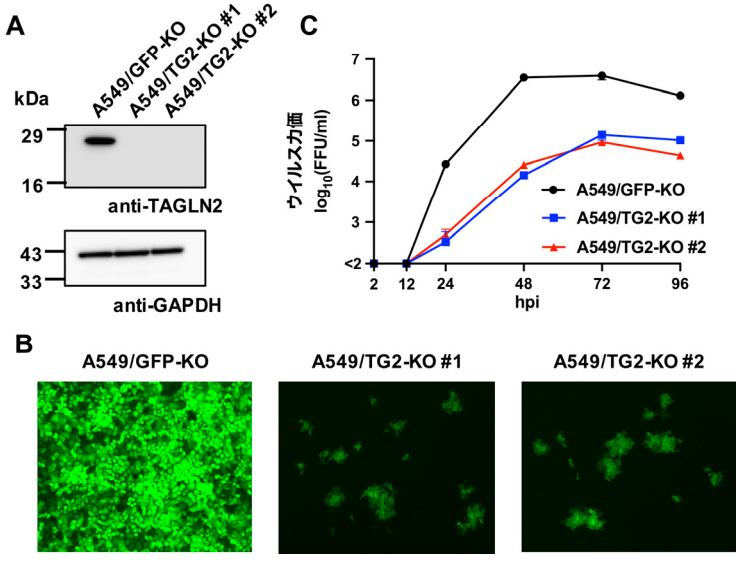
124　アレナウイルス増殖に寄与する宿主因子の機能解析	岩崎　正治

【目的】アレナウイルス科にはヒトに致死的なウイルス性出血熱を引き起こす病原体が複数存在し、それぞれの流行地域で公衆衛生上の重要な問題となっている。特にラッサ熱を引き起こすラッサウイルスは最も人類への影響が大きく、西アフリカで毎年数十万人の患者とおよそ 5 千人の死者を出している。重要なヒトの感染症でありながら確立された治療法や予防法のないラッサ熱は Blueprint Priority Diseases（WHO）に指定されており、その対策は世界的な課題である。我々は先行研究において、ラッサウイルスの治療標的となり得る宿主細胞因子を同定するため、ラッサウイルスと近縁のリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス（LCMV）ヌクレオプロテイン（NP）のインタラクトーム解析を行った。この研究では NP と特異的に結合する 171 個の宿主因子を同定し、その中の ATP1A1（Na^+／K^+-ATPase）が LCMV だけでなく、ラッサウイルスやアルゼンチン出血熱を引き起こすフニンウイルスの増殖にも利用されている因子であることが明らかとなった。本研究では、先の研究で同定された NP 結合宿主タンパク質のうち、ATP1A1 以外の分子の、LCMV 増殖における役割を解析した。

【方法】先行研究で同定した NP 結合タンパク質のうち、LCMV 増殖に寄与する候補宿主因子として CCT2、TAGLN2、RBM14 に着目し、それぞれの遺伝子ノックアウト（KO）細胞を作出した。 それら KO 細胞にレポーター遺伝子 *ZsGreen*（ZsG）を発現する組換え LCMV（rLCMV-ZsG）を感染させ、培養上清中のウイルス力価を測定した。次に、候補宿主因子の LCMV 増殖における役割を明らかにするため、KO 細胞で rLCMV-ZsG を連続継代し、増殖が抑制されない変異株の出現をモニターした。得られた変異株のゲノム配列を解析し、変異を同定した。該当の変異をあらかじめ導入した rLCMV をリバースジェネティクス系により作製し、KO 細胞での増殖効率を解析した。

【結果】TAGLN2 に関しては KO 効率の良い細胞を作出することができたが、CCT2 及び RBM14 に関しては KO の効率が不十分であったため、TAGLN2 に関してさらなる解析を進めた。*TAGLN2*KO A549（A549/TG2-KO）細胞では、rLCMV-ZsG の増殖が著しく減弱していた（図 A～C）。rLCMV-ZsG を A549/TG2-KO で連続継代したところ、3 ないし 4 継代目には増殖がコントロール細胞と同程度まで回復し、変異株の出現が疑われた。そこで、感染細胞中からトータル RNA を抽出し、ウイルス遺伝子のうち、NP、糖タンパク質前駆体（GPC）、マトリックスタンパク質（Z）遺伝子の配列を解析した。その結果、GPC 遺伝子に一つのアミノ酸変異（F129I）を同定した。GPC（F129I）変異をあらかじめ持つ rLCMV-ZsG [rLCMV-ZsG（GPC/F129I）]を作製し、A549/TG2-KO に感染させたところ、ウイルス力価はコントロール細胞に感染させた場合と同程度であった。

