

令和 2 年 6 月 22 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08849

研究課題名(和文)フラビウウイルスの増殖を制御する宿主因子群の機能解析

研究課題名(英文)Molecular Function of host factors involved in flavivirus propagation

研究代表者

森田 英嗣(Morita, Eiji)

弘前大学・農学生命科学部・准教授

研究者番号：70344653

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：海外からの流入感染症として警戒されているデングウイルスやジカウイルスなどのフラビウウイルスは、共通して感染細胞の小胞体近傍に複製オルガネラと呼ばれる構造物を創り、そこでウイルスゲノムの複製と粒子形成を行う。本研究では、我々がこれまでに宿主因子のスクリーニングによって同定してきたERストレス関連因子群、膜蛋白質群のウイルス増殖における作用機序を明らかにした。主に、VCP複合体がウイルス複製オルガネラに集積する分子機構の解明、VCP複合体のウイルス増殖・ウイルス複製オルガネラ形成における役割、小胞体関連分解の複製オルガネラ形成における役割を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で対象とするフラビウウイルスには、C型肝炎ウイルスをはじめ、本邦でも流行の可能性のあるデング熱、ジカ熱、ウエストナイル熱などが含まれている。特に、海外からの流入感染症として警戒されているデングウイルス及びジカウイルスに対しては、現在のところ有効に作用するワクチンは開発されておらず早急な対策が求められている。本研究の成果は、我々独自のプロテオミクス解析により、感染後期過程に焦点を当てた宿主因子との相互作用を明らかにしたものである。よって、これまでにない新たな抗ウイルス薬の開発につながる期待される。

研究成果の概要(英文)：Flavivirus including dengue virus and zika viruses can dramatically rearrange the intracellular membranes of the host cell and produce unusual organelle-like structures called "replication organelle". These membrane structures appear in close proximity to the endoplasmic reticulum and likely serve as a scaffold for the assembly of replication machinery by providing an organization and environment facilitating viral propagation. Previously, we had purified replication complexes from cells infected with flavivirus and performed extensive/quantitative mass spectrometry analyses, and identified several cellular factors that were specifically recruited to viral replication organelle. In this study, we clarified the molecular function of these cellular factors, including ESCRT factors and VCP complexes, on Dengue virus and Japanese encephalitis virus propagation.

研究分野：ウイルス学

キーワード：フラビウウイルス 日本脳炎ウイルス 複製オルガネラ VCP

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

フラビウイルスには、デングウイルスやジカウイルス、ウエストナイルウイルスなど、海外からの流入感染症として警戒されているウイルスが含まれる。特に、デングウイルス感染やジカウイルス感染は、致死率の高いデング出血熱や妊婦感染による小頭症を発症させるにもかかわらず、未だ有効なワクチンはなく治療法も存在しない。現在、企業が中心となって NS3 プロテアーゼや、NS5 RNA ポリメラーゼなどの酵素活性を標的とする抗フラビウイルス薬が開発されているが、未だ実用化には至っていない。また、RNA ウィルスはゲノム複製時における複製エラー率が非常に高く変異しやすいため、抗ウイルス薬に対する耐性株への対応は常に必要である。本研究は、感染後期過程におけるウイルス因子と宿主因子との相互作用を明らかにし、新たな創薬につながるウイルス増殖の分子機構解明を目的とする。

フラビウイルスは、共通して感染細胞の小胞体近傍に複製オルガネラと呼ばれる構造物を創り、そこでウイルスゲノムの複製と粒子形成を行う。また、この構造物は、宿主からの自然免疫応答をはじめ、小胞体ストレス応答、オートファジー機構など、様々な細胞応答からの回避を可能にし、長期にわたり持続的に自身の遺伝子を複製させるために必須な構造物であると考えられている。我々はこれまでに、デングウイルス及び日本脳炎ウイルスの複製複合体を精製し網羅的なプロテオーム解析と siRNA による機能スクリーニングを行い、感染によって特異的にリクルートされウイルスの増殖に必須な宿主因子群を多数同定した (Tabata, Cell Reports, 2016)。その中には我々がこれまでに、レトロウイルスやマイナス鎖 RNA ウィルス粒子形成に必須であることを明らかにしてきた ESCRT (endosomal sorting complex required for transport) 因子群の他に、LC3B などのオートファジー関連因子群、VCP や NPL4 などの小胞体 (ER) ストレス関連因子群、また、KIAA1715, RTN4 などの ER 膜動態を制御する Wedge (くさび) 型膜蛋白質群が含まれていた。

2. 研究の目的

本研究では、これまでに進めてきた宿主因子のスクリーニングによって同定してきた ER ストレス関連因子群、Wedge 型膜蛋白質群が、どのような分子機構でウイルス複製複合体形成、またはウイルス複製に寄与しているか解析し、ウイルスの増殖に必要な鍵となるウイルス因子-宿主因子相互作用を明らかにするとともに、ウイルス増殖に対する制御法開発の分子基盤確立を目指す。

