNA with the 3'-UTR of LCMV glycoprotein precursor mRNA, which is translated less efficiently. We found that a 10-nucleotide sequence proximal to the nucleoprotein open reading frame and its predicted secondary structure were critical for promoting translation. Modification of the 10-nucleotide sequence also affected reporter gene expression in cells infected with recombinant LCMV.

研究分野：ウイルス学

キーワード：翻訳制御 アレナウイルス 遺伝子発現 非翻訳領域 ウイルスベクター マイナス鎖RNAウイルス

1. 研究開始当初の背景

ラッサ熱の原因となるラッサウイルス (Lassa virus, LASV) のように、アレナウイルス科 (Arenaviridae)、哺乳類アレナウイルス属 (*Mammarenavirus*、以下、単にアレナウイルスと表記する) にはウイルス性出血熱を引き起こす病原体が複数含まれる。これらのウイルスはそれぞれの流行地域で公衆衛生上、深刻な問題となっている。特にラッサウイルスは西アフリカにおいて毎年数十万人の感染者を出す、アレナウイルスでは最も人類への影響が大きい病原体である。重要なヒトの疾患でありながら、ラッサ熱に対する特異的な治療法や予防法は確立されていない。ラッサ熱は世界保健機関 (World Health Organization, WHO) によって、エボラウイルス病等とともに Blueprint priority diseases に指定されており、その対策が世界的な課題となっている。疫学的観点から、ラッサウイルスのコントロールには1回の接種で長期間の細胞性、液性免疫を付与できる弱毒生ワクチンが最も有効な方法であると考えられている。一般的に弱毒生ワクチンの開発には連続継代という手法が多く取られてきた。しかし、連続継代で得られたランダムな変異による弱毒化では、そのメカニズムを解明することはほとんど不可能である。そのため、新たな変異を獲得することによる病原性の復帰を否定することができない。そこで、弱毒化メカニズムが明確な新しい方法による弱毒生ワクチンの開発が求められている。しかし、ラッサウイルスの取り扱いには最高レベルの封じ込め施設 BSL-4 (biosafety level 4) が必要であり、このことが研究の大きな妨げとなっていた。そこで我々は BSL-2 施設で取り扱い可能でラッサウイルスと近縁のリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス (lymphocytic choriomeningitis virus, LCMV) を用いて研究を行ってきた。全世界に分布する LCMV はアレナウイルスのプロトタイプであり、免疫不全患者や妊婦の感染で問題となる重要な病原体である。しかしその認識は低く、いわゆる顧みられない病原体 (neglected pathogen) とされている。我々は以前の研究でウイルスゲノムの非翻訳領域 (untranslated region, UTR) である遺伝子間領域 (intergenic region, IGR) に由来する、ウイルス mRNA (vmRNA) の 3'-UTR 配列が翻訳効率を制御することを発見した (Iwasaki et al., *J Virol.* 2015, 2016)。さらに IGR 配列に変異を加えウイルスタンパク質の発現バランスを破壊させることでウイルスを弱毒化し、なおかつ病原性親株に対して十分な防御免疫を付与できる弱毒生ワクチン株作製技術を開発した。しかし、IGR 配列がどのように翻訳効率に影響を与えるのか、その詳細な分子メカニズムは分かっていなかった。

2. 研究の目的

アレナウイルスは、2分節のマイナス鎖 RNA をゲノムに持つエンベロープウイルスである。S、L 分節のゲノム RNA にはそれぞれ2つの遺伝子が逆向きに配置され、その間は遺伝子間領域 (intergenic region, IGR) と呼ばれる非翻訳領域で仕切られている (図 1A)。S 分節はヌcleoプロテイン (nucleoprotein, NP) 及び糖タンパク質前駆体 (glycoprotein precursor, GPC) をコードする。GPC は翻訳中や翻訳後に宿主のプロテアーゼに切断され、N 末端側から stable signal peptide (SSP)、GP1、GP2 の 3 つに分けられる。SSP、GP1、GP2 は受容体の認識や細胞侵入を担う糖タンパク質複合体 (GP) を形成する。L 分節には RNA 依存性 RNA ポリメラーゼの L タンパク質及びマトリックスタンパク質に相当する Z タンパク質がコードされている。ウイルスは細胞への侵入後、L タンパク質の働きによって S 分節ゲノム RNA (vRNA) の 3'末端から転写が開始され、IGR が立体障害となって転写が終結することで、5'末端にキャップ構造を持ち、3'末端は poly(A)付加を受けない NP mRNA が合成される (図1B)。ある時点で L タンパク質が複製モードに切り替わり、vRNA 全長をコピーして vRNA と相補的なアンチゲノム RNA (cRNA) が合成される。cRNA からは GPC mRNA や vRNA が合成される。L 分節も同様の方法で遺伝子の転写やゲノム複製が行われる。

