

シュードタイプウイルスを利用したウイルス侵入機構の解析

谷 英樹

1. はじめに

遺伝子工学技術を用いてウイルスのゲノムを自由に操作する手法が確立され、これまでにウイルスそのものに関する研究だけでなく、ワクチン開発や解析ツールとしてなど、実に多くの応用例が報告されてきた。水疱性口内炎ウイルス (vesicular stomatitis virus: VSV) に関して、リバーシジェネティクス (逆遺伝学) によりエンベロップ遺伝子を欠損させても、通常の形態を保持したウイルス粒子が大量に産生されることから、この性質を利用して、シュードタイプウイルスシステムが確立された。シュードタイプウイルスを利用する大きなメリットとして、技術的にも法的にも取り扱いが困難なバイオセーフティレベル (BSL)-3やBSL-4に属するウイルスをBSL-2レベルで解析できることや、さまざまな要因により培養細胞などで増やせないウイルスの細胞侵入に関わる研究ができることなどがあげられる。またVSVゲノムにはリポーター遺伝子が挿入されているため、このリポーター遺伝子の発現や活性を指標として感染効率を定量的にまた容易に評価することができる。シュードタイプウイルスのシステムはVSVの他にもレトロウイルスやレンチウイルスなどをベースとしたものも広く使われているが、本稿では、主にVSVを基盤としたシュードタイプウイルスの作製方法とその応用について概説したい。

2. VSVとシュードタイプウイルス

VSVはラブドウイルス科ベシクウイルス属のマイナス一本鎖RNAウイルスである。発生はアメリカ大陸のみに限られ、主に馬、ロバ、牛、豚、水牛などに感染し、2~4日の潜伏後、発熱、泡沫性の流涎や蹄、鼻、口腔内

の水疱形成がみられるが、1週間程度で治癒する¹⁾。ヒトが感染してもほぼ症状は現れないが、まれにインフルエンザ様の症状を示すこともある。日本では症状が口蹄疫と酷似することから、家畜伝染病予防法における法定伝染病の対象となっている。主な血清型として、ニュージャージー株とインディアナ株が存在する。実験室株として主に扱われているインディアナ株は、BSL-2で取り扱うことが可能で、増殖効率が高くさまざまな細胞で培養可能なこともあり古くから代表的なマイナス鎖RNAウイルスとして、侵入や複製、出芽機構の研究に用いられてきた。また、VSVと他のウイルスを共感染させるとVSVが他のウイルスのエンベロップを非選択的に取り込んでシュードタイプ化することが知られていた²⁾。シュード (pseudo) とは本来、“偽の” という意味であり、自身のエンベロップタンパク質以外に他のウイルスエンベロップタンパク質などを粒子表面に外套したウイルスをシュードビリオン (pseudovirion)、もしくはシュードタイプウイルス (pseudotype virus) と呼ぶ。VSVは、1995年マイナス鎖RNAウイルスの中で最初にリバーシジェネティクスが確立され³⁾、各構成タンパク質の性状が研究される中、自身のエンベロップ遺伝子を欠損してもウイルスが構成される性質を利用して、一過的に他のウイルスエンベロップ遺伝子や標的分子のみを外套した完全シュードタイプウイルスシステムの開発が行われた^{4,5)}。ほどなく、ウイルスゲノムに直接他のウイルスエンベロップ遺伝子を挿入して自立増殖を可能にした組換えウイルスを用いて、目的タンパク質を発現させるための発現ベクターやワクチンベクターなどの開発も行われ、現在もさまざまな活用法が期待されている^{4,6)}。

3. シュードタイプウイルスの作製方法

シュードタイプウイルスの作製は、親(種)ウイルス [いわゆる一過性にVSVエンベロップタンパク質 (VSVG) を外套したVSV] があれば比較的簡単に作製できる。親ウイルスの作製には、ウイルスのテンプレートとなるゲノムDNAプラスミド (エンベロップ遺伝子を欠損させ、代わりにリポーター遺伝子であるGFPやDsRed、ルシフェラーゼ、分泌型アルカリホスファターゼなどが組み込まれている) と、VSVの各構成タンパク質を発現するヘルパープラスミド (N, P, L, Gをコードする遺伝子をそれぞれ組み

