

# プラス鎖 RNA ウイルス感染症の病態解析及び制御法に関する研究

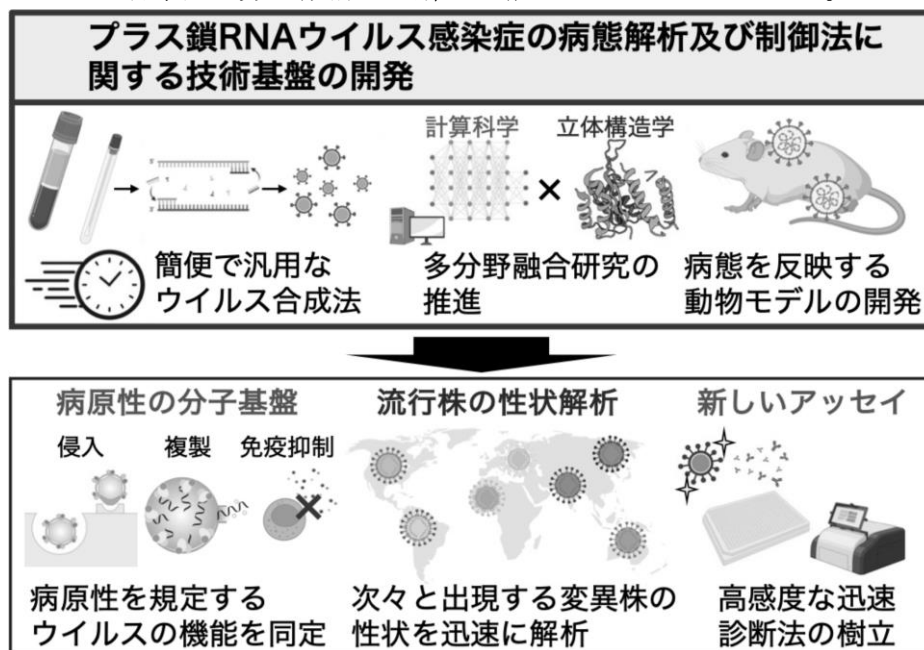
田村 友和（北海道大学 大学院医学研究院）

Tomokazu.Tamura@pop.med.hokudai.ac.jp

これまでに筆者は、動物のプラス鎖 RNA ウイルスを研究の対象とし、その病態を明らかにするために研究を推進してきた。筆者は、病態の解析に必要な遺伝子組換えウイルスの作製技術を簡便で汎用性の高い方法に革新させた。また、臨床病態を反映する動物モデルの作製に成功した。その結果、研究開発速度が大幅に向上し、ウイルスの病原性の分子基盤と生活環の解明に寄与する成果を得た。さらに多分野融合研究を推進し、感染症の診断を簡便にする新しいレポーターアッセイを開発することに成功した。

## はじめに

新型コロナウイルス、デングウイルスなどが原因の人獣共通感染症は絶えず流行を繰り返し、人類に脅威を与え続けている。また、日本で現在流行している豚熱は畜産経済に甚大な影響を与えている。これらの原因ウイルスの遺伝子は全てプラス鎖 RNA である。プラス鎖 RNA ウイルス感染症の制御は公衆衛生および農業経済の向上に寄与する。しかし、病態解析および診断に必須の遺伝子組換え技術とモデル動物は汎用性が低いため、使用が限定されていた。そこで遺伝子組換え技術を駆使し、汎用な組換えウイルス作製法と病態を反映する動物モデルを開発した。この手法により研究開発の速度が大幅に向上した。その結果、プラス鎖 RNA ウイルスの病原性の分子機構の理解を大幅に進めることができた。



—図1. 本研究の概要—

## プラス鎖 RNA ウイルス研究を革新する新しい基盤技術の開発

筆者らはあらゆる特性のプラス鎖 RNA ウイルスに適用でき、従来は数ヶ月かかっていた組換えウイルスの作製を約 1 週間に短縮する方法を開発した<sup>1)</sup>。また、臨床検体からウイルス

