

令和元年6月18日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08820

研究課題名(和文) インターフェロン反応によって確立される抗デングウイルス状態の分子基盤の解析

研究課題名(英文) Analysis of the molecular basis for interferon-established anti-dengue virus state

研究代表者

鈴木 陽一 (Suzuki, Youichi)

大阪医科大学・医学部・講師

研究者番号：40432330

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：Gain-of-function cDNAライブラリースクリーニング法によって、デングウイルスの複製を抑制する細胞性因子としてIFI27とDNAJC14を同定した。IFI27はインターフェロン誘導性因子であったのに対し、DNAJC14はインターフェロン反応に連動しない因子であったが、ともにデングウイルスだけでなく黄熱ウイルスやジカウイルスに対しても阻害活性を示す細胞性タンパクであった。これらの結果より、細胞には共通の機構を介して様々なフラビウイルスを抑制する分子が存在しており、その一部はインターフェロン反応による抗ウイルス状態の確立において重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

デングウイルス感染症は、国内流行が懸念される熱帯感染症のひとつであるが、有効な抗ウイルス薬が存在せず、現在では対症療法に頼らざるを得ない。一方、ヒトの免疫機構の主体をなすインターフェロン反応は、デングウイルスの複製を強く阻害することが報告されている。しかし、細胞内のどのような分子がデングウイルスを抑制するのかについては明らかになっていない。本研究では、デングウイルスの複製を阻害する細胞性タンパクとしてIFI27とDNAJC14を同定した。これらのウイルス抑制分子の詳細な機能を明らかにすることで、デングウイルス感染症に対する治療法の確立において有益な情報が得られるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：By employing a gain-of-function screen using a cDNA library derived from interferon-treated cells, IFI27 and DNAJC14 were identified as cellular factors inhibiting the replication of dengue virus. Gene expression analysis revealed that IFI27 was upregulated in interferon-treated cells, whereas the expression level of DNAJC14 was unchanged upon the interferon treatment. Importantly, the expression of these cellular factors suppressed the replication of not only dengue virus, but also other flaviviruses such as yellow fever virus and Zika virus. Results obtained in this study indicate that host cells intrinsically harbor antiviral factors, which may inhibit the infection of flaviviruses with shared mechanisms-of-action, and some of the factors play an essential role in the establishment of the antiviral state in an interferon response.

研究分野：分子ウイルス学

キーワード：デングウイルス インターフェロン 細胞性ウイルス抑制分子 cDNAライブラリースクリーニング IFI27 DNAJC14 黄熱ウイルス ジカウイルス

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

デングウイルス (dengue virus : DENV) は、ヒトにデング熱やデング出血熱などの熱性疾患を引き起こす一本鎖 RNA ウイルスである。DENV 感染症は蚊によって媒介され主に熱帯・亜熱帯地域で流行するが、我が国でも DENV を媒介できる蚊は生息していることより、国内での流行が懸念されている。実際に、2014 年には東京都で 100 例を超えるデング熱の国内発生が確認された。また、数百もの輸入症例が毎年報告されていることを考えても、DENV は決して我々にとって無縁の病原体とは言えない。しかしながら、デング熱やデング出血熱に対しては有効な治療法が存在せず、現在では輸液や解熱を中心とした対症療法に頼らざるを得ない。したがって、世界規模の温暖化による媒介蚊の北上や、海外からの渡航者の急増に伴って危惧される DENV 感染症の流行に備えて、有効な治療戦略を確立することは急務であると考えられる。

インターフェロン (IFN) 反応は、宿主の自然免疫における感染防御の主体をなすシステムである。以前より、IFN で培養細胞を処理すると DENV の複製効率が 100 倍以上も低下することが報告されている。このことは、DENV がヒトに感染しても、IFN 反応を介して何らかの形でウイルス複製が積極的に抑えられていることを示唆するものである。しかし、IFN は細胞内に抗ウイルス状態を確立するためのサイトカインにすぎず、IFN 反応によって誘導されるどのような細胞性因子が実行 (エフェクター) 分子となって DENV の感染を制御しているのかについてはまだ完全には明らかになっていない。

