

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08500

研究課題名（和文）インタラクトーム解析によるトガ・マトナウイルスのゲノム複製機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the genome replication mechanism of Toga and Matona viruses by host-virus interactome analysis

研究代表者

坂田 真史（Sakata, Masafumi）

国立感染症研究所・ウイルス第三部・主任研究官

研究者番号：20600547

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）：ウイルスは感染した細胞内でウイルス遺伝子を発現させ、その翻訳産物であるウイルスタンパク質と様々な細胞内在性タンパクの相互作用によって効率的にゲノムを複製する。本研究では、近傍に位置するタンパク質へビオチンを付加する酵素を風疹ウイルスのゲノム複製を担う非構造タンパク質、p150へ融合させて、そのウイルスタンパク質近傍に存在する細胞内在性タンパク質をビオチン化タンパク質精製と質量分析法により網羅的に同定した。それらタンパク質群とウイルスタンパク質の相互作用ネットワークを解析し、個々の内在性タンパク質のゲノム複製への寄与を評価した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、ウイルス感染における細胞内タンパク質の役割について重要な知見が得られた。特に、風疹ウイルスのゲノム複製に関与する細胞内在性タンパク質の同定は、ゲノム複製機構の理解に繋がると考えられる。ゲノム複製における細胞内在性タンパク質の相互作用機序の理解は、さらに将来の治療・予防戦略の開発に貢献する可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Viruses express their genes in infected cells and efficiently replicate their genomes through interactions between viral proteins and various cellular proteins. In this study, we fused an enzyme that adds biotin to neighboring proteins with p150, a nonstructural protein responsible for rubella virus genome replication. We comprehensively identified cellular proteins in the vicinity of the p150 by purifying the biotinylated proteins and performing mass spectrometry analysis. The interaction network between these proteins and the p150 was analyzed to evaluate the contribution of individual cellular proteins to genome replication.

研究分野：ウイルス学

キーワード：風疹ウイルス ゲノム複製機構 近接ビオチン化酵素 マトナウイルス

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

チクングニアウイルスやシンドビスウイルスが分類されているトガウイルス科と風疹ウイルス (RuV) が分類されているマトナウイルス科には、ヒトに強い病原性を示し、特異的な治療方法が無い公衆衛生上重要なウイルスが多く分類されている。治療方法の確立には病原性を理解する必要があり、そのためにはゲノム複製機構を解明することが重要である。この2科のウイルスはゲノム構造に類似性があり、ゲノム複製機構にも共通性があると考えられている。ウイルスタンパク質が翻訳されて新生なゲノムが複製されるまでの過程では、それを担う非構造タンパク質によって種々の宿主因子がハイジャックされて進行していること、また逆に、相互作用することでゲノム複製を抑制する宿主因子が存在することが予想されている。これまでウイルスタンパク質と相互作用するこれら宿主因子は、主にアフィニティー精製と質量分析法により同定されてきた。しかし、この従来法では精製時に標的タンパク質と相互作用している宿主因子しか同定出来ない制限があり、ゲノム複製過程に関与する宿主因子群の動的な相互作用ネットワークやその全体像はほとんど理解されていない。

2. 研究の目的

トガ・マトナウイルス科ウイルスのゲノム複製過程に関与する宿主因子を網羅的に同定し、その相互作用ネットワークの全体像をインタラクトーム解析により明らかにし、その特徴からゲノム複製に関与する重要な宿主因子候補を選定する。それら因子のゲノム複製における役割を明らかにして、トガ・マトナウイルスのゲノム複製に関与する重要な新規宿主因子を同定することを目的とした。

3. 研究の方法

RuV の非構造タンパク質は p150 と p90 の僅か2種類であり、最も構成が少ないウイルスの1つである。また、p150 は機能性を保持した上で外来性タンパク質と融合させることが可能である。ゲノム複製過程で p150 と相互作用する宿主因子を同定するために、細胞内で近接するタンパク質をビオチン化する近接依存性ビオチン標識酵素 (TurboID) を用いた。TurboID 融合 p150 (p150^{TurboID}) を発現する RuV サブゲノムレプリコン (RuV-Replicon) を構築し、そのゲノム複製過程で p150 と近接する宿主因子を精製し、質量分析法によりビオチン化ペプチド断片として同定した。それら宿主因子群を Metascape (<http://metascape.org>) を用いて、遺伝子オントロロジー解析とインタラクトーム解析を行なった。その結果に基づいて、ゲノム複製に関与する候補宿主因子を選定した。選定した宿主因子を siRNA によってノックダウンして、ウイルス産生とゲノム複製への影響を評価した。

