

令和 3 年 6 月 13 日現在

機関番号：82609

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H05070

研究課題名(和文) RNAウイルスの複製ファクトリー機能を制御する脂質の解明

研究課題名(英文) Host lipids that regulate the function of replication factories of RNA viruses

研究代表者

山根 大典 (YAMANE, Daisuke)

公益財団法人東京都医学総合研究所・疾患制御研究分野・主席研究員

研究者番号：60782761

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,890,000円

研究成果の概要(和文)：プラス一本鎖RNAウイルスは感染細胞内において脂質代謝変化を誘導し、複製ファクトリーを形成することでウイルス複製サイクルを開始する。ウイルス感染細胞の宿主遺伝子発現プロファイル解析、包括的リポミクスおよび脂肪酸解析により、複数の病原RNAウイルスが脂肪酸切断酵素であるホスホリパーゼおよび脂肪酸不飽和化酵素を介して感染細胞の脂質プロファイルを変化させ、ウイルスゲノム複製を促進していることを見出した。特に脂肪酸の不飽和化の促進はウイルス特異的な複製膜の生化学的性状に重要な影響を与える因子であることを突き止め、その脂肪酸代謝経路の解析を通じて新たな抗ウイルス薬の標的分子候補を見出すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義
ウイルス感染特異的に変化する脂質代謝を理解することはウイルスの感染・複製機構の解明のみならず、その代謝経路を標的とすることでウイルス特異的に作用する創薬に繋がる。この研究において、異なるウイルス感染によって普遍的および特異的に誘導される脂質代謝変化を包括的に捉えたことにより、脂肪酸代謝の重要性を見出すことに繋がった。また、脂肪酸代謝を標的とする薬剤がウイルス複製を有意に変化させることを見出したことから、脂肪酸代謝酵素が抗ウイルス薬の標的分子となり得ることを実証できた。この研究から得られた成果をもとに、今後動物感染モデルを用いた試験を通じて、より安全性の高い創薬開発へと発展することが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Positive strand RNA viruses initiate genome replication within specialized membrane vesicles, designated "replication factory", in infected cells. Such organelles are typically induced by engagement of viral proteins and associated with morphological changes in the structure of host internal membranes. Whereas the process involved in formation of the replication factory must involve alterations in host lipid metabolism, the mechanistic details remain poorly characterized. Through investigations by means of microarray analysis, comprehensive lipidomics analysis and fatty acid profiling, this study has revealed that RNA viruses modulate cellular lipid profiles via modulation of cellular phospholipase activity that cleaves fatty acid tails from membrane phospholipids as well as fatty acid desaturases. Importantly, analyses of fatty acid metabolic pathways that catalyze fatty acid cleavage or desaturation identified host targets that could lead to development of virus-specific antivirals.

研究分野：ウイルス学

キーワード：ウイルス 感染症 脂質 RNAウイルス 複製複合体

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

病原 RNA ウイルスによる感染は、デング・ジカウイルスが先進国において広がりを見せているように、様々なウイルス感染予防ワクチンが普及した現在においても人類にとって脅威となり続けている。RNA ウイルスの複製機構については、全ヒト遺伝子を網羅した siRNA および CRISPR/Cas9 ノックアウトライブラリを用いたアプローチによって、ウイルスが複製に利用する宿主タンパク質について解明されてきた。一方、ウイルスが複製に利用する脂質についての理解はあまり進んでいない。プラス一本鎖 RNA ウイルスの複製機構については、C 型肝炎ウイルス (HCV) 分野を中心に、クライオ電子顕微鏡をはじめとする最先端テクノロジーによってウイルス複製ファクトリーと呼ばれる特徴的な小胞体由来の膜構造が明らかにされつつある。その構造内部でウイルス RNA ヘリカーゼ・RNA ポリメラーゼ機能を持つ複製複合体 (レプリカーゼ) によりウイルスゲノム RNA の複製が起こるが、膜構造の形成およびレプリカーゼの活性調節にどのような脂質代謝が関与しているかについては限定的な理解にとどまっていた。

