

ウイルスの生活環を制御する宿主因子の同定と機能解析

Identification and functional analysis of the host factors that control the life cycle of viruses.

金沢大学	白崎 尚芳
派遣期間	2019年7月1日～2020年6月30日
研究機関	Lineberger Comprehensive Cancer Center, The University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, NC 27599, USA
研究指導者	Prof. Stanley M. Lemon

Hepatitis A virus (HAV) is a unique, hepatotropic human picornavirus that circulates in blood during acute infection as membrane-cloaked, quasi-enveloped virus (eHAV) but is shed in feces as naked, nonenveloped virions. To better understand the life cycle of HAV, we devised a genome-wide, cell death-based, forward genetic CRISPR screen for essential host factors and we identified 39 candidate host factors with high confidence. These host factors included distinct clusters of genes encoding functionally-related proteins, most notably translation initiation factors involved in viral IRES-mediated translation, and key enzymes and sugar transporters involved in the synthesis of gangliosides within the Golgi. Among them, I focused on the PDAP1 protein. In cells knocked out of PDAP1, HAV replication was completely blocked, revealing that PDAP1 is essential for the HAV life cycle. Interestingly, PDAP1 had a role in regulating IRES-dependent translation. The functional role of PDAP1 has not been examined in detail. Therefore, I attempted to identify proteins that interact with PDAP1 by proteomic analysis. I found that PDAP1 interacts with proteins involved in translational regulation and RNA-binding proteins. Further analysis of its function is expected to lead to a better understanding of the life cycle of not only HAV but also other viruses.

研究目的

本研究はヒトに病原性を持つ RNA ウイルスに着目し、RNA ウイルスの生活環に必須な宿主因子を同定し、その機能的役割を解明することを目的とした。当研究室ではゲノムワイド CRISPR スクリーニングにより A 型肝炎ウイルス (HAV) の生活環に必須な宿主因子を同定するシステムを構築した¹。その中で、HAV 生活環を制御する可能性のある宿主因子を数種類同定した。本研究ではまず、同定した宿主因子が HAV の生活環のどのステップに関与するかを明らかにすることを目的とした。宿主因子については、これまでに報告が無く、機能も十分に解明されていない宿主因子を選択した。それにより、新規性・発展性・挑戦性に富み、既存の概念に囚われない独創性のある研究を行うことを本研究の目的とした。

研究経過

HAV の複製に必須な宿主因子の同定

ゲノムワイド CRISPR スクリーニングにより HAV の感染に必須な宿主因子を同定するシステムを構築し、その中で、HAV 複製に必須な宿主因子を数種類同定した。

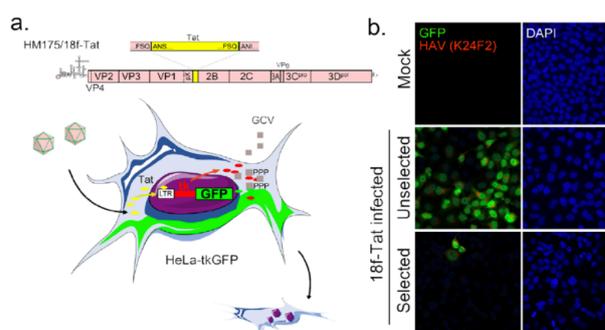
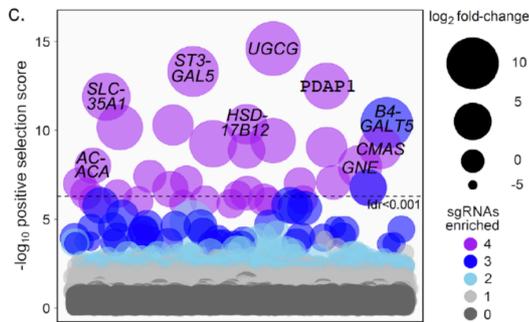


図 a に示すように、HIV-1 Tat 応答性の制御下で、GFP

に融合した単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼを発現する安定形質導入細胞を確立した。これらの細胞を組換え HAV Tat レポーターウイルスで感染させると、GFP 発現が得られ、ガンシクロビルの存在下では効率的な細胞死がもたらされる。この細胞に、それぞれ 4 個の sgRNA を有する 19,114 個のヒト遺伝子を標的とするガイド RNA (sgRNA) ライブラリーを発現するレンチウイルスで形質導入し、HAV を感染させた。図 b に示すように、選択された生存細胞は、感染していないガンシクロビル処理細胞と比較した場合、GFP 発現の頻度の著しい減少が認められた。生存細胞は HAV が複製していない細胞であることが想定された。



