

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26660220

研究課題名(和文) ウイルス由来長鎖ノンコーディングRNAが制御する新規病態発現機序の解明

研究課題名(英文) Study of pathogenic mechanism regulated by virus-derived noncoding RNA

研究代表者

好井 健太郎 (YOSHII, Kentaro)

北海道大学・(連合)獣医学研究科・准教授

研究者番号：50421988

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：フラビウイルスには、人や動物に重篤な症状を引き起こす人獣共通感染症の原因ウイルスが多く属しているが、その病態発現機序には不明な点が多い。本研究では、ウイルス由来長鎖ノンコーディングRNAの産生に関わる3'非翻訳領域が、神経向性フラビウイルスであるダニ媒介性脳炎ウイルスの病態発現に重要であることに着目し、本領域の病態発現における機能を解析した。その結果、3'非翻訳領域内の可変領域の高次構造が病態に関与していることを明らかにし、哺乳動物における適応によって生じる変異/欠損によりこの構造が影響を受け、未知の機構により脳における病原性を上昇している可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Flaviviruses include many clinically important zoonotic pathogens, but little is known about the pathogenic mechanism. In our previous study, we showed that the 3'-untranslated region (UTR) is involved in the pathogenicity of the strains of tick-borne encephalitis virus (TBEV). In this study, to investigate the detailed function of the 3'-UTR, we constructed recombinant TBEV with partial deletions in the variable region of the 3'-UTR. In a mouse model, the partial deletions drastically increased the virulence of the virus, with no effect on virus multiplication in mouse brain. These data suggested that the conformational structure of the variable region is associated with the pathogenicity of TBEV. These findings provide a foundation for further research to identify the pathogenic mechanisms of TBEV.

研究分野：獣医公衆衛生学

キーワード：フラビウイルス 脳炎 ノンコーディングRNA 非翻訳領域 ダニ媒介性脳炎ウイルス

1. 研究開始当初の背景

フラビウイルス科フラビウイルス属に属するウイルスの多くは、ダニや蚊等の節足動物によって媒介されており、ヒトや家畜に感染した場合重篤な症状(脳炎・出血熱等)を引き起こす人獣共通感染症の原因ウイルスが属している。近年話題となっている、デングウイルスやジカウイルスのように、フラビウイルスは世界人口の1/3に感染リスクがあるとされており、公衆衛生上の重要な問題となっている。しかしその病態発現機序は不明な点が多く、特異的な治療法も開発されていない。

ゲノムからは蛋白質をコードする mRNA が転写されるだけではなく、大部分の転写 RNA は蛋白質をコードしないノンコーディング RNA(ncRNA)であることが近年明らかになっており、この ncRNA が生命現象の複雑な表現形とその変化を制御しているのではないかと考えられているが、その機能はほとんど不明である。またウイルス研究においても、ウイルスが産生する長鎖 ncRNA (lncRNA)についてはフラビウイルスを含む数種類で判明しているのみであり、感染現象へ与える機能はほとんど不明である。

近年、フラビウイルスはウイルスゲノム由来する lncRNA を産生し、これがウイルスの病原性に関与していることが分かってきた。申請者はこれまでの研究で、フラビウイルスに属し、ヒトに重篤な脳炎を引き起こすダニ媒介性脳炎ウイルス(TBEV)において、ウイルスの高病原性化に関わる要因についての解析を行ってきた。その結果、lncRNA の産生に関わる 3'-非翻訳領域(3'-UTR)内に認められる欠損が病原性を上昇することを明らかにしてきた(Sakai *et al.*, J Gen Virol 2014)。

2. 研究の目的

TBEV の 3'-UTR 領域はウイルス株毎に多様性が認められる可変領域と、ウイルス株間で高度に保存されウイルスゲノムの複製に重要と考えられている保存領域に分けられる。この内、可変領域は自然界で媒介する節足動物の中では保持されているのに対し、哺乳動物体内での増殖・適応過程において変異・欠損が生じることが明らかになっている。特に終末宿主であるヒト(感染患者)では高率に欠損が認められており、申請者が同定した病原性の上昇に関わるのもこの可変領域の欠損である。本研究においては、この可変領域の変異・欠損がどのような機序で病態発現機序に寄与するか、そのメカニズムの解明

