

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K14912

研究課題名(和文) 日本脳炎ウイルスの感染に関わる宿主因子のゲノムワイド探索およびその機能解析

研究課題名(英文) Genome-wide screening for host factors involved in Japanese encephalitis virus infection

研究代表者

佐久間 智理 (Sakuma, Chisato)

国立感染症研究所・細菌第一部・主任研究官

研究者番号：80782888

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：日本脳炎ウイルスはアジア各地に広く分布し、ヒトに重篤な急性脳炎を引き起こす。日本脳炎ウイルスに対する培養細胞の抗ウイルス応答機構については様々な解析が行われているが、まだ不明な点も多い。

本研究の目的は、CRISPR/Cas9システムによる遺伝子ノックアウト系およびCRISPR/Cas9システムの変法である遺伝子発現活性化系を使用したゲノムワイドスクリーニングにより、遺伝子ノックアウトまたは過剰発現で日本脳炎ウイルスに耐性を示す宿主因子を同定することである。2種類のゲノムワイドスクリーニングを行った結果、日本脳炎ウイルスの感染に関わる複数の宿主因子の同定に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本脳炎は東アジア、東南アジア、南アジアにかけて各地に広く流行している急性脳炎である。日本国内ではワクチンの接種により流行は制御されているが、ブタが同ウイルスを有しているため感染の機会はなくなっていない。

本研究では遺伝子ノックアウト系スクリーニングにより日本脳炎ウイルスのライフサイクルに必要な宿主因子を単離し、遺伝子発現活性化系スクリーニングにより同ウイルスに抵抗性を示す宿主因子の単離に成功した。日本脳炎ウイルスのライフサイクルや宿主の抗ウイルス応答機構について新たな知見を得ることができ、感染症に関する基礎研究や感染症対策において非常に意義があった。

研究成果の概要(英文)：Japanese encephalitis virus (JEV) is widely distributed to Asia, causing serious acute encephalitis. Although the mechanism of anti-JEV responses have been investigated by various studies, much remains unknown.

The aim of this study was to identify host factors involving to resistance to JEV infection by gene knockout screen using CRISPR/Cas9 system or gene activation screen using CRISPR/dCAS9 system. As a result of two genome wide screens, multiple host factors involved in JEV infection were identified.

研究分野：自然免疫

キーワード：日本脳炎ウイルス ゲノムワイドスクリーニング

1. 研究開始当初の背景

日本脳炎ウイルスはフラビウイルス科に属する一本鎖 RNA ウイルスで、蚊を媒介して感染する。アフリカミドリザル由来 Vero 細胞を用いた細胞培養ワクチンの接種により同ウイルスによる脳症等の重篤な発症は減少したものの、国内でも多くの地域で豚が同ウイルスを有しており感染の危険性は無視できない。日本脳炎ウイルスに対する抗ウイルス応答機構については、IRF3/7-I 型 IFN 経路の関与は示唆されているものの(Nature 144; 101-105(2006))全容解明には至っていない。さらに、日本脳炎ウイルスの受容体もまだ同定されていない。

自然免疫系において、RNA ウイルス由来の 2 本鎖 RNA を認識する受容体として TLR3、RIG-I、MDA-5 (Cell 124; 783-801(2006), Nat Immunol 5; 730-737(2004), J Immunol 175; 2851-2858(2005))、1 本鎖 RNA を認識する受容体として TLR7/8(Cell 124;783-801(2006))が同定されている。これらの受容体はウイルス RNA を検知すると抗ウイルス作用をもった I 型インターフェロン(IFN)遺伝子の発現を誘導する。近年、この I 型 IFN のみならず、III 型 IFN をはじめ複数の I 型 IFN 非依存的な抗ウイルス応答機構の存在が示唆されているが (J Immunol 177; 8008-8016(2006)), PNAS 111; 7108-7113(2014))、詳細なメカニズムはまだ不明である。

ゲノム編集法のめざましい発展により抗ウイルス応答に関与する新規因子を探索するツールとして CRISPR/CAS9 システムを用いたゲノムワイドな遺伝子ノックアウトスクリーニングが可能となってきた(Nature 509; 487-491(2014), Science 343; 84-87(2014))。また近年、ゲノムワイドに転写活性化を行うことが可能な CRISPR/dCAS Activation システムが登場した(Cell 159; 1-15(2014), Nature 517; 583-588(2014))。これらのシステムを用いてウイルス感染による細胞死を指標としたスクリーニングを行った場合、CRISPR/CAS9 システムでは遺伝子ノックアウトによりウイルス耐性を与える遺伝子が単離されるため、ウイルス受容体等のウイルスのライフサイクルに必要な宿主因子の単離が期待できる。CRISPR/dCAS Activation システムでは過剰発現によりウイルス感染による細胞死に対して耐性を与える遺伝子が単離されるため、抗ウイルス性因子の網羅的な単離が期待できる。

