

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24780285

研究課題名(和文)イバラキウイルスにおける新規遺伝子操作系を用いた複製機構の解明

研究課題名(英文)Development of Reverse Genetics for Ibaraki Virus to reveal its replication mechanisms

研究代表者

松尾 栄子 (Matsuo, Eiko)

神戸大学・(連合)農学研究科(研究院)・助教

研究者番号：40620878

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：レオウイルス科オルビウイルス属流行性出血熱ウイルス群に属するイバラキウイルス(IBAV)は、10分節の二本鎖RNAをゲノムに持つ。本研究では、同属のブルータンクウイルスなどの研究を基に、IBAVにおける遺伝子改変法(RGシステム)を開発し、オルビウイルスのVP6には、ウイルス複製に必須でない領域が存在することを初めて明らかにした。さらにその領域を様々なタグに置き換えたIBAVを用いて、ウイルス複製時のVP6の動態を可視化することに成功した。また、VP6の粒子形成時における役割を示唆するデータを得た。

研究成果の概要(英文)：Ibaraki virus (IBAV) is a strain of the epizootic hemorrhagic disease virus (EHDV) serogroup, which belongs to the Orbivirus genus of the Reoviridae family. Reverse genetics (RG) system is one of the strong tools to understand molecular mechanisms of virus replication. Here, we developed a RG system for IBAV to identify a nonessential region of a minor structural protein, VP6, by generating VP6-truncated IBAV. Interestingly, the nonessential region of VP6 is sheared in orbiviruses. In addition, several tags were inserted into the truncated region of IBAV VP6 to produce viable VP6-tagged IBAV. We demonstrated that tagged-VP6 proteins were first assembled into puncta in cells infected with VP6-tagged IBAV. Further, as it is believed that orbivirus VP6 is likely to be important for genome packaging, we tried to clarify how orbivirus VP6 could recruit virus genome into the particle by using several orbivirus RG systems.

研究分野：分子ウイルス学

キーワード：遺伝子改変法 イバラキウイルス VP6 複製機構

## 1. 研究開始当初の背景

イバラキ病は 1959 年日本で初めて報告された嚙下障害を主徴とする牛の感染症(致死率~20%)で、家畜伝染病予防法の届出伝染病である。その原因ウイルスであるイバラキウイルス(Ibaraki virus, IBAV)は茨城県下の発病牛から最初に分離された。ワクチン接種などにより、2000 年を最後にイバラキ病の発生はしばらく途絶えているが、感染モニタリング用の「おとり牛」での IBAV 抗体の陽転が、ほぼ毎年確認されており、今後もアウトブレイクが起こる可能性は否定できない。

IBAV は 10 分節二本鎖 RNA(dsRNA)をゲノムとして有し、レオウイルス科、オルピウイルス属、流行性出血病ウイルス(EHDV)血清型第二群に分類されている。ウイルス粒子はエンベロープを持たない 2 層のカシド構造で、10 分節の二本鎖 RNA(dsRNA)ゲノムと 7 種類の構造タンパク質から構成されている。また、感染細胞内では 4 種類の非構造タンパク質を発現する。

IBAV が属するレオウイルス科のウイルスをはじめとする dsRNA ウイルスでは、感染後、細胞内に放出された core 粒子からウイルス mRNA が合成される。ウイルスゲノム複製に宿主因子を必要としないと考えられているが、ウイルスの複製機構、特にゲノム複製複合体の形成機序については国内外を通じてほとんど解明されていない。その理由の一つとして、特定の変異を導入した感染性ウイルス粒子を効率よく作出できる遺伝子操作法(RG システム)の開発が困難であった事が挙げられる。

近年、レオウイルス科のいくつかのウイルスにおいて RG システムが開発され、特に IBAV と同属である BTV において、複製機序の解明が進み始めている。例えば、ウイルスの産生量を増やすために、初期複製機構が存在することや、これまで機能がよく分かっていなかった BTV 構造タンパク質 VP6 が、初期複製機構、特にゲノムの取り込みに必須であること、ゲノムの選択的取り込みに必須である *cis*-acting element が、BTV ゲノム上に存在することが、明らかになった。また、これらの知見を応用した新規の BTV ワクチンの開発も進んでいる。しかし、日本で、家畜への感染が多く報告されている IBAV の研究はほとんど進んでいない。