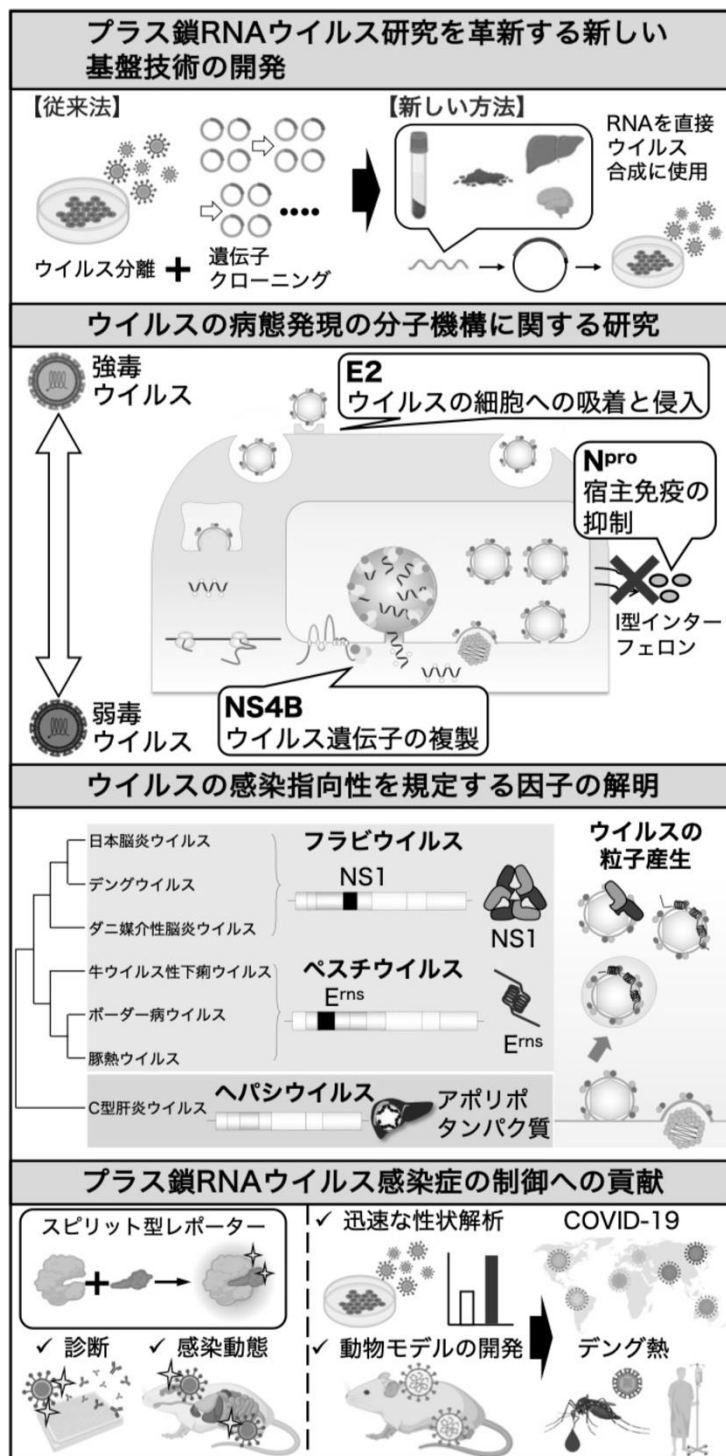
を分離することなく、抽出した RNA から直接ウイルスを人工合成することを可能にした<sup>2,3)</sup>。

### ウイルスの病態発現の分子機構に関する研究

フラビウイルス科ペスチウイルス属に属する豚熱ウイルスは、他のペスチウイルスとは異なりイノシシ科動物に高い感染性を示す。そこで、野外強毒株を異種動物に馴化させた弱毒生ワクチン GPE 株を用いて、病原性の分子メカニズムの解明を試みた。GPE 株を本来の宿主であるブタで連続継代して得られた病原性復帰株を解析したところ、表面糖タンパク質 E2 に 1 カ所、非構造タンパク質 NS4B に 2 カ所のアミノ酸変異を認めた。そこで、それらの変異を

有する組換えウイルスを遺伝子組換え技術にて作製し、ブタに対する病原性を調べた。その結果、継代後に認めた 3 つのアミノ酸の全てが病原性に関与することがわかった。また、*in vitro* のアッセイ系を新たに確立し、E2 の変異はウイルスの細胞間伝播の向上に、NS4B の変異は豚の細胞でのウイルス遺伝子の複製効率の向上に関与することを明らかにした<sup>4)</sup>。さらに野外強毒株との比較解析により、NS4B の N 末端領域の両親媒性ヘリックスがウイルス遺伝子の複製および病原性に関与することを明らかにした<sup>5)</sup>。

豚熱ウイルスの野外株は細胞に感染すると宿主細胞の I 型インターフェロン (IFN) の産生を抑制するが、GPE 株は馴化過程でそれを失っている。そこで GPE 株と野外株の遺伝子を比較し、組換えウイルスを用いた実験により、I 型 IFN 産生抑制に関与するウイルスタンパク質として N<sup>pro</sup> を、さらにその責任アミノ酸を同定した。また、N<sup>pro</sup> による I 型 IFN の産生抑制は、先に同定した E2 と NS4B タンパク質のアミノ酸置換による増殖亢進に相乗作用して、ブタに対する病原性発現に関与することが示唆された<sup>6)</sup>。以上の研究成果から、ペスチウイルスの宿主特異性が病原性発現に重要であ