2. 研究の目的

細胞表面に存在する特異的レセプターに結合した IFN は、細胞内の Jak-STAT 経路を介してインターフェロン誘導性因子 (IFN-stimulated genes : ISGs) と呼ばれる一群の遺伝子の発現を誘導する。これまでに数百種類の ISGs が同定されているが、DENV 感染阻害のエフェクター分子として同定されているものは数少ない。しかし、DENV の複製に抑制的に働く ISG を同定しその分子メカニズムを解明することは、生体がつもつ抗ウイルス作用を応用した新しい治療法の確立において極めて有用な情報を提供するものと考えられる。そこで、本研究では、IFN 反応によって誘導され抗 DENV 活性をもつ ISG を同定し、その機能を解析することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) I 型 IFN (IFN- α) を処理した HeLa 細胞の mRNA より作製した cDNA ライブラリーをレンチウイルスベクターに挿入し、Huh7.5 細胞にトランスダクションした。次に、この Huh7.5 細胞に DENV をチャレンジ感染し、DENV 感染による細胞死を示さない細胞を単離した。そして、それぞれの DENV 耐性細胞株に導入された HeLa mRNA 由来の cDNA をシークエンス解析した。

(2) 同定された候補遺伝子をプラスミド DNA にクローニングし、さらにゲートウェイクローニング法を用いて FLAG エピトグタグを N 末端に付加するレンチウイルス発現ベクターに挿入した。293T 細胞へのトランスフェクションによって作製した VSV-G シュードタイプレンチウイルスベクターを用いて Huh7.5 細胞にトランスダクションした後、プラストサイジン S を用いて各候補遺伝子が安定に発現する細胞株の樹立をおこなった。それぞれの細胞株における候補分子の発現は FLAG 抗体を用いたイムノブロットング法によって確認した。

(3) 樹立した安定発現細胞株を用いて DENV の感染実験をおこなった。感染は MOI=1 でおこない、感染から 2 日後の培養上清におけるウイルス量をプラークアッセイ法、もしくは定量 RT-PCR 法によって調べた。DENV 以外の RNA ウイルス (ジカウイルス、黄熱ウイルス、チクングニアウイルス、麻疹ウイルス、コクサッキーウイルス) の感染も同様におこない、各ウイルスの複製効率は定量 RT-PCR 法によって解析した。

4. 研究成果

(1) I 型 IFN を処理した HeLa 細胞の mRNA から作製した cDNA ライブラリーを導入した Huh7.5 細胞より、DENV 感染に抵抗性を示す細胞クローンを約 50 株得た。そして、それらの細胞に導入されている cDNA の配列をシークエンス解析したところ、23 種類の異なる遺伝子が同定された。DENV 耐性細胞クローンのうち、43%は IFN 誘導性抗 DENV 因子としてすでに報告した RyDEN (C19orf66) 遺伝子、そして 23%の細胞クローンにはリボソーム関連遺伝子が導入されていた。一方、16%の耐性細胞には、いくつかの機能性をもつと推測される遺伝子がそれぞれ導入されていることが明らかとなった (図 1 の ORF sequences Full-length, ORF sequences partial, そして Non-coding RNA)。

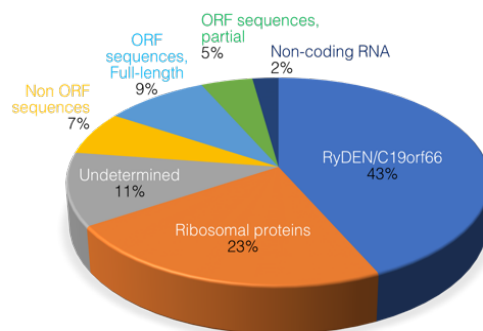


図 1. IFN cDNA ライブラリースクリーニング法によって分離された候補遺伝子群

(2) これらの同定された遺伝子群のうち、RyDEN/C19orf66については、DENVに対する抑制効果がすでに確認されている。また、リボソーム関連遺伝子は抗DENV活性を示す可能性が低いと考えられたため、本研究では、それ以外の候補遺伝子としてLINC00052, C19orf53, Interferon- α inducible protein 27 (IFI27), DNAJC14, およびRNA-binding motif protein 28 (RBM28)の5種類を選択した。これらのうち、C19orf53とIFI27は全長のタンパク読み取り枠(ORF)領域がcDNAとして耐性細胞クローンに導入されていたが、DNAJC14とRBM28はN末端領域が欠損したORFが導入されていた(それぞれDNAJC14 Δ N304およびRBM28 Δ N38)。これらの候補遺伝子の抗DENV活性を調べるため、各遺伝子を発現プラスミドDNAにクローニングし、それらをトランスフェクションしたHeLa細胞にDENVを感染させ、ウイルスの複製を解析した。その結果、IFI27ならびにDNAJC14 Δ N304発現プラスミドをトランスフェクションした細胞において、DENVの複製効率の有意な低下がみられた(図2)。

