

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2009

課題番号：19370058

研究課題名（和文） 病原体感染における脂質動態解析

研究課題名（英文） A study on lipid dynamics during pathogen infection

研究代表者

前濱 朝彦（MAEHAMA TOMOHIKO）

国立感染症研究所・細胞化学部・室長

研究者番号：40322755

研究成果の概要（和文）：C型肝炎ウイルスおよび病原体プリオンをモデル病原体として用い、これらの病原体感染と細胞内脂質動態との関連性を解析した。その結果、C型肝炎ウイルスの複製過程に複数のイノシトールリン脂質が関与していることを明らかにした。また病原体プリオンの細胞間伝播実験系を新たに開発し、スフィンゴ脂質合成系の阻害が病原体プリオンの伝播過程を抑制することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Cellular lipids function as building blocks of biomembranes and signaling molecules thereby being fundamental components for all cells. In this study, we analyzed the function of cellular lipids for infection cycle of hepatitis C virus and infectious prion. We found that certain types of phosphoinositide were required for replication process of human hepatitis C virus. In addition, we found that the inhibition of sphingolipid biosynthesis substantially suppressed cell-to-cell transmission of infectious prion using newly developed infectious prion transmission assay system.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	3,600,000	0	3,600,000
2008年度	4,800,000	0	4,800,000
2009年度	5,000,000	0	5,000,000
年度			
年度			
総計	13,400,000	0	13,400,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：ウイルス、感染症、脂質、シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

(1) 病原体感染における細胞宿主応答を解析する必要性

多様な病原体によって引き起こされる感染症には、ヒトの生命を脅かすほど重篤なもの

も数多くあり、それらの病態解析は極めて重要な医学的課題となっている。その中でもウイルスに代表される細胞侵入性の病原体感染は、(a) 病原体の細胞内への侵入、(b) 病原体の複製・増幅、(c) 宿主細胞の破壊と病

原体放出、の3つのステップによって成立する。病原体はこれらの各ステップを通じて、病原体を排除しようとする様々な宿主細胞応答から逃れ、自らの増殖を試みる。感染症病態の理解および医学的対抗手段を講じるためにはこの「病原体感染 - 宿主細胞応答」のせめぎ合いを分子レベルで解明することが極めて重要である。

(2) 「病原体感染 - 宿主細胞応答」における生体膜ダイナミクスと宿主細胞シグナル系の変化

病原体としてウイルスを考えた場合、感染の最初のステップは「細胞内への侵入」であり、この過程ではエンドサイトーシスや脂質二重膜の融合といった細胞骨格系の再構成を伴う生体膜ダイナミクスが極めて重要な意味をもつ。

さらにウイルスは宿主細胞に侵入した後、宿主細胞のタンパク質合成系を支配し、自らの構造タンパク質群・非構造タンパク質群を新規合成する。そして別途複製したウイルスゲノム核酸をパッケージングすることによって、複製ウイルス粒子を多量に産生する。この複製ステップからウイルスが細胞外に放出される過程にかけても、ウイルス小胞の形成・輸送、そして脂質二重膜の融合・出芽という一連の生体膜ダイナミクスが引き起こされる。一方、感染宿主細胞はTLRを介した自然免疫系を活性化するとともにオートファジー（自食）経路やアポトーシス経路を活性化し、細胞内に侵入したウイルスに対抗すると考えられる。

(3) 「病原体感染 - 宿主細胞応答」におけるイノシトールリン脂質群の関与

イノシトールリン脂質群 (phosphatidylinositol phosphate(s): PIPs) は生体膜の構成成分であるホスファチジルイノシトールのイノシトール環がリン酸化された一連の脂質分子群であり、哺乳動物細胞ではリン酸化部位が異なる7種のPIPsが存在する。興味深いことに、PIPsはエンドサイトーシスをはじめとする多様な生体膜ダイナミクスを制御するシグナル分子として知られているほか、タンパク質合成シグナル経路やオートファジー経路、アポトーシス経路においても中心的な役割を担うシグナル分子であることが広く知られている。すなわち、上記した「病原体感染 - 宿主細胞応答」の全てのステップにおいて重要な役割を担っていることが推測されるが、現在のところウイルス感染に応答した PIPs 動態の解析例は皆無である。なお、本研究で解析対象とするもう一つの病原体「病原体プリオン」の場

合、その感染は「細胞内への侵入 複製 凝集体形成 細胞死(?)」という一連のスキームに従うと考えられるが、その時にどのような PIPs 動態、そして細胞内シグナルの変化が起きているのかは全く未知である。