—図2. 本研究の成果の概略図—

ることがわかった。そこで筆者は、フラビウイルス科のウイルスがどのように特異性を獲得したのかを実験にて検証することを試みた。

### ウイルスの感染指向性を規定する因子の解明

フラビウイルス科に属する豚熱ウイルスとフラビウイルスは、遺伝子に分泌性の膜結合タンパク質の E<sup>ms</sup> と NS1 を各々コードする。一方、同じ科に属する C 型肝炎ウイルスはその様なタンパク質を遺伝子にコードしていない。C 型肝炎ウイルスは、膜結合性のアポリポタンパク質をウイルス粒子の産生に利用することが報告されていたことから、筆者は E<sup>ms</sup> 遺伝子を欠損させた豚熱ウイルスゲノムを人工合成し、アポリポタンパク質や NS1 タンパク質を強制発現させた細胞に導入した。その結果、感染性のウイルス粒子が産生されたことから、E<sup>ms</sup>、NS1 およびアポリポタンパク質等の分泌性の膜結合タンパク質は、フラビウイルスの粒子産生で共通の役割を演じていることを突き止めた<sup>7)</sup>。さらに、これまで解析が困難であった NS1 タンパク質のウイルスの生活環における役割を解明するため、計算構造生物学の手法を駆使して NS1 タンパク質の変異体をスクリーニングし、ウイルス RNA の複製と粒子形成に参与する NS1 タンパク質のアミノ酸を同定した。以上により、フラビウイルスの NS1 タンパク質がウイルス RNA の複製と粒子産生に参与すること実験証明した<sup>8)</sup>。

### プラス鎖 RNA ウイルス感染症の制御への貢献

フラビウイルス科のウイルスの遺伝子は小さく、発光・蛍光タンパク質等の外来遺伝子をそのまま挿入すると、増殖効率やゲノムの安定性が低下することが知られていた。そこで、NanoLuc 遺伝子を分割したスプリット型の HiBiT ペプチド断片の cDNA をウイルス遺伝子に挿入した。作出した組換えウイルスは、親株と同等の増殖性を示し、強く発光することを見出した<sup>9)</sup>。さらに、ウイルスタンパク質の機能を制限せずに HiBiT ペプチドの挿入可能な部位を計算構造生物学の手法で予測し、生体での感染動態を解析可能で、高感度な診断法として豚熱ウイルス、日本脳炎ウイルスおよび C 型肝炎ウイルスに適用することに成功した<sup>9)</sup>。さらに、デング熱の患者由来のサンプルから迅速に組換えウイルスを作製する方法を開発し、デングウイルスの 4 血清型、合わせて 20 株の組換えウイルスを作製し、デング熱の臨床病態を模倣するヒトの免疫システムを持ったヒト化マウスモデルの作製にも成功した<sup>10)</sup>。このヒト化マウスは新型コロナウイルスの感染動態を解析できることも報告した<sup>11)</sup>。さらに、新型コロナウイルスの変異株の組織指向性を解析するために、低侵襲性で高感度に生体でのウイルス動態を解析することができる実験系を開発した<sup>12)</sup>。

筆者は、未曾有の COVID-19 のパンデミックに対応するために、次々と出現する変異株の解析を、革新的組換えウイルス作製法を活用することで新型コロナウイルスの変異株を迅速に人工合成し、その性状解析の成果を報告することで社会貢献した<sup>13)</sup>。

### おわりに

今後は開発した実験基盤を発展させ、未開の動物ウイルス感染症に適用できるように改変して本稿で紹介した技術を多くの研究者に提供したいと考えている。その結果、広くウイルス感染症の制御に資する予防・診断法の開発と病原性の分子基盤の解明に資する成果が得られるため、農畜産学および経済、公衆衛生の発展に寄与するものと考えられる。

## 謝辞

本研究は、北海道大学大学院獣医学研究院、大阪大学微生物病研究所、米国プリンストン大学分子生物学部および北海道大学大学院医学研究院にて行われました。本研究の遂行にあたり、多大なるご指導を賜りました喜田宏先生、松浦善治先生、迫田義博先生、福原崇介先生および Alexander Ploss 先生に厚く御礼申し上げます。また、研究室関係各位、共同研究者の皆様、そして日頃より温かく見守り支援してくれる家族にも深謝いたします。

