

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：17701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24658245

研究課題名(和文) インフルエンザウイルス感染動態解析用マウスの作出

研究課題名(英文) Generation of transgenic mouse for analysis of in vivo dynamics of influenza virus infection

研究代表者

小澤 真 (Ozawa, Makoto)

鹿児島大学・獣医学部・准教授

研究者番号：50568722

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：GFPをコードしたインフルエンザ遺伝子様組換えRNAを発現する遺伝子組換えマウスを作出するため、プラスミドを構築した。プラスミド導入培養細胞へ野生型ウイルスを感染させると、GFPが発現した。プラスミド転写領域のDNAをマウス受精卵に導入し、導入遺伝子陽性マウス3系統を得た。各系統のマウス個体ならびに尻尾由来初代培養細胞に野生型ウイルスを感染させたが、GFPは発現しなかった。本研究の完遂には、プラスミド転写領域の改変が必要と考えられた。

研究成果の概要(英文)：To generate transgenic mouse ubiquitously expressing a recombinant influenza virus-like RNA encoding GFP gene, we constructed a plasmid for the expression of the recombinant RNA. Cultured cells pre-transfected with the constructed plasmid and subsequently infected with wild-type influenza viruses expressed GFP specifically in virus-infected cells. By injecting the transcriptional region fragment of the plasmid into mouse fertilized eggs, we obtained three mouse lines whose germlines were positive for the injected genes. The animals or their tail-derived primary cells, however, did not express GFP even after infection with wild-type influenza viruses. These results imply that the transcriptional region of the plasmid should be modified to complete this study.

研究分野：ウイルス学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：インフルエンザウイルス トランスジェニックマウス レポーター遺伝子

### 1. 研究開始当初の背景

公衆衛生上重要なウイルスの多くは、GFP などのレポーター遺伝子を安定的に発現する組換えウイルスが作出され、その生体内感染動態の解明に利用されてきた。一方インフルエンザウイルスは、これまで最も精力的に研究されてきた病原体のひとつであるにもかかわらず、遺伝子変異率の高さや、分節遺伝子のウイルス粒子内取り込み機構の繊細さ・複雑さのため、そのような組換えウイルスは長い間作出できなかった。2010年に、マウスに致死的な GFP 発現組換えインフルエンザウイルスが初めて報告されたが (PNAS. 2010;107:11531-6) その病原性は野生型ウイルスと比べて著しく弱く、レポーター遺伝子の発現も不安定だったため、実験ツールとして十分な信頼性・汎用性を備えてはいなかった。このような背景から、インフルエンザウイルスの生体内感染動態の解析には、全く新しいアプローチが必要と考えられた。

### 2. 研究の目的

ウイルスではなく宿主にレポーター-vRNA を発現させることで、インフルエンザウイルスの変異率の高さや分節遺伝子維持機構などの問題点を克服した実験ツールを確立し、ウイルスの生体内感染動態の解析に応用することを目的とする。

### 3. 研究の方法

インフルエンザウイルスのゲノムは8遺伝子に分節化しており、その翻訳領域の両端は、vRNA の転写・複製に重要な非翻訳領域に挟まれている。本研究で用いる vRNA には、レポーター遺伝子を効率よく発現させるため、3'末端側非翻訳領域に vRNA プロモーター活性を上昇させる変異 (J Gen Virol. 1995;76:1709-1717) を導入した。また、翻訳領域の一部は、組換え vRNA のウイルス粒子内への取り込みを促してしまうため (PNAS. 2003;100:2002-7)、レポーター-vRNA 上のウイルス蛋白質翻訳領域は、GFP 遺伝子と完全に置換した。インフルエンザウイルスの全8遺伝子に関して上述の条件を満たすコンストラクトを各々作製し、野生型ウイルスの人工合成に必要なプラスミドセットと共にヒト由来培養細胞へ導入して、細胞内における GFP 発現と培養上清中のウイルス力価を確認した。