富山大学大学院医学薬学研究部 (医学) ウイルス学講座
(〒930-0194 富山県富山市杉谷2630番地)

Analyses of entry mechanisms of targeted viruses by pseudotype VSV system

Hideki Tani (Department of Virology, Graduate School of Medicine and Pharmaceutical Sciences, University of Toyama, 2630 Sugitani, Toyama-shi, Toyama 930-0194)

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2017.890251

© 2017 公益社団法人日本生化学会

込んだpBlueScriptベクター)をT7 RNAポリメラーゼを発現させた細胞にコトランスフェクションする。T7 RNAポリメラーゼの供給には、T7 RNAポリメラーゼをコードする組換えワクシニアウイルスを感染させるか、同じくT7 RNAポリメラーゼをコードする哺乳動物発現プラスミドをトランスフェクションした細胞、もしくはそれを安定的に発現する細胞株を用いる。細胞はトランスフェクション効率のいい293TもしくはBHK21細胞などを用いた方が、ウイルスの回収効率が高くなる。いったん回収できたウイルスは、VSVGタンパク質を発現する細胞で繰り返し増やすことができるので、これを小分けして親ウイルスとして -80°C で保存する。感染価は、限外希釈によってリポーター遺伝子の発現状況で判定するか、VSVGタンパク質を発現するBHK21細胞を用いて(293T細胞は、はがれやすいのでBHK21細胞がよい)、寒天培地でウイルスのプラークを作らせて判定する。通常、 10^{7-8} pfu/mLのウイルス液が準備できる。

シュードタイプウイルスを作製するためには、外套させたい目的のウイルスエンベロープタンパク質を発現するプラスミドを準備する。通常、発現量が多い方が感染価の高いシュードタイプウイルスが作製できるが、発現することで細胞傷害が起きるような分子を発現させる場合にはあえて発現を抑える工夫が必要になることもある。VSVは通常、細胞表面から出芽するウイルスであるため、外套させたいエンベロープタンパク質が細胞表面に発現するものの方が、VSVが出芽する際に外套できる効率が高くなるため、比較的高い感染価(10^{6-7} pfu/mL)のシュードタイプウイルスが得られる。一方で、細胞内の小胞体やゴルジ装置などで出芽するようなウイルスのエンベロープタンパク質は、多くが細胞内に残留しているため、VSVがエンベロープタンパク質を外套できる効率が低く、高い感染価のシュードタイプウイルスは得られにくい。実際、こうしたシュードタイプウイルスは、一部細胞内で出芽するようなまれなVSVが細胞内のエンベロープタンパク質を外套しているのか、一部細胞表面に漏れ出てきて発現しているまれなエンベロープタンパク質を外套しているのかは不明である。

発現プラスミドをトランスフェクションし、24~48時間培養して十分なエンベロープタンパク質を発現させた細胞に、上記の親ウイルスをmoi (multiplicity of infection, 細胞あたりのウイルス感染数) 0.1~3程度(ルシフェラーゼをコードしているウイルスの場合、バックグラウンドが高く出るとためmoiは低くする方がよい)で感染させ、1~2時間培養する。その後、感染しなかった親ウイルスを除くために、培地交換等で細胞を洗って親ウイルスを除く。洗い終わった感染細胞を18~24時間培養すると培養上清に十分量のシュードタイプウイルスが出現しているため(実

