

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：17301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20761

研究課題名（和文）クリミア・コンゴ出血熱ウイルスによるRNA修飾制御機構の解析

研究課題名（英文）Analysis of the RNA-modification of Crimean-Congo Hemorrhagic fever virus infection

研究代表者

平野 港 (Hirano, Minato)

長崎大学・高度感染症研究センター・助教

研究者番号：30901029

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：ブニヤウイルス目は数多くの致死的な人獣共通感染症原因ウイルスが属す。代表例の1つであるクリミア・コンゴ出血熱ウイルス（CCHFV）は出血熱を引き起こし、アフリカからユーラシアにかけ広く分布しており、本邦への侵入も危惧される。その感染機構は不明な点が多く、治療法開発のための基盤情報が必要である。本研究では、CCHFVを中心とするナイロウイルスの複製評価系であるミニゲノム系を作成し、抗ウイルス薬候補の解析およびRNA修飾に着目した性状解析を行った。本研究で得られた化合物のさらなる改変およびRNAメチル化を標的とした抗ウイルス薬の研究はCCHFVの治療法開発への基盤となりうる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究にて樹立されたCCHFVミニゲノム等の代替実験系はクローニングおよび安定発現系の構築が困難であり、バイオセキュリティの観点から譲渡が難しいため世界的に見てもごく少数のグループしか保持していない。BSL-4施設での感染性ウイルスを用いた解析の前段階として非常に有力なツールと成りうる。事実、本系を用い、新規の抗ウイルス薬候補が探索された。また、本研究ではCCHFVの感染を補助する因子としてRNA修飾が機能していることが示された。ウイルス感染における本経路の役割は未知であり、さらなる解析により、将来的な抗ウイルス薬開発の標的を探索する上での基盤情報となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Crimean-Congo hemorrhagic fever virus (CCHFV) belongs to Nairoviridae which has tri-segmented negative-sense RNAs as genome. CCHFV is an arbovirus, typically transmitted by Hylaomma ticks, and causes fatal zoonosis. The mortality rate of CCHFV infection reaches 30%, and there is no specific treatment available. However, little is known about the molecular details of CCHFV infection and its druggable targets. We developed minigenome and viral-like particles system for CCHFV as tools to analyze the viral replication in BSL-2 condition. By using these tools, we analyzed the influence of RNA modification on viral replication and screened antiviral compounds. These results will contribute to identifying the derivatives with stronger activity and to understanding CCHFV virology to develop clinically applicable treatments of CCHFV infection.

研究分野：ウイルス学

キーワード：ナイロウイルス ミニゲノム RNA修飾 トランスクリプトーム

## 1. 研究開始当初の背景

研究代表者らはこれまでにウイルス RNA 輸送および免疫制御因子の pre-mRNA スプライシング等の感染/免疫に関わる細胞内 RNA 動態の研究に従事してきた。近年、RNA 修飾は RNA 二次構造の変化や RNA 結合タンパク質との相互作用の変調を介して、RNA 動態の制御に重要な役割を持つことが示されてきている (Zaccara et al., Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 2019)。そして、核-細胞質 RNA 輸送の阻害や宿主 mRNA 5'-Cap 修飾の奪取 (Cap-snatching) 等、ウイルスは感染を成立させる際、自身のゲノムおよび宿主 RNA の動態制御を様々な方法で行っている。しかし、ウイルス感染/免疫における RNA 動態制御の役割に関する研究はタンパク質レベルでの制御と比較し進展しておらず、中でも RNA 修飾は未知の点が多い。この2点より研究代表者らは、ウイルスは RNA の m6A 修飾を制御し自身の感染に利する機構を持つのではないかと、という本研究の着想に至った。

