

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20H03495

研究課題名(和文)蚊媒介性ウイルスによる宿主翻訳抑制の分子機序解明

研究課題名(英文)Elucidation of protein translation shutoff by mosquito-borne flavivirus

研究代表者

岡本 徹 (TORU, OKAMOTO)

順天堂大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：80628595

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：これまでにフラビウイルス科に属する日本脳炎ウイルス(JEV)、デングウイルス(DENV)、ジカウイルス(ZIKV)感染細胞が誘導する細胞死の機序を検討したところ、感染細胞ではATPの低下によるウイルス感染細胞の蛋白質合成阻害が起因していることを明らかにし、ウイルスがATPを奪う代謝経路を同定した。さらには、ウイルスが利用する代謝経路を別の代謝経路からATPを供給することによって、ATP枯渇が起きず、長期に渡りウイルスを産生できることが明らかになった。これらの成績から、フラビウイルスが感染細胞において増殖に必須のATPの取得メカニズムが明らかになることができたと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ウイルス感染によるATP制御機構はこれまでに不明であった。本研究では、フラビウイルスが自身の増殖において特定の代謝経路で産生されるATPを利用していることを明らかにし、その代謝経路からATPが奪われることで、蛋白質翻訳活性の低下や細胞死が誘導されることを明らかにすることができた。さらに、同定した代謝経路とは別の代謝経路から産生されるATPが存在することで、ウイルス感染細胞はATPを維持することができることを見出した。このような研究は、ウイルスによるATPの利用方法を見出しただけでなく、効率の良いウイルス産生に繋がる研究成果でありワクチン生産の点からも意義がある研究であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：It has been elucidated that a decrease in ATP in infected cells leads to inhibition of protein synthesis in virus-infected cells. This suggests that viruses alter host cell metabolism to deprive ATP, thereby reducing the survival capacity of host cells and promoting virus replication. Furthermore, it is noteworthy that the viral metabolic pathway for ATP deprivation has been identified. It has been demonstrated that viruses can avoid ATP depletion by supplying ATP from other metabolic pathways, enabling prolonged virus production. This understanding sheds light on the mechanism by which viruses utilize host cell metabolic pathways to secure energy for their own replication.

These findings represent an important step towards elucidating the mechanism by which Flaviviruses acquire ATP within infected cells. Future research is expected to further elucidate how these mechanisms are involved in virus replication and pathogenicity.

研究分野：ウイルス学

キーワード：日本脳炎ウイルス デングウイルス ATP ワクチン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

フラビウイルス科に属する日本脳炎ウイルスやデングウイルス、ジカウイルスは一本鎖のプラス鎖の RNA をゲノムとして持ち、その mRNA を翻訳してウイルス蛋白質を合成している。本研究実施者は、これまでにフラビウイルス感染は宿主の翻訳活性を阻害することを明らかにしているが、その分子機序は不明である。フラビウイルス感染細胞の翻訳低下のメカニズムの解明は、感染細胞の生存やウイルスの増殖機構の理解にも繋がる応用性の高い研究であると考えた。

2. 研究の目的

日本脳炎ウイルスやデングウイルスが属するフラビウイルスに感染した細胞では、翻訳機能が低下して細胞死が誘導されることが知られているが、その分子機序は明らかにされていない。本研究実施者は、これまでにフラビウイルス感染が宿主細胞のエネルギー通貨として知られる ATP を枯渇させることを見出している。ATP の枯渇は、細胞の翻訳機能を阻害させることから、フラビウイルス感染細胞における翻訳機能にも影響すると考えた。そこで本研究では、フラビウイルス感染細胞の翻訳制御をエネルギー代謝の観点から検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) フラビウイルス感染がエネルギー代謝制御に与える影響

細胞外フラックスアナライザーを用いて、フラビウイルス感染細胞の ATP 産生経路である解糖系活性とミトコンドリア活性を測定し、フラビウイルス感染によるエネルギー代謝への影響を検討した。

