

令和 6 年 6 月 21 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：21K07048

研究課題名(和文) ウイルス感染を制御する宿主の新規抗ウイルス因子の同定

研究課題名(英文) Identification of novel host antiviral factors that control viral infection.

研究代表者

中津 祐一郎 (Nakatsu, Yuichiro)

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：70572113

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)：風疹ウイルスが増殖しやすい培養細胞を宿主の抗ウイルス防御機構であるインターフェロン(IFN)経路関連分子を欠損させることで作出した。どのような宿主因子により風疹ウイルスが抑制されていたのかを解析するためIFNの下流で作用するIFN誘導性遺伝子群(ISGs)を上記の細胞に発現させ解析したところ、6種類のISGsが風疹ウイルス抵抗性に関与していることが明らかとなった。さらに、未知の抗ウイルス因子の探索を目指して、宿主細胞ゲノム上の全遺伝子を対象としたスクリーニングを実施するために必要な組換え風疹ウイルス、および培養細胞を作出し、その評価を実施した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでにインターフェロン経路により風疹ウイルスの増殖が抑制されることが報告されていた一方で、どのような宿主因子がその抑制に直接的に関わっているかについては未知であった。本研究では、6種類の宿主因子が風疹ウイルスの増殖抑制に寄与していることが明らかとなり、今後の作用機序解析が待たれるところである。また、宿主ゲノムにコードされた未知の抗ウイルス因子の探索法の構築も進展させており、今後様々なウイルスを制御する分子基盤の解明に貢献できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Culture cells that efficiently support rubella virus growth were generated by knocked out of several factors that were important for interferon (IFN) pathway using CRISPR-Cas9 genome editing method. To elucidate what host factor(s) contribute this restriction of rubella virus, IFN stimulated genes (ISGs) were ectopically expressed in this cell and finally it was revealed that six ISGs were related to the restriction of rubella virus. Finally, recombinant rubella viruses and cultured cells were generated and evaluated as a preliminary phase of genome wide screening for searching previously unknown antiviral factors.

研究分野：ウイルス学

キーワード：風疹ウイルス

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

感染細胞内でウイルスを非自己と認識し、その増殖を様々なメカニズムで抑制する自然免疫応答経路については、ウイルスの増殖を認識する受容体である RIG-I-like receptor (RLR) や Toll-like receptor (TLR) によるウイルスの認識から転写因子の活性化、および自然免疫応答において重要なシグナル伝達物質であるインターフェロン (IFN) の合成に至るメカニズムの詳細がこれまでに明らかになっている。IFN は 1950 年代にウイルス感染細胞から分泌されるウイルス干渉の原因分子として同定され、その下流で発現制御を受けるインターフェロン誘導性遺伝子群 (Interferon-stimulated genes, ISGs) が数百種類あることが報告されている。代表的な数十種類の ISGs については、その抗ウイルス作用機序がある程度解析されつつある一方、その他の大多数の ISGs についてはほとんど解析されていない。また、IFN 経路に非依存的な抗ウイルス応答については報告が少なく、未知な点も多い。

風疹ウイルス (RuV) は近年までトガウイルス科に分類されていたが、ウイルスポリメラーゼの構造的特徴などからマトナウイルス科に再分類された (+) 鎖 RNA をゲノムとして持つウイルスである。以前より RuV は、IFN によりその増殖が抑制されることが報告されていたが、その詳細な抑制メカニズムはほとんど研究されておらず、その抗ウイルス状態に寄与する宿主遺伝子も不明のままである。

2. 研究の目的

「どのような宿主因子が、どのような作用機序でウイルスを抑制するのか？」という、ウイルスと宿主の攻防の全体像を理解するための重要な知見を得ることを目標とした。自然免疫応答により RuV の増殖が抑制されることは報告されているが、その抑制メカニズムは全く解析されていない。また、これまでに解明されていない IFN 非依存的な宿主応答により RuV が抑制されている可能性も十分にある。本研究の目的は、他のウイルスを抑制することが報告されている ISGs が RuV の抑制にも関与しているかを解析するとともに、ウイルス抵抗性に関与する未知の宿主エフェクター分子群を同定するスクリーニング系を構築することである。

