

令和 2 年 6 月 22 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08865

研究課題名(和文) サフォードウイルス感染受容体の同定と機能解析

研究課題名(英文) Identification and functional analysis of a cellular receptor for Safford virus

研究代表者

大桑 孝子 (OKUWA, Takako)

金沢医科大学・医学部・助教

研究者番号：20460347

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)：CRISPR/Cas9システムを用いてサフォードウイルス(SAFV)高感受性HeLa細胞のゲノムワイドなヒト遺伝子ノックアウトライブラリーを作製し、SAFV感染受容体の探索を行った。その結果、感染受容体あるいはウイルスの感染・増殖を促進すると考えられる3つの候補遺伝子を得た。現在、それらの遺伝子について膜タンパク質を中心にSAFV感染における機能を解析している。また、ウイルス感染を容易に検出できる蛍光タンパク質発現組換えSAFVを作製した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

SAFV高感受性HeLa細胞由来のcDNAライブラリーを非感受性細胞に導入し、ウイルス感受性となった細胞からの感染受容体候補遺伝子の同定を試みたが、成功しなかった。このことは、SAFVの感染受容体が1分子からなるものではなく複合体として機能するものである可能性を示唆している。また、本研究で作製した蛍光タンパク質発現組換えSAFVは、簡便な感染細胞の検出を可能にし、これからの機能解析に有用である。

研究成果の概要(英文)：We generated genome-wide human gene knockout library in Safford virus (SAFV) highly susceptible HeLa cells using the CRISPR/Cas9 system and conducted a search for SAFV receptors. As a result, we obtained three candidate genes that are thought to be receptors or promote viral infection and replication. We are currently analyzing these genes for their functions in SAFV infection, focusing on membrane proteins. We also generated a fluorescent protein-expressing recombinant SAFV that can easily detect viral infection.

研究分野：ウイルス学

キーワード：サフォードウイルス 感染受容体 CRISPR/Cas9 sgRNAライブラリー UnaG発現組換えサフォードウイルス

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。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

サフォードウイルス (SAFV: Scaffold virus) は、2007 年に初めて分離・同定されたヒトに感染するピコルナウイルス科カルジオウイルス属のウイルスである。世界各国で気道炎、胃腸炎、手足口病様疾患、無菌性髄膜炎、脳炎、膵炎など様々な検体から検出されており、近縁のタイラー脳脊髄炎ウイルス (TMEV) やエンテロウイルスと同様に多様な疾患の原因になると考えられている。しかし、ウイルスの病原性を決定する重要な宿主因子である感染受容体が見いだされておらず、SAFV の組織特異性や病原性発現の分子機構は不明である。

2. 研究の目的

本研究では、SAFV の感染受容体を同定することによって、まだ特定されていない SAFV の標的細胞・臓器を明らかにし、SAFV の病原性と疾患の関連について詳細な解析を行うことを目的としていた。

3. 研究の方法

(1) 緑色蛍光タンパク質 UnaG 発現組換え SAFV (SFV/UnaG) の作製

無菌性髄膜炎患者から分離された SAFV (JPN08-404 株、GenBank: HQ902242) をもとに作製した SAFV の感染性 cDNA クローン (pSAF404) [] を用いて、このプラスミドの 2A と 2B 遺伝子の間に CHYSEL の配列を両端に付加した緑色蛍光タンパク質 UnaG の遺伝子 (417bp [GenBank: AB763906) を挿入した (図 1)。このプラスミドから *in vitro* 転写で得られる一本鎖 RNA を BHK-21 細胞にトランスフェクトし、20 時間後に細胞と上清を回収し、凍結融解 3 回繰り返しウイルス液を調製した。調製したウイルス液の HeLa 細胞への感染・回収を繰り返し、蛍光タンパク質の遺伝子が継代によって脱落するかどうか RT-PCR で解析した。

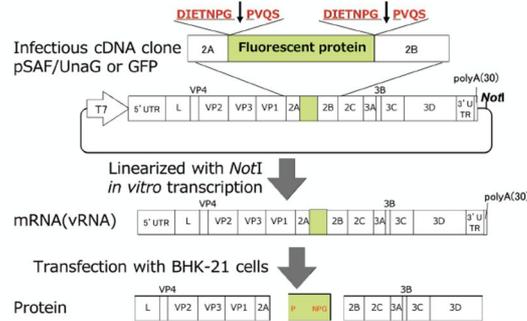


図 1 蛍光タンパク質発現SAFVの感染性cDNAクローン

野生型SAFVの感染性クローンのコンストラクトをもとに、CHYSELの配列を両端に付加したGFP遺伝子あるいはUnaG遺伝子を2Aと2Bの間に挿入した。このプラスミドから*in vitro*転写で得られる一本鎖RNAをBHK-21細胞にトランスフェクトし、ウイルスを作製した。

