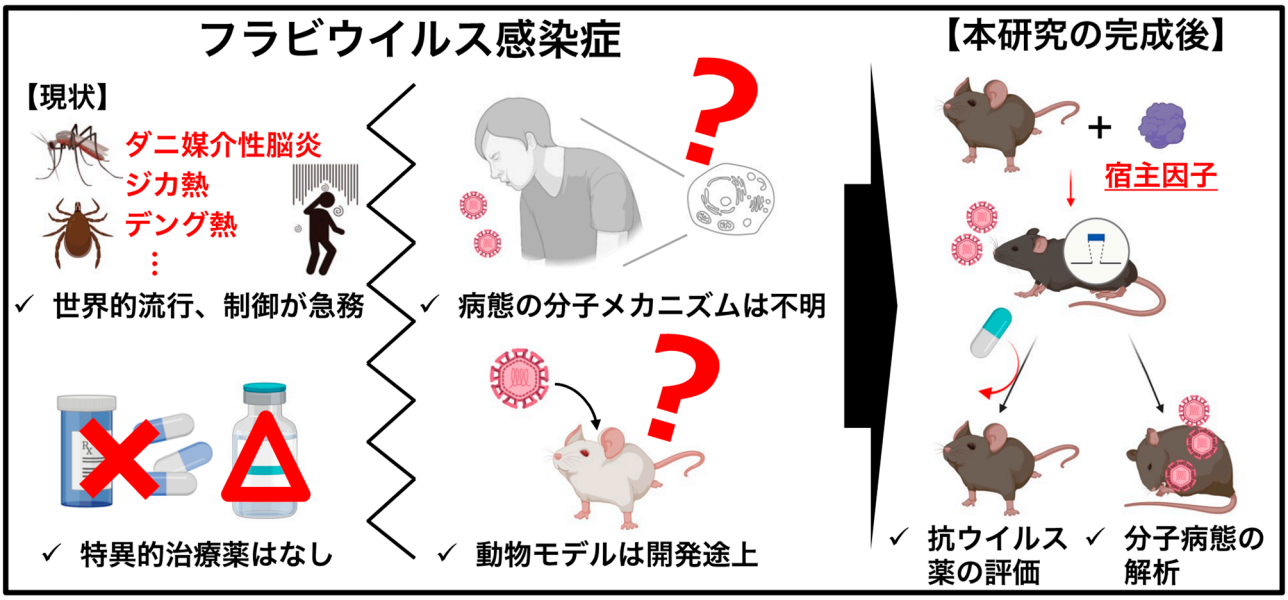
125　フラビウイルスの宿主特異性を決定する因子の同定	田村　友和

【目的】フラビウイルスには、日本脳炎ウイルス、デングウイルス、ジカウイルス、ダニ媒介性脳炎ウイルスなどが属する。ジカ熱の世界的流行、デング熱の国内発生、ダニ媒介性脳炎による国内死亡例が報告されていることから、公衆衛生危機管理上重要な疾病の病原体である。現在までに有効な抗ウイルス薬はなく、対症療法しかない。また、ワクチンが実用化されていないフラビウイルス感染症が多数ある。その理由は現行の動物モデルが不十分で、病態の分子メカニズムが不明であるからである。これまでにマウスの自然免疫系の遺伝子が変異していることが、一般的な実験用マウスでの病態解析を困難にさせる一因と考えられている。一方で、自然免疫系の遺伝子を欠損したマウスの培養細胞でのフラビウイルスの増殖性も、ヒトの細胞と比較して著しく劣っていることがこれまでにわかっている。従って、本研究はマウスにおけるフラビウイルスの増殖に関与する新たな宿主因子の同定を目指し、企図された。

【方法】まず、ウイルス感染細胞を分取し、単離することを可能とする各種フラビウイルスのレポーター遺伝子を搭載した組換えウイルスを作製する。次に、マウスの遺伝子を網羅する cDNA ライブラリーを用いて CRISPR/Cas9 システムを利用した遺伝子転写活性化（CRISPRa）ライブラリーを構築する。ライブラリーをコードするレンチウイルスを作製し、マウスの培養細胞に感染させることでそれに安定的に発現させる。レポーター搭載フラビウイルスを感染させ、発光するウイルス感染細胞を分取し、単離することで、宿主遺伝子を同定する。さらに同定した宿主因子の機能を解析する。