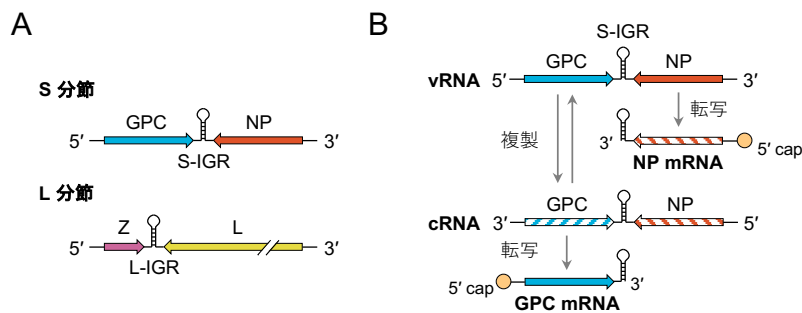


図1. アレナウイルスのゲノム構成 (A) と S 分節の転写・複製機構 (B)

本研究では、IGR に由来し、poly(A)付加を受けないアレナウイルス mRNA の翻訳効率がどのように制御されるのか、ウイルス因子と宿主因子の双方の関わりを解析することにより、その分子機構の解明を目指した。また、アレナウイルスのプロトタイプである LCMV は、感染した細胞に対する傷害性が非常に弱い、非溶解性(non-cytolytic)ウイルスであることが知られている。さらに、LCMV は様々な種類の細胞に感染することができる。これら LCMV の特徴と、IGR 改変による遺伝子発現制御技術を組み合わせることで、搭載外来遺伝子発現量を自在に制御可能な次世代 LCMV ベクター開発に向けた基盤技術の構築を試みた。

### 3. 研究の方法

#### (1) IGR 配列の翻訳制御機能におけるウイルス因子の役割の解析

翻訳効率の高い LCMV NP mRNA 及び翻訳効率の低い GPC mRNA の UTR 配列でレポーター遺伝子 ZsGreen の ORF 配列を挟んだ配列をもつウイルス mRNA 様 RNA (vImRNA) を in vitro 合成し、翻訳効率を ZsGreen の蛍光強度で評価するレポーターアッセイシステムを構築した。UTR 配列を NP mRNA 由来及び GPC mRNA 由来の配列間で様々な組合せで入れ替え、翻訳効率の制御に重要な UTR 配列を分析した。

#### (2) IGR 配列の翻訳制御機能における宿主因子の役割の解析

一部に UTP の代わりに 5-bromouridine-triphosphate (BrUTP)を取り込ませた vImRNA を in vitro 合成し、細胞に導入した。細胞溶解液を回収し、抗 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) 抗体を用いて免疫沈降し、vImRNA と共沈降した宿主タンパク質を分析した。

#### (3) 組換え LCMV を作製し、IGR 配列の改変によりレポータータンパク質発現量をコントロールできるか検証する

(1)の結果を基に、翻訳効率に重要な 3'-UTR 配列に対応する IGR に変異を持つ組換え LCMV を作製し、ウイルスレベルで翻訳効率に与える影響を分析した。

### 4. 研究成果

#### (1) 翻訳制御に重要な vImRNA 3'-UTR の領域の同定と RNA 2 次構造の役割

vImRNA を利用したレポーターアッセイシステムを用いた解析により、NP mRNA ORF 直下 (proximal region, PR) のわずか 10 塩基の配列 (PR<sub>NP</sub>) が翻訳を促進することが明らかになった。PR の配列を翻訳効率の高い LCMV Z mRNA (PR<sub>Z</sub>) 及び翻訳効率の低い L mRNA (PR<sub>L</sub>) の PR 配列に置き換えると、やはり PR<sub>Z</sub>を持つ vImRNA の翻訳効率は高く、PR<sub>L</sub>を持つ vImRNA の翻訳効率は低かった。興味深いことに、この 10 塩基の配列は 2 次構造予測で小さなステムループ構造をとることが示された。そこで、配列は大きく異なるが、同じようなステムループ構造をとるような 10 塩基の配列 (PR<sub>syn</sub>) をデザインし、vImRNA に組み込んだところ、元の 10 塩基の配列 (PR<sub>NP</sub>)を持つ vImRNA と比べて 6 割以上の翻訳活性を示したことから、1 次配列に加え、2 次構造も重要であることが明らかになった (図 2)。

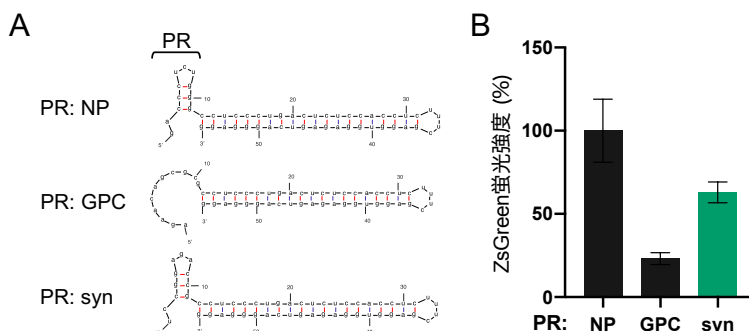


図 2. vImRNA 3'-UTR 配列の予測 2 次構造 (A) と vImRNA の ZsGreen 発現量 (B).

