

令和 4 年 5 月 24 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16211

研究課題名（和文）ライブセル膜動態可視化によるインフルエンザウイルス侵入に伴う膜形態形成機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of membrane structural changes during influenza virus entry by live-cell imaging of membrane dynamics

研究代表者

吉田 藍子（Yoshida, Aiko）

北海道大学・医学研究院・助教

研究者番号：70831288

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：インフルエンザウイルスは、宿主細胞の持つエンドサイトーシスの機構を乗っ取ることで細胞内部への侵入を果たす。エンドサイトーシスの進行には、細胞膜の成分と微小構造の動的な変化が重要であることが報告されているものの、膜形態の動的変化に関する情報は現在のところ限られている。本研究では、高速AFMと薄層遮光照明を組み合わせたハイブリッド顕微鏡を構築し、生細胞の細胞膜の形態と細胞膜成分の同時可視化を試みた。この回折限界を超えた膜イメージング技術により、ウイルス侵入に伴うエンドサイトーシスに関する膜形態形成の分子機構の一端を解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、回折限界を超えたハイブリッド顕微鏡によりウイルスの宿主への侵入の瞬間、つまりウイルス感染の超初期過程を高い時空間分解能で捉えることに成功した。加えて、細胞膜動態へのシグナル伝達の寄与およびウイルス粒子侵入に付随する膜動態の力発生機構の一端を明らかにした。今後、さらなるウイルス・宿主細胞間相互作用インターフェースの詳細な解析により、インフルエンザ感染に特異的な分子・細胞動態の解明が期待される。将来的には、ウイルス側の変異の影響を受けない安全かつ有効な治療法・予防法開発の基盤構築にも繋がる成果をあげたい。

研究成果の概要（英文）：Influenza virus invades the inside of a host cell by hijacking the mechanism of endocytosis. Although it has been reported that dynamic changes in cell membrane components and microstructure are important for the progression of endocytosis, information on dynamic changes in membrane morphology is currently limited. In this study, we constructed a hybrid microscope that combines high-speed AFM and thin-layer shading illumination, and attempted simultaneous visualization of cell membrane morphology and cell membrane components of living cells. By using membrane imaging technology that exceeds this diffraction limit, we have elucidated a part of the molecular mechanism of membrane morphogenesis related to endocytosis associated with viral entry.

研究分野：細胞生物学

キーワード：高速原子間力顕微鏡 膜ナノ動態 エンドサイトーシス インフルエンザウイルス

1. 研究開始当初の背景

インフルエンザ感染症は毎年のように世界中で流行を繰り返している。その対策は喫緊であるが、インフルエンザ感染症研究には今なお多くの課題が残されている。インフルエンザウイルスの宿主細胞への感染は、細胞膜表面に結合したウイルスが宿主細胞の持つエンドサイトーシス機構を巧みにハイジャックすることで宿主細胞への侵入を果たす。しかし、ウイルス粒子が膜に吸着してから膜動態を経てエンドサイトーシスされるまでの「感染初期過程」で生じている膜形態形成については現在もよく分かっていない。最近、申請者の所属する研究室で初めて、インフルエンザウイルスの侵入のキーとなる受容体が同定され、Ca²⁺シグナル発動の重要性が明らかとなった (Fujioka, Cell Host & Microbe, 2018)。したがって、膜形態形成の機構を解明する上での足がかりとなる分子が明らかとなった。しかし、粒子径 100 nm 前後のサイズのウイルス粒子がエンドサイトーシスされるまでの「ダイナミックな膜の形態変化」を理解するために必要な技術が、現状、存在しないことが大きな課題となっている。

申請者は、これまでに生きた細胞の上側の膜 (頂端膜) の微小な構造変化を、数秒の時間分解能と 10 nm の空間分解能で可視化可能なライブセル高速原子間力顕微鏡 (atomic force microscopy, AFM) の開発に成功した。このライブセル高速 AFM は、ナノスケールで繰り返し広げられるウイルス侵入現場のライブイメージングに理想的な技術である。さらに、ライブセル高速 AFM を共焦点顕微鏡に組み合わせることによって、クラスリン依存性エンドサイトーシスに伴う「タンパク質の局在変化 (蛍光情報)」と「膜形態の変化 (AFM 情報)」を同時空間で取得可能な技術を確認した。この技術を用いて微小な頂端膜の動態を観察したところ、エンドサイトーシスが生じるのは頂端膜のうち限られた領域であることを発見した。この発見は、膜上に均一に分布している受容体と基質の相互作用の結果、クラスリンが集積し膜形態変化が誘発されるという従来のモデルとは合致せず、頂端膜にはエンドサイトーシスを効率的に行うために予めプログラムされたドメイン (preprogrammed membrane domain, PMD) が存在することを示唆する。つまり、頂端膜上の膜構成成分 (脂質や膜タンパク質) の不均一な分布が予想される。本研究課題での「問い」は、「PMD を支える分子基盤」および「PMD がいかにウイルス感染に関わっているか」である。