3. 研究の方法

(1) ウィルス増殖に必要な ESCRT 因子群同士の相互作用：スクリーニングによって同定された ESCRT 因子群のうち、TSG101、CHMP2A-B と CHMP4A-C がウイルス粒子形成に必要であることが既に本研究グループの先行研究にて示されていた。本研究では、TSG101、CHMP2 または CHMP4 をノックダウンした細胞に siRNA に抵抗性を示すサイレンス変異を導入した野生型または各種変異体を入れ戻し、VPS4 や ALIX など、これら因子に結合する因子群のウイルス増殖における重要性について明らかにした。

(2) VCP 複合体がウイルス複製オルガネラに集積する分子機構の解明:スクリーニングによって同定された VCP 複合体がどのようにウイルス複製オルガネラに集積するか、その分子機構を明らかにした。VCP と共に作用すると知られている 5 種類のコファクターと、10 種類のウイルス蛋白質との相互作用について、酵母 two hybrid 法、免疫沈降法、免疫染色による共局在解析によって調べた。また構造情報をもとに点変異体、末端欠損変異体群を作出し、VCP 複合体とウイルス蛋白質の相互作用に必要な配列を明らかにした。

(3) 感染細胞内における VCP 複合体のウイルス増殖・ウイルス複製オルガネラ形成における役割:過去の報告より VCP 複合体がストレス顆粒の解除に必要であることが明らかになっていることから、ウイルス感染細胞における VCP のストレス顆粒解除機能とウイルス増殖、ウイルス蛋白質の合成との関係について解析した。VCP の機能を阻害した場合に、感染細胞におけるストレス顆粒形成、宿主及びウイルス蛋白質の翻訳量がどのように変化するか、免疫染色法、ピュアロマイシンラベリングアッセイ、マーカー遺伝子の発現などを調べることにより解析した。

(4) VCP と LNP の複製オルガネラ形成における役割：VCP が関与する ERAD (ER associated degradation 小胞体関連分解) 因子 Derlin1, Derlin2, Derlin2/3, Sel1L、もしくは LNP の遺伝子欠損細胞を用い、ウイルス増殖におけるこれら因子の役割を解析した。また、これら因子の感染細胞内での局在、さらには、全てのウイルス因子に対して ERAD の基質である可能性について、シクロヘキシミドチェイス、タイムラプスイメージング解析、超解像顕微鏡解析等にて調べた。

4. 研究成果

(1) ウィルス増殖に必要な ESCRT 因子群同士の相互作用：本研究では、TSG101、CHMP2 または CHMP4 をノックダウンした細胞に siRNA に抵抗性を示すサイレンス変異を導入した野生型または各種変異体を入れ戻したところ、TSG101 の PTAP 配列への結合、CHMP2A の生体膜及び

CHMP4 への結合などが、フラビウイルスの増殖に必須であることを明らかにした。一方、CHMP2 及び CHMP4 の VPS4 や ALIX への結合はウイルス増殖に必要なことが明らかとなり、フラビウイルス複製オルガネラが形成される小胞体膜変形時にはこれまでに知られていないユニークな ESCRT サブセットが機能している可能性が示された。

(2) VCP 複合体がウイルス複製オルガネラに集積する分子機構の解明：先行研究によってウイルス増殖に必要な因子として同定された VCP 複合体のうち、NPL4 を含む複合体が、ウイルス側の NS4B 蛋白質と直接相互作用することを明らかにした。また、種々の変異体を用いた解析より、NS4B の 143-210 領域が VCP-NPL4 複合体を複製オルガネラにリクルートする上で重要であることを明らかにした。

(3) 感染細胞内における VCP 複合体のウイルス増殖・ウイルス複製オルガネラ形成における役割: siRNA または低分子阻害剤添加により VCP の機能を阻害した場合、感染細胞におけるストレス顆粒の形成が著しく増加することを見出した (図 1)。また、感染細胞においては、酸化ストレスなどによって誘導されるストレス顆粒の形成が著しく抑制されていること、活性型 PKR や eIF2 α 発現によって誘導される翻訳抑制が解除されていることを見出した。さらに、この現象は、感染だけでなく、NS4B や VCP の発現によっても確認された。これらの結果は、ウイルスは VCP 複合体を複製サイトにリクルートすることで、局所的なストレス応答の解除を行い、効率的なウイルス増殖を行なっていることを示している。