3. 研究の方法

RuV を用いた宿主ウイルス抵抗性遺伝子の解析を効率良く実施するために、本来 IFN により極めて強く制限される RuV 増殖が高効率になるような IFN 誘導経路およびシグナル伝達経路関連分子を欠損した細胞を、CRISPR-Cas9 ゲノム編集法により作出した。この細胞に代表的な ISGs をテトラサイクリン誘導性発現で導入することにより、RuV の増殖を抑制しうる ISGs の同定を試みた。また、CRISPR-dCAS9 遺伝子発現活性化型ライブラリー法によるスクリーニングの準備段階として、細胞変性効果 (CPE) の弱い RuV で細胞の生死による選択が感度良く行えるように、自殺遺伝子として汎用されている単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ (HSV-TK) を導入した組換え RuV (rRuV-TK) を作出し、ガンシクロビル (GCV) による感染細胞の細胞死誘導の程度を検討した。最後に CRISPR-dCAS9 による遺伝子発現活性化で RuV の増殖がどの程度抑制され、rRuV-TK による細胞死の誘導が回避できるかを検討するため、前述のテトラサイクリン誘導性 ISG 発現細胞を用いた解析で RuV を抑制できた ISG に対するガイド RNA を作製し、CRISPR-dCAS9 による遺伝子発現活性化システムでも十分な効果が期待できるかを検討した。

4. 研究成果

(1) CRISPR-CAS9 ゲノム編集技術による宿主 IFN 経路欠損細胞での RuV の増殖

RuV 高増殖細胞の作出を目的として、ヒト肺がん由来 A549 細胞をベースに、IFN の誘導に関与する IPS-1 遺伝子、1 型および 3 型 IFN のレセプターの一部である IFNAR1 遺伝子および IFNLR1 遺伝子を欠損させた細胞株を CRISPR-CAS9 ゲノム編集技術により作製した (A549/IPS-1-KO 細胞、A549/IFNAR1-KO 細胞、A549/IFNLR1-KO 細胞)。また、後に使用予定である CRISPR-dCAS9 遺伝子発現活性化型ライブラリーにより IFN 遺伝子自体が発現活性化された場合、IFN が培養細胞集団全体に抗ウイルス作用を発動し、スクリーニングが困難となると考えられたため、上記の 3 遺伝子の三重欠損細胞 (A549/IPS-1, AR1, LR1-TKO 細胞) も作出した。それらの培養細胞を用いて RuV の増殖を解析したところ、A549/IPS-1-KO 細胞では親細胞と比較して 100 倍程度ピークの力価が上昇することが明らかとなった (図 1)。A549/IFNAR1-KO 細胞では IPS1-KO 細胞と比較する