2. 研究の目的

本研究では CRISPR/Cas9 システムによる遺伝子ノックアウト系および CRISPR/dCas Activation システムによる遺伝子発現活性化系を用いて、遺伝子ノックアウトまたは発現活性化により日本脳炎ウイルスが引き起こす細胞死に対して耐性を示す遺伝子のゲノムワイドスクリーニングを行う。日本脳炎ウイルス感染後の細胞の生死という簡便な指標を用いて、日本脳炎ウイルスの感染に関わる宿主因子を網羅的に同定することを目標としている。このスクリーニングにより、日本脳炎ウイルスのライフサイクルに必要なとされる宿主因子および同ウイルスの感染に抵抗性を示す抗ウイルス作用をもった宿主因子の網羅的な単離を狙う。

スクリーニングに用いる細胞は、申請者の所属部にて単離されたウイルス増殖能の高いヒト肝がん細胞株亜株 Huh7.5.1-8 細胞 (Jpn J Infect Dis 68; 81-88(2015))である。Huh7.5.1-8 細胞にはウイルス由来 RNA を認識して抗ウイルス応答を誘導する分子である RIG-I に遺伝子変異が入っており、これを親株にスクリーニングした場合、他の細胞を用いた場合と比べて、これら主要な既知因子以外の因子が単離される可能性が高いと考えられる。

3. 研究の方法

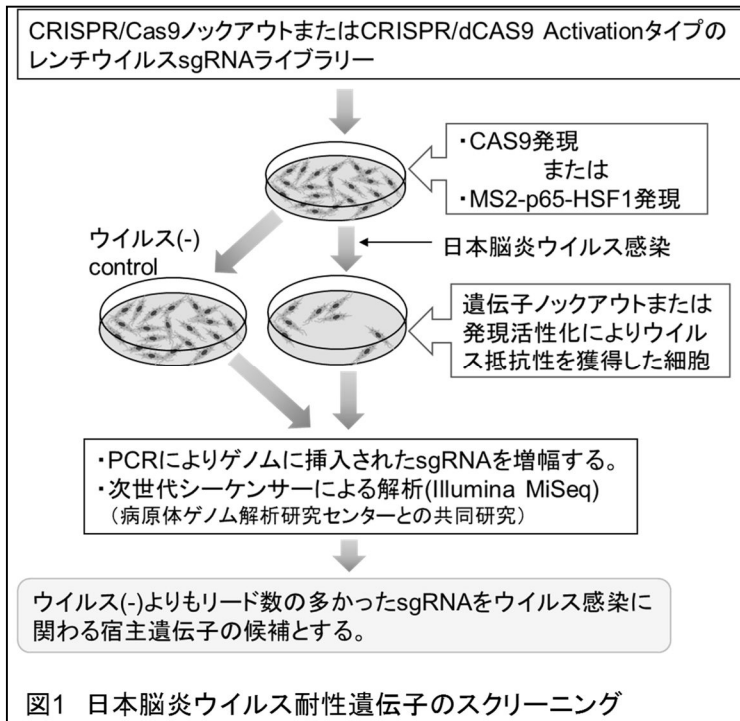
(1) ゲノムワイドな遺伝子ノックアウトおよび発現活性化細胞群の作製

遺伝子ノックアウト系では親株として CAS9 を発現させた細胞を使用し、ガイド RNA (sgRNA) ライブラリーは Feng Chang 研究室が作成した GeCKO v2.0 ライブラリー(Science 343; 83-87(2014))を使用する。遺伝子発現活性化系では親株として MS2-p65-HSF1 融合タンパク質を発現させた細胞を使用し、sgRNA ライブラリーは Feng Chang 研究室が作成した SAM ライブラリー(Nature 517; 583-588 (2014))を使用する。sgRNA ライブラリーはプラスミドの状態で購入し、パッケージング細胞である 293FT 細胞株 (Life technology) を用いてレンチウイルスライブラリーを作成し、薬剤耐性を指標にして sgRNA が導入された細胞群のみを選択する。

(2) 日本脳炎ウイルスに耐性を示す細胞に導入された sgRNA 配列の同定 (図1)

(1) で得られた細胞群に日本脳炎ウイルスを感染させ、ウイルス感染による細胞死に耐性を示した細胞群を回収する。ゲノムに挿入された sgRNA を PCR により増幅し、次世代シーケンサーを用いて解読する。日本脳炎ウイルス感染なしのコントロールも同時に解析を行う。コントロールよりも過剰に検出された sgRNA を日本脳炎ウイルスの感染に関わる遺伝子の候補とする。なお、この解析は国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センターとの共同研究により行う。

