

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：17301
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2021～2023
課題番号：21K07043
研究課題名（和文）異分野・新旧融合実験手法による高病原性ウイルスタンパク質の細胞内輸送機構の解明

研究課題名（英文）Identification of the trafficking pathway of the highly pathogenic viral proteins

研究代表者
浦田 秀造（Urata, Shuzo）
長崎大学・高度感染症研究センター・准教授

研究者番号：20614449
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：エボラウイルスはVP40、アレナウイルスはZタンパク質がマトリックスタンパク質として粒子形成において中心的な役割を果たす。これまでにエボラウイルスVP40による粒子産生を阻害する新規低分子化合物を同定し、この新規低分子化合物に特異的に結合し得る細胞内タンパク質を同定した。しかし、同定した宿主因子の過剰発現やドミナントネガティブ変異体の過剰発現はVP40による粒子産生に影響を与えなかった。また、複数のアレナウイルスZタンパク質が複数のRabタンパク質と細胞内で共局在した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、抗ウイルス薬が限定され、ヒト高病原性であるウイルスの細胞内複製を明らかとするものである。ヒト高病原性ウイルスの細胞内複製機構を分子レベルで明らかとすることは抗ウイルス薬の標的を同定することに繋がる。我々はエボラウイルスのVP40による粒子産生を阻害する低分子化合物を同定し、その化合物が結合し得る宿主因子を同定した。この宿主因子の生体内での機能は解明されておらず、本研究成果は同定宿主因子の機能解明にも繋がる。また、ラッサウイルスのZタンパク質の細胞内輸送に関わる複数の宿主タンパク質も同定したので、これらは新規抗ラッサウイルス薬開発に繋がる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to identify the trafficking pathway of the matrix proteins of the highly pathogenic viruses, such as Ebola virus and Lassa virus. Ebola virus VP40 and Lassa virus Z are known to be matrix proteins which have a central role on the virus particle formation. We identified a novel chemical compound which inhibited Ebola virus VP40-mediated virus like particle (VLP) formation. We further identified host factors which could be the target of this compound. However, the overexpression of neither this host factor nor the dominant negative form of this host factor affected to the VLP production. We also identified several Rab proteins which co-localized with Arenavirus Z proteins.

研究分野：ウイルス学

キーワード：高病原性ウイルス ウイルスマトリックスタンパク質

1. 研究開始当初の背景

我々はこれまでに高病原性ウイルスのマトリックスタンパク質のウイルス粒子形成における役割を分子レベルで明らかとしてきた。本研究ではこれまで研究を進めてきたウイルスのマトリックスタンパク質であるエボラウイルス「VP40」及びアレナウイルス「Z」に着目し、これらの細胞質内での挙動の一端を新旧織り交ぜた実験手法にて Rab タンパク質群や新規同定因子の機能解析を通して分子レベルで解明することを目的とした。具体的には、以下 3 つの項目について研究を進めた。

2. 研究の目的

1. エボラウイルス粒子産生に關与する新規宿主因子の同定
2. 細胞質内での Rab タンパク質群の Z 輸送への關与の解明
3. Photo-PPI 法を用いたアレナウイルス Z と相互作用する因子の網羅的解析

3. 研究の方法

(1) エボラウイルス粒子産生に關与する新規宿主因子の同定

エボラウイルス VP40 によるウイルス様粒子産生 (VLP) を阻害する低分子化合物を合成展開し、ビーズ付加型の低分子化合物を合成し、結合する宿主因子を同定した(図 1)。同定した宿主因子の VP40 による VLP 産生に与える影響を検討した。