TAGLN2 ノックアウト細胞では rLCMV-ZsG 増殖が抑制される



124. アレナウイルス増殖に寄与する宿主因子の機能解析

岩崎　正治

大阪大学 微生物病研究所 感染症国際研究センター 新興ウイルス感染症研究ブループ

Key words：アレナウイルス，LCMV，ラッサウイルス，宿主因子，リバースジェネティクス

緒　言

ラッサ熱の原因となるラッサウイルスやアルゼンチン出血熱を引き起こすフニンウイルスのように、アレナウイルスにはウイルス性出血熱を引き起こし、それぞれの流行地で公衆衛生上重要な問題となっている病原体が複数存在する［1，2］。特にラッサウイルスは西アフリカで毎年 10 万から 30 万人の感染者とおよそ 5 千人の死者をだす、アレナウイルスで最も人類への影響が大きい病原体である。確立された治療法や予防法のないラッサ熱は世界保健機関（World Health Organization、WHO）によって Blueprint priority diseases に指定されており、その対策は世界的な課題である。一方、全世界に分布するリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス（Lymphocytic choriomeningitis virus, LCMV）はアレナウイルスのプロトタイプである。LCMV は胎児に重度の中枢神経発生異常を起こす病原体だがその認識は低く、顧みられない病原体（Neglected pathogen）とされている［3］。効果的な抗ウイルス薬の開発が進まない一因として、抗ウイルス薬の標的となりうるウイルスー宿主相互作用に関する我々の理解が進んでいないことが挙げられる。我々は先行研究において、ラッサウイルスの治療標的となり得る宿主因子を同定するため、LCMV ヌクレオプロテイン（NP）のインタラクトーム解析を行い、NP と特異的に結合する 171 個の宿主因子を同定した［4］。さらに、同定した各宿主因子に対する siRNA を用いて、ウイルス増殖に対して促進的（proviral）に働く因子か、抑制的（antiviral）に働く因子かのスクリーニングを行った。proviral 宿主因子のうち、ATP1A1（Na^+／K^+-ATPase）に関してさらに解析を進めた。その結果、ATP1A1 は LCMV だけでなく、ラッサウイルスやアルゼンチン出血熱を引き起こすフニンウイルスの増殖にも利用されている因子であることが明らかとなり、この先行研究で同定された NP 結合タンパク質には抗アレナウイルス薬の標的に適した分子が含まれていることが示唆された。本研究では、NP 結合宿主タンパク質のうち、ATP1A1 以外の分子に着目し、それら宿主因子の LCMV 増殖における役割を解析した。

先行研究の結果から、siRNA でノックダウンした時に LCMV 増殖の抑制効果が特に高かった proviral 因子として、CCT2、TAGLN2、RBM14 に着目し、まずそれぞれの遺伝子ノックアウト（KO）細胞の作出を試みた。TAGLN2 に関しては KO 効率の良い細胞を作出することができたが、CCT2 及び RBM14 に関しては KO の効率が不十分であったため、TAGLN2 に関してさらなる解析を進めた。*TAGLN2* KO 細胞（A549/TG2-KO）にレポーター遺伝子 *ZsGreen*（ZsG）を発現する組換え LCMV（rLCMV-ZsG）を感染させたところ、感染細胞内の ZsG 発現及び培養上清中のウイルス力価が著しく低下していることが確認された。次に、候補宿主因子の LCMV 増殖における役割を明らかにするため、rLCMV-ZsG を A549/TG2-KO で連続継代したところ、3 ないし 4 継代目には増殖がコントロール細胞と同程度まで回復し、変異株の出現が疑われた。そこで、5 継代目の感染細胞中からトータル RNA を抽出し、ウイルス遺伝子のうち、NP、糖タンパク質前駆体（GPC）、マトリックスタンパク質（Z）遺伝子の配列を解析した。その結果、GPC 遺伝子に一つのアミノ酸変異（F129I）を同定した。この GPC（F129I）変異をあらかじめ持つ rLCMV-ZsG [rLCMV-ZsG（GPC/F129I）]を作製し、A549/TG2-KO に感染させたところ、ウイルス力価はコントロール細胞に感染させた場合と同程度であった。しかし、A549/TG2-KO 感染細胞内の ZsG 発現量はコントロール細胞に感染させた場合に比べ著しく減弱していた。GPC/F129I 変異のみでは TAGLN2 欠損による LCMV 増殖の低下を完全には回復できないことから、TAGLN2 は L タンパク質の機能発現に寄与していることが示唆された。

