

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：34401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K15685

研究課題名(和文) 遺伝子操作系によるネコモルビリウスの分子クローンの樹立と細胞内侵入機構の解明

研究課題名(英文) Establishment of a molecular clone of feline morbillivirus by reverse genetics system and elucidation of its intracellular entry mechanism

研究代表者

坂口 翔一 (Sakaguchi, Shoichi)

大阪医科薬科大学・医学部・助教

研究者番号：20815279

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝子操作系によるネコモルビリウスの分子クローンの樹立に必要な遺伝子組換え実験を行い、ウイルスゲノム、N遺伝子、P遺伝子、L遺伝子それぞれをコードするプラスミドを作製した。また遺伝子導入に当たり、実際のウイルス感染時と同じ条件を設定するため、野生型ウイルス感染時の各遺伝子の発現量を検討した。さらに、ウイルス感染に関わる細胞性因子の同定法の確立、近縁種のウイルス探索システムの構築を行い、それぞれ論文にまとめた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本邦では900万頭近いネコが飼育されており、近年は新規飼養頭数が増加している。ネコは泌尿器疾患の罹患率が比較的高く、その治療・ケアは飼育の負担となっている。ネコモルビリウイルス感染はネコの尿細管間質性腎炎との関与が示唆されていることから、このウイルスを研究することは獣医療・飼い主にとって重要だと考えられる。本研究によりネコモルビリウイルスの性状がさらに明らかとなり、また近縁のウイルスが探索できるようになった。

研究成果の概要(英文)：The plasmids encoding the viral genome, the N gene, the P gene, and the L gene were prepared for the "establishment of a molecular clone of feline morbillivirus by reverse genetics system." Also, to set up the same conditions for transfection as actual virus infection, the expression levels of each gene during infection with wild-type virus were examined. In addition, we established a method for identifying cellular factors involved in viral infection and a system for searching for closely related viruses and summarized the results in two papers, respectively.

研究分野：ウイルス学

キーワード：ネコモルビリウイルス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ネコモルビリウイルスは「はしか」の原因である麻疹ウイルスと同じ、モルビリウイルス属に分類される。しかしその性質は異なっており、麻疹ウイルスが急性の発熱や呼吸器症状、発疹を引き起こす一方、ネコモルビリウイルスは慢性の腎疾患との関連が報告されている。このネコモルビリウイルスに特徴的な病原性がどのような分子メカニズムに起因するのかは不明である。

一般的に、ウイルスの詳細な性状の解析にはリバーシジェネティクス技術による分子クローニングが利用される。リバーシジェネティクス技術とは遺伝子組換えにより、核酸からウイルスを人工的に作出する方法である。様々なウイルスにおいてリバーシジェネティクス系が活用されている一方、ネコモルビリウイルスは2012年に報告されたウイルスだが、リバーシジェネティクス系が樹立されていない。ネコモルビリウイルスとその近縁のウイルス(例えば麻疹ウイルス)の比較や、感染に使われる受容体を同定するためには、組換えウイルスを用いたウイルスタンパク質の詳細な解析が必要である。

2. 研究の目的

ネコモルビリウイルスの病原発現機構がどのような分子メカニズムに起因するのかを調べるため、このウイルスのリバーシジェネティクス系を樹立することを目的とした。またこれを用い、ウイルスが利用する受容体分子の同定、さらには近縁の麻疹ウイルスとの違いを明らかにすることで、モルビリウイルスの全体像をより深く明らかにすることを試みた。

3. 研究の方法

(1)リバーシジェネティクス系の確立

ネコモルビリウイルスのリバーシジェネティクス系は確立されていない。そこで、全長ゲノムの分子クローニング(組換えウイルスの作製)を試みた。ネコモルビリウイルスの全ゲノムをpTM1ベクター(プラスミド)のT7プロモーター下に組み込んだ。また、モノネガウイルスのリバーシジェネティクス系には、ゲノム以外にNPL複合体を作るウイルスタンパク質を供給する必要がある。そこで、ネコモルビリウイルスのN遺伝子、P遺伝子、L遺伝子(サポーター遺伝子)それぞれをpTM1ベクターに組み込んだ。また、T7ポリメラーゼを供給するため、pCAGGS-T7optプラスミド(addgene)を購入した。

一般にモノネガウイルスのリバーシジェネティクス系では、ゲノムとサポーター遺伝子のトランスフェクション比率が、組換えウイルスの産生効率に大きく影響することが報告されている。ネコモルビリウイルスにおけるこの最適な比率は不明である。そこで、ウイルスの野生株感染時のゲノムRNA、サポーター遺伝子それぞれの発現量をリアルタイムRT-PCR系を構築した。使用したプライマー配列は以下の通りである。ゲノムRNA: 5' -aggcgaggagggaatcag-3' および 5' -cgtatcacctggaaccggaac-3'、N遺伝子: 5' -ctttgttatggagttacgctatgggtg-3' および 5' -gcaaatgaactattaacatcccctgaa-3'、P遺伝子: 5' -catctgcaatcaaatgtgtcccg-3' および 5' -ccctcgaatttgagatagaattgtgag-3'、L遺伝子: 5' -ggcatgtgttgggcctgag-3' および 5' -gtcaaacctgggtgtataggctgag-3'。また、これらサポーター遺伝子がコードするタンパク質を認識するポリクローナル抗体を作製した。

