

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25461510

研究課題名(和文) チクングンヤウイルス感染受容体及び感染関連細胞性因子の同定

研究課題名(英文) Determination of cellular factors involved in chikungunya virus infection

研究代表者

田中 淳(Tanaka, Atsushi)

大阪大学・微生物病研究所・特任講師(常勤)

研究者番号：20321953

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：チクングニアウイルス(CHIKV)の感染関連遺伝子の網羅的同定を目的とし、Brummelkampらが開発したヒト一倍体HAP1細胞にエクソトラッピングベクターを挿入する方法で変異細胞ライブラリーを作製し、これにCHIKVのE3-E1膜タンパク質を有する水疱性口内炎ウイルスのシュドウイルスを接種し、感染抵抗性細胞の特異的濃縮を行った。感染抵抗性細胞群と対照細胞群において、挿入されたベクターの近傍遺伝子配列を次世代シーケンサーで解析することにより、感染関連候補遺伝子の網羅的選定を行った。その結果ヘパラン硫酸鎖のN硫酸基修飾がCHIKVの標的細胞への結合に非常に重要であることを明らかにできた。

研究成果の概要(英文)：The molecular mechanisms underlying chikungunya virus (CHIKV) infection are poorly characterized. In this study, we analyzed the host factors involved in CHIKV infection using genome-wide screening. Human haploid HAP1 cells, into which an exon-trapping vector was introduced, were challenged with a pseudotyped vesicular stomatitis virus expressing the CHIKV-E envelope proteins. The genes inserted with the exon-trapping vector were identified using a next-generation sequencer. By the comparison of collected cell pool with control one, specifically enriched genes in the mutant cell pool were selected as candidate genes involved in CHIKV infection. We identified several genes functioning in the heparan sulfate (HS) biosynthesis pathway, and found that the N-sulfation of the glucosamine residue of HS, catalyzed by NDST1 is essential for efficient binding of CHIKV to target cells.

研究分野：virology

キーワード：chikungunya virus heparan sulfate

1. 研究開始当初の背景

チクングンヤ熱はトガウイルス科アルファウイルス属に属するチクングンヤウイルスによる感染症で、アフリカ、インド洋島嶼国、インド、東南アジアの熱帯・亜熱帯地域を中心として流行がみられている。ヒトからヒトへのチクングンヤウイルスの直接的な感染はないが、チクングンヤウイルスを保有するヤブカ属のネッタシマカ、ヒトスジシマカなどにヒトが刺されることで感染する。2005年には、ヒトスジシマカを媒介蚊として、コモロ諸島で流行がおり、コモロ諸島に近いレユニオン島では、2005年の3月から2006年の2月までの期間に、15万人以上の患者が発生し、死者237人が報告されている。ヒトスジシマカは日本では沖縄地方から東北地方まで広く生息が確認されており、また急性期の患者の血液にはチクングンヤウイルスが多く含まれることから、媒介蚊の活動が活発な夏期に、流行地からの保菌者の日本への渡航や、蚊の伝搬を契機とした国内感染の発生に注意が必要である。

チクングンヤウイルスの潜伏期間は3~12日(通常3~7日)で、患者の大多数は急性熱性疾患の症状を呈し、発熱と関節痛が必発する。また重症例では神経症状(脳症)や劇症肝炎が報告されている。関節痛は四肢(遠位)に強く対称性で、その頻度は手首、足首、指趾、膝、肘、肩の順であり、関節の炎症や腫脹を伴う場合もある。関節痛は急性症状が軽快した後も、数週間から数ヶ月にわたって続く場合がある。

チクングンヤウイルスのヒト細胞への感染機構については明らかでなく、チクングンヤウイルスに対する予防薬や、ワクチンも開発されていない。

2. 研究の目的

チクングンヤウイルスのヒト細胞への結合機構ならびに侵入機構を明らかにすることを目的とし、ヒト細胞におけるチクングンヤウイルス感染受容体及び感染関連細胞性因子を同定する。

