

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26660227

研究課題名(和文)革新的な細胞ゲノム改変技術を用いたウイルス増殖制御因子の同定

研究課題名(英文) Identification of cellular factors responsible for virus growth by a novel genome editing technology

研究代表者

堀本 泰介 (Horimoto, Taisuke)

東京大学・農学生命科学研究科・教授

研究者番号：00222282

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)： ウイルスの増殖には宿主細胞の様々な細胞性因子が必須である。本研究では、新規のゲノム編集テクノロジーであるCRISPR/Cas9システムとウイルスベクターを融合させ、ウイルス増殖を制御する細胞性因子の探索を試みた。ランダム標的gRNA/Cas9発現レトロウイルスベクターライブラリーを培養細胞に感染させた後、インフルエンザおよびアカバネウイルスの感染に耐性となる細胞を樹立した。インフルエンザウイルスの新規の増殖関連因子の同定には至らなかったが、アカバネウイルスの細胞への侵入に關与する耐性細胞の解析から、ヘパラン硫酸プロテオグリカンが重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)： Cellular factors are essential for viral growth. To identify these factors, we used a novel genome editing CRISPR/Cas9 system in combination of viral vectors. We constructed a retroviral vector library expressing random targeting gRNA/Cas9 and infected cell culture with the library. Then, following infection of influenza or Akabane virus, we selected cells resistant to virus infections. Through these procedures, we identified heparan sulfate proteoglycan as an cellular attachment factor for Akabane virus.

研究分野：獣医ウイルス学

キーワード：ウイルス CRISPR/Cas9

1. 研究開始当初の背景

偏性細胞内寄生体であるウイルスの増殖には宿主細胞の様々な細胞性因子が必須である。これら宿主因子の同定と詳細な解析はウイルスの生活環、病原性を理解するうえで欠かせない。しかし、一部のウイルスで同定された因子は氷山の一角に過ぎず、その機能も予想の範疇に収まる。このようなウイルス増殖を制御する宿主因子の解析における隘路はその同定手法の制限である。例えば、常法である精製ウイルスタンパク質との共沈/MS解析法やYeast two-hybrid法などは過剰発現に伴う非特異的な結合が解析の信頼性を低下させ、また、変異誘導剤による細胞ゲノムに変異を導入する方法、siRNAによるノックダウン細胞ライブラリー、ハプロイド細胞を用いたノックアウト細胞ライブラリーの網羅的解析によるウイルス増殖関与宿主因子同定の試みは、手法の複雑さや複数導入される変異の解釈がその解析を困難にする。また、標的ゲノム領域が限定されたり、使用できる細胞種も限定されたりするため、適用可能なウイルス種が限られるという欠点もある。

CRISPR/Cas は、本年度初めて報告された細菌の獲得免疫システムを応用した極めて単純なシステムで、12-20 塩基程度の標的ゲノムと相同な認識配列を含む 100 塩基程度の guide RNA (gRNA) と RNA-guided nuclease と呼ばれる Cas9 の 2 種類を細胞に導入することで、染色体の倍数性に関係なくあらゆる哺乳類細胞のゲノム上のほぼ任意の箇所に数塩基の欠損あるいは挿入といった変異を導入することを可能にする技術である。

2. 研究の目的

本研究は、新規の革新的ゲノム編集テクノロジーである CRISPR/Cas システムを、初めてウイルス学の分野に導入するものである。さらに、CRISPR/Cas システムとレトロウイルスベクターを融合させるこれまでに報告のない独自の解析方法を確立し、ウイルス増殖を制御する細胞性因子の網羅的探索に応用する。最終目的は、従来の方法では見つからなかった新規のウイルス抑制細胞因子を同定し、その生物性状を詳細に解析することである。その成果は、新しい抗ウイルス薬、場合によっては汎用性の極めて高い広スペクトル薬剤の開発など臨床や公衆衛生分野へ大きく寄与する可能性がある。また、実験ツールとしても他の研究分野を含めブレイクスルーとなる方法論を提供することが期待できる。