ゲノムおよびサポーター遺伝子をコードするプラスミドをネコの腎臓由来培養細胞 CRFK細胞にトランスフェクション試薬 jetPRIME (Vectura) を用いて遺伝子導入した。

(2)ウイルス感染に関わる宿主側要因の解明

ウイルス感染が起こると、細胞は様々な免疫応答をすることでウイルスを排除しようとする。その一つがインターフェロン(IFN)系で、宿主細胞で産生されたIFNが刺激となり、免疫応答に関わる様々なインターフェロン誘導性遺伝子(ISGs)が発現する。こうしたISGsのような細胞性因子を人工的に発現させることで免疫応答を引き起こすことができることから、ウイルス感染で発現上昇する細胞性因子の探索は創薬のシーズ発見に繋がることが期待される。cDNA発現クローニングは、ウイルス複製を制御するこのような細胞因子の探索において、強力なアプローチとして知られている。従来のcDNA発現クローニングでは、シークエン解析のためにcDNAをプラスミドに回収する必要がある場合が多く時間を要する。そこで本研究ではロングリードシークエンサーを組み合わせ、クローニングステップ不要な手法を以下のように構築した。まずcDNAライブラリーを導入したVero細胞にチクングニアウイルス(CHIKV)をチャレンジ感染し、ウイルスに抵抗性を示す細胞を回収した。次にこれら細胞から抽出したcDNAライブラリー由来のcDNA配列をMinIONシークエンサー(Oxford Nanopore Technologies)で網羅的に解読した。

(3)近縁のウイルス探索

Wolfらが報告したRdRp 4,620アミノ酸配列、NCBI Virus databaseに登録されたRNAウイルス由来18,790アミノ酸配列、浦山らが報告したRNAウイルス由来1,143塩基配列、およびUniProtKBに登録された565,928配列を解析に用いた。最初に について配列類似度に基づ

いてクラスタリングを行った。各クラスターについてアライメントを行い、配列全体の75%以上がアライメントされた領域を一つのドメインとし、各ドメインについて HMM プロファイルを作成した。この HMM プロファイルを用いた hmmsearch を行い、 から RdRp 配列を検出し、 から得た RdRp ドメインと合わせたデータセット を NeoRdRp と名付け、それから HMM プロファイルの作成を行った。NeoRdRp について および のデータセットを用いた性能評価を行った。

4. 研究成果

本研究では、ネコモルビリウイルスのリバースジェネティクス系の構築を試みた。その結果、研究(1)よりネコモルビリウイルスのゲノムおよびサポーター遺伝子を T7 プロモーター下流に含むプラスミドが得られた。また、ウイルスゲノムとサポーター遺伝子の発現比率は当初の予想と異なっていた。そこで、サポータープラスミドの比率を変えて、効率のよい組換えウイルス産生を試みている。本研究より、ネコモルビリウイルスのリバースジェネティクス系の基礎が構築された。今後組換えウイルスを作製し、受容体の同定等に活用することが次の課題である。

次に研究(2)より、生き残った細胞から抽出した cDNA の MinION 配列から、TOM7、S100A16、EC11 の N 末端切断型 (EC11 N59)、RPL29 のオープンリーディングフレームが多くの細胞で挿入されていることが判明した。TOM7、S100A16、EC11 N59 を一過性発現させると、Huh7 細胞における CHIKV の複製は阻害され、これらの細胞因子が抗 CHIKV 分子として潜在していることが示された。このように、cDNA 発現クローニングと MinION シーケンサーを組み合わせることで、ウイルスに対する細胞性阻害因子を迅速かつ包括的に検出できることが実証された。この方法はネコモルビリウイルスに対する細胞性因子の同定にも活用することができ、今後活用したい。

さらに研究(3)より、既存のプログラムに比べてコンパクトかつ特異性の高い RNA ウイルス検索システムを構築することができた。今後このシステムを用い、ネコモルビリウイルスに近縁のウイルス探索を試みる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sakaguchi Shoichi, Suzuki Youichi, Emi Akino, Wu Hong, Nakano Takashi	4. 巻 530
2. 論文標題 Identification of cellular inhibitors against Chikungunya virus replication by a cDNA expression cloning combined with MinION sequencing	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 617 ~ 623
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.07.036	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 Sakaguchi Shoichi, Urayama Syun-ichi, Takaki Yoshihiro, Hirosuna Kensuke, Wu Hong, Suzuki Youichi, Nunoura Takuro, Nakano Takashi, Nakagawa So	4. 巻 -
2. 論文標題 NeoRdRp: A comprehensive dataset for identifying RNA-dependent RNA polymerase of various RNA viruses from metatranscriptomic data	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2021.12.31.474423	査読の有無 無
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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 坂口翔一、中川草、呉紅、鈴木陽一、中野隆史
2. 発表標題 RNAウイルス叢解析のためのパイプライン構築
3. 学会等名 第 74 回日本細菌学会関西支部総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 坂口翔一、浦山俊一、高木善弘、中野隆史、布浦拓郎、中川草
2. 発表標題 RNA依存性RNAポリメラーゼを用いたRNAウイルス叢解析パイプライン
3. 学会等名 ウイルス学若手研究集会2021
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
---------	---------