

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K07137

研究課題名(和文) ウイルス粒子の質を保证する小胞媒介性のウイルスゲノム輸送

研究課題名(英文) The quality control of viral particles through the endocytic transport of viral genome

研究代表者

福田 美香子(広浜美香子)(Fukuda, Mikako)

筑波大学・医学医療系・研究員

研究者番号：60814655

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：複製されたウイルスゲノムは核外輸送後、Rab11a陽性輸送小胞を介して、微小管依存的に細胞膜へと輸送される。小胞輸送系を阻害することで、出芽したウイルス粒子上のウイルス膜タンパク質の密度が低下することを見出し、Rab11a陽性輸送小胞上のARHGAP1によって、ウイルスゲノム輸送と協調したウイルス膜タンパク質のクラスタリングが促進されることを見出した。また、ウイルスゲノムの輸送と協調してクラスタラフトを形成することで、スパイクタンパク質の密度が高い、“良質”なウイルス粒子が形成される。これは、外環境でのウイルス粒子の安定性獲得だけでなく、宿主の免疫系から回避するためにも重要な戦略である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、細胞膜上でのウイルス粒子形成機構については、十分な観察技術が無く、ほとんど明らかにされていなかった。本研究では、高解像度・高時間分解能で細胞膜上でのウイルス粒子形成を観察する技術を開発することで、ウイルスゲノムの細胞膜への輸送に協調して、ウイルス膜タンパク質が集積する分子機構を解析した。特に、アクチンフィラメントを介したウイルス膜タンパク質の流動性の制御により、ウイルス粒子の質が決定されることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：After the nuclear export, the replicated viral genome is transported to the plasma membrane via Rab11a-positive transport vesicles in a microtubule-dependent manner. We found that inhibition of the vesicular transport system reduced the density of viral membrane proteins on viral particles, and that ARHGAP1 on Rab11a-positive transport vesicles promotes the clustering of viral membrane proteins in concert with viral genome transport. The clustering of lipid rafts in response to the viral genome trafficking results in the formation of "high-quality" viral particles with spike viral proteins. This is an important strategy not only for achieving stability of viral particles in the external environment, but also for evading the host immune system.

研究分野：ウイルス学

キーワード：ウイルス粒子形成

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

インフルエンザウイルスは、総脂質の 50% 以上がコレステロールである脂質二重膜をエンベロープとしてもつ。ウイルス粒子上には、ウイルス膜タンパク質 HA 及び NA がスパイク状に発現し、プロトンチャネルである M2 が挿入されている(図 1)。インフルエンザウイルスゲノムは 8 本に分節化された一本鎖 RNA であり、末端にウイルスポリメラーゼが結合し、ウイルスタンパク質 NP が数珠状に連なって RNP 複合体を形成している。細胞核内で複製されたウイルスゲノムは核外輸送後、中心体周囲の Endocytic recycling

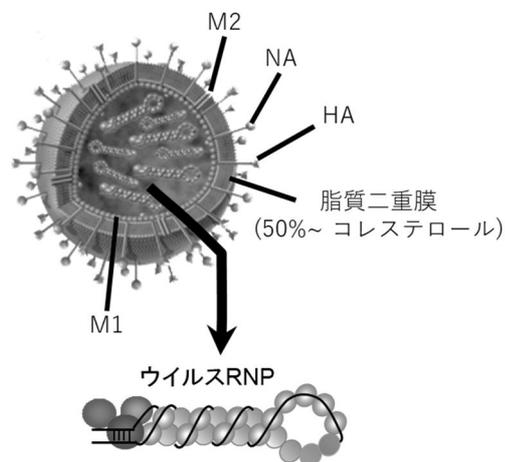


図 1. インフルエンザウイルス粒子の模式図

compartments (ERC) に集積し、ERC から出芽した Rab11a 陽性輸送小胞 (リサイクリングエンドソーム) を介して、微小管依存的に細胞膜へと輸送される。一方、Rab11a 陽性輸送小胞を阻害しても、受動拡散で代替されて、ウイルスゲノムは細胞膜まで到達するため、ウイルス産生量の低下はわずかであり、ウイルスゲノムが小胞輸送系を介して輸送される意義は不明であった。研究代表者らは、小胞輸送系を阻害することで、出芽したウイルス粒子上のウイルス膜タンパク質の密度が低下することを見出し、Rab11a 陽性輸送小胞にはウイルスゲノム輸送と協調したウイルス膜タンパク質のクラスタリング (= budzone 形成) を促進する宿主因子が含まれている可能性が示唆されていた。ちなみに、HA、NA 及び M2 は、リサイクリングエンドソーム非依存的なトランスゴルジ網を介して、細胞膜まで輸送されるため、Rab11a 陽性輸送小胞を阻害しても、細胞膜上のウイルス膜タンパク質は減少しない。

