

新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業

委託業務成果報告

(委託業務題目)

国内侵入・流行が危惧される昆虫媒介性ウイルス感染症に対する総合的対策に関する研究

担当責任者研究報告書

抗 Dengue ウイルス活性測定と化合物スクリーニングに関わる研究開発

研究分担者 日紫喜隆行 (京都大学ウイルス研究所)

研究協力者 加藤文博 (京都大学ウイルス研究所)

研究要旨：

Dengue ウイルス治療薬開発の為に、効率的な抗ウイルス化合物の探索ツールが必要である。そこで本研究班では以前我々が開発した一過性発現型のレプリコンの系を改良し、分泌型ルシフェラーゼを有する恒常発現型のレプリコン細胞の樹立を試みた。まず薬剤耐性遺伝子とルシフェラーゼ遺伝子の発現方法を検討する為に、3種類のコンストラクトを構築した。続いて、それぞれ *in vitro* で合成した RNA を培養細胞に導入し、薬剤選抜を行ったが全ての細胞が死滅し、レプリコン細胞の樹立には至らなかった。今後は RNA の導入方法および外来遺伝子挿入位置の検討を行う予定である。

A. 研究目的

Dengue ウイルスは熱帯・亜熱帯地域を中心に蔓延しており、公衆衛生上大きな問題となっているにもかかわらず、抗ウイルス薬やワクチンは未だ実用化されていない。その理由の一つに抗ウイルス薬開発や、ウイルス学的解析に用いるためのツールが不足していることが挙げられる。

我々は昨年、一過性発現型のレポーターサブゲノムレプリコンという新たなツール

を構築した。この系は、ウイルス粒子形成に必要な構造遺伝子を欠失させていることからウイルス粒子が形成されず安全に扱う事が出来る。また、構造遺伝子の代わりに分泌型ルシフェラーゼ遺伝子が挿入してあるため、培養上清中のルシフェラーゼ活性を測定することによってウイルスの複製率を簡便かつ迅速に解析することが可能である。しかしながらこの系は一過性発現系であるため、抗ウイルス薬耐性変異の解析な

ど長期培養には不向きである。そこで本研究班ではこの系を改良し、細胞内で恒常的に発現するレポーターサブゲノムレプリコン細胞の樹立を試みる。

B. 研究方法

デングウイルス1型の分子クローン (02-20/pMW119) をもとに作製した一過性発現型のサブゲノムレプリコンを恒常発現型にするために、プロモーターの変更 (CMVからT3に)、および薬剤耐性遺伝子 (ネオマイシン耐性遺伝子) の挿入を行なった。また、ルシフェラーゼ遺伝子と薬剤耐性遺伝子の挿入位置を検討する為に、計3種類のプラスミドを構築した。これらのコンストラクト作製には、15 bpのオーバーラップ配列による相同組み換えを利用したIn-Fusionシステム (Clontech社) を用いた。続いて、*in vitro*合成したRNAを培養細胞 (ヒト肝癌由来細胞: Huh7細胞) にトランスフェクション法によって導入後、G418 (500 µg/ml) 入りの培地による薬剤選抜を行なった。3日毎に薬剤入りの新しい培地に交換し、その際に培養上清中のルシフェラーゼ活性を測定した。

C. 研究結果

ルシフェラーゼ遺伝子と薬剤耐性遺伝子の挿入位置が異なる計3種類のコンストラクトを作製した (図1)。それぞれを *in vitro* RNA 合成し培養細胞に導入後、培養上清中のルシフェラーゼ活性を測定したところ、導入3日後には20万以上の値を示していた

が、経時的に値が低下し、導入12日後にはほぼ検出限界値になった (図2)。また、導入21日後には全ての細胞が死滅してしまい、生存細胞を選抜することは出来なかった。

D. 考察

In-Fusionシステムを用いる事によって余計な配列が付加されることなく、任意の場所に遺伝子配列を挿入する事が出来るため、ウイルスの遺伝子組換えには本手法が非常に有用である。

今回薬剤耐性細胞を選抜することができなかったのは、培養細胞に導入するRNA量が少な過ぎた為である可能性が考えられる。そこで今後は、トランスフェクション法を検討し、細胞に多量のRNAを導入することによってレプリコン細胞の樹立を試みる予定である。また、薬剤耐性遺伝子が発現 (または機能) していない可能性も考えられるため、薬剤耐性遺伝子を挿入する場所の検討を試みる。

E. 結論

レプリコン細胞樹立の為にコンストラクト構築は完了したものの、レプリコン細胞樹立する事は出来なかった。

本研究班で作製するレプリコン細胞は、抗ウイルス化合物探索などの多検体解析への応用が期待される。また、当該細胞はデングウイルス複製機構の解析にも有用であり、そこから得られる成果は診断薬やワクチン開発に大きな波及効果をもたらすこと

が期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kato F., Kobayashi T., Tajima S., Takasaki T., Miura T., Igarashi T., and Hishiki T. Development of a novel dengue-1 virus replicon system expressing secretory Gaussia luciferase for analysis of viral replication and discovery of antiviral drugs. *Jpn. J. Infect. Dis.* 67, 209-212, 2014.
2. Hishiki T., Han Q., Arimoto K., Shimotohno K., Igarashi T., Vasudevan S., Suzuki Y., and Yamamoto N. Interferon-mediated ISG15 conjugation restricts dengue virus 2 replication. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 448, 95-100, 2014.