【結果】これまでに報告のある様々な種類の色の併せて 9 種類の蛍光タンパク質を各々搭載した組換え日本脳炎ウイルスの作製を試みた。その結果、その全てで自立増殖することができる組換えレポーターウイルスを得ることができた。次にレポーター遺伝子がウイルス遺伝子に安定して維持されるか否かを検証した。その結果、9 種類のうち、2 種類のみウイルスを 5 回連続継代してもレポーター遺伝子が維持されていた。さらに、作製した組換えウイルスをマウスに接種して、その増殖性を解析した。その結果、レポーター遺伝子を搭載した組換えウイルスの増殖性は親株と比較して著しく低下していた。そのため、スプリット型蛍光タンパク質の実験系を取り入れることで、親株と同等に増殖するレポーター遺伝子を搭載したフラビウイルスの作製に成功した。現在、マウスの遺伝子を網羅的に発現する CRISPRa ライブラリーをもとに、蛍光色にてウイルス感染細胞を単離するスクリーニング実験を実施している。

本研究の背景と展開



125. フラビウイルスの宿主特異性を決定する因子の同定

田村　友和

北海道大学 大学院医学研究院 微生物学免疫学分野 病原微生物学教室

Key words：フラビウイルス，宿主因子，スクリーニング，感染指向性，組換えウイルス

緒　言

フラビウイルスには、日本脳炎ウイルス、デングウイルス、ジカウイルス、ダニ媒介性脳炎ウイルスなどが属する。ジカ熱の世界的流行、デング熱の国内発生、ダニ媒介性脳炎による国内死亡例が報告されていることから、公衆衛生危機管理上重要な疾病の病原体である。これらのウイルスは、ヒト以外の哺乳動物あるいは鳥が保有宿主・増幅動物となる。蚊またはダニにより媒介されるため、フラビウイルスを自然界から排除することは不可能である。またヒトの移動と物流は止めることはできないため、感染予防と流行阻止のためには先回り対策が必要である。すなわち、効果的なワクチンと抗ウイルス薬を利用することであるが、ワクチンは未だフラビウイルス感染症の全てを網羅するものではない。また有効な抗ウイルス薬はなく、対症療法しかない。その理由は適切な動物モデルが存在せず、病態の分子メカニズムが不明であるからである。

一般的な実験用マウスで、フラビウイルス感染症の病態を解析することは難しい。実験用マウスのインターフェロン誘発性遺伝子 *Oas1b* は、変異があるためウイルスを排除することができない［1］。また、ウイルス蛋白質 NS5 はヒトの STAT2 に結合することで分解し、一連の自然免疫応答を抑制する。しかし、NS5 はマウスの STAT2 とは結合することができず、ウイルスは宿主の免疫応答により排除される［2］。近年、マウスの *Stat2* 遺伝子をヒトの *STAT2* 遺伝子に置換したマウスが開発され、ジカ熱の病態解析に利用されている［3］。しかし、解析には免疫不全マウスで継代し、変異を獲得したウイルス株が使用されている。臨床分離株とは異なる指向性を示すマウス馴化株を用いて真にヒトの病態を模倣することができるかは疑問である。さらに、マウスの培養細胞株および自然免疫系の遺伝子をノックアウトしたマウスの初代培養細胞でのフラビウイルスの増殖性は、ヒトの細胞と比較して著しく劣っている［4］。従って、マウスの細胞では自然免疫系以外のフラビウイルスの増殖に関与する宿主因子が、欠損あるいは発現が抑制されていると考えられる。従って、現行の動物モデルとマウス順化株ではヒトの病態を十分に模倣することが達成できない。

そこで本研究では、フラビウイルス感染症の感染予防および治療薬の開発に必要なヒトの病態を模倣する動物モデルを確立するために、マウスにおけるウイルスの増殖に必要な宿主因子を同定することを目的とし、企図された。

方　法

1. レポーター遺伝子を搭載した組換えウイルスの作製

報告者がこれまでに作製した日本脳炎ウイルス AT31 株の cDNA クローン［5］を用いて、ウイルスタンパク質 C 遺伝子領域内に、9 種の蛍光タンパク質（mScarlet-I、mOrange2、MiCy、Tag-RFP、NowGFP、mRFP、sfGFP、mEmerald、RFP）および Thosea asigna virus 由来の 2A ペプチド配列を各々の遺伝子を増幅するプライマーを用いて PCR にて増幅させ、プラスミドベクターにクローニングした。クローニング後に得られたプラスミド DNA の塩基配列は、SeqStudio Genetic Analyzer あるいは FASMAC 社の遺伝子解析サービスを利用して決定し、正しい配列のプラスミド DNA を続く実験に使用した。各種蛍光タンパク質遺伝子を搭載したウイルスの cDNA クローンとそれ以外のウイルス遺伝子領域をコードするプラスミド 6 つおよびウイルスの転写に必要な CMV プロモーターをコードしたプラスミドを用いて、特異的なプライマーにて PCR を行った。その後、報告者の既報［5］に従って Circular Polymerase