2. 研究の目的

PIPsは生体膜ダイナミクスや病原体排除応答において中心的な役割を担うシグナル分子であり、その動態が病原体感染によって大きく変動することが予想される。さらに、その時に起きる細胞内シグナルの変動を解析することは感染症あるいは宿主細胞応答の分子レベルでの理解につながることを期待される。そこで本研究では、「病原体感染メカニズムの分子レベルでの理解」を目指して、これまでほとんど解析された実績のない（しかしながら極めて重要な役割を担っていると考えられる）病原体感染応答時におけるPIPs動態に着目し、以下の解析を行う。

(a) 「病原体感染 - 宿主細胞応答」における PIPs 動態の解析・プロファイリング

(b) PIPs 動態変化の結果引き起こされる（病原体感染に応答した）細胞内シグナル伝達の変動

(c) PIPs 動態変化の原因となる責任酵素群（脂質キナーゼ・ホスファターゼ）および病原因子の同定

そして、これらの解析から、最終的には「PIPs動態の人為的操作による病原体感染制御（感染防御・排除）の可能性を検討」することを目的とする。

なお、本研究では病原体モデルとして、ヒトC型肝炎ウイルス(HCV)および病原体プリオン(PrP^{Sc})を用いる。

3. 研究の方法

(1) HCV・PrP^{Sc}感染に伴うPIPs動態解析・プロファイリング

*in vitro*でのHCV感染系およびPrP^{Sc}感染系を用い、以下の手法によりPIPs動態解析を行う。

細胞を[³²P]無機リン酸あるいは[³H]イノシトールで標識し、放射標識されたPIPsを薄層クロマトグラフィー(TLC)で単離・解析する。また、必要に応じて脱アシル化した放射標識PIPsをHPLCでより詳細に単離・解析する。

各PIPsに特異的に結合するタンパク質ドメイン(PHドメインやPXドメイン)にエピトプタグを付加した分子(レポーター分子)を細胞内に導入し、これらのレポーター分子の挙動、すなわち細胞内局在の変化をモニターする。

PI 3,4,5-三リン酸などの特定のPIPsに関しては抗PIPs抗体が市販されているので、これらの抗体を用いた蛍光抗体法によってPIPs動態を検出する。

(2) HCV・PrP^{Sc}感染に伴う細胞内シグナル変化の解析 - PIPs動態の変動との関連

感染に応じて変化するPIPsの同定から、これらの下流にある細胞内シグナル系を予測し、HCV・PrP^{Sc}感染に伴ったこれらシグナル系の変化を解析する。

細胞骨格系や小胞輸送系の解析では、アクチン骨格の変化やAP-2やクラスリンなどのコートタンパク質の挙動を蛍光抗体法などを用いて観察し、PIPs挙動との相関関係を明らかにする。

タンパク質合成シグナル系やアポトーシス・オートファジー経路に関しては、これらのシグナル経路に關与する PKB や mTOR などの個々のシグナル分子の活性化状態を特異的リン酸化抗体や *in vitro* 活性測定法によって解析し、PIPs の挙動との相関関係を明らかにする。

(3) HCV・PrP^{Sc}感染応答に關与する脂質キナーゼ・ホスファターゼ群の同定

感染応答に關与する PIPs に関して、そのターンオーバーを担う脂質キナーゼ・ホスファターゼ群のノックダウンを行い、感染に感染した当該 PIPs に対する影響を検討し、感染応答に寄与する責任脂質キナーゼ・ホスファターゼを同定する。この時、ノックダウンが感染に感染する細胞内シグナル系におよぼす影響も同時に解析し、「責任酵素 責任 PIPs 細胞内シグナル変動」の連関性を明らかにする。また、Wortmannin (PI 3-キナーゼ阻害剤) やシコニン (PTEN 阻害剤) などを用いた脂質キナーゼ・ホスファターゼ群の選択的阻害も行う。

(4) HCV・PrP^{Sc}感染に伴う細胞内シグナル変化の解析 - PIPs動態の変動との関連

HCV・PrP^{Sc}感染に伴ったPIPs動態およびその下流シグナル系の変化を解析する。特にタンパク質合成シグナル系やアポトーシス・オートファジー経路に着目し、これらのシグナル経路に關与するPKBやmTORなどの個々のシグナル分子の活性化状態を特異的リン酸化抗体や *in vitro*活性測定法によって解析し、PIPsの挙動との相関関係を明らかにする。