2. 研究の目的

ピコルナ・フラビ・C 型肝炎ウイルス (HCV) を含むプラス一本鎖 RNA ウイルスは、いずれも感染細胞内において小胞膜構造を誘導するが、その膜構造内でウイルス複製を制御する脂質については、HCV とその他のウイルスでは異なる生化学的性状を持つことが判明していた。本研究では、主にリピドーム解析を用いて異なる RNA ウイルスがゲノム複製に普遍的、またはウイルス特異的に利用する脂質を同定し、ウイルスの複製制御および病態形成に關与する脂質代謝経路を解明することで、RNA ウイルス感染に対する新たな治療戦略を開拓することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) RNA ウイルス感染細胞におけるリピドーム解析およびマイクロアレイ解析

ウイルス感染において特異的に誘導される微量脂質成分を網羅的に解析する為、ウイルス感染細胞において非感染細胞と比較して量的および質的に変動する脂質の同定を行なった。研究対象とするヒト病原ウイルスが感染感受性を持つ HuH-7 由来細胞を用い、全細胞が感染する条件を達成するため各ウイルス毎に異なる手法を用いて感染サンプルを調整した。また、感染によって引き起こされる細胞死等の二次的な影響を回避するため、ウイルス感染後、機能的な複製ファクトリーが形成され、一過性の複製サイクルが完了するタイミングでのサンプル回収を行った。また、同時に得られたサンプルの一部からトータル RNA を抽出し、マイクロアレイ解析を行なうことで各ウイルス感染細胞における転写レベルの変動および詳細な脂質代謝遺伝子発現プロファイルを得た。

C 型肝炎ウイルス (HCV) には脂質過酸化に対して異なる感受性を持つウイルス株が存在するため、脂質過酸化感受性を持つ H77S.3 (遺伝子型 1a) 株と脂質過酸化に耐性を持つ JFH1 株由来のレプリカーゼを持つキメラウイルスである HJ3-5 株を用いることでサンプル比較を行った。脂質過酸化感受性株については高力価のウイルスを得ることが非常に困難であるため、9 割以上の高率で細胞への導入が可能なエレクトロポレーション法を用いた RNA トランスフェクションにより実験を行なった。また比較対照として、RNA ポリメラーゼの活性中心であるアミノ酸残基 GDD を GND に置換することにより複製能を欠失した変異体 RNA をエレクトロポレーションすることにより非感染コントロールを得た。ウイルスゲノム翻訳後の一過性の増殖が完了する 48 時間後に細胞を回収し、脂質解析に用いた。

ピコルナウイルス属に属する A 型肝炎ウイルス (HAV) は、エンベロープを持たずメタノールによる感染性粒子の不活化が不可能であることから、感染細胞ライセートを脂質解析に持ち込むことができない。これを克服するため、HAV については構造蛋白質を持たずレプリカーゼタンパク質のみをコードする自己複製可能なサブゲノミック RNA を用いることとした。この RNA を HCV と同様にエレクトロポレーション法によって細胞内へ導入することで複製ファクトリーを形成させ、増殖が立ち上がる 48 時間後に回収し脂質解析に用いた。

フラビウイルスであるデングウイルス、ジカウイルスについては高力価の感染性ウイルスを得ることが可能であったことから、高力価で感染させ、全細胞への感染が確認された感染後 24 時間に細胞を回収し、非感染細胞を同時に回収することで脂質解析を行なった。

上記感染細胞について、リピドーム解析により解析可能な酸性リン脂質、微量脂質成分であるフォスファチジルイノシトールリン酸 (PIPs) を含むグリセロリン脂質に加えスフィンゴ脂質の解析を行ない、ウイルス特異的および普遍的に変動する脂質の同定を行なった。

上記の感染細胞サンプルを用いたリピドーム解析においてウイルス感染細胞における脂肪

酸エステルの変動が認められたことから、さらに同サンプル中に含まれる脂肪酸プロファイルの解析を行ない、感染細胞に含まれる脂肪酸の同定を行なった。

(2) 脂質代謝を標的とする抗ウイルス薬候補の探索と作用機序の解析

上記のリピドーム解析、脂肪酸解析および脂質代謝を標的とした遺伝子機能解析によって得られた結果から、ウイルス複製抑制剤の標的となり得る脂質代謝遺伝子および阻害剤の探索を行ない、薬効試験および作用機序の解析を進めた。