Extension Reaction（CPER）を実施して、その反応物をヒト肝臓由来株化細胞 Huh7 にトランスフェクション法にて導入した。その 5 日後に培養上清を回収し、新たな Huh7 細胞に接種した。ウイルスの感染を示す細胞変性効果を認めた時点で培養上清を回収し、続く実験に使用した。回収したウイルスの RNA を Purelink RNA Mini kit にて精製したのち、SuperScriptVI にて cDNA を作製した。その後、上述と同様に DNA アンプリコンを作製し、Sanger 法にてウイルス遺伝子の配列を決定した。ウイルス感染価は、階段希釈したウイルス液を Huh7 細胞に接種し、その 36 時間後に細胞を 4%パラホルムアルデヒド溶液で固定した。その後、ウイルスタンパク質 E に対する抗体にて免疫して、感染する細胞が形成するフォーカスの数を計測することによって算出した。

デングウイルスの組換えウイルスは、デングウイルス血清型 2 の 16,681 株の cDNA クローンをもとに同様の方法で各種蛍光タンパク質遺伝子をコードしたプラスミドを構築した。組換えデングウイルスの CPER 反応液はハムスター胎児由来株化細胞 BHK-21 にトランスフェクション法にて導入した。ウイルス感染価の測定も BHK-21 細胞を用いた。また、同様にジカウイルス MR766 株の組換えウイルスを CPER 法にて作製した。

2. 組換えウイルスに搭載したレポーター遺伝子の安定性の評価

作製した組換え日本脳炎ウイルスを各々多重感染価 0.01 にて 12 穴プレートに単層を成した Huh7 細胞に接種した。その 36 時間後に培養上清を回収し、100 μl を新たな Huh7 細胞の接種に用いた。この実験を合せて 5 回連続して繰り返した。連続継代した各ウイルス液から RNA を抽出し、上述の方法にて逆転写と PCR を行った。PCR 産物をアガロースゲルにて電気泳動することによって、想定される DNA 分子量か否かを検するとともに、シークエンスを決定することでレポーター遺伝子が維持されているか否かを解析した。

3. スプリット型蛍光タンパク質遺伝子を搭載した組換えウイルスの作製と評価

スプリット型蛍光タンパク質の短い断片である mNG_{11}［6］を日本脳炎ウイルス AT31 株の NS1 タンパク質に上述の方法にてプラスミドにクローニングし、CPER にて組換えウイルスを作製した。次に、スプリット型蛍光タンパク質の残された断片である $mNG_{1\text{-}10}$ を pCSII プラスミド［7］に特異的に増幅するプライマーと In Fusion 酵素にてクローニングした。その後、ViraPower Lentiviral Packaging Mix と Lenti-X 293T 細胞を用いてレンチウイルスを作製した。作製したレンチウイルスを Huh7 細胞に感染させることで、$mNG_{1\text{-}10}$ を過剰に発現する Huh7 細胞を作製した。$mNG_{1\text{-}10}$ の発現は、mNeonGreen2 に対する抗体を用いてウェスタンブロッティング法にて確認した。発現を確認することができた Huh7 細胞に mNG_{11} を搭載した組換え日本脳炎ウイルスを接種し、その 24、36 時間後に蛍光を KEYENCE オールインワン顕微鏡 BZ-X810 にて観察した。

4. 組換えウイルスのマウスに対する病原性評価試験

組換えウイルスを BALB/c マウス（8 週齢、オス）に腹腔内接種し、臨床症状を観察した。6 日目に脳を採取し、RNA を上述の方法にて抽出して精製した。その後、Shirato ら（2005）が報告したプライマーセット［8］を用いて、QuantStudio 5 Real-Time PCR System にてウイルス RNA を定量した。

5. フラビウイルスの増殖に関与する宿主因子の同定に向けたスクリーニング実験系の構築

CRISPRa のスクリーニングに必要な dCas9 を発現させるためのレンチウイルスとマウスの Genome-Wide CRISPRa sgRNA Library を用いて同様にレンチウイルスを作製した。