参考文献 (M. Hashizume et al., *J Biol Chem.* 2022) より改変。

#### (2) vImRNA の翻訳は poly(A)-binding protein (PABP) 非依存的である

vImRNA のレポーターアッセイでは、ウイルスタンパク質非存在下で効率的な翻訳が行われることから、vImRNA の翻訳制御には宿主のタンパク質が関与していることが示唆された。vImRNA の免疫沈降により、vImRNA に結合する宿主タンパク質を分析したところ、3'末端に poly(A)付加を受ける細胞 mRNA の翻訳で重要な役割を果たす poly(A)-binding protein (PABP) は検出されなかった。

PABP を siRNA でノックダウンしても vlmRNA の翻訳効率に影響がなかったことから、vmRNA の翻訳は PABP 非依存的であることが明らかになった。また、vlmRNA の免疫沈降では、二本鎖 RNA に結合する adenosine deaminases acting on RNA (ADAR)が vlmRNA の結合タンパク質として同定された。ADAR の遺伝子ノックアウト細胞を用いて LCMV を感染させたが、ウイルス増殖に影響はなかった。従って、ADAR は vmRNA の翻訳制御には関与していないことが示唆された。ADAR 以外の vlmRNR 結合宿主タンパク質をさらに解析し、vmRNA 翻訳制御に寄与する宿主細胞機構の解明につなげていきたい。

(3) 組換え LCMV の PR 配列の改変により PR の上流遺伝子タンパク質発現量を制御できる。

レポーター遺伝子 ZsGreen ORF 直下の PR に相当する IGR 配列に PR<sub>NP</sub> (r3LCMV/ZsG)、PR<sub>syn</sub> (r3LCMV/ZsG-PR<sub>syn</sub>)、PR<sub>L</sub> (r3LCMV/ZsG-PR<sub>L</sub>)を持つ組換え LCMV を作製した。それぞれの組換え LCMV を Vero E6 細胞に感染させ、ZsGreen 発現量を比較したところ、vlmRNA を用いたレポーターアッセイと同様、r3LCMV/ZsG、r3LCMV/ZsG-PR<sub>syn</sub>、r3LCMV/ZsG-PR<sub>L</sub> の順で ZsGreen 発現量が高かった。したがって、ウイルスレベルでも、PR 配列の改変により、上流に配置した外来遺伝子のタンパク質発現量を制御できることを明らかにした。

(4) 今後の展望

本研究により、vmRNA の翻訳にはウイルスタンパク質を必要とせず、宿主細胞機構が利用されていることが明らかになった。vmRNA に限らず、ヒストン mRNA のように poly(A)配列を持たない細胞 mRNA の存在も知られている。vmRNA の翻訳制御に寄与する宿主因子の今後のさらなる探索及び機能解析により、細胞の新規翻訳機構の発見にも繋がることが期待される。

#### <参考文献>

M. Hashizume, A. Takashima, and M. Iwasaki. A small stem-loop-forming region within the 3'-UTR of a non-polyadenylated LCMV mRNA promotes translation. *J Biol Chem.* 298:101576. 2022.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Cai Yingyun, Iwasaki Masaharu, Motooka Daisuke, Liu David X., Yu Shuiqing, Cooper Kurt, Hart Randy, Adams Ricky, Burdette Tracey, Postnikova Elena N., Kurtz Jonathan, St. Claire Marisa, Ye Chengjin, Kuhn Jens H., Martinez-Sobrido Luis, de la Torre Juan Carlos	4. 巻 11
2. 論文標題 A Lassa Virus Live-Attenuated Vaccine Candidate Based on Rearrangement of the Intergenic Region	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 mBio	6. 最初と最後の頁 e00186-20.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/mBio.00186-20	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 該当する

1. 著者名 Hashizume Mei, Takashima Ayako, Iwasaki Masaharu	4. 巻 298
2. 論文標題 A small stem-loop-forming region within the 3'-UTR of a nonpolyadenylated LCMV mRNA promotes translation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 101576 ~ 101576
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2022.101576	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Masaharu Iwasaki, Beatrice Cubitt, Daisuke Motooka, Dylan M. Johnson, Igor S. Lukashevich, Juan C. de la Torre
2. 発表標題 Establishment of recombinant ML29 platform for the generation of polyvalent live-attenuated vaccines against Lassa virus and other infectious agents
3. 学会等名 The 18th Awaji International Forum on Infection and Immunity (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mei Hashizume, Ayako Takashima, Masaharu Iwasaki
2. 発表標題 The role of non-polyadenylated 3'-UTR of LCMV mRNA in translation regulation
3. 学会等名 The 19th Awaji International Forum on Infection and Immunity (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 橋爪芽衣、高嶋綾子、岩崎正治
2. 発表標題 LCMV mRNAの3'-UTR内の特定の領域が翻訳効率を制御する
3. 学会等名 第68回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------