

インターフェロンによって発現が誘導される 細胞性抗ウイルス分子 RyDEN の同定

鈴木 陽一

1. はじめに

我々の体内や周囲には数多くの微生物が存在するが、多くの微生物は我々に何も起こさないか、または益をもたらすこともある。しかし、一部の微生物はヒトの健康状態を乱すことで結果的に病気を引き起こす。これに対し、宿主（ヒト）は免疫機構を活性化することでその感染症に対抗する。すなわち、感染症が成立するかどうかは、宿主と病原体の力関係によって決まるのである。インターフェロン（interferon：IFN）は、病原体の感染初期に発動される自然免疫において重要な役割を果たすサイトカインである。感染細胞から分泌されたIFNは周囲の細胞に働きかけ、それらの細胞内に抗ウイルス状態を確立する。しかし、IFNが作り出した抗ウイルス状態において、どのような分子が実際のエフェクターとなってウイルスを攻撃しているのかについては不明な点が多い。筆者らは、IFNによってヒト細胞内で発現誘導され、デングウイルス（dengue virus：DENV）という病原ウイルスの複製を抑える新規細胞性因子・RyDEN/C19orf66を同定した。本稿では、RyDENの同定に至る過程とそのウイルス抑制メカニズムについて概説する。

2. DENVの感染様式

DENVはヒトにデング熱やデング出血熱などの熱性疾患を引き起こすエンベロープ型RNAウイルスである。このウイルスはフラビウイルス科と呼ばれる一群のウイルスファミリーに分類される¹⁾。フラビウイルス科には日本脳炎ウイルス、黄熱ウイルス、そして近年、南米を中心に猛威をふるうジカウイルス（ZIKV）などが属し²⁾、さらにはC型肝炎ウイルス（HCV）のような難治性疾患の原因ウイ

ルスも含まれる。

DENVは蚊の吸血行動によってヒトに媒介される。DENV感染症は主に熱帯や亜熱帯地域で発生し、世界中で毎年数億人の人々がDENVに感染すると推測されているが³⁾、日本でも他人事ではない。太平洋戦争中には主に南方戦線からの罹患帰還兵を原因とする20万人規模のデング熱の流行が報告されている⁴⁾。また、2014年には70年ぶりの国内発生が確認され、100名を超える感染者が出たことは記憶に新しい⁴⁾。輸入症例（海外で感染した渡航者が国内で発症するケース）については毎年数百名程度報告されていることを考えても、DENVは我々にとって決して無縁の病原体とはいえない。流行国における媒介蚊は主にネッタイシマカであるが、温帯地域に広く生息するヒトスジシマカによっても媒介される。つまり、わが国でデング熱が流行するときには、ヒトスジシマカが大きな役割を果たすことになる⁴⁾。

直径約50nmのDENV粒子中には11kbのゲノムRNAがパッケージングされている。このゲノムはmRNAと同じプラスの極性を持つ一本鎖RNAである。つまり、ゲノムRNAそれ自身がウイルスタンパク質合成のための鋳型としても機能する。また、真核生物のmRNAと同様にDENV RNAの5'末端はキャップ構造が付加されているが、3'末端はポリアデニル化されていない。5'ならびに3'側非翻訳領域（untranslated region：UTR）にはさまれたゲノムRNAの前半にはウイルス粒子を形作るために必要な3種類の構造タンパク質〔カプシド(C)、premembrane (prM)、エンベロープ(E)]が、そして後半領域には感染細胞内でのウイルスRNAやタンパク質の合成に必要な7種類の非構造タンパク質(NS1~5)がコードされている(図1)。

蚊の刺咬によって体内に侵入したDENVは、樹状細胞や単球を含むさまざまな細胞を標的とし、その侵入の際にはC型レクチン受容体(DC-SIGN/CD209)やマンノース受容体(CD206)、さらにはある種のホスファチジルセリン受容体(TIM, TAM)を用いる⁵⁾。受容体に結合したDENV粒子はエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれ、細胞膜とウイルスエンベロープとの膜融合によって、ゲノムRNAが細胞質に放出される。NS5タンパク質が持つRNA依存性RNAポリメラーゼ活性によって新しく合成されたウイルスRNAの一部は、タンパク質産生のた

