

リバーシジェネティクスと麻疹ウイルス

竹田, 誠
九州大学大学院医学研究院ウイルス学分野

柳, 雄介
九州大学大学院医学研究院ウイルス学分野

<https://doi.org/10.15017/18480>

出版情報：福岡醫學雑誌. 97 (5), pp.140-145, 2006-05-25. 福岡医学会
バージョン：
権利関係：



リバースジェネティクスと麻疹ウイルス

九州大学大学院医学研究院 ウイルス学分野

竹田 誠, 柳 雄介

はじめに

マイナス極性の非分節型 RNA をゲノムに持ったウイルスは、遺伝子の並びや機能、遺伝子発現のメカニズムなどに共通性があり、まとめてモノネガウイルス目に分類されている。ヒトに病原性を示す同目の代表的なウイルスには、麻疹ウイルス、ムンプスウイルス、パラインフルエンザウイルス、RS ウイルス、狂犬病ウイルス、エボラウイルスなどがある。本総説では、同目のパラミクソウイルス科モルビリウイルス属の麻疹ウイルスを例に、リバースジェネティクスと呼ばれるウイルスの遺伝子操作手法がウイルスの病原性や遺伝子機能の研究、そしてウイルスベクターの開発などに、どのように貢献しているのかを紹介する。

1. リバースジェネティクスとウイルス研究

従来の遺伝学とは、生物の表現型の相違を研究の起点として、その責任遺伝子、あるいは遺伝子部位を明らかにしてゆく学問である。近年、遺伝子工学の手法が発達し、生物の遺伝子構造を人工的に改変することが可能になってきた。そのことにより、遺伝子改変を研究の起点として、その改変により生じる表現型の変化を解析することができるようになった。このような研究手法は、研究の流れが従来の遺伝学とは逆であるために、リバースジェネティクスと呼ばれている。ウイルスのリバースジェネティクス技術を端的に述べると、プラスミド上にクローン化したウイルスゲノムの cDNA から感染性ウイルスを作出する技術である。改変が自由自在に行えるプラスミドからウイルスを得ることができれば、理論上、思いどおりのウイルスを作出することができる。表現型の異なるウイルスの存在が前提となる従来の遺伝学的研究では、ウイルスの遺伝子機能の解析には、大きな制限があった。意図的な遺伝子改変が可能なりバースジェネティクス技術を用いれば、遺伝子機能の解析の可能性が飛躍的に拡大する。

2. 麻疹ウイルスのリバースジェネティクス

麻疹ウイルスは、パラミクソウイルス科のモルビリウイルス属に属するウイルスで、そのゲノムはマイナス極性をもった非分節型一本鎖 RNA である。約 16 k 塩基で構成され、ゲノムの 3'端から順に N, P, M, F, H, L の 6 つの遺伝子が並んでいる (図 1 A)。それぞれの遺伝子が、N, P, M, F, H, L タンパクをコードしている。P 遺伝子だけが、P タンパクと重複した遺伝子領域に、RNA 編集機構などを利用して、さらにふたつのタンパク (C, V タンパク) をコードしている (図 1 A)。N タンパクはゲノム RNA に整然と並んで結合し、らせん対称のヌクレオカプシドを形成する。ヌクレオカプシドに包まれたゲノムは、ポリメラーゼを構成する L, P タンパクとともに RNP 複合体を形成することにより鑄型活性を発揮することができる。M 蛋白は、エンベロープを裏打ちし、さらに RNP 複合体とも結合することにより、ウイルスの粒子形成の中心的な役割を担っていると考えられている (図 1 B)。エンベロープ上には、受容体と結合する H タンパクと膜融合活性をもった F タンパクがスパイク状に並んでいる (図 1 B)。P 遺伝子にコードされている V, C 蛋白は、粒子中には取り込まれない非構造タンパクと考えられている。1995 年に Radecke らが、麻疹ウイルスの代表的なワクチン株である Edmonston 株の完全長 cDNA から、ウイルスを作出すること、すなわちリバースジェネティクス系の構築に成功した¹⁾。その 5 年後われわれは、野生型