本受賞にあたり、公益社団法人日本獣医学会から推薦を賜りました。猪熊壽理事長をはじめ諸先生および事務局の皆様にご心より感謝申し上げます。

## 引用文献

- 1) Tamura T., Fukuhara T., Uchida T., Ono C., Mori H., Sato A., Fauzyah Y., Okamoto T., Kurosu T., Setoh Y.-X., Imamura M., Tautz N., Sakoda Y., Khromykh A.-A., Chayama K., and Matsuura Y.: *Journal of Virology* 92(2):e01582-17 (2018).
- 2) Tamura T., Yamamoto H., Ogino S., Morioka Y., Tsujino S., Suzuki R., Hiono T., Suzuki S., Isoda N., Sakoda Y and Fukuhara T.: *Journal of Virology*98(3):e0163823 (2024).
- 3) Yamamoto Y\*., Tamura T.\* (\*: equally first authorship), Ichikawa T., Taguchi Y., Mori K., Oguri S., Suzuki R., Suzuki S., Teshima T. and Fukuhara T.: *Journal of Clinical Microbiology* 62(7):e0004224 (2024).
- 4) Tamura T., Sakoda Y., Yoshino F., Nomura T., Yamamoto N., Sato Y., Okamatsu M., Ruggli N. and Kida H.: *Journal of Virology* 86(16):8602-8613 (2012).
- 5) Tamura T., Ruggli N., Nagashima N., Okamatsu M., Igarashi M., Mine J., Hofmann M.-A., Liniger M., Summerfield A., Kida H. and Sakoda Y.: *Journal of General Virology* 96:2623-2635 (2015).
- 6) Tamura T., Nagashima N., Ruggli N., Summerfield A., Kida H. and Sakoda Y.: *Veterinary Research* 45(1):47 (2014).
- 7) Fukuhara T.\*, Tamura T.\* (\*: equally first authorship), Ono C., Shiokawa M., Mori H., Uemura K., Yamamoto S., Kurihara T., Okamoto T., Suzuki R., Yoshii K., Kurosu T., Igarashi M., Aoki H., Sakoda Y. and Matsuura Y.: *PLoS Pathogens* 13(6):e1006475 (2017).
- 8) Tamura T., Torii S., Kajiwara K., Anzai I., Fujioka Y., Noda K., Taguwa S., Morioka Y., Suzuki R., Fauzyah Y., Ono C., Ohba Y., Okada M., Fukuhara T. and Matsuura Y.: *PLOS Pathogens*. 18(6):e1010593 (2022).
- 9) Tamura T., Igarashi M., Enkhbold B., Suzuki T., Okamatsu M., Ono C., Mori H., Izumi T., Sato A., Fauzyah Y., Okamoto T., Sakoda Y., Fukuhara T. and Matsuura Y.: *Journal of Virology* 93(22): e01191-19 (2019).
- 10) Tamura T., Zhang J., Madan V., Biswas A., Schwoerer M.-P., Cafiero T.-R., Heller B.-L., Wang W. and Ploss A.: *Emerging Microbes & infections* 11(1): 227-239 (2022).
- 11) Kenney D.-J.\*, O'Connell A.-K.\*, Turcinovic J.\*, Montanaro P.\*, Hekman R.-M.\*, Tamura T.\* (\*: Equally first authorship), Berneshawi A.-R., Cafiero T.-R., Abdullatif S.-A., Blum B., Goldstein S.-I., Heller B.-L., Gertje H.-P., Bullitt E., Trachtenberg A.-J., Chavez E., Sheikh A., Kurnick S., Grosz K., Bosmann M., Ericsson M., Huber B.-R., Saeed M., Balazs A.-B., Francis K.-P., Klose A., Paragas N., Campbell J.-D., Connor J.-H., Emili A., Crossland N.-A., Ploss A. and Douam F.: *Cell Reports* 9(3):110714 (2022).
- 12) Tamura T., Ito H., Torii S., Wang L., Suzuki R., Tsujino S., Kamiyama A., Oda Y., Tsuda M., Morioka Y., Suzuki S., Shirakawa K., Sato K., Yoshimatsu K., Matsuura Y., Iwano S., Tanaka S. and Fukuhara T.: *iScience* 27(5):109647 (2024).
- 13) Tamura T., Irie T., Deguchi S., Yajima H., Tsuda M., Nasser H., Mizuma K., Plianchaisuk A., Suzuki S., Uriu K., Begum MST.-M., Shimizu R., Jonathan M., Suzuki R., Kondo T., Ito H., Kamiyama A., Yoshimatsu K., Shofa M., Hashimoto R., Anraku Y., Kimura K.-T., Kita S., Sasaki J., Sasaki-Tabata K., Maenaka K., Nao N., Wang L., Oda Y., The Genotype to Phenotype Japan (G2P-Japan) Consortium; Ikeda T., Saito A., Matsuno K., Ito J., Tanaka S., Sato K., Hashiguchi T, Takayama K.: Fukuhara T.: *Nature Communications* 15(1): 1176 (2024).