(2) フラビウイルス感染細胞を用いたメタボローム解析

フラビウイルス感染が各種代謝経路に与える影響を検討するため、フラビウイルス感染細胞と非感染細胞から代謝産物を抽出し、質量分析により代謝産物量を定量し、感染による代謝物の変動を検討した。

(3) フラビウイルスが利用する ATP 産生に關与する宿主因子の同定

フラビウイルスの複製は小胞体で行われ、小胞体膜を改変して複製複合体を形成し、その内側でウイルス蛋白質と宿主因子の複合体を形成してゲノム複製が進むことが知られている。そこで、細胞質における ATP 産生経路である解糖系に着目した。解糖系に關連する因子のフラビウイルス感染による局在の変化を検討するため、解糖系關連因子、ウイルス由来の 2 本鎖 RNA(dsRNA)、小胞体マーカーを用いた多重染色を実施した。また、解糖系の阻害剤である 2-デオキシグルコース (2-DG) あるいはミトコンドリア呼吸における ATP 合成酵素阻害剤の Oligomycin をフラビウイルス感染細胞に処理して、感染性ウイルス粒子の産生への影響を検討した。

(4) フラビウイルス感染細胞における mTORC1 を介した翻訳關連因子

フラビウイルス感染により、細胞内 ATP の枯渇が確認されている。そこで、栄養状態を感知して、翻訳を制御する mTORC1 に着目した。非感染細胞とフラビウイルス感染細胞を用いて、mTORC1 の下流であり翻訳制御に關わる S6 蛋白質や 4EBP1 のリン酸化状態の変化を FACS により検出した。

4. 研究成果

本研究項目は、フラビウイルス感染細胞におけるエネルギー代謝に着目して研究を進めた。フラビウイルス感染は細胞内の ATP を顕著に減少させることをこれまでに明らかにしている。そこで、感染細胞における ATP 産生経路への影響を検討するため、細胞外フラックスアナライザーを用いて解糖系活性とミトコンドリア活性を測定したところ、感染 2 日後には解糖系活性とミトコンドリア活性の両方が顕著に低下することが示され、エネルギー代謝異常が生じていることが明らかになった (図 1)。

そこで、フラビウイルス感染細胞の代謝異常をより詳しく検討するために、メタボローム解析を実施し、特にATP産生に関わる代謝経路の代謝産物の定量を行なった。その結果、ミトコンドリアでの反応であるTCAサイクルの代謝産物、SuccinateやFumarateが顕著に減少していることが示された。TCAサイクルの代謝産物の減少は、ミトコンドリア呼吸の材料の貯蓄量の減少であり、ミトコンドリアにおけるATP産生量の減少に繋がっていると考えられる。このように宿主細胞の代謝異常が細胞質の解糖系とミトコンドリアの両方で生じている一方で、

ウイルスはどのような方法で宿主のATPを奪取しているのかを次に検討することにした。フラビウイルスの複製は小胞体で進むため、ミトコンドリアで産生されたATPを利用するよりも、解糖系由来のATPの方が効率的に宿主から奪取できると考え、解糖系に関わる因子のフラビウイルス感染による蛋白質局在の変化を免疫染色により確認したところ、解糖系に関連する因子の1つがフラビウイルス感染により局在が変化し、ウイルス由来のdsRNA、小胞体マーカーと共局在することが明らかになった。さらに、解糖系の阻害剤である2-DGあるいはミトコンドリア呼吸におけるATP合成酵素阻害剤のOligomycinをフラビウイルス感染細胞に処理して、ウイルス産生への影響を検討した。その結果、オリゴマイシン処理では細胞内のATPが減少しているにもかかわらず、ウイルス産生はコントロールと同程度であったのに対して、2-DG処理では感染性ウイルス粒子の産生が有意に減少することが示された(図2)。これらの結果から、フラビウイルスは解糖系に関連する因子を利用して、解糖系で産生されたATPを効率よく利用していると考えられる。その一方で、宿主はミトコンドリア由来のATPを主に利用した結果、解答系とミトコンドリアの両方で代謝異常が生じたと考えている。

