

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 30 日現在

機関番号：33916
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21590514
 研究課題名（和文） アイチウイルス複製複合体形成機構の解析
 研究課題名（英文） Analysis of the mechanism of Aichi virus replication complex formation.
 研究代表者
 佐々木 潤 （ SASAKI JUN ）
 藤田保健衛生大学・医学部・講師
 研究者番号：70319268

研究成果の概要（和文）：アイチウイルスは急性胃腸炎関連ウイルスである。感染症制御には病原体の増殖機構の理解が不可欠であるが、本ウイルスの複製機構には未だ不明な点が多い。アイチウイルスの複製機構の分子生物学的解明を目的として本研究を行った結果、本ウイルスの複製に関与する二つの宿主因子を明らかにした。これらの宿主タンパク質は本ウイルスに限らず他のウイルスの複製にも重要であることが報告され、ウイルス増殖制御のターゲット分子として期待される。

研究成果の概要（英文）：Aichi virus is thought to be a causative agent of acute gastroenteritis in humans. Understanding the mechanism of the growth of pathogens is required for effective control of infectious diseases; however, the mechanism of Aichi virus replication remains to be cleared. In this study, two host factors essential for Aichi virus replication were identified. The studies on other viruses report that these host proteins are involved in replication of the viruses. Findings in this study, together with the other studies, may lead to the development of drugs to control infection or growth of multiple viruses.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：アイチウイルス 宿主因子 ゲノム複製 ACBD3 PI4KB PI4P

1. 研究開始当初の背景

アイチウイルスは、1989年に愛知県で発生した牡蠣関連の集団胃腸炎患者便から初めて分離されたウイルスである。ゲノムは一本鎖プラス極性のRNAで、ゲノムの全塩基配列

解析の結果をもとに、1998年にピコルナウイルス科の新たな属、コブウイルス属に分類された。ウイルス発見以来、我が国およびアジアで行われてきた疫学研究により、日本を含むアジア各国に本ウイルスが分布してい

ることは明らかにされていたが、その後、ブラジル、ヨーロッパ、北アフリカの胃腸炎患者からの本ウイルス検出例が相次いで報告された。頻度は高くはないが、アイチウイルス以外に胃腸炎の原因となる細菌やウイルスが検出されていない事例も含まれており、本ウイルスが世界各地に分布し、胃腸炎の原因となっていることが考えられる。

感染症制御には、病原体の増殖機構の理解が不可欠である。しかしながら、本ウイルスに関しては、疫学研究は世界各地で行われていたのに対し、増殖機構に関する研究は我々の研究室以外ではほとんど行われていなかった。我々は本研究開始時点までに、アイチウイルスの複製機構を分子生物学的に理解することを目的とし、主としてウイルスタンパク質の機能解析や、ゲノム上に存在する機能領域の解析を行ってきた。一方、アイチウイルスの複製に関与する宿主タンパク質については、全く明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

本研究はアイチウイルスのウイルスゲノム複製における非構造タンパク質や宿主タンパク質の役割を詳細に解明することを目的とする。これまでの研究で行ってきた、ウイルスゲノム複製におけるゲノム機能領域やウイルスタンパク質の機能解析に加え、ウイルス感染による細胞の変化やゲノム複製に必要な細胞因子の同定など、ウイルスと細胞との関わりにも注目し、複製複合体形成に伴う細胞オルガネラの構造変化、複製複合体形成に関わるウイルスタンパク質や宿主タンパク質の同定や機能解析を行う。

3. 研究の方法

HeLa 細胞 cDNA ライブラリーの酵母ツーハイブリッドスクリーニングにより、ウイルス非構造タンパク質と相互作用する宿主タンパク質を探索した。タンパク質間相互作用は、哺乳動物細胞ツーハイブリッド解析および免疫沈降により更に詳細に解析した。ウイルス感染 Vero 細胞を免疫染色し、ウイルス非構造タンパク質、宿主タンパク質および脂質の細胞内局在を調査した。さらに、small

interfering RNA (siRNA)を用いて宿主タンパク質発現をノックダウンし、ウイルス複製への影響を調べた。培養細胞でのウイルスゲノム複製は、感染性 cDNA クローンのキャプシドタンパク質コード領域をルシフェラーゼ遺伝子に置換したレプリコンを利用し、ルシフェラーゼアッセイにより調査した。ウイルスタンパク質の翻訳やプロセッシング解析は、Vero 細胞抽出液中で行った。