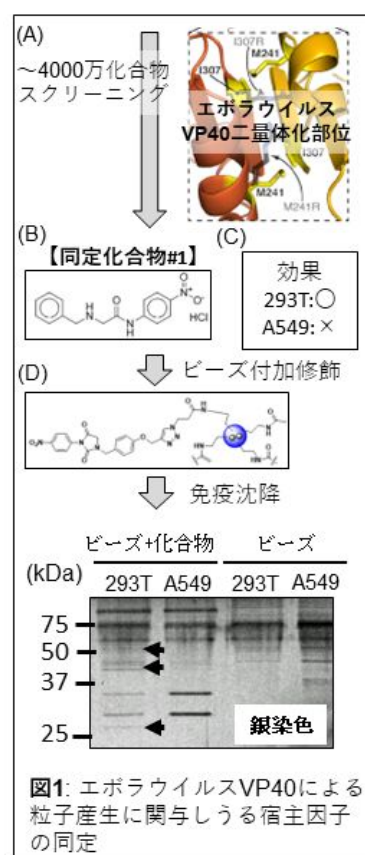
(2) 細胞質内での Rab タンパク質群の Z 輸送への關与の解明

複数の Rab タンパク質とアレナウイルス Z の細胞内局在を免疫染色法並びに共焦点レーザー顕微鏡により解析した。

(3) Photo-PPI 法を用いたアレナウイルス Z と相互作用する因子の網羅的解析

リバースジェネティックス法を用いて、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス (LCMV) の L セグメントの内、Z 遺伝子の 3' に SNAP 遺伝子を付与した L セグメントの作製を試みた。この新規 L セグメントが作製できた場合、S セグメント、NP と L タンパク質を BHK-21 細胞に発現させ、感染性ウイルスを作製することを計画した。作製した遺伝子組換えを細胞に感染させ、経時的に感染細胞から Z-SNAP に結合する宿主タンパク質をプルダウン及び質量分析解析により同定することで Z と結合もしくは近縁に局在する宿主因子の同定を目指した。

4. 研究成果

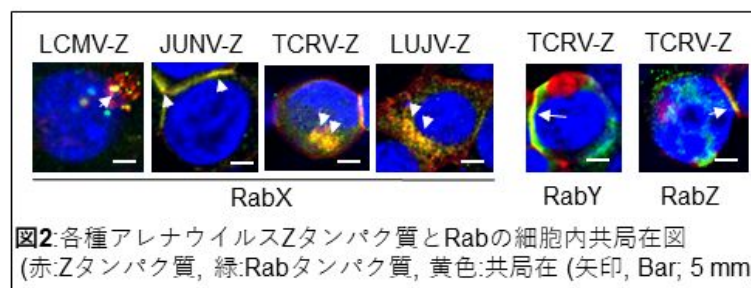


(1) エボラウイルス粒子産生に關与する新規宿主因子の同定

ビーズ付加化合物に結合する同一の細胞内小器官に局在する 2 種類の宿主因子を同定した。このうち 1 つに対して、発現プラスミド並びに変異型発現プラスミドを作製し、エボラウイルス VP40 による VLP 産生への影響を検討したが、特に大きな変化は見られなかった。

(2) 細胞質内での Rab タンパク質群の Z 輸送への關与の解明

LCMV、フニンウイルス (JUNV)、タカリベウイルス (TCRV)、ルジヨウイルス (LUJV) の Z タンパク質と複数の Rab タンパク質が細胞内 (293T) で共局在することを観察した (図 2)。Rab タンパク質はウイルスのみならず多くのタンパク質の輸送に関わる。特に Rab11 はリサイクリングエンドソームに局在し、複数のウイルスタンパク質の細胞内輸送に關与することも報告されている。本研究ではこれまでウイルスタンパク質の輸送において報告のない複数の Rab タンパク質がアレナウイルスのマトリックスタンパク質である Z と局在したことから、今後はこれらの Rab のドミナントネガティブ変異体を作製し、細胞内輸送及び粒子産生への影響を検討していきたい。



(3) Photo-PPI 法を用いたアレナウイルス Z と相互作用する因子の網羅的解析

複数の方法で Z-SNAP 含有 L セグメントの構築を試みたが、最後まで完全長の発現プラスミドは構築できなかった。SNAP 遺伝子のサイズの問題でプラスミドが作製できなかった可能性がある。今後は SNAP 遺伝子より短いタグ遺伝子を付加することでウイルスレベルで Z と相互作用する宿主因子群を同定していきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shuzo Urata, Olaposi Idowu Omotuyi, Ayako Izumisawa, Takeshi Ishikawa, Satoshi Mizuta, Yasuteru Sakurai, Tatsuaki Mizutani, Hiroshi Ueda, Yoshimasa Tanaka, Jiro Yasuda	4. 巻 199
2. 論文標題 Identification of novel chemical compounds targeting filovirus VP40-mediated particle production	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Antiviral Research	6. 最初と最後の頁 105267-105274
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.antiviral.2022.105267	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1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Shuzo Urata
2. 発表標題 Make a Science of the medicine against the highly pathogenic viruses
3. 学会等名 The 19th Awaji International Forum on Infectious and Immunity（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

〔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
研究分担者	大山 要 (Ohyama Kaname) (50437860)	長崎大学・病院（医学系）・教授 (17301)	
研究分担者	水田 賢志 (Mizuta Satoshi) (50717618)	長崎大学・医歯薬学総合研究科（医学系）・助教 (17301)	

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