際には感染4時間ほどからウイルスが産生され始める)、培養上清を回収する。シュードタイプウイルスは通常、トランスフェクション効率の高いことで知られる293T細胞で作製するため、細胞を洗う操作を慎重にしなければ細胞がはがれてしまう。筆者は、接着性の高いコラーゲンコートプレートもしくはディッシュを用いて作製している。培地交換を3~4回ほど行えば、ほぼ親ウイルスは除かれる。ただ、この操作は毎回安定ではないため、常にバックグラウンドのウイルスプレート(もしくはウェル)を用意して、バックグラウンドのウイルスに対してシュードタイプウイルスの感染価を評価しなければならない。筆者は、バックグラウンドのウイルスを作製するのに、トランスフェクション効率も同時に確認するため、GFPを発現するプラスミドをトランスフェクションした細胞でウイルスを作製している(たとえGFPを外套しても感染性はない)。

感染価のあるシュードタイプウイルスの作製にあたり注意する点としては、まずトランスフェクション効率が非常に高いことが必要になる。効率に関しては主観的な判断ではあるが、95%以上は確保できている方がよい。わずかだと思われるかもしれないが80%程度では極端に感染価の低いウイルスとなってしまう。あとは、親ウイルスの感染量(moi)と洗いの程度を調整することによって、バックグラウンドと比較してなるべく高い感染価のシュードタイプウイルスを得ることが必要となる。

4. シュードタイプVSVを用いた応用研究

シュードタイプウイルスがいち早く応用されたのは、エボラウイルスに対してであった⁷⁾。エボラウイルスはBSL4病原体のため、ウイルスそのものを扱うのが多方面の要因から非常に難しく、感染事故のリスクも高い。そこで、エボラウイルスの糖タンパク質を外套したシュードタイプVSVが作製され、BSL2施設で糖タンパク質の性状解析をはじめ細胞侵入機構に関する研究などが行われた。その後、多くのウイルス種のエンベロープタンパク質を外套したシュードタイプVSVが作製され、さまざまな研究が進められた。筆者らは、当時、細胞培養系がなく生ウイルスを扱うことが難しかったC型肝炎ウイルスや日本脳炎ウイルスのシュードタイプVSVおよび組換えVSV(後述)を作製し、受容体との相互作用や中和抗体検出系などの解析に応用した^{8,9)}。また、BSL4病原体であるアレンウイルス科の新興ウイルス種やクリミア・コンゴ出血熱ウイルス、新規ブニヤウイルスの重症熱性血小板現象症候群ウイルスなどでもいち早くシュードタイプVSVを作製し、細胞侵入機構の解析を行った^{10,11)}。その他、麻疹ウイルスの受容体の一つであるSLAM (CDw150)は、シュードタイプウイルスを利用してスクリーニングを行い、同定さ

れた受容体である¹²⁾。現在まで、シュードタイプウイルスは、細胞侵入機構の解析だけでなく、感染患者血清中のウイルス中和抗体の有無を簡便かつ迅速に調べる診断系への応用や、リポーター遺伝子を指標にしたモノクローナル抗体や侵入阻害剤のスクリーニング、より本来のウイルスエンベロープタンパク質に近い構造をとるものとしての免疫抗原としても応用されている(図1)。これまでに、報告されたシュードタイプVSVの応用例について表に記した(表1)。現在でも新種のウイルスが発見されると、シュードタイプウイルスが作製され、いち早くエンベロープタンパク質の性状解析や細胞指向性、受容体の探索を含む細胞

侵入に関する研究などが行われており、今後ますます利用される価値は高いと思われる。

5. 組換えVSVを用いた応用研究

組換えVSVはシュードタイプVSVと異なり、ターゲットとなるウイルスエンベロープタンパク質を自身の複製により産生して、シュードタイプウイルスとなり、二次感染によって自律増殖できるようになるウイルスである。この性質を利用して、現在、最も研究が進んでいるのが、エボラウイルス病をターゲットとしたワクチンベクターの開発である¹³⁾。ウイルスゲノム内にエボラウイルスの糖タンパク質遺伝子を組み込んで作製された組換えVSVをマウスやサルなどの実験動物に感染させ、その後、エボラウイルスを感染させると防御効果が得られる¹⁴⁾。この実験結果をもとに、2015年には西アフリカでのエボラウイルス病流行の影響もあって臨床試験が進められた¹⁵⁾。その結果、ヒトにおいても高い予防効果が得られており、今後、ワクチンとしての実用化が期待されている。