このとき、細胞では、リボソームスキップによってウイルスのポリプロテインとは独立して蛍光タンパク質が翻訳される。

(2) SAFV 高感受性 HeLa 細胞由来 cDNA ライブラリーの作製と SAFV 感染受容体の探索

SAFV 高感受性 HeLa 細胞 [] から mRNA を抽出し、In-Fusion SMARTer Directional cDNA Library Construction Kit (Clontech) を用いて、pMXs レトロウイルスベクターに SAFV 高感受性 HeLa 細胞由来 cDNA を組み込み、cDNA 発現レトロウイルスライブラリーを作製した。作製したレトロウイルス cDNA ライブラリー (20 万クローン) を 100 のプールに分割し、SAFV 非感受性細胞である BHK-21 細胞あるいは CHO-K1 細胞に発現させた。その後、SAFV/UnaG 発現 SAFV を感染させ、蛍光顕微鏡下で UnaG 発現を指標に SAFV 感受性を上昇させる cDNA プールを選別した。

(3) CRISPR/Cas9 法によるゲノムワイドなヒト遺伝子ノックアウトライブラリーを用いた感染受容体の探索

lentiCas9-Blast (Addgene) を用いて調製したレンチウイルスを感染させて Cas9 安定発現 SAFV 高感受性 HeLa (Cas9/HeLa) 細胞株を樹立した。ヒトの 19,050 遺伝子を標的とし 1 遺伝子あたり 6 つの sgRNA が設計されている sgRNA のプールライブラリー (GeCKO v2 human library, Addgene) をレンチウイルスを用いて Cas9/HeLa 細胞に導入し、HeLa 細胞のノックアウトライブラリーを作製した []。このライブラリー細胞 (Cas9/sgRNA/HeLa 細胞) に親細胞株を死滅させられるウイルス力価で SAFV を感染させ、生き残った細胞を SAFV 耐性細胞として回収した。それらの細胞から調製したゲノム DNA を鋳型にして sgRNA 部分を PCR で増幅後、次世代シーケンシング (NGS) により sgRNA の配列を決定した。NGS のデータから、同様に NGS 解析した非感染細胞と比較して、存在比が上昇した sgRNA を同定し、統計学的に sgRNA カウント数が有意に上昇している遺伝子を探索した。

4. 研究成果

(1) SAFV/UnaG の作製

生細胞で感染の有無を検出するため、野生型ウイルスと感染性や増殖能の低下や、遺伝子の脱落が起こらずに蛍光タンパク質を感染細胞内で安定的に発現する組換え SAFV の作製を目指した。遺伝子のサイズが小さい蛍光タンパク質として、ニホンウナギの筋肉に存在する緑色蛍光タンパク質 UnaG [] を用いた。UnaG は、GFP と比較すると、蛍光強度はほぼ同じだが、サイズはおおよそ 60% と小さく、このサイズの小ささが組換えウイルスの作製に有利ではないかと考えられた。作製したウイルスを HeLa 細胞で継代すると、SAFV/GFP は、3 回の継代で GFP

遺伝子が脱落し感染細胞における蛍光が観察されなくなった。一方 SAF/UnaG は、5 回の継代でも全長のサイズが維持されており、感染細胞における蛍光の発現も維持されていた (図 2)。また、SAF/UnaG の増殖は、野生型ウイルスと同程度であった。GFP 遺伝子と比較して UnaG 遺伝子は脱落が起こりにくいこと、SAF/UnaG が感染実験に使用できることが示された。以上の結果から、SAF/UnaG は、簡便に感染細胞を検出することができ、受容体探索やその後の機能解析に有用であると考えられた。

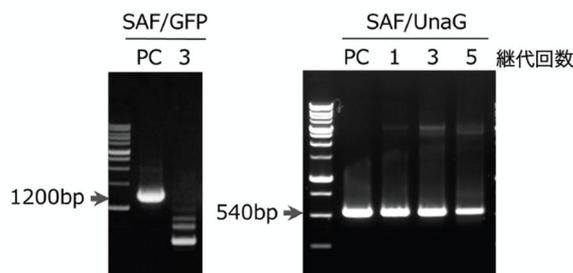


図2 蛍光タンパク質遺伝子のゲノム安定性

HeLa細胞で継代し、回収したウイルス液からウイルスRNAを抽出し、合成したcDNAを鋳型に蛍光タンパク質の遺伝子とその両端のSAFVの配列を含む領域を増幅した。ポジティブコントロールは*in vitro*転写に用いたコンストラクトを鋳型とした。