大阪医科大学微生物学教室（大阪府高槻市大学町2番7号）

Identification of RyDEN/C19orf66 as a novel antiviral interferon-stimulated gene

Youichi Suzuki (Department of Microbiology and Infection Control, Osaka Medical College, 2-7 Daigaku-machi, Takatsuki 569-8686, JAPAN)

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2018.900192

© 2018 公益社団法人日本生化学会

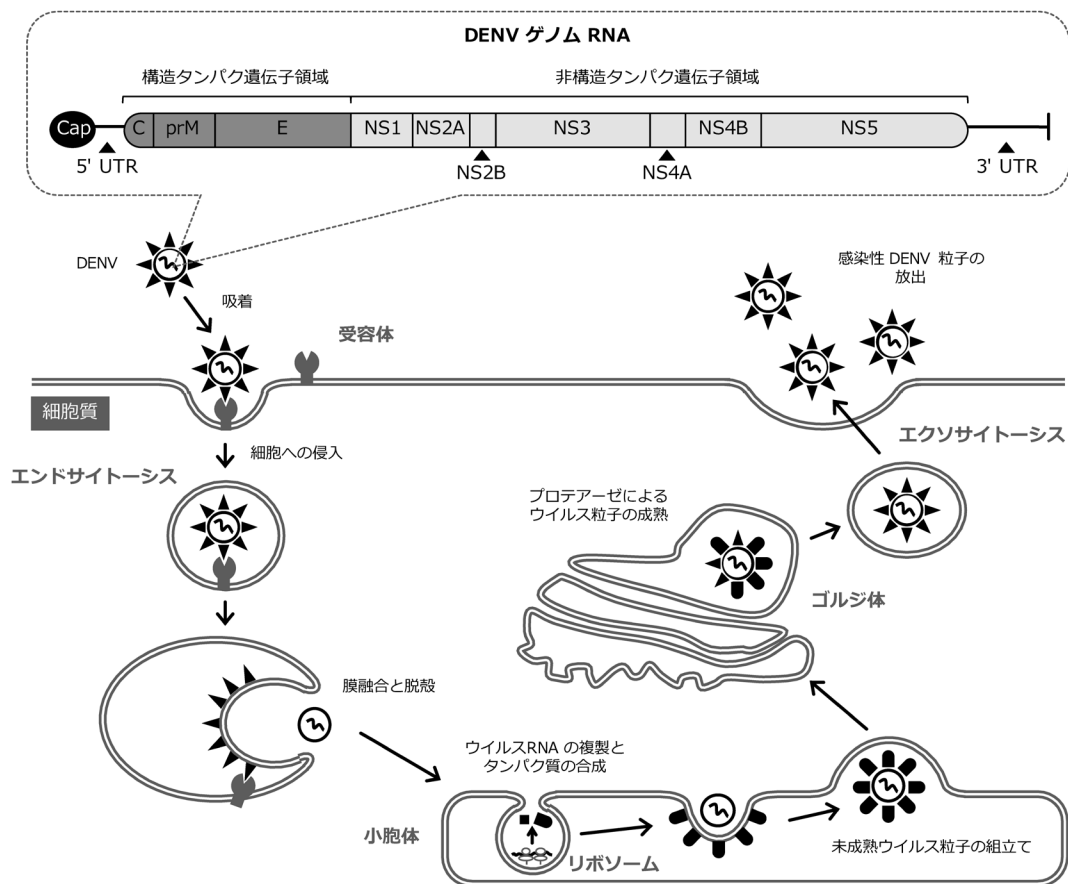


図1 DENVのゲノム構造と複製の様式（生活環）

めの鋳型となる。一つのポリペプチドとして翻訳されたDENVタンパク質は、その後、細胞やウイルスのプロテアーゼによって切断され、機能性を持つタンパク質に変換される。これらの過程は、小胞体（ER）内に形成されたvesicleで行われるが、このような半閉鎖空間環境の形成によってウイルス性分子は細胞側分解酵素やセンサー分子から保護されているかもしれない⁵⁾。新規合成されたウイルスRNAとウイルスタンパク質からは未熟なウイルス粒子が作られ、トランスゴルジネットワークを通過することによって、感染に必要な膜融合能を持つ感染性ウイルス粒子が形成される（ウイルスの成熟）。感染性DENV粒子はエクソサイトーシスにより細胞外へ放出され、次の感染サイクルへと向かう（図1）。