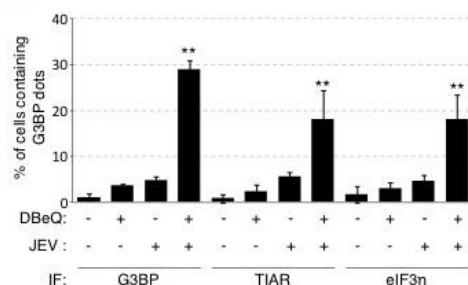


図 1. ウイルス感染由来のストレス顆粒はVCPによって解消されている
 Huh751細胞にJEV感染させ、24時間後に終濃度5 μ MのDBEを4時間処理した後に固定し、SGのマーカータンパク質であるG3BP, TIAR, eIF3 η とJEV NS3の抗体を用いて検出した。SG形成細胞数を測定し、その形成率を表した。

(4) VCP と LNP の複製オルガネラ形成における役割： Derlin2、Derlin2/3、Sel1L、LNP 欠損細胞でウイルス増殖が著しく減弱しており、NS2B、NS4B など、一部の膜アンカー型非構造ウイルス因子が選択的にプロテオソーム依存的に分解されていることを明らかにした (図 2)。また、これら因子は複製オルガネラ内のコンポリューティッド膜に局在していた。これらの結果より、特異的な ERAD 因子による一部のウイルス因子のコンポリューティッド膜での分解がウイルス増殖に必要であることがわかった。

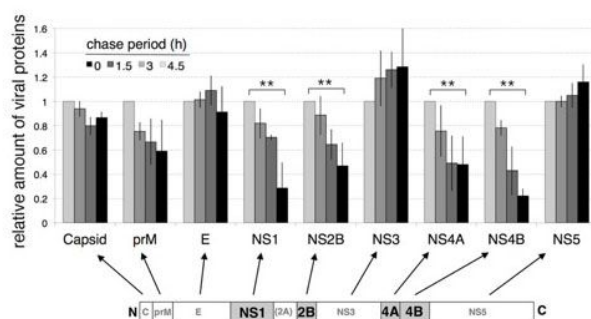


図 2. 一部のウイルス因子は選択的に分解される
 フラビウイルス感染細胞にシクロヘキシミドを添加し新たな蛋白合成を阻害させたあと、各ウイルス因子の安定性についてウエスタンブロット法にて調べた。一部の非構造蛋白質が積極的に分解されていることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Eiji Morita	4. 巻 2
2. 論文標題 Membrane closure in stress induced-autophagosome formation.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Stress.	6. 最初と最後の頁 122-124
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15698/cst2018.06.138	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 -

1. 著者名 Lokesh P. Tripathi, Eiji Morita, Yi An Chen, Kenji Mizuguchi	4. 巻 3
2. 論文標題 Network-based analysis of host-pathogen interactions	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology	6. 最初と最後の頁 932-937
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/B978-0-12-809633-8.20170-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Keisuke Tabata, Atsuki Nara, Hiroko Omori, Eiji Morita	4. 巻 1998
2. 論文標題 Immuno-localization of ESCRT proteins in virus-infected cells by fluorescence and electron microscopy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 73-92
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） DOI: 10.1007/7651	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 森田英嗣
2. 発表標題 フラビウイルス感染時に誘導されるウイルス複製オルガネラ形成・維持の分子機構
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森田英嗣
2. 発表標題 フラビウウイルスの複製オルガネラ形成におけるVCP/p97の役割
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 荒川将志、瓜生慧也、工藤理帆、森田英嗣
2. 発表標題 選択的オートファジーの新規レセプター分子の同定.
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sakika Kimura, Kensuke Kamata, Hirotaka Ebina, and Eiji Morita
2. 発表標題 Efficient VLP assembly of human parvovirus B19 VP1 and VP2 expressed mammalian and bacterial cells.
3. 学会等名 第66回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 後藤史門、石村麻里奈、石田幸太郎、天沼美里、吉田永吉、姫野依太、森田英嗣
2. 発表標題 フラビウウイルスキャプシド蛋白質の核小体への局在の意義
3. 学会等名 第52回日本脳炎ウイルス生態学研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 荒川将志、田端桂介、新井亜利紗、小林万希子、有本大、森田英嗣
2. 発表標題 VCP複合体はフラビウイルス感染細胞のストレス応答を制御する
3. 学会等名 第69回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 石村麻里奈、後藤史門、天沼美里、石田幸太郎、吉田永吉、牛田千里、姫野依太、河原康一、森田英嗣
2. 発表標題 フラビウイルスキャプシド蛋白質と宿主リボソームとの相互作用
3. 学会等名 第71回日本細菌学会東北支部総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 木村咲伽、天沼美里、蝦名博貴、落合晋、生田和良、森田英嗣
2. 発表標題 アデノ随伴ウイルスベクターシステムを利用したヒトパルボウイルスB19感染評価系の確立
3. 学会等名 第65回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 天沼美里、後藤史門、石村麻里奈、石田幸太郎、吉田永吉、姫野依太、森田英嗣
2. 発表標題 アラニンスキャニング変異導入によるフラビウイルスキャプシドの機能解析
3. 学会等名 第65回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2017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
--	---------------------------	-----------------------	----