Makoto TAKEDA and Yusuke YANAGI

Department of Virology, Faculty of Medicine, Kyushu University

Reverse Genetics for Measles Virus

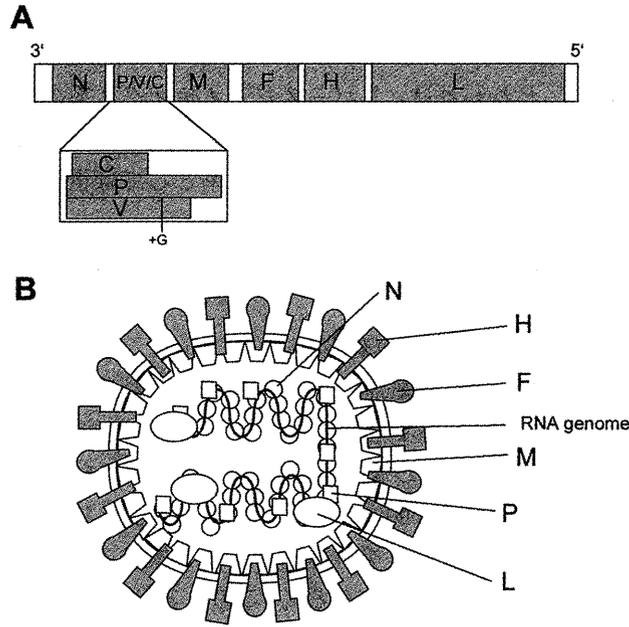


図1 麻疹ウイルスのゲノム構造 (A) と粒子構造 (B)

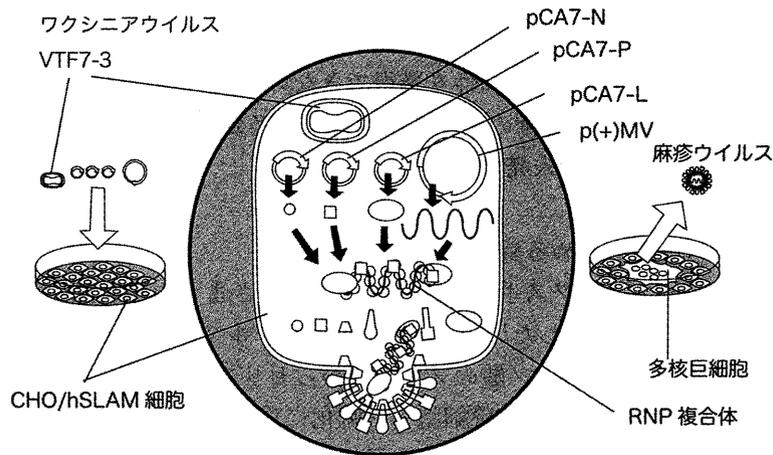


図2 麻疹ウイルスのリバーシジェネティクス系
 麻疹ウイルスのゲノム全長をコードするプラスミド p (+)MV と、RNP 複合体の構成タンパクをコードするプラスミド、pCA7-N、pCA7-P、pCA7-L を、麻疹ウイルスの受容体 SLAM を恒常的に発現させた CHO 細胞 (CHO/hSLAM) に導入する。そこへ T7 RNA ポリメラーゼを発現するワクシニアウイルス vTF7-3 を感染させることにより、ウイルスゲノムと N、P、L タンパクが発現する。ウイルスゲノムは、N、P、L タンパクとともに RNP 複合体を形成することによって活性型となり、麻疹ウイルスが自律増殖を開始する。プラスミド導入後、2 日で麻疹ウイルス感染細胞に特徴的な多核巨細胞を観察することができる。一方、ワクシニアウイルスは、CHO/hSLAM 細胞内で、自身の感染後期過程が行えず、結果として麻疹ウイルスだけを効率良く回収することができる。