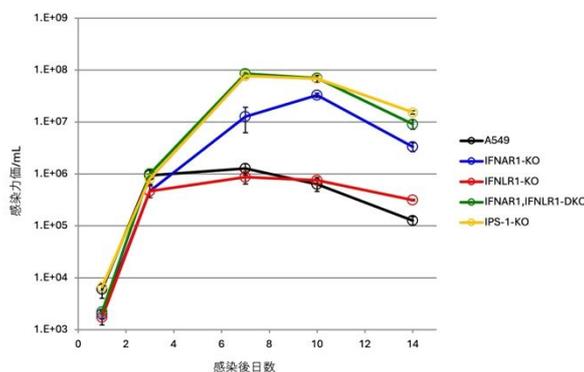


図 1: 各種 KO 細胞での RuV の増殖

と力価上昇がやや低いのに対して、IFNLR1-KO 細胞では親細胞と同程度のウイルス力価であった (図 1)。A549 細胞では RuV は主に 1 型 IFN により抑制されているが、程度は弱いものの多少 3 型 IFN によっても抑制されていると考えられたので、二重欠損細胞 A549/IFNAR1, IFNLR1-DKO 細胞も作出し解析したところ、この細胞では完全に IPS1-KO 細胞と同程度の力価上昇が認められたため、上述の通り RuV は主に 1 型 IFN に、また若干 3 型 IFN によって増殖抑制されることが明らかとなった (図 1)。またこれらの細胞を 1 型および 3 型の組換え IFN で処理した状態で RuV 増殖解析を実施した結果、想定通り各レセプター欠損細胞では組換え IFN の効果が消失することが確認できた。(図 2)

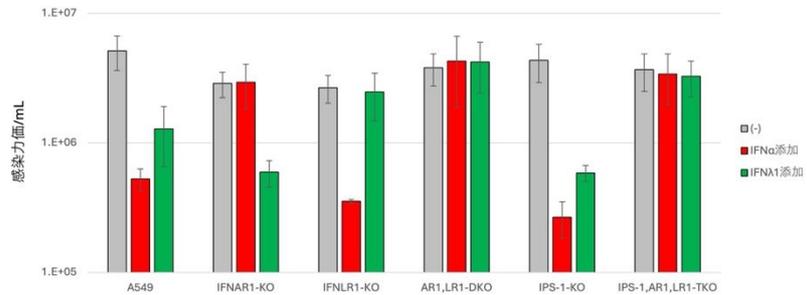


図 2 : 組換え IFN 処理した各種 KO 細胞での RuV 増殖

(2) テトラサイクリン誘導性発現細胞を用いた RuV 抑制に関する ISGs の同定

上述の A549/IPS-1-KO 細胞では RuV 感染による 1 型および 3 型 IFN の発現誘導が起こらず、抗ウイルスエフェクター分子群である ISGs の発現も上昇しないため、RuV の増殖が 100 倍程度上昇すると考えられる (図 1)。そこで、この細胞に個々の ISG を発現させることで RuV 抵抗性に関する ISG を同定することを試みた。発現方法としてテトラサイクリン誘導性ベクターを用いることで、ドキシサイクリン (Dox) による発現誘導状態と未誘導状態の RuV 増殖性の比較解析を行った。ISGs としては、他のウイルスを抑制することが知られている、PKR や MX1、IFIT1/2/3 などを含む 16 種類の代表的な ISGs を検討した。その結果、6 種類の ISGs が RuV の抑制に関与していることが明らかとなった (図 3)。