その他、ターゲティングベクターとしての開発も行われており、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)の受容体であるCD4を組み込んだ組換えVSVは、糖タンパク質であるgp120を発現しているであろうHIV感染細胞にのみ感染できるため、感染細胞のみを選択的に排除するというエイズ治療用ベクターとしての応用にも研究展開されている¹⁶⁾。

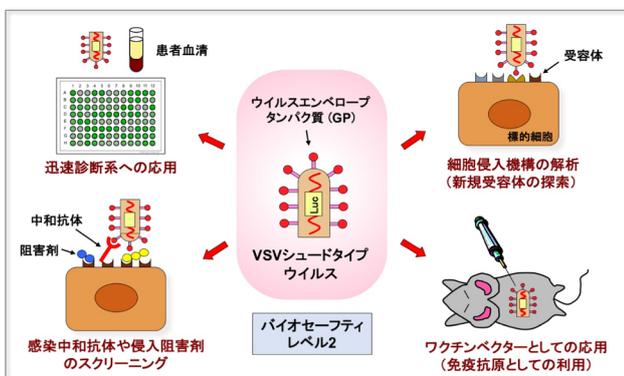


図1 シュードタイプVSVを利用した研究

VSVシュードタイプウイルスはバイオセーフティレベル2で、細胞侵入機構の解析をはじめ、迅速診断系への応用、スクリーニング、ワクチンへの応用などに用いられている。

表1 シュードタイプVSVの応用例

| ウイルス | 文献 | ウイルス | 文献 |
|--------------------------|---|----------------------|--|
| エンベロープタンパク質, 細胞侵入機構の解析など | | ワクチン用ベクター | |
| エボラウイルス | Rakada <i>et al.</i> , <i>PNAS</i> 1997 | インフルエンザウイルス | Roberts <i>et al.</i> , <i>J Virol</i> 1998 |
| C型肝炎ウイルス | Lagging <i>et al.</i> , <i>J Virol</i> 1998 | パピローマウイルス | Roberts <i>et al.</i> , <i>J Virol</i> 2004 |
| | Tani <i>et al.</i> , <i>J Virol</i> 2007 | マールブルグ, エボラ, ラッサウイルス | Garbutt <i>et al.</i> , <i>J Virol</i> 2004 |
| ヒト免疫不全ウイルス | Boritz <i>et al.</i> , <i>J Virol</i> 1999 | ヒト免疫不全ウイルス | Publicover <i>et al.</i> , <i>J Virol</i> 2005 |
| 麻疹ウイルス | Tatsuo <i>et al.</i> , <i>J Virol</i> 2000 | ウエストナイルウイルス | Iyer <i>et al.</i> , <i>Vaccine</i> 2009 |
| ヒトT細胞白血病ウイルス | Okuma <i>et al.</i> , <i>J Gen Virol</i> 2001 | B型肝炎ウイルス | Cobleigh <i>et al.</i> , <i>J Virol</i> 2010 |
| RSウイルス | Kahn <i>et al.</i> , <i>J Virol</i> 2001 | ノロウイルス | Ma & Li, <i>J Virol</i> 2011 |
| SARS コロナウイルス | Fukushi <i>et al.</i> , <i>J Gen Virol</i> 2005 | 診断 | |
| B型肝炎ウイルス | Saha <i>et al.</i> , <i>J Virol</i> 2005 | ボルナ病ウイルス | Perez <i>et al.</i> , <i>J Virol</i> 2001 |
| アレナウイルス科 | Vela <i>et al.</i> , <i>J Virol</i> 2007 | ハンタウイルス | Lee <i>et al.</i> , <i>J Virol</i> 2006 |
| | Tani <i>et al.</i> , <i>J Virol</i> 2014 | ニバウイルス | Kaku <i>et al.</i> , <i>J Virol Methods</i> 2009 |
| 日本脳炎ウイルス | Tani <i>et al.</i> , <i>J Virol</i> 2011 | 狂犬病ウイルス | Moeschler <i>et al.</i> , <i>Viruses</i> 2016 |
| バキュロウイルス | Kaname <i>et al.</i> , <i>J Virol</i> 2011 | ジステンパーウイルス | Logan <i>et al.</i> , <i>Vaccine</i> 2016 |
| リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス | Muik <i>et al.</i> , <i>J Virol</i> 2011 | | |
| MERS コロナウイルス | Fukuma <i>et al.</i> , <i>Arch Virol</i> 2015 | | |
| 重症熱性血小板減少症候群ウイルス | Tani <i>et al.</i> , <i>J Virol</i> 2016 | | |
| クリミア・コンゴ出血熱ウイルス | Suda <i>et al.</i> , <i>Arch Virol</i> 2016 | | |