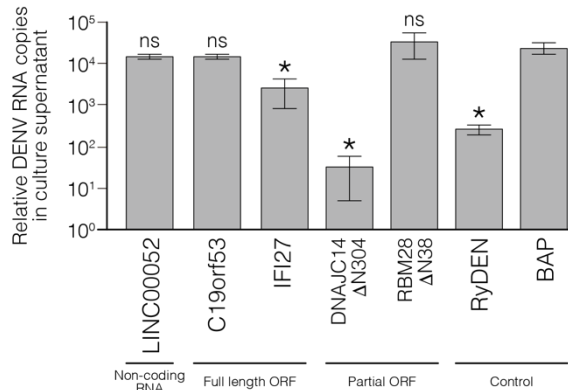


図2. 候補遺伝子のDENV感染に対する影響

(3) 一過性の発現実験においてDENVを抑制する傾向のみられたIFI27とDNAJC14 Δ N304について、FLAGタグとの融合タンパクとして発現するレンチウイルスベクターに挿入し、作製したレンチウイルスベクターをHuh7.5細胞にトランスダクションすることによりそれぞれのタンパクを恒常的に発現する細胞株を樹立した。そして、それらの細胞にDENVを感染させウイルスの複製効率を調べたところ、DNAJC14 Δ N304発現細胞ではコントロールタンパク(FLAG融合BAP)発現細胞に比べて、DENVの複製が100倍以上も低下することが確認された。一方、IFI27発現Huh7.5細胞におけるDENVの複製効率は、コントロールの半分程度であった(図3)。

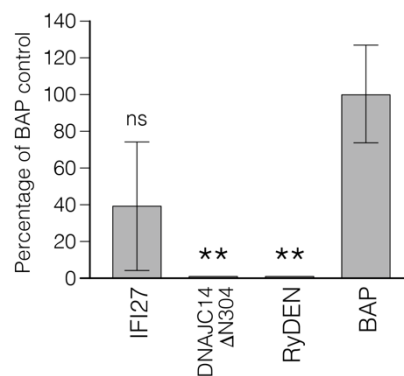


図3. IFI27とN末端欠損型DNAJC14恒常発現細胞におけるDENVの複製

(4) IFI27ならびにDNAJC14 Δ N304の、他のRNAウイルス感染における影響を調べるために、各遺伝子の恒常発現Huh7.5細胞に黄熱ウイルス(yellow fever virus: YFV)、ジカウイルス(Zika virus: ZIKV)、チクングニアウイルス(Chikungunya virus: CHIKV)、麻疹ウイルス(measles virus: MeV)、そしてコクサッキーウイルスB1(Coxsackievirus B1: CVB1)を感染させ、それぞれのウイルスの複製効率を定量RT-PCR法によって解析した。その結果、すでに細胞性抗DENV因子として報告しているRyDEN(C19orf66)と同様に、DNAJC14 Δ N304の発現はYFVとZIKVの複製を強く抑制することが明らかとなった(図4)。それに対し、IFI27の発現はZIKVに対しては有意な阻害効果を示したが、YFVの感染に対しては弱かった。一方、RyDENはCHIKVとMeVの増殖を抑えたが、IFI27とDNAJC14 Δ N304はフラビウイルス(YFV, ZIKV)以外のRNAウイルスに対する抑制活性を示さず、さらにCVB1に対してはどの因子の発現も抑制的に働くことはなかった(図4)。