2. 研究の目的

本研究課題では、「PMD を支える分子基盤」および「PMD がいかにウイルス感染に関わっているか」を解明するために、頂端膜の構成成分 (受容体タンパク質や膜裏打ちタンパク質、脂質組成等) の動態と形態変化を可視化解析することで答えを得る。薄層斜光照明法 (highly inclined and laminated optical sheet, HIL0) による頂端側の細胞膜の一分子イメージングを導入することで、光の回折限界を超えた膜構成成分の動態観察系を構築する (図1)。この顕微技術を生きた細胞高速 AFM 技術と組み合わせることで、細胞膜の構成成分 (膜タンパク質、脂質組成、膜裏打ちタンパク質等) と形態を、数秒の時間分解能と数 10 nm の空間分解能でイメージング可能なハイブリッド顕微鏡を確立する。これにより、高いシグナルノイズ比で頂端膜の膜構成成分と膜形態の動態を同時に検出する。PMD の分子基盤およびウイルス侵入における膜形態形成の分子機構を解明することを最終的な到達点と定める。

3. 研究の方法

2 年間の研究期間中に下記の 3 つの研究項目を実行することで、目的である PMD の分子機構およ

びウイルス侵入における膜形態形成機構を解明する。

- (1) ハイブリッド顕微鏡によるPMDの可視化・解析
- (2) ハイブリッド顕微鏡によるインフルエンザウイルス侵入現場の可視化・解析
- (3) HILOと高速AFMの融合による頂端膜の物理的・光学的同時可視化

4. 研究成果

ハイブリッド顕微鏡による PMD の可視化・解析

ライブセル高速 AFM-共焦顕微鏡のハイブリッド顕微鏡によって、クラスリンによってコートされた膜のくぼみ (Clathrin-coated pit, CCP) が高頻度に出現する膜のドメイン (PMD) の正体に迫った。CCP の同定方法を図 1 A に示す。EGFP 融合型クラスリンの恒常発現細胞で取得した膜の形態 (AFM 情報) とクラスリン局在 (蛍光情報) の画像を重ね合わせたときに、クラスリンの蛍光スポットと重なる膜のくぼみが CCP である (図 1 A)。

予備実験から、本申請者は、上皮成長因子 (epidermal growth factor, EGF) による外部刺激でエンドサイトーシスを亢進させた際に、PMD に出現するピットの数が増加することを明らかにした (図 1 B)。高速 AFM 観察による詳細な解析により、この増加はピット出現頻度の増加によるものであることが分かった (図 1 C)。加えて PMD 内の個々の CCP のサイズと形状および経時変化に着目すると、CCP が時間をかけて大きく開口し楕円化する様子や楕円化を経て分裂する様子が観察された (図 1 D-G)。一方で、未刺激の CCP の形状は円形であり、CCP の分裂は認められなかった (図 1 E、F)。

これまで、エンドサイトーシスの過程で膜小胞となる CCP は、円形の構造であると考えられてきた。しかし、高速 AFM によるナノスケールでの膜形態変化の観察結果は、CCP がときに楕円化・分裂という想像もし得なかった振る舞いをすることを明示している。申請者はこの膜形態変化の理解こそが PMD 解明への鍵となると考え、まず、EGFR から発せられるシグナルの関与を検証した。EGFR のノックダウンおよび阻害条件で、EGF 刺激時の CCP 動態 (CCP の楕円化・分裂) が見られなくなったことから、EGFR シグナリングの下流因子が関与することが示唆された (図 2 A、B)。次に、Ras シグナリングの関与をドミナントネガティブ変異体 (RasN17) で検証したところ、Ras は関与しないことが明らかとなった (図 2 C、D)。Ras には関与しない因子として、Src に着目した。Src はクラスリンの重鎖をリン酸化することでクラスリンの集積を亢進すること、細胞の力学応答に関与することが示唆されている。Src の阻害薬処理によって、EGF 刺激で誘発される CCP の動態変化が生じなくなった (図 2 E、F)。つまり、CCP は円形で分裂せず、PMD でのピットの増加は認められなかった。以上から、EGF で誘発される PMD 形成の分子機構として、Src の関与を初めて見出すことができた。