3. DENVの病原性

ヒトがDENVに感染しても症状がみられずに終わることが多い。しかし、発症した場合には高熱とそれに伴う頭痛、関節痛、筋肉痛、発疹等の症状がみられ、これをデング熱と呼ぶ。一部の感染者においては、さらに著しい血漿漏出と出血傾向を示すことがあり、このような重篤な

病態がデング出血熱である。デング熱は1週間程度で自然治癒することがほとんどであるが、デング出血熱の症状を呈する場合は、循環血液の低下からより重篤なデングショック症候群に移行する危険性がある。よって、デング出血熱に陥った患者に対しては、速やかに適切な治療を施すことが求められる^{3,4)}。デングウイルス感染症の重篤化に至る原因の一つとして抗体依存性感染増強（antibody-dependent enhancement：ADE）という現象が考えられている。DENVにはエンベロープの抗原性の違いから四つの血清型が存在する。1回目のDENV感染の際には、感染したタイプのDENVに対する中和抗体が産生されるが、困ったことにある血清型に対して作られた中和抗体は、他の血清型に対しては十分な抑制効果を示さない。それどころか、異なる血清型のDENV粒子に結合した非中和抗体が、単球由来細胞などのFc受容体を持つ細胞とウイルスを架橋し、結果的に細胞へのウイルス取り込みを促進してしまうのである³⁾。この厄介なADE現象は、DENVワクチンの開発にも大きな障害となる。ワクチン接種によって中途半端な抗体しか誘導できなければ、逆に病態を悪化させてしまうからである。最近の研究結果によると、DENVに対する抗体がZIKVの感染を高めてしまうことも報告されてお

り²⁾, ある種のフラビウイルスを標的とした予防ワクチンを開発する際には, 他のフラビウイルスに対する影響も考えておかなければならない。

4. IFN誘導性抗DENV遺伝子の新規同定

DENV感染症における問題点は, それだけでない。この感染症に対しては特效薬が存在しないのである。したがって, デング熱やデング出血熱の治療は, 輸液や解熱を中心とした対処療法に頼らざるをえない。しかしながら, DENVが感染しても発症せずに終わることが多いことを考えると, 生体防御機構は何らかの形でウイルスの排除に関わっているはずである。

RNAウイルスの感染に対する自然免疫機構の活性化は, 微生物に特異的な分子パターン (pathogen-associated molecular patterns : PAMPs) を通じて, 細胞がウイルスを認識することからスタートする。DENVの感染におけるパターン認識受容体 (pattern recognition receptors : PRRs) としては, Toll様受容体 (TLR3, TLR7) やRIG-I様受容体 (RIG-I, MDA-5) が報告されている^{3,5)}。これらの細胞側センサー分子は下流のシグナル伝達経路を活性化し, IFNや炎症性サイトカインの遺伝子発現を誘導する。次に, ウイルス感染細胞から分泌されたIFNは周囲の細胞のIFN受容体に結合し, それらの細胞に抗ウイルス状態を誘起する。I型やIII型IFNの場合ではJAK-STAT経路を介し, STAT1, STAT2そしてIRF9からなるISGF3複合体の形成を引き起こす。ISGF3はその後, 核内における転写因子として機能し, 最終的にインターフェロン誘導性因子 (IFN-stimulated genes : ISGs) と呼ばれる一群の遺伝子の発現を活性化する。これまでに数百種類のISGsが同定されているが, 重要な点は, ISGsにはウイルスに対して阻害活性を持つものが多く含まれているということである。すなわち, IFN反応が確立する抗ウイルス状態において, 実際の抗ウイルスエフェクター分子はISGsである⁶⁾。