麻疹ウイルスを用いたリバーシジェネティクス系の構築に成功した²⁾。野生型麻疹ウイルスを用いることは、病原性の研究を進める上で重要であるばかりか、各々の遺伝子の野生株本来の機能を知る上でも非常に重要である。さらに2005年に、われわれは、リバーシジェネティクス系の効率を格段に高める方法を開発した³⁾。そのことにより、従来の系では困難であった遺伝子領域の改変や、大幅な遺伝子構造の改築などが可能になった。本システムの効率は、モノネガウイルスの系としては世界的にも最も優れていると考えられる。システムの概要について図2に示した。

3. リバーシジェネティクスを用いた麻疹ウイルス遺伝子の機能解析

1) 麻疹ウイルス H タンパクと細胞指向性の変化

ワクチン株と野生型麻疹ウイルスは、培養細胞での増殖性に顕著な違いがある。ワクチン株は、ヒトの有核細胞の全てを含む、さまざまな培養細胞で増殖できるように馴化している⁴⁾。一方、野生型の麻疹ウイルスは、ヒトの免疫系細胞の一部にしか感染しない⁴⁾。この違いは、ワクチン株と野生株の H タンパクの構造の違いが主な原因であることをわれわれは明らかにした^{4)~6)}。すなわちリバーシジェネティクス法で H 遺伝子 (H タンパクをコードする) だけをワクチン株のものと交換するだけで野生型麻疹ウイルスは、ワクチン株と同様に広い細胞指向性を有するようになる⁶⁾。このことは、野生型麻疹ウイルスの H タンパクが、Signaling lymphocyte activation molecule (SLAM; CD150) と呼ばれるリンパ球活性化に関わる分子にしか結合しないのに対して、ワクチン株の H タンパクが、SLAM に加えて CD46 にも結合できるように変化しているためであり、麻疹ウイルスワクチン株にみられる最も顕著な変化である⁷⁾⁷⁾。一方、ワクチン株にみられる H タンパクのアミノ酸置換の中でも、特に 481 番目のアミノ酸のアスパラギンからチロシンへの置換 (N481Y) が細胞指向性の変化 (CD46 への結合) を決定していると報告されてきた⁸⁾⁹⁾。しかし、実際にリバーシジェネティクス手法で N481Y 変異だけを導入したウイルスを作成してみると、その変異だけでは、ワクチン株と類似の細胞指向性を獲得できないことが明らかになった¹⁰⁾。現在、どのような変異がワクチン株型の H タンパクと同様の機能を持つために必要であるかを解析中であり、その詳細が明らかになりつつある (Tahara et al. 未発表データ)。

2) 細胞内でのウイルス増殖を高める変異

われわれは、リバーシジェネティクス手法を用いて、さらにさまざまな遺伝子領域をワクチン株のものと組換えウイルスを約 20 種類用意した¹¹⁾。それら組換えウイルスの解析から、ワクチン株にみられる変異の中で、M タンパクの 64 番目のアミノ酸のプロリンからセリンへの変異、そして 89 番目のグルタミン酸からリジンへの変異が、非リンパ球系培養細胞への馴化に重要であることが分かった¹¹⁾。それらの変異は、麻疹ウイルスの粒子形成過程を促進していると予想している。一方、ポリメラーゼをコードしている L 遺伝子についても同様に、ワクチン株の L 遺伝子の方が、ウイルスの培養細胞での増殖に有利であることが示された¹¹⁾。

