

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07596

研究課題名(和文) 翻訳制御の番人としてのRyDENによる選択的ウイルスRNA抑制機構の解明

研究課題名(英文) Molecular understanding of the selective suppression of viral RNA by RyDEN - a guardian of translation regulation

研究代表者

鈴木 陽一 (Suzuki, Youichi)

大阪医科薬科大学・医学部・講師

研究者番号：40432330

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、デングウイルスの感染を抑制する宿主因子として同定されたRyDEN/C19orf66のウイルス阻害に至る分子メカニズムの解析をおこなった。その結果、RyDENは、別の細胞性因子(PABPC1, LARP1)やウイルスRNAと複合体を形成することがわかった。また、RyDEN, PABPC1, そしてLARP1は主に細胞質に局在し、PABPC1とLARP1は共局在することが明らかとなった。さらに、RyDENはデングウイルスなどの一本鎖RNAウイルスだけでなく、二本鎖RNAウイルスの増殖も抑制する広域ウイルス阻害分子であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

公衆衛生学的に問題となる病原体にはRNAウイルスが多く含まれるが、現在のところそれらの病原性ウイルスが引き起こす感染症に対しては治療戦略が十分に確立されているとは言えない。本研究では、インターフェロン反応によって発現が誘導されるウイルス阻害分子RyDEN/C19orf66のRNAウイルス抑制の分子メカニズムについて解析をおこなった。本研究によって明らかとなったRyDENの分子機能に着目することで、幅広い抗ウイルス活性をもつ新薬の将来的な開発に繋げることが可能となる。

研究成果の概要(英文)：In this study, the molecular mechanism by which a host factor, RyDEN/C19orf66, inhibits RNA virus replication was investigated. Results showed that RyDEN formed complexes with other cellular factors (PABPC1, LARP1) and viral RNA. Fluorescent microscopy analysis revealed that RyDEN, PABPC1, and LARP1 localized mainly to the cytoplasm, while PABPC1 and LARP1 co-localized. Furthermore, RyDEN was found to be a broad-spectrum cellular inhibitor that suppressed the replication of not only single-stranded RNA viruses, including flaviviruses, but also double-stranded RNA viruses.

研究分野：ウイルス学

キーワード：RyDEN/C19orf66 RNAウイルス ウイルス抑制因子 PABPC1 LARP1 翻訳阻害 オーソログ 構造予測

1. 研究開始当初の背景

公衆衛生的に問題となる病原体には RNA ウイルスが多く含まれる。そして、それらのウイルスにとって RNA 分子は、ゲノムであると同時にウイルスタンパク質合成の鋳型でもある。したがって、ウイルス RNA の翻訳機能に干渉することは、ウイルス RNA の機能阻害ともなり、ウイルス感染症に対する新しい治療戦略の確立にもつながる。研究代表者は、これまでに I 型インターフェロン (IFN) を処理したヒト細胞の mRNA から作製した cDNA ライブラリーを用いた Gain-of-function スクリーニング法によって、蚊媒介性 RNA ウイルスであるデングウイルス (DENV) の増殖を阻害する細胞性因子 C19orf66 を同定し、これを RyDEN (Repressor of yield of DENV) と名付けた。また先行研究の結果より、RyDEN は、DENV のタンパク質翻訳過程に影響を与える可能性が示されたが、その分子機構の詳細は完全には明らかになっていない。

2. 研究の目的

代表者ならびに他の研究グループの結果では、RyDEN は、DENV だけでなく C 型肝炎ウイルス (HCV) の増殖に対しても抑制的に働くことが示されている。DENV と HCV はともにフラビウイルス科に属する一本 (+) 鎖 RNA ウイルスであるものの、ゲノム RNA の構造には大きな違いがみられ、タンパク質翻訳の機構も異なっている。また、代表者の先行研究の結果から、少なくとも培養細胞レベルでは、RyDEN 発現量の変化は、細胞の増殖性には影響を及ぼさないことが明らかとなっている。すなわち、RyDEN は、タンパク質合成の鋳型としての mRNA を非特異的に認識しているのではなく、その RNA 分子がウイルス由来 (もしくは異物由来) であると特異的に識別しているのではないかと推測される。そこで本研究においては、RyDEN/C19orf66 によるウイルス RNA 機能阻害の分子メカニズムの解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1) RyDEN 相互作用分子の解析: N 末端に V5 エピトープタグを融合した RyDEN 発現プラスミドを作製し、ヒト細胞にトランスフェクションしたのち、その細胞ライセートを用いて V5 抗体による免疫沈降をおこなった。免疫沈降サンプルはイムノブロットング法に供し、相互作用因子に対する抗体を用いて検出した。