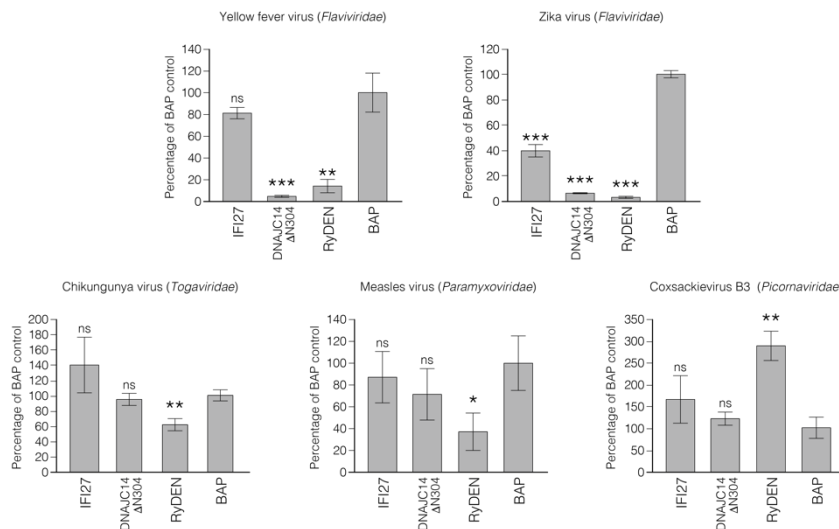


図4. DENV以外のRNAウイルスの複製におけるIFI27とN末端欠損型DNAJC14の影響

(5) DNAJC14 Δ N304 がもつ DENV 阻害活性を詳しく検討するため、DNAJC14 の全長 (full-length, 野生型) ORF を用いて、レンチウイルスベクターによる恒常的発現細胞株を樹立した。この野生型 DNAJC14 発現細胞においては、DENV だけでなく YFV や ZIKV の複製も強く抑えられた (図 5)。つぎに、DNAJC14 Δ N304 ならびに全長 DNAJC14 発現細胞に自立増殖型 DENV レポーターレプリコンゲノムをトランスフェクションし、レプリコンの細胞内複製に伴って発現するレポータールシフェラーゼの量を測定したところ、N 末端欠損型および野生型 DNAJC14 の発現細胞ではコントロール (BAP) 細胞に比べてルシフェラーゼの活性が有意に低かった (図 6)。実験に用いた DENV レプリコンはその構造タンパク領域を欠損していることから、DNAJC14 はフラビウイルスの細胞内 RNA 複製機構を標的としていることが強く示唆された。

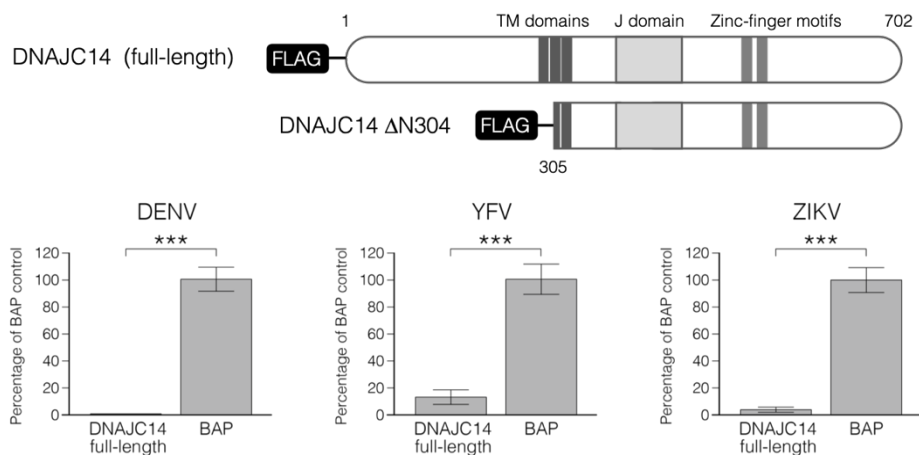


図 5. 野生型 (全長, full-length) DNAJC14 発現によるフラビウイルスの抑制

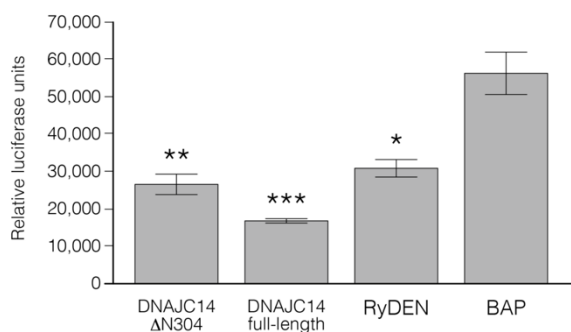


図 6. 野生型 (full-length) と N 末端欠損型 DNAJC14 (Δ N304) の発現による DENV レプリコンの細胞内複製阻害

(6) タンパクの恒常発現細胞を用いた感染実験の結果では、IFI27 の発現は DENV を抑制する傾向がみられるものの、その阻害効果は DNAJC14 ほど強いものではなかった (図 3 および 4)。そこで、IFI27 の抗 DENV 活性を検証するために、合成 siRNA オリゴを用いたノックダウン実験をおこなった。HeLa 細胞に IFI27 mRNA と相補的な配列をもつ siRNA をトランスフェクションし、DENV を感染させ、感染 48 時間後の培養上清中のウイルス量を定量 RT-PCR 法によって測定した。その結果、IFI27 siRNA トランスフェクション細胞から産生されるウイルス量は、コントロール siRNA トランスフェクション細胞からのウイルス量に比べて優位に高かった。さらに、内在性 IFI27 のノックダウンによって YFV と ZIKV の複製効率も上昇したことから、IFI27 は様々なフラビウイルスに対して抑制的に働く細胞性因子であることが示された。