3) アクセサリータンパクと麻疹ウイルスの病原性

麻疹ウイルスの P 遺伝子には、ポリメラーゼのサブユニットである P タンパクに加えて、C、V ふたつのタンパクがコードされている。V タンパクには、インターフェロンのシグナル伝達を阻害する機能があることをわれわれは明らかにしている¹²⁾¹³⁾。一方、C タンパクの機能は、依然として不明である。そこで、われわれは、リバーシジェネティクス手法を用いて、C タンパクの発現を欠いたウイルスを作成して、培養細胞での増殖性や、サルにおける病原性などを解析した¹⁴⁾。その結果、C タンパクは、培養細胞での増殖において必ずしも必要ではないが、その発現を欠くことにより麻疹ウイルスのサルにおける病原性が完全に消失することが明らかになった¹⁴⁾。現在、C タンパクの病原性発現における機能について解析を進めている。

4) 長いタンパク非翻訳領域の機能

麻疹ウイルスのゲノム上には6つの遺伝子が並んでコードされているが、F mRNAの5'末端側、M mRNAの3'末端側に対応する領域には非常に長いタンパク非翻訳領域が存在する。しかしながら、その機能については、分かっていなかった。われわれは、それらの領域を選択的に欠いたウイルスを作製し、解析を行なった¹⁵⁾。その結果、おのおののタンパク非翻訳領域が、Fタンパク、Mタンパクの発現を主には翻訳レベルで調節することによって、ウイルスの高い複製能を維持しつつ、ウイルスによる細胞傷害性を軽減していることが明らかになった¹⁵⁾。宿主(細胞、あるいは感染個体)の傷害性を軽減することは、自然界においてウイルスが存続する上で、重要な要素のひとつであろうとわれわれは、考えている。

4. リバーシジェネティクスを駆使したゲノム構造の改変やウイルスベクターの開発

リバーシジェネティクス技術を応用することにより、新しい遺伝子をウイルスゲノムに追加して、タンパク発現用のベクターとして利用できる。麻疹ウイルスなどのパラミクソウイルスを用いる場合の主な利点のひとつは、これらのウイルスの複製の全過程が細胞質内で行われるため、宿主ゲノムへの影響がないと考えられることである。センダイウイルスなど、近縁のウイルスでは、ウイルスの構造タンパクの一部を欠失させることにより、ウイルスそのものの自己複製能を失わせたベクターが開発されている¹⁶⁾。また、麻疹ウイルスにおいては受容体に結合するHタンパクの構造を変えることにより、癌細胞などの目的の細胞にのみ特異的に感染するウイルスベクターの開発が進んでいる¹⁷⁾。われわれは、これらのベクターの可能性をさらに高めることを目的に、本来は、非分節構造の長い一本のRNA分子である麻疹ウイルスのゲノムを、2本、あるいは3本の短いRNAに分節化することを試みた¹⁸⁾(図3)。一本の長いゲノムを分節化することにより、最大5から6種の外来遺伝子を同時に搭載し発現できる新しいタイプのモノネガウイルスベクターの開発に成功した¹⁸⁾(図3)。われわれの開発した極めて効率の高い麻疹ウイルスのリバーシジェネティクス系を用いて、今後ますます麻疹ウイルスの遺伝子機能の研究が進むとともに、その技術や知見を生かして、より優れたウイルスベクターの開発が進むと考えている。