多くのウイルスで、細胞侵入機構の解析やワクチン用ベクター、診断系の開発が報告されている。

6. おわりに

多くのウイルスでリバースジェネティクスが確立され、そのウイルス自身の解析が行われる中、VSVはいち早くリバースジェネティクスが確立し研究が展開されたこともあるが、自身のエンベロープタンパク質なしでもウイルス粒子が出芽してくること、RNAウイルスのためゲノムにプラスミド等で持ち込んだ外来遺伝子が組み込まれないことなど特長的な性質を利用することでシュードタイプウイルス化が可能になった。同じラブドウイルス科に属する狂犬病ウイルスでも同じくシュードタイプウイルスを作製することは可能であるが、狂犬病ウイルス自身の病原性の問題もあり、あまり応用は進んでいない。VSV自身は非常に増殖能の高いウイルスであるため、実験室内での扱いには人的操作による培養細胞へのウイルスの汚染などに注意が必要であるが、エンベロープ遺伝子を欠損させたウイルスを扱っている限りはたとえ汚染があったとしても影響は低く、外環境下への問題も起こらない。しかしながら、現在このシュードタイプウイルスも通常のVSVと同じく家畜伝染病予防法の届出伝染病等病原体に含まれている。実験室等でこのシュードタイプウイルスを取り扱うときには届出等を忘れないように注意していただき、多くの研究者に広く利用されることを願っている。