では, DENV感染に対して阻害的に働くISGはあるのだろうか? *in vitro*実験では, 培養細胞をIFNであらかじめ処理しておくことでDENVの複製効率が100分の1以下にまで減少することから⁷⁾, 何らかのISGが抗DENV因子として機能していると考えてもよさそうである。そこで筆者らは, cDNAライブラリースクリーニング法を用いて, IFN誘導性抗DENV因子の同定を行った⁸⁾。まず, HeLa細胞をI型IFNであるIFN- α で24時間処理し, そのmRNAからcDNAのライブラリーを作製した。次に, cDNAライブラリーのプールをレンチウイルスベクターの遺伝子に挿入し, 感染性レンチウイルスベクターを産生後, ヒト肝がん由来のHuh7.5細胞にトランスダクションした。レンチウイルスベクターはヒト免疫不全ウイルス (HIV) をベース

としていることから, その組み込み反応によってベクターゲノムをHuh7.5細胞の染色体に組み込む。すなわち, cDNAライブラリーも細胞に安定に組み込まれることになる。そして, このようにして樹立した細胞群にDENVをチャレンジ感染させた。Huh7.5細胞はDENVに対する感受性がきわめて高く, ウイルスの増殖に伴って速やかな細胞死が誘導される。つまり, 我々が期待したのは, i) IFN- α を処理したHeLa細胞内で発現誘導されたISGsのうちDENVに抑制的なものがHuh7.5細胞に導入されれば, ii) そのようなHuh7.5細胞はウイルス感染による細胞死から逃れるだろうということである。結果は予想どおりであった。DENVのチャレンジ感染にも関わらず生き残ってきたHuh7.5細胞のクローンが, 50株ほど得られたのである。そして, それぞれの細胞株に組み込まれたcDNAの配列を解析したところ, 約4割の細胞クローンに*C19orf66*という遺伝子が挿入されていることがわかった。*C19orf66*は, それまでの機能がまったく報告されていない未知の遺伝子であったため, 我々はこれをRepressor of yield of DENV (RyDEN) と名づけた⁸⁾。

5. RyDENの特徴

RyDEN/*C19orf66*遺伝子は19番染色体にコードされており, そのmRNAからは291アミノ酸のタンパク質が作られる。上述のように, この遺伝子については機能がまったく報告されていなかったが, アミノ酸配列をもとにモチーフ検索を行ったところ, その中央領域には核移行シグナル (nuclear localization signal : NLS), そしてC末端領域には核外輸送シグナル (nuclear export signal : NES) と推測される配列の存在が確認された。また, グルタミン酸(E)が連続するユニークな配列 (Eリッチドメイン) もC末端領域にみられる (図2A)。

RyDENが実際にDENV抑制因子として働くのかどうかを調べるために, RyDENを強制発現したヒト細胞株をいくつか樹立し, ウイルスを感染させたところ, cDNAライブラリースクリーニングの結果を裏づけるようにDENVの複製効率はその細胞で大きく減少した (図2B)。一方, 内源性RyDENをRNA干渉法でノックダウンしてやると, ウイルスの増殖が促進された。つまり, RyDENの発現はDENVの感染に負の影響を与えるということである。さらに重要なことには, 細胞をIFN- α で前処理しておくことで, 未処理の細胞に比べてDENVの複製効率は約100分の1に低下するが, RyDENノックダウン細胞ではIFNで処理してもウイルスの複製効率は30分の1程度しか低下しなかった。このことは, I型IFNの処理によって誘起される抗DENV状態の確立において, RyDENが大きな役割を果たしていることを意味している⁸⁾。