そこで、生存している細胞の遺伝子解析を行うことにより、図 c に示すように、39 個の候補ヘパトウイルス宿主因子を同定した。それら宿主因子の中から PDGFA Associated Protein 1 (PDAP1) に着目した。PDAP1 に関する論文は現在 9 本しかなく、その機能的役割もほとんど解明されていない。

PDAP1 が HAV の生活環に与える影響について検討

次に、候補宿主因子である PDAP1 のノックアウト細胞を樹立し、HAV の生活環をモニターした。

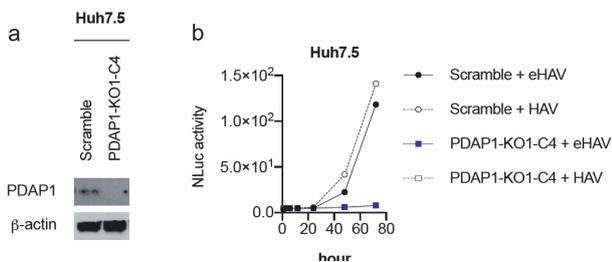


図 a に示すように、Huh7.5-PDAP1 ノックアウト細胞 (PDAP1-KO1-C4) はコントロール細胞 (Scramble) と比べて PDAP1 の発現が完全の消失していることを確認した。これらの細胞に、Nano-Luciferase (NLuc) を発現する HAV (eHAV : quasi-enveloped HAV) 及び

HAV (naked HAV) を感染させ、NLuc 活性を指標に HAV の複製をモニターした。その結果、PDAP1 ノックアウト細胞では HAV の複製が完全に遮断された。そこで、HAV の生活環のどのステップに PDAP1 が関与するかを検討した。まず、PDAP1 と HAV の細胞接着・侵入について検討した。

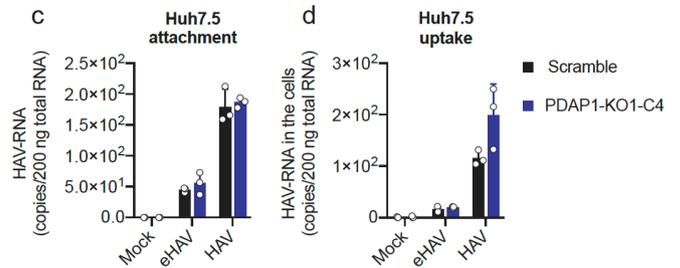


図 c, d に示すように、PDAP1 は HAV の細胞接着 (attachment) や HAV の細胞侵入 (uptake) には関与しないことがわかった。次に、PDAP1 と HAV の複製について検討した。複製の評価にはサブゲノムレプリコンを用いた。

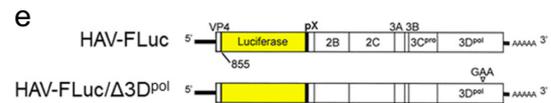


図 e に示すように、HAV ゲノム上の構造領域遺伝子を取り除き、その部分に Luciferase を挿入したサブゲノムレプリコン (HAV-FLuc) を用いることで、HAV-RNA ゲノムの複製のみを検討した。ネガティブコントロールはポリメラーゼ領域に変異を入れたコンストラクト (HAV-FLuc/Δ3D^{pol}) を用いた。

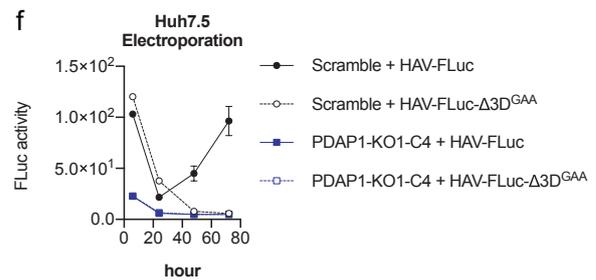


図 f に示すように、PDAP1 ノックアウト細胞 (PDAP1-KO1-C4) はコントロール細胞 (Scramble) と比べて HAV-RNA の複製が完全に遮断されることがわかった。興味深いことに、コントロール細胞と比較して、PDAP1 ノックアウト細胞ではサブゲノム HAV-RNA を細胞に導入後わずか 6 時間で優位に Luciferase 活性が低下していることがわかった。この結果から、PDAP1 は HAV の複製よりも HAV の翻訳

