

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26850187

研究課題名(和文) 狂犬病ウイルス野外株のRNAによる新規複製・転写制御機構の解明

研究課題名(英文) Identification of a novel mechanism that regulates replication and transcription at the RNA level in wild-type rabies virus

研究代表者

鈴木 由紀 (SUZUKI, Yuki)

日本大学・生物資源科学部・助教

研究者番号：30712492

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)：本研究は、狂犬病ウイルス(RABV)のRNAによる新規複製・転写制御機構を明らかにすることを目的に研究を行った。RABV野外株119検体の間で保存されているRNAモチーフを探索した結果、N遺伝子CDSの5'側とM遺伝子の3'UTRにRNAモチーフが同定された。RABVの3'UTR挿入したluciferase RNAを用いてレポーターアッセイを行った結果、MとGの3'UTRがmRNAの分解を促進することが明らかになった。また、ミニゲノムレポーターアッセイと組換えウイルスを用いた実験により、N CDSの高度保存領域はRABVの複製に必要なモチーフ配列をコードすることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to find a novel mechanism that regulates replication and transcription in rabies virus (RABV) at the RNA level. The RNA motifs conserved among 119 wild-type RABV strains were found at the 5' end of N CDS and 3'-UTR of M gene. Since the reporter activities using the luciferase mRNAs with the 3'UTR of RABV genes were lower than that of control luciferase mRNA, the 3'-UTR of M and G mRNAs may promote the degradation of M and G mRNAs, respectively. The mini genome reporter assay showed that the synonymous mutations in conserved motif at the 5' end of N CDS reduced the luciferase activities. In addition, the replication yield of recombinant RABV with synonymous mutations in the conserved motif was lower than that of parental RABV strain. These results suggest that the conserved motif at the 5' end of N CDS encode nucleotide sequences are required for the effective replication of RABV.

研究分野：ウイルス学

キーワード：狂犬病ウイルス 複製・転写制御 3' UTR RNAモチーフ

1. 研究開始当初の背景

狂犬病は、狂犬病ウイルス(RABV)に感染した動物の唾液を介して感染する、致死性の人獣共通感染症である。本病はワクチンにより感染を予防できるが、発症すると有効な治療法はなく、神経症状を呈してほぼ100%死亡する。

野外で流行しているRABV(野外株)は、様々な種類の動物で維持されている。これらRABV 野外株はマウスに接種すると強い毒性を示し、数日以内に死亡する。一方、RABVは脳や細胞で継代を重ねると弱毒化する傾向があり、研究所などで維持されている固定株の中には、マウスに接種しても病状が回復するものもある。このRABV株間における毒性の違いに注目をした研究により、RABVの毒性を決定する複数のアミノ酸残基が同定されてきた。一方、その他の因子として、RABV強毒株は弱毒株よりも子孫ウイルス産生量が少ないことから(引用文献1)、RABVのゲノム複製・転写機構も毒性に関わる可能性がある。

2. 研究の目的

RABVは子孫ウイルスを多く産生すると宿主の免疫誘導や細胞のアポトーシス誘導を起こすため、感染を維持するためにウイルスゲノムの複製・転写調節を進化の過程で特化させてきた可能性がある。RABVは非分節型の1本鎖マイナス鎖ウイルスで、ウイルスゲノムの複製・転写はRNAの配列レベルで制御されていると考えられる。そこで本研究は、RABVの病原性発現機序の解明を目指し、RNAレベルの新規複製・転写機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) RABVのゲノム複製・転写調節に関わる機能候補部位の探索

塩基座位が連続的に保存されているゲノム領域は、複製・転写調節に関わるRNAモチーフをコードしている可能性がある。そこで、全長配列が決定されているRABV野外株119検体の塩基配列をデータベースから回収し、Multiple alignmentsを行い、各塩基座位の塩基一致率を計算し、95%以上の塩基一致率を示す塩基座位が6連続する領域を高度保存領域として同定した。

(2) RABV mRNA 3' UTRの転写後発現調節

pSP-luc+NF Fusion vector(Promega)の*luciferase* 遺伝子にアデニンが60連続するpolyA配列を挿入し、*luciferase* 遺伝子とpolyA配列の間にRABV野外株(BRdg335株、BR-Pfx1株)のN、P、M、G、L遺伝子の3' UTRを挿入したプラスミド作製した。またコントロールとして、RABVの3' UTRを挿入しない*luciferase*-polyAプラスミドも作製した。その後、SP6 RNA polymeraseを用いて上記プラスミドから*luciferase*-RABV 3' UTRのmRNAを*in vitro*合成し、HEK293T細胞にトランス