方　法

1.　候補宿主因子の KO 細胞の作製

pX459 ベクター［5］を利用して、CCT2、TAGLN2、RBM14 に対する sgRNA（single guide RNA）、Cas9、ピューロマイシン耐性遺伝子（Puro^R）を発現するプラスミドを作製した。それぞれの遺伝子に対して、2 つの異なる sgRNA をコードしたプラスミドを用意した。コントロールとして、細胞に存在しない緑色蛍光タンパク質（GFP）に対する sgRNA 及び Cas9 を発現するプラスミドも作製した。sgRNA 作製したプラスミドを A549 細胞に導入し、3 日間ピューロマイシン存在下で培養した。その後、ピューロマイシン非存在下で培養を続け、限界希釈法により KO 細胞クローンを単離した（GFP に対する sgRNA 発現細胞はクローン化しなかった）。作製した KO 細胞の細胞溶解液を SDS-PAGE で展開し、ウェスタンブロット法で各 KO 標的タンパク質を検出した。

2.　ZsGreen 発現組換え LCMV の感染

LCMV の遺伝子操作系（リバースジェネティクス系）を用いて、蛍光タンパク質 ZsGreen を発現する組換え LCMV（rLCMV-ZsG）を作製した。*TAGLN-2* KO 細胞に rLCMV-ZsG を MOI（multiplicity of infection）0.01 で感染させた。一定時間培養し、感染細胞内の ZsG 発現を蛍光顕微鏡で観察した。また、培養上清中のウイルス力価を immunofocus forming assay（IFFA）で定量した。

3.　KO 細胞での rLCMV-ZsG の連続継代

TAGLN2 KO A549 細胞（A549/TG2-KO #1 及び#2）に rLCMV-ZsG を MOI 0.01 で感染させた。72 時間培養し、培養上清中のウイルス力価を IFFA で定量した。この培養上清を 1 継代目とし、1 継代目のウイルス溶液を新たに用意した A549/TG2-KO #1 及び#2 に感染させ、72 時間培養した後の培養上清を 2 継代目とした。この作業を 5 継代目の培養上清を得るまで繰り返した。5 継代目の感染細胞からトータル RNA を抽出し、ランダムプライマーを用いて逆転写を行い、感染細胞の cDNA を得た。ウイルス NP、GPC、Z 各遺伝子コード領域を PCR で増幅し、サンガー法による PCR 産物の DNA シーケンス解析を行った。

結果および考察

1. TAGLN 2 は効率的な LCMV 増殖に寄与する

先行研究での siRNA を用いた解析により、CCT2、TAGLN2、RBM14 は LCMV の増殖に貢献する proviral 因子であることが明らかとなっていた［4］。本研究ではまず、それら分子の proviral 効果を siRNA とは異なる方法で確認するため、sgRNA、Cas9、Puro^R を発現する pX459 ベクターを利用して、KO 細胞の作製を試みた。その結果、ウェスタンブロット法ではほとんど検出できないほど発現が低下した TNGLN2 KO A549 細胞クローン（A549/TG2-KO #1 及び#2）を得ることができた（図 1A）。一方、CCT2 及び RBM14 に関しては十分に発現が低下した KO 細胞クローンを作出することができなかった。次に、A549/TG2-KO #1 及び#2 に rLCMV-ZsG を感染させたところ、培養上清中に放出されるウイルス粒子量、ウイルス感染細胞数ともに著しく減少していた（図 1B，C）。これらの結果から、TAGLN2 は LCMV の効率的な増殖に必要な宿主であることが確認された。

2. GPC の F129I 変異により、*TAGLN2* KO 細胞での LCMV 増殖が部分的に回復する

TAGLN2 が LCMV 増殖に貢献する機序を明らかにするため、*TAGLN2* KO 細胞で LCMV を連続継代し、増殖力が上昇した変異株の出現をモニターした（図 2A）。その結果、3 ないし 4 継代目には *TAGLN2* KO 細胞での LCMV 増殖が、コントロール細胞での増殖と同程度に上昇した。そこで、5 継代目の感染細胞からトータル RNA を抽出し、ウイルス NP、GPC、Z 各遺伝子の配列を解析した。その結果、A549/TG2-KO #1 での継代でられた変異株には NP、GPC、Z 遺伝子に、コントロール細胞で継代したウイルスと配列の違いはなかった。一方、A549/TG2-KO #2 での継代で得られた変異株は GPC の 129 番目のアミノ酸がフェニルアラニン（F）からイソロインシン（I）に変化していた。この F129I 変異のみで TAGLN2 KO 細胞での LCMV 増殖が回復するか、F129I 変異を持つ LCMV [rLCMV-ZsG (GPC/F129I)]を作製して検討した。それまでの結果と一致して、感染 72 時間後の培養上清中の rLCMV-ZsG 量は、コントロール細胞に感染させた場合と比べて、*TAGLN2* KO 細胞では大きく減少していた（図 2B）。