マウス細胞での発現に最適化するため、上述の実験で良好な結果が得られた組換え vRNA 発現コンストラクトのヒト由来 RNA ポリメラーゼ I プロモーター配列を、マウス由来の配列に置換した。作製したプラスミドをげっ歯類由来培養細胞へあらかじめ導入し、野生型ウイルスを感染させ、GFP の発現を確認した。

このプラスミドの転写領域に相当する DNA をマウス受精卵に導入し、F0 個体を得

た。各 F0 個体の尻尾から DNA を抽出し、GFP 遺伝子を標的として組換え遺伝子の有無を調べた。

GFP 遺伝子陽性 F0 個体を野生型マウスと交配させて F1 個体を生まれ、F0 個体と同様に組換え遺伝子の有無を調べた。

GFP 遺伝子陽性 F1 個体、ならびに同個体の尻尾から樹立した初代培養細胞に野生型ウイルスを感染させ、GFP の発現を確認した。

### 4. 研究成果

HA 遺伝子を鋳型とした組換え vRNA のみが、効率的な GFP 発現と高いウイルス力価の両方を示した。

感染細胞特異的な GFP 発現が見られた。

全 69 匹の F0 個体のうち、7 匹の尻尾から GFP 遺伝子が検出された。

7 匹中 6 匹の F0 個体から子供 (F1 個体) が生まれ、そのうち 3 系統の F1 個体の尻尾から GFP 遺伝子が検出された。

野生型ウイルスを感染させたいずれの F1 個体または尻尾由来初代培養細胞でも、GFP は発現しなかった。

以上の結果から、今回作出した遺伝子組換えマウス体内には、導入した組換え DNA は維持されているものの、インフルエンザ遺伝子様組換え RNA は発現していない可能性が示唆された。そのため、本研究の完遂には、プラスミド転写部位の改変が必要と考えられた。

### 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 13 件)

Fonseca W, Ozawa M, Hatta M, Orozco E, Martinez MB, Kawaoka Y. A recombinant influenza virus vaccine expressing the F protein of respiratory syncytial virus. Arch Virol 159, 1067-1077 (2014). 【査読有】 DOI: 10.1007/978-1-61779-621-0\_12  
Kasama Y, Mizukami T, Kusunoki H, Peveling-Oberhag J, Nishito Y, Ozawa M, Kohara M, Mizuochi T, Tsukiyama-Kohara K. B-Cell-Intrinsic Hepatitis C Virus Expression Leads to B-Cell-Lymphomagenesis and Induction of NF-kappaB Signalling. PLoS One 9, e91373 (2014). 【査読有】 DOI: 10.1371/journal.pone.0091373  
Ezzikouri S, Ozawa M, Kohara M, Elmdaghri N, Benjelloun S, Tsukiyama-Kohara K. Recent insights into hepatitis B virus-host interactions. J Med Virol 86, 925-932 (2014). 【査読有】 DOI: 10.1002/jmv.23916  
Watanabe T, Kiso M, Fukuyama S,

Nakajima N, Imai M, Yamada S, Murakami S, Yamayoshi S, Iwatsuki-Horimoto K, Sakoda Y, Takashita E, McBride R, Noda T, Hatta M, Imai H, Zhao D, Kishida N, Shirakura M, de Vries RP, Shichinohe S, Okamatsu M, Tamura T, Tomita Y, Fujimoto N, Goto K, Katsura H, Kawakami E, Ishikawa I, Watanabe S, Ito M, Sakai-Tagawa Y, Sugita Y, Uraki R, Yamaji R, Eisfeld AJ, Zhong G, Fan S, Ping J, Maher EA, Hanson A, Uchida Y, Saito T, Ozawa M, Neumann G, Kida H, Odagiri T, Paulson JC, Hasegawa H, Tashiro M, Kawaoka Y. Characterization of H7N9 influenza A viruses isolated from humans. *Nature* 501, 551-555 (2013).

