

令和 6 年 6 月 15 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K07529

研究課題名(和文) アイチウイルスゲノム複製部位のコレステロール蓄積に必要な宿主・ウイルス因子の解析

研究課題名(英文) Analysis of host and viral proteins required for cholesterol accumulation at the Aichi virus genome replication site.

研究代表者

佐々木 潤 (Sasaki, Jun)

藤田医科大学・医学部・講師

研究者番号：70319268

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)：本研究では、胃腸炎関連ピコルナウイルスであるアイチウイルス(AiV)の複製オルガネラへのコレステロール輸送に関与する新たな宿主因子を見出した。インターフェロン誘導遺伝子の一つ、IFITM1は、多くのウイルスの増殖を阻害するが、アイチウイルスに対してはゲノム複製を亢進することが分かった。タンパク質相互作用解析、AiV複製細胞の免疫染色解析、コレステロール輸送阻害剤を用いた解析などを行った結果、IFITM1がエンドソームからゴルジ体へのコレステロール輸送に関与していることを示唆するデータを得た。IFITM1がピコルナウイルスの複製に関与するという報告はこれが初めてである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

インターフェロン誘導遺伝子であるIFITM1は、多くの場合ウイルス増殖抑制活性を示すが、本研究では逆に、IFITM1がアイチウイルスのゲノム複製を亢進することが明らかとなった。そして、エンドソームからゴルジ体へのコレステロール輸送にIFITM1が関与していることを明らかにし、このことが、ウイルス複製を亢進する要因だと考えられた。IFITM1のこのようなウイルスゲノム複製亢進機構、およびIFITM1がエンドソーム-ゴルジ間コレステロール輸送に関与することについては、これまで報告されていない新知見であり、ウイルスゲノム複製研究および自然免疫機構研究において有意義な発見であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we found a new host factor involved in cholesterol transport to the replication organelle of Aichi virus (AiV), a gastroenteritis-associated picornavirus. One of the interferon-stimulated genes, Interferon induced transmembrane protein 1 (IFITM1), which is known to inhibit replication of many viruses, was found to enhance genome replication for AiV. Protein-protein interaction analysis, immunostaining analysis of AiV replicating cells, and analysis using cholesterol transport inhibitors provided data suggesting that IFITM1 is involved in the transport of cholesterol from endosomes to the Golgi. This is the first report that IFITM1 is involved in picornavirus replication.

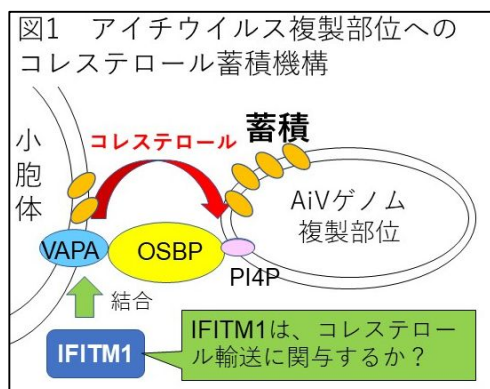
研究分野：ウイルス学

キーワード：アイチウイルス ピコルナウイルス IFITM1 ゲノム複製 複製オルガネラ コレステロール

1. 研究開始当初の背景

アイチウイルス (AiV) は、1989年の愛知県における牡蠣関連胃腸炎集団発生事例の患者便から初めて分離された。ゲノムは一本鎖プラス鎖 RNA で、塩基配列解析の結果、1998年にピコルナウイルス科の新属、コブウイルス属に分類された。日本のみならず世界各地で胃腸炎患者から検出されている。頻度は高くないが、AiV 以外に胃腸炎の原因となる細菌やウイルスが検出されていない事例が存在し、胃腸炎の原因となっていることが示唆されている。

AiV を含むプラス鎖 RNA ウイルスは、感染細胞内の細胞内小器官の膜を再編成し、ウイルスゲノム複製の場 (ピコルナウイルスでは、複製オルガネラと呼ばれる) を構築する。この過程で様々な宿主タンパク質、細胞内物質輸送機構や脂質代謝機構を利用する。我々は、AiV のゲノム複製に必要な宿主因子を解析した結果、AiV の複製オルガネラは、ゴルジ体膜由来であり、二種類の脂質、ホスファチジルイノシトール-4 リン酸(PI4P)



とコレステロールがゲノム複製オルガネラに蓄積していることを明らかにした。明らかにしたメカニズムは以下のとおりである。まず、ウイルスタンパク質がゴルジタンパク質 ACBD3 を介して PI4P 産生キナーゼ PI4KB をリクルートし、PI4P をゲノム複製部位に産生する。そして、ウイルスタンパク質や ACBD3 がさらにコレステロール輸送タンパク質 oxysterol binding protein (OSBP) や小胞体タンパク質 VAPA をリクルートする。このシステムは、AiV だけでなく、エンテロウイルス属のウイルスでも利用されていることも分かっている。

2. 研究の目的

我々はコレステロールとウイルス増殖の関係から、ある論文に注目した。それは、インターフェロン(IFN)によって発現誘導される IFN 誘導遺伝子群 (interferon-stimulated genes; ISGs) の一つである Interferon-induced transmembrane 3 (IFITM3) が、A 型インフルエンザウイルス (influenza A virus; IAV) に対して、小胞体タンパク質 VAPA と結合することで (コレステロール輸送に関わる VAPA-OSBP 結合に対して競合的に働いて;