一方、rLCMV-ZsG（GPC/F129I）を *TAGLN2* KO 細胞に感染させると、培養上清中のウイルス力価がコンロール細胞に感染させた場合と同程度まで回復していた。しかし、rLCMV-ZsG（GPC/F129I）感染 A549/TG2-KO #1 細胞の ZsG 発現を蛍光顕微鏡で観察すると、ZsG 陽性細胞の数は大きく上昇しているものの、感染細胞あたりの ZsG 発現量は低いままであった（図 2C）。また、rLCMV-ZsG（GPC/F129I）感染 A549/TG2-KO #2 細胞でも同様の傾向であった。このことから、F129I 変異はウイルス粒子産生効率を向上させることで培養上清中のウイルス力価を上昇させるが、完全には *TAGLN2* 欠損による LCMV 増殖低下を回復できないことが明らかになった。今後は変異ウイルスのポリメラーゼ L 遺伝子の配列解析を進め、TAGLN2 の LCMV 増殖における機能発現に L タンパク質がどのように関与するのか解析していきたい。

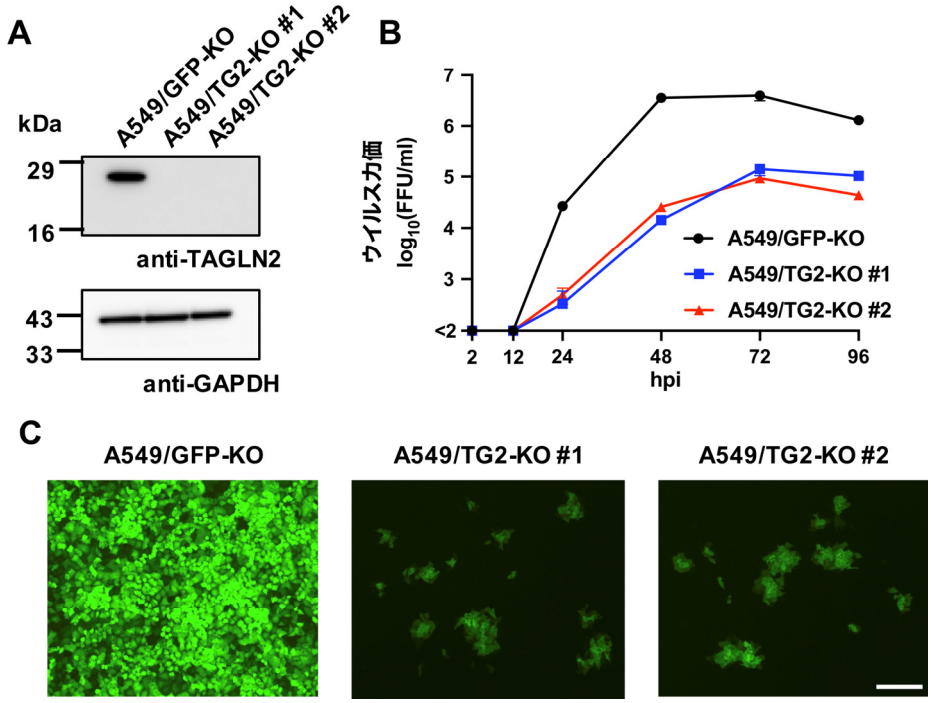


図 1. TAGLN2 は効率的な LCMV 増殖に寄与する

A) *TAGLN2*KO 細胞の作製. TAGLN2 またはコントロールとして GFP に対する sgRNA、Cas9、ピューロマイシン耐性遺伝子を発現するプラスミドを A549 にトランスフェクションし、ピューロマイシン存在下で培養した。限界希釈により単離した *TAGLN2*KO 細胞クローン中の TAGLN2 発現をウェスタンブロット法にて検出した。

B、C) TAGLN2 は効率的な LCMV 増殖に寄与する。*TAGLN2* KO 細胞及びコントール細胞に rLCMV-ZsG を感染させ、各経過時間における培養上清中のウイルス力価を測定した（B）。また、感染 48 時間後の感染細胞中の ZsG 発現を蛍光顕微鏡で観察した（C）。
スケールバーは 200 μm。