(2) 細胞内局在解析: C 末端に EGFP を融合した RyDEN を発現するレンチウイルスベクターゲノムを構築し、そのレンチウイルスベクターを HeLa 細胞にトランスダクションすることによって、GFP-RyDEN を安定的に発現する細胞株を樹立した。樹立細胞株における RyDEN の局在は、共焦点レーザー顕微鏡を用いて解析した。また、RyDEN 共役分子の細胞内局在については、それらの分子に対する抗体を用い、共焦点レーザー顕微鏡によって調べた。

(3) RyDEN のウイルス阻害スペクトラムの解析: RyDEN に対する siRNA をトランスフェクションしたヒト細胞にデングウイルス、ジカウイルス (ZIKV)、黄熱ウイルス (YFV)、チクングニアウイルス (CHIKV)、もしくはレオウイルス科ウイルスを感染させ、それぞれの増殖性を検討した。

4. 研究成果

(1) 先行研究によって、RyDEN の機能に関与する可能性が示された細胞性分子 PABPC1 (Poly-A-binding protein cytoplasmic 1) と LARP1 (La-related protein 1) の RyDEN との細胞内相互作用を免疫沈降法によって調べた。V5-RyDEN を発現させたヒト肝細胞 (Huh7.5 細胞) のライセートを用いて V5 抗体による免疫沈降をおこなったところ、V5-RyDEN は、PABPC1 ならびに LARP1 に結合することが示された。興味深いことに、免疫沈降サンプルの LARP1 抗体によるイムノブロットングでは、分子量の異なる 2 種類の LARP1 が検出された。LARP1 には転写開始部位の違いによって生成されるアイソフォームが存在することが報告されていることから、RyDEN は 2 種類の LARP1 アイソフォームと相互作用することが明らかとなった。また、先行研究における生化学的な解析では、RyDEN の核移行シグナル様 (NLS-L) 配列 (121~137 番目のアミノ酸) が PABPC1 の結合領域であることが示されている。本研究では、NLS-L に変異を入れた V5-RyDEN を用いて同様に免疫沈降実験をおこない、NLS-L 変異体 RyDEN は、PABPC1 とだけでなく LARP1 と共沈降しないことがわかった。すなわち、RyDEN は PABPC1 を介して LARP1 と相互作用していることが明らかとなった。

PABPC1 と LARP1 は、細胞性 mRNA の翻訳調節に関わるとともに mRNA の分解にも関与することが報告されている。そして、これらのタンパク質は RNA 結合活性をもつことから、RyDEN が PABPC1 や LARP1 と形成する複合体には、RNA が含まれている可能性が考えられた。そこで N 末端側に IgG 結合モチーフタグをもつ RyDEN を安定的に発現する細胞を樹立し、DENV を感染したのちに、感染細胞のライセートを、IgG セファロースビーズを用いたアフィニティー精製に供した。そして精製サンプル中に含まれる DENV RNA を定量 RT-PCR 法で検出した結果、IgG

タグ融合 RyDEN 発現細胞由来のサンプルにおいてウイルス RNA の濃縮が確認された。以上の結果より RyDEN は、PABPC1, LARP1, そして RNA と複合体を形成することが明らかとなった。

RyDEN は、ヒト以外の哺乳類や魚類を含む脊椎動物にも存在し、さらにはタコやイカなどの無脊椎動物でもそのオースログが見つかっている。興味深いことに、腕足動物であるミドリシャミセンガイのゲノムには 3 種類の RyDEN 類似配列が見つかっているが (図 1), 酵母では報告されていない。このことから、RyDEN は、細胞が多細胞生物へと進化する過程で獲得し、多細胞生物の生命活動を担う基本的な役割を果たしていったものと推測される。一方、哺乳動物間では RyDEN のアミノ酸配列の保存性は極めて高く、進化速度が遅いことから、ヒトなどの哺乳類では、RyDEN はさらに重要な機能を付加されたのではないかと考えられた。