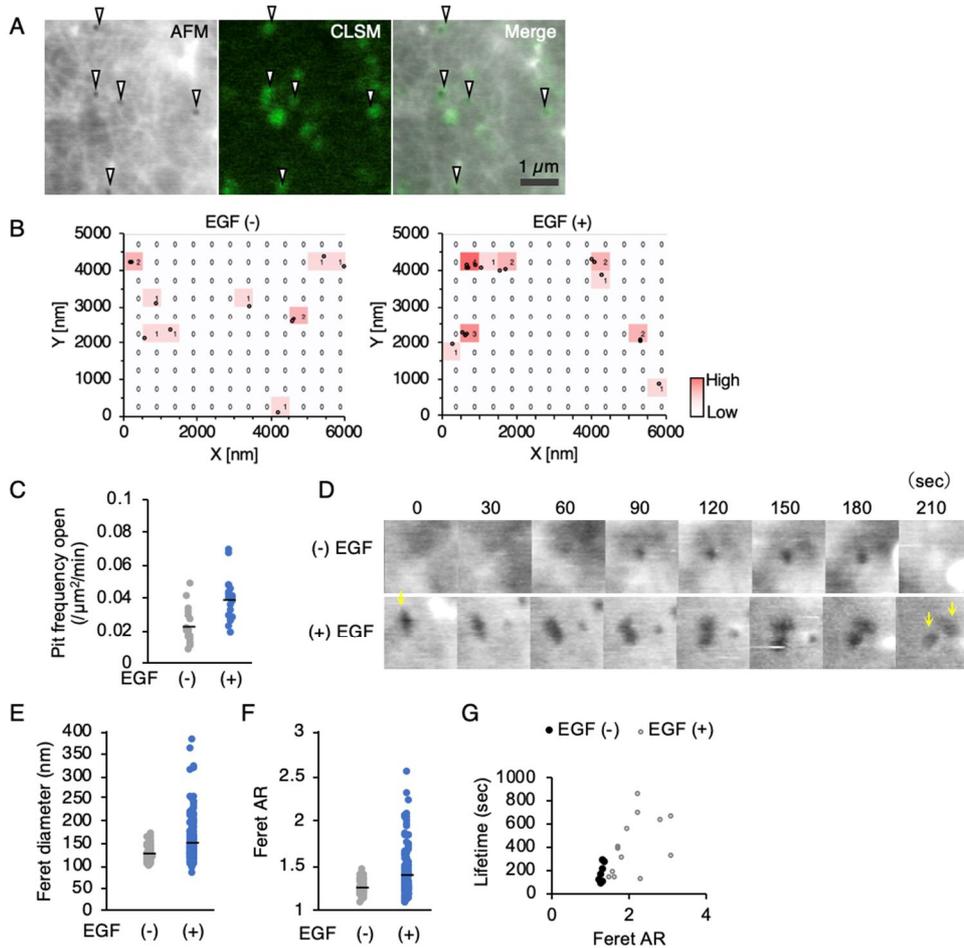


図 1 (A) クラスリン局在と膜形態の同時観察。 矢頭は CCP。(B) EGF 刺激前後での一定時間内に出現した CCP 分布の空間解析 . CCP の開口位置を X-Y グラフにプロットした . 各セルの CCP の数を計算し、カラスケール化した . (C) CCP の出現頻度。(D) EGF 刺激前後での CCP (黒) の経時変化。 矢印の CCP は楕円化を経て分裂する。(E) CCP のフェレー径、(F) フェレーのアスペクト比。(G) は CCP 開口時間のフェレーAR に対するプロット図。

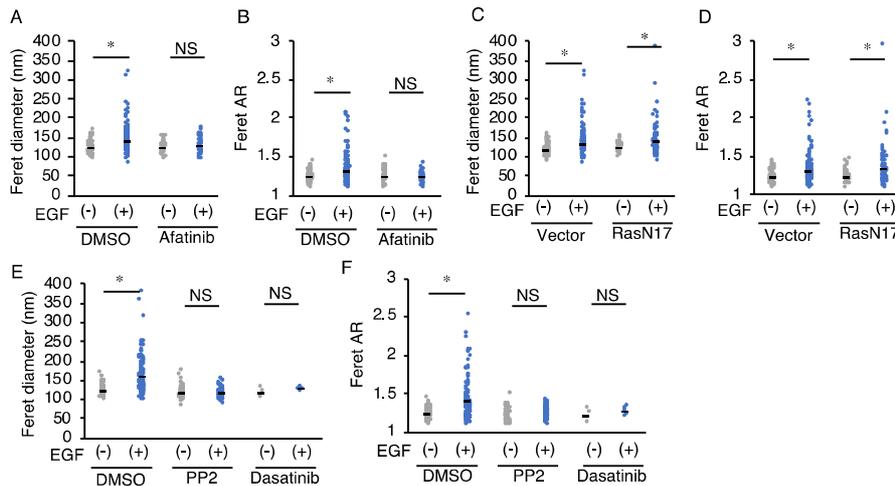


図 2 : EGFR の活性阻害条件下 (Afatinib 前処理) で EGF 刺激前後に観察された CCP のフェレー径 (A) とフェレーAR (B)。 Ras のドミナントネガティブ変異体 (RasN17) 発現下での EGF 刺激前後に観察された CCP のフェレー径 (C) とフェレーAR (D)。 Src の活性阻害条件下 (PP2 あるいは Dasatinib 前処理) で EGF 刺激前後に観察された CCP のフェレー径 (E) とフェレーAR (F)。

