

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07045

研究課題名(和文) CRISPRスクリーニングで同定したサフォードウイルス受容体候補遺伝子の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of Saffold virus receptor candidate genes identified by CRISPR screening

研究代表者

大桑 孝子 (OKUWA, Takako)

金沢医科大学・医学部・助教

研究者番号：20460347

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)：申請者はこれまでに、CRISPR/Cas9システムを用いたゲノムワイドな遺伝子ノックアウトスクリーニングによって、Saffold virus (SAFV) 受容体候補遺伝子を抽出した。これらの候補遺伝子のうち、ヘパラン硫酸(HS)の生合成に関わる遺伝子の解析から、HSがSAFVの感染に重要であることを見出した。さらに、HS以外にも存在すると考えられたSAFV受容体を同定するために、HS欠失HeLa細胞株を作出し、この細胞株を用いたCRISPRスクリーニングを行った。このスクリーニングから抽出された候補遺伝子の中からHS以外のSAFV受容体を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

SAFVは上気道炎、胃腸炎、手足口病様疾患、無菌性髄膜炎、脳炎、膀胱炎などの患者検体から検出されていることから、多様な疾患の原因になると考えられるが、これらの疾患がどのようにして引き起こされるのかは解明されていない。本研究では、SAFVの感染に重要な受容体を同定した。受容体分子の発現分布からSAFVの組織親和性が明らかになり、その組織の細胞株を用いてSAFVの高感度な検出・分離が可能となるだけでなく、感染細胞の解析により、SAFVの詳細な病原性発現の分子機構の解明に繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We have previously selected Saffold virus (SAFV) receptor candidate genes by genome-wide knockout screening using the CRISPR/Cas9 system. Among these candidate genes, we found that heparan sulfate (HS) is important for SAFV infection based on analysis of genes involved in HS biosynthesis. Furthermore, to identify SAFV receptors that were thought to exist in addition to HS, we generated an HS-deficient HeLa cell line and performed a CRISPR screening using this cell line. We identified SAFV receptors other than HS among the candidate genes selected in this screening.

研究分野：ウイルス学

キーワード：Saffold virus 感染受容体 CRISPRスクリーニング

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

サフォードウイルス (Saffoldvirus, SAFV) は、主に小児において、上気道炎・胃腸炎・手足口病様疾患を引き起こす。まれにはあるが、無菌性髄膜炎・脳炎・肺炎などの検体からも検出されることがあり、中枢神経や脾臓に重篤な疾患を引き起こすことが懸念される。しかし、ウイルスに対する感受性を決定する重要な宿主因子である感染受容体が同定されておらず、SAFV の組織親和性や病原性発現の分子機構は不明のままである。代表者らは SAFV 高感受性の HeLa 細胞 [①, ②] における CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノムワイドな遺伝子ノックアウト (KO) スクリーニングを実施し SAFV 受容体候補遺伝子を抽出した。候補遺伝子のうち、ヘパラン硫酸 (HS) 生合成に関わる遺伝子の解析から、HS が SAFV の感染に重要であることを見出した。しかし、細胞表面の HS を欠失させた細胞において SAFV への感受性は低下するが、感染・増殖が起こることから、HS 以外にも受容体となる分子が存在すると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、HS 欠失細胞を用いた CRISPR スクリーニングから SAFV 受容体候補遺伝子を抽出し、それらの SAFV 感染受容体としての機能解析を行い、SAFV 病原性発現の分子機構を明らかにすることを目的としていた。