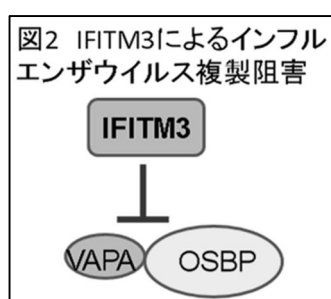


図 2)、感染細胞内のコレステロール代謝阻害を誘導し、エンドソーム内にコレステロールが蓄積させる結果、IAV 複製を抑制するという報告である(Amini-Bavil-Olyae et al., Cell Host Microbe 2013)。上記のとおり VAPA-OSBP 結合を介したコレステロール輸送が AiV ゲノム複製に必須である (図 1) ことから、IFITM が AiV ゲノム複製を阻害することが考えられた。IFITM1、IFITM2、IFITM3 に関して予備実験を行ったところ、興味深いことに、予想

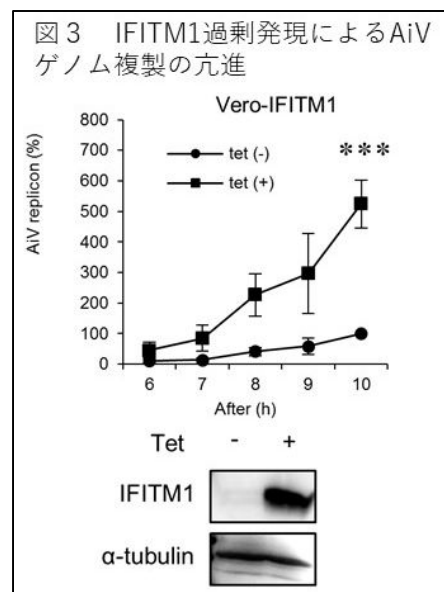
に反して IFITM1 の AiV ゲノム複製亢進作用を示唆するデータを得た。IFITM1 と VAPA が結合することは報告されているが、コレステロール輸送における役割は不明である(図 1)。IFITM3 で報告された VAPA-OSBP 結合競合によるコレステロール代謝阻害とは異なる、コレステロール輸送での何らかの役割が考えられた。従って本研究では、IFITM1 の機能の分子機構の理解を深めることを目指して、IFITM1 のコレステロール輸送における役割および AiV 複製調節のメカニズムの解明を研究目的とする。

3. 研究の方法

- 1) AiV 複製における IFN の効果と IFITM1 の発現の調査
- 2) siRNA を利用した IFITM1 のウイルス複製への詳細な評価。
- 3) 種々のコレステロール輸送阻害剤や siRNA を利用し、AiV ゲノム複製に影響を与えるコレステロール輸送のステップを解析する。
- 4) ウイルスゲノム複製やコレステロール輸送に関わる宿主タンパク質と IFITM1 の相互作用解析や細胞内共局在の調査
- 5) IFITM1 発現誘導細胞を作製し、発現誘導による変化(ウイルス複製やコレステロール輸送・蓄積の変化、種々のコレステロール輸送阻害剤による阻害効果の回復など)の解析

4. 研究成果

- 1) Tet 誘導 IFITM1 過剰発現細胞を作成し、AiV RNA の複製を調査したところ、IFITM1 過剰発現により AiV RNA の複製が亢進することが明らかとなった(図 3)。
- 2) 一方 siRNA による IFITM1 のノックダウンにより、複製が有意に減少した。
- 3) レプリコン RNA をトランスフェクションした細胞、あるいは AiV を感染させた細胞では、内在性の IFITM1 はウイルス RNA 複製部位に局在した。
- 4) IFITM1 は、複製オルガネラを構成するウイルスタンパク質や宿主ゴルジ体タンパク質、ACBD3、PI4KB、OSBP と相互作用した。
- 5) IFITM1 を過剰発現させると、IFITM1 は従来知られているエンドソーム局在だけでなく、ゴルジ体にも局在することが分かった。この IFITM1 のゴルジ体局在は、AiV RNA 複製の初期における内因性 IFITM1 でも観察された。
- 6) 化合物によるエンドソームコレステロール輸送の阻害は、AiV RNA 複製と複製部位へのコレステロール蓄積を減少させた。興味深いことに、この阻害効果は、IFITM1 の過剰発現によって改善されることが分かった。
- 7) 過剰発現された IFITM1 は、ウイルス非感染下においても後期エンドソーム-ゴルジ体コレステロール輸送を促進した。



以上の結果から、IFITM1 がエンドソームからゴルジ体へのコレステロール輸送を促進

し、ゴルジ体由来の複製部位にコレステロールを蓄積させることが示唆された。これにより、IFITM1 が AiV のゲノム複製を亢進させる作用があるものと考えられた。IFITM1 が非エンベロープ型 RNA ウイルスの効率的なゲノム複製を可能にする新しいメカニズムを明らかにするとともに、IFITM1 がエンドソームからゴルジ体へのコレステロール輸送を促進するという、IFITM1 の新たな機能を持つ可能性を提示することができた。

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 ISHIKAWA-Sasaki Kumiko, Murata Takayuki, Sasaki Jun	4. 巻 19
2. 論文標題 IFITM1 enhances nonenveloped viral RNA replication by facilitating cholesterol transport to the Golgi	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PLOS Pathogens	6. 最初と最後の頁 e1011383
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.ppat.1011383	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 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐々木球美子, 村田 貴之, 佐々木 潤
2. 発表標題 IFITM1はアイチウイルスゲノムの複製を亢進する
3. 学会等名 第68回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐々木 潤, 佐々木 球美子, 村田 貴之
2. 発表標題 IFITM1はゴルジ体へのコレステロール輸送を促進することでアイチウイルスゲノムの複製を亢進する
3. 学会等名 第70回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2023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
---------------------------	-----------------------	----

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