上述のPMDとウイルス感染の関係を理解すべく、ハイブリッド顕微鏡を用いて、インフルエンザウイルスの宿主への侵入つまりウイルス感染の超初期過程を高い時空間分解能で捉える試みを行った。取り込み過程におけるウイルスとエンドサイトーシス関連タンパク質（クラスリン、Arf6など）の共局在を検証した結果、取り込みの様式はクラスリン依存性エンドサイトーシスでことが明らかとなった。興味深いことに、エンドサイトーシスの終盤に、片側から隆起した膜の構造体がウイルスを覆い細胞内部へと取り込む様子が頻繁に観察された。各種阻害薬を用いた実験から膜隆起の形成にはコータクチンとArpp2/3複合体が関与することを示した。さらに、研究遂行の過程で、インフルエンザウイルスの宿主受容体の候補因子を新たに見出した。蛍光標識インフルエンザウイルスが候補因子ノックダウン細胞の細胞膜に吸着してからエンドサイトーシスにより内部に取り込まれる過程を、ハイブリッド顕微鏡により可視化解析した。結果、候補因子のノックダウン細胞では通常の細胞よりも細胞膜上でのウイルス粒子の側方拡散係数が高かった。加えて、ノックダウン細胞での取り込み効率はコントロール細胞と比べ有意に低かった。これらのことは、ウイルスが候補因子を介して宿主細胞に吸着しており、因子が取り込みにおいて重要であること、つまり因子が受容体であることを示唆する。今後は、ウイルス侵入とSrcとの関連を検証することで、PMDとのつながりを明らかにしていく。

頂端側細胞膜の物理的・光学的同時スキャン法の確立

さらに項目1のPMDの理解のために、膜成分（基質や受容体、脂質組成、膜裏打ちタンパク質等）と膜形態の光回折限界を超えた同時観察を可能とするべく、ライブセル高速AFM-HILOのハイブリッド顕微鏡の構築に取り組んだ。図3AはHILO照明系の原理である。全反射顕微鏡（total internal reflection fluorescence）を応用したもので、AFM観察面である頂端膜の局所的励起によって、高いIS/N比の画像取得を実現しうる。頂端膜の局所励起の精度を高めるため、入射光の制御を電気的かつコンピュータ制御で自動化した。さらにAFMを設置している既存の光学顕微鏡の限られたスペースに光学系を収めるために、光学系の設計を見直し、光路長を短くした。また、HILO照明で用いる幅広な対物レンズでも油浸観察を可能とするため、イメージング用ガラス基板を再設計し作製した。以上により、頂端側細胞膜の同時イメージングを実現させた（図3B）。

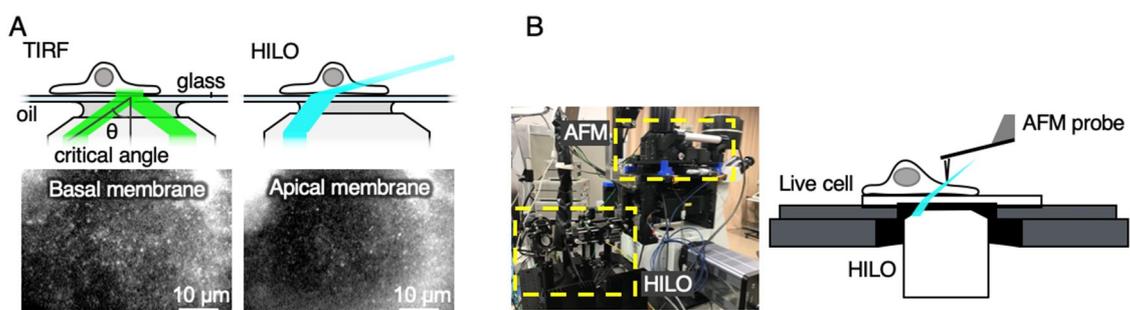


図3：（A）照明法の原理と各照明法での同一細胞におけるクラスリンの局在観察。臨界角で励起光を導入すると全反射が起き、光のしみ出しによるエバネッセント光ができるが（図左）、それより小さい角度では、境界面での屈折により薄層光が形成される（図右）。これにより細胞の局所励起、すなわち全反射照明では基底膜のみを、HILO照明では頂端側細胞膜のみをそれぞれ励起できる。（B）構築したHILO照明系と高速AFMのハイブリッド顕微鏡の外観。HILO照明系を用いてAFM観察面と同じ頂端膜のみを励起し、高いシグナルノイズ比の蛍光画像取得をする。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------