## 2. 研究の目的

ブニヤウイルス目は 2/3 分節(-)ssRNA をゲノムとして持ち、数多くの致死的人獣共通感染症原因ウイルスが属す。代表例の 1 つであるクリミア・コンゴ出血熱ウイルス (CCHFV) は最大 30%の致死率となる出血熱を引き起こし、アフリカからユーラシアにかけ広く分布しており、本邦への侵入も危惧される。その感染機構は不明な点が多く、ワクチン/ウイルス特異酵素/病態機構を標的とする治療法開発のための基盤情報が必要である。RNA は単純なタンパク質の設計図として細胞内に存在するだけでなく、RNA 修飾と呼ばれる種々の化学修飾を受けた上で生命現象の調節も担っている。中でも、N6-メチルアデノシン (m6A) 修飾は mRNA の 5'-Cap 修飾と共に広範に存在し、METTL3 等のメチル基転移酵素などからなる複合体により可逆的に調節される。

本研究においては高病原性ウイルスの複製および細胞応答の分子基盤解明を目的とし、CCHFV による RNA 修飾制御機構、それに伴うウイルス複製/自然免疫への影響を探索する。研究代表者らは CCHFV は感染の際、Npro により自身のゲノムおよび宿主 RNA を修飾し、ウイルス複製の促進/宿主免疫の制御を行う機構を持つのではないかと、の仮説のもと研究を実施した。

## 3. 研究の方法

本研究においては、研究代表者らは CCHFV のミニゲノム系を樹立し、解析を行った。本系は、ウイルス複製に必須の核タンパク質(N)およびポリメラーゼタンパク質(L)を発現した細胞にレポーター遺伝子として *Luciferase* をコードする疑似ウイルス RNA を導入した。ウイルス複製を模した形で疑似ウイルス RNA が複製され、発現した *Luciferase* タンパク質による複製の度合いを定量可能である。また、このミニゲノム系に加え、ウイルス粒子を形成する GPC を発現させることで一回感染性粒子系を作出し、解析した。これはウイルスゲノムのかわりに疑似ウイルス RNA を内包したウイルス様粒子を作出する手法であり、ウイルスの出芽・細胞侵入を含むすべての過程を評価可能な方法である。これらの手法に加え、任意の細胞内遺伝子の RNAi によるノックダウンおよび次世代シーケンス等により、解析を実施した。

## 4. 研究成果

CCHFV または近縁のウイルスであるハザラウイルス(HAZV)のミニゲノム系をヒト腎由来細胞へと導入したところ、ルシフェラーゼの発現が確認され、ミニゲノム系が働いている事が示された。作出した同系を用いて、抗ウイルス化合物をスクリーニングした結果、リバビリンおよび複数の FDA 承認薬が抗ウイルス活性を持つ可能性が示された。これらの化合物は HAZV の感染性ウイルスにおいて抗ウイルス活性を示し、実際の CCHFV 感染も抑制可能なことが示唆された。しかしながら、CCHFV 感染性ウイルスを用いた動物モデルでの

検証には Biosafety Level-4 施設の稼働が必要であり、実施は困難であった。次に、阻害の分子機構を検証した。抗ウイルスヒット化合物の一つであるテトラサイクリン系抗生物質は N タンパク質の RNA 結合部位に競合することが過去の報告にてシミュレートされていた。研究代表者らの解析での *In silico* での解析でも同様の結果が得られた。そこで N タンパク質の免疫沈降および共沈降 RNA の検出を行った。結果、テトラサイクリン系抗生物質がウイルスタンパク質とゲノム RNA の結合を阻害していることが示された。これらの研究成果は海外査読付き学術誌である *Antiviral Research* にて発表した (Hirano et. al., *Antiviral Res.*, 2022)。