4. 研究成果

(1)アイチウイルスの複製に必要な二つの宿主因子、acyl-coenzyme A binding domain containing 3 (ACBD3) と phosphatidylinositol 4-kinase III Beta (PI4KB)の同定

ウイルス非構造タンパク質と相互作用する宿主因子を、酵母ツーハイブリッド法を用いてスクリーニングした結果、3A タンパク質と相互作用する宿主タンパク質として、ゴルジ体に主に局在するタンパク質、ACBD3 を得た。哺乳動物細胞ツーハイブリッド解析や免疫沈降解析により、ACBD3 は 3A に加え、他のウイルス非構造タンパク質 2B、2BC、2C、3AB とも相互作用することが明らかとなった。また、最近エンテロウイルスの複製に必要な宿主因子として、ゴルジ体に存在する PI-4 キナーゼである PI4KB が報告されたが、ACBD3 がこの PI4KB と相互作用することを新たに発見した。ウイルスタンパク質 2B、2BC、2C、3A、3AB と PI4KB との直接の相互作用は認められなかった。感染細胞の免疫染色により、ACBD3、PI4KB、ウイルスタンパク質がウイルスゲノム RNA の複製部位に存在することが示された。加えて、PI4KB のキナーゼの作用により産生される phosphatidyl-4-phosphate (PI4P) もウイルス RNA 複製部位に存在した。PI4KB 特異的阻害剤によるアイチウイルス複製阻害も認められた。また、ACBD3 あるいは PI4KB の発現ノックダウンにより、ウイルス RNA 複製が阻害された。

以上の結果は、アイチウイルスゲノム複製部位でウイルスタンパク質/ACBD3/PI4KB 複合体が形成され、PI4P を産生することがウイルス RNA 複製に重要であることを示唆する。

PI4P は細胞内の膜輸送や脂質輸送に関係するシグナル分子であり、ウイルス感染におけるウイルスタンパク質/ACBD3/PI4KB 複合体形成の役割として、ウイルス複製部位にPI4Pを効率良く産生させ、ウイルス複製複合体形成に必要な細胞内膜構造の再構成を促進させている可能性が考えられる。

我々の論文発表時点では、エンテロウイルスが複製部位にPI4KBをリクルートする方法としては、3A/GBF1/Arf1/PI4KB 複合体形成によるものと考えられており、我々の報告はピコルナウイルスによる新たなPI4KBリクルート法の発見であった。我々の論文が公表された後、エンテロウイルスの3AがACBD3とも相互作用し、3A/ACBD3/PI4KB複合体が形成されることが報告された。加えて、最近、ハンタウイルスの非構造タンパク質とACBD3が相互作用することも報告された。このように、ウイルス複製に必要な宿主因子としては我々が最初に報告したACBD3が、多様なウイルスで複製に利用されている可能性が明らかになりつつある。ACBD3やPI4KBは、多様なウイルス感染制御のためのターゲット分子となることも期待される。

また、PI4Pに関してもこれまでにエンテロウイルスやC型肝炎ウイルスで複製部位に蓄積していることが知られていた。本研究において、アイチウイルスでも同様であることを明らかにしたことは、多様なウイルスがPI4Pを複製に利用している可能性を示唆するものとして、ウイルス学的に意義深いと考えられる。

今後は、複製部位に産生されたPI4Pの役割を詳細に解析し、複製複合体形成に伴う細胞内膜再構成に関わる因子やメカニズムを明らかにしていく必要があると考える。

(2) アイチウイルスのポリプロテインプロセッシングにおける、3CDによるVP1/2A間の切断

ピコルナウイルスのゲノム上には一つの大きなタンパク質読み取り枠が存在する。ウイルスタンパク質はまず、一つの大きなタンパク質（ポリプロテイン）として翻訳された後、ウイルス自身のコードするプロテアーゼ