(5) PIPs動態の人為的操作によるHCV・PrP^{Sc}感染の制御

前項で同定したHCV・PrP^{Sc}感染応答性の脂質キナーゼ・ホスファターゼを活性化・不活性化することによって細胞内PIPsを人為的に操作した場合、HCV・PrP^{Sc}の感染、そして

これらの病原体の増幅におよぼす影響を検討する。

細胞内における脂質キナーゼ・ホスファターゼの人為的な活性化・不活性化は、これら酵素群の過剰発現 (野生型や不活性化型変異体。利用可能な場合にはドミナント・ネガティブ体や恒常的活性化型変異体) あるいはノックダウンによって行う。

HCV感染・増幅は、抗HCV抗体による免疫染色法、あるいは細胞外に放出されたHCVウイルス粒子のELISA法やリアルタイム/qPCR法による定量で評価する。

PrP^{Sc}感染・増幅の評価は、細胞ライセート中のPrP^{Sc}量を標準化された手法(Proteinase K 消化 抗プリオン抗体を用いたウェスタンブロット)による定量で行う。

4. 研究成果

(1) HCV 感染サイクルと脂質動態

低侵襲性 PIPs プローブの作製

テトラサイクリン誘導性の低発現型ベクターを用いてイノシトールリン脂質群に対する細胞内蛍光プローブを発現する実験系を新たに開発した。今回用いたタンパク質ドメインは P40PHOX の PX ドメイン (ホスファチジルイノシトール(PI) 3-リン酸と結合)、FAPP1 の PH ドメイン (PI 4-リン酸と結合)、TAPP1 の PH ドメイン (PI 3,4-二リン酸と結合)、PLCd の PH ドメイン (PI 4,5-二リン酸と結合)、GRP1 の PH ドメイン (PI 3,4,5-三リン酸と結合) である。これらの mVenus 融合タンパク質は細胞内において、それぞれエンドソーム、ゴルジ体・小胞体、細胞膜等へ局在することが観察され、イノシトールリン脂質群の動態解析に有用であることが明らかとなった。

HCV 感染に伴う PIPs 動態

ヒト肝癌細胞 Huh-7 に対して HCV JFH-1 株を感染させ、イノシトールリン脂質動態を解析した。その結果、HCV 感染初期 (0-2 時間) において、既存の PIPs 解析法 (TLC 解析法・蛍光プローブ法) で検出可能な動態の変化は見いだせなかった。その一方で、抗体染色法を用いた解析から、感染中期において脂肪滴上の HCV 複製複合体と PIP2 が局在することを見いだした。

HCV 感染に伴う細胞内シグナル変化

オートファジーおよびタンパク質合成の主要制御因子であるタンパク質キナーゼ mTOR の下流に位置する S6 キナーゼ (S6K) の活性が HCV 感染後一過的に減少し、約 2 時間後には元の活性レベルに戻るのが観察された。この時 mTOR 上流に位置するタンパク質

キナーゼ B (PKB) の活性には変化が見られないことから、HCV 感染が感染初期過程において mTOR 制御系の近傍に作用し S6K の活性化を引き起こしていると考えられた。

PIPs 動態および細胞内シグナルの人為的制御による HCV 感染の制御

前項で記した PIP2 の分解を担う脂質ホスファターゼのノックダウンが HCV 複製を亢進することを見いだした。このホスファターゼのノックダウンが PIP2 の蓄積を誘導すること、さらに PIP2 と HCV 複製複合体との共局在 (前項) から、HCV 複製に PIP2 が重要な因子として関与することが考えられた。また mTOR 制御に関わる複数の因子が HCV 複製に必須因子として関与することが遺伝子ノックダウンの手法を用いた解析から明らかとなり、PIP2 制御系および mTOR 制御系が HCV 複製を抑制するための新たな創薬標的となり得ることが示された。

(2) PrP^{Sc} 感染サイクルと脂質動態

PrP^{Sc} 細胞間伝播実験系の開発

マウス神経芽腫 N2a 細胞を用いた病原性プリオン蛋白質 (PrP^{Sc}) の細胞間伝播実験系を構築した。本実験系では PrP^{Sc} の伝播が 3-5 日で観察でき、従来用いられてきた実験系と比較して 1/10 程度の時間で伝播を評価できることから、PrP^{Sc} 伝播における PIPs 代謝酵素群の役割の評価がより容易に行えるようになった。さらに、PrP^{Sc} の細胞内局在を検証するために、プロテイナーゼ K 処理およびグアニジン塩酸処理を組み合わせ、PrP^{Sc} に対して高い選択性を示す抗体染色法を開発した。