### 2. 研究の目的

細胞膜へのインフルエンザウイルスゲノムの小胞輸送と協調して、ウイルス膜タンパク質が脂質ラフトに集積し、ウイルス粒子は形成される。これは、脂質ラフトのクラスタリングを活性化する分子が輸送小胞に存在するためだと推測され、本研究では、その分子実体を明らかにすることを目的とする。また、ウイルスゲノムの輸送と協調してクラスターラフトを形成することで、スパイクタンパク質の密度が高い、“良質”なウイルス粒子が形成される。これは、外環境でのウイルス粒子の安定性獲得だけでなく、宿主の免疫系から回避するためにも重要な戦略である可能性がある。小胞輸送系を機能欠損した細胞から、スパイクタンパク質が少ない、低質なウイルス粒子を調製してマウスに免疫することで、免疫学的な観点からもウイルス粒子の質を保証する意義を明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### (1) ウイルスゲノム輸送に関与する宿主因子のプロテオミクス解析

myc-BirA\*-Rab11a 発現 A549 細胞 ( $2 \times 10^6$  細胞) を  $\phi 10$  cm ディッシュに播種した。37°C で 12 時間培養後、PR8 株を多重感染度 (MOI) 10 で感染させ、感染 2 時間後に培地を終濃度 20  $\mu$ M Biotin を含む DMEM 増殖培地に交換し、6 時間培養を続けた。感染 8 時間後に細胞を回収し、Lysis buffer1 に懸濁後、氷上で 5 分間静置して細胞を溶解した。その後、等量の Lysis buffer を添加して同様に処理し、可溶画分に streptavidin 磁気ビーズ (TriLink) を添加して混和した。ビーズの洗浄を行い、Elution buffer を添加して 100°C にて 5 分間静置することでビーズに結合

したタンパク質を溶出した。溶出したタンパク質は Q Exactive HF-X mass spectrometer (Thermo Fisher) を用いて液体クロマトグラフィー質量分析 (LC-MS) 解析を行い、DAVID version 6.8 を用いて遺伝子オントロジー解析を行った。

#### (2) 高速原子間力顕微鏡-共焦点顕微鏡の相関観察による budozone 形成の可視化

チップスキャンタイプの高速 AFM と倒立共焦点顕微鏡を組み合わせた相関顕微鏡 (Olympus; BIXAMTM) を使用した。蛍光標識ウイルス膜タンパク質を発現するベクターを COS-7 細胞にトランスフェクションし、1 時間後に PR8 株を MOI = 10 で感染させた。感染 12 時間後、電子ビーム堆積を利用して作製されたバネ定数 0.05 N/m の特注カンチレバー (Nanoworld) を装着した相関顕微鏡を phase-modulation mode で運用し、10 s/frame のスキャン速度で画像を取得した。

#### (3) FRAP 解析によるアクチンフィラメントの動態解析

レンチウイルスベクターを使用して作製した Lifeact-TagGFP2 を恒常的に発現する A549 細胞に PR8 株を MOI = 10 で感染させた。感染 12 時間後、細胞が播種されたガラスボトムディッシュ (IWAKI) を LSM880 共焦点顕微鏡 (Carl Zeiss) に付属のチャンパー (37°C、5% CO<sub>2</sub>) に移して FRAP 解析を行った。prebleach として 2 枚撮影した後、488 nm のレーザー光を用いて Lifeact-TagGFP2 を局所的に退色させ、その後 0.3 s/frame のスキャン速度で 40 秒間画像を取得し、退色領域における蛍光回復をモニターした。非退色領域の測定結果を使用して標準化した退色領域の輝度データをもとに、GraphPad Prism の one-phase exponential equation を使用して近似蛍光回復曲線を作成し、50% 回復に要した時間 (half-recovery time) を導出した。

### 4. 研究成果

#### (1) ウイルスゲノム輸送に関与する宿主因子のプロテオミクス解析

遺伝子オントロジー解析の結果、感染細胞において Rab11a と近接相互作用する因子として、"Cell surface"、"Glycoproteins"、"Cell-cell adhesion"、"Actin-cytoskeleton"、"Vesicle-mediated transport"、"Rab GTPase binding" に関連するタンパク質群を同定した。"Rab GTPase binding" として Rab11 エフェクター分子の FIP1、FIP2、FIP5 が同定された一方で、FIP3 と FIP4 は同定されなかった (Fig. 2-6)。これらの結果から、感染細胞において class I FIP (FIP 1、FIP2、FIP5) は Rab11 エフェクターとして機能している可能性が示唆された。また、アクチン制御因子として、Rho ファミリーを不活性化する GAP であり、Rab11a 陽性小胞上の局在が報告されている ARHGAP1 が同定された。