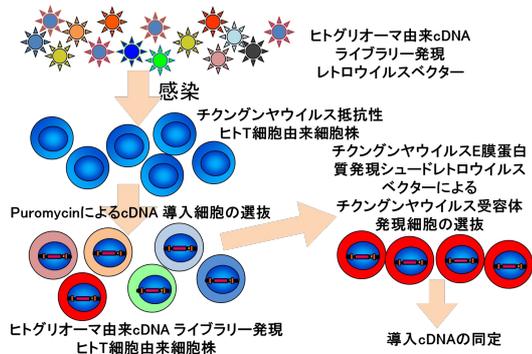
3. 研究の方法

(1) チクングンヤウイルス感染受容体及び感染関連細胞性因子の発現クローニング

チクングンヤウイルス感染に高感受性と考えられているヒトグリオーマ由来細胞株より、mRNAを抽出し、cDNAを合成したのち、レトロウイルスベクタープラスミドにクローニングする。このヒトグリオーマ由来cDNA発現レトロウイルスベクタープラスミドと、レトロウイルスgag-pol発現ベクター、並びに水疱性口内炎ウイルス膜蛋白質遺伝子とを293T細胞株にコトランスフェクトするこ

とで、ヒトグリオーマ由来cDNAライブラリーを発現するレトロウイルスベクターを作出する(図1)。これらヒトグリオーマ由来cDNAライブラリー発現レトロウイルスベク

図1 チクングンヤウイルス受容体の発現クローニング



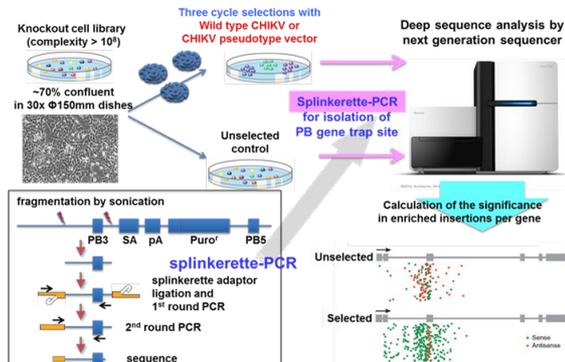
とをチクングンヤウイルスに最も抵抗性であるT細胞由来の細胞株に感染させ、レトロウイルスベクターの持つ薬剤耐性遺伝子(puromycin)を指標に選抜を行い、ヒトグリオーマ由来cDNAライブラリー発現ヒトT細胞由来の細胞株を作出する。ウイルスベクターを用いたチクングンヤウイルス感染受容体発現細胞の選抜方法として、チクングンヤウイルスE膜蛋白質をウイルス粒子表面に持つ薬剤抵抗性遺伝子発現シュードレトロウイルスを感染させた後、薬剤を培養に添加することで、ウイルスベクターの感染が成立した細胞株を選抜する。

選抜できたチクングンヤウイルス感染感受性の更新した細胞から、ゲノムDNAを回収し、cDNAを導入したレトロウイルスベクターの配列をもとに、導入してあるcDNAうちをPCR法により回収し、その塩基配列を決定し、チクングンヤウイルス感染受容体を同定する。

(2) チクングンヤウイルスの感染に関連する遺伝子の網羅的同定

Brummelkampらが開発したヒト一倍体HAP1細胞にエクソントラッピングベクターを挿入する方法で変異細胞ライブラリーを作製する(図2)。この変異細胞ライブラリーにチクングンヤウイルスE膜蛋白質をウイルス粒

図2 Outline of the haploid genetic screen to identify host factors for CHIKV entry



子表面に有する水疱性口内炎ウイルスのシ

ユードウイルスを接種し、ウイルス感染の成立した感受性のある細胞に細胞死を起こさせる。ウイルスに感受性がなく、感染が成立せず細胞死を免れ生き残ってきた細胞はチクングンヤウイルス感染受容体もしくは感染関連細胞性因子が欠失した変異細胞株であると考えられるため、これら生存細胞を回収し、エクソントラッピングベクターが挿入されノックアウトされている遺伝子を、次世代シーケンサーを用いたゲノムワイドスクリーニングで検出及び同定を行う(図2)。