PrP^{Sc} 感染に伴う PIPs 動態

前項で開発した PrP^{Sc} 抗体染色法および PIPs 蛍光プローブ法を用いて PIPs と PrP^{Sc} との細胞内局在の比較を行ったところ、アグリソーム様の細胞内オルガネラにおいて PrP^{Sc} と PIP2 が共局在することを新たに見いだした。しかしながら PIP2 の合成・分解に関与する PIPs 代謝酵素群を強制発現しても PrP^{Sc} の蓄積には大きな影響を与えなかったことから、アグリソーム様構造への PIP2 の局在は PrP^{Sc} の蓄積後に起こる事象であり、PrP^{Sc} 蓄積の原因ではないと考えられた。

PrP^{Sc} 感染に関与する脂質群および細胞内シグナル分子群

本研究で新たに開発した PrP^{Sc} 細胞間伝播実験系を用いて、様々な脂質合成阻害剤の影響を検討したところ、シンバスタチンによる

コレステロール生合成の阻害やフモニシン B1 によるスフィンゴ脂質生合成の阻害が PrP^{Sc} の細胞間伝播を強く抑制することが明らかとなった。さらに PrP^{Sc} 感染に関与する細胞内シグナル分子のスクリーニングを試みたところ、細胞内膜輸送に関与する低分子量 GTP 結合タンパク質 ARF のドミナントネガティブ体の発現が PrP^{Sc} 細胞間伝播を強く抑制することを見いだした。これらの知見は、PrP^{Sc} の感染サイクルに細胞内の膜・タンパク質輸送が大きく関わっていることを示唆している。

5. 主な発表論文等

(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 8 件)

Tanaka, M., Hara, H., Nishina, H., Hanada, K., Hagiwara, K., and Maehama, T. (2010) An improved method for cell-to-cell transmission of infectious prion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (in press) (査読有)

Malchinkhuu, E., Sato, K., Maehama, T., Ishiuchi, S., Yoshimoto, Y., Mogi, C., Kimura, T., Kurose, H., Tomura, H., and Okajima, F. (2009) Role of Rap1B and tumor suppressor PTEN in the negative regulation of lysophosphatidic acid-induced migration by isoproterenol in glioma cells. *Mol. Biol. Cell*, **20**, 5156-5165 (査読有)

前濱朝彦 (2009) アミノ酸感知シグナル - mTOR 活性化の分子機構 - *アミノ酸研究* **3**, 5-14 (査読有)

前濱朝彦 (2009) アミノ酸感知シグナル *細胞工学* **28**, 760-764 (査読有)

Maehama, T., Tanaka, M., Nishina, H., Murakami, M., Kanaho, Y., and Hanada, K. (2008) RalA functions as an indispensable signal mediator for the nutrient-sensing system. *J. Biol. Chem.* **283**, 35053-35059 (査読有)

前濱朝彦, 岡原史明, 金保安則 (2008) あらたな癌抑制遺伝子 PICT-1/GLTSCR2 *医学のあゆみ* **224**, 172-173 (査読有)

Malchinkhuu, E., Sato, K., Maehama, T., Mogi, C., Tomura, H., Ishiuchi, S., Yoshimoto, Y., Kurose, H., and Okajima, F. (2008) S1P₂ receptors mediate inhibition of glioma cell migration through Rho signaling pathways

independent of PTEN. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **366**, 963-968 (査読有)

Maehama, T. (2007) PTEN: its deregulation and tumorigenesis. *Biol. Pharm. Bull.* **30**, 1624-1627 (査読有)

[学会発表](計2件)

田中正彦、原英之、萩原健一、花田賢太郎、仁科博史、前濱朝彦、共培養系を用いた高効率な PrPSc 伝播実験系の確立、第 82 回日本生化学会大会、2009 年 10 月 24 日、兵庫県神戸市

Maehama, T., Identification of a Ras-family GTPase as an indispensable signal mediator for nutrient sensing and mTORC1 activation, 8th International Conference on Protein Phosphatases, 2008 年 11 月 14 日、群馬県前橋市

6 . 研究組織

(1)研究代表者

前濱 朝彦 (MAEHAMA TOMOHIKO)
国立感染症研究所・細胞化学部・室長
研究者番号：40322755

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：