4. 研究成果

1) RuV-Replicon を用いた p150-TurboID 発現と近接したビオチン化タンパク質の同定

ゲノム複製能を持つ RuV-Replicon とそれを基にして作製した RuV-Replicon-p150^{TurboID} を A549 細胞へ発現させた。細胞のビオチン化タンパク質を Streptavidin-HRP を用いてウェスタンブロット (WB) により検出した。p150^{TurboID} を発現させた細胞では、明瞭なシグナルが検出された (図1)。ビオチン化タンパク質を精製し、質量分析法により同定した。その結果、p150 との相互作用が既に報告されている p90 や細胞の分子シャペロンである HSP90α に加えて、159 の宿主因子が対照と比較して有意なものとして抽出された。この宿主因子群のうち、アノテーションが可能であった 156 因子群について、Metascape により遺伝子オントロロジー (GO) 解析とタンパク質間相互作用解析を行なった (図2)。細胞接着、mRNA の代謝制御や RNP 複合体の形成に関わる宿主因子群が上位に濃縮されており、それら因子群が相互作用ネットワークにおいてもクラスターを形成することが示された。

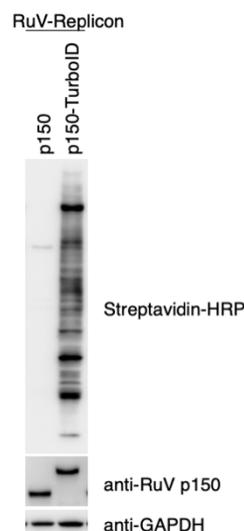


図1 RuV-Repliconを用いたTurboID融合型p150発現によるビオチン化タンパク質の検出

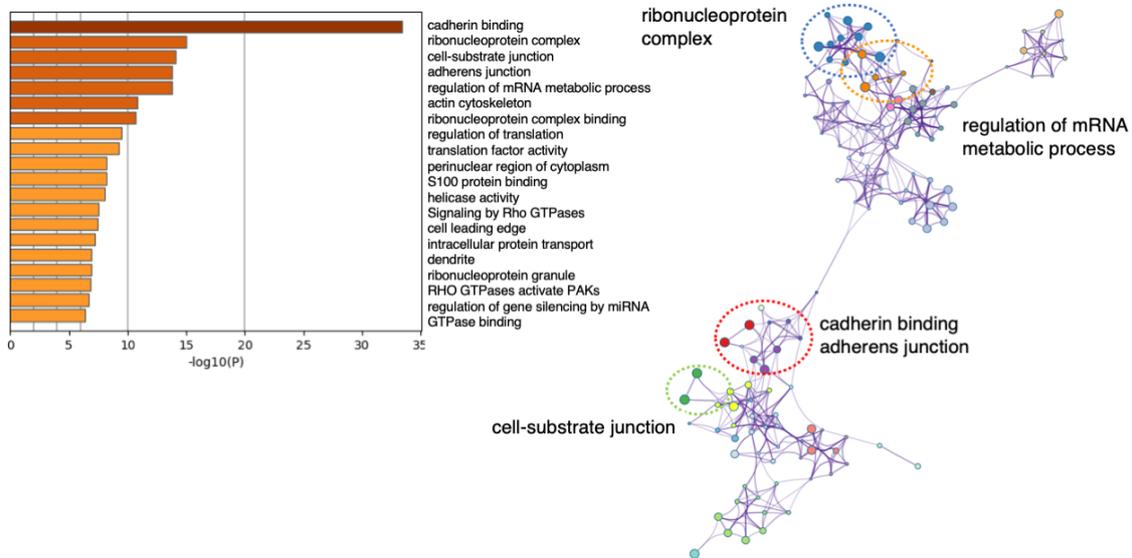


図2 RuV-p150に近接する宿主因子群の機能的分類とタンパク質間相互作用ネットワーク

2) siRNA による候補因子のスクリーニングと p150 との相互作用

GO 解析で上位に濃縮された宿主因子群について、質量分析法によりペプチド断片の検出率が高かった因子を選定し、1 次スクリーニングとしてゲノム複製ならびにウイルス産生への影響を各因子の siRNA を用いて評価した。各因子について 4 つの標的配列を混合した siRNA で A549 細胞を処理した後、感染により NLuc を発現する風疹ウイルス (RuV-P2A-NLuc) と赤色蛍光タンパク質を発現する風疹ウイルス (RuV-P2A-mCherry) を接種して培養した。その後、細胞のルシフェラーゼ活性と培養上清のウイルス力価を測定した(図 3-4)。