#### 4. 研究成果

研究方法(1)の発現クローニング法において、チクングンヤウイルス感染受容体及び感染関連細胞性因子の遺伝子候補を得ることが出来なかった。

研究方法(2)の次世代シーケンサーを用いたゲノムワイドスクリーニングではチクングニアウイルスE膜蛋白質を有する水疱性口内炎ウイルスのシュードウイルス感染に抵抗性の生存細胞を得ることが出来た。次に、感染抵抗性細胞群と対照細胞群において、エクソントラッピングベクターの近傍遺伝子配列を次世代シーケンサーで決定し包括

Table 1 Genes involved in CHIKV infection, identified with genome-wide screening

FDR	Enriched candidate gene	#	§	‡	FDR for genes reported by Jae et. al. (‡)
1.87E-235	EXT1	■			0
1.94E-129	TM9SF2		■		2.67E-138
1.70E-127	EXT2	■			3.14E-164
1.46E-68	COG5		■		5.81E-47
2.29E-66	PTAR1		■		4.90E-263
9.32E-64	TMEM165	■	■		2.18E-62
1.99E-61	COG3		■		4.43E-21
2.26E-37	TMED10		■		0.898
1.82E-26	COG4	■	■		1.42E-50
3.60E-26	COG6		■		3.72E-14
4.01E-24	NDST1	■			1.57E-233
1.08E-22	SLC10A7		■		0.893
1.05E-20	SLC39A9		■		0.00199
8.25E-19	COG7		■		9.60E-68
5.17E-17	COG2	■	■		1.96E-13
6.59E-15	MIA3		■		1
7.97E-12	TMED2		■		0.24
1.12E-11	MON2		■		1
9.75E-11	EXTL3	■			1.24E-311
2.70E-08	SACM1L		■		3.05E-15
0.000177	FAM20B	■			5.04E-29
0.000181	COG1	■	■		7.69E-10
0.000288	KIAA1432		■		1
0.000752	MBTPS2		■		1
0.00128	COG8	■			
0.00267	TM9SF3		■		1
0.00898	ARHGEF26		■		
0.032	ROCK2		■		1
0.0479	B3GAT3	■			6.78E-103

# Enzymes in the HS biosynthetic pathway

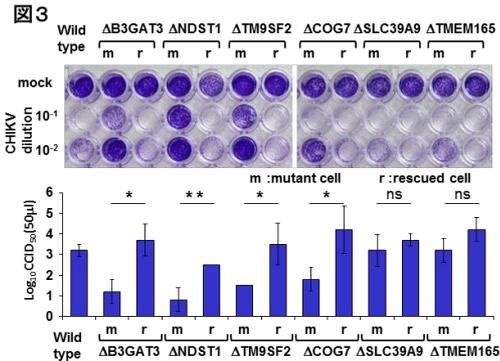
§ Genes associated with congenital disorders of glycosylation

‡ HS-expression-related genes reported by Jae et al.

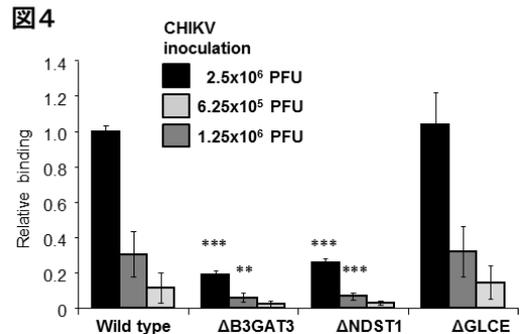
的に解析比較することによって、感染関連候

補遺伝子の網羅的選定を行った。検出された候補遺伝子は、ヘパラン硫酸合成に参与する酵素蛋白質群、ヘパラン硫酸発現への関与が報告されている非酵素蛋白質群、ヘパラン硫酸との関連が不明な蛋白質群の3つのカテゴリーに分けられた (Table 1)。

それぞれの候補遺伝子を選定後、それぞれの遺伝子を Cas9/CRISPR のシステムにより野生細胞株において破壊し、ウイルス感染抵抗性を評価した (図3)。



またヘパラン硫酸鎖における糖鎖修飾経路の硫酸基修飾において、グルコサミンの N-アセチル基を脱アセチル化し、硫酸基を転移させる酵素、N-脱アセチル/N-硫酸転移酵素 (NDST1) による修飾がチクングニアウイルスの標的細胞へ結合に重要であることを明らかにできた(図4)。