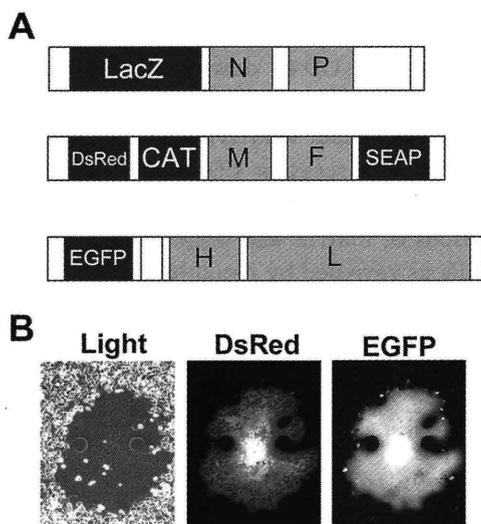


図3 3分節構造をもつように改変した麻疹ウイルス

(A) 本来、非分節型の本一本である麻疹ウイルスのゲノムを、3本の分節型に改変した。分節のおおのが、麻疹ウイルス遺伝子(N, P, M, F, H, L)のふたつをコードしている。さらに、おのおのの分節に外来遺伝子を挿入することにより、総計5種類の外来性タンパク(LacZ, DsRed, CAT, SEAP, EGFP)を発現する麻疹ウイルスを作出することができる。(B) 位相差顕微鏡(Light)で観察できる多核巨細胞が、二種類の蛍光(DsRed, EGFP)を発している。

おわりに

われわれが主に研究を進めている麻疹ウイルスを例に、リバーシジェネティクス技術が、ウイルスの研究、そして新型ウイルスベクターの開発などに、どのように貢献しているのかを概説した。麻疹は、古典的な感染症であり、その名を知らない人はあまりいないであろう。しかし今もなお、発展途上国を中心に猛威をふるっている感染症である。ウイルス自体も、約半世紀前に分離され、熱心に研究が行われてきた。

にも拘らず、そのゲノム機能については不明な点も多く、また、病原性発揮のメカニズムについては、主要な標的細胞が SLAM を発現する一部の免疫細胞であるということを除き、あまり分かっていない。われわれの開発した野生型麻疹ウイルスのリバースジェネティクス技術を用いて、それらの謎解きが急速に進んでいる。さらには、より効率の優れた技術の導入が、今後のウイルス研究、そしてウイルスベクターの開発に大いに役立つものと考えている。