3. 研究の方法

(1) CRISPR/Cas9 システムによるゲノムワイドなヒト遺伝子ノックアウトライブラリーを用いた SAFV 感染受容体の探索

HS 以外の SAFV 受容体を探索するために、Cas9 発現 HS 欠失 HeLa 細胞 (SLC35B2 KO HeLa 細胞) を樹立した。この細胞にヒトの 19,050 遺伝子を標的とし 1 遺伝子あたり 6 つの sgRNA が設計されている sgRNA のプールライブラリー (GeCKO v2.0 human library, Addgene) をレンチウイルスを用いて導入し、ノックアウトライブラリー細胞 (Cas9/sgRNA/SLC35B2 KO HeLa 細胞) を作製した。このライブラリー細胞に SAFV を感染させ、生き残った細胞からゲノム DNA を抽出し sgRNA 部分を PCR で増幅後、次世代シーケンシング (NGS) により導入された sgRNA の配列を決定した。NGS のデータから、同様に NGS 解析した非感染細胞と比較して、存在比が上昇した sgRNA を同定し、統計学的に sgRNA カウント数が有意に上昇している遺伝子を抽出した。

(2) KO 細胞における SAFV 3 型ウイルス (SAFV-3) の感染と増殖

SAFV-3 に高感受性である HeLa 細胞あるいは SLC35B2 KO HeLa 細胞における候補遺伝子 A または B の KO 細胞を作出し、野生型ウイルス SAFV-3 と緑色蛍光タンパク質 UnaG 発現組換えウイルス (SAFV-3/UnaG) [②] を用いてウイルスの感染と増殖を評価した。

(3) 発現細胞における SAFV-3 の感染と増殖

SAFV 非感受性細胞である BHK-21 細胞に protein A および B を発現させた細胞を作出し、SAFV-3 と SAFV-3/UnaG を用いてウイルスの感染と増殖を評価した。

(4) Pulldown assay

SAFV-3 と protein AB の直接結合を調べるために、Fc 融合 protein A と B を 293T 細胞に共発現させ、その培養上清からプロテイン A ビーズを用いて Fc 融合 protein AB を複合体として精製した。ビーズ-Fc 融合 protein AB と SAFV-3 ウイルスを混和し 4°C で 1 時間インキュベーション

した。洗浄したビーズペレットを SDS-PAGE サンプルバッファーに溶解後ボイルし、上清を回収した。上清中の SAFV-3 を抗 SAFV-3 抗血清を用いたウェスタンブロット法で検出した。

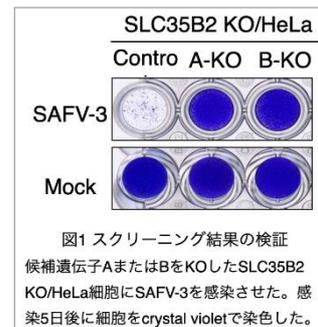
4. 研究成果

(1) SAFV 感染受容体の候補遺伝子の抽出

SLC35B2 KO HeLa 細胞を用いた CRISPR スクリーニングの結果、protein A および protein B がトップヒットとして抽出された。Protein A と B はヘテロダイマーを形成し細胞表面に発現することが知られているタンパク質であった。

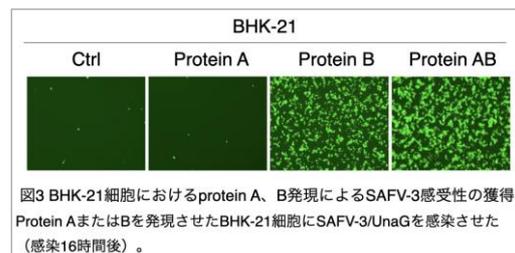
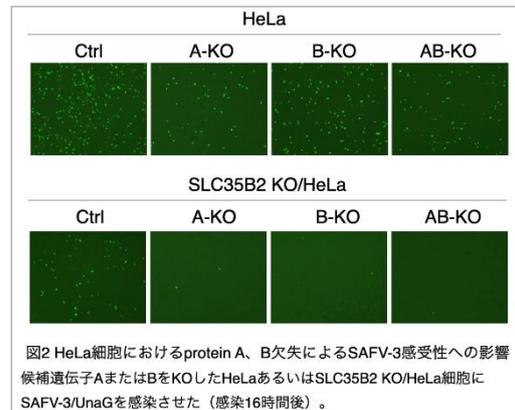
(2) KO HeLa 細胞におけるウイルス感染