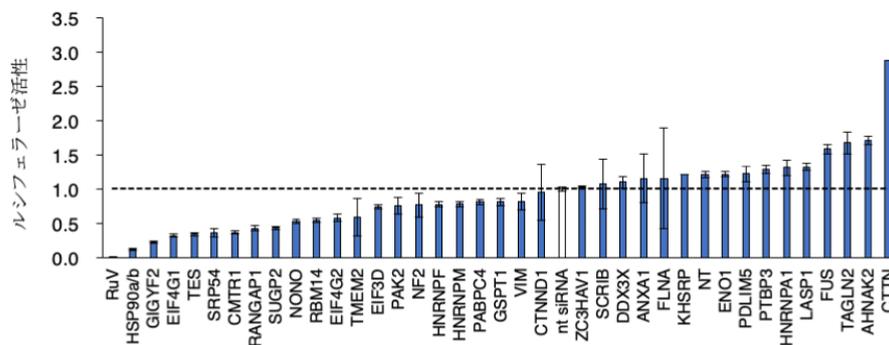


図3 候補因子に対するsiRNA処理によるRuVゲノム複製への影響評価

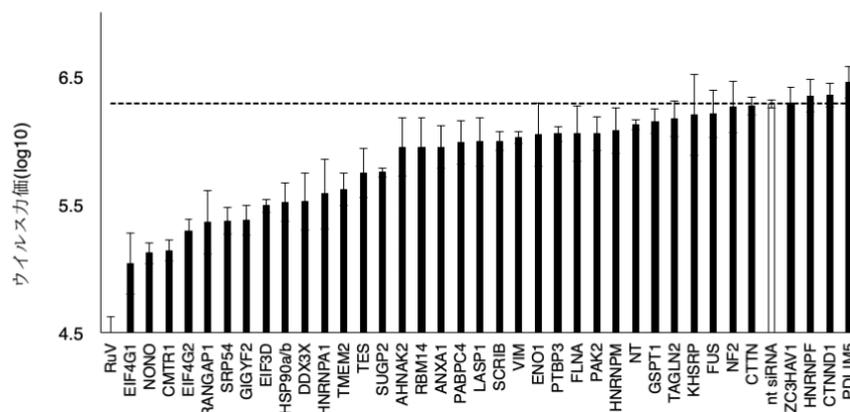


図4 候補因子に対するsiRNA処理による培養上清ウイルス力価への影響評価

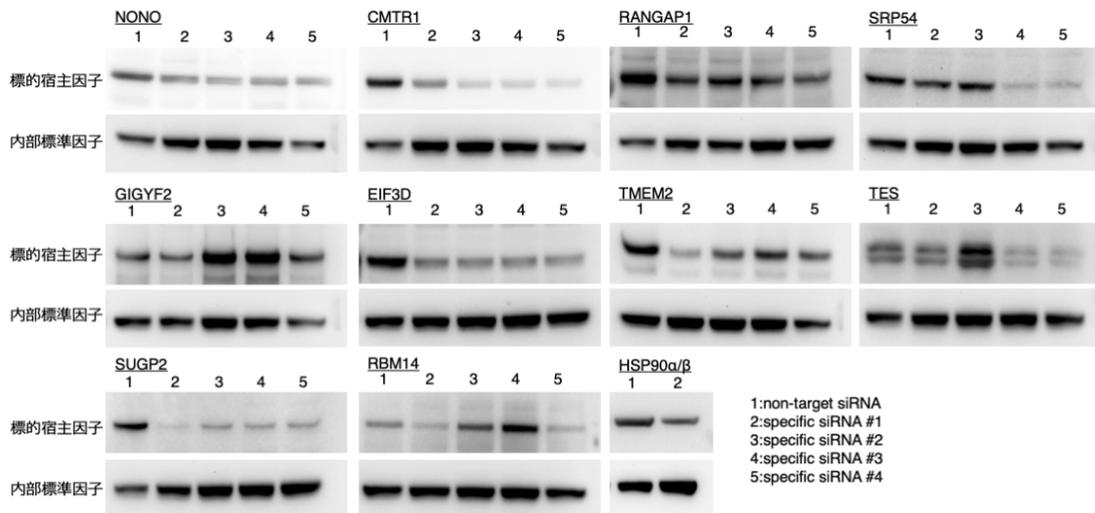


図5 候補因子に対する個別siRNA処理によるタンパク質発現量の評価

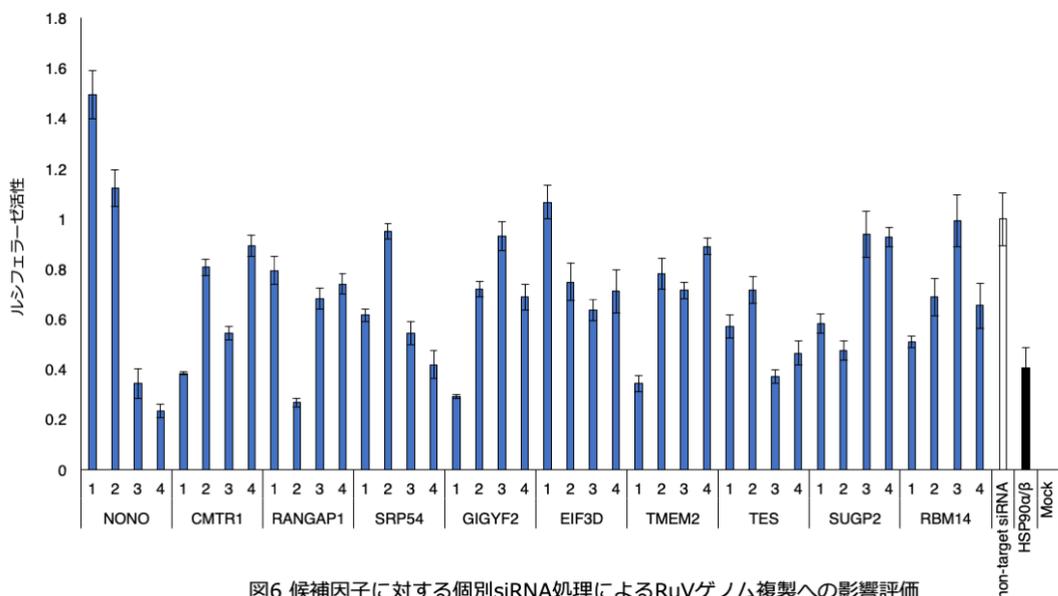


図6 候補因子に対する個別siRNA処理によるRuVゲノム複製への影響評価

ルシフェラーゼ活性と上清力価の有意な低下が認められた 10 因子 (NONO, CMTR1, RANGAP1, SRP54, GIGYF2, EIF3D, TMEM2, TES, SUGP2, RBM14) について、2次スクリーニングとして個々の標的配列 siRNA で A549 細胞を処理し、RuV-P2A-NLuc を接種した。各因子の特異抗体を用いた WB によりタンパク質発現を検出し、感染細胞のルシフェラーゼ活性を測定してゲノム複製への影響を評価した (図 5-6)。RBM14 と SRP54 は、タンパク質発現量とゲノム複製の低下が一致した。SRP54 と RBM14 について、過剰発現系と共免疫沈降法によりそれぞれ p150 との相互作用を検討したが、各因子共に p150 との相互作用は認められなかった (図 7)。