参 考 文 献

- 1) Radecke, F., P. Spielhofer, H. Schneider, K. Kaelin, M. Huber, C. Dotsch, G. Christiansen and M. A. Billeter : 1995. Rescue of measles viruses from cloned DNA. *Embo J* 14 : 5773.
- 2] Takeda, M., K. Takeuchi, N. Miyajima, F. Kobune, Y. Ami, N. Nagata, Y. Suzaki, Y. Nagai and M. Tashiro : 2000. Recovery of pathogenic measles virus from cloned cDNA. *J. Virol.* 74 : 6643.
- 3] Takeda, M., S. Ohno, F. Seki, K. Hashimoto, N. Miyajima, K. Takeuchi and Y. Yanagi. 2005. Efficient rescue of measles virus from cloned cDNA using SLAM-expressing Chinese hamster ovary cells. *Virus Res* 108 : 161.
- 4] Tatsuo, H., K. Okuma, K. Tanaka, N. Ono, H. Minagawa, A. Takade, Y. Matsuura and Y. Yanagi : 2000. Virus entry is a major determinant of cell tropism of Edmonston and wild-type strains of measles virus as revealed by vesicular stomatitis virus pseudotypes bearing their envelope proteins. *J. Virol.* 74 : 4139.
- 5] Tatsuo, H., N. Ono, K. Tanaka and Y. Yanagi : 2000. SLAM (CDw 150) is a cellular receptor for measles virus. *Nature* 406 : 893.
- 6] Takeuchi, K., M. Takeda, N. Miyajima, F. Kobune, K. Tanabayashi and M. Tashiro : 2002. Recombinant wild-type and edmonston strain measles viruses bearing heterologous H proteins : role of H protein in cell fusion and host cell specificity. *J Virol* 76 : 4891.
- 7) Yanagi, Y., N. Ono, H. Tatsuo, K. Hashimoto and H. Minagawa : 2002. Measles virus receptor SLAM (CD 150). *Virology* 299 : 155.
- 8) Hsu, E. C., F. Sarangi, C. Iorio, M. S. Sidhu, S. A. Udem, D. L. Dillehay, W. Xu, P. A. Rota, W. J. Bellini and C. D. Richardson : 1998. A single amino acid change in the hemagglutinin protein of measles virus determines its ability to bind CD 46 and reveals another receptor on marmoset B cells. *J. Virol.* 72 : 2905.
- 9) Lecouturier, V., J. Fayolle, M. Caballero, J. Carabana, M. L. Celma, R. Fernandez-Munoz, T. F. Wild and R. Buckland : 1996. Identification of two amino acids in the hemagglutinin glycoprotein of measles virus (MV) that govern hemadsorption, HeLa cell fusion and CD 46 downregulation : phenotypic markers that differentiate vaccine and wild-type MV strains. *J. Virol.* 70 : 4200.
- 10) Seki, F., M. Takeda, H. Minagawa and Y. Yanagi : 2006. Recombinant wild-type measles virus containing a single N 481 Y substitution in its haemagglutinin cannot use receptor CD 46 as efficiently as that having the haemagglutinin of the Edmonston laboratory strain. *J Gen Virol* 87 : 1643.
- 11] Tahara, M., M. Takeda and Y. Yanagi : 2005. Contributions of matrix and large protein genes of the measles virus edmonston strain to growth in cultured cells as revealed by recombinant viruses. *J Virol* 79 : 15218.
- 12) Takeuchi, K., S. I. Kadota, M. Takeda, N. Miyajima and K. Nagata : 2003. Measles virus V protein blocks interferon (IFN)-alpha/beta but not IFN-gamma signaling by inhibiting STAT 1 and STAT 2 phosphorylation. *FEBS Lett* 545 : 177.
- 13) Ohno, S., N. Ono, M. Takeda, K. Takeuchi and Y. Yanagi : 2004. Dissection of measles virus V protein in relation to its ability to block alpha/beta interferon signal transduction. *J Gen Virol* 85 : 2991.
- 14] Takeuchi, K., M. Takeda, N. Miyajima, Y. Ami, N. Nagata, Y. Suzaki, J. Shahnewaz, S. Kadota and K. Nagata : 2005. Stringent requirement for the C protein of wild-type measles virus for growth both in vitro and in macaques. *J Virol* 79 : 7838.
- 15] Takeda, M., S. Ohno, F. Seki, Y. Nakatsu, M. Tahara and Y. Yanagi. 2005. Long untranslated regions of the measles virus M and F genes control virus replication and cytopathogenicity. *J Virol* 79 : 14346.
- 16) Inoue, M., Y. Tokusumi, H. Ban, M. Shirakura, T. Kanaya, M. Yoshizaki, T. Hironaka, Y. Nagai, A. Iida and M. Hasegawa : 2004. Recombinant Sendai virus vectors deleted in both the matrix and the fusion genes : efficient gene transfer with preferable properties. *J Gene Med* 6 : 1069.
- 17] Nakamura, T., K. W. Peng, M. Harvey, S. Greiner, I. A. Lorimer, C. D. James and S. J. Russell : 2005. Rescue and propagation of fully retargeted oncolytic measles viruses. *Nat Biotechnol* 23 : 209.

- 18] Takeda, M., Y. Nakatsu, S. Ohno, F. Seki, M. Tahara, T. Hashiguchi and Y. Yanagi : 2006. Generation of measles virus with a segmented RNA genome. J Virol 80 : 4242.

(参考文献のうち、数字がゴシック体で表示されているものについては、著者により重要なものと指定された分です。)

プロフィール

竹田 誠 (たけだ まこと)

九州大学助教授 (大学院・医学研究院・ウイルス学)。医学博士。

◆**略歴** 1967年大阪市に生る。平成4年信州大学医学部卒業。平成7年東京大学医科学研究所研究生。平成10年国立感染症研究所研究員。平成12年米国ノースウェスタン大学ハワードヒューズ医学研究所研究員。平成15年九州大学大学院医学研究院助手。平成16年同講師。平成18年より現職。

◆**研究テーマ** 麻疹ウイルス、インフルエンザウイルスなど、マイナス鎖RNAウイルスの病原性発現の分子基盤の解析