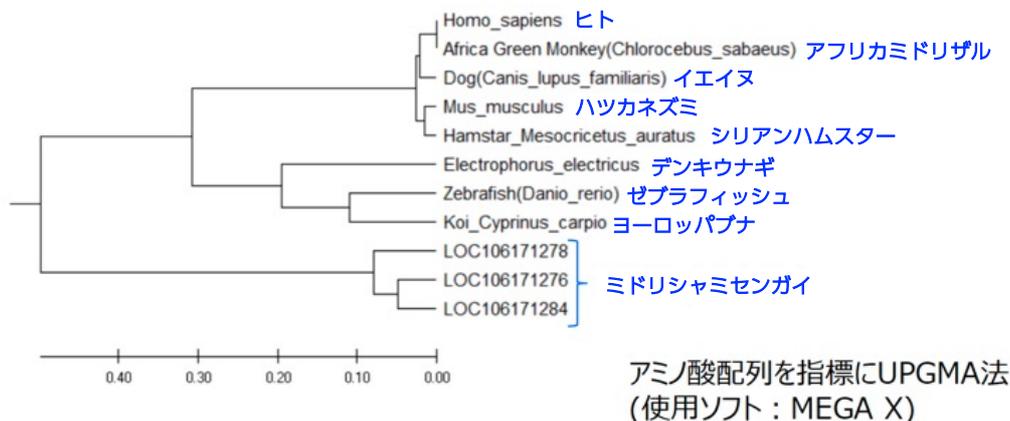


図 1. 生物種間の RyDEN 類似配列を指標にした分子系統樹解析

しかし、本研究で RyDEN が PABPC1 や LARP1 と複合体を形成するのに必要な NLS-L 配列は、哺乳類意外の生物種間でも比較的高く保存されており (図 2A), RyDEN と PABPC1 の相互作用は、RyDEN の機能発現に重要であることが示唆された。構造予測プログラム AlphaFold を用いてヒト RyDEN の立体構造を予測したところ、NLS-L は RyDEN に形成されたポケット領域のほぼ中央に位置していたことから、このポケット領域を介して PABPC1 (さらには LARP1) が RyDEN に相互作用するモデルが考えられた (図 2B)。

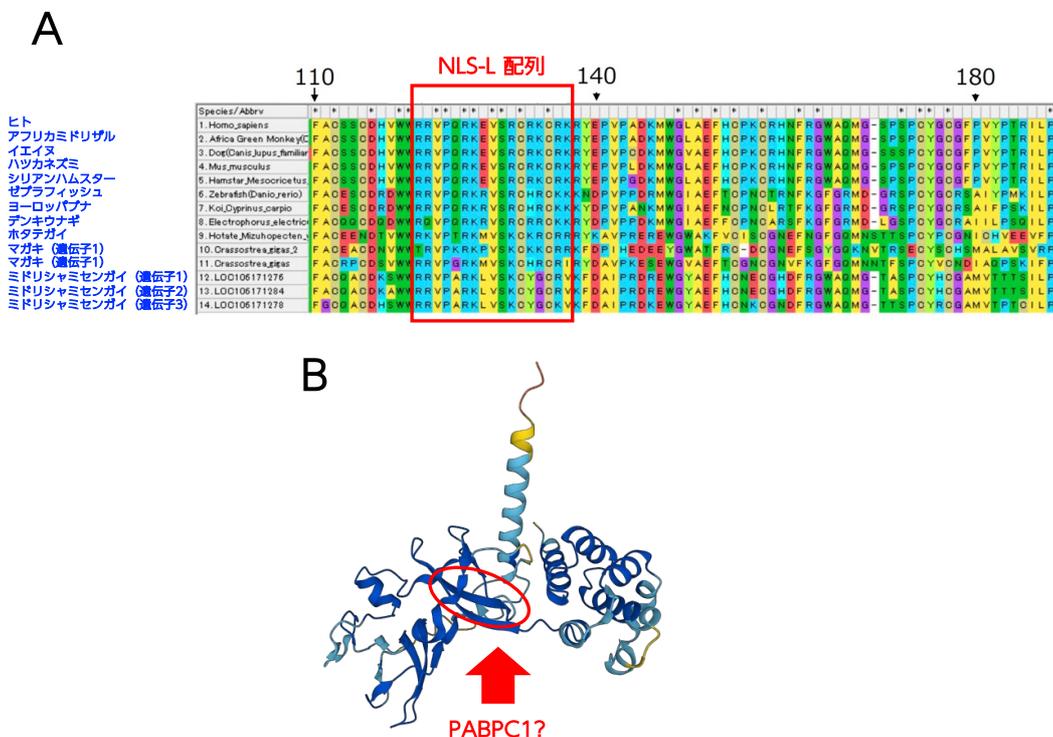


図 2. RyDEN NLS-L 配列の保存性と構造学的な重要性. (A) 様々な動物種の RyDEN オースログにおける NLS-L 配列. (B) 推測される RyDEN の立体構造 (AlphaFold プログラムによる予測構造, <https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/Q9NUL5>) と NLS-L の位置 (赤囲み).