2. 学会発表

1. 日紫喜隆行、加藤文博、三浦智行、五十嵐樹彦：抗 Dengue ウイルス活性を有する生薬由来成分の探索と性状解析、第 62 回日本ウイルス学会学術集会（横浜）、2014 年 11 月
2. 加藤文博、石田裕樹、大石真也、藤井信

孝、三浦智行、五十嵐樹彦、日紫喜隆行：bromocriptine による抗 Dengue ウイルス活性機構の解析、第 62 回日本ウイルス学会学術集会（横浜）、2014 年 11 月

3. 加藤文博、三浦智行、五十嵐樹彦、日紫喜隆行：非ヒト霊長類 PBMC における Dengue ウイルス増殖能の比較、第 21 回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会（横浜）、2014 年 11 月
4. 加藤文博、日紫喜隆行、大石真也、藤井信孝、三浦智行、五十嵐樹彦：抗 Dengue ウイルス化合物のスクリーニングと作用機序の解析、第 49 回日本脳炎ウイルス生態学研究会（山口）、2014 年 5 月
5. 日紫喜隆行、加藤文博、田島茂、高崎智彦、三浦智行、五十嵐樹彦：分泌型ルシフェラーゼを有する Dengue ウイルス 1 型レプリコンの構築、第 49 回日本脳炎ウイルス生態学研究会（山口）、2014 年 5 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