フェクションした24時間後にレポーターアッセイを行った。また、G 3' UTRを挿入した*luciferase* 遺伝子のコピー数をqPCRで算出した。

(3) M 3' UTRと宿主蛋白質の相互作用解析

M 3' UTRに宿主蛋白質が結合する可能性を検討するために、ゲルシフトアッセイを行った。方法は、*in vitro*合成したM 3' UTRの3'末端にビオチン標識を行い、マウス神経芽細胞(Neuro-2a細胞)の細胞質タンパク質とインキュベートした後に電気泳動を行い、M 3' UTRの移動度の変化を観察した。結合が特異的であることを確認するために、コンペティターとして未標識のM 3' UTR RNAを加えて結合が阻害されることを確認した。

また、M 3' UTRに結合する宿主タンパク質の分子量を確認するために、ビオチン標識M 3' UTRとNeuro-2a細胞質タンパク質をUVクロスリンキングで架橋し、SDS-PAGEを行った。

(4) N CDS 高度保存領域がRABVの複製・転写調節に与える影響

N CDSの5'側に同定された高度保存領域がゲノムの複製・転写調節に与える影響を調べるために、ミニゲノムのレポーターアッセイを行った。N CDSで観察された高度保存領域に対応する塩基配列と、高度保存領域の同義座位に変異を挿入したミニゲノムプラスミドを作製し、ヘルパー-N、P、Lプラスミドと共にBHK-T7/9細胞にトランスフェクションした後に、レポーターアッセイを行った。

4. 研究成果

(1) RABVのゲノム複製・転写調節に関わる機能候補部位の同定

RABVのゲノムサイズはおよそ1.2kbで、3'末端からN-P-M-G-L遺伝子をコードしている。RABV野外株119検体の間で連続的に保存されている領域をスクリーニングしたところ、N CDSの5'側の約20塩基と、Mの3' UTRに複数の高度保存領域が同定された(図1)。



図1 RABVのゲノム構造と高度保存領域(☆)

(2) RABV mRNA 3' UTRの転写後発現調節

mRNAの3' UTRは、タンパク質が結合することによってmRNAの転写後発現調節に関与することがある。そこで、*luciferase* 遺伝子CDSの末端にN、P、M、G、Lの3' UTRを結合したCap付加mRNAを*in vitro*合成し、HEK293T細胞にトランスフェクションし、*luciferase*活性をRABVの3' UTRが挿入されていないコントロールプラスミドと比較した。その結果、RABV野外株のMおよびG 3' UTRを*luciferase* 遺伝子に付加すると、コントロールと比較して*luciferase*活性が有意に

減少した(図 2)。従って、M および G 3' UTR は mRNA の分解能を促進する可能性が示唆された。

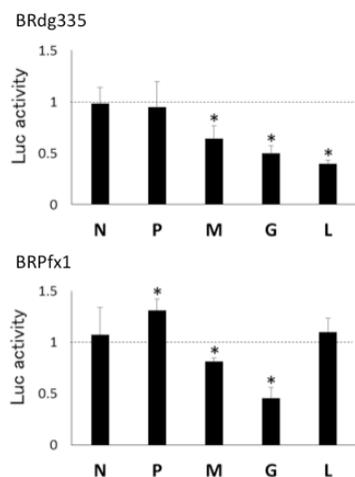


図 2 RABV の各遺伝子の 3' UTR が luciferase 遺伝子の転写後発現に与える影響。RABV の 3' UTR を挿入しないプラスミドから発現した luciferase タンパク質の活性に対する相対値で表している。* $P < 0.05$