謝辞

本稿で紹介した研究成果は、Michael A. Whitt教授（米国テネシー大学メンフィス校）、松浦善治教授（大阪大学微生物病研究所）、森川茂部長（国立感染症研究所獣医科学部）、西條政幸部長（国立感染症研究所ウイルス第一部）をはじめ、多くの共同研究者の方々のご指導、ご協力によるもので、この場を借りて深く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Lyles, D.S., Kuzmin, I.V., & Rupprecht, C.E. (2007) *Rhabdoviridae*, Fields Virology, 5th ed., vol. 1, pp. 885–922, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- 2) Huang, A.S., Palma, E.L., Hewlett, N., & Roizman, R. (1974) *Nature*, **252**, 743–745.
- 3) Lawson, N.D., Stillman, E.A., Whitt, M.A., & Rose, J.K. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 4477–4481.
- 4) Whitt, M.A. (2010) *J. Virol. Methods*, **169**, 365–374.
- 5) Whitt, M.A., Geisbert, T.W., & Mire, C.E. (2016) *Methods Mol. Biol.*, **1403**, 295–311.
- 6) Tani, H., Morikawa, S., & Matsuura, Y. (2012) *Front. Microbiol.*, **2**, 272.
- 7) Takada, A., Robison, C., Goto, H., Sanchez, A., Murti, K.G., Whitt, M.A., & Kawaoka, Y. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 14764–14769.
- 8) Tani, H., Komoda, Y., Matsuo, E., Suzuki, K., Hamamoto, I., Yamashita, T., Moriishi, K., Fujiyama, K., Kanto, T., Hayashi, N., Owsianka, A., Patel, A.H., Whitt, M.A., & Matsuura, Y. (2007) *J. Virol.*, **81**, 8601–8612.
- 9) Tani, H., Shiokawa, M., Kaname, Y., Kambara, H., Mori, Y., Abe, T., Moriishi, K., & Matsuura, Y. (2010) *J. Virol.*, **84**, 2798–2807.
- 10) Tani, H., Iha, K., Shimojima, M., Fukushi, S., Taniguchi, S., Yoshikawa, T., Kawaoka, Y., Nakasone, N., Ninomiya, H., Saijo, M., & Morikawa, S. (2014) *J. Virol.*, **88**, 7317–7330.
- 11) Tani, H., Shimojima, M., Fukushi, S., Yoshikawa, T., Fukuma, A., Taniguchi, S., Morikawa, S., & Saijo, M. (2016) *J. Virol.*, **90**, 5292–5301.
- 12) Tatsuo, H., Ono, N., Tanaka, K., & Yanagi, Y. (2000) *Nature*, **406**, 893–897.
- 13) Garbutt, M., Liebscher, R., Wahl-Jensen, V., Jones, S., Möller, P., Wagner, R., Volchkov, V., Klenk, H.D., Feldmann, H., & Ströher, U. (2004) *J. Virol.*, **78**, 5458–5465.
- 14) Mire, C.E., Matassov, D., Geisbert, J.B., Latham, T.E., Agans, K.N., Xu, R., Ota-Setlik, A., Egan, M.A., Fenton, K.A., Clarke, D.K., Eldridge, J.H., & Geisbert, T.W. (2015) *Nature*, **520**, 688–691.
- 15) Regules, J.A., Beigel, J.H., Paolino, K.M., Voell, J., Castellano, A.R., Muñoz, P., Moon, J.E., Ruck, R.C., Bennett, J.W., Twomey, P.S., Gutiérrez, R.L., Remich, S.A., Hack, H.R., Wisniewski, M.L., Josleyn, M.D., Kwilas, S.A., Van Deusen, N., Mbaya, O.T., Zhou, Y., Stanley, D.A., Bliss, R.L., Cebrik, D., Smith, K.S., Shi, M., Ledgerwood, J.E., Graham, B.S., Sullivan, N.J., Jagodzinski, L.L., Peel, S.A., Alimonti, J.B., Hooper, J.W., Silvera, P.M., Martin, B.K., Monath, T.P., Ramsey, W.J., Link, C.J., Lane, H.C., Michael, N.L., Davey, R.T. Jr., & Thomas, S.J.; rVSVΔG-ZEBOV-GP Study Group. (2017) *N. Engl. J. Med.*, **376**, 330–341.
- 16) Rose, N.F., Marx, P.A., Luckay, A., Nixon, D.F., Moretto, W.J., Donahoe, S.M., Montefiori, D., Roberts, A., Buonocore, L., & Rose, J.K. (2001) *Cell*, **106**, 539–549.

著者寸描

●谷 英樹（たに ひでき）

富山大学大学院医学薬学研究部（医学）ウイルス学講座准教授。博士（保健学）。

■略歴 1973年富山県生まれ。福井県出身。96年東京理科大学基礎工学部生物工学科卒業。2001年東京大学大学院医学系研究科博士課程修了。02年テネシー大学メンフィス校ヘルスサイエンスセンター博士研究員（M.A. Whitt教授）。04年大阪大学

微生物病研究所博士研究員、特任助教、11年国立感染症研究所ウイルス第一部主任研究官を経て、16年7月より現職。

■研究テーマと抱負 VSVベクターを用いた新興ウイルスの細胞侵入機構に関する基礎研究を行ってきました。2016年より新しい環境でのスタートですが、これまでの研究に引き続き、抗ウイルス薬の開発などにも取り組んでいきたいと考えています。

■趣味 アウトドア活動。