結果および考察

1. 全長の蛍光タンパク質を搭載した組換えフラビウイルスの性状

日本脳炎ウイルス AT31 株のウイルス遺伝子に 9 種の蛍光タンパク質（mScarlet-I、mOrange2、MiCy、Tag-RFP、NowGFP、mRFP、sfGFP、mEmerald、RFP）を挿入した結果、その全てで感染性のある組換えウイルスが作製され

たことがわかった。その後、ウイルスを 5 回連続継代した結果、mOrange2 と NowGFP 遺伝子を挿入した組換えウイルスだけが、感染細胞で蛍光を発色した（図 1a）。また、連続継代したこれら組換えウイルスの遺伝子を解析したところ、ウイルス遺伝子に各々の遺伝子が維持されていることがわかった（図 1b）。

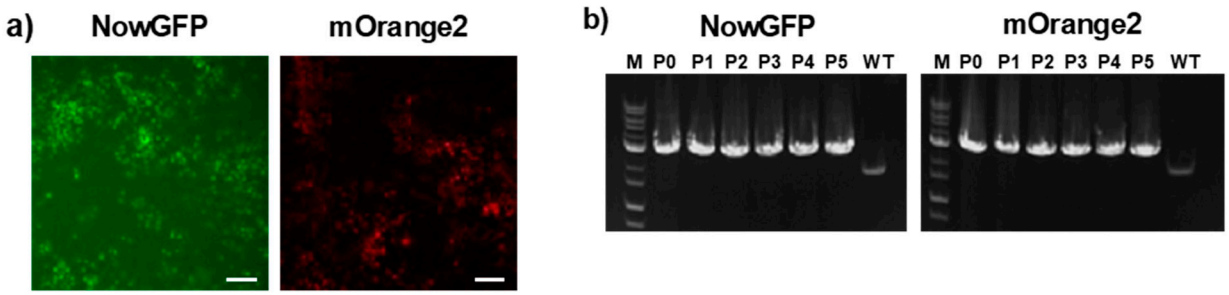


図 1. 全長の蛍光タンパク質搭載組換えウイルスの培養細胞での性状

a) 日本脳炎ウイルス AT31 株に NowGFP（左図）あるいは mOrange2（右図）を挿入した組換えウイルスを Huh7 細胞に接種してその蛍光を観察した。スケールバー：100 μm。

b) 組換えウイルスを連続継代し、挿入した蛍光タンパク質遺伝子が維持されているか否かを当該遺伝子の上流と下流に設計したプライマーにて cDNA を増幅し、得られた DNA の分子量を比較した。M : DNA 分子量のマーカー、P0～P5 : 継代 1 代目から 5 代目、WT : 野生株。

次に、作製した組換えウイルスとその親株を BALB/c マウスに接種し、ウイルスの増殖性を比較した。その結果、親株は接種 6 日目に脳でのウイルス RNA を検出することができたが、各々組換えウイルスを接種したマウスの脳からはウイルス RNA を検出することができなかった（図 2）。従って、当該組換えウイルスは蛍光タンパク質遺伝子を挿入することにより弱毒化したことがわかった。

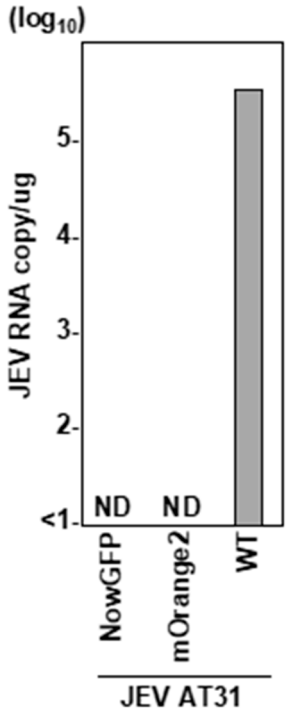


図 2. 組換えウイルスのマウスでの増殖性での性状

ウイルスを接種 6 日後の脳におけるウイルス RNA コピー数。ND : 検出されず、WT : 野生株。

2. スプリット型蛍光タンパク質を搭載した組換えフラビウイルスの性状とスクリーニング実験系の構築

近年、蛍光タンパク質を構造上から正しく相互作用ができるように2つに分割し、各々を同一細胞で会合させることでその蛍光を検出するスプリット型蛍光タンパク質が開発されて、研究に広く使用されている［6］。そこで、日本脳炎ウイルス AT31 株のウイルス遺伝子に split 型 GFP の短い断片を挿入した結果、感染性の組換えウイルスを作出することができ、感染細胞で蛍光を認めた（図3）。また、組換えウイルスを接種したマウスの脳からウイルス RNA を検出することができたことから、スプリット型の蛍光タンパク質を搭載した組換えウイルスを採用して研究を推進することとした。