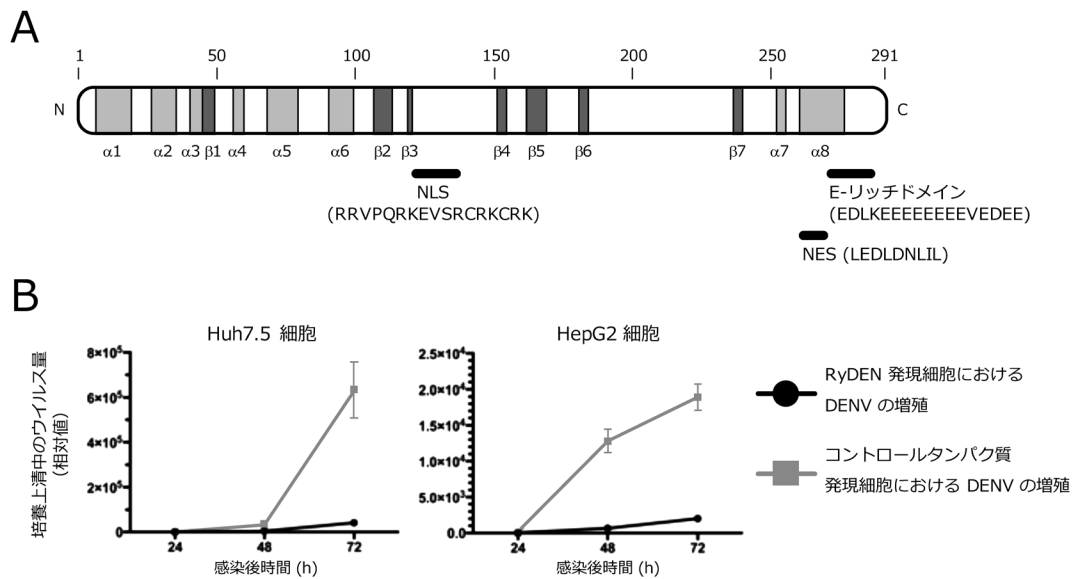


図2 RyDENの抗DENV活性

(A) RyDENのドメイン構造。二次構造予測プログラムによってRyDENには核移行シグナル (NLS) や核外移行シグナル (NES) が含まれることが推測された。C末端領域には特徴的なEリッチドメインもみられた。α1~8とβ1~7はそれぞれαヘリックス、βシート構造を示す。(B) RyDEN発現細胞におけるDENVの増殖性。RyDENを強制発現したヒト細胞 (Huh7.5細胞とHepG2細胞) においては、コントロール細胞に比べてウイルスの複製効率が大きく減少した。

次に、RyDENが持つ抗DENV活性の分子機序を解析しようと試みたが、アミノ酸配列の情報だけではRyDENの機能を考察することは困難であった。そこで、筆者らはRyDENに相互作用する細胞性タンパク質を同定し、それらのco-factorの特徴からRyDENの機能を推察できないかと考えた。プロテインGタグ配列を融合したRyDENをヒト細胞に強制発現させ、IgGビーズを用いて細胞の抽出液からタグ付加RyDENとそれが形成するタンパク質複合体をアフィニティー精製し、質量分析によって解析した。その結果、RyDENはpoly(A)-binding protein cytoplasmic 1 (PABPC1)、およびLa motif-related protein 1 (LARPI) という2種類の細胞性タンパク質と結合することが明らかとなった⁸⁾。

6. 相互作用分子から推測されるRyDENの分子機能

PABPC1はmRNAのタンパク質翻訳過程において、3'末端ポリ(A)鎖に結合すると同時に、5'末端キャップ構造を中心として形成された翻訳開始因子複合体に含まれるeIF4Gとも会合することにより、mRNAを環状化させる分子として知られている。この環状構造が、結果的にmRNAの翻訳開始を促進する⁹⁾。もう一つの因子LARPIについては、細胞分裂やアポトーシスに関与するという報告があり、ショウジョウバエではPABPとともにmRNAの翻訳を制御することも示されているが、詳しい機能はよく

わかっていない¹⁰⁾。

これらのRyDEN結合性因子のDENV感染における役割を調べるために、内在性PABPC1とLARPIの発現を、それぞれRNA干渉法によって低下させたところ、DENVの複製効率は大きく下がること示された。つまり、RyDENとは対照的に、PABPC1とLARPIはDENVの増殖に必要な細胞性因子だったのである⁸⁾。本稿では実験の詳細を解説することができないが、その後の解析によって、1) RyDENは配列非特異的なRNA結合性タンパク質であること、2) PABPC1の存在によってDENV RNAの3'末端領域への結合特異性が高まること、そして3) PABPC1はRyDENの中央領域に存在するNLS様配列に相互作用することが明らかとなった⁸⁾。

これらの結果をもとにすれば、RyDENの機能について次のように考察することができる(図3)。1) DENV RNAからタンパク質が翻訳される段階ではPABPC1が必要であるが、2) IFNで誘導されたRyDENはPABPC1を介してDENV RNAに会合し、3) 何らかの機構をもってウイルスタンパク質の翻訳プロセスを阻害しているのかもしれない。DENVのRNAはポリアデニル化されていないが、PABPがウイルスRNAの3'末端領域に結合することはすでに示されている¹¹⁾。また、PABPC1やLARPIはprocessing body (P-body) のようなRNA代謝構造体に局在し、mRNAの安定性に関与することが報告されていることから^{9,10)}、RyDENがPABPC1/LARPIを介してDENV RNAの分解を促