ATPの枯渇は、飢餓シグナルのAMP活性化プロテインキナーゼ(AMPK)が活性化されて、mTOR複合体1(mTORC1)を抑制することで翻訳を阻害して細胞内のATPを回復されることが報告されている。そこで、mTORC1のシグナルへの影響を検討した。mTORC1の下流であり翻訳制御に関わるS6蛋白質や4EBP1のリン酸化レベルをFACSにより検出したところ、フラビウイルス感染はS6および4EBP1のリン酸化レベルを有意に低下させており、S6や4EBP1の活性が低下していることが示された(図3)。以上の結果から、フラビウイルス感染により生じるエネルギー代謝異常は翻訳活性低下の要因の一つであると考えられる。

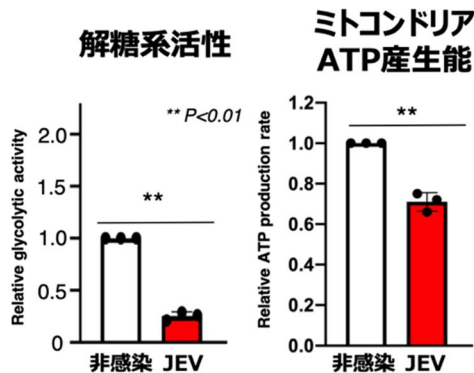


図1. 日本脳炎ウイルス感染によるエネルギー代謝の変化

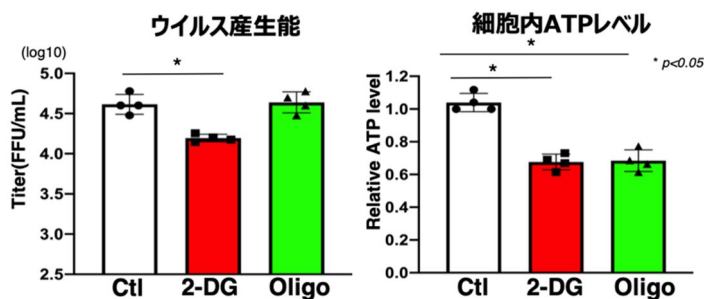


図2. 解糖系の阻害は日本脳炎ウイルスの産生を抑制する

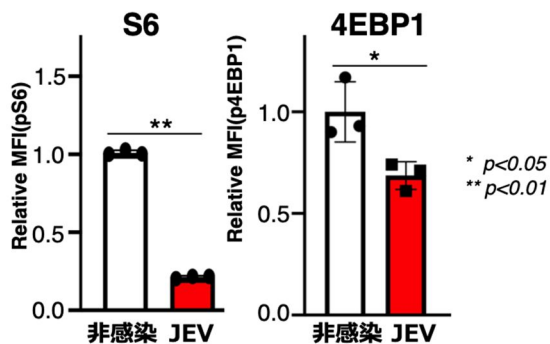


図3. 日本脳炎ウイルス感染がmTORC1シグナルに与える影響

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Miyamoto Y, Itoh Y, Suzuki T, Tanaka T, Sakai Y, Koido M, Hata C, Wang CX, Otani M, Moriishi K, Tachibana T, Kamatani Y, Yoneda Y, Okamoto T, Oka M.	4. 巻 5(1)
2. 論文標題 SARS-CoV-2 ORF6 disrupts nucleocytoplasmic trafficking to advance viral replication	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Commun Biol	6. 最初と最後の頁 483
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-022-03427-4.	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 Zhang H, Itoh Y, Suzuki T, Ihara KI, Tanaka T, Haga S, Enatsu H, Yumiya M, Kimura M, Takada A, Itoh D, Shibasaki Y, Nakao S, Yoshio S, Miyakawa K, Miyamoto Y, Sasaki H, Kajita T, Sugiyama M, Mizokami M, Tachibana T, Ryo A, Moriishi K, Miyoshi E, Kanto T, Okamoto T, Matsuura Y.	4. 巻 66(4)
2. 論文標題 Establishment of monoclonal antibodies broadly neutralize infection of hepatitis B virus.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microbiol Immunol.	6. 最初と最後の頁 179-192
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1348-0421.12964	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 Hirano J, Yoshio S, Sakai Y, Songling L, Suzuki T, Itoh Y, Zhang H, Chen DV, Haga S, Oomori H, Kodama T, Maeda Y, Ono Y, Takahashi Y, Standley DM, Yamamoto M, Moriishi K, Moriya K, Kanto T, Takehara T, Koike K, Matsuura Y, Okamoto T.	4. 巻 118(22)
2. 論文標題 Hepatitis C virus modulates signal peptide peptidase to alter host protein processing	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proc Natl Acad Sci U S A	6. 最初と最後の頁 e2026184118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2026184118	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 -
1. 著者名 Nakae Aya, Kodama Michiko, Okamoto Toru, Tokunaga Makoto, Shimura Hiroko, Hashimoto Kae, Sawada Kenjiro, Kodama Takahiro, Copeland Neal G., Jenkins Nancy A., Kimura Tadashi	4. 巻 552
2. 論文標題 Ubiquitin specific peptidase 32 acts as an oncogene in epithelial ovarian cancer by deubiquitylating farnesyl-diphosphate farnesyltransferase 1	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 120 ~ 127