(2) 先行研究の結果より、RyDEN は細胞質に分布することが示されている。本研究では、共焦点レーザー顕微鏡を用いて、RyDEN の細胞内局在の詳細を解析した。RyDEN は、蛍光染色法に適した抗体がないため、C 末端に EGFP を融合した RyDEN (GFP-RyDEN) を恒常的に発現する HeLa 細胞をレンチウイルスベクターによって樹立した。この細胞においては、DENV の増殖が抑制されることを確認した。共焦点レーザー顕微鏡を用いて GFP-RyDEN の局在を観察したところ、ER と考えられる領域に多く存在することが示された (図 3A)。また、細胞質では RyDEN が特異的に集積するスポットも観察され、これは P-body などの RNA 代謝器官であると推測された (図 3A)。興味深いことに、分裂期前後の細胞では RyDEN は、核内に集積する傾向が見られた (図 3B)。RyDEN タンパク質は、その中央領域に核移行シグナル様の配列 (NLS-L) を有しているが、C 末端領域には核外移行シグナル (NES) とみられるアミノ酸配列も存在しており、細胞の状態によって核と細胞質を往来するシャトリング分子であると考えられた。一方、細胞の IFN 処理や DENV 感染による GFP-RyDEN の局在変化はみられなかった。

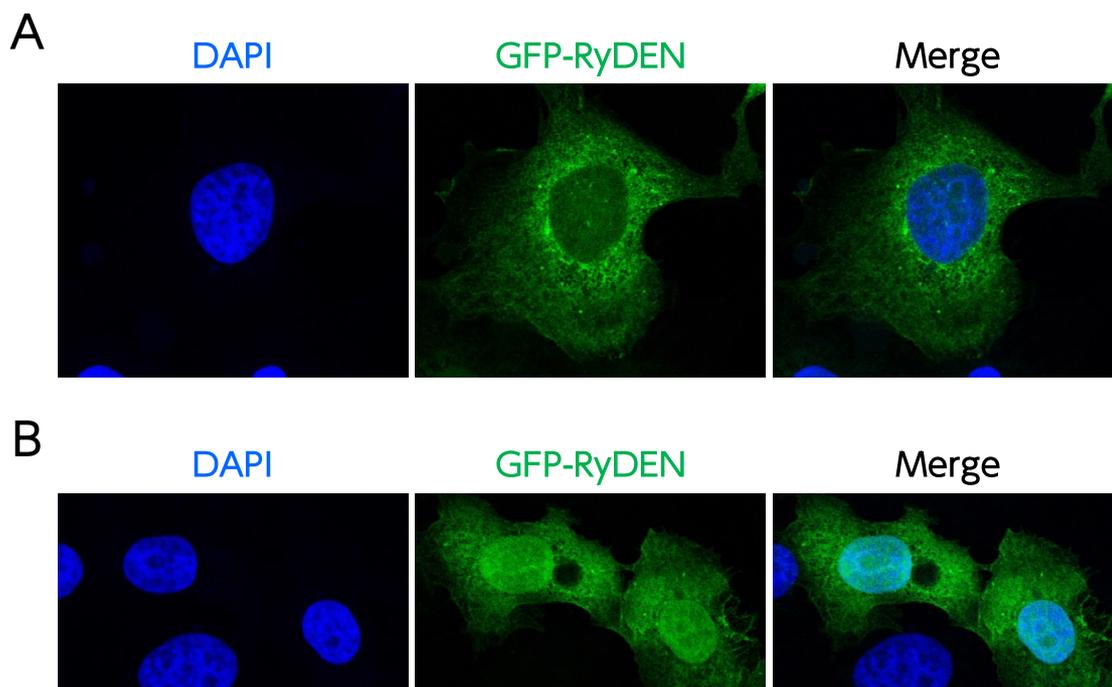


図 3. GFP-RyDEN の細胞内局在

つぎに、RyDEN の相互作用因子である PABPC1 と LARP1 の細胞内局在を、それぞれに対する抗体を用いて解析した。Huh7 細胞を用いた共免疫染色実験では、PABPC1 と LARP1 は、細胞質で共局在する傾向がみられ、これらの分子の細胞内相互作用を裏付ける結果であった (図 4)。