3. 研究の方法

本研究では、新規のゲノム改変技術である CRISPR/Cas システムとレトロウイルスベク

ターシステムを融合させる画期的な着想に基づく方法により、インフルエンザウイルスを中心にウイルスの増殖を制御する細胞性因子の同定と解析を実施する。この方法では、理論上 single-hit の遺伝子ノックアウト細胞ライブラリーを容易に作製でき、その細胞へのウイルス感染により生存する細胞クローンを選択することで、ウイルス増殖に関与する宿主因子(ノックアウト遺伝子産物)を同定できる。同定された細胞性因子はさらに性状解析を進め、ウイルス増殖における役割を明らかにする。

インフルエンザウイルスの増殖を抑制する細胞性因子の探索から開始する。

ランダム標的 gRNA/Cas9 同時発現レトロウイルスベクターの構築とライブラリーの作製。gRNA 発現カセット (PolI プロモーター/20 塩基ランダムゲノム認識配列) と Cas9 発現カセット (CMV プロモーター) を組込んだ、レトロウイルスベクター作製用プラスミドを構築する。プラスミドをパッケージング細胞に導入して、ランダム標的 gRNA/Cas9 同時発現レトロウイルスベクターライブラリーを作製する。

ノックアウト MDCK 細胞ライブラリーの作製。で作製したレトロウイルスベクターライブラリーを MDCK 細胞に感染させ、宿主遺伝子ノックアウト細胞ライブラリーを作製する。確率的に single-hit の変異細胞を作製するため、レトロウイルスベクターが多重感染しない濃度 (30% 程度の感染率) で細胞に感染させる。CRISPR/Cas 発現コンストラクトが細胞にインテグレートされているかをシーケンズ解析で確認する。

インフルエンザウイルス感染耐性細胞クローンの選択。のノックアウト MDCK 細胞ライブラリーに、インフルエンザウイルス実験室株 (A/WSN/33(H1N1)) あるいは鳥インフルエンザ (A/duck/Mongolia/2001(H3N2)) を感染させ、感受性細胞を死滅させる。一方、耐性細胞はコロニーを形成するので回収し、耐性細胞クローンを得る。

インフルエンザウイルスの増殖に必要な細胞性因子の同定と解析。で選択した各耐性細胞クローンに CRISPR/Cas 発現コンストラクトがインテグレートされているかゲノム DNA の PCR で確認後、ゲノム認識配列を決定し、イヌゲノムデータベース上で標的配列候補を BLAST 検索する。CRISPR/Cas システムによるゲノム認識特異性は 3' 側 12 塩基で決定されるので特にその領域を重視する。CRISPR/Cas システムによるゲノム認識配列は 12-20 塩基と短いため、BLAST 検索によって gRNA の標的配列候補が複数挙がる可能性が高い。加えてオフターゲット効果が報告されているため、複数クローンの解析は必須である。各クローンが持つ標的遺伝子から重複する遺伝子を探し、ウイルスの増殖に必要な宿主因子の候補を絞り込む。候補因子の発現プラスミドを作製し、

インフルエンザウイルス耐性細胞に一過性に発現させ、ウイルス感染への感受性が回復するか調べる。感受性を回復させた因子をインフルエンザウイルスの増殖に必要な因子として同定する。同定された細胞性因子の細胞内局在などの性状、ウイルスタンパク質との相互作用などの性状を詳細に解析する。

インフルエンザウイルス以外のウイルスへの適応。同様の戦略によって、家畜に重要な繁殖障害を引き起こすブニヤウイルス科アカバネウイルスの増殖に関する細胞因子を同定・解析する。

4. 研究成果

(1) 20塩基のランダム標的 gRNA/Cas9 を同時に発現するレトロウイルス(マウス白血病ウイルス由来)ベクターおよびレンチウイルス(HIV 由来)ライブラリーを構築し、犬由来 MDCK 細胞に感染させることにより、宿主遺伝子ノックアウト細胞ライブラリーを樹立した。