4. 研究成果

(1) 感染細胞における多様な PIPs 代謝の変化の同定

これまでに HCV の NS5A が PI4 キナーゼの活性を刺激し、PI(4)P の合成を増大させることで小胞体の二重膜構造の誘導を促進することが報告されていた。この研究においても PI(4)P の有意な増加が HJ3-5 感染細胞において認められたが、予想外にも H77S.3 感染においては認められなかったことから、PI4 キナーゼの刺激能はウイルス株ごとに異なることが判明し、また同様に PI(4)P を必要とすることが知られているピコルナウイルスにおいても PI(4)P の変化は認められなかった。微量に存在する PI(4)P はこれまで IgM 抗体を用いた蛍光免疫染色によってのみ検出されてきたが、高感度の LC-MS/MS 法を用いて繊細に定量することができた。実験室株と異なり、患者分離株は培養細胞と比較して少ない PI(4)P 環境でより複製することが既に報告されているが、細胞内 PI(4)P 合成能の違いが培養細胞におけるウイルス株の複製能を規定していることが示唆された。

(2) ウイルス複製ファクトリー機能におけるホスホリパーゼ活性の関与

グリセロリン脂質は脂肪酸エステルを 2 つ持つが、ホスホリパーゼ活性により脂肪酸が切断されることで、リゾ体が形成される。この研究に用いたウイルスに共通してグリセロリン脂質のリゾ体の顕著な増加が認められ、円錐形を持つリゾ体が蓄積することで複製ファクトリーの湾曲した小胞構造の形成を促進していることが示唆された。20 以上存在するホスホリパーゼ遺伝子のうち、Huh-7 細胞に豊富に発現するホスホリパーゼ遺伝子がマイクロアレイ解析の結果から、これまでに報告されている PLA2G4A を含む少数の PLA 遺伝子の関与が示唆され、さらなる詳細な機能解析を進めている。

(3) ウイルス複製ファクトリー機能と脂肪酸代謝

リピドーム解析によって各脂質種を定量的に測定することでリゾ体の増加を認めたと、さらなる詳細な脂肪酸エステル解析によって、脂肪酸の不飽和化が誘導されていることが認められた。このことから、脂肪酸代謝についても詳細な解析を進めたところ、脂質過酸化感受性を持つ HCV 株感染においては脂質過酸化の酸化的分解の基質となる多価不飽和脂肪酸の増加が認められ、また多価不飽和脂肪酸が機能的な重要性を持つ PI(4)P のエステルとして豊富に含まれることを見出した(図 1)。一方、脂質過酸化耐性を持つフラビウイルス感染においては Stearoyl-CoA Desaturase (SCD) 遺伝子発現の増加と、その代謝産物である一価不飽和脂肪酸(オレイン酸)の有意な増大が認められた。一価不飽和脂肪酸は脂質過酸化を抑制する機能を持つことから、脂質過酸化耐性ウイルスは一価不飽和脂肪酸を複製ファクトリー構造に利用することで脂質過酸化耐性を獲得していることが示された。また、脂質過酸化耐性を持つウイルス(HCV、フラビウイルスを含む)はいずれも SCD の抑制によってウイルス複製が抑制されたことから、この不飽和化経路が抗ウイルス剤の標的分子となり得ることが示唆された。また、詳細な脂肪酸解析により、培養細胞においては生体内では通常認められない n-9 脂肪酸が豊富に含まれることを見出した。これまでは n-6 および n-3 脂肪酸を中心とした代謝経路が注目を浴びてきたが、基礎研究で用いられる in vitro 実験系においてはオレイン酸を起点とする n-9 脂肪酸代謝系が重要なパラメーターとして存在しており、ウイルス複製ファクトリー構築の上でも重要な役割を果たしていることを明らかにした。