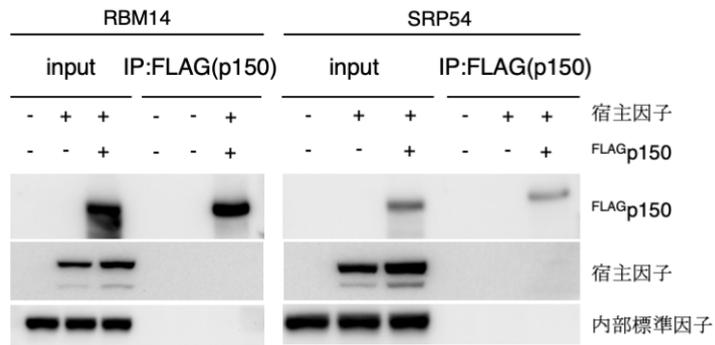


図7 候補因子とRuV-p150の相互作用解析

本研究の解析により RuV のゲノム複製過程で p150 が近接する宿主因子群の包括的なタンパク質間相互作用ネットワークを示した。同定した因子には翻訳に関わる因子群に加えて p150 のフォールディングに関与することが報告されている HSP90 α やゲノム複製過程で相互作用する非構造タンパク質 p90 が含まれていた。したがって、p150 が翻訳され、機能性を獲得し、ゲノムを複製する過程に関与する因子群を網羅的に同定できていることが示唆された。しかし、これら同定した因子群は p150 との近接を指標としているため、相互作用が直接的であるか間接的なのか、また結合親和性については不明瞭である。実際に siRNA のスクリーニングによりゲノム複製への関与が強く示唆された SRP54 や RBM14 についても、共免疫沈降法では相互作用は観察されなかった。同定した候補因子の重要性をさらに解明するためには、細胞内局在や感染細胞におけるライブイメージが必要だと考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 坂田真史
2. 発表標題 哺乳類細胞遺伝子発現ベクターを用いた風疹ウイルスリバースジェネティクス系の構築
3. 学会等名 日本ウイルス学会
4. 発表年 2021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
---------	---------