(3) 日本脳炎ウイルス感染による細胞死に耐性を与える責任遺伝子であることの確認
オフターゲット作用による細胞死への耐性ではないことを確認する。候補遺伝子のうち、その機能およびウイルス応答との関連が未知のものを中心に選択し、CRISPR/Cas9 システムによる遺伝子ノックアウトのための sgRNA の設計および cDNA のクローニングを行う。この sgRNA と cDNA を用いてノックアウト細胞および目的の cDNA を過剰発現する細胞株を樹立し、細胞の生存率を指標として日本脳炎ウイルスへの耐性を評価する。単離が予想される因子を表1に、スクリーニング以降の実験計画を図2に示した。



4. 研究成果

(1) ゲノムワイドな遺伝子ノックアウトおよび発現活性化細胞群の作製

所属部にて単離されたウイルス増殖能の高いヒト肝がん細胞株垂株 Huh7.5.1-8 細胞に CAS9 を発現させ、その中から日本脳炎ウイルスへの感受性を維持しており、かつゲノム編集活性が高いクローンを選定して遺伝子ノックアウト系スクリーニングの親株として使用することとした。sgRNA ライブラリーは Feng Chang 研究室が作成した GeCKO v2.0 ライブラリー (Science 343; 83-87(2014)) を使用した。遺伝子発現活性化系スクリーニングの親株としては MS2-p65-HSF1 融合タンパク質を発現させた IFNAR1・IFNLR1 ダブルノックアウト Huh7.5.1-8 細胞を作成済みであり、sgRNA ライブラリーは Feng Chang 研究室が作成した SAM ライブラリー (Nature 517; 583-588 (2014)) を使用した。2 種類の系の sgRNA ライブラリーはプラスミドの状態入手し、パッケージング細胞である 293FT 細胞株を用いてレンチウイルスライブラリーを作成し、薬剤耐性を指標にして sgRNA が導入された細胞群のみを選択した。このようにして得られたゲノムワイドな遺伝子ノックアウトおよび発現活性化細胞群からゲノム DNA を精製し、ゲノムに挿入された sgRNA を次世代シーケンサーを用いて解読したところライブラリーのバリエーションが保持されていることが確認できた。

(2) 日本脳炎ウイルスに耐性を示す細胞に導入された sgRNA 配列の同定

ゲノムワイドな遺伝子ノックアウトおよび発現活性化細胞群に日本脳炎ウイルスを感染させ、ウイルス感染による細胞死に耐性を示した細胞群を回収した。回収した細胞群からゲノム DNA を精製し、ゲノムに挿入された sgRNA を PCR により増幅し、次世代シーケンサーを用いて解読した。日本脳炎ウイルス感染なしのコントロールも同時に解析を行い、コントロールよりも過剰に検出された sgRNA を日本脳炎ウイルスの感染に関わる遺伝子の候補とした。なお、この解析は国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センターとの共同研究により行った。

(3) 日本脳炎ウイルス感染による細胞死に耐性を与える責任遺伝子であることの確認

(2) で得られた sgRNA に対応する遺伝子を日本脳炎ウイルスのライフサイクルに関わる宿主因子および同ウイルスの感染に抵抗性を示す抗ウイルス作用を持った宿主因子の候補として解析を行った。遺伝子ノックアウト系で得られた候補遺伝子については、オフターゲット作用による細胞死への耐性ではないことを確認するために、CRISPR/Cas9 システムを用いて遺伝子ノックアウト細胞を作製した。遺伝子発現活性化系で得られた候補遺伝子については、オフターゲット作用による細胞死への耐性ではないことを確認するために、クローニングした cDNA を細胞に導入して過剰発現細胞を作製した。これらの候補遺伝子ノックアウト細胞および候補遺伝子過剰発現細胞に日本脳炎ウイルスを感染させ、細胞の生存率を指標として同ウイルスへの耐性を評価したところ、遺伝子ノックアウトおよび遺伝子過剰発現により同ウイルスに耐性を示すもの

が複数あった。また、日本脳炎ウイルスに耐性を示さず、オフターゲット作用であったと考えられる候補遺伝子もいくつかあった。このようにして日本脳炎ウイルスの感染に関わる宿主因子であると考えられるものが複数得られた。これらの宿主因子の機能解析を行うことで、日本脳炎ウイルスの感染機構および宿主細胞の抗ウイルス応答機構について新たな知見が得られることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Chisato Sakuma, Tsuyoshi Sekizuka, Makoto Kuroda, Kentaro Hanada, and Toshiyuki Yamaji	4. 巻 22
2. 論文標題 Identification of SYS1 as a Host Factor Required for Shiga Toxin-Mediated Cytotoxicity in Vero Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International journal of molecular science	6. 最初と最後の頁 4936-4953
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms22094936	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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