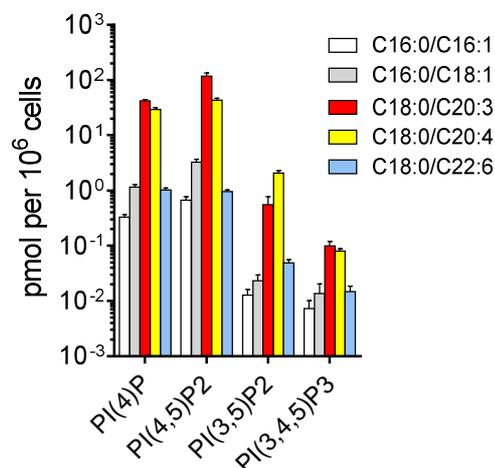


図 1 PIPs の脂肪酸エステル組成

(4) 複製メカニズムの理解に基づいた脂質代謝経路を標的とする抗ウイルス薬

ホスホリパーゼ活性を介した抗ウイルス作用作用機序の解明と抗ウイルス薬候補

脂肪酸代謝に関与すると考えられる PLAAT4(または RARRES3)が抗ウイルスシグナルの下流で誘導されることを見出したことから、そのウイルス抑制作用を検討した結果、そのホスホリパーゼ活性が強力な HAV 抑制機能を持つことを明らかにした。野生型 RARRES3 を過剰発現すると HAV のウイルスゲノム複製を抑制する一方、ホスホリパーゼ活性を欠失した C113S 変異体は抑制機能を完全に失うことが判明した(図2)。さらに RARRES3 の下流シグナルの解析を行なった結果、ホスホリパーゼ活性依存的な mTOR のリン酸化を介した抑制が示唆される結果が得られた。さらに mTOR 阻害剤が HAV 複製を抑制したことから、PLAAT4 の抗ウイルス作用を再現可能な抗ウイルス剤候補としてラパマイシンをはじめとする mTOR 阻害剤を複数見出した(図3)。

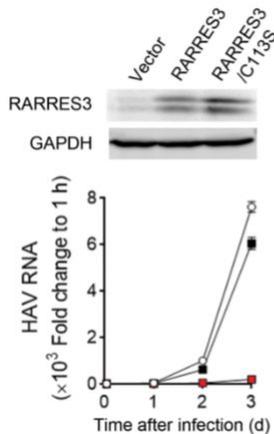


図2 野生型 RARRES3 およびホスホリパーゼ不活性型変異体(C113S)を発現する肝癌由来細胞における HAV 複製。野生型のみウイルス増殖(左図)および細胞病原性(右図)の抑制効果が認められた。