## 2. 研究の目的

本研究では、これまでに得られている BTV での知見を基に、まず、日本で家畜への感染が多く報告されている IBAV における RG システムを開発する。さらに、IBAV の複製機序の解明を進めるとともに、新規予防法および治療法の確立に向け、dsRNA ウイルスのゲノム複製複合体の形成機構の解明をさらに大きく推し進めていく。

## 3. 研究の方法

### (1) IBAV の感染性評価

RG システム構築に適した培養細胞を調べるため、様々な培養細胞での IBAV 複製能を比較した。

### (2) IBAV の RG システムの構築

IBAV を感染させた BHK 細胞から精製した core 粒子を用いて mRNA を *in vitro* で合成し、その mRNA を BHK 細胞に導入し IBAV が作製されるかを調べた。

IBAV 感染細胞からゲノム dsRNA を精製し、RT-PCR 法を用いて 10 分節それぞれの完全長 cDNA クローンを作製した。さらに、T7 プロモーター下に各 cDNA を挿入したベクターを作製し、T7 ポリメラーゼを用いて *in vitro* で ssRNA を合成した。合成された ssRNA を BHK 細胞に導入し IBAV が作製されるかを調べた。

### (3) RG システムの改良

IBAV の mRNA を用いて、transfection の回数によるウイルス産生量の変化を調べることで、初期複製機構が存在するかを明らかにした。

各分節の翻訳領域をほ乳動物細胞用高発現ベクターにサブクローニングした。これらのベクターと IBAV の mRNA を様々な組み合わせで、細胞に transfection した場合のウイルス産生量の変化を調べ、最も効率よくウイルスを回収できる条件を決定した。

### (4) 遺伝子組換え IBAV の作製

複製可能な変異を入れた VP6 を発現できる IBAV を変異 S9 ssRNA と mRNA の reassortment によって作製した。

ヘルパー細胞を用いて複製不可能な変異を入れた VP6 を発現できる IBAV を変異 S9 ssRNA と mRNA の reassortment によって作製した。

### (5) 変異 IBAV の性状解析

作製された遺伝子組換え IBAV について、増殖性などの性状を調べ、VP6 の機能について考察した。

## 4. 研究成果

(1) RG システム構築のため、IBAV が効率よく増殖できる培養細胞系を決定した。ハムスター由来細胞である BHK-21 および HmLu 細胞において IBAV が効率よく増幅することが分かった。一方、これまで株化細胞系では細胞向性がないと考えられていた IBAV が増殖出来ない培養細胞株を発見した。また、IBAV の増殖阻止が複製のどの過程で起こっているかを明らかにした。さらに、IBAV 持続感染細胞を樹立した。現在、増殖抑制因子を探索中である。

(2) 既報の精製方法を改変した新しい簡易精製法を用いて、イバラキウイルス(IBAV)の core 粒子を感染細胞(BHK-21)から精製し、SDS-PAGE および電子顕微鏡観察にて純度等を確認した(図 1, Matsuo et al, FEBS Open Bio, 2015)。さらに、精製した core 粒子を用いて *in vitro* で mRNA 合成した。約 25 µg

の core 粒子から 20 µg 以上の mRNA が合成可能であった。以上より、超遠心機を用いずとも、純度の高いウイルス粒子/core 粒子を精製

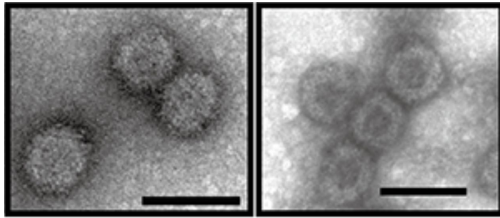


図1 精製 IBAV 粒子(左)および core 粒子(右)  
Bar: 100 nm

が可能であることが明らかとなった。また、core 粒子からゲノム dsRNA を精製し、配列非特異的 RT-PCR 法を用いて 10 分節それぞれの全長 cDNA クローンを作製し、その全塩基配列を確認したところ、既報の配列とは異なる箇所があることが分かった。IBAV を感染させた BHK 細胞から精製した core 粒子を用いて *in vitro* で合成した core mRNA を、BHK 細胞に導入し、IBAV を作製することに成功した。一方、mRNA の代わりに、T7 ベクターから合成された ssRNA を用いた場合、IBAV は作製されなかった。現在、各 T7 ベクターの塩基配列を再確認中である。(3) core mRNA を用いた RG システムによるウイルス産生は、core mRNA の