【査読有】DOI: 10.1038/nature12392  
Uraki R, Kiso M, Iwatsuki-Horimoto K, Fukuyama S, Takashita E, Ozawa M, Kawaoka Y. A Novel Bivalent Vaccine Based on a PB2-Knockout Influenza Virus Protects Mice from Pandemic H1N1 and Highly Pathogenic H5N1 Virus Challenges. *J Virol* 87, 7874-7881 (2013). 【査読有】DOI: 10.1128/JVI.00076-13

Fan S, Macken CA, Li C, Ozawa M, Goto H, Iswahyudi NF, Nidom CA, Chen H, Neumann G, Kawaoka Y. Synergistic Effect of the PDZ and p85beta-Binding Domains of the NS1 Protein on Virulence of an Avian H5N1 Influenza A Virus. *J Virol* 87, 4861-4871 (2013). 【査読有】DOI: 10.1128/JVI.02608-12

Ozawa M, Shimojima M, Goto H, Watanabe S, Hatta Y, Kiso M, Furuta Y, Horimoto T, Peters NR, Hoffmann FM, Kawaoka Y. A cell-based screening system for influenza A viral RNA transcription/replication inhibitors. *Sci Rep* 3, 1106 (2013). 【査読有】DOI: 10.1038/srep01106

Salem NE, Saito M, Kasama Y, Ozawa M, Kawabata T, Harada S, Suda H, Asonuma K, El-Gohary A, Tsukiyama-Kohara K. Genomic polymorphisms in 3beta-hydroxysterol Delta24-reductase promoter sequences. *Microbiol Immunol* 57, 179-184 (2013).

【査読有】DOI: 10.1111/1348-0421  
Takashita E, Muraki Y, Sugawara K, Asao H, Nishimura H, Suzuki K, Tsuji T, Hongo S, Ohara Y, Kawaoka Y, Ozawa M, Matsuzaki Y. Intrinsic temperature sensitivity of influenza C virus hemagglutinin-esterase-fusion protein. *J Virol* 86, 13108-13111 (2012).

【査読有】DOI: 10.1128/JVI.01925-12  
Inagaki A, Goto H, Kakugawa S, Ozawa M, Kawaoka Y. Competitive incorporation of homologous gene segments of influenza A virus into virions. *J Virol* 86, 10200-10202 (2012).

【査読有】DOI: 10.1128/JVI.01204-12  
Imai M, Watanabe T, Hatta M, Das SC, Ozawa M, Shinya K, Zhong G, Hanson A, Katsura H, Watanabe S, Li C, Kawakami E, Yamada S, Kiso M, Suzuki Y, Maher EA, Neumann G, Kawaoka Y. Experimental adaptation of an influenza H5 HA confers respiratory droplet transmission to a reassortant H5 HA/H1N1 virus in ferrets. *Nature* 486, 420-428 (2012).

【査読有】DOI: 10.1038/nature10831  
Watanabe T, Imai M, Watanabe S, Shinya K, Hatta M, Li C, Neumann G, Ozawa M, Hanson A, Zhong G, Fukuyama S, Kawakami E, Simmons HA, Schenkman D, Brunner K, Capuano SV, 3rd, Weinfurter JT, Kilander A, Dudman SG, Suresh M, Hungnes O, Friedrich TC, Kawaoka Y. Characterization in vitro and in vivo of pandemic (H1N1) 2009 influenza viruses isolated from patients. *J Virol* 86, 9361-9368 (2012). 【査読有】DOI: 10.1128/JVI.01214-12

Neumann G, Ozawa M, Kawaoka Y. Reverse genetics of influenza viruses. *Methods Mol Biol* 865, 193-206 (2012).

【査読無】  
DOI: 10.1007/978-1-61779-621-0\_12

〔学会発表〕(計13件)

第61回日本ウイルス学会学術集会 小澤 真、奥谷 公亮、川畑 淑子、永野 希織、楠元 勇、高瀬 公三、小原 恭子 「ツル越冬地の水からのインフルエンザウイルスの分離」 神戸国際会議場 2013年11月

International Symposium of Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology. Makoto Ozawa and Yoshihiro Kawaoka. Development and Application of replication-incompetent foreign gene-expressing influenza viruses. Hwaseong (Republic of Korea). October, 2013.