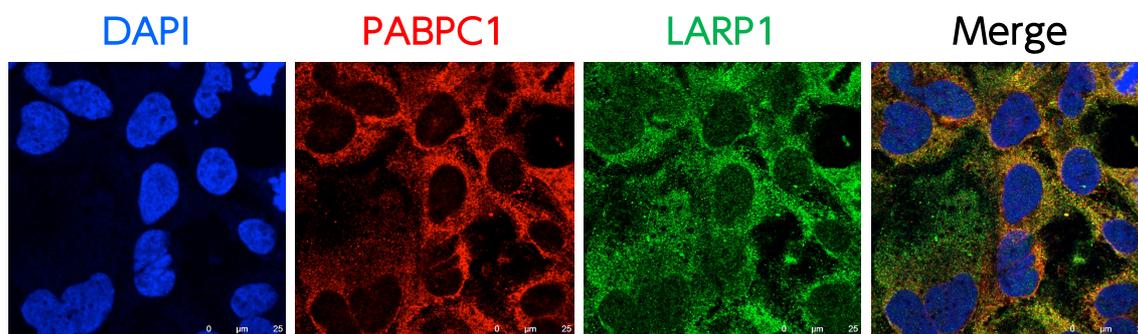


図 4. PABPC1 と LARP1 の細胞内局在

(3) 様々な RNA ウイルスに対する RyDEN の阻害活性を、RNA 干渉法によって調べた。RyDEN に対する siRNA をトランスフェクションした細胞においては、ZIKV, YFV, そして CHIKV の増殖効率は上昇した。一方、PABPC1 と LARP1 に対する siRNA をトランスフェクションした細胞では、CHIKV の増殖性の低下が見られた。同様に、二本鎖 RNA ウイルスであるレオウイルス科ウイルスの増殖性は、RyDEN のノックダウンによって上昇したのに対し、PABPC1 や LARP1 のノックダウンでは低下した。以上の結果より、RyDEN は、フラビウイルス科 (DENV, ZIKV, YFV) だけでなくそれ以外の一本鎖 RNA ウイルス (CHIKV)、さらには二本鎖 RNA ウイルス

(レオウイルス) に対して抑制活性をもつことが明らかとなった。しかし、RyDEN と複合体を形成する PABPC1 と LARP1 については、RNA ウイルスの増殖に必要な細胞性因子である可能性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sakaguchi Shoichi、Suzuki Youichi、Emi Akino、Wu Hong、Nakano Takashi	4. 巻 530
2. 論文標題 Identification of cellular inhibitors against Chikungunya virus replication by a cDNA expression cloning combined with MinION sequencing	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 617 ~ 623
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.07.036	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 Suzuki Youichi、Tanaka Atsushi、Maeda Yusuke、Emi Akino、Fujioka Yoshihiko、Sakaguchi Shoichi、Vasudevan Subhash G.、Kobayashi Takeshi、Lim Chang-Kweng、Takasaki Tomohiko、Wu Hong、Nakano Takashi	4. 巻 552
2. 論文標題 Construction and characterization of an infectious clone generated from Chikungunya virus SL11131 strain	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Virology	6. 最初と最後の頁 52 ~ 62
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.virol.2020.09.006	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 該当する

