

国際共同研究者養成プログラム報告書(2023年度分)

報告日：2024年3月30日

国際共同研究に関して、記入日時点の研究成果、研究成果の発表予定について具体的に記入してください。

適宜、行を追加してください。

所属名	農学研究科
氏名	松尾栄子
研究タイトル	二本鎖RNAウイルスの遺伝子発現および粒子形成の時空間的解析
研究目的	二本鎖RNA (dsRNA) ウイルスの複製では、mRNAをdsRNAから合成する過程(転写)とmRNAからゲノムdsRNAを合成する過程(ゲノム複製)が、一種類のRNA依存的RNAポリメラーゼ(RdRp)によって行われている。しかし、いつどのようにしてRdRpの合成能力が「1→2本鎖型(ゲノムdsRNA複製型)」と「2→1本鎖型(mRNA転写型)」に切り替わるのかは、未だ謎である。そこで本申請では、松尾がこれまで解析を進めているオルビウイルス特有の構造タンパク質でゲノムの取り込みに必須のVP6とmRNA合成時にのみ必要なCap付加酵素(VP4)、VP6と一時的に結合するカプシドタンパク質VP3ならびに粒子形成の場でもあるウイルス封入体(VIB)に着目し、RdRpを中心としたタンパク質-RNA相互作用の時空間的解析に挑戦する。
研究報告 (内容および成果) 2000字以内	<p>本申請研究ではまず、dsRNAウイルス数種の遺伝子のクローニングを行った。まず、日本で分離されたヒトロタウイルス(HRV) Odelia株のウイルス粒子からRdRpおよびVIBの主要な構成成分である非構造タンパク質NSP5、粒子形成に必須の非構造タンパク質NSP4をコードする遺伝子をクローニングし、哺乳動物発現プラスミドを作成した。現在、これらのプラスミドを用いて哺乳動物細胞数種での各タンパク質発現を確認中である。次に、HRVに加えて、流行性白血病ウイルス(EHDV)、ムコウイルス(MUV)のRdRpについてバキュロウイルス発現系の構築を目指した。現在、発現バキュロウイルスの作製中である。また、cryoEMや3D再構築、CLEMを行うための条件を検討中である。</p> <p>英国ロンドンには、2023年12月14日から2025年1月23日まで滞在し、ロンドン大学衛生熱帯医学大学院(LSHTM) Roy研究室にて、LSHTMへの立ち入りができなかった数日(クリスマス、学内一斉停電など)を除き、ほぼ毎日研究活動を行った。まず、松尾がかつて構築したブルータングウイルス(BTV)の<i>in vitro</i> RdRp assayの改良を行なった。これまでは、バキュロウイルス発現系を用いて合成したBTVのRdRpの「ゲノムdsRNA複製型」酵素活性を放射線同位体(RI)である³²Pを用いて解析していたが、日本だけでなく英国でもRIの利用が困難になってきたため、非RIのアッセイ系を構築する必要があった。そこでまず、Roy研究室の博士研究員とともに蛍光標識NTPを用いたassay系の構築を試みたが、dsRNA合成を確認することができなかったため、別の非RI標識を試みることにした。以前松尾はBTVのRdRpが持つプライミング機能を利用し、新たに合成されるdsRNAをビオチン標識ApGで標識することに成功している(Matsuo et al 2011 PLoS One)。そこでこ</p>

	<p>の知見をもとに、ビオチン標識dinucleotideやビオチン標識NTPを用いた非RI系の <i>in vitro</i> RdRp assayの構築に着手した。ビオチン標識dinucleotideを用いた assay系では高い再現性を得ることができたため、今後RdRpの酵素活性測定に利用できると考えられる。現在は、ビオチン標識UTPやCTPを用いた assay系を構築中である。次に、Roy教授とのこれまでの共同研究で構築したBTVおよびのアフリカ馬疫ウイルス（AHSV）遺伝子改良技術をさらなる簡便化に成功した。さらに、2017年に大阪大学のグループが構築に成功したロタウイルスの遺伝子改良技術の改良を試みた結果、システムの効率化に成功し、ウイルス作出までの時間を大幅に短縮することができるようになった。同時に本システムに用いる試薬などの検討を行い、コスト削減にも成功した。これらの今回の訪問で松尾が主軸となって構築・改良した技術についての情報は、すべてRoy教授および博士研究員と共有した。</p>
<p>研究成果の発表予定</p>	<p>本申請研究で得られた結果の一部は、R6年度の学会（日本ウイルス学会学術集会11月、名古屋）で発表予定である。また、現在Roy教授とのこれまでの共同研究の成果を国際共著論文として発表するため話し合いを進めており、R6年度中のアクセプトを目指している。</p>