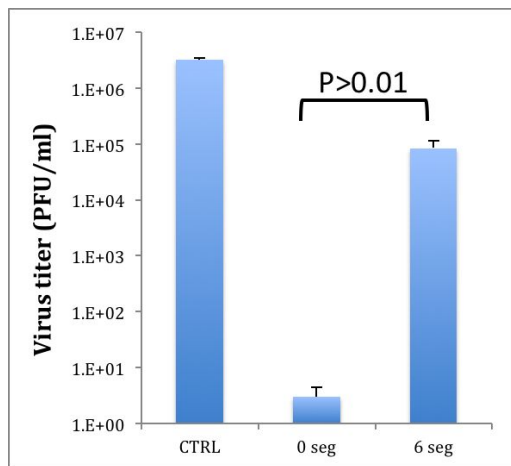


図2 .core タンパク質および NS2 タンパク質の過発現 (6seg) によるウイルス産生の亢進。CTRL; IBV 感染 (MOI 0.01)

double-transfection や、初期複製機構に必要と考えられる IBV タンパク質 (VP1、VP3、VP4、VP6、VP7、NS2) を予め発現させることで、はるかに増加した (図2)。このことから、初期複製機構が IBV の life cycle にも存在することが分かった。さらに、初期複製機構に関与するタンパク質で、最も初期に必要なとされるタンパク質が NS2、次いで VP1、VP4 である可能性を示唆する結果を得た。しかし、全体的にそのウイルス産生効率はブルータングウイルス (BTV) やアフリカ馬疫ウイルス (AHSV) の RG システムに比べて悪いため、

更なる改変が必要と考えられる。

(4) ウイルス産生効率が予想外に悪かったため、他のオルビウイルスで確立されている T7 ベクターを用いた RG システムではなく、core mRNA と、T7 ベクターから人工合成した変異 T7S9ssRNA との reassortment を用いて変異ウイルスを作製した。

まず、IBAV の複製に影響を及ぼさない変異を導入したウイルスを作製した。

BTV VP6 (329 aa) の NMR 解析から、BTV VP6 には、大きなループ領域が二カ所あり、一方のループ領域 (ループ A, aa 34-130) を欠損させてもその三次構造に影響を及ぼさないことが明らかとなった (Matsuo et al, Biochemical and Biophysical Research Communications, 2014)。同様に、IBAV VP6 (337 aa) も、二次構造予想 (Jpred4) の結果より、大きなループ領域が二カ所 (ループ A', aa 31-130、ループ B', aa 292-230) 存在することが分かった (図3、Matsuo et al, FEBS Open Bio, 2015)。構造は似通っているにもかかわらず、これらのループ領域のアミノ酸配列相同性は、ループ領域以外の相同性と比べて低かった。VP6 がウイルスゲノムの取り込みに関与していることと合わせ、本ループ領域が、ゲノムの取り込みにおける種特異性を発揮している可能性が考えられる。

BTV、IBAV とともに、VP6 ループ領域を欠損させた場合も、VP6 の高次構造に影響がない

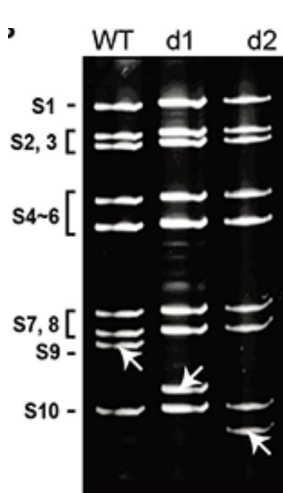


図3 . 変異 BTV のゲノム dsRNA。S9 (VP6) 遺伝子を矢印で示す。

と考えられるため、これらのループ領域欠損 VP6 が機能的であるかを調べるため、RG システムを用いて、VP6 欠損変異 BTV および IBV を作製した。まず、英国ロンドン大学、Roy 教授の協力のもと、ループ A 全体 (d2; aa 34-130) および半分 (d1, aa 34-90) を欠損した VP6 を遺伝的にもつ