#### (2) 高速原子間力顕微鏡-共焦点顕微鏡の相関観察による budozone 形成の可視化

Budozone の形成およびウイルス粒子膜の出芽は、ウイルス膜タンパク質が埋め込まれている脂質ラフトのクラスタリングと協調して行われる。高速原子間力顕微鏡 (HS-AFM) に蛍光顕微鏡が搭載された相関顕微鏡 (Olympus; BIXAM) を用いて、budozone 形成のダイナミクスの観察を試みた。HA-Venus および M2-mCherry を発現する COS-7 細胞に PR8 株を MOI = 10 で感染させ、感染 12 時間後に相関顕微鏡で観察した。非感染細胞では直径 400 nm の数十秒で消失する膜ラッフルが観察された。一方で感染細胞においては、過去の TEM 観察例と類似した直径 500 nm 程度の budozone 様の突出構造が約 3 分にわたって比較的安定して観察され、HA-Venus および M2-mCherry と共局在した。Budozone 様構造においては、リング状の HA 染色像が M2 染色像を取り囲む様子が観察され、細胞膜から出芽するウイルス粒子の首部分に M2 が集積し、粒子の切り離しを行うモデルを支持した。また HA のコレステロール結合ドメインに I532A、

Y533A、S534A の変異を導入した non-raft HA においては、突出構造および M2 との共局在が観察されず、HA が脂質ラフトのクラスタリングを介して budzone に集積するモデルを支持した。