を試みた。

3. 研究の方法

(1) ヒトの脳炎患者から分離された TBEV の高病原性株である Sofjin-HO 株 (accession no. AB062064) と、北海道の犬から分離された低病原性株である Oshima 5-10 株 (accession no. AB062063) について、RNA の 2 次構造解析プログラムである MFOLD (<http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold/RNA-Folding-Form>)を用いて、3'-UTR の 2 次構造の解析を試みた。

解析結果を元に、両株で特徴的な 2 次構造を取る領域に着目して、Oshima 5-10 株を元に 2 次構造に欠損・変異を導入した組換えウイルスを作製し、培養細胞における増殖性をマウス神経芽腫由来培養細胞である NA 細胞を用いて確認した。

(2) 作製した組換えウイルス、及び親株を C57BL/6J マウスに 1,000 pfu 皮下接種し、病原性の解析を行った。各 10 匹のウイルス接種マウスを 28 日間観察し、体重の変化及び臨床症状を記録した。また、ウイルス接種後 1、3、5、7、9 日後に、各 3 匹のマウスを安楽殺し、血液、脾臓、脳を採材し、各臓器中のウイルス力価を測定し増殖性を解析した。

(3) 各ウイルスのウイルス由来 lncRNA の産生状態を検討するため、各ウイルスを感染させ 48 時間後の BHK 細胞より RNA を抽出し、DIG 標識した TBEV の 3'-UTR に対する RNA プローブを用いることで、ウイルス由来 RNA を検出した。

またインターフェロン(IFN)系による抗ウイルス応答を解析するために、ヒト神経芽腫培養細胞である SYM 細胞に 4×IRF-3-Luc レポータープラスミドをトランスフェクトし、各ウイルスを感染させて、感染 48 時間後の IFN-β プロモーター活性を測定した。また NA 細胞に pISRE-Luc レポータープラスミドをトランスフェクトし、各ウイルスを感染させて 24 時間後に IFN-α を作用させて、3 時間後に ISRE プロモーターの活性化を測定した。

4. 研究成果

(1) Sofjin-HO 株と Oshima 5-10 株の 3'-UTR の配列を比較した所、Sofjin 株では可変領域中の SL3、SL4、SL5 構造が欠損していた(図 1)。そこで、Oshima 5-10 株を基に、SL3/4、SL5、又は SL3/4/5 を欠損させたウイルス dSL3/4、dSL5、dSL3/4/5 を作製した。作製し

たウイルスの培養細胞での増殖性を解析した所、欠損による影響はなく、それぞれのSL構造はウイルスのゲノム複製・増殖能には関与していないことが示された(図1)。

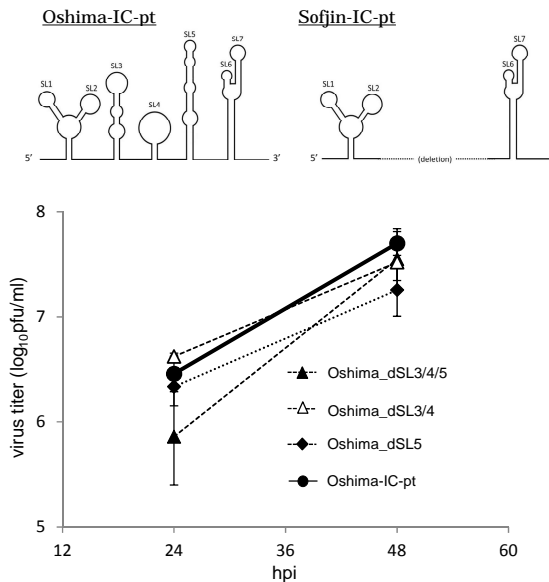


図1. 3'-UTRのRNA2次構造(上)と培養細胞での増殖性(下)

(2) 各ウイルスをマウスに感染させた所、SL3/4/5領域のいずれかに欠損が導入されることによって、Sofjin株と同様の生存曲線を示すようになり病原性の上昇が認められた(図2)。さらに各臓器中での増殖性を解析した所、欠損を持つウイルスは親株と比較して血中でのウイルス力価は低下していたものの、脳内での増殖性は殆ど変わらなかった。