遺伝子組換え BTV を作製した (図3) と、d1BTV は複製可能であったが、d2BTV は野生型の BTV VP6 を供給しない限り、複製することができなかった。このことから、aa 34-99 の領域は複製に重要でないことが明らかとなった。次に、IBAV の VP6 (S9 遺伝子) のループ A' 領域に次の 4 種類の欠損変異を入れた: D1, aa 34-76; D2, aa 34-82; D3, aa 34-91; D4, aa 34-129。BHK 細胞を用いた reassortment の結果、D1 および D2 の変異 VP6 をもつ IBV は

作製できたが、D3 および D4 は作製できなかった (Matsuo et al, FEBS Open Bio, 2015)。D1IBAV および、D2IBAV は野生型の IBAV と

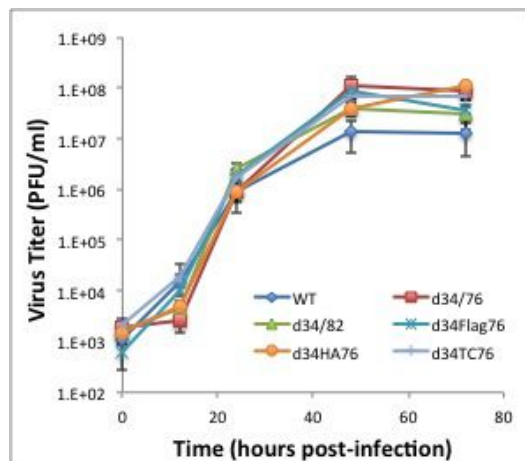


図4. 変異 IBAV の複製能の比較

ほぼ同等の複製能力を有していた (図4)。また、各変異 IBAV を 10 回以上継代しても、欠損箇所は維持されており、少なくとも、aa 34-82 の領域が複製に必須ではないことが明らかになった。さらに、D1IBAV、D2IBAV の core 粒子を精製し、粒子中に欠損 VP6 が取り込まれていることを確認した。しかし、その粒子径は、野生型 IBAV を変わらなかった。次に、aa 34-76 の領域を Flag タグ、HA タグならびにテトラシステインタグ (TC) に置き換えたところ、各タグ付き欠損 VP6 (tagged-VP6) をもつ VP6-tagged IBAV も野生型の IBAV と同程度の複製能を持つことが分かった (図4)。さらに、各 tagged-VP6 は VP6-tagged IBAV 感染細胞内で検出可能であった (図5)。特に TC-VP6 は、生細胞内での VP6 の動態のモニタリングが可能であるため、TC-IBAV は、今後、様々な研究への応用が期待できる。

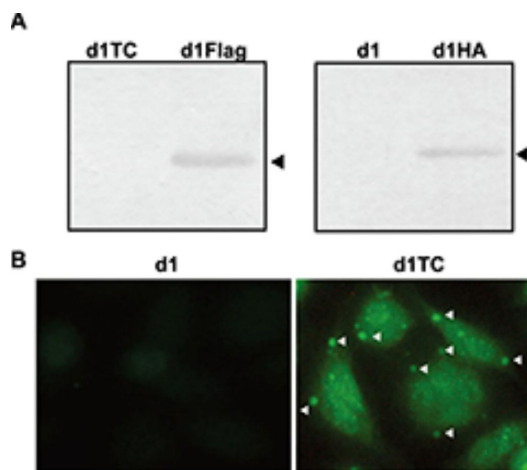


図5. VP6-tagged IBAV 感染細胞での VP6 の抗タグ抗体による検出 (A) および FIAsh 蛍光標識法による検出 (B)。

Tagged-VP6 が機能的であることが分かった

ため、Flag-VP6 を恒常的に発現する BHK 細胞を作製し、ヘルパー細胞 (BHK-F6) とした。BHK-F6 を用いたところ、D3IBAV、D4IBAV とともに作製することができた。現在、これらの変異 IBAV の複製能力を検討中である。

(5) VP6-tagged IBAV 感染細胞内での tagged-VP6 の動態を調べたところ、感染後、早い段階で、VP6 が集塊状になっていることが明らかとなった (図6)。オルビウイルスの初期複製複合体 (core 粒子・サブ core 粒子) は、ウイルス封入体 (NS2) で形成されることから、今回観察された集塊状の構造物はウイルス封入体に VP6 が集まっている状態である可能性が考えられる。