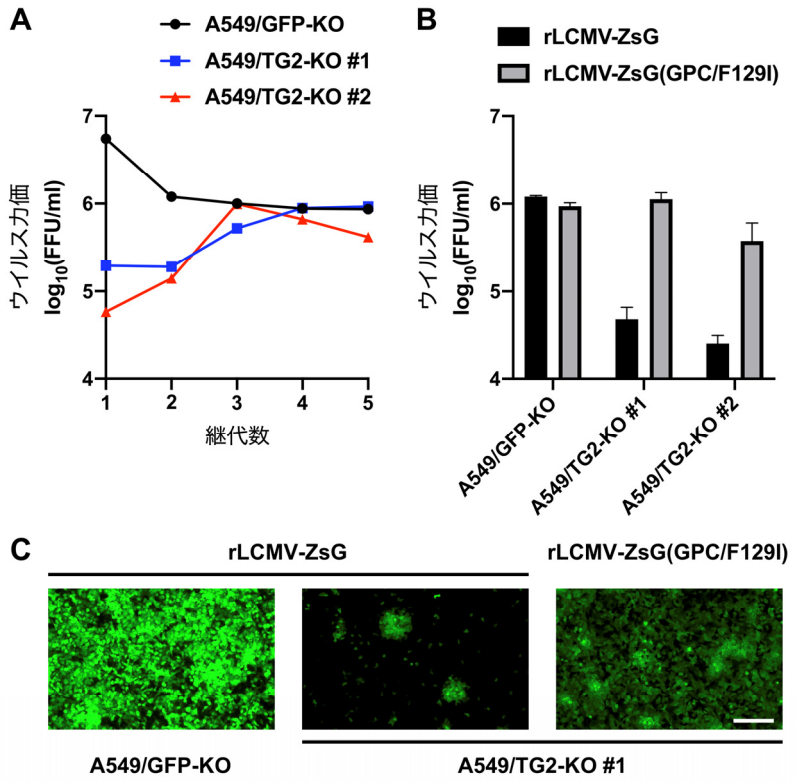


図 2. 連続継代による TAGLN2 非依存 LCMV 変異株の作出

A) 連続継代により *TAGLN2* 欠損による LCMV 増殖抑制を免れた変異株が産生される。rLCMV-ZsG を *TAGLN2* KO 細胞及びコントロール細胞で連続継代した時のウイルス力価の推移。

B、C) F129I 変異導入による *TAGLN2* 欠損細胞でのウイルス増殖の回復。rLCMV-ZsG または rLCMV（GPC/F129I）を *TAGLN2* KO 細胞及びコントロール細胞に感染させ、72 時間後の培養上清中のウイルス力価を測定した（B）。また、感染 72 時間後の感染細胞中の ZsG 発現を蛍光顕微鏡で観察した（C）。スケールバーは 200 μm。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、大阪大学微生物病研究所新興ウイルス感染症研究グループの高嶋綾子氏である。

文　献

1) Buckley SM, Casals J. Lassa fever, a new virus disease of man from West Africa. 3. Isolation and characterization of the virus. Am J Trop Med Hyg. 1970 Jul;19(4):680-91. PMID: 4987547 DOI: 10.4269/ajtmh.1970.19.680

2) Weissenbacher MC, Laguens RP, Coto CE. Argentine hemorrhagic fever. Curr Top Microbiol Immunol. 1987;134:79-116. PMID: 3034513 DOI: 10.1007/978-3-642-71726-0_4

3) Jahrling PB, Peters CJ. Lymphocytic choriomeningitis virus. A neglected pathogen of man. Arch Pathol Lab Med. 1992 May;116(5):486-8. PMID: 1316111

4) Iwasaki M, Minder P, Caì Y, Kuhn JH, Yates JR 3rd, Torbett BE, de la Torre JC. Interactome analysis of the lymphocytic choriomeningitis virus nucleoprotein in infected cells reveals ATPase Na+/K+ transporting subunit Alpha 1 and prohibitin as host-cell factors involved in the life cycle of mammarenaviruses. PLoS Pathog. 2018 Feb 20;14(2):e1006892. PMID: 29462184 DOI: 10.1371/journal.ppat.1006892.
5) Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. Nat Protoc. 2013 Nov;8(11):2281-2308. PMID: 24157548 DOI: 10.1038/nprot.2013.143.