従って、SL領域の欠損による病原性の上昇はウイルスの増殖性の変化に由来ものではなく、ウイルスが感染脳神経細胞に対して何らか機能変化をもたらしたためでは無いかと推察された。さらに、SL3/4/5はそれぞれのSL単独ではなく、SL3/4/5によって形成される高次構造が病原性に重要であることが明らかになった。

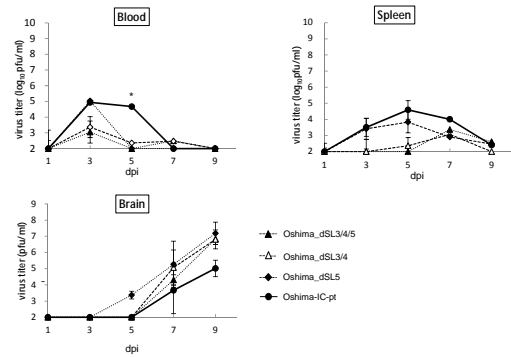
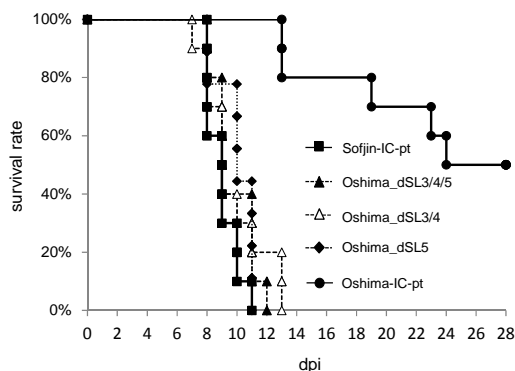


図2. ウイルス感染マウスの生存曲線(上)と各臓器での増殖性(下)

(3) 各ウイルスのウイルス由来 lncRNA 産生状況を解析した所、約 300 bp 及び 500 bp の lncRNA を産生していることが示された。さらに、ウイルス感染による IFN-β プロモーター活性及び ISRE プロモーター活性には、欠損による影響は認められなかった。

以上の研究成績より、3'-UTR の可変領域は脳内における宿主応答を未知の機構で変化させることによって病原性を発現させるのに関与していることが示唆される。この機能には脳内の宿主蛋白と可変領域の RNA 高次構造の相互作用が重要であると考えられ、今後その宿主因子を同定し機能を解析していくことで、TBEV による神経病態発現機序の解明に繋がっていくものと思われる。

引用文献

Sakai M, Yoshii K, *et al.* (2014). "Variable region of the 3' UTR is a critical virulence factor in the Far-Eastern subtype of tick-borne encephalitis virus in a mouse model." *J Gen Virol* 95: 823-835.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計12件)

Inagaki E, Sakai M, Hirano M, Muto M, Kobayashi S, Kariwa H, **Yoshii K**

“Development of a serodiagnostic multi-species ELISA against tick-borne encephalitis virus using subviral particles.”

Ticks Tick Borne Dis.

S1877-959X(16)30039-5. 2016(査読有)doi: 10.1016/j.ttbdis.2016.03.002

Kobayashi S, **Yoshii K**, Sawa H (他7名. 5番目) “Rab8b Regulates Transport of West Nile Virus Particles from Recycling

Endosomes.” **J Biol Chem**. 291:6559-68. 2016 (査読有) doi: 10.1074/jbc.M115.712760

Talactac MR, **Yoshii K**, Mochizuki M (他 7 名. 2 番目) “Virucidal activity of Haemaphysalis longicornis longicin P4 peptide against tick-borne encephalitis virus surrogate Langat virus.” **Parasit Vectors** 9:59. 2016 (査読有) doi: 10.1186/s13071-016-1344-5

Lubick KJ, **Yoshii K**, Best SM (他 20 名. 22 番目) “Flavivirus antagonism of type I interferon signaling reveals prolidase as a regulator of IFNAR1 maturation and expression.” **Cell Host Microbe**. 18:61-74. 2015 (査読有) doi: 10.1016/j.chom.2015.06.007

Muto M, Bazartseren B, Tsevel B, Dashzevge E, **Yoshii K**, Kariwa H “Isolation and characterization of tick-borne encephalitis virus from Ixodes persulcatus in Mongolia in 2012.” **Ticks and tick-borne diseases**. 6:623-9. 2015 (査読有) doi: 10.1016/j.ttbdis.2015.05.006