(2) 樹立した細胞ライブラリーにインフルエンザウイルス WSN 株を感染させ、生存する細胞クローンを選択した。

(3) いずれの細胞株ともインフルエンザウイルスのレセプターであるシアル酸の発現が抑制されていることが示された。つまり、これらの細胞株の表面シアル発現に参与する何らかの宿主遺伝子がゲノム編集により KO されている可能性が示されたが、この知見が既知の報告の範疇であることから、それ以上の追究は行わなかった。

(4) 同様にハムスター由来 HmLu-1 細胞を用いて、宿主遺伝子ノックアウト細胞ライブラリーを作製し、家畜に繁殖障害を引き起こすブニヤウイルス科のアカバネウイルスを感染させ、耐性細胞株を樹立した。

(5) 耐性細胞株を解析するため、継代によるクローン化を行ったところ、ウイルスに対する感受性が回復する現象が見られたため、ゲノム変異部位の解析を試みたが、その同定までには至らなかった。

(6) CRISPR/Cas システムの有効性を検証するために、HmLu-1 細胞を用いてシアル酸合成酵素およびヘパラン硫酸プロテオグリカン合成酵素 EXT2 の KO を行ったところ、期待通りの細胞クローンの樹立に成功した。

(7) 樹立した細胞クローンにアカバネウイルスを感染させたところ、その増殖抑制が認められた(図1)。

(8) ウイルス吸着効率を測定したところ、その抑制が認められた(図2)。

これらの成績から、アカバネウイルスの増殖を抑制する新規の細胞因子としてヘパラン硫酸プロテオグリカンの同定に成功した。

総じて、本研究では、新しいゲノム編集技術である CRISPR/Cas システムにより、ウイ

ルスの増殖必須細胞因子を同定することが可能であることが示された。今後の展開が期待される。

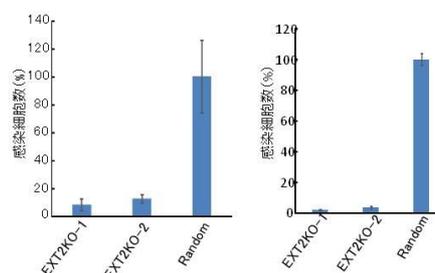


図1ヘパラン硫酸KO細胞におけるアカバネウイルスの増殖

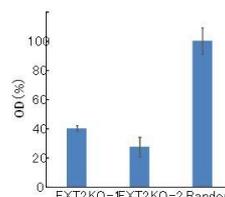


図2ヘパラン硫酸KO細胞へのアカバネウイルスの吸着

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)

[雑誌論文](計 3 件)

Mohamed YM, Bangphoomi N, Yamane D, Suda Y, Kato K, Horimoto T, Akashi H. Physical interaction between bovine viral diarrhea virus nonstructural protein 4A and adenosine deaminase acting on RNA (ADAR). Arch Virol. 2014 159:1735-41.

doi: 10.1007/s00705-014-1997-3.

Murakoshi F, Ichikawa-Seki M, Aita J, Yaita S, Kinami A, Fujimoto K, Nishikawa Y, Murakami S, Horimoto T, Kato K. Molecular epidemiological analyses of Cryptosporidium parvum virus 1 (CSpV1), a symbiotic virus of Cryptosporidium parvum, in Japan. Virus Res. 2016 211:69-72.

doi: 10.1016/j.virusres.2015.09.021.

Suda Y, Fukushi S, Tani H, Murakami S, Saijo M, Horimoto T, Shimojima M. Analysis of the entry mechanism of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, using a vesicular stomatitis virus pseudotyping system. Arch Virol. 2016 Jun;161(6):1447-54.

doi: 10.1007/s00705-016-2803-1.

[学会発表](計 2 件)

須田遊人、大塚旭、村上晋、堀本泰介 牛ウイルス性下痢ウイルス非構造蛋白質のオートファゴゾーム形成誘導の解析 第

158 回日本獣医学会 2015.9.7-9.8 北里
大学(十和田)
村上晋、上間亜希子、加藤健太郎、堀本
泰介 アカバネウイルス感染におけるヘ
パラン硫酸プロテオグリカンの役割 第
158 回日本獣医学会 2015.9.7-9.8 北里
大学(十和田)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀本 泰介 (HORIMOTO, Taisuke)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・
教授
研究者番号：00222282

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：