IBAV の複製における VP6 の機能解析の一環として、粒子形成に関与していると考えられ

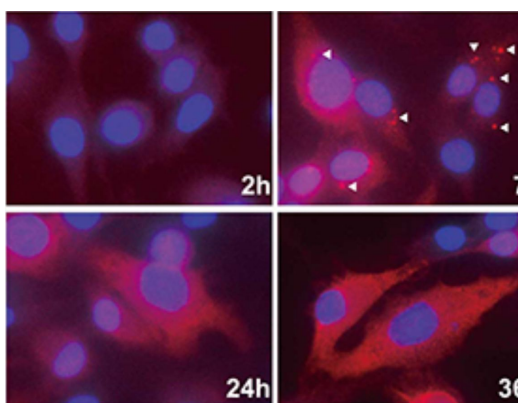


図6. Flag-IBAV 感染細胞内での Flag-VP6 の経時的局在変化。

る領域に変異を入れた VP6 をもつ IBAV を作製した。

BTV で、VP3 と VP6 が結合することが明らかになったため、IBAV においても VP3 と VP6 が結合することを確認した。さらに、BTV VP6 と IBAV VP6 の VP3 結合領域をそれぞれ同定し、VP3 結合モチーフが、オルビウイルスの VP6 に共通して存在していることを明らかにした (Matsuo et al, The 13th Awaji International Forum on Infection and Immunity in Nara, 2014 他)。この VP6 の VP3 結合モチーフに変異を挿入した変異 IBAV および BTV は、ヘルパー細胞以外の細胞では増殖することができないことが明らかとなった。さらに、VP6 と VP3 の結合が、粒子形成に重要な働きをしていることを示唆するデータを得た。現在、VP6 と VP3 の結合のウイルス複製における意義をさらに詳細に検討中である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 5 件)

Eiko Matsuo, Keiichi Saeki, Polly Roy and Junichi Kawano, "Development of reverse

genetics for Ibaraki Virus to produce viable VP6-tagged IBAV” FEBS Open Bio, 査読有, in press, Available online 27 May 2015, <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211546315000510>

松尾 栄子, “特集-Double Strand RNA Virus のウイルス学：オルビウイルスの初期複製と VP6 タンパク質の機能解析” 学会誌「ウイルス」, 査読無, 第 64 巻, 2014, pp. 203-212

Eiko Matsuo, Esther Leon, Steve J Matthews and Polly Roy, "Structure based modification of Bluetongue virus helicase protein VP6 to Produce a viable VP6-truncated BTV" Biochemical and Biophysical Research Communications, 査読有, Vol. 451, 2014, pp. 603-608, <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X14014430>

〔学会発表〕(計 20 件)

Eiko Matsuo, Keiichi Saeki, Polly Roy and Junichi Kawano, “Development of reverse genetics for Ibaraki Virus to produce viable VP6-tagged IBAV” Eighth International Virus Assembly Symposium, 2015. 5.20,

ドゥプロブニク (クロアチア)

Eiko Matsuo, Hideyuki Tsuji, Yu Murakami, Keiichi Saeki, Junichi Kawano and Polly Roy, “The essential interaction of VP6 protein with VP3 for recruitment of the replicase complex into orbivirus particle” The 13th Awaji International Forum on Infection and Immunity in Nara, 2014.9.23, 奈良新公会堂

(奈良県)

Eiko Matsuo, Esther Leon, Steve J Matthews and Polly Roy, "Structural based modification of Bluetongue virus VP6 to produce a viable VP6-truncated BTV" 2014 年国際微生物学会議, 2014.7.28, モントリオール (カナダ)

〔その他〕

ホームページ等

神戸大学農学部インターゲノミクス研究会  
<http://www.research.kobe-u.ac.jp/ans-intergenomics/researcher.html>

神戸大学大学院農学研究科  
<http://www.ans.kobe-u.ac.jp/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

松尾 栄子 (MATSUO EIKO)  
神戸大学・大学院農学研究科・助教  
研究者番号：40620878

(2)研究協力者

Polly Roy (POLLY ROY)  
London School of Hygiene & Tropical  
Medicine (United Kingdom)・教授