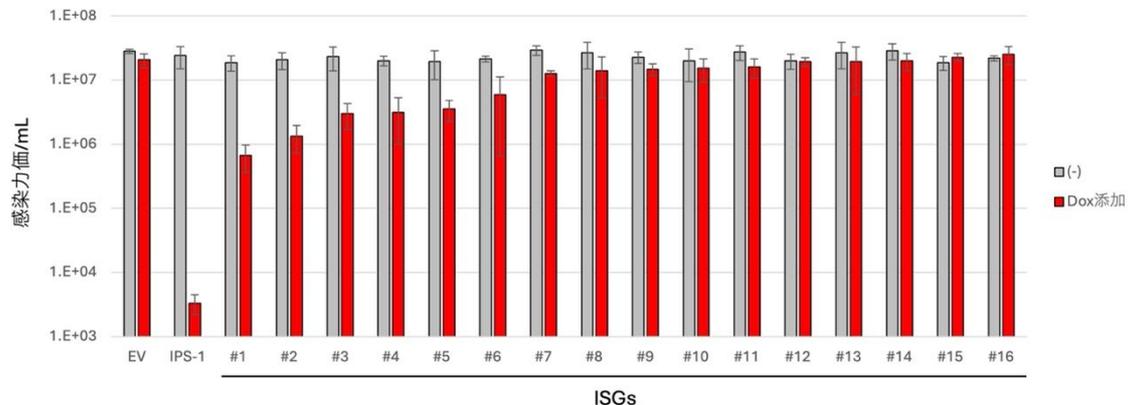


図 3 : テトラサイクリン誘導性 ISGs 発現細胞を用いた RuV の増殖の抑制解析

(3) rRuV-TK 感染細胞における GCV による細胞死の誘導

本研究課題では、ゲノムワイドな CRISPR-dCAS9 遺伝子発現活性化型ライブラリーを用いて、細胞死を指標とした抗ウイルス因子の同定を目指すものである。一方で前述の通り、RuV は CPE が極めて弱いため、細胞死を指標とした網羅的なスクリーニングの実施は困難であった。この問題点を克服するため、細胞死を誘導可能な組換え RuV の作製を試みた。着目したのは自殺遺伝子として知られている HSV-TK であり、細胞に HSV-TK が発現した状態で GCV を処理すると細胞が死滅することが知られている。そこで rRuV-TK を作出し、その細胞死誘導能について検討した。rRuV-TK を前述の A549/IPS-1, IFNAR1, IFNLR1-TKO 細胞に MOI=0.5 で感染させ、感染 11 日目から 20 μg/mL GCV を添加することで、感染 26 日目 (GCV 処理 15 日目) には 95%以上の細胞が死滅することが確認できた (図 4)。

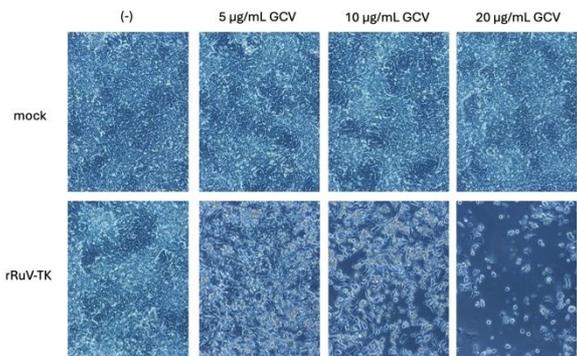


図 4 : rRuV-TK 感染細胞の GCV 処理による細胞死

(4) CRISPR-dCAS9 転写活性化システムを用いた ISG 発現誘導の評価

CRISPR-dCAS9 による遺伝子発現誘導レベルで、未知の抗 RuV 因子が同定しうるかを評価するため、実際のゲノムワイドスクリーニングの実施に先立って、(2)の ISG_#4 (図 3) をこの方法