### (3) FRAP 解析によるアクチンフィラメントの動態解析

Lifect-TagGFP2 発現細胞を用いた FRAP 法を行ない、アクチンフィラメントのダイナミクスを測定した。非感染細胞では平均 50% 蛍光回復時間 (mean half-recovery time) が 3.28 秒であったのに対して、感染細胞においては 4.49 秒と長く、感染細胞ではアクチンフィラメントの動態が安定化していることが示された。そこで次に、Sec14-homology domain を介して Rab11 陽性リサイクリングエンドソームに局在し、主に RhoA と Cdc42 の GAP として機能してアクチンフィラメントのダイナミクスを制御する ARHGAP1 に着目し、感染細胞におけるアクチン制御機構の詳細解明を試みた。FLAG-ARHGAP1 発現細胞に PR8 株を MOI = 10 で感染させ、感染 0、4、8 時間後に細胞を固定し、免疫染色と FISH 法で解析を行った。ARHGAP1 と vRNA の共局在は感染 4 時間後では ERC 周辺において、感染 8 時間後では細胞質の小胞様の点状構造で観察された。感染 8 時間後の細胞では、細胞質の ARHGAP1 の点状構造の数が非感染細胞と比較して増加した一方で、感染 8 時間後の FIP5 KD 細胞においては、そのような増加は見られなかった。これらの結果から、ARHGAP1 は vRNP の輸送と協調して FIP5 依存的に細胞膜直下へと輸送されることが示された。FRAP 法によってアクチンフィラメントのダイナミクスを解析したところ、コントロール細胞では感染依存的に mean half-recovery time が増加した一方で、FIP5 KD 細胞と ARHGAP1 KD 細胞ではそのような増加は見られなかった。さらに ARHGAP1 KD 細胞では、感染後期における HA-M2 間の PLA シグナルはコントロールの 6 割程度に減少しており、放出されるウイルス粒子の HA 充填率もコントロールの 6 割程度であった。加えて、ARHGAP1 KD 細胞から放出されるウイルス粒子はコントロールよりもプロテアーゼ耐性が低下していた。以上の結果から、ARHGAP1 は FIP5 依存的な vRNP の輸送に付随して細胞膜直下へと到達し、アクチンフィラメントの動態を安定化して budzone 形成を促進することで、“良質”な粒子形成を促進することが明らかになった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Guo Youjia, Kawaguchi Atsushi, Takeshita Masaru, Sekiya Takeshi, Hirohama Mikako, Yamashita Akio, Siomi Haruhiko, Murano Kensaku	4. 巻 296
2. 論文標題 Potent mouse monoclonal antibodies that block SARS-CoV-2 infection	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 100346 ~ 100346
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbc.2021.100346	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 SENBAS AKYAZI Burcak, PIRINCAL Aysegul, KAWAGUCHI Atsushi, NAGATA Kyosuke, TURAN Kadir	4. 巻 44
2. 論文標題 Interaction of influenza A virus NS2/NEP protein with the amino-terminal part of Nup214	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 TURKISH JOURNAL OF BIOLOGY	6. 最初と最後の頁 82 ~ 92
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3906/biy-1909-49	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 該当する
1. 著者名 Lee SangJoon, Ishitsuka Akari, Noguchi Masayuki, Hirohama Mikako, Fujiyasu Yuji, Petric Philipp P., Schwemmler Martin, Staeheli Peter, Nagata Kyosuke, Kawaguchi Atsushi	4. 巻 4
2. 論文標題 Influenza restriction factor MxA functions as inflammasome sensor in the respiratory epithelium	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Science Immunology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciimmunol.aau4643	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 該当する
1. 著者名 Lee S, Hirohama M, Noguchi M, Nagata K, Kawaguchi A.	4. 巻 92
2. 論文標題 Influenza A Virus Infection Triggers Pyroptosis and Apoptosis of Respiratory Epithelial Cells through the Type I Interferon Signaling Pathway in a Mutually Exclusive Manner.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 e00396-18
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/JVI.00396-18.	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 Kuroki T, Lee S, Hirohama M, Taku T, Kumakura M, Haruyama T, Nagata K, Kawaguchi A.	4. 巻 9
2. 論文標題 Inhibition of Influenza Virus Infection by <i>Lentinus edodes</i> Mycelia Extract Through Its Direct Action and Immunopotentiating Activity.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 1164
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2018.01164.	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 Kuroki T, Osari S, Nagata K, Kawaguchi A.	4. 巻 9
2. 論文標題 Influenza A Virus NS1 Protein Suppresses JNK1-Dependent Autophagosome Formation Mediated by Rab11a Recycling Endosomes.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 3120
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2018.03120.	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 Pham PTV, Turan K, Nagata K, Kawaguchi A.	4. 巻 20
2. 論文標題 Biochemical characterization of avian influenza viral polymerase containing PA or PB2 subunit from human influenza A virus.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Microbes and Infection	6. 最初と最後の頁 353-359
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.micinf.2018.04.003.	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11件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 川口敦史
2. 発表標題 インフルエンザウイルス感染による気道上皮組織の炎症応答機構
3. 学会等名 第94回日本感染症学会総会・学術講演会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takeshi Sekiya, Mikako Hirohama, Atsushi Kawaguchi
2. 発表標題 Regulatory mechanism of respiratory epithelium-specific inflammatory response upon influenza virus infection by a novel NS1 binding protein
3. 学会等名 第67回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kameyama K, Nagata K, Kawaguchi A.
2. 発表標題 Inhibition of type I IFN production in avian influenza virus-infected macrophages
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 Kuroki T, Osari S, Nagata K, Kawaguchi A.
2. 発表標題 Influenza virus NS1 protein inhibits selective autophagy induced by virus genome recognition
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 Lee S, Nagata K, Kawaguchi A.
2. 発表標題 Influenza virus restriction factor MxA functions as inflammasome receptor in respiratory epithelium
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 Kawaguchi A.
2. 発表標題 Influenza A virus infection induces apoptosis and pyroptosis in respiratory epithelial cells in a mutually exclusive manner
3. 学会等名 Asian-Pacific Centenary Spanish 1918-flu Symposium (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岩崎憲治、川口敦史
2. 発表標題 多様なコンフォメーションの解析を可能にするクライオ電子顕微鏡解析
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川口敦史
2. 発表標題 インフルエンザウイルス感染に対する気道上皮組織特異的な炎症応答機構
3. 学会等名 都医学研セミナー (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kawaguchi A.
2. 発表標題 Molecular mechanism of host responses against influenza virus infection
3. 学会等名 Infectious disease symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kawaguchi A.
2. 発表標題 Respiratory epithelium-specific inflammasome restricts influenza A virus infection
3. 学会等名 Symposium on influenza and other infections (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川口敦史
2. 発表標題 ウイルスポリメラーゼの動態構造から読み解く新型インフルエンザの Outbreak
3. 学会等名 筑波大-KEK連携セミナーシリーズ 第5回 (招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<a href="http://www.md.tsukuba.ac.jp/basic-med/infectionbiology/virology/">http://www.md.tsukuba.ac.jp/basic-med/infectionbiology/virology/</a>
---

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
研究分担者	川口 敦史  (Kawaguchi Atsushi)  (90532060)	筑波大学・医学医療系・教授    (12102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------