

平成 21 年 4 月 20 日現在

研究種目：基盤研究（S）

研究期間：2006～2010

課題番号：18109004

研究課題名（和文）ポリオウイルスの体内動態と宿主機能

研究課題名（英文）Dissemination mechanism of poliovirus

研究代表者

野本 明男（NOMOTO AKIO）

東京大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：70112670

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：ウイルス、感染症、生体分子、脳神経疾患、病理学

1. 研究計画の概要

ポリオウイルス（PV）の体内動態に関する多くの事柄の内、腸管での増殖機構、中枢神経系への伝播機構、神経細胞への病原性発現機構に焦点を絞り、感染過程進行にとって、作用する宿主機能の解析を進め、宿主内におけるウイルスの感染現象の基本を理解する。

2. 研究の進捗状況

ヒト PV 受容体（hPVR）を持つトランスジェニック（Tg）マウスを感染モデルとし、血流中から中枢神経系へ速い移行を示すと思われる PV 変異体を分離し、そのゲノム構造を解析した。その結果、キャプシド蛋白質 VP1 のウイルス粒子表面に位置するペプチドの一部に変異があることを明らかにした。この変異が BBB 透過に関与しているかは、以下の BBB 透過に関する実験の進行に合わせ解明する予定である。

hPVR が関与しないことが知られる BBB 透過機構の *in vitro* BBB モデルを使用した研究から、トランスフェリンが PV の BBB 透過と競合すること、また両者は、マウス脳血管内皮細胞内の同一のエンドソームに取り込まれ得る可能性を示した。そこで、トランスフェリン受容体と PV の結合実験を行い、両者が互いに直接結合することを示した。さらに、両者の結合に関与するトランスフェリン受容体上のペプチドを同定した。

PV の逆行性軸索輸送に関しては、これまでに、ダイニン複合体を介した速い輸送系が PV を含むエンドソームの輸送に関与していることを明らかにしていたが、その輸送系に加え、遅い輸送系も PV 輸送に関与している

ことを明らかにした。さらに、hPVR を介さない PV の逆行性軸索輸送系が存在することも明らかにした。

PV は、軸索内を、感染性粒子としては運ばれ、神経細胞体で、複製を開始する。このメカニズムを研究するための実験系として、神経細胞体と神経シナプスを分離して培養するシステム、すなわち分離培養に成功した。

神経細胞は PV 抵抗性を持ち、PV の 1 回の感染では細胞変性効果が現れない。このメカニズムを解析したところ、神経細胞は、PV 特異的 2A プロテアーゼに対し、コントロールの HeLa 細胞に比べると圧倒的に抵抗性があることが明らかとなった。しかし神経細胞も PV の複数回の感染には細胞変性を現すことから、さらに検討を重ねたところ、神経細胞は、HeLa 細胞と同様に、PV のキャプシド蛋白質に対し感受性があり、この蛋白質の連続発現により細胞変性効果が現れることが判明した。PV を基本とした、神経細胞を標的とした発現ベクター作製にとって貴重な知見となった。

3. 現在までの達成度

おおむね順調に進展している。

Tg マウスの腸管に適応した、PV 変異株の分離同定は困難であった。複数回、腸管適応の PV の存在を確認しているが、その変異株を安定に維持することが出来なかった。残念ではあるが、方針を変え、BBB 透過に関すると思われる変異株を分離した。この分離株が BBB 透過に関する変異株であるか否かは今後の問題である。その他は順調である。

4. 今後の研究の推進方策

PV の BBB 透過に関しては、まず PV 粒子上のトランスフェリン受容体に結合するペプチドの同定を進める。現在、研究は進行しており、ある程度の領域は同定されている。この領域内に BBB 透過が亢進した PV の変異部位が存在するので、この変異 PV を使用して、in vitro BBB の透過実験を行う。

次に、PV 粒子上の透過に関するペプチドを蛍光標識し、その蛍光を指標として、細胞内での動き、細胞の反対側への放出などの観察を行い、PV がトランスサイトosisされるメカニズムを明らかにする。

上記ペプチドをタグとして使用し、薬物の BBB 透過効率を上昇させる研究を行い、DDS (drug delivery system) の世界に、新たな方法論を紹介する。

Tg マウスの運動神経細胞の初代培養を分離培養システムを使用して行う。この培養システムで培養した神経細胞のシナプス側へ、PV を感染させ、神経細胞体に到達した PV が複製過程に入っていくメカニズムを解析する。

さらに、PV を基本とし、神経細胞を標的にした PV 発現ベクターを構築し、PV では不可能といわれていた分泌型蛋白質の発現を成功させたい。

5. 代表的な研究成果

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 4 件)

(1)S. Ohka, M. Sakai, S. Bohnert, H. Igarashi, K. Deinhardt, G. Schiavo, & A. Nomoto. Receptor-dependent and -independent axonal retrograde transport of poliovirus in motor neurons. *J. Virol.*, 査読有, in press

(2)Tsuyoshi Tachibana, Shoko Okazaki, Asako Murayama, Akira Naganuma, Akio Nomoto, & Shusuke Kuge. A major peroxiredoxin-induced activation of Yap1 transcription factor is mediated by reduction-sensitive disulfide bonds and reveals a low level of transcriptional activation. *J. Biol. Chem.*, 査読有, 284(7): 4464-4472, 2009

(3)T. Nishimura, M. Saito, T. Takano, A. Nomoto, M. Kohara, & K. Tsukiyama-Kohara. Comparative aspects on the role of polypyrimidine tract-binding protein in internal initiation of hepatitis C virus and poliovirus RNAs. *Comparat Immunol Microbiol Infect Dis.*, 査読有, 31: 435-448, 2008

〔学会発表〕(計 10 件)

(1)Seii Ohka, Mai Sakai, Stephanie Bohnert, Hiroko Igarashi, Katrin Deinhardt, Giampietro Schiavo, & Akio Nomoto. Poliovirus receptor (hPVR/CD155)-dependent and -independent axonal retrograde transport of poliovirus in motor neurons. *Europic* 2008, 2008.5. 27, Barcelona

(2)Akio Nomoto. The molecular basis of poliovirus neurovirulence. The International Symposium Hamamatsu University School of Medicine COE Program Medical Photonics Viruses Shed Light on Neuroscience, 2008.2.9 Hamamatsu