1. 著者名 Tsurumi Sayaka、Watanabe Tadashi、Iwaisako Yuki、Suzuki Youichi、Nakano Takashi、Fujimuro Masahiro	4. 巻 558
2. 論文標題 Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus ORF17 plays a key role in capsid maturation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Virology	6. 最初と最後の頁 76 ~ 85
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.virol.2021.02.009	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 Wu Hong、Iwai Noritaka、Suzuki Youichi、Nakano Takashi	4. 巻 52
2. 論文標題 Molecular association of FtsZ with the intrabacterial nanotransportation system for urease in Helicobacter pylori	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Medical Molecular Morphology	6. 最初と最後の頁 226 ~ 234
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00795-019-00225-6	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 Morita Eiji, Suzuki Youichi	4. 巻 13
2. 論文標題 Membrane-Associated Flavivirus Replication Complex - Its Organization and Regulation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Viruses	6. 最初と最後の頁 1060 ~ 1060
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/v13061060	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 Wu Hong, Fujioka Yoshihiko, Sakaguchi Shoichi, Suzuki Youichi, Nakano Takashi	4. 巻 55
2. 論文標題 Three-dimensional reconstruction by electron tomography for the application to ultrastructural analysis of SARS-CoV-2 particles	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Medical Molecular Morphology	6. 最初と最後の頁 60 ~ 67
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00795-021-00309-2	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 Suzuki Youichi, Hishiki Takayuki, Emi Akino, Sakaguchi Shoichi, Itamura Ronko, Yamamoto Rain, Matsuzawa Tamio, Shimotohno Kunitada, Mizokami Masashi, Nakano Takashi, Yamamoto Naoki	4. 巻 575
2. 論文標題 Strong alkaline electrolyzed water efficiently inactivates SARS-CoV-2, other viruses, and Gram-negative bacteria	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 36 ~ 41
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.08.048	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 Minami Kenta, Masutani Ryota, Suzuki Youichi, Kubota Meri, Osaka Naofumi, Nakanishi Toyofumi, Nakano Takashi, Ukimura Akira	4. 巻 27
2. 論文標題 Evaluation of SARS-CoV-2 RNA quantification by RT-LAMP compared to RT-qPCR	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Infection and Chemotherapy	6. 最初と最後の頁 1068 ~ 1071
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jiac.2021.05.004	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 Tanaka Atsushi, Suzuki Youichi	4. 巻 13
2. 論文標題 Genome-Wide Approaches to Unravel the Host Factors Involved in Chikungunya Virus Replication	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 866271
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2022.866271	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 -

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 鈴木陽一、江見晶野、坂口翔一、林昌宏、高崎智彦、小林剛、呉紅、中野隆史
2. 発表標題 チクングニアウイルスSL11131株由来感染性クローンの構築とその性状の解析
3. 学会等名 第54回日本脳炎ウイルス生態学研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Youichi Suzuki, Yasuo Watanabe, Akino Emi, Takayuki Hishiki, Fumihiko Kato, Chang-Kweng Lim, Tomohiko Takasaki, Shoichi Sakaguchi, Hong Wu, Takashi Nakano
2. 発表標題 Generation of a Gaussia luciferase-expressing replicon derived from Chikungunya virus SL11131 strain and its application for identification of antiviral agents
3. 学会等名 第67回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shoichi Sakaguchi, Youichi Suzuki, Akino Emi, Takayuki Hishiki, Hong Wu, Takashi Nakano
2. 発表標題 Inhibition of dengue virus replication by an interferon-inducible factor, IFI27
3. 学会等名 第67回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木陽一、江見晶野、坂口翔一、呉紅、中野隆史
2. 発表標題 チクングニアウイルス臨床分離株を由来とする分子クローンの作製とその性状の解析
3. 学会等名 第72回日本細菌学会関西支部総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Youichi Suzuki
2. 発表標題 RyDEN/C19orf66 - a novel interferon-inducible suppressor against flaviviruses
3. 学会等名 International Health and Medical Sciences Conference 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木陽一、天野剛志、高木春樺、三浦滉矢、石田幸太郎、濱嶋竜生、中野隆史、森田英嗣、廣明秀一
2. 発表標題 SARS-CoV-2 エンペローブタンパク質と宿主 PDZ タンパク質との相互作用を阻害する化合物の探索
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 高橋宏隆、重松裕樹、鈴木陽一、中野隆史、澤崎達也
2. 発表標題 デングウイルスNS3に結合する新規宿主因子SIGIRRの機能解析
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 祝迫佑紀, 渡部匡史, 鈴木陽一, 中野隆史, 藤室雅弘
2. 発表標題 KSHV ORF7は成熟カプシドの形成に重要である
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 鈴木陽一, 岩本知央子, 服部圭一郎, 布施朱理, 坂口翔一, 呉紅, 中野隆史
2. 発表標題 Gain-of-function cDNAライブラリースクリーニングによる新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)複製抑制因子の探索
3. 学会等名 第74回日本細菌学会関西支部総会
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