以上より、現在マウスの網羅的な遺伝子をコードする CRISPRa アッセイを構築し、種々の組換えウイルスを用いて感染実験を実施している。

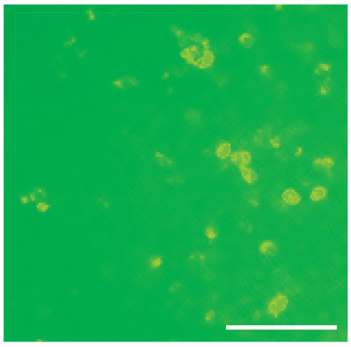


図3. スプリット型の蛍光タンパク質搭載組換えウイルスの培養細胞での性状
日本脳炎ウイルス AT31 株に Split 型 GFP を挿入した組み換えウイルスを Huh7 細胞に接種してその蛍光を観察した。スケールバー：100μm。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、北海道大学大学院医学研究院教授の福原崇介博士である。本研究を推進するにあたり、多大なる協力を頂いた同研究院技術職員の丸山華氏に感謝するとともに、研究をご支援下さった公益財団法人上原記念生命科学財団に深謝いたします。

文　献

1） Perelygin AA, Scherbik SV, Zhulin IB, Stockman BM, Li Y, Brinton MA. Positional cloning of the murine flavivirus resistance gene. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002;99(14):9322-7. Epub 20020621. doi: 10.1073/pnas.142287799. PubMed PMID: 12080145; PubMed Central PMCID: PMC123139.

2） Ashour J, Laurent-Rolle M, Shi PY, García-Sastre A. NS5 of dengue virus mediates STAT2 binding and degradation. J Virol. 2009;83(11):5408-18. Epub 20090311. doi: 10.1128/JVI.02188-08. PubMed PMID: 19279106; PubMed Central PMCID: PMC2681973.

3） Gorman MJ, Caine EA, Zaitsev K, Begley MC, Weger-Lucarelli J, Uccellini MB, et al. An Immunocompetent Mouse Model of Zika Virus Infection. Cell Host Microbe. 2018;23(5):672-85.e6. doi: 10.1016/j.chom.2018.04.003. PubMed PMID: 29746837; PubMed Central PMCID: PMC5953559.

4） Setoh YX, Prow NA, Peng N, Hugo LE, Devine G, Hazlewood JE, et al. De Novo Generation and Characterization of New Zika Virus Isolate Using Sequence Data from a Microcephaly Case. mSphere. 2017;2(3). doi: 10.1128/mSphereDirect.00190-17. PubMed PMID: 28529976; PubMed Central PMCID: 5437134.

5) Tamura T, Fukuhara T, Uchida T, Ono C, Mori H, Sato A, et al. Characterization of Recombinant Flaviviridae Viruses Possessing a Small Reporter Tag. J Virol. 2018;92(2). doi: 10.1128/jvi.01582-17. PubMed PMID: 29093094; PubMed Central PMCID: 5752933.
6) Feng S, Sekine S, Pessino V, Li H, Leonetti MD, Huang B. Improved split fluorescent proteins for endogenous protein labeling. Nat Commun. 2017;8(1):370. Epub 20170829. doi: 10.1038/s41467-017-00494-8. PubMed PMID: 28851864; PubMed Central PMCID: PMC5575300.
7) Fukuhara T, Wada M, Nakamura S, Ono C, Shiokawa M, Yamamoto S, et al. Amphipathic alpha-helices in apolipoproteins are crucial to the formation of infectious hepatitis C virus particles. PLoS Pathog. 2014;10(12):e1004534. doi: 10.1371/journal.ppat.1004534. PubMed PMID: 25502789; PubMed Central PMCID: 4263759.
8) Shirato K, Miyoshi H, Kariwa H, Takashima I. Detection of West Nile virus and Japanese encephalitis virus using real-time PCR with a probe common to both viruses. J Virol Methods. 2005;126(1-2):119-25. doi: 10.1016/j.jviromet.2005.02.001. PubMed PMID: 15847927.