(7) IFI27 と DNAJC14 は、IFN- α で処理した HeLa 細胞の mRNA から合成した cDNA ライブラリーを用いたスクリーニングによって同定された。そこで、これらの分子が IFN 誘導性因子 (ISGs) であるかどうかを調べた。HeLa 細胞を IFN- α で処理し、24 時間後に mRNA を抽出した。そして、遺伝子の発現量を定量 RT-PCR 法によって非処理 HeLa 細胞のそれと比較したところ、IFI27 は IFN- α 処理によってその発現が約 300 倍も上昇する ISG であった。それに対し、DNAJC14 の発現量は、IFN- α で処理しても変化はみられなかった (図 7)。

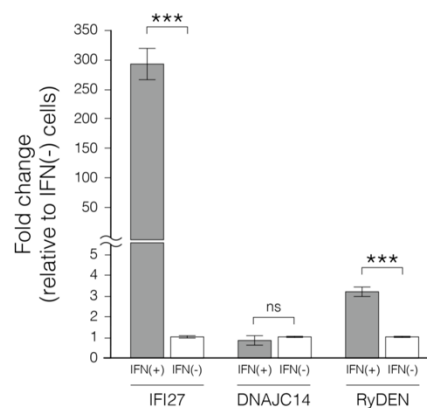


図 7. I 型 IFN を処理した HeLa 細胞における IFI27 と DNAJC14 mRNA の発現変化

(8) 本研究においては、IFN 処理細胞由来 cDNA ライブラリーを用いた gain-of-function スクリーニング法によって、DENV に阻害活性をもつ細胞性因子として IFI27 と DNAJC14 を同定した。IFI27 は IFN 誘導性因子 (ISG) であったのに対し、DNAJC14 は IFN 反応に連動しない分子であった。しかし、これらの細胞性因子は、DENV だけでなく YFV や ZIKV といった他のフラビウイルスに対しても抑制効果を示したことから、宿主細胞には共通の機構を介して様々なフラビウイルスを阻害する分子が存在し、その一部は IFN 反応による抗ウイルス状態の確立において重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 10 件)

- ① Suzuki Y, Kotoura M, Yashima S, Wu H, Nakano T, Sano K. Measuring dengue virus RNA in the culture supernatant of infected cells by real-time quantitative polymerase chain reaction. J Vis Exp. 査読有, 2018, 58407.
- ② 鈴木陽一. インターフェロンによって発現が誘導される細胞性抗ウイルス分子 RyDEN の同定. 生化学. 査読無, 90 巻, 2018, 192-197.
- ③ Suzuki Y, Chin WX, Han Q, Ichiyama K, Lee CH, Eyo ZW, Ebina H, Takahashi H, Takahashi C, Tan BH, Hishiki T, Ohba K, Matsuyama T, Koyanagi Y, Tan YJ, Sawasaki T, Chu JJH, Vasudevan SG, Sano K, Yamamoto N. Characterization of RyDEN (C19orf66) as an interferon-stimulated cellular inhibitor against dengue virus replication. PLoS Pathog. 査読有, 12 巻, 2016, e1005357.

[学会発表] (計 7 件)

- ① Suzuki Y. RyDEN/C19orf66 - a novel interferon-inducible suppressor against flaviviruses. 1st International Health and Medical Sciences Conference, Malaysia, 2019.
- ② 鈴木陽一, 坂口翔一, 呉紅, 中野隆史. 感染細胞培養上清中のウイルス RNA の迅速定量法の確立. 第 71 回日本細菌学会関西支部総会・学術集会, 2018.
- ③ 鈴木陽一, 琴浦麻美, 呉紅, 中野隆史, 佐野浩一. The characterization of anti-dengue virus cellular factors identified by a gain-of-function screen using interferon-related cDNA library. 第 65 回日本ウイルス学会学術集会, 2017.

[図書] (計 1 件)

- ① Takahashi H, Suzuki Y, IntechOpen (London), Cellular control of dengue virus replication: role of interferon-inducible genes, Dengue - Immunopathology and Control Strategies, 2017, pp. 3-25.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

(特になし)

6. 研究組織

(1) 研究分担者

(なし)

(2) 研究協力者

研究協力者氏名: 琴浦 麻美

ローマ字氏名: KOTOURA, Mami

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。