

## 研究成果報告書

1. 研究課題名：高感度生体イメージング技術による腸管系ウイルスの病原性発現機構と腸内環境が及ぼす影響の解析

2. 研究代表者氏名：田村 友和

3. 研究発表（論文、著書、学会発表等があれば記載してください）

現在、成果を公表するために準備を進めている。

4. 研究実績（必要であれば図を用いても構いません）

腸管系ウイルスとは、肝臓あるいは腸管で増殖するウイルスの総称である。そのうち、A型肝炎ウイルス(HAV)は急性肝炎や下痢など消化管疾患を引き起こすA型肝炎の原因ウイルスである。本研究では生体の深部からの発光を検出することできる生体イメージング技術を駆使し、HAVの生体における感染動態を解析することで病態の発生機序を明らかにするために企図された。

まず、腸管でのウイルス増殖を非侵襲性に、且つ高感度に解析するために、長波長での発光を可能とした新基質Aを、Fireflyルシフェラーゼを発現させたマウスに腹腔内投与し、その発光度を解析し、条件検討した。

次に、Fireflyルシフェラーゼを2つに分けて、各々を異なるタンパク質に発現させ、細胞内で会合することによりFireflyルシフェラーゼとして機能させるスプリット型のアッセイ(Paulmurugan et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2002)を本研究で採用した。Fireflyルシフェラーゼ遺伝子の大きいN末端側の断片をレンチウイルスを用いてヒト肝細胞癌由来株化細胞Huh7細胞にトランスタクションし、タンパク質を強制発現させた。

また、片割れのC末端断片を発現するプラスミドを作製した。N末端側のFireflyルシフェラーゼタンパク質が発現する細胞にトランスクレプションにて導入し、プラスミドの量依存的に発現することを確認した。以上から、Fireflyルシフェラーゼのスプリット型アッセイを作製した培養細胞にて実施できることがわかった。

FireflyルシフェラーゼのC末端断片を搭載した組換えHAVを、報告者らが開発した迅速な組換えウイルス作製技術(Tamura et al., J. Virol. 2024)を基盤として、そのcDNAクローンを構築した。続いてcDNAクローンから組換えウイルスのRNAを人工的に合成し、Huh7細胞へトランスクレプションすることで、感染性を有する組換えウイルスを作出した。

以上の成果踏まえ、生体にてスプリット型Fireflyルシフェラーゼ遺伝子を搭載した組換えHAVを用いた感染動態を解析する実験系を現在開発している。