CCHFV および HAZV N タンパク質のアデニルメチル基転移酵素様モチーフである NPPY モチーフに変異を導入したプラスミドを作出した。ヒト腎由来細胞 (293T) に野生型および変異型のプラスミドをトランスフェクションし、分泌型ナノルシフェラーゼ活性を元にミニゲノム活性を測定した。結果、変異導入において優位な活性減少が認められた。NPPY モチーフがウイルス複製を促進する因子であることが示された。ただし、ネガティブコントロールとして用いたウイルス複製を行うことができない RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ変異型と比較すると、ある程度の活性が認められることから、ウイルス複製に必須ではなく、あくまで補助因子としての機能であることが考察された。次に、副腎皮質由来細胞である SW13 細胞を用い、解析を行った。RNAi により RNA 修飾関連因子である METTL3、KIAA1429、FTO のノックダウンを行い、HAZV 感染時のウイルス複製への影響を評価した。結果、RNA のメチル化を担う METTL3 および KIAA1429 のノックダウン時にはウイルス複製の低下が認められた。一方で脱メチル化を担う FTO のノックアウト時には減少が認められなかった。RNA のメチル化がウイルス複製を促進することが示唆された。次に、ウイルスゲノム RNA のメチル化の評価を試みた。メチル化 RNA 特異的な抗体を用いた免疫沈降法により、HAZV 感染 SW13 より RNA を精製し、共沈降した RNA を検出した。結果、約 30% の RNA がメチル化されているという結果が得られた。これは、ポジティブコントロールとして解析したメチル化されることが既知の宿主 RNA と比較し、遜色のない値であり、ウイルスゲノム RNA は高度にメチル化されていることが明らかになった。また、その割合はゲノムセグメントごとに異なり、M セグメントについてはやや割合が低く、メチル化の対象となるモチーフが割合少ないことが示唆された。以上より、ブニヤウイルスのゲノムはメチル化を受けており、これはウイルス複製を補助すると考えられた。

最後に CCHFV N の宿主細胞トランスクリプトームに与える影響を解析するため、N 発現 293T 細胞の次世代シーケンシングによる解析を試みた。回収した RNA の状態を評価するため、バイオアナライザーによる解析を行ったところ、分解等の問題は認められなかった。Poly-A セレクションのない、全 RNA の DNBSEQ による次世代シーケンシングの結果、177 遺伝子の変動が認められた (発現上昇 127、減少 50 遺伝子)。変動した遺伝子のパスウェイ解析の一種である GSEA を実施したところ、N の発現により紫外線による遺伝子ダメージである UV レスポンスに関するパスウェイが活性化していることが明らかになった。N による NPPY モチーフが実際にこのパスウェイ応答に影響をしているかを示すためにはさらなる解析を要する。

本研究では、CCHFV を中心とするナイロウイルスの複製評価系であるミニゲノム系を作出し、抗ウイルス薬候補の解析および RNA 修飾に着目した性状解析を行った。本研究で得られた化合物のさらなる改変および RNA メチル化を標的とした抗ウイルス薬の研究は CCHFV の治療法開発への基盤となりうる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1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 0件）

1. 著者名 Hirano Minato, Sakurai Yasuteru, Urata Shuzo, Kurosaki Yohei, Yasuda Jiro, Yoshii Kentaro	4. 巻 200
2. 論文標題 A screen of FDA-approved drugs with minigenome identified tigecycline as an antiviral targeting nucleoprotein of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Antiviral Research	6. 最初と最後の頁 105276 ~ 105276
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.antiviral.2022.105276	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3件（うち招待講演 1件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Hirano Minato, Sakurai Yasuteru, Urata Shuzo, Kurosaki Yohei, Yasuda Jiro, Yoshii Kentaro
2. 発表標題 Development and application of minigenome and transcriptionally competent virus-like particle systems of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus
3. 学会等名 第68回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hirano Minato
2. 発表標題 Towards the understanding of pathogenic mechanisms of highly pathogenic arthropod-borne viruses.
3. 学会等名 プロテイン・アイランド・松山（PIM）第20回 松山国際学術シンポジウム（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 平野港, 櫻井康晃, 黒崎陽平, 安田二郎, 好井健太郎
2. 発表標題 ミニゲノムおよび複製可能ウイルス様粒子系を用いたナイロウイルス複製機構の解析
3. 学会等名 第165回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2022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
---------	---------