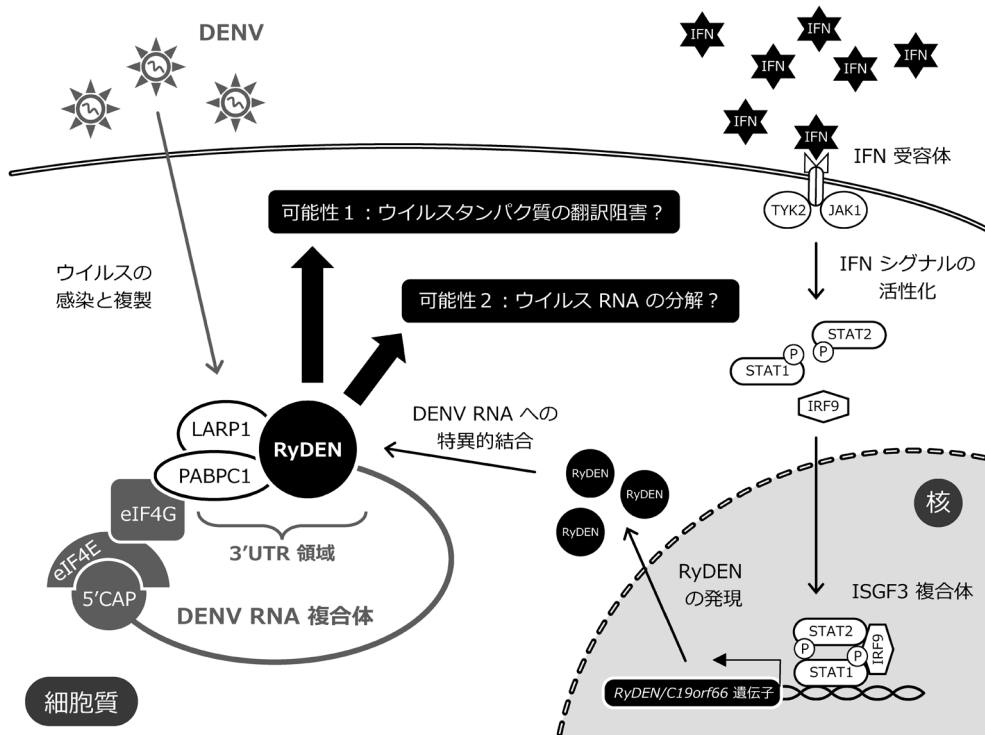


図3 RyDENの抗DENV活性の分子メカニズム

IFNシグナルの活性化によって発現誘導されたRyDENは、細胞質にてDENV RNAに結合する。ウイルスRNAへの結合特異性はPABPC1によって付与されるようである。DENV RNAの翻訳複合体にリクルートされたRyDENは、1) ウイルスタンパク質の合成阻害、もしくは2) P-bodyにおけるウイルスRNAの分解を誘導することによって、結果的にDENVの複製を抑制する可能性が考えられる。

進する可能性も考えられる。他の研究グループの報告によると、RyDENは実際にP-bodyに集積するようである¹²⁾。RyDENの抗DENV活性がどちらの機序（DENV RNAの翻訳阻害もしくは分解促進）によって発現しているのかについては、今後解明していかなければならない課題である。

7. おわりに

タイ国で行われた調査によると、デング熱やデング出血熱の患者では健常者に比べて血清中のIFN- α 量が高く、特に解熱前に上昇することが報告されている¹³⁾。また、アカゲザルを用いた実験では、IFN- α の投与が血中のDENV量を下げる効果を持つことも示されている¹⁴⁾。これらのエビデンスは、DENV感染者においてIFN反応がウイルスのコントロールに寄与していることを示唆するものである。ウイルス性肝炎の治療にはI型IFNの直接投与が一般的に行われているが、DENV感染症に対してこのようなインターフェロン療法は実施されていない。ウイルス性肝炎とは異なりデング熱は急性感染症であることや、副作用の問題もあるであろう。しかし、ISGの抗DENV活性のメカニズムを分子レベルで明らかにすることはウイルスの弱点を暴き出すことであり、ひいては抗ウイルス薬の