まず、スクリーニングの結果を検証するために、SLC35B2 KO HeLa 細胞で A、B の遺伝子をそれぞれ KO した細胞を作製し、SAFV-3 を感染させた。A、B どちらの KO 細胞も SAFV 感染に高い抵抗性を示すことが確認された (図 1)。さらに、protein A、B が SAFV の感染と増殖に及ぼす影響を調べるために、SAFV-3/UnaG ウイルスを感染させた。その結果、HS をもつ野生型 HeLa 細胞では、遺伝子 A、B、AB 両方を KO した細胞で、感染細胞が減少し SAFV-3 に対する感受性の低下がみられた。一方、SLC35B2 KO HeLa 細胞でさらに A、B を KO した細胞では、SAFV-3 に対する感受性が消失した (図 2)。



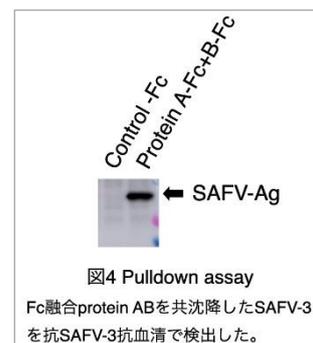
(3) Protein AB 発現 BHK-21 細胞におけるウイルス感染

BHK-21 細胞 (ハムスター腎細胞) は、細胞に SAFV-3 を接種しても感染しないが、infectious RNA をトランスフェクションすることにより子孫ウイルスを産生することができる (replication permissive) [2]。つまり、BHK-21 細胞は SAFV の感染に必要な受容体を発現していない。Protein A、B が SAFV-3 受容体であることを確認するために、protein A、B あるいは AB 両方を発現させた BHK-21 細胞に、SAFV-3/UnaG ウイルスを接種した。その結果、protein B および AB 両方を発現させた BHK-21 細胞は SAFV-3 に対する感受性を獲得した (図 3)。Protein B 発現細胞では内在性の protein A と形成したダイマーを利用して感染していると考えられる。



(4) Pulldown assay による SAFV-3 と protein AB の結合の確認

次に、protein AB と SAFV-3 の結合を調べるために、Fc 融合 protein AB を用いて pulldown assay を行った。その結果、protein AB と共沈降した SAFV-3 が検出され、protein AB と SAFV-3 が直接結合できることが示された (図 4)。



以上の結果から、SAFV-3 の感染に関わる HS 以外の受容体として protein AB を同定した。また、

HeLa 細胞における SAFV の感染には、HS 依存経路のほかに、HS がなくても感染できる経路（HS 非依存経路）があることがわかった。そして、その HS 非依存経路からの感染に重要な宿主因子が、protein AB であることが明らかになった。

<引用文献>

- ① Himeda, T., Hosomi, T., Okuwa, T., Muraki, Y., & Ohara, Y. (2013). Saffold virus type 3 (SAFV-3) persists in HeLa cells. *PloS ONE*, 8(1).
- ② Okuwa, T., Himeda, T., Utani, K., & Higuchi, M. (2023). Generation of a recombinant Saffold Virus expressing UnaG as a marker for the visualization of viral infection. *Virology*, 20:175

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 Okuwa Takako, Himeda Toshiki, Utani Koichi, Higuchi Masaya	4. 巻 20
2. 論文標題 Generation of a recombinant Saffold Virus expressing UnaG as a marker for the visualization of viral infection	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Virology Journal	6. 最初と最後の頁 175
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12985-023-02142-8	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 大桑孝子, 姫田敏樹, 小林郷介, 野村奈美子, 宇谷公一, 小池 智, 樋口雅也
2. 発表標題 CRISPR/Cas9 システムを用いた Saffold virus 受容体の同定
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

1. 発表者名 大桑孝子, 姫田敏樹, 宇谷公一, 小林郷介, 小池智, 樋口雅也
2. 発表標題 CRISPR/Cas9システムを用いたSaffoldウイルス感染受容体同定の試み
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

〔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
---------	---------