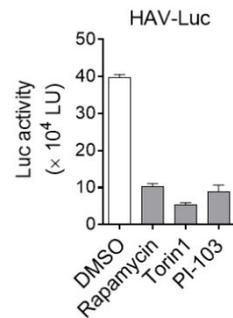


図3 様々な mTOR 阻害剤による HAV サブゲノム (HAV-Luc) RNA の複製抑制効果。

脂肪酸の不飽和化を標的としたウイルス複製制御化合物

脂肪酸プロファイル解析によって脂肪酸の不飽和化に関する遺伝子がウイルス感染細胞において誘導されることを示したことから、Stearoyl-CoA Desaturase を介した不飽和化を阻害する化合物および遺伝子を標的とする siRNA を用いてその機能を阻害することで、ウイルス複製を阻害することを示した。また、HCV 感染細胞においては不飽和度が亢進することから、細胞死を誘導しない濃度の脂質過酸化誘導剤を添加することによって多価不飽和脂肪酸の酸化的分解を促すことでウイルス複製を低下させるのみならず、複製複合体の立体構造を変化させることにより直接作用型抗ウイルス剤の親和性を高めることを示した。本研究で得られた成果をもとに、今後感染動物モデルを用いた試験により安全性および抗ウイルス効果の高い創薬応用へと繋げる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 6件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Feng Hui, Zhang Yi-Bing, Gui Jian-Fang, Lemon Stanley M., Yamane Daisuke	4. 巻 17
2. 論文標題 Interferon regulatory factor 1 (IRF1) and anti-pathogen innate immune responses	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS Pathogens	6. 最初と最後の頁 e1009220
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.ppat.1009220	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Dultz Georg, Shimakami Tetsuro, Schneider Markus, Murai Kazuhisa, Yamane Daisuke, Marion Antoine, Zeitler Tobias M., Stross Claudia, Grimm Christian, Richter Rebecca M., Baumer Katrin, Yi MinKyung, Biondi Ricardo M., Zeuzem Stefan, Tampe Robert, Antes Iris, Lange Christian M., Welsch Christoph	4. 巻 295
2. 論文標題 Extended interaction networks with HCV protease NS3-4A substrates explain the lack of adaptive capability against protease inhibitors	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 13862 ~ 13874
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA120.013898	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Yamane Daisuke, Feng Hui, Rivera-Serrano Efrain, Selitsky Sara, Hirai-Yuki Asuka, Das Anshuman, McKnight Kevin, Misumi Ichiro, Suzuki Ryosuke, Matsuda Mami, Nakanishi Hiroki, Ohto-Nakanishi Takayo, Hishiki Takayuki, Oikawa Tsunekazu, Morita Kouichi, Sethupathy Praveen, Kohara Michinori, Whitmire Jason, Lemon Stanley.	4. 巻 4
2. 論文標題 Basal expression of interferon regulatory factor 1 drives intrinsic hepatocyte resistance to multiple RNA viruses	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Microbiology	6. 最初と最後の頁 1096 ~ 1104
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41564-019-0425-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Feng Hui, Sander Anna-Lena, Moreira-Soto Andres, Yamane Daisuke, Drexler Jan Felix, Lemon Stanley M.	4. 巻 71
2. 論文標題 Hepatovirus 3ABC proteases and evolution of mitochondrial antiviral signaling protein (MAVS)	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Hepatology	6. 最初と最後の頁 25 ~ 34
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jhep.2019.02.020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Hishiki Takayuki, Kato Fumihito, Nio Yasunori, Watanabe Satoru, Wen Tan Nicole Wei, Yamane Daisuke, Miyazaki Yasuyuki, Lin Chun-Chieh, Suzuki Rieko, Tajima Shigeru, Lim Chang-Kweng, Saijo Masayuki, Hijikata Makoto, Vasudevan Subhash G., Takasaki Tomohiko	4. 巻 165
2. 論文標題 Stearoyl-CoA desaturase-1 is required for flavivirus RNA replication	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Antiviral Research	6. 最初と最後の頁 42 ~ 46
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.antiviral.2019.03.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Benzine T, Brandt R, Lovell WC, Yamane D, Neddermann P, De Francesco R, Lemon SM, Perelson AS, Ke R, McGivern DR.	4. 巻 13
2. 論文標題 NSSA inhibitors unmask differences in functional replicase complex half-life between different hepatitis C virus strains.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 PLoS Pathog.	6. 最初と最後の頁 e1006343
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.ppat.1006343	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Feng H, Lenarcic EM, Yamane D, Wauthier E, Mo J, Guo H, McGivern DR, Gonzalez-Lopez O, Misumi I, Reid LM, Whitmire JK, Ting JP, Duncan JA, Moorman NJ, Lemon SM.	4. 巻 18
2. 論文標題 NLRX1 promotes immediate IRF1-directed antiviral responses by limiting dsRNA-activated translational inhibition mediated by PKR.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nat Immunol.	6. 最初と最後の頁 1299-1309
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/ni.3853	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 山根大典
2. 発表標題 脂溶性ビタミンを介した肝炎ウイルス複製制御機構
3. 学会等名 第364回脂溶性ビタミン総合研究委員会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山根大典
2. 発表標題 肝細胞に内在するRNA ウイルス抑制シグナルとその制御機構
3. 学会等名 第65回肝炎ウイルスセミナー（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Daisuke Yamane, Asuka Hirai-Yuki, Michinori Kohara, Stanley M. Lemon
2. 発表標題 RARRES3 mediates interferon regulatory factor 1-induced suppression of hepatitis A virus replication through modulation of the mTOR activity.
3. 学会等名 第67回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Daisuke Yamane, Asuka Hirai-Yuki, Ichiro Misumi, Michinori Kohara, Jason K Whitmire, and Stanley M Lemon
2. 発表標題 MAVS-independent activity of interferon regulatory factor 1 restricts hepatotropic RNA virus infections
3. 学会等名 第66回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Daisuke Yamane, Michinori Kohara
2. 発表標題 Efficient replication of non-adapted hepatitis C virus isolates in cell culture
3. 学会等名 第65回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

ウイルス感染を抑制する新たな肝細胞の自然免疫の仕組みを発見
<http://www.igakuken.or.jp/topics/2019/0415.html>
How Liver Cells Protect Against Viral Attacks
<https://globalhealth.unc.edu/2019/04/researchers-identify-liver-cells-protect-viral-attacks/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
米国	The University of North Carolina			
ドイツ	Goethe University Hospital Frankfurt			