開発にもつながるものと筆者は考える。興味深いことに、RyDENを強制発現した細胞では、DENVだけでなくHCVやチングニアウイルスといった他のRNAウイルス、さらにはある種のDNAウイルスの増殖も抑制された⁸⁾。つまり、RyDENは多様なウイルスに対して抑制効果を示すISGだったのである。現在、ウイルス感染症の治療に用いられる分子標的薬は、特定のウイルスにしか効果がない（狭域スペクトラム）ものがほとんどである。もしRyDENの機能を模倣することができれば、さまざまなウイルスに対して阻害効果を持つ（広域スペクトラム）抗ウイルス薬の開発が可能になるかもしれない。その意味でも、RyDENの分子機能のさらなる解明が待たれる。

文 献

- 1) Fernandez-Garcia, M., Mazzon, M., Jacobs, M., & Amara, A. (2009) *Cell Host Microbe*, **5**, 318–328.
- 2) Miner, J.J. & Diamond, M.S. (2017) *Immunity*, **46**, 771–773.
- 3) Guzman, M.G. & Harris, E. (2015) *Lancet*, **385**, 453–465.
- 4) 高崎智彦 (2015) モダンメディア, **61**, 130–134.
- 5) Diamond, M.S. & Pierson, T.C. (2015) *Cell*, **162**, 488–492.
- 6) Schneider, W.M., Chevillotte, M.D., & Rice, C.M. (2014) *Annu. Rev. Immunol.*, **32**, 513–545.
- 7) Diamond, M.S., Roberts, T.G., Edgil, D., Lu, B., Ernst, J., & Har-

- ris, E. (2000) *J. Virol.*, **74**, 4957–4966.
- 8) Suzuki, Y., Chin, W.X., Han, Q., Ichiyama, K., Lee, C.H., Eyo, Z.W., Ebina, H., Takahashi, H., Takahashi, C., Tan, B.H., Hishiki, T., Ohba, K., Matsuyama, T., Koyanagi, Y., Tan, Y.J., Sawasaki, T., Chu, J.J., Vasudevan, S.G., Sano, K., & Yamamoto, N. (2016) *PLoS Pathog.*, **12**, e1005357.
- 9) Smith, R.W., Blee, T.K., & Gray, N.K. (2014) *Biochem. Soc. Trans.*, **42**, 1229–1237.
- 10) Bayfield, M.A., Yang, R., & Maraia, R.J. (2010) *Biochim. Biophys. Acta*, **1799**, 365–378.
- 11) Polacek, C., Friebe, P., & Harris, E. (2009) *J. Gen. Virol.*, **90**, 687–692.
- 12) Balinsky, C.A., Schmeisser, H., Wells, A.I., Ganesan, S., Jin, T., Singh, K., & Zoon, K.C. (2017) *J. Virol.*, **91**, e01606–e01616.
- 13) Kurane, I., Innis, B.L., Nimmannitya, S., Nisalak, A., Meager, A., & Ennis, F.A. (1993) *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **48**, 222–229.
- 14) Ajariyakhajorn, C., Mammen, M.P. Jr., Endy, T.P., Gettayacamin, M., Nisalak, A., Nimmannitya, S., & Libraty, D.H. (2005) *Antimicrob. Agents Chemother.*, **49**, 4508–4514.

著者寸描

●鈴木 陽一 (すずき よういち)

大阪医科大学微生物学教室講師，医学博士。

■略歴 1993年山口大学農学部卒業，95年同大学大学院農学研究科修士課程修了，99年東京医科歯科大学大学院医学研究科博士課程修了，99～2000年日本エイズ予防財団リサーチレジデント，01～05年米国NIH博士研究員，06～10年京都大学ウイルス研究所特任准教授，10～14年シンガポール国立大学上級研究員，14年より現職。

■研究テーマと抱負 ウイルスと宿主との相互作用を分子レベルで明らかにし，抗ウイルス薬の開発につなげたい。

■ウェブサイト <http://www.omc-m.org/research/kiso-virus/>