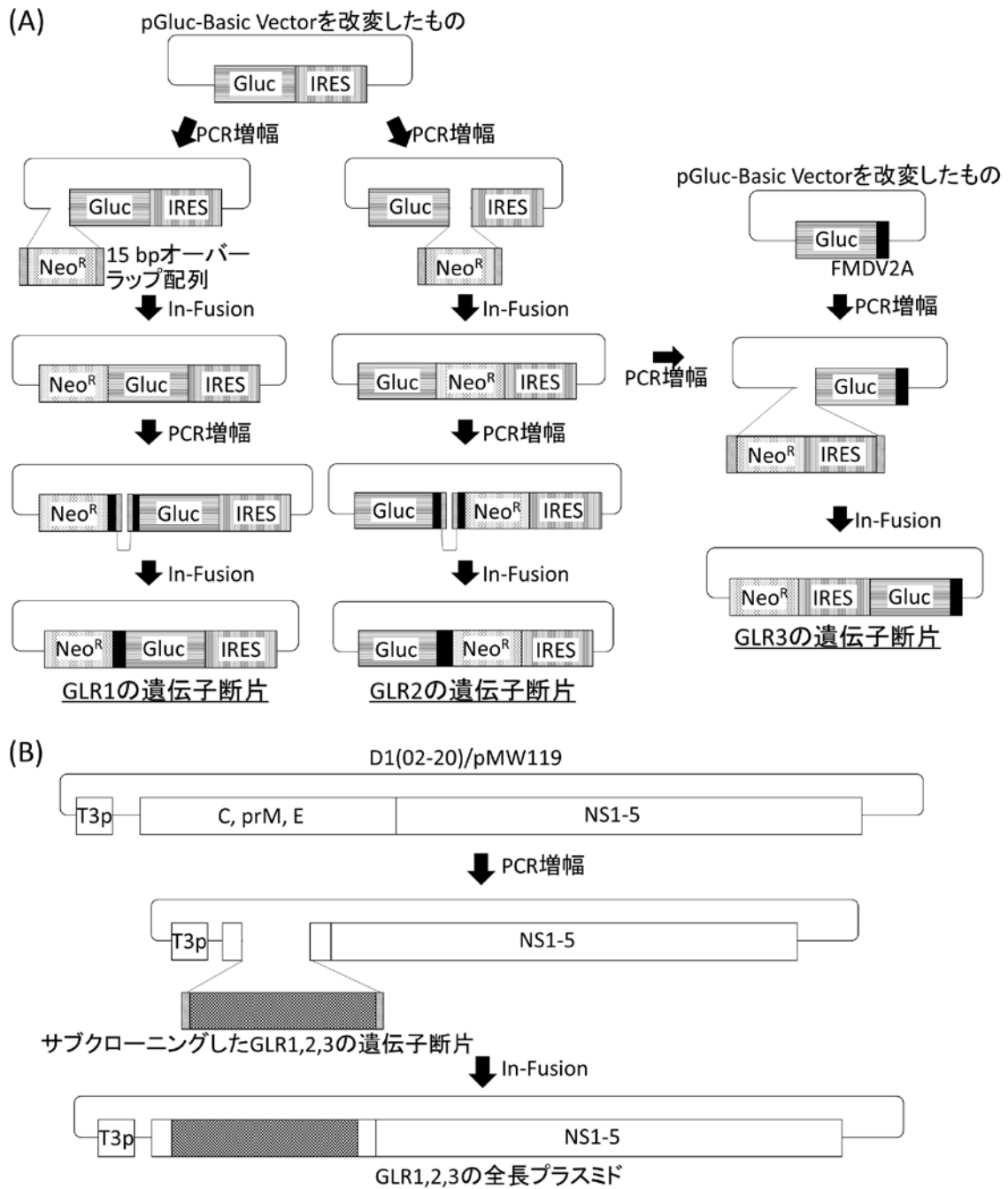


図1. レプリコン細胞作製用のコンストラクト

(A) ネオマイシン耐性遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子の発現法の検討のため、3種類の遺伝子断片を作製した。(B) 作製した遺伝子断片をそれぞれ分子クローンの構造遺伝子領域と置換した。Gluc: Gaussia lusiferase gene, IRES: Internal ribosome entry site derived from encephalomyocarditis virus, Neo^R: Neomycin resistance gene, FMDV2A: Foot-and-mouth-disease 2A cleavage sequence, T3p: T3 promoter

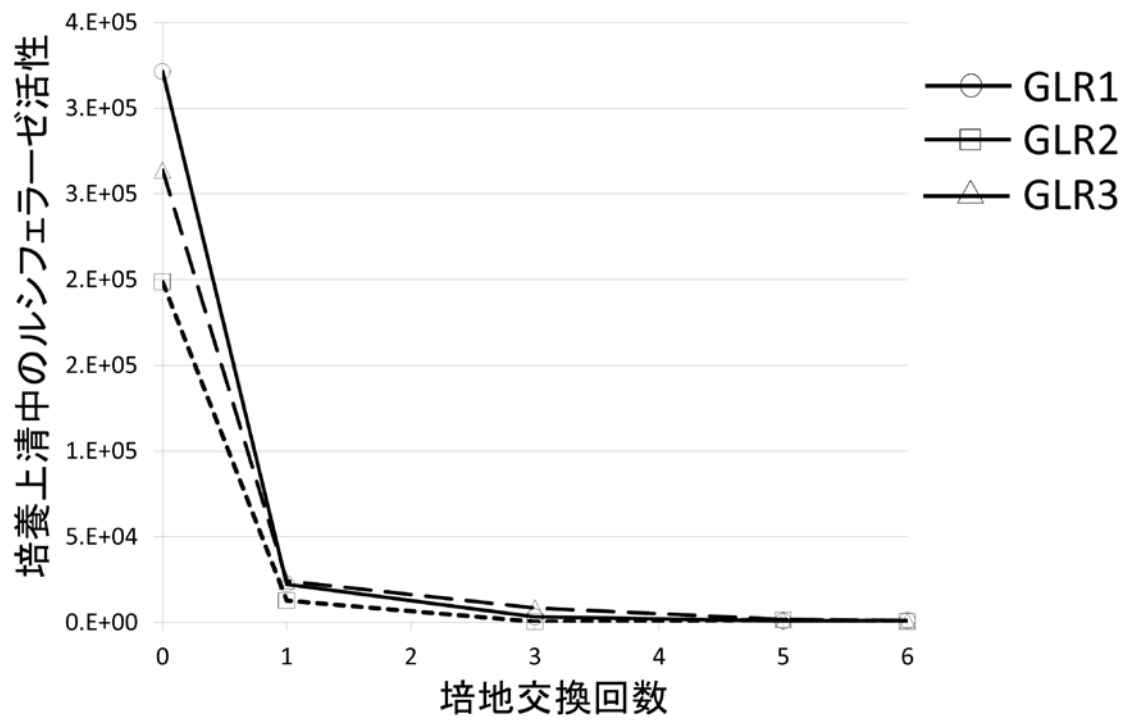


図2. RNA導入後の培養上清中のルシフェラーゼ活性
 作製した3種類それぞれのプラスミドから *in vitro* 合成したウイルスRNAをHuh7細胞にトランスフェクションした。3日ごとにG418入りの新しい培地に交換し、培養上清中のルシフェラーゼ活性を測定した。