(3) G 3' UTR が mRNA 分解能に与える影響

上記解析により、特に G 3' UTR は mRNA の分解能が高い可能性が示唆された。しかし、Palusa ら (2012) は G 3' UTR が mRNA の分解を抑制することを報告している (引用文献 2)。しかし、RABV 野外株の G 3' UTR はおよそ 456 塩基長であるが、Palusa らは G 3' UTR が 72 塩基と短い ERA 株を解析に用いていたため、長さの違いが結果に影響をしていた可能性がある。そこで G 3' UTR の mRNA 分解能調べるために、ERA 株の G 3' UTR の 72 塩基に相当する BRdg332 株の G 3' UTR 領域 (62 塩基長) と、全長の 3' UTR (456 塩基長) を挿入した luciferase mRNA を HEK293T 細胞にトランスフェクションし、24 時間後に細胞内の mRNA 残存量を qPCR で定量した。その結果、全長の G3' UTR mRNA は短い G 3' UTR と比較して mRNA の残存量が有意に減少した (図 3)。従って、RABV 野外株の G 3' UTR は G mRNA を分解促進することが示唆された。

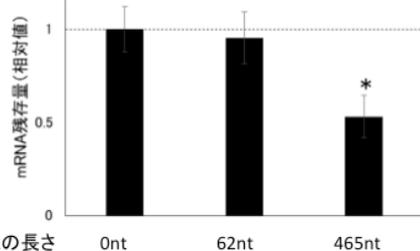


図 3 G 3' UTR が luciferase 遺伝子の転写後発現に与える影響。ERA 株の G3' UTR と相同な BRdg335 の塩基配列を挿入した luciferase 遺伝子 (62nt)、G 3' UTR の全長を挿入した luciferase 遺伝子 (465nt) の luciferase 活性を、G3' UTR を挿入しない luciferase 遺伝子

(0nt) と比較した。* $P < 0.05$

(4) RABV M 3' UTR と宿主タンパク質の相互作用

M mRNA 3' UTR で高度保存領域が複数箇所観察されたことから、これらの保存領域はタンパク質が結合するモチーフ配列である可能性がある。そこで M 3' UTR に宿主タンパク質が結合することを確認するために、ビオチン標識した M 3' UTR RNA を Neuro-2a 細胞質タンパク質とインキュベートし、ゲルシフトアッセイを行った。その結果、細胞質タンパク質とインキュベートしたビオチン標識 M 3' UTR は移動度が変化したことから、M 3' UTR には宿主タンパク質が結合する可能性が示唆された (図 4A)。

また、UV クロスリンクによりビオチン標識 M 3' UTR と Neuro-2a 細胞質タンパク質を架橋し、SDS-PAGE を行った結果、M 3' UTR には 150kDa 付近のタンパク質が結合する可能性が示唆された (図 4B)。現在、M 3' UTR に結合するタンパク質の同定を行っており、このタンパク質の種類が明らかになれば、M 3' UTR の高度保存領域の機能が明らかになることが期待される。

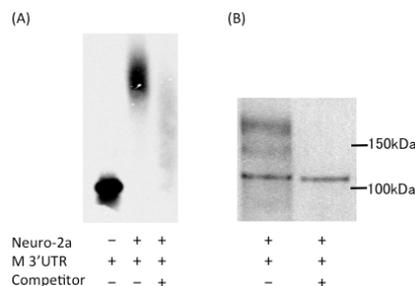


図 4 ビオチン標識 M 3' UTR と Neuro-2a 細胞質タンパク質の (A) ゲルシフトアッセイ (B) UV クロスリンク法

(5) RABV N CDS 高度保存領域

N は CDS 領域の 5' 側から約 20 塩基に同義座位を含む連続的に保存された高度保存領域が観察された (図 5A)。そこで RABV の N CDS 高度保存領域を 5' 側に挿入し、N-luciferase 融合遺伝子をコードする plasmid を作製し、ミニゲノム系によるレポーターアッセイを行った。その結果、N CDS に同義変異を挿入した場合、luciferase 活性が 70% 程度低下した (図 5B)。また、N の高度保存領域に同義変異を挿入したレスキューウイルスを作製した結果、RABV の複製速度が低下することが明らかになった (図 5C)。従って、N CDS の高度保存領域は RABV の複製に必要な配列をコードしており、おそらく RNA 依存性 RNA ポリメラーゼの認識に関わる領域であることが示唆された。