Sakai M, Muto M, Hirano M, Kariwa H, **Yoshii K** “Virulence of tick-borne encephalitis virus is associated with intact conformational viral RNA structures in the variable region of the 3'-UTR.” **Virus Res**. 203:36-40. 2015 (査読有) doi: 10.1016/j.virusres.2015.03.006

Yoshii K, Okamoto N, Nakao R, Hofstetter RK, Yabu T, Masumoto H, Someya A, Kariwa H, Maeda A “Isolation of the Thogoto virus from a Haemaphysalis longicornis in Kyoto city, Japan.” **J Gen Virol**. 96:2099-103. 2015 (査読有) doi: 10.1099/vir.0.000177

Yoshii K, Sunden Y, Yokozawa K, Igarashi M, Kariwa H, Holbrook MR, Takashima I “A Critical Determinant of Neurological Disease Associated with Highly Pathogenic Tick-borne Flavivirus in Mice.” **J Virol** 88:5406-20. 2014 (査読有) doi: 10.1128/JVI.00421-14

Hirano M, **Yoshii K**, Sakai M, Hasebe R, Ichii O, Kariwa H “Tick-borne flaviviruses alter membrane structure and replicate in dendrites of primary mouse neuronal cultures.” **J Gen Virol** 95:849-861. 2014 (査読有) doi: 10.1099/vir.0.061432-0

Sakai M, **Yoshii K**, Sunden Y, Yokozawa K, Hirano M, Kariwa H “Variable region of the 3' UTR is a critical virulence factor in the Far-Eastern subtype of tick-borne encephalitis virus in a mouse model.” **J Gen Virol** 95:823-835. 2014 (査読有) doi: 10.1099/vir.0.060046-0

Chidumayo NN, **Yoshii K**, Saasa N, Sakai M, Kariwa H “Development of a tick-borne encephalitis serodiagnostic ELISA using recombinant Fc-antigen fusion proteins.” **Diagn Microbiol Infect Dis** 78:373-378. 2014 (査読有) doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2013.12.014

Chidumayo NN, **Yoshii K**, Kariwa H “Evaluation of the European tick-borne encephalitis vaccine against Omsk hemorrhagic fever virus.” **Microbiol Immunol** 58:112-118. 2014 (査読有) doi: 10.1111/1348-0421.12122.

[学会発表] (計 20 件)

平野港、境瑞紀、苅和宏明、小林進太郎、**好井健太郎**。ダニ媒介性脳炎ウイルスの神経細胞内におけるウイルスゲノム RNA 輸送機構の解析。第 38 回日本分子生物学会年会。兵庫県神戸市 (2015, 12.1)

小林進太郎、Wallaya Phongphaew、**好井健太郎**、平野港、武藤芽未、大場靖子、澤洋文、苅和宏明。ウエストナイルウイルス感染による変性タンパク質蓄積機構の解析。第 38 回日本分子生物学会年会。兵庫県神戸市 (2015, 12.1)

Hirano M, Sakai M, Kariwa H, Kobayashi S, **Yoshii K**. Analysis of the transport mechanism of the genomic RNA of TBEV in the neurites of neuron. 第 63 回日本ウイルス学会学術集会。福岡県福岡市 (2015, 11. 23)

Inagaki E, Sakai M, Hirano M, Muto M, Kobayashi S, Kariwa H, **Yoshii K**. ダニ媒介性脳炎ウイルスのウイルス様粒子を用いた動物種非特異的な新規血清学的診断法の開発。第 63 回日本ウイルス学会学術集会。福岡県福岡市 (2015, 11. 23)

Yoshii K, Ishizuka M, Kobayashi S, Kamitani W, Kariwa H. BAP31 regulates the assembly and secretory pathway of the flavivirus particles. 第 63 回日本ウイルス学会学術集会。福岡県福岡市 (2015, 11. 22)

Kobayashi S ,Wallaya P ,**Yoshii K** ,Hirano M , Muto M ,Orba Y ,Sawa H ,Kariwa H. Analysis of the accumulation mechanism of denatured proteins by West Nile virus infection. 第 63 回日本ウイルス学会学術集会. 福岡県福岡市 (2015, 11. 22)

Sakai M, Hirano M, Muto M, Kariwa H, **Yoshii K**. The variable region of the 3' untranslated region is a critical virulence factor in the Far-Eastern subtype of tick-borne encephalitis virus in mouse model. International Symposium on Flaviviruses: Structure and Immunity. Vienna, Austria (2015, 10.9).