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.03.049	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 Chen David Virya, Suzuki Tatsuya, Itoh Yumi, Maeda Yusuke, Hirano Junki, Haga Saori, Zhang He, Ito Daiki, Matsuura Yoshiharu, Okamoto Toru	4. 巻 65
2. 論文標題 Denedylation by SENP8 restricts hepatitis B virus propagation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microbiology and Immunology	6. 最初と最後の頁 125 ~ 135
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1348-0421.12874	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 Fauzyah Yuzy, Ono Chikako, Torii Shiho, Anzai Itsuki, Suzuki Rigel, Izumi Takuma, Morioka Yuhei, Maeda Yusuke, Okamoto Toru, Fukuhara Takasuke, Matsuura Yoshiharu	4. 巻 186
2. 論文標題 Ponesimod suppresses hepatitis B virus infection by inhibiting endosome maturation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Antiviral Research	6. 最初と最後の頁 104999 ~ 104999
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.antiviral.2020.104999	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 Fukushima Kiyoharu, Satoh Takashi, Sugihara Fuminori, Sato Yuki, Okamoto Toru, Mitsui Yuichi, Yoshio Sachiyo, Li Songling, Nojima Satoshi, Motooka Daisuke, Nakamura Shota, Kida Hiroshi, Standley Daron M., Morii Eiichi, Kanto Tatsuya, Yanagita Motoko, Matsuura Yoshiharu, Nagasawa Takashi, Kumanogoh Atsushi, Akira Shizuo	4. 巻 52
2. 論文標題 Dysregulated Expression of the Nuclear Exosome Targeting Complex Component Rbm7 in Nonhematopoietic Cells Licenses the Development of Fibrosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Immunity	6. 最初と最後の頁 542 ~ 556.e13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.immuni.2020.02.007	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 Djajawi Tirta Mario, Liu Lei, Gong Jia-nan, Huang Allan Shuai, Luo Ming-jie, Xu Zhen, Okamoto Toru, Call Melissa J., Huang David C. S., van Delft Mark F.	4. 巻 27
2. 論文標題 MARCH5 requires MTCH2 to coordinate proteasomal turnover of the MCL1:NOXA complex	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Death & Differentiation	6. 最初と最後の頁 2484 ~ 2499
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41418-020-0517-0	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2件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 岡本徹
2. 発表標題 ウイルスによる宿主への感染戦略
3. 学会等名 第18回霊長類医科学フォーラム（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岡本徹
2. 発表標題 ウイルス感染における細胞死の制御
3. 学会等名 第 93 回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2020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
研究分担者	奥崎 大介 (Okuzaki Daisuke) (00346131)	大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任准教授 (常勤) (14401)	
研究分担者	宮本 洋一 (Yoichi Miyamoto) (10379084)	国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・医薬基盤研究所 創薬デザイン研究センター・サブプロジェクトリーダー (84420)	

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