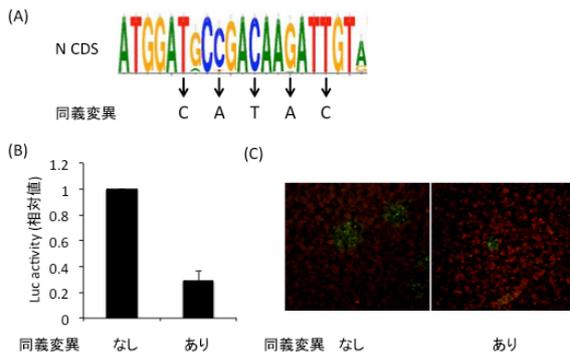


図 5 (A)RABV 野外株 119 検体の N CDS(塩基座位 71-91)の Multiple alignments。矢印は同義変異を挿入した塩基座位と配列を示す。(B)ミニゲノムレポーターアッセイ (C)RABV のフォーカスアッセイ。同義変異を入れた RABV は複製速度が低下するためフォーカスサイズが小さい。

<引用文献>

1. Dietzschold B, Li J, Faber M, Schnell M. 2008. Concepts in the pathogenesis of rabies. *Future Virol.* 3: 481-490.
2. Palusa S, Ndaluka C, Bowen RA, Wilusz CJ, Wilusz J. 2012. The 3' Untranslated Region of the Rabies Virus Glycoprotein mRNA Specifically Interacts with Cellular PCBP2 Protein and Promotes Transcript Stability. *PLoS One.* 7: e33561.

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)

- ① Kobayashi Y, Horie M, Nakano A, Murata K, Ito T, Suzuki Y. 2016. Exaptation of bornavirus-like nucleoprotein elements in afrotherians. *PLoS Pathog.* 12: e1005785. (査読有)
- ② Kobayashi Y, Dadonaite B, Doremalen N, Suzuki Y, Barclay W, Pybus OG. 2016. Computational and molecular analysis of conserved influenza A virus RNA secondary structures involved in infectious virion production. *RNA Biol.* 13: 883-894. (査読有)
- ③ Nkogue CN, Horie M, Fujita S, Oginio M, Kobayashi Y, Mizukami K, Masatani T, Ezzikouri S, Matsuu A, Mizutani T, Ozawa M, Yamato O, Ngomanda A, Yamagiwa J, Tsukiyama-Kohara K. 2016. Molecular epidemiological study of adenovirus infecting western lowland gorillas and humans in and around Moukalaba-Doudou National Park (Gabon). *Virus Genes.* 52:671-678. (査読有)

④ Horie M, Kobayashi Y, Honda T, Fujino K, Akasaka T, Kohl C, Wibbelt G, Mühlendorfer K, Kurth A, Müller MA, Corman VM, Gillich N, Suzuki Y, Schwemmler M, Tomonaga K. 2016. An RNA-dependent RNA polymerase gene in bat genomes derived from an ancient negative-strand RNA virus. *Sci Rep.* 6: 25873. (査読有)

⑤ Ito T, Fukayama T, Mochizuki N, Kobayashi Y, Deberaldini ER, Carvalho AA, Ito FH, Sakai T. 2016. Molecular epidemiological tracing of a cattle rabies outbreak lasting less than a month in Rio Grande do Sul in southern Brazil. *BMC Res Notes.* 9: 87. (査読有)

[学会発表] (計 4 件)

- ① Nakagawa K, Ito N, Kobayashi Y, Okada K, Sugiyama M. Establishment of L gene-deficient rabies virus and its utility for functional studies on L protein. 第 64 回日本ウイルス学会 (札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市), 2016 年 10 月 25 日)
- ② 中川賢人, 小林由紀, 伊藤直人, 岡田和真, 杉山誠. L 遺伝子欠損型狂犬病ウイルスを活用した L 蛋白質保存領域の機能解析. 第 159 回日本獣医学会学術集会 (日本大学(神奈川県・藤沢市), 2016 年 9 月 8 日).
- ③ 伊藤優真, 日高侑也, Dressa, F., 小林由紀, 伊藤琢也. エチオピアにおける狂犬病ウイルスの分子系統解析. 第 159 回日本獣医学会学術集会 (日本大学(神奈川県・藤沢市), 2016 年 9 月 8 日).
- ④ 日下部美帆, 小林由紀, Fumio H Ito, 酒井健夫, 伊藤琢也. ブラジルの吸血および食果コウモリ由来狂犬病ウイルスの分子系統解析 第 157 回日本獣医学会学術集会(北海道大学(北海道・札幌市), 2014 年 9 月 10 日)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 由紀 (SUZUKI, Yuki)

日本大学・生物資源科学部・助教

研究者番号: 30712492

(発表論文等は旧姓 Kobayashi Y. で記載)

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

井上 智 (INOUE, Satoshi)