稲垣恵理、境瑞紀、平野港、武藤芽未、苅和宏明、**好井健太郎**。ダニ媒介性脳炎ウイルスのウイルス様粒子を用いた動物種非特異的な新規血清学的診断法の開発。第 158 回日本獣医学会学術集会。青森県十和田市 (2015, 9.7)

平野港、境瑞紀、苅和宏明、**好井健太郎**。ダニ媒介性脳炎ウイルスの神経細胞内におけるウイルスゲノム RNA 輸送機構の解析。第 17 回日本 RNA 学会年会。北海道札幌市 (2015, 7.16)

好井健太郎、石塚万里子、神谷亘、苅和宏明。フラビウイルス粒子形成・分泌に関与する宿主因子の検索及び機能解析。第 50 回日本脳炎ウイルス生態学研究会。京都府京都市 (2015, 5.15)

池端真帆、**好井健太郎**、境瑞紀、平野港、苅和宏明。レポーター遺伝子発現ダニ媒介性脳炎ウイルスの作製と性状解析。第 62 回日本ウイルス学会学術集会。神奈川県横浜市。(2014, 11.12).

境瑞紀、**好井健太郎**、横澤香菜、平野港、苅和宏明。極東型ダニ媒介性脳炎ウイルスの高病原化に関わる 3'非翻訳領域 variable region の役割。第 62 回日本ウイルス学会学術集会。神奈川県横浜市。(2014, 11.12).

武藤芽未、Boldbaatar B, **好井健太郎**、苅和宏明。モンゴルにおけるダニ媒介性脳炎ウイルスの分離と性状解析。第 62 回日本ウイルス学会学術集会。神奈川県横浜市。(2014, 11.10).

好井健太郎。フラビウイルス粒子形成・分泌に関与する宿主因子の検索および機能解析。第 21 回トガ・フラビ・ペスチウイルス

研究会。神奈川県横浜市。(2014, 11.9).

池端真帆、**好井健太郎**、境瑞紀、平野港、苅和宏明。レポーター遺伝子発現ダニ媒介性脳炎ウイルスの作製と性状解析。第 157 回日本獣医学会学術集会。北海道札幌市。(2014, 9.10).

境瑞紀、**好井健太郎**、横澤香菜、平野港、苅和宏明。極東型ダニ媒介性脳炎ウイルスの高病原化に関わる 3'非翻訳領域 variable region の役割。第 157 回日本獣医学会学術集会。北海道札幌市。(2014, 9.9).

Yoshii K, Sunden Y, Yokozawa K, Igarashi M, Kariwa H, Holbrook MR, Takashima I. A critical determinant of neurological disease associated with highly pathogenic tick-borne flavivirus in mice. International Union of Microbiological Societies 2014. Montreal, Canada. (2014, 7.29).

Hirano M, **Yoshii K**, Sakai M, Hasebe R, Ichii O, Kariwa H. Tick-borne flaviviruses alter membrane structure and replicate in dendrites of primary mouse neuronal cultures. International Union of Microbiological Societies 2014. Montreal, Canada. (2014, 7.29).

Sakai M, **Yoshii K**, Sunden Y, Yokozawa K, Hirano M, Kariwa H. Variable region of the 3' UTR is a critical virulence factor in the Far-Eastern subtype of tick-borne encephalitis virus in a mouse model. International Union of Microbiological Societies 2014. Montreal, Canada. (2014, 7.29).

好井健太郎、鶴田征太郎、境瑞紀、苅和宏明。ダニ媒介性フラビウイルスのインターフェロンアンタゴニスト作用の解析。第 49 回日本脳炎ウイルス生態学研究会。山口県山口市。(2014, 5.16).

6. 研究組織

(1)研究代表者

好井 健太郎 (YOSHII Kentaro)
北海道大学・大学院獣医学研究科・准教授
研究者番号：50421988