で発現誘導した場合の評価を実施した。ISG_#4 の転写を活性化しうるガイド RNA 発現ベクターを構築し、CRISPR-dCAS9 遺伝子発現活性化法に必要な dCas9-VP64 発現ベクターと共に上述の A549/IPS-1, IFNAR1, IFNLR1-TKO 細胞に共発現させ、当該 ISG の発現誘導を mRNA およびタンパク質発現レベルで確認したところ、確かに発現誘導が認められる一方で、先に作製していたテトラサイクリン誘導性発現の場合と比較して、極めて弱い発現レベルであることが確認できた(図5)。また、この弱い発現の程度は、野生型 A549 細胞に RuV を感染させた際と同レベルであったことから、テトラサイクリン誘導性発現では自然状態と乖離した極めて高い遺伝子発現法であるのに対して、CRISPR-dCAS9 遺伝子発現活性化法は自然状態に近い発現誘導が可能であることが示唆された。そこで、その細胞に蛍光タンパク質 mCherry 発現組換え RuV(rRuV-mCherry)を感染させたところ、当該 ISG のガイド RNA 導入細胞では感染の程度が僅かに減弱した程度であった一方で、テトラサイクリン誘導性発現の場合は RuV 感染による mCherry の発現が認められないレベルまで感染が抑制されていた(図6)。また、(3)で確立した手順で rRuV-TK による細胞死解析を実施したが、CRISPR-dCAS9 遺伝子発現活性化の場合は ISG_#4 のガイド RNA 導入細胞においても生存細胞数の増加は認められなかった一方で、テトラサイクリン誘導性発現により ISG_#4 を発現させた場合は~50%の細胞が生存できることが確認できた(図7)。これらの結果から、テトラサイクリン誘導性発現のような極めて強い遺伝子発現法を用いた場合は、より多くの抗 RuV 宿主因子の同定が可能になる一方で、自然状態での表現系とは乖離した結果になる可能性があると考えられた。一方で、CRISPR-dCAS9 遺伝子発現活性化による転写誘導は自然状態の発現誘導と同等に比較的弱く、実際のウイルス感染時における表現系を模倣できると考えられたが、テトラサイクリン誘導性発現では十分に RuV を抑制可能であった ISG_#4 (図3)であっても、CRISPR-dCAS9 遺伝子発現活性化システムでは RuV をあまり抑制できなかったことから、より強い抗ウイルス因子しか同定できない可能性が考えられた。今回スクリーニングに用いることを検討した RuV は(2)の解析により、複数の ISGs が協調的に働くことで、その増殖が極めて強く抑制されていること可能性が初めて明らかとなった(図3)。今後は、テトラサイクリン誘導性発現のような強い遺伝子発現法をベースとしたスクリーニングにより「個々の RuV 抑制能は弱い、協調的に RuV 抑制に関与している未知の宿主因子群」の全体像の解明を検討しつつ、CRISPR-dCAS9 遺伝子発現活性化型ライブラリー法を用いたスクリーニングによる「自然状態に近い発現量でも極めて強く RuV を抑制しうる未知の宿主因子」の探索を行っていく予定である。

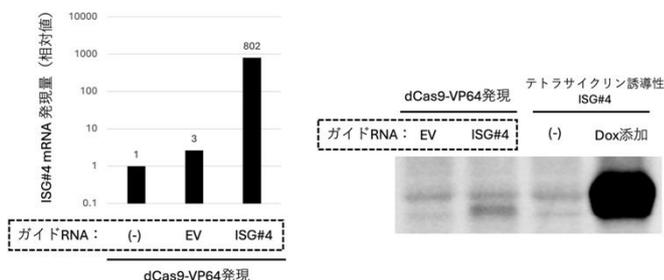


図5：CRISPR-dCas9による特定のISGの発現誘導

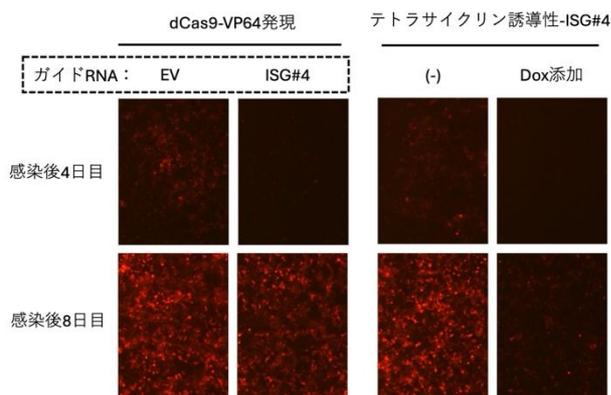


図6：各種ISG発現誘導系におけるRuV感染の程度

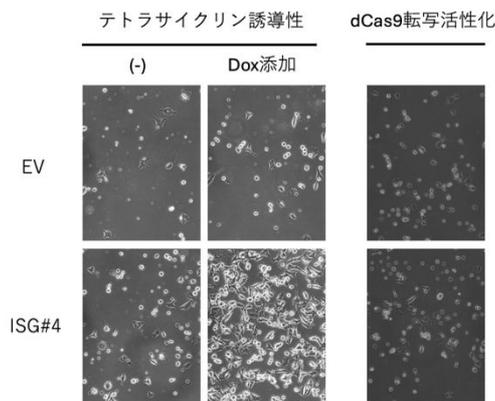


図7：各種ISG発現誘導系におけるRuV-TKによる細胞死誘導の評価

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------