により、それぞれの機能をもつ11から12の個々のタンパク質へと切断される。3Cタンパク質が全てのピコルナウイルスに共通のプロテアーゼであるが、ウイルスによっては、3C以外にもポリプロテインの切断にかかわるタンパク質をコードしている。

これまでの我々の研究により、アイチウイルスのポリプロテインプロセッシングに関わるプロテアーゼは、3Cあるいはその前駆体だけであることが示唆されていた。本研究において、Vero細胞抽出液を用いてアイチウイルスのポリプロテインのプロセッシングを詳細に調べたところ、3Cとその前駆体3CDがポリプロテインをプロセッシング出来ることが示されたが、3CDが全ての切断部位を効率良く切断できたのに対し、3Cは切断部位のうち、VP1/2A間での切断効率が3CDに比べて著しく低いことが明らかとなった。免疫沈降および哺乳類ツーハイブリッド法による解析において、3CDは2Aと強く結合するが、3Cは2Aに対し弱い結合能しか持たないこと、さらに、2Aや3CDの変異体を用いた解析により、VP1/2A間の切断と2Aと3CD間の相互作用には相関があることが分かった。

これらの結果はアイチウイルスのポリプロテインの切断部位のうちVP1/2A切断部位のみが、効率良く切断されるために3Cではなく3CDという形のプロテアーゼを必要とすることを示し、その切断には3CDと2A間の相互作用が深く関与している可能性を示唆している。そのメカニズムとして、3CDがポリプロテインの2A領域に結合することで、ポリプロテインの構造変化がおこり、それまで隠れていたVP1/2A切断部位が3CDプロテアーゼによって認識されるようになるという可能性が考えられる。

他のピコルナウイルス、ポリオウイルスや口蹄疫ウイルスでも、3Cより3CDの方が特定の切断部位を効率良く切断できることは知られていたが、このような基質とプロテアーゼとの相互作用が関係した機構が示されたのは本研究が最初である。

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)

研究者番号 : 70319268

[雑誌論文] (計3件)

- ① Sasaki J*, Ishikawa K*, Arita M, Taniguchi K. ACBD3-mediated recruitment of PI4KB to picornavirus RNA replication sites. EMBO J. 31: 754-766. 2012. 査読有. *These authors contributed equally to this work.
- ② Sasaki J, Ishikawa K, Taniguchi K. 3CD, but not 3C, cleaves the VP1/2A site efficiently during Aichi virus polyprotein processing through interaction with 2A. Virus Res. 163: 592-598. 2012. 査読有.
- ③ Ishikawa K, Sasaki J, Taniguchi K. Overall linkage map of the nonstructural proteins of Aichi virus. Virus Res. 147: 77-84. 2010. 査読有.

[学会発表] (計3件)

- ① Ishikawa K, Sasaki J, Maeno Y, Moriguchi K, Komoto S, Taniguchi K. A Golgi protein interacting with 2B, 2BC, 2C, 3A and 3AB is a host factor required for Aichi virus RNA replication. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. 2011年9月15日. 札幌コンベンションセンター (北海道).
- ② 佐々木潤、石川球美子、前野芳正、河本聡志、守口匡子、谷口孝喜. アイチウイルス 3CD による 2A の N 末端の切断. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会. 2009 年 10 月 25 日. 東京都 都市センターホテル.
- ③ Sasaki J, Ishikawa K, Taniguchi K. Cleavage at the N-terminus of 2A by 3CD of Aichi virus. 第 9 回あわじしま感染症・免疫フォーラム. 2009 年 9 月 10 日. 兵庫県淡路市 兵庫県立淡路夢舞台国際会議場.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐々木 潤 (SASAKI JUN)

藤田保健衛生大学・医学部・講師