第156回日本獣医学会学術集会 神田 雄大、小澤 真、小原 恭子 「口蹄疫ウイルスのIRES依存性翻訳活性の評価」 岐阜 2013年9月

第156回日本獣医学会学術集会 金澤 伯弘、川畑 淑子、永野 希織、小原 道法、小澤 真、小原 恭子 「ツパイと

ヒトとの遺伝的相同性の検証」 岐阜  
2013年9月  
第156回日本獣医学会学術集会 奥谷  
公亮、川畑 淑子、永野 希織、楠元 勇、  
高瀬 公三、小原 恭子、小澤 真 「ツル  
のねぐらにおけるインフルエンザウ  
イルスの分離」 岐阜 2013年9月  
第156回日本獣医学会学術集会 小澤  
真、川畑 淑子、出口 栄三郎、小原 恭  
子 「養豚における抗インフルエンザウ  
イルス抗体の保有状況」 岐阜 2013  
年9月  
Options for the Control of Influenza  
VIII. M. Saito, M. Ozawa, F. Yasui, T.  
Sasaki, T. Munakata, Y. Tobita, R. Ito,  
K. Munekata, K. Tsukiyama-Kohara,  
A. Sakurai, F. Shibasaki, Y. Sakoda, H.  
Kida, P. C. Reid, K. Kubota, H. Suga,  
M. Kohara. Influenza viral  
hemagglutinin-targeted macrocycles  
as an antiviral agent. Cape Town  
(South Africa). September, 2013.  
15th International Negative Strand  
Virus Meeting. M. Ozawa, M.  
Shimajima, H. Goto, S. Watanabe, Y.  
Hatta, M. Kiso, Y. Furuta, T. Horimoto,  
N. R. Peters, F. M. Hoffmann, Y.  
Kawaoka. A cell-based screening  
system for influenza A viral RNA  
transcription/replication inhibitors.  
Granada (Spain). June, 2013.  
International Symposium of Tokyo  
Metropolitan Institute of Medical  
Science. Makoto Ozawa and  
Yoshihiro Kawaoka. Development and  
Application of  
replication-incompetent foreign  
gene-expressing influenza viruses.  
Tokyo (Japan). February, 2013.  
鹿児島県養豚研究会 平成24年度第2  
回研究会 小澤 真 「豚インフルエ  
ンザの現状」 鹿児島 2013年1月23日  
第60回日本ウイルス学会学術集会 小  
澤 真、福山 聡、桂 廣亮、石川 い  
ずみ、河岡 義裕 「生体内ライブイメ  
ージングを可能とする組換え A 型イン  
フルエンザウイルスの作出」 大阪  
2012年11月  
第154回日本獣医学会学術集会 小澤  
真、Sylvia Victor、渡辺 真治、角川 学  
士、桂 廣亮、河岡 義裕 「非増殖性・  
外来遺伝子発現組換えインフルエンザ  
ウイルスの作出とワクチン効果の検討」  
岩手 2012年9月  
南九州養豚会 第111回定例会 小澤  
真 「豚におけるインフルエンザについ  
て」 鹿児島 2012年7月

ンフルエンザウイルス講座「インフルエ  
ンザウイルスの分類法—科・型・亜型—」  
インフルエンザ 15(1), pp.45-47 (2014).

〔産業財産権〕

取得状況(計1件)

名称: Influenza viruses with mutant PB2  
gene segment as live attenuated vaccines.

発明者: Yoshihiro Kawaoka, Gabriele  
Neumann, Makoto Ozawa.

権利者: 同上

種類: 特許

番号: Ref: P110003US02, App.#:  
13/594611

取得年月日: August 24, 2012

国内外の別: 国外(アメリカ)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小澤 真 (OZAWA, Makoto)

鹿児島大学・共同獣医学部・准教授

研究者番号: 50568722

〔図書〕(計1件)

小澤 真、河岡 義裕 専門家に聞くイ