(2) SAFV 高感受性 HeLa 細胞由来 cDNA ライブラリーを用いた SAFV 受容体の探索

スクリーニングの過程で、ネガティブコントロールとして HeLa 細胞由来の cDNA を組み込んでいない空ベクターを用いて調製したレトロウイルスを感染させた BHK-21 細胞において、SAF/UnaG 感染細胞 (UnaG 発現細胞) 数が顕著に増加した。この感染細胞数の増加はマクロピノサイトーシス阻害剤である ethylisopropylamiloride (EIPA) 存在下で抑制されたので、感染性受容体を介した感染ではないと考えられた。このようなバックグラウンドの上昇によってスクリーニングの続行が困難となった。次に、別の SAFV 非感受性細胞として CHO-K1 細胞を用いたスクリーニングを試みた。レトロウイルス感染後の受容体を介さないウイルスの侵入によるバックグラウンドは軽減されたが、細胞内での SAFV のタンパク質合成能が BHK-21 細胞よりも低く、検出感度が劣るため、スクリーニングの続行が困難であった。単一の遺伝子の導入で感染が成立するようになるのであれば、バックグラウンドの上昇や検出感度の低下があっても検出することができるかもしれない。しかし、これらの方法では SAFV の感染受容体遺伝子を同定できなかった。このことから、2 種類以上の遺伝子または複数のタンパク質からなる複合体が SAFV の感染に必要な可能性が考えられた。

(3) CRISPR/Cas9 法によるゲノムワイドなヒト遺伝子ノックアウト HeLa 細胞を用いた SAFV 受容体の探索

SAFV 感染後に生き残った Cas9/sgRNA/HeLa 細胞 (SAFV 耐性細胞) からゲノム DNA を回収し、細胞に導入されている sgRNA 配列を決定した (図 3)。その結果、感染受容体およびウイルスの感染・増殖を促進すると考えられる 3 つの候補遺伝子を得た。現在、それらの遺伝子について SAFV 感染における機能を解析している。

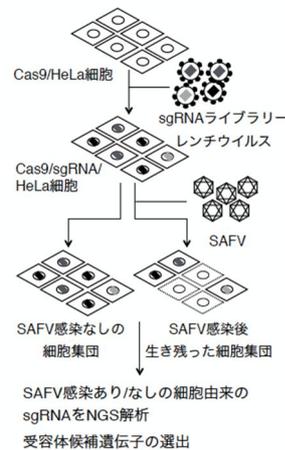


図3 スクリーニングの概要

< 引用文献 >

- Himeda, T., Hosomi, T., Asif, N., Shimizu, H., Okuwa, T., Muraki, Y., & Ohara, Y. (2011). The preparation of an infectious full-length cDNA clone of Saffold virus. *Virology journal*, 8(1), 110.
- Himeda, T., Hosomi, T., Okuwa, T., Muraki, Y., & Ohara, Y. (2013). Saffold virus type 3 (SAFV-3) persists in HeLa cells. *PloS one*, 8(1).
- Joung, J., Konermann, S., Gootenberg, J. S., Abudayyeh, O. O., Platt, R. J., Brigham, M. D., ... & Zhang, F. (2017). Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout and transcriptional activation screening. *Nature protocols*, 12(4), 828.
- Hayashi, S., & Toda, Y. (2009). A novel fluorescent protein purified from eel muscle. *Fisheries Science*, 75(6), 1461.
- Kumagai, A., Ando, R., Miyatake, H., Greimel, P., Kobayashi, T., Hirabayashi, Y., ... & Miyawaki, A. (2013). A bilirubin-inducible fluorescent protein from eel muscle. *Cell*, 153(7), 1602-1611.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大桑孝子、姫田敏樹、宇谷公一、樋口雅也
2. 発表標題 サフォードウイルスVP1蛋白の分解における他のウイルス蛋白関与
3. 学会等名 第54回日本細菌学会中部支部総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大桑孝子、姫田敏樹、宇谷公一、樋口雅也
2. 発表標題 サフォードウイルスVP1カプシド蛋白質の分解機構の解析
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大桑孝子、姫田敏樹、宇谷公一、樋口雅也
2. 発表標題 サフォードウイルス感染受容体の探索
3. 学会等名 第1回がん・ウイルス研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大桑孝子、姫田敏樹、宇谷公一、樋口雅也
2. 発表標題 蛍光タンパク質発現サフォードウイルスの作製
3. 学会等名 第55回日本細菌学会中部支部総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大桑孝子、姫田敏樹、宇谷公一、樋口雅也
2. 発表標題 ニホンウナギ由来蛍光タンパク質UnaG発現サフォードウイルスの作製
3. 学会等名 第11回北陸合同バイオシンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大桑孝子、姫田敏樹、宇谷公一、樋口雅也
2. 発表標題 ニホンウナギ由来蛍光タンパク質UnaG発現Safold virusの作製
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

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
--	---------------------------	-----------------------	----