機構に影響を与えていることが示唆された。そこで、PDAP1 と HAV の翻訳機構について検討した。

g

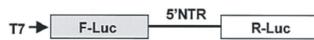


図 g に示すように、Bicistronic レポーターベクターを用いることで PDAP1 が HAV の internal ribosome entry site (IRES) 依存的翻訳制御に関与するかを検討した。Firefly Luciferase (F-Luc) の活性は Cap 依存的翻訳を表し、Renilla luciferase (R-Luc) の活性は HAV-IRES 依存的翻訳を表す。

h

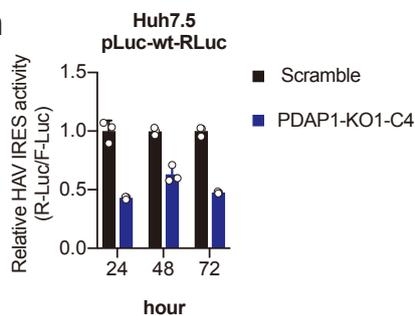
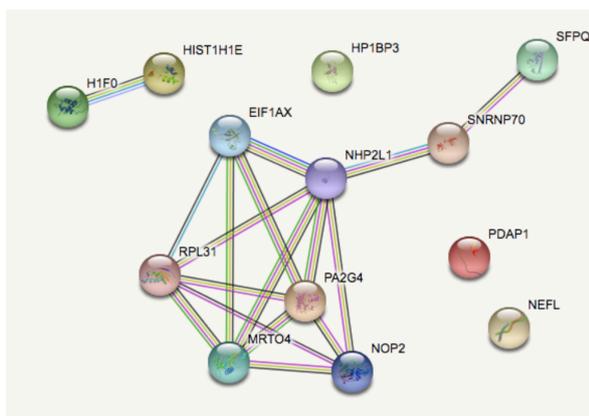


図 h に示すように、PDAP1 は HAV の IRES 依存的翻訳機構を制御していることがわかった。

PDAP1 と相互作用する宿主因子の同定

前述の通り、PDAP1 の機能的役割はほとんど解明されていない。そこで、PDAP1 と相互作用する宿主因子の同定をプロテオミクス解析を用いて試みた。



上図に示すように、PDAP1 と相互作用する可能性のあるタンパク質を 31 種類同定した。興味深いことに、同定したタンパク質の中には翻訳制御に関わる eIF1AX、RNA 結合タンパク質である NHP2L1、リボゾームコンポーネントの一つである MRTO4 などのタンパク質が含まれていた。これらのタンパク質

は実際に PDAP1 と結合していることを免疫沈降法により確認した。

考察

本研究で HAV の生活環の維持に極めて重要な宿主因子である PDAP1 を同定した。PDAP1 はその機能的役割がほとんど解明されていないが、本研究で、PDAP1 は HAV の IRES 依存性翻訳機構に極めて重要な機能を有することを明らかにした。更に、プロテオミクス解析から、PDAP1 と相互作用するタンパク質の同定にも成功した。今後、PDAP1 が HAV のタンパク質翻訳にどのように作用するか、その機能的役割を詳細に検討する。更に、PDAP1 の作用は HAV 特異的かウイルス共通かを明らかにしていく。当研究室ではインターフェロンレセプターをノックアウトしたマウスで HAV が感染することを世界で初めて示した²。このマウスを用いて、PDAP1 の作用が培養細胞のみならず生体内でも効果があるのかを明らかにする。

本研究では主に PDAP1 に着目してきたが、ゲノムワイド CRISPR スクリーニングにより多数の宿主因子を同定している。PDAP1 以外の宿主因子の解析も同時に行なっており、いくつかの宿主因子は PDAP1 同様に HAV の生活環の維持に必須であった。更に、興味深いことに、それら宿主因子の中には新型コロナウイルスの複製を制御するものも含まれていた。本研究を通して HAV の生活環を維持する宿主因子の機能的役割を解明するのみならず、新型コロナウイルスをはじめとした、種々のウイルスの生活環の維持に必須な宿主因子が同定されることが期待される。更に、本研究を通して、これまでにない全く新しい抗ウイルス剤の開発に繋がることが期待される。

参考文献

- 1 Das A, Barrientos R, Shiota T, Madigan V, Misumi I, McKnight KL, Sun L, Li Z, Meganck RM, Li Y, Kaluzna E, Asokan A, Whitmire JK, Kapustina M, Zhang Q, Lemon SM. Gangliosides are essential endosomal receptors for quasi-enveloped and naked hepatitis A virus. *Nat Microbiol.* 2020 Sep;5(9):1069-1078.
- 2 Hirai-Yuki A, Hensley L, McGivern DR, González-López O, Das A, Feng H, Sun L, Wilson JE, Hu F, Feng Z, Lovell W, Misumi I, Ting JP, Montgomery S, Cullen J, Whitmire JK, Lemon SM. MAVS-dependent host species

range and pathogenicity of human hepatitis A virus.
Science. 2016 Sep 30;353(6307):1541-1545.

研究の発表

口頭発表

現在、本研究が進行中であるため口頭発表は行なっていない

誌上発表

無し