本研究からチクングンヤウイルス感染において、ウイルス粒子と細胞表面グリコサミノグリカンとの結合は従来考えられていたものより複雑であり、標的細胞の発現しているヘパラン硫酸の構造に強く影響をうけることが考えられた。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計 9件)

発表者

Atsushi Tanaka, Uranan Tumkosit, Sumalee Chanama, Atchareeya A-nuegoonpipat, Pornsiri Somasa, Naokazu Takeda, Areerat Sa-ngasang

発表表題  
Determination of the cellular factors affecting to the chikungunya virus propagation  
学会名 新興・再興感染症に関するアジア・アフリカリサーチフォーラム  
発表年月日 2014年1月20-22日

発表者

Atsushi Tanaka, Uranan Tumkosit, Sumalee Chanama, Atchareeya A-nuegoonpipat, Pornsiri Somasa, Naokazu Takeda, Areerat Sa-ngasang

発表表題  
Challenges in probing cellular factors for chikungunya virus replication  
学会名 2014年国際微生物学会議(IUMS 2014)  
発表年月日 2014年7月27-8月1日

発表者

Atsushi Tanaka, Uranan Tumkosit, Sumalee Chanama, Atchareeya A-nuegoonpipat, Pornsiri Somasa, Naokazu Takeda, Areerat Sa-ngasang

発表表題  
キリングアッセイによるチクングニアウイルス感染関連細胞性因子の探索  
学会名 第62回日本ウイルス学会学術集会  
発表年月日 2014年11月10-12日

発表者

Uranan Tumkosit, Hiroko Omori, Yusuke Maeda, Pathompong Sittisaman, Naokazu Takeda, and Atsushi Tanaka

発表表題  
Visualization of binding and localization of chikungunya virus on cell surfaces using green fluorescent protein-tagged virus-like particles  
学会名 14th Awaji International Forum on Infection and Immunity  
発表年月日 2015年9月8-11日

発表者

Yusuke Maeda, Shota Nakamura, Daisuke Motooka, Uranan Tumkosit, Shigeyuki Hamada, Taroh Kinoshita, Naokazu Takeda, Atsushi Tanaka

発表表題  
Genome-wide screening of genes involved in Chikungunya virus infection  
学会名 14th Awaji International Forum on Infection and Immunity  
発表年月日 2015年9月8-11日

発表者 Uranan Tumkosit, Hiroko Omori, Yusuke Maeda, Pathompong Sittisaman,

Naokazu Takeda, and Atsushi Tanaka

発表表題  
Green fluorescent protein-tagged chikungunya virus-like particles for analysis of virus-cell interactions  
学会名 第63回日本ウイルス学会学術集会  
発表年月日 2015年11月22-24日

発表者 前田 裕輔, 中村 昇太, 元岡 大祐, Tumkosit Uranan, 木下 タロウ, 武田 直和, 田中 淳

発表表題  
複数経路の糖鎖修飾に関係する新規タンパク質の同定ならびにその機能解析  
学会名 BMB2015(第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会 合同大会)  
発表年月日 2015年12月1-4日

発表者

田中 淳, 中村 昇太, Uranan Tumkosit, 元岡 大祐, 木下 タロウ, 武田 直和, 前田 裕輔

発表表題  
チクングニアウイルス感染関連遺伝子の網羅的同定  
学会名 BMB2015(第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会 合同大会)  
発表年月日  
2015年12月1-4日

発表者 Atsushi Tanaka, Uranan Tumkosit, Shota Nakamura, Daisuke Motooka, Natsuko Kishishita, Thongkoon Priengprom, Areerat Sa-ngasang, Taroh Kinoshita, Naokazu Takeda, Yusuke Maeda

発表表題  
Minimum heparan sulfate structure for chikungunya virus binding and infection to the target cells  
学会名 第64回日本ウイルス学会学術集会  
発表年月日 2016年10月23-25日

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

田中 淳 (TANAKA ATSUSHI)

大阪大学 微生物病研究所 特任講師  
研究者番号: 20321953

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号:

### (4) 研究協力者

( )